



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118265522 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 28

(21) 申请号 202280074040.3

(22) 申请日 2022.09.09

(30) 优先权数据

PCT/EP2021/074976 2021.09.10 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/075168 2022.09.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/036960 EN 2023.03.16

(71) 申请人 生物技术欧洲股份公司

地址 德国美因兹

(72) 发明人 H·黑费莎 H·哈斯 F·贝茨

C·霍茨 K·卡里科

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

专利代理师 曹雯 黄歆

(51) Int.Cl.

A61K 9/127 (2006.01)

权利要求书9页 说明书119页

序列表(电子公布) 附图77页

(54) 发明名称

适用于治疗的基于脂质的RNA制剂

(57) 摘要

本公开涉及包含具有磷脂酰丝氨酸头基的磷脂的RNA颗粒,用于在给药后,特别是在肠胃外、瘤内或瘤周给药后将RNA递送至靶组织,以及包含这类RNA颗粒的组合物。本公开还涉及制备本文所述RNA颗粒的方法。

1. 一种RNA颗粒,其包含:

- (i) RNA,
- (ii) 至少一种阳离子或阳离子可电离脂质,以及
- (iii) 至少一种磷脂酰丝氨酸。

2. 权利要求1的RNA颗粒,其中所述阳离子或阳离子可电离脂质包含头基,所述头基包括至少一个优选在生理条件下带正电荷或能够质子化的氮原子。

3. 权利要求1或2的RNA颗粒,其中所述阳离子或阳离子可电离脂质选自N,N-二甲基-2,3-二油氧基丙胺(DODMA)、1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-二甲基-羟乙基溴化铵(DMRIE)、N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、N-(1-(2,3-二油氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷基-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯(D-Lin-MC3-DMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)和4-((二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)氧基)-N,N-二甲基-4-氧代丁-1-胺(DPL-14),或者它们的混合物。

4. 权利要求1-3中任一项的RNA颗粒,其中所述磷脂酰丝氨酸包含二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)、1,2-二辛酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(08:0PS)、1,2-二癸酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(10:0PS)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(12:0PS)、二肉豆蔻酰基磷脂酰丝氨酸(DMPS)、二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸(DPPS)、1,2-双十七烷酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(17:0PS)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(18:0PS)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(POPS)、1-硬脂酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(SOPS)、1-棕榈酰基-2-亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(PLenPS)、1-棕榈酰基-2-花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(16:0-20:4PS)、1-棕榈酰基-2-二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(16:0-22:6PS)、1-硬脂酰基-2-亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(18:0-18:2PS)、1-硬脂酰基-2-花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(18:0-20:4PS)、1-硬脂酰基-2-二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(18:0-22:6PS)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(18:2PS)、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(20:4PS)、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(22:6PS)、1-十三烷酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(13:0Lyso PS)、1-(10Z-十七碳烯酰基)-2-羟基-sn-甘油-3-[磷酸-L-丝氨酸](17:1Lyso PS)、1-棕榈酰基-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(16:0Lyso PS)、1-油酰基-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(18:1Lyso PS)、1-硬脂酰基-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(18:0Lyso PS)、脑PS、脑lyso PS、大豆PS或它们的混合物。

5. 权利要求1-4中任一项的RNA颗粒,其进一步包含至少一种额外的脂质。

6. 权利要求5的RNA颗粒,其中所述额外的脂质选自中性脂质、类固醇及其组合。

7. 权利要求5或6的RNA颗粒,其中所述额外的脂质包含中性脂质。

8. 权利要求5-7中任一项的RNA颗粒,其中所述额外的脂质包含磷脂。

9. 权利要求8的RNA颗粒,其中所述磷脂选自磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、

磷脂酸和鞘磷脂。

10. 权利要求8或9的RNA颗粒,其中所述磷脂选自二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、双十五酰基磷脂酰胆碱、二月桂酰基磷脂酰胆碱、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二花生酰基磷脂酰胆碱(DAPC)、双二十二碳酰基磷脂酰胆碱(DBPC)、双二十三碳酰基磷脂酰胆碱(DTPC)、双二十四酰基磷脂酰胆碱(DLPC)、棕榈酰油酰基-磷脂酰胆碱(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-胆甾烯基半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、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-磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二月桂酰基-磷脂酰乙醇胺(DLPE)和二植酰基-磷脂酰乙醇胺(DPyPE)。

11. 权利要求5-10中任一项的RNA颗粒,其中所述额外的脂质包含胆固醇或胆固醇衍生物。

12. 权利要求5-11中任一项的RNA颗粒,其中所述额外的脂质包含磷脂和胆固醇或胆固醇衍生物的混合物。

13. 权利要求5-12中任一项的RNA颗粒,其中所述额外的脂质包含DOPE、胆固醇或者DOPE和胆固醇的混合物。

14. 权利要求1-13中任一项的RNA颗粒,其中所述阳离子或阳离子可电离脂质占所述颗粒中存在的总脂质的约20摩尔%至约95摩尔%。

15. 权利要求1-14中任一项的RNA颗粒,其中所述磷脂酰丝氨酸占所述颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约70摩尔%。

16. 权利要求5-15中任一项的RNA颗粒,其中所述额外的脂质占所述颗粒中存在的总脂质的约0摩尔%至约80摩尔%。

17. 权利要求1-16中任一项的RNA颗粒,其包含阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质。

18. 权利要求17的RNA颗粒,其中所述额外的脂质包含中性脂质、类固醇或其混合物。

19. 权利要求5-18中任一项的RNA颗粒,其中阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为2-9.5:0.2-7:0.2-8。

20. 权利要求5-19中任一项的RNA颗粒,其中阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为约6:约1:约1。

21. 权利要求5-19中任一项的RNA颗粒,其中阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为约6:约1:约1.2-1.8,如约6:约1:约1.2、约6:约1:约1.7或约6:约1:约1.8。

22. 权利要求1-21中任一项的RNA颗粒,其包含阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE。

23. 权利要求22的RNA颗粒,其中阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为2-9.5:0.2-7:0.2-8。

24. 权利要求22或23的RNA颗粒,其中阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1。

25. 权利要求22或23的RNA颗粒,其中阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔

比为约6:约1:约1.2-1.8,如约6:约1:约1.2、约6:约1:约1.7或约6:约1:约1.8。

26. 权利要求1-22中任一项的RNA颗粒,其包含DODMA、DOPS和DOPE。

27. 权利要求26的RNA颗粒,其中DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为2-9.5:0.2-7:0.2-8。

28. 权利要求26或27的RNA颗粒,其中DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1。

29. 权利要求26-28中任一项的RNA颗粒,其中DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.2-1.8,如约6:约1:约1.2、约6:约1:约1.7或约6:约1:约1.8。

30. 一种RNA颗粒,其包含:

(i) RNA,

(ii) 至少一种阳离子或阳离子可电离脂质,

(iii) 第一磷脂,其为磷脂酰丝氨酸,以及

(iv) 第二磷脂。

31. 权利要求30的RNA颗粒,其中所述阳离子或阳离子可电离脂质包含DODMA。

32. 权利要求30或31的RNA颗粒,其中所述磷脂酰丝氨酸包含DOPS。

33. 权利要求30-32中任一项的RNA颗粒,其中所述第二磷脂包含DOPE。

34. 权利要求30-33中任一项的RNA颗粒,其中所述阳离子或阳离子可电离脂质占所述颗粒中存在的总脂质的约20摩尔%至约95摩尔%。

35. 权利要求30-34中任一项的RNA颗粒,其中所述磷脂酰丝氨酸占所述颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约70摩尔%。

36. 权利要求30-35中任一项的RNA颗粒,其中所述第二磷脂占所述颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约80摩尔%。

37. 权利要求30-36中任一项的RNA颗粒,其中阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为2-9.5:0.2-7:0.2-8。

38. 权利要求30-37中任一项的RNA颗粒,其中阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为约6:约1:约1。

39. 权利要求30-37中任一项的RNA颗粒,其中阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为约6:约1:约1.2-1.8,如约6:约1:约1.2或约6:约1:约1.7或约6:约1:约1.8。

40. 一种RNA颗粒,其包含(i) RNA, (ii) N,N-甲基-2,3-二油氧基丙胺(DODMA), 和(iii) 二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)。

41. 权利要求40的RNA颗粒,其进一步包含二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

42. 权利要求40或41的RNA颗粒,其中所述DODMA占所述颗粒中存在的总脂质的约20摩尔%至约95摩尔%。

43. 权利要求40-42中任一项的RNA颗粒,其中所述DOPS占所述颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约70摩尔%。

44. 权利要求41-43中任一项的RNA颗粒,其中所述DOPE占所述颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约80摩尔%。

45. 权利要求41-44中任一项的RNA颗粒,其中DODMA:DOPE:DOPS的摩尔比为2-9.5:0.2-8:0.2-7。

46. 权利要求41-45中任一项的RNA颗粒,其中DODMA:DOPE:DOPS的摩尔比为5.5-6.5:

0.9-1.1:0.9-1.1。

47. 权利要求41-46中任一项的RNA颗粒,其中DODMA:DOPE:DOPS的摩尔比为约6:约1:约1。

48. 权利要求41-45中任一项的RNA颗粒,其中DODMA:DOPE:DOPS的摩尔比为约6:约1.2-1.8:约1,如约6:约1.2:约1或约6:约1.7:约1或约6:约1.8:约1。

49. 权利要求1-48中任一项的RNA颗粒,其包含非离子两亲有机化合物。

50. 权利要求49的RNA颗粒,其中所述非离子两亲有机化合物是表面活性剂。

51. 权利要求49或50的RNA颗粒,其中所述非离子两亲有机化合物是聚(乙二醇)(PEG)表面活性剂。

52. 权利要求49-51中任一项的RNA颗粒,其中所述非离子两亲有机化合物包含连接至单个疏水链的聚(乙二醇)(PEG)链。

53. 权利要求49-52中任一项的RNA颗粒,其中所述非离子两亲有机化合物包含聚氧乙烯脱水山梨醇酯、D- α -生育酚聚乙二醇-琥珀酸酯(TPGS)、饱和C10-C22羟基脂肪酸的聚氧乙烯单酯、聚氧乙烯脂肪酸酯、聚氧乙烯烷基醚或它们的组合。

54. 权利要求1-53中任一项的RNA颗粒,其包含聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯。

55. 权利要求1-54中任一项的RNA颗粒,其包含聚山梨酯。

56. 权利要求55的RNA颗粒,其中所述聚山梨酯是聚山梨酯20。

57. 权利要求1-10和13-56中任一项的RNA颗粒,其不包含胆固醇。

58. 权利要求1-10和13-57中任一项的RNA颗粒,其不包含类固醇。

59. 权利要求1-58中任一项的RNA颗粒,其中所述RNA是mRNA或saRNA。

60. 权利要求1-59中任一项的RNA颗粒,其中所述颗粒是脂质纳米颗粒(LNP)或脂质复合物颗粒(LPX)。

61. 权利要求1-60中任一项的RNA颗粒,其中所述颗粒的大小为约30nm至约500nm。

62. 权利要求1-61中任一项的RNA颗粒,其中所述颗粒是非病毒颗粒。

63. 权利要求1-62中任一项的RNA颗粒,其中所述RNA是单分子或多分子物质。

64. 权利要求1-63中任一项的RNA颗粒,其中所述RNA是编码RNA。

65. 权利要求1-64中任一项的RNA颗粒,其中所述RNA包含编码不同肽或多肽的mRNA的混合物。

66. 权利要求1-65中任一项的RNA颗粒,其中所述RNA编码一种或多种选自以下的肽或多肽:细胞因子、激素、粘附分子、免疫球蛋白、免疫活性化合物、生长因子、蛋白酶抑制剂、酶、受体、凋亡调节剂、转录因子、肿瘤抑制蛋白、结构蛋白、重编程因子、基因组工程蛋白和血液蛋白。

67. 权利要求1-66中任一项的RNA颗粒,其中所述RNA包含编码IL-12sc蛋白的RNA、编码IL-15sushi蛋白的RNA、编码IFN α 蛋白的RNA和编码GM-CSF蛋白的RNA。

68. 权利要求65-67中任一项的RNA颗粒,其中

i. 每种RNA的比率为1:1:1:1(w/w/w/w);和/或

ii. 每种RNA包含修饰的核苷代替每个尿苷;和/或

iii. 每种RNA包含修饰的核苷代替每个尿苷,其中所述修饰的核苷独立地选自假尿苷(ψ)、N1-甲基-假尿苷(m1 ψ)和5-甲基-尿苷(m5U);和/或

- iv. 每种RNA包含5' 帽 $m_2^{7,3'-0}$ Gppp($m_1^{2'-0}$)ApG或3'-O-Me- m^7 G(5')ppp(5')G;和/或
- v. 每种RNA包含5' UTR,所述5' UTR包含选自SEQ ID NO:2和4的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:2和4的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列;和/或
- vi. 每种RNA包含3' UTR,所述3' UTR包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:6的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列;和/或
- vii. 每种RNA包含poly-A尾,其中所述poly-A尾包含至少100个核苷酸,并且其中所述poly-A尾包含SEQ ID NO:27所示的poly-A尾或由SEQ ID NO:27所示的poly-A尾组成。
69. 权利要求67或68的RNA颗粒,其中
- i. 编码IL-12sc蛋白的RNA包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:7的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列;和/或
- ii. 编码IL-15sushi蛋白的RNA包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:8的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列;和/或
- iii. 编码IFN α 蛋白的RNA包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:9的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列;和/或
- iv. 编码GM-CSF蛋白的RNA包含SEQ ID NO:10的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:10的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列。
70. 权利要求67-69中任一项的RNA颗粒,其中
- i. 所述IL-12sc蛋白包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的氨基酸序列;和/或
- ii. 所述IL-15sushi蛋白包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的氨基酸序列;和/或
- iii. 所述IFN α 蛋白包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的氨基酸序列;和/或
- iv. 所述GM-CSF蛋白包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的氨基酸序列。
71. 权利要求1-70中任一项的RNA颗粒,其可通过包括以下步骤的方法获得:
- (i) 在有机溶剂中制备酸化的脂质溶液;
- (ii) 将所述酸化的脂质溶液添加至水相中以产生脂质体胶体;以及
- (iii) 将所述脂质体胶体添加至包含RNA和非离子两亲有机化合物的水性溶液中以产生RNA脂质颗粒。
72. 权利要求71的RNA颗粒,其中所述颗粒是脂质复合物颗粒(LPX)。
73. 权利要求1-70中任一项的RNA颗粒,其可通过包括以下步骤的方法获得:
- (i) 在有机溶剂中制备酸化的脂质溶液;以及

(ii) 将所述酸化的脂质溶液添加至包含RNA和非离子两亲有机化合物的水性溶液中以产生RNA脂质颗粒。

74. 权利要求73的RNA颗粒, 其中所述颗粒是脂质纳米颗粒(LNP)。

75. 权利要求71-74中任一项的RNA颗粒, 其中所述有机溶剂包含醇。

76. 权利要求75的RNA颗粒, 其中所述醇是乙醇。

77. 权利要求71-76中任一项的RNA颗粒, 其中所述非离子两亲有机化合物占总脂质的约0.1摩尔%至约30摩尔%。

78. 权利要求71-77中任一项的RNA颗粒, 其中所述非离子两亲有机化合物占总脂质的约5摩尔%以上。

79. 权利要求71-78中任一项的RNA颗粒, 其中所述非离子两亲有机化合物占总脂质的约5摩尔%至约25摩尔%。

80. 一种组合物, 其包含权利要求1-79中任一项的一种或多种RNA颗粒或者多种RNA颗粒。

81. 权利要求80的组合物, 其包含水性溶液。

82. 权利要求81的组合物, 其中所述颗粒和/或水性溶液包含非离子两亲有机化合物。

83. 权利要求82的组合物, 其中所述非离子两亲有机化合物是表面活性剂。

84. 权利要求82或83的组合物, 其中所述非离子两亲有机化合物是聚(乙二醇)(PEG)表面活性剂。

85. 权利要求82-84中任一项的组合物, 其中所述非离子两亲有机化合物包含连接至单个疏水链的聚(乙二醇)(PEG)链。

86. 权利要求82-85中任一项的组合物, 其中所述非离子两亲有机化合物包含聚氧乙烯脱水山梨醇酯、D- α -生育酚聚乙二醇-琥珀酸酯(TPGS)、饱和C10-C22羟基脂肪酸的聚氧乙烯单酯、聚氧乙烯脂肪酸酯、聚氧乙烯烷基醚或它们的组合。

87. 权利要求80-86中任一项的组合物, 其包含聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯。

88. 权利要求80-87中任一项的组合物, 其包含聚山梨酯。

89. 权利要求88的组合物, 其中所述聚山梨酯是聚山梨酯20。

90. 权利要求82-89中任一项的组合物, 其中所述非离子两亲有机化合物占所述组合物中存在的总脂质的约0.1摩尔%至约30摩尔%。

91. 权利要求82-90中任一项的组合物, 其中所述非离子两亲有机化合物占所述组合物中存在的总脂质的约5摩尔%以上。

92. 权利要求82-91中任一项的组合物, 其中所述非离子两亲有机化合物占所述组合物中存在的总脂质的约5摩尔%至约25摩尔%。

93. 权利要求80-92中任一项的组合物, 其包含DODMA、DOPE、DOPS和聚山梨酯20。

94. 权利要求80-93中任一项的组合物, 其包含DODMA、DOPE、DOPS和聚山梨酯20, 其中DODMA:DOPE:DOPS:聚山梨酯20的摩尔比为5.5-6.5:0.9-1.1:0.9-1.1:1.5-2.5。

95. 权利要求93或94的组合物, 其中DODMA:DOPE:DOPS:聚山梨酯20的摩尔比为约6:约1:约1:约2, 或者DODMA:DOPE:DOPS:聚山梨酯20的摩尔比为约1.2-1.8:约1:约2, 如约6:约1.2:约1:约2或约6:约1.7:约1:约2或约6:约1.8:约1:约2。

96. 权利要求80-95中任一项的组合物, 其包含至少约0.6mM水平的非离子两亲有机化

合物。

97. 权利要求80-96中任一项的组合物,其包含至少约1.8mM水平的DODMA、至少约0.3mM水平的DOPE和至少约0.3mM水平的DOPS。

98. 权利要求80-97中任一项的组合物,其中所述组合物不包含胆固醇。

99. 权利要求80-98中任一项的组合物,其中所述组合物不包含类固醇。

100. 权利要求80-99中任一项的组合物,其中所述组合物中的脂质由DODMA、DOPE、DOPS和聚山梨酯20组成。

101. 权利要求80-100中任一项的组合物,其中所述颗粒是LPX颗粒。

102. 权利要求101的组合物,其中所述LPX颗粒的N/P比为约3至约5,并且其中所述组合物的pH为约7至约7.5。

103. 权利要求101组合物,其中所述LPX颗粒的N/P比为约3至约5,并且其中所述组合物的pH为约5.0至约6.0,任选约5.2至约5.8,任选约5.5。

104. 权利要求101-103中任一项的组合物,其中所述LPX颗粒的N/P比为约3。

105. 权利要求80-104中任一项的组合物,其中所述RNA包含编码IL-12sc蛋白的RNA、编码IL-15sushi蛋白的RNA、编码IFN α 蛋白的RNA和编码GM-CSF蛋白的RNA。

106. 权利要求80-105中任一项的组合物,其中所述组合物包含柠檬酸盐缓冲液,任选柠檬酸盐缓冲液和氯化钠。

107. 一种将RNA递送至受试者的细胞的方法,所述方法包括向所述受试者给药权利要求1-79中任一项的一种或多种RNA颗粒或者多种RNA颗粒或者权利要求80-106中任一项的组合物。

108. 一种将治疗性或预防性肽或多肽递送至受试者的方法,所述方法包括向所述受试者给药权利要求1-79中任一项的一种或多种RNA颗粒或者多种RNA颗粒或者权利要求80-106中任一项的组合物,其中所述RNA编码所述治疗性或预防性肽或多肽。

109. 一种治疗或预防受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者给药药理学有效量的权利要求1-79中任一项的一种或多种RNA颗粒或者多种RNA颗粒或者权利要求80-106中任一项的组合物,其中将所述RNA递送至所述受试者的细胞有利于治疗或预防所述疾病。

110. 一种治疗或预防受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者给药药理学有效量的权利要求1-79中任一项的一种或多种RNA颗粒或者多种RNA颗粒或者权利要求80-106中任一项的组合物,其中所述RNA编码所述治疗性肽或多肽,并且其中将所述治疗性肽或多肽递送至所述受试者有利于治疗或预防所述疾病。

111. 权利要求107-110中任一项的方法,其中给药是通过静脉内、瘤内或瘤周注射。

112. 权利要求107-111中任一项的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

113. 权利要求112的方法,其中所述哺乳动物是人。

114. 一种制备包含至少一种磷脂酰丝氨酸的RNA脂质颗粒的方法,所述方法包括在包含至少一种磷脂酰丝氨酸的有机溶剂中制备脂质溶液的步骤,其中所述脂质溶液是酸化的。

115. 权利要求114的方法,其中所述有机溶剂包含醇。

116. 权利要求115的方法,其中所述醇是乙醇。

117. 权利要求114-116中任一项的方法,其中所述脂质溶液具有酸性pH,以使所述至少

一种磷脂酰丝氨酸呈电中性。

118. 权利要求114-117中任一项的方法,其中所述脂质溶液进一步包含阳离子可电离脂质,并且所述脂质溶液的酸性pH使所述阳离子可电离脂质质子化。

119. 权利要求114-118中任一项的方法,其进一步包括将脂质溶液添加至水相中以产生脂质体胶体。

120. 权利要求119的方法,其进一步包括将所述脂质体胶体添加至包含RNA的水性溶液中以产生RNA脂质颗粒。

121. 权利要求120的方法,其中所述包含RNA的水性溶液包含柠檬酸盐缓冲液,任选柠檬酸盐缓冲液和氯化钠。

122. 权利要求114-121中任一项的方法,其中所述RNA脂质颗粒是脂质复合物颗粒(LPX)。

123. 权利要求120-122中任一项的方法,其中将所述脂质体胶体和包含RNA的水性溶液以至少200mL/min的流速混合,任选以300-400mL/min的流速混合,优选以300-360mL/min的流速混合。

124. 权利要求114-118中任一项的方法,进一步包括将所述脂质溶液与包含RNA的水性溶液混合以产生RNA脂质颗粒。

125. 权利要求114-118中任一项的方法,其中所述RNA脂质颗粒是脂质纳米颗粒(LNP)。

126. 权利要求124或125的方法,其中将所述脂质溶液和包含RNA的水性溶液以约2至约12mL/min的流速混合,任选以约4至约10mL/min的流速混合,优选以约6至约10mL/min的流速混合。

127. 权利要求114-126中任一项的方法,其中所述脂质溶液和/或RNA溶液包含非离子两亲有机化合物。

128. 权利要求114-127中任一项的方法,所述方法进一步包括将所述RNA脂质颗粒在-80℃下冷冻保存。

129. 一种制备RNA脂质颗粒的方法,所述方法包括在有机溶剂中制备脂质溶液并将脂质溶液与包含RNA的水性溶液混合以产生RNA脂质颗粒的步骤,其中非离子两亲有机化合物存在于脂质溶液或RNA溶液中,或两者中。

130. 权利要求129的方法,其中所述有机溶剂包含醇。

131. 权利要求130的方法,其中所述醇是乙醇。

132. 权利要求127-131中任一项的方法,其中所述脂质溶液和/或RNA溶液包含总脂质的约0.1摩尔%至约30摩尔%的非离子两亲有机化合物的摩尔分数。

133. 权利要求127-132中任一项的方法,其中所述非离子两亲有机化合物占总脂质的约5摩尔%以上。

134. 权利要求127-133中任一项的方法,其中所述非离子两亲有机化合物占总脂质的约5摩尔%至约25摩尔%。

135. 一种制备包含RNA脂质复合物颗粒的组合物的方法,所述RNA脂质复合物颗粒包含至少一种磷脂酰丝氨酸,所述方法包括:

i) 制备包含脂质体的酸化的水性胶体,其中所述脂质体包含至少一种磷脂酰丝氨酸,其中包含脂质体的酸化的水性胶体包含10-30mM乙酸;以及

ii) 将包含脂质体的酸化的水性胶体与包含RNA的水性溶液混合；
从而产生包含RNA脂质复合物颗粒的组合物，
其中所述RNA脂质复合物颗粒和脂质体包含二油酰基磷脂酰丝氨酸 (DOPS)；N,N-二甲基-2,3-二油氧基丙胺 (DODMA)；和二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DOPE)。

适用于治疗的基于脂质的RNA制剂

技术领域

[0001] 本公开涉及包含具有磷脂酰丝氨酸头基的磷脂的RNA颗粒,用于在给药后,特别是在肠胃外、瘤内或瘤周给药后将RNA递送至靶组织,以及包含这类RNA颗粒的组合物。本公开还涉及制备本文所述RNA颗粒的方法。一些实施方案中的RNA颗粒包含单链RNA如mRNA,其编码所关注的肽或多肽,如药学活性肽或多肽。RNA被靶组织的细胞吸收,并且RNA被翻译为编码的肽或多肽,这可以表现其生理活性。本文所述的方法、工艺和组合物适用于以符合药品要求的方式使用,更具体地,符合GMP制造的要求和药品质量的要求。

背景技术

[0002] 使用RNA将外源遗传信息递送至靶细胞中,是DNA的一种有吸引力的替代方法。RNA的优点包括瞬时表达和非转化特征。RNA的表达不需要细胞核浸润,而且不会整合到宿主基因组中,从而消除致癌的风险。

[0003] 可以通过不同的媒介物将RNA递送至靶标,主要基于阳离子聚合物或脂质,它们与RNA结合形成纳米颗粒。纳米颗粒的目的是保护RNA免受降解,使RNA能够递送至靶位点,并促进细胞吸收和靶细胞的加工。RNA递送的效率部分取决于纳米颗粒的分子组成,并受许多参数的影响,包括粒径、制剂以及分子部分的电荷或接枝,如聚乙二醇(PEG)或其他配体。

[0004] 需要提供将生物活性RNA递送至靶组织的制剂,在靶组织中,递送的RNA被有效地翻译成其编码的肽或多肽。发明人出人意料地发现本文所述的RNA颗粒制剂满足上述要求。

发明内容

[0005] 本发明一般提供包含具有磷脂酰丝氨酸头基的磷脂的RNA颗粒。发明人发现,含有带负电荷的具有磷脂酰丝氨酸头基的磷脂的RNA颗粒制剂可以以稳健和可重复的方式制备。它们适合作为RNA递送系统,并且与没有磷脂酰丝氨酸的系统相比显示出优异的生物学特征。

[0006] 为了克服与RNA的静电排斥,在制备的某些阶段,可以降低pH以减少或完全去除磷脂酰丝氨酸脂质的负电荷。随后,为了给药,可以将颗粒恢复到接近生理范围的pH。这样,颗粒保持其稳定性,同时保持其有利的生物活性。

[0007] 本文所述的RNA颗粒制剂可用作体内应用的RNA递送媒介物。此外,颗粒可以以符合GMP的方式制备,具有相对简单和直接的方案。这去除制备其他基于脂质的纳米颗粒产品所需的不期望的加工步骤(渗滤、挤压等)。最终产品适用于制药应用。

[0008] 在一些方面,本发明提供一种RNA颗粒,其包含:

[0009] (i) RNA,

[0010] (ii) 至少一种阳离子或阳离子可电离脂质,以及

[0011] (iii) 至少一种磷脂酰丝氨酸。

[0012] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质包含头基,所述头基包括至少一个优选在生理条件下带正电荷或能够质子化的氮原子。

[0013] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质选自N,N-二甲基-2,3-二油氧基丙胺(N,N-dimethyl-2,3-dioleyloxypropylamine,DODMA)、1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-二甲基-羟乙基溴化铵(1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxy ethyl ammonium bromide,DMRIE)、N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(N,N-dioleyl-N,N-dimethylammonium chloride,DODAC)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium-propane,DODAP)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(N,N-distearyl-N,N-dimethylammonium bromide,DDAB)、N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride,DOTAP)、N-(1-(2,3-二油氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(N-(1-(2,3-dioleyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride,DOTMA)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(1,2-dilinoleyloxy-N,N-dimethylaminopropane,DLinDMA)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷基-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl 4-(dimethylamino)butanoate,D-Lin-MC3-DMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(1,2-dilinenyloxy-N,N-dimethylaminopropane,DLenDMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(2,2-dilinoley1-4-(2-dimethylaminoethyl)-[1,3]-dioxolane,DLin-KC2-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(2,2-dilinoley1-4-dimethylaminomethyl-[1,3]-dioxolane,DLin-K-DMA)和4-((二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)氧基)-N,N-二甲基-4-氧代丁-1-胺(4-((di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-yl)amino)oxy)-N,N-dimethyl-4-oxobutan-1-amine,DPL-14),或者它们的混合物。

[0014] 在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸包括二油酰基磷脂酰丝氨酸(dioleoylphosphatidylserine,DOPS)、1,2-二辛酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1,2-diocanoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,08:OPS)、1,2-二癸酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine 10:OPS)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,12:OPS)、二肉豆蔻酰基磷脂酰丝氨酸(dimyristoylphosphatidylserine,DMPS)、二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸(dipalmitoylphosphatidylserine,DPPS)、1,2-双十七烷酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,17:OPS)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,18:OPS)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,POPS)、1-硬脂酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,SOPS)、1-棕榈酰基-2-亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,PLenPS)、1-棕榈酰基-2-花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,16:0-20:4PS)、1-棕榈酰基-2-二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1-palmitoyl-2-docosaheptaenoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,16:0-22:6PS)、1-硬脂酰基-2-亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1-stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,18:0-18:2PS)、1-硬脂酰基-2-花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-

glycero-3-phospho-L-serine,18:0-20:4PS)、1-硬脂酰基-2-二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1-stearoyl-2-docosaheptaenoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,18:0-22:6PS)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,18:2PS)、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1,2-diarachidonoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,20:4PS)、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1,2-didocosaheptaenoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,22:6PS)、1-十三烷酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1-tridecanoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,13:0Lyso PS)、1-(10Z-十七碳烯酰基)-2-羟基-sn-甘油-3-[磷酸-L-丝氨酸](1-(10Z-heptadecenoyl)-2-hydroxy-sn-glycero-3-[phospho-L-serine],17:1Lyso PS)、1-棕榈酰基-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-L-serine,16:0Lyso PS)、1-油酰基-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-L-serine,18:1Lyso PS)、1-硬脂酰基-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1-stearoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-L-serine,18:0Lyso PS)、脑PS、脑lyso PS、大豆PS(soy PS)或它们的混合物。

[0015] 在一些实施方案中,RNA颗粒进一步包含至少一种额外的脂质。

[0016] 在一些实施方案中,额外的脂质选自中性脂质、类固醇及其组合。

[0017] 在一些实施方案中,额外的脂质包含中性脂质。

[0018] 在一些实施方案中,额外的脂质包含磷脂。

[0019] 在一些实施方案中,磷脂选自磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酸和鞘磷脂。

[0020] 在一些实施方案中,磷脂选自二油酰基磷脂酰乙醇胺(dioleoylphosphatidylethanolamine,DOPE)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(distearoylphosphatidylcholine,DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(dioleoylphosphatidylcholine,DOPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(dimyristoylphosphatidylcholine,DMPC)、双十五酰基磷脂酰胆碱(dipentadecanoylphosphatidylcholine)、二月桂酰基磷脂酰胆碱(dilauroylphosphatidylcholine)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(dipalmitoylphosphatidylcholine,DPPC)、二花生酰基磷脂酰胆碱(diarachidoylphosphatidylcholine,DAPC)、双二十二碳酰基磷脂酰胆碱(dibehenoylphosphatidylcholine,DBPC)、双二十三碳酰基磷脂酰胆碱(ditricosanoylphosphatidylcholine,DTPC)、双二十四酰基磷脂酰胆碱(dilignoceroylphosphatidylcholine,DLPC)、棕榈酰油酰基-磷脂酰胆碱(palmitoyloleoyl-phosphatidylcholine,POPC)、1,2-二-0-十八烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(1,2-di-0-octadecenyl-sn-glycero-3-phosphocholine,18:0Diether PC)、1-油酰基-2-胆甾烯基半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(1-oleoyl-2-cholesterylhemisuccinoyl-sn-glycero-3-phosphocholine,0ChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(1-hexadecyl-sn-glycero-3-phosphocholine,C16 Lyso PC)、二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(distearoyl-phosphatidylethanolamine,DSPE)、二棕榈酰基-磷脂酰乙醇胺(dipalmitoyl-phosphatidylethanolamine,DPPE)、二肉豆蔻酰基-磷脂酰乙醇胺(dimyristoyl-phosphatidylethanolamine,DMPE)、二月桂酰基-磷脂酰乙醇胺(DLPE)和二植酰基-磷脂酰乙醇胺(diphytanoyl-phosphatidylethanolamine,DPyPE)。

- [0021] 在一些实施方案中,额外的脂质包含胆固醇或胆固醇衍生物。
- [0022] 在一些实施方案中,额外的脂质包含磷脂和胆固醇或胆固醇衍生物的混合物。
- [0023] 在一些实施方案中,额外的脂质包含DOPE、胆固醇或者DOPE和胆固醇的混合物。
- [0024] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约20摩尔%至约95摩尔%。
- [0025] 在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约70摩尔%。
- [0026] 在一些实施方案中,额外的脂质占颗粒中存在的总脂质的约0摩尔%至约80摩尔%。
- [0027] 在一些实施方案中,RNA颗粒包含阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质。
- [0028] 在一些实施方案中,额外的脂质包含中性脂质、类固醇或其混合物。
- [0029] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为2-9.5:0.2-7:0.2-8。
- [0030] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为约6:约1:约1。
- [0031] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为约6:约1:约1.2-1.8。
- [0032] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为约6:约1:约1.2。
- [0033] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为约6:约1:约1.7。
- [0034] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为约6:约1:约1.8。
- [0035] 在一些实施方案中,RNA颗粒包含阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE。
- [0036] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为2-9.5:0.2-7:0.2-8。
- [0037] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1。
- [0038] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.2-1.8。
- [0039] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.2。
- [0040] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.7。
- [0041] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.8。
- [0042] 在一些实施方案中,RNA颗粒包含DODMA、DOPS和DOPE。
- [0043] 在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为2-9.5:0.2-7:0.2-8。

- [0044] 在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1。
- [0045] 在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.2-1.8。
- [0046] 在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.2。
- [0047] 在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.7。
- [0048] 在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.8。
- [0049] 在一些方面,本发明提供一种RNA颗粒,其包含:
- [0050] (i) RNA,
- [0051] (ii) 至少一种阳离子或阳离子可电离脂质,
- [0052] (iii) 第一磷脂,其为磷脂酰丝氨酸,以及
- [0053] (iv) 第二磷脂。
- [0054] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质包含DODMA。
- [0055] 在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸包含DOPS。
- [0056] 在一些实施方案中,第二磷脂包含DOPE。
- [0057] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约20摩尔%至约95摩尔%。
- [0058] 在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约70摩尔%。
- [0059] 在一些实施方案中,第二磷脂占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约80摩尔%。
- [0060] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为2-9.5:0.2-7:0.2-8。
- [0061] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为约6:约1:约1。
- [0062] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为约6:约1:约1.2-1.8。
- [0063] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为约6:约1:约1.2。
- [0064] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为约6:约1:约1.7。
- [0065] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为约6:约1:约1.8。
- [0066] 在一些方面,本发明提供一种RNA颗粒,其包含(i) RNA, (ii) N,N-二甲基-2,3-二油氧基丙胺(DODMA) 和(iii) 二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)。
- [0067] 在一些实施方案中,RNA颗粒进一步包含二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)。
- [0068] 在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的约20摩尔%至约95摩尔%。
- [0069] 在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约70摩尔%。
- [0070] 在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约80摩尔%。
- [0071] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS的摩尔比为2-9.5:0.2-8:0.2-7。
- [0072] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS的摩尔比为5.5-6.5:0.9-1.1:0.9-1.1。
- [0073] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS的摩尔比为约6:约1:约1。

[0074] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS的摩尔比为约6:约1.2-1.8:约1。

[0075] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS的摩尔比为约6:约1.2:约1。

[0076] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS的摩尔比为约6:约1.7:约1。

[0077] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS的摩尔比为约6:约1.8:约1。

[0078] 在一些实施方案中,本文公开的所有方面的RNA颗粒包含非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的非离子两亲有机化合物水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约5摩尔%,或至少约0.15mM。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的非离子两亲有机化合物水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约20摩尔%,或至少约0.6mM。

[0079] 在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物是表面活性剂。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的表面活性剂水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约5摩尔%,或至少约0.15mM。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的表面活性剂水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约20摩尔%,或至少约0.6mM。

[0080] 在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物是聚(乙二醇)(PEG)表面活性剂。

[0081] 在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含连接至单个疏水链的聚(乙二醇)(PEG)链。

[0082] 在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含聚氧乙烯脱水山梨醇酯、D- α -生育酚聚乙二醇-琥珀酸酯(TPGS)、饱和C10-C22羟基脂肪酸的聚氧乙烯单酯、聚氧乙烯脂肪酸酯、聚氧乙烯烷基醚或它们的组合。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约5摩尔%,或至少约0.15mM。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约20摩尔%,或至少约0.6mM。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含聚山梨酯。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的聚山梨酯水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约5摩尔%,或至少约0.15mM。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的聚山梨酯水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约20摩尔%,或至少约0.6mM。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含聚山梨酯20。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的聚山梨酯20水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约5摩尔%,或至少约0.15mM。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的聚山梨酯20水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约20摩尔%,或至少约0.6mM。

[0083] 在一些实施方案中,RNA颗粒不包含固醇(例如,胆固醇或胆固醇衍生物)。在一些实施方案中,RNA颗粒不包含胆固醇。在一些实施方案中,RNA颗粒不包含胆固醇衍生物。在一些实施方案中,RNA颗粒不包含类固醇。

[0084] 在一些实施方案中,RNA颗粒不包含PEG。在一些实施方案中,RNA颗粒不包含与PEG缀合的阳离子或阳离子可电离脂质。在一些实施方案中,RNA颗粒不包含与PEG缀合的磷脂。

[0085] 在一些实施方案中,RNA是mRNA或saRNA。

[0086] 在一些实施方案中,颗粒是脂质纳米颗粒(LNP)或脂质复合物(lipoplex)颗粒(LPX)。

[0087] 在一些实施方案中,颗粒的大小为约30nm至约500nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约30nm至约100nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约100nm至约200nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约200nm至约300nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约300nm至约400nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约400nm至约500nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约30nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约50nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约75nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约100nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约125nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约175nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约200nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约250nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约300nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约350nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约400nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约450nm。在一些实施方案中,颗粒的大小为约500nm。

[0088] 在一些实施方案中,本文所述的mRNA颗粒(例如,LNP和LPX)的平均直径在一些实施方案中从约50nm至约1000nm、从约50nm至约800nm、从约50nm至约700nm、从约50nm至约600nm、从约50nm至约500nm、从约50nm至约450nm、从约50nm至约400nm、从约50nm至约350nm、从约50nm至约300nm、从约50nm至约250nm、从约50nm至约200nm、从约100nm至约1000nm、从约100nm至约800nm、从约100nm至约700nm、从约100nm至约600nm、从约100nm至约500nm、从约100nm至约450nm、从约100nm至约400nm、从约100nm至约350nm、从约100nm至约300nm、从约100nm至约250nm、从约100nm至约200nm、从约150nm至约1000nm、从约150nm至约800nm、从约150nm至约700nm、从约150nm至约600nm、从约150nm至约500nm、从约150nm至约450nm、从约150nm至约400nm、从约150nm至约350nm、从约150nm至约300nm、从约150nm至约250nm、从约150nm至约200nm、从约200nm至约1000nm、从约200nm至约800nm、从约200nm至约700nm、从约200nm至约600nm、从约200nm至约500nm、从约200nm至约450nm、从约200nm至约400nm、从约200nm至约350nm、从约200nm至约300nm或从约200nm至约250nm。

[0089] 在一些实施方案中,颗粒是非病毒颗粒。

[0090] 在一些实施方案中,RNA是单分子或多分子物质(species)。

[0091] 在一些实施方案中,RNA是编码RNA。

[0092] 在一些实施方案中,RNA包含编码不同肽或多肽的mRNA的混合物。在一些实施方案中,mRNA的混合物包含编码不同肽或多肽的2、3或4种mRNA。在一些实施方案中,mRNA的混合物包含编码2种不同肽或多肽的2种mRNA。在一些实施方案中,mRNA的混合物包含编码3种不同肽或多肽的3种mRNA。在一些实施方案中,mRNA的混合物包含编码4种不同肽或多肽的4种mRNA。在一些实施方案中,mRNA的混合物包含编码不同肽或多肽的mRNA,其中存在相同重量的每种mRNA。在一些实施方案中,mRNA的混合物包含编码4种不同肽或多肽的4种mRNA,其中mRNA以1:1:1:1的重量比存在。

[0093] 在一些实施方案中,RNA编码一种或多种选自以下的肽或多肽:细胞因子、激素、粘附分子、免疫球蛋白、免疫活性化合物、生长因子、蛋白酶抑制剂、酶、受体、凋亡调节剂、转录因子、肿瘤抑制蛋白、结构蛋白、重编程因子、基因组工程蛋白和血液蛋白。

[0094] 在一些实施方案中,肽或多肽是细胞因子。在一些实施方案中,RNA包含以下或由

以下组成：编码IL-12sc蛋白的RNA、编码IL-15sushi蛋白的RNA、编码IFN α 蛋白的RNA和编码GM-CSF蛋白的RNA。在一些实施方案中，RNA包含以下或由以下组成：编码IL-12sc蛋白的RNA、编码IL-15sushi蛋白的RNA、编码IFN α 蛋白的RNA和编码GM-CSF蛋白的RNA，其中每种RNA的比率为1:1:1:1(w/w/w/w)。

[0095] 在一些实施方案中：

[0096] i. 每种RNA的比率为1:1:1:1(w/w/w/w)；和/或

[0097] ii. 每种RNA包含修饰的核苷代替每个尿苷；和/或

[0098] iii. 每种RNA包含修饰的核苷代替每个尿苷，其中所述修饰的核苷独立地选自假尿苷(ψ)、N1-甲基-假尿苷(m1 ψ)和5-甲基-尿苷(m5U)；和/或

[0099] iv. 每种RNA包含5'帽m27, 3'-OGppp(m12'-O)ApG或3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G；和/或

[0100] v. 每种RNA包含5' UTR, 所述5' UTR包含选自SEQ ID NO:2和4的核苷酸序列，或者与选自SEQ ID NO:2和4的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列；和/或

[0101] vi. 每种RNA包含3' UTR, 所述3' UTR包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列，或者与SEQ ID NO:6的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列；和/或

[0102] vii. 每种RNA包含poly-A尾，其中所述poly-A尾包含至少100个核苷酸，并且其中所述poly-A尾包含SEQ ID NO:27中所示的poly-A尾或由SEQ ID NO:27中所示的poly-A尾组成。

[0103] 在一些实施方案中：

[0104] i. 编码IL-12sc蛋白的RNA包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列，或者与SEQ ID NO:7的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列；和/或

[0105] ii. 编码IL-15sushi蛋白的RNA包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列，或者与SEQ ID NO:8的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列；和/或

[0106] iii. 编码IFN α 蛋白的RNA包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列，或者与SEQ ID NO:9的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列；和/或

[0107] iv. 编码GM-CSF蛋白的RNA包含SEQ ID NO:10的核苷酸序列，或者与SEQ ID NO:10的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列。

[0108] 在一些实施方案中：

[0109] i. IL-12sc蛋白包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列，或者与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的氨基酸序列；和/或

[0110] ii. IL-15sushi蛋白包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列，或者与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的氨基酸序列；和/或

[0111] iii. IFN α 蛋白包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的氨基酸序列;和/或

[0112] iv. GM-CSF蛋白包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的氨基酸序列。

[0113] 在一些实施方案中,本文所述的RNA颗粒可通过包括以下步骤的方法获得:

[0114] (i) 在有机溶剂中制备酸化的脂质溶液;

[0115] (ii) 将酸化的脂质溶液添加至水相中以产生脂质体胶体;以及

[0116] (iii) 将脂质体胶体添加至包含RNA和非离子两亲有机化合物的水性溶液中以产生RNA脂质颗粒。

[0117] 在一些实施方案中,颗粒是脂质复合物颗粒(LPX)。在一些实施方案中,LPX颗粒中存在的聚山梨酯水平为颗粒中存在的总脂质的至少约5摩尔%。

[0118] 在一些实施方案中,本文所述的RNA颗粒可通过包括以下步骤的方法获得:

[0119] (i) 在有机溶剂中制备酸化的脂质溶液;以及

[0120] (ii) 将酸化的脂质溶液添加至包含RNA和非离子两亲有机化合物的水性溶液中以产生RNA脂质颗粒。

[0121] 在一些实施方案中,颗粒是脂质纳米颗粒(LNP)。在一些实施方案中,LNP颗粒中存在的聚山梨酯水平为颗粒中存在的总脂质的至少约5摩尔%。

[0122] 在一些实施方案中,有机溶剂包含醇。在一些实施方案中,醇是乙醇。

[0123] 在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占总脂质的约0.1摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占总脂质的约5摩尔%以上。

[0124] 在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占总脂质的约5摩尔%至约25摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物水平为颗粒中存在的总脂质的至少约5摩尔%。

[0125] 在一些方面,本发明提供一种组合物,其包含本文公开的一种或多种RNA颗粒或者多种RNA颗粒。

[0126] 在一些实施方案中,组合物包含水性溶液。

[0127] 在一些实施方案中,颗粒和/或水性溶液包含非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物在颗粒中。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物在水性溶液中。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物存在于颗粒和水性溶液中。

[0128] 在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物是表面活性剂。

[0129] 在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物是聚(乙二醇)(PEG)表面活性剂。

[0130] 在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含连接至单个疏水链的聚(乙二醇)(PEG)链。

[0131] 在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含聚氧乙烯脱水山梨醇酯、D- α -生育酚聚乙二醇-琥珀酸酯(TPGS)、饱和C10-C22羟基脂肪酸的聚氧乙烯单酯、聚氧乙烯脂肪酸酯、聚氧乙烯烷基醚或它们的组合。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含聚山梨酯。在一些实施方案中,聚山梨酯是聚山梨酯20。

[0132] 在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质(包括脂质样物质,例如,非离子两亲有机化合物)的约0.1摩尔%至约50摩尔%、约1摩尔%至约50摩

一些实施方案中,组合物包含至少约4.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约5.0mM水平的非离子两亲有机化合物。

[0134] 在一些实施方案中,组合物包含约0.15mM至约0.3mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约0.3mM至约0.6mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约0.6mM至约0.75mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约0.75mM至约1.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约1.0mM至约1.25mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约1.25mM至约1.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约1.75mM至约2.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约2.0mM至约2.25mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约2.25mM至约2.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约2.5mM至约2.75mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约2.75mM至约3.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约3.0mM至约3.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约4.0mM至约4.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约4.5mM至约5.0mM水平的非离子两亲有机化合物。

[0135] 在一些实施方案中,组合物包含DODMA、DOPE、DOPS和聚山梨酯20。

[0136] 在一些实施方案中,组合物包含DODMA、DOPE、DOPS和聚山梨酯20,其中DODMA:DOPE:DOPS:聚山梨酯20的摩尔比为5.5-6.5:0.9-1.1:0.9-1.1:1.5-2.5。

[0137] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS:聚山梨酯20的摩尔比为约6:约1:约1:约2。

[0138] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS:聚山梨酯20的摩尔比为约6:约1.2-1.8:约1:约2。

[0139] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS:聚山梨酯20的摩尔比为约6:约1.2:约1:约2。

[0140] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS:聚山梨酯20的摩尔比为约6:约1.7:约1:约2。

[0141] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS:聚山梨酯20的摩尔比为约6:约1.8:约1:约2。

[0142] 在一些实施方案中,组合物包含至少约0.15mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.3mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.6mM水平的非离子两亲有机化合物。

[0143] 在一些实施方案中,组合物包含至少约1.8mM水平的DODMA、至少约0.3mM水平的DOPE和至少约0.3mM水平的DOPS。在一些实施方案中,组合物包含约1.8mM水平的DODMA、约0.3mM水平的DOPE和约0.3mM水平的DOPS。

[0144] 在一些实施方案中,组合物中的脂质由DODMA、DOPE、DOPS和聚山梨酯20组成。

[0145] 在一些实施方案中,颗粒是LPX颗粒。

[0146] 在一些实施方案中,LPX颗粒的N/P为约3至约5,其中组合物的pH为约7至约7.5。在一些实施方案中,LPX颗粒的N/P为约3至约5,其中组合物的pH为约5.0至约6.0,任选约5.2至约5.8,任选约5.5。在一些实施方案中,在给药之前将pH调整至约6.5至约7.0,任选约6.7

至约6.8。

[0147] 在一些实施方案中,LPX颗粒的N/P比为约3。

[0148] 在一些实施方案中,RNA包含编码IL-12sc蛋白的RNA、编码IL-15sushi蛋白的RNA、编码IFN α 蛋白的RNA和编码GM-CSF蛋白的RNA。

[0149] 在一些实施方案中,组合物不包含固醇(例如,胆固醇或胆固醇衍生物)。在一些实施方案中,组合物不包含胆固醇。在一些实施方案中,组合物不包含胆固醇衍生物。在一些实施方案中,组合物不包含类固醇。

[0150] 在一些实施方案中,组合物不包含PEG。在一些实施方案中,组合物不包含与PEG缀合的阳离子或阳离子可电离脂质。在一些实施方案中,组合物不包含与PEG缀合的磷脂。在一些实施方案中,组合物不包含具有少于4个PEG链的脂质。在一些实施方案中,组合物不包含具有少于3个PEG链的脂质。在一些实施方案中,组合物不包含具有少于2个PEG链的脂质。在一些实施方案中,组合物不包含仅具有1个PEG链的脂质。

[0151] 在一些实施方案中,组合物不包含含有聚(乙二醇)(PEG)链和一条以上疏水链的化合物。在一些实施方案中,组合物不包含含有聚(乙二醇)(PEG)链和两条疏水链的化合物。

[0152] 在一些实施方案中,组合物包含缓冲剂如HAc、柠檬酸钠(NaOCit)、乙酸钠(NAOAc)、NaCl、Na₂HPO₄、KH₂PO₄或它们的任何组合。在一些实施方案中,组合物包含柠檬酸盐缓冲液,任选柠檬酸盐缓冲液和氯化钠。在一些实施方案中,组合物包含冷冻保护剂如蔗糖。在一些实施方案中,组合物包含HAc、NaOCit、NAOAc、NaCl、Na₂HPO₄、KH₂PO₄和蔗糖。在一些实施方案中,组合物包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:RNA、DODMA、DOPE、DOPS、聚山梨酯20、HAc、NaOCit、NAOAc、NaCl、KCl、Na₂HPO₄、KH₂PO₄、蔗糖和水。在一些实施方案中,组合物包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:1.5mg/ml DODMA、0.2-0.3mg/ml DOPE、0.2-0.3mg/ml DOPS、0.5-1.0mg/ml 聚山梨酯20、0.01-0.05mg/ml HAc、0.2-0.3mg/ml NaOCit、0.2-0.5mg/ml NAOAc、0.1-10mg/ml NaCl、0-0.5mg/ml KCl、0-1.5mg/ml Na₂HPO₄、0-0.5mg/ml KH₂PO₄、75-125mg/ml蔗糖和水。在一些实施方案中,组合物包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:RNA、约1.24或约1.12mg/ml DODMA、约0.25或约0.225mg/ml DOPE、约0.27或约0.24mg/ml DOPS、约0.82或约0.74mg/ml 聚山梨酯20、约0.03或约0.027mg/ml HAc、约0.26或约0.23mg/ml NaOCit、约0.41或约0.37mg/ml NAOAc、约100或约90mg/ml NaCl、0或约0.2mg/ml KCl、0或约1.42mg/ml Na₂HPO₄、0或约0.24mg/ml KH₂PO₄、75-125mg/ml蔗糖和水。

[0153] 在一些方面,本发明提供一种将RNA递送至受试者的细胞的方法,所述方法包括向受试者给药本文公开的一种或多种RNA颗粒或者多种RNA颗粒或者组合物。

[0154] 在一些方面,本发明提供一种将治疗性肽或多肽递送至受试者的方法,所述方法包括向受试者给药本文公开的一种或多种RNA颗粒或者多种RNA颗粒或者组合物,其中所述RNA编码治疗性肽或多肽。

[0155] 在一些方面,本发明提供一种治疗或预防受试者的疾病的方法,所述方法包括向受试者给药本文公开的一种或多种RNA颗粒或者多种RNA颗粒或者组合物,其中将所述RNA递送至受试者的细胞有利于治疗或预防所述疾病。

[0156] 在一些方面,本发明提供一种治疗或预防受试者疾病的方法,所述方法包括向受

试者给药本文公开的一种或多种RNA颗粒或者多种RNA颗粒或者组合物,其中所述RNA编码治疗性肽或多肽,并且其中将所述治疗性肽或多肽递送至受试者有利于治疗或预防疾病。

[0157] 在一些实施方案中,以药学有效量给药一种或多种RNA颗粒或者多种RNA颗粒。在一些实施方案中,以药学有效量给药组合物。

[0158] 在本文公开的所有方面的一些实施方案中,给药是通过静脉内、瘤内或瘤周注射。在一些实施方案中,给药是通过静脉内注射。在一些实施方案中,给药是通过瘤内注射。在一些实施方案中,注射是通过瘤周注射。

[0159] 在本文公开的所有方面的一些实施方案中,受试者是哺乳动物。

[0160] 在一些实施方案中,哺乳动物是人。

[0161] 在其他方面,本发明提供一种制备包含至少一种磷脂酰丝氨酸的RNA脂质颗粒的方法,所述方法包括在包含至少一种磷脂酰丝氨酸的有机溶剂中制备脂质溶液的步骤,其中所述脂质溶液是酸化的。

[0162] 在一些实施方案中,有机溶剂包含醇。

[0163] 在一些实施方案中,醇是乙醇。

[0164] 在一些实施方案中,脂质溶液具有酸性pH,以使至少一种磷脂酰丝氨酸呈电中性。

[0165] 在一些实施方案中,脂质溶液进一步包含阳离子可电离脂质,并且所述脂质溶液的酸性pH使阳离子可电离脂质质子化。

[0166] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括将脂质溶液添加至水相中以产生脂质体胶体。

[0167] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括将脂质体胶体添加至包含RNA的水性溶液中以产生RNA脂质颗粒。

[0168] 在一些实施方案中,包含RNA的水性溶液包含柠檬酸盐缓冲液,任选柠檬酸盐缓冲液和氯化钠。

[0169] 在一些实施方案中,RNA脂质颗粒是脂质复合物颗粒(LPX)。

[0170] 在这些实施方案中的一些实施方案中,其中RNA脂质颗粒是LPX,将脂质体胶体和包含RNA的水性溶液以至少200mL/min的流速混合,任选以300-400mL/min的流速混合,优选以300-360mL/min的流速混合。

[0171] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括将脂质溶液与包含RNA的水性溶液混合以产生RNA脂质颗粒。

[0172] 在一些实施方案中,RNA脂质颗粒是脂质纳米颗粒(LNP)。

[0173] 在这些实施方案中的一些实施方案中,其中RNA脂质颗粒是LNP,将脂质溶液和包含RNA的水性溶液以约2至约12mL/min的流速混合,任选以约4至约10mL/min的流速混合,优选以约6至约10mL/min的流速混合。

[0174] 在一些实施方案中,脂质溶液和/或RNA溶液包含非离子两亲有机化合物。

[0175] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括将RNA脂质颗粒在-80℃下冷冻保存。

[0176] 在另一方面,本发明提供一种制备RNA脂质颗粒的方法,所述方法包括在有机溶剂中制备脂质溶液并将脂质溶液与包含RNA的水性溶液混合以产生RNA脂质颗粒的步骤,其中非离子两亲有机化合物存在于脂质溶液或RNA溶液中,或两者中。

[0177] 在一些实施方案中,有机溶剂包含醇。

[0178] 在一些实施方案中,醇是乙醇。

[0179] 在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占脂质溶液和/或RNA溶液中存在的总脂质(包括脂质样物质,例如,非离子两亲有机化合物)的约0.1摩尔%至约50摩尔%、约1摩尔%至约50摩尔%、约1摩尔%至约40摩尔%、约1摩尔%至约30摩尔%、约1摩尔%至约20摩尔%、约1摩尔%至约15摩尔%、约1摩尔%至约10摩尔%、约1摩尔%至约7.5摩尔%或约2摩尔%至约5摩尔%。在一些实施方案中,脂质溶液和/或RNA溶液包含约0.1摩尔%至约30摩尔%的非离子两亲有机化合物的摩尔分数。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占存在的总脂质的约3摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占存在的总脂质的至少约3摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占存在的总脂质的至少约5摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占存在的总脂质的至少约10摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占存在的总脂质的至少约15摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占存在的总脂质的至少约20摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占存在的总脂质的至少约25摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占存在的总脂质的少于约30摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占存在的总脂质的约5摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占存在的总脂质的约5摩尔%至约25摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占存在的总脂质的约5摩尔%至约20摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占存在的总脂质的约5摩尔%至约15摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占存在的总脂质的约5摩尔%至约10摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占存在的总脂质的约10摩尔%至约25摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占存在的总脂质的约15摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占存在的总脂质的约15摩尔%至约25摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占存在的总脂质的约20摩尔%至约25摩尔%。

[0180] 在一些实施方案中,组合物包含至少约0.15mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.2mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.25mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.3mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.35mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.4mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.45mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.55mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.6mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.7mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.8mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.9mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约1.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约1.1mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约1.2mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约1.3mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约1.4mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约

1.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约2.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约2.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约3.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约4.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约5.0mM水平的非离子两亲有机化合物。

[0181] 在一些实施方案中,组合物包含约0.15mM至约0.3mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约0.3mM至约0.6mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约0.6mM至约0.75mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约0.75mM至约1.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约1.0mM至约1.25mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约1.25mM至约1.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约1.75mM至约2.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约2.0mM至约2.25mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约2.25mM至约2.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约2.5mM至约2.75mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约2.75mM至约3.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约3.0mM至约3.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约4.0mM至约4.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约4.5mM至约5.0mM水平的非离子两亲有机化合物。

[0182] 在一些实施方案中,包含RNA颗粒的组合物包含下表中所列的组分:

[0183]	组分	制备过程中的相	浓度
	RNA	RNA 相	0.22 mg/mL (总 RNA)
	HEPES		0.26 mg/mL
	EDTA		0.003 mg/mL
	NaCl		0.13 mg/mL
	柠檬酸钠		0.12 mg/mL
	柠檬酸		0.12 mg/mL
	DODMA	脂质体相	1.23 mg/mL
	DOPE		0.25 mg/mL
	DOPS		0.27 mg/mL
	聚山梨酯 20		0.81 mg/mL
	乙酸		0.03 mg/mL
	蔗糖	储存基质	100 mg/mL
	乙酸钠		0.41 mg/mL
	注射用水	中间稀释	q.s. (例如 1 mL)

[0184] 在一些实施方案中,包含RNA颗粒的组合物包含下表中所列的组分:

[0185]	组分	浓度
	RNA	0.44mg/mL (总RNA)

DODMA	2.48mg/mL
DOPE	0.50mg/mL
DOPS	0.54mg/mL
聚山梨酯20	1.64mg/mL
乙酸	0.05mg/mL
蔗糖	100mg/mL
柠檬酸三钠二水合物	0.18mg/mL
柠檬酸一水合物	0.19mg/mL
NaCl	0.19mg/mL
HEPES	0.53mg/mL
EDTA	0.006mg/mL
乙酸钠三水合物	0.68mg/mL

[0186] 在另一方面,本发明提供一种制备包含RNA脂质复合物颗粒的组合物的方法,所述RNA脂质复合物颗粒包含至少一种磷脂酰丝氨酸,所述方法包括:

[0187] i) 制备包含脂质体的酸化的水性胶体,其中所述脂质体包含至少一种磷脂酰丝氨酸,其中包含脂质体的酸化的水性胶体包含10-30mM乙酸;以及

[0188] ii) 将包含脂质体的酸化的水性胶体与包含RNA的水性溶液混合;

[0189] 从而产生包含RNA脂质复合物颗粒的组合物,

[0190] 其中所述RNA脂质复合物颗粒和脂质体包含二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS);N,N-二甲基-2,3-二油氧基丙胺(DODMA);和二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

[0191] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS的摩尔比为5.5-6.5:0.9-1.1:0.9-1.1。

[0192] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS的摩尔比为约6:约1:约1。

[0193] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS的摩尔比为约6:约1.2-1.8:约1。

[0194] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS的摩尔比为约6:约1.2:约1。

[0195] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS的摩尔比为约6:约1.7:约1。

[0196] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS的摩尔比为约6:约1.8:约1。

[0197] 在一些实施方案中,包含脂质体的酸化的水性胶体的pH在约4.5和约6.5之间,如在约5.0和约6.0之间,或在约5.2和约5.5之间。

[0198] 在一些实施方案中,包含脂质体的酸化的水性胶体包含15mM-25mM乙酸。

[0199] 在一些实施方案中,组合物包含非离子两亲有机化合物,任选其是表面活性剂。在一些实施方案中,组合物包含聚氧乙烯脱水山梨醇酯,任选聚山梨酯,优选聚山梨酯20。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物或聚氧乙烯脱水山梨醇酯(例如,聚山梨酯20)占组合物中存在的总脂质的约0.1摩尔%至约30摩尔%,任选大于组合物中存在的总脂质的约5摩尔%,优选组合物中存在的总脂质的约5摩尔%至约25摩尔%。

[0200] 在一些实施方案中,组合物包含DODMA、DOPE、DOPS和聚山梨酯20。

[0201] 在一些实施方案中,组合物包含DODMA、DOPE、DOPS和聚山梨酯20,其中DODMA:DOPE:DOPS:聚山梨酯20的摩尔比为5.5-6.5:0.9-1.1:0.9-1.1:1.5-2.5。

[0202] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS:聚山梨酯20的摩尔比为约6:约1:约1:约2。

[0203] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS:聚山梨酯20的摩尔比为约6:约1.2-1.8:约

1:约2。

[0204] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS:聚山梨酯20的摩尔比为约6:约1.2:约1:约2。

[0205] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS:聚山梨酯20的摩尔比为约6:约1.7:约1:约2。

[0206] 在一些实施方案中,DODMA:DOPE:DOPS:聚山梨酯20的摩尔比为约6:约1.8:约1:约2。

[0207] 在一些实施方案中,包含RNA的水性溶液不包含氯化钠(NaCl)。

[0208] 在一些实施方案中,将包含脂质体的酸化的水性胶体和包含RNA的水性溶液以至少200mL/min的流速混合,任选以300-400mL/min的流速混合,优选以300-360mL/min的流速混合。

[0209] 在一些实施方案中,在与包含脂质体的酸化的水性胶体混合时,包含RNA的水性溶液中RNA的浓度小于0.5mg/mL,任选0.1-0.5mg/mL,优选小于0.3mg/mL,任选0.1-0.25mg/mL。

[0210] 在一些实施方案中,包含脂质体的酸化的水性胶体通过以下方法制备:

[0211] i) 在有机相中制备包含至少一种磷脂酰丝氨酸的脂质溶液,并且将所述脂质溶液注入酸化的水相中;或者

[0212] ii) 通过将包含至少一种磷脂酰丝氨酸的脂质溶液在有机溶剂中脱水制备脂质膜,并且将脂质膜在酸化的水相中再水合。

[0213] 在一些实施方案中,有机溶剂包含或是醇或丙酮。在一些实施方案中,有机溶剂是乙醇、丙酮、异丙醇(IPA)或叔丁醇。

[0214] 在一些实施方案中,脂质溶液包含DODMA,并且包含脂质体的酸化的水性胶体的酸性pH使DODMA质子化。

[0215] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括对包含RNA脂质复合物颗粒的组合物进行超滤/渗滤(UF/DF)步骤。在一些实施方案中,如通过RNA的浓度所测量的,所述步骤增加RNA脂质复合物颗粒的浓度。

[0216] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括将稀释溶液添加至包含RNA脂质复合物颗粒的组合物中。在一些实施方案中,添加稀释溶液后RNA脂质复合物颗粒的浓度小于0.3mg/mL,任选0.1-0.25mg/mL。

[0217] 在一些实施方案中,稀释溶液包含至少10%蔗糖、至少20%蔗糖或优选至少30%蔗糖。

[0218] 在一些实施方案中,稀释溶液包含pH 5.0-6.5的缓冲液,任选pH 5.1-6.0,任选pH 5.2-5.5,任选pH 5.3或pH 5.5。

[0219] 在一些实施方案中,缓冲液是组氨酸缓冲液。在一些实施方案中,缓冲液包含至少20mM组氨酸缓冲液。

[0220] 在一些实施方案中,RNA LPX颗粒的N/P比为约3至约5。在一些实施方案中,RNA LPX颗粒的N/P比为约3。

[0221] 在一些实施方案中,稀释的组合物适用于通过注射向人患者给药,任选im或iv注射,例如在解冻后且无需进一步稀释。

[0222] 在另一方面,本发明提供一种包含RNA-LPX颗粒的组合物,所述RNA-LPX颗粒包含至少一种磷脂酰丝氨酸,所述组合物可通过本文公开的制备包含RNA脂质复合物颗粒的组合作的方法获得,所述RNA脂质复合物颗粒包含至少一种磷脂酰丝氨酸。

[0223] 在一些方面,本发明提供本文所述的颗粒和组合物,例如,药物组合物,用于本文所述的治疗或治疗方法。

附图说明

[0224] 图1A和1B: (A): 本文使用的PS-LNP制备工艺的概述。(B): 本文使用的PS-LPX制备工艺的概述。

[0225] 图2A-2C. Balb/c小鼠模型中的萤光素酶活性。用PS-LNP1、PS-LNP2或F12脂质复合物(Kranz et al. 2016, Nature 534:396)作为对照配制体外转录的 (IVT) mRNA。通过静脉内 (i.v.) 途径将20 μ g注射到小鼠中。在递送配制的mRNA后4和24小时,腹腔内注射萤光素酶底物萤光素,并且使用体内成像系统 (IVIS) 检测萤光素酶活性。图2A示出注射小鼠在4和24小时的侧面和腹部图像。图2B和2C示出肝 (图2B) 和脾 (图2C) 中的总通量值。

[0226] 图3A和3B. Balb/c小鼠模型器官中的24小时离体萤光素酶活性。用PS-LNP1、PS-LNP2或F12脂质复合物(Kranz et al. 2016, Nature 534:396)作为对照配制IVT mRNA。通过静脉内 (i.v.) 途径将20 μ g注射到小鼠中。24小时后,将小鼠处死并取出器官,使用体内成像系统 (IVIS) 检测萤光素酶活性。图3A示出肺、肝、脾和肾的图像。图3B示出肝和脾中的总通量值。

[0227] 图4A-4C. B6小鼠模型中的萤光素酶活性。用PS-LNP1、PS-LNP2或F12脂质复合物(Kranz et al, Nature 534:396)作为对照配制IVT mRNA,并且通过静脉内 (i.v.) 途径将20 μ g注射到小鼠中。在递送配制的mRNA后4和24小时,腹腔内注射萤光素酶底物萤光素,并且使用体内成像系统 (IVIS) 检测萤光素酶活性。图4A示出注射小鼠在4和24小时的侧面和腹部图像。图4B和4C示出肝 (图4B) 和脾 (图4C) 中的总通量值。

[0228] 图5A和B. B6小鼠模型器官中的24小时离体萤光素酶活性。用PS-LNP1、PS-LNP2或F12脂质复合物(Kranz et al, Nature 534:396)作为对照配制IVT mRNA。通过静脉内 (i.v.) 途径将20 μ g注射到小鼠中。24小时后,将小鼠处死并取出器官,使用体内成像系统 (IVIS) 检测萤光素酶活性。图5A示出肺、肝、脾和肾的图像。图5B示出肝和脾中的总通量值。

[0229] 图6. 用磷脂酰丝氨酸PS-LNP1或PS-LNP2或PS-LNP3配制并通过不同应用途径递送的体外转录的 (IVT) 萤火虫萤光素酶编码mRNA注射的小鼠中的萤光素酶活性。通过皮内 (i.d.)、肌肉内 (i.m.) 或静脉内 (i.v.) 途径将3 μ g注射到小鼠中。在递送配制的mRNA后6、24、48、72小时和第6天,腹腔内注射萤光素酶底物萤光素,并且使用体内成像系统 (IVIS) 检测萤光素酶活性。

[0230] 图7. 用磷脂酰丝氨酸PS-LNP1或PS-LNP2配制并通过不同应用途径递送的体外转录的 (IVT) 小鼠EPO (mEPO) 编码mRNA注射的小鼠的血浆促红细胞生成素 (EPO) 水平。

[0231] 图8A和8B. 用磷脂酰丝氨酸PS-LNP1和PS-LNP26配制的体外转录的 (IVT) 萤光素酶 mRNA转染的HepG2细胞中的萤光素酶活性。F12脂质复合物(Kranz et al. 2016, Nature 534:396) 和TransIT分别用作内部和商业对照。实验一式三份进行。结果以线性 (图8A) 和对数刻度 (图8B) 显示。

[0232] 图9A-9C.向小鼠瘤内注射分别编码萤火虫萤光素酶和IL-12sc的两种不同mRNA的制品,在制剂PS-LNP1和PS-LNP2中,以促进转染和靶向翻译。PS-LNP1粒径、PDI、 ζ (zeta) 电位和EE%分别为203nm、0.14、-8.19mV和84。PS-LNP2粒径、PDI、 ζ 电位和EE%分别为362nm、0.26、-30.52mV和93。N/P比为3。注射后 (p.i.) 6h通过在靶解剖部位(肿瘤;图9A) 以及脱靶位置(图9B) 进行生物发光成像评估萤光素酶蛋白活性,后者反映来自脾和肝的信号。 1×10^5 p/s左右的值可以认为是基线。靶标与脱靶比率表示通过制剂向肿瘤特异性递送的程度。IL-12是一种分泌型细胞因子,在6h p.i.提取的血清中通过MSD ELISA测定(图9C)。

[0233] 图10A-10F.向小鼠瘤内注射分别编码萤火虫萤光素酶和IL-12sc的两种不同mRNA的制品,在所示制剂中,以促进转染和靶向翻译。在6和24h p.i.通过在靶解剖部位(肿瘤) 以及脱靶器官进行生物发光成像评估萤光素酶蛋白活性。BLI比率表示通过制剂在6h p.i.特异性递送至肿瘤而不是脱靶器官的程度。在6h p.i.提取的小鼠血清中通过MSD ELISA测定IL-12。图10A示出6h时的肿瘤BLI;图10B示出24h时的肿瘤BLI;图10C示出6h时的脱靶BLI;图10D示出靶标/脱靶比率;图10E示出血清IL-12细胞因子水平;图10F示出总通量测量。

[0234] 图11A-11B.向小鼠瘤内注射分别编码萤火虫萤光素酶和IL-12sc的两种不同mRNA的制品,在所示制剂中,以促进转染和靶向翻译。在6、24和48h p.i.通过在靶解剖部位(肿瘤) 以及脱靶器官进行生物发光成像评估萤光素酶蛋白活性。图11A示出6hp.i.时的肿瘤图像,图11B示出直到48h p.i.的总通量测量。

[0235] 图12A-12C.向小鼠瘤内注射所示制剂中的编码萤火虫萤光素酶的mRNA,以促进转染和靶向翻译。在6p.i.通过在靶解剖部位(肿瘤) 以及脱靶器官进行生物发光成像评估萤光素酶蛋白活性。图12A示出6h p.i.时的靶标和脱靶总通量测量,图12B示出直到48小时p.i.的总通量测量。图12C示出6h p.i.时的区域BLI比率。

[0236] 图13A-13E.向小鼠瘤内注射分别编码萤火虫萤光素酶和IL-12sc的两种不同mRNA的制品,在所示制剂中,以促进转染和靶向翻译。在6、24和48h p.i.通过在靶解剖部位(肿瘤) 以及脱靶器官进行生物发光成像评估萤光素酶蛋白活性。在6h p.i.提取的小鼠血清中通过MSD ELISA测定IL-12。图13A和13B分别示出6h p.i.时的肿瘤总通量测量和50h p.i.时的动力学。图13C和13D分别示出6h p.i.和24h时的靶标/脱靶BLI比率。图13E示出IL-12血清水平。

[0237] 图14.用磷脂酰丝氨酸PS-LNP24和PS-LNP25配制的体外转录的小鼠EPO mRNA转染的HepG2细胞的促红细胞生成素(EPO)分泌。通过ELISA测量培养基中的小鼠EPO水平。F12脂质复合物(Kranz et al.2016,Nature 534:396)和TransIT分别用作内部和商业对照。实验一式三份进行。

[0238] 图15.用磷脂酰丝氨酸PS-LNP24、PS-LNP25或TransIT对照配制的体外转录的小鼠EPO编码mRNA注射的小鼠中的血浆促红细胞生成素(EPO)水平。通过皮下(s.c.)递送途径向小鼠注射5 μ g mRNA或通过静脉内(i.v.)递送途径向小鼠注射3 μ g mRNA。在注射mRNA后6、24、48和72小时收集血液,并且如所述(Mahiny and Karikó2016,Methods in Mol Biol 1428:297)通过ELISA测量血浆中的小鼠EPO水平。

[0239] 图16A-16D.向小鼠瘤内注射分别编码萤火虫萤光素酶和IL-12sc的两种不同mRNA的制品,在所示制剂中,以促进转染和靶向翻译。在6、24和48h p.i.通过在靶解剖部位(肿

瘤)以及脱靶器官进行生物发光成像评估萤光素酶蛋白活性。BLI比率表示给定时间点的靶标与脱靶比率。在6h p.i.提取的小鼠血清中通过MSD ELISA测定IL-12。图16A和16B示出肿瘤的肿瘤总通量测量(16A)和靶标/脱靶比率(16B)。图16C示出靶标和脱靶总通量测量。图16D示出IL-12血清水平。

[0240] 图17A-D.向小鼠瘤内注射分别编码萤火虫萤光素酶和IL-12sc的两种不同mRNA的制品,在所示制剂中,以促进转染和靶向翻译。在p.i.6和24h通过在靶解剖部位(肿瘤)以及脱靶器官进行生物发光成像评估萤光素酶蛋白活性。BLI比率表示在6和24h p.i.通过制剂向肿瘤特异性递送的程度。图17A示出6h和24小时时的肿瘤和脱靶BLI图像;图17B示出6h时的靶标和脱靶BLI;图17C示出6h时的靶标/脱靶BLI比率;图17D示出6和24h p.i.时的总通量测量。

[0241] 图18A-18D.向4T1荷瘤小鼠瘤内注射分别编码萤火虫萤光素酶和IL-12sc的两种不同mRNA的制品,在所示制剂中,以促进转染和靶向翻译。在6、24和48h p.i.通过在靶解剖部位(肿瘤)以及脱靶器官进行生物发光成像评估萤光素酶蛋白活性。脾/肝的倍数表示给定时间点的靶标与脱靶比率。图18A示出6、24和48小时时的图像;图18B示出6h时的靶标和脱靶BLI;图18C示出6和24小时时的靶标/脱靶动力学;图18D示出6、24和48小时p.i.时的总通量测量。

[0242] 图19A-C.向小鼠瘤内注射分别编码萤火虫萤光素酶和IL-12sc的两种不同mRNA的制品,在所示制剂中,以促进转染和靶向翻译。在6、28和49h p.i.通过在靶解剖部位(肿瘤)以及脱靶器官进行生物发光成像评估萤光素酶蛋白活性。脾/肝的倍数表示给定时间点的靶标与脱靶比率。图19A示出6h时的靶标和脱靶BLI;图19B示出6、28和50小时时的靶标/脱靶动力学;图19C示出各种颗粒在各种时间点的靶标/脱靶比率动力学。

[0243] 图20A-20H.向CT26荷瘤小鼠瘤内注射与所示制剂复合的编码Thy1.1的mRNA或对照RNA,然后在20h p.i.收获器官并对Thy 1.1表达进行流式细胞术分析。图20A示出上靶(on-target)Thy1.1阳性百分比;图20B示出脱靶(off-target)Thy1.1阳性百分比;图20C-20E示出流式细胞术分析的结果;图20F示出TIL亚群Thy1.1阳性百分比;图20G示出脾亚群Thy1.1阳性百分比;图20H示出肝亚群Thy1.1阳性百分比。

[0244] 图21A和21B.向小鼠瘤内注射编码萤火虫萤光素酶的mRNA,在制剂中,如PS-PLX52 DODMA/DOPE/DOPS/聚山梨酯20,1.8/0.3/0.3/0.6mM(A组),PS-LPX52DODMA/DOPE/DOPS/聚山梨酯20,1.8/0.3/0.3/0.3mM(B组)和PS-LPX52DODMA/DOPE/DOPS/聚山梨酯20,1.8/0.3/0.3/0.15mM(C组),以促进转染和靶向翻译。在6h、24h、48h p.i.通过在靶解剖部位(肿瘤)以及脱靶器官进行生物发光成像评估萤光素酶蛋白活性。BLI比率指示6h p.i.时的区域BLI值。图21A示出肿瘤和脱靶部位的图像;图21B示出三个测试组在6h p.i.时的总通量。

[0245] 图22A-G.将荷有建立的CT26肿瘤的小鼠用与所示制剂复合的细胞因子编码mRNA混合物或对照mRNA瘤内处理。与林格氏液中的裸RNA相比,所有制剂均提高完全反应率,其中LNP49-3治愈90%接受治疗的小鼠。通过光子相关光谱法测量以Z-平均值(Z.平均值)表示的颗粒大小和多分散性指数(PI)。图22A和B示出细胞因子mRNA(A)和对照mRNA(B)的林格氏液对照;图22C和D示出细胞因子mRNA(A)和对照mRNA(B)的PS-LNP25;图22E和F示出细胞因子mRNA(A)和对照mRNA(B)的PS-LNP49-3;图22G示出测试颗粒的Z.平均值和多分散性(PDI)。

[0246] 图23A-G.将荷有建立的CT26肿瘤的小鼠用与PS-LPX52 (PS-LNP52脂质混合物)或在普通林格盐溶液中复合的细胞因子编码mRNA混合物或对照luc mRNA瘤内处理4次,每次两个剂量。图23A和B示出PS-LPX52 hi (A) 和lo (B) 处理动物的单个肿瘤体积;图23C和D示出林格hi (A) 和lo (B) 处理动物的单个肿瘤体积;图23E示出luc对照处理动物的单个肿瘤体积;图23F示出测试和对照组的平均肿瘤生长动力学;图23G示出测试颗粒的Z.平均值和多分散性(PDI)。

[0247] 图24A和B.采用与临床规模生产兼容的方案制备PSLPX2*It. IV,在-20℃下冷冻保存长达3个月,然后注射到TC-1荷瘤小鼠中。由于注射前优化的储存基质和制备方案,在实验过程中没有观察到储存时间对生物分布或细胞因子分泌的影响。图24A示出图像和BLI数据;图24B示出实验的示意图。

[0248] 图25A和B. PS-LNP1 (A) 和PS-LNP2 (B) 的低温透射电子显微镜术(Cryo-TEM)。脂质组合物为DODMA/CHOL/DOPS/聚山梨酯20和DODMA/DOPE/DOPS/聚山梨酯20, PS-LNP1和PS-LNP2的摩尔比分别为57/30/10/3, 77/10/10/3。它们含有正/负(DODMA脂质/RNA核苷酸)比为3:1的RNA, RNA浓度为0.5mg/mL。

[0249] 图26. PS-LPX52的低温透射电子显微镜术(Cryo-TEM)。脂质组合物为DODMA/CHOL/DOPS/吐温20和DODMA/DOPE/DOPS/吐温20, 摩尔比为60/10/10/20。它含有正/负(DODMA脂质/RNA核苷酸)比为3:1的RNA。多层结构, 单个物质的直径为 $100\text{nm} < 2a < 150\text{nm}$ 。许多颗粒合并在一起, 形成较大的复合物。插图示出具有层状结构的相应图像的傅里叶变换。获得自FT图像的间距为 $d = 5.9\text{--}6.1\text{nm}$ ($\text{pH} = 5.2 \pm 0.1$)。

[0250] 图27. PS-LPX-A的缓冲液组分。(A, B) 包含柠檬酸盐(A) 或乙酸盐(B) 缓冲液, pH4的PS-LPX-A的物理化学特性、粒径和多分散性的比较。(C) 测量PS-LPX-A在体外的蛋白表达, 并对具有柠檬酸盐缓冲液或乙酸盐缓冲液的PS-LPX-A进行比较。(D) 对于补充有(i) 氯化钠, 或者(ii) 柠檬酸盐缓冲液和氯化钠的PS-LPX-A, 比较PS-LPX-A的蛋白表达。

[0251] 图28. PS-LPX-A的N/P比。(A) 以0.5至6之间的N/P比制备的PS-LPX-A的蛋白表达。(B) 测量以0.5至6的N/P比制备的PS-LPX-A的包裹效率(%EE)和RNA可及性(%)。

[0252] 图29. PS-LPX-A混合流速。(A) 测量在50和360mL/min之间的流速下形成的PS-LPX-A颗粒的尺寸和多分散性。测量在50和360mL/min之间的流速下形成的PS-LPX-A颗粒的尺寸 $>10\mu\text{m}$ 和 $>25\mu\text{m}$ 的颗粒数量。(B) 测量在50和388mL/min之间的流速下形成的PS-LPX-A颗粒的蛋白表达。

[0253] 图30. PS-LPX-A颗粒形成过程中的缓冲条件。(A) 测量在颗粒形成时在2.5mM和30mM之间的乙酸浓度下产生的PS-LPX-A的体外蛋白表达, 并与基准(BM, 5mM乙酸)进行比较。(B) 测量在颗粒形成时用5mM或20mM乙酸制备的PS-LPX-A的体外蛋白表达, 并与BM进行比较。

[0254] 图31. PS-LPX-A的储存缓冲液。(A, B) 添加pH在4.5和5.5之间的20mM组氨酸储存缓冲液后, 测量PS-LPX-A组合物的粒径和pH和 ζ 电位。(C) 添加pH在4.5和5.5之间的20mM组氨酸储存缓冲液后, 在所示冻融循环次数中测量PS-LPX-A的粒径。(D) 添加pH在4.5和5.5之间的20mM组氨酸储存缓冲液后, 测量PS-LPX-A的蛋白表达, 并与BM(pH 6.7)进行比较。

[0255] 图32. 改进PS-LPX-A中的脂质比率测量用所示%摩尔(mol)比的DODMA、DOPE和DOPS脂质制备的PS-LPX-A的蛋白表达。

[0256] 图33.PS-LPX-A的粒径。(A) 如图所示,对于在颗粒形成时在0.11和0.66mg/mL之间的RNA浓度下制备的PS-LPX-A,测量粒径、多分散性以及粒径 $>10\mu\text{m}$ 或 $>25\mu\text{m}$ 的颗粒数量。(B) 测量在颗粒形成时用0.4和0.6mg/mL之间的RNA浓度制备的PS-LPX-A的蛋白表达。

[0257] 图34.2X浓缩的PS-LPX制剂的稳定性。(A-B) 在所示储存条件后,测量2X、3X和4X PS-LPX制剂的粒径和多分散性(A) 以及粒径 $>10\mu\text{m}$ 或 $>25\mu\text{m}$ 的颗粒数量(B)。(C-E) 在所示储存条件后,测量2X PS-LPX制剂的粒径和多分散性(C)、粒径 $>10\mu\text{m}$ 或 $>25\mu\text{m}$ 的颗粒数量(D) 以及RNA浓度(E)。

具体实施方式

[0258] 尽管下文更详细地进一步描述了本公开,但是应当理解本公开并不限于本文描述的特定方法、方案和试剂,因为这些可以变化。还应当理解本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,而不是为了限制本公开的范围,本公开的范围仅受所附权利要求书的限制。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0259] 在下文中会更详细地描述本公开的要素。这些要素用具体实施方案列出,然而,应当理解它们可以以任何方式和任何数量组合以产生另外的实施方案。不同描述的实例和优选实施方案不应理解为将本公开仅限于明确描述的实施方案。本说明书应当理解为支持并涵盖组合明确描述的实施方案与任何数量的公开和/或优选的要素的实施方案。此外,除非上下文另有说明,否则本申请中所有描述的要素的任何排列和组合都应当认为通过本申请的说明书公开。

[0260] 除非另有说明,否则本发明的实践会采用本领域文献中解释的常规化学、生物化学、细胞生物学、免疫学和重组DNA技术。

[0261] 在整个说明书和所附权利要求书中,除非上下文另有要求,否则词语“包含(comprise)”及变化如“包含(comprises)”和“包含(comprising)”应当理解为意指包括所陈述的特征、要素、成员、整数或步骤或者特征、要素、成员、整数或步骤的组,但不排除任何其他特征、要素、成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组。术语“基本上由…组成”将权利要求或公开的范围限制在指定的特征、要素、成员、整数或步骤,以及不会实质上影响权利要求或公开的基本和新特征的那些。术语“由…组成”将权利要求或公开的范围限制在指定的特征、要素、成员、整数或步骤。术语“包含”涵盖术语“基本上由…组成”,而后者又涵盖术语“由…组成”。因此,在本申请中每次出现时,术语“包含”可以替换为术语“基本上由…组成”或“由…组成”。同样,在本申请中每次出现时,术语“基本上由…组成”可以替换为术语“由…组成”。

[0262] 在描述本公开的上下文中(特别是在权利要求的上下文中)使用的术语“一个(a)”、“一个(an)”和“这个”以及相似指称应当理解为覆盖单数和复数,除非在本文中另有指明或与上下文明显矛盾。本文中值的范围的列举仅为了用作单独提到落在所述范围内的每个不同值的速记方法。除非本文另有说明,否则每个单独的值如其在本文中单独陈述地加入本说明书。

[0263] 除非在本文中另有说明或与上下文明显矛盾,否则本文描述的所有方法可以以任何合适的顺序进行。

[0264] 除非另外要求保护,否则本文提供的任何和所有实例或者示例性语言(例如,“如”)的使用仅为了更好地说明本公开,并不对本公开的范围构成限制。本说明书中没有语言应当理解为说明对于本公开的实践必不可少的任何未要求保护的要素。

[0265] 在本文中使用时,“和/或”被视作两个指定特征或组分中每一个的具体公开,包含或不包含另一个。例如,“X和/或Y”被视作(i) X, (ii) Y,以及(iii) X和Y中每一个的具体公开,就像每个在本文中单独列出一样。

[0266] 在本公开的上下文中,术语“约”表示准确性的区间,本领域普通技术人员会理解所述准确性的区间仍确保所讨论的特征的技术效果。该术语通常表示与所示数值偏差 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.9\%$ 、 $\pm 0.8\%$ 、 $\pm 0.7\%$ 、 $\pm 0.6\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.4\%$ 、 $\pm 0.3\%$ 、 $\pm 0.2\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.05\%$ 和例如 $\pm 0.01\%$ 。在一些实施方案中,“约”表示与所示数值偏差 $\pm 10\%$ 。在一些实施方案中,“约”表示与所示数值偏差 $\pm 5\%$ 。在一些实施方案中,“约”表示与所示数值偏差 $\pm 4\%$ 。在一些实施方案中,“约”表示与所示数值偏差 $\pm 3\%$ 。在一些实施方案中,“约”表示与所示数值偏差 $\pm 2\%$ 。在一些实施方案中,“约”表示与所示数值偏差 $\pm 1\%$ 。在一些实施方案中,“约”表示与所示数值偏差 $\pm 0.9\%$ 。在一些实施方案中,“约”表示与所示数值偏差 $\pm 0.8\%$ 。在一些实施方案中,“约”表示与所示数值偏差 $\pm 0.7\%$ 。在一些实施方案中,“约”表示与所示数值偏差 $\pm 0.6\%$ 。在一些实施方案中,“约”表示与所示数值偏差 $\pm 0.5\%$ 。在一些实施方案中,“约”表示与所示数值偏差 $\pm 0.4\%$ 。在一些实施方案中,“约”表示与所示数值偏差 $\pm 0.3\%$ 。在一些实施方案中,“约”表示与所示数值偏差 $\pm 0.2\%$ 。在一些实施方案中,“约”表示与所示数值偏差 $\pm 0.1\%$ 。在一些实施方案中,“约”表示与所示数值偏差 $\pm 0.05\%$ 。在一些实施方案中,“约”表示与所示数值偏差 $\pm 0.01\%$ 。如普通技术人员会理解的,对于给定技术效果的数值的这种具体偏差将取决于技术效果的性质。例如,自然或生物技术效果一般可以具有比人造或工程技术效果更大的这种偏差。

[0267] 本文中值的范围的列举仅为了用作单独提到落在所述范围内的每个不同值的速记方法。除非本文另有说明,否则每个单独的值如其在本文中单独陈述地加入本说明书。

[0268] 在这个说明书的整个正文中引用了几个文件。本文引用的每个文件(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、指导等),无论上文或下文,均整体援引加入本文。本文中的任何内容都不应理解为承认本发明无权凭借在先发明而早于这些公开。

[0269] 定义

[0270] 在下文中,将提供适用于本公开的所有方面的定义。除非另有说明,否则以下术语具有以下含义。任何未定义的术语均具有其公认的含义。

[0271] 如本文所用的术语如“减少”或“抑制”表示导致总体降低的能力,例如,在水平上,降低约5%或更多、约10%或更多、约15%或更多、约20%或更多、约25%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多或者约75%或更多。术语“抑制”或类似短语包括完全或基本上完全的抑制,即减少至0或基本上至0。

[0272] 如本文所用的术语“增强”表示导致总体增加或增强的能力,例如,在水平上,增加或增强至少约5%或更多、约10%或更多、约15%或更多、约20%或更多、约25%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约75%或更多或者约100%或更多。

[0273] 如本文所用的“生理pH”是指约7.4的pH。在一些实施方案中,生理pH从7.3至7.5。在一些实施方案中,生理pH从7.35至7.45。在一些实施方案中,生理pH为7.3、7.35、7.4、

7.45或7.5。

[0274] 如本公开中所用,“%w/v”是指重量体积百分比,它是一种浓度单位,以克(g)为单位测量溶质的量,表示为以毫升(mL)为单位的溶液总体积的百分比。

[0275] 如本公开中所用,“重量%”是指重量百分比,它是一种浓度单位,以克(g)为单位测量物质的量,表示为以克(g)为单位的总组合物的总重量的百分比。

[0276] 如本公开中所用,“摩尔%”定义为一种组分的摩尔数与所有组分的总摩尔数的比值,乘以100。

[0277] 如本公开中所用,“总脂质的摩尔%”定义为一种脂质组分的摩尔数与所有脂质的总摩尔数的比值,乘以100。在这个上下文中,在一些实施方案中,术语“总脂质”包括脂质和脂质样物质如表面活性剂,例如聚山梨酯20。

[0278] 术语“离子强度”是指特定溶液中不同种类离子类别的数量和它们各自电荷之间的数学关系。因此,离子强度I在数学上通过下式表示:

[0279]
$$I = \frac{1}{2} \cdot \sum_i z_i^2 \cdot c_i$$

[0280] 其中c是特定离子类别的摩尔浓度,z是其电荷的绝对值。总和 Σ 取自溶液中所有不同种类的离子(i)。

[0281] 根据本公开,在一些实施方案中,术语“离子强度”涉及单价离子的存在。关于二价离子的存在,特别是二价阳离子,在一些实施方案中,由于螯合剂的存在,它们的浓度或有效浓度(游离离子的存在)足够低以防止RNA的降解。在一些实施方案中,二价离子的浓度或有效浓度低于RNA核苷酸之间磷酸二酯键水解的催化水平。在一些实施方案中,游离二价离子的浓度为20 μ M或更少。在一些实施方案中,没有或基本上没有游离的二价离子。

[0282] “重量摩尔渗透压浓度(osmolality)”是指特定溶质的浓度,表示为每千克溶剂的溶质渗透压摩尔(osmole)数。

[0283] 术语“冻干(lyophilizing)”或“冻干(lyophilization)”是指物质的冷冻干燥,通过将其冷冻然后降低周围压力(例如,低于15Pa,如低于10Pa,低于5Pa或1Pa或更低)以允许物质中的冷冻介质直接从固相升华至气相。因此,术语“冻干”和“冷冻-干燥”在本文中可互换使用。

[0284] 术语“喷雾干燥”是指通过混合(加热)气体与容器(喷雾干燥器)内雾化(喷雾)的流体来喷雾干燥物质,其中来自形成的液滴的溶剂蒸发,导致干燥粉末。

[0285] 术语“重构”涉及将溶剂如水添加至干燥的产品以使其恢复为液体状态,例如其原始液体状态。

[0286] 如本文所用的术语“天然存在”是指物体可以在自然界中发现这一事实。例如,存在于生物体(包括病毒)中且可以分离自自然来源并且尚未被人在实验室中有意修饰的肽或核酸是天然存在的。术语“在自然界中发现”表示“存在于自然界中”,包括已知的物体以及尚未从自然界发现和/或分离,但是将来可能从自然来源发现和/或分离的物体。

[0287] 如本文所用,术语“室温”和“环境温度”在本文中可互换使用,是指至少约15 $^{\circ}$ C的温度,例如,约15 $^{\circ}$ C至约35 $^{\circ}$ C、约15 $^{\circ}$ C至约30 $^{\circ}$ C、约15 $^{\circ}$ C至约25 $^{\circ}$ C或约17 $^{\circ}$ C至约22 $^{\circ}$ C。这类温度包括15 $^{\circ}$ C、16 $^{\circ}$ C、17 $^{\circ}$ C、18 $^{\circ}$ C、19 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、21 $^{\circ}$ C和22 $^{\circ}$ C。在一些实施方案中,温度为15 $^{\circ}$ C至约25 $^{\circ}$ C。在一些实施方案中,温度为17 $^{\circ}$ C至约25 $^{\circ}$ C。在一些实施方案中,温度为约15 $^{\circ}$ C。在一

些实施方案中,温度为约16℃。在一些实施方案中,温度为约17℃。在一些实施方案中,温度为约18℃。在一些实施方案中,温度为约19℃。在一些实施方案中,温度为约20℃。在一些实施方案中,温度为约21℃。在一些实施方案中,温度为约22℃。

[0288] 术语“EDTA”是指乙二胺四乙酸二钠盐。关于EDTA二钠盐给出所有浓度。

[0289] 术语“冷冻保护剂”涉及添加到制剂中以在冷冻阶段保护活性成分的物质。

[0290] 术语“冻干保护剂”涉及添加到制剂中以在干燥阶段保护活性成分的物质。

[0291] 根据本公开,术语“肽”是指包含通过肽键相互连接的约2个或更多个、约3个或更多个、约4个或更多个、约6个或更多个、约8个或更多个、约10个或更多个、约13个或更多个、约16个或更多个、约20个或更多个以及多达约50个、约100个或约150个连续氨基酸的物质。术语“多肽”是指较大的肽,特别是具有至少约151个氨基酸的肽。术语“肽”和“多肽”都是蛋白质分子。

[0292] 当以治疗有效量提供给受试者时,“治疗性蛋白”对受试者的状况或疾病状态具有积极或有利的的作用。在一些实施方案中,治疗性蛋白具有治愈或缓解特性,并且可以给药以改善、减轻、缓解、逆转、延迟疾病的一种或多种症状的发生或者减轻疾病的一种或多种症状的严重程度。治疗性蛋白可以具有预防特性,并且可以用于延迟疾病的发生或者减轻这类疾病或病理状况的严重程度。术语“治疗性蛋白”包括完整的肽或多肽,并且还可以指其治疗活性片段。其还可以包括肽或多肽的治疗活性变体。治疗活性蛋白的实例包括但不限于用于疫苗接种的抗原和免疫刺激剂如细胞因子。术语“治疗性蛋白”和“治疗活性蛋白”在本文中可互换使用。

[0293] 根据本公开的各种实施方案,编码肽或多肽的核酸如mRNA被摄取或引入,即转染或转导至细胞中,导致所述肽或多肽的表达,所述细胞可以存在于体外或受试者中。细胞可以例如在细胞内(例如在细胞质中和/或在细胞核中)表达编码的肽或多肽,可以分泌编码的肽或多肽,和/或可以在表面上表达它。

[0294] 根据本公开,术语如“核酸表达”和“核酸编码”或类似术语在本文中可互换使用,并且关于特定肽或多肽,其表示如果存在于适当环境中,例如在细胞内,核酸可以表达以产生所述肽或多肽。

[0295] 术语“部分(portion)”是指一部分。关于特定结构如氨基酸序列或蛋白,术语其“部分”可以指所述结构的连续或不连续部分。

[0296] 术语“部分(part)”和“片段”在本文中可互换使用,是指连续的元件。例如,结构如氨基酸序列或蛋白的一部分是指所述结构的连续元件。当在组合物的上下文中使用时,术语“部分(part)”表示组合物的一部分(portion)。例如,组合物的一部分(part)可以是组合物的0.1%-99.9%(如0.1%、0.5%、1%、5%、10%、50%、90%或99%)的任何部分(portion)。

[0297] 关于氨基酸序列(肽或多肽),“片段”涉及氨基酸序列的一部分,即代表在N-末端和/或C-末端缩短的氨基酸序列的序列。在C-末端缩短的片段(N-末端片段)例如通过缺少开放阅读框3'-末端的截短的开放阅读框的翻译可获得。在N-末端缩短的片段(C-末端片段)例如通过缺少开放阅读框5'-末端的截短的开放阅读框的翻译可获得,只要截短的开放阅读框包含用于启动翻译的起始密码子。氨基酸序列的片段包含例如来自氨基酸序列的至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%的氨基酸残基。氨基酸序列的片段包含例

如来自氨基酸序列的至少6个、特别是至少8个、至少12个、至少15个、至少20个、至少30个、至少50个或至少100个连续氨基酸。

[0298] 根据本公开的某些实施方案,肽或多肽的部分或片段优选具有衍生它的肽或多肽的至少一种功能特性。这类功能特性可以包括药理活性、与其他肽或多肽的相互作用、酶促活性、与抗体的相互作用以及核酸的选择性结合。例如,肽或多肽的药理活性片段具有衍生该片段的肽或多肽的至少一种药理活性。肽或多肽的部分或片段包含例如所述肽或多肽的至少6个、特别是至少8个、至少10个、至少12个、至少15个、至少20个、至少30个或至少50个连续氨基酸的序列。肽或多肽的部分或片段包含例如所述肽或多肽的最多8个、特别是最多10个、最多12个、最多15个、最多20个、最多30个或最多55个连续氨基酸的序列。

[0299] 如本文所用且关于氨基酸序列(肽或多肽)的“变体”是指至少一个氨基酸(例如,不同的氨基酸,或相同氨基酸的修饰)不同于亲本氨基酸序列的氨基酸序列。亲本氨基酸序列可以是天然存在的或野生型(WT)氨基酸序列,或者可以是野生型氨基酸序列的修饰形式。在一些实施方案中,与亲本氨基酸序列相比,变体氨基酸序列具有至少一个氨基酸差异,例如,与亲本相比,具有1至约20个氨基酸差异,如1至约10个或1至约5个氨基酸差异。

[0300] 本文中的“野生型”或“WT”或“天然”表示在自然界中发现的氨基酸序列,包括等位基因变异。野生型氨基酸序列、肽或多肽具有未被有意修饰的氨基酸序列。

[0301] 为了本公开的目的,氨基酸序列(肽或多肽)的“变体”可以包含氨基酸插入变体、氨基酸添加变体、氨基酸缺失变体和/或氨基酸取代变体。术语“变体”包括所有突变体、剪接变体、翻译后修饰变体、构象、同种型、等位基因变体、物种变体和物种同源物,特别是天然存在的那些。特别地,术语“变体”包括氨基酸序列的片段。

[0302] 氨基酸插入变体包括在特定氨基酸序列中插入单个或两个或更多个氨基酸。在具有插入的氨基酸序列变体的情况下,将一个或多个氨基酸残基插入氨基酸序列中的特定位置,尽管适当筛选所得产物的随机插入也是可以的。氨基酸添加变体包含一个或多个氨基酸的氨基-和/或羧基-末端融合,如1、2、3、5、10、20、30、50或更多个氨基酸。氨基酸缺失变体的特征在于从序列去除一个或多个氨基酸,如去除1、2、3、5、10、20、30、50或更多个氨基酸。缺失可以在蛋白的任何位置。在蛋白的N-末端和/或C-末端包含缺失的氨基酸缺失变体也称作N-末端和/或C-末端截短变体。氨基酸取代变体的特征在于去除序列中的至少一个残基并在其位置插入另一残基。优先考虑在同源肽或多肽之间不保守的氨基酸序列位置中的修饰和/或用具有类似特性的其他氨基酸取代氨基酸。在一些实施方案中,肽和多肽变体中的氨基酸变化是保守的氨基酸变化,即,相似带电荷或不带电荷的氨基酸的取代。保守的氨基酸变化包括在它们的侧链中相关的氨基酸家族中一个的取代。天然存在的氨基酸一般分为四个家族:酸性(天冬氨酸、谷氨酸),碱性(赖氨酸、精氨酸、组氨酸),非极性(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸),和不带电荷的极性(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)氨基酸。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时共同归类为芳香氨基酸。在一些实施方案中,保守氨基酸取代包括以下组内的取代:

[0303] -甘氨酸、丙氨酸;

[0304] -缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;

[0305] -天冬氨酸、谷氨酸;

[0306] -天冬酰胺、谷氨酰胺;

[0307] -丝氨酸、苏氨酸;

[0308] -赖氨酸、精氨酸;以及

[0309] -苯丙氨酸、酪氨酸。

[0310] 在一些实施方案中,给定氨基酸序列和所述给定氨基酸序列变体的氨基酸序列之间的相似性,如相同性程度是至少约60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些实施方案中,对参考氨基酸序列整个长度的至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%的氨基酸区域给出相似性或相同性程度。例如,如果参考氨基酸序列由200个氨基酸组成,则例如对至少约20、至少约40、至少约60、至少约80、至少约100、至少约120、至少约140、至少约160、至少约180或约200个氨基酸给出相似性或相同性程度,在一些实施方案中是连续氨基酸。在一些实施方案中,对参考氨基酸序列的整个长度给出相似性或相同性程度。可以用本领域已知的工具进行确定序列相似性,如序列相同性的比对,如使用最佳序列比对,例如,使用Align,使用标准设置,优选EMBOSS::needle,Matrix:Blosum62,Gap Open 10.0,Gap Extend 0.5。

[0311] “序列相似性”表示相同或代表保守氨基酸取代的氨基酸的百分比。两个氨基酸序列之间的“序列相同性”表示所述序列之间相同的氨基酸的百分比。两个核酸序列之间的“序列相同性”表示所述序列之间相同的核苷酸的百分比。

[0312] 特别地,术语“%相同”和“%相同性”或类似术语是指在待比较的序列之间的最佳比对中相同的核苷酸或氨基酸的百分比。百分比纯粹是统计上的,并且两个序列之间的差异可以但不必一定随机分布在待比较的序列的整个长度上。通常在对片段或“比较窗口”最佳比对之后,通过比较序列进行两个序列的比较,以便鉴定相应序列的局部区域。用于比较的最佳比对可以手动进行,或者借助Smith and Waterman,1981,Ads App.Math.2,482的局部同源算法,借助Neddleman and Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48,443的局部同源算法,借助Pearson and Lipman,1988,Proc.Natl Acad.Sci.USA88,2444的相似性搜索算法或借助使用所述算法的计算机程序(Wisconsin Genetics Software Package,Genetics Computer Group,575Science Drive,Madison,Wis.中的GAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST N和TFASTA)。在一些实施方案中,使用BLASTN或BLASTP算法确定两个序列的百分比相同性,可在美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站(例如,在blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq)上获得。在一些实施方案中,用于NCBI网站上的BLASTN算法的算法参数包括:(i)Expect Threshold设置为10;(ii)Word Size设置为28;(iii)查询范围中的最大匹配设置为0;(iv)Match/Mismatch Scores设置为1,-2;(v)Gap Costs设置为Linear;以及(vi)用于低复杂度区域的过滤器。在一些实施方案中,用于NCBI网站上的BLASTP算法的算法参数包括:(i)Expect Threshold设置为10;(ii)Word Size设置为3;(iii)查询范围中的最大匹配设置为0;(iv)Matrix设置为BLOSUM62;(v)Gap Costs设置为Existence:11Extension:1;以及(vi)条件成分评分矩阵调整。

[0313] 通过确定待比较的序列对应的相同位置的数目,用这个数目除以比较的位置数目

(例如,参考序列中的位置数目),并将这个结果乘以100,获得百分比相同性。

[0314] 在一些实施方案中,对参考序列整个长度的至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%的区域给出相似性或相同性程度。例如,如果参考核酸序列由200个核苷酸组成,则对至少约100个、至少约120个、至少约140个、至少约160个、至少约180个或约200个核苷酸给出相同性程度,在一些实施方案中是连续核苷酸。在一些实施方案中,对参考序列的整个长度给出相似性或相同性程度。

[0315] 根据本公开,同源氨基酸序列表现出氨基酸残基的至少40%、特别是至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%以及例如至少95%、至少98或至少99%相同性。

[0316] 技术人员可以容易地制备本文所述的氨基酸序列变体,例如,通过重组DNA操作。例如,Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th Edition, M.R.Green and J.Sambrook eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 2012中详细描述用于制备具有取代、添加、插入或缺失的肽或多肽的DNA序列的操作。此外,本文所述的肽、多肽和氨基酸变体可以借助已知的肽合成技术容易地制备,例如,通过固相合成和类似方法。

[0317] 在一些实施方案中,氨基酸序列(肽或多肽)的片段或变体优选是“功能片段”或“功能变体”。氨基酸序列的术语“功能片段”或“功能变体”涉及表现出一种或多种与衍生它的氨基酸序列相同或相似的功能特性的任何片段或变体,即功能等同。关于抗原或抗原序列,一种特定功能是衍生片段或变体的氨基酸序列表现出的一种或多种免疫原性活性。如本文所用,术语“功能片段”或“功能变体”特别是指这样的变体分子或序列,其包含与亲本分子或序列的氨基酸序列相比改变一个或多个氨基酸的氨基酸序列,并且仍能够完成亲本分子或序列的一种或多种功能,例如,诱导免疫应答。在一些实施方案中,亲本分子或序列的氨基酸序列中的修饰不显著影响或改变所述分子或序列的特征。在不同的实施方案中,功能片段或功能变体的功能可能降低但仍显著存在,例如,功能片段或功能变体的功能可以是亲本分子或序列的至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。然而,在其他实施方案中,与亲本分子或序列相比,可以增强功能片段或功能变体的功能。

[0318] 氨基酸序列(肽或多肽)“源自”指定氨基酸序列(肽或多肽)是指第一个氨基酸序列的起源。在一些实施方案中,源自特定氨基酸序列的氨基酸序列具有与该特定序列或其片段相同、基本上相同或同源的氨基酸序列。源自特定氨基酸序列的氨基酸序列可以是该特定序列或其片段的变体。例如,本领域普通技术人员会理解,可以改变适合用于本文的抗原,从而它们的序列不同于衍生它们的天然存在的序列或天然序列,同时保留天然序列的可取活性。

[0319] 在一些实施方案中,“分离的”表示从自然状态或人工组合物如来自生产过程的组合物中移除(例如,纯化)。例如,天然存在于活动物体内的核酸、肽或多肽不是“分离的”,但是从其自然状态的共存物质部分或完全分离的相同核酸、肽或多肽是“分离的”。分离的核酸、肽或多肽可以以基本上纯化的形式存在,或者可以存在于非天然环境中,例如,宿主细胞。

[0320] 术语“转染”涉及将核酸,特别是RNA,引入细胞。为了本公开的目的,术语“转染”还包括将核酸引入细胞或这种细胞摄取核酸,其中所述细胞可以存在于受试者中,例如,患者,或者所述细胞可以在体外,例如,在患者外部。因此,根据本公开,用于转染本文所述核酸的细胞可以存在于体外或体内,例如细胞可以构成患者的器官、组织和/或身体的一部

分。根据本公开,转染可以是瞬时或稳定的。对于转染的一些应用,转染的遗传物质仅瞬时表达就足够了。可以将RNA转染入细胞以瞬时表达其编码的蛋白。因为转染过程中引入的核酸通常不整合至核基因组中,所以外源核酸会通过有丝分裂稀释或降解。允许核酸游离扩增的细胞大大降低稀释率。如果期望转染的核酸实际上保留在细胞及其子细胞的基因组中,则必须进行稳定转染。例如,这种稳定转染可以通过使用基于病毒的系统或基于转座子的系统进行转染来实现。通常,将编码抗原的核酸瞬时转染入细胞。可以将RNA转染入细胞以瞬时表达其编码的蛋白。

[0321] 根据本公开,肽或多肽的类似物是衍生它的肽或多肽的修饰形式,并且具有所述肽或多肽的至少一种功能特性。例如,肽或多肽的药理活性类似物具有衍生该类似物的肽或多肽的至少一种药理活性。这类修饰包括任何化学修饰,并且包括与肽或多肽相关的任何分子的单个或多个取代、缺失和/或添加,如碳水化合物、脂质和/或肽或多肽。在一些实施方案中,肽或多肽的“类似物”包括由糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、棕榈酰化、豆蔻酰化、异戊二烯化、脂化、烷基化、衍生化、引入保护/封闭基团、蛋白酶切割或者结合抗体或另一细胞配体所致的那些修饰形式。术语“类似物”还延伸至所述肽和多肽的所有功能化学等价物。

[0322] 如本文所用,“激活”或“刺激”是指已充分刺激以诱导可检测的细胞增殖的细胞状态,例如免疫效应细胞如T细胞。激活还可以与信号传导途径的启动、诱导的细胞因子产生和可检测的效应子功能相关。其中,术语“激活的免疫效应细胞”是指正在进行细胞分裂的免疫效应细胞。

[0323] 术语“引发”是指这样的过程,其中免疫效应细胞如T细胞与其特异性抗原首次接触并导致分化为效应细胞如效应T细胞。

[0324] 术语“扩增”是指其中特定实体倍增的过程。在一些实施方案中,该术语用于免疫应答的上下文,其中免疫效应细胞被抗原刺激,增殖,并且识别所述抗原的特异性免疫效应细胞扩增。在一些实施方案中,扩增导致免疫效应细胞的分化。

[0325] 根据本公开的“抗原”涵盖会引发免疫应答的任何物质和/或免疫应答或免疫机制如细胞应答所针对的任何物质。这还包括其中将抗原加工为抗原肽并且免疫应答或免疫机制针对一种或多种抗原肽的情况,特别是如果在MHC分子的背景中呈递。特别地,“抗原”涉及与抗体或T-淋巴细胞(T-细胞)特异性反应的任何物质,如肽或多肽。术语“抗原”可以包含分子,所述分子包含至少一个表位,如T细胞表位。在一些实施方案中,抗原是一种分子,任选在加工后,其诱导免疫应答,所述免疫应答可以是抗原(包括表达抗原的细胞)特异性的。在一些实施方案中,抗原是疾病相关抗原,如肿瘤抗原、病毒抗原或细菌抗原,或者源自这种抗原的表位。

[0326] 根据本公开,可以使用任何合适的抗原,其是免疫应答的候选物,其中所述免疫应答可以是体液以及细胞免疫应答。在本公开的一些实施方案的背景下,抗原由细胞呈递,例如由抗原呈递细胞在MHC分子的背景下呈递,这导致针对抗原的免疫应答。抗原可以是对应于或源自天然存在的抗原的产物。这类天然存在的抗原可以包括或可以源自过敏原、病毒、细菌、真菌、寄生虫和其他传染物和病原体,或者抗原也可以是肿瘤抗原。根据本公开,抗原可以对应于天然存在的产物,例如,病毒蛋白或其部分。

[0327] 术语“疾病相关抗原”以其最广泛的含义用于指与疾病相关的任何抗原。疾病相关

抗原是一种含有表位的分子,所述表位会刺激宿主的免疫系统以产生针对疾病的细胞抗原特异性免疫应答和/或体液抗体应答。疾病相关抗原包括病原体相关抗原,即与微生物感染相关的抗原,通常是微生物抗原(如细菌或病毒抗原),或者与癌症相关的抗原,通常是肿瘤,如肿瘤抗原。

[0328] 在一些实施方案中,抗原是肿瘤抗原,即肿瘤细胞的一部分,特别是那些主要出现在细胞内或作为肿瘤细胞表面抗原的抗原。在另一实施方案中,抗原是病原体相关抗原,即源自病原体的抗原,例如,源自病毒、细菌、单细胞生物或寄生虫,例如病毒抗原如病毒核糖核蛋白或外壳蛋白。在一些实施方案中,抗原应当由MHC分子呈递,这导致调节,特别是免疫系统细胞的激活,如CD4⁺和CD8⁺淋巴细胞,特别是通过T-细胞受体活性的调节。

[0329] 术语“肿瘤抗原”是指癌细胞的成分,其可以源自细胞质、细胞表面或细胞核。特别地,它是指那些在细胞内产生或作为肿瘤细胞上的表面抗原的抗原。例如,肿瘤抗原包括癌胚抗原、 α 1-胎蛋白、异铁蛋白和胎儿硫糖蛋白、 α 2-H-铁蛋白和 γ -胎蛋白,以及各种病毒肿瘤抗原。根据本公开的一些实施方案,肿瘤抗原包括在类型和/或表达水平方面是肿瘤或癌症以及肿瘤或癌细胞特有的任何抗原。

[0330] 术语“病毒抗原”是指具有抗原特性,即能够在个体中引起免疫应答的任何病毒组分。病毒抗原可以是病毒核糖核蛋白或包膜蛋白。

[0331] 术语“细菌抗原”是指具有抗原特性,即能够在个体中引起免疫应答的任何细菌组分。细菌抗原可以源自细菌的细胞壁或细胞质膜。

[0332] 术语“表位”是指分子如抗原中的抗原决定簇,即免疫系统识别的分子的一部分或片段,例如,抗体、T细胞或B细胞识别的分子的一部分或片段,特别是在MHC分子的背景下呈递时。蛋白的表位可以包含所述蛋白的连续或不连续部分,并且例如长度可以为约5至约100,约5至约50,约8至约30或约10至约25个氨基酸,例如,表位可以优选长度为9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。在一些实施方案中,本公开的上下文中的表位是T细胞表位。

[0333] 术语如“表位”、“抗原片段”、“免疫原性肽”和“抗原肽”在本文中可互换使用,并且例如可以涉及抗原的不完全呈递,例如,其能够引发针对抗原或者表达或包含并呈递抗原的细胞的免疫应答。在一些实施方案中,该术语涉及抗原的免疫原性部分。在一些实施方案中,它是T细胞受体识别(即,特异性结合)的抗原的一部分,特别是如果在MHC分子的背景下呈递。某些优选的免疫原性部分与MHC I类或II类分子结合。术语“表位”是指免疫系统识别的分子如抗原的一部分或片段。例如,表位可以被T细胞、B细胞或抗体识别。抗原的表位可以包括所述抗原的连续或不连续部分,并且可以长度为约5-约100,如约5-约50,约8-约30或约8-约25个氨基酸,例如,表位可以长度为9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。在一些实施方案中,表位长度在约10和约25个氨基酸之间。术语“表位”包括T细胞表位。

[0334] 术语“T细胞表位”是指在MHC分子的背景下呈递时被T细胞识别的蛋白的一部分或片段。术语“主要组织相容性复合物”和缩写“MHC”包括MHC I类和MHC II类分子,并且涉及存在于所有脊椎动物中的基因复合物。MHC蛋白或分子对于免疫反应中淋巴细胞与抗原呈递细胞或病变细胞之间的信号传导很重要,其中MHC蛋白或分子结合肽表位并呈递它们用于T细胞上的T细胞受体识别。MHC编码的蛋白在细胞表面上表达,并且向T细胞展示自身抗

原(来自细胞自身的肽片段)和非自身抗原(例如,入侵微生物的片段)。在I类MHC/肽复合物的情况下,结合肽通常长约8至约10个氨基酸,尽管更长或更短的肽可能是有效的。在II类MHC/肽复合物的情况下,结合肽通常长约10至约25个氨基酸,特别是长约13至约18个氨基酸,而更长或更短的肽可能是有效的。

[0335] 肽和多肽抗原可以长度为2-100个氨基酸,包括例如,5个氨基酸、10个氨基酸、15个氨基酸、20个氨基酸、25个氨基酸、30个氨基酸、35个氨基酸、40个氨基酸、45个氨基酸或50个氨基酸。在一些实施方案中,肽可以大于50个氨基酸。在一些实施方案中,肽可以大于100个氨基酸。

[0336] 肽或多肽抗原可以是诱导或增加免疫系统发展对肽或多肽的抗体和T细胞应答的能力的任何肽或多肽。

[0337] 在一些实施方案中,疫苗抗原,即将其接种到受试者中诱导免疫应答的抗原,被免疫效应细胞识别。在一些实施方案中,如果疫苗抗原被免疫效应细胞识别,其能够在适当的共刺激信号存在下诱导携带识别疫苗抗原的抗原受体的免疫效应细胞的刺激、引发和/或扩增。在本公开的实施方案的上下文中,疫苗抗原可以例如呈递或存在于细胞表面上,如抗原呈递细胞。在一些实施方案中,抗原由病变细胞(例如肿瘤细胞或感染细胞)呈递。在一些实施方案中,抗原受体是TCR,其与在MHC背景下呈递的抗原表位结合。在一些实施方案中,当由T细胞表达和/或呈递在T细胞上时,TCR与细胞如抗原呈递细胞呈递的抗原的结合导致所述T细胞的刺激、引发和/或扩增。在一些实施方案中,当由T细胞表达和/或呈递在T细胞上时,TCR与病变细胞上呈递的抗原的结合导致病变细胞的细胞溶解和/或凋亡,其中所述T细胞释放细胞毒性因子,例如穿孔蛋白和颗粒酶。

[0338] 在一些实施方案中,抗原受体是与抗原表位结合的抗体或B细胞受体。在一些实施方案中,抗体或B细胞受体与抗原的天然表位结合。

[0339] 术语“在细胞表面上表达”或“与细胞表面相关联”表示分子如抗原与细胞的质膜相关联并位于细胞的质膜上,其中至少一部分分子面向所述细胞的细胞外空间,并且可从所述细胞的外部可及,例如,通过位于细胞外部的抗体。在这个上下文中,一部分可以是例如至少4个、至少8个、至少12个或至少20个氨基酸。关联可以是直接或间接的。例如,关联可以通过一个或多个跨膜结构域,一个或多个脂质锚定物,或者通过与可以在细胞质膜的外小叶上发现的任何蛋白、脂质、糖或其他结构相互作用。例如,与细胞表面关联的分子可以是具有细胞外部分的跨膜蛋白,或者可以通过与作为跨膜蛋白的另一蛋白相互作用而与细胞表面关联的蛋白。

[0340] “细胞表面”或“细胞的表面”按照其在本领域中的正常含义使用,因此包括蛋白和其他分子可接近结合的细胞外部。如果抗原位于细胞表面并且例如添加至细胞的抗原特异性抗体可接近结合,则抗原在细胞表面上表达。

[0341] 本公开的上下文中的术语“细胞外部分”或“胞外域(exodomain)”是指分子如蛋白的一部分,其面向细胞的胞外空间并且优选从所述细胞外可及,例如通过结合位于细胞外的分子如抗体。在一些实施方案中,该术语是指一个或多个细胞外环或结构域或其片段。

[0342] 术语“T细胞”和“T淋巴细胞”在本文中可互换使用,并且包括T辅助细胞(CD4+T细胞)和细胞毒性T细胞(CTL、CD8+T细胞),其包含溶细胞性T细胞。术语“抗原特异性T细胞”或类似术语涉及识别T细胞所靶向的抗原的T细胞,特别是当在MHC分子的背景下呈递于抗原

呈递细胞或病变细胞如癌细胞的表面时,并且优选发挥T细胞的效应子功能。如果细胞杀死表达抗原的靶细胞,则认为T细胞是抗原特异性的。可以使用各种标准技术中的任一种,例如,在铬释放测定或增殖测定内评价T细胞特异性。或者,可以测量淋巴因子(如干扰素- γ)的合成。在本公开的一些实施方案中, RNA (特别是 mRNA) 编码至少一个表位。

[0343] 术语“靶标”应当表示物质如细胞或组织,其是免疫应答如细胞免疫应答的靶标。靶标包括呈递抗原或抗原表位(即源自抗原的肽片段)的细胞。在一些实施方案中,靶细胞是表达抗原并用I类MHC呈递所述抗原的细胞。

[0344] “抗原加工”是指抗原降解为加工产物,其是所述抗原的片段(例如,多肽降解为肽),并且这些片段中的一个或多个与MHC分子关联(例如,通过结合)用于通过细胞如抗原呈递细胞呈递给特定T-细胞。

[0345] “抗原反应性CTL”表示对抗原或源自所述抗原的肽有反应的CD8⁺T-细胞,其与I类MHC一起在抗原呈递细胞表面上呈递。

[0346] 根据本公开,CTL反应性可以包括持续的钙通量、细胞分裂、产生细胞因子如IFN- γ 和TNF- α 、上调激活标记如CD44和CD69以及特异性溶细胞杀死表达肿瘤抗原的靶细胞。还可以使用准确指示CTL反应性的人工报告物确定CTL反应性。

[0347] 术语“免疫应答”和“免疫反应”在本文中以其常规含义可互换使用,是指对抗原的综合身体应答,并且可以指细胞免疫应答、体液免疫应答或两者。根据本公开,关于物质如抗原、细胞或组织的术语“对...免疫应答”或“针对...免疫应答”涉及针对所述物质的免疫应答如细胞应答。免疫应答可以包括一种或多种选自以下的反应:发展针对一种或多种抗原的抗体,以及抗原特异性T-淋巴细胞,如CD4⁺和CD8⁺T-淋巴细胞,例如CD8⁺T-淋巴细胞的扩增,其可以在体外的各种增殖或细胞因子产生测试中检测到。

[0348] 在本公开的上下文中,术语“诱导免疫应答”和“引发免疫应答”以及类似术语是指免疫应答的诱导,如细胞免疫应答、体液免疫应答或两者的诱导。免疫应答可以是保护性/防护性/预防性和/或治疗性的。免疫应答可以针对任何免疫原或抗原或抗原肽,如针对肿瘤相关抗原或病原体相关抗原(例如,病毒(如流感病毒(A、B或C)、CMV或RSV)的抗原)。在这个上下文中“诱导”可以表示在诱导之前没有针对特定抗原或病原体的免疫应答,但是其也可以表示在诱导之前有一定水平的针对特定抗原或病原体的免疫应答,并且在诱导之后所述免疫应答增强。因此,在这个上下文中“诱导免疫应答”也包括“增强免疫应答”。在一些实施方案中,在个体中诱导免疫应答之后,所述个体受到保护免于发展疾病如传染病或恶性疾病,或者疾病状况通过诱导免疫应答达得到改善。

[0349] 术语“细胞免疫应答”、“细胞应答”、“细胞介导的免疫”或类似术语表示包括针对细胞的细胞应答,其特征在于抗原的表达和/或用I类或II类MHC呈递抗原。细胞应答涉及称作T细胞或T淋巴细胞的细胞,其充当“辅助细胞”或“杀伤细胞”。辅助T细胞(也称作CD4⁺T细胞)通过调节免疫应答发挥中心作用,而杀伤细胞(也称作细胞毒性T细胞、溶细胞性T细胞、CD8⁺T细胞或CTL)杀死细胞如病变细胞。

[0350] 术语“体液免疫应答”是指活生物体中的一个过程,其中对物质和生物体应答产生抗体,它们最终中和和/或消除所述物质和生物体。抗体应答的特异性由T和/或B细胞通过结合单一特异性抗原的膜相关受体来介导。在结合适当抗原并接收各种其他激活信号之后,B淋巴细胞分裂,产生记忆B细胞以及分泌抗体的浆细胞克隆,每个克隆产生的抗体识别

与其抗原受体识别的相同的抗原表位。记忆B淋巴细胞保持休眠状态,直至它们随后被其特异性抗原激活。这些淋巴细胞提供记忆的细胞基础,并且在再次暴露于特异性抗原时导致抗体应答升级。

[0351] 如本文所用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子,其能够与抗原上的表位特异性结合。特别地,术语“抗体”是指包含通过二硫键互相连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白。术语“抗体”包括单克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体和任何前述抗体的组合。每条重链包含重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)。每条轻链包含轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)。可变区和恒定区在本文中分别称作可变结构域和恒定结构域。VH和VL区可以进一步细分为高变性的区域,称作互补决定区(CDR),其中散布着更保守的、称作框架区(FR)的区域。每个VH和VL包含3个CDR和4个FR,从氨基-末端至羧基-末端按照以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。VH的CDR称为HCDR1、HCDR2和HCDR3,VL的CDR称为LCDR1、LCDR2和LCDR3。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区包含重链恒定区(CH)和轻链恒定区(CL),其中CH可以进一步细分为恒定结构域CH1、铰链区以及恒定结构域CH2和CH3(从氨基-末端至羧基-末端按照以下顺序排列:CH1、CH2、CH3)。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。抗体可以是源自天然来源或重组来源的完整免疫球蛋白,并且可以是完整免疫球蛋白的免疫活性部分。抗体通常是免疫球蛋白分子的四聚体。抗体可以以各种形式存在,包括例如多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab和F(ab)₂以及单链抗体和人源化抗体。

[0352] 术语“免疫球蛋白”涉及免疫球蛋白超家族的蛋白,如涉及抗原受体如抗体或B细胞受体(BCR)。免疫球蛋白的特征在于具有特征性免疫球蛋白(Ig)折叠的结构结构域,即免疫球蛋白结构域。该术语涵盖膜结合免疫球蛋白以及可溶性免疫球蛋白。膜结合免疫球蛋白也称作表面免疫球蛋白或膜免疫球蛋白,其通常是BCR的一部分。可溶性免疫球蛋白一般称作抗体。免疫球蛋白一般包含几条链,通常是通过二硫键连接的两条相同的重链和两条相同的轻链。这些链主要由免疫球蛋白结构域组成,如V_L(可变轻链)结构域,C_L(恒定轻链)结构域,V_H(可变重链)结构域以及C_H(恒定重链)结构域C_H1、C_H2、C_H3和C_H4。有五种类型的哺乳动物免疫球蛋白重链,即 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ,其导致不同类别的抗体,即IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。与可溶性免疫球蛋白的重链相反,膜或表面免疫球蛋白的重链在它们的羧基-末端包含跨膜结构域和短胞质结构域。在哺乳动物中有两种类型的轻链,即 λ 和 κ 。免疫球蛋白链包含可变区和恒定区。恒定区在免疫球蛋白的不同同种型内基本上是保守的,其中可变部分高度不同并负责抗原识别。

[0353] 术语“疫苗接种”和“免疫接种”描述出于治疗或预防原因治疗个体的过程,并且涉及以下程序:向个体施用一种或多种免疫原或抗原或其衍生物,特别是以对其编码的RNA(尤其是mRNA)的形式,如本文所述,并且刺激针对所述一种或多种免疫原或抗原的免疫应答或者以呈递所述一种或多种免疫原或抗原为特征的细胞。

[0354] “以呈递抗原为特征的细胞”或“呈递抗原的细胞”或“在抗原呈递细胞表面上呈递抗原的MHC分子”或类似表述表示细胞如病变细胞,特别是肿瘤细胞或受感染的细胞,或者直接或在加工之后呈递抗原或抗原肽的抗原呈递细胞,在MHC分子的背景下,如MHC I类和/或MHC II类分子。在一些实施方案中,MHC分子是MHC I类分子。

[0355] 在本公开的上下文中,术语“转录”涉及一个过程,其中将DNA序列中的遗传密码转录为RNA(尤其是mRNA)。随后,可以将RNA翻译为肽或多肽。

[0356] 关于RNA,术语“表达”或“翻译”涉及细胞核糖体中的过程,通过这个过程mRNA链指导氨基酸序列的组装以产生肽多肽。

[0357] 如本文所用的术语“任选”或“任选地”表示随后描述的事件、情况或条件可能发生或可能不发生,并且该描述包括所述事件、情况或条件发生和不发生的情况。

[0358] 本文所述特定化合物的前药是在向个体给药后在生理条件下发生化学转化以提供所述特定化合物的那些化合物。此外,前药可以在离体环境中通过化学或生物化学方法转化为所述特定化合物。例如,当例如与合适的酶或化学试剂一起放置在透皮贴剂储库(transdermal patch reservoir)中时,前药可以缓慢地转化为特定化合物。示例性前药是在体内可水解的酯类(使用特定化合物中含有的醇或羧基)或酰胺(使用特定化合物中含有的氨基或羧基)。具体地,包含在特定化合物中并且具有至少一个氢原子的任何氨基均可以被转化为前药形式。典型的N-前药形式包括氨基甲酸酯、曼尼希碱(Mannich base)、烯胺和烯胺酮。

[0359] 在本说明书中,化合物的结构式可以代表所述化合物的某种异构体。然而,应当理解本公开包括所有异构体如几何异构体、基于不对称碳的光学异构体、立体异构体、互变异构体等结构上出现的异构体和异构体混合物,并不限于式的描述。

[0360] “异构体”是具有相同分子式但结构不同(“结构异构体”)或官能团和/或原子的几何(空间)定位不同(“立体异构体”)的化合物。“对映异构体”是一对彼此不可重叠镜像的立体异构体。“外消旋混合物”或“外消旋物”含有一对等量的对映异构体,并用前缀(±)表示。“非对映异构体”是不可重叠且不是彼此镜像的立体异构体。“互变异构体”是相同化学物质的结构异构体,即使是纯的,但由于各个原子或原子群的迁移,也会自发地和可逆地相互转化;即互变异构体彼此处于动态化学平衡。互变异构体的一个实例是酮-烯醇-互变异构现象的异构体。“构象异构体(Conformer)”是立体异构体,仅通过形式单键的旋转即可相互转化,尤其包括那些导致不同3维形式的(杂)环的立体异构体,例如环己烷的椅式、半椅式、船式和扭船式。

[0361] 术语“平均直径”是指通过动态光散射(DLS)并使用所谓的累积量算法进行数据分析而测得的颗粒的平均流体动力学直径,其结果是提供具有一定长度尺寸的所谓的 $Z_{\text{平均}}$,以及无量纲的多分散性指数(PDI)(Koppel, D., J. Chem. Phys. 57, 1972, pp 4814-4820, ISO 13321)。这里颗粒的“平均直径”、“直径”或“尺寸”与 $Z_{\text{平均值}}$ 的这个值同义使用。

[0362] 在一些实施方案中,“多分散性指数”可以基于动态光散射测量,通过“平均直径”的定义中提到的所谓的累积量分析来计算。在某些先决条件下,可以将其作为纳米颗粒整体尺寸分布的度量。

[0363] 颗粒绕旋转轴的“回转半径”(在本文中缩写为 R_g)是一个点到旋转轴的径向距离,如果假设颗粒的整个质量集中在该点,则其绕给定轴的转动惯量会与其实际质量分布相同。在数学上, R_g 是颗粒组分与其质量中心或给定轴的均方根距离。例如,对于包含 n 个质量元素的大分子,质量为 m_i ($i=1, 2, 3, \dots, n$),位于距质量中心固定距离 s_i 处, R_g 是所有质量元素的 s_i^2 的质量平均值的平方根,并且可以计算如下:

$$[0364] \quad R_g = \left(\sum_{i=1}^n m_i \cdot s_i^2 / \sum_{i=1}^n m_i \right)^{1/2}$$

[0365] 回转半径可以通过实验来确定或计算,例如,通过使用光散射。特别地,对于小散射矢量 $\vec{q}$,结构函数S定义如下:

$$[0366] \quad S(\vec{q}) \approx N \cdot \left(1 - \frac{q^2 \cdot R_g^2}{3} \right)$$

[0367] 其中N是组分的数目(Guinier's定律)。

[0368] 颗粒的“流体动力学半径”(有时称为“Stokes半径”或“Stokes-Einstein半径”)是以与所述颗粒相同的速度扩散的假设硬球体的半径。流体动力学半径与颗粒的移动性相关,不仅考虑尺寸,而且还考虑溶剂效应。例如,具有较强水合作用的较小带电颗粒可能比具有较弱水合作用的较大带电颗粒具有更大的流体动力学半径。这是因为较小的颗粒在穿过溶液时拖曳更多的水分子。因为颗粒在溶剂中的实际尺寸不可直接测量,流体动力学半径可以由Stokes-Einstein方程定义:

$$[0369] \quad R_h = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}$$

[0370] 其中 k_B 是Boltzmann常数;T是温度; η 是溶剂的粘度;D是扩散系数。扩散系数可以通过实验确定,例如,通过使用动态光散射(DLS)。因此,一种确定颗粒或颗粒群的流体动力学半径(如本文公开的样品或对照组合物中包含的颗粒的流体动力学半径或者对这样的样品或对照组合物进行场-流分级分离获得的颗粒峰的流体动力学半径)的方法是测量所述颗粒或颗粒群的DLS信号(如本文公开的样品或对照组合物中包含的颗粒的DLS信号或者对这样的样品或对照组合物进行场-流分级分离获得的颗粒峰的DLS信号)。

[0371] 如本文所用的表述“光散射”是指物理过程,其中由于光通过的介质中的局部不均匀性而迫使光偏离直线轨迹至一条或多条路径。

[0372] 术语“UV”表示紫外光,并且指定波长从10nm至400nm的电磁波谱带,即比可见光短但比X-射线长。

[0373] 如本文所用的表述“多角度光散射”或“MALS”涉及用于测量由样品散射成多角度的光的技术。“多角度”在这方面表示在测量时可以在不同的离散角度检测散射光,例如,通过在包括所选特定角度的范围内移动的单个检测器或固定在特定角度位置的检测器阵列。在某些实施方案中,MALS中使用的光源是激光源(MALLS:多角度激光散射)。基于包含颗粒的组合物的MALS信号并通过使用适当形式(例如,Zimm图、Berry图或Debye图),可以确定回转半径(R_g),并因此确定所述颗粒的尺寸。优选地,Zimm图是使用以下等式的图形表示:

$$[0374] \quad \frac{R_\theta}{K^*c} = M_w P(\theta) - 2A_2cM_w^2P^2(\theta)$$

[0375] 其中c是颗粒在溶剂中的质量浓度(g/mL); A_2 是第二维里系数($\text{mol} \cdot \text{mL}/\text{g}^2$); $P(\theta)$ 是与散射光强度对角度的依赖性相关的形状因数; R_θ 是过量Rayleigh比例(cm^{-1}); K^* 是一个光学常数,等于 $4\pi^2\eta_0(\text{dn}/\text{dc})^2\lambda_0^4N_A^{-1}$,其中 η_0 是溶剂在入射辐射(真空)波长处的折射率, λ_0 是入射辐射(真空)波长(nm), N_A 是阿伏伽德罗数(mol^{-1}), dn/dc 是微分折射率增量(mL/g)(参见,例如,Buchholz et al. (Electrophoresis 22 (2001), 4118-4128); B.H. Zimm

(J. Chem. Phys. 13 (1945), 141; P. Debye (J. Appl. Phys. 15 (1944): 338; 和 W. Burchard (Anal. Chem. 75 (2003), 4279-4291)。优选地, Berry图按以下项计算:

$$[0376] \quad \sqrt{\frac{R_{\theta}}{K^*c}}$$

[0377] 其中 c 、 R_{θ} 和 K^* 如上文定义。优选地, Debye图按以下项计算:

$$[0378] \quad \frac{K^*c}{R_{\theta}}$$

[0379] 其中 c 、 R_{θ} 和 K^* 如上文定义。

[0380] 如本文所用的表述“动态光散射”或“DLS”是指确定颗粒的尺寸和尺寸分布图的技术,特别是关于颗粒的流体动力学半径。单色光源,通常是激光,通过偏振器射入样品。然后散射光穿过第二个偏振器,在那里它被检测到,并且将生成的图像投影到屏幕上。溶液中的颗粒被光击中并在所有方向上衍射光。来自颗粒的衍射光可以相长干扰(亮区)或相消干扰(暗区)。这个过程以很短的时间间隔重复,并且通过比较每个点随时间的强度的自相关器来分析产生的散斑图案集。

[0381] 如本文所用的表述“静态光散射”或“SLS”是指确定颗粒的尺寸和尺寸分布曲线的技术,特别是关于颗粒的回转半径和/或颗粒的摩尔质量。在含有颗粒的溶液中发射高强度单色光,通常是激光。一个或多个检测器用于在一个或多个角度测量散射强度。需要角度依赖性来获得所有半径大分子的摩尔质量和尺寸的准确测量。因此,在相对于入射光方向的几个角度同时测量,称作多角度光散射(MALS)或多角度激光散射(MALLS),一般视为静态光散射的标准实施方式。

[0382] 术语“核酸”包括脱氧核糖核苷酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、它们的组合和它们的修饰形式。该术语包括基因组DNA、cDNA、mRNA、重组产生和化学合成的分子。核酸可以作为单链或双链以及线性或共价环状闭合分子存在。核酸可以是分离的。根据本公开,术语“分离的核酸”表示所述核酸(i)是体外扩增的,例如通过用于DNA的聚合酶链反应(PCR)或用于RNA的体外转录(使用例如RNA聚合酶),(ii)是通过克隆重组产生的,(iii)是纯化的,例如通过切割和通过凝胶电泳分离,或者(iv)是合成的,例如,通过化学合成。

[0383] 术语“核苷”(在本文中缩写为“N”)涉及可以认为是没有磷酸基团的核苷酸的化合物。虽然核苷是与糖(例如,核糖或脱氧核糖)连接的核碱基,但是核苷酸包含核苷以及一个或多个磷酸基团。核苷的实例包括胞苷、尿苷、假尿苷、腺苷和鸟苷。

[0384] 通常构成天然存在的核酸的五种标准核苷是尿苷、腺苷、胸苷、胞苷和鸟苷。五种核苷通常分别缩写为它们的单字母代码U、A、T、C和G。但是,胸苷更常写作“dT”(“d”代表“脱氧”),因为它含有2'-脱氧呋喃核糖部分而不是尿苷中发现的呋喃核糖环。这是因为胸苷存在于脱氧核糖核酸(DNA)而不是核糖核酸(RNA)中。相反地,尿苷存在于RNA而不是DNA中。其余三种核苷可以在RNA和DNA中找到。在RNA中,它们会表示为A、C和G,而在DNA中,它们会表示为dA、dC和dG。

[0385] 修饰的嘌呤(A或G)或嘧啶(C、T或U)碱基部分优选被一个或多个烷基修饰,更优选一个或多个 C_{1-4} 烷基,甚至更优选一个或多个甲基。修饰的嘌呤或嘧啶碱基部分的具体实例包括 N^7 -烷基-鸟嘌呤、 N^6 -烷基-腺嘌呤、5-烷基-胞嘧啶、5-烷基-尿嘧啶和 $N(1)$ -烷基-尿嘧

啶,如 N^7 - C_{1-4} 烷基-鸟嘌呤、 N^6 - C_{1-4} 烷基-腺嘌呤、5- C_{1-4} 烷基-胞嘧啶、5- C_{1-4} 烷基-尿嘧啶和N(1)- C_{1-4} 烷基-尿嘧啶,优选 N^7 -甲基-鸟嘌呤、 N^6 -甲基-腺嘌呤、5-甲基-胞嘧啶、5-甲基-尿嘧啶和N(1)-甲基-尿嘧啶。

[0386] 在本文中,术语“DNA”涉及包括脱氧核糖核苷酸残基的核酸分子。在优选的实施方案中,DNA包含全部或大部分脱氧核糖核苷酸残基。如本文所用,“脱氧核糖核苷酸”是指在 β -D-呋喃核糖基的2'-位置缺少羟基的核苷酸。DNA包括但不限于双链DNA、单链DNA、分离的DNA如部分纯化的DNA、基本上纯的DNA、合成的DNA、重组产生的DNA,以及通过添加、缺失、取代和/或改变一个或多个核苷酸而不同于天然存在的DNA的修饰的DNA。这类改变可以指将非核苷酸物质添加至内部DNA核苷酸或DNA的末端。本文还考虑DNA中的核苷酸可以是非标准核苷酸,如化学合成的核苷酸或核糖核苷酸。对于本公开,认为这些改变的DNA是天然存在的DNA的类似物。如果基于分子中核苷酸残基的总数,分子中脱氧核糖核苷酸残基的含量超过50%(如至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%),则分子包含“大部分脱氧核糖核苷酸残基”。分子中核苷酸残基的总数是所有核苷酸残基的总和(不管核苷酸残基是否是标准的(即,天然存在的)核苷酸残基或其类似物)。

[0387] DNA可以是重组DNA,并且可以通过核酸特别是cDNA的克隆来获得。cDNA可以通过RNA的逆转录获得。

[0388] 术语“RNA”涉及包括核糖核苷酸残基的核酸分子。在优选的实施方案中,RNA包含全部或大部分核糖核苷酸残基。如本文所用,“核糖核苷酸”是指在 β -D-呋喃核糖基的2'-位置具有羟基的核苷酸。RNA包括但不限于双链RNA、单链RNA、分离的RNA如部分纯化的RNA、基本上纯的RNA、合成的RNA、重组产生的RNA,以及通过添加、缺失、取代和/或改变一个或多个核苷酸而不同于天然存在的RNA的修饰的RNA。这类改变可以指将非核苷酸物质添加至内部RNA核苷酸或RNA的末端。本文中考虑RNA中的核苷酸可以是非标准核苷酸,如化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。对于本公开,这些改变/修饰的核苷酸可以称作天然存在的核苷酸的类似物,并且含有这类改变/修饰的核苷酸的相应RNA(即,改变/修饰的RNA)可以称作天然存在的RNA的类似物。如果基于分子中核苷酸残基的总数,分子中核糖核苷酸残基的含量超过50%(如至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%),则分子包含“大部分核糖核苷酸残基”。分子中核苷酸残基的总数是所有核苷酸残基的总和(不管核苷酸残基是否是标准的(即,天然存在的)核苷酸残基或其类似物)。

[0389] “RNA”包括mRNA、tRNA、核糖体RNA(rRNA)、小核RNA(snRNA)、自我扩增RNA(saRNA)、单链RNA(ssRNA)、dsRNA、抑制性RNA(如反义ssRNA、小干扰RNA(siRNA)或microRNA(miRNA))、激活RNA(如小激活RNA)和免疫刺激性RNA(isRNA)。在一些实施方案中,“RNA”是指mRNA。

[0390] 如本文所用的术语“体外转录”或“IVT”表示以无细胞方式进行转录(即,RNA的产生)。即,IVT不使用活的/培养细胞,而是使用从细胞提取的转录机制(例如,细胞裂解物或其分离的组分,包括RNA聚合酶(优选T7、T3或SP6聚合酶))。

[0391] mRNA

[0392] 根据本公开,术语“mRNA”表示“信使-RNA”,并且涉及可以通过使用DNA模板产生并

可以编码肽或多肽的“转录物”。通常,mRNA包含5'-UTR、肽/多肽编码区和3'-UTR。在本公开的上下文中,mRNA可以通过体外转录 (IVT) 从DNA模板产生。如上所示,体外转录方法是技术人员已知的,并且各种体外转录试剂盒是可商购的。

[0393] mRNA是单链的,但是可以含有自我互补序列,其允许mRNA的部分(part)折叠并与自身配对以形成双螺旋。

[0394] 根据本公开,“dsRNA”表示双链RNA,并且是具有两条部分或完全互补链的RNA。

[0395] 在本公开的优选实施方案中,mRNA涉及编码肽或多肽的RNA转录物。

[0396] 在一些实施方案中,优选编码肽或多肽的mRNA的长度为至少45个核苷酸(如至少60个、至少90个、至少100个、至少200个、至少300个、至少400个、至少500个、至少600个、至少700个、至少800个、至少900个、至少1,000个、至少1,500个、至少2,000个、至少2,500个、至少3,000个、至少3,500个、至少4,000个、至少4,500个、至少5,000个、至少6,000个、至少7,000个、至少8,000个、至少9,000个核苷酸),优选多达15,000个,如多达14,000个,多达13,000个,多达12,000个核苷酸,多达11,000个核苷酸或多达10,000个核苷酸。

[0397] 如本领域中建立的,mRNA一般含有5'非翻译区(5'-UTR)、肽/多肽编码区和3'非翻译区(3'-UTR)。在一些实施方案中,mRNA是通过体外转录或化学合成产生的。在一些实施方案中,使用DNA模板通过体外转录产生mRNA。体外转录方法是技术人员已知的,参见,例如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,4th Edition,M.R.Green and J.Sambrook eds.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor 2012。此外,各种体外转录试剂盒是可商购的,例如,来自Thermo Fisher Scientific(如TranscriptAid™ T7试剂盒、MEGAscript® T7试剂盒、MAXIsript®)、New England BioLabs Inc.(如HiScribe™ T7试剂盒、HiScribe™ T7 ARCA mRNA试剂盒)、Promega(如RiboMAX™、HeLaScribe®、Riboprobe®系统)、Jena Bioscience(如SP6或T7转录试剂盒)和Epicentre(如AmpliScribe™)。为了提供修饰的mRNA,相应修饰的核苷酸,如修饰的天然存在的核苷酸、非天然存在的核苷酸和/或修饰的非天然存在的核苷酸,可以在合成(优选体外转录)期间掺入,或者修饰在转录之后实现和/或添加至mRNA。

[0398] 在一些实施方案中,mRNA是体外转录的mRNA (IVT-RNA),并且可以通过适当DNA模板的体外转录获得。用于控制转录的启动子可以是任何RNA聚合酶的任何启动子。RNA聚合酶的具体实例是T7、T3和SP6 RNA聚合酶。优选地,体外转录由T7或SP6启动子控制。用于体外转录的DNA模板可以通过克隆核酸,特别是cDNA,并将其引入适当的载体用于体外转录来获得。cDNA可以通过RNA的逆转录获得。

[0399] 在本公开的一些实施方案中,mRNA是“复制子mRNA”或简单地是“复制子”,特别是“自我复制mRNA”或“自我扩增mRNA”。在某些实施方案中,复制子或自我复制mRNA源自或包含源自ssRNA病毒的元件,特别是正链ssRNA病毒如甲病毒。甲病毒是正链RNA病毒的典型代表。甲病毒在受感染细胞的细胞质中复制(甲病毒生命周期的综述参见José et al.,Future Microbiol.,2009,vol.4,pp.837-856)。许多甲病毒的总基因组长度通常范围在11,000和12,000个核苷酸之间,并且基因组RNA通常具有5'-帽和3' poly(A)尾。甲病毒的基因组编码非结构蛋白(参与病毒RNA的转录、修饰和复制以及蛋白修饰)和结构蛋白(形成病毒颗粒)。基因组中通常有两个开放阅读框(ORF)。四种非结构蛋白(nsP1-nsP4)通常由基因组5'末端附近开始的第一ORF一起编码,而甲病毒结构蛋白由第二ORF一起编码,所述第二ORF位于第

—ORF下游并延伸至基因组的3'末端附近。通常,第一ORF比第二ORF大,比率大约为2:1。在被甲病毒感染的细胞中,只有编码非结构蛋白的核酸序列从基因组RNA翻译,而编码结构蛋白的遗传信息可从亚基因组转录物翻译,这是一种类似于真核信使RNA的RNA分子(mRNA; Gould et al., 2010, Antiviral Res., vol. 87pp. 111-124)。感染之后,即在病毒生命周期的早期阶段, (+) 链基因组RNA直接充当信使RNA,用于翻译编码非结构多聚蛋白(nsP1234)的开放阅读框。已建议将甲病毒衍生的载体用于将外来遗传信息递送至靶细胞或靶生物体中。在简单的方法中,编码甲病毒结构蛋白的开放阅读框被编码所关注的蛋白的开放阅读框置换。基于甲病毒的反式复制系统依赖于两个单独的核酸分子上的甲病毒核苷酸序列元件:一个核酸分子编码病毒复制酶,而另一个核酸分子能够被所述复制酶反式复制(因此命名为反式复制系统)。反式复制需要在给定的宿主细胞中存在这两种核酸分子。能够被复制酶反式复制的核酸分子必须包含某些甲病毒序列元件以允许甲病毒复制酶进行识别和RNA合成。

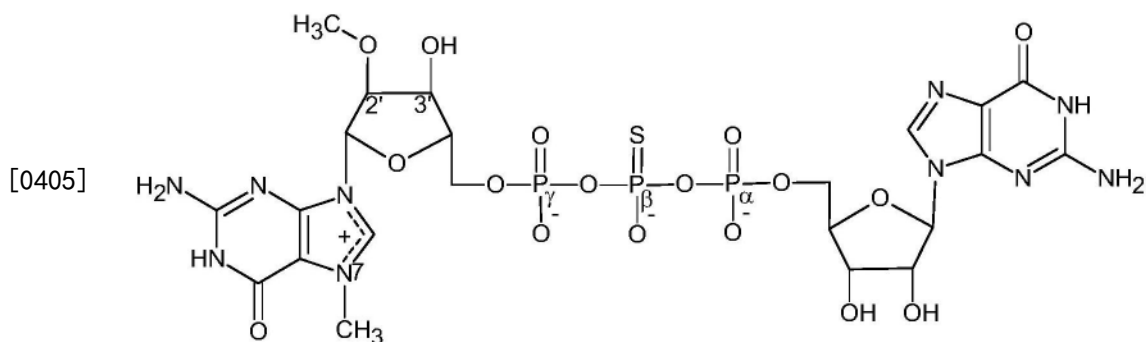
[0400] 在本公开的一些实施方案中,mRNA含有一种或多种修饰,例如,以便增加其稳定性和/或增加翻译效率和/或降低免疫原性和/或降低细胞毒性。例如,为了增加mRNA的表达,可以在编码区,即编码所表达的肽或多肽的序列内对其进行修饰,优选不改变所表达的肽或多肽的序列。这类修饰例如在WO 2007/036366和PCT/EP2019/056502中有所描述,并且包括以下:5'-帽结构;天然存在的poly(A)尾的延长或截短;5'-和/或3'-非翻译区(UTR)的改变,如引入与所述RNA的编码区无关的UTR;用合成核苷酸置换一个或多个天然存在的核苷酸;以及密码子优化(例如,改变,优选增加RNA的GC含量)。

[0401] 在一些实施方案中,mRNA包含5'-帽结构。在一些实施方案中,mRNA没有未加帽的5'-三磷酸。在一些实施方案中,mRNA可以包含常规5'-帽和/或5'-帽类似物。术语“常规5'-帽”是指在mRNA分子的5'-末端发现的帽结构,一般由鸟苷5'-三磷酸(Gppp)组成,所述鸟苷5'-三磷酸(Gppp)通过其三磷酸部分连接至mRNA的下一个核苷酸的5'-末端(即,鸟苷通过5'至5'三磷酸键连接至mRNA的其余部分)。鸟苷可以在位置N⁷甲基化(导致帽结构m⁷Gppp)。术语“5'-帽类似物”包括5'-帽,其基于常规5'-帽,但是已在m⁷鸟苷结构的2'-或3'-位置进行修饰以避免5'-帽类似物在反方向上整合(这类5'-帽类似物也称作抗反向帽类似物(ARCA))。特别优选的5'-帽类似物是在磷酸桥中的桥接和非桥接氧处具有一个或多个取代的那些,如在β-磷酸处硫代磷酸酯修饰的5'-帽类似物(如m₂^{7,2'-0}G(5')ppSp(5')G(称作beta-S-ARCA或β-S-ARCA)),如PCT/EP2019/056502所述。提供如本文所述的具有5'-帽结构的mRNA可以通过在相应的5'-帽化合物存在下体外转录DNA模板来实现,其中所述5'-帽结构共转录地掺入产生的mRNA链中,或者可以例如通过体外转录产生mRNA,并且可以使用加帽酶,例如痘苗病毒的加帽酶,将5'-帽结构转录后连接至mRNA。

[0402] 在一些实施方案中,mRNA包含5'-帽结构,其选自m₂^{7,2'-0}G(5')ppSp(5')G(特别是其D1非对映体)、m₂^{7,3'-0}G(5')ppp(5')G和m₂^{7,3'-0}Gppp(m₁^{2'-0})ApG。

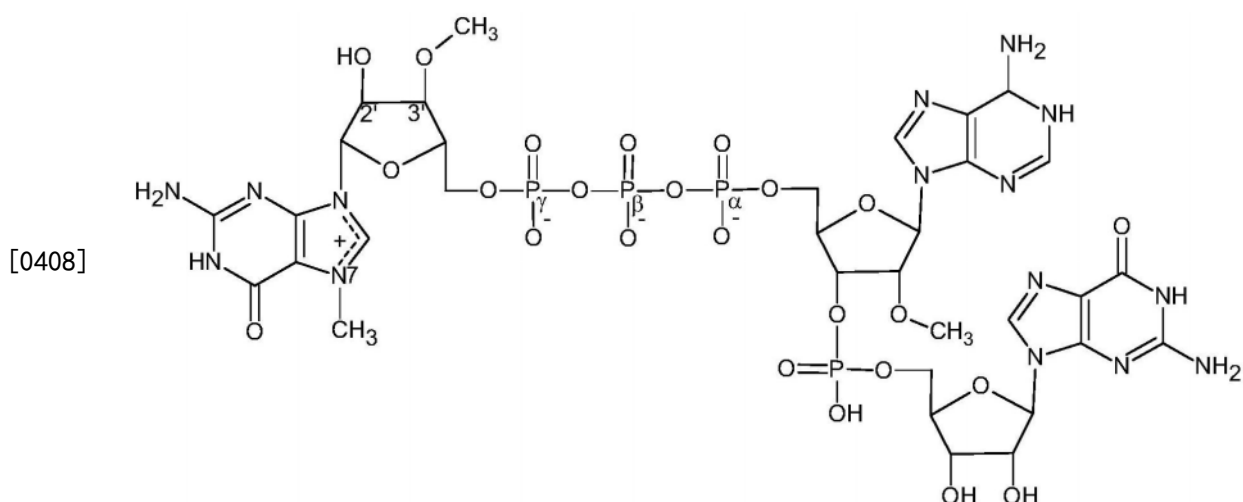
[0403] 在一些实施方案中,mRNA包含cap0、cap1或cap2,优选cap1或cap2。根据本公开,术语“cap0”表示结构“m⁷GpppN”,其中N是在2'位置带有OH部分的任何核苷。根据本公开,术语“cap1”表示结构“m⁷GpppNm”,其中Nm是在2'位置带有OCH₃部分的任何核苷。根据本公开,术语“cap2”表示结构“m⁷GpppNmNm”,其中每个Nm独立地是在2'位置带有OCH₃部分的任何核苷。

[0404] beta-S-ARCA(β-S-ARCA)的D1非对映体具有以下结构:

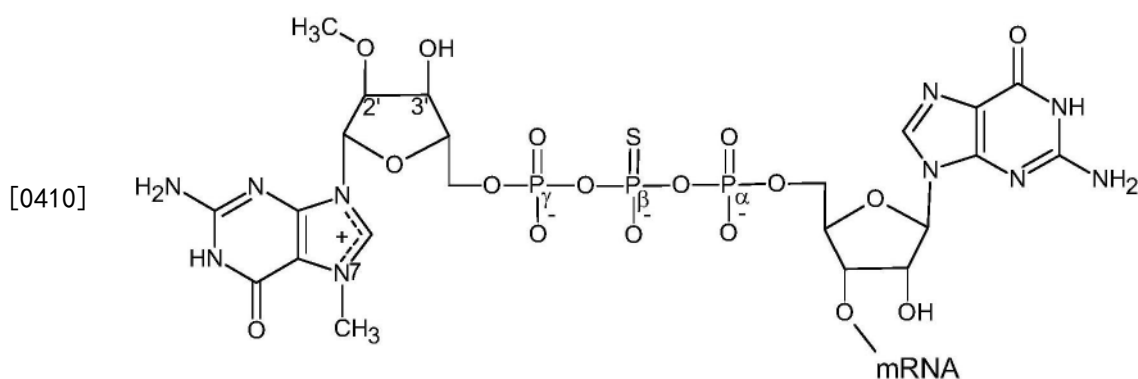


[0406] “ β -S-ARCA的D1非对映体”或“ β -S-ARCA (D1)”是 β -S-ARCA的非对映体,与 β -S-ARCA的D2非对映体(β -S-ARCA (D2))相比其在HPLC柱上首先洗脱,因此表现出较短的保留时间。HPLC优选是分析HPLC。在一些实施方案中,使用Supelcosil LC-18-TRP (优选形式:5 μ m, 4.6x 250mm)进行分离,由此可以应用1.3ml/min的流速。在一些实施方案中,使用乙酸铵中的甲醇梯度,例如,在15min内,0.05M乙酸铵,pH=5.9中甲醇的0-25%线性梯度。UV-检测(VWD)可以在260nm下进行,荧光检测(FLD)可以在280nm激发和337nm检测下进行。

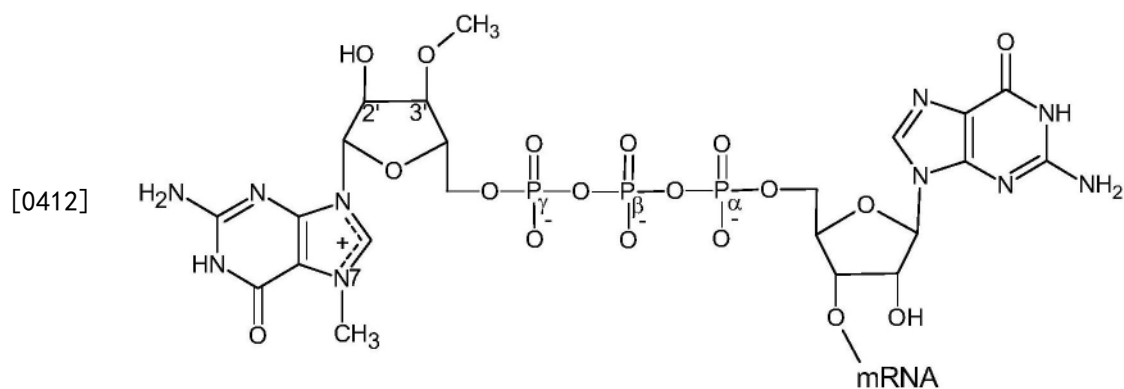
[0407] cap1的构建块5'-帽类似物 $m_2^{7,3'-0}$ Gppp($m_1^{2'-0}$)ApG (也称作 $m_2^{7,3'-0}$ G(5')ppp(5') $m_1^{2'-0}$ ApG)具有以下结构:



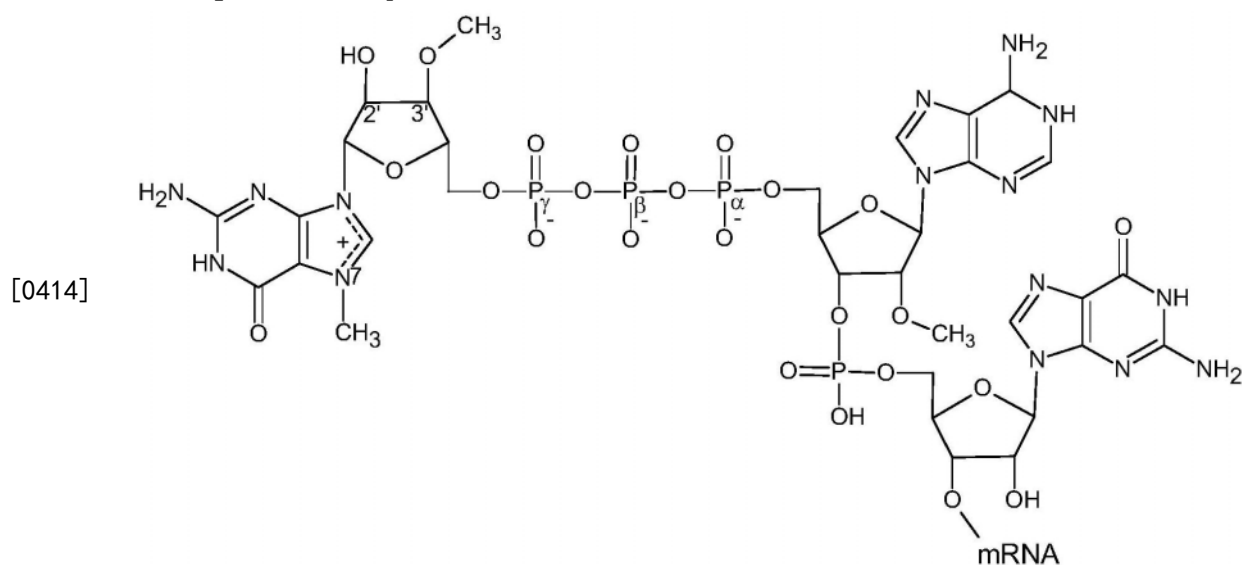
[0409] 包含 β -S-ARCA和mRNA的示例性cap0 mRNA具有以下结构:



[0411] 包含 $m_2^{7,3'-0}$ G(5')ppp(5')G和mRNA的示例性cap0 mRNA具有以下结构:



[0413] 包含 $m_2^{7,3'-0}$ Gppp($m_1^{2'-0}$)ApG和mRNA的示例性cap1 mRNA具有以下结构:



[0415] 如本文所用,术语“poly(A)尾”或“poly-A序列”是指腺苷酸残基的不间断或间断序列,其通常位于mRNA分子的3'-末端。Poly-A尾或poly-A序列是本领域技术人员已知的,并且可以在本文所述的mRNA中的3'-UTR之后。不间断的poly-A尾的特征在于连续的腺苷酸残基。在自然界中,不间断的poly-A尾是典型的。本文公开的mRNA可以具有在转录之后通过不依赖于模板的RNA聚合酶连接至mRNA的游离3'-末端的poly-A尾,或者由DNA编码并由模板依赖性RNA聚合酶转录的poly-A尾。

[0416] 已证实约120个A核苷酸的poly-A尾对转染的真核细胞中的mRNA水平以及从存在于poly-A尾上游(5')的开放阅读框翻译的蛋白水平具有有益影响(Holtkamp et al., 2006, Blood, vol. 108, pp. 4009-4017)。

[0417] poly-A尾可以具有任何长度。在一些实施方案中,poly-A尾包含、基本上由或由以下组成:至少20个、至少30个、至少40个、至少80个或至少100个以及多达500个、多达400个、多达300个、多达200个或多达150个A核苷酸,特别是约120个A核苷酸。在这种情况下,“基本上由…组成”表示poly-A尾中的大多数核苷酸,通常poly-A尾中核苷酸数量的至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%是A核苷酸,但是允许其余的核苷酸是除A核苷酸以外的核苷酸,如U核苷酸(尿苷酸)、G核苷酸(鸟苷酸)或C核苷酸(胞苷酸)。在这种情况下,“由…组成”表示poly-A尾中的所有核苷酸,即poly-A尾中100%数量的核苷酸是A核苷酸。术语“A核苷酸”或“A”是指腺苷酸。

[0418] 在一些实施方案中,基于在与编码链互补的链中包含重复的dT核苷酸(脱氧胸苷酸)的DNA模板,在RNA转录期间,例如,在制备体外转录的RNA期间,连接poly-A尾。编码poly-A尾的DNA序列(编码链)称作poly(A)盒。

[0419] 在一些实施方案中,DNA编码链中存在的poly(A)盒基本上由dA核苷酸组成,但是被四种核苷酸(dA、dC、dG和dT)的随机序列中断。这样的随机序列的长度可以为5-50、10-30或10-20个核苷酸。在WO 2016/005324 A1中公开这样的盒,其援引加入本文。WO 2016/005324 A1中公开的任何poly(A)盒都可以用于本公开。涵盖这样的poly(A)盒,其基本上由dA核苷酸组成,但是被具有均等分布的四种核苷酸(dA、dC、dG、dT)且具有例如5-50个核苷酸长度的随机序列中断,在DNA水平上在大肠杆菌(*E. coli*)中表现出质粒DNA的恒定增殖,并且在RNA水平上仍与支持RNA稳定性和翻译效率方面的有益特性相关。因此,在一些实施方案中,本文所述mRNA分子中包含的poly-A尾基本上由A核苷酸组成,但是被四种核苷酸(A、C、G、U)的随机序列中断。这样的随机序列的长度可以为5-50、10-30或10-20个核苷酸。

[0420] 在一些实施方案中,在poly-A尾的3'-末端侧翼没有除A核苷酸以外的核苷酸,即poly-A尾在其3'-末端未被A以外的核苷酸掩盖或跟随。

[0421] 在一些实施方案中,本公开中使用的mRNA包含5'-UTR和/或3'-UTR。术语“非翻译区”或“UTR”涉及DNA分子中的区域,其转录但不翻译为氨基酸序列,或者涉及RNA分子如mRNA分子中的相应区域。非翻译区(UTR)可以存在于开放阅读框的5'(上游)(5'-UTR)和/或开放阅读框的3'(下游)(3'-UTR)。如果存在,5'-UTR位于5'-末端,蛋白编码区的起始密码子的上游。5'-UTR位于5'-帽(如果存在)的下游,例如,直接与5'-帽相邻。如果存在,3'-UTR位于3'-末端,蛋白编码区的终止密码子的下游,但是术语“3'-UTR”一般不包括poly-A序列。因此,3'-UTR位于poly-A序列(如果存在)的上游,例如,直接与poly-A序列相邻。将3'-UTR掺入RNA(优选mRNA)分子的3'-非翻译区可以导致翻译效率的提高。可以通过掺入两个或更多个这样的3'-UTR(它们优选以头对尾方向排列;参见,例如,Holtkamp et al., Blood 108, 4009-4017 (2006))来实现协同效应。3'-UTR对于将其引入的RNA(例如,mRNA)可以是自体的或异源的。在某些实施方案中,3'-UTR源自珠蛋白基因或mRNA,如 $\alpha 2$ -珠蛋白、 $\alpha 1$ -珠蛋白或 β -珠蛋白,例如 β -珠蛋白,例如人 β -珠蛋白的基因或mRNA。例如,可以通过用一个或多个,例如两个拷贝的3'-UTR置换现有3'-UTR或者插入一个或多个,例如两个拷贝的3'-UTR来修饰RNA(例如,mRNA),所述3'-UTR源自珠蛋白基因,如 $\alpha 2$ -珠蛋白、 $\alpha 1$ -珠蛋白或 β -珠蛋白,例如 β -珠蛋白,例如人 β -珠蛋白。

[0422] mRNA可以具有修饰的核糖核苷酸以增加其稳定性和/或降低免疫原性和/或降低细胞毒性。例如,在一些实施方案中,本文描述mRNA中的尿苷被修饰的核苷置换(部分或完全,优选完全)。在一些实施方案中,修饰的核苷是修饰的尿苷。

[0423] 在一些实施方案中,置换尿苷的修饰的尿苷选自假尿苷(ψ)、N1-甲基-假尿苷(m1 ψ)、5-甲基-尿苷(m5U)和它们的组合。

[0424] 在一些实施方案中,置换(部分或完全,优选完全)mRNA中的尿苷的修饰的核苷可以是以下任何一种或多种:3-甲基-尿苷(m3U)、5-甲氧基-尿苷(mo5U)、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-卤代-尿苷(例如,5-碘-尿苷或5-溴-尿苷)、尿苷5-氧乙酸(cmo5U)、尿苷5-氧乙酸甲酯(mcmo5U)、5-羧甲基-尿苷(cm5U)、

1-羧甲基-假尿苷、5-羧基羟甲基-尿苷(chm5U)、5-羧基羟甲基-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)、1-乙基-假尿苷、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-氨甲酰基甲基-尿苷(ncm5U)、5-羧甲基氨基甲基-尿苷(cmm5U)、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代-尿苷(cmm5s2U)、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-尿苷(τ m5U)、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷(τ m5s2U)、1-牛磺酸甲基-4-硫代-假尿苷、5-甲基-2-硫代-尿苷(m5s2U)、1-甲基-4-硫代-假尿苷(m1s4 ψ)、4-硫代-1-甲基-假尿苷、3-甲基-假尿苷(m3 ψ)、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-去氮杂-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-去氮杂-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-羧丙基)尿苷(acp3U)、1-甲基-3-(3-氨基-3-羧丙基)假尿苷(acp3 ψ)、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)、 α -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(ψ 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-氨甲酰基甲基-2'-O-甲基-尿苷(ncm5Um)、5-羧甲基氨基甲基-2'-O-甲基-尿苷(cmm5Um)、3,2'-O-二甲基-尿苷(m3Um)、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-阿糖(ara)-尿苷、2'-F-尿苷、2'-OH-阿糖-尿苷、5-(2-甲氧羰基乙烯基)尿苷、5-[3-(1-E-丙烯基氨基)尿苷或本领域已知的任何其他修饰的尿苷。

[0425] 被假尿苷修饰(部分或完全,优选完全置换尿苷)的RNA(优选mRNA)在本文中称作“ Ψ -修饰的”,而术语“m1 Ψ -修饰的”表示RNA(优选mRNA)含有N(1)-甲基假尿苷(部分或完全,优选完全置换尿苷)。此外,术语“m5U-修饰的”表示RNA(优选mRNA)含有5-甲基尿苷(部分或完全,优选完全置换尿苷)。这类 Ψ -或m1 Ψ -或m5U-修饰的RNA与它们的未修饰形式相比通常表现出降低的免疫原性,因此在避免或最小化免疫应答诱导的应用中是优选的。

[0426] 本公开中使用的mRNA的密码子可以进一步优化,例如,以增加RNA的GC含量和/或置换在细胞(或受试者)中稀有的密码子,其中由作为所述细胞(或受试者)中的同义频繁密码子的密码子表达所关注的肽或多肽。在一些实施方案中,由本公开中使用的mRNA编码的氨基酸序列由编码序列编码,所述编码序列经过密码子优化和/或与野生型编码序列相比其G/C含量是增加的。这还包括实施方案,其中与野生型编码序列的相应序列区域相比,编码序列的一个或多个序列区域是密码子优化和/或G/C含量增加的。在一些实施方案中,密码子优化和/或G/C含量的增加优选不改变编码的氨基酸序列的序列。

[0427] 术语“密码子优化”是指改变核酸分子编码区中的密码子以反映宿主生物体的典型密码子使用,而优选不改变所述核酸分子编码的氨基酸序列。在本公开的上下文中,编码区可以是密码子优化的,以用于使用本文所述的mRNA在待治疗的受试者中的最佳表达。密码子优化是基于以下发现:翻译效率还由细胞中tRNA出现的不同频率决定。因此,可以修饰mRNA的序列,从而插入可获得频繁出现的tRNA的密码子代替“稀有密码子”。

[0428] 在一些实施方案中,与野生型RNA的相应编码序列的G/C含量相比,本文所述mRNA的编码区的鸟苷/胞嘧啶(G/C)含量增加,其中与野生型RNA编码的氨基酸序列相比,所述

mRNA编码的氨基酸序列优选是未修饰的。mRNA序列的这种修饰是基于以下事实：待翻译的任何RNA区域的序列对于该mRNA的高效翻译都很重要。具有增加的G(鸟苷)/C(胞嘧啶)含量的序列比具有增加的A(腺苷)/U(尿嘧啶)含量的序列更稳定。关于几个密码子编码同一个氨基酸(所谓的遗传密码的简并性)的事实,可以确定对于稳定性最有利的密码子(所谓的替代密码子使用)。根据mRNA编码的氨基酸,与其野生型序列相比,对于mRNA序列的修饰有各种可能性。特别地,含有A和/或U核苷酸的密码子可以通过用其他密码子取代这些密码子来修饰,所述其他密码子编码相同氨基酸但不含A和/或U或者含有较低量的A和/或U核苷酸。

[0429] 在各种实施方案中,与野生型RNA编码区的G/C含量相比,本文所述mRNA编码区的G/C含量增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少55%或甚至更多。

[0430] 上述修饰的组合,即掺入5'-帽结构,掺入poly-A序列,暴露poly-A序列,改变5'-和/或3'-UTR(如掺入一个或多个3'-UTR),用合成核苷酸置换一个或多个天然存在的核苷酸(例如,5-甲基胞苷用于胞苷和/或假尿苷(Ψ)或N(1)-甲基假尿苷(m1 Ψ)或5-甲基尿苷(m5U)用于尿苷)以及密码子优化对RNA(优选mRNA)的稳定性和翻译效率的提高具有协同影响。因此,在一些实施方案中,本公开中使用的mRNA含有上述修饰中的至少两种、至少三种、至少四种或全部五种的组合,即,(i)掺入5'-帽结构,(ii)掺入poly-A序列,暴露poly-A序列;(iii)改变5'-和/或3'-UTR(如掺入一个或多个3'-UTR);(iv)用合成核苷酸替换一个或多个天然存在的核苷酸(例如,5-甲基胞苷用于胞苷和/或假尿苷(Ψ)或N(1)-甲基假尿苷(m1 Ψ)或5-甲基尿苷(m5U)用于尿苷),以及(v)密码子优化。

[0431] 本公开的一些方面涉及将本文公开的mRNA靶向递送至某些细胞或组织。在一些实施方案中,本公开涉及靶向淋巴系统,特别是次级淋巴器官,更特别是脾。如果给药的mRNA是编码诱导免疫应答的抗原或表位的mRNA,则特别优选靶向淋巴系统,特别是次级淋巴器官,更特别是脾。在一些实施方案中,靶细胞是脾细胞。在一些实施方案中,靶细胞是抗原呈递细胞如脾中的专业(professional)抗原呈递细胞。在一些实施方案中,靶细胞是脾中的树突细胞。“淋巴系统”是循环系统的一部分,并且是免疫系统的重要部分,包含携带淋巴的淋巴管网络。淋巴系统由淋巴器官、淋巴管的传导网络和循环淋巴组成。主要或中央淋巴器官从未成熟的祖细胞产生淋巴细胞。胸腺和骨髓构成主要淋巴器官。包括淋巴结和脾在内的次要或外周淋巴器官维持成熟的幼稚淋巴细胞并启动适应性免疫应答。

[0432] 基于脂质的mRNA递送系统对肝脏具有固有的偏好。肝脏积累是由肝血管系统或脂质代谢(脂质体以及脂质或胆固醇缀合物)的不连续性质引起的。在一些实施方案中,靶器官是肝脏,靶组织是肝组织。特别地,如果希望在器官或组织中存在mRNA或者编码的肽或多肽和/或如果希望表达大量编码的肽或多肽和/或如果希望或需要全身存在编码的肽或多肽、特别是大量编码的肽或多肽,则优选递送至这样的靶组织。

[0433] 在一些实施方案中,给药本文所述的mRNA颗粒后,将至少一部分mRNA递送至靶细胞或靶器官。在一些实施方案中,将至少一部分mRNA递送至靶细胞的胞质溶胶。在一些实施方案中,mRNA是编码肽或多肽的mRNA,并且mRNA由靶细胞翻译以产生所述肽或多肽。在一些实施方案中,靶细胞是肝脏中的细胞。在一些实施方案中,靶细胞是肌细胞。在一些实施方案中,靶细胞是内皮细胞。在一些实施方案中靶细胞是肿瘤细胞或肿瘤微环境中的细胞。在一些实施方案中,靶细胞是血细胞。在一些实施方案中,靶细胞是淋巴结中的细胞。在一些

实施方案中,靶细胞是肺中的细胞。在一些实施方案中,靶细胞是血细胞。在一些实施方案中,靶细胞是皮肤中的细胞。在一些实施方案中,靶细胞是脾细胞。在一些实施方案中,靶细胞是抗原呈递细胞如脾中的专业抗原呈递细胞。在一些实施方案中,靶细胞是脾中的树突细胞。在一些实施方案中,靶细胞是T细胞。在一些实施方案中,靶细胞是B细胞。在一些实施方案中,靶细胞是NK细胞。在一些实施方案中,靶细胞是单核细胞。因此,本文所述的RNA颗粒可以用于将mRNA递送至这样的靶细胞。因此,本公开还涉及一种将mRNA递送至受试者中的靶细胞的方法,所述方法包括将本文所述的mRNA颗粒给药至受试者。在一些实施方案中,将mRNA递送至靶细胞的胞质溶胶。在一些实施方案中,mRNA是编码肽或多肽的mRNA,并且RNA由靶细胞翻译以产生所述肽或多肽。

[0434] “编码”是指多核苷酸如基因、cDNA或mRNA中特定核苷酸序列的固有特性,以便用作模板用于在生物过程中合成其他聚合物或大分子,所述聚合物或大分子具有确定的核苷酸序列(即,rRNA、tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列以及由此所致的生物学特性。因此,如果对应于基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白,则该基因编码蛋白。其核苷酸序列与mRNA序列相同且通常在序列表中提供的编码链以及用作基因或cDNA转录模板的非编码链均可以称作编码该基因或cDNA的蛋白或其他产物。

[0435] 在一些实施方案中,本公开中使用的mRNA包含编码一种或多种肽或多肽,优选药理学活性肽或多肽的核酸序列。

[0436] 在一优选实施方案中,本公开中使用的mRNA包含编码肽或多肽,优选药理学活性肽或多肽的核酸序列,并且能够表达所述肽或多肽,特别是如果被转移至细胞或受试者中。因此,在一些实施方案中,本公开中使用的mRNA含有编码肽或多肽的编码区(开放阅读框(ORF)),例如,编码药理学活性肽或多肽。在这方面,“开放阅读框”或“ORF”是一段连续的密码子,以起始密码子开始并以终止密码子结束。这种编码药理学活性肽或多肽的mRNA在本文中也称作“药理学活性mRNA”。

[0437] 根据本公开,术语“药理学活性肽或多肽”表示可以用于治疗个体的肽或多肽,其中所述肽或多肽的表达会有益于例如改善疾病的症状。优选地,药理学活性肽或多肽具有治疗或姑息特性,并且可以将其给药以改善、减轻、缓解、逆转、延迟疾病的一种或多种症状的发生或者减轻疾病的一种或多种症状的严重程度。在一些实施方案中,当以治疗有效量给药至个体时,药理学活性肽或多肽对个体的疾病状况或疾病状态具有积极或有利的影 响。药理学活性肽或多肽可以具有预防特性,并且可以用于延迟疾病的发生或者减轻这种疾病的严重程度。术语“药理学活性肽或多肽”包括完整的肽或多肽,并且还可以指其药理学活性片段。其还可以包括肽或多肽的药理学活性类似物。

[0438] 药理学活性肽和多肽的具体实例包括但不限于细胞因子、激素、粘附分子、免疫球蛋白、免疫活性化合物、生长因子、蛋白酶抑制剂、酶、受体、凋亡调节剂、转录因子、肿瘤抑制蛋白、结构蛋白、重编程因子、基因组工程蛋白和血液蛋白。

[0439] 术语“细胞因子”涉及具有约5-60kDa的分子量并参与细胞信号传导(例如,旁分泌、内分泌和/或自分泌信号传导)的蛋白。特别地,当释放时,细胞因子对其释放位置周围的细胞行为产生影响。细胞因子的实例包括淋巴因子、白介素、趋化因子、干扰素和肿瘤坏死因子(TNF)。根据本公开,细胞因子不包括激素或生长因子。细胞因子与激素的不同之处在于(i)它们通常在比激素更多变的浓度下起作用,以及(ii)一般由广泛的细胞产生(几乎

所有有核细胞都可以产生细胞因子)。干扰素通常特征在于抗病毒、抗增殖和免疫调节活性。干扰素是通过与受调节细胞表面上的干扰素受体结合来改变和调节细胞内的基因转录的蛋白,从而防止细胞内的病毒复制。干扰素可以分为两种类型。IFN- γ 是唯一的II型干扰素;其他都是I型干扰素。细胞因子的具体实例包括促红细胞生成素(EPO)、集落刺激因子(CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF)、骨形态发生蛋白(BMP)、干扰素 α (IFN α)、干扰素 β (IFN β)、干扰素 γ (IFN γ)、白介素2(IL-2)、白介素4(IL-4)、白介素10(IL-10)、白介素11(IL-11)、白介素12(IL-12)、白介素15(IL-15)和白介素21(IL-21),以及它们的变体和衍生物。

[0440] 在一些实施方案中,药学活性肽或多肽包含替代蛋白。在这些实施方案中,本公开提供一种治疗患有需要蛋白替代的病症(例如,蛋白缺乏症)的受试者的方法,包括向受试者给药如本文所述的编码替代蛋白的RNA。术语“蛋白替代”是指将蛋白(包括其功能变体)引入这种蛋白缺乏的受试者。该术语还指将蛋白引入需要或受益于提供蛋白的受试者,例如,患有蛋白不足的受试者。术语“以蛋白缺乏为特征的病症”是指任何由蛋白的缺乏或不足导致的出现病理现象的病症。这个术语涵盖蛋白折叠障碍,即构象障碍,导致无生物活性的蛋白产物。蛋白不足可以涉及传染病、免疫抑制、器官衰竭、腺体问题、放射性疾病、营养缺乏、中毒或者其他环境或外部伤害。

[0441] 术语“激素”涉及一类由腺体产生的信号传导分子,其中信号传导通常包括以下步骤:(i)在特定组织中合成激素;(ii)储存和分泌;(iii)将激素转运至其靶标;(iv)通过受体结合激素;(v)信号的中继和放大;以及(vi)激素的分解。激素与细胞因子的不同之处在于(1)激素通常以较少变化的浓度发挥作用,以及(2)一般由特定种类的细胞产生。在一些实施方案中,“激素”是肽或多肽激素,如胰岛素、加压素、催乳素、促肾上腺皮质激素(ACTH)、甲状腺激素、生长激素(如人生长激素或牛促生长素)、催产素、心房利钠肽(ANP)、胰高血糖素、生长抑素、胆囊收缩素、胃泌素和瘦蛋白。

[0442] 术语“粘附分子”涉及位于细胞表面并参与细胞与其他细胞或与胞外基质(ECM)结合的蛋白。粘附分子通常是跨膜受体,可以分为钙不依赖性(例如,整合素、免疫球蛋白超家族、淋巴细胞归巢受体)和钙依赖性(钙粘着蛋白和选择素)。粘附分子的具体实例是整合素、淋巴细胞归巢受体、选择素(例如,P-选择素)和地址素。

[0443] 整合素也参与信号转导。特别地,当配体结合时,整合素调节细胞信号传导途径,例如,跨膜蛋白激酶如受体酪氨酸激酶(RTK)的途径。这种调节可以导致细胞生长、分裂、存活或分化或者细胞凋亡。整合素的具体实例包括: $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 、 $\alpha_7\beta_1$ 、 $\alpha_L\beta_2$ 、 $\alpha_M\beta_2$ 、 $\alpha_{IIB}\beta_3$ 、 $\alpha_V\beta_1$ 、 $\alpha_V\beta_3$ 、 $\alpha_V\beta_5$ 、 $\alpha_V\beta_6$ 、 $\alpha_V\beta_8$ 和 $\alpha_6\beta_4$ 。

[0444] 术语“免疫球蛋白”或“免疫球蛋白超家族”是指参与细胞的识别、结合和/或粘附过程的分子。属于这个超家族的分子具有共同特征,它们含有称作免疫球蛋白结构域或折叠的区域。免疫球蛋白超家族的成员包括抗体(例如,IgG)、T细胞受体(TCR)、主要组织相容性复合物(MHC)分子、共受体(例如,CD4、CD8、CD19)、抗原受体辅助分子(例如,CD-3 γ 、CD3- δ 、CD-3 ϵ 、CD79a、CD79b)、共刺激或抑制分子(例如,CD28、CD80、CD86)等。

[0445] 术语“免疫活性化合物”涉及改变免疫应答的任何化合物,例如,通过诱导和/或抑制免疫细胞的成熟,诱导和/或抑制细胞因子生物合成,和/或通过刺激B细胞产生抗体来改变体液免疫。免疫活性化合物具有强效的免疫刺激活性,包括但不限于抗病毒和抗肿瘤活

性,并且还可以下调免疫应答的其他方面,例如将免疫应答从TH2免疫应答转移,这可用于治疗广泛的TH2介导的疾病。免疫活性化合物可以用作疫苗佐剂。免疫活性化合物的具体实例包括白介素、集落刺激因子(CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、促红细胞生成素、肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素、整合素、地址素、选择素、归巢受体和抗原,特别是肿瘤相关抗原、病原体相关抗原(如细菌、寄生虫或病毒抗原)、过敏原和自身抗原。免疫活性化合物可以是疫苗抗原,即接种到受试者中诱导免疫应答的抗原。

[0446] 术语“自身抗原”或“自体抗原”是指源自受试者体内的抗原(即,自身抗原也可以称作“自体的抗原”),并且针对身体的这个正常部分产生异常强烈的免疫应答。这种针对自身抗原的强烈免疫反应可能是“自身免疫疾病”的原因。

[0447] 术语“过敏原”是指一种源自受试者体外的抗原(即,过敏原也可以称作“异源抗原”),并且产生异常强烈的免疫应答,其中受试者的免疫系统击退感知到的对受试者无害的威胁。“过敏”是由这种针对过敏原的强烈免疫反应引起的疾病。过敏原通常是能够通过免疫球蛋白E(IgE)应答在特应性个体中刺激I型超敏反应的抗原。过敏原的具体实例包括源自花生蛋白(例如,Ara h 2.02)、卵清蛋白、草花粉蛋白(例如,Phl p 5)和尘螨蛋白(例如,Der p 2)的过敏原。

[0448] 术语“生长因子”是指能够刺激细胞生长、增殖、愈合和/或细胞分化的分子。通常,生长因子充当细胞之间的信号传导分子。术语“生长因子”包括与其靶细胞表面上的特异性受体结合的特定细胞因子和激素。生长因子的实例包括骨形态发生蛋白(BMP)、成纤维细胞生长因子(FGF)、血管内皮生长因子(VEGF)如VEGFA、表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子、肝配蛋白、巨噬细胞集落刺激因子、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、神经调节蛋白、神经营养蛋白(例如,脑源性神经营养因子(BDNF)、神经生长因子(NGF))、胎盘生长因子(PGF)、血小板源性生长因子(PDGF)、肾胺酶(RNLS)(抗凋亡存活因子)、T-细胞生长因子(TCGF)、血小板生成素(TPO)、转化生长因子(转化生长因子 α (TGF- α)、转化生长因子 β (TGF- β))以及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。在一些实施方案中,“生长因子”是肽或多肽生长因子。

[0449] 术语“蛋白酶抑制剂”是指抑制蛋白酶功能的分子,特别是肽或多肽。蛋白酶抑制剂可以根据被抑制的蛋白酶(例如,天冬氨酸蛋白酶抑制剂)或它们的作用机制(例如,自杀抑制剂,如丝氨酸蛋白酶抑制剂)进行分类。蛋白酶抑制剂的具体实例包括丝氨酸蛋白酶抑制剂,如 α 1-抗胰蛋白酶、抑肽酶和苯丁抑制素(bestatin)。

[0450] 术语“酶”是指加速化学反应的大分子生物催化剂。像任何催化剂一样,酶不会在其催化的反应中被消耗,并且不改变反应的平衡。与许多其他催化剂不同,酶的特异性要高得多。在一些实施方案中,酶对于受试者的体内平衡是必不可少的,例如,酶的任何功能障碍(特别地,可能由任何突变、缺失或产生减少引起的活性降低)都会导致疾病。酶的实例包括单纯疱疹病毒1型胸苷激酶(HSV1-TK)、氨基己糖苷酶、苯丙氨酸羟化酶、假胆碱酯酶和乳糖酶。

[0451] 术语“受体”是指从细胞外接收信号(特别是称作配体的化学信号)的蛋白分子。信号(例如,配体)与受体的结合引起细胞的某种应答,例如,激酶的细胞内激活。受体包括跨膜受体(如离子通道连接(离子型)受体、G蛋白连接(代谢型)受体和酶联受体)和细胞内受

体(如细胞质受体和核受体)。受体的具体实例包括类固醇激素受体、生长因子受体和肽受体(即,配体是肽的受体),如P-选择素糖蛋白配体-1(PSGL-1)。术语“生长因子受体”是指与生长因子结合的受体。

[0452] 术语“细胞凋亡调节因子”是指调节细胞凋亡,即激活或抑制细胞凋亡的分子,特别是肽或多肽。细胞凋亡调节因子可以分为两大类:调节线粒体功能的调节因子和调节胱天蛋白酶的调节因子。第一类包括蛋白(例如,BCL-2、BCL-xL),其通过防止线粒体膜电位丧失和/或促凋亡蛋白如细胞色素C释放至胞质溶胶中来保护线粒体完整性。同样属于第一类的是促进细胞色素C释放的促凋亡蛋白(例如,BAX、BAK、BIM)。第二类包括阻断胱天蛋白酶激活的凋亡蛋白抑制剂(例如,XIAP)或FLIP。

[0453] 术语“转录因子”涉及调节遗传信息从DNA到信使RNA的转录速率的蛋白,特别是通过与特定DNA序列结合来调节。转录因子可以调节整个生命中的细胞分裂、细胞生长和细胞死亡;胚胎发育期间的细胞迁移和组织;和/或响应来自细胞外的信号,如激素。转录因子含有至少一个与特定DNA序列结合的DNA-结合结构域,通常与受转录因子调节的基因相邻。转录因子的具体实例包括MECP2、FOXP2、FOXP3、STAT蛋白家族和HOX蛋白家族。

[0454] 术语“肿瘤抑制蛋白”涉及保护细胞免于在癌症道路上的迈出一步的分子,特别是肽或多肽。肿瘤抑制蛋白(通常由相应的肿瘤抑制基因编码)表现出对细胞周期调节的减弱或抑制作用和/或促进细胞凋亡。它们的功能可能是以下一种或多种:抑制对细胞周期持续至关重要的基因;将细胞周期与DNA损伤耦合(只要细胞中存在受损的DNA,就不应当发生细胞分裂);如果不可以修复受损的DNA,则启动细胞凋亡;转移抑制(例如,防止肿瘤细胞分散,阻断接触抑制的丧失以及抑制转移);以及DNA修复。肿瘤抑制蛋白的具体实例包括p53、磷酸酶和张力蛋白同系物(PTEN)、SWI/SNF(SWitch/Sucrose Non-Fermentable)、von Hippel-Lindau肿瘤抑制蛋白(pVHL)、结肠腺瘤样息肉蛋白(APC)、CD95、肿瘤发生抑制蛋白5(ST5)、肿瘤发生抑制蛋白5(ST5)、肿瘤发生抑制蛋白14(ST14)和Yippee样3(YPEL3)。

[0455] 术语“结构蛋白”是指赋予流体生物组分刚度和刚性的蛋白。结构蛋白大多是纤维状的(如胶原蛋白和弹性蛋白),但是也可以是球状的(如肌动蛋白和微管蛋白)。通常,球状蛋白作为单体是可溶的,但是聚合形成长纤维,例如,其可以构成细胞骨架。其他结构蛋白是能够产生机械力的运动蛋白(如肌球蛋白、驱动蛋白和动力蛋白),以及表面活性蛋白。结构蛋白的具体实例包括胶原蛋白、表面活性蛋白A、表面活性蛋白B、表面活性蛋白C、表面活性蛋白D、弹性蛋白、微管蛋白、肌动蛋白和肌球蛋白。

[0456] 术语“重编程因子”或“重编程转录因子”涉及分子,特别是肽或多肽,当在体细胞中任选与其他物质如其他重编程因子一起表达时,其导致所述体细胞重编程或去分化为具有干细胞特征,特别是多能性的细胞。重编程因子的具体实例包括OCT4、SOX2、c-MYC、KLF4、LIN28和NANOG。

[0457] 术语“基因组工程蛋白”涉及能够在受试者基因组中插入、缺失或置换DNA的蛋白。基因组工程蛋白的具体实例包括大范围核酸酶(meganuclease)、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)和成簇规律间隔短回文重复-CRISPR-相关蛋白9(CRISPR-Cas9)。

[0458] 术语“血液蛋白”涉及存在于受试者的血浆,特别是健康受试者的血浆中的肽或多肽。血液蛋白具有多种功能如转运(例如,白蛋白、转铁蛋白)、酶促活性(例如,凝血酶或铜

蓝蛋白)、凝血(例如,纤维蛋白原)、防御病原体(例如,补体组分和免疫球蛋白)、蛋白酶抑制剂(例如, α 1-抗胰蛋白酶)等。血液蛋白的具体实例包括凝血酶、血清白蛋白、因子VII、因子VIII、胰岛素、因子IX、因子X、组织纤溶酶原激活物、蛋白C、血管性血友病因子、抗凝血酶III、葡萄糖苷脂酶、促红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、修饰的因子VIII和抗凝剂。

[0459] 因此,在一些实施方案中,药学活性肽或多肽是(i)细胞因子,优选选自促红细胞生成素(EPO)、白介素4(IL-2)和白介素10(IL-11),更优选EPO;(ii)粘附分子,特别是整合素;(iii)免疫球蛋白,特别是抗体;(iv)免疫活性化合物,特别是抗原;(v)激素,特别是加压素、胰岛素或生长激素;(vi)生长因子,特别是VEGFA;(vii)蛋白酶抑制剂,特别是 α 1-抗胰蛋白酶;(viii)酶,优选选自单纯疱疹病毒1型胸苷激酶(HSV1-TK)、氨基己糖苷酶、苯丙氨酸羟化酶、假胆碱酯酶、胰酶和乳糖酶;(ix)受体,特别是生长因子受体;(x)细胞凋亡调节剂,特别是BAX;(xi)转录因子,特别是FOXP3;(xii)肿瘤抑制蛋白,特别是p53;(xiii)结构蛋白,特别是表面活性蛋白B;(xiv)重编程因子,例如,选自OCT4、SOX2、c-MYC、KLF4、LIN28和NANOG;(xv)基因组工程蛋白,特别是成簇的规律间隔短回文重复-CRISPR-相关蛋白9(CRISPR-Cas9);以及(xvi)血液蛋白,特别是纤维蛋白原。

[0460] 在一些实施方案中,药学活性肽或多肽包含一种或多种抗原或者一种或多种表位,即向受试者给药肽或多肽在受试者中引发针对所述一种或多种抗原或者一种或多种表位的免疫应答,这可以是治疗性的或者部分或完全保护性的。

[0461] 在一些实施方案中,mRNA编码至少一种表位。

[0462] 在一些实施方案中,表位源自肿瘤抗原。肿瘤抗原可以是“标准”抗原,其一般已知在各种癌症中表达。肿瘤抗原也可以是“新抗原”,其是个体肿瘤特异性的,并且以前尚未被免疫系统识别。新抗原或新表位可以由癌细胞基因组中的一个或多个癌症特异性突变导致氨基酸变化所致。肿瘤抗原的实例包括但不限于p53,ART-4,BAGE, β -联蛋白/m,Bcr-abL CAMEL,CAP-1,CASP-8,CDC27/m,CDK4/m,CEA,密蛋白家族的细胞表面蛋白,如CLAUDIN-6、CLAUDIN-18.2和CLAUDIN-12,c-MYC,CT,Cyp-B,DAM,ELF2M,ETV6-AML1,G250,GAGE,GnT-V,Gap 100,HAGE,HER-2/neu,HPV-E7,HPV-E6,HAST-2,hTERT(或hTRT),LAGE,LDLR/FUT,MAGE-A,优选MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A 10、MAGE-A 11或MAGE-A12,MAGE-B,MAGE-C,MART-1/Melan-A,MC1R,肌球蛋白/m,MUC1,MUM-1,MUM-2,MUM-3,NA88-A,NF1,NY-ESO-1,NY-BR-1,p190最小BCR-abL,Pml/RARa,PRAME,蛋白酶3,PSA,PSM,RAGE,RU1或RU2,SAGE,SART-1或SART-3,SCGB3A2,SCP1,SCP2,SCP3,SSX,SURVIVIN,TEL/AML1,TPI/m,TRP-1,TRP-2,TRP-2/INT2,TPTE,WT以及WT-1。

[0463] 癌症突变因每个个体而异。因此,编码新的表位(新表位)的癌症突变代表在开发疫苗组合物和免疫疗法中有吸引力的靶标。肿瘤免疫疗法的效力依赖于选择能够在宿主内诱导有效免疫应答的癌症特异性抗原和表位。RNA可以用于将患者特异性肿瘤表位递送至患者。驻留在脾中的树突细胞(DC)代表对免疫原性表位或抗原如肿瘤表位的RNA表达特别感兴趣的抗原呈递细胞。已显示使用多个表位会促进肿瘤疫苗组合物的治疗效力。肿瘤突变组(mutanome)的快速测序可以为个体化疫苗提供多个表位,所述疫苗可以由本文所述的mRNA编码,例如,作为单一多肽,其中所述表位任选被接头隔开。在本公开的一些实施方案中,mRNA编码至少一个表位、至少两个表位、至少三个表位、至少四个表位、至少五个表位、

至少六个表位、至少七个表位、至少八个表位、至少九个表位或至少十个表位。示例性实施方案包括编码至少五个表位(称作“五表位”)的mRNA和编码至少十个表位(称作“十表位”)的mRNA。

[0464] 在一些实施方案中,表位源自病原体相关抗原,特别是源自病毒抗原。在一些实施方案中,表位源自SARS-CoV-2S蛋白、其免疫原性变体、或者所述SARS-CoV-2S蛋白的免疫原性片段或其免疫原性变体。因此,在一些实施方案中,本公开中使用的mRNA编码氨基酸序列,所述氨基酸序列包含SARS-CoV-2S蛋白、其免疫原性变体、或者所述SARS-CoV-2S蛋白的免疫原性片段或其免疫原性变体。

[0465] 在本公开的一些实施方案中,抗原(如肿瘤抗原或疫苗抗原)优选作为单链、5'加帽的mRNA给药,其在进入给药所述RNA的受试者细胞时翻译为相应的蛋白。优选地,RNA含有在稳定性和翻译效率方面为RNA的最大效力优化的结构元件(5'帽、5'UTR、3'UTR、poly(A)序列)。

[0466] 在一些实施方案中, β -S-ARCA(D1)用作mRNA的5'-末端的特异性加帽结构。在一些实施方案中, $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 用作mRNA的5'-末端的特异性加帽结构。在一些实施方案中,5'-UTR序列源自人 α -珠蛋白mRNA,并且任选具有优化的“Kozak序列”以提高翻译效率。在一些实施方案中,将源自“分裂的氨基末端增强子”(AES)mRNA(称作F)和线粒体编码的12S核糖体RNA(称作I)的两个序列元件的组合(FI元件)置于编码序列和poly(A)序列之间,以确保更高的最大蛋白水平和延长的mRNA持久性。在一些实施方案中,将源自人 β -珠蛋白mRNA的两个重复的3'-UTR置于编码序列和poly(A)序列之间,以确保更高的最大蛋白水平和延长的mRNA持久性。在一些实施方案中,使用长度为110个核苷酸的poly(A)序列,其由一段30个腺苷残基,随后10个核苷酸接头序列和另外70个腺苷残基组成。设计这个poly(A)序列以增强RNA稳定性和翻译效率。

[0467] 在一些实施方案中,编码抗原(如肿瘤抗原或疫苗抗原)的mRNA在治疗以提供抗原的受试者的细胞中表达。在一些实施方案中,mRNA在受试者的细胞中瞬时表达。在一些实施方案中,mRNA是在体外转录的。在一些实施方案中,抗原的表达在细胞表面。在一些实施方案中,抗原在MHC的背景下表达和呈递。在一些实施方案中,抗原的表达是进入细胞外空间,即分泌抗原。

[0468] 抗原分子或其加工产物,例如,其片段,可以与免疫效应细胞携带的抗原受体如BCR或TCR结合,或者与抗体结合。

[0469] 根据本公开通过给药编码肽和多肽抗原的mRNA提供给受试者的肽和多肽抗原,其中所述抗原是疫苗抗原,优选在提供所述肽或多肽抗原的受试者中导致诱导免疫应答,例如,体液和/或细胞免疫应答。免疫应答优选针对靶抗原。因此,疫苗抗原可以包含靶抗原、其变体或其片段。在一些实施方案中,这样的片段或变体在免疫学上等同于靶抗原。在本公开的上下文中,术语“抗原的片段”或“抗原的变体”表示导致诱导免疫应答的试剂,所述免疫应答靶向所述抗原,即靶抗原。因此,疫苗抗原可以对应于或可以包含靶抗原,可以对应于或可以包含靶抗原的片段,或者可以对应于或可以包含与靶抗原或其片段同源的物质。因此,根据本公开,疫苗抗原可以包含靶抗原的免疫原性片段或与靶抗原的免疫原性片段同源的氨基酸序列。根据本公开的“抗原的免疫原性片段”优选涉及能够诱导针对靶抗原的免疫应答的抗原片段。所述疫苗抗原可以是重组抗原。

[0470] 术语“在免疫学上等同”表示在免疫学上等同的分子,如在免疫学上等同的氨基酸序列表现出相同或基本上相同的免疫学特性和/或发挥相同或基本上相同的免疫学效应,例如,在免疫学效应的类型方面。在本公开的上下文中,关于用于免疫的抗原或抗原变体的免疫学效应或特性,优选使用术语“在免疫学上等同”。例如,如果氨基酸序列在暴露于受试者的免疫系统时诱导具有与参考氨基酸序列反应特异性的免疫反应,则该氨基酸序列在免疫学上等同于参考氨基酸序列。

[0471] 在一些实施方案中,本公开中使用的mRNA是非免疫原性的。可以根据本公开给药编码免疫刺激剂的RNA以提供辅助作用。编码免疫刺激剂的RNA可以是标准RNA或非免疫原性RNA。

[0472] 如本文所用的术语“非免疫原性RNA”(如“非免疫原性mRNA”)是指这样的RNA,其在给药至例如哺乳动物时不会诱导免疫系统的应答,或者诱导的应答比不同之处仅在于尚未进行使非免疫原性RNA成为非免疫原性的修饰和处理的相同RNA诱导的弱,即比标准RNA(stdRNA)诱导的弱。在某些实施方案中,通过将抑制RNA介导的先天免疫受体激活的修饰的核苷掺入RNA并去除双链RNA(dsRNA),使得在本文中也称作修饰的RNA(modRNA)的非免疫原性RNA成为非免疫原性。

[0473] 为了通过掺入修饰的核苷使非免疫原性RNA(尤其是mRNA)成为非免疫原性的,可以使用任何修饰的核苷,只要其降低或抑制RNA的免疫原性。特别优选抑制RNA介导的先天免疫受体激活的修饰的核苷。在一些实施方案中,修饰的核苷包括用包含修饰的核碱基的核苷置换一个或多个尿苷。在一些实施方案中,修饰的核碱基是修饰的尿嘧啶。在一些实施方案中,包含修饰的核碱基的核苷选自3-甲基-尿苷(m^3U)、5-甲氧基-尿苷(mo^5U)、5-氮杂-尿苷、6-氮杂-尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-尿苷(s^2U)、4-硫代-尿苷(s^4U)、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羟基-尿苷(ho^5U)、5-氨基烯丙基-尿苷、5-卤代-尿苷(例如,5-碘-尿苷或5-溴-尿苷)、尿苷5-氧乙酸(cmo^5U)、尿苷5-氧乙酸甲基酯($mcmo^5U$)、5-羧甲基-尿苷(cm^5U)、1-羧甲基-假尿苷、5-羧基羟甲基-尿苷(chm^5U)、5-羧基羟甲基-尿苷甲基酯($mchm^5U$)、5-甲氧基羰基甲基-尿苷(mcm^5U)、5-甲氧基羰基甲基-2-硫代-尿苷(mcm^5s^2U)、5-氨基甲基-2-硫代-尿苷(nm^5s^2U)、5-甲基氨基甲基-尿苷(mnm^5U)、1-乙基-假尿苷、5-甲基氨基甲基-2-硫代-尿苷(mnm^5s^2U)、5-甲基氨基甲基-2-硒基-尿苷(mnm^5se^2U)、5-氨甲酰基甲基-尿苷(ncm^5U)、5-羧甲基氨基甲基-尿苷($cmnm^5U$)、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代-尿苷($cmnm^5s^2U$)、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-尿苷(τm^5U)、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷(τm^5s^2U)、1-牛磺酸甲基-4-硫代-假尿苷、5-甲基-2-硫代-尿苷(m^5s^2U)、1-甲基-4-硫代-假尿苷($m^1s^4\psi$)、4-硫代-1-甲基-假尿苷、3-甲基-假尿苷($m^3\psi$)、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-去氮杂-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-去氮杂-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(m^5D)、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-羧丙基)尿苷(acp^3U)、1-甲基-3-(3-氨基-3-羧丙基)假尿苷($acp^3\psi$)、5-(异戊烯基氨基甲基)尿苷(inm^5U)、5-(异戊烯基氨基甲基)-2-硫代-尿苷(inm^5s^2U)、 α -硫代-尿苷、2'-0-甲基-尿苷(Um)、5,2'-0-二甲基-尿苷(m^5Um)、2'-0-甲基-假尿苷(ψm)、2-硫代-2'-0-甲基-尿苷(s^2Um)、5-甲氧基羰基甲基-2'-0-甲基-尿苷(mcm^5Um)、5-氨甲酰基甲基-2'-0-甲基-尿苷(ncm^5Um)、5-羧甲基氨基甲基-2'-0-

甲基-尿苷 (cmnm⁵Um)、3,2'-O-二甲基-尿苷 (m³Um)、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-阿糖-尿苷、2'-F-尿苷、2'-OH-阿糖-尿苷、5-(2-甲氧羰基乙烯基)尿苷以及5-[3-(1-E-丙烯基氨基)尿苷。在某些实施方案中,包含修饰的核碱基的核苷是假尿苷(ψ)、N1-甲基-假尿苷(m1ψ)或5-甲基-尿苷(m5U),特别是N1-甲基-假尿苷。

[0474] 在一些实施方案中,用包含修饰的核碱基的核苷置换一个或多个尿苷包括置换至少1%、至少2%、至少3%、至少4%、至少5%、至少10%、至少25%、至少50%、至少75%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的尿苷。

[0475] 在使用T7 RNA聚合酶通过体外转录(IVT)合成mRNA的过程中,由于酶的非常规活性,产生大量的异常产物,包括双链RNA(dsRNA)。dsRNA诱导炎性细胞因子并激活效应酶,导致蛋白合成抑制。例如,可以使用无孔或多孔C-18聚苯乙烯-二乙烯基苯(PS-DVB)基质通过离子对反相HPLC从RNA如IVT RNA去除dsRNA。或者,可以使用基于酶的方法,使用特异性水解dsRNA但不水解ssRNA的大肠杆菌RNase III,从而从IVT RNA制品消除dsRNA污染物。此外,可以通过使用纤维素材料将dsRNA与ssRNA分离。在一些实施方案中,使RNA制品与纤维素材料接触,并且在允许dsRNA与纤维素材料结合且不允许ssRNA与纤维素材料结合的条件下将ssRNA与纤维素材料分离。用于提供ssRNA的合适方法公开于例如WO 2017/1822524中。

[0476] 当术语在本文中使用时,“去除(remove)”或“去除(removal)”是指将第一物质群体(如非免疫原性RNA)与第二物质群体(如dsRNA)临近性分离的特征,其中第一物质群体不必完全没有第二物质,并且第二物质群体不必完全没有第一物质。然而,与第一和第二物质的未分离的混合物相比,以去除第二物质群体为特征的第一物质群体具有可测量的较低含量的第二物质。

[0477] 在一些实施方案中,从非免疫原性RNA去除dsRNA(尤其是mRNA)包括去除dsRNA,从而非免疫原性RNA组合物中少于10%、少于5%、少于4%、少于3%、少于2%、少于1%、少于0.5%、少于0.3%或少于0.1%的RNA是dsRNA。在一些实施方案中,非免疫原性RNA(尤其是mRNA)不含或基本上不含dsRNA。在一些实施方案中,非免疫原性RNA(尤其是mRNA)组合物包含单链核苷修饰的RNA的纯化制品。例如,在一些实施方案中,单链核苷修饰的RNA(尤其是mRNA)的纯化制品基本上不含双链RNA(dsRNA)。在一些实施方案中,相对于所有其他核酸分子(DNA、dsRNA等),纯化的制品是至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少99.9%单链核苷修饰的RNA。

[0478] 在一些实施方案中,非免疫原性RNA(尤其是mRNA)在细胞中比具有相同序列的标准RNA更有效地翻译。在一些实施方案中,相对于其未修饰的对应物,翻译增强2倍。在一些实施方案中,翻译增强3倍。在一些实施方案中,翻译增强4倍。在一些实施方案中,翻译增强5倍。在一些实施方案中,翻译增强6倍。在一些实施方案中,翻译增强7倍。在一些实施方案中,翻译增强8倍。在一些实施方案中,翻译增强9倍。在一些实施方案中,翻译增强10倍。在一些实施方案中,翻译增强15倍。在一些实施方案中,翻译增强20倍。在一些实施方案中,翻译增强50倍。在一些实施方案中,翻译增强100倍。在一些实施方案中,翻译增强200倍。在一些实施方案中,翻译增强500倍。在一些实施方案中,翻译增强1000倍。在一些实施方案中,翻译增强2000倍。在一些实施方案中,系数是10-1000倍。在一些实施方案中,系数是10-100

倍。在一些实施方案中,系数是10-200倍。在一些实施方案中,系数是10-300倍。在一些实施方案中,系数是10-500倍。在一些实施方案中,系数是20-1000倍。在一些实施方案中,系数是30-1000倍。在一些实施方案中,系数是50-1000倍。在一些实施方案中,系数是100-1000倍。在一些实施方案中,系数是200-1000倍。在一些实施方案中,翻译增强任何其他显著量或量的范围。

[0479] 在一些实施方案中,非免疫原性RNA(尤其是mRNA)表现出比具有相同序列的标准RNA显著更低的先天免疫原性。在一些实施方案中,非免疫原性RNA(尤其是mRNA)表现出比其未修饰的对应物少2倍的先天免疫应答。在一些实施方案中,先天免疫原性降低3倍。在一些实施方案中,先天免疫原性降低4倍。在一些实施方案中,先天免疫原性降低5倍。在一些实施方案中,先天免疫原性降低6倍。在一些实施方案中,先天免疫原性降低7倍。在一些实施方案中,先天免疫原性降低8倍。在一些实施方案中,先天免疫原性降低9倍。在一些实施方案中,先天免疫原性降低10倍。在一些实施方案中,先天免疫原性降低15倍。在一些实施方案中,先天免疫原性降低20倍。在一些实施方案中,先天免疫原性降低50倍。在一些实施方案中,先天免疫原性降低100倍。在一些实施方案中,先天免疫原性降低200倍。在一些实施方案中,先天免疫原性降低500倍。在一些实施方案中,先天免疫原性降低1000倍。在一些实施方案中,先天免疫原性降低2000倍。

[0480] 术语“表现出显著更低的先天免疫原性”是指先天免疫原性的可检测的减少。在一些实施方案中,该术语是指减少,使得可以给药有效量的非免疫原性RNA(尤其是mRNA)而不触发可检测的先天免疫应答。在一些实施方案中,该术语是指减少,使得可以重复给药非免疫原性RNA(尤其是mRNA)而不引发足以可检测地减少非免疫原性RNA编码的蛋白生成的先天免疫应答。在一些实施方案中,减少使得可以重复给药非免疫原性RNA(尤其是mRNA)而不引发足以消除非免疫原性RNA编码的蛋白的可检测产生的先天免疫应答。

[0481] “免疫原性”是外来物质如RNA在人或其他动物体内引起免疫应答的能力。先天免疫系统是免疫系统的组成部分,其是相对非特异性和即时的。它和适应性免疫系统一起是脊椎动物免疫系统的两个主要组成部分之一。

[0482] 如本文所用,“内源”是指来自生物体、细胞、组织或系统或者在其内部产生的任何物质。

[0483] 如本文所用,术语“外源”是指从生物体、细胞、组织或系统外部引入或者在其外部产生的任何物质。

[0484] 如本文所用的术语“表达”定义为特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0485] 如本文所用,术语“连接”、“融合的”或“融合”可互换使用。这些术语是指两个或更多个元件或组件或结构域连接在一起。

[0486] 颗粒

[0487] 本文提供RNA颗粒,其包含(i)RNA, (ii)至少一种阳离子或阳离子可电离脂质,以及(iii)至少一种磷脂酰丝氨酸。在一些实施方案中,本文提供的RNA颗粒包含(i)RNA, (ii)至少一种阳离子或阳离子可电离脂质, (iii)第一磷脂,其为磷脂酰丝氨酸,以及(iv)第二磷脂。在一些实施方案中,RNA颗粒进一步包含一种或多种额外的脂质。在一些实施方案中,RNA颗粒进一步包含非离子两亲有机化合物,例如,表面活性剂。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的非离子两亲有机化合物(如聚山梨酯)水平为颗粒或

组合物中存在的总脂质的至少约5摩尔%,或至少约0.15mM。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的非离子两亲有机化合物(如聚山梨酯)水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约5摩尔%,或至少约0.15mM。

[0488] 先前已描述了不同类型的含有RNA的颗粒适合递送颗粒形式的RNA(参见,例如,Kaczmarek,J.C.et al.,2017,Genome Medicine 9,60)。对于非病毒RNA递送媒介物,RNA的纳米颗粒包裹在物理上保护RNA免于降解,并且根据特定的化学,可以辅助细胞摄取和内体逃逸。

[0489] 带正电荷的分子如聚合物和脂质与带负电荷的核酸之间的静电相互作用参与颗粒形成。这导致核酸颗粒的复合和自发形成。

[0490] 在一些实施方案中,与具有不同组分和/或组分比率的RNA颗粒相比,RNA颗粒中的组分和/或组分比率导致在例如给药至受试者如哺乳动物时颗粒内包含的RNA的表达增加。在一些实施方案中,与具有不同组分和/或组分比率的RNA颗粒相比,RNA颗粒中的组分和/或组分比率导致在例如局部给药至哺乳动物受试者(例如,瘤内或瘤周注射)时颗粒内包含的RNA的脱靶表达减少。在一些实施方案中,本文提供的RNA颗粒和/或含有RNA颗粒的组合物包含非离子两亲有机化合物,其中所述非离子两亲有机化合物以有效减少哺乳动物受试者局部给药(例如,瘤内或瘤周注射)后RNA的脱靶表达的量存在。在一些实施方案中,脱靶表达是RNA在没有注射RNA颗粒的器官中的表达。在一些实施方案中,脱靶表达是肝脏中的表达。在一些实施方案中,受试者是人。

[0491] 在本公开的上下文中,术语“颗粒”涉及由分子或分子复合物形成的结构化实体,特别是形成颗粒的化合物。优选地,颗粒含有由一种或多种类型的两亲物质(例如,两亲脂质)形成的包膜(例如,一个或多个层或薄层)。在这个上下文中,表述“两亲物质”表示物质具有亲水和亲脂特性。包膜还可以包含不必是两亲的额外物质(例如,额外的脂质)。因此,颗粒可以是单层或多层结构,其中构成一个或多个层或薄层的物质包含一种或多种类型的两亲物质(特别是选自两亲脂质),任选与不必是两亲的额外物质(例如,额外的脂质)组合。在一些实施方案中,术语“颗粒”涉及微米或纳米大小的结构,如微米或纳米大小的致密结构。根据本公开,术语“颗粒”包括脂质复合物颗粒(LPX)和脂质纳米颗粒(LNP)。根据本公开,术语“颗粒”包括纳米颗粒。

[0492] “RNA颗粒”可以用于将RNA递送至所关注的靶位点(例如,细胞、组织、器官等)。RNA颗粒可以由包含至少一种阳离子或阳离子可电离脂质或脂质样物质的脂质形成。不受任何理论的束缚,据信阳离子或阳离子可电离脂质或脂质样物质与RNA组合在一起形成聚集体,并且这种聚集导致胶体稳定的颗粒。本文所述的RNA颗粒包括基于脂质纳米颗粒(LNP)和基于脂质复合物(LPX)的制剂。

[0493] 一般来说,脂质复合物(LPX)可通过混合两种水相获得,即包含RNA的相和包含脂质分散体的相。在一些实施方案中,脂质相包含脂质体。

[0494] 在一些实施方案中,脂质体是自我封闭的单层或多层囊泡颗粒,其中层包含脂质双层,封装的内腔包含水相。使用脂质体形成纳米颗粒的先决条件是所需混合物中的脂质能够在应用的水性环境中形成层状(双层)相。

[0495] 在一些实施方案中,脂质体是包含单层或多层磷脂双层的球形囊泡,包裹水性核心(在本文中也称作水性内腔)。它们可以由具有极性头部(亲水)基团和非极性尾部(疏水)

基团的材料制备而成。在一些实施方案中,配制设计用于递送核酸的脂质体中采用的阳离子脂质具有两亲性,并且由带正电荷的(阳离子)胺头基通过甘油连接至碳链或胆固醇衍生物组成。

[0496] 在一些实施方案中,脂质复合物是基于多层脂质体的制剂,其由阳离子脂质体与RNA的静电相互作用形成。在一些实施方案中,形成的脂质复合物具有独特的分子内部排列,这是由脂质体结构转化为紧密的RNA-脂质复合物所引起的。在一些实施方案中,这些制剂的特征在于对RNA的包裹性差,对RNA的包埋不完全。

[0497] 在一些实施方案中,LPX颗粒包含两亲脂质,特别是阳离子或阳离子可电离的两亲脂质,以及如本文所述的RNA(尤其是mRNA)。在一些实施方案中,带正电荷的脂质体(由一种或多种两亲脂质,特别是阳离子或阳离子可电离的两亲脂质制成)和带负电荷的核酸(尤其是mRNA)之间的静电相互作用导致核酸脂质复合物颗粒的复合和自发形成。带正电荷的脂质体一般可以使用阳离子或阳离子可电离的两亲脂质如DODMA以及额外的脂质如DOPE合成。在一些实施方案中,RNA(尤其是mRNA)脂质复合体颗粒是纳米颗粒。

[0498] 一般来说,脂质纳米颗粒(LNP)可通过将水相中的RNA与包含有机溶剂如乙醇的相中的脂质直接混合而获得。在这种情况下,脂质或脂质混合物可以用于颗粒形成,它们在水中不会形成层状(双层)相。

[0499] 在一些实施方案中,LNP包含以下或由以下组成:阳离子/可电离脂质和辅助脂质如磷脂、胆固醇和/或聚乙二醇(PEG)脂质。在一些实施方案中,在本文所述的RNALNP中,mRNA与占据LNP中心核心的可电离脂质结合。在一些实施方案中,PEG脂质与磷脂一起形成LNP的表面。在一些实施方案中,表面包含双层。在一些实施方案中,胆固醇和带电荷和不带电荷形式的可电离脂质可以分布在整个LNP中。

[0500] 在一些实施方案中,RNA(例如,mRNA)可以与如本文所述的颗粒非共价结合。在一些实施方案中,RNA(尤其是mRNA)可以粘附至颗粒的外表面(表面RNA(尤其是表面mRNA))和/或可以包含在颗粒中(包裹的RNA(尤其是包裹的mRNA))。

[0501] 在一些实施方案中,本文所述颗粒的大小(如直径)在约10至约2000nm的范围内,如至少约15nm(例如,至少约20nm、至少约25nm、至少约30nm、至少约35nm、至少约40nm、至少约45nm、至少约50nm、至少约55nm、至少约60nm、至少约65nm、至少约70nm、至少约75nm、至少约80nm、至少约85nm、至少约90nm、至少约95nm或至少约100nm)和/或至多1900nm(例如,至多约1900nm、至多约1800nm、至多约1700nm、至多约1600nm、至多约1500nm、至多约1400nm、至多约1300nm、至多约1200nm、至多约1100nm、至多约1000nm、至多约950nm、至多约900nm、至多约850nm、至多约800nm、至多约750nm、至多约700nm、至多约650nm、至多约600nm、至多约550nm或至多约500nm),如在约20至约1500nm的范围内,如约30至约1200nm、约40至约1100nm、约50至约1000、约60至约900nm、约70至800nm、约80至700nm、约90至600nm、或者约50至500nm或约100至500nm,如在10至1000nm、15至500nm、20至450nm、25至400nm、30至350nm、40至300nm、50至250nm、60至200nm或70至150nm的范围内。

[0502] 在一些实施方案中,本文所述的颗粒(例如,LNP和LPX)的平均直径在一些实施方案中从约50nm至约1000nm、从约50nm至约800nm、从约50nm至约700nm、从约50nm至约600nm、从约50nm至约500nm、从约50nm至约450nm、从约50nm至约400nm、从约50nm至约350nm、从约50nm至约300nm、从约50nm至约250nm、从约50nm至约200nm、从约100nm至约1000nm、从约

100nm至约800nm、从约100nm至约700nm、从约100nm至约600nm、从约100nm至约500nm、从约100nm至约450nm、从约100nm至约400nm、从约100nm至约350nm、从约100nm至约300nm、从约100nm至约250nm、从约100nm至约200nm、从约150nm至约1000nm、从约150nm至约800nm、从约150nm至约700nm、从约150nm至约600nm、从约150nm至约500nm、从约150nm至约450nm、从约150nm至约400nm、从约150nm至约350nm、从约150nm至约300nm、从约150nm至约250nm、从约150nm至约200nm、从约200nm至约1000nm、从约200nm至约800nm、从约200nm至约700nm、从约200nm至约600nm、从约200nm至约500nm、从约200nm至约450nm、从约200nm至约400nm、从约200nm至约350nm、从约200nm至约300nm或从约200nm至约250nm。

[0503] 在一些实施方案中,本文所述的RNA颗粒是纳米颗粒。术语“纳米颗粒”涉及包含如本文所述的RNA(尤其是mRNA)以及至少一种阳离子或阳离子可电离脂质的纳米大小的颗粒,其中颗粒的所有三个外部尺寸为纳米级,即至少约1nm且低于约1000nm。优选地,颗粒的大小是它的直径。

[0504] 本文所述的RNA颗粒(尤其是mRNA颗粒)可以呈现出小于约0.5、小于约0.4、小于约0.3、小于约0.2、小于约0.1或小于约0.05的多分散性指数(PDI)。举例来说,RNA颗粒可以呈现出在约0.01至约0.4或约0.1至约0.3范围内的多分散性指数。

[0505] 关于RNA脂质颗粒(尤其是mRNA颗粒),N/P比给出脂质中的氮基团与RNA中的磷酸基团数量的比率。它与电荷比率有关,因为氮原子(取决于pH)通常带正电荷,而磷酸基团带负电荷。当存在电荷平衡时,N/P比取决于pH。脂质制剂通常以大于4最多12的N/P比形成,因为认为带正电荷的纳米颗粒有利于转染。在这种情况下,认为RNA与纳米颗粒完全结合。

[0506] 本文所述的RNA颗粒(尤其是mRNA颗粒)可以使用广泛的方法制备,其可以包括从至少一种阳离子或阳离子可电离脂质获得胶体,并且将所述胶体与RNA混合以获得RNA颗粒。

[0507] 如本文所用的术语“胶体”涉及一种均匀混合物,其中分散的颗粒不会沉淀。混合物中的不溶性颗粒是微观的,粒径在1和1000纳米之间。混合物可以称为胶体或胶体悬浮液。有时术语“胶体”仅指混合物中的颗粒而不是整个悬浮液。

[0508] 为了制备包含至少一种阳离子或阳离子可电离脂质的胶体,常规用于制备脂质体囊泡并适当调整的方法可适用于本文。制备脂质体囊泡的最常用方法有以下基本阶段:(i)脂质在有机溶剂中的溶解,(ii)所得溶液的干燥,以及(iii)干燥脂质的水合(使用各种水性介质)。

[0509] 在膜水合方法中,首先将脂质溶于合适的有机溶剂中,然后干燥以在烧瓶底部产生薄膜。使用适当的水性介质将获得的脂质膜水合以产生脂质体分散体。此外,可以包括额外的缩小步骤。

[0510] 反相蒸发是用于制备脂质体囊泡的膜水合的可选方法,其包括在水相和含有脂质的有机相之间形成油包水乳液。为了系统均质化,需要对这种混合物进行简短的超声处理。在减压下去除有机相产生乳状凝胶,其随后变为脂质体悬浮液。

[0511] 术语“乙醇注射技术”是指一个过程,其中通过针头将包含脂质的乙醇溶液快速注射至水性溶液中。这个行为将脂质分散在整个溶液中,并且促进脂质结构形成,例如脂质囊泡形成如脂质体形成。一般来说,本文所述的RNA(尤其是mRNA)脂质复合物颗粒可通过将RNA(尤其是mRNA)添加至胶体脂质体分散体来获得。在一些实施方案中,利用乙醇注射技

术,如下形成这种胶体脂质体分散体:在搅拌下将包含脂质如阳离子或阳离子可电离脂质(如DODMA)和额外脂质的乙醇溶液注射至水性溶液中。在一些实施方案中,本文所述的RNA(尤其是mRNA)脂质复合物颗粒无需挤出步骤即可获得。

[0512] 术语“挤出(extruding)”或“挤出(extrusion)”是指产生具有固定横截面轮廓的颗粒。特别地,其是指颗粒的缩小,由此迫使颗粒通过具有限定孔的过滤器。

[0513] 具有不含有机溶剂特征的其他方法也可以根据本公开用于制备胶体。

[0514] 在一些实施方案中,LNP包含四种组分:可电离阳离子脂质,中性脂质如磷脂,类固醇如胆固醇和聚合物缀合脂质。在一些实施方案中,LNP可以通过将溶于乙醇的脂质与水性缓冲液中的RNA快速混合来制备。虽然本文所述的RNA颗粒可以包含聚合物缀合脂质如PEG脂质,但本文还提供不包含聚合物缀合脂质如PEG脂质的RNA颗粒。

[0515] 在一些实施方案中,本文所述的包含RNA以及至少一种阳离子或阳离子可电离脂质的LNP是通过以下步骤制备的:(a)制备含有水和缓冲系统的RNA溶液;(b)制备包含阳离子或阳离子可电离脂质以及一种或多种额外脂质(如果存在)的乙醇溶液;以及(c)将根据(a)制备的RNA溶液与根据(b)制备的乙醇溶液混合,从而制备包含LNP的制剂。在步骤(c)之后,可以进行选自稀释和过滤的一个或多个步骤,如切向流过滤。

[0516] 在一些实施方案中,本文所述的包含RNA以及至少一种阳离子或阳离子可电离脂质的LNP是通过以下步骤制备的:(a')在水相中制备阳离子或阳离子可电离脂质与一种或多种额外脂质(如果存在)的脂质体或胶体制品;(b')制备含有水和缓冲系统的RNA溶液;以及(c')将根据(a')制备的脂质体或胶体制品与根据(b')制备的RNA溶液混合。在步骤(c')之后,可以进行选自稀释和过滤的一个或多个步骤,如切向流过滤。

[0517] 本公开描述颗粒,其包含RNA(尤其是mRNA)以及至少一种与RNA缔合形成RNA颗粒的阳离子或阳离子可电离脂质,以及包含这类颗粒的组合物。RNA颗粒可以包含通过非共价相互作用以不同形式与颗粒复合的RNA。本文所述的颗粒不是病毒颗粒,特别不是感染性病毒颗粒,即它们不能病毒式地感染细胞。

[0518] 合适的阳离子或阳离子可电离脂质是那些形成RNA颗粒的脂质,并且被涵盖在术语“颗粒形成组分”或“颗粒形成剂”定义下。术语“颗粒形成组分”或“颗粒形成剂”涉及与RNA缔合形成RNA颗粒的任何组分。这类组分包括可以是RNA颗粒的一部分的任何组分。

[0519] 在一些实施方案中,RNA颗粒(尤其是mRNA颗粒)包含一种以上的RNA分子,其中RNA分子的分子参数可以彼此相似或不同,例如关于摩尔质量或基本结构元件如分子结构、加帽、编码区或其他特征。

[0520] 在微粒制剂中,有可能将每种RNA物质分别配制为单独的微粒制剂。在这种情况下,每种单独的微粒制剂会包含一种RNA物质。单个微粒制剂可以作为单独的实体存在,例如在单独的容器中。这类制剂可通过分别提供每种RNA物质(通常每种以含有RNA的溶液形式)连同颗粒形成剂,从而允许形成颗粒来获得。各自的颗粒会只含有在形成颗粒时提供的特定RNA物质(单独的微粒制剂)。在一些实施方案中,组合物如药物组合物包含一种以上单独的颗粒制剂。各自的药物组合物称作混合微粒制剂。根据本发明的混合微粒制剂可通过分别形成单独的微粒制剂,然后混合单独的微粒制剂的步骤获得。通过混合的步骤,可获得包含含有RNA颗粒的混合群体的制剂。单独的微粒群体可以一起在一个容器中,其包含单独的微粒制剂的混合群体。或者,有可能将药物组合物的所有RNA物质一起配制为组合的微粒

制剂。这类制剂可通过提供所有RNA物质的组合制剂(通常是组合溶液)连同颗粒形成剂,从而允许形成颗粒来获得。与混合微粒制剂相反,组合微粒制剂通常包含颗粒,所述颗粒包含一种以上的RNA物质。在组合微粒组合物中,不同的RNA物质通常一起存在于单个颗粒中。

[0521] 阳离子可电离脂质

[0522] 本文所述的RNA颗粒包含至少一种阳离子或阳离子可电离脂质作为颗粒形成剂。本文中预期使用的阳离子或阳离子可电离脂质包括任何能够静电结合核酸的阳离子或阳离子可电离脂质(包括脂质样物质)。在一些实施方案中,本文中预期使用的阳离子或阳离子可电离脂质可以与核酸缔合,例如通过与核酸形成复合物或者形成其中包封或包裹核酸的囊泡。

[0523] 如本文所用,“阳离子脂质”是指具有净正电荷的脂质或脂质样物质。阳离子脂质通过静电相互作用结合带负电荷的核酸。一般来说,阳离子脂质具有亲脂性部分,如固醇、酰基链、二酰基或更多个酰基链,并且脂质的头基通常携带正电荷。

[0524] 在一些实施方案中,阳离子脂质仅在某些pH下,特别是在酸性pH下具有净正电荷,而在不同的、优选更高的pH如生理pH下,其优选没有净正电荷,优选没有电荷,即,其是中性的。与在生理pH下保持阳离子状态的颗粒相比,据认为这种可电离的行为通过帮助内体逃逸和降低毒性来增强效力。

[0525] 如本文所用,“阳离子可电离脂质”是指具有净正电荷或中性的脂质或脂质样物质,即非永久阳离子的。因此,取决于溶解阳离子可电离脂质的组合物的pH,阳离子可电离脂质是带正电荷的或中性的。为了本公开的目的,除非与环境矛盾,否则术语“阳离子脂质”涵盖阳离子可电离脂质。

[0526] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质包含头基,所述头基包括至少一个例如在生理条件下带正电荷或能够质子化的氮原子(N)。

[0527] 阳离子或阳离子可电离脂质的实例包括但不限于N,N-二甲基-2,3-二油氧基丙胺(DODMA)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane, DOTAP); 1,2-二-0-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(1,2-di-0-octadecenyl-3-trimethylammonium propane, DOTMA)、3-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨甲酰基)胆固醇(3-(N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl)cholesterol, DC-Chol)、二甲基双十八烷基铵(dimethyldioctadecylammonium, DDAB); 1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium-propane, DODAP); 1,2-二酰氧基-3-二甲基铵丙烷(1,2-diacyloxy-3-dimethylammonium propane); 1,2-二烷氧基-3-二甲基铵丙烷(1,2-dialkyloxy-3-dimethylammonium propane); 双十八烷基二甲基氯化铵(dioctadecyldimethyl ammonium chloride, DODAC)、1,2-二硬脂酰氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(1,2-distearoyloxy-N,N-dimethyl-3-aminopropane, DSDMA)、2,3-二(十四烷氧基)丙基-(2-羟乙基)-二甲基氮鎓(2,3-di(tetradecoxy)propyl-(2-hydroxyethyl)-dimethylazanium, DMRIE)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, DMEPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-3-三甲基铵丙烷(1,2-dimyristoyl-3-trimethylammonium propane, DMTAP)、1,2-二油氧基丙基-3-二甲基-羟乙基溴化铵(1,2-dioleyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethyl ammonium bromide, DORIE)和2,3-二油酰氧基-N-[2(精胺羧酰胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙三氟乙酸

铵(2,3-dioleoyloxy-N-[2(spermine carboxamide)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanamium trifluoroacetate,DOSPA)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(1,2-dilinoleyloxy-N,N-dimethylaminopropane,DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(1,2-dilinenyloxy-N,N-dimethylaminopropane,DLenDMA)、双十八烷基氨基甘氨酸精胺(dioctadecylamidoglycyl spermine,DOGS)、3-二甲基氨基-2-(胆甾-5-烯-3- β -氧基丁烷-4-氧基)-1-(顺式,顺式-9,12-十八碳二烯氧基)丙烷(3-dimethylamino-2-(cholest-5-en-3-beta-oxybutan-4-oxy)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxy)propane,CLinDMA)、2-[5'-(胆甾-5-烯-3- β -氧基)-3'-氧杂戊氧基]-3-二甲基-1-(顺式,顺式-9',12'-十八碳二烯氧基)丙烷(2-[5'-(cholest-5-en-3-beta-oxy)-3'-oxapentoxy]-3-dimethyl-1-(cis,cis-9',12'-octadecadienoxy)propane,CpLinDMA)、N,N-二甲基-3,4-二油基氧基苄胺(N,N-dimethyl-3,4-dioleyloxybenzylamine,DMOBA)、1,2-N,N'-二油基氨甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(1,2-N,N'-dioleylcarbamyl-3-dimethylaminopropane,D0carbDAP)、2,3-二亚油酰氧基-N,N-二甲基丙胺(2,3-Dilinoleyloxy-N,N-dimethylpropylamine,DLinDAP)、1,2-N,N'-二亚油基氨甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(1,2-N,N'-Dilinoleylcarbamyl-3-dimethylaminopropane,DLincarbDAP)、1,2-二亚油酰基氨甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(1,2-Dilinoleoylcarbamyl-3-dimethylaminopropane,DLinCDAP)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(2,2-dilinoleyl-4-dimethylaminomethyl-[1,3]-dioxolane,DLin-K-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(2,2-dilinoleyl-4-dimethylaminoethyl-[1,3]-dioxolane,DLin-K-XTC2-DMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(2,2-dilinoleyl-4-(2-dimethylaminoethyl)-[1,3]-dioxolane,DLin-KC2-DMA)、三十七烷基-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯(heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl-4-(dimethylamino)butanoate,DLin-MC3-DMA)、N-(2-羟乙基)-N,N-二甲基-2,3-双(十四烷氧基)-1-溴化丙铵(N-(2-Hydroxyethyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(tetradecyloxy)-1-propanaminium bromide,DMRIE)、(±)-N-(3-氨基丙基)-N,N-二甲基-2,3-双(顺式-9-十四烯氧基)-1-溴化丙铵((±)-N-(3-aminopropyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(cis-9-tetradecenyloxy)-1-propanaminium bromide,GAP-DMORIE)、(±)-N-(3-氨基丙基)-N,N-二甲基-2,3-双(十二烷氧基)-1-溴化丙铵((±)-N-(3-aminopropyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(dodecyloxy)-1-propanaminium bromide,GAP-DLRIE)、(±)-N-(3-氨基丙基)-N,N-二甲基-2,3-双(十四烷氧基)-1-溴化丙铵((±)-N-(3-aminopropyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(tetradecyloxy)-1-propanaminium bromide,GAP-DMRIE)、N-(2-氨基乙基)-N,N-二甲基-2,3-双(十四烷氧基)-1-溴化丙铵(N-(2-Aminoethyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(tetradecyloxy)-1-propanaminium bromide, β AE-DMRIE)、N-(4-羧基苄基)-N,N-二甲基-2,3-双(油酰氧基)丙烷-1-铵(N-(4-carboxybenzyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(oleoyloxy)propan-1-aminium,DOBAQ)、2-({8-[(3 β)-胆固醇-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(2-({8-[(3 β)-cholest-5-en-3-yloxy]octyl}oxy)-N,N-dimethyl-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-yloxy]propan-1-amine,辛基-CLinDMA)、1,2-二肉豆蔻酰基-3-二甲基铵-丙烷(1,2-dimyristoyl-3-dimethylammonium-propane,DMDAP)、1,2-二棕榈酰基-3-二甲基铵-丙

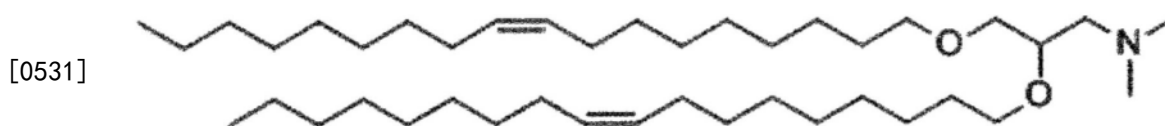
烷(1,2-dipalmitoyl-3-dimethylammonium-propane,DPDAP)、N1-[2-((1S)-1-[(3-氨基丙基)氨基]-4-[二(3-氨基-丙基)氨基]丁基甲酰氨基)乙基]-3,4-二[油氧基]-苯甲酰胺(N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropyl)amino]-4-[di(3-amino-propyl)amino]butylcarboxamido)ethyl]-3,4-di[oleoyloxy]-benzamide,MVL5)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine,DOEPC)、2,3-双(十二烷氧基)-N-(2-羟乙基)-N,N-二甲基丙烷-1-溴化铵(2,3-bis(dodecyloxy)-N-(2-hydroxyethyl)-N,N-dimethylpropan-1-aminium bromide,DLRIE)、N-(2-氨基乙基)-N,N-二甲基-2,3-双(十四烷基氧基)丙烷-1-溴化铵(N-(2-aminoethyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(tetradecyloxy)propan-1-aminium bromide,DMORIE)、二((Z)-壬-2-烯-1-基)8,8'-(((2(二甲基氨基)乙基)硫代)羰基)氮杂二基)二辛酸酯(di((Z)-non-2-en-1-yl)8,8'-(((2(dimethylamino)ethyl)thio)carbonyl)azanediyl)dioctanoate,ATX)、N,N-二甲基-2,3-双(十二烷氧基)丙-1-胺(N,N-dimethyl-2,3-bis(dodecyloxy)propan-1-amine,DLDMA)、N,N-二甲基-2,3-双(十四烷氧基)丙-1-胺(N,N-dimethyl-2,3-bis(tetradecyloxy)propan-1-amine,DMDMA)、二((Z)-壬-2-烯-1-基)-9-((4-(二甲基氨基丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(Di((Z)-non-2-en-1-yl)-9-((4-(dimethylaminobutanoyl)oxy)heptadecanedioate,L319)、N-十二烷基-3-((2-十二烷基氨甲酰基-乙基)-{2-[(2-十二烷基氨甲酰基-乙基)-2-[(2-十二烷基氨甲酰基-乙基)-[2-(2-十二烷基氨甲酰基-乙基)-氨基]-乙基氨基]丙酰胺(N-Dodecyl-3-((2-dodecylcarbamoyl-ethyl)-{2-[(2-dodecylcarbamoyl-ethyl)-2-[(2-dodecylcarbamoyl-ethyl)-[2-(2-dodecylcarbamoyl-ethylamino)-ethyl]-amino}-ethylamino)propionamide,lipidoid 98N12-5)、1-[2-[双(2-羟基十二烷基)氨基]乙基]-[2-[4-[2-[双(2-羟基十二烷基)氨基]乙基]哌嗪-1-基]乙基]氨基]十二烷-2-醇(1-[2-[bis(2-hydroxydodecyl)amino]ethyl]-[2-[4-[2-[bis(2-hydroxydodecyl)amino]ethyl]piperazin-1-yl]ethyl]amino)dodecan-2-ol,lipidoid C12-200)。

[0528] 在各种不同的实施方案中,阳离子可电离脂质选自N,N-二甲基-2,3-二油氧基丙胺(DODMA)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)、三十七烷基-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和4-((二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氨基)氧基)-N,N-二甲基-4-氧代丁-1-胺(DPL-14)。在一些实施方案中,阳离子可电离脂质是DODMA。

[0529] 阳离子可电离脂质的其他实例包括但不限于3-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨甲酰基)胆固醇(DC-Chol)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP);1,2-二酰氧基-3-二甲基铵丙烷;1,2-二烷氧基-3-二甲基铵丙烷、1,2-二硬脂酰氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DSDMA)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、双十八烷基氨基甘氨酸精胺(DOGS)、3-二甲基氨基-2-(胆甾-5-烯-3-β-氧基丁烷-4-氧基)-1-(顺式,顺式-9,12-十八碳二烯氧基)丙烷(CLinDMA)、2-[5'-(胆甾-5-烯-3-β-氧基)-3'-氧杂戊氧基]-3-二甲基-1-(顺式,顺式-9',12'-十八碳二烯氧基)丙烷(CpLinDMA)、N,N-二甲基-3,4-二油基氧基苄胺(DMOBA)、1,2-N,N'-二油基氨甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(DOcarbDAP)、2,3-二亚油酰氧基-N,N-二甲基丙胺(DLinDAP)、1,2-N,N'-二亚油基氨甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLincarbDAP)、1,2-二亚油酰基氨甲酰基-3-

二甲基氨基丙烷(DLinCDAP)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-XTC2-DMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、三十七烷基-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA)、2-({8-[(3 β)-胆固醇-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(辛基-CLinDMA)、1,2-二肉豆蔻酰基-3-二甲基铵-丙烷(DMDAP)、1,2-二棕榈酰基-3-二甲基铵-丙烷(DPDAP)、N1-[2-((1S)-1-[(3-氨基丙基)氨基]-4-[二(3-氨基-丙基)氨基]丁基甲酰氨基)乙基]-3,4-二[油氧基]-苯甲酰胺(MVL5)、二((Z)-壬-2-烯-1-基)8,8'-(((2(二甲基氨基)乙基)硫代)羰基)氮杂二基)二辛酸酯(ATX)、N,N-二甲基-2,3-双(十二烷基氧基)丙-1-胺(DLDMA)、N,N-二甲基-2,3-双(十四烷基氧基)丙-1-胺(DMDMA)、二((Z)-壬-2-烯-1-基)-9-((4-(二甲基氨基丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319)、N-十二烷基-3-((2-十二烷基氨基甲酰基-乙基)-{2-[(2-十二烷基氨基甲酰基-乙基)-2-{(2-十二烷基氨基甲酰基-乙基)-[2-(2-十二烷基氨基甲酰基-乙基氨基)-乙基]-氨基}-乙基氨基)丙酰胺(lipidoid 98N12-5)、1-[2-[双(2-羟基十二烷基)氨基]乙基]-[2-[4-[2-[双(2-羟基十二烷基)氨基]乙基]哌嗪-1-基]乙基]氨基]十二烷-2-醇(lipidoid C12-200)。

[0530] DODMA是具有叔胺头基的可电离阳离子脂质。DODMA的结构可以表示如下：



[0532] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质可以占颗粒中存在的总脂质的约10摩尔%至约95摩尔%、约20摩尔%至约95摩尔%、约20摩尔%至约90摩尔%、约30摩尔%至约90摩尔%、约40摩尔%至约90摩尔%或约40摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约60摩尔%。

[0533] 额外的脂质

[0534] 本文所述的颗粒还可以包含除阳离子或阳离子可电离脂质(在本文中也统称为阳离子脂质)以外的脂质(包括脂质样物质),即非阳离子脂质(包括非阳离子或非阳离子可电离脂质或脂质样物质)。阴离子和中性脂质或脂质样物质在本文中统称为非阳离子脂质。通过添加除阳离子或阳离子可电离脂质以外的其他疏水部分如胆固醇和脂质来优化RNA颗粒的制剂,可以增强颗粒稳定性和RNA递送的效力。

[0535] 术语“脂质”和“脂质样物质”在本文中广泛定义为包含一个或多个疏水部分或基团以及任选还包含一个或多个亲水部分或基团的分子。包含疏水部分和亲水部分的分子也常表示为两亲物。脂质通常不溶或难溶于水,但是可溶于许多有机溶剂。在水性环境中,两亲性质允许分子自组装为有组织的结构和不同的相。这些相之一由脂质双层组成,因为它们存在于水性环境中的囊泡、多层/单层脂质体或膜中。可以通过包含非极性基团来赋予疏水性,所述非极性基团包括但不限于长链饱和和不饱和脂肪烃基团以及被一个或多个芳香、脂环或杂环基团取代的这类基团。亲水基团可以包含极性和/或带电荷的基团,并且包括碳水化合物、磷酸根、羧酸根、硫酸根、氨基、巯基、硝基、羟基和其他类似基团。

[0536] 如本文所用,术语“疏水”是指在水性溶液中基本上不互溶或不溶的任何分子、部分或基团。术语疏水基团包括具有至少6个碳原子的烃。疏水基团可以具有官能团(例如,

醚、酯、卤化物等)以及碳和氢以外的原子,只要该基团满足在水性溶液中基本上不互溶或不溶的条件。

[0537] 术语“烃”包括如本文定义的烷基、烯基或炔基。应当理解烷基、烯基或炔基中的一个或多个氢可以被其他原子取代,例如,卤素、氧或硫。除非另有说明,否则碳氢化合物基团还可以包括环状(烷基、烯基或炔基)基团或芳基,前提是碳氢化合物的整体极性保持相对非极性。

[0538] 术语“烷基”是指饱和的线性或支化的单价烃部分,其可以具有6-30个,通常6-20个,通常6-18个碳原子。示例性非极性烷基包括但不限于己基、癸基、十二烷基、十四烷基、十六烷基、十八烷基等。

[0539] 术语“烯基”是指具有至少一个碳碳双键的线性或支化的单价烃部分,其中总碳原子可以是6-30个,通常6-20个,通常6-18个。

[0540] 术语“炔基”是指具有至少一个碳碳三键的线性或支化的单价烃部分,其中总碳原子可以是6-30个,通常6-20个,通常6-18个。炔基可以任选具有一个或多个碳碳双键。

[0541] 如本文所用,术语“两亲”是指具有极性部分和非极性部分的分子。通常,两亲化合物具有连接至长疏水尾的极性头。在一些实施方案中,极性部分可溶于水,而非极性部分不溶于水。此外,极性部分可以具有形式上的正电荷或形式上的负电荷。或者,极性部分可以具有形式上的正电荷和负电荷,并且可以是两性离子或内盐。为了本公开的目的,两亲化合物可以是但不限于一种或多种天然或非天然脂质和脂质样化合物。

[0542] 术语“脂质样物质”、“脂质样化合物”或“脂质样分子”涉及在结构和/或功能上与脂质相关但在严格意义上可能不视为脂质的物质,特别是两亲物质。例如,该术语包括在水性环境中存在于囊泡、多层/单层脂质体或膜中时能够形成两亲层的化合物,并且包括表面活性剂或者具有亲水和疏水部分的合成化合物。一般来说,该术语是指分子,其包含具有不同结构组织的亲水和疏水部分,其可以与脂质结构组织相似或不同。能够自发整合至细胞膜中的脂质样化合物的实例包括功能性脂质构建体如合成的功能-间隔子-脂质构建体(FSL)、合成的功能-间隔子-固醇构建体(FSS)以及人工两亲分子。脂质一般呈圆柱形。两条烷基链占据的面积与极性头基占据的面积相似。脂质作为单体溶解度低,倾向于聚集成不溶于水的平面双层。传统的表面活性剂一般呈圆锥形。亲水头基倾向于比线性烷基链占据更多的分子空间。在一些实施方案中,表面活性剂倾向于聚集成水溶性的球形或椭圆形胶束。虽然脂质也具有与表面活性剂相同的一般结构-极性亲水头基和非极性疏水尾-但脂质与表面活性剂的不同之处在于单体的形状、溶液中形成的聚集体的类型以及聚集所需的浓度范围。如本文所用,术语“脂质”解释为涵盖脂质和脂质样物质,除非本文另有说明或明显与上下文矛盾。

[0543] 在一些实施方案中,本文提供的颗粒或组合物包含非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的非离子两亲有机化合物水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约5摩尔%,或至少约0.15mM。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的非离子两亲有机化合物水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约20摩尔%,或至少约0.6mM。

[0544] 可以包括在两亲层中的两亲化合物的具体实例包括但不限于磷脂、氨基脂质和鞘酯。

[0545] 一般来说,脂质可以分为8类:脂肪酸、甘油酯、甘油磷脂、鞘脂、糖脂、聚酮(源自酮酰亚基的缩合)、固醇脂质和异戊烯醇(prenol)脂质(源自异戊二烯亚基的缩合)。尽管有时将术语“脂质”用作脂肪的同义词,但脂肪是称作甘油三酯的脂质亚组。脂质还涵盖分子如脂肪酸和它们的衍生物(包括甘油三酯、甘油二酯、单甘油酯和磷脂),以及类固醇,即含有固醇的代谢物如胆固醇或其衍生物。胆固醇衍生物的实例包括但不限于胆甾烷醇、胆甾烷酮、胆甾烯酮、粪固醇、胆固醇基-2'-羟乙基醚、胆固醇基-4'-羟丁基醚、生育酚及其衍生物,以及它们的混合物。

[0546] 脂肪酸或脂肪酸残基是由以羧酸基团终止的烃链形成的一组多样化分子;这种排列赋予分子极性、亲水性末端,以及不溶于水的非极性、疏水性末端。通常长度为4-24个碳的碳链可以是饱和或不饱和的,并且可以连接至含有氧、卤素、氮和硫的官能团。如果脂肪酸含有双键,则可能存在顺式或反式几何异构现象,这会显著影响分子的构型。顺式双键导致脂肪酸链弯曲,这种作用与链中更多的双键复合。脂肪酸类别中的其他主要脂质类别是脂肪酯和脂肪酰胺。

[0547] 甘油酯包括单、二和三取代的甘油,最著名的是甘油的脂肪酸三酯,称作甘油三酯。词语“三酰甘油”有时与“甘油三酯”同义使用。在这些化合物中,甘油的三个羟基通常被不同脂肪酸各自酯化。甘油酯的其他亚类由糖基甘油代表,其特征存在于存在一个或多个通过糖苷键连接至甘油的糖残基。

[0548] 甘油磷脂是两亲分子(含有疏水区和亲水区),其含有甘油核心,所述甘油核心通过酯键连接至两个脂肪酸衍生的“尾部”,并且通过磷酸酯键连接至一个“头部”基团。通常称作磷脂(尽管鞘磷脂也归类为磷脂)的甘油磷脂的实例是磷脂酰胆碱(也称作PC、GPCCho或卵磷脂)、磷脂酰乙醇胺(PE或GPEtn)和磷脂酰丝氨酸(PS或GPSer)。

[0549] 鞘脂是一个复杂的化合物家族,其享有共同结构特征,鞘氨醇碱骨架。哺乳动物中的主要鞘氨醇碱通常称作鞘氨醇。神经酰胺(N-酰基-鞘氨醇碱)是鞘氨醇碱衍生物的主要亚类,其具有酰胺连接的脂肪酸。脂肪酸通常是饱和或单不饱和的,具有16-26个碳原子的链长度。哺乳动物的主要磷酸鞘酯(phosphosphingolipid)是鞘磷脂(神经酰胺磷酸胆碱),而昆虫主要含有神经酰胺磷酸乙醇胺,真菌则具有植物神经酰胺磷酸肌醇和含有甘露糖的头基。鞘糖脂是一个多样化的分子家族,其包含一个或多个通过糖苷键连接至鞘氨醇碱的糖残基。这些的实例是简单和复杂的鞘糖脂如脑苷脂和神经节苷脂。

[0550] 固醇脂质,如胆固醇及其衍生物,或者生育酚及其衍生物,与甘油磷脂和鞘磷脂一起是膜脂质的重要组分。

[0551] 糖脂描述其中脂肪酸直接连接至糖骨架,形成与膜双层相容的结构的化合物。在糖脂中,单糖取代甘油酯和甘油磷脂中存在的甘油骨架。最熟知的糖脂是革兰氏阴性细菌中脂多糖的脂质A组分的酰化葡萄糖胺前体。典型的脂质A分子是葡萄糖胺的二糖,其衍生有多达七条脂肪-酰基链。在大肠杆菌生长中需要的最小脂多糖是Kdo2-脂质A,用两个3-脱氧-D-甘露糖-辛酮糖酸(Kdo)残基糖基化的葡萄糖胺的六酰化二糖。

[0552] 聚酮是通过经典酶以及和脂肪酸合成酶享有机械特征的迭代和多模块酶聚合乙酰基和丙酰基亚基合成的。它们包含大量来自动物、植物、细菌、真菌和海洋来源的次级代谢物和天然产物,并且具有很大的结构多样性。许多聚酮是环状分子,其骨架通常通过糖基化、甲基化、羟基化、氧化或其他过程进一步修饰。

[0553] 根据本公开,脂质和脂质样物质可以是阳离子、阴离子或中性的。中性脂质或脂质样物质在所选pH下以不带电荷或中性的两性离子形式存在。

[0554] 可以将一种或多种额外的脂质掺入本文所述的颗粒,其可能影响或不影响RNA颗粒的总电荷。在一些实施方案中,一种或多种额外的脂质是非阳离子脂质或脂质样物质。非阳离子脂质可以包含例如一种或多种阴离子脂质和/或中性脂质。如本文所用,“阴离子脂质”是指在所选pH下带负电荷的任何脂质。如本文所用,“中性脂质”是指在所选pH下以不带电荷或中性的两性离子形式存在的多种脂质物质中的任一种。

[0555] 在一些实施方案中,本文所述的RNA颗粒(尤其是包含mRNA的颗粒)包含阳离子或阳离子可电离脂质以及一种或多种额外的脂质。

[0556] 不希望受理论束缚,与一种或多种额外的脂质的量相比,阳离子或阳离子可电离脂质的量可以影响重要的RNA颗粒特征,如电荷、粒径、稳定性、组织选择性和RNA的生物活性。因此,在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与一种或多种额外的脂质的摩尔比为约10:0至约1:9、约4:1至约1:2、约4:1至约1:1、约3:1至约1:1或约3:1至约2:1。

[0557] 在一些实施方案中,本文所述的RNA颗粒(尤其是包含mRNA的颗粒)中包含的一种或多种额外的脂质包含以下一种或多种:中性脂质、类固醇及其组合。

[0558] 在一些实施方案中,一种或多种额外的脂质包含中性脂质,其是磷脂。在一些实施方案中,磷脂选自磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酸、磷脂酰丝氨酸和鞘磷脂。可以使用的具体磷脂包括但不限于磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酸、磷脂酰丝氨酸或鞘磷脂。这类磷脂特别包括二酰基磷脂酰胆碱,如二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、双十五酰基磷脂酰胆碱、二月桂酰基磷脂酰胆碱、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二花生酰基磷脂酰胆碱(DAPC)、双二十二碳酰基磷脂酰胆碱(DBPC)、双二十三碳酰基磷脂酰胆碱(DTPC)、双二十四酰基磷脂酰胆碱(DLPC)、棕榈酰油酰基-磷脂酰胆碱(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-胆甾烯基半琥珀酰基-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)和磷脂酰乙醇胺,特别是二酰基磷脂酰乙醇胺,如二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、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-磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二月桂酰基-磷脂酰乙醇胺(DLPE)、二植酰基-磷脂酰乙醇胺(DPyPE)、1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPG)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸-(1'-rac-甘油)(DPPG)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(POPE)、N-棕榈酰基-D-赤型-鞘氨醇磷酰胆碱(SM),以及具有不同疏水链的其他磷脂酰乙醇胺脂质。在一些实施方案中,中性脂质选自DSPC、DOPC、DMPC、DPPC、POPC、DOPE、DOPG、DPPG、POPE、DPPE、DMPE、DSPE和SM。在一些实施方案中,中性脂质选自DSPC、DPPC、DMPC、DOPC、POPC、DOPE和SM。在一些实施方案中,中性脂质是DOPE。

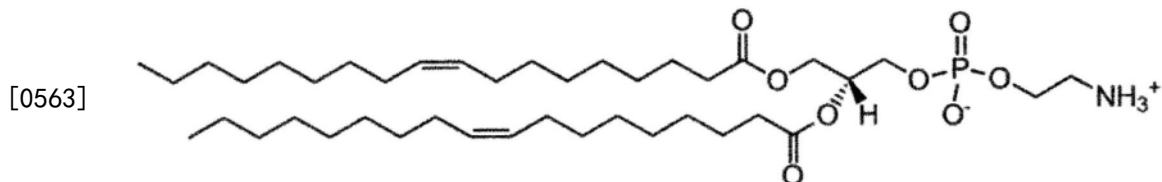
[0559] 在一些实施方案中,额外的脂质包含以下之一:(1)磷脂,(2)胆固醇或其衍生物;或者(3)磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物。胆固醇衍生物的实例包括但不限于胆甾烷醇、胆甾烷酮、胆甾烯酮、粪固醇、胆固醇基-2'-羟乙基醚、胆固醇基-4'-羟丁基醚、生育酚及其衍生物,以及它们的混合物。

[0560] 因此,在一些实施方案中,本文所述的RNA颗粒(尤其是包含mRNA的颗粒)包含(1)

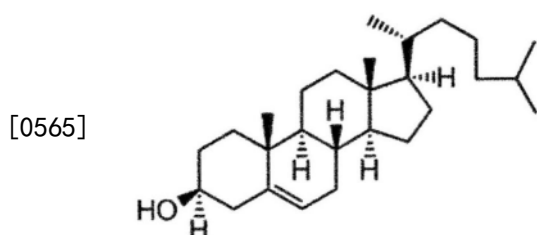
阳离子或阳离子可电离脂质,以及磷脂如DOPE,或者(2)阳离子或阳离子可电离脂质以及磷脂如DOPE和胆固醇。

[0561] 在一些实施方案中,本文所述的RNA颗粒(尤其是包含mRNA的颗粒)包含(1)DODMA和DOPE,或者(2)DODMA、DOPE和胆固醇。

[0562] DOPE是中性磷脂。DOPE的结构可以表示如下:



[0564] 胆固醇的结构可以表示如下:



[0566] 在一些实施方案中,本文所述的颗粒不包含聚合物缀合脂质如聚乙二醇化脂质。术语“聚乙二醇化脂质”是指包含脂质部分和聚乙二醇部分的分子。聚乙二醇化脂质是本领域已知的。

[0567] 在一些实施方案中,额外的脂质(例如,一种或多种磷脂和/或胆固醇)可以占颗粒中存在的总脂质的约0摩尔%至约90摩尔%、约0摩尔%至约80摩尔%、约2摩尔%至约80摩尔%、约5摩尔%至约80摩尔%、约5摩尔%至约60摩尔%、约5摩尔%至约50摩尔%、约7.5摩尔%至约50摩尔%或约10摩尔%至约40摩尔%。在一些实施方案中,额外的脂质(例如,一种或多种磷脂和/或胆固醇)占颗粒中存在的总脂质的约10摩尔%、约15摩尔%或约20摩尔%。

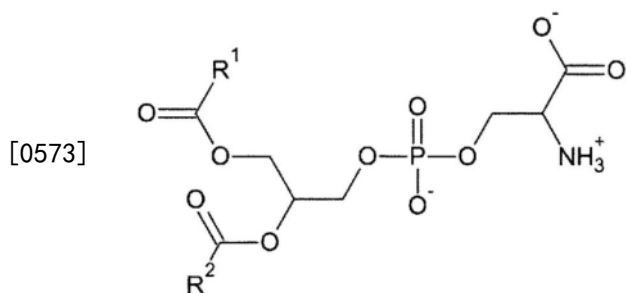
[0568] 在一些实施方案中,额外的脂质包含以下混合物:(i)磷脂如DOPE;以及(ii)胆固醇及其衍生物。在一些实施方案中,磷脂如DOPE与胆固醇或其衍生物的摩尔比为约9:0至约1:10、约2:1至约1:4、约1:1至约1:4或约1:1至约1:3。

[0569] 磷脂酰丝氨酸

[0570] 本文所述的RNA颗粒包含一种或多种磷脂酰丝氨酸。这类颗粒进一步包含一种或多种阳离子或阳离子可电离脂质以及任选存在的一种或多种额外的脂质。

[0571] 术语“磷脂酰丝氨酸”涉及磷脂,更具体的说是甘油磷脂,其由两个以酯键连接至甘油的第一和第二碳的脂肪酸以及通过磷酸二酯键连接至甘油的第三碳的丝氨酸组成。如本文所用的术语“磷脂酰丝氨酸”包括磷脂酰基-L-丝氨酸。

[0572] 在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸是式(I)的化合物:



[0574] 其中 R^1 和 R^2 各自独立地是C2至C43支化或未支化的无环烷基或无环烯基。在不同的实施方案中, R^1 和 R^2 相同或不同。

[0575] 在一些实施方案中, R^1 和 R^2 各自独立地是C13至C43支化或未支化的无环烷基或无环烯基,连同它们相邻的羰基对应于C14至C44饱和或不饱和脂肪酸残基,如C14至C24饱和或不饱和脂肪酸残基。在一些实施方案中, R^1 和 R^2 是C13至C23支化或未支化的无环烷基或无环烯基,连同它们相邻的羰基是C14至C24饱和或不饱和脂肪酸残基。

[0576] 在各种实施方案中, R^1 和 R^2 连同它们相邻的羰基是饱和或不饱和脂肪酸残基,其中衍生脂肪酸残基的脂肪酸选自:辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、山嵛酸(behenic acid)、二十四酸(lignoceric acid)、二十六酸(cerotic acid)、肉豆蔻油酸(myristoleic acid)、棕榈油酸(palmitoleic acid)、十六碳烯酸(sapienic acid)、油酸、反油酸(elaidic acid)、异油酸(vaccenic acid)、亚油酸、反亚油酸(linoelaidic acid)、 α -亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、芥酸和二十二碳六烯酸。在一些实施方案中, R^1 和 R^2 连同它们相邻的羰基都衍生自油酸。

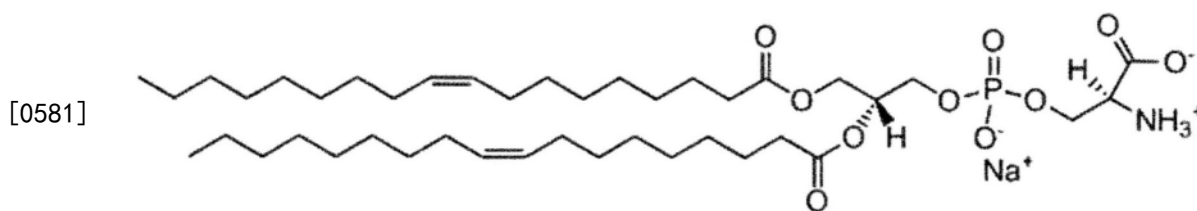
[0577] 如本文所用的术语“磷脂酰丝氨酸”还包括溶血磷脂酰丝氨酸,其涉及磷脂酰丝氨酸的衍生物,其中一个或两个酰基衍生物已通过水解去除。

[0578] 在不同的实施方案中,磷脂酰丝氨酸包含二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)、1,2-二辛酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(08:0PS)、1,2-二癸酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(10:0PS)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(12:0PS)、二肉豆蔻酰基磷脂酰丝氨酸(DMPS)、二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸(DPPS)、1,2-双十七烷酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(17:0PS)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(18:0PS)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(POPS)、1-硬脂酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(SOPS)、1-棕榈酰基-2-亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(PLenPS)、1-棕榈酰基-2-花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(16:0-20:4PS)、1-棕榈酰基-2-二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(16:0-22:6PS)、1-硬脂酰基-2-亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(18:0-18:2PS)、1-硬脂酰基-2-花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(18:0-20:4PS)、1-硬脂酰基-2-二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(18:0-22:6PS)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(18:2PS)、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(20:4PS)、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(22:6PS)、1-十三烷酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(13:0Lyso PS)、1-(10Z-十七碳烯酰基)-2-羟基-sn-甘油-3-[磷酸-L-丝氨酸](17:1Lyso PS)、1-棕榈酰基-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(16:0Lyso PS)、1-油酰基-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(18:1Lyso PS)、1-硬脂酰基-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(18:0Lyso PS)、脑PS、脑lyso PS、大豆PS或它们

的混合物。

[0579] 一种特别优选的磷脂酰丝氨酸是1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(DOPS)。

[0580] DOPS的结构可以表示如下：



[0582] 在某些情况下,磷脂酰丝氨酸可以占颗粒中存在的总脂质的约0.5摩尔%至约80摩尔%、约1摩尔%至约70摩尔%、约2摩尔%至约70摩尔%、约2摩尔%至约60摩尔%、约2摩尔%至约50摩尔%、约2摩尔%至约40摩尔%、约2摩尔%至约30摩尔%、约5摩尔%至约20摩尔%或约7.5摩尔%至约15摩尔%。在某些情况下,磷脂酰丝氨酸可以占颗粒中存在的总脂质的约10摩尔%。

[0583] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与磷脂酰丝氨酸的摩尔比为约10:1至约1:1、约8:1至约1:1、约6:1至约2:1或约4:1至约2:1。

[0584] RNA-脂质颗粒

[0585] 在一些方面,提供一种RNA颗粒,其包含:

[0586] (i) RNA,

[0587] (ii) 至少一种阳离子或阳离子可电离脂质,以及

[0588] (iii) 至少一种磷脂酰丝氨酸。

[0589] 在一些实施方案中, RNA颗粒进一步包含至少一种额外的脂质。在一些实施方案中,额外的脂质选自中性脂质、类固醇及其组合。在一些实施方案中,额外的脂质包含中性脂质。在一些实施方案中,额外的脂质包含磷脂。在一些实施方案中,额外的脂质包含胆固醇或胆固醇衍生物。在一些实施方案中,额外的脂质包含磷脂和胆固醇或胆固醇衍生物的混合物。在一些实施方案中,额外的脂质包含DOPE、胆固醇或者DOPE和胆固醇的混合物。

[0590] 在一些实施方案中, RNA颗粒包含阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质。

[0591] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约10摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约15摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约20摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约25摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约30摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约35摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约40摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约45摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约50摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约55摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中

存在的总脂质的至少约60摩尔%。

[0592] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约10摩尔%至约95摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约20摩尔%至约95摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约20摩尔%至约90摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约30摩尔%至约90摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约40摩尔%至约90摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约40摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约50摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约50摩尔%至约70摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约60摩尔%。

[0593] 在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸占颗粒中存在的总脂质的约0.5摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸占颗粒中存在的总脂质的约1摩尔%至约70摩尔%。在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约70摩尔%。在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约60摩尔%。在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约50摩尔%。在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约40摩尔%。在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约20摩尔%。在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约15摩尔%。在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸占颗粒中存在的总脂质的约7.5摩尔%至约15摩尔%。在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸占颗粒中存在的总脂质的约10摩尔%。

[0594] 在一些实施方案中,额外的脂质占颗粒中存在的总脂质的约0摩尔%至约90摩尔%。在一些实施方案中,额外的脂质占颗粒中存在的总脂质的约0摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,额外的脂质占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,额外的脂质占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,额外的脂质占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约70摩尔%。在一些实施方案中,额外的脂质占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约60摩尔%。在一些实施方案中,额外的脂质占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约50摩尔%。在一些实施方案中,额外的脂质占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约40摩尔%。在一些实施方案中,额外的脂质占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,额外的脂质占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约20摩尔%。在一些实施方案中,额外的脂质占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约15摩尔%。在一些实施方案中,额外的脂质占颗粒中存在的总脂质的约7.5摩尔%至约15摩尔%。在一些实施方案中,额外的脂质占颗粒中存在的总脂质的约10摩尔%。

[0595] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与额外的脂质的摩尔比为2-9.5:0.2-8。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与额外的脂质的摩尔比为2-9:0.5-

8. 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与额外的脂质的摩尔比为3-9:0.5-7。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与额外的脂质的摩尔比为4-9:0.5-6。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与额外的脂质的摩尔比为4-8:0.5-5。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与额外的脂质的摩尔比为5-8:0.5-4。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与额外的脂质的摩尔比为5-7:0.5-3。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与额外的脂质的摩尔比为5-7:0.5-2。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与额外的脂质的摩尔比为5-7:0.5-1.5。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与额外的脂质的摩尔比为约6:约1。

[0596] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为2-9.5:0.2-7:0.2-8。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为2-9:0.2-6:0.5-8。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为3-9:0.2-5:0.5-7。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为4-9:0.2-4:0.5-6。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为4-8:0.2-3:0.5-5。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为5-8:0.5-3:0.5-4。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为5-7:0.5-3:0.5-3。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为5-7:0.5-2:0.5-3。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为5-7:0.5-2:0.5-2。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为5-7:0.5-1.5:0.5-1.5。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为约6:约1:约1。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为约6:约1:约1.2-1.8。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为约6:约1:约1.2。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为约6:约1:约1.7。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和额外的脂质的摩尔比为约6:约1:约1.8。

[0597] 在一些方面,提供一种RNA颗粒,其包含:

[0598] (i) RNA,

[0599] (ii) 至少一种阳离子或阳离子可电离脂质,

[0600] (iii) 第一磷脂,其为磷脂酰丝氨酸,以及

[0601] (iv) 第二磷脂。

[0602] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质包含DODMA。在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸包含DOPS。在一些实施方案中,第二磷脂包含DOPE。

[0603] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约10摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约15摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约20摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约25摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质

至约20摩尔%。在一些实施方案中,第二磷脂占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约15摩尔%。在一些实施方案中,第二磷脂占颗粒中存在的总脂质的约7.5摩尔%至约15摩尔%。在一些实施方案中,第二磷脂占颗粒中存在的总脂质的约10摩尔%。

[0607] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与第二磷脂的摩尔比为2-9.5:0.2-8。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与第二磷脂的摩尔比为2-9:0.5-8。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与第二磷脂的摩尔比为3-9:0.5-7。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与第二磷脂的摩尔比为4-9:0.5-6。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与第二磷脂的摩尔比为4-8:0.5-5。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与第二磷脂的摩尔比为5-8:0.5-4。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与第二磷脂的摩尔比为5-7:0.5-3。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与第二磷脂的摩尔比为5-7:0.5-2。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与第二磷脂的摩尔比为5-7:0.5-1.5。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与第二磷脂的摩尔比为约6:约1。

[0608] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为2-9.5:0.2-7:0.2-8。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为2-9:0.2-6:0.5-8。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为3-9:0.2-5:0.5-7。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为4-9:0.2-4:0.5-6。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为4-8:0.2-3:0.5-5。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为5-8:0.5-3:0.5-4。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为5-7:0.5-3:0.5-3。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为5-7:0.5-2:0.5-3。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为5-7:0.5-2:0.5-2。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为5-7:0.5-1.5:0.5-1.5。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为约6:约1:约1。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为约6:约1:约1.2-1.8。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为约6:约1:约1.2。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为约6:约1:约1.7。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和第二磷脂的摩尔比为约6:约1:约1.8。

[0609] 在一些方面,提供一种RNA颗粒,其包含:(i)RNA,(ii)N,N-二甲基-2,3-二油氧基丙胺(DODMA),和(iii)二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)。

[0610] 在一些实施方案中,RNA颗粒进一步包含二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

[0611] 在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的至少约10摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的至少约15摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的至少约20摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的至少约25摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的至少约30摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的至少约35摩尔%。在一些实施方案中,DODMA

些实施方案中,DODMA与DOPE的摩尔比为5-7:0.5-3。在一些实施方案中,DODMA与DOPE的摩尔比为5-7:0.5-2。在一些实施方案中,DODMA与DOPE的摩尔比为5-7:0.5-1.5。在一些实施方案中,DODMA与DOPE的摩尔比为约6:约1。

[0616] 在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为2-9:0.2-7:0.2-8。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为2-9:0.2-6:0.5-8。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为3-9:0.2-5:0.5-7。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为4-9:0.2-4:0.5-6。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为4-8:0.2-3:0.5-5。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为5-8:0.5-3:0.5-4。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为5-7:0.5-3:0.5-3。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为5-7:0.5-2:0.5-3。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为5-7:0.5-2:0.5-2。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为5-7:0.5-1.5:0.5-1.5。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.2-1.8。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.2。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.7。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.8。

[0617] 在一些方面,提供一种包含RNA、阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的RNA颗粒。

[0618] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约10摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约15摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约20摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约25摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约30摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约35摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约40摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约45摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约50摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约55摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的至少约60摩尔%。

[0619] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约10摩尔%至约95摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约20摩尔%至约95摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约20摩尔%至约90摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约30摩尔%至约90摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约40摩尔%至约90摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约40摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约50摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约50摩尔%至约70摩尔%。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质占颗粒中存在的总脂质的约60

摩尔%。

[0620] 在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约0.5摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约1摩尔%至约70摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约70摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约60摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约50摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约40摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约20摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约15摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约7.5摩尔%至约15摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约10摩尔%。

[0621] 在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约0.5摩尔%至约90摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约1摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约70摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约60摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约50摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约40摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约20摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约15摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约7.5摩尔%至约15摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约10摩尔%。

[0622] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与DOPE的摩尔比为2-9.5:0.2-8。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与DOPE的摩尔比为2-9:0.5-8。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与DOPE的摩尔比为3-9:0.5-7。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与DOPE的摩尔比为4-9:0.5-6。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与DOPE的摩尔比为4-8:0.5-5。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与DOPE的摩尔比为5-8:0.5-4。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与DOPE的摩尔比为5-7:0.5-3。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与DOPE的摩尔比为5-7:0.5-2。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与DOPE的摩尔比为5-7:0.5-1.5。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质与DOPE的摩尔比为约6:约1。

[0623] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为2-9.5:0.2-7:0.2-8。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为2-9:0.2-6:0.5-8。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为3-9:0.2-5:0.5-7。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为4-9:0.2-4:0.5-6。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为4-8:0.2-3:0.5-5。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩

尔比为5-8:0.5-3:0.5-4。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为5-7:0.5-3:0.5-3。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为5-7:0.5-2:0.5-3。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为5-7:0.5-2:0.5-2。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为5-7:0.5-1.5:0.5-1.5。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.2-1.8。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.2。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.7。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.8。

[0624] 在一些方面,提供一种包含RNA、DODMA、DOPS和DOPE的RNA颗粒。

[0625] 在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的至少约10摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的至少约15摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的至少约20摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的至少约25摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的至少约30摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的至少约35摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的至少约40摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的至少约45摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的至少约50摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的至少约55摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的至少约60摩尔%。

[0626] 在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的约10摩尔%至约95摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的约20摩尔%至约95摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的约20摩尔%至约90摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的约30摩尔%至约90摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的约40摩尔%至约90摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的约40摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的约50摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的约50摩尔%至约70摩尔%。在一些实施方案中,DODMA占颗粒中存在的总脂质的约60摩尔%。

[0627] 在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约0.5摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约1摩尔%至约70摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约70摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约60摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约50摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约40摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约20摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约15摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约7.5摩尔%至约15摩尔%。在一些实施方案中,DOPS占颗粒中存在的总脂质的约10摩尔%。

[0628] 在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约0.5摩尔%至约90摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约1摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约80摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约70摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约60摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约50摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约40摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约20摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约15摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约7.5摩尔%至约15摩尔%。在一些实施方案中,DOPE占颗粒中存在的总脂质的约10摩尔%。

[0629] 在一些实施方案中,DODMA与DOPE的摩尔比为2-9.5:0.2-8。在一些实施方案中,DODMA与DOPE的摩尔比为2-9:0.5-8。在一些实施方案中,DODMA与DOPE的摩尔比为3-9:0.5-7。在一些实施方案中,DODMA与DOPE的摩尔比为4-9:0.5-6。在一些实施方案中,DODMA与DOPE的摩尔比为4-8:0.5-5。在一些实施方案中,DODMA与DOPE的摩尔比为5-8:0.5-4。在一些实施方案中,DODMA与DOPE的摩尔比为5-7:0.5-3。在一些实施方案中,DODMA与DOPE的摩尔比为5-7:0.5-2。在一些实施方案中,DODMA与DOPE的摩尔比为5-7:0.5-1.5。在一些实施方案中,DODMA与DOPE的摩尔比为约6:约1。

[0630] 在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为2-9.5:0.2-7:0.2-8。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为2-9:0.2-6:0.5-8。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为3-9:0.2-5:0.5-7。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为4-9:0.2-4:0.5-6。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为4-8:0.2-3:0.5-5。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为5-8:0.5-3:0.5-4。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为5-7:0.5-3:0.5-3。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为5-7:0.5-2:0.5-3。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为5-7:0.5-2:0.5-2。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为5-7:0.5-1.5:0.5-1.5。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.2-1.8。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.2。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.7。在一些实施方案中,DODMA、DOPS和DOPE的摩尔比为约6:约1:约1.8。

[0631] 在一些实施方案中,本文所述的RNA颗粒包含非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物是表面活性剂。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物是聚(乙二醇)(PEG)表面活性剂。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含连接至单个疏水链的聚(乙二醇)(PEG)链。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含聚氧乙烯脱水山梨醇酯、D- α -生育酚聚乙二醇-琥珀酸酯(TPGS)、饱和C10-C22羟基脂肪酸的聚氧乙烯单酯、聚氧乙烯脂肪酸酯、聚氧乙烯烷基醚或它们的组合。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的非离子两亲有机化合物水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约5摩尔%,或至少约0.15mM。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的

组合物)中存在的非离子两亲有机化合物水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约20摩尔%,或至少约0.6mM。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约5摩尔%,或至少约0.15mM。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约20摩尔%,或至少约0.6mM。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含聚山梨酯。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的聚山梨酯水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约5摩尔%,或至少约0.3mM。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的聚山梨酯水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约20摩尔%,或至少约0.6mM。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含聚山梨酯20。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的聚山梨酯20水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约5摩尔%,或至少约0.3mM。在一些实施方案中,RNA颗粒(或包含RNA颗粒的组合物)中存在的聚山梨酯20水平为颗粒或组合物中存在的总脂质的至少约20摩尔%,或至少约0.6mM。

[0632] 在一些实施方案中,组合物包含至少约0.15mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.2mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.25mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.3mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.35mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.4mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.45mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.55mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.6mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.7mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.8mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.9mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约1.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约1.1mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约1.2mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约1.3mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约1.4mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约1.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约2.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约2.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约3.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约4.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约5.0mM水平的非离子两亲有机化合物。

[0633] 在一些实施方案中,组合物包含约0.6mM至约0.75mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约0.75mM至约1.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约1.0mM至约1.25mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约1.25mM至约1.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案

中,组合物包含约1.75mM至约2.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约2.0mM至约2.25mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约2.25mM至约2.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约2.5mM至约2.75mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约2.75mM至约3.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约3.0mM至约3.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约4.0mM至约4.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约4.5mM至约5.0mM水平的非离子两亲有机化合物。

[0634] 在一些实施方案中,本文所述的RNA颗粒不包含胆固醇。在一些实施方案中,本文所述的RNA颗粒不包含类固醇。

[0635] 在一些实施方案中,本文所述的RNA颗粒是脂质纳米颗粒(LNP)或脂质复合物颗粒(LPX)。

[0636] 在一些实施方案中,除RNA外,本文所述的RNA颗粒包含:(i)阳离子或阳离子可电离脂质,(ii)非阳离子脂质,特别是中性脂质,(例如,一种或多种磷脂和/或胆固醇),以及(iii)磷脂酰丝氨酸。

[0637] 在一些实施方案中,除RNA外,本文所述的RNA颗粒包含:

[0638] (i)阳离子脂质或阳离子可电离脂质,其可以占颗粒中存在的总脂质的约10摩尔%至约95摩尔%、约20摩尔%至约95摩尔%、约20摩尔%至约90摩尔%、约30摩尔%至约90摩尔%、约40摩尔%至约90摩尔%或约40摩尔%至约80摩尔%,

[0639] (ii)非阳离子脂质,特别是中性脂质,(例如,一种或多种磷脂和/或胆固醇),其可以占颗粒中存在的总脂质的约0摩尔%至约90摩尔%、约0摩尔%至约80摩尔%、约2摩尔%至约80摩尔%、约5摩尔%至约80摩尔%、约5摩尔%至约60摩尔%、约5摩尔%至约50摩尔%、约7.5摩尔%至约50摩尔%或约10摩尔%至约40摩尔%,以及

[0640] (iii)磷脂酰丝氨酸,其可以占颗粒中存在的总脂质的约0.5摩尔%至约80摩尔%、约1摩尔%至约70摩尔%、约2摩尔%至约70摩尔%、约2摩尔%至约60摩尔%、约2摩尔%至约50摩尔%、约2摩尔%至约40摩尔%、约2摩尔%至约30摩尔%、约5摩尔%至约20摩尔%或约7.5摩尔%至约15摩尔%。

[0641] 在一些实施方案中,除RNA外,本文所述的RNA颗粒包含:(i)阳离子或阳离子可电离脂质,(ii)非阳离子脂质,特别是中性脂质,(例如,一种或多种磷脂和/或胆固醇),以及(iii)磷脂酰丝氨酸,其中(i)与(ii)与(iii)的摩尔比为5.5-6.5:0.9-1.1:0.9-1.1,如约6:1:1。

[0642] 在一些实施方案中,本文所述的RNA颗粒中的RNA组分是mRNA或saRNA。在一些实施方案中,本文所述的RNA颗粒中的RNA组分是mRNA。在一些实施方案中,RNA是编码RNA。

[0643] 在一些实施方案中,RNA是单分子或多分子物质。在一些实施方案中,RNA包含编码不同肽或多肽的mRNA的混合物。

[0644] 在一些实施方案中:

[0645] i.每种RNA的比率为1:1:1:1(w/w/w/w);和/或

[0646] ii.每种RNA包含修饰的核苷代替每个尿苷;和/或

[0647] iii.每种RNA包含修饰的核苷代替每个尿苷,其中所述修饰的核苷独立地选自假

尿苷(ψ)、N1-甲基-假尿苷(m 1ψ)和5-甲基-尿苷(m $5U$);和/或

[0648] iv.每种RNA包含5'帽 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 或3'-O-Me-m $^7G(5')$ ppp(5')G;和/或

[0649] v.每种RNA包含5' UTR,所述5' UTR包含选自SEQ ID NO:2和4的核苷酸序列,或者与选自SEQ ID NO:2和4的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列;和/或

[0650] vi.每种RNA包含3' UTR,所述3' UTR包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:6的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列;和/或

[0651] vii.每种RNA包含poly-A尾,其中所述poly-A尾包含至少100个核苷酸,并且其中所述poly-A尾包含SEQ ID NO:27中所示的poly-A尾或由SEQ ID NO:27中所示的poly-A尾组成。

[0652] 在一些实施方案中,RNA编码一种或多种选自以下的肽或多肽:细胞因子、激素、粘附分子、免疫球蛋白、免疫活性化合物、生长因子、蛋白酶抑制剂、酶、受体、凋亡调节剂、转录因子、肿瘤抑制蛋白、结构蛋白、重编程因子、基因组工程蛋白和血液蛋白。

[0653] 在一些实施方案中,RNA包含编码IL-12sc蛋白的RNA、编码IL-15sushi蛋白的RNA、编码IFN α 蛋白的RNA和编码GM-CSF蛋白的RNA。

[0654] 在一些实施方案中,

[0655] i.编码IL-12sc蛋白的RNA包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:7的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列;和/或

[0656] ii.编码IL-15sushi蛋白的RNA包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:8的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列;和/或

[0657] iii.编码IFN α 蛋白的RNA包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:9的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列;和/或

[0658] iv.编码GM-CSF蛋白的RNA包含SEQ ID NO:10的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:10的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列。

[0659] 在一些实施方案中,

[0660] i.IL-12sc蛋白包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的氨基酸序列;和/或

[0661] ii.IL-15sushi蛋白包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的氨基酸序列;和/或

[0662] iii.IFN α 蛋白包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的氨基酸序列;和/或

[0663] iv.GM-CSF蛋白包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的氨基酸序列。

[0664] 本文所述的mRNA颗粒(例如,LNP和LPX)的平均直径在一些实施方案中从约50nm至约1000nm、从约50nm至约800nm、从约50nm至约700nm、从约50nm至约600nm、从约50nm至约500nm、从约50nm至约450nm、从约50nm至约400nm、从约50nm至约350nm、从约50nm至约300nm、从约50nm至约250nm、从约50nm至约200nm、从约100nm至约1000nm、从约100nm至约800nm、从约100nm至约700nm、从约100nm至约600nm、从约100nm至约500nm、从约100nm至约450nm、从约100nm至约400nm、从约100nm至约350nm、从约100nm至约300nm、从约100nm至约250nm、从约100nm至约200nm、从约150nm至约1000nm、从约150nm至约800nm、从约150nm至约700nm、从约150nm至约600nm、从约150nm至约500nm、从约150nm至约450nm、从约150nm至约400nm、从约150nm至约350nm、从约150nm至约300nm、从约150nm至约250nm、从约200nm至约1000nm、从约200nm至约800nm、从约200nm至约700nm、从约200nm至约600nm、从约200nm至约500nm、从约200nm至约450nm、从约200nm至约400nm、从约200nm至约350nm、从约200nm至约300nm或从约200nm至约250nm。

[0665] 本文所述的例如通过本文所述方法制备的RNA颗粒,表现出小于约0.5、小于约0.4、小于约0.3、小于约0.2、小于约0.1或约0.05或更小的多分散性指数。例如,mRNA LNP可以表现出在约0.05至约0.2范围内的多分散性指数,如约0.05至约0.1。

[0666] 在本公开的一些实施方案中,本文所述的mRNA颗粒(例如,LNP和LPX)中的mRNA的浓度从约0.002mg/mL至约5mg/mL、从约0.002mg/mL至约2mg/mL、从约0.005mg/mL至约2mg/mL、从约0.01mg/mL至约1mg/mL、从约0.05mg/mL至约0.5mg/mL或从约0.1mg/mL至约0.5mg/mL。在具体实施方案中,mRNA的浓度从约0.005mg/mL至约0.1mg/mL、从约0.005mg/mL至约0.09mg/mL、从约0.005mg/mL至约0.08mg/mL、从约0.005mg/mL至约0.07mg/mL、从约0.005mg/mL至约0.06mg/mL或从约0.005mg/mL至约0.05mg/mL。

[0667] 在一些实施方案中,N/P值范围为2-20、2-12、3-10、3-8或3-7。在一些实施方案中,N/P值是约3、4或5。在一些实施方案中,N/P值从约3至约5。在一些实施方案中,N/P值是约3。在一些实施方案中,N/P值是约4。在一些实施方案中,N/P值是约5。

[0668] 本文所述的RNA-脂质颗粒或简单地称为RNA颗粒通常由阳离子或阳离子可电离脂质如DODMA,以及一种或多种非阳离子脂质如磷脂(例如,DOPE)、胆固醇或其混合物,以及磷脂酰丝氨酸如DOPS形成。在一些实施方案中,RNA颗粒由DODMA、DOPE和/或胆固醇以及磷脂酰丝氨酸如DOPS形成。

[0669] 本文所述的RNA颗粒可以采用不同的技术制备。例如,可以将RNA与脂质的乙醇溶液(包含阳离子或阳离子可电离脂质,任选存在的额外的脂质以及磷脂酰丝氨酸)或与脂质体(包含阳离子或阳离子可电离脂质,任选存在的额外的脂质以及磷脂酰丝氨酸)一起温育,脂质体可以通过乙醇注射方法获得。混合时RNA可以存在于水性溶液中。通过乙醇的酸化,例如,通过使用盐酸或者乙酸和盐酸的混合物,可以大幅度提高磷脂酰丝氨酸的溶解度。

[0670] 在一些实施方案中,RNA颗粒形成(例如,通过混合脂质的乙醇溶液和RNA的水性溶液)可以通过添加接枝亲水部分(例如,聚乙二醇、多肽或相似部分)的脂质来控制(特别是在所得的粒径方面)。因此,本文所述的一种或多种颗粒形成脂质或脂质样物质可以包含一种或多种这类亲水部分。或者,可以通过使用非离子两亲有机化合物来控制颗粒形成,例如,表面活性剂如聚山梨酯(吐温(TWEENS)),例如,聚山梨酯20(在本文中也称作吐温

(Tween) 20和Tween20), D- α -生育酚聚乙二醇琥珀酸酯 (TPGS), solutol, Myr js, Brijs, 在任一相中, 即RNA相和/或脂质或脂质体相, 如RNA相。在不同的实施方案中, 非离子两亲有机化合物可以占混合物中存在的总脂质 (包括脂质样物质, 例如, 非离子两亲有机化合物, 例如, 表面活性剂) 的约0.1摩尔%至约50摩尔%、约1摩尔%至约50摩尔%、约1摩尔%至约40摩尔%、约1摩尔%至约30摩尔%、约1摩尔%至约20摩尔%、约1摩尔%至约15摩尔%、约1摩尔%至约10摩尔%、约1摩尔%至约7.5摩尔%或约2摩尔%至约5摩尔%。

[0671] 例如, 通过制备含有RNA、表面活性剂如聚山梨酯20 (吐温20) 和缓冲液 (例如, 柠檬酸盐缓冲液, 100mM, pH 4) 的水性溶液以及酸化的乙醇中的脂质溶液, 并将溶液混合, 可以获得颗粒。可以对RNA颗粒溶液进行透析, 例如, 针对pH>5.5的缓冲液。

[0672] 或者, 通过在酸化的乙醇中制备脂质溶液并将脂质溶液注入水中, 如在水的搅拌下 (例如, 以250rpm的搅拌速度) 以形成脂质体, 可以获得颗粒。可以对脂质体溶液进行透析, 例如, 针对酸性水性溶液。可以将脂质体与含有RNA、表面活性剂如吐温20和缓冲液 (例如, 柠檬酸盐缓冲液, 100mM, pH 4) 的水性溶液混合, 以便形成RNA颗粒。

[0673] 在一些实施方案中, 本文所述的RNA颗粒可通过包括以下步骤的方法获得:

[0674] (i) 在有机溶剂中制备酸化的脂质溶液;

[0675] (ii) 将酸化的脂质溶液添加至水相中以产生脂质体胶体; 以及

[0676] (iii) 将脂质体胶体添加至包含RNA和非离子两亲有机化合物的水性溶液中以产生RNA脂质颗粒。在一些实施方案中, 颗粒是脂质复合物颗粒 (LPX)。

[0677] 在一些实施方案中, 本文所述的RNA颗粒可通过包括以下步骤的方法获得:

[0678] (i) 在有机溶剂中制备酸化的脂质溶液; 以及

[0679] (ii) 将酸化的脂质溶液添加至包含RNA和非离子两亲有机化合物的水性溶液中以产生RNA脂质颗粒。在一些实施方案中, 颗粒是脂质纳米颗粒 (LNP)。

[0680] 在一些实施方案中, 有机溶剂包含醇。在一些实施方案中, 醇是乙醇。

[0681] 在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的至少约0.1摩尔%。在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的至少约0.5摩尔%。在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的至少约1摩尔%。在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的至少约2摩尔%。在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的至少约3摩尔%。在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的至少约4摩尔%。在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的至少约5摩尔%。在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的至少约6摩尔%。在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的至少约7摩尔%。在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的至少约8摩尔%。在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的至少约9摩尔%。在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的至少约10摩尔%。在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的至少约15摩尔%。在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的至少约20摩尔%。

[0682] 在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的约0.1摩尔%至约40摩尔%。在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的约0.1摩尔%至约35摩尔%。在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的约0.1摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中, 非离子两亲有机化合物占总脂质的约0.5摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方

案中,非离子两亲有机化合物占总脂质的约1摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占总脂质的约5摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占总脂质的约5摩尔%至约25摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占总脂质的约10摩尔%至约25摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占总脂质的约15摩尔%至约25摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占总脂质的约20摩尔%。

[0683] 包含RNA颗粒的组合物

[0684] 在一些方面,本发明提供一种组合物,其包含本文所述的一种或多种RNA颗粒。如果所述组合物包含一种以上本文所述的颗粒,则颗粒的组成可以相同或不同,例如,关于脂质或脂质样物质和/或RNA。在一些实施方案中,组合物是水性组合物。在一些实施方案中,组合物是药物组合物。

[0685] 在一些实施方案中,一种或多种RNA颗粒的群体包含超过 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{16} 、 10^{17} 、 10^{18} 、 10^{19} 、 10^{20} 、 10^{21} 、 10^{22} 或 10^{23} 个或更多颗粒。在一些实施方案中,RNA颗粒以药学有效量存在(例如在组合物中)或使用(例如,在治疗方法或制备药物的过程中)。在一些实施方案中,一种以上RNA颗粒的群体包括含有相同脂质或脂质样物质和/或RNA的RNA颗粒的群体。在一些实施方案中,一种以上RNA颗粒的群体包括含有相同量的相同脂质或脂质样物质和/或RNA的RNA颗粒的群体。在一些实施方案中,一种以上RNA颗粒的群体包含在脂质或脂质样物质和/或RNA方面相同的RNA颗粒的群体。

[0686] 术语“多种RNA颗粒”是指在给定实施方案或权利要求的属(genus)内包含一个以上种类(species)的RNA颗粒的群体;例如,至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个种类,以及例如多达100个、多达50个、多达30个、多达20个或多达15个种类。在一些实施方案中,多种RNA颗粒包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个种类、至少50个种类或至少100个种类。

[0687] 在一些实施方案中,本文所述的组合物是液体或固体,固体是指冷冻形式或冻干形式或喷雾干燥形式。在一优选实施方案中,组合物是液体。

[0688] 根据本公开,本文所述的组合物可以包含盐如氯化钠。不希望受理论束缚,氯化钠用作离子渗透压(osmolality)剂,用于在与脂质混合之前预处理RNA。在一些实施方案中,本文所述的组合物可以包含可选的有机或无机盐。可选的盐包括但不限于氯化钾、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、乙酸钾、碳酸氢钾、硫酸钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、乙酸钠、碳酸氢钠、硫酸钠、氯化锂、氯化镁、磷酸镁、氯化钙和乙二胺四乙酸(EDTA)的钠盐。

[0689] 一般来说,用于储存RNA颗粒如用于冷冻RNA颗粒的组合物包含低氯化钠浓度,或包含低离子强度。在一些实施方案中,氯化钠的浓度为0mM至约50mM、0mM至约40mM或约10mM至约50mM。

[0690] 根据本公开,本文所述的RNA颗粒组合物的pH适合RNA颗粒稳定性,特别是适合RNA稳定性。不希望受理论束缚,缓冲系统的使用在组合物的制备、储存和使用期间维持本文所述颗粒组合物的pH。在本公开的一些实施方案中,缓冲系统可以包含溶剂(特别是水,如去离子水,特别是注射用水)和缓冲物质。缓冲物质可以选自2-[4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基]乙

磺酸(HEPES)、2-氨基-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇(Tris)、乙酸盐和组氨酸。优选的缓冲物质是HEPES。

[0691] 本文所述的组合物还可以包含冷冻保护剂和/或表面活性剂作为稳定剂以避免产品质量的显著损失,特别是在储存、冷冻和/或冻干期间mRNA活性的显著损失,例如以减少或防止聚集、颗粒坍塌、mRNA降解和/或其他类型的损害。

[0692] 在一实施方案中,冷冻保护剂是碳水化合物。如本文所用,术语“碳水化合物”是指并且涵盖单糖、二糖、三糖、寡糖和多糖。

[0693] 在一实施方案中,冷冻保护剂是单糖。如本文所用,术语“单糖”是指不可以水解为更简单的碳水化合物单元的单个碳水化合物单元(例如,单糖(simple sugar))。示例性单糖冷冻保护剂包括葡萄糖、果糖、半乳糖、木糖、核糖等。

[0694] 在一实施方案中,冷冻保护剂是二糖。如本文所用,术语“二糖”是指由2个单糖单元形成的化合物或化学部分,所述单糖单元通过糖苷键,例如通过1-4键或1-6键键合在一起。二糖可以水解为两个单糖。示例性二糖冷冻保护剂包括蔗糖、海藻糖、乳糖、麦芽糖等。

[0695] 术语“三糖”表示连接在一起形成一个分子的三个糖。三糖的实例包括棉子糖和松三糖。

[0696] 在一实施方案中,冷冻保护剂是寡糖。如本文所用,术语“寡糖”是指由3至约15个,如3至约10个单糖单元形成的化合物或化学部分,所述单糖单元通过糖苷键,例如通过1-4个键或1-6个键键合在一起,形成线性、支化或环状结构。示例性寡糖冷冻保护剂包括环糊精、棉子糖、松三糖、麦芽三糖、水苏糖、阿卡波糖等。寡糖可以被氧化或还原。

[0697] 在一实施方案中,冷冻保护剂是环状寡糖。如本文所用,术语“环状寡糖”是指由3至约15个,如6、7、8、9或10个单糖单元形成的化合物或化学部分,所述单糖单元通过糖苷键,例如通过1-4个键或1-6个键键合在一起,形成环状结构。示例性环状寡糖冷冻保护剂包括作为离散化合物的环状寡糖,如 α 环糊精、 β 环糊精或 γ 环糊精。

[0698] 其他示例性环状寡糖冷冻保护剂包括这样的化合物,其包括较大分子结构中的环糊精部分,如含有环状寡糖部分的聚合物。环状寡糖可以被氧化或还原,例如,氧化为二羰基形式。如本文所用,术语“环糊精部分”是指环糊精(例如, α 、 β 或 γ 环糊精)基团,其掺入到较大分子结构如聚合物中或是其一部分。环糊精部分可以直接或通过任选存在的接头键合至一个或多个其他部分。环糊精部分可以被氧化或还原,例如,氧化为二羰基形式。

[0699] 碳水化合物冷冻保护剂,例如,环状寡糖冷冻保护剂,可以是衍生的碳水化合物。例如,在一实施方案中,冷冻保护剂是衍生的环状寡糖,例如,衍生的环糊精,例如,2-羟丙基- β -环糊精,例如,部分醚化的环糊精(例如,部分醚化的 β 环糊精)。

[0700] 示例性冷冻保护剂是多糖。如本文所用,术语“多糖”是指由至少16个单糖单元形成的化合物或化学部分,所述单糖单元通过糖苷键,例如通过1-4个键或1-6个键键合在一起,形成线性、支化或环状结构,并且包括含有多糖作为其骨架结构一部分的聚合物。在骨架中,多糖可以是线性或环状的。示例性多糖冷冻保护剂包括糖原、淀粉酶、纤维素、葡聚糖、麦芽糖糊精等。

[0701] 在一些实施方案中,RNA颗粒组合物可以包含蔗糖。不希望受理论束缚,蔗糖的作用是促进组合物的冷冻保护,从而防止RNA(尤其是mRNA)颗粒聚集并维持组合物的化学和物理稳定性。在一些实施方案中,RNA颗粒组合物可以包含蔗糖的替代冷冻保护剂。替代稳

定剂包括但不限于海藻糖和葡萄糖。在一具体实施方案中,蔗糖的替代稳定剂是海藻糖或者蔗糖和海藻糖的混合物。

[0702] 优选的冷冻保护剂选自蔗糖、海藻糖、葡萄糖及其组合,如蔗糖和海藻糖的组合。在一优选实施方案中,冷冻保护剂是蔗糖。

[0703] 在一些实施方案中,本文所述的RNA颗粒和/或RNA颗粒组合物包含非离子两亲有机化合物。本文描述这类非离子两亲有机化合物的实例。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物的存在稳定颗粒并防止脱靶效应。

[0704] 可以使用任何合适的非离子两亲有机化合物或者不会对RNA颗粒或其组分产生不利影响的化合物,可以是低摩尔质量的,也可以是聚合的。这些化合物可以是表面活性剂。

[0705] 在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含表面活性剂。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含聚(乙二醇)(PEG)表面活性剂。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含连接至单个疏水链的聚(乙二醇)(PEG)链。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含聚氧乙烯脱水山梨醇酯、D- α -生育酚聚乙二醇-琥珀酸酯(TPGS)、饱和C10-C22羟基脂肪酸的聚氧乙烯单酯、聚氧乙烯脂肪酸酯、聚氧乙烯烷基醚或它们的组合。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含聚山梨酯。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物包含聚山梨酯20。

[0706] 特别地,非离子两亲有机化合物可以选自

[0707] 聚氧乙烯脂肪酸酯,其包括聚氧乙烯硬脂酸酯,如MYRJ系列。MYRJ系列中的特定化合物是,例如MYRJ 53和PEG-40-硬脂酸酯,可作为MYRJ52获得;

[0708] 脱水山梨醇衍生物,其包括聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯(聚山梨酯)(例如,聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单油酸酯(吐温80)、聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单硬脂酸酯(吐温60)、聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单月桂酸酯(吐温20)和其他吐温);

[0709] 聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物和嵌段共聚物或者泊洛沙姆,例如,Pluronic F127或Pluronic F68;

[0710] 聚氧乙烯烷基醚,例如,C12-C18醇的聚氧乙烯二醇醚,例如聚氧乙烯(polyoxyl)10-或20-十六烷基醚或聚氧乙烯23-月桂基醚,或20-油基醚,或者聚氧乙烯10-、20-或100-硬脂基醚,作为BRIJ系列已知和可商购。BRIJ系列中特别有用的产品是BRIJ58;BRIJ76;BRIJ78;BRIJ35,即聚氧乙烯23月桂基醚,以及BRIJ 98,即聚氧乙烯20油基醚;

[0711] 水溶性生育酚PEG琥珀酸酯,例如,TPGS;

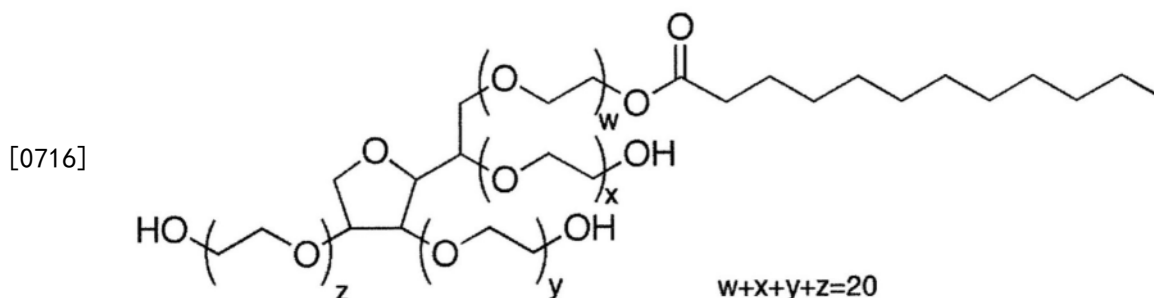
[0712] 饱和C10-C22的聚氧乙烯单酯,如C18取代的例如羟基脂肪酸;例如12羟基硬脂酸PEG酯,例如约600-900如660道尔顿MW的PEG,例如SOLUTOL。

[0713] 非离子两亲有机化合物(例如,表面活性剂)的实施方案包括聚山梨酯(TWEEN)如聚山梨酯20(吐温20)、聚山梨酯40、聚山梨酯60、聚山梨酯80,D- α -生育酚聚乙二醇琥珀酸酯(TPGS),solutol,Myrjs,Brijs。在一些实施方案中,表面活性剂是聚山梨酯20。

[0714] 术语“聚山梨酯20”或“聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单月桂酸酯是指一种非离子聚山梨酯型表面活性剂,由脱水山梨醇经乙氧基化后加入月桂酸而形成。乙氧基化过程为分子提供20个聚乙二醇重复单元。在实践中,这些被分为4个不同的链,这导致含有一系列化学实体的商业产品。(CAS编号9005-64-5)。在一些实施方案中,聚山梨酯20是山梨醇和山梨醇

酐的月桂酸酯部分酯的混合物,每摩尔山梨醇及其单酐或二酐与约20摩尔环氧乙烷缩合。

[0715] 聚山梨酯20的结构可以表示如下:



[0717] 在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的至少约0.1摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的至少约0.5摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的至少约1摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的至少约2摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的至少约3摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的至少约4摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的至少约5摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的至少约6摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的至少约7摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的至少约8摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的至少约9摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的至少约10摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的至少约15摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的至少约20摩尔%。

[0718] 在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的约0.1摩尔%至约40摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的约0.1摩尔%至约35摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的约0.1摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的约0.5摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的约1摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的约5摩尔%至约30摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的约5摩尔%至约25摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的约10摩尔%至约25摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的约15摩尔%至约25摩尔%。在一些实施方案中,非离子两亲有机化合物占组合物中存在的总脂质的约20摩尔%。

[0719] 在一些实施方案中,组合物包含至少约0.15mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.2mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.25mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.3mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约

0.35mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.4mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.45mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.55mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.6mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.7mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.8mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.9mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约1.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约1.1mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约1.2mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约1.3mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约1.4mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约1.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约2.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约2.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约3.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约4.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约5.0mM水平的非离子两亲有机化合物。

[0720] 在一些实施方案中,组合物包含约0.15mM至约0.3mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约0.3mM至约0.6mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约0.6mM至约0.75mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约0.75mM至约1.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约1.0mM至约1.25mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约1.25mM至约1.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约1.75mM至约2.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约2.0mM至约2.25mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约2.25mM至约2.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约2.5mM至约2.75mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约2.75mM至约3.0mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约3.0mM至约3.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约4.0mM至约4.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含约4.5mM至约5.0mM水平的非离子两亲有机化合物。

[0721] 在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸、额外的脂质以及非离子两亲有机化合物的摩尔比(例如,DODMA、DOPS、DOPE和聚山梨酯20的摩尔比)为2-9.5:0.2-7:0.2-8:0.05-4。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸、额外的脂质以及非离子两亲有机化合物的摩尔比为2-9:0.2-6:0.5-8:0.1-4。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸、额外的脂质以及非离子两亲有机化合物的摩尔比为3-9:0.2-5:0.5-7:0.2-4。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸、额外的脂质以及非离子两亲有机化合物的摩尔比为4-9:0.2-4:0.5-6:0.3-4。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸、额外的脂质以及非

离子两亲有机化合物的摩尔比为4-8:0.2-3:0.5-5:0.4-4。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸、额外的脂质以及非离子两亲有机化合物的摩尔比为5-8:0.5-3:0.5-4:0.5-4。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸、额外的脂质以及非离子两亲有机化合物的摩尔比为5-7:0.5-3:0.5-3:0.5-3。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸、额外的脂质以及非离子两亲有机化合物的摩尔比为5-7:0.5-2:0.5-3:0.75-3。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸、额外的脂质以及非离子两亲有机化合物的摩尔比为5-7:0.5-2:0.5-2:1-3。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸、额外的脂质以及非离子两亲有机化合物的摩尔比为5-7:0.5-1.5:0.5-1.5:1.5-2.5。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸、额外的脂质以及非离子两亲有机化合物的摩尔比为5.5-6.5:0.9-1.1:0.9-1.1:1.5-2.5。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸、额外的脂质以及非离子两亲有机化合物的摩尔比为约6:约1:约1:约2。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸、额外的脂质以及非离子两亲有机化合物的摩尔比为约6:约1:约1.2-1.8:约2。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸、额外的脂质以及非离子两亲有机化合物的摩尔比为约6:约1:约1.2:约2。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸、额外的脂质以及非离子两亲有机化合物的摩尔比为约6:约1:约1.7:约2。在一些实施方案中,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸、额外的脂质以及非离子两亲有机化合物的摩尔比为约6:约1:约1.8:约2。

[0722] 在一些实施方案中,组合物包含至少约0.1mM水平的非离子两亲有机化合物(例如,聚山梨酯20)。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.2mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.3mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.4mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.5mM水平的非离子两亲有机化合物。在一些实施方案中,组合物包含至少约0.6mM水平的非离子两亲有机化合物。

[0723] 在本公开的一些实施方案中,考虑在本文所述的RNA组合物中使用螯合剂。螯合剂是指能够与金属离子形成至少两个配位共价键,从而产生稳定的水溶性络合物的化合物。不希望受理论束缚,螯合剂降低游离二价离子的浓度,否则在本公开中其可能诱导加速的RNA降解。合适的螯合剂的实例包括但不限于乙二胺四乙酸(EDTA)、EDTA的盐、去铁草酰胺(desferrioxamine)B、去铁胺(deferoxamine)、二硫卡宾钠(dithiocarb sodium)、青霉胺、喷替酸钙(pentetate calcium)、喷替酸(pentetic acid)的钠盐、二巯基丁二酸(succimer)、曲恩汀、次氨基三乙酸(nitrilotriacetic acid)、反式-二氨基环己烷四乙酸(DCTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)和双(氨基乙基)乙二醇醚-N,N',N'-四乙酸。在一些实施方案中,螯合剂是EDTA或EDTA的盐。在一示例性实施方案中,螯合剂是EDTA二钠二水合物。在一些实施方案中,EDTA的浓度为约0.05mM至约5mM、约0.1mM至约2.5mM或约0.25mM至约1mM。

[0724] 在一可选实施方案中,本文所述的RNA颗粒组合物不包含螯合剂。

[0725] 药物组合物

[0726] 本文所述的RNA颗粒组合物可用作或用于制备用于治疗或预防性治疗的药物组合物或药物。

[0727] 本文所述的RNA颗粒可以以任何合适的药物组合物的形式给药。

[0728] 术语“药物组合物”涉及一种包含治疗有效剂的组合物,优选与药学可接受的载剂、稀释剂和/或赋形剂一起。通过向受试者给药药物组合物,所述药物组合物可用于治疗、预防或降低疾病的严重程度。在本公开的上下文中,药物组合物包含如本文所述的一种或多种RNA颗粒,或者多种RNA颗粒。

[0729] 本公开的药物组合物可以包含一种或多种佐剂,或者可以与一种或多种佐剂一起给药。术语“佐剂”涉及延长、增强或加速免疫应答的化合物。佐剂包含一组异质化合物如油乳剂(例如,弗氏佐剂)、矿物质化合物(如明矾)、细菌产物(如百日咳杆菌毒素)或免疫刺激复合物。佐剂的实例包括但不限于LPS、GP96、CpG寡脱氧核苷酸、生长因子和细胞因子,如单核因子、淋巴因子、白介素、趋化因子。趋化因子可以是IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、INF α 、INF- γ 、GM-CSF、LT- α 。其他已知的佐剂是氢氧化铝、弗氏佐剂(Freund's adjuvant)或油如 Montanide® ISA51。用于本公开的其他合适的佐剂包括脂肽,例如Pam3Cys,以及亲脂性组分,例如皂苷、海藻糖-6,6'-二山嵛酸酯(TDB)、单磷酸脂质-A(MPL)、单分支酰基甘油(MMG)或吡喃葡萄糖基脂质佐剂(GLA)。

[0730] 本公开的药物组合物可以是可储存形式(例如,冷冻或冻干/冷冻干燥形式)或“即用形式”(即,可以立即向受试者给药的形式,例如,不需要任何加工如稀释)。因此,在给药可储存形式的药物组合物之前,必须将这种可储存形式加工或转变为即用型或可给药形式。例如,冷冻的药物组合物必须解冻,或者冷冻干燥的药物组合物必须重构,例如通过使用合适的溶剂(例如,去离子水,如注射用水)或液体(例如,水性溶液)。

[0731] 根据本公开的药物组合物一般以“药学有效量”和在“药学可接受的制品”中应用。

[0732] 术语“药学可接受的”是指物质的无毒性,其不与药物组合物的活性组分的作用相互作用。

[0733] 术语“药学有效量”是指单独或与进一步的剂量一起实现期望反应或期望效果的量。在涉及治疗特定疾病的一些实施方案中,期望的反应可以涉及抑制疾病过程。这包括减缓疾病的发展,在一些实施方案中,中断或逆转疾病的发展。疾病治疗中的期望反应还可以是延迟所述疾病或所述疾病状况的发生或者防止其发生。本文所述的颗粒或药物组合物的有效量取决于待治疗的疾病状况,疾病的严重程度,患者的个体参数,包括年龄、生理状况、体形和体重,治疗的持续时间,伴随疗法的类型(如果存在),给药的具体途径以及类似因素。因此,本文所述的颗粒或药物组合物的给药剂量可以取决于各种这样的参数。在患者对初始剂量的反应不足的情况下,可以使用更高的剂量(或者通过不同的、更局部化的给药途径达到的有效的更高剂量)。

[0734] 本公开的药物组合物可以含有缓冲剂、防腐剂和任选存在的其他治疗剂。在一些实施方案中,本公开的药物组合物包含一种或多种药学可接受的载剂、稀释剂和/或赋形剂。

[0735] 用于本公开的药物组合物的合适防腐剂包括但不限于苯扎氯铵、氯代丁醇、对羟基苯甲酸酯和硫柳汞。

[0736] 如本文所用的术语“赋形剂”是指可以存在于本公开的药物组合物中但不是活性成分的物质。赋形剂的实例包括但不限于载剂、粘合剂、稀释剂、润滑剂、增稠剂、表面活性剂、防腐剂、稳定剂、乳化剂、缓冲剂、增香剂或着色剂。

[0737] 术语“稀释剂”涉及稀释(diluting)和/或稀释性(thinning)物质。此外,术语“稀释剂”包括流体、液体或固体悬浮液和/或混合介质中的任何一种或多种。合适稀释剂的实例包括乙醇、甘油和水。

[0738] 术语“载剂”是指可以是天然的、合成的、有机的、无机的组分,其中组合活性组分以促进、增强或使药物组合物的给药成为可能。如本文所用的载剂可以是一种或多种相容的固体或液体填充剂、稀释剂或包封物质,其适合向受试者给药。合适的载剂包括但不限于无菌水、林格氏液、乳酸林格氏液、无菌氯化钠溶液、等渗盐水、聚亚烷基二醇、氢化萘,特别是生物相容性丙交酯聚合物、丙交酯/乙交酯共聚物或聚氧乙烯/聚氧-丙烯共聚物。在一些实施方案中,本公开的药物组合物包括等渗盐水。

[0739] 用于治疗用途的药学可接受的载剂、赋形剂或稀释剂在药学领域是众所周知的,并且例如在Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R Gennaro edit.1985)中进行描述。

[0740] 药物载剂、赋形剂或稀释剂可以根据预期的给药途径和标准药物实践进行选择。

[0741] 药物组合物的给药途径

[0742] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物可以静脉内、动脉内、皮下、皮内、皮肤、结节内、肌肉内、瘤内或瘤周给药。在一些实施方案中,将药物组合物配制用于局部给药或全身给药。全身给药可以包括肠道给药,其包括通过胃肠道吸收,或者肠胃外给药。如本文所用,“肠胃外给药”是指以通过胃肠道以外的任何方式给药,如通过静脉内注射。在一些实施方案中,将药物组合物配制用于全身给药。在一些实施方案中,全身给药是通过静脉内给药。在一些实施方案中,将包含本文所述RNA颗粒的药物组合物配制用于瘤内给药/将其瘤内给药。在一些实施方案中,将包含本文所述RNA颗粒的药物组合物配制用于瘤周给药/将其瘤周给药。在一些实施方案中,RNA可以编码一种或多种细胞因子或细胞因子融合物。在一些实施方案中,一种或多种细胞因子或细胞因子融合物调节肿瘤微环境。在一些实施方案中,一种或多种细胞因子或细胞因子融合物具有抗肿瘤活性(例如,增加对肿瘤的免疫应答)。

[0743] 药物组合物的用途

[0744] 本文所述的RNA颗粒可以用于各种疾病的治疗性或预防性治疗,特别是在向受试者提供肽或多肽导致治疗或预防效果的疾病中。例如,提供源自病毒的抗原或表位可以用于治疗由所述病毒引起的病毒性疾病。提供肿瘤抗原或表位可以用于治疗其中癌细胞表达所述肿瘤抗原的癌症疾病。提供功能性蛋白或酶可以用于治疗以功能失调的蛋白为特征的遗传性病症,例如溶酶体贮积病(例如粘多糖贮积病)或因子缺乏症。提供细胞因子或细胞因子-融合物可以用于调节肿瘤微环境。

[0745] 术语“疾病”(在本文中也称作“病症”)是指影响个体身体的异常状况。疾病通常解释为与特定症状或体征相关的医学状况。疾病可能是由源自外部来源的因素引起的,如传染病,或者其可能是由内部功能失调引起的,如自身免疫疾病。在人中,“疾病”通常更广泛地用于指引起患病个体的疼痛、功能障碍、窘迫、社会问题或死亡或者与个体接触的人的相似问题的任何状况。在这个更广泛的意义上,其有时包括损伤、残疾、病症、综合征、感染、孤立症状、偏差行为以及结构和功能的非典型变化,但是在其他上下文中和为了其他目的,这些可以认为是可区分的类别。疾病通常不仅在身体上,而且还在情感上影响个体,因为感染

和患有许多疾病可以改变一个人的人生观和一个人的性格。

[0746] 在本文中,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”或“治疗性干预”涉及为了对抗疾病状况如疾病的目的而对受试者的管理和护理。该术语旨在包括对受试者所患的给定疾病状况的全谱治疗,如给药治疗有效的化合物以减轻症状或并发症,延迟疾病、病症或疾病状况的发展,减轻或缓解症状和并发症,和/或治愈或消除疾病、病症或疾病状况以及预防疾病状况,其中预防应理解为为了对抗疾病、疾病状况或病症的目的而对个体的管理和护理,并且包括给药活性化合物以预防症状或并发症的发生。

[0747] 术语“治疗性治疗”涉及改善健康状态和/或延长(增加)个体生命的任何治疗。治疗可以消除个体的疾病,阻止或减缓个体的疾病发展,抑制或减缓个体的疾病发展,降低个体症状的频率或严重程度,和/或减少当前患有或以前患有疾病的个体中的复发。

[0748] 术语“预防性治疗”或“预防治疗”涉及旨在防止疾病在个体中发生的任何治疗。术语“预防性治疗”或“预防治疗”在本文中可互换使用。

[0749] 术语“个体”和“受试者”在本文中可互换使用。它们是指人或其他哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、兔、狗、猫、牛、猪、羊、马或灵长类动物),或者任何其他非哺乳动物,包括鸟(鸡)、鱼或者任何其他动物物种,所述动物物种可能患有或易患疾病(例如,癌症、传染病),但是可能患有或不患有疾病,或者可能需要预防性干预如疫苗接种,或者可能需要干预如通过蛋白置换。在许多实施方案中,个体是人。除非另有说明,否则术语“个体”和“受试者”并不表示特定年龄,因此涵盖成年人、老年人、儿童和新生儿。在本公开的一些实施方案中,“个体”或“受试者”是“患者”。

[0750] 术语“患者”表示治疗的个体或受试者,特别是患病的个体或受试者。

[0751] 一些实施方案涉及一种将RNA递送至受试者的细胞的方法,所述方法包括向受试者给药本文所述的RNA颗粒。一些实施方案涉及一种将RNA递送至受试者的细胞的方法,所述方法包括向受试者给药本文所述的一种或多种RNA颗粒、多种RNA颗粒或者组合物。

[0752] 一些实施方案涉及一种将治疗性或预防性肽或多肽递送至受试者的方法,所述方法包括向受试者给药本文所述的RNA颗粒,其中所述RNA编码治疗性肽或多肽。一些实施方案涉及一种将治疗性或预防性肽或多肽递送至受试者的方法,所述方法包括向受试者给药本文所述的一种或多种RNA颗粒、多种RNA颗粒或者组合物,其中所述RNA编码一种或多种治疗性肽或多肽。

[0753] 一些实施方案涉及一种治疗或预防受试者的疾病的方法,所述方法包括向受试者给药本文所述的RNA颗粒,其中将所述RNA递送至受试者的细胞有利于治疗或预防疾病。一些实施方案涉及一种治疗或预防受试者的疾病的方法,所述方法包括向受试者给药本文所述的一种或多种RNA颗粒、多种RNA颗粒或者组合物,其中将所述RNA递送至受试者的细胞有利于治疗或预防疾病。

[0754] 一些实施方案涉及一种治疗或预防受试者疾病的方法,所述方法包括向受试者给药本文所述的RNA颗粒,其中所述RNA编码治疗性肽或多肽,并且其中将所述治疗性肽或多肽递送至受试者有利于治疗或预防疾病。一些实施方案涉及一种治疗或预防受试者的疾病的方法,所述方法包括向受试者给药本文所述的一种或多种RNA颗粒、多种RNA颗粒或者组合物,其中所述RNA编码治疗性肽或多肽,并且其中将所述治疗性肽或多肽递送至受试者有利于治疗或预防疾病。

- [0755] 在一些实施方案中,以药学有效量给药一种或多种RNA颗粒或者多种RNA颗粒。
- [0756] 在一些实施方案中,以药学有效量给药组合物。
- [0757] 在一些实施方案中,给药是通过静脉内、瘤内或瘤周注射。
- [0758] 在一些实施方案中,受试者是哺乳动物。在一些实施方案中,哺乳动物是人。
- [0759] 在本公开的一些实施方案中,目的是通过疫苗接种来提供对抗传染病的保护。
- [0760] 在本公开的一些实施方案中,目的是向受试者、特别是有此需要的受试者提供分泌的治疗性蛋白,例如抗体、双特异性抗体、细胞因子、细胞因子融合蛋白、酶。
- [0761] 在本公开的一些实施方案中,目的是向受试者、特别是有此需要的受试者提供蛋白替代疗法,如产生红细胞生成素、因子VII、血管性血友病因子、 β -半乳糖苷酶、 α -N-乙酰基葡萄糖苷酶。
- [0762] 在本公开的一些实施方案中,目的是调节/重新编程血液中的免疫细胞。
- [0763] 在本公开的一些实施方案中,目的是向受试者、特别是有此需要的受试者提供一种或多种调节肿瘤微环境的细胞因子或细胞因子融合物。
- [0764] 在本公开的一些实施方案中,目的是向受试者、特别是有此需要的受试者提供一种或多种具有抗肿瘤活性的细胞因子或细胞因子融合物。
- [0765] 一些实施方案涉及一种治疗患有癌症(例如,实体瘤癌症)的受试者的方法,其包括给药有效量的RNA颗粒(例如,包含RNA颗粒的药物组合物),其中所述颗粒中的RNA包含以下或由以下组成:编码IL-12sc蛋白的RNA、编码IL-15sushi蛋白的RNA、编码IFN α 蛋白的RNA和编码GM-CSF蛋白的RNA。考虑用于治疗患有癌症的受试者的颗粒和颗粒组合物,其中所述颗粒中的RNA包含以下或由以下组成:编码IL-12sc蛋白的RNA、编码IL-15sushi蛋白的RNA、编码IFN α 蛋白的RNA和编码GM-CSF蛋白的RNA。本文描述用于给药这类RNA的颗粒和颗粒组合物。
- [0766] 在一些实施方案中,受试者患有晚期、不可切除或转移性实体瘤癌症。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,受试者患有转移性实体瘤。在一些实施方案中,受试者患有不可切除的实体瘤。在一些实施方案中,实体瘤癌症是上皮肿瘤、前列腺肿瘤、卵巢肿瘤、肾细胞肿瘤、胃肠道肿瘤、肝肿瘤、结肠直肠肿瘤、脉管系统肿瘤、间皮瘤肿瘤、胰腺肿瘤、乳腺肿瘤、肉瘤肿瘤、肺肿瘤、结肠肿瘤、黑素瘤肿瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、神经母细胞瘤肿瘤、睾丸肿瘤、癌肿瘤、腺癌肿瘤、精原细胞瘤肿瘤、视网膜母细胞瘤、皮肤鳞状细胞癌(CSCC)、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、头颈癌、骨肉瘤肿瘤、肾肿瘤、甲状腺肿瘤、甲状腺未分化癌(ATC)、肝肿瘤、结肠肿瘤或其他适合瘤内注射的实体瘤。在一些实施方案中,实体瘤癌症是淋巴瘤。在一些实施方案中,淋巴瘤是非霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中,实体瘤癌症是霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中,实体瘤癌症是黑素瘤。在一些实施方案中,实体瘤癌症是黑素瘤,其中黑素瘤是葡萄膜黑素癌或粘膜黑素瘤。在一些实施方案中,实体瘤癌症是黑素瘤,包括适合瘤内注射的浅表、皮下和/或淋巴结转移。在一些实施方案中,实体瘤癌症是HNSCC和/或仅有粘膜部位的粘膜黑素瘤。在一些实施方案中,实体瘤癌症不是黑素瘤。在一些实施方案中,受试者患有一种以上实体瘤。在一些实施方案中,实体瘤癌症是III期、III期的子集、IV期或IV期的子集。在一些实施方案中,实体瘤癌症是晚期且不可切除的。在一些实施方案中,实体瘤癌症已从其起源扩散到受试者的另一部位。在一些实施方案中,实体瘤癌症具有一个或多个皮肤或皮下病变,任选其中癌症不是皮肤癌。在

一些实施方案中,实体瘤癌症是IIIB期、IIIC期或IV期黑素瘤。在一些实施方案中,实体瘤癌症不是黑素瘤、非小细胞肺癌、肾癌、头颈癌、乳腺癌或CSCC。在一些实施方案中,实体瘤癌症包括浅表或皮下病变和/或转移。

[0767] 一些实施方案涉及一种治疗晚期黑素瘤的方法,其包括向患有晚期黑素瘤的受试者给药有效量的RNA颗粒,其中所述RNA颗粒中的RNA包含以下或由以下组成:编码IL-12sc蛋白的RNA、编码IL-15sushi蛋白的RNA、编码IFN α 蛋白的RNA和编码GM-CSF蛋白的RNA。考虑用于治疗晚期黑素瘤的颗粒和颗粒组合物,其中所述颗粒中的RNA包含以下或由以下组成:编码IL-12sc蛋白的RNA、编码IL-15sushi蛋白的RNA、编码IFN α 蛋白的RNA和编码GM-CSF蛋白的RNA。

[0768] 在一些实施方案中,黑素瘤包括适合直接瘤内或瘤周注射的肿瘤。本文描述用于给药这类RNA的颗粒和颗粒组合物。

[0769] 在一些实施方案中,治疗实体瘤癌症包括减小肿瘤的大小或防止受试者的癌症转移。

[0770] 在一些实施方案中,RNA颗粒通过瘤内注射给药。在一些实施方案中,瘤内注射包括注射至单个实体瘤中。在一些实施方案中,RNA颗粒通过瘤周注射给药。

[0771] 如本文所用,并且如本领域众所周知的,“实体瘤”是组织的恶性肿瘤。“实体瘤癌症”是包含实体瘤的癌症。示例性实体瘤癌症是肉瘤、癌和淋巴瘤。关于淋巴瘤,实体瘤可以是淋巴管内的大量淋巴细胞。

[0772] 如本文所用,“晚期(advanced-stage)实体瘤癌症”或“晚期(advanced)实体瘤癌症”包括实体瘤癌症,其分期被确定为III期、III期的子集、IV期或IV的子集,由已知系统评估,例如,由美国癌症联合委员会(AJCC)开发的肿瘤、淋巴结和转移(TNM)分期系统(参见AJCC Cancer Staging Manual,8th Edition)。在一些实施方案中,TNM分期系统用于除黑素瘤以外的实体瘤癌症。在一些实施方案中,癌症是黑素瘤或晚期黑素瘤,其包括由AJCC黑素瘤分期(2018年第8版)评估的IIIB期、IIIC期或IV期。Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, et al. Melanoma of the skin. In: Amin MB, ed. AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed. Chicago, IL: AJCC-Springer; 2017: 563-585中提供关于AJCC黑素瘤分期的非限制性描述,其全部内容援引加入本文。在一些实施方案中,癌症是肉瘤、癌或黑素瘤,包括例如乳腺癌、鳞状细胞癌(SCC)、基底细胞癌(BCC)、Merkle细胞癌(MCC)、皮肤鳞状细胞癌(CSCC)和头颈部鳞状细胞癌(HNSCC),每种都可能是晚期的。所有主要癌症都存在类似的分期系统,一般基于肿瘤的临床和/或病理细节以及这些因素如何影响生存。

[0773] “肿瘤”在本文中也可以称作“赘生物”。例如,术语“实体瘤”和“实体赘生物”可以互换。

[0774] “不可切除”(例如,晚期不可切除)的癌症通常不可以通过手术切除。

[0775] “浅表”(有时也称作“皮肤”)病变或转移是在皮肤内或皮肤表面的病变或转移。在一些实施方案中,浅表病变或转移在皮肤内。在一些实施方案中,浅表病变或转移在真皮内。在一些实施方案中,浅表病变或转移在表皮内。

[0776] “皮下”病变或转移在皮肤下方。在一些实施方案中,皮下病变或转移与皮下组织有关。

[0777] 在一些实施方案中,并且在实体瘤癌症的背景下,“肿瘤病变”或“病变”是实体瘤,

例如,原发性实体瘤或由另一实体瘤转移产生的实体瘤。

[0778] 可以存在于本文所述颗粒和/或颗粒组合物中的RNA混合物(例如,包含编码IL-12sc蛋白的RNA、编码IL-15sushi蛋白的RNA、编码IFN α 蛋白的RNA和编码GM-CSF蛋白的RNA的RNA混合物)可以包含大约相同量的RNA。

[0779] “大约相同量”或“大约相等量”等中的短语表示涵盖其中每种RNA是精确的1:1:1:1(w/w/w/w)比率的情况,以及其中RNA与每种RNA的规定量相差不超过10%的情况。在一些实施方案中,RNA与每种RNA的规定量相差不超过9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或少于1%。在一些实施方案中,RNA与每种RNA的规定量相差不超过0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%或0.1%。

[0780] 如本文所用的术语“瘤内”或“瘤周”等表示进入肿瘤。

[0781] 如本文所用,“淋巴瘤”是源自淋巴细胞的实体瘤癌症。淋巴瘤包括霍奇金和非霍奇金淋巴瘤。淋巴瘤在淋巴结内形成实体瘤/赘生物,转移时也可以在非淋巴结组织中发现。

[0782] 在一些实施方案中,(i)编码IL-12sc蛋白的RNA包含SEQ ID NO:7、14或15的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:7、14或15的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列,和/或(ii)IL-12sc蛋白包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码IL-12sc蛋白的RNA包含SEQ ID NO:7。

[0783] 在一些实施方案中,(i)编码IL-15sushi蛋白的RNA包含SEQ ID NO:8或23的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:8或23的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列,和/或(ii)IL-15sushi蛋白包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码IL-15sushi蛋白的RNA包含SEQ ID NO:8。

[0784] 在一些实施方案中,(i)编码IFN α 蛋白的RNA包含SEQ ID NO:9、19或20的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:9、19或20的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列,和/或(ii)IFN α 蛋白包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码IFN α 蛋白的RNA包含SEQ ID NO:9。

[0785] 在一些实施方案中,(i)编码GM-CSF蛋白的RNA包含SEQ ID NO:10或26的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:10或26的核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的核苷酸序列,和/或(ii)GM-CSF蛋白包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%相同性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码GM-CSF蛋白的RNA包含SEQ ID NO:10。

[0786] 在一些实施方案中,编码IL-12sc蛋白的RNA包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列。

[0787] 在一些实施方案中,编码IL-15sushi蛋白的RNA包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列。

[0788] 在一些实施方案中,编码IFN α 蛋白的RNA包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列。

[0789] 在一些实施方案中,编码GM-CSF蛋白的RNA包含SEQ ID NO:10的核苷酸序列。

[0790] 在一些实施方案中,编码IL-12sc蛋白的RNA包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列,编码IL-15sushi蛋白的RNA包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列;编码IFN α 蛋白的RNA包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列;并且编码GM-CSF蛋白的RNA包含SEQ ID NO:10的核苷酸序列。

[0791] 在一些实施方案中,编码IL-12sc蛋白的RNA包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列,编码IL-15sushi蛋白的RNA包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列;编码IFN α 蛋白的RNA包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列;编码GM-CSF蛋白的RNA包含SEQ ID NO:10的核苷酸序列,并且每种RNA包含5'帽,所述5'帽包含 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 或 $3'-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G$ 。在一些实施方案中,5'帽包含 $m_2^{7,3'-0}Gppp(m_1^{2'-0})ApG$ 。

[0792] 本领域技术人员会知道免疫疗法和疫苗接种的原理之一是基于以下事实:通过用抗原或表位免疫受试者来产生对疾病的免疫保护性反应,其有待治疗的疾病在免疫学上相关。因此,本文所述的药物组合物可用于诱导或增强免疫应答。因此本文所述的药物组合物可用于涉及抗原或表位的疾病的预防性和/或治疗性治疗。

[0793] 术语“免疫”或“疫苗接种”描述向个体给药抗原的过程,目的是例如出于治疗或预防原因诱导免疫应答。

[0794] 本文参考的文件和研究的引用并不意味着承认任何前述内容是相关的现有技术。关于这些文件内容的所有陈述都是基于申请人可获得的信息,并且不构成对这些文件内容正确性的任何承认。

[0795] 呈现所述描述(包括以下实施例)是为了使本领域普通技术人员能够制备和使用各种实施方案。特定设备、技术和应用的描述仅作为实例提供。对本文描述的实例的各种修改对于本领域普通技术人员是显而易见的,并且在不背离各种实施方案的精神和范围的情况下,本文中定义的一般原理可以应用于其他实例和应用。因此,各种实施方案不是为了限制本文描述和示出的实例,而是与符合权利要求的范围一致。

[0796]

序列描述		
SEQ ID NO:	描述	序列
5' UTR		
1	5' UTR (DNA)	GGAATAAACTAGTCTCAACACAACATATACAAAACAAACGAATCTCAAGCAATC AAGCATTCTACTTCTATTGCAGCAATTTAAATCATTTCTTTTAAAGCAAAAGCAA TTTCTGAAAATTTTCACCATTTACGAACGATAGCC
2	5' UTR (RNA)	GGAAUAAACUAGUCUCAACACAACAUUAUACAAAACAAACGAUUCUCAAGCAA UCAAGCAUUCUACUUCUAUUGCAGCAAUUUAAAUCAUUUCUUUAAAAGCAAAA GCAAUUUUCUGAAAAUUUUCACCAUUUACGAACGAUAGCC
3	Mod 5' UTR (DNA)	AGACGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC
4	Mod 5' UTR (RNA)	AGACGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC
3' UTR		
5	3' UTR (DNA)	CTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCTTTCCCGTCCTGGG TACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCACCTCCACCTG CCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATGC AGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAAC CTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAAGGGTTGGTCAA TTTCGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT
6	3' UTR (RNA)	CUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGG GUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUUAGCUCCACCACC UGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAA UGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAU UAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAAACUAAGCUAUACUAACCCCAAGGUU GGUCAUUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGUAGCCGCG UCGCU
7	编码 IL-12sc 的 mRNA 序列注释 CAPS:5'UTR CAPS:编码序列 CAPS:3'UTR CAPS:poly A 'Y':	AGACGAACYA GYAYCYCY GGYCCCCACA GACYCAGAGA GAACCCGCCA CCAYGYGYCA CCAGCAGCYG GYGAYCYCAY GGYCYCCY GGYAYYYCYG GCAYCYCCYC YYGYCGCAAY CYGGGAACYG AAGAAAGACG YGYAYGYCGY YGAGCYCGAC YGGYAYCCGG AYGCGCCYGG CGAGAYGGYG GYGCGYACCY GYGACACCCC AGAGGAGGAY GGGAYCACYY GGACCCYYGA YCAAYCCYCC GAAGYGCCYCG GGYCYGGCAA GACYCYGACC AYACAAGYGA AAGAGYYYGG CGAYGCCGGG CAGYACACY GCCAYAAGGG CGGAGAAGYY CYGYCCCACY CACYGCGYCY GCYGCACAAG AAAGAGGACG GAAYYYGGAG YACCGAYAYC CYGAAAGAYC AGAAAGAGCC CAAGAACAAA ACCYYCYGYC GYGCGAAGC CAAGAACYAC YCAGGGAGAY YYACYGYGYG GYGGCYGACG ACGAYCAGCA CCGAYCYGAC YYYCYCCGYG AAAYCAAGYA GGGGAYCAYC YGACCCYCAA

[0797]

8	N1-甲基假尿苷	GGAGYCACAY GYGGAGCGGC YACYCYGAGC GCYGAACGCG YAAGAGGGGA CAAYAAGGAG YACGAGYAYA GCGYYGAGYG CCAAGAGGAY AGCGCAYGCC CCGCCGCCGA AGAAYCAYYG CCCAYGAAG YGAYGGYGGGA YGCGYACAC AAGCYGAAGY AYGAGAACYA CACAAGCYCC YYCYCAYCC GYGACAYCAY CAAACCAGAY CCYCCYAAGA ACCYCCAGCY YAAACCYCYG AAGAACYCYA GACAGGYGGA AGYGYCYYG GAGYAYCCCG ACACCYGGYC YACACCACAY YCCYACYYCA GYCYCACAYY CYGCGYYCAG GYACAGGGCA AGYCCAAAAG GGAGAAGAAG GAYCGGGYCY YYACAGAYAA AACAAGYGCC ACCGYAYAY GCCGAAGAA YGCCYCYAY YCYGYGCGYG CGCAGGACAG AYACYAYAGC AGCYCYYGGA GYGAAYGGGC CAGYGYCCCA YGYCAGGGY CAYCCGGYGG YGGCGGCAGC CCCGGAGGCG GYAGCYCCAG AAAYCYCCY GYGGCYACAC CYGAYCCAGG CAYGYYYCCC YGYYYGCACC AYAGCCAAAA CCYCCYGAGA GCAGYCAGCA ACAYGCYCCA GAAAGCYAGA CAAACACYGG AAYCYACCC AYGCACCYCC GAGGAAAYAG AYCACGAGGA YAYCACYAAG GACAAAACAA GCACYGYCGA AGCAYGCCY CCYGGGAAC YGACAAAGAA CGAGAGYYGC CYAAAYCAA GAGAAACAYC YYYCAYYACA AACGGYAGCY GCYYGGCAAG CAGAAAAACA YCYYYAYGA YGGCCYYYG YCYGAGCAGY AYYYAYGAGG AYCYCAAAAY GYACCAGGYG GAGYYAAGA CCAYGAAYGC CAAGCYGCGY AYGGACCCAA AGAGACAGAY YYYCCYCGAY CAGAAYAYGC YGGCYGYGAY YGAYGAACYG AYGCAGGCCY YGAAYYCAA CAGCGAAACC GYYCCCAGA AAAGCAGYCY YGAAGAACCY GACYYYAYA AGACCAAGAY CAAACYGYGY AAYCYCCYGC AYGCCYYAG AAYCAGAGCA GYCACAYAG AYAGAGYGAY GYCCYACCYG AAYGCYYCCY GAYGACYCGA GCYGGYACYG CAYGCACGCA AYGAYAGCYG CCCCYYYCCC GYCCYGGGYA CCCCAGYCY CCCCAGCCY CGGGYCCCAG GYAYGCYCCC ACCYCCACCY GCCCACYCA CCACCYCYGC YAGYYCCAGA CACCYCCCAA GCACGCAGCA AYGCAGCYCA AAACGCYYAG CCYAGCCACA CCCCACGGG AAACAGCAGY GAYYAACCYY YAGCAAYAAA CGAAAGYYA ACYAAGCYAY ACYAACCCCA GGGYGGYCA AYYCYGYGCC AGCCACACCG AGACCYGGYC CAGAGYCGCY AGCCGCGYCG CYAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAGCAYYGA CYAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA
	编码 IL-15 sushi 的 mRNA	AGACGAACYA GYAYCYCY GGYCCCCACA GACYCAGAGA GAACCCGCCA CCAYGGCCCC GCGGCGGGCG CGCGGCGYCC GGACCCYCGG YCYCCGGCG CYGAYACYGC YGCGYCYGY CCGCCGCCG GCGACGCGGG GCAYCACGYG CCCYCCCCC AYGYCCGYG AACACGCAGA CAYCYGGGYC AAGAGCYACA GCYYGYACYC CAGGGAGCGG YACAYYGYA ACYCYGGYYY CAAGCGYAAA GCCGGCACGY CCAGCCYGAC GGAGYGCGYG YYGAACAAG CCACGAAYGY CGCCACYGG ACAACCCCA GYCYCAAAYG CAYYAGAGAC CCYGCCYGG YYACCAAAG GCCAGCGCA CCCGGGGGAG GAYCYGGCGG CGGYGGGYCY GGCGGGGGAY CYGGCGGAG AGGAAGCYA CAGAACYGGG YGAAYGYAAY AAGYGAYY YG AAAAAAYY AAGAYCYAY YCAAYCYAYG CAYAYGYAYG CYACYYAYA YACGAAAGY GAYGYCACC CCAGYYGCAA AGYAACAGCA AYGAAGYCY YCYCYYGGA GYACAAGY AYYCACYYG AGYCCGGAGA YGCAAGYAY CAYGAYACAG YAGAAAYCY GAYCAYCCYA GCAACAACA
	序列注释	
	CAPS:5'UTR CAPS:编码序列 CAPS:3'UTR CAPS:poly A 'Y': N1-甲基假尿苷	

[0798]

		GYYYGYCYC YAAYGGGAAY GYAACAGAAY CYGGAYGCAA AGAAYGYGAG GAACYGGAGG AAAAAAAYAY YAAAGAAYYY YYGCAGAGYY YYGYACAYAY YGYCCAAAYG YYCAYCAACA CYCYYGAYG <u>ACYCGAGCYG</u> <u>GYACYGCAYG</u> <u>CACGCAAYGC</u> <u>YAGCYGCCCC</u> <u>YYYCCCGYCC</u> <u>YGGGYACCCC</u> <u>GAGYCYCCCC</u> <u>CGACCYCGGG</u> <u>YCCCAGGYAY</u> <u>GCYCCCACCY</u> <u>CCACCYGCCC</u> <u>CACYCACCAC</u> <u>CYCYGCGYAGY</u> <u>YCCAGACACC</u> <u>YCCAAGCAC</u> <u>GCAGCAAYGC</u> <u>AGCYAAAAAC</u> <u>GCYYAGCCYA</u> <u>GCCACACCCC</u> <u>CACGGGAAAC</u> <u>AGCAGYGAYY</u> <u>AACCCYYAGC</u> <u>AAAYAAACGAA</u> <u>AGYYAAACYA</u> <u>AGCYAYACYA</u> <u>ACCCAGGGY</u> <u>YGGYCAAYYY</u> <u>CGYGCCAGCC</u> <u>ACACCGAGAC</u> <u>CYGGYCCAGA</u> <u>GYCGCYAGCC</u> <u>GCGYCGCYAA</u> AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAAGC AYAYGACYAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
9	编码 IFN α 2b 的 mRNA 序列注释 CAPS:5'UTR CAPS:编码序列 <u>CAPS:3'UTR</u> <i>CAPS:poly A</i> 'Y': N1-甲基假尿苷	AGACGAACYA GYAYYCYCY GGYCCCCACA GACYCAGAGA GAACCCGCCA CCAYGGCCCY GACYYYYGCC CYCYCYGYGG CYYYGYGYGGY GCYGAGYYGC AAAYCYCCY GYAGYGYCGG AYGYGAYCYG CCYCAAACCC ACAGYCYGGG AYCYAGGAGA ACACYGAYGC YGYGGCACA GAYGAGGAGA AYYAGCCYCY YYYCCYGCCY GAAGGAYAGA CAYGACYYCG GCYYYCCCCA AGAGGAGYYY GGCAAYCAGY YCCAGAAAGC GGAAACGAYY CCCGYCYGC ACGAGAYGAY CCAGCAGAYC YYCAACCYCY YYYCAACCAA AGACAGCYCA GCAGCCYGGG AYGAGACACY GCYGGACAAA YCYACACAG AACYGYAYCA GCAGCYAAC GAYCYGGAGG CAYGCGYGAY CCAAGGGGY GGYGYGACYG AAACYCCGCY YAYGAAGGAG GACYCCAYYC YGGCYGYACG GAAGYACYYC CAGAGAAYAA CCCYCYAYCY GAAGGAGAAG AAGYACYCAC CAYGYGCYYG GGAAGYCGYG AGAGCCGAAA YCAYGAGAYC CYCAGCCYY AGCACCAAYC YCCAGGAAYC YCYGAGAAGC AAAGAGYGAY GACYCGAGCY GGYACYGCAY GCACGCAAYG CYAGCYGCC CYYYCCCGYC CYGGGYACCC CGAGYCYCCC CCGACCYCGG GYCCCAGGYA YGCYCCCACC YCCACCYGCC CCACYCACCA CCYCYGCGYAG YYCCAGACAC CYCCCAAGCA CGCAGCAAYG CAGCYCAAAA CGCYAGCCY AGCCACACCC CCACGGGAAA CAGCAGYGAY YAACCYYYAG CAAYAAACGA AAGYYAACY AAGCYAYACY AACCCAGGG YGGYCAAYY YCGYGCCAGC CACACCGAGA CCYGGYCCAG AGYCGCYAGC CGCGYCGCYA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAAG CAYAYGACYA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
10	编码 GM-CSF 的 mRNA 序列注释 CAPS:5'UTR CAPS:编码序列 <u>CAPS:3'UTR</u> <i>CAPS:poly A</i>	AGACGAACYA GYAYYCYCY GGYCCCCACA GACYCAGAGA GAACCCGCCA CCAYGYGGCY CCAGAGCCY GYCYCYYYGG GCACYGYGGC CYGCGCCAYC YCYGCACCCG CCCGCGCGCC CAGCCCAGC ACGCAGCCCY GGGAGCAYGY GAAYGCCAYC CAGGAGGCC GGCYCYGCGY GAACCYGAGY AGAGACACYG CYGCGYAGAY GAAYGAAACA GYAGAAGYCA YCYCAGAAAY GYYYGACCYC CAGGAGCCGA CCYGCCYACA GACCCGCCY GAGCYGYACA AGCAGGGCCY GCGGGGAGC CYACCAAGC YCAAGGGCC CYYGACCAYG AYGGCCAGCC ACYACAAGCA GCACYGCCY CCAACCCCG AAACYYCCY YGCAACCCAG AYYAYCACCY YYGAAAGYYY CAAAGAGAAC CYGAAGGACY YYCYGYYGY CAYCCCCYYY GACYGCGYGG AGCCAGYCCA GGAGYGAYGA CYCGAGCYGG

[0799]

	'Y': N1-甲基假尿苷	<u>YACYGCAYGC ACGCAAYGCY AGCYGCCCCY YYCCCGYCCY GGGYACCCCG</u> <u>AGYCYCCCCC GACCYCGGGY CCCAGGYAYG CYCCCACCYC CACCYGCCCC</u> <u>ACYCACCACC YCYGCAAGYY CCAGACACCY CCAAGCACG CAGCAAYGCA</u> <u>GCYCAAAACG CYYAGCCYAG CCACACCCCC ACGGGAAACA GCAGYGAYYA</u> <u>ACCYYYAGCA AYAAACGAAA</u> <u>GYYYAACYAA GCYAYACYAA CCCCAGGGYY GGYCAAYYYC GYGCCAGCCA</u> <u>CACCGAGACC YGGYCCAGAG YCGCYAGCCG CGYCGCYAAA AAAAAAAAAA</u> <u>AAAAAAAAAA AAAAAAGCA YAYGACYAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA</u> <u>AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA</u>
IL-12sc		
11	人 IL-12sc (氨基酸)	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMMVLTCDTPEE DGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ GVTCTGAATLSAERVGRDNKEYEYSVECQEDSACPAEESLPIEVMVDAVHKLKYE NYTSSFFIRDIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGSSGGG GSPGGGSSRNLPVATPDPMFPCPLHHSQNLRAVSNMLQKARQTLEFYPTCTSEID HEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSI YEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKS SLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
12	人未优化的 IL-12sc (CDS DNA) 序列注释 CAPS: p40 结构 域; CAPS: 接头; CAPS: p35.	<u>ATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTTTCCCTGGTTTTCTGGCATCTCCCC</u> <u>TCGTGGCCATATGGGAACTGAAGAAAGATGTTTATGTCTGATAGAATTGGATTGGTATCC</u> <u>GGATGCCCCCTGGAGAAATGGTGGTCCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGTAT</u> <u>CACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTCTGGCAAAACCTGACCA</u> <u>TCCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGTCACAAAGGAGGCGAG</u> <u>GTTCTAAGCCATTCGCTCCTGCTGCTTCACAAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCCACT</u> <u>GATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCACAAAAATAAGACCTTTCTAAGATGCGAGGC</u> <u>CAAGAATTATTCTGGACGTTTACCTGTCTGGTGGCTGACGACAATCAGTACTGATTT</u> <u>GACATTCAAGTGTCAAAGCAGCAGAGGGTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTGCG</u> <u>GAGCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGGAGTATGAGTAC</u> <u>TCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCCAT</u> <u>TGAGGTTCATGGTGGATGCCGTTCAAGCTCAAGTATGAAAACCTACACCAGCAGCTT</u> <u>CTTCATCAGGGACATCATCAAACCTGACCCACCCAAGAACTTGACGCTGAAGCCATT</u> <u>AAAGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTGAGTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGTACTC</u> <u>CACATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTTCAAGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAG</u> <u>AAAAGAAAGATAGAGTCTTACGGACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGCCGCAA</u> <u>AATGCCAGCATTAGCGTGCAGGGCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCGAA</u> <u>TGGGCATCTGTGCCCTGCAGTGGCTCTAGCGGAGGGGGAGGCTCTCTTGGCGGGGG</u> <u>ATCTAGCAGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCT</u> <u>TCACCACTCCCCAAACCTGCTGAGGGCCGTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCA</u> <u>GACAACTCTAGAATTTTACCCTTGCACTTCTGAGGAAATTGATCATGAAGATA</u> <u>TCACAAAAGATAAAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCA</u> <u>AGAATGAGAGTTGCCTAAATTCCAGAGAGACCTCTTTTATACTAATGGGAGTT</u> <u>GCCTGGCCTCCAGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTT</u>

[0800]

		ATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAATGCAAAGCTT CTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTTTCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATT GATGAGCTGATGCAGGCCCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAAATC CTCCCTTGAAGAACCGGATTTTATAAACTAAAAATCAAGCTCTGCATACTTCTT CATGCTTTCAGAATTCGGGCAGTGACTATTGATAGAGTGATGAGCTATCTGAAT GCTTCCTGATGA
13	人优化的 IL-12sc (CDS DNA) 序列注释 CAPS: p40 结构 域; CAPS: 接头; CAPS: p35.	ATGTGTCAACCAGCAGCTGGTGATCTCATGGTTCTCCCTGGTATTTCTGGCATCTCCTC TTGTGCGAATCTGGGAACTGAAGAAAGACGTGTATGTCGTTGAGCTCGACTGGTATC CGGATGCGCCTGGCGAGATGGTGGTGCTGACCTGTGACACCCCAGAGGAGGATGGG ATCACTTGGACCCCTTGATCAATCCTCCGAAGTGCTCGGGTCTGGCAAGACTCTGACC ATACAAGTGAAAGAGTTTGGCGATGCCGGGCAGTACACTTGCCATAAGGGCGGAGA AGTTCTGTCCCACTCACTGCTGCTGCTGCACAAGAAAGAGGACGGAATTTGGAGTA CCGATATCCTGAAAGATCAGAAAGAGCCCAAGAACAAAACCTTCTTGCGGTGCGAA GCCAAGAAGTACTCAGGGAGATTTACTTGTGGTGGCTGACGACGATCAGCACCGAT CTGACTTTCTCCGTGAAATCAAGTAGGGGATCATCTGACCCTCAAGGAGTCACATGT GGAGCGGCTACTCTGAGCGCTGAACGCGTAAGAGGGGACAATAAGGAGTACGAGTA TAGCGTTGAGTGCCAAGAGGATAGCGCATGCCCCGCCGCCGAAGAATCATTGCCCAT TGAAGTGATGGTGGATGCTGTACACAAGCTGAAGTATGAGAACTACACAAGCTCCTT CTTCATCCGTGACATCATCAAACCAGATCCTCCTAAGAACCTCCAGCTTAAACCTCT GAAGAACTCTAGACAGGTGGAAGTGTCTTGGGAGTATCCCGACACCTGGTCTACAC CACATTCTACTTTCAGTCTCACATTCTGCGTTTCAGGTACAGGGCAAGTCCAAAAGGG AGAAGAAGGATCGGGTCTTTACAGATAAAACAAGTGCCACCGTTATATGCCGGAAG AATGCCTCTATTTCTGTGCGTGCGCAGGACAGATACTATAGCAGCTCTTGGAGTGAAT GGGCCAGTGTCCTATGTTTCAGGGTCATCCGGTGGTGGCGGCAGCCCCGGAGGCGGT AGCTCCAGAAATCTCCCTGTGGCTACACCTGATCCAGGCATGTTTCCCTGTTTG CACCATAGCCAAAACCTCCTGAGAGCAGTCAGCAACATGCTCCAGAAAGCTAG ACAAACACTGGAATTTCTACCCATGCACCTCCGAGGAAATAGATCACGAGGATAT CACTAAGGACAAAACAAGCACTGTCTGAAGCATGCCTTCCCTTGGAAGTGACAA AGAACGAGAGTTGCCCTTAATTCAGAGAAACATCTTTCATTACAAACGGTAGCT GCTTGGCAAGCAGAAAAACATCTTTTATGATGGCCCTTTGTCTGAGCAGTATTT ATGAGGATCTCAAAATGTACCAGGTGGAGTTTAAGACCATGAATGCCAAGCTG CTGATGGACCCAAAGAGACAGATTTTCTCGATCAGAATATGCTGGCTGTGATT GATGAACTGATGCAGGCCTTGAATTTCAACAGCGAAACCGTTCCCCAGAAAAG CAGTCTTGAAGAACCTGACTTTTATAAGACCAAGATCAAAGTGTGTATTCTCCT GCATGCCCTTAGAATCAGAGCAGTCACTATAGATAGAGTGATGTCTACCTGAA TGCTTCCTGATGA
14	人未优化的 IL-12sc (编码 CDS 的 RNA)	AUGUGUCACCAGCAGUUGGUCAUCUCUUGGUUUUCCUGGUUUUUCUGGCAU CUCCCCUCGUGGCCAUUUGGGAACUGAAGAAAGAUUUUAUGUCGUAGAAUU GGAUUGGUUAUCCGGAUGCCCCUGGAGAAAUGGUGGUCCUACCUUGACACC CCUGAAGAAGAUUGGUUUCACCUUGGACCUUGGACCAGAGCAGUGAGGUUUUAG GCUCUGGCAAAACCCUGACCAUCCAAGUCAAGAGUUUGGAGAUUGCUGGCCA GUACACCUGUCACAAAGGAGGCGAGGUUCUAAGCCAUUCGCUCCUGCUGCUU CACAAAAAGGAAGAUGGAAUUUGGUCCACUGAUUUUUAAAGGACCAGAAAG AACCCAAAAUAAAGACCUUUCUAAAGAUUGCGAGGCCAAGAAUUUUCUGGACG UUUCACCUGCUGGUGGCUGACGACAAUCAGUACUGAUUUGACAUCAGUGUC

[0801]

		AAAAGCAGCAGAGGGUCUUCUGACCCCCAAGGGGUGACGUGCGGAGCUGCU ACACUCUCUGCAGAGAGAGUCAGAGGGGACAACAAGGAGUAUGAGUACUCAG UGGAGUGCCAGGAGGACAGUGCCUGCCCAGCUGCUGAGGAGAGUCUGCCCA UUGAGGUCAUGGUGGAUGCCGUUCACAAGCUCAAGUAUGAAAAACUACACCAG CAGCUUCUUCAUACAGGGACAUCAUCAAACCUGACCCACCCAAGAACUUGCAG CUGAAGCCAUUAAAGAAUUCUCGGCAGGUGGAGGUCAGCUGGGAGUACCCUG ACACCGGAGUACUCCACAUUCCUACUUCUCCUGACAUUCUGCGUUCAGGU CCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAAGAAAGAUAGAGUCUUCACGGACAAGACC UCAGCCACGGUCAUCUGCCGCAAAAAUGCCAGCAUAGCGUGCGGGCCAGG ACCGCUACUUAAGCUCUUCUUGGAGCGAAUGGGCAUCUGUGCCCUGCAGUGG CUCUAGCGGAGGGGGAGGCUCUCCUGGCGGGGAUCUAGCAGAAACCUC CGUGGCCACUCCAGACCCAGGAUGUCCCAUGCCUUCACCACUCCCAAAAC CUGCUGAGGGCCGUCAGCAACAUGCUCAGAAAGGCCAGACAAACUCUAGAAU UUUACCCUUGCACUUCUGAGGAAAUUGAUCAUGAAGAUACACAAAAGAUAA AACCAGCACAGUGGAGGCCUGUUUACCAUUGGAAUUAACCAAGAAUGAGAGU UGCCUAAAUUCCAGAGAGACCUCUUUCAUAACUAAUGGGAGUUGCCUGGCCU CCAGAAAGACCUCUUUUAUGAUGGCCCUGUGCCUAGUAGUAUUUAUGAAGA CUUGAAGAUUACCAGGUGGAGUUCAGACCAUGAAUGCAAAGCUUCUGAUG GAUCCUAAAGAGGCAGAUUUUCUAGAUCAAAACAUUGCGGCAGUUAUUGAUG AGCUGAUGCAGGCCCUGAAUUUCAACAGUGAGACUGUGCCACAAAAUCCUC CCUUGAAGAACCUGAUUUUUAUAAAACUAAAUCAAGCUCUGCAUACUUCU CAUGCUUUCAGAAUUCGGGCAGUGACUUAUGAUAGAGUGAUGAGCUAUCUGA AUGCUUCCUGAUGA
15	人优化的 IL-12sc (编码 CDS 的 RNA)	AUGUGUACCAGCAGCUGGUGAUCUCAUGGUUCUCCUGGUUUUCUGGCAU CUCCUCUUGUCGCAAUCUGGGAACUGAAGAAAGACGUGUAUGUCGUUGAGCU CGACUGGUUACCGGAUGCGCCUGGCGAGAUGGUGGUGCUGACCUGUGACAC CCCAGAGGAGGAUGGGAUCACUUGGACCCUUGAUCAAUCCUCCGAAGUGCUC GGGUCUGGCAAGACUCUGACCAUACAAGUGAAAGAGUUUGGCGAUGCCGGG CAGUACACUUGCCAUAGGGGCGGAGAAGUUCUGUCCACUCACUGCUGCUGC UGCACAAGAAAGAGGACGGAAUUGGAGUACCGAUUACUGAAAGAUACAGAA AGAGCCCAAGAACAAAACCUUCUUGCGGUGCGAAGCCAAGAACUACUCAGGG AGAUUUACUUGUUGGUGGCUGACGACGAUCAGCACCGAUCUGACUUUCUCCG UGAAUACAAGUAGGGGAUCAUCUGACCCUCAAGGAGUCACAUGUGGAGCGGC UACUCUGAGCGCUGAACGCGUAAGAGGGGACAAUAAGGAGUACGAGUAUAGC GUUGAGUGCCAAGAGGAUAGCGCAUGCCCCGCCGCCGAAGAAUCAUUGCCCA UUGAAGUGAUGGUGGAUGCUGUACACAAGCUGAAGUAUGAGAAACUACACAAG CUCCUUCUUCAUCCGUGACAUCAUCAAACCAGAUCCUCCUAGAACCUCAG CUUAAACCUCUGAAGAACUCUAGACAGGUGGAAGUGUCUUGGGAGUAUCCCG ACACCGGUCUACACCACAUUCCUACUUCAGUCUCACAUCUGCGUUCAGGU ACAGGGCAAGUCCAAAAGGGAGAAGAAGGAUCGGGUCUUUACAGAUAAAACA AGUGCCACCGUUAUUGCCGGAAGAAUGCCUCUAUUUCUGUGCGUGCGCAGG ACAGAUACUUAAGCAGCUCUUGGAGUGAAUGGGCCAGUGUCCCAUGUUCAGG GUCAUCCGGUGGUGGCGGCAGCCCCGGAGGCGGUAGCUCCAGAAAUCUCC UGUGGCUACACCUGAUCCAGGAUGUUUCCUGUUUGCACCAUAGCCAAAAC CUCCUGAGAGCAGUCAGCAACAUGCUCAGAAAGCUAGACAAACACUGGAU

[0802]

		UCUACCCAUGCACCUCGAGGAAUAGAUCACGAGGAUAUCACUAAGGACAA AACAAGCACUGUCGAAGCAUGCCUUCUUUGGAACUGACAAAGAACGAGAGU UGCCUUAUUCAAGAGAAACAUCUUUCAUUACAAACGGUAGCUGCUUGGCAA GCAGAAAAACAUCUUUUUAUGAUGGCCCCUUGUCUGAGCAGUAUUUAUGAGGA UCUCAAAAUGUACCAGGUGGAGUUUAAGACCAUGAAUGCCAAGCUGCUGAUG GACCCAAAGAGACAGAUUUUCCUCGAUCAGAAUAUGCUGGCUGUGAUUGAUG AACUGAUGCAGGCCUUGAAUUUCAACAGCGAAACCGUCCCCAGAAAAGCAG UCUUGAAGAACCUGACUUUAUAAAGACCAAGAUAACUGUGUAUUCUCCUG CAUGCCUUUAGAAUCAGAGCAGUCACUAUAGAUAGAGUGAUGUCCUACCUGA AUGCUUCCUGAUGA
IFN α 2b (IFN α 2b)		
16	人 IFN α 2b (氨基酸)	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVGC DLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLF SCLKDR HDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQIFNLFSTKSSAAWDETL LDKFYTELY QQ LNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVR AEIMRSFSLSTNLQESLSRKE
17	人未优化的 IFN α 2b (CDS DNA)	ATGGCCTTGACCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGCTCAGCTGCAAGTC AAGCTGCTCTGTGGGCTGTGATCTGCCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGGA GGACCTTGATGCTCCTGGCACAGATGAGGAGAATCTCTCTTTTCTCCTGCTTG AAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCCCAGGAGGAGTTTGGCAACCAAGTTCCA AAAGGCTGAAACCATCCCTGTCTCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAACCT TTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGGATGAGACCCTCCTAGACAAATT CTACACTGAACTCTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGG GGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCCTGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGT GAGGAAATACTTCCAAAAGAATCACTCTCTATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCC TTGTGCCTGGGAGGTTGTGACAGCAGAAATCATGAGATCTTTTTCTTTGTCAAC AAACTTGCAAGAAAGTTTAAGAAGTAAGGAATGATGA
18	人优化的 IFN α 2b (CDS DNA)	ATGGCCCTGACTTTTGCCCTTCTCGTGGCTTTGTTGGTGCTGAGTTGCAAATCT TCCTGTAGTGTCCGATGTGATCTGCCTCAAACCCACAGTCTGGGATCTAGGAG AACACTGATGCTGTTGGCACAGATGAGGAGAATTAGCCTCTTTTCTGCCTGA AGGATAGACATGACTTCGGCTTTCCCCAAGAGGAGTTTGGCAATCAGTTCCAG AAAGCGGAAACGATTCCC GTTCTGCACGAGATGATCCAGCAGATCTTCAACCT CTTTTCAACCAAAGACAGCTCAGCAGCCTGGGATGAGACACTGCTGGACAAAT TCTACACAGAACTGTATCAGCAGCTTAACGATCTGGAGGCATGCGTGATCCAAG GGGTGGTG TGA CTGAACTCCGCTTATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTA CGGAAGTACTTCCAGAGAATAACCTCTATCTGAAGGAGAAGAAGTACTCACCA TGTGCTTGGGAAGTCGTGAGAGCCGAAATCATGAGATCCTTCAGCCTTAGCAC CAATCTCAGGAATCTCTGAGAAGCAAAGAGTGATGA
19	人未优化的 IFN α 2b (编码 CDS 的 RNA)	AUGGCCUUGACCUUUGCUUUACUGGUGGCCCUCCUGGUGCUCAGCUGCAAGU CAAGCUGCUCUGUGGGCUGUGAUCUGCCUCAAACCCACAGCCUGGGUAGCAG GAGGACCUUGAUGCUCUGGCACAGAUGAGGAGAAUCUCUCUUUUCUCCUGC UUGAAGGACAGACAUGACUUUGGAUUUCCCCAGGAGGAGUUUGGCAACCAGU UCCAAAAGGCUGAAACCAUCCUGUCCUCCAUGAGAUGAUCCAGCAGAUUU CAACCUUUUCAGCACAAAGGACUCAUCUGCUGCUUGGGAUGAGACCCUCCUA GACAAAUUCUACACUGAACUCUACCAGCAGCUGAAUGACCUGGAAGCCUGUG UGAUACAGGGGGUGGGGGUGACAGAGACUCCCCUGAUGAAGGAGGACUCCA

[0803]

		UUCUGGCUGUGAGGAAUACUCCAAAGAAUCACUCUCUAUCUGAAAGAGAA GAAAUACAGCCCUUGUGCCUGGGAGGUUGUCAGAGCAGAAAUCAUGAGAUCU UUUUCUUUGUCAACAAACUUGCAAGAAAGUUUAAGAAGUAAGGAAUGAUGA
20	人优化的 IFN α 2b (编码 CDS 的 RNA)	AUGGCCCUGACUUUUGCCCUUCUCGUGGCUUUGUUGGUGCUGAGUUGCAAAU CUUCCUGUAGUGUCGGAUGUGAUCUGCCUCAAAACCCACAGUCUGGGAUCUAG GAGAACACUGAUGCUGUUGGCACAGAUGAGGAGAAUAGCCUCUUUUCUGC CUGAAGGAUAGACAUGACUUCGGCUUUCCTCAAGAGGAGUUUGGCAAUCAGU UCCAGAAAGCGGAAACGAUUCCTGUCACGAGAGAUGAUCAGCAGAUUU CAACCUCUUUUAACCAAAAGACAGCUCAGCAGCCUGGGAUGAGACACUGCUG GACAAAUUCUACACAGAACUGUAUCAGCAGCUAAACGAUCUGGAGGCAUGCG UGAUCCAAGGGGUUGGUGUGACUGAAACUCCGCUUAUGAAGGAGGACUCCAU UCUGGCUGUACGGAAGUACUCCAGAGAAUAACCCUCUAUCUGAAGGAGAAG AAGUACUCACCAUGUGCUUGGGAAGUCGUGAGAGCCGAAAUCAUGAGAUCU UCAGCCUAGCACCAAUUCUCCAGGAAUCUCUGAGAAGCAAAGAGUGAUGA
IL-15 sushi		
21	人 IL-15 sushi (氨 基酸)	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLLRPPATRGITCPPMSVEHADIWVKSYSLSYRER YICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPAIVHQRPAAPPGGGSG GGSGGGSGGGSLQNVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAM KCFLLELQVISLESGDASHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKE FLQSFVHIVQMFINTS
22	人 IL-15 sushi (CDS DNA) 序列注释 CAPS: IL-15 sushi; CAPS: 接头; CAPS: 成熟 IL-15	<u>ATGGCCCCGCGCGGGCGCGCGGCTGCCGACCCTCGGTCTCCCGGCGCTGCTACT</u> <u>GCTGCTGCTGCTCCGCGCCGCCGGCGACGCGGGCATCACGTGCCCTCCCCCATGTC</u> <u>CGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGACTCCAGGGAGCGGT</u> <u>ACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGC</u> <u>GTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCCTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATT</u> <u>AGAGACCCTGCCCTGGTTACCAAAGGCCAGCGCCACCCGGGGGAGGATCTGGCG</u> <u>GCGGTGGGTCTGGCGGGGATCTGGCGGAGGAGGAAGCTTACAGAACTGGGTGAA</u> <u>TGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGAT</u> <u>GCTACTTTATATACGGAAGTGATGTTACCCCAAGTTGCAAAAGTAACAGCAATG</u> <u>AAGTGCTTTCTCTTGAGATTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGT</u> <u>ATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTA</u> <u>ATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAA</u> <u>AATATTAAAGAATTTTGCAGAGTTTGTACATATTGTCCAATGTTTCATCAACA</u> <u>CTTCTTGATGA</u>
23	人 IL-15 sushi (编 码 CDS 的 RNA)	AUGGCCCCGCGCGGGCGCGCGGCUGCCGACCCUCGGUCUCCCGGCGCUG CUACUGCUGCUGCUGCUCUCCGGCCGCCGGCGACGCGGGGCAUCACGUGCCUC CCCCAUGUCCGUGGAACACGCAGACAUCUGGGUCAAGAGCUACAGCUUGUA CUCCAGGGAGCGGUACAUAUUGUAACUCUGGUUUAAGCGUAAAGCCGGCACG UCCAGCCUGACGGAGUGCGUGUUGAACAAGGCCACGAAUGUCGCCACUGGA CAACCCCAAGUCUCAAAUGCAUUAAGAGACCCUGCCUGGUUACCAAAGGCC AGCGCCACCCGGGGGAGGAUCUGGCGGCGGUGGGUCUGGCGGGGGAUCUGG CGGAGGAGGAAGCUACAGAACUGGGUGAAUGUAAUAAGUGAUUUGAAAAAA AUUGAAGAUUCUUAUCAAUCUAUGCAUUAUGAUGCUACUUUAUUAACGAAA GUGAUGUUCACCCAGUUGCAAAGUAACAGCAAUGAAGUGCUUUCUCUUGGA GUUACAAGUUAUUCACUUGAGUCCGGAGAUGCAAGUAUUAUGAUACAGUA

[0804]

		GAAAAUCUGAUCAUCCUAGCAAACAACAGUUUGUCUUCUAAUGGGAAUGUAA CAGAAUCUGGAUGCAAAGAAUGUGAGGAACUGGAGGAAAAAAUAUUAAGA AUUUUUGCAGAGUUUUGUACAUUUGUCCAAAUGUUCAUCAACACUUCUUGA UGA
	GM-CSF	
24	人 GM-CSF(氨基酸)	MWLQSLLLLTGTVACSISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDTAAEMNET VEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRSLTKLKGPLTMASHYKQHCPTPET SCATQIITFESFKENLKDFFLVIPFDCWEPVQE
25	人 GM-CSF (CDS DNA)	ATGTGGCTCCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCCTGCTCCATCTCTGC ACCCGCCCCGCTCGCCAGCCCCAGCACGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCC ATCCAGGAGGCCCGGCGTCTGCTGAACCTGAGTAGAGACACTGCTGCTGAGAT GAATGAAACAGTAGAAGTCATCTCAGAAATGTTTGACCTCCAGGAGCCGACCT GCCTACAGACCCGCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCTGCGGGGCAGCCTCAC CAAGCTCAAGGGCCCCCTTGACCATGATGGCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCC CTCCAACCCCGGAAACTTCCTGTGCAACCCAGATTATCACCTTTGAAAGTTTCA AAGAGAACCTGAAGGACTTTCTGCTTGTTCATCCCTTTGACTGCTGGGAGCCA GTCCAGGAGTGATGA
26	人 GM-CSF (编码 CDS 的 RNA)	AUGUGGCUCAGAGCCUGCUGCUCUUGGGCACUGUGGCCUGCUCCAUCUCUG CACCCGCCCCGUCGCCCAGCCCCAGCACGCAGCCUGGGAGCAUGUGAAUGC CAUCCAGGAGGCCCGGCGUCUGCUGAACCUGAGUAGAGACACUGCUGCUGAG AUGAAUGAAACAGUAGAAGUCAUCUCAGAAAUGUUUGACCUCAGGAGCCGA CCUGCCUACAGACCCGCCUGGAGCUGUACAAGCAGGGCCUGCGGGGCAGCCU CACCAAGCUCAAGGGCCCCUUGACCAUGAUGGCCAGCCACUACAAGCAGCAC UGCCCUCCAACCCCGGAAACUUCUGUGCAACCCAGAUUAUACCCUUGAAA GUUUCAAAGAGAACCUGAAGGACUUCUGCUUGUCAUCCCCUUGACUGCUG GGAGCCAGUCCAGGAGUGAUGA
27	示例性 Poly-A	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAUAUGACUAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAA

[0805] 实施例

[0806] 实施例1:实验部分

[0807] 磷脂酰丝氨酸脂质纳米颗粒 (PS-LNP) 的制备

[0808] 脂质相的制备:制备计算的脂质溶液并将其置于40-45℃的超声水浴中直至获得澄清的溶液,同时避免由于过度超声而降解。

[0809] 水相的制备:将水性RNA溶液储存在-20℃下并在冰浴上解冻。在无菌无核酸酶的5mL eppendorf管中,移取计算量的RNA、柠檬酸盐缓冲液(100mM, pH 4)、吐温20 和无核酸酶水。然后通过温和涡旋1秒将其混合。

[0810] 通过手动混合制备PS-LNP:用装有27G针头的5mL注射器抽取水相(RNA/柠檬酸盐缓冲液/吐温20)并去除任何气泡。将其快速注入脂质相,避免注入气泡。将其轻轻混合并在室温下温育10-15min,然后透析。

[0811] 通过NanoAssembler混合制备PS-LNP:将水相(RNA/柠檬酸盐缓冲液/吐温20)抽取到5mL注射器中并去除任何气泡。将酸化的乙醇脂质溶液抽取到3mL注射器中并去除任何气泡。使用NanoAssembler将两相合并,流速为12mL/min,混合比为3:1(脂质:水性)。将脂质和水相混合后,将所得的PS-LNP在室温下温育10-15min,然后透析。

[0812] 透析:在适当的烧杯中装入计算的1x D-PBS (250mL 1x PBS用于1mL PS-LNP样品),并将其放置在磁力搅拌器上。搅拌溶液以确保装有PS-LNP的透析盒的流畅移动,并允许透析2h。

[0813] 将透析的PS-LNP从透析盒回收到无核酸酶的eppendorf管中,并在2-8℃下储存。

[0814] PS-LNP制备过程的概览如图1A所示。

[0815] 磷脂酰丝氨酸脂质复合物 (PS-LPX) 的制备

[0816] 在制备PS-LPX之前,分别制备PS-脂质体。

[0817] 作为PS-脂质体实例的DODMA/DOPE/DOPS脂质体的制备:

[0818] 表1.PS-脂质体的60mM脂质储备液所需的脂质

[0819]	DODMA脂质液体	0.278g
	DOPE脂质粉末	0.056g
	DOPS脂质粉末	0.061g
	HCl _(aq) 溶液1M	0.60mL
	无水乙醇ad	10mL

[0820] 1.向称重的脂质添加无水乙醇,直至储备液的总体积为10mL。

[0821] 2.将溶液在40-45℃的水浴中超声处理2-3分钟。

[0822] 3.向脂质/乙醇混合物添加计算量的1M HCl水溶液并在40-45℃的水浴中超声处理,直至获得澄清的溶液。

[0823] 4.将42.50mL无核酸酶水转移至100mL无核酸酶玻璃烧杯中。

[0824] 5.在装有20G针头的10mL注射器的辅助下,抽取7.50mL酸化的脂质共混乙醇溶液并去除任何气泡。

[0825] 6.将针插入水中,直接注射7.50mL脂质溶液,同时在数字搅拌器上以250rpm的速度搅拌。将所得的脂质体再搅拌30min,然后透析。

[0826] PS-脂质体的透析

[0827] 将形成的脂质体对无核酸酶的5mM乙酸 (HAC) 水溶液透析,同时不断搅拌 (对于每个装有10mL PS-脂质体的Slide-A-Lyzer™ G2 Dialysis Cassette (3.5KD MWC0,15mL (Thermo Scientific,Catalogue ID 87724),2500mL的5mM乙酸水溶液) 3hr,随后在无核酸酶的玻璃瓶中回收。在无菌层流洁净工作台下,使用0.22μm PES膜 (Merck Millipore参考号:SLMPL25SS或SLGP033RS,取决于体积) 过滤透析的脂质体,然后储存在2-8℃下。

[0828] 磷脂酰丝氨酸脂质复合物 (PS-LPX) 的制备:

[0829] PS-脂质体相的制备:将先前制备的PS-脂质体用无核酸酶水稀释以将浓度调整至3.914mM DODMA、0.652mM DOPE、0.652mM DOPS和5mM HAC。

[0830] RNA水相的制备:使用前将储存在-20℃下的水性RNA溶液在冰上解冻。在无菌无核酸酶的5mL eppendorf管中,按表2所述的降序吸取以下组分。通过上下两次移液将溶液充分混合,同时避免形成气泡。

[0831] 表2.用于PS-LPX形成的RNA水相混合物

[0832]	组分	体积[μl]	终浓度
	无核酸酶水	910.85	
	RNA (水性溶液, 2mg/mL)	400	0.435mg/mL

柠檬酸盐缓冲液 (100mM, pH 4)	500	27.174mM
吐温20, 10% (水性溶液)	29.15	1.304mM
体积 (总计)	1840	

[0833] 通过手动混合制备PS-LPX: 用装有27G针头的3mL注射器抽取水相 (RNA/柠檬酸盐缓冲液/吐温20) 并去除任何气泡。用注射器针头直接在脂质相中, 快速注入水相, 避免注入气泡。1mL移液管通过上下移液3次混合所得的PS-LPX, 然后将其在室温下温育10-15min, 然后用0.320mL的10X PBS稀释并以相同方式混合。

[0834] 通过NanoAssemblr制备PS-LPX: 用3mL注射器抽取水相 (RNA/柠檬酸盐缓冲液/吐温20) 并去除任何气泡。以相同方式, 用3mL注射器也抽取PS-脂质体相并去除任何气泡。以1:1混合比率 (脂质: 水性) 和12mL/min的流速用NanoAssemblr混合相, 并且将所得的PS-LPX在室温下温育10-15min。随后, 用适当的移液管, 添加0.320mL的10X PBS并通过上下移液3次混合。

[0835] PS-LPX制备过程的概览如图1B所示。

[0836] 物理化学表征:

[0837] • 用来自WYATT technology的DynaPro酶标仪II通过动态光散射常规测量粒径和多分散性指数 (PDI)。将样品用1X D-PBS缓冲液稀释以获得2-10 μ g/mL的最终mRNA浓度。对于数据分析, 考虑样品的直径 (z-平均值, 由强度加权分布计算) 和PDI ($(\text{std.dev.}/\text{mean})^2$)。

[0838] • 使用WALLIS ζ -ZETAPOTENTIAL ANALYZER的高分辨率激光多普勒电泳迁移技术进行 ζ 电位测量, 随后的数据根据Smoluchowski或Huckel理论进行分析。

[0839] • 通过Ribogreen Assay测量脂质颗粒 (PS-LNP和PS-LPX) 中的RNA浓度。这种测定还使得能够通过比较存在和不存在Triton X100时染料的荧光信号来评估制剂中的RNA可及性。这是可能的, 因为染料仅在与RNA结合时才发出荧光。与RNA结合的RiboGreen试剂的激发最大值为~500nm, 发射最大值为~525nm。

[0840] • 用Agilent 2100生物分析仪测试RNA分子的完整性。生物分析仪操作原理是基于传统的凝胶电泳原理, 但使用芯片技术。每个芯片包括几个样品孔、凝胶孔和一个用于外标 (Ladder) 的孔。这些孔通过填充有聚合物和荧光染料的微通道相互连接。然后, 每个芯片中装载12个样品、带有标记的ladder。当填充孔和微通道时, 将芯片通过电极连接至电源, 根据大小分离RNA分子, 较小的片段比较大的片段迁移更快。然后将数据转换为凝胶图像 (条带) 和电泳图 (峰)。

[0841] 低温透射电子显微镜成像 (Cryo-TEM)

[0842] 在网格制备之前将样品涡旋30sec。通过氧等离子体 (负表面电荷) 使网格亲水化。将每个样品保存在200-目铜网格 (QuantiFoil®R2/1) 上由多孔碳膜支撑的玻璃化冰中。通过将6 μ L样品悬浮液滴施用在清洁的网格上, 用滤纸吸干, 然后立即用Leica EM GP在-180°C的液态乙烷中进行玻璃化, 制备每个样品。将网格储存在液氮下, 直到转移至电子显微镜进行成像。冷冻溶液后, 用Zeiss Libra® 120在液态N2冷冻条件下在多孔碳包被的铜网格上进行低温TEM成像。显微镜在120kV加速电压下使用, 用Gatan UltraScan® ccd相机拍摄图像。使用低温台将玻璃质冰网格转移到电镜中, 所述低温台将网格保持在-170°C以下的温度。以多个尺度获得每个网格的图像以评估样本的总体分布。

[0843] 生物学测试:

[0844] 将PS-LNP和PS-LPX给药至小鼠:

[0845] 使用30G 3/10cc胰岛素注射器(BD Biosciences),通过肌肉内(IM,2x 25 μ L)、皮内(ID,2x 25 μ L)、静脉内(IV,200 μ L)、皮下(SC,200 μ L)、腹腔内(IP,200 μ L)或瘤内(IT,50 μ L)途径,向动物注射0.05-0.15mg/kg剂量的达尔伯克磷酸盐缓冲盐水(DPBS)中的mRNA-PS-LNP和mRNA-PS-LPX。通过麻醉小鼠的眶后窦进行静脉内注射。

[0846] 给药编码小鼠EPO的mRNA配制的PS-LNP和PS-LPX后小鼠血浆EPO的测量:

[0847] 为了确定编码小鼠促红细胞生成素(mEPO)的mRNA在体内的翻译,通过4种不同途径,包括肌肉内(3.0 μ g)、腹腔内(1.0 μ g)、静脉内(3.0 μ g)和皮下(3.0 μ g),将用PS-LNP和PS-LPX配制的含有cap1结构(CleanCap413, TriLink)和1-甲基假尿苷(m¹Ψ)的mRNA注射至小鼠中。如Mahiny和Karikó (2016, Methods in Mol Biol 1428:297)所述在mRNA注射后6、24和48小时采集血液,以避免采样对动物血液学参数的影响。

[0848] 简单地说,通过尾静脉穿刺抽取18微升血液,与2 μ L 0.5M EDTA(pH 7.2)混合,并且在20 μ L Drummond microcaps玻璃毛细管(Sigma-Aldrich)中离心。折断毛细管后,回收血浆,使用mEPO DuoSet ELISA Development试剂盒(R&D Systems, Minneapolis, MN)根据制造商的说明书测量血浆mEPO水平。简单地说,将平底96-孔板用捕获抗体(PBS中100 μ l/孔)预包被,并且在室温(RT)下温育过夜。将板用含有0.05%吐温-20的PBS洗涤,并且用1%牛白蛋白血清(BSA)在RT下温育2小时以防止抗体的非特异性结合,然后再次洗涤。将使用不同稀释因子(i.m.和s.c.为1:20, i.v.和i.p.为1:150)在1%BSA-PBS中稀释的血浆样品添加至适当的孔中,并且将平板在RT下温育2小时。之后,将在1%BSA-PBS(1:180)中稀释的抗EPO单克隆检测抗体添加至每个孔中,并且将平板在RT下温育2小时。洗涤之后,将平板用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的二抗(1:200)在RT下温育20min,然后将底物溶液(KPL TMB 2-组分微孔过氧化物酶底物系统)添加至每个孔中(100 μ l/孔)。5min温育后,添加2M硫酸(50 μ l/孔)以终止反应,并且使用Infinite 200Pro酶标仪(Tecan, Mannedorf, Switzerland)在450nm下测量吸光度。

[0849] 给药用PS-LNP和PS-LPX配制的编码萤火虫萤光素酶的mRNA后小鼠中萤光素酶活性的检测:为了确定编码萤火虫萤光素酶的mRNA在体内的翻译,通过4种不同途径,包括皮内、肌肉内、静脉内和皮下,将用PS-LNP或PS-LPX配制的含有cap1结构(CleanCap413, TriLink)和1-甲基假尿苷(m¹Ψ)的mRNA注射至小鼠中。使用IVIS光谱体内成像系统(PerkinElmer, Rodgau, Germany)在PS-LNP递送后6、24、48、72小时和第6天进行萤光素酶表达的体内成像。为了确定生物发光的差异,向小鼠腹腔内给药150mg/kg剂量的D-萤光素(生物发光底物)。小鼠接受D-萤光素后,在补充有2.5%异氟烷的小室中进行麻醉。将小鼠置于成像平台上后,在注射D-萤光素后5分钟使用1min曝光时间对动物进行成像。获取的信号在低于CCD相机饱和限度的有效检测范围(4、8或16bin)内。

[0850] 实施例2:制剂实施例

[0851] 报告存在于以下制剂实施例的LNP和LPX中的每种脂质的量(例如,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和表面活性剂的量)是用于产生相应LNP或LPX的量。对于本文实施例中描述的每种配制的LNP和LPX,据信用于制备制剂的每种脂质的量(例如,阳离子或阳离子可电离脂质、磷脂酰丝氨酸和表面活性剂的量)与制备的制剂中的量相同。

[0852] 制剂实施例1:PS-LNP1

[0853] PS-LNP1的制备和质量控制测试如实验部分所述进行。PS-LNP1的脂质组成为DODMA/CHOL/DOPS/吐温20(57/30/10/3摩尔%)。阳性/阴性(阳离子脂质/RNA核苷酸)比率为3。

[0854] 在体内实验中(图2-5),用PS-LNP1和F12脂质复合物配制体外转录(IVT)萤火虫萤光素酶编码mRNA(Kranz et al.2016,Nature 534:396,作为内部基准)。PS-LNP1的粒径、PDI、 ζ 电位和EE%分别为413nm、0.20、-3.57mV和86.7。每只小鼠接受200 μ L静脉内(IV)注射,其含有20 μ g配制的mRNA。在递送配制的mRNA后4和24小时,腹腔内注射萤光素酶底物萤光素,并且使用体内成像系统(IVIS)检测萤光素酶活性。PS-LNP1的体内和离体数据证实脾和肝组织的高转染,导致体内高度可检测的生物发光信号。

[0855] 在另一体内实验中(图6),PS-LNP1用IVT萤火虫萤光素酶编码mRNA配制,并通过不同的施用途径递送到小鼠中。这批PS-LNP1的粒径、PDI和 ζ 电位分别为348nm、0.34和-26.29mV。每只小鼠通过皮内(ID)、肌肉内(IM)或静脉内(IV)途径接受3 μ g配制的RNA。体内结果表明,PS-LNP1在i.d.和i.m.给药时表现出高局部信号,在i.v.施用表现出脾和肝组织转染。这种体内高度可检测的生物发光信号清楚地证明了PS-LNP1纳米颗粒制剂的高效率和功能性。

[0856] 在另一体内实验中(图7),PS-LNP1用IVT小鼠EPO(mEPO)编码mRNA配制,并通过不同的施用途径递送到小鼠中。PS-LNP1的这种制剂的粒径、PDI和 ζ 电位分别为243nm、0.22、-8.78mV和308nm、0.19、-26.89mV。每只小鼠通过肌肉内(IM)、腹腔内(IP)、静脉内(IV)或皮下(SC)途径接受1 μ g(IP)或3 μ g(IM,IV,SC)配制的RNA。如Mahiny,A.J.和Karikó,K.(2016) (“Measuring Hematocrit in Mice Injected with In Vitro-Transcribed Erythropoietin mRNA.Methods in Mol Biol 1428:297-306)所述在注射后6、24和48小时取血并通过ELISA测量血浆小鼠EPO水平。PS-LNP1的体内数据证明,在所有给药途径下,血液中mEPO均显著增加。mEPO血液水平的升高根据给药途径排列如下:i.v.>i.p.>s.c.>i.m.。

[0857] 在体外实验中(图8),PS-LNP1、作为内部基准的F12脂质复合物(Kranz et al.2016,Nature 534:396)和TransIT mRNA(Mirus Bio)与IVT萤火虫萤光素酶编码mRNA配制并转染到HepG2细胞中。PS-LNP1的这种制剂的粒径、PDI和 ζ 电位分别为303.5nm、0.29、-23.26mV。转染前一天,将HepG2细胞接种在具有补充了10%胎牛血清的DMEM培养基(200 μ L/孔)的96孔板(25,000个细胞/孔)中。转染时,将培养基从细胞移除,并将50 μ L配制的mRNA(0.2 μ g/孔)添加至细胞。将细胞温育,随后在指定时间使用100 μ L1x细胞裂解缓冲液(Promega)裂解。将裂解物在-20℃下冷冻,直至使用Promega的标准程序测量萤光素酶活性。图8显示PS-LNP1表现出高转染效率,导致体外高度可检测的生物发光信号。

[0858] 在四个不同的体内实验中(图9-12),用PS-LNP1配制IVT mRNA。向小鼠瘤内注射分别编码萤火虫萤光素酶和IL-12的两种不同mRNA的制品,在所示制剂中,以促进转染和靶向翻译。6h p.i.,通过在靶解剖部位(肿瘤)以及脱靶位置进行生物发光成像评估萤光素酶蛋白活性,后者反映来自脾和肝的信号。1x10⁵ p/s左右的值可以认为是基线。靶标与脱靶比率表示通过制剂向肿瘤特异性递送的程度。IL-12是一种分泌型细胞因子,在6h p.i.提取的血清中通过MSD ELISA测定。数据表明PS-LNP1促进靶mRNA翻译,因此蛋白丰度或酶活性比林格氏盐溶液和内部基准高,这取决于制备方法。然而,脱靶翻译也增加高于内部对照。

[0859] 在CryoTEM成像中,如图25所示,PS-LNP1显示出具有寡层和多层颗粒的囊泡结构。一些颗粒非常致密,尺寸范围为50-500nm。

[0860] 制剂实施例2:PS-LNP2

[0861] PS-LNP2的制备和质量控制测试如实验部分所述进行。PS-LNP2的脂质组成为DODMA/DOPE/DOPS/吐温20(77/10/10/3摩尔%)。阳性/阴性(阳离子脂质/RNA核苷酸)比率为3。

[0862] 在一体内实验中(图2-5),如制剂实施例1所述,PS-LNP2和作为内部基准的F12脂质复合物(Kranz et al.2016,Nature 534:396)与编码萤火虫萤光素酶的IVT mRNA配制并注射到小鼠中。PS-LNP2的这种制剂的粒径、PDI、 ζ 电位和EE%分别为596.5nm、0.31、-7.89mV和56.9。PS-LNP2的体内和离体数据证实脾和肝组织的高转染,导致体内高度可检测的生物发光信号。

[0863] 在另一体内实验中(图6),在如制剂实施例1所述的相同实验设定中测试PS-LNP2。PS-LNP2的这种制剂的粒径、PDI和 ζ 电位分别为406.6nm、0.28和-26.89mV。体内结果表明,PS-LNP2在ID和IM给药时表现出高局部信号,在i.v.施用表现出脾和肝组织转染。这种体内高度可检测的生物发光信号清楚地表明PS-LNP2纳米颗粒制剂的高功能性。

[0864] 在另一体内实验中(图7),在如制剂实施例1所述的相同实验设定中测试PS-LNP2。这批制剂PS-LNP2的粒径、PDI和 ζ 电位分别为308nm、0.19和-26.89mV。如图7所示,PS-LNP2的体内结果证明,在所有给药途径下,血流中mEPO均显著增加。mEPO血液水平的升高根据给药途径排列如下:i.v.>i.p.>s.c.>i.m.。

[0865] 在如图9-11所示的三个不同体内实验中,按照如制剂实施例1所述的相同实验设定瘤内注射小鼠。数据表明PS-LNP2促进靶mRNA翻译,因此蛋白丰度或酶活性比林格氏盐溶液和内部基准高。然而,脱靶翻译也增加高于内部对照。

[0866] CryoTEM成像显示(图25),PS-LNP2显示囊泡纳米颗粒,双壁和多壁纳米颗粒。显示了50-500nm的没有或具有不规则层状结构的纳米颗粒以及尺寸范围为50-400nm的多层纳米颗粒。

[0867] 制剂实施例3:PS-LNP3

[0868] PS-LNP3的制备和质量控制测试如实验部分所述进行。PS-LNP3的脂质组成为DODMA/DOPS/吐温20(87/10/3摩尔%),并且阳性/阴性(阳离子脂质/RNA核苷酸)比率为3。

[0869] 在体内实验中(图6),在如制剂实施例1和2所述的相同实验设定中测试PS-LNP3。这批PS-LNP3制剂的粒径、PDI和 ζ 电位分别为367.26nm、0.31和-23.84mV。体内数据表明,PS-LNP3在ID和IM给药时表现出中等局部信号,在i.v.施用表现出脾和肝组织转染。这种体内可检测的生物发光信号清楚地表明PS-LNP3纳米颗粒制剂的功能性。

[0870] 制剂实施例4:PS-LNP8

[0871] PS-LNP8的脂质组成为DODMA/DOPE/DOPS/吐温20(62/25/10/3摩尔%)。该制剂的设计目的是增加DOPE摩尔%和减少DODMA摩尔%,这可能会减轻肝信号。阳性/阴性(阳离子脂质/RNA核苷酸)比率为4。如实验部分所述制备并表征该制剂。

[0872] 在瘤内体内实验中(图10),将PS-LNP8用IVT mRNA配制。PS-LNP8的这种制剂的粒径、PDI、 ζ 电位和EE%分别为243.3nm、0.31、-2.87mV和97.2。如制剂实施例1和2所述在相同的实验设定中瘤内注射小鼠。与所有含磷脂酰丝氨酸的LNP一样,PS-LNP8在内部基准范围

内促进靶mRNA翻译,但特异性较低,PS-LNP8在这两个方面显示出较高值的趋势。因此,在测试范围内DOPE摩尔%的增加和DODMA摩尔%的减少并不显示肝信号的减少。

[0873] 制剂实施例5:PS-LNP9

[0874] PS-LNP9的脂质组成为DODMA/DOPE/DOPS/吐温20, (70/10/10/10摩尔%)。该制剂的设计目的是增加吐温20摩尔%和减少DODMA摩尔%,这可能通过在血流中形成较软的颗粒而降低颗粒的稳定性,从而减轻肝信号。阳性/阴性(阳离子脂质/RNA核苷酸)比率为4。如实验部分所述制备并表征该制剂。

[0875] 在体内实验中(图10),将PS-LNP9用IVT mRNA配制。PS-LNP9的这种制剂的粒径、PDI、 ζ 电位和EE%分别为200.9nm、0.18、-14.35mV和69.70。如制剂实施例1和2所述瘤内注射小鼠。从PS-LNP2(3摩尔%吐温20)和PS-LNP9(10摩尔%吐温20)的比较中可以清楚地看出,两种制剂在内部基准范围内促进靶mRNA翻译,但特异性较低,PS-LNP9在两个方面(靶标和脱靶)都显示出较高值的趋势。然而,在这个实验设定中,将吐温20摩尔%从3摩尔%增加至10摩尔%和将DODMA浓度从77摩尔%减少至70摩尔%(PS-LNP9)略微提高靶标/脱靶比例(比较PS-LNP2与PS-LNP9)。

[0876] 制剂实施例6:PS-LNP16

[0877] PS-LNP16的脂质组成为DODMA/DOPE/DOPS/吐温20, (27/60/10/3摩尔%)。PS-LNP16设计为具有高摩尔%的DOPE(60摩尔%),并且降低pH敏感的脂质摩尔%,这可能导致脱靶,特别是肝信号的减少。如实验部分所述制备并表征该制剂。

[0878] 制剂实施例7:PS-LNP19

[0879] 胆固醇(CHOL)是脂质体和LNP中的常用成分,是通过填充磷脂之间的空隙来稳定脂质双层的组分。在血清蛋白的存在下,加入CHOL有助于提高LNP的稳定性。此外,已证明CHOL促进膜融合。作为用于体内基因递送的LNP制剂中的共脂质,CHOL总体上优于DOPE,尽管其致融合性(fusogenicity)较低。当以高百分比存在时,CHOL看起来增强阳离子脂质的活性并促进基因转移,可能是通过促进双层去稳定。CHOL与PC的存在导致稳定的脂质双层,CHOL通常用于寡核苷酸LNP制剂(Xinwei Cheng, Robert J. Lee, Advanced Drug Delivery Reviews 2017, p 127-137)。因此,LNP的常规组合物含有40-50摩尔%的胆固醇。PS-LNP19(DODMA/CHOL/DOPS/吐温20(77/10/10/3摩尔%))设计为具有低摩尔%的CHOL(10摩尔%),这可能导致在血流中较不稳定的颗粒,进而导致脱靶,特别是肝信号的减少。由于总摩尔%为100,因此胆固醇摩尔%的减少由DODMA摩尔%的增加来补偿。阳性/阴性(阳离子脂质/RNA核苷酸)比率为3。如实验部分所述制备并表征该制剂。

[0880] 在体内实验中(图11),将PS-LNP16和PS-LNP19用IVT mRNA配制。制剂PS-LNP16的粒径、PDI、 ζ 电位和EE%分别为243.3nm、0.31、-2.87mV和97.2。制剂PS-LNP19的粒径、PDI和 ζ 电位分别为235.6nm、0.24和-7.89mV。按照如制剂实施例1和2所述的相同实验设定瘤内注射小鼠。PS-LNP16和PS-LNP19始终以较低的特异性介导相同或更好的上靶蛋白翻译。与各自的亲本PS-LNP制剂PS-LNP2和PS-LNP1相比,增加DOPE摩尔%(PS-LNP16)和减少CHOL摩尔%(PS-LNP19)并没有改善上靶/脱靶mRNA翻译。此外,将DOPE增加至60摩尔%和将DODMA减少至27摩尔%(PS-LNP16)显然会导致整体信号的降低。

[0881] 制剂实施例8:PS-LNP23

[0882] PS-LNP23的脂质组成为DMRIE/CHOL/DOPE/DOPS/吐温20, (47/30/10/10/3摩

尔%)。该制剂设计为用永久性阳离子脂质DMRIE代替pH敏感脂质,DMRIE在其他实验中显示出非常低的肝信号(数据未显示)。阳离子脂质/RNA核苷酸(阳性/阴性)比率为3。如实验部分所述制备并表征该制剂。

[0883] 如图13所示,用PS-LNP23配制IVT mRNA。按照如制剂实施例1和2所述的相同实验设定瘤内注射小鼠。体内数据显示,与含有pH敏感脂质的PS-LNP相比,PS-LNP23能够仅转染肿瘤组织而不转染脾和肝组织,但表现出低的总体信号。

[0884] 制剂实施例9&10:PS-LNP24&PS-LNP25

[0885] 这些组合物设计为与DODMA脂质比较测试Dlin-KC2-DMA脂质。PS-LNP24的脂质组成为DODMA/CHOL/DOPE/DOPS/吐温20(47/30/10/10/3摩尔%),而PS-LNP25的脂质组成为Dlin-KC2/CHOL/DOPE/DOPS/吐温20(47/30/10/10/3摩尔%)。两种制剂的阳性/阴性(阳离子脂质/RNA核苷酸)比率均为3。如实验部分所述进行PS-LNP24和PS-LNP25的制备和质量控制。

[0886] 在体外实验中(图14),如制剂实施例1和2所述将PS-LNP24、PS-LNP25、作为内部基准的F12脂质复合物(Kranz et al.2016,Nature 534:396)和TransIT mRNA(Mirus Bio)用IVT小鼠EPO mRNA配制,并转染至HepG2细胞中。PS-LNP24制剂的粒径、PDI和 ζ 电位分别为257.4nm、0.21和-24.38mV。PS-LNP25的粒径、PDI和 ζ 电位分别为235.8nm、0.20、-22.23mV。如图14所示,PS-LNP24和PS-LNP25表现出高转染效率,导致体外高度可检测的EPO。

[0887] 在另一体内实验中(图15),将PS-LNP24以及PS-LNP25用IVT小鼠EPO编码mRNA(m1 Ψ 修饰的CC413 EPO mRNA)配制,并且皮下或静脉内递送至小鼠。每只小鼠接受5 μ g(SC)或通过静脉内(i.v.)递送途径的3 μ g(IV)配制的mRNA。mRNA给药后6、24、48和72小时收集血液,并且如Mahiny和Karikó(2016,Methods in Mol Biol 1428:297-306)所述通过ELISA测量血浆小鼠EPO水平。图15所示的结果表明PS-LNP24导致EPO血液水平升高。与SC给药相比,IV给药表现出更高的EPO水平。

[0888] 制剂实施例11:PS-LNP26

[0889] PS-LNP26的脂质组成为Dlin-MC3-DMA/CHOL/DOPE/DOPS/吐温20,(47/30/10/10/3摩尔%)。该制剂设计为用高效pH敏感脂质Dlin-MC3-DMA代替pH敏感脂质DODMA,作为pH敏感脂质的另一个实例。此外,每种脂质的生物分布谱可能不同。阳离子脂质/RNA核苷酸(阳性/阴性)比率为3。如实验部分所述制备并表征制剂。

[0890] 在如制剂实施例1和图8所述的相同环境中测试PS-LNP26。PS-LNP26的这种制剂的粒径、PDI和 ζ 电位分别为297.8nm、0.31和-21.72mV。如图8所示,PS-LNP26表现出高转染效率,导致体外高度可检测的生物发光信号。

[0891] 在体内实验中(图12),将PS-LNP26用IVT mRNA配制,并且在如制剂实施例1和2所述的相同实验设定中瘤内注射小鼠。如图12所示,LNP26介导的萤光素酶活性高于内部基准。从DODMA到MC3-DMA的变化改善特异性mRNA递送,导致与内部基准相似的靶标与脱靶比率。

[0892] 在另一体内实验中(图13),按照如上所述的相同实验设定测试PS-LNP26。PS-LNP26的体内和离体数据证明高肿瘤、脾和肝组织高转染,导致体内高度可检测的生物发光信号。

[0893] 制剂实施例12:PS-LNP49、PS-LNP49-2、PS-LNP49-3和PS-LNP50

[0894] 全部如实验部分所述使用表3中列出的脂质比率制备和表征PS-LNP (PS-LNP49、PS-LNP49-2、PS-LNP49-3和PS-LNP50)。配制的PS-LNP设计为通过改变其摩尔比来研究主要(可电离)脂质和吐温20的影响。此外,PS-LNP50不含PS脂质。

[0895] 表3:PS-LNP49、PS-LNP49-2、PS-LNP49-3和PS-LNP50,组成和摩尔%、缓冲液、Z-平均值、PDI、 ζ 电位值和N/P比(pH敏感(阳离子)脂质/RNA)

组	组成	缓冲液	Z-平均值 (nm)	PDI	ζ 电位 (mV)	N/P
PS-LNP49	Dlin-MC3-DMA/DOPE/DOPS/ 吐温 20, (50/10/10/30)	PBS	288.5	0.35	19.03	3
[0896] PS-LNP49-2	Dlin-MC3-DMA/DOPE/DOPS/ 吐温 20, (55/10/10/25)	PBS	275.3	0.27	11.19	3
PS-LNP49-3	Dlin-MC3-DMA/DOPE/DOPS/ 吐温 20, (60/10/10/20)	PBS	262.2	0.226	1.71	3
PS-LNP50 (无 DOPS)	Dlin-MC3-DMA/DOPE/ 吐温 20, (55/20/25)	PBS	247.6	0.228	5.78	3

[0897] 如制剂实施例1所述按照相同的实验设定瘤内测试制剂。增加可电离脂质Dlin-MC3-DMA的摩尔百分比(从50至60摩尔%)和降低吐温20的摩尔百分比(从30摩尔%至20摩尔%)改善上靶向翻译和特异性,从而提高了靶标/脱靶比率(PS-LNP49-3>PS-LNP49-2>PS-LNP49)。如图16A-D所示,去除磷脂酰丝氨酸导致活性降低以及靶标与脱靶比率下降(PS-LNP50)。

[0898] 制剂实施例13:PS-LNP49-3和PS-LNP52

[0899] 如实验部分所述使用表4中列出的脂质比率制备和表征PS-LNP49-3和PS-LNP52。在这个实验中,PS-LNP制剂设计为建立可电离脂质Dlin-MC3-DMA和DODMA之间的直接比较。如表4所述,PS-LNP49-3和PS-LNP52分别含有Dlin-MC3-DMA和DODMA。

[0900] 表4:PS-LNP49-3和PS-LNP52脂质组成和摩尔%、缓冲液、粒径、PDI、 ζ 电位值和N/P比(pH敏感(阳离子)脂质/RNA)

组	制剂	缓冲液	Z-平均值(nm)	PDI	N/P
[0901] PS-LNP49-3	Dlin-MC3-DMA/DOPE/DOPS/ 吐温 20 (60/10/10/20)	PBS	297.9	0.155	3
PS-LNP52	DODMA/DOPE/DOPS/吐温 20 (60/10/10/20)	PBS	256.6	0.257	3

[0902] 在体内实验中(图17),向TC1荷瘤小鼠瘤内注射PS-LNP49-3和PS-LNP52的制品,这两种制品用编码萤火虫萤光素酶和IL-12的两种不同mRNA配制。如图17所示,清楚地观察到用DODMA代替Dlin-MC3-DMA导致非常相似的上靶翻译率,但表现出脱靶减少的趋势,主要是在TC1-肿瘤模型中肝脏的24小时。

[0903] 制剂实施例14:PS-LNP25,PS-LNP49-3,PS-LNP52

[0904] 如实验部分所述使用表5中列出的脂质比率制备和表征PS-LNP25、PS-LNP49-3、PS-LNP52。在这个实验中,PS-LNP设计为用另一种肿瘤模型证实制剂实施例13中获得的结果。如表5所述,PS-LNP25、PS-LNP49-3和PS-LNP52分别含有可电离脂质Dlin-KC2-DMA、

Dlin-MC3-DMA和DODMA。

[0905] 表5:PS-LNP25、PS-LNP49-3和PS-LNP52脂质组成和摩尔%、缓冲液、Z-平均值、PDI和N/P比 (pH敏感(阳离子) 脂质/RNA)

[0906]

制剂	组成	缓冲液	Z-平均值 (nm)	PDI	N/P 比
PS-LNP25	Dlin-KC2-DMA/CHOL/DOPE/DOPS/吐温 20 (47/30/10/10/3)	PBS	135.4	多模式	3
PS-LNP49-3	Dlin-MC3-DMA/DOPE/DOPS/吐温 20 (60/10/10/20)	PBS	266.6	0.221	3
PS-LNP52	DODMA/DOPE/DOPS/吐温 20 (60/10/10/20)	PBS	160.0	0.199	3

[0907] 如图18所示,在体内实验中,按照如制剂实施例13所述的相同实验设定用PS-LNP病灶内注射4T1荷瘤小鼠。表明在靶标:脱靶比率方面,PS-LNP制剂具有各种生物分布谱,这取决于使用的可电离脂质。由于靶标:脱靶比率是药物特异性的仲裁参数,因此测试的PS-LNP可以排列如下:PS-LNP25<PS-LNP49-3<PS-LNP52。

[0908] 制剂实施例15:PS-LNP52、PS-LNP52-2、PS-LNP52-3、PS-LNP52-4和PS-LNP52-5

[0909] 如实验部分所述使用表6中列出的脂质比率制备和表征PS-LNP52、PS-LNP52-2、PS-LNP52-3、PS-LNP52-4、PS-LNP52-5。在这个实验中,PS-LNP制剂设计为研究将N/P比从3变为5以及将吐温20浓度从20摩尔%变为5摩尔%的影响。由于总摩尔%为100,因此通过将DOPS浓度从10摩尔%增加至30摩尔%来补偿吐温摩尔%的降低。

[0910] 表6:PS-LNP52、PS-LNP52-2、PS-LNP52-3、PS-LNP52-4和PS-LNP52-5脂质组成和摩尔%、缓冲液、粒径、PDI、 ζ -电位值和N/P比 (pH敏感(阳离子) 脂质/RNA)

[0911]

样品	脂质组成	Z-平均值 (nm) PBS	PDI	ζ (0.1 PBS)	N/P
PS-LNP52	DODMA/DOPE/DOPS/吐温 20 (60/10/10/20)	188.5	0.232	-32.27	3
PS-LNP52-2	DODMA/DOPE/DOPS/吐温 20 (60/10/10/20)	240.3	0.243	-9.71	4
PS-LNP52-3	DODMA/DOPE/DOPS/吐温 20 (60/10/10/20)	271.6	0.21	-4.43	5
PS-LNP52-4	DODMA/DOPE/DOPS/吐温 20 (60/10/20/10)	242.3	0.237	-27.15	3
PS-LNP52-5	DODMA/DOPE/DOPS/吐温 20 (55/10/30/5)	232.4	0.219	-35.25	3

[0912] 如图19所示,按照如制剂实施例1和2所述的相同实验设定,向小鼠瘤内注射用编码萤火虫萤光素酶和IL-12的两种不同mRNA配制的PS-LNP制品。结果表明,增加N/P比既不显著改变器官特异性,也不显著改变配制的RNA的上靶翻译。清楚地表明,通过DOPS补充减少的吐温20量对靶标/脱靶比率没有明显影响(图19)。

[0913] 制剂实施例16:PS-LNP52

[0914] 如实验部分所述制备并表征PS-LNP52。脂质组成和物理化学数据在表7中列出。表7:PS-LNP52脂质组成和摩尔%、缓冲液、粒径、多分散性指数(PDI)和N/P比(pH敏感(阳离子)脂质/RNA)

组	脂质组成	缓冲液	Z-平均值(nm)	PDI	N/P	pH
[0915] LNP52	DODMA/DOPE/DOPS/吐温 20 (60/10/10/20)	PBS	216,1	0,169	3	7

[0916] 在体内实验中(图20A&B),PS-LNP52用编码Thy1.1的mRNA和对照mRNA配制,并且瘤内注射至CT26荷瘤小鼠中。注射后20小时,收获器官并完成流式细胞术分析以分析Thy1.1表达。表明,测试的LNP52制剂和内部基准在mRNA肿瘤浸润白细胞(TIL)和肿瘤细胞之间相同地促进转染。脾和肝细胞中的脱靶翻译较低。图20B显示通过流式细胞术分析的瘤内注射配制的RNA后Thy1.1的免疫细胞类型特异性表达。发现在TIL内,配制的mRNA主要靶向髓样细胞。脱靶器官的转染率普遍较低,主要局限于髓样和其他免疫细胞。肝细胞(主要的肝细胞类型)很可能不被配制的mRNA靶向,因为非免疫细胞几乎没有任何高于背景水平的报告基因表达。

[0917] 制剂实施例17:具有与脂质浓度无关的不同吐温20浓度的PS-LPX52,因为将吐温20添加至先前制备的脂质体中

[0918] 如实验部分所述制备PS-脂质体和PS-LPX52。当在15mM NaCl水溶液中测量时,PS-脂质体显示50-90nm的平均粒径、PDI<0.5和+30-60mV的 ζ 电位。

[0919] 表8:PS-LPX52的脂质组成、N/P比、Z-平均值、PDI、pH、报告RNA和总配制的RNA剂量/小鼠

	形式	组成/摩尔%/浓度 mM	N/P	大 小 (nm)	PDI	pH	报告	总剂量 μ g/小鼠
[0920] A	PS-LP X52	(DODMA/DOPE/DOPS/ 吐温 20, 60/10/10/20, 1.8/0.3/0.3/0.6	3	233.9	0.237	5-6	IL12-LUC	10
B	PS-LP X52	DODMA/DOPE/DOPS/吐温 20, 66.67/11.11/11.11/11.11, 1.8/0.3/0.3/0.3	3	189.8	0.231	5-6	IL12-LUC	10
C	PS-LP X52	DODMA/DOPE/DOPS/吐温 20, 70.59/11.76/11.76/5.89, 1.8/0.3/0.3/0.15	3	259.3	0.216	5-6	IL12-LUC	10

[0921] 在体内实验中(图21),将具有不同吐温20浓度的PS-LPX52用编码萤火虫荧光素酶的mRNA配制并瘤内注射至小鼠中,实验目的是促进转染和靶标翻译:PS-LPX52 A组:DODMA/DOPE/DOPS/吐温20,60/10/10/20(1.8/0.3/0.3/0.6mM),PS-LPX52 B组:DODMA/DOPE/DOPS/吐温20,66.67/11.11/11.11/11.11(1.8/0.3/0.3/0.3mM),PS-LPX52 C组:DODMA/DOPE/DOPS/吐温20,70.59/11.76/11.76/5.89(1.8/0.3/0.3/0.15mM)。所有制剂都显示出范围内的粒径和PDI值(表8)。PS-LPX52的所有制剂均介导高荧光素酶活性,并且证明将吐温20从0.6mM减少至0.15mM会导致靶标/脱靶比率降低(A组>B组>C组)。

[0922] 在如图26所示的PS-LPX的CryoTEM成像中,PS-LPX52显示出50-200nm大小的囊泡

纳米颗粒、寡层和多层脂质复合物。

[0923] 制剂实施例18:PS-LNP25和PS-LNP49-3的治疗效力

[0924] 这个实验设计为测试PS-LNP25 (如制剂实施例14图18所示,显示出高靶标/脱靶比率) 和PS-LNP49-3 (如制剂实施例14图18所示,显示出靶标/脱靶比率的合理改善) 的治疗效力。如实验部分所述使用表9中列出的脂质比率制备和表征PS-LNP25和PS-LNP49-3。

[0925] 表9:PS-LNP25、PS-LNP49-3和林格 (Ringer) 组成和摩尔%、缓冲液、 ζ 电位值、N/P比 (pH敏感(阳离子) 脂质/RNA) 和使用的RNA

组	组成	缓冲液	ζ 电位 [mV]	N/P	RNA
PS-LNP25	Dlin-KC2-DMA/CHOL/DOPE/DOPS/ 吐温 20 (47/30/10/10/3)	PBS	-4,96	3	RNA 细胞因子混合物
PS-LNP49-3	Dlin-MC3-DMA/DOPE/DOPS/吐温 20 (60/10/10/20)	PBS	-2,48	3	RNA 细胞因子混合物
林格	林格	林格		-	RNA 细胞因子混合物
PS-LNP25	Dlin-KC2-DMA/CHOL/DOPE/DOPS/ 吐温 20 (47/30/10/10/3)	PBS	-6,45	3	LUC
PS-LNP49-3	Dlin-MC3-DMA/DOPE/DOPS/吐温 20 (60/10/10/20)	PBS	-2,98	3	LUC
林格	林格	林格		-	LUC

[0927] 如图22所示,将荷有建立的CT26肿瘤的小鼠用与所示制剂复合的细胞因子编码mRNA混合物 (RNA细胞因子混合物) 或对照 (LUC) mRNA瘤内注射。四个不同批次的粒径和PDI值如图22B所示。如图22A所示,与林格氏液中的裸RNA相比,所有制剂均提高完全反应率,其中LNP49-3治愈90%接受治疗的小鼠。

[0928] 制剂实施例19:PS-LPX52相比林格的治疗效力

[0929] 在这个实验中,同时测试PS-LPX52 (DODMA/DOPE/DOPS/吐温20/RNA) 和RNA林格氏液,以证明PS-LPX配制的RNA优于RNA-林格氏液。如实验部分所述制备和表征PS-LPX52,同时通过林格和RNA水性溶液的简单混合制备林格/RNA溶液。如图23B所示,所有粒径值均在预期范围内 (200-280nm)。将荷有建立的CT26肿瘤的小鼠用与PS-LPX52复合或在普通林格氏盐溶液中的细胞因子编码mRNA混合物或对照LUC mRNA每周一次瘤内处理,持续4周,每次两个剂量。结果表明,用最高剂量的PS-LPX52配制的细胞因子mRNA在抑制肿瘤生长方面最有效,并且治愈了10只治疗小鼠中的7只 (图23A)。

[0930] 表10:PS-LPX52和林格组成、N/P比 (pH敏感(阳离子) 脂质/RNA)、剂量/靶标/小鼠、每只小鼠总RNA和使用的RNA

[0931]

制剂	组成	N/P 比	剂量/靶标/小鼠[μg]	总 RNA/小鼠[μg]	RNA
PS-LPX52	DODMA/DOPE/DOPS/吐温 20 (60/10/10/20)	3	2.5	10	RNA 细胞因子混合物
林格		-		10	RNA 细胞因子混合物
PS-LPX52	DODMA/DOPE/DOPS/吐温 20 (60/10/10/20)	3	1	4	RNA 细胞因子混合物
林格		-		4	RNA 细胞因子混合物
PS-LPX52	DODMA/DOPE/DOPS/吐温 20 (60/10/10/20)	3	10	10	LUC

[0932] 制剂实施例20:PS-LPX2*It.IV相比林格长期冷冻保存的影响

[0933] 在这个实验中,PS-LPX2*It.IV (DODMA/DOPE/DOPS/吐温20,60/10/10/20摩尔%,含储存添加剂的PS-LPX52)的配制方式使其与在-20℃下延长冷冻储存相容,并使用适合流体路径的改进方案制备。简单地说,通过流体路径合并RNA和脂质体前体的两个等体积相来制备PS-LPX2*It.IV,RNA相含有一些缓冲盐(柠檬酸二钠和氯化钠)。然后收集脂质复合的RNA,并且添加含有冷冻保护剂的储存基质(乙酸钠和蔗糖),使PS-LPX2*It.IV材料能够冷冻。在下文提到的体内实验当天,取出PS-LPX2*It.IV的等分试样并使其达到室温;然后将10x DPBS添加至每个等分试样中以达到1x PBS浓度,并将溶液轻轻混合。然后将PS-LPX2*It.IV材料用整体相(bulk phase)稀释至合适的浓度(0.1mg/mL),对应于5μg总RNA的预期剂量。表11中给出PS-LPX2*It.IV内赋形剂的定量描述。表12中列出这个实验的总结物理化学数据。QC测量后,将材料瘤内给药至荷有TC-1模型肿瘤的小鼠。没有观察到PS-LPX2*It.IV的延长储存的影响,并且新鲜和老化的样品相对于林格对照都产生了相当的增强的细胞因子表达,由图24中的虚线标记。

[0934] 表11:储存期间和注射时PS-LPX2*It.IV(含储存添加剂的PS-LPX52)的组成

[0935]

产品属性	功能	浓度 储存期间	浓度 注射时
药物	活性物质	0.22 mg/mL	0.20 mg/mL
DODMA	功能脂质	1.24 mg/mL	1.12 mg/mL
DOPE	结构脂质	0.25 mg/mL	0.225 mg/mL
DOPS	结构脂质	0.27 mg/mL	0.24 mg/mL
吐温 20	表面活性剂	0.82 mg/mL	0.74 mg/mL

[0936]

HAc	缓冲液	0.03 mg/mL	0.027 mg/mL
蔗糖	冷冻保护剂	100.00 mg/mL	90.00 mg/mL
NaOCit.	缓冲液	0.26 mg/mL	0.23 mg/mL
NaOAc.	缓冲液	0.41 mg/mL	0.37 mg/mL
NaCl	缓冲液	0.13 mg/mL	8.14 mg/mL
KCl	缓冲液	0.00 mg/mL	0.20 mg/mL
Na ₂ HPO ₄	缓冲液	0.00 mg/mL	1.42 mg/mL
KH ₂ PO ₄	缓冲液	0.00 mg/mL	0.24 mg/mL
注射用水	溶剂/媒介物	适量	适量

[0937] 表12:与图24所示体内数据相对应的PS-LPX2*It.IV DP的物理化学参数汇总表

[0938]

-20°C 下储存 的时间	重量摩尔渗透压浓度(渗 透压摩尔/kg)	pH	SVP 计数 (>1μm)	SVP 计数 (>10μm)	SVP 计数 (>25μm)	ζ(mV)	大小/z. 平均 (nm)	PDI
“新鲜”								
1 天	0,610	6,23	13977	22	0	-31,25	214,20	0,238
19 天	0,637	6,77	6270	30	2	-33,38	235,50	0,229
83 天	0,615	6,78	316	1	0	-18,68	203,13	0,238

[0939] 制剂实施例21:在不同类型的非离子表面活性剂存在下产生包含磷脂酰丝氨酸的RNA脂质纳米颗粒

[0940] 这个实验旨在比较在不同类型的非离子表面活性剂存在下用RNA配制的PS-LNP和PS-LPX的物理化学特征。

[0941] 如表13所示,所有颗粒都具有明确的粒径和中性至负的ζ电位。

[0942] 表13:不同非离子表面活性剂稳定的PS-LNP和PS-LPX的物理化学表征

[0943]

	脂质组成(摩尔%)	大小 (nm)	PDI	ζ 电位(mV)		N/P 比
				水	15mM NaCl	
PS-LNP-TPGS-1	DODMA/DOPS/TPGS, (87/10/3)	151.7	0.09	- 31.19	- 4.78	3
PS-LNP-TPGS-2	DODMA/DOPE/DOPS/TPGS, (77/10/10/3)	171.9	0.10	- 29.76	- 3.98	3
PS-LNP-TPGS-3	DODMA/CHOL/DOPS/TPGS, (57/30/10/3)	115.5	0.02	-4.12	7.2	3
PS-LNP-Solutol	DODMA/CHOL/DOPS/Solutol, (57/30/10/3)	245.7	0.10	-16.13	7.1	3
PS-LNP-吐温 80	DODMA/CHOL/DOPS/ 吐 温 80, (57/30/10/3)	194.3	0.10	-2.87	2.87	3

[0944]	PS-LNP-Myrj52	DODMA/DOPS/Myrj52, 87/10/3	229.3	0.24	-16.31	-7.17	3
	PS-LPX-Dlin-MC3	Dlin-MC3-DMA/DOPE/DOPS/吐温 20 (60/10/10/20)	420.1	0.363	NA	-38.21	3
	PS-LPX-DlinDMA A	DlinDMA/DOPE/DOPS/吐温 20 (60/10/10/20)	449.5	0.45	NA	NA	3

[0945] 表14:所有PS-LNP和PS-LPX的汇总表

[0946]	制剂名称	脂质组成(摩尔%)	
	PS-LNP1	DODMA/CHOL/DOPS/吐温20, (57/30/10/3)	
	PS-LNP2	DODMA/DOPE/DOPS/吐温20, (77/10/10/3)	
	PS-LNP3	DODMA/DOPS/吐温20, (87/10/3)	
	PS-LNP8	DODMA/DOPE/DOPS/吐温20, (62/25/10/3)	
	PS-LNP9	DODMA/DOPE/DOPS/吐温20, (70/10/10/10)	
	PS-LNP16	DODMA/DOPE/DOPS/吐温20, (27/60/10/3)	
	PS-LNP19	DODMA/CHOL/DOPS/吐温20, (77/10/10/3)	
	PS-LNP23	DMRIE/CHOL/DOPE/DOPS/吐温20, (47/30/10/10/3)	
	PS-LNP24	DODMA/CHOL/DOPE/DOPS/吐温20, (47/30/10/10/3)	
	PS-LNP25	DlinDMA-KC2/CHOL/DOPE/DOPS/吐温20, (47/30/10/10/3)	
	PS-LNP26	DlinDMA-MC3/CHOL/DOPE/DOPS/吐温20, (47/30/10/10/3)	
	PS-LNP49	Dlin-MC3/DOPE/DOPS/吐温20, (50/10/10/30)	
	PS-LNP49-2	Dlin-MC3/DOPE/DOPS/吐温20, (55/10/10/25)	
	PS-LNP49-3	Dlin-MC3/DOPE/DOPS/吐温20, (60/10/10/20)	
	PS-LNP50	Dlin-MC3/DOPE/吐温20, (55/20/25)	
	PS-LNP52	DODMA/DOPE/DOPS/吐温20, (60/10/10/20)	
	PS-LNP52-4	DODMA/DOPE/DOPS/吐温20, (60/10/20/10)	
	PS-LNP52-5	DODMA/DOPE/DOPS/吐温20, (55/10/30/5)	
	PS-LPX52	(DODMA/DOPE/DOPS/吐温20, 60/10/10/20 (1.8/0.3/0.3/0.6mM))	
	PS-LPX52	DODMA/DOPE/DOPS/吐温20, 66.67/11.11/11.11/11.11 (1.8/0.3/0.3/0.3mM)	
	PS-LPX52	DODMA/DOPE/DOPS/吐温20, 70.59/11.76/11.76/5.89 (1.8/0.3/0.3/0.15)	
	PS-LNP	DODMA/DOPS/TPGS, (87/10/3)	
	PS-LNP	DODMA/DOPE/DOPS/TPGS, (77/10/10/3)	
	PS-LNP	DODMA/CHOL/DOPS/TPGS, (57/30/10/3)	
	PS-LNP	DODMA/CHOL/DOPS/Solutol, (57/30/10/3)	
	PS-LNP	DODMA/DOPS/Myrj52, 87/10/3	
	PS-LPX	Dlin-MC3-DMA/DOPE/DOPS/吐温20 (60/10/10/20)	
	PS-LPX	DlinDMA/DOPE/DOPS/吐温20 (60/10/10/20)	

[0947] 实施例3:PS-LPX制剂的进一步优化

[0948] 进行另外的实验以进一步优化RNA-脂质复合物,其包含1:1:1:1重量/体积比的编码人细胞因子的四种化学修饰RNA的混合物。RNA是通过体外转录产生的单链、5'加帽的RNA,提供为10mM HEPES/0.1mM EDTA(NaOH, pH 7.0)缓冲液中的2mg/mL溶液。将RNA混合物与脂质体前体复合,所述脂质体前体包含1,2-二油氧基-3-二甲基氨基丙烷(DODMA)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸丝氨酸(DOPS)、聚山梨酯20,并在补充有蔗糖作为冷冻保护剂的乙酸钠缓冲液中提供。

[0949] 在测试浓度下,与用乙酸盐缓冲液制备的脂质复合物(LPX)相比,用柠檬酸盐作为

酸化剂用萤光素酶RNA配制的脂质复合物(LPX)的粒径相对较小(图27A,B)。此外,与用乙酸盐缓冲液制备的脂质复合物相比,用柠檬酸盐缓冲液制备的脂质复合物表现出更高水平的体外转染(图27C)。较高的柠檬酸盐缓冲液浓度导致较高的萤光素酶表达,但相应较高的离子负荷对冷冻状态下LPX的胶体稳定性产生负面影响。作为生物活性和胶体稳定性之间的平衡,选择4.5mM的柠檬酸盐缓冲液浓度。此外,当RNA相补充柠檬酸盐缓冲液和氯化钠的组合时,所有四种细胞因子的体外转染都增加(图27D)。

[0950] 研究了阳离子脂质与RNA的复合比率(N/P比,如本文进一步描述)。据发现来自PS-LPX的4-细胞因子RNA混合物的体外蛋白表达在N/P比<3时较低(图28A)。此外,评估了PS-LPX中RNA的包裹效率,还测量了可及的RNA。据发现在N/P比为3或更多时观察到改善的RNA包裹(图28B)。对于渐增的N/P比,未观察到蛋白表达或包裹效率的显著改善。因此,对于4-细胞因子RNA药物产品,选择N/P比为3。

[0951] 使用Y型混合元件将RNA和脂质体相1:1混合进行LPX配制,脂质体和RNA相通道的管长度为5cm,混合通道的管长度为20cm,管直径为1.6或2.4mm。以50-388mL/min的不同总流速制备LPX。在流速<200mL/min时形成的LPX颗粒具有相对较高的亚可见颗粒计数(图29A)。在流速 $\leq$ 100mL/min时制备的样品的粒径和多分散性较高(图29A)。在300和360mL/min时制备的样品在粒径、多分散性和亚可见计数方面相当(图29A)。观察到随着流速的增加蛋白表达增加的趋势(图29B)。对于LPX制备,选择360mL/min的总流速。

[0952] 还研究了PS-LPX制备工艺的优化,并开发了改进的PS-LPX制备方法。描述了制备RNA脂质复合物(RNA-LPX)颗粒的方法,所述方法包括:(i)制备包含脂质体的酸化的水性溶液,其中包含脂质体的酸化的水性溶液包含10-30mM乙酸;以及(ii)将包含脂质体的酸化的水性溶液与包含RNA的水性溶液混合;从而产生包含RNA-LPX颗粒的溶液;其中RNA-LPX颗粒和脂质体包含二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS);N,N-二甲基-2,3-二油氧基丙胺(DODMA);和二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)(DODMA/DOPE/DOPS RNA-LPX)。示出了测试的乙酸浓度对来自DODMA/DOPE/DOPS RNA-LPX的4-细胞因子RNA混合物的体外蛋白表达的影响(图30A,B)。包含RNA的水性溶液不包含氯化钠(NaCl)。在与包含脂质体的溶液混合时,包含RNA的水性溶液中RNA的浓度为0.5mg/mL或更少。所述方法进一步包括将储存/稀释缓冲液添加至形成的DODMA/DOPE/DOPS RNA-LPX中,其中所述储存/稀释缓冲液包含30%蔗糖以及pH5.5或6.5的20mM组氨酸缓冲液。包含储存/稀释缓冲液的DODMA/DOPE/DOPS RNA-LPX的pH为5.30或5.50。观察到在pH 5.30或pH 5.5下来自DODMA/DOPE/DOPS RNA-LPX的储存稳定性改善,蛋白表达更高(图31A-D)。

[0953] 为了评估不同脂质组分及其比率对4-细胞因子RNA混合物的蛋白表达的影响,制备含有19种不同%摩尔比率的三种关键脂质组分:DODMA、DOPE和DOPS的LPX颗粒。测量四种细胞因子中每一种的体外蛋白表达,并且观察到脂质组成对药物产品的蛋白表达有影响(图32)。运行ID编号18和19看起来在体外导致更高的蛋白表达。在如本文所述的PS-LPX制备过程中通常使用的颗粒形成时的RNA浓度为0.50mg/mL,随后用冷冻保护剂稀释后,使用0.22mg/mL的靶最终RNA浓度。测试不同的RNA浓度以评估对物理化学特性和蛋白表达水平的影响。观察到随着RNA浓度的增加,粒径和多分散性增加的趋势(图33A)。此外,在RNA浓度>0.40mg/mL时制备的LPX显示出更多大小 $\geq 25\mu\text{m}$ 的亚可见颗粒(图33A)。在不同RNA浓度下制备的LPX的蛋白表达看起来没有显著变化。

[0954] 在所描述的赋形剂和参数的进一步优化后固定制剂的组成(如表15所示)。

[0955] 表15:PS-LPX-A的组成

组分	功能	浓度	组合物(每1.35mL药品小瓶)
RNA	药物物质	0.22mg/mL [b]	0.30mg
DODMA	可电离脂质	1.23mg/mL	1.66mg
DOPE	辅助脂质	0.25mg/mL	0.33mg
DOPS	辅助脂质	0.27mg/mL	0.36mg
聚山梨酯20	表面活性剂	0.81mg/mL	1.09mg
乙酸	缓冲液组分	0.03mg/mL	0.04mg
蔗糖	冷冻保护剂	100mg/mL	135mg
柠檬酸钠	缓冲液组分	0.12mg/mL	0.16mg
柠檬酸	缓冲液组分	0.12mg/mL	0.16mg
NaCl	张力调节剂	0.13mg/mL	0.17mg
HEPES	缓冲液组分	0.26mg/mL	0.35mg
EDTA	螯合剂	0.003mg/mL	0.004mg
乙酸钠	缓冲液组分	0.41mg/mL	0.55mg
注射用水	溶剂	q.s. 1mL	q.s. 1.35mL

[0957] 说明:q.s.-适量;

[0958] [a]当提及药典时,其意为适用该药典的当前版本[b]总RNA(每种RNA药物物质的重量比为1:1:1:1)

[0959] 此外,通过超滤/渗滤(UF/DF)产生PS-LPX制剂的高浓缩(up-concentrated)形式,并且显示可以形成稳定的颗粒。据发现含有0.44mg/mL RNA的高浓缩PS-LPX制剂最稳定,同时提供更高的RNA浓度(图34)。这种PS-LPX制剂的组成在下文表16中示出。

[0960] 表16:PS-LPX和高浓缩PS-LPX的组成比较

组分	浓度	浓度
RNA	0.22mg/mL	0.44mg/mL
DODMA	1.23mg/mL	2.48mg/mL
DOPE	0.25mg/mL	0.50mg/mL
DOPS	0.27mg/mL	0.54mg/mL
聚山梨酯20	0.81mg/mL	1.64mg/mL
乙酸	0.03mg/mL	0.05mg/mL
蔗糖	100mg/mL	100mg/mL
柠檬酸三钠二水合物	0.12mg/mL	0.18mg/mL
柠檬酸一水合物	0.13mg/mL	0.19mg/mL
NaCl	0.13mg/mL	0.19mg/mL
HEPES	0.26mg/mL	0.53mg/mL
EDTA	0.003mg/mL	0.006mg/mL
乙酸钠三水合物	0.68mg/mL	0.68mg/mL

A

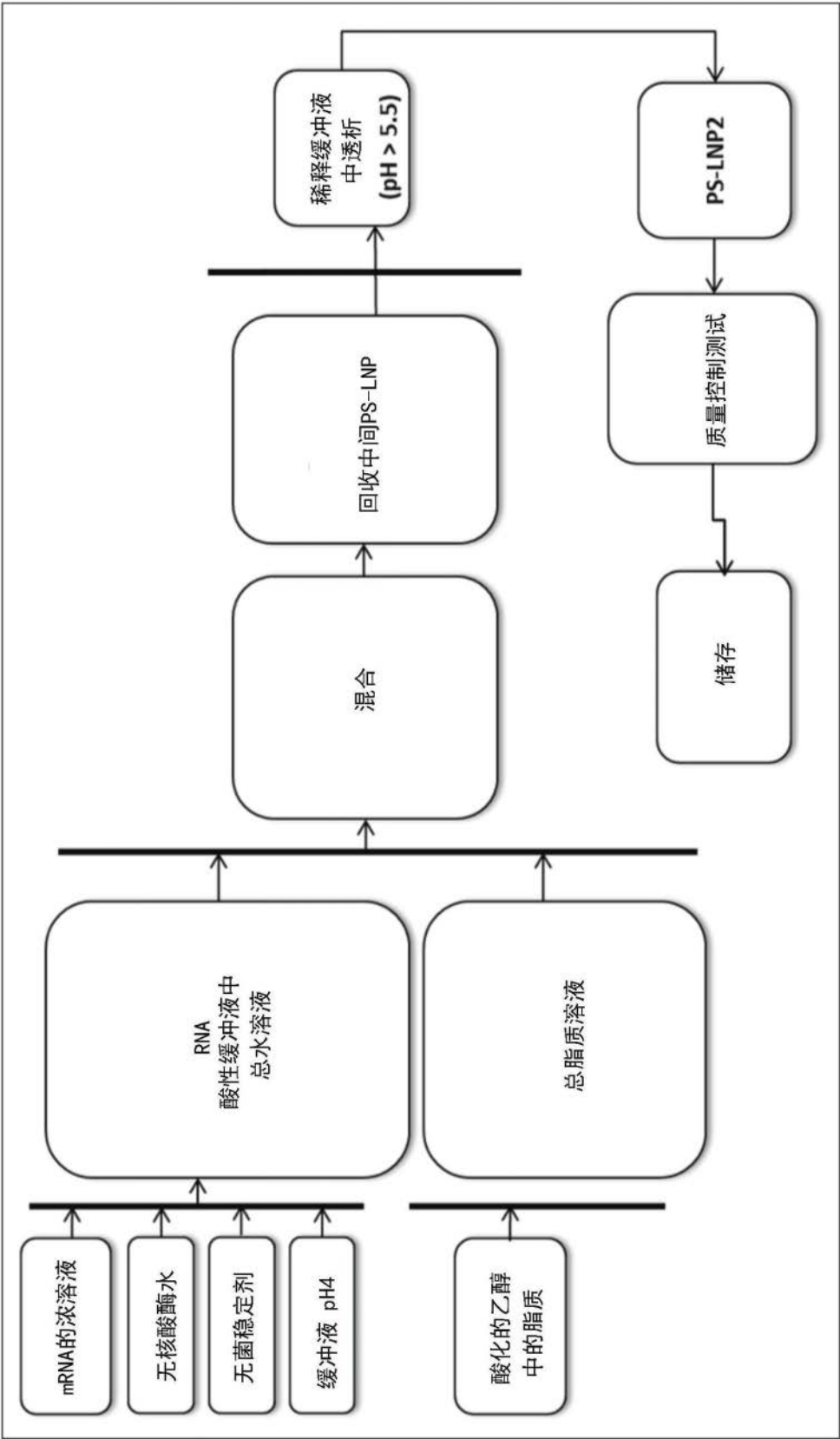


图1

B

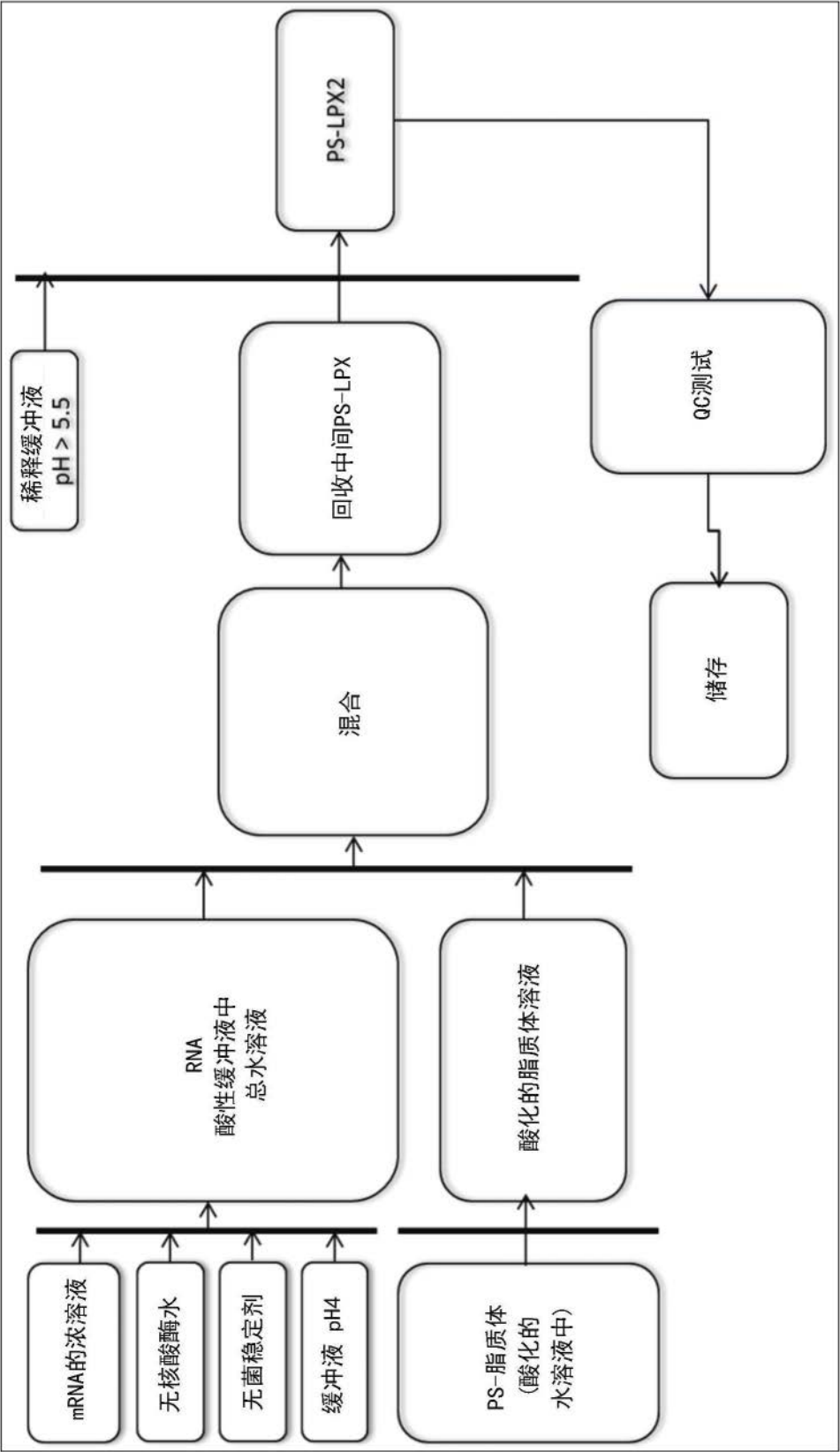


图1续

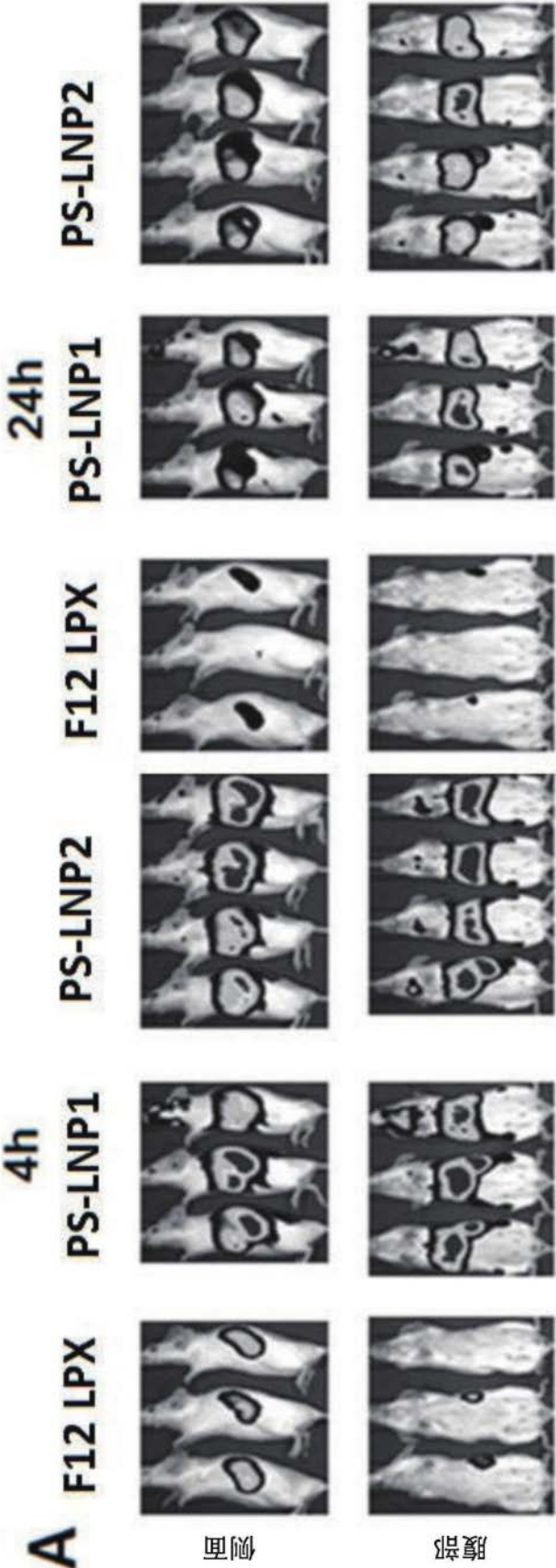


图2

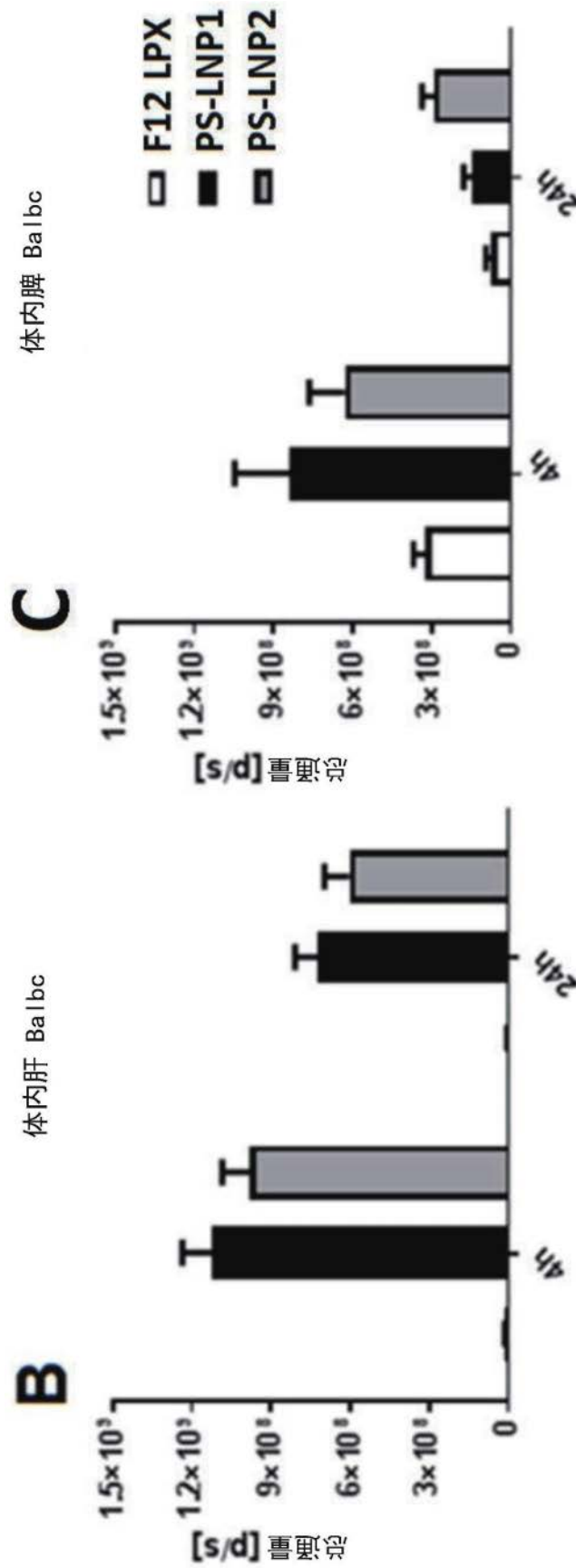


图2续

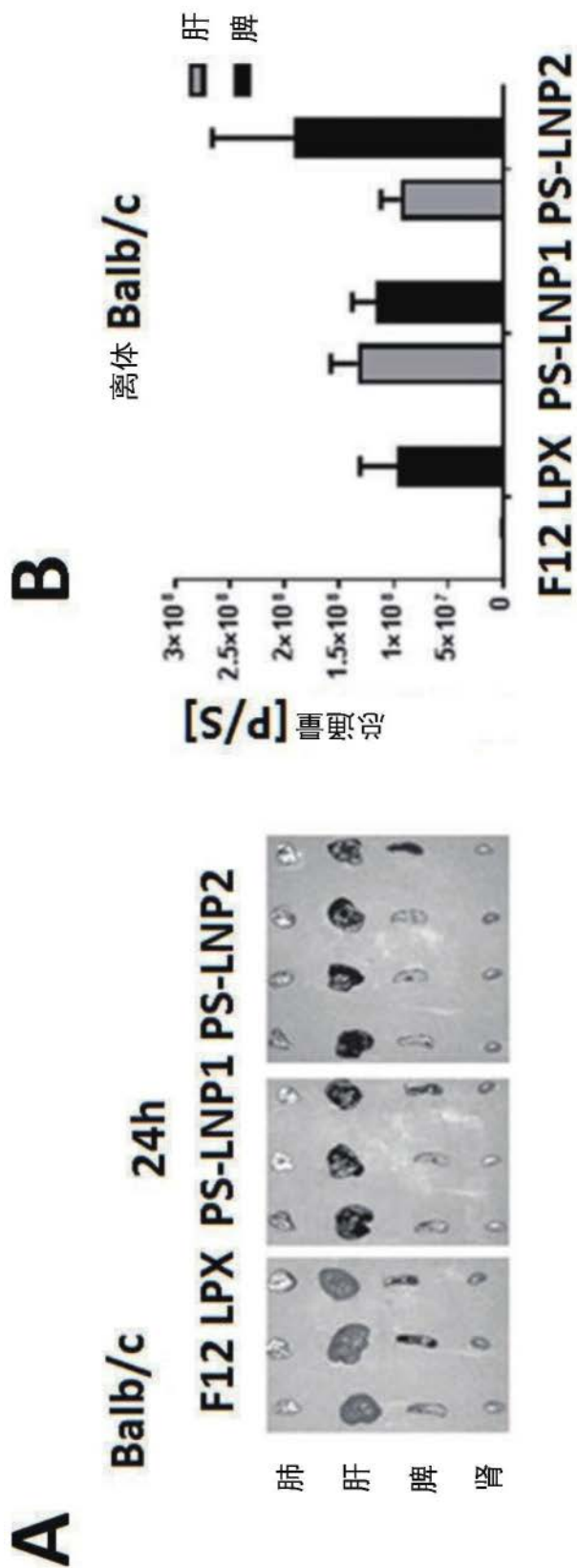


图3

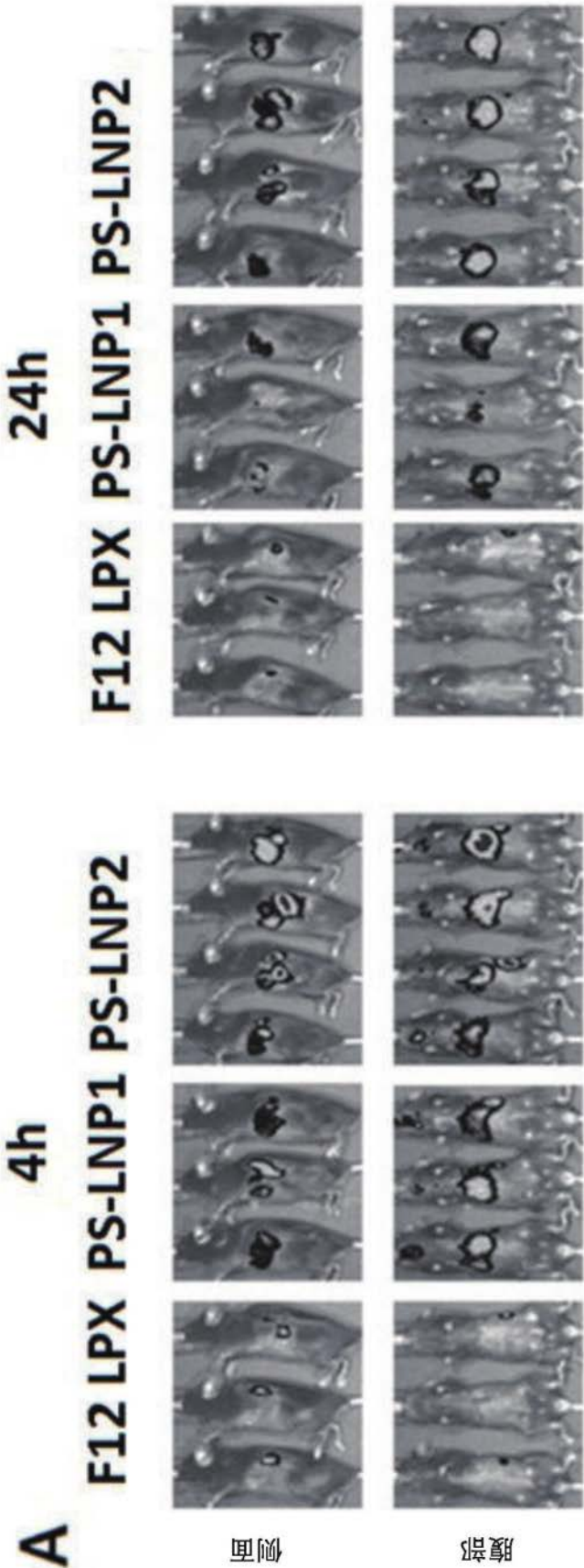


图4

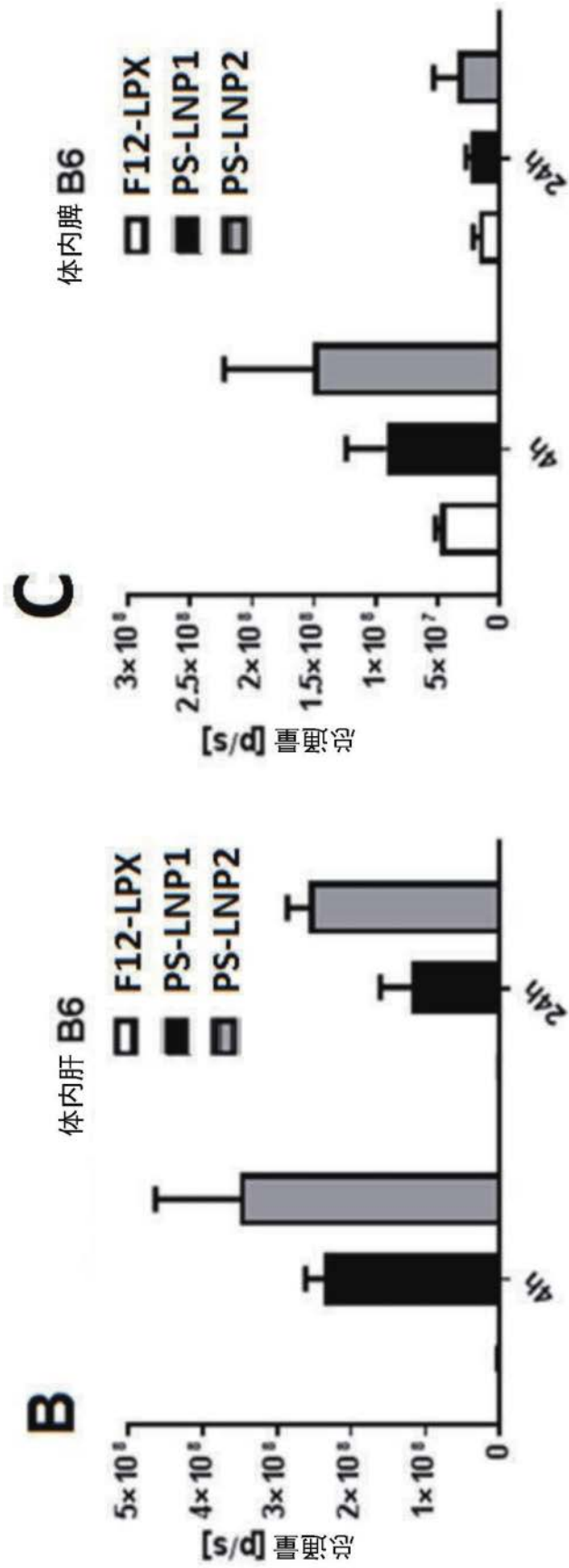


图4续

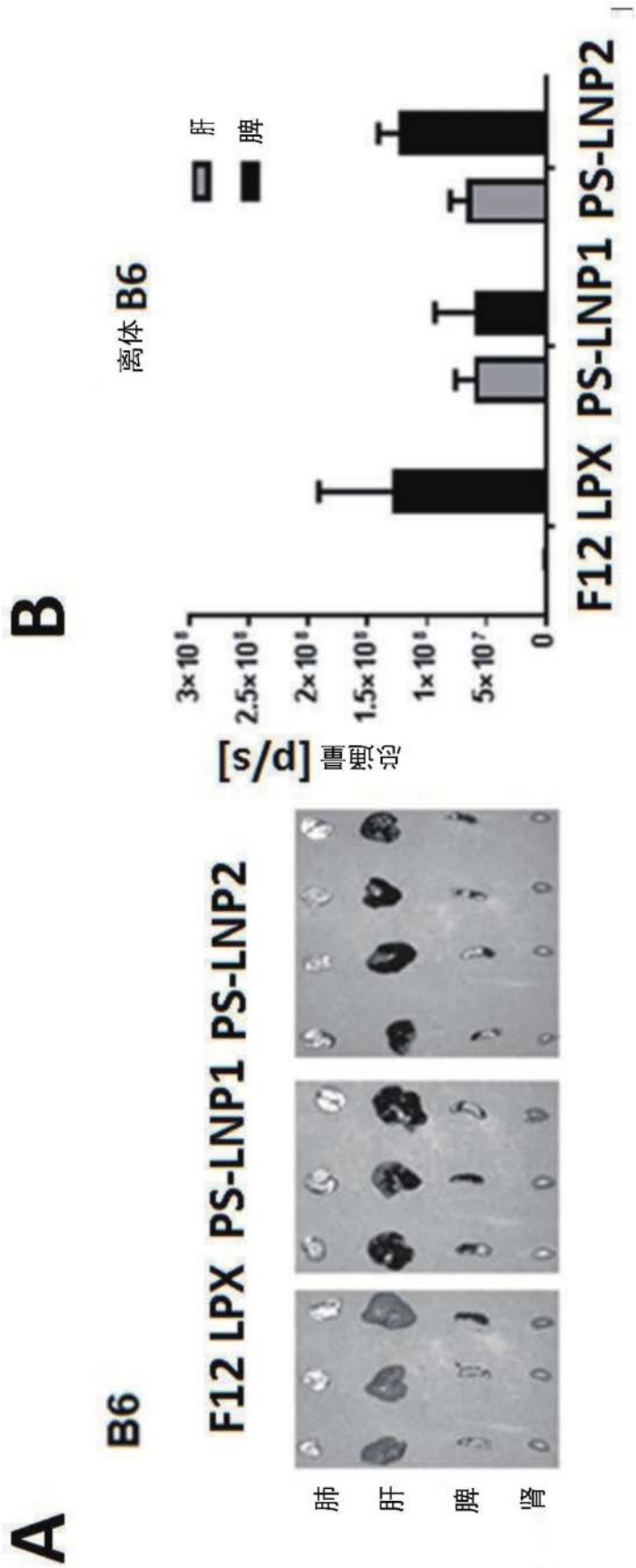


图5

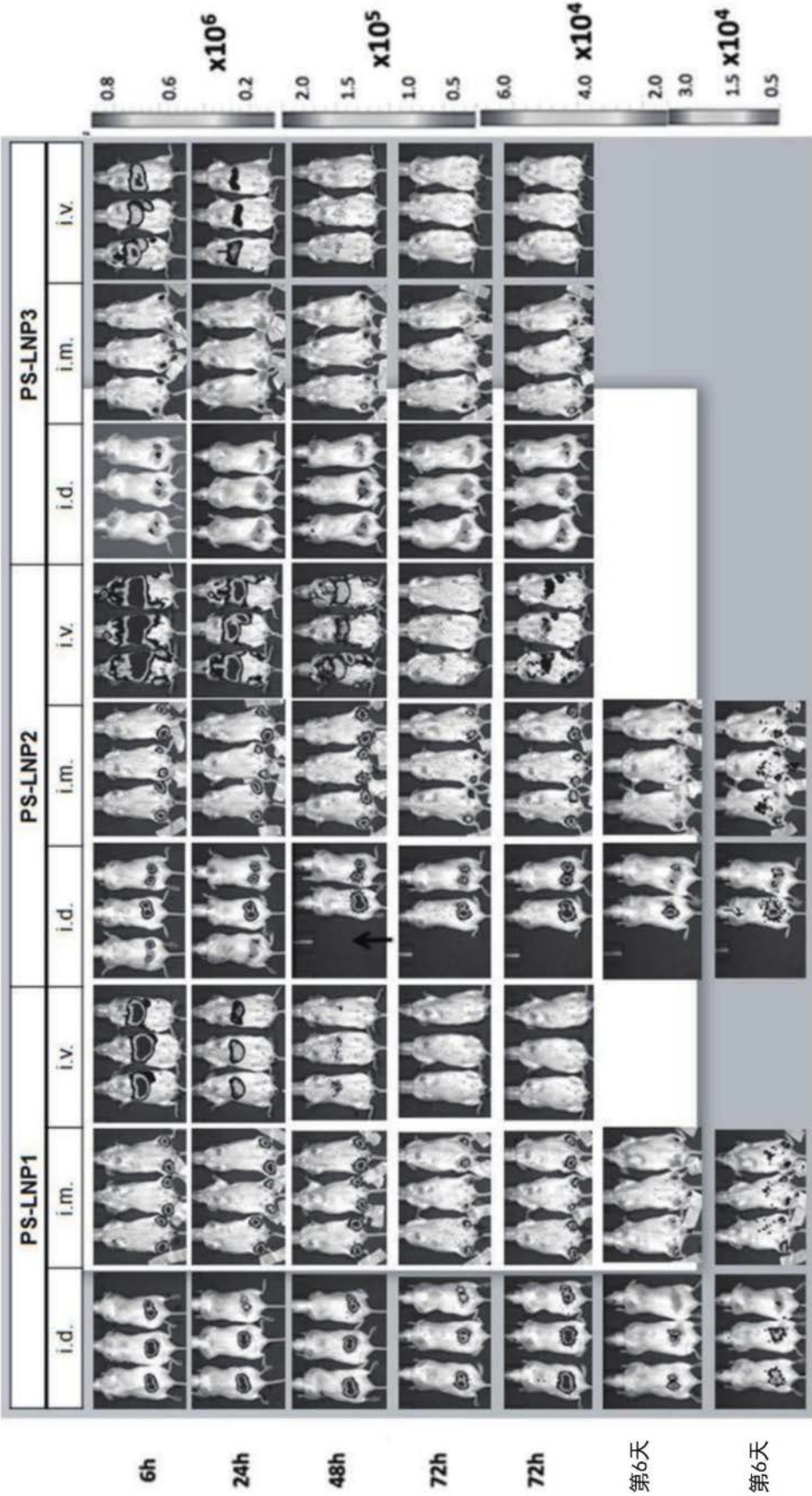


图6

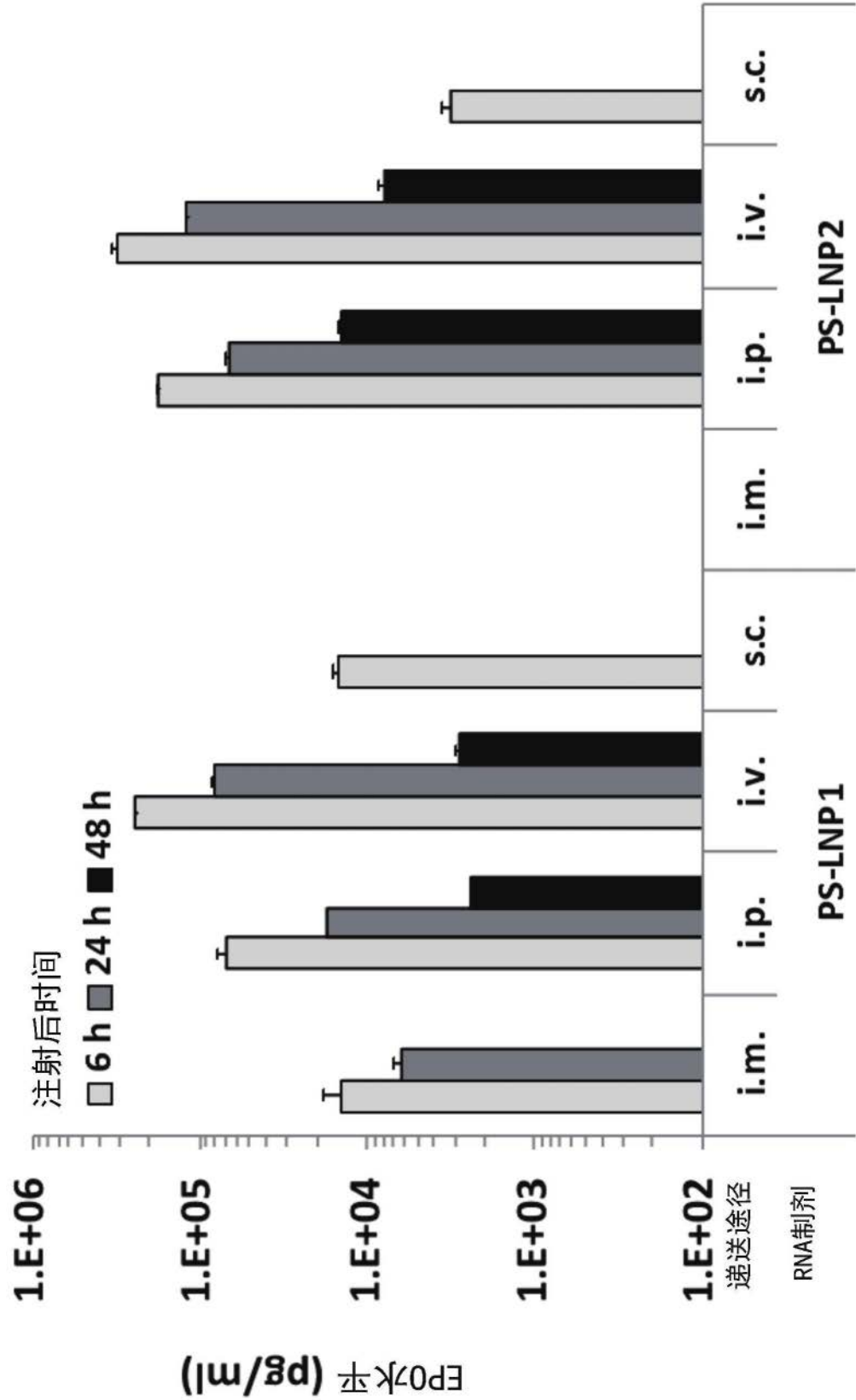


图7

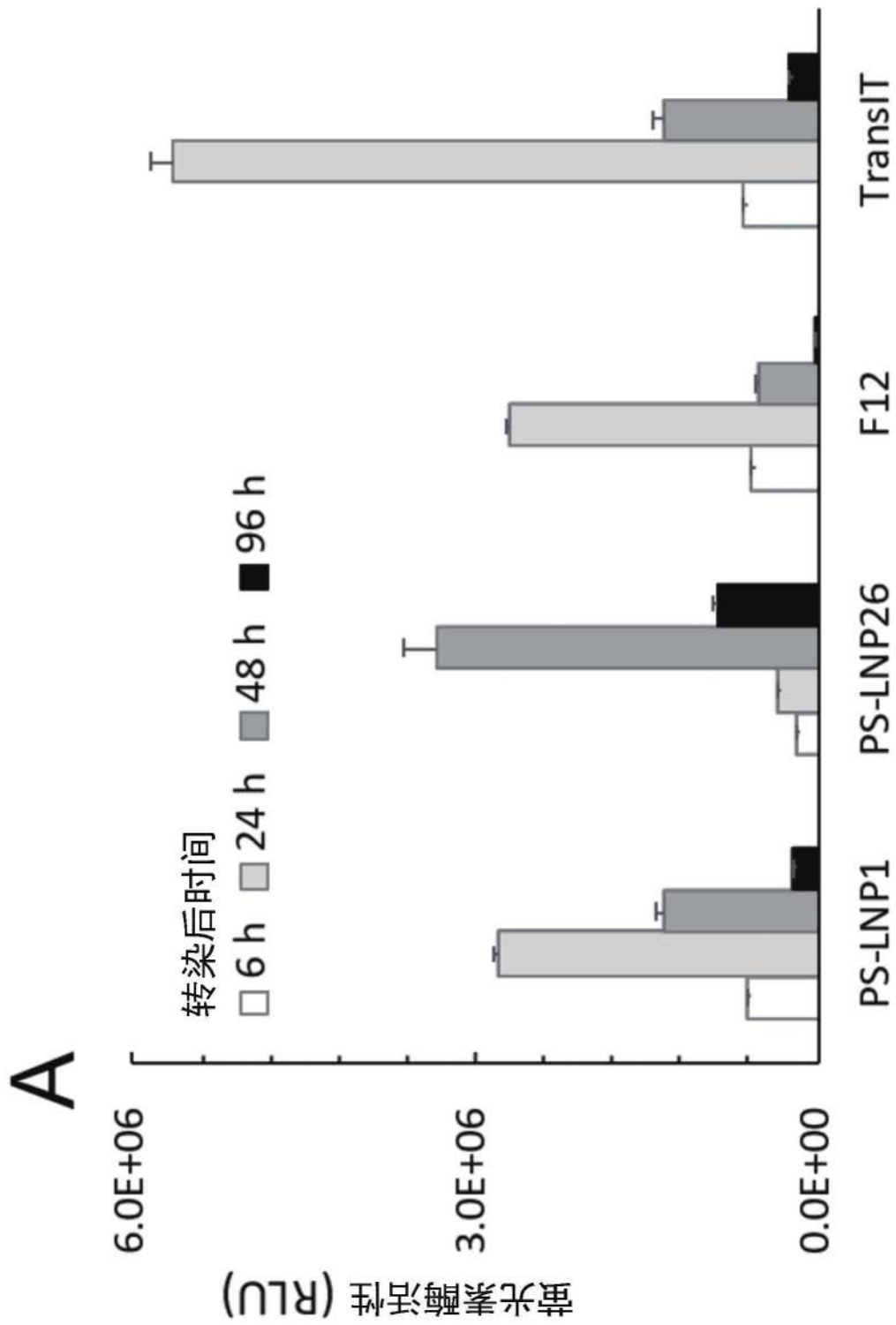


图8

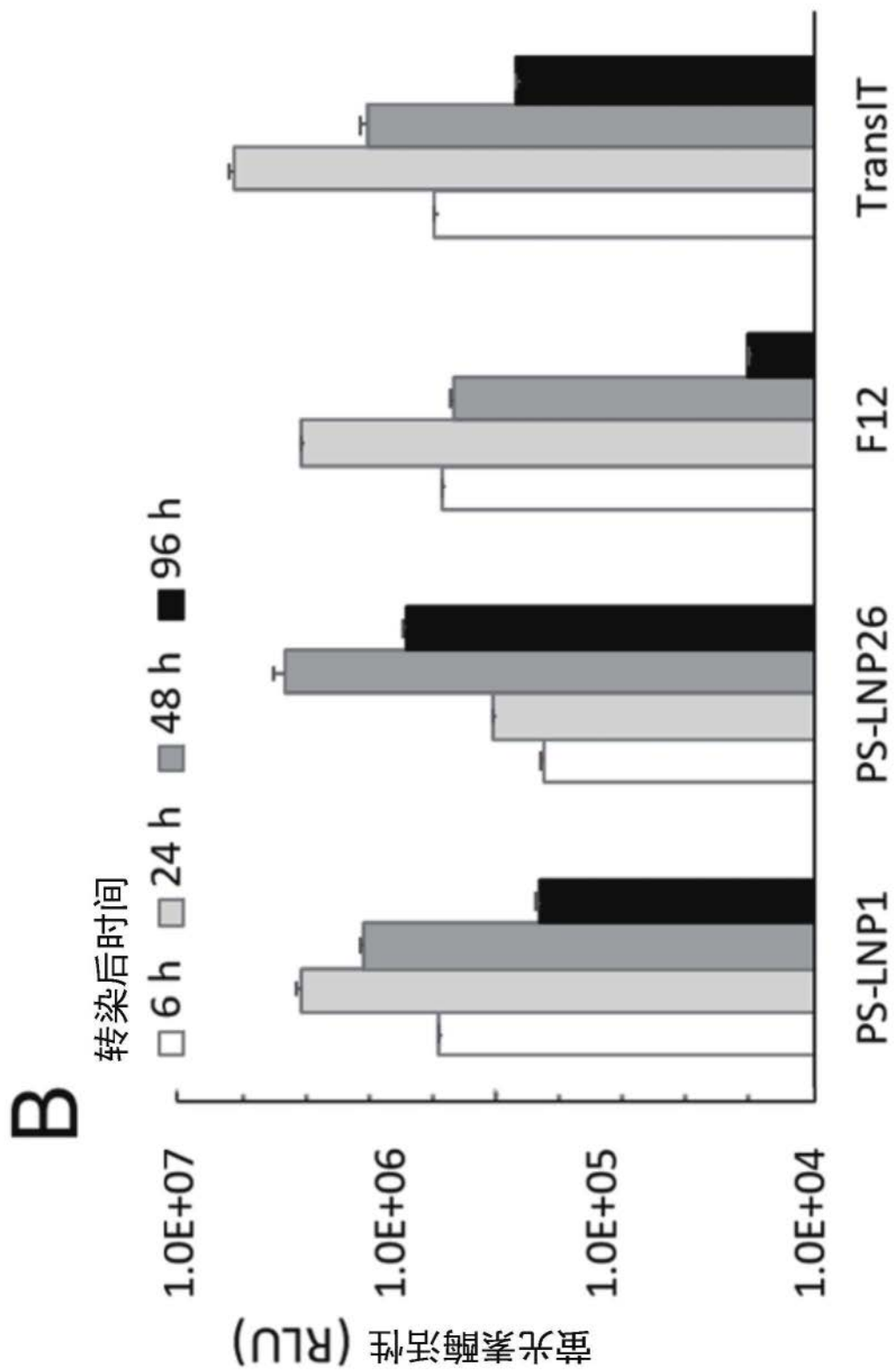


图8续

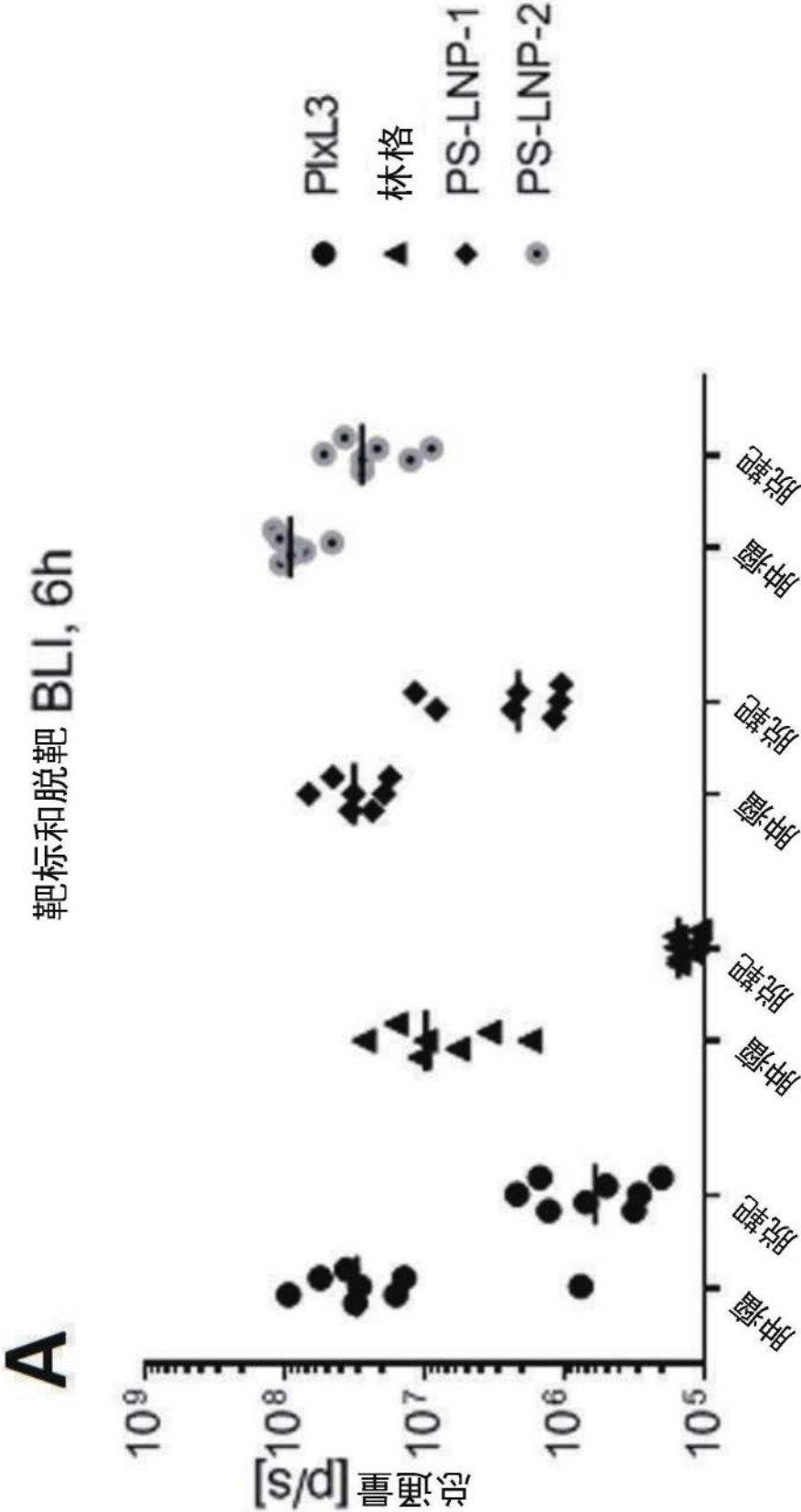


图9

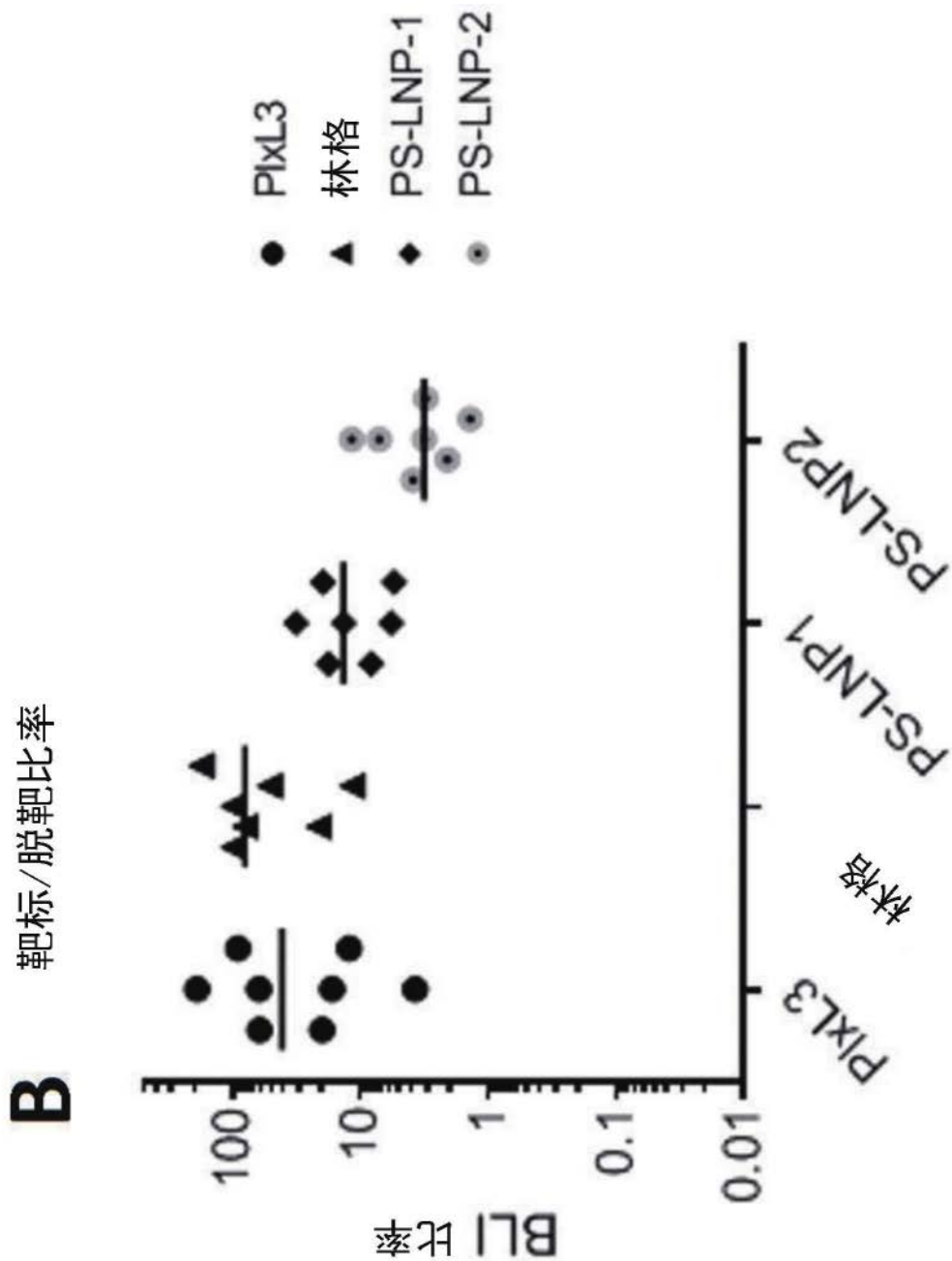


图9续

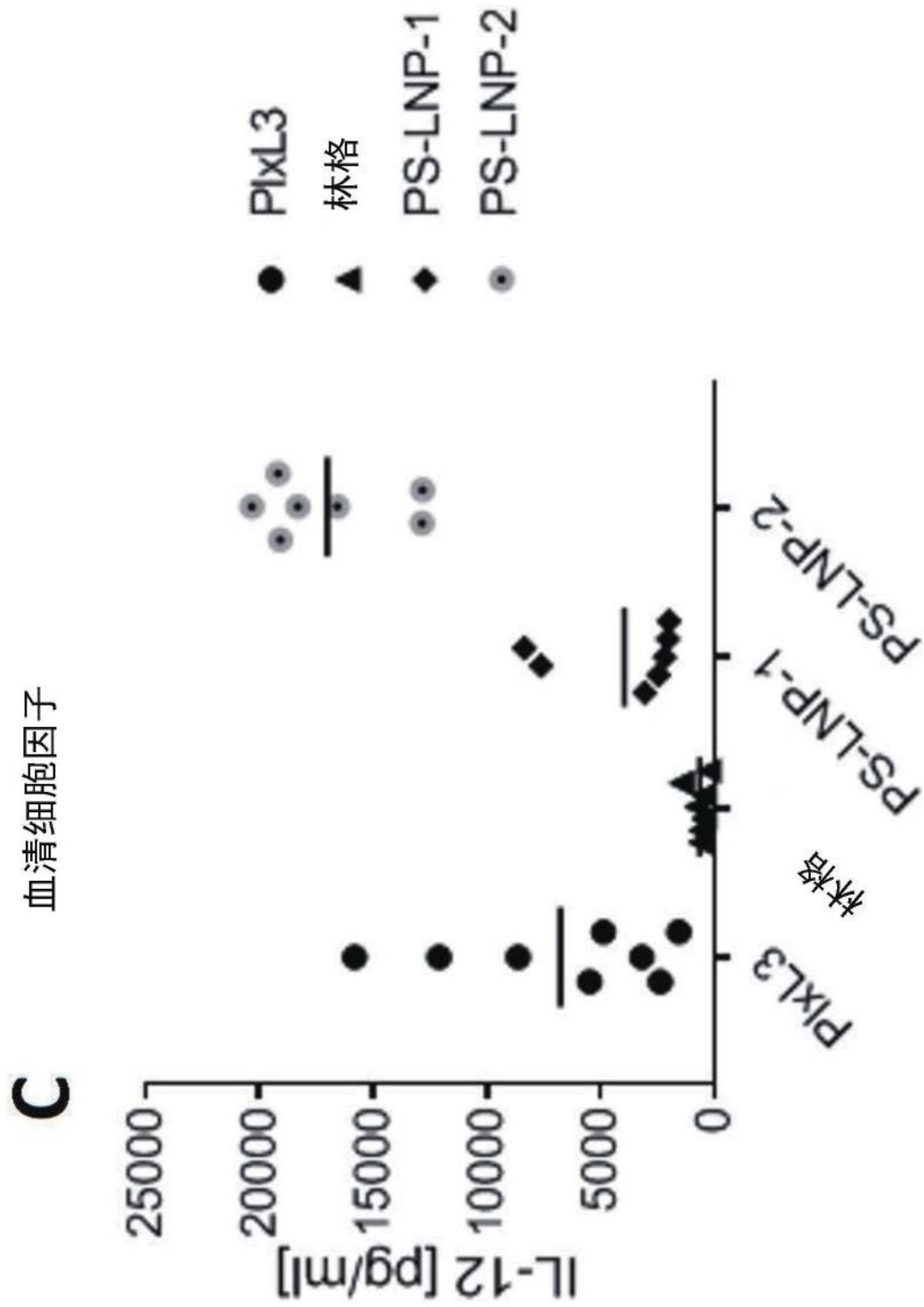


图9续

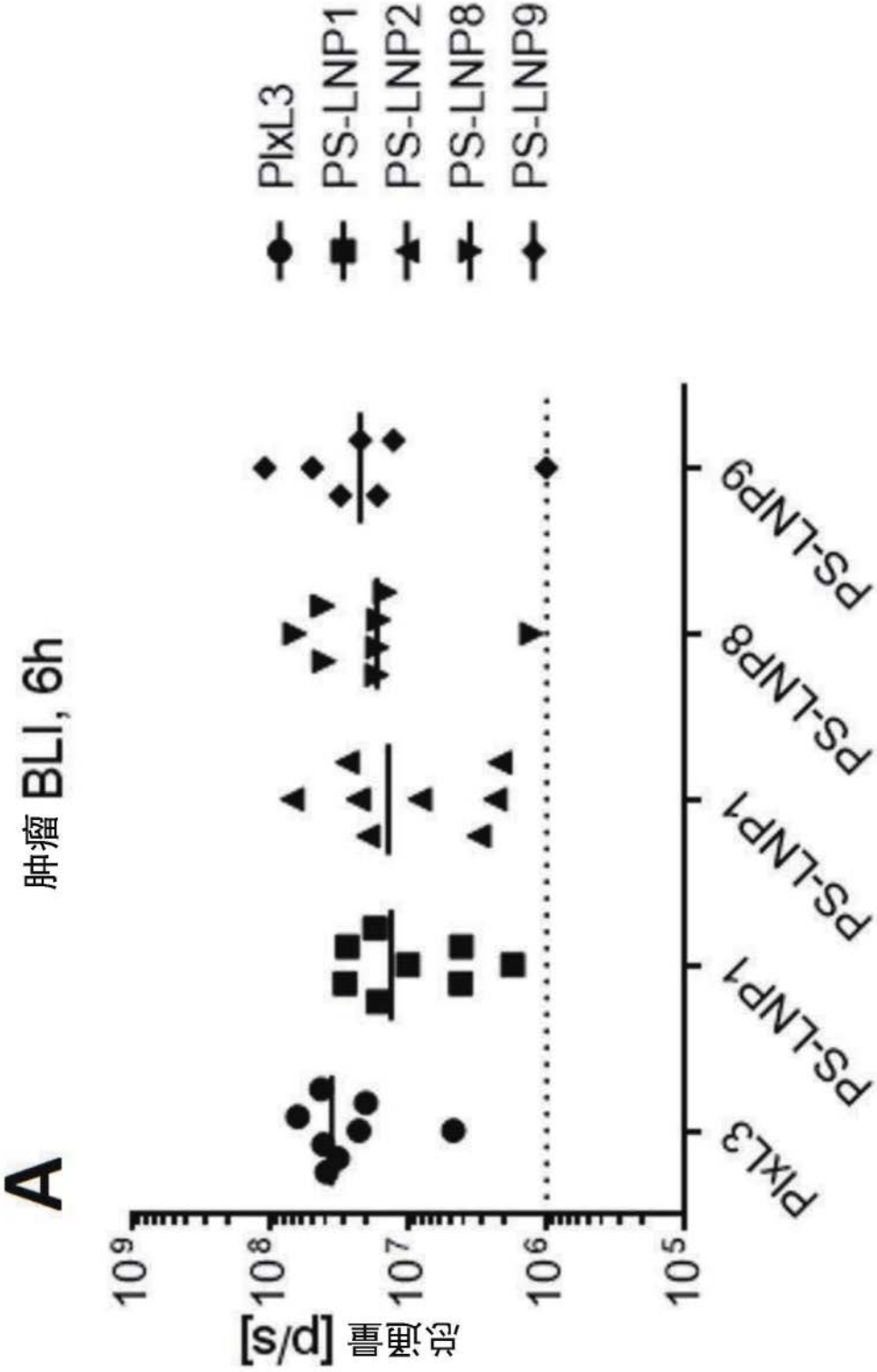


图10

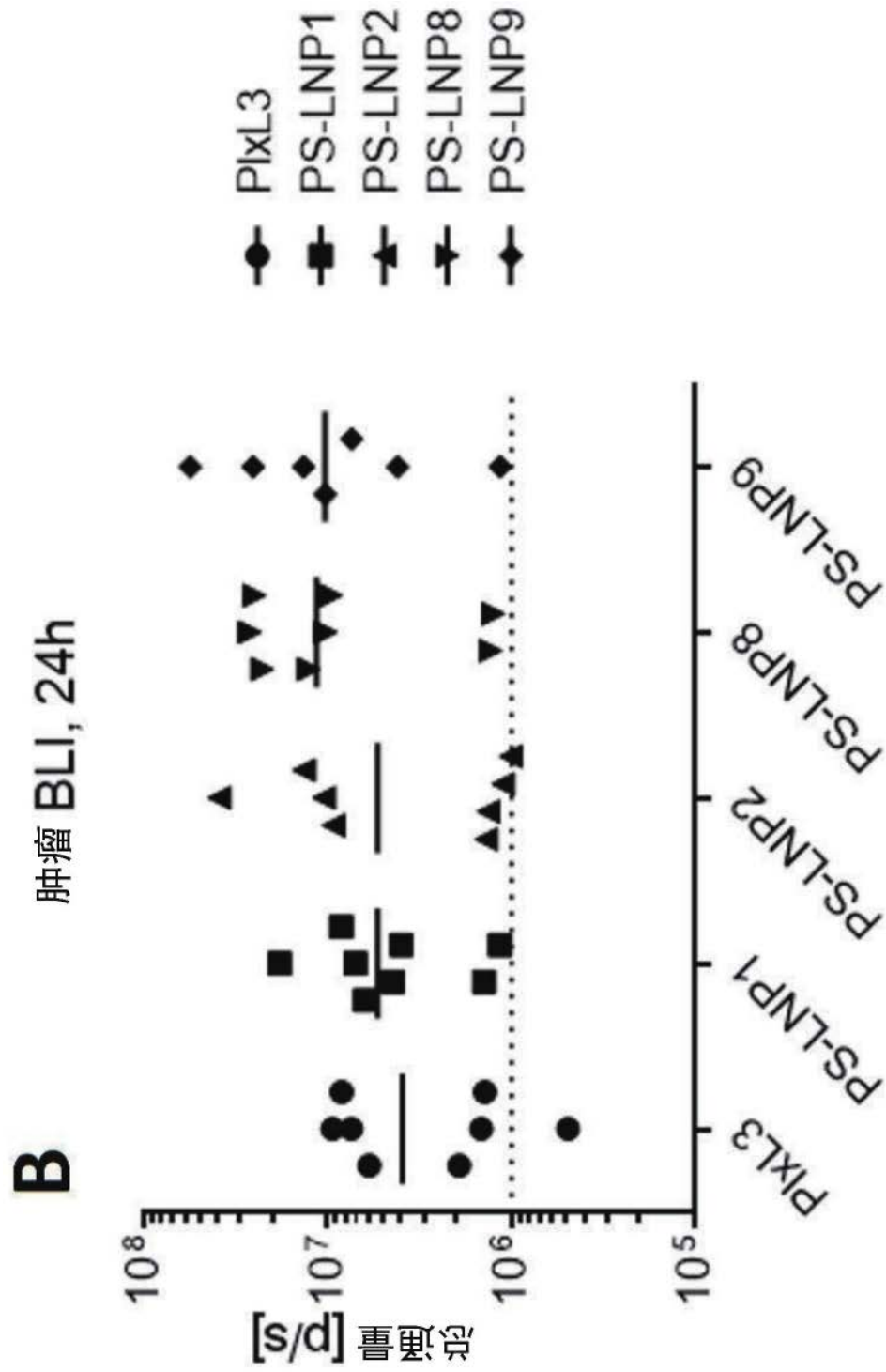


图10续

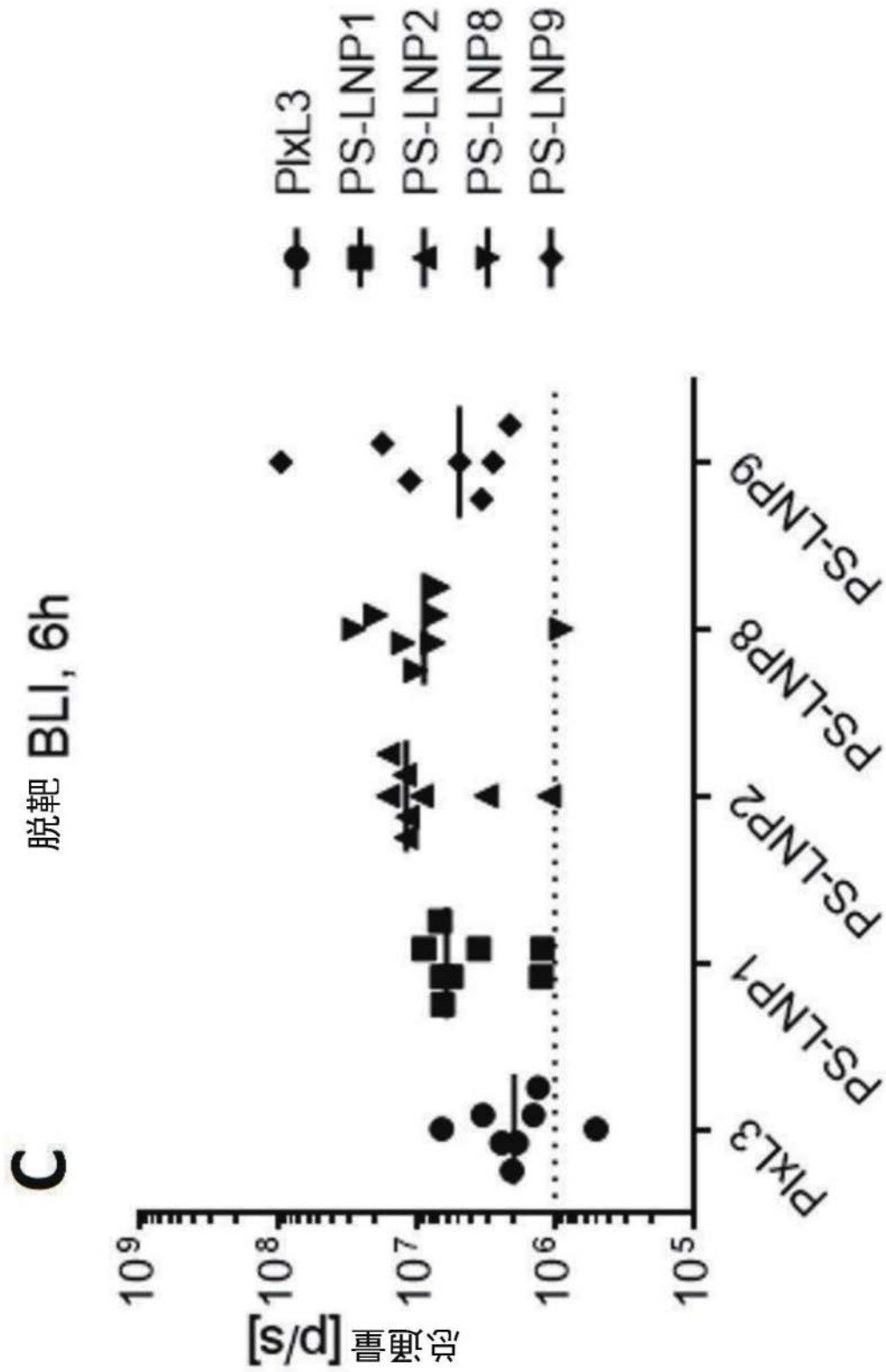


图10续

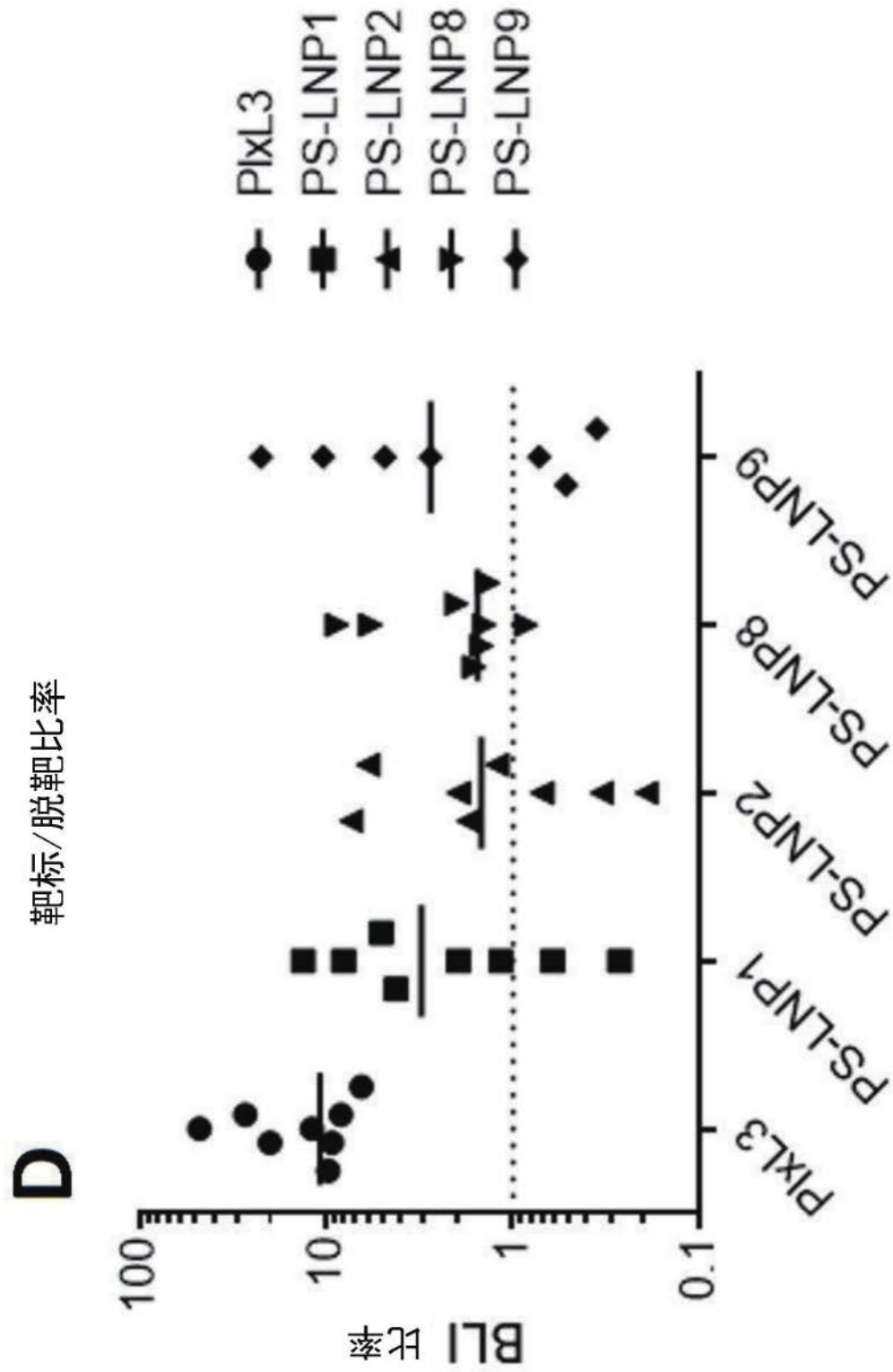


图10续

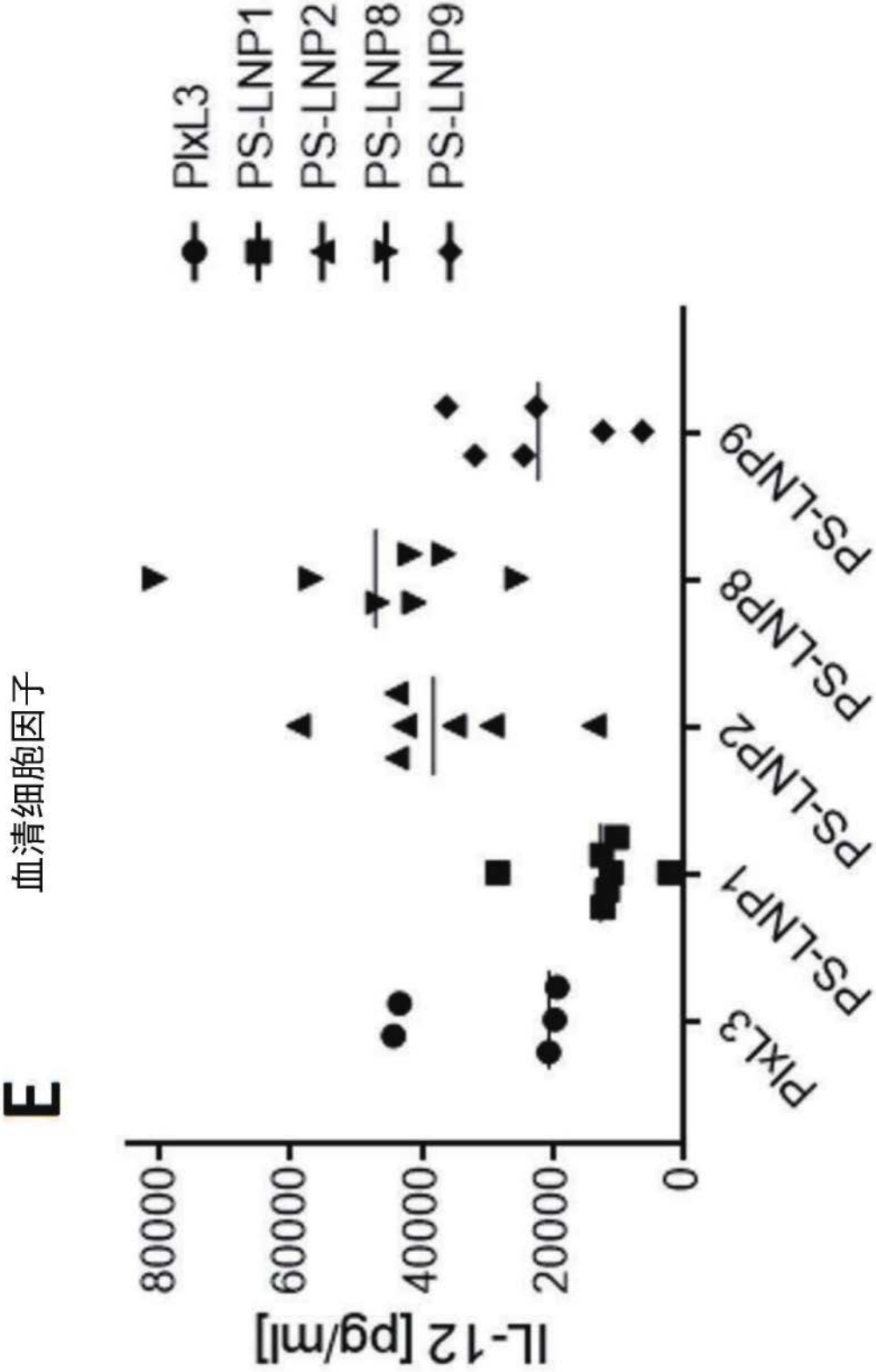


图10续

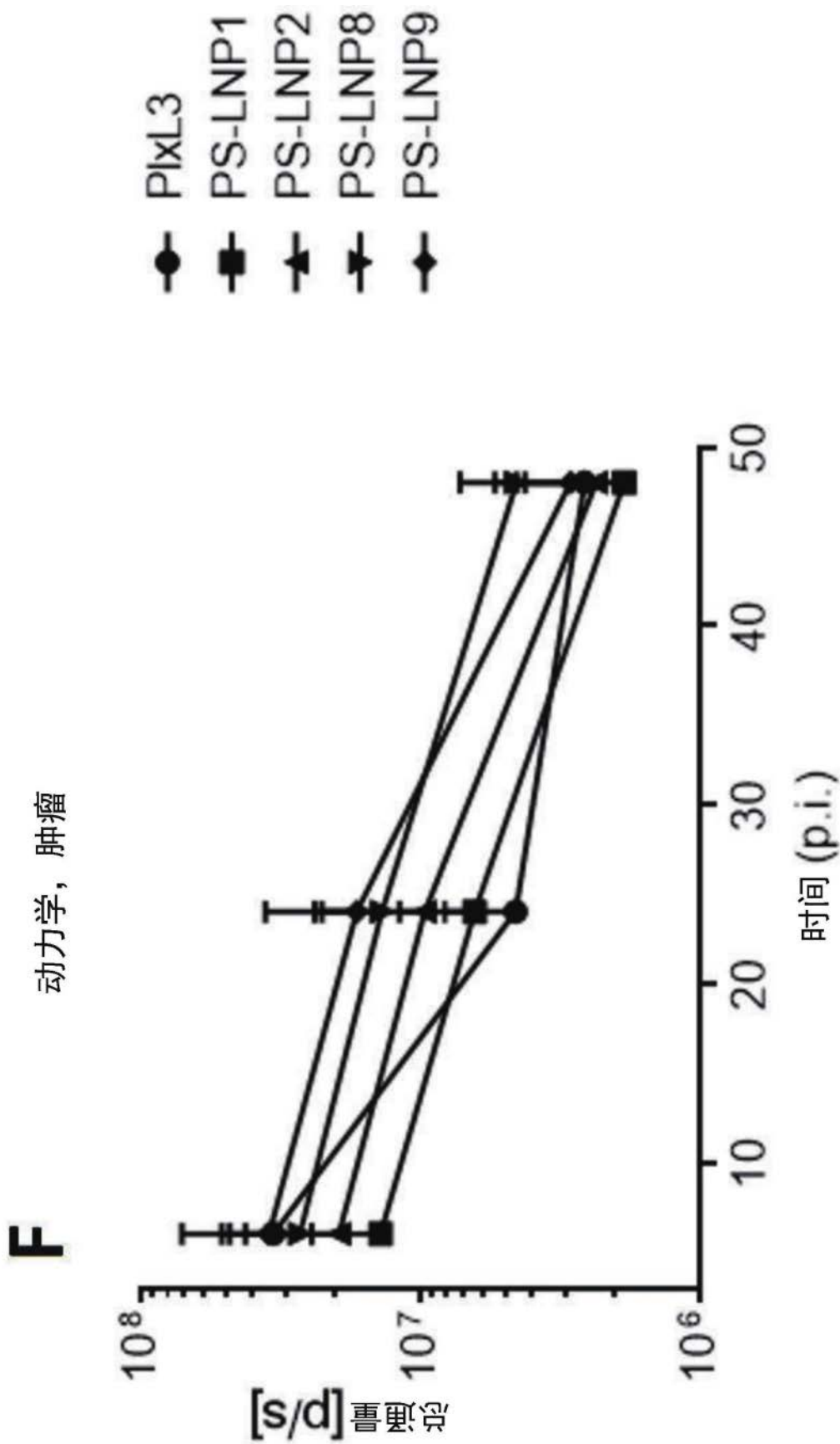


图10续

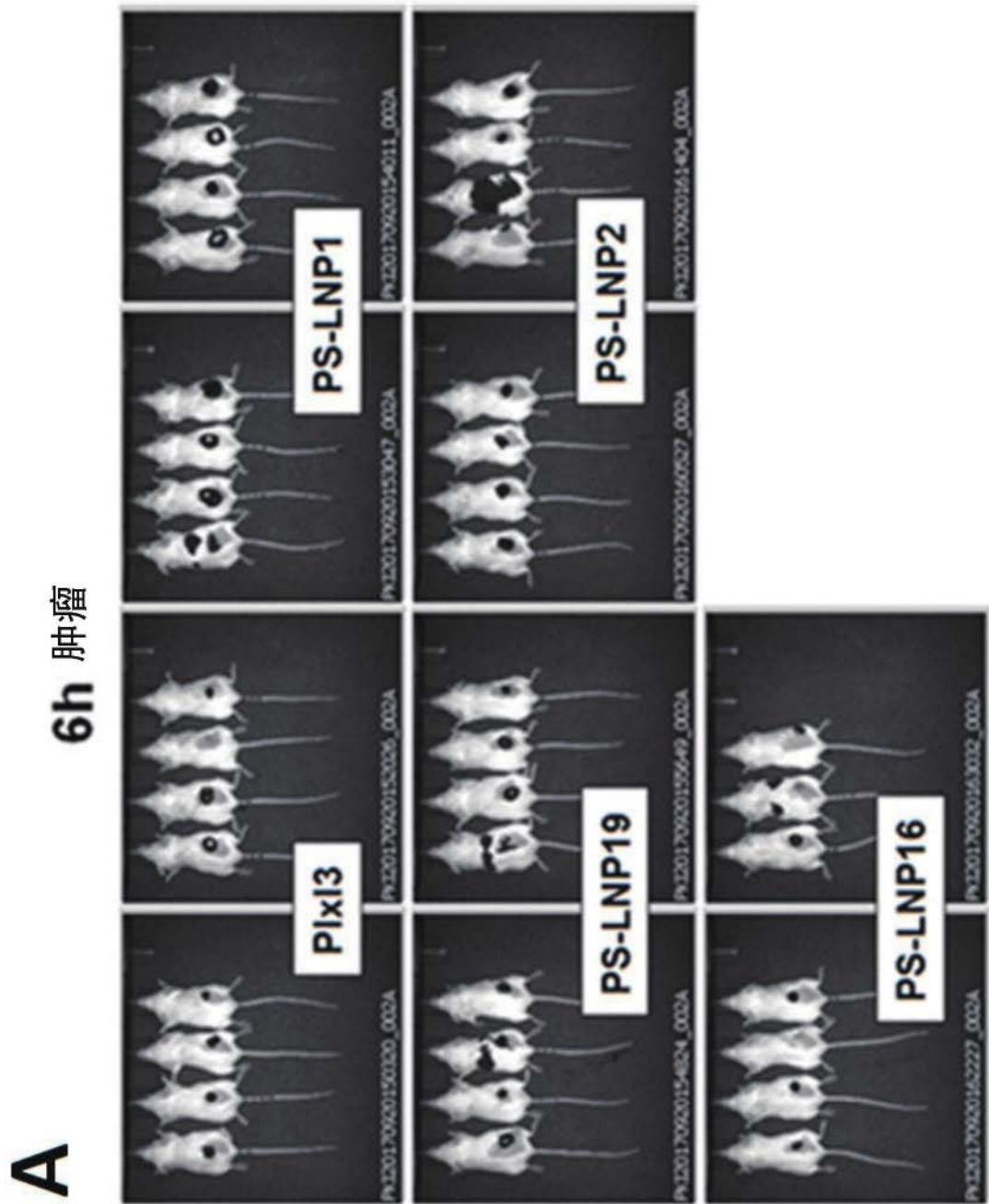


图11

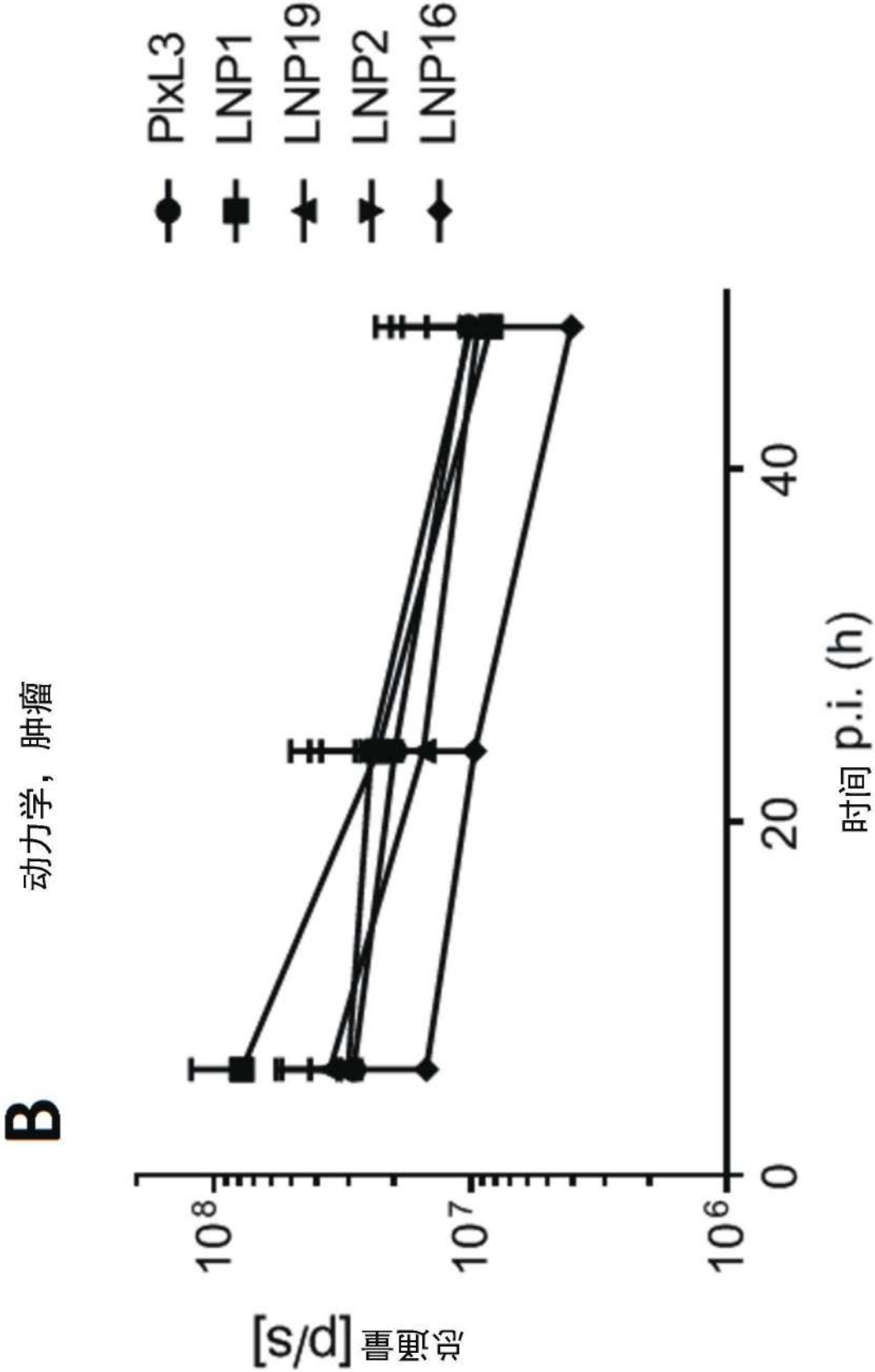


图11续

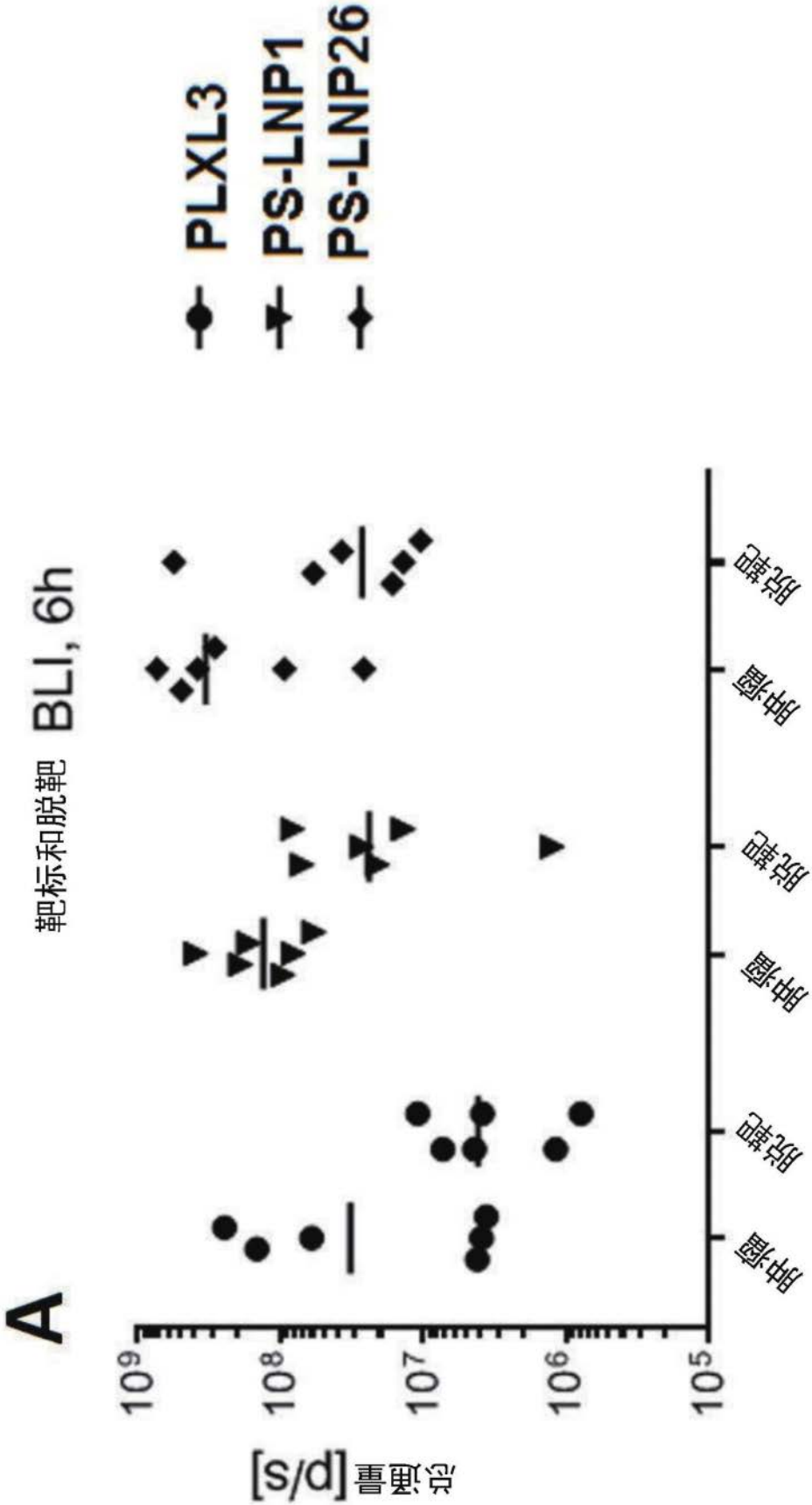


图12

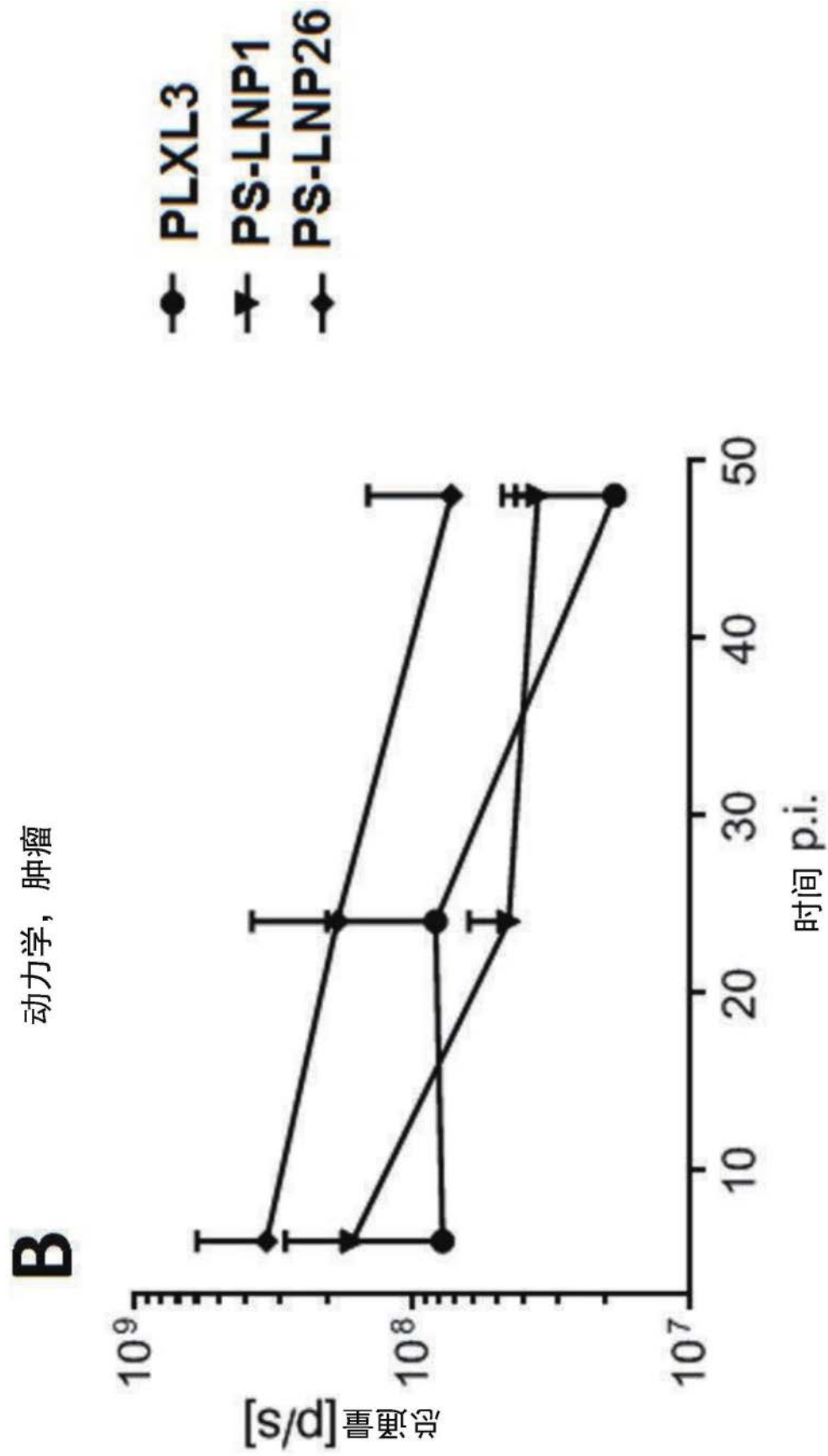


图12续

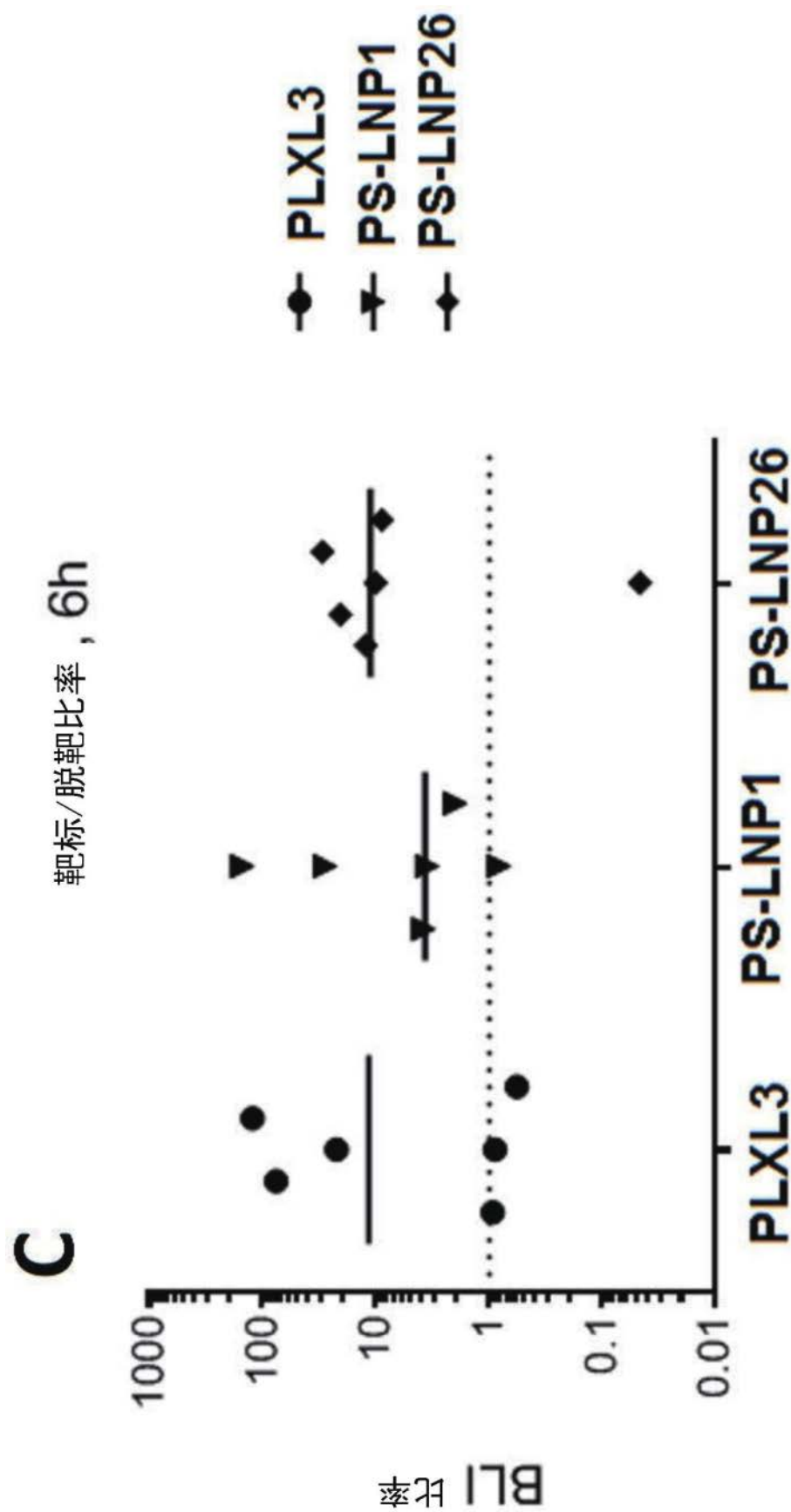


图12续

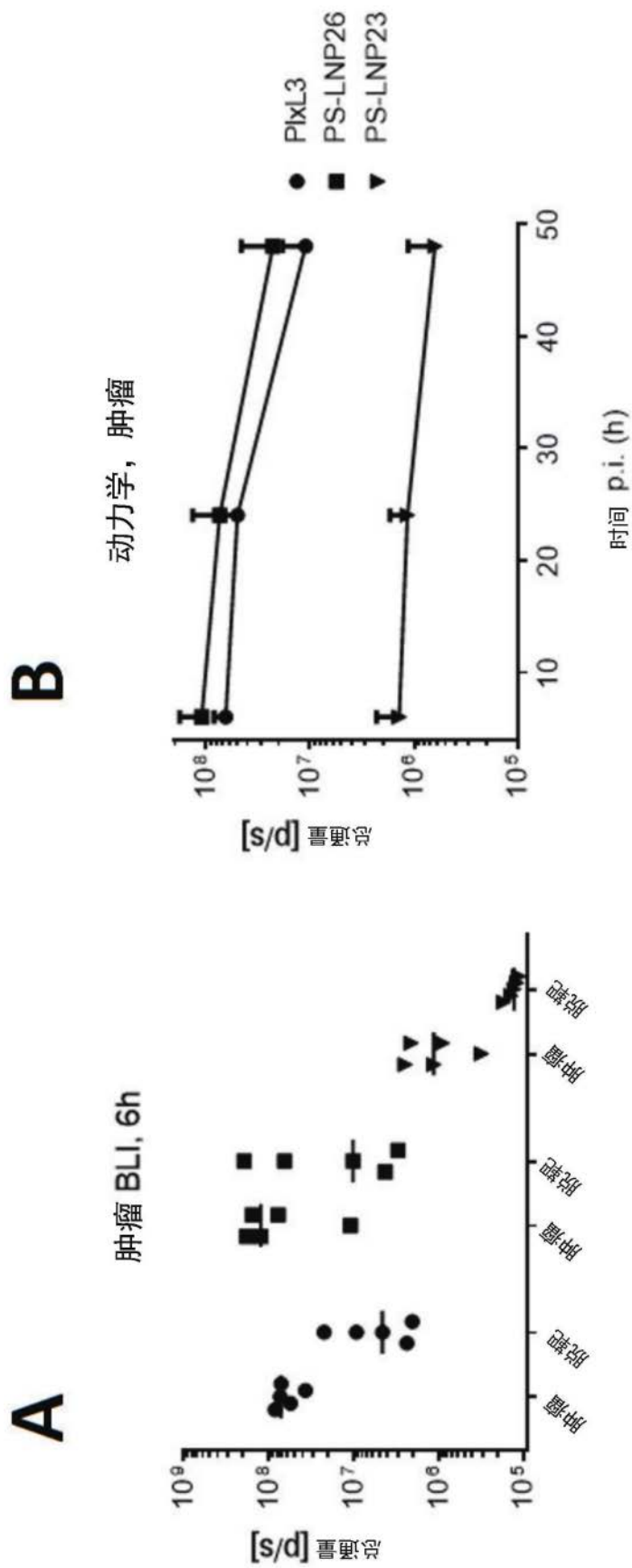


图13

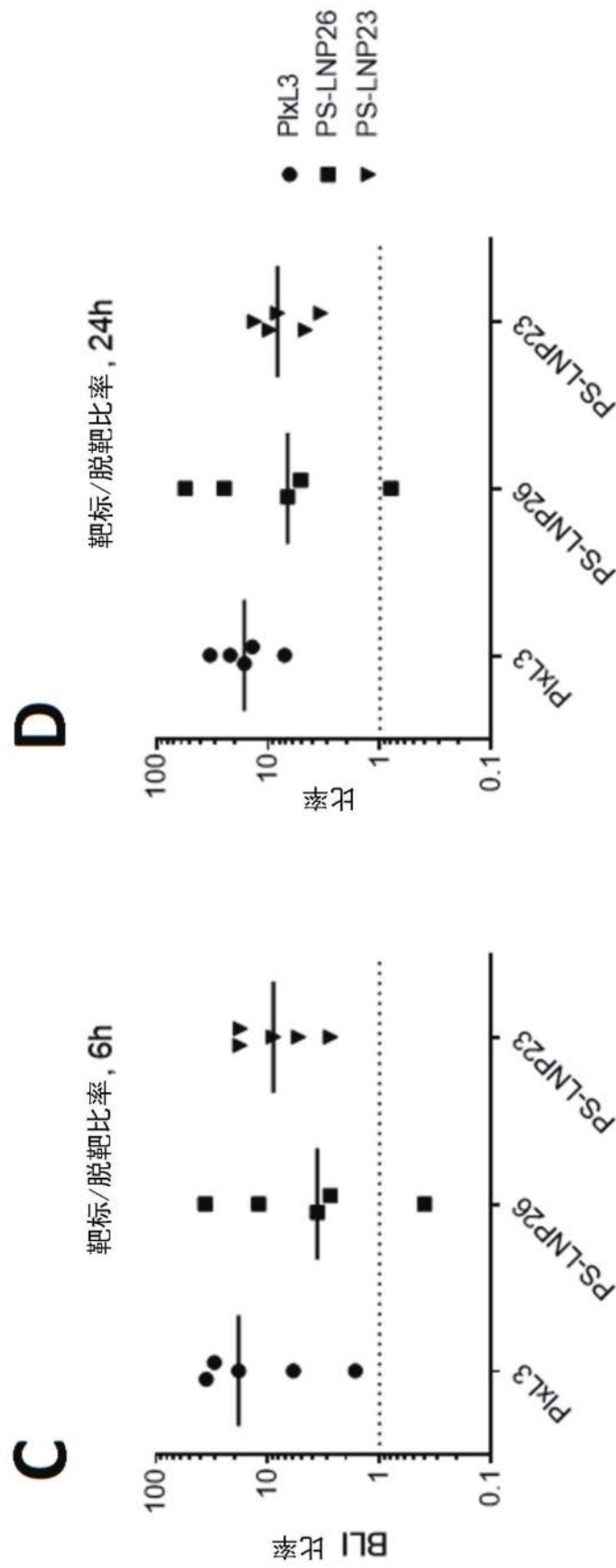


图13续

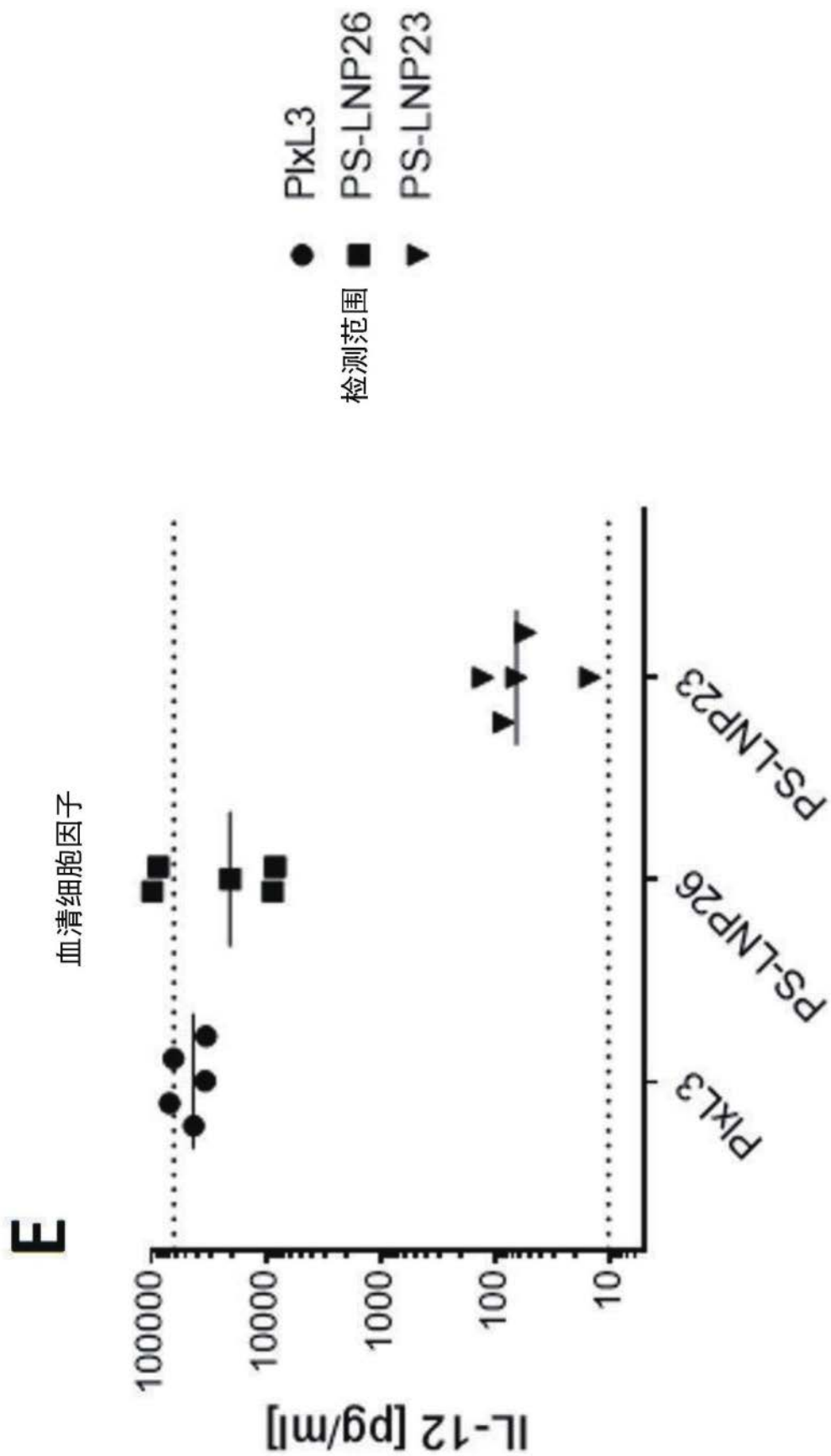


图13续

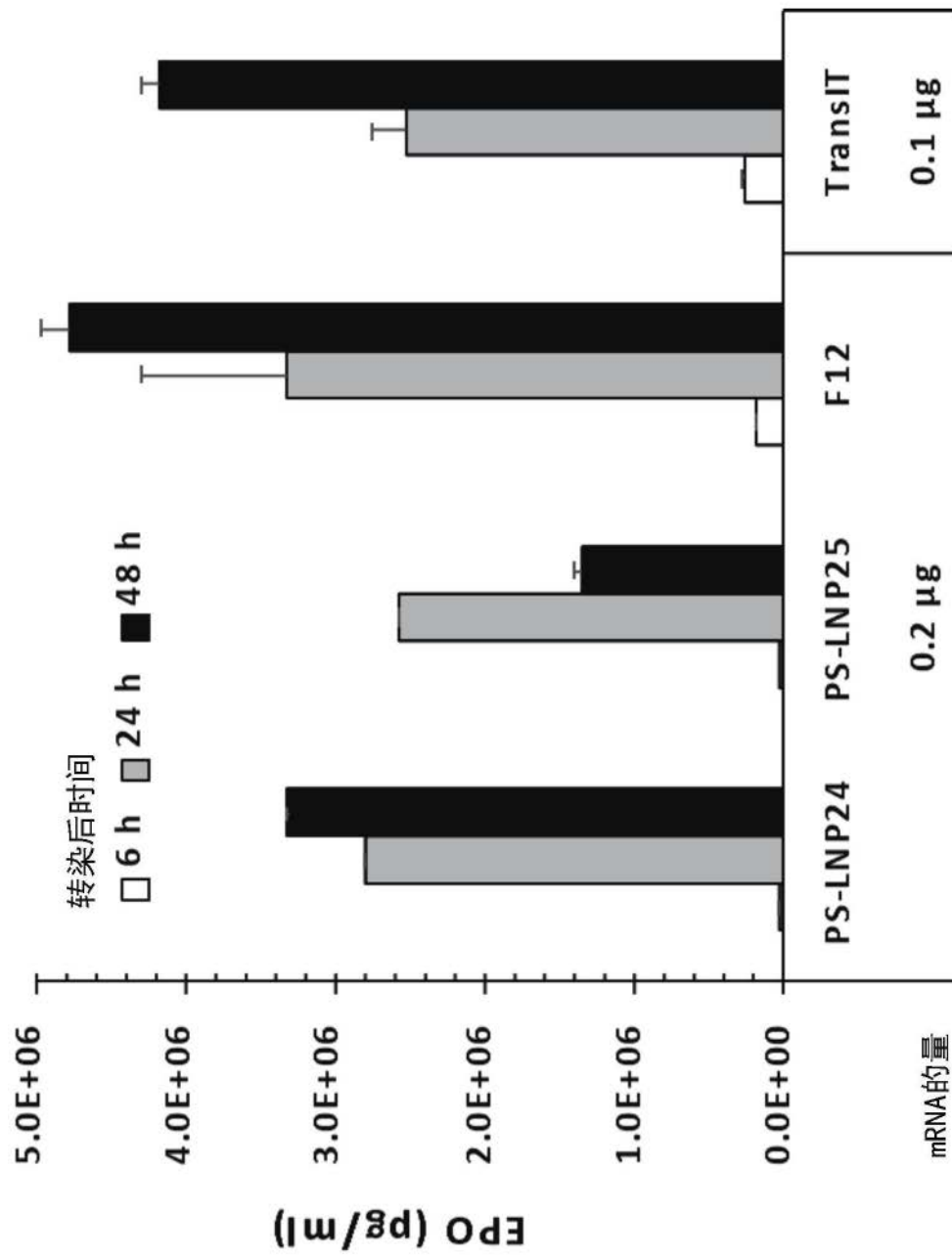


图14

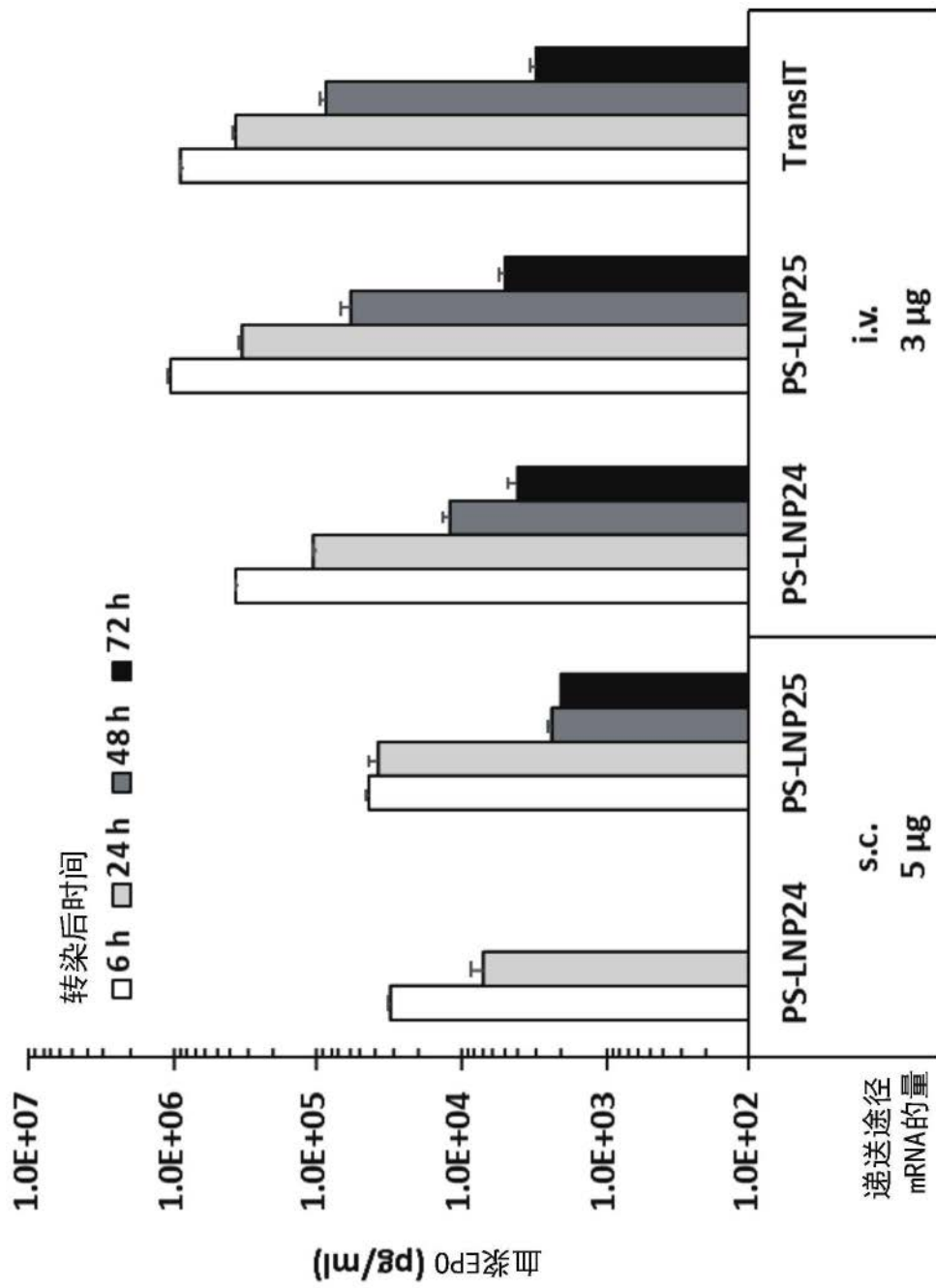


图15

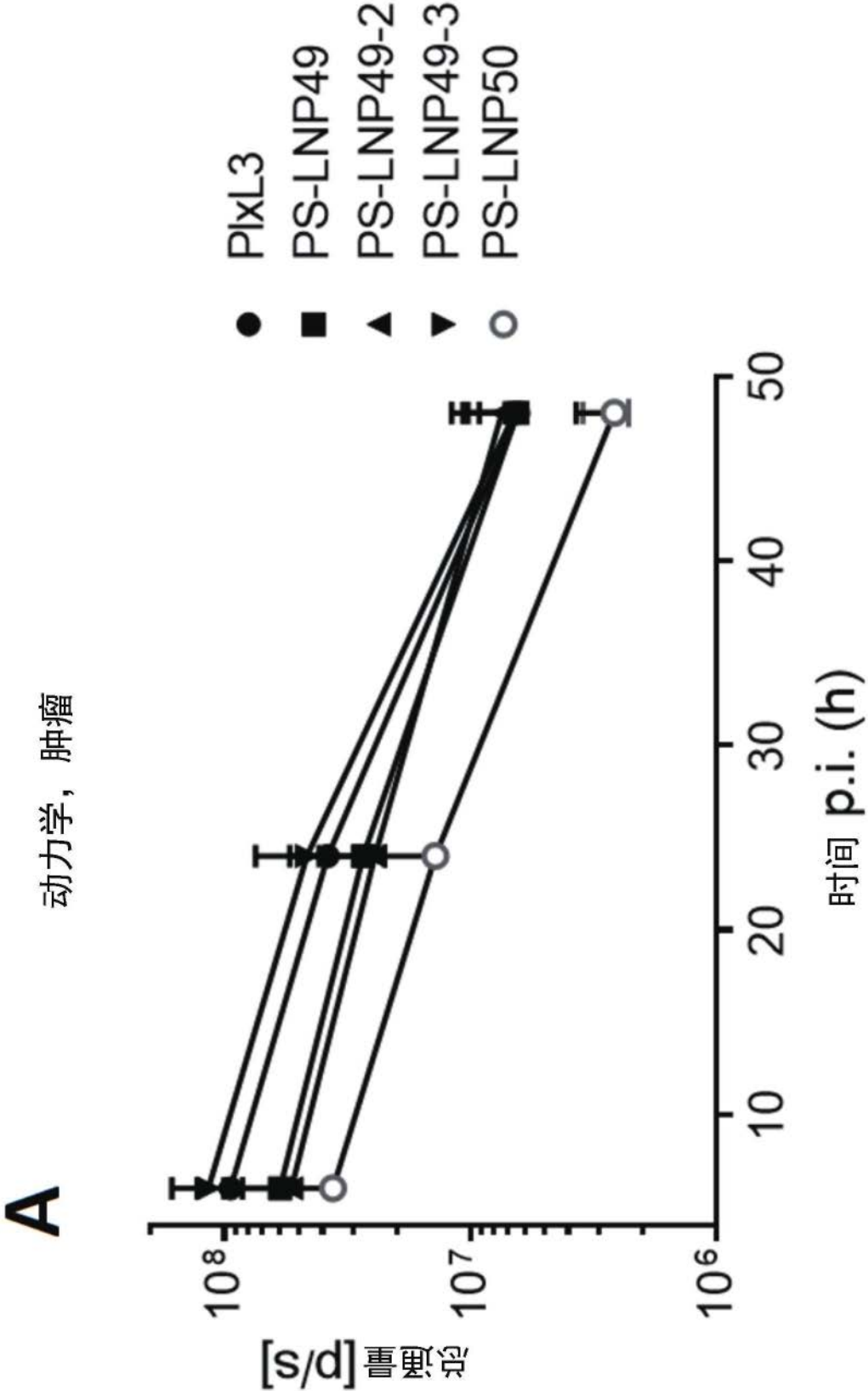


图16

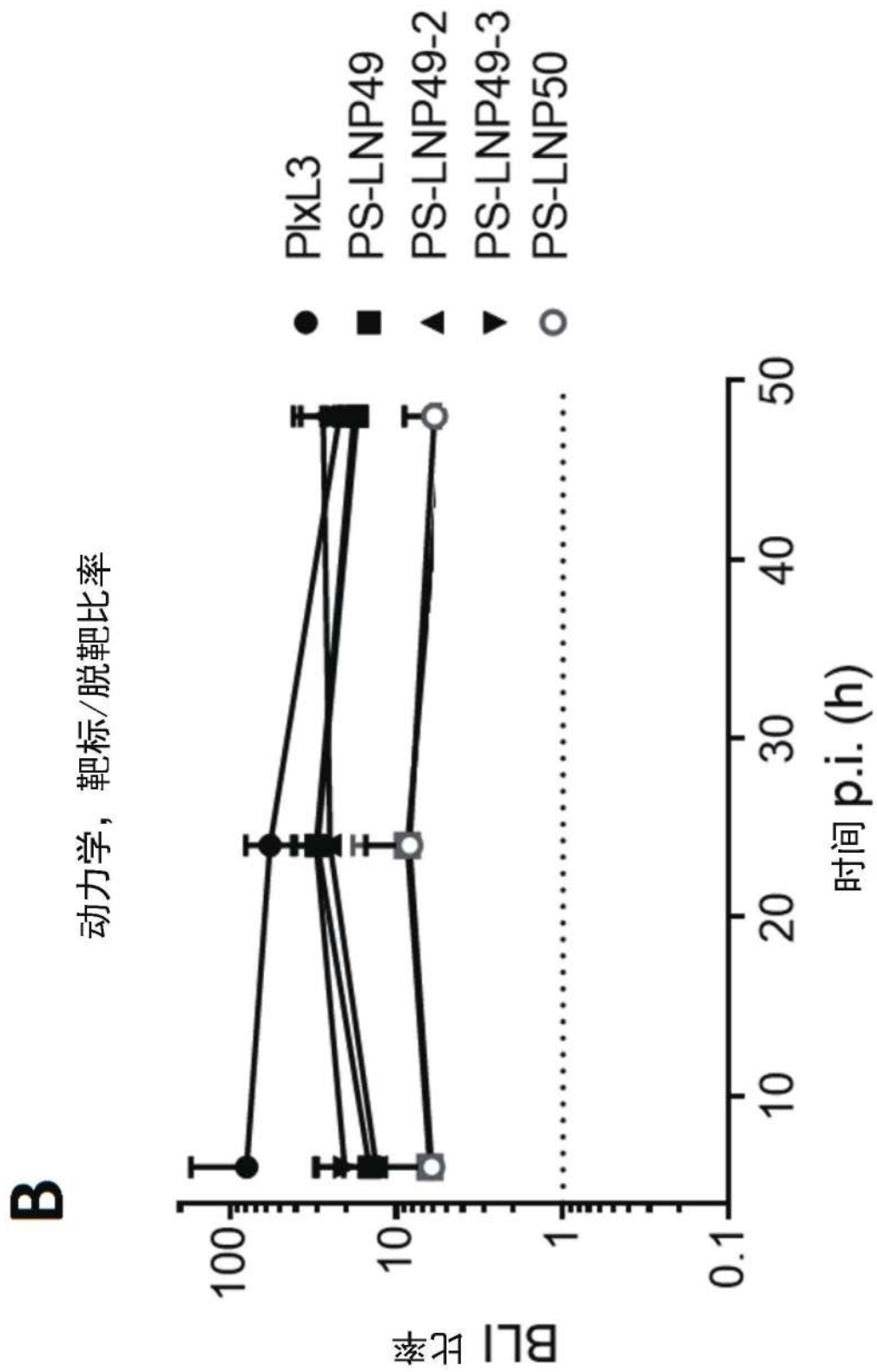


图16续

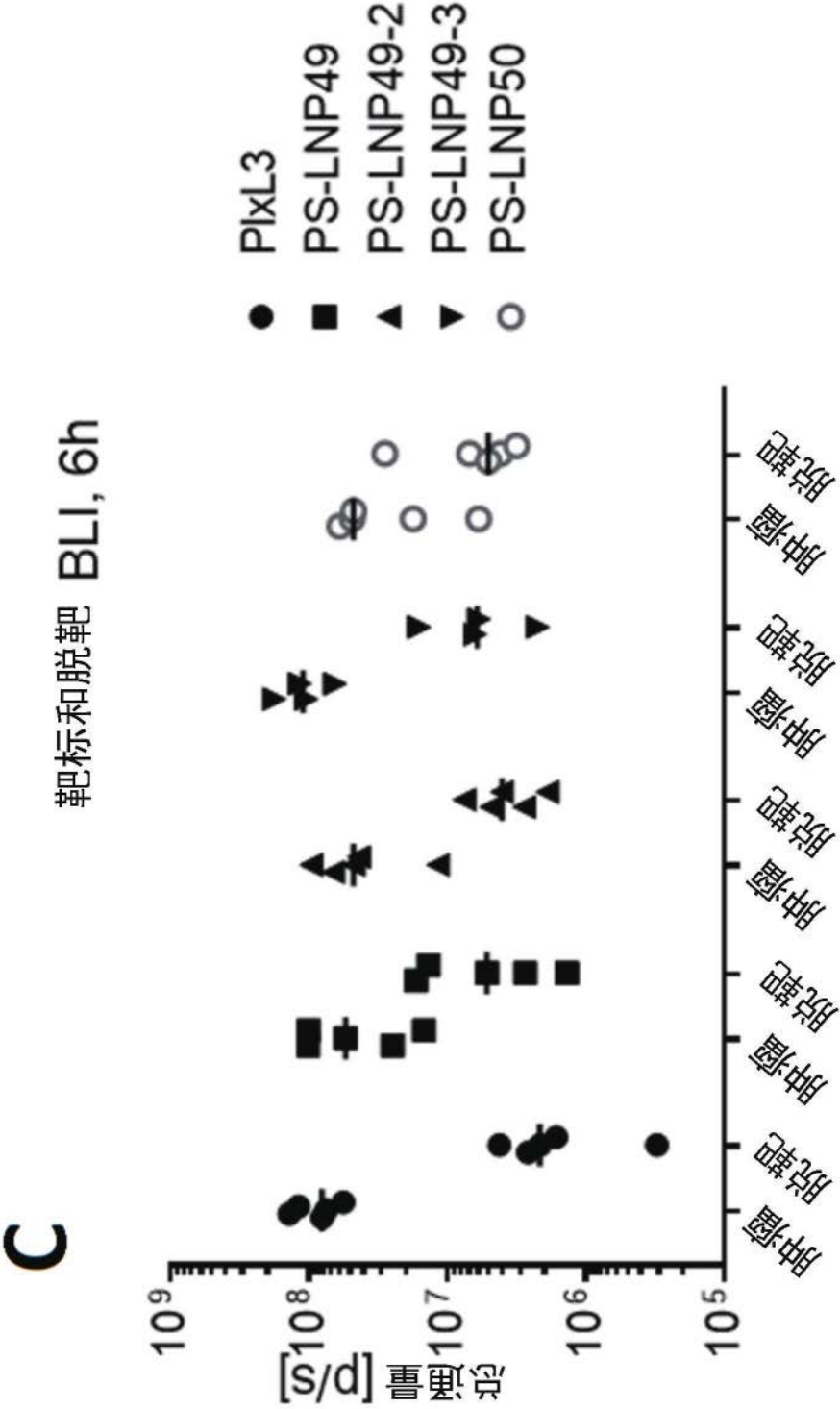


图16续

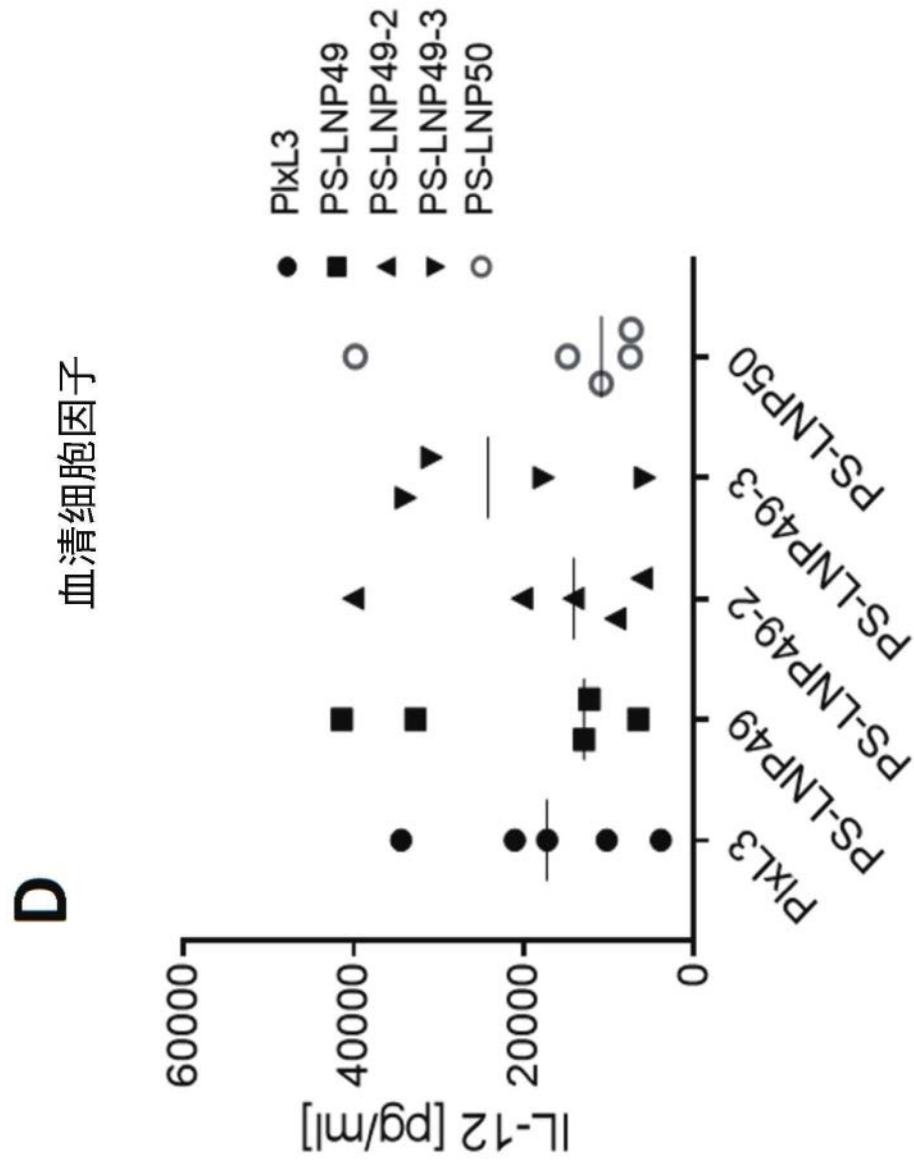


图16续

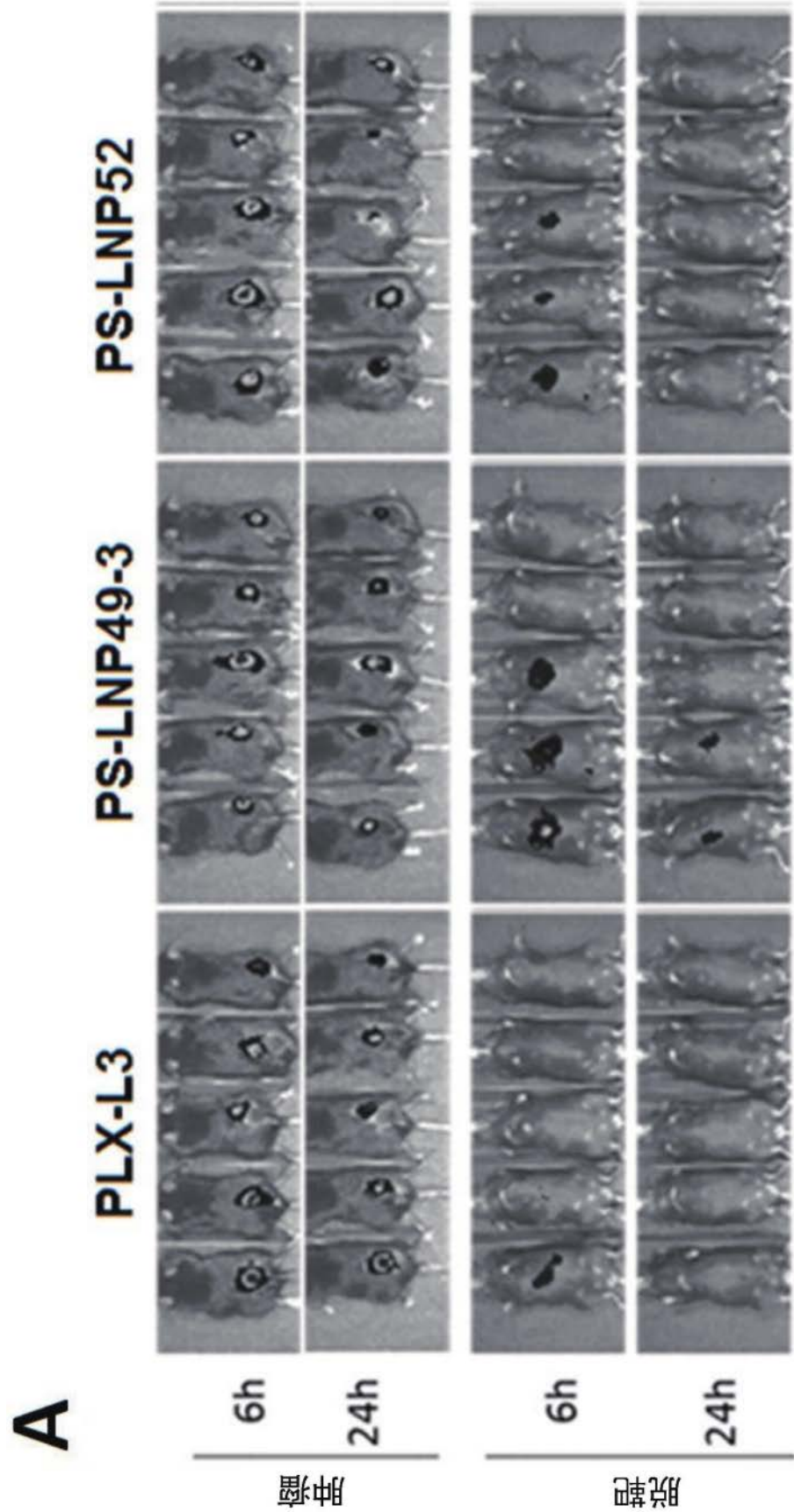


图17

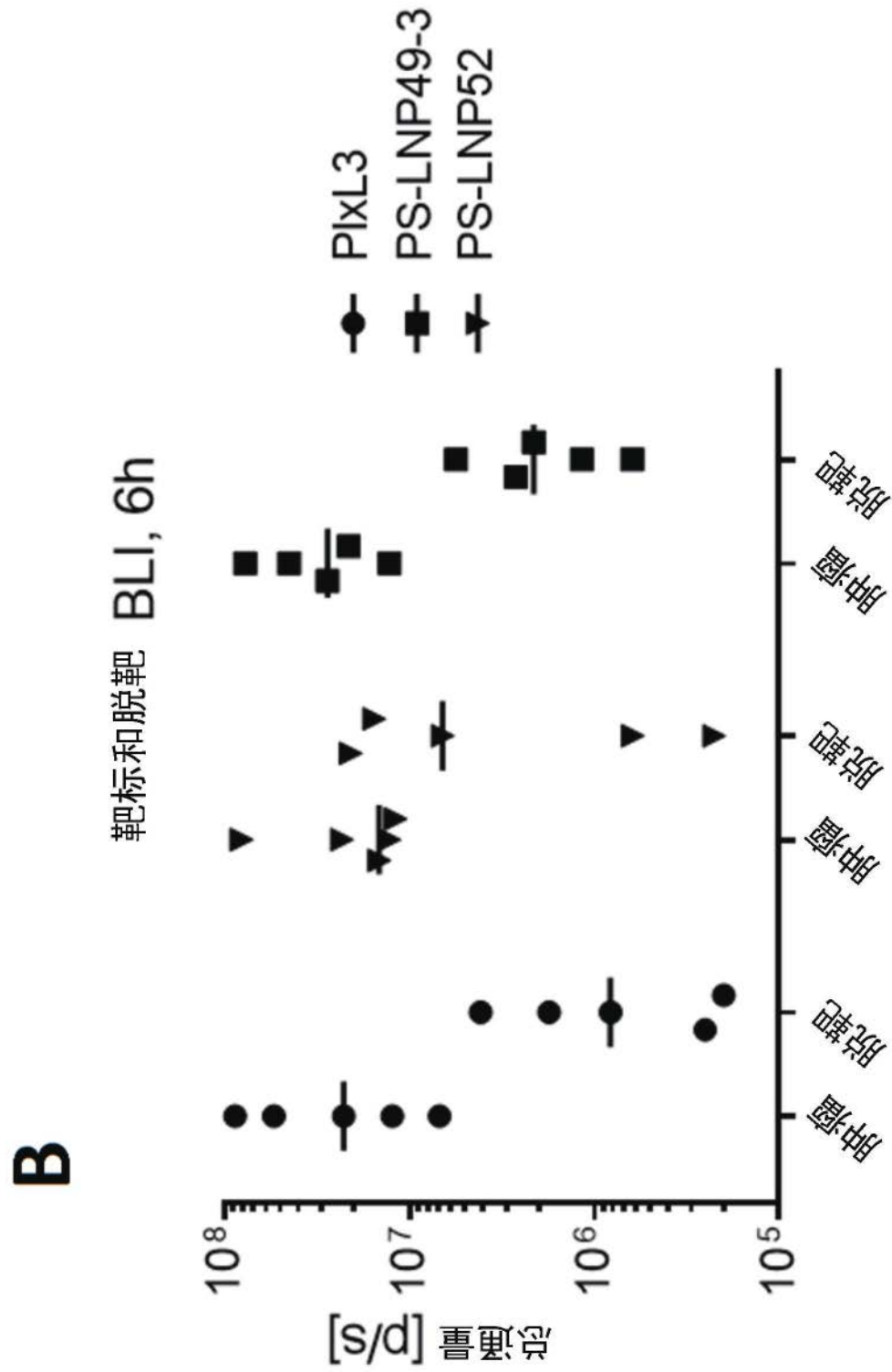


图17续

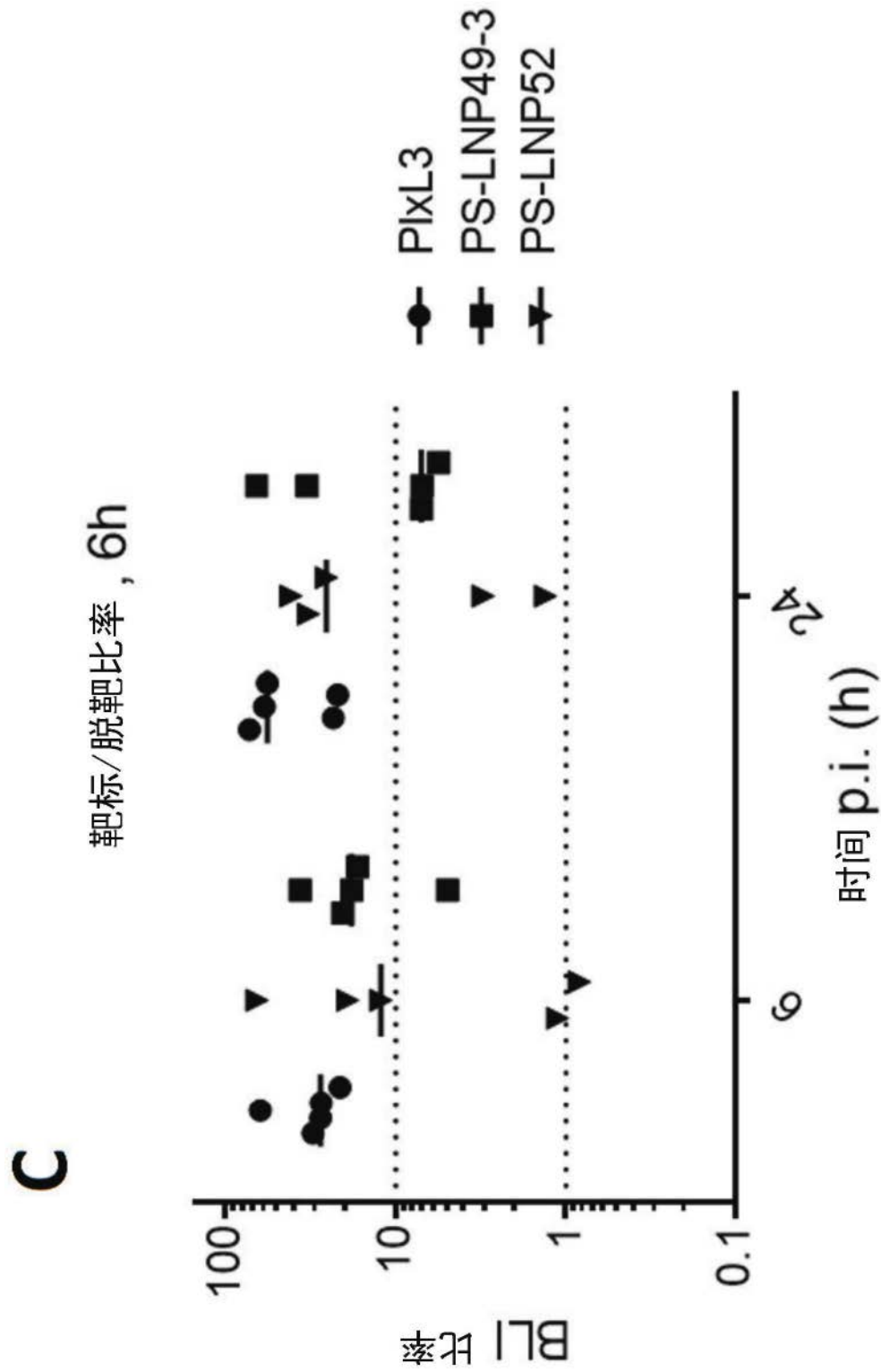


图17续

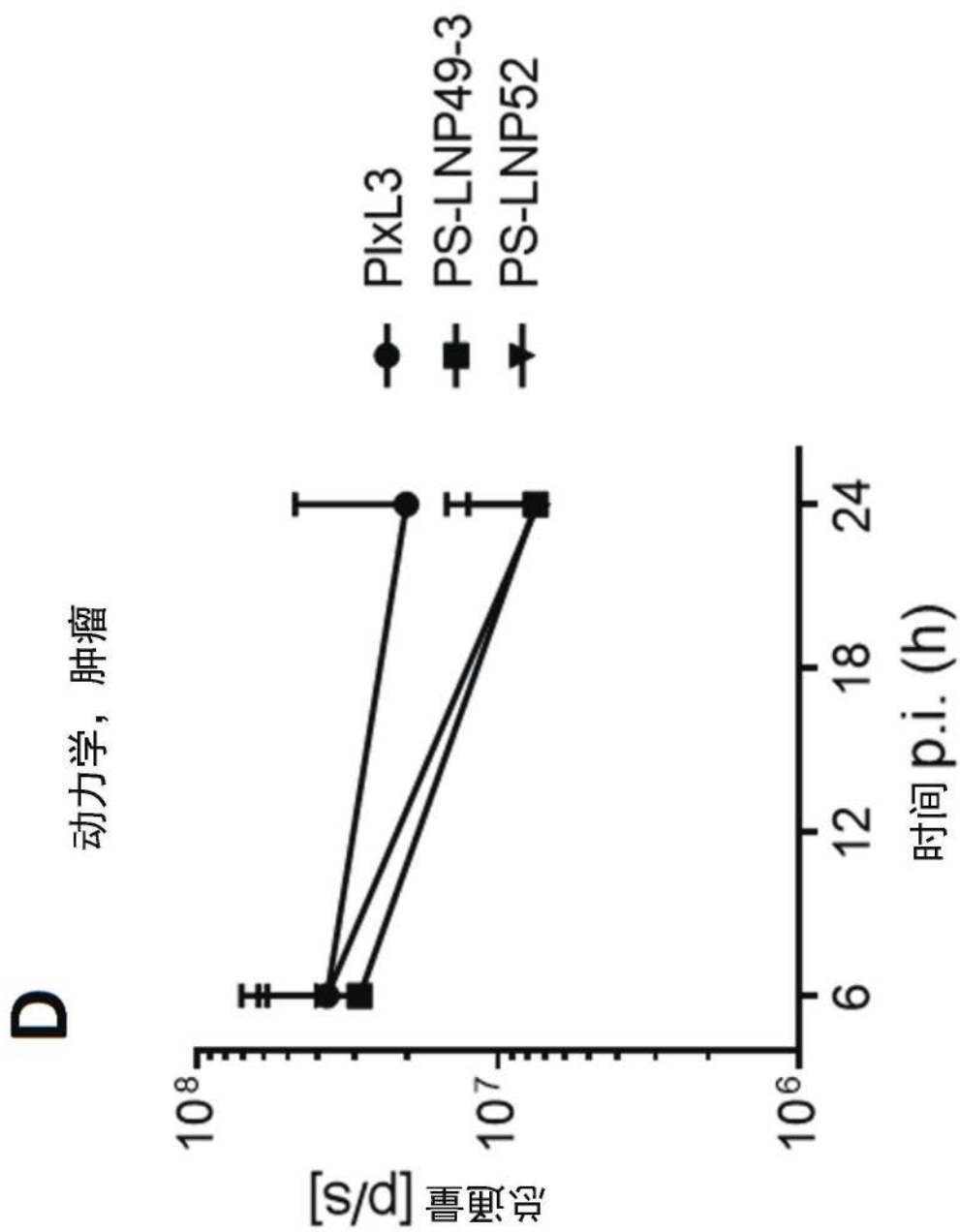


图17续

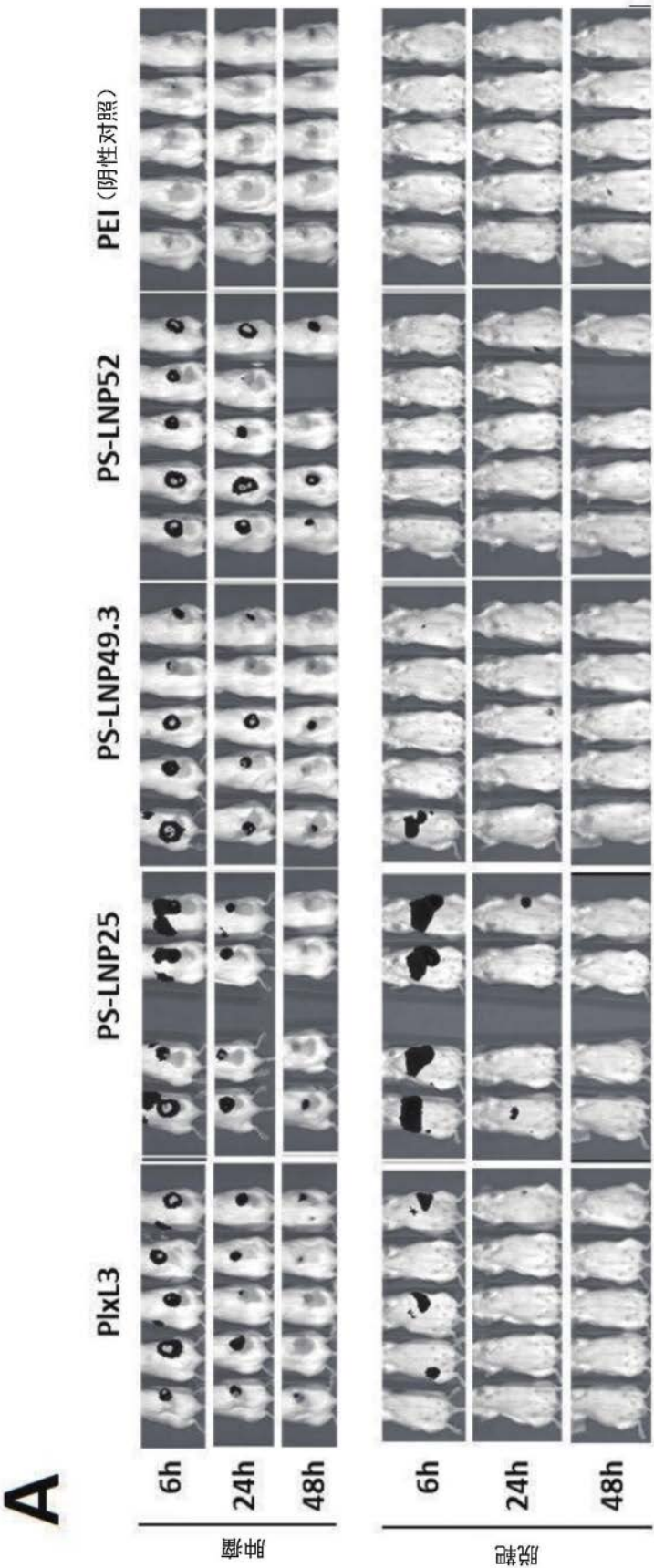


图18

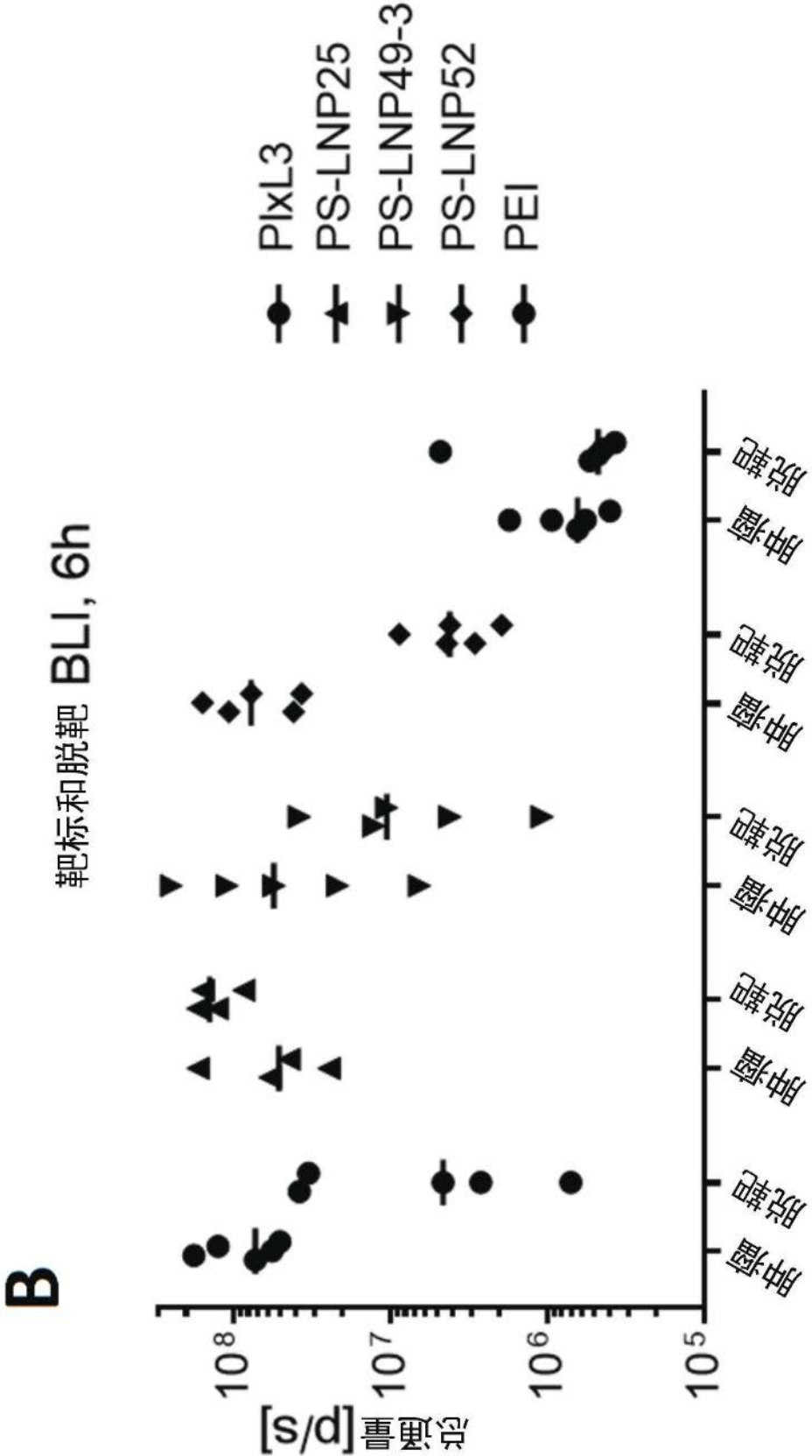


图18续

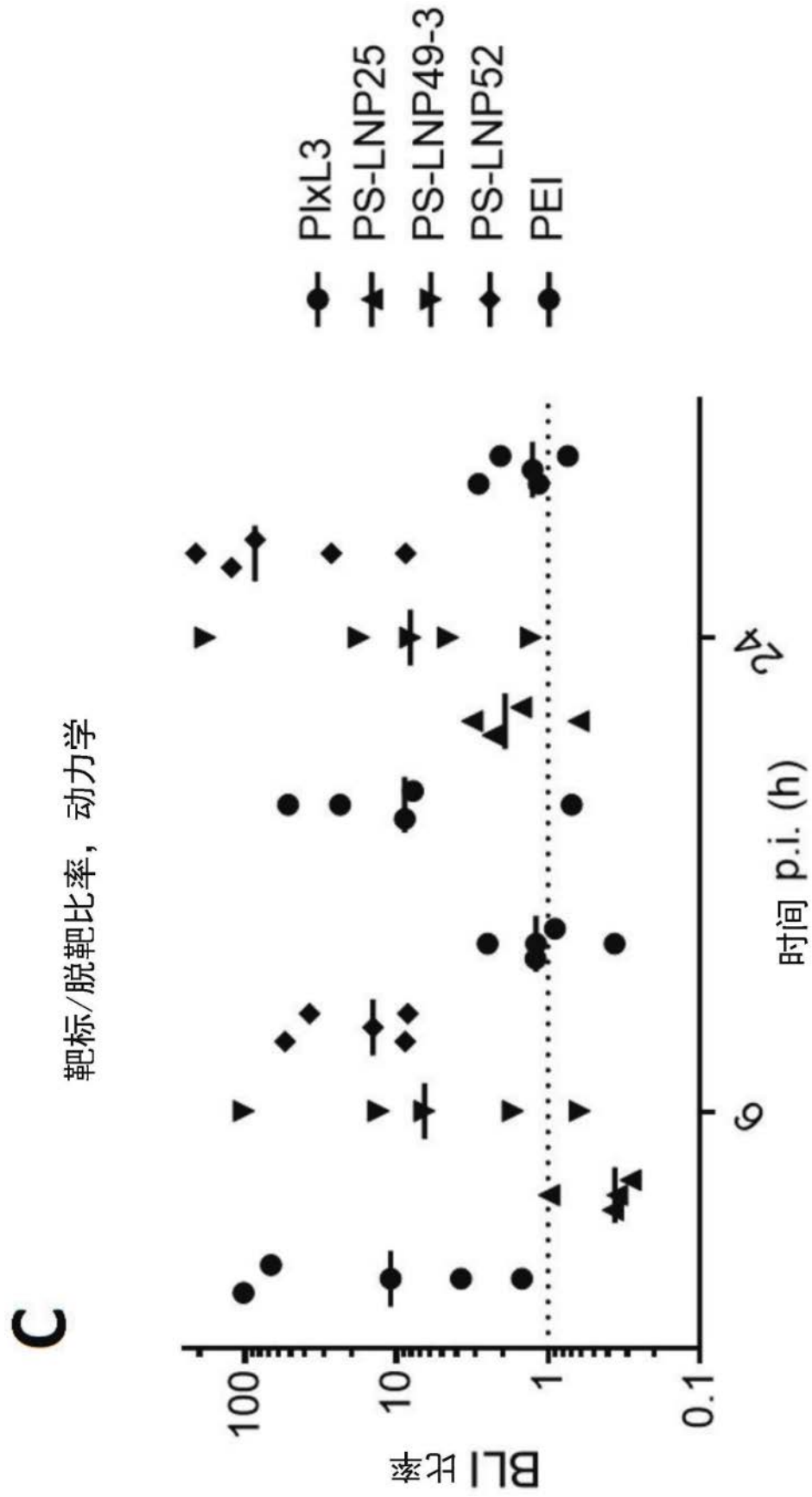


图18续

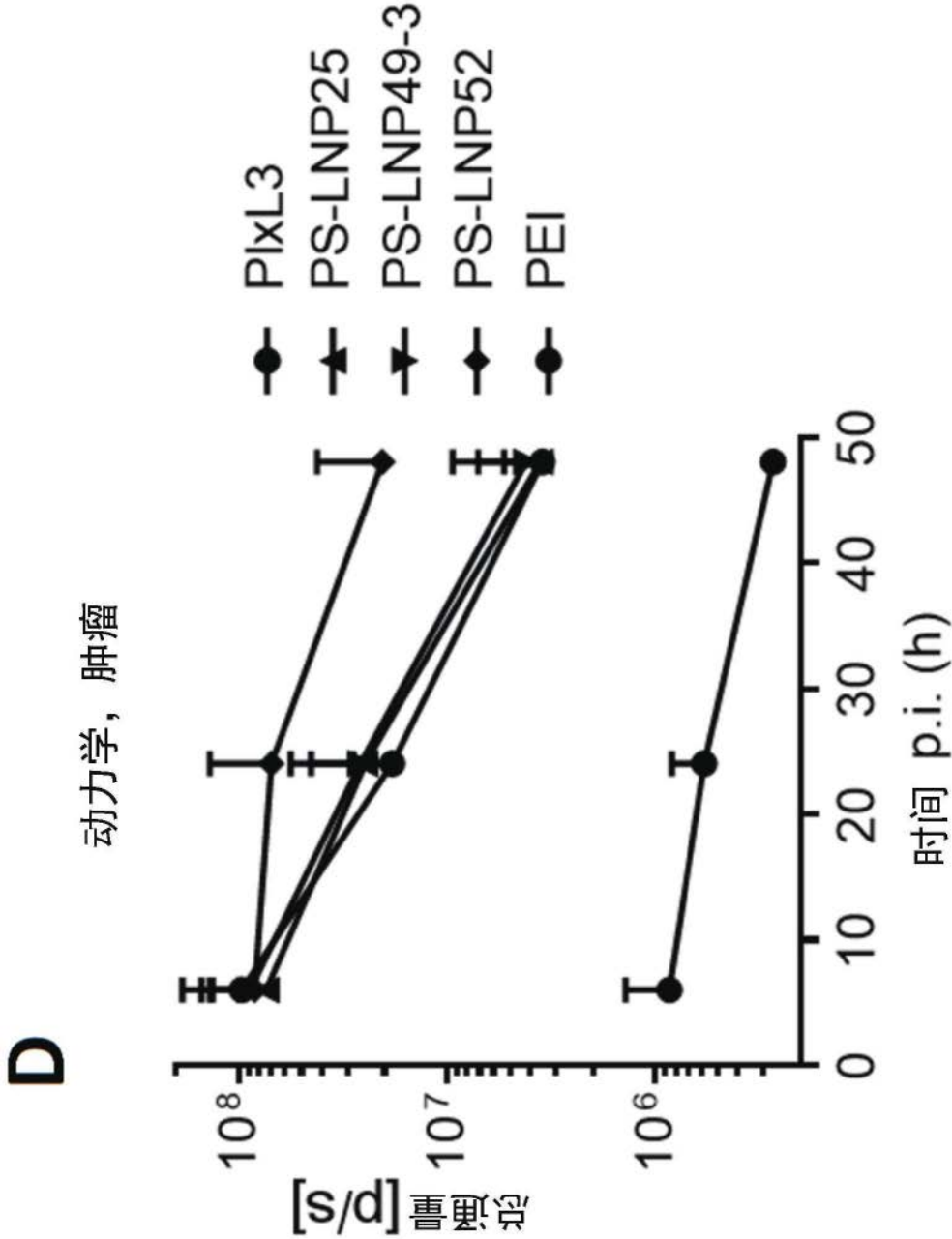


图18续

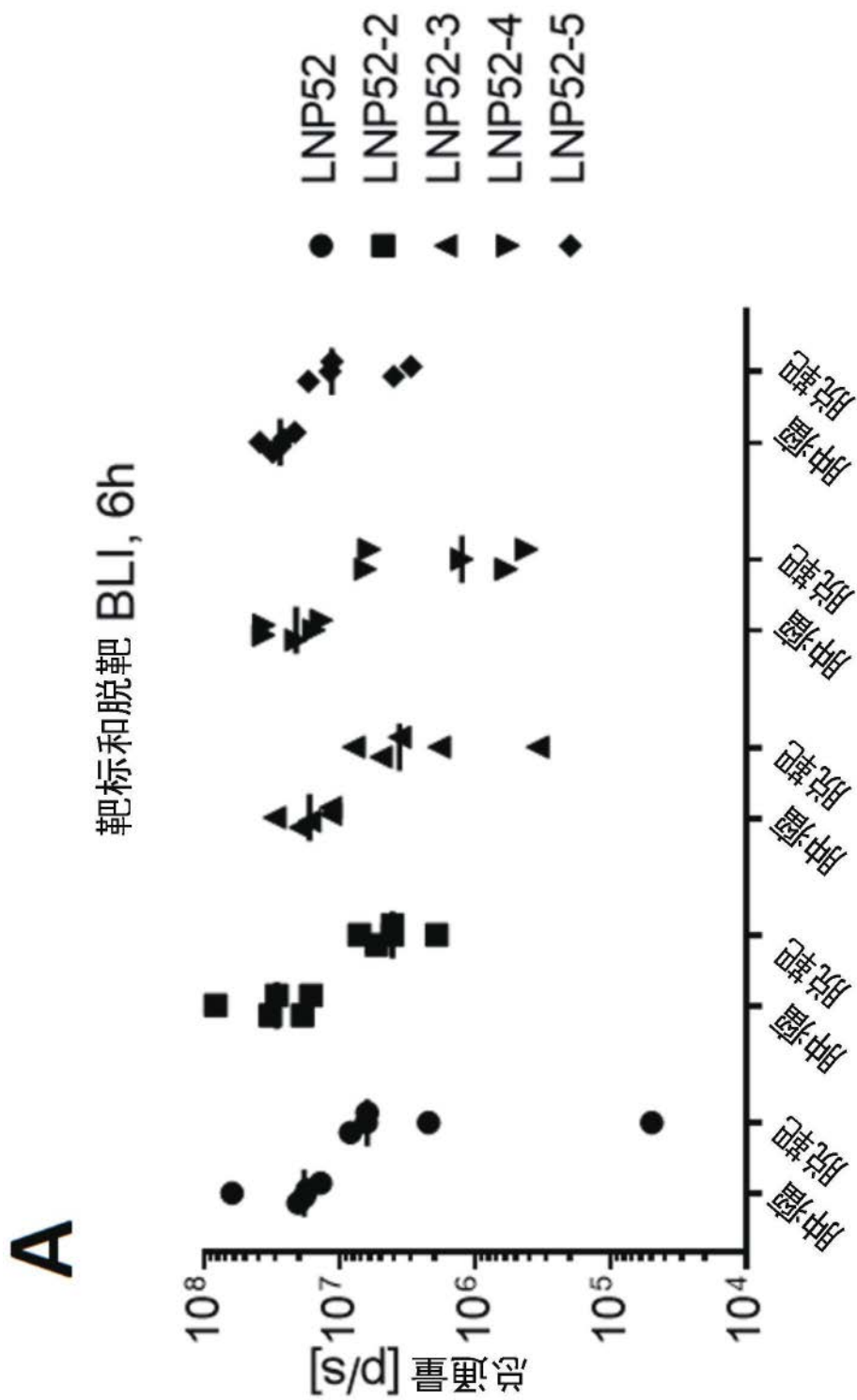


图19

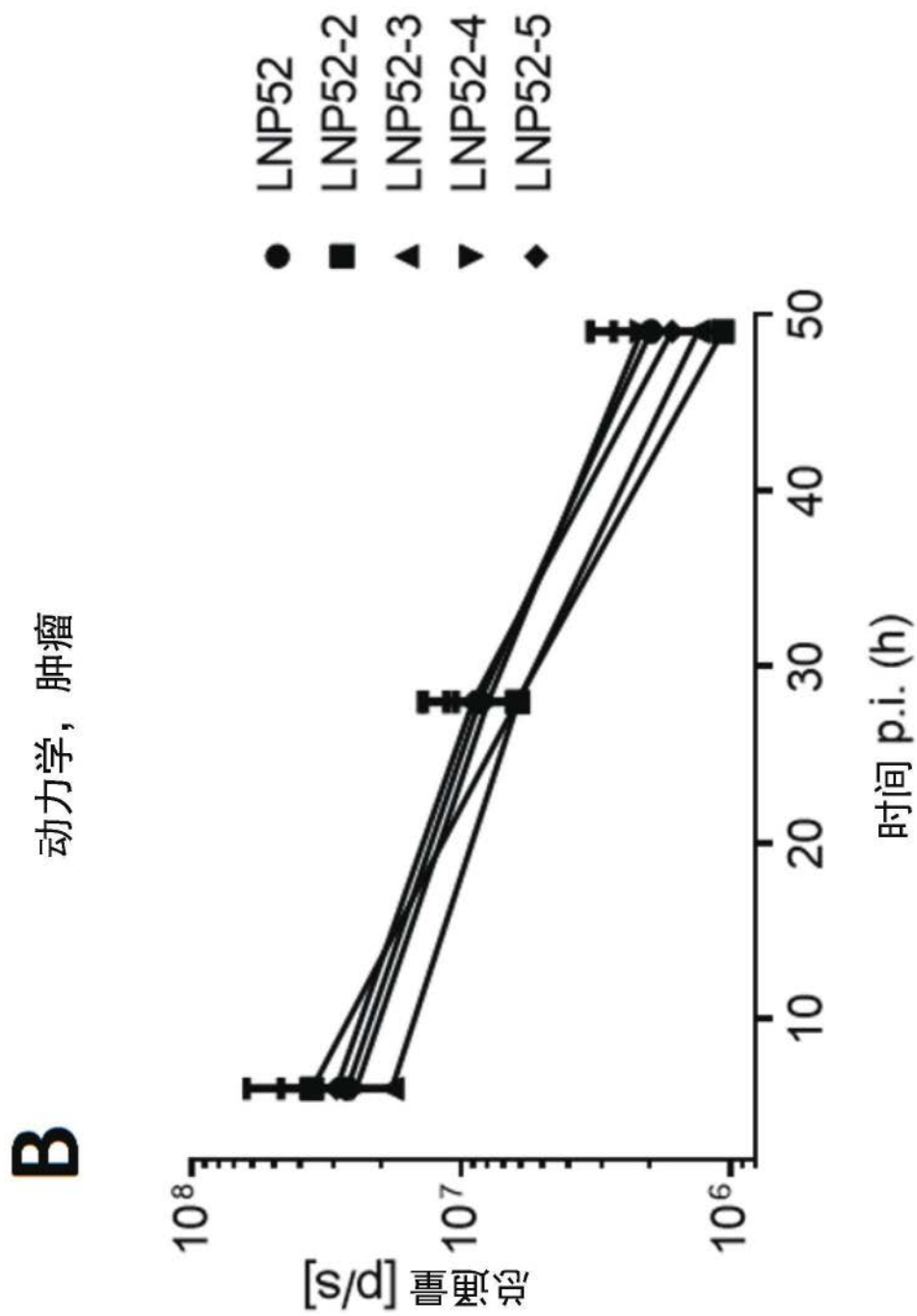


图19续

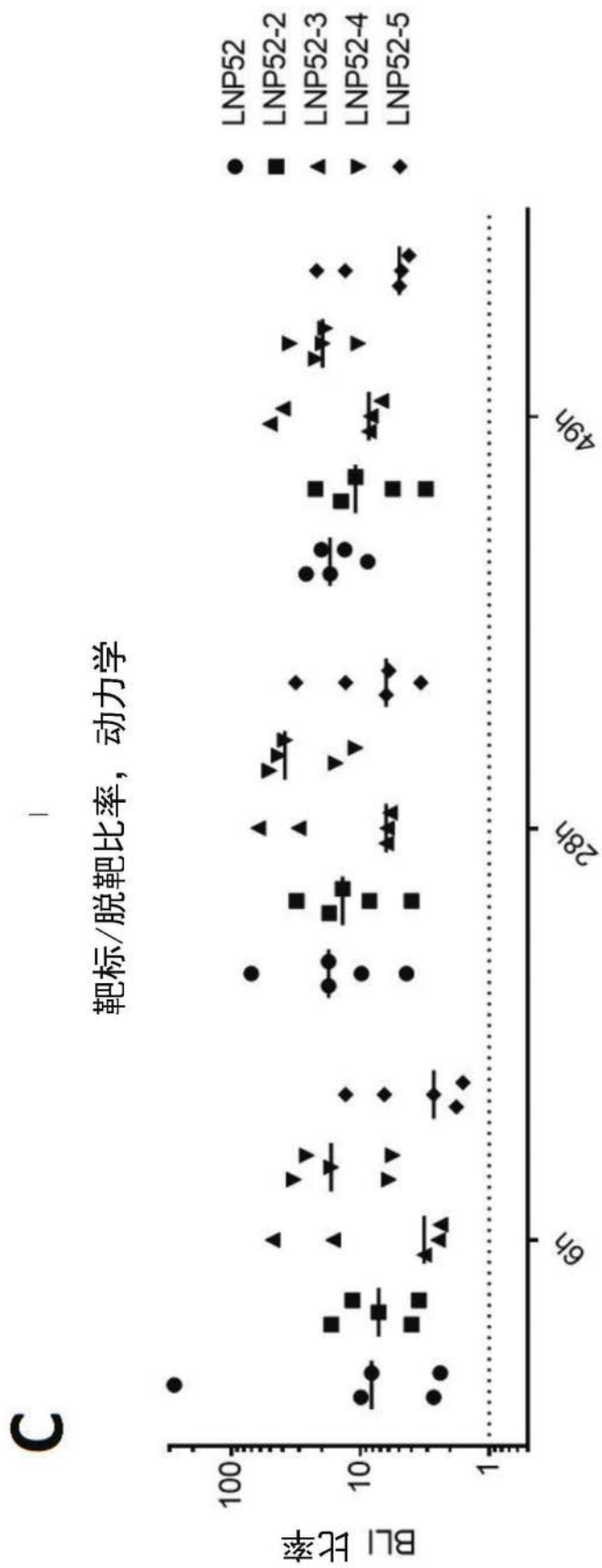


图19续

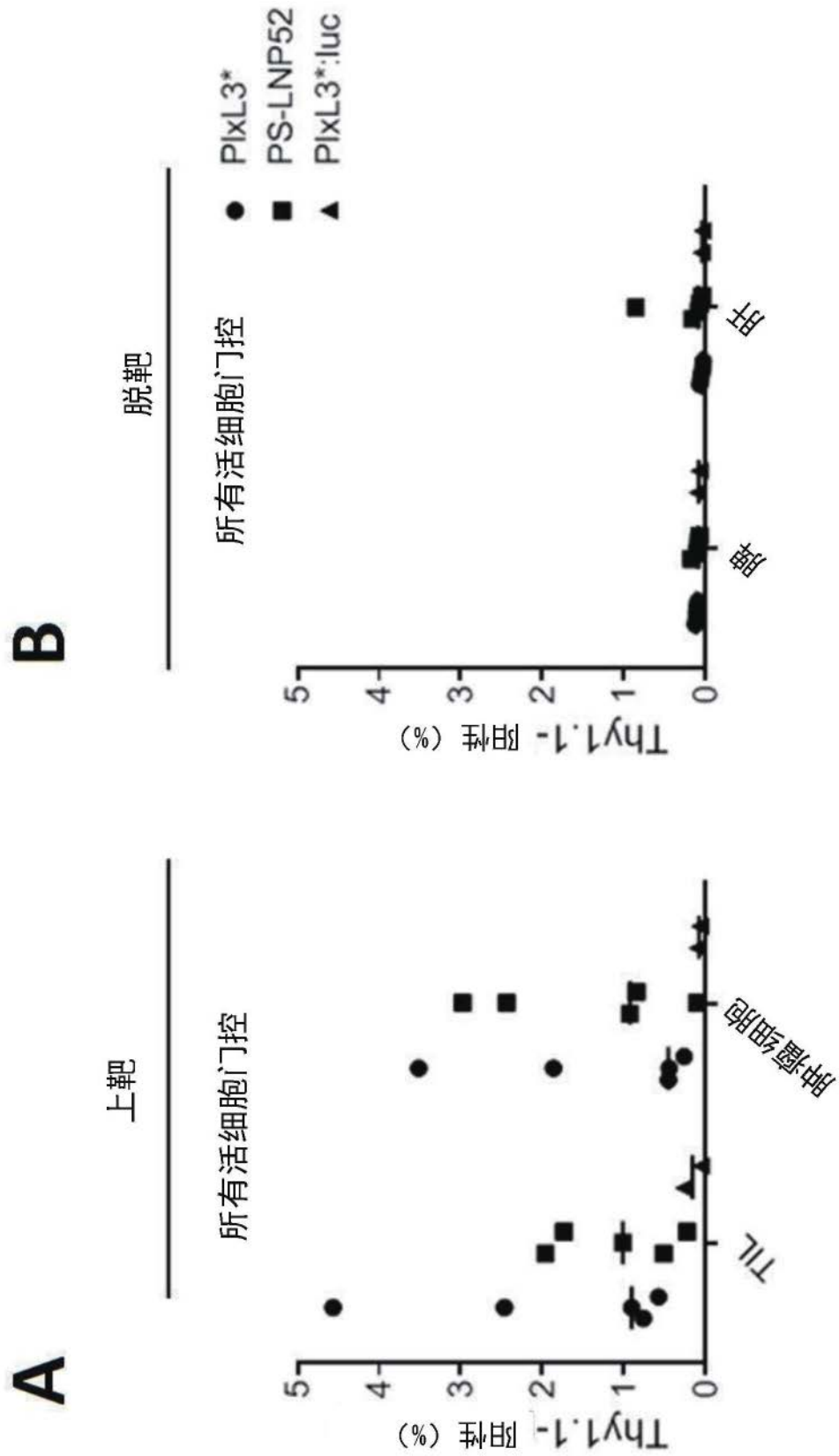


图20

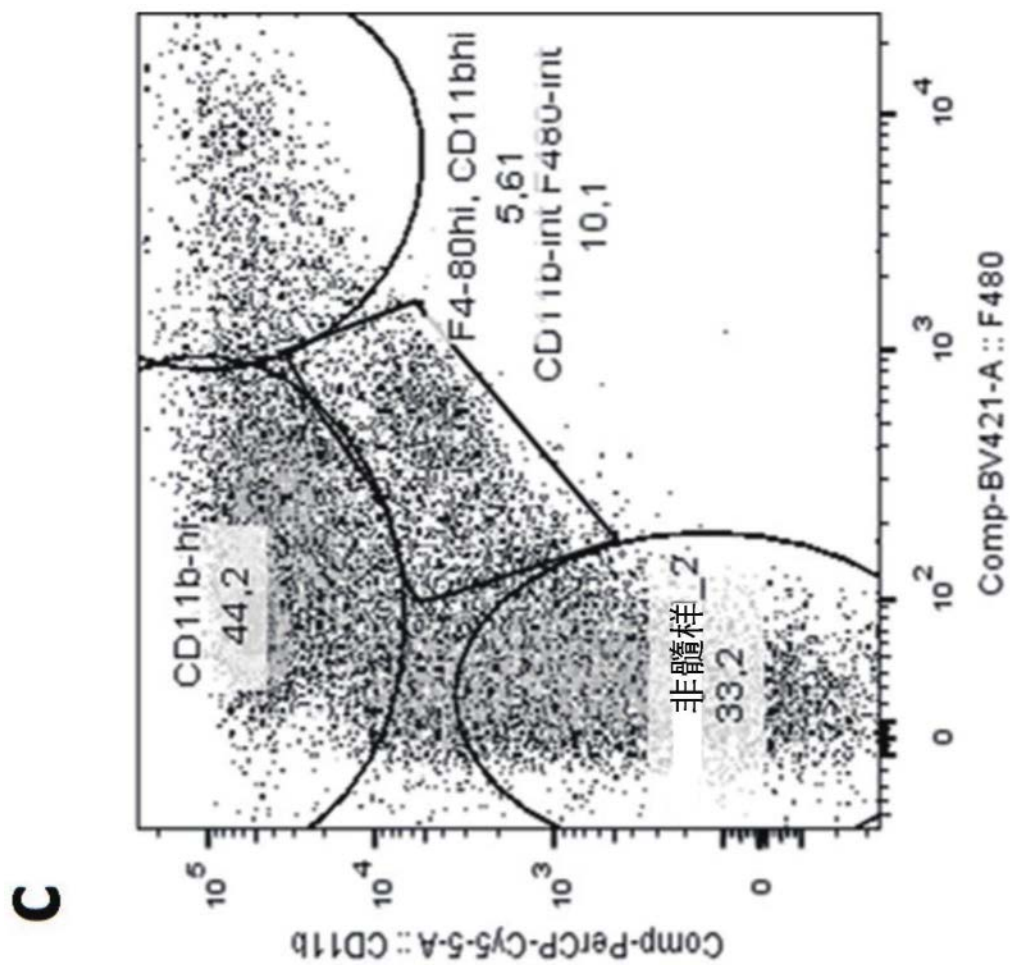


图20续

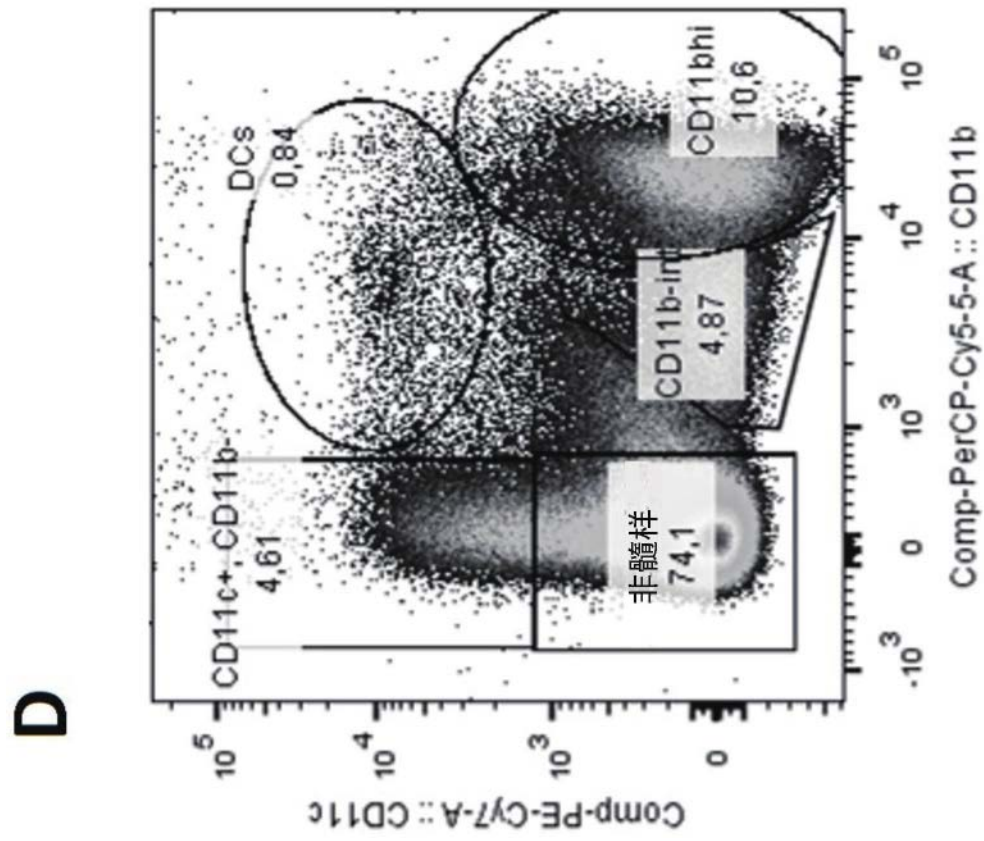


图20续

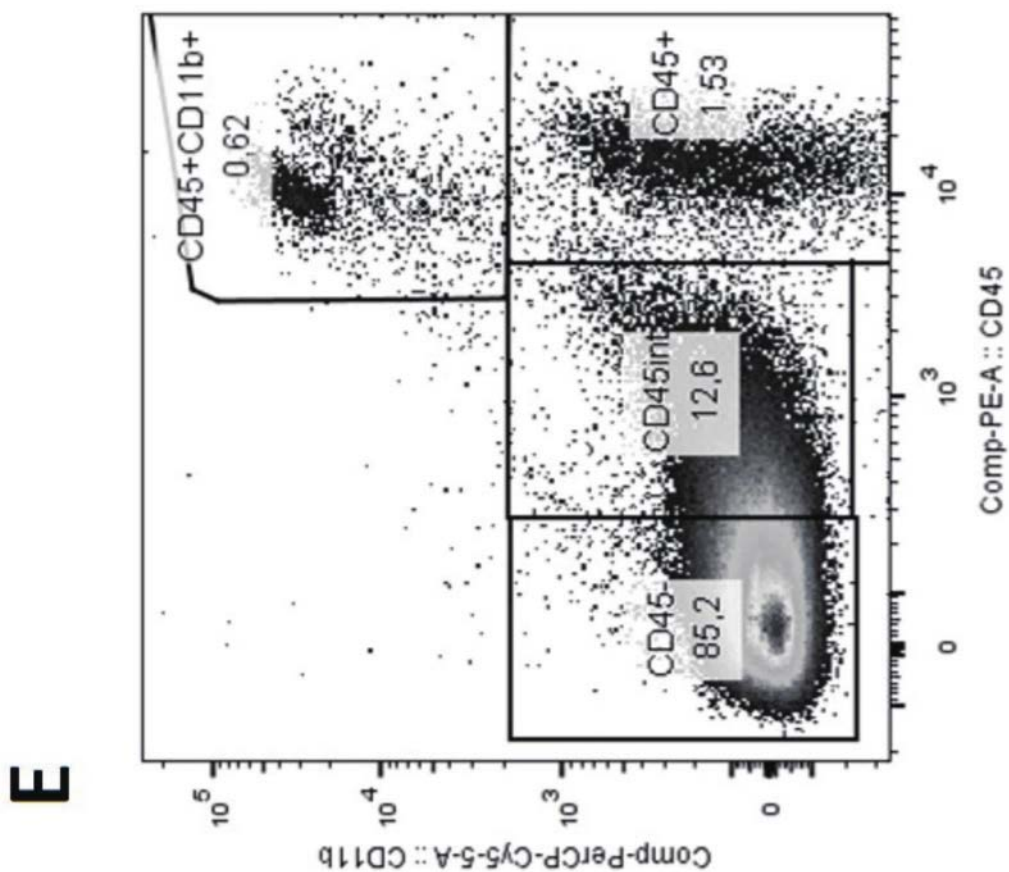


图20续

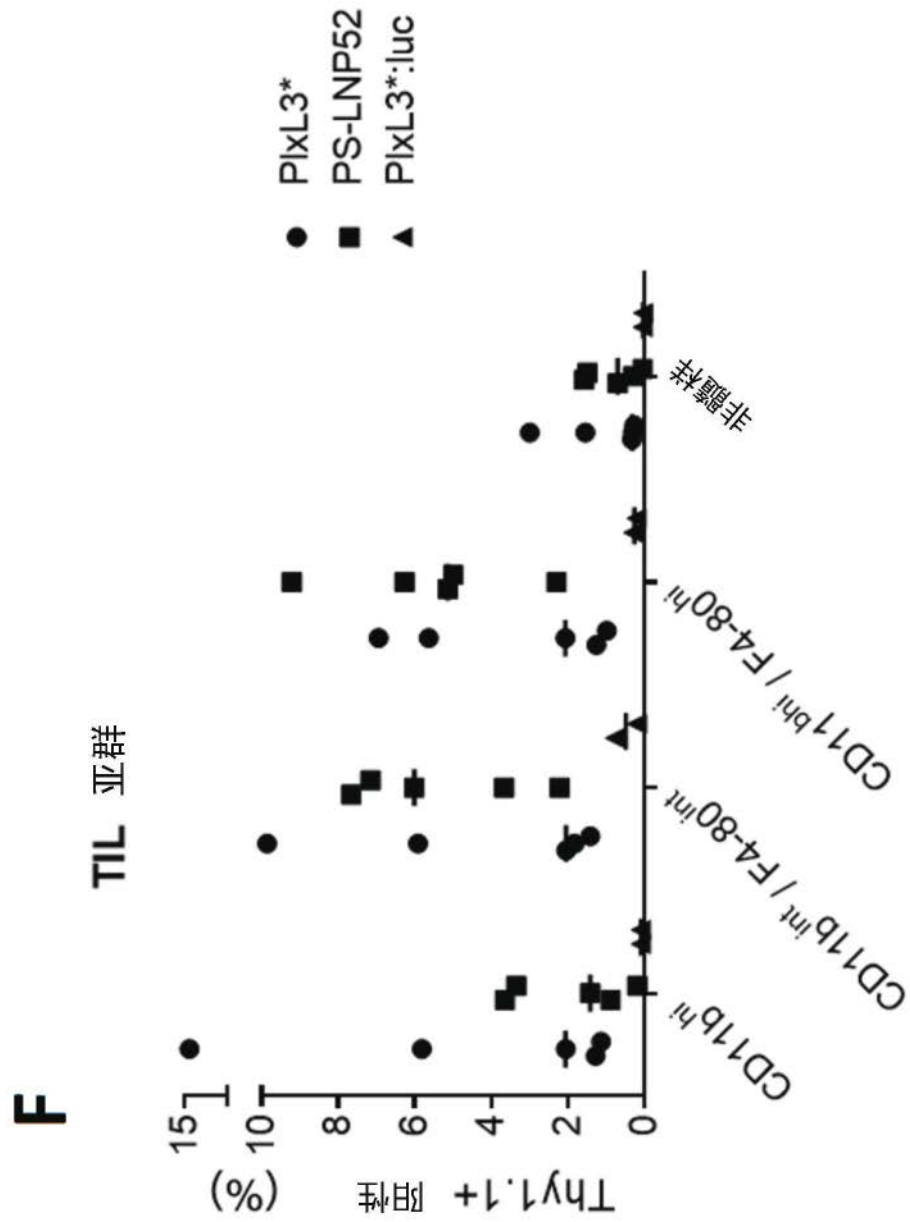


图20续

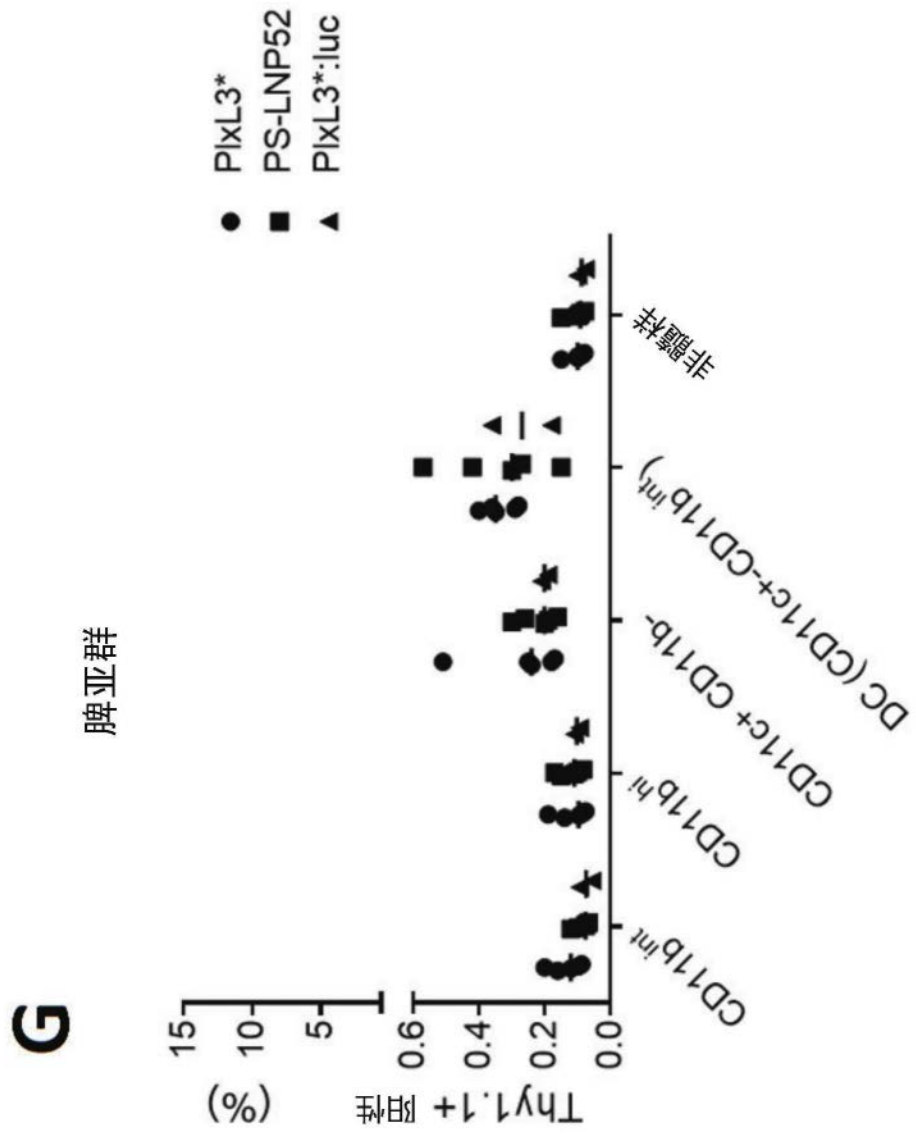


图20续

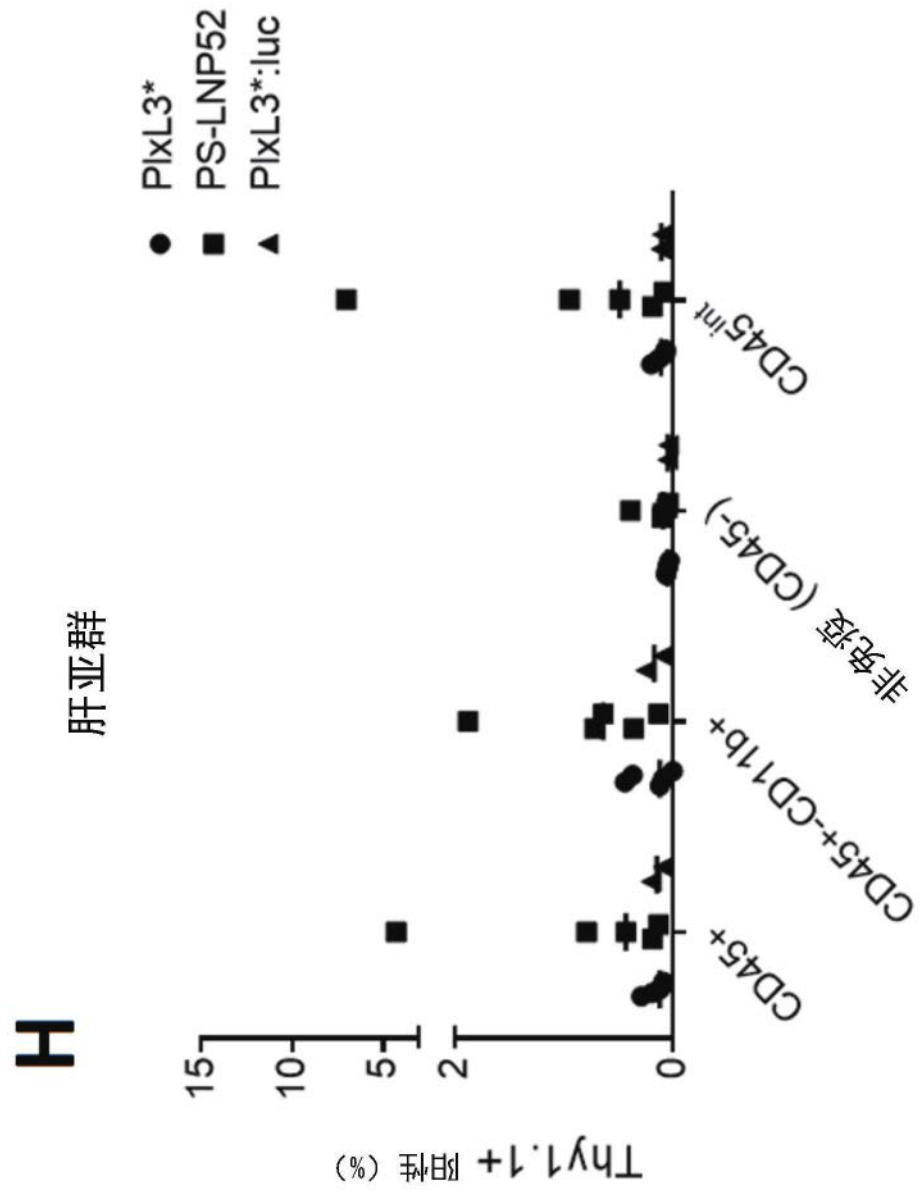


图20续

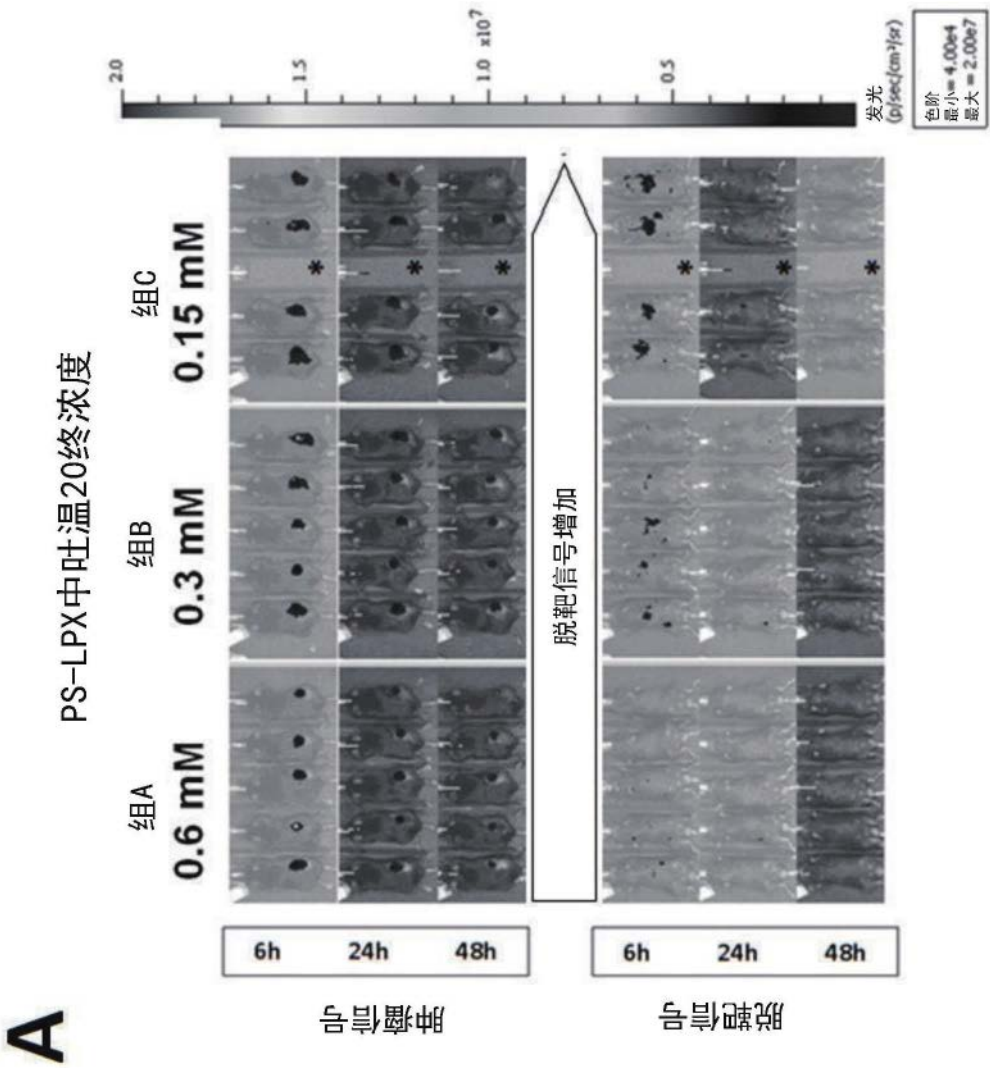


图21

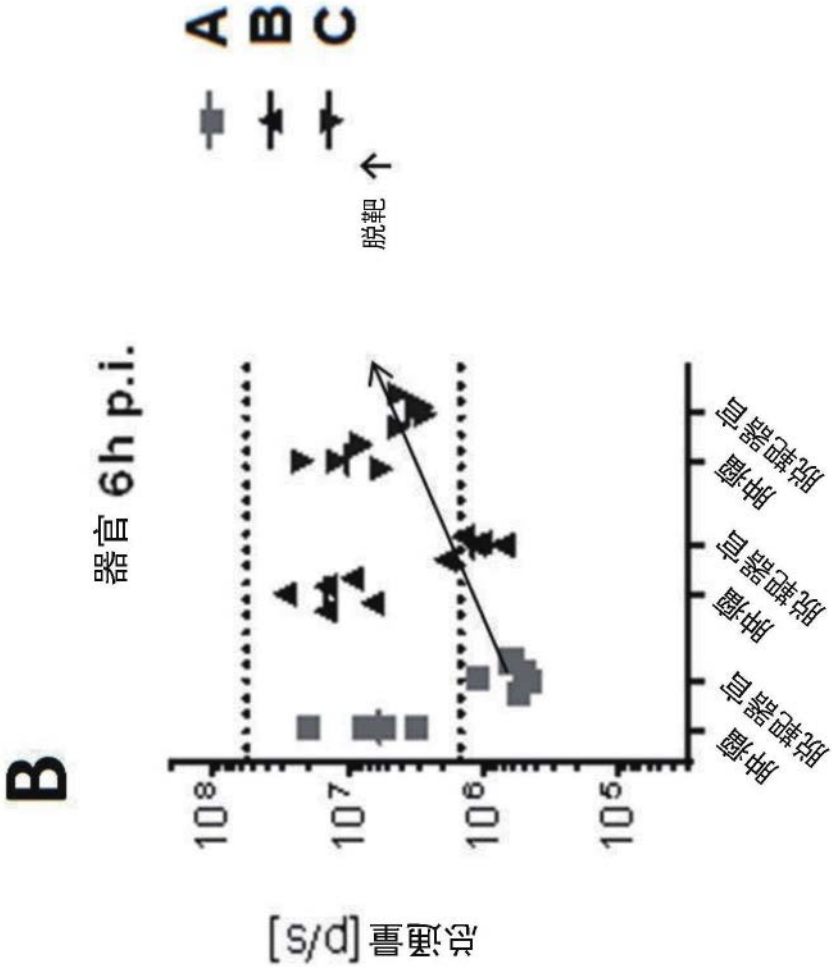


图21续

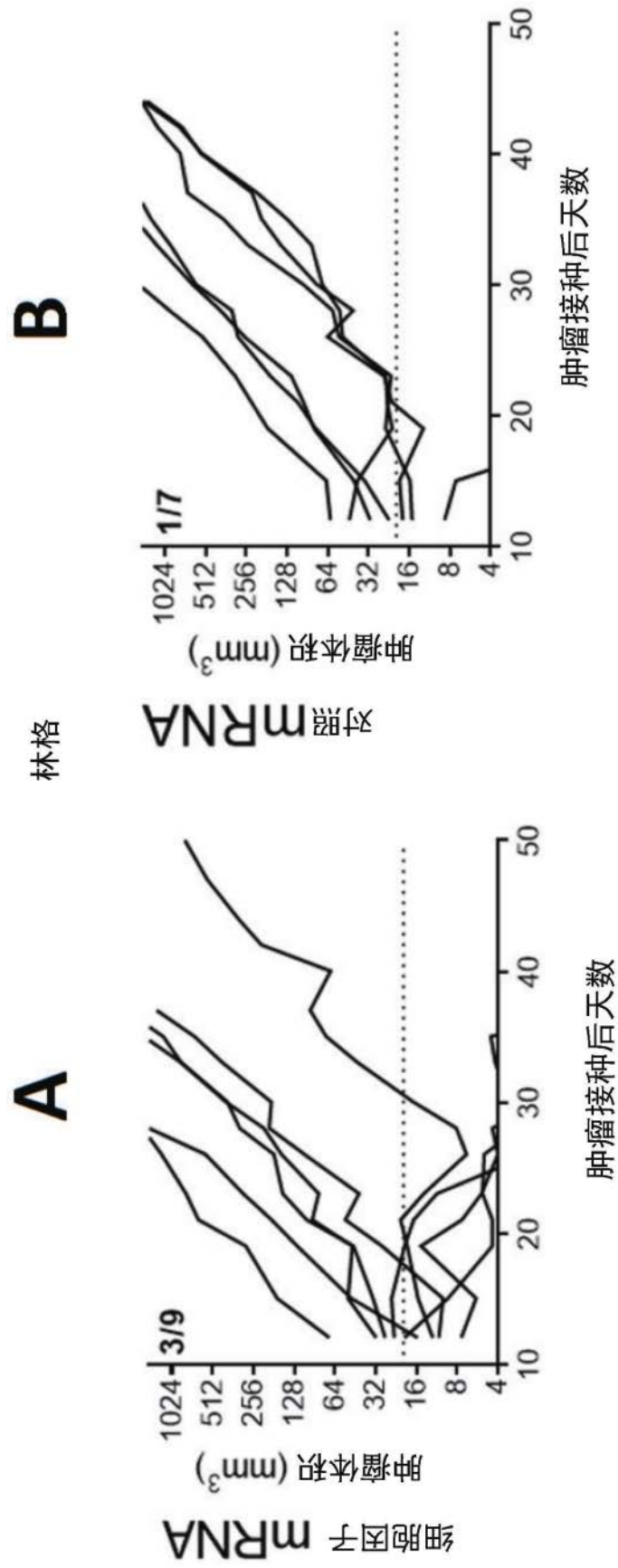


图22

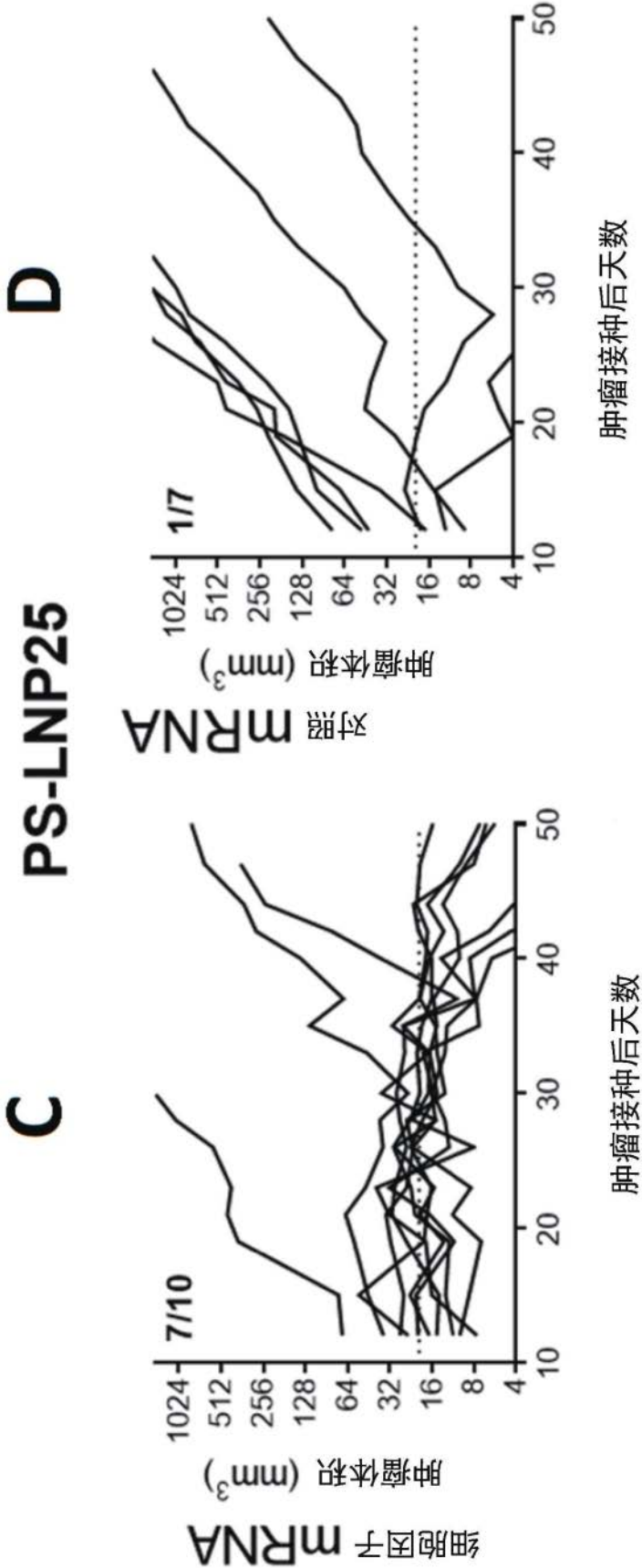


图22续

E PS-LNP49-3 F

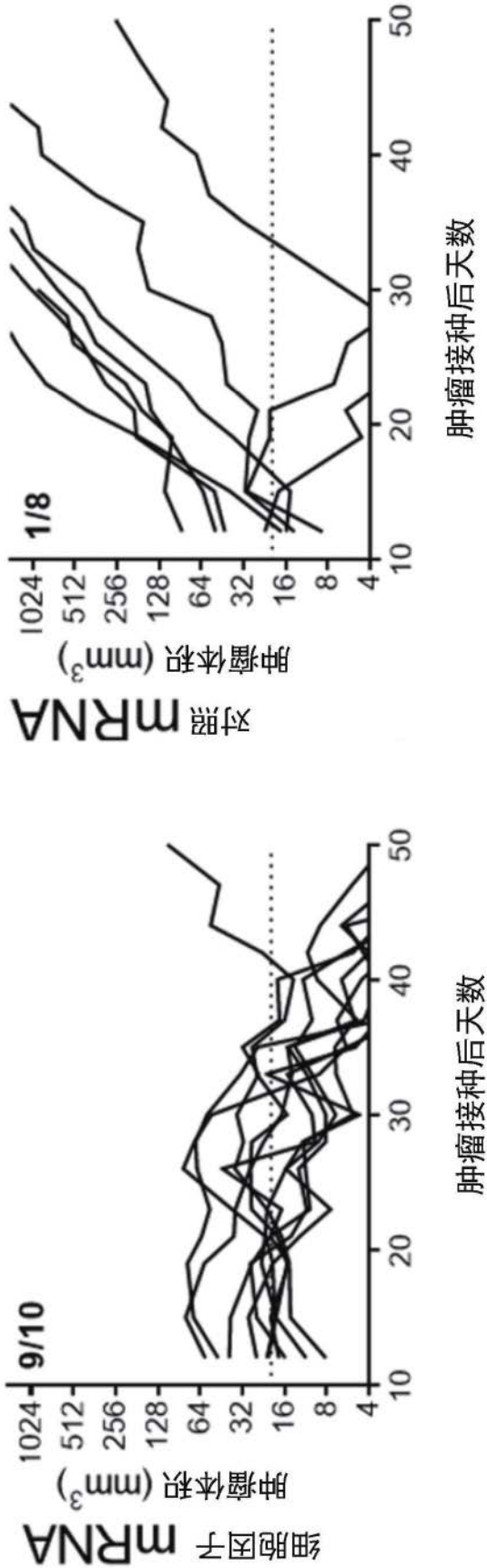


图22续

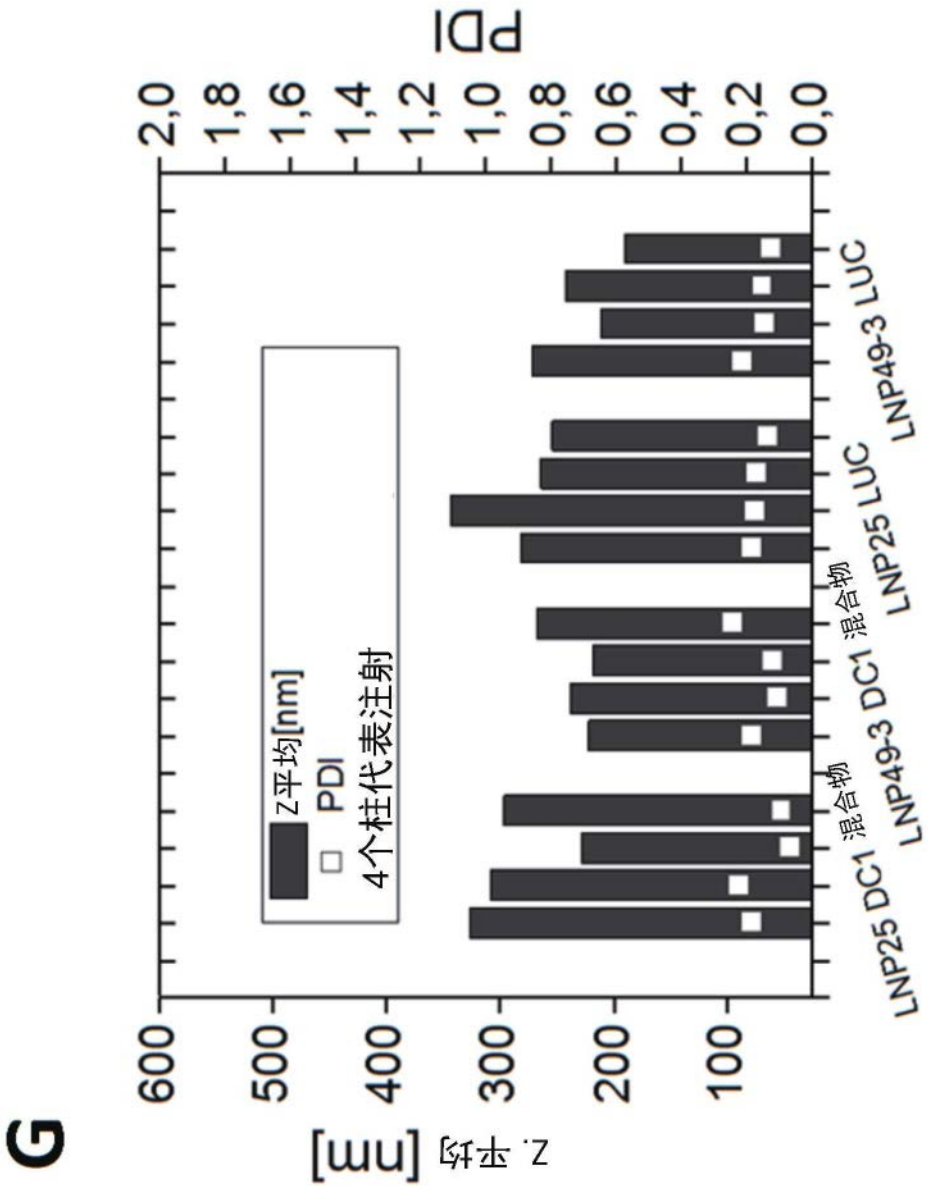


图22续

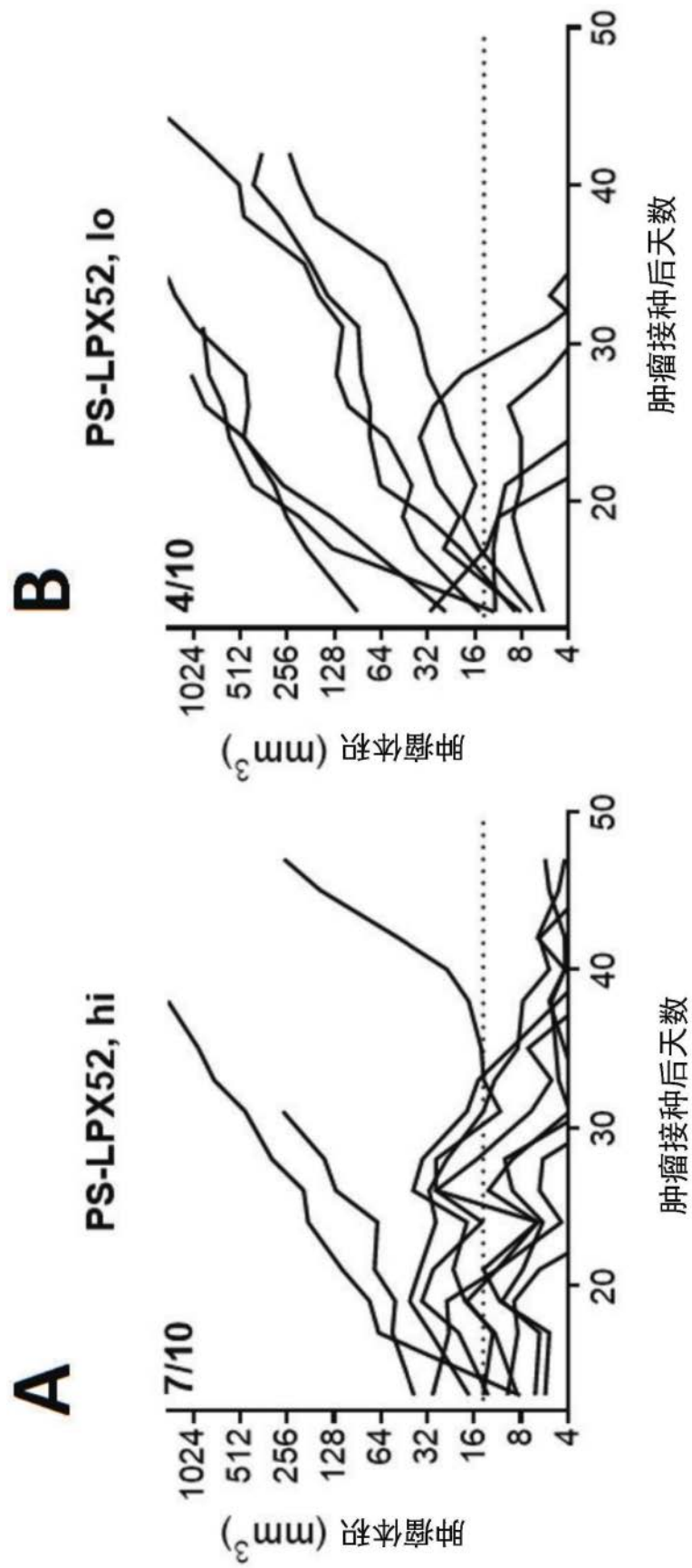


图23

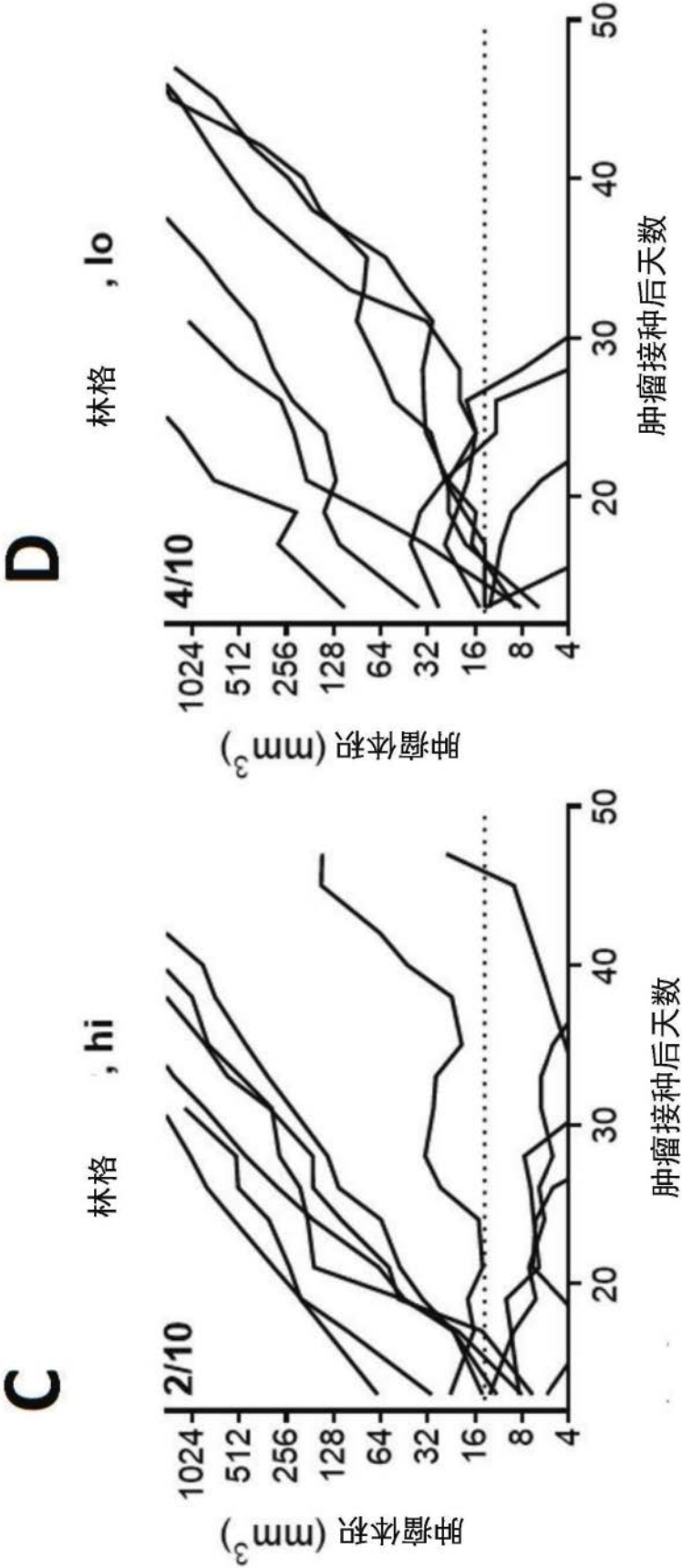


图23续

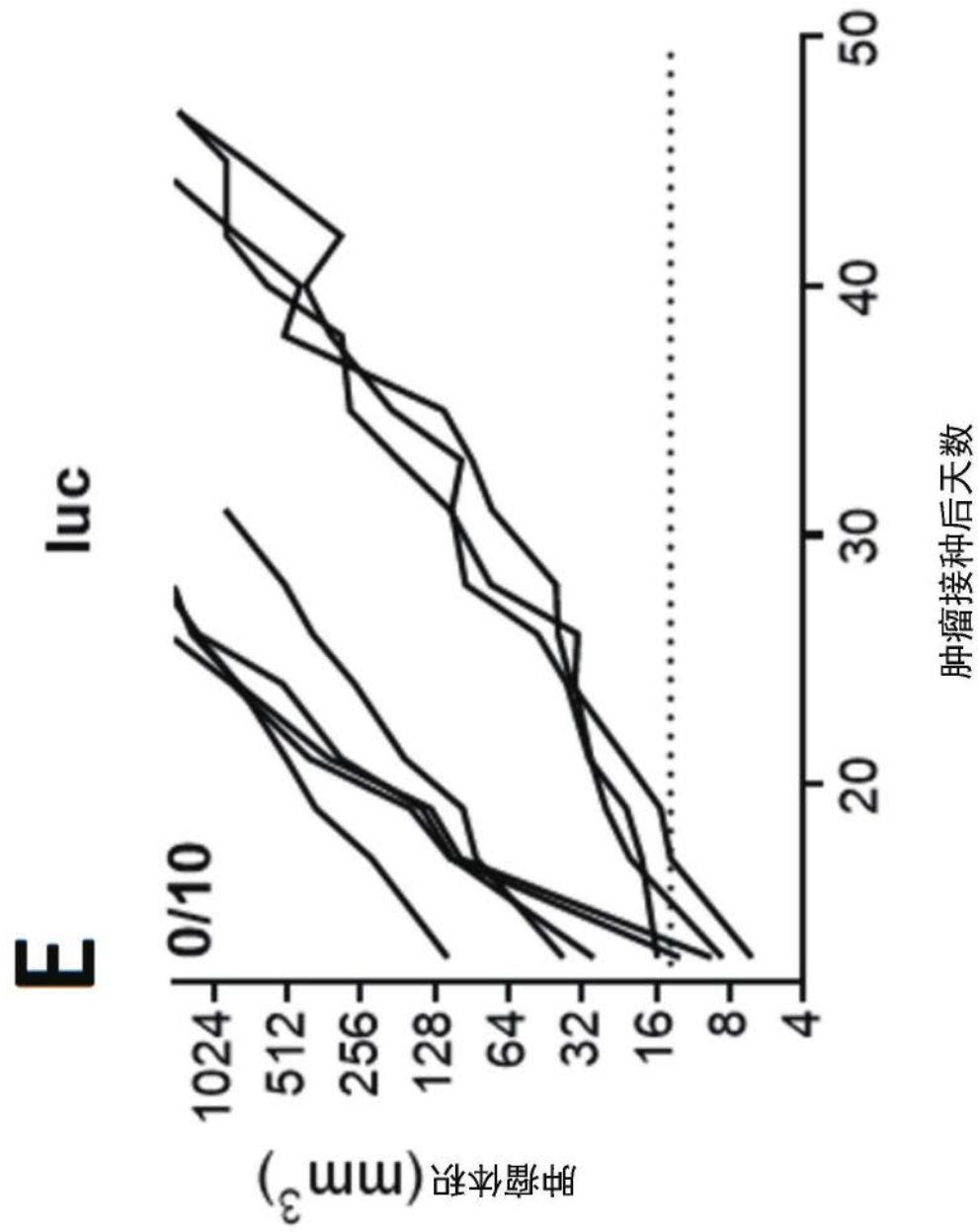


图23续

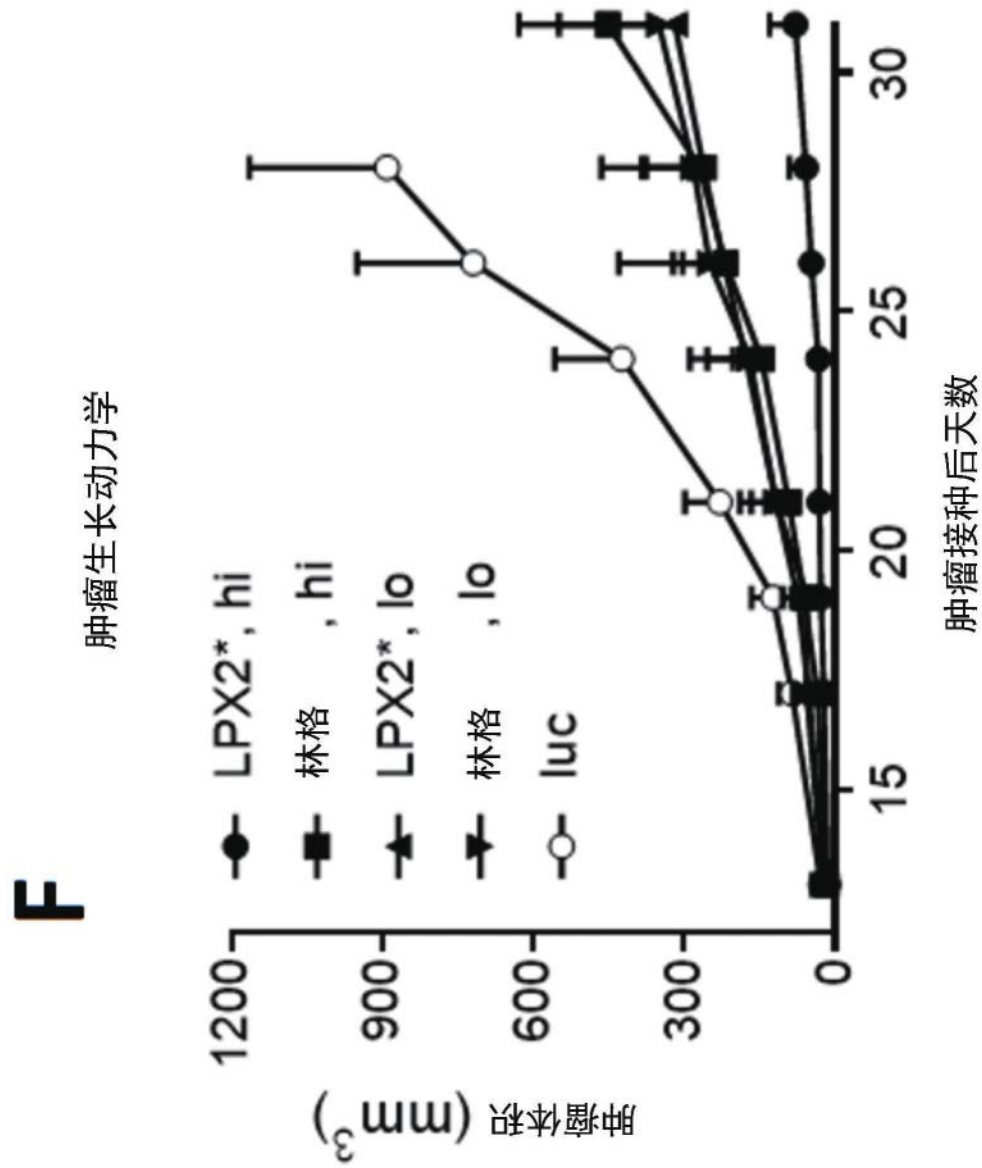


图23续

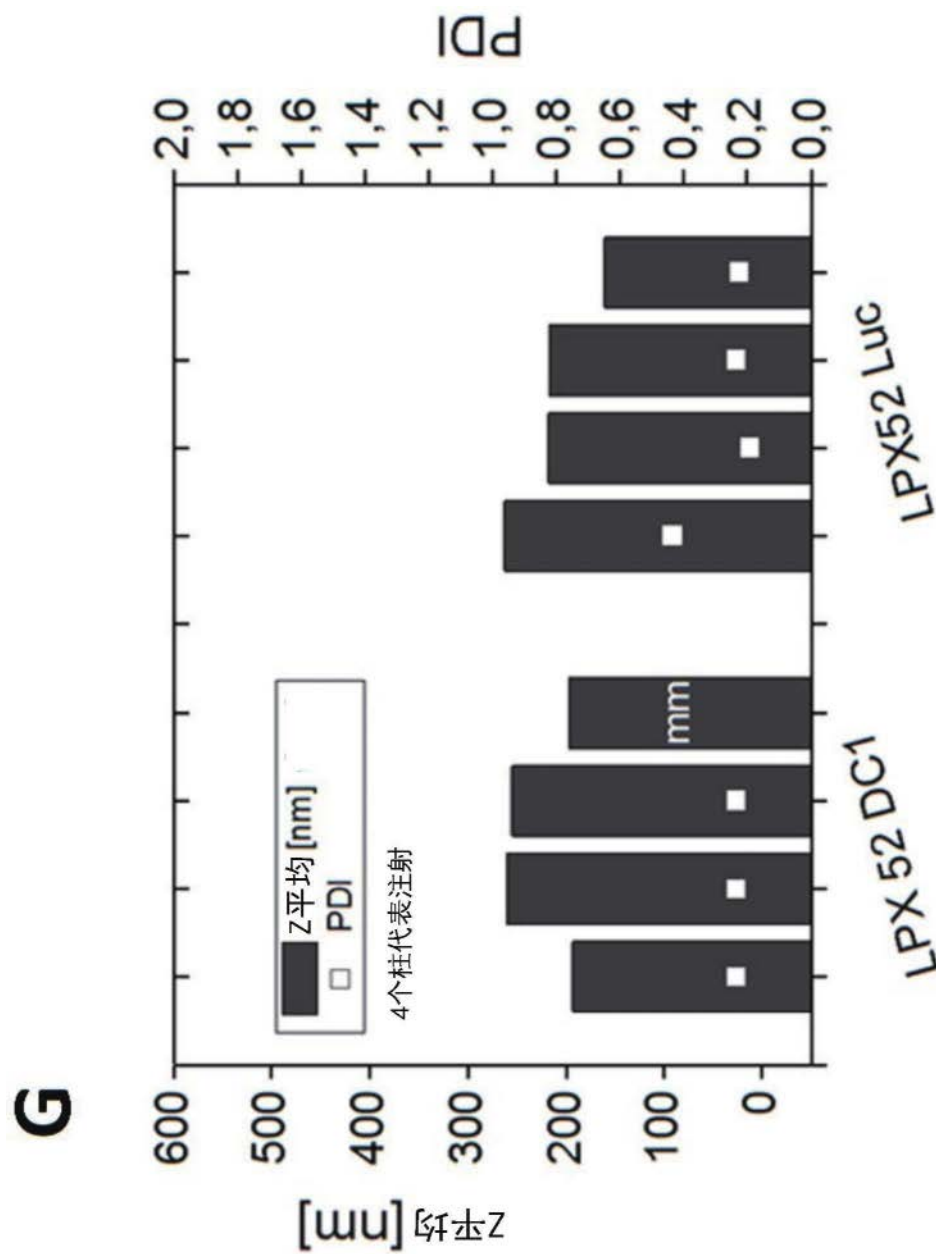


图23续

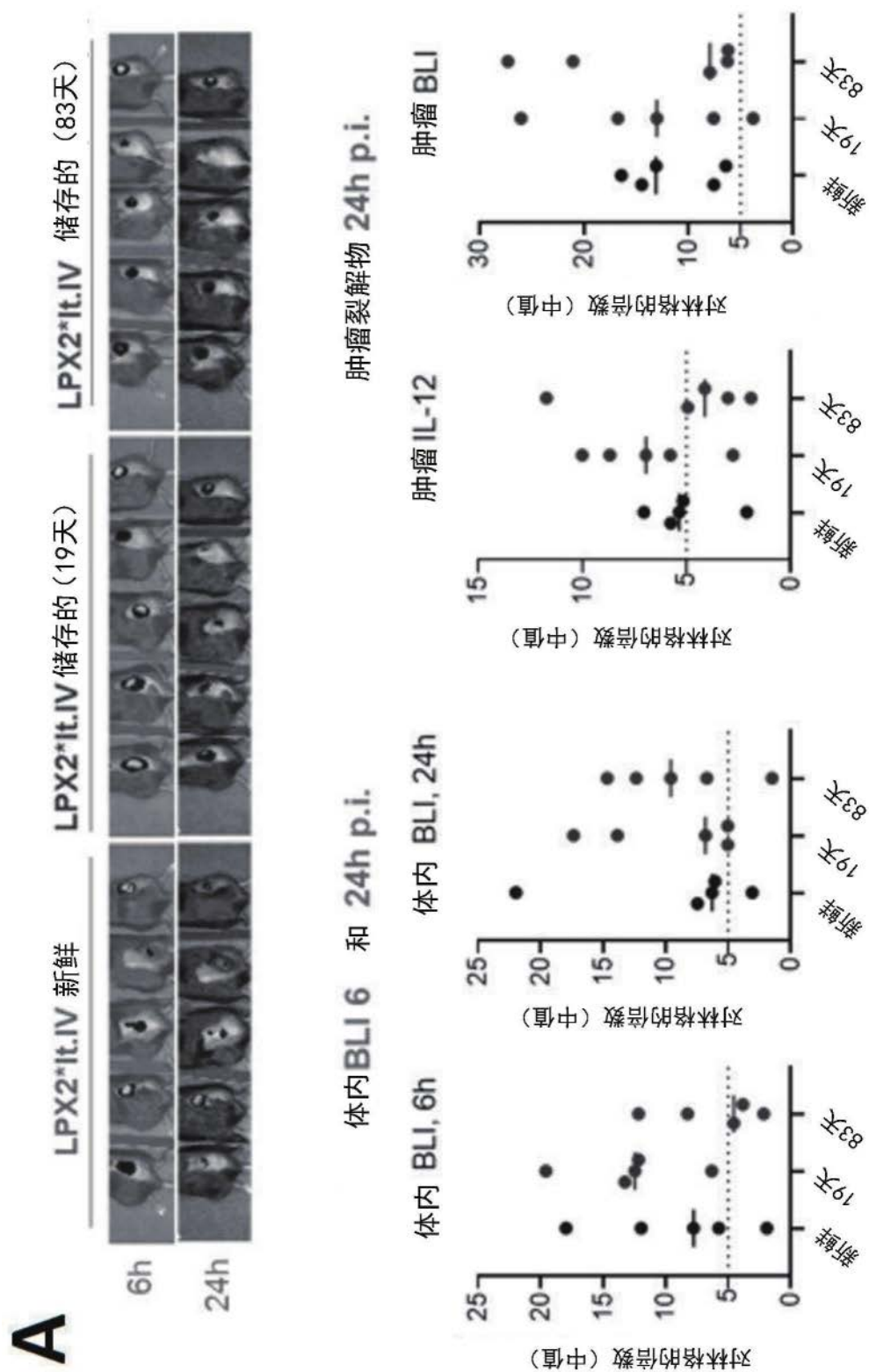


图24

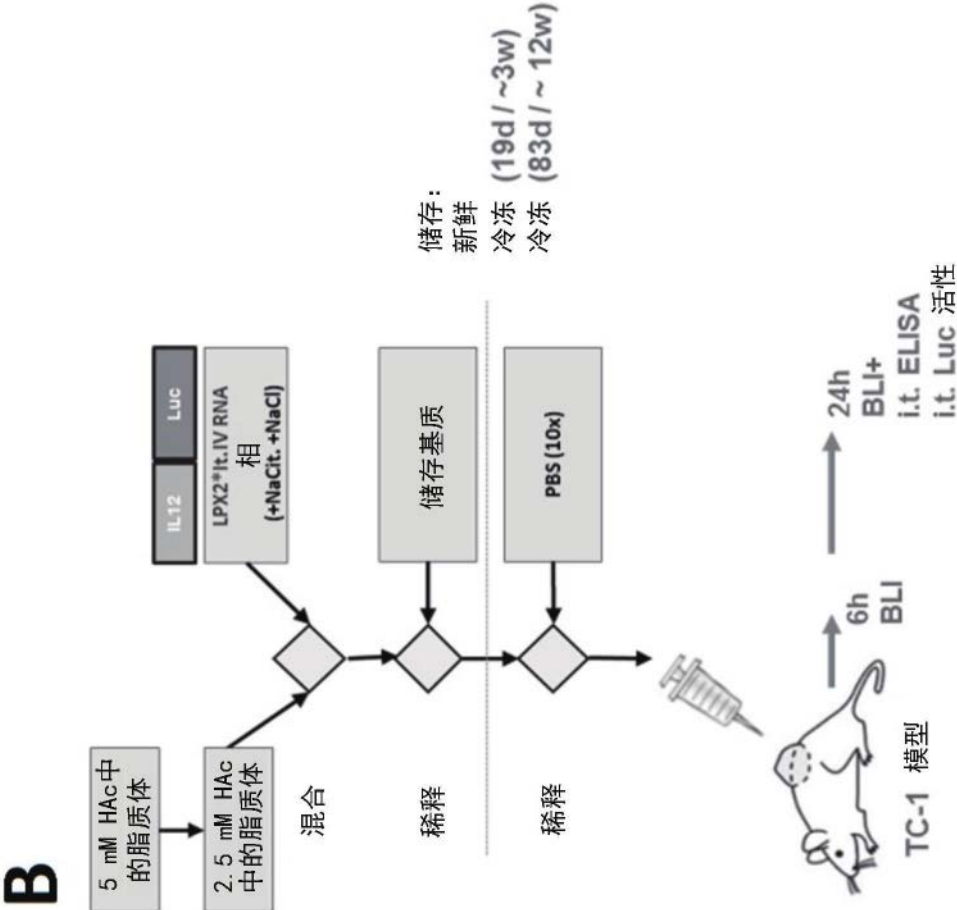


图24续

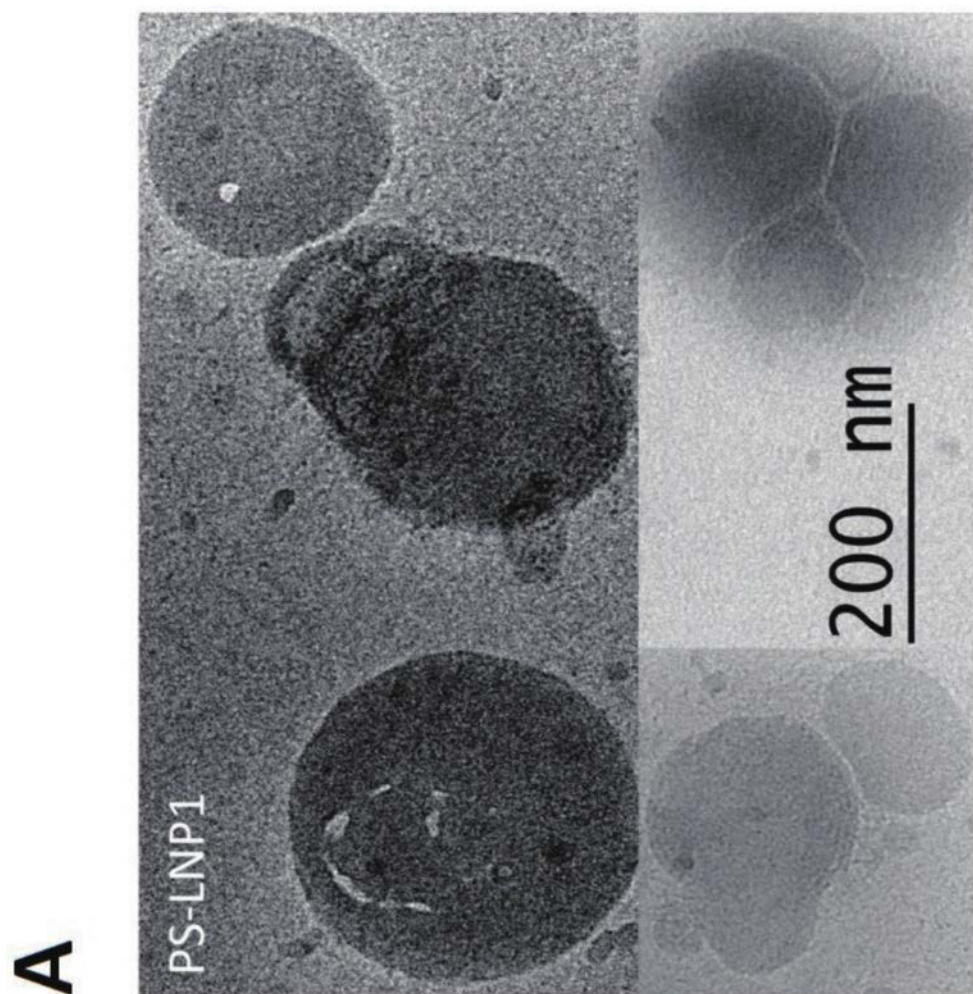


图25

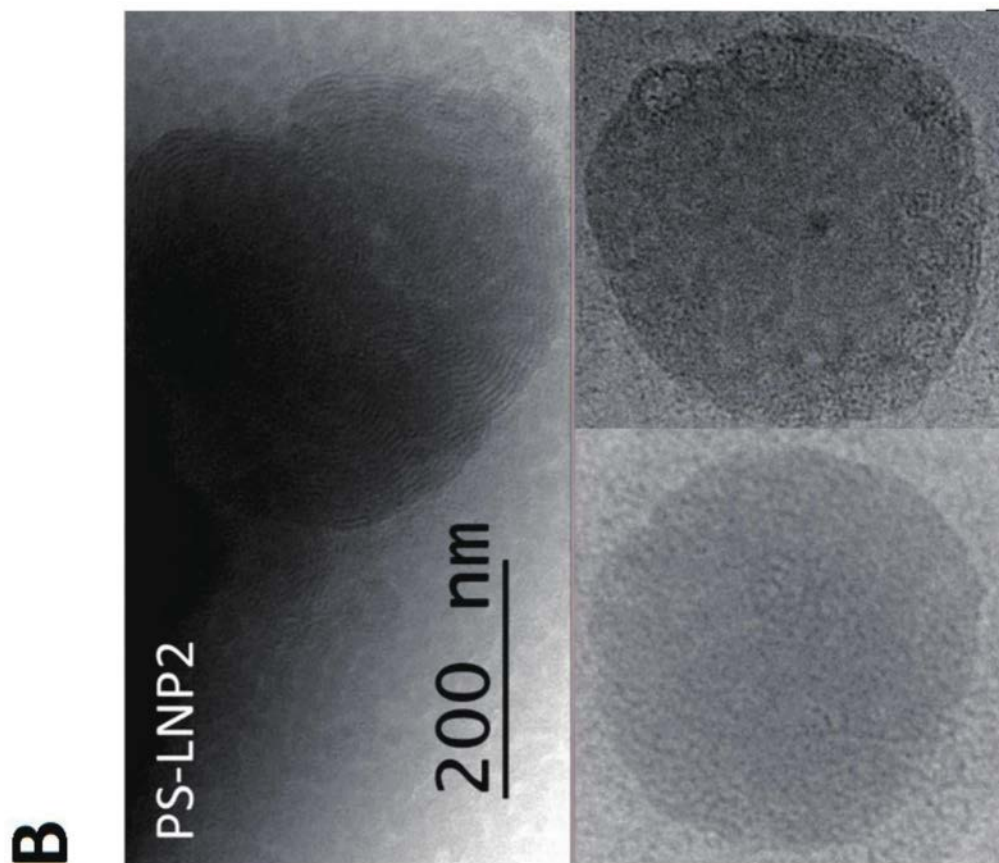


图25续

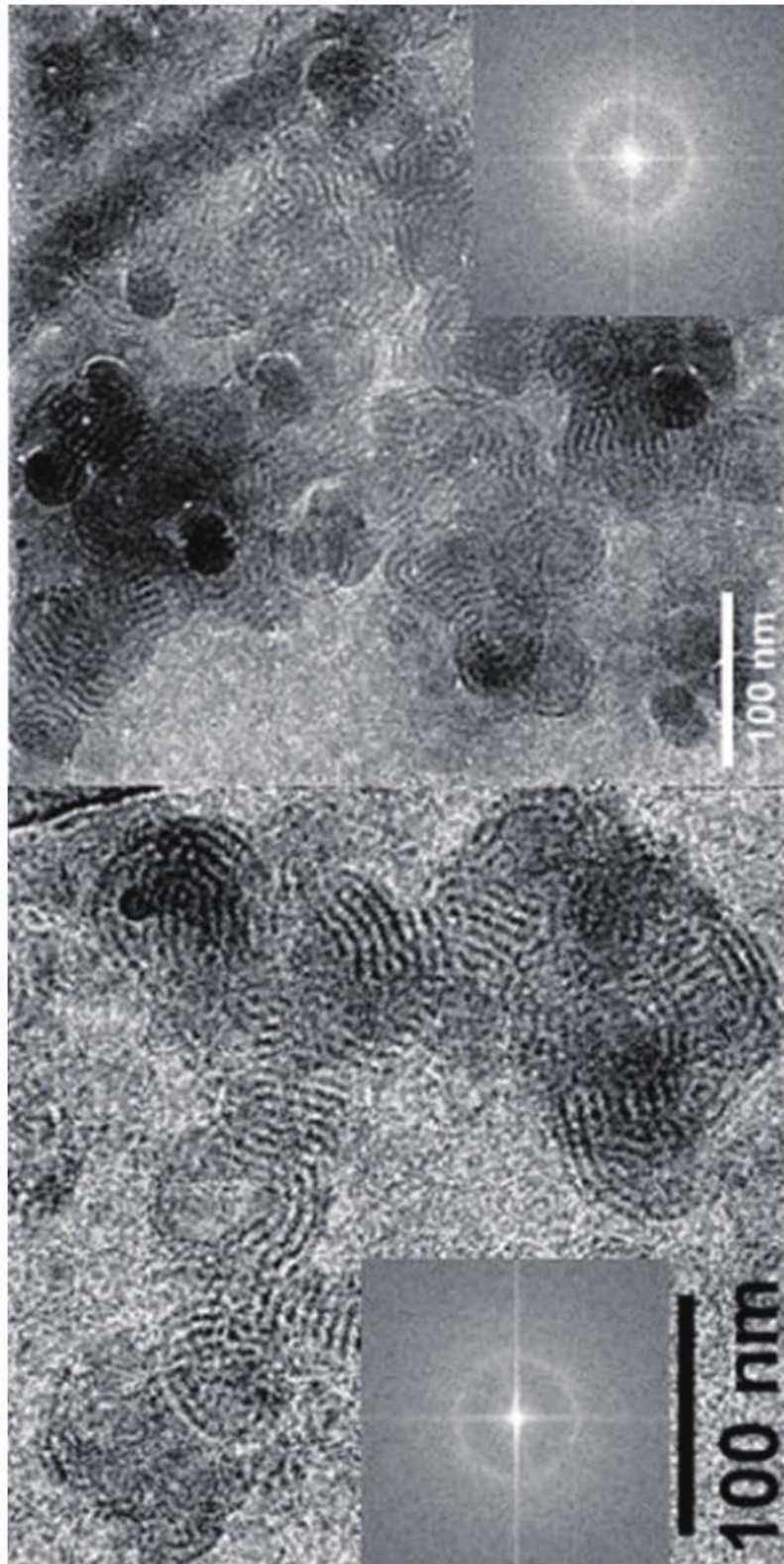


图26

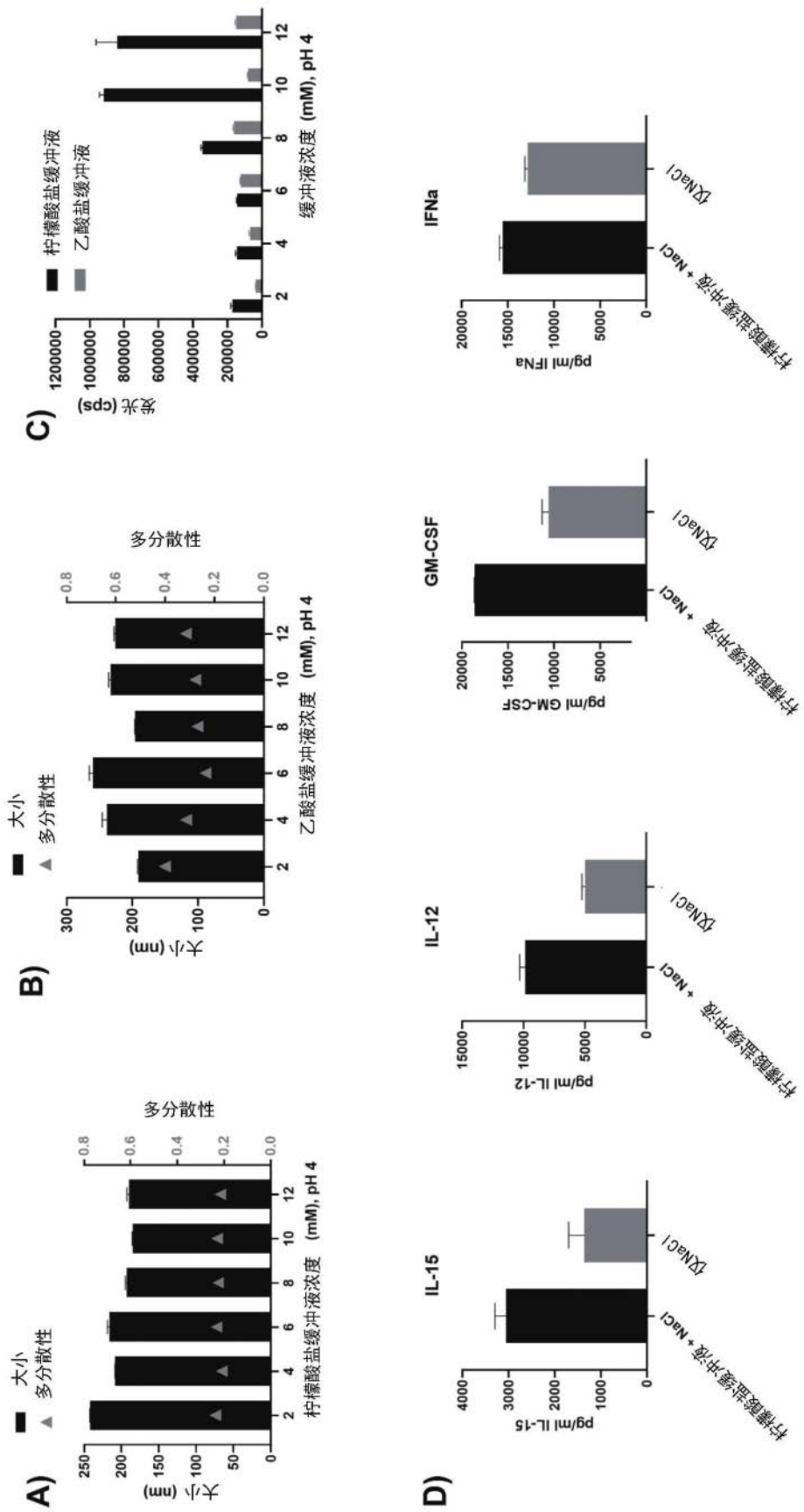


图27

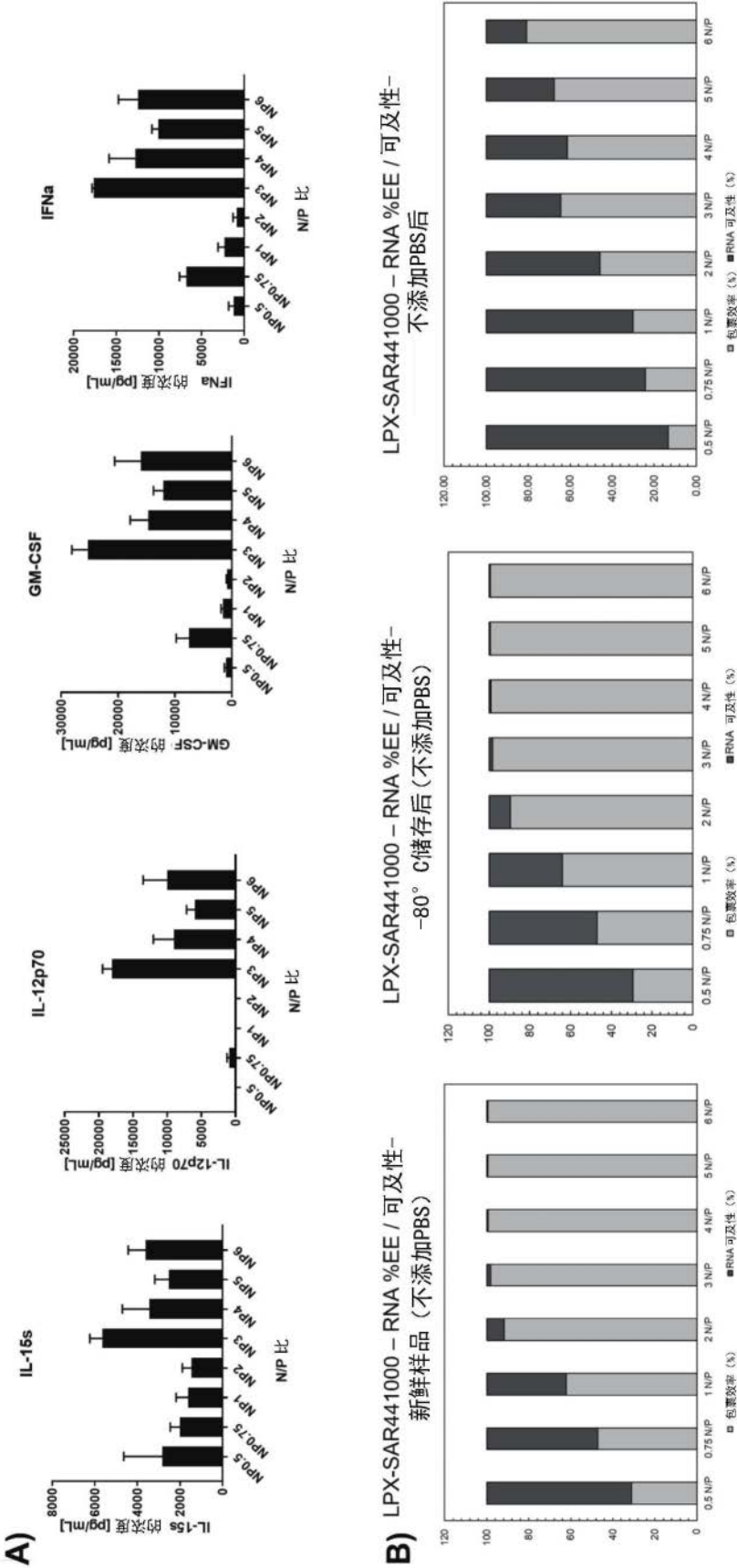


图28

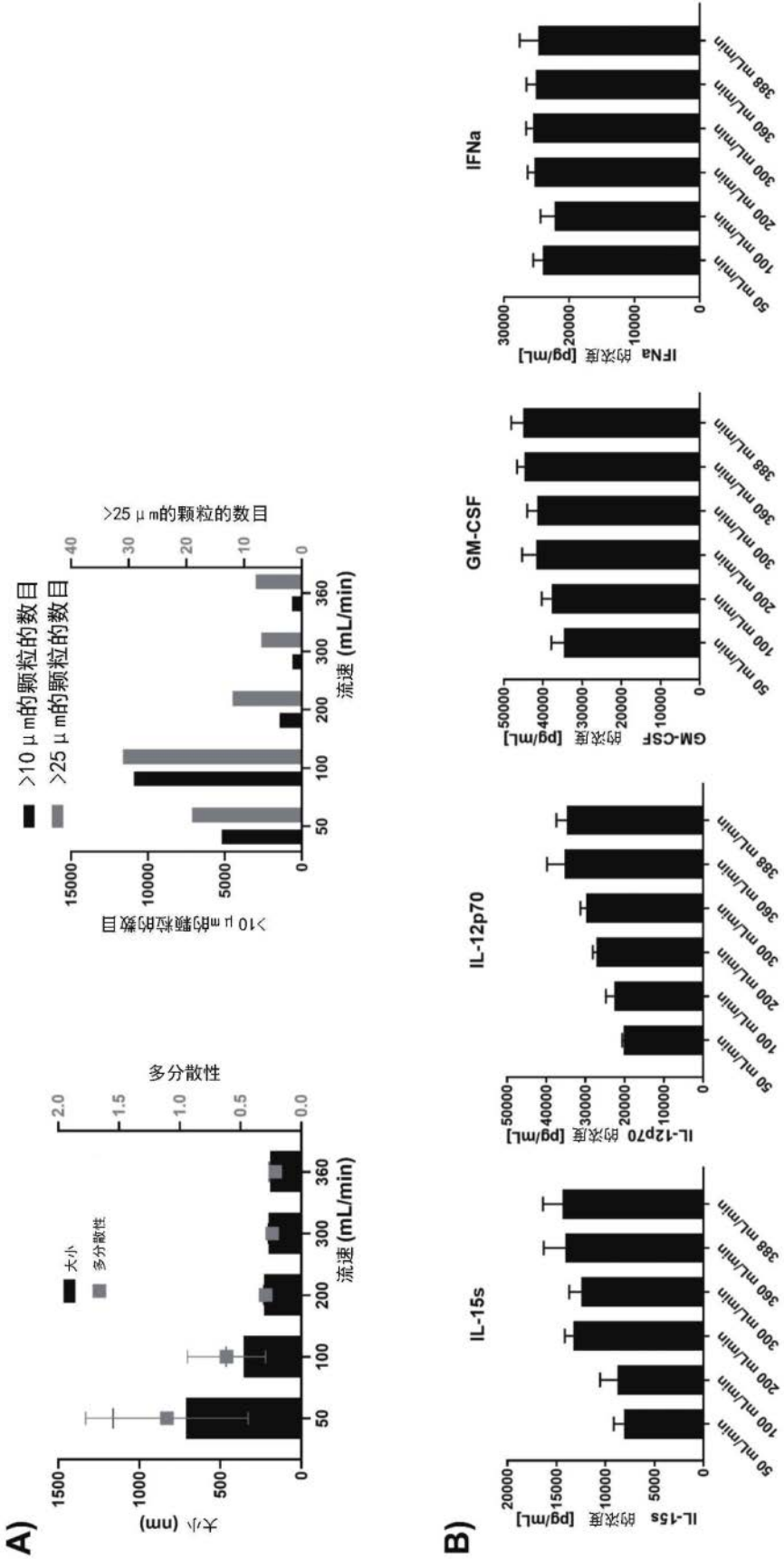


图29

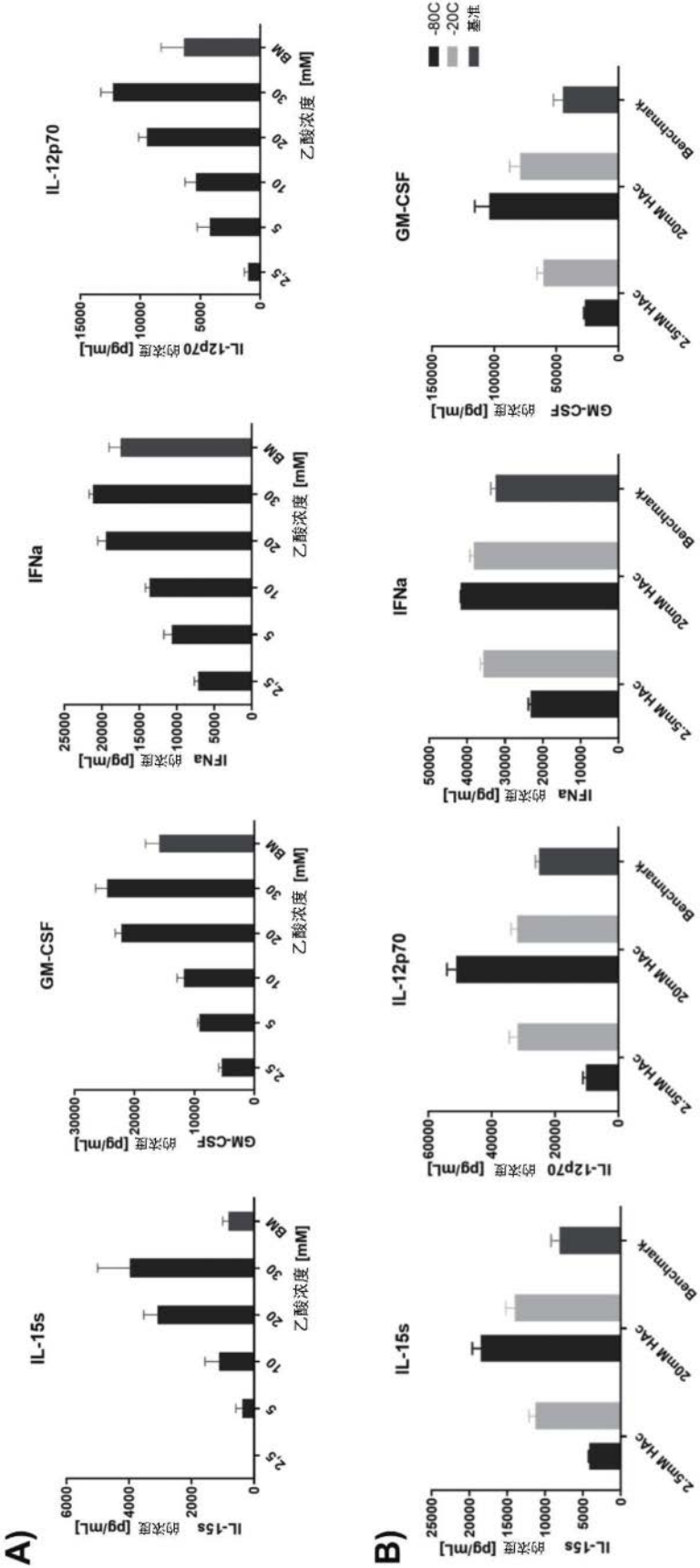


图30

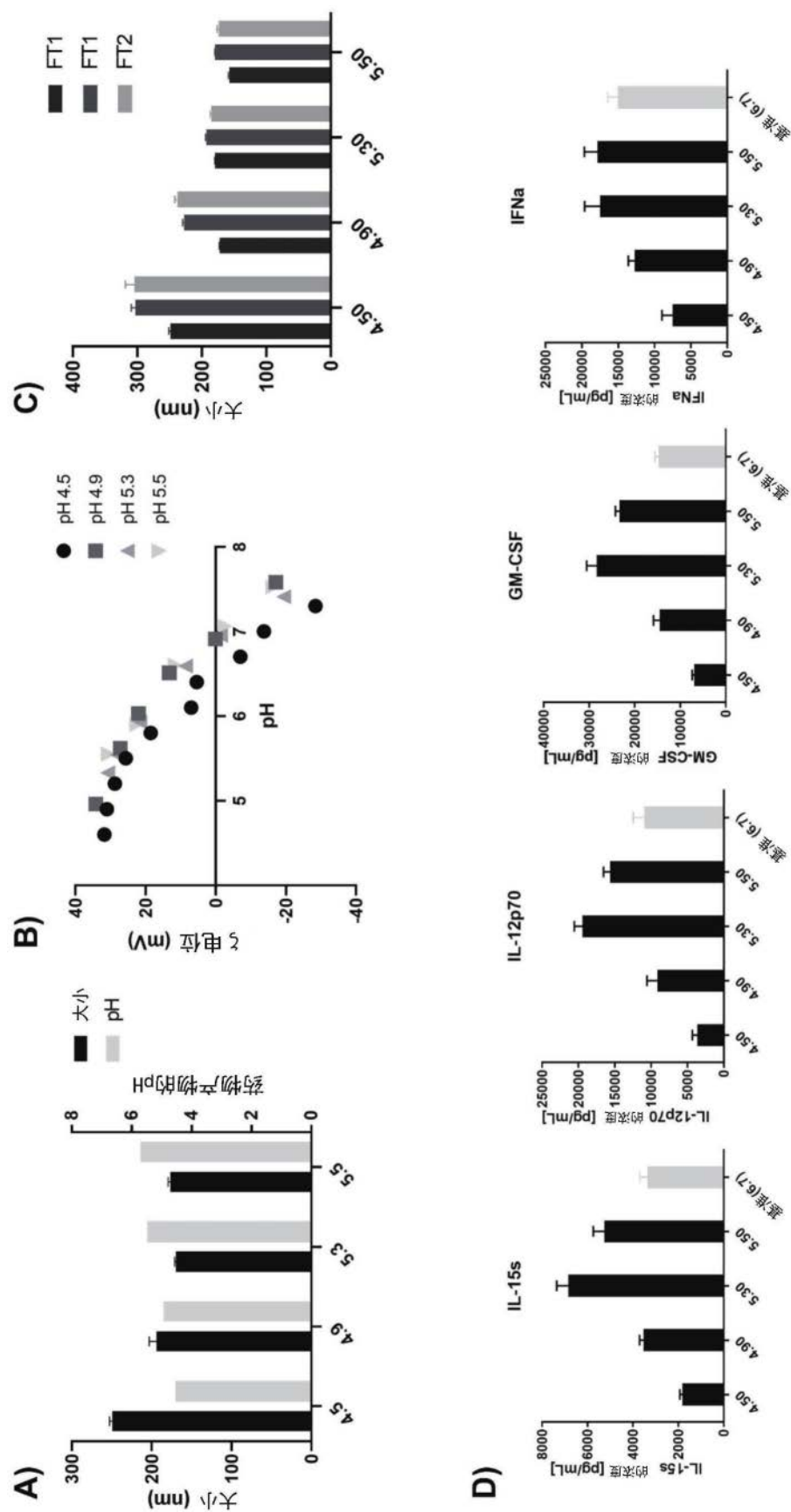


图31

运行ID	DODMA %摩尔	DOPE %摩尔	DOPS %摩尔
1	40.00	30.00	30.00
2	50.00	25.00	25.00
3	60.00	20.00	20.00
4	70.00	15.00	15.00
5	75.00	12.50	12.50
6	80.00	10.00	10.00
7	90.00	5.00	5.00
8	85.71	14.29	0.00
9	81.43	13.57	5.00
10	77.14	12.86	10.00
11	75.00	12.50	12.50
12	72.86	12.14	15.00
13	68.57	11.43	20.00
14	85.71	0.00	14.29
15	81.43	5.00	13.57
16	77.14	10.00	12.86
17	75.00	12.50	12.50
18	72.86	15.00	12.14
19	68.57	20.00	11.43

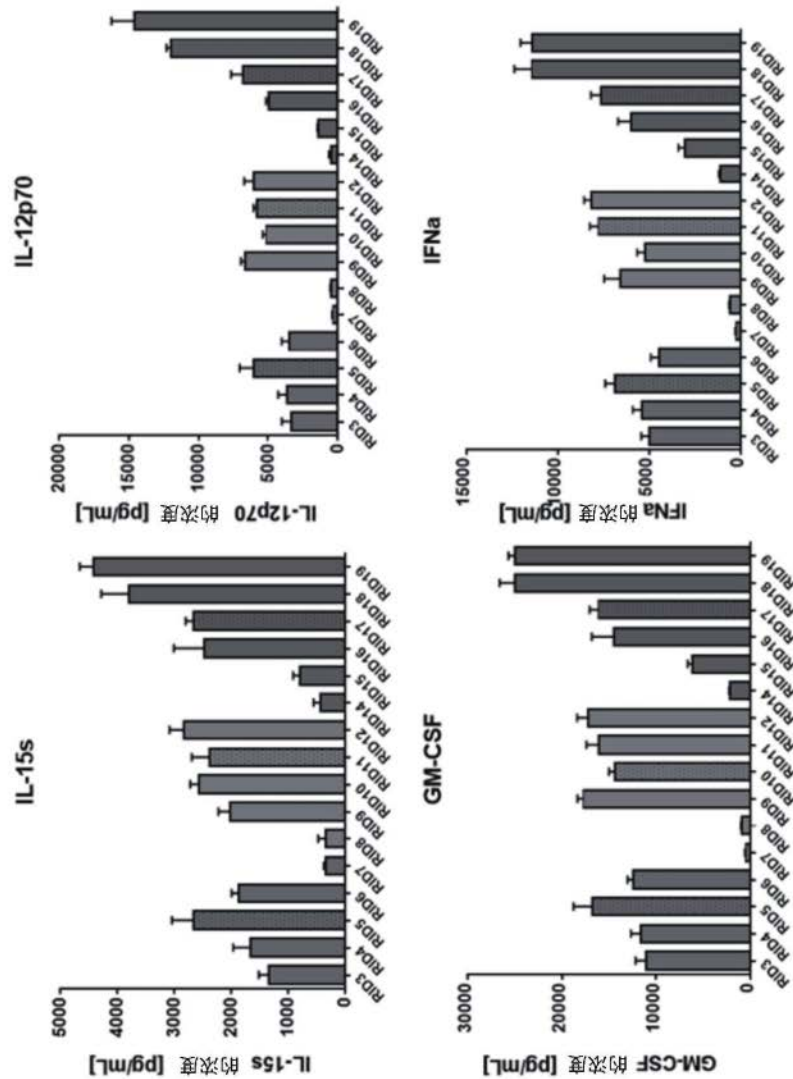


图32

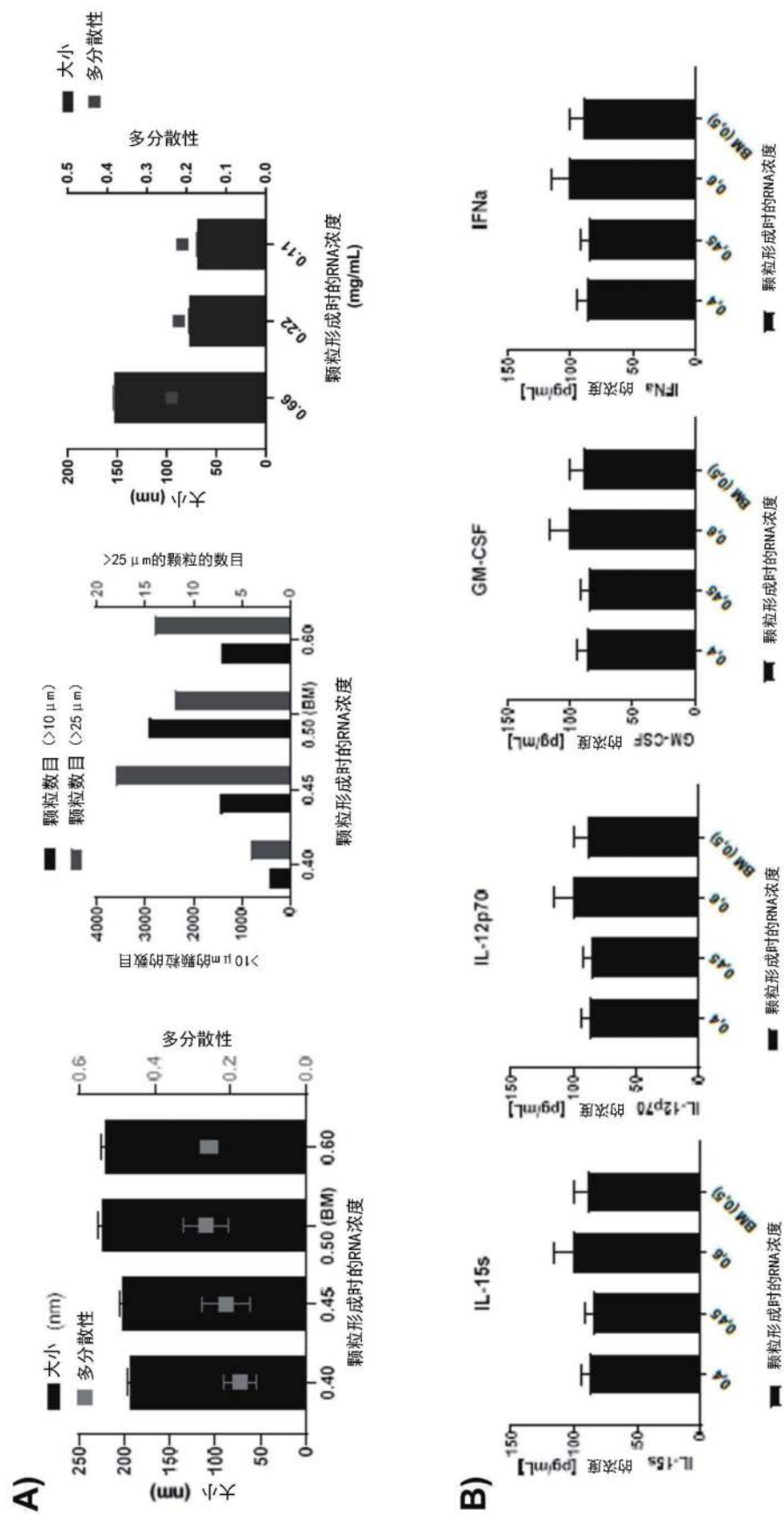


图33

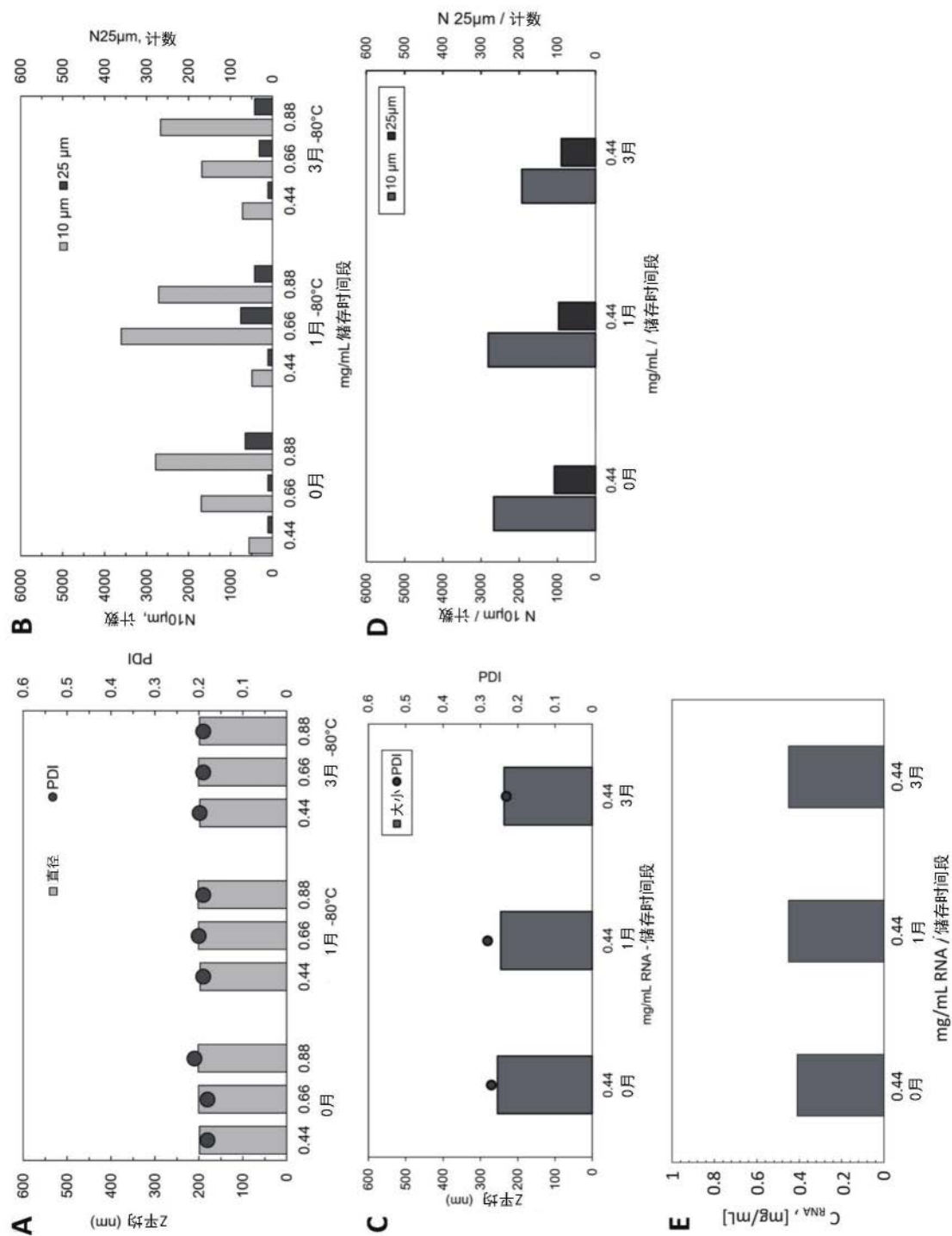


图34