



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110167922 B

(45) 授权公告日 2023.09.19

(21) 申请号 201780082052.X	(51) Int.Cl.
(22) 申请日 2017.11.07	<i>G07D 295/04</i> (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 110167922 A	<i>G07D 295/12</i> (2006.01)
(43) 申请公布日 2019.08.23	<i>G07D 295/08</i> (2006.01)
(30) 优先权数据 62/418,844 2016.11.08 US 62/507,829 2017.05.18 US	<i>G07C 233/00</i> (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2019.06.19	<i>G07C 219/04</i> (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/IL2017/051212 2017.11.07	<i>G07C 229/02</i> (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 W02018/087753 EN 2018.05.17	<i>G07D 233/66</i> (2006.01)
(73) 专利权人 特拉维夫大学拉莫特有限公司 地址 以色列特拉维夫	<i>G07C 279/04</i> (2006.01)
(72) 发明人 丹·培尔 斯里尼瓦·拉米谢蒂	<i>G07C 333/10</i> (2006.01)
(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262 专利代理师 王玮玮 郑霞	<i>G07C 59/01</i> (2006.01)
	<i>G07C 243/10</i> (2006.01)
	<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
	<i>A61P 29/00</i> (2006.01)
	<i>A61K 47/18</i> (2006.01)
	<i>A61K 48/00</i> (2006.01)
	(56) 对比文件
	CN 104603102 A, 2015.05.06
	WO 2015199952 A1, 2015.12.30
	CN 105152939 A, 2015.12.16
	审查员 何丹
	权利要求书8页 说明书64页 附图17页

(54) 发明名称

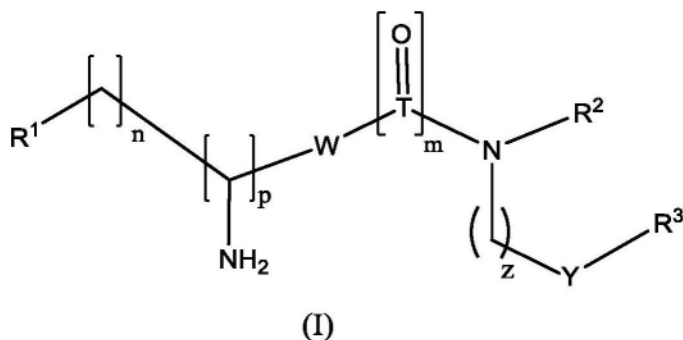
用于核酸递送的阳离子脂质及其制备

(57) 摘要

本发明提供了阳离子脂质以及包括单独的或与其他脂质组合的这些脂质的脂质纳米颗粒制剂。这些脂质纳米颗粒可以与核酸一起配制，以促进它们用于体外和体内两者治疗应用的细胞内递送。本发明还提供了这些脂质的化学合成方法、脂质纳米颗粒制备以及具有核酸的制剂。

1. 一种阳离子脂质或其盐, 所述阳离子脂质由式(I)、式(II)或式(IIIA)的结构表示, 其中式(I)、式(II)和式(IIIA)的结构表示如下:

式(I):



其中

Y是O或NH;

T是C或S;

W是键或NH;

R¹选自由以下组成的组:

(a) NR⁴R⁵, 其中R⁴和R⁵各自独立地是C₁-C₄烷基; 或R⁴和R⁵与它们被附接到的氮一起形成5元或6元的杂环或杂芳香族环, 所述杂环或杂芳香族环任选地含有一个或更多个选自由O、N和S组成的组的另外的杂原子; 或NR⁴R⁵表示胍基团(-NHC(=NH)NH₂);

(b) 天然或非天然的氨基酸的侧链; 以及

(c) 含有一个或更多个选自由O、N和S组成的组的杂原子的5元或6元的杂环或杂芳香族环;

R²和R³选自由以下组成的组:

(a) C₁₀-C₂₂烷基;

(b) C₁₀-C₂₂烯基;

(c) C₁₀-C₂₂炔基;

(d) C₄-C₁₀亚烷基-Z-C₄-C₂₂烷基; 以及

(e) C₄-C₁₀亚烷基-Z-C₄-C₂₂烯基;

Z是-O-C(=O)-、-C(=O)-O-或-O-;

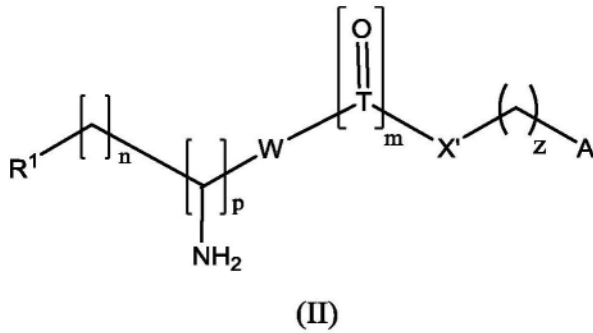
n是0、1、2、3、4、5或6;

m是0或1;

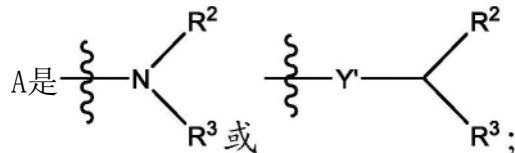
p是0或1; 并且

z是0或2;

式(II):



其中



X' 是O或NH;

Y' 是O或NH;

条件是当A是 时, X' 和Y' 两者不能均是O; T是C或S;

W是键、O、NH或S;

R¹选自由以下组成的组:

(a) NR⁴R⁵, 其中R⁴和R⁵各自独立地是C₁-C₄烷基; 或R⁴和R⁵与它们被附接到的氮一起形成5元或6元的杂环或杂芳香族环, 所述杂环或杂芳香族环任选地含有一个或更多个选自由O、N和S组成的组的另外的杂原子; 或NR⁴R⁵表示胍基团(-NHC(=NH)NH₂);

(b) 天然或非天然的氨基酸的侧链; 以及

(c) 含有一个或更多个选自由O、N和S组成的组的杂原子的5元或6元的杂环或杂芳香族环;

R²和R³选自由以下组成的组:

(a) C₁₀-C₂₂烷基;

(b) C₁₀-C₂₂烯基;

(c) C₁₀-C₂₂炔基;

(d) C₄-C₁₀亚烷基-Z-C₄-C₂₂烷基; 以及

(e) C₄-C₁₀亚烷基-Z-C₄-C₂₂烯基;

Z是-O-C(=O)-、-C(=O)-O-或-O-;

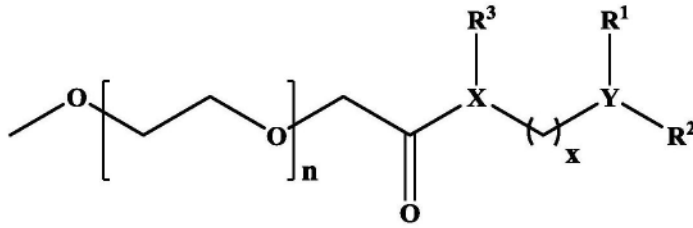
n是0、1、2、3、4、5或6;

m是0或1;

p是0或1; 并且

z是0或2;

式(IIIA):



(IIIA)

其中

X和Y各自独立地是O、N或NH，其中X和Y两者不能均是O；

R¹、R²和R³中的每个独立地不存在或是C₁₀-C₂₂烷基、C₁₀-C₂₂烯基或C₁₀-C₂₂炔基；

n是在1和30之间的整数；并且

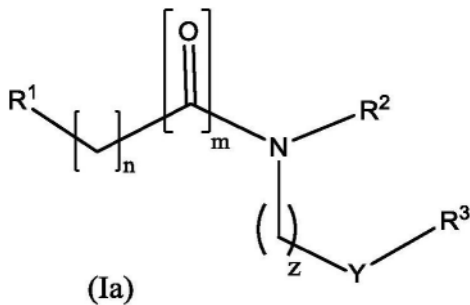
x是0或2。

2. 根据权利要求1所述的阳离子脂质或其盐，所述阳离子脂质由式(I)的结构表示。

3. 根据权利要求2所述的阳离子脂质或其盐，其中T是C并且W是键，或者其中R¹是NR⁴R⁵。

4. 根据权利要求2所述的阳离子脂质或其盐，其中当Y是O时，z是0。

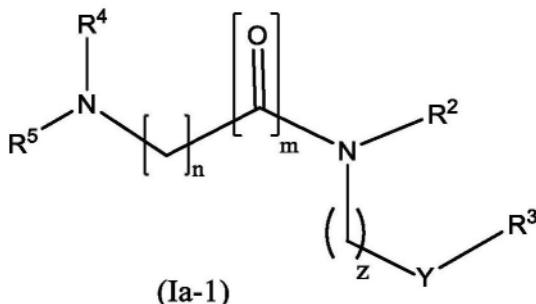
5. 根据权利要求2所述的阳离子脂质或其盐，其中p是0，W是键并且T是C，并且化合物由式(Ia)的结构表示：



(Ia)

其中R¹、R²、R³、Y、m、n和z是根据权利要求1中针对式(I)定义的。

6. 根据权利要求5所述的阳离子脂质或其盐，其中R¹是NR⁴R⁵，并且化合物由式(Ia-1)的结构表示：



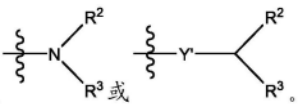
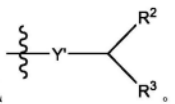
(Ia-1)

其中R²、R³、R⁴、R⁵、Y、m、n和z是根据权利要求1中针对式(I)定义的。

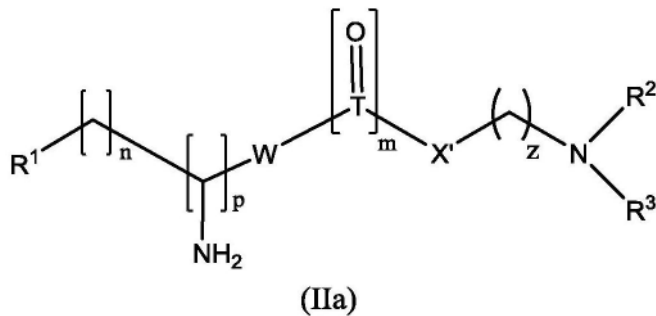
7. 根据权利要求5所述的阳离子脂质或其盐，其中R⁴和R⁵各自是CH₃，或其中R⁴和R⁵与它们被附接到的氮一起形成选自由吡咯烷基、哌啶基和哌嗪基组成的组的杂环，所述吡咯烷基、哌啶基和哌嗪基中的每个任选地被烷基取代。

8. 根据权利要求1所述的阳离子脂质或其盐，所述阳离子脂质由式(II)的结构表示。

9. 根据权利要求8所述的阳离子脂质或其盐，其中当X'是NH时，m是1。

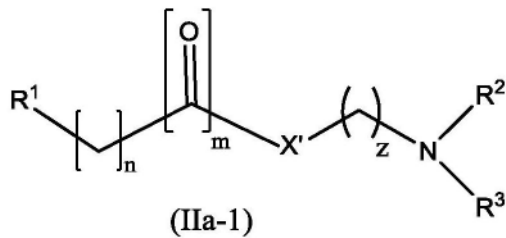
10. 根据权利要求8所述的阳离子脂质或其盐,其中当m是1时,A是  或 .

11. 根据权利要求8所述的阳离子脂质或其盐,所述阳离子脂质由式(IIa)的结构表示:



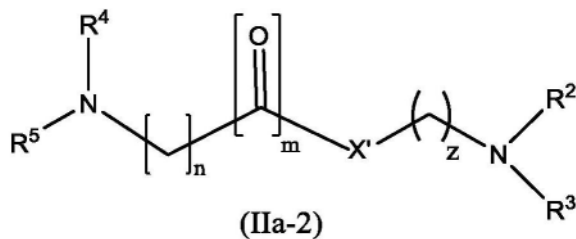
其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 X' 、T、W、n、m、p和z是根据权利要求1中针对式(II)定义的。

12. 根据权利要求11所述的阳离子脂质或其盐,其中p是0,W是键并且T是C,并且化合物由式(IIa-1)的结构表示:



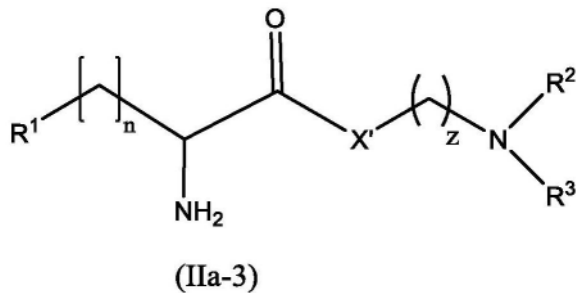
其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 X' 、n、m和z是根据权利要求1中针对式(II)定义的。

13. 根据权利要求12所述的阳离子脂质或其盐,其中 R^1 是 NR^4R^5 ,并且化合物由式(IIa-2)的结构表示:



其中 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 X' 、n、m和z是根据权利要求1中针对式(II)定义的。

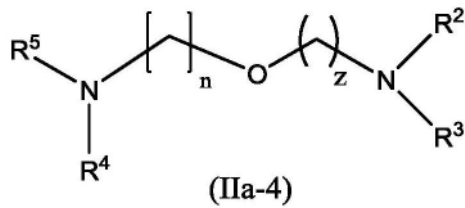
14. 根据权利要求11所述的阳离子脂质或其盐,其中p是1,m是1,W是键并且T是C,并且化合物由式(IIa-3)的结构表示:



其中 R^1 是天然或非天然的氨基酸的侧链;并且

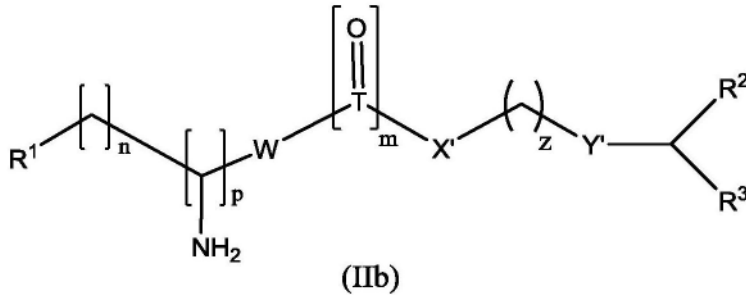
R^2 、 R^3 、 X' 、n和z是根据权利要求1中针对式(II)定义的。

15. 根据权利要求11所述的阳离子脂质或其盐,其中p是0, R^1 是 NR^4R^5 , W是键, m是0并且 X' 是0, 并且化合物由式(IIa-4)的结构表示:



其中 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、n和z是根据权利要求1中针对式(II)定义的。

16. 根据权利要求8所述的阳离子脂质或其盐,所述阳离子脂质由式(IIb)的结构表示:



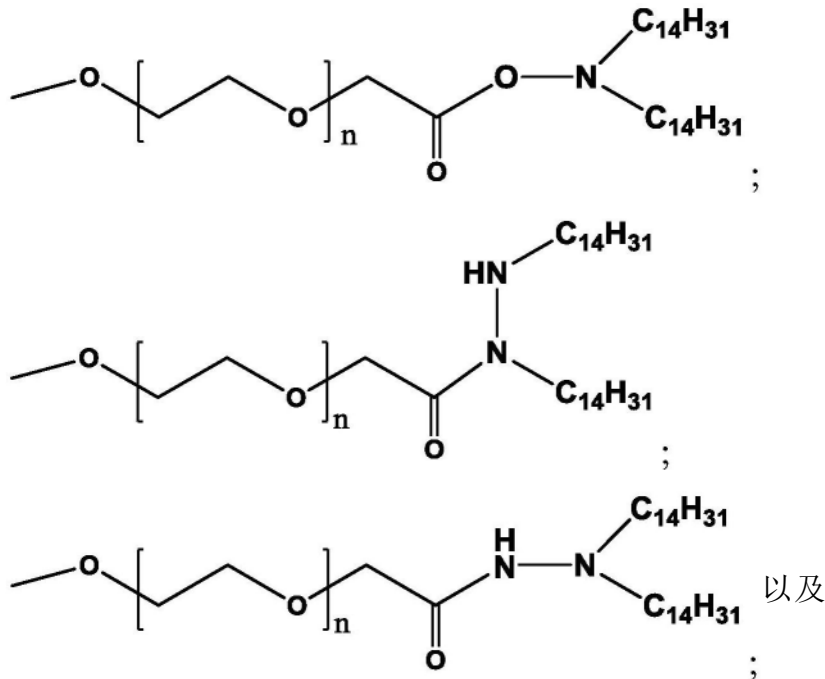
其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、T、W、 X' 、 Y' 、n、m、p和z是根据权利要求1中针对式(II)定义的,条件是当m是1时, Y' 是NH。

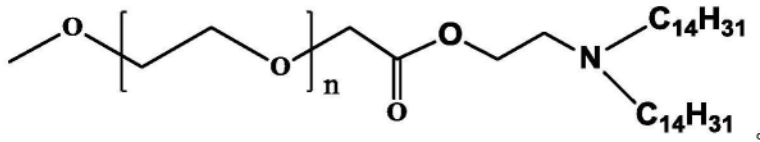
17. 根据权利要求16所述的阳离子脂质或其盐,其中p是0, W是键, T是C, 并且 R^1 是 NR^4R^5 。

18. 根据权利要求1所述的阳离子脂质或其盐,所述阳离子脂质由式(IIIA)的结构表示。

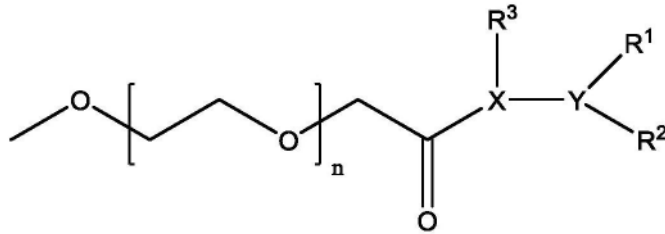
19. 根据权利要求18所述的阳离子脂质或其盐,其中Y是N或NH。

20. 根据权利要求18所述的阳离子脂质或其盐,所述阳离子脂质选自自由以下组成的组:





21. 根据权利要求1所述的阳离子脂质或其盐,所述阳离子脂质由式(III)的结构表示:



(III)

其中

X和Y各自独立地是O、N或NH,其中X和Y两者不能均是O;

R^1 、 R^2 和 R^3 中的每个独立地不存在或是 C_{10} - C_{22} 烷基、 C_{10} - C_{22} 烯基或 C_{10} - C_{22} 炔基;并且n是1至30。

22. 一种阳离子脂质或其盐,所述阳离子脂质选自由以下组成的组:

2- (1,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)-N,N-二甲基乙-1-胺;

4- (1,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)-N,N-二甲基丁-1-胺;

1- (4- (1,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)丁基)吡咯烷;

N,N-二甲基-4-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)氨基)丁-1-胺;

4- (二甲基氨基)-N'-((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-N-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)丁烷酰胍;

4- ((二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)氧基)-N,N-二甲基丁-1-胺;

1- (4- (2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)丁基)吡咯烷;

4- (((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基)氨基)氧基)-N,N-二甲基丁-1-胺;

2- ((二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)氧基)-N,N-二甲基-2-氧代乙-1-胺;

4- (二甲基氨基)-N',N'-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)丁烷酰胍;

(S)-2-氨基-6- (二甲基氨基)-N',N'-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)己烷酰胍;

4- (2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)-N,N-二甲基丁-1-胺;

1- ((S)-4-氨基-5- (2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)-5-氧代戊基)胍;

4- ((二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)氧基)-N,N-二甲基-4-氧代丁-1-胺;

2- (2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)-N,N-二甲基乙-1-胺;

4- (二甲基氨基)-N-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-N-(((9Z,12Z)-十八碳-9,

12-二烯-1-基)氧基)丁酰胺;

N',N'-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-4-(吡咯烷-1-基)丁烷酰肼;

(S)-2-氨基-3-(1H-咪唑-4-基)-N',N'-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)丙烷酰肼;

N,N-二甲基-2-(2-((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-1-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)乙-1-胺;

N,N-二甲基-2-(1-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-2-十八烷基胍基)乙-1-胺;

4-(4-甲基哌嗪-1-基)-N',N'-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)丁烷酰肼;

0-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)丁酰基)-N,N-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)羟胺;

(2-(4-(二甲基氨基)丁酰基)胍-1,1-二基)双(己烷-6,1-二基)双(2-己基癸酸酯);

(1-(2-(二甲基氨基)乙基)胍-1,2-二基)双(己烷-6,1-二基)双(2-己基癸酸酯);

(1-(2-(二甲基氨基)乙基)胍-1,2-二基)双(壬烷-9,1-二基)双(2-己基癸酸酯);

二(十三碳-7-基)10,10'-(1-(2-(二甲基氨基)乙基)胍-1,2-二基)双(癸酸酯);

(2-(4-(二甲基氨基)丁基)胍-1,1-二基)双(己烷-6,1-二基)双(2-己基癸酸酯);

(2-(4-(二甲基氨基)丁基)胍-1,1-二基)双(壬烷-9,1-二基)双(2-己基癸酸酯);

((4-(二甲基氨基)丁氧基)氮烷二基)双(己烷-6,1-二基)双(2-己基癸酸酯);

((4-(二甲基氨基)丁氧基)氮烷二基)双(壬烷-9,1-二基)双(2-己基癸酸酯);

4-(2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)乙基)-1H-咪唑;

1-(2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)乙基)胍;

0-(2-(1H-咪唑-4-基)乙酰基)-N,N-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)羟胺;

1-(2-((二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)氧基)-2-氧代乙基)胍;

2-(二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)乙基2-(1H-咪唑-4-基)乙酸酯;

2-(二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)乙基氨基甲亚胺酰基甘氨酸酯;

2-(二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)乙基二甲基甘氨酸酯;

2-(二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)乙基4-(二甲基氨基)丁酸酯;

2-(二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)乙基L-组氨酸酯;

(1-(2-(二甲基氨基)乙基)胍-1,2-二基)双(辛烷-8,1-二基)(4Z,4'Z)-双(2-己基癸-4-烯酸酯);

(1-(2-(二甲基氨基)乙基)胍-1,2-二基)双(辛烷-8,1-二基)(3Z,3'Z)-双(壬-3-烯酸酯);

二((Z)-壬-3-烯-1-基)8,8'-(2-(2-(二甲基氨基)乙基)胍-1,1-二基)二辛酸酯;

二((Z)-十五碳-9-烯-7-基)8,8'-(2-(2-(二甲基氨基)乙基)胍-1,1-二基)二辛酸酯;

二((Z)-十五碳-9-烯-7-基)8,8'-(((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)氮烷二基)二辛酸酯;

二((Z)-壬-3-烯-1-基)8,8'-(((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)氮烷二基)二辛酸酯;

二((Z)-十五碳-9-烯-7-基)8,8'-(2-(((2-(二甲基氨基)乙基)硫代)羰基)胍-1,1-二基)二辛酸酯;

二(十三碳-7-基)8,8'-(2-(((2-(二甲基氨基)乙基)硫代)羰基)胍-1,1-二基)二辛酸酯;

二((Z)-十五碳-9-烯-7-基)8,8'-((2-((二甲基甘氨酸基)氧基)乙基)氮烷二基)二辛酸酯;

二((Z)-壬-3-烯-1-基)8,8'-((2-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)乙基)氮烷二基)二辛酸酯;

二((Z)-壬-3-烯-1-基)8,8'-((2-((氨基甲亚胺酰基甘氨酸基)氧基)乙基)氮烷二基)二辛酸酯;

二(十三碳-7-基)8,8'-((2-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)乙基)氮烷二基)二辛酸酯;

((2-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)乙基)氮烷二基)双(辛烷-8,1-二基)(3Z,3'Z)-双(壬-3-烯酸酯);

((2-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)乙基)氮烷二基)双(庚烷-7,1-二基)双(癸酸酯);

2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)乙基4-(4-甲基哌嗪-1-基)丁酸酯;

二((Z)-壬-3-烯-1-基)6,6'-((2-(4-(二甲基氨基)丁酰基)肼-1,1-二基)二己酸酯);

(2-(2-(二甲基氨基)乙基)肼-1,1-二基)双(庚烷-7,1-二基)双(癸酸酯);

(9Z,12Z)-N-(2-(4-(二甲基氨基)丁氧基)乙基)-N-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)十八碳-9,12-二烯-1-胺;

4-(二甲基氨基)-N',N'-双(6-((Z)-壬-3-烯-1-基)氧基)己基)丁烷酰肼;

2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)乙基4-(吡咯烷-1-基)丁酸酯;

N-(2-(4-(二甲基氨基)丁氧基)乙基)-6-((Z)-壬-3-烯-1-基)氧基)-N-(6-((Z)-壬-3-烯-1-基)氧基)己基)己-1-胺;

((2-(4-(二甲基氨基)丁氧基)乙基)氮烷二基)双(庚烷-7,1-二基)双(癸酸酯);以及

二((Z)-壬-3-烯-1-基)6,6'-((2-(4-(二甲基氨基)丁氧基)乙基)氮烷二基)二己酸酯。

23. 一种组合物,包括根据前述权利要求中任一项所定义的阳离子脂质或其盐。

24. 根据权利要求23所述的组合物,还包括至少一种另外的中性脂质或PEG修饰的脂质。

25. 根据权利要求23所述的组合物,还包括核酸,其中所述核酸选自由以下组成的组:小干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)、反义寡核苷酸、信使RNA(mRNA)、核酶、pDNA、CRISPR mRNA、gRNA和免疫刺激核酸。

26. 根据权利要求25所述的组合物在制备用于基因沉默的药物中的用途。

27. 根据权利要求25所述的组合物在制备用于治疗白细胞相关的状况的药物中的用途。

28. 根据权利要求27所述的用途,其中所述白细胞相关的状况选自由以下组成的组:癌症、感染、自身免疫疾病、神经退行性疾病和炎症。

用于核酸递送的阳离子脂质及其制备

发明领域

[0001] 本发明提供了阳离子脂质以及包括单独的或与其他脂质组合的这些脂质的脂质纳米颗粒制剂。这些脂质纳米颗粒可以与核酸一起配制,以促进它们用于体外和体内两者治疗应用的细胞内递送。本发明还提供了这些脂质的化学合成方法、脂质纳米颗粒制备以及具有核酸的制剂。

[0002] 发明背景

[0003] 包括小干扰RNA (siRNA)、微RNA (miRNA)、反义寡核苷酸、信使RNA (mRNA)、核酶、pDNA和免疫刺激核酸的治疗性核酸,经由多种机制发挥作用。特异性蛋白质可以通过RNA干扰 (RNAi) 被siRNA或miRNA下调。造血细胞诸如通常白细胞,并且特别是初级T淋巴细胞和B细胞,众所周知地难以用小干扰RNA (siRNA) 转染。通过使用RNA干扰 (RNAi) 下调特定基因来调节免疫细胞功能,诸如T细胞和B细胞,在推进许多免疫相关的紊乱的靶向治疗中具有巨大潜力,所述免疫相关的紊乱包括癌症、炎症、自身免疫和病毒感染。RNAi的治疗应用极其广泛,因为siRNA和miRNA构建体可以用针对靶蛋白的任何核苷酸序列合成。迄今为止,在体外模型和体内模型两者中,siRNA构建体已经示出特异性地沉默靶蛋白的能力。这些目前正在临床研究中评价。

[0004] 信使RNA (mRNA) 是将遗传信息从DNA转运至核糖体的大RNA分子的家族。一些核酸,诸如mRNA或质粒,可以用于实现特定细胞产物的表达。这些核酸在与蛋白质或酶的缺陷相关的疾病的治疗中将是有益的。然而,在治疗环境中许多问题与核酸相关。治疗性核酸的主要问题中的一个磷酸二酯核苷酸间连接(phosphodiester inter nucleotide link)的稳定性及其对于核酸酶的敏感性。除此之外,这些核酸具有有限的穿过细胞膜的能力。

[0005] 在基因治疗应用中,阳离子脂质已经被证明是治疗各种疾病的核酸的优良载体。由阳离子脂质和其他共脂质诸如胆固醇、DSPC和PEG化的脂质形成的脂质纳米颗粒包封寡核苷酸,这保护寡核苷酸免于降解并且促进细胞摄取。然而,本领域中仍然存在对于合适并且有效的用于递送寡核苷酸的递送平台的需求。

[0006] 发明概述

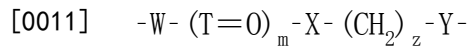
[0007] 本发明涉及可以用于脂质纳米颗粒制备的新颖的阳离子脂质。这些脂质纳米颗粒保护核酸免于降解、从循环中清除和细胞内释放。此外,包封核酸的脂质纳米颗粒有利地是耐受良好的并且提供充足的治疗指数,使得患者以核酸的有效剂量的治疗与对于患者的不可接受的毒性和/或风险不相关联。本发明还提供了这些脂质的化学合成方法、脂质纳米颗粒制备以及具有核酸的制剂。

[0008] 在一些实施方案中,本发明涉及新颖的阳离子脂质,以及这些脂质与siRNA和pDNA的制剂。这些脂质纳米颗粒 (LNP) 还通过DLS表征,并且评估它们在各种癌细胞系中的体外活性。

[0009] 根据本发明的原理,脂质结构是基于官能团诸如胍、酰胍或羟胺,该官能团直接地或通过连接基连接至脂肪酸残基R-C(=O)-、R-C(=O)-O-或R-,其中RCOOH是相应的脂肪酸,该相应的脂肪酸可以是饱和的或不饱和的。脂质还含有官能性头部基团,例如胺、含N杂

环或杂芳基、或氨基酸侧链(例如,组氨酸侧链或精氨酸侧链),该官能性头部基团通过连接基例如亚烷基链被连接。在一些实施方案中,脂质以不对称结构和增强的电荷为特征,因此假设这样的脂质由于结构不平衡将显示出改善的结合并且改善内体逃逸(即,增强的稳定性)。根据本发明的其他脂质具有如本文进一步描述的对称结构。

[0010] 因此,在一个实施方案中,本发明涉及阳离子脂质,该阳离子脂质包括由以下结构表示的官能团:



[0012] 其中

[0013] X和Y各自独立地是O、N或NH,其中X和Y两者不能同时是O;

[0014] W是键、O、NH或S;

[0015] T是C或S;

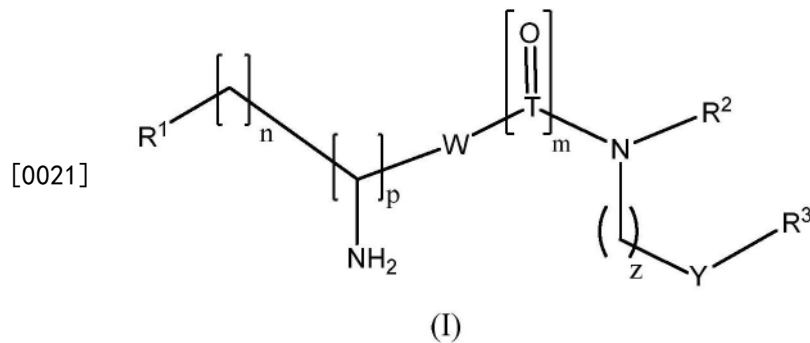
[0016] m是0或1;并且

[0017] z是0或2;

[0018] 其中官能团被连接至至少一个饱和的或不饱和的脂肪酸残基。

[0019] 在一些实施方案中,阳离子脂质包括对称地或不对称地连接至上述官能团的两个脂肪酸残基。

[0020] 在本发明的一个方面中,阳离子脂质由式(I)的结构表示:



[0022] 其中

[0023] Y是O或NH;

[0024] T是C或S;

[0025] W是键、O、NH或S;

[0026] R¹选自由以下组成的组:

[0027] (a) NR⁴R⁵,其中R⁴和R⁵各自独立地是C₁-C₄烷基;或R⁴和R⁵与它们被附接到的氮一起形成5元或6元的杂环或杂芳香族环,该杂环或杂芳香族环任选地含有一个或更多个选自由O、N和S组成的组的另外的杂原子;或NR⁴R⁵表示胍基团(-NHC(=NH)NH₂);

[0028] (b)天然或非天然的氨基酸的侧链;以及

[0029] (c)含有一个或更多个选自由O、N和S组成的组的杂原子的5元或6元的杂环或杂芳香族环;

[0030] R²和R³选自由以下组成的组:

[0031] (a)C₁₀-C₂₂烷基;

[0032] (b)C₁₀-C₂₂烯基;

[0033] (c) C_{10} - C_{22} 炔基;

[0034] (d) C_4 - C_{10} 亚烷基-Z- C_4 - C_{22} 烷基;以及

[0035] (e) C_4 - C_{10} 亚烷基-Z- C_4 - C_{22} 烯基;

[0036] Z是-O-C(=O)-、-C(=O)-O-或-O-;

[0037] n是0、1、2、3、4、5或6;

[0038] m是0或1;

[0039] p是0或1;并且

[0040] z是0或2;

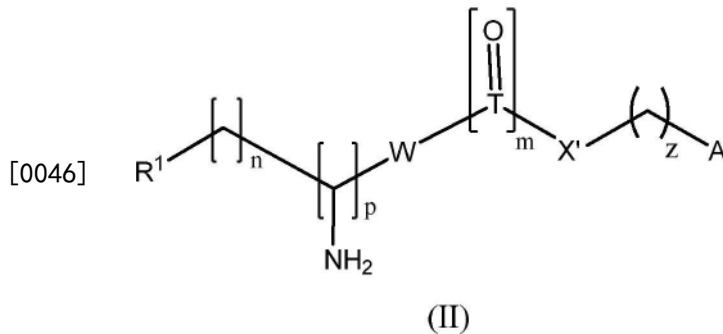
[0041] 包括其盐、水合物、溶剂化物、多晶型物、光学异构体、几何异构体、对映异构体、非对映异构体及混合物。

[0042] 在一些实施方案中,式(I)的化合物包括选自胍、羟胺、酰胍、乙醇胺和乙二胺的官能团。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

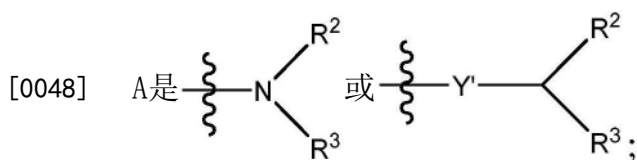
[0043] 在式(I)的一些实施方案中,m是0。在式(I)的其他实施方案中,m是1。在式(I)的其他实施方案中,p是0。在式(I)的其他实施方案中,p是1。在式(I)的其他实施方案中,m是0并且p是0。在式(I)的其他实施方案中,m是1并且p是0。在式(I)的其他实施方案中,z是0。在式(I)的其他实施方案中,z是2。在式(I)的其他实施方案中,T是C。在式(I)的其他实施方案中,W是键。在式(I)的其他实施方案中, R^1 是 NR^4R^5 。

[0044] 在式(I)的一些代表性实施方案中,p是0,W是键并且T是C,并且化合物由式(Ia)的结构表示。在式(Ia)的一些代表性实施方案中, R^1 是 NR^4R^5 ,并且化合物由式(Ia-1)的结构表示。式(Ia)和式(Ia-1)的结构在下文的详细描述中描绘。

[0045] 在本发明的另一方面中,阳离子脂质由式(II)的结构表示:

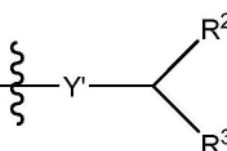


[0047] 其中



[0049] X' 是O或NH;

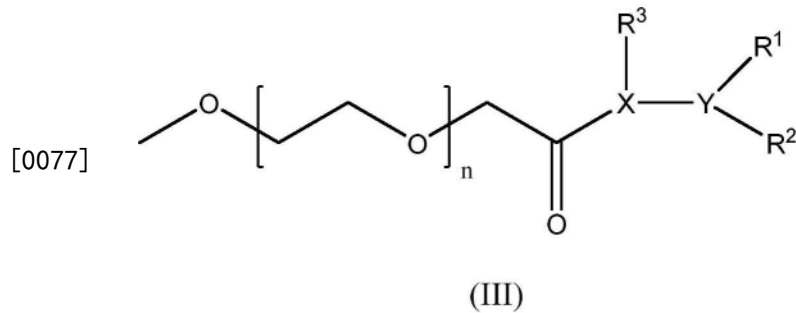
[0050] Y' 是O或NH;

[0051] 条件是当A是  时,X' 和Y' 两者不能同时是O;

- [0052] T是C或S;
- [0053] W是键、O、NH或S;
- [0054] R^1 选自由以下组成的组:
- [0055] (a) NR^4R^5 , 其中 R^4 和 R^5 各自独立地是 C_1-C_4 烷基;或 R^4 和 R^5 与它们被附接到的氮一起形成5元或6元的杂环或杂芳香族环, 该杂环或杂芳香族环任选地含有一个或更多个选自由O、N和S组成的组的另外的杂原子;或 NR^4R^5 表示胍基团($-NHC(=NH)NH_2$);
- [0056] (b) 天然或非天然的氨基酸的侧链;以及
- [0057] (c) 含有一个或更多个选自由O、N和S组成的组的杂原子的5元或6元的杂环或杂芳香族环;
- [0058] R^2 和 R^3 选自由以下组成的组:
- [0059] (a) $C_{10}-C_{22}$ 烷基;
- [0060] (b) $C_{10}-C_{22}$ 烯基;
- [0061] (c) $C_{10}-C_{22}$ 炔基;
- [0062] (d) C_4-C_{10} 亚烷基-Z- C_4-C_{22} 烷基;以及
- [0063] (e) C_4-C_{10} 亚烷基-Z- C_4-C_{22} 烯基;
- [0064] Z是-O-C(=O)-、-C(=O)-O-或-O-;
- [0065] n是0、1、2、3、4、5或6;
- [0066] m是0或1;
- [0067] p是0或1;并且
- [0068] z是0或2;
- [0069] 包括其盐、水合物、溶剂化物、多晶型物、光学异构体、几何异构体、对映异构体、非对映异构体及混合物。
- [0070] 在一些实施方案中, 式(II)的化合物包括选自胍、羟胺、酰胍、乙醇胺和乙二胺的官能团。每种可能性代表本发明的单独实施方案。
- [0071] 在式(II)的一些实施方案中, m是0。在式(II)的其他实施方案中, m是1。在式(II)的其他实施方案中, m是1并且p是0。在式(II)的其他实施方案中, z是0。在式(II)的其他实施方案中, z是2。在式(II)的其他实施方案中, T是C。在式(II)的其他实施方案中, W是键。在式(II)的一些实施方案中, m是0并且W是0。
- [0072] 在式(II)的一些代表性实施方案中, 阳离子脂质由式(IIa)的结构表示。在式(IIa)的一些代表性实施方案中, 阳离子脂质由式(IIa-1)的结构表示。在式(IIa)的其他代表性实施方案中, 阳离子脂质由式(IIa-2)的结构表示。在式(IIa)的其他代表性实施方案中, 阳离子脂质由式(IIa-3)的结构表示。在式(IIa)的其他代表性实施方案中, 阳离子脂质由式(IIa-4)的结构表示。在式(II)的其他代表性实施方案中, 阳离子脂质由式(IIb)的结构表示。在式(IIb)的一些代表性实施方案中, 阳离子脂质由式(IIb-1)的结构表示。
- [0073] 下文的详细描述中描绘了式(IIa)、式(IIa-1)、式(IIa-2)、式(IIa-3)、式(IIa-4)、式(IIb)和式(IIb-1)的结构。
- [0074] 式(I)、式(Ia)、式(Ia-1)、式(II)、式(IIa)、式(IIa-1)、式(IIa-2)、式(IIa-3)、式(IIa-4)、式(IIb)和式(IIb-1)的化合物的具体实例是化合物1-66, 化合物1-66的结构在详细描述中的表1中描绘。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0075] 可以用于制备式 (IIa-4) 的化合物的式 (IIa-5) 的中间体代表本发明的单独实施方案。

[0076] 在另一方面中,本发明的阳离子脂质由式 (III) 的结构表示:



[0078] 其中

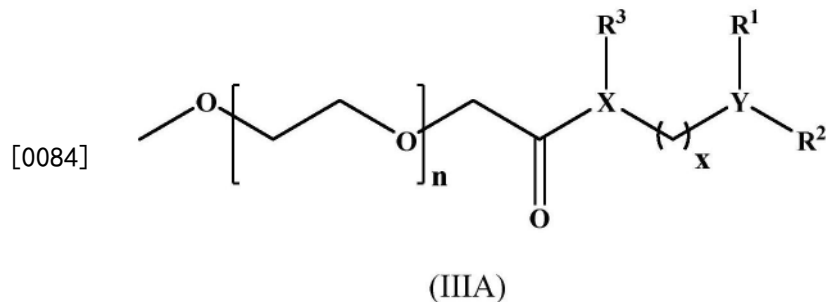
[0079] X和Y各自独立地是O、N或NH,其中X和Y两者不能同时是O;

[0080] R^1 、 R^2 和 R^3 中的每个独立地不存在或是 C_{10} - C_{22} 烷基、 C_{10} - C_{22} 烯基或 C_{10} - C_{22} 炔基;并且

[0081] n是在1和30之间的整数;

[0082] 包括其盐、水合物、溶剂化物、多晶型物、光学异构体、几何异构体、对映异构体、非对映异构体及混合物。

[0083] 在另一方面中,本发明的阳离子脂质由式 (IIIA) 的结构表示:



[0085] 其中

[0086] X和Y各自独立地是O、N或NH,其中X和Y两者不能同时是O;

[0087] R^1 、 R^2 和 R^3 中的每个独立地不存在或是 C_{10} - C_{22} 烷基、 C_{10} - C_{22} 烯基或 C_{10} - C_{22} 炔基;

[0088] n是在1和30之间的整数;并且

[0089] x是0或2;

[0090] 包括其盐、水合物、溶剂化物、多晶型物、光学异构体、几何异构体、对映异构体、非对映异构体及混合物。

[0091] 式 (III) 的化合物的具体实例是化合物67-70,化合物67-70的结构在详细描述中的表2中描绘。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0092] 在另一方面中,本发明涉及组合物,该组合物包括式 (I)、式 (Ia)、式 (Ia-1)、式 (II)、式 (IIa)、式 (IIa-1)、式 (IIa-2)、式 (IIa-3)、式 (IIa-4)、式 (IIb)、式 (IIb-1) 和式 (III) 中的任一个的阳离子脂质,并且还包含至少一种另外的中性脂质或PEG修饰的脂质。在一些实施方案中,组合物还可以包括核酸。核酸的实例包括但不限于小干扰RNA (siRNA)、微RNA (miRNA)、反义寡核苷酸、信使RNA (mRNA)、核酶、pDNA、CRISPR mRNA、gRNA和免疫刺激核酸。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0093] 在另一方面中,本发明涉及基因沉默的方法,该方法包括使细胞与根据本发明的组合物接触的步骤。在一些实施方案中,细胞是癌细胞。

[0094] 在其他实施方案中,本发明的组合物可以用作递送系统,以将治疗剂施用至其在身体中的靶位置。因此,在一些实施方案中,本发明涉及用于施用治疗剂的方法,所述方法是通过制备包括如本文描述的阳离子脂质和治疗剂的组合物并且将该组合施用至需要其的受试者。

[0095] 本发明的阳离子脂质可以单独地使用,或与其他脂质组分组合地使用,以形成用于递送治疗剂的脂质纳米颗粒,该其他脂质组分诸如中性脂质、带电荷的脂质、类固醇(包括例如固醇)和/或它们的类似物、和/或聚合物缀合的脂质。在一些情况下,脂质纳米颗粒被用于递送核酸以用于治疗各种疾病或状况,特别是白细胞相关的状况,诸如炎症和/或缺乏足够的蛋白质。

[0096] 因此,在一些实施方案中,本发明涉及治疗白细胞相关的状况的方法,该方法包括向需要其的受试者施用根据本发明的组合物的步骤。白细胞相关的状况可以选自自由以下组成的组:癌症、感染、自身免疫疾病、神经退行性疾病和炎症。

[0097] 本发明的另外的实施方案和可适用性的全部范围将从下文给出的详细描述变得明显。然而,应理解,详细描述和具体实施例(虽然指示本发明的优选的实施方案),仅通过说明的方式给出,因为从该详细描述中,在本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员将变得明显。

[0098] 附图简述

[0099] 图1:脂质1的体外基因沉默效应:以不同的siRNA剂量(0.4 μ M、0.2 μ M、0.1 μ M),用包括阳离子脂质1包封的siCD45的脂质纳米颗粒(LNP)治疗人类T细胞SupT1持续48小时(A)或72小时(B)。

[0100] 图2:用LNP-siPLK-1或LNP-siLuc纳米颗粒治疗耐药人类卵巢癌细胞(NAR)持续72小时,并且通过qPCR测量PLK-1表达。

[0101] 图3:脂质1在NAR细胞中的体外基因沉默效应:以不同的siRNA浓度(0.2 μ M和0.1 μ M)用脂质1/siPLK1纳米颗粒治疗人类卵巢癌细胞(NAR细胞)持续48小时。通过使用PI/膜联蛋白的分析凋亡细胞。

[0102] 图4:脂质10和11在NAR细胞中的体外基因沉默效应:以不同的siRNA浓度(0.1 μ M和0.05 μ M)用脂质1/siPLK1纳米颗粒治疗人类卵巢癌细胞(NAR细胞)持续48小时。通过使用PI/膜联蛋白的FACS分析凋亡细胞。

[0103] 图5:用LNP-siPLK-1或LNP-siLuc纳米颗粒治疗人类卵巢癌细胞(OVCAR 8)持续72小时,并且通过qPCR测量PLK-1表达。

[0104] 图6:用LNP-siPLK-1或LNP-siLuc纳米颗粒治疗耐药人类卵巢癌细胞(NAR)的球体持续72小时,并且通过qPCR测量PLK-1表达。

[0105] 图7:将人类结肠癌细胞(HCT116)与具有ctl siRNA的LNP(包括MC3、脂质38或55)一起孵育持续72小时。通过XTT测定测量细胞活力。图10示出相对于siPLK1的浓度的细胞增殖(未治疗细胞的%)。

[0106] 图8:脂质38或55的体外基因沉默效应。将人类多发性骨髓瘤悬浮细胞(U266)与含有不同浓度的siPLK1的LNP一起孵育持续48小时。通过qPCR测量PLK1表达。PLK1-mRNA水平

相对于LNP-ctl siRNA治疗的细胞被归一化。

[0107] 图9:PLK1沉默对细胞活力的效应。将人类多发性骨髓瘤悬浮细胞(U266)与包括阳离子脂质38或55和不同浓度的siPLK1或ctl-siRNA的LNP一起孵育持续48小时。通过XTT测定测量由PLK1下调诱导的细胞活力。

[0108] 图10:PLK1沉默对细胞活力的效应;将人类B细胞淋巴瘤悬浮细胞(RPMI-8226)与包括阳离子脂质38或55和不同浓度的siPLK1或ctl-siRNA的LNP一起孵育持续48小时。通过XTT测定测量由PLK1下调诱导的细胞活力。

[0109] 图11:PLK1沉默对细胞活力的效应。将人类多发性骨髓瘤悬浮细胞(MM1)与包括阳离子脂质38或55和不同浓度的siPLK1或ctl-siRNA的LNP一起孵育持续48小时。通过XTT测定测量由PLK1下调诱导的细胞活力。

[0110] 图12:pDNA的体外表达。将人类结肠癌细胞(HCT 116)与不同浓度的LNP-LUC pDNA一起孵育持续48小时。通过发光计测量荧光素酶表达。Lipofectamine 2000(Lipo 2000)用作阳性对照。LNP用脂质38和不同量的DOPE连同其他共脂质胆固醇(Chol)和PEG-DMG来配制。

[0111] 图13:用LNP-DNA纳米颗粒(10:1N/P比率,0.6nM DNA)治疗HEK293细胞持续72小时,并且通过流式细胞术分析mKATE表达。

[0112] 图14:用不同DNA的LNP-DNA纳米颗粒(10:1N/P比率)治疗HEK293细胞持续72小时,并且通过流式细胞术分析mKATE表达。图14A:脂质1。图14B:脂质10。

[0113] 图15:mRNA的体外递送。以不同的mRNA浓度,用含有阳离子脂质38或54和荧光素酶mRNA的LNP治疗难以转染的鼠科动物巨噬细胞(RAW 264.7)持续18小时。通过发光计测量荧光素酶表达。

[0114] 图16:mRNA的体内递送。将含有阳离子脂质38或54和荧光素酶mRNA的LNP以1mg/kg体重肌内施用至C57BL6/j小鼠。荧光素酶表达通过生物发光成像系统Biospace来测量:(A)在肌内施用8小时之后;和(B)在24小时之后。

[0115] 图17:将包括与荧光素酶mRNA一起配制的脂质54或脂质38的LNP以1mg/kg体重静脉内施用至C57BL6/j小鼠中。在8小时之后,通过生物发光成像系统Biospace测量荧光素酶表达。

[0116] 图18:mRNA向肝的体内递送。将包括与荧光素酶mRNA一起配制的脂质38的LNP以1mg/kg体重静脉内施用至C57BL6/j小鼠中。在施用8小时和24小时之后,通过生物发光成像系统Biospace测量荧光素酶表达。

[0117] 图19:与MC3相比,在非人类灵长类动物中无肝毒性。食蟹猴(Cynomolgus monkey)(每组n=2,雄性)接收具有siNC5的MC3颗粒(0.5mg/kg)和具有siNC5的基于脂质38的颗粒(0.5mg/Kg)的单次静脉内施用(1ml/kg)。在施用后1h和24h收集血清,并且分析ALT、AST。每个数据点是2个动物的平均值±SEM。

[0118] 本发明的详细描述

[0119] 本发明基于阳离子脂质的发现,该阳离子脂质在制备脂质纳米颗粒以在体外和在体内递送活性剂中是有用的。本发明的阳离子脂质在核酸诸如siRNA、miRNA和mRNA等的递送中是有用的。

[0120] 阳离子脂质

[0121] 在一些实施方案中,本发明涉及阳离子脂质,该阳离子脂质包括连接至至少一个饱和的或不饱和的脂肪酸残基的胍、酰胍、羟胺、乙醇胺或二亚乙基二胺部分。在一些实施方案中,阳离子脂质包括不对称地连接至胍、酰胍、羟胺、乙醇胺或二亚乙基二胺部分的两个脂肪酸残基。

[0122] 如本文预期的,本发明涉及阳离子脂质,该阳离子脂质包括由以下结构表示的官能团:

[0123] $-W-(T=O)_m-X-(CH_2)_z-Y-$;

[0124] 其中

[0125] X和Y各自独立地是O、N或NH,其中X和Y两者不能均是O;

[0126] W是键、O、NH或S;

[0127] T是C或S;

[0128] m是0或1;并且

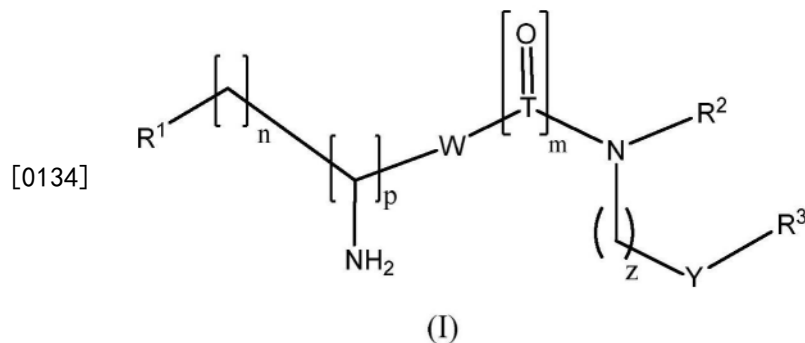
[0129] z是0或2;

[0130] 其中官能团被连接至至少一个饱和的或不饱和的脂肪酸残基。

[0131] 在一些实施方案中,X和Y各自独立地是O或N,其中X和Y两者不能均是O。

[0132] 在一些实施方案中,阳离子脂质包括对称地或不对称地连接至上述官能团的两个脂肪酸残基。

[0133] 在本发明的一个方面中,X是N,并且阳离子脂质由式(I)的结构表示:



[0135] 其中

[0136] Y是O或NH;

[0137] T是C或S;

[0138] W是键、O、NH或S;

[0139] R¹选自自由以下组成的组:

[0140] (a) NR⁴R⁵,其中R⁴和R⁵各自独立地是C₁-C₄烷基;或R⁴和R⁵与它们被附接到的氮一起形成5元或6元的杂环或杂芳香族环,该杂环或杂芳香族环任选地含有一个或更多个选自由O、N和S组成的组的另外的杂原子;或NR⁴R⁵表示胍基团(-NHC(=NH)NH₂);

[0141] (b)天然或非天然的氨基酸的侧链;以及

[0142] (c)含有一个或更多个选自由O、N和S组成的组的杂原子的5元或6元的杂环或杂芳香族环;

[0143] R²和R³选自自由以下组成的组:

[0144] (a)C₁₀-C₂₂烷基;

[0145] (b) C_{10} - C_{22} 烯基;

[0146] (c) C_{10} - C_{22} 炔基;

[0147] (d) C_4 - C_{10} 亚烷基-Z- C_4 - C_{22} 烷基;以及

[0148] (e) C_4 - C_{10} 亚烷基-Z- C_4 - C_{22} 烯基;

[0149] Z是-O-C(=O)-、-C(=O)-O-或-O-;

[0150] n是0、1、2、3、4、5或6;

[0151] m是0或1;

[0152] p是0或1;并且

[0153] z是0或2;

[0154] 包括其盐、水合物、溶剂化物、多晶型物、光学异构体、几何异构体、对映异构体、非对映异构体及混合物。

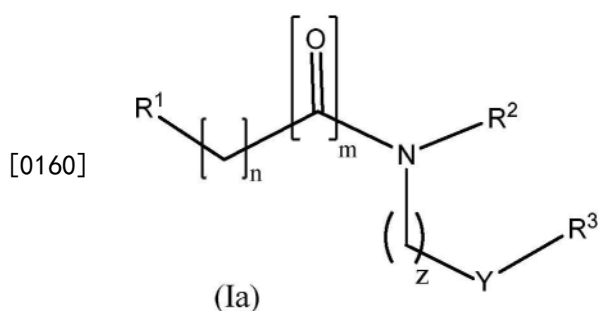
[0155] 在式(I)的一些实施方案中, R^2 和 R^3 选自由以下组成的组:(a) C_{10} - C_{22} 烷基、 C_{10} - C_{22} 烯基或 C_{10} - C_{22} 炔基;以及(b) C_4 - C_{10} 亚烷基-Z- C_4 - C_{22} 烷基,其中Z是-O-C(=O)-、-C(=O)-O-或-O-。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0156] 在式(I)的一些实施方案中, R^1 是 NR^4R^5 。在式(I)的一些实施方案中, R^1 是天然或非天然的氨基酸的侧链。在式(I)的一些实施方案中, R^1 是含有一个或多个选自O、N和S组成的组的杂原子的5元或6元的杂环或杂芳香族环。

[0157] 在一些实施方案中,式(I)的化合物包括选自由以下组成的组的官能团:肼、羟胺、酰肼、乙醇胺和乙二胺。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0158] 在式(I)的一些实施方案中,m是0。在式(I)的其他实施方案中,m是1。在式(I)的其他实施方案中,p是0。在式(I)的其他实施方案中,p是1。在式(I)的其他实施方案中,m是0并且p是0。在式(I)的其他实施方案中,m是1并且p是0。在式(I)的其他实施方案中,z是0。在式(I)的其他实施方案中,z是2。在式(I)的其他实施方案中,T是C。在式(I)的其他实施方案中,W是键。

[0159] 在式(I)的一些代表性实施方案中,p是0,W是键并且T是C,并且化合物由式(Ia)的结构表示:

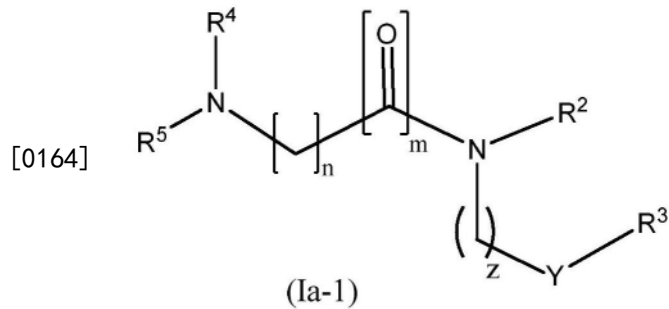


[0161] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、Y、m、n和z如式(I)中定义。

[0162] 在式(Ia)的一些实施方案中,m是0。在式(Ia)的其他实施方案中,m是1。在式(Ia)的其他实施方案中,z是0。在式(Ia)的其他实施方案中, R^2 和 R^3 各自独立地是 C_{14} - C_{20} 烷基或 C_{14} - C_{20} 烯基。在式(Ia)的其他实施方案中, R^2 和 R^3 各自独立地是 C_4 - C_{10} 亚烷基-Z- C_4 - C_{22} 烷基,其中Z是-O-C(=O)-、-C(=O)-O-或-O-。在式(Ia)的其他实施方案中, R^2 和 R^3 各自独立地是 C_4 - C_{10} 亚烷基-Z- C_4 - C_{22} 烯基,其中Z是-O-C(=O)-、-C(=O)-O-或-O-。在式(Ia)的其他实施

方案中, Y是O。在式(Ia)的其他实施方案中, Y是NH。

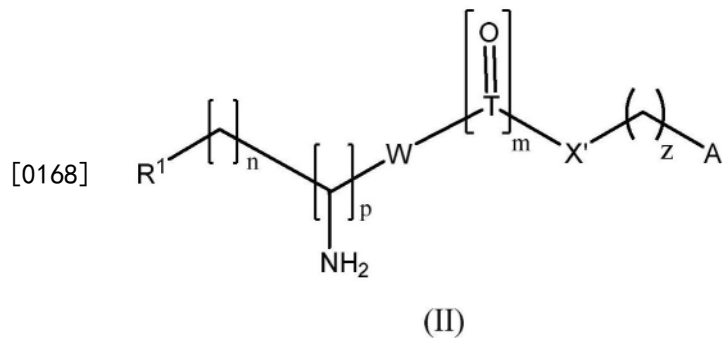
[0163] 在式(I)的其他代表性实施方案中, R^1 是 NR^4R^5 , 并且化合物由式(Ia-1)的结构表示:



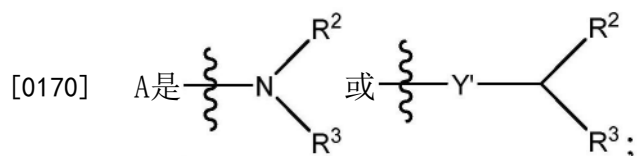
[0165] 其中 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、Y、m、n和z如式(I)中定义。

[0166] 在式(Ia-1)的一些实施方案中, R^4 和 R^5 各自是 CH_3 。在式(Ia-1)的其他实施方案中, R^4 和 R^5 与它们被附接到的氮一起形成选自吡咯烷基、哌啶基和哌嗪基组成的组的杂环, 所述吡咯烷基、哌啶基和哌嗪基中的每个任选地被烷基取代。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0167] 在本发明的另一方面中, 阳离子脂质由式(II)的结构表示:



[0169] 其中



[0171] X' 是O或NH;

[0172] Y' 是O或NH;

[0173] 条件是当A是 时, X' 和 Y' 两者不能均是O;

[0174] T是C或S;

[0175] W是键、O、NH或S;

[0176] R^1 选自由以下组成的组:

[0177] (a) NR^4R^5 , 其中 R^4 和 R^5 各自独立地是 C_1 - C_4 烷基; 或 R^4 和 R^5 与它们被附接到的氮一起形成5元或6元的杂环或杂芳香族环, 该杂环或杂芳香族环任选地含有一个或更多个选自由

O、N和S组成的组的另外的杂原子；或 NR^4R^5 表示胍基团 $(-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2)$ ；

[0178] (b)天然或非天然的氨基酸的侧链；以及

[0179] (c)含有一个或多个选自由O、N和S组成的组的杂原子的5元或6元的杂环或杂芳香族环；

[0180] R^2 和 R^3 选自由以下组成的组：

[0181] (a) C_{10} - C_{22} 烷基；

[0182] (b) C_{10} - C_{22} 烯基；

[0183] (c) C_{10} - C_{22} 炔基；

[0184] (d) C_4 - C_{10} 亚烷基-Z- C_4 - C_{22} 烷基；以及

[0185] (e) C_4 - C_{10} 亚烷基-Z- C_4 - C_{22} 烯基；

[0186] Z是 $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 或 $-\text{O}-$ ；

[0187] n是0、1、2、3、4、5或6；

[0188] m是0或1；

[0189] p是0或1；并且

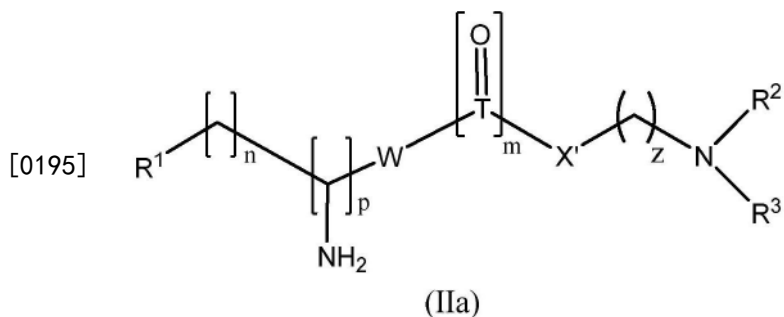
[0190] z是0或2；

[0191] 包括其盐、水合物、溶剂化物、多晶型物、光学异构体、几何异构体、对映异构体、非对映异构体及混合物。

[0192] 在式(II)的一些实施方案中， R^2 和 R^3 选自由以下组成的组：(a) C_{10} - C_{22} 烷基、 C_{10} - C_{22} 烯基或 C_{10} - C_{22} 炔基；以及(b) C_4 - C_{10} 亚烷基-Z- C_4 - C_{22} 烷基，其中Z是 $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 或 $-\text{O}-$ 。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

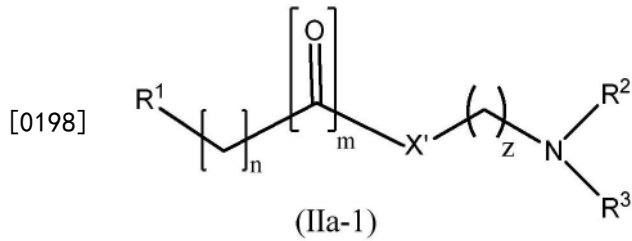
[0193] 在式(II)的一些实施方案中，m是0。在式(II)的其他实施方案中，m是1。在式(II)的其他实施方案中，m是1并且p是0。在式(II)的其他实施方案中，z是0。在式(II)的其他实施方案中，z是2。在式(II)的其他实施方案中，T是C。在式(II)的其他实施方案中，W是键。在式(II)的一些实施方案中，m是0并且W是0。

[0194] 在式(II)的一些代表性实施方案中，阳离子脂质由式(IIa)的结构表示：



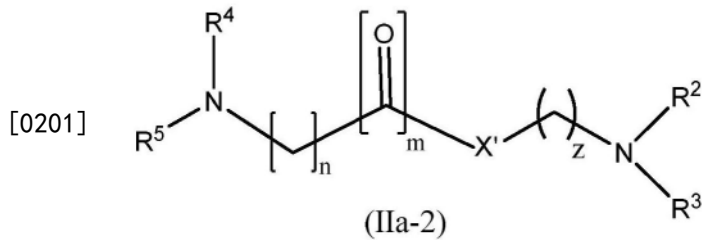
[0196] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 X' 、T、W、n、m、p和z如式(II)中定义。

[0197] 在式(IIa)的一些实施方案中，p是0，W是键并且T是C，并且化合物由式(IIa-1)的结构表示：



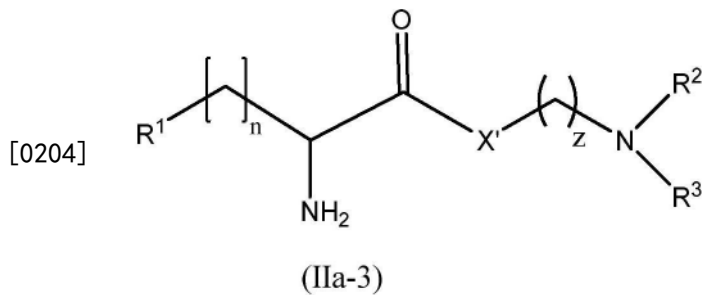
[0199] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 X' 、 n 、 m 和 z 如式(II)中定义。

[0200] 在式(IIa)的其他实施方案中, R^1 是 NR^4R^5 ,并且化合物由式(IIa-2)的结构表示:



[0202] 其中 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 X' 、 n 、 m 和 z 如式(II)中定义。

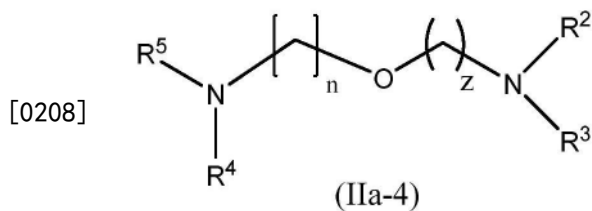
[0203] 在式(IIa)的还其他实施方案中, p 是1, m 是1, W 是键并且 T 是C,并且化合物由式(IIa-3)的结构表示:



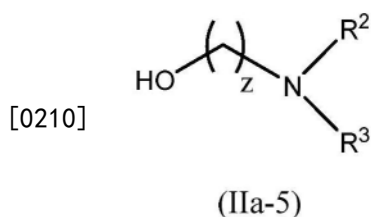
[0205] 其中 R^1 是天然或非天然的氨基酸的侧链;并且

[0206] R^2 、 R^3 、 X' 、 n 和 z 如式(II)中定义。

[0207] 在式(IIa)的一些实施方案中, p 是0, R^1 是 NR^4R^5 , W 是键, m 是0, X' 是O,并且化合物由式(IIa-4)的结构表示:

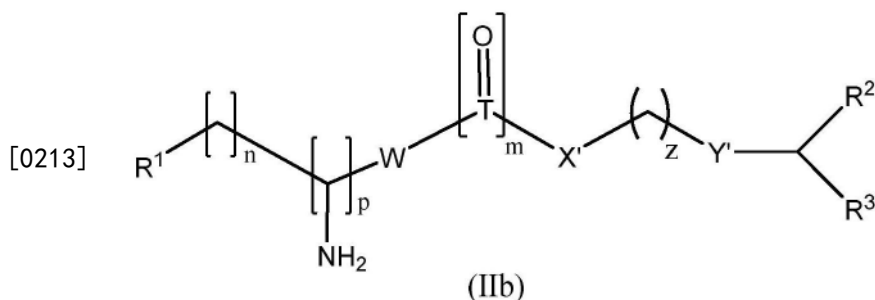


[0209] 在一些实施方案中,式(IIa-5)的化合物可以用作用于制备式(IIa-4)的化合物的中间体:



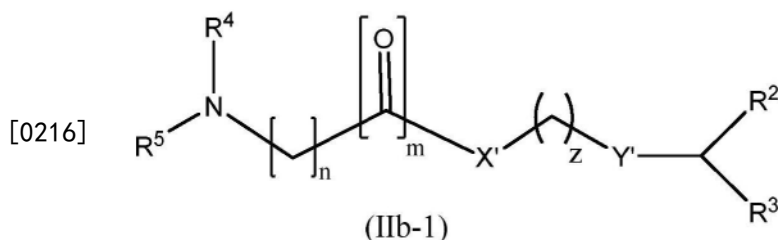
[0211] 其中 R^2 和 R^3 如式(IIa-4)中定义。

[0212] 在式(II)的其他代表性实施方案中,阳离子脂质由式(IIb)的结构表示:



[0214] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、T、W、 X' 、 Y' 、n、m、p和z如式(II)中定义。

[0215] 在式(IIb)的一些代表性实施方案中,p是0,W是键,T是C,并且 R^1 是 NR^4R^5 ,并且化合物由式(IIb-1)的结构表示:



[0217] 其中 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 X' 、 Y' 、n、m和z如式(II)中定义。

[0218] 在式(II)、式(IIa)、式(IIa-1)、式(IIa-2)、式(IIa-3)、式(IIa-4)、式(IIb)和式(IIb-1)中任一个的化合物的一些实施方案中, R^2 和 R^3 各自独立地是 C_{14} - C_{20} 烷基或 C_{14} - C_{20} 烯基。

[0219] 在式(II)、式(IIa)、式(IIa-1)、式(IIa-2)、式(IIa-3)、式(IIa-4)、式(IIb)和式(IIb-1)中任一个的化合物的其他实施方案中, R^2 和 R^3 各自独立地是 C_4 - C_{10} 亚烷基-Z- C_4 - C_{22} 烷基,其中Z是-O-C(=O)-、-C(=O)-O-或-O-。

[0220] 在式(II)、式(IIa)、式(IIa-1)、式(IIa-2)、式(IIa-3)、式(IIa-4)、式(IIb)和式(IIb-1)中任一个的化合物的其他实施方案中, R^2 和 R^3 各自独立地是 C_4 - C_{10} 亚烷基-Z- C_4 - C_{22} 烯基,其中Z是-O-C(=O)-、-C(=O)-O-或-O-。

[0221] 在式(II)、式(IIa)、式(IIa-1)、式(IIa-2)、式(IIa-3)、式(IIa-4)、式(IIb)和式(IIb-1)中任一个的化合物的其他实施方案中, X' 是O。

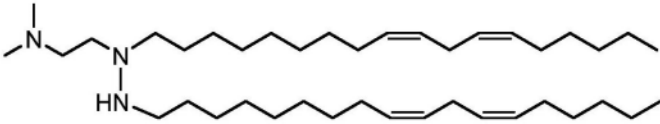
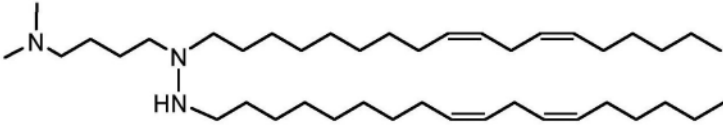
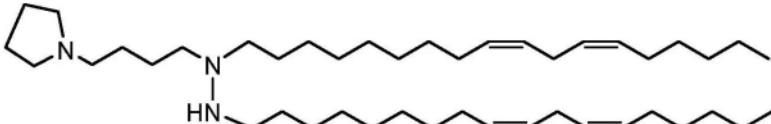
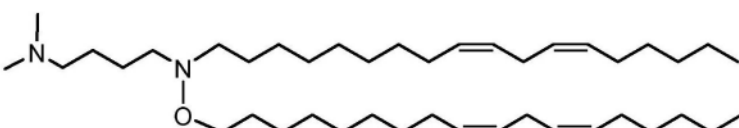
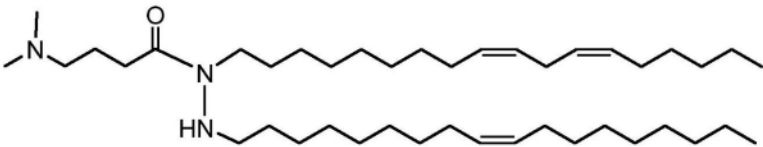
[0222] 在式(II)、式(IIa)、式(IIa-1)、式(IIa-2)、式(IIa-3)、式(IIa-4)、式(IIb)和式(IIb-1)中任一个的化合物的其他实施方案中, X' 是NH。

[0223] 在式(II)、式(IIa)、式(IIa-1)、式(IIa-2)、式(IIa-3)、式(IIa-4)、式(IIb)和式(IIb-1)中任一个的化合物的其他实施方案中, Y' 是NH。

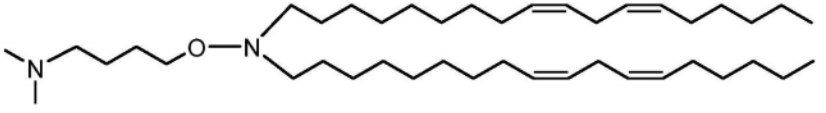
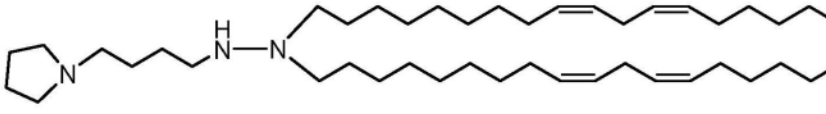
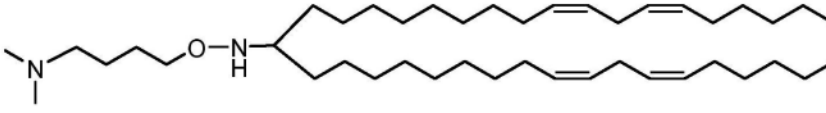
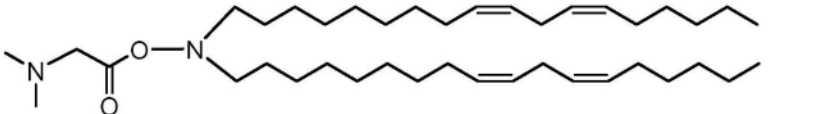
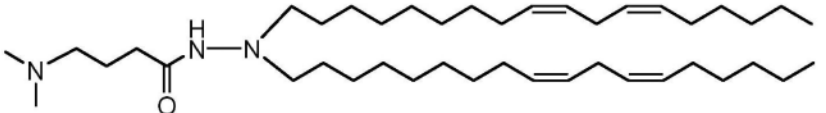
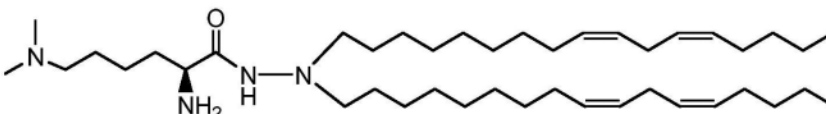
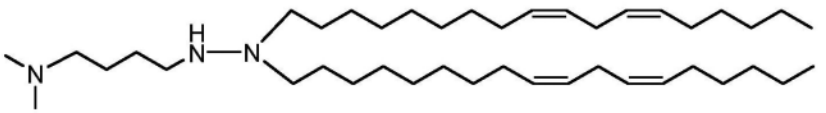
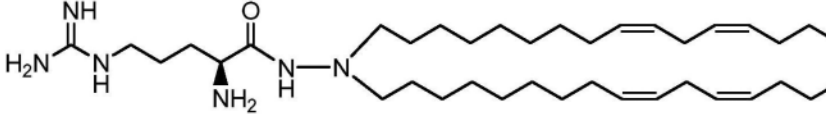
[0224] 在式(II)、式(IIa)、式(IIa-1)、式(IIa-2)、式(IIa-3)、式(IIa-4)、式(IIb)和式(IIb-1)中任一个的化合物的其他实施方案中, R^4 和 R^5 各自是 CH_3 ,或其中 R^4 和 R^5 与它们被附接到的氮一起形成选自吡咯烷基、哌啶基和哌嗪基组成的组的杂环,所述吡咯烷基、哌啶基和哌嗪基中的每个任选地被烷基取代。

[0225] 式(I)、式(Ia)、式(Ia-1)、式(II)、式(IIa)、式(IIa-1)、式(IIa-2)、式(IIa-3)、式(IIa-4)、式(IIa-5)、式(IIb)和式(IIb-1)的化合物的具体实例是化合物1-66,化合物1-66的结构在下文表1中描绘。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0226] 表1

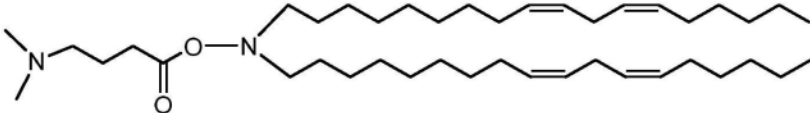
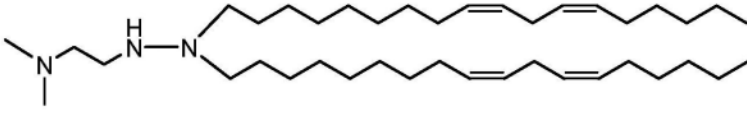
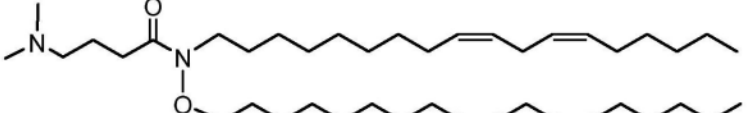
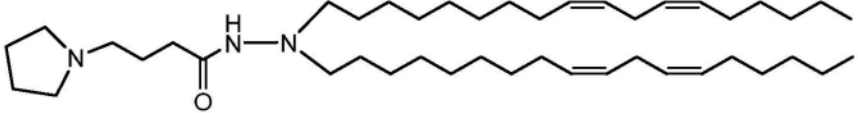
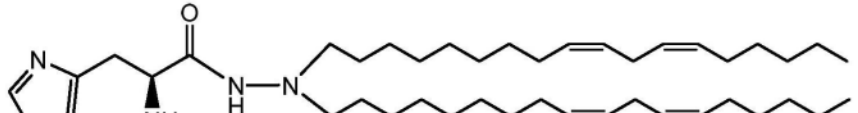
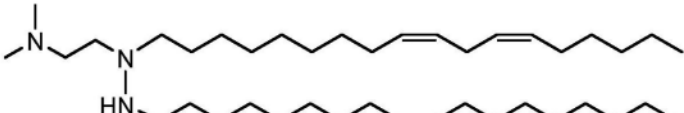

化合物编号	化学结构/ 化学名称
1	 <p>2-(1,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)-N,N-二甲基乙-1-胺</p>
2	 <p>4-(1,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)-N,N-二甲基丁-1-胺</p>
3	 <p>1-(4-(1,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)丁基)吡咯烷</p>
4	 <p>N,N-二甲基-4-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)氨基)丁-1-胺</p>
5	 <p>4-(二甲基氨基)-N'-((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-N-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)丁烷酰胍</p>

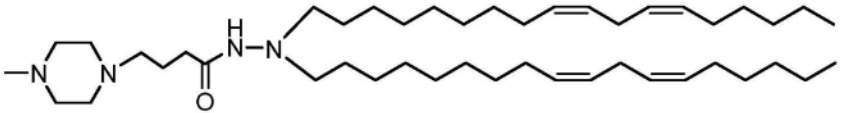
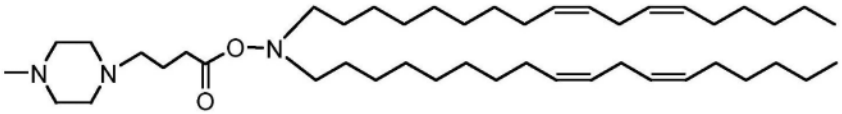
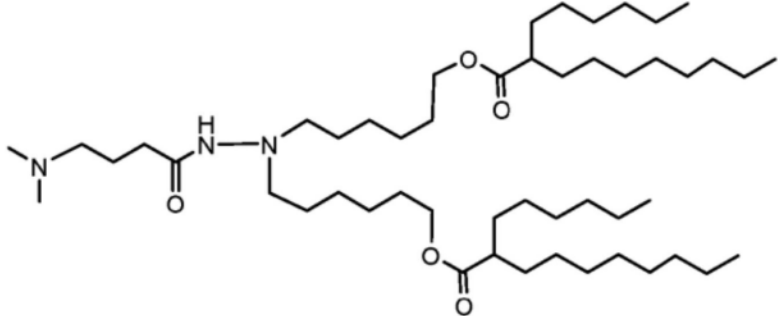
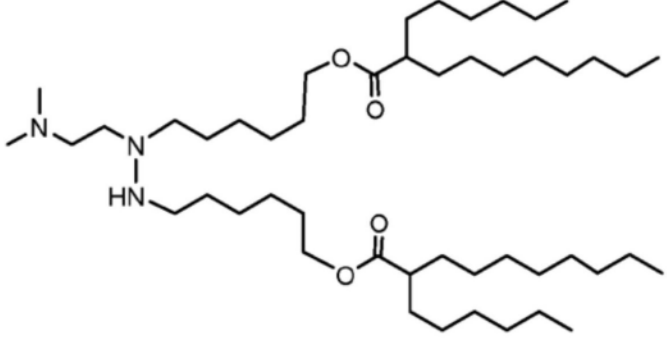
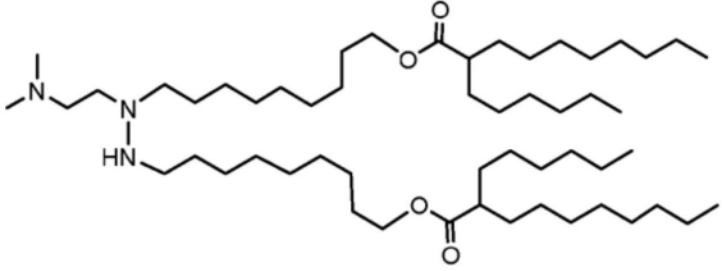
[0227]

6	 <p>4-((二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)氧基)-N,N-二甲基丁-1-胺</p>
7	 <p>1-(4-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)丁基)吡咯烷</p>
8	 <p>4-(((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基)氨基)氧基)-N,N-二甲基丁-1-胺</p>
9	 <p>2-((二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)氧基)-N,N-二甲基-2-氧代乙-1-胺</p>
10	 <p>4-(二甲基氨基)-N',N'-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)丁烷酰胍</p>
11	 <p>(S)-2-氨基-6-(二甲基氨基)-N',N'-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)己烷酰胍</p>
12	 <p>4-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)-N,N-二甲基丁-1-胺</p>
13	 <p>1-((S)-4-氨基-5-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)-5-氧代戊基)胍</p>

[0228]

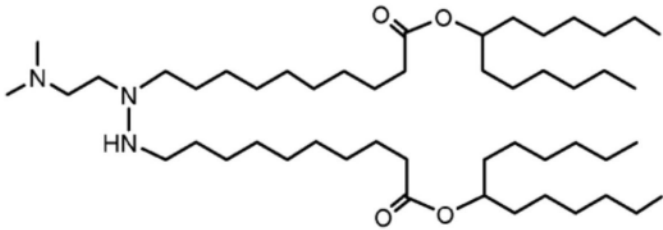
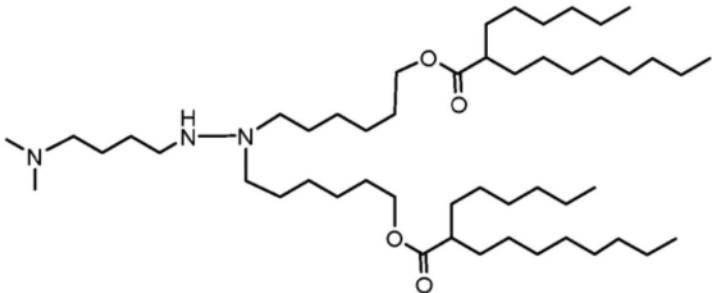
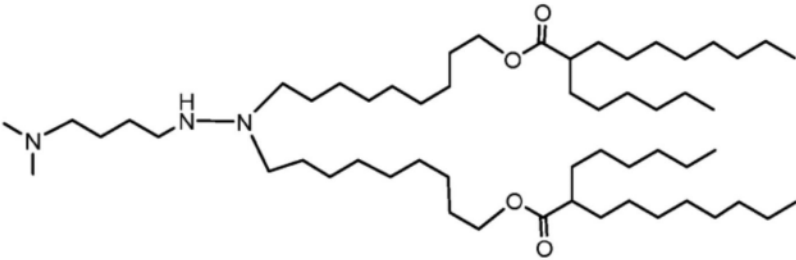
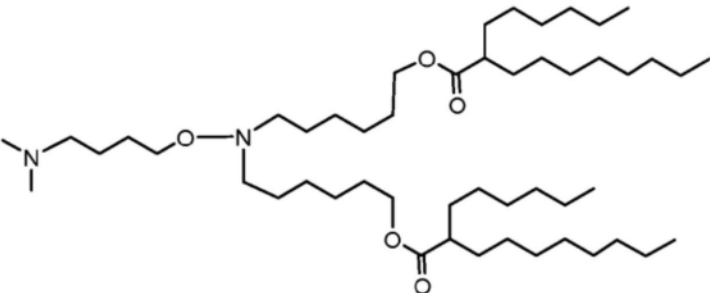
[0229]

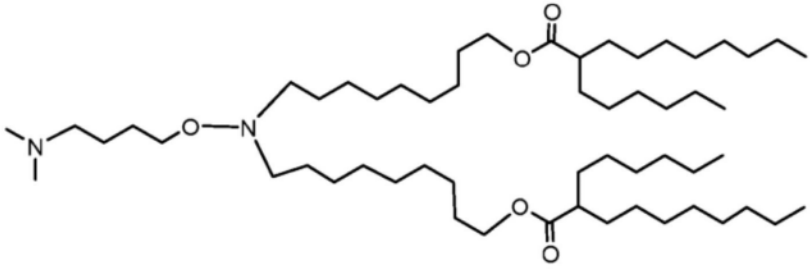
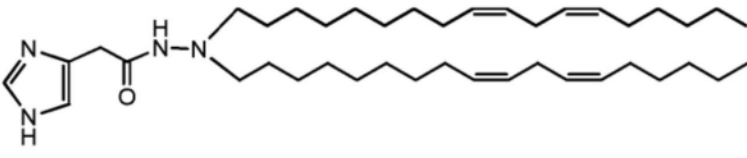
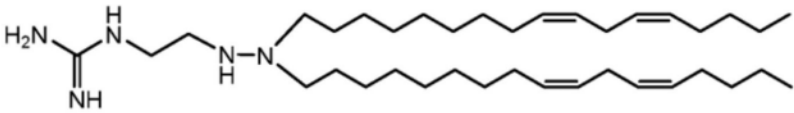
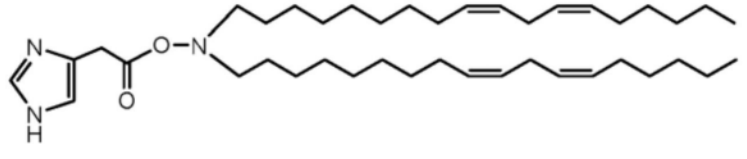
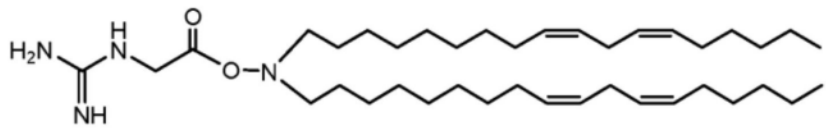
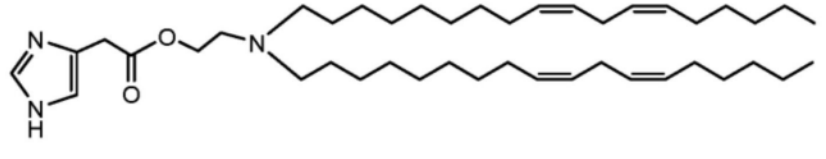
14	 <p>4-((二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)氧基)-N,N-二甲基-4-氧代丁-1-胺</p>
15	 <p>2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)-N,N-二甲基乙-1-胺</p>
16	 <p>4-(二甲基氨基)-N-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-N-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧基)丁酰胺</p>
17	 <p>N',N'-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-4-(吡咯烷-1-基)丁烷酰肼</p>
18	 <p>(S)-2-氨基-3-(1H-咪唑-4-基)-N',N'-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)丙烷酰肼</p>
19	 <p>N,N-二甲基-2-(2-((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-1-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)乙-1-胺</p>
20	 <p>N,N-二甲基-2-(1-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-2-十八烷基胍基)乙-1-胺</p>

21	 <p>4-(4-甲基哌嗪-1-基)-N',N'-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)丁烷酰肼</p>
22	 <p>O-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)丁酰基)-N,N'-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)羟胺</p>
23	 <p>(2-(4-(二甲基氨基)丁酰基)肼-1,1-二基)双(己烷-6,1-二基) 双(2-己基癸酸酯)</p>
24	 <p>(1-(2-(二甲基氨基)乙基)肼-1,2-二基)双(己烷-6,1-二基) 双(2-己基癸酸酯)</p>
25	 <p>(1-(2-(二甲基氨基)乙基)肼-1,2-二基)双(壬烷-9,1-二基) 双(2-己基癸酸酯)</p>

[0230]

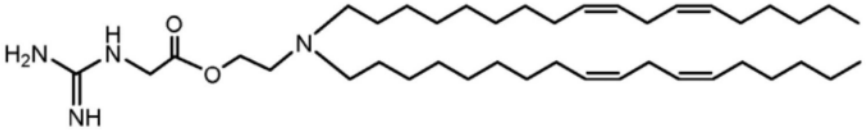
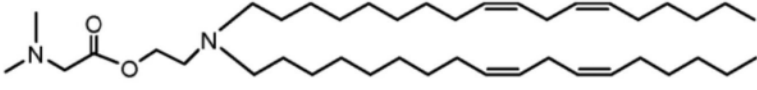
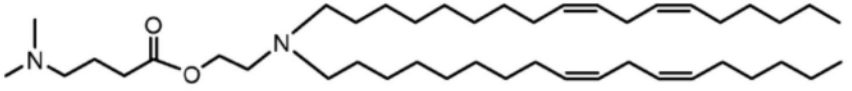
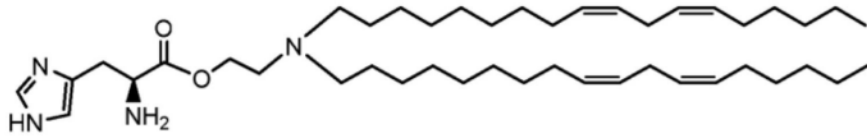
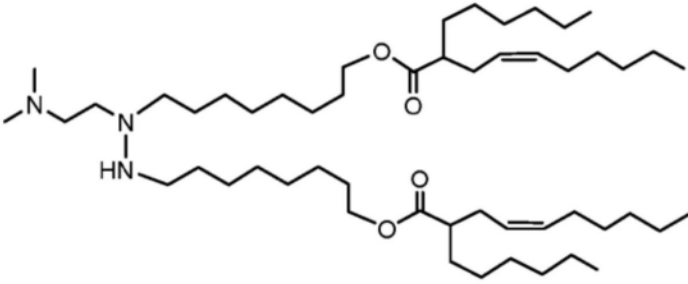
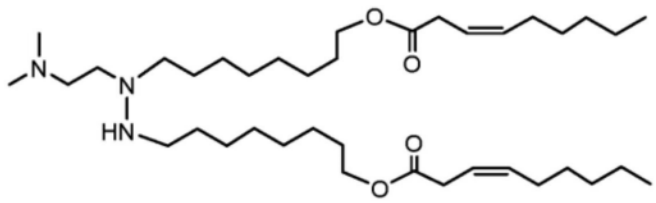
[0231]

26	 <p>二(十三碳-7-基) 10,10'-(1-(2-(二甲基氨基)乙基)胍-1,2-二基) 双(癸酸酯)</p>
27	 <p>(2-(4-(二甲基氨基)丁基)胍-1,1-二基)双(己烷-6,1-二基) 双(2-己基癸酸酯)</p>
28	 <p>(2-(4-(二甲基氨基)丁基)胍-1,1-二基)双(壬烷-9,1-二基) 双(2-己基癸酸酯)</p>
29	 <p>((4-(二甲基氨基)丁氧基)氮烷二基)双(己烷-6,1-二基) 双(2-己基癸酸酯)</p>

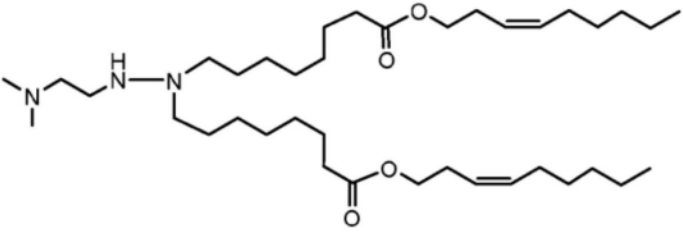
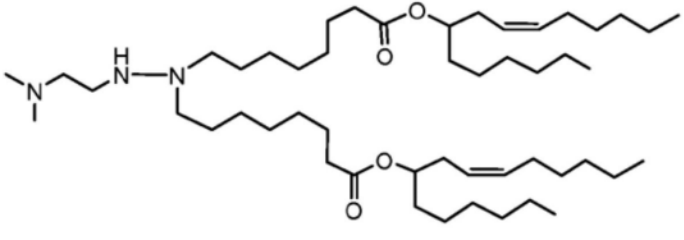
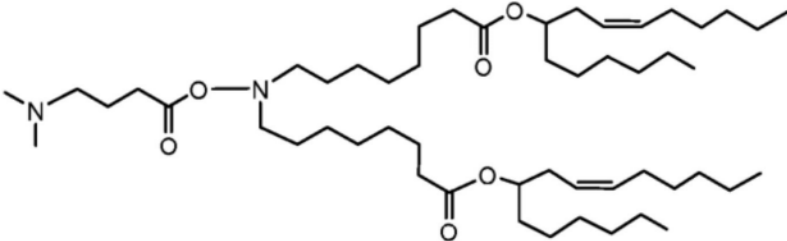
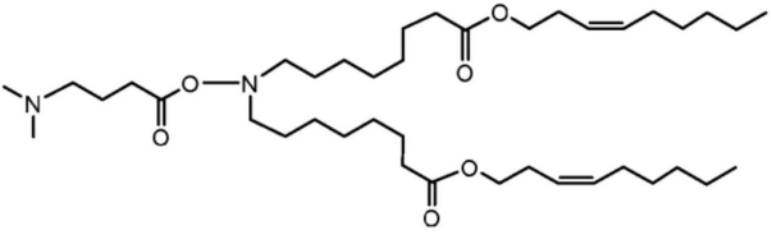
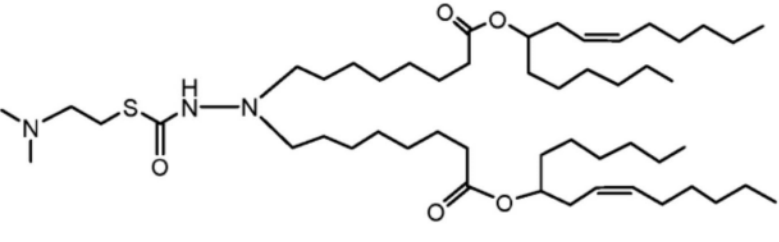
30	 <p>((4-(二甲基氨基)丁氧基)氮烷二基)双(壬烷-9,1-二基) 双(2-己基癸酸酯)</p>
31	 <p>2-(1<i>H</i>-咪唑-4-基)-<i>N',N'</i>-二(9<i>Z</i>,12<i>Z</i>)-十八碳-9,12-二烯-1-基)乙酰肼</p>
32	 <p>1-(2-(2,2-二((9<i>Z</i>,12<i>Z</i>)-十八碳-9,12-二烯-1-基)胍基)乙基)胍</p>
33	 <p><i>O</i>-(2-(1<i>H</i>-咪唑-4-基)乙酰基)-<i>N,N'</i>-二((9<i>Z</i>,12<i>Z</i>)-十八碳-9,12-二烯-1-基)羟胺</p>
34	 <p>1-(2-((二((9<i>Z</i>,12<i>Z</i>)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)氧基)-2-氧代乙基)胍</p>
35	 <p>2-((二((9<i>Z</i>,12<i>Z</i>)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)乙基) 2-(1<i>H</i>-咪唑-4-基)乙酸酯</p>

[0232]

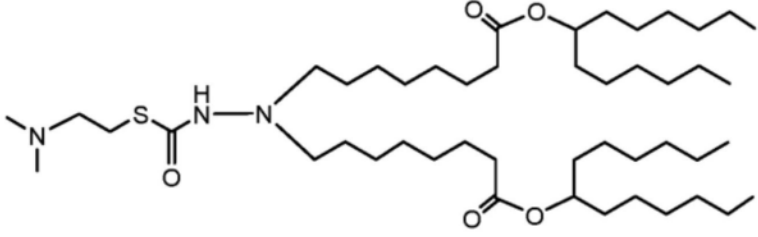
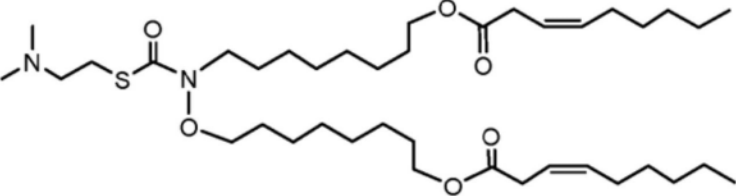
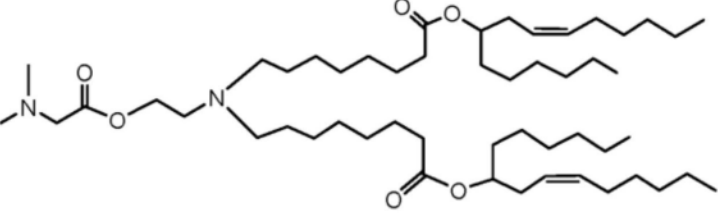
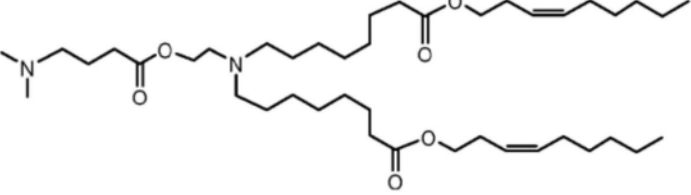
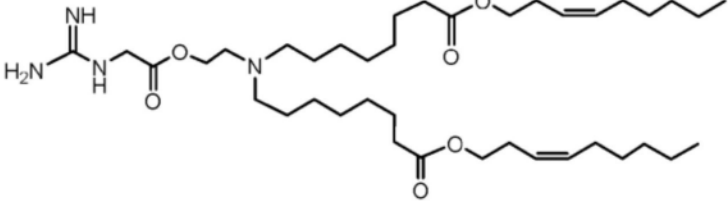
[0233]

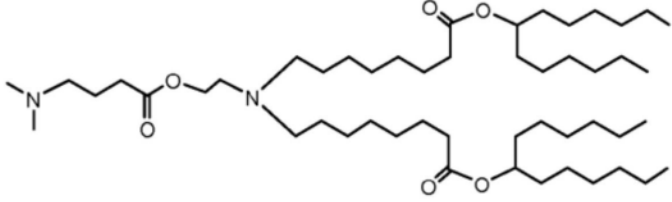
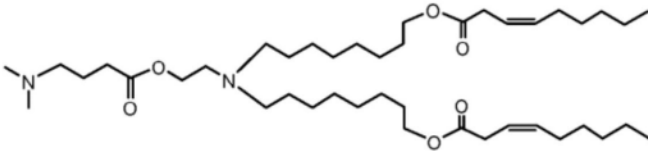
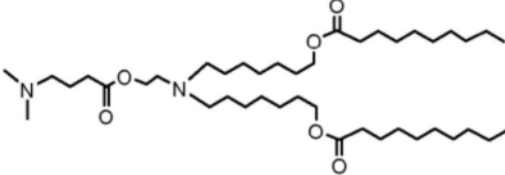
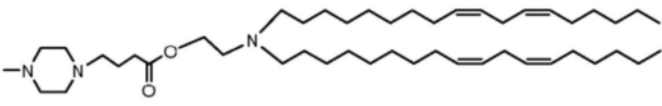
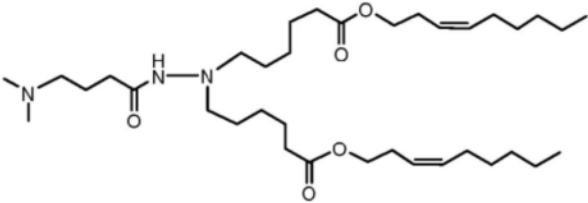
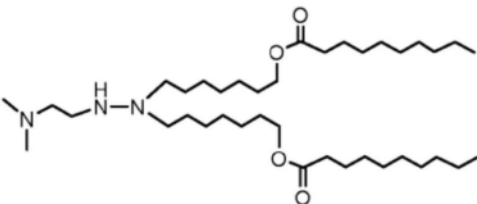
<p>36</p>	 <p>2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基乙基氨基甲亚胺酰基甘氨酸酯</p>
<p>37</p>	 <p>2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基乙基二甲基甘氨酸酯</p>
<p>38</p>	 <p>2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基乙基 4-(二甲基氨基)丁酸酯</p>
<p>39</p>	 <p>2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基乙基 L-组氨酸酯</p>
<p>40</p>	 <p>(1-(2-(二甲基氨基)乙基)胍-1,2-二基)双(辛烷-8,1-二基) (4Z,4'Z)-双(2-己基癸-4-烯酸酯)</p>
<p>41</p>	 <p>(1-(2-(二甲基氨基)乙基)胍-1,2-二基)双(辛烷-8,1-二基) (3Z,3'Z)-双(壬-3-烯酸酯)</p>

[0234]

42	 <p>二((Z)-壬-3-烯-1-基) 8,8'-(2-(2-(二甲基氨基)乙基)胍-1,1-二基)二辛酸酯</p>
43	 <p>二((Z)-十五碳-9-烯-7-基) 8,8'-(2-(2-(二甲基氨基)乙基)胍-1,1-二基)二辛酸酯</p>
44	 <p>二((Z)-十五碳-9-烯-7-基) 8,8'-(((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)氧基)氧烷二基)二辛酸酯</p>
45	 <p>二((Z)-壬-3-烯-1-基) 8,8'-(((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)氧基)氧烷二基)二辛酸酯</p>
46	 <p>二((Z)-十五碳-9-烯-7-基) 8,8'-(2-(((2-(二甲基氨基)乙基)硫代)羰基)胍-1,1-二基)二辛</p>

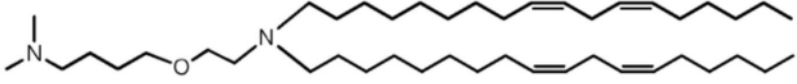
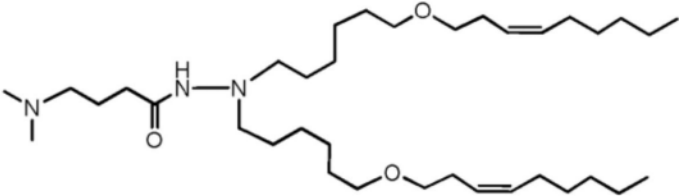
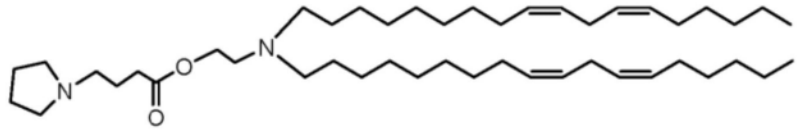
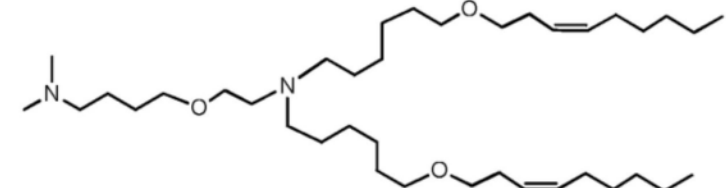
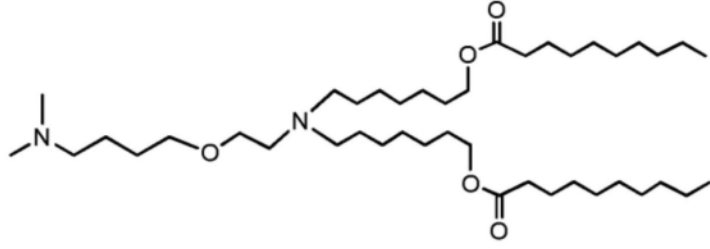
[0235]

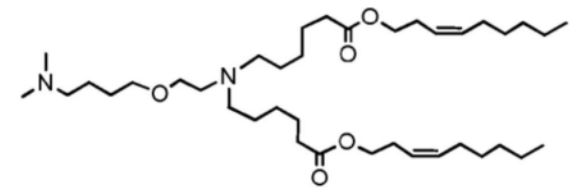
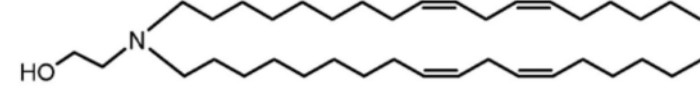
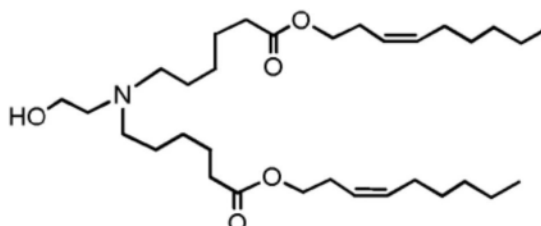
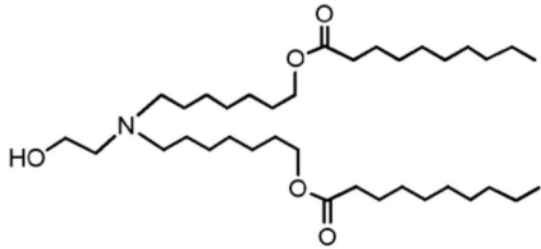
	酸酯
47	 <p>二(十三碳-7-基) 8,8'-((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫代)羰基)胍-1,1-二基)二辛酸酯</p>
48	 <p>8-(((2-(二甲基氨基)乙基)硫代)羰基)((8-((Z)-壬-3-烯酰基)氧基)辛基)氧基)氨基)辛基 (Z)-壬-3-烯酸酯</p>
49	 <p>二((Z)-十五碳-9-烯-7-基) 8,8'-((2-((二甲基甘氨酸酰基)氧基)乙基)氮烷二基)二辛酸酯</p>
50	 <p>二((Z)-壬-3-烯-1-基) 8,8'-((2-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)乙基)氮烷二基)二辛酸酯</p>
51	 <p>二((Z)-壬-3-烯-1-基) 8,8'-((2-((氨基甲亚胺酰基甘氨酸酰基)氧基)乙基)氮烷二基)二辛酸酯</p>

52	 <p>二(十三碳-7-基) 8,8'-((2-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)乙基)氮烷二基)二辛酸酯</p>
53	 <p>((2-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)乙基)氮烷二基)双(辛烷-8,1-二基) (3Z,3'Z)-双(壬-3-烯酸酯)</p>
54	 <p>((2-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)乙基)氮烷二基)双(庚烷-7,1-二基) 双(癸酸酯)</p>
55	 <p>2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)乙基 4-(4-甲基哌嗪-1-基)丁酸酯</p>
56	 <p>二((Z)-壬-3-烯-1-基) 6,6'-(2-(4-(二甲基氨基)丁酰基)肼-1,1-二基)二己酸酯</p>
57	 <p>(2-(2-(二甲基氨基)乙基)肼-1,1-二基)双(庚烷-7,1-二基) 双(癸酸酯)</p>

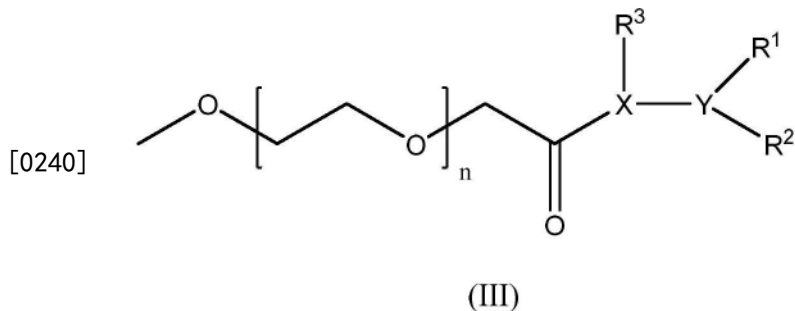
[0236]

[0237]

58	 <p>(9Z,12Z)-N-(2-(4-(二甲基氨基)丁氧基)乙基)-N-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)十八碳-9,12-二烯-1-胺</p>
59	 <p>4-(二甲基氨基)-N',N'-双(6-(((Z)-壬-3-烯-1-基)氧基)己基)丁烷酰肼</p>
60	 <p>2-(二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)乙基 4-(吡咯烷-1-基)丁酸酯</p>
61	 <p>N-(2-(4-(二甲基氨基)丁氧基)乙基)-6-(((Z)-壬-3-烯-1-基)氧基)-N-(6-(((Z)-壬-3-烯-1-基)氧基)己基)-1-胺</p>
62	 <p>((2-(4-(二甲基氨基)丁氧基)乙基)氮烷二基)双(庚烷-7,1-二基)双(癸酸酯)</p>

63	 <p>二((Z)-壬-3-烯-1-基) 6,6'-((2-(4-(二甲基氨基)丁氧基)乙基)氮烷二基)二己酸酯</p>
64 (中间体)	 <p>2-(二(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)乙-1-醇</p>
[0238] 65 (中间体)	 <p>二((Z)-壬-3-烯-1-基) 6,6'-((2-羟基乙基)氮烷二基)二己酸酯</p>
66 (中间体)	 <p>((2-羟基乙基)氮烷二基)双(庚烷-7,1-二基) 双(癸酸酯)</p>

[0239] 在另一方面中,本发明的阳离子脂质由式(III)的结构表示:



[0241] 其中

[0242] X和Y各自独立地是O、N或NH,其中X和Y两者不能均是O;

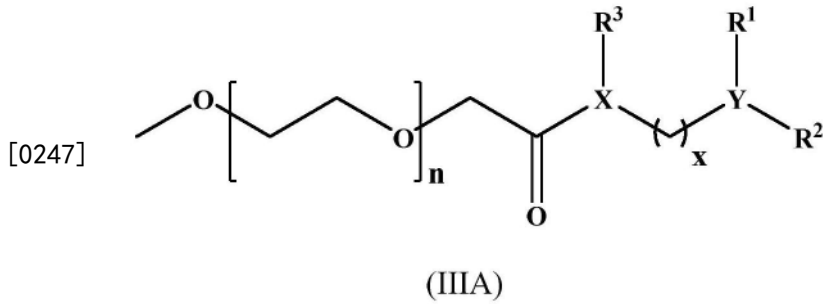
[0243] R^1 、 R^2 和 R^3 中的每个独立地不存在或是 C_{10} - C_{22} 烷基、 C_{10} - C_{22} 烯基或 C_{10} - C_{22} 炔基;并且

[0244] n是在1和30之间的整数;

[0245] 包括其盐、水合物、溶剂化物、多晶型物、光学异构体、几何异构体、对映异构体、非

对映异构体及混合物。

[0246] 在另一方面中,本发明的阳离子脂质由式(IIIA)的结构表示:



[0248] 其中

[0249] X和Y各自独立地是O、N或NH,其中X和Y两者不能均是O;

[0250] R^1 、 R^2 和 R^3 中的每个独立地不存在或是 C_{10} - C_{22} 烷基、 C_{10} - C_{22} 烯基或 C_{10} - C_{22} 炔基;

[0251] n是在1和30之间的整数;并且

[0252] x是0或2;

[0253] 包括其盐、水合物、溶剂化物、多晶型物、光学异构体、几何异构体、对映异构体、非对映异构体及混合物。

[0254] 在式(III)或式(IIIA)的一些实施方案中,X和Y各自独立地选自由O和N组成的组。在式(III)的其他实施方案中,X和Y各自独立地选自由O、N和NH组成的组。

[0255] 式(III)的化合物的具体实例是化合物67-70,化合物67-70的结构在表2中描绘。

[0256] 表2

化合物编号	化学结构/ 化学名称
67	
68	
69	
70	

[0258] 其中n如以上关于式(III)或式(IIIA)所定义。

[0259] 本发明的另外的实施方案

[0260] 在另外的实施方案中,本发明涉及阳离子脂质,该阳离子脂质包括由以下结构表

示的官能团：

[0261] $-W-(T=O)_m-X-(CH_2)_z-Y-$

[0262] 其中

[0263] X和Y各自独立地是O或N,其中X和Y两者不能均是O;

[0264] W是键、O、NH或S;

[0265] T是C或S;

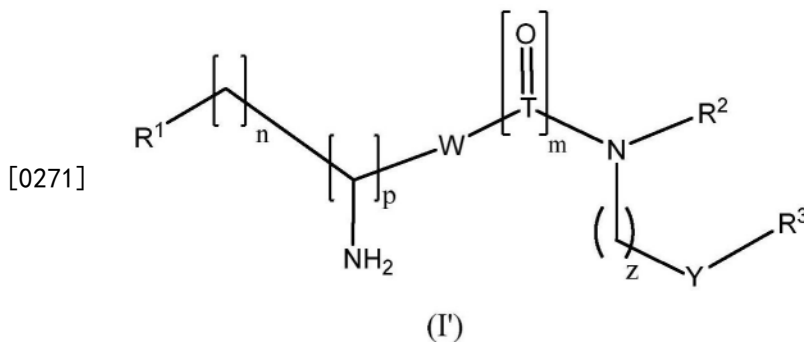
[0266] m是0或1;并且

[0267] z是0或2;

[0268] 其中官能团被连接至至少一个饱和的或不饱和的脂肪酸残基。

[0269] 在一些实施方案中,阳离子脂质包括对称地或不对称地连接至上述官能团的两个脂肪酸残基。

[0270] 在本发明的一个方面中,阳离子脂质由式(I')的结构表示:



[0272] 其中

[0273] Y是O或NH;

[0274] T是C或S;

[0275] W是键、O、NH或S;

[0276] R^1 选自由以下组成的组:

[0277] (a) NR^4R^5 ,其中 R^4 和 R^5 各自独立地是 C_1-C_4 烷基;或 R^4 和 R^5 与它们被附接到的氮一起形成5元或6元的杂环或杂芳香族环,该杂环或杂芳香族环任选地含有一个或更多个选自O、N和S的杂原子;或 NR^4R^5 表示胍基团($-NHC(=NH)NH_2$);

[0278] (b) 天然或非天然的氨基酸的侧链;以及

[0279] (c) 含有一个或更多个选自O、N和S的杂原子的5元或6元的杂环或杂芳香族环;

[0280] R^2 和 R^3 选自由以下组成的组:

[0281] (a) $C_{10}-C_{22}$ 烷基、 $C_{10}-C_{22}$ 烯基或 $C_{10}-C_{22}$ 炔基;以及

[0282] (b) C_4-C_{10} 亚烷基-Z- C_4-C_{22} 烷基,其中Z是 $-O-C(=O)-$ 或 $-C(=O)-O-$;

[0283] n是0、1、2、3、4、5或6;

[0284] m是0或1;

[0285] p是0或1;并且

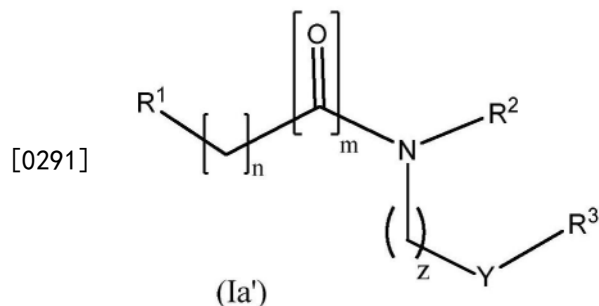
[0286] z是0或2;

[0287] 包括其盐、水合物、溶剂化物、多晶型物、光学异构体、几何异构体、对映异构体、非对映异构体及混合物。

[0288] 在一些实施方案中,式(I')的化合物包括选自胍、羟胺和酰肼的官能团。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

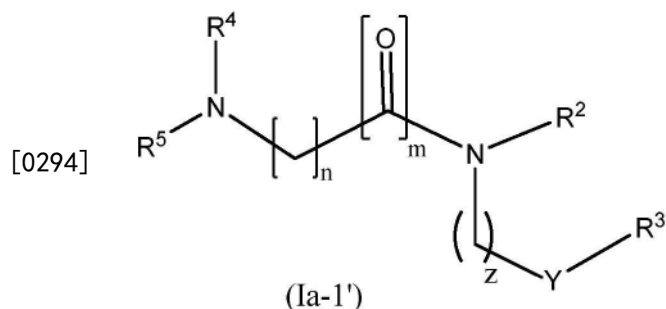
[0289] 在式(I')的一些实施方案中,m是0。在式(I')的其他实施方案中,m是1。在式(I')的其他实施方案中,p是0。在式(I')的其他实施方案中,p是1。在式(I')的其他实施方案中,m是0并且p是0。在式(I')的其他实施方案中,m是1并且p是0。在式(I')的其他实施方案中,z是0。在式(I')的其他实施方案中,z是2。在式(I')的其他实施方案中,T是C。在式(I')的其他实施方案中,W是键。在式(I')的其他实施方案中,R¹是NR⁴R⁵。

[0290] 在式(I')的一些代表性实施方案中,p是0,W是键并且T是C,并且化合物由式(Ia')的结构表示:

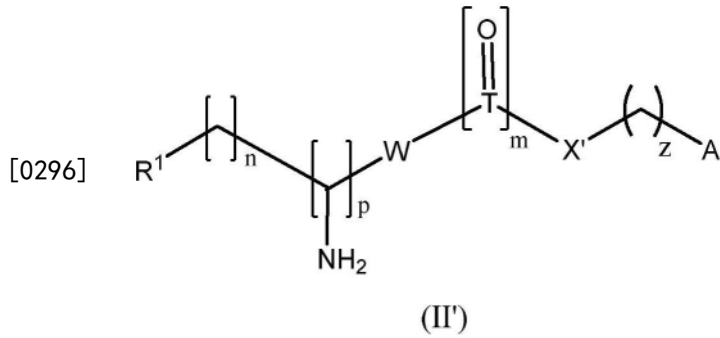


[0292] 其中R¹、R²、R³、Y、m、n和z如式(I')中定义。在式(Ia')的一些实施方案中,m是0。在式(Ia')的其他实施方案中,m是1。在式(Ia')的其他实施方案中,z是0。在式(Ia')的其他实施方案中,R²和R³各自独立地是C₁₄-C₂₀烷基或C₁₄-C₂₀烯基。在式(Ia')的其他实施方案中,R²和R³各自独立地是C₄-C₁₀亚烷基-Z-C₄-C₂₂烷基,其中Z是-O-C(=O)-或-C(=O)-O-。在式(Ia')的其他实施方案中,Y是O。在式(Ia')的其他实施方案中,Y是NH。

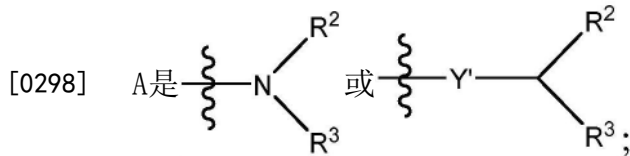
[0293] 在式(I')的其他代表性实施方案中,R¹是NR⁴R⁵,并且化合物由式(Ia-1')的结构表示:



[0295] 其中R²、R³、R⁴、R⁵、Y、m、n和z如式(I)中定义。在式(Ia-1')的一些实施方案中,R⁴和R⁵各自是CH₃。在式(Ia-1')的其他实施方案中,R⁴和R⁵与它们被附接到的氮一起形成选自吡咯烷基、哌啶基和哌嗪基的杂环,所述吡咯烷基、哌啶基和哌嗪基中的每个任选地被烷基取代。每种可能性代表本发明的单独实施方案。在本发明的另一方面中,阳离子脂质由式(II')的结构表示:

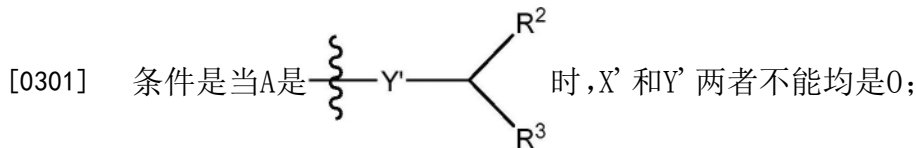


[0297] 其中



[0299] X' 是O或NH;

[0300] Y' 是O或NH;



[0302] T是C或S;

[0303] W是键、O、NH或S;

[0304] R¹选自以下组成的组:

[0305] (a) NR⁴R⁵, 其中R⁴和R⁵各自独立地是C₁-C₄烷基; 或R⁴和R⁵与它们被附接到的氮一起形成5元或6元的杂环或杂芳香族环, 该杂环或杂芳香族环任选地含有一个或更多个选自O、N和S的杂原子; 或NR⁴R⁵表示胍基团(-NHC(=NH)NH₂);

[0306] (b) 天然或非天然的氨基酸的侧链; 以及

[0307] (c) 含有一个或更多个选自O、N和S的杂原子的5元或6元的杂环或杂芳香族环;

[0308] R²和R³选自以下组成的组:

[0309] (a) C₁₀-C₂₂烷基、C₁₀-C₂₂烯基或C₁₀-C₂₂炔基; 以及

[0310] (b) C₄-C₁₀亚烷基-Z-C₄-C₂₂烷基, 其中Z是-O-C(=O)-或-C(=O)-O;

[0311] n是0、1、2、3、4、5或6;

[0312] m是0或1;

[0313] p是0或1; 并且

[0314] z是0或2;

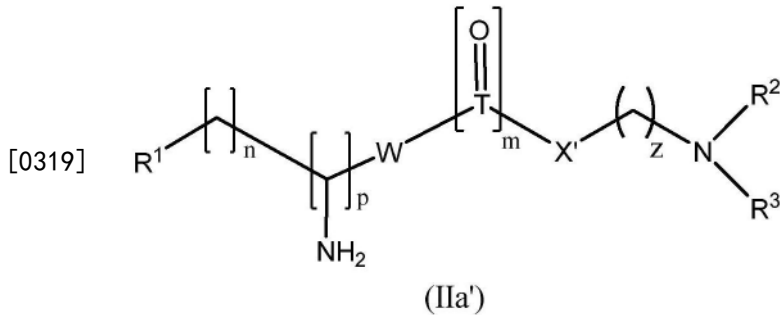
[0315] 包括其盐、水合物、溶剂化物、多晶型物、光学异构体、几何异构体、对映异构体、非对映异构体及混合物。

[0316] 在一些实施方案中, 式(II')的化合物包括选自胍、羟胺和酰胍的官能团。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0317] 在式(II')的一些实施方案中, m是0。在式(II')的其他实施方案中, m是1。在式(II')的其他实施方案中, m是1。在式(II')的其他实施方案中, m是1并且p是0。在式(II')的

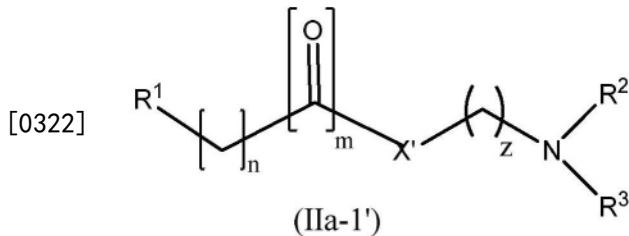
其他实施方案中, z 是 0。在式 (II') 的其他实施方案中, z 是 2。在式 (II') 的其他实施方案中, T 是 C。在式 (II') 的其他实施方案中, W 是键。

[0318] 在式 (II') 的一些代表性实施方案中, 阳离子脂质由式 (IIa') 的结构表示:



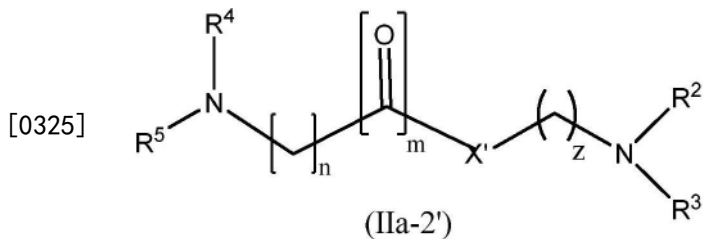
[0320] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 X' 、 T 、 W 、 n 、 m 、 p 和 z 如式 (II') 中定义。

[0321] 在式 (IIa') 的一些实施方案中, p 是 0, W 是键并且 T 是 C, 并且化合物由式 (IIa-1') 的结构表示:



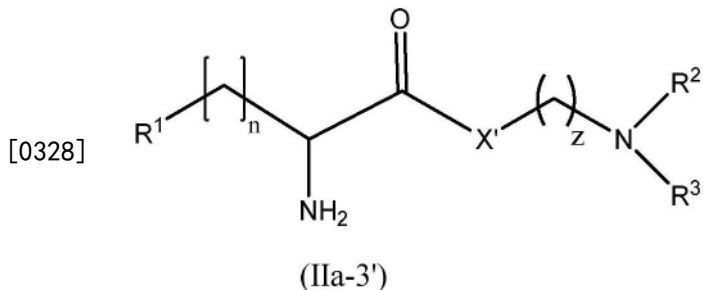
[0323] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 X' 、 n 、 m 和 z 如式 (II') 中定义。

[0324] 在式 (IIa') 的其他实施方案中, R^1 是 NR^4R^5 , 并且化合物由式 (IIa-2') 的结构表示:



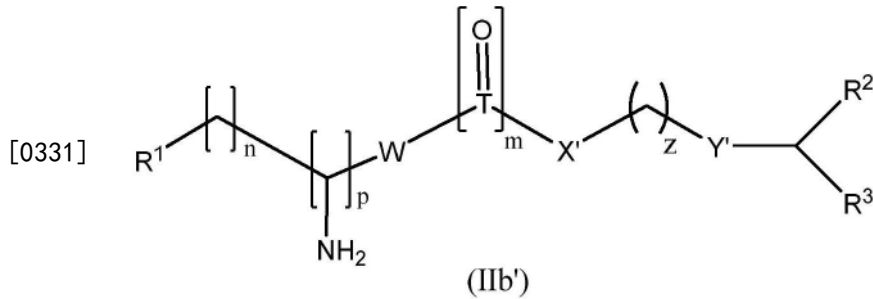
[0326] 其中 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 X' 、 n 、 m 和 z 如式 (II') 中定义。

[0327] 在式 (IIa') 的还其他实施方案中, p 是 1, m 是 1, W 是键并且 T 是 C, 并且化合物由式 (IIa-3') 的结构表示:



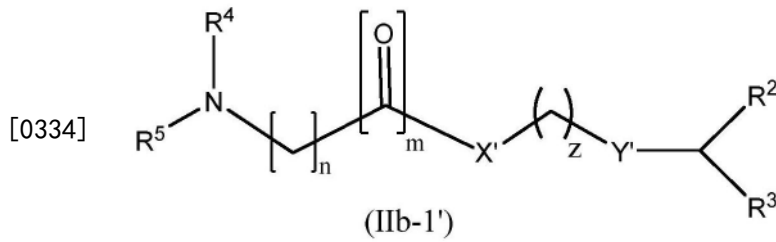
[0329] 其中 R^1 是天然或非天然的氨基酸的侧链; 并且 R^1 、 R^2 、 R^3 、 X' 、 n 和 z 如式 (II) 中定义。

[0330] 在式 (II') 的其他代表性实施方案中, 阳离子脂质由式 (IIb') 的结构表示:



[0332] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 T 、 W 、 X' 、 Y' 、 n 、 m 、 p 和 z 如式(II')中定义。

[0333] 在式(IIb')的一些代表性实施方案中, p 是0, W 是键, T 是C,并且 R^1 是 NR^4R^5 ,并且化合物由式(IIb-1')的结构表示:



[0335] 其中 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 X' 、 Y' 、 n 、 m 和 z 如式(II')中定义。

[0336] 在式(II')、式(IIa')、式(IIa-1')、式(IIa-2')、式(IIa-3')、式(IIb')和式(IIb-1')中任一个的化合物的一些实施方案中, R^2 和 R^3 各自独立地是 C_{14} - C_{20} 烷基或 C_{14} - C_{20} 烯基。

[0337] 在式(II')、式(IIa')、式(IIa-1')、式(IIa-2')、式(IIa-3')、式(IIb')和式(IIb-1')中任一个的化合物的其他实施方案中, R^2 和 R^3 各自独立地是 C_4 - C_{10} 亚烷基-Z- C_4 - C_{22} 烷基,其中Z是-O-C(=O)-或-C(=O)-O-。

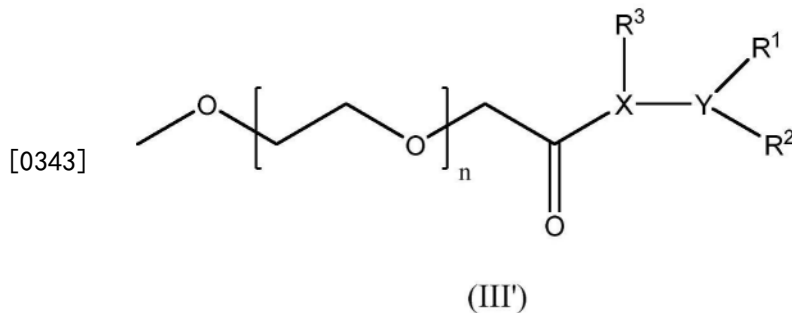
[0338] 在式(II')、式(IIa')、式(IIa-1')、式(IIa-2')、式(IIa-3')、式(IIb')和式(IIb-1')中任一个的化合物的其他实施方案中, X' 是O。

[0339] 在式(II')、式(IIa')、式(IIa-1')、式(IIa-2')、式(IIa-3')、式(IIb')和式(IIb-1')中任一个的化合物的其他实施方案中, X' 是NH。

[0340] 在式(II')、式(IIa')、式(IIa-1')、式(IIa-2')、式(IIa-3')、式(IIb')和式(IIb-1')中任一个的化合物的其他实施方案中, Y' 是NH。

[0341] 在式(II')、式(IIa')、式(IIa-1')、式(IIa-2')、式(IIa-3')、式(IIb')和式(IIb-1')中任一个的化合物的其他实施方案中, R^4 和 R^5 各自是 CH_3 ,或其中 R^4 和 R^5 与它们被附接到的氮一起形成选自吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基的杂环,所述吡咯烷基、哌啶基和哌嗪基中的每个任选地被烷基取代。

[0342] 在另一方面中,本发明的阳离子脂质由式(III')的结构表示:



[0344] 其中

[0345] X和Y各自独立地是O或N;

[0346] R^1 、 R^2 和 R^3 中的每个独立地不存在或是 C_{10} - C_{22} 烷基、 C_{10} - C_{22} 烯基或 C_{10} - C_{22} 炔基;并且

[0347] n是1至30;

[0348] 包括其盐、水合物、溶剂化物、多晶型物、光学异构体、几何异构体、对映异构体、非对映异构体及混合物。

[0349] 化学定义

[0350] “烷基”基团是指任何饱和脂肪族烃,包括直链和支链烷基基团。在一个实施方案中,烷基基团具有1-4个碳,在此被称为 C_1 - C_4 -烷基。在另一个实施方案中,烷基基团具有10-22个碳,在此被称为 C_{10} - C_{22} -烷基。在另一个实施方案中,烷基基团具有4-10个碳,在此被称为 C_4 - C_{10} -烷基。在另一个实施方案中,烷基基团具有4-22个碳,在此被称为 C_4 - C_{22} -烷基。烷基基团可以是未被取代的或被一个或更多个选自卤素、羟基、烷氧基羰基、酰氨基、烷基酰氨基、二烷基酰氨基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、羧基、硫代和硫代烷基的基团取代。

[0351] “烯基”基团是指含有至少一个碳-碳双键的脂肪族烃基团,包括直链、支链和环状的烯基基团。在一个实施方案中,烯基基团具有10-22个碳,在此被称为 C_{10} - C_{22} -烯基。在另一个实施方案中,烯基基团具有4-10个碳,在此被称为 C_4 - C_{10} -烯基。在另一个实施方案中,烯基基团具有4-22个碳,在此被称为 C_4 - C_{22} -烯基。示例性的烯基基团包括乙烯基、丙烯基、正丁烯基、异丁烯基、3-甲基丁-2-烯基、正戊烯基、庚烯基、辛烯基、环己基-丁烯基和癸烯基。烯基基团可以是未被取代的或通过可用的碳原子被上文关于烷基定义的一个或更多个基团取代。

[0352] “炔基”基团是指含有至少一个碳-碳三键的脂肪族烃基团,包括直链和支链。在一个实施方案中,炔基基团具有10-22个碳,在此被称为 C_{10} - C_{22} -炔基。在另一个实施方案中,炔基基团具有4-10个碳,在此被称为 C_4 - C_{10} -炔基。在另一个实施方案中,炔基基团具有4-22个碳,在此被称为 C_4 - C_{22} -炔基。示例性的炔基基团包括乙炔基、丙炔基、正丁炔基、2-丁炔基、3-甲基丁炔基、正戊炔基、庚炔基、辛炔基和癸炔基。炔基基团可以是未被取代的或通过可用的碳原子被上文关于烷基定义的一个或更多个基团取代。

[0353] 本文单独地或作为另一个基团的一部分使用的术语“杂芳基”是指含有至少一个杂原子环的杂芳香族体系,其中原子选自氮、硫和氧。杂芳基含有5个或更多个环原子。杂芳基基团可以是单环的、双环的、三环的以及类似的。在此定义中还包括苯并杂环。如果氮是环原子,则本发明还预期含氮杂芳基的N-氧化物。杂芳基部分的非限制性实例包括噻吩基、苯并噻吩基、1-萘并噻吩基、噻蒎基、呋喃基、苯并呋喃基、吡咯基、咪唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、吲哚基、异吲哚基、吲唑基、嘌呤基、异喹啉基、喹啉基、萘啶基、喹喔啉基、喹唑啉基、噌啉基、蝶啶基、咔啉基、噻唑基、噁唑基、异噻唑基、异噁唑基和类似物。杂芳基基团可以是未被取代的或通过可用的原子被上文关于烷基定义的一个或更多个基团取代。

[0354] 本文单独地或作为另一个基团的一部分使用的术语“杂环”或“杂环基”是指具有1个至4个杂原子的5元至8元环,该杂原子诸如氧、硫和/或氮,特别是单独的氮或与硫环原子或氧环原子结合的氮。这些5元至8元环可以是饱和的、完全不饱和的或部分不饱和的,其中

完全饱和的环是优选的。优选的杂环部分包括哌啶基、吡咯烷基、哌嗪基、吡咯啉基、吡唑啉基、吡唑烷基、吗啉基、硫代吗啉基、吡喃基、硫代吡喃基、二氢吲哚基、二氢呋喃基、四氢呋喃基、二氢噻吩基、四氢噻吩基、二氢吡喃基、四氢吡喃基、二氢噻唑基和类似物。在一些实施方案中，环状基团是吡咯烷基。在其他实施方案中，杂芳基或杂环基基团是哌啶基。在其他实施方案中，杂环基基团是哌啶。杂环基基团可以是未被取代的或通过可用的原子被上文关于烷基定义的一个或更多个基团取代。

[0355] 如本文在说明书和以下权利要求部分中使用的，术语“氨基酸(amino acid)”或“氨基酸(amino acids)”应理解为包括20种天然存在的氨基酸，即，丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。每种可能性代表本发明的单独实施方案。根据其他实施方案，术语氨基酸是指非天然氨基酸或合成氨基酸。

[0356] 此外，术语“氨基酸”包括D-氨基酸和L-氨基酸两者。根据本发明的原理，术语“氨基酸侧链”是指式 $H_2N-C(R)-COOH$ 的氨基酸的基团“R”。

[0357] 术语“胼”部分是指基团“-NH-NH-”。

[0358] 如本文使用的术语“羟胺”部分是指基团“-NH-O-”。

[0359] 如本文使用的术语“酰胼”部分是指基团“-C(=O)-N-N-”。

[0360] 如本文使用的术语“乙醇胺”部分是指基团“-O-CH₂-CH₂-N-”或“-N-CH₂-CH₂-O-”。

[0361] 如本文使用的术语“乙二胺”部分是指基团“-N-CH₂-CH₂-N-”或“-N-CH₂-CH₂-N-”。

[0362] 如本文使用的术语“胍”是指基团-NHC(=NH)NH₂。

[0363] 如本文使用的术语“离去基团”是指容易被另一个部分替代的任何不稳定的离去基团。在一些实施方案中，离去基团选自自由以下组成的组：卤素、磺酰基氧基和-OC(O)R'，其中R'是烷基、芳基或烷基芳基。在一些优选的实施方案中，离去基团选自自由以下组成的组：Cl、Br、I、甲磺酸酯(OMs)、三氟甲磺酸酯(OTf)和甲苯磺酸酯(OTs)。在当前优选的实施方案中，离去基团X是Br。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0364] 术语“保护基团”是指用于在化学合成期间封闭反应性位点的化学残基，该化学残基能够使化学反应在多官能化合物中的一个反应位点处选择性地进行的，其他反应性位点必须被临时封闭。用于封闭这些反应性位点的残基被称为保护基团。

[0365] 如本文可互换地使用的术语“氮保护基团”或“N保护基团”或“氨基保护基团”是指键合至氨基基团的容易裂解的基团。氨基-保护基团的实例包括叔丁氧基羰基(BOC)、苄氧基羰基、乙酰基、苯基羰基或甲硅烷基基团，该甲硅烷基基团可以被烷基取代(三烷基甲硅烷基)、被芳基取代(三芳基甲硅烷基)或被其组合取代(例如，二烷基苯基甲硅烷基)，例如，三甲基甲硅烷基(TMS)或叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)。羟基保护基团的其他实例包括例如，C₁-C₄烷基(例如，甲基、乙基、丙基、丁基和类似物)；-CH₂Ph(苄基或bz1)；烯丙基(A11)；(烯丙基)-CO-(C₁-C₆烷基)；-SO₂-(C₁-C₆烷基)；-SO₂-芳基；-CO-Ar，其中Ar是如以上定义的芳基基团；以及-CO-(C₁-C₆烷基)Ar(例如，羧基苄基(Bz)基团)。羟基保护基团的其他实例包括酸敏感保护基团，诸如四氢吡喃基(THP)、甲氧基甲基(MOM)、三苯基甲基(Trityl)和二甲氧基三苯基甲基(DMT)。每种可能性代表本发明的单独实施方案。保护基团可以通过应用如本领域已知的脱保护剂来除去。并入和脱保护的方法通过以下来描述：C.B.Reese和E.Haslam, "Protective Groups in Organic Chemistry," J.G.W.McOmie, 编辑, Plenum

Press, New York, NY, 1973, 分别地第3章和第4章, 以及T.W.Greene和P.G.M.Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 第2版, John Wiley and Sons, New York, NY, 1991以及A.J.Pearson和W.R.Roush, Activating Agents and Protecting Groups, John Wiley and Sons (1999), 其中的每一篇的内容通过引用以其整体并入。根据一些实施方案, 药学上可接受的盐包括“酸”加成盐和“碱”加成盐两者, 该“酸”加成盐和“碱”加成盐保留酸或碱的生物学效力。

[0366] 本发明的阳离子脂质中的一种或更多种可以作为盐存在。术语“盐”包括碱加成盐和酸加成盐两者, 包括但不限于, 羧酸盐或与胺氮的盐, 并且包括用以下讨论的有机和无机的阴离子和阳离子形成的盐。此外, 该术语包括通过与碱性基团(诸如氨基基团)和有机酸或无机酸的标准酸-碱反应形成的盐。这样的酸包括盐酸、氢氟酸、三氟乙酸、硫酸、磷酸、乙酸、琥珀酸、柠檬酸、乳酸、马来酸、富马酸、棕榈酸、胆酸、帕莫酸、粘液酸、D-谷氨酸、D-樟脑酸、戊二酸、邻苯二甲酸、酒石酸、月桂酸、硬脂酸、水杨酸、甲磺酸、苯磺酸、山梨酸、苦味酸、苯甲酸、肉桂酸和类似的酸。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0367] 术语“有机或无机阳离子”是指盐的阴离子的抗衡离子。抗衡离子包括但不限于, 碱金属和碱土金属(诸如锂、钠、钾、钡、铝和钙); 铵以及单烷基胺、二烷基胺和三烷基胺, 诸如三甲胺、环己胺; 以及有机阳离子, 诸如二苄基铵、苄基铵、2-羟基乙基铵、双(2-羟基乙基)铵、苄基乙基苄基铵、二苄基亚乙基二铵和类似的阳离子。参见, 例如, Berge等人, J.Pharm.Sci. (1977), 66:1-19, 该文献通过引用并入本文。

[0368] 组合物和治疗用途

[0369] 在一些方面, 本发明提供组合物和药学上可接受的赋形剂, 该组合物包括根据式(I)、式(Ia)、式(Ia-1)、式(II)、式(IIa)、式(IIa-1)、式(IIa-2)、式(IIa-3)、式(IIa-4)、式(IIb)和式(IIb-1)中任一个的阳离子脂质, 例如, 化合物1至66中的任一个。该组合物还可以包括至少一种另外的中性脂质或PEG修饰的脂质。

[0370] 在一些实施方案中, 组合物还可以包括核酸。核酸的实例包括小干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)、反义寡核苷酸、信使RNA(mRNA)、核酶、pDNA、CRISPR mRNA、gRNA和免疫刺激核酸。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0371] 在一些实施方案中, 本发明提供基因沉默的方法, 该方法包括使细胞与包括本发明的阳离子脂质的组合物接触的步骤。在一些实施方案中, 细胞是癌细胞。

[0372] 在其他实施方案中, 组合物还包括一种或更多种选自由以下组成的组的组分: 中性脂质、带电荷的脂质、类固醇和聚合物缀合的脂质。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0373] 在其他实施方案中, 本发明的组合物可以用作递送系统, 以将治疗剂施用至其在身体中的靶位置。因此, 在一些实施方案中, 本发明涉及用于施用治疗剂的方法, 所述方法是通过制备包括如本文描述的阳离子脂质和治疗剂的组合物并且将该组合施用至需要其的受试者。

[0374] 在特定的实施方案中, 本发明提供新颖的阳离子脂质, 该新颖的阳离子脂质能够配制改善的组合物, 以用于IVT-mRNA和/或其他寡核苷酸的体外和体内递送。

[0375] 在一些实施方案中, 这些脂质纳米颗粒组合物对于由mRNA编码的蛋白质的表达是有用的。

[0376] 在其他实施方案中,这些改善的脂质纳米颗粒组合物通过递送miRNA抑制剂对于内源性蛋白质表达的上调是有用的,所述miRNA抑制剂靶向一种特异性miRNA或靶向调节一种靶mRNA或若干mRNA的miRNA组。

[0377] 在其他实施方案中,这些改善的脂质纳米颗粒组合物对于下调(例如,沉默)靶基因的蛋白质水平和/或mRNA水平是有用的。

[0378] 在一些其他实施方案中,脂质纳米颗粒对于递送用于转基因的表达的mRNA和质粒也是有用的。

[0379] 在还其他实施方案中,脂质纳米颗粒组合物对于诱导由蛋白质的表达产生的药理学作用是有用的,例如,通过递送合适的红细胞生成素mRNA增加红细胞的产生,或通过递送对合适的抗体编码的mRNA保护以免感染。

[0380] 根据一些实施方案,阳离子脂质可以呈纳米颗粒的形式,并且按原样施用。在一些实施方案中,纳米颗粒可以在溶液中施用。在一些实施方案中,纳米颗粒可以被配制合适的药物组合物以通过任何期望的施用途径被施用。示例性的施用途径包括诸如但不限于以下的途径:局部途径、口服途径或肠胃外途径。取决于预期的施用模式,所使用的组合物可以呈固体剂型、半固体剂型或液体剂型的形式,诸如,例如片剂、栓剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、液体、悬浮液或类似物,优选地呈适合用于单次施用精确剂量的单位剂型。药物组合物可以包括阳离子颗粒、药学上可接受的赋形剂,并且任选地可以包括其他药物制剂、药剂、载体、佐剂和类似物。优选的是,药学上可接受的载体是对于包封在颗粒内的核酸惰性并且在使用条件下不具有有害的副作用或毒性的载体。在一些实施方案中,施用是局部化的。在一些实施方案中,施用是全身的。

[0381] 在一些实施方案中,用于肠胃外施用的可注射制剂可以被制备为液体溶液或悬浮液、适合用于在注射之前溶解或悬浮在液体中的固体形式,或制备为乳剂。合适的赋形剂是例如水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇或类似物。此外,如果需要,待施用的药物组合物还可以含有少量的无毒辅助物质诸如湿润剂或乳化剂、pH缓冲剂和类似物,诸如例如乙酸钠、脱水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯和类似物。水性注射悬浮液还可以含有增加悬浮液的粘度的物质,包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或右旋糖酐。任选地,悬浮液还可以含有稳定剂。肠胃外制剂可以存在于单位剂量或多剂量密封的容器诸如安瓿和小瓶中,并且可以储存在冷冻干燥(冻干)条件中,仅需要在使用之前立即添加无菌液体载体诸如例如水以用于注射。在一些实施方案中,肠胃外施用包括静脉内施用。

[0382] 在其他实施方案中,为了口服施用,药学上可接受的无毒组合物可以通过并入任何通常使用的赋形剂来形成,赋形剂诸如例如甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、交联羧甲基纤维素钠、葡萄糖、明胶、蔗糖、碳酸镁和类似物。这样的组合物包括溶液、悬浮液、片剂、可分散片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、持续释放制剂和类似物。适合用于口服施用的制剂可以由以下组成:液体溶液,诸如溶解于稀释剂诸如水、盐水或橙汁中的有效量的化合物;小袋、锭剂(lozenge)和锭剂(troche),每种含有预定量的作为固体或粒剂的活性成分;粉末;在适当的液体中的悬浮液;以及合适的乳剂。液体制剂可以包括稀释剂诸如水和醇,(诸如,例如乙醇、苄醇和聚乙烯醇),添加或不添加药学上可接受的表面活性剂、悬浮剂或乳化剂。

[0383] 在确定待施用的颗粒的剂量时,施用的剂量和频率可以关于包封在颗粒内的特定

核酸的药理学性质来选择。

[0384] 在一些代表性实施方案中,取决于核酸、特异性靶白细胞以及类似的特性,包括核酸诸如例如siRNA、miRNA、shRNA、反义RNA和类似物的颗粒,可以用于治疗各种白细胞相关的状况。在一些实施方案中,包封在颗粒内的核酸可以是能够诱导靶基因的沉默的核酸。在一些实施方案中,靶基因可以是其表达与待治疗的状况相关的任何基因。在一些实施方案中,靶基因可以是选自但不限于以下的基因:生长因子(诸如EGFR、PDGFR)、与血管生成路径相关的基因(诸如VEGF、整联蛋白)、细胞内信号传导路径和细胞周期调节中所涉及的基因(诸如PI3K/AKT/mTOR、Ras/Raf/MAPK、PDK1、CHK1、PLK1、细胞周期蛋白)。在一些实施方案中,各自具有一种或更多种靶的核酸的组合可以被包封在颗粒内。

[0385] 根据一些实施方案,可以通过靶向的颗粒治疗的示例性白细胞相关的状况可以选自但不限于:各种类型的癌症、各种感染(诸如,例如病毒感染、细菌感染、真菌感染以及类似感染)、自身免疫疾病、神经退行性疾病、炎症以及类似状况。

[0386] 在一些代表性实施方案中,包括核酸(诸如,siRNA或miRNA、shRNA、反义RNA或类似物)的靶向的颗粒可以用于治疗癌症。

[0387] 在一些实施方案中,癌症是这样的紊乱:其中细胞群体已经在不同程度上变得对于通常掌控增殖和分化的控制机制无响应。在一些实施方案中,癌症是血癌。血癌的非限制性实例是淋巴瘤、白血病和骨髓瘤。淋巴瘤可以被分为两类:霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。大多数非霍奇金淋巴瘤是快速地(高级)或缓慢地(低级)生长的B细胞淋巴瘤。存在14种类型的B细胞非霍奇金淋巴瘤。其他淋巴瘤是T细胞淋巴瘤。

[0388] 在一些代表性实施方案中,可以用于治疗癌症的核酸是针对细胞周期的调节中所涉及的靶基因。在一些代表性实施方案中,靶基因可以是Polo样激酶1(PLK)、细胞周期蛋白D1、CHK1、Notch路径基因。

[0389] 根据一些示例性实施方案,脂质颗粒的多种脂质可以是天然来源的或合成来源的,并且可以选自但不限于:阳离子脂质、磷脂酰乙醇胺、离子化脂质、膜稳定脂质、磷脂质以及类似物,或其组合。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0390] 在一些实施方案中,膜稳定脂质可以选自但不限于:胆固醇、磷脂质(诸如,例如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、二磷脂酰甘油)、脑磷脂、鞘脂(鞘磷脂和鞘糖脂)、甘油糖脂(glycoglycerolipid)及其组合。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0391] 在一些实施方案中,磷脂酰乙醇胺可以选自但不限于:1,2-二月桂酰基-L-磷脂酰基-乙醇胺(DLPE)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DPhPE)、1,3-二棕榈酰基-sn-甘油基-2-磷酸乙醇胺(1,3-DPPE)、1-棕榈酰基-3-油酰基-sn-甘油基-2-磷酸乙醇胺(1,3-POPE)、生物素-磷脂酰乙醇胺、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DMPE)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DSPE)或其组合。在一些实施方案中,磷脂酰乙醇胺可以缀合至PEG-胺衍生物。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0392] 根据一些实施方案,“中性脂质”是指在生理学pH以不带电荷或中性两性离子形式存在的许多脂质物质中的任何一种,这样的脂质包括但不限于,磷脂酰胆碱,诸如1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPPC)、

1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DMPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC);磷脂酰乙醇胺,诸如1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE);鞘磷脂(SM);神经酰胺;类固醇诸如固醇以及它们的衍生物。中性脂质可以是合成的或天然衍生的。

[0393] 根据一些实施方案,颗粒(其脂质相)还可以包括一种或更多种PEG衍生物。在一些实施方案中,PEG衍生物可以缀合至一种或更多种另外的分子诸如脂质。在一些实施方案中,PEG衍生物选自但不限于:PEG-DMG3-N-(-甲氧基聚(乙二醇)2000)氨基甲酰基-1,2-二肉豆蔻基甘油;PEG-cDMA3-N-(-甲氧基聚(乙二醇)2000)氨基甲酰基-1,2-二肉豆蔻基氧基丙胺;PEG-cDSA,3-N-(-甲氧基聚(乙二醇)2000)氨基甲酰基-1,2-二硬脂酰基氧基丙胺;DSPE-PEG;PEG-马来酰亚胺;DSPE-PEG-马来酰亚胺或其组合。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0394] 在一些实施方案中,马来酰亚胺衍生物/部分可以被缀合、附接或连接至PEG-衍生物,该PEG-衍生物本身可以被缀合、连接和/或附接至脂质。

[0395] 根据一些实施方案,颗粒中各种脂质之间的比率可以变化。在一些实施方案中,比率是摩尔比。在一些实施方案中,比率是重量比。在一些实施方案中,脂质组中的每种可以以约1%-99%的摩尔比/重量比。

[0396] 根据一些实施方案,核酸和脂质混合物之间的重量比可以被调节,以便在靶位点上通过核酸实现最大生物学效应。在一些实施方案中,核酸和脂质相之间的比率可以是1:1。例如,核酸和脂质相之间的重量比可以是1:2。例如,核酸和脂质相之间的重量比可以是1:5。例如,核酸和脂质相之间的重量比可以是1:10。例如,核酸和脂质相之间的重量比可以是1:16。例如,核酸和脂质相之间的重量比可以是1:20。在一些实施方案中,核酸和脂质相之间的重量比是约1:1至1:20(w:w)。

[0397] 在一些实施方案中,颗粒是纳米颗粒。在一些实施方案中,颗粒(包括包封在其中的核酸)和表面颗粒上的靶向部分具有在约10nm至约500nm的范围内的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有在约10nm至约350nm的范围内的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有在约50nm至约250nm的范围内的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有在约10nm至约200nm的范围内的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有在约20nm至约200nm的范围内的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有在约50nm至约200nm的范围内的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有在约75nm至约200nm的范围内的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有在约90nm至约200nm的范围内的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有在约100nm至约200nm的范围内的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有在约120nm至约200nm的范围内的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有在约150nm至约200nm的范围内的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有在约50nm至约150nm的范围内的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有在超过约10nm的范围内的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有超过约20nm的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有超过约30nm的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有超过约40nm的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有超过约50nm的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有超过约60nm的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有超过约70nm的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有超过约80nm的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有超过约90nm的粒度(直径)。在一些实施方

案中,颗粒具有超过约100nm的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有超过约200nm的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒具有不大于约500nm的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒(包括包封在其中的核酸)具有在约5nm至约200nm的范围内的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒(包括包封在其中的核酸)具有在约50nm至约60nm的范围内的粒度(直径)。在一些实施方案中,颗粒(包括包封在其中的核酸)具有在约55nm至约58nm的范围内的粒度(直径)。在一些实施方案中,尺寸是流体动力学直径。

[0398] 根据示例性实施方案,颗粒可以包括阳离子脂质(诸如表1或表2中示出的化合物)、胆固醇、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)、PEG衍生物(诸如DMG-PEG)以及以各种mol:mol比缀合至脂质并且还缀合至靶向部分的PEG-马来酰亚胺(诸如DSPE-PEG-马来酰亚胺),其中靶向部分被缀合、连接、附接至马来酰亚胺部分。例如,脂质相可以包括:阳离子脂质(DLinMC3)/DSPC/胆固醇/DMG-PEG/DSPE-PEG-马来酰亚胺(mol/mol 150:10:38:1.5:0.5)。例如,脂质相可以包括:DLinMC3-DMA/胆固醇/DSPC/DMG-PEG/DSPE-PEG-马来酰亚胺(mol/mol 50:38:10:1.95:0.05)。

[0399] 根据一些实施方案,脂质相可以包括约30%-60%(mol)阳离子脂质。例如,阳离子脂质可以构成脂质相的约40%-50%(mol)。

[0400] 根据一些实施方案,脂质相可以包括约20%-70%(mol)膜稳定脂质。例如,膜稳定脂质可以构成脂质相的约40%-60%。在一些实施方案中,脂质相中可以使用多于一种类型的膜稳定脂质。例如,膜稳定脂质可以包括胆固醇(脂质相的约30%-50%(mol))和磷脂质(诸如,例如DSPC),该磷脂质可以是脂质相的约5%-15%(mol)。

[0401] 根据一些实施方案,脂质相可以包括约0.01%-3%(mol:mol)的PEG-马来酰亚胺(任选地缀合至脂质)。例如,PEG-马来酰亚胺可以构成脂质混合物的约0.05%-0.6%。

[0402] 根据一些实施方案,另外的PEG-衍生物(缀合至脂质)可以构成脂质相组合物的约0.5%-10%。

[0403] 根据一些示例性实施方案,提供了用于制备靶向的颗粒以用于将核酸递送至白细胞的方法,该方法包括以下步骤中的一个或多个:

[0404] a) 在有机溶剂中以期望的比率混合多种脂质,多种脂质包括根据本发明的阳离子脂质、膜稳定脂质和缀合至磷脂质的PEG-马来酰亚胺;

[0405] b) 在合适的溶液中以期望的比率将核酸添加至混合物;

[0406] c) 在微流体微混合器中将脂质混合物和核酸混合以形成颗粒;

[0407] d) 渗析颗粒以除去不期望的溶剂;

[0408] e) 将颗粒与减少的(reduced)靶向抗体一起孵育以产生靶向的颗粒;

[0409] f) 任选地通过凝胶过滤,除去未缀合的抗体;

[0410] g) 过滤包封核酸分子的重构t-缀合的颗粒;

[0411] 在一些实施方案中,将脂质悬浮于酸性水性缓冲剂诸如乙醇中。在一些实施方案中,核酸在乙酸盐缓冲剂溶液中。

[0412] 在一些实施方案中,核酸可以在微流化器混合器中与脂质混合物混合,以形成包封/携带核酸的颗粒。

[0413] 定义

[0414] 为了促进理解本发明,以下定义许多术语和措辞。应理解,这些术语和措辞是为了

描述的目的而不是为了限制的目的,使得本说明书的术语或措辞将由技术人员根据本文呈现的教导和指导结合本领域普通技术人员的知识来理解。

[0415] 如本文提及的,术语“核酸”、“核酸分子”、“寡核苷酸”、“多核苷酸”和“核苷酸”在本文中可互换地使用。该术语涉及脱氧核糖核苷酸(DNA)、核糖核苷酸(RNA)及其修饰的形式的聚合物,所述聚合物呈单独的片段或作为较大构建体的组分、直链或支链的、单链、双链、三链或其杂合体的形式。该术语还包括RNA/DNA杂合体。多核苷酸可以包括DNA或RNA的有义寡核苷酸和反义寡核苷酸(sense and antisense oligonucleotide)或多核苷酸序列。DNA或RNA分子可以是,例如,但不限于:互补DNA(cDNA)、基因组DNA、合成的DNA、重组DNA或其杂合体,或RNA分子,诸如,例如,mRNA、shRNA、siRNA、miRNA、反义RNA和类似物。每种可能性代表本发明的单独实施方案。该术语还包括包含天然存在的碱基、糖和共价的核苷间键的寡核苷酸,以及具有非天然存在的部分的寡核苷酸,所述非天然存在的部分的功能类似于相应的天然存在的部分。

[0416] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换地用于指氨基酸残基的聚合物。该术语应用于其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物,以及应用于天然存在的氨基酸聚合物。

[0417] 如本文使用的,术语“构建体”是指人工组装或分离的核酸分子,该核酸分子可以包括一个或多个核酸序列,其中所述核酸序列可以包括编码序列(即,编码终产物的序列)、调节序列、非编码序列或其任何组合。术语构建体包括,例如,载体,但不应被视为限于此。

[0418] “表达载体”是指具有将异源核酸片段(诸如,例如DNA)并入外来细胞中并且使异源核酸片段(诸如,例如DNA)在外来细胞中表达的能力的构建体。换言之,表达载体包括能够被转录的核酸序列/片段(诸如DNA、mRNA、tRNA、rRNA)。许多原核和真核表达载体是已知的和/或可商购的。选择适当的表达载体在本领域技术人员的知识范围内。在一些代表性实施方案中,表达载体可以在靶位点编码双链RNA分子。

[0419] 如本文使用的,术语“表达”是指期望的终产物分子在靶细胞中的产生。终产物分子可以包括例如,RNA分子;肽或蛋白质;和类似物;或其组合。

[0420] 如本文使用的,术语“引入”和“转染”可以互换地使用,并且是指将分子诸如例如核酸、多核苷酸分子、载体和类似物转移至靶细胞中,并且更具体地转移至靶细胞的膜包围的空间的内部中。分子可以通过本领域技术人员已知的任何手段被“引入”到靶细胞中,例如如通过Sambrook等人Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York(2001)教导的,该文献的内容通过引用并入本文。将分子“引入”到细胞中的手段包括,例如但不限于:热激、磷酸钙转染、PEI转染、电穿孔、脂质转染、转染试剂、病毒介导的转移以及类似手段或其组合。细胞的转染可以在任何来源的任何类型的细胞上进行,诸如例如人类细胞、动物细胞、植物细胞、病毒细胞以及类似细胞。细胞可以选自分离的细胞、组织培养的细胞、细胞系、有机体身体内存在的细胞以及类似细胞。

[0421] 如本文使用的术语“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”是指消除、抑制、减慢或逆转疾病或状况的进展,改善疾病或状况的临床症状,或预防疾病或状况的临床症状的出现。术语“预防”在本文中被定义为防止受试者获得紊乱或疾病或状况。

[0422] 术语“癌症的治疗”意图包括以下中的一种或更多种:癌症的生长速率的降低(即

癌症仍然生长,但以较慢的速率);癌生长的生长停止,即,肿瘤生长的停滞,并且肿瘤缩小或在尺寸上减小。该术语还包括转移瘤(metastase)的数目的减少、形成的新转移瘤的数目的减少、癌症从一个阶段向另一个阶段进展的减慢以及由癌症诱导的血管生成的减少。在大多数优选的情况下,肿瘤被完全消除。此术语中另外包括延长经历治疗的受试者的存活期、延长疾病进展的时间、肿瘤消退以及类似情况。在一些实施方案中,癌症是血癌。

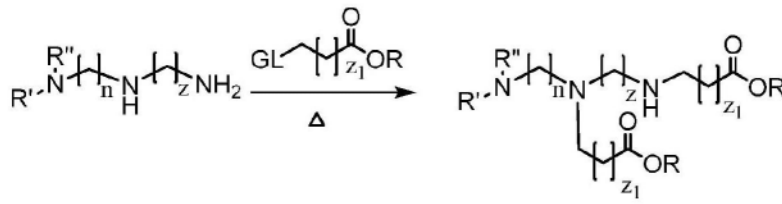
[0423] 术语“白细胞”涉及产生自和源自骨髓中的多能造血干细胞的白细胞(WBC)。白细胞具有细胞核,并且基于功能特性或物理特性,白细胞的类型可以分为五种主要类型,包括中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞。主要类型可以分为亚型。例如,淋巴细胞包括B细胞、T细胞和NK细胞。例如,B细胞释放抗体并且帮助激活T细胞。例如,T细胞可以分为若干亚型,包括:辅助性T细胞(T-helper cells)(CD4+Th),其激活并且调节T细胞和B细胞;细胞毒性T细胞(CD8+),其可以靶向并且杀死病毒感染的细胞和肿瘤细胞; γ - δ T细胞(γ δ T细胞),其可以桥接在先天性免疫应答和适应性免疫应答之间,并且参与吞噬作用;以及调节(抑制)T细胞,其调节免疫系统,保持对于自身抗原的耐受性,并且消除自身免疫状况。

[0424] 合成方法

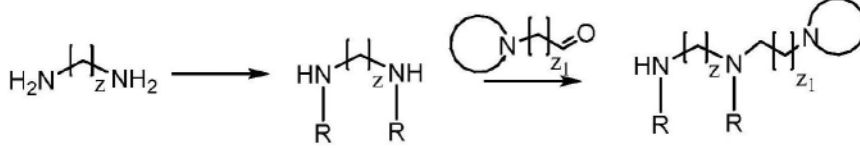
[0425] 本发明的化合物可以根据以下一般合成方法制备:

一般方案

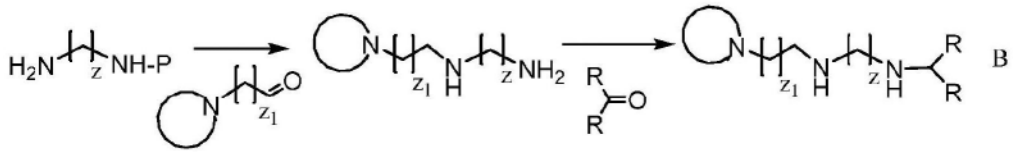
方法



C

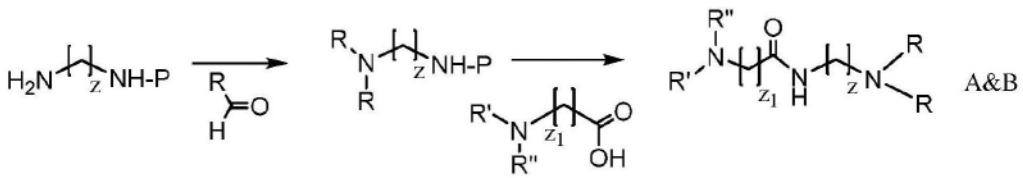


A&B

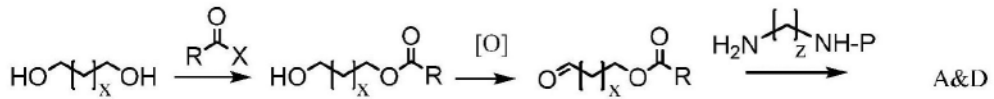


B

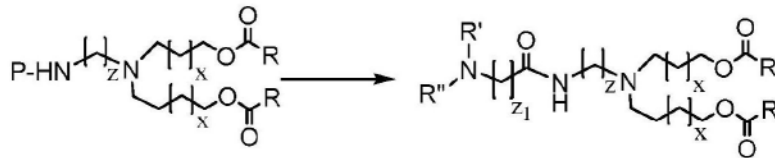
[0427]



A&B

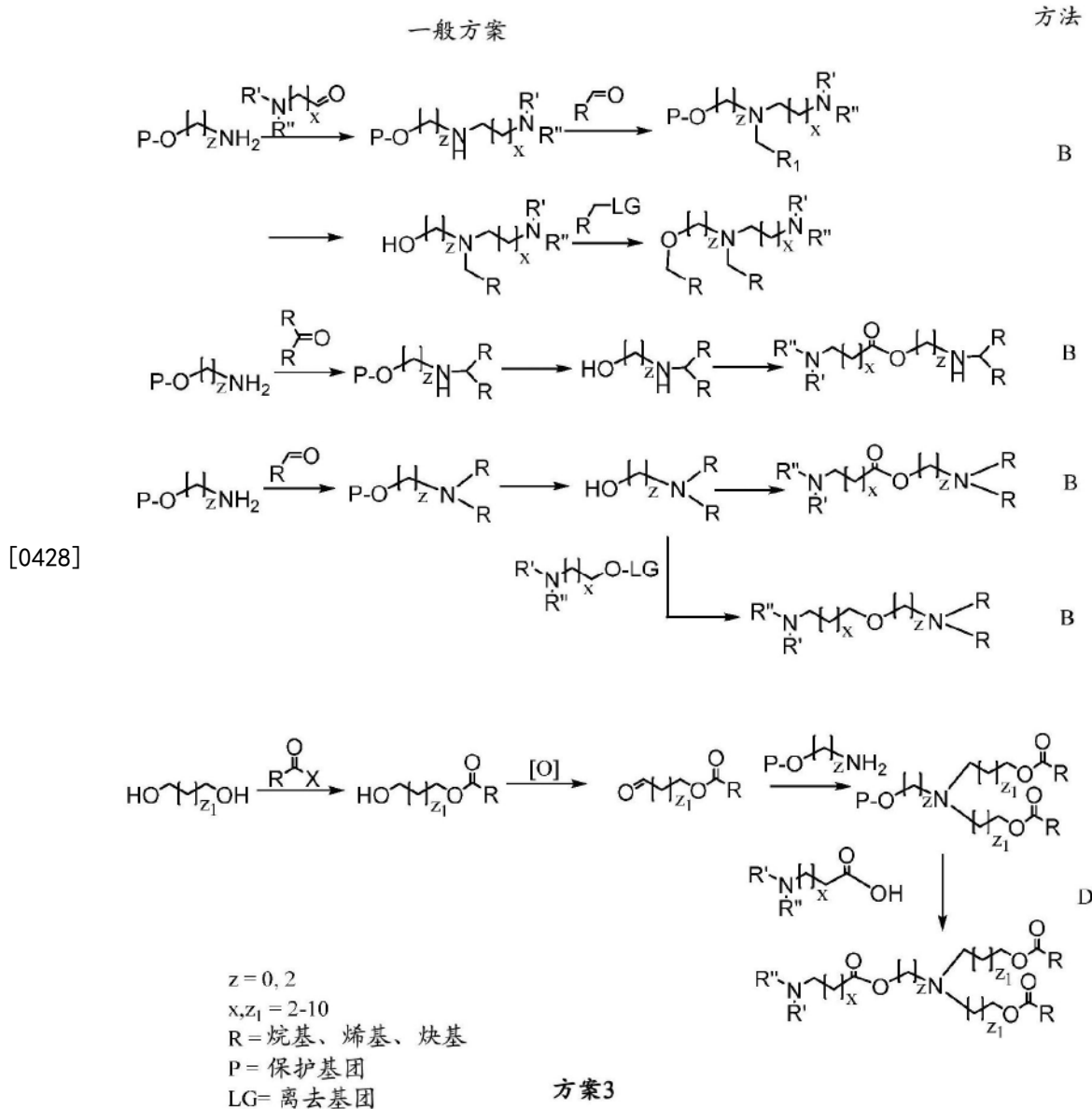


A&D



方案2

z = 0, 2
 z₁, x = 2-10
 n = 0, 6
 R = 烷基、烯基、炔基
 R', R'' = 烷基
 P = 胺保护基团
 LG = 离去基团



[0429] 相关技术的前述实例和与其相关的限制意图是说明性的而非排他性的。相关技术的其他限制将在本领域技术人员阅读说明书和研究附图后变得明显。

[0430] 本文引用的所有参考文献据此通过引用以其整体并入本文。

[0431] 实施例1:材料和方法:

[0432] 材料

[0433] 脂质:用于LNP产生的所有脂质(胆固醇、DSPC和DSPE PEG-马来酰亚胺)购自Avanti Polar lipids(USA)。

[0434] 单克隆抗体:抗-CD45 Af647、膜联蛋白-647购自BioLegend。碘化丙啶购自Sigma-Aldrich。

[0435] siRNA分子由Alnylam Pharmaceuticals(USA)设计和筛选。

[0436] 化学修饰的siRNA序列:

[0437] CD45 siRNA:

[0438] 有义链:cuGGcuGAAuuucAGAGcAdTsdT(SEQ ID NO:1)

[0439] 反义链:UGCUCUGAAAUUcAGCcAGdTsdT(SEQ ID NO:2)

- [0440] NC5 siRNA(siNC5或ctl siRNA):
- [0441] 有义链:CAUAAUUGCGCGUAUAGUCGCGUUAG
- [0442] 反义链:UGGUAAUACGCGCAUAUCAGCGCAAUC
- [0443] Luc siRNA(siLuc):
- [0444] 有义链:cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT (SEQ ID NO:3)
- [0445] 反义链:UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT (SEQ ID NO:4)
- [0446] Alexa-647标记的siRNA具有与siLuc相同的序列。2'-OMe修饰的核苷酸是以小写,并且硫代磷酸酯键通过“s”表示。
- [0447] PLK 1 siRNA(PLK 1)
- [0448] 有义链GCUUAAUGACGAGUUCUUUACUUCT
- [0449] 反义链:GACGAAUUACUGCUCAAGAAAUGAAGA
- [0450] 细胞系:
- [0451] SupT1、HEK 293、NAR和OVCAR-8细胞购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),并且按照推荐培养。
- [0452] 夹带siRNA的基于脂质的纳米颗粒(LNP)的制备
- [0453] 如Cohen等人描述的,通过使用微流体微混合物(Precision NanoSystems, Vancouver, BC, 加拿大)来制备LNP。一体积的在乙醇中的脂质混合物(阳离子脂质、DSPC、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG马来酰亚胺以50:10:38:1.5:0.5摩尔比,9.64nM总脂质浓度)和三体积的含有siRNA的乙酸盐缓冲剂溶液(1:16w/w siRNA与脂质)以2mL/分钟(0.5mL/min用于乙醇,并且1.5mL/min用于水性缓冲剂)的组合流量注射通过微混合器。对于标记的LNP,并入10%的Alexa-647标记的siRNA。对于Cy5标记的颗粒,使用10%Cy5标记的非靶向的siRNA。所得到的混合物相对于PBS(pH 7.4)渗析持续16h以除去乙醇。
- [0454] α CD38-LNP-siRNA的尺寸、 ζ 电位和超微结构分析
- [0455] 使用Malvern nano ZS ζ -分粒器(sizer)(Malvern instruments,UK)通过动态光散射确定LNP尺寸分布和 ζ 电位。对于尺寸测量,LNP在PBS中稀释成1:20。所有利用的样品示出低于0.2的多分散性指数(PDI)。对于 ζ 电位测量,LNP在DDW中稀释成1:200。如指示的,在一些情况下,尺寸和 ζ 电位测量在水中进行的。
- [0456] 定量实时PCR
- [0457] 在转染后48小时或72小时,通过实时PCR定量细胞中的polo样激酶1(PLK1基因)的mRNA水平。总RNA使用E-Z RNA纯化试剂盒(Biological industries,Beit Haemek,以色列)分离,并且来自每个样品的1 μ g的RNA使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems, Foster City,CA)逆转录成cDNA,使用syber green(Applied Biosystems)在一步序列检测系统(step one Sequence Detection System)(Applied Biosystems,Foster City,CA)上进行cDNA的定量(总共5ng)。GAPDH被选为管家基因。
- [0458] 对于实时PCR,选择以下引物:
- [0459] 用于PLK1的引物:
- [0460] 正向-ACCAGCACGTCGTAGGATTC
- [0461] 反向-CAAGCACAATTTGCCGTAGG
- [0462] 用于GAPDH的引物:

[0463] 正向-TCA GGG TTT CAC ATT TGG CA

[0464] 反向-GAG CAT GGA TCG GAA AAC CA

[0465] 体外基因沉默

[0466] 将Supt1或NAR或OVCAR细胞用1mL的完全培养基以 1×10^5 个细胞的密度放置于组织培养12孔板中。将含有不同siRNA (siPLK1或siCD45或siLUC)的LNP添加至孔,并且浓度在附图中提及。细胞以在附图中提及的不同的时间间隔分离,并且通过流式细胞术(用于siCD45敲除)或用于分析PLK1沉默的qPCR进行分析。在siPLK1诱导的细胞死亡的情况下,通过流式细胞术分析使用PI/膜联蛋白的细胞凋亡测定。

[0467] 细胞周期研究:

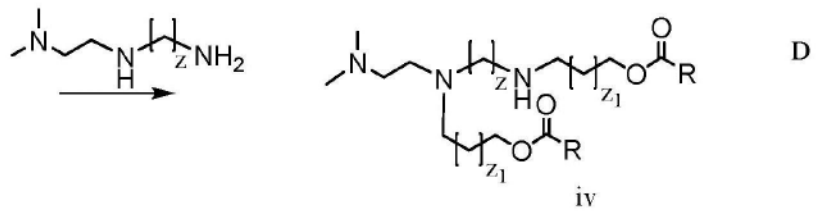
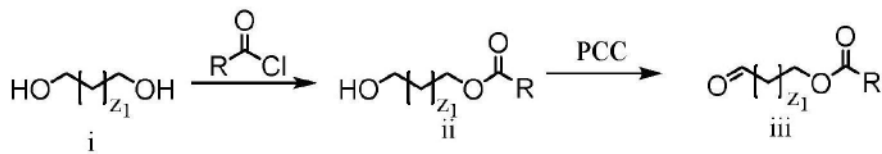
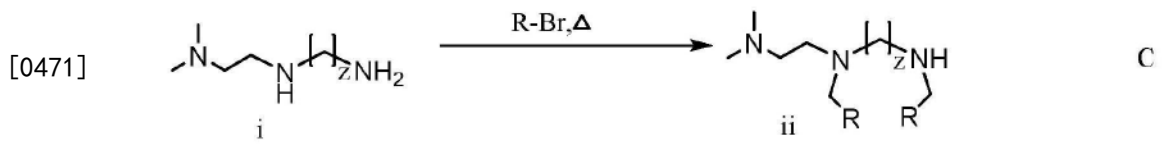
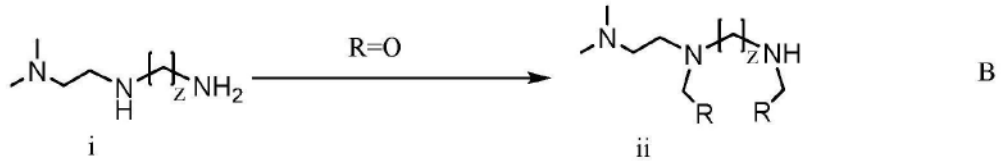
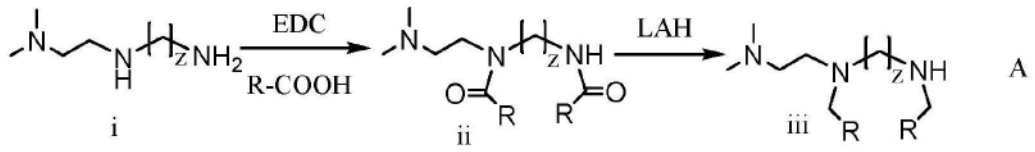
[0468] 转染的细胞用冰冷的PBS洗涤,并且用70%乙醇固定持续1h。然后,细胞用冷的PBS洗涤两次,并且在37°C在具有10 μ g/mL碘化丙啶(PI)、2.5 μ g/mL无DNA酶的RNA酶A (Sigma, USA)和0.01% Triton-X的250 μ L PBS中孵育持续10min。通过流式细胞术评价PI荧光。在基于FL2-面积/FL2-宽度通道门输出(gate out)碎片和细胞双链体(cell duplets)之后,通过FlowJoTM对每样品至少9000个细胞进行分析。经由将Dean-Jett-Fox模型应用于RMS评分在1.5和2.5之间的范围内的门控的细胞(gated cell)上,获得细胞周期分布。

[0469] 实施例2:脂质的合成:

[0470] 一般制备方法(方案1-3的示例性实施方案)。

一般方案

方法

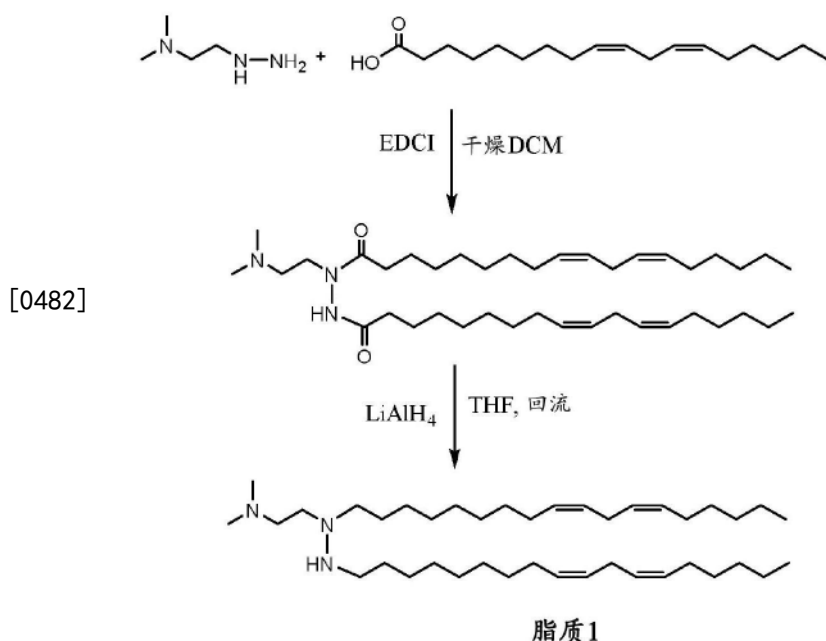


$z = 0, 2$
 $z_1 = 2-10$
 $R = \text{烷基、烯基、炔基}$

方案4

化得到期望的化合物(iv)。

脂质1的合成(方法A)：



[0483] 将亚油酸(0.88mg, 3.14mmol)和EDCI(0.9mg, 4.71mmol)置于100mL烧瓶中,并且溶解于干燥DCM中,随后添加二甲基氨基乙基胍盐酸盐(0.2mg, 1.25mmol)和三乙胺(0.1ml)。将反应混合物搅拌持续24小时,用水和盐水溶液洗涤。粗制化合物通过硅胶柱色谱法(MeOH:CHCl₃(4:96))纯化,以得到0.8g的纯化合物(9Z, 12Z)-N'-((2-(二甲基氨基)乙基)-N'-((9Z, 12Z)-十八碳-9, 12-二烯酰基)十八碳-9, 12-二烯酰基)胍。

[0484] ¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ5.22-5.45(8H, m); 3.7-3.8(1H, t); 3.2-3.3(1H, m); 2.8(4H, t), 2.6(2H, t), 2.3(6H, s); 2.2(4H, m); 2.0(8H, q); 1.2-1.4(32H, m), 0.9(6H, t)。

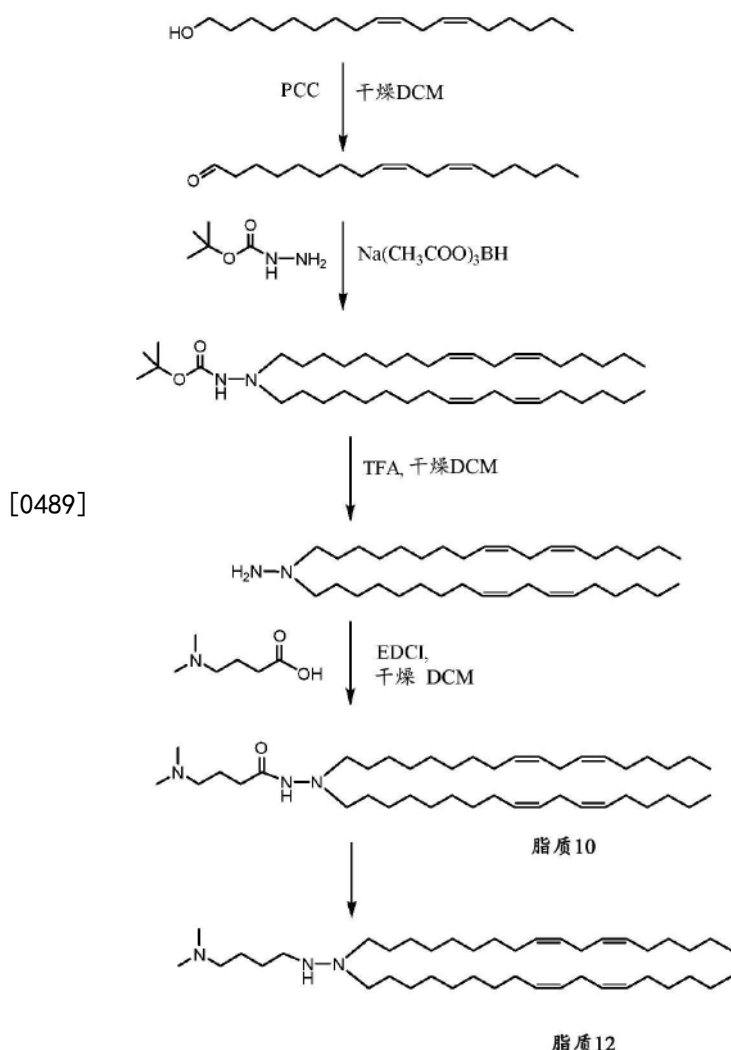
[0485] ESI-MS: 628.6(M+1)

[0486] 将以上化合物(0.8mg, 1.27mmol)置于50mL圆底(RB)烧瓶中,并且溶解于5mL的干燥THF中,随后添加在THF溶液中的1N LAH(6mL, 6.36mmol),并且将反应混合物回流持续24小时。反应用饱和氯化铵在0℃猝灭,随后硅胶柱色谱法(MeOH:CHCl₃(2:98))纯化以得到0.3g的作为浅黄色液体的纯化合物2-(1,2-二((9Z, 12Z)-十八碳-9, 12-二烯-1-基)胍基)-N,N-二甲基乙-1-胺。

[0487] ¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δNMR: 5.22-5.45(8H, m); 3.2(2H, t); 3.1(2H, t); 2.8(4H, t), 2.5(2H, m); 2.4(6H, s); 2.3(1H, m); 2.0(12H, q); 1.5(4H, m); 1.2-1.4(32H, m), 0.9(6H, t)。

[0488] ESI-MS: 600.6(M+1)

脂质10和12的合成:



[0490] 将亚油醇 (1.7g, 6.3mmol) 在氩气下溶解于干燥DCM中, 并且将分子筛添加至反应混合物。经10min的时间, 将PCC (2g, 9.5mmol) 按份添加至反应混合物。将反应混合物搅拌持续1小时, 并且通过二氧化硅垫过滤以除去PCC, 随后蒸发溶剂, 以得到1.5g的粗制亚油醛 (linoleic aldehyde)。将粗制醛 (1.5g, 5.6mmol) 和Boc-酰肼 (0.6g, 4.5mmol) 在氩气气氛下溶解于干燥DCM中, 然后将三乙酰氧基硼氢化钠 (4.7g, 22.6mmol) 添加至反应混合物, 并且在室温搅拌持续24小时。反应用氢氧化钠溶液猝灭, 并且用DCM (3×50mL) 萃取, 随后用水和盐水溶液洗涤。将溶剂蒸发, 并且残余物通过二氧化硅柱色谱法纯化 (EtOAc: 己烷 (5:95)), 得到1.3g的纯化化合物N,N'-二亚油基-boc酰肼。

[0491] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 5.22-5.45 (8H, m); 2.8 (4H, t), 2.6 (3H, bs), 2.0-2.1 (8H, q); 1.5-1.8 (6H, m); 1.4-1.5 (12H, s), 1.2-1.4 (32H, m), 0.9 (6H, t)

[0492] ESI-MS: 629.6 (M+1)⁺

[0493] 将N,N'-二亚油基-boc酰肼 (1.3g, 2.07mmol) 在氩气气氛下溶解于干燥DCM中。将反应混合物冷却至0℃, 并且逐滴添加三氟乙酸 (TFA) (2mL), 并且搅拌持续3小时。通过TLC分析反应完成后, 反应混合物用碳酸氢钠洗涤, 随后用盐水溶液洗涤。将溶剂蒸发, 并且将粗制反应混合物 (0.4g, 0.76mmol)、N,N'-二甲基氨基丁酸 (0.19g, 1.3mmol) 和EDCI (0.43g,

2.26mmol)在氩气气氛下溶解于干燥DCM中。添加三乙胺,并且将反应搅拌持续24小时。反应混合物用水洗涤,随后用碳酸氢钠和盐水溶液洗涤。将溶剂蒸发,并且残余物通过硅胶柱色谱法纯化(MeOH:CHCl₃(2:98))以得到0.3g的作为无色液体的纯脂质10。

[0494] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ5.22-5.45 (8H, m); 2.8 (4H, t), 2.6 (3H, m), 2.3-2.5 (4H, m); 2.2 (6H, s); 2.0 (8H, q); 1.6-1.8 (8H, m); 1.2-1.5 (36H, m), 0.9 (6H, t)。

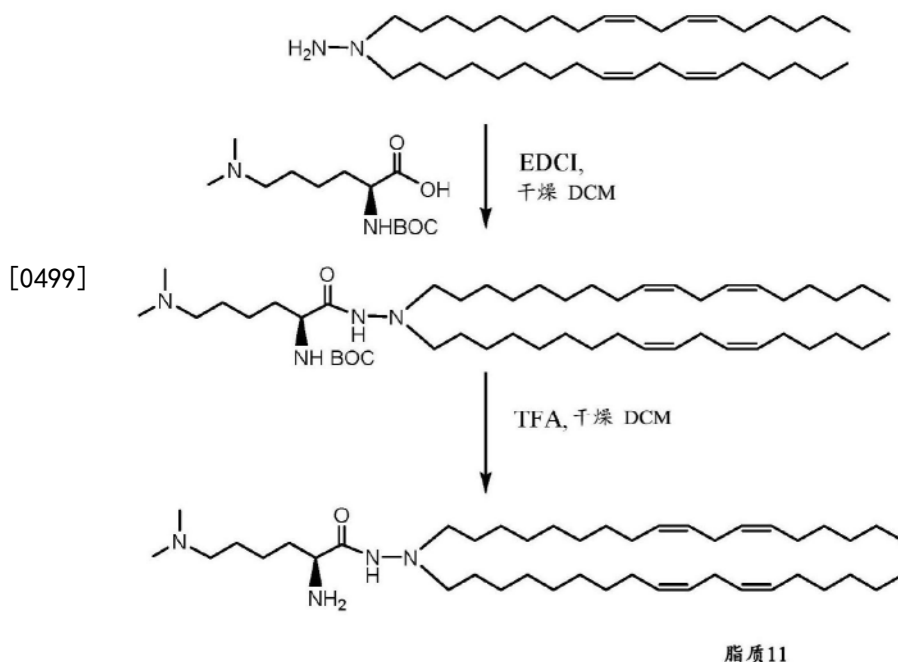
[0495] ESI-MS: 642.6 (M+1)⁺

[0496] 将化合物2溶解于干燥THF中,并且将在THF溶液中的1M LAH添加至反应混合物,并且回流持续12h。反应用氯化铵溶液猝灭,随后溶剂蒸发和硅胶柱色谱法纯化得到纯脂质12。

[0497] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δNMR: 5.22-5.45 (8H, m); 2.8 (4H, t), 2.6 (2H, m), 2.4-2.5 (6H, m); 2.2 (6H, s); 2.0 (8H, q); 1.6-1.8 (8H, m); 1.2-1.5 (36H, m), 0.9 (6H, t)。

[0498] ESI-MS: 629.1 (M+1)⁺

脂质11的合成:



[0500] 将N,N'-二亚油基肼(300mg, 0.56mmol)、N_ε,N_ε-二甲基-N_α-boc-L-赖氨酸(180mg, 1.13mmol)和EDCI(320mg, 1.68mmol)置于50mL RB烧瓶中,并且在氩气下溶解于10mL干燥DCM中。将反应混合物搅拌持续24h,并且然后反应混合物用水洗涤,随后用碳酸氢钠和盐水溶液洗涤。粗制产物通过硅胶柱色谱法纯化(MeOH:CHCl₃;3:97)以得到200mg的纯化合物。

[0501] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ5.22-5.45 (8H, m); 3.8-4.0 (1H, m); 2.8 (4H, t), 2.6-2.7 (4H, t), 2.4 (2H, m); 2.2 (6H, s), 2.0 (8H, m), 1.5-1.8 (6H, m); 1.4 (9H, s), 1.2-1.4 (34H, m), 0.9 (6H, t)。

[0502] ESI-MS: 785.6 (M+1)⁺

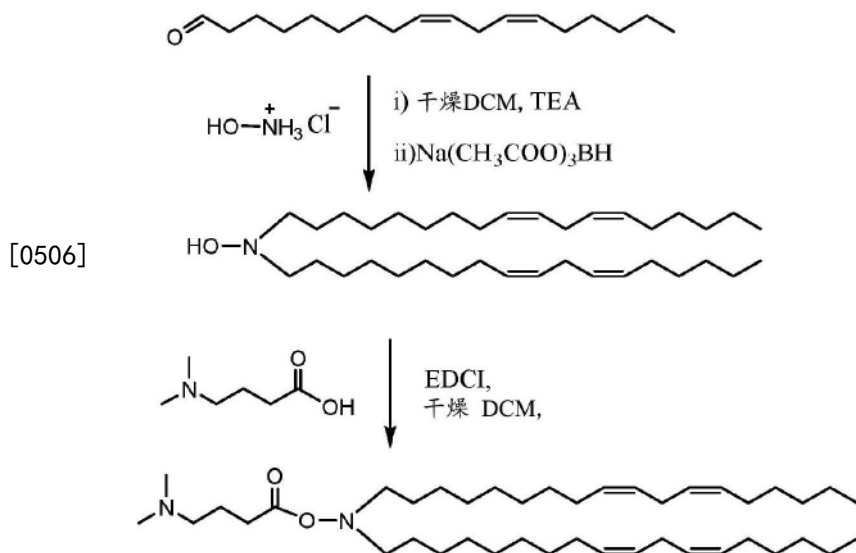
[0503] 将以上化合物(200mg, 0.25mmol)置于50mL RB烧瓶中,并且在氩气气氛下溶解于4mL干燥DCM中。在0℃逐滴添加三氟乙酸(2mL)。将反应混合物搅拌持续3小时。溶剂用碳酸

氢钠溶液洗涤,随后用盐水洗涤。反应混合物通过使用氯仿和甲醇溶剂体系(95:5)的硅胶柱色谱法纯化,以得到120mg的作为半固体的纯化合物11(2-氨基-6-(二甲基氨基)-N',N'-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)己烷酰胺)。

[0504] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 5.22-5.45 (8H, m); 3.4 (1H, m), 2.8 (4H, t), 2.7 (4H, t), 2.5 (2H, t), 2.4 (6H, s), 2.0 (m), 1.6 (2H, m), 1.4-1.5 (6H, m), 1.2-1.4 (34H, m), 0.9 (6H, t)。

[0505] ESI-MS: 686.6 (M+1)⁺

脂质14的合成:



[0507] 将亚油基醛(2.64g, 10.0mmol, 2当量)和盐酸羟胺(0.34g, 5.0mmol, 1.0当量)在氩气氛下溶解于干燥DCM中,然后添加三甲胺(0.7ml, 5.0mmol, 1.0当量)。在溶解化合物之后,将三乙酰氧基硼氢化钠(3.1g, 15.0mmol, 3当量)添加至反应混合物,并且在室温搅拌持续24小时。反应用氢氧化钠溶液猝灭,随后用水和盐水溶液洗涤。将溶剂蒸发,并且残余物通过二氧化硅柱色谱法纯化(EtOAc: 己烷(5:95))以得到1.5g(55%)的纯的白色化合物N,N-二亚油基羟胺。

[0508] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 5.27-5.39 (8H, m); 2.77 (4H, t, J=6.84Hz), 2.57-2.68 (4H, m), 2.05 (8H, q, J=6.80, 6.87Hz); 1.50-1.65 (4H, m); 1.22-1.42 (32H, m), 0.89 (6H, t, J=6.86Hz)。

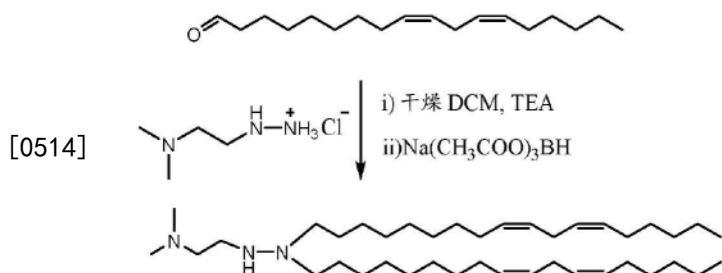
[0509] ESI-MS: 530 [M+1]⁺

[0510] 将N,N-二亚油基羟胺(0.48g, 0.90mmol, 1当量)、N,N-二甲基氨基丁酸盐(0.30g, 1.8mmol, 2当量)、EDCI(0.34g, 1.8mmol, 2当量)和DMAP(0.01g, 0.09mmol, 0.1当量)在氩气氛下溶解于干燥DCM中。然后添加三甲胺(0.25ml, 1.8mmol, 2当量),并且将反应搅拌持续24小时。反应混合物用水洗涤,随后用碳酸氢钠和盐水溶液洗涤。将溶剂蒸发,并且残余物通过硅胶柱色谱法纯化(MeOH: CHCl_3 (3:97))以得到0.6g(85%)的作为无色液体的纯脂质14。

[0511] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 5.22-5.45 (8H, m); 2.71-2.87 (8H, m), 2.24-2.36 (4H, m); 2.21 (6H, s); 1.93-2.12 (8H, m); 1.74-1.81 (2H, m); 1.42-1.58 (4H, m); 1.6-1.8 (8H, m); 1.20-1.40 (32H, m), 0.89 (6H, t, J=6.90Hz)。

[0512] 质量: 643.1 [M]⁺; 644.1 [M+1]⁺

[0513] 脂质15的合成:

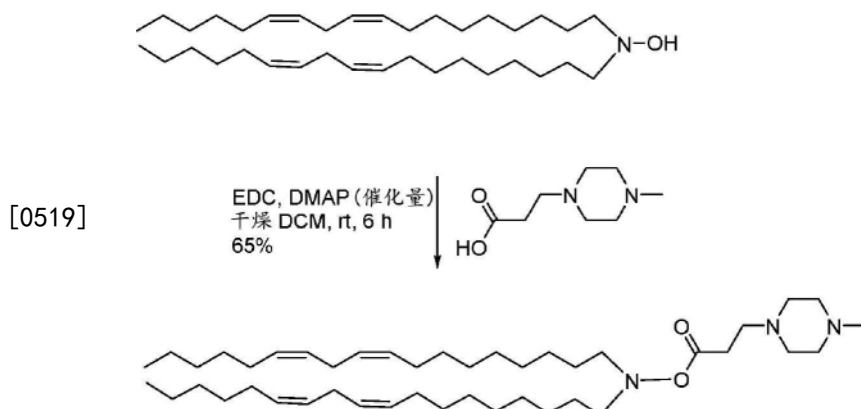


[0515] 将亚油基醛 (1.7g, 6.06mmol, 2当量)、N,N-二甲基氨基乙基胍盐酸盐 (0.53g, 3.03mmol, 1当量) 和三甲胺 (0.84ml, 6.06mmol, 2当量) 在氩气气氛下溶解于干燥DCM中, 然后添加三乙酰氧基硼氢化钠 (1.91g, 9.09mmol, 3当量), 并且将反应混合物在室温搅拌持续24小时。反应用氢氧化钠溶液猝灭, 随后用水和盐水溶液洗涤。将溶剂蒸发, 并且残余物通过硅胶柱色谱法纯化 (MeOH:CHCl₃ (3:97), 得到1.08g (60%) 的作为无色液体的纯脂质15。

[0516] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ6.77 (1H, t, J=5.55Hz), 5.34-5.48 (8H, m); 3.13 (2H, m), 3.00-3.05 (2H, m), 2.77 (4H, t, J=6.44Hz), 2.41-2.48 (4H, m), 2.22-2.34 (2H, m), 2.28 (s, 6H); 1.46-1.51 (4H, m); 1.32-1.40 (32H, m), 0.89 (6H, t, J=6.90Hz)。

[0517] ESI-MS: 599 ([M]⁺), 600 ([M+1]⁺)。

[0518] 脂质22的合成:

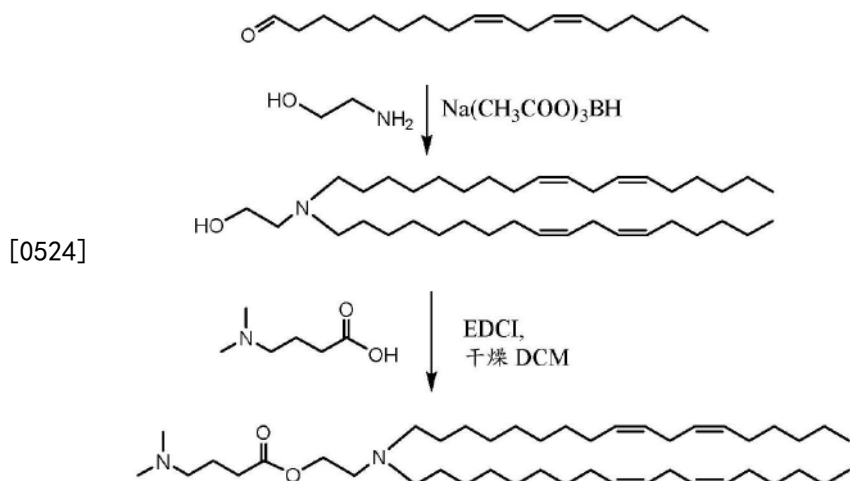


[0520] 将N,N-二亚油基羟胺 (0.20g, 0.37mmol, 1当量)、N-甲基哌嗪丙酸 (0.12g, 0.74mmol, 2当量)、EDCI (0.13g, 0.74mmol, 2当量) 和DMAP (5mg, 0.03mmol, 0.1当量) 在氩气气氛下溶解于干燥DCM中。然后添加三甲胺 (0.1ml, 0.74mmol, 2当量), 并且将反应搅拌持续24小时。反应混合物用水洗涤, 随后用碳酸氢钠和盐水溶液洗涤。将溶剂蒸发, 并且残余物通过硅胶柱色谱法纯化 (MeOH:CHCl₃ (5:95) 以得到0.21g (76%) 的作为无色液体的纯脂质。

[0521] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ5.21-5.45 (8H, m); 2.75-2.87 (8H, m), 2.70 (2H, t, J=7.28Hz); 2.47 (2H, t, J=7.25Hz); 2.27 (3H, s); 1.98-2.10 (8H, m); 1.44-1.57 (4H, m); 1.15-1.40 (32H, m), 0.88 (6H, t, J=6.81Hz)。

[0522] 质量: 684.8 [M+1]⁺

[0523] 脂质38的合成:



[0525] 将亚油基醛(2.64g, 10.0mmol, 2当量)和乙醇胺(0.30g, 5.0mmol, 1当量)在氩气气氛下溶解于干燥DCM中, 然后添加三乙酰氧基硼氢化钠(3.1g, 15.0mmol, 3当量), 并且将反应混合物在室温搅拌持续24小时。反应用氢氧化钠溶液猝灭, 随后用水和盐水溶液洗涤。将溶剂蒸发, 并且残余物通过柱色谱法纯化(MeOH:CHCl₃(2:98))以得到2.3g(85%)的纯的浅黄色化合物N,N-二亚油基氨基乙醇。

[0526] ¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ5.35-5.46(8H, m); 3.52(2H, t, J=5.38Hz); 2.77(4H, t, J=6.37Hz), 2.57(2H, t, J=5.38Hz), 2.43-2.49(4H, m), 2.05(8H, q, J=6.73, 6.75Hz), 1.43-1.48(4H, m), 1.32-1.38(32H, m), 0.89(6H, t, J=6.85Hz)

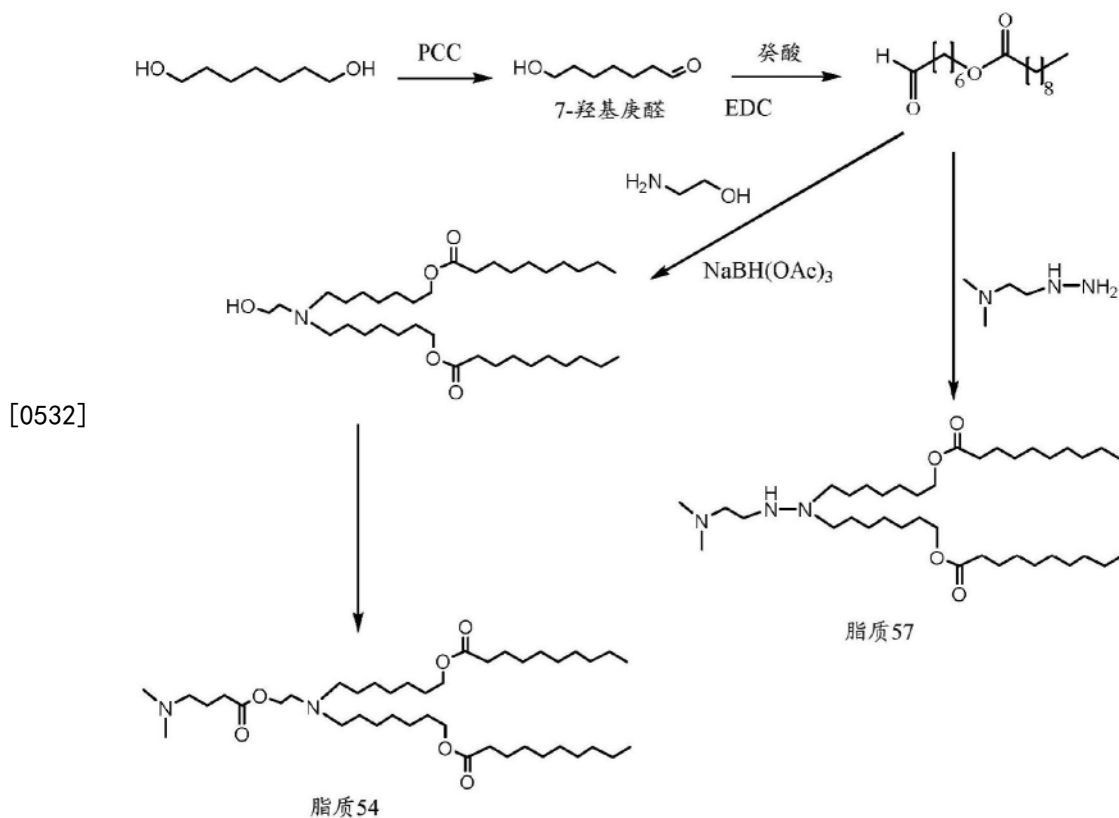
[0527] ESI-MS: 558[M+1]⁺

[0528] 将N,N-二亚油基氨基乙醇(0.55g, 1.0mmol, 1当量)、N,N-二甲基氨基丁酸(0.33g, 2.0mmol, 2当量)、EDCI(0.38g, 2.0mmol, 2当量)和DMAP(0.01g, 0.01mmol, 0.1当量)在氩气气氛下溶解于干燥DCM中。添加三甲胺(0.28ml, 2.00mmol, 2当量), 并且将反应混合物搅拌持续24小时。反应混合物用水洗涤, 随后用碳酸氢钠和盐水溶液洗涤。将溶剂蒸发, 并且残余物通过硅胶柱色谱法纯化(MeOH:CHCl₃(3:97))以得到0.46g(70%)的作为无色液体的纯脂质38。

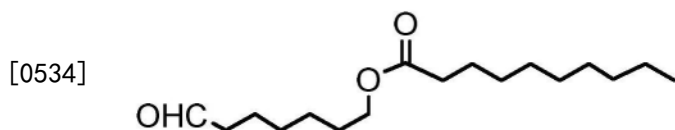
[0529] ¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ5.27-5.45(8H, m); 4.12(2H, t, J=6.33Hz); 2.77(4H, t, J=6.37Hz); 2.67(2H, t, J=6.34Hz); 2.38-2.49(4H, m), 2.19-2.38(4H, m); 2.21(6H, s); 2.05(8H, q, J=6.82, 6.84Hz); 1.70-1.85(4H, m); 1.20-1.50(36H, m), 0.9(6H, t, J=6.85Hz)。

[0530] ESI-MS: 671([M]⁺), 672([M+1]⁺)。

[0531] 脂质54和57的合成:



[0533] 7-氧代庚基癸酸酯:



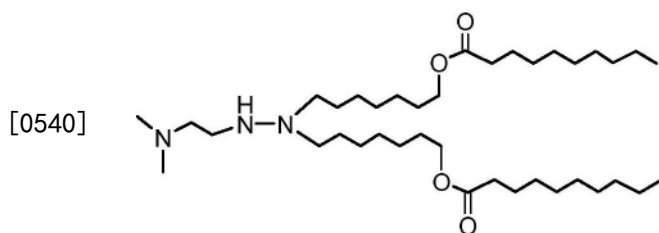
[0535] 将1,7-庚二醇(5g, 37mmol)置于100mL烧瓶中,并且溶解于干燥DCM中,随后分批缓慢添加PCC(8.9g, 41.6mmol)持续15min.然后,将反应混合物在室温搅拌持续2h.将粗制反应混合物通过硅胶垫过滤,并且用DCM(2×50mL)洗涤.有机溶剂经 Na_2SO_4 干燥,并且在减压下除去溶剂.获得的粗制羟基醛被直接使用,而没有任何进一步纯化。

[0536] 将粗制羟基醛(1.3g, 10.0mmol)、癸酸(2.0g, 12.0mmol)和EDC(2.8g, 15.0mmol)置于100mL烧瓶中,并且溶解于干燥DCM中,并且在0℃添加DMAP(催化量).将反应混合物在室温搅拌持续24小时.然后反应混合物用水洗涤,随后用盐水溶液洗涤,并且经无水 Na_2SO_4 干燥.粗制混合物通过二氧化硅柱色谱法纯化(EtOAc:己烷(5:95))以给出具有90%(2.4g)收率的无色油。

[0537] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 9.76(1H, t, $J=1.91\text{Hz}$); 4.05(2H, t, $J=6.76\text{Hz}$), 2.43(2H, dt, $J=7.48, 5.70\text{Hz}$); 2.28(2H, t, $J=7.68\text{Hz}$); 1.78-1.52(8H, m); 1.44-1.33(4H, m); 1.32-1.20(12H, m), 0.87(3H, t, $J=6.62\text{Hz}$)。

[0538] 质量: 285.8[M+1]⁺, 283.8[M-1]⁺

[0539] (2-(2-(二甲基氨基)乙基)肼-1,1-二基)双(庚烷-7,1-二基)双(癸酸酯)(脂质57):

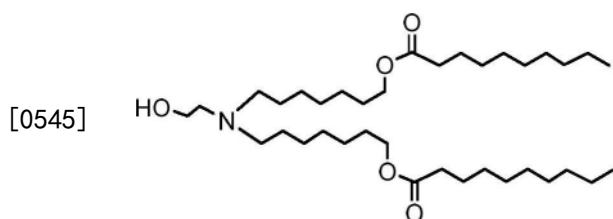


[0541] 将7-氧代庚基癸酸酯(0.6g, 2.2mmol)和二甲基氨基乙基胍盐酸盐(0.18g, 1.0mmol)溶解于干燥DCM中,随后添加三甲胺(0.1ml)。将三乙酰氧基硼氢化钠(0.6g, 3.0mmol)添加至反应混合物,并且在室温搅拌持续24小时。反应混合物用NaHCO₃溶液洗涤,随后用盐水溶液洗涤,并且经硫酸钠干燥。粗制混合物通过硅胶柱色谱法纯化(MeOH:CHCl₃ (5:95)以得到73% (0.51g) 作为浅黄色液体的纯的(2-(2-(二甲基氨基)乙基)胍-1,1-二基)双(庚烷-7,1-二基)双(癸酸酯)。

[0542] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ9.28 (1H, t, J=5.55Hz); 4.01 (1H, t, J=6.60Hz), 3.70 (2H, t, J=7.70Hz), 3.30-3.20 (3H, m), 2.54 (3H, t, J=7.55Hz), 2.33-2.21 (6H, m), 2.20 (s, 6H); 1.80-1.70 (4H, m); 1.37-1.17 (24H, m), 0.83 (6H, t, J=6.90Hz)。

[0543] ESI-MS: 640 ([M+1]⁺)。

[0544] ((2-羟基乙基)氮烷二基)双(庚烷-7,1-二基)双(癸酸酯):

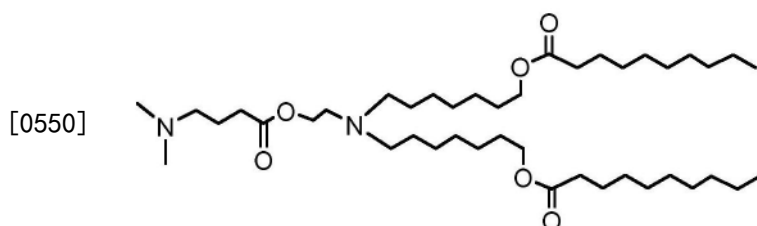


[0546] 将7-氧代庚基癸酸酯(1.0g, 3.7mmol)和乙醇胺(0.11g, 1.85mmol)溶解于干燥DCM中,随后添加三乙酰氧基硼氢化钠(1.1g, 5.5mmol),并且将反应混合物在室温搅拌持续24小时。反应混合物用碳酸氢钠溶液洗涤,随后用盐水溶液洗涤,并且经硫酸钠干燥。粗制混合物通过硅胶柱色谱法纯化(MeOH:CHCl₃ (2:97)以得到85% (0.91g) 的作为浅黄色液体的纯的((2-羟基乙基)氮烷二基)双(庚烷-7,1-二基)双(癸酸酯)。

[0547] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ4.05 (4H, t, J=6.98Hz); 3.60 (2H, t, J=5.31Hz); 2.66 (2H, t, J=5.31Hz); 2.54 (4H, t, J=7.58Hz); 2.28 (4H, t, J=7.58Hz); 1.68-1.54 (8H, m); 1.53-1.41 (4H, m); 1.20-1.40 (32H, m), 0.89 (6H, t, J=6.80Hz)。

[0548] ESI-MS: 598 ([M+1]⁺)。

[0549] ((2-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)乙基)氮烷二基)双(庚烷-7,1-二基)双(癸酸酯)(脂质54):



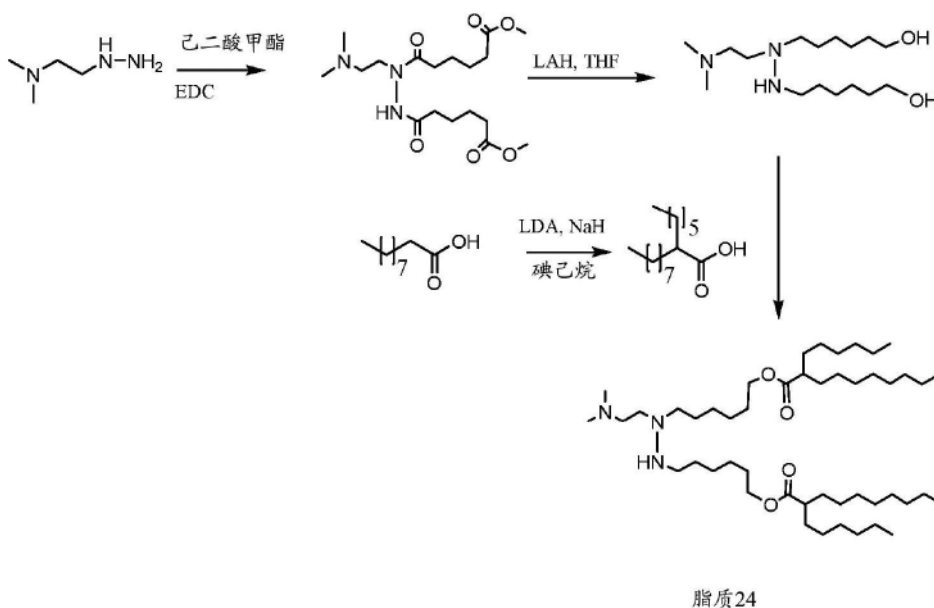
[0551] 将((2-羟基乙基)氮烷二基)双(庚烷-7,1-二基)双(癸酸酯)(0.4g, 0.7mmol)和4-(二甲基氨基)丁酸(0.17g, 1.0mmol)置于100mL烧瓶中,并且溶解于干燥DCM中。然后向反应

混合物添加EDCI (0.27g, 1.4mmol), 随后添加DMAP(催化量), 并且将反应混合物搅拌过夜。反应混合物用水洗涤, 随后用盐水溶液洗涤, 并且经 Na_2SO_4 干燥。粗制混合物通过硅胶柱色谱法纯化($\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ (2:98)) 以得到75% (0.37g) 作为浅色液体的纯的((2-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)乙基)氮烷二基)双(庚烷-7,1-二基)双(癸酸酯)。

[0552] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 4.11 (2H, t, $J=6.51\text{Hz}$); 4.04 (4H, t, $J=6.78\text{Hz}$); 2.66 (2H, t, $J=6.51\text{Hz}$); 2.43 (4H, t, $J=7.73\text{Hz}$); 2.33 (2H, t, $J=7.58\text{Hz}$); 2.28 (4H, t, $J=7.58\text{Hz}$); 2.21 (6H, s); 1.68-1.54 (6H, m); 1.67-1.52 (8H, m); 1.46-1.36 (4H, m); 1.20-1.40 (32H, m), 0.87 (6H, t, $J=6.80\text{Hz}$)。

[0553] ESI-MS: 711 ($[\text{M}+1]^+$)。

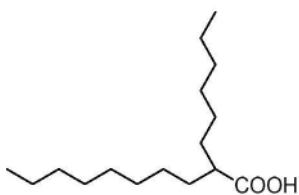
[0554] 脂质24的合成



[0555]

[0556] 2-己基癸酸:

[0557]

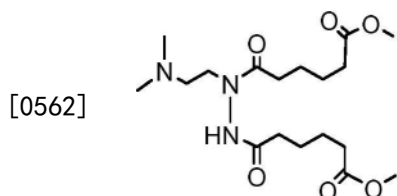


[0558] 在 0°C 将新鲜制备的在THF (30mL) 中的LDA (9.0mL, 2M在THF中, 18.0mmol) 缓慢地添加至癸酸 (2.6g, 15.3mmol) 和NaH (60w/w% 矿物油悬浮液, 690mg, 18.0mmol) 在THF (19mL) 中的溶液, 并且在室温搅拌持续30min。在添加 $n\text{-C}_6\text{H}_{13}\text{I}$ (2.6mL, 18.0mmol) 之后, 将反应混合物在 45°C 搅拌持续6h, 然后在室温用1N HCl猝灭。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥, 并且在减压下浓缩。残余物通过快速二氧化硅柱色谱法纯化($\text{EtOAc}:\text{Hex}$ (10:90)) 以给出无色液体 (3.7g, 65%)。

[0559] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 2.38-2.28 (1H, m); 1.69-1.53 (2H, m); 1.50-1.40 (2H, m); 1.36-1.20 (20H, m); 0.87 (6H, t, $J=6.87\text{Hz}$)。

[0560] 质量: 255 $[\text{M}-1]^+$

[0561] 二甲基6,6'- (1- (2- (二甲基氨基) 乙基) 肼-1,2-二基) 双(6-氧代己酸酯):

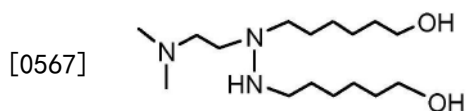


[0563] 将己二酸甲酯 (1.6g, 10.0mmol)、二甲基氨基乙基肼 (0.88g, 5.0mmol) 和 EDC (2.8g, 15.0mmol) 溶解于干燥 DCM 中, 随后添加三乙胺。将反应混合物搅拌过夜。反应混合物用水洗涤, 随后用盐水溶液洗涤, 并且经硫酸钠干燥。粗制混合物通过柱色谱法纯化 (MeOH: CHCl₃ (5:95)) 以给出浅黄色液体。

[0564] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 3.66 (3H, s); 3.64 (3H, s); 2.26-2.41 (6H, m); 2.15-2.26 (12H, s); 1.65-1.54 (4H, m); 1.65-1.55 (4H, m)。

[0565] 质量: 388 [M+1]⁺

[0566] 6,6'-(1-(2-(二甲基氨基)乙基)肼-1,2-二基)双(己-1-醇):

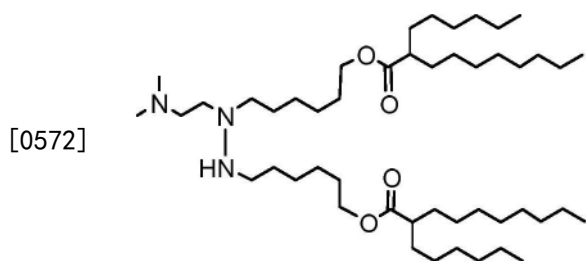


[0568] 将二甲基-6,6'-(1-(2-(二甲基氨基)乙基)肼-1,2-二基)双(6-氧代己酸酯) (0.77g, 2.0mmol) 溶解于干燥 THF 中, 随后添加过量的 LAH (10.0mL, 2M 在 THF 中, 20.0mmol)。将反应混合物回流持续 24 小时, 通过缓慢添加 H₂O 猝灭, 并且过滤, 并且经 Na₂SO₄ 干燥。通过在减压下除去溶剂, 通过硅胶柱色谱法纯化, 以得到 90% (0.5g) 纯的 6,6'-(1-(2-(二甲基氨基)乙基)肼-1,2-二基)双(己-1-醇)。

[0569] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 3.62 (4H, t, J=6.70Hz); 2.70 (2H, t, J=6.87Hz); 2.65 (2H, t, J=7.10Hz); 2.50-2.60 (4H, m); 2.44 (2H, t, J=6.91Hz); 2.29 (6H, s); 1.65-1.45 (6H, m); 1.44-1.25 (8H, m)。

[0570] ESI-MS: 304 ([M+1]⁺)。

[0571] (1-(2-(二甲基氨基)乙基)肼-1,2-二基)双(己烷-6,1-二基)双(2-己基癸酸酯) (脂质 24):



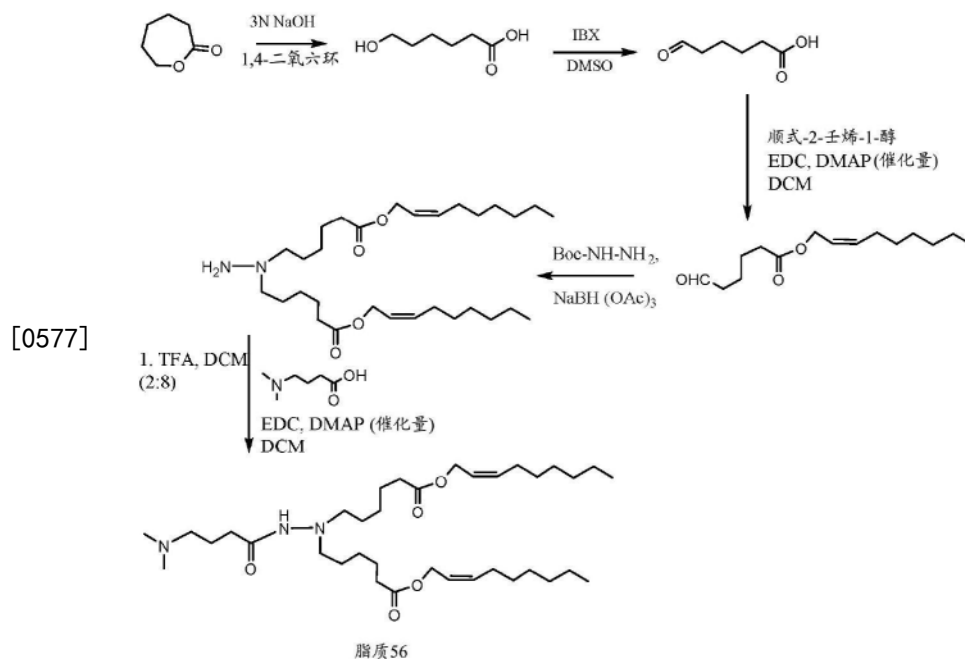
[0573] 将 6,6'-(1-(2-(二甲基氨基)乙基)肼-1,2-二基)双(己-1-醇) (0.30g, 1.0mmol) 和 2-己基癸酸 (0.50g, 2.2mmol, 2 当量) 置于 50mL 烧瓶中, 并且溶解于干燥 DCM 中。然后向反应混合物添加 EDC (0.27g, 1.4mmol), 随后添加 DMAP (催化量), 并且将反应搅拌过夜。反应混合物用水洗涤, 随后用盐水溶液洗涤, 并且经 Na₂SO₄ 干燥。粗制混合物通过硅胶柱色谱法纯化 (MeOH: CHCl₃ (5:95)) 以得到 65% (0.49g) 作为浅色液体的纯化合物。

[0574] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 3.72 (4H, t, J=5.65Hz); 3.20-3.34 (4H, m); 2.31 (4H, t, J=6.71Hz); 2.21 (6H, s); 1.71-1.85 (4H, m); 1.68-1.50 (6H, m); 1.50-1.36 (6H, m); 1.32-

1.17 (50H, m), 0.84 (12H, t, J=6.91Hz)。

[0575] ESI-MS: 780 ($[M+1]^+$)。

[0576] 脂质56的合成



[0578] 6-羟基己酸:

[0579] HOCCCCCC(=O)O

[0580] 将 ϵ -己内酯 (2.2g, 20.0mmol) 溶解于二氧六环6mL中, 并且添加50ml的3M NaOH溶液。将混合物在室温搅拌过夜。溶液用乙酸乙酯洗涤以除去一些有机杂质。将水层用浓HCl 37%酸化至pH 3-4, 并且然后用乙酸乙酯 (2 \times 50mL) 萃取。有机层用饱和NaCl (2 \times 50mL) 洗涤, 用Na₂SO₄干燥, 并且过滤。有机层在真空中浓缩, 以得到>90% (2.0g) 无色油。

[0581] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 3.62 (2H, t, J=6.30Hz); 2.33 (2H, t, J=7.45Hz); 1.63 (2H, 五重峰); 1.55 (2H, q, J=7.45Hz); 1.42-1.32 (2H, m)。

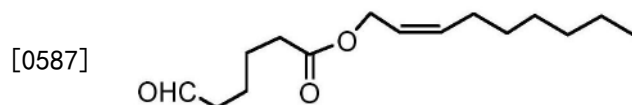
[0582] 7-氧代庚酸:

[0583] O=C(O)CCCCCO

[0584] 将IBX (1.0g, 3.5mmol, 1.5当量) 添加至6-羟基己酸 (0.60g, 4.5mmol) 在DMSO (10mL) 中的溶液。将混合物搅拌持续6h, 并且通过添加水猝灭。通过过滤除去沉淀物。用乙酸乙酯 (2 \times 50mL) 萃取, 用Na₂SO₄脱水, 并且在真空中除去溶剂, 给出作为无色油的几乎纯的氧代酸, 收率0.46g (78%)。

[0585] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 9.48 (1H, t, J=1.57Hz); 2.33 (2H, t, J=7.45Hz); 2.20 (2H, t, J=7.20Hz); 2.10-1.95 (2H, m), 1.45-1.32 (2H, m)。

[0586] (Z)-壬-2-烯-1-基6-氧代己酸酯:



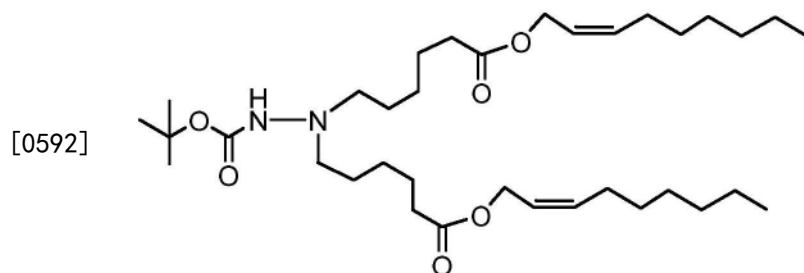
[0588] 将7-氧代庚酸 (0.26g, 2.0mmol) 和顺式-2-壬烯-1-醇 (0.28g, 2.0mmol, 1当量) 置于50mL烧瓶中, 并且溶解于干燥DCM中, 并且向反应混合物添加EDCI (0.27g, 1.4mmol), 随后

添加DMAP(催化量),搅拌过夜。反应混合物用水洗涤,随后用盐水溶液洗涤,并且经亚硫酸钠干燥。粗制混合物通过硅胶柱色谱法纯化(EtOAc:己烷(5:95))以得到85%(0.44g)作为液体的纯化化合物。

[0589] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 9.74 (1H, t, $J=1.69\text{Hz}$), 5.68-5.58 (1H, m); 5.54-5.44 (1H, m); 4.60 (2H, d, $J=7.20\text{Hz}$); 2.40-2.50 (2H, m); 2.38-2.28 (2H, m); 2.08 (2H, q, $J=7.70, 6.90\text{Hz}$); 1.70-1.60 (4H, m); 1.40-1.20 (8H, m); 0.86 (6H, t, $J=6.95\text{Hz}$)。

[0590] ESI-MS: 277 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$)。

[0591] 二((Z)-壬-2-烯-1-基)6,6'-(2-(叔丁氧基羰基)胍-1,1-二基)二己酸酯:

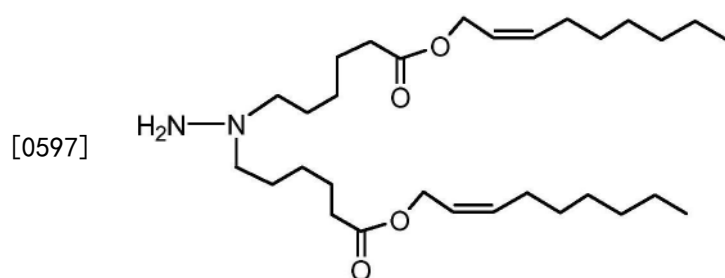


[0593] 将(Z)-壬-2-烯-1-基6-氧代己酸酯(0.25g, 1.0mmol, 2当量)和Boc-胍(0.06g, 0.5mmol, 1.0当量)在氮气气氛下溶解于干燥DCM中,然后将三乙酰氧基硼氢化钠(0.63g, 3.0mmol, 3.0当量)添加至反应混合物,并且在室温搅拌持续12h。反应用碳酸氢钠溶液猝灭,并且用DCM萃取,随后用水和盐水溶液洗涤。将溶剂蒸发,并且通过柱色谱法纯化(EtOAc:己烷(10:90))以得到0.21g(78%)的作为无色液体的纯脂质。

[0594] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 5.60-5.50 (2H, m); 5.47-5.37 (2H, m); 5.25 (br s, 1H), 4.53 (2H, s), 4.51 (2H, s), 2.65-2.42 (4H, m), 2.21 (4H, t, $J=7.50\text{Hz}$), 2.00 (4H, q, $J=7.90, 7.11\text{Hz}$), 1.54 (4H, 五重峰); 1.32-1.45 (15H, m), 1.30-1.09 (18H, m), 0.79 (6H, t, $J=6.75\text{Hz}$)。

[0595] ESI-MS: 609 ($[\text{M}+1]^+$), 553 ($[\text{M}-\text{t-Bu}]^+$)。

[0596] 二((Z)-壬-2-烯-1-基)6,6'-(胍-1,1-二基)二己酸酯:

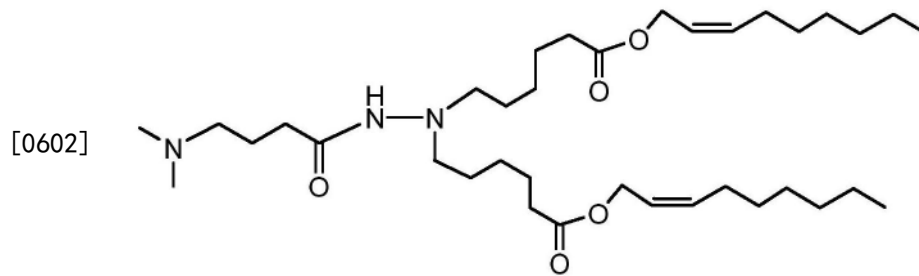


[0598] 将以上Boc保护的胍化合物(0.25g, 0.41mmol)在氮气气氛下在室温溶解于10mL TFA/DCM(2:8)中持续2h。反应用碳酸氢钠溶液猝灭,并且用DCM萃取,随后用水和盐水溶液洗涤,并且经 Na_2SO_4 干燥。将溶剂蒸发以得到0.20g(99%)的作为浅黄色液体的纯的胍,而没有进一步纯化。

[0599] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 5.70-5.58 (2H, m); 5.56-5.42 (2H, m); 4.62 (2H, s), 4.60 (2H, s); 2.44 (4H, t, $J=7.52\text{Hz}$); 2.31 (4H, t, $J=7.52\text{Hz}$); 2.09 (4H, q, $J=7.52, 7.15\text{Hz}$); 1.64 (4H, 五重峰); 1.55 (4H, 五重峰); 1.43-1.20 (18H, m); 0.87 (6H, t, $J=7.15\text{Hz}$)。

[0600] ESI-MS: 509 ($[\text{M}+1]^+$)

[0601] 二((Z)-壬-2-烯-1-基)6,6'-(2-(4-(二甲基氨基)丁酰基)胍-1,1-二基)二己酸酯(脂质56):



[0603] 将二((Z)-壬-2-烯-1-基)6,6'-(胍-1,1-二基)二己酸酯(0.20g,0.4mmol,1当量)、N,N-二甲基氨基丁酸盐(0.10g,0.6mmol,1.5当量)、EDC(0.15g,0.8mmol,2.0当量)和DMAP(催化量)在氮气气氛下溶解于干燥DCM中。然后添加三甲胺(0.28ml,2.00mmol,2当量),并且将反应搅拌持续12h。向反应混合物添加碳酸氢钠,并且混合物用水洗涤,随后用盐水溶液洗涤,并且经Na₂SO₄干燥。将溶剂蒸发,并且反应混合物通过二氧化硅柱色谱法纯化(MeOH:CHCl₃(5:95))以得到85%(0.20g)的作为浅黄色液体的纯脂质。

[0604] ¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ5.67-5.57(4H,m);5.57-5.44(4H,m);4.61(4H,t,J=5.52Hz);2.66(2H,t,J=8.16Hz);2.45(2H,t,J=7.47Hz);2.40(2H,t,J=7.75Hz);2.34-2.20(4H,m);2.28(6H,s);2.08(4H,q,J=7.80Hz);2.00-1.90(4H,m);1.86-1.76(2H,m);1.70-1.55(4H,m),1.54-1.40(4H,m),1.38-1.20(14H,m),0.87(6H,t,J=6.92Hz)。

[0605] ESI-MS:622([M+1]⁺)。

[0606] 实施例3:物理-化学表征

[0607]

LNP-siRNA 制剂	尺寸(d.nm)	PDI	ζ-电位 (mV)
Dlin-MC3-DMA	44.5	0.18	-1
脂质 1	45.1	0.14	18.5
脂质 2	56.3	0.06	13.9
脂质 9	75.1	0.04	-13.6
脂质 10	50.5	0.08	18.5
脂质 11	108.5	0.10	20.4
脂质 14	44.3	0.09	-3.6
脂质 15	52.5	0.11	10.1
脂质 33	46.0	0.15	-10.8
脂质 21	67.7	0.16	-2.8
脂质 38	59.0	0.08	6.7
脂质 55	97.0	0.17	-1.28
脂质 54	138.6	0.06	-1.82

[0608] 实施例4:生物学结果

[0609] 体外基因沉默如实施例1中描述的进行。

[0610] 图1描绘了体外基因沉默效应脂质1:以不同的siRNA剂量(0.4 μ M、0.2 μ M、0.1 μ M),用包括阳离子脂质1包封的siCD45的脂质纳米颗粒(LNP)治疗人类T细胞SupT1持续48小时(A)或72小时(B)。结果证实了脂质1在难以转染的T细胞中下调CD45基因的效率。

[0611] 用LNP-siPLK-1或LNP-siLuc纳米颗粒脂质1LNP(A)、脂质10和11LNP(B)治疗耐药人类卵巢癌细胞(NAR)持续72小时;并且通过qPCR测量PLK-1表达,如实施例1中描述的。如图2A中所示,含有脂质1的LNP有效地下调原癌基因PLK1,这可以诱导癌细胞的细胞凋亡。在较高剂量的cntr LUC-siRNA下,具有脂质1的LNP不影响plk1表达。进一步如图2B中所示,含有脂质10和11的LNP-siPLK1也以不同的剂量有效地下调plk1基因,而siLUC LNP对plk1表达不具有影响。

[0612] 脂质1在NAR细胞中的体外基因沉默效应:以不同的siRNA浓度(0.2 μ M和0.1 μ M),用脂质1/siPLK1纳米颗粒治疗人类卵巢癌细胞(NAR细胞)持续48小时。通过使用PI/膜联蛋白的FACS分析凋亡细胞。如图3中所示,由于原癌基因plk1的下调,具有脂质1的siPLK1-LNP诱导癌细胞的细胞凋亡。早期凋亡细胞的百分比在被siPLK1-LNP以0.2 μ M的siPLK1剂量治疗的细胞中是较高的。在被siLUC-LNP治疗的细胞中,对细胞周期不存在影响,这表明siPLK1

向NAR细胞的有效递送。

[0613] 脂质10和11在NAR细胞中的体外基因沉默效应:以不同的siRNA浓度(0.1 μ M和0.05 μ M),用脂质10/siPLK1纳米颗粒或脂质11/siPLK1纳米颗粒治疗人类卵巢癌细胞(NAR细胞)持续48小时。siLUC-LNP用作阴性对照。通过使用PI/膜联蛋白的FACS分析凋亡细胞。如图4中所示,包括脂质10或脂质11的siPLK1-LNP有效地下调PLK1基因,随后诱导NAR细胞的细胞凋亡。

[0614] 用具有siPLK1或siLUC的含有脂质1的LNP治疗人类卵巢癌细胞(OVCAR 8)持续72小时,并且通过qPCR测量PLK-1表达。如图5中所示,与含有dlin-mc3-dma的LNP相比,含有脂质1的siPLK1-LNP有效地下调PLK1基因。

[0615] 用包括脂质1并且具有siPLK-1或siLuc的LNP治疗耐药人类卵巢癌细胞(NAR)的球体持续72小时,并且通过qPCR测量PLK-1表达。球体是模拟体内肿瘤的肿瘤细胞的3D培养物。如图6中所示,与siLUC-LNP相比,含有脂质1的siPLK1-LNP显著下调PLK1基因,表明脂质1向NAR球体中递送siRNA的效率。

[0616] 将人类结肠癌细胞(HCT116)与具有ctl siRNA的LNP一起孵育持续72小时(参见方法)。通过XTT测定测量细胞活力。将包括脂质38或脂质55的LNP的毒性与包括Dlin-MC3-DMA的金标准LNP进行比较。如图7中所示,以剂量依赖的方式,包括脂质38或脂质55的LNP比包括Dlin-MC3-DMA的LNP毒性小。

[0617] 脂质38和55的体外基因沉默效应。将人类多发性骨髓瘤悬浮细胞(U266)与含有不同浓度的siPLK1的LNP一起孵育持续48小时。通过qPCR测量PLK1表达。PLK1-mRNA水平被归一化为经LNP-ctl siRNA治疗的细胞。如图8中所示,在被包括脂质38或脂质55的siPLK1-LNP治疗的细胞中,PLK1基因被有效地下调,并且与Dlin-MC3-DMA LNP相当。

[0618] PLK1下调对多发性骨髓瘤细胞存活的影响:将人类多发性骨髓瘤悬浮细胞(U266)与不同浓度的包括脂质38或55的siPLK1-LNP或siCtl-LNP一起孵育持续48小时。通过XTT测定测量受PLK1下调影响的细胞活力。如图9中所示,与Dlin-MC3-DMA LNP相比,由于PLK1基因的有效下调,包括脂质38或脂质55的siPLK1-LNP对细胞活力具有更大的影响,而siCtl-LNP对细胞活力不具有影响,表明新脂质的安全使用。

[0619] PLK1沉默对B细胞淋巴瘤活力的影响:将人类B细胞淋巴瘤悬浮细胞(RPMI-8226)与不同浓度的包括脂质38或55的siPLK1-LNP或siCtl-LNP一起孵育持续48小时。通过XTT测定测量受PLK1下调影响的细胞活力。如图10中所示,由于PLK1基因的有效下调,包括脂质38或脂质55的siPLK1-LNP呈现出对B细胞淋巴瘤癌细胞活力的剂量依赖的影响,而siCtl-LNP对细胞活力不具有影响。

[0620] PLK1沉默对细胞活力的影响:将人类多发性骨髓瘤悬浮细胞(MM1)与不同浓度的包括脂质38或55的siPLK1-LNP或siCtl-LNP一起孵育持续48小时。通过XTT测定测量受PLK1下调影响的细胞活力。如图11中所示,由于PLK1下调,包括脂质38或脂质55的siPLK1-LNP呈现出对多发性骨髓瘤癌细胞活力的剂量依赖的影响,而siCtl-LNP对细胞活力不具有影响。

[0621] pDNA的体外表达:将人类结肠癌细胞(HCT 116)与不同浓度的LNP-LUC pDNA一起孵育持续48小时。通过发光计测量荧光素酶表达。Lipofectamine 2000(Lipo 2000)用作阳性对照。LNP包括脂质38和不同量的共脂质DOPE,连同其他共脂质诸如胆固醇、PEG-DMG。如图12中所示,包括脂质38的LNP-pDNA有效地将pDNA递送至细胞核。荧光素酶表达的量类似

于阳性对照lipo 2000。

[0622] pDNA在HEK 293细胞中的体外表达:以0.6nM pDNA的浓度,用包括包封有mKATE-pDNA的脂质1或脂质10的LNP治疗HEK细胞。在72小时之后,通过流式细胞术分析mKATE表达。如图13中所示,包括脂质1或脂质10的LNP有效地将pDNA递送至细胞核,并且观察到mKATE表达,而Dlin-MC3-DMA LNP对mKATE表达未示出任何影响。

[0623] pDNA在HEK 293细胞中的剂量依赖的表达:以不同量的pDNA,用包括包封有mKATE-pDNA的脂质1或脂质10的LNP治疗HEK细胞。在72小时之后,通过流式细胞术分析mKATE表达。如图14A中所示,包括脂质1的LNP-pDNA未示出任何剂量依赖的表达,但如图14B中所示,含有脂质10的LNP呈现出mKATE的剂量依赖的表达。

[0624] mRNA的体外递送:用包括脂质38或脂质54并且与以不同量的mRNA的荧光素酶mRNA一起配制的LNP治疗难以转染的鼠科动物巨噬细胞(RAW 264.7)。在18小时之后,通过发光计测量荧光素酶表达。如图15中所示,与脂质54-LNP相比,在被脂质38-LNP有效地治疗的细胞中观察到荧光素酶表达,此外,在含有脂质38的LNP中观察到剂量依赖的表达。

[0625] mRNA向肌肉细胞的体内递送:将包括与荧光素酶mRNA一起配制的脂质54或脂质38的LNP以1mg/kg体重肌肉内施用至C57BL6/j小鼠中。通过生物发光成像系统Biospace测量荧光素酶表达:(a)在肌肉内施用8小时之后;和(b)在24小时之后。如图16中所示,对于包括脂质38或脂质54的LNP两者,在施用8小时之后观察到大量的荧光素酶。在施用LNP 24小时之后表达仍然是高的,这表明这些脂质在体内递送mRNA的效率。

[0626] mRNA向肝的体内递送:将包括与荧光素酶mRNA一起配制的脂质54或脂质38的LNP以1mg/kg体重静脉内施用至C57BL6/j小鼠中。在8小时之后,通过生物发光成像系统Biospace测量荧光素酶表达。如图17中所示,与包括脂质54的LNP相比,用包括脂质38和mRNA的LNP治疗的小鼠在小鼠肝中示出大量的荧光素酶。

[0627] mRNA向肝的体内递送:将包括与荧光素酶mRNA一起配制的脂质38的LNP以1mg/kg体重静脉内施用至C57BL6/j小鼠中。在施用8小时和24小时之后,通过生物发光成像系统Biospace测量荧光素酶表达。如图18中所示,在肝中观察到大量的荧光素酶表达。此外,与24小时之后相比,荧光素酶表达在8小时之后是高的。

[0628] 图19:证实了与MC3相比,非人类灵长类动物中不存在肝毒性。食蟹猴(每组n=2,雄性)接收具有siNC5的MC3颗粒(0.5mg/kg)和具有siNC5的基于脂质38的颗粒(0.5mg/Kg)的单次静脉内施用(1ml/kg)。在施用后1h和24h收集血清,并且分析ALT、AST(通过Roch Cobra自动分析仪)。每个数据点是2个动物的平均值±SEM。

[0629] 虽然已经具体描述了本发明,但本领域技术人员将理解,可以进行许多变化和修改。因此,本发明不被认为受限于具体描述的实施方案,并且本发明的范围和理念将通过参考伴随的权利要求而更容易理解。

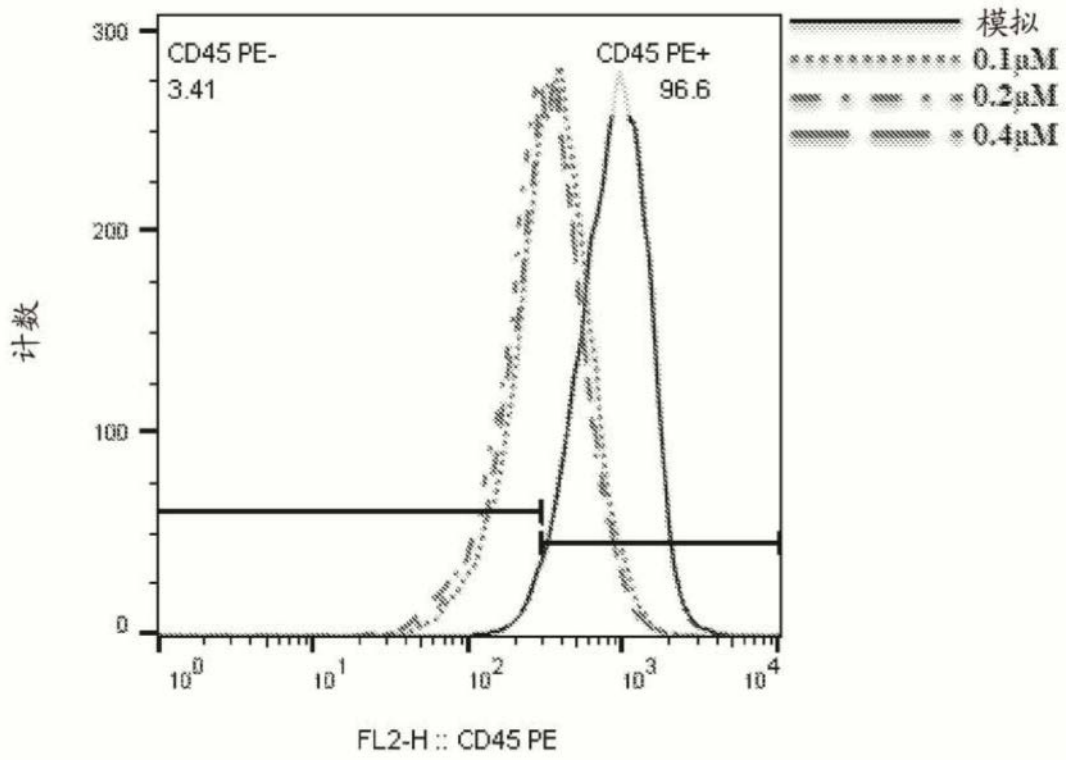


图1A

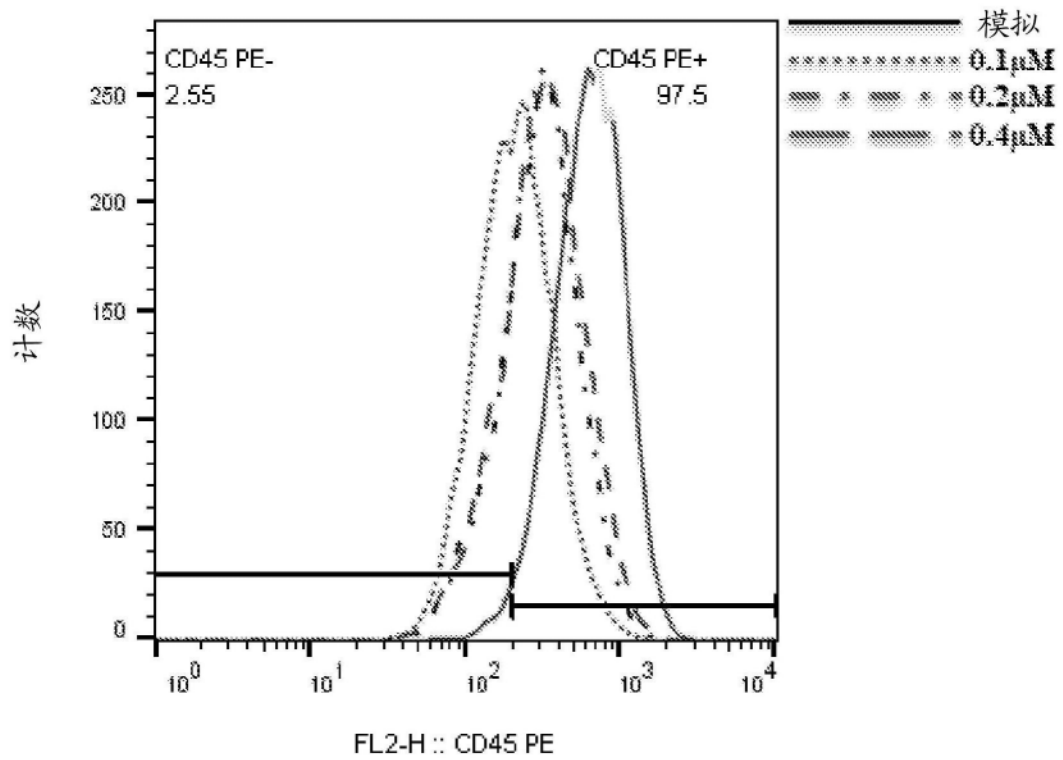


图1B

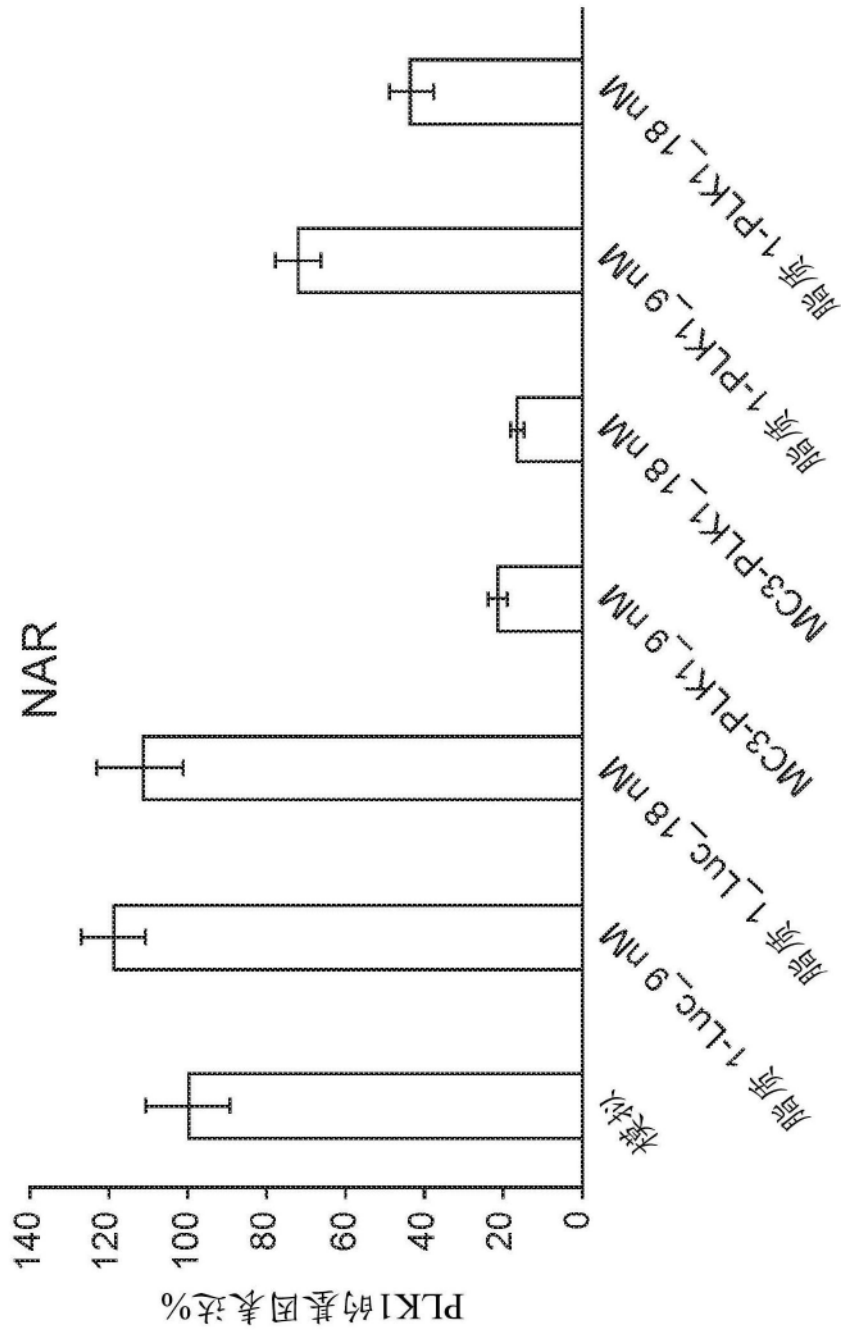


图2A

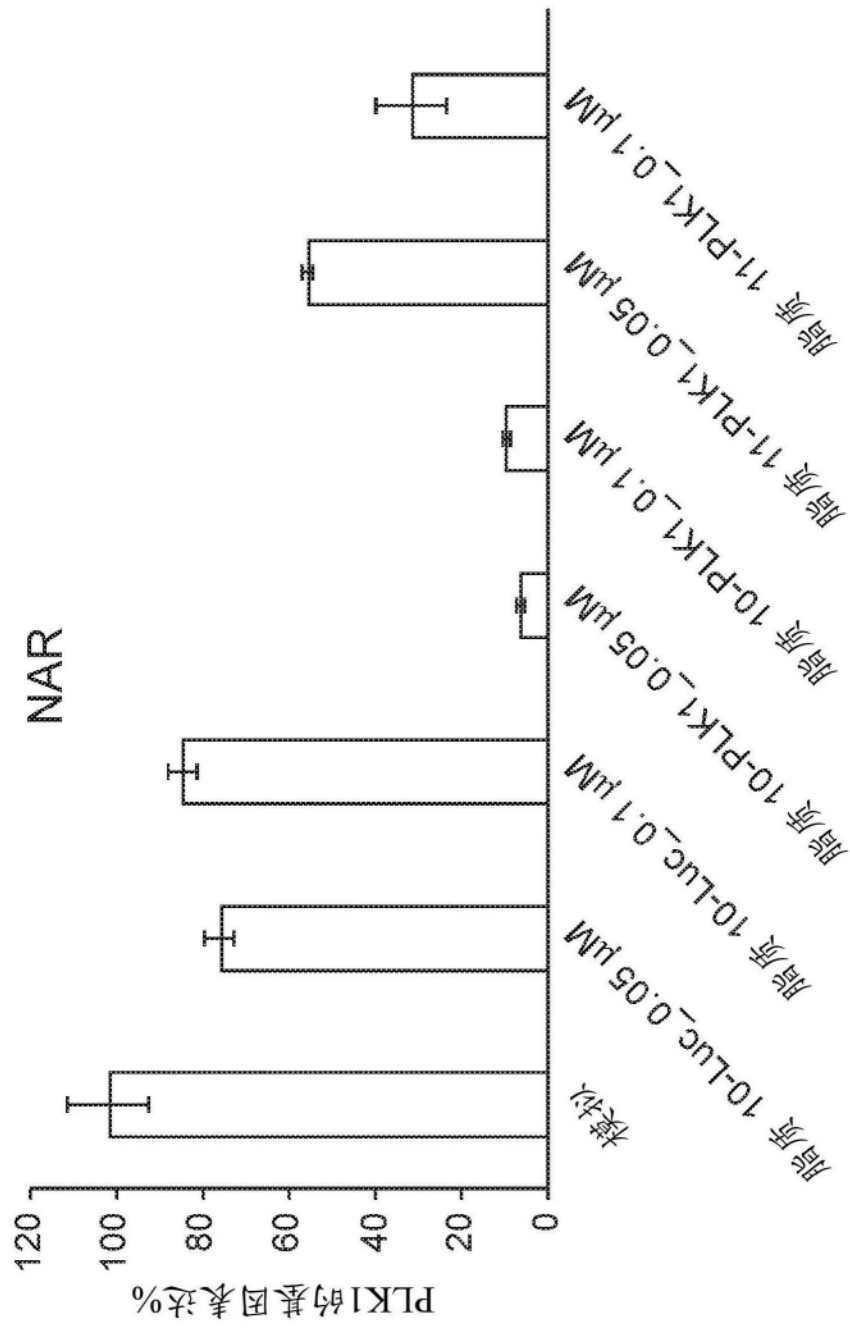


图2B

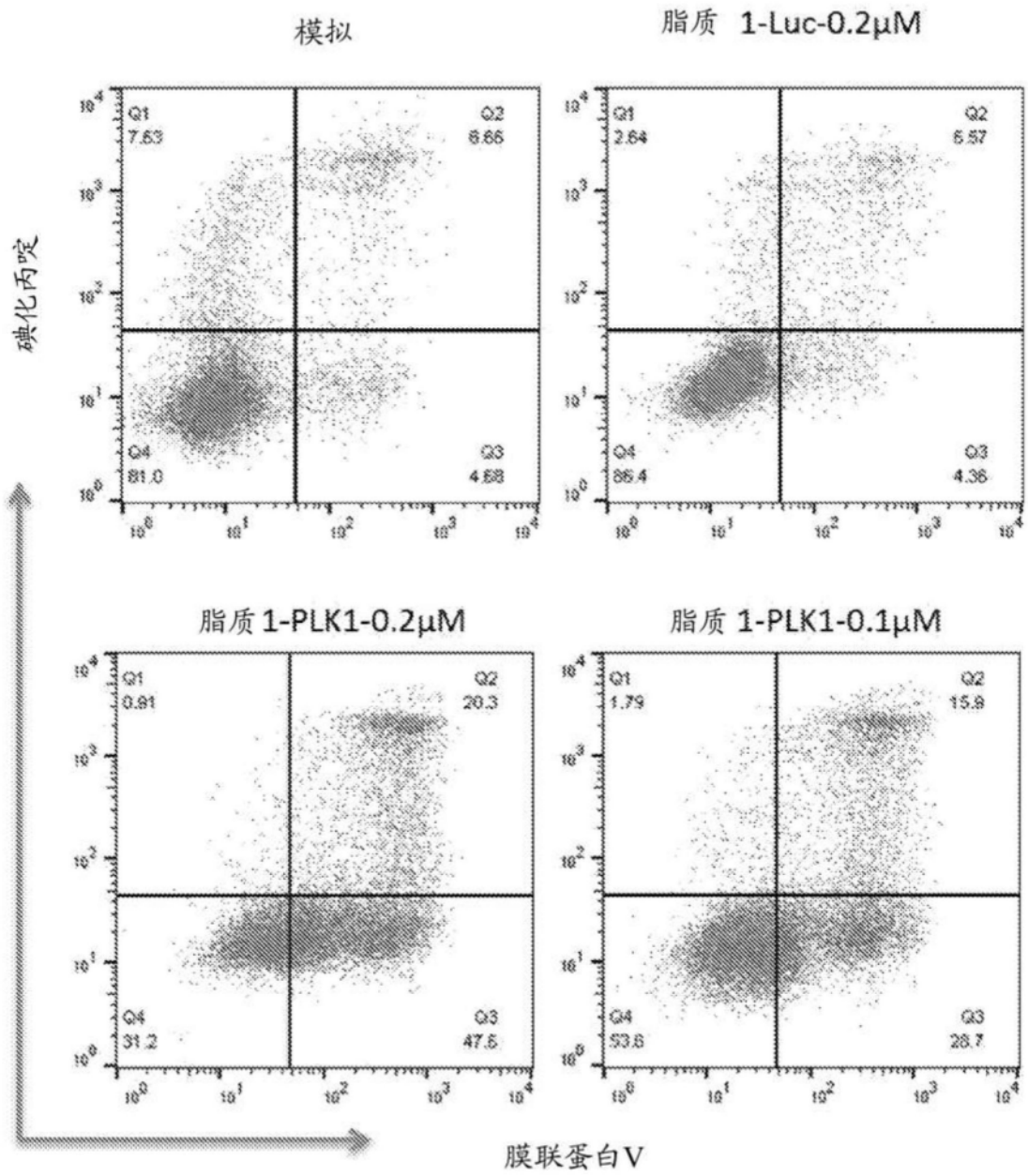


图3

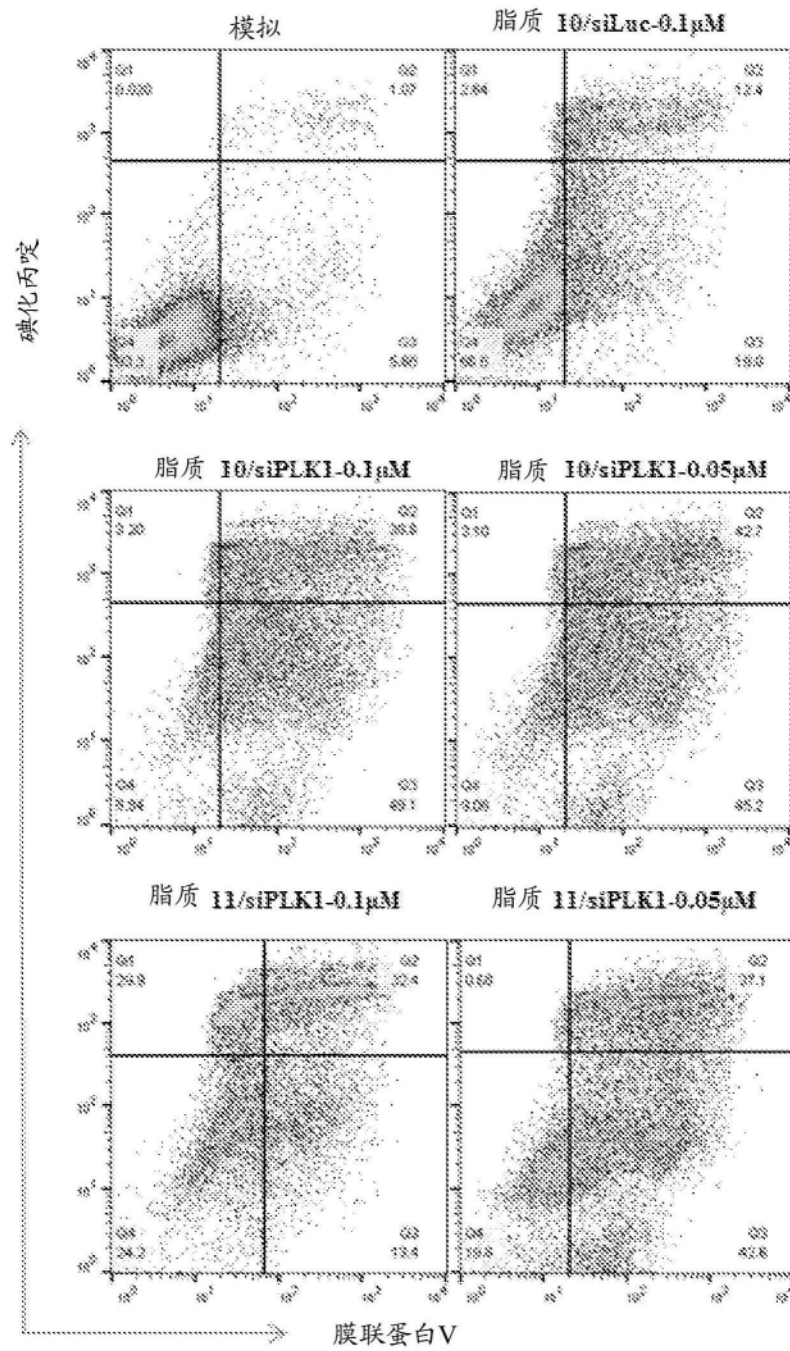


图4

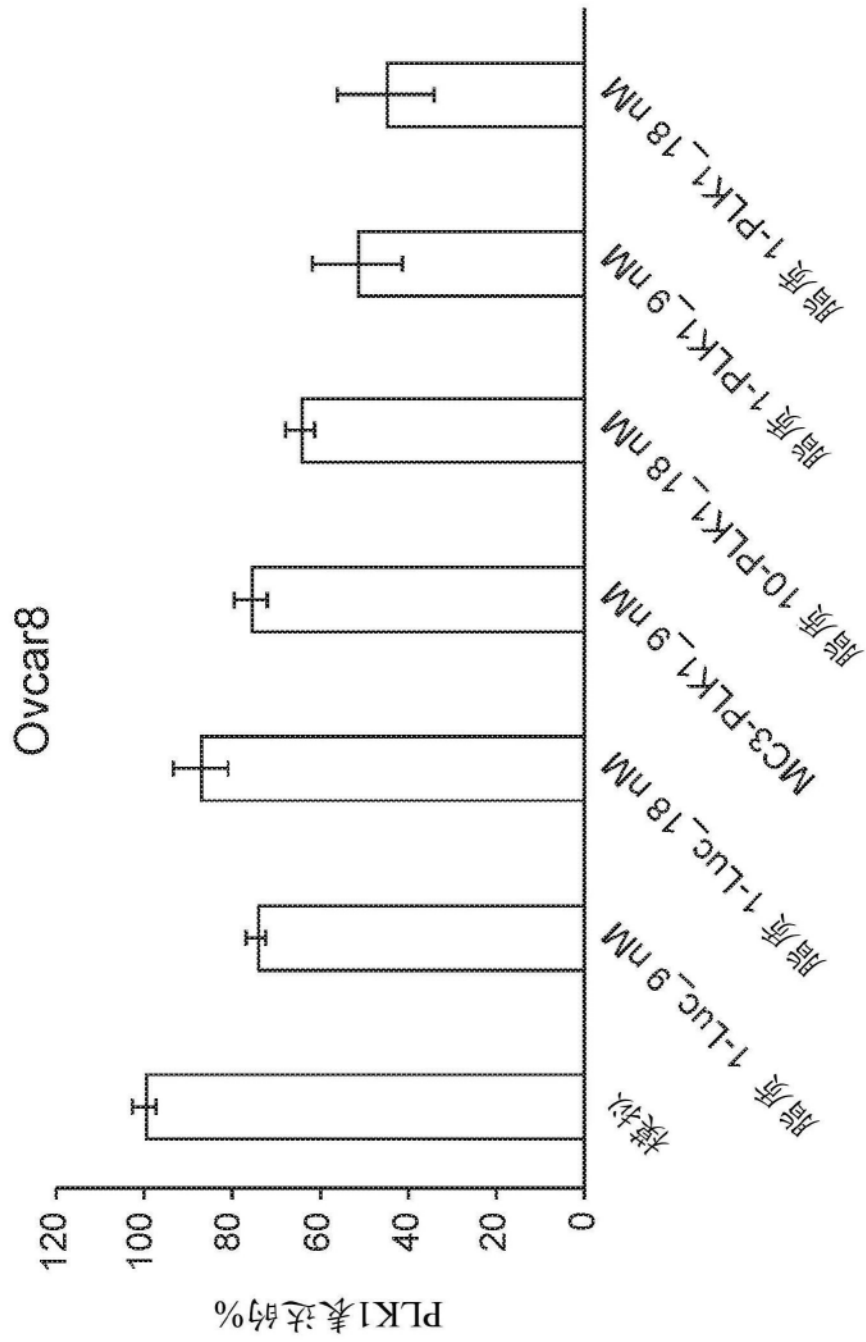


图5

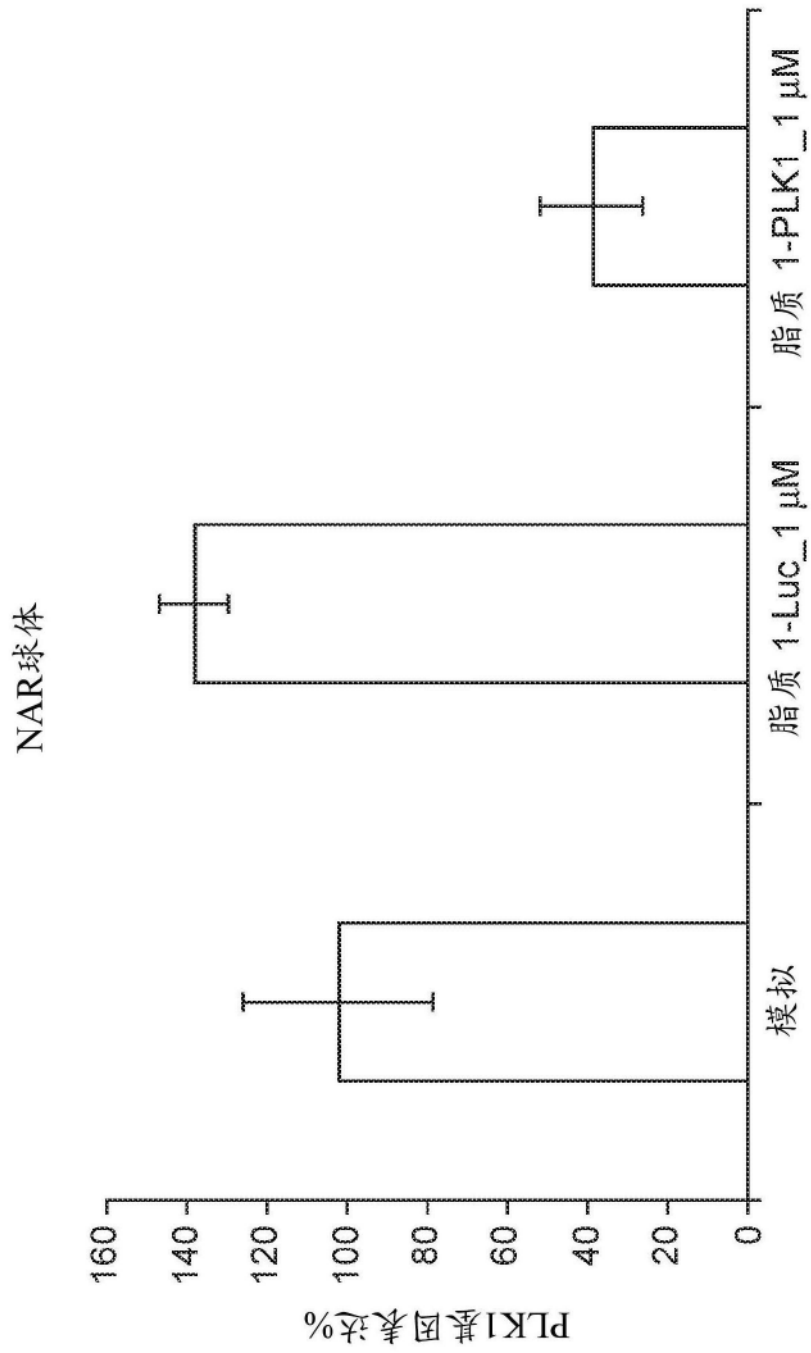


图6

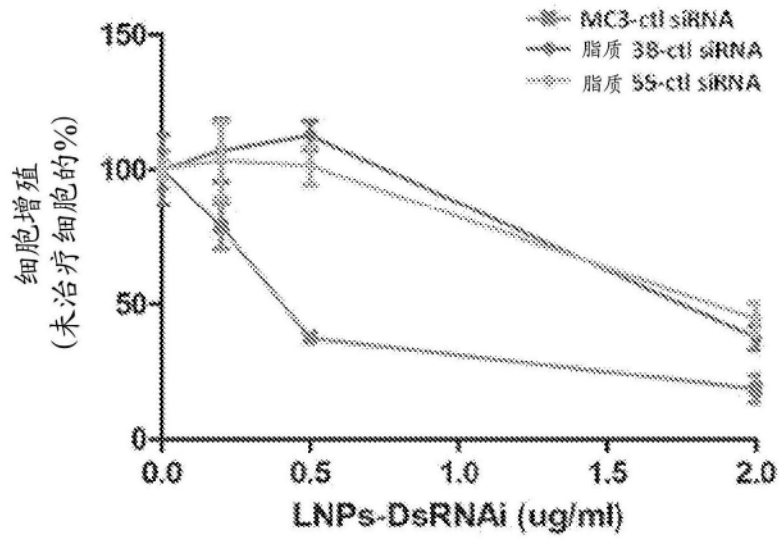


图7

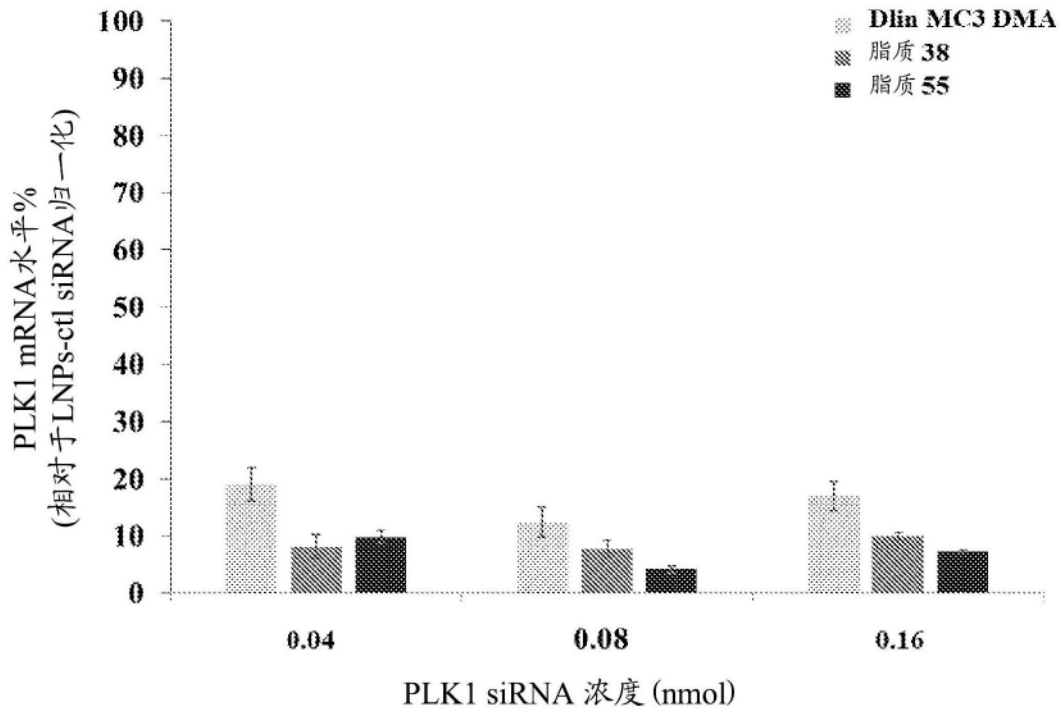


图8

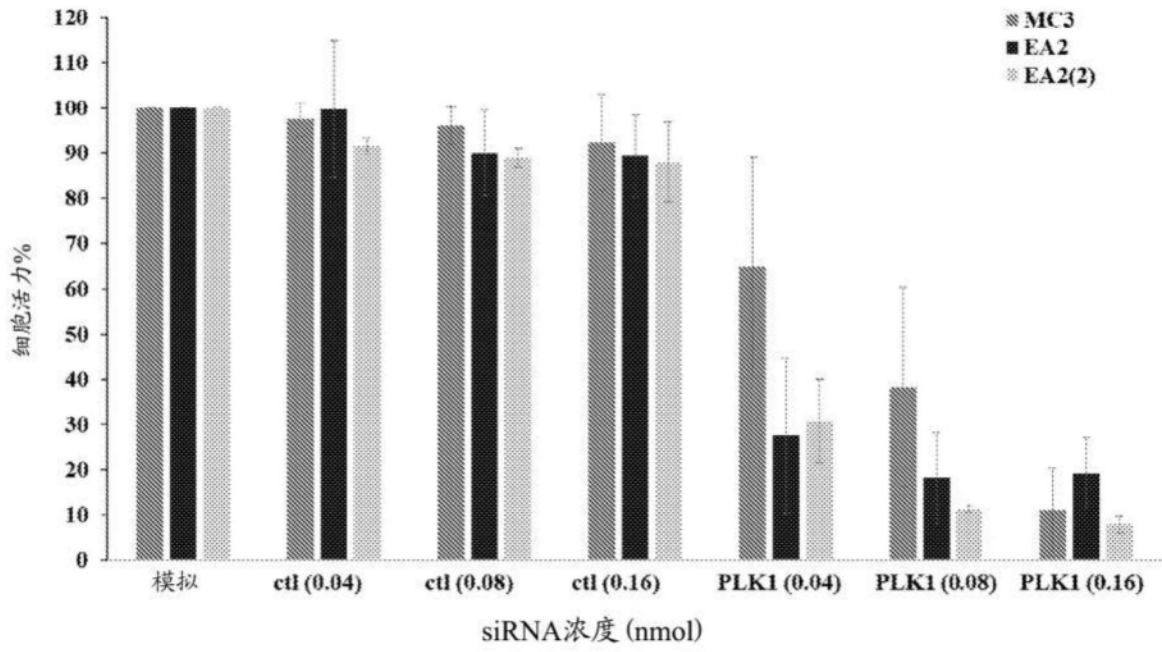


图9

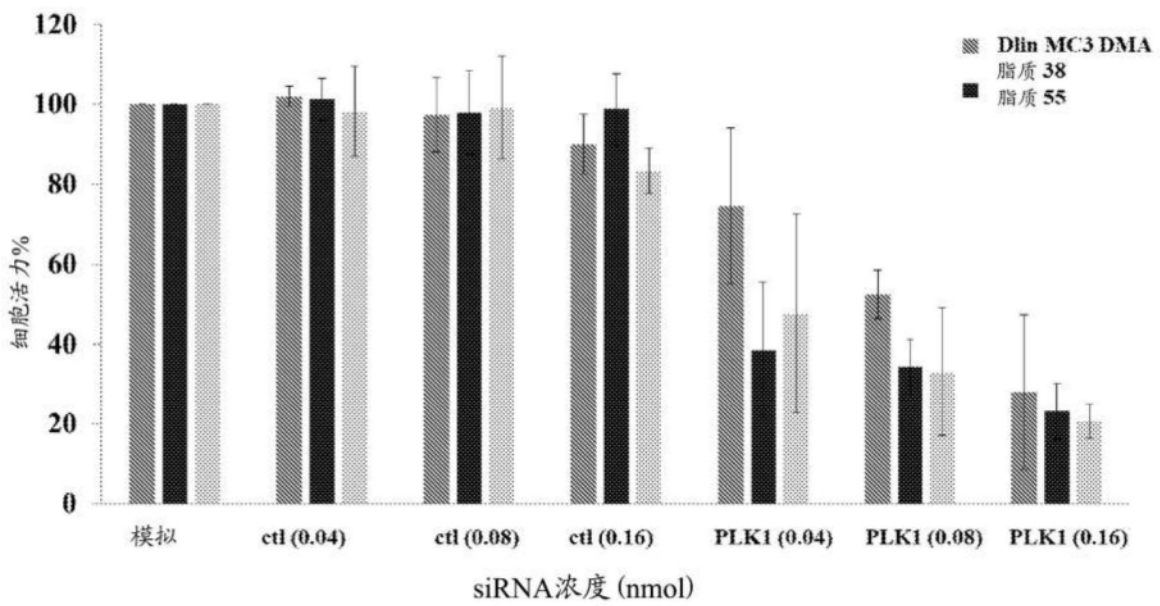


图10

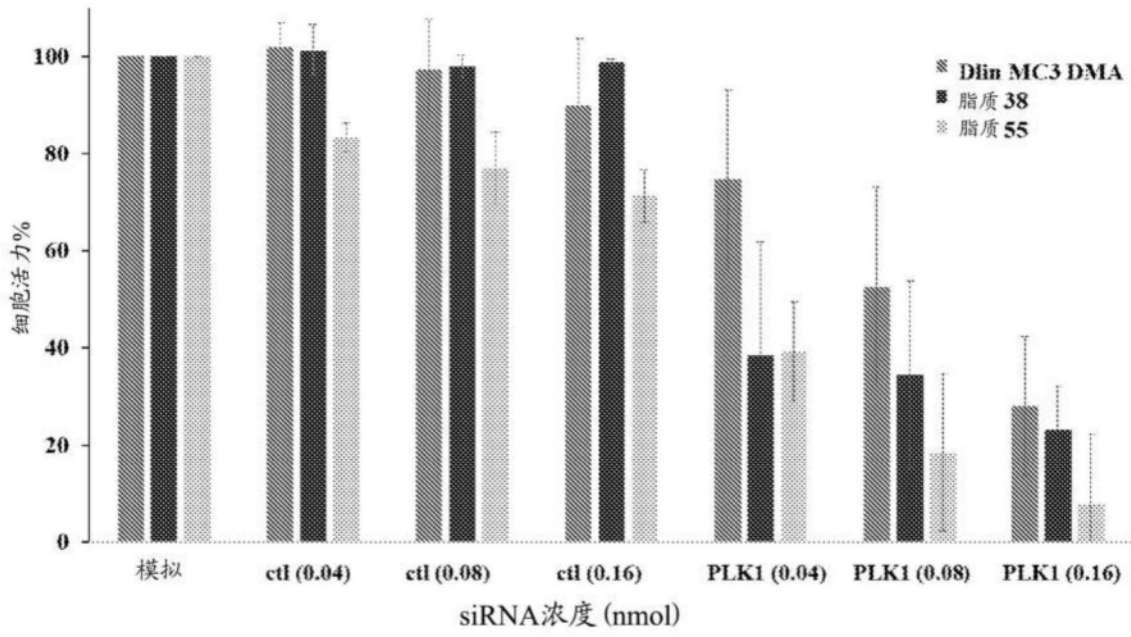


图11

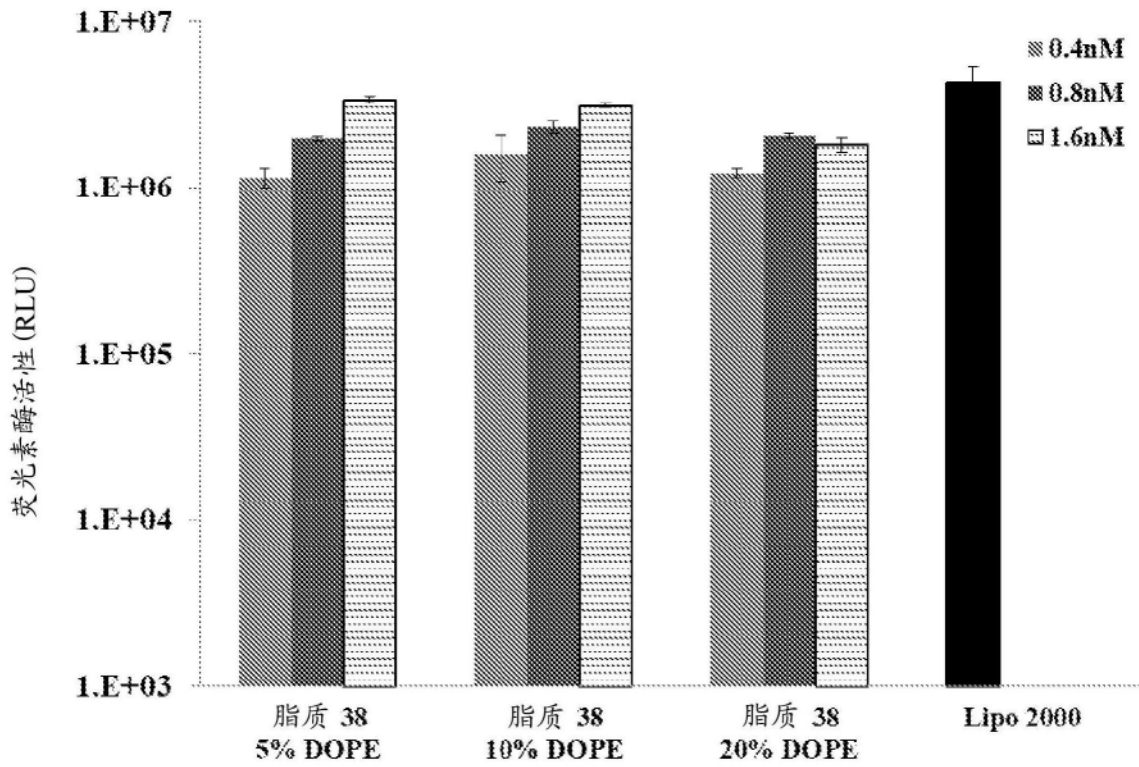


图12

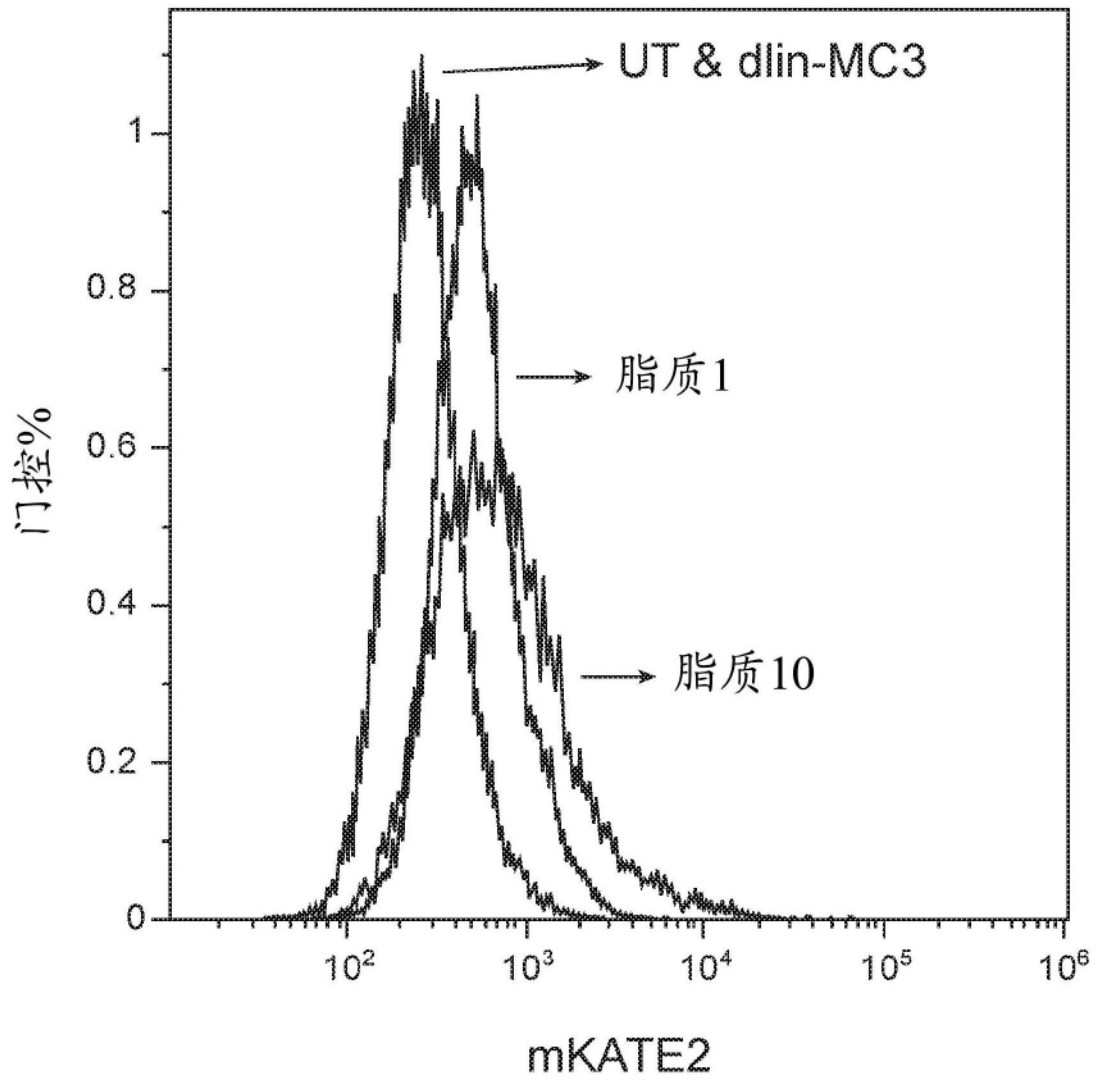


图13

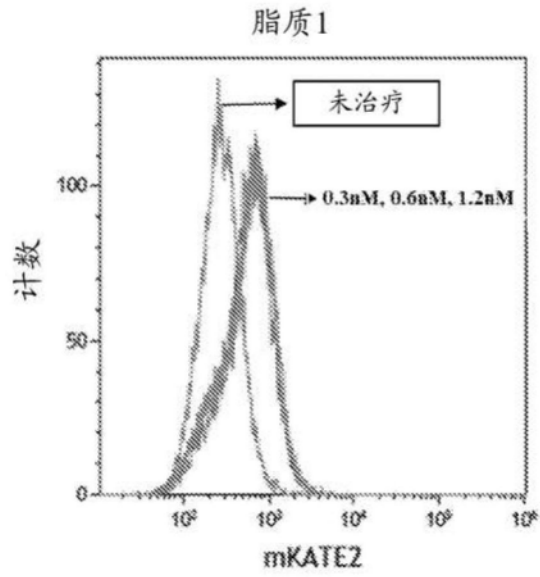


图14A

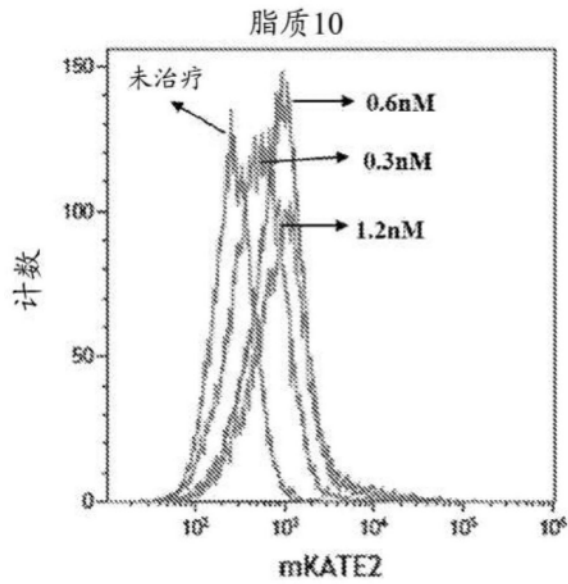


图14B

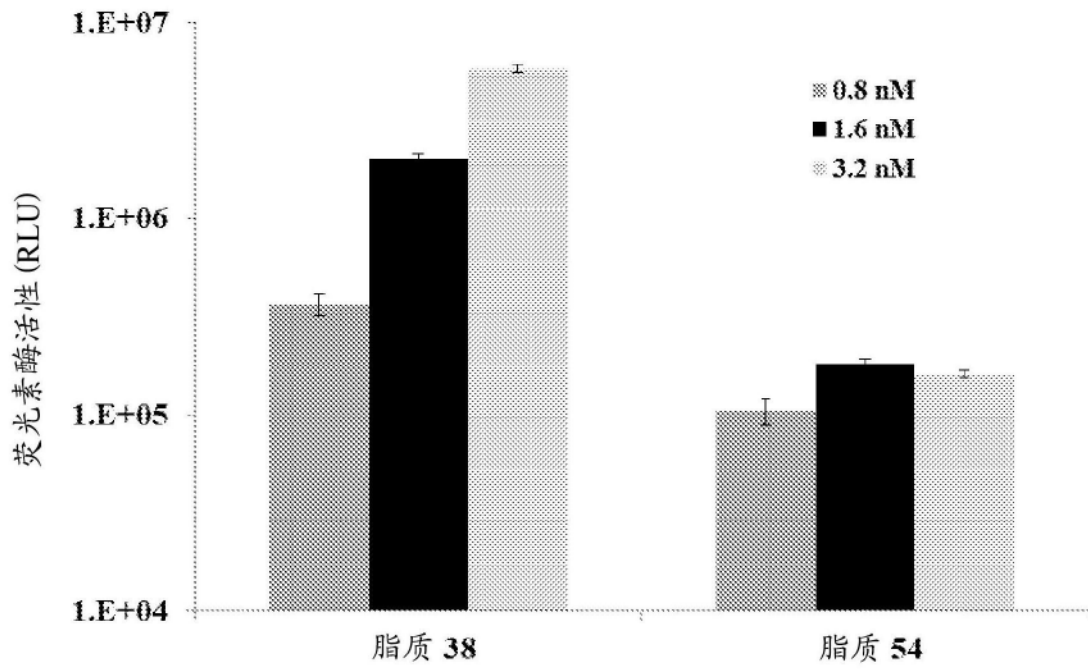


图15

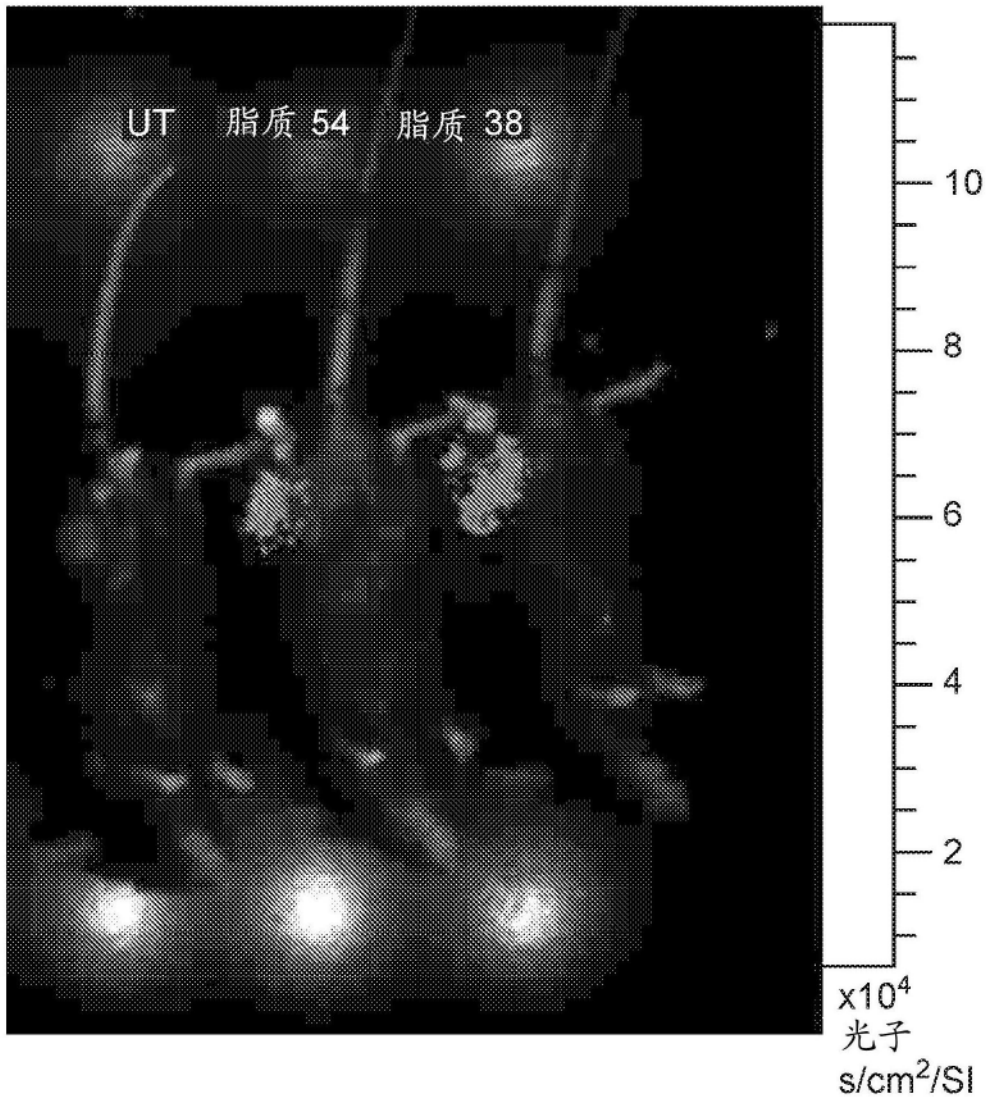


图16A

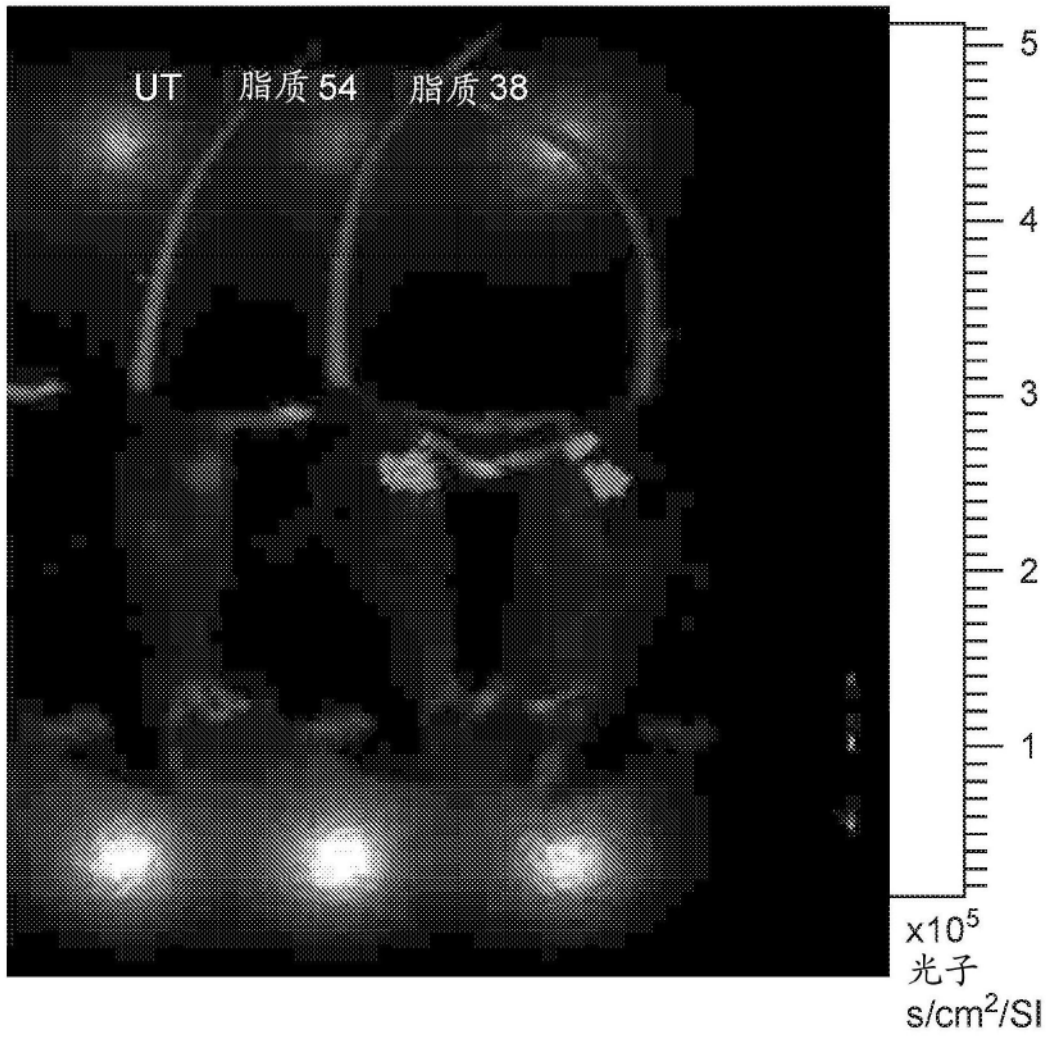


图16B

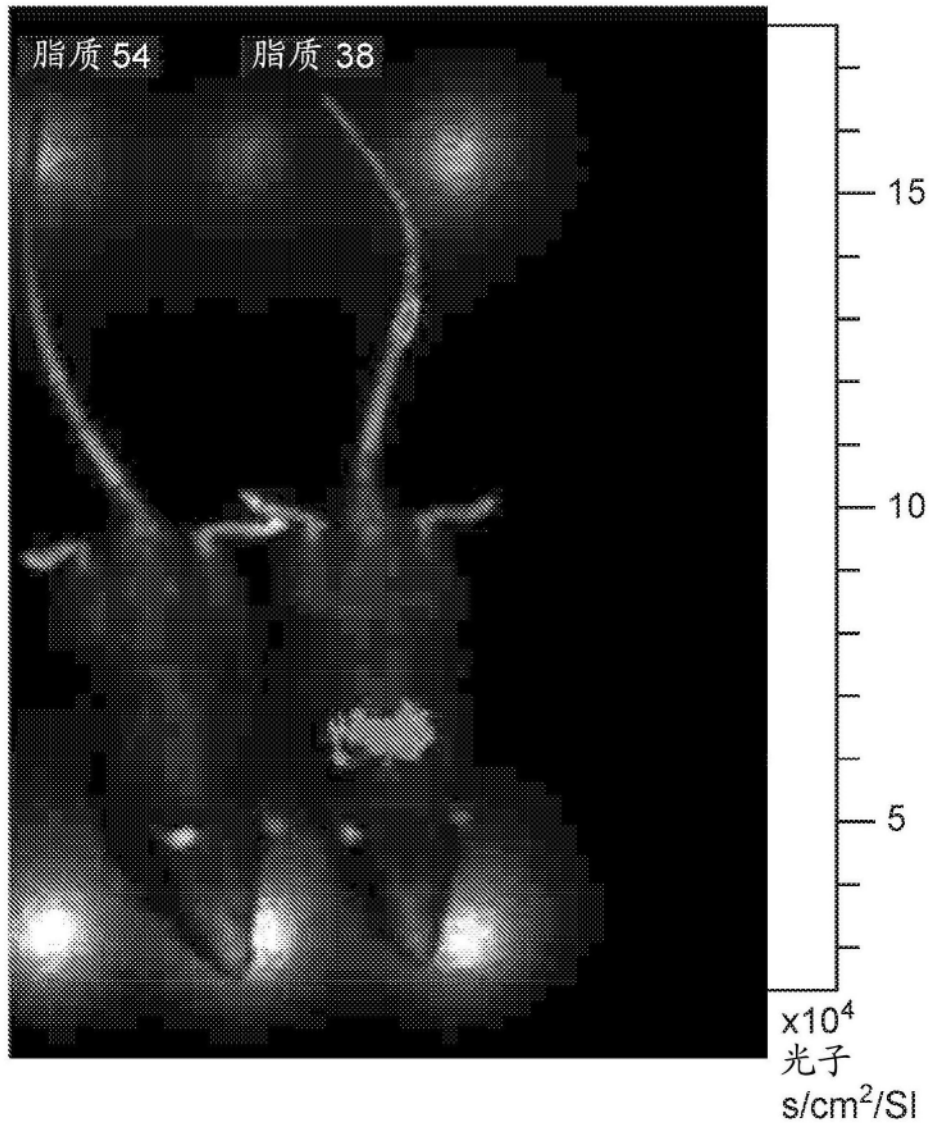


图17

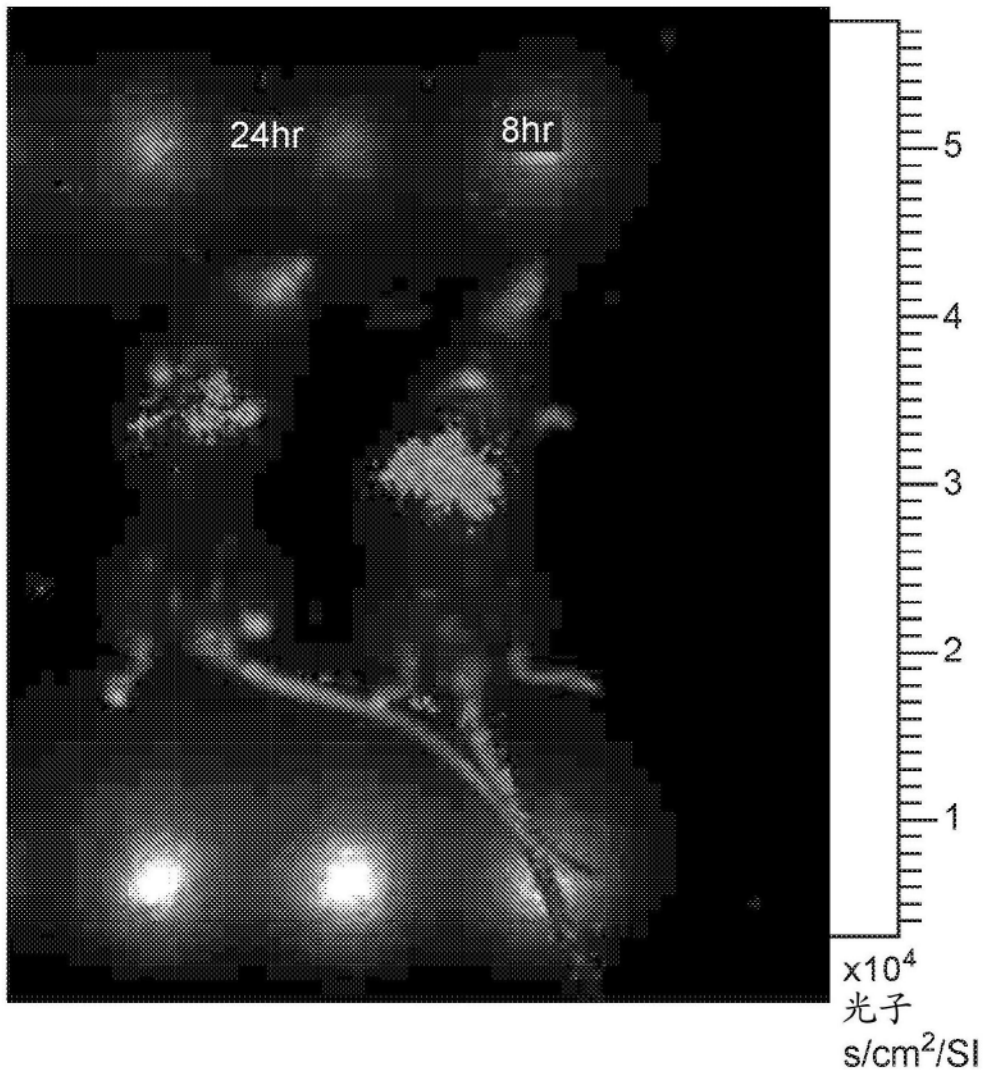


图18

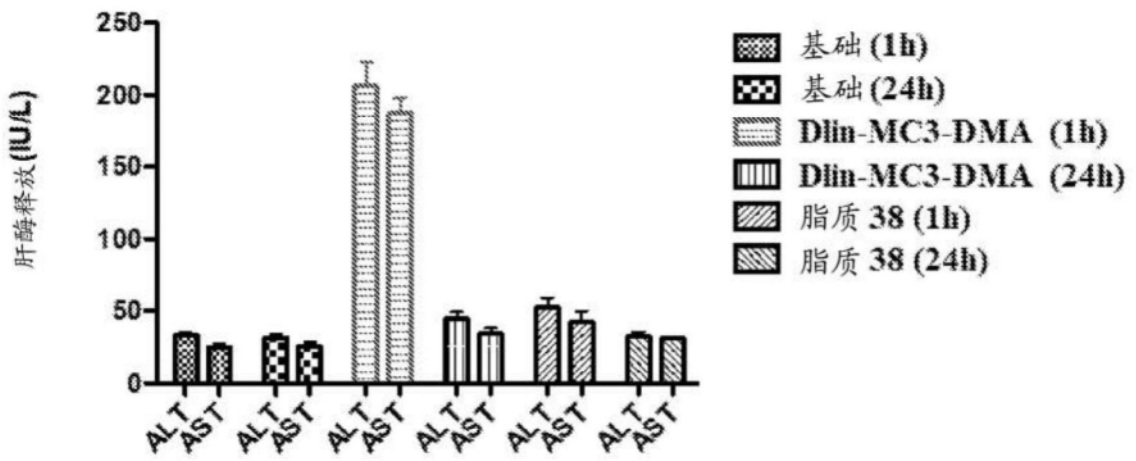


图19