



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118369308 A

(43) 申请公布日 2024.07.19

(21) 申请号 202280081536.3

(22) 申请日 2022.12.09

(30) 优先权数据

63/288317 2021.12.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/052347 2022.12.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/107669 EN 2023.06.15

(71) 申请人 摩登纳特斯有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 K·E·贝内纳托 李峻荣

M·西珀萨乌德

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 彭昶

(51) Int.Cl.

C07C 229/16 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

权利要求书10页 说明书133页

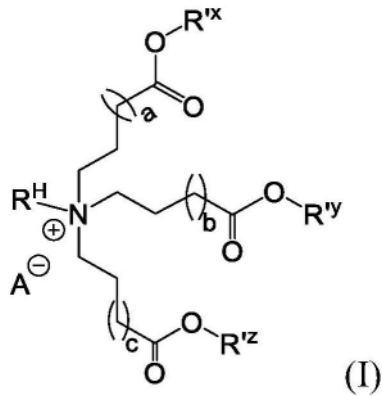
(54) 发明名称

用于递送治疗剂的化合物和组合物

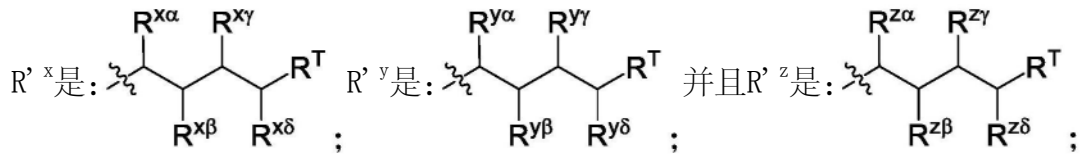
(57) 摘要

本公开提供新颖脂质和包含所述脂质的组合物。脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)包括新颖阳离子脂质以及诸如可离子化脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质的额外脂质。还包括诸如RNA的治疗剂和/或预防剂的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可用于向哺乳动物细胞或器官递送治疗剂和/或预防剂以例如调节多肽、蛋白质或基因表达。

1. 一种式 (I) 的阳离子脂质:



或其异构体, 其中:



其中  $\text{---}\xi\text{---}$  表示连接点;

$R^{x\alpha}$ 、 $R^{x\beta}$ 、 $R^{xy}$  和  $R^{x\delta}$  各自独立地选自由 H、 $C_{1-12}$  烷基和  $C_{2-12}$  烯基组成的组;

$R^{y\alpha}$ 、 $R^{y\beta}$ 、 $R^{yy}$  和  $R^{y\delta}$  各自独立地选自由 H、 $C_{1-12}$  烷基和  $C_{2-12}$  烯基组成的组;

$R^{z\alpha}$ 、 $R^{z\beta}$ 、 $R^{zy}$  和  $R^{z\delta}$  各自独立地选自由 H、 $C_{1-12}$  烷基和  $C_{2-12}$  烯基组成的组;

$R^H$  为  $-(CH_2)_q OH$ , 其中 q 选自 1、2、3、4 和 5;

各  $R^T$  独立地选自  $C_{1-12}$  烷基和  $C_{2-12}$  烯基;

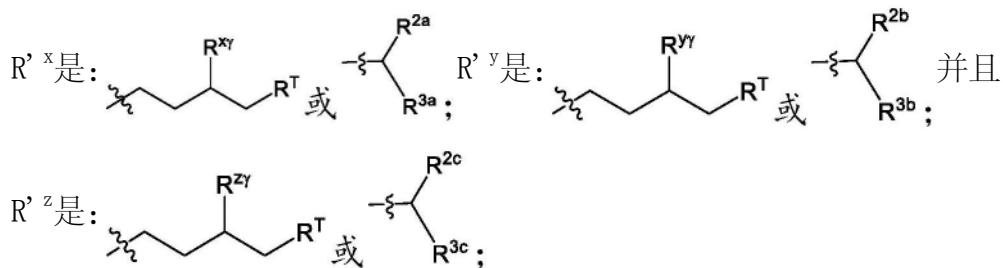
a 选自 1、2、3、4、5、6、7、8 和 9;

b 选自 1、2、3、4、5、6、7、8 和 9;

c 选自 1、2、3、4、5、6、7、8 和 9; 并且

A 是任何药学上可接受的阴离子。

2. 如权利要求 1 所述的阳离子脂质, 其中



其中  $\text{---}\xi\text{---}$  表示连接点;

$R^{xy}$  选自由 H、 $C_{1-12}$  烷基和  $C_{2-12}$  烯基组成的组;

$R^{yy}$  选自由 H、 $C_{1-12}$  烷基和  $C_{2-12}$  烯基组成的组;

$R^{zy}$  选自由 H、 $C_{1-12}$  烷基和  $C_{2-12}$  烯基组成的组; 并且

$R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、 $R^{2c}$ 、 $R^{3a}$ 、 $R^{3b}$  和  $R^{3c}$  各自独立地选自由  $C_{1-14}$  烷基和  $C_{2-14}$  烯基组成的组。

3. 如权利要求 1 所述的阳离子脂质, 其中



18. 一种负载LNP, 所述负载LNP包含:

(a) 负载LNP核心, 其包含:

- (i) 可离子化脂质,
- (ii) 磷脂,
- (iii) 结构脂质, 和
- (iv) PEG-脂质, 和

(b) 封装于所述核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂, 和

(c) 阳离子剂, 其中所述阳离子剂是如权利要求1-10中任一项所述的阳离子脂质。

19. 一种负载LNP, 所述负载LNP包含:

(a) 负载LNP核心, 其包含:

- (i) 可离子化脂质,
- (ii) 磷脂,
- (iii) 结构脂质, 和
- (iv) PEG-脂质, 和

(b) 封装于所述核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂, 和

(c) 阳离子剂。

20. 如权利要求19所述的负载LNP, 其中所述阳离子剂是阳离子脂质。

21. 如权利要求17-20中任一项所述的负载LNP, 其中所述治疗剂和/或预防剂是核酸。

22. 如权利要求21所述的负载LNP, 其中所述治疗剂和/或预防剂是核糖核酸(RNA)。

23. 如权利要求22所述的负载LNP, 其中所述RNA选自由短干扰RNA(siRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、RNA干扰(RNAi)分子、微小RNA(miRNA)、安塔够妙(antagomir)、反义RNA、核酶、Dicer底物RNA(dsRNA)、小发夹RNA(shRNA)、信使RNA(mRNA)和它们的混合物组成的组。

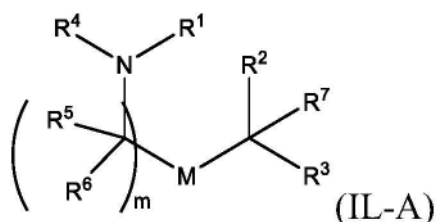
24. 如权利要求23所述的负载LNP, 其中所述RNA是mRNA。

25. 如权利要求24所述的负载LNP, 其中所述mRNA是修饰的mRNA(mmRNA)。

26. 如权利要求24或25所述的负载LNP, 其中所述mRNA并入微小RNA结合位点(miR结合位点)。

27. 如权利要求24-26中任一项所述的负载LNP, 其中所述mRNA包括茎环、链终止核苷、polyA序列、多腺苷酸化信号和/或5'帽结构中一者或多者。

28. 如权利要求12-27中任一项所述的空LNP或负载LNP, 其中所述可离子化脂质是式(IL-A)化合物:

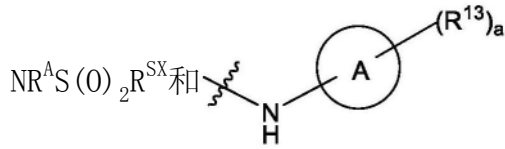


或其N-氧化物, 或其盐或异构体, 其中:


$R^1$ 选自由 $C_{5-30}$ 烷基、 $C_{5-20}$ 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''M'R'$ 组成的组;

$R^2$ 和 $R^3$ 独立地选自由H、 $C_{1-14}$ 烷基、 $C_{2-14}$ 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R^*OR''$ 组成的组, 或 $R^2$ 和 $R^3$ 连同它们所连接的原子形成杂环或碳环;

$R^4$ 选自自由氢、 $C_{3-6}$ 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-(CH_2)_oC(R^{12})_2(CH_2)_{n-o}Q$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ(R)_2$ 、 $-C(O)NQR$ 和未取代的 $C_{1-6}$ 烷基组成的组,其中 $Q$ 选自碳环、杂环、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_n(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(R)R^8$ 、 $-N(R)S(O)_2R^8$ 、 $-O(CH_2)_nOR$ 、 $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(=CHR^9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)R$ 、 $-N(OR)S(O)_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR^9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR^9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 、 $-(CH_2)_nN(R)_2$ 和 $-C(R)N(R)_2C(O)OR$ 、



其中A是含有一个或多个选自N、O和S的杂原子的3-14

元杂环;并且a是1、2、3或4;其中表示连接点;

各o独立地选自1、2、3和4,并且各n独立地选自1、2、3、4和5;

$R^8$ 选自自由 $C_{3-6}$ 碳环和杂环组成的组;

$R^9$ 选自自由H、CN、 $NO_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基、 $-OR$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2N(R)_2$ 、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{3-6}$ 碳环和杂环组成的组;

$R^{12}$ 选自自由H、OH、 $C_{1-3}$ 烷基和 $C_{2-3}$ 烯基组成的组;

各R独立地选自自由 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-3}$ 烷基-芳基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组;

$R^A$ 选自H和 $C_{1-3}$ 烷基;

$R^{SX}$ 选自 $C_{3-8}$ 碳环、含有一个或多个选自N、O和S的杂原子的3-14元杂环、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $(C_{1-3}$ 烷氧基) $C_{1-3}$ 烷基、 $(CH_2)_{p1}O(CH_2)_{p2}R^{SX1}$ 和 $(CH_2)_{p1}R^{SX1}$ ,其中所述碳环和所述杂环任选地被一个或多个选自氧代、 $C_{1-6}$ 烷基和 $(C_{1-3}$ 烷氧基) $C_{1-3}$ 烷基的基团取代;

$R^{SX1}$ 选自 $C(O)NR^{14}R^{14'}$ 、 $C_{3-8}$ 碳环和含有一个或多个选自N、O和S的杂原子的3-14元杂环,其中所述碳环和所述杂环各自任选地被一个或多个选自氧代、卤基、 $C_{1-3}$ 烷基、 $(C_{1-3}$ 烷氧基) $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基和 $NH_2$ 的基团取代;

各 $R^{13}$ 选自自由OH、氧代、卤基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷氧基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $NH_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、CN和 $NO_2$ 组成的组;

$R^{14}$ 和 $R^{14'}$ 各自独立地选自自由H和 $C_{1-6}$ 烷基组成的组;

$p_1$ 选自1、2、3、4和5;

$p_2$ 选自1、2、3、4和5;

各 $R^5$ 独立地选自自由OH、 $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组;

各 $R^6$ 独立地选自自由OH、 $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组;

$R^7$ 选自自由 $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组;

M和M'独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)M''$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-C(O)N(R^M)-$ 、 $-N(R^M)C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR^M)O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基和杂芳基,其中M''为键、 $C_{1-13}$ 烷基或 $C_{2-13}$ 烯基;

各 $R^M$ 独立地选自自由H、 $C_{1-6}$ 烷基和 $C_{2-6}$ 烯基组成的组;

各 $R'$ 独立地选自自由 $C_{1-18}$ 烷基、 $C_{2-18}$ 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、 $(CH_2)_qOR^*$ 和H组成的组,

并且各 $q'$ 独立地选自1、2和3;

各R<sup>7</sup>独立地选自由C<sub>3-15</sub>烷基和C<sub>3-15</sub>烯基组成的组；

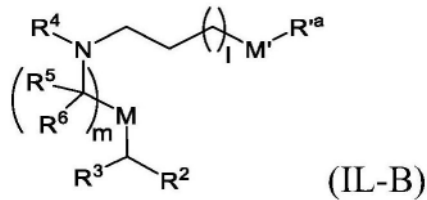
各R<sup>8</sup>独立地选自由C<sub>1-12</sub>烷基和C<sub>2-12</sub>烯基组成的组；

各Y独立地为C<sub>3-6</sub>碳环；

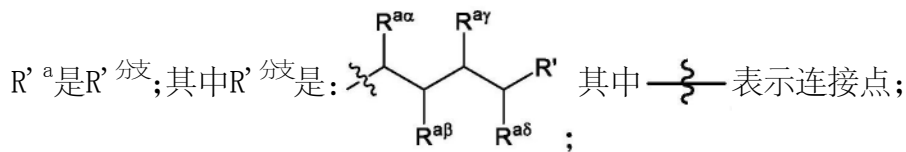
各X独立地选自由F、Cl、Br和I组成的组；并且

m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13。

29. 如权利要求28所述的空LNP或负载LNP, 其中所述可离子化脂质是式(IL-B)化合物:



或其N-氧化物, 或其盐或异构体, 其中:



其中R<sup>aα</sup>、R<sup>aβ</sup>、R<sup>aγ</sup>和R<sup>aδ</sup>各自独立地选自由H、C<sub>2-12</sub>烷基和C<sub>2-12</sub>烯基组成的组;

R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>各自独立地选自由C<sub>1-14</sub>烷基和C<sub>2-14</sub>烯基组成的组;

R<sup>4</sup>选自由-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH (其中n选自由1、2、3、4和5组成的组) 和 组成的

组,

其中 表示连接点; 其中

R<sup>10</sup>为N(R)<sub>2</sub>; 各R独立地选自由C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>2-3</sub>烯基和H组成的组; 并且n<sub>2</sub>选自由1、2、3、4、5、6、7、8、9和10组成的组;

各R<sup>5</sup>独立地选自由C<sub>1-3</sub>烷基、C<sub>2-3</sub>烯基和H组成的组;

各R<sup>6</sup>独立地选自由C<sub>1-3</sub>烷基、C<sub>2-3</sub>烯基和H组成的组;

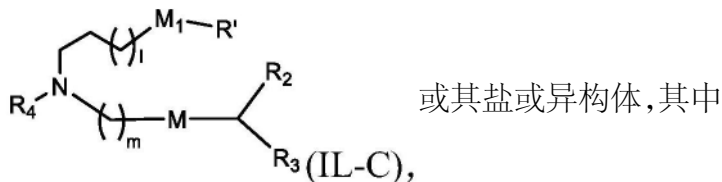
M和M<sup>'</sup>各自独立地选自由-C(O)O-和-OC(O)-组成的组;

R<sup>'</sup>为C<sub>1-12</sub>烷基或C<sub>2-12</sub>烯基;

l选自由1、2、3、4和5组成的组; 并且

m选自由5、6、7、8、9、10、11、12和13组成的组。

30. 如权利要求28所述的空LNP或负载LNP, 其中所述可离子化脂质是式(IL-C)化合物:



l选自1、2、3、4和5;

M<sub>1</sub>为M<sup>'</sup>;

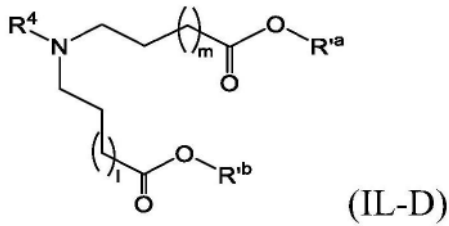
R<sub>4</sub>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, 其中Q是OH, 并且n选自1、2、3、4或5;

M和M' 独立地选自 -C(O)O- 和 -OC(O)-;

R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>均为C<sub>1-14</sub>烷基或C<sub>2-14</sub>烯基;并且

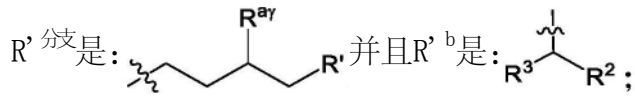
R' 为C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>直链烷基。

31. 如权利要求28所述的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-D)化合物:



或其N-氧化物,或其盐或异构体,

其中R<sup>a</sup>是R' 分支或R' 环状;其中



其中 表示连接点;

其中R<sup>aγ</sup>选自自由C<sub>1-12</sub>烷基和C<sub>2-12</sub>烯基组成的组;

R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>各自独立地选自自由C<sub>1-14</sub>烷基和C<sub>2-14</sub>烯基组成的组;

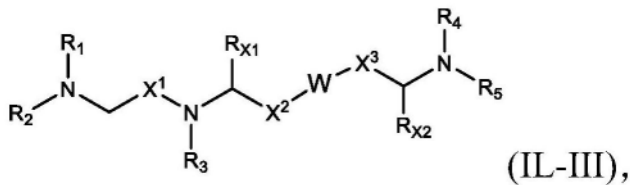
R<sup>4</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH,其中n选自自由1、2、3、4和5组成的组;

R' 为C<sub>1-12</sub>烷基或C<sub>2-12</sub>烯基;

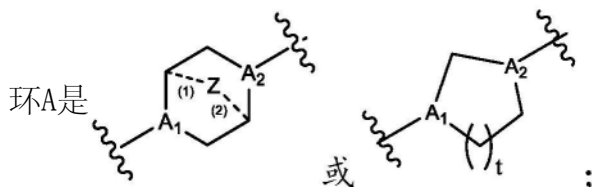
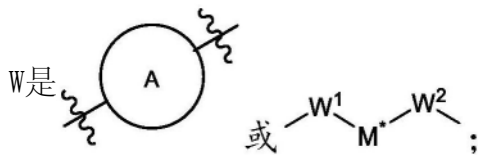
m选自1、2、3、4、5、6、7、8和9;

l选自1、2、3、4、5、6、7、8和9。

32. 如权利要求12-27中任一项所述的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-III)化合物:



或其盐或异构体,其中



t是1或2;

A<sub>1</sub>和A<sub>2</sub>各自独立地选自CH或N;

Z为CH<sub>2</sub>或不存在,其中当Z为CH<sub>2</sub>时,虚线(1)和(2)各自表示单键;并且当Z不存在时,虚

线(1)和(2)均不存在;

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 和 $R_5$ 独立地选自自由 $C_{5-20}$ 烷基、 $C_{5-20}$ 烯基、 $-R''MR'$ 、 $-R''YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''OR''$ 组成的组;

$R_{X1}$ 和 $R_{X2}$ 各自独立地为H或 $C_{1-3}$ 烷基;

各M独立地选自自由 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-SC(O)-$ 、芳基和杂芳基组成的组;

M\*为 $C_1-C_6$ 烷基,

$W^1$ 和 $W^2$ 各自独立地选自自由 $-O-$ 和 $-N(R_6)-$ 组成的组;

各 $R_6$ 独立地选自自由H和 $C_{1-5}$ 烷基组成的组;

$X^1$ 、 $X^2$ 和 $X^3$ 独立地选自自由键、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-CHR-$ 、 $-CHY-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $(CH_2)_n-C(O)-$ 、 $-C(O)-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-OC(O)-$ 、 $-C(O)O-(CH_2)_n-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-C(S)-$ 和 $-CH(SH)-$ 组成的组;

各Y独立地为 $C_{3-6}$ 碳环;

各 $R^*$ 独立地选自自由 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组;

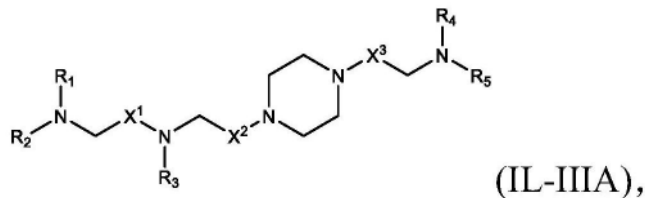
各R独立地选自自由 $C_{1-3}$ 烷基和 $C_{3-6}$ 碳环组成的组;

各 $R'$ 独立地选自自由 $C_{1-12}$ 烷基、 $C_{2-12}$ 烯基和H组成的组;

各 $R''$ 独立地选自自由 $C_{3-12}$ 烷基、 $C_{3-12}$ 烯基和 $-R''MR'$ 组成的组;并且

n是整数1-6。

33. 如权利要求32所述的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-III A)化合物:



或其盐或异构体,其中

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 和 $R_5$ 独立地选自自由 $C_{5-20}$ 烷基、 $C_{5-20}$ 烯基、 $-R''MR'$ 、 $-R''YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''OR''$ 组成的组;

各M独立地选自自由 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')$ 、 $-S(O)_2-$ 、芳基和杂芳基组成的组;

$X^1$ 、 $X^2$ 和 $X^3$ 独立地选自自由键、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-CHR-$ 、 $-CHY-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)-$ 、 $-C(O)O-CH_2-$ 、 $-OC(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)O-$ 、 $-CH_2-OC(O)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-C(S)-$ 和 $-CH(SH)-$ 组成的组;

各Y独立地为 $C_{3-6}$ 碳环;

各 $R^*$ 独立地选自自由 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组;

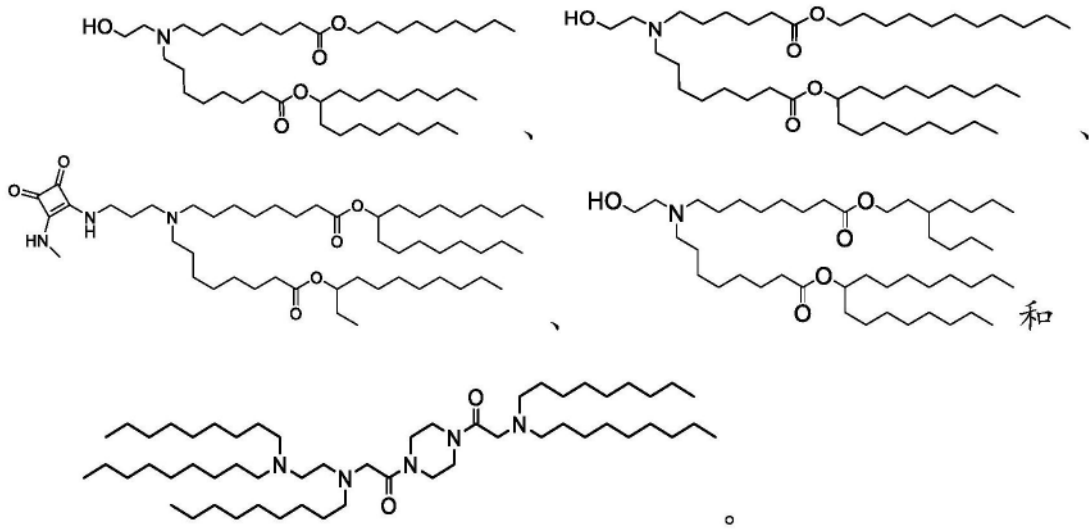
各R独立地选自自由 $C_{1-3}$ 烷基和 $C_{3-6}$ 碳环组成的组;

各 $R'$ 独立地选自自由 $C_{1-12}$ 烷基、 $C_{2-12}$ 烯基和H组成的组;并且

各 $R''$ 独立地选自自由 $C_{3-12}$ 烷基和 $C_{3-12}$ 烯基组成的组。

34. 如权利要求32或33所述的空LNP或负载LNP,其中 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 和 $R_5$ 各自为 $C_{5-20}$ 烷基; $X^1$ 为 $-CH_2-$ ;并且 $X^2$ 和 $X^3$ 各自为 $-C(O)-$ 。

35. 如权利要求12-27中任一项所述的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是选自以下的化合物:



36. 如权利要求12-27中任一项所述的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是选自表IL-1至IL-7的化合物的化合物。

37. 如权利要求13-36中任一项所述的空LNP或负载LNP,其中所述磷脂选自由以下组成的组:

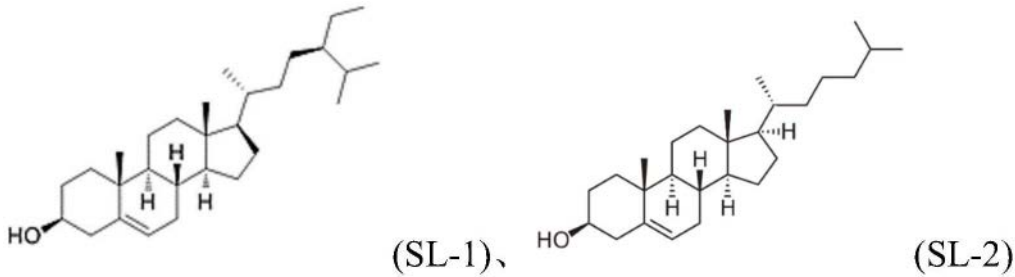
1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二(十一烷酰基)-sn-甘油-磷酸胆碱(DUPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二-0-十八烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0Diether PC)、1-油酰基-2-胆固醇基半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(0ChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二(二十二碳六烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二(二十二碳六烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-外消旋-(1-甘油)钠盐(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二硬脂酰基-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺(DMPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰胆碱(SOPC)、鞘磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)、鞘磷脂和它们的混合物。

38. 如权利要求37所述的空LNP或负载LNP,其中所述磷脂是DSPC。

39. 如权利要求14-38中任一项所述的空LNP或负载LNP,其中所述结构脂质选自由胆固醇、粪甾醇、谷甾醇、麦角固醇、菜油甾醇、豆甾醇、菜子甾醇、番茄碱、熊果酸、 $\alpha$ -生育酚和它

们的混合物组成的组。

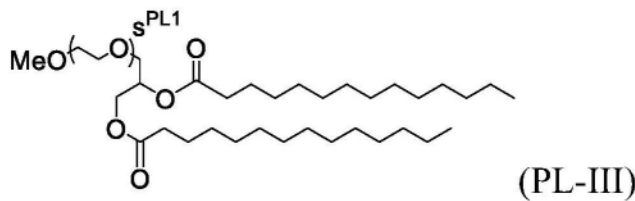
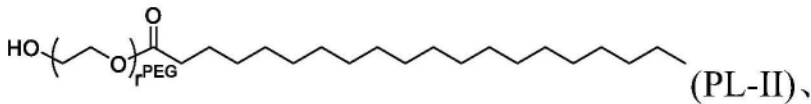
40. 如权利要求39所述的空LNP或负载LNP,其中所述结构脂质是



或其盐。

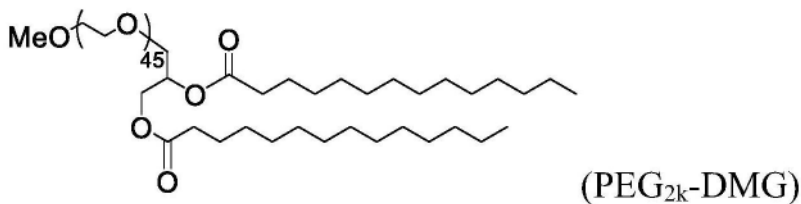
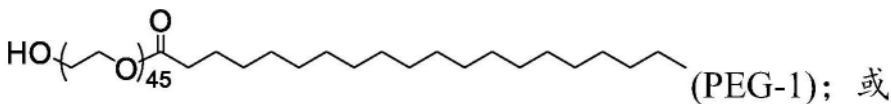
41. 如权利要求15-40中任一项所述的空LNP或负载LNP,其中所述PEG脂质选自由PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油、PEG修饰的二烷基甘油和它们的混合物组成的组。

42. 如权利要求41所述的空LNP或负载LNP,其中所述PEG脂质是以下结构之一的化合物:



或其盐,其中r是整数1至100;并且s是整数1至100。

43. 如权利要求42所述的空LNP或负载LNP,其中所述PEG脂质是以下化合物之一:



或其盐。

44. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求17-43中任一项所述的负载LNP和药学上可接受的载体。

45. 一种向受试者内的细胞递送治疗剂和/或预防剂的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求17-43中任一项所述的负载LNP或如权利要求44所述的药物组合物。

46. 一种在受试者内的细胞中产生所关注的多肽的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求17-43中任一项所述的负载LNP或如权利要求44所述的药物组合物。

47. 如权利要求45或46所述的方法,其中所述细胞是内皮细胞。

48. 如权利要求47所述的方法,其中所述内皮细胞是肺内皮细胞、呼吸道内皮细胞或支气管内皮细胞。

49. 一种向受试者的器官特异性地递送治疗剂和/或预防剂的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求17-43中任一项所述的负载LNP或如权利要求44所述的药物组合物。

50. 如权利要求49所述的方法,其中所述器官是肺。

51. 一种向受试者的组织特异性地递送治疗剂和/或预防剂的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求17-43中任一项所述的负载LNP或如权利要求44所述的药物组合物。

52. 如权利要求51所述的方法,其中所述组织是内皮。

53. 如权利要求51所述的方法,其中所述组织是肺内皮。

54. 一种治疗有需要的受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的如权利要求17-43中任一项所述的负载LNP或如权利要求44所述的药物组合物。

55. 如权利要求45-54中任一项所述的方法,其中所述施用是肠胃外、肌肉、皮内、皮下和/或静脉内执行。

## 用于递送治疗剂的化合物和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2021年12月10日提交的美国申请号63/288,317的优先权和权益,所述美国申请的完整内容以引用的方式并入本文中。

### 发明领域

[0003] 本公开提供新颖阳离子脂质、包含此类脂质的组合物和涉及脂质纳米粒子组合物以向哺乳动物细胞或器官递送一种或多种治疗剂和/或预防剂和/或在哺乳动物细胞或器官中产生多肽的方法。除了新颖阳离子脂质以外,本公开的脂质纳米粒子组合物也可以包括特定分率的一种或多种可离子化氨基脂质、包括多不饱和脂质在内的磷脂、PEG脂质、结构脂质和/或治疗剂和/或预防剂。

### 背景技术

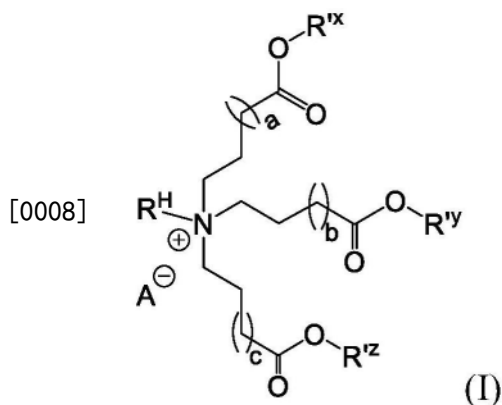
[0004] 有效地靶向递送诸如小分子药物、蛋白质和核酸的生物活性物质代表了一项持续的医学挑战。尤其,由于此类物质的相对不稳定性和低细胞渗透性,使得核酸至细胞的递送变得困难。因此,需要开发促进诸如核酸的治疗剂和/或预防剂递送至细胞的方法和组合物。

[0005] 已证明含脂质的纳米粒子组合物、脂质体和脂质体复合物有效地作为诸如小分子药物、蛋白质和核酸的生物活性物质的转运媒介进入细胞和/或细胞内隔室中。此类组合物一般包括一种或多种“阳离子”和/或氨基(可离子化)脂质、包括多不饱和脂质在内的磷脂、结构脂质(例如固醇)和/或含有聚乙二醇的脂质(PEG脂质)。阳离子和/或可离子化脂质包括例如可容易地质子化的含胺脂质。尽管多种此类含脂质的纳米粒子组合物已得到证明,但仍缺乏安全性、功效和特异性的改进。

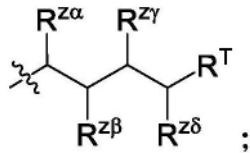
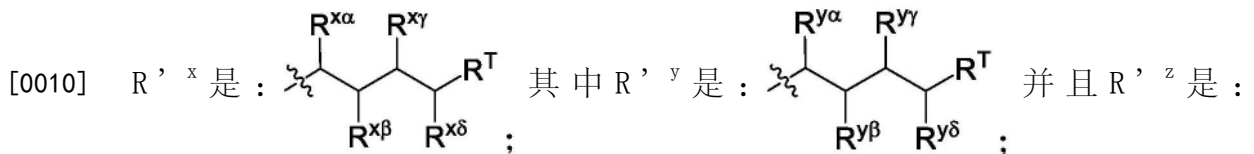
### 发明内容


[0006] 本公开提供新颖阳离子脂质和组合物(例如,脂质纳米粒子)以及涉及所述阳离子脂质和组合物的方法。

[0007] 在一些方面,本公开涉及式(I)的阳离子脂质:



[0009] 或其异构体,其中:



[0011] 其中  表示连接点;

[0012]  $R^{xα}$ 、 $R^{xβ}$ 、 $R^{xy}$  和  $R^{xδ}$  各自独立地选自由H、 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组;

[0013]  $R^{yα}$ 、 $R^{yβ}$ 、 $R^{yγ}$  和  $R^{yδ}$  各自独立地选自由H、 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组;

[0014]  $R^{zα}$ 、 $R^{zβ}$ 、 $R^{zy}$  和  $R^{zδ}$  各自独立地选自由H、 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组;

[0015]  $R^H$ 为 $-(CH_2)_qOH$ ,其中q选自1、2、3、4和5;

[0016] 各 $R^T$ 独立地选自 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基;

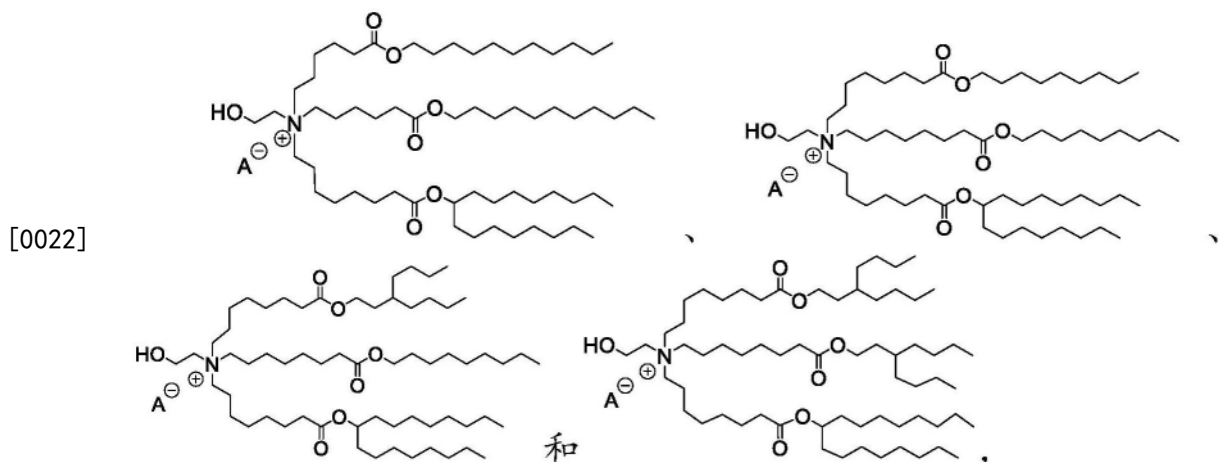
[0017] a选自1、2、3、4、5、6、7、8和9;

[0018] b选自1、2、3、4、5、6、7、8和9;

[0019] c选自1、2、3、4、5、6、7、8和9;并且

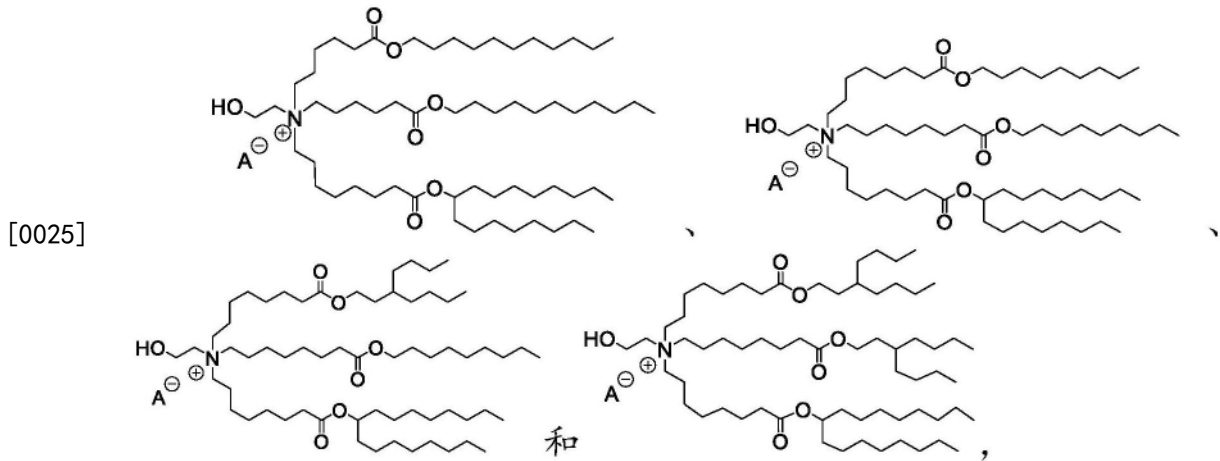
[0020]  $A^-$  是任何药学上可接受的阴离子。

[0021] 在一些实施方案中,式(I)的阳离子脂质具有以下结构之一:



[0023] 其中 $A^-$ 选自氯离子、溴离子、碘离子、氢氧根、硫酸根、硫酸氢根、氨基磺酸根、硝酸根、磷酸根、柠檬酸根、甲烷磺酸根、三氟乙酸根、谷氨酸根、葡萄糖醛酸根、戊二酸根、苹果酸根、马来酸根、琥珀酸根、富马酸根、酒石酸根、甲苯磺酸根、水杨酸根、乳酸根、萘磺酸根和乙酸根。

[0024] 在一些实施方案中,式(I)的阳离子脂质具有以下结构之一:



[0026] 其中A<sup>-</sup>是溴离子、氯离子、氢氧根或它们的组合。在一些实施方案中,A<sup>-</sup>是溴离子或氢氧根。在一些实施方案中,A<sup>-</sup>是氯离子或氢氧根。在一些实施方案中,A<sup>-</sup>是溴离子。在一些实施方案中,A<sup>-</sup>是氯离子。在一些实施方案中,A<sup>-</sup>是氢氧根。

### 具体实施方式

[0027] 本公开提供包括中央胺部分和至少一个生物可降解基团的新颖阳离子脂质。本文所述的阳离子脂质可有利地用于脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)以将治疗剂和/或预防剂递送至哺乳动物细胞或器官。例如,本文所述的阳离子脂质可有利地用于脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)以将治疗剂和/或预防剂递送至特定哺乳动物细胞或器官。在一些实施方案中,本文所述的阳离子脂质可有利地用于脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)以将治疗剂和/或预防剂递送至内皮细胞或肺。

[0028] 本公开还提供包含新颖阳离子脂质的脂质纳米粒子(LNP)以将治疗剂和/或预防剂递送至内皮细胞。例如,此类LNP可用于将治疗剂和/或预防剂(例如,mRNA治疗剂)递送至内皮细胞。在一些实施方案中,此类LNP可用于递送用于基因编辑的核酸分子、小分子或其他有效载荷以改善内皮细胞功能障碍。在一些实施方案中,此类LNP可用于将抗原递送至内皮细胞,所述抗原是炎症反应的主要参与者和调节剂。休眠内皮细胞预防凝血,控制血流和血液中的蛋白质传递进入组织中,并且抑制炎症。在一些实施方案中,所述抗原是呈存在于LNP中的mRNA构建体形式,导致多肽或肽表达,使得产生对所述抗原的免疫反应。

[0029] LNP是用于将治疗剂和/或预防剂(例如,mRNA)安全并且有效递送至靶标细胞的理想平台。LNP具有递送治疗剂和/或预防剂(例如核酸,例如mRNA)的独特能力,其机制涉及细胞摄取、细胞内转运和内体释放或内体逃逸。本文所提供的一些实施方案提供具有改进特性的LNP。在一些实施方案中,本文所提供的LNP包含脂质纳米粒子核心、封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂以及主要安置于纳米粒子的外表面上的阳离子剂。不受特定理论束缚,具有主要安置于核心的外表面上的阳离子剂的LNP可改进细胞(诸如人类肺内皮细胞)中的LNP积聚,并且也可改进治疗剂和/或预防剂的功能,例如,如通过细胞(例如,肺中的内皮细胞)中的mRNA表达所测量。

[0030] 在一些实施方案中,本文提供一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0031] (a) 脂质纳米粒子核心,

[0032] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

- [0033] (c) 主要安置于核心的外表面上的阳离子剂(例如,式(I)的阳离子脂质),
- [0034] 其中所述负载LNP在生理pH下具有大于中性的 $\zeta$ 电位。
- [0035] 在一些实施方案中,本文提供一种负载LNP,所述负载LNP包含:
- [0036] (a) 负载LNP核心,其包含:
- [0037] (i) 可离子化脂质,
- [0038] (ii) 磷脂,
- [0039] (iii) 结构脂质,和
- [0040] (iv) PEG-脂质,和
- [0041] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和
- [0042] (c) 阳离子剂(例如,式(I)的阳离子脂质)。
- [0043] 在一些实施方案中,本文提供一种负载LNP,所述负载LNP包含:
- [0044] (a) 脂质纳米粒子核心,其包含:
- [0045] (i) 可离子化脂质,
- [0046] (ii) 磷脂,
- [0047] (iii) 结构脂质,和
- [0048] (iv) PEG-脂质,和
- [0049] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的多核苷酸或多肽有效载荷治疗剂和/或预防剂,和
- [0050] (c) 主要安置于核心的外表面上的阳离子剂(例如,式(I)的阳离子脂质)。
- [0051] 在一些实施方案中,本文提供一种负载LNP,所述负载LNP包含:
- [0052] (a) 脂质纳米粒子核心,
- [0053] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和
- [0054] (c) 阳离子剂(例如,式(I)的阳离子脂质),
- [0055] 其中所述负载LNP展现至少约20%细胞的细胞积聚并且在施用所述负载LNP的细胞群体中的细胞中展现约5%或更大表达。在一些实施方案中,所述负载LNP在施用所述负载LNP的细胞群体中的约1%至约75%、5%至约50%、约10%至约40%或约15%至约25%细胞中展现细胞积聚。
- [0056] 在一些实施方案中,所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.5%至约50%、约1%至约40%、约3%至约20%或约5%至约15%细胞中展现表达。
- [0057] 在一些实施方案方面中,本文提供一种负载LNP,所述负载LNP包含:
- [0058] (a) 脂质纳米粒子核心,
- [0059] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和
- [0060] (c) 主要安置于核心的外表面上的阳离子剂(例如,式(I)的阳离子脂质),
- [0061] 其中所述负载LNP在施用所述负载LNP的细胞群体中的至少约20%细胞中展现细胞积聚并且在其中积聚所述负载LNP的细胞中展现约5%或更大表达。在一些实施方案中,所述负载LNP在施用所述负载LNP的细胞群体中的约1%至约75%、约5%至约50%、约10%至约40%或约15%至约25%细胞中展现细胞积聚。在一些实施方案中,所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的细胞中展现约0.5%至约50%、约1%至约40%、约3%至约20%或约5%至约15%表达。

[0062] 在一些实施方案中,本文提供一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0063] (a) 脂质纳米粒子核心,

[0064] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0065] (c) 主要安置于核心的外表面上的阳离子剂(例如,式(I)的阳离子脂质),

[0066] 其中所述治疗剂和/或预防剂表达蛋白质并且其中负载LNP在施用所述负载LNP的细胞群体中的约0.5%至50%细胞中展现蛋白质表达。在一些实施方案中,所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.1%至约60%、约0.5%至约40%、约1%至约30%或约1%至约20%细胞中展现蛋白质表达。

[0067] 在一些实施方案中,本文提供一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0068] (a) 脂质纳米粒子核心,

[0069] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0070] (c) 阳离子剂(例如,式(I)的阳离子脂质),

[0071] 其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.5%至50%细胞中展现蛋白质表达。在一些实施方案中,所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.1%至约60%、约0.5%至约40%、约1%至约30%或约1%至约20%细胞中展现蛋白质表达。

[0072] 在一些实施方案中,本文提供一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0073] (a) 脂质纳米粒子核心,

[0074] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0075] (c) 阳离子剂(例如,式(I)的阳离子脂质),

[0076] 其中所述负载LNP在内皮细胞中展现至少约20%的细胞积聚并且在其中积聚所述负载LNP的内皮细胞中展现约5%或更大表达。在一些实施方案中,所述负载LNP在施用所述负载LNP的内皮细胞细胞群体中展现约1%至约75%、约5%至约50%、约10%至约40%或约15%至约25%内皮细胞的细胞积聚。在一些实施方案中,所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的内皮细胞中展现约0.5%至约50%、约1%至约40%、约3%至约20%或约5%至约15%表达。

[0077] 在一些实施方案中,本文提供一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0078] (a) 脂质纳米粒子核心,

[0079] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0080] (c) 阳离子剂(例如,式(I)的阳离子脂质),

[0081] 其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.5%至50%内皮细胞中展现蛋白质表达。在一些实施方案中,所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.1%至约60%、约0.5%至约40%、约1%至约30%或约1%至约20%内皮细胞中展现蛋白质表达。

[0082] 在一些实施方案中,本文提供一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0083] (a) 脂质纳米粒子核心,

[0084] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0085] (c) 阳离子剂(例如,式(I)的阳离子脂质),

[0086] 其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.5%至约50%肺细胞中展现蛋白质表达。在一些实施方案中,所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.1%至约60%、约0.5%至约40%、约1%至约30%或约1%至约20%肺内皮细胞中展现蛋白质表达。

[0087] 在一些实施方案中,本文提供一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0088] (a) 脂质负载LNP核心,

[0089] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0090] (c) 阳离子剂(例如,式(I)的阳离子脂质),

[0091] 其中所述负载LNP在呼吸道内皮细胞中展现至少约20%的细胞积聚并且在其中积聚所述负载LNP的呼吸道内皮细胞中展现约5%或更大表达。在一些实施方案中,所述负载LNP在施用所述负载LNP的呼吸道内皮细胞群体中展现约1%至约75%、约5%至约50%、约10%至约40%或约15%至约25%呼吸道内皮细胞的细胞积聚。在一些实施方案中,所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的呼吸道内皮细胞中展现约0.5%至约50%、约1%至约40%、约3%至约20%或约5%至约15%表达。

[0092] 在一些实施方案中,本文提供一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0093] (a) 脂质负载LNP核心,

[0094] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0095] (c) 阳离子剂(例如,式(I)的阳离子脂质),

[0096] 其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.5%至约50%呼吸道内皮细胞中展现蛋白质表达。在一些实施方案中,所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.1%至约60%、约0.5%至约40%、约1%至约30%或约1%至约20%呼吸道内皮细胞中展现蛋白质表达。

[0097] 在一些实施方案中,本文提供一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0098] (a) 脂质负载LNP核心,

[0099] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0100] (c) 阳离子剂(例如,式(I)的阳离子脂质),

[0101] 其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.5%至约50%HeLa细胞中展现蛋白质表达。在一些实施方案中,所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.1%至约60%、约0.5%至约40%、约1%至约30%或约1%至约20% HeLa细胞中展现蛋白质表达。

[0102] 在一些实施方案中,本文提供一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0103] (a) 脂质负载LNP核心,

[0104] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0105] (c) 阳离子剂(例如,式(I)的阳离子脂质),

[0106] 其中所述负载LNP在施用所述负载LNP的支气管内皮细胞群体中的至少约20%支气管内皮细胞中展现细胞积聚并且在其中积聚所述负载LNP的支气管内皮细胞中展现约5%或更大表达。在一些实施方案中,所述负载LNP在施用所述负载LNP的呼吸道内皮细胞群体中展现约1%至约75%、约5%至约50%、约10%至约40%或约15%至约25%呼吸道内皮细胞的细胞积聚。在一些实施方案中,所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的肺内皮细胞中展现约0.5%至约50%、约1%至约40%、约3%至约20%或约5%至约15%表达。

[0107] 在一些实施方案中,阳离子剂与治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约0.1:1至约20:1。在一些实施方案中,阳离子剂与治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约1.5:1至约10:1。在一些实施方案中,阳离子剂与治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约1.5:1至约9:1。在一些实施方案中,阳离子剂与治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约1.5:1至约8:1。在一些实施方案中,阳

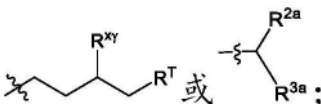
离子剂与治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约1.5:1至约7:1。在一些实施方案中,阳离子剂与治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约1.5:1至约6:1。在一些实施方案中,阳离子剂与治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约1.5:1至约5:1。在一些实施方案中,阳离子剂与治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约1.5:1。在一些实施方案中,阳离子剂与治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约2:1。在一些实施方案中,阳离子剂与治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约3:1。在一些实施方案中,阳离子剂与治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约4:1。在一些实施方案中,阳离子剂与治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约5:1。

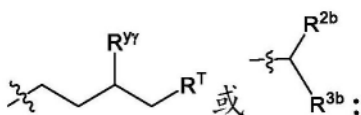
[0108] 在一些实施方案中,本公开的纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)具有约5mV至约20mV的 $\zeta$ 电位。在一些实施方案中,所述纳米粒子具有约5mV至约15mV的 $\zeta$ 电位。在一些实施方案中,所述纳米粒子具有约5mV至约12mV的 $\zeta$ 电位。在一些实施方案中,所述纳米粒子具有约5mV至约10mV的 $\zeta$ 电位。

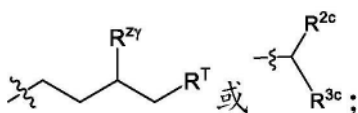
[0109] 阳离子剂


[0110] 阳离子剂可包含具有净正电荷的任何水性/有机可溶性分子或物质。此类剂也可以是脂质可溶性的,但也可溶于水溶液中。阳离子剂可在生理pH下带电。生理pH是通常在人体中观察到的pH水平。生理pH可以是约7.30-7.45或约7.35-7.45。生理pH可以是约7.40。一般来说,阳离子剂在生理pH下提供净正电荷,因为它含有一个或多个碱性官能团,所述官能团在水性介质中在生理pH下质子化。例如,阳离子剂可含有一个或多个胺基,例如各自具有8.0或更大的pKa的伯胺、仲胺或叔胺。pKa可大于约9。在一些实施方案中,阳离子剂为阳离子脂质(即,在生理pH下具有正电荷或部分正电荷的脂质)。在一些实施方案中,阳离子剂为式(I)的阳离子脂质。

[0111] 在一些实施方案中,当适用时,式(I)的脂质包括一种或多种以下特征。

[0112] 在一些实施方案中, $R'^x$ 是: ;

[0113]  $R'^y$ 是: ;

[0114]  $R'^z$ 是: ;

[0115] 其中  表示连接点;

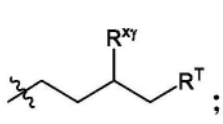
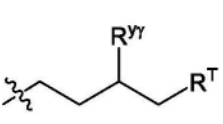
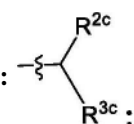
[0116]  $R^{xy}$ 选自由H、 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组;


[0117]  $R^{yy}$ 选自由H、 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组;

[0118]  $R^{zy}$ 选自由H、 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组;并且

[0119]  $R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、 $R^{2c}$ 、 $R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 和 $R^{3c}$ 各自独立地选自由 $C_{1-14}$ 烷基和 $C_{2-14}$ 烯基组成的组。

[0120] 在一些实施方案中,

[0121]  $R'^a$ 是: ;  $R'^b$ 是: ; 并且 $R'^c$ 是: ;

[0122] 其中  表示连接点；

[0123]  $R^{xy}$  选自由H、 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组；

[0124]  $R^{yy}$  选自由H、 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组；并且

[0125]  $R^{2c}$ 和 $R^{3c}$ 各自独立地选自由 $C_{1-14}$ 烷基和 $C_{2-14}$ 烯基组成的组。

[0126] 在一些实施方案中， $R^{xy}$ 和 $R^{yy}$ 各自为H。

[0127] 在一些实施方案中， $R^{xy}$ 和 $R^{yy}$ 各自为 $C_{1-12}$ 烷基或 $C_{2-12}$ 烯基。

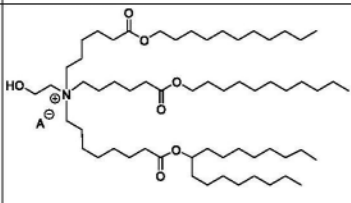
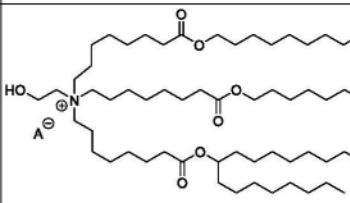
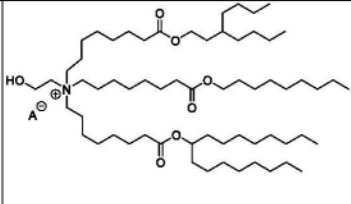
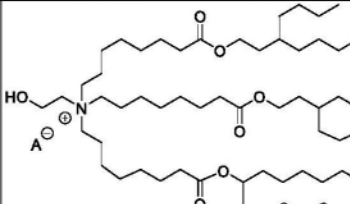
[0128] 在一些实施方案中， $R^{xy}$ 为 $C_{1-12}$ 烷基或 $C_{2-12}$ 烯基，并且 $R^{yy}$ 为H。

[0129] 在一些实施方案中，q是2。

[0130] 在一些实施方案中，本文所述的式(I)的阳离子脂质适用于制备用于肌肉施用的纳米粒子组合物。

[0131] 在一些实施方案中，式(I)的阳离子脂质选自表1的脂质或其异构体。

[0132] 表1. 阳离子脂质。

化合物	结构	化合物	结构
1		2	
3		4	

[0134] 其中 $A^-$ 是溴离子或氢氧根。

[0135] 定义

[0136] 如本文所用，术语“烷基(alkyl/alkyl group)”意指包括一个或多个碳原子(例如，一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个或更多个碳原子)的直链或分支链、饱和烃，所述烃任选地被取代。记法“ $C_{1-14}$ 烷基”意指任选取代的包括1-14个碳原子的直链或分支链、饱和烃。除非另外规定，否则本文所述的烷基是指未取代和取代的烷基。如本文所用，“直链”烷基意指直链烷基(甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、正十一烷基或正十二烷基)，其中连接点是在 $C_1$ 碳处。

[0137] 如本文所用，术语“烯基(alkenyl/alkenyl group)”意指包括两个或更多个碳原子(例如，两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个或更多个碳原子)和至少一个双键的直链或分支链烃，所述烃任选地被取代。记法“ $C_{2-14}$ 烯基”意指任选取代的包括2-14个碳原

子和至少一个碳-碳双键的直链或分支链烃。烯基可包括一个、两个、三个、四个或更多个碳-碳双键。例如,  $C_{18}$  烯基可包括一个或多个双键。包括两个双键的  $C_{18}$  烯基可以是亚油烯基。除非另外规定, 否则本文所述的烯基是指未取代和取代的烯基。

[0138] 如本文所用, 术语“炔基(alkynyl)”或“炔基(alkynyl group)”意指包括两个或更多个碳原子(例如, 两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个或更多个碳原子)和至少一个碳-碳三键的直链或分支链烃, 所述烃任选地被取代。记法“ $C_{2-14}$ 炔基”意指任选取代的包括2-14个碳原子和至少一个碳-碳三键的直链或分支链烃。炔基可包括一个、两个、三个、四个或更多个碳-碳三键。例如,  $C_{18}$  炔基可包括一个或多个碳-碳三键。除非另外规定, 否则本文所述的炔基是指未取代和取代的炔基。

[0139] 如本文所用, 术语“碳环(carbocycle)”或“碳环基(carbocyclic group)”意指任选取代的包括一个或多个碳原子环的单环或多环系统。环可以是三元、四元、五元、六元、七元、八元、九元、十元、十一元、十二元、十三元、十四元、十五元、十六元、十七元、十八元、十九元或二十元环。记法“ $C_{3-6}$ 碳环”意指包括具有3-6个碳原子的单环的碳环。碳环可包括一个或多个碳-碳双键或三键并且可以是非芳香族的或芳香族的(例如, 环烷基或芳基)。碳环可以是单环或多环(例如, 稠环、桥环或螺环)系统。碳环的实例包括环丙基、环戊基、环己基、苯基、萘基和1,2-二氢萘基。如本文所用, 术语“环烷基”意指非芳香族碳环并且可或可不包括任何双键或三键。除非另外规定, 否则本文所述的碳环是指未取代和取代的碳环基, 即任选取代的碳环。在一些实施方案中, 碳环是  $C_{3-8}$  环烷基。在一些实施方案中, 碳环是  $C_{3-6}$  环烷基。在一些实施方案中, 碳环是  $C_{6-10}$  芳基。

[0140] “芳基”包括具有芳香性的基团, 包括具有至少一个芳环并且在所述环结构中不含任何杂原子的“共轭”或多环系统。实例包括苯基、苄基、1,2,3,4-四氢萘基等。在一些实施方案中, “芳基”是具有芳香性的  $C_{6-10}$  碳环(例如, “芳基”是  $C_{6-10}$  芳基)。

[0141] 如本文所用, 术语“杂环(heterocycle)”或“杂环基(heterocyclic group)”意指任选取代的包括一个或多个环的单环或多环系统, 其中至少一个环包括至少一个杂原子。杂原子可以是例如氮、氧或硫原子。环可以是三元、四元、五元、六元、七元、八元、九元、十元、十一元、十二元、十三元或十四元环。杂环可包括一个或多个双键或三键并且可以是非芳香族的或芳香族的(例如, 杂环烷基或杂芳基)。杂环的实例包括咪唑基、咪唑烷基、噁唑基、噁唑烷基、噻唑基、噻唑烷基、吡唑基、吡唑烷基、异噁唑基、异噁唑基、异噻唑基、异噻唑基、吗啉基、吡咯基、吡咯烷基、呋喃基、四氢呋喃基、噻吩基、吡啶基、哌啶基、喹啉基和异喹啉基。如本文所用, 术语“杂环烷基”意指非芳香族杂环并且可或可不包括任何双键或三键。除非另外规定, 否则本文所述的杂环是指未取代和取代的杂环基, 即任选取代的杂环。在一些实施方案中, 杂环是4至12元杂环烷基。在一些实施方案中, 杂环是5元或6元杂芳基。

[0142] “杂芳基”是如上文所定义的芳基, 除了在环结构中具有一至四个杂原子, 并且也可称作“芳基杂环”或“杂芳香族化合物”。如本文所用, 术语“杂芳基”意图包括稳定的5元、6元或7元单环或7元、8元、9元、10元、11元或12元双环芳香族杂环, 所述杂环由碳原子和独立地选自氮、氧、硫和硼组成的组的一个或多个杂原子(例如1个或1-2个或1-3个或1-4个或1-5个或1-6个杂原子, 或例如1、2、3、4、5或6个杂原子)组成。氮原子可被取代或未被取代

(即N或NR,其中R是H或如所定义的其他取代基)。氮和硫杂原子可任选地氧化(即 $N \rightarrow O$ 和 $O)_p$ ,其中 $p=1$ 或 $2$ )。

[0143] 杂芳基的实例包括吡咯、呋喃、噻吩、噻唑、异噻唑、咪唑、三唑、四唑、吡唑、噁唑、异噁唑、吡啶、吡嗪、哒嗪、嘧啶等。

[0144] 此外,术语“芳基”和“杂芳基”包括多环芳基和杂芳基,例如三环、双环,例如萘、苯并噁唑、苯并二噁唑、苯并噻唑、苯并咪唑、苯并噻吩、喹啉、异喹啉、萘啶(naphthrydine)、吲哚、苯并呋喃、嘌呤、苯并呋喃、脱氮嘌呤、吲哚。

[0145] 如本文所用,“生物可降解基团”是可以促进哺乳动物实体中脂质的更快速代谢的基团。生物可降解基团可以选自由但不限于 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、芳基和杂芳基组成的组。如本文所用,“芳基”是任选取代的包括一个或多个芳环的碳环基。芳基的实例包括苯基和萘基。如本文所用,“杂芳基”是任选取代的包括一个或多个芳环的杂环基。杂芳基的实例包括吡咯基、呋喃基、噻吩基、咪唑基、噁唑基和噻唑基。芳基和杂芳基均可任选地被取代。例如,M和M'可选自由任选取代的苯基、噁唑和噻唑组成的非限制性组。在本文中的各式中,M和M'可独立地选自上文生物可降解基团的清单。除非另外规定,否则本文所述的芳基或杂芳基是指未取代和取代的基团,即任选取代的芳基或杂芳基。

[0146] 除非另外规定,否则烷基、烯基和环基(例如,碳环基和杂环基)可任选地被取代。任选的取代基可以选自由但不限于卤素原子(例如,氯化物、溴化物、氟化物或碘化物基团)、羧酸(例如 $-C(O)OH$ )、醇(例如羟基、 $-OH$ )、酯(例如 $-C(O)OR$ 或 $-OC(O)R$ )、醛(例如 $-C(O)H$ )、羰基(例如 $-C(O)R$ ,或者由 $C=O$ 表示)、酰基卤(例如 $-C(O)X$ ,其中X是选自溴化物、氟化物、氯化物和碘化物的卤化物)、碳酸酯(例如 $-OC(O)OR$ )、烷氧基(例如 $-OR$ )、缩醛(例如 $-C(OR)_2R$ ”,其中各OR是可相同或不同的烷氧基并且R”是烷基或烯基)、磷酸酯(例如 $P(O)_4^{3-}$ )、硫醇(例如 $-SH$ )、亚砷(例如 $-S(O)R$ )、亚磺酸(例如 $-S(O)OH$ )、磺酸(例如 $-S(O)_2OH$ )、硫醛(例如 $-C(S)H$ )、硫酸酯(例如 $S(O)_4^{2-}$ )、磺酰基(例如 $-S(O)_2-$ )、酰胺(例如 $-C(O)NR_2$ 或 $-N(R)C(O)R$ )、叠氮基(例如 $-N_3$ )、硝基(例如 $-NO_2$ )、氰基(例如 $-CN$ )、异氰基(例如 $-NC$ )、酰氧基(例如 $-OC(O)R$ )、氨基(例如 $-NR_2$ 、 $-NRH$ 或 $-NH_2$ )、氨基甲酰基(例如 $-OC(O)NR_2$ 、 $-OC(O)NRH$ 或 $-OC(O)NH_2$ )、磺酰胺(例如 $-S(O)_2NR_2$ 、 $-S(O)_2NRH$ 、 $-S(O)_2NH_2$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(H)S(O)_2R$ 、 $-N(R)S(O)_2H$ 或 $-N(H)S(O)_2H$ )、烷基、烯基和环基(例如,碳环基或杂环基)组成的组。在所述任一者中,R是如本文所定义的烷基或烯基。在一些实施方案中,所述取代基本身可以进一步被例如一个、两个、三个、四个、五个或六个如本文所定义的取代基取代。例如, $C_{1-6}$ 烷基可以进一步被一个、两个、三个、四个、五个或六个如本文所述的取代基取代。

[0147] 本公开的含氮脂质可通过用氧化剂(例如3-氯过氧基苯甲酸(mCPBA)和/或过氧化氢)处理而转化为N-氧化物以提供本公开的其他脂质。因此,当价态和结构允许时,所有所显示和要求的含氮脂质均被视为包括如所示的脂质和其N-氧化物衍生物(它可被指定为 $N \rightarrow O$ 或 $N^+-O^-$ )。此外,在其他情况下,本公开的脂质中的氮可转化为N-羟基或N-烷氧基脂质。例如,N-羟基脂质可通过利用诸如m-CPBA的氧化剂氧化母胺来制备。当价态和结构允许时,所有所显示和要求的含氮脂质也被视为涵盖如所示的脂质和其N-羟基(即 $N-OH$ )和N-烷氧基(即 $N-OR$ ,其中R是取代或未取代的 $C_1-C_6$ 烷基、 $C_1-C_6$ 烯基、 $C_1-C_6$ 炔基、3-14元碳环或3-14元杂环)衍生物。

[0148] 约、大约:如本文所用,如应用于一个或多个所关注的值的术语“大约”和“约”是指类似于所陈述的参考值的值。在某些实施方案中,除非另外规定或在其他方面从本文显而易见(除了所述数字将超过可能的值的100%的情况),否则术语“大约”或“约”是指值的范围,所述范围落在所陈述的参考值在任一方向(大于或小于)的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更低以内。例如,当在纳米粒子组合物的脂质组分中的给定脂质的量的背景中使用,“约”可意指所陈述的值的 $\pm 10\%$ 。例如,包括具有约40%的给定脂质的脂质组分的纳米粒子组合物可包括30-50%的所述脂质。

[0149] 如本文所用,术语“脂质”意图包括所描绘的结构的所有异构体和同位素。“同位素”是指具有相同原子序数但由于原子核中不同数目的中子而具有不同质量数的原子。例如,氢的同位素包括氘和氚。此外,本公开的脂质、盐或复合物可通过常规方法与溶剂或水分子组合制备以形成溶剂化物和水合物。

[0150] 如本文所用,术语“接触(contacting)”意指在两个或更多个实体之间建立物理连接。例如,使哺乳动物细胞与纳米粒子组合物接触意指使所述哺乳动物细胞与纳米粒子共享物理连接。体内和离体使细胞与外部实体接触的方法是生物学技术中众所周知的。例如,使纳米粒子组合物和安置于哺乳动物内的哺乳动物细胞接触可通过变化的施用途径(例如,静脉内、肌内、皮内和皮下)执行并且可涉及变化量的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)。此外,超过一种哺乳动物细胞可由纳米粒子组合物接触。

[0151] 如本文所用,术语“递送(delivering)”意指向目的地提供实体。例如,向受试者递送治疗剂和/或预防剂可涉及向所述受试者施用包括所述治疗剂和/或预防剂的纳米粒子组合物(例如,通过静脉内、肌内、皮内或皮下途径)。向哺乳动物或哺乳动物细胞施用纳米粒子组合物可涉及使一种或多种细胞与所述纳米粒子组合物接触。

[0152] 如本文所用,术语“增强的递送(enhanced delivery)”意指与对照纳米粒子向所关注的靶标组织递送治疗剂和/或预防剂的水平(例如MC3、KC2或DLinDMA)相比,由纳米粒子向所关注的靶标组织(例如,哺乳动物肝或肺)递送更多(例如,至少1.5倍多、至少2倍多、至少3倍多、至少4倍多、至少5倍多、至少6倍多、至少7倍多、至少8倍多、至少9倍多、至少10倍多)治疗剂和/或预防剂。纳米粒子向特定组织递送的水平可通过比较组织中产生的蛋白质的量与所组织的重量,比较组织中治疗剂和/或预防剂的量与所组织的重量,比较组织中产生的蛋白质的量与所组织中总蛋白质的量,或比较组织中治疗剂和/或预防剂的量与所组织中总治疗剂和/或预防剂的量来测量。应理解,纳米粒子向靶标组织的增强的递送无需在所治疗的受试者中测定,它可以在诸如动物模型(例如大鼠模型)的替代物中测定。在某些实施方案中,无论施用途径如何,包括本公开的阳离子脂质的纳米粒子组合物具有大体上相同水平的递送增强。例如,当本文所公开的某些脂质用于静脉内或肌内递送治疗剂和/或预防剂时,它们展现相似的递送增强。在其他实施方案中,当本文所公开的某些脂质用于肌内递送治疗剂和/或预防剂时,它们展现高于静脉内的递送增强水平。

[0153] 如本文所用,术语“特异性递送(specific delivery)”、“特异性地递送(specifically deliver)”或“特异性地递送(specifically delivering)”意指与脱靶组织(例如,哺乳动物脾)相比,由纳米粒子向所关注的靶标组织(例如,哺乳动物肝或肺)递送更多(例如,至少1.5倍多、至少2倍多、至少3倍多、至少4倍多、至少5倍多、至少6倍多、至少7

倍多、至少8倍多、至少9倍多、至少10倍多)治疗剂和/或预防剂。纳米粒子向特定组织递送的水平可通过比较组织中产生的蛋白质的量与所述组织的重量,比较组织中治疗剂和/或预防剂的量与所述组织的重量,比较组织中产生的蛋白质的量与所述组织中总蛋白质的量,或比较组织中治疗剂和/或预防剂的量与所述组织中总治疗剂和/或预防剂的量来测量。例如,关于肾血管靶向,如果在治疗剂和/或预防剂的全身性施用之后与递送至肝或脾的量相比,每1g组织1.5倍、2倍、3倍、5倍、10倍、15倍或20倍多的治疗剂和/或预防剂递送至肾,则如与肝和脾相比,治疗剂和/或预防剂特异性地提供至哺乳动物肾。应理解,纳米粒子特异性地递送至靶标组织的能力无需在所治疗的受试者中测定,它可以在诸如动物模型(例如大鼠模型)的替代物中测定。

[0154] 如本文所用,“封装效率(encapsulation efficiency)”是指相对于用于制备纳米粒子组合物的治疗剂和/或预防剂的初始总量,变成纳米粒子组合物的一部分的治疗剂和/或预防剂的量。例如,如果在最初提供至纳米粒子组合物的总计100mg治疗剂和/或预防剂中有97mg治疗剂和/或预防剂被封装于所述组合物中,则可以给出97%的封装效率。如本文所用,“封装(encapsulation)”可指完全、大体或部分封闭、限制、围绕或包装。

[0155] 如本文所用,“封装(encapsulation)”、“封装(encapsulated)”、“负载(loaded)”和“缔合(associated)”可指完全、大体或部分封闭、限制、围绕或包装。如本文所用,“封装”或“缔合(association)”可指限制纳米粒子内的个别核酸分子和/或在个别核酸分子与纳米粒子之间建立生理化学联系的过程。如本文所用,“空纳米粒子”可指大体上不含治疗剂或预防剂的纳米粒子。如本文所用,“空纳米粒子”或“空脂质纳米粒子”可指大体上不含核酸的纳米粒子。如本文所用,“空纳米粒子”或“空脂质纳米粒子”可指大体上不含核苷酸或多肽的纳米粒子。如本文所用,“空纳米粒子”或“空脂质纳米粒子”可指大体上仅由脂质组分组成的纳米粒子。如本文所用,“负载LNP”、“负载纳米粒子”或“负载脂质纳米粒子”(还称作“完全纳米粒子”或“完全脂质纳米粒子”)可指包含空纳米粒子的组分和大量治疗剂或预防剂的纳米粒子。在一些实施方案中,所述负载LNP包含至少部分在所述LNP内部的治疗剂或预防剂。在一些实施方案中,所述负载LNP包含大量治疗剂或预防剂,它与所述LNP的表面缔合或缀合至所述LNP外部。如本文所用,“负载LNP”、“负载纳米粒子”或“负载脂质纳米粒子”(还称作“完全纳米粒子”或“完全脂质纳米粒子”)可指包含空纳米粒子的组分和大量核苷酸或多肽的纳米粒子。在一些实施方案中,所述负载LNP包含至少部分在所述LNP内部的核苷酸或多肽。在一些实施方案中,所述负载LNP包含核苷酸或多肽,它与所述LNP的表面缔合或缀合至所述LNP外部。如本文所用,“负载LNP”、“负载纳米粒子”或“负载脂质纳米粒子”(还称作“完全纳米粒子”或“完全脂质纳米粒子”)可指包含空纳米粒子的组分和大量核酸的纳米粒子。在一些实施方案中,所述负载LNP包含至少部分在所述LNP内部的核酸(例如,mRNA)。在一些实施方案中,所述负载LNP包含核酸(例如,mRNA),它与所述LNP的表面缔合或缀合至所述LNP外部。

[0156] 如本文所用,核酸序列的“表达”是指mRNA翻译成多肽或蛋白质和/或多肽或蛋白质的翻译后修饰。

[0157] 如本文所用,“负载LNP的表达”是指包含于所述负载LNP中的剂的表达。例如,在一些实施方案中,所述剂是核酸(例如,mRNA)。例如,在一些实施方案中,所述剂表达蛋白质或多肽。在一些实施方案中,所述蛋白质是荧光蛋白。例如,在一些实施方案中,术语“负载LNP

展现表达”意指积聚于细胞中的负载LNP将剂递送至细胞,并且所述剂(例如核酸,例如 mRNA)在细胞中表达例如蛋白质或多肽。

[0158] 如本文所用,脂质的“疏水性”描述脂质排除水的倾向。在一些实施方案中,脂质纳米粒子表面的疏水性影响脂质纳米粒子渗透通过细胞的脂质双层。在一些实施方案中,疏水性纳米粒子相对于亲水性脂质纳米粒子显示增加的细胞摄取。

[0159] 如本文所用,术语“体外”是指事件发生于人工环境中,例如试管或反应容器中、细胞培养物中、培养皿等中,而非发生于生物体(例如动物、植物或微生物)内。

[0160] 如本文所用,术语“体内”是指事件发生于生物体(例如动物、植物或微生物或其细胞或组织)内。

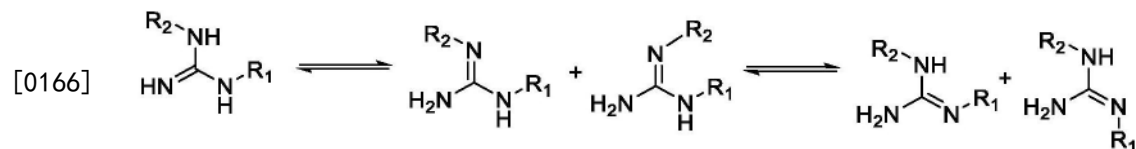
[0161] 如本文所用,术语“离体”是指事件发生于生物体(例如动物、植物或微生物或其细胞或组织)外部。离体事件可发生于从天然(例如体内)环境最低程度地改变的环境中。

[0162] 如本文所用,术语“异构体”意指化合物(例如,本公开的脂质)的任何几何异构体、互变异构体、两性离子、立体异构体、对映异构体或非对映异构体。化合物化合物(例如,本公开的脂质)可包括一个或多个手性中心和/或双键并且可因此作为立体异构体,诸如双键异构体(即,几何E/Z异构体)或非对映异构体(例如,对映异构体(即,(+)或(-))或顺式/反式异构体)存在。本公开涵盖本文所述的脂质的任何和所有异构体,包括立体异构体纯形式(例如,几何异构体纯、对映异构体纯或非对映异构体纯)以及对映异构体和立体异构体混合物(例如外消旋物)。脂质的对映异构体和立体异构体混合物以及将它们拆分成它们的组分对映异构体或立体异构体的手段是众所周知的。

[0163] “互变异构体”是平衡存在并且易于从一种异构体形式转化成另一异构体形式的两种或更多种结构异构体之一。这一转化导致氢原子的形式迁移,伴随相邻的共轭双键的转换。互变异构体作为溶液中的互变异构体集合的混合物存在。在其中可能发生互变异的溶液中,将达到互变异构体的化学平衡。互变异构体的精确比率取决于数种因素,包括温度、溶剂和pH。可通过互变异构相互转化的互变异构体的概念被称作互变异构现象。

[0164] 在可能存在的数种类型的互变异构现象中,通常观察到两种。在酮-烯醇互变异构现象中,发生电子和氢原子的同时位移。由于糖链分子中的醛基(-CHO)与所述同一分子中的一个羟基(-OH)反应而发生环链互变异构现象,使它呈环状(环形)形式,如葡萄糖所展现。

[0165] 常见的互变异构体对是:酮-烯醇、酰胺-腈、内酰胺-内酰亚胺、杂环中(例如,诸如鸟嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶的核碱基中)的酰胺-亚氨酸互变异构现象、亚胺-烯胺和烯胺-烯胺。二取代的胍中的互变异构现象的实例显示如下。



[0167] 应理解,本公开的脂质可描绘为不同的互变异构体。还应理解,当脂质具有互变异构体形式时,所有互变异构体形式均意图包括于本公开的范围,并且所述脂质的命名不排除任何互变异构体形式。

[0168] 如本文所用,“脂质组分”是纳米粒子组合物中包括一种或多种脂质的组分。例如,

脂质组分可包括一种或多种阳离子脂质、可离子化脂质、PEG化、结构或其他脂质,诸如磷脂。在本公开的空LNP或负载LNP的一些实施方案中,脂质组分包含至少一种阳离子脂质和至少一种可离子化脂质。

[0169] 如本文所用,“接头”是连接两个部分的部分,例如帽物质的两个核苷之间的连接。接头可包括一个或多个基团,包括但不限于磷酸酯基(例如,磷酸酯、硼烷磷酸酯、硫代磷酸酯、硒代磷酸酯和膦酸酯)、烷基、酰胺化物或甘油。例如,帽类似物的两个核苷可在它们的5'位置处由三磷酸酯基或由包括两个磷酸酯部分和一个硼烷磷酸酯部分的链连接。

[0170] 如本文所用,“施用方法”可包括静脉内、肌内、皮内、皮下或向受试者递送组合物的其他方法。可选择一种施用方法以靶向递送(例如,特异性地递送)至身体的特定区域或系统。

[0171] 如本文所用,“修饰的”意指非天然。例如,RNA可以是修饰的RNA。即,RNA可包括一个或多个非天然存在的核碱基、核苷、核苷酸或接头。“修饰的”物质也可在本文中称作“改变的”物质。物质可以化学方式、在结构上或在功能上进行修饰或改变。例如,修饰的核碱基物质可包括一种或多种非天然存在的取代。

[0172] 如本文所用,“N:P比率”是例如在包括脂质组分和RNA的纳米粒子组合物中,脂质中的可离子化(在生理pH范围中)氮原子:RNA中的磷酸酯基的摩尔比。

[0173] 如本文所用,“纳米粒子组合物”是包含一种或多种脂质的组合物。纳米粒子组合物的大小通常在微米或更小数量级,并且可包括脂质双层。纳米粒子组合物涵盖脂质纳米粒子(LNP)、脂质体(例如脂质囊泡)和脂质体复合物。例如,纳米粒子组合物可以是含有具有500nm或更小的直径的脂质双层的脂质体。

[0174] 如本文所用,“天然存在”意指无人工辅助而存在于自然界中。

[0175] 如本文所用,“患者”是指可寻求或需要治疗、要求治疗、正在接受治疗、将接受治疗的受试者,或处于针对特定疾病或疾患受过训练的专业人员的护理下的受试者。

[0176] 如本文所用,“PEG脂质”或“PEG化脂质”是指包含聚乙二醇组分的脂质。

[0177] 短语“药学上可接受”在本文中用于指在合理医学判断的范围内适合与人类和动物组织接触使用而无过量毒性、刺激、过敏性反应或其他问题或并发症,与合理效益/风险比率相称的那些化合物、阴离子、阳离子、材料、组合物、载体和/或剂型。

[0178] 如本文所用,短语“药学上可接受的赋形剂”是指除本文所述的脂质以外(例如,能够悬浮、复合或溶解所述活性脂质的媒剂)并且具有在患者中大体上无毒并且非炎性的特性的任何成分。赋形剂可包括例如:防粘剂、抗氧化剂、粘合剂、包衣、压缩助剂、崩解剂、染料(色料)、润肤剂、乳化剂、填充剂(稀释剂)、成膜剂或包衣、调味剂、芳香剂、助流剂(流动增强剂)、润滑剂、防腐剂、印刷油墨、吸附剂、悬浮或分散剂、甜味剂和水合水。示例性赋形剂包括但不限于:丁基化羟基甲苯(BHT)、碳酸钙、磷酸钙(二碱性的)、硬脂酸钙、交联羧甲基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、交联聚维酮、半胱氨酸、乙基纤维素、明胶、羟基丙基纤维素、羟基丙基甲基纤维素、乳糖、硬脂酸镁、麦芽糖醇、甘露醇、甲硫氨酸、甲基纤维素、对羟基苯甲酸甲酯、微晶纤维素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、预胶凝淀粉、对羟基苯甲酸丙酯、视黄醇棕榈酸酯、虫胶、二氧化硅、羧基甲基纤维素钠、柠檬酸钠、乙醇酸淀粉钠、山梨醇、淀粉(玉米)、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化钛、维生素A、维生素E( $\alpha$ -生育酚)、维生素C、木糖醇和本文所公开的其他物质。

[0179] 在本说明书中,脂质的结构式在一些情况下为方便起见表示特定异构体,但本公开包括所有异构体,诸如几何异构体、基于不对称碳的光学异构体、立体异构体、互变异构体等,应理解并非所有异构体均可具有相同活性水平。此外,关于由所述式表示的脂质,可存在晶体多态性。应注意,任何晶形、晶形混合物或其酐或水合物均包括于本公开的范围中。

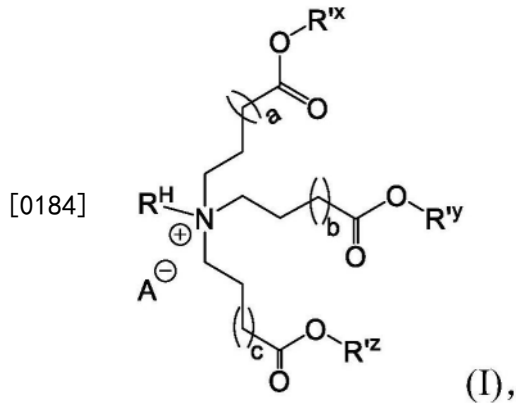
[0180] 术语“晶体多晶型物”、“多晶型物”或“晶形”意指晶体结构,其中化合物(例如本公开的脂质;或其盐或溶剂化物)可以不同的晶体堆积排列结晶,所有所述晶体堆积排列具有相同元素组成。不同晶形通常具有不同的X射线衍射图案、红外光谱、熔点、密度硬度、晶体形状、光学和电学特性、稳定性和溶解度。再结晶溶剂、结晶速率、存储温度和其他因素可使一种晶形占优势。脂质的晶体多晶型物可通过在不同条件下结晶来制备。

[0181] 本公开的化合物包括所述化合物本身以及它们的盐和它们的溶剂化物,如果适用的话。例如,盐可在阴离子与带正电基团(例如,四级氨基)之间形成。合适阴离子包括氯离子、溴离子、碘离子、硫酸根、硫酸氢根、氨基磺酸根、硝酸根、磷酸根、柠檬酸根、氢氧根、甲烷磺酸根、三氟乙酸根、谷氨酸根、葡萄糖醛酸根、戊二酸根、苹果酸根、马来酸根、琥珀酸根、富马酸根、酒石酸根、甲苯磺酸根、水杨酸根、乳酸根、萘磺酸根和乙酸根(例如,三氟乙酸根)。术语“药学上可接受的阴离子”是指适合形成药学上可接受的盐的阴离子。在盐形式中,应理解化合物与盐的阳离子或阴离子的比率可以是1:1,或除1:1以外的任何比率,例如3:1、2:1、1:2或1:3。

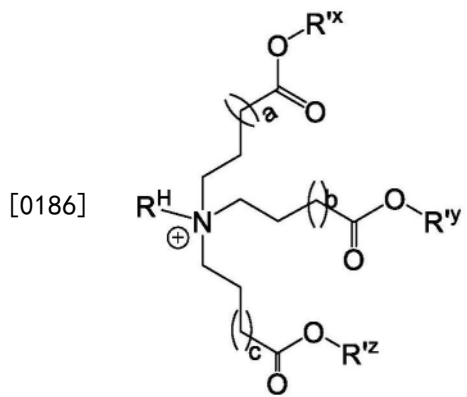
[0182] 组合物也可包括一种或多种脂质的盐。盐可以是药学上可接受的盐。如本文所用,“药学上可接受的盐”是指所公开的脂质的衍生物,其中母脂质通过将现有酸或碱部分转化为其盐形式(例如,通过使游离碱基与合适有机酸反应)而发生改变。药学上可接受的盐的实例包括但不限于诸如胺的碱性残基的无机或有机酸盐;诸如羧酸的酸性残基的碱金属或有机盐;等。代表性酸加成盐包括乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙烷磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙烷磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲烷磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。代表性碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等;以及无毒铵、季铵和胺阳离子,包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。本公开的药学上可接受的盐包括例如由无毒无机或有机酸形成的母脂质的常规无毒盐。本公开的药学上可接受的盐可通过常规化学方法由含有碱性或酸性部分的母脂质合成。一般来说,此类盐可通过使这些脂质的游离酸或碱形式与化学计量的量的适当碱或酸在水中或在有机溶剂中或在两者的混合物中反应来制备;一般来说,非水性介质为优选的,如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。

[0183] 应理解,则本公开的化合物包括所述化合物本身以及它们的离子衍生物,如果适用的话。如本文所用,术语“离子衍生物”是指所提及结构的离子形式。所述离子形式可以是游离阳离子、游离阴离子或两性离子。例如,当结构在本文中描述为盐时,本公开意图包括

所述结构的相应游离阳离子,或所述结构的相应游离阴离子。例如,式(I)化合物:



[0185] 意图包括其相应游离阳离子:



[0187] 如本文所用,“磷脂”是包括磷酸酯部分和一个或多个碳链(诸如不饱和脂肪酸链)的脂质。磷脂可包括一个或多个多重(例如,双或三)键(例如,一个或多个不饱和)。特定磷脂可促进与膜的融合。例如,阳离子磷脂可与膜(例如,细胞或细胞内膜)的一种或多种带负电荷的磷脂相互作用。磷脂与膜的融合可允许含脂质的组合物的一种或多种要素通过膜,从而允许例如将所述一种或多种要素递送至细胞。

[0188] 如本文所用,“多分散性指数”或“PDI”是描述系统的粒径分布的均质性的比率。例如小于0.3的小值指示狭窄粒径分布。

[0189] 如本文所用,术语“多肽”或“所关注的多肽”是指典型地通过肽键接合的氨基酸残基的聚合物,其可天然地(例如,经分离或经纯化)或以合成方式产生。术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用以指任何长度的氨基酸的聚合物。所述聚合物可包含修饰的氨基酸。所述术语还涵盖已天然地或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其他操纵或修饰,诸如与标记组分缀合。所述定义内还包括例如含有氨基酸(包括例如非天然氨基酸,诸如高半胱氨酸、鸟氨酸、对乙酰基苯基丙氨酸、D-氨基酸和肌氨酸)的一种或多种类似物以及本领域中已知的其他修饰的多肽。如本文所用,所述术语是指任何大小、结构或功能的蛋白质、多肽和肽。多肽包括编码的多核苷酸产物、天然存在的多肽、合成多肽、前述各物的同系物、直系同源物、旁系同源物、片段和其他等效物、变体和类似物。多肽可以是单体或可以是多分子复合物,诸如二聚体、三聚体或四聚体。它们也可包含单链或多链多肽。最常见地,二硫键发现于多链多肽中。术语多肽也可适用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化

学类似物。在一些实施方案中，“肽”可以小于或等于50个氨基酸长，例如约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸长。

[0190] 如本文所用，“RNA”是指可天然或非天然存在的核糖核酸。例如，RNA可包括修饰的和/或非天然存在的组分，诸如一种或多种核碱基、核苷、核苷酸或接头。RNA可包括帽结构、链终止核苷、茎环、polyA序列和/或多腺苷酸化信号。RNA可具有编码所关注的多肽的核苷酸序列。

[0191] 如本文所用，“DNA”是指可天然或非天然存在的脱氧核糖核酸。例如，DNA可以是合成分子，例如体外产生的合成DNA分子。在一些实施方案中，DNA分子是重组分子。如本文所用，“重组DNA分子”是指并非作为天然产物存在，而是使用分子生物学技术产生的DNA分子。

[0192] 如本文所用，“单一单位剂量”是以一个剂量/同时/单一途径/单一接触点(即，单一施用事件)施用的任何治疗剂的剂量。

[0193] 如本文所用，“分次剂量”是将单一单位剂量或总每日剂量分成两个或更多个剂量。

[0194] 如本文所用，“总每日剂量”是以24小时时期给出或开处方的量。它可作为单一单位剂量施用。

[0195] 如本文所用，在脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)背景中的“大小”或“平均大小”是指纳米粒子组合物的平均直径。

[0196] 如本文所用，术语“受试者”或“患者”是指可例如出于实验、诊断、预防和/或治疗目的施用根据本公开的组合物任何生物体。典型受试者包括动物(例如哺乳动物，诸如小鼠、大鼠、兔、非人类灵长类动物和人类)和/或植物。

[0197] 如本文所用，“靶向细胞”是指所关注的任何一种或多种细胞。所述细胞可发现于生物体的体外、体内、原位或者组织或器官中。生物体可以是动物，优选哺乳动物，更优选人类并且最优选患者。

[0198] 如本文所用，“靶标组织”是指所关注的任何一种或多种组织类型，其中治疗剂和/或预防剂的递送将达成所需的生物和/或药理效应。所关注的靶标组织的实例包括特定组织、器官和系统或其组。在特定应用中，靶标组织可以是肾、肺、脾、在血管中(例如，冠状动脉内或股动脉内)的血管内皮或肿瘤组织(例如，经由肿瘤内注射)。“脱靶组织”是指任何一种或多种组织类型，其中编码蛋白的表达不会达成所需的生物和/或药理效应。在特定应用中，脱靶组织可包括肝和脾。

[0199] 术语“治疗剂”或“预防剂”是指当施用于受试者时具有治疗、诊断和/或预防效应和/或引起所需的生物和/或药理效应的任何剂。治疗剂还称作“活性剂(active)”或“活性剂(active agent)”。所述剂包括但不限于细胞毒素、放射性离子、化学治疗剂、小分子药物、蛋白质和核酸。

[0200] 如本文所用，术语“治疗有效量”意指欲递送的剂(例如，核酸、药物、组合物、治疗剂、诊断剂、预防剂等)的量，所述量当施用于罹患或易经受感染、疾病、病症和/或疾患的受试者时足以治疗所述感染、疾病、病症和/或疾患，改进其症状，诊断、预防所述感染、疾病、病症和/或疾患，和/或延迟其发作。

[0201] 如本文所用，“转染”是指将物质(例如RNA)引入细胞中。转染可例如体外、离体或体内发生。

[0202] 如本文所用,术语“治疗”是指部分地或完全地缓解、改善、改进、减轻特定感染、疾病、病症和/或疾患,延迟其发作,抑制其进展,降低其严重程度,和/或降低其一种或多种症状或特征的发生率。例如,“治疗”癌症可指抑制肿瘤的生存、生长和/或扩散。出于降低发展与疾病、病症和/或疾患相关的病理的风险的目的,治疗可施用于未展现疾病、病症和/或疾患的病征的受试者,和/或施用于仅展现疾病、病症和/或疾患的早期病征的受试者。

[0203] 如本文所用,“ζ电位”是例如粒子组合物中的脂质的动电位。

[0204] 纳米粒子组合物

[0205] 本公开还提供包含如本文所述的根据式 (I) 的阳离子脂质的脂质纳米粒子(例如,空LNP或负载LNP)。

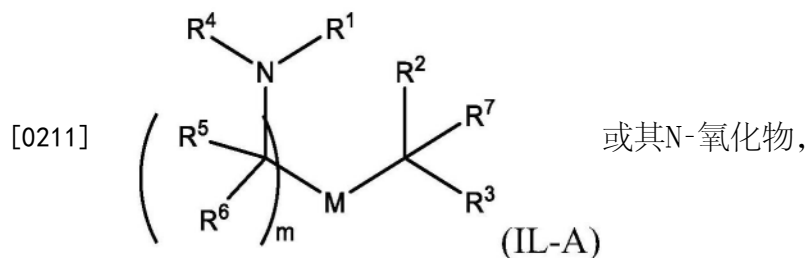
[0206] 在一些实施方案中,纳米粒子组合物的最大尺寸是1μm或更短(例如,1μm、900nm、800nm、700nm、600nm、500nm、400nm、300nm、200nm、175nm、150nm、125nm、100nm、75nm、50nm或更短),例如当通过动态光散射(DLS)、透射电子显微术、扫描电子显微术或另一方法测量时。纳米粒子组合物包括例如脂质纳米粒子(LNP;例如,空LNP或负载LNP)、脂质体、脂质囊泡和脂质体复合物。在一些实施方案中,纳米粒子组合物是包括一个或多个脂质双层的囊泡。在某些实施方案中,纳米粒子组合物包括由水性隔室分开的两个或更多个同心双层。脂质双层可以官能化和/或彼此交联。脂质双层可包括一种或多种配体、蛋白质或通道。

[0207] 本公开的脂质纳米粒子(例如,空LNP或负载LNP)包含至少一种根据式 (I) 的阳离子脂质。在一些实施方案中,本公开的空LNP或负载LNP包括表1的一种或多种阳离子脂质。纳米粒子组合物也可包括多种其他组分。例如,在一些实施方案中,除根据式 (I) 的脂质以外,所述空LNP或负载LNP还包括一种或多种可离子化脂质。

[0208] 可离子化脂质

[0209] 在一些实施方案中,除式 (I) 的阳离子脂质以外,本公开的脂质纳米粒子(例如,空LNP或负载LNP)还包括一种或多种可离子化脂质。

[0210] 在一些方面,可离子化脂质是式 (IL-A) 化合物:



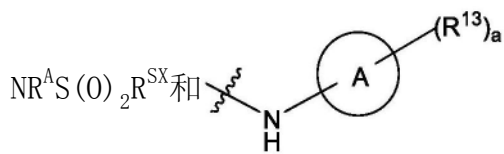
[0212] 或其盐或异构体,其中:

[0213] R<sup>1</sup>选自由C<sub>5-30</sub>烷基、C<sub>5-20</sub>烯基、-R\*YR”、-YR”和-R”M’R’组成的组;


[0214] R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>独立地选自由H、C<sub>1-14</sub>烷基、C<sub>2-14</sub>烯基、-R\*YR”、-YR”和-R\*OR”组成的组,或R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>连同它们所连接的原子形成杂环或碳环;

[0215] R<sup>4</sup>选自由氢、C<sub>3-6</sub>碳环、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR、-(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>C(R<sup>12</sup>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n-o</sub>Q、-CHQR、-CQ(R)<sub>2</sub>、-C(O)NQR和未取代的C<sub>1-6</sub>烷基组成的组,其中Q选自碳环、杂环、-OR、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(R)<sub>2</sub>、-C(O)OR、-OC(O)R、-OC(O)O-、-CX<sub>3</sub>、-CX<sub>2</sub>H、-CXH<sub>2</sub>、-CN、-N(R)<sub>2</sub>、-C(O)N(R)<sub>2</sub>、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)<sub>2</sub>R、-N(R)C(O)N(R)<sub>2</sub>、-N(R)C(S)N(R)<sub>2</sub>、-N(R)R<sup>8</sup>、-N(R)S(O)<sub>2</sub>R<sup>8</sup>、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OR、-N(R)C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>、-N(R)C(=CHR<sup>9</sup>)N(R)<sub>2</sub>、-OC(O)N(R)<sub>2</sub>、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)

$_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR^9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR^9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 、 $-(CH_2)_nN(R)_2$ 和 $-C(R)N(R)_2C(O)OR$ 、



其中A是含有一个或多个选自N、O和S的杂原子的3-14

元杂环；并且a是1、2、3或4；其中表示连接点；

[0216] 各o独立地选自1、2、3和4；并且各n独立地选自1、2、3、4和5；

[0217]  $R^8$ 选自由 $C_{3-6}$ 碳环和杂环组成的组；

[0218]  $R^9$ 选自由H、CN、 $NO_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基、 $-OR$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2N(R)_2$ 、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{3-6}$ 碳环和杂环组成的组；

[0219]  $R^{12}$ 选自由H、OH、 $C_{1-3}$ 烷基和 $C_{2-3}$ 烯基组成的组；

[0220] 各R独立地选自由 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-3}$ 烷基-芳基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组；

[0221]  $R^A$ 选自H和 $C_{1-3}$ 烷基；

[0222]  $R^{SX}$ 选自 $C_{3-8}$ 碳环、含有一个或多个选自N、O和S的杂原子的3-14元杂环、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $(C_{1-3}$ 烷氧基) $C_{1-3}$ 烷基、 $(CH_2)_{p_1}O(CH_2)_{p_2}R^{SX1}$ 和 $(CH_2)_{p_1}R^{SX1}$ ，其中所述碳环和所述杂环任选地被一个或多个选自氧代、 $C_{1-6}$ 烷基和 $(C_{1-3}$ 烷氧基) $C_{1-3}$ 烷基的基团取代；

[0223]  $R^{SX1}$ 选自 $C(O)NR^{14}R^{14'}$ 、 $C_{3-8}$ 碳环和含有一个或多个选自N、O和S的杂原子的3-14元杂环，其中所述碳环和所述杂环各自任选地被一个或多个选自氧代、卤基、 $C_{1-3}$ 烷基、 $(C_{1-3}$ 烷氧基) $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基和 $NH_2$ 的基团取代；

[0224] 各 $R^{13}$ 选自由OH、氧代、卤基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷氧基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $NH_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、CN和 $NO_2$ 组成的组；

[0225]  $R^{14}$ 和 $R^{14'}$ 各自独立地选自由H和 $C_{1-6}$ 烷基组成的组；

[0226]  $p_1$ 选自1、2、3、4和5；

[0227]  $p_2$ 选自1、2、3、4和5；

[0228] 各 $R^5$ 独立地选自由OH、 $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组；

[0229] 各 $R^6$ 独立地选自由OH、 $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组；

[0230]  $R^7$ 选自由 $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组；

[0231] M和M'独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)-M''$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-C(O)N(R^M)-$ 、 $-N(R^M)C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR^M)O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基和杂芳基，其中M''为键、 $C_{1-13}$ 烷基或 $C_{2-13}$ 烯基；

[0232] 各 $R^M$ 独立地选自由H、 $C_{1-6}$ 烷基和 $C_{2-6}$ 烯基组成的组；

[0233] 各 $R'$ 独立地选自由 $C_{1-18}$ 烷基、 $C_{2-18}$ 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、 $(CH_2)_qOR^*$ 和H组成的组，

[0234] 并且各 $q'$ 独立地选自1、2和3；

[0235] 各 $R''$ 独立地选自由 $C_{3-15}$ 烷基和 $C_{3-15}$ 烯基组成的组；

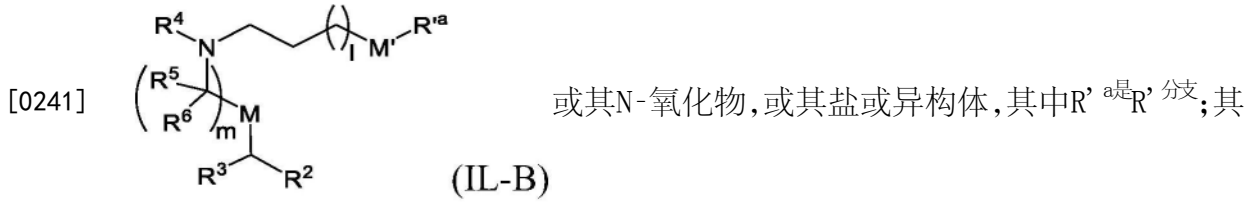
[0236] 各 $R^*$ 独立地选自由 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组；

[0237] 各Y独立地为 $C_{3-6}$ 碳环；

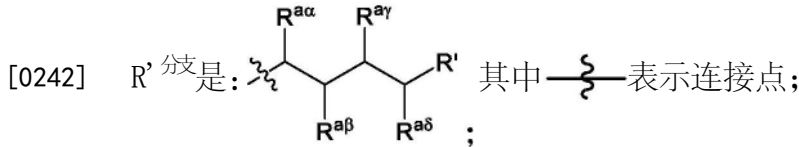
[0238] 各X独立地选自由F、Cl、Br和I组成的组；并且

[0239] m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13。

[0240] 在一些方面,可离子化脂质是式(IL-B)化合物:

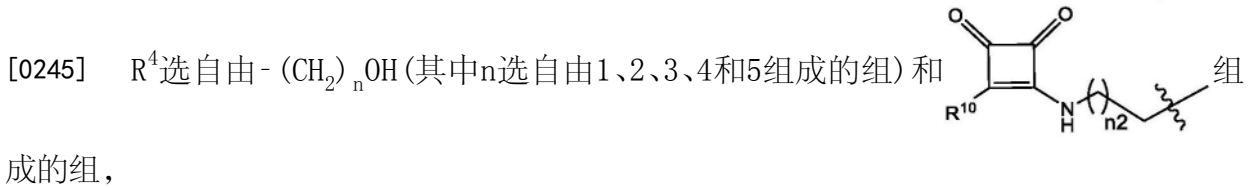



中



[0243] 其中R<sup>α</sup>、R<sup>β</sup>、R<sup>γ</sup>和R<sup>δ</sup>各自独立地选自自由H、C<sub>2-12</sub>烷基和C<sub>2-12</sub>烯基组成的组;

[0244] R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>各自独立地选自自由C<sub>1-14</sub>烷基和C<sub>2-14</sub>烯基组成的组;



[0246] 其中——表示连接点;其中

[0247] R<sup>10</sup>为N(R)<sub>2</sub>;各R独立地选自自由C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>2-3</sub>烯基和H组成的组;并且n<sub>2</sub>选自自由1、2、3、4、5、6、7、8、9和10组成的组;

[0248] 各R<sup>5</sup>独立地选自自由C<sub>1-3</sub>烷基、C<sub>2-3</sub>烯基和H组成的组;

[0249] 各R<sup>6</sup>独立地选自自由C<sub>1-3</sub>烷基、C<sub>2-3</sub>烯基和H组成的组;

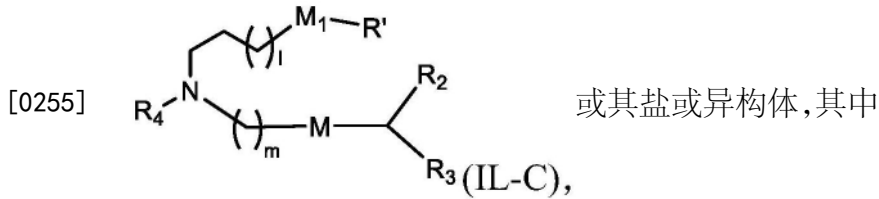
[0250] M和M'各自独立地选自自由-C(O)O-和-OC(O)-组成的组;

[0251] R'为C<sub>1-12</sub>烷基或C<sub>2-12</sub>烯基;

[0252] l选自自由1、2、3、4和5组成的组;并且

[0253] m选自自由5、6、7、8、9、10、11、12和13组成的组。

[0254] 在一些方面,可离子化脂质是式(IL-C)化合物:



[0256] l选自1、2、3、4和5;

[0257] M<sub>1</sub>为M' ;

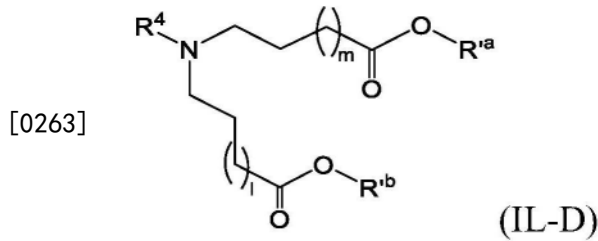
[0258] R<sub>4</sub>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q,其中Q是OH,并且n选自1、2、3、4或5;

[0259] M和M'独立地选自自由-C(O)O-和-OC(O)-;

[0260] R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>均为C<sub>1-14</sub>烷基或C<sub>2-14</sub>烯基;并且

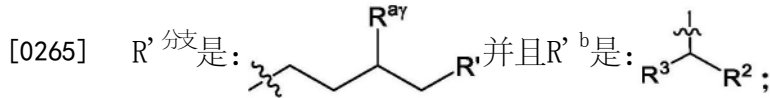
[0261] R'为C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>直链烷基。


[0262] 在一些方面,可离子化脂质是式(IL-D)化合物:



或其N-氧化物,或其盐或异构体,

[0264] 其中R<sup>a</sup>是R'<sup>分支</sup>或R'<sup>环状</sup>;其中



[0266] 其中  表示连接点;

[0267] 其中R<sup>ay</sup>选自由C<sub>1-12</sub>烷基和C<sub>2-12</sub>烯基组成的组;

[0268] R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>各自独立地选自由C<sub>1-14</sub>烷基和C<sub>2-14</sub>烯基组成的组;

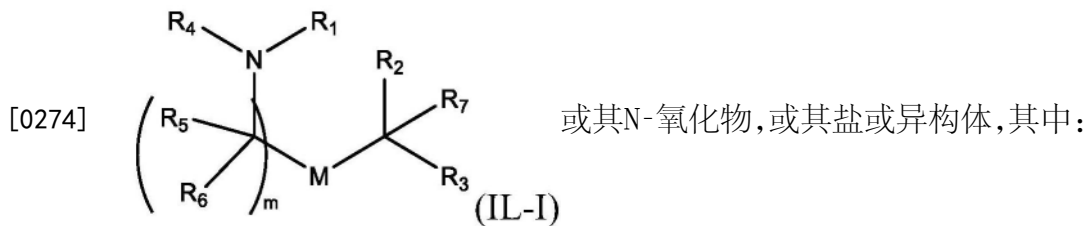
[0269] R<sup>4</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH,其中n选自由1、2、3、4和5组成的组;

[0270] R'为C<sub>1-12</sub>烷基或C<sub>2-12</sub>烯基;

[0271] m选自1、2、3、4、5、6、7、8和9;

[0272] l选自1、2、3、4、5、6、7、8和9。

[0273] 在一些方面,可离子化脂质是式(IL-I)化合物:



[0275] R<sup>1</sup>选自由C<sub>5-30</sub>烷基、C<sub>5-20</sub>烯基、-R\*YR''、-YR''和-R''M'R'组成的组;

[0276] R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>独立地选自由H、C<sub>1-14</sub>烷基、C<sub>2-14</sub>烯基、-R\*YR''、-YR''和-R\*OR''组成的组,或R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>连同它们所连接的原子形成杂环或碳环;

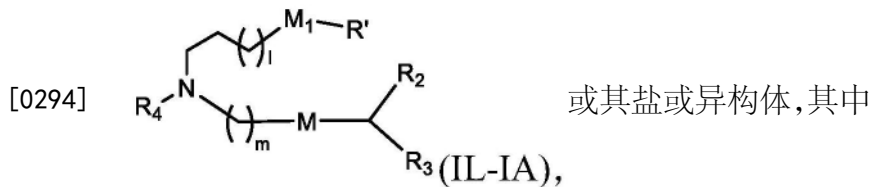
[0277] R<sup>4</sup>选自由氢、C<sub>3-6</sub>碳环、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR、-(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>C(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n-o</sub>Q、-CHQR、-CQ(R)<sub>2</sub>和未取代的C<sub>1-6</sub>烷基组成的组,其中Q选自碳环、杂环、-OR、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(R)<sub>2</sub>、-C(O)OR、-OC(O)R、-CX<sub>3</sub>、-CX<sub>2</sub>H、-CXH<sub>2</sub>、-CN、-N(R)<sub>2</sub>、-C(O)N(R)<sub>2</sub>、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)<sub>2</sub>R、-N(R)C(O)N(R)<sub>2</sub>、-N(R)C(S)N(R)<sub>2</sub>、-N(R)R<sup>8</sup>、-N(R)S(O)<sub>2</sub>R<sup>8</sup>、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OR、-N(R)C(=NR<sup>9</sup>)N(R)<sub>2</sub>、-N(R)C(=CHR<sup>9</sup>)N(R)<sub>2</sub>、-OC(O)N(R)<sub>2</sub>、-N(R)C(O)OR、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)<sub>2</sub>R、-N(OR)C(O)OR、-N(OR)C(O)N(R)<sub>2</sub>、-N(OR)C(S)N(R)<sub>2</sub>、-N(OR)C(=NR<sup>9</sup>)N(R)<sub>2</sub>、-N(OR)C(=CHR<sup>9</sup>)N(R)<sub>2</sub>、-C(=NR<sup>9</sup>)N(R)<sub>2</sub>、-C(=NR<sup>9</sup>)R、-C(O)N(R)OR和-C(R)N(R)<sub>2</sub>C(O)OR,各o独立地选自1、2、3和4,并且各n独立地选自1、2、3、4和5;

[0278] 各R<sup>5</sup>独立地选自由OH、C<sub>1-3</sub>烷基、C<sub>2-3</sub>烯基和H组成的组;

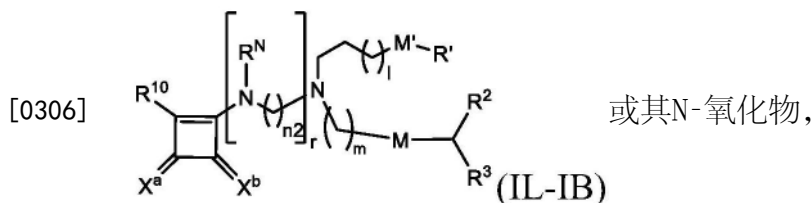
[0279] 各R<sup>6</sup>独立地选自由OH、C<sub>1-3</sub>烷基、C<sub>2-3</sub>烯基和H组成的组;

[0280] M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)-M''-C(O)O-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)<sub>2</sub>-、-S-S-、芳基和杂芳基,其中M''为键、C<sub>1-13</sub>烷基或C<sub>2-13</sub>烯基;

- [0281]  $R^7$ 选自由 $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组；
- [0282]  $R^8$ 选自由 $C_{3-6}$ 碳环和杂环组成的组；
- [0283]  $R^9$ 选自由H、CN、 $NO_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基、-OR、-S(O)<sub>2</sub>R、-S(O)<sub>2</sub>N(R)<sub>2</sub>、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{3-6}$ 碳环和杂环组成的组；
- [0284]  $R^{10}$ 选自由H、OH、 $C_{1-3}$ 烷基和 $C_{2-3}$ 烯基组成的组；
- [0285] 各R独立地选自由 $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基、 $(CH_2)_qOR^*$ 和H组成的组，
- [0286] 并且各q独立地选自1、2和3；
- [0287] 各R'独立地选自由 $C_{1-18}$ 烷基、 $C_{2-18}$ 烯基、-R\*YR''、-YR''和H组成的组；
- [0288] 各R''独立地选自由 $C_{3-15}$ 烷基和 $C_{3-15}$ 烯基组成的组；
- [0289] 各R\*独立地选自由 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组；
- [0290] 各Y独立地为 $C_{3-6}$ 碳环；
- [0291] 各X独立地选自由F、Cl、Br和I组成的组；并且
- [0292] m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13。
- [0293] 在一些方面，可离子化脂质是式(IL-IA)化合物：

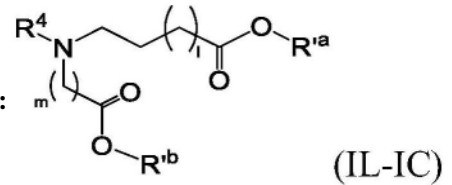


- [0295] l选自1、2、3、4和5；
- [0296] m选自5、6、7、8和9；
- [0297]  $M^1$ 为键或 $M'$ ；
- [0298]  $R_4$ 为未取代的 $C_{1-3}$ 烷基或 $-(CH_2)_nQ$ ，其中Q是OH、-NHC(S)N(R)<sub>2</sub>、-NHC(O)N(R)<sub>2</sub>、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)<sub>2</sub>R、-N(R)R<sub>8</sub>、-NHC(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>、-NHC(=CHR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>、-OC(O)N(R)<sub>2</sub>、-N(R)C(O)OR、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)<sub>2</sub>R、-N(OR)C(O)OR、-N(OR)C(O)N(R)<sub>2</sub>、-N(OR)C(S)N(R)<sub>2</sub>、-N(OR)C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>、-N(OR)C(=CHR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>或杂芳基，并且各n选自1、2、3、4或5；
- [0299] M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-P(O)(OR')O-、-S-S-、芳基和杂芳基；并且
- [0300]  $R_2$ 和 $R_3$ 均为 $C_{1-14}$ 烷基或 $C_{2-14}$ 烯基；
- [0301]  $R_8$ 选自由 $C_{3-6}$ 碳环和杂环组成的组；
- [0302]  $R_9$ 选自由H、CN、 $NO_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基、-OR、-S(O)<sub>2</sub>R、-S(O)<sub>2</sub>N(R)<sub>2</sub>、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{3-6}$ 碳环和杂环组成的组；
- [0303] 各R独立地选自由 $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组；并且
- [0304] R'为 $C_{1-18}$ 烷基或 $C_{2-18}$ 烯基。
- [0305] 在一些方面，可离子化脂质是式(IL-IB)化合物：



- [0307] 或其盐或异构体,其中
- [0308] 1选自1、2、3、4和5;
- [0309] m选自5、6、7、8和9;
- [0310] R<sup>1</sup>选自自由C<sub>1-14</sub>烷基和C<sub>2-14</sub>烯基组成的组;并且
- [0311] R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>独立地选自自由C<sub>1-14</sub>烷基和C<sub>2-14</sub>烯基组成的组;
- [0312] M和M'独立地选自-C(O)O-和-OC(O)-;
- [0313] R<sup>N</sup>为H或C<sub>1-3</sub>烷基;
- [0314] X<sup>a</sup>和X<sup>b</sup>各自独立地为O或S;
- [0315] R<sup>10</sup>选自自由H、卤基、-OH、R、-N(R)<sub>2</sub>、-CN、-N<sub>3</sub>、-C(O)OH、-C(O)OR、-OC(O)R、-OR、-SR、-S(O)R、-S(O)OR、-S(O)<sub>2</sub>OR、-NO<sub>2</sub>、-S(O)<sub>2</sub>N(R)<sub>2</sub>、-N(R)S(O)<sub>2</sub>R、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>t1</sub>N(R)<sub>2</sub>、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>q1</sub>N(R)<sub>2</sub>、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>OR、-N((CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>OR)<sub>2</sub>、-N(R)-碳环、-N(R)-杂环、-N(R)-芳基、-N(R)-杂芳基、-N(R)(CH<sub>2</sub>)<sub>t1</sub>-碳环、-N(R)(CH<sub>2</sub>)<sub>t1</sub>-杂环、-N(R)(CH<sub>2</sub>)<sub>t1</sub>-芳基、-N(R)(CH<sub>2</sub>)<sub>t1</sub>-杂芳基、碳环、杂环、芳基和杂芳基组成的组;
- [0316] 各R独立地选自自由C<sub>1-12</sub>烷基、C<sub>2-12</sub>烯基和H组成的组;
- [0317] m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13;
- [0318] n2选自1、2、3、4、5、6、7、8、9和10;
- [0319] r是0或1;
- [0320] t<sup>1</sup>选自1、2、3、4和5;
- [0321] p<sup>1</sup>选自1、2、3、4和5;
- [0322] q<sup>1</sup>选自1、2、3、4和5;并且
- [0323] s<sup>1</sup>选自1、2、3、4。

[0324] 在一些方面,可离子化脂质是式(IL-IC)化合物:



或其N-氧化物,或其盐或异构体,其中R<sup>' a</sup>是R<sup>'</sup>分支或R<sup>'</sup>环状;其中

[0325] R<sup>'</sup>分支是 , 并且 R<sup>'</sup>环状是:

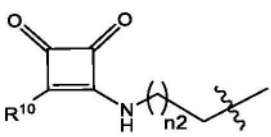

并且

[0326] R<sup>' b</sup>是: ; 其中 表示连接点;

[0327] 其中R<sup>a gamma</sup>、R<sup>a gamma</sup>和R<sup>a gamma</sup>各自为C<sub>1-12</sub>烷基或C<sub>2-12</sub>烯基;

[0328] R<sup>b gamma</sup>为H、C<sub>1-12</sub>烷基或C<sub>2-12</sub>烯基;

[0329] R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>各自独立地选自自由C<sub>1-14</sub>烷基和C<sub>2-14</sub>烯基组成的组;

[0330]  $R^4$ 为 $-(CH_2)_nOH$ ;或  其中  表示连接点;

[0331] 各 $R'$ 独立地为 $C_{1-12}$ 烷基或 $C_{2-12}$ 烯基;

[0332]  $R^{10}$ 为 $N(R)_2$ ;各 $R$ 独立地选自 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基和 $H$ 组成的组;并且 $n$ 和 $n_2$ 各自选自由1、2、3、4和5组成的组;

[0333]  $Y^a$ 是 $C_{3-6}$ 碳环;

[0334]  $R^{*a}$ 选自 $C_{1-15}$ 烷基和 $C_{2-15}$ 烯基组成的组;

[0335]  $l$ 选自1、2、3、4和5;

[0336]  $m$ 选自5、6、7、8和9;并且

[0337]  $s$ 是2或3。

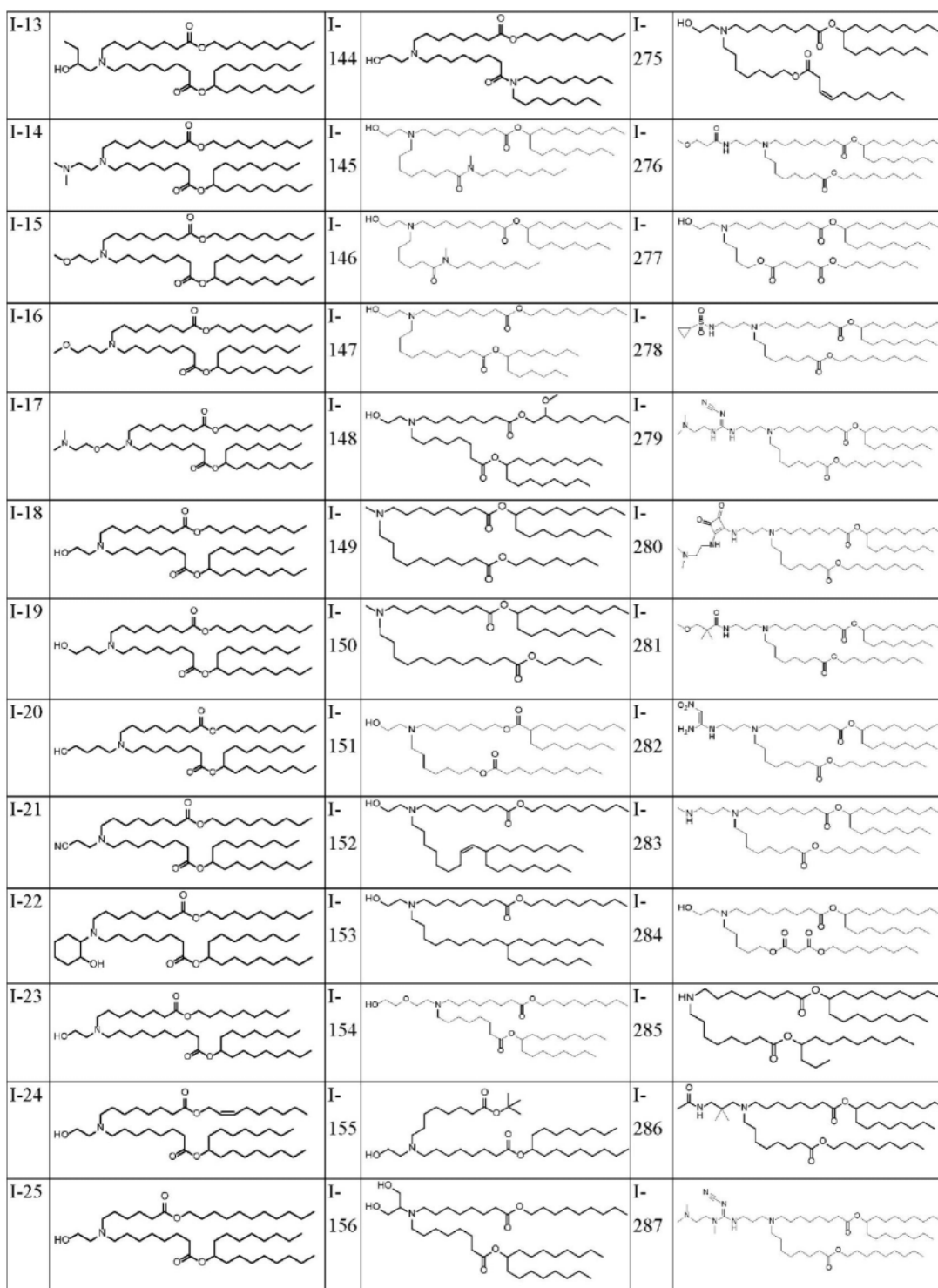
[0338] 在一些实施方案中,可离子化脂质是选自表IL-1的化合物。

[0339] 表IL-1:可离子化脂质

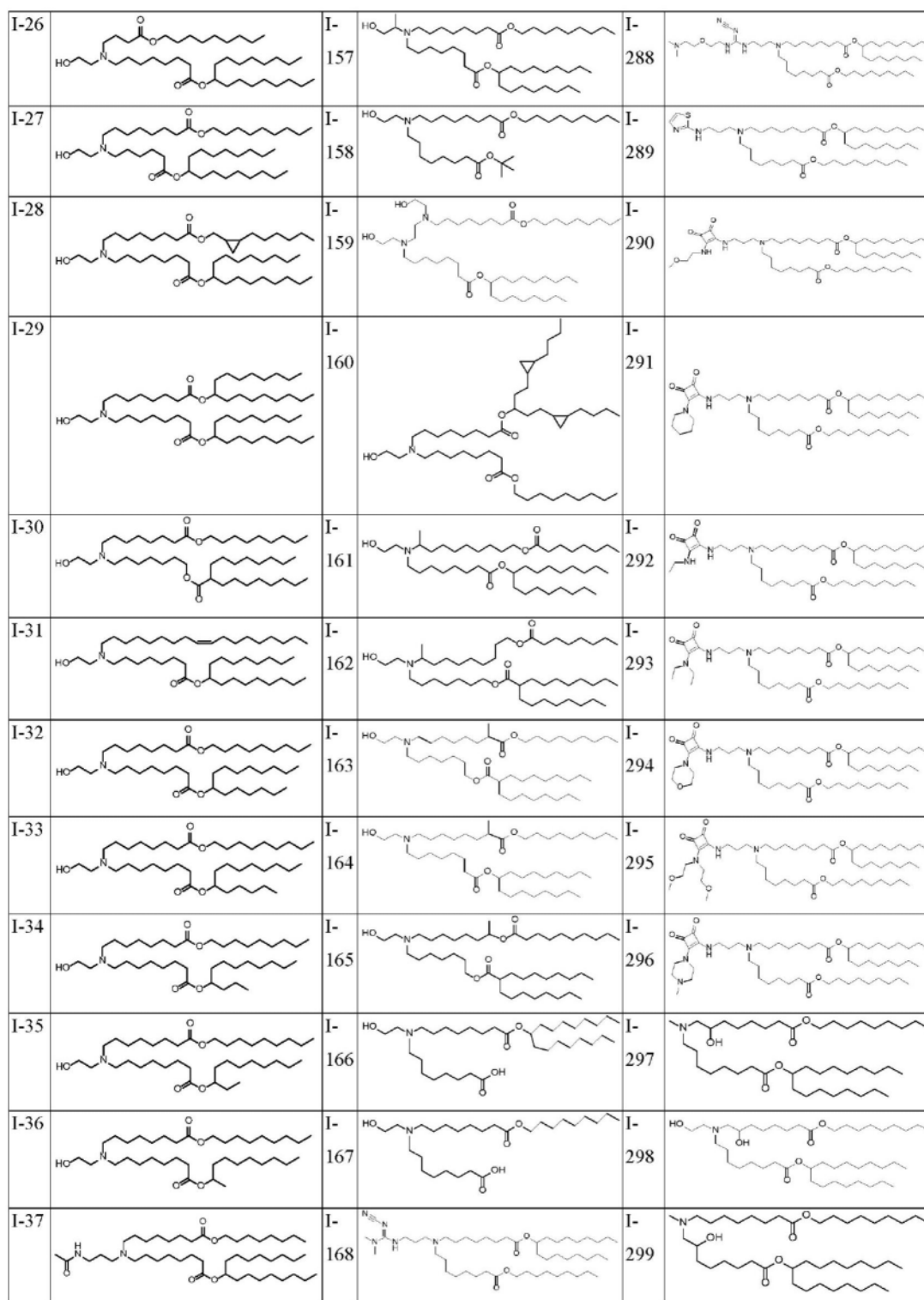
[0340]

化合物#	结构	化合物#	结构	化合物#	结构
I-1		I-132		I-263	
I-2		I-133		I-264	
I-3		I-134		I-265	
I-4		I-135		I-266	
I-5		I-136		I-267	
I-6		I-137		I-268	
I-7		I-138		I-269	
I-8		I-139		I-270	
I-9		I-140		I-271	
I-10		I-141		I-272	
I-11		I-142		I-273	
I-12		I-143		I-274	

[0341]



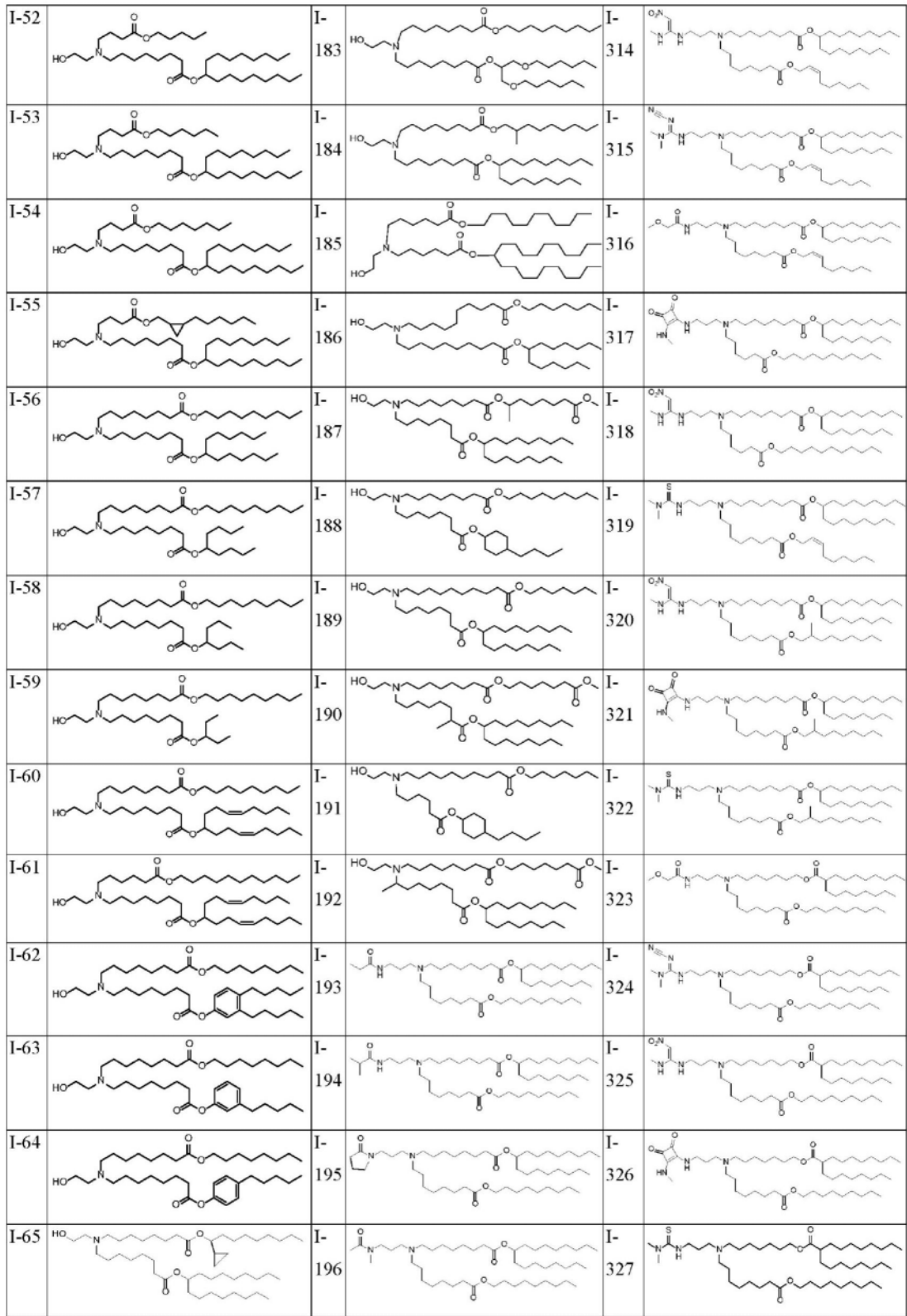
[0342]



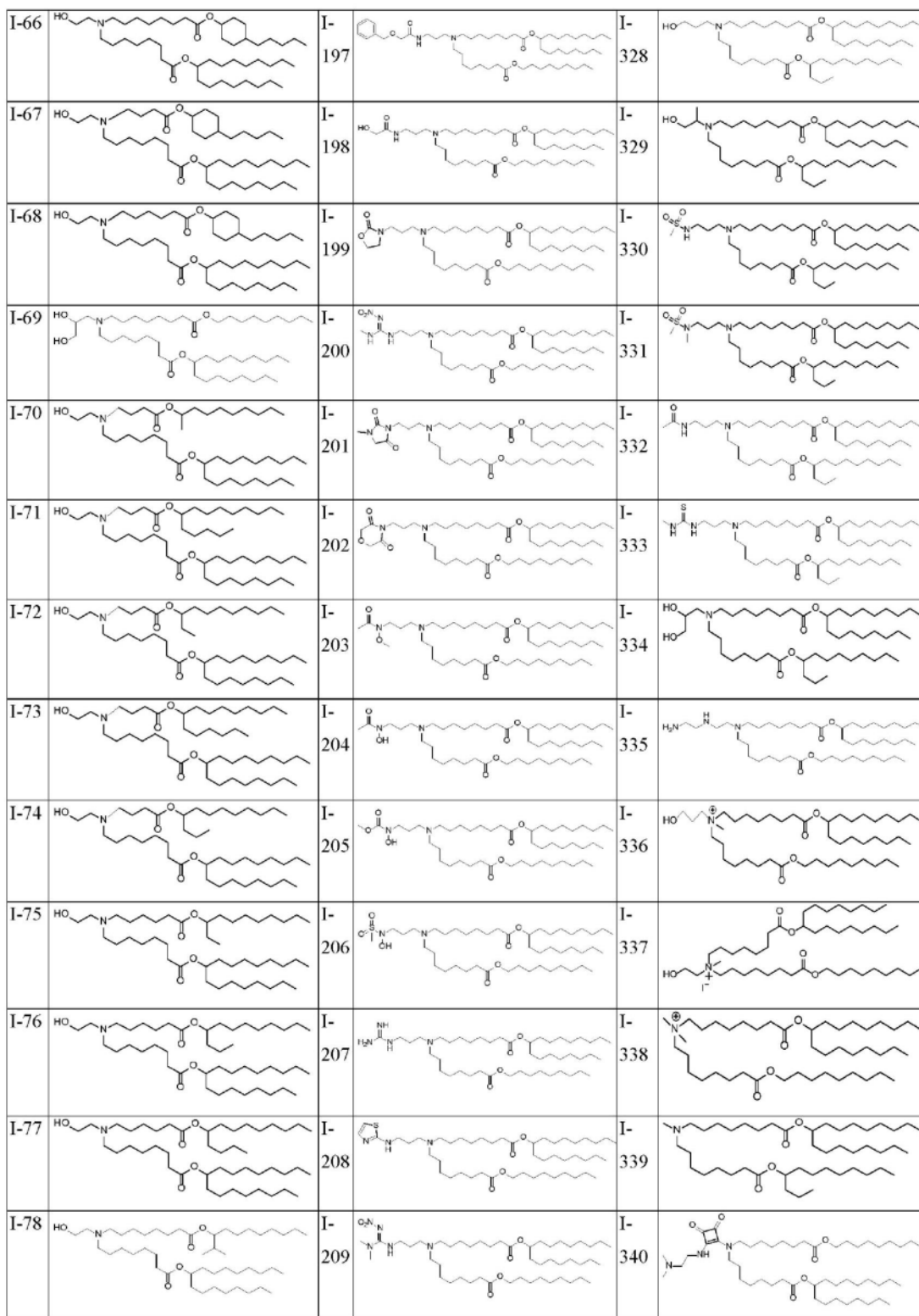
[0343]

I-38		I-169		I-300	
I-39		I-170		I-301	
I-40		I-171		I-302	
I-41		I-172		I-303	
I-42		I-173		I-304	
I-43		I-174		I-305	
I-44		I-175		I-306	
I-45		I-176		I-307	
I-46		I-177		I-308	
I-47		I-178		I-309	
I-48		I-179		I-310	
I-49		I-180		I-311	
I-50		I-181		I-312	
I-51		I-182		I-313	

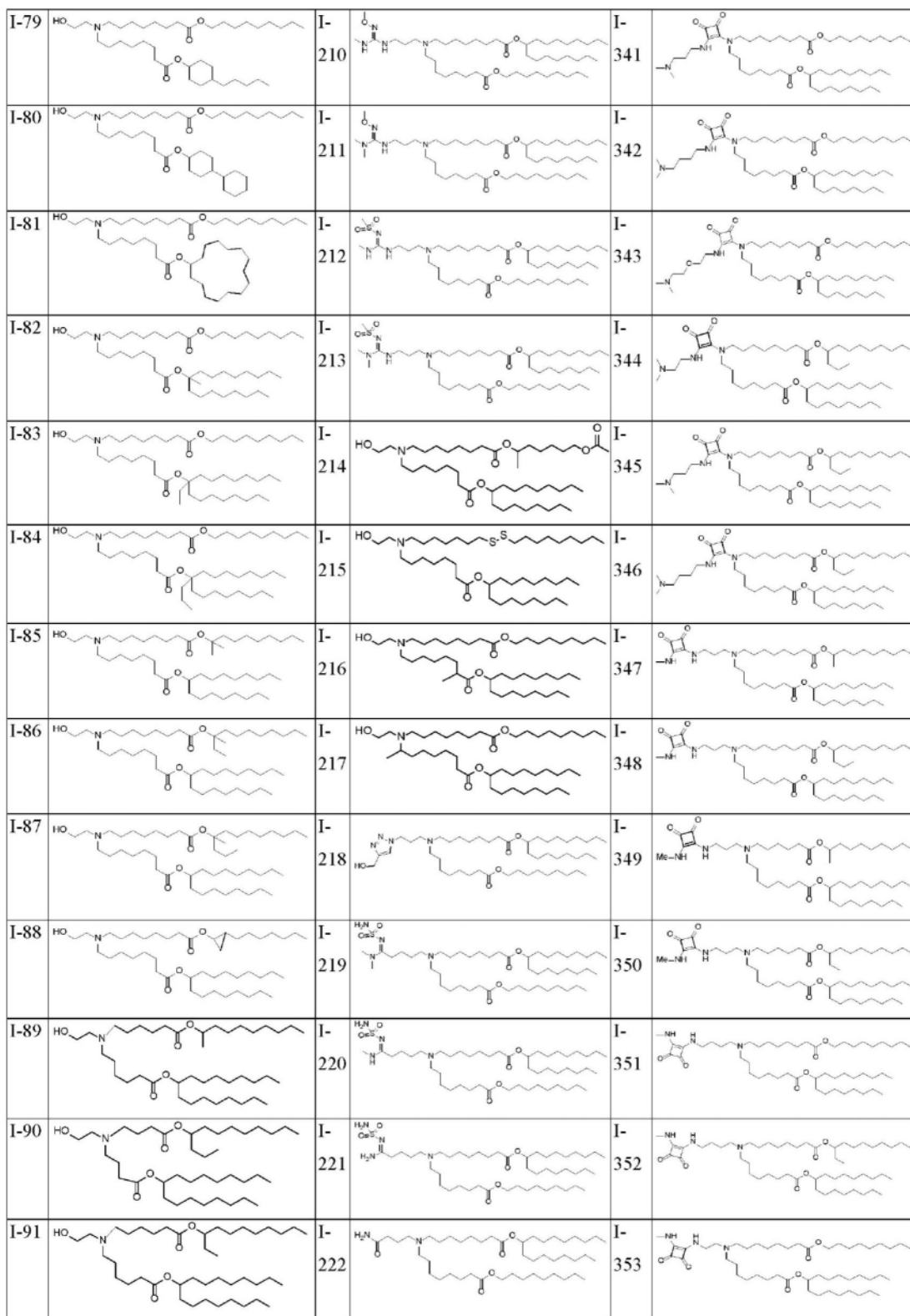
[0344]



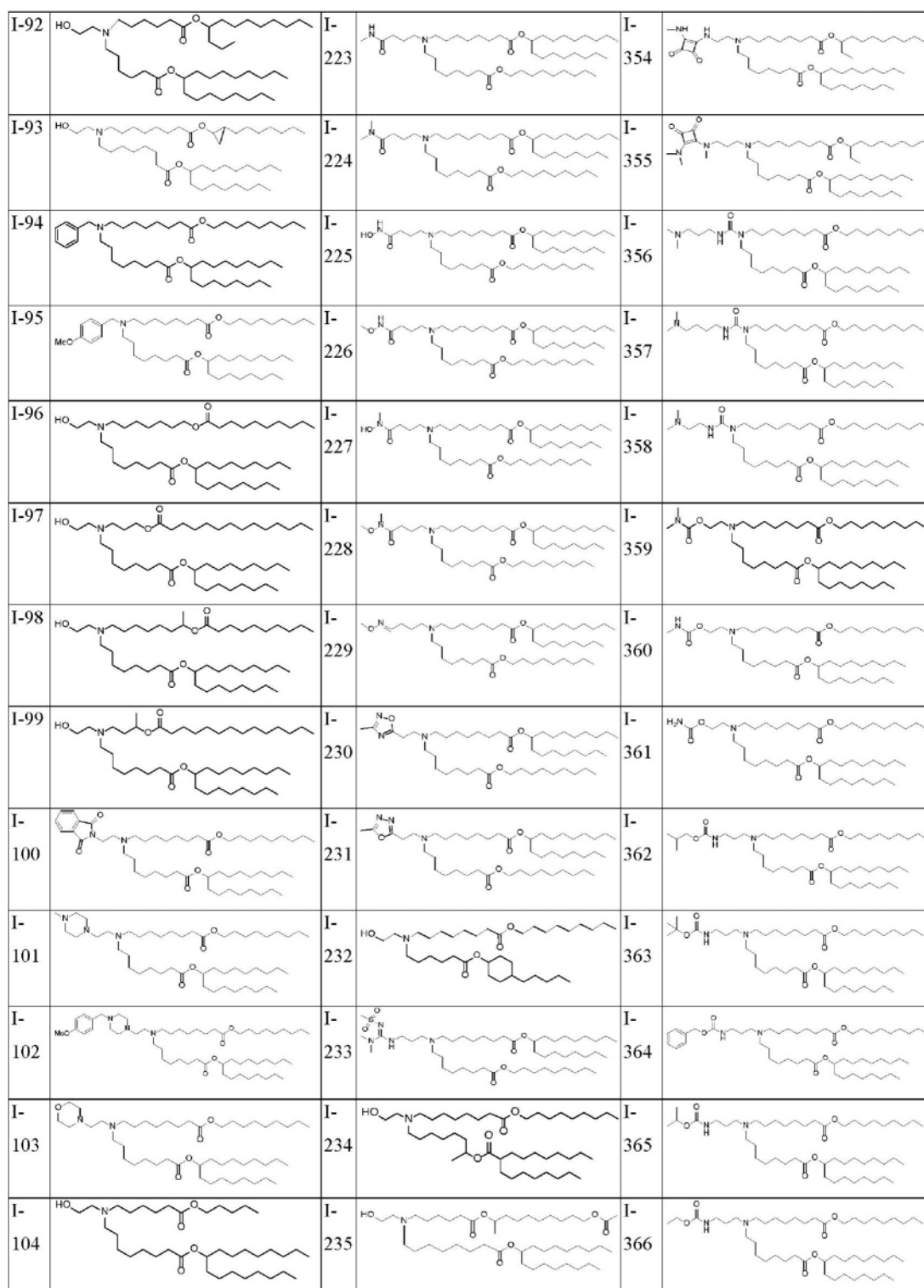
[0345]



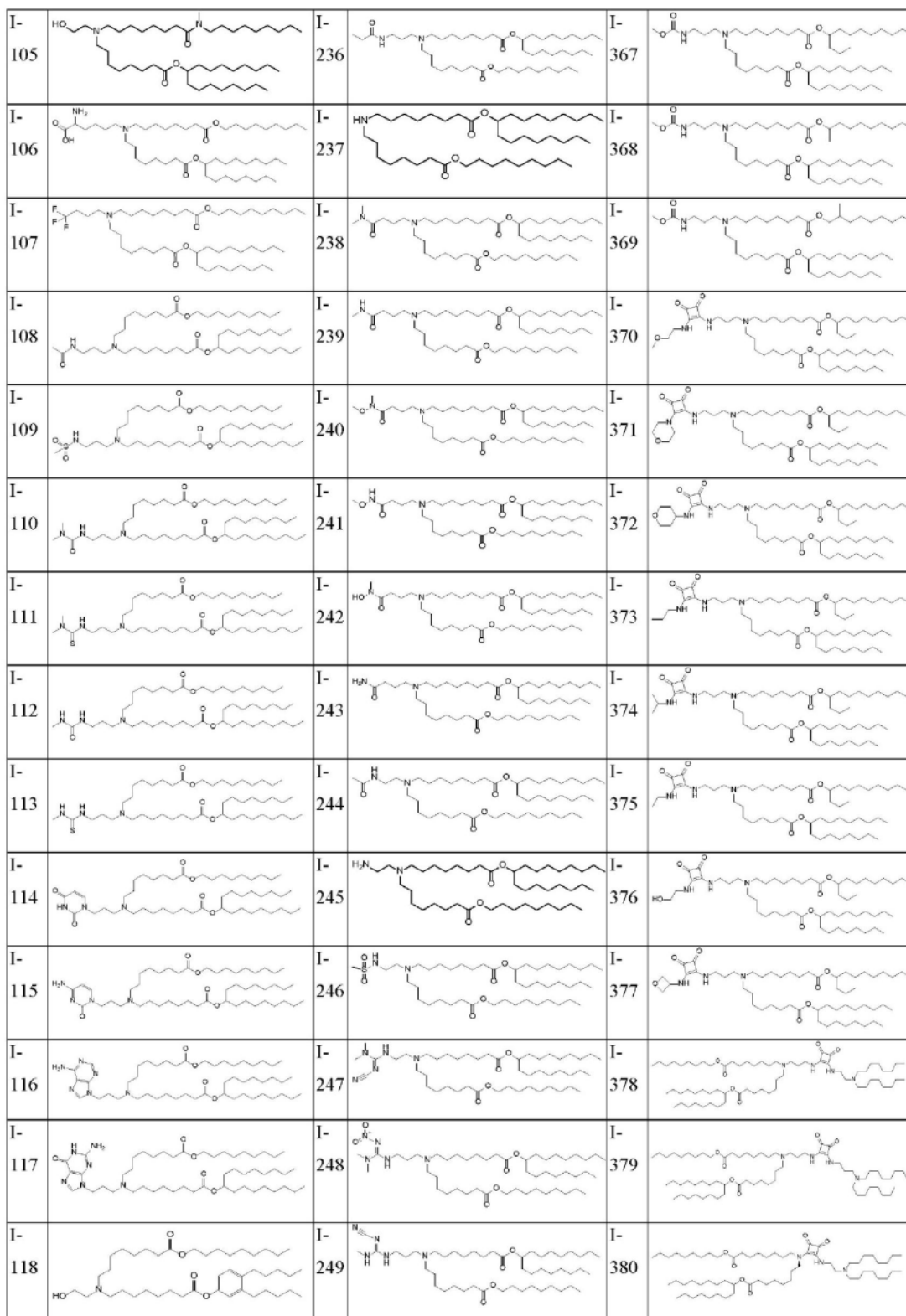
[0346]



[0347]



[0348]



[0349]

I-119		I-250		I-381	
I-120		I-251		I-382	
I-121		I-252		I-383	
I-122		I-253		I-384	
I-123		I-254		I-385	
I-124		I-255		I-386	
I-125		I-256		I-387	
I-126		I-257		I-388	
I-127		I-258		I-389	
I-128		I-259		I-390	
I-129		I-260		I-391	
I-130		I-261		I-392	
I-131		I-262			

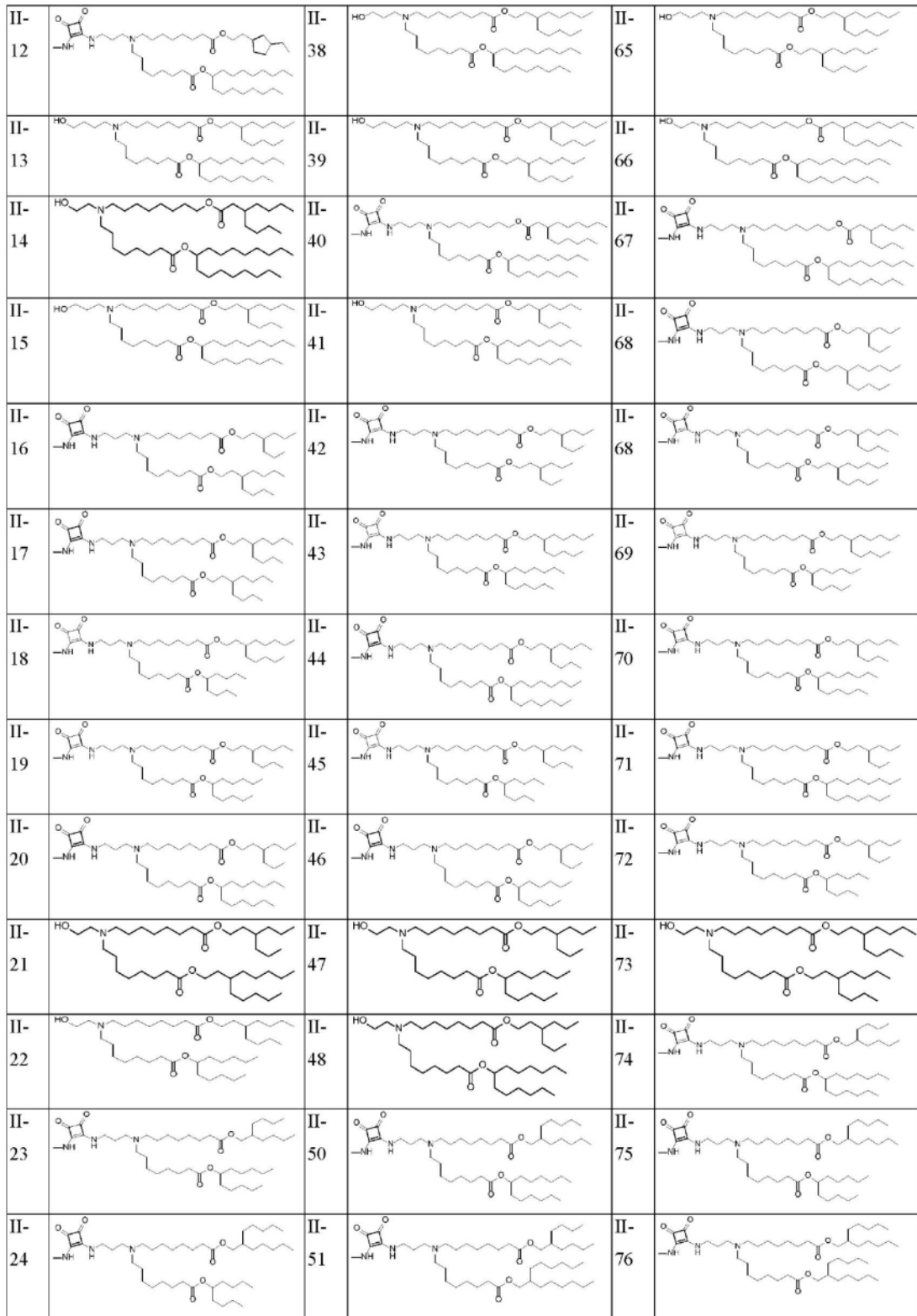
[0350] 在一些实施方案中,可离子化脂质是选自表IL-2的化合物。

[0351] 表IL-2:可离子化脂质

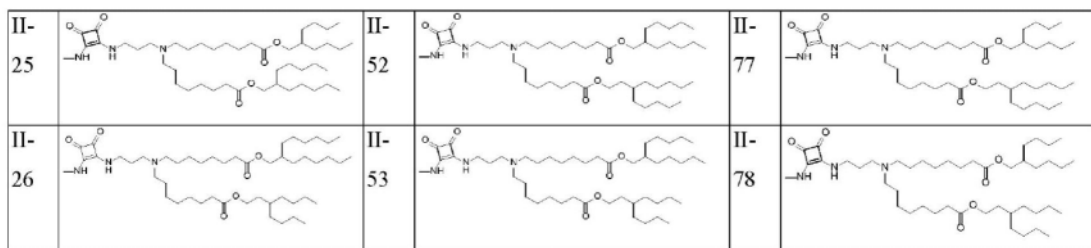
[0352]

化合物#	结构	化合物#	结构	化合物#	结构
II-1		II-27		II-54	
II-2		II-28		II-55	
II-3		II-29		II-56	
II-4		II-30		II-57	
II-5		II-31		II-58	
II-6		II-32		II-59	
II-7		II-33		II-60	
II-8		II-34		II-61	
II-9		II-35		II-62	
II-10		II-36		II-63	
II-11		II-37		II-64	

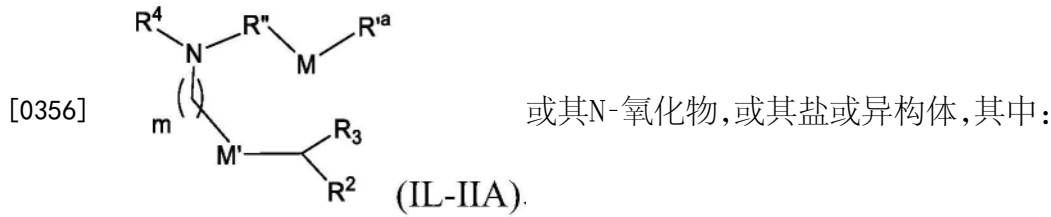
[0353]



[0354]

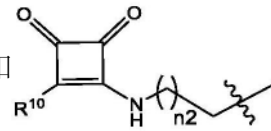


[0355] 在一些方面,可离子化脂质是式(IL-IIA)化合物:



[0357] m选自5、6、7、8和9;

[0358] R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>各自独立地选自由H、C<sub>1-14</sub>烷基和C<sub>2-14</sub>烯基组成的组;

[0359] R<sup>4</sup>选自-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH(其中n选自1、2、3、4和5)和  (其中n<sub>2</sub>选自1、2、3、4、5、6、7、8、9和10;并且R<sup>10</sup>为-N(R)<sub>2</sub>,其中各R独立地选自由C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>2-3</sub>烯基和H组成的组);

[0360] M选自-OC(O)O-、-C(O)O-、-O-M''-O-和-N(R<sup>M</sup>)C(O)-,其中M''为-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>C(O)-,其中z是1、2、3或4;

[0361] M'选自-OC(O)O-、-C(O)O-、-O-M''-O-、-N(R<sup>M</sup>)C(O)O-和-O-N=C(R<sup>M</sup>)-,其中:

[0362] M''为-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>C(O)-、C<sub>1-13</sub>烷基、-B(R\*\*)或-Si(R\*\*)<sub>2</sub>-;

[0363] z是1、2、3或4;

[0364] 各R<sup>M</sup>独立地选自H和C<sub>1-6</sub>烷基;

[0365] 各R\*\*独立地选自H和C<sub>1-12</sub>烷基;

[0366] R<sup>a</sup>是C<sub>1-18</sub>烷基、C<sub>2-18</sub>烯基或-R\*YR\*',其中:

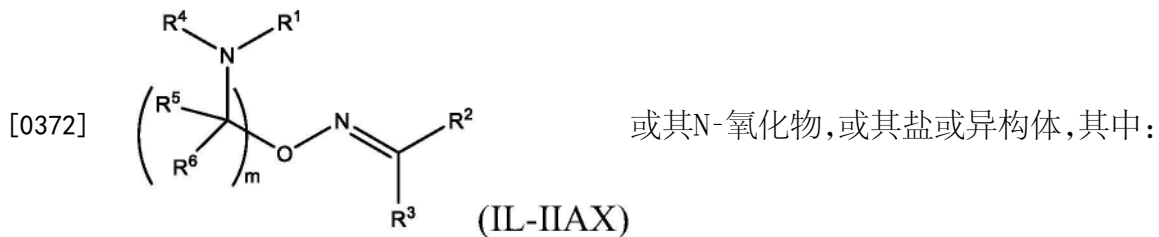
[0367] 各R\*'独立地为C<sub>1-15</sub>烷基;

[0368] 各R\*独立地为C<sub>1-12</sub>烷基;

[0369] 各Y独立地为C<sub>3-6</sub>碳环;并且

[0370] R''为C<sub>3</sub>-C<sub>13</sub>烷基,任选地被OH取代。

[0371] 在一些方面,可离子化脂质是式(IL-IIAX)化合物:



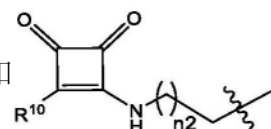
[0373] R<sup>1</sup>为-R''M'R',其中:

[0374] 各R'独立地为C<sub>1-18</sub>烷基;

[0375] M'选自-C(O)O-和-O-N=C(R<sup>M</sup>)-,其中各R<sup>M</sup>独立地选自H和C<sub>1-6</sub>烷基;

[0376] 各R''独立地为C<sub>3-15</sub>烷基;

[0377] R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>各自独立地选自由H、C<sub>1-14</sub>烷基和C<sub>2-14</sub>烯基组成的组;

[0378] R<sup>4</sup>选自-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH(其中n选自1、2、3、4和5)和  (其中n<sub>2</sub>选自1、2、3、4、5、6、7、8、9和10;并且R<sup>10</sup>为-N(R)<sub>2</sub>,其中各R独立地选自由C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>2-3</sub>烯基和H组成的组);

3、4、5、6、7、8、9和10；并且 $R^{10}$ 为 $-N(R)_2$ ，其中各R独立地选自由 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组)；

[0379] 各 $R^5$ 为H；

[0380] 各 $R^6$ 为H；并且

[0381] m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13。

[0382] 在一些实施方案中，可离子化脂质是选自表IL-3的化合物。

[0383] 表IL-3：可离子化脂质

[0384]

化合物#	结构	化合物#	结构	化合物#	结构
III-1		III-23		III-46	
III-2		III-24		III-47	

[0385]

III-3		III-25		III-48	
III-4		III-26		III-49	
III-5		III-27		III-50	
III-6		III-29		III-51	
III-7		III-30		III-52	
III-8		III-31		III-53	
III-9		III-32		III-54	
III-10		III-33		III-55	
III-11		III-34		III-56	
III-12		III-35		III-57	
III-13		III-36		III-58	



[0390]  $R^2$ 和 $R^3$ 各自独立地选自由 $C_{1-14}$ 烷基和 $C_{2-14}$ 烯基组成的组；

[0391]  $R^4$ 选自 $-(CH_2)_nNRTQ$ 、 $-(CH_2)_nNRS(O)_2TQ$ 、 $-(CH_2)_nNRC(O)HTQ$ 和 $-(CH_2)_nNRC(O)TQ$ ，其中n选自1、2、3、4和5；

[0392] T为键或 $C_{1-3}$ 烷基接头、 $C_{2-3}$ 烯基接头或 $C_{2-3}$ 炔基接头；

[0393] Q选自含有1-5个选自N、O和S的杂原子的3-14元杂环、 $C_{3-10}$ 碳环、 $C_{1-6}$ 烷基和 $C_{2-6}$ 烯基，其中所述烷基、所述烯基、所述杂环和所述碳环各自任选地被一个或多个 $R^Q$ 取代；

[0394] 各 $R^Q$ 独立地选自由氧代、羟基、氰基、氨基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $C_{1-6}$ 烷基氨基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷氧基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{1-6}$ 烷酰基、 $-C(O)C_{1-6}$ 烷基和 $-NRC(O)C_{1-6}$ 烷基组成的组；

[0395] 各R独立地选自H、 $C_{1-6}$ 烷基和 $C_{2-6}$ 烯基；

[0396] 各 $R'$ 独立地选自 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基；

[0397] m选自1、2、3、4、5、6、7、8和9；并且

[0398] l选自1、2、3、4、5、6、7、8和9。

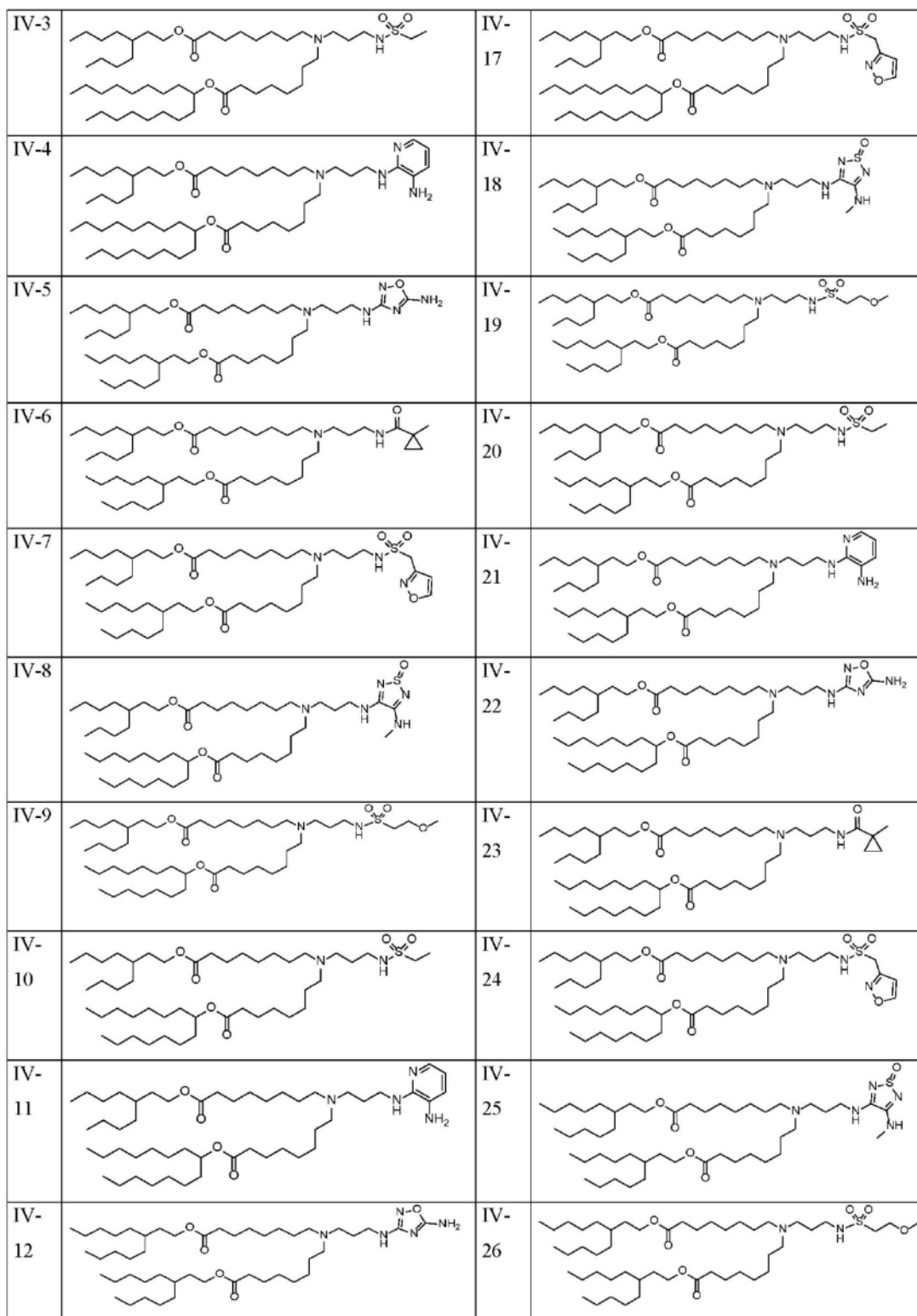
[0399] 在一些实施方案中，可离子化脂质是选自表IL-4的化合物。

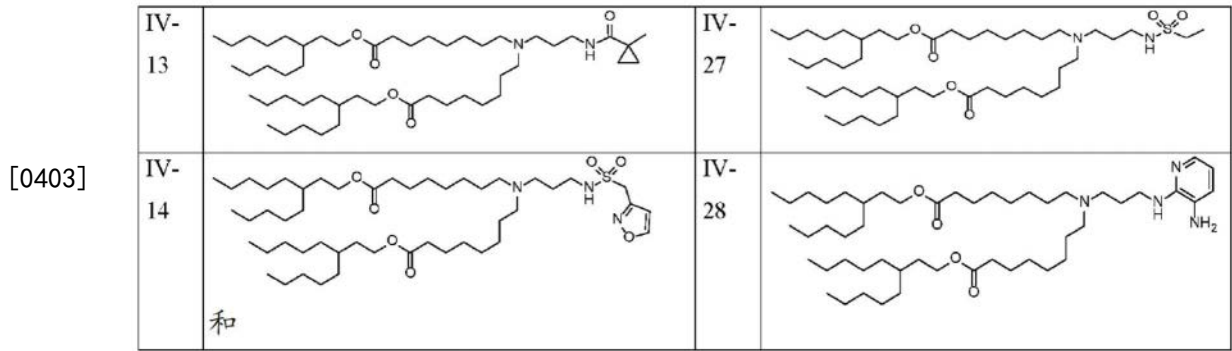
[0400] 表IL-4:可离子化脂质

[0401]

化合物#	结构	化合物#	结构
IV-1		IV-15	
IV-2		IV-16	

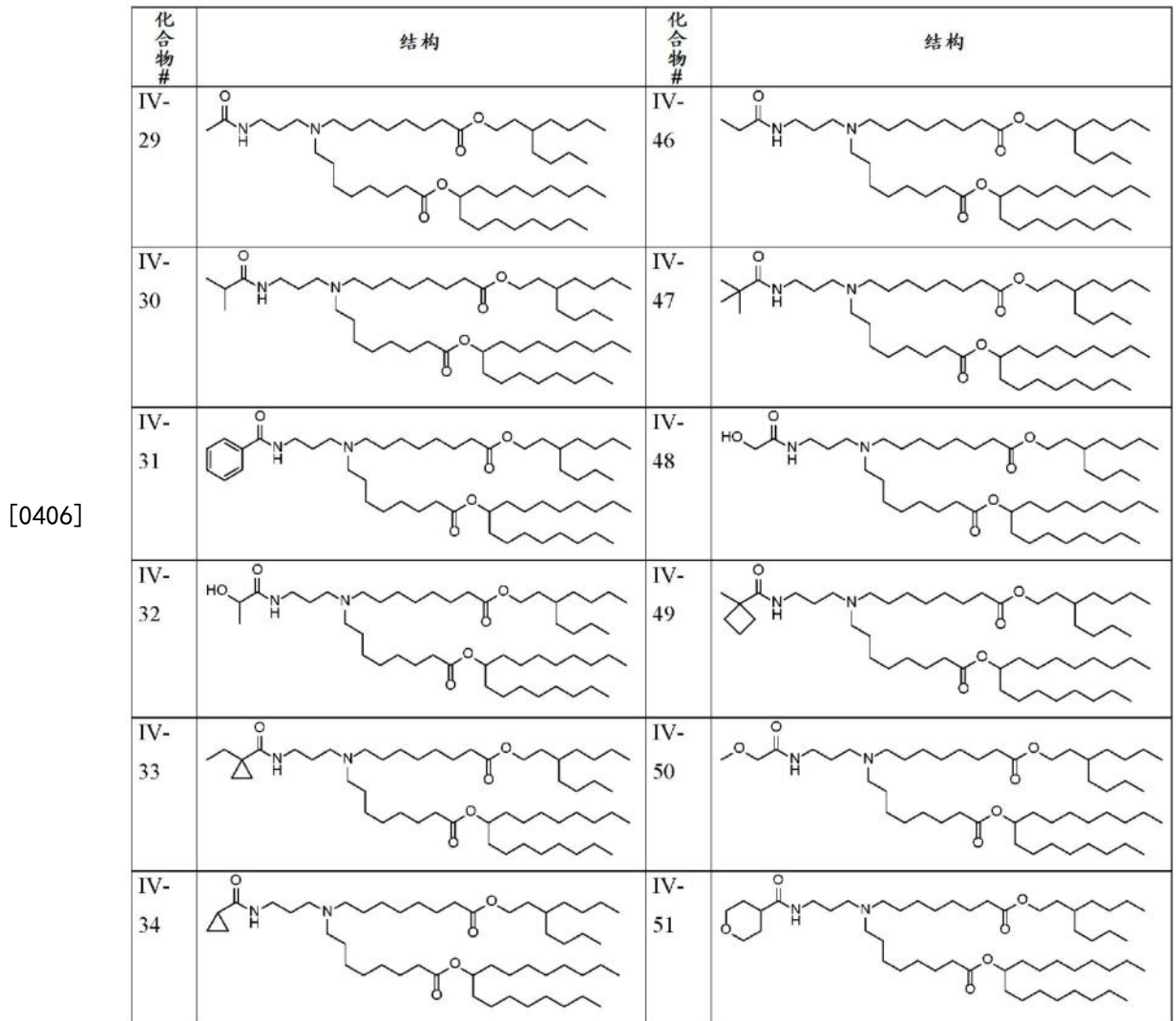
[0402]



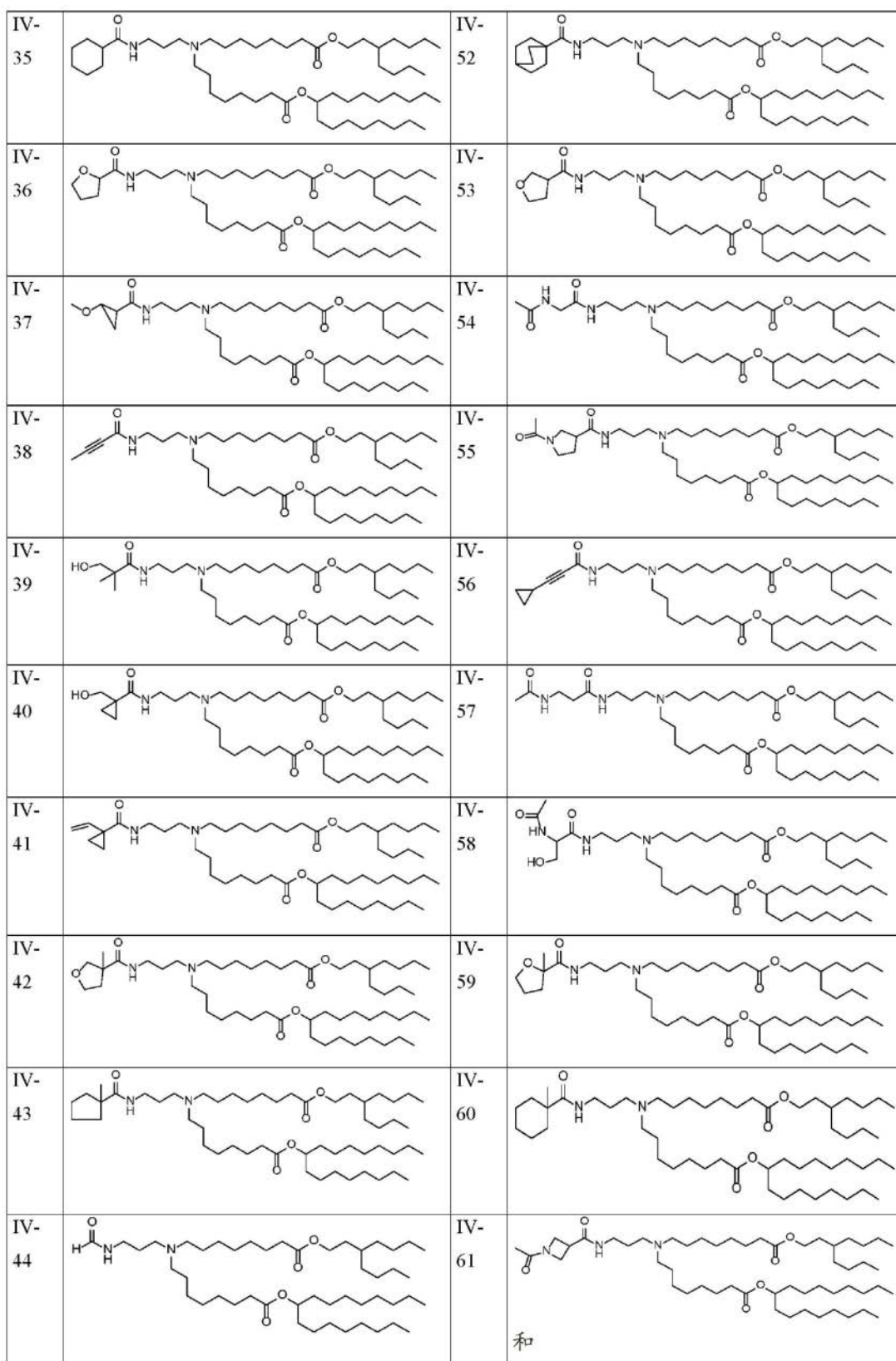


[0404] 在一些实施方案中,可离子化脂质是选自表IL-5的化合物。

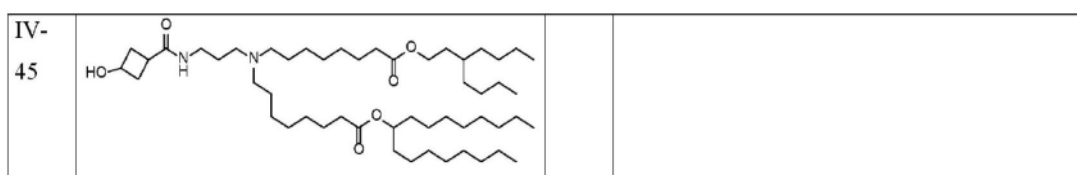
[0405] 表IL-5:可离子化脂质



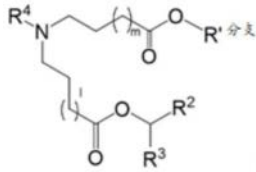
[0407]



[0408]



[0409] 在一些方面,可离子化脂质是式(IL-IIC)化合物:



[0410] 或其N-氧化物,或其盐或异构体,其中:

(IL-IIC)

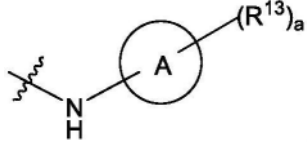
[0411]  $R^1$  分支是 其中 表示连接点;

[0412] 其中 $R^{a\alpha}$ 和 $R^{\beta}$ 各自独立地选自由H和 $C_{1-2}$ 烷基组成的组,其中 $R^{a\alpha}$ 和 $R^{\beta}$ 中的至少一者是 $C_1$ 或 $C_2$ 烷基;

[0413]  $R^1$  选自由 $C_{1-18}$ 烷基和 $C_{2-18}$ 烯基组成的组;

[0414]  $R^2$ 和 $R^3$ 各自独立地选自由 $C_{1-14}$ 烷基和 $C_{2-14}$ 烯基组成的组;

[0415]  $R^4$  为  $-(CH_2)_n Q$ , 其中n独立地选自1、2、3、4和5, 其中Q选自NRS(O)<sub>2</sub>R<sup>SX</sup>和



其中A是含有一个或多个选自N、O和S的杂原子的3-14元杂环;并且a

是1、2、3或4;其中 表示连接点;

[0416] R选自H和 $C_{1-3}$ 烷基;

[0417]  $R^{SX}$ 选自 $C_{3-8}$ 碳环、含有一个或多个选自N、O和S的杂原子的3-14元杂环、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{2-6}$ 烯基、( $C_{1-3}$ 烷氧基) $C_{1-3}$ 烷基、 $(CH_2)_{p_1}O(CH_2)_{p_2}R^{SX1}$ 和 $(CH_2)_{p_1}R^{SX1}$ , 其中所述碳环和所述杂环任选地被一个或多个选自氧代、 $C_{1-6}$ 烷基和( $C_{1-3}$ 烷氧基) $C_{1-3}$ 烷基的基团取代;

[0418]  $R^{SX1}$ 选自 $C(O)NR^{14}R^{14'}$ 、 $C_{3-8}$ 碳环和含有一个或多个选自N、O和S的杂原子的3-14元杂环, 其中所述碳环和所述杂环各自任选地被一个或多个选自氧代、卤基、 $C_{1-3}$ 烷基、( $C_{1-3}$ 烷氧基) $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二-( $C_{1-6}$ 烷基)氨基和 $NH_2$ 的基团取代;

[0419] 各 $R^{13}$ 选自由OH、氧代、卤基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷氧基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二-( $C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $NH_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、CN和 $NO_2$ 组成的组;

[0420]  $R^{14}$ 和 $R^{14'}$ 各自独立地选自由H和 $C_{1-6}$ 烷基组成的组;

[0421] m选自1、2、3、4、5、6、7、8和9;

[0422] l选自1、2、3、4、5、6、7、8和9;

[0423]  $p_1$ 选自1、2、3、4和5;并且

[0424]  $p_2$ 选自1、2、3、4和5。

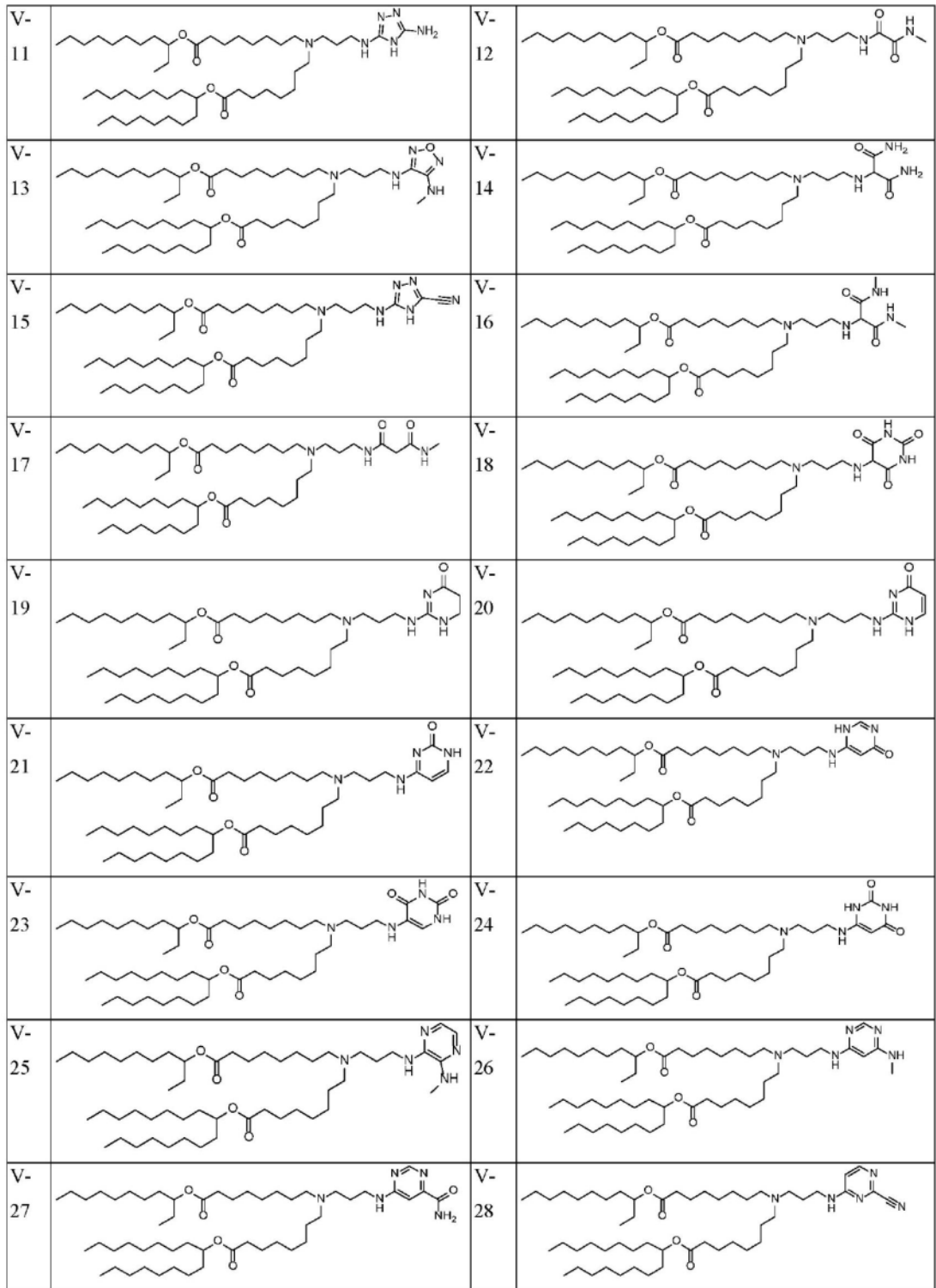
[0425] 在一些实施方案中,可离子化脂质是选自表IL-6的化合物。

[0426] 表IL-6:可离子化脂质

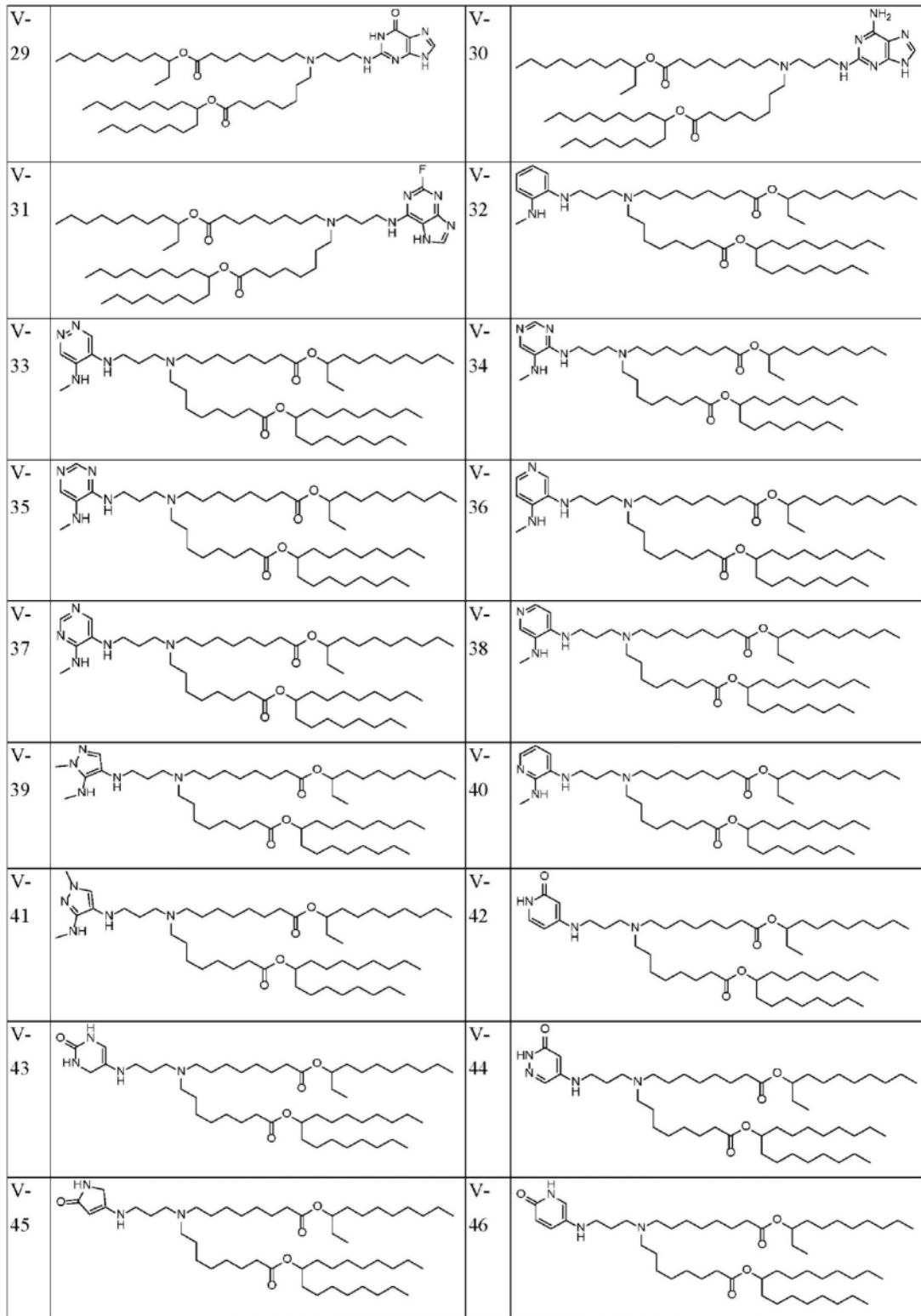
[0427]

化合物#	结构	化合物#	结构
V-1		V-2	
V-3		V-4	
V-5		V-6	
V-7		V-8	
V-9		V-10	

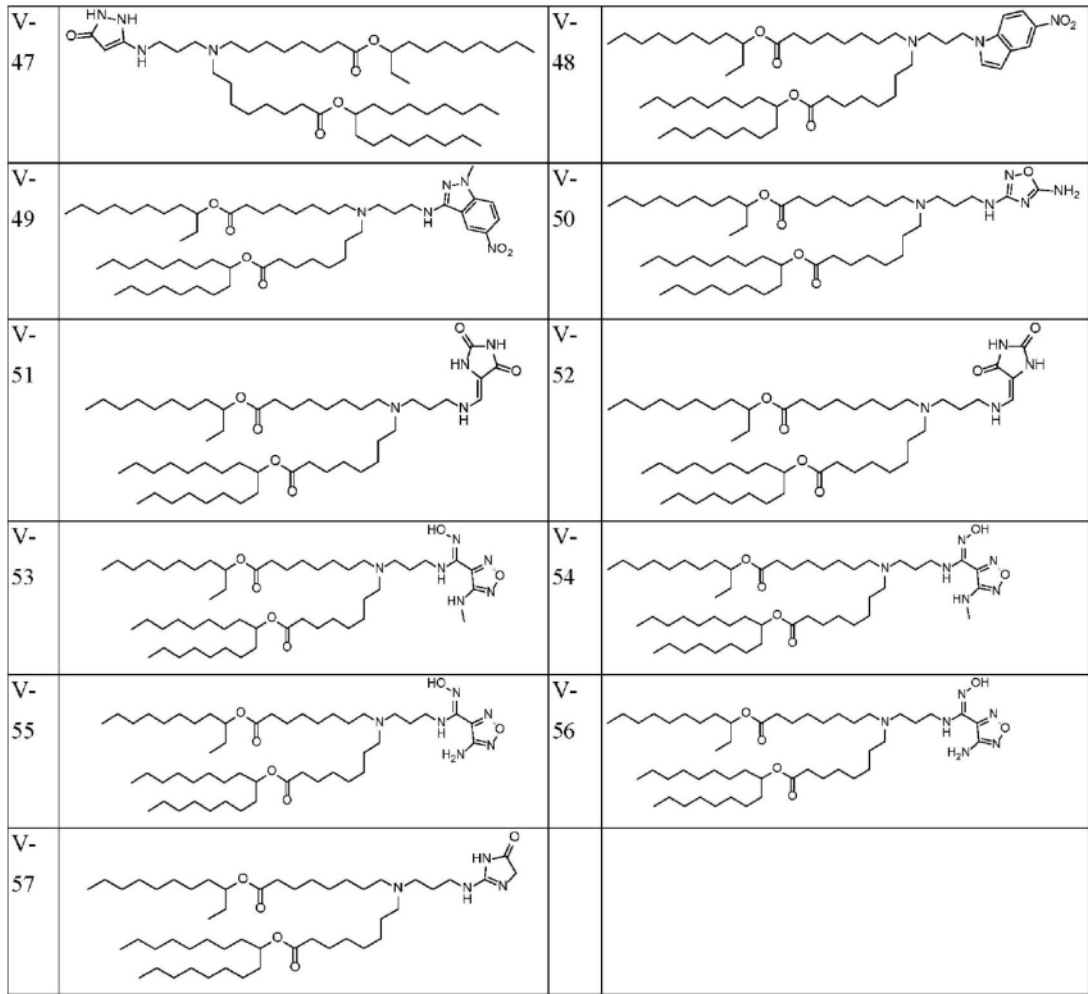
[0428]



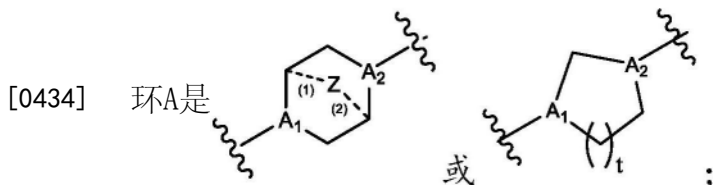
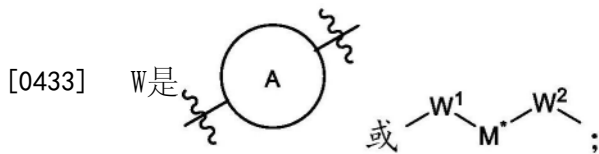
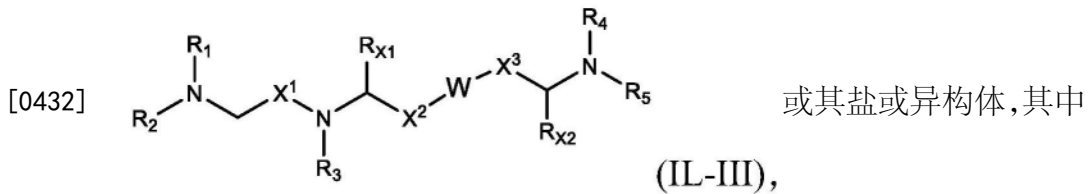
[0429]



[0430]



[0431] 在一些方面,可离子化脂质是式(IL-III)化合物:



[0435] t是1或2;

[0436] A<sub>1</sub>和A<sub>2</sub>各自独立地选自CH或N;

[0437] Z为CH<sub>2</sub>或不存在,其中当Z为CH<sub>2</sub>时,虚线(1)和(2)各自表示单键;并且当Z不存在时,虚线(1)和(2)均不存在;

[0438]  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 和 $R_5$ 独立地选自自由 $C_{5-20}$ 烷基、 $C_{5-20}$ 烯基、 $-R''MR'$ 、 $-R''YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R*OR''$ 组成的组；

[0439]  $R_{X1}$ 和 $R_{X2}$ 各自独立地为H或 $C_{1-3}$ 烷基；

[0440] 各M独立地选自自由 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-SC(O)-$ 、芳基和杂芳基组成的组；

[0441]  $M^*$ 为 $C_1-C_6$ 烷基，

[0442]  $W^1$ 和 $W^2$ 各自独立地选自自由 $-O-$ 和 $-N(R_6)$ 组成的组；

[0443] 各 $R_6$ 独立地选自自由H和 $C_{1-5}$ 烷基组成的组；

[0444]  $X^1$ 、 $X^2$ 和 $X^3$ 独立地选自自由键、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-CHR-$ 、 $-CHY-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-(CH_2)_n-C(O)-$ 、 $-C(O)-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-OC(O)-$ 、 $-C(O)O-(CH_2)_n-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-C(S)-$ 和 $-CH(SH)-$ 组成的组；

[0445] 各Y独立地为 $C_{3-6}$ 碳环；

[0446] 各 $R^*$ 独立地选自自由 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组；

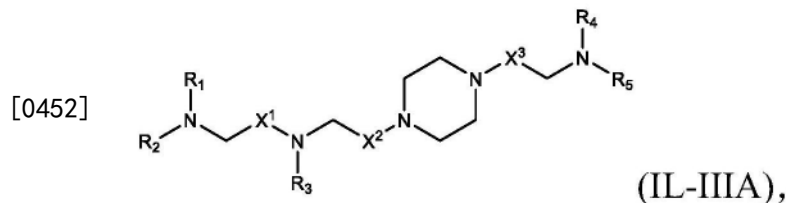
[0447] 各R独立地选自自由 $C_{1-3}$ 烷基和 $C_{3-6}$ 碳环组成的组；

[0448] 各 $R'$ 独立地选自自由 $C_{1-12}$ 烷基、 $C_{2-12}$ 烯基和H组成的组；

[0449] 各 $R''$ 独立地选自自由 $C_{3-12}$ 烷基、 $C_{3-12}$ 烯基和 $-R*MR'$ 组成的组；并且

[0450] n是整数1-6。

[0451] 在一些方面，可离子化脂质是式(IL-III A)化合物：



[0453] 或其盐或异构体，其中

[0454]  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 和 $R_5$ 独立地选自自由 $C_{5-20}$ 烷基、 $C_{5-20}$ 烯基、 $-R''MR'$ 、 $-R''YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R*OR''$ 组成的组；

[0455] 各M独立地选自自由 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、芳基和杂芳基组成的组；

[0456]  $X^1$ 、 $X^2$ 和 $X^3$ 独立地选自自由键、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-CHR-$ 、 $-CHY-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)-$ 、 $-C(O)O-CH_2-$ 、 $-OC(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)O-$ 、 $-CH_2-OC(O)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-C(S)-$ 和 $-CH(SH)-$ 组成的组；

[0457] 各Y独立地为 $C_{3-6}$ 碳环；

[0458] 各 $R^*$ 独立地选自自由 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组；

[0459] 各R独立地选自自由 $C_{1-3}$ 烷基和 $C_{3-6}$ 碳环组成的组；

[0460] 各 $R'$ 独立地选自自由 $C_{1-12}$ 烷基、 $C_{2-12}$ 烯基和H组成的组；并且

[0461] 各 $R''$ 独立地选自自由 $C_{3-12}$ 烷基和 $C_{3-12}$ 烯基组成的组。

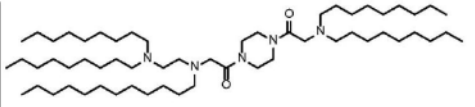
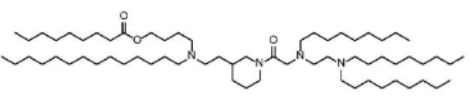
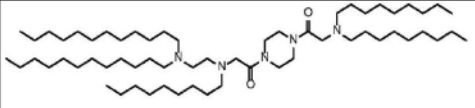
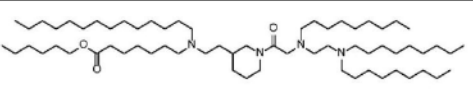
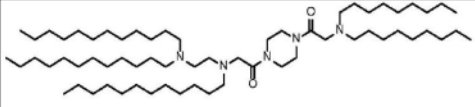
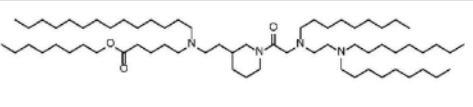
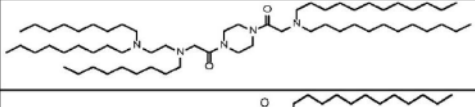
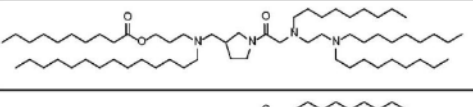
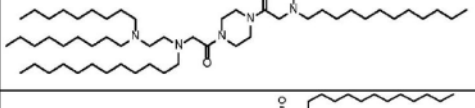
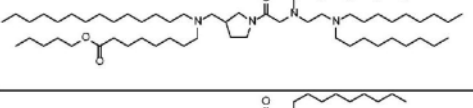
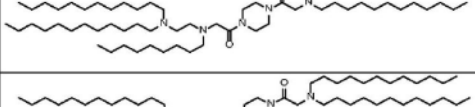
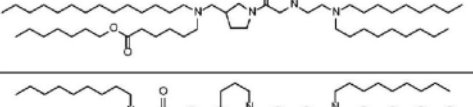
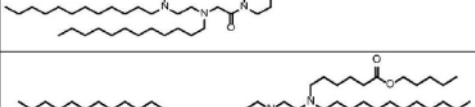
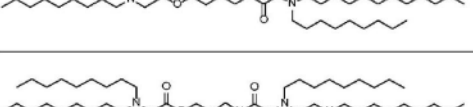
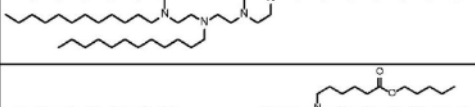

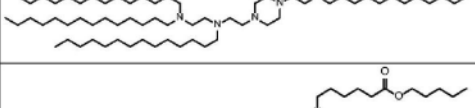
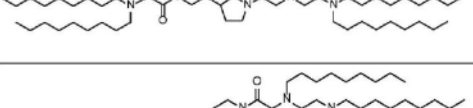
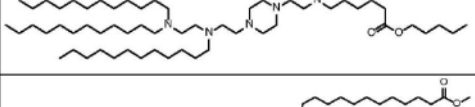
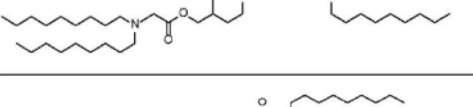
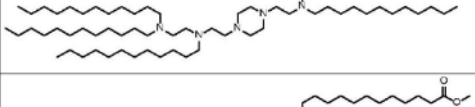
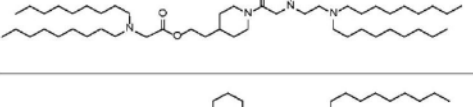
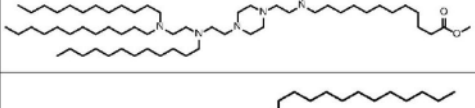
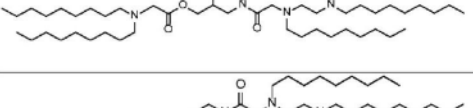
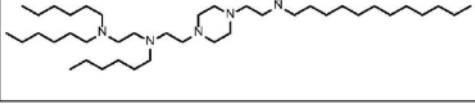
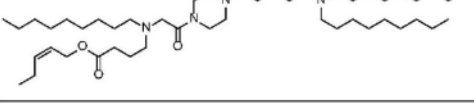
[0462] 在一些实施方案中，可离子化脂质是选自表IL-7的化合物。

[0463] 表IL-7:可离子化脂质

[0464]

化合物#	结构	化合物#	结构
VI-1		VI-91	
VI-2		VI-92	
VI-3		VI-93	
VI-4		VI-94	

[0465]

VI-5		VI-95	
VI-6		VI-96	
VI-7		VI-97	
VI-8		VI-98	
VI-9		VI-99	
VI-10		VI-100	
VI-11		VI-101	
VI-12		VI-102	
VI-13		VI-103	
VI-14		VI-104	
VI-15		VI-105	
VI-16		VI-106	
VI-17		VI-107	

[0466]

VI-18		VI-108	
VI-19		VI-109	
VI-20		VI-110	
VI-21		VI-111	
VI-22		VI-112	
VI-23		VI-113	
VI-24		VI-114	
VI-25		VI-115	
VI-26		VI-116	
VI-27		VI-117	
VI-28		VI-118	
VI-29		VI-119	
VI-30		VI-120	

[0467]

VI-31		VI-121	
VI-32		VI-122	
VI-33		VI-123	
VI-34		VI-124	
VI-35		VI-125	
VI-36		VI-126	
VI-37		VI-127	
VI-38		VI-128	
VI-39		VI-129	
VI-40		VI-130	
VI-41		VI-131	
VI-IV		VI-132	
VI-42		VI-133	

[0468]

VI-43		VI-134	
VI-44		VI-135	
VI-45		VI-136	
VI-46		VI-137	
VI-47		VI-138	
VI-48		VI-139	
VI-49		VI-140	
VI-50		VI-141	
VI-51		VI-142	
VI-52		VI-143	

[0469]

VI-53		VI-144	
VI-54		VI-145	
VI-55		VI-146	
VI-56		VI-147	
VI-57		VI-148	
VI-58		VI-149	
VI-59		VI-150	
VI-60		VI-151	
VI-61		VI-152	
VI-62		VI-153	

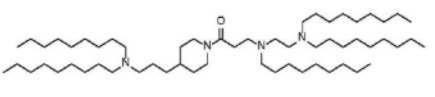
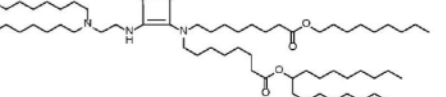
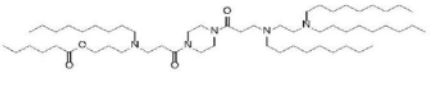
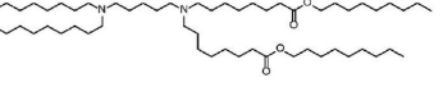
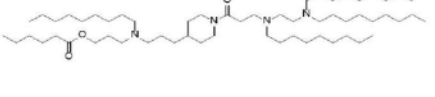
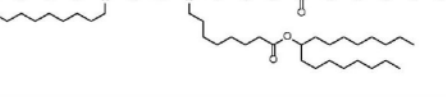
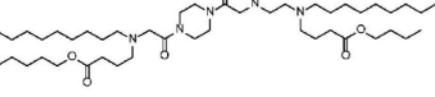
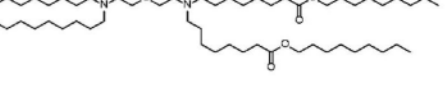
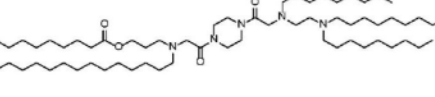
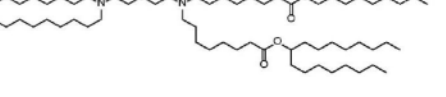
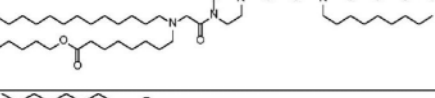
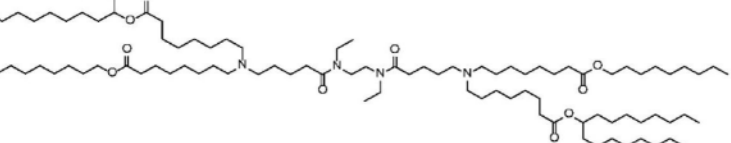
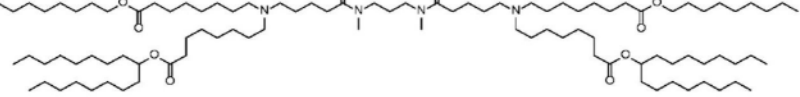
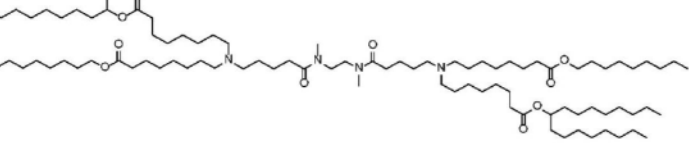
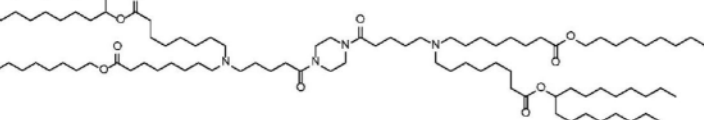
[0470]

VI-63		VI-154	
VI-64		VI-155	
VI-65		VI-156	
VI-66		VI-157	
VI-67		VI-158	
VI-68		VI-159	
VI-69		VI-160	
VI-70		VI-161	
VI-71		VI-162	
VI-72		VI-163	
VI-73		VI-164	

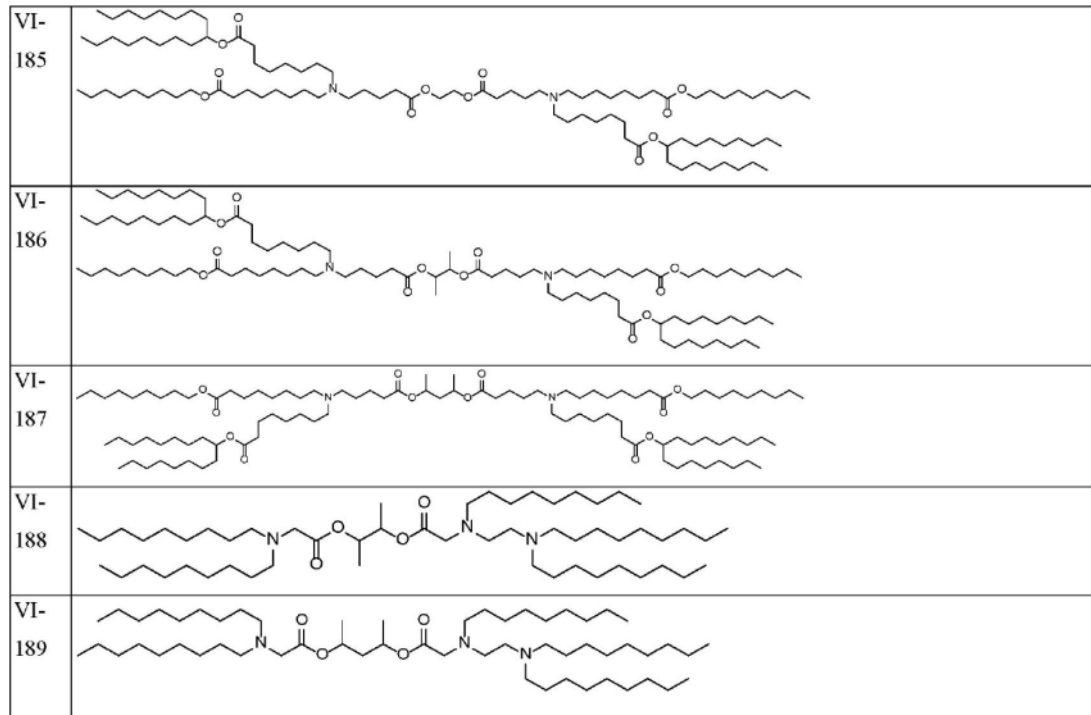
[0471]

VI-74		VI-165	
VI-75		VI-166	
VI-76		VI-167	
VI-77		VI-168	
VI-78		VI-169	
VI-79		VI-170	
VI-80		VI-171	
VI-81		VI-172	
VI-82		VI-173	
VI-83		VI-174	
VI-84		VI-175	

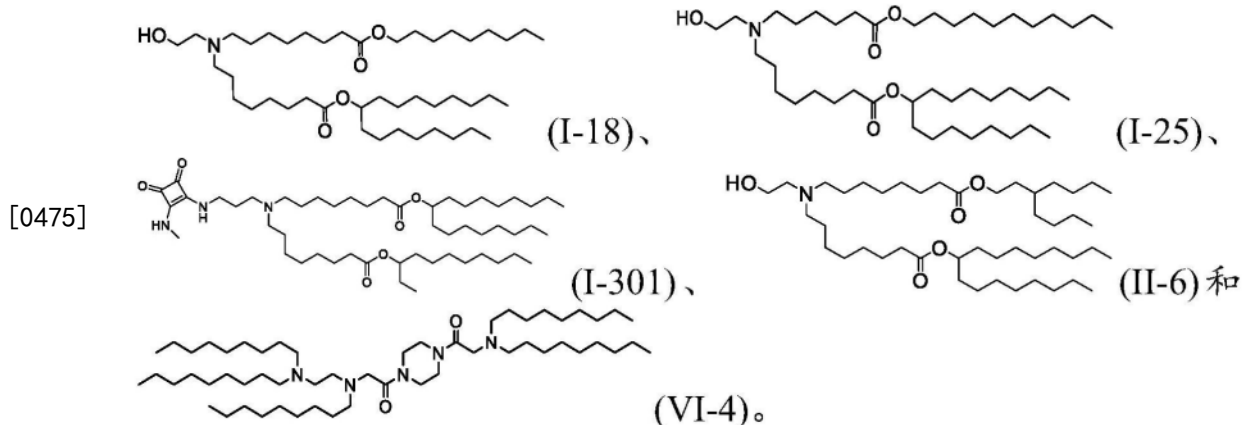
[0472]

VI-85		VI-176	
VI-86		VI-177	
VI-87		VI-178	
VI-88		VI-179	
VI-89		VI-180	
VI-90			
VI-181			
VI-182			
VI-183			
VI-184			

[0473]



[0474] 在一些实施方案中,可离子化脂质是选自以下的化合物:

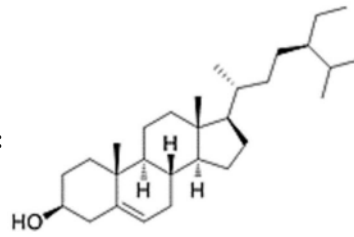


[0476] 在一些实施方案中,可离子化脂质是公布的国际专利申请号W0/2017/049245、W0/2017/112865、W0/2018/170306、W0/2018/232120、W0/2021/055835、W0/2021/055833和W0/2021/055849中所公开的脂质,所述国际专利申请各自以引用的方式整体并入本文中。

[0477] 结构脂质

[0478] 脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可包括一种或多种结构脂质。结构脂质可选自但不限于胆固醇、粪甾醇、谷甾醇、麦角固醇、菜油甾醇、豆甾醇、菜子甾醇、番茄碱、番茄苷、熊果酸、 $\alpha$ -生育酚和它们的混合物组成的组。在一些实施方案中,结构脂质是胆固醇。在一些实施方案中,结构脂质包括胆固醇和皮质类固醇(诸如泼尼松龙(prednisolone)、地塞米松(dexamethasone)、泼尼松(prednisone)和氢化可的松(hydrocortisone))或它们的

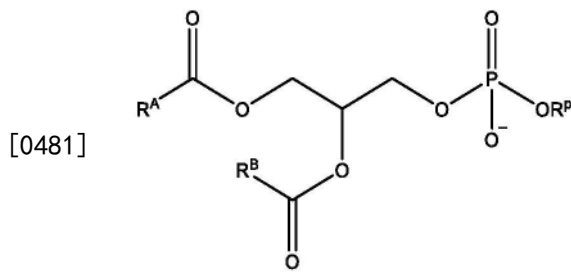
组合。在一些实施方案中,结构脂质是:



(SL-1)。

[0479] 磷脂

[0480] 脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可包括一种或多种磷脂,诸如一种或多种(多)不饱和脂质。磷脂可组装成一个或多个脂质双层。一般来说,磷脂可包括磷脂部分和一个或多个脂肪酸部分。例如,磷脂可以是根据式(PhL-IV)的脂质:



[0482] 其中 $R_p$ 表示磷脂部分并且 $R^A$ 和 $R^B$ 表示具有或不具有不饱和的脂肪酸部分,所述脂肪酸部分可以是相同或不同的。磷脂部分可选自由磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、2-溶血磷脂酰胆碱和鞘磷脂组成的非限制性组。脂肪酸部分可选自由月桂酸、肉豆蔻酸、肉豆蔻油酸、棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸、油酸、亚麻油酸、 $\alpha$ -亚麻酸、芥子酸、植烷酸、花生酸、花生油酸、二十碳五烯酸、山嵛酸、二十二碳五烯酸和二十二碳六烯酸组成的非限制性组。还预期非天然物质,包括具有包括分支、氧化、环化和炔在内的修饰和取代的天然物质。例如,磷脂可用一种或多种炔(例如,其中一个或多个双键被三键置换的烯基)官能化或与所述一种或多种炔交联。在适当反应条件下,炔基可在暴露于叠氮化物时经历铜催化的环加成。此类反应可用于官能化脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的脂质双层以促进膜渗透或细胞识别,或可用于使脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)缀合至可用组分,诸如靶向或成像部分(例如染料)。

[0483] 可用于所述组合物和方法的磷脂可选自由1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二(十一烷酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DUPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二-0-十八烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0Diether PC)、1-油酰基-2-胆固醇基半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(0ChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二(二十二碳六烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二(二十二碳六烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-外消旋-

(1-甘油)钠盐(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二硬脂酰基-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺(DMPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰胆碱(SOPC)、鞘磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)和它们的混合物组成的非限制性组。在一些实施方案中,脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)包括DSPC。在某些实施方案中,脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)包括DOPE。在一些实施方案中,脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)包括DSPC和DOPE两者。

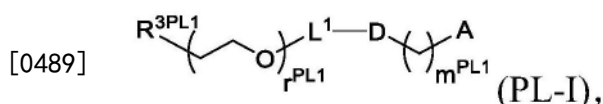
[0484] PEG脂质

[0485] 脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可包括一种或多种PEG脂质或PEG修饰的脂质。此类物质可替代地称作PEG化脂质。PEG脂质是被聚乙二醇修饰的脂质。PEG脂质可选自由PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺(PEG-CER)、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油(PEG-DEG)、PEG修饰的二烷基甘油和它们的混合物组成的非限制性组。例如,PEG脂质可以是PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC或PEG-DSPE脂质。

[0486] 在某些实施方案中,PEG脂质选自由PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油和PEG修饰的二烷基甘油组成的组。

[0487] 在某些实施方案中,PEG脂质选自由1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(PEG-DMG)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](PEG-DSPE)、PEG-二硬脂基甘油(PEG-DSG)、PEG-二棕榈油烯基、PEG-二油烯基、PEG-二硬脂基、PEG-二酰基甘油酰胺(diacylglycamide)(PEG-DAG)、PEG-二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(PEG-DPPE)或PEG-1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-胺(PEG-c-DMA)组成的组。例如,在一些实施方案中,PEG脂质是PEG-DMG。

[0488] 在某些实施方案中,PEG脂质是式(PL-I)化合物:



[0490] 或其盐,其中:

[0491]  $R^{3PL1}$ 为 $-OR^{0PL1}$ ;

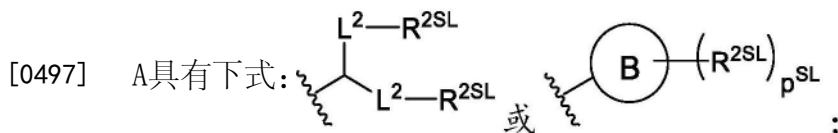
[0492]  $R^{0PL1}$ 为氢、任选取代的烷基或氧保护基;

[0493]  $r^{PL1}$ 是1与100之间的整数,包括1和100;

[0494]  $L^1$ 为任选取代的 $C_{1-10}$ 亚烷基,其中所述任选取代的 $C_{1-10}$ 亚烷基的至少一个亚甲基独立地被任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、 $-O-$ 、 $-N(R^{NPL1})-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{NPL1})-$ 、 $-NR^{NPL1}C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^{NPL1})-$ 、 $-NR^{NPL1}C(O)O-$ 或 $-NR^{NPL1}C(O)N(R^{NPL1})-$ 置换;

[0495] D是通过点击化学获得的部分或在生理条件下可裂解的部分;

[0496]  $m^{PL1}$ 是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;



[0498]  $L^2$ 的各情况独立地为键或任选取代的 $C_{1-6}$ 亚烷基,其中所述任选取代的 $C_{1-6}$ 亚烷基的一个亚甲基单元任选地被 $-O-$ 、 $-N(R^{NPL1})-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{NPL1})-$ 、 $-NR^{NPL1}C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^{NPL1})-$ 、 $-NR^{NPL1}C(O)O-$ 或 $-NR^{NPL1}C(O)N(R^{NPL1})-$ 置换;

[0499]  $R^{2SL}$ 的各情况独立地为任选取代的 $C_{1-30}$ 烷基、任选取代的 $C_{1-30}$ 烯基或任选取代的 $C_{1-30}$ 炔基;任选地,其中 $R^{2SL}$ 的一个或多个亚甲基单元独立地被任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、 $-N(R^{NPL1})-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{NPL1})-$ 、 $-NR^{NPL1}C(O)-$ 、 $-NR^{NPL1}C(O)N(R^{NPL1})-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^{NPL1})-$ 、 $-NR^{NPL1}C(O)O-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(=NR^{NPL1})-$ 、 $-C(=NR^{NPL1})N(R^{NPL1})-$ 、 $-NR^{NPL1}C(=NR^{NPL1})-$ 、 $-NR^{NPL1}C(=NR^{NPL1})N(R^{NPL1})-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)N(R^{NPL1})-$ 、 $-NR^{NPL1}C(S)-$ 、 $-NR^{NPL1}C(S)N(R^{NPL1})-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-OS(O)-$ 、 $-S(O)O-$ 、 $-OS(O)O-$ 、 $-OS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2O-$ 、 $-OS(O)_2O-$ 、 $-N(R^{NPL1})S(O)-$ 、 $-S(O)N(R^{NPL1})-$ 、 $-N(R^{NPL1})S(O)N(R^{NPL1})-$ 、 $-OS(O)N(R^{NPL1})-$ 、 $-N(R^{NPL1})S(O)O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-N(R^{NPL1})S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R^{NPL1})-$ 、 $-N(R^{NPL1})S(O)_2N(R^{NPL1})-$ 、 $-OS(O)_2N(R^{NPL1})-$ 或 $-N(R^{NPL1})S(O)_2O-$ 置换;

[0500]  $R^{NPL1}$ 的各情况独立地为氢、任选取代的烷基或氮保护基;

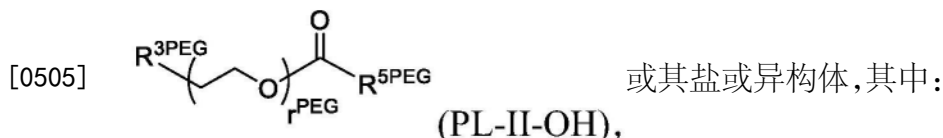
[0501] 环B为任选取代的碳环基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基;并且

[0502]  $p^{SL}$ 是1或2。

[0503] 在某些实施方案中,PEG脂质是式(PL-I-OH)化合物:



[0504] 在某些实施方案中,PEG脂质是式(PL-II-OH)化合物:



[0506]  $R^{3PEG}$ 为 $-OR^0$ ;

[0507]  $R^0$ 为氢、 $C_{1-6}$ 烷基或氧保护基;

[0508]  $r^{PEG}$ 是1与100之间的整数;

[0509]  $R^{5PEG}$ 为 $C_{10-40}$ 烷基、 $C_{10-40}$ 烯基或 $C_{10-40}$ 炔基;并且任选地, $R^{5PEG}$ 的一个或多个亚甲基独立地被 $C_{3-10}$ 亚碳环基、4至10元亚杂环基、 $C_{6-10}$ 亚芳基、4至10元亚杂芳基、 $-N(R^{NPEG})-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^{NPEG})-$ 、 $-NR^{NPEG}C(O)-$ 、 $-NR^{NPEG}C(O)N(R^{NPEG})-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^{NPEG})-$ 、 $-NR^{NPEG}C(O)O-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(=NR^{NPEG})-$ 、 $-C(=NR^{NPEG})N(R^{NPEG})-$ 、 $-NR^{NPEG}C(=NR^{NPEG})-$ 、 $-NR^{NPEG}C(=NR^{NPEG})N(R^{NPEG})-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)N(R^{NPEG})-$ 、 $-NR^{NPEG}C(S)-$ 、 $-NR^{NPEG}C(S)N(R^{NPEG})-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-OS(O)-$ 、 $-S(O)O-$ 、 $-OS(O)O-$ 、 $-OS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2O-$ 、 $-OS(O)_2O-$ 、 $-N(R^{NPEG})S(O)-$ 、 $-S(O)N(R^{NPEG})-$ 、 $-N(R^{NPEG})S(O)N(R^{NPEG})-$ 、 $-OS(O)N(R^{NPEG})-$ 、 $-N(R^{NPEG})S(O)O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-N(R^{NPEG})S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R^{NPEG})-$ 、 $-N(R^{NPEG})S(O)_2N(R^{NPEG})-$ 、 $-OS(O)_2N(R^{NPEG})-$ 或 $-N(R^{NPEG})S(O)_2O-$ 置换;

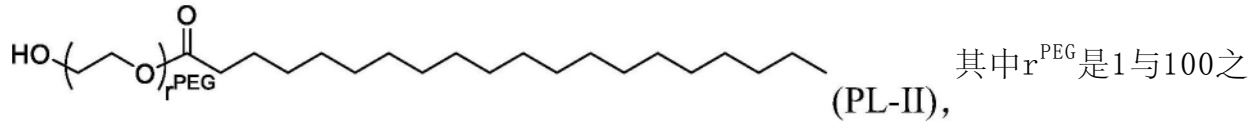
(R<sup>NPEG</sup>) - 或 -N(R<sup>NPEG</sup>)S(O)<sub>2</sub>O- 置换; 并且

[0510] R<sup>NPEG</sup> 的各情况独立地为氢、C<sub>1-6</sub> 烷基或氮保护基。

[0511] 在某些实施方案中, 在式 (PL-II-OH) 的 PEG 脂质中, r 是 40 与 50 之间的整数。例如, r 选自自由 40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 和 50 组成的组。例如, r 是 45。

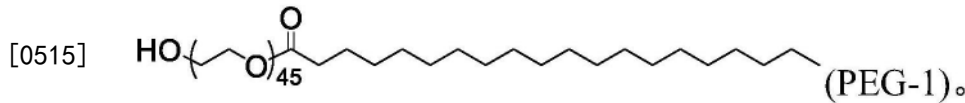
[0512] 在某些实施方案中, 在式 (PL-II-OH) 的 PEG 脂质中, R<sup>5</sup> 为 C<sub>17</sub> 烷基。

[0513] 在某些实施方案中, PEG 脂质是式 (PL-II) 化合物:

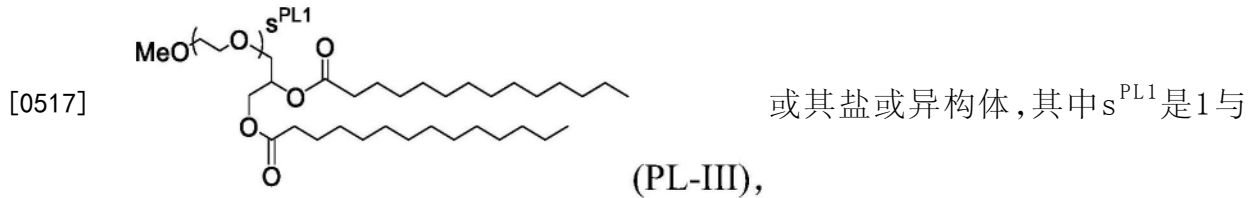


间的整数。

[0514] 在某些实施方案中, PEG 脂质是式 (PEG-1) 化合物:

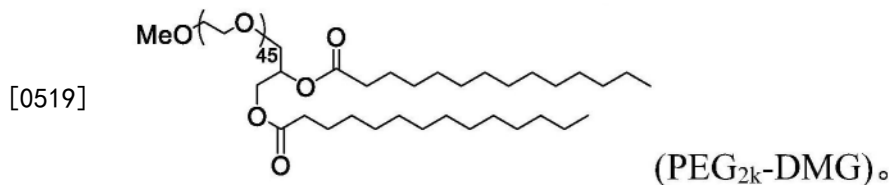


[0516] 在某些实施方案中, PEG 脂质是式 (PL-III) 化合物:



100 之间的整数。

[0518] 在某些实施方案中, PEG 脂质是下式的化合物:



[0520] 在某些实施方案中, 式 (PL-I)、(PL-I-OH)、(PL-II)、(PL-II-OH)、(PL-III)、PEG<sub>2k</sub>-DMG 或 PEG-1 的脂质并入纳米粒子制剂中可改进脂质纳米粒子制剂的药物动力学和/或生物分布。例如, 式 (PL-II-OH)、(PL-IIa-OH)、(PL-II) 或 PEG-1 的脂质并入纳米粒子制剂中可降低加速血液清除 (ABC) 效应。

[0521] 佐剂

[0522] 在一些实施方案中, 包括本文所述的一种或多种脂质的脂质纳米粒子 (例如空 LNP 或负载 LNP) 还可包括一种或多种佐剂, 例如吡喃葡萄糖基脂质佐剂 (GLA)、CpG 寡脱氧核苷酸 (例如 A 或 B 类)、poly(I:C)、氢氧化铝和 Pam3CSK4。

[0523] 治疗剂

[0524] 脂质纳米粒子 (例如空 LNP 或负载 LNP) 可包括一种或多种治疗剂和/或预防剂。本公开提供向哺乳动物细胞或器官递送治疗剂和/或预防剂、在哺乳动物细胞中产生所关注的多肽和治疗有需要的哺乳动物的疾病或病症的方法, 所述方法包括向哺乳动物施用包括治疗剂和/或预防剂的脂质纳米粒子 (例如空 LNP 或负载 LNP) 和/或使哺乳动物细胞与包括治疗剂和/或预防剂的脂质纳米粒子 (例如空 LNP 或负载 LNP) 接触。

[0525] 治疗剂和/或预防剂包括生物学活性物质并且替代地称作“活性剂”。治疗剂和/或预防剂可以是一旦递送至细胞或器官即在所述细胞、器官或其他身体组织或系统中引起所需变化的物质。此类物质可用于治疗一种或多种疾病、病症或疾患。在一些实施方案中,治疗剂和/或预防剂是可用于治疗特定疾病、病症或疾患的小分子药物。

[0526] 在一些实施方案中,治疗剂和/或预防剂是疫苗、引起免疫反应的化合物(例如,编码蛋白质或多肽或肽的多核苷酸或核酸分子或者蛋白质或多肽或肽)和/或另一治疗剂和/或预防剂。疫苗包括能够提供针对与传染病相关的一种或多种疾患的免疫性的化合物和制剂并且可包括编码传染病源性抗原和/或表位的mRNA。疫苗还包括指导针对癌细胞的免疫反应的化合物和制剂并且可包括编码肿瘤细胞源性抗原、表位和/或新表位的mRNA。在一些实施方案中,疫苗和/或能够引起免疫反应的化合物经由本公开的组合物肌肉施用。

[0527] 在其他实施方案中,治疗剂和/或预防剂是蛋白质,例如增加或补充所关注的天然存在的蛋白质所需的蛋白质。此类蛋白质或多肽可以是天然存在的,或可使用本领域中已知的方法进行修饰,例如以延长半衰期。示例性蛋白质是细胞内、跨膜或分泌性的。

[0528] 多核苷酸和核酸

[0529] 在一些实施方案中,治疗剂是增强(即,增加、刺激、上调)蛋白质表达的剂。可用于增强蛋白质表达的治疗剂类型的非限制性实例包括RNA、mRNA、dsRNA、CRISPR/Cas9技术、ssDNA和DNA(例如表达载体)。上调蛋白质表达的剂可上调天然存在或非天然存在的蛋白质(例如已进行修饰以改进半衰期的嵌合蛋白,或包含所需氨基酸变化的蛋白质)的表达。示例性蛋白质包括细胞内、跨膜或分泌性蛋白质、肽或多肽。

[0530] 在一些实施方案中,治疗剂是DNA治疗剂。DNA分子可以是双链DNA、单链DNA(ssDNA)或作为部分双链DNA的分子(即,具有双链部分和单链部分)。在一些情况下,DNA分子是三链的或是部分三链的(即,具有三链部分和双链部分)。DNA分子可以是环状DNA分子或直链DNA分子。

[0531] DNA治疗剂可以是能够将基因转移至细胞中,例如编码转录物并且可表达转录物的DNA分子。在其他实施方案中,DNA分子是合成分子,例如体外产生的合成DNA分子。在一些实施方案中,DNA分子是重组分子。非限制性示例性DNA治疗剂包括质粒表达载体和病毒表达载体。

[0532] 本文所述的DNA治疗剂(例如DNA载体)可包括多种不同特征。本文所述的DNA治疗剂(例如DNA载体)可包括非编码DNA序列。例如,DNA序列可包括针对基因的至少一种调节元件,例如启动子、增强子、终止元件、多腺苷酸化信号元件、剪接信号元件等。在一些实施方案中,非编码DNA序列是内含子。在一些实施方案中,非编码DNA序列是转座子。在一些实施方案中,本文所述的DNA序列可具有可操作性连接至转录活性基因的非编码DNA序列。在其他实施方案中,本文所述的DNA序列可具有未连接至基因的非编码DNA序列,即所述非编码DNA不调节所述DNA序列上的基因。

[0533] 在一些实施方案中,在本公开的负载LNP中,所述一种或多种治疗剂和/或预防剂是核酸。在一些实施方案中,所述一种或多种治疗剂和/或预防剂选自由核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)组成的组。

[0534] 例如,在一些实施方案中,当所述治疗剂和/或预防剂是DNA时,所述DNA选自由双链DNA、单链DNA(ssDNA)、部分双链DNA、三链DNA和部分三链DNA组成的组。在一些实施方案

中,所述DNA选自由环状DNA、直链DNA和它们的混合物组成的组。

[0535] 在一些实施方案中,在本公开的负载LNP中,所述一种或多种治疗剂和/或预防剂选自由质粒表达载体、病毒表达载体和它们的混合物组成的组。

[0536] 例如,在一些实施方案中,当所述治疗剂和/或预防剂是RNA时,所述RNA选自由单链RNA、双链RNA(dsRNA)、部分双链RNA和它们的混合物组成的组。在一些实施方案中,所述RNA选自由环状RNA、直链RNA和它们的混合物组成的组。

[0537] 例如,在一些实施方案中,当所述治疗剂和/或预防剂是RNA时,所述RNA选自由短干扰RNA(siRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、RNA干扰(RNAi)分子、微小RNA(miRNA)、安塔够妙(antagomir)、反义RNA、核酶、Dicer-底物RNA(dsRNA)、小发夹RNA(shRNA)、信使RNA(mRNA)、锁核酸(LNA)和CRISPR/Cas9技术和它们的混合物组成的组。

[0538] 例如,在一些实施方案中,当所述治疗剂和/或预防剂是RNA时,所述RNA选自由小干扰RNA(siRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、Dicer-底物RNA(dsRNA)、小发夹RNA(shRNA)、信使RNA(mRNA)和它们的混合物组成的组。

[0539] 在一些实施方案中,所述一种或多种治疗剂和/或预防剂是mRNA。在一些实施方案中,所述一种或多种治疗剂和/或预防剂是修饰的mRNA(mmRNA)。

[0540] 在一些实施方案中,所述一种或多种治疗剂和/或预防剂是并入微小RNA结合位点(miR结合位点)的mRNA。此外,在一些实施方案中,mRNA包括茎环、链终止核苷、polyA序列、多腺苷酸化信号和/或5'帽结构中一者或多者。

[0541] mRNA可以是天然或非天然存在的mRNA。mRNA可包括一个或多个如下文所述的修饰的核碱基、核苷或核苷酸,在所述情况下它可称作“修饰的mRNA”或“mmRNA”。如本文所述,“核苷”是定义为含有与有机碱基(例如,嘌呤或嘧啶)或其衍生物(本文中还可称作“核碱基”)组合的糖分子(例如,戊糖或核糖)或其衍生物的化合物。如本文所述,“核苷酸”是定义为包括磷酸酯基的核苷。

[0542] mRNA可包括5'非翻译区(5'-UTR)、3'非翻译区(3'-UTR)和/或编码区(例如开放阅读框)。mRNA可包括任何合适数目的碱基对,包括数十个(例如,10、20、30、40、50、60、70、80、90或100个)、数百个(例如,200、300、400、500、600、700、800或900个)或数千个(例如,1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000个)碱基对。任何数目(例如,全部、一些或无)的核碱基、核苷或核苷酸均可以是规范物质的类似物,被取代、被修饰或以其他方式非天然存在。在某些实施方案中,所有的特定核碱基类型均可被修饰。在一些实施方案中,所有的尿嘧啶或尿苷均被修饰。当所有的核碱基、核苷或核苷酸均被修饰时(例如,所有的尿嘧啶或尿苷),所述mRNA可称作“完全修饰的”,例如针对尿嘧啶或尿苷。

[0543] 在一些实施方案中,如本文所述的mRNA可包括5'帽结构、链终止核苷酸、任选的Kozak序列(还称作Kozak共有序列)、茎环、polyA序列和/或多腺苷酸化信号。

[0544] 5'帽结构或帽物质是包括通过接头接合的两个核苷部分的化合物并且可选自天然存在的帽、非天然存在的帽或帽类似物或抗-反向帽类似物(ARCA)。帽物质可包括一个或多个修饰的核苷和/或接头部分。例如,天然mRNA帽可包括鸟嘌呤核苷酸和在7位置处甲基化的鸟嘌呤(G)核苷酸,由所述核苷酸的5'位置处的三磷酸酯键接合,例如m7G(5')ppp(5')G,通常书写为m7GpppG。帽物质也可以是抗-反向帽类似物。可能的帽物质的非限制性清单包括m7GpppG、m7Gpppm7G、m73'dGpppG、m27,03'GpppG、m27,03'GppppG、m27,02'GppppG、

m7Gpppm7G、m73'dGpppG、m27,03'GpppG、m27,03'GppppG和m27,02'GppppG。

[0545] mRNA可替代地或另外包括链终止核苷。例如,链终止核苷可包括在它们的糖基的2'和/或3'位置处脱氧的那些核苷。此类物质可包括3'脱氧腺苷(蛹虫草菌素(cordycepin))、3'脱氧尿苷、3'脱氧胞嘧啶、3'脱氧鸟苷、3'脱氧胸腺嘧啶和2',3'二脱氧核苷(诸如2',3'二脱氧腺苷、2',3'二脱氧尿苷、2',3'二脱氧胞嘧啶、2',3'二脱氧鸟苷和2',3'二脱氧胸腺嘧啶)。在一些实施方案中,将链终止核苷酸并入mRNA中(例如3'-末端处)可达成mRNA的稳定化。

[0546] mRNA可替代地或另外包括茎环,诸如组蛋白茎环。茎环可包括2、3、4、5、6、7、8个或更多个核苷酸碱基对。例如,茎环可包括4、5、6、7或8个核苷酸碱基对。茎环可位于mRNA的任何区域中。例如,茎环可位于非翻译区(5'非翻译区或3'非翻译区)、编码区或polyA序列或尾端中、之前或之后。在一些实施方案中,茎环可影响mRNA的一种或多种功能,诸如翻译起始、翻译效率和/或转录终止。

[0547] mRNA可替代地或另外包括polyA序列和/或多腺苷酸化信号。polyA序列可完全地或主要包含腺嘌呤核苷酸或其类似物或衍生物。poly A序列也可包含稳定化核苷酸或类似物。例如,poly A序列可包括脱氧胸苷作为稳定化核苷酸或类似物,例如反向(或反向键)脱氧胸苷(dT)。关于使用反向dT和其他稳定化poly A序列修饰的细节可见于例如WO2017/049275A2中,本案的内容以引用的方式并入本文中。polyA序列可以是与mRNA的3'非翻译区相邻定位的尾端。在一些实施方案中,polyA序列可影响mRNA的核输出、翻译和/或稳定性。

[0548] mRNA可替代地或另外包括微小RNA结合位点。微小RNA结合位点(或miR结合位点)可用于调节多种组织或细胞类型中的mRNA表达。在示例性实施方案中,miR结合位点被工程改造成mRNA的3'UTR序列以调节(例如,增强)mRNA在表达同源miR的细胞或组织中的降解。此类调节可用于调节或控制mRNA的“脱靶”表达,即在体内非所需细胞或组织中的表达。关于使用mir结合位点的细节可见于例如WO 2017/062513 A2中,本案的内容以引用的方式并入本文中。

[0549] 在一些实施方案中,mRNA是包含第一编码区和第二编码区的双顺反子mRNA,所述编码区具有包含允许第一与第二编码区之间的内部翻译起始的内部核糖体进入位点(IRES)序列的介入序列,或具有编码自裂解肽(诸如2A肽)的介入序列。IRES序列和2A肽典型地用于增强来自同一载体的多种蛋白质的表达。多种IRES序列是本领域已知并可获得的并且可加以使用,包括例如脑心肌炎病毒IRES。

[0550] 在一些实施方案中,本公开的mRNA包含一个或多个修饰的核碱基、核苷或核苷酸(称作“修饰的mRNA”或“mmRNA”)。在一些实施方案中,修饰的mRNA可具有适用特性,包括如与参考未修饰的mRNA相比,增强的稳定性、细胞内保留、增强的翻译和/或缺乏对其中引入所述mRNA的细胞的先天性免疫反应的实质诱导。因此,修饰的mRNA的使用可增强蛋白质生产效率、核酸的细胞内保留,以及具有降低的免疫原性。

[0551] 在一些实施方案中,mRNA包括一个或多个(例如,1、2、3或4个)不同的修饰的核碱基、核苷或核苷酸。在一些实施方案中,mRNA包括一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100个或更多个)不同的修饰的核碱基、核苷或核苷酸。在一些实施方案中,相对于相应的未修饰的mRNA,修饰的mRNA可在其中引入所述mRNA的细胞中具有降低的降解。

[0552] 在一些实施方案中,修饰的核碱基是修饰的尿嘧啶。具有修饰的尿嘧啶的示例性核碱基和核苷包括假尿苷( $\psi$ )、吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮杂-尿苷、6-氮杂-尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-尿苷(s2U)、4-硫代-尿苷(s4U)、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羟基-尿苷(ho5U)、5-氨基烯丙基-尿苷、5-卤基-尿苷(例如,5-碘-尿苷或5-溴-尿苷)、3-甲基-尿苷(m3U)、5-甲氧基-尿苷(mo5U)、尿苷5-氧乙酸(cmo5U)、尿苷5-氧乙酸甲酯(mcmo5U)、5-羧基甲基-尿苷(cm5U)、1-羧基甲基-假尿苷、5-羧基羟基甲基-尿苷(chm5U)、5-羧基羟基甲基-尿苷甲酯(mchm5U)、5-甲氧基羰基甲基-尿苷(mcm5U)、5-甲氧基羰基甲基-2-硫代-尿苷(mcm5s2U)、5-氨基甲基-2-硫代-尿苷(nm5s2U)、5-甲基氨基甲基-尿苷(mnm5U)、5-甲基氨基甲基-2-硫代-尿苷(mnm5s2U)、5-甲基氨基甲基-2-硒代-尿苷(mnm5se2U)、5-氨基甲酰基甲基-尿苷(ncm5U)、5-羧基甲基氨基甲基-尿苷(cmm5U)、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代-尿苷(cmm5s2U)、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酰甲基-尿苷( $\tau$ m5U)、1-牛磺酰甲基-假尿苷、5-牛磺酰甲基-2-硫代-尿苷( $\tau$ m5s2U)、1-牛磺酰甲基-4-硫代-假尿苷、5-甲基-尿苷(m5U,即具有核碱基脱氧胸腺嘧啶)、1-甲基-假尿苷(m1 $\psi$ )、5-甲基-2-硫代-尿苷(m5s2U)、1-甲基-4-硫代-假尿苷(m1s4 $\psi$ )、4-硫代-1-甲基-假尿苷、3-甲基-假尿苷(m3 $\psi$ )、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、二氢尿苷(D)、二氢假尿苷、5,6-二氢尿苷、5-甲基-二氢尿苷(m5D)、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、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、N1-甲基-假尿苷、3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷(acp3U)、1-甲基-3-(3-氨基-3-羧基丙基)假尿苷(acp3 $\psi$ )、5-(异戊烯基氨基甲基)尿苷(inm5U)、5-(异戊烯基氨基甲基)-2-硫代-尿苷(inm5s2U)、 $\alpha$ -硫代-尿苷、2'-O-甲基-尿苷(Um)、5,2'-O-二甲基-尿苷(m5Um)、2'-O-甲基-假尿苷( $\psi$ m)、2-硫代-2'-O-甲基-尿苷(s2Um)、5-甲氧基羰基甲基-2'-O-甲基-尿苷(mcm5Um)、5-氨基甲酰基甲基-2'-O-甲基-尿苷(ncm5Um)、5-羧基甲基氨基甲基-2'-O-甲基-尿苷(cmm5Um)、3,2'-O-二甲基-尿苷(m3Um)和5-(异戊烯基氨基甲基)-2'-O-甲基-尿苷(inm5Um)、1-硫代-尿苷、脱氧胸苷、2'-F-阿拉伯糖-尿苷、2'-F-尿苷、2'-OH-阿拉伯糖-尿苷、5-(2-甲氧羰基乙烯基)尿苷和5-[3-(1-E-丙烯基氨基)]尿苷。

[0553] 在一些实施方案中,修饰的核碱基是修饰的胞嘧啶。具有修饰的胞嘧啶的示例性核碱基和核苷包括5-氮杂-胞苷、6-氮杂-胞苷、假异胞苷、3-甲基-胞苷(m3C)、N4-乙酰基-胞苷(ac4C)、5-甲酰基-胞苷(f5C)、N4-甲基-胞苷(m4C)、5-甲基-胞苷(m5C)、5-卤基-胞苷(例如5-碘-胞苷)、5-羟基甲基-胞苷(hm5C)、1-甲基-假异胞苷、吡咯并-胞苷、吡咯并-假异胞苷、2-硫代-胞苷(s2C)、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-脱氮-假异胞苷、1-甲基-1-脱氮-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、4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷、立西啶(lysidine,k2C)、 $\alpha$ -硫代-胞苷、2'-O-甲基-胞苷(Cm)、5,2'-O-二甲基-胞苷(m5Cm)、N4-乙酰基-2'-O-甲基-胞苷(ac4Cm)、N4,2'-O-二甲基-胞苷(m4Cm)、5-甲酰基-2'-O-甲基-胞苷(f5Cm)、N4,N4,2'-O-三甲基-胞苷(m42Cm)、1-硫代-胞苷、2'-F-阿拉伯糖-胞苷、2'-F-胞苷和2'-OH-阿拉伯糖-胞苷。

[0554] 在一些实施方案中,修饰的核碱基是修饰的腺嘌呤。具有修饰的腺嘌呤的示例性

核碱基和核苷包括 $\alpha$ -硫代-腺苷、2-氨基-嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-卤基-嘌呤(例如2-氨基-6-氯-嘌呤)、6-卤基-嘌呤(例如6-氯-嘌呤)、2-氨基-6-甲基-嘌呤、8-叠氮基-腺苷、7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤、7-脱氮-2-氨基-嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2-氨基-嘌呤、7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、1-甲基-腺苷(m1A)、2-甲基-腺嘌呤(m2A)、N6-甲基-腺苷(m6A)、2-甲基硫代-N6-甲基-腺苷(ms2m6A)、N6-异戊烯基-腺苷(i6A)、2-甲基硫代-N6-异戊烯基-腺苷(ms2i6A)、N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷(io6A)、2-甲基硫代-N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷(ms2io6A)、N6-甘氨酸基氨基甲酰基-腺苷(g6A)、N6-苏氨酸基氨基甲酰基-腺苷(t6A)、N6-甲基-N6-苏氨酸基氨基甲酰基-腺苷(m6t6A)、2-甲基硫代-N6-苏氨酸基氨基甲酰基-腺苷(ms2g6A)、N6,N6-二甲基-腺苷(m62A)、N6-羟基正缬氨酸基氨基甲酰基-腺苷(hn6A)、2-甲基硫代-N6-羟基正缬氨酸基氨基甲酰基-腺苷(ms2hn6A)、N6-乙酰基-腺苷(ac6A)、7-甲基-腺嘌呤、2-甲基硫代-腺嘌呤、2-甲氧基-腺嘌呤、 $\alpha$ -硫代-腺苷、2'-O-甲基-腺苷(Am)、N6,2'-O-二甲基-腺苷(m6Am)、N6,N6,2'-O-三甲基-腺苷(m62Am)、1,2'-O-二甲基-腺苷(m1Am)、2'-O-核糖基腺苷(磷酸酯)(Ar(p))、2-氨基-N6-甲基-嘌呤、1-硫代-腺苷、8-叠氮基-腺苷、2'-F-阿拉伯糖-腺苷、2'-F-腺苷、2'-OH-阿拉伯糖-腺苷和N6-(19-氨基-五氧杂十九烷基)-腺苷。

[0555] 在一些实施方案中,修饰的核碱基是修饰的鸟嘌呤。具有修饰的鸟嘌呤的示例性核碱基和核苷包括 $\alpha$ -硫代-鸟苷、肌苷(I)、1-甲基-肌苷(m1I)、怀俄苷(imG)、甲基怀俄苷(mimG)、4-去甲基-怀俄苷(imG-14)、异怀俄苷(imG2)、怀丁苷(yW)、过氧怀丁苷(o2yW)、羟基怀丁苷(OhyW)、修饰不足的羟基怀丁苷(OhyW\*)、7-脱氮-鸟苷、癸苷(Q)、环氧癸苷(oQ)、半乳糖基-癸苷(galQ)、甘露糖基-癸苷(manQ)、7-氰基-7-脱氮-鸟苷(preQ0)、7-氨基甲基-7-脱氮-鸟苷(preQ1)、古嘌呤(G+)、7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、6-硫代-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、7-甲基-鸟苷(m7G)、6-硫代-7-甲基-鸟苷、7-甲基-肌苷、6-甲氧基-鸟苷、1-甲基-鸟苷(m1G)、N2-甲基-鸟苷(m2G)、N2,N2-二甲基-鸟苷(m22G)、N2,7-二甲基-鸟苷(m2,7G)、N2,N2,7-二甲基-鸟苷(m2,2,7G)、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、N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷、 $\alpha$ -硫代-鸟苷、2'-O-甲基-鸟苷(Gm)、N2-甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m2Gm)、N2,N2-二甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m22Gm)、1-甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m1Gm)、N2,7-二甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m2,7Gm)、2'-O-甲基-肌苷(Im)、1,2'-O-二甲基-肌苷(m1Im)、2'-O-核糖基鸟苷(磷酸酯)(Gr(p))、1-硫代-鸟苷、O6-甲基-鸟苷、2'-F-阿拉伯糖-鸟苷和2'-F-鸟苷。

[0556] 在一些实施方案中,本公开的mRNA包括一种或多种前述修饰的核碱基的组合(例如,2、3或4种前述修饰的核碱基的组合)。

[0557] 在一些实施方案中,修饰的核碱基是假尿苷( $\psi$ )、N1-甲基假尿苷(m1 $\psi$ )、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲氧基尿苷或2'-O-甲基尿苷。在一些实施方案中,本公开的mRNA包括一种或多种前述修饰的核碱基的组合(例如,2、3或4种前述修饰的核碱基的组合)。在一些实施方案中,修饰的核碱基是N1-甲基假尿苷(m1 $\psi$ )并且本公开的mRNA完全地被N1-甲基假尿苷(m1 $\psi$ )修饰。在一些实施方案中,N1-甲基假尿苷(m1 $\psi$ )表示mRNA中的75-100%尿嘧啶。在一

些实施方案中,N1-甲基假尿苷(m1 $\psi$ )表示mRNA中的100%尿嘧啶。

[0558] 在一些实施方案中,修饰的核碱基是修饰的胞嘧啶。具有修饰的胞嘧啶的示例性核碱基和核苷包括N4-乙酰基-胞苷(ac4C)、5-甲基-胞苷(m5C)、5-卤基-胞苷(例如5-碘-胞苷)、5-羟基甲基-胞苷(hm5C)、1-甲基-假异胞苷、2-硫代-胞苷(s2C)、2-硫代-5-甲基-胞苷。在一些实施方案中,本公开的mRNA包括一种或多种前述修饰的核碱基的组合(例如,2、3或4种前述修饰的核碱基的组合)。

[0559] 在一些实施方案中,修饰的核碱基是修饰的腺嘌呤。具有修饰的腺嘌呤的示例性核碱基和核苷包括7-脱氮-腺嘌呤、1-甲基-腺苷(m1A)、2-甲基-腺嘌呤(m2A)、N6-甲基-腺苷(m6A)。在一些实施方案中,本公开的mRNA包括一种或多种前述修饰的核碱基的组合(例如,2、3或4种前述修饰的核碱基的组合)。

[0560] 在一些实施方案中,修饰的核碱基是修饰的鸟嘌呤。具有修饰的鸟嘌呤的示例性核碱基和核苷包括肌苷(I)、1-甲基-肌苷(m1I)、怀俄苷(imG)、甲基怀俄苷(mimG)、7-脱氮-鸟苷、7-氰基-7-脱氮-鸟苷(preQ0)、7-氨基甲基-7-脱氮-鸟苷(preQ1)、7-甲基-鸟苷(m7G)、1-甲基-鸟苷(m1G)、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷。在一些实施方案中,本公开的mRNA包括一种或多种前述修饰的核碱基的组合(例如,2、3或4种前述修饰的核碱基的组合)。

[0561] 在一些实施方案中,修饰的核碱基是1-甲基-假尿苷(m1 $\psi$ )、5-甲氧基-尿苷(mo5U)、5-甲基-胞苷(m5C)、假尿苷( $\psi$ )、 $\alpha$ -硫代-鸟苷或 $\alpha$ -硫代-腺苷。在一些实施方案中,本公开的mRNA包括一种或多种前述修饰的核碱基的组合(例如,2、3或4种前述修饰的核碱基的组合)。

[0562] 在一些实施方案中,mRNA包含假尿苷( $\psi$ )。在一些实施方案中,mRNA包含假尿苷( $\psi$ )和5-甲基-胞苷(m5C)。在一些实施方案中,mRNA包含1-甲基-假尿苷(m1 $\psi$ )。在一些实施方案中,mRNA包含1-甲基-假尿苷(m1 $\psi$ )和5-甲基-胞苷(m5C)。在一些实施方案中,mRNA包含2-硫代尿苷(s2U)。在一些实施方案中,mRNA包含2-硫代尿苷和5-甲基-胞苷(m5C)。在一些实施方案中,mRNA包含5-甲氧基-尿苷(mo5U)。在一些实施方案中,mRNA包含5-甲氧基-尿苷(mo5U)和5-甲基-胞苷(m5C)。在一些实施方案中,mRNA包含2'-O-甲基尿苷。在一些实施方案中,mRNA包含2'-O-甲基尿苷和5-甲基-胞苷(m5C)。在一些实施方案中,mRNA包含N6-甲基-腺苷(m6A)。在一些实施方案中,mRNA包含N6-甲基-腺苷(m6A)和5-甲基-胞苷(m5C)。

[0563] 在某些实施方案中,本公开的mRNA是针对特定修饰均一地被修饰(即,完全地被修饰、遍及整个序列被修饰)。例如,mRNA可均一地被N1-甲基假尿苷(m1 $\psi$ )或5-甲基-胞苷(m5C)修饰,意指mRNA序列中的所有尿苷或所有胞嘧啶核苷均被N1-甲基假尿苷(m1 $\psi$ )或5-甲基-胞苷(m5C)置换。同样,本公开的mRNA可通过用修饰的残基(诸如上文所陈述的那些)置换而针对存在于所述序列中的任何类型的核苷残基均一地被修饰。

[0564] 在一些实施方案中,本公开的mRNA可在编码区(例如,编码多肽的开放阅读框)中进行修饰。在其他实施方案中,mRNA可在除编码区之外的区域中进行修饰。例如,在一些实施方案中,提供5'-UTR和/或3'-UTR,其中任一者或两者可独立地含有一种或多种不同的核苷修饰。在此类实施方案中,核苷修饰也可存在于编码区中。

[0565] 本公开的mmRNA可包括针对糖、核碱基和/或核苷间键的修饰的组合。这些组合可包括本文所述的任何一种或多种修饰。

[0566] 在列出单一修饰的情况下,所列出的核苷或核苷酸表示100%的那种A、U、G或C核苷酸或核苷已被修饰。在列出百分率的情况下,这些表示所存在的A、U、G或C三磷酸酯的总量中所述百分率的那种特定A、U、G或C核碱基三磷酸酯。例如,组合:25%5-氨基烯丙基-CTP+75% CTP/25%5-甲氧基-UTP+75% UTP是指多核苷酸,其中25%的胞嘧啶三磷酸酯是5-氨基烯丙基-CTP,而75%的胞嘧啶是CTP;而25%的尿嘧啶是5-甲氧基UTP,而75%的尿嘧啶是UTP。在未列出修饰的UTP的情况下,则天然存在的ATP、UTP、GTP和/或CTP用于所述多核苷酸中发现的那些核苷酸的100%位点中。在这一实例中,所有的GTP和ATP核苷酸均保持未修饰。

[0567] 本公开的mRNA或其区域可进行密码子优化。密码子优化方法是本领域中已知的并且可用于多种目的:匹配宿主生物体中的密码子频率以确保适当折叠,使GC含量产生偏好以增加mRNA稳定性或降低二级结构,使可削弱基因构建或表达的串联重复序列密码子或碱基连串降至最少,定制转录和翻译控制区,插入或删除蛋白质转运序列,去除/添加编码蛋白中的翻译后修饰位点(例如糖基化位点),添加、去除或改组蛋白域,插入或缺失限制位点,修饰核糖体结合位点和mRNA降解位点,调节翻译速率以允许蛋白质的多个域适当地折叠,或降低或消除多核苷酸内的问题二级结构。密码子优化工具、算法和服务是本领域中已知的;非限制性实例包括来自GeneArt(Life Technologies)、DNA2.0(Menlo Park,CA)的服务和/或专属方法。在一些实施方案中,使用优化算法来优化mRNA序列,例如以优化哺乳动物细胞中的表达或增强mRNA稳定性。

[0568] 在某些实施方案中,本公开包括与任何本文所述的多核苷酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的多核苷酸。

[0569] 本公开的mRNA可通过本领域中可获得的手段,包括但不限于体外转录(IVT)和合成方法产生。可使用酶(IVT)、固相、液相、组合合成方法、小区域合成和接合方法。在一些实施方案中,使用IVT酶合成方法制得mRNA。因此,本公开还包括可用于体外转录本文所述的mRNA的多核苷酸,例如DNA、构建体和载体。

[0570] 在合成期间或合成后,可以将非天然修饰的核碱基引入多核苷酸(例如,mRNA)中。在某些实施方案中,修饰可以在核苷间键、嘌呤或嘧啶碱基或糖上。在特定实施方案中,可以将修饰引入多核苷酸链的末端处或所述多核苷酸链中的别处;使用化学合成或使用聚合酶。

[0571] 酶或化学接合方法可用于使多核苷酸或它们的区域与不同的功能部分(诸如靶向或递送剂、荧光标记、液体、纳米粒子等)缀合。用于降低蛋白质表达的治疗剂

[0572] 在一些实施方案中,治疗剂是降低(即,减少、抑制、下调)蛋白质表达的治疗剂。可用于降低蛋白质表达的治疗剂的类型的非限制性实例包括并入微小RNA结合位点(miR结合位点)的mRNA、微小RNA(miRNA)、安塔够妙、小(短)干扰RNA(siRNA)(包括短聚物(shortmer)和dicer-底物RNA)、RNA干扰(RNAi)分子、反义RNA、核酶、小发夹RNA(shRNA)、锁核酸(LNA)和CRISPR/Cas9技术。

[0573] 肽/多肽治疗剂

[0574] 在一些实施方案中,治疗剂是肽治疗剂。在一些实施方案中,治疗剂是多肽治疗剂。

[0575] 在一些实施方案中,肽或多肽是天然来源的,例如从天然来源分离。在其他实施方

案中,肽或多肽是合成分子,例如体外产生的合成肽或多肽。在一些实施方案中,肽或多肽是重组分子。在一些实施方案中,肽或多肽是嵌合分子。在一些实施方案中,肽或多肽是融合分子。在一些实施方案中,所述组合物的肽或多肽治疗剂是天然存在的肽或多肽。在一些实施方案中,所述组合物的肽或多肽治疗剂是天然存在的肽或多肽的修饰形式(例如,与其野生型、天然存在的肽或多肽配对物相比,含有少于3个、少于5个、少于10个、少于15个、少于20个或少于25个氨基酸取代、缺失或添加)。

[0576] 在一些实施方案中,在本公开的负载LNP中,所述一种或多种治疗剂和/或预防剂是多核苷酸或多肽。

[0577] 其他组分

[0578] 脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可包括一种或多种除前述部分中所述的那些以外的组分。例如,脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可包括一种或多种小疏水性分子,诸如维生素(例如,维生素A或维生素E)或固醇。

[0579] 脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)也可包括一种或多种渗透性增强剂分子、碳水化合物、聚合物、表面改变剂或其他组分。碳水化合物可包括单糖(例如葡萄糖)和多糖(例如糖原和其衍生物和类似物)。

[0580] 聚合物可包括于纳米粒子组合物中和/或用于封装或部分地封装纳米粒子组合物。聚合物可以是生物可降解的和/或生物相容性的。聚合物可选自但不限于聚胺、聚醚、聚酰胺、聚酯、聚氨基甲酸酯(polycarbamate)、聚脲、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚酰亚胺、聚砜、聚氨基甲酸酯(polyurethane)、聚乙炔、聚乙烯、聚乙烯亚胺、聚异氰酸酯、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯腈和聚丙烯酸酯。例如,聚合物可包括聚(己内酯)(PCL)、乙烯乙酸乙烯酯聚合物(EVA)、聚(乳酸)(PLA)、聚(L-乳酸)(PLLA)、聚(乙醇酸)(PGA)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、聚(L-乳酸-共-乙醇酸)(PLLGA)、聚(D,L-丙交酯)(PDLA)、聚(L-丙交酯)(PLLA)、聚(D,L-丙交酯-共-己内酯)、聚(D,L-丙交酯-共-己内酯-共-乙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-PEO-共-D,L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-PPG-共-D,L-丙交酯)、聚氨基丙烷酸酯、聚氨基甲酸酯、聚-L-赖氨酸(PLL)、甲基丙烯酸羟甲基酯(HPMA)、聚乙二醇、聚-L-谷氨酸、聚(羟氨酸)、聚酞、聚原酸酯、聚(酯酰胺)、聚酰胺、聚(酯醚)、聚碳酸酯、聚亚烷基(诸如聚乙烯和聚丙烯)、聚亚烷基二醇(诸如聚(乙二醇)(PEG))、聚氧化烯(PEO)、聚对苯二甲酸亚烷基酯(诸如聚(对苯二甲酸乙二酯))、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯醚、聚乙烯酯(诸如聚(乙酸乙烯酯))、聚卤化乙烯(诸如聚(氯乙烯)(PVC))、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚硅氧烷、聚苯乙烯(PS)、聚氨基甲酸酯、衍生化纤维素(诸如烷基纤维素、羟基烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、羟基丙基纤维素、羧基甲基纤维素)、丙烯酸聚合物(诸如聚((甲基)丙烯酸甲酯)(PMMA)、聚((甲基)丙烯酸乙酯)、聚((甲基)丙烯酸丁酯)、聚((甲基)丙烯酸异丁酯)、聚((甲基)丙烯酸己酯)、聚((甲基)丙烯酸异癸酯)、聚((甲基)丙烯酸月桂酯)、聚((甲基)丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)、聚(丙烯酸十八烷酯)和其共聚物和混合物)、聚二噁烷酮和其共聚物、聚羟基烷酸酯、聚富马酸丙二醇酯、聚甲醛、泊洛沙姆、聚氧胺、聚(原酸)酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)、聚(丙交酯-共-己内酯)、三亚甲基碳酸酯(trimethylene carbonate)、聚(N-丙烯酰基吗啉)(PACM)、聚(2-甲基-2-噁唑啉)(PMOX)、聚(2-乙基-2-噁唑啉)(PEOZ)和聚甘油。

[0581] 表面改变剂可包括但不限于阴离子蛋白(例如牛血清白蛋白)、表面活性剂(例如

阳离子表面活性剂,诸如二甲基二(十八烷基)-溴化铵)、糖或糖衍生物(例如环糊精)、核酸、聚合物(例如肝素、聚乙二醇和泊洛沙姆)、粘液溶解剂(例如乙酰基半胱氨酸、艾蒿、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、大青属(clerodendrum)、溴己新(bromhexine)、羧甲司坦(carbocisteine)、依普拉酮(eprazinone)、美司钠(mesna)、氨溴索(ambroxol)、索布瑞醇(sobrerol)、多米奥醇(domiodol)、来托司坦(letosteine)、司替罗宁(stepronin)、硫普罗宁(tiopronin)、凝溶胶蛋白、胸腺素 $\beta$ 4、阿法链道酶(dornase alfa)、奈替克新(neltenexine)和厄多司坦(erdosteine))和DNA酶(例如rhDNase)。表面改变剂可安置于纳米粒子内和/或脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的表面上(例如,通过涂布、吸附、共价连接或其他方法)。

[0582] 脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)也可包含一种或多种官能化脂质。例如,脂质可用炔基官能化,所述炔基当在适当反应条件下暴露于叠氮化物时可经历环加成反应。尤其,脂质双层可以这种方式用可用于促进膜渗透、细胞识别或成像的一种或多种基团官能化。脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的表面也可与一种或多种可用抗体缀合。可用于靶向细胞递送、成像和膜渗透的官能团和缀合物是本领域中众所周知的。

[0583] 除了这些组分以外,脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)也可包括可用于药物组合物的任何物质。例如,脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可包括一种或多种药学上可接受的赋形剂或附属成分,诸如但不限于一种或多种溶剂、分散介质、稀释剂、分散助剂、悬浮助剂、造粒助剂、崩解剂、填充剂、助流剂、液体媒剂、粘合剂、表面活性剂、等渗剂、增稠或乳化剂、缓冲剂、润滑剂、油、防腐剂和其他物质。也可包括诸如蜡、乳酪、着色剂、涂布剂、调味剂和芳香剂的赋形剂。

[0584] 稀释剂的实例可包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙、磷酸二钙、硫酸钙、磷酸氢钙、磷酸钠、乳糖、蔗糖、纤维素、微晶纤维素、高岭土、甘露醇、山梨醇、肌醇、氯化钠、干淀粉、玉米淀粉、粉糖和/或它们的组合。造粒剂和分散剂可选自由马铃薯淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉、乙醇酸淀粉钠、粘土、海藻酸、瓜尔胶、柑橘渣、琼脂、膨润土、纤维素和木制品、天然海绵、阳离子交换树脂、碳酸钙、硅酸盐、碳酸钠、交联聚(乙烯-吡咯烷酮)(交联聚维酮)、羧基甲基淀粉钠(乙醇酸淀粉钠)、羧基甲基纤维素、交联羧基甲基纤维素钠(交联羧甲纤维素)、甲基纤维素、预胶凝淀粉(淀粉1500)、微晶淀粉、水不溶性淀粉、羧基甲基纤维素钙、硅酸镁铝(VEEGUM®)、月桂基硫酸钠、季铵化合物和/或它们的组合组成的非限制性清单。

[0585] 表面活性剂和/或乳化剂可包括但不限于天然乳化剂(例如,阿拉伯胶、琼脂、海藻酸、海藻酸钠、黄耆胶、克罗珠克(chondrux)、胆固醇、黄原胶、果胶、明胶、蛋黄、酪蛋白、羊毛脂、胆固醇、蜡和卵磷脂)、胶质粘土(例如,膨润土[硅酸铝]和VEEGUM®[硅酸镁铝])、长链氨基酸衍生物、高分子量醇(例如,硬脂醇、鲸蜡醇、油醇、三乙酸甘油酯单硬脂酸酯、乙二醇二硬脂酸酯、甘油单硬脂酸酯和丙二醇单硬脂酸酯、聚乙烯醇)、卡波姆(例如,羧聚乙烯、聚丙烯酸、丙烯酸聚合物和羧基乙烯基聚合物)、角叉菜胶、纤维素衍生物(例如,羧基甲基纤维素钠、粉状纤维素、羟基甲基纤维素、羟基丙基纤维素、羟基丙基甲基纤维素、甲基纤维素)、山梨醇酐脂肪酸酯(例如,聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯[TWEEN®20]、聚氧乙烯山梨醇酐[TWEEN®60]、聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯[TWEEN®80]、山梨醇酐单

棕榈酸酯[SPAN®40]、山梨醇酐单硬脂酸酯[SPAN®60]、山梨醇酐三硬脂酸酯[SPAN®65]、甘油单油酸酯、山梨醇酐单油酸酯[SPAN®80]、聚氧乙烯酯(例如,聚氧乙烯单硬脂酸酯[MYRJ®45]、聚氧乙烯氢化蓖麻油、聚乙氧基化蓖麻油、聚氧亚甲基硬脂酸酯和SOLUTOL®)、蔗糖脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯(例如CREMOPHOR®)、聚氧乙烯醚(例如,聚氧乙烯月桂基醚[BRIJ®30])、聚(乙烯-吡咯烷酮)、二乙二醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、油酸钠、油酸钾、油酸乙酯、油酸、月桂酸乙酯、月桂基硫酸钠、PLURONIC®F68、POLOXAMER® 188、西曲溴铵、西吡氯铵、苯扎氯铵、多库酯钠和/或它们的组合。

[0586] 粘合剂可以是淀粉(例如,玉米淀粉和淀粉糊);明胶;糖(例如,蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糊精、糖蜜、乳糖、乳糖醇、甘露醇);天然和合成胶(例如,阿拉伯胶、海藻酸钠、爱尔兰苔提取物、潘瓦尔胶(panwar gum)、茄替胶、伊莎珀尔果壳的粘液、羧基甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素、乙酸纤维素、聚(乙烯-吡咯烷酮)、硅酸镁铝(VEEGUM®)和落叶松阿拉伯半乳聚糖);海藻酸盐;聚氧化乙烯;聚乙二醇;无机钙盐;硅酸;聚甲基丙烯酸酯;蜡;水;醇;和它们的组合或任何其他合适的粘合剂。

[0587] 防腐剂的实例可包括但不限于抗氧化剂、螯合剂、抗微生物防腐剂、抗真菌防腐剂、醇防腐剂、酸性防腐剂和/或其他防腐剂。抗氧化剂的实例包括但不限于 $\alpha$ 生育酚、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯、一硫代甘油、偏亚硫酸氢钾、丙酸、没食子酸丙酯、抗坏血酸钠、亚硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠和/或亚硫酸钠。螯合剂的实例包括乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸单水合物、依地酸二钠、依地酸二钾、依地酸、富马酸、苹果酸、磷酸、依地酸钠、酒石酸和/或依地酸三钠。抗微生物防腐剂的实例包括但不限于苯扎氯铵、苜索氯铵、苜醇、布罗波尔(bronopol)、溴棕三甲铵、西吡氯铵、洛赫西定(chlorhexidine)、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲苯酚、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶(hexetidine)、咪脲、苯酚、苯氧乙醇、苯基乙醇、硝酸苯汞、丙二醇和/或硫柳汞。抗真菌防腐剂的实例包括但不限于对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸、羟基苯甲酸、苯甲酸钾、山梨酸钾、苯甲酸钠、丙酸钠和/或山梨酸。醇防腐剂的实例包括但不限于乙醇、聚乙二醇、苜醇、苯酚、酚类化合物、双酚、氯丁醇、羟基苯甲酸酯和/或苯基乙醇。酸性防腐剂的实例包括但不限于维生素A、维生素C、维生素E、 $\beta$ -胡萝卜素、柠檬酸、乙酸、脱氢抗坏血酸、抗坏血酸、山梨酸和/或植酸。其他防腐剂包括但不限于生育酚、乙酸生育酚、甲磺酸得立肟、溴棕三甲铵、丁基化羟基茴香醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、乙二胺、月桂基硫酸钠(SLS)、月桂基醚硫酸钠(SLES)、亚硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钾、偏亚硫酸氢钾、GLYDANT PLUS®、PHENONIP®、对羟基苯甲酸甲酯、GERMALL® 115、GERMABEN®II、NEOLONE™、KATHON™和/或EUXYL®。

[0588] 缓冲剂的实例包括但不限于柠檬酸盐缓冲溶液、乙酸盐缓冲溶液、磷酸盐缓冲溶液、氯化铵、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、葡乳醛酸钙、葡庚糖酸钙、葡萄糖酸钙、d-葡萄糖酸、甘油磷酸钙、乳酸钙、乳糖酸钙、丙酸、乙酰丙酸钙、戊酸、磷酸氢钙、磷酸、磷酸三钙、羟基磷灰石(calcium hydroxide phosphate)、乙酸钾、氯化钾、葡萄糖酸钾、钾混合物、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸钾混合物、乙酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、柠檬酸钠、乳酸钠、磷酸氢二钠、

磷酸二氢钠、磷酸钠混合物、缓血酸胺、氨基-磺酸盐缓冲液(例如HEPES)、氢氧化镁、氢氧化铝、海藻酸、无热原质水、等渗盐水、林格氏溶液、乙醇和/或它们的组合。润滑剂可选自由硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、硅石、滑石、麦芽、甘油山嵛酸酯、氢化植物油、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、白氨酸、月桂基硫酸镁、月桂基硫酸钠和它们的组合组成的非限制性组。

[0589] 油的实例包括但不限于扁桃仁、杏仁、鳄梨、巴西棕榈、佛手柑、黑加仑籽、琉璃苣、刺楸、甘菊、芥花、香菜、卡瑙巴、蓖麻、肉桂、可可、椰子、鱼肝、咖啡、玉米、棉籽、鹌鹑、案树、月见草、鱼、亚麻仁、香草醇、葫芦、葡萄籽、榛子、海索草、肉豆蔻酸异丙酯、荷荷巴、夏威夷核果、熏衣草花、熏衣草、柠檬、山苍子、澳洲坚果、锦葵、芒果核、池花籽、貂、肉豆蔻、橄榄、橙、大西洋胸棘鲷、棕榈、棕榈仁、桃仁、花生、罂粟籽、南瓜籽、油菜籽、米糠、迷迭香、红花、白檀、山茶花、欧洲薄荷、沙棘、芝麻、乳木果油、硅酮、大豆、向日葵、茶树、薊、椿花、香根草、胡桃和小麦胚芽油以及硬脂酸丁酯、辛酸三酸甘油酯、癸酸三酸甘油酯、环甲基硅酮、癸二酸二乙酯、二甲硅油360、西甲硅油、肉豆蔻酸异丙酯、矿物油、辛基十二醇、油醇、硅酮油和/或它们的组合。

[0590] 纳米粒子组合物的制造

[0591] 在一些实施方案中,通过组合根据式(I)的阳离子脂质、根据式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂(例如DSPC)、PEG脂质(例如1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油甲氧基聚乙二醇,还称作PEG-DMG,例如PEG<sub>2k</sub>-DMG或PEG-1)和结构脂质(例如胆固醇),使用例如乙醇下降纳米沉淀(ethanol drop nanoprecipitation),随后使用透析将溶剂交换成合适水性缓冲液,来制备包含本公开的脂质的纳米粒子。

[0592] 纳米粒子组合物的表征

[0593]  $\zeta$ 电位量度胶状分散液中的动电位。 $\zeta$ 电位的量值指示分散液中的相邻、带相同电荷粒子之间的静电排斥程度。 $\zeta$ 电位可在Wyatt Technologies Mobius $\zeta$ 电位仪器上测量。这种仪器通过“大规模平行相分析光散射(Massively Parallel Phase Analysis Light Scattering)”或MP-PALS原理来表征迁移率和 $\zeta$ 电位。不希望受理论束缚,这种测量比仅使用一个检测角的ISO方法13099-1:2012更灵敏并且应力感应更小,并且需要更高操作电压。在一些实施方案中,使用利用MP-PALS原理的仪器来测量本公开的空或负载LNP的 $\zeta$ 电位。

[0594] 可使用紫外-可见光谱来测定负载LNP中的治疗剂和/或预防剂(例如RNA)的浓度。将100 $\mu$ L在1 $\times$ PBS中的稀释制剂添加至900 $\mu$ L甲醇和氯仿4:1(v/v)混合物中。混合之后,在DU 800分光光度计(Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA)上例如在230nm与330nm之间记录溶液的吸收光谱。负载LNP中的治疗剂和/或预防剂的浓度可基于用于组合物中的治疗剂和/或预防剂的消光系数和例如260nm波长下的吸光度与例如330nm波长下的基线值之间的差异来计算。

[0595] 对于包括RNA的负载LNP,可使用QUANT-IT<sup>TM</sup> RIBOGREEN<sup>®</sup> RNA分析(Invitrogen Corporation Carlsbad, CA)来评估LNP对RNA的封装。在TE缓冲溶液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5)中将样品稀释至大约5 $\mu$ g/mL的浓度。将50 $\mu$ L稀释样品转移至聚苯乙烯96孔板中并且将50 $\mu$ L TE缓冲液或50 $\mu$ L 2% Triton X-100溶液添加至孔中。在37 $^{\circ}$ C的温度下孵育所述板持续15分钟。将RIBOGREEN<sup>®</sup>试剂1:100稀释于TE缓冲液中,并

且将100 $\mu$ L这一溶液添加至各孔中。使用荧光板式读取器(Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA)在例如约480nm的激发波长和例如约520nm的发射波长下测量荧光强度。从每个样品的荧光值减去试剂空白的荧光值并且通过将完整样品(不添加Triton X-100)的荧光强度除以受破坏样品(通过添加Triton X-100而引起)的荧光值来确定游离RNA的百分率。

#### [0596] 体内制剂研究

[0597] 为了监测各种纳米粒子组合物如何有效地将治疗剂和/或预防剂递送至靶向细胞,制备包括特定治疗剂和/或预防剂(例如,修饰的或天然存在的RNA,诸如mRNA)的不同纳米粒子组合物并且施用于动物群体。静脉内、肌内、动脉内或肿瘤内向动物(例如,小鼠、大鼠或非人类灵长类动物)施用单一剂量,包括包含本公开的脂质和表达蛋白质(例如OX40L或tdTomato)的mRNA的纳米粒子组合物。也可利用包括PBS的对照组合物。

[0598] 在向动物施用纳米粒子组合物后,可通过酶联免疫吸附分析(ELISA)、生物发光成像或其他方法来测量特定制剂和其剂量的剂量递送概况、剂量反应和毒性。对于包括mRNA的纳米粒子组合物,也可评估蛋白质表达的时间过程。从动物收集的用于评估的样品可包括血液、血清和组织(例如,来自肌内注射位点的肌肉组织和内部组织);样品收集可涉及动物处死。

[0599] 包括mRNA的纳米粒子组合物(例如负载LNP)可用于评估各种用于递送治疗剂和/或预防剂的制剂的的功效和有用性。通过施用包括mRNA的组合物所诱导的较高水平的蛋白质表达将指示较高的mRNA翻译和/或纳米粒子组合物mRNA递送效率。由于非RNA组分被认为不影响翻译机构本身,较高水平的蛋白质表达可能指示给定的纳米粒子组合物相对于其他纳米粒子组合物或其不存在的情形递送治疗剂和/或预防剂的效率较高。

#### [0600] 制剂

[0601] 脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可包括脂质组分和一种或多种额外组分,诸如治疗剂和/或预防剂。脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可设计用于一种或多种特定应用或靶标。脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的要素可基于特定应用或靶标,和/或基于一种或多种要素的功效、毒性、费用、易用性、可用性或其他特征进行选择。同样,可根据例如特定要素组合的功效和毒性选择纳米粒子组合物的特定制剂用于特定应用或靶标。

[0602] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子组合物(例如空LNP或负载LNP)的脂质组分包括例如根据式(I)的阳离子脂质、根据式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂(诸如不饱和脂质,例如DOPE或DSPC)、PEG脂质和结构脂质。脂质组分的要素可以特定分率来提供。

[0603] 在一些实施方案中,空LNP或负载LNP的脂质组分包括根据式(I)的阳离子脂质、根据式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂、PEG脂质和结构脂质。在某些实施方案中,纳米粒子组合物的脂质组分包括约20mol%至约40mol%根据式(I)的阳离子脂质、约15mol%至约40mol%式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、约0mol%至约30mol%磷脂、约18.5mol%至约48.5mol%结构脂质和约

0mol%至约10mol%PEG脂质,其限制条件在于总mol%不超过100%。在一些实施方案中,纳米粒子组合物的脂质组分包括约20mol%至约40mol%根据式(I)的阳离子脂质、约20mol%至约25mol%式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、约5mol%至约25mol%磷脂、约30mol%至约40mol%结构脂质和约0mol%至约10mol%PEG脂质。

[0604] 在一些实施方案中,空脂质纳米粒子(空LNP)包含式(I)的阳离子脂质、根据式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质。

[0605] 在一些实施方案中,负载脂质纳米粒子(负载LNP)包含式(I)的阳离子脂质、根据式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂、结构脂质、PEG脂质和一种或多种治疗剂和/或预防剂。

[0606] 在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含约20mol%至约40mol%的量的式(I)的阳离子脂质。

[0607] 在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含约15mol%至约40mol%的量的式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质。

[0608] 在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含约0mol%至约20mol%的量的磷脂。例如,在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含约0mol%至约20mol%的量的DSPC。

[0609] 在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含约30mol%至约50mol%的量的结构脂质。例如,在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含约30mol%至约50mol%的量的胆固醇。

[0610] 在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含约0mol%至约5mol%的量的PEG脂质。例如,在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含约0mol%至约5mol%的量的PEG-1或PEG<sub>2k</sub>-DMG。

[0611] 在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含约20mol%至约40mol%式(I)的阳离子脂质、约15mol%至约40mol%式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、约0mol%至约20mol%磷脂、约30mol%至约50mol%结构脂质和约0mol%至约5mol%PEG脂质。

[0612] 在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含约20mol%至约40mol%式(I)的阳离子脂质、约15mol%至约40mol%式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、约0mol%至约20mol%DSPC、约30mol%至约50mol%胆固醇和约0mol%至约5mol%PEG<sub>2k</sub>-DMG。在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含约20mol%至约40mol%表1的脂质、约15mol%至40mol%表IL-1至IL-7的脂质、约0mol%至约20mol%DSPC、约30mol%至约50mol%胆固醇和约0mol%至约5mol%PEG<sub>2k</sub>-DMG。

[0613] 在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含约20mol%至约40mol%式(I)的阳离子脂质、约15mol%至约40mol%式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-

IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、约0mol%至约20mol%DSPC、约30mol%至约50mol%胆固醇和约0mol%至约5mol%PEG-1。在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含约20mol%至约40mol%表1的脂质、约15mol%至40mol%表IL-1至IL-7的脂质、约0mol%至约20mol%DSPC、约30mol%至约50mol%胆固醇和约0mol%至约5mol%PEG-1。

[0614] 在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质,其中磷脂是DSPC并且结构脂质是胆固醇。在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含表1的阳离子脂质、表IL-1至IL-7的可离子化脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质,其中磷脂是DSPC并且结构脂质是胆固醇。

[0615] 在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质,其中结构脂质是胆固醇并且PEG脂质是 $PEG_{2k}$ -DMG。在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含表1的脂质、表IL-1至IL-7的可离子化脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质,其中结构脂质是胆固醇并且PEG脂质是 $PEG_{2k}$ -DMG。

[0616] 在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质,其中结构脂质是胆固醇并且PEG脂质是PEG-1。在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含表1的阳离子脂质、表IL-1至IL-7的可离子化脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质,其中结构脂质是胆固醇并且PEG脂质是PEG-1。

[0617] 在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质,其中磷脂是DSPC并且PEG脂质是 $PEG_{2k}$ -DMG。在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含表1的脂质、表IL-1至IL-7的可离子化脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质,其中磷脂是DSPC并且PEG脂质是 $PEG_{2k}$ -DMG。

[0618] 在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质,其中磷脂是DSPC并且PEG脂质是PEG-1。在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含表1的脂质、表IL-1至IL-7的可离子化脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质,其中磷脂是DSPC并且PEG脂质是PEG-1。

[0619] 在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含式(I)的脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质,其中磷脂是DSPC,结构脂质是胆固醇,并且PEG脂质是 $PEG_{2k}$ -DMG。在一些实施方案中,空LNP或负载LNP包含表1的阳离子脂质、表IL-1至IL-7的可离子化脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质,其中磷脂是

DSPC, 结构脂质是胆固醇, 并且PEG脂质是PEG<sub>2k</sub>-DMG。在一些实施方案中, 空LNP或负载LNP包含表1的阳离子脂质、表IL-1至IL-7的可离子化脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质, 其中磷脂是DSPC, 结构脂质是胆固醇, 并且PEG脂质是PEG<sub>2k</sub>-DMG。

[0620] 在一些实施方案中, 空LNP或负载LNP包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质, 其中磷脂是DSPC, 结构脂质是胆固醇, 并且PEG脂质是PEG-1。在一些实施方案中, 空LNP或负载LNP包含表1的阳离子脂质、表IL-1至IL-7的可离子化脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质, 其中磷脂是DSPC, 结构脂质是胆固醇, 并且PEG脂质是PEG-1。

[0621] 脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可设计用于一种或多种特定应用或靶标。例如, 纳米粒子组合物可以被设计为向哺乳动物的身体中的特定细胞、组织、器官或系统或其组递送治疗剂和/或预防剂, 诸如RNA。脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的生理化学特性可发生改变以便增加针对特定身体靶标的选择性。例如, 粒径可基于不同器官的开窗大小加以调节。纳米粒子组合物中所包括的治疗剂和/或预防剂也可基于一个或多个所需递送靶标进行选择。例如, 治疗剂和/或预防剂可针对特定适应症、疾患、疾病或病症和/或针对向特定细胞、组织、器官或系统或其组的递送(例如, 局部或特异性递送)进行选择。在某些实施方案中, 纳米粒子组合物可包括编码所关注的多肽的mRNA, 它能够在细胞内翻译以产生所关注的多肽。此类组合物可以被设计为特异性地递送至特定器官。在一些实施方案中, 组合物可以被设计为特异性地递送至哺乳动物肝。在一些实施方案中, 组合物可以被设计为特异性地递送至哺乳动物肺。

[0622] 纳米粒子组合物中的治疗剂和/或预防剂的量可取决于纳米粒子组合物的大小、组成、所需靶标和/或应用或其他特性, 以及取决于治疗剂和/或预防剂的特性。例如, 可用于纳米粒子组合物中的RNA的量可取决于RNA的大小、序列和其他特征。纳米粒子组合物中的治疗剂和/或预防剂和其他要素(例如脂质)的相对量也可变化。在一些实施方案中, 纳米粒子组合物中的液体组分: 治疗剂和/或预防剂的wt/wt比率可以是约5:1至约60:1, 诸如5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1和60:1。例如, 液体组分: 治疗剂和/或预防剂的wt/wt比率可以是约10:1至约40:1。在某些实施方案中, wt/wt比率是约20:1。

[0623] 纳米粒子组合物中的治疗剂和/或预防剂的量可例如使用吸收光谱法(例如, 紫外-可见光谱)进行测量。

[0624] 在一些实施方案中, 纳米粒子组合物包括一种或多种RNA, 并且可以选择所述一种或多种RNA、脂质和其量以提供特定N:P比率。组合物的N:P比率是指一种或多种脂质中的氮原子:RNA中的磷酸酯基的数目的摩尔比。一般来说, 较低N:P比率是优选的。可以选择所述一种或多种RNA、脂质和其量以提供约2:1至约30:1, 诸如2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、12:1、14:1、16:1、18:1、20:1、22:1、24:1、26:1、28:1或30:1的N:P比率。在某些实施方案中, N:P比率可以是约2:1至约8:1。在其他实施方案中, N:P比率是约5:1至约8:1。例如, N:P比率可以是约5.0:1、约5.5:1、约5.67:1、约6.0:1、约6.5:1或约7.0:1。在一些实施方案中, N:P比率是约5.67:1。在一些实施方案中, N:P比率是约4.9:1。

[0625] 物理特性

[0626] 脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的特征可取决于其组分。例如,包括胆固醇作为结构脂质的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可具有与包括不同结构脂质的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)不同的特征。同样,脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的特征可取决于其组分的绝对或相对量。例如,包括较高摩尔分率的磷脂的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可具有与包括较低摩尔分率的磷脂的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)不同的特征。特征也可视纳米粒子组合物的制备方法和条件而变化。

[0627] 脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可通过多种方法表征。例如,可使用显微术(例如,透射电子显微术或扫描电子显微术)来检查纳米粒子组合物的形态和大小分布。可使用动态光散射或电位分析法(例如电位滴定)来测量 $\zeta$ 电位。也可使用动态光散射来测定粒径。 $\zeta$ 电位可在Wyatt Technologies Mobius $\zeta$ 电位仪器上测量。这种仪器通过“大规模平行相分析光散射”或MP-PALS原理来表征迁移率和 $\zeta$ 电位。不希望受理论束缚,这种测量比仅使用一个检测角的ISO方法13099-1:2012更灵敏并且应力感应更小,并且需要更高操作电压。在一些实施方案中,使用利用MP-PALS原理的仪器来测量本文所述的空LNP组合物脂质的 $\zeta$ 电位。 $\zeta$ 电位可在Malvern Zetasizer(Nano ZS)上测量。

[0628] 在一些实施方案中,本公开的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的平均直径是在数十nm与数百nm之间,如通过动态光散射(DLS)所测量。例如,在一些实施方案中,本公开的脂质纳米粒子的平均直径是约40nm至约150nm。在一些实施方案中,本公开的脂质纳米粒子的平均直径是约40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm。在一些实施方案中,脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的平均直径是约50nm至约100nm、约50nm至约90nm、约50nm至约80nm、约50nm至约70nm、约50nm至约60nm、约60nm至约100nm、约60nm至约90nm、约60nm至约80nm、约60nm至约70nm、约70nm至约150nm、约70nm至约130nm、约70nm至约100nm、约70nm至约90nm、约70nm至约80nm、约80nm至约150nm、约80nm至约130nm、约80nm至约100nm、约80nm至约90nm、约90nm至约150nm、约90nm至约130nm或约90nm至约100nm。在某些实施方案中,本公开的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的平均直径是约70nm至约130nm或约70nm至约100nm。在一些实施方案中,本公开的纳米粒子的平均直径是约80nm。在一些实施方案中,本公开的纳米粒子的平均直径是约100nm。在一些实施方案中,本公开的纳米粒子的平均直径是约110nm。在一些实施方案中,本公开的纳米粒子的平均直径是约120nm。

[0629] 在一些实施方案中,用本公开的脂质配制的多种脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的多分散性指数(“PDI”)小于0.3。在一些实施方案中,用本公开的脂质配制的多种脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)具有约0至约0.25的多分散性指数。在一些实施方案中,用本公开的脂质配制的多种脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)具有约0.10至约0.20的多分散性指数。

[0630] 可通过Laurdan广义极化(GPL)来测量本公开的纳米粒子的表面疏水性。在这种方法中,将Laurdan(一种荧光氨基萘酮脂质)后插入至纳米粒子表面中并且收集Laurdan的荧光光谱以确定标准化广义极化(N-GP)。在一些实施方案中,用本公开的脂质配制的纳米粒子具有在约0.5与约1.5之间的表述为N-GP的表面疏水性。例如,在一些实施方案中,用本公开的脂质配制的纳米粒子具有约0.5、约0.6、约0.7、约0.8、约0.9、约1.0、约1.1、约1.2、约

1.3、约1.4或约1.5的表述为N-GP的表面疏水性。在一些实施方案中,用本公开的脂质配制的纳米粒子具有约1.0或约1.1的表述为N-GP的表面疏水性。

[0631] 脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的 $\zeta$ 电位可用于指示组合物的动电位。例如, $\zeta$ 电位可描述胶状分散液(例如,纳米粒子组合物)的表面电荷。具有相对低电荷(正或负)的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)一般为所需的,因为更高电荷物质可与身体中的细胞、组织和其他要素非所需地相互作用。 $\zeta$ 电位的量值指示分散液中的相邻、带相同电荷粒子之间的静电排斥程度。在一些实施方案中,脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的 $\zeta$ 电位可以是约-10mV至约+20mV、约-10mV至约+15mV、约-10mV至约+10mV、约-10mV至约+5mV、约-10mV至约0mV、约-10mV至约-5mV、约-5mV至约+20mV、约-5mV至约+15mV、约-5mV至约+10mV、约-5mV至约+5mV、约-5mV至约0mV、约0mV至约+20mV、约0mV至约+15mV、约0mV至约+10mV、约0mV至约+5mV、约+5mV至约+20mV、约+5mV至约+15mV或约+5mV至约+10mV。

[0632] 治疗剂和/或预防剂的封装效率描述了相对于所提供的初始量,在制备之后用脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)封装或以其他方式与脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)缔合的治疗剂和/或预防剂的量。高封装效率是合乎需要的(例如,接近100%)。封装效率可例如通过比较在用一种或多种有机溶剂或清洁剂破碎负载LNP之前和之后含有负载LNP的溶液中的治疗剂和/或预防剂的量来测量。可使用荧光来测量溶液中的游离治疗剂和/或预防剂(例如RNA)的量。关于用本公开的脂质配制的负载LNP,治疗剂和/或预防剂的封装效率为至少50%,例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些实施方案中,封装效率为至少80%。在一些实施方案中,封装效率为至少90%。在一些实施方案中,治疗剂和/或预防剂的封装效率是在80%与100%之间。

[0633] 药物组合物

[0634] 脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可完整地或部分地被配制为药物组合物。药物组合物可包括一种或多种脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)。在一个实施方案中,药物组合物包含脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的群体。例如,药物组合物可包括一种或多种脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP),所述一种或多种脂质纳米粒子包括一种或多种不同的治疗剂和/或预防剂。药物组合物还可包括一种或多种药学上可接受的赋形剂或附属成分,诸如本文所述的那些。关于药物组合物和剂的配制和制造的一般准则可例如在Remington的The Science and Practice of Pharmacy,第21版,A.R.Gennaro; Lippincott, Williams&Wilkins, Baltimore, MD, 2006中获得。常规赋形剂和附属成分可用于任何药物组合物,除非任何常规赋形剂或附属成分可与纳米粒子组合物的一种或多种组分不相容。如果赋形剂或附属成分与脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的组分的组合可导致任何非所需生物效应或在其他方面导致有害效应,则所述赋形剂或附属成分可与所述组分不相容。

[0635] 在一些实施方案中,一种或多种赋形剂或附属成分可构成包括纳米粒子组合物的药物组合物的总质量或体积的超过50%。例如,一种或多种赋形剂或附属成分可构成药物组合物的50%、60%、70%、80%、90%或90%以上。在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂为至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%纯。在一些实施方案中,赋形剂获得批准用于人类和用于兽医用途。在一些实施方案中,赋形剂获得美国食品和药

物管理局批准。在一些实施方案中,赋形剂是医药级。在一些实施方案中,赋形剂满足美国药典(USP)、欧洲药典(EP)、英国药典和/或国际药典的标准。

[0636] 根据本公开的药物组合物中的所述一种或多种脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)、所述一种或多种药学上可接受的赋形剂和/或任何额外成分的相对量将视所治疗的受试者的身份、体格和/或状况并且进一步视组合物的施用途径而变化。举例来说,药物组合物可包含0.1%与100%(wt/wt)之间的一种或多种脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)。

[0637] 在某些实施方案中,本公开的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)和/或药物组合物被冷藏或冷冻用于存储和/或装运(例如,存储于4°C或更低温度,诸如约-150°C与约0°C之间或约-80°C与约-20°C之间的温度(例如,约-5°C、-10°C、-15°C、-20°C、-25°C、-30°C、-40°C、-50°C、-60°C、-70°C、-80°C、-90°C、-130°C或-150°C)下。例如,包含式(I)的阳离子脂质的药物组合物是冷藏于例如约-20°C、-30°C、-40°C、-50°C、-60°C、-70°C或-80°C下用于存储和/或装运的溶液。在某些实施方案中,本公开还涉及一种通过将包含式(I)的阳离子脂质的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)和/或药物组合物存储于4°C或更低温度,诸如约-150°C与约0°C之间或约-80°C与约-20°C之间的温度,例如约-5°C、-10°C、-15°C、-20°C、-25°C、-30°C、-40°C、-50°C、-60°C、-70°C、-80°C、-90°C、-130°C或-150°C)下来增加脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)和/或药物组合物的稳定性的方法。例如,本文所公开的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)和/或药物组合物例如在4°C或更低(例如,约4°C与-20°C之间)的温度下稳定约至少1周、至少2周、至少3周、至少4周、至少5周、至少6周、至少1个月、至少2个月、至少4个月、至少6个月、至少8个月、至少10个月、至少12个月、至少14个月、至少16个月、至少18个月、至少20个月、至少22个月或至少24个月。在一些实施方案中,所述制剂在约4°C下稳定至少4周。在某些实施方案中,本公开的药物组合物包含本文所公开的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)和选自Tris、乙酸盐(例如乙酸钠)、柠檬酸盐(例如柠檬酸钠)、盐水、PBS和蔗糖中的一者或多者的药学上可接受的载体。在某些实施方案中,本公开的药物组合物具有约7与8之间(例如,6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8.0,或7.5与8之间或7与7.8之间)的pH值。例如,本公开的药物组合物包含本文所公开的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)、Tris、盐水和蔗糖,并且具有约7.5-8的pH,所述pH适用于在例如约-20°C下存储和/或装运。例如,本公开的药物组合物包含本文所公开的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)和PBS并且具有约7-7.8的pH,所述pH适用于在例如约4°C或4°C以下存储和/或装运。在本公开背景中的“稳定性”、“稳定化”和“稳定”是指本文所公开的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)和/或药物组合物在给定的制造、制备、运输、存储和/或使用中条件下,例如当施加诸如剪切力、冷冻/解冻应力等应力时,抵抗化学或物理变化(例如,降解、粒径变化、聚集、封装变化等)。

[0638] 在一些实施方案中,本公开的药物组合物包含空LNP或负载LNP、冷冻保护剂、缓冲液或它们的组合。

[0639] 在一些实施方案中,冷冻保护剂包含一种或多种冷冻保护剂,并且所述一种或多种冷冻保护剂中的每一者独立地为多元醇(例如二醇或三醇,诸如丙二醇(即,1,2-丙二醇)、1,3-丙二醇、甘油、(+/-)-2-甲基-2,4-戊二醇、1,6-己二醇、1,2-丁二醇、2,3-丁二醇、乙二醇或二乙二醇)、非清洁剂磺基甜菜碱(例如NDSB-201(3-(1-吡啶基)-1-丙磺酸酯)、渗

压剂(例如L-脯氨酸或三甲胺N-氧化物二水合物)、聚合物(例如聚乙二醇200(PEG 200)、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG<sub>2k</sub>-DMG、PEG 3350、PEG 4000、PEG 8000、PEG 10000、PEG 20000、聚乙二醇单甲醚550(mPEG 550)、mPEG 600、mPEG 2000、mPEG 3350、mPEG 4000、mPEG 5000、聚乙烯吡咯烷酮(例如聚乙烯吡咯烷酮K 15)、新戊四醇丙氧基化物或聚丙二醇P 400)、有机溶剂(例如二甲亚砜(DMSO)或乙醇)、糖(例如D-(+)-蔗糖、D-山梨醇、海藻糖、D-(+)-麦芽糖单水合物、间赤藻糖醇、木糖醇、肌醇、D-(+)-蜜三糖五水合物、D-(+)-海藻糖二水合物或D-(+)-葡萄糖单水合物)或盐(例如,乙酸锂、氯化锂、甲酸锂、硝酸锂、硫酸锂、乙酸镁、乙酸钠、氯化钠、甲酸钠、丙二酸钠、硝酸钠、硫酸钠或其任何水合物)或它们的任何组合。在一些实施方案中,冷冻保护剂包含蔗糖。在一些实施方案中,冷冻保护剂和/或赋形剂是蔗糖。在一些实施方案中,冷冻保护剂包含乙酸钠。在一些实施方案中,冷冻保护剂和/或赋形剂是乙酸钠。在一些实施方案中,冷冻保护剂包含蔗糖和乙酸钠。

[0640] 在一些实施方案中,其中缓冲液选自由乙酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、tris缓冲液和它们的组合组成的组。

[0641] 脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)和/或包括一种或多种脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的药物组合物可施用于任何患者或受试者,包括可受益于通过向一种或多种特定细胞、组织、器官或系统或其组递送治疗剂和/或预防剂而提供的治疗效应的那些患者或受试者。尽管本文所提供的对于脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)和包括脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的药物组合物的描述原则上是有关适合施用于人类的组合物,熟练技术人员应理解此类组合物一般适合施用于任何其他哺乳动物。应充分了解,可对适合施用于人类的组合物进行修饰以便使所述组合物适合施用于多种动物,并且普通熟练的兽医药理学家仅需普通(若有的话)实验即可设计和/或执行此类修饰。考虑施用所述组合物的受试者包括但不限于人类、其他灵长类动物和其他哺乳动物,包括商业上相关的哺乳动物,诸如牛、猪、马、绵羊、猫、狗、小鼠和/或大鼠。本发明的脂质纳米粒子也可用于体外和离体用途。

[0642] 包括一种或多种脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的药物组合物可通过药理学技术中已知或今后开发的任何方法来制备。一般来说,所述制备方法包括使活性成分与赋形剂和/或一种或多种其他辅助成分缔合,并且接着有需要或必要时,将产物分成、成形和/或封装成所需单一剂量或多剂量单元。

[0643] 根据本公开的药物组合物可大批、作为单一单位剂量和/或作为多个单一单位剂量进行制备、封装和/或销售。如本文所用,“单位剂量”是包含预定量的活性成分的药物组合物(例如,纳米粒子组合物)的个别量。活性成分的量一般等于将施用于受试者的活性成分的剂量,和/或此类剂量的合宜分率,诸如此类剂量的一半或三分之一。

[0644] 药物组合物可以适用于多种施用途径和方法的多种形式制备。例如,药物组合物可以液体剂型(例如,乳液、微乳液、纳米乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酞剂)、可注射形式、固体剂型(例如,胶囊、片剂、丸剂、粉末和颗粒)、用于表面和/或透皮施用的剂型(例如,软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、粉末、溶液、喷雾剂、吸入剂和贴片)、悬浮液、粉末和其他形式制备。

[0645] 用于口服和肠胃外施用的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳液、微乳液、纳米乳液、溶液、悬浮液、糖浆和/或酞剂。除了活性成分以外,液体剂型也可包含本领域中通常使用的惰性稀释剂,诸如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂,诸如乙醇、异丙醇、碳酸乙

酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(尤其,棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇以及山梨聚糖的脂肪酸酯和它们的混合物。除了惰性稀释剂以外,口服组合物也可包括额外治疗剂和/或预防剂、额外的剂(诸如湿润剂、乳化和悬浮剂、甜味剂、调味剂和/或芳香剂)。在关于肠胃外施用的某些实施方案中,组合物与诸如Cremophor<sup>®</sup>、醇、油、改性油、二醇、聚山梨醇酯、环糊精、聚合物和/或它们的组合的增溶剂混合。

[0646] 可注射制剂(例如无菌可注射水性或油质悬浮液)可根据已知技术使用合适的分散剂、湿润剂和/或悬浮剂进行配制。无菌可注射制剂可以是无毒肠胃外可接受的稀释剂和/或溶剂中的无菌可注射溶液、悬浮液和/或乳液,例如1,3-丁二醇中的溶液。可使用的可接受的媒剂和溶剂有水、林格氏溶液(U.S.P.)和等渗氯化钠溶液。无菌、不挥发油惯常地用作溶剂或悬浮介质。出于此目的,可使用任何温和不挥发油,包括合成单酸甘油酯或二酸甘油酯。诸如油酸的脂肪酸可用于可注射剂的制备。

[0647] 可注射制剂可例如通过经由细菌截留过滤器过滤,和/或通过并入呈无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌,所述灭菌剂可在使用前溶解或分散于无菌水或其他无菌可注射介质中。

[0648] 为了延长活性成分的效应,通常可需要减慢从皮下或肌内注射吸收所述活性成分。此举可通过使用具有弱水溶性的结晶或非晶形材料的液体悬浮液来实现。药物的吸收速率则取决于它的溶解速率,而它的溶解速率又可取决于晶体大小和结晶形式。或者,通过使药物溶解或悬浮于油媒剂中来实现肠胃外施用的药物形式的延迟吸收。可注射储槽形式是通过在诸如聚丙交酯-聚乙交酯的生物可降解聚合物中形成药物的微封装基质而制得。视药物与聚合物的比率和所用的特定聚合物的性质而定,可控制药物释放的速率。其他生物可降解聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酞)。储槽可注射制剂是通过将药物截留于可与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备。

[0649] 用于直肠或阴道施用的组合物典型地为栓剂,所述栓剂可通过混合组合物与合适的非刺激性赋形剂(诸如可可脂、聚乙二醇或栓剂蜡)来制备,所述赋形剂在环境温度下为固体,但在体温下为液体并且因此在直肠或阴道腔中熔融并且释放活性成分。

[0650] 用于口服施用的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、薄膜、粉末和颗粒。在所述固体剂型中,活性成分与至少一种惰性、药学上可接受的赋形剂,诸如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或填充剂或增量剂(例如,淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸)、粘合剂(例如,羧基甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶)、保湿剂(例如甘油)、崩解剂(例如,琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、特定硅酸盐和碳酸钠)、溶液延迟剂(例如石蜡)、吸收促进剂(例如季铵化合物)、湿润剂(例如鲸蜡醇和甘油单硬脂酸酯)、吸收剂(例如高岭土和膨润土)和润滑剂(例如,滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠)和它们的混合物混合。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型可包含缓冲剂。

[0651] 类似类型的固体组合物可在使用诸如乳糖(lactose/milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等赋形剂的软填充和硬填充明胶胶囊中用作填充剂。片剂、糖衣药丸、胶囊、丸剂和颗粒的固体剂型可用包衣和壳,诸如肠溶包衣和药物配制技术中众所周知的其他包衣制备。它们可任选地包含失透剂并且可具有如下组成,所述组成使其任选地以延迟方式在肠道的特定部分中仅或优先地释放活性成分。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物和

蜡。类似类型的固体组合物可在使用诸如乳糖以及高分子量聚乙二醇等赋形剂的软填充和硬填充明胶胶囊中用作填充剂。

[0652] 用于组合物的表面和/或透皮施用的剂型可包括软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、粉末、溶液、喷雾剂、吸入剂和/或贴片。一般来说,活性成分在无菌条件下与可需要的药学上可接受的赋形剂和/或任何所需防腐剂和/或缓冲液混合。另外,本公开考虑使用透皮贴片,所述透皮贴片通常具有向身体提供化合物的控制递送的附加优势。此类剂型可例如通过使化合物溶解和/或分散于适当介质中来制备。或者或另外,可通过提供速率控制膜和/或通过在聚合物基质和/或凝胶中分散化合物来控制速率。

[0653] 用于递送本文所述的皮内药物组合物的合适器件包括短针器件。皮内组合物可通过限制针进入皮肤中的有效穿透长度的器件来施用。经由液体射流注射器和/或经由刺穿角质层并且产生到达真皮的射流的针向真皮递送液体组合物的射流注射器件是合适的。使用压缩气体来加速呈粉末形式的疫苗通过皮肤外层到达真皮的弹道粉末/粒子递送器件是合适的。或者或另外,常规注射器可用于皮内施用的经典孟陀方法(mantoux method)中。

[0654] 适用于表面施用的制剂包括但不限于液体和/或半液体制剂,诸如搽剂、洗剂、水包油和/或油包水乳液(诸如乳膏、软膏和/或糊剂和/或溶液和/或悬浮液)。可表面施用的制剂可例如包含约1%至约10%(wt/wt)活性成分,不过活性成分的浓度可高达活性成分在溶剂中的溶解度极限。用于表面施用的制剂还可包含一种或多种本文所述的额外成分。

[0655] 药物组合物可以适用于经由口腔进行肺部施用的制剂形式进行制备、封装和/或销售。此类制剂可包括包含活性成分的干燥粒子。此类组合物便利地呈干粉形式以使用包括干粉储集器的器件(推进剂流可被引导至其中以分散粉末)和/或使用自推进溶剂/粉末分配容器(诸如包含溶解和/或悬浮于密封容器中的低沸点推进剂中的活性成分的器件)进行施用。干粉组合物可包括固体细粉稀释剂,诸如糖,并且便利地以单位剂型提供。

[0656] 低沸点推进剂一般包括在大气压力下具有低于65°F的沸点的液体推进剂。一般来说,推进剂可构成组合物的50%至99.9%(wt/wt),并且活性成分可构成组合物的0.1%至20%(wt/wt)。推进剂还可包含额外成分,诸如液体非离子和/或固体阴离子表面活性剂和/或固体稀释剂(其可具有与包含活性成分的粒子相同级别的粒径)。

[0657] 配制用于肺部递送的药物组合物可提供呈溶液和/或悬浮液的小液滴形式的活性成分。此类制剂可作为任选地无菌并且包含活性成分的水性和/或稀醇溶液和/或悬浮液进行制备、封装和/或销售,并且可便利地使用任何喷雾和/或雾化器件进行施用。此类制剂还可包含一种或多种额外成分,包括但不限于调味剂(诸如糖精钠)、挥发油、缓冲剂、表面活性剂和/或防腐剂(诸如羟基苯甲酸甲酯)。由这种施用途径提供的小液滴可具有在约1nm至约200nm范围内的平均直径。

[0658] 本文中描述为可用于肺部递送的制剂可用于鼻内递送药物组合物。适用于鼻内施用的另一制剂是包含活性成分并且具有约0.2 $\mu\text{m}$ 至500 $\mu\text{m}$ 的平均粒径的粗粉。此类制剂是以其中采取鼻吸的方式来施用,即通过鼻道从紧贴鼻子的粉末容器快速吸入。

[0659] 适用于鼻施用的制剂可例如包含约低达0.1%(wt/wt)并且高达100%(wt/wt)的活性成分,并且可包含一种或多种本文所述的额外成分。药物组合物可以适用于颊施用的制剂形式进行制备、封装和/或销售。此类制剂可例如呈使用常规方法制得的片剂和/或口含锭形式,并且可例如0.1%至20%(wt/wt)活性成分,余量包含口服可溶解和/或可降解组

合物并且任选地包含一种或多种本文所述的额外成分。或者,适用于颊施用的制剂可包括包含活性成分的粉末和/或烟雾化和/或雾化溶液和/或悬浮液。当分散时,此类粉状、烟雾化和/或雾化制剂可具有在约0.1nm至约200nm范围内的平均粒子和/或小液滴大小,并且还可包含一种或多种本文所述的任何额外成分。

[0660] 药物组合物可以适用于眼施用的制剂形式进行制备、封装和/或销售。此类制剂可例如呈滴眼剂形式,所述滴眼剂包括例如活性成分于水性或油性液体赋形剂中的0.1/1.0% (wt/wt) 溶液和/或悬浮液。此类滴剂还可包含缓冲剂、盐和/或一种或多种其他本文所述的任何额外成分。可用的其他眼施用制剂包括包含呈微晶形式和/或呈脂质体制剂的活性成分的那些。滴耳剂和/或滴眼剂预期在本公开的范围之内。

[0661] mRNA疗法

[0662] 作为药物形式的mRNA具有递送分泌蛋白以及细胞内蛋白和跨膜蛋白的潜力。作为药物形式的mRNA具有递送跨膜和细胞内蛋白(即,标准生物制剂由于它们在以蛋白质形式递送时不能跨过细胞膜而无法接近的靶标)的潜力。实现基于mRNA的疗法的一项主要挑战在于最佳递送媒剂的鉴别。归因于较大大小、化学不稳定性和潜在免疫原性,mRNA需要可提供免受核酸内切酶和核酸外切酶的保护,以及遮蔽货物躲开免疫哨兵的递送媒剂。就此来说,脂质纳米粒子(LNP)已被鉴别为主要选项。

[0663] 关于脂质纳米粒子递送系统的关键性能标准是使细胞摄取增至最高并且使得mRNA能从内体有效释放。在一个实施方案中,包含本文所公开的新颖脂质的本发明LNP展示细胞摄取和内体释放中的至少一者的改进。同时,LNP必须提供稳定药物产品并且能够安全地以治疗相关水平给药。LNP是典型地由氨基脂质、磷脂、胆固醇和PEG-脂质组成的多组分系统。核酸货物的有效递送和粒子稳定性的方面需要各组分。被认为驱动细胞摄取、内体逃逸和耐受性的关键组分是氨基脂质。胆固醇和PEG-脂质促进体内和货架期药物产品的稳定性,而磷脂提供LNP的额外融合性,因此帮助驱动内体逃逸并且使得核酸在细胞的细胞溶质中可生物利用。

[0664] 过去二十年来,已关于寡核苷酸递送开发了数种氨基脂质系列,包括氨基脂质MC3(DLin-MC3-DMA)。基于MC3的LNP已显示有效递送mRNA。此类LNP在静脉内递送时由阿朴脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)快速地调理,使得能由低密度脂蛋白受体(LDLr)进行细胞摄取。然而,仍然担心MC3的长组织半衰期可能促进阻碍它用于长期疗法的不利副作用。另外,大量文献证据表明,脂质纳米粒子的长期给药可产生数种毒性副作用,包括补体激活相关性假过敏(CARPA)和肝损伤。因此,为了释放用于人类的基于mRNA和其他核酸、核苷酸或肽的疗法的潜力,需要一类具有增加的递送效率连同将使得能够在人类中进行长期给药的代谢和毒性概况的LNP。

[0665] 治疗多种疾病的能力需要以变化的剂量水平长期安全地给药的顺从度。经由氨基脂质结构的系统性优化,本公开的脂质被鉴别为平衡化学稳定性、归因于改进的内体逃逸的改进的递送效率、快速体内代谢和纯净毒性概况的脂质。这些特征的组合提供可长期地给药而不激活免疫系统的药物候选物。初始啮齿动物筛选导致具有良好递送效率和药物动力学的主要脂质的鉴别。前导LNP在单一和重复给药之后进一步在非人类灵长类动物中针对递送效率进行概况剖绘。最后,在大鼠和非人类灵长类动物中的一个重复剂量毒性研究中评估优化的LNP。不希望受理论束缚,本公开的新颖可离子化脂质具有改进的细胞递

送、改进的蛋白表达和改进的生物可降解性特性,这可导致如与缺乏本发明脂质的LNP相比细胞中的mRNA表达的超过2倍、5倍、10倍、15倍或20倍增加。在另一实施方案中,包含本发明脂质的LNP可导致如与其他细胞类型相比特异性(例如,优先)递送至一种或多种特定细胞类型,由此导致如与缺乏本发明脂质的LNP相比特定细胞或组织中的mRNA表达的超过2倍、5倍、10倍、15倍或20倍增加。这些技术改进允许在急性和慢性疾病中安全并且有效地使用基于mRNA的疗法。

#### [0666] 使用方法

[0667] 在一些方面,本公开提供一种向细胞(例如哺乳动物细胞)递送治疗剂和/或预防剂的方法。这种方法包括使所述细胞与本公开的负载LNP或药物组合物接触的步骤,由此将所述治疗剂和/或预防剂递送至所述细胞。在一些实施方案中,所述细胞是在受试者中并且所述接触包含向所述受试者施用所述细胞。在一些实施方案中,所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂、结构脂质、PEG脂质和一种或多种治疗剂和/或预防剂,由此将所述治疗剂和/或预防剂递送至所述细胞。

[0668] 在一些实施方案中,本公开提供一种向受试者内的细胞递送治疗剂和/或预防剂的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG<sub>2k</sub>-DMG以及选自核苷酸、多肽和核酸(例如RNA)的一种或多种治疗剂和/或预防剂。

[0669] 在一些实施方案中,本公开提供一种向受试者内的细胞递送治疗剂和/或预防剂的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG-1以及选自核苷酸、多肽和核酸(例如RNA)的一种或多种治疗剂和/或预防剂。

[0670] 在一些方面,本公开提供一种向哺乳动物器官或组织(例如,肝、肾、脾或肺)递送(例如特异性地递送)治疗剂和/或预防剂的方法。这种方法包括使所述细胞与本公开的负载LNP或药物组合物接触的步骤,由此将所述治疗剂和/或预防剂递送至靶标器官或组织。在一些实施方案中,所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂、结构脂质、PEG脂质和一种或多种治疗剂和/或预防剂,由此将所述治疗剂和/或预防剂递送至靶标器官或组织。在一些实施方案中,所述靶标器官是肺或所述靶标组织是肺内皮。

[0671] 在一些实施方案中,本公开提供一种向受试者的器官特异性地递送治疗剂和/或预防剂的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-

IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG<sub>2k</sub>-DMG以及选自核苷酸、多肽和核酸(例如RNA)的一种或多种治疗剂和/或预防剂。

[0672] 在一些实施方案中,本公开提供一种向受试者的器官特异性地递送治疗剂和/或预防剂的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG-1以及选自核苷酸、多肽和核酸(例如RNA)的一种或多种治疗剂和/或预防剂。

[0673] 在一些方面,本公开提供一种用于向靶标组织(例如,肝、脾或肺)增强递送治疗剂和/或预防剂(例如mRNA)的方法。这种方法包括使所述细胞与本公开的负载LNP或药物组合物接触的步骤,由此将所述治疗剂和/或预防剂递送至靶标组织(例如,肝、肾、脾或肺)。在一些实施方案中,所述靶标组织是肺内皮。在一些实施方案中,所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂、结构脂质、PEG脂质和一种或多种治疗剂和/或预防剂,由此将所述治疗剂和/或预防剂递送至靶标组织(例如,肝、肾、脾或肺)。在一些实施方案中,所述靶标组织是肺内皮。

[0674] 在一些实施方案中,本公开提供一种用于向靶标组织增强递送治疗剂和/或预防剂的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG<sub>2k</sub>-DMG以及选自核苷酸、多肽和核酸(例如RNA)的一种或多种治疗剂和/或预防剂。

[0675] 在一些实施方案中,本公开提供一种用于向靶标组织增强递送治疗剂和/或预防剂的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG-1以及选自核苷酸、多肽和核酸(例如RNA)的一种或多种治疗剂和/或预防剂。在一些实施方案中,所述靶标组织是肺内皮。

[0676] 在一些方面,本公开提供一种在细胞(例如哺乳动物细胞)中产生所关注的多肽的方法。这种方法包括使所述细胞与本公开的负载LNP或药物组合物接触的步骤,其中所述负载LNP或药物组合物包含mRNA,由此所述mRNA能够在细胞中翻译以产生所述多肽。在一些实施方案中,所述细胞是在受试者中并且所述接触包含向所述受试者施用所述细胞。在一些实施方案中,所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂、结构脂质、PEG脂质和mRNA,由此所述mRNA能够在细胞中翻译以产生所述多肽。

[0677] 在一些实施方案中,本公开提供一种在细胞中产生所关注的多肽的方法,其中所

述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG<sub>2k</sub>-DMG以及mRNA。例如,在一些实施方案中,本公开提供一种在细胞中产生所关注的多肽的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含表1的阳离子脂质、表IL-1至IL-7的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG<sub>2k</sub>-DMG以及mRNA。

[0678] 在一些实施方案中,本公开提供一种在细胞中产生所关注的多肽的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG-1以及mRNA。例如,在一些实施方案中,本公开提供一种在细胞中产生所关注的多肽的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含表1的阳离子脂质、表IL-1至IL-7的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG-1以及mRNA。

[0679] 在一些方面,本公开提供一种治疗有需要的哺乳动物(例如人类)的疾病或病症的方法。所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的本公开的负载LNP或药物组合物的步骤。在一些实施方案中,所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂、结构脂质、PEG脂质和一种或多种治疗剂和/或预防剂,由此将所述治疗剂和/或预防剂递送至所述细胞。在一些实施方案中,所述疾病或病症的特征在于功能障碍性或异常蛋白或多肽活性。例如,所述疾病或病症选自罕见病、传染病、癌症和增生性疾病、遗传疾病、自身免疫疾病、糖尿病、神经退行性疾病、心血管和肾血管疾病和代谢疾病组成的组。

[0680] 在一些实施方案中,本公开提供一种治疗受试者的疾病或病症的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG<sub>2k</sub>-DMG以及选自核苷酸、多肽和核酸(例如RNA)的一种或多种治疗剂和/或预防剂。例如,在一些实施方案中,本公开提供一种治疗受试者的疾病或病症的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含表1的阳离子脂质、表IL-1至IL-7的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG<sub>2k</sub>-DMG以及选自核苷酸、多肽和核酸(例如RNA)的一种或多种治疗剂和/或预防剂。

[0681] 在一些实施方案中,本公开提供一种治疗受试者的疾病或病症的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG-1以及选自核苷酸、多肽和核酸(例如RNA)的一种或多种治疗剂和/或预防剂。例如,在一些实施方案中,本公开提供一种治疗受试者的疾病或病症的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含表1的阳离子脂质、表IL-1至

IL-7的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG-1以及选自核苷酸、多肽和核酸(例如RNA)的一种或多种治疗剂和/或预防剂。

[0682] 在另一方面中,本公开提供一种降低免疫原性的方法,所述方法包括将本公开的负载LNP或药物组合物引入细胞中,其中如与细胞中通过参考组合物诱导的细胞免疫反应的诱导相比,所述负载LNP或药物组合物降低所述细胞对所述负载LNP或药物组合物的细胞免疫反应的诱导。在一些实施方案中,所述细胞是在受试者中并且所述接触包含向所述受试者施用所述细胞。在一些实施方案中,所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、磷脂、结构脂质、PEG脂质以及选自核苷酸、多肽和核酸(例如RNA)的一种或多种治疗剂和/或预防剂,其中如与通过参考组合物诱导的细胞中的细胞免疫反应的诱导相比,包含式(I)的阳离子脂质和式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质的脂质纳米粒子降低细胞对包含式(I)的阳离子脂质和式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质的脂质纳米粒子的细胞免疫反应的诱导。例如,所述细胞免疫反应是先天性免疫反应、适应性免疫反应或两者。

[0683] 在一些实施方案中,本公开提供一种降低受试者的免疫原性的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG<sub>2k</sub>-DMG以及选自核苷酸、多肽和核酸(例如RNA)的一种或多种治疗剂和/或预防剂。例如,在一些实施方案中,本公开提供一种降低受试者的免疫原性的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含表1的阳离子脂质、表IL-1至IL-7的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG<sub>2k</sub>-DMG以及选自核苷酸、多肽和核酸(例如RNA)的一种或多种治疗剂和/或预防剂。

[0684] 在一些实施方案中,本公开提供一种降低受试者的免疫原性的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含式(I)的阳离子脂质、式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG-1以及选自核苷酸、多肽和核酸(例如RNA)的一种或多种治疗剂和/或预防剂。例如,在一些实施方案中,本公开提供一种降低受试者的免疫原性的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米粒子的步骤,所述脂质纳米粒子包含表1的阳离子脂质、表IL-1至IL-7的可离子化脂质、DSPC、胆固醇和PEG-1以及选自核苷酸、多肽和核酸(例如RNA)的一种或多种治疗剂和/或预防剂。

[0685] 本公开还包括合成式(I)的阳离子脂质的方法,和制备包括包含式(I)的阳离子脂质的脂质组分的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的方法。

[0686] 在细胞中产生多肽的方法

[0687] 本公开提供在哺乳动物细胞中产生所关注的多肽的方法。产生多肽的方法涉及使

细胞与包括编码所关注的多肽的mRNA的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)接触。在细胞与纳米粒子组合物接触时,所述mRNA可在细胞中溶解并翻译以产生所关注的多肽。

[0688] 一般来说,使哺乳动物细胞与包括编码所关注的多肽的mRNA的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)接触的步骤可在体内、离体、在培养物中或在体外执行。与细胞接触的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的量和/或其中mRNA的量可取决于所接触的细胞或组织的类型、施用方式、脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)和其中mRNA的生理化学特征(例如,大小、电荷和化学组成)以及其他因素。一般来说,脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的有效量将允许细胞中的有效多肽产生。关于效率的度量可包括多肽翻译(由多肽表达指示)、mRNA降解的水平和免疫反应指示剂。

[0689] 使包括mRNA的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)与细胞接触的步骤可涉及或引起转染。脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的脂质组分中包括的磷脂可例如通过与细胞或细胞内膜相互作用和/或融合而促进转染和/或增加转染效率。转染可允许细胞内的mRNA翻译。

[0690] 在一些实施方案中,本文所述的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可在治疗上使用。例如,脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)中包括的mRNA可编码治疗多肽(例如,在可翻译区中)并且在接触和/或进入(例如,转染至)细胞中时产生所述治疗多肽。在其他实施方案中,脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)中包括的mRNA可编码可改进或增加受试者的免疫性的多肽。例如,mRNA可编码粒细胞-集落刺激因子或曲妥珠单抗(trastuzumab)。

[0691] 在某些实施方案中,脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)中包括的mRNA可编码重组多肽,所述重组多肽可置换可大体上不存在于与纳米粒子组合物接触的细胞中的一种或多种多肽。所述一种或多种大体上不存在的多肽可归因于编码基因或其调节路径的基因突变而缺乏。或者,通过mRNA翻译产生的重组多肽可拮抗存在于细胞中、细胞的表面上或从细胞分泌的内源蛋白的活性。拮抗性重组多肽可需要抗击由所述内源蛋白的活性引起的有害效应,诸如改变的活性或通过突变引起的定位。在另一替代中,通过mRNA翻译产生的重组多肽可间接地或直接地拮抗存在于细胞中、细胞的表面上或从细胞分泌的生物部分的活性。受到拮抗的生物部分可包括但不限于脂质(例如胆固醇)、脂蛋白(例如低密度脂蛋白)、核酸、碳水化合物和小分子毒素。通过mRNA翻译产生的重组多肽可进行工程改造以定位于细胞内,诸如特定隔室(诸如细胞核)内,或可进行工程改造以从细胞分泌或易位至细胞的质膜。

[0692] 在一些实施方案中,使细胞与包括mRNA的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)接触可降低细胞对外源核酸的先天性免疫反应。细胞可与包括第一量的包括可翻译区的第一外源mRNA的第一脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)接触并且可测定所述细胞对所述第一外源mRNA的先天性免疫反应的水平。随后,所述细胞可与包括第二量的所述第一外源mRNA的第二组合物接触,所述第二量是与所述第一量相比较少量的所述第一外源mRNA。或者,所述第二组合物可包括第一量的不同于所述第一外源mRNA的第二外源mRNA。使所述细胞与第一和第二组合物接触的步骤可重复一次或多次。另外,可任选地测定细胞中的多肽产生(例如翻译)效率,并且所述细胞可重复地与第一和/或第二组合物再接触,直至实现靶标蛋白产生效率。

[0693] 向细胞和器官递送治疗剂的方法

[0694] 本公开提供向哺乳动物细胞或器官递送治疗剂和/或预防剂的方法。向细胞递送治疗剂和/或预防剂涉及向受试者施用包括所述治疗剂和/或预防剂的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP),其中所述组合物的施用涉及使所述细胞与所述组合物接触。例如,可以将蛋白质、细胞毒性剂、放射性离子、化学治疗剂或核酸(诸如RNA,例如mRNA)递送至细胞或器官。在治疗剂和/或预防剂是mRNA的情况下,在细胞与所述纳米粒子组合物接触后,可翻译mRNA可在细胞中进行翻译以产生所关注的多肽。然而,大体上不可翻译的mRNA也可递送至细胞。大体上不可翻译的mRNA可用作疫苗和/或可隔绝细胞的翻译组分以降低其他物质在细胞中的表达。

[0695] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可靶向特定类型或类别的细胞(例如,特定器官或其系统的细胞)。例如,包括所关注的治疗剂和/或预防剂的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可特异性地递送至哺乳动物肝、肾、脾或肺。特异性递送至特定类别的细胞、器官或系统或其组暗示相对于其他目的地,较高比例的包括治疗剂和/或预防剂的脂质纳米粒子(例如负载LNP)被递送至所关注的目的地(例如组织)。在一些实施方案中,包含mRNA的负载LNP的特异性递送可导致如与另一目的地(例如脾)的细胞相比,靶向目的地(例如所关注的组织,诸如肝)的细胞中的mRNA表达的超过2倍、5倍、10倍、15倍或20倍增加。在一些实施方案中,所关注的组织选自由肝、肾、肺、脾和肿瘤组织(例如,经由肿瘤内注射)组成的组。

[0696] 作为靶向或特异性递送的另一实例,编码细胞表面上的蛋白结合搭配物(例如,抗体或其功能片段、骨架蛋白或肽)或受体的mRNA可包括于纳米粒子组合物中。mRNA可另外或替代地用于指导脂质、碳水化合物或其他生物部分的合成和细胞外定位。或者,脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的其他治疗剂和/或预防剂或要素(例如脂质或配体)可基于它们对特定受体(例如低密度脂蛋白受体)的亲合力加以选择,以致脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可更容易地与包括所述受体的靶标细胞群体相互作用。例如,配体可包括但不限于特定结合对的成员、抗体、单克隆抗体、Fv片段、单链Fv(scFv)片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、单域抗体、骆驼化抗体和其片段、人源化抗体和其片段以及其多价形式;包括单特异性或双特异性抗体的多价结合试剂,诸如二硫化物稳定化Fv片段、scFv串联、双功能抗体、三功能抗体或四功能抗体;和适体、受体和融合蛋白。

[0697] 在一些实施方案中,配体可以是表面结合抗体,所述表面结合抗体可允许对细胞靶向特异性的调整。这是尤其有用的,因为高度特异性抗体可关于所需靶向位点针对所关注的表位产生。在一些实施方案中,多种抗体在细胞的表面上表达,并且每种抗体可对所需靶标具有不同特异性。此类方法可增加靶向相互作用的亲合力和特异性。

[0698] 配体可例如由生物领域的技术人员基于细胞的所需定位或功能进行选择。

[0699] 靶向细胞可包括但不限于肝细胞、上皮细胞、造血细胞、上皮细胞、内皮细胞、肺细胞、骨细胞、干细胞、间质细胞、神经细胞、心脏细胞、脂肪细胞、血管平滑肌细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞、 $\beta$ 细胞、垂体细胞、滑膜衬里细胞、卵巢细胞、睾丸细胞、纤维母细胞、B细胞、T细胞、网状细胞、白血球、粒细胞和肿瘤细胞。

[0700] 治疗疾病和病症的方法

[0701] 脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可用于治疗疾病、病症或疾患。尤其,此类组合物可用于治疗特征在于缺失或异常蛋白或多肽活性的疾病、病症或疾患。例如,包含编码

缺失或异常多肽的mRNA的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可施用或递送至细胞。mRNA的后续翻译可产生所述多肽,由此降低或消除由所述多肽引起的活性缺失或异常而引起的问题。因为翻译可快速地发生,故所述方法和组合物可用于治疗急性疾病、病症或疾患,诸如败血症、中风和心肌梗塞。脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)中包括的治疗剂和/或预防剂也可能能够改变给定物质的转录速率,由此影响基因表达。

[0702] 可施用组合物的特征在于功能障碍性或异常蛋白或多肽活性的疾病、病症和/或疾患包括但不限于罕见病、传染病(作为疫苗和治疗剂两者)、癌症和增生性疾病、遗传疾病、自身免疫疾病、糖尿病、神经退行性疾病、心血管和肾血管疾病和代谢疾病。多种疾病、病症和/或疾患的特征可在于缺失(或大体上削弱,以致适当蛋白功能未出现)蛋白活性。此类蛋白质可以不存在,或它们可以是基本上非功能性的。本公开提供一种通过施用脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)来治疗受试者的此类疾病、病症和/或疾患的方法,所述脂质纳米粒子包括RNA和包括根据式(I)的脂质的阳离子脂质组分、包括根据式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的脂质的可离子化脂质组分、磷脂(任选地不饱和)、PEG脂质和结构脂质,其中所述RNA可以是编码拮抗或以其他方式克服存在于受试者的细胞中的异常蛋白活性的多肽的mRNA。

[0703] 本公开提供了方法,所述方法涉及施用包括一种或多种治疗剂和/或预防剂的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)和包括所述脂质纳米粒子的药物组合物。术语治疗剂和预防剂可在本文中关于本公开的特征和实施方案互换使用。其治疗组合物或成像、诊断或预防组合物可使用有效用于预防、治疗、诊断疾病、病症和/或疾患或使疾病、病症和/或疾患成像和/或任何其他目的的任何合理量和任何施用途径施用于受试者。施用于给定受试者的特定量可视所述受试者的物种、年龄和一般状况;施用目的;特定组合物;施用模式;等而变化。为便于施用和剂量的均一性,根据本公开的组合物可以剂量单位形式进行配制。然而,应了解,本公开的组合物的总每日用量将由主治医生在合理医学判断的范围内确定。针对任何特定患者的特定治疗有效、预防有效或在其他方面适当的剂量水平(例如,用于成像)将取决于多种因素,包括所治疗的病症的严重程度和鉴别(若存在的话);所用的一种或多种治疗剂和/或预防剂;所用特定组合物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;施用时间、施用途径和所用的特定药物组合物的排泄速率;治疗持续时间;与所用的特定药物组合物组合或同时使用的药物;和药物领域中众所周知的类似因素。

[0704] 负载LNP可通过任何途径进行施用。在一些实施方案中,包括一种或多种本文所述的负载LNP的组合物(包括预防、诊断或成像组合物)通过多种途径中的一者或多者进行施用,包括口服、静脉内、肌内、动脉内、皮下、透皮或皮内、皮间、腹膜内、粘膜、鼻、肿瘤内、鼻内、通过吸入;作为口服喷雾剂和/或粉末、鼻喷雾剂和/或气雾剂,和/或经由门静脉导管。在一些实施方案中,组合物可静脉内、肌内、皮内、动脉内、肿瘤内、皮下或通过任何其他肠胃外施用途径或通过吸入进行施用。然而,考虑到药物递送科学的可能进展,本公开涵盖通过任何适当途径递送或施用本文所述的组合物。一般来说,最适当的施用途径将取决于多种因素,包括包含一种或多种治疗剂和/或预防剂的负载LNP的性质(例如,它在诸如血流和胃肠道的多种身体环境中的稳定性)、患者状况(例如,所述患者是否能够耐受特定施用途径)等。

[0705] 在某些实施方案中,根据本公开的组合物可以给定剂量中足以递送约0.0001mg/kg至约10mg/kg、约0.001mg/kg至约10mg/kg、约0.005mg/kg至约10mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、约0.05mg/kg至约10mg/kg、约0.1mg/kg至约10mg/kg、约1mg/kg至约10mg/kg、约2mg/kg至约10mg/kg、约5mg/kg至约10mg/kg、约0.0001mg/kg至约5mg/kg、约0.001mg/kg至约5mg/kg、约0.005mg/kg至约5mg/kg、约0.01mg/kg至约5mg/kg、约0.05mg/kg至约5mg/kg、约0.1mg/kg至约5mg/kg、约1mg/kg至约5mg/kg、约2mg/kg至约5mg/kg、约0.0001mg/kg至约2.5mg/kg、约0.001mg/kg至约2.5mg/kg、约0.005mg/kg至约2.5mg/kg、约0.01mg/kg至约2.5mg/kg、约0.05mg/kg至约2.5mg/kg、约0.1mg/kg至约2.5mg/kg、约1mg/kg至约2.5mg/kg、约2mg/kg至约2.5mg/kg、约0.0001mg/kg至约1mg/kg、约0.001mg/kg至约1mg/kg、约0.005mg/kg至约1mg/kg、约0.01mg/kg至约1mg/kg、约0.05mg/kg至约1mg/kg、约0.1mg/kg至约1mg/kg、约0.0001mg/kg至约0.25mg/kg、约0.001mg/kg至约0.25mg/kg、约0.005mg/kg至约0.25mg/kg、约0.01mg/kg至约0.25mg/kg、约0.05mg/kg至约0.25mg/kg或约0.1mg/kg至约0.25mg/kg的治疗剂和/或预防剂(例如mRNA)的剂量水平进行施用,其中1mg/kg (mpk) 剂量提供1mg治疗剂和/或预防剂/1kg受试者体重。在一些实施方案中,可施用约0.001mg/kg至约10mg/kg的剂量的负载LNP的治疗剂和/或预防剂。在其他实施方案中,可施用约0.005mg/kg至约2.5mg/kg的剂量的治疗剂和/或预防剂。在某些实施方案中,可施用约0.1mg/kg至约1mg/kg的剂量。在其他实施方案中,可施用约0.05mg/kg至约0.25mg/kg的剂量。剂量可以相同或不同量每天施用一次或多次,以获得所需水平的mRNA表达和/或治疗、诊断、预防或成像效应。所需剂量可例如一天三次、一天二次、一天一次、每隔一天、每三天、每周、每两周、每三周或每四周进行递送。在某些实施方案中,所需剂量可使用多次施用(例如二次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次或更多次施用)进行递送。在一些实施方案中,单一剂量可例如在手术程序之前或之后或在急性疾病、病症或疾患的情形中进行施用。

[0706] 包括一种或多种治疗剂和/或预防剂的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可与一种或多种其他治疗剂、预防剂、诊断剂或成像剂组合。“与.....组合(in combination with)”不意图暗示所述剂必须同时施用和/或配制用于一起递送,不过这些递送方法是在本公开的范围内。例如,可组合施用包括一种或多种不同的治疗剂和/或预防剂的一种或多种脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)。组合物可与一种或多种其他所需治疗剂或医学程序并行地、在一种或多种其他所需治疗剂或医学程序之前或之后施用。一般来说,每种剂将以针对所述剂确定的剂量和/或时程施用。在一些实施方案中,本公开涵盖其组合物或成像、诊断或预防组合物与改进它们的生物可用性、降低和/或修饰它们的代谢、抑制它们的排泄和/或修改它们在身体内的分布的剂的组合递送。

[0707] 应进一步理解,组合使用的治疗、预防、诊断或成像活性剂可在单一组合物中一起施用,或在不同组合物中分开地施用。一般来说,预期组合使用的剂是以不超过它们在个别地使用时的水平的水平使用。在一些实施方案中,组合使用的水平可低于个别地使用的那些。

[0708] 用于组合方案中的疗法(治疗剂或程序)的特定组合将考虑到所需治疗剂和/或程序的可相容性以及欲实现的所需治疗效应。还应理解,所用疗法可对同一病症实现所需效应(例如,可用于治疗癌症的组合物可与化学治疗剂并行地施用),或它们可实现不同效应

(例如,对诸如输注相关反应的任何不良效应的控制)。

[0709] 脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可与剂组合使用以增加组合物的有效性和/或治疗窗。此类剂可以是例如消炎化合物、类固醇(例如皮质类固醇)、斯他汀(statin)、雌二醇、BTK抑制剂、S1P1促效剂、糖皮质激素受体调节剂(GRM)或抗组织胺。在一些实施方案中,脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可与地塞米松、甲氨喋呤、乙酰胺酚、H1受体阻断剂或H2受体阻断剂组合使用。在一些实施方案中,一种治疗有需要的受试者或向受试者(例如哺乳动物)递送治疗剂和/或预防剂的方法可涉及在施用纳米粒子组合物之前用一种或多种剂预处理所述受试者。例如,受试者可用适用量(例如,10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg或任何其他适用量)的地塞米松、甲氨喋呤、乙酰胺酚、H1受体阻断剂或H2受体阻断剂预处理。预处理可在脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)的施用之前24小时或更短时间(例如,24小时、20小时、16小时、12小时、8小时、4小时、2小时、1小时、50分钟、40分钟、30分钟、20分钟或10分钟)发生并且可以例如增加的剂量发生一次、两次或更多次。

[0710] 本领域技术人员应认识到,或能够仅使用常规实验来确定根据本文所述的公开内容的特定实施方案的多种等效物。本公开的范围不意图局限于以上具体实施方式,而是如随附权利要求书中所陈述。

[0711] 除非相反指示或在其他方面从本文显而易见,否则在权利要求书中,诸如“一(a/an)”和“所述(the)”的冠词可意指一个(种)或超过一个(种)。除非相反指示或在其他方面从本文显而易见,否则在一组的一个或多个成员之间包括“或”的技术方案或描述在组成员中的一者、超过一者或全部存在于、用于给定产物或工艺中或以其他方式与给定产物或工艺相关时被视为满足条件的。本公开包括如下实施方案,其中所述组的正好一个成员存在于、用于给定产物或工艺中或以其他方式与给定产物或工艺相关。本公开包括如下实施方案,其中组成员中的超过一者或全部存在于、用于给定产物或工艺中或以其他方式与给定产物或工艺相关。除非另外规定,否则如本文所用,表述“A、B或C中的一者或多者”、“一个或多个A、B或C”、“A、B和C中的一者或多者”、“一个或多个A、B和C”、“选自A、B和C”、“选自由A、B和C组成的组”等可互换使用并且均是指选自由A、B和/或C组成的组,即一个或多个A、一个或多个B、一个或多个C或它们的任何组合。

[0712] 还应注意,术语“包含(comprising)”意图为开放性的并且允许但不需要包括额外要素或步骤。当术语“包含”在本文中使用时,因此还涵盖并且公开术语“基本上由……组成”和“由……组成”。在通篇描述中,在组合物被描述为具有、包括或包含特定组分的情况下,预期组合物也基本上由所陈述的组分组成,或由所陈述的组分组成。同样,在方法或工艺被描述为具有、包括或包含特定工艺步骤的情况下,所述工艺也基本上由所陈述的工艺步骤组成,或由所陈述的工艺步骤组成。此外,应理解步骤的顺序或关于执行某些动作的顺序并不重要,只要本发明保持可操作。此外,两个或更多个步骤或动作可同时进行。

[0713] 在给出范围的情况下,包括端点。此外,还应理解除非另外指示或在其他方面从本文和本领域普通技术人员的理解显而易见,否则以范围表述的值可在本公开的不同实施方案中假设所陈述的范围内的任何特定值或子范围,除非本文另外清楚地指示,否则达到所述范围的下限的十分位。

[0714] 本公开的合成工艺可耐受多种官能团,因此可使用多种取代的起始材料。所述工

艺一般地在总体过程结束或接近结束时提供所需的最终脂质,不过在某些情况下可需要进一步将脂质转化为其药理学上可接受的盐。

[0715] 本公开的脂质可使用市售起始材料、文献中已知的化合物或由容易制备的中间体通过使用本领域技术人员已知或熟练技术人员鉴于本文教导将显而易见的标准合成方法和程序以多种方式制备。用于有机分子制备和官能团转化和操纵的标准合成方法和程序可获自相关科学文献或本领域中的标准教科书。尽管不限于任何一种或数种来源,经典文本(诸如Smith, M.B., March, J., *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 第5版, John Wiley & Sons: New York, 2001; Greene, T.W., Wuts, P.G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第3版, John Wiley & Sons: New York, 1999; R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); L. Fieser和M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); 和L. Paquette编, *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995), 以引用的方式并入本文中)是本领域技术人员已知的适用并且认可的有机合成参考教科书。设计合成方法的以下描述以说明但不限制用于本公开的脂质的制备的一般程序。

[0716] 具有本文所述的式的本公开的阳离子脂质可根据以下方案中说明的程序由市售起始材料或可使用文献程序制备的起始材料来制备。本领域普通技术人员应注意,在本文所述的反应序列和合成方案期间,某些步骤的顺序可发生变化。

[0717] 本领域普通技术人员应认识到,某些基团可需要经由使用保护基受到保护以免于经受反应条件。保护基也可用于区分分子中的相似官能团。保护基的清单和如何引入和去除这些基团可见于Greene, T.W., Wuts, P.G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第5版, John Wiley & Sons: New York, 2014中。

[0718] 优选的保护基包括但不限于:

[0719] 关于羟基部分: TBS、苄基、THP、Ac。

[0720] 关于羧酸: 苄基酯、甲酯、乙酯、烯丙酯。

[0721] 关于胺: Fmoc、Cbz、BOC、DMB、Ac、Bn、Tr、Ts、三氟乙酰基、邻苯二甲酰亚胺、亚苄胺。

[0722] 关于二醇: Ac ( $\times 2$ ) TBS ( $\times 2$ ), 或当合在一起时, 丙酮化合物。

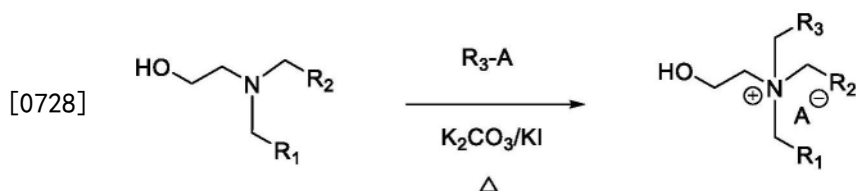
[0723] 关于硫醇: Ac。

[0724] 关于苯并咪唑: SEM、苄基、PMB、DMB。

[0725] 关于醛: 二-烷基缩醛, 诸如二甲氧基缩醛或二乙基乙酰基。

[0726] 在本文所述的反应方案中, 可产生多种立体异构体。当未指示特定立体异构体时, 应理解意指可能由所述反应产生的所有可能的立体异构体。本领域普通技术人员应认识到, 可优化所述反应以优先地生成一种异构体, 或可设计新方案以产生单一异构体。如果产生混合物, 则可使用诸如制备型薄层色谱法、制备型HPLC、制备型手性HPLC或制备型SFC的技术来分离异构体。

[0727] 一般方案1



[0729] 如上文一般方案1中所说明,可离子化脂质与碱(例如K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)中的所需尾端在碘化钾存在下反应,并且加热至回流,以提供本公开的阳离子脂质。A<sup>-</sup>是任何药学上可接受的阴离子。

[0730] 本领域普通技术人员应认识到,在以上方案中,某些步骤的顺序可互换。

[0731] 在某些方面中,本公开还包括合成式(I)的阳离子脂质和用于合成所述脂质的中间体的方法。不希望受理论束缚,应理解伴随式(I)的阳离子脂质的阴离子(即,“A<sup>-</sup>”)可由式(I)的阳离子脂质的合成中所涉及的起始材料供应。例如,Br<sup>-</sup>离子可由6-溴己酸十一烷基酯、8-溴辛酸壬酯或8-溴辛酸3-丁基庚酯供应。不希望受理论束缚,阴离子的鉴定可利用已知方法进行的额外分析(例如,元素分析)。然而,应理解,阴离子的鉴定并非式(I)的阳离子脂质的合成中的必要步骤。不希望受理论束缚,在任何本文所述的合成期间,式(I)的阳离子脂质可用在纯化步骤期间由另一阴离子置换的阴离子形成。例如,在一些实施方案中,式(I)的阳离子脂质最初用Br<sup>-</sup>离子或Cl<sup>-</sup>离子形成,但所述Br<sup>-</sup>离子或Cl<sup>-</sup>离子在纯化步骤期间由OH<sup>-</sup>离子置换。例如,当NH<sub>4</sub>OH包含于用于硅胶柱纯化的洗脱剂中时,初始抗衡离子(例如Br<sup>-</sup>或Cl<sup>-</sup>)可由OH<sup>-</sup>阴离子置换。应理解,在其中存在式(I)化合物的超过一种分子的一些实施方案中,可存在阴离子混合物。例如,抗衡离子可以是式(I)化合物的一种分子的Br<sup>-</sup>和另一种分子的OH<sup>-</sup>。

[0732] 本文所述的可离子化脂质可根据公布的国际专利申请号W0/2017/049245、W0/2017/112865、W0/2018/170306、W0/2018/232120、W0/2021/055835、W0/2021/055833和W0/2021/055849中所公开的程序来制备,所述国际专利申请中的每一者均以引用的方式整体并入本文中。

[0733] 此外,应理解落在现有技术内的本公开的任何特定实施方案均可明确地从权利要求书的任何一项或多项中排除。由于此类实施方案被认为是本领域普通技术人员已知的,故可将它们排除在外,即使在本文中未明确陈述所述排除。

[0734] 所有引用的来源(例如,参考文献、出版物、资料库、资料库入口和本文所引用的技术)均以引用的方式并入本申请中,即使在引用中未明确陈述。在引用的来源与本申请的陈述有冲突的情况下,应以本申请中的陈述为准。

[0735] 实施例

[0736] 实施例1:合成表1的阳离子脂质

[0737] A.一般考虑

[0738] 除非另外注明,否则所有的所用溶剂和试剂均在商业上获得并且原样使用。<sup>1</sup>H NMR谱在CDCl<sub>3</sub>中在300K下使用Bruker Ultrashield 300MHz仪器加以记录。关于<sup>1</sup>H,化学位移是报告为相对于TMS(0.00)的百万分率(ppm)。在ISCO CombiFlash Rf+Lumen仪器上使用ISCO RediSep Rf Gold Flash Cartridges(粒径:20-40微米)执行硅胶色谱法。在ISCO CombiFlash Rf+Lumen仪器上使用RediSep Rf Gold C18高效柱执行反相色谱法。所有的最

终脂质经由通过反相UPLC-MS(保留时间,RT,以分钟计)分析被测定为超过85%纯,使用具有DAD和ELSD的Waters Acquity UPLC仪器和ZORBAX快速分辨率高清晰度(RRHD)SB-C18 LC柱(2.1mm、50mm、1.8 $\mu$ m),并且经过5分钟梯度为65-100%乙腈/含0.1% TFA的水,1.2mL/min。注入体积为5 $\mu$ L并且柱温度为80 $^{\circ}$ C。检测是基于使用Waters SQD质谱仪(Milford,MA,USA)和蒸发光散射检测器以阳性模式进行的电喷雾电离(ESI)。

[0739] LCMS方法:

[0740] 仪器信息:HPLC/MS-Agilent 1100

[0741] 柱:Agela Technologies Durashell C18 3.5 $\mu$ m, 100  $\text{\AA}$ , 4.6 $\times$ 50mm流动相A:水/0.1%三氟乙酸

[0742] 流动相B:乙腈/0.1%三氟乙酸

[0743] 流动速率:1mL/min

[0744] 梯度:5分钟内70% B-100% B,保持100% B持续10分钟,分钟内100% B-70% B,并且接着停止。

[0745] 柱温度:环境

[0746] 检测器:ELSD

[0747] 下文所述的程序可用于合成表1的脂质。

[0748] 以下缩写用于本文中:

[0749] THF:四氢呋喃

[0750] TLC:薄层色谱法

[0751] MeCN:乙腈

[0752] LAH:氢化锂铝

[0753] DCM:二氯甲烷

[0754] DMAP:4-二甲基氨基吡啶

[0755] LDA:二异丙基胺化锂

[0756] rt:室温

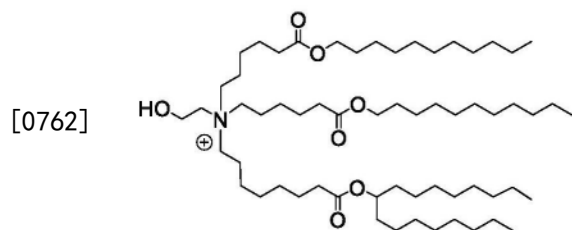
[0757] DME:1,2-二甲氧基乙烷

[0758] n-BuLi:正丁基锂

[0759] CPME:环戊基甲醚

[0760] i-Pr<sub>2</sub>EtN:N,N-二异丙基乙胺

[0761] 制备8-(十七烷-9-基氧基)-N-(2-羟基乙基)-8-氧代-N,N-双(6-氧代-6-(十一烷氧基)己基)辛-1-铵(化合物1)

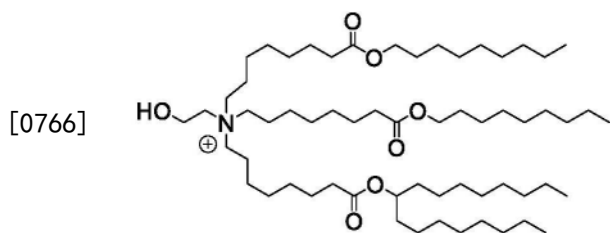


[0763] 将8-((2-羟基乙基)(6-氧代-6-(十一烷氧基)己基)氨基)-辛酸十七烷-9-基酯(40g,51mmol)和6-溴己酸十一烷酯(90g,258mmol)溶解于乙腈(220mL)中。使烧瓶配备空气

冷却的回流冷凝器并且在90°C下搅拌。在回流下在N<sub>2</sub>(g)下搅拌所述溶液。5天之后,所述反应冷却至室温并且干燥乙腈。将残留油状物溶解于庚烷(600mL)中并且用乙腈(3×250mL)萃取所述庚烷溶液。收集庚烷层并且干燥。通过两个硅胶柱的色谱法纯化粗油状物的部分(4.84g)。用多个柱体积的100%乙酸异丙酯、随后含20% MeOH的二氯甲烷运行第一个柱。使用梯度方法[含0-100%(含1% NH<sub>4</sub>OH、20% MeOH的二氯甲烷的混合物)的二氯甲烷]运行第二个柱以获得998.4mg 8-(十七烷-9-基氧基)-N-(2-羟基乙基)-8-氧代-N,N-双(6-氧代-6-(十一烷氧基)己基)辛-1-铵。UPLC/ELSD:RT=3.13min。HRMS(ESI):C<sub>61</sub>H<sub>120</sub>NO<sub>7</sub><sup>+</sup>(M+H)m/z计算值978.91;观测值979.40。<sup>1</sup>H NMR(300MHz,CDC13)δ:ppm 4.85(m,1H);4.49-4.40(br,m,1H);4.19-4.09(br,2H);4.05(t,4H,J=6.0Hz);3.64-3.57(br,m,2H);3.45-3.31(br,m,6H);2.45-2.23(m,6H);1.83-1.55(m,19H);1.54-1.14(m,64H);0.98-0.82(m,15H)。

[0764] 如以下文献中所述来制备化合物8-((2-羟基乙基)(6-氧代-6-(十一烷氧基)己基)氨基)辛酸十七烷-9-基酯和6-溴己酸十一烷酯: Sabnis, S.; Kumarasinghe, E. S.; Salerno, T.; Cosmin, M.; Ketoba, T.; Senn, J. J.; Lynn, A.; Bulychev, A.; Mcfadyen, I.; Chan, J.; Almarsson, Ö.; Stanton, M. G. A Novel Amino Lipid Series for mRNA Delivery: Improved Endosomal Escape and Sustained Pharmacology and Safety in Non-human Primates, *Molecular Therapy*, 2018, 1509-1519; 以引用的方式整体并入本文中。

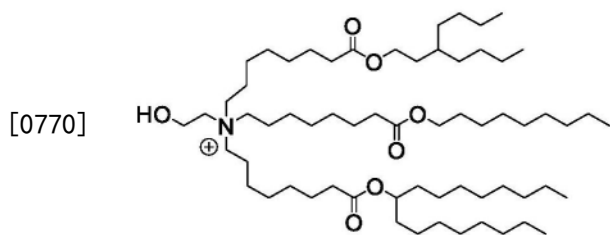
[0765] 制备8-(十七烷-9-基氧基)-N-(2-羟基乙基)-N,N-双(8-(壬氧基)-8-氧代辛基)-8-氧代辛-1-铵(化合物2)



[0767] 向配备有顶置式搅拌器、加热套、温度探针、空气冷却的回流冷凝器和N<sub>2</sub>入口的12L三颈圆底烧瓶中馈入碳酸钾(225g,1.63mol)、碘化钾(74g,0.45mol)和8-((2-羟基乙基)氨基)辛酸壬酯(215g,0.40mol)。使固体悬浮于乙腈(2.2L)中。将8-溴辛酸壬酯(167.3g,0.47mol)添加至搅拌的悬浮液中,随后添加环戊基甲醚(2200mL)。在81.0°C下加热所得混合物。48h后,使反应冷却至室温并且过滤白色无机盐。将滤液浓缩成油状物并且将粗油状物溶解于庚烷(3L)中并且用乙腈(5×1000mL)洗涤。收集乙腈层并且浓缩。通过两个硅胶柱的色谱法纯化粗产物的一部分(2g)。第一个硅胶柱使用梯度方法[含0-80%(含1%NH<sub>4</sub>OH、20%MeOH的二氯甲烷的混合物)的二氯甲烷]并且第二个柱用多个柱体积的100%乙酸异丙酯、随后含1% NH<sub>4</sub>OH、20%MeOH的二氯甲烷的混合物运行。获得呈淡黄色油状的所需产物8-(十七烷-9-基氧基)-N-(2-羟基乙基)-N,N-双(8-(壬氧基)-8-氧代辛基)-8-氧代辛-1-铵(988.4mg)。UPLC/ELSD:RT=3.16min。HRMS(ESI):C<sub>61</sub>H<sub>120</sub>NO<sub>7</sub><sup>+</sup>(M+H)m/z计算值978.91;观测值979.64。<sup>1</sup>H NMR(300MHz,CDC13)δ:ppm 4.85(m,1H);4.57-4.36(br,m,1H);4.18-4.09(br,2H);4.05(t,4H,J=6.0Hz);3.65-3.55(br,m,2H);3.45-3.30(br,m,6H);2.37-2.22(m,6H);1.75-1.55(m,19H);1.54-1.15(m,64H);0.97-0.82(m,15H)。

[0768] 如以下文献中所述来制备化合物8-((2-羟基乙基)氨基)辛酸壬酯和8-溴辛酸壬酯: Sabnis, S.; Kumarasinghe, E.S.; Salerno, T.; Cosmin, M.; Ketoba, T.; Senn, J.J.; Lynn, A.; Bulychev, A.; Mcfadyen, I.; Chan, J.; Almarsson, Ö.; Stanton, M.G. A Novel Amino Lipid Series for mRNA Delivery: Improved Endosomal Escape and Sustained Pharmacology and Safety in Non-human Primates, *Molecular Therapy*, 2018, 1509-1519; 以引用的方式整体并入本文中。

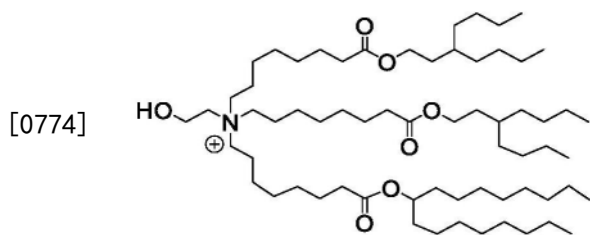
[0769] 制备8-((3-丁基庚基)氧基)-N-(8-(十七烷-9-基氧基)-8-氧代辛基)-N-(2-羟基乙基)-N-(8-(壬氧基)-8-氧代辛基)-8-氧代辛-1-铵(化合物3)



[0771] 将8-((2-羟基乙基)(8-壬氧基)-8-氧代辛基)氨基)辛酸十七烷-9-基酯(2g, 2.82mmol)和8-溴辛酸3-丁基庚酯(5.31g, 14.08mmol)溶解于乙腈(10mL)中。反应在80°C下搅拌6天。反应在一天后变为淡黄橙色并且最终变为淡黄色。使反应冷却至室温。将庚烷(10mL)添加至溶液中并且用乙腈(6×10mL)洗涤庚烷层。浓缩乙腈层并且通过两个硅胶柱的色谱法进行纯化。第一个硅胶柱使用多个柱体积的100%乙酸异丙酯、随后含1% NH<sub>4</sub>OH、20% MeOH的二氯甲烷的混合物。第二个硅胶色谱法使用梯度方法[含0-80%(含1% NH<sub>4</sub>OH、20% MeOH)的二氯甲烷的混合物]的二氯甲烷以生成产物(1.06g)8-((3-丁基庚基)氧基)-N-(8-(十七烷-9-基氧基)-8-氧代辛基)-N-(2-羟基乙基)-N-(8-(壬氧基)-8-氧代辛基)-8-氧代辛-1-铵。UPLC/ELSD: RT=3.07min。HRMS (ESI): C<sub>63</sub>H<sub>124</sub>NO<sub>7</sub><sup>+</sup> (M+H) m/z 计算值 1006.94; 观测值 1007.40。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 4.85 (m, 1H); 4.17-4.00 (m, 7H); 3.59-3.50 (br, m, 2H); 3.45-3.33 (br, m, 6H); 2.35-2.22 (m, 6H); 1.76-1.45 (m, 23H); 1.44-1.17 (m, 64H); 0.96-0.82 (m, 15H)。

[0772] 如以下文献中所述来制备化合物8-((2-羟基乙基)(8-壬氧基)-8-氧代辛基)氨基)辛酸十七烷-9-基酯: Sabnis, S.; Kumarasinghe, E.S.; Salerno, T.; Cosmin, M.; Ketoba, T.; Senn, J.J.; Lynn, A.; Bulychev, A.; Mcfadyen, I.; Chan, J.; Almarsson, Ö.; Stanton, M.G. A Novel Amino Lipid Series for mRNA Delivery: Improved Endosomal Escape and Sustained Pharmacology and Safety in Non-human Primates, *Molecular Therapy*, 2018, 1509-1519; 并且如以下文献中所述来制备化合物8-溴辛酸3-丁基庚酯: Benenato, K.E.; Cornebise, M.; Hennessy, E.; Kumarasinghe, E.S. Branched Tail Lipid Compounds and Compositions for Intracellular Delivery of Therapeutic Agents, US11066355B2; 以引用的方式整体并入本文中。

[0773] 制备8-((3-丁基庚基)氧基)-N-(8-((3-丁基庚基)氧基)-8-氧代辛基)-N-(8-(十七烷-9-基氧基)-8-氧代辛基)-N-(2-羟基乙基)-8-氧代辛-1-铵(化合物4)



[0775] 在圆底烧瓶中,将8-((2-羟基乙基)(8-壬氧基)-8-氧代辛基)氨基)辛酸十七烷-9-基酯(2g,2.709mmol)和8-溴辛酸3-丁基庚酯(5.112g,13.55mmol)溶解于乙腈(10mL)中。反应在80°C下搅拌6天,其中反应颜色从透明变为淡黄色。在反应冷却至室温之后,将10mL庚烷添加至溶液中。用乙腈(6×10mL)洗涤庚烷层。收集乙腈部分并且浓缩以通过硅胶色谱法纯化。第一个硅胶柱用多个柱体积的100%乙酸异丙酯、随后含1% NH<sub>4</sub>OH、20% MeOH的二氯甲烷的混合物运行。在第一个柱之后,第二个硅胶色谱法使用梯度方法[含0-80%(含1%NH<sub>4</sub>OH、20% MeOH的二氯甲烷的混合物)的二氯甲烷以收集目标产物8-((3-丁基庚基)氧基)-N-(8-((3-丁基庚基)氧基)-8-氧代辛基)-N-(8-(十七烷-9-基氧基)-8-氧代辛基)-N-(2-羟基乙基)-8-氧代辛-1-铵(1.274g)。UPLC/ELSD:RT=3.08min。HRMS(ESI):C<sub>65</sub>H<sub>128</sub>N<sub>7</sub><sup>+</sup>(M+H)m/z计算值1034.97;观测值1035.03。<sup>1</sup>H NMR(300MHz,CDC13)δ:ppm 4.85(m,1H);4.20-4.01(m,6H);3.56-3.50(br,m,2H);3.45-3.32(br,m,6H);2.35-2.21(m,6H);1.75-1.46(m,25H);1.45-1.17(m,64H);0.98-0.81(m,18H)。

[0776] 如以下文献中所述来制备化合物8-((2-羟基乙基)(8-壬氧基)-8-氧代辛基)氨基)-辛酸十七烷-9-基酯和8-溴辛酸3-丁基庚酯:Benenato,K.E.;Cornebise,M.;Hennessy,E.;Kumarasinghe,E.S.Branched Tail Lipid Compounds and Compositions for Intracellular Delivery of Therapeutic Agents,US11066355B2;以引用的方式整体并入本文中。

[0777] 实施例2:LNP制剂

[0778] 包括治疗剂和/或预防剂的脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP)可视根据式(I)的阳离子脂质的选择、额外脂质的选择、脂质组分中的每种脂质的量和脂质组分:治疗剂和/或预防剂的wt:wt比率进行优化。

[0779] 制备脂质纳米粒子(例如空LNP或负载LNP),包括作为磷脂的DSPC和DOPE、作为结构脂质的胆固醇、作为PEG脂质的PEG-1、根据式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质和根据式(I)的阳离子脂质。

[0780] 通过将脂质(例如,根据式(IL-A)、(IL-B)、(IL-C)、(IL-D)、(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-IC)、(IL-IIA)、(IL-IIAX)、(IL-IIB)、(IL-IIC)、(IL-III)或(IL-IIIA)的可离子化脂质、根据式(I)的阳离子脂质、DSPC、胆固醇和PEG 1)以12.5mM浓度和如表2中所概述的摩尔比溶解于乙醇中来制备示例性脂质纳米粒子组合物。脂质:mRNA比率维持于4.9的N:P比率下。接着用25mM乙酸钠(pH 5.0)稀释mRNA并且以3:1(水性:乙醇)的体积比与脂质混合物组合。使用分子截止值为10KDa的Slide-A-Lyzer透析盒(Thermo Scientific,Rockford,IL,USA),使所得制剂针对20mM tris/8%蔗糖mM氯化钠(pH 7.4)透析至少18h,体积为初级产物的体积的300倍。第一次透析在室温下在数字式轨道振荡器上以85rpm进行3h并且接着随后在4°C下透析过夜。使用离心过滤器浓缩制剂,通过0.22-μm过滤器并且存储于4°C下直

至使用。典型地将脂质纳米粒子溶液调节至0.1mg/mL与1mg/mL之间的特定mRNA浓度。

[0781] 表2概述示例性LNP的组分和组成。表3概述LNP制剂的特征,所述特征均在制备当天并且在室温下测定。如表3中所示,大多数包含式(I)的阳离子脂质的LNP呈现较小的大小(在60nm与80nm之间)。

[0782] 表2. 示例性LNP的组分和组成。

[0783]	LNP	阳离子	可离子化	磷脂	结构脂质	PEG 脂质	N:P
		脂质 (mol%)	脂质 (mol%)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	
	LNP-1	-	II-6 (48)	DSPC (11.0)	胆固醇(39)	PEG-1 (2.0)	4.9
	LNP-2	1 (30)	VI-4 (25)	DOPE (16.7)	胆固醇(26.8)	PEG-DMG (1.5)	4.9
[0784]	LNP-3	1 (30)	II-6 (33)	DSPC (7.7)	胆固醇(27.3)	PEG-1 (2.0)	4.9
	LNP-4	2 (30)	II-6 (33)	DSPC (7.7)	胆固醇(27.3)	PEG-1 (2.0)	4.9
	LNP-5	3 (30)	II-6 (33)	DSPC (7.7)	胆固醇(27.3)	PEG-1 (2.0)	4.9
	LNP-6	4 (30)	II-6 (33)	DSPC (7.7)	胆固醇(27.3)	PEG-1 (2.0)	4.9

[0785] 表3. 包含本公开的脂质的纳米粒子的特征。

[0786]	LNP	阳离子脂质 (mol%)	mRNA	直径/大小 (nm)	PDI	N:P
	LNP-1	-	mOX40L	56.7	0.154	4.9
	LNP-2	1 (30)	mOX40L	64.1	0.182	4.9
	LNP-3	1 (30)	mOX40L	68.9	0.299	4.9
	LNP-4	2 (30)	mOX40L	70.6	0.331	4.9
	LNP-5	3 (30)	mOX40L	79.1	0.136	4.9
	LNP-6	4 (30)	mOX40L	146.5	多模式	4.9

[0787] 实施例3:用于流式细胞术的鼠科动物内皮肺细胞的分离

[0788] 试剂:消化培养基:3mg/mL胶原酶I、0.1mg/mL DNase I、杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM);洗涤溶液:杜氏磷酸盐缓冲盐水(DPBS)+0.5%牛血清白蛋白(BSA);FACS缓冲液:流式细胞术染色缓冲液(eBioscience™, ThermoFisher Scientific)。

[0789] 最小标记物组:

[0790] • CD31:一般内皮标记物;

[0791] • CD45:白血球常见标记物;

[0792] • mOX40L:跨膜报告基因;

[0793] • tdTomato:来自Ai14小鼠的Cre介导的重组的荧光蛋白报告基因。

[0794] 使6周龄雌性小鼠(Ai14)在室内老化至大约7-8周龄。每组n=5,在收集之前8天经

由侧尾静脉将Cre mRNA(即,导致tdTomato表达的mRNA)配制的LNP进行静脉内给药。第一次给药后1周,用包含表达OX40L的mRNA的本公开的负载LNP对小鼠进行静脉内(侧尾静脉)给药。第二次静脉内给药后24小时,在CO<sub>2</sub>窒息下对小鼠实施安乐死并且剪断右心房以使血液流出。用5mL PBS通过心脏的右心室对肺进行灌注并且随后取出。将肺的左肺叶存储于3mL PBS中并且放置于冰上。将左肺叶切割成<1mm块并且将每块放置于8mL消化培养基中。在37°C下在消化培养基中孵育组织悬浮液持续45分钟,其中每15分钟倒置。使组织悬浮液通过附接20G套管的3mL注射器,直至混合物被湿磨成单细胞悬浮液。经由70μm滤网将细胞混合物过滤至冰冷洗涤溶液中。随后在滤网顶部添加额外的洗涤溶液。使细胞混合物在300xg、4°C下离心5分钟。去除上清液,并且将细胞集结粒再悬浮于洗涤缓冲液中。使细胞混合物在300xg、4°C下离心5分钟。去除上清液,并且将细胞集结粒再悬浮于氯化铵钾(ACK)溶解缓冲液中持续1分钟并且添加洗涤缓冲液(2×体积)。使细胞混合物在300xg、4°C下离心5分钟并且随后去除上清液。将细胞集结粒再悬浮于流式细胞术染色(FACS)缓冲液中并且经由70μm网过滤。根据制造商的建议,用活力染料和针对标记物组的抗体对肺细胞染色。在用抗体混合液染色之前10分钟,将细胞再悬浮于抗小鼠CD16/32抗体(TruStain FcX™,BioLegend)中。在流式细胞仪上运行补偿对照(compensation control)。在声聚焦流式细胞仪(Attune™ NxT,ThermoFisher Scientific)上运行肺样品。使用流式细胞术分析软件(FlowJo™)分析所收集的数据。

[0795] 实施例4:通过本公开的LNP进行内皮递送

[0796] 为了评估本公开的负载LNP中所包含的治疗剂向内皮细胞的递送,在如实施例3所述向Ai14小鼠施用负载LNP之后,在内皮细胞中测量封装于本公开的负载LNP中的Cre和mOX40L mRNA的表达。结果概述于下表4和表5中,并且显示出在施用本公开的LNP后在如通过流式细胞术所检测对给定的报告基因呈阳性的样品内皮细胞群体中展现表达的内皮细胞的分率。在包含30mol%式(I)的阳离子脂质的LNP和不包含式(I)的阳离子脂质的负载LNP(即,不包含阳离子脂质的LNP,或包含二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)的LNP)中评估表达。负载LNP还包含如表中所指示的可离子化脂质和PEG脂质。

[0797] 表4:在施用本公开的负载LNP后内皮细胞中的mOX40L表达

可离子化脂质/PEG脂质	阳离子脂质	内皮细胞%					
		样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	平均值
[0798] VI-4/PEG-DMG	无						0
	1	77.3	74.0	70.3	79.8	77.9	75.9
	DOTAP						0
I-18/PEG-1	无						0
	1						0
II-6/PEG-1	无	0.4	0.4	0.9	0.4	0.4	0.5
	1	79.6	61.8	76.9	76.6	78.0	74.6
	2	62.2	83.2	71.2	89.1	79.2	77.0
	3	63.5	72.4	87.4	83.8	88.0	79.0
	4	65.2	78.5	80.7	58.1	80.5	72.6

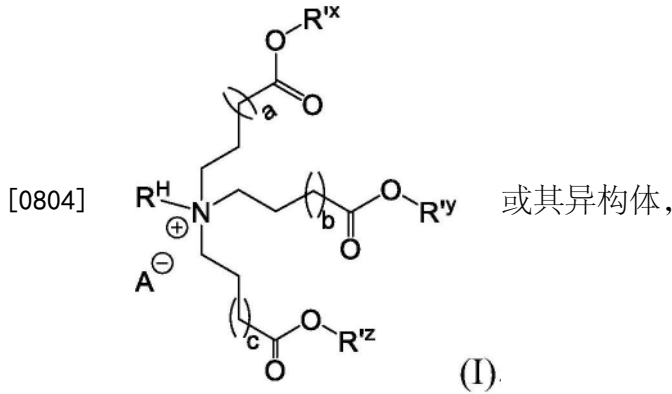
[0799] 表5:在施用本公开的负载LNP后内皮细胞中的tdTomato表达

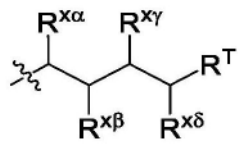
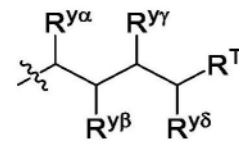
可离子化脂质/PEG	阳离子脂质	内皮细胞%					
		样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	平均值

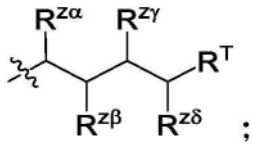
脂质							
[0801] VI-4/PEG-DMG	无						0
	1	82.1	74.9	80.8	77.7	79.4	79.0
	DOTAP						0
I-18/PEG-1	无						0
	1						0
II-6/PEG-1	无	7.0	4.1	5.0	2.7	3.2	4.4
	1	82.4	76.2	71.9	73.6	74.5	75.7
	2	83.2	73.9	76.5	79.6	80.4	78.7
	3	76.1	75.3	76.5	76.2	76.2	76.1
	4	69.4	72.2	69.2	70.2	70.9	70.4


[0802] 列举的实施方案

[0803] 实施方案1.一种式(I)的阳离子脂质:



[0805] 其中 R<sup>x</sup> 是:  ; R<sup>y</sup> 是:  ; 并且 R<sup>z</sup> 是:



[0806] 其中  表示连接点;

[0807] R<sup>xα</sup>、R<sup>xβ</sup>、R<sup>xy</sup>和R<sup>xδ</sup>各自独立地选自由H、C<sub>1-12</sub>烷基和C<sub>2-12</sub>烯基组成的组;

[0808] R<sup>yα</sup>、R<sup>yβ</sup>、R<sup>yy</sup>和R<sup>yδ</sup>各自独立地选自由H、C<sub>1-12</sub>烷基和C<sub>2-12</sub>烯基组成的组;

[0809] R<sup>zα</sup>、R<sup>zβ</sup>、R<sup>zy</sup>和R<sup>zδ</sup>各自独立地选自由H、C<sub>1-12</sub>烷基和C<sub>2-12</sub>烯基组成的组;

[0810] R<sup>H</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>OH,其中q选自1、2、3、4和5;

[0811] 各R<sup>T</sup>独立地选自C<sub>1-12</sub>烷基和C<sub>2-12</sub>烯基;

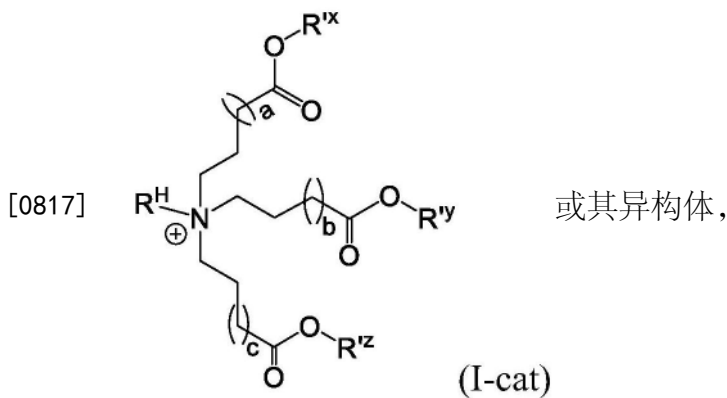
[0812] a选自1、2、3、4、5、6、7、8和9;

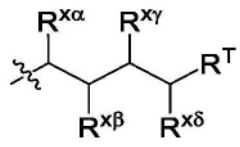
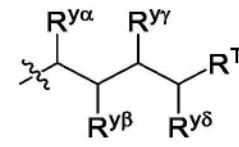
[0813] b选自1、2、3、4、5、6、7、8和9;

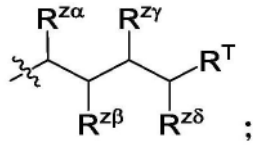
[0814] c选自1、2、3、4、5、6、7、8和9;并且


[0815] A<sup>-</sup>是任何药学上可接受的阴离子。

[0816] 实施方案2.一种式(I-cat)的阳离子脂质:



[0818] 其中  $R'^x$  是：  $R'^y$  是： 并且  $R'^z$  是：



[0819] 其中  表示连接点；

[0820]  $R^{xα}$ 、 $R^{xβ}$ 、 $R^{xy}$  和  $R^{xδ}$  各自独立地选自由 H、 $C_{1-12}$  烷基和  $C_{2-12}$  烯基组成的组；

[0821]  $R^{yα}$ 、 $R^{yβ}$ 、 $R^{yγ}$  和  $R^{yδ}$  各自独立地选自由 H、 $C_{1-12}$  烷基和  $C_{2-12}$  烯基组成的组；

[0822]  $R^{zα}$ 、 $R^{zβ}$ 、 $R^{zγ}$  和  $R^{zδ}$  各自独立地选自由 H、 $C_{1-12}$  烷基和  $C_{2-12}$  烯基组成的组；

[0823]  $R^H$  为  $-(CH_2)_qOH$ ，其中  $q$  选自 1、2、3、4 和 5；

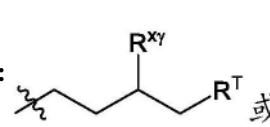
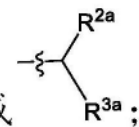
[0824] 各  $R^T$  独立地选自  $C_{1-12}$  烷基和  $C_{2-12}$  烯基；

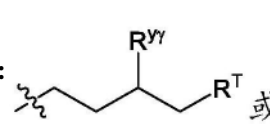
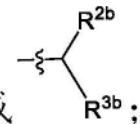
[0825]  $a$  选自 1、2、3、4、5、6、7、8 和 9；

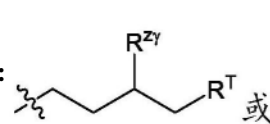
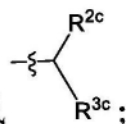
[0826]  $b$  选自 1、2、3、4、5、6、7、8 和 9；


[0827]  $c$  选自 1、2、3、4、5、6、7、8 和 9。

[0828] 实施方案 3. 如实施方案 1 或 2 的阳离子脂质，其中

[0829]  $R'^x$  是： 或 ；

[0830]  $R'^y$  是： 或  并且

[0831]  $R'^z$  是： 或 ；

[0832] 其中  表示连接点；

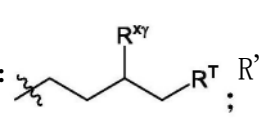
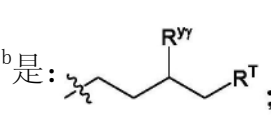
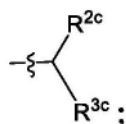
[0833]  $R^{xy}$  选自由 H、 $C_{1-12}$  烷基和  $C_{2-12}$  烯基组成的组；


[0834]  $R^{yγ}$  选自由 H、 $C_{1-12}$  烷基和  $C_{2-12}$  烯基组成的组；

[0835]  $R^{zy}$  选自由 H、 $C_{1-12}$  烷基和  $C_{2-12}$  烯基组成的组；并且

[0836]  $R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、 $R^{2c}$ 、 $R^{3a}$ 、 $R^{3b}$  和  $R^{3c}$  各自独立地选自由  $C_{1-14}$  烷基和  $C_{2-14}$  烯基组成的组。

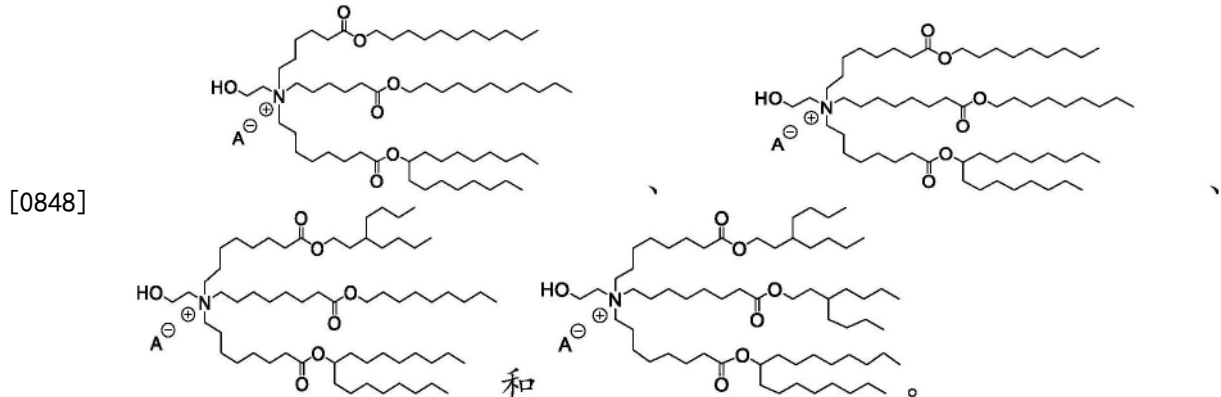
[0837] 实施方案 4. 如前述实施方案中任一项的阳离子脂质，其中

[0838]  $R'^a$  是：； $R'^b$  是：；并且  $R'^c$  是：；

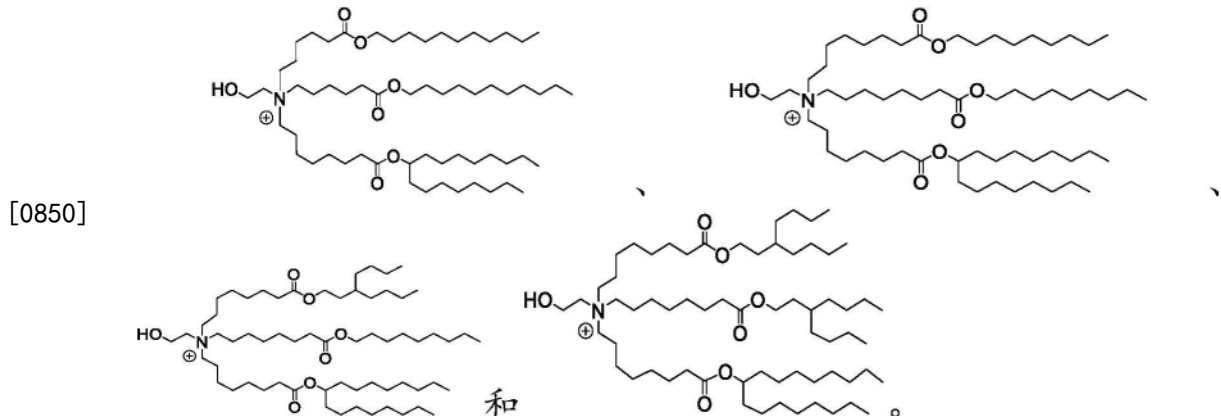
[0839] 其中  表示连接点；

[0840]  $R^{xy}$  选自由 H、 $C_{1-12}$  烷基和  $C_{2-12}$  烯基组成的组；

- [0841]  $R^{y\gamma}$  选自由H、 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组；并且
- [0842]  $R^{2c}$ 和 $R^{3c}$ 各自独立地选自由 $C_{1-14}$ 烷基和 $C_{2-14}$ 烯基组成的组。
- [0843] 实施方案5.如前述实施方案中任一项的化合物,其中 $R^{x\gamma}$ 和 $R^{y\gamma}$ 各自为H。
- [0844] 实施方案6.如前述实施方案中任一项的化合物,其中 $R^{x\gamma}$ 和 $R^{y\gamma}$ 各自为 $C_{1-12}$ 烷基或 $C_{2-12}$ 烯基。
- [0845] 实施方案7.如前述实施方案中任一项的化合物,其中 $R^{x\gamma}$ 为 $C_{1-12}$ 烷基或 $C_{2-12}$ 烯基并且 $R^{y\gamma}$ 为H。
- [0846] 实施方案8.如前述实施方案中任一项的化合物,其中q是2。
- [0847] 实施方案9.如前述实施方案中任一项的化合物,其中所述化合物选自:



- [0849] 实施方案10.一种化合物,所述化合物选自:



- [0851] 实施方案11.如前述实施方案中任一项的化合物,其中 $A^-$ 选自氯离子、溴离子、碘离子、氢氧根、硫酸根、硫酸氢根、氨基磺酸根、硝酸根、磷酸根、柠檬酸根、甲烷磺酸根、三氟乙酸根、谷氨酸根、葡萄糖醛酸根、戊二酸根、苹果酸根、马来酸根、琥珀酸根、富马酸根、酒石酸根、甲苯磺酸根、水杨酸根、乳酸根、萘磺酸根和乙酸根。
- [0852] 实施方案12.如前述实施方案中任一项的化合物,其中 $A^-$ 选自溴离子、氯离子和氢氧根。
- [0853] 实施方案13.如前述实施方案中任一项的化合物,其中 $A^-$ 是溴离子。
- [0854] 实施方案14.如前述实施方案中任一项的化合物,其中 $A^-$ 是氯离子。
- [0855] 实施方案15.如前述实施方案中任一项的化合物,其中 $A^-$ 是溴离子或氢氧根。
- [0856] 实施方案16.如前述实施方案中任一项的化合物,其中 $A^-$ 是氯离子或氢氧根。
- [0857] 实施方案17.如前述实施方案中任一项的化合物,其中 $A^-$ 是氢氧根。

[0858] 实施方案18.一种空脂质纳米粒子(空LNP),所述空脂质纳米粒子(空LNP)包含如前述实施方案中任一项的阳离子脂质。

[0859] 实施方案19.如前述实施方案中任一项的空LNP,所述空LNP还包含可离子化脂质。

[0860] 实施方案20.如前述实施方案中任一项的空LNP,所述空LNP还包含磷脂。

[0861] 实施方案21.如前述实施方案中任一项的空LNP,所述空LNP还包含结构脂质。

[0862] 实施方案22.如前述实施方案中任一项的空LNP,所述空LNP还包含PEG脂质。

[0863] 实施方案23.一种包含脂质组分的空LNP,所述脂质组分包含约20mol%至约40mol%如前述实施方案中任一项的阳离子脂质;约15mol%至约40mol%可离子化脂质、约0mol%至约30mol%磷脂、约15mol%至约50mol%结构脂质和约0mol%至约1mol%PEG脂质。

[0864] 实施方案24.一种负载脂质纳米粒子(负载LNP),所述负载脂质纳米粒子(负载LNP)包含如前述实施方案中任一项的空LNP和治疗剂和/或预防剂。

[0865] 实施方案25.一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0866] (a) 脂质纳米粒子核心,

[0867] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0868] (c) 主要安置于核心的外表面上的阳离子剂,

[0869] 其中所述负载LNP在生理pH下具有大于中性的 $\zeta$ 电位。

[0870] 实施方案26.一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0871] (a) 负载LNP核心,其包含:

[0872] (i) 可离子化脂质,

[0873] (ii) 磷脂,

[0874] (iii) 结构脂质,和

[0875] (iv) PEG-脂质,和

[0876] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0877] (c) 阳离子剂。

[0878] 实施方案27.一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0879] (a) 脂质纳米粒子核心,其包含:

[0880] (i) 可离子化脂质,

[0881] (ii) 磷脂,

[0882] (iii) 结构脂质,和

[0883] (iv) PEG-脂质,和

[0884] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的多核苷酸或多肽有效载荷治疗剂和/或预防剂,和

[0885] (c) 主要安置于核心的外表面上的阳离子剂。

[0886] 实施方案28.一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0887] (a) 脂质纳米粒子核心,

[0888] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0889] (c) 阳离子剂,

[0890] 其中所述负载LNP展现至少约20%细胞的细胞积聚并且在施用所述负载LNP的细

胞群体中的细胞中展现约5%或更大表达。在一些实施方案中,所述负载LNP在施用所述负载LNP的细胞群体中的约1%至约75%、约5%至约50%、约10%至约40%或约15%至约25%细胞中展现细胞积聚。

[0891] 实施方案29.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.5%至约50%、约1%至约40%、约3%至约20%或约5%至约15%细胞中展现表达。

[0892] 实施方案30.在一些实施方案方面中,本文提供一种负载LNP

[0893] 实施方案31.所述负载LNP包含:

[0894] (a) 脂质纳米粒子核心,

[0895] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0896] (c) 主要安置于核心的外表面上的阳离子剂,

[0897] 其中所述负载LNP在施用所述负载LNP的细胞群体中展现至少约20%细胞的细胞积聚并且在其中积聚所述负载LNP的细胞中展现约5%或更大表达。

[0898] 实施方案32.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述负载LNP在施用所述负载LNP的细胞群体中的约1%至约75%、约5%至约50%、约10%至约40%或约15%至约25%细胞中展现细胞积聚。

[0899] 实施方案33.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的细胞中展现约0.5%至约50%、约1%至约40%、约3%至约20%或约5%至约15%表达。

[0900] 实施方案34.一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0901] (a) 脂质纳米粒子核心,

[0902] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0903] (c) 主要安置于核心的外表面上的阳离子剂,

[0904] 其中所述治疗剂和/或预防剂表达蛋白质并且其中负载LNP在施用所述负载LNP的细胞群体中的约0.5%至50%细胞中展现蛋白质表达。

[0905] 实施方案35.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.1%至约60%、约0.5%至约40%、约1%至约30%或约1%至约20%细胞中展现蛋白质表达。

[0906] 实施方案36.一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0907] (a) 脂质纳米粒子核心,

[0908] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0909] (c) 阳离子剂,

[0910] 其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.5%至50%细胞中展现蛋白质表达。

[0911] 实施方案37.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.1%至约60%、约0.5%至约40%、约1%至约30%或约1%至约20%细胞中展现蛋白质表达。

[0912] 实施方案38.一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0913] (a) 脂质纳米粒子核心,

- [0914] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和
- [0915] (c) 阳离子剂,
- [0916] 其中所述负载LNP在内皮细胞中展现至少约20%的细胞积聚并且在其中积聚所述负载LNP的内皮细胞中展现约5%或更大表达。
- [0917] 实施方案39.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述负载LNP在施用所述负载LNP的内皮细胞细胞群体中展现约1%至约75%、约5%至约50%、约10%至约40%或约15%至约25%内皮细胞的细胞积聚。
- [0918] 实施方案40.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的内皮细胞中展现约0.5%至约50%、约1%至约40%、约3%至约20%或约5%至约15%表达。
- [0919] 实施方案41.一种负载LNP,所述负载LNP包含:
- [0920] (a) 脂质纳米粒子核心,
- [0921] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和
- [0922] (c) 阳离子剂,
- [0923] 其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.5%至50%内皮细胞中展现蛋白质表达。
- [0924] 实施方案42.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.1%至约60%、约0.5%至约40%、约1%至约30%或约1%至约20%内皮细胞中展现蛋白质表达。
- [0925] 实施方案43.一种负载LNP,所述负载LNP包含:
- [0926] (a) 脂质纳米粒子核心,
- [0927] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和
- [0928] (c) 阳离子剂,
- [0929] 其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.5%至约50%肺细胞中展现蛋白质表达。
- [0930] 实施方案44.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.1%至约60%、约0.5%至约40%、约1%至约30%或约1%至约20%肺内皮细胞中展现蛋白质表达。
- [0931] 实施方案45.一种负载LNP,所述负载LNP包含:
- [0932] (a) 脂质负载LNP核心,
- [0933] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和
- [0934] (c) 阳离子剂,
- [0935] 其中所述负载LNP在呼吸道内皮细胞中展现至少约20%的细胞积聚并且在其中积聚所述负载LNP的呼吸道内皮细胞中展现约5%或更大表达。
- [0936] 实施方案46.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述负载LNP在施用所述负载LNP的呼吸道内皮细胞群体中展现约1%至约75%、约5%至约50%、约10%至约40%或约15%至约25%呼吸道内皮细胞的细胞积聚。
- [0937] 实施方案47.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的呼吸道内皮细胞中展现约0.5%至约50%、约1%至约40%、约3%至约20%

或约5%至约15%表达。

[0938] 实施方案48.一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0939] (a) 脂质负载LNP核心,

[0940] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0941] (c) 阳离子剂,

[0942] 其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.5%至约50%呼吸道内皮细胞中展现蛋白质表达。

[0943] 实施方案49.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.1%至约60%、约0.5%至约40%、约1%至约30%或约1%至约20%呼吸道内皮细胞中展现蛋白质表达。

[0944] 实施方案50.一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0945] (a) 脂质负载LNP核心,

[0946] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0947] (c) 阳离子剂,

[0948] 其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.5%至约50%HeLa细胞中展现蛋白质表达。

[0949] 实施方案51.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的约0.1%至约60%、约0.5%至约40%、约1%至约30%或约1%至约20%HeLa细胞中展现蛋白质表达。

[0950] 实施方案52.一种负载LNP,所述负载LNP包含:

[0951] (a) 脂质负载LNP核心,

[0952] (b) 封装于核心内以递送至细胞中的治疗剂和/或预防剂,和

[0953] (c) 阳离子剂,

[0954] 其中所述负载LNP在施用所述负载LNP的支气管内皮细胞群体中的至少约20%支气管内皮细胞中展现细胞积聚并且在其中积聚所述负载LNP的支气管内皮细胞中展现约5%或更大表达。

[0955] 实施方案53.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂是阳离子脂质。

[0956] 实施方案54.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂是式(I)的阳离子脂质。

[0957] 实施方案55.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂是如实施方案1-17中任一项的阳离子脂质。

[0958] 实施方案56.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述负载LNP在施用所述负载LNP的呼吸道内皮细胞群体中展现约1%至约75%、约5%至约50%、约10%至约40%或约15%至约25%呼吸道内皮细胞的细胞积聚。

[0959] 实施方案57.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述负载LNP在其中积聚所述负载LNP的肺内皮细胞中展现约0.5%至约50%、约1%至约40%、约3%至约20%或约5%至约15%表达。

[0960] 实施方案58.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗

剂和/或预防剂的重量比是约0.1:1至约15:1。

[0961] 实施方案59.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的重量比是约0.2:1至约10:1。

[0962] 实施方案60.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的重量比是约1:1至约10:1。

[0963] 实施方案61.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的重量比是约1:1至约8:1。

[0964] 实施方案62.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的重量比是约1:1至约7:1。

[0965] 实施方案63.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的重量比是约1:1至约6:1。

[0966] 实施方案64.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的重量比是约1:1至约5:1。

[0967] 实施方案65.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的重量比是约1:1至约4:1。

[0968] 实施方案66.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的重量比是约1.25:1至约3.75:1。

[0969] 实施方案67.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的重量比是约1.25:1。

[0970] 实施方案68.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的重量比是约2.5:1。

[0971] 实施方案69.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的重量比是约3.75:1。

[0972] 实施方案70.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约0.1:1至约20:1。

[0973] 实施方案71.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约1.5:1至约10:1。

[0974] 实施方案72.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约1.5:1至约9:1。

[0975] 实施方案73.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约1.5:1至约8:1。

[0976] 实施方案74.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约1.5:1至约7:1。

[0977] 实施方案75.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约1.5:1至约6:1。

[0978] 实施方案76.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约1.5:1至约5:1。

[0979] 实施方案77.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约1.5:1。

[0980] 实施方案78.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约2:1。

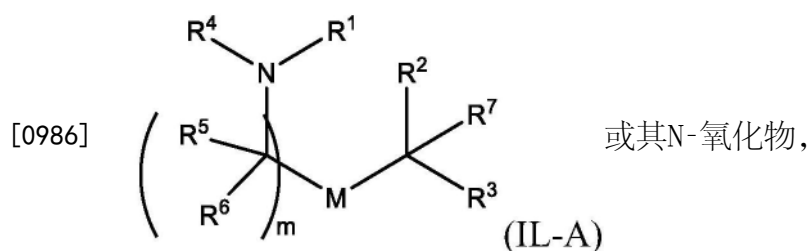
[0981] 实施方案79.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约3:1。

[0982] 实施方案80.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约4:1。

[0983] 实施方案81.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述阳离子剂与所述治疗剂和/或预防剂的摩尔比是约5:1。

[0984] 实施方案82.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,

[0985] 其中所述可离子化脂质是式(IL-A)化合物:

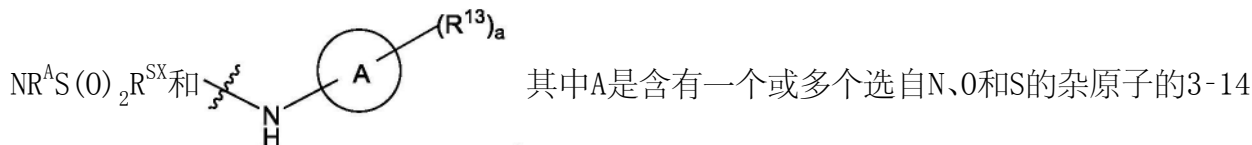



[0987] 或其盐或异构体,其中:

[0988]  $R^1$ 选自由 $C_{5-30}$ 烷基、 $C_{5-20}$ 烯基、 $-R^*YR^*$ 、 $-YR^*$ 和 $-R^*M^*R^*$ 组成的组;

[0989]  $R^2$ 和 $R^3$ 独立地选自由H、 $C_{1-14}$ 烷基、 $C_{2-14}$ 烯基、 $-R^*YR^*$ 、 $-YR^*$ 和 $-R^*OR^*$ 组成的组,或 $R^2$ 和 $R^3$ 连同它们所连接的原子形成杂环或碳环;

[0990]  $R^4$ 选自由氢、 $C_{3-6}$ 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-(CH_2)_oC(R^{12})_2(CH_2)_{n-o}Q$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ(R)_2$ 、 $-C(O)NQR$ 和未取代的 $C_{1-6}$ 烷基组成的组,其中Q选自碳环、杂环、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_n(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(R)R^8$ 、 $-N(R)S(O)_2R^8$ 、 $-O(CH_2)_nOR$ 、 $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(=CHR^9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(O)R$ 、 $-N(OR)S(O)_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR^9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR^9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 、 $-(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(R)N(R)_2C(O)OR$ 、



元杂环;并且a是1、2、3或4;其中表示连接点;

[0991] 各o独立地选自1、2、3和4;并且各n独立地选自1、2、3、4和5;

[0992]  $R^8$ 选自由 $C_{3-6}$ 碳环和杂环组成的组;

[0993]  $R^9$ 选自由H、CN、 $NO_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基、 $-OR$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2N(R)_2$ 、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{3-6}$ 碳环和杂环组成的组;

[0994]  $R^{12}$ 选自由H、OH、 $C_{1-3}$ 烷基和 $C_{2-3}$ 烯基组成的组;

[0995] 各R独立地选自由 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-3}$ 烷基-芳基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组;

[0996]  $R^A$ 选自H和 $C_{1-3}$ 烷基;

[0997]  $R^{SX}$ 选自 $C_{3-8}$ 碳环、含有一个或多个选自N、O和S的杂原子的3-14元杂环、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $(C_{1-3}$ 烷氧基) $C_{1-3}$ 烷基、 $(CH_2)_{p_1}O(CH_2)_{p_2}R^{SX1}$ 和 $(CH_2)_{p_1}R^{SX1}$ ,其中所述碳环和所述杂环任选地被一个或多个选自氧代、 $C_{1-6}$ 烷基和 $(C_{1-3}$ 烷氧基) $C_{1-3}$ 烷基的基团取代;

[0998]  $R^{SX1}$ 选自 $C(O)NR^{14}R^{14'}$ 、 $C_{3-8}$ 碳环和含有一个或多个选自N、O和S的杂原子的3-14元杂环,其中所述碳环和所述杂环各自任选地被一个或多个选自氧代、卤基、 $C_{1-3}$ 烷基、 $(C_{1-3}$ 烷氧基) $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基和 $NH_2$ 的基团取代;

[0999] 各 $R^{13}$ 选自由OH、氧代、卤基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷氧基、 $C_{2-6}$ 烯基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $NH_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、CN和 $NO_2$ 组成的组;

[1000]  $R^{14}$ 和 $R^{14'}$ 各自独立地选自由H和 $C_{1-6}$ 烷基组成的组;

[1001]  $p_1$ 选自1、2、3、4和5;

[1002]  $p_2$ 选自1、2、3、4和5;

[1003] 各 $R^5$ 独立地选自由OH、 $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组;

[1004] 各 $R^6$ 独立地选自由OH、 $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组;

[1005]  $R^7$ 选自由 $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组;

[1006] M和M'独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)-M''-C(O)O-$ 、 $-C(O)N(R^M)-$ 、 $-N(R^M)C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR^M)O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基和杂芳基,其中M''为键、 $C_{1-13}$ 烷基或 $C_{2-13}$ 烯基;

[1007] 各 $R^M$ 独立地选自由H、 $C_{1-6}$ 烷基和 $C_{2-6}$ 烯基组成的组;

[1008] 各 $R'$ 独立地选自由 $C_{1-18}$ 烷基、 $C_{2-18}$ 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、 $(CH_2)_q$ 、OR\*和H组成的组,

[1009] 并且各 $q'$ 独立地选自1、2和3;

[1010] 各 $R''$ 独立地选自由 $C_{3-15}$ 烷基和 $C_{3-15}$ 烯基组成的组;

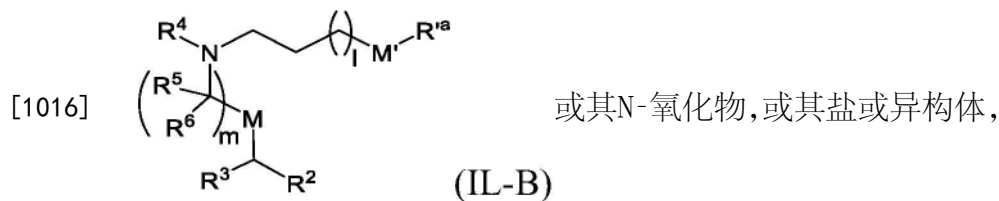
[1011] 各 $R^*$ 独立地选自由 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组;

[1012] 各Y独立地为 $C_{3-6}$ 碳环;

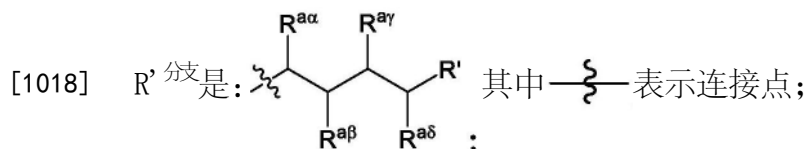
[1013] 各X独立地选自由F、Cl、Br和I组成的组;并且

[1014] m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13。

[1015] 实施方案83.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-B)化合物:



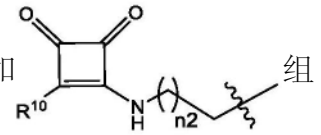
[1017] 其中 $R'^a$ 是 $R'$ 分支;其中




[1019] 其中 $R^{a\alpha}$ 、 $R^{a\beta}$ 、 $R^{a\gamma}$ 和 $R^{a\delta}$ 各自独立地选自由H、 $C_{2-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组;

[1020]  $R^2$ 和 $R^3$ 各自独立地选自由 $C_{1-14}$ 烷基和 $C_{2-14}$ 烯基组成的组;

[1021]  $R^4$ 选自自由 $-(CH_2)_nOH$  (其中n选自自由1、2、3、4和5组成的组) 和



成的组,

[1022] 其中表示连接点;其中

[1023]  $R^{10}$ 为 $N(R)_2$ ;各R独立地选自自由 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组;并且n2选自自由1、2、3、4、5、6、7、8、9和10组成的组;

[1024] 各 $R^5$ 独立地选自自由 $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组;

[1025] 各 $R^6$ 独立地选自自由 $C_{1-3}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组;

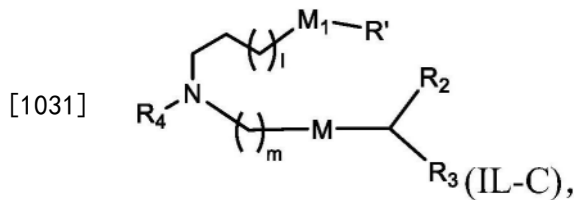
[1026] M和M'各自独立地选自自由-C(O)O-和-OC(O)-组成的组;

[1027]  $R^7$ 为 $C_{1-12}$ 烷基或 $C_{2-12}$ 烯基;

[1028] l选自自由1、2、3、4和5组成的组;并且

[1029] m选自自由5、6、7、8、9、10、11、12和13组成的组。

[1030] 实施方案84.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-C)化合物:



[1032] 或其盐或异构体,其中

[1033] l选自1、2、3、4和5;

[1034]  $M_1$ 为 $M'$ ;

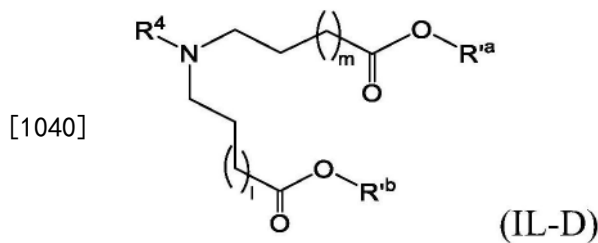
[1035]  $R_4$ 为 $-(CH_2)_nQ$ ,其中Q是OH,并且n选自1、2、3、4或5;

[1036] M和M'独立地选自-C(O)O-和-OC(O)-;

[1037]  $R_2$ 和 $R_3$ 均为 $C_{1-14}$ 烷基或 $C_{2-14}$ 烯基;并且

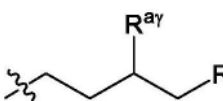
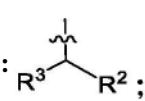
[1038]  $R^7$ 为 $C_1-C_{12}$ 直链烷基。

[1039] 实施方案85.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-D)化合物:



或其N-氧化物,或其盐或异构体,

[1041] 其中 $R'^a$ 是 $R'$ 分支或 $R'$ 环状;其中

[1042]  $R'$ 分支是: 并且 $R'^b$ 是:

[1043] 其中  $\text{---}\xi\text{---}$  表示连接点；

[1044] 其中  $R^{a\gamma}$  是选自由  $C_{1-12}$  烷基和  $C_{2-12}$  烯基组成的组；

[1045]  $R^2$  和  $R^3$  各自独立地选自由  $C_{1-14}$  烷基和  $C_{2-14}$  烯基组成的组；

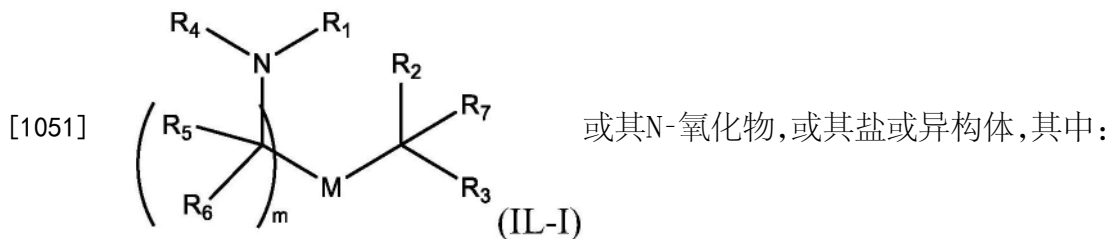
[1046]  $R^4$  为  $-(CH_2)_nOH$ ，其中  $n$  选自由 1、2、3、4 和 5 组成的组；

[1047]  $R^7$  为  $C_{1-12}$  烷基或  $C_{2-12}$  烯基；

[1048]  $m$  选自 1、2、3、4、5、6、7、8 和 9；

[1049]  $l$  选自 1、2、3、4、5、6、7、8 和 9。

[1050] 实施方案 86. 如前述实施方案中任一项的空 LNP 或负载 LNP，其中所述可离子化脂质是式 (IL-I) 化合物：



[1052]  $R^1$  选自由  $C_{5-30}$  烷基、 $C_{5-20}$  烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$  和  $-R''M'R'$  组成的组；

[1053]  $R^2$  和  $R^3$  独立地选自由 H、 $C_{1-14}$  烷基、 $C_{2-14}$  烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$  和  $-R^*OR''$  组成的组，或  $R^2$  和  $R^3$  连同它们所连接的原子形成杂环或碳环；

[1054]  $R^4$  选自由氢、 $C_{3-6}$  碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-(CH_2)_oC(R^{10})_2(CH_2)_{n-o}Q$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ$  ( $R$ )<sub>2</sub> 和未取代的  $C_{1-6}$  烷基组成的组，其中  $Q$  选自碳环、杂环、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(R)R^8$ 、 $-N(R)S(O)_2R^8$ 、 $-O(CH_2)_nOR$ 、 $-N(R)C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(=CHR^9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)R$ 、 $-N(OR)S(O)_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR^9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR^9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$  和  $-C(R)N(R)_2C(O)OR$ ，各  $o$  独立地选自 1、2、3 和 4，并且各  $n$  独立地选自 1、2、3、4 和 5；

[1055] 各  $R^5$  独立地选自由 OH、 $C_{1-3}$  烷基、 $C_{2-3}$  烯基和 H 组成的组；

[1056] 各  $R^6$  独立地选自由 OH、 $C_{1-3}$  烷基、 $C_{2-3}$  烯基和 H 组成的组；

[1057]  $M$  和  $M'$  独立地选自由  $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)-M''-C(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基和杂芳基，其中  $M''$  为键、 $C_{1-13}$  烷基或  $C_{2-13}$  烯基；

[1058]  $R^7$  选自由  $C_{1-3}$  烷基、 $C_{2-3}$  烯基和 H 组成的组；

[1059]  $R^8$  选自由  $C_{3-6}$  碳环和杂环组成的组；

[1060]  $R^9$  选自由 H、CN、 $NO_2$ 、 $C_{1-6}$  烷基、 $-OR$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2N(R)_2$ 、 $C_{2-6}$  烯基、 $C_{3-6}$  碳环和杂环组成的组；

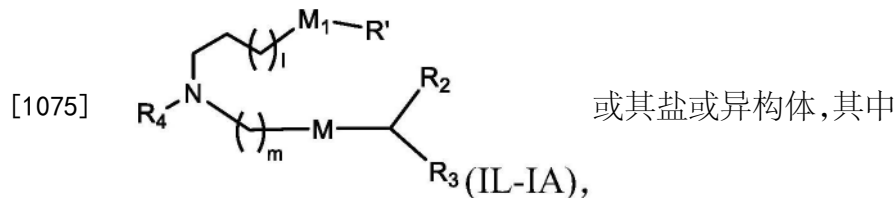
[1061]  $R^{10}$  选自由 H、OH、 $C_{1-3}$  烷基和  $C_{2-3}$  烯基组成的组；

[1062] 各  $R$  独立地选自由  $C_{1-3}$  烷基、 $C_{2-3}$  烯基、 $(CH_2)_qOR^*$  和 H 组成的组，

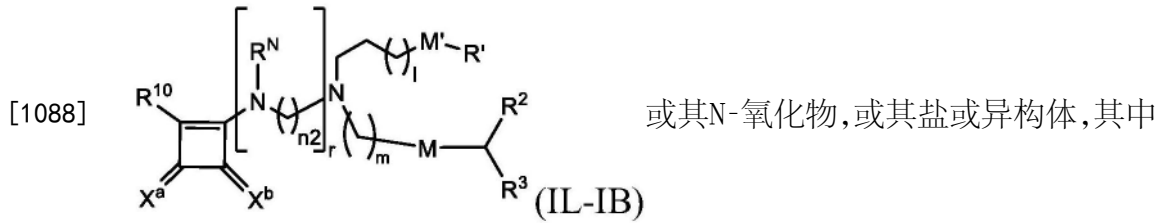
[1063] 并且各  $q$  独立地选自 1、2 和 3；

[1064] 各  $R'$  独立地选自由  $C_{1-18}$  烷基、 $C_{2-18}$  烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$  和 H 组成的组；

- [1065] 各R''独立地选自自由C<sub>3-15</sub>烷基和C<sub>3-15</sub>烯基组成的组；
- [1066] 各R\*独立地选自自由C<sub>1-12</sub>烷基和C<sub>2-12</sub>烯基组成的组；
- [1067] 各Y独立地为C<sub>3-6</sub>碳环；
- [1068] 各X独立地选自自由F、Cl、Br和I组成的组；并且
- [1069] m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13。
- [1070] 实施方案87.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-I)化合物,其中R<sup>7</sup>为H。
- [1071] 实施方案88.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-I)化合物,其中R<sup>5</sup>和R<sup>5</sup>各自为H。
- [1072] 实施方案89.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-I)化合物,其中R<sup>1</sup>选自自由C<sub>5-30</sub>烷基、C<sub>5-20</sub>烯基和-R''M'R'组成的组。
- [1073] 实施方案90.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-I)化合物,其中R<sup>1</sup>为-R''M'R'。
- [1074] 实施方案91.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IA)化合物:



- [1076] l选自1、2、3、4和5；
- [1077] m选自5、6、7、8和9；
- [1078] M<sup>1</sup>为键或M'；
- [1079] R<sub>4</sub>为未取代的C<sub>1-3</sub>烷基或-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q,其中Q是OH、-NHC(S)N(R)<sub>2</sub>、-NHC(O)N(R)<sub>2</sub>、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)<sub>2</sub>R、-N(R)R<sub>8</sub>、-NHC(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>、-NHC(=CHR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>、-OC(O)N(R)<sub>2</sub>、-N(R)C(O)OR、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)<sub>2</sub>R、-N(OR)C(O)OR、-N(OR)C(O)N(R)<sub>2</sub>、-N(OR)C(S)N(R)<sub>2</sub>、-N(OR)C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>、-N(OR)C(=CHR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>或杂芳基,并且各n选自1、2、3、4或5；
- [1080] M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-P(O)(OR')O-、-S-S-、芳基和杂芳基；并且
- [1081] R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>均为C<sub>1-14</sub>烷基或C<sub>2-14</sub>烯基；
- [1082] R<sub>8</sub>选自自由C<sub>3-6</sub>碳环和杂环组成的组；
- [1083] R<sub>9</sub>选自自由H、CN、NO<sub>2</sub>、C<sub>1-6</sub>烷基、-OR、-S(O)<sub>2</sub>R、-S(O)<sub>2</sub>N(R)<sub>2</sub>、C<sub>2-6</sub>烯基、C<sub>3-6</sub>碳环和杂环组成的组；
- [1084] 各R独立地选自自由C<sub>1-3</sub>烷基、C<sub>2-3</sub>烯基和H组成的组；并且
- [1085] R'为C<sub>1-18</sub>烷基或C<sub>2-18</sub>烯基。
- [1086] 实施方案92.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-I)或(IL-IA)化合物,其中R<sub>4</sub>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q,其中Q是OH或-N(R)R<sub>8</sub>。
- [1087] 实施方案93.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IB)化合物:



[1089] 1选自1、2、3、4和5;

[1090] m选自5、6、7、8和9;

[1091] R' 选自由C<sub>1-14</sub>烷基和C<sub>2-14</sub>烯基组成的组;并且

[1092] R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>独立地选自由C<sub>1-14</sub>烷基和C<sub>2-14</sub>烯基组成的组;

[1093] M和M' 独立地选自-C(O)O-和-OC(O)-;

[1094] R<sup>N</sup>为H或C<sub>1-3</sub>烷基;

[1095] X<sup>a</sup>和X<sup>b</sup>各自独立地为O或S;

[1096] R<sup>10</sup>选自由H、卤基、-OH、R、-N(R)<sub>2</sub>、-CN、-N<sub>3</sub>、-C(O)OH、-C(O)OR、-OC(O)R、-OR、-SR、-S(O)R、-S(O)OR、-S(O)<sub>2</sub>OR、-NO<sub>2</sub>、-S(O)<sub>2</sub>N(R)<sub>2</sub>、-N(R)S(O)<sub>2</sub>R、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>t1</sub>N(R)<sub>2</sub>、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>q1</sub>N(R)<sub>2</sub>、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>OR、-N((CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>OR)<sub>2</sub>、-N(R)-碳环、-N(R)-杂环、-N(R)-芳基、-N(R)-杂芳基、-N(R)(CH<sub>2</sub>)<sub>t1</sub>-碳环、-N(R)(CH<sub>2</sub>)<sub>t1</sub>-杂环、-N(R)(CH<sub>2</sub>)<sub>t1</sub>-芳基、-N(R)(CH<sub>2</sub>)<sub>t1</sub>-杂芳基、碳环、杂环、芳基和杂芳基组成的组;

[1097] 各R独立地选自由C<sub>1-12</sub>烷基、C<sub>2-12</sub>烯基和H组成的组;

[1098] m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13;

[1099] n<sub>2</sub>选自1、2、3、4、5、6、7、8、9和10;

[1100] r是0或1;

[1101] t<sup>1</sup>选自1、2、3、4和5;

[1102] p<sup>1</sup>选自1、2、3、4和5;

[1103] q<sup>1</sup>选自1、2、3、4和5;并且

[1104] s<sup>1</sup>选自1、2、3、4。

[1105] 实施方案94.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IB)化合物,其中R<sup>N</sup>为H。

[1106] 实施方案95.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IB)化合物,其中X<sup>a</sup>为O。

[1107] 实施方案96.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IB)化合物,其中X<sup>b</sup>为O。

[1108] 实施方案97.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IB)化合物,其中R<sup>10</sup>为-N(R)<sub>2</sub>。

[1109] 实施方案98.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IB)化合物,其中R<sup>10</sup>为-NHCH<sub>3</sub>。

[1110] 实施方案99.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IA)或(IL-IB)化合物,其中M<sub>1</sub>为M'。

[1111] 实施方案100.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-I)、(IL-IA)或(IL-IB)化合物,其中M和M' 独立地为-C(O)O-或-OC(O)-。

[1112] 实施方案101.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-I)、(IL-IA)或(IL-IB)化合物,其中M和M'各自为-C(O)O-。

[1113] 实施方案102.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-I)、(IL-IA)或(IL-IB)化合物,其中R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>均为C<sub>1-14</sub>烷基。

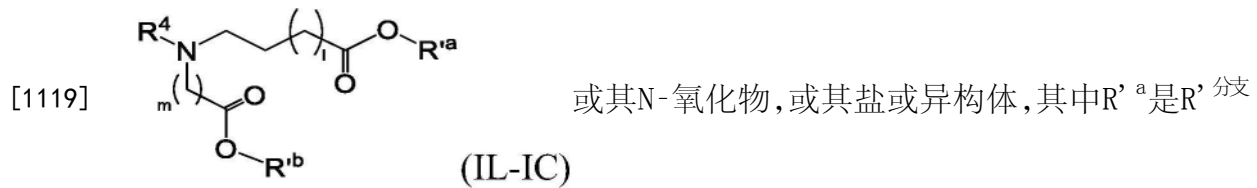
[1114] 实施方案103.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-I)、(IL-IA)或(IL-IB)化合物,其中R'为C<sub>1-18</sub>烷基。

[1115] 实施方案104.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-I)、(IL-IA)或(IL-IB)化合物,其中各R独立地选自由C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>2-6</sub>烯基和H组成的组。

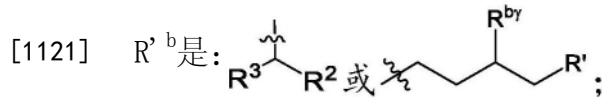
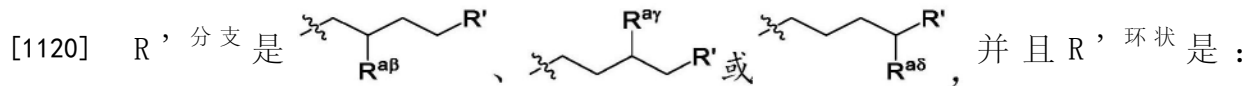
[1116] 实施方案105.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-I)、(IL-IA)或(IL-IB)化合物,其中各R独立地选自由C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>2-6</sub>烯基和H组成的组。


[1117] 实施方案106.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-I)、(IL-IA)或(IL-IB)化合物,其中各R独立地选自由C<sub>1-2</sub>烷基、C<sub>2</sub>烯基和H组成的组。

[1118] 实施方案107.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IC)化合物:



或R' 环状;其中

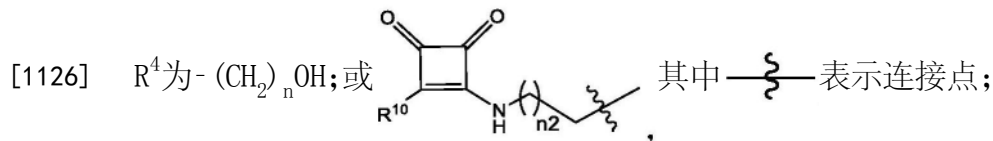


[1122] 其中  表示连接点;

[1123] 其中R<sup>aγ</sup>、R<sup>αγ</sup>和R<sup>βγ</sup>各自为C<sub>1-12</sub>烷基或C<sub>2-12</sub>烯基;

[1124] R<sup>bγ</sup>为H、C<sub>1-12</sub>烷基或C<sub>2-12</sub>烯基;

[1125] R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>各自独立地选自由C<sub>1-14</sub>烷基和C<sub>2-14</sub>烯基组成的组;



[1127] 各R' 独立地为C<sub>1-12</sub>烷基或C<sub>2-12</sub>烯基;

[1128] R<sup>10</sup>为N(R)<sub>2</sub>;各R独立地选自由C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>2-3</sub>烯基和H组成的组;并且n和n<sub>2</sub>各自选自

由1、2、3、4和5组成的组；

[1129]  $Y^a$ 是 $C_{3-6}$ 碳环；

[1130]  $R^{*a}$ 选自由 $C_{1-15}$ 烷基和 $C_{2-15}$ 烯基组成的组；

[1131] l选自1、2、3、4和5；

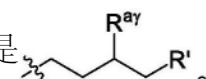
[1132] m选自5、6、7、8和9；并且

[1133] s是2或3。

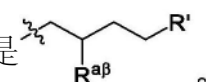
[1134] 实施方案108.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IC)化合物,其中 $R^{a\gamma}$ 、 $R^{a\gamma}$ 和 $R^{a\gamma}$ 各自为 $C_{1-6}$ 烷基或 $C_{2-6}$ 烯基。

[1135] 实施方案109.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IC)化合物,其中 $R^{b\gamma}$ 为 $C_{1-6}$ 烷基或 $C_{2-6}$ 烯基。


[1136] 实施方案110.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂

质是式(IL-IC)化合物,其中 $R'$ 分支是 。

[1137] 实施方案111.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂

质是式(IL-IC)化合物,其中 $R'$ 分支是 。

[1138] 实施方案112.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂

质是式(IL-IC)化合物,其中 , 其中 $R^{b\gamma}$ 为 $C_{1-6}$ 烷基。

[1139] 实施方案113.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IB)或(IL-IC)化合物,其中n2选自2、3和4。

[1140] 实施方案114.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IA)、(IL-IB)或(IL-IC)化合物,其中l选自3、4和5。

[1141] 实施方案115.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)或(IL-IC)化合物,其中m选自6、7和8。

[1142] 实施方案116.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-I)、(IL-IA)或(IL-IC)化合物,其中n选自2、3和4。

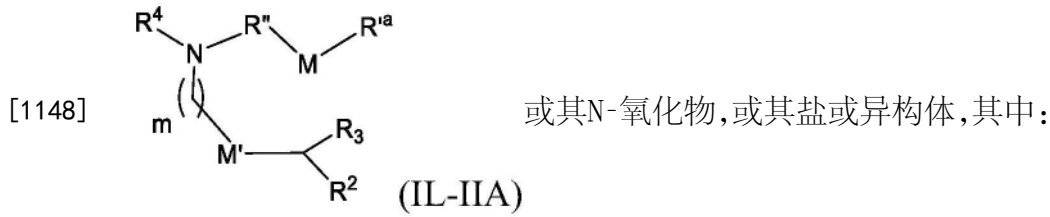
[1143] 实施方案117.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-I)、(IL-IA)或(IL-IC)化合物,其中 $R'$ 为 $C_{1-18}$ 烷基。

[1144] 实施方案118.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-I)、(IL-IA)或(IL-IC)化合物,其中 $R'$ 为直链 $C_{1-18}$ 烷基。

[1145] 实施方案119.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-I)、(IL-IA)或(IL-IC)化合物,其中 $R'$ 为分支 $C_{1-18}$ 烷基。

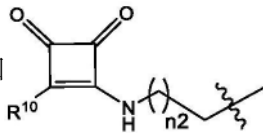
[1146] 实施方案120.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是选自表IL-1或IL-2的化合物。

[1147] 实施方案121.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIA)化合物：



[1149] m选自5、6、7、8和9;

[1150] R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>各自独立地选自由H、C<sub>1-14</sub>烷基和C<sub>2-14</sub>烯基组成的组;

[1151] R<sup>4</sup>选自-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH(其中n选自1、2、3、4和5)和  (其中n<sub>2</sub>选自1、2、

3、4、5、6、7、8、9和10;并且R<sup>10</sup>为-N(R)<sub>2</sub>,其中各R独立地选自由C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>2-3</sub>烯基和H组成的组);

[1152] M选自-OC(O)O<sup>-</sup>、-C(O)O<sup>-</sup>、-O-M''-O<sup>-</sup>和-N(R<sup>M</sup>)C(O)-,其中M''为-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>C(O)-,其中z是1、2、3或4;

[1153] M'选自-OC(O)O<sup>-</sup>、-C(O)O<sup>-</sup>、-O-M''-O<sup>-</sup>、-N(R<sup>M</sup>)C(O)O<sup>-</sup>和-O-N=C(R<sup>M</sup>)-,其中:

[1154] M''为-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>C(O)-、C<sub>1-13</sub>烷基、-B(R\*\*)或-Si(R\*\*)<sub>2</sub>-;

[1155] z是1、2、3或4;

[1156] 各R<sup>M</sup>独立地选自H和C<sub>1-6</sub>烷基;

[1157] 各R\*\*独立地选自H和C<sub>1-12</sub>烷基;

[1158] R<sup>a</sup>是C<sub>1-18</sub>烷基、C<sub>2-18</sub>烯基或-R\*YR\*',其中:

[1159] 各R\*'独立地为C<sub>1-15</sub>烷基;

[1160] 各R\*独立地为C<sub>1-12</sub>烷基;

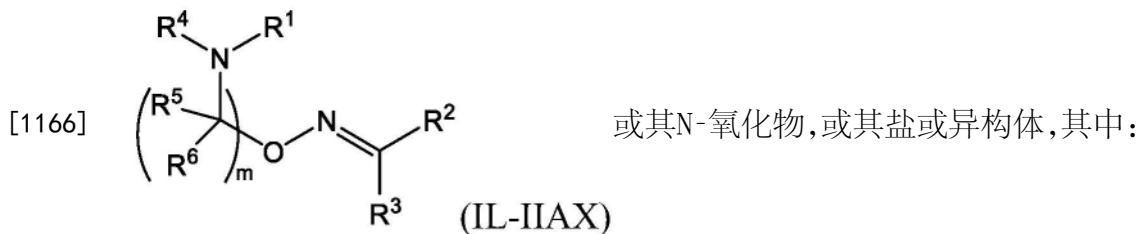
[1161] 各Y独立地为C<sub>3-6</sub>碳环;并且

[1162] R''为C<sub>3</sub>-C<sub>13</sub>烷基,任选地被OH取代。

[1163] 实施方案122.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIA)化合物,其中M为-OC(O)O<sup>-</sup>。

[1164] 实施方案123.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIA)化合物,其中M'为-OC(O)O<sup>-</sup>。

[1165] 实施方案124.在一些实施方案中,所述可离子化脂质是式(IL-IIAX)化合物:



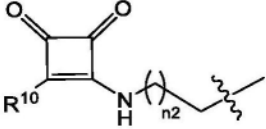
[1167] R<sup>1</sup>为-R''M'R',其中:

[1168] 各R'独立地为C<sub>1-18</sub>烷基;

[1169] M'选自-C(O)O<sup>-</sup>和-O-N=C(R<sup>M</sup>)-,其中各R<sup>M</sup>独立地选自H和C<sub>1-6</sub>烷基;

[1170] 各R''独立地为C<sub>3-15</sub>烷基;

[1171] R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>各自独立地选自由H、C<sub>1-14</sub>烷基和C<sub>2-14</sub>烯基组成的组;

[1172]  $R^4$ 选自  $-(CH_2)_nOH$  (其中n选自1、2、3、4和5) 和  (其中n2选自1、2、

3、4、5、6、7、8、9和10; 并且 $R^{10}$ 为  $-N(R)_2$ , 其中各R独立地选自由 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{2-3}$ 烯基和H组成的组);

[1173] 各 $R^5$ 为H;

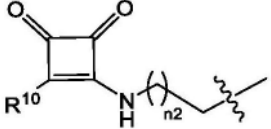
[1174] 各 $R^6$ 为H; 并且

[1175] m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13。

[1176] 实施方案125. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述可离子化脂质是式(IL-IIA)或(IL-IIAX)化合物, 其中 $R^4$ 为  $-(CH_2)_nOH$ 。

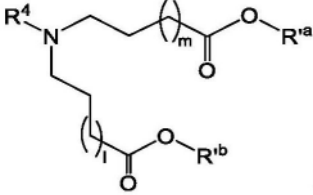
[1177] 实施方案126. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述可离子化脂质是式(IL-IIA)或(IL-IIAX)化合物, 其中 $R^2$ 和 $R^3$ 各自独立地选自由 $C_{1-14}$ 烷基和 $C_{2-14}$ 烯基组成的组。

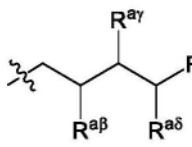
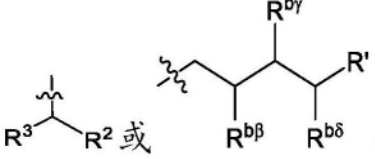
[1178] 实施方案127. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述可离子化脂


质是式(IL-IIA)或(IL-IIAX)化合物, 其中 $R^4$ 为 

[1179] 实施方案128. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述可离子化脂质是选自表IL-3的化合物。

[1180] 实施方案129. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述可离子化脂质是式(IL-IIB)化合物:

[1181]  或其N-氧化物, 或其盐或异构体, (IL-IIB)

[1182] 其中 $R^a$ 是:  并且 $R^b$ 是:  ;

[1183] 其中  表示连接点;

[1184]  $R^{aβ}$ 、 $R^{aγ}$ 和 $R^{aδ}$ 各自独立地选自由H、 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组;

[1185]  $R^{bβ}$ 、 $R^{bγ}$ 和 $R^{bδ}$ 各自独立地选自由H、 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组, 其中 $R^{bβ}$ 、 $R^{bγ}$ 和 $R^{bδ}$ 中的至少一者选自由 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组;

[1186]  $R^2$ 和 $R^3$ 各自独立地选自由 $C_{1-14}$ 烷基和 $C_{2-14}$ 烯基组成的组;

[1187]  $R^4$ 选自  $-(CH_2)_nNRTQ$ 、 $-(CH_2)_nNRS(O)_2TQ$ 、 $-(CH_2)_nNRC(O)H$ 和  $-(CH_2)_nNRC(O)TQ$ , 其中n选自1、2、3、4和5;

[1188] T是键或 $C_{1-3}$ 烷基接头、 $C_{2-3}$ 烯基接头或 $C_{2-3}$ 炔基接头;

[1189] Q选自含有1-5个选自N、O和S的杂原子的3-14元杂环、C<sub>3-10</sub>碳环、C<sub>1-6</sub>烷基和C<sub>2-6</sub>烯基,其中所述烷基、所述烯基、所述杂环和所述碳环各自任选地被一个或多个R<sup>Q</sup>取代;

[1190] 各R<sup>Q</sup>独立地选自自由氧代、羟基、氰基、氨基、C<sub>1-6</sub>烷基氨基、二-C<sub>1-6</sub>烷基氨基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>2-6</sub>烯基、C<sub>1-6</sub>烷酰基、-C(O)C<sub>1-6</sub>烷基和-NRC(O)C<sub>1-6</sub>烷基组成的组;

[1191] 各R独立地选自H、C<sub>1-6</sub>烷基和C<sub>2-6</sub>烯基;

[1192] 各R'独立地选自C<sub>1-12</sub>烷基和C<sub>2-12</sub>烯基;

[1193] m选自1、2、3、4、5、6、7、8和9;并且

[1194] l选自1、2、3、4、5、6、7、8和9。

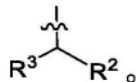
[1195] 实施方案130.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIB)化合物,其中R<sup>aβ</sup>和R<sup>aδ</sup>各自为H。

[1196] 实施方案131.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIB)化合物,其中R<sup>aγ</sup>为C<sub>1-12</sub>烷基或C<sub>2-12</sub>烯基。

[1197] 实施方案132.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIB)化合物,其中R<sup>aγ</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基或C<sub>2-6</sub>烯基。

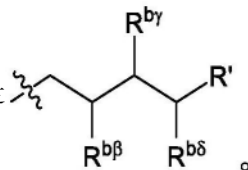
[1198] 实施方案133.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂

质是式(IL-IIB)化合物,其中R'<sup>b</sup>是:



[1199] 实施方案134.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂

质是式(IL-IIB)化合物,其中R'<sup>b</sup>是:



[1200] 实施方案135.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIB)化合物,其中R<sup>bβ</sup>和R<sup>bδ</sup>各自为H。

[1201] 实施方案136.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIB)化合物,其中R<sup>bγ</sup>为C<sub>1-12</sub>烷基或C<sub>2-12</sub>烯基。

[1202] 实施方案137.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIB)化合物,其中R<sup>bγ</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基或C<sub>2-6</sub>烯基。

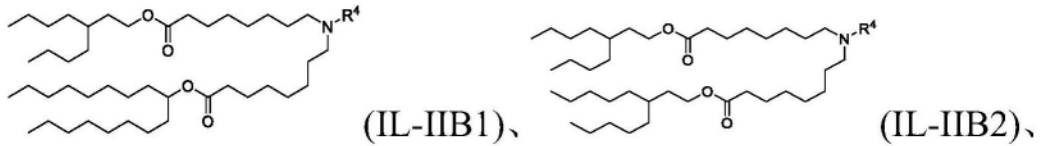
[1203] 实施方案138.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIB)化合物,其中R<sup>4</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NRTQ。

[1204] 实施方案139.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIB)化合物,其中R<sup>4</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NRS(O)<sub>2</sub>TQ。

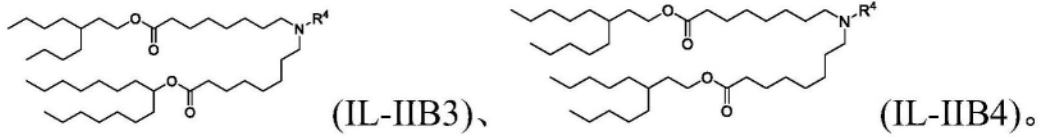
[1205] 实施方案140.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIB)化合物,其中R<sup>4</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NRC(O)H。

[1206] 实施方案141.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIB)化合物,其中R<sup>4</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NRC(O)TQ。

[1207] 实施方案142.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIB1)、(IL-IIB2)、(IL-IIB3)或(IL-IIB4)化合物:

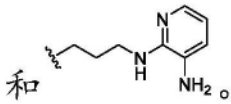
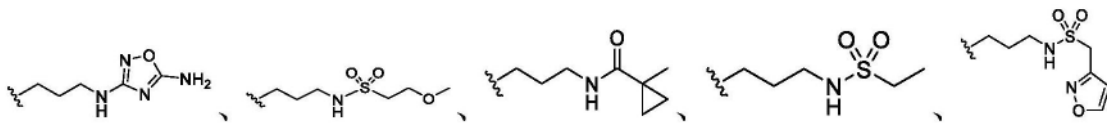


[1208]

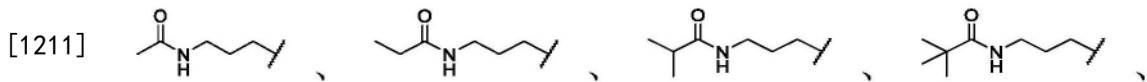


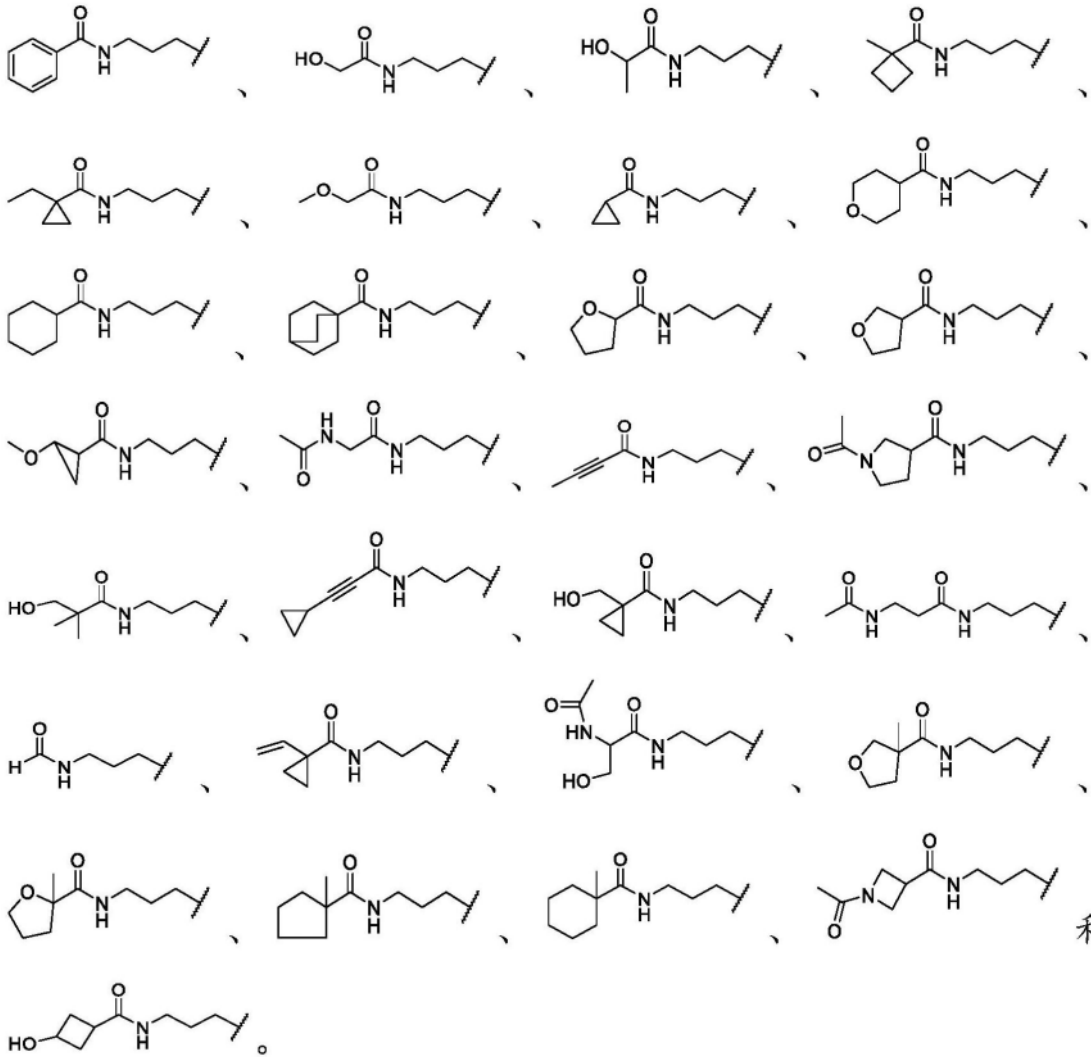
[1209] 实施方案143.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂

质是式 (IL-IIB) 化合物,其中R<sup>4</sup>选自:



[1210] 实施方案144.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂  
质是式 (IL-IIB) 化合物,其中R<sup>4</sup>选自:

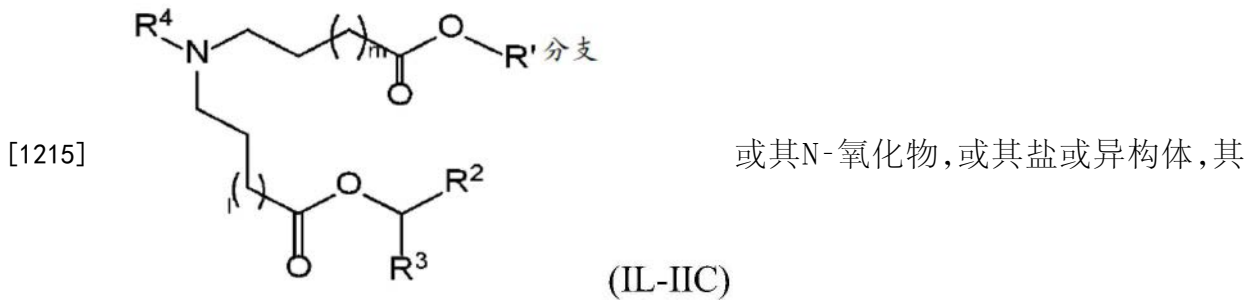




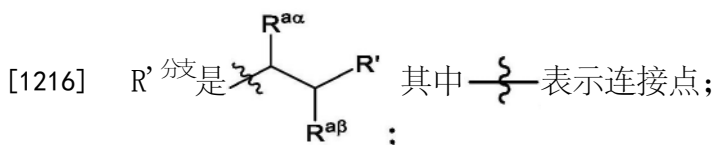
[1212]

[1213] 实施方案145. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述可离子化脂质是选自表IL-4或IL-5的化合物。

[1214] 实施方案146. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述可离子化脂质是式(IL-IIC)化合物:



中:



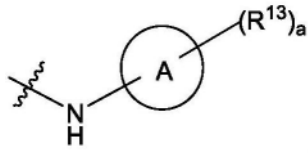
[1217] 其中 $R^{\alpha}$ 和 $R^{\beta}$ 各自独立地选自由H和 $C_{1-2}$ 烷基组成的组, 其中 $R^{\alpha}$ 和 $R^{\beta}$ 中的至少一者

是C<sub>1</sub>或C<sub>2</sub>烷基;

[1218] R' 选自自由C<sub>1-18</sub>烷基和C<sub>2-18</sub>烯基组成的组;

[1219] R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>各自独立地选自自由C<sub>1-14</sub>烷基和C<sub>2-14</sub>烯基组成的组;

[1220] R<sup>4</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, 其中n独立地选自1、2、3、4和5, 其中Q选自NRS(O)<sub>2</sub>R<sup>SX</sup>和



其中A是含有一个或多个选自N、O和S的杂原子的3-14元杂环;并且a

是1、2、3或4;其中 表示连接点;

[1221] R选自H和C<sub>1-3</sub>烷基;

[1222] R<sup>SX</sup>选自C<sub>3-8</sub>碳环、含有一个或多个选自N、O和S的杂原子的3-14元杂环、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>2-6</sub>烯基、(C<sub>1-3</sub>烷氧基)C<sub>1-3</sub>烷基、(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>p2</sub>R<sup>SX1</sup>和(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>R<sup>SX1</sup>, 其中所述碳环和所述杂环任选地被一个或多个选自氧代、C<sub>1-6</sub>烷基和(C<sub>1-3</sub>烷氧基)C<sub>1-3</sub>烷基的基团取代;

[1223] R<sup>SX1</sup>选自C(O)NR<sup>14</sup>R<sup>14'</sup>、C<sub>3-8</sub>碳环和含有一个或多个选自N、O和S的杂原子的3-14元杂环, 其中所述碳环和所述杂环各自任选地被一个或多个选自氧代、卤基、C<sub>1-3</sub>烷基、(C<sub>1-3</sub>烷氧基)C<sub>1-3</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷基氨基、二-(C<sub>1-6</sub>烷基)氨基和NH<sub>2</sub>的基团取代;

[1224] 各R<sup>13</sup>选自自由OH、氧代、卤基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、C<sub>2-6</sub>烯基、C<sub>1-6</sub>烷基氨基、二-(C<sub>1-6</sub>烷基)氨基、NH<sub>2</sub>、C(O)NH<sub>2</sub>、CN和NO<sub>2</sub>组成的组;

[1225] R<sup>14</sup>和R<sup>14'</sup>各自独立地选自自由H和C<sub>1-6</sub>烷基组成的组;

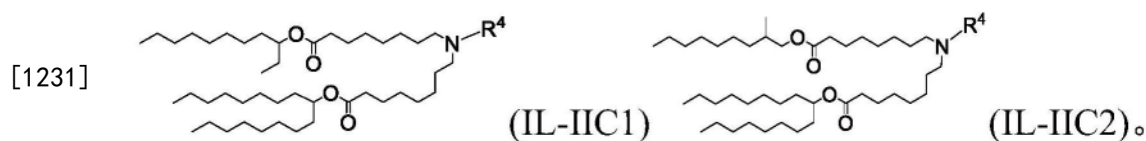
[1226] m选自1、2、3、4、5、6、7、8和9;

[1227] l选自1、2、3、4、5、6、7、8和9;

[1228] p<sub>1</sub>选自1、2、3、4和5;并且

[1229] p<sub>2</sub>选自1、2、3、4。

[1230] 实施方案147. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述可离子化脂质是式(IL-IIC1)或(IL-IIC2)化合物:



[1232] 实施方案148. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述可离子化脂质是式(IL-IIC)化合物, 其中n是3。

[1233] 实施方案149. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述可离子化脂质是式(IL-IIC)、(IL-IIC1)或(IL-IIC2)化合物, 其中Q是NRS(O)<sub>2</sub>R<sup>SX</sup>。

[1234] 实施方案150. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述可离子化脂质是式(IL-IIC)、(IL-IIC1)或(IL-IIC2)化合物, 其中R是H。

[1235] 实施方案151. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述可离子化脂质是式(IL-IIC)、(IL-IIC1)或(IL-IIC2)化合物, 其中R<sup>SX</sup>选自C<sub>3-6</sub>碳环和C<sub>1-3</sub>烷基。

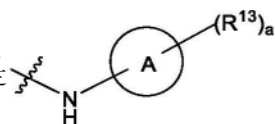
[1236] 实施方案152. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述可离子化脂质是式(IL-IIC)、(IL-IIC1)或(IL-IIC2)化合物, 其中R<sup>SX</sup>为乙基或环丙基。

[1237] 实施方案153.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIC)、(IL-IIC1)或(IL-IIC2)化合物,其中 $R^{SX}$ 为 $(CH_2)_{p_1}R^{SX1}$ 。

[1238] 实施方案154.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIC)、(IL-IIC1)或(IL-IIC2)化合物,其中 $p_1$ 是1并且 $R^{SX1}$ 为6元杂环烷基、5元杂芳基或苯基。

[1239] 实施方案155.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIC)、(IL-IIC1)或(IL-IIC2)化合物,其中 $R^{SX1}$ 为噁唑或异噁唑。

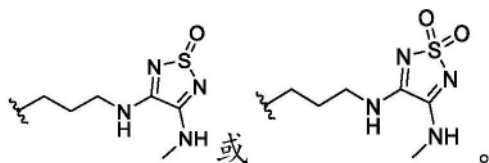
[1240] 实施方案156.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂

质是式(IL-IIC)、(IL-IIC1)或(IL-IIC2)化合物,其中Q是 。

[1241] 实施方案157.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIC)、(IL-IIC1)或(IL-IIC2)化合物,其中A是5元杂芳基。

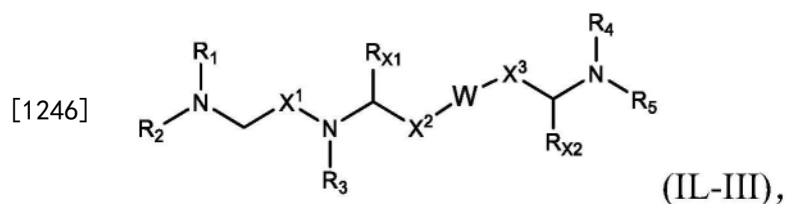
[1242] 实施方案158.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIC)、(IL-IIC1)或(IL-IIC2)化合物,其中各 $R^{13}$ 选自自由氧代、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基和 $NH_2$ 组成的组。

[1243] 实施方案159.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-IIC)、(IL-IIC1)或(IL-IIC2)化合物,其中 $R^4$ 为

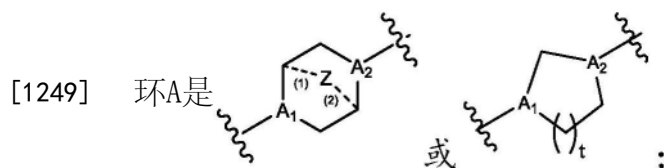
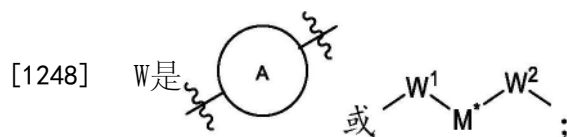


[1244] 实施方案160.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是选自表IL-6的化合物。

[1245] 实施方案161.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-III)化合物:



[1247] 或其盐或异构体,其中



[1250] t是1或2;

[1251]  $A_1$ 和 $A_2$ 各自独立地选自CH或N;

[1252] Z为 $CH_2$ 或不存在,其中当Z为 $CH_2$ 时,虚线(1)和(2)各自表示单键;并且当Z不存在时,虚线(1)和(2)均不存在;

[1253]  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 和 $R_5$ 独立地选自由 $C_{5-20}$ 烷基、 $C_{5-20}$ 烯基、 $-R''MR'$ 、 $-R''YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''OR''$ 组成的组;

[1254]  $R_{X1}$ 和 $R_{X2}$ 各自独立地为H或 $C_{1-3}$ 烷基;

[1255] 各M独立地选自由 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-SC(O)-$ 、芳基和杂芳基组成的组;

[1256]  $M^*$ 为 $C_1-C_6$ 烷基,

[1257]  $W^1$ 和 $W^2$ 各自独立地选自由 $-O-$ 和 $-N(R_6)-$ 组成的组;

[1258] 各 $R_6$ 独立地选自由H和 $C_{1-5}$ 烷基组成的组;

[1259]  $X^1$ 、 $X^2$ 和 $X^3$ 独立地选自由键、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-CHR-$ 、 $-CHY-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-(CH_2)_n-C(O)-$ 、 $-C(O)-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-OC(O)-$ 、 $-C(O)O-(CH_2)_n-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-C(S)-$ 和 $-CH(SH)-$ 组成的组;

[1260] 各Y独立地为 $C_{3-6}$ 碳环;

[1261] 各 $R^*$ 独立地选自由 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组;

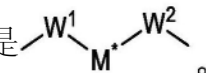
[1262] 各R独立地选自由 $C_{1-3}$ 烷基和 $C_{3-6}$ 碳环组成的组;

[1263] 各 $R'$ 独立地选自由 $C_{1-12}$ 烷基、 $C_{2-12}$ 烯基和H组成的组;

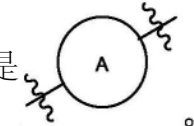
[1264] 各 $R''$ 独立地选自由 $C_{3-12}$ 烷基、 $C_{3-12}$ 烯基和 $-R''MR'$ 组成的组;并且

[1265] n是整数1-6。

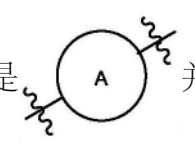
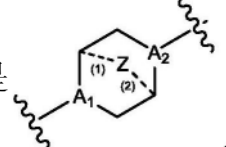
[1266] 实施方案162.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂

质是式(IL-III)化合物,其中W是 。

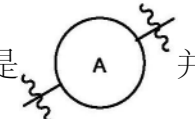
[1267] 实施方案163.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂

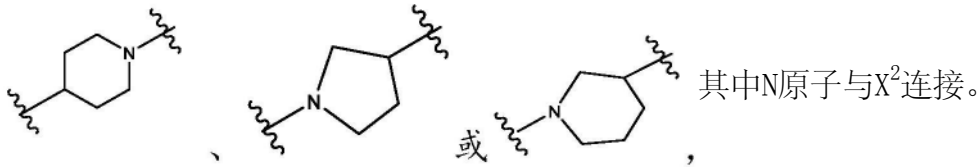
质是式(IL-III)化合物,其中W是 。

[1268] 实施方案164.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂

质是式(IL-III)化合物,其中W是  并且环A是 。

[1269] 实施方案165.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂

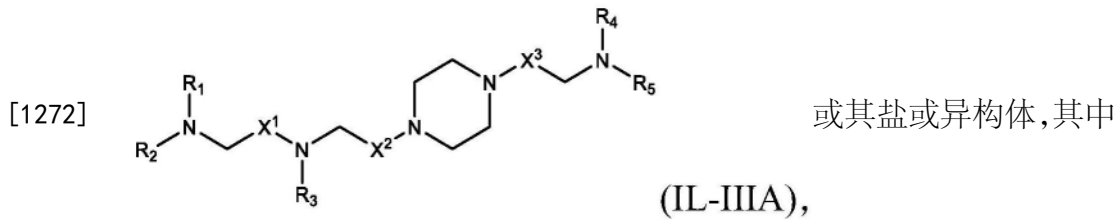
质是式(IL-III)化合物,其中W是  并且环A是



[1270] 实施方案166.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-III)化合物,其中W是



[1271] 实施方案167.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-III A)化合物:



[1273]  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 和 $R_5$ 独立地选自由 $C_{5-20}$ 烷基、 $C_{5-20}$ 烯基、 $-R''MR'$ 、 $-R''YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''OR''$ 组成的组;

[1274] 各M独立地选自由 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')$ 、 $-S(O)_2-$ 、芳基和杂芳基组成的组;

[1275]  $X^1$ 、 $X^2$ 和 $X^3$ 独立地选自由键、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-CHR-$ 、 $-CHY-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)-$ 、 $-C(O)O-CH_2-$ 、 $-OC(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)O-$ 、 $-CH_2-OC(O)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-C(S)-$ 和 $-CH(SH)-$ 组成的组;

[1276] 各Y独立地为 $C_{3-6}$ 碳环;

[1277] 各 $R''$ 独立地选自由 $C_{1-12}$ 烷基和 $C_{2-12}$ 烯基组成的组;

[1278] 各R独立地选自由 $C_{1-3}$ 烷基和 $C_{3-6}$ 碳环组成的组;

[1279] 各 $R'$ 独立地选自由 $C_{1-12}$ 烷基、 $C_{2-12}$ 烯基和H组成的组;并且

[1280] 各 $R''$ 独立地选自由 $C_{3-12}$ 烷基和 $C_{3-12}$ 烯基组成的组。

[1281] 实施方案168.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-III)或(IL-III A)化合物,其中 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 和 $R_5$ 各自独立地选自 $C_{5-20}$ 烷基和 $C_{5-20}$ 烯基。

[1282] 实施方案169.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-III)或(IL-III A)化合物,其中 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 和 $R_5$ 各自独立地为 $C_6$ 烷基、 $C_9$ 烷基、 $C_{12}$ 烷基或 $C_{14}$ 烷基。

[1283] 实施方案170.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-III)或(IL-III A)化合物,其中 $X^1$ 为 $-CH_2-$ 。

[1284] 实施方案171.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是式(IL-III)或(IL-III A)化合物,其中 $X^2$ 为 $-C(O)-$ 。

[1285] 实施方案172.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂

质是式(IL-III)或(IL-IIIA)化合物,其中X<sup>3</sup>为-C(O)-。

[1286] 实施方案173.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是选自表IL-7的化合物。

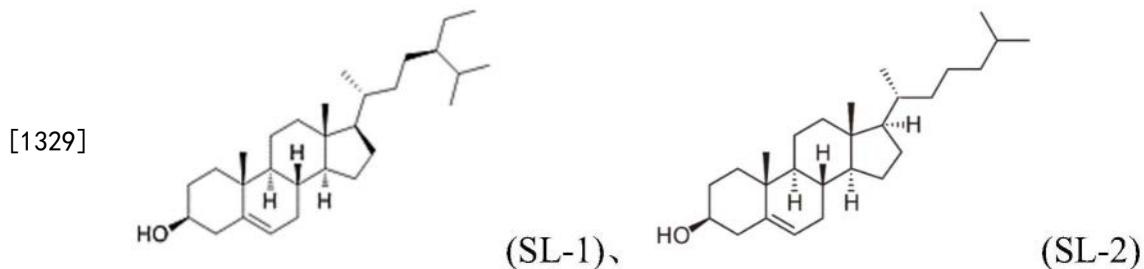
[1287] 实施方案174.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是选自化合物(I-18)、(I-25)、(I-301)、(II-6)和(VI-4)的化合物。

[1288] 实施方案175.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述可离子化脂质是选自表IL-1至IL-7的化合物的化合物。

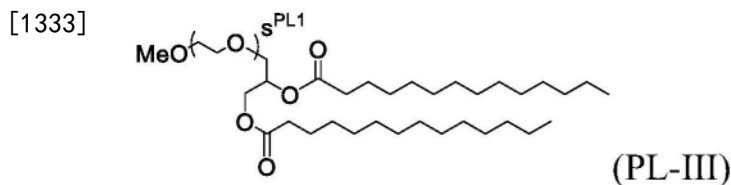
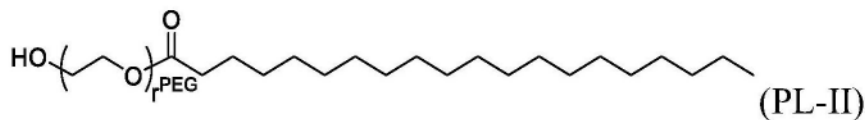
[1289] 实施方案176.如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP,其中所述磷脂选自由以下组成的组:

- [1290] 1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、
- [1291] 1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-磷酸胆碱(DMPC)、
- [1292] 1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、
- [1293] 1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、
- [1294] 1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、
- [1295] 1,2-二(十一烷酰基)-sn-甘油-磷酸胆碱(DUPC)、
- [1296] 1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、
- [1297] 1,2-二-0-十八烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0Diether PC)、
- [1298] 1-油酰基-2-胆固醇基半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemsPC)、
- [1299] 1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、
- [1300] 1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、
- [1301] 1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、
- [1302] 1,2-二(二十二碳六烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱、
- [1303] 1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、
- [1304] 1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0PE)、
- [1305] 1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、
- [1306] 1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、
- [1307] 1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、
- [1308] 1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、
- [1309] 1,2-二(二十二碳六烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、
- [1310] 1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-外消旋-(1-甘油)钠盐(DOPG)、
- [1311] 二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、
- [1312] 二硬脂酰基-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、
- [1313] 二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、
- [1314] 二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺(DMPE)、
- [1315] 1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、
- [1316] 1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰胆碱(SOPC)、
- [1317] 鞘磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、
- [1318] 磷脂酰丝氨酸、
- [1319] 磷脂酰肌醇、

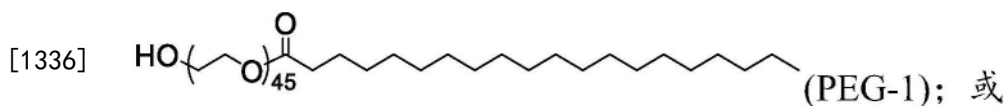
- [1320] 磷脂酸、
- [1321] 棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱、
- [1322] 溶血磷脂酰胆碱、
- [1323] 溶血磷脂酰乙醇胺 (LPE)
- [1324] 鞘磷脂和
- [1325] 它们的混合物。
- [1326] 实施方案177. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述磷脂是 DSPC。
- [1327] 实施方案178. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述结构脂质选自由胆固醇、粪甾醇、谷甾醇、麦角固醇、菜油甾醇、豆甾醇、菜子甾醇、番茄碱、熊果酸、 $\alpha$ -生育酚和它们的混合物组成的组。
- [1328] 实施方案179. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述结构脂质是

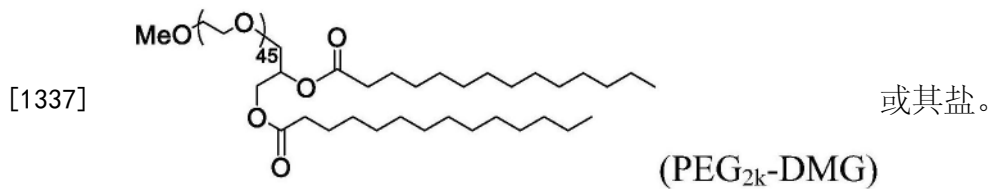


- [1330] 或其盐。
- [1331] 实施方案180. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述PEG脂质选自由PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油、PEG修饰的二烷基甘油和它们的混合物组成的组。
- [1332] 实施方案181. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述PEG脂质是以下结构之一的化合物:



- [1334] 或其盐, 其中r是整数1至100; 并且s是整数1至100。
- [1335] 实施方案182. 如前述实施方案中任一项的空LNP或负载LNP, 其中所述PEG脂质是以下化合物之一:





[1338] 实施方案183.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述治疗剂和/或预防剂是核酸。

[1339] 实施方案184.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述治疗剂和/或预防剂是核糖核酸(RNA)。

[1340] 实施方案185.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述RNA选自短干扰RNA(siRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、RNA干扰(RNAi)分子、微小RNA(miRNA)、安塔够妙、反义RNA、核酶、Dicer底物RNA(dsRNA)、小发夹RNA(shRNA)、信使RNA(mRNA)和它们的混合物组成的组。

[1341] 实施方案186.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述RNA是mRNA。

[1342] 实施方案187.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述mRNA是修饰的mRNA(mmRNA)。

[1343] 实施方案188.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述mRNA并入微小RNA结合位点(miR结合位点)。

[1344] 实施方案189.如前述实施方案中任一项的负载LNP,其中所述mRNA包括茎环、链终止核苷、polyA序列、多腺苷酸化信号和/或5'帽结构中的一者或多者。

[1345] 实施方案190.一种药物组合物,所述药物组合物包含如前述实施方案中任一项的负载LNP和药学上可接受的载体。

[1346] 实施方案191.一种向受试者内的细胞递送治疗剂和/或预防剂的方法,所述方法包括向所述受试者施用如前述实施方案中任一项的负载LNP。

[1347] 实施方案192.一种在受试者内的细胞中产生所关注的多肽的方法,所述方法包括向所述受试者施用如前述实施方案中任一项的负载LNP。

[1348] 实施方案193.如前述实施方案中任一项的负载LNP,用于向受试者内的细胞递送治疗剂和/或预防剂的方法中,所述方法包括向所述受试者施用所述负载LNP。

[1349] 实施方案194.如前述实施方案中任一项的负载LNP,用于在受试者内的细胞中产生所关注的多肽的方法中,所述方法包括向所述受试者施用所述负载LNP。

[1350] 实施方案195.如前述实施方案中任一项的方法或供使用的负载LNP,其中所述细胞是内皮细胞。

[1351] 实施方案196.如前述实施方案中任一项的方法或供使用的负载LNP,其中所述内皮细胞是肺内皮细胞。

[1352] 实施方案197.如前述实施方案中任一项的方法或供使用的负载LNP,其中所述内皮细胞是呼吸道内皮细胞。

[1353] 实施方案198.如前述实施方案中任一项的方法或供使用的负载LNP,其中所述内皮细胞是支气管内皮细胞。

[1354] 实施方案199.一种向受试者的器官特异性地递送治疗剂和/或预防剂的方法,所述方法包括向所述受试者施用如前述实施方案中任一项的负载LNP。

[1355] 实施方案200.如前述实施方案中任一项的负载LNP,用于向受试者内的器官特异性地递送治疗剂和/或预防剂的方法中,所述方法包括向所述受试者施用所述负载LNP。

[1356] 实施方案201.如前述实施方案中任一项的方法或供使用的负载LNP,其中所述器官选自自由肝、肾、肺和脾组成的组。

[1357] 实施方案202.如前述实施方案中任一项的方法或供使用的负载LNP,其中所述器官是肺。

[1358] 实施方案203.一种向受试者的组织特异性地递送治疗剂和/或预防剂的方法,所述方法包括向所述受试者施用如前述实施方案中任一项的负载LNP。

[1359] 实施方案204.如前述实施方案中任一项的负载LNP,用于向受试者的组织特异性地递送治疗剂和/或预防剂的方法中,所述方法包括向所述受试者施用所述负载LNP。

[1360] 实施方案205.如前述实施方案中任一项的方法或供使用的负载LNP,其中所述组织是内皮。

[1361] 实施方案206.如前述实施方案中任一项的方法或供使用的负载LNP,其中所述组织是肺内皮。

[1362] 实施方案207.一种治疗有需要的受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用如前述实施方案中任一项的负载LNP。

[1363] 实施方案208.如前述实施方案中任一项的负载LNP,用于治疗有需要的受试者的疾病或病症的方法中,所述方法包括向所述受试者施用所述负载LNP。

[1364] 实施方案209.如前述实施方案中任一项的方法或供使用的负载LNP,其中所述施用是肠胃外、肌内、皮内、皮下和/或静脉内执行的。

[1365] 等效方案

[1366] 应理解,虽然本公开已结合其详细描述加以描述,但前述描述意图说明而非限制本公开的范围,所述范围由随附权利要求书的范围限定。其他方面、优势和改变是在以下权利要求书的范围内。