(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116059170 A
(43)申请公布日 2023.05.05

(21)申请号 202211265951.2

(22)申请日 2015.06.24

(30)优先权数据
62/016,512 2014.06.24 US

(62)分案原申请数据
201580043663.4 2015.06.24

(71)申请人 川斯勒佰尔公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 F·德罗莎 S·卡夫 M·哈特莱因

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
专利代理师 吴瑜 张璐

(51)Int.Cl.
A61K 9/127(2006.01)
A61K 9/51(2006.01)
A61K 31/7088(2006.01)
A61K 31/7105(2006.01)
A61K 47/22(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)

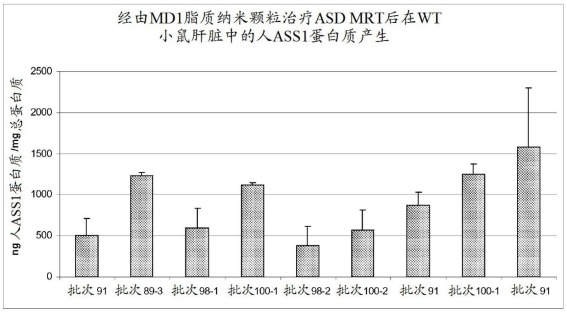
权利要求书2页 说明书65页
序列表（电子公布） 附图1页

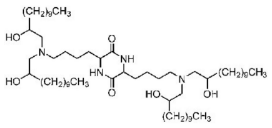
(54)发明名称

用于递送核酸的立体化学富集组合物

(57)摘要

部分地提供了包含一种或多种式I的化学实体的组合物，所述化学实体中的每一者是式(I)的化合物：其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物，所述组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第一阈值量的：是式I.a的化学实体，其中第一阈值量是50％；或是式I.b.1的化学实体，其中第一阈值量是25％；或是式I.b.2的化学实体，其中第一阈值量是25％，其中本文描述了式I.a、I.b.1和I.b.2的化学实体，以及使用这类组合物例如在体内递送多核苷酸的方法。





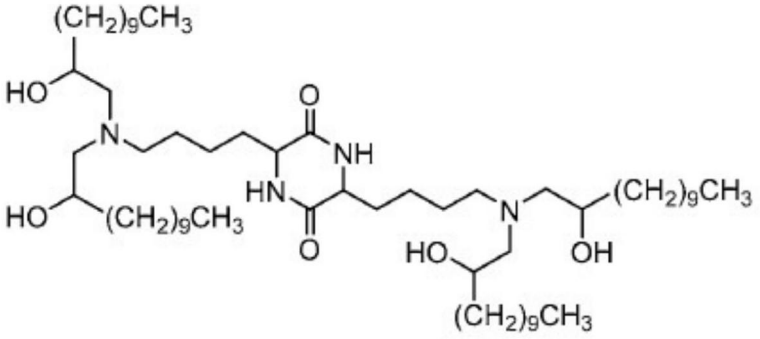
CN 116059170 A

1.一种脂质纳米颗粒,其包含:

多核苷酸,其是信使RNA(mRNA);

一种或多种非基于胆固醇的非阳离子脂质、一种或多种基于胆固醇的脂质,和/或一种或多种PEG修饰的脂质;和

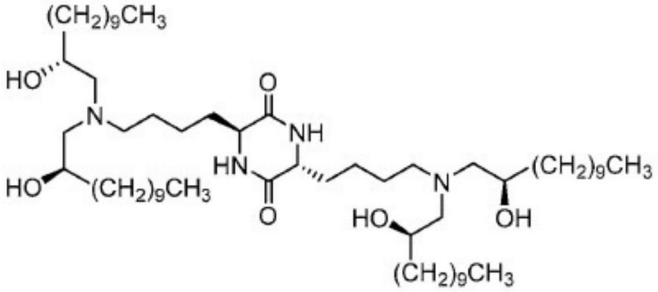
一种或多种式I的化学实体,所述化学实体中的每一者是式I的化合物:



I,

或其药学上可接受的盐,

其中,所述式I的化学实体中的70%或更多具有式I.a.i所示的结构:



I.a.i,

。

2.如权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中所述式I的化学实体中的80%或更多具有式I.a.i所示的结构。

3.如权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中所述式I的化学实体中的90%或更多具有式I.a.i所示的结构。

4.如权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中所述式I的化学实体中的95%或更多具有式I.a.i所示的结构。

5.一种在体内递送信使RNA(mRNA)的方法,其包括

对需要递送的受试者施用如权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中所述脂质纳米颗粒的施用导致由所述mRNA编码的所述蛋白质在体内的表达。

6.一种治疗疾病或病症的方法,其包括使用如权利要求1所述的脂质纳米颗粒递送编码治疗性蛋白质的mRNA的步骤。

7.如权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中所述一种或多种非阳离子脂质选自下组:DSPC(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱)、DPPC(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱)、DOPE(1,2-二油基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DOPC(1,2-二油基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱)、DPPE(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DMPE(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺),和DOPG(1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸-(1'-外消旋-甘油))。

8.如权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中所述一种或多种基于胆固醇的脂质是胆固

醇和/或PEG化胆固醇。

9.如权利要求1所述的脂质纳米颗粒，其中所述一种或多种PEG修饰的脂质包含共价连接于具有C_6-C_{20}长度的烷基链的脂质的长度达5kDa的聚(乙)二醇链。

10.一种在体内递送信使RNA(mRNA)的方法，其包括对需要递送的受试者施用如权利要求7所述的脂质纳米颗粒，其中所述脂质纳米颗粒的施用导致由所述mRNA编码的所述蛋白质在体内的表达。

11.一种在体内递送信使RNA(mRNA)的方法，其包括对需要递送的受试者施用如权利要求8所述的脂质纳米颗粒，其中所述脂质纳米颗粒的施用导致由所述mRNA编码的所述蛋白质在体内的表达。

12.一种在体内递送信使RNA(mRNA)的方法，其包括对需要递送的受试者施用如权利要求9所述的脂质纳米颗粒，其中所述脂质纳米颗粒的施用导致由所述mRNA编码的所述蛋白质在体内的表达。

用于递送核酸的立体化学富集组合物

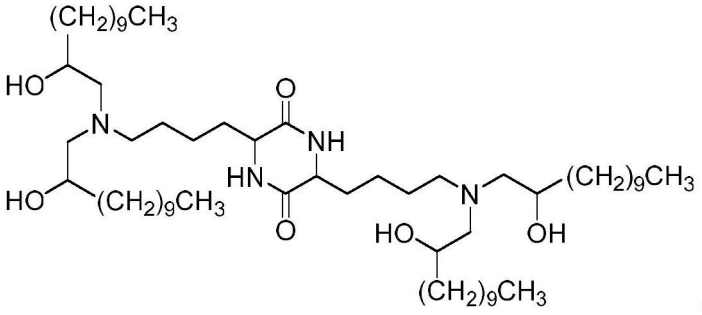
[0001] 本申请是申请号为201580043663.4、申请日为2015年6月24日、发明名称为“用于递送核酸的立体化学富集组合物”的中国发明专利申请的分案申请，原申请为国际申请号为PCT/US2015/037392的国家阶段申请，该国际申请要求申请日为2014年6月24日，申请号为62/016,512的美国临时专利申请的优先权。

背景技术

[0002] 已经广泛地探索了使用脂质递送核酸以治疗各种疾病。仍然非常需要开发具有高效率和低毒性的能递送诸如短干扰RNA(siRNA)和信使RNA(mRNA)的核酸的脂质和/或脂质组合物。

发明内容

[0003] 除其它方面外，本发明提供用于递送mRNA的包含立体化学富集的脂质的组合物。本发明部分地基于意外的发现，即包含下式I的立体化学富集的脂质的组合物在体内递送mRNA和产生编码蛋白质方面是高度有效的并具有意想不到的低毒性：

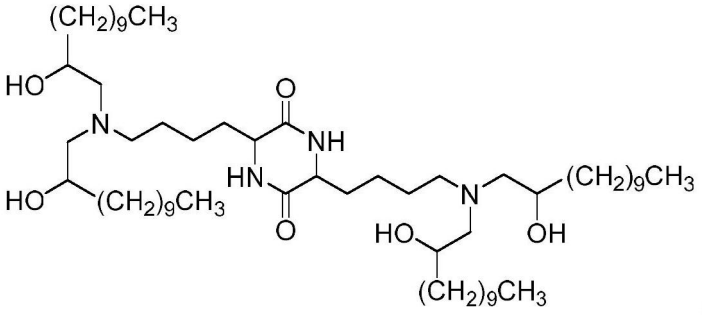
[0004] 

。

I

[0005] 本发明人发现，与相同脂质的立体化学非富集或立体化学富集程度较低的组合物相比，当用于mRNA递送时，I的立体化学富集的组合物具有意外低的毒性，例如通过显著较低的丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)表达水平表明的那样。参见表1。

[0006] 在一些实施方案中，本发明提供包含一种或多种式I的化学实体的组合物，所述化学实体中的每一者是式I的化合物：

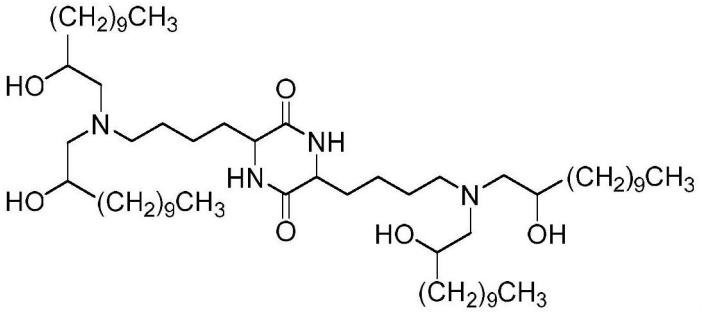
[0007] 

I

[0008] 其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物，

[0009] 所述组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.a、I.b.1、I.b.2、I.c、I.d、I.e、I.f、I.g或I.h的化学实体，这些化学式中的每一者独立地如以下所定义和描述。

[0010] 在一些实施方案中，本发明提供包含一种或多种式I的化学实体的组合物，所述化学实体中的每一者是式I的化合物：

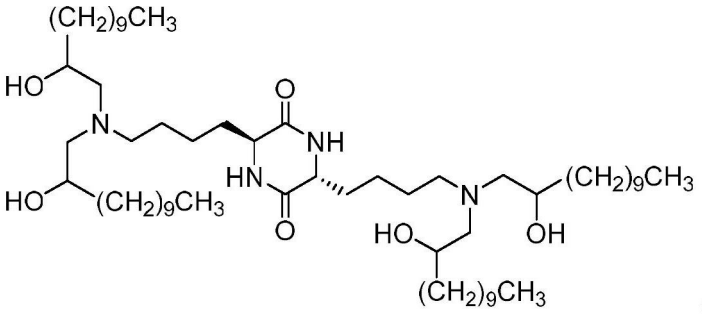
[0011] 

[0012] I

[0013] 其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物，

[0014] 所述组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的：

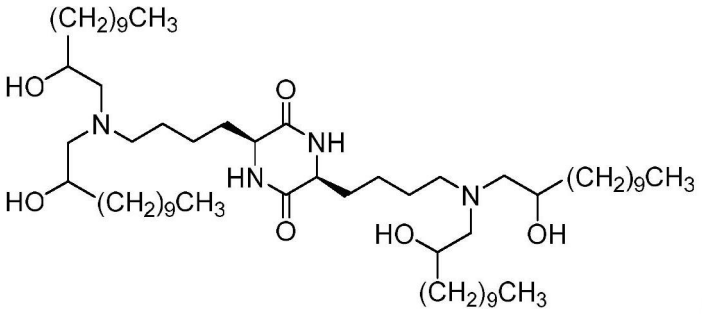
[0015] 是式I.a的化学实体：

[0016] 

I.a

[0017] 其中第一阈值量是50％；或者

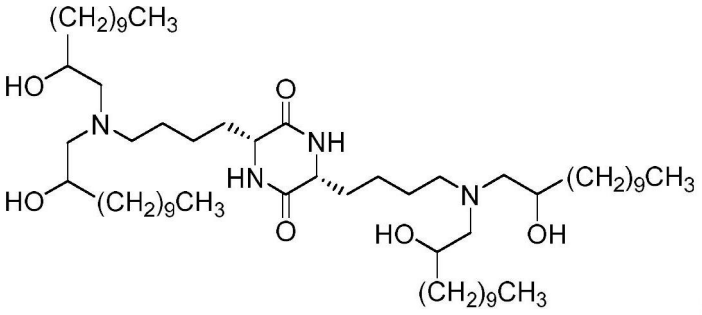
[0018] 是式I.b.1的化学实体：

[0019] 

I.b.1

[0020] 其中第一阈值量是25%;或者

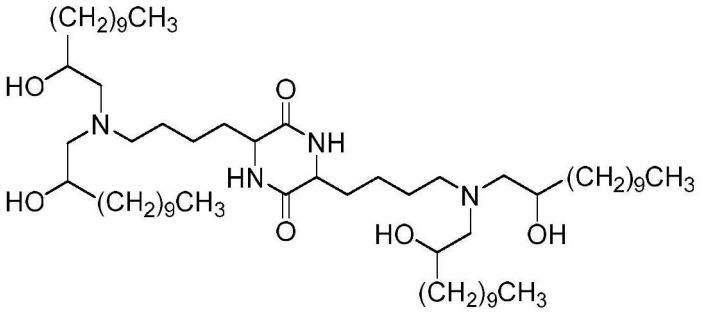
[0021] 是式I.b.2的化学实体:

[0022] 

I.b.2

[0023] 其中,第一阈值量是25%。

[0024] 在一些实施方案中,本发明提供包含一种或多种式I的化学实体的组合物,所述化学实体中的每一者是式I的化合物:

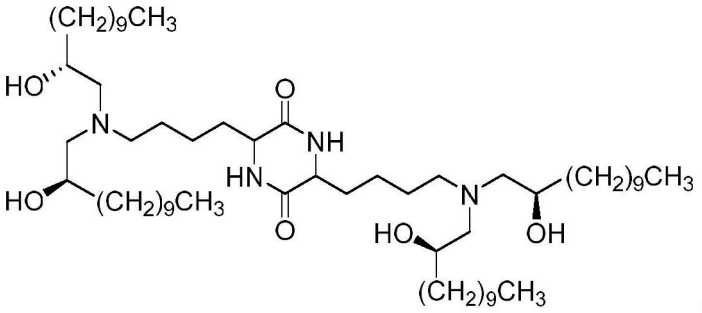
[0025] 

I

[0026] 其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物,

[0027] 所述组合物的特征在于,组合物中大于式I的化学实体的总量的第一阈值量的:

[0028] 是式I.c的化学实体:

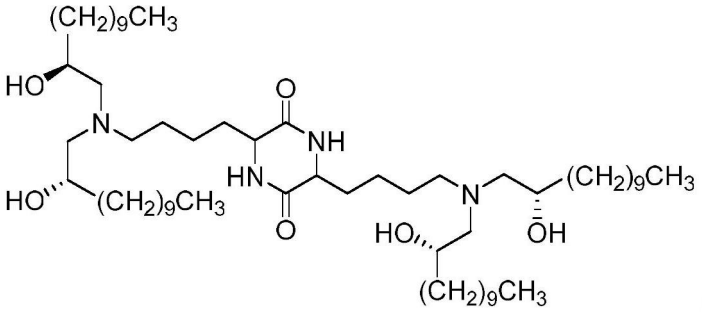
[0029] 

,

I.c

[0030] 其中第一阈值量是6.25%;或者

[0031] 是式I.d的化学实体:

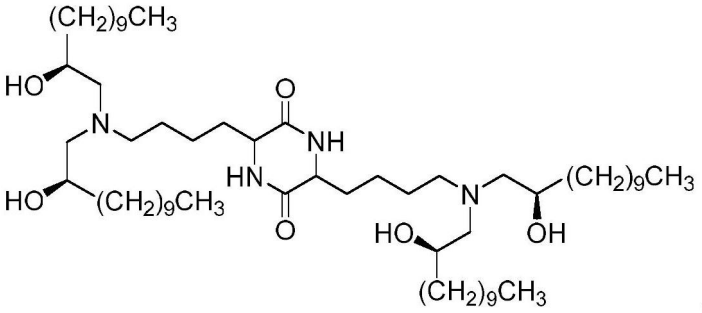
[0032] 

,

I.d

[0033] 其中第一阈值量是6.25%;或者

[0034] 是式I.e的化学实体:

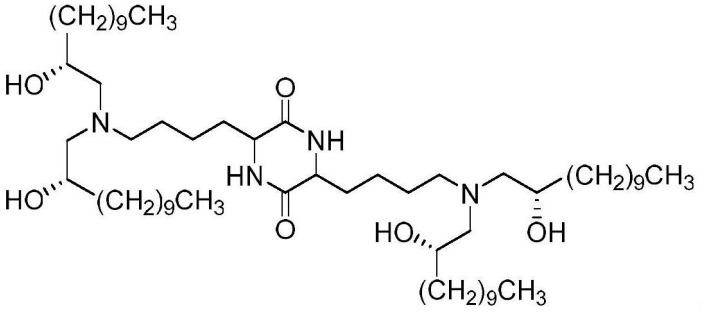
[0035] 

,

I.e

[0036] 其中第一阈值量是25%;或者

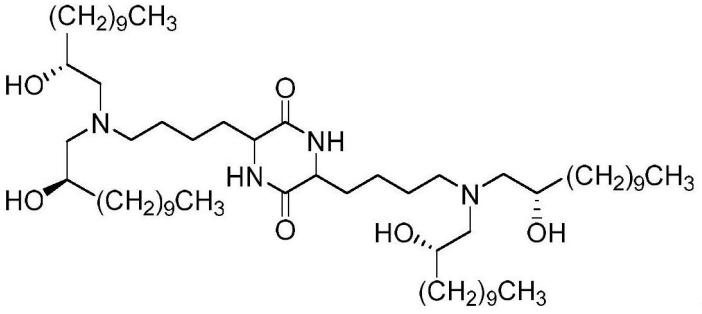
[0037] 是式I.f的化学实体:

[0038] 

I.f

[0039] 其中第一阈值量是25%;或者

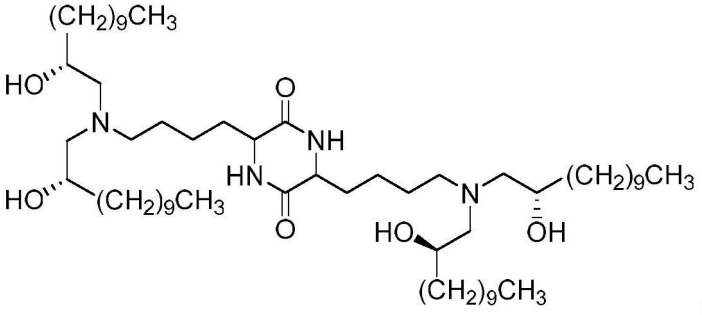
[0040] 是式I.g的化学实体:

[0041] 

I.g

[0042] 其中第一阈值量是12.5%;或者

[0043] 是式I.h的化学实体:

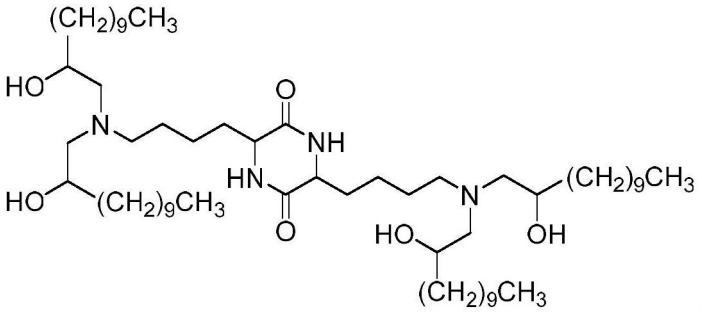
[0044] 

I.h

[0045] 其中第一阈值量是25%。

[0046] 在一些实施方案中,第一阈值量是50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些实施方案中,第一阈值量是50%。在一些实施方案中,第一阈值量是70%。在一些实施方案中,第一阈值量是80%。在一些实施方案中,第一阈值量是95%。

[0047] 在一些实施方案中,本发明提供包含一种或多种式I的化学实体的组合物,所述化学实体中的每一者是式I的化合物:

[0048] 

I

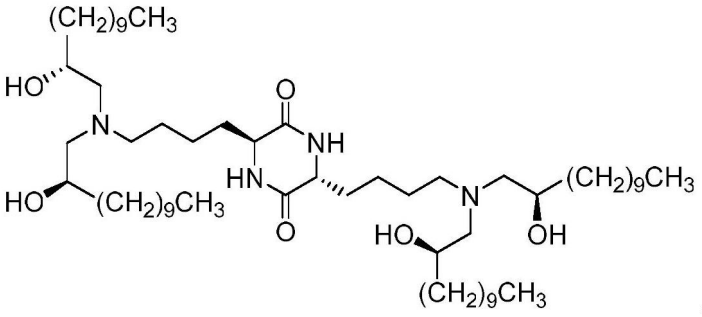
[0049] 其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物，

[0050] 所述组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是选自式I.a、I.b.1、I.b.2、I.c、I.d、I.e、I.f、I.g或I.h的第一式的化学实体；且

[0051] 组合物中大于或等于第一式的化学实体的总量的第二阈值量的是第一式的相同立体异构体的化学实体。

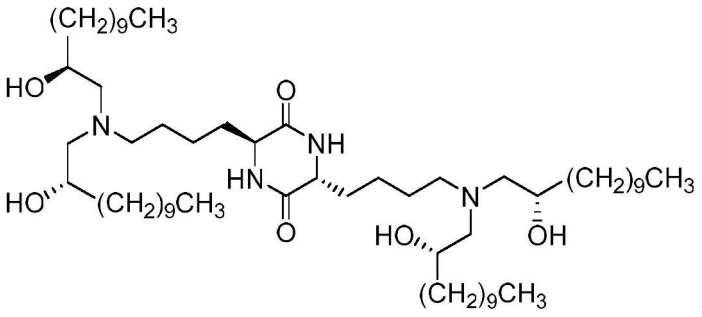
[0052] 在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.a的化学实体。

[0053] 在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.a的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.i的化学实体：

[0054] 

I.a.i (即， *R4-SR-cKK-E12*)

[0055] 在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.a的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.ii的化学实体：

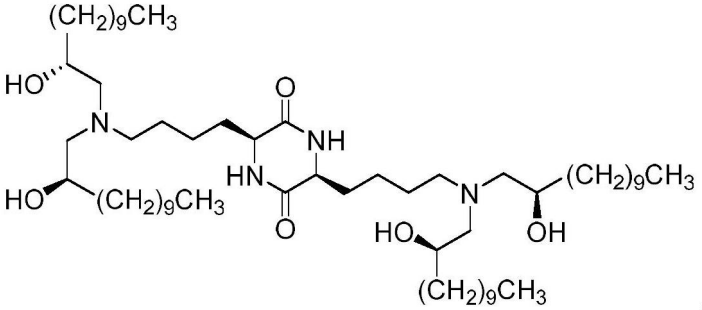
[0056] 

I.a.ii(即， *S4-SR-cKK-E12*)

[0057] 在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的

是式I.b.1的化学实体。

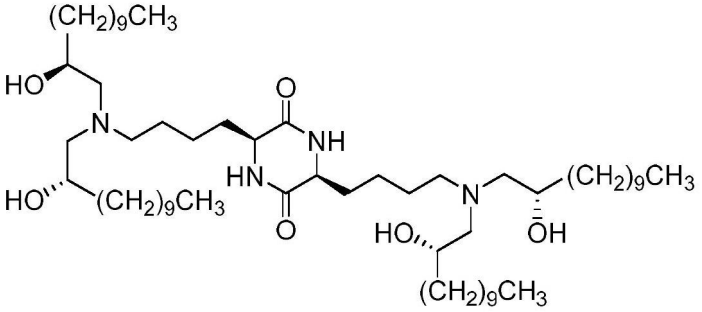
[0058] 在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.b.1的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.1.i的化学实体：

[0059] 

。

[0060] **I.b.1.i**(即， *R4-SS-cKK-E12*)

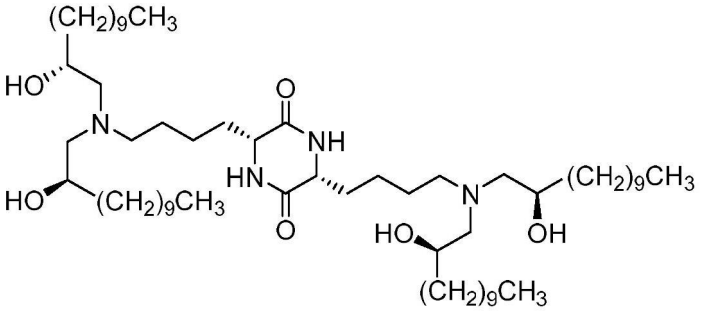
[0061] 在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.b.1的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.1.ii的化学实体：

[0062] 

I.b.1.ii(即， *S4-SS-cKK-E12*)

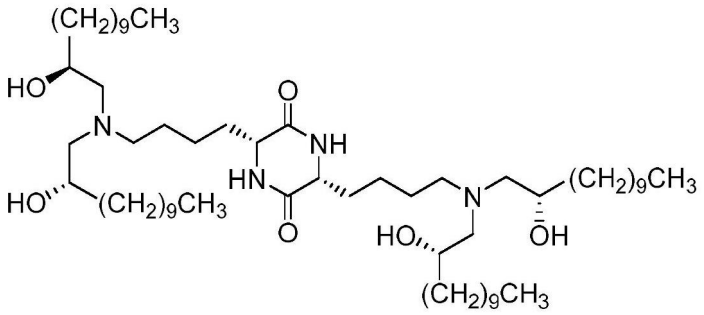
[0063] 在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.b.2的化学实体。

[0064] 在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.b.2的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.2.i的化学实体：

[0065] 

I.b.2.i(即， *R4-RR-cKK-E12*)

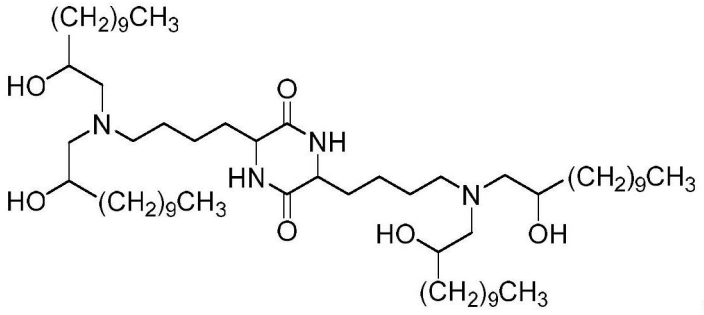
[0066] 在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.b.2的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.2.ii的化学实体：

[0067] 

I.b.2.ii(即， *S4-RR-cKK-E12*)

[0068] 在一些实施方案中，第二阈值量是50％、60％、70％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％。在一些实施方案中，第二阈值量是50％。在一些实施方案中，第二阈值量是70％。在一些实施方案中，第二阈值量是80％。在一些实施方案中，第二阈值量是95％。

[0069] 在一些实施方案中，本发明提供包含一种或多种式I的化学实体的组合物，所述化学实体中的每一者是式I的化合物：

[0070] 

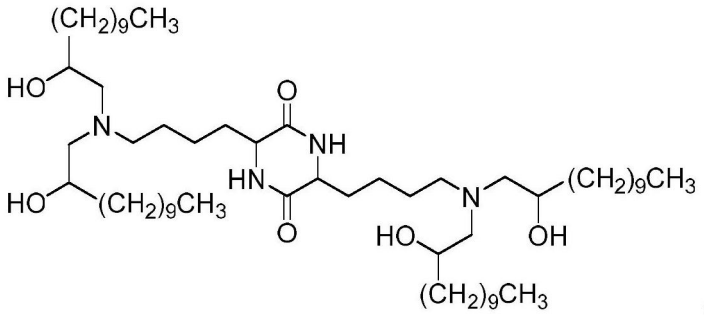
，

I

[0071] 其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物，

[0072] 所述组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I的化学实体。

[0073] 在一些实施方案中，本发明提供包含一种或多种式I的化学实体的组合物，所述化学实体中的每一者是式I的化合物：

[0074] 

，

I

[0075] 其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物，

[0076] 所述组合物的特征在于,组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I的相同立体异构体的化学实体。

[0077] 在一些实施方案中,式I的立体异构体具有式I.a.i、I.a.ii、I.b.1.i、I.b.1.ii、I.b.2.i或I.b.2.ii的结构。

[0078] 在一些实施方案中,大于或等于组合物的总量的第三阈值量的是式I.a.i、I.a.ii、I.b.1.i、I.b.1.ii、I.b.2.i或I.b.2.ii的化学实体。在一些实施方案中,大于或等于组合物的总量的第三阈值量的是式I.a.i的化学实体。在一些实施方案中,大于或等于组合物的总量的第三阈值量的是式I.a.ii的化学实体。在一些实施方案中,大于或等于组合物的总量的第三阈值量的是式I.b.1.i的化学实体。在一些实施方案中,大于或等于组合物的总量的第三阈值量的是式I.b.1.ii的化学实体。在一些实施方案中,大于或等于组合物的总量的第三阈值量的是式I.b.2.i的化学实体。在一些实施方案中,大于或等于组合物的总量的第三阈值量的是式I.b.2.ii的化学实体。

[0079] 在一些实施方案中,第三阈值量是50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%(w/w)。在一些实施方案中,第三阈值量是50%(w/w)。在一些实施方案中,第三阈值量是70%(w/w)。在一些实施方案中,第三阈值量是80%(w/w)。在一些实施方案中,第三阈值量是85%(w/w)。在一些实施方案中,第三阈值量是95%(w/w)。

[0080] 在一些实施方案中,所提供的组合物进一步包含一种或多种用于编码蛋白质在体内的mRNA递送和表达的mRNA。

[0081] 在一些实施方案中,本发明提供在体内高效递送和表达mRNA和编码蛋白质的方法。在一些实施方案中,本发明提供在体内递送mRNA的方法,包括对需要递送的受试者施用所提供的包含mRNA的组合物。在一些实施方案中,由于所提供的组合物毒性低,则其允许有更多递送的mRNA、更高的蛋白质表达水平和/或更低的施用频率,从而提供更有效力、更安全且更具专利友好性(patent-friendly)的mRNA疗法。

附图说明

[0082] 图1描述在用包括式I的化合物的脂质纳米颗粒治疗后在野生型小鼠肝脏中的体内人ASS1蛋白质产生的结果。

[0083] 定义

[0084] 为了能更容易地理解本发明,下面首先定义某些术语。以下术语及其它术语的附加定义是在整个说明书中阐述的。本文引用以描述发明背景并提供有关其实施的附加细节的出版物及其它参考资料据此以引用的方式并入。

[0085] 氨基酸:如本文所用,术语"氨基酸"在其最广泛的意义上是指可被并入到多肽链当中的任何化合物和/或物质。在一些实施方案中,氨基酸具有一般结构H_EN-C(H)(R)-COHO。在一些实施方案中,氨基酸是天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,氨基酸是合成氨基酸;在一些实施方案中,氨基酸是d-氨基酸;在一些实施方案中,氨基酸是l-氨基酸。"标准氨基酸"是指常见于天然存在的肽中的二十种标准l-氨基酸中的任一者。"非标准氨基酸"是指除标准氨基酸以外的任何氨基酸,不论其是合成制备的还是得自天然来源。如本文所用,"合成氨基酸"涵盖化学修饰的氨基酸,包括但不限于盐、氨基酸衍生物(如酰胺)

和/或取代物。可通过甲基化、酰胺化、乙酰化、保护基团和/或用能改变肽的循环半衰期而不会不利地影响其活性的其它化学基团取代来修饰氨基酸，包括肽中的羧基和/或氨基末端氨基酸。氨基酸可参与二硫键。氨基酸可包含一个或翻译后修饰，诸如与一个或多个化学实体(例如，甲基基团、乙酸根基团、乙酰基基团、磷酸根基团、甲酰基部分、类异戊二烯基团、硫酸根基团、聚乙二醇部分、脂质部分、碳水化合物部分、生物素部分等)缔合。术语“氨基酸”可与“氨基酸残基”互换使用，并且可以指肽的游离氨基酸和/或氨基酸残基。由该术语的使用背景可明显地知道其是指肽的游离氨基酸还是残基。

[0086] 动物：如本文所用，术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施方案中，“动物”是指处于发育的任何阶段的人。在一些实施方案中，“动物”是指处于发育的任何阶段的非人动物。在某些实施方案中，非人动物是哺乳动物(例如，啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、绵羊、牛、灵长类动物和/或猪)。在一些实施方案中，动物包括但不限于哺乳动物、鸟、爬行动物、两栖动物、鱼、昆虫和/或蠕虫。在一些实施方案中，动物可以是转基因动物、遗传工程改造的动物和/或克隆体。

[0087] 大约或约：如本文所用，应用于所关注的一个或多个值的术语“大约”或“约”是指与所陈述的参考值类似的值。在某些实施方案中，术语“大约”或“约”是指除另有说明或从上下文中明显不然外在任一方向上与所陈述的参考值相差(大于或小于)25％、20％、19％、18％、17％、16％、15％、14％、13％、12％、11％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％、1％或更小以内范围的值(除非这样的数会超过可能值的100％)。

[0088] 化学实体：术语“化学实体”包括化合物、其盐或溶剂合物，或化合物、其盐或溶剂合物的任意组合。

[0089] 递送：如本文所用，术语“递送”涵盖局部和全身递送两者。例如，mRNA的递送涵盖其中mRNA被递送到靶组织并且所编码的蛋白被表达和保留在靶组织内的情况(也被称为“局部分配”或“局部递送”)以及其中mRNA被递送到靶组织并且所编码的蛋白被表达和分泌到患者的循环系统(例如，血清)里且全身分配并被其它组织吸收的情况(也被称为“全身分配”或“全身递送”)。

[0090] 表达：如本文所用，核酸序列的“表达”是指mRNA翻译成多肽、多个多肽(例如，抗体的重链或轻链)组装成完整蛋白(例如，抗体)和/或多肽或完全组装蛋白(例如，抗体)的翻译后修饰。在本申请中，术语“表达”和“产生”及语法上的等效表述可互换使用。

[0091] 功能性：如本文所用，“功能性”生物分子是这样形式的生物分子，即其表现出其借以被表征的性质和/或活性。

[0092] 半衰期：如本文所用，术语“半衰期”是按在时间段开始时测量诸如核酸或蛋白质浓度或活性的量降到其值的一半所需的时间。

[0093] 提高、增加或减少：如本文所用，术语“提高”、“增加”或“减少”或语法上的等效表述表示相对于基线测量的值，所述基线测量如在开始本文所述的治疗之前在同一个体中进行的测量，或者是在不存在本文所述的治疗的情况下在对照受试者(或多个对照受试者)中进行的测量。“对照受试者”是罹患与所治疗的受试者相同形式的疾病的受试者，其具有与所治疗的受试者大致相同的年龄。

[0094] 体外：如本文所用，术语“体外”是指在人为环境中发生的事件，例如，在试管或反应容器中、在细胞培养物中，等等，而不是在多细胞生物体内。

[0095] 体内:如本文所用,术语“体内”是指在诸如人及非人动物的多细胞生物体内发生的事件。在基于细胞的系统的上下文中,该术语可用于指活细胞内发生的事件(与例如体外系统相反)。

[0096] 分离的:如本文所用,术语“分离的”是指这样的物质和/或实体,其已经(1)与在最初产生时(在自然界和/或在实验环境中)与其相关联的至少一些组分分开,和/或(2)通过人手动产生、制备和/或制造。分离的物质和/或实体可与约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或超过约99%的最初与其相关联的其它组分分开。在一些实施方案中,分离的药剂是约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或超过约99%纯的。如本文所用,如果物质基本上不含其它组分,则该物质是“纯的”。如本文所用,计算分离的物质和/或实体的百分比纯度不应包括赋形剂(例如,缓冲液、溶剂、水等)。

[0097] 局部分配或递送:如本文所用,术语“局部分配”、“局部递送”或语法上的等效表述是指组织特异性递送或分配。通常,局部分配或递送需要由mRNA编码的蛋白质(例如,酶)在细胞内或以避免进入患者的循环系统的有限分泌的方式被翻译和表达。

[0098] 信使RNA(mRNA):如本文所用,术语“信使RNA(mRNA)”是指编码至少一种多肽的多核苷酸。如本文所用的mRNA涵盖修饰的和未修饰的RNA两者。mRNA可含有一个或多个编码及非编码区。mRNA可由天然来源纯化,使用重组表达系统产生,并且任选纯化、以化学方式合成,等等。在适当情况下,例如在化学合成的分子的情况下,mRNA可包含核苷类似物,如具有化学修饰的碱基或糖、主链修饰等的类似物。除另指出外,以5’至3’方向给出mRNA序列。在一些实施方案中,mRNA是或包含天然核苷(例如,腺苷、鸟苷、胞苷、尿苷);核苷类似物(例如,2-氨基腺苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯并-嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C-5丙炔基-胞苷、C-5丙炔基-尿苷、2-氨基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5丙炔基-尿苷、C5丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、2-氨基腺苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-氧代腺苷、8-氧代鸟苷、O(6)-甲基鸟嘌呤和2-硫代胞苷);化学修饰的碱基;生物修饰的碱基(例如,甲基化碱基);插入碱基;修饰的糖(例如,2’-氟核糖、核糖、2’-脱氧核糖、阿拉伯糖和己糖);和/或修饰的磷酸基团(例如,硫代磷酸酯和5’-N-亚磷酰胺键)。

[0099] 在一些实施方案中,mRNA包含一个或多个非标准核苷酸残基。非标准核苷酸残基可包括例如5-甲基-胞苷(“5mC”)、假尿苷和/或2-硫代-尿苷(“2sU”)。参见例如第8,278,036号美国专利或WO2011012316关于这类残基及其并入mRNA的讨论。mRNA可以是这样的RNA,其被定义为其中25%的U残基是2-硫代-尿苷且25%的C残基是5-甲基胞苷的RNA。美国专利公开US20120195936和国际公开WO2011012316中公开了使用RNA的教导,这两篇文献特此以引用的方式全文并入。非标准核苷酸残基的存在可使mRNA比具有相同序列但仅含有标准残基的对照mRNA更稳定和/或免疫原性更低。在进一步的实施方案中,mRNA可包含选自异胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、6-氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、肌苷、二氨基嘌呤和2-氯-6-氨基嘌呤胞嘧啶的一种或多种非标准核苷酸残基以及这些修饰和其它核碱基修饰的组合。某些实施方案可进一步包括对呋喃糖环或核碱基的另外的修饰。另外的修饰可包括例如糖修饰或取代(例如,2’-O-烷基修饰、锁定核酸(LNA)中的一种或多种)。在一些实施方案中,RNA可与另外的多核苷酸和/或肽多核苷酸(PNA)复合或杂交。在其中糖修饰

是2'-O-烷基修饰的实施方案中,这种修饰可包括但不限于2'-脱氧-2'-氟修饰、2'-O-甲基修饰、2'-O-甲氧基乙基修饰和2'-脱氧修饰。在某些实施方案中,这些修饰中的任一者可以核苷酸的0-100%存在—例如超过个别或组合的构成核苷酸的0%、1%、10%、25%、50%、75%、85%、90%、95%或100%。

[0100] 核酸:如本文所用,术语"核酸"在其最广泛的意义上是指是或能并入多核苷酸链的任何化合物和/或物质。在一些实施方案中,核酸为是或能经由磷酸二酯键并入多核苷酸链的化合物和/或物质。在一些实施方案中,"核酸"是指个别的核酸残基(例如,核苷酸和/或核苷)。在一些实施方案中,"核酸"是指包含个别核酸残基的多核苷酸链。在一些实施方案中,核酸"涵盖RNA以及单链和/或双链DNA和/或cDNA。

[0101] 患者:如本文所用,术语"患者"或"受试者"是指例如为了实验、诊断、预防、美容和/或治疗目的可对其施用所提供的组合物的任何生物体。典型的患者包括动物(例如,哺乳动物,如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和/或人)。在一些实施方案中,患者是人。人包括出生前和出生后的形式。

[0102] 药学上可接受的:如本文所用的术语"药学上可接受的"是指在合理的医学判断范围内适合用于与人和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激性、过敏性反应或其它问题或并发症、与合理的有益效果/风险比相称的物质。

[0103] 聚合物:"聚合物"是指包含至少3个(例如,至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100个等)重复的共价结合的结构单元的化合物。

[0104] 盐:如本文所用,术语"盐"或"药学上可接受的盐"是指在合理的医学判断范围内适合用于与人和低等动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激性、过敏性反应等且与合理的有益效果/风险比相称的那些盐。药学上可接受的盐是本领域中熟知的。例如,S.M.Berge等人在J.Pharmaceutical Sciences(1977)66:1-19中详细描述了药学上可接受的盐。本发明的化合物的药学上可接受的盐包括衍生自合适的无机和有机酸及碱的那些盐。药学上可接受的无毒酸加成盐的实例有氨基与无机酸(如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸)或与有机酸(如乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或雷诺酸)形成或者通过采用本领域中所用的其它方法(如离子交换)形成的盐。其它药学上可接受的盐包括己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐。二葡糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳糖醛酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、扑酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。衍生自适当碱的盐包括碱金属、碱土金属、铵和N+(C1-4烷基)4盐。代表性的碱或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等。进一步的药学上可接受的盐包括(在适当时)使用诸如卤离子、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、磺酸根和芳基磺酸根的抗衡离子形成的无毒铵、季铵和胺阳离子。进一步的药学上可接受的盐包括由胺的季铵化形成的盐,使用的是适当的亲电子试剂,例如烷基卤化物,以形成季铵化的烷基化氨基盐。

[0105] 全身分配或递送:如本文所用,术语"全身分配"、"全身递送"或语法上的等效表述

是指影响整个身体或整个生物体的递送或分配机制或方法。通常，全身分配或递送是经由身体的循环系统(例如，血流)完成的。与“局部分配或递送”的定义相比。

[0106] 受试者：如本文所用，术语“受试者”是指人或任何非人动物(例如，小鼠、大鼠、兔、犬、猫、牛、猪、绵羊、马或灵长类动物)。人包括出生前和出生后的形式。在许多实施方案中，受试者是人。受试者可以是患者，其是指引见给医疗服务提供者以诊断或治疗疾病的人。术语“受试者”在本文中可与“个体”或“患者”互换使用。受试者可罹患或易患疾病或病症，但可能或可能不显示疾病或病症的症状

[0107] 基本上：如本文所用，术语“基本上”是指表现出所关注的特征或性质的全部或接近全部范围或程度的定性条件。生物学领域的普通技术人员将会理解，生物及化学现象很少(如果有的话)达到完成和/或进行到完全或者实现或避免绝对的结果。因此术语“基本上”在本文中用于捕捉在许多生物学及化学现象中固有的可能缺少的完全性。

[0108] 靶组织：如本文所用，术语“靶组织”是指受待治疗的疾病影响的任何组织。在一些实施方案中，靶组织包括显示出与疾病相关的病理、症状或特征的那些组织。

[0109] 治疗有效量：如本文所用，术语治疗剂的“治疗有效量”意指当对罹患或易患疾病、病症和/或病状的subject施用时足以治疗、诊断、预防和/或延迟疾病、病症和/或病状的症状的发作的量。本领域的普通技术人员将会意识到通常经由包含至少一个单位剂量的给药方案施用治疗有效量。

[0110] 治疗：如本文所用，术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是指用于部分或完全缓解、改善、减轻、抑制、预防、延迟特定疾病、病症和/或病状的一种或多种症状或特征的发作、降低其严重程度和/或减少其发生率的任何方法。可以对未显示出疾病的征兆和/或仅显示出疾病的早期征兆的受试者施用治疗，目的是为了降低与疾病相关联的病理进展的风险。

具体实施方式

[0111] 本发明提供(除其它方面外)脂质组合物和使用立体化学富集的脂质组合物体内递送mRNA的方法。

[0112] 脂质组合物

[0113] 在一些实施方案中，本发明提供包含一种或多种式I的化学实体的组合物，所述化学实体中的每一者是式I的化合物、其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物，

[0114] 所述组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.a、I.b.1、I.b.2、I.c、I.d、I.e、I.f、I.g或I.h的化学实体。

[0115] 在一些实施方案中，所提供的组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.a、I.b.1、I.b.2、I.c、I.d、I.e、I.f、I.g或I.h的化学实体。在一些实施方案中，所提供的组合物的特征在于，组合物中式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.a、I.b.1、I.b.2、I.c、I.d、I.e、I.f、I.g或I.h的化学实体。

[0116] 如本文所用，某式的“化学实体”是该式的化合物、其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物。

[0117] 在一些实施方案中，第一阈值量是50％、60％、70％、80％、85％、90％、91％、92％、

93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些实施方案中，第一阈值量是50%。在一些实施方案中，第一阈值量是70%。在一些实施方案中，第一阈值量是80%。在一些实施方案中，第一阈值量是95%。

[0118] 在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.a的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.a的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.a的化学实体。在一些实施方案中，第一阈值量是50%。在一些实施方案中，第一阈值量是70%。在一些实施方案中，第一阈值量是80%。在一些实施方案中，第一阈值量是90%。在一些实施方案中，第一阈值量是95%。

[0119] 在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.b.1的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.b.1的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.b.1的化学实体。在一些实施方案中，第一阈值量是25%。在一些实施方案中，第一阈值量是50%。在一些实施方案中，第一阈值量是70%。在一些实施方案中，第一阈值量是80%。在一些实施方案中，第一阈值量是90%。在一些实施方案中，第一阈值量是95%。

[0120] 在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.b.2的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.b.2的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.b.2的化学实体。在一些实施方案中，第一阈值量是25%。在一些实施方案中，第一阈值量是50%。在一些实施方案中，第一阈值量是70%。在一些实施方案中，第一阈值量是80%。在一些实施方案中，第一阈值量是90%。在一些实施方案中，第一阈值量是95%。

[0121] 在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.c的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.c的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.c的化学实体。在一些实施方案中，第一阈值量是6.25%。在一些实施方案中，第一阈值量是12.5%。在一些实施方案中，第一阈值量是25%。在一些实施方案中，第一阈值量是50%。在一些实施方案中，第一阈值量是70%。在一些实施方案中，第一阈值量是80%。在一些实施方案中，第一阈值量是90%。在一些实施方案中，第一阈值量是95%。

[0122] 在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.d的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.d的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.d的化学实体。在一些实施方案中，第一阈值量是6.25%。在一些实施方案中，第一阈值量是12.5%。在一些实施方案中，第一阈值量是25%。在一些实施方案中，第一阈值量是50%。在一些实施方案中，第一阈值量是70%。在一些实施方案中，第一阈值量是80%。在一些实施

方案中，第一阈值量是90％。在一些实施方案中，第一阈值量是95％。

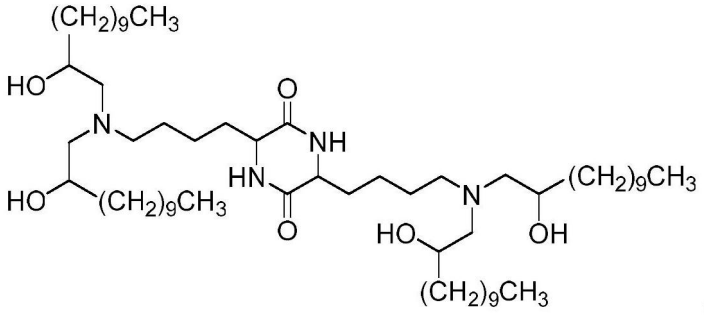
[0123] 在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.e的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.e的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.e的化学实体。在一些实施方案中，第一阈值量是25％。在一些实施方案中，第一阈值量是50％。在一些实施方案中，第一阈值量是70％。在一些实施方案中，第一阈值量是80％。在一些实施方案中，第一阈值量是90％。在一些实施方案中，第一阈值量是95％。

[0124] 在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.f的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.f的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.f的化学实体。在一些实施方案中，第一阈值量是25％。在一些实施方案中，第一阈值量是50％。在一些实施方案中，第一阈值量是70％。在一些实施方案中，第一阈值量是80％。在一些实施方案中，第一阈值量是90％。在一些实施方案中，第一阈值量是95％。

[0125] 在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.g的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.g的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.g的化学实体。在一些实施方案中，第一阈值量是12.5％。在一些实施方案中，第一阈值量是25％。在一些实施方案中，第一阈值量是50％。在一些实施方案中，第一阈值量是70％。在一些实施方案中，第一阈值量是80％。在一些实施方案中，第一阈值量是90％。在一些实施方案中，第一阈值量是95％。

[0126] 在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.h的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.h的化学实体。在一些实施方案中，所述组合物的特征在于，组合物中式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.h的化学实体。在一些实施方案中，第一阈值量是25％。在一些实施方案中，第一阈值量是50％。在一些实施方案中，第一阈值量是70％。在一些实施方案中，第一阈值量是80％。在一些实施方案中，第一阈值量是90％。在一些实施方案中，第一阈值量是95％。

[0127] 在一些实施方案中，本发明提供包含一种或多种式I的化学实体的组合物，所述化学实体中的每一者是式I的化合物：

[0128] 

,

I

[0129] 其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物，

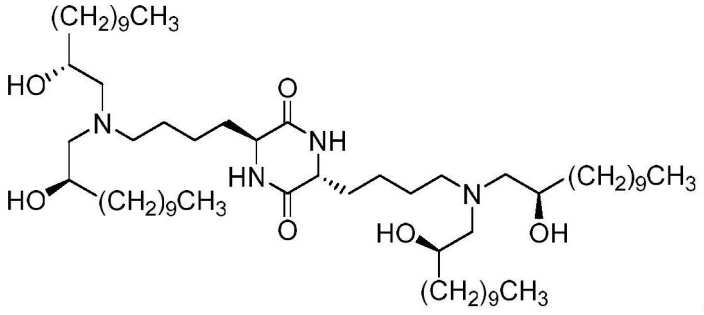
[0130] 所述组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是选自式I.a、I.b.1、I.b.2、I.c、I.d、I.e、I.f、I.g和I.h的第一式的化学实体；且

[0131] 组合物中大于或等于第一式的化学实体的总量的第二阈值量的是第一式的相同立体异构体的化学实体。

[0132] 在一些实施方案中，组合物中大于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是选自式I.a、I.b.1、I.b.2、I.c、I.d、I.e、I.f、I.g和I.h的第一式的化学实体。在一些实施方案中，组合物中式I的化学实体的总量的第一阈值量的是选自式I.a、I.b.1、I.b.2、I.c、I.d、I.e、I.f、I.g和I.h的第一式的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于第一式的化学实体的总量的第二阈值量的是第一式的相同立体异构体的化学实体。在一些实施方案中，组合物中第一式的化学实体的总量的第二阈值量的是第一式的相同立体异构体的化学实体。

[0133] 在一些实施方案中，第一式是式I.a。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.a的化学实体，且组合物中大于或等于式I.a的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a的相同立体异构体的化学实体。

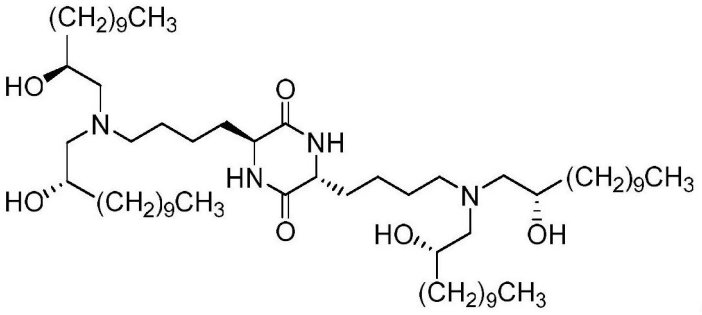
[0134] 在一些实施方案中，式I.a的立体异构体具有式I.a.i的结构：

[0135] 

。

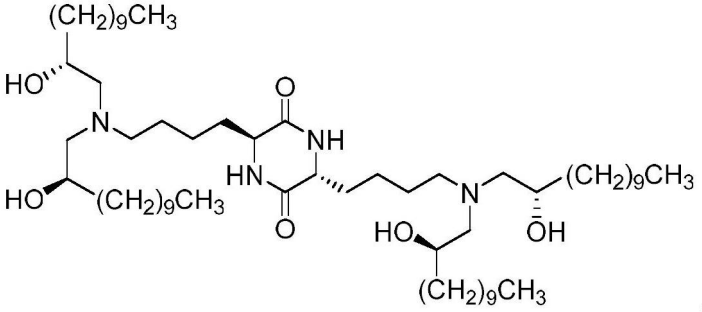
I.a.i (即， *R4-SR-cKK-E12*)

[0136] 在一些实施方案中，式I.a的立体异构体具有式I.a.ii的结构：

[0137] 

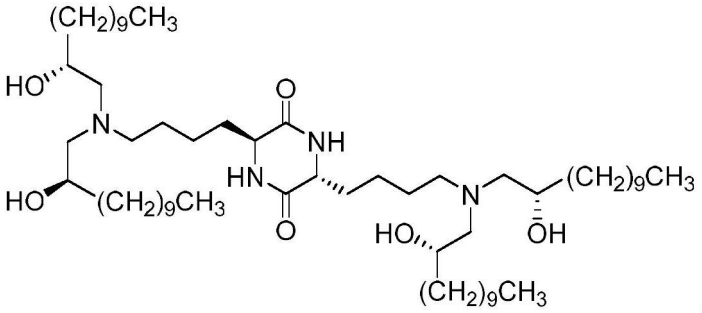
I.a.ii (即， *S4-SR-cKK-E12*)

[0138] 在一些实施方案中，式I.a的立体异构体具有式I.a.iii的结构：

[0139] 

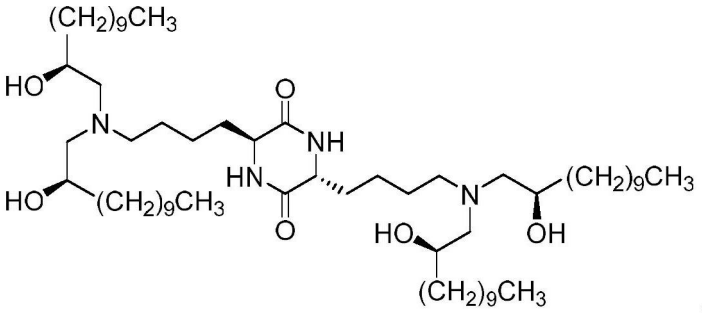
I.a.iii

[0140] 在一些实施方案中，式I.a的立体异构体具有式I.a.iv的结构：

[0141] 

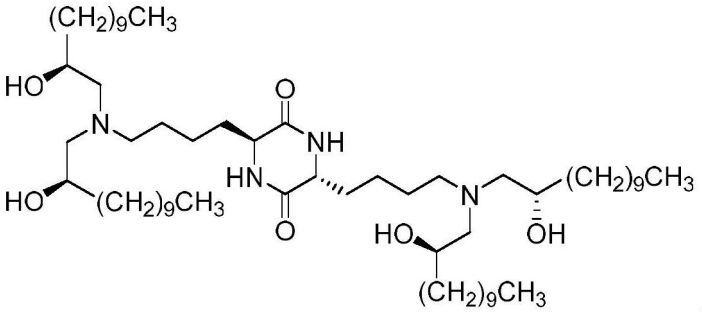
I.a.iv

[0142] 在一些实施方案中，式I.a的立体异构体具有式I.a.v的结构：

[0143] 

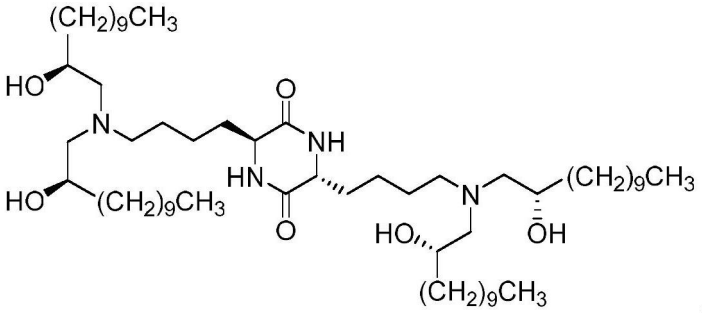
I.a.v

[0144] 在一些实施方案中,式I.a的立体异构体具有式I.a.vi的结构:

[0145] 

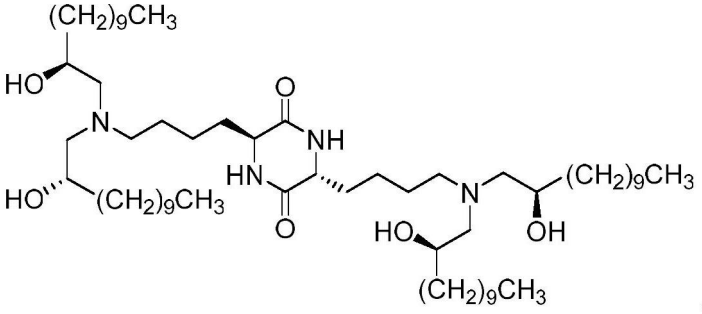
I.a.vi

[0146] 在一些实施方案中,式I.a的立体异构体具有式I.a.vii的结构:

[0147] 

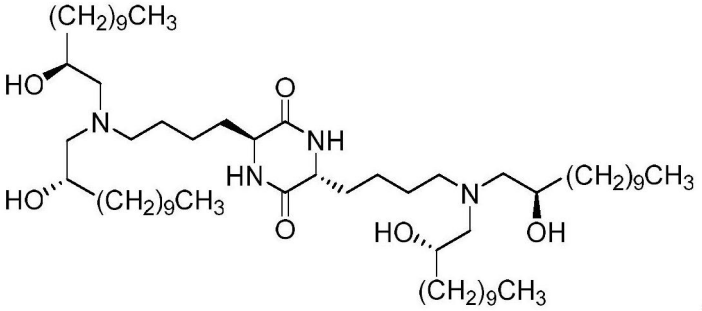
I.a.vii

[0148] 在一些实施方案中,式I.a的立体异构体具有式I.a.viii的结构:

[0149] 

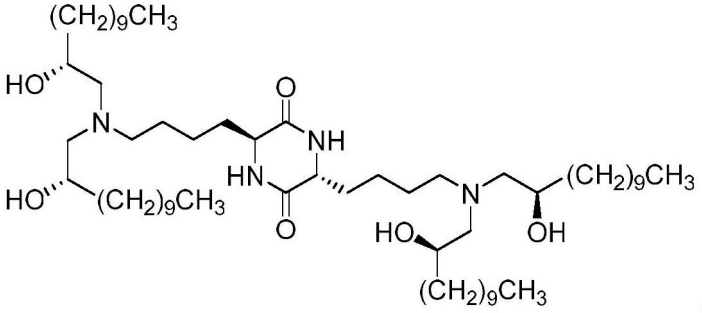
I.a.viii

[0150] 在一些实施方案中,式I.a的立体异构体具有式I.a.ix的结构:

[0151] 

I.a.ix

[0152] 在一些实施方案中,式I.a的立体异构体具有式I.a.x的结构:

[0153] 

I.a.x

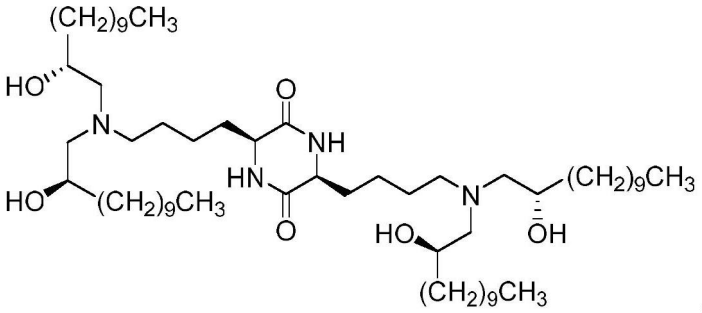
[0154] 在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.a的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.i的化学实体。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.a的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.ii的化学实体。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.a的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.iii的化学实体。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.a的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.iv的化学实体。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.a的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.v的化学实体。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.a的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.vi的化学实体。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.a的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.vii的化学实体。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.a的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.viii的化学实体。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.a的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.ix的化学实体。

[0155] 在一些实施方案中,第一式是式I.b.1。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.b.1的化学实体,且组合物中大于或等于式I.b.1的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.1的相同立体异构体的化学实体。

[0156] 在一些实施方案中,式I.b.1的立体异构体具有式I.b.1.i的结构(即,R4-SS-cKK-E12)。

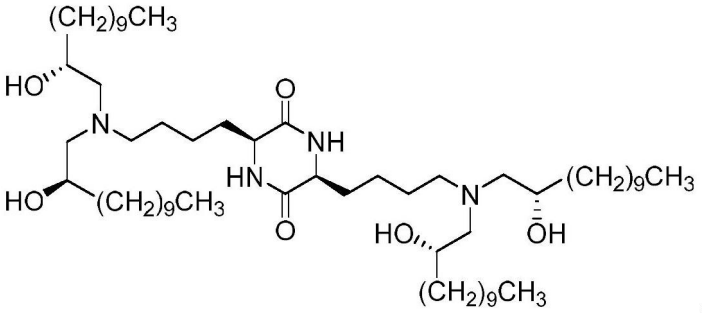
[0157] 在一些实施方案中,式I.b.1的立体异构体具有式I.b.1.ii的结构(即,S4-SS-cKK-E12)。

[0158] 在一些实施方案中,式I.b.1的立体异构体具有式I.b.1.iii的结构:

[0159] 

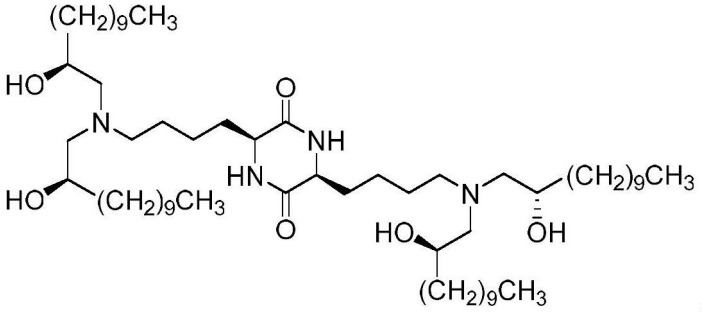
I.b.1.iii

[0160] 在一些实施方案中,式I.b.1的立体异构体具有式I.b.1.iv的结构:

[0161] 

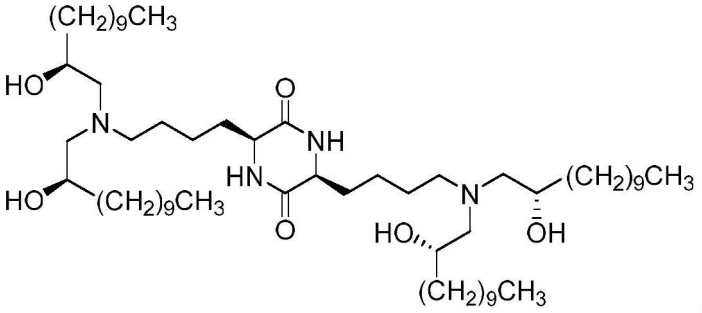
I.b.1.iv

[0162] 在一些实施方案中,式I.b.1的立体异构体具有式I.b.1.v的结构:

[0163] 

I.b.1.v

[0164] 在一些实施方案中,式I.b.1的立体异构体具有式I.b.1.vi的结构:

[0165] 

I.b.1.vi

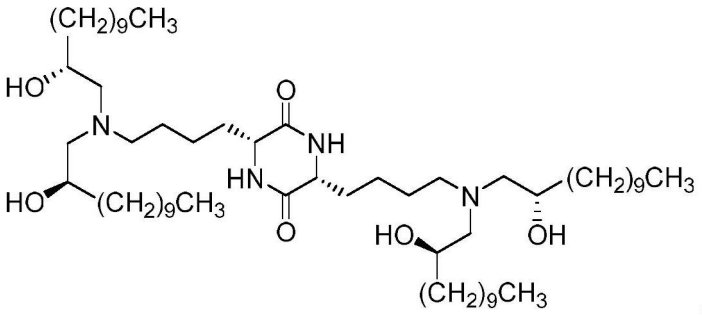
[0166] 在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.b.1的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.1.i的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.b.1的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.1.ii的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.b.1的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.1.iii的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.b.1的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.1.iv的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.b.1的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.1.v的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.b.1的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.1.vi的化学实体。

[0167] 在一些实施方案中，第一式是式I.b.2。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.b.2的化学实体，且组合物中大于或等于式I.b.2的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.2的相同立体异构体的化学实体。

[0168] 在一些实施方案中，式I.b.2的立体异构体具有式I.b.2.i的结构(即，R4-RR-cKK-E12)。

[0169] 在一些实施方案中，式I.b.2的立体异构体具有式I.b.2.ii的结构(即，S4-RR-cKK-E12)。

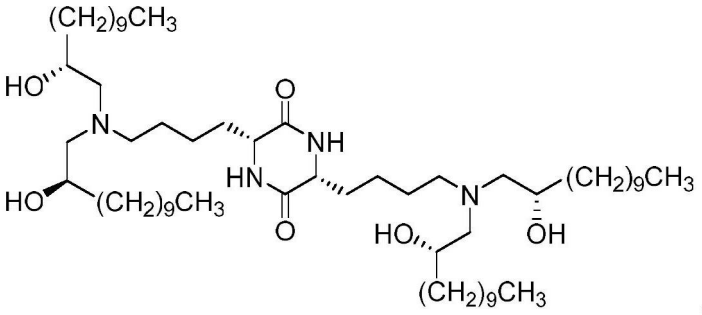
[0170] 在一些实施方案中，式I.b.2的立体异构体具有式I.b.2.iii的结构：

[0171] 

。

I.b.2.iii

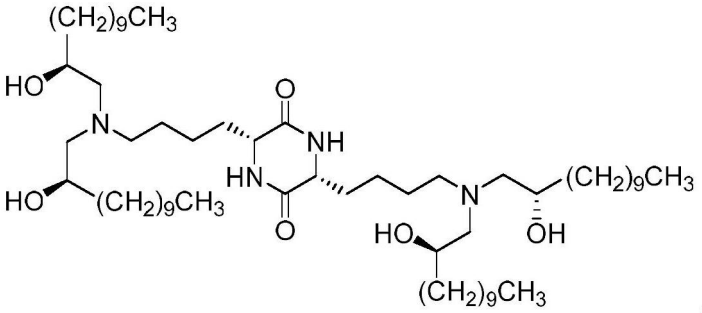
[0172] 在一些实施方案中，式I.b.2的立体异构体具有式I.b.2.iv的结构：

[0173] 

。

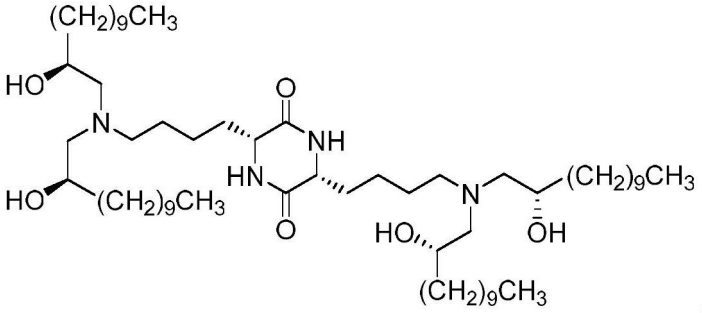
I.b.2.iv

[0174] 在一些实施方案中，式I.b.2的立体异构体具有式I.b.2.v的结构：

[0175] 

I.b.2.v

[0176] 在一些实施方案中,式I.b.2的立体异构体具有式I.b.2.vi的结构:

[0177] 

I.b.2.vi

[0178] 在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.b.2的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.2.i的化学实体。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.b.2的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.2.ii的化学实体。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.b.2的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.2.iii的化学实体。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.b.2的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.2.iv的化学实体。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.b.2的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.2.v的化学实体。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.b.2的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.2.vi的化学实体。

[0179] 在一些实施方案中,第一式是式I.c。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.c的化学实体,且组合物中大于或等于式I.c的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.c的相同立体异构体的化学实体。在一些实施方案中,式I.c的立体异构体具有式I.a.i的结构。在一些实施方案中,式I.c的立体异构体具有式I.b.1.i的结构。在一些实施方案中,式I.c的立体异构体具有式I.b.2.i的结构。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.c的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.i的化学实体。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.c的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.1.i的化学实体。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I.c的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.2.i的化学实体。

[0180] 在一些实施方案中,第一式是式I.d。在一些实施方案中,组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.d的化学实体,且组合物中大于或等于式I.d的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.d的相同立体异构体的化学实体。在一些实施方案中,

式I.d的立体异构体具有式I.a.ii的结构。在一些实施方案中，式I.d的立体异构体具有式I.b.1.ii的结构。在一些实施方案中，式I.d的立体异构体具有式I.b.2.ii的结构。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.d的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.ii的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.d的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.1.ii的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.d的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.2.ii的化学实体。

[0181] 在一些实施方案中，第一式是式I.e。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.e的化学实体，且组合物中大于或等于式I.e的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.e的相同立体异构体的化学实体。在一些实施方案中，式I.e的立体异构体具有式I.a.iii的结构。在一些实施方案中，式I.e的立体异构体具有式I.a.v的结构。在一些实施方案中，式I.e的立体异构体具有式I.b.1.iii的结构。在一些实施方案中，式I.e的立体异构体具有式I.b.2.iii的结构。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.e的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.iii的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.e的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.v的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.e的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.1.iii的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.e的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.2.iii的化学实体。

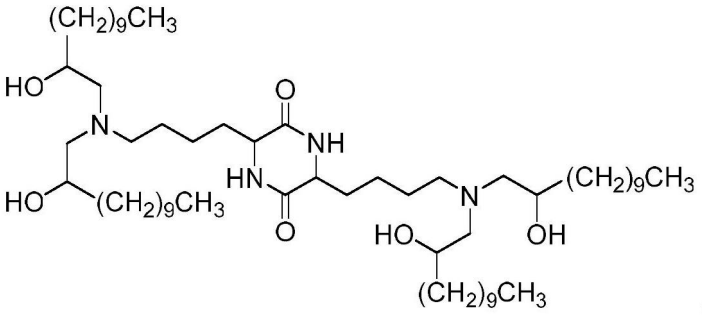
[0182] 在一些实施方案中，第一式是式I.f。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.f的化学实体，且组合物中大于或等于式I.f的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.f的相同立体异构体的化学实体。在一些实施方案中，式I.f的立体异构体具有式I.a.vii的结构。在一些实施方案中，式I.f的立体异构体具有式I.a.ix的结构。在一些实施方案中，式I.f的立体异构体具有式I.b.1.vi的结构。在一些实施方案中，式I.f的立体异构体具有式I.b.2.vi的结构。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.f的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.iii的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.f的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.ix的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.f的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.1.vi的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.f的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.2.vi的化学实体。

[0183] 在一些实施方案中，第一式是式I.g。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.g的化学实体，且组合物中大于或等于式I.g的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.g的相同立体异构体的化学实体。在一些实施方案中，式I.g的立体异构体具有式I.a.iv的结构。在一些实施方案中，式I.g的立体异构体具有式I.a.viii的结构。在一些实施方案中，式I.g的立体异构体具有式I.b.1.iv的结构。在一些实施方案中，式I.g的立体异构体具有式I.b.2.iv的结构。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.g的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.iv的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.g的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.viii的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.g的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.1.iv的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.g的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.2.iv的化学实体。

[0184] 在一些实施方案中，第一式是式I.h。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第一阈值量的是式I.h的化学实体，且组合物中大于或等于式I.h的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.h的相同立体异构体的化学实体。在一些实施方案中，式I.h的立体异构体具有式I.a.vi的结构。在一些实施方案中，式I.h的立体异构体具有式I.b.1.v的结构。在一些实施方案中，式I.h的立体异构体具有式I.b.2.v的结构。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.h的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.vi的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.h的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.1.v的化学实体。在一些实施方案中，组合物中大于或等于式I.h的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.2.v的化学实体。

[0185] 在一些实施方案中，第二阈值量是10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％。在一些实施方案中，第二阈值量是50％。在一些实施方案中，第二阈值量是70％。在一些实施方案中，第二阈值量是80％。在一些实施方案中，第二阈值量是85％。在一些实施方案中，第二阈值量是90％。在一些实施方案中，第二阈值量是95％。

[0186] 在一些实施方案中，本发明提供包含一种或多种式I的化学实体的组合物，所述化学实体中的每一者是式I的化合物：

[0187] 

，

I

[0188] 其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物，

[0189] 所述组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I的化学实体。

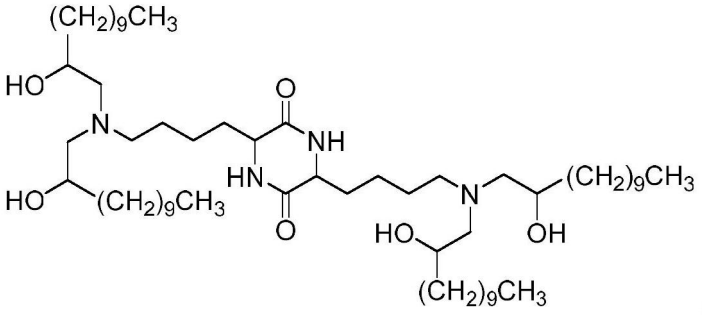
[0190] 在一些实施方案中，所提供的组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I的化学实体。在一些实施方案中，所提供的组合物的特征在于，组合物中式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I的化学实体。

[0191] 在一些实施方案中，所提供的组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I.a、I.b.1、I.b.2、I.c、I.d、I.e、I.f、I.g或I.h的化学实体。在一些实施方案中，所提供的组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I.a的化学实体。在一些实施方案中，所提供的组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I.b.1的化学实体。在一些实施方案中，所提供的组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I.b.2的化学实体。在一些实施方案中，所提供的组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I.c的化学实体。在一些实

施方案中，所提供的组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I.d的化学实体。在一些实施方案中，所提供的组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I.e的化学实体。在一些实施方案中，所提供的组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I.f的化学实体。在一些实施方案中，所提供的组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I.g的化学实体。在一些实施方案中，所提供的组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I.h的化学实体。

[0192] 在一些实施方案中，所提供的组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I.a.i、I.a.ii、I.a.iii、I.a.iv、I.a.v、I.a.vi、I.a.vii、I.a.viii、I.a.ix、I.b.1.i、I.b.1.ii、I.b.1.iii、I.b.1.iv、I.b.1.v、I.b.1.vi、I.b.2.i、I.b.2.ii、I.b.2.iii、I.b.2.iv、I.b.2.v和I.b.2.vi的化学实体。

[0193] 在一些实施方案中，本发明提供包含一种或多种式I的化学实体的组合物，所述化学实体中的每一者是式I的化合物：

[0194] 

[0195] **I**

[0196] 其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物，

[0197] 所述组合物的特征在于，组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I的相同立体异构体的化学实体。

[0198] 在一些实施方案中，所提供的组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I的相同立体异构体的化学实体。在一些实施方案中，所提供的组合物的特征在于，组合物中式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I的相同立体异构体的化学实体。

[0199] 在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.a.i、I.a.ii、I.a.iii、I.a.iv、I.a.v、I.a.vi、I.a.vii、I.a.viii或I.a.ix的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.a.i的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.a.ii的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.a.iii的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.a.iv的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.a.v的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.a.vi的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.a.vii的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.a.viii的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.a.ix的结构。

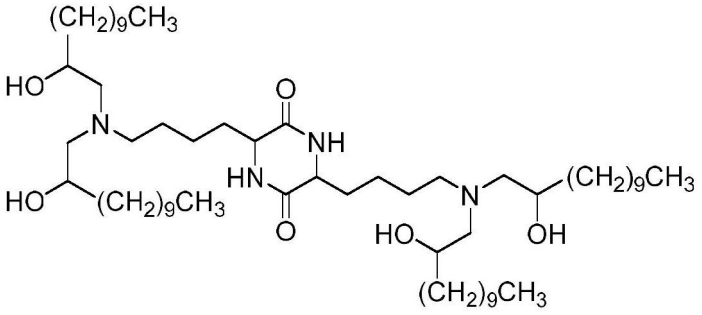
[0200] 在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.b.1.i、I.b.1.ii、I.b.1.iii、I.b.1.iv、I.b.1.v或I.b.1.vi的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式

I.b.1.i的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.b.1.ii的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.b.1.iii的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.b.1.iv的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.b.1.v的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.b.1.vi的结构。

[0201] 在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.b.2.i、I.b.2.ii、I.b.2.iii、I.b.2.iv、I.b.2.v或I.b.2.vi的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.b.2.i的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.b.2.ii的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.b.2.iii的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.b.2.iv的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.b.2.v的结构。在一些实施方案中，式I的立体异构体具有式I.b.2.vi的结构。

[0202] 在一些实施方案中，第三阈值量是50％、60％、70％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％(w/w)。在一些实施方案中，第三阈值量是50％(w/w)。在一些实施方案中，第三阈值量是70％(w/w)。在一些实施方案中，第三阈值量是80％(w/w)。在一些实施方案中，第三阈值量是85％(w/w)。在一些实施方案中，第三阈值量是90％(w/w)。在一些实施方案中，第三阈值量是95％(w/w)。在一些实施方案中，第三阈值量是96％(w/w)。在一些实施方案中，第三阈值量是97％(w/w)。在一些实施方案中，第三阈值量是98％(w/w)。在一些实施方案中，第三阈值量是99％(w/w)。

[0203] 在一些实施方案中，本发明提供包含一种或多种式I的化学实体的组合物，所述化学实体中的每一者是式I的化合物：

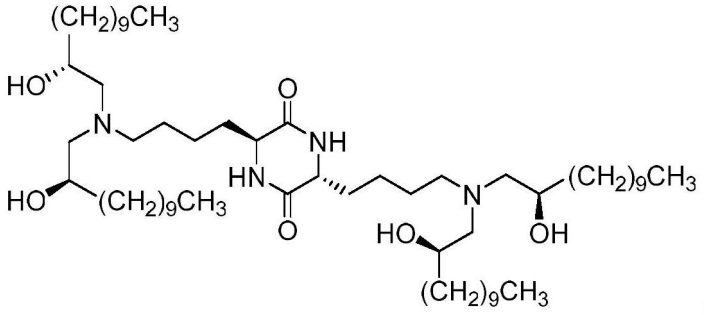
[0204] 

，

I

[0205] 其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物，

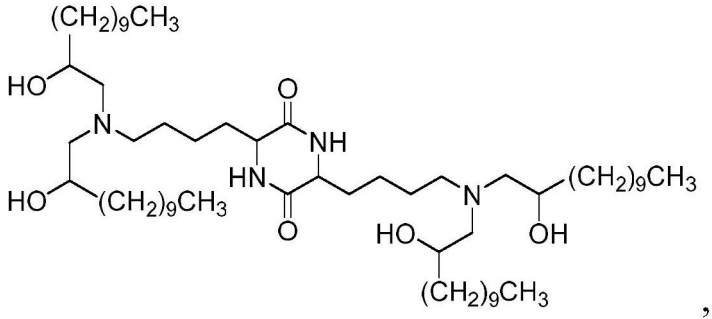
[0206] 所述组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I.a.i的化学实体：

[0207] 

I.a.i (即， *R4-SR-cKK-E12*)

[0208] 其中第三阈值量是50％。

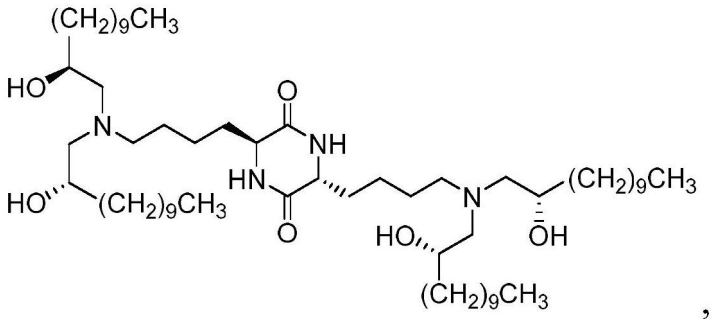
[0209] 在一些实施方案中，本发明提供包含一种或多种式I的化学实体的组合物，所述化学实体中的每一者是式I的化合物：

[0210] 

I

[0211] 其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物，

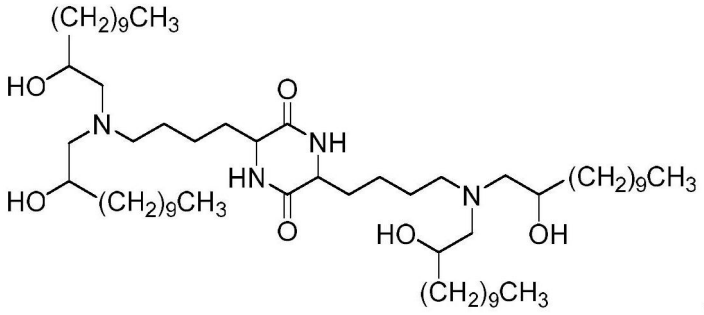
[0212] 所述组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I.a.ii的化学实体：

[0213] 

I.a.ii (即， *S4-SR-cKK-E12*)

[0214] 其中第三阈值量是50％。

[0215] 在一些实施方案中，本发明提供包含一种或多种式I的化学实体的组合物，所述化学实体中的每一者是式I的化合物：

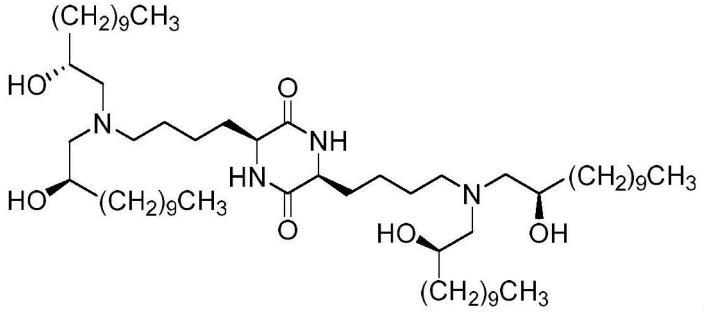
[0216] 

,

I

[0217] 其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物，

[0218] 所述组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I.b.1.i的化学实体：

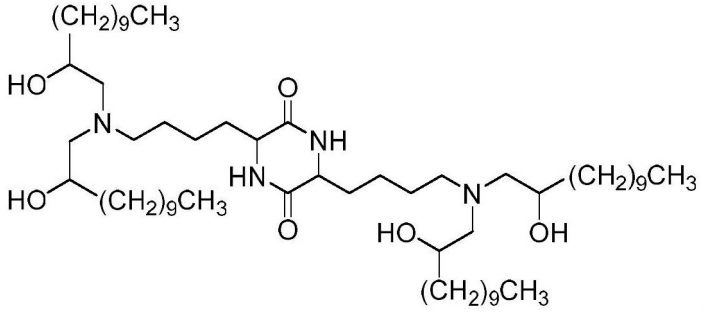
[0219] 

,

[0220] **I.b.1.i** (即， *R4-SS-cKK-E12*)

[0221] 其中第三阈值量是50％。

[0222] 在一些实施方案中，本发明提供包含一种或多种式I的化学实体的组合物，所述化学实体中的每一者是式I的化合物：

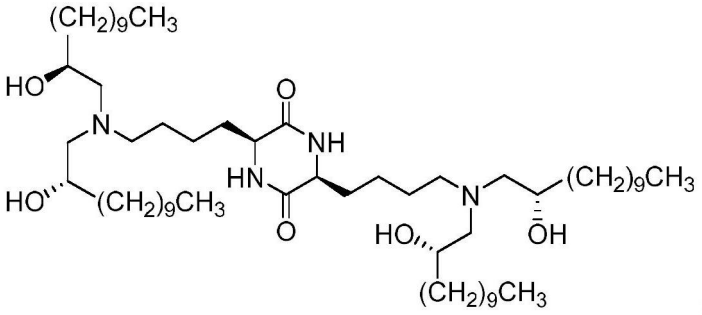
[0223] 

,

I

[0224] 其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物，

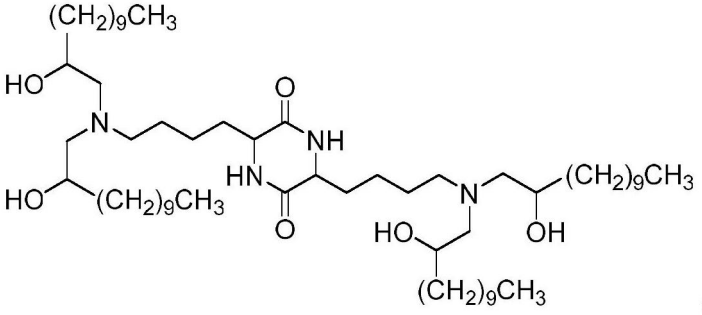
[0225] 所述组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I.b.1.ii的化学实体：

[0226] 

I.b.1.ii (即， *S4-SS-cKK-E12*)

[0227] 其中第三阈值量是50％。

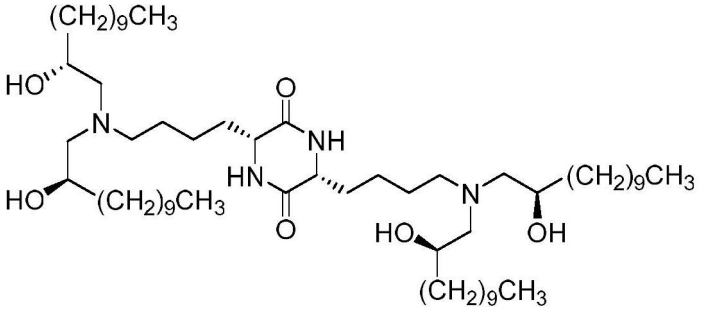
[0228] 在一些实施方案中，本发明提供包含一种或多种式I的化学实体的组合物，所述化学实体中的每一者是式I的化合物：

[0229] 

I

[0230] 其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物，

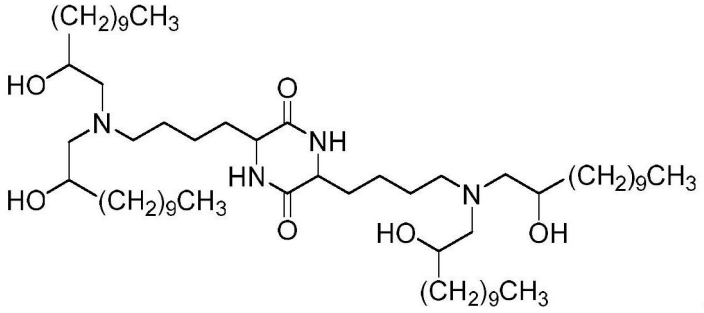
[0231] 所述组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I.b.2.i的化学实体：

[0232] 

I.b.2.i (即， *R4-RR-cKK-E12*)

[0233] 其中第三阈值量是50％。

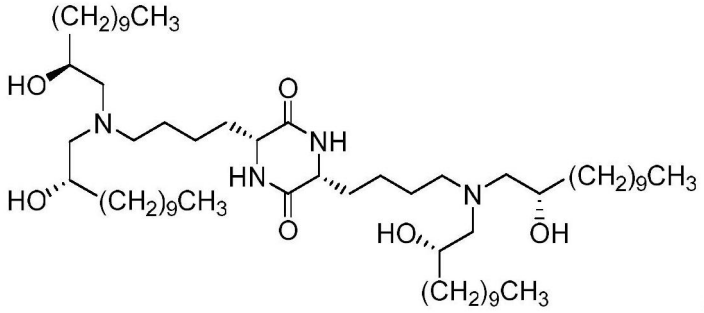
[0234] 在一些实施方案中，本发明提供包含一种或多种式I的化学实体的组合物，所述化学实体中的每一者是式I的化合物：

[0235] 

[0236] **I**

[0237] 其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物，

[0238] 所述组合物的特征在于，组合物中大于式I的化学实体的总量的第三阈值量的是式I.b.2.ii的化学实体：

[0239] 

I.b.2.ii (即， *S4-RR-cKK-E12*)

[0240] 其中第三阈值量是50％。

[0241] 在一些实施方案中，第二阈值量是50％、60％、70％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％。在一些实施方案中，第二阈值量是50％。在一些实施方案中，第二阈值量是70％。在一些实施方案中，第二阈值量是80％。在一些实施方案中，第二阈值量是95％。

[0242] 用于递送诸如mRNA的药剂的脂质体

[0243] 除了其它方面，本发明提供包含本文描述的用于递送治疗剂的脂质化合物的组合物。在一些实施方案中，所提供的组合物是基于脂质的纳米颗粒，如脂质体。如本文所用，术语“脂质体”是指任何层状、多层状或固体的脂质纳米颗粒囊泡。通常，可通过混合一种或多种脂质或通过混合一种或多种脂质和聚合物来形成本文中所用的脂质体。因此，如本文所用的术语“脂质体”涵盖基于脂质和聚合物两者的纳米颗粒。特别地，根据本发明的脂质体结合了本文描述的作为阳离子脂质组分的脂质化合物。作为非限制性实例，根据本发明的脂质体包括包含一种或多种式I的化学实体的组合物。合适的脂质体还可以含有第二种或另外的阳离子脂质、辅助脂质(例如，非阳离子脂质和/或基于胆固醇的脂质)、PEG修饰的脂质和/或聚合物。

[0244] 在一些实施方案中，阳离子脂质(例如，包含一种或多种式I的化学实体的组合物)按摩尔比计构成脂质体的约30-50％(例如，约30-45％、约30-40％、约35-50％、约35-45％或约35-40％)。在一些实施方案中，阳离子脂质(例如，包含一种或多种式I的化学实体的组合物)按摩尔比计构成脂质体的约30％、约35％、约40％、约45％或约50％。在一些实施方案

中,脂质体包含第二种脂质或另外的阳离子脂质。

[0245] 第二种或另外的阳离子脂质

[0246] 在一些实施方案中,脂质体可包含第二种或另外的阳离子脂质。如本文所用,短语"阳离子脂质"是指在诸如生理pH的选定pH下具有净正电荷的许多脂质种类中的任意种。文献中已经描述了若干种阳离子脂质,其中许多是市售的。特别适合用在本发明的组合物和方法中的阳离子脂质包括国际专利公开WO 2010/053572(并且特别地,在[00225]段描述的C12-200)、WO 2012/170930和WO 2013063468中描述的那些,上述文献中的每一者全文以引用的方式并入本文。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法使用2013年3月29日提交的第PCT/US2013/034602号国际专利申请(公开号WO 2013/149140,以引用的方式并入本文)中描述的包含可离子化阳离子脂质的脂质纳米颗粒,举例如(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-15,18-二烯-1-胺(HGT5000)、(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-4,15,18-三烯-1-胺(HGT5001)和(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-5,15,18-三烯-1-胺(HGT5002)。

[0247] 在一些实施方案中,使用第二种或另外的阳离子脂质N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵或"DOTMA"。(Feigner等人(Proc.Nat'l Acad.Sci.84,7413(1987);第4,897,355号美国专利)。DOTMA可单独配制或者可以与中性脂质二油酰磷脂酰-乙醇胺或"DOPE"或其它阳离子或非阳离子脂质合并成脂质体转移媒介物或脂质纳米颗粒,且这类脂质体可用于增强核酸向靶细胞里的递送。其它合适的阳离子脂质包括例如5-羧基精氨酰甘氨酸双十八烷基酰胺或"DOGS"、2,3-二油基氧基-N-[2(精胺-甲酰氨基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙铵或"DOSPA"(Behr等人Proc.Nat.'l Acad.Sci.86,6982(1989);第5,171,678号美国专利;第5,334,761号美国专利)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷或"DODAP"、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷或"DOTAP"。另外的示例性阳离子脂质还包括1,2-二硬脂酰氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷或"DSDMA"、1,2-二油基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷或"DODMA"、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷或"DLinDMA"、1,2-二亚油烯基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷或"DLenDMA"、N-二油基-N,N-二甲基氯化铵或"DODAC"、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵或"DDAB"、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵或"DMRIE"、3-二甲基氨基-2-(胆甾-5-烯-3-β-氧基丁-4-氧基)-1-(顺,顺-9,12-十八碳二烯氧基)丙烷或"CLinDMA"、2-[5'-(胆甾-5-烯-3-β-氧基)-3'-氧杂戊氧基)-3-二甲基-1-(顺,顺-9',1-2'-十八碳二烯氧基)丙烷或"CpLinDMA"、N,N-二甲基-3,4-二油基氧基苄胺或"DMOBA"、1,2-N,N'-二油基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷或"DOcarbDAP"、2,3-二亚油酰基氧基-N,N-二甲基丙胺或"DLinDAP"、1,2-N,N'-二亚油基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷或"DLincarbDAP"、1,2-二亚油酰基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷或"DLinCDAP"、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环或"DLin--DMA"、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环或"DLin-K-XTC2-DMA"和2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基乙胺(DLin-KC2-DMA))(参见WO 2010/042877;Semple等人,Nature Biotech.28:172-176(2010))或它们的混合物。(Heyes,J.等人,J Controlled Release 107:276-287(2005);Morrissey,DV.等人,Nat.Biotechnol.23(8):1003-1007(2005);PCT公开WO2005/121348A1)。在一些实施方案

中,阳离子脂质中的一种或多种包含咪唑、二烷基氨基或胍部分中的至少一者。

[0248] 在一些实施方案中,第二种或另外的阳离子脂质可选自XTC(2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环)、MC3(4-(二甲基氨基)丁酸((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯)、ALNY-100((3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊二烯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-胺))、NC98-5(4,7,13-三(3-氧代-3-十一烷基氨基)丙基)-N1,N16-双十一烷基-4,7,10,13-四氮杂十六烷-1,16-二酰胺)、DODAP(1,2-二油基-3-二甲基铵丙烷)、HGT4003(WO 2012/170889,其教导全文以引用的方式并入本文)、ICE(WO 2011/068810,其教导全文以引用的方式并入本文)、HGT5000(国际专利公开WO/2013/149140,其教导全文以引用的方式并入本文)或HGT5001(顺式或反式)(WO/2013/149140)、诸如WO2010/053572中公开的那些氨基醇类脂、DOTAP(1,2-二油基-3-三甲基铵丙烷)、DOTMA(1,2-二-O-十八烯基-3-三甲基铵丙烷)、DLinDMA(Heyes,J.;Palmer,L.;Bremner,K.;MacLachlan,I.“Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids”J.Contr.Rel.2005,107,276-287)、DLin-KC2-DMA(Semple,S.C等人“Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery”Nature Biotech.2010,28,172-176)、C12-200(Love,K.T.等人“Lipid-like materials for low-dose in vivo gene silencing”PNAS 2010,107,1864-1869)。

[0249] 非阳离子/辅助脂质

[0250] 在一些实施方案中,所提供的脂质体含有一种或多种非阳离子(“辅助”)脂质。如本文所用,短语“非阳离子脂质”是指任何中性、两性离子或阴离子脂质。如本文所用,短语“阴离子脂质”是指在诸如生理pH的选定H下携带净负电荷的许多脂质种类中的任意种。非阳离子脂质包括但不限于二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰-磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、16-O-单甲基PE、16-O-二甲基PE、18-1-反式PE、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)或它们的混合物。

[0251] 在一些实施方案中,这类非阳离子脂质可单独使用,但优选与其它赋形剂(例如,阳离子脂质)组合使用。在一些实施方案中,非阳离子脂质可占脂质体中存在的全部脂质的约5%至约90%或约10%至约70%的摩尔比。在一些实施方案中,非阳离子脂质是中性脂质,即在配制和/或施用组合物的条件下不携带净电荷的脂质。在一些实施方案中,脂质体中非阳离子脂质的百分比可大于5%、大于10%、大于20%、大于30%或大于40%。

[0252] 基于胆固醇的脂质

[0253] 在一些实施方案中,所提供的脂质体包含一种或多种基于胆固醇的脂质。例如,合适的基于胆固醇的阳离子脂质包括例如DC-Choi(N,N-二甲基-N-乙基羧酰胺基胆固醇)、1,4-双(3-N-油基氨基-丙基)哌嗪(Gao等人Biochem.Biophys.Res.Comm.179,280(1991);Wolf等人BioTechniques 23,139(1997);第5,744,335号美国专利)或ICE。在一些实施方案中,基于胆固醇的脂质可占脂质体中存在的全部脂质的约2%至约30%或约5%至约20%的

摩尔比。在一些实施方案中，脂质纳米颗粒中基于胆固醇的脂质的百分比可大于5%、10%、大于20%、大于30%或大于40%。

[0254] PEG化脂质

[0255] 在一些实施方案中，所提供的脂质体包含一种或多种PEG化脂质。例如，本发明还设想了使用聚乙二醇(PEG)修饰的磷脂及衍生化的脂质，如衍生化的神经酰胺(PEG-CER)，包括N-辛酰基-鞘氨醇-1-[琥珀酰(甲氧基聚乙二醇)-2000](C8 PEG-2000神经酰胺)，与一种或多种阳离子脂质以及在一些实施方案中的其它脂质相组合，它们一起组成脂质体。所设想的PEG-修饰的脂质包括但不限于共价连接于具有C_6-C_{20}长度的烷基链的脂质的长度达5kDa的聚乙二醇链。在一些实施方案中，PEG修饰或PEG化的脂质是PEG化胆固醇或PEG-2K。添加这类组分可防止复杂聚集并且还可提供提高循环寿命和增加脂质-核酸组合物向靶细胞的递送的手段(Klibanov等人(1990)FEBS Letters,268(1):235-237)，或者可以选择它们以在体内快速交换出制剂(参见第5,885,613号美国专利)。

[0256] 在一些实施方案中，特别有用的可交换脂质是具有较短酰基链(例如，C_{14}或C_{18})的PEG-神经酰胺。本发明的PEG-修饰的磷脂和衍生化脂质可占脂质体中存在的全部脂质的约0%至约15%、约0.5%至约15%、约1%至约15%、约4%至约10%或约2%的摩尔比。

[0257] 根据各种实施方案，组成脂质纳米颗粒的第二种或另外的阳离子脂质、非阳离子脂质和/或PEG-修饰的脂质以及这类脂质彼此的相对摩尔比的选择是基于选定脂质的特性、预期靶细胞的性质、要递送的mRNA的特性进行的。另外的考虑包括例如烷基链的饱和度以及选定脂质的大小、电荷、pH、pKa、融合性(fusogenicity)及毒性。因此可相应地调节摩尔比。在一些实施方案中，脂质体中PEG-修饰的脂质的百分比可大于1%、大于2%、大于5%、大于10%或大于15%。

[0258] 聚合物

[0259] 在一些实施方案中，根据本发明的合适脂质体进一步包括聚合物，与所述的一种或多种阳离子脂质以及在一些实施方案中的包括本文所述的各种脂质在内的其它载体相组合。因此，在一些实施方案中，如本文所用的脂质体递送媒介物还涵盖含纳米颗粒的聚合物。合适的聚合物可包括例如聚丙烯酸酯、聚烷基氰基丙烯酸酯、聚丙交酯、聚丙交酯-聚乙交酯共聚物、聚己内酯、葡聚糖、白蛋白、明胶、藻酸盐、胶原、壳聚糖、环糊精、鱼精蛋白、PEG化鱼精蛋白、PLL、PEG化PLL和聚乙烯亚胺(PEI)。当存在PEI时，其可以是分子量范围在10至40kDA的支链PEI，例如25kDa支链PEI(Sigma#408727)。

[0260] 治疗剂

[0261] 本发明可用于递送任何治疗剂。具体地，可使用本文所述的复合物、皮米颗粒(picoparticle)、纳米颗粒、胶束或脂质体递送要向受试者施用的任何治疗剂。药剂可以是有机分子(例如，治疗剂、药物)、无机分子、核酸、蛋白质、氨基酸、肽、多肽、多核苷酸、靶向剂、同位素标记的有机或无机分子、疫苗、免疫剂等。在本发明的某些实施方案中，要递送的药剂可以是药剂的混合物。

[0262] 在某些实施方案中，治疗剂是具有药物活性的有机分子，例如药物。在某些实施方案中，药物是抗生素、抗病毒剂、麻醉剂、类固醇剂、抗炎剂、抗肿瘤剂、抗癌剂、抗原、疫苗、抗体、减充血剂、抗高血压药、镇静剂、节育药、促孕药、抗胆碱能药、镇痛药、抗抑郁药、抗精神病药、I3-肾上腺素能阻断剂、利尿药、心血管活性剂、血管活性剂、非类固醇抗炎药、营养

剂等。

[0263] 诊断剂包括气体;金属;用在正电子发射断层摄影(PET)、计算机辅助断层摄影(CAT)、单光子发射计算机化断层摄影、x射线、荧光透视和磁共振成像(MRI)中的市售成像剂;以及造影剂。在MRI中用作造影剂的合适材料的实例包括钆螯合物以及铁、镁、锰、铜和铬。可用于CAT和x射线成像的材料的实例包括基于碘的材料。

[0264] 治疗和预防剂包括但不限于抗生素、营养补充剂和疫苗。疫苗可包含分离的蛋白质或肽、灭活的生物体和病毒、死亡的生物体和病毒、遗传改变的生物体或病毒以及细胞提取物。

[0265] 多核苷酸

[0266] 本发明可用于递送任何多核苷酸。在某些实施方案中,多核苷酸是干扰RNA(RNAi)。RNAi的现象例如在以下参考文献中有更详细的讨论:Elbashir等人,2001,Genes Dev.,15:188;Fire等人,1998,Nature,391:806;Tabara等人,1999,Cell,99:123;Hammond等人,Nature,2000,404:293;Zamore等人,2000,Cell,101:25;Chakraborty,2007,Curr.Drug Targets,8:469;以及Morris和Rossi,2006,Gene Ther.,13:553。在某些实施方案中,多核苷酸是dsRNA(双链RNA)。在某些实施方案中,多核苷酸是siRNA(短干扰RNA)。在某些实施方案中,多核苷酸是shRNA(短发夹RNA)。在某些实施方案中,多核苷酸是miRNA(微小RNA)。微小RNA(miRNA)是长度约21-23个核苷酸的基因组编码的非编码RNA,其有助于调节基因表达,特别是在发育期间。参见例如Bartel,2004,Cell,116:281;Novina和Sharp,2004,Nature,430:161;以及美国专利公开2005/0059005;还综述于Wang和Li,2007,Front.Biosci.,12:3975;以及Zhao,2007,Trends Biochem.Sci.,32:189中。在某些实施方案中,多核苷酸是反义RNA。

[0267] 在某些实施方案中,可提供多核苷酸作为反义试剂或RNA干扰(RNAi)。参见例如Fire等人,Nature 391:806-811,1998。反义治疗意指包括例如施用或原位提供单链或双链寡核苷酸或其衍生物,其在细胞条件下与细胞mRNA和/或基因组DNA或其突变体特异性杂交(例如,结合),以便例如通过抑制转录和/或翻译来抑制编码蛋白质的表达。参见例如Crooke"Molecular mechanisms of action of antisense drugs"Biochim.Biophys.Acta 1489(1):31-44,1999;Crooke"Evaluating the mechanism of action of antiproliferative antisense drugs"Antisense Nucleic Acid Drug Dev.10(2):123-126,discussion 127,2000;Methods in Enzymology volumes 313-314,1999。结合可以是通过常规的碱基对互补性,或者例如在与DNA双链体结合的情况下,经过双螺旋的大沟中的特异性相互作用(即,三螺旋形成)。参见例如Chan等人,J.Mol.Med.75(4):267-282,1997。

[0268] 在一些实施方案中,可使用大量可用算法中的一种或多种来设计和/或预测dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA、反义RNA和/或RNAi。仅给出几个实例,可利用以下资源来设计和/或预测多核苷酸:见于Alnylum Online、Dharmacon Online、OligoEngine Online、Molecula Online、Ambion Online、BioPredsi Online、RNAi Web Online、Chang Bioscience Online、Invitrogen Online、LentiWeb Online GenScript Online、Protocol Online的算法;Reynolds等人,2004,Nat.Biotechnol.,22:326;Naito等人,2006,Nucleic Acids Res.,34:W448;Li等人,2007,RNA,13:1765;Yiu等人,2005,Bioinformatics,21:144;和Jia等人,2006,BMC Bioinformatics,7:271。

[0269] 多核苷酸可具有任意大小或序列，并且它们可以是单链的或双链的。在某些实施方案中，多核苷酸长于100个碱基对。在某些实施方案中，多核苷酸长于1000个碱基对，并且可长于10,000个碱基对。可通过本领域中已知的任何手段提供多核苷酸。在某些实施方案中，已采用重组技术将多核苷酸工程改造。参见例如Ausubel等人，Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley&Sons,Inc.,New York,1999)；Molecular Cloning:A Laboratory Manual，第2版，Sambrook,Fritsch和Maniatis编(Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989)。也可以由天然来源获得多核苷酸并与通常见于自然界中的污染组分分离纯化。也可以在实验室中化学合成多核苷酸。在某些实施方案中，采用标准的固相化学方法合成多核苷酸。

[0270] 可通过化学或生物学手段修饰多核苷酸。在某些实施方案中，这些修饰导致多核苷酸的稳定性提高。修饰包括甲基化、磷酸化、封端等。

[0271] mRNA

[0272] 本发明可用于递送任何mRNA。mRNA通常被认为是携带从DNA到核糖体的信息的RNA的类型。mRNA的存在通常非常短暂，包括加工和翻译，接着降解。通常，在真核生物体中，mRNA加工包括在N-末端(5')端添加“帽”和在C-末端(3')端添加“尾”。典型的帽是7-甲基鸟苷帽，其是通过5'-5′-三磷酸键联接到第一转录核苷酸的鸟苷。帽的存在对于提供对见于大多数真核细胞的核酸酶的抗性是重要的。尾通常是聚腺苷酸化事件，聚腺苷酰基部分由此被加到mRNA分子的3'端。此“尾”的存在用来保护mRNA免于核酸外切酶降解。信使RNA由核糖体翻译成构成蛋白质的一系列氨基酸。

[0273] 能够被翻译成一种或多种肽(例如，蛋白质)或肽片段的任何mRNA都被设想在本发明的范围内。在一些实施方案中，mRNA编码一种或多种天然存在的肽。在一些实施方案中，mRNA编码一种或多种修饰的或非天然的肽。

[0274] 在一些实施方案中，mRNA编码细胞内蛋白质。在一些实施方案中，mRNA编码胞质蛋白质。在一些实施方案中，mRNA编码与肌动蛋白细胞骨架相关联的蛋白质。在一些实施方案中，mRNA编码与质膜相关联的蛋白质。在一些具体实施方案中，mRNA编码跨膜蛋白质。在一些具体实施方案中，mRNA编码离子通道蛋白质。在一些实施方案中，mRNA编码核周蛋白质。在一些实施方案中，mRNA编码核蛋白质。在一些具体实施方案中，mRNA编码转录因子。在一些实施方案中，mRNA编码伴侣蛋白质。在一些实施方案中，mRNA编码细胞内酶(例如，编码与尿素循环或溶酶体贮积代谢紊乱相关联的酶的mRNA)。在一些实施方案中，mRNA编码参与细胞代谢、DNA修复、转录和/或翻译的蛋白质。在一些实施方案中，mRNA编码细胞外蛋白质。在一些实施方案中，mRNA编码与细胞外基质相关联的蛋白质。在一些实施方案中，mRNA编码分泌蛋白质。在具体的实施方案中，用在本发明的组合物和方法中的mRNA可用于表达由一个或多个靶细胞排泄或分泌到周围细胞外液里的功能性蛋白质或酶(例如，编码激素和/或神经递质的mRNA)。

[0275] mRNA的合成

[0276] 可根据多种已知方法中的任一种方法合成根据本发明的mRNA。例如，可经由体外转录(IVT)合成根据本发明的mRNA。简言之，IVT通常用含有启动子的线性或环状DNA模板、核糖核苷三磷酸的汇集物、可包括DTT和镁离子的缓冲系统以及适当的RNA聚合酶(例如，T3、T7或SP6 RNA聚合酶)、DNA酶I、焦磷酸酶和/或RNA酶抑制剂来进行。确切的条件将根据

具体的应用而有所不同。

[0277] 在一些实施方案中，为制备根据本发明的mRNA，在体外转录DNA模板。合适的DNA模板通常具有用于体外转录的启动子，例如T3、T7或SP6启动子，接着是用于所需mRNA的所需核苷酸序列和终止信号。

[0278] 可采用标准方法确定根据本发明的所需mRNA序列并将其并入DNA模板。例如，从所需的氨基酸序列(例如，酶序列)开始，基于简并的遗传密码进行虚拟反向翻译。然后优化算法可用于选择合适的密码子。通常，一方面可优化G/C含量以达到最高可能的G/C含量，另一方面根据密码子使用最好可能考虑tRNA的频率。可例如借助于适当的展示装置建立和展示优化的RNA序列并与原始(野生型)序列相比较。还可以分析二级结构以计算稳定化和去稳定化性质或相应地计算RNA的区域。

[0279] 修饰的mRNA

[0280] 在一些实施方案中，可将根据本发明的mRNA合成为未修饰的或修饰的mRNA。通常，修饰mRNA以提高稳定性。mRNA的修饰可包括例如RNA的核苷酸的修饰。因此根据本发明的修饰的mRNA可包括例如主链修饰、糖修饰或碱基修饰。在一些实施方案中，可由天然存在的核苷酸和/或核苷酸类似物(修饰的核苷酸)合成mRNA，这些包括但不限于嘌呤(腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G))或嘧啶(胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶C)、尿嘧啶(U))，以及作为嘌呤和嘧啶的修饰的核苷酸类似物或衍生物，举例如1-甲基-腺嘌呤、2-甲基-腺嘌呤、2-甲硫基-N-6-异戊烯基-腺嘌呤、N6-甲基-腺嘌呤、N6-异戊烯基-腺嘌呤、2-硫代-胞嘧啶、3-甲基-胞嘧啶、4-乙酰基-胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、1-甲基-鸟嘌呤、2-甲基-鸟嘌呤、2,2-二甲基-鸟嘌呤、7-甲基-鸟嘌呤、肌苷、1-甲基-肌苷、假尿嘧啶(5-尿嘧啶)、二氢-尿嘧啶、2-硫代-尿嘧啶、4-硫代-尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代-尿嘧啶、5-(羧基羟甲基)-尿嘧啶、5-氟-尿嘧啶、5-溴-尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-尿嘧啶、5-甲基-2-硫代-尿嘧啶、5-甲基-尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、5-甲基氨基甲基-尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫代-尿嘧啶、5'-甲氧基羰基甲基-尿嘧啶、5-甲氧基-尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、1-甲基-假尿嘧啶、羟苷(queosine)、β-D-甘露糖基-羟苷、怀丁苷(wybutosine)和氨基磷酸酯、硫代磷酸酯、肽核苷酸、甲基膦酸酯、7-脱氮-鸟苷、5-甲基胞嘧啶和肌苷。这类类似物的制备是本领域技术人员已知的，例如见于第4,373,071号美国专利、第4,401,796号美国专利、第4,415,732号美国专利、第4,458,066号美国专利、第4,500,707号美国专利、第4,668,777号美国专利、第4,973,679号美国专利、第5,047,524号美国专利、第5,132,418号美国专利、第5,153,319号美国专利、第5,262,530和5,700,642号美国专利，上述公开内容以全文引用的方式并入本文。

[0281] 在一些实施方案中，mRNA(例如，编码mRNA的酶)可含有RNA主链修饰。通常，主链修饰是其中RNA中所含的核苷酸的主链的磷酸酯被化学修饰的修饰。示例性主链修饰通常包括但不限于由甲基膦酸酯、甲基氨基磷酸酯、氨基磷酸酯、硫代磷酸酯(例如胞苷5'-O-(1-硫代磷酸酯))、硼烷磷酸酯、带正电荷的鎓基团等组成的组的修饰，这意味着通过其它阴离子、阳离子或中性基团置换磷酸二酯键。

[0282] 在一些实施方案中，mRNA(例如，编码mRNA的酶)可含有糖修饰。典型的糖修饰是其含有的核苷酸的糖的化学修饰，包括但不限于选自2'-脱氧-2'-氟-寡核糖核苷酸(2'-氟-2'-脱氧胞苷5'-三磷酸、2'-氟-2'-脱氧尿苷5'-三磷酸)、2'-脱氧-2'-脱胺-寡核糖核苷酸

(2'-氨基-2'-脱氧胞苷5'-三磷酸、2'-氨基-2'-脱氧尿苷5'-三磷酸)、2'-O-烷基寡核糖核苷酸、2'-脱氧-2'-C-烷基寡核糖核苷酸(2'-O-甲基胞苷5'-三磷酸、2'-甲基尿苷5'-三磷酸)、2'-C-烷基寡核糖核苷酸及其异构体(2'-阿糖胞苷5'-三磷酸、2'-阿糖尿苷5'-三磷酸)或叠氮三磷酸(2'-叠氮-2'-脱氧胞苷5'-三磷酸、2'-叠氮-2'-脱氧尿苷5'-三磷酸)的糖修饰。

[0283] 在一些实施方案中,mRNA(例如,编码mRNA的酶)可含有核苷酸的碱基的修饰(碱基修饰)。含有碱基修饰的修饰的核苷酸也称为碱基修饰的核苷酸。这类碱基修饰的核苷酸的实例包括但不限于2-氨基-6-氯嘌呤核糖苷5'-三磷酸、2-氨基腺苷5'-三磷酸、2-硫代胞苷5'-三磷酸、2-硫代尿苷5'-三磷酸、4-硫代尿苷5'-三磷酸、5-氨基烯丙基胞苷5'-三磷酸、5-氨基烯丙基尿苷5'-三磷酸、5-溴胞苷5'-三磷酸、5-溴尿苷5'-三磷酸、5-碘胞苷5'-三磷酸、5-碘尿苷5'-三磷酸、5-甲基胞苷5'-三磷酸、5-甲基尿苷5'-三磷酸、6-氮杂胞苷5'-三磷酸、6-氮杂尿苷5'-三磷酸、6-氯嘌呤核糖苷5'-三磷酸、7-脱氮腺苷5'-三磷酸、7-脱氮鸟苷5'-三磷酸、8-氮杂腺苷5'-三磷酸、8-叠氮腺苷5'-三磷酸、苯并咪唑核糖苷5'-三磷酸、N1-甲基腺苷5'-三磷酸、N1-甲基鸟苷5'-三磷酸、N6-甲基腺苷5'-三磷酸、O6-甲基鸟苷5'-三磷酸、假尿苷5'-三磷酸、嘌呤霉素5'-三磷酸或黄苷5'-三磷酸。

[0284] 帽结构

[0285] 通常,mRNA合成包括在N-末端(5')端加“帽”和在C-末端(3')端加“尾”。帽的存在对于提供对见于大多数真核细胞的核酸酶的抗性是重要的。“尾”的存在用来保护mRNA免于核酸外切酶降解。

[0286] 因此,在一些实施方案中,mRNA(例如,编码mRNA的酶)包括5'帽结构。通常如下加5'帽:首先,RNA末端磷酸酶自5'核苷酸除去末端磷酸基团之一,留下两个末端磷酸;然后经由鸟苷酰基转移酶将鸟苷三磷酸(GTP)加到末端磷酸上,产生5'5'5三磷酸键;然后通过甲基转移酶将鸟嘌呤的7-氮甲基化。帽结构的实例包括但不限于m7G(5')ppp(5'(A,G(5')ppp(5')A和G(5')ppp(5')G。

[0287] 在一些实施方案中,天然存在的帽结构包含经由三磷酸桥联接到第一转录核苷酸的5'-端的7-甲基鸟苷,导致m^7G(5')ppp(5')N的二核苷酸帽,其中N是任意核苷。在体内,酶促加帽。在细胞核中加帽并通过酶鸟苷酰基转移酶催化。在转录起始后立即发生对RNA的5'末端加帽。末端核苷通常是鸟苷,并且与所有其它核苷酸(即G(5')ppp(5')GpNpNp)反向。

[0288] 用于通过体外转录产生的mRNA的常见帽是m^7G(5')ppp(5')G,其已在体外用T7或SP6 RNA聚合酶转录中用作二核苷酸帽以获得在RNA的5'-末端具有帽结构的RNA。用于体外合成加帽mRNA的普遍方法使用形式为m^7G(5')ppp(5')G(“m^7GpppG”)的预形成的二核苷酸作为转录的起始子。

[0289] 迄今,体外翻译实验中使用的合成二核苷酸帽的通常形式是抗-反向帽类似物(“ARCA”)或修饰的ARCA,其通常是修饰的帽类似物,其中2'或3'OH基团用-OCH_3置换。

[0290] 另外的帽类似物包括但不限于选自以下的化学结构:m^7GpppG、m^7GpppA、m^7GpppC;未甲基化的帽类似物(例如,GpppG);二甲基化的帽类似物(例如,$m^{2,7}$GpppG)、三甲基化的帽类似物(例如,$m^{2,2,7}$GpppG)、二甲基化的对称帽类似物(例如,m^7Gpppm^{7}G)或抗反向帽类似物(例如,ARCA;$m^{7,2,^{Ome}}$GpppG、$m^{72,^d}$GpppG、$m^{7,3,^{Ome}}$GpppG、$m^{7,3'^d}$GpppG以及它们的四磷酸衍生物)(参见例如Jemielity等人,“Novel‘anti-reverse’cap analogs with superior

translational properties",RNA,9:1108-1122(2003))。

[0291] 在一些实施方案中,合适的帽是经由三磷酸桥联接到第一转录核苷酸的5'-端的7-甲基鸟苷酸("m^7G"),产生$m^7G(5')ppp(5')N$,其中N是任意核苷。本发明的实施方案中利用的m^7G帽的优选实施方案是$m^7G(5')ppp(5')G$。

[0292] 在一些实施方案中,帽是Cap0结构。Cap0结构缺少连接于碱基1和2的核糖的2'-O-甲基残基。在一些实施方案中,帽是Cap1结构。Cap1结构在碱基2处具有2'-O-甲基残基。在一些实施方案中,帽是Cap2结构。Cap2结构具有连接于碱基2和3两者的2'-O-甲基残基。

[0293] 各种m^7G帽类似物是本领域中已知的,其中许多是市售的。这些包括上述的m^7GpppG以及ARCA 3'-OCH_3和2'-OCH_3帽类似物(Jemielity,J.等人,RNA,9:1108-1122(2003))。用于本发明的实施方案的另外的帽类似物包括N7-苄基化的二核苷四磷酸类似物(描述于Grudzien,E.等人,RNA,10:1479-1487(2004))、硫代磷酸酯帽类似物(描述于Grudzien-Nogalska,E.等人,RNA,13:1745-1755(2007))及第8,093,367和8,304,529号美国专利(以引用方式并入本文)中描述的帽类似物(包括生物素化的帽类似物)。

[0294] 尾结构

[0295] 通常,"尾"的存在用来保护mRNA免于核酸外切酶降解。多聚A尾被认为使天然信使及合成有义RNA稳定。因此,在某些实施方案中,可对mRNA分子加长的多聚A尾,从而使RNA更稳定。可采用多种本领域中公认的技术加多聚A尾。例如,可使用多聚A聚合酶对合成或体外转录的RNA加长的多聚A尾(Yokoe等人,Nature Biotechnology.1996;14:1252-1256)。转录载体也可编码长多聚A尾。此外,可通过直接由PCR产物转录来加多聚A尾。也可用RNA连接酶将多聚A连接到有义RNA的3'端(参见例如,Molecular Cloning A Laboratory Manual,第2版,Sambrook、Fritsch和Maniatis编(Cold Spring Harbor Laboratory Press:1991edition))。

[0296] 在一些实施方案中,mRNA(例如,编码mRNA的酶)包括3'多聚(A)尾结构。通常,多聚A尾的长度可以是至少约10、50、100、200、300、400至少500个核苷酸。在一些实施方案中,mRNA的3'末端上的多聚-A尾通常包括约10至300个腺苷核苷酸(例如,约10至200个腺苷核苷酸、约10至150个腺苷核苷酸、约10至100个腺苷核苷酸、约20至70个腺苷核苷酸或约20至60个腺苷核苷酸)。在一些实施方案中,mRNA包括3'多聚(C)尾结构。mRNA的3'末端上的合适的多聚-C尾通常包括约10至200个胞嘧啶核苷酸(例如,约10至150个胞嘧啶核苷酸、约10至100个胞嘧啶核苷酸、约20至70个胞嘧啶核苷酸、约20至60个胞嘧啶核苷酸或约10至40个胞嘧啶核苷酸)。多聚-C尾可以被加到多聚-A尾或者可以取代多聚-A尾。

[0297] 在一些实施方案中,调节多聚A或多聚C尾的长度以控制本发明的修饰有义mRNA分子的稳定性,并因此控制蛋白质的转录。例如,由于多聚A尾的长度可影响有义mRNA分子的半衰期,因此可调节多聚A尾的长度以改变mRNA对核酸酶的抗性水平,从而控制靶细胞中的多核苷酸表达和/或多肽产生的时间过程。

[0298] 5'和3'非翻译区

[0299] 在一些实施方案中,mRNA包括5'和/或3'非翻译区。在一些实施方案中,5'非翻译区包括一种或多种影响mRNA的稳定性或翻译的元件,例如铁响应元件。在一些实施方案中,5'非翻译区长度可介于约50与500个核苷酸之间。

[0300] 在一些实施方案中,3'非翻译区包括聚腺苷酸化信号、影响mRNA在细胞中的位置

稳定性的蛋白质的结合位点或一个或多个miRNA的结合位点中的一者或多者。在一些实施方案中,3'非翻译区长度可介于50与500个核苷酸之间或更长。

[0301] 示例性3'和/或5'UTR序列可源自稳定的mRNA分子(例如,球蛋白、肌动蛋白、GAPDH、微管蛋白、组蛋白或柠檬酸循环酶),以提高有义mRNA分子的稳定性。例如,5'UTR序列可包括CMV立即早期1(IE1)基因或其片段的部分序列,以提高核酸酶抗性和/或提高多核苷酸的半衰期。还设想了将编码人生长激素(hGH)或其片段的序列包含于多核苷酸(例如,mRNA)的3'端或非翻译区以进一步稳定多核苷酸。一般地,这些修饰提高了多核苷酸相对于其未修饰的对应物的稳定性和/或药代动力学性质(例如,半衰期),并且包括例如为提高这类多核苷酸对体内核酸酶消化的抗性而做出的修饰。

[0302] 根据各种实施方案,可由所提供的脂质体包封任意大小的mRNA。在一些实施方案中,所提供的脂质体可包封长度大于约0.5kb、1kb、1.5kb、2kb、2.5kb、3kb、3.5kb、4kb、4.5kb或5kb的mRNA。

[0303] 脂质体

[0304] 可通过本领域中目前已知的各种技术制备用于所提供的组合物的脂质体。例如,可根据常规的技术制备多层囊泡(MLV),如通过将脂质溶解在适当的溶剂中,然后将溶剂蒸发,在器皿的内部留下薄膜或者通过喷雾干燥,由此将选定的脂质沉积在合适容器或器皿的内壁上。然后可采用涡旋运动将水相添加到器皿中,涡旋运动导致MLV的形成。然后可通过多层囊泡的均化、声处理或挤压形成单层囊泡(ULV)。此外,可通过洗涤剂去除技术来形成单层囊泡。

[0305] 在某些实施方案中,所提供的组合物包含脂质体,其中诸如核酸(例如,mRNA)的药剂缔合在脂质体的表面上和包封在相同的脂质体内。例如,在本发明的组合物的制备期间,阳离子脂质体可通过静电相互作用与mRNA缔合。例如,在本发明的组合物的制备期间,阳离子脂质体可通过静电相互作用与mRNA缔合。

[0306] 在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包含包封在脂质体中的mRNA。在一些实施方案中,一种或多种mRNA种类可被包封在相同的脂质体中。在一些实施方案中,一种或多种mRNA种类可被包封在不同的脂质体中。在一些实施方案中,mRNA被包封在一种或多种脂质体中,所述一种或多种脂质体在其脂质组成、脂质组分的摩尔比、大小、电荷(ζ电位)、靶向配体和/或其组合方面不同。在一些实施方案中,一种或多种脂质体可具有不同组成的阳离子脂质、中性脂质、PEG-修饰的脂质和/或其组合。在一些实施方案中,一种或多种脂质体可具有用于产生脂质体的不同摩尔比的阳离子脂质、中性脂质、胆固醇和PEG修饰的脂质。

[0307] 向脂质体里掺入诸如核酸(例如,mRNA)的所需治疗剂的过程通常被称为"加载"。Lasic等人,FEBS Lett.,312:255-258,1992(以引用的方式并入本文)中描述了示例性方法。掺入脂质体的核酸可完全或部分地位于脂质体的内部空间中、脂质体的双层膜内或者与脂质体膜的外表面缔合。核酸掺入到脂质体里在本文中也被称为"包封",其中核酸被完全包含在脂质体的内部空间内。将mRNA掺入到诸如脂质体的转移媒介物里的目的通常是保护核酸免受环境的影响,所述环境可能含有降解核酸的酶或化学物质和/或引起核酸的快速排泄的系统或受体。因此,在一些实施方案中,合适的递送媒介物能够增强其中所含的mRNA的稳定性和/或促进mRNA向靶细胞或组织的递送。

[0308] 脂质体大小

[0309] 根据本发明的合适脂质体可制成各种大小。在一些实施方案中，所提供的脂质体可制成为比先前已知的mRNA包封脂质体小。在一些实施方案中，脂质体的大小减小与mRNA的更有效的递送相关联。选择适当的脂质体大小可考虑靶细胞或组织的位点并且在一定程度上考虑制备脂质体的应用。

[0310] 在一些实施方案中，选择适当大小的脂质体以促进由mRNA编码的抗体的全身分配。在一些实施方案中，可能期望限制mRNA转染至某些细胞或组织。例如，为靶向肝细胞，可定脂质体的大小，使得其尺寸小于在肝脏中包衬肝窦状隙的内皮层的开窗；在这种情况下，脂质体能很容易地穿透这类内皮开窗到达靶肝细胞。

[0311] 可选地或另外，可定脂质体的大小，使得脂质体的尺寸具有足以限制或明确避免分配到某些细胞或组织里的直径。例如，可定脂质体的大小，使得其尺寸大于包衬肝窦状隙的内皮层的开窗，从而限制脂质体分配到肝细胞中。

[0312] 在一些实施方案中，合适的脂质体的大小等于或小于约500nm、450nm、400nm、350nm、300nm、250nm、200nm、150nm、125nm、110nm、100nm、95nm、90nm、85nm、80nm、75nm、70nm、65nm、60nm、55nm或50nm。在一些实施方案中，合适的脂质体的大小不大于约250nm(例如，不大于约225nm、200nm、175nm、150nm、125nm、100nm、75nm或50nm)。在一些实施方案中，合适的脂质体大小范围在约10-250nm(例如，范围在约10-225nm、10-200nm、10-175nm、10-150nm、10-125nm、10-100nm、10-75nm或10-50nm)。在一些实施方案中，合适的脂质体大小范围在约100-250nm(例如，范围在约100-225nm、100-200nm、100-175nm、100-150nm)。在一些实施方案中，合适的脂质体大小范围在约10-100nm(例如，范围在约10-90nm、10-80nm、10-70nm、10-60nm或10-50nm)。

[0313] 本领域中已知的多种替代方法可用于定脂质体群体的大小。第4,737,323号美国专利(以引用的方式并入本文)中描述了一种这样的定大小方法。通过浴或探针声处理的方式对脂质体悬浮液进行声处理产生大小逐渐减小到直径小于约0.05微米的小ULV。均化是另一种方法，其依靠剪切能将大脂质体碎成较小的脂质体。在典型的均化程序中，使MLV再循环通过标准的乳液均化器，直至观察到选定的脂质体大小，通常在约0.1与0.5微米之间。可通过如以引用的方式并入本文的Bloomfield,Ann.Rev.Biophys.Bioeng.,10:421-150(1981)中描述的准电光散射(QELS)来测定脂质体的大小。通过声处理所形成的脂质体可减小平均脂质体直径。间歇声处理循环可与QELS评估交替以引导有效的脂质体合成。

[0314] 药物组合物

[0315] 为便于诸如核酸(例如，mRNA)的药剂的递送和/或体内mRNA的表达，可将诸如脂质体的递送媒介物与一种或多种另外的核酸、载体、靶向配体或稳定化试剂相组合配制，或者在药理学组合物中进行配制，其在药理学组合物中与合适的赋形剂混合。配制和施用药物的技术可见于“Remington's Pharmaceutical Sciences”,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,最新版。

[0316] 可根据当前的医疗实践将所提供的脂质体包封的药剂(如核酸，例如mRNA)进行施用和给药，同时考虑受试者的临床病状、施用的部位和方法、施用的时间安排、受试者的年龄、性别、体重和与本领域普通临床医生相关的其它因素。可通过实验临床研究、药理学、临床和医疗领域普通技术人员已知的相关考虑来确定用于本文目的的“有效量”。在一些实施

方案中，所施用的量可有效实现症状及其它被本领域技术人员选择作为疾病进展、消退或改善的适当量度的指标的至少一些稳定、改善或消除。例如，合适的量及给药方案至少引起瞬时蛋白质(例如，酶)产生。

[0317] 合适的施用途径包括例如经口、经直肠、经阴道、经粘膜、经肺，包括气管内或吸入或经肠施用；肠胃外递送，包括皮内、经皮(局部)、肌内、皮下、髓内注射以及鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内和/或鼻内施用。

[0318] 可选地或另外，可以按局部而非全身的方式施用本发明的脂质体包封的药剂(如核酸，例如mRNA)及组合物，例如经由将药物组合物直接注入靶向的组织，优选以缓释制剂的形式注射。局部递送可以各种方式受到影响，这取决于要靶向的组织。例如，可吸入含有本发明的组合物的气雾剂(用于鼻、气管或支气管递送)；可将本发明的组合物注入例如受伤、疾病表现或疼痛的部位；可以用于经口、经气管或经食管施加的锭剂形式提供组合物；可以用于施用至胃或肠的液体、片剂或胶囊形式提供，可以用于经直肠或阴道施加的栓剂形式提供；或者甚至可以通过使用霜剂、滴剂或甚至注射剂递送至眼部。甚至可以例如与聚合物或可允许组合物从植入部位扩散至周围细胞的其它结构或物质相结合，通过手术施用含有所提供的组合物与治疗性分子或配体络合的制剂。可选地，它们可在不使用聚合物或支持体的情况下通过手术来施加。

[0319] 在一些实施方案中，将所提供的脂质体和/或组合物配制成使得它们适合于其中所含的药剂(例如，mRNA)的延迟释放。可方便地以延迟的给药间隔对受试者施用这类延迟释放组合物。例如，在一个实施方案中，每天两次、每天或每隔一天对受试者施用本发明的组合物。在优选的实施方案中，一周两次、一周一次、每十天、每两周、每三周或更优选每四周、一月一次、每六周、每八周、每隔一个月、每三个月、每四个月、每六个月、每八个月、每九个月或每年对受试者施用本发明的组合物。还设想了配制用于贮库施用(例如，肌内、皮下、玻璃体内)以经延迟的时间段递送或释放mRNA的组合物和脂质体。优选地，将所用的延迟释放手段与对mRNA进行的修饰相结合以提高稳定性。

[0320] 本文中还设想了包含本文所公开的一种或多种脂质体的冻干药物组合物以及使用这类组合物的相关方法，例如2012年6月8日提交的第PCT/US2012/041663号国际专利申请(公开号WO2012/170889，其教导内容全文以引用的方式并入本文)中所公开的那样。例如，可将根据本发明的冻干药物组合物在施用前复溶，或者可在体内复溶。例如，可将冻干药物组合物配制成适当的剂型(例如，诸如圆片、棒或膜的皮内剂型)并施用，使得剂型通过个体的体液在体内随着时间的推移再水合。

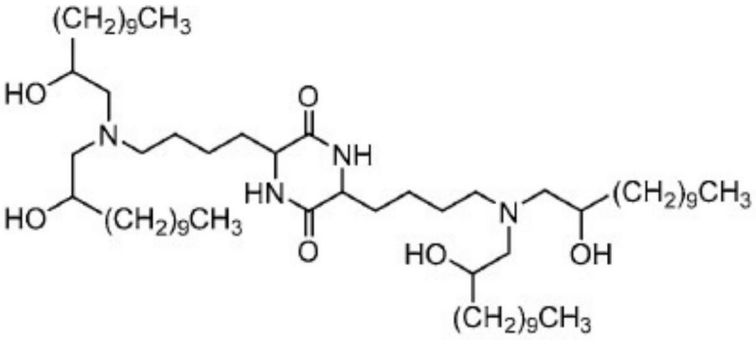
[0321] 可以将所提供的脂质体和组合物施用于任何所需的组织。在一些实施方案中，由所提供的脂质体或组合物递送的药剂(例如，mRNA)在其中施用了脂质体和/或组合物的组织中表达。在一些实施方案中，递送的mRNA在不同于其中施用了脂质体和/或组合物的组织中表达。所递送的mRNA可在其中被递送和/或表达的示例性组织包括但不限于肝、肾、心脏、脾、血清、脑、骨骼肌、淋巴结、皮肤和/或脑脊液。

[0322] 根据各种实施方案，可调整所递送的药剂(例如，mRNA)的表达的时机以适应特定的医疗需要。在一些实施方案中，由所递送的mRNA编码的蛋白质的表达可在单次施用所提供的脂质体或组合物后1、2、3、6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66和/或72小时在血清或靶组织中检出。在一些实施方案中，由mRNA编码的蛋白质的表达可在单次施用所提供的脂

质体或组合物后1天、2天、3天、4天、5天、6天和/或7天在血清或靶组织中检出。在一些实施方案中，由mRNA编码的蛋白质的表达可在单次施用所提供的脂质体或组合物后1周、2周、3周和/或4周在血清或靶组织中检出。在一些实施方案中，由mRNA编码的蛋白质的表达可在单次施用所提供的脂质体或组合物后的一个月或更长时间后检出。

[0323] 本文还包括以下实施方案：

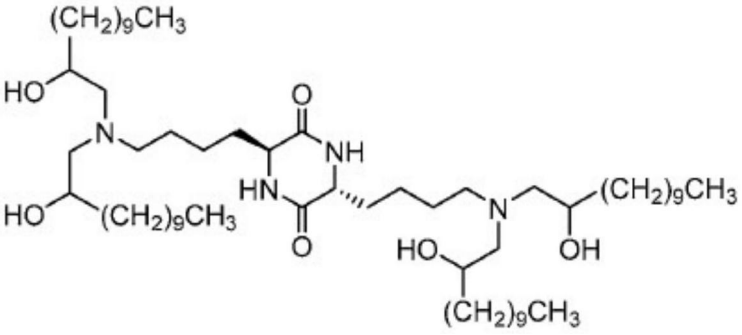
[0324] 实施方案1.一种组合物，其包含一种或多种式I的化学实体，所述化学实体中的每一者是式I的化合物：

[0325]  **I，**

[0326] 其药学上可接受的盐、其溶剂合物或其药学上可接受的盐的溶剂合物，

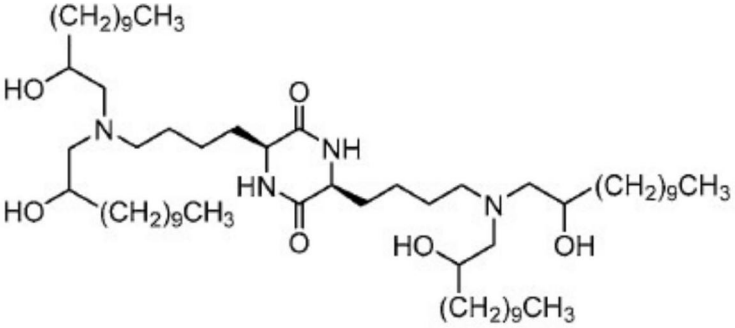
[0327] 所述组合物的特征在于，所述组合物中大于式I的化学实体的总量的第一阈值量的：

[0328] 是式I.a的化学实体：

[0329]  **I.a，**

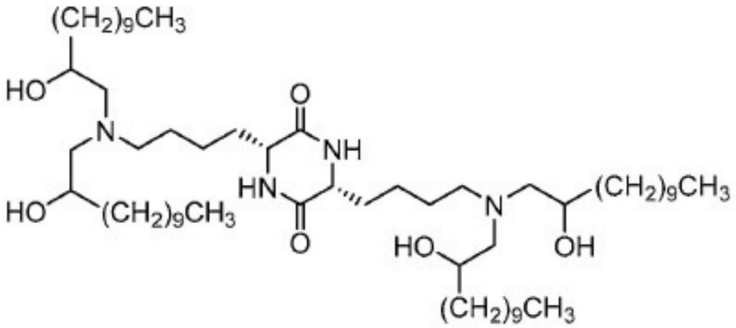
[0330] 其中所述第一阈值量是50％；或

[0331] 是式I.b.1的化学实体：

[0332]  **I.b.1，**

[0333] 其中所述第一阈值量是25％；或

[0334] 是式I.b.2的化学实体：

[0335] 

I.b.2,

[0336] 其中所述第一阈值量是25%。

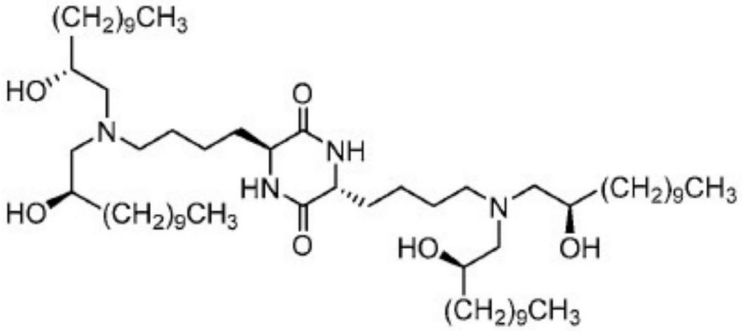
[0337] 实施方案2.如实施方案1所述的组合物,其中所述第一阈值量是70%。

[0338] 实施方案3.如实施方案1所述的组合物,其中所述第一阈值量是80%。

[0339] 实施方案4.如实施方案1所述的组合物,其中所述第一阈值量是95%。

[0340] 实施方案5.如实施方案1-4中任一项所述的组合物,其中所述组合物中大于式I的化学实体的总量的所述第一阈值量的是式I.a的化学实体。

[0341] 实施方案6.如实施方案5所述的组合物,其特征在于,所述组合物中大于或等于式I.a的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.i的化学实体:

[0342] 

I.a.i,

[0343] 其中所述第二阈值量是50%。

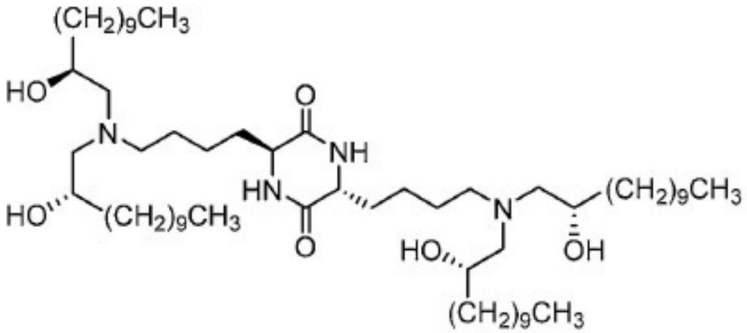
[0344] 实施方案7.如实施方案6所述的组合物,其中所述第二阈值量是70%。

[0345] 实施方案8.如实施方案6所述的组合物,其中所述第二阈值量是80%。

[0346] 实施方案9.如实施方案6所述的组合物,其中所述第二阈值量是90%。

[0347] 实施方案10.如实施方案6所述的组合物,其中所述第二阈值量是95%。

[0348] 实施方案11.如实施方案5所述的组合物,其特征在于,所述组合物中大于或等于式I.a的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.a.ii的化学实体:

[0349] 

I.a.ii,

[0350] 其中所述第二阈值量是50%。

[0351] 实施方案12.如实施方案11所述的组合物,其中所述第二阈值量是70%。

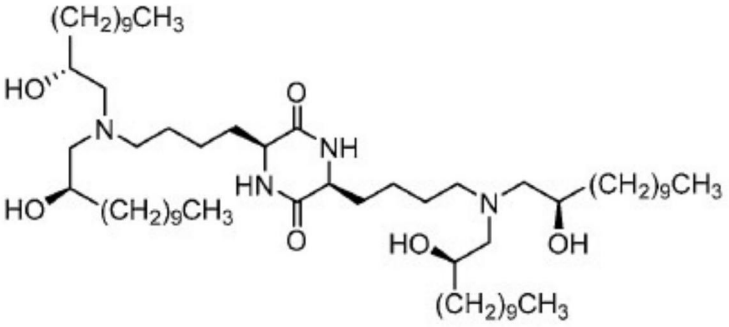
[0352] 实施方案13.如实施方案11所述的组合物,其中所述第二阈值量是80%。

[0353] 实施方案14.如实施方案11所述的组合物,其中所述第二阈值量是90%。

[0354] 实施方案15.如实施方案11所述的组合物,其中所述第二阈值量是95%。

[0355] 实施方案16.如实施方案1-4中任一项所述的组合物,其中所述组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的所述第一阈值量的是式I.b.1的化学实体。

[0356] 实施方案17.如实施方案16所述的组合物,其特征在于,所述组合物中大于或等于式I.b.1的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.1.i的化学实体:

[0357]  **I.b.1.i,**

[0358] 其中所述第二阈值量是50%。

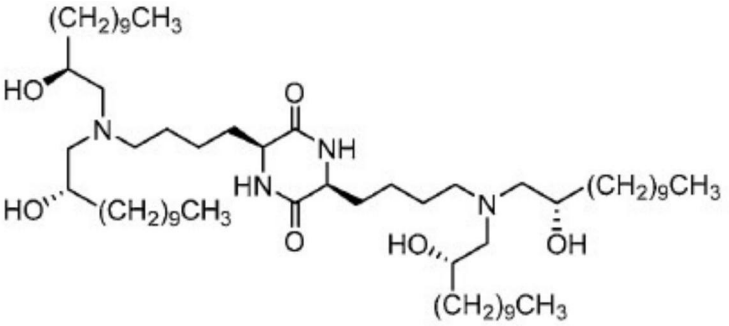
[0359] 实施方案18.如实施方案17所述的组合物,其中所述第二阈值量是70%。

[0360] 实施方案19.如实施方案17所述的组合物,其中所述第二阈值量是80%。

[0361] 实施方案20.如实施方案17所述的组合物,其中所述第二阈值量是90%。

[0362] 实施方案21.如实施方案17所述的组合物,其中所述第二阈值量是95%。

[0363] 实施方案22.如实施方案16所述的组合物,其特征在于,所述组合物中大于或等于式I.b.1的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.1.ii的化学实体:

[0364]  **I.b.1.ii,**

[0365] 其中所述第二阈值量是50%。

[0366] 实施方案23.如实施方案22所述的组合物,其中所述第二阈值量是70%。

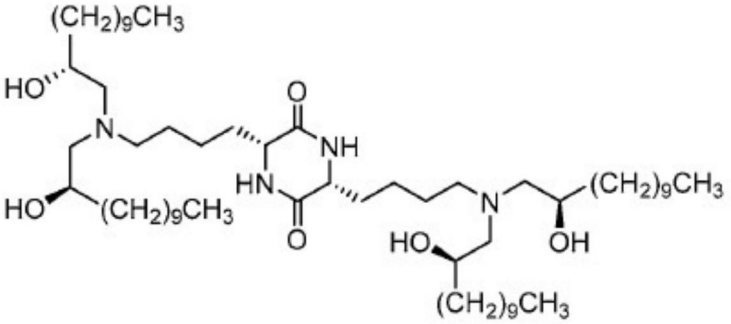
[0367] 实施方案24.如实施方案22所述的组合物,其中所述第二阈值量是80%。

[0368] 实施方案25.如实施方案22所述的组合物,其中所述第二阈值量是90%。

[0369] 实施方案26.如实施方案22所述的组合物,其中所述第二阈值量是95%。

[0370] 实施方案27.如实施方案1-4中任一项所述的组合物,其中所述组合物中大于或等于式I的化学实体的总量的所述第一阈值量的是式I.b.2的化学实体。

[0371] 实施方案28.如实施方案27所述的组合物,其特征在于所述组合物中大于或等于式I.b.2的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.2.i的化学实体:

[0372]  **I.b.2.i,**

[0373] 其中所述第二阈值量是50％。

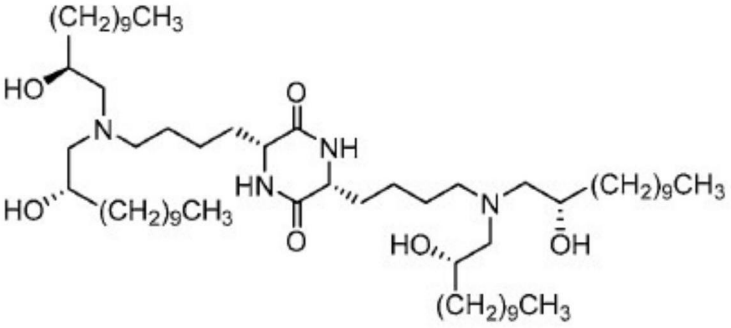
[0374] 实施方案29.如实施方案28所述的组合物,其中所述第二阈值量是70％。

[0375] 实施方案30.如实施方案28所述的组合物,其中所述第二阈值量是80％。

[0376] 实施方案31.如实施方案28所述的组合物,其中所述第二阈值量是90％。

[0377] 实施方案32.如实施方案28所述的组合物,其中所述第二阈值量是95％。

[0378] 实施方案33.如实施方案27所述的组合物,其特征在于,所述组合物中大于或等于式I.b.2的化学实体的总量的第二阈值量的是式I.b.2.ii的化学实体:

[0379]  **I.b.2.ii,**

[0380] 其中所述第二阈值量是50％。

[0381] 实施方案34.如实施方案33所述的组合物,其中所述第二阈值量是70％。

[0382] 实施方案35.如实施方案33所述的组合物,其中所述第二阈值量是80％。

[0383] 实施方案36.如实施方案33所述的组合物,其中所述第二阈值量是90％。

[0384] 实施方案37.如实施方案33所述的组合物,其中所述第二阈值量是95％。

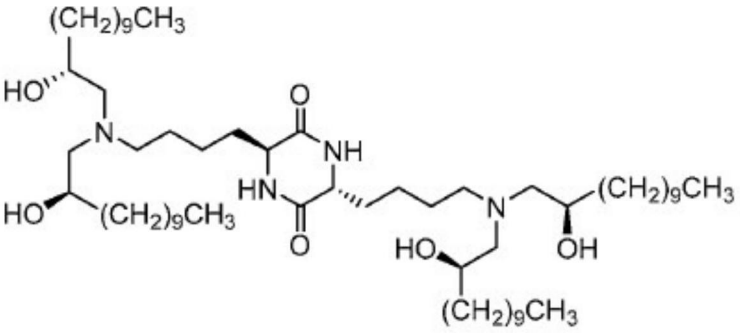
[0385] 实施方案38.如实施方案1-4中任一项所述的组合物,其特征在于,大于或等于所述组合物的总量的第三阈值量的是式I的化学实体,其中所述第三阈值量是85％(w/w)。

[0386] 实施方案39.如实施方案38所述的组合物,其中所述第三阈值量是90％。

[0387] 实施方案40.如实施方案38所述的组合物,其中所述第三阈值量是95％。

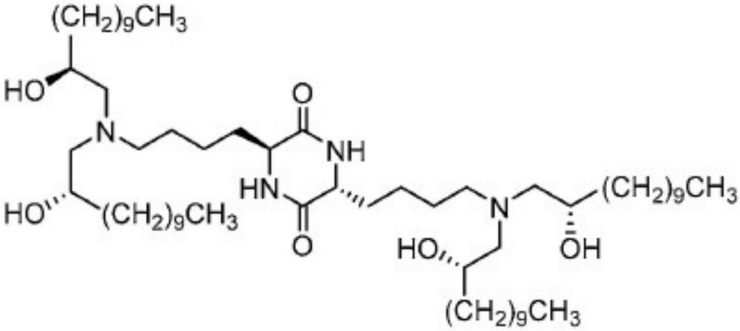
[0388] 实施方案41.如实施方案38所述的组合物,其中所述第三阈值量是98％。

[0389] 实施方案42.如实施方案41所述的组合物,其中大于或等于所述组合物的总量的90％(w/w)的是式I.a.i的化学实体:

[0390] 

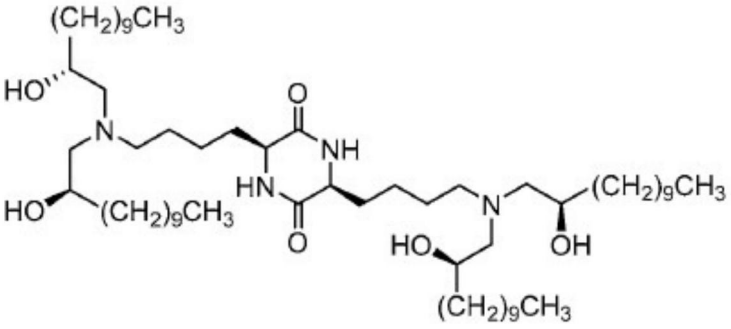
I.a.i。

[0391] 实施方案43.如实施方案41所述的组合物,其中大于或等于所述组合物的总量的90%(w/w)的是式I.a.ii的化学实体:

[0392] 

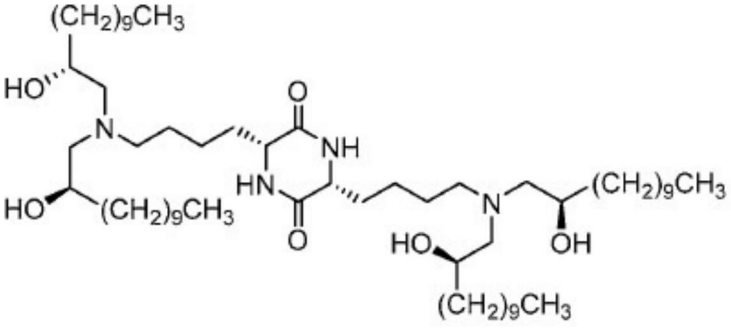
I.a.ii。

[0393] 实施方案44.如实施方案42所述的组合物,其中大于或等于所述组合物的总量的90%(w/w)的是式I.b.1.i的化学实体:

[0394] 

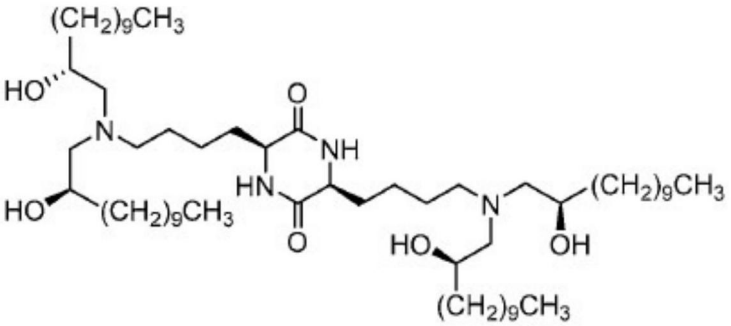
I.b.1.i。

[0395] 实施方案45.如实施方案41所述的组合物,其中大于或等于所述组合物的总量的90%(w/w)的是式I.b.2.i的化学实体:

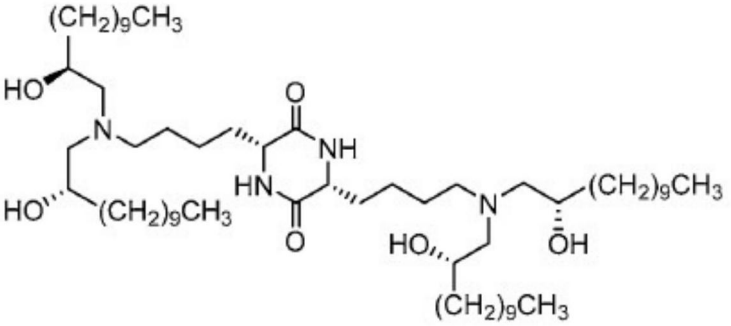
[0396] 

I.b.2.i。

[0397] 实施方案46.如实施方案41所述的组合物,其中大于或等于所述组合物的总量的90%(w/w)的是式I.b.1.i的化学实体:

[0398]  I.b.1.i。

[0399] 实施方案47.如实施方案41所述的组合物,其中大于或等于所述组合物的总量的90%(w/w)的是式I.b.2.i.的化学实体:

[0400]  I.b.2.ii。

[0401] 实施方案48.一种在体内递送信使RNA(mRNA)的方法,其包括

[0402] 对需要递送的受试者施用包封在脂质体内的包含编码蛋白质的mRNA的组合物,使得所述组合物的施用导致由所述mRNA编码的所述蛋白质在体内的表达;

[0403] 其中所述脂质体包含如实施方案1-47中任一项所述的阳离子脂质组合物。

[0404] 实施方案49.如实施方案48所述的方法,其中所述脂质体进一步包含一种或多种非阳离子脂质、一种或多种基于胆固醇的脂质和/或一种或多种PEG修饰的脂质。

[0405] 实施方案50.如实施方案49所述的方法,其中所述一种或多种非阳离子脂质选自DSPC(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱)、DPPC(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱)、DOPE(1,2-二油基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DOPC(1,2-二油基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱)DPPE(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DMPE(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DOPG(1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸-(1'-外消旋-甘油))。

[0406] 实施方案51.如实施方案49或50所述的方法,其中所述一种或多种基于胆固醇的脂质是胆固醇和/或PEG化胆固醇。

[0407] 实施方案52.如实施方案49-51中任一项所述的方法,其中所述一种或多种PEG修饰的脂质包含共价连接于具有C_6-C_{20}长度的烷基链的脂质的长度达5kDa的聚(乙)二醇链。

[0408] 实施方案53.如实施方案48-52中任一项所述的方法,其中所述脂质体具有小于约250nm、200nm、150nm、100nm、75nm或50nm的大小。

[0409] 实施方案54.如实施方案48-53中任一项所述的方法,其中所述mRNA具有等于或大于约0.5kb、1kb、1.5kb、2kb、2.5kb、3kb、3.5kb、4kb、4.5kb或5kb的长度。

[0410] 实施方案55.如实施方案48-54中任一项所述的方法,其中由所述mRNA编码的所述蛋白质是胞质蛋白质。

[0411] 实施方案56.如实施方案48-54中任一项所述的方法,其中由所述mRNA编码的所述蛋白质是分泌蛋白质。

[0412] 实施方案57.如实施方案48-54中任一项所述的方法,其中由所述mRNA编码的所述蛋白质是酶。

[0413] 实施方案58.如实施方案48-57中任一项所述的方法,其中所述mRNA包含一种或多种修饰的核苷酸。

[0414] 实施方案59.如实施方案58所述的方法,其中所述一种或多种修饰的核苷酸包括假尿苷、N-1-甲基-假尿苷、2-氨基腺苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯并-嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C-5丙炔基-胞苷、C-5丙炔基-尿苷、2-氨基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、2-氨基腺苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-氧代腺苷、8-氧代鸟苷、O(6)-甲基鸟嘌呤和/或2-硫代胞苷。

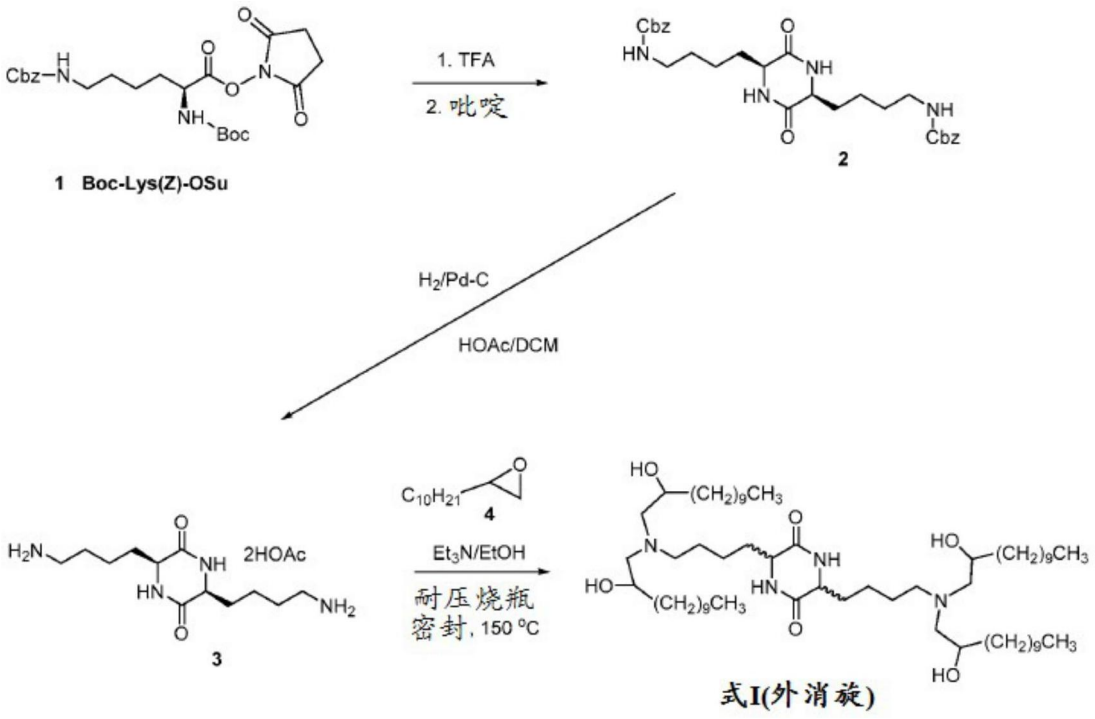
[0415] 实施方案60.如实施方案48-59中任一项所述的方法,其中所述mRNA是未修饰的。

[0416] 实施方案61.一种治疗疾病或病症的方法,其包括采用实施方案48-60中任一项所述的方法递送编码治疗性蛋白质的mRNA的步骤。

[0417] 实施例

[0418] 实施例1-式I的外消旋化合物的合成

[0419]



[0420] 方案1.式I的外消旋化合物的合成路线

[0421] 由被保护的赖氨酸衍生物1即Boc-Lys(Z)-OSu通过用三氟乙酸裂解α-氨基叔丁基氨基甲酸酯并使所得的游离胺二聚形成3,6-二氧代哌嗪2来制备外消旋化合物10。2经催化钯氢化产生伯二胺3,将其用四当量的环氧化物4和三乙胺处理,形成式I的外消旋3,6-二氧代哌嗪10。

[0422] 二苄基(((2S,5S)-3,6-二氧代哌嗪-2,5-二基)双(丁烷-4,1-二基))二氨基甲酸酯2:向用冰浴冷却的Boc-Lys(Z)-OSu 1(50g)中缓慢添加TFA(60mL)。将所得混合物搅拌20分钟。除去冰浴并继续搅拌1h。通过旋转蒸发除去TFA。将油状残余物溶于DMF(80mL)并缓慢添加到搅拌的吡啶(无水,2.5L)中。质谱显示1h后反应完全。通过旋转蒸发除去吡啶并将残余物用EtOAc(2L)稀释。搅拌20分钟后过滤混合物,得到呈灰白色固体的2(过夜真空干燥后

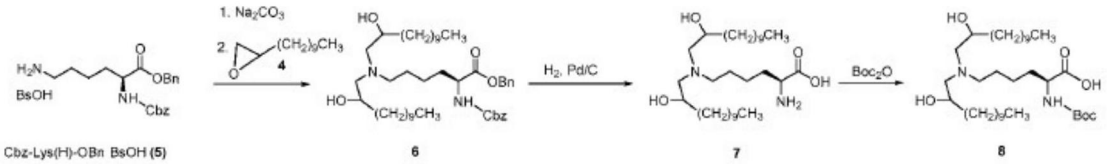
为20g,收率:73%)。

[0423] (3S,6S)-3,6-双(4-氨基丁基)哌嗪-2,5-二酮-2HOAc 3:向AcOH(550mL)和DCM(550mL)的混合物中的化合物2添加Pd/C(10%,湿10g)。将此混合物在H_2气球下搅拌4h,这时质谱显示反应完全。将反应混合物用氮冲洗10分钟并通过硅藻土过滤。用MeOH(3×250mL)漂洗硅藻土。将合并的滤液蒸发并将残余物与EtOAc(1.0L)一起搅拌30分钟。过滤得到呈白色固体的3(过夜真空干燥后为16.37g。收率:114%。^{1}H NMR显示产物干净,但样品中有额外的HOAc)

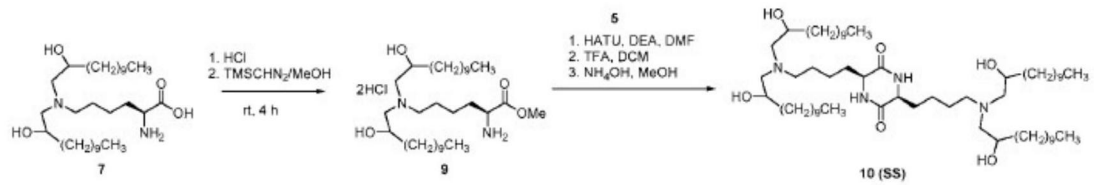
[0424] 3,6-双(4-(双(2-羟基十二烷基)氨基)丁基)哌嗪-2,5-二酮10:向在室温下在500mL耐压烧瓶中搅拌的EtOH(75mL)中的3(15.87g,42.2mmol)和4(57mL,261mmol)的混合物中添加Et_3N(23mL,165mmol)。将烧瓶用氮冲洗5分钟并密封。将混合物(固体和液体浆料)在室温下搅拌30分钟,然后加热到150-155℃(油浴温度)并搅拌5h。温度达到150℃后得到澄清溶液。在被冷却到室温后将反应溶液蒸发,并以0-30% MeOH/DCM为洗脱液通过快速柱色谱法将残余物纯化9次,以0-30% MeOH/EtOAc为洗脱液纯化2次。使用DCM至50%的75:22:3DCM/MeOH/NH4OH(水溶液)为洗脱液导致产物与极性较小的副产物的共洗脱。以30%MeOH/DCM为展开溶剂,副产物在TLC上紧随产物。以30% MeOH/EtOAc为展开溶剂,其在TLC上与产物良好地分离。汇集来自柱纯化的纯产物级分并蒸发。将油状残余物溶解在Et_2O中并蒸发。在真空下干燥过夜除去所有的溶剂并得到外消旋化合物10,为浅黄色凝胶(9.85g,收率:24%)。具有ELSD检测的HPLC显示出具有相同产物质量的两个相似大小的峰。元素分析:(计算值):C,72.63;H,12.17;N,5.64;(实测值):C,72.25;H,12.37;N,5.68。质谱:993.8m/z。

[0425] 在用7.15g的3和25.6mL的4的另一次实验中,用0-30%MeOH/EtOAc为洗脱液将粗产物纯化两次,得到两批产物:来自早期级分的1.55g批次和来自后期级分的7.38g批次。通过^{1}H NMR分析两批次都是纯的。具有ELSD检测的HPLC显示出对于7.38g批次的具有相同产物质量的两个相似大小的峰,但对于1.55g批次仅有单个产物峰。

[0426] 实施例2-式I.b.1的手性化合物(即,化合物10)的合成。



[0427]

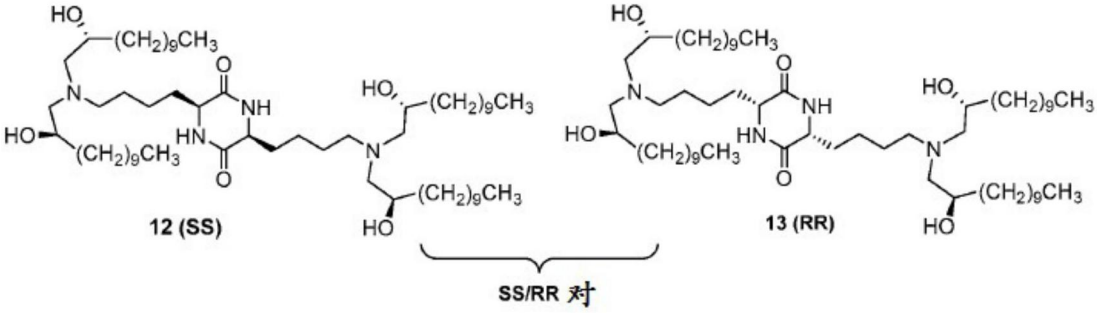


[0428] 方案2.式I.b.1的手性化合物(即,化合物10)的合成路线。

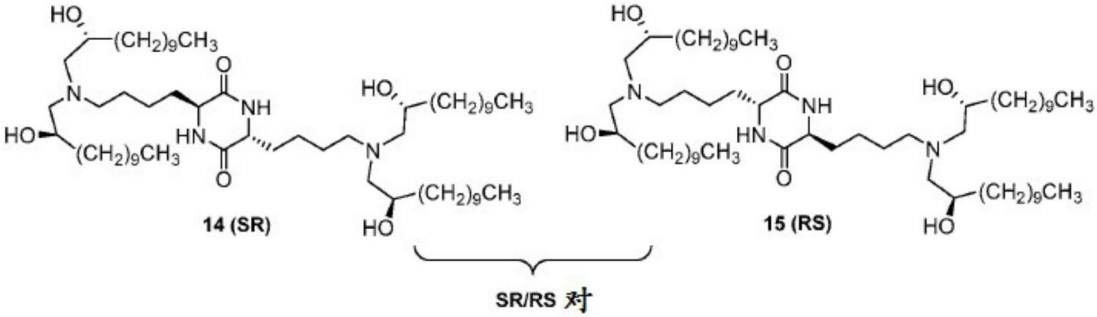
[0429] 经由用两个当量的环氧化物4将被保护的赖氨酸衍生物5N-烷基化以形成二醇6来合成手性化合物10。二醇6经催化钯氢化形成α氨基酸7,其被分成两个部分。将α氨基酸7的第一部分使其α氨基基团被保护为氨基甲酸叔丁酯,经用BOC酸酐处理后以形成羧酸8。将α氨基酸7的第二部分使其游离酸转化为甲酯以形成胺9。羧酸8和胺9在诸如DMF的非质子溶剂中经由诸如HATU和二乙醇胺的肽偶联试剂偶联至酰胺中间体,用在二氯甲烷中的三氟乙

酸使酰胺中间体的氨基甲酸叔丁酯基团裂解，并使所得的氨基酯产物环化为哌嗪-2,5-二酮10。经由此路线保留在所有手性中心处的立体化学。

[0430] 使用相应手性环氧化物起始材料经由所描述的合成路线制备下面的手性化合物12-15。



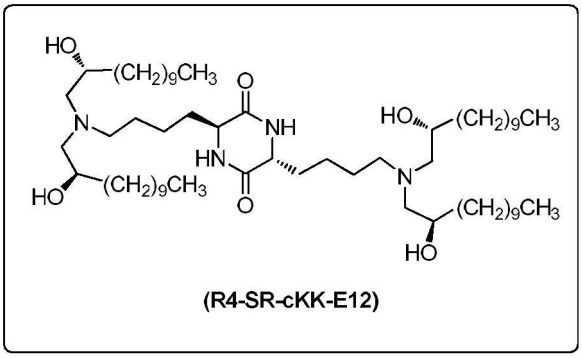
[0431]



[0432] 方案3.手性化合物12-15。

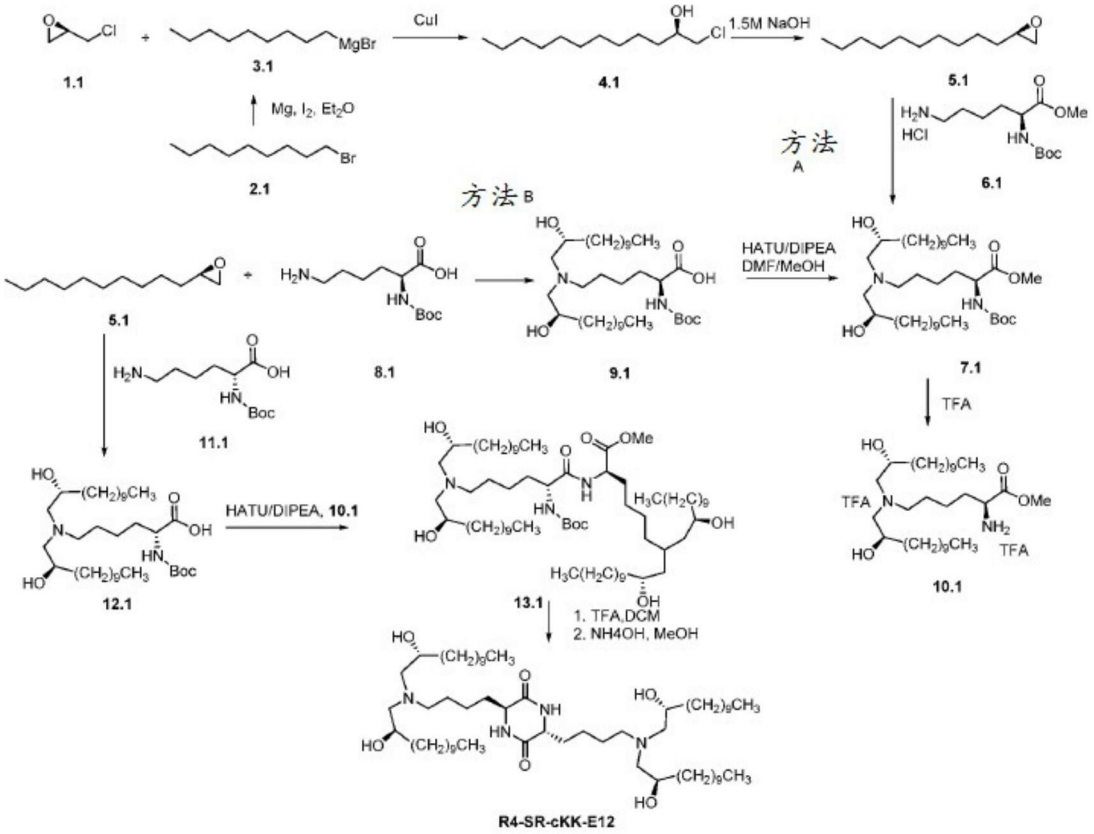
[0433] 实施例3-式I.a.i的化合物(即,R4-SR-cKK-E12)

[0434]



[0435] 方案4:式I.a.i的化合物(即,R4-SR-cKK-E12)的合成

[0436]



[0437] 化合物3.1的合成:向Mg(60g,2.5mol)在无水Et_2O(1000mL)中的悬浮液中添加碘的一种晶体,接着添加1-溴壬烷(25ML)。引发反应并在用水浴加热反应烧瓶后溶液开始回流。在1.5h内通过加料漏斗添加剩余的1-溴壬烷(360mL,总共2.0mol)以保持回流。添加后,用水浴将反应溶液在回流下再加热30分钟,然后将其冷却到室温。将3.1的此醚溶液直接用于下一反应。

[0438] 化合物4.1的合成:向在5L三颈烧瓶中在-78℃下用机械搅拌器搅拌的CuI(39g,0.2mol)在无水THF(1000mL)中的悬浮液中添加R-表氯醇(185g,2.0mol)(加料漏斗)。添加后,在1h内经由插管添加3.1的上述醚溶液。将混合物在-78℃下搅拌3.5小时,然后用饱和NH_4Cl水溶液(1500mL)淬灭。将有机层分离。将水层用Et_2O(2000mL)萃取。将合并的有机相用盐水洗涤、(经$MgSO_4$)干燥并在真空下蒸发。通过快速柱色谱法(2.5kg SiO_2,用己烷中的0-10% EtOAc洗脱)纯化粗产物,得到292g为浅黄色油状物的4.1(收率:66%)。

[0439] 化合物5.1的合成:在0℃下通过加料漏斗向4.1(292g,1.33mol)在MeOH(600mL)和THF(600mL)中的溶液中添加NaOH水溶液(1.5M,1000mL)。添加后将反应混合物在室温下搅拌2.5小时,TLC显示有主要产物、非常少量的起始材料(EtOAc:己烷=1:9,Rf=0.6)。在真空下通过旋转蒸发除去THF和MeOH。将含水残余物用Et_2O(600mL×3)萃取。将合并的有机相用盐水洗涤、经$MgSO_4$干燥并蒸发。通过柱(SiO_2,2.5kg,用己烷中的0-10% EtOAc洗脱)纯化黄色油状残余物,得到205g(84%)纯的5.1。

[0440] 化合物7.1的合成:方法A:向在室温下被搅拌的6.1(75g,0.25mol)在DCM(1000mL)和MeOH(71mL)的混合物中的溶液中添加Na_2CO_3水溶液(2.0M,135mL)。分离有机层并用DCM(250mL×2)萃取水层。将合并的有机相经Na_2SO_4干燥并在真空下蒸发。将残余物溶解在MeOH(375mL)中,然后添加化合物5.1(185g,1.0mol)。将反应混合物在室温下搅拌4天,这时MS和

TLC显示主要为所需产物。浓缩后，通过快速柱色谱法(2.0kg SiO_2，用己烷中的0-60％ EtOAc洗脱)纯化粗产物，得到呈浅色粘稠油状物的7.1(131g，82％)。

[0441] 方法B：向8.1(50g，0.2mol)在MeOH(600mL)中的悬浮液中添加DIPEA(45mL)，然后添加化合物5.1(150g，0.813mol，4.0当量)。将反应混合物在室温下搅拌7天。除去溶剂，通过柱(1.0kg的SiO_2，用EtOAc中的0-30％ MeOH洗脱)纯化残余物，得到呈蜡状固体的9.1(83g，67％)。向在0℃下搅拌的9.1(81g，0.13mol)在DMF(1000mL)中的溶液中添加HATU(50.1g，0.13mol)，接着是DIPEA(92mL，0.52mol)。将混合物在0℃下搅拌40分钟，然后添加MeOH(53.2mL，10.0当量)。将所得混合物在室温下搅拌过夜。然后将其用水(5000mL)稀释并用EtOAc(500mL×4)萃取。将合并的有机相用盐水(600mL×3)洗涤、经无水$MgSO_4$干燥并在真空下蒸发。通过柱(1.0kg的SiO_2，用己烷中的0-80％ EtOAc洗脱)纯化粗产物，得到呈浅色粘稠油状物的7.1(69g，对于2个步骤为55％)。

[0442] 化合物10.1的合成：向7.1(69g，0.11mol)在DCM(200mL)中的溶液中添加TFA(200mL)，将混合物在室温下搅拌2小时，MS检测显示仅有所需产物。在真空下将所有溶剂蒸发，得到115g带棕色的油状产物10.1，其不经进一步纯化即用于下一步。

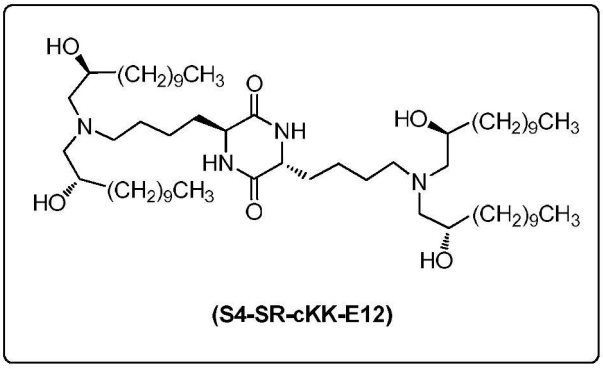
[0443] 化合物12.1的合成：向11.1、Boc-D-赖氨酸(75g，0.305mol)在MeOH(900mL)中的悬浮液中添加DIPEA(68mL)和5.1(196g，1.06mol)。将混合物在室温下搅拌7天。除去挥发物并通过柱(2.5kg的SiO_2，用EtOAc中的0-40％ MeOH洗脱)纯化粗产物，得到118g(63％)纯的化合物12.1。

[0444] 化合物13.1的合成：向用冰浴冷却的12.1(67.5g，0.11mol)在DMF(600mL，升温至50℃达30分钟以得到均匀溶液)中的溶液中添加HATU(50g，0.12mol)和DIPEA(95mL，0.55mol)。将所得混合物在0℃下搅拌45分钟，然后使用加料漏斗添加在DMF(400mL)中的化合物10.1(115g，如上得到的)。将混合物在室温下搅拌过夜。添加醚(1000mL)，接着是水(1000mL)。将有机相分离；用醚(250mL×2)萃取水溶液。将合并的有机相用水洗涤、经无水$MgSO_4$干燥、过滤并浓缩。通过柱(1.0kg的SiO_2，用EtOAc中的0-20％ MeOH洗脱)纯化残余物，得到94.2g(76％)化合物13.1。

[0445] 式I.a.i的化合物(即，R4-SR-cKK-E12)的合成：向13.1(94g，0.084mol)在DCM(300mL)中的溶液中添加TFA(300mL)。将混合物在室温下搅拌2小时。MS检测显示反应完全。在真空下蒸发溶剂。将残余物溶解在DCM(500mL)中并用Na_2CO_3水溶液(1.0M，500mL)洗涤。将水洗液用DCM(100mL)反萃取。将合并的有机相经无水$NaSO_4$干燥并蒸发。将残余物溶解在MeOH(1500mL)中并用冰浴冷却。通过加料漏斗添加NH_4OH水溶液(28％，80mL)。使反应混合物缓慢升温至室温并在环境温度下搅拌2天。在真空下将挥发物蒸发。通过柱(1.0kg的SiO_2，用溶剂：1％ NH_4OH、4-9％ MeOH、95-90％ EtOAc洗脱)纯化粗产物，得到34g纯的R4-SR-cKK-E12和22g不纯的R4-SR-cKK-E12。通过柱再纯化不纯的R4-SR-cKK-E12，得到12g纯的R4-SR-cKK-E12。因此，总共得到46g(55％)纯的R4-SR-cKK-E12(胶状固体)。

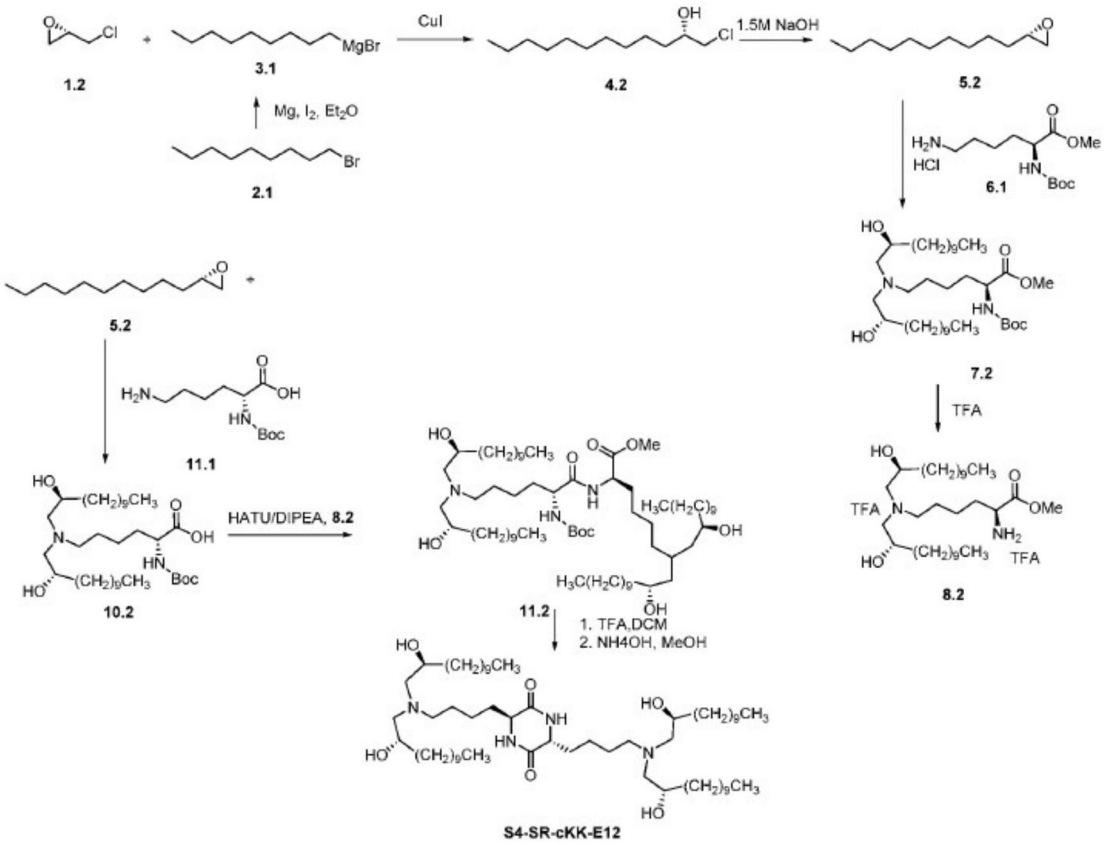
[0446] 实施例4-式I.a.ii的化合物(即，S4-SR-cKK-E12)

[0447]



[0448] 方案5:式I.a.ii的化合物(即,S4-SR-cKK-E12)的合成

[0449]



[0450] 化合物3.1的合成:向Mg(30g,1.25mol)在无水Et_2O(600mL)中的悬浮液中添加碘的一种晶体,接着添加1-溴壬烷(30mL)。引发反应并在用水浴加热反应烧瓶后溶液开始回流。在1.5h内通过加料漏斗添加剩余的1-溴壬烷(161mL,总共2.0mol)以保持回流。添加后,用水浴将反应溶液在回流下再加热30分钟,然后将其冷却到室温。将3.1的此醚溶液直接用于下一反应。

[0451] 化合物4.2的合成:使用加料漏斗向在5L三颈烧瓶中在-78℃下用机械搅拌器搅拌的CuI(19g,0.1mol)在无水THF(1000mL)中的悬浮液中添加S-表氯醇(92g,1.0mol)。添加后,在1h内经由插管添加3.2的上述醚溶液。将混合物在-78℃下搅拌3.5小时,然后用饱和NH_4Cl水溶液(400mL)淬灭。将有机层分离。将水层用Et_2O(1000mL)萃取。将合并的有机相用盐水洗涤、(经$MgSO_4$)干燥并在真空下蒸发。通过快速柱色谱法(2.5kg SiO_2,用己烷中的0-10% EtOAc洗脱)纯化粗产物,得到111.6g为浅黄色油状物的4.2(收率:66%)。

[0452] 化合物5.2的合成:在0℃下使用加料漏斗向4.2(111.3g,0.506mol)在MeOH

(230mL)和THF(230mL)中的溶液中添加NaOH水溶液(1.5M,395mL)。添加后将反应混合物在室温下搅拌2.5小时,TLC显示有主要产物和非常少量的起始材料(EtOAc:己烷=1:9,Rf=0.6)。在真空下通过旋转蒸发除去THF和MeOH。将含水残余物用Et_2O(200mL×3)萃取。将合并的有机相用盐水洗涤、经$MgSO_4$干燥并蒸发。通过柱(SiO_2,10kg,用己烷中的0-10% EtOAc洗脱)纯化黄色油状残余物,得到81g(87%)纯的5.2。

[0453] 化合物7.2的合成:向在室温下被搅拌的6.1(13g,0.044mol)在DCM(100mL)和MeOH(10mL)的混合物中的溶液中添加Na_2CO_3水溶液(2.0M,25mL)。分离有机层并用DCM(250mL×2)萃取水层。将合并的有机相经Na_2SO_4干燥并在真空下蒸发。将残余物溶解在MeOH(60mL)中,然后添加化合物5.2(32g,0.174mol)。将反应混合物在室温下搅拌4天,这时MS和TLC显示主要为所需产物。浓缩后,通过快速柱色谱法(600g SiO_2,用己烷中的0-60% EtOAc洗脱)纯化粗产物,得到呈浅色粘稠油状物的7.2(23g,85%)。

[0454] 化合物8.2的合成:向7.2(23g,0.0366mol)在DCM(60mL)中的溶液中添加TFA(60mL),将混合物在室温下搅拌2小时,MS检测显示仅有所需产物。在真空下蒸发所有溶剂,得到40g带棕色的油状产物8.2,其不经进一步纯化即用于下一步。

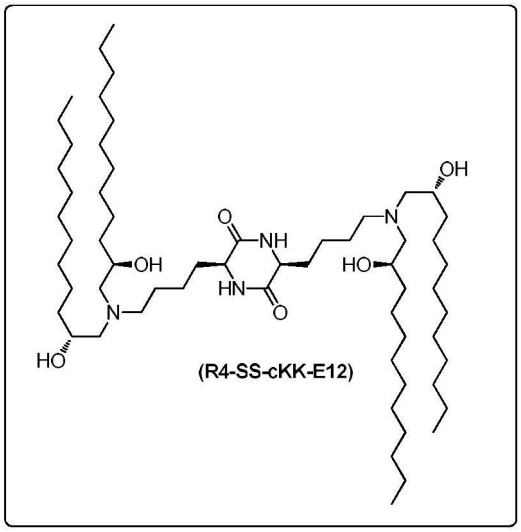
[0455] 化合物10.2的合成:向11.1、Boc-D-赖氨酸(14g,0.057mol)在MeOH(900mL)中的悬浮液中添加TEA(11.6mL)和5.2(42g,0.228mol)。将混合物在室温下搅拌7天。除去挥发物并通过柱(1.0kg的SiO_2,用EtOAc中的0-40% MeOH洗脱)纯化粗产物,得到24g(70%)纯的化合物10.2。

[0456] 化合物11.2的合成:向用冰浴冷却的10.2(9.1g,14.82mmol)在DMF(120mL)中的溶液中添加HATU(8.4g,22.23mol)和DIPEA(25mL,148.2mmol)。将混合物在0℃下搅拌45分钟,然后使用加料漏斗添加在DMF(80mL)中的化合物8.2。将所得混合物在室温下搅拌过夜。MS检测显示无起始材料。添加醚(1000mL),接着是水(1000mL)。将有机相分离,用醚(200mL×2)萃取水溶液。将合并的有机相用盐水洗涤、经无水$MgSO_4$干燥、过滤并浓缩。通过柱(330g的SiO_2,用EtOAc中的0-20% MeOH洗脱)纯化残余物,得到10.6g所需化合物11.2。

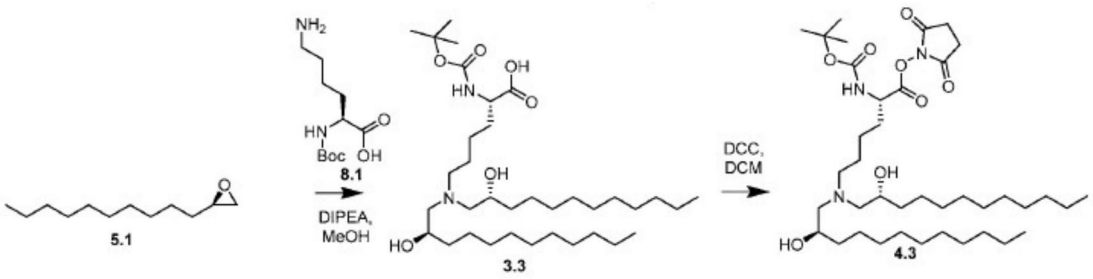
[0457] 式I.a.ii的化合物(即,S4-SR-cKK-E12)的合成:向11.2(10.6g,0.084mol)在DCM(30mL)中的溶液中添加TFA(30mL)。将混合物在室温下搅拌2小时。MS检测显示反应完全。在真空下蒸发溶剂。将残余物溶解在DCM(150mL)中并用Na_2CO_3水溶液(1.0M,200mL)洗涤。将水洗液用DCM(100mL)反萃取。将合并的有机相经无水$NaSO_4$干燥并蒸发。将残余物溶解在MeOH(200mL)中并用冰浴冷却。使用加料漏斗添加NH_4OH水溶液(28%,10mL)。使反应混合物缓慢升温至室温并在环境温度下搅拌2天。在真空下将挥发物蒸发。通过柱(600g的SiO_2,用溶剂:1% NH_4OH、4-9% MeOH、95-90%EtOAc洗脱)纯化粗产物,得到5.1g纯的S4-SR-cKK-E12。

[0458] 实施例5-式I.b.1.i的化合物(即,R4-SS-cKK-E12)

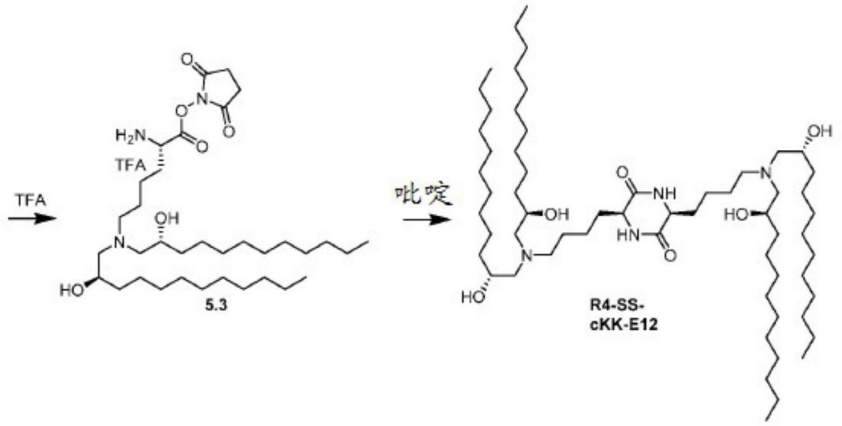
[0459]



[0460] 方案6:式I.b.1.i的化合物(即,R4-SS-cKK-E12)的合成。



[0461]

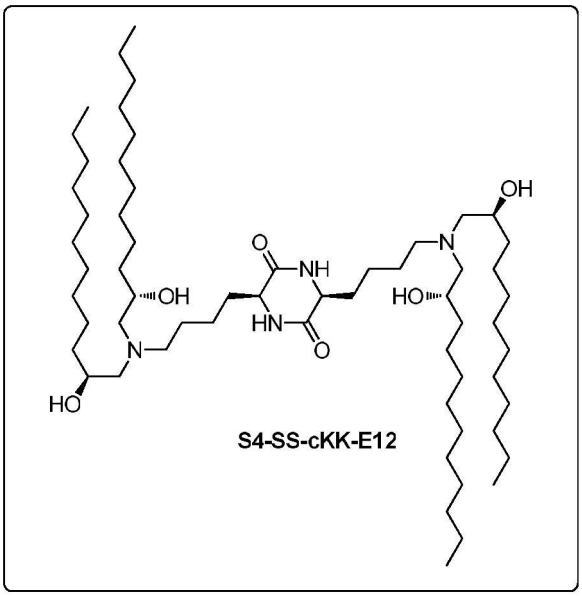


[0462] 化合物3.3(N^2-(叔丁氧基羰基)-N^6,N^6-双((R)-2-羟基十二烷基)-L-赖氨酸)的合成:将R-环氧化物(5.1,46g,250mmol)、Boc-L-赖氨酸8.1(15g,61mmol)和二异丙基乙胺(11ml)在甲醇(80ml)中的混合物在室温下搅拌3d。除去挥发物并将黄色油状残余物通过用EtOAc/MeOH(100/0至70/30,20分钟)洗脱的硅胶(330g)色谱法纯化,得到产物3.3,为白色固体(9.7g,26%)。

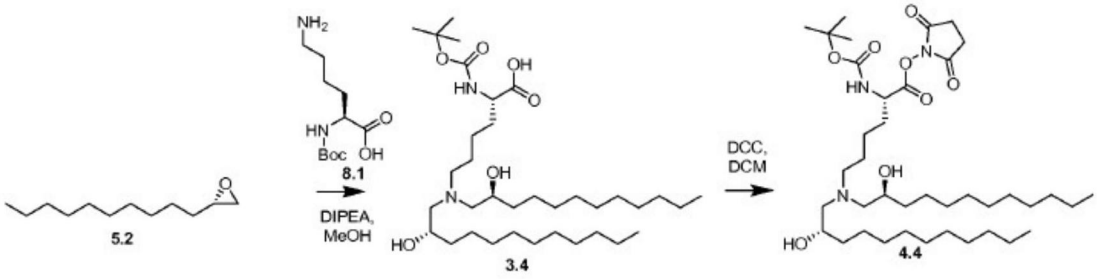
[0463] 式I.b.1.i.的化合物(即,R4-SS-cKK-E12;((3S,6S)-3,6-双(4-(双((S)-2-羟基十二烷基)氨基)丁基)哌嗪-2,5-二酮))的合成:向3.3(7.4g,12mmol)和NHS(1.38g,12mmol)在DCM(280ml)中的溶液中添加DCC(2.97g,14.4mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1.5h。然后除去溶剂并将残余物(粗4.3)溶解在TFA(30ml)中。将所得混合物在室温下搅拌1h。然后除去TFA,向残余物中添加DCM(30ml)并共蒸发以除去残留的TFA。在0℃和N_2下将粗

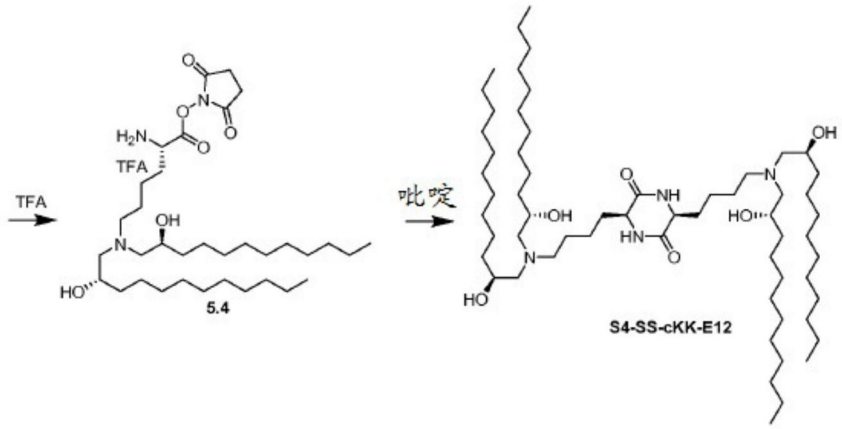
5.3溶于DCM(30mL)并添加到无水吡啶(480mL)中。将所得混合物在室温下搅拌过夜。然后除去吡啶并将残余物用乙醚(300mL)稀释。通过过滤除去形成的白色固体。将滤液用Na_2CO_3水溶液(1M,150ml)和盐水(150ml)洗涤、经Na_2SO_4干燥并浓缩。通过用3%NH_4OH/7%MeOH/90%EtOAc洗脱的柱色谱法纯化残余物五次(一次是330g柱,接着四次是80g柱),得到1.05g为浅色胶的纯的R4-SS-cKK-E12、1.0g R4-SS-cKK-E12。

[0464] 实施例6-式I.b.1.ii的化合物(即,S4-SS-cKK-E12)

[0465] 

[0466] 方案7:式I.b.1.ii的化合物(即,S4-SS-cKK-E12)的合成



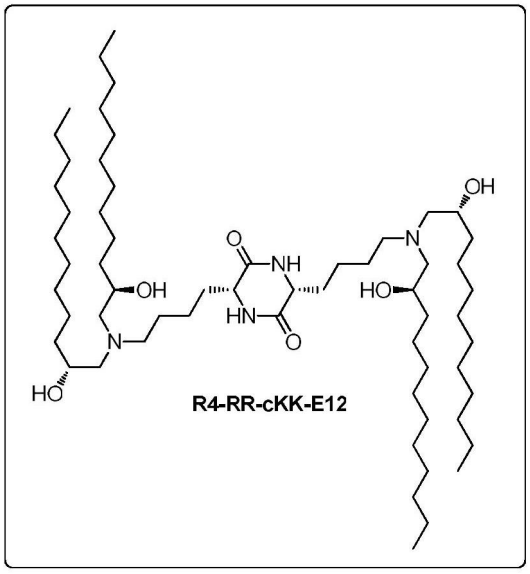
[0467] 

[0468] 化合物3(N^2-(叔丁氧基羰基)-N^6,N^6-双((S)-2-羟基十二烷基)-L-赖氨酸)的合成:将S-环氧化物(5.2,46g,250mmol)、Boc-L-赖氨酸8.1(15g,61mmol)和二异丙基乙胺(11ml)在甲醇(80ml)中的混合物在室温下搅拌8d。除去挥发物并将黄色油状残余物通过用

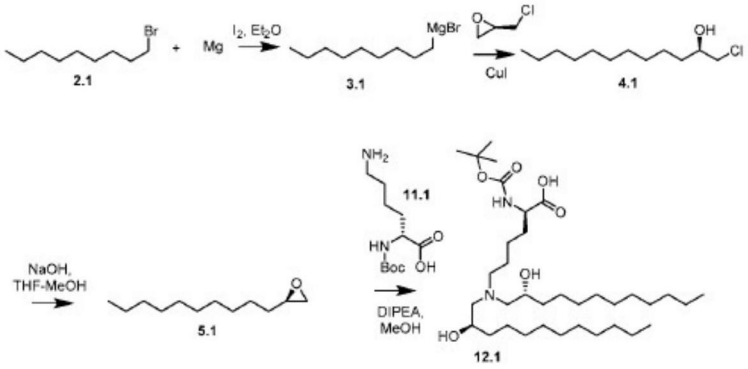
EtOAc/MeOH(100/0至70/30,20分钟)洗脱的硅胶(330g)色谱法纯化,得到产物3.4,为白色固体(22g,59%)。

[0469] 式I.b.1.ii的化合物(即,S4-SS-cKK-E12;((3S,6S)-3,6-双(4-(双((S)-2-羟基十二烷基)氨基)丁基)哌嗪-2,5-二酮)的合成:向3.4(24.5g,40mmol)和NHS(4.6g,40mmol)在DCM(280ml)中的溶液中添加DCC(9.9g,48mmol)。将反应混合物在室温下搅拌3h。然后除去溶剂并在0℃下将残余物(粗4.4)溶解在TFA(100ml)中。使所得混合物升温至室温并搅拌45分钟。然后除去TFA并向残余物中添加DCM(120ml),然后共蒸发以除去残余的TFA。在0℃和N_2下将粗5.4溶解在无水吡啶(1.6L)中,将所得混合物在室温下搅拌过夜。然后通过旋转蒸发器除去吡啶,并将残余物用乙醚(1L)稀释。通过过滤除去形成的白色固体并用乙醚(200ml)洗涤。将滤液用Na_2CO_3水溶液(1M,500ml)和盐水(500ml)洗涤、经Na_2SO_4干燥并浓缩。通过用0-50%(3%NH_4OH/7%MeOH/90% EtOAc)/EtOAc洗脱的硅胶(330g)柱色谱法纯化残余物,得到6.8g TLC纯的S4-SS-cKK-E12和7.1g略微不纯的S4-SS-cKK-E12。将6.8g(6.8mmol)TLC纯的S4-SS-cKK-E12溶解在120ml乙酸乙酯中。添加Boc_2O(0.22g,1.0mmol)。将混合物在室温下搅拌2h。除去溶剂并通过用0-50%(3%NH_4OH/7%MeOH/90%EtOAc)/EtOAc洗脱的硅胶(120g)柱色谱法纯化残余物,得到5.7g(84%)的纯产物S4-SS-cKK-E12,其不含胺副产物。

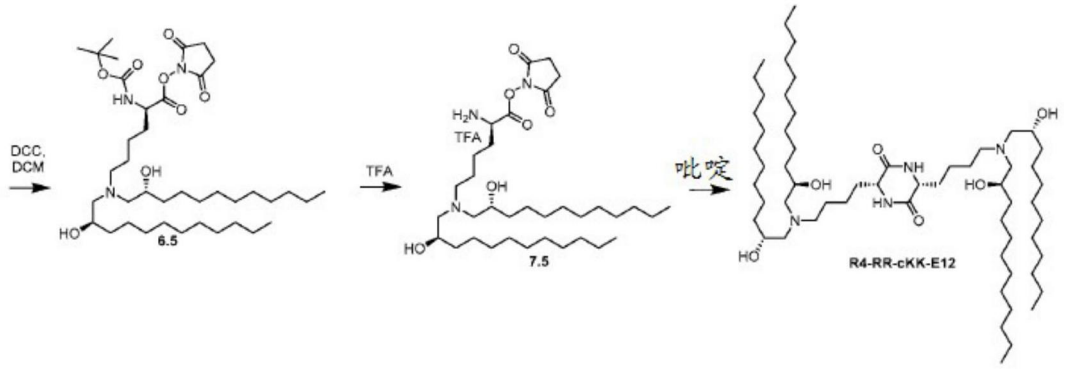
[0470] 实施例7-式I.b.2.i的化合物(即,R4-RR-cKK-E12)

[0471] 

[0472] 方案8:式I.b.2.i的化合物(即,R4-RR-cKK-E12)的合成



[0473]



[0474] 化合物3.1的合成:对悬浮在无水Et_2O(0.9L)中的镁(60g)添加1-溴壬烷2.1(20mL),接着添加催化量的碘(50mg)。将所得混合物用热水浴加热,直到Mg与2.1的反应开始。除去浴并添加剩余的1-溴壬烷(379.1mL)以保持温和回流。添加2.1后,通过热水浴再保持回流30分钟。将所得的3.1的格氏溶液冷却并直接用于下一步。

[0475] 化合物4.1的合成:对在-78℃下悬浮于THF(1.5L)中的CuI(38.1g)添加R-(-)-表氯醇(156.8mL)。然后经由插管添加3.1的上述格氏溶液,同时将反应温度保持在<-65℃。将所得反应混合物在-78℃下再搅拌3小时。然后,小心地添加饱和氯化铵水溶液(0.8L),接着添加水(1.0L)。将所得混合物搅拌并使其升温到室温。分离有机层并将水层用Et_2O(0.5L×2)萃取。将有机层与Et_2O萃取液合并,将所得溶液用盐水(0.5L×2)洗涤并经无水硫酸镁干燥。在真空下蒸发溶剂并将所得残余物在硅胶柱(己烷至20% EtOAc/己烷)上纯化,得到呈黄色油状物的4.1(243.5g,55%)。

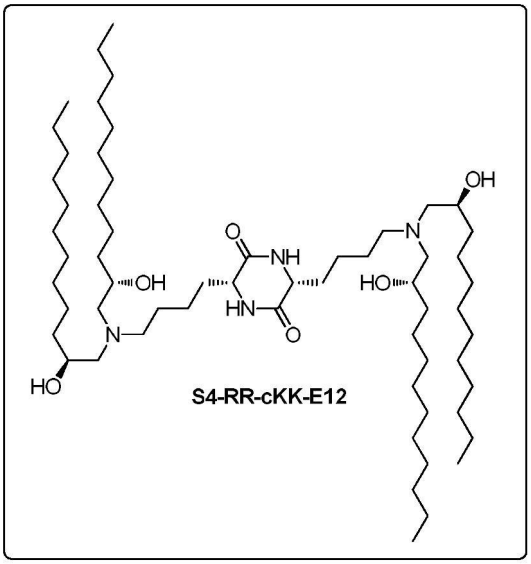
[0476] 化合物5.1的合成:向在0℃下搅拌的4.1(243.49g)在1:2.6MeOH-THF(3.6L)中的溶液中缓慢添加NaOH水溶液(1.5M,0.89L,1.33摩尔)。使所得混合物升温并在室温下搅拌3h。TLC分析显示4.1完全消失。蒸发有机溶剂并将水层用Et_2O(1L+500mL×2)萃取。将有机萃取液合并,用盐水(600mL)洗涤并经无水硫酸镁干燥。在真空下蒸发溶剂得到残余物,将其在硅胶柱(己烷至10% EtOAc/己烷)上纯化,得到呈浅黄色油状物的环氧化物5.1(193.7g,95%)。

[0477] 化合物12.1的合成:在室温下搅拌N-Boc-D-赖氨酸11.1(49.2g,0.2摩尔)和环氧化物5.1(147.2g,0.8摩尔)在MeOH(1.04L)中的混合物。添加DIPEA(51.9g,0.4摩尔)。然后将所得混合物搅拌8天,然后浓缩至干。将残余物在硅胶柱(2kg,MeOH/DCM,0至10%)上纯化,得到49.2g大部分纯的12.1(MZ-550-180)和58.3g不纯的12.1,通过第二柱(1.5kg,MeOH/EtOAc,10至40%)纯化后者,得到41.4g大部分纯的12.1。将两个大部分纯的批次合并并与EtOAc(0.5L)一起搅拌3h。将混合物过滤,得到41.4g纯的12.1,为白色固体。将滤液浓

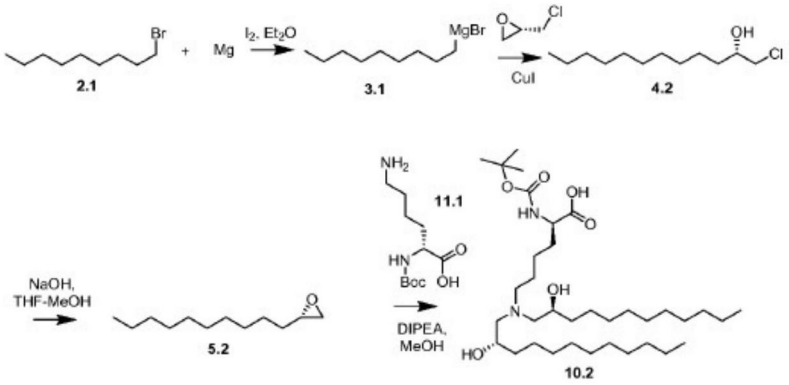
缩至干。将残余物与EtOAc(0.1L)一起搅拌1h并过滤,得到10.6g纯的12.1。将滤液浓缩至干并将残余物在硅胶柱(330g,MeOH/EtOAc,10至40%)上纯化,得到第三批26.9g纯的12.1。总共得到78.9g纯的12.1。收率:64%

[0478] 式I.b.2.i的化合物(即,R4-RR-cKK-E12)的制备:批次1:向12.1(6.14g,10mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(1.15g,10mmol)在DCM(70mL)中的溶液中添加DCC(2.47g,12mmol)。将所得混合物在室温下搅拌3h。在真空下蒸发挥发物,得到残余物(NHS酯6.5),将其溶解在TFA(25mL)中并搅拌0.5h。在真空下除去TFA并将残余物(化合物7.5)冷却到0℃。添加吡啶(无水,400mL)并将反应混合物在室温下搅拌2h。在真空下除去吡啶并将残余物悬浮于Et_2O(300mL)中。通过过滤除去固体。将滤液用1M Na_2CO_3水溶液(150mL)和盐水(150mL)洗涤、经无水硫酸镁干燥并浓缩至干。通过柱色谱(80g,7:3MeOH-NH_3-H_2O(4x与EtOAc)/EtOAc,0至50%)分离残余物,得到呈胶状固体的R4-RR-cKK-E12(2.22g)。由EtOAc多次沉淀并研磨,得到纯的R4-RR-cKK-E12(0.46g),为胶状物。

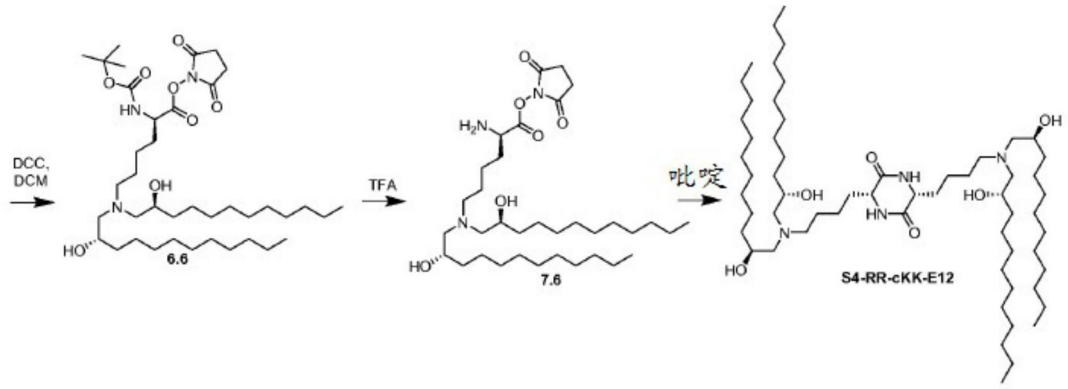
[0479] 实施例8-式I.b.2.ii的化合物(即,S4-RR-cKK-E12)

[0480] 

[0481] 方案9:式I.b.2.ii的化合物(即,S4-RR-cKK-E12)的合成



[0482]



[0483] 化合物3.1的合成:对悬浮于无水Et_2O(0.9L)中的镁(60g)添加1-溴壬烷2.1(20mL),接着添加催化量的碘(50mg)。将所得混合物用热水浴加热,直到Mg与2.1的反应开始。除去浴并添加剩余的1-溴壬烷(379.1mL)以保持温和回流。添加2.1后,通过热水浴再保持回流30分钟。将所得的3.1的格氏溶液冷却并直接用于下一步。

[0484] 化合物4.2的合成:对在-78℃下悬浮于THF(1.5L)中的CuI(38.1g)添加S-(-)-表氯醇(156.8mL)。然后经由插管添加3.1的上述格氏溶液,同时将反应温度保持在<-65℃。将所得反应混合物在-78℃下再搅拌3小时。然后,小心地添加饱和氯化铵水溶液(0.8L),接着添加水(1.0L)。将所得混合物搅拌并使其升温到室温。分离有机层并将水层用Et_2O(0.5L×2)萃取。将有机层与Et_2O萃取液合并,将所得溶液用盐水(0.5L×2)洗涤并经无水硫酸镁干燥。在真空下蒸发溶剂并将残余物在硅胶柱(己烷至20% EtOAc/己烷)上纯化,得到呈浅黄色油状物的4.2(250.8g,57%)。

[0485] 化合物5.2的合成:向在0℃下搅拌的4.2(250.8g)在1:2.6MeOH-THF(3.9L)中的溶液中缓慢添加NaOH水溶液(1.5M,1.36摩尔,0.90L)。使所得混合物升温并在室温下搅拌3h。TLC分析显示4.2完全消失。蒸发有机溶剂并将水层用Et_2O(1L+500mL×2)萃取。将有机萃取液合并,用盐水(600mL)洗涤并经无水硫酸镁干燥。在真空下蒸发溶剂得到残余物,将其在硅胶柱(己烷至10% EtOAc/己烷)上纯化,得到呈浅黄色油状物的5.2(195.4g,93%)。

[0486] 在室温下搅拌N-Boc-D-赖氨酸11.1(49.2g,0.2摩尔)和环氧化物5.2(147.2g,0.8摩尔)在MeOH(1.04L)中的混合物。添加DIPEA(51.9g,0.4摩尔)。然后将所得混合物搅拌8天,然后浓缩至干。将所得残余物在硅胶柱(2kg,MeOH/EtOAc,10至30%)上纯化,得到呈白色固体的10.2(79.9g,65%)。

[0487] 式I.b.2.ii的化合物(即,S4-RR-cKK-E12)的制备向10.2(61.4g,100mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(11.5g,100mmol)在DCM(800mL)中的溶液中添加DCC(24.7g,120mmol)。将所

得混合物在室温下搅拌4h。在真空下蒸发挥发物，得到残余物(NHS酯6.6)，将其溶解在TFA(25mL)中并搅拌40分钟。在真空下除去TFA并将残余物(化合物7.6)冷却到0℃。添加吡啶(无水，3.5L)并将反应混合物在室温下搅拌19h。在真空下除去吡啶并将残余物悬浮于Et_2O(3.0L)中。通过过滤除去固体。将滤液用1M的Na_2CO_3水溶液(1.0L)和盐水(1.0L)洗涤、经无水硫酸镁干燥并浓缩至干。通过柱色谱(4×330g硅胶柱，用(7％MeOH/3％NH_3-H_2O/90％EtOAc)/EtOAc，0至50％洗脱)纯化残余物，得到S4-RR-cKK-E12，为胶状固体(15.9g，16％)

[0488] 实施例9-制剂

[0489] 本文描述的制剂由使用设计为包封各种基于核酸的材料的一种或多种阳离子脂质、辅助脂质和PEG化脂质的不同比例的多组分脂质混合物组成。普遍使用的阳离子脂质是式I的化合物(3,6-双(4-(双(2-羟基十二烷基)氨基)丁基)哌嗪-2,5-二酮)。辅助脂质可包括(但不限于)DSPC(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱)、DPPC(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱)、DOPE(1,2-二油基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DOPC(1,2-二油基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱)DPPE(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DMPE(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DOPG(,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸-(1'-外消旋-甘油))、胆固醇等。PEG化脂质可包括(但不限于)共价连接于具有C_6-C_{20}长度的烷基链的脂质的长度达5kDa的聚(乙)二醇链。

[0490] 信使RNA材料

[0491] 通过由编码基因的质粒DNA模板体外转录，其接着添加5'帽结构(Cap 1)(Fechter,P.;Brownlee,G.G."Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins"J.Gen.Virology 2005,86,1239-1249)和通过凝胶电泳测定长度大约250个核苷酸的3'多聚(A)尾，由此合成人因子IX(FIX)、密码子优化的萤火虫荧光素酶(FFL)和密码子优化的人精氨琥珀酸合成酶(ASS1)信使RNA。每种mRNA产物中存在的5'和3'非翻译区分别以X和Y表示并如所述的那样定义(参见下文)。

[0492] 密码子优化的人精氨琥珀酸合成酶(ASS1)mRNA：

XAUGAGCAGCAAGGGCAGCGUGGUGCUGGCCUACAGCGGCGGCCUGGACACCAGC
UGCAUCCUGGUGUGGCUGAAGGAGCAGGGCUACGACGUGAUCGCCUACCUGGCCA
ACAUCGGCCAGAAGGAGGACUUCGAGGAGGCCCGCAAGAAGGCCCUGAAGCUGGG
CGCCAAGAAGGUGUUCAUCGAGGACGUGAGCCGCGAGUUCGUGGAGGAGUUCAU
CUGGCCCGCCAUCCAGAGCAGCGCCCUGUACGAGGACCGCUACCUGCUGGGCACC
AGCCUGGCCCGCCCCUGCAUCGCCCGCAAGCAGGUGGAGAUCGCCCAGCGCGAGG
GCGCCAAGUACGUGAGCCACGGCGCCACCGGCAAGGGCAACGACCAGGUGCGCUU
CGAGCUGAGCUGCUACAGCCUGGCCCCCCAGAUCAAGGUGAUCGCCCCCUGGCGC
AUGCCCGAGUUCUACAACCGCUUCAAGGGCCGCAACGACCUGAUGGAGUACGCCA
AGCAGCACGGCAUCCCCAUCCCCGUGACCCCCAAGAACCCCUGGAGCAUGGACGA

[0493] GAACCUGAUGCACAUCAGCUACGAGGCCGGCAUCCUGGAGAACCCCAAGAACCAG
GCCCCCCCCGGCCUGUACACCAAGACCCAGGACCCCGCCAAGGCCCCCAACACCCC
CGACAUCCUGGAGAUCGAGUUCAAGAAGGGCGUGCCCGUGAAGGUGACCAACGU
GAAGGACGGCACCACCCACCAGACCAGCCUGGAGCUGUUCAUGUACCUGAACGAG
GUGGCCGGCAAGCACGGCGUGGGCCGCAUCGACAUCGUGGAGAACCGCUUCAUCG
GCAUGAAGAGCCGCGGCAUCUACGAGACCCCCGCCGGCACCAUCCUGUACCACGC
CCACCUGGACAUCGAGGCCUUCACCAUGGACCGCGAGGUGCGCAAGAUCAAGCAG
GGCCUGGGCCUGAAGUUCGCCGAGCUGGUGUACACCGGCUUCUGGCACAGCCCCG
AGUGCGAGUUCGUGCGCCACUGCAUCGCCAAGAGCCAGGAGCGCGUGGAGGGCAA
GGUGCAGGUGAGCGUGCUGAAGGGCCAGGUGUACAUCCUGGGCCGCGAGAGCCCC
CUGAGCCUGUACAACGAGGAGCUGGUGAGCAUGAACGUGCAGGGCGACUACGAG
CCCACCGACGCCACCGGCUUCAUCAACAUCAACAGCCUGCGCCUGAAGGAGUACC
ACCGCCUGCAGAGCAAGGUGACCGCCAAGUGAY

[0494] 5'和3'UTR序列

X =

[0495] GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACC
GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCCCG
UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG

Y =

CGGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUGGAAGUUGCC
ACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC

[0496] 制剂方案

[0497] 混合一种或多种式I的化合物、DOPE、胆固醇和DMG-PEG2K的50mg/mL乙醇性溶液的等分试样并用乙醇稀释到3mL最终体积。单独地，由1mg/mL储备液制备ASS1 mRNA的缓冲水溶液(10mM柠檬酸盐/150mM NaCl，pH 4.5)。将脂质溶液快速注入mRNA水溶液并摇动以产生在20％乙醇中的最终悬浮液。将所得纳米颗粒悬浮液过滤，用1xPBS(pH 7.4)渗滤，浓缩并在2-8℃下储存。最终浓度＝0.64mg/mL ASS1 mRNA(包封)。$Z_{平均}$＝78nm($Dv_{(50)}$＝46nm；$Dv_{(90)}$＝96nm)。

[0498] 实施例10-分析经由静脉内递送的加载ASS1 mRNA的纳米颗粒产生的ASS1蛋白质：

[0499] 注射方案

[0500] 在每次实验的开始使用大约6-8周龄的雄性CD-1小鼠进行所有研究。通过单次尾静脉推注等效总剂量为1.0mg/kg(或另外指定)的包封的ASS1 mRNA来引入样品。处死小鼠并在指定的时间点用盐水灌注。

[0501] 分离器官组织用于分析

[0502] 收获每只小鼠的肝脏、脾脏、肾脏和心脏，分成单独的部分并储存在10％中性缓冲

福尔马林中或快速冷冻并储存在-80℃下用于分析。

[0503] 分离血浆用于分析

[0504] 在给药后的指定时间点(±5%)通过CO_2窒息将所有动物无痛致死,接着进行胸廓切开术和末端心脏血液采集。将经由在无痛致死的动物上心脏穿刺将全血(最大可得量)采集到血清分离管当中,使其在室温下凝结至少30分钟,在22℃±5℃下以9300g离心10分钟,并且将提取血清。对于临时血液采集,将经由面静脉穿刺或尾部剪切采集大约40-50μL全血。使用自非治疗动物采集的样品作为用于比较的基线ASS1水平以研究动物。

[0505] 酶联免疫吸附测定(ELISA)分析

[0506] 人ASS1 ELISA:遵循标准的ELISA程序,使用小鼠抗ASS12D1-2E12 IgG为捕获抗体,其中兔抗ASS1#3285IgG为二级(检测)抗体(Shire Human Genetic Therapies)。将辣根过氧化物酶(HRP)缀合的山羊抗兔IgG用于活化3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物溶液。20分钟后使用2N H_2SO_4淬灭反应。经由在Molecular Device SpectraMax仪器上吸收(450nm)监测检测。将未处理的小鼠血清和器官以及人ASS1蛋白质分别用作阴性和阳性对照。

[0507] 实施例11-体内人ASS1蛋白质产生

[0508] 如上所述在CD-1小鼠中按单次静脉内推注测试经由包含式I的化合物的加载密码子优化的hASS1 mRNA的脂质纳米颗粒产生人ASS1蛋白质。图1描述当以1.0mg/kg剂量用式I的各种外消旋及手性化合物处理加载小鼠人ASS1 mRNA的脂质纳米颗粒时经由ELISA检测到的人ASS1蛋白质的量。注射后二十四小时处死小鼠并收获诸如肝脏的器官。

[0509] 实施例12-毒性研究

[0510] 对于式I的各种外消旋及手性化合物测量丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)的表达水平。AST和/或ALT表达水平增加通常是由引起肝脏毒性的药剂引起的。与相同脂质的立体化学非富集或立体化学富集程度较低的组合物相比,式I的手性化合物通常产生ALT和/或AST的较低表达水平,即与较低的肝脏毒性问题相关。参见下表1和2。

[0511] 表1.

[0512]

结构	ALT (U/L)	AST (U/L)	ASS1 (ng/mg 总蛋白质)
外消旋混合物	190 ± 43	212 ± 54	471 ± 309
	201 ± 89	403 ± 42	937 ± 337
	207 ± 84	425 ± 169	497 ± 213
	344 ± 57	555 ± 122	1387 ± 593
	426 ± 112	757 ± 158	1509 ± 598
	457 ± 274	728 ± 126	910 ± 327

	503 ± 201	653 ± 133	1010 ± 154
	618 ± 503	638 ± 273	209 ± 169

结构	ALT (U/L)	AST (U/L)	ASS1 (ng/mg 总蛋白质)
具有外消旋赖氨酸核的 S_4	170 ± 40	132 ± 44	375 ± 244
	155 ± 57	157 ± 38	674 ± 147

结构	ALT (U/L)	AST (U/L)	ASS1 (ng/mg 总蛋白质)
具有外消旋赖氨酸核的 R_4			
	188 ± 22	265 ± 122	823 ± 215
	236 ± 163	237 ± 139	568 ± 248

结构	ALT (U/L)	AST (U/L)	ASS1 (ng/mg 总蛋白质)
具有 SS 赖氨酸核的外消旋–OH	378 ± 58	622 ± 76	117 ± 80
	618 ± 503	638 ± 273	209 ± 169

结构	ALT (U/L)	AST (U/L)	ASS1 (ng/mg 总蛋白质)
S_4-S,S-cKKE12	226 ± 71	384 ± 233	1121 ± 468

[0513]

结构	ALT (U/L)	AST (U/L)	ASS1 (ng/mg 总蛋白质)
R_4-S,S-cKKE12	175 ± 102	144 ± 35	449 ± 105

结构	ALT (U/L)	AST (U/L)	ASS1 (ng/mg 总蛋白质)
S_4-S,R-cKKE12	190 ± 75	193 ± 71	2303 ± 491

结构	ALT (U/L)	AST (U/L)	ASS1 (ng/mg 总蛋白质)
R_4-S,R-cKKE12	75 ± 13	82 ±12	264 ± 317
	86 ± 27	119 ± 32	1369 ± 233
	94 ± 22	88 ± 16	467 ±149
	59 ± 13	73 ± 18	401 ±137
	139 ± 28	177 ± 73	1182 ± 150
	180 ± 19	141 ± 25	750 ± 324
	269 ± 80	424 ± 156	2790 ± 464
	123 ± 39	124 ± 22	1113 ± 35
	60 ± 4	49 ± 5	846 ± 226
	70 ± 10	78 ± 24	1082 ± 189

[0514] 表2.

[0515]

用于筛选的配制后 24 小时的单次静脉内剂量的 cKK-E12 是 cKK-E12:DOPE:Chol:DMG-PEG2K	结构归属	ALT	AST
批号 1	“外消旋”混合物	885 ± 489	982 ± 350

[0516]

		207 ± 84	425 ± 169
		504 ± 317	657 ± 176
		503 ± 201	653 ± 133
批号 2		365 ± 152	604 ± 136
		401 ± 265	586 ± 193
批号 3		197 ± 50	309 ± 33
批号 1	S_4-SS	226 ± 71	384 ± 233
批号 1	R_4-SS	175 ± 102	144 ± 35
批号 1	S_4-RR	152 ± 9	180 ± 42
批号 1	R_4-RR	136 ± 34	194 ± 80
批号 1	S_4-RS/SR	143 ± 29	240 ± 98
		189 ± 47	203 ± 87
批号 2		190 ± 75	193 ± 71
批号 1	R_4-RS/SR	86 ± 27	119 ± 32
		75 ± 13	82 ±12
		76 ± 4	79 ± 4
		94 ± 22	88 ± 16
批号 2		269 ± 80	424 ± 156
		139 ± 28	177 ± 73
		180 ± 19	141 ± 25
		91 ±13	98 ±18
批号 3		125 ± 47	104 ± 27
批号 4		94 ± 24	91 ± 14
批号 5		60 ± 4	49 ± 5
批号 6		70 ± 10	78 ± 24
批号 7		308 ± 115	354 ± 128
		123 ± 39	124 ± 22

[0517] 虽然本文已经描述和例示了本发明的若干实施方案，但本领域的普通技术人员会很容易地设想出用于执行功能和/或得出本文描述的结果和/或一种或多种优点的各种其它手段和/或结构，并且这类变化和/或修改中的每一种被认为属于本发明的范围以内。更一般地，本领域技术人员将容易理解的是，本文描述的所有参数、尺寸、材料和构造旨在为示例性的，实际的参数、尺寸、材料和/或构造将取决于具体的应用或针对本发明的教导的应用。本领域技术人员仅采用常规的实验便会确认或能够确定出本文描述的本发明的具体实施方案的许多等效方案。因此要理解的是，前述实施方案仅是以举例方式给出的，并且在所附权利要求及其等效方案的范围内，可以按不同于具体描述和要求保护的方式实施本发明。本发明涉及本文描述的各单独的特征、系统、制品、材料、试剂盒和/或方法。此外，如果这类特征、系统、制品、材料、试剂盒和/或方法不是相互不一致的话，则两种或更多种这类特征、系统、制品、材料、试剂盒和/或方法的任意组合包括在本发明的范围以内。

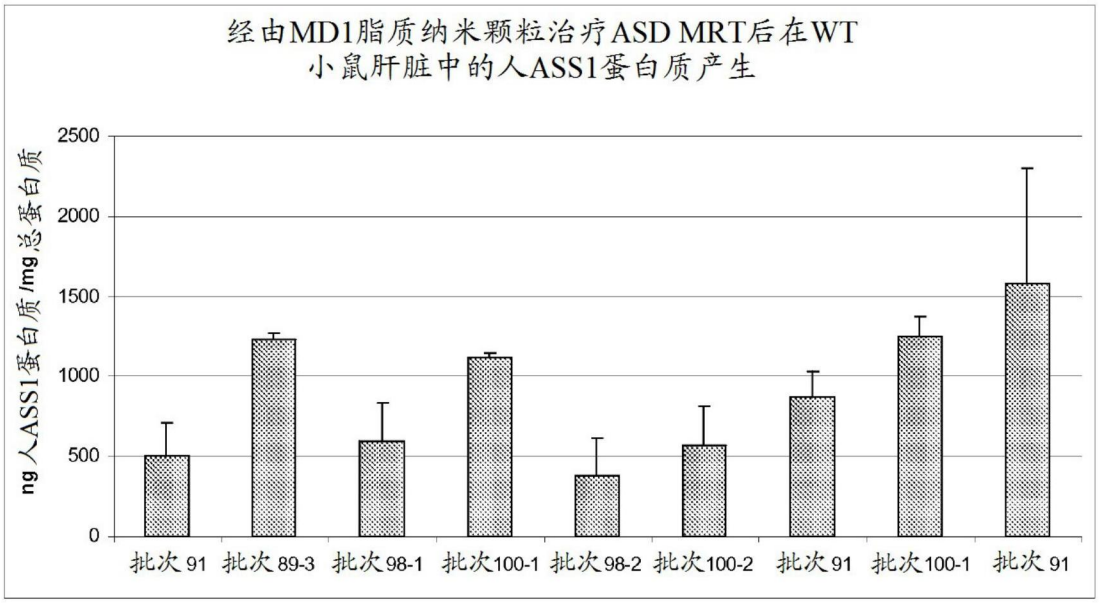

经由MD1脂质纳米颗粒治疗ASD MRT后在WT
小鼠肝脏中的人ASS1蛋白质产生
ng人ASS1蛋白质/mg总蛋白质
2500
2000
1500
1000
500
0
批次91
批次89-3
批次98-1
批次100-1
批次98-2
批次100-2
批次91
批次100-1
批次91

图1