



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118695875 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 24

(21) 申请号 202380021541.X

(22) 申请日 2023.02.14

(30) 优先权数据

22156604.5 2022.02.14 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/053639 2023.02.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/152398 EN 2023.08.17

(71) 申请人 潘泽尔纳疗法有限公司

地址 德国

(72) 发明人 V·菲灵 O·凯尔 J·卡夫曼

A·莫嘎

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

专利代理师 王娜

(51) Int.Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/7052 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

权利要求书3页 说明书44页 附图4页

(54) 发明名称

在用于治疗 and/或预防疾病的方法中使用的
制剂

(57) 摘要

本发明涉及用于在疗法中使用的制剂,其中
疗法包括向受试者局部施用制剂,其中局部施用
选自自由肌内施用、皮下施用、玻璃体内施用、鞘内
施用、瘤内施用、脑内施用和皮内施用组成的组,
其中所述制剂包含脂质纳米颗粒,其中脂质纳米
颗粒包括包含第一和第二脂质的脂质组合物和
治疗活性核酸分子,且其中脂质纳米颗粒是两性
的、总体上带中性电荷的脂质纳米颗粒。

1. 一种用于在疗法中使用的制剂,
其中疗法包括向受试者局部施用所述制剂,其中所述局部施用选自由肌肉施用、皮下施用和皮内施用组成的组,
其中所述制剂包含脂质纳米颗粒,
其中所述脂质纳米颗粒包含脂质组合物和治疗活性剂,并且,在7至8的pH下是总体上带中性电荷的两性脂质纳米颗粒,
其中所述脂质组合物包含第一脂质和第二脂质,
其中所述第一脂质选自CHEMS(胆固醇半琥珀酸酯)、烷基羧酸、二酰基甘油半琥珀酸酯和二酰基-磷脂酰丝氨酸,其中优选地所述烷基羧酸是12至20个烃的饱和或不饱和的支链或直链烷基羧酸,并且其中优选地所述酰基基团是12至20个烃的饱和或不饱和的支链或直链烷基基团,
其中所述第二脂质在约7.2至约7.5的pH下、优选地在约7.4的pH下携带多于一个阳离子电荷,并且其中所述第二脂质优选地选自由 β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N,N-二烷基-酰胺和L-精氨酸基- β -丙氨酸-N,N-二烷基-酰胺组成的组,其中所述烷基链彼此独立地是12至20个烃的饱和或不饱和的支链或直链烷基基团,和
其中所述治疗活性剂是治疗活性的核酸分子。
2. 权利要求1的用于所述用途的制剂,其中,所述脂质组合物包含第三脂质和/或第四脂质,其中所述第三脂质是中性脂质,并且所述第四脂质是PEG化脂质。
3. 权利要求1至2中任一项的用于所述用途的制剂,其中,所述脂质纳米颗粒的表面、优选地所述脂质纳米颗粒的外表面在6.7至7.7的中性pH值下提供大致相同数目的正(阳离子)电荷和负(阴离子)电荷。
4. 权利要求1至3中任一项的用于所述用途的制剂,其中,所述第一脂质与所述第二脂质的摩尔比使得所述脂质组合物的负(阴离子)电荷的数目和所述脂质组合物的正(阳离子)电荷的数目在6.7至7.7的pH下大致相同。
5. 权利要求2至4中任一项的用于所述用途的制剂,其中,所述第三脂质是(a)选自由磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱组成的组的两性离子磷脂或(b)选自包含动物甾醇和植物甾醇的组的不带电荷的甾醇脂质。
6. 权利要求5的用于所述用途的制剂,其中,所述两性离子磷脂选自由以下组成的组: DSPC(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱)、DMPC(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱)、DSPE(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DMPE(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DLPE(1,2-月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DPhyPE(1,2-二植烷酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DOPE(1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)和POPE(1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)。
7. 权利要求2至6中任一项的用于所述用途的制剂,其中,所述第四脂质选自包含以下的组: 甲氧基PEG-DSPE、甲氧基PEG-DMPE、甲氧基PEG-DMG、甲氧基PEG-DPG、甲氧基PEG-DSG、甲氧基PEG-c-DMA、2(甲氧基PEG)-N,N-二-十八烷基乙酰胺、2(甲氧基PEG)-N,N-二-十四烷基乙酰胺、甲氧基PEG-C8-神经酰胺和甲氧基PEG-C16-神经酰胺的组。
8. 权利要求2至7中任一项的用于所述用途的制剂,其中,所述脂质组合物包含:
-CHEMS作为所述第一脂质,

- β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺作为所述第二脂质,
- 胆固醇作为所述第三脂质,
- 甲氧基PEG2000-DMPE作为所述第四脂质。

9. 权利要求2至8中任一项的用于所述用途的制剂,其中,所述脂质组合物的摩尔比是(a):

- 20-80mol%的所述第一脂质,
- 20-80mol%的所述第二脂质,
- 10-50mol%的所述第三脂质,和
- 1-10mol%的所述第四脂质,

其中所述脂质组合物的总脂质含量是100mol%,或

(b):

- 20-60mol%的所述第一脂质,
- 20-60mol%的所述第二脂质,
- 10-40mol%的所述第三脂质,和
- 1-5mol%的所述第四脂质,

其中所述脂质组合物的总脂质含量是100mol%。

10. 权利要求9的用于所述用途的制剂,其中,

所述脂质组合物包含

- 49mol%的CHEMS作为所述第一脂质,

-29mol%的 β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺作为所述第二脂质,

- 20mol%的胆固醇作为所述第三脂质,和

- 2mol% mPEG2000-DMPE作为所述第四脂质;

或

所述脂质组合物包含:

- 48mol%的CHEMS作为所述第一脂质

-29mol%的 β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺作为所述第二脂质

- 18mol%的胆固醇作为所述第三脂质,和

- 5mol%的甲氧基PEG2000-DMPE作为所述第四脂质。

11. 权利要求1至10中任一项的用于所述用途的制剂,其中,所述脂质纳米颗粒的平均粒度是约15nm至约400nm、优选地约25nm至约200nm并且更优选地约40nm至约100nm,如通过动态光散射(DLS)所测定的。

12. 权利要求1至11中任一项的用于所述用途的制剂,其中,所述脂质纳米颗粒的 ζ -电势是约-10mV至约+10mV、优选地约-5mV至约+5mV。

13. 权利要求1至12中任一项的用于所述用途的制剂,其中,所述治疗活性核酸分子选自以下组成的组:mRNA、编码Cas (CRISPR相关内切核酸酶蛋白)的mRNA、质粒-DNA、ssDNA (单链DNA)、适配体、Spiegelmer、siRNA分子、反义分子、miRNA (微小RNA) 分子、sgRNA (单链向导RNA) 分子、saRNA (自扩增RNA) 分子及其组合。

14. 权利要求1至13中任一项的用于所述用途的制剂,其中,疗法包括用于治疗和/或预防受试者中的疾病的方法,并且其中所述方法包括向所述受试者局部施用所述制剂,其中优选地局部施用选自自由肌内施用、皮下施用和皮内施用组成的组。

在用于治疗和/或预防疾病的方法中使用的制剂

[0001] 本发明涉及包含有效负载分子和脂质组合物的制剂、用于局部递送有效负载的制剂、用于在用于治疗和/或预防疾病的方法中使用的制剂、用于在用于局部递送有效负载的方法中使用的制剂、包含制剂的药物组合物、用于局部递送有效负载的药物组合物、用于在用于治疗和/或预防疾病的方法中使用的药物组合物以及用于制备所述制剂的方法。

[0002] 目前所应用的用于肌内、皮下和皮内施用RNA的脂质纳米颗粒 (LNP) 基于强阳离子脂质并且甚至更通常基于pH-敏感的阳离子脂质,也称为可离子化阳离子脂质。

[0003] 强阳离子LNP由脂质系统制成,该脂质系统除了中性辅助脂质 (co-lipid) 和PEG化脂质之外还含有强阳离子脂质。所述强阳离子脂质的pKa通常高于9,这意味着所述阳离子脂质在宽pH范围上是带正电荷的。因此,此种强阳离子脂质在酸性 (pH 3至6.7) 和中性pH值 (pH 6.8至7.4) 下是带正电荷的,并且甚至在轻度 (pH 7.5至8) 和中度碱性 (pH 8.1至10) pH值下示出长久的阳离子特性。该特征允许总体带负电荷的核糖核酸 (RNA) 的强络合以及与总体带负电荷的细胞膜 (如胞内体膜) 的强相互作用,该细胞膜旨在通过包含此类强阳离子脂质的LNP转染。然而,该类脂质的强阳离子电荷与其他带负电荷的组分诸如细胞外物质如蛋白质相互作用,因此包含RNA和脂质的复合物迅速解离,并且因此释放的RNA被迅速降解。与带负电荷的细胞外物质的此种相互作用也可能导致脂质纳米颗粒的聚集,从而抑制LNP进入靶细胞的功能性摄取。

[0004] 在另一方面,pH-敏感的阳离子LNP由中性辅助脂质、PEG化脂质和可离子化阳离子脂质制成,其特征为在8至9.5之间的典型pKa值。由于相对低的pKa值,此种阳离子脂质在酸性pH值下 (典型地在4.5至5.5的pH下) 是带正电荷的,并且在这些酸性pH值下,其能够与RNA静电相互作用,或与RNA复合并由此形成包封RNA的LNP。一旦形成LNP并且将悬浮介质的pH调节至中性pH值,LNP的表面处的pH-敏感脂质就会失去其正电荷,例如,由于氨基基团的去质子化,而RNA仍然被包封在LNP颗粒内。因此,LNP表面可以被描述为相当中性和疏水性。这些LNP最初被设计为用于静脉内应用的靶向肝细胞的LNP,并且由于其与疏水性物质如ApoE的强相互作用而闻名。

[0005] 本发明的潜在问题是提供用于递送有效负载、优选地在中性或生理pH值下带负电荷的有效负载的装置,更优选地有效负载是核酸分子并且最优选地是RNA分子。

[0006] 本发明的另一个潜在问题是提供适合用于局部施用有效负载、优选地在中性或生理pH值下带负电荷的有效负载的装置,更优选地有效负载是核酸分子并且最优选地是RNA分子。

[0007] 本发明的另一个潜在问题是提供用于局部施用有效负载、优选地在中性或生理pH值下带负电荷的有效负载的装置,更优选地有效负载是核酸分子并且最优选地是RNA分子。

[0008] 本发明的另一个潜在问题是提供适合用于局部递送有效负载、优选地在中性或生理pH值下带负电荷的有效负载的装置,更优选地有效负载是核酸分子并且最优选地是RNA分子。

[0009] 本发明的另一个潜在问题是提供用于局部递送有效负载、优选地在中性或生理pH值下带负电荷的有效负载的装置,更优选地有效负载是核酸分子并且最优选地是RNA分子。

[0010] 本发明的另一个潜在问题是提供适合用于治疗和/或预防疾病的装置,其中治疗和/或预防疾病包括局部施用有效负载、优选地在中性或生理pH值下带负电荷的有效负载,更优选地有效负载是核酸分子并且最优选地是RNA分子。

[0011] 本发明的另一个潜在问题是提供用于治疗和/或预防疾病的装置,其中治疗和/或预防疾病包括局部施用有效负载、优选地在中性或生理pH值下带负电荷的有效负载,更优选地有效负载是核酸分子并且最优选地是RNA分子。

[0012] 本发明还另外的潜在问题是提供用于生产此种装置的方法。

[0013] 这些和其他问题通过所附独立权利要求的主题来解决;优选实施方案可以取自所附从属权利要求。

[0014] 此外,这些和其他问题也通过以下方面及其实施方案的主题来解决。

[0015] 本发明的潜在问题在第一方面(其也是第一方面的第一实施方案)通过包含有效负载分子和脂质组合物的制剂来解决,其中脂质组合物包含第一脂质和第二脂质,其中第一脂质是具有至少一个具有4至7的pKa值的分子部分的阴离子脂质,并且第二脂质是(a)具有至少一个具有大于9.5至13.5之间的pKa值的分子部分的阳离子脂质,或(b)阳离子脂质,其不依赖pH地带正电荷。

[0016] 在第一方面的第二实施方案(其也是第一方面的第一实施方案的实施方案)中,第一脂质的pKa值是在5至7之间。

[0017] 在第一方面的第三实施方案(其也是第一方面的第一和第二实施方案的实施方案)中,第一脂质的pKa值是在5.5至6.5之间。

[0018] 在第一方面的第四实施方案(其也是第一方面的第一、第二和第三实施方案的实施方案)中,第二脂质的该至少一个分子部分的pKa值是 $9.5 < pKa \leq 13.5$,优选地pKa值是在9.8至13.2之间。

[0019] 在第一方面的第五实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三和第四实施方案的实施方案)中,第二脂质的该至少一个分子部分的pKa值是在10至13之间。

[0020] 在第一方面的第六实施方案(其也是第一方面的第一、第二和第三实施方案的实施方案)中,第二脂质是不依赖pH地带正电荷的脂质。

[0021] 在第一方面的第七实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五和第六实施方案的实施方案)中,第一脂质携带至少一个负电荷。

[0022] 在第一方面的第八实施方案(其也是第一方面的第七实施方案的实施方案)中,第一脂质在中性pH值下携带至少一个负电荷。

[0023] 在第一方面的第九实施方案(其也是第一方面的第八实施方案的实施方案)中,中性pH值是约6.7至约7.7的pH值、优选地约6.9至约7.5的pH值、更优选地约7.2至约7.5的pH值。

[0024] 在第一方面的第十实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八和第九实施方案的任一实施方案)中,第二脂质携带至少一个正电荷。

[0025] 在第一方面的第十一实施方案(其也是第一方面的第十实施方案的实施方案)中,第二脂质在中性pH值下携带至少一个正电荷。

[0026] 在第一方面的第十二实施方案(其也是第一方面的第十一实施方案的实施方案)中,中性pH值是约6.7至约7.7的pH值、优选地约6.9至约7.5的pH值、更优选地约7.2至约7.5

的pH值。

[0027] 在第一方面的第13实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一和第十二实施方案的任一实施方案)中,第一脂质携带至少一个羧基基团。

[0028] 在第一方面的第14实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二和第十三实施方案,优选地第十三实施方案的任一实施方案)中,第二脂质携带至少一个选自包含选自以下的组的基团:氨基、亚氨基、胍基、被烷基取代的氨基、被烷基取代的亚氨基和被烷基取代的胍基。

[0029] 在第一方面的第15实施方案(其也是第一方面的第十三实施方案的实施方案)中,烷基是直链和/或支链C1、C2、C3或C4烃基团。

[0030] 在第一方面的第16实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四和第十五实施方案中的任一实施方案)中,脂质组合物包含第三脂质。

[0031] 在第一方面的第17实施方案(其也是第一方面的第十六实施方案的实施方案)中,第三脂质是中性脂质。

[0032] 在第一方面的第18实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六和第十七实施方案的实施方案)中,脂质组合物包含第四脂质。

[0033] 在第一方面的第19实施方案(其也是第一方面的第十八实施方案的实施方案)中,第四脂质是PEG化脂质。

[0034] 在第一方面的第20实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七、第十八和第十九实施方案的实施方案)中,脂质组合物形成脂质纳米颗粒。

[0035] 在第一方面的第21实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七、第十八和第十九实施方案的实施方案)中,脂质组合物包含脂质纳米颗粒。

[0036] 在第一方面的第22实施方案(其也是第一方面的第二十实施方案和第21实施方案的实施方案)中,脂质纳米颗粒的表面提供约相同数目的正电荷和负电荷。

[0037] 在第一方面的第23实施方案(其也是第一方面的第二十二实施方案的实施方案)中,脂质纳米颗粒的表面是脂质纳米颗粒的外表面。

[0038] 在第一方面的第24实施方案(其也是第一方面的第二十实施方案和第21实施方案的实施方案)中,在脂质纳米颗粒的表面上存在约相同数目的正电荷和负电荷。

[0039] 在第一方面的第25实施方案(其也是第一方面的第二十四实施方案的实施方案)中,脂质纳米颗粒的表面是脂质纳米颗粒的外表面。

[0040] 在第一方面的第26实施方案(其也是第一方面的第二十二、第二十三、第二十四和第二十五实施方案的实施方案)中,正电荷的数目和负电荷的数目是在中性pH值下各自的正(阳离子)和负(阴离子)电荷的数目。

[0041] 在第一方面的第27实施方案(其也是第一方面的第二十六实施方案的实施方案)中,中性pH值是约6.7至约7.7、优选地约6.9至约7.5、更优选地约7.2至约7.5的pH值。

[0042] 在第一方面的第28实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26和第27实施方案的实施方案)中,脂质组合物包含在分散介质中的第一和第二脂质。

[0043] 在第一方面的第29实施方案(其也是第一方面的第28实施方案的实施方案)中,分散介质包含脂质纳米颗粒。

[0044] 在第一方面的第30实施方案(其也是第一方面的第28和第29实施方案的实施方案)中,分散介质包含连续相。

[0045] 在第一方面的第31实施方案(其也是第一方面的第30实施方案的实施方案)中,连续相包含药学上可接受的水性缓冲液体系,优选地缓冲液体系具有生理pH值和等渗强度并且进一步包含冷冻保护剂,更优选地缓冲液体系具有7.0至7.4的pH值和250至330mosmol/kg的渗透压重量浓度并且包含选自包含蔗糖和海藻糖的组的冷冻保护剂,并且甚至更优选地缓冲液体系是pH 7.4的10mM磷酸盐或10mM TRIS/HCl缓冲液并且包含270mM蔗糖作为冷冻保护剂。

[0046] 在第一方面的第32实施方案(其也是第一方面的第28、第29、第30和第31实施方案的实施方案)中,分散介质的pH值是中性pH值。

[0047] 在第一方面的第33实施方案(其也是第一方面的第32实施方案的实施方案)中,中性pH值是约6.7至约7.7、优选地约6.9至约7.5、更优选地约7.2至约7.5的pH值。

[0048] 在第一方面的第34实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33实施方案的实施方案)中,第一脂质与第二脂质的摩尔比使得由脂质组合物提供的负(阴离子)电荷的数目与由脂质组合物提供的正(阳离子)电荷的数目大约相同。

[0049] 在第一方面的第35实施方案(其也是第一方面的第34实施方案的实施方案)中,脂质组合物的第一脂质与脂质组合物的第二脂质的摩尔比使得在脂质纳米颗粒的表面上由脂质组合物提供的负电荷的数目与在脂质纳米颗粒的表面上由脂质组合物提供的正电荷的数目大约相同。

[0050] 在第一方面的第36实施方案(其也是第一方面的第35实施方案的实施方案)中,脂质纳米颗粒的表面是脂质纳米颗粒的外表面。

[0051] 在第一方面的第37实施方案(其也是第一方面的第35和第36实施方案的实施方案)中,在脂质纳米颗粒的表面上由脂质组合物提供的负电荷的数目与在脂质纳米颗粒的表面上由脂质组合物提供的正电荷的数目在中性pH值下大约相同。

[0052] 在第一方面的第38实施方案(其也是第一方面的第37实施方案的实施方案)中,中性pH值是约6.7至约7.7、优选地约6.9至约7.5、更优选地约7.2至约7.5的pH值。

[0053] 在第一方面的第39实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33实施方案的实施方案)中,第一脂质与第二脂质的摩尔比使得脂质组合物的负(阴离子)电荷的数目与脂质组合物的正(阳离子)电荷的数目大约相同。

[0054] 在第一方面的第40实施方案(其也是第一方面的第39实施方案的实施方案)中,脂质组合物的第一脂质与脂质组合物的第二脂质的摩尔比使得在脂质纳米颗粒的表面上脂质组合物的负电荷的数目与在脂质纳米颗粒的表面上脂质组合物的正电荷的数目大约相同。

[0055] 在第一方面的第41实施方案(其也是第一方面的第40实施方案的实施方案)中,脂质纳米颗粒的表面是脂质纳米颗粒的外表面。

[0056] 在第一方面的第42实施方案(其也是第一方面的第40和第41实施方案的实施方案)中,在脂质纳米颗粒的表面上脂质组合物的负电荷的数目与在脂质纳米颗粒的表面上脂质组合物的正电荷的数目在中性pH值下大约相同。

[0057] 在第一方面的第43实施方案(其也是第一方面的第42实施方案的实施方案)中,中性pH值是约6.7至约7.7、优选地约6.9至约7.5、更优选地约7.2至约7.5的pH值。

[0058] 在第一方面的第44实施方案(其也是第一方面的第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42和第43实施方案的实施方案)中,脂质纳米颗粒是两性脂质纳米颗粒。

[0059] 在第一方面的第45实施方案(其也是第一方面的第44实施方案的实施方案)中,脂质纳米颗粒在约7至约8的pH值下、优选地在约7.4的pH下是两性脂质纳米颗粒。

[0060] 在第一方面的第46实施方案(其也是第一方面的第44和第45实施方案的实施方案)中,两性脂质纳米颗粒是总体上带中性电荷的脂质纳米颗粒。

[0061] 在第一方面的第47实施方案(其也是第一方面的第46实施方案的实施方案)中,两性脂质纳米颗粒在约7至约8的pH值下、优选地在约7.4的pH下是总体上带中性电荷的脂质纳米颗粒。

[0062] 在第一方面的第48实施方案(其也是第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46和第47实施方案的实施方案)中,第一脂质携带以pH依赖性方式去质子的羧基基团,并且第二脂质携带以pH依赖性方式质子化的三种官能团,其中脂质纳米颗粒具有如图3中示出的图表(I)的pH依赖性总表面电荷。

[0063] 在第一方面的第49实施方案(其也是第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46和第47实施方案的实施方案)中,第一脂质携带以pH依赖性方式去质子的羧基基团,并且第二脂质携带以pH依赖性方式质子化的两种官能团,其中脂质纳米颗粒具有如图4中示出的图表(II)的pH依赖性总表面电荷。

[0064] 在第一方面的第50实施方案(其也是第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46和第47实施方案的实施方案)中,第一脂质携带以pH依赖性方式去质子的羧基基团,并且第二脂质携带以pH依赖性方式质子化的一种官能团,其中脂质纳米颗粒具有如图5中示出的图表(III)的pH依赖性总表面电荷。

[0065] 在第一方面的第51实施方案(其也是第48、第49和第50实施方案的实施方案)中,脂质纳米颗粒的pH依赖性总表面电荷由脂质组合物的第一脂质所提供的负电荷和由脂质组合物的第二脂质所提供的正电荷产生。

[0066] 在第一方面的第52实施方案(其也是第一方面的第48、第49、第50和第51实施方案的实施方案)中,脂质纳米颗粒的总表面电荷是分散介质中存在的脂质颗粒的总表面电荷。

[0067] 在第一方面的第53实施方案(其也是第一方面的第52实施方案的实施方案)中,脂质纳米颗粒的总表面电荷是脂质纳米颗粒的外表面的总电荷。

[0068] 在第一方面的第54实施方案(其也是第一方面的第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52和第53实施方案的实施方案)中,脂质纳米颗粒是亲水性纳米颗粒。

[0069] 在第一方面的第55实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53和第54实施方案的每一和任一实施方案)中,制剂包含脂质纳米颗粒,其中脂质纳米颗粒包含脂质组合物和任选地治疗活性剂,并且,在7至8之间的pH下,纳米颗粒是总体上带中性电荷的两性脂质纳米颗粒,

[0070] 其中脂质组合物包含第一脂质和第二脂质,

[0071] 其中第一脂质选自自由以下组成的组:胆固醇与二羧酸、烷基羧酸、烯基羧酸的单酯,二酰基甘油酯与二羧酸的单酯和二酰基磷脂酰醇;

[0072] 其中第二脂质是携带多于一个阳离子电荷的脂质;和

[0073] 其中优选地治疗活性剂是治疗活性核酸分子。

[0074] 在第一方面的第56实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54和第55实施方案的每一和任一实施方案)中,第一脂质是胆固醇与二羧酸的单酯。

[0075] 在第一方面的第57实施方案(其也是第一方面的第56实施方案的实施方案)中,胆固醇与二羧酸的单酯的二羧酸选自自由琥珀酸、戊二酸和己二酸组成的组。

[0076] 在第一方面的第58实施方案(其也是第一方面的第57实施方案的实施方案)中,胆固醇与二羧酸的单酯是胆固醇半琥珀酸酯。

[0077] 在第一方面的第59实施方案(其也是第一方面的第57实施方案的实施方案)中,胆固醇与二羧酸的单酯是胆固醇半戊二酸酯。

[0078] 在第一方面的第60实施方案(其也是第一方面的第57实施方案的实施方案)中,胆固醇与二羧酸的单酯是胆固醇半己二酸酯。

[0079] 在第一方面的第61实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54和第55实施方案的每一和任一实施方案)中,第一脂质是烷基羧酸。

[0080] 在第一方面的第62实施方案(其也是第一方面的第61实施方案的实施方案)中,烷基羧酸是具有12、13、14、15、16、17、18、19或20个C原子的烷基羧酸。

[0081] 在第一方面的第63实施方案(其也是第一方面的第62实施方案的实施方案)中,烷基羧酸是具有14、15、16、17或18个C原子的烷基羧酸。

[0082] 在第一方面的第64实施方案(其也是第一方面的第62和第63实施方案的实施方案)中,烷基羧酸是直链羧酸。

[0083] 在第一方面的第65实施方案(其也是第一方面的第62、第63和第64实施方案的每一和任一实施方案)中,烷基羧酸是饱和烷基羧酸。

[0084] 在第一方面的第66(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54和第55实施方案的每一和任一实施方案)中,第一脂质是烯基羧酸。

[0085] 在第一方面的第67实施方案(其也是第一方面的第66实施方案的实施方案)中,烯基羧酸是具有12、13、14、15、16、17、18、19或20个C原子的烯基羧酸。

[0086] 在第一方面的第68实施方案(其也是第一方面的第67实施方案的实施方案)中,烯基羧酸是具有14、15、16、17或18个C原子的烯基羧酸。

[0087] 在第一方面的第69实施方案(其也是第一方面的第66、第67和第68实施方案的每一和任一实施方案)中,烯基羧酸是直链羧酸。

[0088] 在第一方面的第70实施方案(其也是第一方面的第66、第67、第68和第69实施方案的每一和任一实施方案)中,烯基羧酸是不饱和烷基羧酸,优选地烯基羧酸具有一个、两个或三个双键。

[0089] 在第一方面的第71实施方案(其也是第一方面的第70实施方案的实施方案)中,至少一个双键处于顺式构型。

[0090] 在第一方面的第72实施方案(其也是第一方面的第71实施方案的实施方案)中,所有双键均处于顺式构型。

[0091] 在第一方面的第73实施方案(其也是第一方面的第66、第67、第68、第69、第70、第71和第72实施方案的每一和任一实施方案)中,烯基羧酸选自油酸、亚油酸和亚麻酸组成的组。

[0092] 在第一方面的第74实施方案(其也是第一方面的第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72和第73实施方案的每一和任一实施方案)中,烯基羧酸是油酸。

[0093] 在第一方面的第75实施方案(其也是第一方面的第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72和第73实施方案的每一和任一实施方案)中,烯基羧酸是亚油酸。

[0094] 在第一方面的第76实施方案(其也是第一方面的第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72和第73实施方案的每一和任一实施方案)中,烯基羧酸是亚麻酸。

[0095] 在第一方面的第77实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第

51、第52、第53、第54和第55实施方案的每一和任一实施方案)中,第一脂质是二酰基甘油酯与二羧酸的单酯。

[0096] 在第一方面的第78实施方案(其也是第一方面的第77实施方案的实施方案)中,二酰基甘油酯与二羧酸的单酯的二羧酸选自由琥珀酸、戊二酸和己二酸组成的组。

[0097] 在第一方面的第79实施方案(其也是第一方面的第78实施方案的实施方案)中,二酰基甘油酯与二羧酸的单酯是二酰基甘油半琥珀酸酯。

[0098] 在第一方面的第80实施方案(其也是第一方面的第78实施方案的实施方案)中,二酰基甘油酯与二羧酸的单酯是二酰基甘油半戊二酸酯。

[0099] 在第一方面的第81实施方案(其也是第一方面的第78实施方案的实施方案)中,二酰基甘油酯与二羧酸的单酯是二酰基甘油半己二酸酯。

[0100] 在第一方面的第82实施方案(其也是第一方面的第77、第78、第79、第80和第81实施方案,优选地第一方面的第79实施方案的每一和任一实施方案)中,二酰基甘油的每个酰基基团各自且独立地是羧酸的残基,其中羧酸各自且单独地是具有12、13、14、15、16、17、18、19或20个C原子的羧酸。

[0101] 在第一方面的第83实施方案(其也是第一方面的第77、第78、第79、第80、第81和第82实施方案,优选地第一方面的第79实施方案的每一和任一实施方案)中,二酰基甘油的每个酰基基团各自且独立地是羧酸的残基,其中羧酸各自且单独地是具有14、15、16、17或18个C原子的羧酸。

[0102] 在第一方面的第84实施方案(其也是第一方面的第77、第78、第79、第80、第81、第82和第83实施方案的每一和任一实施方案,优选地第一方面的第79和第82和第83实施方案的任一实施方案)中,二酰基甘油的酰基基团中的至少一个是羧酸的残基,其中羧酸是直链羧酸。

[0103] 在第一方面的第85实施方案(其也是第一方面的第77、第78、第79、第80、第81、第82、第83和第84实施方案的每一和任一实施方案,优选地第一方面的第79和第82、第83和第84实施方案的任一实施方案)中,二酰基甘油的酰基基团中的至少一个是羧酸的残基,其中羧酸是饱和羧酸。

[0104] 在第一方面的第86实施方案(其也是第一方面的第77、第78、第79、第80、第81、第82、第83和第84实施方案的每一和任一实施方案,优选地第一方面的第79和第82、第83和第84实施方案的任一实施方案)中,二酰基甘油的酰基基团中的至少一个是羧酸的残基,其中羧酸是不饱和羧酸。

[0105] 在第一方面的第87实施方案(其也是第一方面的第86实施方案的每一和任一实施方案)中,不饱和羧酸具有至少一个双键。

[0106] 在第一方面的第88实施方案(其也是第一方面的第86和第87实施方案的每一和任一实施方案)中,不饱和羧酸具有一个、两个或三个双键。

[0107] 在第一方面的第89实施方案(其也是第一方面的第86、第87和第88实施方案的每一和任一实施方案)中,至少一个双键处于顺式构型。

[0108] 在第一方面的第90实施方案(其也是第一方面的第87、第88和第89实施方案的每一和任一实施方案)中,所有双键都处于顺式构型。

[0109] 在第一方面的第91实施方案(其也是第一方面的第87、第88、第89和第90实施方案

的每一和任一实施方案)中,不饱和羧酸选自由油酸、亚油酸和亚麻酸组成的组。

[0110] 在第一方面的第92实施方案(其也是第一方面的第91实施方案的实施方案)中,饱和羧酸是油酸。

[0111] 在第一方面的第93实施方案(其也是第一方面的第91实施方案的实施方案)中,饱和羧酸是亚油酸。

[0112] 在第一方面的第94实施方案(其也是第一方面的第91实施方案的实施方案)中,饱和羧酸是亚麻酸。

[0113] 在第一方面的第95实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54和第55实施方案的每一和任一实施方案)中,第一脂质是与醇的二酰基-磷脂酰酯,其中醇在中性pH值下携带至少一个负电荷。

[0114] 在第一方面的第96实施方案(其也是第一方面的第95实施方案的实施方案)中,中性pH值是约6.7至约7.7的pH值、优选地约6.0至约7.6的pH值、更优选地约7.2至约7.5的pH值、更优选地约7.4的pH值。

[0115] 在第一方面的第97实施方案(其也是第一方面的第95和第96实施方案的实施方案)中,醇选自由携带OH的氨基酸和携带OH的醇组成的组,优选地携带OH的醇是携带OH的羧酸。

[0116] 在第一方面的第98实施方案(其也是第一方面的第97实施方案的实施方案)中,携带OH的氨基酸是 α -氨基酸。

[0117] 在第一方面的第99实施方案(其也是第一方面的第97的实施方案)中,携带OH的氨基酸是L-氨基酸。

[0118] 在第一方面的第100实施方案(其也是第一方面的第97的实施方案)中,携带OH的氨基酸是L- α -氨基酸。

[0119] 在第一方面的第101实施方案(其也是第一方面的第97、第98、第99和第100实施方案的每一和任一实施方案)中,携带OH的氨基酸选自由丝氨酸和苏氨酸组成的组。

[0120] 在第一方面的第102实施方案(其也是第一方面的第97、第98、第99和第100实施方案的每一和任一实施方案)中,第一脂质是二酰基-磷脂酰丝氨酸。

[0121] 在第一方面的第103实施方案(其也是第一方面的第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101和第102实施方案,优选地第一方面的第102实施方案的每一和任一实施方案)中,与醇的二酰基-磷脂酰酯的每个酰基各自且独立地是羧酸的残基,其中羧酸各自且单独地是具有12、13、14、15、16、17、18、19或20个C原子的羧酸。

[0122] 在第一方面的第104实施方案(其也是第一方面的第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102和第103实施方案,优选地第一方面的第102和第103实施方案的每一和任一实施方案)中,与醇的二酰基-磷脂酰酯的每个酰基基团各自且独立地是羧酸的残基,其中羧酸各自且单独地是具有14、15、16、17或18个C原子的羧酸。

[0123] 在第一方面的第105实施方案(其也是第一方面的第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103和第104实施方案,优选地第一方面的第102、第103和第104实施方

案的每一和任一实施方案)中,与醇的二酰基-磷脂酰酯的酰基基团中的至少一个是羧酸的残基,其中羧酸是直链羧酸。

[0124] 在第一方面的第106实施方案(其也是第一方面的第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103、第104和第105实施方案,优选地第一方面的第102、第103、第104和第105实施方案的每一和任一实施方案)中,与醇的二酰基-磷脂酰酯的酰基基团中的至少一个是羧酸的残基,其中羧酸是饱和羧酸。

[0125] 在第一方面的第107实施方案(其也是第一方面的第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103、第104和第105实施方案,优选地第一方面的第102、第103、第104和第105实施方案的每一和任一实施方案)中,与醇的二酰基-磷脂酰酯的酰基基团中的至少一个是羧酸的残基,其中羧酸是不饱和羧酸。

[0126] 在第一方面的第108实施方案(其也是第一方面的第107实施方案的实施方案)中,不饱和羧酸具有至少一个双键。

[0127] 在第一方面的第109实施方案(其也是第一方面的第107和第108实施方案的实施方案)中,不饱和羧酸具有一个、两个或三个双键。

[0128] 在第一方面的第110实施方案(其也是第一方面的第108和第109实施方案的实施方案)中,至少一个双键处于顺式构型。

[0129] 在第一方面的第111实施方案(其也是第一方面的第108、第109和第110实施方案的实施方案)中,所有双键均处于顺式构型。

[0130] 在第一方面的第112实施方案(其也是第一方面的第107、第108、第109、第110和第111实施方案的实施方案)中,不饱和羧酸选自由油酸、亚油酸和亚麻酸组成的组。

[0131] 在第一方面的第113实施方案(其也是第一方面的第112实施方案的实施方案)中,不饱和羧酸是油酸。

[0132] 在第一方面的第114实施方案(其也是第一方面的第112实施方案的实施方案)中,不饱和羧酸是亚油酸。

[0133] 在第一方面的第115实施方案(其也是第一方面的第112实施方案的实施方案)中,不饱和羧酸是亚麻酸。

[0134] 在第一方面的第116实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54、第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73、第74、第75、第76、第77、第78、第79、第80、第81、第82、第83、第84、第85、第86、第87、第88、第89、第90、第91、第92、第93、第94、第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103、第104、第105、第106、第107、第108、第109、第110、第111、第112、第113、第114和115实施方案,优选地第一方面的第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73、第74、第75、第76、第77、第78、第79、第80、第81、第82、第83、第84、第85、第86、第87、第88、第89、第90、第91、第92、第93、第94、第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103、第104、第105、第106、第107、第108、第109、第110、第111、第112、第113、第114和

第115实施方案的每一和任一实施方案)中,第二脂质是携带多于一个阳离子电荷的脂质。

[0135] 在第一方面的第117实施方案(其也是第一方面的第116实施方案的实施方案)中,携带多于一个阳离子电荷的脂质是携带两个或更多个阳离子电荷的脂质。

[0136] 在第一方面的第118实施方案(其也是第一方面的第117实施方案的实施方案)中,携带多于一个阳离子电荷的脂质是携带两个或三个阳离子电荷的脂质。

[0137] 在第一方面的第119实施方案(其也是第一方面的第116、第117和第118实施方案的实施方案)中,阳离子电荷在中性pH值下携带多于一个阳离子电荷。

[0138] 在第一方面的第120实施方案(其也是第一方面的第119实施方案的实施方案)中,中性pH值是约6.7至约7.7的pH值、优选地约6.0至约7.6的pH值、更优选地约7.2至约7.5的pH值、更优选地约7.4的pH值。

[0139] 在第一方面的第121实施方案(其也是第一方面的第116、第117、第118、第119和第120实施方案的实施方案)中,第二脂质选自由 β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N,N-二烷基-酰胺和L-精氨酸基- β -丙氨酸-N,N-二烷基-酰胺组成的组。

[0140] 在第一方面的第122实施方案(其也是第一方面的第121实施方案的实施方案)中,第二脂质是 β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N,N-二烷基-酰胺,其中二烷基包含第一烷基和第二烷基,其中第一烷基和第二烷基各自且独立地选自饱和烷基、不饱和烷基、直链烷基和支链烷基。

[0141] 在第一方面的第123实施方案(其也是第一方面的第122实施方案的实施方案)中,第一烷基和第二烷基各自且独立地选自饱和直链烷基、不饱和直链烷基、饱和支链烷基和不饱和支链烷基。

[0142] 在第一方面的第124实施方案(其也是第一方面的第123实施方案的实施方案)中,烷基具有12、13、14、15、16、17、18、19或20个C原子。

[0143] 在第一方面的第125实施方案(其也是第一方面的第123和第124实施方案的实施方案)中,烷基具有14、15、16、17或18个C原子,优选地烷基具有16个C原子或18个C原子。

[0144] 在第一方面的第126实施方案(其也是第一方面的第123、第124和第125实施方案的实施方案)中,烷基是饱和烷基。

[0145] 在第一方面的第127实施方案(其也是第一方面的第123、第124、第125和第126实施方案的实施方案)中,烷基是饱和直链烷基。

[0146] 在第一方面的第128实施方案(其也是第一方面的第123、第124、第125、第126和第127实施方案的实施方案)中,烷基是棕榈基。

[0147] 在第一方面的第129实施方案(其也是第一方面的第123、第124和第125实施方案的实施方案)中,烷基是不饱和烷基。

[0148] 在第一方面的第130实施方案(其也是第一方面的第123、第124、第125和第129实施方案的实施方案)中,其中烷基是不饱和直链烷基。

[0149] 在第一方面的第131实施方案(其也是第一方面的第123、第124、第125、第129和第130实施方案的实施方案)中,不饱和烷基包含至少一个双键,优选地该至少一个双键处于顺式构型。

[0150] 在第一方面的第132实施方案(其也是第一方面的第123、第124、第125、第129、第130和第131实施方案的实施方案)中,烷基是油基。

[0151] 在第一方面的第133实施方案(其也是第一方面的第123、第124、第125、第129、第130、第131和第132实施方案的实施方案)中,第一烷基和第二烷基之一是饱和烷基、优选地饱和直链烷基,并且第一烷基和第二烷基中的另一个是不饱和烷基、优选地不饱和直链烷基。

[0152] 在第一方面的第134实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54、第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73、第74、第75、第76、第77、第78、第79、第80、第81、第82、第83、第84、第85、第86、第87、第88、第89、第90、第91、第92、第93、第94、第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103、第104、第105、第106、第107、第108、第109、第110、第111、第112、第113、第114、第115、第116、第117、第118、第119、第120、第121、第122、第123、第124、第125、第126、第127、第128、第129、第130、第131、第132和第133实施方案的实施方案)中,第二脂质选自包含以下的组: β -(L-精氨酸)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺、L-精氨酸- β -丙氨酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺、DOTAP(N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基铵)、DOTMA(1,2-二-O-十八碳烯基-3-三甲基铵丙烷)和DC-胆固醇(3β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇盐酸盐)。

[0153] 在第一方面的第135实施方案(其也是第一方面的第134实施方案的实施方案)中,DOTAP是(N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵)或其任何其他盐诸如甲磺酸盐,尽管氯化物盐是优选的。

[0154] 在第一方面的第136实施方案(其也是第一方面的第134实施方案的实施方案)中,DOTMA是作为氯化物盐的1,2-二-O-十八碳烯基-3-三甲基铵丙烷或其任何其他盐诸如甲磺酸盐,尽管氯化物盐是优选的。

[0155] 在第一方面的第137实施方案(其也是第一方面的第134、第58实施方案的实施方案)中,DC-胆固醇是 3β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇盐酸盐或其任何其他盐诸如甲磺酸盐,尽管氯化物盐是优选的。

[0156] 在第一方面的第138实施方案(其也是第一方面的第134实施方案的实施方案)中,第二脂质选自包含 β -(L-精氨酸)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺和L-精氨酸- β -丙氨酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺的组,优选地,第二脂质是 β -(L-精氨酸)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺。

[0157] 在第一方面的第139实施方案(其也是第一方面的第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54、第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73、第74、第75、第76、第77、第78、第79、第80、第81、第82、第83、第84、第85、第86、第87、第88、第89、第90、第91、第92、第93、第94、第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103、第104、第105、第106、第107、第108、第109、第110、第111、第112、第113、第114、第115、第116、第117、第118、第119、第120、第121、

第122、第123、第124、第125、第126、第127、第128、第129、第130、第131、第132、第133、第134、第135、第136、第137和第138实施方案的实施方案)中,第三脂质是两性离子磷脂或不带电荷的甾醇脂质。

[0158] 在第一方面的第140实施方案(其也是第一方面的第139实施方案的实施方案)中,两性离子磷脂选自包含磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱的组。

[0159] 在第一方面的第141实施方案(其也是第一方面的第139实施方案的实施方案)中,不带电荷的甾醇脂质选自包含动物甾醇和植物甾醇的组。

[0160] 在第一方面的第142实施方案(其也是第一方面的第139和第140实施方案的实施方案)中,两性离子磷脂选自包含以下的组:DSPC(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱)、DMPC(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱)、DSPE(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DMPE(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DLPE(1,2-月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DPhyPE(1,2-二植烷酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DOPE(1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)和POPE(1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)。

[0161] 在第一方面的第143实施方案(其也是第一方面的第139实施方案的实施方案)中,不带电荷的甾醇脂质选自包含胆固醇和豆甾醇的组。

[0162] 在第一方面的第144实施方案(其也是第一方面的第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54、第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73、第74、第75、第76、第77、第78、第79、第80、第81、第82、第83、第84、第85、第86、第87、第88、第89、第90、第91、第92、第93、第94、第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103、第104、第105、第106、第107、第108、第109、第110、第111、第112、第113、第114、第115、第116、第117、第118、第119、第120、第121、第122、第123、第124、第125、第126、第127、第128、第129、第130、第131、第132、第133、第134、第135、第136、第137、第138、第139、第140、第141、第142和第143实施方案的实施方案)中,第四脂质是屏蔽脂质(shielding lipid)。

[0163] 在第一方面的第145实施方案(其也是第一方面的第144实施方案的实施方案)中,屏蔽脂质是包含选自包含PEG(聚乙二醇)、HES(羟基乙基淀粉)、PG(聚甘氨酸)和聚Sarc(聚肌氨酸(聚-N-甲基甘氨酸))的组的部分的脂质。

[0164] 在第一方面的第146实施方案(其也是第一方面的第145实施方案的实施方案)中,屏蔽脂质是PEG化脂质。

[0165] 在第一方面的第147实施方案(其也是第一方面的第146实施方案的实施方案)中,PEG化脂质选自包含甲氧基PEG-DSPE、甲氧基PEG-DMPE、甲氧基PEG-DMG、甲氧基PEG-DPG、甲氧基PEG-DSG、甲氧基PEG-c-DMA、2(甲氧基PEG)-N,N-二-十八烷基乙酰胺、2(甲氧基PEG)-N,N-二-十四烷基乙酰胺、甲氧基PEG-C8-神经酰胺和甲氧基PEG-C16-神经酰胺的组。

[0166] 在第一方面的第148实施方案(其也是第一方面的第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第

54、第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73、第74、第75、第76、第77、第78、第79、第80、第81、第82、第83、第84、第85、第86、第87、第88、第89、第90、第91、第92、第93、第94、第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103、第104、第105、第106、第107、第108、第109、第110、第111、第112、第113、第114、第115、第116、第117、第118、第119、第120、第121、第122、第123、第124、第125、第126、第127、第128、第129、第130、第131、第132、第133、第134、第135、第136、第137、第138、第139、第140、第141、第142、第143、第144、第145、第146和第147实施方案的任一实施方案)中,PEG化脂质的PEG部分具有约750Da至约5000Da、优选地约1500Da至约3000Da的分子量。

[0167] 在第一方面的第149实施方案(其也是第一方面的第148实施方案的实施方案)中,PEG是直链PEG或支链PEG。

[0168] 在第一方面的第150实施方案(其也是第一方面的第149实施方案的实施方案)中,PEG是直链PEG。

[0169] 在第一方面的第151实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54、第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73和第74实施方案,优选地第一方面的第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54、第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73、第74、第75、第76、第77、第78、第79、第80、第81、第82、第83、第84、第85、第86、第87、第88、第89、第90、第91、第92、第93、第94、第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103、第104、第105、第106、第107、第108、第109、第110、第111、第112、第113、第114、第115、第116、第117、第118、第119、第120、第121、第122、第123、第124、第125、第126、第127、第128、第129、第130、第131、第132、第133、第134、第135、第136、第137、第138、第139、第140、第141、第142、第143、第144、第145、第146、第147、第148、149、第149和第150实施方案的任一实施方案)中,脂质组合物的脂质的摩尔百分比如下:

[0170] -20-80mol %的第一脂质

[0171] -20-80mol %的第二脂质

[0172] -10-50mol %的第三脂质,和

[0173] -1-10mol %的第四脂质,

[0174] 其中脂质组合物的总脂质含量是100mol %。

[0175] 在第一方面的第152实施方案(其也是第一方面的第151实施方案的实施方案)中,脂质组合物的摩尔比如下:

[0176] -20-60mol %的第一脂质

[0177] -20-60mol %的第二脂质

[0178] -10-40mol %的第三脂质,和

[0179] -1-5mol %的第四脂质,

[0180] 其中脂质组合物的总脂质含量是100mol %。

[0181] 在第一方面的第153实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54、第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73、第74、第75和第76实施方案,优选地第一方面的第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54、第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73、第74、第75、第76、第77、第78、第79、第80、第81、第82、第83、第84、第85、第86、第87、第88、第89、第90、第91、第92、第93、第94、第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103、第104、第105、第106、第107、第108、第109、第110、第111、第112、第113、第114、第115、第116、第117、第118、第119、第120、第121、第122、第123、第124、第125、第126、第127、第128、第129、第130、第131、第132、第133、第134、第135、第136、第137、第138、第139、第140、第141、第142、第143、第144、第145、第146、第147、第148、149、第149、第150、第151和第152实施方案的任一的实施方案)中,脂质组合物包含:

[0182] -CHEMS作为第一脂质,

[0183] - β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺作为第二脂质,

[0184] -胆固醇作为第三脂质,

[0185] -甲氧基PEG2000-DMPE作为第四脂质。

[0186] 在第一方面的第154实施方案(其也是第一方面的第153实施方案的实施方案)中,脂质组合物包含

[0187] -49mol %的CHEMS作为第一脂质,

[0188] -29mol %的 β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺作为第二脂质,

[0189] -20mol %的胆固醇作为第三脂质,和

[0190] -2mol %mPEG2000-DMPE作为第四脂质。

[0191] 在第一方面的第155实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54、第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73、第74、第75和第76实施方案,优选地第一方面的第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第

48、第49、第50、第51、第52、第53、第54、第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73、第74、第75、第76、第77、第78、第79、第80、第81、第82、第83、第84、第85、第86、第87、第88、第89、第90、第91、第92、第93、第94、第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103、第104、第105、第106、第107、第108、第109、第110、第111、第112、第113、第114、第115、第116、第117、第118、第119、第120、第121、第122、第123、第124、第125、第126、第127、第128、第129、第130、第131、第132、第133、第134、第135、第136、第137、第138、第139、第140、第141、第142、第143、第144、第145、第146、第147、第148、149、第149、第150、第151、第152、第153和第154实施方案的任一实施方案)中,脂质组合物包含:

[0192] -CHEMS作为第一脂质

[0193] - β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺作为第二脂质

[0194] -胆固醇作为第三脂质,和

[0195] -甲氧基PEG2000-DMPE作为第四脂质。

[0196] 在第一方面的第156实施方案(其也是第一方面的第155实施方案的实施方案)中,脂质组合物包含

[0197] -48mol%的CHEMS作为第一脂质

[0198] -29mol%的 β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺作为第二脂质

[0199] -18mol%的胆固醇作为第三脂质,和

[0200] -5mol%的甲氧基PEG2000-DMPE作为第四脂质。

[0201] 在第一方面的第157实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54、第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73、第74、第75、第76、第77、第78、第79、第80、第81、第82、第83、第84、第85、第86、第87、第88、第89、第90、第91、第92、第93、第94、第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103、第104、第105、第106、第107、第108、第109、第110、第111、第112、第113、第114、第115、第116、第117、第118、第119、第120、第121、第122、第123、第124、第125、第126、第127、第128、第129、第130、第131、第132、第133、第134、第135、第136、第137、第138、第139、第140、第141、第142、第143、第144、第145、第146、第147、第148、149、第149、第150、第151和第152实施方案的任一实施方案)中,脂质组合物溶解在水混溶性溶剂中。

[0202] 在第一方面的第158实施方案(其也是第一方面的第157实施方案的实施方案)中,溶剂选自包含以下的组:乙醇、丙酮、1-丁醇、2-丁醇、叔丁醇、3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丙醇、1-丙醇、2-丙醇、二甲基亚砜,优选地选自包含乙醇、叔丁醇和1-丁醇的组。

[0203] 在第一方面的第159实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第

36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54、第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73、第74、第75、第76、第77、第78、第79、第80、第81、第82、第83、第84、第85、第86、第87、第88、第89、第90、第91、第92、第93、第94、第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103、第104、第105、第106、第107、第108、第109、第110、第111、第112、第113、第114、第115、第116、第117、第118、第119、第120、第121、第122、第123、第124、第125、第126、第127、第128、第129、第130、第131、第132、第133、第134、第135、第136、第137、第138、第139、第140、第141、第142、第143、第144、第145、第146、第147、第148、149、第149、第150、第151、第152、第153、第154、第155、第156、第157和第158实施方案的任一实施方案)中,脂质纳米颗粒的平均粒度是约15nm至约400nm。

[0204] 在第一方面的第160实施方案(其也是第一方面的第159实施方案的实施方案)中,脂质纳米颗粒的平均粒度是约25nm至约200nm。

[0205] 在第一方面的第161实施方案(其也是第一方面的第159和第160实施方案的任一实施方案)中,脂质纳米颗粒的平均粒度是约40nm至约100nm。

[0206] 在第一方面的第162实施方案(其也是第一方面的第159、第160和第161实施方案的任一实施方案)中,脂质纳米颗粒的平均粒度通过动态光散射(DLS)来测定。

[0207] 在第一方面的第163实施方案(其也是第一方面的第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54、第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73、第74、第75、第76、第77、第78、第79、第80、第81、第82、第83、第84、第85、第86、第87、第88、第89、第90、第91、第92、第93、第94、第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103、第104、第105、第106、第107、第108、第109、第110、第111、第112、第113、第114、第115、第116、第117、第118、第119、第120、第121、第122、第123、第124、第125、第126、第127、第128、第129、第130、第131、第132、第133、第134、第135、第136、第137、第138、第139、第140、第141、第142、第143、第144、第145、第146、第147、第148、149、第149、第150、第151、第152、第153、第154、第155、第156、第157、第158、第159、第160、第161和第162实施方案的每一和任一实施方案)中,脂质纳米颗粒具有或示出 ζ -电势,其中 ζ -电势是约-20mV至约+20mV。

[0208] 在第一方面的第164实施方案(其也是第一方面的第163实施方案的实施方案)中, ζ -电势是约-10mV至约+10mV,优选地 ζ -电势是约-5mV至约+5mV。

[0209] 在第一方面的第165实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54、第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73、第74、第75、第76、第77、第78、第79、第80、第81、第82、第83、第84、第85、第86、第87、第88、第89、第90、第91、第92、第93、第94、第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103、第104、第105、第106、第107、第108、第

109、第110、第111、第112、第113、第114、第115、第116、第117、第118、第119、第120、第121、第122、第123、第124、第125、第126、第127、第128、第129、第130、第131、第132、第133、第134、第135、第136、第137、第138、第139、第140、第141、第142、第143、第144、第145、第146、第147、第148、第149、第149、第150、第151、第152、第153、第154、第155、第156、第157、第158、第159、第160、第161、第162、第163和第164实施方案的每一和任一实施方案)中,有效负载分子选自包含核酸分子或多肽分子的组,所述多肽分子包含50至1000个氨基酸并且包含>6的等电点(pI)

[0210] 在第一方面的第166实施方案(其也是第一方面的第165实施方案的实施方案)中,有效负载分子是核酸分子。

[0211] 在第一方面的第167实施方案(其也是第一方面的第165和第166实施方案的每一和任一实施方案)中,核酸选自包含核糖核酸分子、脱氧核糖核酸分子或其组合的组。

[0212] 在第一方面的第168实施方案(其也是第一方面的第165、第166和第176实施方案的每一和任一实施方案)中,其中核酸分子是单链核酸分子、双链核酸分子或部分双链核酸分子。

[0213] 在第一方面的第169实施方案(其也是第一方面的第165、第166、第167和第168实施方案的每一和任一实施方案)中,核酸包含约15至约20000个核苷酸,优选地核酸分子包含约21至约10000个核苷酸,更优选地核酸分子包含约100至约8000个核苷酸并且最优选地核酸分子包含约200至约7000个核苷酸。

[0214] 在第一方面的第170实施方案(其也是第一方面的第165、第166、第167、第168和第169实施方案的每一和任一实施方案)中,核酸分子是功能核酸分子。

[0215] 在第一方面的第171实施方案(其也是第一方面的第170实施方案的实施方案)中,功能核酸分子选自包含以下的组:mRNA、编码Cas (CRISPR相关内切核酸酶蛋白)的mRNA、质粒-DNA、ssDNA(单链DNA)、适配体、Spiegelmer、siRNA分子、反义分子、miRNA(微小RNA)分子、sgRNA(单链向导RNA)分子、saRNA(自扩增RNA)分子及其组合。

[0216] 在第一方面的第172实施方案(其也是第一方面的第165、第166、第167、第168、第169、第170和第171实施方案的实施方案)中,制剂中脂质与核酸的质量比是5至40、优选地10至35,甚至更优选地制剂中脂质与核酸的质量比是15至30,并且最优选地制剂中脂质与核酸的质量比是约28。

[0217] 在第一方面的第173实施方案(其也是第一方面的第165、第166、第167、第168、第169、第170、第171和第172实施方案的实施方案)中,核酸分子包含在脂质纳米颗粒内。

[0218] 在第一方面的第174实施方案(其也是第一方面的第165、第166、第167、第168、第169、第170、第171、第172和第173实施方案的实施方案)中,脂质制剂中脂质与核酸的质量比是5至40、优选地10至35,甚至更优选地脂质制剂中脂质与核酸的质量比是15至30,并且最优选地脂质制剂中脂质与核酸的质量比是约28。

[0219] 在第一方面的第175实施方案(其也是第一方面的第165、第166、第167、第168、第169、第170、第171、第172、第173和第174实施方案的实施方案)中,脂质纳米颗粒中脂质与核酸的质量比是5至40、优选地10至35,甚至更优选地脂质纳米颗粒中脂质与核酸的质量比是15至30,并且最优选地脂质纳米颗粒中脂质与核酸的质量比是约28。

[0220] 在第一方面的第176实施方案(其也是第一方面的第165实施方案的实施方案)中,

有效负载分子是包含10至1000个氨基酸残基、优选地50至900个氨基酸残基并且更优选地80至800个氨基酸残基的多肽分子。

[0221] 在第一方面的第177实施方案(其也是第一方面的第165和第176的实施方案)中,多肽包含或具有>6的等电点(pI)。

[0222] 在第一方面的第178实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54、第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73、第74、第75、第76、第77、第78、第79、第80、第81、第82、第83、第84、第85、第86、第87、第88、第89、第90、第91、第92、第93、第94、第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103、第104、第105、第106、第107、第108、第109、第110、第111、第112、第113、第114、第115、第116、第117、第118、第119、第120、第121、第122、第123、第124、第125、第126、第127、第128、第129、第130、第131、第132、第133、第134、第135、第136、第137、第138、第139、第140、第141、第142、第143、第144、第145、第146、第147、第148、第149、第149、第150、第151、第152、第153、第154、第155、第156、第157、第158、第159、第160、第161、第162、第163、第164、第165、第166、第167、第168、第169、第170、第171、第172、第173、第174、第175和第176实施方案的每一和任一实施方案)中,有效负载分子是治疗活性剂或其前体。

[0223] 在第一方面的第179实施方案(其也是第一方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22、第23、第24、第25、第26、第27、第28、第29、第30、第31、第32、第33、第34、第35、第36、第37、第38、第39、第40、第41、第42、第43、第44、第45、第46、第47、第48、第49、第50、第51、第52、第53、第54、第55、第56、第57、第58、第59、第60、第61、第62、第63、第64、第65、第66、第67、第68、第69、第70、第71、第72、第73、第74、第75、第76、第77、第78、第79、第80、第81、第82、第83、第84、第85、第86、第87、第88、第89、第90、第91、第92、第93、第94、第95、第96、第97、第98、第99、第100、第101、第102、第103、第104、第105、第106、第107、第108、第109、第110、第111、第112、第113、第114、第115、第116、第117、第118、第119、第120、第121、第122、第123、第124、第125、第126、第127、第128、第129、第130、第131、第132、第133、第134、第135、第136、第137、第138、第139、第140、第141、第142、第143、第144、第145、第146、第147、第148、第149、第149、第150、第151、第152、第153、第154、第155、第156、第157、第158、第159、第160、第161、第162、第163、第164、第165、第166、第167、第168、第169、第170、第171、第172、第173、第174、第175、第176、第177和第178实施方案的每一和任一实施方案)中,制剂适用于局部施用。

[0224] 在第一方面的第180实施方案(其也是第一方面的第179实施方案的实施方案)中,局部施用是肌肉施用。

[0225] 在第一方面的第181实施方案(其也是第一方面的第179实施方案的实施方案)中,局部施用是皮下施用。

[0226] 在第一方面的第182实施方案(其也是第一方面的第179实施方案的实施方案)中,

局部施用是皮内施用,

[0227] 本发明的潜在问题在第二方面(其也是第二方面的第一实施方案)中,通过根据第一方面(包括其任何实施方案)的制剂用于在用于治疗 and/或预防受试者中的疾病的方法中使用来解决,其中该方法包括向受试者局部施用有效负载分子,优选地该方法包括局部施用制剂。

[0228] 在第二方面的第二实施方案(其也是第二方面的第一实施方案的实施方案)中,局部施用是肌内施用。

[0229] 在第二方面的第三实施方案(其也是第二方面的第一实施方案的实施方案)中,局部施用是皮下施用。

[0230] 在第二方面的第四实施方案(其也是第二方面的第一实施方案的实施方案)中,局部施用是玻璃体内施用。

[0231] 在第二方面的第五实施方案(其也是第二方面的第一实施方案的实施方案)中,局部施用是鞘内施用。

[0232] 在第二方面的第六实施方案(其也是第二方面的第一实施方案的实施方案)中,局部施用是瘤内施用。

[0233] 在第二方面的第七实施方案(其也是第二方面的第一实施方案的实施方案)中,局部施用是脑内施用。

[0234] 在第二方面的第八实施方案(其也是第二方面的第一实施方案的实施方案)中,局部施用是皮内施用。

[0235] 在第二方面的第九实施方案(其也是第二方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七和第八实施方案的实施方案)中,疾病是可以由有效负载分子治疗和/或预防的疾病。

[0236] 本发明的潜在问题在第三方面中,通过包含如本发明的第一方面(包括其任何实施方案)所定义的制剂和药学上可接受的赋形剂的药物组合物来解决。

[0237] 本发明的潜在问题在第四方面(其也是第四方面的第一实施方案)中,通过根据第三方面(包括其任何实施方案)的药物组合物用于在用于治疗 and/或预防受试者中的疾病的方法中使用来解决,其中该方法包括向受试者局部施用有效负载分子,优选地该方法包括局部施用药物组合物。

[0238] 在第四方面的第二实施方案(其也是第四方面的第一实施方案的实施方案)中,局部施用是肌内施用。

[0239] 在第四方面的第三实施方案(其也是第四方面的第一实施方案的实施方案)中,局部施用是皮下施用。

[0240] 在第四方面的第四实施方案(其也是第四方面的第一实施方案的实施方案)中,局部施用是玻璃体内施用。

[0241] 在第四方面的第五实施方案(其也是第四方面的第一实施方案的实施方案)中,局部施用是鞘内施用。

[0242] 在第四方面的第六实施方案(其也是第四方面的第一实施方案的实施方案)中,局部施用是瘤内施用。

[0243] 在第四方面的第七实施方案(其也是第四方面的第一实施方案的实施方案)中,局

部施用是脑内施用。

[0244] 在第四方面的第八实施方案(其也是第四方面的第一实施方案的实施方案)中,局部施用是皮内施用。

[0245] 在第四方面的第九实施方案(其也是第四方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七和第八实施方案的实施方案)中,疾病是可以由有效负载分子治疗和/或预防的疾病。

[0246] 本发明的潜在问题在第6方面中,通过在制备用于根据本发明的第二方面(包括其任何实施方案)使用的制剂中使用第一脂质来解决,其中第一脂质是如本发明的第一方面(包括其任何实施方案)中所定义的第一脂质。

[0247] 本发明的潜在问题在第7方面中,通过在制备用于根据本发明的第二方面(包括其任何实施方案)使用的制剂中使用第二脂质来解决,其中第二脂质是如本发明的第一方面(包括其任何实施方案)中所定义的第二脂质。

[0248] 本发明的潜在问题在第8方面中,通过在制备用于根据本发明的第二方面(包括其任何实施方案)使用的制剂中使用第三脂质来解决,其中第三脂质是如本发明的第一方面(包括其任何实施方案)中所定义的第三脂质。

[0249] 本发明的潜在问题在第9方面中,通过在制备用于根据本发明的第二方面(包括其任何实施方案)使用的制剂中使用第四脂质来解决,其中第四脂质是如本发明的第一方面(包括其任何实施方案)中所定义的第四脂质。

[0250] 在不希望受任何理论束缚的情况下,本发明人们出人意料地发现,与现有技术中用于肌内、皮下和皮内施用RNA所使用的强阳离子LNP和包含可离子化阳离子脂质的LNP相比,根据本发明的制剂中所使用的脂质组合物和分别由此种脂质组合物形成的LNP优于那些强阳离子LNP和包含可离子化阳离子脂质的pH敏感的阳离子LNP。由根据本发明的制剂中所使用的脂质组合物形成的LNP在本文中也称为本发明的LNP。

[0251] 本发明的脂质的混合物优选地在更低的pH值下带强正电荷,因为阳离子脂质在酸性pH值下带正电荷,但是由于其羧基的质子化,阴离子脂质不再带电荷。这些带强正电荷的脂质系统能够与RNA静电相互作用为复合物RNA并且相应地形成LNP。一旦形成本发明的LNP并且将悬浮介质的pH调节至中性pH值,LNP的表面处的阳离子脂质仍然带正电荷,但同时阴离子脂质的负电荷由于其羧基的去质子化而再生,而RNA仍然被捕获在LNP颗粒内。在这些两性LNP体系中,阳离子脂质与阴离子脂质之间的摩尔比优选地以使得在中性pH值下由阳离子脂质呈现的阳离子电荷的数目超过由阴离子脂质呈现的阴离子电荷的数目的方式选择。因此,LNP表面布置有几乎相同数目的正电荷和负电荷。因此,所得LNP表面可以被描述为总体中性,并且与包含现有技术的可离子化阳离子脂质的LNP相反,其不是疏水性的而是亲水性的。

[0252] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,有效负载分子是在靶标处具有活性的化合物。活性优选地是选自包含生物活性、化学活性、生化活性、生理学活性、药理学活性和物理活性的组的活性。如本文优选地使用的,生物活性是在靶标处引起生物效应的活性。优选地,此种生物效应是蛋白质、多肽或肽活性的增加或降低,其中蛋白质或多肽是酶、结构蛋白、支架蛋白、跨膜蛋白、通道蛋白、分泌蛋白、激素、线粒体蛋白、受体、配体、表位/新表位/抗原肽(MHC-I结合为9-聚体(9-

mer)、或MHC-II结合为13-25-聚体是符合的)(参见,例如,Andreatta M等人,Bioinformatics 2016;32:511-7)、或核酸结合蛋白。可替代地,此种生物效应是核酸分子的活性或半衰期的增加或降低,或核酸分子的定位(localization)、定位(positioning)、处理、运输、或包装。此种核酸可以是脱氧核糖核酸或核糖核酸(参见,例如,Jurtz V等人,J Immunol 2017;199:3360-8)。

[0253] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,靶标选自包含分子、亚细胞结构、细胞、组织和器官的组。优选地,靶标被本发明的制剂靶向。如果期望由靶标替代或取代或补充给定细胞中的缺陷、异常、丢失或低蛋白表达,则预期靶标功能导致功能获得性表型。如果期望由靶标抑制或消除给定细胞中的过度活跃、显性活跃、异常、或高蛋白表达,则也预期靶标功能导致功能丧失性表型。例如,在肌肉细胞中,基因突变旨在在DNA水平上被修复,缺陷性突变蛋白变体被替换(活性蛋白的瞬时强制表达)或修复(mRNA外显子跳跃)。瞬时强制蛋白表达也旨在由存在于或被吸引至施用位点处的任何类型的抗原呈递细胞分泌、内吞和细胞外呈递。

[0254] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,局部施用是选自包含以下的组的施用:肌肉施用、皮下施用、玻璃体内施用、鞘内施用、瘤内施用、脑内施用、心肌内施用、冠状动脉内施用和皮内施用。

[0255] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,作为带有不依赖pH的正电荷的脂质是具有总正电荷的脂质而无论此种脂质所暴露的pH如何,优选地此种脂质在0至14的任何pH下所暴露的pH如何。更优选地,带有不依赖pH的正电荷的脂质选自包含DOTAP(N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵)和DOTMA(1,2-二-O-十八碳烯基-3-三甲基丙烷氯化铵)的组。

[0256] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的替代性实施方案中,并且如本文优选地使用的,通过使用TNS测定(6-(对甲苯胺基)-2-萘磺酸钠盐测定)测量LNP的总pKa值。在第一步骤中,制备4x TNS主缓冲液,其由100mM柠檬酸盐、80mM磷酸钠、80mM乙酸铵和600mM氯化钠以及1mg/ml TNS在二甲基甲酰胺和水(2/8v/v)的混合物中的储备溶液组成。为了制备一系列具有不同pH值(例如,范围从pH 3至pH 10)的2x TNS测定缓冲液,对于每个pH值,将20ml的4x TNS主缓冲液置于管诸如falcon管中,用HCl或NaOH将pH调节至目标pH值,并且添加适当量的水以得到40ml的2x TNS测定缓冲液。随后,通过向2ml水中添加8μl的TNS储备溶液(二甲基甲酰胺和水(2/8v/v))和8μl的含有所述LNP(脂质浓度2-8mg/ml)的制剂(10mM TRIS pH 7.5)来制备待测定pKa的LNP的工作溶液。测量在黑色96孔板中进行。出于此目的,在每个孔中放入100μl 2x TNS测定缓冲液/pH值,并且将100μl的工作溶液添加至每个孔中以得到200μl/孔的最终体积。将由此获得的最终混合物在37℃下温育30min,并且之后在1000rpm下离心1min。上清液的荧光强度在读板器诸如Tecan M1000读板器上在322nm的激发和431nm的发射下读取。测量之后,从每个探针/脂质/缓冲液混合物中减去96孔板上空孔的背景荧光值。然后将荧光强度值归一化为最低pH下的值。随后将归一化荧光强度对pH绘图并且提供最佳拟合线。确定最佳拟合线上归一化荧光强度在此处等于0.5的点,并且相应的pH值被认为是LNP的pKa。

[0257] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,总体上带中性电荷的两性脂质纳米颗粒是其中由脂质纳米颗粒产生的负电荷

和正电荷的总和是零的脂质纳米颗粒。优选地如果脂质纳米颗粒暴露于7至8的pH值,更优选地脂质颗粒暴露于7.4的pH值,则总和是零。因此,所述脂质纳米颗粒的 ζ -电势是零 $\pm$ 5mV。

[0258] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,直链和/或支链C1-C4烃基团各自且单独地意指甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基中的任一种。

[0259] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,中性脂质是携带不带电荷的分子部分的脂质或是包含相同量的带正电荷和带负电荷分子部分的两性离子脂质分子。优选地,中性脂质是甾醇或磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。

[0260] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,PEG化脂质是包含脂质部分和附接至脂质部分的PEG部分的化合物。优选地,PEG部分共价附接至脂质部分。脂质部分优选地是甾醇或磷脂酰乙醇胺或二酰基甘油,并且更优选地脂质部分选自包含1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰乙醇胺、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰乙醇胺、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰乙醇胺、1,2-二硬脂酰基-外消旋-甘油、1,2-二棕榈酰基-外消旋-甘油和1,2-二肉豆蔻酰基-外消旋-甘油的组。

[0261] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,脂质纳米颗粒的外表面是面向脂质纳米颗粒周围的任何介质的脂质纳米颗粒的表面。优选地,脂质纳米颗粒的外表面与脂质纳米颗粒的内结构相对。

[0262] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,中性pH值是约6.7至约7.7、优选地约6.9至约7.5、更优选地约7.2至约7.5的pH值。

[0263] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,脂质组合物的负电荷由第一脂质提供。

[0264] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,脂质组合物的正电荷由第二脂质提供。

[0265] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,第一脂质的羧基基团呈质子化或去质子化形式存在。如果呈去质子化形式存在,羧基基团赋予第一脂质负电荷。

[0266] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,第一脂质的pKa值由第一脂质的羧基基团测定。优选地,第一脂质的pKa值由羧基基团的pKa值测定。更优选地,羧基基团的pKa值是第一脂质的pKa值。

[0267] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,第二脂质的官能团呈质子化或非质子化形式存在。如果呈质子化形式存在,则官能团赋予第二脂质正电荷。

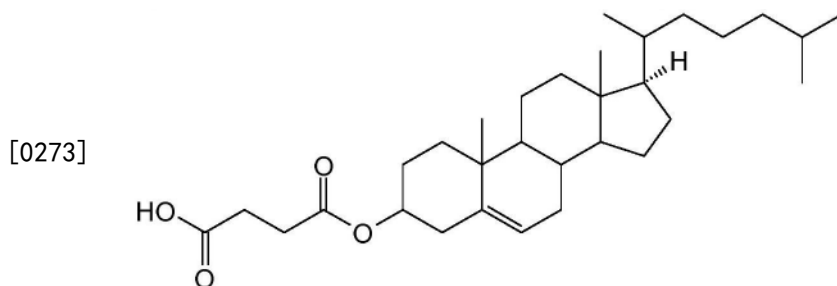
[0268] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,第二脂质是(a)具有至少一个具有大于9.5至13.5之间的pKa值的分子部分的阳离子脂质,或(b)阳离子脂质,其带有不依赖pH的正电荷。

[0269] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,术语12至20个烃的烷基基团包含12个烃的烷基、13个烃的烷基基团、14个烃的烷基基团、15个烃的烷基基团、16个烃的烷基基团、17个烃的烷基基团、18个烃的烷基基团、19个烃的烷基基团和20个烃的烷基基团。

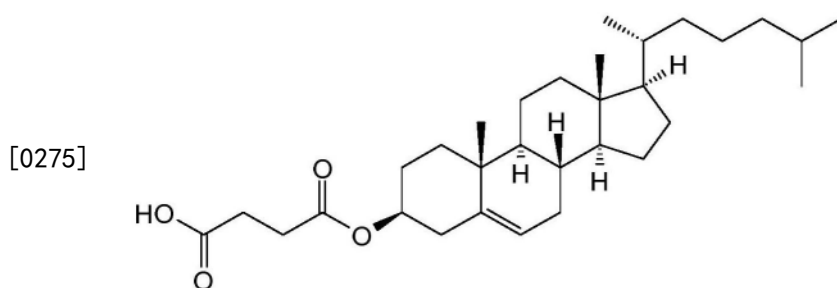
[0270] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,术语支链烷基基团是具有烃原子的骨架的烷基基团,其中至少一种另外的烃在骨架的任一端处与烃不同的位置处共价联接至骨架的烃的碳原子。

[0271] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,术语不饱和烷基基团是包含至少两个烃和至少一个共价连接两个烃的双键的烷基基团。本领域技术人员应理解,不饱和烷基包含一个或多个双键。在优选实施方案中,不饱和烷基包含一个、两个、三个或四个双键。本领域技术人员还应理解,双键可以位于烷基的任何两个相邻烃之间处。优选地,在不饱和烷基包含两个或更多个双键的情况下,此类双键被布置为由两个单键分开的双键。本领域技术人员还应理解,双键是顺式双键或反式双键。优选地,双键是顺式构型的双键。

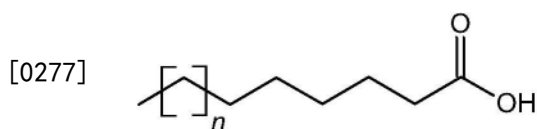
[0272] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,化合物CHEMS(胆固醇半琥珀酸酯)具有以下式:



[0274] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:

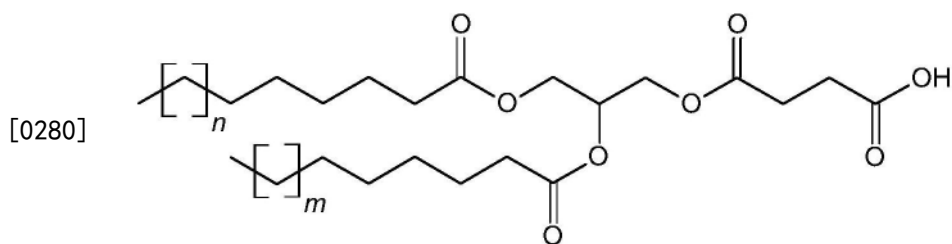


[0276] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,化合物烷基羧酸具有以下式:



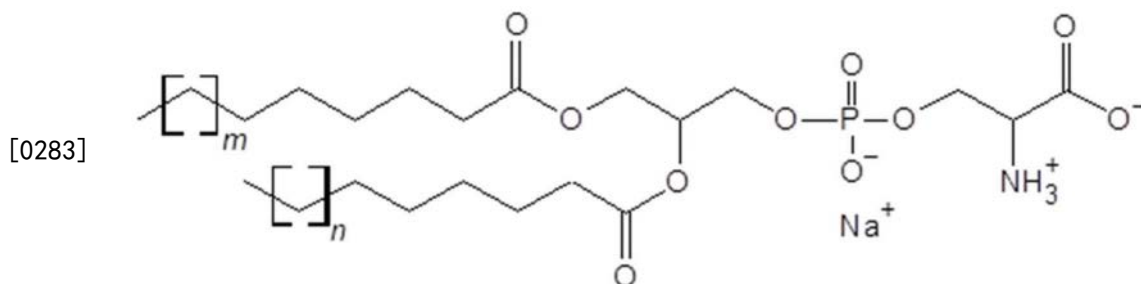
[0278] 其中 $n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ 或 11 。

[0279] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,化合物二酰基甘油半琥珀酸酯具有以下式:



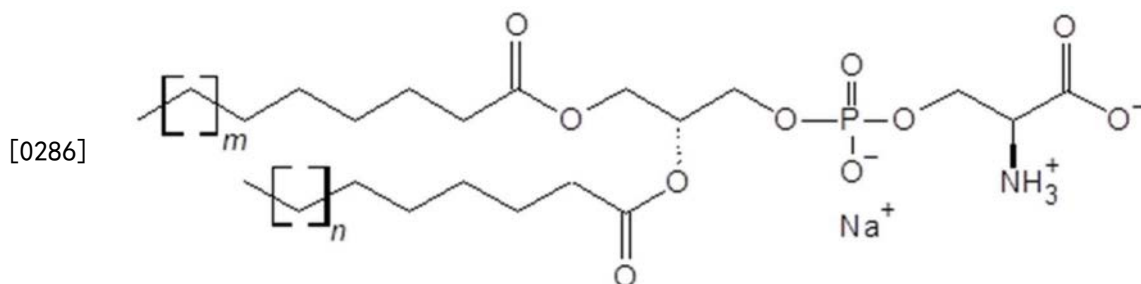
[0281] 其中n是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11,并且m是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11。

[0282] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,化合物磷脂酰丝氨酸具有以下式:



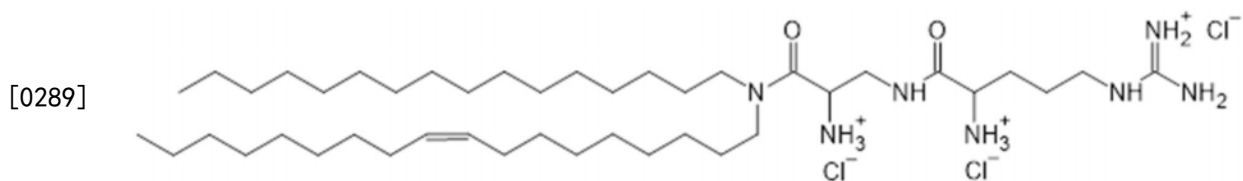
[0284] 其中n是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11,并且m是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11。

[0285] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:

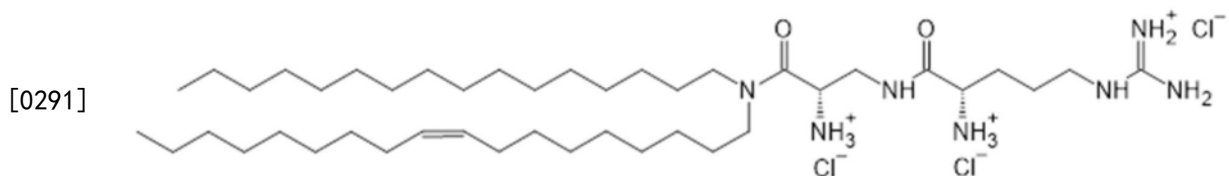


[0287] 其中n是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11,并且m是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11。

[0288] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中, β -(L-精氨酸酰基)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺)具有以下式:

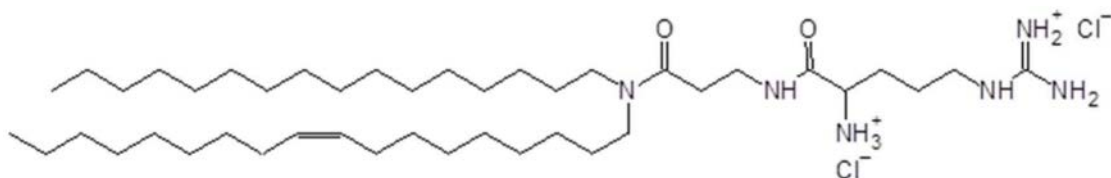


[0290] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:



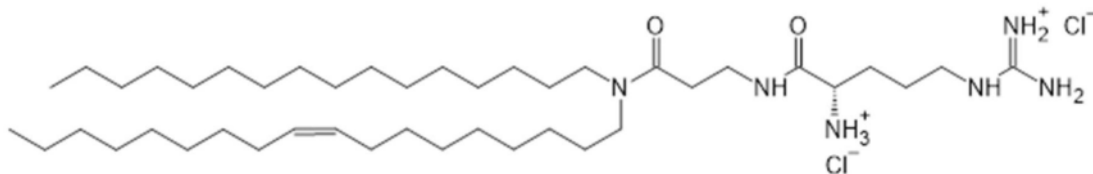
[0292] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物L-精氨酸酰基- β -丙氨酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺具有以下式:

[0293]



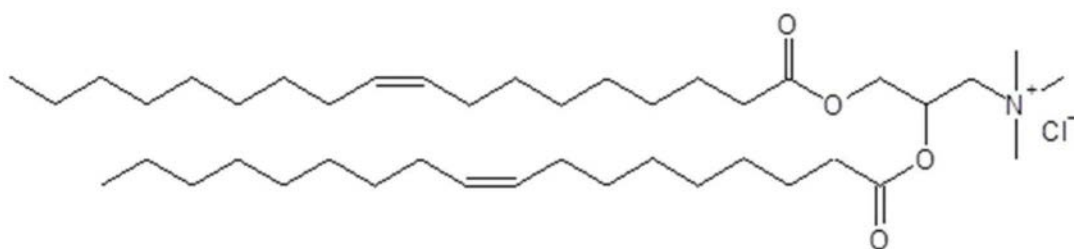
[0294] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:

[0295]



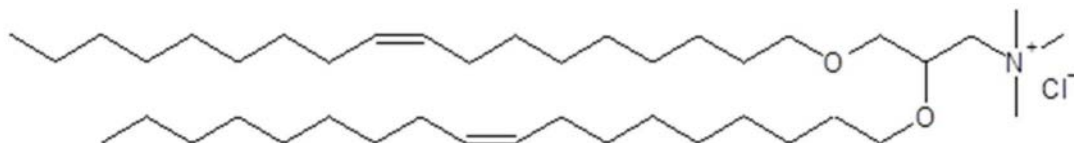
[0296] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物DOTAP (N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基甲基-氯化铵)具有以下式:

[0297]



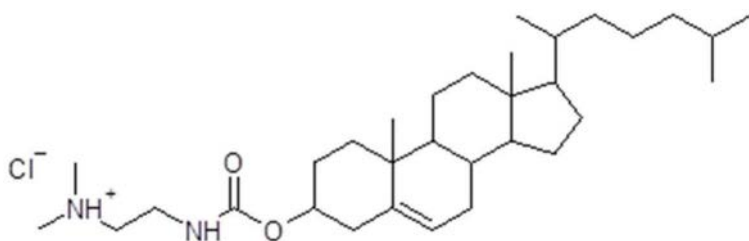
[0298] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物DOTMA (1,2-二-O-十八碳烯基-3-三甲基铵丙烷(优选地作为氯化物盐))具有以下式:

[0299]



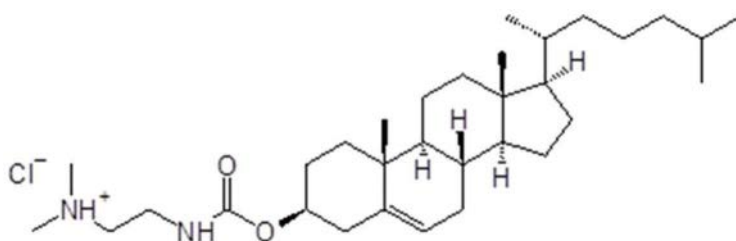
[0300] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,化合物DC-胆固醇(3β-[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇盐酸盐)具有以下式:

[0301]



[0302] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:

[0303]

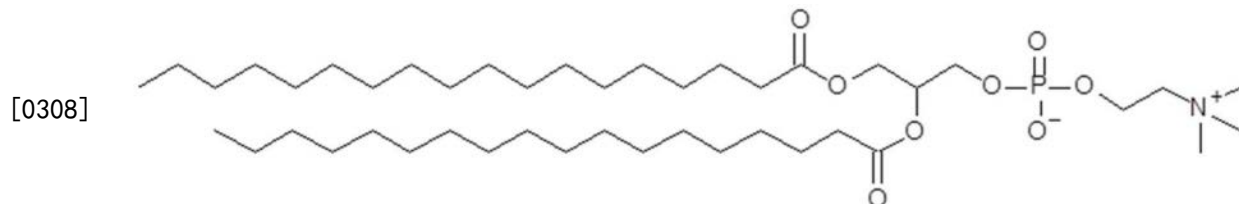


[0304] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,动物甾醇是动物来源的甾醇。

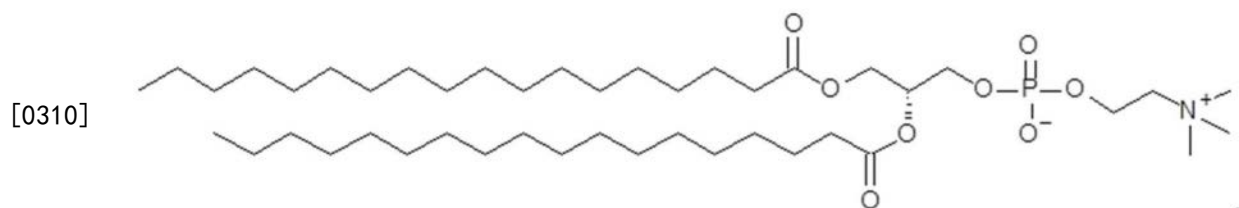
[0305] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,植物甾醇是植物来源的甾醇。

[0306] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,两性离子磷脂是包含相等数目的带正电荷和带负电荷官能团的磷脂。

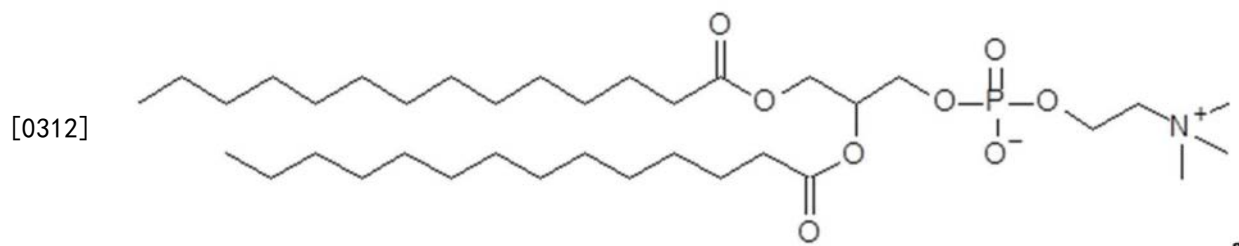
[0307] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物DSPC(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胆碱)具有以下式:



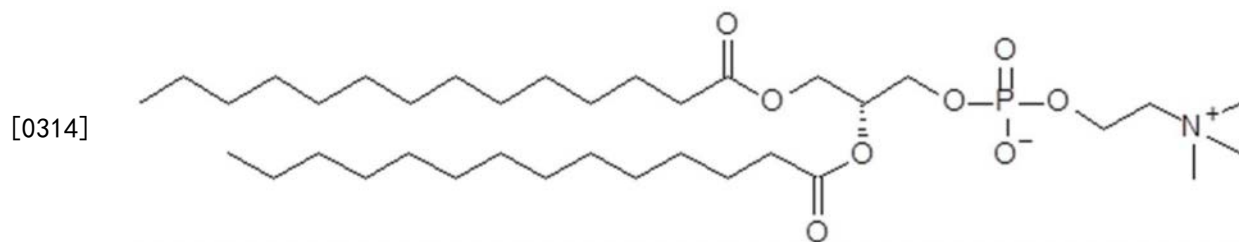
[0309] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:



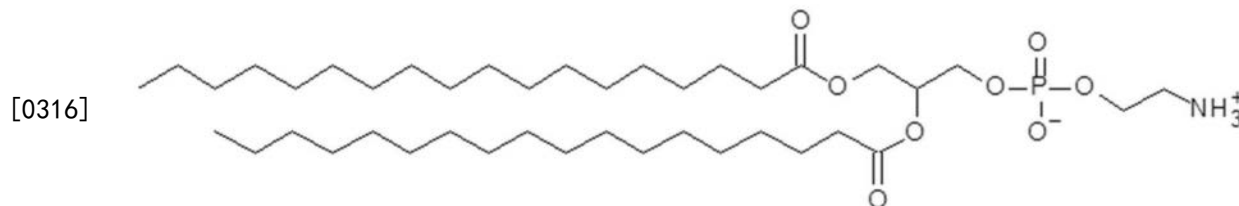
[0311] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物DMPC(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)具有以下式:



[0313] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:

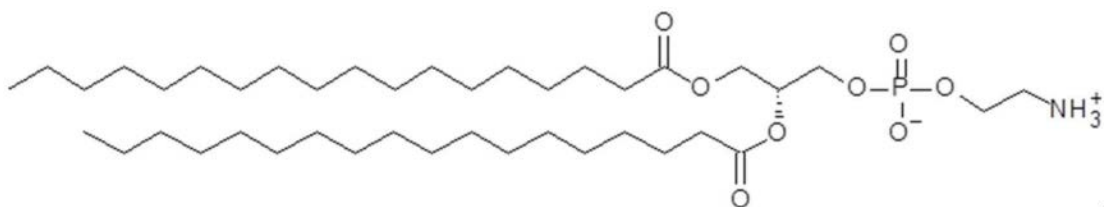


[0315] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物DSPE(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)具有以下式:



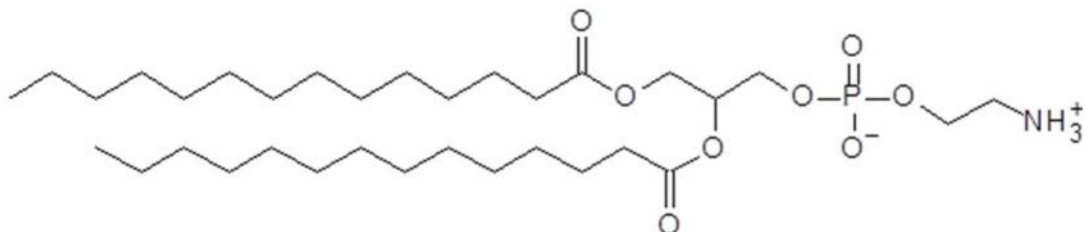
[0317] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:

[0318]



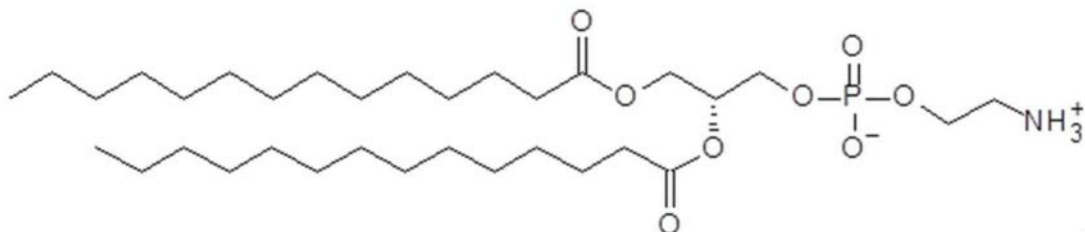
[0319] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物DMPE (1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)具有以下式:

[0320]



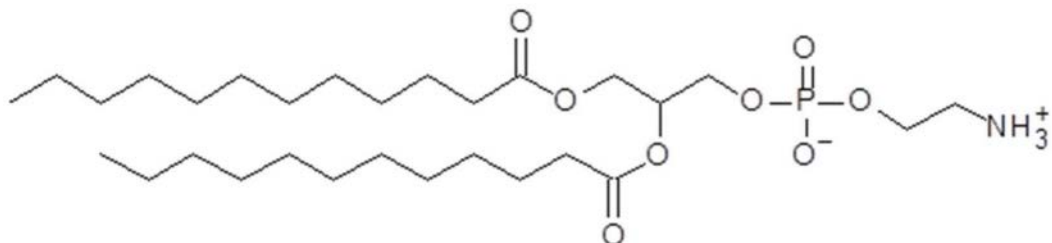
[0321] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:

[0322]



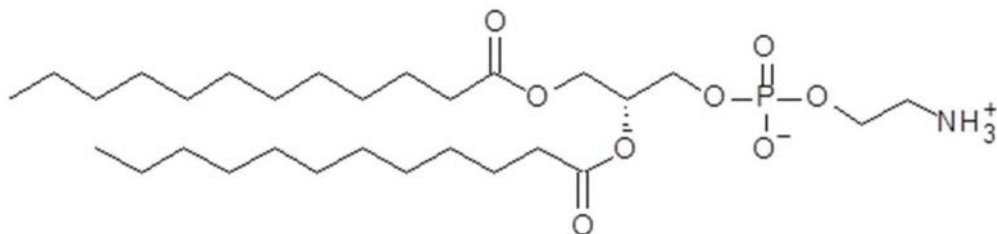
[0323] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物DLPE (1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)具有以下式:

[0324]

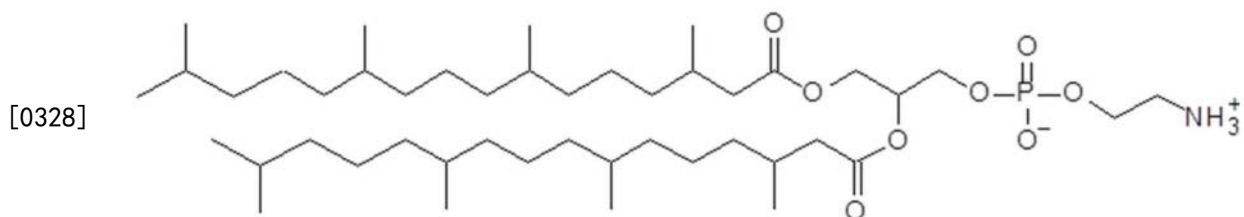


[0325] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:

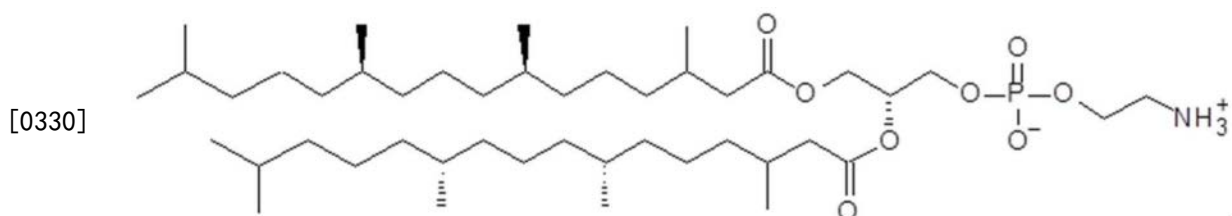
[0326]



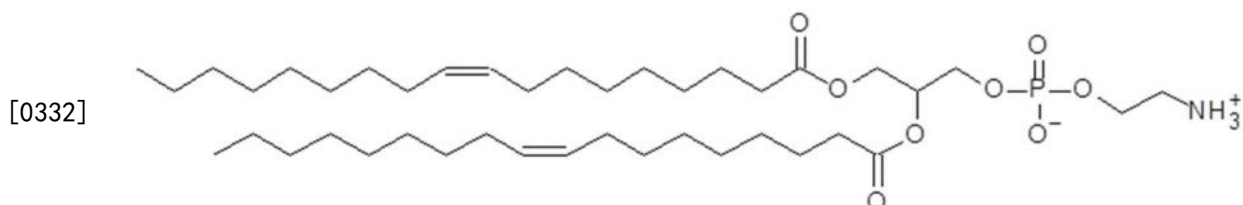
[0327] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物DPhyPE (1,2-(7R,11R)二植烷酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)具有以下式:



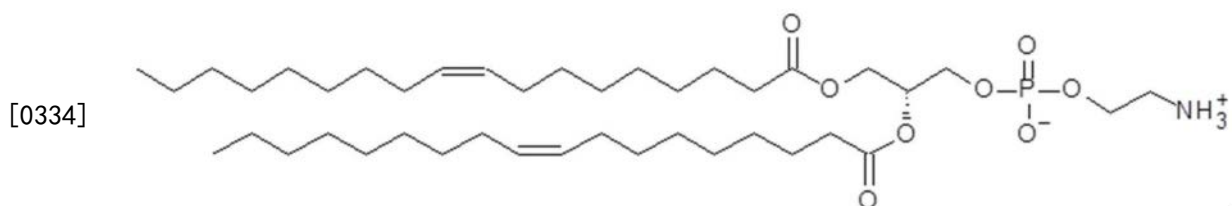
[0329] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:



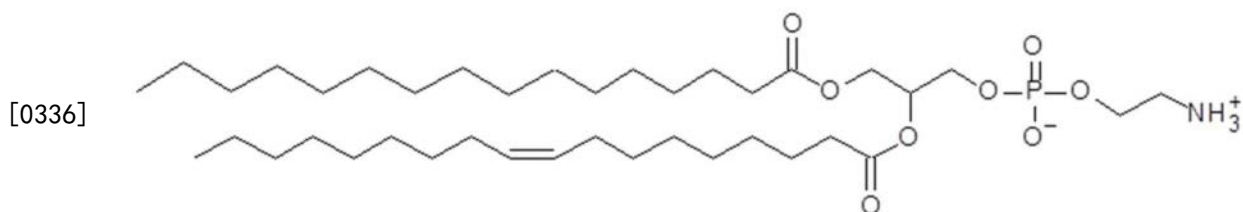
[0331] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物DOPE (1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)具有以下式:



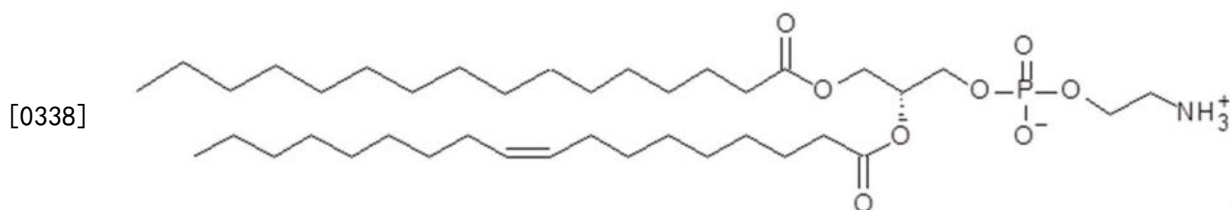
[0333] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:



[0335] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物POPE (1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)具有以下式:

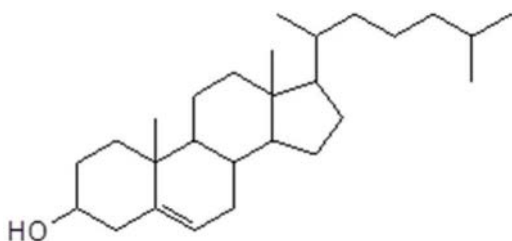


[0337] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:



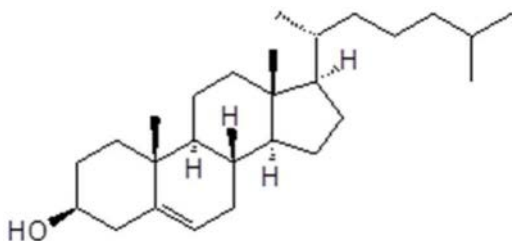
[0339] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物胆固醇具有以下式:

[0340]



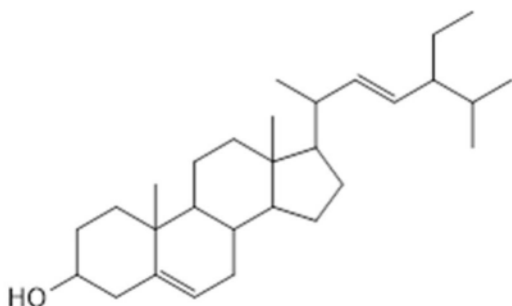
[0341] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:

[0342]



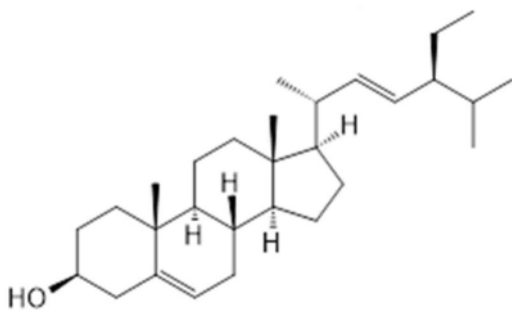
[0343] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,化合物豆甾醇(豆甾-5,22-二烯-3-醇)具有以下式:

[0344]



[0345] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:

[0346]

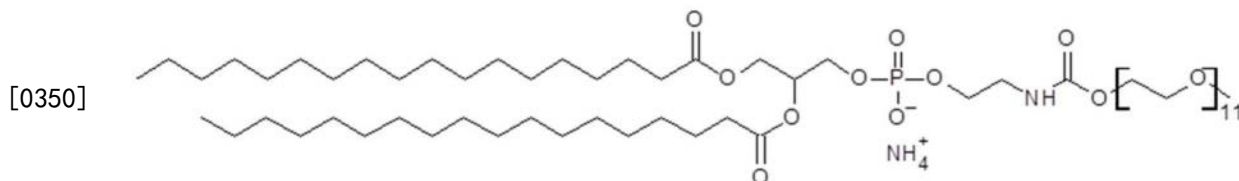


[0347] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,屏蔽脂质是提供脂质纳米颗粒的立体稳定并且还提供在体内减少脂质纳米颗粒表面与含蛋白体液的非预期相互作用(其可能以其他方式导致LNP的聚集或分解)的脂质。因此,其允许脂质纳米颗粒有效负载向靶细胞的持续体内递送,并且从而允许LNP有效负载的更有效递送和延长的功能生物活性。术语屏蔽还意味着免疫系统的元件或施用此种脂质组合物的身体的其他防御或去除机制不立即与脂质组合物相互作用,再次增加其在活生物体中的功能生物利用度。在此程度上,屏蔽脂质起到抗调理化合物的作用。不希望受任何机制或理论的束缚,看起来屏蔽脂质形成覆盖物或涂层,其减少可用于与其环境相互作用的脂质组合物的表面积,否则这种相互作用将导致脂质组合物分别与其他脂质融合或被人体和动物体的因子结合,而此时对于此种相互作用还为时过早,但是已认识到在稍后阶段,即在

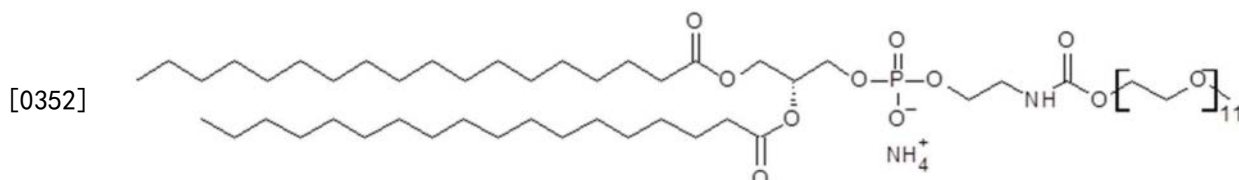
施用脂质组合物后延长时间之后,此种相互作用通常至少在一定程度上是优选或期望的,以便提供本发明的脂质组合物和制剂的有效负载的递送。

[0348] 屏蔽化合物优选地是共价结合至脂质部分的生物学上惰性的分子部分。取决于脂质部分的疏水性,例如脂质部分的烷基链长度范围从C12至C18个碳,即12、13、14、15、16、17、18、19和20个烃,屏蔽化合物可以以使得能够随着时间的推移与脂质纳米颗粒分离,使得纳米颗粒表面更易于与靶细胞的膜进行预期相互作用的方式设计。

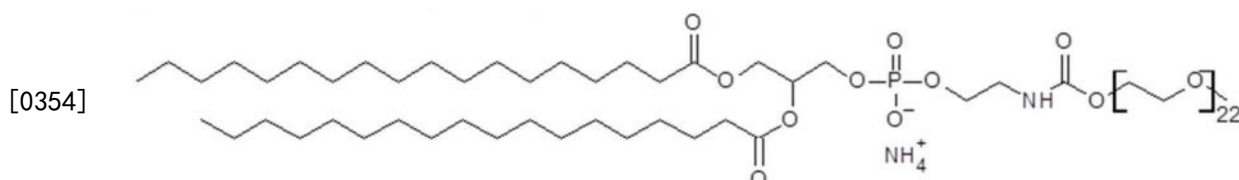
[0349] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物mPEG-500-DSPE(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-500]具有以下式:



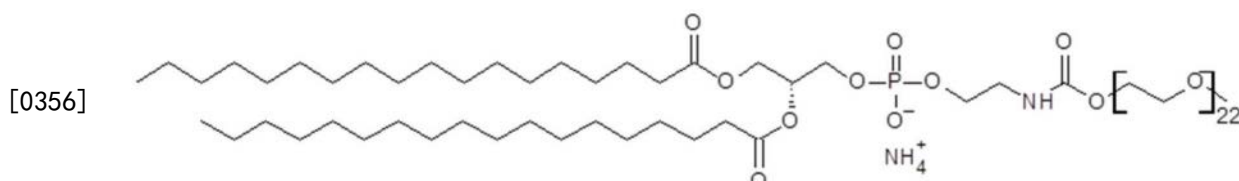
[0351] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:



[0353] 优选地,化合物mPEG-500-DSPE分别作为铵盐存在和使用。在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物mPEG-1000-DSPE(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-1000]具有以下式:

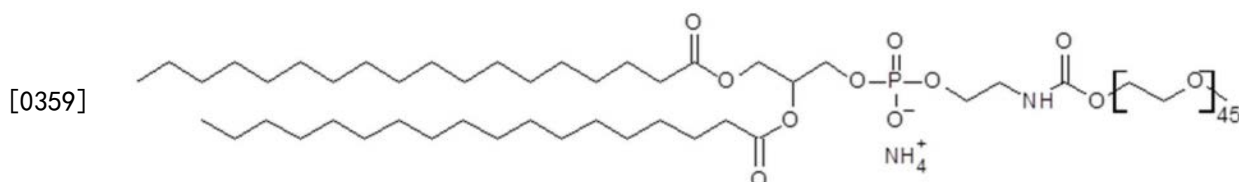


[0355] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:

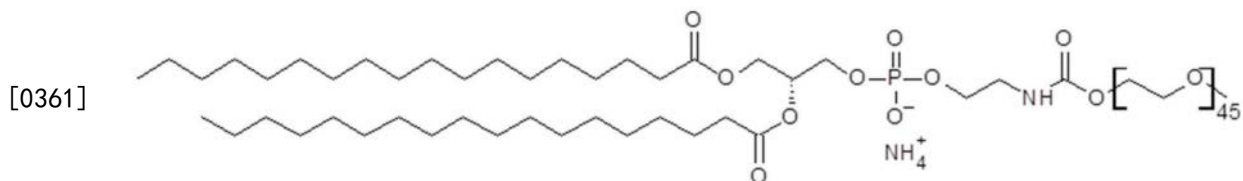


[0357] 优选地,化合物mPEG-1000-DSPE分别作为铵盐存在和使用。

[0358] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物mPEG-2000-DSPE(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]具有以下式:

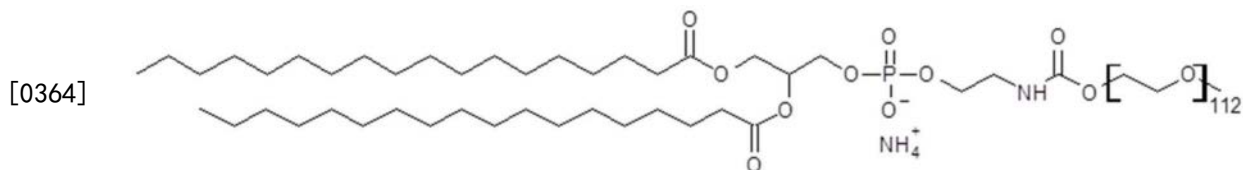


[0360] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:

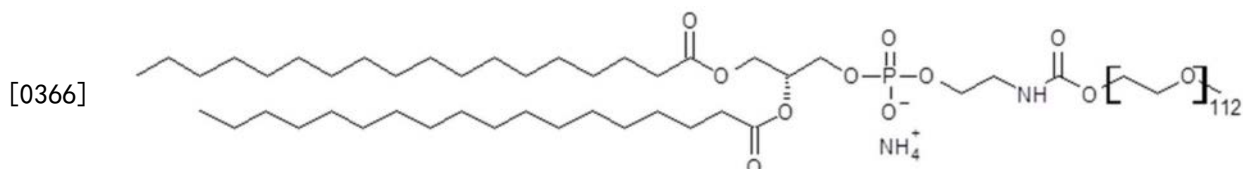


[0362] 优选地,化合物mPEG-2000-DSPE分别作为铵盐存在和使用。

[0363] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物mPEG-5000-DSPE(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-5000]具有以下式:

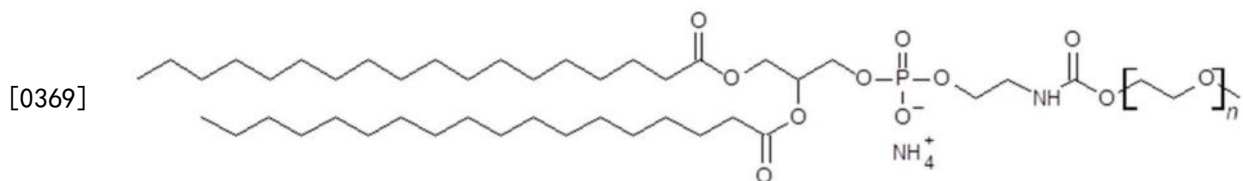


[0365] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:

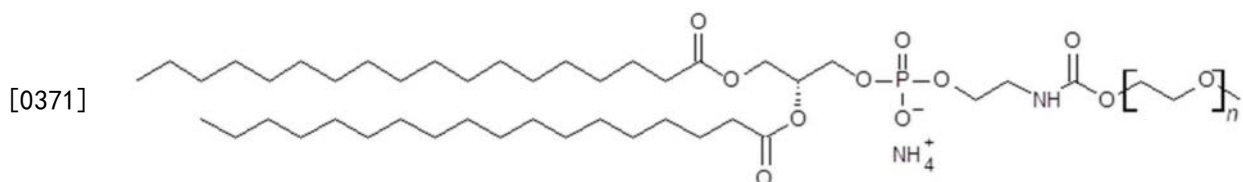


[0367] 优选地,化合物mPEG-5000-DSPE分别作为铵盐存在和使用。

[0368] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物mPEG-DSPE(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)]具有以下式:

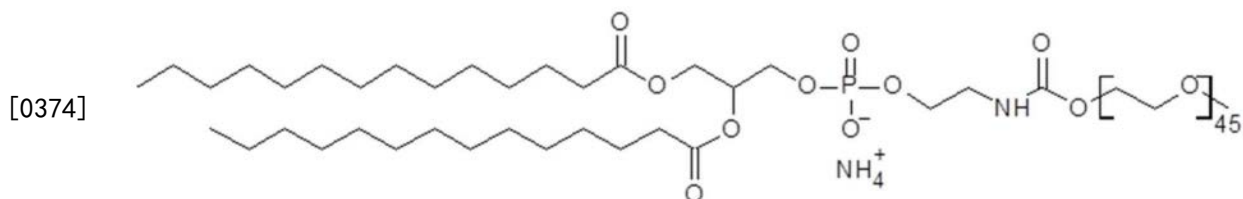


[0370] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:

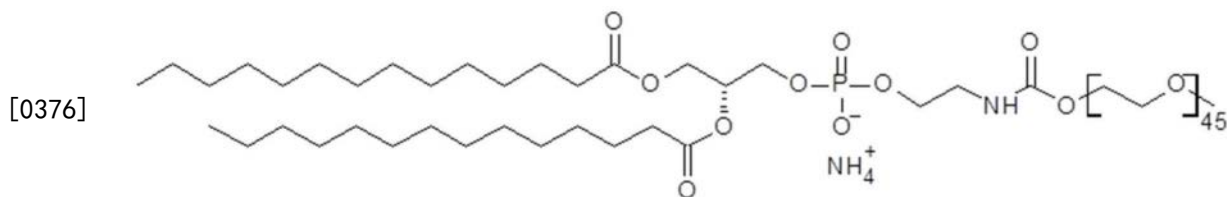


[0372] 优选地,化合物mPEG-DSPE分别作为铵盐存在和使用。

[0373] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物mPEG-2000-DMPE(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]具有以下式:

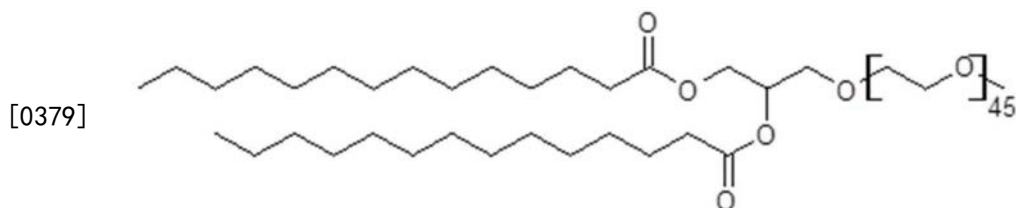


[0375] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:

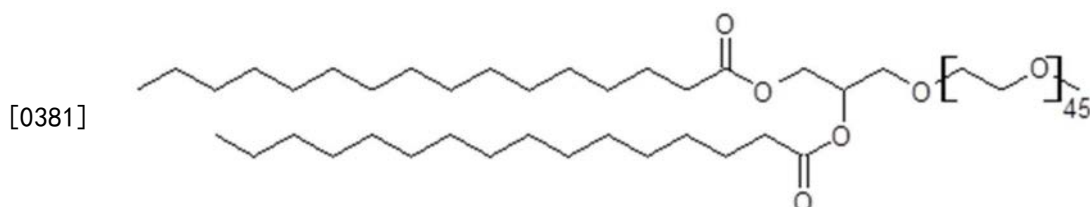


[0377] 优选地,化合物mPEG-2000-DMPE分别作为铵盐存在和使用。

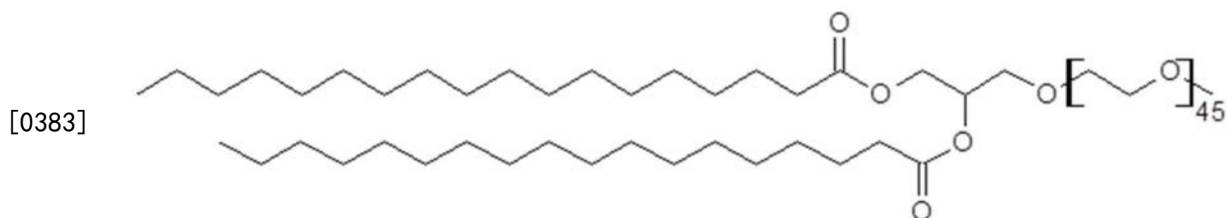
[0378] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物mPEG-2000-DMG(1,2-二肉豆蔻酰基-外消旋-甘油基-3-甲氧基聚乙二醇-2000)具有以下式:



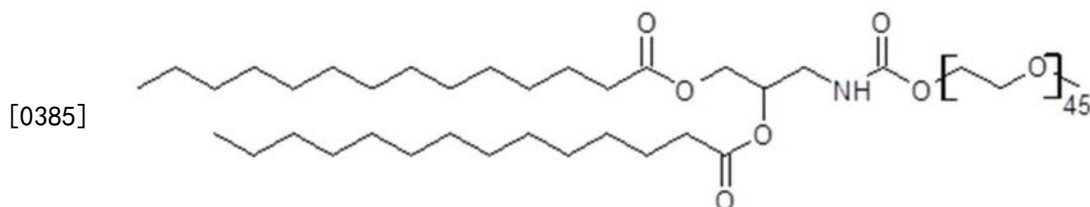
[0380] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物mPEG-2000-DPG(1,2-二棕榈酰基-外消旋-甘油基-3-甲氧基聚乙二醇-2000)具有以下式:



[0382] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物mPEG-2000-DSG(1,2-二棕榈酰基-外消旋-甘油基-3-甲氧基聚乙二醇-2000)具有以下式:

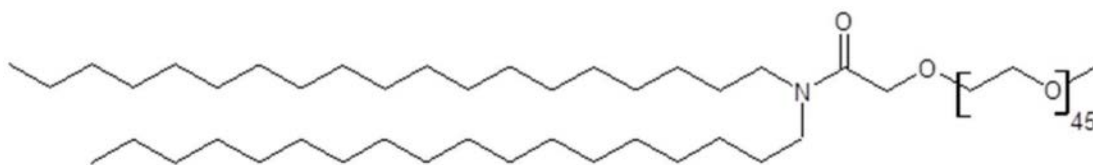


[0384] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物mPEG-2000-C-DMA(N-[(甲氧基聚(乙二醇)2000)氨基甲酰基]-1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-胺)具有以下式:



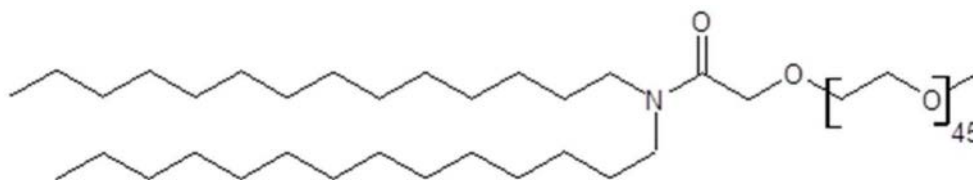
[0386] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物2-(甲氧基PEG-2000)-N,N-二-十八烷基乙酰胺具有以下式:

[0387]



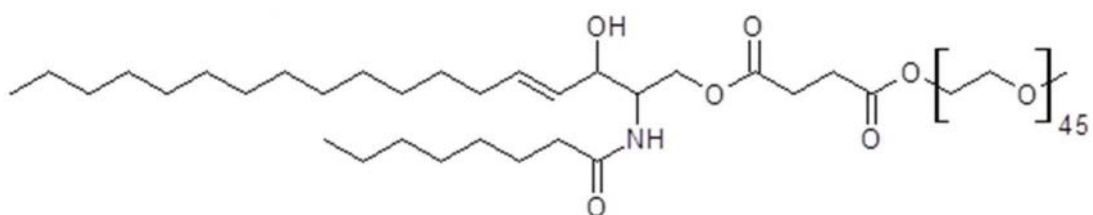
[0388] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物2-(甲氧基 PEG-2000)-N,N-二-十四烷基乙酰胺具有以下式:

[0389]



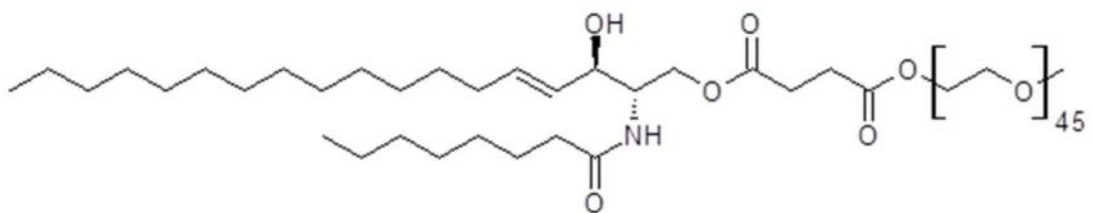
[0390] 在本发明的每个和任何方面(包括其实施方案)的实施方案中,化合物mPEG-2000-C8-神经酰胺(N-辛酰基-鞘氨醇-1-{琥珀酰基[甲氧基(聚乙二醇)2000]})具有以下式:

[0391]



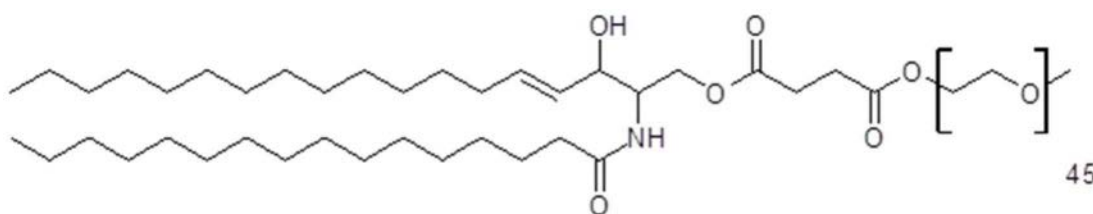
[0392] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:

[0393]



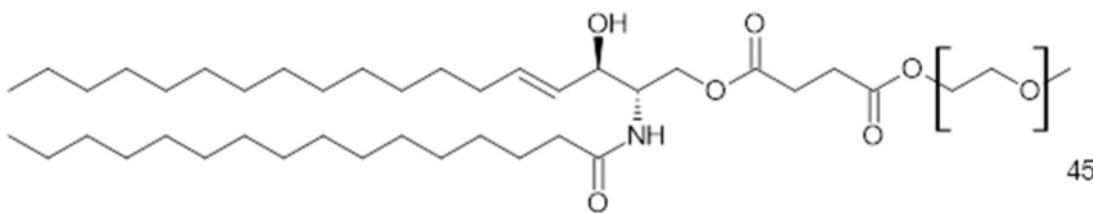
[0394] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,化合物mPEG-2000-C16-神经酰胺(N-棕榈酰基-鞘氨醇-1-{琥珀酰基[甲氧基(聚乙二醇)2000]})具有以下式:

[0395]



[0396] 优选地,立体中心如以下式中所示出的定义:

[0397]



[0398] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,脂质纳米颗粒的平均粒度通过动态光散射(DLS)使用Zetasizer Ultra(Malvern Panalytical Ltd,

Malvern,UK)测定。所有测量优选地在作为分散剂的水性缓冲液中进行,该缓冲液是在pH 7.4下用10mM TRIS缓冲的270mM蔗糖溶液。DLS例如更详细地公开于Stetefeld,J., McKenna,S.A.&Patel,T.R.“Dynamic light scattering:a practical guide and applications in biomedical sciences”.Biophys Rev8,409-427(2016);和Thomas,J.C.“The determination of log normal particle size distributions by dynamic light scattering”.Journal of Colloid and Interface Science 117,187-192(1987)中;其公开内容通过引用并入本文。

[0399] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中, ζ -电势诸如脂质纳米颗粒的 ζ -电势通过激光多普勒电泳使用Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical Ltd,Malvern,UK)测定。所有测量优选地在作为分散剂的水性缓冲液中进行,该缓冲液是在pH 7.4下用10mM TRIS缓冲的270mM蔗糖溶液。激光多普勒电泳例如更详细地公开于Clogston,J.D.&Patri,A.K.in“Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery”697,63-70 (Humana Press,2011);和Sze,A.,Erickson,D.,Ren,L.&Li,D.“Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow”,Journal of Colloid and Interface Science 261,402-410(2003)中,其公开内容通过引用并入本文。

[0400] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,脂质纳米颗粒的总电荷是约 $\pm 10\text{mV}$,优选地约 $\pm 5\text{mV}$ 。

[0401] 本领域技术人员应理解,脂质纳米颗粒的 ζ 电势反映了此类脂质纳米颗粒的总电荷。

[0402] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,核酸分子是构建单元的聚合物。所述构建单元是核苷酸。在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,核糖核酸分子是构建单元的聚合物,其中所述构建单元是核糖核苷酸。在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,脱氧核糖核酸分子是构建单元的聚合物,其中所述构建单元是脱氧核糖核苷酸、优选地2' 脱氧核糖核苷酸。在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,所述核苷酸构建单元选自包含2'-氟、2'-甲氧基修饰的核糖核苷酸的组。

[0403] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,核酸分子是D-核酸分子。在实施方案中并且如本文优选地使用的,D-核酸分子是构建单元的聚合物,其中所述构建单元是D-核苷酸。在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的优选实施方案中,D-核酸分子是D-核糖核酸分子。在实施方案中并且如本文优选地使用的,D-核糖核酸分子是构建单元的聚合物,其中所述构建单元是D-核糖核苷酸。在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的替代性实施方案中,D-核酸分子是D-脱氧核糖核酸分子。在实施方案中并且如本文优选地使用的,D-脱氧核糖核酸分子是构建单元的聚合物,其中所述构建单元是D-脱氧核糖核苷酸。

[0404] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,核酸分子是D,L-核酸分子。在实施方案中并且如本文优选地使用的,D,L-核酸分子是构建单元的聚合物,其中所述构建单元是D-核苷酸和L-核苷酸两者。本领域技术人员应理解,D-核苷酸与L-核苷酸的任何相对比率可以在此种D,L-核酸分子中实现。本领域技术人员应进一步理解,所

述D-核苷酸和L-核苷酸的任何排列可以在此种D,L-核酸分子中实现。在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的优选实施方案中,D,L-核酸分子是D,L-核糖核酸分子。在实施方案中并且如本文优选地使用的,D,L-核糖核酸分子是构建单元的聚合物,其中所述构建单元是D-核糖核苷酸和L-核糖核苷酸两者。在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的替代性实施方案中,D,L-核酸分子是D,L-脱氧核糖核酸分子。在实施方案中并且如本文优选地使用的,D,L-脱氧核糖核酸分子是构建单元的聚合物,其中所述构建单元是D-脱氧核糖核苷酸和L-脱氧核糖核苷酸两者。

[0405] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,单链核酸分子是核酸分子,其由彼此共价附接的核苷酸的单链组成,优选地借助于选自由磷酸二酯键或磷酸硫醚(phosphothioether)键组成的组的键(bond)或键(linkage)。优选地,此种键将第一核苷的糖部分的3' C原子的OH基团共价连接至磷酸盐的第一OH基团,并且将第二核苷的糖部分的5' C原子的OH基团共价连接至磷酸盐的第二OH基团。

[0406] 在本发明的每个和任何方面(包括其任何实施方案)的实施方案中,并且如本文优选地使用的,双链核酸分子是包含双链结构的核酸分子。所述双链结构是其中核苷酸的第一链和核苷酸的第二链彼此附接的结构。此种附接优选地选自包含非共价附接和共价附接的组。在实施方案中,所述非共价附接是由一个或多个氢键介导或引起的附接;优选地,所述非共价附接在形成核苷酸的第一链和核苷酸的第二链的核苷酸中的一个或多个之间由沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对或由胡斯坦(Hoogsteen)碱基配对介导或引起。更优选地,核苷酸的第一链的所有核苷酸和核苷酸的第二链的所有核苷酸都参与此种碱基配对,由此第一链的一个核苷酸与第二链的一个核苷酸碱基配对。

[0407] 在替代性实施方案中,所述共价附接是由形成双链结构的核苷酸的第一链的至少一个核苷酸与形成双链的核苷酸的第二链的至少一个核苷酸之间的一个或多个共价键介导的附接。

[0408] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,功能核酸分子是具有不同于结构核酸分子的功能的核酸分子。在优选的实施方案中,功能核酸分子不同于核糖体核糖核酸分子,并且不同于7SL-RNA,并且不同于核酶。

[0409] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,mRNA是包含5' → 3' 方向、帽结构、5' 非翻译区(5' UTR)、典型地以AUG密码子开始并与终止于终止密码子的编码序列(CDS)连接的编码序列、3' 非翻译区(3' UTR)和poly-A-尾的核酸分子。优选地,mRNA由核糖核苷酸、更优选地由D-核糖核苷酸制成。

[0410] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,Cas(CRISPR相关核酸内切酶蛋白)-编码mRNA是编码CRISPR(成簇规律间隔短回文重复)相关内切核酸酶蛋白的mRNA。Cas蛋白及其衍生物包括例如Cas9DNA核酸酶(NCBI参考序列(mRNA):NC_002737.2;NCBI参考序列(Prot):NP_269215.1)或Cas13a-d RNA核酸酶(例如LwaCas13a韦德纤毛菌(*Leptotrichia wadeii*)(NCBI参考序列:WP_021746003.1);PspCas13b普氏菌属物种(*Prevotella* sp.)P5-125;RfxCas13d黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)(NCBI参考序列:WP_075424065.1))。

[0411] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,适配体是可以形成不同且稳定的三维结

构并且特异性地结合至靶分子的单链核酸分子,其中适配体优选地由D-核苷酸制成。适配体可以针对几种靶分子,例如小分子、蛋白质、核酸并且甚至细胞、组织和生物体进行识别,并且可以抑制特异性靶分子的体外和/或体内功能。适配体通常通过靶向选择方法(称为体外选择或通过指数富集的配体系统进化(缩写SELEX))识别(Bock L.C.等人(1992), Nature.355(6360):564-6;Ellington&Szostak(1990) Nature,346(6287):818-22;Tuerk C.和Gold L.(1990), Science.249(4968):505-10)。非修饰适配体从血流中快速清除,半衰期为几分钟至几小时,主要是由于核酸酶降解和被肾脏从体内清除,这是适配体的固有的低分子量的结果。因此,为了在治疗上使用适配体,它们必须在糖的2'位处进行修饰。更优选地,适配体与靶分子的结合通过非共价键,更优选地通过不同于沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对或胡斯坦(Hoogsteen)碱基配对的键。

[0412] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,spiegelmer是可以形成不同且稳定的三维结构并且特异性地结合至靶分子的单链核酸分子,其中spiegelmer优选地由L-核苷酸制成。Spiegelmer可以针对几种靶分子,例如,小分子、蛋白质、核酸并且甚至细胞、组织和生物体进行识别,并且可以抑制特异性靶分子的体外和/或体内功能。Spiegelmer通过如1996年首次发表的镜像选择来识别(Klussmann S.等人(1996), Nat Biotechnol.14(9):1112-5;Nolte A.等人(1996), Nat Biotechnol.14(9):1116-9)。更优选地,适配体与靶分子的结合通过非共价键,更优选地通过不同于沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对或胡斯坦(Hoogsteen)碱基配对的键。

[0413] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,质粒DNA是重组、环状双链脱氧核糖核酸分子,其包含核苷酸序列、特别是在真核启动子序列的控制下的开放阅读框,编码例如药理学上活性的多肽或蛋白质。可替代地,使用真核启动子体系来表达编码长非编码RNA、tRNA和/或shRNA/siRNA的药理学上活性的核苷酸序列。

[0414] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,在本领域中也称为短干扰RNA或沉默RNA的siRNA是一类双链RNA非编码RNA分子,典型地长度为20-24个碱基对并且在RNA干扰(RNAi)途径内操作。其通过在转录之后降解mRNA、阻止转译来干扰具有互补核苷酸序列的特定基因的表达。siRNA分子可以从长双链和小发夹RNA分子由Dicer酶催化产生。siRNA诱导的转录后基因沉默始于RNA诱导的沉默复合物(RISC)的组装。复合体通过裂解编码靶基因的mRNA分子来使某些基因表达沉默。为了开始该过程,这两条siRNA链之一,即向导链(guide strand)(反义链)将被负载到RISC中,而另一条链,即乘客链(passenger strand)(有义链)被降解。某些Dicer酶可以负责将向导链负载到RISC中。然后,siRNA扫描并且引导RISC至在mRNA分子上基本上-完全地互补的序列。mRNA分子的裂解被认为是由RISC的Argonaute蛋白的Piwi域催化的。然后通过裂解从5'端计数,与siRNA残基10和11配对的靶核苷酸之间的磷酸二酯键精确地切割mRNA分子。该裂解导致mRNA片段被细胞外切核酸酶进一步降解。5'片段通过外泌体从其3'端降解,而3'片段通过5'-3'外切核糖核酸酶1(XRN1)从其5'端降解。裂解之后来自RISC的靶mRNA链的解离允许更多的mRNA被沉默。该解离过程很可能是由ATP水解驱动的外在因素促进的。可替代地,可以将siRNA并入RNA诱导的转录沉默(RITS)复合物中。活性RITS复合物将触发与siRNA匹配的DNA周围形成异染色质,有效地使DNA的该区域中的基因沉默。

[0415] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,反义分子或反义寡核苷酸是单链脱氧核

糖核酸或单链核糖核酸。

[0416] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,天然或合成的微小RNA(miRNA, antagomir)是含有约22个核苷酸的小单链非编码RNA分子,其通过mRNA表达的转录后调节在基因沉默中起作用。miRNA经由与mRNA分子内的互补序列碱基配对起作用。因此,这些mRNA分子通过以下过程中的一个或多个被沉默:(1)将mRNA链裂解成两段,(2)通过缩短其poly(A)尾和mRNA衰变使mRNA不稳定,和(3)通过阻断mRNA转译。

[0417] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,单链向导RNA(sgRNA)是识别目标靶DNA区域并且引导其中的Cas核酸酶用于编辑的特异性RNA序列。sgRNA由两部分组成:crispr RNA(crRNA),与靶DNA互补的17、18、19或20个核苷酸的核苷酸序列,和用作Cas核酸酶的结合支架的tracr RNA.sgRNA是将天然存在的两段式向导RNA复合物改造成单个、连续序列的形式。使用简化的单链向导RNA来引导Cas9蛋白结合和裂解特定DNA序列用于基因组编辑。

[0418] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,自扩增RNA(saRNA)编码5'和3'CSE序列、甲病毒属nsP1-4基因、亚基因组启动子和治疗性蛋白质或抗原的蛋白质编码区。在原位转译后,nsP1-4蛋白形成RdRP复合物,其识别侧翼CSE序列并且扩增蛋白质编码转录物。

[0419] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,脂质与核酸的质量比是[制剂的脂质组合物的质量]与[制剂的核酸的质量]的比率。更优选地,制剂的核酸的质量是制剂中所包含的核酸分子的总量的质量。

[0420] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,核酸分子包含在脂质纳米颗粒内。本领域技术人员应理解,术语“包含在脂质纳米颗粒内”优选地意指制剂中包含的大多数单个核酸分子包含在脂质纳米颗粒内。然而,也在本发明内的是,单个核酸分子至少以一定的百分比附接至脂质纳米颗粒。也在本发明内的是,大多数单个核酸分子与包含有效负载分子和脂质组合物的制剂的脂质组合物相关联,其中有效负载分子和脂质组合物优选地是本文所公开的有效负载分子和脂质组合物。本领域技术人员同样地应理解,本文特别呈现的涉及作为制剂的有效负载的核酸分子的公开内容同样地适用于作为制剂的有效负载的多肽。

[0421] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,肌肉施用是将物质注射到肌肉(例如,横纹肌和平滑肌、骨骼肌和心肌、括约肌)中。其是用于药物的胃肠外施用的几种方法之一。肌肉注射可以是优选的,因为肌肉具有比皮下组织更大和更多的血管,导致比皮下或皮内注射更快的吸收。经由肌肉注射施用的药物不经受影响口服药物的首过代谢效应。

[0422] 用于肌肉注射的常见部位包括上臂的三角肌和臀部的臀肌。在婴儿中,大腿的股外侧肌是常用的。注射到骨骼肌之后肌肉施用导致将更大体积的物质递送到真皮和皮下层下的肌肉组织中。肌肉连接至血管和淋巴管的大型网络并且为物质提供贮库效应和向抗原呈递细胞的显著暴露。

[0423] 皮下施用是指在真皮和表皮下递送到皮下区域,而皮内施用是指将物质直接递送至真皮。两种途径在某种程度上也提供贮库效应。心肌内施用是指将物质直接注射到心肌(cardiac muscle/myocardium)中。此外,可以通过将物质直接注射到给定组织中来到达非骨骼肌,例如,用于压力性尿失禁的泌尿道括约肌。

[0424] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,可以使用本发明的制剂治疗和/或预防的疾病是可以通过有效负载的分子治疗和/或预防的疾病。疾病包括但不限于:外周动脉脉病(mRNA有效负载:VEGF165/COMP-Ang1、Follistatin-like 1)、肌炎(mRNA有效负载:抗炎

细胞因子)、肌肉肥大(mRNA有效负载:肌生成抑制蛋白)、饮食诱导性肥胖(mRNA有效负载:IL-6、BDNF、FGF21)、缺血再灌注损伤(mRNA有效负载:肌联素)、LAMA2缺陷型肌营养不良(mRNA有效负载: α LNNd、Mini-agrin)、抑郁症(有效负载:犬尿氨酸氨基转移酶)、肌肉和神经肌肉障碍(包括诸如肌病、先天性肌病、线粒体肌病)(有效负载tRNA)、肌肉变性症、肌肉萎缩症、肌炎、癌症(例如软组织肉瘤)、萎缩(用于各种生长因子的有效负载mRNA)、肥大、假性肥大、张力减退、肌肉痉挛(muscular spasms)、恶病质、肌肉的糖原沉积病、肌无力(例如重症肌无力)以及心肌病和心肌梗死等疾病。

[0425] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,使用本发明的制剂预防和/或治疗疾病包括疫苗接种。在本发明的上下文中,有效负载(诸如蛋白质或编码充当用于抗原呈递细胞的表位或新表位(抗原)的蛋白质或多肽的mRNA/核酸)的肌内递送可以用作疫苗以引发抗原特异性免疫应答。在本发明的上下文中的疫苗接种旨在预防或治疗疾病,诸如感染、癌症、过敏和自身免疫性疾病。

[0426] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,药学上可接受的赋形剂是药学上可接受的水性缓冲液体系,优选地缓冲液体系具有生理pH值和等渗强度并且进一步包含冷冻保护剂,更优选地缓冲液体系具有7.0至7.4的pH值和250至330mosmol/kg的渗透压重量浓度并且包含选自包含蔗糖和海藻糖的组的冷冻保护剂,并且甚至更优选地缓冲液体系是pH 7.4的10mM磷酸盐或10mM TRIS/HCl缓冲液并且包含270mM蔗糖作为冷冻保护剂。其他药学上可接受的赋形剂是本领域技术人员已知的。

[0427] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,受试者是选自包含人、猴、大鼠和小鼠的组的哺乳动物,优选地受试者是人类。

[0428] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,有效负载分子是治疗活性剂。

[0429] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,疗法是用于治疗和/或预防受试者中的疾病的方法,优选地该方法包括向受试者施用适用于或有效治疗和/或预防疾病的药剂。

[0430] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,疗法是用于治疗和/或预防疾病的方法。更优选地,在用于治疗和/或预防疾病的此种方法中,将治疗活性剂施用受试者、优选地需要此种治疗和/或预防的受试者。在其实施方案中,受试者是人类。

[0431] 本领域技术人员应理解,本文所公开的制剂、优选地所公开的用于在疗法中使用的制剂,也可以用于诊断、优选地体内或原位诊断。

[0432] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,诊断是用于诊断疾病的方法。更优选地,在用于诊断疾病的此种方法中,将诊断活性剂施用受试者、优选地需要此种诊断的受试者。在其实施方案中,受试者是人类。

[0433] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,胆固醇与二羧酸的单酯是在胆固醇的OH基团与一个羧基基团或二羧酸之间形成的酯。据此,胆固醇与二羧酸(其中二羧酸是琥珀酸)的单酯是胆固醇半琥珀酸酯;胆固醇与二羧酸(其中二羧酸是戊二酸)的单酯是胆固醇半戊二酸酯;并且胆固醇与二羧酸(其中二羧酸是己二酸)的单酯是胆固醇半己二酸酯。

[0434] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,如果据说化合物在所指示的pH值下携带负电荷,则这意味着此种化合物在介质中具有负电荷,其中介质具有所指示的pH值。在优选实施方案中,介质是形成包含脂质纳米颗粒的制剂的流体部分的流体,其中脂质纳米颗粒包含脂质组合物,并且其中脂质组合物包含第一脂质和第二脂质。

[0435] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,如果据说化合物在所指示的pH下携带正电荷,则这意味着此种化合物在介质中具有正电荷,其中介质具有所指示的pH值。在优选实施方案中,介质是形成包含脂质纳米颗粒的制剂的流体部分的流体,其中脂质纳米颗粒包含脂质组合物,并且其中脂质组合物包含第一脂质和第二脂质。

[0436] 在实施方案中并且如本文优选地使用的,脂质是包含疏水性部分和亲水性部分的分子,其中亲水性部分是吸引水的化学基团、优选地在7.2-7.5的pH下携带至少一个负电荷或正电荷的化学基团。

[0437] 本发明的制剂,特别是如结合第一方面所公开的,依赖于将包含脂质组合物的脂质组分的溶液与包含mRNA的溶液混合,其中混合是在线混合(in-line mixing)。混合步骤通过应用微流体混合装置来进行,并且可以特别地通过使用交错的人字形混合器装置、Dean涡流分叉混合装置或微流体流体动力混合装置来完成。由于其特殊设计的微通道,这些装置允许快速、非湍流和基于扩散的混合过程。交错的人字形混合器及其在制备颗粒、优选地如本发明的组合物中包含的颗粒中的用途例如描述于Zhigaltsev, I.V.等人“Bottom-Up Design and Synthesis of Limit Size Lipid Nanoparticle Systems with Aqueous and Triglyceride Cores Using Millisecond Microfluidic Mixing”.*Langmuir* 28, 3633-3640 (2012)中,其公开内容通过引用并入本文。微流体流体动力混合及其在制备颗粒、优选地如本发明的组合物中包含的颗粒中的用途例如描述于Krzysztoń, R.等人“Microfluidic self-assembly of folate-targeted monomolecular siRNA-lipid nanoparticles.”*Nanoscale* 9, 7442-7453 (2017)中,其公开内容通过引用并入本文。最后,Dean涡流分叉混合及其在制备颗粒、优选地如本发明的组合物中包含的颗粒中的用途例如描述于Chen, J.J., Chen, C.H. & Shie, S.R. “Optimal designs of staggered dean vortex micromixers.” *Int J Mol Sci* 12, 3500-3524 (2011)中,其公开内容通过引用并入本文。除了微流体混合程序之外,包含脂质组合物的脂质组分的溶液与包含mRNA的溶液的混合可以使用受限冲击式射流混合器[Knauer GmbH, Berlin, Germany]进行。

[0438] 本发明将通过以下实施例进一步说明,从这些实施例可以获得另外的特征、实施方案和优点,其中

[0439] 图1示出将FLuc-mRNA、包封到阳离子LNP的FLuc-mRNA、包封到根据本发明的总体中性LNP的FLuc-mRNA和包封到根据现有技术的基于可离子化阳离子脂质的中性LNP中的FLuc-mRNA在肌肉注射到小鼠中之后,荧光素酶表达的体内评估的研究设计;

[0440] 图2是示出作为各种制剂的荧光素酶活性的指示的相对光单位的图表,更具体地,图2示出将FLuc-mRNA、包封到阳离子LNP的FLuc-mRNA、包封到根据本发明的总体中性LNP的FLuc-mRNA和包封到根据现有技术的基于可离子化阳离子脂质的中性LNP中的FLuc-mRNA在肌肉注射到小鼠中之后,所获得的荧光素酶表达结果;

[0441] 图3示出指示根据本发明的制剂的实施方案的脂质纳米颗粒的pH依赖性总表面电荷的图表I,其中脂质组合物的第一脂质携带以pH依赖性方式去质子化的羧基基团,并且脂质组合物的第二脂质携带三个以pH依赖性方式质子化的官能团;

[0442] 图4示出指示根据本发明的制剂的实施方案的脂质纳米颗粒的pH依赖性总表面电荷的图表II,其中脂质组合物的第一脂质携带以pH依赖性方式去质子化的羧基基团,并且脂质组合物的第二脂质携带两个以pH依赖性方式质子化的官能团;和

[0443] 图5示出指示根据本发明的制剂的实施方案的脂质纳米颗粒的pH依赖性总表面电荷的图表III,其中脂质组合物的第一脂质携带以pH依赖性方式去质子化的羧基基团,并且脂质组合物的第二脂质携带一个以pH依赖性方式质子化的官能团。

[0444] 实施例1:用于通过肌内、皮下或皮内施用在体内应用的在脂质纳米颗粒中的FLuc mRNA的制剂 (PTX_LNP#1)

[0445] 对于体内实验,mRNA-LNP在以 β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺作为阳离子脂质的配制方法中制备。可替代地,其他阳离子脂质如L-精氨酸基- β -丙氨酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺可以用于相同的程序中以制备类似的mRNA-LNP。

[0446] 通过将脂质组分2 β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺:DPhyPE:mPEG-2000-DSPE以50:49:1的摩尔比溶解于乙醇中来制备脂质溶液。随后,使用微流体混合器(**NanoAssemblr®**;Precision Nanosystems,Vancouver,BC),施加18ml/min的总流速,将该脂质溶液与**CleanCap®** FLuc mRNA (5moU (=5-甲氧基-尿苷修饰); Trilink Biotechnologies, San Diego)的水溶液以2:1的体积比(RNA溶液:脂质溶液)混合。以这种方式调节所施用的脂质和mRNA浓度,使得由此获得的mRNA制剂的总脂质与mRNA质量比等于28。在混合工艺之后,使用3.5kDa MWC0 Slide-A-Lyzer透析盒(Thermo Fisher Scientific)对制剂进行对10mM TRIS缓冲270mM蔗糖溶液的透析。将浮动透析盒中的制剂在室温下透析2小时,同时轻轻搅拌透析缓冲液;更换透析缓冲液并且在室温下再透析2小时。再次更换透析缓冲液并且在4°C下透析过夜。在透析程序期间,使用至少300倍样品体积的总透析缓冲液。除了蔗糖,其他糖如海藻糖或葡萄糖同样地可以在配制方法内使用。

[0447] 随后,测试由此获得的制剂的粒度(Zetasizer Ultra instrument (Malvern Instruments Ltd,Malvern,UK)、按照制造商(Thermo Fisher Scientific)方案的RNA包封(Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit)和内毒素含量。发现粒度是60至90nm(Z-平均值),具有35mV+/-10mV的 ζ -电势。制剂显示大于90%的mRNA包封。此时,将制剂的最终mRNA浓度调节至100 μ g/ml。将获得的mRNA-LNP制剂在-80°C下储存,直到进一步体外或体内使用。

[0448] 实施例2:用于通过肌内、皮下或皮内施用在体内应用的在脂质纳米颗粒中的FLuc mRNA的制剂 (PTX_LNP#2)

[0449] 对于体内实验,mRNA-LNP在以 β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺作为阳离子脂质的配制方法中制备。可替代地,其他阳离子脂质如L-精氨酸基- β -丙氨酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺可以用于相同的程序中以制备类似的mRNA-LNP。

[0450] 通过将脂质组分2 β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺:胆固醇:mPEG-2000-DSPE以70:29:1的摩尔比溶解于乙醇中来制备脂质溶液。随后,使用微流体混合器(**NanoAssemblr®**;Precision Nanosystems,Vancouver,BC),施加18ml/min的总流速,将该脂质溶液与**CleanCap®** FLuc mRNA (5moU; Trilink Biotechnologies, San Diego)的水溶液以3:1的体积比(RNA溶液:脂质溶液)混合。以这种方式调节所施用的脂质和mRNA浓度,使得由此获得的mRNA制剂的总脂质与mRNA质量比等于14。在混合工艺之后,使用3.5kDa MWC0 Slide-A-Lyzer透析盒(Thermo Fisher Scientific)对制剂进行对10mM TRIS缓冲270mM蔗糖溶液的透析。将浮动透析盒中的制剂在室温下透析2小时,同时轻轻搅拌透析缓冲液;更换透析缓冲液并且在室温下再透析2小

时。再次更换透析缓冲液并且在4℃下透析过夜。在透析程序期间,使用至少300倍样品体积的总透析缓冲液。除了蔗糖,其他糖如海藻糖或葡萄糖同样地可以在配制方法内使用。

[0451] 随后,测试由此获得的制剂的粒度(Zetasizer Ultra instrument (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK)、按照制造商(Thermo Fisher Scientific)方案的RNA包封(Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit)和内毒素含量。发现粒度是60至90nm(Z-平均值),具有35mV $\pm$ 10mV的 ζ -电势。制剂显示大于90%的mRNA包封。此时,将制剂的最终mRNA浓度调节至100 μ g/ml。将获得的mRNA-LNP制剂在-80℃下储存,直到进一步体外或体内使用。

[0452] 实施例3:用于通过肌内、皮下或皮内施用在体内应用的在中性脂质纳米颗粒中的FLuc mRNA的制剂(PTX_LNP#3)

[0453] 对于体内实验,mRNA-LNP在以 β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺作为阳离子脂质的配制方法中制备。可替代地,其他阳离子脂质如L-精氨酸基- β -丙氨酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺可以用于相同的程序中以制备类似的mRNA-LNP。

[0454] 通过将脂质组分2 β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺:CHEMS:胆固醇:mPEG-2000-DMPE以29:49:20:2的摩尔比溶解于乙醇中来制备脂质溶液。随后,使用微流体混合器(**NanoAssemblr®**; Precision Nanosystems, Vancouver, BC),施加18ml/min的总流速,将该脂质溶液与**CleanCap®** FLuc mRNA (5moU; Trilink Biotechnologies, San Diego)在乙酸盐缓冲液(50mM, pH 4)中的溶液以2:1的体积比(RNA溶液:脂质溶液)混合。以这种方式调节所施用的脂质和mRNA浓度,使得由此获得的mRNA制剂的总脂质与mRNA质量比等于28。在混合工艺之后,使用3.5kDa MWC0 Slide-A-Lyzer透析盒(Thermo Fisher Scientific)对制剂进行对10mM TRIS缓冲270mM蔗糖溶液的透析。将浮动透析盒中的制剂在室温下透析2小时,同时轻轻搅拌透析缓冲液;更换透析缓冲液并且在室温下再透析2小时。再次更换透析缓冲液并且在4℃下透析过夜。在透析程序期间,使用至少300倍样品体积的总透析缓冲液。除了蔗糖,其他糖如海藻糖或葡萄糖同样地可以在配制方法内使用。

[0455] 随后,测试由此获得的制剂的粒度(Zetasizer Ultra instrument (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK)、按照制造商(Thermo Fisher Scientific)方案的RNA包封(Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit)和内毒素含量。发现粒度是60至90nm(Z-平均值),具有0mV $\pm$ 10mV的 ζ -电势。制剂显示大于90%的mRNA包封。此时,将制剂的最终mRNA浓度调节至100 μ g/ml。将获得的mRNA-LNP制剂在-80℃下储存,直到进一步体外或体内使用。

[0456] 实施例4:用于通过肌内、皮下或皮内施用在体内应用的在脂质纳米颗粒中的FLuc mRNA的制剂(PTX_LNP#4)

[0457] 对于体内实验,mRNA-LNP在以 β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺作为阳离子脂质的配制方法中制备。可替代地,其他阳离子脂质如L-精氨酸基- β -丙氨酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺可以用于相同的程序中以制备类似的mRNA-LNP。

[0458] 通过将脂质组分2 β -(L-精氨酸基)-L-2,3-二氨基丙酸-N-棕榈基-N-油基-酰胺:CHEMS:胆固醇:mPEG-2000-DMPE以29:48:18:5的摩尔比溶解于乙醇中来制备脂质溶液。随后,使用微流体混合器(**NanoAssemblr®**; Precision Nanosystems, Vancouver, BC),施加18ml/min的总流速,将该脂质溶液与**CleanCap®** FLuc mRNA (5moU; Trilink

Biotechnologies, San Diego) 在乙酸盐缓冲液 (50mM, pH 4) 中的溶液以 2:1 的体积比 (RNA 溶液:脂质溶液) 混合。以这种方式调节所施用的脂质和 mRNA 浓度,使得由此获得的 mRNA 制剂的总脂质与 mRNA 质量比等于 32。在混合工艺之后,使用 3.5kDa MWC0 Slide-A-Lyzer 透析盒 (Thermo Fisher Scientific) 对制剂进行对 10mM TRIS 缓冲 270mM 蔗糖溶液的透析。将浮动透析盒中的制剂在室温下透析 2 小时,同时轻轻搅拌透析缓冲液;更换透析缓冲液并且在室温下再透析 2 小时。再次更换透析缓冲液并且在 4°C 下透析过夜。在透析程序期间,使用至少 300 倍样品体积的总透析缓冲液。除了蔗糖,其他糖如海藻糖或葡萄糖同样地可以在配制方法内使用。

[0459] 随后,测试由此获得的制剂的粒度 (Zetasizer Ultra instrument (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK)、按照制造商 (Thermo Fisher Scientific) 方案的 RNA 包封 (Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit) 和内毒素含量。发现粒度是 40 至 90nm (Z-平均值), 具有 $0\text{mV} \pm 10\text{mV}$ 的 ζ -电势。制剂显示大于 90% 的 mRNA 包封。此时,将制剂的最终 mRNA 浓度调节至 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 。将获得的 mRNA-LNP 制剂在 -80°C 下储存,直到进一步体外或体内使用。

[0460] 实施例 5:将不同 PTX_LNP 肌肉注射到小鼠中之后荧光素酶表达的体内评估。

[0461] 为了评估在肌肉注射各种 PTX_LNP 之后的萤火虫荧光素酶 (FLuc) 表达,如图 1 中所描绘的设计小鼠研究。组名称在以下表中示出,即,组 A 是没有任何 FLuc-mRNA 的生理盐水组用作媒介物对照。组 B 是仅 FLuc-mRNA 而没有任何脂质用作对照,组 C 是如实施例 1 中所描述的制备的总体上带正电荷的 FLuc-mRNA-LNP。组 D 是如实施例 2 中所描述的制备的总体上带正电荷的 FLuc-mRNA-LNP。组 E 是根据本发明的总体上中性的 FLuc-mRNA-LNP,其如实施例 3 中所描述的制备并且其包含 2mol % mPEG2000-DMPE。组 F 是根据本发明的总体上中性的 FLuc-mRNA-LNP,其如实施例 4 中所描述的制备并且其包含 5mol % mPEG2000-DMPE。组 G 是基于现有技术可离子化阳离子脂质的中性 FLuc-mRNA-LNP。对于所述组,在注射后 24 小时评估荧光素酶表达,而对于包含与组 B 至 G 同样样品的组 H 至 M,在注射后 72 小时评估荧光素酶表达。每组由三只 8-10 周龄 C57BL/6 小鼠组成。

[0462] 对于治疗,如以下表 1 中所概述的,通过使用 Omnican 50U-100 注射器和 30G 针头 (0.30mm x 12mm) 进行肌肉注射,小鼠每条大腿 (左侧和右侧后肢) 接受 $6 \times 10\mu\text{l}$ 的每种测试物质。因此,在注射之前,将大腿剃毛,并且小鼠在每条大腿肌肉大约 2-3mm 的距离处各自接受 $6 \times 10\mu\text{l}$ 注射,其中将套管施用到肌肉组织中 4-5mm 深。

[0463] 分别 24 小时或 72 小时后,将小鼠处死,并且将总大腿肌肉组织在液氮中急冻。对于荧光素酶测定,将冷冻的肌肉组织在干冰预冷研钵中粉碎,并且使用珠粒 raptor (QIAGEN TissueLyser LT) 将 60-90mg 的组织在 PROMEGA Luciferase Cell Culture Lysis 裂解缓冲液 ($10\mu\text{l}/\text{mg}$ 组织粉末) 中匀化 5min/50Hz。

[0464] 将匀浆离心,并且使用 PROMEGA **Nano-Glo® Dual-Luciferase®** Reporter Assay System 试剂盒测量上清液中表达的荧光素酶。简言之,将未稀释的组织裂解物与等体积的含有荧光素的测定缓冲液混合,并且立即使用 TECAN infinite 200Pro 发光计测量发光。

[0465] 结果呈现于图 2 中。与总体阳离子 LNP (PTX_LNP#2 and PTX_LNP#3) 和常规 FLuc-mRNA 相比,总体电荷中性的 LNP (PTX_LNP#3 和 PTX_LNP#4) 在肌肉注射之后显示出显著更高的荧光素酶表达。此外,还与现有技术的总体电荷中性 LNP (基于可离子化的阳离子脂质) 相

比,根据本发明的总体电荷中性的LNP (PTX_LNP#3和PTX_LNP#4) 在肌内注射之后示出显著更高的荧光素酶表达。有趣地,对于包含更高量的mPEG-DMPE脂质的PTX_LNP#4 (5%相对于PTX_LNP#3中的2%),72小时之后的荧光素酶表达显著高于24小时之后,表明PTX_LNP#4的持续的生物活性。

[0466] 表1:肌内注射之后荧光素酶表达的小鼠实验的组命名(剂量/时间点)。

	组	剂量组	处死
		$\mu\text{g mRNA/大腿}$	小时 p.t.
	A 生理盐水对照	-	24 h
	B FLuc-mRNA*	6 μg (6 x 10 μl)	24 h
	C PTX_LNP#1	6 μg (6 x 10 μl)	24 h
	D PTX_LNP#2	6 μg (6 x 10 μl)	24 h
	E PTX_LNP#3	6 μg (6 x 10 μl)	24 h
[0467]	F PTX_LNP#4	6 μg (6 x 10 μl)	24 h
	G LNP#5	6 μg (6 x 10 μl)	24 h
	H FLuc-mRNA*	6 μg (6 x 10 μl)	72 h
	I PTX_LNP#1	6 μg (6 x 10 μl)	72 h
	J PTX_LNP#2	6 μg (6 x 10 μl)	72 h
	K PTX_LNP#3	6 μg (6 x 10 μl)	72 h
	L PTX_LNP#4	6 μg (6 x 10 μl)	72 h
	M LNP#5	6 μg (6 x 10 μl)	72 h

[0468] *“裸”CleanCap®FLuc mRNA (5moU) 溶解于0.9%生理盐水中而无任何脂质,浓度为0.100mg/ml

[0469] 说明书、权利要求和/或附图中所公开的本发明的特征可以单独地和以其任何组合两者作为用于呈其各种形式实现本发明的材料。

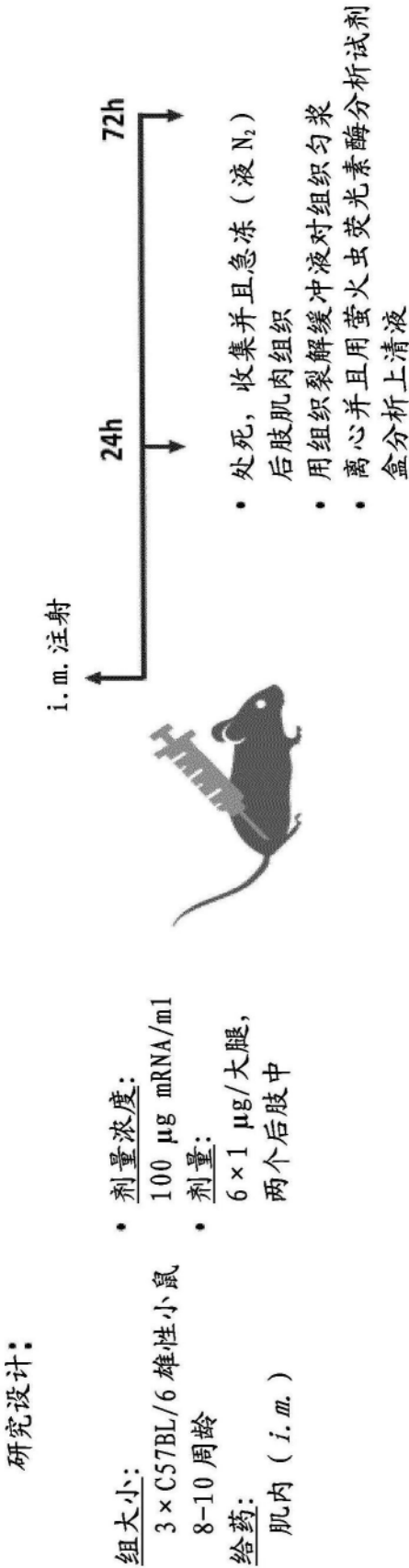


图1

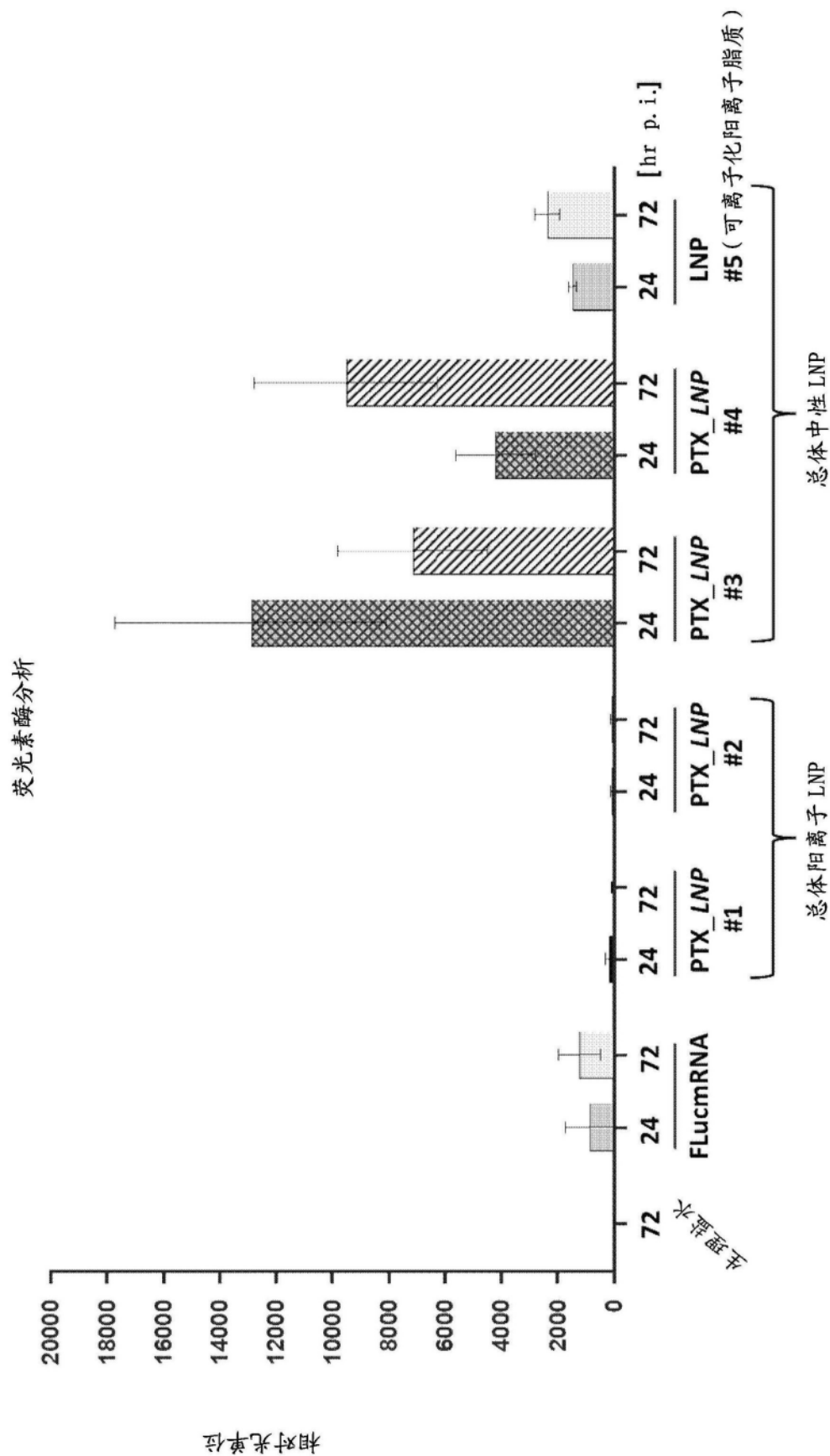


图2

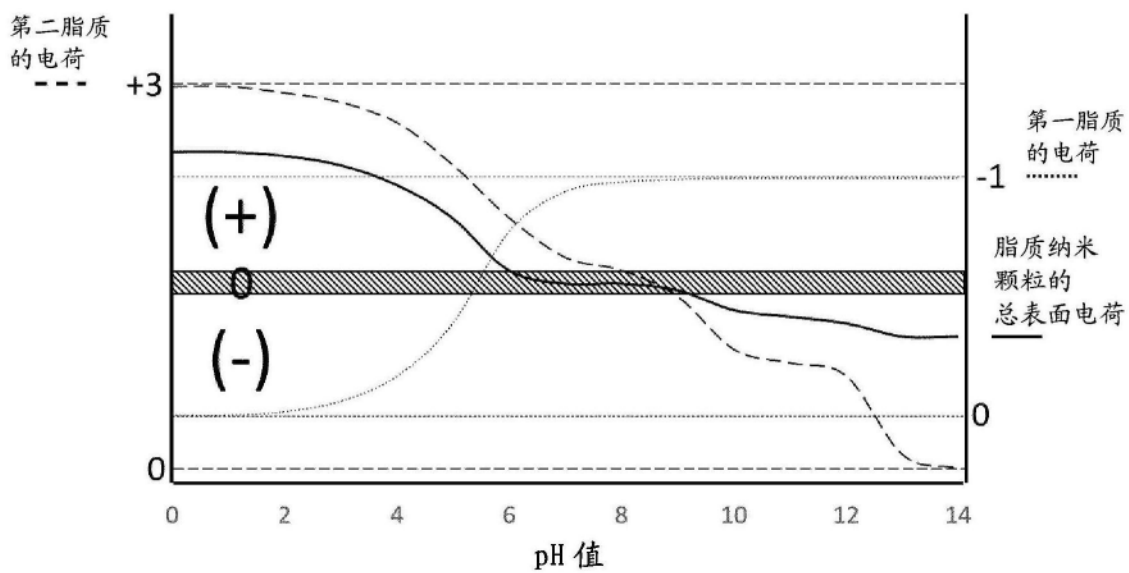


图3

(II)

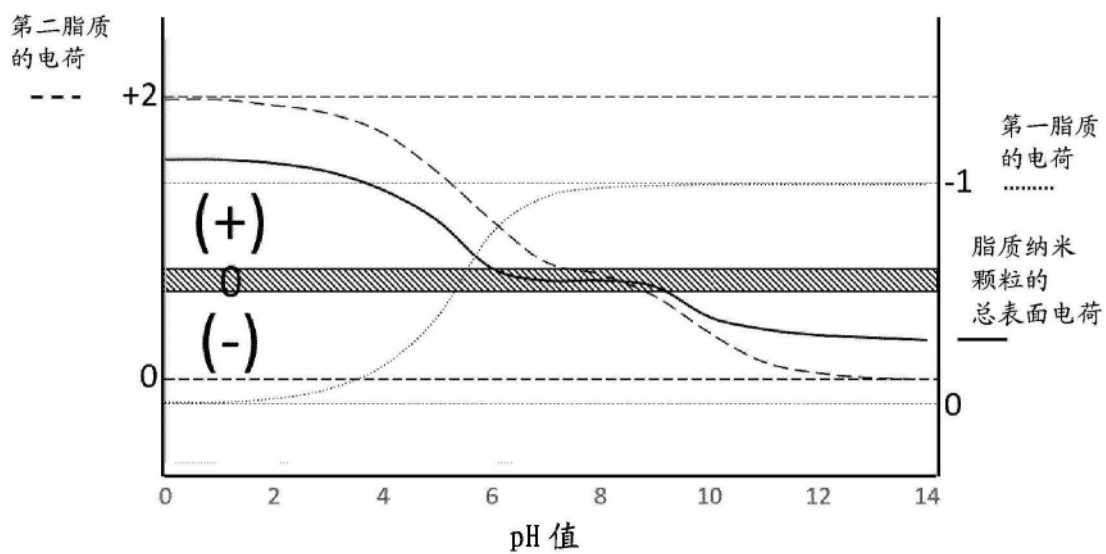


图4

(III)

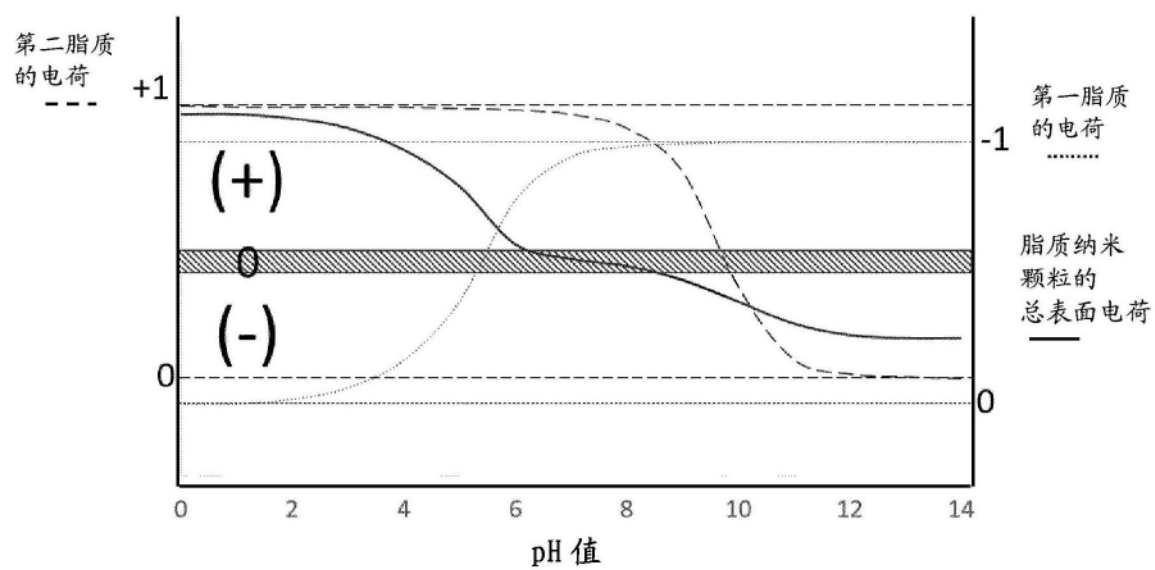


图5