(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114302715 A
(43)申请公布日 2022.04.08

(21)申请号 202080060116.8

(22)申请日 2020.12.31

(30)优先权数据
10-2020-0005642 2020.01.15 KR
10-2020-0040586 2020.04.02 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.02.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2020/019502 2020.12.31

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/145595 KO 2021.07.22

(71)申请人 银汉斯德生物技术公司
地址 韩国首尔特别市

(72)发明人 李赫镇 金珉廷 郑汉森 权孝琼 徐允美 郑睿熙

(74)专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243
代理人 钟海胜 宋琴芝

(51)Int.Cl.
A61K 9/51(2006.01)
A61K 47/24(2006.01)
A61K 47/28(2006.01)
A61K 47/22(2006.01)
A61K 47/10(2006.01)
A61K 31/713(2006.01)
A61K 31/7088(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 1/16(2006.01)
A61P 3/06(2006.01)
A61P 31/20(2006.01)

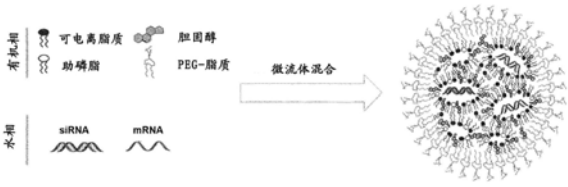
权利要求书2页 说明书26页
序列表8页 附图8页

(54)发明名称

用于体内药物递送的脂质纳米颗粒及其用途

(57)摘要

本发明涉及一种用于体内药物递送的脂质纳米颗粒及其用途，其中脂质纳米颗粒对肝脏组织具有特异性，具有优良的生物相容性，并且可以高效递送基因治疗剂等，从而可用于脂质纳米颗粒介导的基因治疗等相关技术领域。

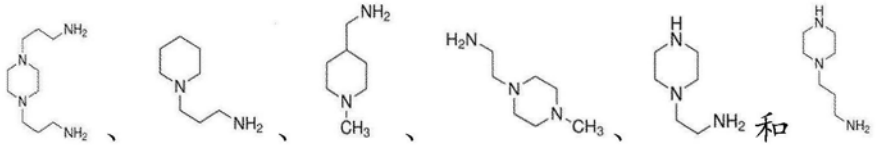


CN 114302715 A

1.一种脂质纳米颗粒,其包含6元杂环胺和烷基环氧化物结合的可电离脂质;磷脂;胆固醇;和脂质-PEG(聚乙二醇)结合物。

2.根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中,所述6元杂环胺是包含叔胺的链状或非链状胺。

3.根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中,所述6元杂环胺选自由



组成的组。

4.根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中,所述烷基环氧化物为1,2-环氧十二烷。

5.根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中,所述磷脂为选自由DOPE、DSPC、POPC、EPC、DOPC、DPPC、DOPG、DPPG、DSPE、磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、POPE、POPC、DOPS和1,2-二油酰-sn-甘油-3-[磷酸-L-丝氨酸]组成的组中的一种或多种。

6.根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中,所述脂质-PEG结合物中的脂质为选自由神经酰胺、二肉豆蔻酰甘油(DMG)、琥珀酰二酰甘油(s-DAG)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)和胆固醇组成的组中的一种或多种。

7.根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中,所述脂质-PEG结合物的含量为0.25-10mol%。

8.根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中,所述脂质纳米颗粒包含摩尔比为20-50:10-30:30-60:0.25-10的可电离脂质:磷脂:胆固醇:脂质-PEG结合物。

9.根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中,所述脂质纳米颗粒的pKa为6.0-7.0。

10.根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中,所述脂质纳米颗粒特异性靶向肝组织。

11.根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中,所述脂质纳米颗粒靶向肝细胞。

12.根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中,所述脂质纳米颗粒靶向LSEC(肝窦内皮细胞)。

13.一种药物递送组合物,其包含(1)根据权利要求1至12中任一项所述的脂质纳米颗粒;和(2)阴离子药物、核酸或其组合。

14.根据权利要求13所述的药物递送组合物,其中,所述阴离子药物、核酸或其组合被包封在所述脂质纳米颗粒的内部。

15.根据权利要求13所述的药物递送组合物,其中,所述脂质纳米颗粒的平均直径为30nm-150nm。

16.根据权利要求13所述的药物递送组合物,其中,所述阴离子药物为选自由肽、药物蛋白质、蛋白质-核酸结构和阴离子生物聚合物-药物结合物组成的组中的一种或多种。

17.根据权利要求13所述的药物递送组合物,其中,所述核酸为选自由小干扰核糖核酸(siRNA)、核糖体核糖核酸(rRNA)、核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、互补脱氧核糖核酸(cDNA)、适配体、信使核糖核酸(mRNA)、转移核糖核酸(tRNA)、反义寡核苷酸、shRNA、miRNA、核酶、PNA和DNA核酶组成的组中的一种或多种。

18.一种用于预防或治疗肝脏疾病的药物组合物,其包含(1)根据权利要求1至12中任

一项所述的脂质纳米颗粒;和(2)阴离子药物、核酸或其组合。

19.根据权利要求18所述的药物组合物,其中,所述肝脏疾病为选自由ATTR淀粉样变性、高胆固醇血症、乙型肝炎病毒感染、急性肝功能衰竭、肝硬化和肝纤维化组成的组中的一种或多种。

20.根据权利要求18所述的药物组合物,其中,所述脂质纳米颗粒的平均直径为30nm-150nm。

用于体内药物递送的脂质纳米颗粒及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及用于体内药物递送的脂质纳米颗粒及其用途。

背景技术

[0002] 在药物制剂行业,药物递送系统(DDS)旨在通过减少药物的副作用且最大限度地提高疗效和效果,有效地递送所需量的药物,是一项能够创造与新药开发相当的经济效益的高附加值核心技术,具有巨大的成功潜力,其目的是通过提高给药效率来提高患者的治疗质量。

[0003] 难溶性药物的增溶技术属于药物吸收促进技术,是药物递送系统的核心技术之一,被认为是降低新药物质开发成本,同时提高目前上市药物的附加值的最合理途径。特别是在韩国等新药开发条件较差的情况下,通过开发药物增溶技术开发改良型新药,是能够以低成本创造巨大附加值的领域。

[0004] 以改变基因结合并治疗多种疾病的巨大希望建立使用基因药物递送系统的基因治疗。在成功和安全地执行这种基因治疗中,有效的基因递送是主要挑战之一,并且病毒递送系统被证明在基因递送中是有效的。然而,由于免疫原性、插入DNA大小的限制以及大规模生产的困难等缺陷,病毒作为基因递送系统的应用受到限制。非病毒基因载体如阳离子脂质体和聚合物开始被注意到作为病毒系统的替代手段。

[0005] 聚合物递送系统稳定性特征的改善以及制造和操作的简易性引发了对无毒和可生物降解的聚合物载体的设计和合成的研究,以实现有效和安全的基因递送。聚(L-赖氨酸)、聚乙烯亚胺、星爆、聚酰胺-胺树枝状高分子和阳离子脂质体等可自组装并将质粒DNA(pDNA)压缩成足够小的结构,以通过内吞作用进入细胞,因此它们已被作为一种非病毒基因递送系统被广泛研究。

[0006] 反义RNA、siRNA等核酸是一种能够在体内抑制特定蛋白质表达的物质,作为治疗癌症、遗传病、感染性疾病、自身免疫病等的重要工具而备受关注(Novina和Sharp,Nature,430,161-164,2004)。然而,siRNA等核酸难以直接输送到细胞内,它们容易被血液中的酶分解,因此有很多研究来克服它们。迄今为止,将核酸递送到细胞中的方法主要使用通过与带正电荷的脂质或聚合物(分别称为脂质-DNA结合物(脂质复合物)和聚合物-DNA结合物(聚合复合物))混合携带的方法(Hirko等,Curr.Med.Chem.,10,1185-93,2003;Merdan等,Adv.Drug.Deliv.Rev.,54,715-58,2002)。脂质-DNA结合物与核酸结合,将核酸很好地递送到细胞中,因此在细胞水平上被大量使用,但在体内,局部注射时,在许多情况下,它具有诱发炎症的缺点(Filonand和Phillips,Biochim.Biophys.Acta,1329,345-56,1997)。

[0007] 此外,这种非病毒递送系统存在转染效率低的问题。很多努力都倾向于提高转染效率,但这离稳定的系统还很远。此外,非病毒基因递送系统的载体由于生物相容性差和不可生物降解性而表现出显著的高细胞毒性。

[0008] 在这样的技术背景下,由于本发明人试图开发一种具有优异的包封率并能将阴离子药物、核酸等有效递送至靶器官或细胞的新型颗粒,他们通过生产包含可电离脂质;磷

脂;胆固醇;和脂质-PEG(聚乙二醇)结合物的脂质纳米颗粒,并证实脂质纳米颗粒被特异性递送至肝组织,并且可以高效包封阴离子化合物或核酸等药物完成了本发明。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 本发明的一个目的是提供一种脂质纳米颗粒,其包含6元杂环胺和烷基环氧化物结合的可电离脂质、磷脂、胆固醇和脂质-PEG(聚乙二醇)结合物。

[0011] 本发明的另一目的是提供一种用于递送药物(阴离子药物、核酸或其组合)的组合物,其包含(1)脂质纳米颗粒;和(2)阴离子药物、核酸或其组合。

[0012] 本发明的另一目的是提供一种用于预防或治疗肝脏疾病的药物组合物,其包含(1)脂质纳米颗粒;和(2)阴离子药物、核酸或其组合。

[0013] 技术方案

[0014] 这将在下面详细描述。另一方面,在本发明中公开的每个描述和实施方式可以应用于彼此的描述和实施方式。换言之,本文公开的各种要素的所有组合均落入本发明的范围内。此外,不能认为本发明的范围受以下具体描述的限制。

[0015] 实现上述目的的一个方面提供了一种脂质纳米颗粒,其包含6元杂环胺和烷基环氧化物结合的可电离脂质;磷脂;胆固醇;和脂质-PEG(聚乙二醇)结合物。

[0016] 根据一实例的脂质纳米颗粒具有肝脏组织特异性,具有优良的生物相容性,可以高效递送基因治疗剂等,因此可用于脂质纳米颗粒介导的基因治疗和图像诊断技术等相关技术领域。

[0017] 在本文中,“可电离脂质”或“类脂质”是指容易质子化的含胺脂质,例如,可以是电荷状态根据周围的pH值而变化的脂质。可电离脂质可以是其中结合了6元杂环胺和烷基环氧化物的脂质。具体地,可电离脂质可以是具有类似于通过使6元杂环胺与烷基环氧化物反应产生的脂质的特性的化合物,更具体地,它可以是通过使6元杂环胺和烷基环氧化物反应的环氧化物的开环反应产生的化合物。

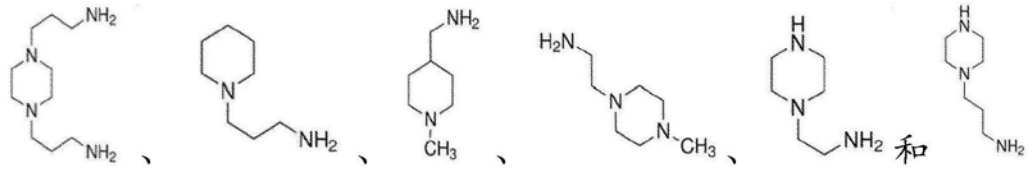
[0018] 在一个实例中,可电离脂质可以是这样一种脂质,其中6元杂环胺和烷基环氧化物以1:n的摩尔比(n=包含在6元杂环胺中的伯胺数量×2+仲胺数×1)反应而使它们结合。根据一个具体实例,它可以通过将246胺和1,2-环氧十二烷以1:4的摩尔比混合并在700-800rpm和85-95的条件下反应2-4天来制备。

[0019] 可电离脂质可以在低于阳离子脂质的pKa的pH下质子化(带正电),并且在高于pKa的pH下它可以基本上是中性的。在一个实例中,脂质纳米颗粒可包含质子化的可电离脂质和/或显示中性的可电离脂质。

[0020] 可电离脂质是一种具有与脂质相似特性的可电离化合物,通过与药物(例如阴离子药物和/或核酸)的静电相互作用,可以起到将药物高效包封在脂质纳米颗粒内的作用。

[0021] 6元杂环胺可包含哌嗪或哌啶的结构。

[0022] 6元杂环胺可以是包含叔胺的链状或非链状胺,根据一个实例,它可以是选自由



组成的组中的一种或多种。

[0023] 在一实例中,6元杂环胺可以是选自由1,4-双(3-氨基丙基)哌嗪、N-(3-氨基丙基)哌啶、(1-甲基-4-哌啶基)甲胺、2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙胺、1-(2-氨基乙基)哌嗪和1-(3-氨基丙基)哌嗪组成的组中的一种或多种。

[0024] 根据可电离脂质中所含胺的类型,(i)药物包封率,(ii)PDI(多分散指数),和/或(iii)脂质纳米颗粒向肝脏组织和/或构成肝脏的细胞(例如,肝细胞)和/或LSEC(肝窦内皮细胞)的药物递送效率可能不同。

[0025] 包含含有胺的可电离脂质的脂质纳米颗粒可具有以下一种或多种特征:

[0026] (1)高效包封药物;

[0027] (2)制备的颗粒大小均匀(或具有低PDI值);和/或

[0028] (3)对肝组织和/或构成肝脏的细胞(例如,肝细胞和/或LSEC)的优异药物递送效率。

[0029] 根据一个实例,包含含有1,4-双(3-氨基丙基)哌嗪(例如Cas No.7209-38-3)的可电离脂质的脂质纳米颗粒与包含含有其他类型胺的可电离脂质的脂质纳米颗粒相比可具有以下特征中的一种或多种:

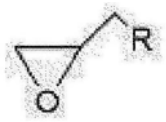
[0030] (1)高效包封药物;

[0031] (2)制备的颗粒大小均匀(或具有低PDI值);和/或

[0032] (3)对肝组织和/或构成肝脏的细胞(例如,肝细胞和/或LSEC)的优异药物递送效率。

[0033] 烷基环氧化物可具有以下化学式1的结构。

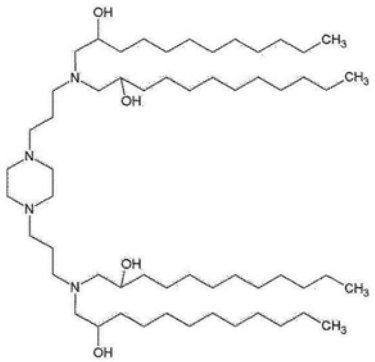
[0034] [化学式1]

[0035] 

[0036] 烷基环氧化物可以具有C6至C14、C6至C12、C6至C10、C8至C14、C8至C12、C8至C10、C10至C14、C10至C12或C10的碳长度,并且例如,它可以是C10的1,2-环氧十二烷。通过将包含在可电离脂质中的烷基环氧化物的碳原子数设置为上述范围,可以表现出包封在脂质纳米颗粒中的药物的高包封率。

[0037] 在一个实例中,可电离脂质可具有以下化学式2的通式。

[0038] [化学式2]

[0039] 

[0040] 化学式2的结构是根据一个实例的可电离脂质的结构的一个实例，并且可电离脂质的结构可以根据6元杂环胺和烷基环氧化物的类型而不同。

[0041] 根据一个实例，包含具有化学式2结构的可电离脂质的脂质纳米颗粒与包含其他类型的可电离脂质的脂质纳米颗粒相比可具有以下特征中的一种或多种：

[0042] (1)高效包封药物；

[0043] (2)制备的颗粒大小均匀(或具有低PDI值)；和/或

[0044] (3)对肝组织和/或构成肝脏的细胞(例如，肝细胞和/或LSEC)的优异药物递送效率。

[0045] 根据一个实例，脂质纳米颗粒可以具有5至8、5.5至7.5、6至7或6.5至7的pKa。pKa是酸解离常数，是指通常用作指示目标物质的酸强度的指标。脂质纳米颗粒的pKa值在脂质纳米颗粒的体内稳定性和脂质纳米颗粒的药物释放方面是重要的。在一个实例中，示出pKa值在上述范围内的脂质纳米颗粒可以在体内安全地递送至靶器官(例如肝脏)和/或靶细胞(肝细胞，和/或LSEC)，并到达靶器官和/或靶细胞，在胞吞作用后，通过与内体膜的阴离子蛋白的静电相互作用，显示出正电荷以释放包封的药物。

[0046] 根据一个实例的脂质纳米颗粒的元件的磷脂起到覆盖和保护脂质纳米颗粒中可电离脂质与药物相互作用形成的核的作用，并且通过与靶细胞的磷脂双层结合可以在药物的细胞内递送过程中促进细胞膜渗透和内体逃逸。

[0047] 对于磷脂，可以不限制地使用根据一个实例的能够促进脂质纳米颗粒融合的磷脂，例如可以是选自由二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、卵磷脂酰胆碱(EPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)、磷脂酰乙醇胺(PE)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(POPE)、1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-[磷酸-L-丝氨酸](DOPS)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-[磷酸-L-丝氨酸]等组成的组中的一种或多种。在一个实例中，包含DOPE的脂质纳米颗粒可有效递送mRNA(对mRNA的优异药物递送效率)，并且在另一实例中，包含DSPE的脂质纳米颗粒可有效递送siRNA(对siRNA的优异药物递送效率)。

[0048] 根据一个实例的脂质纳米颗粒的元件的胆固醇可以为脂质纳米颗粒中的脂质填充提供形态刚性并且分散在纳米颗粒的核心和表面中以提高纳米颗粒的稳定性。

[0049] 在本文中，“脂质-PEG(聚乙二醇)结合物”、“脂质-PEG”、“PEG-脂质”、“PEG-脂质”或“脂质-PEG”是指脂质和PEG结合的形式，并且是指一种脂质，其中作为亲水性聚合物的聚

乙二醇(PEG)聚合物与一端结合。脂质-PEG结合物有助于脂质纳米颗粒内的纳米颗粒在血清中的粒子稳定性,并起到防止纳米颗粒之间聚集的作用。此外,脂质-PEG结合物可以在核酸的体内递送过程中保护核酸免于酶降解,增强核酸在体内的稳定性并增加包封在纳米颗粒中的药物的半衰期。

[0050] 在脂质-PEG结合物中,PEG可以直接与脂质结合或通过接头部分与脂质连接。可以使用适合将PEG结合到脂质的任何接头部分,例如,包括不含酯的接头部分和含酯接头部分。不含酯的接头部分不仅包括酰胺基(-C(O)NH-)、氨基(-NR-)、羰基(-C(O)-)、氨基甲酸酯(-NHC(O)O-)、尿素(-NHC(O)NH-)、二硫化物(-SS-)、醚(-O-)、琥珀酰基(-(O)CCH2CH2C(O)-)、琥珀酰胺基(-NHC(O)CH2CH2C(O)NH-)、醚、二硫化物,还包括它们的组合(例如,包含氨基甲酸酯接头部分和酰胺基接头部分两者的接头),但不限于此。含酯接头部分包括例如碳酸酯(-OC(O)O-)、琥珀酰基、磷酸酯(-O-(O)POH-O-)、磺酸酯及其组合,但不限于此。

[0051] 在一个实例中,脂质-PEG结合物的平均分子量可以是100道尔顿至10,000道尔顿、200道尔顿至8,000道尔顿、500道尔顿至5,000道尔顿、1,000道尔顿至3,000道尔顿、1,000道尔顿至2,600道尔顿、1,500道尔顿至2,600道尔顿、1,500道尔顿至2,500道尔顿、2,000道尔顿至2,600道尔顿,2,000道尔顿至2,500道尔顿,或2,000道尔顿。

[0052] 对于脂质-PEG结合物中的脂质,可以不受限制地使用能够与聚乙二醇结合的任何脂质,并且也可以使用作为脂质纳米颗粒的其他元件的磷脂和/或胆固醇。具体地,脂质-PEG结合物中的脂质可以是神经酰胺、二肉豆蔻酰甘油(DMG)、琥珀酰-二酰基甘油(s-DAG)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)或胆固醇,但不限于此。

[0053] 在一个实例中,脂质-PEG结合物可以是与二烷氧基丙基结合的PEG(PEG-DAA)、与二酰基甘油结合的PEG(PEG-DAG)、与磷脂如磷脂酰乙醇胺结合的PEG(PEG-PE)、与神经酰胺结合的PEG(PEG-CER、神经酰胺-PEG结合物、神经酰胺-PEG、PEG-神经酰胺结合物或PEG-神经酰胺)、胆固醇或与其衍生物结合的PEG、PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC、PEG-DSPE(DSPE-PEG)及其混合物,例如可以是C16-PEG2000神经酰胺(N-棕榈酰-鞘氨醇-1-{琥珀酰[甲氧基(聚乙二醇)2000]})、DMG-PEG2000,14:0PEG2000 PE。

[0054] 根据一个实例,包含神经酰胺-PEG结合物的脂质纳米颗粒的情况比包含其他类型的脂质-PEG结合物的脂质纳米颗粒的情况可具有以下特征中的一种或多种:

[0055] (1)高效包封药物;

[0056] (2)制备的颗粒大小均匀(或具有低PDI值);和/或

[0057] (3)对肝组织和/或构成肝脏的细胞(例如,肝细胞和/或LSEC)具有优异的药物递送效率。

[0058] 脂质-PEG结合物中的PEG是亲水性聚合物,具有抑制血清蛋白吸附的能力,增加脂质纳米颗粒在体内的循环时间,可以起到防止纳米颗粒间聚集的作用。此外,脂质-PEG结合物可在体内表现出隐身功能以防止纳米颗粒降解。

[0059] PEG可以是官能团与未与脂质结合的一侧结合的物质(官能化PEG)。在这种情况下,可以使用的官能团可以是选自由琥珀酰基、羧酸、马来酰亚胺、胺基、生物素、氰脲基和叶酸等组成的组中的一种或多种。

[0060] 根据一个实例,包含在脂质纳米颗粒中的脂质-PEG结合物的量可以为0.1-15mol%、0.25-15mol%、0.5-15mol%、1-15mol%、1.5-15mol%、2-15mol%、2.5-15mol%、

0.1-12.5mol%、0.25-12.5mol%、0.5-12.5mol%、1-12.5mol%、1.5-12.5mol%、2-12.5mol%、2.5-12.5mol%、0.1-10mol%、0.25-10mol%、0.5-10mol%、1-10mol%、1.5-10mol%、2-10mol%、2.5-10mol%、0.1-7.5mol%、0.25-7.5mol%、0.5-7.5mol%、1-7.5mol%、1.5-7.5mol%、2-7.5mol%、2.5-7.5mol%、0.1-5mol%、0.25-5mol%、0.5-5mol%、1-5mol%、1.5-5mol%、2-5mol%、2.5-5mol%、0.1-3mol%、0.25-3mol%、0.5-3mol%、1-3mol%、1.5-3mol%、2-3mol%、2.5-3mol%、0.1-2.5mol%、0.25-2.5mol%、0.5-2.5mol%、1-2.5mol%、1.5-2.5mol%、2-2.5mol%、0.1-4.5mol%、0.25-4.5mol%、0.5-4.5mol%、1-4.5mol%、1.5-4.5mol%、2-4.5mol%、2.5-4.5mol%、0.1-4mol%、0.25-4mol%、0.5-4mol%、1-4mol%、1.5-4mol%、2-4mol%、2.5-4mol%、0.1-3.5mol%、0.25-3.5mol%、0.5-3.5mol%、1-3.5mol%、1.5-3.5mol%、2-3.5mol%、2.5-3.5mol%、0.1-2.0mol%、0.1-1.5mol%、0.1-1.0mol%、0.5-2.0mol%、0.5-1.5mol%、0.5-1.0mol%、1.0-2.0mol%、1.0-1.5mol%、1.5-2.0mol%、1.0mol%或1.5mol%。

[0061] 在一个实例中，脂质纳米颗粒的肝组织、肝细胞和/或LSEC靶向效应(药物递送效应)可能取决于脂质纳米颗粒中包含的脂质-PEG结合物的含量。

[0062] 例如，包含脂质-PEG结合物的脂质纳米颗粒的量为0.1-15mol%、0.25-15mol%、0.5-15mol%、1-15mol%、1.5-15mol%、2-15mol%、2.5-15mol%、0.1-12.5mol%、0.25-12.5mol%、0.5-12.5mol%、1-12.5mol%、1.5-12.5mol%、2-12.5mol%、2.5-12.5mol%、0.1-10mol%、0.25-10mol%、0.5-10mol%、1-10mol%、1.5-10mol%、2-10mol%、2.5-10mol%、0.1-7.5mol%、0.25-7.5mol%、0.5-7.5mol%、1-7.5mol%、1.5-7.5mol%、2-7.5mol%、2.5-7.5mol%、0.1-5mol%、0.25-5mol%、0.5-5mol%、1-5mol%、1.5-5mol%、2-5mol%、2.5-5mol%、0.1-3mol%、0.25-3mol%、0.5-3mol%、1-3mol%、1.5-3mol%、2-3mol%、2.5-3mol%、0.1-2.5mol%、0.25-2.5mol%、0.5-2.5mol%、1-2.5mol%、1.5-2.5mol%、2-2.5mol%、0.1-4.5mol%、0.25-4.5mol%、0.5-4.5mol%、1-4.5mol%、1.5-4.5mol%、2-4.5mol%、2.5-4.5mol%、0.1-4mol%、0.25-4mol%、0.5-4mol%、1-4mol%、1.5-4mol%、2-4mol%、2.5-4mol%、0.1-3.5mol%、0.25-3.5mol%、0.5-3.5mol%、1-3.5mol%、1.5-3.5mol%、2-3.5mol%、2.5-3.5mol%、0.1-10mol%、0.1-5.0mol%、0.1-4.5mol%、0.1-4.0mol%、0.1-3.5mol%、0.1-3.0mol%、0.1-2.5mol%、0.1-2.0mol%、0.1-1.5mol%、0.1-1.0mol%、0.5-10mol%、0.5-5.0mol%、0.5-4.5mol%、0.5-4.0mol%、0.5-3.5mol%、0.5-3.0mol%、0.5-2.5mol%、0.5-2.0mol%、0.5-1.5mol%、0.5-1.0mol%、1.0-10mol%、1.0-5.0mol%、1.0-4.5mol%、1.0-4.0mol%、1.0-3.5mol%、1.0-3.0mol%、1.0-2.5mol%、1.0-2.0mol%、1.0-1.5mol%、1.5-10mol%、1.5-5.0mol%、1.5-4.5mol%、1.5-4.0mol%、1.5-3.5mol%、1.5-3.0mol%、1.5-2.5mol%、1.5-2.0mol%、1.0mol%或1.5mol%(比包含量在上述范围之外的脂质-PEG结合物的脂质纳米颗粒)可能对肝细胞具有优异的靶向作用。

[0063] 作为另一个实例，包含脂质-PEG结合物的脂质纳米颗粒的量为0.1-15mol%、0.25-15mol%、0.5-15mol%、1-15mol%、1.5-15mol%、2-15mol%、2.5-15mol%、0.1-12.5mol%、0.25-12.5mol%、0.5-12.5mol%、1-12.5mol%、1.5-12.5mol%、2-12.5mol%、2.5-12.5mol%、0.1-10mol%、0.25-10mol%、0.5-10mol%、1-10mol%、1.5-10mol%、2-10mol%、2.5-10mol%、0.1-7.5mol%、0.25-7.5mol%、0.5-7.5mol%、1-7.5mol%、1.5-

7.5mol%、2-7.5mol%、2.5-7.5mol%、0.1-5mol%、0.25-5mol%、0.5-5mol%、1-5mol%、1.5-5mol%、2-5mol%、2.5-5mol%、0.1-3mol%、0.25-3mol%、0.5-3mol%、1-3mol%、1.5-3mol%、2-3mol%、2.5-3mol%、0.1-2.5mol%、0.25-2.5mol%、0.5-2.5mol%、1-2.5mol%、1.5-2.5mol%、2-2.5mol%、0.1-4.5mol%、0.25-4.5mol%、0.5-4.5mol%、1-4.5mol%、1.5-4.5mol%、2-4.5mol%、2.5-4.5mol%、0.1-4mol%、0.25-4mol%、0.5-4mol%、1-4mol%、1.5-4mol%、2-4mol%、2.5-4mol%、0.1-3.5mol%、0.25-3.5mol%、0.5-3.5mol%、1-3.5mol%、1.5-3.5mol%、2-3.5mol%、2.5-3.5mol%、0.1-10mol%、0.1-5.0mol%、0.1-4.5mol%、0.1-4.0mol%、0.1-3.5mol%、0.1-3.0mol%、0.1-2.5mol%、0.1-2.0mol%、0.1-1.5mol%、0.1-1.0mol%、0.5-10mol%、0.5-5.0mol%、0.5-4.5mol%、0.5-4.0mol%、0.5-3.5mol%、0.5-3.0mol%、0.5-2.5mol%、0.5-2.0mol%、0.5-1.5mol%、0.5-1.0mol%、1.0-10mol%、1.0-5.0mol%、1.0-4.5mol%、1.0-4.0mol%、1.0-3.5mol%、1.0-3.0mol%、1.0-2.5mol%、1.0-2.0mol%、1.0-1.5mol%、1.5-10mol%、1.5-5.0mol%、1.5-4.5mol%、1.5-4.0mol%、1.5-3.5mol%、1.5-3.0mol%、1.5-2.5mol%、1.5-2.0mol%、1.0mol%、或1.5mol%(比包含量在上述范围之外的脂质-PEG结合物的脂质纳米颗粒)可能对LSEC具有优异的靶向作用。

[0064] 根据一个实例,包含在脂质纳米颗粒中的胆固醇的量可以为10-60mol%、20-60mol%、30-60mol%、30-55mol%、30-52.5mol%、30-52mol%、30-51mol%、30-50mol%、30-47.5mol%、30-45mol%、30-44mol%、30-43.5mol%、30-43mol%、30-41.5mol%、30-40mol%、30-39.5mol%、35-60mol%、35-55mol%、35-52.5mol%、35-52mol%、35-51mol%、35-50mol%、35-47.5mol%、35-45mol%、35-44mol%、35-43.5mol%、35-43mol%、35-41.5mol%、35-40mol%、35-39.5mol%、37-60mol%、37-55mol%、37-52.5mol%、37-52mol%、37-51mol%、37.5-50mol%、37.5-47.5mol%、37.5-45mol%、37.5-44mol%、37.5-43.5mol%、37.5-43mol%、37.5-41.5mol%、37.5-40mol%、37.5-39.5mol%、39.5-60mol%、39.5-55mol%、39.5-52.5mol%、39.5-52mol%、39.5-51mol%、39.5-50mol%、39.5-47.5mol%、39.5-45mol%、39.5-44mol%、39.5-43.5mol%、39.5-43mol%、39.5-41.5mol%、39.5-40mol%、40-60mol%、40-55mol%、40-52.5mol%、40-52mol%、40-51mol%、40-50mol%、40-47.5mol%、40-45mol%、40-44mol%、40-43.5mol%、40-43mol%、40-41.5mol%、41.5-60mol%、41.5-55mol%、41.5-52.5mol%、41.5-52mol%、41.5-51mol%、41.5-50mol%、41.5-47.5mol%、41.5-45mol%、41.5-44mol%、41.5-43.5mol%、41.5-43mol%、43-60mol%、43-55mol%、43-52.5mol%、43-52mol%、43-51mol%、43-50mol%、43-47.5mol%、43-45mol%、43-44mol%、43-43.5mol%、43.5-60mol%、43.5-55mol%、43.5-52.5mol%、43.5-52mol%、43.5-51mol%、43.5-50mol%、43.5-47.5mol%、43.5-45mol%、43.5-44mol%、45-60mol%、45-55mol%、45-52.5mol%、45-52mol%、45-51mol%、45-50mol%、45-47.5mol%、47.5-60mol%、47.5-55mol%、47.5-52.5mol%、47.5-52mol%、47.5-51mol%、47.5-50mol%、%、50-60mol%、50-55mol%、50-52.5mol%、50-52mol%、50-52.5mol%50-51.5mol%、51-60mol%、51-55mol%、51-52.5mol%、or51-52 mol%、%、51-60mol%、51-55mol%、51-52.5mol%或51-52mol%。

[0065] 根据一个实例,包含在脂质纳米颗粒中的脂质-PEG结合物和胆固醇的量的总和可

以为30-70mol％、40-70mol％、40-60mol％、40-55mol％、40-53.5mol％、40-50mol％、40-47.5mol％、40-45mol％、40-44.5mol％、42-60mol％、42-55mol％、42-53.5mol％、42-50mol％、42-47.5mol％、42-45mol％、42-44、5mol％、44-60mol％、44-55mol％、44-53.5mol％、44-50mol％、44-47.5mol％、44-45mol％、44-44.5mol％、44.5-60mol％、44.5-55mol％、44.5-53.5mol％、44.5-50mol％、44.5-47.5mol％或44.5-45mol％。

[0066] 根据一个实例，包含在脂质纳米颗粒中的可电离脂质的量可以为10-70mol％、10-60mol％、10-55mol％、10-50mol％、10-45mol％、10-42.5mol％、10-40mol％、10-35mol％、10-30mol％、10-26.5mol％、10-25mol％、10-20mol％、15-60mol％、15-55mol％、15-50mol％、15-45mol％、15-42.5mol％、15-40mol％、15-35mol％、15-30mol％、15-26.5mol％、15-25mol％、15-20mol％、20-60mol％、20-55mol％、20-50mol％、20-45mol％、20-42.5mol％、20-40mol％、20-35mol％、20-30mol％、20-26.5mol％、20-25mol％、25-60mol％、25-55mol％、25-50mol％、25-45mol％、25-42.5mol％、25-40mol％、25-35mol％、25-30mol％、25-26.5mol％、26.5-60mol％、26.5-55mol％、26.5-50mol％、26.5-45mol％、26.5-42.5mol％、26.5-40mol％、26.5-35mol％、26.5-30mol％、30-60mol％、30-55mol％、30-50mol％、30-45mol％、30-42.5mol％、30-40mol％、30-35mol％、35-60mol％、35-55mol％、35-50mol％、35-45mol％、35-42.5mol％、35-40mol％、40-60mol％、40-55mol％、40-50mol％、40-45mol％、40-42.5mol％、42.5-60mol％、42.5-55mol％、42.5-50mol％或42.5-45mol％。

[0067] 根据一个实例，包含在脂质纳米颗粒中的磷脂的量可以为1-50mol％、5-50mol％、5-40mol％、5-30mol％、5-25mol％、5-20mol％、5-15mol％、5-13mol％、5-10mol％、10-30mol％、10-25mol％、10-20mol％、10-15mol％、10-13mol％、15-30mol％、15-25mol％、15-20mol％、20-30mol％或20-25mol％。

[0068] 在本文中，“mol％(mol％，摩尔百分比)”表示为特定成分的mol数除以所有成分的mol数之和，再乘以100的百分比，例如用公式表示，它可以是下面的公式1。

[0069] (公式1)

[0070] mol％＝(特定成分的mol数)/(所有成分的mol数总和)×100

[0071] 脂质纳米颗粒可包含摩尔比为以下的可电离脂质:磷脂:胆固醇:脂质-PEG结合物，20-50:10-30:20-60:0.1-10;20-50:10-30:20-60:0.25-10;20-50:10-30:30-60:0.25-10;20-50:10-30:30-60:0.1-5;20-50:10-30:30-60:0.5-5;25-45:10-25:40-50:0.5-3;25-45:10-20:40-55:0.5-3;25-45:10-20:40-55:1.0-1.5;40-45:10-15:40-45:0.5-3.0;40-45:10-15:40-45:0.5-3;40-45:10-15:40-45:1-1.5;25-30:17-22:50-55:0.5-3.0;25-30:17-22;50-55:1.0-2.5;或25-30:17-22:50-55:1.5-2.5。根据一个实例，在包含在脂质纳米颗粒的组分中，保持脂质-PEG结合物和胆固醇的摩尔数总和恒定的同时，胆固醇的摩尔数减少与脂质-PEG结合物的摩尔数增加一样多，从而可以保持组分的摩尔比。

[0072] 在本文中，摩尔比是指摩尔的比，“重量份”是指所包含的各组分的重量比。

[0073] 在一个实例中，脂质纳米颗粒可包含20-50重量份的可电离脂质、10-30重量份的磷脂、20-60重量份(或20-60重量份)的胆固醇和0.1-10重量份(或0.25-10重量份、0.5-5重量份)的脂质-PEG结合物。基于纳米颗粒的总重量，脂质纳米颗粒可包含20-50重量％的可电离脂质、10-30重量％的磷脂、20-60重量％(或30-60重量％)的胆固醇和0.1-10重量％

(或0.25-10重量%,0.5-5重量%)的脂质-PEG结合物。在其他实例中,基于纳米颗粒的总重量,脂质纳米颗粒可包含25-50重量%的可电离脂质、10-20重量%的磷脂、35-55重量%的胆固醇和0.1-10重量%(或0.25-10重量%,0.5-5重量%)的脂质-PEG结合物。

[0074] 包含上述范围(摩尔比、重量份数和/或重量%)的可电离脂质、胆固醇、磷脂和/或脂质-PEG结合物的脂质纳米颗粒相比包含上述范围外的可电离脂质、胆固醇、磷脂和/或脂质-PEG结合物的脂质纳米颗粒可具有优异的(i)脂质纳米颗粒的稳定性,(ii)药物的包封率,和/或(iii)靶向肝组织和/或细胞(例如,肝细胞和/或LSEC)的药物递送效率。

[0075] 根据一个实例的脂质纳米颗粒可以具有20nm-200nm、20-180nm、20nm-170nm、20nm-150nm、20nm-120nm、20nm-100nm、20nm-90nm、30nm-200nm、30-180nm、30nm-170nm、30nm-150nm、30nm-120nm、30nm-100nm、30nm-90nm、40nm-200nm、40-180nm、40nm-170nm、40nm-150nm、40nm-120nm、40nm-100nm、40nm-90nm、50nm-200nm、50-180nm、50nm-170nm、50nm-150nm、50nm-120nm、50nm-100nm、50nm-90nm、60nm-200nm、60-180nm、60nm-170nm、60nm-150nm、60nm-120nm、60nm-100nm、60nm-90nm、70nm-200nm、70-180nm、70nm-170nm、70nm-150nm、70nm-120nm、70nm-100nm、70nm-90nm、80nm-200nm、80-180nm、80nm-170nm、80nm-150nm、80nm-120nm、80nm-100nm、80nm-90nm、90nm-200nm、90-180nm、90nm-170nm、90nm-150nm、90nm-120nm或90nm-100nm的平均直径,便于导入肝组织、肝细胞和/或LSEC(肝窦内皮细胞)。当脂质纳米颗粒的尺寸小于上述范围时,由于脂质纳米颗粒的表面积过度增加而难以保持稳定性,从而可能降低向靶组织的递送和/或药物作用。

[0076] 根据一个实例,脂质纳米颗粒的肝组织、肝细胞和/或LSEC靶向效应(药物递送效应)可以取决于脂质纳米颗粒的尺寸。例如,在脂质纳米颗粒的直径为40-120nm、30-100nm、35-95nm、40-90nm、45-90nm、50-90nm、55-85nm、60-80nm、70-90nm、70-80nm、50-70nm或60-70nm的情况下,对肝细胞的靶向作用可能优异(比直径在上述范围之外的纳米颗粒)。作为另一个实例,在脂质纳米颗粒的直径为20-200nm、20-180nm、40-180nm、40-170nm、50-160nm、70-180nm、70-170nm、75-170nm、75-165nm、70-150nm、70-130nm、75-130nm、80-120nm、85-120nm、about90-120 nm、90-110nm、90-100nm、80-110nm、80-100nm、85-95nm、约90nm或90nm的情况下,对LSEC的靶向效果可能优异(比在直径上述范围之外的纳米颗粒)。

[0077] 脂质纳米颗粒可以特异性靶向肝组织。根据一个实例的脂质纳米颗粒可以非常相似地模仿天然脂蛋白的代谢行为,并且可以通过肝脏和治疗机制有效地应用于脂质代谢过程。

[0078] 脂质纳米颗粒可以靶向肝细胞。当脂质纳米颗粒中包含的脂质-PEG的含量为0.1-15mol%、0.25-15mol%、0.5-15mol%、1-15mol%、1.5-15mol%、2-15mol%、2.5-15mol%、0.1-12.5mol%、0.25-12.5mol%、0.5-12.5mol%、1-12.5mol%、1.5-12.5mol%、2-12.5mol%、2.5-12.5mol%、0.1-10mol%、0.25-10mol%、0.5-10mol%、1-10mol%、1.5-10mol%、2-10mol%、2.5-10mol%、0.1-7.5mol%、0.25-7.5mol%、0.5-7.5mol%、1-7.5mol%、1.5-7.5mol%、2-7.5mol%、2.5-7.5mol%、0.1-5mol%、0.25-5mol%、0.5-5mol%、1-5mol%、1.5-5mol%、2-5mol%、2.5-5mol%、0.1-3mol%、0.25-3mol%、0.5-3mol%、1-3mol%、1.5-3mol%、2-3mol%、2.5-3mol%、0.1-2.5mol%、0.25-2.5mol%、0.5-2.5mol%、1-2.5mol%、1.5-2.5mol%、2-2.5mol%、0.1-4.5mol%、0.25-4.5mol%、0.5-4.5mol%、1-4.5mol%、1.5-4.5mol%、2-4.5mol%、2.5-4.5mol%、0.1-4mol%、0.25-

4mol%、0.5-4mol%、1-4mol%、1.5-4mol%、2-4mol%、2.5-4mol%、0.1-3.5mol%、0.25-3.5mol%、0.5-3.5mol%、1-3.5mol%、1.5-3.5mol%、2-3.5mol%、2.5-3.5mol%、0.1-2.0mol%、0.1-1.5mol%、0.1-1.0mol%、0.5-2.0mol%、0.5-1.5mol%、0.5-1.0mol%、1.0-2.0mol%、1.0-1.5mol%、1.5-2.0mol%、1.0mol%或1.5mol%时，脂质纳米颗粒向肝细胞的药物递送效率(肝细胞靶向效率)可能是优异的。

[0079] 脂质纳米颗粒可以靶向LSEC(肝窦内皮细胞)。当脂质纳米颗粒中包含的脂质-PEG的含量为0.1-15mol%、0.25-15mol%、0.5-15mol%、1-15mol%、1.5-15mol%、2-15mol%、2.5-15mol%、0.1-12.5mol%、0.25-12.5mol%、0.5-12.5mol%、1-12.5mol%、1.5-12.5mol%、2-12.5mol%、2.5-12.5mol%、0.1-10mol%、0.25-10mol%、0.5-10mol%、1-10mol%、1.5-10mol%、2-10mol%、2.5-10mol%、0.1-7.5mol%、0.25-7.5mol%、0.5-7.5mol%、1-7.5mol%、1.5-7.5mol%、2-7.5mol%、2.5-7.5mol%、0.1-5mol%、0.25-5mol%、0.5-5mol%、1-5mol%、1.5-5mol%、2-5mol%、2.5-5mol%、0.1-3mol%、0.25-3mol%、0.5-3mol%、1-3mol%、1.5-3mol%、2-3mol%、2.5-3mol%、0.1-2.5mol%、0.25-2.5mol%、0.5-2.5mol%、1-2.5mol%、1.5-2.5mol%、2-2.5mol%、0.1-4.5mol%、0.25-4.5mol%、0.5-4.5mol%、1-4.5mol%、1.5-4.5mol%、2-4.5mol%、2.5-4.5mol%、0.1-4mol%、0.25-4mol%、0.5-4mol%、1-4mol%、1.5-4mol%、2-4mol%、2.5-4mol%、0.1-3.5mol%、0.25-3.5mol%、0.5-3.5mol%、1-3.5mol%、1.5-3.5mol%、2-3.5mol%、2.5-3.5mol%、0.1-2.0mol%、0.1-1.5mol%、0.1-1.0mol%、0.5-2.0mol%、0.5-1.5mol%、0.5-1.0mol%、1.0-2.0mol%、1.0-1.5mol%、1.5-2.0mol%、1.0mol%或1.5mol%时，脂质纳米颗粒向LSEC的药物递送效率(LSEC靶向效率)可能是优异的。

[0080] 在本文中，脂质纳米颗粒对肝组织、肝细胞和/或LSEC的“靶向”和“定位”可以是组织或细胞中的内化，并且可能意味着细胞核内的内化，因为它可以穿透核膜。

[0081] 在另一方面，提供了用于药物递送的组合物，其包含(i)脂质纳米颗粒；和(ii)阴离子药物、核酸或其组合(阴离子药物和核酸的组合)。药物可以是阴离子药物、核酸或其组合(阴离子药物和核酸)。

[0082] 用于药物递送的组合物可以是可以将生物活性物质如阴离子药物和/或核酸等包封在脂质纳米颗粒内部的物质，并且可以稳定和高效地包封阴离子药物和/或核酸等的生物活性物质，从而可以通过用于递送的组合物显示出优异的治疗效果。此外，具有根据治疗目的不同地控制要包封在脂质纳米颗粒中的药物种类的优点。

[0083] 脂质纳米颗粒可具有包封在(脂质纳米颗粒)内部的阴离子药物和/或核酸。对于(在脂质纳米颗粒内部)包封阴离子药物和/或核酸的脂质纳米颗粒与上述脂质纳米颗粒相同。

[0084] 在一个实例中，脂质纳米颗粒中包含的可电离脂质与药物(阴离子药物、核酸或其组合)的重量比可为1-20:1、1-15:1、1-10:1、5-20:1、5-15:1、5-10:1、7.5-20:1、7.5-15:1或7.5-10:1。

[0085] 在一个实例中，当(i)可电离脂质；和(2)药物(阴离子药物、核酸或其组合)以上述范围内的重量比包含时，脂质纳米颗粒内的药物(阴离子药物、核酸或其组合)的包封率和/或药物递送效率可高于包含重量比在上述范围外的(1)可电离脂质；和(2)阴离子药物、核酸或其组合的脂质纳米颗粒。

[0086] 其中包封了阴离子药物和/或核酸的脂质纳米颗粒的平均直径可以为20nm-200nm、20-180nm、20nm-170nm、20nm-150nm、20nm-120nm、20nm-100nm、20nm-90nm、30nm-200nm、30-180nm、30nm-170nm、30nm-150nm、30nm-120nm、30nm-100nm、30nm-90nm、40nm-200nm、40-180nm、40nm-170nm、40nm-150nm、40nm-120nm、40nm-100nm、40nm-90nm、50nm-200nm、50-180nm、50nm-170nm、50nm-150nm、50nm-120nm、50nm-100nm、50nm-90nm、60nm-200nm、60-180nm、60nm-170nm、60nm-150nm、60nm-120nm、60nm-100nm、60nm-90nm、70nm-200nm、70-180nm、70nm-170nm、70nm-150nm、70nm-120nm、70nm-100nm、70nm-90nm、80nm-200nm、80-180nm、80nm-170nm、80nm-150nm、80nm-120nm、80nm-100nm、80nm-90nm、90nm-200nm、90-180nm、90nm-170nm、90nm-150nm、90nm-120nm或90nm-100nm，便于引入到肝组织、肝细胞和/或LSEC(肝窦内皮细胞)中。

[0087] 当脂质纳米颗粒的尺寸小于上述范围的下限时，(i)在脂质纳米颗粒的全身循环过程中，血液中存在的载脂蛋白(例如ApoE(例如ApoE3))的结合减少，因此，进入细胞的脂质纳米颗粒的数量可能会减少和/或(ii)脂质纳米颗粒的表面积过度增加，因此难以保持稳定性，从而导致靶组织(或靶细胞)的药物递送效率和/或脂质纳米颗粒携带的药物的治疗效果可能会降低。

[0088] 具有直径在上述范围内的脂质纳米颗粒比直径超过上述范围上限的脂质纳米颗粒对靶器官和/或细胞具有优异的药物递送效率。

[0089] 在一个实例中，包含(1)脂质纳米颗粒；(2)阴离子药物、核酸或其组合的用于药物递送的组合物可以是用于将药物递送至肝细胞的组合物。

[0090] 根据一个实例，包含在用于将药物(阴离子药物、核酸或其组合)递送至肝细胞的组合物中的脂质纳米颗粒的直径可以是40-120nm、30-100nm、35-95nm、40-90nm、45-90nm、50-90nm、55-85nm、60-80nm、70-90nm、70-80nm、50-70nm或60-70nm。在向肝细胞递送药物的过程中，从肝窦腔通向肝细胞的窗孔直径在哺乳动物中约为140nm，在人类中约为100nm，因此与直径在上述范围之外的脂质纳米颗粒相比，直径在上述范围内的药物递送组合物可具有优异的向肝细胞的药物递送效率。

[0091] 根据一个实例，包含在用于将药物递送至肝细胞的组合物中的脂质纳米颗粒可以包含量为0.1-15mol％、0.25-15mol％、0.5-15mol％、1-15mol％、1.5-15mol％、2-15mol％、2.5-15mol％、0.1-12.5mol％、0.25-12.5mol％、0.5-12.5mol％、1-12.5mol％、1.5-12.5mol％、2-12.5mol％、2.5-12.5mol％、0.1-10mol％、0.25-10mol％、0.5-10mol％、1-10mol％、1.5-10mol％、2-10mol％、2.5-10mol％、0.1-7.5mol％、0.25-7.5mol％、0.5-7.5mol％、1-7.5mol％、1.5-7.5mol％、2-7.5mol％、2.5-7.5mol％、0.1-5mol％、0.25-5mol％、0.5-5mol％、1-5mol％、1.5-5mol％、2-5mol％、2.5-5mol％、0.1-3mol％、0.25-3mol％、0.5-3mol％、1-3mol％、1.5-3mol％、2-3mol％、2.5-3mol％、0.1-2.5mol％、0.25-2.5mol％、0.5-2.5mol％、1-2.5mol％、1.5-2.5mol％、2-2.5mol％、0.1-4.5mol％、0.25-4.5mol％、0.5-4.5mol％、1-4.5mol％、1.5-4.5mol％、2-4.5mol％、2.5-4.5mol％、0.1-4mol％、0.25-4mol％、0.5-4mol％、1-4mol％、1.5-4mol％、2-4mol％、2.5-4mol％、0.1-3.5mol％、0.25-3.5mol％、0.5-3.5mol％、1-3.5mol％、1.5-3.5mol％、2-3.5mol％、2.5-3.5mol％、0.1-2.0mol％、0.1-1.5mol％、0.1-1.0mol％、0.5-2.0mol％、0.5-1.5mol％、0.5-1.0mol％、1.0-2.0mol％、1.0-1.5mol％、1.5-2.0mol％、1.0mol％或1.5mol％的脂质-

PEG结合物，且包含上述范围内的脂质-PEG结合物的脂质纳米颗粒可以具有对肝细胞(或靶向肝细胞)特异性的优异的药物递送效率。

[0092] 根据一个实例，包含在用于将药物递送至肝细胞的组合物中的脂质纳米颗粒可包含上述范围内或摩尔比为20-50:10-30:30-60:0.5-5，摩尔比为25-45:10-25:40-50:0.5-3，摩尔比为25-45:10-20:40-55:0.5-3，或摩尔比为25-45:10-20:40-55:1.0-1.5的可电离脂质:磷脂:胆固醇:脂质-PEG结合物。包含摩尔比在上述范围内的组分的脂质纳米颗粒可具有对肝细胞(或靶向肝细胞)特异性的优异的药物递送效率。

[0093] 在一个实例中，包含(1)脂质纳米颗粒；(2)阴离子药物、核酸或其组合的用于药物递送的组合物可以是用于将药物递送到LSEC中的组合物。

[0094] 当包含在用于将药物递送至LSEC的组合物中的脂质纳米颗粒的直径与窗孔的直径相似或略小时，药物递送至LSEC的效果可能优异。在一个实例中，包含在用于将药物递送至LSEC的组合物中的脂质纳米颗粒的直径可以是20-200nm、20-180nm、40-180nm、40-170nm、50-160nm、70-180nm、70-170nm、75-170nm、75-165nm、70-150nm、70-130nm、75-130nm、80-120nm、85-120nm、约90-120nm、90-110nm、80-110nm、80-100nm、85-95nm、约90nm或90nm。

[0095] 根据一个实例，包含在用于将药物递送至LSEC的组合物中的脂质纳米颗粒可以包含量为0.1-15mol％、0.25-15mol％、0.5-15mol％、1-15mol％、1.5-15mol％、2-15mol％、2.5-15mol％、0.1-12.5mol％、0.25-12.5mol％、0.5-12.5mol％、1-12.5mol％、1.5-12.5mol％、2-12.5mol％、2.5-12.5mol％、0.1-10mol％、0.25-10mol％、0.5-10mol％、1-10mol％、1.5-10mol％、2-10mol％、2.5-10mol％、0.1-7.5mol％、0.25-7.5mol％、0.5-7.5mol％、1-7.5mol％、1.5-7.5mol％、2-7.5mol％、2.5-7.5mol％、0.1-5mol％、0.25-5mol％、0.5-5mol％、1-5mol％、1.5-5mol％、2-5mol％、2.5-5mol％、0.1-3mol％、0.25-3mol％、0.5-3mol％、1-3mol％、1.5-3mol％、2-3mol％、2.5-3mol％、0.1-2.5mol％、0.25-2.5mol％、0.5-2.5mol％、1-2.5mol％、1.5-2.5mol％、2-2.5mol％、0.1-4.5mol％、0.25-4.5mol％、0.5-4.5mol％、1-4.5mol％、1.5-4.5mol％、2-4.5mol％、2.5-4.5mol％、0.1-4mol％、0.25-4mol％、0.5-4mol％、1-4mol％、1.5-4mol％、2-4mol％、2.5-4mol％、0.1-3.5mol％、0.25-3.5mol％、0.5-3.5mol％、1-3.5mol％、1.5-3.5mol％、2-3.5mol％、2.5-3.5mol％、0.1-2.0mol％、0.1-1.5mol％、0.1-1.0mol％、0.5-2.0mol％、0.5-1.5mol％、0.5-1.0mol％、1.0-2.0mol％、1.0-1.5mol％、1.5-2.0mol％、1.0mol％或1.5mol％的脂质-PEG结合物，且包含上述范围内的脂质-PEG结合物的脂质纳米颗粒可具有对LSEC(或靶向LSEC)特异性的优异的药物递送效率。

[0096] 根据一个实例，包含在用于将药物递送至LSEC的组合物中的脂质纳米颗粒可以包含上述范围内或摩尔比为20-50:10-30:30-60:0.5-5，摩尔比为25-45:10-25:40-50:0.5-3，摩尔比为25-45:10-20:40-55:0.5-3，或摩尔比为25-45:10-20:40-55:1.0-1.5的可电离脂质:磷脂:胆固醇:脂质-PEG结合物。包含摩尔比在上述范围内的组分的脂质纳米颗粒可具有对LSEC(或靶向LSEC)特异性的优异的药物递送效率。

[0097] 根据一个实例的脂质纳米颗粒可以通过肝组织特异性特性将治疗剂高效地递送到肝组织、肝细胞和/或LSEC中，并且可以有效地用于治疗肝病的药物、用于治疗的基因的递送方法，以及由肝脏介导的治疗剂，其介导这种高效的肝组织、肝细胞和/或LSEC特异性

脂质纳米颗粒。此外，根据一个实例的脂质纳米颗粒与核酸等基因药物形成稳定的复合物，且示出细胞毒性低和细胞吸收有效，因此可有效递送核酸等基因药物。

[0098] 脂质纳米颗粒与上述相同。

[0099] 根据一个实例的脂质纳米颗粒在酸性pH条件下通过示出5-8、5.5-7.5、6-7或6.5-7的pKa而表现出正电荷，并且可以通过与示出负电荷的治疗剂如核酸和阴离子药物(例如，蛋白质)的静电相互作用与药物形成复合物而高效地包封药物，并且它可以有效地用作药物的细胞内或体内药物递送的组合物(例如，核酸)。

[0100] 在本文中，“包封”是指将递送物质包封起来，有效地将其包围并嵌入体内，药物包封效率(包封率)是指脂质纳米颗粒中包封的药物的含量占用于制备的总药物的含量。

[0101] 用于递送的组合物的阴离子或核酸药物的包封率可以为70％或更高、75％或更高、80％或更高、85％或更高、90％或更高、91％或更高、92％或更高、94％或更高、超过80％至99％或更低、超过80％至97％或更低、超过80％至95％或更低、85％或更高至95％或更低、87％或更高至95％或更低、90％或更高至95％或更低、91％或更高至95％或更低、91％或更高至94％或更低、超过91％至95％或更低、92％或更高至99％或更低、92％或更高至97％或更低、或92％或更高至95％或更低。

[0102] 根据一个实例，包封率可以通过常用的方法计算，例如，药物包封率可以通过以下公式2计算，利用Triton-X处理根据一个实例的脂质纳米颗粒并在特定波长带宽(例如，激发:480～490nm，发射:520～530nm)下测量Triton-X处理和Triton-X未处理的脂质纳米颗粒的荧光强度。

[0103] (公式2)

[0104] 药物包封率(％)＝(Triton-X处理的脂质纳米颗粒的荧光强度(荧光)-Triton-X未处理的脂质纳米颗粒的荧光强度(荧光))/(Triton-X处理的脂质纳米颗粒的荧光强度(荧光))×100

[0105] 根据一个实例的用于药物递送的组合物可以包含具有高包封率的Cas9mRNA。先前已知的用于递送Cas9 mRNA的组合物在将其用作用于递送Cas9mRNA的组合物方面具有局限性，因为它包含低比例的Cas9 mRNA。另一方面，根据一个实例的脂质纳米颗粒可以包含具有高包封率，具体地，包封率为70％或更高的Cas9 mRNA，因此其可以有效地用于基因编辑治疗。

[0106] 阴离子药物可以是阴离子生物聚合物-药物结合物，例如具有阴离子的各种肽、蛋白质药物、蛋白质-核酸结构或透明质酸-肽结合物、透明质酸-蛋白质结合物等。蛋白质药物的非限制性实例可以是细胞凋亡诱导因子(例如细胞色素C、caspase3/7/8/9等)，包括基因编辑蛋白例如Cas 9、cpf1(它们是基因编辑剪刀)，以及各种细胞内蛋白质(例如转录因子)等。

[0107] 核酸可以是选自由小干扰RNA(siRNA)、核糖体核糖核酸(rRNA)、核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、互补脱氧核糖核酸(cDNA)、适配体、信使核糖核酸(mRNA)、转移核糖核酸(tRNA)、反义寡核苷酸、shRNA、miRNA、核酶、PNA、DNA核酶(DNAzyme)和用于基因编辑的sgRNA等组成的组中的一种或多种，但不限于此。

[0108] 在本文中，术语“siRNA”是指可通过切割特定mRNA来诱导RNAi(RNA干扰)的双链RNA(双链RNA)，或具有在单链RNA内部的双链形式的单链RNA。它由具有与靶基因的mRNA同

源的序列的有义RNA链和具有与其互补的序列的反义RNA链组成。由于siRNA可以抑制靶基因的表达,因此可以通过有效的基因敲除方法或基因治疗方法提供。双链之间的结合是通过核苷酸之间的氢键结合来实现的,并不是双链内的所有核苷酸都必须是互补的、完全结合的。

[0109] siRNA的长度可为约15-60,具体地约15-50、约15-40、约15-30、约15-25、约16-25、约19-25、约20-25或约20-23个核苷酸。siRNA的长度是指双链RNA的一侧的核苷酸数量,即碱基对的数量,在单链RNA的情况下,则是指单链RNA内部的双链长度。此外,siRNA可以由引入各种官能团以增加血液稳定性或减弱免疫应答等的核苷酸组成。

[0110] 在本文中,术语"反义寡核苷酸"可以在一个或多个碱基、糖或骨架的位置进行修饰以增强功效(De Mesmaeker等,Curr Opin Struct Biol.,5(3):343-55,1995)。寡核苷酸骨架可以通过硫代磷酸酯、磷酸三酯、甲基膦酸酯、短链烷基、环烷基、短链杂原子、杂环糖间结合等修饰。此外,反义寡核苷酸可以包含一个或多个取代的糖部分。反义寡核苷酸可以包含修饰的碱基。修饰的碱基包括次黄嘌呤、6-甲基腺嘌呤、5-甲基嘧啶(特别是5-甲基胞嘧啶)、5-羟甲基胞嘧啶(HMC)、糖基HMC、龙胆二糖基HMC、2-氨基腺嘌呤、2-硫尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羟甲基尿嘧啶、8-氮鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、N6(6-氨基己基)腺嘌呤、2,6-二氨基嘌呤等。

[0111] 在本文中,"单链脱氧核糖核酸(ssDNA)"是指选择性结合特定靶DNA并诱导反基因效应的单链寡核苷酸。

[0112] 在本文中,"适配体"是指与特定靶标结合的寡核苷酸(通常为20～80nt DNA或RNA)。优选地,在本文中,"适配体"是指寡核苷酸适配体(例如,DNA或RNA适配体)。

[0113] 在本文中,"mRNA"是指能够表达基因的合成mRNA(体外转录的mRNA)。

[0114] 在本文中,"shRNA"是指单链50-70个核苷酸,在体内形成茎环(茎环)结构。在5-10个核苷酸的环的两侧,互补地,19-29个核苷酸的长RNA碱基配对形成双链茎。

[0115] 在本文中,"miRNA(微小RNA)"是指控制基因表达的单链RNA分子,由全长21-23个核苷酸组成。miRNA是一种在细胞中不表达的寡核苷酸,具有短的茎环结构。miRNA与一种或两种或更多种mRNA(信使RNA)具有完全或部分同源性,通过与mRNA的互补结合抑制靶基因表达。

[0116] 在本文中,"核酶"是RNA的一种,是识别特定RNA的核苷酸序列并具有与自身切割的酶相同功能的RNA。核酶是目标信使RNA链的互补核苷酸序列,由一个特异性结合的区域和一个切割目标RNA的区域组成。

[0117] 在本文中,"DNA核酶(DNAzyme)"是具有酶活性的单链DNA分子,由10-23个核苷酸组成的DNA核酶(10-23DNA核酶)在生理上相似的条件下在特定位置切割RNA链。10-23DNA核酶在没有碱基配对的情况下在任何暴露的嘌呤和嘧啶之间进行切割。10-23DNA核酶由15个保守核苷酸序列(例如5'-GGCTAGCTACAACGA-3')组成的酶活性位点(催化域)和由7～8个DNA核苷酸序列组成的可识别上述酶活性域左右两侧的RNA底物的RNA底物结合域组成。

[0118] 在本文中,"PNA(肽核酸)"是具有核酸和蛋白质的所有特性的分子,是指能够与DNA或RNA互补结合的分子。PNA于1999年首次报道为类似DNA,其中核碱基通过肽键连接(文件[Nielsen PE、Egholm M、Berg RH、Buchardt O,"用胸腺嘧啶取代的聚酰胺通过链置换对DNA进行序列选择性识别(Sequence-selective recognition of DNA by strand

displacement with a thymine-substituted polyamide)",Science 1991,Vol.254:pp1497-1500])。PNA在自然界中没有发现,是通过化学方法人工合成的。PNA引起与互补核苷酸序列的天然核酸的杂交反应以形成双链。PNA/DNA双链比相同长度的DNA/DNA双链更稳定。作为肽的骨架,最常用的是通过酰胺键重复连接的N-(2-氨基乙基)甘氨酸,在这种情况下,肽核酸的骨架是电中性的,不同于天然核酸的骨架。PNA中存在的4种核苷酸具有与天然核酸几乎相同的空间大小和核苷酸之间的距离。PNA不仅在化学上比天然核酸更稳定,而且在生物学上也很稳定,因为它不会被核酸酶或蛋白酶降解。

[0119] 在本文中,"sgRNA"是与特定DNA靶标结合的寡核苷酸(通常为RNA分子),是指crispr RNA(crRNA)和示踪剂(tracrRNA)的复杂单个RNA分子。它是一种用于在CRISPR系统中用Cas9核酸酶识别特定DNA序列并实现选择性基因切割的RNA分子,大约包含20-nt的能够与DNA互补结合的序列,总长度为100nt。

[0120] 在本文中,"基因编辑蛋白"是指Cas9、spCas9、cjCas9、casX、CasY和Cpf1等,是指用sgRNA识别靶DNA核苷酸序列引起DNA切割的蛋白质。

[0121] 根据一个实例,通过脂质纳米颗粒递送药物和/或核酸的靶细胞可以是体内或体内分离的肝细胞和/或LSEC。根据一个实例,用于药物递送的组合物和/或药物(阴离子药物、核酸或其组合)与脂质纳米颗粒的复合物可以靶向或特异性靶向肝细胞和/或LSEC。因此,根据一个实例的包含脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒或用于药物或核酸递送的组合物可用于治疗急性或慢性肝病,例如肝纤维化、肝硬化、肝炎(例如甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎等),此外,它还可以用作递送通过肝脏吸收的治疗剂(药物)的组合物。

[0122] 另一方面提供了一种用于预防或治疗肝脏疾病的药物组合物,包含(1)脂质纳米颗粒;和(2)阴离子药物、核酸或其组合。

[0123] 用于预防或治疗肝脏疾病的药物组合物中包含的脂质纳米颗粒与前述用于药物递送的组合物中包含的脂质纳米颗粒相同。

[0124] 用于预防或治疗肝脏疾病的药物组合物中包含的阴离子药物和核酸与前述用于药物递送的组合物中包含的阴离子药物和核酸相同。

[0125] 根据一个实例的用于预防或治疗肝脏疾病的药物组合物可包含脂质纳米颗粒,其中包封了阴离子药物和/或核酸。

[0126] 肝脏疾病可以是选自由ATTR淀粉样变性、高胆固醇血症、乙型肝炎病毒感染、急性肝衰竭、肝硬化和肝纤维化组成的组中的一种或多种。

[0127] 阴离子药物可具有预防或治疗肝脏疾病的作用。

[0128] 所述核酸可以具有预防或治疗肝脏疾病的作用,例如可以是siRNA和/或miRNA,其可以抑制表达如(1)TTR(甲状腺素蛋白)((例如,人TTR(蛋白质:GenBank登录号NP_000362.1;基因:GenBank登录号NM_000371.4等),小鼠TTR(蛋白质:GenBank登录号NP_038725.1;基因:GenBank登录号NM_013697.5等)),(2)PCSK9(前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/可欣9型)(例如,人PCSK9(蛋白质:GenBank登录号NP_777596.2;基因:GenBank登录号NM_174936.4等),小鼠PCSK9(蛋白质:GenBank登录号NP_705793.1;基因:GenBank登录号NM_153565.2等)),(3)HBV(乙型肝炎病毒)(例如,HBV基因型A(例如,GenBank登录号:X02763、X51970或AF090842));HBV基因型B(例如,GenBank登录号:D00329、AF100309或AB033554);HBV基因型C(例如,GenBank登录号:X04615、M12906、AB014381、AB042285、

AB042284、AB042283、AB042282、AB026815、AB026814、AB026813、AB026812或AB026811)；HBV基因型D(例如，GenBank登录号：X65259、M32138或X85254)；HBV基因型E(例如，GenBank登录号：X75657或AB032431)；HBV基因型F(例如，GenBank登录号：X69798、AB036910或AF223965)；HBV基因型G(例如，GenBank登录号：AF160501、AB064310或AF405706)HBV基因型H(例如，AY090454、AY090457或AY090460)(4)Bax(BCL2相关的基因库蛋白)(例如，人Bax(蛋白质：GenBank登录号NP_001278357.1、NP_001278358.1、NP_001278359.1、NP_001278360.1、NP_004315.1；基因：GenBank登录号NM_001291428.2、NM_001291429.2、NM_001291430.1、NM_001291431.2、NM_004324.4等)，小鼠Bax(蛋白质：GenBank登录号NP_031553.1；基因：GenBank登录号NM_007527.3等)，(5)VEGF(血管内皮生长因子)(例如，VEGFA((例如，人VEGFA(蛋白质：GenBank登录号NP_001020537.2、NP_001020538.2、NP_001020539.2、NP_001020540.2、NP_001020541.2；基因：GenBank登录号NM_003376.6、NM_001025366.3、NM_001025367.3、NM_001025368.3、NM_001025369.3等)，小鼠VEGFA(蛋白质：GenBank登录号NP_001020421.2、NP_001020428.2、NP_001103736.1、NP_001103737.1、NP_001103738.1；基因：GenBank登录号NM_001025250.3、NM_001025257.3、NM_001110266.1、NM_001110267.1、NM_001110268.1等)；VEGFB(例如，人类VEGFB(蛋白质：GenBank登录号NP_001230662.1、NP_003368.1；基因：GenBank登录号NM_003377.5、NM_001243733.2等)，小鼠VEGFB(蛋白质：GenBank登录号NP_001172093.1、NP_035827.1；基因：GenBank登录号NM_001185164.1、NM_011697.3等)；VEGFC(例如，人VEGFC(蛋白质：GenBank登录号NP_005420.1；基因：GenBank登录号NM_005429.5等)，小鼠VEGFC(蛋白质：GenBank登录号NP_033532.1；基因：GenBank登录号NM_009506.2等))，和/或(6)PDGF(血小板衍生生长因子)(例如，PDGFA((例如，人PDGFA(蛋白质：GenBank登录号NP_002598.4、NP_148983.1；基因：GenBank登录号NM_002607.5、NM_033023.4等)，小鼠PDGFA(蛋白质：GenBank登录号NP_032834.1、NP_001350200.1；基因：GenBank登录号NM_008808.4、NM_001363271.1等))；PDGFB((例如，人PDGFB(蛋白质：GenBank登录号NP_002599.1、NP_148937.1；基因：GenBank登录号NM_033016.3、NM_002608.4等)，小鼠PDGFB(蛋白质：GenBank登录号NP_035187.2；基因：GenBank登录号NM_011057.4等))；PDGFC(例如，人PDGFC(蛋白质：GenBank登录号NP_057289.1；基因：GenBank登录号NM_016205.3等)，小鼠PDGFC(蛋白质：GenBank登录号NP_064355.1、NP_001344675.1；基因：GenBank登录号NM_019971.3、NM_001357746.1等)；PDGFD(例如，人PDGFD(蛋白质：GenBank登录号NP_079484.1、NP_149126.1；基因：GenBank登录号NM_033135.4、NM_025208.5等)，小鼠PDGFD(蛋白质：GenBank登录号NP_082200.1、NP_001344326.1、NP_001344327.1；基因：GenBank登录号NM_027924.3、NM_001357397.1、NM_001357398.1等))。

[0129] 药物组合物可以通过多种途径给药，包括对哺乳动物(包括人)的肠胃外给药，肠胃外给药可以静脉内、皮下、腹膜内或局部给药，剂量根据患者的病症和体重、疾病程度、药物形式、给药途径和时间而不同，但可以由本领域技术人员适当地选择。

[0130] 当配制根据一个实例的药物组合物时，它通过使用例如填充剂、增量剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、表面活性剂等常用的稀释剂或赋形剂来制备。

[0131] 肠胃外给药制剂包括无菌水溶液、非水溶剂、悬浮溶剂、乳剂、冻干制剂、栓剂等。

[0132] 作为非水溶剂和悬浮溶剂，可以使用丙二醇、聚乙二醇、橄榄油等植物油、油酸乙

酯等注射用酯等。作为栓剂的基质化合物，有合成脂肪酸酯(witepsol)、聚乙二醇、吐温61、可可脂、月桂脂、甘油、明胶等。

[0133] 根据一个实例的药物组合物以药学有效剂量给药。在本文中，“药物有效剂量”是指在适用于医学治疗的合理获益/风险比下足以治疗疾病的量，有效剂量水平可根据包括患者的疾病类型、严重程度、药物活性、药物敏感性、给药时间、给药途径和排泄率、治疗周期和伴随药物，以及其他医学领域众所周知的因素等因素确定。根据一个实例的药物组合物可以作为单独的治疗剂给药或可以与其他治疗剂组合给药，并且可以与常规治疗剂依次或同时给药，并且可以单独或多次给药。考虑到上述所有因素，重要的是给予能够以最小量获得最大效果且没有副作用的量，并且这可以由本领域技术人员容易地确定。

[0134] 具体地，根据本发明化合物的有效剂量可根据患者的年龄、性别和体重而变化，可以每天给药或隔日给药，或每天分1至3次给药。然而，它可以根据给药途径、肥胖的严重程度、性别、体重、年龄等增加或减少，因此，上述剂量不以任何方式限制本发明的范围。

[0135] 在一个具体实例中，基于包含在药物组合物中的药物(阴离子药物、核酸或组合)的浓度，药物组合物可以0.1-100mg/kg、0.1-50mg/kg、1-10mg/kg或1-5mg/kg的剂量给药。

[0136] 另一方面提供了一种用于预防或治疗肝脏疾病的方法，其包括给药组合物(例如，用于预防或治疗肝脏疾病的药物组合物)，该组合物包含(1)脂质纳米颗粒；和(2)阴离子药物、核酸或其组合。脂质纳米颗粒、阴离子药物、核酸、药物组合物和肝脏疾病与上述相同。

[0137] 根据一个实例，用于预防或治疗肝脏疾病的方法还可以包括在给药组合物之前确认(选择)需要预防和/或治疗肝脏疾病的患者。

[0138] 应用治疗方法的受试者是指包括小鼠、家畜等的哺乳动物，包括患有或可能患有肝脏疾病的人，但不限于此。包含根据一个实例的脂质纳米颗粒的药物组合物可以有效地将阴离子药物和/或核酸递送至肝脏，从而可以有效地治疗受试者。

[0139] 根据一个实例，提供一种用于预防或治疗肝脏疾病的方法，包括向患者给药药学有效剂量的组合物(例如，用于预防或治疗肝脏疾病的药物组合物)，该组合物包含(1)脂质纳米颗粒；和(2)阴离子药物、核酸或其组合。药学有效剂量与上述相同，并且在正确的医学判断范围内，可根据治疗确定合适的每日总用量，可一次给药或分数次给药。然而，对特定患者的特定治疗有效剂量将根据各种因素以不同方式应用，包括特定组合物、患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食、给药时间、给药途径和组合物的排泄率、治疗周期，以及与特定组合物一起或同时使用的药物，除此之外还有要达到的反应的类型和程度，以及是否使用其他药剂，如有必要，以及制药领域众所周知的类似因素。

[0140] [有益效果]

[0141] 根据一个实例，该脂质纳米颗粒具有肝脏组织特异性，具有优异的生物相容性，可以高效递送基因治疗剂，因此可有效地用于如脂质纳米颗粒介导的基因治疗等相关技术领域。

附图说明

[0142] 图1a示出了根据一个实例的脂质纳米颗粒的示例性结构，图1b示出了通过Cryo-TEM观察的根据一个实例的纳米颗粒的图像。

[0143] 图2示出了246-C10在$CDCl_3$中的^1H NMR(室温，400MHz)结果。

[0144] 图3a(241-C10 LNP至243-C10 LNP)和图3b(244-C10 LNP至246-C10 LNP)示出了在pH 4.1至pH 9.6范围的溶液中测量每个脂质纳米颗粒显示的荧光强度的结果。

[0145] 图4a和图4b示出了每个纳米颗粒的细胞内基因递送效率的结果。具体地,图4a示出了将包封编码荧光素酶的mRNA(luc mRNA)的LNP转化到HeLa细胞并将细胞溶解后测得的发光强度,且图4b示出了将包封luc mRNA的LNP转化到肝细胞并将细胞溶解后测得的发光强度。在图4b中,+ApoE指的是ApoE3处理的组,-ApoE指的是ApoE3未处理的组。

[0146] 图5a示出了小鼠体内药物递送分布,向该小鼠给药了包封有Luc mRNA的244-C10 LNP至246-C10 LNP。图5b示出了从小鼠身上取出的小鼠的每个器官的药物递送分布,向该小鼠给药了包封有Luc mRNA的246-C10 LNP。

[0147] 图6示出了脂质纳米颗粒的药物递送效率和纳米颗粒的大小,这取决于小鼠中脂质纳米颗粒中包含的脂质-PEG的含量,向该小鼠给药了1.0-2.5mol%的量的包含脂质-PEG的246-C10 LNP。

[0148] 图7示出了通过FVII的表达,根据包封在脂质纳米颗粒中的siFVII的给药浓度来确认肝细胞靶向可能性的结果。

[0149] 图8示出了根据脂质纳米颗粒中包含的脂质-PEG的含量的脂质纳米颗粒的尺寸和脂质纳米颗粒的PDI值(左表),并示出了通过FVII的表达确认了体内药物递送至肝细胞的效率的结果(右图)。

[0150] 图9示出了根据脂质纳米颗粒中包含的脂质-PEG的含量的脂质纳米颗粒的尺寸和脂质纳米颗粒的PDI值(左表),并示出了通过FVII的表达确认了体内药物递送至LSEC的效率的结果(右图)。

[0151] 图10示出了包含神经酰胺-PEG或DSPE-PEG的脂质纳米颗粒的细胞内siRNA递送效率的测量结果。

具体实施方式

[0152] 本发明将通过以下实施例更详细地描述,但本发明的范围不旨在受以下实施例的限制。

[0153] 在下文中,本发明将通过实施例更详细地描述。这些实施例仅用于更详细地描述本发明,对于本领域技术人员来说显而易见的是,根据本发明的要旨,本发明的范围不受这些实施例的限制。

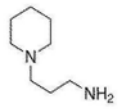
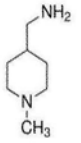
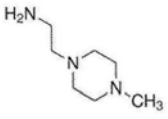
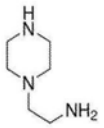
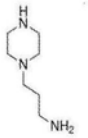
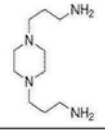
[0154] 实施例1.可电离脂质的制备

[0155] 实施例1-1.可电离脂质的制备

[0156] 可电离脂质是通过使以下表1中包含的6元杂环叔胺的胺类化合物与1,2-环氧化癸烷(在下文中,C10)(Sigma-Aldrich,USA)以1:n(n=伯胺×2+仲胺×1)的摩尔比反应合成的。

[0157] [表1]

[0158]

名称	结构式
241	
242	
243	
244	
245	
246	

[0159] 具体而言,将表1的241-246胺中的每一种与环氧化物(C10)以1:n(n＝伯胺×2+仲胺×1)的摩尔比添加到具有磁棒的5ml小瓶中,于750rpm、90℃下搅拌反应3天。然后,用WELUX细硅胶柱(Intertec,Korea)纯化后,计算反应产生的每种可电离脂质的分子量,并使用乙醇以100mg/ml的浓度储存。使用241胺和C10产生的可电离脂质命名为‘241-C10’,使用其他种类胺产生的可电离脂质以相同方式命名为‘使用的胺名称(241-246)-C10’。

[0160] 实施例1-2.确认产生的可电离脂质

[0161] 为了确认实施例1-1中产生的可电离脂质,进行了1H NMR。具体而言,将5μg实施例1-1中合成的可电离脂质(246-C10)通过在0.5ml $CDCl_3$(sigma,USA)中稀释至100mmole浓度来制备。然后取每个0.5ml放入400MHz核磁共振管中封顶,再用石蜡膜封口,使用Agilent 400MHZ FT-NMR(Agilent,USA)得到核磁共振谱,结果如图2所示。从图2中可以看出,代表246-C10的每个官能团的信号已经饱和。

[0162] 此外,为了确认实施例1-1中制备的可电离脂质(241-C10至246-C10),进行了MS分析。具体而言,将可电离脂质以0.5ppm或以下的浓度在乙醇中稀释并进行MS分析。分析所用设备为安捷伦科技(Palo Alto,USA)的6230LC/MS,分离管采用安捷伦科技的Zorbax SB-C18(100mm×2.1mm内径,3.5μm),采用含有0.1%甲酸的蒸馏水(A)和乙腈(B)两种溶剂进行梯度洗脱。流动相的溶剂梯度保持4分钟,直到有机溶剂乙腈(B)的比例从30%开始增加到80%,持续2分钟,然后有机溶剂的比例再次降低到30%并保持稳定。流动相流速为300μl/

min,且分析仪进样量为2μl。进行MS分析的结果示于下表2中。如表2所示,可以确认可电离脂质的测量m/z比和计算m/z比几乎相同。

[0163] [表2]

[0164]

	化学式	计算的m/z比	观察的m/z比
241-C10	$C_{32}H_{66}N_2O_2$	510.87864	511.5201
242-C10	$C_{31}H_{64}N_2O_2$	496.85206	497.5043
243-C10	$C_{31}H_{65}N_3O_2$	511.8667	513.5186
244-C10	$C_{42}H_{87}N_3O_3$	682.15848	682.6821
245-C10	$C_{43}H_{89}N_3O_3$	696.18506	696.7045
246-C10	$C_{58}H_{120}N_4O_4$	937.5978	937.9383

[0165] 从结果可以证实,实施例1-1中的可电离脂质制备良好。

[0166] 实施例2.脂质纳米颗粒的制备

[0167] 实施例2-1.脂质纳米颗粒的制备

[0168] 将实施例1-1中制备的可电离脂质(241-C10至246-C10)、胆固醇(胆固醇粉末,BioReagent,适用于细胞培养,≥99%,sigma,Korea)、磷脂(DSPC)(Avanti,US)和脂质-PEG结合物(神经酰胺-PEG结合物;C16 PEG2000神经酰胺,Avanti,US)以42.5:13:43:1.5的摩尔比溶解在乙醇中。

[0169] 将溶解了可电离脂质、胆固醇、磷脂和脂质-PEG的乙醇和醋酸盐缓冲液以1:3的体积比、于微流体混合装置(Benchtop Nanoassemblr;PNI,Canada)中以12ml/min的流速进行混合,从而制备脂质纳米颗粒(LNP)。

[0170] 实施例2-2.核酸包封脂质纳米颗粒的制备

[0171] 将实施例1-1中制备的可电离脂质(241-C10至246-C10)、胆固醇(胆固醇粉末,BioReagent,适用于细胞培养,≥99%,sigma,Korea)、磷脂(DSPC或DOPE)(18:0PC(DSPC)、18:1(△9-Cis)PE(DOPE),Avanti,US)和脂质-PEG结合物(神经酰胺-PEG结合物;C16 PEG2000神经酰胺,Avanti,US)溶解在乙醇中。将RNA治疗剂30μg mRNA(荧光素酶mRNA;SEQ ID NO:1)于0.75ml柠檬酸钠中稀释,或30μg siRNA(siFVII:SEQ ID NO:2和3以相同摩尔比混合,或siFVIII:SEQ ID NO:4至11以相同摩尔比混合,或siLuc:SEQ ID NO:12和13以相同摩尔比混合)于0.75ml醋酸钠(50mM)中稀释以制备水相。

[0172] 使用的siRNA序列如下:SEQ ID NO:2(FVII靶向siRNA_有义;5'-GGAUCAUCUCAAGUCUUACdtdt-3')、SEQ ID NO:3(FVII靶向siRNA_反义;5'-GUAAGACUUGAGAUGAUCCdtdt-3')、SEQ ID NO:4(FVIII靶向siRNA_有义_1;5'CUUAUAUCGUGGAGAAUUAdtdt-3')SEQ ID NO:5(FVIII靶向siRNA_反义_1;5'-UAAUUCUCCACGAUAUAAGdtdt-3')、SEQ ID NO:6(FVIII靶向siRNA_有义_2;5'-UCAAAGGAUUCGAUGGUAUdtdt-3')、SEQ ID NO:7(FVIII靶向siRNA_反义_2;5'-AUACCAUCGAAUCCUUUGAdtdt-3')、SEQ ID NO:8(FVIII靶向siRNA_有义_3;5'-CAAGAGCACUAGUGAUUAUdtdt-3')、SEQ ID NO:9(FVIII靶向siRNA_反义_3;5'-AUAAUCACUAGUGCUCUUGdtdt-3')、SEQ ID NO:10(FVIII靶向siRNA_有义_4;5'-GGGCACCACUCCUGAAAUAdtdt-3')、SEQ ID NO:11(FVIII靶向siRNA_反义_4;5'-UAUUUCAGGAGUGGUGCCCdtdt-3')、SEQ ID NO:12(siLuc_有义;5'-

AACGCUGGGCGUUAAUCAAdtdt-3')、SEQ ID NO:13(siLuc_反义;5'-UUGAUUAACGCCCAGCGUUdtdt-3')。

[0173] 水相(醋酸钠或柠檬酸钠)中溶解了可电离脂质、胆固醇、磷脂和脂质-PEG结合物(以下称为脂质-PEG)的有机相(乙醇)和溶解的RNA治疗剂(核酸)通过微流体混合装置(Benchtop Nanoassemblr;PNI,Canada)以12ml/min的流率进行混合,以制备其中包封有核酸的脂质纳米颗粒(LNP)。(i)为了制备其中包封有mRNA的脂质纳米颗粒,将可电离脂质:磷脂(DOPE):胆固醇:脂质-PEG(C16-PEG2000神经酰胺)以26.5:20:52.5-51:1.0-2.5的摩尔比溶解在乙醇中(调整胆固醇和脂质-PEG的含量,使摩尔比之和为100),将有机相和水相混合,使mRNA(荧光素酶mRNA;SEQ ID NO:1):可电离脂质的重量比为1:10,从而制备脂质纳米颗粒。(ii)为了制备其中包封有siRNA的脂质纳米颗粒,将可电离脂质:磷脂(DSPC):胆固醇:脂质-PEG(C16-PEG2000神经酰胺)以42.5:13:44-39.5:0.5-5.0的摩尔比溶解在乙醇中(调整胆固醇和脂质-PEG的含量,使摩尔比之和为100),将有机相和水相混合,使siRNA(siFVII;SEQ ID NO:2和3以相同摩尔比混合,或siFVIII;SEQ ID NO:4至11以相同摩尔比混合,或siLuc:SEQ ID NO:12和13以相同摩尔比混合):可电离脂质的重量比为1:7.5,从而制备脂质纳米颗粒(LNP)。

[0174] 使用3500MWCO透析盒将制备的LNP对PBS透析16小时,以去除乙醇并调节身体pH值和纳米颗粒的pH值。

[0175] 包含可电离脂质'241-C10'的脂质纳米颗粒被命名为'241-C10 LNP',使用包含胺的可电离脂质(包括包封核酸的脂质纳米颗粒)制备的脂质纳米颗粒被命名为'含胺(214-246)-C10 LNP'。

[0176] 实施例2-3.包封核酸的脂质纳米颗粒的观察

[0177] 通过使用如实施例2-2的神经酰胺-PEG结合物(C16-PEG2000神经酰胺)制备其中包封有siLuc(SEQ ID NO:12和13)的脂质纳米颗粒。将制备的脂质纳米颗粒(包含1.5mol%的神经酰胺-PEG结合物)以60μg的量(基于siRNA浓度)负载在200目碳蕾丝膜Cu网格上,浸入用vitrobot液化的乙烷(约-170℃或更低)并进行速冻制备,然后用Cryo-TEM(TecnaiF20,FEI)观察,结果如图1b所示。如图1b所示,观察到具有实心形状的球形颗粒。

[0178] 实施例3.脂质纳米颗粒的pKa

[0179] 在本实施例中,实施例2-1中配制的每种脂质纳米颗粒(LNP)的pKa是通过体外TNS测定计算的。阴离子TNS通过与带正电荷的可电离脂质相互作用而变得亲脂,随着pH值接近每种LNP的pKa值,TNS的亲脂性变低,更多的水分子淬灭TNS荧光,因此,具有pKa为6.0-7.0的脂质纳米颗粒具有优异的体内药物递送效率,并且脂质纳米颗粒在图中示出的"s型曲线"代表根据pH的荧光,这意味着它们易于与内体膜相互作用并可以在酸化过程中轻松逃离内体。

[0180] 具体地,将包含20mM磷酸钠、25mM柠檬酸盐、20mM乙酸铵和150mM NaCl的溶液的pH用0.1N NaOH和/或0.1N HCl以0.5的间隔从pH 4.1至pH9.6制备各种pH单位的溶液。将100μl的具有每种pH值(pH以0.5的间隔从pH 4.1至pH 9.6)的每种溶液添加到黑色96孔板中,然后使用300μM的TNS储备溶液将每种溶液加入到具有所述范围内的pH值的溶液中从而具有6μM的最终浓度。将241-C10 LNP至246-C10 LNP加入混合溶液中,使终浓度为20μM。通过Tecan设备通过325nm激发和435nm发射测量荧光强度,每个脂质纳米颗粒的荧光强度示于

图3a和图3b中，在pH值达到最大荧光一半时计算每种脂质纳米颗粒的pKa，并示于下表3中。如图3b所示，可以看出244-C10LNP到246-C10 LNP通过非线性回归表现出荧光滴定S形曲线。

[0181] [表3]

[0182]

脂质纳米颗粒	pKa
241-C10LNP	7.7
242-C10LNP	8.7
243-C10LNP	8.2
244-C10LNP	6.8
245-C10LNP	6.9
246-C10LNP	7

[0183] 如表3所证实，证实了根据一种实施例的脂质纳米颗粒显示出pKa 6.0-7.0范围，其中体内安全性和药物释放优异。

[0184] 通过如实施例2-2的方法制备的包封有核酸的LNP也根据所含的可电离脂质的类型(可电离脂质中所含胺的类型)示出了相同的模式。

[0185] 实施例4.脂质纳米颗粒特征的确认

[0186] 实施例4-1.粒度测量

[0187] 在本实施例中，测量实施例2-2中测量的其中包封有mRNA的脂质纳米颗粒(LNP;包含1.5mol％的脂质-PEG)的尺寸。使用PBS稀释，使实施例2-2制备的每种脂质纳米颗粒中包含的RNA(荧光素酶mRNA;SEQ ID NO:1)的浓度为1μg/ml，使用动态光散射(DLS)在Malvern Zetasizer Nano(Malvern Instruments,UK)中测量了LNP的直径和多分散指数(PDI)，结果在下表4中描述。

[0188] [表4]

[0189]

脂质纳米颗粒	直径(nm)	PDI
241-C10LNP	128	0.259
242-C10LNP	77	0.210
243-C10LNP	56	0.225
244-C10LNP	66	0.149
245-C10LNP	70	0.210
246-C10LNP	68	0.143

[0190] 由表4证实，根据一种实施例的脂质纳米颗粒示出了易于导入肝细胞且具有优异的药物释放的粒度，还发现其PDI值小且颗粒均匀，顺序为241-C10LNP>243-C10 LNP>242-C10 LNP＝245-C10 LNP>244-C10 LNP>246-C10 LNP。

[0191] 实施例4-2.包封率的测量

[0192] 通过Ribogreen分析(Quant-iT™RiboGreen®RNA,Invitrogen)测量其中将siRNA(siFVII siRNA)包封为核酸药物的每种LNP(包含1.5mol％的脂质-PEG)的包封率(药物包封率，％)。将实施例2-2制备的包封有核酸药物的LNP在96孔板中用50μl 1×TE缓冲液稀释，使siRNA的终浓度为4-7μg/ml。向Triton-X(Triton-x LNP(-))未处理组中加入50μl

1xTE缓冲液,向Triton-X(Triton-x LNP(+))处理组中加入50μl 2%的Triton-X缓冲液。于37℃孵育10分钟,通过用Triton-X降解LNP包封的核酸被释放出来。然后,每孔加入Ribogreen试剂100μl。通过Infinite® 200PRO NanoQuant(Tecan)中的波长带宽(激发:485nm,发射:528nm)测量了Triton LNP(-)和Triton LNP(+)的荧光强度(FL),并采用以下公式3计算药物包封率(包封率,%)。作为重复测量两次的结果的平均值的每种LNP的药物包封率(%)示于下表5中。

[0193] (公式3)

[0194] 药物包封率(%)=(Triton LNP(+)的荧光强度-Triton LNP(-)的荧光强度)/(Triton LNP(+)的荧光强度)×100

[0195] [表5]

[0196]

脂质纳米颗粒	包封率(%)
241-C10LNP	84
242-C10LNP	83
243-C10LNP	91
244-C10LNP	87
245-C10LNP	91
246-C10LNP	94

[0197] 如表5所证实,证实了根据一种实施例的脂质纳米颗粒可以高效地包封药物。

[0198] 实施例5.使用脂质纳米颗粒确认细胞内核酸递送

[0199] 实施例5-1.根据LNP中包含的可电离脂质的类型的核酸递送效果

[0200] 在根据一种实施例的LNP转染至细胞前1天,将HeLa细胞(Korea Cell Line Bank)以0.01×10^6个细胞/孔等分于白板(96孔)中,于DMEM培养基(SH30022,Hyclone,USA)中37℃、0.5～3%CO_2条件下培养。在搅拌其中编码荧光素酶基因的mRNA(lucmRNA;SEQ ID NO:1)的LNP(241-C10 LNP至246-C10 LNP,包含1.5mol%的脂质-PEG)与通过移液的0.1μg/ml ApoE3后,在室温下孵育10分钟,使它们在HeLa细胞中被处理(100ng/孔,基于脂质纳米颗粒中包含的mRNA)。ApoE3与LNP表面结合,并通过细胞表面表达的LDL受体通过内吞作用使LNP进入细胞。

[0201] 每种处理100μl/孔Bright-Glo™荧光素梅测定溶液(promega,USA)并在室温下放置10分钟后24小时,使用Infinite M200发光测量设备(Tecan,USA)测量溶解细胞的发光强度,结果如图4a所示。如图4a所示,pKa范围为6.0～7.0的244-C10 LNP、245-C10 LNP和246-C10 LNP表现出较强的发光强度,其中246-C10 LNP的发光强度最高,由此可见246-C10 LNP具有最高的细胞内药物递送效率。

[0202] 实施例5-2.确认肝细胞中的核酸递送

[0203] 通过使用实施例2-2中制备的246-C10脂质纳米颗粒将luc mRNA递送到肝细胞中来测量发光强度,从而确认基因的表达。

[0204] 具体而言,在将其中包封有luc mRNA(SEQ ID NO:1)的246-C10 LNP(包含1.5mol%的脂质-PEG)与ApoE 35μg/ml结合后,将LNP处理到以1×10^5细胞/孔等分的0.2μg/孔、0.5μg/孔或1μg/孔肝细胞系(Nexel,韩国)中(基于纳米颗粒中包含的mRNA浓度)。6小时后,用100μl/孔的Bright-Glo荧光素酶测定溶液(promega,USA)处理并在室温下放置10

分钟,然后使用Infinite M200发光测量设备(Tecan,US)测量溶解细胞的发光强度,结果示于图4b中。

[0205] 如图4b所证实,证实了根据一种实施例的脂质纳米颗粒通过与ApoE3结合易于导入细胞内,以浓度依赖性方式增加药物(核酸)的递送量,并能高效地将药物递送至肝细胞。

[0206] 实施例6.使用脂质纳米颗粒确认体内表达

[0207] 如实施例5-1中所证实的,在本实施例中证实了在体外表现出优异基因表达效果(基因递送效果)的244-C10 LNP至246-C10 LNP的体内药物递送效率和生物分布。

[0208] 制备244-C10至246-C10 LNP(含1.5mol%脂质-PEG),其中通过实施例2-2的方法包封有luc mRNA(SEQ ID NO:1),每种纳米颗粒在PBS中透析16小时去除乙醇。基于脂质纳米颗粒中包含的mRNA,以0.1mg/kg的量向C57BL/6雌性7周龄小鼠(Orient Bio)静脉内(iv)注射包封有mRNA的脂质纳米颗粒3小时后,腹腔注射0.25mg/kg荧光素,通过IVIS(PerkinElmer,USA)设备确认生物发光,结果如图5a所示。

[0209] 将给药了包封luc mRNA的246-C10 LNP的小鼠处死并取出器官,通过IVIS设备确认脂质纳米颗粒在每个器官中的生物分布,结果示于图5b中。

[0210] 如图5a所示,给药了包封luc mRNA的244-C10 LNP至246-C10 LNP的小鼠显示出高发光强度,这对应于实施例5-1的结果。特别是,如图5a和图5b所示,通过全身成像和离体器官成像,证实包封luc mRNA的246-C10 LNP特异性地对肝脏表现出高发光强度,从而可以证实根据一种实施例的脂质纳米颗粒对肝脏表现出高生物分布。

[0211] 实施例7.确认核酸递送最佳的脂质纳米颗粒的组成比

[0212] 在本实施例中,要确认具有最优异的体内肝脏特异性药物递送效率的脂质纳米颗粒的组成比。

[0213] 在脂质纳米颗粒的制备中,通过将脂质-PEG(C16-PEG2000神经酰胺)以1.0-2.5mol%混合,通过实施例2-2的方法制备其中包封有luc mRNA(SEQ ID NO:1)的脂质纳米颗粒(246-C10 LNP)。脂质纳米颗粒中包含的可电离脂质:mRNA的重量比为10:1,并且LNP中包含的可电离脂质(246-C10):磷脂(DOPE):胆固醇:脂质-PEG(C16-PEG2000神经酰胺)的摩尔比为26.5:20:52.5-51:1.0-2.5(调整胆固醇和脂质-PEG的含量,使摩尔比的总和为100)。

[0214] 对于其中包含1.0mol%、1.5mol%或2.5mol%脂质-PEG并且包封有luc mRNA的246-C10 LNP,类似于实施例6的方法,基于脂质纳米颗粒中包含的lucmRNA,以0.1mg/kg的量向C57BL/6雌性7周龄小鼠(Orient Bio)静脉内(iv)注射包封有mRNA的脂质纳米颗粒3小时后,腹腔注射0.25mg/kg荧光素,通过IVIS(PerkinElmer,USA)设备确认生物发光,结果如图6所示。与实施例4-1的方法相同,根据脂质-PEG含量测量脂质纳米颗粒的尺寸,并描述在下表6和图6中。

[0215] [表6]

[0216]

LNP中包含的脂质-PEG含量	直径(nm)
1.0mol%	90
1.5mol%	67
2.5mol%	55

[0217] 如图6所示,可以证实给药根据一种实施例的脂质纳米颗粒的组具有优异的肝脏

药物递送效率,并且包含1.5mol%脂质-PEG的LNP尺寸约为70nm。

[0218] 实施例8.确认肝细胞特异性药物递送效果

[0219] 实施例8-1.使用脂质纳米颗粒确认FVII的敲除效果

[0220] FVII在肝细胞中特异性表达,因此,在本实施例中,根据一种实施例的脂质纳米颗粒的肝细胞靶向性将通过使用siFVII的FVII(因子Ⅶ)敲除效应来确认。

[0221] 因此基于脂质纳米颗粒中包含的siRNA浓度的浓度为0.03mg/kg、0.1mg/kg或0.3mg/kg,在将实施例2-2中制备的包封有FVII靶向siRNA(SEQ ID NO:2和3)的246-C10脂质纳米颗粒(包含1.5mol脂质-PEG)静脉注射到C57BL/6雌性7周龄20g小鼠3天后,尾静脉采血,按照coaset FVII测定试剂盒的说明进行血液分析,并用PBS给药的小鼠血液绘制标准曲线,测量FVII表达,结果如图7所示。如图7所示,FVII表达在体内受到的抑制取决于包封在246-C10脂质纳米颗粒中的siRNA浓度,证实根据一种实施例的脂质纳米颗粒可以将核酸递送至肝细胞作为靶标。

[0222] 实施例8-2.根据脂质-PEG含量对肝细胞的药物递送效果

[0223] 通过实施例2-2的方法、通过将脂质纳米颗粒中包含的脂质-PEG的含量调整为0.5-5.0mol,制备了包封有siFVII(SEQ ID NO:2和3)的脂质纳米颗粒(246-C10 LNP)。脂质纳米颗粒中包含的可电离脂质:siRNA的重量比为7.5:1,并且LNP中包含的可电离脂质(246-C10):磷脂(DSPC):胆固醇:脂质-PEG(C16-PEG2000神经酰胺)的摩尔比为42.5:13:44-39.5:0.5-5.0(调整胆固醇和脂质-PEG的含量,使摩尔比的总和为100)。

[0224] 与实施例4-1的方法相同,测量上述制备的脂质纳米颗粒的直径和多分散指数,示于以下表7和图8(左表)中。

[0225] [表7]

[0226]

脂质-PEG(%)	平均直径(nm)	PDI
0.5	120	0.018
1	78	0.106
1.5	52	0.159
3	42	0.152
5	37	0.226

[0227] 使得基于脂质纳米颗粒中包含的siRNA浓度的浓度为0.2mg/kg,在将包封有siFVII的脂质纳米颗粒(包含0.5-5mol%的脂质-PEG)静脉注射给C57BL/6雌性7周龄20g小鼠3天后,尾静脉采血,与实施例8-1的方法类似,使用coaset FVII测定试剂盒,测定FVII表达,结果见图8(右图)。如图8所示,证实当给药根据一实施例的脂质纳米颗粒时,体内FVII表达降低,而当给药脂质-PEG的含量为0.5-5.0mol%的脂质纳米颗粒时,FVII表达得到极好的抑制。

[0228] 实施例9.LSEC-特异性药物递送效果

[0229] 由于FVIII在LSEC(肝窦内皮细胞)中特异性表达,因此在本实施例中,根据一种实施例的脂质纳米颗粒的LSEC靶向性将通过使用siFVIII的FVIII(因子VIII)的敲除效应来确认,并且检查了根据脂质-PEG含量的药物递送效果。

[0230] 通过将脂质纳米颗粒中包含的脂质-PEG的含量调整为0.5-5.0mol%,通过实施例2的方法制备了包封有siFVIII(SEQ ID NO:4-11)的脂质纳米颗粒(246-C10 LNP)。脂质纳

米颗粒中包含的可电离脂质:siRNA的重量比为7.5:1,LNP中包含的可电离脂质(246-C10):磷脂(DSPC):胆固醇:脂质-PEG(C16-PEG2000神经酰胺)=42.5:13:44-39.5:0.5-5.0(调整胆固醇和脂质-PEG的含量,使摩尔比的总和为100)。

[0231] 通过与实施例4-1相同的方法测量上述制备的脂质纳米颗粒的直径和PDI,并显示于以下表8和图9(左表)。

[0232] [表8]

[0233]

脂质-PEG(%)	平均直径(nm)	PDI
0.5	166	0.018
1	87	0.106
1.5	78	0.159
3	42	0.152
5	35.6	0.226

[0234] 使得基于脂质纳米颗粒中包含的siRNA浓度的浓度为0.5mg/kg,在将包封有siFVIII的脂质纳米颗粒(包含0.5-5mol%的脂质-PEG)静脉内注射给C57BL/6雌性7周龄20g小鼠2天后,尾静脉采血,与实施例8-1的方法类似,使用coaset FVII测定试剂盒,测定FVIII表达,结果见图9(右图)。如图9所示,证实当给药根据一种实施例的脂质纳米颗粒时,体内FVIII表达降低,并且根据一种实施例的脂质纳米颗粒可以靶向LSEC,且当给药脂质-PEG含量为0.5-5.0mol%的脂质纳米颗粒时,FVIII表达得到极好的抑制。

[0235] 实施例10.根据脂质-PEG结合物类型的药物递送效果

[0236] 类似于实施例2-2的方法制备了包含神经酰胺-PEG结合物(C16-PEG 2000神经酰胺;Avanti,US)或PEG-DSPE(Avanti,US)作为脂质-PEG结合物的脂质纳米颗粒(包含0.25-10.0mol%的脂质-PEG结合物)。

[0237] 脂质纳米颗粒中包含的可电离脂质:siRNA(siLuc)的重量比为7.5:1,LNP中包含的可电离脂质(2464-C10):磷脂(DSPC):胆固醇:脂质-PEG(神经酰胺-PEG或PEG-DSPE)的摩尔比为42.5:13:44.25-34.5:0.25-10(调整胆固醇和脂质-PEG的含量使得摩尔比的总和为100)。使用的siLuc的序列(靶向荧光素酶基因的siRNA;SEQ ID NO:12和13)在实施例2-2中描述。

[0238] 在将根据一种实施例的LNP转染至细胞中前1天,将HeLa细胞(Korea CellLine Bank)以0.01×10^6个细胞/孔分装于白板(96孔)中,在DMEM培养基(SH30022,Hyclone,USA)中于37℃、0.5～3%CO_2条件下培养。基于siRNA浓度利用包封有siLuc的脂质纳米颗粒以10nM处理HeLa-Luc细胞系24小时后,并用Bright-Glo™荧光素酶测定溶液(promega,USA)以100μl/孔进行处理,室温静置10分钟,然后对溶解的细胞,使用Infinite M200发光测量仪(Tecan,USA)测量发光强度,结果如图10所示。测量结果以平均值±标准差表示。结果值通过T检验法进行统计学验证,$p<0.05$或更多的情况定义为有统计学意义。

[0239] 如图10所示,根据一种实施例的脂质纳米颗粒对细胞具有优异的核酸递送效果,特别是在包含神经酰胺-PEG结合物作为脂质-PEG结合物的情况下,核酸递送效果优异。

<110> 银汉斯德生物技术公司

<120> 用于体内药物递送的脂质纳米颗粒及其用途

<130> OPP20204870KR

<150> KR 10-2020-0005642
<151> 2020-01-15

<150> KR 10-2020-0040586
<151> 2020-04-02

<160> 13

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1
<211> 1653
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0001] <220>
<223> 荧光素酶mRNA

<400> 1
auggaagacg ccaaaaacau aaagaaaggc ccggcgccau ucuauccgcu ggaagaugga 60

accgcuggag agcaacugca uaaggcuaug aagagauacg cccugguucc uggaacaauu 120

gcuuuuacag augcacauau cgagguggac aucacuuacg cugaguacuu cgaaaugucc 180

guucgguugg cagaagcuau gaaacgauau gggcugaaua caaaucacag aaucgucgua 240

ugcagugaaa acucucuuca auucuuuaug ccgguguugg gcgcguuauu uaucggaguu 300

gcaguugcgc ccgcgaacga cauuuauaau gaacgugaau ugcucaacag uaugggcauu 360

ucgcagccua ccgugguguu cguuuccaaa aagggguugc aaaaaauuuu gaacgugcaa

420

aaaaagcucc caaucaucca aaaaauuauu aucauggauu cuaaaacgga uuaccaggga 480

uuucagucga uguacacguu cgucacaucu caucuaccuc ccgguuuuaa ugaauacgau 540

uuugugccag aguccuucga uagggacaag acaauugcac ugaucaugaa cuccucugga 600

ucuacugguc ugccuaaagg ugucgcucug ccucauagaa cugccugcgu gagauucucg 660

caugccagag auccuauuuu uggcaaucaa aucauuccgg auacugcgau uuuaaguguu 720

guuccauucc aucacgguuu uggaauguuu acuacacucg gauauuugau auguggauuu 780

cgagucgucu uaauguauag auuugaagaa gagcuguuuc ugaggagccu ucaggauuac 840

[0002] aagauucaaa gugcgcugcu ggugccaacc cuauucuccu ucuucgccaa aagcacucug 900

auugacaaau acgauuuauc uaauuuacac gaaauugcuu cugguggcgc uccccucucu 960

aaggaagucg gggaagcggu ugccaagagg uuccaucugc cagguaucag gcaaggauau 1020

gggcucacug agacuacauc agcuauucug auuacacccg agggggauga uaaaccgggc 1080

gcggucggua aaguuguucc auuuuuuugaa gcgaagguug uggaucugga uaccgggaaa 1140

acgcugggcg uuaaucaaag aggcgaacug ugugugagag guccuaugau uauguccggu 1200

uauguaaaca auccggaagc gaccaacgcc uugauugaca aggauggaug gcuacauucu 1260

ggagacauag cuuacuggga cgaagacgaa cacuucuuca ucguugaccg ccugaagucu 1320

cugauuaagu acaaaggcua ucagguggcu cccgcugaau uggaauccau cuugcuccaa

1380

cacccaaca ucuucgacgc aggugucgca ggucuucccg acgaugacgc cggugaacuu 1440

cccgccgccg uuguuguuuu ggagcacgga aagacgauga cggaaaaaga gaucguggau 1500

uacgucgcca gucaaguaac aaccgcgaaa aaguugcgcg gaggaguugu guuuguggac 1560

gaaguaccga aaggucuuac cggaaaacuc gacgcaagaa aaaucagaga gauccucaua 1620

aaggccaaga agggcggaaa gaucgccgug uaa 1653

<210> 2
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0003]

<220>
<223> FVII靶向siRNA_有义

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 脱氧核糖核苷酸

<400> 2
ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 3
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FVII靶向siRNA_反义

<220>

<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 脱氧核糖核苷酸

<400> 3
guaagacuug agaugaucct t 21

<210> 4
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FVIII靶向siRNA_有义_1

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 脱氧核糖核苷酸

[0004]

<400> 4
cuuauaucgu ggagaauuat t 21

<210> 5
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FVIII靶向siRNA_反义_1

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 脱氧核糖核苷酸

<400> 5

uaauucucca cgauauaagt t 21

<210> 6
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FVIII靶向siRNA_有义_2

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 脱氧核糖核苷酸

<400> 6
ucaaaggauu cgaugguaut t 21

[0005]

<210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FVIII靶向siRNA_反义_2

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 脱氧核糖核苷酸

<400> 7
auaccaucga auccuuugat t 21

<210> 8
<211> 21
<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FVIII靶向siRNA_有义_3

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 脱氧核糖核苷酸

<400> 8
caagagcacu agugauuaut t 21

<210> 9
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0006]

<220>
<223> FVIII靶向siRNA_反义_3

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 脱氧核糖核苷酸

<400> 9
auaaucacua gugcucuugt t 21

<210> 10
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FVIII靶向siRNA_有义_4

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 脱氧核糖核苷酸

<400> 10
gggcaccacu ccugaaauat t 21

<210> 11
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FVIII靶向siRNA_反义_4

[0007]

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 脱氧核糖核苷酸

<400> 11
uauuucagga guggugccct t 21

<210> 12
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> siFluc_有义

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 脱氧核糖核苷酸

<400> 12
aacgcugggc guuaaucaat t 21

<210> 13
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
[0008] <223> siFluc_反义

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 脱氧核糖核苷酸

<400> 13
uugauuaacg cccagcguut t 21

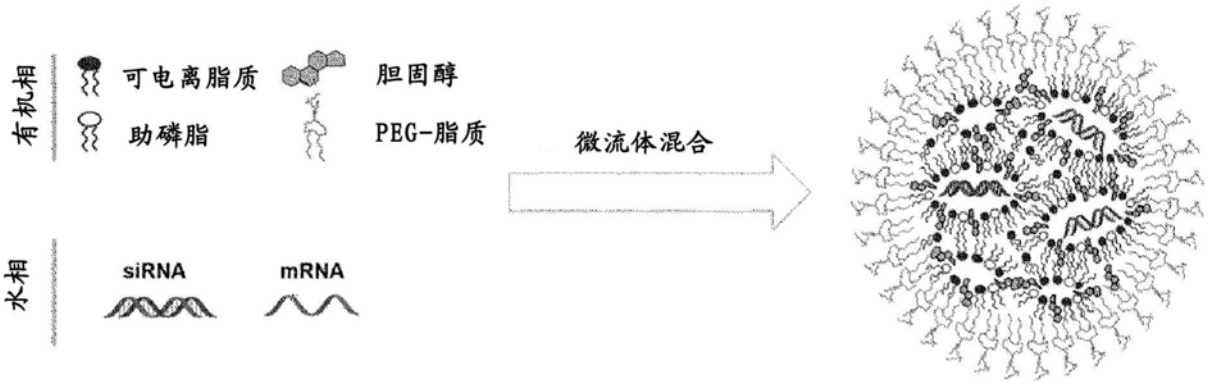


图1a

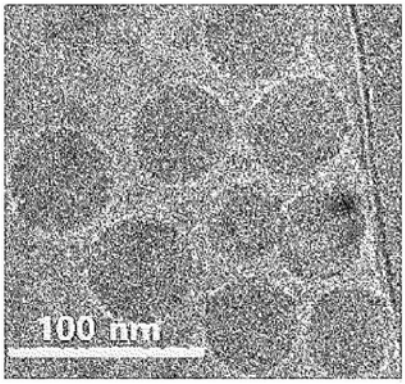


图1b

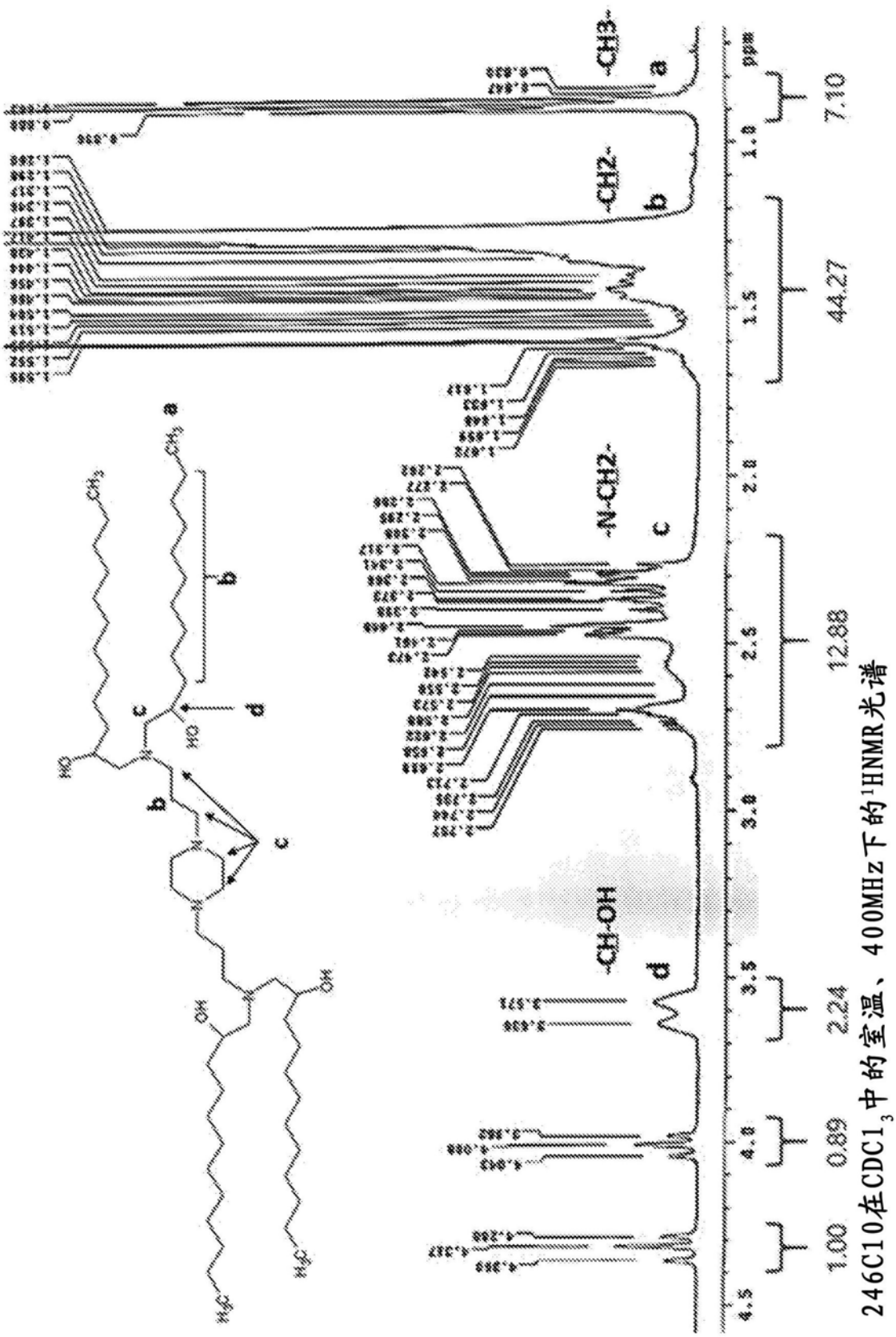

-CH3-
-CH2-
-N-CH2-
-CH-OH
a
b
c
d
ppm
7.10
44.27
12.88
2.24
0.89
1.00
246C10在CDCl3中的室温、400MHz下的1HNMR光谱

图2

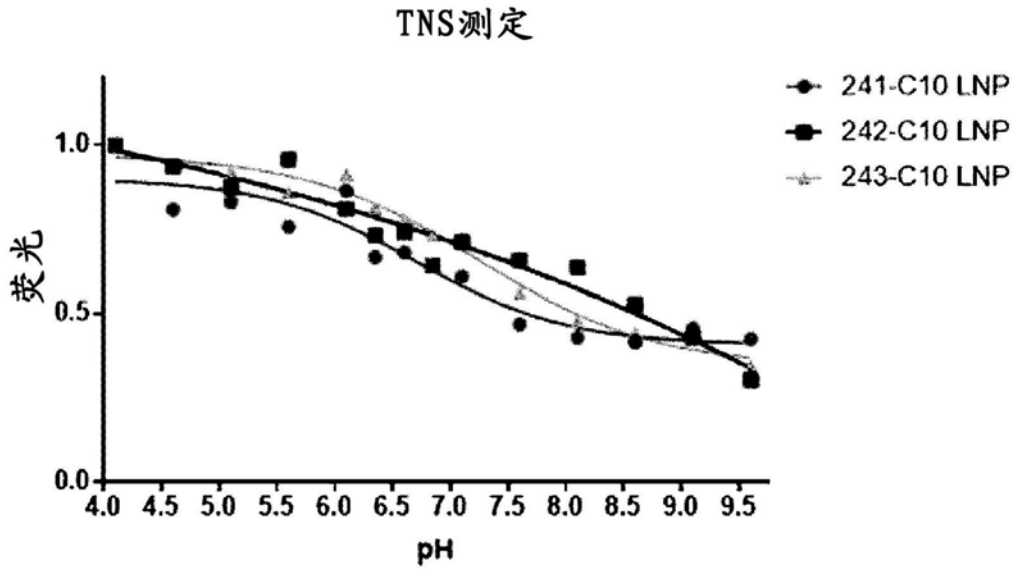

TNS测定
241-C10 LNP
242-C10 LNP
243-C10 LNP
荧光
1.0
0.5
0.0
4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 9.5
pH

图3a

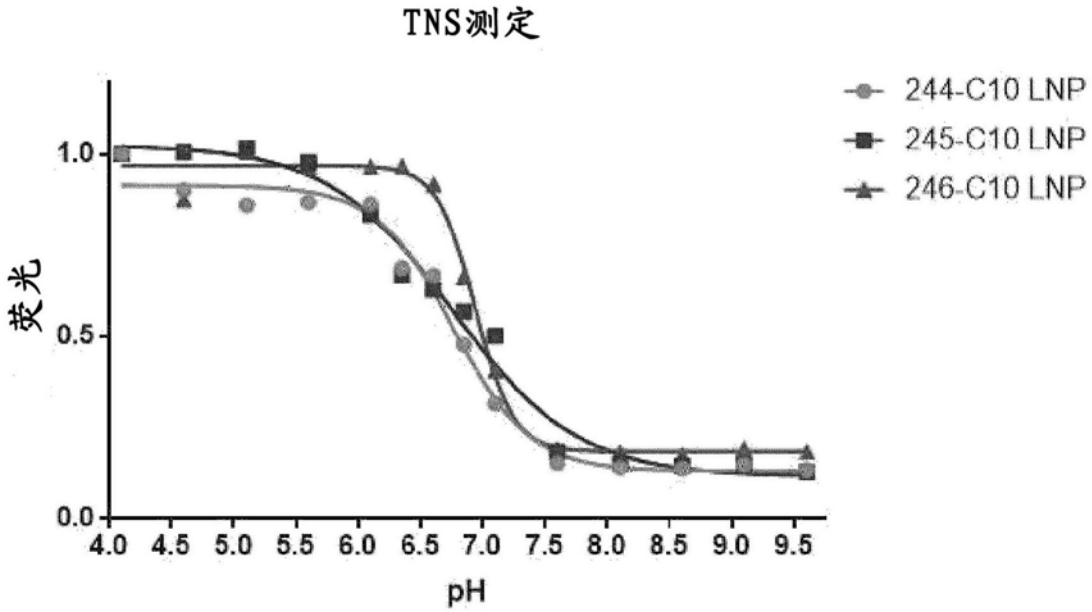

TNS测定
244-C10 LNP
245-C10 LNP
246-C10 LNP
荧光
1.0
0.5
0.0
4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 9.5
pH

图3b

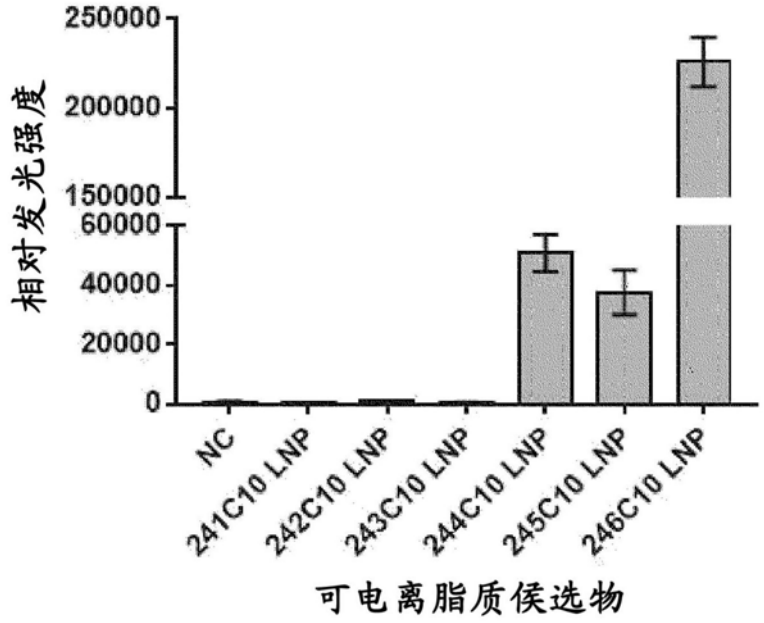

250000
200000
150000
60000
40000
20000
0
相对发光强度
NC
241C10 LNP
242C10 LNP
243C10 LNP
244C10 LNP
245C10 LNP
246C10 LNP
可电离脂质侯选物

图4a

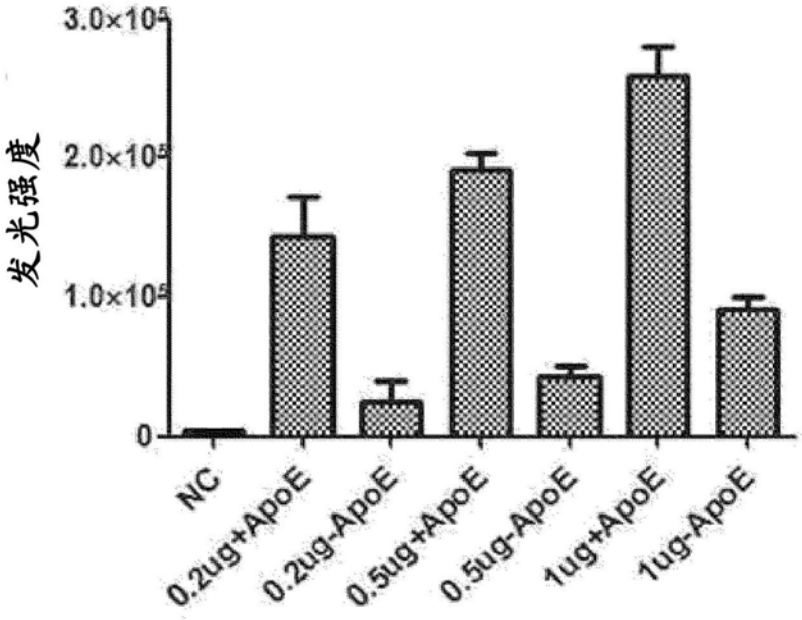

3.0×10⁵
2.0×10⁵
1.0×10⁵
0
发光强度
NC
0.2ug+ApoE
0.2ug-ApoE
0.5ug+ApoE
0.5ug-ApoE
1ug+ApoE
1ug-ApoE

图4b

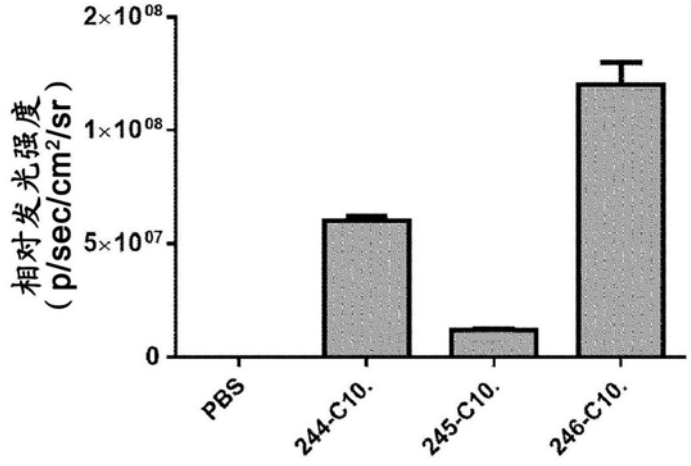

2×10^08
1×10^08
5×10^07
0
相对发光强度
（p/sec/cm²/sr）
PBS
244-C10.
245-C10.
246-C10.

图5a

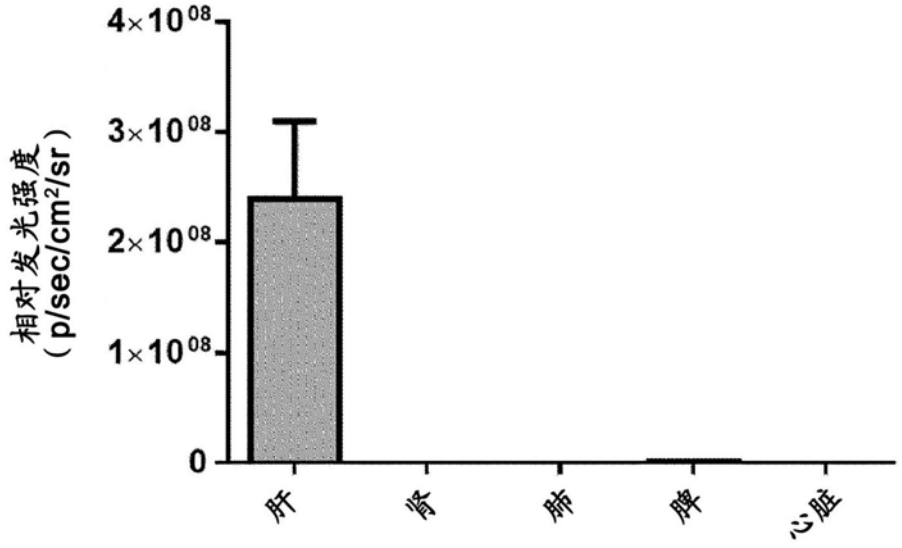

4×10^08
3×10^08
2×10^08
1×10^08
0
相对发光强度
（p/sec/cm²/sr）
肝
肾
肺
脾
心脏

图5b

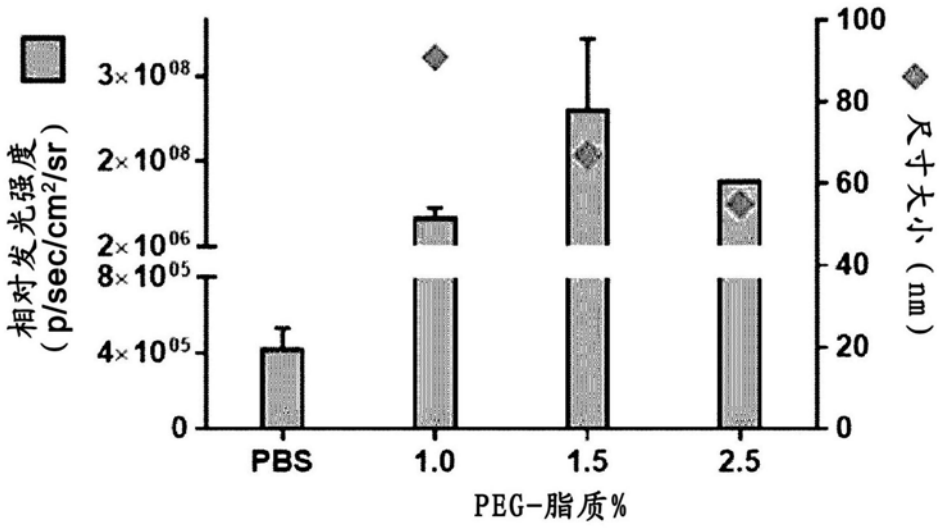

相对发光强度
（p/sec/cm²/sr）
3×10⁰⁸
2×10⁰⁸
2×10⁰⁶
8×10⁰⁵
4×10⁰⁵
0
100
80
60
40
20
0
尺寸大小（nm）
PBS
1.0
1.5
2.5
PEG-脂质%

图6

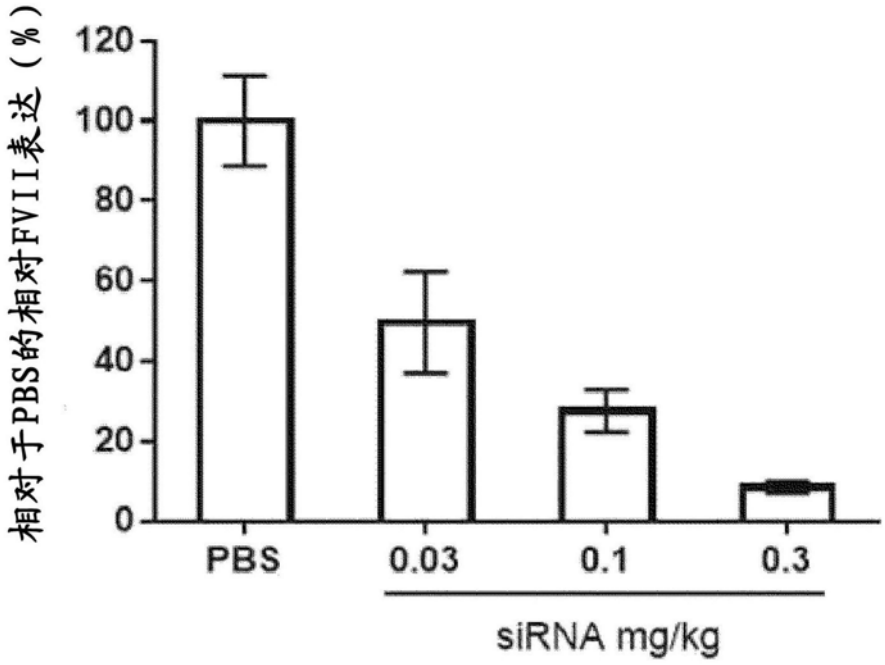

相对于PBS的相对FVII表达（%）
120
100
80
60
40
20
0
PBS
0.03
0.1
0.3
siRNA mg/kg

图7

PEG-脂质%	平均颗粒尺寸（nm）	PDI
0.5	120	0.018
1.0	78	0.106
1.5	52	0.159
3.0	42	0.152
5.0	37	0.226

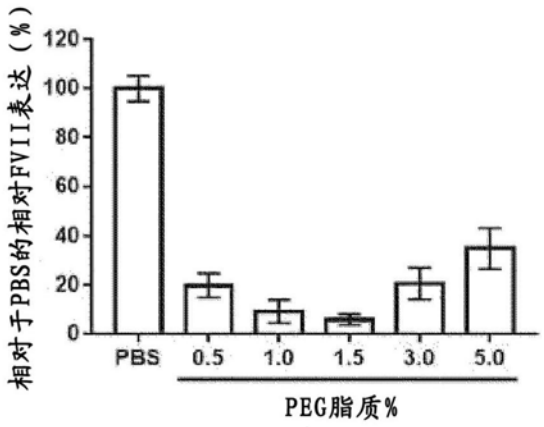


图8

PEG-脂质%	平均颗粒尺寸（nm）	PDI
0.5	166	0.018
1.0	87	0.106
1.5	78	0.159
3.0	42	0.152
5.0	35.6	0.226

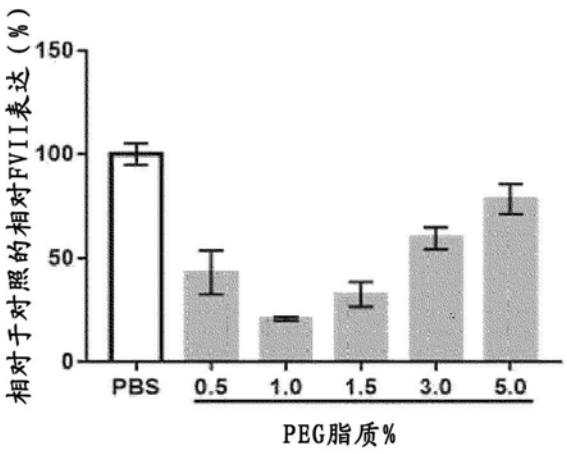


图9

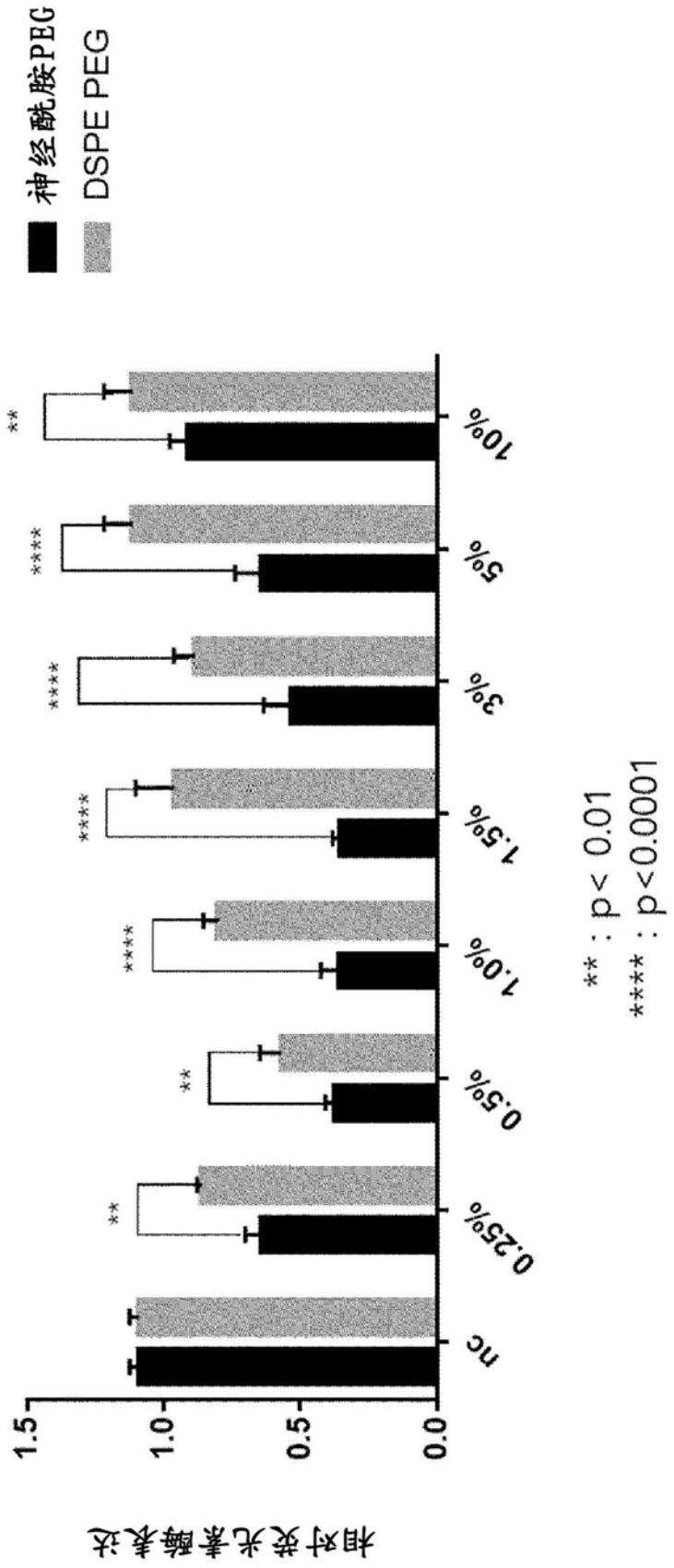

神经酰胺PEG
DSPE PEG
相对荧光素酶表达
1.5
1.0
0.5
0.0
nc
0.25%
0.5%
1.0%
1.5%
3%
5%
10%
**
**
****
****
****
****
**
** : p< 0.01
**** : p<0.0001

图10