



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117479963 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 30

(21) 申请号 202180091294.1

张文煊

(22) 申请日 2021.12.20

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

(30) 优先权数据

11332

63/127,684 2020.12.18 US

专利代理师 刘明海 胡彬

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2023.07.19

A61K 48/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/064351 2021.12.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/133344 EN 2022.06.23

(71) 申请人 盖纳万科学有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 詹姆斯·海斯

理查德·J·霍兰德 林莽梦

艾伦·D·马丁 马克·伍德

权利要求书4页 说明书58页 附图2页

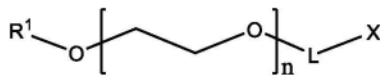
(54) 发明名称

PEG脂质和脂质纳米粒子

(57) 摘要

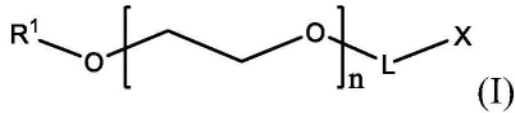
本发明提供了一种式(I)化合物或其盐,其中R¹、n、L以及X具有本文所述的值中的任一者;以及包含式I化合物的组合物和脂质纳米粒子;以及它们用于递送诸如siRNA和mRNA等治疗剂的

用途。



(I)

1. 一种式 (I) 化合物:



或其盐, 其中:

R^1 为 H、 (C_1-C_6) 烷基或 (C_1-C_6) 烷基酰基;

n 为约 10 至约 150 范围内的整数; 并且

L 不存在且 X 为 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$; 或

L 为 (C_1-C_6) 烷基并且 X 选自由以下组成的组: $-\text{N}(\text{R}^4)\text{C}(=\text{O})\text{CH}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $-\text{OCH}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $-\text{N}(\text{R}^4)\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 以及 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$;

R^2 为 $(\text{C}_{10}-\text{C}_{20})$ 烷基;

R^3 为 $(\text{C}_{10}-\text{C}_{20})$ 烷基; 并且

R^4 为 H 或 (C_1-C_6) 烷基。

2. 如权利要求 1 所述的化合物, 其中 L 不存在并且 X 为 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$ 。

3. 如权利要求 1 所述的化合物, 其中 L 为 (C_1-C_6) 烷基并且 X 为 $-\text{N}(\text{R}^4)\text{C}(=\text{O})\text{CH}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 。

4. 如权利要求 1 所述的化合物, 其中 L 为 (C_1-C_6) 烷基并且 X 为 $-\text{OCH}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 。

5. 如权利要求 1 所述的化合物, 其中 L 为 (C_1-C_6) 烷基并且 X 为 $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 。

6. 如权利要求 1 所述的化合物, 其中 L 为 (C_1-C_6) 烷基并且 X 为 $-\text{N}(\text{R}^4)\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 。

7. 如权利要求 1 所述的化合物, 其中 L 为 (C_1-C_6) 烷基并且 X 为 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 。

8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的化合物, 其中 R^1 为 H。

9. 如权利要求 1-7 中任一项所述的化合物, 其中 R^1 为 (C_1-C_6) 烷基。

10. 如权利要求 1-7 中任一项所述的化合物, 其中 R^1 为甲基。

11. 如权利要求 1-7 中任一项所述的化合物, 其中 R^1 为 (C_1-C_6) 烷基酰基。

12. 如权利要求 1-7 中任一项所述的化合物, 其中 R^1 为 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})-$ 。

13. 如权利要求 1-12 中任一项所述的化合物, 其中 n 为约 20 至约 100 范围内的整数。

14. 如权利要求 1-12 中任一项所述的化合物, 其中 n 为约 20 至约 70 范围内的整数。

15. 如权利要求 1-12 中任一项所述的化合物, 其中 n 为约 20 至约 60 范围内的整数。

16. 如权利要求 1-12 中任一项所述的化合物, 其中 n 为约 20 至约 50 范围内的整数。

17. 如权利要求 1-12 中任一项所述的化合物, 其中 n 为约 30 至约 100 范围内的整数。

18. 如权利要求 1-12 中任一项所述的化合物, 其中 n 为约 40 至约 100 范围内的整数。

19. 如权利要求 1-12 中任一项所述的化合物, 其中 n 为约 40 至约 60 范围内的整数。

20. 如权利要求 1-12 中任一项所述的化合物, 其中 n 为约 40 至约 50 范围内的整数。

21. 如权利要求 1-12 中任一项所述的化合物, 其中 n 为约 44 至约 46 范围内的整数。

22. 如权利要求 1-21 中任一项所述的化合物, 其中 R^2 为 C_{11} -烷基、 C_{12} -烷基、 C_{13} -烷基、 C_{14} -烷基、 C_{15} -烷基、 C_{16} -烷基、 C_{17} -烷基、 C_{18} -烷基、 C_{19} -烷基或 C_{20} -烷基。

23. 如权利要求 1-21 中任一项所述的化合物, 其中 R^2 为 C_{12} -烷基、 C_{13} -烷基、 C_{14} -烷基、 C_{15} -烷基、 C_{16} -烷基、 C_{17} -烷基或 C_{18} -烷基。

24. 如权利要求 1-21 中任一项所述的化合物, 其中 R^2 为 C_{12} -烷基、 C_{14} -烷基或 C_{16} -烷基。

25. 如权利要求 1-21 中任一项所述的化合物, 其中 R^2 为 C_{14} -烷基。

26. 如权利要求1-25中任一项所述的化合物,其中 R^3 为 C_{11} -烷基、 C_{12} -烷基、 C_{13} -烷基、 C_{14} -烷基、 C_{15} -烷基、 C_{16} -烷基、 C_{17} -烷基、 C_{18} -烷基、 C_{19} -烷基或 C_{20} -烷基。

27. 如权利要求1-25中任一项所述的化合物,其中 R^3 为 C_{12} -烷基、 C_{13} -烷基、 C_{14} -烷基、 C_{15} -烷基、 C_{16} -烷基、 C_{17} -烷基或 C_{18} -烷基。

28. 如权利要求1-25中任一项所述的化合物,其中 R^3 为 C_{12} -烷基、 C_{14} -烷基或 C_{16} -烷基。

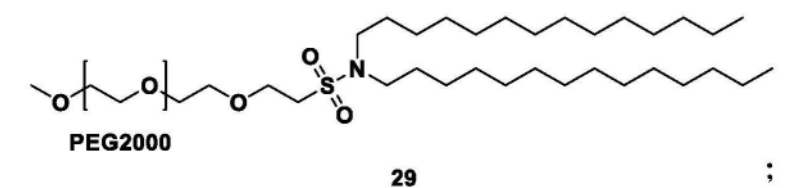
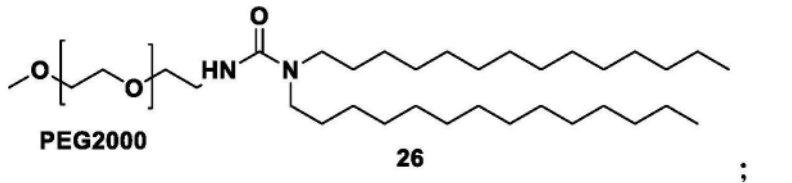
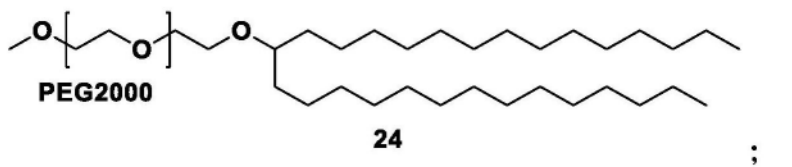
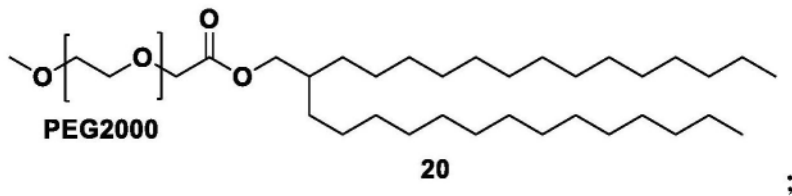
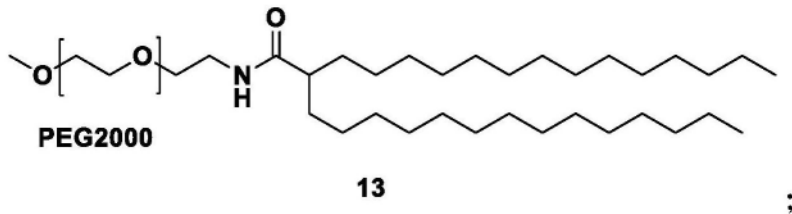
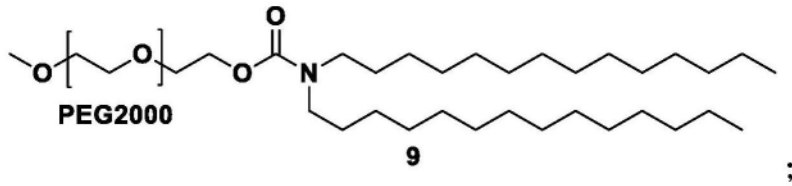
29. 如权利要求1-25中任一项所述的化合物,其中 R^3 为 C_{14} -烷基。

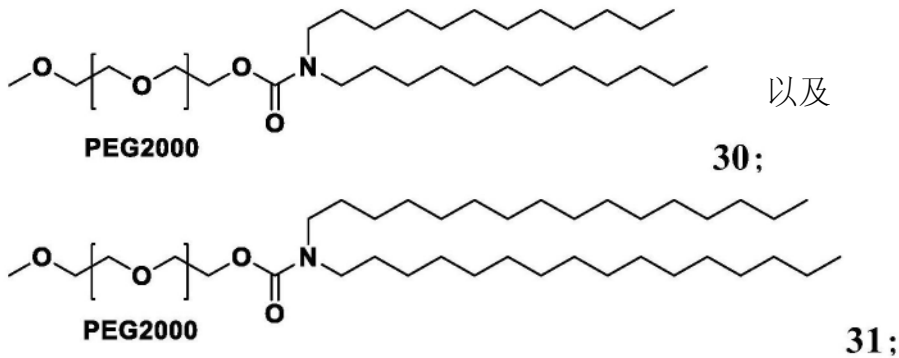
30. 如权利要求1-29中任一项所述的化合物,其中 R^4 为H。

31. 如权利要求1-29中任一项所述的化合物,其中 R^4 为 (C_1-C_6) 烷基。

32. 如权利要求1-29中任一项所述的化合物,其中 R^4 为甲基。

33. 如权利要求1所述的化合物,所述化合物选自:





或其盐。

34. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含如权利要求1-33中任一项所述的化合物或其盐以及药学上可接受的载体。

35. 一种脂质纳米粒子, 所述脂质纳米粒子包含如权利要求1-33中任一项所述的化合物或其盐。

36. 如权利要求35所述的脂质纳米粒子, 所述脂质纳米粒子还包含阳离子脂质、非阳离子脂质(例如磷脂, 例如DSPC)、胆固醇以及治疗剂。

37. 如权利要求36所述的脂质纳米粒子, 其中所述阳离子脂质选自: 3-(((6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-三十七碳-6, 9, 28, 31-四烯-19-基)氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺; 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; 5-(二甲基氨基)戊酸(6Z, 16Z)-12-((Z)-癸-4-烯-1-基)二十二碳-6, 16-二烯-11-基酯; 6-(二甲基氨基)己酸(6Z, 16Z)-12-((Z)-癸-4-烯-1-基)二十二碳-6, 16-二烯-11-基酯; N,N-二甲基-4-(三(((Z)-癸-4-烯-1-基)氧基)甲硅烷基)丁-1-胺; N,N-二甲基-5-(三(((Z)-癸-4-烯-1-基)氧基)甲硅烷基)戊-1-胺; N,N-二甲基-6-(三(((Z)-癸-4-烯-1-基)氧基)甲硅烷基)己-1-胺; 2-(甲基(4-(三(((Z)-癸-4-烯-1-基)氧基)甲硅烷基)丁基)氨基)乙-1-醇; (Z)-十一-5-烯酸(6Z, 16Z)-12-((6-(二甲基氨基)己酰基)氧基)二十二碳-6, 16-二烯-11-基酯; N1, N3-双(4-(双(((Z)-癸-4-烯-1-基)氧基)(甲基)甲硅烷基)丁基)-N1, N3-二甲基丙烷-1, 3-二胺; N1, N3-二甲基-N1, N3-双(4-(三(((Z)-庚-3-烯-1-基)氧基)甲硅烷基)丁基)丙烷-1, 3-二胺; (1r, 4r)-N1, N4-双(4-(双(((Z)-癸-4-烯-1-基)氧基)(甲基)甲硅烷基)丁基)-N1, N4-二甲基环己烷-1, 4-二胺; 2, 8-双(4-(双(((Z)-癸-4-烯-1-基)氧基)(甲基)甲硅烷基)丁基)-2, 8-二氮杂螺[4.5]癸烷; 或10-(N-(3-(二甲基氨基)丙基)壬酰胺基)-十九烷二酸双(2-丁基辛基)酯; 10-(N-(3-(二甲基氨基)丙基)辛酰胺基)-十九烷二酸二(十三-7-基)酯; 10-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十九烷二酸二(十三-7-基)酯; 双(2-丁基辛酸)((4-羟丁基)氮烷二基)双(壬-9, 1-二基)酯或8-((2-羟乙基)(8-(壬氧基)-8-氧代辛基)氨基)辛酸十七-9-基酯; (9Z, 12Z)-十八-9, 12-二烯酸3-((4, 4-双(辛氧基)丁酰基)氧基)-2-(((3-(二乙基氨基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯或3, 6-双(4-(双(2-羟基十二烷基)氨基)丁基)哌嗪-2, 5-二酮; 3, 6-双(4-(双((9Z, 12Z)-2-羟基十八烷-9, 12-二烯-1-基)氨基)丁基)哌嗪-2, 5-二酮; 1, 1'-((2-(1-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌啶-4-基)乙基)氮烷二基)双(十二-2-醇); 3, 3', 3'', 3'''-((氮烷二基双(丙烷-3, 1-二基))双(氮烷三基))四丙酸四(十三烷基)酯或8-((8, 8-双(辛氧基)辛基)(2-羟乙基)氨基)辛酸壬酯或8, 8'-(((2-(二甲基氨基)乙基)硫代)羰基)氮烷二基)二辛酸二

((Z)-壬-2-烯-1-基)酯。

38. 如权利要求36或37所述的脂质纳米粒子,其中所述治疗剂为核酸。

39. 如权利要求38所述的脂质粒子,其中所述核酸为DNA。

40. 如权利要求38所述的脂质粒子,其中所述核酸为RNA。

41. 如权利要求39所述的脂质粒子,其中所述DNA呈反义分子、质粒DNA、预凝聚DNA、PCR产物、载体、表达盒、嵌合序列或染色体DNA或它们的组合的形式。

42. 如权利要求40所述的脂质粒子,其中所述DNA呈siRNA、不对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、tRNA、病毒RNA(vRNA)或自扩增RNA或它们的组合的形式。

43. 如权利要求38所述的脂质纳米粒子,其中所述治疗剂为mRNA。

44. 如权利要求38所述的脂质纳米粒子,其中所述治疗剂为siRNA。

45. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求35-44中任一项所述的脂质纳米粒子以及药学上可接受的载体。

46. 如权利要求45所述的药物组合物,所述药物组合物被配制用于静脉内或肌肉内施用。

47. 如权利要求46所述的药物组合物,所述药物组合物被配制用于静脉内施用。

48. 如权利要求46所述的药物组合物,所述药物组合物被配制用于肌肉内施用。

49. 一种用于将核酸递送至细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与如权利要求38-48中任一项所述的脂质纳米粒子接触。

50. 一种用于治疗以功能蛋白缺陷为特征的疾病的方法,所述方法包括向患有所述疾病的受试者施用如权利要求43所述的脂质纳米粒子,其中所述mRNA编码所述功能蛋白或具有与所述功能蛋白相同的生物活性的蛋白质。

51. 一种用于治疗以多肽过表达为特征的疾病的方法,所述方法包括向患有所述疾病的受试者施用如权利要求44所述的脂质纳米粒子,其中所述siRNA靶向所述过表达多肽的表达。

52. 一种用于向有需要的受试者递送疫苗的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的权利要求43所述的脂质纳米粒子或权利要求48所述的药物组合物。

53. 如权利要求43所述的脂质纳米粒子,所述脂质纳米粒子用于治疗性或预防性地治疗以功能蛋白缺陷为特征的疾病。

54. 如权利要求44所述的脂质纳米粒子,所述脂质纳米粒子用于治疗性或预防性地治疗以多肽过表达为特征的疾病。

55. 如权利要求43所述的脂质纳米粒子,所述脂质纳米粒子用作疫苗。

56. 如权利要求48所述的药物组合物,所述药物组合物用作疫苗。

PEG脂质和脂质纳米粒子

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求2020年12月18日提交的美国申请序列号63/127,684的优先权益,所述申请以引用的方式并入本文中。

背景技术

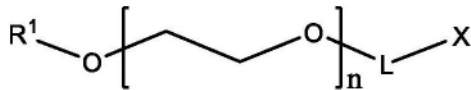
[0003] 脂质纳米粒子(LNP)是生物活性化合物(诸如治疗性核酸、蛋白质以及肽)的有效药物递送系统,这些物质以其他方式为细胞不可渗透的。为了有效,必须将包括诸如体外转录信使RNA(mRNA)等大核酸分子以及与信使RNA或基因相互作用的较小多核苷酸的基于核酸的药物递送至适当的细胞区室。举例来说,诸如双链RNA分子(dsRNA)等双链核酸(包括例如siRNA)的理化特性使得它们对细胞来说是不可渗透的。在被递送至适当的区室中后,siRNA通过称为RNA干扰(RNAi)的高度保守的调控机制阻断基因表达。通常,siRNA的尺寸较大,分子量在12-17kDa范围内并且因其磷酸骨架具有多达50个负电荷而为高度阴离子性的。此外,两个互补RNA链产生刚性螺旋。这些特征促成了siRNA的不良“药物样”特性。当静脉内施用,siRNA从身体快速分泌,典型半衰期在仅10分钟范围内。另外,siRNA通过存在于血液和其他流体中或组织中的核酸酶快速降解,并且已显示在体外和体内刺激强免疫反应。参见例如Robbins等,Oligonucleotides 19:89-102,2009。mRNA分子具有类似的不可渗透性、易碎性以及免疫原性的问题。参见国际专利申请公布号W02016/118697。

[0004] 脂质纳米粒子制剂在体内具有改善的核酸递送。举例来说,此类制剂可使实现体内靶标敲低所必需的siRNA剂量显著降低。参见Zimmermann等,Nature 441:111-114,2006。通常,此类脂质纳米粒子药物递送系统为多组分制剂,所述多组分制剂包含阳离子(或可离子化)脂质、辅助脂质以及含有聚乙二醇的脂质。应注意,除非另有描述,否则在本文中涉及脂质时,术语‘阳离子’与‘可离子化’可互换使用。带正电荷的阳离子脂质结合至阴离子核酸,而其他组分支持脂质纳米粒子的稳定自组装。

[0005] 已努力改善脂质纳米粒子制剂的递送功效。许多此类努力以开发更适当的阳离子脂质为目标。参见例如Akinc等,Nature Biotechnology 26:561-569,2008;Love等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 107:1864-1869,2010;Baigude等,Journal of Controlled Release 107:276-287,2005;Semple等,Nature Biotechnology 28:172-176,2010。另外,已将PEG脂质PEG2000-C-DMA用于LNP制剂中,LNP制剂已在如肿瘤学、疫苗、抗病毒剂以及代谢疾病等应用中进入人类临床试验。已开发这些LNP制剂以递送治疗性有效负荷,包括但不限于寡核苷酸,诸如质粒DNA、siRNA、mRNA以及自复制RNA。尽管已作出这些努力,但是仍存在对含有脂质纳米粒子的制剂的需要,所述含有脂质纳米粒子的制剂在施用后提供更高效能并且允许施用更低剂量的核酸,诸如mRNA和siRNA。举例来说,对具有例如对在脂质纳米粒子制剂中使用来说独特的或改善的特性的额外PEG脂质存在需要。

发明内容

[0006] 因此,本文提供了一种式(I)化合物:



[0007]

(I)

[0008] 或其盐,其中:

[0009] R^1 为H、 (C_1-C_6) 烷基或 (C_1-C_6) 烷酰基;[0010] n 为约10至约150范围内的整数;并且[0011] L不存在且X为 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$;或[0012] L为 (C_1-C_6) 烷基并且X选自由以下组成的组: $-\text{N}(\text{R}^4)\text{C}(=\text{O})\text{CH}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $-\text{OCH}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、[0013] $-\text{N}(\text{R}^4)\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 以及 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$;[0014] R^2 为 $(\text{C}_{10}-\text{C}_{20})$ 烷基;[0015] R^3 为 $(\text{C}_{10}-\text{C}_{20})$ 烷基;并且[0016] R^4 为H或 (C_1-C_6) 烷基。

[0017] 此化合物可用作可用于例如递送治疗剂(诸如siRNA和mRNA)的脂质纳米粒子的组分。

[0018] 本文还提供了脂质纳米粒子和包含脂质纳米粒子的药物组合物。所述脂质纳米粒子和药物组合物尤其可用于向患者(例如人)或向细胞递送核酸。

[0019] 本发明还提供了一种包含本发明的脂质纳米粒子以及药学上可接受的载体的药物组合物。

[0020] 本发明还提供了一种用于将核酸递送至细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与本发明的脂质纳米粒子接触。更总体上说,本发明提供了在体内或体外向活细胞施用核酸的方法。

[0021] 本发明还提供了一种用于治疗以功能蛋白缺陷为特征(例如由遗传缺陷引起)的疾病的方法,所述方法包括:向患有所述疾病的受试者施用本发明的脂质纳米粒子,其中核酸分子为编码所述功能蛋白或与所述功能蛋白具有相同生物活性的蛋白质的mRNA。

[0022] 本发明还提供了一种用于治疗以多肽过表达为特征的疾病的方法,所述方法包括向患有所述疾病的受试者施用本发明的脂质纳米粒子,其中核酸分子为靶向所述过表达多肽的表达的siRNA。

[0023] 本发明还提供了一种本发明的脂质纳米粒子,所述脂质纳米粒子用于治疗性或预防性地治疗以功能蛋白缺陷为特征(例如由遗传缺陷引起)的疾病。

[0024] 本发明还提供了一种本发明的脂质纳米粒子,所述脂质纳米粒子用于治疗性或预防性地治疗以多肽过表达为特征的疾病。

[0025] 本发明还提供了一种用于治疗动物的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述动物施用治疗有效量的本发明的脂质纳米粒子。

[0026] 本发明还提供了本文所公开的可用于制备本发明的脂质纳米粒子的方法和中间物。

附图说明

[0027] 图1.图1展示了抗PEG抗体分析的结果,从左到右展示每种化合物第0天、第7天以及第14天的结果。

[0028] 图2.图2展示了抗PEG抗体分析的结果,从左到右展示每种化合物第0天、第7天以及第14天的结果。

[0029] 图3.图3展示了EPO表达分析的结果,从左到右展示每种化合物第0天、第7天以及第14天的结果。

[0030] 图4.图4展示了脂质清除分析的结果。PEG-C-DMA为90分钟点处的中间迹线,化合物9为90分钟点处的下部迹线,而化合物31为90分钟点处的上部迹线。

[0031] 图5.图5展示了OTC表达分析的结果。


[0032] 图6.图6展示了抗OVA IgG分析的结果,从左到右展示每种化合物第0天、第7天、第14天、第21天、第28天以及第35天的结果。

具体实施方式

[0033] 定义

[0034] 除非另有描述,否则使用以下定义:卤基或卤素为氟、氯、溴或碘。烷基表示直链与分枝链基团;但提到个别基团,诸如丙基时仅涵盖直链基团,特定地提到分枝链异构体(诸如异丙基)。

[0035] 除非另外说明,否则术语“烷基”单独或作为另一取代基的一部分意指具有指定碳原子数目的直链或分枝链烃基(即,(C₁-C₈)烷基意指一个至八个碳)。实例包括(C₁-C₈)烷基、(C₂-C₈)烷基、C₁-C₆)烷基、(C₂-C₆)烷基以及(C₃-C₆)烷基。烷基的实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基以及高级同系物和异构体。

[0036] 如本文所用,在化学结构中,与键相交的波浪线“”指示所述键的连接点,从而在所述化学结构中波浪状键与分子其余部分相交。

[0037] 术语“治疗(treat/treatment/treating)”在其涉及一种疾病或疾患时包括抑制所述疾病或疾患、消除所述疾病或疾患和/或缓和所述疾病或疾患的一种或多种症状。术语“治疗(treat/treatment/treating)”还指治疗性治疗和/或预防性治疗两者或预防措施,其中目标是防止或减慢(减轻)不希望的生理变化或病症,诸如癌症的发展或扩散。举例来说,有益或所需的临床结果包括但不限于可检测或不可检测的症状的缓解、疾病或病症的程度的减轻、疾病或病症的状态稳定(即,不恶化)、疾病进展的延迟或减慢、所述疾病状态或病症的改善或缓和以及缓解(部分或总体)。“治疗(Treat/treatment/treating)”还可意指与如果不接受治疗的预期存活相比延长存活。需要治疗的那些包括已患有所述疾病或病症的那些以及倾向于患有所述疾病或病症的那些或要预防所述疾病或病症的那些。在一个实施方案中,“治疗(treat/treatment/treating)”不包括预防(preventing/prevention)。

[0038] 短语“治疗有效量”或“有效量”包括但不限于(i)治疗或预防本文所述的特定疾病、疾患或病症,(ii)减轻、改善或消除所述特定疾病、疾患或病症的一种或多种症状,或(iii)预防或延迟所述特定疾病、疾患或病症的一种或多种症状的发作的化合物的量。

[0039] 如本文所用的术语“哺乳动物”是指人、较高级的非人类灵长类动物、啮齿动物、家养的牛、马、猪、绵羊、狗以及猫。在一个实施方案中,哺乳动物为人。如本文所用的术语“患者”是指包括哺乳动物的任何动物。在一个实施方案中,患者为哺乳动物患者,在一个实施方案中,患者为人患者。

[0040] 在某些情况下本文所公开的化合物还可以互变异构体形式存在。尽管可能仅展示了一种离域共振结构,但所有此类形式都涵盖在本发明的范畴内。

[0041] 本领域技术人员应理解,本发明还包括声称相较于天然存在的同位素比率可在任何或所有原子处富集一种或多种同位素(诸如但不限于氘(²H或D))的任何化合物。作为非限制性实例,-CH₃基团可用-CD₃取代。

[0042] 本发明的药物组合物可包含一种或多种赋形剂。当与本发明的药物组合物组合使用时,术语“赋形剂”通常指与式(I)化合物或其药学上可接受的盐组合以提供对应组合物的另一成分。举例来说,当与本发明的药物组合物组合使用时,术语“赋形剂”包括但不限于:载体、结合剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、包衣剂、防腐剂以及染料。

[0043] 本文所用的立体化学定义和惯例大体上遵循S.P.Parker编,McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(1984)McGraw-Hill Book Company,New York;以及Eliel,E.和Wilen,S.,“Stereochemistry of Organic Compounds”,John Wiley&Sons, Inc.,New York,1994。本发明的化合物可含有不对称或手性中心,并且因此以不同立体异构体形式存在。本发明的化合物的所有立体异构体形式(包括但不限于非对映异构体、对映异构体以及阿托异构体(atropisomer)以及它们的混合物,诸如外消旋混合物)旨在形成本发明的一部分。许多有机化合物以光学活性形式存在,即其具有转动平面偏振光的平面的能力。在描述光学活性化合物时,使用前缀D和L或R和S来表示分子围绕其一个或多个手性中心的绝对构型。前缀d和l或(+)和(-)用于指定由化合物引起的平面偏振光的旋转方向,其中(-)或l意味着化合物为左旋的。具有前缀(+)或d的化合物为右旋的。对于给定化学结构,这些立体异构体相同,除了它们为彼此的镜像。特定立体异构体也可被称为对映异构体,并且此类异构体的混合物常常称为对映异构体混合物。对映异构体的50:50混合物称为外消旋混合物或外消旋物,在化学反应或方法中在一直不存在立体选择或立体特异性的情况下所述外消旋混合物或外消旋物可存在。术语“外消旋混合物”和“外消旋物”是指两种对映异构体种类的等摩尔混合物,没有光学活性。

[0044] 本领域技术人员将理解,具有手性中心的本发明的化合物可以光学活性和外消旋形式存在并且以光学活性和外消旋形式进行分离。一些化合物可展现多晶型。应了解,本发明涵盖本发明的化合物的任何外消旋、光学活性、多晶型或立体异构体形式或它们的混合物,所述物质具有本文所述的可用特性,本领域中熟知如何制备光学活性形式(例如通过用再结晶技术拆分外消旋形式、通过从光学活性起始物质合成、通过手性合成或通过使用手性静止相的色谱分离)。

[0045] 当本文中的化合物式中的键以非立体化学方式(例如平面)绘制时,与所述键连接的原子包括所有立体化学可能性。除非另外指出,否则当本文中的化合物式中的键以确定的立体化学方式(例如加粗、加粗楔形、短划线或短划线楔形)绘制时,应了解,与所述立体化学键连接的原子富含所展示的绝对立体异构体。在一个实施方案中,化合物可至少51%为所展示的绝对立体异构体。在另一实施方案中,化合物可至少60%为所展示的绝对立体

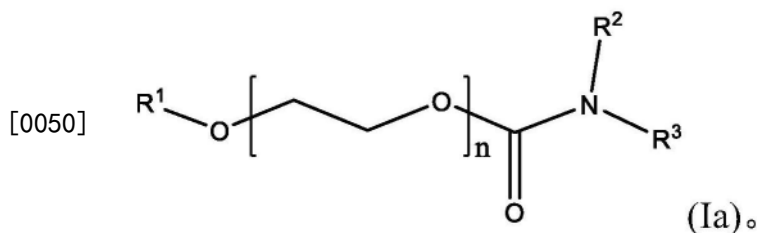
异构体。在另一实施方案中,化合物可至少80%为所展示的绝对立体异构体。在另一实施方案中,化合物可至少90%为所展示的绝对立体异构体。在另一实施方案中,化合物可至少95%为所展示的绝对立体异构体。在另一实施方案中,化合物可至少99%为所展示的绝对立体异构体。

[0046] 术语“残基”在其应用于化合物的残基时是指已按使得在开放化合价的位点处形成开放化合价的任何方式将化合物改性。可通过从化合物移除1个或更多个原子(例如移除单个原子,诸如氢,或移除超过一个原子,诸如一组原子,包括但不限于胺、羟基、甲基、酰胺(例如-C(=O)NH₂)或乙酰基)来形成开放化合价。还可通过使化合物的第一官能团化学转化为化合物的第二官能团(例如羰基的还原、羰基用胺置换),随后从第二官能团移除1个或更多个原子以形成开放化合价来形成开放化合价。

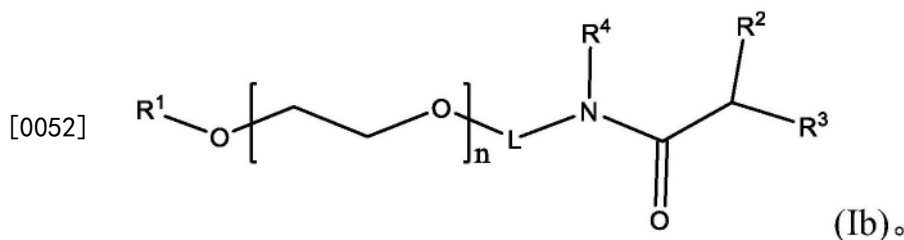
[0047] 以下关于基团、取代基以及范围所列的特定值仅用于说明;它们不排除用于基团和取代基的其他确定值或确定范围内的其他值。应了解,可将两个或更多个值组合。还应了解,本文以下所列的值(或其子集)可被排除。

[0048] 具体来说,(C₁-C₆)烷基可为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、戊基、3-戊基或己基;并且(C₁-C₆)烷酰基可为乙酰基、丙酰基或丁酰基。

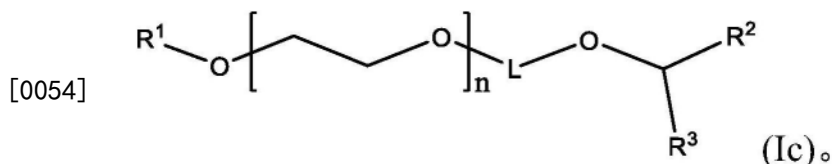
[0049] 一种特定式(I)化合物为其中L不存在并且X为-C(=O)NR²R³的化合物,例如式(Ia)化合物:



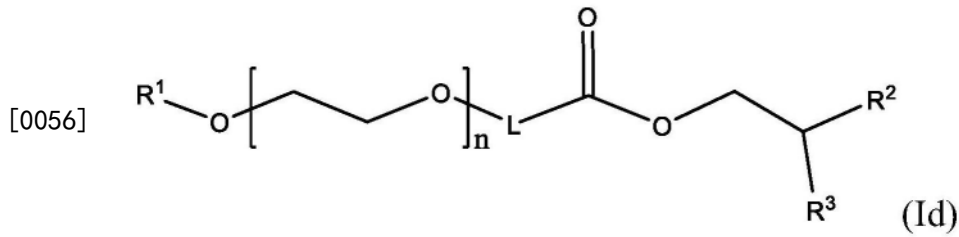
[0051] 一种特定式(I)化合物为其中L为(C₁-C₆)烷基并且X为-N(R⁴)C(=O)CH(R²)(R³)的化合物,例如式(Ib)化合物:



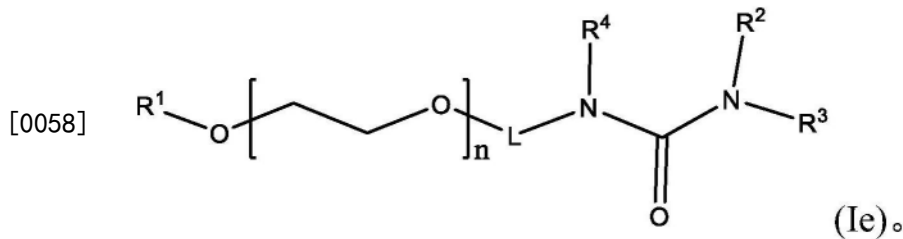
[0053] 一种特定式(I)化合物为其中L为(C₁-C₆)烷基并且X为-OCH(R²)(R³)的化合物,例如式(Ic)化合物:



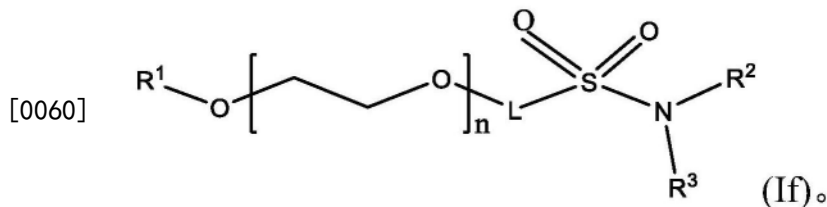
[0055] 一种特定式(I)化合物为其中L为(C₁-C₆)烷基并且X为-C(=O)CH₂CH(R²)(R³)的化合物,例如式(Id)化合物:



[0057] 一种特定式(I)化合物为其中L为(C₁-C₆)烷基并且X为-N(R⁴)C(=O)N(R²)(R³)的化合物,例如式(Ie)化合物:



[0059] 一种特定式(I)化合物为其中L为(C₁-C₆)烷基并且X为-SO₂N(R²)(R³)的化合物,例如式(If)化合物:



[0061] R¹的特定值为H。

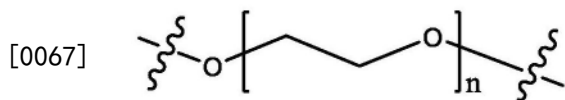
[0062] R¹的特定值为(C₁-C₆)烷基。

[0063] R¹的特定值为甲基。

[0064] R¹的特定值为(C₁-C₆)烷酰基。

[0065] R¹的特定值为CH₃C(=O)-。

[0066] n的特定值为约20至约100范围内的整数。n的特定值为约20至约70范围内的整数。n的特定值为约20至约60范围内的整数。n的特定值为约20至约50范围内的整数。n的特定值为约30至约100范围内的整数。n的特定值为约40至约100范围内的整数。n的特定值为约40至约60范围内的整数。n的特定值为约40至约50范围内的整数。n的特定值为约44至约46范围内的整数。在一个特定实施方案中,基团:



[0068] 为PEG-2000。

[0069] R²的特定值为C₁₁-烷基、C₁₂-烷基、C₁₃-烷基、C₁₄-烷基、C₁₅-烷基、C₁₆-烷基、C₁₇-烷基、C₁₈-烷基、C₁₉-烷基或C₂₀-烷基。

[0070] R²的特定值为C₁₂-烷基、C₁₃-烷基、C₁₄-烷基、C₁₅-烷基、C₁₆-烷基、C₁₇-烷基或C₁₈-烷基。

[0071] R²的特定值为C₁₂-烷基、C₁₄-烷基或C₁₆-烷基。

[0072] R²的特定值为C₁₄-烷基。

[0073] R³的特定值为C₁₁-烷基、C₁₂-烷基、C₁₃-烷基、C₁₄-烷基、C₁₅-烷基、C₁₆-烷基、C₁₇-烷基、C₁₈-烷基、C₁₉-烷基或C₂₀-烷基。

[0074] R³的特定值为C₁₂-烷基、C₁₃-烷基、C₁₄-烷基、C₁₅-烷基、C₁₆-烷基、C₁₇-烷基或C₁₈-烷基。

[0075] R³的特定值为C₁₂-烷基、C₁₄-烷基或C₁₆-烷基。

[0076] R³的特定值为C₁₄-烷基。

[0077] R⁴的特定值为H。

[0078] R⁴的特定值为(C₁-C₆)烷基。

[0079] R⁴的特定值为甲基。

[0080] 术语“约”意指±5%、±4%、±3%、±2%或±1%。

[0081] 术语“干扰RNA”或“RNAi”或“干扰RNA序列”是指单链RNA(例如成熟miRNA)或双链RNA(即,双链体RNA,诸如siRNA、aiRNA或前体miRNA),所述单链RNA或双链RNA能够在干扰RNA与靶基因或序列在相同细胞中时降低或抑制靶基因或序列的表达(例如通过介导与干扰RNA序列互补的mRNA的降解或抑制其翻译)。因此,干扰RNA是指与靶mRNA序列互补的单链RNA或指由两个互补链或由单个自互补链形成的双链RNA。干扰RNA可与靶基因或序列具有基本或完全同一性,或可包含错配的区域(即,错配基序)。干扰RNA的序列可对应于全长靶基因或其子序列。

[0082] 干扰RNA包括“小干扰RNA”或“siRNA”,例如干扰RNA的长度为约15-60、15-50或15-40(双链体)个核苷酸,更通常长度为约15-30、15-25或19-25(双链体)个核苷酸并且优选地长度为约20-24、21-22或21-23(双链体)个核苷酸(例如双链siRNA的各个互补序列的长度为15-60、15-50、15-40、15-30、15-25或19-25个核苷酸,优选地长度为约20-24、21-22或21-23个核苷酸,并且双链siRNA的长度为约15-60、15-50、15-40、15-30、15-25或19-25个碱基对,优选地长度为约18-22、19-20或19-21个碱基对)。siRNA双链体可包含约1至约4个核苷酸或约2至约3个核苷酸的3'短悬端以及5'磷酸端。siRNA的实例包括但不限于由两个单独链分子组装的双链多核苷酸分子,其中一个链是有义链并且另一个是互补反义链;由单链分子组装的双链多核苷酸分子,其中有义和反义区域通过基于核酸或不基于核酸的接头键联;具有发夹二级结构的双链多核苷酸分子,所述发夹二级结构具有自互补的有义和反义区域;以及环状单链多核苷酸分子,所述环状单链多核苷酸分子具有两个或更多个环结构以及具有自互补有义和反义区域的茎,其中环状多核苷酸可在体内或体外加工以产生活性双链siRNA分子。

[0083] 优选地,siRNA为化学合成的。还可通过用大肠杆菌(E.coli)RNA酶III或Dicer裂解较长的dsRNA(例如长度大于约25个核苷酸的dsRNA)来产生siRNA。这些酶将dsRNA加工成生物活性siRNA(参见例如Yang等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:9942-9947(2002); Calegari等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:14236(2002);Byrom等,Ambion TechNotes,10(1):4-6(2003);Kawasaki等,Nucleic Acids Res.,31:981-987(2003);Knight等,Science,293:2269-2271(2001);以及Robertson等,J.Biol.Chem.,243:82(1968))。优选地,dsRNA的长度为至少50个核苷酸至约100、200、300、400或500个核苷酸。dsRNA的长度可长达1000、1500、2000、5000个核苷酸或更长。dsRNA可编码整个基因转录物或部分基因转录物。在某些情况下,siRNA可由质粒编码(例如转录为自动折叠成具有发夹环的双链体的序

列)。

[0084] 如本文所用,术语“错配基序”或“错配区域”是指干扰RNA(例如siRNA、aiRNA、miRNA)序列中不与其靶序列具有100%互补性的部分。干扰RNA可具有至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个错配区域。错配区域可为连续的或可由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个核苷酸隔开。错配基序或区域可包含单个核苷酸或可包含两个、三个、四个、五个或更多个核苷酸。

[0085] 核酸(诸如例如干扰RNA或mRNA等核酸)的“有效量”或“治疗有效量”为如下量,所述量足以产生所需效应,例如与在不存在干扰RNA的情况下检测到的正常表达水平相比抑制靶序列的表达;或在其中表达蛋白质的有机体中引起所需生物效应的mRNA引导的一定量的蛋白质的表达。当在存在干扰RNA的情况下获得的值相对于对照为约90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%时,实现对靶基因或靶序列的表达的抑制。在其他实施方案中,所表达的蛋白质为通常在体内的一种细胞类型中表达的蛋白质的活性形式,并且mRNA的治疗有效量为产生通常在健康个体的所述细胞类型中表达的蛋白质的量的至少50%(例如至少60%或至少70%或至少80%或至少90%)的量的编码蛋白质的量。适合于测量靶基因或靶序列的表达的分析包括例如使用本领域技术人员已知的技术(诸如本领域技术人员已知的斑点印迹、RNA印迹、原位杂交、ELISA、免疫沉淀、酶功能以及表型分析)来检查蛋白质或RNA水平。

[0086] 干扰RNA使免疫反应“降低(decrease/decreasing/reduce/reducing)”意在指对给定干扰RNA(例如修饰的干扰RNA)的免疫反应的可检测的降低。修饰的干扰RNA使免疫反应降低的量可相对于在存在未修饰的干扰RNA的情况下的免疫反应的水平来确定。可检测的降低可为与在存在未修饰的干扰RNA的情况下检测到的免疫反应相比降低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多。通常通过反应细胞在体外产生的细胞因子(例如IFN γ 、IFN α 、TNF α 、IL-6或IL-12)减少或在施用干扰RNA之后哺乳动物受试者的血清中产生的细胞因子减少来测量对干扰RNA的免疫反应降低。

[0087] mRNA使免疫反应“降低(decrease/decreasing/reduce/reducing)”意在指对给定mRNA(例如修饰mRNA)的免疫反应的可检测的降低。修饰的mRNA使免疫反应降低的量可相对于在存在未修饰的mRNA的情况下的免疫反应的水平来确定。可检测降低可为与在存在未修饰的mRNA的情况下检测到的免疫反应相比降低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多。通常通过反应细胞在体外产生的细胞因子(例如IFN γ 、IFN α 、TNF α 、IL-6或IL-12)减少或在施用mRNA之后哺乳动物受试者的血清中产生的细胞因子减少来测量对mRNA的免疫反应降低。

[0088] 如本文所用,术语“反应细胞”是指当与免疫刺激性干扰RNA(诸如未修饰siRNA)接触时产生可检测免疫反应的细胞,优选哺乳动物细胞。示例性反应细胞包括例如树突细胞、巨噬细胞、外周血单核细胞(PBMC)、脾细胞等。可检测免疫反应包括例如产生细胞因子或生长因子,诸如TNF- α 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、TGF以及它们的组合。

[0089] “基本同一性”是指序列在严格条件下与参考序列杂交,或指序列在参考序列的指定区域具有指定同一性百分比。

[0090] 短语“严格杂交条件”是指使得通常在核酸的复杂混合物中核酸将与其靶序列杂交但不与其他序列的条件。严格条件为序列依赖性的并且在不同情况下将有所不同。越长的序列尤其在越高的温度下杂交。在Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993) 中可找到对核酸杂交的详细指导。通常, 严格条件被选择为比特定序列在确定的离子强度pH下的热力学解链点 (T_m) 低约5-10°C。 T_m 为使得50%的与靶标互补的探针在平衡状态下与靶序列杂交的温度(在确定的离子强度、pH值以及核酸浓度下)(在靶序列过量存在时, 在 T_m 下, 50%的探针在平衡状态下被占用)。还可用添加去稳定剂(诸如甲酰胺)来实现严格条件。对于选择性或特异性杂交, 正信号为至少两倍于背景、优选10倍于背景的杂交。

[0091] 示例性严格杂交条件可如下: 50%甲酰胺, 5×SSC, 以及1% SDS, 在42°C下孵育, 或5×SSC, 1% SDS, 在65°C下孵育, 并且在0.2×SSC中洗涤, 以及0.1% SDS, 65°C。对于PCR, 约36°C的温度为低严格扩增的典型温度, 不过退火温度可在约32°C与48°C之间变化, 这取决于引物长度。对于高严格PCR扩增, 约62°C的温度是典型温度, 不过高严格退火温度可在约50°C与至约65°C范围内, 这取决于引物长度和特异性。高严格与低严格扩增的典型循环条件包括90°C-95°C的变性阶段持续30秒-2分钟, 退火阶段持续30秒-2分钟, 以及约72°C的延伸阶段持续1-2分钟。例如Innis等, *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990) 中提供了低严格和高严格扩增反应的方案和指南。

[0092] 如果在严格条件下不彼此杂交的核酸所编码的多肽为基本上同一的, 那么所述核酸仍为基本上同一的。举例来说, 当使用遗传密码容许的最大密码子简并度形成核酸的一个拷贝时会发生这种情况。在此类情况下, 核酸通常在适度严格的杂交条件下杂交。示例性“适度严格的杂交条件”包括在40%甲酰胺、1M NaCl、1% SDS (37°C) 的缓冲液中杂交以及在1×SSC中洗涤 (45°C)。阳性杂交为至少两倍于背景。本领域一般技术人员将容易地认识到, 可使用替代杂交和洗涤条件来提供类似严格程度的条件。许多参考文献中提供了针对确定杂交参数的额外指南, 例如*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel等编。

[0093] 在两个或更多个核酸的情形下, 术语“基本上同一”或“基本同一性”是指当进行比较和比对以在比较窗或指定区域内获得最大对应时如使用以下序列比较算法中的一者或通过手动比对和视觉检查所测量为相同的或具有指定百分比的相同核苷酸(即, 在指定区域具有至少约60%, 优选至少约65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性)的两个或更多个序列或子序列。当上下文指示时, 此定义还类似地指序列的补体。优选地, 在长度为至少约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60个核苷酸的区域存在基本同一性。

[0094] 在序列比较中, 通常一个序列充当参考序列, 将参考序列与测试序列相比较。当使用序列比较算法时, 将测试序列和参考序列输入计算机, 必要时, 指定子序列坐标, 并且指定序列算法程序参数。可使用默认程序参数, 或可指定替代参数。然后, 序列比较算法基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0095] 如本文所用, “比较窗”包括参考选自由以下组成的组的连续位置编号中的任一者的区段: 约5至约60、通常约10至约45、更通常约15至约30, 其中在对两个序列进行最佳比对

之后,可将一个序列与具有相同连续位置编号的参考序列相比较。用于比较的序列比对方法为本领域中熟知的。可例如通过Smith和Waterman, *Appl. Math.*, 2:482(1981)的局部同源性算法,通过Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443(1970)的同源性比对算法,通过Pearson和Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444(1988)的相似性检索法,通过这些算法的计算机化实现方式(Wisconsin遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA以及TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)或通过手动比对和视觉检查(参见例如Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel等编(1995增补))对用于比较的序列进行最佳比对。

[0096] 适合于确定序列同一性百分比和序列相似性的算法的优选实例为BLAST和BLAST 2.0算法,这两种算法分别描述于Altschul等, *Nuc. Acids Res.*, 25:3389-3402(1977)和Altschul等, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410(1990)中。使用BLAST和BLAST 2.0,使用本文所述的参数来确定核酸的序列同一性百分比。用于进行BLAST分析的软件为通过国家生物技术信息中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)公共可用的。

[0097] BLAST算法还进行两个序列之间的相似性统计分析(参见例如Karlin和Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873-5787(1993))。由BLAST算法提供的一个相似性度量为最小总和概率(P(N)),最小总和概率提供两个核苷酸序列之间将偶然发生匹配的概率的指示。举例来说,如果在比较测试核酸与参考核酸时最小总和概率小于约0.2,更优选小于约0.01,并且最优选小于约0.001,那么所述核酸被认为类似于参考序列。

[0098] 如本文所用的术语“核酸”是指含有呈单链或双链形式的至少两个脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的聚合物并且包括DNA和RNA。DNA可呈例如反义分子、质粒DNA、预凝聚DNA、PCR产物、载体(P1、PAC、BAC、YAC、人工染色体)、表达盒、嵌合序列、染色体DNA或衍生物以及这些基团的组合的形式。RNA可呈siRNA、不对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、病毒RNA(vRNA)、自扩增RNA以及它们的组合的形式。核酸包括含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或键联的核酸,所述核酸为合成的、天然存在的以及非天然存在的,并且与参考核酸具有类似结合特性。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸甲酯、手性-磷酸甲酯、2'-O-甲基核糖核苷酸以及肽-核酸(PNA)。除非特别限制,否则术语涵盖含有与参考核酸具有类似结合特性的天然核苷酸的已知类似物的核酸。除非另外指出,否则特定核酸序列还隐式地涵盖其保守修饰变体(例如简并密码子取代)、等位基因、异种同源物、SNP以及互补序列以及明确指出的序列。具体来说,可通过产生其中一个或多个所选(或所有)密码子的第三位置用混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现简并密码子取代(Batzler等, *Nucleic Acid Res.*, 19:5081(1991); Ohtsuka等, *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608(1985); Rossolini等, *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98(1994))。“核苷酸”含有脱氧核糖(DNA)或核糖(RNA)、碱基以及磷酸酯基。核苷酸通过磷酸酯基键联在一起。“碱基”包括嘌呤和嘧啶,嘌呤和嘧啶进一步包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷以及嘌呤和嘧啶的天然类似物和合成衍生物,所述合成衍生物包括但不限于放置诸如但不限于胺、醇、硫醇、甲酸酯以及卤代烷的新的反应基团的修饰形式。

[0099] 术语“基因”是指包含制备多肽或前体多肽所必需的部分长度或整个长度的编码序列的核酸(例如DNA或RNA)序列。

[0100] 如本文所用,“基因产物”是指基因的产物,诸如RNA转录物或多肽。

[0101] 术语“脂质”是指一组有机化合物,这组有机化合物包括但不限于脂肪酸的酯并且其特征为不溶于水,但可溶于许多有机溶剂。它们通常分成至少三类:(1)“简单脂质”,简单脂质包括脂肪和油以及蜡;(2)“复合脂质”,复合脂质包括磷脂和糖脂;以及(3)“衍生脂质”,诸如类固醇。

[0102] 除非另外说明,否则术语“烷基”单独或作为另一取代基的一部分意指具有指定碳原子数目(即, C_{1-8} 意指一个至八个碳)的直链或分枝链烃基,所述直链或分枝链烃基可为饱和或不饱和的。烷基的实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基等。术语“烯基”是指具有一个或多个双键的不饱和烷基。类似地,术语“炔基”是指具有一个或多个三键的不饱和烷基。此类不饱和烷基的实例包括乙烯基、2-丙烯基、巴豆基、2-异戊烯、2-(丁二烯基)、2,4-戊二烯基、3-(1,4-戊二烯基)、乙炔基、1-丙炔基和3-丙炔基、3-丁炔基以及高级同系物和异构体。

[0103] 如本文所用,术语脂质纳米粒子“LNP”是指脂质-核酸粒子或核酸-脂质粒子(例如稳定的核酸-脂质粒子)。LNP表示由脂质(例如阳离子脂质、非阳离子脂质以及预防粒子聚集的结合脂质)与核酸制成的粒子,其中核酸(例如siRNA、aiRNA、miRNA、ssDNA、dsDNA、ssRNA、短发夹RNA(shRNA)、dsRNA、mRNA、自扩增RNA或质粒,包括从其转录干扰RNA或mRNA的质粒)封装在脂质内。在一个实施方案中,核酸至少50%封装在脂质中;在一个实施方案中,核酸至少75%封装在脂质中;在一个实施方案中,核酸至少90%封装在脂质中;并且在一个实施方案中,核酸完全封装在脂质中。LNP通常含有阳离子脂质、非阳离子脂质以及脂质缀合物(例如PEG-脂质缀合物)。LNP非常可用于全身施加,因为它们可在静脉内(i.v.)注射后可展现延长的循环寿命,它们可在远端位点(例如与施用位点物理分离的位点)处累积,并且它们可在这些远端位点处介导转染基因的表达或靶基因表达的沉默。

[0104] 本发明的脂质粒子(例如LNP)通常具有约40nm至约150nm、约40nm至约80nm、约40nm至约60nm、约50nm至约60nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm或约70至约90nm的平均直径,并且基本上无毒。此外,当存在于本发明的脂质粒子中时,核酸在水溶液中对核酸酶降解具抗性。例如美国专利公布号20040142025和20070042031中公开了核酸-脂质粒子和其制备方法,这些专利公布的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0105] 如本文所用,“脂质封装的”可指脂质粒子为核酸(例如干扰RNA或mRNA)提供完全封装、部分封装或两者。在一个实施方案中,核酸完全封装在脂质粒子中(例如以形成LNP或其他核酸-脂质粒子)。

[0106] 术语“阳离子脂质”是指在所选pH值(诸如生理pH值,例如约7.0的pH值)下带有净正电荷的许多脂质物质中的任一者。已意外发现,包含具有多个不饱和位点(例如至少两个或三个不饱和位点)的烷基链的阳离子脂质特别可用于形成具有增加的膜流体性的脂质粒子。许多阳离子脂质和相关类似物也可用于本发明中,美国专利公布号20060083780和20060240554;美国专利号5,208,036;5,264,618;5,279,833;5,283,185;5,753,613;以及5,785,992;以及PCT公布号W0 96/10390中已描述这些阳离子脂质和相关类似物,所述专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。本文详细描述了阳离子脂质的非限制性实例。在一些情况下,阳离子脂质包含可质子化叔胺(例如pH值可滴定)头部基团、

C18烷基链、头部基团与烷基链之间的醚键联以及0至3个双键。此类脂质包括例如DSDMA、DLinDMA、DLenDMA以及DODMA。

[0107] 在本文所述的脂质纳米粒子中,阳离子脂质可为例如以下中的一者或多者:1,2-二亚油烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、2,2-二亚油烯基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-C2-DMA;“XTC2”)、2,2-二亚油烯基-4-(3-二甲基氨基丙基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-C3-DMA)、2,2-二亚油烯基-4-(4-二甲基氨基丁基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-C4-DMA)、2,2-二亚油烯基-5-二甲基氨基甲基-[1,3]-二噁烷(DLin-K6-DMA)、2,2-二亚油烯基-4-N-甲基哌嗪-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-MPZ)、2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-DMA)、1,2-二亚油烯基氨基甲酰基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油烯基氧基-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚油烯基氧基-3-吗啉基丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油酰基硫代-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚油烯基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亚油烯基氧基-3-三甲基氨基丙烷氯盐(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油酰基-3-三甲基氨基丙烷氯盐(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚油烯基氧基-3-(N-甲基哌嗪)丙烷(DLin-MPZ)、3-(N,N-二亚油烯基氨基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油烯基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亚油烯基氧代-3-(2-N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、1,2-二油烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DODMA)、1,2-二硬脂基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DSDMA)、N-(1-(2,3-二油烯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、3-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基)胆固醇(DC-Chol)、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)、2,3-二油烯基氧基-N-[2(精胺-甲酰胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙铵三氟乙酸盐(DOSPA)、双十八烷基酰胺基甘氨酸基精胺(DOGS)、3-二甲基氨基-2-(胆固-5-烯-3-β-氧基丁-4-氧基)-1-(顺,顺-9,12-十八二烯氧基)丙烷(CLInDMA)、2-[5'-(胆固-5-烯-3-β-氧基)-3'-氧杂戊氧基]-3-二甲基-1-(顺,顺-9',1-2'-十八二烯氧基)丙烷(CpLinDMA)、N,N-二甲基-3,4-二油烯基氧基苯甲胺(DMOBA)、1,2-N,N'-二油烯基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(DOcarbDAP)、1,2-N,N'-二亚油烯基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLincarbDAP)或它们的混合物。在某些实施方案中,阳离子脂质为DLinDMA、DLin-K-C2-DMA(“XTC2”)或它们的混合物。

[0108] 在某些实施方案中,阳离子脂质选自以下脂质中的一者:3-(((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基)氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺;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;5-(二甲基氨基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯-1-基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯;6-(二甲基氨基)己酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯-1-基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯;N,N-二甲基-4-(三((Z)-癸-4-烯-1-基)氧基)甲硅烷基)丁-1-胺;N,N-二甲基-5-(三((Z)-癸-4-烯-1-基)氧基)甲硅烷基)戊-1-胺;N,N-二甲基-6-(三((Z)-癸-4-烯-1-基)氧基)甲硅烷基)己-1-胺;2-(甲基(4-(三((Z)-癸-4-烯-1-基)氧基)甲硅烷基)丁基)氨基)乙-1-醇;(Z)-十一-5-烯酸(6Z,16Z)-12-((6-(二甲基氨基)己酰基)氧基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯;N1,N3-双(4-(双

((Z)-癸-4-烯-1-基)氧基(甲基)甲硅烷基)丁基)-N₁,N₃-二甲基丙烷-1,3-二胺;N₁,N₃-二甲基-N₁,N₃-双(4-(三((Z)-庚-3-烯-1-基)氧基)甲硅烷基)丁基)丙烷-1,3-二胺;(1r,4r)-N₁,N₄-双(4-(双((Z)-癸-4-烯-1-基)氧基(甲基)甲硅烷基)丁基)-N₁,N₄-二甲基环己烷-1,4-二胺;2,8-双(4-(双((Z)-癸-4-烯-1-基)氧基(甲基)甲硅烷基)丁基)-2,8-二氮杂螺[4.5]癸烷;或双(2-丁基辛基)10-(N-(3-(二甲基氨基)丙基)壬酰胺基)-十九烷二酸酯;10-(N-(3-(二甲基氨基)丙基)辛酰胺基)-十九烷二酸二(十三-7-基)酯;10-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十九烷二酸二(十三-7-基)酯;双(2-丁基辛酸)((4-羟丁基)氮烷二基)双(壬-9,1-二基)酯或8-((2-羟乙基)(8-(壬氧基)-8-氧代辛基)氨基)辛酸十七-9-基酯;(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯酸3-((4,4-双(辛氧基)丁酰基)氧基)-2-(((3-(二乙基氨基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯或3,6-双(4-(双(2-羟基十二烷基)氨基)丁基)哌嗪-2,5-二酮;3,6-双(4-(双((9Z,12Z)-2-羟基十八烷-9,12-二烯-1-基)氨基)丁基)哌嗪-2,5-二酮;1,1'-((2-(1-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌啶-4-基)乙基)氮烷二基)双(十二-2-醇);3,3',3'',3'''-((氮烷二基双(丙烷-3,1-二基))双(氮烷三基))四丙酸四(十三烷基)酯或8-((8,8-双(辛氧基)辛基)(2-羟乙基)氨基)辛酸壬酯或8,8'-(((2-(二甲基氨基)乙基)硫代)羰基)氮烷二基)二辛酸二(Z)-壬-2-烯-1-基)酯。

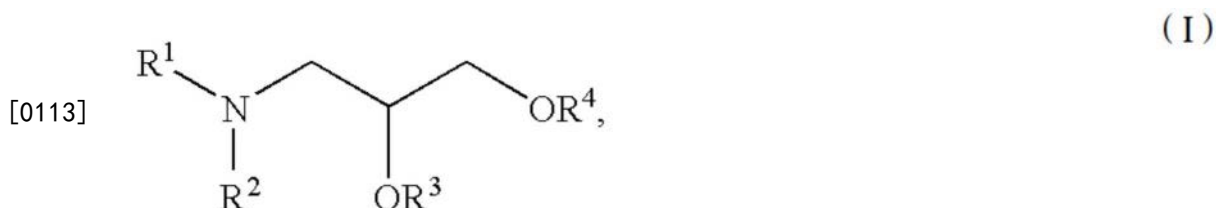
[0109] 2008年10月9日提交的美国临时申请号61/104,212中描述了诸如DLin-K-C2-DMA(“XTC2”)、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLin-K6-DMA以及DLin-K-MPZ等阳离子脂质以及额外阳离子脂质的合成,所述临时申请的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。2008年12月31日提交的PCT申请号PCT/US08/88676中描述了诸如DLin-K-DMA、DLin-C-DAP、DLin-DAC、DLin-MA、DLinDAP、DLin-S-DMA、DLin-2-DMAP、DLin-TMA.Cl、DLin-TAP.Cl、DLin-MPZ、DLinAP、DOAP以及DLin-EG-DMA等阳离子脂质以及额外阳离子脂质的合成,所述PCT申请的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。美国专利公布号20060240554中描述了诸如CLinDMA等阳离子脂质以及额外阳离子脂质的合成,所述专利公布的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0110] 可将多种阳离子脂质中的任一者单独或与一种或多种其他阳离子脂质物质或非阳离子脂质物质组合用于本发明的类脂物粒子(例如LNP)中。

[0111] 可用于本发明中的阳离子脂质可为在生理pH值下带有净正电荷的许多类脂物物质中的任一者。此类脂质包括但不限于N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、1,2-二油烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DODMA)、1,2-二硬脂基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DSDMA)、N-(1-(2,3-二油烯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、3-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基)胆固醇(DC-Chol)、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)、2,3-二油烯基氧基-N-[2(精胺-甲酰胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙铵三氟乙酸盐(DOSPA)、双十八烷基酰胺基甘氨酸基精胺(DOGS)、3-二甲基氨基-2-(胆固-5-烯-3-β-氧基丁-4-氧基)-1-(顺,顺-9,12-十八二烯氧基)丙烷(CLindMA)、2-[5'-胆固-5-烯-3.β.-氧基)-3'-氧杂戊氧基)-3-二甲基-1-(顺,顺-9',1-2'-十八二烯氧基)丙烷(CpLindMA)、N,N-二甲基-3,4-二油烯基氧基苯甲胺(DMOBA)、1,2-N,N'-二油烯基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(DOcarbDAP)、1,2-N,N'-二亚

油烯基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLincarbDAP)、1,2-亚油酰基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinCDAP)以及它们的混合物。这些脂质和相关类似物中有许多已在美国专利公布号20060083780和20060240554;美国专利号5,208,036;5,264,618;5,279,833;5,283,185;5,753,613;以及5,785,992;以及PCT公布号W0 96/10390中有描述,所述专利的公开内容各自出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。另外,阳离子脂质的许多商业制剂为可获得的并且可用于本发明中。这些制剂包括例如LIPOFECTIN®(包含DOTMA和DOPE的可商购获得的阳离子脂质体,来自GIBCO/BRL,Grand Island,N.Y.,USA);LIPOFECTAMINE®(包含DOSPA和DOPE的可商购获得的阳离子脂质体,来自GIBCO/BRL);以及TRANSFECTAM®(包含DOGS的可商购获得的阳离子脂质体,来自Promega Corp.,Madison,Wis.,USA)。

[0112] 另外,具有以下结构的式I的阳离子脂质可用于本发明中。



[0114] 其中 R^1 和 R^2 为独立选择的并且为H或 C_1 - C_3 烷基, R^3 和 R^4 为独立选择的并且为约10至约20个碳原子的烷基,并且 R^3 和 R^4 中的至少一者包含至少两个不饱和位点。在某些情况下, R^3 与 R^4 两者为相同的,即, R^3 和 R^4 均为亚油烯基(C_{18})等。在某些其他情况下, R^3 与 R^4 不同,即, R^3 为十四碳三烯基(C_{14})而 R^4 为亚油烯基(C_{18})。在一个实施方案中,式I的阳离子脂质为对称的,即, R^3 与 R^4 两者为相同的。在另一实施方案中, R^3 与 R^4 均包含至少两个不饱和位点。在一些实施方案中, R^3 和 R^4 独立地选自由以下组成的组:十二碳二烯基、十四碳二烯基、十六碳二烯基、亚油烯基以及二十碳二烯基。在一个实施方案中, R^3 与 R^4 均为亚油烯基。在一些实施方案中, R^3 和 R^4 包含至少三个不饱和位点并且独立地选自例如十二碳三烯基、十四碳三烯基、十六碳三烯基、亚麻烯基以及二十碳三烯基。在特定实施方案中,式I的阳离子脂质为1,2-二亚油烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)或1,2-二亚麻烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)。

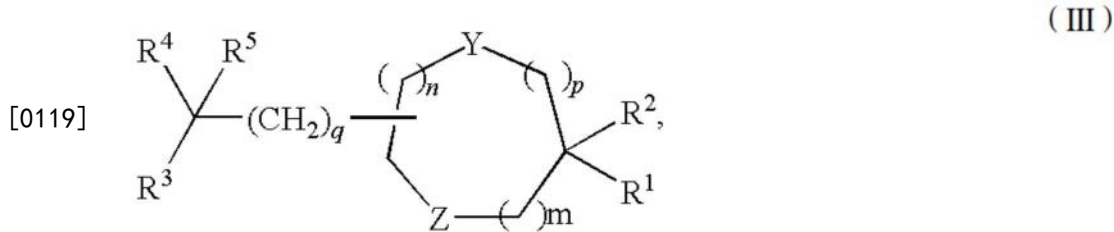
[0115] 此外,具有以下结构的式II的阳离子脂质可用于本发明中。



[0117] 其中 R^1 和 R^2 为独立选择的并且为H或 C_1 - C_3 烷基, R^3 和 R^4 为独立选择的并且为约10至约20个碳原子的烷基,并且 R^3 和 R^4 中的至少一者包含至少两个不饱和位点。在某些情况下, R^3 与 R^4 两者为相同的,即, R^3 和 R^4 均为亚油烯基(C_{18})等。在某些其他情况下, R^3 与 R^4 不同,即, R^3 为十四碳三烯基(C_{14})而 R^4 为亚油烯基(C_{18})。在一个实施方案中,本发明的阳离子脂质为对称的,即, R^3 与 R^4 两者为相同的。在另一实施方案中, R^3 与 R^4 均包含至少两个不饱和位点。

在一些实施方案中, R^3 和 R^4 独立地选自由以下组成的组:十二碳二烯基、十四碳二烯基、十六碳二烯基、亚油烯基以及二十碳二烯基。在一个实施方案中, R^3 与 R^4 均为亚油烯基。在一些实施方案中, R^3 和 R^4 包含至少三个不饱和位点并且独立地选自例如十二碳三烯基、十四碳三烯基、十六碳三烯基、亚麻烯基以及二十碳三烯基。

[0118] 此外,具有以下结构的式III的阳离子脂质(或其盐)可用于本发明中。



[0120] 其中 R^1 与 R^2 为相同或不同的并且独立地为任选取代的 C_{12} - C_{24} 烷基、任选取代的 C_{12} - C_{24} 烯基、任选取代的 C_{12} - C_{24} 炔基或任选取代的 C_{12} - C_{24} 酰基; R^3 与 R^4 为相同或不同的并且独立地为任选取代的 C_1 - C_6 烷基、任选取代的 C_1 - C_6 烯基或任选取代的 C_1 - C_6 炔基或 R^3 与 R^4 可连接以形成任选取代的4至6个碳原子以及1或2个选自氮和氧的杂原子的杂环; R^5 不存在或为氢或 C_1 - C_6 烷基以提供季胺; m 、 n 以及 p 为相同或不同的并且独立地为0或1,前提条件是 m 、 n 以及 p 不同时为0; q 为0、1、2、3或4;并且 Y 与 Z 为相同或不同的并且独立地为O、S或NH。

[0121] 在一些实施方案中,式III的阳离子脂质为2,2-二亚油烯基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-C2-DMA;“XTC2”)、2,2-二亚油烯基-4-(3-二甲基氨基丙基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-C3-DMA)、2,2-二亚油烯基-4-(4-二甲基氨基丁基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-C4-DMA)、2,2-二亚油烯基-5-二甲基氨基甲基-[1,3]-二噁烷(DLin-K6-DMA)、2,2-二亚油烯基-4-N-甲基哌嗪-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-MPZ)、2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-DMA)、1,2-二亚油烯基氨基甲酰基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油烯基氧基-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚油烯基氧基-3-吗啉基丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油酰基硫代-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚油烯基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亚油烯基氧基-3-三甲基氨基丙烷氯盐(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油酰基-3-三甲基氨基丙烷氯盐(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚油烯基氧基-3-(N-甲基哌嗪)丙烷(DLin-MPZ)、3-(N,N-二亚油烯基氨基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油烯基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亚油烯基氧代-3-(2-N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)或它们的混合物。在一些实施方案中,式III的阳离子脂质为DLin-K-C2-DMA(XTC2)。

[0122] 阳离子脂质通常构成存在于粒子中的总脂质的约50mol%至约90mol%、约50mol%至约85mol%、约50mol%至约80mol%、约50mol%至约75mol%、约50mol%至约70mol%、约50mol%至约65mol%或约55mol%至约65mol%。

[0123] 本领域技术人员将轻易显而易见的是,根据粒子的预期用途,可改变组分比例并且可使用例如内体释放参数(ERP)分析来测量特定制剂的递送效率。

[0124] 用于本发明的脂质粒子(例如LNP)中的非阳离子脂质可为能够产生稳定复合物的多种中性不带电荷的、两性离子的或阴离子脂质中的任一者。

[0125] 非阳离子脂质的非限制性实例包括磷脂,诸如卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷

脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、神经鞘磷脂、卵神经鞘磷脂 (ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、二鲸蜡基磷酸酯、二硬脂酰基磷脂酰胆碱 (DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱 (DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱 (DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油 (DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油 (DPPG)、二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、棕榈酰基油酰基-磷脂酰胆碱 (POPC)、棕榈酰基油酰基-磷脂酰乙醇胺 (POPE)、棕榈酰基油酰基-磷脂酰甘油 (POPG)、二油酰基磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-甲酸酯 (DOPE-ma1)、二棕榈酰基-磷脂酰乙醇胺 (DPPE)、二肉豆蔻酰基-磷脂酰乙醇胺 (DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺 (DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺、二甲基-磷脂酰乙醇胺、二反油烯酰基-磷脂酰乙醇胺 (DEPE)、硬脂酰基油酰基-磷脂酰乙醇胺 (SOPE)、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰胆碱以及它们的混合物。还可使用其他二酰基磷脂酰胆碱和二酰基磷脂酰乙醇胺磷脂。这些脂质中的酰基通常为来源于具有 C_{10} - C_{24} 碳链的脂肪酸的酰基,例如月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基或油酰基。

[0126] 非阳离子脂质的额外实例包括固醇,诸如胆固醇和其衍生物,诸如胆固醇、胆固醇酮、胆固醇烯酮、粪固醇、胆固醇基-2'-羟乙基醚、胆固醇基-4'-羟丁基醚以及它们的混合物。

[0127] 在一些实施方案中,存在于脂质粒子(例如LNP)中的非阳离子脂质包含胆固醇或其衍生物或由其组成,例如不含磷脂的脂质粒子制剂。在其他实施方案中,存在于脂质粒子(例如LNP)中的非阳离子脂质包含一种或多种磷脂或由其组成,例如不含胆固醇的脂质粒子制剂。在其他实施方案中,存在于脂质粒子(例如LNP)中的非阳离子脂质包含一种或多种磷脂以及胆固醇或其衍生物的混合物或由其组成。

[0128] 适合用于本发明中的非阳离子脂质的其他实例包括不含磷的脂质,诸如硬脂胺、十二胺、十六胺、棕榈酸乙酰酯、甘油蓖麻酸酯、硬脂酸十六酯、肉豆蔻酸异丙酯、两性丙烯酸聚合物、三乙醇胺-月桂基硫酸酯、烷基-芳基硫酸酯聚乙氧基化脂肪酸酰胺、双十八基二甲基溴化铵、神经酰胺、神经鞘磷脂等。

[0129] 术语“疏水脂质”是指具有包括但不限于长链饱和和不饱和脂肪烃基的非极性基团的化合物,并且此类基团任选地由一个或多个芳族、环脂族或杂环基取代。合适的实例包括但不限于二酰基甘油、二烷基甘油、N-N-二烷基氨基、1,2-二酰氧基-3-氨基丙烷以及1,2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0130] 术语“膜融合”是指脂质粒子(诸如LNP)与细胞的膜融合的能力。膜可为质膜或细胞器(例如内体、核等)周围的膜。

[0131] 如本文所用,术语“水溶液”是指完全或部分包含水的组合物。

[0132] 如本文所用,术语“有机脂质溶液”是指完全或部分包含具有脂质的有机溶剂的组合物。

[0133] 如本文所用的“远端位点”是指物理分离的位点,所述物理分离的位点不限于邻近毛细管床,但包括广泛分布于有机体中的位点。

[0134] 关于脂质纳米粒子(诸如LNP)的“血清稳定”意味着在暴露于血清或将显著降解游离DNA或RNA的核酸酶分析之后粒子不会显著降解。合适的分析包括例如标准血清分析、DNA酶分析或RNA酶分析。

[0135] 如本文所用,“全身递送”是指递送脂质粒子使得核酸(诸如干扰RNA或mRNA)广泛

生物分布于有机体内。一些施用技术可引起某些剂的全身递送,但不会引起其他剂的全身递送。全身递送意味着使可用、优选治疗量的剂暴露于身体的大多数部分。为获得广泛生物分布,通常需要使得剂在到达施用位点远端的疾病位点之前不会快速降解或清除(诸如通过第一道器官(肝脏、肺脏等)或通过快速、非特异性细胞结合)的血液寿命。脂质粒子的全身递送可通过本领域中已知的包括例如静脉内、皮下以及腹膜内的任何手段来进行。在一个优选实施方案中,脂质粒子的全身递送通过静脉内递送来进行。

[0136] 如本文所用,“局部递送”是指将核酸(诸如干扰RNA或mRNA)直接递送至有机体内的目标位点。举例来说,可通过直接注射至疾病位点(诸如肿瘤或其他目标位点,诸如炎症位点)或靶器官(诸如肝脏、心脏、胰腺、肾脏等)来局部递送一种剂。

[0137] 术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物物种,诸如人、小鼠、大鼠、狗、猫、仓鼠、豚鼠、兔、家畜等。

[0138] 术语“癌症”是指以异常细胞的不受控制生长为特征的疾病类别的任何成员。所述术语包括被表征为恶性、良性、软组织或实体的所有已知的癌症和赘生疾患,以及所有阶段和等级的癌症,包括转移前和转移后癌症。不同类型的癌症的实例包括但不限于肺癌、结肠癌、直肠癌、肛门癌、胆管癌、小肠癌、胃(stomach/gastric)癌、食管癌;胆囊癌、肝癌、胰腺癌、附件癌、乳腺癌、卵巢癌;宫颈癌、前列腺癌、肾癌(例如肾细胞癌)、中枢神经系统癌症、成胶质细胞瘤、皮肤癌、淋巴瘤、绒毛膜癌、头颈癌、骨原性肉瘤以及血液癌。特定类型的肝癌的非限制性实例包括肝细胞癌(HCC)、继发性肝癌(例如由另外一些非肝癌细胞类型的转移引起)以及肝胚细胞瘤。如本文所用,“肿瘤”包含一个或多个癌细胞。

[0139] 某些实施方案提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含如本文所述的脂质纳米粒子以及药学上可接受的载体。

[0140] 在某些实施方案中,药物组合物被配制用于静脉内施用。

[0141] 某些实施方案提供了一种用于将核酸递送至细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与如本文所述的脂质纳米粒子接触。

[0142] 某些实施方案提供了一种用于治疗以功能蛋白缺陷为特征(例如由遗传缺陷引起)的疾病的方法,所述方法包括:向患有所述疾病的受试者施用如本文所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子包含编码所述功能蛋白或与所述功能蛋白具有相同生物活性的蛋白质的mRNA。

[0143] 某些实施方案提供了一种用于治疗以多肽过表达为特征的疾病的方法,所述方法包括向患有所述疾病的受试者施用如本文所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子包含靶向所述过表达多肽的表达的siRNA。

[0144] 某些实施方案提供了一种如本文所述的脂质纳米粒子,所述脂质纳米粒子用于治疗性或预防性地治疗以功能蛋白缺陷为特征(例如由遗传缺陷引起)的疾病。

[0145] 某些实施方案提供了一种如本文所述的脂质纳米粒子,所述脂质纳米粒子用于治疗性或预防性地治疗以多肽过表达为特征的疾病。

[0146] 在某些实施方案中,核酸完全封装在脂质粒子的脂质部分内,使得脂质粒子中的核酸在水溶液中对例如由核酸酶或蛋白酶进行酶降解具抗性。在某些其他实施方案中,脂质粒子对哺乳动物(诸如人)基本上无毒。

[0147] 在某些情况下,核酸包含干扰RNA分子,诸如siRNA、aiRNA、miRNA或它们的混合物。

在某些其他情况下,核酸包含单链或双链DNA、RNA或DNA/RNA杂合物,诸如反义寡核苷酸、核糖酶、质粒、免疫刺激寡核苷酸或它们的混合物。在某些其他情况下,核酸包含一个或多个mRNA分子(例如混合物)。

[0148] 在一个实施方案中,核酸包含siRNA。在一个实施方案中,siRNA分子包含长度为约15至约60个核苷酸(例如长度为约15-60、15-50、15-40、15-30、15-25或19-25个核苷酸,或长度为15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸)的双链区域。本发明的siRNA分子能够使靶序列在体外和/或体内的表达沉默。

[0149] 在一些实施方案中,siRNA分子包含至少一个修饰的核苷酸。在某些优选实施方案中,siRNA分子在双链区域中包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个修饰的核苷酸。在某些情况下,siRNA在双链区域中包含约1%至约100%(例如约1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)的修饰的核苷酸。在优选实施方案中,双链区域中小于约25%(例如小于约25%、20%、15%、10%或5%)或约1%至约25%(例如约1%-25%、5%-25%、10%-25%、15%-25%、20%-25%或10%-20%)的核苷酸包含修饰的核苷酸。

[0150] 在其他实施方案中,siRNA分子包含修饰的核苷酸,包括但不限于2'-O-甲基(2'OMe)核苷酸、2'-脱氧-2'-氟(2'F)核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-O-(2-甲氧基乙基)(MOE)核苷酸、锁核酸(LNA)核苷酸以及它们的混合物。在优选实施方案中,siRNA包含2'OMe核苷酸(例如2'OMe嘌呤和/或嘧啶核苷酸),诸如2'OMe-鸟苷核苷酸、2'OMe-尿苷核苷酸、2'OMe-腺苷核苷酸、2'OMe-胞嘧啶核苷酸以及它们的混合物。在某些情况下,siRNA不包含2'OMe-胞嘧啶核苷酸。在其他实施方案中,siRNA包含发夹环结构。

[0151] siRNA可在siRNA分子的双链区域的一个链(即,意义或反义)或两个链中包含修饰的核苷酸。优选地,在siRNA双链体的双链区域的选择性位置处,尿苷和/或鸟苷核苷酸为修饰的。关于尿苷核苷酸修饰,有义和/或反义链中的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个尿苷核苷酸可为修饰的尿苷核苷酸,诸如2'OMe-尿苷核苷酸。在一些实施方案中,有义和/或反义链中的每个尿苷核苷酸均为2'OMe-尿苷核苷酸。关于鸟苷核苷酸修饰,有义和/或反义链中的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个鸟苷核苷酸可为修饰的鸟苷核苷酸,诸如2'OMe-鸟苷核苷酸。在一些实施方案中,有义和/或反义链中的每个鸟苷核苷酸均为2'OMe-鸟苷核苷酸。

[0152] 在某些实施方案中,可例如通过引入错配以消除5'-GU-3'基序和/或通过引入修饰的核苷酸(诸如2'OMe核苷酸)对siRNA序列中的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或更多个5'-GU-3'基序进行修饰。5'-GU-3'基序可在siRNA序列的有义链、反义链或两种链中。5'-GU-3'基序可为彼此相邻的或替代地它们可由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个或更多个核苷酸隔开。

[0153] 在一些优选实施方案中,修饰的siRNA分子与对应未修饰的siRNA序列相比免疫刺激性较低。在此类实施方案中,具有降低的免疫刺激特性的修饰的siRNA分子有利地保留针对靶序列的RNAi活性。在另一实施方案中,修饰的siRNA分子的免疫刺激特性与它使靶基因表达沉默能力可通过在siRNA序列内(诸如在siRNA双链体的双链区域内)引入最小并且具选择性的2'OMe修饰来加以平衡或优化。在某些情况下,与对应未修饰siRNA相比,修饰的siRNA的免疫刺激性低至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、

55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。本领域技术人员将轻易显而易见的是,可通过例如测量在哺乳动物中全身施用或使用适当的基于脂质的递送系统(诸如本文所公开的LNP递送系统)转染哺乳动物反应细胞之后约两小时至约十二小时INF- α 和/或IL-6的水平来确定修饰的siRNA分子和对应未修饰的siRNA分子的免疫刺激特性。

[0154] 在某些实施方案中,修饰的siRNA分子具有小于或等于对应未修饰的siRNA的十倍的 IC_{50} (即,半数最大抑制浓度)(即,修饰的siRNA具有小于或等于十倍于对应未修饰的siRNA的 IC_{50} 的 IC_{50})。在其他实施方案中,修饰的siRNA具有小于或等于对应未修饰的siRNA序列的三倍的 IC_{50} 。在其他实施方案中,修饰的siRNA具有小于或等于对应未修饰的siRNA的两倍的 IC_{50} 。本领域技术人员将轻易显而易见的是,可产生剂量反应曲线并且可使用本领域技术人员已知的方法容易地确定修饰的siRNA和对应未修饰的siRNA的 IC_{50} 值。

[0155] 在另一实施方案中,相对于对应未修饰的siRNA序列,修饰的siRNA分子能够使靶序列的至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的表达沉默。

[0156] 在一些实施方案中,siRNA分子例如在双链区域的有义和/或反义链中不包含磷酸酯骨架修饰。在其他实施方案中,siRNA例如在有义和/或反义链双链区域的中包含一个、两个、三个、四个或更多个磷酸酯骨架修饰。在优选实施方案中,siRNA不包含磷酸酯骨架修饰。

[0157] 在其他实施方案中,siRNA例如在双链区域的有义和/或反义链中不包含2'-脱氧核苷酸。在另一实施方案中,siRNA例如在双链区域的有义和/或反义链中包含一个、两个、三个、四个或更多个2'-脱氧核苷酸。在优选实施方案中,siRNA不包含2'-脱氧核苷酸。

[0158] 在某些情况下,在有义和/或反义链中双链区域的3'端的核苷酸不为修饰的核苷酸。在某些其他情况下,在有义和/或反义链中靠近双链区域3'端(例如在3'端的一个、两个、三个或四个核苷酸内)的核苷酸不为修饰的核苷酸。

[0159] 本文所述的siRNA分子在双链区域的一侧或两侧可具有一个、两个、三个、四个或更多个核苷酸的3'短悬端,或在双链区域的一侧或两侧可缺乏短悬端(即,具有平端末端)。优选地,siRNA在双链区域的每一侧具有两个核苷酸的3'短悬端。在某些情况下,反义链上的3'短悬端与靶序列具有互补性并且有义链上的3'短悬端与靶序列的互补链具有互补性。或者,3'短悬端不与靶序列或其互补链具有互补性。在一些实施方案中,3'短悬端包含一个、两个、三个、四个或更多个核苷酸,诸如2'-脱氧(2'H)核苷酸。在某些优选实施方案中,3'短悬端包含脱氧胸苷(dT)和/或尿苷核苷酸。在其他实施方案中,在双链区域的一侧或两侧的3'短悬端中的核苷酸中的一者或多者包含修饰的核苷酸。修饰的核苷酸的非限制性实例如上文所述并且包括2'OMe核苷酸、2'-脱氧-2'F核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-O-2-MOE核苷酸、LNA核苷酸以及它们的混合物。在优选实施方案中,存在于siRNA的有义和/或反义链上的3'短悬端中的一个、两个、三个、四个或更多个核苷酸包含2'OMe核苷酸(例如2'OMe嘌呤和/或嘧啶核苷酸),诸如2'OMe-鸟苷核苷酸、2'OMe-尿苷核苷酸、2'OMe-腺苷核苷酸、2'OMe-胞嘧啶核苷酸以及它们的混合物。

[0160] siRNA可包含使靶基因表达沉默的未修饰和/或修饰的siRNA序列中的至少一者或其混合物(例如至少两者、三者、四者、五者、六者、七者、八者、九者、十者或更多者)。siRNA

的混合物可包含针对一个或多个靶基因的相同区域或结构域(例如“热点”)和/或针对不同区域或结构域的序列。在某些情况下,一个或多个(例如至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)使靶基因表达沉默的修饰的siRNA存在于混合物中。在某些其他情况下,一个或多个(例如至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)使靶基因表达沉默的未修饰的siRNA序列存在于混合物中。

[0161] 在一些实施方案中,siRNA分子的反义链包含与靶序列或其部分至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%互补的序列或由其组成。在其他实施方案中,siRNA分子的反义链包含与靶序列或其部分100%互补的序列或由其组成。在其他实施方案中,siRNA分子的反义链包含特异性地杂交至靶序列或其部分的序列或由其组成。

[0162] 在其他实施方案中,siRNA分子的有义链包含与靶序列或其部分具至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列或由其组成。在其他实施方案中,siRNA分子的有义链包含与靶序列或其部分具100%同一性的序列或由其组成。

[0163] 胆固醇衍生物的实例包括但不限于胆固醇、胆固醇酮、胆固醇烯酮、粪固醇、胆固醇基-2'-羟乙基醚、胆固醇基-4'-羟丁基醚以及它们的混合物。胆固醇基-2'-羟乙基醚的合成如本文所述。

[0164] 如本文所用,DSPC意指二硬脂酰基磷脂酰胆碱。

[0165] 在本发明的脂质粒子中,核酸可完全封装在粒子的脂质部分内,从而防止核酸发生酶降解。在优选实施方案中,包含核酸(诸如干扰RNA,例如siRNA)或mRNA的LNP完全封装在粒子的脂质部分内,从而防止核酸发生核酸酶降解。在某些情况下,在粒子在37°C下暴露于核酸酶至少约20、30、45或60分钟之后,LNP中的核酸基本上不降解。在某些其他情况下,在将粒子在37°C下在血清中孵育至少约30、45或60分钟或至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34或36小时之后,LNP中的核酸基本上不降解。在其他实施方案中,核酸(例如核酸,诸如siRNA或mRNA)与粒子的脂质部分复合。本发明的制剂的益处之一为脂质粒子组合物对哺乳动物(诸如人)基本上无毒。

[0166] 术语“完全封装”表明在暴露于血清或将显著降解游离DNA、RNA或蛋白质的核酸酶或蛋白酶分析之后,脂质粒子中的核酸不会显著降解。在完全封装系统中,在将通常降解100%的游离核酸的处理中,优选粒子中小于约25%的核酸被降解,更优选地粒子中小于约10%并且最优选地小于约5%的核酸被降解。在核酸治疗剂情形下,完全封装可通过Oligreen®分析来确定。Oligreen®为用于定量溶液中的寡核苷酸以及单链DNA或RNA的超敏荧光核酸染色(可购自Invitrogen Corporation;Carlsbad,Calif.)。“完全封装”还表明脂质粒子为血清稳定的,换句话说,在体内施用后它们不会快速分解成其组成部分。

[0167] 在另一方面中,本发明提供了一种包含多个脂质粒子的脂质粒子(例如LNP)组合物。在优选实施方案中,核酸(例如核酸)完全封装在脂质粒子(例如LNP)的脂质部分内,使得约30%至约100%、约40%至约100%、约50%至约100%、约60%至约100%、约70%至约100%、约80%至约100%、约90%至约100%、约30%至约95%、约40%至约95%、约50%至约95%、约60%至约95%、约70%至约95%、约80%至约95%、约85%至约95%、约90%至约95%、约30%至约90%、约40%至约90%、约50%至约90%、约60%至约90%、约70%至约90%、约80%至约90%或至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%(或其任何部分或其

中的范围)的脂质粒子(例如LNP)具有封装在其中的核酸。

[0168] 通常,本发明的脂质粒子(例如LNP)具有约1至约100的脂质:活性剂(例如脂质:核酸)比(质量/质量比)。在一些情况下,脂质:活性剂(例如脂质:核酸)比(质量/质量比)在约1至约50、约2至约25、约3至约20、约4至约15或约5至约10范围内。

[0169] 通常,本发明的脂质粒子(例如LNP)具有约40nm至约150nm的平均直径。在一些实施方案中,本发明的脂质粒子具有约40nm至约130nm、约40nm至约120nm、约40nm至约100nm、约50nm至约120nm、约50nm至约100nm、约40nm至约80nm、约40nm至约60nm、约50nm至约60nm、约60nm至约120nm、约60nm至约110nm、约60nm至约100nm、约60nm至约90nm、约60nm至约80nm、约70nm至约120nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约70nm至约90nm、约70nm至约80nm或小于约150nm、120nm、110nm、100nm、90nm或80nm(或其任何部分或其中的范围)的平均直径。本发明还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含本文所述的脂质粒子(例如LNP)以及药学上可接受的载体。

[0170] 在另一方面中,本发明提供了一种用于将一种或多种活性剂或治疗剂(例如核酸)引入细胞中的方法,所述方法包括使所述细胞与本文所述的脂质粒子(例如LNP)接触。在一个实施方案中,细胞为在哺乳动物中的并且哺乳动物为人。在另一实施方案中,本发明提供了一种用于体内递送一种或多种活性剂或治疗剂(例如核酸)的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用本文所述的脂质粒子(例如LNP)。在一个优选实施方案中,施用模式包括但不限于经口、鼻内、静脉内、腹膜内、肌肉内、关节内、病损内、气管内、皮下以及真皮内。优选地,哺乳动物受试者为人。

[0171] 在一个实施方案中,在注射之后约8、12、24、36或48小时,至少约5%、10%、15%、20%或25%的总注射剂量的脂质粒子(例如LNP)存在于血浆中。在其他实施方案中,在注射之后约8、12、24、36或48小时,超过约20%、30%、40%并且多达约60%、70%或80%的总注射剂量的脂质粒子(例如LNP)存在于血浆中。在某些情况下,在施用之后约1小时,多个粒子中的超过约10%存在于哺乳动物的血浆中。在某些其他情况下,在施用粒子之后至少约1小时,可检测到脂质粒子(例如LNP)的存在。在某些实施方案中,在施用之后约8、12、24、36、48、60、72或96小时,在细胞中可检测到核酸(诸如干扰RNA,例如siRNA)或mRNA的存在(例如肺脏、肝脏、肿瘤或在炎症位点处)。在其他实施方案中,在施用之后约8、12、24、36、48、60、72或96小时,可检测到核酸(诸如干扰RNA,例如siRNA)对靶序列的表的下调。在其他实施方案中,核酸(诸如干扰RNA,例如siRNA)对靶序列的表的下调优先在肿瘤细胞中或在炎症位点处的细胞中发生。在其他实施方案中,在施用之后约12、24、48、72或96小时或在约6、8、10、12、14、16、18、19、20、22、24、26或28天,在施用位点的近端或远端位点处或在肺脏、肝脏或肿瘤的细胞中可检测到细胞中核酸(诸如干扰RNA,例如siRNA)的存在或效应。在其他实施方案中,在施用之后约8、12、24、36、48、60、72或96小时可检测到核酸(诸如mRNA或自扩增RNA)对靶序列的表的上调。在其他实施方案中,核酸(诸如mRNA或自扩增RNA)对靶序列的表的上调优先在肿瘤细胞中或在炎症位点处的细胞中发生。在其他实施方案中,在施用之后约12、24、48、72或96小时或在约6、8、10、12、14、16、18、19、20、22、24、26或28天,在施用位点的近端或远端位点或肺脏、肝脏或肿瘤的细胞中可检测到细胞中核酸(诸如mRNA或自扩增RNA)的存在或效应。在其他实施方案中,本发明的脂质粒子(例如LNP)为肠胃外或腹膜内施用的。在诸多个实施方案中,本发明的脂质粒子(例如LNP)为肌肉内施用的。

[0172] 在一些实施方案中,本发明的脂质粒子(例如LNP)可用于治疗性递送一种或多种包含干扰RNA序列(例如siRNA)的核酸的方法中。具体来说,本发明的一个目标为提供用于治疗哺乳动物(例如啮齿动物,诸如小鼠;或灵长类动物,诸如人、黑猩猩或猴)的疾病或病症的体外和体内方法,所述方法通过使一种或多种所关注的靶核酸序列或基因的转录和/或翻译下调或沉默来进行。作为非限制性实例,本发明的方法可用于将干扰RNA(例如siRNA)体内递送至哺乳动物受试者的肝脏和/或肿瘤。在某些实施方案中,疾病或病症与基因的表达和/或过表达相关并且基因的表达或过表达因干扰RNA(例如siRNA)而降低。在某些其他实施方案中,可向哺乳动物施用治疗有效量的脂质粒子(例如LNP)。在一些情况下,将干扰RNA(例如siRNA)配制到LNP中,并且向需要此类治疗的患者施用粒子。在其他情况下,从患者移除细胞,体外(例如使用本文所述的LNP)递送干扰RNA(例如siRNA),并且将细胞再注入患者体内。

[0173] 在另一方面中,本发明提供了包含使靶基因的表达沉默的不对称干扰RNA(aiRNA)分子的脂质粒子(例如LNP),以及使用此类粒子来使靶基因表达沉默的方法。

[0174] 在一个实施方案中,aiRNA分子包含长度为约10至约25(碱基对)个核苷酸的双链(双链体)区域,其中aiRNA分子包含含有5'和3'短悬端的反义链,并且其中aiRNA分子能够使靶基因表达沉默。

[0175] 在某些情况下,aiRNA分子包含长度为约12-20、12-19、12-18、13-17或14-17(碱基对)个核苷酸,更通常长度为12、13、14、15、16、17、18、19或20(碱基对)个核苷酸的双链(双链体)区域。在某些其他情况下,反义链上的5'和3'短悬端包含与靶RNA序列互补的序列,并且可任选还包含非靶向序列。在一些实施方案中,反义链上的5'和3'短悬端中的每一者包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或更多个核苷酸或由其组成。

[0176] 在其他实施方案中,aiRNA分子包含选自由以下组成的组的修饰的核苷酸:2'OMe核苷酸、2'F核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-O-MOE核苷酸、LNA核苷酸以及它们的混合物。在一个优选实施方案中,aiRNA分子包含2'OMe核苷酸。作为非限制性实例,2'OMe核苷酸可选自由以下组成的组:2'OMe-鸟苷核苷酸、2'OMe-尿苷核苷酸以及它们的混合物。

[0177] 在一个相关方面中,本发明提供了包含使靶基因的表达沉默的微RNA(miRNA)分子的脂质粒子(例如LNP)以及使用此类组合物来使靶基因表达沉默的方法。

[0178] 在一个实施方案中,miRNA分子的长度包含约15至约60个核苷酸,其中miRNA分子能够使靶基因表达沉默。

[0179] 在某些情况下,miRNA分子的长度包含约15-50、15-40或15-30个核苷酸,更通常长度为约15-25或19-25个核苷酸,并且优选地长度为约20-24、21-22或21-23个核苷酸。在一个优选实施方案中,miRNA分子为靶向所关注的RNA序列的成熟miRNA分子。

[0180] 在一些实施方案中,miRNA分子包含选自由以下组成的组的修饰的核苷酸:2'OMe核苷酸、2'F核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-O-MOE核苷酸、LNA核苷酸以及它们的混合物。在一个优选实施方案中,miRNA分子包含2'OMe核苷酸。作为非限制性实例,2'OMe核苷酸可选自由以下组成的组:2'OMe-鸟苷核苷酸、2'OMe-尿苷核苷酸以及它们的混合物。

[0181] 在一些实施方案中,本发明的脂质粒子(例如LNP)可用于治疗性地递送一种或多种mRNA分子的方法中。具体来说,本发明的一个目标为提供用于治疗哺乳动物(例如啮齿动物诸如小鼠;或灵长类动物,诸如人、黑猩猩或猴)的疾病或病症的体外和体内方法,所述体

外和体内方法通过一种或多种靶蛋白质的表达来进行。作为非限制性实例,本发明的方法可用于向哺乳动物受试者体内递送一种或多种mRNA分子。在某些其他实施方案中,可向哺乳动物施用治疗有效量的脂质粒子(例如LNP)。在一些情况下,将一种或多种mRNA分子配制到LNP中,并且向需要此类治疗的患者施用粒子。在其他情况下,从患者移除细胞,体外(例如使用本文所述的LNP)递送一种或多种mRNA分子,并且将细胞再注入患者中。

[0182] 在其他实施方案中,siRNA分子包含选自以下组成的组的修饰的核苷酸:2'OMe核苷酸、2'F核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-O-MOE核苷酸、LNA核苷酸以及它们的混合物。在一个相关方面中,本发明提供了包含使靶基因的表达沉默的微RNA(miRNA)分子的脂质粒子(例如LNP)以及使用此类组合物来使靶基因表达沉默的方法。

[0183] 因而,本发明的脂质粒子(例如LNP)为有利的并且适合用于向受试者(例如哺乳动物,诸如人)施用活性剂或治疗剂,诸如核酸(例如干扰RNA,诸如siRNA、aiRNA和/或miRNA;或mRNA;引导RNA;自扩增RNA;环状RNA;DNA,包括质粒DNA和封端DNA;因为它们循环中为稳定的,具有药效动力学性质所需的尺寸从而使得到达血管外位点,并且能够到达靶细胞群体。

[0184] 在本发明的背景下,术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”是指由天然存在的碱基、糖以及糖间(骨架)键联组成的核苷酸或核苷单体的聚合物或寡聚物。术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”还包括包含非天然存在的单体或其类似地发挥作用的部分的聚合物或寡聚物。此类修饰或取代的寡核苷酸与天然形式相比由于诸如增强的细胞摄入、降低的免疫原性以及核酸酶存在下增加的稳定性等特性而经常为优选的。

[0185] 寡核苷酸通常被归类为脱氧核糖寡核苷酸或核糖寡核苷酸。脱氧核糖寡核苷酸由称为脱氧核糖的5-碳糖组成,所述5-碳糖在此糖的5'和3'碳处共价连接至磷酸酯从而形成交替、非分支链聚合物。核糖寡核苷酸由其中5-碳糖为核糖的类似重复结构组成。

[0186] 存在于根据本发明的脂质-核酸粒子中的核酸包括已知的任何形式的核酸。本文中所用的核酸可为单链DNA或RNA或双链DNA或RNA或DNA-RNA杂合物。双链DNA的实例如本文所述并且包括例如结构基因、包括控制和终止区域的基因以及自复制系统,诸如病毒或质粒DNA。双链RNA的实例如本文所述并且包括例如siRNA以及其他RNAi剂,诸如aiRNA和前体miRNA。单链核酸包括例如反义寡核苷酸、核糖酶、成熟miRNA以及形成三链体的寡核苷酸。

[0187] 核酸可具有各种长度,这通常取决于核酸的具体形式。举例来说,在特定实施方案中,质粒或基因的长度可为约1,000至约100,000个核苷酸残基。在特定实施方案中,寡核苷酸的长度可在约10至约100个核苷酸范围内。在各种相关实施方案中,单链、双链以及三链寡核苷酸的长度可在约10至约60个核苷酸、约15至约60个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约15至约30个核苷酸范围内,或长度为约20至约30个核苷酸。

[0188] 在特定实施方案中,本发明的寡核苷酸(或其链)与靶多核苷酸序列特异性地杂交或互补。如本文所用的术语“可特异性地杂交”和“互补”指示足以使得DNA或RNA靶标与寡核苷酸之间发生稳定并且特异性的结合的互补程度。应了解,寡核苷酸不需要与其要可特异性杂交的靶核酸序列100%互补。在优选实施方案中,当寡核苷酸结合至靶序列妨碍靶序列的正常功能从而引起其功效或表达损失,并且存在足以在其中需要特异性结合的条件下(即,在体内分析或治疗性治疗的情况下在生理条件下或在体外分析的情况下在其中进行分析的条件下)避免寡核苷酸非特异性结合至非靶序列的互补程度时,寡核苷酸为可特异

性杂交的。因此,寡核苷酸与其所靶向或与其特异性杂交的基因或mRNA序列的区域相比可包括1、2、3或更多个碱基取代。

[0189] siRNA

[0190] 本发明的脂质纳米粒子的siRNA组分能够使所关注的靶基因的表达沉默。siRNA双链体的每个链的长度通常为约15至约60个核苷酸,优选地长度为约15至约30个核苷酸。在某些实施方案中,siRNA包含至少一个修饰的核苷酸。修饰的siRNA与对应未修饰的siRNA序列相比通常免疫刺激性较低并且保留针对所关注的靶基因的RNAi活性。在一些实施方案中,修饰的siRNA含有至少一个2'OMe嘌呤或嘧啶核苷酸,诸如2'OMe-鸟苷、2'OMe-尿苷、2'OMe-腺苷和/或2'OMe-胞嘧啶核苷酸。在优选实施方案中,尿苷和/或鸟苷核苷酸中的一者或多者为修饰的。修饰的核苷酸可存在于siRNA的一个链(即,有义或反义)或两个链中。siRNA序列可具有短悬端(例如如Elbashir等,Genes Dev.,15:188(2001)或Nykänen等,Cell,107:309(2001)中所述的3'或5'短悬端),或缺乏短悬端(即,具有平末端)。

[0191] 修饰的siRNA通常在siRNA双链体的双链区域中包含约1%至约100%(例如约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)个修饰的核苷酸。在某些实施方案中,siRNA的双链区域中的核苷酸中的一者、两者、三者、四者、五者、六者、七者、八者、九者、十者或更多者包含修饰的核苷酸。

[0192] 在一些实施方案中,siRNA的双链区域中小于约25%(例如小于约25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%)的核苷酸包含修饰的核苷酸。

[0193] 在其他实施方案中,siRNA的双链区域中约1%至约25%(例如约1%-25%、2%-25%、3%-25%、4%-25%、5%-25%、6%-25%、7%-25%、8%-25%、9%-25%、10%-25%、11%-25%、12%-25%、13%-25%、14%-25%、15%-25%、16%-25%、17%-25%、18%-25%、19%-25%、20%-25%、21%-25%、22%-25%、23%-25%、24%-25%等)或约1%至约20%(例如约1%-20%、2%-20%、3%-20%、4%-20%、5%-20%、6%-20%、7%-20%、8%-20%、9%-20%、10%-20%、11%-20%、12%-20%、13%-20%、14%-20%、15%-20%、16%-20%、17%-20%、18%-20%、19%-20%、1%-19%、2%-19%、3%-19%、4%-19%、5%-19%、6%-19%、7%-19%、8%-19%、9%-19%、10%-19%、11%-19%、12%-19%、13%-19%、14%-19%、15%-19%、16%-19%、17%-19%、18%-19%、1%-18%、2%-18%、3%-18%、4%-18%、5%-18%、6%-18%、7%-18%、8%-18%、9%-18%、10%-18%、11%-18%、12%-18%、13%-18%、14%-18%、15%-18%、16%-18%、17%-18%、1%-17%、2%-17%、3%-17%、4%-17%、5%-17%、6%-17%、7%-17%、8%-17%、9%-17%、10%-17%、11%-17%、12%-17%、13%-17%、14%-17%、15%-17%、16%-17%、1%-16%、2%-16%、3%-16%、4%-16%、5%-16%、6%-16%、7%-16%、8%-16%、9%-16%、10%-16%、11%-16%、12%-16%、13%-16%、14%-16%、15%-16%、1%-15%、2%-15%、3%-15%、4%-15%、5%-15%、6%-15%、7%-15%、8%-15%、9%-15%、10%-15%、11%-15%、12%-15%、13%-15%、14%-15%等)的核苷酸包含修饰的核苷酸。

[0194] 在其他实施方案中,例如当siRNA的一个或两个链在尿苷和/或鸟苷核苷酸处经过

选择性修饰时,所得修饰的siRNA可包含小于约30%的修饰的核苷酸(例如小于约30%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的修饰的核苷酸)或约1%至约30%的修饰的核苷酸(例如约1%-30%、2%-30%、3%-30%、4%-30%、5%-30%、6%-30%、7%-30%、8%-30%、9%-30%、10%-30%、11%-30%、12%-30%、13%-30%、14%-30%、15%-30%、16%-30%、17%-30%、18%-30%、19%-30%、20%-30%、21%-30%、22%-30%、23%-30%、24%-30%、25%-30%、26%-30%、27%-30%、28%-30%或29%-30%的修饰的核苷酸)。

[0195] siRNA序列的选择

[0196] 可使用本领域中已知的任何手段来鉴定合适的siRNA序列。通常,将Elbashir等, *Nature*, 411:494-498 (2001) 和Elbashir等, *EMBO J.*, 20:6877-6888 (2001) 中所述的方法与Reynolds等, *Nature Biotech.*, 22(3):326-330 (2004) 中所阐述的合理设计规则组合。

[0197] 通常,对来自所关注的靶基因的转录物的AUG起始密码子3'的核苷酸序列进行扫描以获得二核苷酸序列(例如AA、NA、CC、GG或UU,其中N=C、G或U)(参见例如Elbashir等, *EMBO J.*, 20:6877-6888 (2001))。将紧接在二核苷酸序列3'的核苷酸鉴定为潜在siRNA序列(即,靶序列或有义链序列)。通常,将紧接在二核苷酸序列3'的19、21、23、25、27、29、31、33、35或更多个核苷酸鉴定为潜在siRNA序列。在一些实施方案中,二核苷酸序列为AA或NA序列并且将紧接在AA或NA二核苷酸3'的19个核苷酸鉴定为潜在siRNA序列。通常沿靶基因的长度在不同位置处将siRNA序列间隔开。为了进一步增强siRNA序列的沉默效率,可对潜在siRNA序列进行分析以鉴定不含与例如在靶细胞或有机体中的其他编码序列具同源性的区域的位点。举例来说,约21个碱基对的合适的siRNA序列通常不会具有超过16-17个与靶细胞或有机体中的编码序列具同源性的连续碱基对。如果要从RNA Pol III启动子表达siRNA序列,那么选择缺乏超过4个连续A'或T'的siRNA序列。

[0198] 已鉴定潜在siRNA序列后,可设计互补序列(即,反义链序列)。还可使用本领域中已知的多种准则对潜在siRNA序列进行分析。举例来说,为增强其沉默效率,通过合理设计算法可对siRNA序列进行分析以鉴定具有以下特征中的一者或多者的序列:(1)G/C含量为约25%至约60% G/C;(2)有义链的位置15-19处至少3个A/U;(3)没有内部重复;(4)有义链的位置19处为A;(5)有义链的位置3处为A;(6)有义链的位置10处为U;(7)有义链的位置19处不为G/C;以及(8)有义链的位置13处不为G。合并分配这些特征中的每一者的合适的值的算法并且可用于选择siRNA的siRNA设计工具可在例如<http://boz094.ust.hk/RNAi/siRNA>找到。本领域技术人员将理解,可选择具有前述特征中的一者或多者的序列进行作为潜在siRNA序列的进一步分析和测试。

[0199] 另外,具有以下准则中的一者或多者的潜在siRNA序列可常常被排除作为siRNA:(1)一排中包含4个或更多个相同碱基的延伸段的序列;(2)包含G的均聚物的序列(即,从而因这些聚合物的结构特征而降低可能的非特异性作用);(3)包含三重碱基基序(例如GGG、CCC、AAA或TTT)的序列;(4)一排中包含7个或更多个G/C的延伸段的序列;以及(5)候选物内包含4个或更多个碱基的直接重复从而产生内部折叠结构的序列。然而,本领域技术人员将理解,仍可选择具有前述特征中的一者或多者的序列来进行作为潜在siRNA序列的进一步分析和测试。

[0200] 在一些实施方案中,可如例如Khvorova等,Cell,115:209-216(2003);以及Schwarz等,Cell,115:199-208(2003)中所述基于siRNA双链体不对称性对潜在siRNA序列进行进一步分析。在其他实施方案中,可如例如Luo等,Biophys.Res.Comm.,318:303-310(2004)中所述基于目标位点处的二级结构对潜在siRNA序列进行进一步分析。举例来说,可使用Mfold算法(可在<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi>获得)对目标位点处的二级结构进行模型化,以选择有利于其中存在较少的呈碱基配对和茎-环形式的二级结构的目标位点处的可及性的siRNA序列。

[0201] 已鉴定潜在siRNA序列后,可例如使用体外细胞因子分析或体内动物模型针对任何免疫刺激特性的存在对序列进行分析。siRNA序列的有义和/或反义链中的基序(诸如富GU基序,例如5'-GU-3',5'-UGU-3',5'-GUGU-3',5'-UGUGU-3'等)还可提供序列是否可能具免疫刺激性的指示。发现siRNA分子具免疫刺激性后,可然后如本文所述对其进行修饰以降低其免疫刺激特性。作为非限制性实例,可在使得细胞产生可检测免疫反应的条件下使siRNA序列与哺乳动物反应细胞接触,以确定siRNA是免疫刺激性还是非免疫刺激siRNA。哺乳动物反应细胞可来自原初哺乳动物(即,先前尚未与siRNA序列的基因产物接触的哺乳动物)。哺乳动物反应细胞可为例如外周血单核细胞(PBMC)、巨噬细胞等。可检测免疫反应可包含产生细胞因子或生长因子,诸如TNF- α 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL-6、IL-12或它们的组合。然后可通过将有义和/或反义链上的核苷酸中的至少一者用修饰核苷酸置换来对被鉴定为免疫刺激性的siRNA分子进行修饰,以降低其免疫刺激特性。举例来说,可将siRNA双链体的双链区域中小于约30%(例如小于约30%、25%、20%、15%、10%或5%)的核苷酸用修饰核苷酸(诸如2'OMe核苷酸)置换。然后可如上文所述使修饰siRNA与哺乳动物反应细胞接触以证实其免疫刺激特性已降低或消除。

[0202] 适合用于检测免疫反应的体外分析包括但不限于David等(美国专利号4,376,110)的双重单克隆抗体夹心免疫分析技术;单克隆-多克隆抗体夹心分析(Wide等,Kirkham和Hunter编,Radioimmunoassay Methods,E.and S.Livingstone,Edinburgh(1970));Gordon等(美国专利号4,452,901)的“蛋白质印迹”法;标记配体的免疫沉淀(Brown等,J.Biol.Chem.,255:4980-4983(1980));如例如Raines等,J.Biol.Chem.,257:5154-5160(1982)所述的酶联免疫吸附分析(ELISA);免疫细胞化学技术,包括使用荧光染料(Brooks等,Clin.Exp.Immunol.,39:477(1980));以及活性的中和(Bowen-Pope等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:2396-2400(1984))。除上文所述的免疫分析外,许多其他免疫分析为可获得的,包括美国专利号3,817,827;3,850,752;3,901,654;3,935,074;3,984,533;3,996,345;4,034,074;以及4,098,876中所述的那些免疫分析。这些参考文献的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0203] 用于检测免疫反应的体内模型的非限制性实例包括如例如Judge等,Mol.Ther.,13:494-505(2006)中所述的体内小鼠细胞因子诱导分析。在某些实施方案中,可如下进行分析:(1)可通过在侧尾静脉中标准静脉注射来施用siRNA;(2)在施用之后约6小时可通过心脏穿刺收集血液并且加工成血浆用于细胞因子分析;以及(3)可根据厂商的说明书使用夹心ELISA试剂盒(例如小鼠和人IFN- α (PBL Biomedical;Piscataway,N.J.);人IL-6和TNF- α (eBioscience;San Diego,Calif.);以及小鼠IL-6、TNF- α 以及IFN- γ (BD Biosciences;San Diego,Calif.))对细胞因子进行定量。

[0204] 特异性地结合细胞因子和生长因子的单克隆抗体可从多个来源商购获得并且可使用本领域中已知的方法产生(参见例如Kohler等, *Nature*, 256:495-497 (1975) 以及Harlow和Lane, *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Publication, New York (1999))。先前已描述单克隆抗体的产生并且可通过本领域中已知的任何手段来实现(Buhring等, *Hybridoma*, 第10卷, 第1期, 第77-78页 (1991))。在一些方法中, 对单克隆抗体进行标记(例如用通过光谱、光化学、生物化学、电学、光学或化学方法可检测的任何组合物)以有助于检测。

[0205] 产生siRNA分子

[0206] 可以若干形式提供siRNA, 包括例如以一种或多种分离的小干扰RNA (siRNA) 双链体的形式、以较长双链RNA (dsRNA) 的形式或以在DNA质粒中从转录盒转录的siRNA或dsRNA的形式。siRNA序列可具有短悬端(例如如Elbashir等, *Genes Dev.*, 15:188 (2001) 或Nykänen等, *Cell*, 107:309 (2001) 中所述的3'或5'短悬端, 或可缺乏短悬端(即, 具有平末端)。

[0207] 可使用可用于提供与所选靶序列具有基本或完全同一性的长前体RNA或长前体RNA的RNA群体来制备siRNA。可根据本领域技术人员熟知的方法从合成和/或克隆的细胞或组织分离RNA。RNA可为混合群体(从细胞或组织获得、从cDNA转录、去掉、选择等)或可表示单个靶序列。RNA可为天然存在的(例如从组织或细胞样品分离)、体外合成的(例如使用T7或SP6聚合酶以及PCR产物或克隆的cDNA)或化学合成的。

[0208] 为了形成长dsRNA, 在合成RNA时, 还在体外转录补体并且杂交以形成dsRNA。如果使用天然存在的RNA群体, 那么还例如通过转录对应于RNA群体的cDNA或通过使用RNA聚合酶来提供RNA补体(例如以形成dsRNA以便由大肠杆菌RNA酶III或Dicer消化)。然后使前体RNA杂交以形成用于消化的双链RNA。dsRNA可直接向受试者施用或可在施用之前在体外消化。

[0209] 用于分离RNA、合成RNA、杂交核酸、制造和筛选cDNA文库以及进行PCR的方法为本领域中熟知的(参见例如Gubler和Hoffman, *Gene*, 25:263-269 (1983); Sambrook等, 同上; Ausubel等, 同上), 正如PCR方法(参见美国专利号4,683,195和4,683,202; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis等编, 1990))一般。表达文库也是本领域技术人员熟知的。公开本发明中的用途的一般方法的额外基础文本包括Sambrook等, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (第2版1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); 以及 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel等编, 1994)。这些参考文献的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0210] 优选地, siRNA为化学合成的。包含本发明的siRNA分子的寡核苷酸可使用本领域中已知的诸如Usman等, *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845 (1987); Scaringe等, *Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990); Wincott等, *Nucl. Acids Res.*, 23:2677-2684 (1995); 以及Wincott等, *Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997) 中所述的多种技术中的任一者来合成。寡核苷酸的合成利用了常用核酸保护和偶联基团, 诸如在5'端的二甲氧基三苯甲基以及在3'端的亚磷酰胺。作为非限制性实例, 小规模合成可在使用0.2 μ mol规模方案的Applied Biosystems合成仪上进行。或者, 在0.2 μ mol规模下的合成可在来自Protogene (Palo Alto, Calif.) 的96孔板

合成仪上进行。然而,更大或更小规模的合成也在本发明范畴内。适合用于寡核苷酸合成的试剂、用于RNA脱保护的方法以及用于RNA纯化的方法为本领域技术人员已知的。

[0211] 还可经由串联合成技术合成siRNA分子,其中将两个链合成为由可裂解接头隔开的单个连续寡核苷酸片段或链,所述可裂解接头随后裂解以提供单独片段或链,所述单独片段或链杂交以形成siRNA双链体。接头可为多核苷酸接头或非核苷酸接头。siRNA的串联合成可容易地适合于多孔/多盘合成平台以及使用分批处理反应器、合成塔等的大规模合成平台。或者,可从两个独特的寡核苷酸组装siRNA分子,其中一个寡核苷酸包含siRNA的有义链,而另一个包含反义链。举例来说,可分开合成每个链并且在合成和/或脱保护之后通过杂交或连结而连接在一起。在某些其他情况下,可将siRNA分子合成为单个连续寡核苷酸片段,其中自互补有义和反义区域杂交以形成具有发夹二级结构的siRNA双链体。

[0212] 修饰siRNA序列

[0213] 在某些方面中,siRNA分子包含具有两个链以及双链区域中的至少一个修饰的核苷酸的双链体,其中每个链的长度为约15至约60个核苷酸。有利地,修饰的siRNA与对应未修饰的siRNA序列相比免疫刺激性较小,但保留使靶序列的表达沉默的能力。在优选实施方案中,siRNA分子中引入的化学修饰的程度使降低或消除siRNA的免疫刺激特性与保留RNAi活性之间取得平衡。作为非限制性实例,可在siRNA双链体内在选择性尿苷和/或鸟苷核苷酸处最低限度地对靶向所关注的基因的siRNA分子进行修饰(例如小于约30%、25%、20%、15%、10%或5%被修饰),以消除由siRNA产生的免疫反应,同时保留其使靶基因表达沉默的能力。

[0214] 适合用于本发明中的修饰的核苷酸的实例包括但不限于具有2'-O-甲基(2'OMe)、2'-脱氧-2'-氟(2'F)、2'-脱氧-5-C-甲基、2'-O-(2-甲氧基乙基)(MOE)、4'-硫代、2'-氨基或2'-C-烯丙基的核糖核苷酸。诸如Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag Ed. (1984)中所述的具有北方构象(Northern conformation)的修饰的核苷酸也适合用于siRNA分子中。此类修饰的核苷酸包括但不限于锁核酸(LNA)核苷酸(例如2'-O、4'-C-亚甲基-(D-呋喃核糖基)核苷酸)、2'-O-(2-甲氧基乙基)(MOE)核苷酸、2'-甲基-硫代-乙基核苷酸、2'-脱氧-2'-氟(2'F)核苷酸、2'-脱氧-2'-氯(2'Cl)核苷酸以及2'-叠氮基核苷酸。在某些情况下,本文所述的siRNA分子包括一个或多个G形夹核苷酸。G形夹核苷酸是指修饰的胞嘧啶类似物,其中所述修饰赋予氢键合双链体内的互补鸟苷酸的沃森-克里克(Watson-Crick)与霍氏面(Hoogsteen face)的能力(参见例如Lin等, J. Am. Chem. Soc., 120:8531-8532 (1998))。此外,可将具有核苷酸碱基类似物(诸如C-苯基、C-萘基、其他芳族衍生物、肌苷、唑甲酰胺以及硝基唑衍生物,诸如3-硝基吡咯、4-硝基吡咯、5-硝基吡咯以及6-硝基吡咯)的核苷酸(参见例如Loakes, Nucl. Acids Res., 29:2437-2447 (2001))合并至siRNA分子中。

[0215] 在某些实施方案中,siRNA分子还可包括一种或多种化学修饰,诸如末端盖帽部分、磷酸酯骨架修饰等。末端盖帽部分的实例包括但不限于反向脱氧无碱基残基、甘油基修饰、4',5'-亚甲基核苷酸、1-(β -D-赤呋喃糖基)核苷酸、4'-硫代核苷酸、碳环核苷酸、1,5-失水己糖醇核苷酸、L-核苷酸、 α -核苷酸、修饰的碱基核苷酸、苏式呋喃戊糖基核苷酸、非环3',4'-断核苷酸、非环3,4-二羟丁基核苷酸、非环3,5-二羟戊基核苷酸、3'-3'-反向核苷酸部分、3'-3'-反向无碱基部分、3'-2'-反向核苷酸部分、3'-2'-反向无碱基部分、5'-5'-反

向核苷酸部分、5'-5'-反向无碱基部分、3'-5'-反向脱氧无碱基部分、磷酸5'-氨基-烷基酯、磷酸1,3-二氨基-2-丙酯、磷酸3-氨基丙酯、磷酸6-氨基己酯、磷酸1,2-氨基十二酯、磷酸羟丙酯、1,4-丁二醇磷酸酯、3'-氨基磷酸酯、5'-氨基磷酸酯、己基磷酸酯、磷酸氨基己酯、3'-磷酸酯、5'-氨基、3'-硫代磷酸酯、5'-硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯以及桥接或非桥接甲基磷酸酯或5'-巯基部分(参见例如美国专利号5,998,203;Beaucage等,Tetrahedron 49:1925(1993))。磷酸酯骨架修饰(即,产生修饰的核苷酸间键联)的非限制性实例包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、磷酸三酯、吗啉基、酰胺化、氨基甲酸酯、羧基甲基、乙酰亚氨酸酯(acetamidate)、聚酰胺、磺酸酯、磺酰胺、氨基磺酸酯、甲缩醛、硫代甲缩醛以及烷基甲硅烷基取代(参见例如Hunziker等,Nucleic Acid Analogues:Synthesis and Properties,Modern Synthetic Methods,VCH,331-417(1995);Mesmaeker等,Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides,in Carbohydrate Modifications in Antisense Research,ACS,24-39(1994))。可在siRNA的有义链、反义链或两个链的5'端和/或3'端进行此类化学修饰。这些参考文献的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0216] 在一些实施方案中,siRNA分子的有义和/或反义链可还包含具有约1至约4(例如1、2、3或4)个2'-脱氧核糖核苷酸和/或修饰和未修饰的核苷酸的任何组合的3'端短悬端。例如英国专利号GB 2,397,818B和美国专利公布号20040192626、20050282188以及20070135372中描述了修饰的核苷酸以及可引入siRNA分子中的化学修饰类型的额外实例,所述专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0217] 本文所述的siRNA分子可任选在siRNA的一个或两个链中包含一个或多个非核苷酸。如本文所用,术语“非核苷酸”是指可代替一个或多个包括糖和/或磷酸酯取代的核苷酸单元合并至核酸链中并且允许剩余碱基展现其活性的任何基团或化合物。所述基团或化合物为无碱基的,因为它不含普遍认可的核苷酸碱基,诸如腺苷、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶,并且因此在1'-位置缺乏碱基。

[0218] 在其他实施方案中,siRNA的化学修饰包括使缀合物连接至siRNA分子。缀合物可经由共价连接(诸如可生物降解接头)连接在siRNA的有义和/或反义链的5'和/或3'端。缀合物还可例如通过氨基甲酸酯基或其他键联基团连接至siRNA(参见例如美国专利公布号20050074771、20050043219以及20050158727)。在某些情况下,缀合物为有助于将siRNA递送至细胞中的分子。适合于连接至siRNA的缀合物分子的实例包括但不限于类固醇(诸如胆固醇)、二醇(诸如聚乙二醇(PEG))、人血清白蛋白(HSA)、脂肪酸、类胡萝卜素、萜烯、胆酸、叶酸盐(例如叶酸、叶酸盐类似物及其衍生物)、糖(例如半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺、葡萄糖、甘露糖、果糖、海藻糖等)、磷脂、肽、能够介导细胞摄取的细胞受体的配体以及它们的组合(参见例如美国专利公布号20030130186、20040110296以及20040249178;美国专利号6,753,423)。其他实例包括美国专利公布号20050119470和20050107325中所述的亲脂性部分、维生素、聚合物、肽、蛋白质、核酸、小分子、寡糖、碳水化合物聚集物、嵌插物、小沟结合剂、裂解剂以及交联剂缀合物分子。其他实例包括美国专利公布号20050153337中所述的2'-O-烷基胺、2'-β-烷氧基烷基胺、聚胺、C5-阳离子修饰嘧啶、阳离子肽、胍基、脒基(amidininium group)、阳离子氨基酸缀合物分子。额外的实例包括美国专利公布号20040167090中所述的疏水性基团、膜活性化合物、细胞穿透化合物、细胞靶向信号、相互作用

用改良剂以及空间稳定剂缀合物分子。其他实例包括美国专利公布号20050239739中所述的缀合物分子。可对所用的缀合物类型以及缀合至siRNA分子的程度进行评估,以在保留RNAi活性的同时,获得改善的siRNA的药代动力学型态、生物利用率和/或稳定性。因而,本领域技术人员可使用多种熟知体外细胞培养或体内动物模型中的任一者筛选具有各种相连接的缀合物的siRNA分子,以鉴定具有改善的特性和完全RNAi活性的siRNA分子。上文所述的专利文件的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0219] 靶基因

[0220] 在某些实施方案中,可使用本文所述的脂质纳米粒子的核酸组分(例如siRNA)来下调所关注的基因的翻译(即,表达)或使其沉默。所关注的基因包括但不限于与病毒感染和存活相关的基因、与代谢疾病和病症(例如肝脏疾病和病症)相关的基因、与肿瘤发生和细胞转化(例如癌症)相关的基因、血管生成基因、免疫调节基因(诸如与炎性和自体免疫反应相关的免疫调节基因)、配体受体基因以及与神经退行性病症相关的基因。在某些实施方案中,所关注的基因在肝细胞中表达。

[0221] 与病毒感染和存活相关的基因包括由病毒表达以结合细胞、进入细胞以及在细胞中复制的基因。特别受关注的是与慢性病毒疾病相关的病毒序列。特别受关注的病毒序列包括以下病毒的序列:丝状病毒,诸如埃博拉病毒(Ebola virus)和马伯格氏病毒(Marburg virus)(参见例如Geisbert等,J. Infect. Dis., 193:1650-1657 (2006));沙粒病毒,诸如拉沙病毒(Lassa virus)、胡宁病毒(Junin virus)、马秋波病毒(Machupo virus)、瓜纳里托病毒(Guanarito virus)以及萨比亚病毒(Buchmeier等, *Arenaviridae: the viruses and their replication*, In: *FIELDS VIROLOGY*, Knipe等(编), 第4版, Lippincott-Raven, Philadelphia, (2001));流感病毒,诸如流感A、B以及C病毒(参见例如Steinhauer等, *Annu Rev Genet.*, 36:305-332 (2002);以及Neumann等, *J Gen Virol.*, 83:2635-2662 (2002));肝炎病毒(参见例如Hamasaki等, *FEBS Lett.*, 543:51 (2003);Yokota等, *EMBO Rep.*, 4:602 (2003);Schlomai等, *Hepatology*, 37:764 (2003);Wilson等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:2783 (2003);Kapadia等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:2014 (2003);以及*FIELDS VIROLOGY*, Knipe等(编), 第4版, Lippincott-Raven, Philadelphia (2001));Human Immunodeficiency Virus (HIV) (Banerjee等, *Mol. Ther.*, 8:62 (2003);Song等, *J. Virol.*, 77:7174 (2003);Stephenson, *JAMA*, 289:1494 (2003);Qin等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:183 (2003));Herpes viruses (Jia等, *J. Virol.*, 77:3301 (2003));以及Human Papilloma Viruses (HPV) (Hall等, *J. Virol.*, 77:6066 (2003);Jiang等, *Oncogene*, 21:6041 (2002))。

[0222] 可变得沉默的示例性丝状病毒核酸序列包括但不限于编码结构蛋白(例如VP30、VP35、核蛋白(NP)、聚合酶蛋白(L-pol))以及膜相关蛋白(例如VP40、糖蛋白(GP)、VP24)的核酸序列。埃博拉病毒的完全基因组序列阐述于例如基因库登录号NC-002549;AY769362;NC-006432;NC-004161;AY729654;AY354458;AY142960;AB050936;AF522874;AF499101;AF272001;and AF086833中。埃博拉病毒VP24序列阐述于例如基因库登录号U77385和AY058897中。埃博拉病毒L-pol序列阐述于例如基因库登录号X67110中。埃博拉病毒VP40序列阐述于例如基因库登录号AY058896中。埃博拉病毒NP序列阐述于例如基因库登录号AY058895中。埃博拉病毒GP序列阐述于例如基因库登录号AY058898;Sanchez等, *Virus*

Res., 29:215-240 (1993); Will等, J. Virol., 67:1203-1210 (1993); Volchkov等, FEBS Lett., 305:181-184 (1992); 以及美国专利号6,713,069中。额外的埃博拉病毒序列阐述于例如基因库登录号L11365和X61274中。马伯格氏病毒完全基因组序列阐述于例如基因库登录号NC_001608; AY430365; AY430366; 以及AY358025中。马伯格氏病毒GP序列阐述于例如基因库登录号AF005734; AF005733; 以及AF005732中。马伯格氏病毒VP35序列阐述于例如基因库登录号AF005731和AF005730中。额外的马伯格氏病毒序列阐述于例如基因库登录号X64406; Z29337; AF005735; 以及Z12132中。靶向埃博拉病毒和马伯格氏病毒核酸序列的siRNA分子的非限制性实例包括美国专利公布号20070135370中所述的siRNA分子, 所述专利公布的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0223] 可变得沉默的示例性流感病毒核酸序列包括但不限于编码核蛋白(NP)、基质蛋白(M1和M2)、非结构蛋白(NS1和NS2)、RNA聚合酶(PA、PB1、PB2)、神经氨酸酶(NA)以及血细胞凝集素(HA)的核酸序列。流感A NP序列阐述于例如基因库登录号NC_004522; AY818138; AB166863; AB188817; AB189046; AB189054; AB189062; AY646169; AY646177; AY651486; AY651493; AY651494; AY651495; AY651496; AY651497; AY651498; AY651499; AY651500; AY651501; AY651502; AY651503; AY651504; AY651505; AY651506; AY651507; AY651509; AY651528; AY770996; AY790308; AY818138; 以及AY818140中。流感A PA序列阐述于例如基因库登录号AY818132; AY790280; AY646171; AY818132; AY818133; AY646179; AY818134; AY551934; AY651613; AY651610; AY651620; AY651617; AY651600; AY651611; AY651606; AY651618; AY651608; AY651607; AY651605; AY651609; AY651615; AY651616; AY651640; AY651614; AY651612; AY651621; AY651619; AY770995; 以及AY724786中。靶向流感病毒核酸序列siRNA分子的非限制性实例包括美国专利公布号20070218122中所述的siRNA分子, 所述专利公布的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0224] 可变得沉默的示例性肝炎病毒核酸序列包括但不限于参与转录和翻译的核酸序列(例如En1、En2、X、P)以及编码结构蛋白(例如包括C蛋白和C相关蛋白的核心蛋白、衣壳以及包括S、M和/或L蛋白的包膜蛋白, 或其片段)的核酸序列(参见例如FIELD'S VIROLOGY, 同上)。可变得沉默的示例性C型肝炎病毒(HCV)核酸序列包括但不限于5'-未翻译区(5'-UTR)、3'-未翻译区(3'-UTR)、聚蛋白翻译起始密码子区域、内部核糖体进入位点(IRES)序列和/或编码核心蛋白、E1蛋白、E2蛋白、p7蛋白、NS2蛋白质、NS3蛋白酶/解旋酶、NS4A蛋白、NS4B蛋白、NS5A蛋白质和/或NS5B RNA依赖性RNA聚合酶的核酸序列。HCV基因组序列阐述于例如基因库登录号NC-004102 (HCV基因型1a)、AJ238799 (HCV基因型1b)、NC-009823 (HCV基因型2)、NC-009824 (HCV基因型3)、NC-009825 (HCV基因型4)、NC-009826 (HCV基因型5)以及NC-009827 (HCV基因型6)中。A型肝炎病毒核酸序列阐述于例如基因库登录号NC-001489中; B型肝炎病毒核酸序列阐述于例如基因库登录号NC-003977中; D型肝炎病毒核酸序列阐述于例如基因库登录号NC-001653中; E型肝炎病毒核酸序列阐述于例如基因库登录号NC-001434中; 并且G型肝炎病毒核酸序列阐述于例如基因库登录号NC-001710中。可适宜地将使编码与病毒感染和存活相关的基因的序列沉默与施用用于治疗病毒疾患的常规剂组合使用。靶向肝炎病毒核酸序列的siRNA分子的非限制性实例包括美国专利公布号20060281175、20050058982以及20070149470; 美国专利号7,348,314; 以及2009年3月20日提交的美国临时申请号61/162,127中所述的siRNA分子, 所述专利的公开内容出于所有目

的以全文引用的方式并入本文中。

[0225] 与代谢疾病和病症相关的基因(例如其中靶向肝脏的病症以及肝脏疾病和病症)包括例如在血脂异常(例如肝X受体,诸如LXR α 和LXR β (基因库登录号NM-007121)、法呢醇X受体(farnesoid X receptor, FXR)(基因库登录号NM-005123)、固醇调控元件结合蛋白(SREBP)、位点-1蛋白酶(SIP)、3-羟基-3-甲基戊二酰基辅酶-A还原酶(HMG辅酶-A还原酶)、载脂蛋白B(ApoB)(基因库登录号NM-000384)、载脂蛋白CIII(ApoC3)(基因库登录号NM-000040和NG-008949区域:5001.8164)以及载脂蛋白E(ApoE)(基因库登录号NM-000041和NG-007084区域:5001.8612));以及糖尿病(例如葡萄糖6-磷酸酶)中表达的基因(参见例如Forman等,Cell,81:687(1995);Seol等,Mol.Endocrinol.,9:72(1995),Zavacki等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,94:7909(1997);Sakai等,Cell,85:1037-1046(1996);Duncan等,J.Biol.Chem.,272:12778-12785(1997);Willy等,Genes Dev.,9:1033-1045(1995);Lehmann等,J.Biol.Chem.,272:3137-3140(1997);Janowski等,Nature,383:728-731(1996);以及Peet等,Cell,93:693-704(1998))。本领域技术人员将理解,与代谢疾病和病症(例如其中靶向肝脏的疾病和病症以及肝脏疾病和病症)相关的基因包括在肝脏本身中表达的基因以及其他器官和组织中表达的基因。可适宜地将使编码与代谢疾病和病症相关的基因的序列沉默与施用用于治疗所述疾病或病症的常规剂组合使用。靶向ApoB基因的siRNA分子的非限制性实例包括美国专利公布号20060134189中所述的siRNA分子,所述专利公布的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。靶向ApoC3基因的siRNA分子的非限制性实例包括2009年1月26日提交的美国临时申请号61/147,235中所述的siRNA分子,所述临时申请的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0226] 与肿瘤发生和细胞转化(例如癌症或其他瘤变)相关的基因序列的实例包括有丝分裂驱动蛋白,诸如Eg5(KSP、KIF11;基因库登录号NM-004523);丝氨酸/苏氨酸激酶,诸如polo样激酶1(PLK-1)(基因库登录号NM-005030;Barr等,Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.,5:429-440(2004));酪氨酸激酶,诸如WEE1(基因库登录号NM-003390和NM-001143976);凋亡抑制剂,诸如XIAP(基因库登录号NM-001167);COP9信号转导体亚单位,诸如CSN1、CSN2、CSN3、CSN4、CSN5(JAB1;基因库登录号NM-006837);CSN6、CSN7A、CSN7B以及CSN8;泛素连接酶,诸如COP1(RFWD2;基因库登录号NM-022457和NM-001001740);以及组蛋白去乙酰酶,诸如HDAC1、HDAC2(基因库登录号NM-001527)、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8、HDAC9等。靶向Eg5和XIAP基因的siRNA分子的非限制性实例包括2007年5月29日提交的美国专利申请序列号11/807,872中所述的siRNA分子,所述专利申请的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。靶向PLK-1基因的siRNA分子的非限制性实例包括美国专利公布号20050107316和20070265438;以及2008年12月23日提交的美国专利申请序列号12/343,342中所述的siRNA分子,所述专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。靶向CSN5基因的siRNA分子的非限制性实例包括2008年4月15日提交的美国临时申请号61/045,251中所述的siRNA分子,所述临时申请的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0227] 与肿瘤发生和细胞转化相关的基因序列的额外实例包括转位序列,诸如MLL融合基因、BCR-ABL(Wilda等,Oncogene,21:5716(2002);Scherr等,Blood,101:1566(2003))、TEL-AML1、EWS-FLI1、TLS-FUS、PAX3-FKHR、BCL-2、AML1-ETO以及AML1-MTG8(Heidenreich

等, Blood, 101:3157 (2003)); 过表达序列, 诸如多药抗性基因 (Nieth等, FEBS Lett., 545:144 (2003); Wu等, Cancer Res. 63:1515 (2003))、周期蛋白 (Li等, Cancer Res., 63:3593 (2003); Zou等, Genes Dev., 16:2923 (2002))、 β -连环蛋白 (Verma等, Clin Cancer Res., 9:1291 (2003))、端粒酶基因 (Kosciolek等, Mol Cancer Ther., 2:209 (2003))、c-MYC、N-MYC、BCL-2、生长因子受体 (例如EGFR/ErbB1 (基因库登录号NM-005228、NM-201282、NM-201283以及NM-201284; 还参见Nagy等Exp. Cell Res., 285:39-49 (2003)、ErbB2/HER-2 (基因库登录号NM-004448和NM-001005862)、ErbB3 (基因库登录号NM-001982和NM-001005915) 以及ErbB4 (基因库登录号NM-005235和NM-001042599)); 以及突变序列, 诸如RAS (在Tuschl和Borkhardt, Mol. Interventions, 2:158 (2002) 中综述)。靶向EGFR基因的siRNA分子的非限制性实例包括2007年5月29日提交的美国专利申请序列号11/807,872中所述的siRNA分子, 所述专利申请的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0228] 使编码DNA修复酶的序列沉默可与施用化学治疗剂组合使用 (Collis等, Cancer Res., 63:1550 (2003))。编码与肿瘤迁移相关的蛋白质的基因也是所关注的靶序列, 例如整合素、选择素以及金属蛋白酶。前述实例不为排他性的。本领域技术人员将理解, 可包括有助于或促进肿瘤发生或细胞转化、肿瘤生长或肿瘤迁移的任何整个或部分基因序列作为模板序列。

[0229] 血管生成基因能够促进形成新的血管。特别受关注的是血管内皮生长因子 (VEGF) (Reich等, Mol. Vis., 9:210 (2003)) 或VEGFR。靶向VEGFR的siRNA序列阐述于例如GB 2396864; 美国专利公布号20040142895; 以及CA 2456444中, 所述专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0230] 抗血管生成基因能够抑制新血管形成。这些基因特别可用于治疗其中血管生成在疾病的病理发展中起作用的那些癌症。抗血管生成基因的实例包括但不限于内皮抑素 (参见例如美国专利号6,174,861)、血管抑素 (参见例如美国专利号5,639,725) 以及VEGFR2 (参见例如Decaussin等, J. Pathol., 188:369-377 (1999)), 所述参考文献的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0231] 免疫调节基因为调节一种或多种免疫反应的基因。免疫调节基因的实例包括但不限于细胞因子, 诸如生长因子 (例如TGF- α 、TGF- β 、EGF、FGF、IGF、NGF、PDGF、CGF、GM-CSF、SCF等)、白介素 (例如IL-2、IL-4、IL-12 (Hill等, J. Immunol., 171:691 (2003))、IL-15、IL-18、IL-20等)、干扰素 (例如IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 等) 以及TNF。Fas和Fas配体基因也是所关注的免疫调节剂靶序列 (Song等, Nat. Med., 9:347 (2003))。编码造血和淋巴样细胞中的第二信号分子的基因也包括在本发明中, 例如Tec家族激酶, 诸如布鲁顿酪氨酸激酶 (Bruton's tyrosine kinase, Btk) (Heinonen等, FEBS Lett., 527:274 (2002))。

[0232] 细胞受体配体包括能够结合至细胞表面受体 (例如胰岛素受体、EPO受体、G蛋白偶联受体、具有酪氨酸激酶活性的受体、细胞因子受体、生长因子受体等)、调节 (例如抑制、活化等) 受体参与的生理路径 (例如葡萄糖水平调节、血细胞发育、有丝分裂发生等) 的配体。细胞受体配体的实例包括但不限于细胞因子、生长因子、白介素、干扰素、红细胞生成素 (EPO)、胰岛素、胰高血糖素、G蛋白偶联受体配体等。编码三核苷酸重复 (例如CAG重复) 的扩增的模板可用于使由三核苷酸重复的扩增引起的神经退行性病症 (诸如脊髓延髓肌肉萎缩 (spinobulbular muscular atrophy) 和亨廷顿氏病 (Huntington's Disease)) 中的病原序

列沉默(Caplen等,Hum.Mol.Genet.,11:175(2002))。

[0233] 可由核酸(例如由siRNA)靶向以下调基因表达或使基因表达沉默的某些其他靶基因包括但不限于主动脉平滑肌肌动蛋白 $\alpha 2$ (Actin,Alpha 2,Smooth Muscle,Aorta)(ACTA2)、乙醇脱氢酶1A(ADH1A)、乙醇脱氢酶4(ADH4)、乙醇脱氢酶6(ADH6)、Afamin(AFM)、血管紧张素原(AGT)、丝氨酸-丙酮酸氨基转移酶(AGXT)、 α -2-HS-糖蛋白(AHSG)、醛酮还原酶家族1成员C4(AKR1C4)、血清白蛋白(ALB)、 α -1-微球蛋白/bikunin前体(AMBP)、血管生成素相关蛋白3(ANGPTL3)、血清淀粉样蛋白P组分(APCS)、载脂蛋白A-II(APOA2)、载脂蛋白B-100(APOB)、载脂蛋白C3(APOC3)、载脂蛋白C-IV(APOC4)、载脂蛋白F(APOF)、 β -2-糖蛋白1(APOH)、水通道蛋白-9(AQP9)、胆酸-辅酶A:氨基酸N-酰基转移酶(BAAT)、C4b结合蛋白 β 链(C4BPB)、由LINC01554编码的假定未表征蛋白(C5orf27)、补体因子3(C3)、补体因子5(C5)、补体组分C6(C6)、补体组分C8 α 链(C8A)、补体组分C8 β 链(C8B)、补体组分C8 γ 链(C8G)、补体组分C9(C9)、钙调素结合转录活化剂1(CAMTA1)、CD38(CD38)、补体因子B(CFB)、补体因子H-相关蛋白1(CFHR1)、补体因子H-相关蛋白2(CFHR2)、补体因子H-相关蛋白3(CFHR3)、大麻素受体1(CNR1)、血浆铜蓝蛋白(CP)、羧肽酶B2(CPB2)、结缔组织生长因子(CTGF)、C-X-C基序趋化因子2(CXCL2)、细胞色素P450 1A2(CYP1A2)、细胞色素P450 2A6(CYP2A6)、细胞色素P450 2C8(CYP2C8)、细胞色素P450 2C9(CYP2C9)、细胞色素P450家族2亚家族D成员6(CYP2D6)、细胞色素P450 2E1(CYP2E1)、叶绿醌 ω -羟化酶CYP4F2(CYP4F2)、7- α -羟基胆甾-4-烯-3-酮12- α -羟化酶(CYP8B1)、二肽基肽酶4(DPP4)、凝血因子12(F12)、凝血因子II(凝血酶)(F2)、凝血因子IX(F9)、纤维蛋白原 α 链(FGA)、纤维蛋白原 β 链(FGB)、纤维蛋白原 γ 链(FGG)、纤维蛋白原样蛋白1(FGL1)、含黄素的单加氧酶3(FMO3)、含黄素的单加氧酶5(FMO5)、组特异性组分(维生素D结合蛋白)(GC)、生长激素受体(GHR)、甘氨酸N-甲基转移酶(GNMT)、玻尿酸结合蛋白2(HABP2)、铁调素抗微生物肽(HAMP)、羟基酸氧化酶(羟乙酸盐氧化酶)1(HAO1)、HGF活化剂(HGFAC)、结合珠蛋白相关蛋白;结合珠蛋白(HPR)、血红素结合蛋白(HPX)、富组氨酸糖蛋白(HRG)、羟基类固醇(11- β)脱氢酶1(HSD11B1)、羟基类固醇(17- β)脱氢酶13(HSD17B13)、间 α -胰蛋白酶抑制剂重链H1(ITIH1)、间 α -胰蛋白酶抑制剂重链H2(ITIH2)、间 α -胰蛋白酶抑制剂重链H3(ITIH3)、间 α -胰蛋白酶抑制剂重链H4(ITIH4)、前激肽释放酶(KLKB1)、乳酸脱氢酶A(LDHA)、肝脏表达的抗微生物肽2(LEAP2)、白细胞源性趋化因子2(LECT2)、脂蛋白(a)(LPA)、甘露聚糖结合凝集素丝氨酸肽酶2(MASP2)、S-腺苷甲硫氨酸合酶同种型-1(MAT1A)、NADPH氧化酶4(NOX4)、聚[ADP-核糖]聚合酶1(PARP1)、对氧磷脂酶1(PON1)、对氧磷脂酶3(PON3)、维生素K依赖性蛋白C(PROC)、视黄醇脱氢酶16(RDH16)、组成性血清淀粉样蛋白A4(SAA4)、丝氨酸脱水酶(SDS)、丝氨酸蛋白酶抑制剂家族A成员1(SERPINA1)、丝氨酸蛋白酶抑制剂A11(SERPINA11)、人源性激肽释放酶结合蛋白(SERPINA4)、皮质类固醇结合球蛋白(SERPINA6)、抗凝血酶-III(SERPINC1)、肝素辅因子2(SERPIND1)、丝氨酸蛋白酶抑制剂家族H成员1(SERPINH1)、溶质载体家族5成员2(SLC5A2)、钠/胆酸协同转运蛋白(SLC10A1)、溶质载体家族13成员5(SLC13A5)、溶质载体家族22成员1(SLC22A1)、溶质载体家族25成员47(SLC25A47)、溶质载体家族2、易化葡萄糖转运蛋白成员2(SLC2A2)、钠偶联中性氨基酸转运蛋白4(SLC38A4)、溶质载体有机阴离子转运蛋白家族成员1B1(SLC01B1)、神经鞘磷脂磷酸二酯酶1(SMPD1)、胆汁盐磺基转移酶(SULT2A1)、酪氨酸氨基转移酶(TAT)、色氨酸2,3-双加氧酶(TDO2)、UDP葡萄糖醛酸基转移酶2家族多肽B10

(UGT2B10)、UDP葡萄糖醛酸基转移酶2家族多肽B15 (UGT2B15)、UDP葡萄糖醛酸基转移酶2家族多肽B4 (UGT2B4) 以及玻连蛋白 (VTN)。

[0234] 除了出于治疗目的使任何上述基因的表达沉默以外,本文所述的某些核酸(例如siRNA)还可用于研究和开发应用以及诊断、预防、预后、临床以及其他健康护理应用。作为非限制性实例,某些核酸(例如siRNA)可用于以测试所关注的基因是否具有作为治疗靶标的潜能为目的的靶标验证研究中。某些核酸(例如siRNA)还可用于旨在发现基因因为潜在治疗靶标的靶标鉴定研究中。

[0235] CRISPR

[0236] 靶向基因组编辑已从壁龛技术发展由许多生物研究者使用的方法。成簇的规律间隔的短回文重复序列 (CRISPR) 技术的出现极大地推进此进展 (参见例如Sander等, *Nature Biotechnology*, 32 (4), 347-355, 包括附加信息 (2014) 以及国际公布号W0 2016/197132和W0 2016/197133)。因此,本文提供了可与CRISPR技术组合使用来治疗疾病(诸如HBV)的改善方案(例如脂质纳米粒子和其制剂)。考虑到使用CRISPR的目标,可将CRISPR技术中使用的引导RNA (gRNA) 设计成靶向例如HBV基因组的具体鉴定的序列,例如靶基因。国际公布号W0 2016/197132中提供了此类靶序列的实例。另外,国际公布号W0 2013/151665 (例如参见表6;该文件特定地以引用的方式并入本文中,尤其包括表6,以及相关序列列表)描述了在mRNA表达构建体的情形下所要求的约35,000个mRNA序列。本发明的某些实施方案利用CRISPR技术来靶向这些序列中的任一者的表达。本发明的某些实施方案还可利用CRISPR技术来靶向本文论述的靶基因的表达。

[0237] aiRNA

[0238] 像siRNA一样,不对称干扰RNA (aiRNA) 可招募RNA诱导沉默复合体 (RISC) 并且通过相对于反义链的5'端介导靶序列中核苷酸10与11之间的序列的特异性裂解引起哺乳动物细胞中多种基因的有效沉默 (Sun等, *Nat. Biotech.*, 26:1379-1382 (2008))。通常,aiRNA分子包含具有有义链和反义链的短RNA双链体,其中双链体在反义链的3'端和5'端含有短悬端。aiRNA通常为非对称的,因为当与互补反义链相比时,两个末端的有义链较短。在一些方面中,可在与siRNA分子所用的条件类似的条件下对aiRNA分子进行设计、合成以及退火。作为非限制性实例,可使用上文针对选择siRNA序列所述的方法来选择和产生aiRNA序列。

[0239] 在另一实施方案中,可将各种长度(例如约10-25、12-20、12-19、12-18、13-17或14-17个碱基对,更通常12、13、14、15、16、17、18、19或个碱基对)的aiRNA双链体设计成在反义链的3'端和5'端具有短悬端以靶向所关注的mRNA。在某些情况下,aiRNA分子的有义链的长度为约10-25、12-20、12-19、12-18、13-17或14-17个核苷酸,更通常长度为12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷酸。在某些其他情况下,aiRNA分子的反义链的长度为约15-60、15-50或15-40个核苷酸,更通常长度为约15-30、15-25或19-25个核苷酸,并且优选地长度为约20-24、21-22或21-23个核苷酸。

[0240] 在一些实施方案中,5'反义短悬端含有一个、两个、三个、四个或更多个非靶向核苷酸(例如“AA”、“UU”,“dTdT”等)。在其他实施方案中,3'反义短悬端含有一个、两个、三个、四个或更多个非靶向核苷酸(例如“AA”、“UU”、“dTdT”等)。在某些方面中,本文所述的aiRNA分子可例如在双链(双链体)区域中和/或反义短悬端中包含一个或多个修饰的核苷酸。作为非限制性实例,aiRNA序列可包含上文针对siRNA序列所述的修饰的核苷酸中的一者或多

者。在一个优选实施方案中,aiRNA分子包含2'OMe核苷酸,诸如2'OMe-鸟苷核苷酸、2'OMe-尿苷核苷酸或它们的混合物。

[0241] 在某些实施方案中,aiRNA分子可包含对应于siRNA分子(例如本文所述的siRNA分子中的一者)的反义链的反义链。在其他实施方案中,可使用aiRNA分子来使上文所阐述的靶基因中的任一者的表达沉默,诸如与病毒感染和存活相关的基因、与代谢疾病和病症相关的基因、与肿瘤发生和细胞转化相关的基因、血管生成基因、免疫调节基因(诸如与炎性和自体免疫反应相关的基因)、配体受体基因以及与神经退行性病症相关的基因。

[0242] miRNA

[0243] 通常,微RNA(miRNA)为调控基因表达的长度为约21-23个核苷酸的单链RNA分子。miRNA由从其转录DNA的基因编码,但miRNA不翻译成蛋白质(非编码RNA);替代地,各主要转录物(前miRNA)被加工成称为前体miRNA的短茎-环结构并且最后加工成功能性成熟miRNA。成熟miRNA分子部分或完全与一个或多个信使RNA(mRNA)分子互补,并且其主要功能为使基因表达下调。例如Lagos-Quintana等*Science*,294:853-858;Lau等,*Science*,294:858-862;以及Lee等,*Science*,294:862-864中描述了miRNA分子的鉴定。

[0244] 编码miRNA的基因比所加工的成熟miRNA分子长得多。miRNA首先转录为主要转录物或具有盖帽和poly-A尾部的miRNA前体并且在细胞核中加工成短的约70个核苷酸的称为前体miRNA的茎-环结构。在动物中此加工通过称为微加工剂复合物的蛋白质复合体来进行,所述微加工剂复合体由核酸酶Drosha和双链RNA结合蛋白Pasha组成(Denli等,*Nature*,432:231-235(2004))。然后在细胞质中这些前体miRNA通过与核酸内切酶Dicer相互作用被加工成成熟miRNA,所述核酸内切酶Dicer还引起了RNA诱导沉默复合体(RISC)的形成(Bernstein等,*Nature*,409:363-366(2001))。DNA的有义链或反义链可充当模板从而产生miRNA。

[0245] 当Dicer裂解前体miRNA茎-环时,形成两个互补短RNA分子,但仅一个被整合至RISC复合体中。这个链称为引导链并且由RISC复合体中的催化活性RNA酶argonaute蛋白基于5'端的稳定性而选择((Preall等,*Curr.Biol.*,16:530-535(2006))。剩下的链称为抗引导或随从链,它被降解为RISC复合体底物(Gregory等,*Cell*,123:631-640(2005))。在整合至活性RISC复合体中之后,miRNA与其互补mRNA分子碱基配对并且诱导靶mRNA降解和/或翻译沉默。

[0246] 哺乳动物miRNA分子通常与靶mRNA序列的3'UTR中的位点互补。在某些情况下,miRNA退火至靶mRNA通过阻断蛋白质翻译机构而抑制蛋白质翻译。在某些其他情况下,miRNA退火至靶mRNA通过类似于RNA干扰(RNAi)的方法促进靶mRNA的裂解和降解。miRNA还可靶向对应于所靶向的mRNA的基因组位点的甲基化。通常,miRNA与统称为miRNP的蛋白质补体结合发挥功能。

[0247] 在某些方面中,本文所述的miRNA分子的长度为约15-100、15-90、15-80、15-75、15-70、15-60、15-50或15-40个核苷酸,更通常长度为约15-30、15-25或19-25个核苷酸,并且优选地长度为约20-24、21-22或21-23个核苷酸。在某些其他方面中,miRNA分子可包含一个或多个修饰的核苷酸。作为非限制性实例,miRNA序列可包含上文针对siRNA序列所述的修饰的核苷酸中的一者或多者。在一个优选实施方案中,miRNA分子包含2'OMe核苷酸,诸如2'OMe-鸟苷核苷酸、2'OMe-尿苷核苷酸或它们的混合物。

[0248] 在一些实施方案中,可使用miRNA分子来使上文所阐述的靶基因中的任一者的表达沉默,诸如与病毒感染和存活相关的基因、与代谢疾病和病症相关的基因、与肿瘤发生和细胞转化相关的基因、血管生成基因、免疫调节基因(诸如与炎性和自体免疫反应相关的基因)、配体受体基因以及与神经退行性病症相关的基因。

[0249] 在其他实施方案中,使用本发明的脂质粒子(例如脂质纳米粒子)来施用阻断靶向所关注的mRNA的miRNA的活性的一种或多种剂。阻断剂的实例包括但不限于空间阻断寡核苷酸、锁核酸寡核苷酸以及吗啉基寡核苷酸。此类阻断剂可直接结合至miRNA或靶mRNA上的miRNA结合位点。

[0250] 反义寡核苷酸

[0251] 在一个实施方案中,核酸为针对所关注的靶基因或序列的反义寡核苷酸。术语“反义寡核苷酸”或“反义”包括与靶向的多核苷酸序列互补的寡核苷酸。反义寡核苷酸为与所选序列互补的DNA或RNA的单链。反义RNA寡核苷酸通过结合至RNA来阻止互补RNA链的翻译。可使用反义DNA寡核苷酸来靶向特定互补(编码或非编码)RNA。如果发生结合,那么此DNA/RNA杂合物可由RNA酶H降解。在一个特定实施方案中,反义寡核苷酸包含约10至约60个核苷酸,更优选地约15至约30个核苷酸。所述术语还涵盖可能不完全与所需靶基因互补的反义寡核苷酸。因此,在其中在反义情况下发现非靶标特异性活性或其中含有与靶序列的一个或多个错配的反义序列对于特定用途来说最优选的情况下,可使用本发明。

[0252] 反义寡核苷酸已被证实为有效并且靶向型的蛋白质合成抑制剂,并且因此可用于特异性地抑制由所靶向的基因合成蛋白质。反义寡核苷酸抑制蛋白质合成的功效为充分确立的。举例来说,聚半乳糖醛酸酶和蝇蕈碱2型乙酰胆碱受体的合成受到针对相应mRNA序列的反义寡核苷酸的抑制(参见美国专利号5,739,119和5,759,829)。此外,在核蛋白周期蛋白、多耐药性基因(MDR1)、ICAM-1、E-选择素、STK-1、纹状体GABAA受体以及人EGF情况下展现出反义抑制的实例(参见Jaskulski等, *Science*, 240:1544-6(1988); Vasanthakumar等, *Cancer Commun.*, 1:225-32(1989); Penis等, *Brain Res Mol Brain Res.*, 15:57:310-20(1998); 以及美国专利号5,801,154; 5,789,573; 5,718,709以及5,610,288)。此外,还已描述反义构建体抑制并且可用于治疗多种异常细胞增殖,例如癌症(参见美国专利号5,747,470; 5,591,317; 以及5,783,683)。这些参考文献的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0253] 产生反义寡核苷酸的方法为本领域中已知的并且可容易地适合于产生靶向任何多核苷酸序列的反义寡核苷酸。对给定靶序列具特异性的反义寡核苷酸序列的选择是基于所选靶序列的分析以及二级结构、 T_m 、结合能以及相对稳定性的测定。可基于相对不能形成二聚体、发夹或其他二级结构从而将减少或阻止与宿主细胞中靶mRNA的特异性结合来选择反义寡核苷酸。mRNA的高度优选的靶区域包括在AUG翻译起始密码子处或附近的那些区域以及与mRNA的5'区域基本上互补的那些序列。这些二级结构分析和目标位点选择考虑可例如使用OLIGO引物分析软件第4版(Molecular Biology Insights)和/或BLASTN 2.0.5算法软件(Altschul等, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-402(1997))来进行。

[0254] 核糖酶

[0255] 根据本发明的另一实施方案,脂质纳米粒子与核糖酶相缔合。核糖酶为含有具有核酸内切酶活性的特定催化结构域的RNA-蛋白质复合物(参见Kim等,

Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,84:8788-92(1987);以及Forster等,Cell,49:211-20(1987)。举例来说,大量核糖酶以高特异性程度加快磷酸酯转移反应,常常仅裂解寡核苷酸底物中的若干磷酸酯中的一者(参见Cech等,Cell,27:487-96(1981);Michel等,J.Mol.Biol.,216:585-610(1990);Reinhold-Hurek等,Nature,357:173-6(1992))。此特异性是归因于需要底物在化学反应之前经由特定碱基配对相互作用结合至核糖酶的内部引导序列(“IGS”)。

[0256] 目前已知至少六种基本种类的天然存在的酶促RNA分子。每一者均可在生理条件下催化RNA磷酸二酯键的反式水解(并且因此可裂解其他RNA分子)。一般来说,酶促核酸通过首先结合至靶RNA来起作用。此类结合通过酶促核酸的靶标结合部分来进行,所述靶标结合部分保持非常靠近起裂解靶RNA的作用的分子的酶促部分。因此,酶促核酸首先识别靶RNA,然后通过互补碱基配对结合靶RNA,并且在结合至恰当位点后,以酶促方式起作用从而切割靶RNA。此类靶RNA的战略裂解将破坏其直接合成所编码蛋白质的能力。在酶促核酸已结合和裂解其RNA靶标之后,它由所述RNA释放,从而搜寻另一靶标并且可重复地结合和裂解新的靶标。

[0257] 酶促核酸分子可在例如锤头、发夹、肝炎δ病毒、I型内含子或RNA酶P RNA(与RNA引导序列结合)或脉孢菌属(Neurospora)VS RNA基序中形成。例如Rossi等,Nucleic Acids Res.,20:4559-65(1992)中描述了锤头基序的具体实例。例如EP 0360257,Hampel等,Biochemistry,28:4929-33(1989);Hampel等,Nucleic Acids Res.,18:299-304(1990);以及美国专利号5,631,359中描述了发夹基序的实例。例如Perrotta等,Biochemistry,31:11843-52(1992)中描述了肝炎δ病毒基序的实例。例如Guerrier-Takada等,Cell,35:849-57(1983)中描述了RNA酶P基序的实例。例如Saville等,Cell,61:685-96(1990);Saville等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:8826-30(1991);Collins等,Biochemistry,32:2795-9(1993)中描述了脉孢菌属VS RNA核糖酶基序的实例。例如美国专利号4,987,071中描述了I型内含子的实例。根据本发明使用的酶促核酸分子的重要特征为它们具有特异性底物结合位点,所述特异性底物结合位点与靶基因DNA或RNA区域中的一者或多者互补,并且它们在所述底物结合位点内或周围具有赋予分子RNA裂解活性的核苷酸序列。因此,核糖酶构建体无需限于本文提到的特定基序。这些参考文献的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0258] 产生靶向任何多核苷酸序列的核糖酶的方法为本领域中已知的。可如例如PCT公布号W0 93/23569和W0 94/02595中所述来设计核糖酶,并且进行合成以如其中所述在体外和/或体内进行测试。这些PCT公布的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0259] 可通过改变核糖酶结合臂的长度或化学合成具有防止由血清核糖核酸酶降解的修饰(参见例如PCT公布号W0 92/07065、W0 93/15187、W0 91/03162以及W0 94/13688;EP 92110298.4;以及美国专利号5,334,711,所述专利描述了可对酶促RNA分子的糖部分进行的各种化学修饰,所述专利的公开内容各自出于所有目的以全文引用的方式并入本文中)、增强其在细胞中的功效的修饰以及移除茎II碱基以缩短RNA合成时间并且降低化学要求的核糖酶对核糖酶活性进行优化。

[0260] 免疫刺激寡核苷酸

[0261] 与本发明的脂质粒子相关的核酸可为免疫刺激性的,包括当向受试者施用时能够诱导免疫反应的免疫刺激寡核苷酸(ISS;单链或双链),所述受试者可为哺乳动物,诸如人。ISS包括例如某些回文序列,从而产生发夹二级结构(参见Yamamoto等,J.Immunol.,148:4072-6(1992)),或CpG基序,以及其他已知ISS特征(诸如多G结构域;参见PCT公布号W0 96/11266,所述公布的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中)。

[0262] 当不需要免疫刺激核酸特异性地结合至靶序列并且降低其表达以引起免疫反应时,将免疫刺激核酸视为非序列特异性的。因此,某些免疫刺激核酸可包含对应于天然存在的基因或mRNA的区域的序列,但它们仍可被认为是非序列特异性免疫刺激核酸。

[0263] 在一个实施方案中,免疫刺激核酸或寡核苷酸包含至少一个CpG二核苷酸。寡核苷酸或CpG二核苷酸可为未甲基化的或甲基化的。在另一实施方案中,免疫刺激核酸包含具有甲基化胞嘧啶的至少一个CpG二核苷酸。在一个实施方案中,核酸包含单个CpG二核苷酸,其中CpG二核苷酸中的胞嘧啶为甲基化的。在一个替代实施方案中,核酸包含至少两个CpG二核苷酸,其中CpG二核苷酸中的至少一个胞嘧啶为甲基化的。在另一实施方案中,存在于序列中的CpG二核苷酸中的每个胞嘧啶为甲基化的。在另一实施方案中,核酸包含多个CpG二核苷酸,其中CpG二核苷酸中的至少一者包含甲基化胞嘧啶。2008年12月31日提交的PCT申请号PCT/US08/88676、PCT公布号W0 02/069369和W0 01/15726、美国专利号6,406,705以及Raney等,J.Pharm.Exper.Ther.,298:1185-92(2001)中描述了适合用于本发明的组合物和方法中的免疫刺激寡核苷酸的实例,所述参考文献的公开内容各自出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法中所用的寡核苷酸具有磷酸二酯(“PO”)骨架或硫代磷酸酯(“PS”)骨架和/或CpG基序中的至少一个甲基化胞嘧啶残基。

[0264] mRNA

[0265] 本发明的某些实施方案提供了可用于在活细胞(例如人体内的细胞)中表达一种或多种mRNA分子的组合物和方法。mRNA分子编码要在活细胞内表达的一种或多种多肽。在一些实施方案中,多肽在患病的有机体(例如哺乳动物,诸如人)内表达,并且多肽的表达改善疾病的一种或多种症状。本发明的组合物和方法特别可用于治疗由人体内不存在功能多肽或其水平降低引起的人类疾病。因此,在某些实施方案中,LNP可包含一种或多种核酸分子,诸如一种或多种mRNA分子(例如mRNA分子的混合物)。

[0266] 在一些实施方案中,将一个或多个mRNA完全封装于核酸-脂质粒子(例如LNP)中。就包含mRNA混合物的制剂来说,可将存在于混合物中的不同类型的mRNA种类(例如具有不同序列的mRNA)共封装于相同粒子中,或可将存在于混合物中的每种类型的mRNA物质封装在单独的粒子中。可使用相同、类似或不同浓度或摩尔比的两种或更多种个别mRNA(各自具有独特序列)的混合物将mRNA混合物配制在本文所述的粒子中。在一个实施方案中,使用相同、类似或不同浓度或摩尔比的每种mRNA种类来配制mRNA的混合物(对应于具有不同序列的多个mRNA),并且将不同类型的mRNA共封装在相同粒子中。在另一实施方案中,以相同、类似或不同mRNA浓度或摩尔比将存在于混合物中的每种类型的mRNA种类封装在不同粒子中,并且将因此形成的粒子(各自含有不同mRNA有效负荷)单独施用(例如根据治疗方案在不同时期),或加以组合并且作为单个单位剂量(例如使用药学上可接受的载体)一起施用。本文所述的粒子为血清稳定的,对核酸酶降解具抗性,并且对哺乳动物(诸如人)基本上无毒。

[0267] 对mRNA的修饰

[0268] 用于实践本发明的mRNA可包括一个、两个或超过两个核苷修饰。在一些实施方案中,相对于对应未修饰的mRNA,修饰的mRNA在mRNA引入其中的细胞中展现降低的降解。

[0269] 在一些实施方案中,修饰的核苷包括吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮杂-尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫尿苷、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羟基尿苷、3-甲基尿苷、5-羧基甲基-尿苷、1-羧基甲基-假尿苷、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸甲基尿苷、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷、1-牛磺酸甲基-4-硫代-尿苷、5-甲基-尿苷、1-甲基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-去氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-去氮-假尿苷、二氢尿苷、二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-甲氧基尿苷、2-甲氧基-4-硫代-尿苷、4-甲氧基-假尿苷以及4-甲氧基-2-硫代-假尿苷。

[0270] 在一些实施方案中,修饰的核苷包括5-氮杂-胞苷、假异胞苷、3-甲基-胞苷、N4-乙酰胞苷、5-甲酰基胞苷、N4-甲基胞苷、5-羟甲基胞苷、1-甲基-假异胞苷、吡咯并-胞苷、吡咯并-假异胞苷、2-硫代-胞苷、2-硫代-5-甲基-胞苷、4-硫代-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-1-去氮-假异胞苷、1-甲基-1-去氮-假异胞苷、泽布拉林(zebularine)、5-氮杂-泽布拉林、5-甲基-泽布拉林、5-氮杂-2-硫代-泽布拉林、2-硫代-泽布拉林、2-甲氧基-胞苷、2-甲氧基-5-甲基-胞苷、4-甲氧基-假异胞苷以及4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷。

[0271] 在其他实施方案中,修饰的核苷包括2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、7-去氮-腺嘌呤、7-去氮-8-氮杂-腺嘌呤、7-去氮-2-氨基嘌呤、7-去氮-8-氮杂-2-氨基嘌呤、7-去氮-2,6-二氨基嘌呤、7-去氮-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、1-甲基腺苷、N6-甲基腺苷、N6-异戊烯基腺苷、N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷、2-甲硫基-N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷、N6-缩水甘油基氨基甲酰基腺苷、N6-苏氨酰基氨基甲酰基腺苷、2-甲硫基-N6-苏氨酰基氨基甲酰基腺苷、N6,N6-二甲基腺苷、7-甲基腺嘌呤、2-甲硫基-腺嘌呤以及2-甲氧基-腺嘌呤。

[0272] 在具体实施方案中,修饰的核苷为5'-0-(1-硫代磷酸酯)-腺苷、5'-0-(1-硫代磷酸酯)-胞苷、5'-0-(1-硫代磷酸酯)-鸟苷、5'-0-(1-硫代磷酸酯)-尿苷或5'-0-(1-硫代磷酸酯)-假尿苷。提供 α -硫代取代的磷酸酯部分以通过非天然硫代磷酸酯骨架键联赋予RNA聚合物稳定性。硫代磷酸酯RNA具有增加的核酸酶抗性并且随后在细胞环境中具有更长的半衰期。硫代磷酸酯键联的核酸预期还通过较弱的细胞先天免疫分子结合/活化降低先天免疫反应。

[0273] 在某些实施方案中,例如如果需要准确时间的蛋白质产生,那么需要将引入细胞中的修饰的核酸细胞内降解。因此,本发明提供了一种含有降解结构域的修饰的核酸,所述修饰的核酸能够在细胞内以定向方式受到作用。

[0274] 在其他实施方案中,修饰的核苷包括肌苷、1-甲基-肌苷、 γ 苷、怀丁苷(wybutosine)、7-去氮-鸟苷、7-去氮-8-氮杂-鸟苷、6-硫代-鸟苷、6-硫代-7-去氮-鸟苷、6-硫代-7-去氮-8-氮杂-鸟苷、7-甲基-鸟苷、6-硫代-7-甲基-鸟苷、7-甲基肌苷、6-甲氧基-鸟苷、1-甲基鸟苷、N2-甲基鸟苷、N2,N2-二甲基鸟苷、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷、1-甲基-6-硫代-鸟苷、N2-甲基-6-硫代-鸟苷以及N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷。

[0275] 修饰的核酸的任选组分

[0276] 在其他实施方案中,修饰的核酸可包括其他任选组分,所述其他任选组分在一些实施方案中可为有益的。这些任选组分包括但不限于未翻译区、kozak序列、内含子核苷酸序列、内部核糖体进入位点(IRES)、盖帽以及polyA尾部。举例来说,可提供5'未翻译区(UTR)和/或3'UTR,其中任一者或两者可独立地含有一个或多个不同的核苷修饰。在此类实施方案中,核苷修饰还可存在于可翻译区域中。还提供含有Kozak序列的核酸。

[0277] 另外,提供了含有能够从核酸切除的一个或多个内含子核苷酸序列的核酸。

[0278] 未翻译区(UTR)

[0279] 基因的未翻译区(UTR)经过转录,但未经过翻译。5'UTR在转录起始位点处起始并且继续进行至起始密码子,但不包括起始密码子;而3'UTR在终止密码子后立即起始并且继续进行至转录终止信号。就核酸分子的稳定性和翻译来说,存在越来越多的关于由UTR进行的调控作用的证据。可将UTR的调控特征合并至本发明中所用的mRNA中以增加分子的稳定性。还可合并特异性特征以在其误定向至不希望的器官位点的情况下确保转录物的受控制下调。

[0280] 5'加帽

[0281] mRNA的5'盖帽结构参与核输出,增加mRNA稳定性并且结合mRNA盖帽结合蛋白(CBP),盖帽结合蛋白通过使CBP与聚(A)结合蛋白缔合以形成成熟环状mRNA种类来负责细胞中的mRNA稳定性以及翻译能力。盖帽还辅助在mRNA剪接期间5'近端内含子移除的移除。

[0282] 内源性mRNA分子可为5'端加帽的,从而在mRNA分子的末端鸟苷盖帽残基与5'端转录有义核苷酸之间产生5'-ppp-5'-三磷酸酯键联。此5'-鸟苷酸盖帽可然后经过甲基化以产生N7-甲基-鸟苷酸残基。mRNA的5'端的末端和/或前末端转录核苷酸的核糖可任选地也为2'-O-甲基化的。通过水解和裂解鸟苷酸盖帽结构进行的5'-去帽可靶向核酸分子,诸如mRNA分子,以便降解。

[0283] IRES序列

[0284] 含有内部核糖体进入位点(IRES)的mRNA也可用于实践本发明。IRES可充当唯一核糖体结合位点,或可充当mRNA的多个核糖体结合位点中的一者。含有超过一个功能性核糖体结合位点的mRNA可编码由核糖体独立翻译的若干肽或多肽(“多顺反子mRNA”)。当为mRNA提供IRES时,还任选提供了第二可翻译区域。可根据本发明使用的IRES序列的实例包括但不限于来自小核糖核酸病毒(例如FMDV)、害虫病毒(CFFV)、脊髓灰质炎病毒(PV)、脑心肌炎病毒(ECMV)、口蹄疫病毒(FMDV)、C型肝炎病毒(HCV)、经典猪瘟病毒(CSFV)、鼠白血病病毒(MLV)、猴免疫缺陷病毒(SIV)或蟋蟀麻痹病毒(CrPV)的IRES序列。

[0285] Poly-A尾部

[0286] 在RNA加工期间,可将长腺嘌呤核苷酸链(poly-A尾部)添加至多核苷酸(诸如mRNA分子)上,以增加稳定性。在转录之后,可立即将转录物的3'端裂解以释放3'羟基。然后,poly-A聚合酶将腺嘌呤核苷酸链添加至RNA。所述过程称为聚腺苷酸化,聚腺苷酸化添加可为100至250个残基长的poly-A尾部。

[0287] 通常,poly-A尾部的长度为长度大于30个核苷酸。在另一实施方案中,poly-A尾部的长度为大于35个核苷酸(例如至少或大于约35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2,000、2,500以及3,000个核苷酸)。

[0288] 在此背景下,poly-A尾部的长度可比修饰的mRNA大10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。还可将poly-A尾部设计为其所属修饰的核酸的一个部分。在此背景下,poly-A尾部可为修饰的mRNA的总长度的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%或更多,或修饰的mRNA的总长度减去poly-A尾部。

[0289] 产生mRNA分子

[0290] 用于分离RNA、合成RNA、杂交核酸、制备和筛选cDNA文库以及进行PCR的方法为本领域中熟知的(参见例如Gubler和Hoffman, *Gene*, 25:263-269 (1983); Sambrook等, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (第2版1989)); 如PCR方法(参见美国专利号4,683,195和4,683,202; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis等编, 1990))一般。表达文库也是本领域技术人员熟知的。公开用于本发明中的一般方法的额外基础文本包括Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); 以及 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel等编, 1994)。这些参考文献的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0291] 编码的多肽

[0292] 本文所述的脂质纳米粒子的mRNA组分可用于表达所关注的多肽。人的某些疾病由其中功能蛋白通常存在并且具活性的细胞类型中所述蛋白质不存在或受损引起。功能蛋白可完全或部分不存在,这归因于例如编码基因的转录不活动性或归因于编码基因中存在赋予所述蛋白质完全或部分非功能性的突变。由蛋白质完全或部分失活引起的人疾病的实例包括X连锁严重联合免疫缺陷(X-SCID)和肾上腺脑白质营养不良(X-ALD)。X-SCID由编码共同 γ 链蛋白的基因中的一个或多个突变引起,共同 γ 链蛋白为参与免疫系统内的B细胞和T细胞的发育和成熟的若干白介素的受体的组分。X-ALD由称为ABCD1的过氧化物酶体膜转运蛋白基因中的一个或多个突变引起。患有X-ALD的个体在体内在组织中具有非常高水平的长链脂肪酸,这引起可能会导致精神损伤或死亡的多种症状。

[0293] 已尝试使用基因疗法来治疗由其中功能蛋白通常存在并且具活性的细胞类型中所述蛋白质不存在或受损引起的一些疾病。基因疗法通常涉及将包括编码受影响的蛋白质的功能形式的基因的载体引入患病的人中,并且使功能蛋白表达以治疗疾病。迄今为止,基因疗法已取得有限的成功。另外,例如国际公布号WO 2018/006052和WO 2015/011633中已描述使用LNP递送mRNA的某些方面。

[0294] 因而,对使蛋白质的功能性形式在罹患由功能蛋白完全或部分不存在引起的疾病的人体内表达进行改善存在继续的需要,并且对经由例如对疗法可触发较小的免疫反应的方法和组合物来改善核酸(例如mRNA)的递送存在需要。在此情形下本发明的某些实施方案为可用的。因此,在某些实施方案中,多肽的表达改善疾病或病症的一种或多种症状。本发明的某些组合物和方法可用于治疗由人体内不存在功能性多肽或其水平降低引起的人疾病。在其他实施方案中,本发明的某些组合物和方法可用于表达疫苗抗原,例如用于治疗癌症。某些实施方案提供了本文所述的脂质纳米粒子作为疫苗例如用于向有需要的受试者递送治疗性mRNA的用途。

[0295] 自扩增RNA

[0296] 在某些实施方案中,核酸为一个或多个自扩增RNA分子。自扩增RNA(sa-RNA)也可被称为自复制RNA、可复制型RNA、复制子或RepRNA。当来源于正链病毒时被称为自扩增mRNA

的RepRNA产生自缺乏至少一个结构基因的病毒基因组；它可在不产生感染性子代病毒的情况下翻译和复制(因此“自扩增”)。在某些实施方案中,可使用RepRNA技术来插入编码所关注的所需抗原的基因盒。举例来说, α 病毒基因组分成两个开放阅读框(ORF):第一ORF编码用于RNA依赖性RNA聚合酶(复制酶)的蛋白质,并且第二ORF编码结构蛋白。在sa-RNA疫苗构建体中,编码病毒结构蛋白的ORF可用所选的任何抗原替换,同时病毒复制酶保留疫苗的组成部分并且在免疫之后驱动RNA的细胞内扩增。

[0297] 脂质粒子的制备

[0298] 在某些实施方案中,本发明提供了经由连续混合方法产生的LNP,例如一种方法包括提供第一储库中包含核酸的水溶液,提供第二储库中的有机脂质溶液,以及将水溶液与有机脂质溶液混合,使得有机脂质溶液与水溶液混合以便基本上立即产生封装核酸(例如干扰RNA或mRNA)的脂质体。美国专利公布号20040142025中详细描述了此方法和用于执行此方法的设备,所述专利公布的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0299] 将脂质和缓冲溶液连续引入混合环境中(诸如混合室中)的动作使得脂质溶液用缓冲溶液连续稀释,从而在混合后基本上立即产生脂质体。如本文所用,短语“用缓冲溶液连续稀释脂质溶液”(以及变化型式)通常意味着在水化过程中用足以产生囊泡的力足够快速地稀释脂质溶液。通过将包含核酸的水溶液与有机脂质溶液混合,有机脂质溶液在存在缓冲溶液(即,水溶液)的情况下经历连续逐步稀释以产生脂质纳米粒子。

[0300] 使用连续混合方法形成的LNP通常具有约40nm至约150nm、约40nm至约80nm、约40nm至约60nm、约50nm至约60nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm或约70nm至约90nm的尺寸。因此形成的粒子不聚集并且任选经过尺寸调节以实现均匀粒度。

[0301] 在另一实施方案中,本发明提供了经由直接稀释方法产生的LNP,所述直接稀释方法包括形成脂质体溶液以及将脂质体溶液立即并且直接引入含有控制量的稀释缓冲液的收集容器中。在优选方面中,收集容器包括被配置成搅拌收集容器的内容物以促进稀释的一个或多个元件。在一个方面中,存在于收集容器中的稀释缓冲液的量基本上等于其中引入的脂质体溶液的体积。作为非限制性实例,当将含脂质体溶液的45%乙醇引入含有相等体积的稀释缓冲液的收集容器中时将有利地产生更小的粒子。

[0302] 在另一实施方案中,本发明提供了经由直接稀释方法产生的LNP,其中含有稀释缓冲液的第三储集器流体地偶联至第二混合区。在此实施方案中,将第一混合区中所形成的脂质体溶液立即并且直接与第二混合区中的稀释缓冲液混合。在优选方面中,第二混合区包括被布置成使得脂质体溶液和稀释缓冲液流以相对的180°流的形式相遇的T形连接件;然而,可使用提供较浅角度(例如约27°至约180°)的连接件。泵机构将可控制的缓冲液流递送至第二混合区。在一个方面中,将提供至第二混合区的稀释缓冲液的流速控制为基本上等于脂质体溶液从第一混合区引入其中的流速。此实施方案有利地允许更多的对与第二混合区中的脂质体溶液混合的稀释缓冲液的流动的控制,并且因此也允许更多的对在第二混合过程中脂质体溶液在缓冲液中的浓度的控制。稀释缓冲液流速的此类控制有利地允许以降低的浓度形成小粒度。

[0303] 美国专利公布号20070042031中详细描述了这些方法和用于执行这些直接稀释方法的设备,所述专利公布的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0304] 使用直接稀释方法形成的LNP通常具有约40nm至约150nm、约40nm至约80nm、约

40nm至约60nm、约50nm至约60nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm或约70nm至约90nm的尺寸。因此形成的粒子不聚集并且任选经过尺寸调节以实现均匀粒度。

[0305] 如果需要,那么可通过可用于对脂质体进行尺寸调节的方法中的任一者对本发明的脂质粒子(例如LNP)进行尺寸调节。可进行尺寸调节以实现所需尺寸范围以及相对窄的粒度分布。

[0306] 若干技术可用于将粒子的尺寸调节至所需尺寸。美国专利号4,737,323中描述了用于脂质体并且同样地适用于本发明粒子的一种尺寸调节方法,所述专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。通过浴槽或探针超声处理对粒子悬浮液进行超声处理使得粒子的尺寸渐进地降低至尺寸小于约50nm。均质化为另一方法,所述方法依赖于剪切能来将较大的粒子片段化成较小的粒子。在一种典型均质化程序中,使粒子再循环穿过标准乳液均质器直至观测到通常在约60与约80nm之间的所选粒度。在两种方法中,可通过常规激光束粒度辨别或QELS来监测粒度分布。

[0307] 将粒子通过小孔隙聚碳酸酯膜或不对称陶瓷膜挤出也是一种使粒度减小到相对明确界定的尺寸分布的有效方法。通常,一次或多次使悬浮液循环穿过所述膜直至实现所需粒度分布。可使粒子依次通过更小孔隙的膜挤出,以实现尺寸的逐步减小。

[0308] 在一些实施方案中,如例如美国专利申请序列号09/744,103中所述使LNP中的核酸预凝聚,所述专利申请的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0309] 在其他实施方案中,所述方法还将包括添加可用于使用本发明组合物实现细胞的脂质体转染的非脂质聚阳离子。合适的非脂质聚阳离子的实例包括海地美溴铵(hexadimethrine bromide)(以商标名**POLYBRENE®**出售,来自Aldrich Chemical Co.,Milwaukee,Wis.,USA)或海地美铵的其他盐。其他合适的聚阳离子包括例如聚L-鸟氨酸、聚L-精氨酸、聚L-赖氨酸、聚D-赖氨酸、聚烯丙基胺以及聚乙烯亚胺的盐。这些盐的添加优选在已形成粒子之后进行。

[0310] 脂质粒子的施用

[0311] 在形成后,本发明的脂质粒子(例如LNP)可用于将核酸引入细胞中。因此,本发明还提供了用于将核酸(诸如例如干扰RNA或mRNA等核酸)引入细胞中的方法。在体外或体内通过首先形成如上文所述的粒子,然后使粒子与细胞接触足以发生核酸递送至细胞的一段时间来执行方法。

[0312] 本发明的脂质粒子(例如LNP)可吸附至与其混合或接触的几乎任何细胞类型。在吸附后,粒子可由细胞的一部分胞吞,与细胞膜交换脂质,或与细胞融合。粒子的核酸(例如核酸)部分的转移或合并可经由这些路径中的任一者来进行。具体来说,当发生融合时,粒子膜整合至细胞膜中并且粒子的内容物与细胞内流体组合。

[0313] 本发明的脂质粒子(例如LNP)可单独地或以与根据施用途径和标准药物实践选择的药学上可接受的载体(例如生理盐水或磷酸盐缓冲液)的混合物的形式进行施用。通常,将采用普通缓冲盐水(例如135-150mM NaCl)作为药学上可接受的载体。其他合适的载体包括例如水、缓冲水、0.4%生理盐水、0.3%甘氨酸等,包括用于获得增强的稳定性的糖蛋白,诸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。例如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 第17版(1985)中描述了额外的合适的载体。如本文所用,“载体”包括任何以及所有溶剂、分散介质、媒介物、包衣剂、稀释剂、抗细菌和抗真

菌剂、等张和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶体等。短语“药学上可接受的”是指当向人施用分子实体和组合物不产生过敏性或类似不良反应。

[0314] 通常在粒子形成之后添加药学上可接受的载体。因此,在形成粒子之后,可将粒子稀释至药学上可接受的载体(诸如普通缓冲盐水)中。

[0315] 药物制剂中的粒子的浓度可广泛地变化,即从小于约0.05重量%,通常等于或至少约2至5重量%,到多达约10至90重量%,并且将根据特定所选施用模式主要通过流体体积、粘度等来进行选择。举例来说,可增加浓度以降低与治疗相关的流体负荷。在患有动脉粥样硬化相关充血性心力衰竭或严重高血压的患者中这可能是特别需要的。或者,可将由刺激性脂质组成的粒子稀释至低浓度以减轻施用位点处的炎症。

[0316] 可通过常规的熟知灭菌技术对本发明的药物组合物进行灭菌。水溶液可经过包装以供使用或在无菌条件下过滤并且冻干,在施用之前将冻干制剂与无菌水溶液组合。组合物可按需要含有诸如以下的药学上可接受的辅助物质以接近生理条件:pH调节和缓冲剂、张力调节剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾以及氯化钙。另外,粒子悬浮液可包括脂质保护剂,脂质保护剂防止脂质在储存时发生自由基和脂质过氧化损伤。亲脂性自由基淬灭剂(诸如 α 生育酚)和水溶性铁特异性螯合剂(诸如铁草胺)为合适的。

[0317] 体内施用

[0318] 已使用核酸-脂质粒子(诸如PCT公布号W0 05/007196、W005/121348、W0 05/120152以及W0 04/002453中所述的核酸-脂质粒子)实现用于体内疗法的全身递送(例如经由身体系统(诸如循环)将治疗性核酸递送至远端靶细胞),所述公布的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。本发明还提供了防止核酸在血清中发生核酸酶降解的完全封装的脂质粒子,所述完全封装的脂质粒子为非免疫原性的、尺寸小并且适合重复给药。

[0319] 对于体内施用,施用可以本领域中已知的任何方式来进行,例如通过注射、经口施用、吸入(例如鼻内或气管内)、经真皮施加或经直肠施用。施用可经由单次或分次剂量来实现。药物组合物可肠胃外施用,即关节内、静脉内、腹膜内、皮下或肌肉内施用。在一些实施方案中,通过快速注射(参见例如美国专利号5,286,634)静脉内或腹膜内施用药物组合物。Straubinger等,Methods Enzymol.,101:512(1983);Mannino等,Biotechniques,6:682(1988);Nicolau等,Crit.Rev.Ther Drug Carrier Syst.,6:239(1989);以及Behr,Acc.Chem.Res.,26:274(1993)中也论述了细胞内核酸递送。例如美国专利号3,993,754;4,145,410;4,235,871;4,224,179;4,522,803;以及4,588,578中描述了其他施用基于脂质的治疗剂的方法。可通过在疾病位点处直接注射或通过向疾病位点的远端位点处注射来施用脂质粒子(参见例如Culver,HUMAN GENE THERAPY,MaryAnn Liebert,Inc.,Publishers,New York.第70-71页(1994))。以上所述的参考文献的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0320] 可将单独或与其他合适组分组合的本发明的组合物制成气溶胶制剂(即,它们可为“雾化的”)以经由吸入(例如鼻内或气管内)进行施用(参见Brigham等,Am.J.Sci.,298:278(1989))。可将气溶胶制剂放入加压的可接受的推进剂(诸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮等)中。

[0321] 在某些实施方案中,可通过鼻内喷雾、吸入和/或其他气溶胶递送媒介物来递送药

物组合物。例如美国专利号5,756,353和5,804,212中已描述用于经由经鼻气溶胶喷雾将核酸组合物直接递送至肺脏的方法。同样地,使用鼻内微粒树脂和溶血磷脂酰基-甘油化合物(美国专利号5,725,871)递送药物也是药物领域中熟知的。类似地,美国专利号5,780,045中描述了以聚四氟乙烯支撑物基质形式进行经粘膜药物递送。以上所述的专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0322] 适合用于诸如通过关节内(在关节中)、静脉内、肌肉内、真皮内、腹膜内以及皮下途径肠胃外施用的制剂包括水性和非水性等张无菌注射溶液,所述等张无菌注射溶液可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂以及溶质,从而使得制剂与预期接受者的血液等张;以及水性和非水性无菌悬浮液,所述水性和非水性无菌悬浮液可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂以及防腐剂。在本发明的实践中,优选例如通过静脉输注、经口、经表面、腹膜内、膀胱内或鞘内方式施用组合物。

[0323] 通常,当静脉内施用,用合适的药物载体配制脂质粒子制剂。许多药学上可接受的载体可用于本发明的组合物和方法中。在例如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 第17版(1985)中可找到适合用于本发明中的制剂。可使用多种水性载体,例如水、缓冲水、0.4%生理盐水、0.3%甘氨酸等,并且可包括用于获得增强的稳定性的糖蛋白,诸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。通常,将采用普通缓冲盐水(135-150mM NaCl)作为药学上可接受的载体,但其他合适的载体也将满足要求。这些组合物可通过诸如过滤等常规脂质体灭菌技术来灭菌。组合物可按需要含有包括诸如以下的药学上可接受的辅助物质以接近生理条件:pH调节和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、脱水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯等。这些组合物可通过诸如过滤等常规脂质体灭菌技术来灭菌。所得水溶液可经过包装以供使用或在无菌条件下过滤并且冻干,在施用之前将冻干制剂与无菌水溶液组合。

[0324] 在某些应用中,本文所公开的脂质粒子可经由经口施用来递送至个体。可将粒子与赋形剂合并并且以可摄取片剂、口含片、药片、胶囊、丸剂、糖锭、酏剂、嗽口水、悬浮液、口腔喷雾、糖浆、压片等形式使用(参见例如美国专利号5,641,515、5,580,579以及5,792,451,所述专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中)。这些口服剂型还可含有以下物质:粘合剂、明胶;赋形剂、润滑剂和或调味剂。当单位剂型为胶囊时,它除上文所述的材料外还可含有液体载体。各种其他材料可以包衣形式存在或以其他方式改变剂量单位的物理形式。当然,制备任何单位剂型时所用的任何材料均应为药学纯的并且以所采用的量为基本上无毒的。

[0325] 通常,这些口服制剂可含有至少约0.1%的脂质粒子或更多,不过粒子的百分比当然可变化并且可适宜地在总制剂的重量或体积的约1%或2%与约60%或70%之间或更多。天然地,可制备的每种治疗可用的组合物中的粒子的量使得将以任何给定单位剂量的化合物获得合适的给药。制备此类药物制剂的本领域技术人员将考虑诸如溶解度、生物利用率、生物半衰期、施用途径、产品保质期以及其他药理学考虑因素等因素,并且因此多种剂量和治疗方案可能为所需的。

[0326] 适合经口施用的制剂可由以下物质组成:(a)液体溶液,诸如悬浮于稀释剂(诸如水、盐水或PEG 400)中的有效量的包装的治疗剂,诸如核酸(例如干扰RNA或mRNA);(b)胶囊、囊剂或片剂,各自含有预定量的呈液体、固体、颗粒或明胶形式的治疗剂,诸如核酸(例

如干扰RNA或mRNA)；(c)于适当的液体中的悬浮液；以及(d)合适的乳液。片剂形式可包括以下中之一者或多者：乳糖、蔗糖、甘露糖醇、山梨糖醇、磷酸钙、玉米淀粉、马铃薯淀粉、微晶纤维素、明胶、胶态二氧化硅、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸以及其他赋形剂、着色剂、填料、粘合剂、稀释剂、缓冲剂、湿润剂、防腐剂、调味剂、染料、崩解剂以及药学上相容的载体。糖锭形式可包含含治疗剂(诸如核酸,例如干扰RNA或mRNA)的调味剂(例如蔗糖),以及包含含治疗剂的惰性基质的软锭剂,诸如除治疗剂外含有本领域中已知的载体的明胶和甘油或蔗糖以及阿拉伯胶乳液、凝胶等。

[0327] 在其用途的另一实例中,脂质粒子可合并至广泛范围的表面剂型中。举例来说,可配制含有核酸-脂质粒子(诸如LNP)的悬浮液并且以凝胶、油、乳液、表面乳霜、糊状物、软膏、洗液、泡沫、慕斯等形式施用。

[0328] 当制备本发明的脂质粒子的药物制剂时,使用大量粒子为优选的,所述大量粒子已经过纯化以减少或消除空粒子或含有与外表面缔合的治疗剂(诸如核酸)的粒子。

[0329] 可在多种宿主中实践本发明的方法。优选的宿主包括哺乳动物物种,诸如灵长类动物(例如人和黑猩猩以及其他非人灵长类动物)、犬、猫、马、牛、绵羊、公山羊、啮齿动物(例如大鼠和小鼠)、兔类动物以及猪。

[0330] 施用的粒子的量将取决于治疗剂(例如核酸)与脂质的比率、所用的特定治疗剂(例如核酸)、正在治疗的疾病或病症、患者的年龄、体重以及状况以及临床医师的判断,但通常将介于每千克体重约0.01与约50mg之间,优选介于每千克体重约0.1与约5mg之间,或每次施用(例如注射)约 10^8 - 10^{10} 个粒子。

[0331] 体外施用

[0332] 对于体外应用,可向在培养物中生长的具有植物或脊椎动物或无脊椎动物来源并且属于任何组织或类型的任何细胞递送治疗剂,诸如核酸(例如干扰RNA或mRNA)。在优选实施方案中,细胞为动物细胞,更优选为哺乳动物细胞,并且最优选为人细胞。

[0333] 当体外进行时在生物学相容培养基中进行细胞与脂质粒子之间的接触。粒子的浓度根据特定应用广泛地改变,但通常介于约 $1\mu\text{mol}$ 与约 10mmol 之间。通常在生理温度(约 37°C)下将用脂质粒子处理细胞持续约1至48小时、优选约2至4小时的时间段。

[0334] 在一组优选实施方案中,将脂质粒子悬浮液添加至60-80%汇合的细胞密度为约 10^3 至约 10^5 个细胞/ml、更优选约 2×10^4 个细胞/ml的涂铺细胞中。添加至细胞中的悬浮液的浓度优选为约0.01至 $0.2\mu\text{g/ml}$,更优选约 $0.1\mu\text{g/ml}$ 。

[0335] 使用内体释放参数(ERP)分析,可对LNP或本发明的其他脂质粒子的递送效率进行优化。美国专利公布号20030077829中详细描述了ERP分析,所述专利公布的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。更明确地说,ERP分析的目的是基于对内体膜的结合/摄入或融合/扰动的相对影响来区别LNP的各种阳离子脂质和辅助脂质组分的效应。此分析允许我们定量地确定LNP或其他脂质粒子的各组分如何影响递送效率,从而对LNP或其他脂质粒子进行优化。通常,ERP分析测量报告蛋白(例如荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、绿色荧光蛋白(GFP)等)的表达,并且在一些情况下,针对表达质粒优化的LNP制剂也将适合于封装干扰RNA或mRNA。在其他情况下,ERP分析可适合于在存在或不存在干扰RNA(例如siRNA)的情况下测量靶序列的转录或翻译的下调。在其他情况下,ERP分析可适合于在存在或不存在mRNA的情况下测量靶蛋白质的表达。通过对各种LNP或其他脂质粒子中的每一者的ERP进行

比较,我们可容易地确定优化的系统,例如在细胞中具有最大摄入的LNP或其他脂质粒子。

[0336] 用于递送脂质粒子的细胞

[0337] 使用本发明的组合物和方法在体内和体外对多种细胞类型进行处理。合适的细胞包括例如造血前体(干)细胞、成纤维细胞、角质细胞、肝细胞、内皮细胞、骨骼和平滑肌细胞、成骨细胞、神经元、静息淋巴细胞、终末分化细胞、慢速或不循环原代细胞、实质细胞、淋巴样细胞、上皮细胞、骨细胞等。在一个实施方案中,将核酸(诸如一个或多个核酸分子,例如干扰RNA(例如siRNA)或mRNA)递送至癌细胞,诸如肺癌细胞、结肠癌细胞、直肠癌细胞、肛门癌细胞、胆管癌细胞、小肠癌细胞、胃(胃)癌细胞、食管癌细胞、胆囊癌细胞、肝癌细胞、胰腺癌细胞、附件癌细胞、乳腺癌细胞、卵巢癌细胞、宫颈癌细胞、前列腺癌细胞、肾癌细胞、中枢神经系统癌细胞、成胶质细胞瘤肿瘤细胞、皮肤癌细胞、淋巴瘤细胞、绒毛膜癌肿瘤细胞、头颈癌细胞、骨原性肉瘤肿瘤细胞以及血液癌细胞。

[0338] 体内递送脂质粒子(诸如封装一个或多个核酸分子(例如干扰RNA(例如siRNA)或mRNA)的LNP)适合于靶向任何细胞类型的细胞。可在包括哺乳动物(诸如犬、猫、马、牛、绵羊、公山羊、啮齿动物(例如小鼠、大鼠以及豚鼠)、兔类动物、猪以及灵长类动物(例如猴、黑猩猩以及人类))的多种脊椎动物的细胞的情况下使用所述方法和组合物。

[0339] 在可能需要细胞的组织培养物的情况下,组织培养物是本领域中熟知的。举例来说,Freshney,Culture of Animal Cells,a Manual of Basic Technique,第3版,Wiley-Liss,New York(1994),Kuchler等,Biochemical Methods in Cell Culture and Virology,Dowden,Hutchinson and Ross,Inc.(1977)以及其中所引用的参考文献提供了对细胞培养物的一般指导。培养细胞系统常常将呈单层细胞形式,不过还使用细胞悬浮液。

[0340] 脂质粒子的检测

[0341] 在一些实施方案中,在约1、2、3、4、5、6、7、8或更多个小时时,在受试者中本发明的脂质粒子(例如LNP)为可检测的。在其他实施方案中,在施用粒子之后约8、12、24、48、60、72或96小时或约6、8、10、12、14、16、18、19、22、24、25或28天时,在受试者中本发明的脂质粒子(例如LNP)为可检测的。可在来自受试者的细胞、组织或其他生物样品中检测到粒子的存在。可例如通过直接检测粒子、检测治疗性核酸(诸如干扰RNA(例如siRNA)序列或mRNA序列)、检测所关注的靶序列(即,通过检测所关注的序列的表达的变化)或它们的组合来检测粒子。

[0342] 粒子的检测

[0343] 可使用本领域中已知的任何方法来检测本发明的脂质粒子,诸如LNP。举例来说,可使用本领域中熟知的方法将标记直接或间接偶联至脂质粒子的组分。可使用多种标记,标记的选择取决于所需的灵敏度、与脂质粒子组分缀合的容易性、稳定性要求以及可获得的仪器和处置规定。合适的标记包括但不限于光谱标记,诸如荧光染料(例如荧光素和衍生物,诸如异硫氰酸荧光素(FITC)和Oregon Green™;罗丹明(rhodamine)和衍生物(诸如得克萨斯红(Texas red)、四罗丹明异硫氰酸盐(TRITC)等)、地高辛(digoxigenin)、生物素、藻红素、AMCA、CyDyes™等;放射性标记,诸如³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、³²P、³³P等;酶,诸如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等;光谱比色标记,诸如胶态金或有色玻璃或塑料珠粒,诸如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等。可使用本领域中已知的任何手段来检测标记。

[0344] 核酸的检测

[0345] 本文通过本领域技术人员熟知的许多手段中的任一者来检测和定量核酸(例如干扰RNA或mRNA)。可通过熟知方法(诸如南方分析、北方分析、凝胶电泳、PCR、放射性标记、闪烁计数以及亲和色谱)来进行核酸的检测。还可使用额外的分析生化方法,诸如分光光度法、放射线照相术、电泳、毛细管电泳、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)以及超扩散色谱。

[0346] 核酸杂交模式的选择并不关键。多种核酸杂交模式为本领域技术人员已知的。举例来说,常用模式包括夹心分析和竞争或置换分析。例如“Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach,”Hames和Higgins编, IRL Press(1985)中大体描述了杂交技术。

[0347] 可通过使用使正在检测的靶核酸增殖的核酸扩增系统来增强杂交分析的灵敏度。适合于扩增用作分子探针或用于产生用于后续亚克隆的核酸片段的序列的体外扩增技术为已知的。在以下参考文献中可找到足以通过此类体外扩增方法指导技术人员的技术的实例,包括聚合酶链反应(PCR)连接酶链反应(LCR)、Q β -复制酶扩增以及其他RNA聚合酶介导的技术(例如NASBATM): Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2000); 以及Ausubel等, SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY编, Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc.和John Wiley&Sons, Inc. (2002); 以及美国专利号4,683,202; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications(Innis等编)Academic Press Inc.San Diego, Calif. (1990); Arnheim和Levinson(Oct.1,1990), C&EN 36; The Journal Of NIH Research, 3:81(1991); Kwoh等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173(1989); Guatelli等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874(1990); Lomell等, J. Clin. Chem., 35:1826(1989); Landegren等, Science, 241:1077(1988); Van Brunt, Biotechnology, 8:291(1990); Wu和Wallace, Gene, 4:560(1989); Barringer等, Gene, 89:117(1990); 以及Sooknanan和Malek, Biotechnology, 13:563(1995)。美国专利号5,426,039中描述了改善克隆体外扩增的核酸的方法。本领域中所所述的其他方法为基于核酸序列的扩增(NASBATM, Cangene, Mississauga, Ontario)和Q β -复制酶系统。这些系统可用于直接鉴定突变体,其中PCR或LCR引物被设计成仅在存在所选序列时延伸或连结。或者,通常可使用例如非特异性PCR引物和随后探查指示突变的特定序列的扩增靶区域来扩增所选序列。以上所述的参考文献的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0348] 通常根据由Beaucage等, Tetrahedron Letts., 22:1859-1862(1981)描述的固相亚磷酰胺三酯方法以化学方式合成用作探针(例如在体外扩增方法中)、用作基因探针或作为抑制剂组分的核酸,例如如Needham VanDevanter等, Nucleic Acids Res., 12:6159(1984)中所述,使用自动化合成仪。必要时,如Pearson等, J. Chrom., 255:137-149(1983)中所述,通常通过天然丙烯酰胺凝胶电泳或通过阴离子交换HPLC来进行多核苷酸的纯化。可使用Maxam和Gilbert(1980)在Grossman和Moldave(编)Academic Press, New York, Methods in Enzymology, 65:499中的化学降解方法来验证合成多核苷酸的序列。

[0349] 用于确定转录水平的替代手段为原位杂交。原位杂交分析为熟知的并且大体上描述于Angerer等, Methods Enzymol., 152:649(1987)中。在原位杂交分析中,将细胞固定至固体载体,通常为载玻片。如果要探查DNA,那么用热或碱性物质使细胞变性。然后使细胞在中等温度下与杂交溶液接触以容许经过标记的特定探针退火。优选地将探针用放射性同位

素或荧光报告子标记。

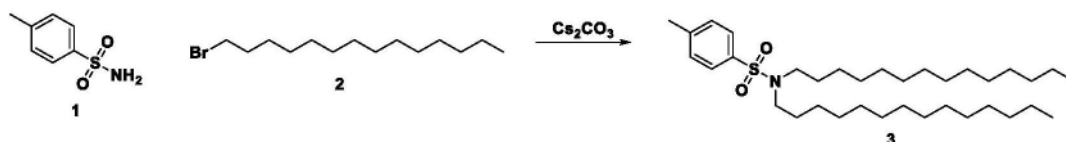
[0350] 实施例

[0351] 已将PEG2000-C-DMA (US 8,936,942) 用于脂质纳米粒子 (LNP) 制剂中,所述脂质纳米粒子制剂已进入在肿瘤学、疫苗、抗病毒剂以及代谢疾病等应用中进行的人临床试验。这些LNP制剂已用于递送治疗性有效负荷,包括但不限于核酸,诸如质粒DNA、siRNA、mRNA以及自复制RNA。PEG-2000-C-DMA为用于FDA批准的Onpattro中的PEG-C-DOMG的封闭结构类似物。

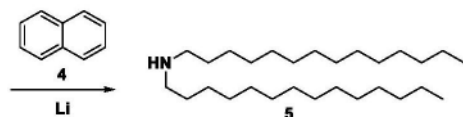
[0352] PEG脂质的烷基结构域的性质(例如尺寸、数目、饱和水平)可对体内LNP生物性能有影响。此烷基结构域充当允许配制LNP和合并至LNP中的“锚”,从而引起PEG结构域的表面呈现。除允许配制小的稳定粒子并且在体内掩蔽这些粒子以避免先天免疫反应外,PEG脂质对生物活性来说同样重要。在体内施用之后,PEG脂质扩散离开LNP,并且在肝脏定向制剂的情况下,伴随地用APOE取代,从而有助于经由LDL受体进行肝细胞摄入。因此,PEG脂质从LNP移除的速率为一种重要特性,PEG脂质从LNP移除的速率又与烷基结构域锚的功效直接相关。

[0353] 作为用于优化和改善用于核酸递送的LNP制剂的策略的一部分,设计并且合成一系列PEG脂质,其中长度相同的两个烷基链连接至单个原子(碳或氮)。这与C-DMA和DOMG中的设计基序形成对比,其中烷基结构域经由缩水甘油接头连接。设计若干化学官能团并且对其进行研究以将PEG结构域偶联至二烷基结构域。当比较相同长度烷基链(例如C₁₄)时,这些新颖PEG脂质的表现大体上与基准PEG-2000-C-DMA相同或更好。发现与其他相关化合物相比,某些基序(例如氨基甲酸酯和脲)意外地产生更有效的粒子。

[0354] 通过双十四烷基胺(5)的合成例示的对称二烷基胺的一般合成



[0355]



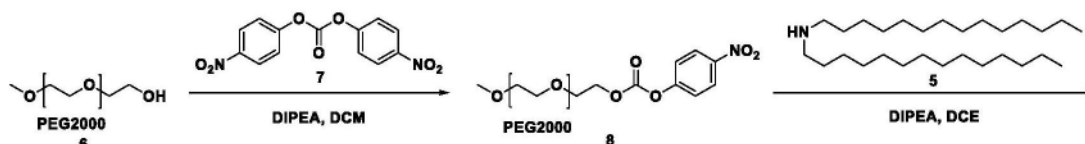
[0356] a. 4-甲基-N,N-双十四烷基苯磺酰胺(3)的合成

[0357] 将K₂CO₃ (20.18g, 146.0mmol)、对甲苯磺酰胺(1) (5.00g, 29.2mmol) 以及1-溴十四烷(2) (21.7ml, 73.0mmol) 在DMF (75ml) 中在回流下加热20h。将反应物冷却至室温,用Et₂O (100ml) 稀释并且过滤。将滤液用H₂O (50ml) 洗涤并且将水性物用Et₂O (100ml) 反萃取。将合并的有机物干燥(Na₂SO₄), 过滤, 真空浓缩并且将残余物通过自动化快速色谱(DCM/己烷40/60) 纯化, 得到N,N-双十四烷基-对甲苯磺酰胺(3) (15.86g, 96%)。

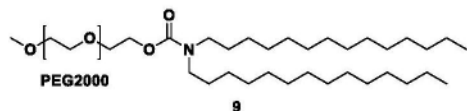
[0358] b. 双十四烷基胺(5)的合成

[0359] 在0℃下将含4-甲基-N,N-双十四烷基苯磺酰胺(3) (10g, 17.7mmol) 的THF (5ml) 添加至萘锂(由将萘(4) (11.36g, 88.7mmol) 和锂金属(0.92g, 133.0mmol) 在THF (40ml) 中在室温下搅拌1h所制备) 的溶液中并且将反应物在室温下搅拌1h。添加MeOH (4ml), 随后添加H₂O (50ml) 并且将混合物用醚(100ml) 萃取。将有机物干燥(Na₂SO₄), 过滤并且真空浓缩。将残余物通过自动化快速色谱(EtOAc/Hex (50:50)) 纯化, 得到双十四烷基胺(5) (4.85g, 66.7%)。

[0360] 实施例1.通过化合物(9)例示的二烷基氨基甲酸酯PEG脂质的一般合成



[0361]



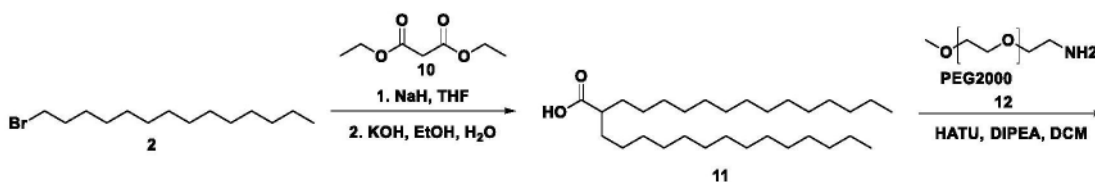
[0362] a. PEG2000对硝基碳酸酯(8)的合成

[0363] 将甲氧基PEG 2000OH (6) 和DIPEA (0.8ml, 4.6mmol) 在DCM (100ml) 中在室温下搅拌。添加双(4-硝基苯基碳酸酯) (7) (1.4g, 4.6mmol) 并且将反应物在室温下搅拌16h。将反应物用NaHCO₃ (3x 150ml)、盐水 (150ml) 洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤并且真空浓缩。将残余物通过自动化快速色谱 (0-15% MeOH/DCM) 纯化, 得到PEG2000对硝基碳酸酯 (8)。

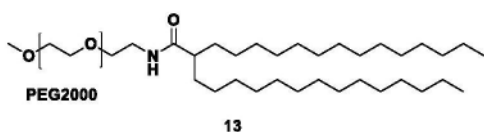
[0364] b. 二烷基氨基甲酸酯PEG脂质 (9) 的合成

[0365] 将PEG2000对硝基碳酸酯 (8) (1g, 0.42mmol)、DIPEA (0.15ml, 0.85mmol) 以及双十四烷基胺 (5) (0.174g, 0.42mmol) 在DCE中在回流下加热16h。将反应冷却, 用饱和NaHCO₃ (5x 75ml) 洗涤, 干燥 (MgSO₄) 并且真空浓缩。将残余物通过自动化快速色谱 (0-15% MeOH/DCM) 纯化。使用切向流超滤 (MWC0=10000kDA) 使用10倍体积水洗涤液将此材料进一步纯化。对回收的水溶液进行冻干, 得到化合物 (9) (406mg, 36%)。¹H NMR (400MHz, D6-DMSO) δ 4.21 (m, 3H), 3.62 (m, 136H), 3.38 (s, 3H), 3.15 (bs, 5H), 1.49 (bs, 4H), 1.24 (bs, 35H), 0.87 (t, J=8Hz, 6H)。

[0366] 实施例2.通过化合物(13)例示的二烷基酰胺PEG脂质的一般合成



[0367]



[0368] a. 2-十四烷基十六烷酸 (11) 的合成

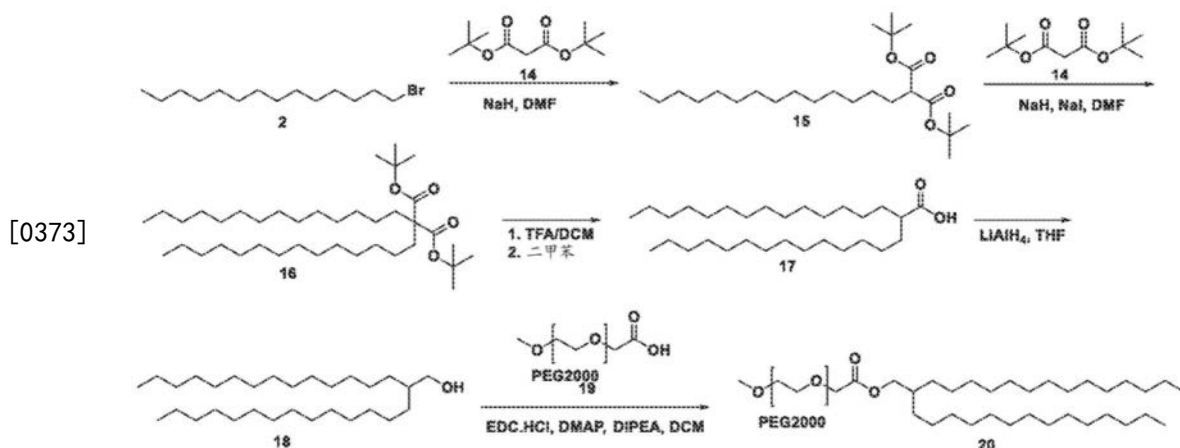
[0369] 在0℃下将丙二酸二乙酯 (10) (10.0g, 9.5mmol) 逐滴添加至NaH (于矿物油中的60%分散体) (2.75g, 68.7mmol) 于无水THF中的悬浮液中。添加1-溴十四烷 (2) (19.5ml, 65.6mmol) 并且将反应物回流18h。将反应物冷却, 用MeOH中止反应, 真空浓缩并且将残余物分配于己烷与H₂O之间。将有机层用H₂O和盐水洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤并且真空浓缩。将残余物通过自动化快速色谱 (5% EtOAc/Hex) 纯化。随后以与上文相同的方式对此材料进行第二烷基化步骤。将中间物二乙基-2,2,双肉豆蔻-丙二酸酯溶解于EtOH (250ml) 中, 添加含KOH (24.5g, 437mmol) 的H₂O (250ml) 并且将反应物在回流下搅拌18h。将反应冷却, 倾倒入冰上并且用3M HCl酸化。将水性物用EtOAc萃取, 将有机物干燥 (MgSO₄) 并且真空浓缩。在没有溶剂的情况下将残余物在170℃下在真空下加热, 直至气体停止逸出。在冷却之后, 将粗物

质通过自动化快速色谱(5% MeOH,DCM)纯化,得到2-十四烷基十六烷酸(11)(7.24g, 24.4%)。

[0370] b. 二烷基酰胺PEG脂质(13)的合成

[0371] 将2-十四烷基十六烷酸(11)(0.142g,0.31mmol)、甲氧基PEG 2000胺(12)(500mg, 0.25mmol)、HATU(0.143g,0.375mmol)以及DIPEA(0.13mL,0.75mmol)在DCM中在室温下搅拌18h。将反应物用DCM稀释,依序用饱和NaHCO₃和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并且真空浓缩。将残余物通过自动化快速色谱(0-15%MeOH/DCM)纯化。将纯PEG-脂质溶解于水(8mL)中并且冻干,得到二烷基酰胺PEG脂质(13)(365mg,60.0%)。¹H NMR(400MHz,D₆-DMSO) δ3.81(m, 1H), 3.64(bs, 179H), 3.53(m, 5H), 3.45(m, 1H), 3.35(m, 3H), 2.8(s, 6H), 1.31(bs, 53H), 0.9(t, J=8Hz, 6H)。

[0372] 实施例3. 通过化合物(20)例示的用于合成二烷基醚PEG脂质的一般程序



[0374] a. 2-十四烷基丙二酸二-叔丁酯(15)的合成

[0375] 将NaH(于矿物油中的60%分散体)(453mg, 11.3mmol)溶解于DMF(100mL)中并且冷却至0℃。添加丙二酸二-叔丁酯(14)(2.2g, 10.3mmol)并且将反应物搅拌10min。添加1-溴十四烷(2)(3.0g, 10.8mmol)并且将反应物在室温下搅拌18h。将反应物冷却至0℃,用饱和NH₄Cl溶液中止反应,并且用己烷萃取。将有机层用盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并且真空浓缩。将残余物通过自动化快速色谱(0-10%EtOAc/Hex)纯化,得到(15)(4.1g, 95.7%)。

[0376] b. 2,2-双十四烷基丙二酸二-叔丁酯(16)的合成

[0377] 将NaH于矿物油中的60%分散体(433mg, 10.8mmol)溶解于DMF(100mL)中并且冷却至0℃。添加2-十四烷基丙二酸二-叔丁酯(14)(4.1g, 9.9mmol)并且将混合物搅拌10min。添加1-溴十四烷(2)(2.87g, 10.3mmol)和NaI(0.44g, 3.0mmol)并且将反应物在室温下搅拌3天。将反应物冷却至0℃,用饱和NH₄Cl溶液中止反应并且用EtOAc萃取。将有机层用盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并且真空浓缩。将残余物通过自动化快速色谱(0-5% EtOAc/Hex)纯化,得到2,2-双十四烷基丙二酸二-叔丁酯(16)(5.0g, 83.8%)。

[0378] c. 2-十四烷基十六烷酸(17)的合成

[0379] 将2,2-双十四烷基丙二酸二-叔丁酯(16)(5.5g, 9.1mmol)溶解于DCM(40mL)中并且在0℃下添加TFA(20mL)。将反应物在室温下搅拌2h,然后与甲苯共沸两次。将残余物溶解于二甲苯(30mL)中并且在150℃下搅拌18h。将反应物冷却至室温并且真空浓缩。将残余物溶解于己烷(20mL)中,加热至50℃至溶解并且热加载至快速柱上。将产物通过自动化快速

色谱(0-30% EtOAc/Hex)纯化,得到2-十四烷基十六烷酸(17)(2.2g,52.8%)。

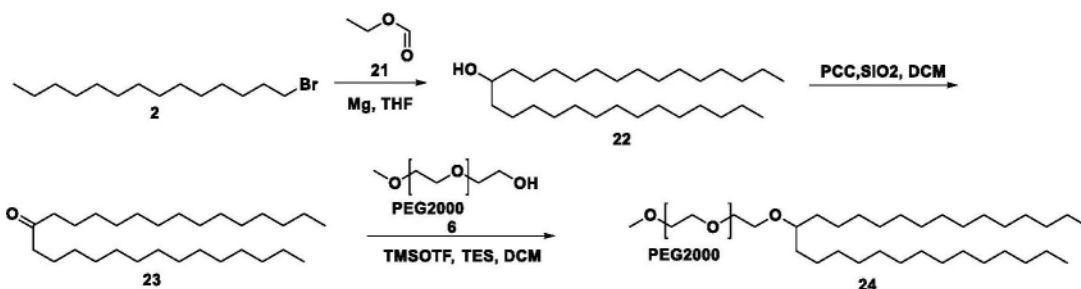
[0380] d. 2-十四烷基十六烷-1-醇(18)的合成

[0381] 在0℃下将2-十四烷基十六烷酸(17)(2.2g,5.0mmol)于THF(100mL)中的溶液添加至LiAlH₄(364mg,9.6mmol)于THF中的搅拌溶液中。将反应物升温至室温并且搅拌18h。在0℃下在搅拌下逐滴添加饱和Na₂SO₄·10H₂O溶液的溶液。通过经硅藻土过滤移除所得PPT。将滤液真空浓缩并且将残余物通过自动化快速色谱(0-20%EtOAc/Hex)纯化,得到2-十四烷基十六烷-1-醇(18)(1.9g,92.1%)。

[0382] e. 二烷基醚PEG脂质(20)的合成

[0383] 在0℃下将PEG2000-CO₂H(19)(1.0g,0.45mmol)、2-十四烷基十六烷-1-醇(18)(0.3g,0.68mmol)、EDC.HCl(0.22g,1.1mmol)、DMAP(6mg,0.05mmol)以及DIPEA(0.18g,1.36mmol)溶解于DCM(20mL)中。将反应物升温至室温并且搅拌3天。添加额外的EDC.HCl(0.22g,1.13mmol)并且将反应物在回流下加热18h。在冷却之后,将反应物用盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并且将滤液真空浓缩。将残余物通过自动化快速色谱(0-10%MeOH/DCM)纯化。使用切向流超滤(MWCO=10000kDA)使用10倍体积水洗涤液将回收的产物进一步纯化。对回收的水溶液进行冻干,得到二烷基醚PEG脂质(20)(187mg,15.7%)。1H NMR(400MHz, CDCl₃) δ4.14(s, 2H), 4.05(d, J=4Hz, 2H), 3.64(PEG), 3.38(s, 3H), 1.25(bs, 54H), 0.88(t, J=8Hz, 6H)。

[0384] 实施例4. 通过化合物(24)例示的用于合成二烷基醚PEG脂质的一般程序



[0385] a. 二十九烷-15-醇(22)的合成

[0387] 使用标准格任亚条件(Grignard condition)从含1-溴十四烷(2)(20g,72.1mmol)和镁屑(1.75g,72.1mmol)的无水THF制备肉豆蔻基溴化镁。在室温下搅拌2h之后,逐滴添加甲酸乙酯(21)(5.8ml,72.1mmol)并且将反应物搅拌16h。添加H₂O(100mL),随后缓慢添加6M HCl,直至所有镁溶解。通过过滤移除所得PPT并且将滤液真空浓缩,得到随后未进一步纯化就使用的二十九烷-15-醇(22)(3.5g,22.8%)。

[0388] b. 二十九烷-15-酮(23)的合成

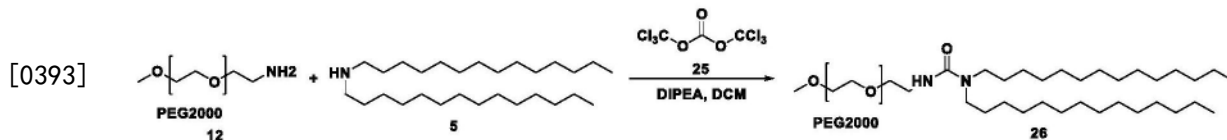
[0389] 将二十九烷-15-醇(22)(500mg,1.2mmol)溶解于DCM(20mL)中。添加PCC/Si(1.5g,3.5mmol)并且将反应物在室温下搅拌16h。将反应物过滤并且将滤液真空浓缩,得到随后未纯化就使用的粗二十九烷-15-酮(23)。

[0390] c. 二烷基醚PEG脂质(24)的合成

[0391] 将甲氧基PEG2000-OH(6)(1.5g,0.75mmol)溶解于无水DCM(25mL)中并且冷却至0℃。添加三氟甲烷磺酸三甲基甲硅烷酯(0.22g,1mmol)并且将反应物搅拌20min。依序添加二十九烷-15-酮(23)(211mg,0.5mmol)和三乙基硅烷(116mg,1mmol)。在5min之后,添加额外的三氟甲烷磺酸酯(111mg,0.5mmol)。将反应物在室温下搅拌2h,用1M NaOH(10mL)中止

反应并且用DCM(50mL)稀释。将有机物用H₂O(50mL)、盐水(50mL)洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并且真空浓缩。将残余物通过自动化快速色谱(0-15% MeOH/DCM)纯化,得到二烷基醚PEG脂质(24)(635mg,54%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ3.8(m,2H),3.63(m,156H),3.37(s,3H),3.22(m,2H),1.24(m,48H),0.87(t,J=8Hz,6H)。

[0392] 实施例5.通过化合物(26)例示的用于合成二烷基脲PEG脂质的一般程序



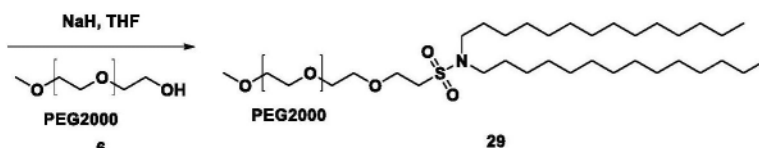
[0394] a.二烷基脲PEG脂质(26)的合成

[0395] 将甲氧基PEG2000胺(12)(500mg,0.25mmol)和DIPEA(0.096mL,0.55mmol)在DCM(5mL)中搅拌。添加三光气(25)(27mg,0.093mmol)并且将反应物在室温下搅拌4h。逐滴添加含双十四烷基胺(5)(102mg,0.25mmol)的DCM(5mL)并且将反应在室温下搅拌18h。将反应物用DCM稀释,用盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并且真空浓缩。将粗物质通过自动化快速色谱(0-15% MeOH/DCM)纯化。将回收的产物通过切向流超滤(10倍洗涤液体积)进一步纯化并且冻干,得到二烷基脲PEG脂质(26)(250mg,0.102mmol,40.8%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ3.63(m,146H),3.54(m,6H),3.37(s,3H),3.15(t,J=8Hz,2H),1.82(bs,6H),1.51(bs,4H),1.24(m,40H),0.87(t,J=8Hz,6H)。

[0396] 实施例6.通过(29)例示的用于合成二烷基磺酰胺PEG脂质的一般程序



[0397]



[0398] a.N,N-双十四烷基乙烯磺酰胺(28)的合成

[0399] 在室温下将乙烯磺酰氯(27)(154mg,1.2mmol)添加至双十四烷基胺(5)(0.5g,1.2mmol)和DIPEA(0.34ml,2.5mmol)中。将反应物在室温下搅拌2小时,真空浓缩并且将残余物通过自动化快速色谱(7%EtOAc/Hex)纯化,得到N,N-双十四烷基乙烯磺酰胺(28)(190mg,31%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ6.41(m,1H),6.18(D,J=16Hz,1H),5.88(D,J=12Hz,1H),3.09(t,J=8Hz,4H),1.56(BS,8H),1.27(BS,41H),0.87(t,J=8Hz,6H)。

[0400] b.二烷基磺酰胺PEG脂质(29)的合成

[0401] 将甲氧基PEG 2000(6)(1.2g,0.56mmol)和NaH(于矿物油中的60%分散体)(22mg,0.56mmol)在无水THF中在室温下搅拌30min。添加N,N-双十四烷基乙烯磺酰胺(28)(280mg,0.56mmol)并且将反应物在室温下搅拌16h。将反应物真空浓缩并且将残余物通过自动化快速色谱(7% MeOH/DCM)纯化,得到二烷基磺酰胺PEG脂质(29)(500mg,34%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ3.84(m,3H),3.58(m,110H),3.37(s,3H),3.21(t,J=8Hz,2H),3.13(t,t,8Hz,3H),1.72(BS,4H),1.56(BS,4H),1.27(BS,34H),0.87(t,J=8Hz,6H)。

[0413] 将肝脏的冷冻等分试样解冻并且使用FastPrep®均质器在1mL的1xCLLR (细胞培养溶解试剂) 中均质化。然后将匀浆在4°C下在16,000RPM下离心10分钟。将二十(20)μL的上清液加载至96孔白色板中并且在添加荧光素酶试剂 (Promega荧光素酶分析系统) 之后测量发光。通过将均质化样品的发光与荧光素酶蛋白质标准相比较来确定荧光素酶活性。为了解释肝脏匀浆中的组分对发光的任何淬灭, 将荧光素酶添加至未处理动物的肝脏匀浆中并且测量所得发光。将所得淬灭因数应用于所有样品以获得校正的荧光素酶活性并且根据每单位所分析组织的质量进行规范化。

[0414] 在BALB/c小鼠中静脉内施用之后6小时测量到0.5mg/kg含有荧光虫荧光素酶mRNA和各种PEG-缀合脂质的LNP的荧光素酶活性 (n=4); 结果如下表所示。

处理	静脉内施用后 6h	
	Luc 活性(每克肝脏的皮克数)	标准偏差(每克肝脏的皮克数)
[LNP 摩尔比为 1.6: 54.6: 32.8: 10.9; PEG-脂质:可离子化脂质:胆固醇:DSPC]		
PEG-C-DMA (基准)	4.91E+07	7.95E+06
[0415] 化合物 9 - 实施例 1	8.26E+07	1.44E+07
化合物 13 - 实施例 2	5.98E+07	1.22E+07
化合物 20 - 实施例 3	2.81E+07	3.16E+06
化合物 24 - 实施例 4	2.88E+07	3.84E+06
化合物 26 - 实施例 5	6.65E+07	1.81E+07
化合物 29 - 实施例 6	7.25E+07	4.03E+07

[0416] 实施例12. 大鼠模型中的重复剂量效能和耐受性

[0417] 脂质纳米粒子制剂的制备. 如实施例9中所述制备这些制剂, 除了制剂封装人红细胞生成素 (EPO)mRNA (TriLink Biotechnologies, L-7209)。

[0418] LNP的体内施用. 将封装人EPO mRNA的LNP制剂以0.25mg/kg静脉注射至雄性斯普雷格多利大鼠 (Sprague Dawley rat) (7-8周龄) 中。在第0天、第7天以及第14天, 每周(每7天一次) 对动物进行给药持续总共3个剂量。在每次注射当天, 将LNP储备液过滤并且用磷酸盐缓冲盐水稀释至所需给药浓度。在施用测试物品之前, 在给药后6h, 并且在终末时间点 (第三剂量后6h), 将血液样品收集至EDTA微量采血管中并且在4°C下在16,000x g下离心5分钟。将所有血浆样品储存在-80°C下, 直至进行EPO表达和抗PEG抗体分析。

[0419] 抗PEG抗体分析. 使用ELISA方法来测量大鼠血浆样品中抗PEG IgM和IgG抗体的存在。将Millipore Multiscreen-HTS IP板 (Millipore, MSIPN4510) 用0.5mg/mL PEG脂质包被并且保持在37°C下直至干燥。在用含10% FBS的PBS封闭并且用含1% FBS的PBS洗涤一次之后, 以1/30稀释度将血浆样品涂铺至2个单独的板上。在洗涤三次之后, 将缀合至过氧化物酶 (Cedarlane, 112-036-072) 的山羊抗大鼠IgG添加至一个板中, 并且将缀合至过氧化物酶 (Cedarlane, 112-036-075) 的山羊抗大鼠IgM添加至第二板中。在孵育和洗涤之后, 添加TMB底物 (BD Biosciences, 555214) 以便显色并且用2N硫酸停止反应。将每个孔的内容物

转移至透明96孔板,用于在450/5700D下读取吸光度。

[0420] 如果带有核酸有效负荷的LNP在血液中循环延长的时间,那么它们可为免疫原性的。识别LNP(通常PEG聚合物)的表面化学的抗体(IgG/IgM)增加并且容易在血液中检测到。对于重复施用LNP来说这可为有问题的,因为由第一剂量诱导的抗PEG抗体检测并且清除后续剂量,从而引起效能损失和超敏反应。更具炎性的包括mRNA的有效负荷使效应加重,所述更具炎性的有效负荷不能在与作为缓和策略的其他核酸有效负荷(例如siRNA)相同的程度上进行化学修饰。PEG脂质被确定促进由肝脏更快地摄入,并且从血液更快地清除率。PEG-C-DMA用作基准,所述基准已用于若干临床siRNA-LNP产品中。与基准PEG-C-DMA相比,本发明的化合物(诸如化合物26)展现低得多的抗体(IgG/IgM)反应(参见图1和图2)。

[0421] EPO表达分析.根据制造商的说明书使用EPO ELISA分析(目录号DEP00;R&D systems)确定大鼠血浆中的人EPO浓度确定。

[0422] 在SD大鼠中在每个0.25mg/kg静脉内剂量之后6小时测量EPO表达(n=4)。在重复施用含有PEG-C-DMA但不含化合物26的LNP后观察到效能(人EPO表达)损失(参见图3)。这些数据与由第一剂量诱导的抗PEG抗体的水平有关,所述由第一剂量诱导的抗PEG抗体识别并且快速清除后续剂量从而使其无效。

[0423] 实施例13.非人灵长类动物模型中的单剂量OTC表达

[0424] 脂质纳米粒子制剂的制备.如实施例9中所述制备这些制剂,除了制剂封装在TriLink Biotechnologies定制合成的编码人鸟氨酸氨甲酰基转移酶(OTC)的mRNA。

[0425] LNP的体内施用.经由60min静脉输注以0.5mg/kg向原初食蟹猴(n=4;2-3岁)施用封装人OTC mRNA的LNP制剂。在给药当天,将LNP储备液过滤并且用0.9%盐水稀释至所需给药浓度。在起始输注后的各个时间点将血液样品收集至EDTA微量采血管中并且在4°C下在16,000x g下离心5分钟。将所有血浆样品储存在-80°C下直至进行脂质分析。在终点时间点(给药后24h),从左外叶收集500mg的肝脏并且在液氮中快速冷冻。将肝脏样品储存在冷冻器环境中,以维持-80°C直至通过基于LC-MS的方法对人OTC表达进行分析。

[0426] 脂质清除.使用基于LC-MS的方法来测量随时间推移存在于NHP血浆样品中的可离子化脂质的量(参见图4)。PEG-C-DMA与化合物9均包含缀合至分子量为约2000g/mol的PEG聚合物组分的两个C14烷基链;然而,化合物9被报道在NHP中的清除快得多。这和与PEG-C-DMA相比包含本发明的PEG-脂质的LNP的免疫原性更小的观测一致。化合物31为化合物9的类似物,但具有更大的脂质锚,从而使其保持在LNP中(两个C16烷基链,而不是C14链)。这表明,具有更大的锚的PEG-脂质更紧密地结合至LNP并且促成更长的循环时间。

[0427] OTC蛋白表达.在投药后24h,使用基于LC-MS的方法来测量存在于NHP肝脏样品中的人OTC蛋白的量。(参见图5)正如所料,化合物31的药代动力学越慢在NHP肝脏中引起的蛋白质表达更低,而PEG-C-DMA与化合物9均报道类似水平的人OTC蛋白。

[0428] 实施例14.在肌肉内施用之后小鼠OVA模型中的免疫原性

[0429] 脂质纳米粒子制剂的制备.如实施例9中所述制备这些制剂,除了制剂封装卵清蛋白(OVA)mRNA(TriLink Biotechnologies,L-7210)。

[0430] LNP的体内施用.在第0天(初免)和第21天(加强免疫)以1 μ g剂量向BALB/c小鼠(7-8周龄)肌肉内施用封装OVA mRNA的LNP制剂。在给药前以及第7天、第14天、第21天以及第28天将血液样品收集至EDTA微量采血管中。在第35天收集终点血液。将血浆样品储存在冷

冻器环境中以维持-80℃直至通过ELISA对抗OVA IgG进行分析。

[0431] 抗OVA IgG分析.使用ELISA方法来测量抗OVA IgG抗体的产生,这是在疫苗环境中的功效的度量。(参见图6)配制1.5:50:38.5:10(PEG-脂质:可离子化脂质:胆固醇:DSPC)的两种本发明的PEG脂质(化合物26、化合物30),以及基准化合物PEG-DMG。PEG-DMG为包含两个C14烷基链的可商购获得的PEG脂质并且用于Moderna COVID疫苗mRNA-1273中,所述疫苗在此研究中充当基准。此外,将所述LNP组合物与用于mRNA-1273和BNT162b2 COVID疫苗的LNP组合物进行比较。在两个IM剂量之后,含有化合物26或化合物30的LNP报道与基准比较物(PEG-DMG、mRNA-1273以及BNT162b2)类似的抗OVA IgG水平。

[0432] 将借助于具体实施例更详细地描述本发明。以下实施例是出于说明性目的而提供并且不旨在以任何方式限制本发明。

[0433] 应了解,以上描述旨在为说明性的并且不具限制性。在阅读以上描述后,对本领域技术人员来说许多实施方案将为显而易见。因此,本发明的范畴不应参考以上描述来确定,而应替代地参考此类权利要求以及随附权利要求有权具有的等效物的全部范畴来确定。包括专利申请、专利、PCT公布以及基因库登录号的所有文章和参考文献的公开内容出于所有目的以引用的方式并入本文中。

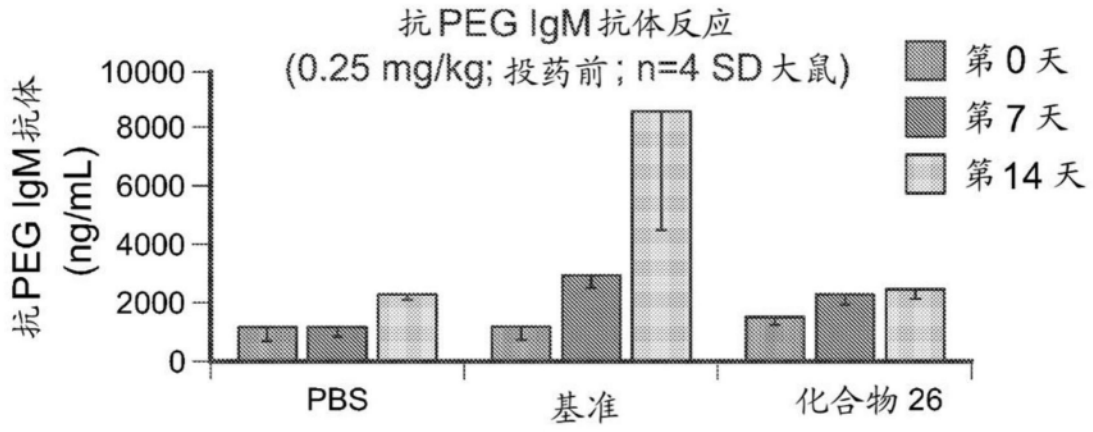


图1

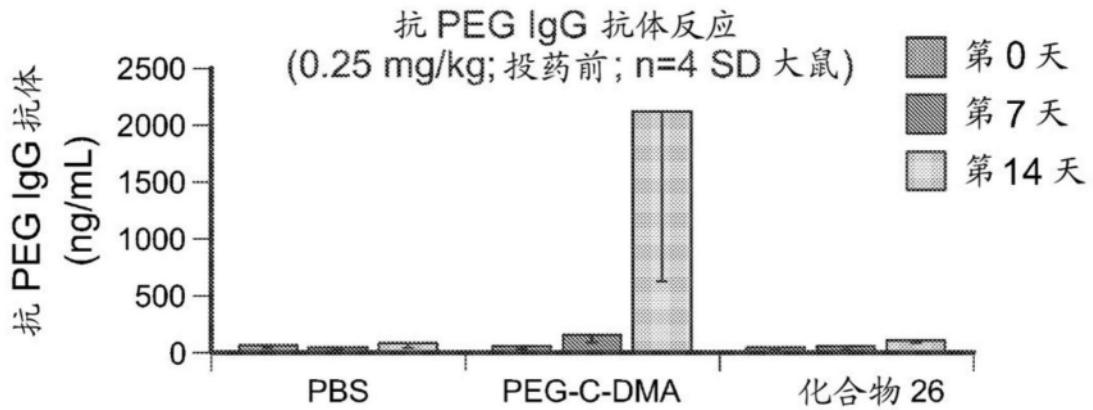


图2

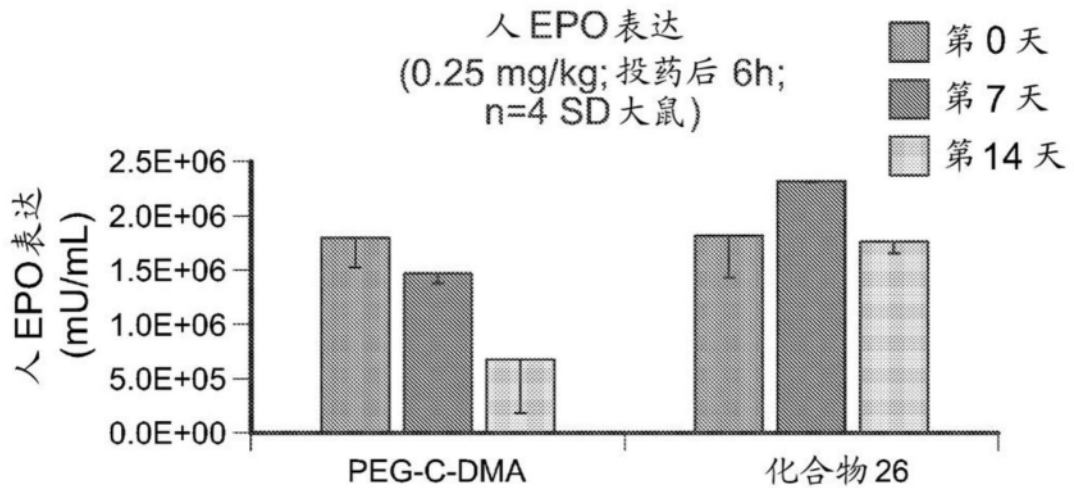


图3

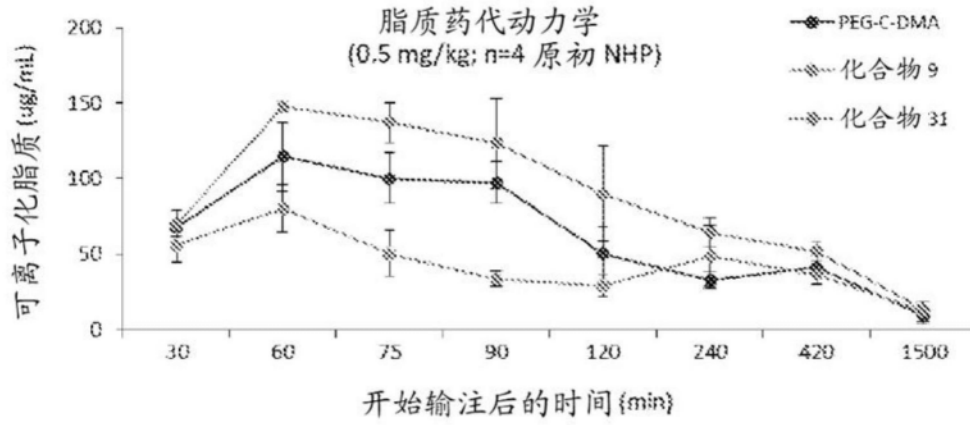


图4

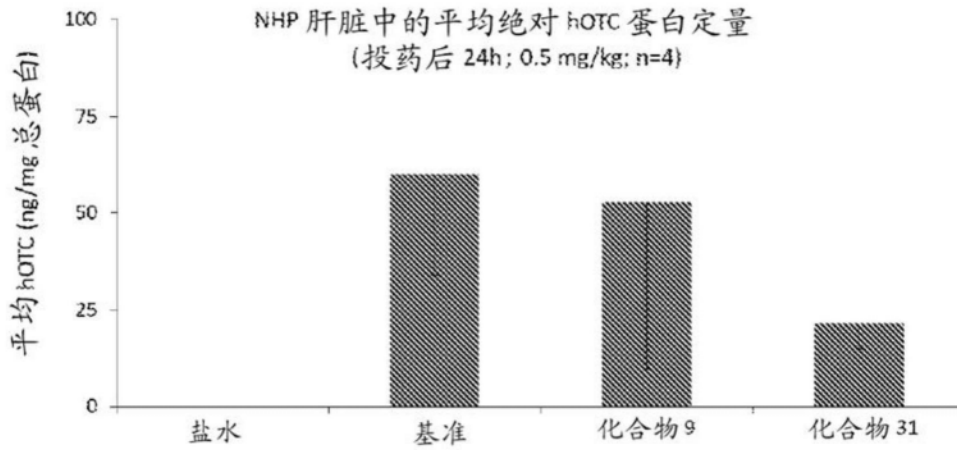


图5

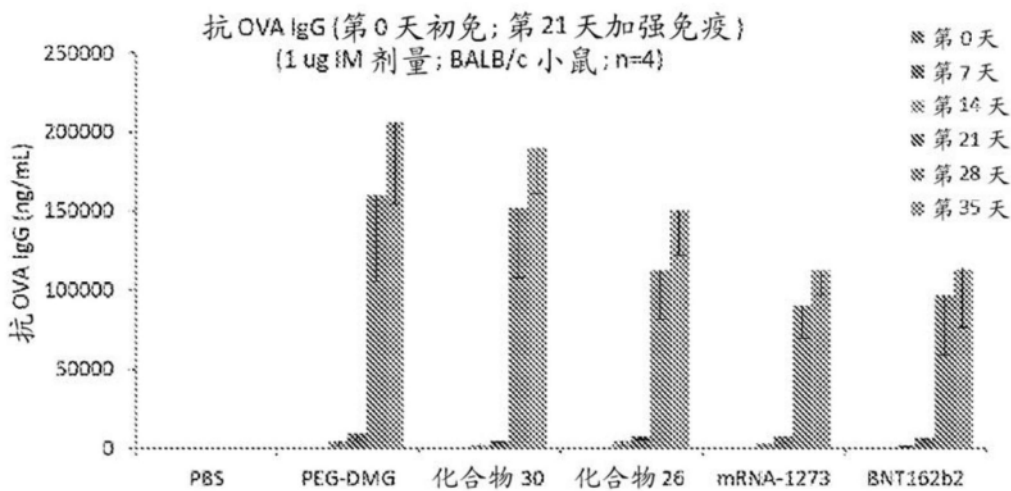


图6