(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119654141 A
(43)申请公布日 2025.03.18

(21)申请号 202380057619.3

(22)申请日 2023.08.17

(66)本国优先权数据
PCT/CN2022/113414 2022.08.18 CN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.02.05

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2023/113447 2023.08.17

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/037578 EN 2024.02.22

(71)申请人 苏州艾博生物科技有限公司
地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物医药产业园B1-501

(72)发明人 蒋玉航 英博

(74)专利代理机构 北京永新同创知识产权代理有限公司 11376
专利代理师 栾星明 程大军

(51)Int.Cl.
A61K 9/51(2006.01)
A61K 31/7105(2006.01)
A61K 39/12(2006.01)
A61K 47/69(2017.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 37/04(2006.01)
C12N 15/11(2006.01)
A61K 9/00(2006.01)
A61K 47/28(2006.01)

权利要求书9页 说明书68页 附图8页

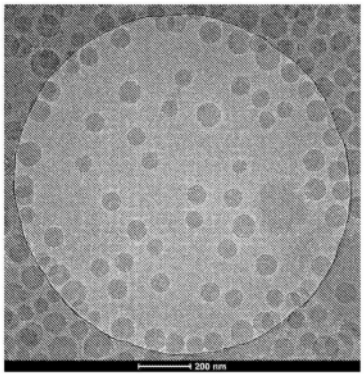
(54)发明名称

脂质纳米颗粒的组合物

(57)摘要

本文提供了脂质纳米颗粒组合物,所述脂质纳米颗粒组合物包含阳离子脂质、类固醇、聚合物结合的脂质和不超过0.5摩尔百分比的磷脂,所述脂质纳米颗粒组合物能够用于递送治疗性有效负载(例如,mRNA、siRNA、DNA)以用于治疗或预防目的。

由C1/胆固醇/DMG-PEG(60%/38.5%/1.5%)组成的 LNP的Cyro-TEM 图像



CN 119654141 A

1.一种脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒包含:

(a)所述纳米颗粒中存在的总脂质的约40mol%至约75mol%的量的阳离子脂质,其中所述阳离子脂质包含(i)至少一个叔胺或季铵部分,和(ii)至少一个C_{14}-C_{42}烷基酯部分;

(b)所述纳米颗粒中存在的总脂质的约22mol%至约59.5mol%的量的类固醇;

(c)所述纳米颗粒中存在的总脂质的约0.5mol%至约2.5mol%的量的聚合物结合的脂质;和

(d)核酸;

条件是所述脂质纳米颗粒包含不超过0.5摩尔百分比的磷脂。

2.如权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约55mol%至约65mol%。

3.如权利要求2所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约60mol%。

4.如权利要求1至3中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述聚合物结合的脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2mol%。

5.如权利要求4所述的脂质纳米颗粒,其中所述聚合物结合的脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约1.5mol%。

6.如权利要求1至5中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述类固醇的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约33mol%至约44mol%。

7.如权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约45mol%至约70mol%,并且其中所述聚合物结合的脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2.5mol%。

8.如权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约45mol%至约65mol%,并且其中所述聚合物结合的脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2.5mol%。

9.如权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约45mol%至约65mol%,并且其中所述聚合物结合的脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2mol%。

10.如权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约65mol%,并且其中所述聚合物结合的脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约0.5mol%至约2.5mol%。

11.如权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约60mol%,并且其中所述聚合物结合的脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约0.8mol%至约2mol%。

12.如权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约60mol%,并且其中所述聚合物结合的脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2mol%。

13.如权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约55mol%至约65mol%,并且其中所述聚合物结合的脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2.5mol%。

14.如权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约60mol％至约65mol％,并且其中所述聚合物结合的脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol％至约2mol％。

15.如权利要求1所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约60mol％至约65mol％,并且其中所述聚合物结合的脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约1.5mol％至约2.5mol％。

16.如权利要求1所述的脂质纳米颗粒,所述阳离子脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约40mol％至约55mol％,并且所述聚合物结合的脂质的所述量是所述纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol％至约2.5mol％。

17.如权利要求1至16中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述聚合物结合的脂质是聚乙二醇(PEG)结合的脂质。

18.如权利要求17所述的脂质纳米颗粒,其中所述聚合物结合的脂质是PEG-二酰基甘油(PEG-DAG)缀合物、PEG-二烷基氧基丙基(PEG-DAA)缀合物、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(PEG-DMA)缀合物、PEG-二硬脂基氧基丙基(PEG-DSA)缀合物或其混合物。

19.如权利要求17所述的脂质纳米颗粒,其中所述聚合物结合的脂质是DMG-PEG2000或DMPE-PEG2000。

20.如权利要求1至19中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述类固醇是糖皮质激素、盐皮质激素、氯倍他索、胆固醇或胆固醇衍生物。

21.如权利要求1至20中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质具有至少9的pKa。

22.如权利要求1至21中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质仅包含一个酯部分,所述酯部分是C_{14}-C_{42}烷基酯部分。

23.如权利要求1至21中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质包含所述C_{14}-C_{42}烷基酯部分和至少第二酯部分。

24.如权利要求1至23中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质的至少一个酯部分是-C(=O)OR^1或-OC(=O)R^1,其中R^1是支链C_{14}-C_{42}烷基。

25.如权利要求23或24所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质的所述第二酯部分是-C(=O)OR^2或-OC(=O)R^2,其中R^2是直链或支链C_6-C_{42}烷基。

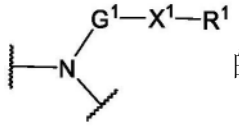
26.如权利要求1至21中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质包含所述C_{14}-C_{42}烷基酯部分和至少第二酯部分以及第三酯部分。

27.如权利要求26所述的脂质纳米颗粒,其中所述第二烷基酯部分和所述第三烷基酯部分独立地为-C(=O)OR^2或-OC(=O)R^2,其中每个R^2独立地为直链C_7-C_{11}烷基。

28.如权利要求1至27中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质仅包含一个叔胺。

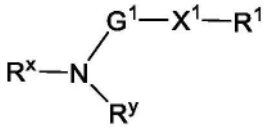
29.如权利要求1至27中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质包含两个叔胺。

30.如权利要求1至29中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质包含



的部分,其中G^1是C_2-C_{12}亚烷基;X^1是-C(=O)O-或-OC(=O)-;并且R^1是支链C_{14}-C_{42}烷基。

31.如权利要求1至30中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质具有式(I):



(I),

或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体,

其中:

G^1是C_2-C_{12}亚烷基;

X^1是-C(=O)O-或-OC(=O)-;

R^1是支链C_{14}-C_{42}烷基;

R^y是C_1-C_6烷基或-G^2-X^2-R^2;

G^2是C_2-C_{12}亚烷基;

X^2是-C(=O)O-或-OC(=O)-;

R^2是直链或支链C_6-C_{42}烷基;

R^x是C_1-C_6烷基或-G^3-R^3;

G^3是C_2-C_{12}亚烷基;

R^3是-N(R^4)R^5或-OR^6;

R^4是C_1-C_{12}烷基、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基或C_6-C_{10}芳基;

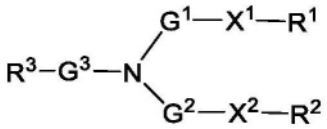
R^5是C_1-C_{12}烷基、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基或C_6-C_{10}芳基;

或者R^4和R^5与它们所连接的氮一起形成环状部分;

R^6是氢、C_1-C_{12}烷基、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基或C_6-C_{10}芳基;并且

其中每个烷基、烯基、环烷基、环烯基、芳基、亚烷基以及环状部分独立地任选地被取代。

32.如权利要求31所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质具有式(II):



(II),

或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体。

33.如权利要求31或32所述的脂质纳米颗粒,其中R^1是支链C_{14}-C_{24}烷基。

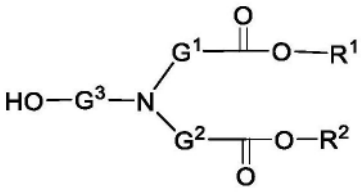
34.如权利要求31至33中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中R^2是直链C_6-C_{24}烷基。

35.如权利要求31至33中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中R^2是支链C_{14}-C_{24}烷基。

36.如权利要求31至35中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中R^3是-OH。

37.如权利要求31至35中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中R^3是-N(R^4)R^5。

38.如权利要求32所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质具有式(II-A):



(II-A),

或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体,

其中:

G^1是C_5-C_7亚烷基;

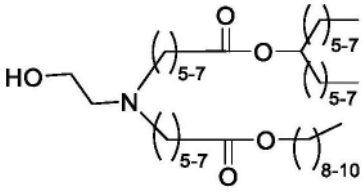
R^1是支链C_{14}-C_{19}烷基;

G^2是C_5-C_7亚烷基;

R^2是直链C_7-C_{13}烷基;

G^3是C_2-C_4亚烷基。

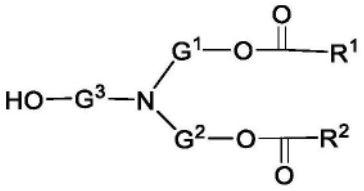
39.如权利要求38所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质具有式(II-A-1):



(II-A-1),

或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体。

40.如权利要求32所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质具有式(II-B):



(II-B),

或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体,

其中:

G^1是C_5-C_7亚烷基;

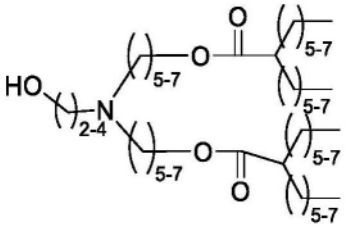
R^1是支链C_{14}-C_{19}烷基;

G^2是C_5-C_7亚烷基;

R^2是支链C_{14}-C_{19}烷基;

G^3是C_2-C_4亚烷基。

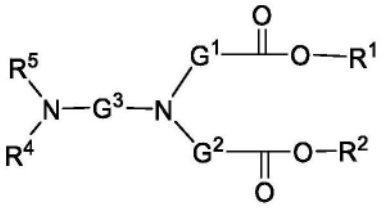
41.如权利要求40所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质具有式(II-B-1):



(II-B-1),

或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体。

42.如权利要求32所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质具有式(II-C):



(II-C),

或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体,

其中:

G^1是C_5-C_7亚烷基;

R^1是支链C_{14}-C_{19}烷基;

G^2是C_5-C_7亚烷基;

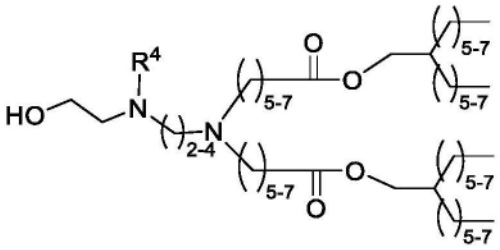
R^2是支链C_{14}-C_{19}烷基;

G^3是C_2-C_4亚烷基;

R^4是C_3-C_8环烷基;并且

R^5是被羟基取代的C_2-C_4烷基。

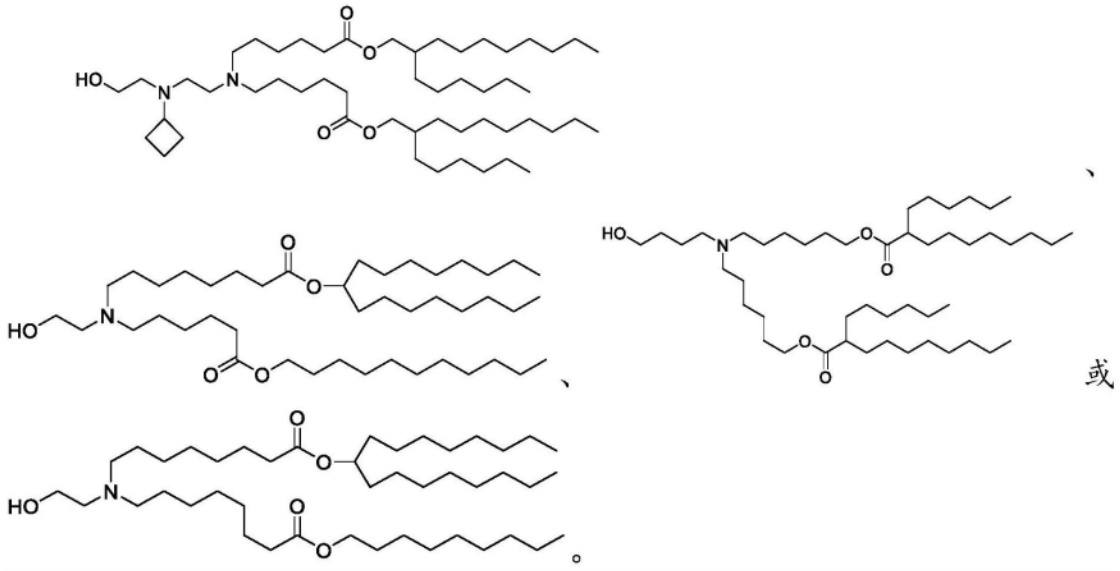
43.如权利要求42所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质具有式(II-C-1):



(II-C-1),

或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体。

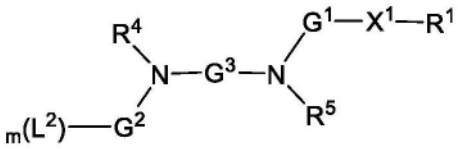
44.如权利要求31所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质是



或

。

45.如权利要求1至30中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质具有式(III):



(III),

或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体,

其中:

G^1是C_2-C_{12}亚烷基;

X^1是-C(=O)O-或-OC(=O)-;

R^1是支链C_{14}-C_{42}烷基;

G^2是C_2-C_{12}亚烷基;

每个L^2独立地为-X^2-R^2;

每个X^2独立地为-C(=O)O-或-OC(=O)-;

每个R^2独立地为直链或支链C_6-C_{42}烷基;

m是1或2;

G^3是C_2-C_{12}亚烷基;

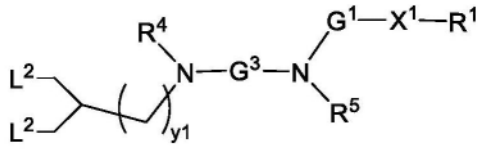
R^4是C_1-C_{12}烷基、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基或C_6-C_{10}芳基;

R^5是C_1-C_{12}烷基、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基或C_6-C_{10}芳基;

并且

其中每个烷基、烯基、环烷基、环烯基、芳基、亚烷基以及环状部分独立地任选地被取代。

46.如权利要求45所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质具有式(IV):



(IV),

或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体,

其中:

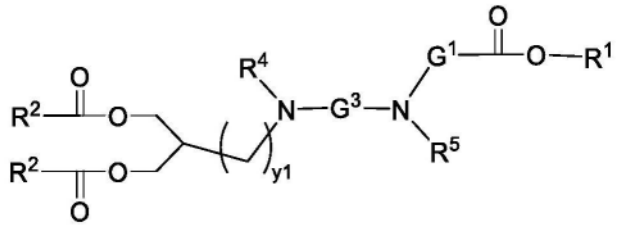
y1是0至9的整数。

47.如权利要求45或46所述的脂质纳米颗粒,其中R^1是支链C_{14}-C_{24}烷基。

48.如权利要求45至47中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中每个L^2独立地为-OC(=O)R^2,并且每个R^2独立地为直链C_7-C_{11}烷基。

49.如权利要求45至48中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中R^5是-CH_2CH_2OH。

50.如权利要求46所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质具有式(IV-A):



(IV-A),

或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体,

其中:

G^1是C_5-C_7亚烷基;

R^1是支链C_{14}-C_{19}烷基;

每个R^2独立地为直链C_7-C_{13}烷基;

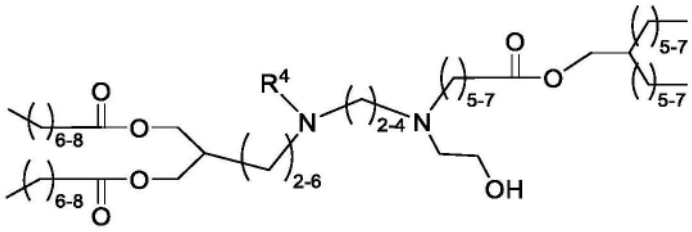
G^3是C_2-C_4亚烷基;

R^4是C_3-C_8环烷基;

R^5是被羟基取代的C_2-C_4烷基;并且

y1是2至6的整数。

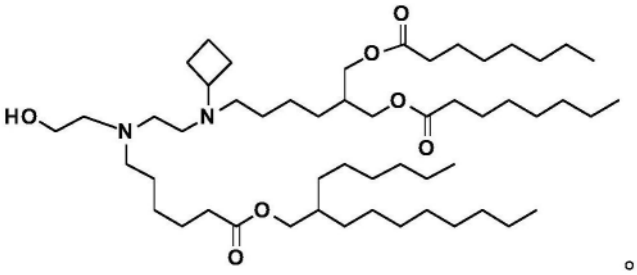
51.如权利要求47所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质具有式(IV-A-1):



(IV-A-1),

或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体。

52.如权利要求45所述的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质是



。

53.如权利要求1至52中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述脂质纳米颗粒不包含磷脂。

54.如权利要求1至53中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述脂质纳米颗粒具有约9:1至约20:1的脂质:核酸质量比。

55.如权利要求1至54中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述核酸是mRNA。

56.如权利要求55所述的脂质纳米颗粒,其中所述mRNA是编码抗原或其片段或表位的mRNA。

57.如权利要求56所述的脂质纳米颗粒,其中所述mRNA是单顺反子mRNA。

58.如权利要求56所述的脂质纳米颗粒,其中所述mRNA是多顺反子mRNA。

59.如权利要求56至58中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述抗原是致病性抗原。

60.如权利要求56至58中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述抗原是肿瘤相关抗原。

61.如权利要求1至60中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述核酸是小干扰RNA(siRNA)。

62.如权利要求1至61中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述核酸经化学修饰。

63.如权利要求1至62中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中与参考制剂相比,所述纳米颗粒的尺寸增加;其中所述参考制剂与所述脂质纳米颗粒的不同之处在于:(i)所述参考制剂包含磷脂,并且(ii)所述阳离子脂质:所述类固醇:所述磷脂:所述聚合物结合的脂质的摩尔比是约50:38.5:10:1.5。

64.如权利要求63所述的脂质纳米颗粒,其中与所述参考制剂相比,所述纳米颗粒的尺寸增加至少约50%。

65.如权利要求1至62中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述纳米颗粒的尺寸是约100nm至约140nm。

66.如权利要求65所述的脂质纳米颗粒,其中所述纳米颗粒的尺寸是约110nm至约130nm。

67.如权利要求1至66中任一项所述的脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒具有所述核酸的至少约80%的包封效率。

68.如权利要求67所述的脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒具有所述核酸的至少约90%的包封效率。

69.如权利要求1至68中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述核酸编码RNA或蛋白质;并且其中在哺乳动物细胞或哺乳动物的组织中由所述纳米颗粒中的所述核酸表达的RNA或蛋白质的量大于由参考制剂中的所述核酸表达的RNA或蛋白质的量;其中所述参考制剂与所述脂质纳米颗粒的不同之处在于(i)所述参考制剂包含磷脂,并且(ii)所述阳离子脂质:所述类固醇:所述磷脂:所述聚合物结合的脂质的摩尔比是约50:38.5:10:1.5。

70.如权利要求69所述的脂质纳米颗粒,其中由所述纳米颗粒中的所述核酸表达的RNA或蛋白质的量比由参考制剂中的所述核酸表达的RNA或蛋白质的量多至少约50%。

71.如权利要求70所述的脂质纳米颗粒,其中由所述纳米颗粒中的所述核酸表达的RNA或蛋白质的量比由参考制剂中的所述核酸表达的RNA或蛋白质的量多至少约100%。

72.一种药用组合物,所述药物组合物包含权利要求1至71中任一项所述的脂质纳米颗粒和药学上可接受的赋形剂。

73.一种在哺乳动物细胞或哺乳动物的组织中表达mRNA的方法,所述方法包括将权利要求1至71中任一项所述的脂质纳米颗粒或权利要求72所述的药物组合物递送至所述哺乳动物细胞或所述哺乳动物的所述组织,其中核酸是mRNA;并且其中所递送的mRNA在所述哺乳动物细胞中或在所述哺乳动物的所述组织中表达。

74.一种用于将编码蛋白质的mRNA引入细胞中的方法,所述方法包括使所述细胞与权利要求1至71中任一项所述的脂质纳米颗粒或权利要求72所述的药物组合物接触。

75.如权利要求74所述的方法,其中所述细胞在哺乳动物中。

76.一种用于治疗人的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述人施用治疗有效量的权利要求1至71中任一项所述的脂质纳米颗粒或权利要求72所述的药物组合物。

77.一种用于治疗人中由蛋白质的表达受损引起的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述人施用治疗有效量的权利要求1至71中任一项所述的脂质纳米颗粒或权利要求72所述的药物组合物,其中核酸是编码所述蛋白质的mRNA。

78.如权利要求76或77所述的方法,其中所述疾病或病症是病毒感染、肝脏疾病或病症或癌症。

79.如权利要求76至78中任一项所述的方法,其中所述施用是鼻内、静脉内、腹膜内、肌内、关节内、病灶内、气管内、皮下或皮内施用。

80.一种用于预防受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含治疗有效量的权利要求1至71中任一项所述的脂质纳米颗粒或权利要求72所述的药物组合物的疫苗,其中核酸编码与所述疾病或病症相关的抗原,从而在所述受试者中触发针对所述疾病或病症的免疫反应。

81.如权利要求80所述的方法,其中所述疾病或病症是病毒感染、肝脏疾病或病症或癌症。

82.如权利要求80或81所述的方法,其中所述抗原是病毒。

83.如权利要求80至82中任一项所述的方法,其中所述核酸是mRNA。

84.如权利要求83所述的方法,其中所述mRNA编码病原体所特有的致病性蛋白质或其抗原片段或表位。

脂质纳米颗粒的组合物

[0001] 1.相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年8月18日提交的国际专利申请第PCT/CN2022/113414号的优先权,所述专利申请的全部内容通过引用并入本文中。

技术领域

[0003] 本文提供了脂质纳米颗粒(LNP)组合物,其包含阳离子脂质、类固醇、聚合物结合的脂质和不超过0.5摩尔百分比的磷脂,所述脂质纳米颗粒组合物可用于递送治疗有效负载(例如,mRNA、siRNA、miRNA、非编码RNA、DNA、反义寡核苷酸、基因编辑盒)以用于治疗或预防目的。

背景技术

[0004] 治疗性核酸具有彻底改变疫苗接种、基因疗法、细胞疗法以及癌症和遗传性疾病的治疗的巨大潜力。自2000年代开始对治疗性核酸进行首次临床研究以来,核酸分子的设计、修饰和递送已经取得了重大进展。已经研究了多种基于核酸的疗法,包括mRNA、siRNA、质粒DNA、病毒和细菌载体以及患者来源的细胞疗法,其中十几种已被美国食品与药品管理局(FDA)批准用于人类,并且更多的处于临床试验中。然而,核酸治疗剂仍然面临多重挑战,诸如脱靶效应、不需要的免疫刺激和低递送效率。对于基于mRNA的疗法,血清中的核酸酶对mRNA的快速降解使得递送过程更具挑战性。

[0005] 当前的LNP递送系统通常包括阳离子脂质、磷脂、胆固醇和PEG-脂质缀合物。四脂质组分LNP制剂(例如,具有阳离子脂质:胆固醇:DSPC:DSPC:DMG-PEG=50:38.5:10:1.5的典型脂质比)已被证明在多种商业药物产品中是成功的,但仍有改进的空间。仍然需要开发简化的脂质纳米颗粒组合物而不牺牲核酸有效负载的递送效率。

发明内容

[0006] 在一个实施方案中,本文提供了一种包含减少量(例如,与常规四脂质组分脂质纳米颗粒相比)的磷脂组分的脂质纳米颗粒。

[0007] 在一个实施方案中,本文提供了一种脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒包含:

[0008] (a)所述纳米颗粒中存在的总脂质的约40mol%至约75mol%的量的阳离子脂质,其中所述阳离子脂质包含(i)至少一个叔胺或季铵部分,和(ii)至少一个C_{14}-C_{42}烷基酯部分;

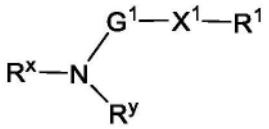
[0009] (b)所述纳米颗粒中存在的总脂质的约22mol%至约59.5mol%的量的类固醇;

[0010] (c)所述纳米颗粒中存在的总脂质的约0.5mol%至约2.5mol%的量的聚合物结合的脂质;和

[0011] (d)核酸;

[0012] 条件是所述脂质纳米颗粒包含不超过0.5摩尔百分比的磷脂。

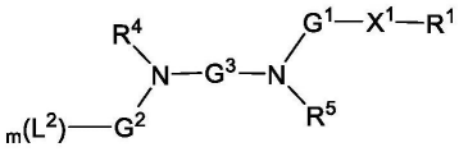
[0013] 在一个实施方案中,阳离子脂质具有式(I):

[0014] 

(I),

[0015] 或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体,其中G^1、X^1、R^1、R^x和R^y如本文或别处所定义。

[0016] 在一个实施方案中,阳离子脂质具有式(III):

[0017] 

(III),

[0018] 或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体,其中G^1、X^1、R^1、R^x和R^y如本文或别处所定义。

[0019] 在一个实施方案中,与常规四脂质组分脂质纳米颗粒(诸如其中阳离子脂质:类固醇:磷脂:聚合物结合的脂质的摩尔比为约50:38.5:10:1.5的四脂质组分脂质纳米颗粒)相比,本文提供的三脂质组分脂质纳米颗粒(不含磷脂组分,或具有减少/不显著量的磷脂组分)具有增加的尺寸。在一个实施方案中,本文提供的三脂质组分纳米颗粒的尺寸是约110nm至约130nm。

[0020] 本文还提供了药物组合物,所述药物组合物包含本文提供的脂质纳米颗粒和药学上可接受的赋形剂。

[0021] 本文还提供了使用本文提供的脂质纳米颗粒或本文提供的药物组合物用于在哺乳动物细胞或哺乳动物的组织中表达mRNA、用于将编码蛋白质的mRNA引入细胞中、用于治疗人的疾病或病症或用于治疗人的由蛋白质的表达受损引起的疾病或病症的方法。

附图说明

[0022] 图1示出静脉内注射含有脂质-5的LNP后6小时的体内蛋白质(hEPv)表达。LNP组成和性质列于表1和表5中。所有表达数据均针对制剂L-0进行归一化。显示误差线以表示平均值的标准误差(S.E.M.)。

[0023] 图2示出静脉内施用含有SM-102的LNP后6小时的体内蛋白质(hEPO)表达。LNP组成和性质列于表2和表6中。所有表达数据均针对制剂S-0进行归一化。显示误差线以表示S.E.M.。

[0024] 图3示出静脉内施用含有C1或ALC-0315的LNP后6小时的体内蛋白质(hEPO)表达。LNP组成和性质列于表3、表4、表7和表8中。所有表达数据均针对制剂A-0或C1-0进行归一化。显示误差线以表示S.E.M.。

[0025] 图4示出静脉内施用含有超过3mol%的PEG-脂质的LNP后6小时的体内蛋白质(hEPO)表达。所有表达数据均针对制剂L-0或S-0进行归一化。显示误差线以表示S.E.M.。

[0026] 图5A、图5B和图5C示出通过用片段分析(FA)测定评价包封的mRNA的纯度,分别在室温、2℃-8℃和-20℃下储存的某些含脂质-5的LNP在4个月过程内的长期稳定性。

[0027] 图5D和图5E示出分别在2℃-8℃或-20℃下储存长达400天的某些含脂质-5的LNP的更新长期稳定性。

[0028] 图6A示出肌内施用某些含脂质-5的LNP后6小时的体内GFP表达;图6B示出根据所表达的GFP的量归一化的IL-6水平。

[0029] 图7A和图7B示出分别静脉内施用和肌内施用某些含脂质-5的LNP后7天内监测到的小鼠体重变化。

[0030] 图8示出静脉内施用含有C2的LNP后6小时的体内蛋白质(hEPO)表达。LNP组成和性质列于表9和表10中。所有表达数据均针对制剂C2-0进行归一化。显示误差线以表示S.E.M.。

[0031] 图9A和图9B分别示出由C1/胆固醇/DMG-PEG(60%/38.5%/1.5%)组成的LNP和由C1/胆固醇/DMG-PEG(65%/33%/2.0%)组成的LNP的Cyro-TEM图像。

具体实施方式

[0032] 6.1一般技术

[0033] 本文所描述或引用的技术和程序包括本领域技术人员一般充分理解和/或使用常规方法通常采用的技术和程序,例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3版,2001);Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel等人编,2003)中所描述的广泛使用的方法。

[0034] 6.2术语

[0035] 除非另有描述,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本领域的技术人员通常所理解相同的含义。出于解释本说明书的目的,将应用以下术语描述,并且在适当时,以单数形式使用的术语还将包括复数形式,反之亦然。所有专利、申请、公布的申请和其它出版物通过引用以其整体并入。如果所阐述的关于术语的任何描述与通过引用并入本文中的任何文件相冲突,则以下文阐述的术语描述为准。

[0036] 如本文所用且除另有说明外,否则术语“脂质”是指一组有机化合物,其包括但不限于脂肪酸的酯,并且通常特征在于难溶于水,但可溶于许多非极性有机溶剂如戊烷、己烷、二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯和乙醚中。虽然脂质通常在水中溶解性差,但有某些类别的脂质(例如,由极性基团修饰的脂质,例如DMG-PEG2000)具有有限的水溶性,并且可以在某些条件下溶于水。已知类型的脂质包括生物分子,如脂肪酸、蜡、固醇、脂溶性维生素、甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯和磷脂。脂质可分成至少三类:(1)“简单脂质”,其包括脂肪和油以及蜡;(2)“复合脂质”,其包括磷脂和糖脂(例如,DMPE-PEG2000);和(3)“衍生脂质”,如类固醇。进一步地,如本文所用,脂质还涵盖合成类脂质化合物。术语“类脂质化合物”又简称为“类脂质”,是指脂质样化合物(例如具有脂质样物理性质的两亲性化合物)。

[0037] 术语“脂质纳米颗粒”或“LNP”是指具有至少一个纳米(nm)级的尺寸(例如,1至1,000nm)的颗粒,其含有一种或多种类型的脂质分子。本文提供的LNP可进一步含有至少一种非脂质有效负载分子(例如,一种或多种核酸分子)。在一个实施方案中,LNP包含部分或完全包封在脂质壳内部的非脂质有效负载分子。特别地,在一个实施方案中,其中有效负载是带负电的分子(诸如包括RNA和DNA的核酸),并且LNP的脂质组分包含至少一种阳离子脂质。不受理论的束缚,预期阳离子脂质可以通过静电效应与带负电的有效负载分子相互作用,

并在LNP形成期间促进有效负载结合和/或包封到LNP中。可形成如本文所提供的LNP的一部分的其它脂质包括但不限于中性脂质和带电脂质,诸如类固醇、聚合物结合的脂质和各种两性离子性脂质。在某些实施方案中,根据本公开的LNP包含一种或多种如所描述的式(I)和(II)的阳离子脂质。

[0038] 术语“阳离子脂质”是指在其环境的任何pH值或氢离子活性下带正电,或能够响应于其环境(例如,其预期用途的环境)的pH值或氢离子活性而带正电的脂质。因此,术语“阳离子脂质”涵盖“永久性阳离子脂质”、“可阳离子化脂质”和“可电离脂质”。在某些实施方案中,阳离子脂质中的正电荷源自季氮原子的存在。在某些实施方案中,阳离子脂质包含两性离子性脂质,所述两性离子性脂质在其预期用途的环境中(例如,在生理pH值下)带正电荷。在某些实施方案中,阳离子脂质是可电离脂质。在某些实施方案中,阳离子脂质是如本文所述的一种或多种式(I)或(II)的脂质。

[0039] 术语“聚合物结合的脂质”是指既包含脂质部分又包含聚合物部分的分子。聚合物结合的脂质的实例是聚乙二醇化脂质(PEG-脂质),其中聚合物部分包含聚乙二醇。

[0040] 如本文所用且除非另有说明,否则术语“烷基”是指仅由碳和氢原子组成的饱和直链或支链烃链基团。烷基不含有任何碳-碳双键或碳-碳三键。在一个实施方案中,烷基具有例如一至二十四个碳原子(C_1-C_{24}烷基)、四至二十个碳原子(C_4-C_{20}烷基)、六至十六个碳原子(C_6-C_{16}烷基)、六至九个碳原子(C_6-C_9烷基)、一至十五个碳原子(C_1-C_{15}烷基)、一至十二个碳原子(C_1-C_{12}烷基)、一至八个碳原子(C_1-C_8烷基)、一至六个碳原子(C_1-C_6烷基)、二至十二个碳原子(C_1-C_{12}烷基)、十四至四十二个碳原子(C_{14}-C_{42}烷基)、一至六个碳原子(C_1-C_6烷基)、六至四十二个碳原子(C_6-C_{42}烷基)、六至二十四个碳原子(C_6-C_{24}烷基)或十四至二十四个碳原子(C_{14}-C_{24}烷基)且其通过单键连接至分子的其余部分。作为非限制性实例,烷基包括甲基、乙基、正丙基、1-甲基乙基(异丙基)、正丁基、正戊基、1,1-二甲基乙基(叔丁基)、3-甲基己基、2-甲基己基等。除非另有说明,否则烷基任选地被取代。

[0041] 如本文所用并且除非另有说明,否则术语“亚烷基”或“亚烷基链”是指将分子其余部分连接至基团的直链或支链多价(例如,二价或三价)烃链,其仅由碳和氢组成并且为饱和的。在一个实施方案中,亚烷基具有例如一至二十四个碳原子(C_1-C_{24}亚烷基)、一至十五个碳原子(C_1-C_{15}亚烷基)、一至十二个碳原子(C_1-C_{12}亚烷基)、一至八个碳原子(C_1-C_8亚烷基)、一至六个碳原子(C_1-C_6亚烷基)、二至四个碳原子(C_2-C_4亚烷基)、一至二个碳原子(C_1-C_2亚烷基)或二至十二个碳原子(C_2-C_{12}亚烷基)。作为非限制性实例,亚烷基包括亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚异丙基、亚正丁基、亚叔丁基等。亚烷基链通过单键连接至分子的其余部分,并且通过单键连接至基团。亚烷基链与分子其余部分和与基团的连接点可通过链内的一个碳或任何两个碳。除非另有说明,否则亚烷基链任选地被取代。

[0042] 如本文所使用且除非另有说明,否则术语“环烷基”是指仅由碳和氢原子组成且为饱和的非芳族单环或多环烃基。环烷基可包括稠合或桥连环系统。在一个实施方案中,环烷基具有例如3至15个环碳原子(C_3-C_{15}环烷基)、3至10个环碳原子(C_3-C_{10}环烷基)或3至8个环碳原子(C_3-C_8环烷基)。环烷基通过单键连接至分子的其余部分。作为非限制性实例,单环环烷基包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。多环环烷基的实例包括金刚烷基、降冰片基、十氢萘基、7,7-二甲基-双环[2.2.1]庚基等。除非另有说明,否则环烷基任选地被取代。

[0043] 如本文所用且除非另有说明,否则术语“环烯基”是指仅由碳和氢原子组成且包含一个或多个碳-碳双键的非芳族单环或多环烃基。环烯基可包括稠合或桥连环系统。在一个实施方案中,环烯基具有例如3至15个环碳原子(C_3-C_{15}环烯基)、3至10个环碳原子(C_3-C_{10}环烯基)或3至8个环碳原子(C_3-C_8环烯基)。环烯基通过单键连接至分子的其余部分。作为非限制性实例,环烯基包括环丙烯基、环丁烯基、环戊烯基、环己烯基、环庚烯基、环辛烯基等。除非另有说明,否则环烯基任选地被取代。

[0044] 如本文所用并且除非另有说明,否则术语“芳基”是指含有至少一个芳族烃环的单环芳族基团和/或多环单价芳族基团。在某些实施方案中,芳基具有6至18个环碳原子(C_6-C_{18}芳基)、6至14个环碳原子(C_6-C_{14}芳基)或6至10个环碳原子(C_6-C_{10}芳基)。芳基的实例包括但不限于苯基、萘基、芴基、蒽基、葸基、菲基、芘基、联苯基和联三苯基。术语“芳基”还指双环、三环或其它多环烃环,其中至少一个环是芳族环,并且其它环可以是饱和、部分不饱和或芳族环,例如二氢萘基、茚基、二氢茚基或四氢萘基(tetrahydronaphthyl/tetralinyl)。除非另有说明,否则芳基任选地被取代。

[0045] 当本文所描述的基团被称为“被取代”时,其可被一个或多个任何适当的取代基取代。取代基的说明性实例包括但不限于在本文所提供的示例性化合物和实施方案中发现的取代基,以及:卤素原子,如F、Cl、Br或I;氰基;氧代基(=O);羟基(-OH);烷基;烯基;炔基;环烷基;芳基;-(C=O)OR';-O(C=O)R';-C(=O)R';-OR';-S(O)$_x$R';-S-SR';-C(=O)SR';-SC(=O)R';-NR'R';-NR'C(=O)R';-C(=O)NR'R';-NR'C(=O)NR'R';-OC(=O)NR'R';-NR'C(=O)OR';-NR'S(O)$_x$NR'R';-NR'S(O)$_x$R';以及-S(O)$_x$NR'R',其中:R'在每次出现时独立地为H、C_1-C_{15}烷基或环烷基,并且x是0、1或2。在一个实施方案中,取代基是C_1-C_{12}烷基。在其它实施方案中,取代基是环烷基。在其它实施方案中,取代基是卤基,如氟基。在其它实施方案中,取代基是氧代基。在其它实施方案中,取代基是羟基。在其它实施方案中,取代基是烷氧基(-OR')。在其它实施方案中,取代基是羧基。在其它实施方案中,取代基是氨基(-NR'R')。

[0046] 如本文所述并且除非另有说明,否则术语“任选的”或“任选地”(例如,任选取代的)意指随后描述的事件或情况可能发生或不发生,并且描述包括所述事件或情况发生的情况以及所述事件或情况不发生的情况。举例来说,“任选取代的烷基”意指烷基可被取代或者可不被取代,并且所述描述包括取代的烷基和不具有取代的烷基两者。

[0047] 如本文所用且除非另有说明,否则术语“药学上可接受的盐”包括酸加成盐和碱加成盐两者。

[0048] 作为非限制性实例,药学上可接受的酸加成盐包括盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等;以及有机酸,例如但不限于乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、褐藻酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰胺基苯甲酸、樟脑酸、樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸、环拉酸(cyclamic acid)、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙烷磺酸、2-羟基乙烷磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖二酸、龙胆酸、葡庚糖酸、葡糖酸、葡糖醛酸、谷氨酸、戊二酸、2-氧代戊二酸、甘油磷酸、乙醇酸、马尿酸、异丁酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、甲烷磺酸、粘液酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2-磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、烟酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、帕莫酸(pamoic acid)、丙酸、焦谷氨酸、丙酮酸、水杨酸、4-氨基水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸、三氟乙酸、十一碳烯酸等。

[0049] 作为非限制性实例,药学上可接受的碱加成盐包括通过将无机碱或有机碱添加至游离酸化合物而制备的盐。衍生自无机碱的盐包括但不限于钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐、镁盐、铁盐、锌盐、铜盐、锰盐、铝盐等。在一个实施方案中,无机盐是铵盐、钠盐、钾盐、钙盐和镁盐。衍生自有机碱的盐包括但不限于以下物质的盐:伯胺、仲胺和叔胺、取代的胺(包括天然存在的取代的胺)、环胺和碱性离子交换树脂,如氨、异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、二乙醇胺、乙醇胺、丹醇、2-二甲基氨基乙醇、2-二乙基氨基乙醇、二环已基胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因(procaine)、海巴明(hydrabamine)、胆碱、甜菜碱、苯乙苄胺、苄星青霉素、乙二胺、葡糖胺、甲基葡糖胺、可可碱、三乙醇胺、氨丁三醇、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶、聚胺树脂等。在一个实施方案中,有机碱是异丙胺、二乙胺、乙醇胺、三甲胺、二环已基胺、胆碱和咖啡因。

[0050] 本文所提供的化合物可含有一个或多个不对称中心,并且因此可产生对映异构体、非对映异构体和其它立体异构形式,所述形式可根据绝对立体化学定义为(R)-或(S)-或对于氨基酸可定义为(D)-或(L)-。除非另有说明,否则本文所提供的化合物意图包括所有此类可能的异构体,以及它们的外消旋和光学纯形式。光学活性(+)与(-)、(R)-与(S)-或(D)-与(L)-异构体可使用手性合成子或手性试剂制备,或使用常规技术,例如色谱法和分步结晶法拆分。用于制备/分离个别对映异构体的常规技术包括从适合的光学纯前体手性合成或使用例如手性高效液相色谱法(HPLC)拆分外消旋物(或盐或衍生物的外消旋物)。当本文所述的化合物含有烯属双键或其它几何不对称中心时,并且除非另有说明,否则所述化合物意图包括E和Z几何异构体。同样,还意图包括所有互变异构形式。

[0051] 如本文所用且除非另有说明,否则术语“异构体”是指具有相同分子式的不同化合物。“立体异构体”是仅原子在空间中的排列方式不同的异构体。“阻转异构体”是由围绕单键的受阻旋转得到的立体异构体。“对映异构体”是一对互为不可重叠的镜像的立体异构体。一对对映异构体的任何比例的混合物可称为“外消旋”混合物。“非对映异构体”是具有至少两个不对称原子但不互为镜像的立体异构体。

[0052] “立体异构体”还可包括E和Z异构体或其混合物,以及顺式和反式异构体或其混合物。在某些实施方案中,本文所述的化合物分离为E或Z异构体。在其它实施方案中,本文所述的化合物是E和Z异构体的混合物。

[0053] “互变异构体”是指化合物的彼此平衡的异构形式。异构形式的浓度将取决于化合物所处的环境,并且可能取决于例如化合物是固体还是处于有机溶液或水溶液中而有所不同。

[0054] 还应注意,本文所述的化合物可在一个或多个原子处含有非天然比例的原子同位素。举例来说,化合物可用放射性同位素进行放射性标记,例如像氚(^{3}H)、碳-14(^{14}C)、碳-11(^{11}C)、氟-18(^{18}C)、硫-35(^{35}S)、碘-125(^{125}I),或者可以是同位素富集的,如氘(^{2}H)、碳-13(^{13}C)或氮-15(^{15}N)。如本文所用,“同位素体”是同位素富集的化合物。术语“同位素富集的”是指原子的同位素组成不同于所述原子的天然同位素组成。“同位素富集的”还可指化合物含有的至少一个原子的同位素组成不同于所述原子的天然同位素组成。术语“同位素组成”是指给定原子存在的每种同位素的量。经放射性标记和同位素富集的化合物可用作治疗剂,例如癌症治疗剂;研究试剂,例如结合测定试剂;和诊断剂,例如体内成像剂。如本文所述的化合物的所有同位素变体,无论是否具有放射性,皆意图涵盖在本文所提供的实施方

案的范围内。在一个实施方案中,提供了本文所述的化合物的同位素体,例如同位素体是氘、碳-13和/或氮-15富集的。如本文所用,“氘代”是指化合物中的至少一个氢(H)已被氘(以D或^{2}H表示)置换,也就是说,化合物在至少一个位置处富含氘。

[0055] 应注意,如果所描绘的结构与所述结构的名称之间存在差异,则应以所描绘的结构为准。

[0056] 如本文所用且除非另有说明,否则术语“药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂”包括但不限于被美国食品与药物管理局批准可接受用于人类或家畜的任何佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、风味增强剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、助悬剂、稳定剂、等渗剂、溶剂或乳化剂。

[0057] 术语“组合物”意图涵盖含有任选指定量的指定成分(例如本文所提供的mRNA分子)的产品。

[0058] 如本文可互换使用,术语“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸聚合物,并且包括例如DNA和RNA。核酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核苷酸或碱基和/或其类似物,或者可通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应并入聚合物中的任何底物。核酸可包含经修饰的核苷酸,诸如甲基化核苷酸及其类似物。核酸可呈单链或双链形式。如本文所用且除非另有说明,否则“核酸”还包括核酸模拟物,如锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)和吗啉核酸。如本文所用,“寡核苷酸”是指短的合成多核苷酸,其长度一般但未必少于约200个核苷酸。术语“寡核苷酸”与“多核苷酸”并非互相排斥的。以上关于多核苷酸的描述同样且完全适用于寡核苷酸。除非另有说明,否则本文所公开的任何单链多核苷酸序列的左手端为5’端;双链多核苷酸序列的左手方向称为5’方向。新生RNA转录物的5’至3’添加方向称为转录方向;DNA链上具有与RNA转录物相同的序列并且相对于RNA转录物的5’端而位于5’处的序列区域称为“上游序列”;DNA链上具有与RNA转录物相同的序列并且相对于RNA转录物的3’端而位于3’处的序列区域称为“下游序列”。

[0059] 如本文所用,术语“非天然存在的”当参考如本文所述的核酸分子使用时意图指所述核酸分子在自然界中不存在。编码病毒肽或蛋白质的非天然存在的核酸含有至少一种通常不存在于病毒的天然存在的毒株(包括病毒的野生型毒株)中的遗传改变或化学修饰。遗传改变包括例如引入编码病毒的异源肽或多肽的可表达核酸序列的修饰、其它核酸添加、核酸缺失、核酸取代和/或对病毒的遗传物质的其它功能破坏。此类修饰包括例如对病毒物种的异源、同源、或异源和同源多肽的编码区及其功能片段的修饰。额外修饰包括例如对非编码调控区的修饰,其中所述修饰改变基因或操纵子的表达。额外修饰还包括例如将核酸序列并入诸如质粒或人工染色体的载体中。化学修饰包括例如一种或多种如本文所述的功能性核苷酸类似物。

[0060] “分离的核酸”是指与天然地伴随原生序列的其它基因组DNA序列以及蛋白质或复合物(诸如核糖体和聚合酶)基本上分离的核酸,例如RNA、DNA或核酸混合物。“分离的”核酸分子是与存在于核酸分子的天然来源中的其它核酸分子分离的核酸分子。此外,当通过重组技术制造时,“分离”的核酸分子,如mRNA分子,可基本上不含其它细胞材料或培养基,或者当化学合成时,其可基本上不含化学前体或其它化学品。在具体实施方案中,如本文所述的编码抗原的一种或多种核酸分子是分离的或纯化的。所述术语包括已从其天然存在的环境移除的核酸序列,并且包括重组或克隆的DNA或RNA分离物以及化学合成的类似物或由异

源系统生物合成的类似物。基本上纯的分子可包括分子的分离形式。

[0061] 术语“编码核酸”或其语法等效物当用于指核酸分子时包括:(a)处于天然状态或通过本领域的技术人员熟知的方法操作时可转录产生mRNA且接着翻译成肽和/或多肽的核酸分子;和(b)mRNA分子本身。反义链是此类核酸分子的互补序列,并且可由其推断出编码序列。术语“编码区”是指编码核酸序列中翻译成肽或多肽的部分。术语“非翻译区”或“UTR”是指编码核酸中不翻译成肽或多肽的部分。取决于UTR相对于核酸分子的编码区的取向,UTR如果位于编码区5’端,则称为5’-UTR,并且UTR如果位于编码区3’端,则称为3’-UTR。

[0062] 如本文所用,术语“mRNA”是指包含一个或多个开放阅读框(ORF)的信使RNA分子,其可被具有所述mRNA的细胞或生物体翻译以产生一种或多种肽或蛋白质产物。含有一个或多个ORF的区域称为mRNA分子的编码区。在某些实施方案中,mRNA分子还包含一个或多个非翻译区(UTR)。

[0063] 在某些实施方案中,mRNA是仅包含一个ORF的单顺反子mRNA。在某些实施方案中,单顺反子mRNA编码包含选定抗原(例如致病性抗原或肿瘤相关抗原)的至少一个表位的肽或蛋白质。在其它实施方案中,mRNA是包含两个或更多个ORF的多顺反子mRNA。在某些实施方案中,多顺反子mRNA编码可彼此相同或不同的两种或更多种肽或蛋白质。在某些实施方案中,由多顺反子mRNA编码的每种肽或蛋白质包含选定抗原的至少一个表位。在某些实施方案中,由多顺反子mRNA编码的不同肽或蛋白质各自包含不同抗原的至少一个表位。在本文所述实施方案中的任一个中,至少一个表位可以是抗原的至少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个表位。

[0064] 术语“核碱基”涵盖嘌呤和嘧啶,包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷以及其天然或合成类似物或衍生物。

[0065] 如本文所用,术语“功能性核苷酸类似物”是指经典核苷酸A、G、C、U或T的经修饰型式,所述型式(a)保留相应经典核苷酸的碱基配对特性,并且(b)含有至少一种对相应天然核苷酸的(i)核碱基、(ii)糖基、(iii)磷酸酯基或(iv)(i)至(iii)的任何组合的化学修饰。如本文所用,碱基配对不仅涵盖经典沃森-克里克(Watson-Crick)腺嘌呤-胸腺嘧啶、腺嘌呤-尿嘧啶或鸟嘌呤-胞嘧啶碱基对,而且还涵盖在经典核苷酸与功能性核苷酸类似物之间或在一对功能性核苷酸类似物之间形成的碱基对,其中氢键供体与氢键受体的布置允许在经修饰的核碱基与经典核碱基之间或在两个互补的经修饰核碱基结构之间形成氢键。举例来说,鸟苷(G)的功能性类似物保留与胞嘧啶(C)或胞嘧啶的功能性类似物碱基配对的能力。此类非经典碱基配对的一个实例是经修饰核苷酸肌苷与腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶之间的碱基配对。如本文所述,功能性核苷酸类似物可以是天然存在或非天然存在的。因此,含有功能性核苷酸类似物的核酸分子可具有至少一个经修饰的核碱基、糖基和/或核苷间键联。本文提供对核酸分子的核碱基、糖基或核苷间键联的示例性化学修饰。

[0066] 如本文所用的术语“翻译增强子元件”、“TEE”和“翻译增强子”是指核酸分子中用于促进核酸的编码序列翻译成蛋白质或肽产物,如经由帽依赖性或非帽依赖性翻译而翻译成蛋白质或肽产物的区域。TEE通常位于核酸分子(例如,mRNA)的UTR区中,并增强位于上游或下游的编码序列的翻译水平。举例来说,核酸分子的5’-UTR中的TEE可位于核酸分子的启动子与起始密码子之间。各种TEE序列是本领域中已知的(Wellensiek等人Genome-wide profiling of human cap-independent translation-enhancing elements,Nature

Methods,2013年8月;10(8):747-750;Chappell等人PNAS2004年6月29日101(26)9590-9594)。已知一些TEE在多个物种中是保守的(Pánek等人Nucleic Acids Research,第41卷,第16期,2013年9月1日,第7625-7634页)。

[0067] 如本文所用的术语“siRNA”是指“小干扰”或“短干扰RNA”。siRNA是可靶向目标基因的核苷酸的RNA双链体。“RNA双链体”是指通过RNA分子的两个区域之间的互补配对形成的结构。siRNA“靶向”基因,因为siRNA的双链体部分的核苷酸序列与所靶向基因的核苷酸序列互补。在一个实施方案中,siRNA的双链体的长度小于30个核苷酸。在一个实施方案中,siRNA的双链体的长度介于20至25个核苷酸之间。在一个实施方案中,siRNA的双链体的长度可以是29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、18、16、14、12或10个核苷酸。siRNA的RNA双链体部分可以是发夹结构的一部分。除了双链体部分之外,发夹结构还可含有位于形成双链体的两个序列之间的环部分。环的长度可以变化。在一个实施方案中,环的长度是5、6、7、8、9、10、11、12或13个核苷酸。发夹结构还可含有3’或5’突出部分。在一个实施方案中,突出端是长度为0、1、2、3、4或5个核苷酸的3’或5’突出端。siRNA可由核酸序列编码,并且核酸序列还可包含启动子。核酸序列还可包含聚腺苷酸化信号。在一个实施方案中,聚腺苷酸化信号是合成的最小聚腺苷酸化信号。在一个实施方案中,siRNA用于“基因沉默”。“基因沉默”是指抑制基因表达。基因沉默可通过影响转录的过程和/或通过影响转录后机制的过程来介导。在一个实施方案中,基因沉默在siRNA经由RNA干扰以序列特异性方式启动目标基因的mRNA的降解时发生。在一个实施方案中,siRNA通过在转录后降解mRNA来干扰具有互补核苷酸序列的特定基因的表达,从而阻止翻译。在一个实施方案中,基因沉默可以是等位基因特异性的,其是指基因的一个等位基因的特异性沉默。在一个实施方案中,siRNA用于基因“敲低”。“敲低”是指一种基因沉默技术,其中靶基因的表达与引入siRNA之前的基因表达相比有所降低,其可导致对靶基因产物的产生的抑制。术语“降低”在本文中用于表示靶基因表达降低1%-100%。例如,表达可降低10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%或99%。可使用siRNA来指导基因表达的敲低。

[0068] 术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,是指具有超过五十(50)个由共价肽键连接的氨基酸残基的聚合物。即,针对多肽的描述同样适用于针对蛋白质的描述,反之亦然。所述术语适用于天然存在的氨基酸聚合物以及一个或多个氨基酸残基为非天然存在的氨基酸(例如,氨基酸类似物)的氨基酸聚合物。如本文所用,所述术语涵盖任何长度的氨基酸链,包括全长蛋白质(例如抗原)。

[0069] 在肽或多肽的情况下,如本文所用,术语“衍生物”是指包含病毒肽或蛋白质的氨基酸序列或病毒肽或蛋白质的片段的肽或多肽,其已通过引入氨基酸残基取代、缺失或添加而发生改变。如本文所用,术语“衍生物”还指病毒肽或蛋白质,或者病毒肽或蛋白质的片段,其已例如通过使任何类型的分子共价连接至多肽而经化学修饰。例如但非限制,病毒肽或蛋白质或者病毒肽或蛋白质的片段可例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护基/阻断基衍生化、蛋白水解裂解、化学裂解、配制、衣霉素代谢合成、与细胞配体或其它蛋白质连接等而经化学修饰。衍生物以在所连接分子的类型或位置方面不同于天然存在或起始肽或多肽的方式经修饰。衍生物还包括一个或多个天然存在于病毒肽或蛋白质上的化学基团的缺失。此外,病毒肽或蛋白质或者病毒肽或蛋白质的片段的衍生物可含有一种或多种非经典氨基酸。在具体实施方案中,衍生物是衍生出所述衍生物的原

生或未经修饰的肽或多肽的功能衍生物。

[0070] 术语“功能衍生物”是指保留衍生出所述衍生物的天然存在或起始肽或多肽的一种或多种功能或活性的衍生物。例如,冠状病毒S蛋白的功能衍生物可保留结合宿主细胞上的一种或多种其受体的能力。例如,冠状病毒N蛋白的功能衍生物可保留结合RNA或包装病毒基因组的能力。

[0071] 术语“一致性”是指两个或更多个多肽分子或两个或更多个核酸分子的序列之间的关系,如通过比对和比较序列所确定。相对于参考多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”定义为在比对序列以及必要时引入空位(实现最大序列同一性百分比)并且不将任何保守取代当作序列同一性的一部分后,候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的目的比对可以本领域技术范围内的多种方式实现,例如,使用公开可用的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN(DNAStar,Inc.)软件。本领域技术人员可确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列的全长内实现最大比对所需的任何算法。

[0072] 对氨基酸残基/位置的“修饰”是指如与起始氨基酸序列相比一级氨基酸序列的变化,其中所述变化是由涉及所述氨基酸残基/位置的序列改变引起的。例如,典型修饰包括用另一氨基酸取代残基(例如,保守或非保守取代)、紧邻所述残基/位置插入一个或多个(例如,通常少于5、4或3个)氨基酸和/或缺失所述残基/位置。

[0073] 在肽或多肽的情况下,如本文所用,术语“片段”是指包含少于全长的氨基酸序列的肽或多肽。此类片段可例如来自于氨基末端的截短、羧基末端的截短和/或氨基酸序列中残基的内部缺失。片段可例如由选择性RNA剪接或由体内蛋白酶活性产生。在某些实施方案中,片段是指包括含多肽的氨基酸序列的至少5个连续氨基酸残基、至少10个连续氨基酸残基、至少15个连续氨基酸残基、至少20个连续氨基酸残基、至少25个连续氨基酸残基、至少30个连续氨基酸残基、至少40个连续氨基酸残基、至少50个连续氨基酸残基、至少60个连续氨基酸残基、至少70个连续氨基酸残基、至少80个连续氨基酸残基、至少90个连续氨基酸残基、至少100个连续氨基酸残基、至少125个连续氨基酸残基、至少150个连续氨基酸残基、至少175个连续氨基酸残基、至少200个连续氨基酸残基、至少250个、至少300个、至少350个、至少400个、至少450个、至少500个、至少550个、至少600个、至少650个、至少700个、至少750个、至少800个、至少850个、至少900个或至少950个连续氨基酸残基的氨基酸序列的多肽。在具体实施方案中,多肽的片段保留多肽的至少1种、至少2种、至少3种或更多种功能。

[0074] 如本文在肽或多肽(例如,蛋白质)的上下文中所用的,术语“免疫原性片段”是指肽或多肽的片段,其保留肽或多肽在与哺乳动物免疫系统接触时引发免疫反应(包括先天性免疫反应和/或适应性免疫反应)的能力。在一个实施方案中,肽或多肽的免疫原性片段可以是表位。

[0075] 术语“抗原”是指能够被受试者的免疫系统(包括适应性免疫系统)识别并且能够在使受试者与抗原接触后触发免疫反应(包括抗原特异性免疫反应)的物质。在某些实施方案中,抗原是与患病细胞(诸如被病原体感染的细胞)或赘生性细胞相关的蛋白质(例如,肿瘤相关抗原(TAA))。

[0076] “表位”是抗原分子表面上的与单个抗体分子结合的位点,诸如抗原表面上能够与抗体的一个或多个抗原结合区结合并且在动物,诸如哺乳动物(例如人类)中具有能够引发

免疫反应的抗原性或免疫原性活性的局部区域。具有免疫原性活性的表位是在动物中引发抗体反应的多肽的一部分。具有抗原活性的表位是抗体所结合的多肽的一部分,如通过本领域中熟知的任何方法(包括例如通过免疫测定)所确定。抗原性表位未必具有免疫原性。表位通常由分子的化学活性表面基团,如氨基酸或糖侧链组成,并且具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。抗体表位可以是线性表位或构象表位。线性表位是由蛋白质中的连续氨基酸序列形成的。构象表位由在蛋白质序列中是不连续的,但在蛋白质折叠成其三维结构时聚集在一起的氨基酸形成。当蛋白质的三维结构呈改变的构象时,如在另一种蛋白质或配体活化或结合之后,形成诱导性表位。在某些实施方案中,表位是多肽的三维表面特征。在其它实施方案中,表位是多肽的线性特征。通常,抗原具有若干或许多不同的表位,并且可与许多不同的抗体反应。

[0077] 如本文所用的术语“基因疫苗”是指包含至少一种核酸分子的治疗性或预防性组合物,所述至少一种核酸分子编码与目标疾病(例如,感染性疾病或赘生性疾病)相关的抗原。向受试者施用疫苗(“疫苗接种”)允许产生编码的肽或蛋白质,由此在受试者体内引发针对目标疾病的免疫反应。在某些实施方案中,免疫反应包括适应性免疫反应,如产生针对编码的抗原的抗体,和/或能够特异性消除表达所述抗原的患病细胞的免疫细胞的活化和增殖。在某些实施方案中,免疫反应还包括先天免疫反应。根据本公开,疫苗可在目标疾病的临床症状发作之前或之后施用于受试者。在一个实施方案中,对健康或无症状受试者进行疫苗接种使经疫苗接种的受试者对目标疾病的发展具有免疫性或不太敏感。在一个实施方案中,对显示疾病症状的受试者进行疫苗接种改善经疫苗接种的受试者的疾病状况或治疗疾病。

[0078] 术语“先天性免疫反应”和“先天性免疫”是本领域中公认的,并且是指身体的免疫系统在识别出病原体相关分子模式时启动的非特异性防御机制,其涉及不同形式的细胞活动,包括通过各种路径的细胞因子产生和细胞死亡。如本文所用,先天免疫反应包括但不限于炎症细胞因子的产生(例如I型干扰素或IL-10产生)增加;NFκB路径的活化;免疫细胞的增殖、成熟、分化和/或存活增加,以及在一些情况下细胞凋亡的诱导。先天免疫的活化可使用本领域中已知的方法检测,如测量(NF)-κB活化。

[0079] 术语“适应性免疫反应”和“适应性免疫”是本领域中公认的,并且是指身体的免疫系统在识别出特定抗原时启动的抗原特异性防御机制,包括体液反应和细胞介导的反应。如本文所用,适应性免疫反应包括由疫苗组合物,诸如本文所述的遗传组合物触发和/或增强的细胞反应。在一个实施方案中,疫苗组合物包含作为抗原特异性适应性免疫反应的靶标的抗原。在其它实施方案中,疫苗组合物在施用后允许在经免疫的受试者中产生抗原,所述抗原是抗原特异性适应性免疫反应的靶标。适应性免疫反应的活化可使用本领域中已知的方法检测,诸如测量抗原特异性抗体的产生或抗原特异性细胞介导的细胞毒性的水平。

[0080] 术语“抗体”意图包括免疫球蛋白类别的多肽内的B细胞的多肽产物,所述多肽产物能够结合至特定分子抗原并且由两对相同的多肽链组成,其中每对具有一条重链(约50-70kDa)和一条轻链(约25kDa),每条链的每个氨基末端部分包含约100至约130个或更多个氨基酸的可变区,并且每条链的每个羧基末端部分包含恒定区。参见例如Antibody Engineering(Borrebaeck编,第2版,1995);和Kuby,Immunology(第3版,1997)。在具体实施方案中,特定分子抗原可由本文所提供的抗体结合,包括多肽、其片段或表位。抗体还包括

但不限于合成抗体、重组产生的抗体、骆驼化抗体、胞内抗体、抗独特型(抗Id)抗体以及上述任一者的功能片段,所述功能片段是指抗体重链或轻链多肽的保留作为所述片段来源的抗体的部分或全部结合活性的一部分。功能片段的非限制性实例包括单链Fv(scFv)(例如包括单特异性、双特异性等)、Fab片段、F(ab')片段、F(ab)$_2$片段、F(ab')$_2$片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、Fd片段、Fv片段、双抗体、三抗体、四抗体和微型抗体。特别地,本文所提供的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,例如抗原结合结构域或含有抗原结合位点的分子(例如抗体的一个或多个CDR)。此类抗体片段可在例如Harlow和Lane,Antibodies:A Laboratory Manual(1989);Mol.Biology and Biotechnology:A Comprehensive Desk Reference(Myers编辑,1995);Huston等人,1993,Cell Biophysics 22:189-224;Plückthun和Skerra,1989,Meth.Enzymol.178:497-515;以及Day,Advanced Immunochemistry(第2版,1990)中找到。本文所提供的抗体可具有免疫球蛋白分子的任何类别(例如IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)或任何亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。

[0081] 术语"施用(administer/administration)"是指将存在于体外的物质(例如本文所述的脂质纳米颗粒组合物)注射或以其它方式物理递送至患者体内的操作,如经粘膜、真皮内、静脉内、肌肉内递送和/或本文所描述或本领域中已知的任何其它物理递送方法递送。当治疗疾病、病症、疾患或其症状时,通常在所述疾病、病症、疾患或其症状发作之后进行物质的施用。当预防疾病、病症、疾患或其症状时,通常在所述疾病、病症、疾患或其症状发作之前进行物质的施用。

[0082] "长期"施用与急性模式相对,是指以连续模式施用一种或多种剂(例如持续一段时间,如数天、数周、数月或数年),由此在较长一段时间内维持初始治疗效果(活性)。"间歇性"施用是指治疗不是不间断地连续进行,而是本质上周期性的。

[0083] 如本文所用,术语"靶向递送"或动词形式"靶向"是指相较于递送至任何其它器官、组织、细胞或细胞内隔室(称为非目标位置),促进所递送的剂(如本文所述的脂质纳米颗粒组合物中的治疗有效负载分子)到达特定器官、组织、细胞和/或细胞内隔室(称为目标位置)的过程。靶向递送可使用本领域中已知的方法检测,例如通过在全身施用后将所递送的剂在目标细胞群体中的浓度与所递送的剂在非目标细胞群体处的浓度相比较来检测。在某些实施方案中,靶向递送使得目标位置处的浓度为非目标位置处的浓度的至少2倍高。

[0084] "有效量"通常是足以降低症状的严重程度和/或频率;消除症状和/或潜在原因;防止症状和/或其潜在原因的发生;和/或改善或补救由疾病、病症或疾患,包括例如由感染和赘瘤形成引起或与之相关的损害的量。在一个实施方案中,有效量是治疗有效量或预防有效量。

[0085] 如本文所用的术语"治疗有效量"是指足以减少和/或改善给定疾病、病症或疾患,和/或其相关症状(例如,感染性疾病,如由病毒感染引起的感染性疾病,或赘生性疾病,如癌症)的严重程度和/或持续时间的剂(例如,疫苗组合物)的量。本公开的物质/分子/剂(例如本文所述的脂质纳米颗粒组合物)的"治疗有效量"可根据诸多因素而变化,如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及物质/分子/剂在个体体内引起所需反应的能力。治疗有效量包含物质/分子/剂的治疗有益作用胜过其任何有毒或有害作用的量。在某些实施方案中,术语"治疗有效量"是指有效"治疗"受试者或哺乳动物的疾病、病症或疾患的如本文所述的脂质纳米颗粒组合物或其中所含治疗剂或预防剂(例如治疗性mRNA)的量。

[0086] “预防有效量”是当施用于受试者时将具有预期预防作用,例如预防疾病、病症、疾患或相关症状(例如感染性疾病,诸如由病毒感染引起的感染性疾病,或赘生性疾病,诸如癌症)、延迟其发作(或复发)或降低其发作(或复发)可能性的药物组合物的量。通常但非必须地,由于预防剂量是在疾病、病症或疾患之前或其早期阶段用于受试者,因此预防有效量可能小于治疗有效量。完全的治疗或预防作用未必通过施用一次剂量而发生,而可能仅在施用一系列剂量后才发生。因此,治疗或预防有效量可分一次或多次施用来施用。

[0087] 如本文所使用且除非另有说明,否则术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”是指全部或部分减轻病症、疾病或疾患,或与病症、疾病或疾患相关的一种或多种症状,或减缓或停止那些症状的进一步进展或恶化,或减轻或根除病症、疾病或疾患本身的病因。

[0088] 如本文所使用且除非另有说明,否则术语“预防(prevent)”、“预防(preventing)”和“预防(prevention)”是指降低疾病、病症、疾患或相关症状(例如感染性疾病,诸如由病毒感染引起的感染性疾病,或赘生性疾病,诸如癌症)发作(或复发)的可能性。

[0089] 如本文所使用且除非另有说明,否则术语“控制(manage)”、“控制(managing)”和“控制(management)”是指受试者从疗法(例如预防剂或治疗剂)中获得的有益作用,所述有益作用不会引起疾病的治愈。在某些实施方案中,向受试者施用一种或多种疗法(例如预防剂或治疗剂,如本文所述的脂质纳米颗粒组合物)以“控制”感染性或赘生性疾病、其一种或多种症状,由此预防疾病的进展或恶化。

[0090] 术语“预防剂”是指可以完全或部分地抑制受试者的疾病和/或其相关症状的发展、复发、发作或扩散的任何剂。

[0091] 术语“治疗剂”是指可用于治疗、预防或减轻疾病、病症或疾患,包括用于治疗、预防或减轻疾病、病症或疾患和/或其相关症状的一种或多种症状的任何剂。

[0092] 术语“疗法”是指可用于预防、控制、治疗和/或改善疾病、病症或疾患的任何方案、方法和/或剂。在某些实施方案中,术语“疗法(therapies/therapy)”是指本领域的技术人员,如医务人员已知可用于预防、控制、治疗和/或改善疾病、病症或疾患的生物疗法、支持疗法和/或其它疗法。

[0093] 如本文所用,“预防有效的血清滴度”是受试者(例如人)中完全地或部分地抑制受试者中的疾病、病症或疾患和/或与其相关的症状的发展、复发、发作或扩散的抗体的血清滴度。

[0094] 术语“副作用”涵盖疗法(例如,预防剂或治疗剂)的不想要和/或不良作用。不想要的作用未必为不良的。疗法(例如预防剂或治疗剂)的不良作用可能为有害的、令人不适的或有风险的。副作用的实例包括腹泻、咳嗽、肠胃炎、喘鸣、恶心、呕吐、厌食、腹部绞痛、发烧、疼痛、体重减轻、脱水、脱发、呼吸困难、失眠、头晕、粘膜炎、神经和肌肉影响、疲劳、口干、食欲不振、施用部位出现皮疹或肿胀、如发烧、发冷和疲劳之类的类似流感的症状、消化道问题和过敏反应。患者经历的其它不期望的作用众多且为本领域中所知的。有许多作用描述于Physician's Desk Reference(第68版,2014)中。

[0095] 术语“受试者”与“患者”可互换使用。如本文所用,在某些实施方案中,受试者是哺乳动物,如非灵长类动物(例如牛、猪、马、猫、狗、大鼠等)或灵长类动物(例如猴和人类)。在具体实施方案中,受试者是人类。在一个实施方案中,受试者是患有感染性疾病或赘生性疾

病的哺乳动物(例如人类)。在另一个实施方案中,受试者是有发展感染性疾病或赘生性疾病的风险的哺乳动物(例如人类)。

[0096] “基本上全部”是指至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或约100%。

[0097] 如本文所用且除非另有说明,否则术语“约”或“大约”意指本领域的普通技术人员所测定的特定值的可接受的误差,其部分取决于测量或测定所述值的方式。在某些实施方案中,术语“约”或“大约”意指在1、2、3或4个标准偏差以内。在某些实施方案中,术语“约”和“大约”意指在给定值或范围的20%以内、15%以内、10%以内、9%以内、8%以内、7%以内、6%以内、5%以内、4%以内、3%以内、2%以内、1%以内、0.5%以内、0.05%以内或更低。

[0098] 除非上下文另外明确指出,否则本文所用的单数形式术语“一个(种)(a/an)”和“所述”包括复数个(种)参考物。

[0099] 本说明书中引用的所有出版物、专利申请、登录号和其它参考文献都通过引用以其整体并入本文中,其引用程度就如同特定并且单独地指示每一个别出版物或专利申请通过引用并入一般。本文所论述的出版物仅为了其在本申请的申请日之前的公开内容而提供。本文中任何内容均不应解释为承认本发明无权凭借在先发明而早于此类出版物。此外,所提供的公布日期可能与实际公布日期有所不同,实际公布日期可能需要独立确认。

[0100] 已经描述了本发明的多个实施方案。然而,应理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可进行各种修改。因此,实验部分和实施例中的描述旨在说明而非限制权利要求书中所描述的发明范围。

[0101] 6.3脂质纳米颗粒(LNP)组合物

[0102] 磷脂通常被认为是LNP中的辅助脂质或结构脂质,在常规LNP制剂中发挥重要作用。据信磷脂通过介导膜融合赋予结构稳定性并促进体内基因递送效率。三种基于LNP的商业产品(Onpattro®、Comirnaty®和mRNA-1273)均含有DSPC作为基本组分(Eygeris等人Chemistry of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery.Acc.Chem.Res.2022,55,2-12)。然而,如本文所提供,显示磷脂并不像普遍认为的那样在LNP制剂中必不可少。

[0103] 在一个实施方案中,本文提供了一种包含减少量(例如,与常规四脂质组分脂质纳米颗粒相比)的磷脂组分的脂质纳米颗粒。在一个实施方案中,LNP包含不超过0.5摩尔百分比的磷脂。

[0104] 在一个实施方案中,本文提供了一种脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒包含:

[0105] (a)所述纳米颗粒中存在的总脂质的约40mol%至约75mol%的量的阳离子脂质,其中所述阳离子脂质包含(i)至少一个叔胺或季铵部分,和(ii)至少一个C_{14}-C_{42}烷基酯部分;

[0106] (b)所述纳米颗粒中存在的总脂质的约22mol%至约59.5mol%的量的类固醇;

[0107] (c)所述纳米颗粒中存在的总脂质的约0.5mol%至约2.5mol%的量的聚合物结合的脂质;和

[0108] (d)核酸;

[0109] 条件是所述脂质纳米颗粒包含不超过0.5摩尔百分比的磷脂。

[0110] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约40mol%至约75mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约40mol%至约55mol%。在一个实施方

案中,阳离子脂质的量是约45mol%至约60mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约50mol%至约65mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约55mol%至约70mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约60mol%至约75mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约40mol%至约50mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约45mol%至约55mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约50mol%至约60mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约55mol%至约65mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约60mol%至约70mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约65mol%至约75mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约40mol%至约45mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约45mol%至约50mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约50mol%至约55mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约55mol%至约60mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约60mol%至约65mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约65mol%至约70mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约70mol%至约75mol%。

[0111] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约40mol%、约42.5mol%、约45mol%、约47.5mol%、约50mol%、约51mol%、约52mol%、约53mol%、约54mol%、约55mol%、约55.5mol%、约56mol%、约56.5mol%、约57mol%、约57.5mol%、约58mol%、约58.5mol%、约59mol%、约59.5mol%、约60mol%、约60.5mol%、约61mol%、约61.5mol%、约62mol%、约62.5mol%、约63mol%、约63.5mol%、约64mol%、约64.5mol%、约65mol%、约65.5mol%、约66mol%、约66.5mol%、约67mol%、约67.5mol%、约68mol%、约68.5mol%、约69mol%、约70mol%、约72.5mol%或约75mol%。

[0112] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约42.5mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约45mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约47.5mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约50mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约52.5mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约55mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约57.5mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约60mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约62.5mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约65mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约67.5mol%。在一个实施方案中,阳离子脂质的量是约70mol%。

[0113] 在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约0.5mol%至约2.5mol%。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约0.5mol%至约0.75mol%、约0.75mol%至约1mol%、约0.5mol%至约1mol%、约1mol%至约1.25mol%、约1.25mol%至约1.5mol%、约1mol%至约1.5mol%、约1.5mol%至约1.75mol%、约1.75mol%至约2mol%、约1mol%至约2mol%、约2mol%至约2.25mol%、约2.25mol%至约2.5mol%或约2mol%至约2.5mol%。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是约0.5mol%至约2mol%。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是约1mol%至约2.5mol%。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是约0.5mol%至约1.5mol%。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是约1mol%至约2mol%。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是约1.5mol%至约2.5mol%。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是约0.5mol%至约1mol%。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是约1mol%至约1.5mol%。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是约1.5mol%至约2mol%。在一个实

施方案中,聚合物结合的脂质的量是约2mol%至约2.5mol%。

[0114] 在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约0.5mol%、约0.6mol%、约0.7mol%、约0.8mol%、约0.9mol%、约1mol%、约1.1mol%、约1.2mol%、约1.25mol%、约1.3mol%、约1.35mol%、约1.4mol%、约1.45mol%、约1.5mol%、约1.55mol%、约1.6mol%、约1.65mol%、约1.7mol%、约1.75mol%、约1.8mol%、约1.85mol%、约1.9mol%、约1.95mol%、约2mol%、约2.1mol%、约2.2mol%、约2.3mol%、约2.4mol%或约2.5mol%。

[0115] 在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是约1.25mol%。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是约1.5mol%。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是约1.75mol%。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是约2mol%。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是约2.25mol%。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质的量是约2.5mol%。

[0116] 在一个实施方案中,类固醇的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约22mol%至约59.5mol%。在一个实施方案中,类固醇的量是约27mol%至约54.5mol%。在一个实施方案中,类固醇的量是约32mol%至约49.5mol%。在一个实施方案中,类固醇的量是约30mol%至约50mol%。在一个实施方案中,类固醇的量是约33mol%至约44mol%。在一个实施方案中,类固醇的量是约33mol%至约38mol%。在一个实施方案中,类固醇的量是约38mol%至约48mol%。在一个实施方案中,类固醇的量是约38mol%至约44mol%。在一个实施方案中,类固醇的量是约44mol%至约49mol%。在一个实施方案中,类固醇的量是纳米颗粒中存在的总脂质(除阳离子脂质和聚合物结合的脂质之外)的余量。

[0117] 在一个实施方案中,类固醇的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约22mol%至约23.5mol%、约23.5mol%至约29mol%、约29mol%至约33mol%、约33mol%至约36.5mol%、约36.5mol%至约38mol%、约38mol%至约42mol%、约42mol%至约44mol%、约33mol%至约44mol%、约44mol%至约49mol%、约49mol%至约54mol%或约54mol%至约59.5mol%。

[0118] 在一个实施方案中,类固醇的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约33mol%。在一个实施方案中,类固醇的量是约38mol%。在一个实施方案中,类固醇的量是约38.5mol%。在一个实施方案中,类固醇的量是约39mol%。在一个实施方案中,类固醇的量是约44mol%。在一个实施方案中,类固醇的量是约48mol%。在一个实施方案中,类固醇的量是约48.5mol%。在一个实施方案中,类固醇的量是约49mol%。

[0119] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约45mol%至约70mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2.5mol%。

[0120] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约45mol%至约70mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2mol%。

[0121] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1.5mol%至约2.5mol%。

[0122] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约45mol%至约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2.5mol%。

[0123] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约45mol%至约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2mol%。

[0124] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约0.5mol%至约2.5mol%。

[0125] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2mol%。

[0126] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约1.5mol%。

[0127] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1.5mol%至约2mol%。

[0128] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约2mol%至约2.5mol%。

[0129] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约60mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约0.8mol%至约2mol%。

[0130] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约60mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2mol%。

[0131] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约60mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1.5mol%至约2.5mol%。

[0132] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约60mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约2mol%至约2.5mol%。

[0133] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约55mol%至约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2.5mol%。

[0134] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约55mol%至约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2mol%。

[0135] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约55mol%至约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约0.5mol%至约2.5mol%。

[0136] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约55mol%至约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约0.8mol%至约2mol%。

[0137] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约60mol%至约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2mol%。

[0138] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约60mol%至约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1.5mol%至约2.5mol%。

[0139] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约45mol%至约60mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2.5mol%。

[0140] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约45mol%至约60mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2mol%。

[0141] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约45mol%至约55mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2.5mol%。

[0142] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约45mol%至约50mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2.5mol%。

[0143] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约55mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2.5mol%。

[0144] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约55mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2mol%。

[0145] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约55mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1.5mol%至约2.5mol%。

[0146] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约55mol%至约60mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2.5mol%。

[0147] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约55mol%至约60mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2mol%。

[0148] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约55mol%至约60mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约0.5mol%至约2.5mol%。

[0149] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约55mol%至约60mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约0.8mol%至约2mol%。

[0150] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约60mol%至约70mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2.5mol%。

[0151] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约40mol%至约55mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2.5mol%。

[0152] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约40mol%至约55mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2mol%。

[0153] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约67.5mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约2mol%。

[0154] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%。

[0155] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1.5mol%。

[0156] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约2mol%。

[0157] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约65mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约2.5mol%。

[0158] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约60mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%。

[0159] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约60mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1.5mol%。

[0160] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约60mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约2mol%。

[0161] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约60mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约2.5mol%。

[0162] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约55mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%。

[0163] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约55mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1.5mol%。

[0164] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约55mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约2mol%。

[0165] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约55mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约2.5mol%。

[0166] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1mol%。

[0167] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约1.5mol%。

[0168] 在一个实施方案中,阳离子脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约50mol%,并且聚合物结合的脂质的量是纳米颗粒中存在的总脂质的约2mol%。

[0169] 在一个实施方案中,具有本文提供的阳离子脂质的量和聚合物缀合的脂质的量的脂质纳米颗粒具有如本文或其它地方所述(例如,约100nm至约140nm,或约110nm至约130nm)或如实施例中所示的增加的纳米颗粒尺寸。

[0170] 在一个实施方案中,纳米颗粒组合物的脂质组分包括一种或多种聚合物结合的脂质,诸如聚乙二醇化脂质(PEG脂质)。不受理论束缚,预期纳米颗粒组合物中的聚合物结合的脂质组分可改善胶体稳定性,减少纳米颗粒的蛋白质吸收和/或增加纳米颗粒的血液循环时间。

[0171] 在一个实施方案中,聚合物结合的脂质是聚乙二醇化脂质,例如聚乙二醇化二酰基甘油(PEG-DAG)(诸如1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG))、聚乙二醇化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)、PEG琥珀酸二酰基甘油(PEG-S-DAG)(诸如4-O-(2',3'-二(十四烷酰基氧基)丙基-1-O-(ω-甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯(PEG-S-DMG))、聚乙二醇化神经酰胺(PEG-cer)或PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯(诸如ω-甲氧基(聚乙氧基)乙基-N-(2,3-二(十四烷氧基)丙基)氨基甲酸酯或2,3-二(十四烷氧基)丙基-N-(ω-甲氧基(聚乙氧基)乙基)氨基甲酸酯)。

[0172] 在一个实施方案中,聚合物结合的脂质是聚乙二醇(PEG)结合的脂质。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质是PEG-二酰基甘油(PEG-DAG)缀合物、PEG-二烷基氧基丙基(PEG-DAA)缀合物、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(PEG-DMA)缀合物、PEG-二硬脂基氧基丙基(PEG-DSA)缀合物或其混合物。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质是PEG-DAG。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质是PEG-DAA。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质是PEG-DMA。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质是PEG-DSA。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质是PEG-DMG。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质是PEG-DMPE。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质是DMG-PEG2000。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质是DMPE-PEG2000。

[0173] 在一个实施方案中,聚合物结合的脂质是聚乙二醇(PEG)结合的脂质,其中PEG的分子量是约500g/mol、约750g/mol、约1000g/mol、约1500g/mol、约2000g/mol、约2500g/mol、约3000g/mol、约3500g/mol、约4000g/mol、约4500g/mol、约5000g/mol或约10000g/mol。

[0174] 在一个实施方案中,聚合物结合的脂质选自由以下组成的组:DMG-PEG500、DMG-PEG1000、DMG-PEG1500、DMG-PEG2000、DMG-PEG2500、DMG-PEG3000、DMG-PEG5000和DMG-PEG10000。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质选自由以下组成的组:DMPE-PEG500、DMPE-PEG1000、DMPE-PEG1500、DMPE-PEG2000、DMPE-PEG2500、DMPE-PEG3000、DMPE-PEG5000和DMPE-PEG10000。

[0175] 在一个实施方案中,类固醇是糖皮质激素、盐皮质激素、氯倍他索、胆固醇或胆固醇衍生物。在一个实施方案中,类固醇是胆固醇。在一个实施方案中,类固醇是胆固醇衍生物。在一个实施方案中,类固醇是糖皮质激素。在一个实施方案中,类固醇是盐皮质激素。在一个实施方案中,类固醇是氯倍他索。在一个实施方案中,类固醇是糖皮质激素、盐皮质激素、氯倍他索、胆固醇或胆固醇衍生物的混合物。

[0176] 在一个实施方案中,聚合物结合的脂质是PEG结合的脂质,并且类固醇是胆固醇或胆固醇衍生物。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质是DMG-PEG2000,并且类固醇是胆固醇或胆固醇衍生物。在一个实施方案中,聚合物结合的脂质是DMPE-PEG2000,并且类固醇是胆固醇或胆固醇衍生物。

[0177] 在一个实施方案中,阳离子脂质具有至少6的pKa。在一个实施方案中,阳离子脂质具有至少7的pKa。在一个实施方案中,阳离子脂质具有至少8的pKa。在一个实施方案中,阳离子脂质具有至少9的pKa。在一个实施方案中,阳离子脂质具有至少9.5的pKa。在一个实施方案中,阳离子脂质具有至少10的pKa。在一个实施方案中,阳离子脂质具有至少11的pKa。在一个实施方案中,阳离子脂质具有至少12的pKa。

[0178] 在一个实施方案中,阳离子脂质仅包含一个酯部分,其为C_{14}-C_{42}烷基酯部分。在一个实施方案中,酯部分是C_{14}-C_{37}烷基酯部分。在一个实施方案中,酯部分是C_{14}-C_{32}烷基酯部分。在一个实施方案中,酯部分是C_{14}-C_{27}烷基酯部分。在一个实施方案中,酯部分是C_{14}-C_{22}烷基酯部分。在一个实施方案中,酯部分是C_{14}-C_{17}烷基酯部分。在一个实施方案中,酯部分是C_{15}烷基酯部分。在一个实施方案中,酯部分是C_{16}烷基酯部分。在一个实施方案中,酯部分是C_{17}烷基酯部分。

[0179] 在一个实施方案中,阳离子脂质包含C_{14}-C_{42}烷基酯部分和至少第二酯部分。在一个实施方案中,阳离子脂质包含C_{14}-C_{42}烷基酯部分和第二烷基酯部分。在一个实施方案中,阳离子脂质包含两个C_{14}-C_{42}烷基酯部分。在一个实施方案中,两个C_{14}-C_{42}烷基酯部分相同。在一个实施方案中,两个C_{14}-C_{42}烷基酯部分不同。在一个实施方案中,阳离子脂质包含两个C_{15}烷基酯部分。在一个实施方案中,阳离子脂质包含两个C_{16}烷基酯部分。在一个实施方案中,阳离子脂质包含C_{10}烷基酯部分和C_{17}烷基酯部分。

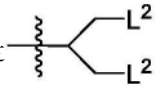
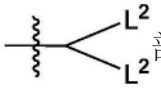
[0180] 在一个实施方案中,阳离子脂质的至少一个酯部分是-C(=O)OR^1或-OC(=O)R^1,其中R^1是支链C_{14}-C_{42}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{14}-C_{19}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{20}-C_{25}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{26}-C_{31}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{32}-C_{37}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{38}-C_{42}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{15}烷基酯部分。在一个实施方案中,R^1是支链C_{16}烷基酯部分。在一个实施方案中,R^1是支链C_{17}烷基酯部分。

[0181] 在一个实施方案中,阳离子脂质的第二酯部分是-C(=O)OR^2或-OC(=O)R^2,其中R^2是直链或支链C_6-C_{42}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链或支链C_6-C_{11}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链或支链C_{12}-C_{17}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链或支链C_{18}-C_{23}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链或支链C_{24}-C_{29}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链或支链C_{30}-C_{35}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链或支链C_{36}-C_{42}烷基。

[0182] 在一个实施方案中,阳离子脂质的第二酯部分是-C(=O)OR^2或-OC(=O)R^2,其中R^2是直链C_6-C_{42}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_6-C_{12}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链

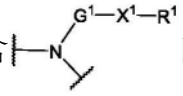
C_{13}-C_{18}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_{19}-C_{25}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_{26}-C_{32}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_{32}-C_{42}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_9烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_{10}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_{11}烷基。

[0183] 在一个实施方案中,阳离子脂质的第二酯部分是-C(=O)OR^2或-OC(=O)R^2,其中R^2是支链C_6-C_{12}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{13}-C_{24}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{25}-C_{42}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{15}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{16}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{17}烷基。

[0184] 在一个实施方案中,阳离子脂质包含C_{14}-C_{42}烷基酯部分和至少第二酯部分以及第三酯部分。在一个实施方案中,阳离子脂质包含C_{14}-C_{42}烷基酯部分、第二烷基酯部分以及第三酯部分。在一个实施方案中,第二烷基酯部分和第三烷基酯部分独立地为-C(=O)OR^2或-OC(=O)R^2,其中每个R^2独立地为直链C_7-C_{11}烷基。在一个实施方案中,第二烷基酯部分和第三烷基酯部分是部分的一部分,其中每个L^2独立地为-OC(=O)R^2,并且每个R^2独立地为直链C_7-C_{11}烷基。在一个实施方案中,第二烷基酯部分和第三烷基酯部分是部分的一部分,其中每个L^2独立地为-C(=O)OR^2,并且每个R^2独立地为直链C_7-C_{11}烷基。

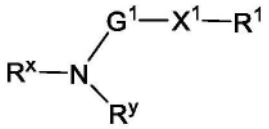
[0185] 在一个实施方案中,阳离子脂质仅包含一个叔胺。在一个实施方案中,阳离子脂质包含两个叔胺。在一个实施方案中,叔胺被质子化。在一个实施方案中,叔胺带正电荷。在一个实施方案中,叔胺以季铵盐的形式存在。在一个实施方案中,当pH为约5至约9时,叔胺被质子化。在一个实施方案中,叔胺在pH 5、pH 5.5、pH 6、pH 6.5、pH 7、pH 7.5、pH 8、pH 8.5或pH 9下被质子化。

[0186] 在一个实施方案中,阳离子脂质包含至少一个叔胺和至少一个C_{14}-C_{42}烷基酯部分。在一个实施方案中,阳离子脂质包含一个叔胺和两个C_{14}-C_{42}烷基酯部分。在一个实施方案中,阳离子脂质包含两个叔胺和两个C_{14}-C_{42}烷基酯部分。在一个实施方案中,阳离子脂质包含一个叔胺、一个支链C_{14}-C_{42}烷基酯部分和一个直链C_6-C_{42}烷基酯部分。在一个实施方案中,阳离子脂质包含两个叔胺、一个C_{14}-C_{42}烷基酯部分、直链C_7-C_{11}烷基第二酯部分和直链C_7-C_{11}烷基第三酯部分。

[0187] 在一个实施方案中,阳离子脂质包含的部分,其中G^1是C_2-C_{12}亚烷基;X^1是-C(=O)O-或-OC(=O)-;并且R^1是支链C_{14}-C_{42}烷基。在一个实施方案中,G^1是C_2-C_5亚烷基。在一个实施方案中,G^1是C_6-C_9亚烷基。在一个实施方案中,G^1是C_{10}-C_{12}亚烷基。

[0188] 在一个实施方案中,G^1是C_2-C_{12}亚烷基;X^1是-C(=O)O-或-OC(=O)-;并且R^1是支链C_{14}-C_{19}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{20}-C_{25}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{26}-C_{31}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{32}-C_{37}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{38}-C_{42}烷基。

[0189] 在一个实施方案中,阳离子脂质具有式(I):

[0190] 

(I),

[0191] 或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体,其中:

[0192] G^1是C_2-C_{12}亚烷基;

[0193] X^1是-C(=O)O-或-OC(=O)-;

[0194] R^1是支链C_{14}-C_{42}烷基;

[0195] R^y是C_1-C_6烷基或-G^2-X^2-R^2;

[0196] G^2是C_2-C_{12}亚烷基;

[0197] X^2是-C(=O)O-或-OC(=O)-;

[0198] R^2是直链或支链C_6-C_{42}烷基;

[0199] R^x是C_1-C_6烷基或-G^3-R^3;

[0200] G^3是C_2-C_{12}亚烷基;

[0201] R^3是-N(R^4)R^5或-OR^6;

[0202] R^4是C_1-C_{12}烷基、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基或C_6-C_{10}芳基;

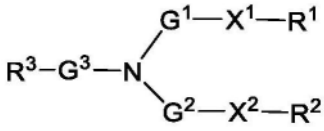
[0203] R^5是C_1-C_{12}烷基、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基或C_6-C_{10}芳基;

[0204] 或者R^4和R^5与它们所连接的氮一起形成环状部分;

[0205] R^6是氢、C_1-C_{12}烷基、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基或C_6-C_{10}芳基;并且

[0206] 其中每个烷基、烯基、环烷基、环烯基、芳基、亚烷基以及环状部分独立地任选地被取代。

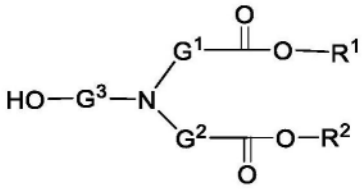
[0207] 在一个实施方案中,阳离子脂质具有式(II):

[0208] 

(II),

[0209] 或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体。

[0210] 在一个实施方案中,阳离子脂质具有式(II-A):

[0211] 

(II-A),

[0212] 或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体,其中:

[0213] G^1是C_5-C_7亚烷基;

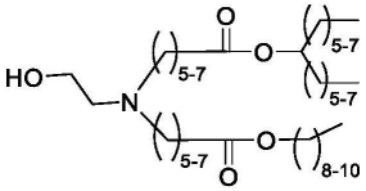
[0214] R^1是支链C_{14}-C_{19}烷基;

[0215] G^2是C_5-C_7亚烷基;

[0216] R^2是直链C_7-C_{13}烷基;

[0217] G^3是C_2-C_4亚烷基。

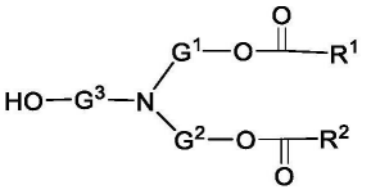
[0218] 在一个实施方案中,阳离子脂质具有式(II-A-1):

[0219] 

(II-A-1),

[0220] 或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体。

[0221] 在一个实施方案中,阳离子脂质具有式(II-B):

[0222] 

(II-B),

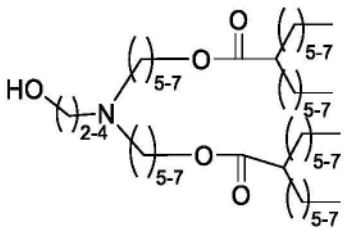
[0223] 或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体,其中:G^1是C_5-C_7亚烷基;

[0224] R^1是支链C_{14}-C_{19}烷基;

[0225] G^2是C_5-C_7亚烷基;

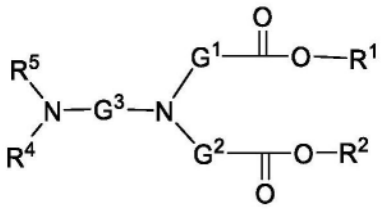
[0226] R^2是支链C_{14}-C_{19}烷基;

[0227] G^3是C_2-C_4亚烷基。

[0228] 在一个实施方案中,阳离子脂质具有式(II-B-1): 

(II-B-1),

[0229] 或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体。

[0230] 在一个实施方案中,阳离子脂质具有式(II-C): 

(II-C),

[0231] 或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体,其中:G^1是C_5-C_7亚烷基;

[0232] R^1是支链C_{14}-C_{19}烷基;

[0233] G^2是C_5-C_7亚烷基;

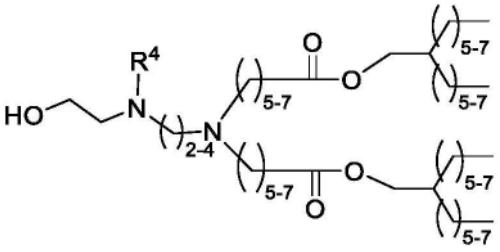
[0234] R^2是支链C_{14}-C_{19}烷基;

[0235] G^3是C_2-C_4亚烷基;

[0236] R^4是C_3-C_8环烷基;并且

[0237] R^5是被羟基取代的C_2-C_4烷基。

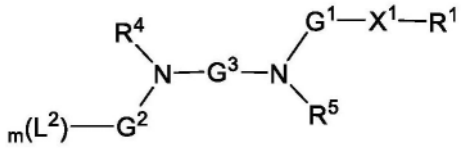
[0238] 在一个实施方案中,阳离子脂质具有式(II-C-1):



(II-C-1),

[0239] 或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体。

[0240] 在一个实施方案中,阳离子脂质具有式(III):

[0241] 

(III),

[0242] 或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体,其中:

[0243] G^1是C_2-C_{12}亚烷基;

[0244] X^1是-C(=O)O-或-OC(=O)-;

[0245] R^1是支链C_{14}-C_{42}烷基;

[0246] G^2是C_2-C_{12}亚烷基;

[0247] 每个L^2独立地为-X^2-R^2;

[0248] 每个X^2独立地为-C(=O)O-或-OC(=O)-;

[0249] 每个R^2独立地为直链或支链C_6-C_{42}烷基;

[0250] m是1或2;

[0251] G^3是C_2-C_{12}亚烷基;

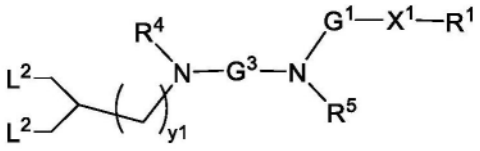
[0252] R^4是C_1-C_{12}烷基、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基或C_6-C_{10}芳基;

[0253] R^5是C_1-C_{12}烷基、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基或C_6-C_{10}芳基;并且

[0254] 其中每个烷基、烯基、环烷基、环烯基、芳基、亚烷基以及环状部分独立地任选地被取代。

[0255] 在一个实施方案中,m是1。在一个实施方案中,m是2。

[0256] 在一个实施方案中,阳离子脂质具有式(IV):

[0257] 

(IV),

[0258] 或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体,其中:

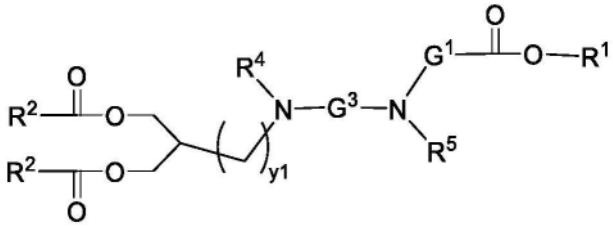
[0259] y1是0至9的整数。

[0260] 在一个实施方案中,y1是2至6的整数。在一个实施方案中,y1是2。在一个实施方案

中,y1是3。在一个实施方案中,y1是4。在一个实施方案中,y1是5。在一个实施方案中,y1是6。

[0261] 在一个实施方案中,每个L^2独立地为-OC(=O)R^2。在一个实施方案中,每个L^2独立地为-OC(=O)R^2,并且每个R^2独立地为直链C_7-C_{11}烷基。在一个实施方案中,每个L^2独立地为-C(=O)OR^2。在一个实施方案中,每个L^2独立地为-C(=O)OR^2,并且每个R^2独立地为直链C_7-C_{11}烷基。

[0262] 在一个实施方案中,阳离子脂质具有式(IV-A):

[0263] 

(IV-A),

[0264] 或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体,其中:

[0265] G^1是C_5-C_7亚烷基;

[0266] R^1是支链C_{14}-C_{19}烷基;

[0267] 每个R^2独立地为直链C_7-C_{13}烷基;

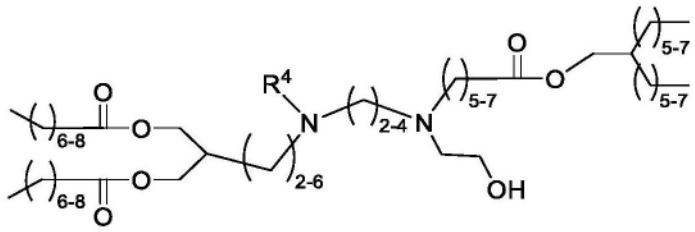
[0268] G^3是C_2-C_4亚烷基;

[0269] R^4是C_3-C_8环烷基;

[0270] R^5是被羟基取代的C_2-C_4烷基;并且

[0271] y1是2至6的整数。

[0272] 在一个实施方案中,阳离子脂质具有式(IV-A-1):

[0273] 

(IV-A-1),

[0274] 或其药学上可接受的盐、前药或立体异构体。

[0275] 在一个实施方案中,G^1是C_2-C_5亚烷基。在一个实施方案中,G^1是C_5-C_7亚烷基。在一个实施方案中,G^1是C_6-C_9亚烷基。在一个实施方案中,G^1是C_{10}-C_{12}亚烷基。在一个实施方案中,G^1是C_2亚烷基。在一个实施方案中,G^1是C_3亚烷基。在一个实施方案中,G^1是C_4亚烷基。在一个实施方案中,G^1是C_5亚烷基。在一个实施方案中,G^1是C_6亚烷基。在一个实施方案中,G^1是C_7亚烷基。在一个实施方案中,G^1是C_8亚烷基。在一个实施方案中,G^1是C_9亚烷基。在一个实施方案中,G^1是C_{10}亚烷基。在一个实施方案中,G^1是C_{11}亚烷基。在一个实施方案中,G^1是C_{12}亚烷基。

[0276] 在一个实施方案中,X^1是-C(=O)O-。在一个实施方案中,X^1是-OC(=O)-。除非另有说明,否则左侧朝向G^1,并且右侧朝向R^1。

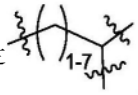
[0277] 在一个实施方案中,R^1是支链C_{14}-C_{24}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{14}-C_{19}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{20}-C_{25}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{26}-C_{31}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{32}-C_{37}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{38}-C_{42}烷基。在一个实施方案中,R^1是-R^7-CH(R^8) (R^9),其中R^7是C_0-C_5亚烷基,并且R^8和R^9独立地为C_2-C_{10}烷基。在一个实施方案中,R^1是-R^7-CH(R^8) (R^9),其中R^7是C_0-C_1亚烷基,并且R^8和R^9独立地为C_4-C_8烷基。

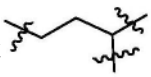
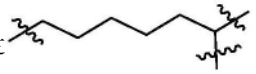
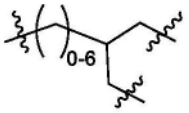
[0278] 在一个实施方案中,R^1是支链C_{14}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{15}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{16}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{17}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{18}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{19}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{20}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{22}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{24}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{26}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{28}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{30}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{32}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{34}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{36}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{38}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{40}烷基。在一个实施方案中,R^1是支链C_{42}烷基。

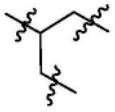
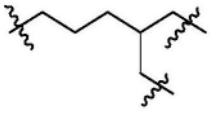
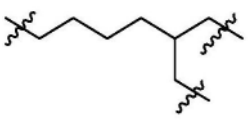
[0279] 在一个实施方案中,R^y是C_1-C_6烷基。在一个实施方案中,R^y是甲基。在一个实施方案中,R^y是乙基。在一个实施方案中,R^y是C_3烷基。在一个实施方案中,R^y是C_4烷基。在一个实施方案中,R^y是C_5烷基。在一个实施方案中,R^y是C_6烷基。

[0280] 在一个实施方案中,R^y是-G^2-X^2-R^2。

[0281] 在一个实施方案中,G^2是C_2-C_{12}亚烷基。在一个实施方案中,G^2是C_2-C_5亚烷基。在一个实施方案中,G^2是C_5-C_7亚烷基。在一个实施方案中,G^2是C_6-C_9亚烷基。在一个实施方案中,G^2是C_{10}-C_{12}亚烷基。在一个实施方案中,G^2是C_2亚烷基。在一个实施方案中,G^2是C_3亚烷基。在一个实施方案中,G^2是C_4亚烷基。在一个实施方案中,G^2是C_5亚烷基。在一个实施方案中,G^2是C_6亚烷基。在一个实施方案中,G^2是C_7亚烷基。在一个实施方案中,G^2是C_8亚烷基。在一个实施方案中,G^2是C_9亚烷基。在一个实施方案中,G^2是C_{10}亚烷基。在一个实施方案中,G^2是C_{11}亚烷基。在一个实施方案中,G^2是C_{12}亚烷基。

[0282] 在一个实施方案中,G^2是

。在一个实施方案中,G^2是。在一个实施方案中,G^2是。在一个实施方案中,G^2是

。在一个实施方案中,G^2是。在一个实施方案中,G^2是。在一个实施方案中,G^2是。

[0283] 在一个实施方案中,X^2是-C(=O)O-。在一个实施方案中,X^2是-OC(=O)-。除非另有说明,否则左侧朝向G^2,并且右侧朝向R^2。

[0284] 在一个实施方案中,R^2是直链或支链C_6-C_{11}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链或支链C_{12}-C_{17}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链或支链C_{18}-C_{23}烷基。在一个实施方案中,R^2是直

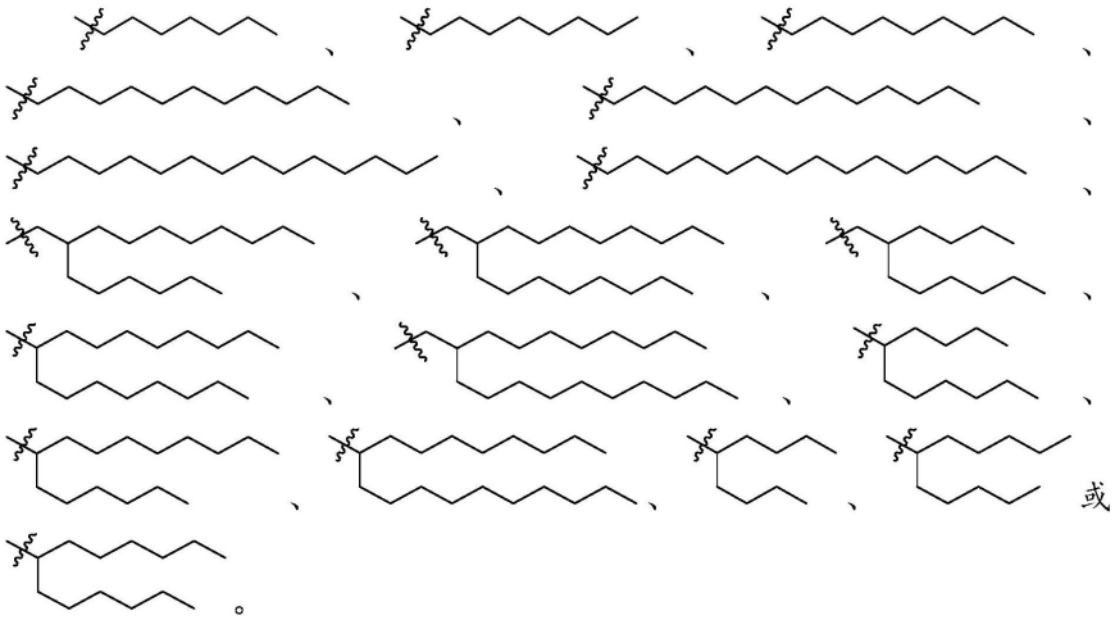
链或支链C_{24}-C_{29}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链或支链C_{30}-C_{35}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链或支链C_{36}-C_{42}烷基。

[0285] 在一个实施方案中,R^2是直链C_6-C_{24}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_7-C_{13}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_7-C_{11}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_8烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_9烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_{10}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_{11}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_{12}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_{13}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_{14}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_{15}烷基。在一个实施方案中,R^2是直链C_{16}烷基。

[0286] 在一个实施方案中,R^2是支链C_{14}-C_{24}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{14}-C_{19}烷基。在一个实施方案中,R^2是-R^7-CH(R^8)(R^9),其中R^7是C_0-C_5亚烷基,并且R^8和R^9独立地为C_2-C_{10}烷基。在一个实施方案中,R^2是-R^7-CH(R^8)(R^9),其中R^7是C_0-C_1亚烷基,并且R^8和R^9独立地为C_4-C_8烷基。

[0287] 在一个实施方案中,R^2是支链C_6烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_8烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{10}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{12}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{14}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{15}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{16}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{17}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{18}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{19}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{20}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{22}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{24}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{26}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{28}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{30}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{32}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{34}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{36}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{38}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{40}烷基。在一个实施方案中,R^2是支链C_{42}烷基。

[0288] 在一个实施方案中,R^1、R^2各自独立地为以下结构之一:

[0289] 

[0290] 在一个实施方案中,R^x是C_1-C_6烷基。在一个实施方案中,R^x是甲基。在一个实施方案中,R^x是乙基。在一个实施方案中,R^x是C_3烷基。在一个实施方案中,R^x是C_4烷基。在一个实施方案中,R^x是C_5烷基。在一个实施方案中,R^x是C_6烷基。

[0291] 在一个实施方案中,R^x是-G^3-R^3。

[0292] 在一个实施方案中,G^3是C_2-C_{12}亚烷基。在一个实施方案中,G^3是C_2-C_4亚烷基。在一个实施方案中,G^3是C_2-C_5亚烷基。在一个实施方案中,G^3是C_6-C_9亚烷基。在一个实施方案中,G^3是C_{10}-C_{12}亚烷基。在一个实施方案中,G^3是C_2亚烷基。在一个实施方案中,G^3是C_3亚烷基。在一个实施方案中,G^3是C_4亚烷基。在一个实施方案中,G^3是C_5亚烷基。在一个实施方案中,G^3是C_6亚烷基。在一个实施方案中,G^3是C_7亚烷基。在一个实施方案中,G^3是C_8亚烷基。在一个实施方案中,G^3是C_9亚烷基。在一个实施方案中,G^3是C_{10}亚烷基。在一个实施方案中,G^3是C_{11}亚烷基。在一个实施方案中,G^3是C_{12}亚烷基。

[0293] 在一个实施方案中,R^3是-N(R^4)R^5。

[0294] 在一个实施方案中,R^4是C_1-C_{12}烷基、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基或C_6-C_{10}芳基。

[0295] 在一个实施方案中,R^4是C_1-C_{12}烷基。在一个实施方案中,R^4是C_1-C_8烷基。在一个实施方案中,R^4是C_1-C_6烷基。在一个实施方案中,R^4是C_1-C_4烷基。在一个实施方案中,R^4是甲基。在一个实施方案中,R^4是乙基。在一个实施方案中,R^4是正丙基。在一个实施方案中,R^4是异丙基。在一个实施方案中,R^4是正丁基。在一个实施方案中,R^4是正戊基。在一个实施方案中,R^4是正己基。在一个实施方案中,R^4是正辛基。在一个实施方案中,R^4是正壬基。

[0296] 在一个实施方案中,R^4是C_3-C_8环烷基。在一个实施方案中,R^4是环丙基。在一个实施方案中,R^4是环丁基。在一个实施方案中,R^4是环戊基。在一个实施方案中,R^4是环己基。在一个实施方案中,R^4是环庚基。在一个实施方案中,R^4是环辛基。

[0297] 在一个实施方案中,R^4是C_3-C_8环烯基。在一个实施方案中,R^4是环丙烯基。在一个实施方案中,R^4是环丁烯基。在一个实施方案中,R^4是环戊烯基。在一个实施方案中,R^4是环己烯基。在一个实施方案中,R^4是环庚烯基。在一个实施方案中,R^4是环辛烯基。

[0298] 在一个实施方案中,R^4是C_6-C_{10}芳基。在一个实施方案中,R^4是苯基。

[0299] 在一个实施方案中,R^4未被取代。

[0300] 在一个实施方案中,R^4被一个或多个选自由以下组成的组的取代基取代:氧代基、-OR^g、-$NR^gC(=O)R^h$、-$C(=O)NR^gR^h$、-$C(=O)R^h$、-$OC(=O)R^h$、-$C(=O)OR^h$和-O-R^i-OH,其中:

[0301] R^g在每次出现时独立地为H或C_1-C_6烷基;

[0302] R^h在每次出现时独立地为C_1-C_6烷基;并且

[0303] R^i在每次出现时独立地为C_1-C_6亚烷基。

[0304] 在一个实施方案中,R^4被一个或多个羟基取代。在一个实施方案中,R^4被一个羟基取代。在一个实施方案中,R^4被一个或多个羟基和一个或多个氧代基取代。在一个实施方案中,R^4被一个羟基和一个氧代基取代。

[0305] 在一个实施方案中,R^5是C_1-C_{12}烷基、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基或C_6-C_{10}芳基。

[0306] 在一个实施方案中,R^5是C_1-C_{12}烷基。在一个实施方案中,R^5是C_1-C_8烷基。在一个实施方案中,R^5是C_1-C_6烷基。在一个实施方案中,R^5是C_1-C_4烷基。在一个实施方案中,R^5是C_2-C_4烷基。在一个实施方案中,R^5是甲基。在一个实施方案中,R^5是乙基。在一个实施方案中,R^5是正丙基。在一个实施方案中,R^5是异丙基。在一个实施方案中,R^5是正丁基。在一个实施方案中,R^5是正戊基。在一个实施方案中,R^5是正己基。在一个实施方案中,R^5是正辛基。在一个实施方案中,R^5是正壬基。

[0307] 在一个实施方案中,R^5是C_3-C_8环烷基。在一个实施方案中,R^5是环丙基。在一个实施方案中,R^5是环丁基。在一个实施方案中,R^5是环戊基。在一个实施方案中,R^5是环己基。在一个实施方案中,R^5是环庚基。在一个实施方案中,R^5是环辛基。

[0308] 在一个实施方案中,R^5是C_3-C_8环烯基。在一个实施方案中,R^5是环丙烯基。在一个实施方案中,R^5是环丁烯基。在一个实施方案中,R^5是环戊烯基。在一个实施方案中,R^5是环己烯基。在一个实施方案中,R^5是环庚烯基。在一个实施方案中,R^4是环辛烯基。

[0309] 在一个实施方案中,R^5是C_6-C_{10}芳基。在一个实施方案中,R^5是苯基。

[0310] 在一个实施方案中,R^4和R^5与它们所连接的氮一起形成环状部分。

[0311] 在一个实施方案中,环状部分(由R^4和R^5与它们所连接的氮一起形成)是杂环基。在一个实施方案中,环状部分是杂环烷基。在一个实施方案中,环状部分是4至8元杂环烷基。在一个实施方案中,环状部分是4元杂环烷基。在一个实施方案中,环状部分是5元杂环烷基。在一个实施方案中,环状部分是6元杂环烷基。在一个实施方案中,环状部分是7元杂环烷基。在一个实施方案中,环状部分是8元杂环烷基。

[0312] 在一个实施方案中,环状部分(由R^4和R^5与它们所连接的氮一起形成)是氮杂环丁烷-1-基。在一个实施方案中,环状部分是吡咯烷-1-基。在一个实施方案中,环状部分是哌啶-1-基。在一个实施方案中,环状部分是氮杂环庚烷-1-基。在一个实施方案中,环状部分是氮杂环辛烷-1-基。在一个实施方案中,环状部分是吗啉基。在一个实施方案中,环状部分是哌嗪-1-基。这些基团中的连接点是与G^3。

[0313] 如本文所述并且除非另外指明,否则R^5的取代模式也适用于由R^4和R^5与它们所连接的氮一起形成的环状部分。

[0314] 在一个实施方案中,R^5未被取代。

[0315] 在一个实施方案中,R^5被一个或多个选自由以下组成的组的取代基取代:氧代基、$-OR^g$、$-NR^gC(=O)R^h$、$-C(=O)NR^gR^h$、$-C(=O)R^h$、$-OC(=O)R^h$、$-C(=O)OR^h$和$-O-R^i-OH$,其中:

[0316] R^g在每次出现时独立地为H或C_1-C_6烷基;

[0317] R^h在每次出现时独立地为C_1-C_6烷基;并且

[0318] R^i在每次出现时独立地为C_1-C_6亚烷基。

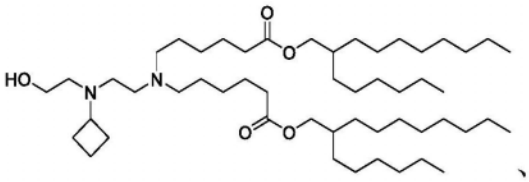
[0319] 在一个实施方案中,R^5被一个或多个羟基取代。在一个实施方案中,R^5被一个羟基取代。

[0320] 在一个实施方案中,R^5被一个或多个羟基和一个或多个氧代基取代。在一个实施方案中,R^5被一个羟基和一个氧代基取代。在一个实施方案中,R^5是被羟基取代的C_2-C_4烷基。在一个实施方案中,R^5是$-CH_2CH_2OH$。

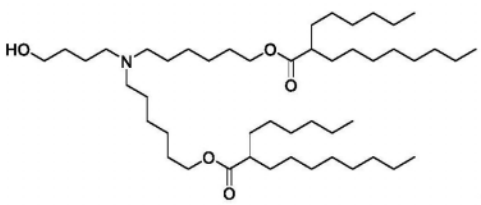
[0321] 在一个实施方案中,R^3是$-OR^6$。

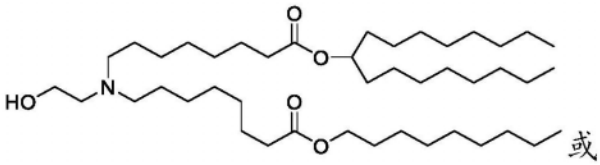
[0322] 在一个实施方案中,R^6是氢(即,R^3是-OH)。在一个实施方案中,R^6是C_1-C_{12}烷基。在一个实施方案中,R^6是C_1-C_8烷基。在一个实施方案中,R^6是C_1-C_6烷基。在一个实施方案中,R^6是C_1-C_4烷基。在一个实施方案中,R^6是甲基。在一个实施方案中,R^6是乙基。在一个实施方案中,R^6是C_3-C_8环烷基。在一个实施方案中,R^6是C_3-C_8环烯基。在一个实施方案中,R^6是C_6-C_{10}芳基。在一个实施方案中,R^6是苯基。在一个实施方案中,R^6未被取代。在一个实施方案中,R^6被取代。

[0323] 在一个实施方案中,阳离子脂质是

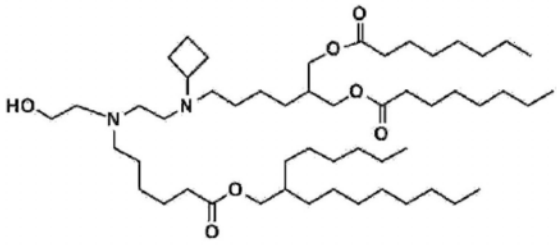


[0324]





或



。

[0325] 应理解,如上所陈述的本文所提供的化合物的任何实施方案,以及如上所陈述的本文所提供的化合物的任何特定取代基和/或变量可独立地与化合物的其它实施方案和/或取代基和/或变量组合以形成以上未具体陈述的实施方案。此外,在列出任何特定基团或变量的取代基和/或变量的列表的情况下,应理解,可从特定实施方案和/或技术方案中删除每一个别取代基和/或变量,并且其余的取代基和/或变量列表将被认为在本文所提供的实施方案的范围内。

[0326] 应理解,在本说明书中,所描绘各式的取代基和/或变量的组合仅在此类贡献产生稳定化合物时才为容许的。

[0327] 在一个实施方案中,磷脂是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)。在一个实施方案中,磷脂是1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。在一个实施方案中,磷脂是1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)。在一个实施方案中,磷脂是1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-磷酸胆碱(DMPC)。在一个实施方案中,磷脂是1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)。在一个实施方案中,磷脂是1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)。在一个实施方案中,磷脂是1,2-二(十一烷酰基)-sn-甘油-磷酸胆碱(DUPC)。在一个实施方案中,磷脂是1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)。

[0328] 在一个实施方案中,脂质纳米颗粒包含不超过0.5mol%的磷脂。在一个实施方案中,脂质纳米颗粒包含不超过0.01mol%的磷脂、不超过0.05mol%的磷脂、不超过0.1mol%的磷脂、不超过0.15mol%的磷脂、不超过0.2mol%的磷脂、不超过0.25mol%的磷脂、不超过0.3mol%的磷脂、不超过0.35mol%的磷脂、不超过0.4mol%的磷脂、不超过0.45mol%的磷脂或不超过0.5mol%的磷脂。在一个实施方案中,脂质纳米颗粒不包含磷脂。

[0329] 在一个实施方案中,脂质纳米颗粒具有约9:1至约20:1的脂质:核酸质量比。在一个实施方案中,脂质纳米颗粒具有约9:1至约15:1的脂质:核酸质量比。在一个实施方案中,脂质纳米颗粒具有约9:1至约12:1的脂质:核酸质量比。在一个实施方案中,脂质:核酸质量比是约9:1。在一个实施方案中,脂质:核酸质量比是约10:1。在一个实施方案中,脂质:核酸

质量比是约11:1。在一个实施方案中,脂质:核酸质量比是约12:1。在一个实施方案中,脂质:核酸质量比是约13:1。在一个实施方案中,脂质:核酸质量比是约14:1。在一个实施方案中,脂质:核酸质量比是约15:1。在一个实施方案中,脂质:核酸质量比是约16:1。在一个实施方案中,脂质:核酸质量比是约17:1。在一个实施方案中,脂质:核酸质量比是约18:1。在一个实施方案中,脂质:核酸质量比是约19:1。在一个实施方案中,脂质:核酸质量比是约20:1。

[0330] 在一个实施方案中,本文提供的LNP的尺寸和包封效率与常规LNP制剂的尺寸和包封效率相当。在一个实施方案中,与常规LNP制剂相比,本文提供的LNP具有提高的体外和/或体内mRNA递送效率,如通过蛋白质表达水平所评价的。

[0331] 在一个实施方案中,LNP是包括一个或多个脂质双层的囊泡。在一个实施方案中,LNP包括经水性隔室隔开的两个或更多个同心双层。脂质双层可经官能化和/或彼此交联。脂质双层可包括一种或多种配体、蛋白质或通道。

[0332] 在一个实施方案中,纳米颗粒包含一个或多个核酸分子作为治疗有效负载。

[0333] 在一个实施方案中,核酸是RNA。在一个实施方案中,核酸是信使RNA(mRNA)、小干扰RNA(siRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、dicer底物RNA(dsRNA)、小发夹RNA(shRNA)、转移RNA(tRNA)、小引导RNA(sgRNA)、Cas9 RNA或其混合物。在一个实施方案中,核酸是mRNA。在一个实施方案中,核酸是DNA。在一个实施方案中,核酸是质粒DNA。在一个实施方案中,核酸是超螺旋DNA。在一个实施方案中,核酸是线性DNA。

[0334] 在一个实施方案中,mRNA是编码抗原或其片段或表位的mRNA。在一个实施方案中,mRNA是编码致病性抗原的mRNA。在一个实施方案中,mRNA是编码肿瘤相关抗原的mRNA。在一个实施方案中,mRNA是编码肿瘤特异性抗原的mRNA。

[0335] 在一个实施方案中,mRNA是单顺反子mRNA。在一个实施方案中,mRNA是多顺反子mRNA。在一个实施方案中,mRNA是包含两个或更多个开放阅读框(ORF)的多顺反子mRNA。在一个实施方案中,多顺反子mRNA编码两种相同的肽或蛋白质。在一个实施方案中,多顺反子mRNA编码两种不同的肽或蛋白质。

[0336] 在一个实施方案中,由多顺反子mRNA编码的每种肽或蛋白质包含选定抗原的至少一个表位。在一个实施方案中,由多顺反子mRNA编码的不同肽或蛋白质各自包含不同抗原的至少一个表位。

[0337] 在一个实施方案中,至少一个表位可以是抗原的至少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个表位。

[0338] 在一个实施方案中,核酸是小干扰RNA(siRNA)。

[0339] 在一个实施方案中,在向有需要的受试者施用包含siRNA的纳米颗粒组合物后,siRNA使与特定疾病、病症或疾患相关的基因选择性地沉默。

[0340] 在一个实施方案中,核酸是免疫调节siRNA。

[0341] 在一个实施方案中,siRNA包含与编码目标蛋白质产物的mRNA序列互补的序列。

[0342] 在一个实施方案中,核酸分子仅含有选自A (腺苷)、G(鸟苷)、C(胞嘧啶)、U(尿苷)和T(胸苷)的规范核苷酸。在一个实施方案中,核酸包含至少一种功能性核苷酸类似物。在一个实施方案中,功能性核苷酸类似物含有非经典核碱基。

[0343] 在一个实施方案中,核酸经化学修饰。在一个实施方案中,核酸包含对核碱基的至

少一种化学修饰。对核碱基的示例性修饰包括但不限于一个或多个取代或修饰,包括但不限于烷基、芳基、卤基、氧代、羟基、烷氧基和/或硫代取代;一个或多个稠环或开环、氧化和/或还原。在一个实施方案中,核酸包含对糖基的至少一种化学修饰。在一个实施方案中,核酸包含对核苷键联的至少一种化学修饰。

[0344] 在一个方面,本文所述的核酸分子被配制用于体外和体内递送。特别地,在一个实施方案中,核酸分子被配制成脂质纳米颗粒。在一个实施方案中,脂质纳米颗粒将核酸分子包封在脂质壳内。在一个实施方案中,脂质壳保护核酸分子免于降解。在一个实施方案中,脂质纳米颗粒还促进将封闭的核酸分子运输至细胞内隔室和/或机构中以发挥预期治疗或预防功能。在某些实施方案中,当存在于脂质纳米颗粒中时,核酸在水溶液中抵抗核酸酶降解。包含核酸的脂质纳米颗粒和其制备方法是本领域中已知的,诸如在例如美国专利公布第2004/0142025号、美国专利公布第2007/0042031号、PCT公布第WO 2017/004143号、PCT公布第WO 2015/199952号、PCT公布第WO 2013/016058号和PCT公布第WO 2013/086373号中公开的那些,所述公布中的每一者的完整公开内容出于所有目的通过引用以其整体并入本文中。

[0345] 在一个实施方案中,本文提供的LNP组合物的最大尺寸是1μm或更短(例如,≤1μm、≤900nm、≤800nm、≤700nm、≤600nm、≤500nm、≤400nm、≤300nm、≤200nm、≤175nm、≤150nm、≤125nm、≤100nm、≤75nm、≤50nm或更短),诸如当通过动态光散射(DLS)、透射电子显微术、扫描电子显微术或另一方法测量时。

[0346] 在一个实施方案中,本文提供了脂质纳米颗粒,其中纳米颗粒的尺寸是约40nm至约150nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约50nm至约100nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约40nm至约120nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约40nm至约100nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约50nm至约150nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约60nm至约150nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约60nm至约120nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约70nm至约120nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约80nm至约120nm。

[0347] 如本文所用并且除非另有说明,否则纳米颗粒的尺寸是指所述纳米颗粒群体或多个纳米颗粒的平均尺寸。在一个实施方案中,与参考制剂相比,本文提供的三脂质组分脂质纳米颗粒(不含磷脂组分,或具有减少/不显著量的磷脂组分)的尺寸增加;其中所述参考制剂与所述脂质纳米颗粒的不同之处在于:(i)所述参考制剂包含磷脂,并且(ii)阳离子脂质:类固醇:磷脂:聚合物结合的脂质的摩尔比是约50:38.5:10:1.5。在一个实施方案中,本文提供的三脂质组分纳米颗粒具有至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%或至少约80%的尺寸增加。在一个实施方案中,与参考制剂相比,纳米颗粒的尺寸增加至少约50%。在一个实施方案中,本文提供的三脂质组分纳米颗粒具有不超过约90%、不超过约100%或不超过约110%的尺寸增加。在一个实施方案中,(本文提供的三脂质组分纳米颗粒的)尺寸是约90nm至约150nm。在一个实施方案中,尺寸是约100nm至约140nm。在一个实施方案中,尺寸是约110nm至约130nm。在一个实施方案中,尺寸是约100nm至约110nm。在一个实施方案中,尺寸是约110nm至约120nm。在一个实施方案中,尺寸是约120nm至约130nm。

[0348] 在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约40nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺

寸是约50nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约55nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约60nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约65nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约70nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约75nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约80nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约85nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约90nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约95nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约100nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约105nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约110nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约115nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约120nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约125nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约125nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约130nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约135nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约140nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约145nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约150nm。在一个实施方案中,纳米颗粒的尺寸是约155nm。

[0349] 在一个实施方案中,本文提供的脂质纳米颗粒具有至少约80%的核酸包封效率。在一个实施方案中,本文提供的脂质纳米颗粒具有至少约80%的mRNA包封效率。在一个实施方案中,本文提供的脂质纳米颗粒具有至少约80%的DNA包封效率。在一个实施方案中,本文提供的脂质纳米颗粒具有至少约80%的siRNA包封效率。

[0350] 在一个实施方案中,本文提供的脂质纳米颗粒具有至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%或至少约96%的核酸包封效率。

[0351] 在一个实施方案中,本文提供的脂质纳米颗粒具有至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%或至少约96%的mRNA包封效率。

[0352] 在一个实施方案中,纳米颗粒具有至少约90%的核酸包封效率。在一个实施方案中,纳米颗粒具有至少约90%的mRNA包封效率。在一个实施方案中,纳米颗粒具有至少约90%的DNA包封效率。在一个实施方案中,纳米颗粒具有至少约90%的siRNA包封效率。

[0353] 在一个实施方案中,核酸编码RNA或蛋白质,其中在哺乳动物细胞或哺乳动物的组织中由纳米颗粒中的核酸表达的RNA或蛋白质的量大于由参考制剂中的核酸表达的RNA或蛋白质的量;其中所述参考制剂与脂质纳米颗粒的不同之处在于(i)所述参考制剂包含磷脂,并且(ii)阳离子脂质:类固醇:磷脂:聚合物结合的脂质的摩尔比是约50:38.5:10:1.5。

[0354] 在一个实施方案中,参考制剂中磷脂的量是参考制剂中存在的总脂质的大于5mol%。在一个实施方案中,参考制剂中磷脂的量是参考制剂中存在的总脂质的大于10mol%。在一个实施方案中,参考制剂中磷脂的量是参考制剂中存在的总脂质的大于15mol%。在一个实施方案中,参考制剂中磷脂的量是参考制剂中存在的总脂质的大于20mol%。在一个实施方案中,参考制剂中磷脂的量是参考制剂中存在的总脂质的大于25mol%。在一个实施方案中,参考制剂中磷脂的量是参考制剂中存在的总脂质的大于30mol%。在一个实施方案中,参考制剂中磷脂的量是参考制剂中存在的总脂质的大于35mol%。在一个实施方案中,参考制剂中磷脂的量是参考制剂中存在的总脂质的大于

40mol％。在一个实施方案中,参考制剂中磷脂的量是参考制剂中存在的总脂质的大于45mol％。在一个实施方案中,参考制剂中磷脂的量是参考制剂中存在的总脂质的大于50mol％。

[0355] 在一个实施方案中,参考制剂中磷脂的量是参考制剂中存在的总脂质的约10mol％。

[0356] 在一个实施方案中,参考制剂包含DSPC。在一个实施方案中,参考制剂包含DOPE。

[0357] 在一个实施方案中,由本文提供的纳米颗粒中的核酸表达的RNA或蛋白质的量比由参考制剂中的核酸表达的RNA或蛋白质的量多至少约50％。

[0358] 在一个实施方案中,由本文提供的纳米颗粒中的核酸表达的RNA或蛋白质的量比由参考制剂中的核酸表达的RNA或蛋白质的量多至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％或至少约100％。

[0359] 在一个实施方案中,由本文提供的纳米颗粒中的核酸表达的RNA或蛋白质的量比由参考制剂中的核酸表达的RNA或蛋白质的量多至少约100％。在一个实施方案中,由本文提供的纳米颗粒中的核酸表达的RNA或蛋白质的量比由参考制剂中的核酸表达的RNA或蛋白质的量多至少约150％。在一个实施方案中,由本文提供的纳米颗粒中的核酸表达的RNA或蛋白质的量比由参考制剂中的核酸表达的RNA或蛋白质的量多至少约200％。在一个实施方案中,由本文提供的纳米颗粒中的核酸表达的RNA或蛋白质的量比由参考制剂中的核酸表达的RNA或蛋白质的量多至少约250％。在一个实施方案中,由本文提供的纳米颗粒中的核酸表达的RNA或蛋白质的量比由参考制剂中的核酸表达的RNA或蛋白质的量多至少约300％。

[0360] 在一个实施方案中,由本文提供的纳米颗粒中的核酸表达的RNA或蛋白质的量比由参考制剂中的核酸表达的RNA或蛋白质的量多至少约110％、至少约120％、至少约130％、至少约140％、至少约150％、至少约160％、至少约170％、至少约180％、至少约190％、至少约200％、至少约210％、至少约220％、至少约230％、至少约240％、至少约250％、至少约260％、至少约270％、至少约280％、至少约290％、至少约300％、至少约310％、至少约320％、至少约330％、至少约340％或至少约350％。

[0361] 在一个实施方案中,本文提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含本文提供的脂质纳米颗粒和药学上可接受的赋形剂。在一个实施方案中,赋形剂被批准用于人类和用于兽医使用。

[0362] 在一个实施方案中,一种或多种赋形剂可构成包含纳米颗粒组合物的药物组合物的总质量或体积的大于50％。举例来说,一种或多种赋形剂可构成药物组合物的50％、60％、70％、80％、90％或更高百分比。

[0363] 在一个实施方案中,药物组合物可包含介于0.1％与100％(wt/wt)之间的一种或多种纳米颗粒组合物。

[0364] 在一个实施方案中,药物组合物包含100％(wt/wt)的纳米颗粒组合物。在一个实施方案中,药物组合物包含约75％(wt/wt)的纳米颗粒组合物。在一个实施方案中,药物组合物包含约50％(wt/wt)的纳米颗粒组合物。在一个实施方案中,药物组合物包含约25％(wt/wt)的纳米颗粒组合物。在一个实施方案中,药物组合物包含1％(wt/wt)的纳米颗粒组合物。在一个实施方案中,药物组合物包含0.1％(wt/wt)的纳米颗粒组合物。

[0365] 在一个实施方案中,本文提供了一种在哺乳动物细胞或哺乳动物的组织中表达mRNA的方法,所述方法包括将本文提供的脂质纳米颗粒或本文提供的药物组合物递送至哺乳动物细胞或哺乳动物的组织,其中核酸是mRNA;并且其中所递送的mRNA在哺乳动物细胞中或在哺乳动物的组织中表达。

[0366] 在一个实施方案中,本文提供了一种用于将编码蛋白质的mRNA引入细胞中的方法,所述方法包括使所述细胞与本文提供的脂质纳米颗粒或本文提供的药物组合物接触。

[0367] 在一个实施方案中,细胞是原核细胞。在一个实施方案中,细胞是真核细胞。在一个实施方案中,细胞在哺乳动物中。在一个实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在一个实施方案中,细胞在人体中。

[0368] 在一个实施方案中,细胞在肝脏中。在一个实施方案中,细胞在肺中。在一个实施方案中,细胞在脾中。在一个实施方案中,细胞在结肠中。在一个实施方案中,细胞在肾中。

[0369] 在一个实施方案中,细胞是免疫细胞。免疫细胞的实例包括但不限于T细胞、B细胞、自然杀伤细胞、嗜中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞。

[0370] 在一个实施方案中,细胞是遗传工程化细胞。

[0371] 在一个实施方案中,细胞是干细胞。干细胞的实例包括但不限于多能干细胞、间充质干细胞、神经干细胞和造血干细胞等。

[0372] 在一个实施方案中,细胞是癌细胞。

[0373] 在一个实施方案中,本文提供了一种用于治疗人的疾病或病症的方法,所述方法包括向人施用治疗有效量的本文提供的脂质纳米颗粒或本文提供的药物组合物。

[0374] 在一个实施方案中,本文提供了一种用于治疗人中由蛋白质的表达受损引起的疾病或病症的方法,所述方法包括向人施用治疗有效量的本文提供的脂质纳米颗粒或本文提供的药物组合物,其中核酸是编码蛋白质的mRNA。在一个实施方案中,蛋白质的表达水平增加至少10%、至少20%、至少40%、至少60%、至少80%、至少100%、至少150%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%、至少750%或至少1000%。

[0375] 在一个实施方案中,本文提供了一种用于治疗人中由蛋白质的过表达引起的疾病或病症的方法,所述方法包括向人施用治疗有效量的本文提供的脂质纳米颗粒或本文提供的药物组合物,其中核酸是降低蛋白质的表达水平的siRNA。在一个实施方案中,蛋白质的表达水平降低10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。

[0376] 在一个实施方案中,疾病或病症是病毒感染。在一个实施方案中,疾病或病症是肝脏疾病。在一个实施方案中,疾病或病症是癌症。

[0377] 在一个实施方案中,施用是鼻内、静脉内、腹膜内、肌内、关节内、病灶内、气管内、皮下或皮内施用。在一个实施方案中,施用是静脉内施用。在一个实施方案中,施用是肌内施用。在一个实施方案中,施用是口服施用。

[0378] 在一个实施方案中,本文提供了一种通过向受试者施用包含治疗有效量的本文提供的脂质纳米颗粒或本文提供的药物组合物的疫苗来预防所述受试者的疾病的方法,其中核酸编码与所述疾病相关的抗原,从而在所述受试者中触发针对目标疾病的免疫反应。在一个实施方案中,免疫反应是适应性免疫反应或先天性免疫反应或两者。

[0379] 在一个实施方案中,疫苗在目标疾病的临床症状出现之前施用,从而使接种疫苗的人对目标疾病的发展具有免疫性或不太敏感。在一个实施方案中,疫苗在临床症状出现

后施用,从而缓解症状和/或预防复发。

[0380] 在一个实施方案中,抗原是病毒。在一个实施方案中,抗原是细菌。在一个实施方案中,抗原是真菌。在一个实施方案中,抗原是寄生虫。

[0381] 在一个实施方案中,病原体是冠状病毒(例如,SARS、SARS-Cov-2、MERS)、流感病毒、麻疹病毒、人乳头瘤病毒(HPV)、狂犬病病毒、脑膜炎病毒、百日咳病毒、破伤风病毒、鼠疫病毒、肝炎病毒和结核病病毒。

[0382] 在一个实施方案中,治疗性有效负载包含编码病原体所特有的致病性蛋白质或其抗原片段或表位的核酸序列(例如,mRNA)。疫苗在施用于经疫苗接种的受试者后,允许表达所编码的致病性蛋白质(或其抗原片段或表位),由此在受试者体内引发针对病原体的免疫。

[0383] 在一个实施方案中,本文提供了一种通过向受试者施用包含治疗有效量的本文提供的脂质纳米颗粒或本文提供的药物组合物的疫苗来预防受试者的感染性疾病的方法,其中核酸编码与感染性疾病相关的多肽,从而在人中触发针对目标疾病的免疫反应。

[0384] 在一个实施方案中,感染性疾病是病毒感染。在一个实施方案中,感染性疾病是细菌感染。

[0385] 在一个实施方案中,核酸是编码抗原中存在的多肽的mRNA。

[0386] 6.3.1治疗性有效负载

[0387] 如本文所述的纳米颗粒组合物可包含一种或多种治疗剂和/或预防剂。这些治疗剂和/或预防剂在本公开中有时称为“治疗性有效负载”或“有效负载”。在一些实施方案中,治疗性有效负载可在体内或体外,使用纳米颗粒作为递送媒介物施用。

[0388] 在一个实施方案中,治疗性有效负载是本文提供的核酸。在一个实施方案中,纳米颗粒组合物除了本文提供的核酸之外还包含治疗性有效负载。在一个实施方案中,纳米颗粒组合物包含治疗性有效负载代替本文提供的核酸。

[0389] 在一些实施方案中,纳米颗粒组合物包含以下作为治疗性有效负载:小分子化合物(例如小分子药物),例如抗癌剂(例如长春新碱(vincristine)、多柔比星(doxorubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、喜树碱(camptothecin)、顺铂(cisplatin)、博来霉素(bleomycin)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、甲氨喋呤(methotrexate)和链脲佐菌素(streptozotocin))、抗肿瘤剂(例如放线菌素D(actinomycin D)、长春新碱、长春花碱(vinblastine)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(cytosine arabinoside)、蒽环霉素(anthracyclines)、烷基化剂、铂类化合物、抗代谢物和核苷类似物,例如甲氨喋呤以及嘌呤和嘧啶类似物)、抗感染剂、局麻药(例如地布卡因(dibucaine)和氯丙嗪(chlorpromazine))、β-肾上腺素性阻断剂(例如普萘洛尔(propranolol)、噻吗洛尔(timolol)和拉贝洛尔(labetalol))、抗高血压剂(例如可乐定(clonidine)和肼屈嗪(hydralazine))、抗抑郁剂(例如丙咪嗪(imipramine)、阿米替林(amitriptyline)和多塞平(doxepin))、抗痉挛剂(例如苯妥英(phenytoin))、抗组胺剂(例如苯海拉明(diphenhydramine)、氯非安明(chlorpheniramine)和异丙嗪(promethazine))、抗生素/抗细菌剂(例如庆大霉素(gentamycin)、环丙沙星(ciprofloxacin)和头孢西丁(cefoxitin))、抗真菌剂(例如咪康唑(miconazole)、特康唑(terconazole)、益康唑(econazole)、异康唑(isoconazole)、布康唑(butaconazole)、克霉唑(clotrimazole)、伊

曲康唑(itraconazole)、制霉菌素(nystatin)、萘替芬(naftifine)和两性霉素B(amphotericin B))、抗寄生虫剂、激素、激素拮抗剂、免疫调节剂、神经传递质拮抗剂、抗青光眼剂、维生素、麻醉剂和成像剂。

[0390] 在一些实施方案中,治疗性有效负载包含细胞毒素、放射性离子、化学治疗剂、疫苗、引发免疫反应的化合物和/或另一治疗剂和/或预防剂。细胞毒素或细胞毒性剂包括可能对细胞有害的任何剂。实例包括但不限于紫杉醇(taxol)、细胞松弛素B(cytochalasin B)、短杆菌肽D(gramicidin D)、溴化乙锭(ethidium bromide)、依米丁(emetine)、丝裂霉素(mitomycin)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide)、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱(colchicine)、多柔比星、道诺霉素(daunorubicin)、二羟基蒽二酮(dihydroxyanthracinedione)、米托蒽醌、米拉霉素(mithramycin)、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔、嘌呤霉素(puromycin)、美登素类化合物(maytansinoids),例如美登醇(maytansinol)、拉奇霉素(rachelmycin)(CC-1065)以及其类似物或同系物。放射性离子包括但不限于碘(例如碘125或碘131)、锶89、磷、钯、铯、铱、磷酸根、钴、钇90、钐153和镱。

[0391] 在其它实施方案中,本发明纳米颗粒组合物的治疗性有效负载可包括但不限于治疗剂和/或预防剂,例如抗代谢物(例如甲氨喋呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪(dacarbazine))、烷基化剂(例如氮芥(mechlorethamine)、噻替哌(thiotepa)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、拉奇霉素(CC-1065)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine)(BSNU)、洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、环磷酰胺、白消安(busulfan)、二溴甘露醇(dibromomannitol)、链脲佐菌素、丝裂霉素C和顺二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环霉素(例如道诺霉素(先前称为柔红霉素(daunomycin))和多柔比星)、抗生素(例如放线菌素D(dactinomycin)(先前称为放线菌素))、博来霉素、米拉霉素和安曲霉素(anthramycin)(AMC))和抗有丝分裂剂(例如长春新碱、长春花碱、紫杉醇和美登素类化合物)。

[0392] 在一些实施方案中,纳米颗粒组合物包含诸如肽和多肽之类生物分子作为治疗性有效负载。形成本发明纳米颗粒组合物的一部分的生物分子可以是天然来源或合成的。举例来说,在一些实施方案中,本发明纳米颗粒组合物的治疗性有效负载可包括但不限于庆大霉素、阿米卡星(amikacin)、胰岛素、促红细胞生成素(EPO)、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)、因子VIR、促黄体激素释放激素(LHRH)类似物、干扰素、肝素、B型肝炎表面抗原、伤寒疫苗、霍乱疫苗以及肽和多肽。

[0393] 6.3.1.1核酸的另外描述

[0394] 在一些实施方案中,本发明纳米颗粒组合物包含一种或多种核酸分子(例如DNA或RNA分子)作为治疗性有效负载。可作为治疗性有效负载包括在本发明纳米颗粒组合物中的核酸分子的示例性形式包括但不限于以下中的一种或多种:脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA),包括信使mRNA(mRNA)、其杂交体、RNAi诱导剂、RNAi剂、siRNA、shRNA、miRNA、反义RNA、核糖酶、催化性DNA、诱导形成三螺旋的RNA、适体、载体等。在某些实施方案中,治疗性有效负载包含RNA。可作为治疗性有效负载包括在本发明纳米颗粒组合物中的RNA分子包括但不限于短聚体(shortmer)、agomir、antagomir、反义体(antisense)、核糖酶、小干扰RNA(siRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、Dicer-底物RNA(dsRNA)、小发夹RNA

(shRNA)、转移RNA(tRNA)、信使RNA(mRNA)和本领域中已知的RNA分子的其它形式。在特定实施方案中,RNA是mRNA。

[0395] 在一个实施方案中,本发明纳米颗粒组合物包含一种或多种核酸分子(例如DNA或RNA分子)作为治疗性有效负载。可作为治疗性有效负载包括在本发明纳米颗粒组合物中的核酸分子的示例性形式包括但不限于以下中的一种或多种:脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA),包括信使mRNA(mRNA)、其杂交体、RNAi诱导剂、RNAi剂、siRNA、shRNA、miRNA、反义RNA、核糖酶、催化性DNA、诱导形成三螺旋的RNA、适体、载体等。在某些实施方案中,治疗性有效负载包含RNA。可作为治疗性有效负载包括在本发明纳米颗粒组合物中的RNA分子包括但不限于短聚体(shortmer)、agomir、antagomir、反义体(antisense)、核糖酶、小干扰RNA(siRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、Dicer-底物RNA(dsRNA)、小发夹RNA(shRNA)、转移RNA(tRNA)、信使RNA(mRNA)和本领域中已知的RNA分子的其它形式。在特定实施方案中,RNA是mRNA。

[0396] 在其它实施方案中,纳米颗粒组合物包含siRNA分子作为治疗性有效负载。特别地,在一个实施方案中,siRNA分子能够选择性干扰并下调目标基因的表达。举例来说,在一个实施方案中,在向有需要的受试者施用包含siRNA的纳米颗粒组合物后,siRNA有效负载使与特定疾病、病症或疾患相关的基因选择性地沉默。在一个实施方案中,siRNA分子包含与编码目标蛋白质产物的mRNA序列互补的序列。在一个实施方案中,siRNA分子是免疫调节性siRNA。

[0397] 在一个实施方案中,纳米颗粒组合物包含shRNA分子或编码shRNA分子的载体作为治疗性有效负载。特别地,在一个实施方案中,治疗性有效负载在施用于靶细胞后,在靶细胞内产生shRNA。与shRNA相关的构建体和机制是相关领域中熟知的。

[0398] 在一个实施方案中,纳米颗粒组合物包含mRNA分子作为治疗性有效负载。特别地,在一个实施方案中,mRNA分子编码目标多肽,包括任何天然或非天然存在或以其它方式修饰的多肽。由mRNA编码的多肽可具有任何大小并且可具有任何二级结构或活性。在一个实施方案中,由mRNA有效负载编码的多肽当在细胞中表达时可具有治疗效应。

[0399] 在一些实施方案中,本公开的核酸分子包含mRNA分子。在具体实施方案中,核酸分子包含至少一个编码目标肽或多肽的编码区(例如,开放阅读框(ORF))。在一个实施方案中,核酸分子还包含至少一个非翻译区(UTR)。在特定实施方案中,非翻译区(UTR)位于编码区的上游(5'端),并且在本文中称为5'-UTR。在特定实施方案中,非翻译区(UTR)位于编码区的下游(3'端),并且在本文中称为3'-UTR。在特定实施方案中,核酸分子包含5'-UTR和3'-UTR两者。在一个实施方案中,5'-UTR包含5'-帽结构。在一个实施方案中,核酸分子包含Kozak序列(例如,在5'-UTR中)。在一个实施方案中,核酸分子包含poly-A区(例如,在3'-UTR中)。在一个实施方案中,核酸分子包含聚腺苷酸化信号(例如,在3'-UTR中)。在一个实施方案中,核酸分子包含稳定区(例如,在3'-UTR中)。在一个实施方案中,核酸分子包含二级结构。在一个实施方案中,二级结构是茎-环。在一个实施方案中,核酸分子包含茎-环序列(例如,在5'-UTR和/或3'-UTR中)。在一个实施方案中,核酸分子包含一个或多个能够在剪接过程中切除的内含子区。在具体实施方案中,核酸分子包含一个或多个选自5'-UTR和编码区的区域。在具体实施方案中,核酸分子包含一个或多个选自编码区和3'-UTR的区域。在具体实施方案中,核酸分子包含一个或多个选自5'-UTR、编码区和3'-UTR的区域。

[0400] 编码区

[0401] 在一个实施方案中,本公开的核酸分子包含至少一个编码区。在一个施方案中,编码区是编码单一肽或蛋白质的开放阅读框(ORF)。在一个实施方案中,编码区包含至少两个ORF,每个ORF编码肽或蛋白质。在编码区包含多于一个ORF的那些实施方案中,所编码的肽和/或蛋白质可彼此相同或不同。在一个实施方案中,编码区中的多个ORF被非编码序列隔开。在具体实施方案中,隔开两个ORF的非编码序列包含内部核糖体进入位点(IRES)。

[0402] 不受理论束缚,预期内部核糖体进入位点(IRES)可用作唯一的核糖体结合位点,或充当mRNA的多个核糖体结合位点之一。包含多于一个功能性核糖体结合位点的mRNA分子可编码若干肽或多肽,所述肽或多肽独立地由核糖体翻译(例如多顺反子mRNA)。因此,在一个实施方案中,本公开的核酸分子(例如.,mRNA)包含一个或多个内部核糖体进入位点(IRES)。可与本公开结合使用的IRES序列的实例包括但不限于来自小RNA病毒(例如FMDV)、瘟病毒(CFFV)、脊髓灰质炎病毒(PV)、脑心肌炎病毒(ECMV)、口蹄疫病毒(FMDV)、丙型肝炎病毒(HCV)、猪瘟病毒(CSFV)、鼠白血病病毒(MLV)、猴免疫缺陷病毒(SIV)或蟋蟀麻痹病毒(CrPV)的那些IRES序列。

[0403] 在各个实施方案中,本公开的核酸分子编码至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10种或多于10种肽或蛋白质。由核酸分子编码的肽和蛋白质可相同或不同。在一个实施方案中,本公开的核酸分子编码二肽(例如,肌肽和鹅肌肽)。在一个实施方案中,核酸分子编码三肽。在一个实施方案中,核酸分子编码四肽。在一个实施方案中,核酸分子编码五肽。在一个实施方案中,核酸分子编码六肽。在一个实施方案中,核酸分子编码七肽。在一个实施方案中,核酸分子编码八肽。在一个实施方案中,核酸分子编码九肽。在一个实施方案中,核酸分子编码十肽。在一个实施方案中,核酸分子编码具有至少约15个氨基酸的肽或多肽。在一个实施方案中,核酸分子编码具有至少约50个氨基酸的肽或多肽。在一个实施方案中,核酸分子编码具有至少约100个氨基酸的肽或多肽。在一个实施方案中,核酸分子编码具有至少约150个氨基酸的肽或多肽。在一个实施方案中,核酸分子编码具有至少约300个氨基酸的肽或多肽。在一个实施方案中,核酸分子编码具有至少约500个氨基酸的肽或多肽。在一个实施方案中,核酸分子编码具有至少约1000个氨基酸的肽或多肽。

[0404] 在一个实施方案中,本公开的核酸分子的长度是至少约30个核苷酸(nt)。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约35nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约40nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约45nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约50nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约55nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约60nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约65nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约70nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约75nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约80nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约85nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约90nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约95nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约100nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约120nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约140nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约160nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约180nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约200nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约250nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至

少约300nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约400nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约500nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约600nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约700nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约800nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约900nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约1000nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约1100nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约1200nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约1300nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约1400nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约1500nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约1600nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约1700nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约1800nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约1900nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约2000nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约2500nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约3000nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约3500nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约4000nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约4500nt。在一个实施方案中,核酸分子的长度是至少约5000nt。

[0405] 在具体实施方案中,治疗性有效负载包含如本文所述的疫苗组合物(例如基因疫苗)。在一个实施方案中,治疗性有效负载包含能够触发针对一种或多种目标疾患或疾病的免疫的化合物。在一个实施方案中,目标疾患与病原体感染相关或由病原体感染引起,所述病原体诸如冠状病毒(例如2019-nCoV)、流感病毒、麻疹病毒、人乳头瘤病毒(HPV)、狂犬病病毒、脑膜炎病毒、百日咳病毒、破伤风病毒、鼠疫病毒、肝炎病毒和结核病病毒。在一个实施方案中,治疗性有效负载包含编码病原体所特有的致病性蛋白质或其抗原片段或表位的核酸序列(例如mRNA)。疫苗在施用于经疫苗接种的受试者后,允许表达所编码的致病性蛋白质(或其抗原片段或表位),由此在受试者体内引发针对病原体的免疫。

[0406] 在一个实施方案中,目标疾患与细胞的赘生性生长相关或由细胞的赘生性生长引起(诸如癌症)。在一个实施方案中,治疗性有效负载包含编码癌症所特有的肿瘤相关抗原(TAA)或其抗原片段或表位的核酸序列(例如mRNA)。疫苗在施用于经疫苗接种的受试者后,允许表达所编码的TAA(或其抗原片段或表位),由此在受试者体内引发针对表达TAA的赘生性细胞的免疫。

[0407] 5'-帽结构

[0408] 不受理论束缚,预期多核苷酸的5'-帽结构参与核输出并增加多核苷酸稳定性,并且结合mRNA帽结合蛋白(CBP),CBP负责细胞中的多核苷酸稳定性,并且通过CBP与poly-A结合蛋白缔合形成成熟环状mRNA物质来引起翻译能力。5'-帽结构进一步有助于mRNA剪接期间5'-近端内含子的移除。因此,在一个实施方案中,本公开的核酸分子包含5'-帽结构。

[0409] 核酸分子可在5'端经细胞内源性转录机构加帽,由此在多核苷酸的末端鸟苷帽残基与5'末端转录的有义核苷酸之间产生5'-ppp-5'-三磷酸键联。这种5'-鸟苷酸帽然后可被甲基化以便产生N7-甲基-鸟苷酸残基。多核苷酸5'端的末端和/或末端前(anteterminal)转录的核苷酸的核糖也可任选地经2'-O-甲基化。经由鸟苷酸帽结构水解和裂解进行的5'-脱帽可靶向核酸分子,例如mRNA分子以进行降解。

[0410] 在一个实施方案中,本公开的核酸分子包含对由内源过程产生的天然5'-帽结构的一个或多个改变。不受理论束缚,对5'-帽的修饰可增加多核苷酸的稳定性,增加多核苷

酸的半衰期,并且可增加多核苷酸的翻译效率。

[0411] 对天然5'-帽结构的示例性改变包括产生不可水解的帽结构,以防止脱帽,并由此增加多核苷酸的半衰期。在一个实施方案中,因为帽结构水解需要裂解5'-ppp-5'磷酸二酯键联,所以在一个实施方案中,可在加帽反应期间使用经修饰的核苷酸。举例来说,在一个实施方案中,可根据制造商的说明书,将来自New England Biolabs(Ipswich,Mass.)的牛痘病毒加帽酶(Vaccinia Capping Enzyme)用于α-硫代鸟苷核苷酸以在5'-ppp-5'帽中产生硫代磷酸酯键联。可使用额外经修饰的鸟苷核苷酸,诸如α-甲基膦酸和硒代磷酸核苷酸。

[0412] 对天然5'-帽结构的额外示例性改变还包括在加帽的三磷酸鸟苷(GTP)的2'-和/或3'-位的修饰、用亚甲基部分(CH_2)替代糖环氧(产生碳环)、在帽结构的三磷酸桥部分处的修饰或在核碱基(G)部分处的修饰。

[0413] 对天然5'-帽结构的额外示例性改变包括但不限于多核苷酸5'-末端和/或5'-末端前核苷酸的核糖在糖2'-羟基上的2'-O-甲基化(如上所述)。可使用多个不同的5'-帽结构来产生多核苷酸(诸如mRNA分子)的5'-帽。可与本公开结合使用的额外示例性5'-帽结构还包括国际专利公布:WO2008127688、WO2008016473和WO 2011015347中描述的那些,所述专利的全部内容通过引用并入本文中。

[0414] 在各个实施方案中,5'-末端帽可包括帽类似物。帽类似物,本文也称为合成帽类似物、化学帽、化学帽类似物或结构或功能帽类似物,其化学结构不同于天然(即,内源性、野生型或生理性)5'-帽,并且保留帽功能。帽类似物可按化学方式(即,非酶方式)或酶方式合成和/或连接至多核苷酸。

[0415] 举例来说,抗反向帽类似物(ARCA)帽含有通过5'-5'-三磷酸基团连接的两个鸟苷,其中一个鸟苷含有N7-甲基以及3'-O-甲基(即,N7,3'-O-二甲基-鸟苷-5'-三磷酸-5'-鸟苷,m^7G-3'mppp-G,其可等效地称为3'O-Me-m7G(5')ppp(5')G)。另一个未改变的鸟苷的3'-O原子与加帽多核苷酸(例如,mRNA)的5'-末端核苷酸连接。N7-和3'-O-甲基化的鸟苷提供了加帽多核苷酸(例如,mRNA)的末端部分。另一示例性帽结构是mCAP,其类似于ARCA,但在鸟苷上具有2'-O-甲基(即,N7,2'-O-二甲基-鸟苷-5'-三磷酸-5'-鸟苷,m_7Gm-ppp-G)。

[0416] 在一个实施方案中,帽类似物可以是二核苷酸帽类似物。作为非限制性实例,二核苷酸帽类似物可在不同磷酸酯位置处用硼烷磷酸酯基(boranophosphate)或硒代磷酸酯基(phophoroselenoate)进行修饰,如美国专利第8,519,110号中所描述的二核苷酸帽类似物,所述专利的全部内容通过引用以其整体并入本文中。

[0417] 在一个实施方案中,帽类似物可以是本领域中已知和/或本文所描述的N7-(4-氯苯氧基乙基)取代的二核苷酸帽类似物。N7-(4-氯苯氧基乙基)取代的二核苷酸帽类似物的非限制性实例包括N7-(4-氯苯氧基乙基)-G(5')ppp(5')G和N7-(4-氯苯氧基乙基)-m3'-OG(5')ppp(5')G帽类似物(参见例如,Kore等人Bioorganic&Medicinal Chemistry 2013 21:4570-4574中所述的各种帽类似物和合成帽类似物的方法;所述文献的全部内容通过引用并入本文中)。在其它实施方案中,可与本公开的核酸分子结合使用的帽类似物是4-氯/溴苯氧基乙基类似物。

[0418] 在各个实施方案中,帽类似物可包括鸟苷类似物。有用的鸟苷类似物包括但不限于肌苷、N1-甲基-鸟苷、2'-氟-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、8-氧代-鸟苷、2-氨基-鸟苷、LNA-鸟苷和2-叠氮基-鸟苷。

[0419] 不受理论的束缚,预期尽管帽类似物允许在体外转录反应中多核苷酸的伴随加帽,但高达20%的转录物保持未加帽。这种情况以及帽类似物与由细胞的内源性转录结构产生的多核苷酸的天然5'-帽结构的结构差异可能导致翻译能力减弱和细胞稳定性降低。

[0420] 因此,在一个实施方案中,本公开的核酸分子还可使用酶在转录后加帽,以便产生更真实(authentic)的5'-帽结构。如本文所用,短语"更真实"是指一种特征在结构上或功能上密切反映或模仿内源或野生型特征。也就是说,与现有技术的合成特征或类似物相比,"更真实"的特征更好地代表内源性、野生型、天然或生理细胞功能和/或结构,或者其在一个或多个方面胜过相应内源性、野生型、天然或生理特征。可与本公开的核酸分子结合使用的更真实的5'-帽结构的非限制性实例是相较于本领域中已知的合成5'-帽结构(或相较于野生型、天然或生理性5'-帽结构),尤其具有增强的与帽结合蛋白的结合、增加的半衰期、降低的对5'-核酸内切酶的敏感性和/或减少的5'-脱帽的结构。举例来说,在一个实施方案中,重组牛痘病毒加帽酶和重组2'-O-甲基转移酶可在多核苷酸的5'-末端核苷酸与鸟苷帽核苷酸之间产生经典的5'-5'-三磷酸键联,其中帽鸟苷含有N7-甲基化,并且多核苷酸的5'-末端核苷酸含有2'-O-甲基。这种结构称为帽1结构。与例如本领域中已知的其它5'帽类似物结构相比,这种帽引起更高的翻译能力、细胞稳定性和减少的细胞促炎性细胞因子的活化。其它示例性帽结构包括7mG(5')ppp(5')N,pN2p(帽0)、7mG(5')ppp(5')N1mpNp(帽1)、7mG(5')-ppp(5')N1mpN2mp(帽2)和m(7)Gpppm(3)(6,6,2')Apm(2')Apm(2')Cpm(2)(3,2')Up(帽4)。

[0421] 不受理论束缚,预期本公开的核酸分子可在转录后加帽,并且由于这种方法较为高效,因此几乎100%的核酸分子可经加帽。

[0422] 非翻译区(UTR)

[0423] 在一个实施方案中,本公开的核酸分子包含一个或多个非翻译区(UTR)。在一个实施方案中,UTR位于核酸分子中编码区的上游,并且被称为5'-UTR。在一个实施方案中,UTR位于核酸分子中的编码区的下游,并且被称为3'-UTR。UTR的序列可与核酸分子中所发现的编码区的序列同源或异源。多个UTR可包括在核酸分子中,并且可具有相同或不同的序列和/或基因起源。根据本公开,核酸分子中UTR的任何部分(包括没有任何部分)可经密码子优化,并且任何部分可在密码子优化之前和/或之后独立地含有一个或多个不同的结构或化学修饰。

[0424] 在一个实施方案中,本公开的核酸分子(例如mRNA)包含相对于彼此为同源的UTR和编码区。在其它实施方案中,本公开的核酸分子(例如,mRNA)包含相对于彼此为异源的UTR和编码区。在一个实施方案中,为了监测UTR序列的活性,可在体外(例如细胞或组织培养物)或在体内(例如向受试者)施用包含UTR和可检测探针的编码序列的核酸分子,并且可使用本领域中已知的方法测量UTR序列的效应(例如调节表达水平、编码产物的细胞定位或编码产物的半衰期)。

[0425] 在一个实施方案中,本公开的核酸分子(例如mRNA)的UTR包含至少一个翻译增强子元件(TEE),所述TEE起到增加由所述核酸分子产生的多肽或蛋白质的量的作用。在一个实施方案中,TEE位于核酸分子的5'-UTR中。在其它实施方案中,TEE位于核酸分子的3'-UTR处。在其它实施方案中,至少两个TEE分别位于核酸分子的5'-UTR和3'-UTR处。在一个实施方案中,本公开的核酸分子(例如,mRNA)可包含一个或多个拷贝的TEE序列或包含多于一个

不同的TEE序列。在一个实施方案中,存在于本公开的核酸分子中的不同TEE序列可相对于彼此为同源的或异源的。

[0426] 各种TEE序列是本领域中已知的,并且可与本公开结合使用。举例来说,在一个实施方案中,TEE可以是内部核糖体进入位点(IRES)、HCV-IRES或IRES元件。Chappell等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101:9590-9594,2004;Zhou等人Proc.Natl.Acad.Sci.102:6273-6278,2005。可与本公开结合使用的额外内部核糖体进入位点(IRES)包括但不限于美国专利第7,468,275号、美国专利公布第2007/0048776号和美国专利公布第2011/0124100号,以及国际专利公布第WO2007/025008号和国际专利公布第WO2001/055369号中所述的IRES,其各自的内容通过引用以其整体并入本文中。在一个实施方案中,TEE可以是Wellensiek等人Genome-wide profiling of human cap-independent translation-enhancing elements,Nature Methods,2013年8月;10(8):747-750的补充表1和补充表2中所述的TEE;所述文献的内容通过引用以其整体并入本文中。

[0427] 可与本公开结合使用的额外示例性TEE包括但不限于美国专利第6,310,197号、美国专利第6,849,405号、美国专利第7,456,273号、美国专利第7,183,395号、美国专利公布第2009/0226470号、美国专利公布第2013/0177581号、美国专利公布第2007/0048776号、美国专利公布第2011/0124100号、美国专利公布第2009/0093049号、国际专利公布第WO2009/075886号、国际专利公布第WO2012/009644号和国际专利公布第WO1999/024595号、国际专利公布第WO2007/025008号、国际专利公布第WO2001/055371号、欧洲专利第2610341号、欧洲专利第2610340号中所述的TEE序列,其各自的内容通过引用以其整体并入本文中。

[0428] 在各种实施方案中,本公开的核酸分子(例如,mRNA)包含至少一个UTR,其包含至少1个、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、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少30个、至少35个、至少40个、至少45个、至少50个、至少55个或超过60个TEE序列。在一个实施方案中,核酸分子的UTR中的TEE序列是相同TEE序列的拷贝。在其它实施方案中,核酸分子的UTR中的至少两个TEE序列具有不同的TEE序列。在一个实施方案中,多个不同的TEE序列以一种或多种重复模式布置于核酸分子的UTR区中。仅出于说明的目的,重复模式可以是例如ABABAB、AABBAABBAABB、ABCABCABC等,其中在这些示例性模式中,每个大写字母(A、B或C)代表不同的TEE序列。在一个实施方案中,在核酸分子的UTR中,至少两个TEE序列彼此为连续的(即,其间无间隔子序列)。在其它实施方案中,至少两个TEE序列通过间隔子序列隔开。在一个实施方案中,UTR可包含TEE序列-间隔子序列模块,所述模块在UTR中重复至少一次、至少两次、至少3次、至少4次、至少5次、至少6次、至少7次、至少8次、至少9次或多于9次。在本段中描述的任何实施方案中,UTR可以是核酸分子的5'-UTR、3'-UTR或5'-UTR和3'-UTR两者。

[0429] 在一个实施方案中,本公开的核酸分子(例如,mRNA)的UTR包含至少一个翻译抑制元件,所述元件起到减少由所述核酸分子产生的多肽或蛋白质的量的作用。在一个实施方案中,核酸分子的UTR包含由一个或多个微小RNA识别的一个或多个miR序列或其片段(例如,miR种子序列(seed sequence))。在一个实施方案中,核酸分子的UTR包含下调核酸分子的翻译活性的一个或多个茎-环结构。用于抑制与核酸分子相关的翻译活性的其它机制是本领域中已知的。在本段中描述的任何实施方案中,UTR可以是核酸分子的5'-UTR、3'-UTR

或5'-UTR和3'-UTR两者。

[0430] 聚腺苷酸化(Poly-A)区

[0431] 在天然RNA加工过程中,通常将长链腺苷核苷酸(poly-A区)添加至信使RNA(mRNA)分子中以增加分子的稳定性。转录后,立即将转录物的3'-端裂解以释放3'-羟基。接着,poly-A聚合酶将一连串腺苷核苷酸添加至RNA中。所述过程称为聚腺苷酸化,添加长度在100与250个残基之间的poly-A区。不受理论束缚,预期poly-A区可赋予本公开的核酸分子多个优点。

[0432] 因此,在一个实施方案中,本公开的核酸分子(例如,mRNA)包含聚腺苷酸化信号。在一个实施方案中,本公开的核酸分子(例如,mRNA)包含一个或多个聚腺苷酸化(poly-A)区。在一个实施方案中,poly-A区完全由腺嘌呤核苷酸或其功能性类似物构成。在一个实施方案中,核酸分子在其3'端包含至少一个poly-A区。在一个实施方案中,核酸分子在其5'端包含至少一个poly-A区。在一个实施方案中,核酸分子在其5'端包含至少一个poly-A区并且在其3'端包含至少一个poly-A区。

[0433] 根据本公开,在不同实施方案中,poly-A区可具有不同长度。特别地,在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少30个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少35个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少40个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少45个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少50个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少55个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少60个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少65个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少70个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少75个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少80个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少85个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少90个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少95个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少100个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少110个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少120个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少130个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少140个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少150个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少160个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少170个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少180个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少190个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少200个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少225个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少250个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少275个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至

少300个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少350个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少400个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少450个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少500个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少600个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少700个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少800个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少900个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少1000个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少1100个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少1200个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少1300个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少1400个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少1500个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少1600个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少1700个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少1800个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少1900个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少2000个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少2250个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少2500个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少2750个核苷酸。在一个实施方案中,本公开的核酸分子的poly-A区的长度是至少3000个核苷酸。

[0434] 在一个实施方案中,核酸分子中poly-A区的长度可基于核酸分子的总长度或其部分(诸如核酸分子的编码区的长度或开放阅读框的长度等)来选择。举例来说,在一个实施方案中,poly-A区占含有poly-A区的核酸分子的总长度的约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高百分比。

[0435] 不受理论束缚,预期某些RNA结合蛋白可结合至位于mRNA分子3'端的poly-A区。这些poly-A结合蛋白(PABP)可调节mRNA表达,诸如与细胞中的翻译起始机构相互作用和/或保护3'-poly-A尾免于降解。因此,在一个实施方案中,本公开的核酸分子(例如,mRNA)包含poly-A结合蛋白(PABP)的至少一个结合位点。在其它实施方案中,在将核酸分子负载至递送媒介物(例如,脂质纳米颗粒)中之前,使其与PABP缀合或复合。

[0436] 在一个实施方案中,本公开的核酸分子(例如,mRNA)包含poly-A-G四联体。G四联体是可由DNA和RNA中富含G的序列形成的氢键合的四个鸟苷核苷酸的环状阵列。在这个实施方案中,G-四联体并入在poly-A区的末端。可测定所得多核苷酸(例如,mRNA)的稳定性、蛋白质产量和其它参数,包括在不同时间点的半衰期。已发现,poly-A-G四联体结构的蛋白质产量等于仅使用含120个核苷酸的poly-A区所观察到的蛋白质产量的至少75%。

[0437] 在一个实施方案中,本公开的核酸分子(例如,mRNA)可包括poly-A区,并且可通过添加3'-稳定区来稳定。在一个实施方案中,可用于使核酸分子(例如,mRNA)稳定的3'-稳定区包括国际专利公布第WO2013/103659号中所述的poly-A或poly-A-G四联体结构,所述公

布的内容通过引用以其整体并入本文中。

[0438] 在其它实施方案中,可与本公开的核酸分子结合使用的3'-稳定区包括链终止核苷,诸如但不限于3'-脱氧腺苷(虫草素(cordycepin));3'-脱氧尿苷;3'-脱氧胞嘧啶;3'-脱氧鸟苷;3'-脱氧胸腺嘧啶;2',3'-双脱氧核苷,诸如2',3'-双脱氧腺苷、2',3'-双脱氧尿苷、2',3'-双脱氧胞嘧啶、2',3'-双脱氧鸟苷、2',3'-双脱氧胸腺嘧啶;2'-脱氧核苷;或0-甲基核苷;3'-脱氧核苷;2',3'-双脱氧核苷;3'-0-甲基核苷;3'-0-乙基核苷;3'-阿拉伯糖苷,以及本领域中已知和/或本文所描述的其它替代性核苷。

[0439] 二级结构

[0440] 不受理论束缚,预期茎-环结构可引导RNA折叠,保护核酸分子(例如mRNA)的结构稳定性,提供RNA结合蛋白的识别位点,并用作酶反应的底物。举例来说,miR序列和/或TEE序列的并入将改变茎-环区的形状,由此可增加和/或减少翻译(Kedde等人A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3'UTR controls miR-221 and miR-222 accessibility.Nat Cell Biol.,2010年10月;12(10):1014-20,所述文献的内容通过引用以其整体并入本文中)。

[0441] 因此,在一个实施方案中,本文所述的核酸分子(例如,mRNA)或其部分可呈现茎环结构,诸如但不限于组蛋白茎环。在一个实施方案中,茎-环结构由长度为约25个或约26个核苷酸的茎-环序列形成,诸如但不限于国际专利公布第WO2013/103659号中所述的结构,其内容通过引用以其整体并入本文中。茎-环序列的额外实例包括国际专利公布第WO2012/019780号和国际专利公布第WO201502667号中所述的序列,其内容通过引用并入本文中。在一个实施方案中,茎-环序列包含如本文所述的TEE。在一个实施方案中,茎-环序列包含如本文所述的miR序列。在具体实施方案中,茎-环序列可包括miR-122种子序列。在具体实施方案中,核酸分子包含国际专利公布第WO2021204175号中描述的两个茎-环序列,所述专利的全部内容通过引用并入本文中。

[0442] 在一个实施方案中,本公开的核酸分子(例如,mRNA)包含位于核酸分子中编码区上游(在5'端)的茎-环序列。在一个实施方案中,茎-环序列位于核酸分子的5'-UTR内。在一个实施方案中,本公开的核酸分子(例如,mRNA)包含位于核酸分子中编码区下游(在3'端)的茎-环序列。在一个实施方案中,茎-环序列位于核酸分子的3'-UTR内。在一些情况下,核酸分子可含有多于一个茎-环序列。在一些实施方案中,核酸分子在5'-UTR中包含至少一个茎-环序列并且在3'-UTR中包含至少一个茎-环序列。

[0443] 在一个实施方案中,包含茎-环结构的核酸分子还包含稳定区。在一个实施方案中,稳定区包含至少一个链终止核苷,其起到减慢降解并由此增加核酸分子的半衰期的作用。可与本公开的核酸分子结合使用的示例性链终止核苷包括但不限于3'-脱氧腺苷(虫草素);3'-脱氧尿苷;3'-脱氧胞嘧啶;3'-脱氧鸟苷;3'-脱氧胸腺嘧啶;2',3'-双脱氧核苷,诸如2',3'-双脱氧腺苷、2',3'-双脱氧尿苷、2',3'-双脱氧胞嘧啶、2',3'-双脱氧鸟苷、2',3'-双脱氧胸腺嘧啶;2'-脱氧核苷;或0-甲基核苷;3'-脱氧核苷;2',3'-双脱氧核苷;3'-0-甲基核苷;3'-0-乙基核苷;3'-阿拉伯糖苷,以及本领域中已知和/或本文所描述的其它替代性核苷。在其它实施方案中,茎-环结构可通过改变多核苷酸的3'-区域来稳定,所述改变可防止和/或抑制寡聚(U)的添加(国际专利公布第WO2013/103659号,其通过引用以其整体并入本文中)。

[0444] 在一个实施方案中,本公开的核酸分子包含至少一个茎-环序列和poly-A区或聚腺苷酸化信号。包含至少一个茎-环序列和poly-A区或聚腺苷酸化信号的多核苷酸序列的非限制性实例包括国际专利公布第WO2013/120497号、国际专利公布第WO2013/120629号、国际专利公布第WO2013/120500号、国际专利公布第WO2013/120627号、国际专利公布第WO2013/120498号、国际专利公布第WO2013/120626号、国际专利公布第WO2013/120499号和国际专利公布第WO2013/120628号中所述的序列,其各自的内容通过引用以其整体并入本文中。

[0445] 在一个实施方案中,包含茎-环序列和poly-A区或聚腺苷酸化信号的核酸分子可编码病原体抗原或其片段,诸如国际专利公布第WO2013/120499号和国际专利公布第WO2013/120628号中所述的多核苷酸序列,其各自的内容通过引用以其整体并入本文中。

[0446] 在一个实施方案中,包含茎-环序列和poly-A区或聚腺苷酸化信号的核酸分子可编码治疗性蛋白质,诸如国际专利公布第WO2013/120497号和国际专利公布第WO2013/120629号中所述的多核苷酸序列,其各自的内容通过引用以其整体并入本文中。

[0447] 在一个实施方案中,包含茎-环序列和poly-A区或聚腺苷酸化信号的核酸分子可编码肿瘤抗原或其片段,诸如国际专利公布第WO2013/120500号和国际专利公布第WO2013/120627号中所述的多核苷酸序列,其各自的内容通过引用以其整体并入本文中。

[0448] 在一个实施方案中,包含茎-环序列和poly-A区或聚腺苷酸化信号的核酸分子可编码致敏性抗原或自身免疫性自身抗原,诸如国际专利公布第WO2013/120498号和国际专利公布第WO2013/120626号中所述的多核苷酸序列,其各自的内容通过引用以其整体并入本文中。

[0449] 功能性核苷酸类似物

[0450] 在一个实施方案中,本文所述的有效负载核酸分子仅含有选自A(腺苷)、G(鸟苷)、C(胞嘧啶)、U(尿苷)和T(胸苷)的规范核苷酸。不受理论束缚,预期某些功能性核苷酸类似物可赋予核酸分子有用的特性。在本公开的上下文中,此类有用特性的实例包括但不限于核酸分子的稳定性增加、核酸分子在诱导先天免疫反应中的免疫原性降低、由核酸分子编码的蛋白质的产量增加、核酸分子的细胞内递送和/或保留增加,和/或核酸分子的细胞毒性降低等。

[0451] 因此,在一个实施方案中,有效负载核酸分子包含至少一种如本文所述的功能性核苷酸类似物。在一个实施方案中,功能性核苷酸类似物含有至少一个针对核碱基、糖基和/或磷酸酯基的化学修饰。因此,包含至少一种功能性核苷酸类似物的有效负载核酸分子含有至少一个针对核碱基、糖基和/或核苷间键联的化学修饰。本文提供对核酸分子的核碱基、糖基或核苷间键联的示例性化学修饰。

[0452] 如本文所述,有效负载核酸分子中所有核苷酸的0%至100%范围的核苷酸可以为如本文所述的功能性核苷酸类似物。举例来说,在各个实施方案中,核酸分子中的所有核苷酸中约1%至约20%、约1%至约25%、约1%至约50%、约1%至约60%、约1%至约70%、约1%至约80%、约1%至约90%、约1%至约95%、约10%至约20%、约10%至约25%、约10%至约50%、约10%至约60%、约10%至约70%、约10%至约80%、约10%至约90%、约10%至约95%、约10%至约100%、约20%至约25%、约20%至约50%、约20%至约60%、约20%至约70%、约20%至约80%、约20%至约90%、约20%至约95%、约20%至约100%、约50%至

约60％、约50％至约70％、约50％至约80％、约50％至约90％、约50％至约95％、约50％至约100％、约70％至约80％、约70％至约90％、约70％至约95％、约70％至约100％、约80％至约90％、约80％至约95％、约80％至约100％、约90％至约95％、约90％至约100％、或约95％至约100％的核苷酸是本文所述的功能性核苷酸类似物。在这些实施方案中的任一个中，功能性核苷酸类似物可存在于核酸分子的任何位置处，包括5'-末端、3'-末端和/或一个或多个内部位置。在一个实施方案中，单个核酸分子可含有不同的糖修饰、不同的核碱基修饰和/或不同类型的核苷间键联(例如主链结构)。

[0453] 如本文所述，有效负载核酸分子中一种类型的所有核苷酸(例如作为一种类型的所有含嘌呤核苷酸、或作为一种类型的所有含嘧啶核苷酸、或作为一种类型的所有A、G、C、T或U)中范围自0％至100％的核苷酸可以是本文所述的功能性核苷酸类似物。举例来说，在各个实施方案中，核酸分子中一种类型的核苷酸中约1％至约20％、约1％至约25％、约1％至约50％、约1％至约60％、约1％至约70％、约1％至约80％、约1％至约90％、约1％至约95％、约10％至约20％、约10％至约25％、约10％至约50％、约10％至约60％、约10％至约70％、约10％至约80％、约10％至约90％、约10％至约95％、约10％至约100％、约20％至约25％、约20％至约50％、约20％至约60％、约20％至约70％、约20％至约80％、约20％至约90％、约20％至约95％、约20％至约100％、约50％至约60％、约50％至约70％、约50％至约80％、约50％至约90％、约50％至约95％、约50％至约100％、约70％至约80％、约70％至约90％、约70％至约95％、约70％至约100％、约80％至约90％、约80％至约95％、约80％至约100％、约90％至约95％、约90％至约100％、或约95％至约100％的核苷酸是本文所述的功能性核苷酸类似物。在这些实施方案中的任一个中，功能性核苷酸类似物可存在于核酸分子的任何位置处，包括5'-末端、3'-末端和/或一个或多个内部位置。在一个实施方案中，单个核酸分子可含有不同的糖修饰、不同的核碱基修饰和/或不同类型的核苷间键联(例如主链结构)。

[0454] 核碱基的修饰

[0455] 在一个实施方案中，功能性核苷酸类似物含有非经典核碱基。在一个实施方案中，核苷酸中的经典核碱基(例如，腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶)可经修饰或置换以提供所述核苷酸的一种或多种功能性类似物。核碱基的示例性修饰包括但不限于一个或多个取代或修饰，包括但不限于烷基、芳基、卤基、氧代、羟基、烷氧基和/或硫代取代；一个或多个稠环或开环、氧化和/或还原。

[0456] 在一个实施方案中，非经典核碱基是经修饰的尿嘧啶。具有经修饰的尿嘧啶的示例性核碱基和核苷包括假尿苷(ψ)、吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮杂尿嘧啶、6-氮杂尿嘧啶、2-硫代-5-氮杂尿嘧啶、2-硫代尿嘧啶(s^2U)、4-硫代-尿嘧啶(s^4U)、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羟基-尿嘧啶(ho^5U)、5-氨基烯丙基-尿嘧啶、5-卤代尿嘧啶(例如5-碘尿嘧啶或5-溴尿嘧啶)、3-甲基尿嘧啶(m^3U)、5-甲氧基尿嘧啶(mo^5U)、尿嘧啶5-氧乙酸(cmo^5U)、尿嘧啶5-氧乙酸甲酯($mcmo^5U$)、5-羧甲基-尿嘧啶(cm^5U)、1-羧甲基-假尿苷、5-羧基羟甲基-尿嘧啶(chm^5U)、5-羧基羟甲基-尿嘧啶甲酯($mchm^5U$)、5-甲氧基羰基甲基-尿嘧啶(mcm^5U)、5-甲氧基羰基甲基-2-硫代尿嘧啶(mcm^5s^2U)、5-氨基甲基-2-硫代尿嘧啶(nm^5s^2U)、5-甲基氨基甲基尿嘧啶(mnm^5U)、5-甲基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶(mnm^5s^2U)、5-甲基氨基甲基-2-硒代尿嘧啶(mnm^5se^2U)、5-氨甲酰基甲基尿嘧啶(ncm^5U)、5-羧甲基氨基甲基-尿嘧啶($cmnm^5U$)、5-羧

甲基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶(cmnm^{5}s^{2}U)、5-丙炔基-尿嘧啶、1-丙炔基-假尿嘧啶、5-牛磺酸甲基-尿嘧啶(τm ^{5}U)、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿嘧啶(τm^{5}5s^{2}U)、1-牛磺酸甲基-4-硫代-假尿苷、5-甲基-尿嘧啶(m^{5}U,即,具有核碱基脱氧胸腺嘧啶)、1-甲基-假尿苷(m^{1}ψ)、1-乙基-假尿苷(Et^{1}ψ)、5-甲基-2-硫代-尿嘧啶(m^{5}s^{2}U)、1-甲基-4-硫代-假尿苷(m^{1}s^{4}ψ)、4-硫代-1-甲基-假尿苷、3-甲基-假尿苷(m^{3}ψ)、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、二氢尿嘧啶(D)、二氢假尿苷、5,6-二氢尿嘧啶、5-甲基-二氢尿嘧啶(m^{5}D)、2-硫代-二氢尿嘧啶、2-硫代-二氢假尿苷、2-甲氧基-尿嘧啶、2-甲氧基-4-硫代-尿嘧啶、4-甲氧基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、N1-甲基-假尿苷、3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿嘧啶(acp^{3}U)、1-甲基-3-(3-氨基-3-羧基丙基)假尿苷(acp^{3}ψ)、5-(异戊烯基氨基甲基)尿嘧啶(m^{5}U)、5-(异戊烯基氨基甲基)-2-硫代-尿嘧啶(m^{5}s^{2}U)、5,2'-O-二甲基-尿苷(m^{5}Um)、2-硫代-2'-O-甲基-尿苷(s^{2}Um)、5-甲氧基羰基甲基-2'-O-甲基-尿苷(mcm^{5}Um)、5-氨甲酰基甲基-2'-O-甲基-尿苷(ncm^{5}Um)、5-羧甲基氨基甲基-2'-O-甲基-尿苷(cmnm^{5}Um)、3,2'-O-二甲基-尿苷(m^{3}Um)和5-(异戊烯基氨基甲基)-2'-O-甲基-尿苷(inm^{5}Um)、1-硫代-尿嘧啶、脱氧胸苷、5-(2-甲氧羰基乙烯基)-尿嘧啶、5-(氨甲酰基羟甲基)-尿嘧啶、5-氨甲酰基甲基-2-硫代-尿嘧啶、5-羧甲基-2-硫代-尿嘧啶、5-氰基甲基-尿嘧啶、5-甲氧基-2-硫代-尿嘧啶和5-[3-(1-E-丙烯基氨基)]尿嘧啶。

[0457] 在一个实施方案中,非经典核碱基是经修饰的胞嘧啶。具有经修饰的胞嘧啶的示例性核碱基和核苷包括5-氮杂胞嘧啶、6-氮杂胞嘧啶、假异胞苷、3-甲基胞嘧啶(m3C)、N4-乙酰基胞嘧啶(ac4C)、5-甲酰基胞嘧啶(f5C)、N4-甲基-胞嘧啶(m4C)、5-甲基-胞嘧啶(m5C)、5-卤代-胞嘧啶(例如5-碘-胞嘧啶)、5-羟甲基-胞嘧啶(hm5C)、1-甲基-假异胞苷、吡咯并胞嘧啶、吡咯并假异胞苷、2-硫代胞嘧啶(s2C)、2-硫代-5-甲基胞嘧啶、4-硫代假异胞苷、4-硫代-1-甲基-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、泽布拉林(zebularine)、5-氮杂-泽布拉林、5-甲基-泽布拉林、5-氮杂-2-硫代-泽布拉林、2-硫代-泽布拉林、2-甲氧基-胞嘧啶、2-甲氧基-5-甲基-胞嘧啶、4-甲氧基-假异胞苷、4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷、赖西丁(lysidine)(k2C)、5,2'-O-二甲基-胞苷(m5Cm)、N4-乙酰基-2'-O-甲基-胞苷(ac4Cm)、N4,2'-O-二甲基-胞苷(m4Cm)、5-甲酰基-2'-O-甲基-胞苷(fSCm)、N4,N4,2'-O-三甲基-胞苷(m42Cm)、1-硫代-胞嘧啶、5-羟基-胞嘧啶、5-(3-叠氮基丙基)-胞嘧啶和5-(2-叠氮基乙基)-胞嘧啶。

[0458] 在一个实施方案中,非经典核碱基是经修饰的腺嘌呤。具有替代腺嘌呤的示例性核碱基和核苷包括2-氨基-嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-卤代-嘌呤(例如2-氨基-6-氯-嘌呤)、6-卤代-嘌呤(例如6-氯-嘌呤)、2-氨基-6-甲基-嘌呤、8-叠氮基-腺嘌呤、7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤、7-脱氮-2-氨基-嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2-氨基-嘌呤、7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、1-甲基-腺嘌呤(m1A)、2-甲基-腺嘌呤(m2A)、N6-甲基-腺嘌呤(m6A)、2-甲硫基-N6-甲基-腺嘌呤(ms2m6A)、N6-异戊烯基-腺嘌呤(i6A)、2-甲硫基-N6-异戊烯基-腺嘌呤(ms2i6A)、N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺嘌呤(io6A)、2-甲硫基-N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺嘌呤(ms2io6A)、N6-甘氨酰基氨甲酰基-腺嘌呤(g6A)、N6-苏氨酰基氨甲酰基-腺嘌呤(t6A)、N6-甲基-N6-苏氨酰基氨甲酰基-腺嘌呤(m6t6A)、2-甲硫基-N6-苏氨酰基氨甲酰基-腺嘌呤(ms2g6A)、N6,N6-二甲基-腺嘌呤(m62A)、N6-羟基正缬氨酰基氨甲酰基-腺嘌呤(hn6A)、2-甲硫基-N6-羟基正缬氨酰基氨甲

酰基-腺嘌呤(ms2hn6A)、N6-乙酰基-腺嘌呤(ac6A)、7-甲基-腺嘌呤、2-甲硫基-腺嘌呤、2-甲氧基-腺嘌呤、N6,2'-O-二甲基-腺苷(m6Am)、N6,N6,2'-O-三甲基-腺苷(m62Am)、1,2'-O-二甲基-腺苷(m1Am)、2-氨基-N6-甲基-嘌呤、1-硫代-腺嘌呤、8-叠氮基-腺嘌呤、N6-(19-氨基-五氧杂十九烷基)-腺嘌呤、2,8-二甲基-腺嘌呤、N6-甲酰基-腺嘌呤和N6-羟甲基-腺嘌呤。

[0459] 在一个实施方案中,非经典核碱基是经修饰的鸟嘌呤。具有经修饰的鸟嘌呤的示例性核碱基和核苷包括肌苷(I)、1-甲基-肌苷(m1I)、怀俄苷(wyosine)(imG)、甲基怀俄苷(mimG)、4-脱甲基-怀俄苷(imG-14)、异怀俄苷(imG2)、怀丁苷(wybutosine)(yW)、过氧怀丁苷(o2yW)、羟基怀丁苷(OHyW)、修饰不足(undermodified)的羟基怀丁苷(OHyW*)、7-脱氮-鸟嘌呤、辫苷(queuosine)(Q)、环氧辫苷(oQ)、半乳糖基-辫苷(galQ)、甘露糖基-辫苷(manQ)、7-氰基-7-脱氮-鸟嘌呤(preQ0)、7-氨基甲基-7-脱氮-鸟嘌呤(preQ1)、古嘌苷(archaeosine)(G+)、7-脱氮-8-氮杂-鸟嘌呤、6-硫代-鸟嘌呤、6-硫代-7-脱氮-鸟嘌呤、6-硫代-7-脱氮-8-氮杂-鸟嘌呤、7-甲基-鸟嘌呤(m7G)、6-硫代-7-甲基-鸟嘌呤、7-甲基-肌苷、6-甲氧基-鸟嘌呤、1-甲基-鸟嘌呤(m1G)、N2-甲基-鸟嘌呤(m2G)、N2,N2-二甲基-鸟嘌呤(m22G)、N2,7-二甲基-鸟嘌呤(m2,7G)、N2,N2,7-二甲基-鸟嘌呤(m2,2,7G)、8-氧代-鸟嘌呤、7-甲基-8-氧代-鸟嘌呤、1-甲基-6-硫代-鸟嘌呤、N2-甲基-6-硫代-鸟嘌呤、N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟嘌呤、N2-甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m2Gm)、N2,N2-二甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m22Gm)、1-甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m1Gm)、N2,7-二甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m2,7Gm)、2'-O-甲基-肌苷(Im)、1,2'-O-二甲基-肌苷(m1Im)、1-硫代-鸟嘌呤和O-6-甲基-鸟嘌呤。

[0460] 在一个实施方案中,功能性核苷酸类似物的非经典核碱基可独立地为嘌呤、嘧啶、嘌呤类似物或嘧啶类似物。举例来说,在一个实施方案中,非经典核碱基可以是经修饰的腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶或次黄嘌呤。在其它实施方案中,非经典核碱基还可包括例如碱基的天然存在的和合成的衍生物,包括吡唑并[3,4-d]嘧啶;5-甲基胞嘧啶(5-me-C);5-羟甲基胞嘧啶;黄嘌呤;次黄嘌呤;2-氨基腺嘌呤;腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物;腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物;2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶;5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶;6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶;5-尿嘧啶(假尿嘧啶);4-硫代尿嘧啶;8-卤代(例如8-溴)、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤;5-卤代,尤其为5-溴、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶;7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤;8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤;脱氮鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤;脱氮腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮腺嘌呤;吡唑并[3,4-d]嘧啶;咪唑并[1,5-a]1,3,5-三嗪酮;9-脱氮嘌呤;咪唑并[4,5-d]吡嗪;噻唑并[4,5-d]嘧啶;吡嗪-2-酮;1,2,4-三嗪;哒嗪;或1,3,5-三嗪。

[0461] 糖的修饰

[0462] 在一个实施方案中,功能性核苷酸类似物含有非经典糖基。在各个实施方案中,非经典糖基可以是具有一个或多个取代的5-碳或6-碳糖(诸如戊糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖或其脱氧衍生物),所述一个或多个取代诸如为卤素、羟基、硫醇基、烷基、烷氧基、烯基氧基、炔基氧基、环烷基、氨基烷氧基、烷氧基烷氧基、羟基烷氧基、氨基、叠氮基、芳基、氨基烷基、氨基烯基、氨基炔基等。

[0463] 一般来说,RNA分子含有核糖糖基,所述核糖糖基是含氧5元环。示例性非限制性替

代核苷酸包括核糖中的氧置换(例如用S、Se或亚烷基,如亚甲基或亚乙基置换);双键的添加(例如用环戊烯基或环己烯基置换核糖);核糖的缩环(例如用于形成环丁烷或氧杂环丁烷的4元环);核糖的扩环(例如用于形成具有额外碳或杂原子的6元或7元环,如对于失水己糖醇、阿卓糖醇(altritol)、甘露糖醇、环己烷基、环己烯基和N-吗啉基(其还具有氨基磷酸酯主链));多环形式(例如三环和"未锁定"形式,如二醇核酸(GNA)(例如R-GNA或S-GNA,其中核糖经连接至磷酸二酯键的二醇单元置换)、苏糖核酸(TNA,其中核糖经α-L-呋喃苏糖基-(3'→2')置换)和肽核酸(PNA,其中2-氨基-乙基-甘氨酸键联置换核糖和磷酸二酯主链))。

[0464] 在一个实施方案中,糖基含有一个或多个碳,所述一个或多个碳具有与核糖中相应碳相反的立体化学构型。因此,核酸分子可包括含例如阿拉伯糖或L-核糖作为糖的核苷酸。在一个实施方案中,核酸分子包括至少一个其中糖是L-核糖、2'-O-甲基核糖、2'-氟核糖、阿拉伯糖、己糖醇、LNA或PNA的核苷。

[0465] 核苷间键联的修饰

[0466] 在一个实施方案中,本公开的有效负载核酸分子可含有一个或多个经修饰的核苷间键联(例如磷酸酯主链)。主链磷酸酯基可通过用不同取代基置换一个或多个氧原子来改变。

[0467] 在一个实施方案中,功能性核苷酸类似物可包括用本文所述的另一个核苷间键联置换未改变的磷酸酯部分。替代性磷酸酯基的实例包括但不限于硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、硼烷磷酸盐、硼烷磷酸酯、膦酸氢酯、氨基磷酸酯、二氨基磷酸酯、烷基或芳基膦酸酯和磷酸三酯。二硫代磷酸酯的两个非连接氧均经硫置换。还可通过用氮(桥连的氨基磷酸酯)、硫(桥连的硫代磷酸酯)和碳(桥连的亚甲基膦酸酯)置换连接氧来改变磷酸酯连接子。

[0468] 替代性核苷和核苷酸可包括一个或多个非桥连氧被甲硼烷部分(BH_3)、硫(硫代)、甲基、乙基和/或甲氧基置换。作为非限制性实例,在同一位置(例如alpha(α)、beta(β)或gamma(γ)位置)处的两个非桥连氧可经硫(硫代)和甲氧基置换。置换磷酸酯部分(例如α-硫代磷酸酯)位置处的一个或多个氧原子可经由非天然硫代磷酸酯主链键联赋予RNA和DNA稳定性(诸如针对核酸外切酶和核酸内切酶的稳定性)。硫代磷酸酯DNA和RNA具有增加的核酸酶抗性,并且因此在细胞环境中具有较长的半衰期。

[0469] 本文描述可根据本公开使用的其它核苷间键联,包括不含磷原子的核苷间键联。

[0470] 可与本公开结合使用的核酸分子(例如mRNA)、相关组合物、制剂和/或方法的额外实例还包括WO2002/098443、WO2003/051401、WO2008/052770、WO2009127230、WO2006122828、WO2008/083949、WO2010088927、WO2010/037539、WO2004/004743、WO2005/016376、WO2006/024518、WO2007/095976、WO2008/014979、WO2008/077592、WO2009/030481、WO2009/095226、WO2011069586、WO2011026641、WO2011/144358、WO2012019780、WO2012013326、WO2012089338、WO2012113513、WO2012116811、WO2012116810、WO2013113502、WO2013113501、WO2013113736、WO2013143698、WO2013143699、WO2013143700、WO2013/120626、WO2013120627、WO2013120628、WO2013120629、WO2013174409、WO2014127917、WO2015/024669、WO2015/024668、WO2015/024667、WO2015/024665、WO2015/024666、WO2015/024664、WO2015101415、WO2015101414、WO2015024667、WO2015062738、WO2015101416中所述的那些,其各自的内容以其整体并入本文中。

[0471] 6.3.2制剂

[0472] 本文所述的脂质纳米颗粒组合物可包含至少一种脂质组分和一种或多种额外组分,诸如治疗剂和/或预防剂(例如,本文所述的治疗性核酸)。可针对一种或多种特定应用或靶标来设计纳米颗粒组合物。纳米颗粒组合物的成分可基于特定应用或靶标,和/或基于一种或多种成分的功效、毒性、费用、易用性、可用性或其它特征来选择。类似地,纳米颗粒组合物的特定配方可根据例如每种成分的特定组合的功效和毒性,针对特定应用或靶标来选择。

[0473] 在一个实施方案中,包封在纳米颗粒中的治疗剂和/或预防剂可在体外递送至宿主细胞,例如通过使宿主细胞与纳米颗粒组合物接触,或在体内递送至宿主细胞,例如通过将纳米颗粒组合物施用于含有宿主细胞的受试者。在一个实施方案中,在递送后,包封在纳米颗粒中的治疗性核酸分子可经由宿主细胞内源性转录和翻译机构表达。

[0474] 在一个实施方案中,纳米颗粒组合物包含非脂质组分,所述非脂质组分包含治疗剂。在一个实施方案中,治疗剂是核酸分子。在一个实施方案中,治疗剂是mRNA分子。

[0475] 在一个实施方案中,在将含有纳米颗粒组合物的核酸递送至宿主细胞后,核酸经由宿主细胞内源性转录和/或翻译机构表达以形成RNA和/或蛋白质。在一个实施方案中,与参考LNP组合物中配制的核酸相比,LNP中配制的核酸的表达水平得到增强。

[0476] 因此,本文所述的纳米颗粒组合物可用于在宿主受试者的宿主细胞或组织中表达mRNA的方法中,其中所述方法包括将mRNA配制在纳米颗粒组合物内并将所述纳米颗粒组合物递送至所述宿主细胞或宿主受试者;并且其中所递送的mRNA在所述宿主细胞或所述宿主受试者中表达。在一个实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞(诸如源自人或非人脊椎动物的细胞)。在一个实施方案中,宿主受试者是哺乳动物(诸如人或非人脊椎动物)。在一个实施方案中,可通过使纳米颗粒组合物在体外与宿主细胞接触来递送所述纳米颗粒组合物。在一个实施方案中,可通过将纳米颗粒组合物体内施用于宿主受试者来递送纳米颗粒组合物。

[0477] 在一些实施方案中,纳米颗粒组合物中治疗剂与脂质比率(即,N/P,其中N表示阳离子脂质的摩尔数,并且P表示作为核酸主链的一部分存在的磷酸酯的摩尔数)在9:1至20:1的范围内,例如在10:1至15:1的范围内。示例性N/P范围包括约9:1、约10:1、约11:1、约12:1、约13:1、约14:1、约15:1、约16:1、约17:1、约18:1、约19:1和约20:1。

[0478] 在一个实施方案中,本文提供了用于靶向递送治疗性有效负载的脂质纳米颗粒。纳米颗粒组合物可被设计成用于一种或多种特定应用或靶标。举例来说,纳米颗粒组合物可被设计成用于将治疗剂和/或预防剂,例如RNA递送至哺乳动物体内的特定细胞、组织、器官或系统或其组。纳米颗粒组合物的物理化学特性可经改变以增加对特定身体目标的选择性。举例来说,可基于不同器官的开窗大小来调整粒度。纳米颗粒组合物中所包含的治疗剂和/或预防剂还可基于一个或多个所希望的递送目标进行选择。举例来说,治疗剂和/或预防剂可针对特定适应症、疾患、疾病或病症和/或针对递送至特定细胞、组织、器官或系统或其组(例如局部或特异性递送)进行选择。在某些实施方案中,纳米颗粒组合物可包含编码目标多肽的mRNA,其能够在细胞内翻译以产生目标多肽。此类组合物可被设计成特异性递送至特定器官。在一个实施方案中,组合物可被设计成特异性递送至哺乳动物肝脏。在一个实施方案中,组合物可被设计成特异性递送至哺乳动物肺。在一个实施方案中,组合物可被

设计成特异性递送至目标部位,诸如炎症部位、癌症部位或感染部位。

[0479] 纳米颗粒组合物中治疗剂和/或预防剂的量可取决于纳米颗粒组合物的尺寸、组成、所需靶标和/或应用,或其它特性,以及治疗剂和/或预防剂的特性。举例来说,可用于纳米颗粒组合物中的RNA的量可取决于RNA的大小、序列和其它特征。纳米颗粒组合物中治疗剂和/或预防剂和其它成分(例如脂质)的相对量还可变化。在一个实施方案中,纳米颗粒组合物中脂质组分与治疗剂和/或预防剂的wt/wt比率可以是约5:1至约60:1,诸如约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、22:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1和60:1。举例来说,脂质组分与治疗剂和/或预防剂的wt/wt比率可以是约10:1至约40:1。在某些实施方案中,wt/wt比率是约20:1。纳米颗粒组合物中治疗剂和/或预防剂的量可例如使用吸收光谱法(例如紫外-可见光谱法)测量。

[0480] 在一个实施方案中,纳米颗粒组合物包含一种或多种RNA,并且可选择一种或多种RNA、脂质及其量来提供特定N:P比率。

[0481] 纳米颗粒组合物可通过多种方法表征。举例来说,可使用显微镜检查(例如透射电子显微镜检查或扫描电子显微镜检查)来检查纳米颗粒组合物的形态和尺寸分布。可使用动态光散射或电位测定法(例如电位滴定法)来测量ζ电位。动态光散射还可用于确定粒度。还可使用仪器,例如Zetasizer Nano ZS(Malvem Instruments Ltd,Malvem,Worcestershire,UK)来测量纳米颗粒组合物的多个特征,例如粒度、多分散指数和ζ电位。

[0482] 在各个实施方案中,纳米颗粒组合物的平均尺寸可在数十纳米至数百纳米之间。例如,平均尺寸可以是约40nm至约150nm,如约40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm。在一个实施方案中,脂质纳米颗粒组合物包含多个纳米颗粒,并且多个纳米颗粒的平均尺寸是约40nm至约150nm。在一个实施方案中,多个颗粒的平均尺寸是约50nm至约100nm。在一个实施方案中,多个颗粒的平均尺寸是约95nm。

[0483] 在一个实施方案中,与常规四脂质组分脂质纳米颗粒组合物(诸如其中阳离子脂质:类固醇:磷脂:聚合物结合的脂质的摩尔比为约50:38.5:10:1.5的四脂质组分脂质纳米颗粒)的平均尺寸相比,本文提供的三脂质组分脂质纳米颗粒组合物(不含磷脂组分,或具有减少/不显著量的磷脂组分)的平均尺寸具有增加的尺寸。在一个实施方案中,本文提供的三脂质组分纳米颗粒组合物的平均尺寸具有至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%或至少约80%的尺寸增加。在一个实施方案中,本文提供的三脂质组分纳米颗粒组合物的平均尺寸具有不超过约90%、不超过约100%或不超过约110%的尺寸增加。在一个实施方案中,本文提供的三脂质组分纳米颗粒组合物的平均尺寸是约90nm至约150nm。在一个实施方案中,(本文提供的三脂质组分纳米颗粒组合物)的平均尺寸是约100nm至约140nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约110nm至约130nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约100nm至约110nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约110nm至约120nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约120nm至约130nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约90nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约95nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约100nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约105nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约110nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约115nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约120nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约125nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约130nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约

135nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约140nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约145nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约150nm。在一个实施方案中,平均尺寸是约155nm。

[0484] 纳米颗粒组合物可以是相对均质的。多分散性指数可用于指示纳米颗粒组合物的均匀性,例如纳米颗粒组合物的粒度分布。小(例如小于0.3)的多分散性指数通常表示窄的粒度分布。纳米颗粒组合物可具有约0至约0.25,如0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24或0.25的多分散性指数。在一个实施方案中,纳米颗粒组合物的多分散指数可以是约0.10至约0.20。在一个实施方案中,脂质纳米颗粒组合物包含多个纳米颗粒,并且纳米颗粒组合物的多分散指数(PDI)是约0至约0.25。在一个实施方案中,纳米颗粒组合物的PDI小于0.1。

[0485] 纳米颗粒组合物的ζ电位可用于指示组合物的动电位。举例来说,ζ电位可描述纳米颗粒组合物的表面电荷。具有相对较低正或负电荷的纳米颗粒组合物一般是合意的,因为带较高电荷的物质可与体内的细胞、组织和其它成分发生不合意的相互作用。在一个实施方案中,纳米颗粒组合物的ζ电位可以是约-10mV至约+20mV、约-10mV至约+15mV、约-10mV至约+10mV、约-10mV至约+5mV、约-10mV至约0mV、约-10mV至约-5mV、约-5mV至约+20mV、约-5mV至约+15mV、约-5mV至约+10mV、约-5mV至约+5mV、约-5mV至约0mV、约0mV至约+20mV、约0mV至约+15mV、约0mV至约+10mV、约0mV至约+5mV、约+5mV至约+20mV、约+5mV至约+15mV或约+5mV至约+10mV。

[0486] 治疗剂和/或预防剂的包封效率描述相对于所提供的初始量,在制备后经纳米颗粒组合物包封或以其它方式与纳米颗粒组合物缔合的治疗剂和/或预防剂的量。包封效率合意地较高(例如接近100%)。包封效率可例如通过比较在用一种或多种有机溶剂或清洁剂破坏纳米颗粒组合物之前与之后含有纳米颗粒组合物的溶液中治疗剂和/或预防剂的量来测量。荧光可用于测量溶液中游离治疗剂和/或预防剂(例如RNA)的量。对于本文所述的纳米颗粒组合物,治疗剂和/或预防剂的包封效率可以是至少50%,例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0487] 纳米颗粒组合物可任选地包含一种或多种包衣。举例来说,可将纳米颗粒组合物配制成具有包衣的胶囊、膜片或片剂。包含本文所述组合物的胶囊、膜片或片剂可具有任何有用的大小、抗拉强度、硬度或密度。

[0488] 6.3.3药物组合物

[0489] 根据本公开,纳米颗粒组合物可整体或部分地配制成药物组合物。药物组合物可包含一种或多种纳米颗粒组合物。举例来说,药物组合物可包含一种或多种纳米颗粒组合物,所述一种或多种纳米颗粒组合物包含一种或多种不同的治疗剂和/或预防剂。药物组合物还可包含一种或多种药学上可接受的赋形剂或辅助成分,如本文所述的那些。关于药物组合物和剂的配制和制造的一般准则可见于例如Remington's The Science and Practice of Pharmacy,第21版,A.R.Gennaro;Lippincott,Williams&Wilkins,Baltimore,Md.,2006。常规赋形剂和辅助成分可用于任何药物组合物中,除非任何常规赋形剂或辅助成分与纳米颗粒组合物的一种或多种组分不相容。如果赋形剂或辅助成分与纳米颗粒组合物的组分的组合会导致任何不希望的生物作用或其它有害作用,则赋形剂或辅

助成分与纳米颗粒组合物的组分不相容。

[0490] 在一个实施方案中,一种或多种赋形剂或辅助成分可构成包含纳米颗粒组合物的药物组合物的总质量或体积的大于50%。举例来说,一种或多种赋形剂或辅助成分可构成药物组合物的50%、60%、70%、80%、90%或更高百分比。在一个实施方案中,药学上可接受的赋形剂是至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%纯。在一个实施方案中,赋形剂被批准用于人类和用于兽医使用。在一个实施方案中,赋形剂得到美国食品与药品管理局批准。在一个实施方案中,赋形剂是医药级的。在一个实施方案中,赋形剂符合美国药典(USP)、欧洲药典(EP)、英国药典和/或国际药典的标准。

[0491] 根据本公开的药物组合物中的一种或多种纳米颗粒组合物、一种或多种药学上可接受的赋形剂和/或任何额外成分的相对量将取决于所治疗受试者的身分、体格和/或状况且进一步取决于组合物的施用途径而变化。举例来说,药物组合物可包含介于0.1%与100%(wt/wt)之间的一种或多种纳米颗粒组合物。

[0492] 在某些实施方案中,将本公开的纳米颗粒组合物和/或药物组合物冷藏或冷冻以用于储存和运输(例如,在4℃或更低的温度下,如介于约-150℃与约0℃之间或介于约-80℃与约-20℃之间(例如约-5℃、-10℃、-15℃、-20℃、-25℃、-30℃、-40℃、-50℃、-60℃、-70℃、-80℃、-90℃、-130℃或-150℃)的温度下储存)。在某些实施方案中,本公开还涉及通过将纳米颗粒组合物和/或药物组合物储存在4℃或更低的温度,如介于约-150℃与约0℃之间或在约-80℃与约-20℃之间(例如约-5℃、-10℃、-15℃、-20℃、-25℃、-30℃、-40℃、-50℃、-60℃、-70℃、-80℃、-90℃、-130℃或-150℃)的温度下来维持或增加脂质纳米颗粒组合物和/或药物组合物的稳定性的方法。举例来说,本文所公开的纳米颗粒组合物和/或药物组合物在例如4℃或更低(例如约4℃与-20℃之间)的温度下稳定保持约至少1周、至少2周、至少3周、至少4周、至少5周、至少6周、至少1个月、至少2个月、至少4个月、至少6个月、至少8个月、至少10个月、至少12个月、至少14个月、至少16个月、至少18个月、至少20个月、至少22个月或至少24个月。在一个实施方案中,制剂在约4℃下稳定保持至少4周。在某些实施方案中,本公开的药物组合物包含本文所公开的纳米颗粒组合物和药学上可接受的载体,所述载体选自以下中的一种或多种:Tris、乙酸盐(例如乙酸钠)、柠檬酸盐(例如柠檬酸钠)、盐水、PBS和蔗糖。在某些实施方案中,本公开的药物组合物的pH值在约7与8之间(例如6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8.0,或在7.5与8之间或在7与7.8之间)。举例来说,本公开的药物组合物包含本文所公开的纳米颗粒组合物、Tris、盐水和蔗糖,并且具有约7.5-8的pH值,其适于在例如约-20℃下储存和/或运输。举例来说,本公开的药物组合物包含本文所公开的纳米颗粒组合物和PBS,并且具有约7-7.8的pH值,其适于在例如约4℃或更低温度下储存和/或运输。在本公开的上下文中,“稳定性”、“稳定化”和“稳定的”是指本文所公开的纳米颗粒组合物和/或药物组合物在给定制造、制备、转运、储存和/或使用条件下,例如当施加压力,如剪切力、冷冻/解冻压力等时,对化学或物理变化(例如降解、粒度变化、聚集、包封的变化等)具有抗性。

[0493] 可将纳米颗粒组合物和/或包含一种或多种纳米颗粒组合物的药物组合物施用于任何患者或受试者,包括可受益于通过将治疗剂和/或预防剂递送至一种或多种特定细胞、组织、器官或系统或其组,如肾脏系统所提供的治疗作用的患者或受试者。尽管本文所提供的关于纳米颗粒组合物和包含纳米颗粒组合物的药物组合物的描述主要针对适于施用于

人类的组合物,但本领域技术人员应理解,此类组合物一般适于施用于任何其它哺乳动物。为了使组合物适于施用于各种动物而对适于施用于人类的组合物的改进是众所周知的,并且有普通技术的兽医药理学家仅通过普通实验(如果有的话)即可设计和/或进行此类改进。经考虑,施用组合物的受试者包括但不限于人类、其它灵长类动物和其它哺乳动物,包括商业上相关的哺乳动物,诸如牛、猪、马、绵羊、猫、狗、小鼠和/或大鼠。

[0494] 包含一种或多种纳米颗粒组合物的药物组合物可通过药理学领域中已知或以后将开发的任何方法制备。一般来说,此类制备方法包括使活性成分与赋形剂和/或一种或多种其它辅助成分结合,并且接着,如果需要或必要,则将产物分成、成型成和/或包装成所希望的单剂量或多剂量单元。

[0495] 根据本公开的药物组合物可以散装、作为单次单位剂量和/或作为多个单次单位剂量制备、包装和/或出售。如本文所用,“单位剂量”是包含预定量的活性成分(例如纳米颗粒组合物)的药物组合物的离散量。活性成分的量一般等于将被施用于受试者的活性成分的剂量和/或此类剂量的便利部分,例如此类剂量的一半或三分之一。

[0496] 药物组合物可制备成适合多种施用途径和方法的多种形式。举例来说,药物组合物可制备成液体剂型(例如,乳液、微乳液、纳米乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂)、可注射形式、固体剂型(例如胶囊、片剂、丸剂、粉剂和颗粒剂)、用于局部和/或经皮施用的剂型(例如软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶剂、粉剂、溶液、喷雾剂、吸入剂和贴片)、悬浮液、粉剂和其它形式。

[0497] 经口和肠胃外施用的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳液、微乳液、纳米乳液、溶液、悬浮液、糖浆和/或酏剂。除活性成分外,液体剂型还可包含本领域中常用的惰性稀释剂,例如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油类(尤其为棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨醇脂肪酸酯,以及其混合物。除惰性稀释剂外,口服组合物还可包含额外治疗剂和/或预防剂、额外剂,例如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂和/或加香剂。在供肠胃外施用的某些实施方案中,将组合物与增溶剂混合,所述增溶剂诸如为Cremophor™、醇、油、改性油、二醇、聚山梨醇酯、环糊精、聚合物和/或其组合。

[0498] 可注射制剂,例如无菌可注射水性或油性悬浮液,可根据已知技术,使用适合分散剂、润湿剂和/或助悬剂来配制。无菌可注射制剂可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂和/或溶剂中的无菌可注射溶液、悬浮液和/或乳液,例如在1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的媒介物和溶剂包括水、林格氏溶液(Ringer's solution)、USP和等张氯化钠溶液。无菌不挥发性油通常用作溶剂或悬浮介质。为了这个目的,可采用任何温和不挥发性油,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。脂肪酸如油酸可用于制备注射剂。

[0499] 可注射制剂可例如通过经由细菌截留过滤器过滤和/或通过并入灭菌剂来灭菌,所述灭菌剂呈无菌固体组合物形式,可在使用前溶解或分散于无菌水或其它无菌可注射介质中。

[0500] 本公开提供向哺乳动物细胞或器官递送治疗剂和/或预防剂,在哺乳动物细胞中产生目标多肽,以及治疗有需要的哺乳动物的疾病或病症的方法,所述方法包括向哺乳动物施用包含治疗剂和/或预防剂的纳米颗粒组合物和/或使哺乳动物细胞与所述纳米颗粒

组合物接触。

[0501] 7.实施例

[0502] 本章节中的实施例以举例说明而不是限制的方式提供。

[0503] 实施例1:脂质纳米颗粒制剂的制备

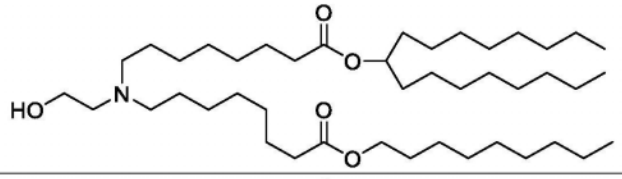
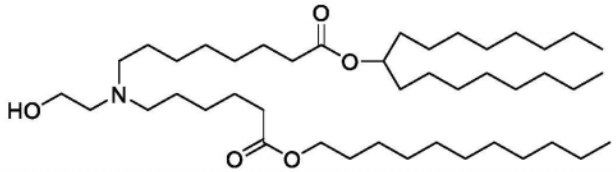
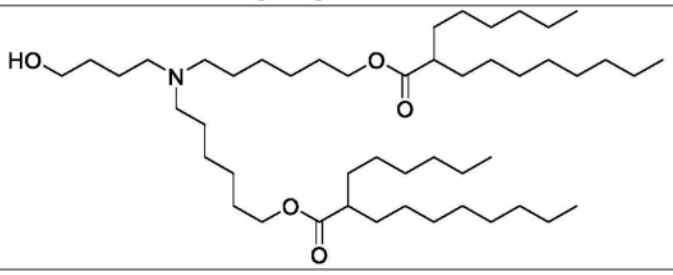
[0504] 通过将脂质和mRNA储备溶液以1:3的流量通过T型连接器混合来制备LNP制剂,总流量为12mL/min。在乙醇中制备脂质储备溶液,总脂质浓度为12.5mM。在20mM pH 4.0柠檬酸盐缓冲液中制备mRNA储备溶液,最终浓度为0.125mg/mL。所有制剂的尺寸和分布均通过动态光散射(DLS)测量来确定。根据试剂盒的供应商说明书,通过Ribogreen测定来测定每种制剂的包封效率(EE%)。使用HPLC通过测量260nm处的UV吸收并比较标准浓度线性曲线来确定制剂的浓度。

[0505] 实施例2:脂质纳米颗粒制剂的物理性质

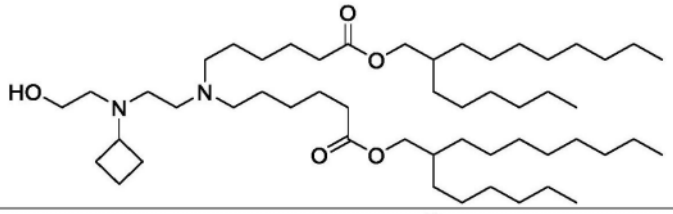
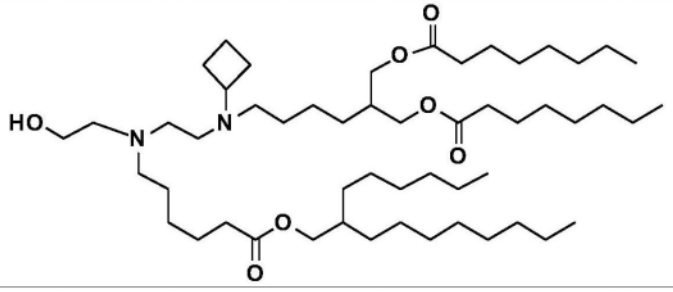
[0506] 包含mRNA和可变脂质组成的脂质纳米颗粒组合物列于下表1至4和9中。LNP组合物的物理表征列于下表5至8和10中。

[0507] 所测试的阳离子脂质的结构和名称在以下列出:

[0508]

脂质-5	
SM-102	
ALC-0315	

[0509]

C1	
C2	

[0510] 表1.包含脂质-5的LNP

[0511]

制剂 ID	脂质(mol %)			
	脂质-5 / %	胆固醇/ %	DMG-PEG2000 / %	磷脂/ %
L-0	50	38.5	1.5	10
L-40/1.0	40	59.0	1.0	0
L-40/1.5	40	58.5	1.5	0
L-45/1.0	45	54.0	1.0	0
L-45/1.5	45	53.5	1.5	0
L-45/2.0	45	53.0	2.0	0
L-47.5/1.0	47.5	51.5	1.0	0
L-47.5/1.5	47.5	51.0	1.5	0
L-47.5/2.0	47.5	50.5	2.0	0
L-50/0.6	50	49.4	0.6	0
L-50/0.8	50	49.2	0.8	0
L-50/1.0	50	49.0	1.0	0
L-50/1.5	50	48.5	1.5	0
L-50/2.0	50	48.0	2.0	0
L-50/2.5	50	47.5	2.5	0
L-55/0.6	55	44.4	0.6	0
L-55/0.8	55	44.2	0.8	0
L-55/1.0	55	44.0	1.0	0
L-55/1.5	55	43.5	1.5	0
L-55/2.0	55	43.0	2.0	0
L-55/2.5	55	42.5	2.5	0
L-60/0.6	60	39.4	0.6	0
L-60/0.8	60	39.2	0.8	0
L-60/1.0	60	39.0	1.0	0
L-60/1.5	60	38.5	1.5	0
L-60/2.0	60	38.0	2.0	0
L-60/2.5	60	37.5	2.5	0
L-60/2.8	60	37.2	2.8	0

[0512]

L-60/3.0	60	37.0	3.0	0
L-60/3.5	60	36.5	3.5	0
L-65/1.0	65	34.0	1.0	0
L-65/1.5	65	33.5	1.5	0
L-65/2.0	65	33.0	2.0	0
L-65/2.5	65	32.5	2.5	0
L-67.5/1.5	67.5	31	1.5	0
L-67.5/2.0	67.5	30.5	2.0	0
L-70/1.5	70	28.5	1.5	0
L-70/2.5	70	27.5	2.5	0

[0513] 表2.包含SM-102的LNP

[0514]

制剂 ID	脂质(mol %)			
	SM-102 / %	胆固醇/ %	DMG-PEG2000 / %	磷脂/ %
S-0	50	38.5	1.5	10
S-40/1.5	40	58.5	1.5	0
S-42.5/1.5	42.5	56.0	1.5	0
S-45/1.0	45	54.0	1.0	0
S-45/1.5	45	53.5	1.5	0
S-45/2.0	45	53.0	2.0	0
S-47.5/0.6	47.5	51.9	0.6	0
S-47.5/0.8	47.5	51.7	0.8	0
S-47.5/1.0	47.5	51.5	1.0	0
S-47.5/2.0	47.5	50.5	2.0	0
S-50/0.6	50	49.4	0.6	0
S-50/0.8	50	49.2	0.8	0
S-50/1.0	50	49.0	1.0	0
S-50/1.5	50	48.5	1.5	0
S-50/2.0	50	48.0	2.0	0
S-50/2.5	50	47.5	2.5	0
S-55/0.8	55	44.2	0.8	0
S-55/1.0	55	44.0	1.0	0
S-55/1.5	55	43.5	1.5	0
S-55/2.0	55	43.0	2.0	0
S-55/2.5	55	42.5	2.5	0
S-55/2.7	55	42.3	2.7	0
S-60/1.0	60	39.0	1.0	0
S-60/1.5	60	38.5	1.5	0
S-60/2.0	60	38.0	2.0	0
S-60/2.5	60	37.5	2.5	0
S-60/2.7	60	37.3	2.7	0
S-60/3.0	60	37.0	3.0	0
S-65/1.0	65	34.0	1.0	0
S-65/1.5	65	33.5	1.5	0
S-65/2.0	65	33.0	2.0	0

[0515]

S-65/2.5	65	32.5	2.5	0
S-67.5/1.5	67.5	31	1.5	0
S-67.5/2.0	67.5	30.5	2.0	0
S-70/1.5	70	28.5	1.5	0

[0516] 表3.包含ALC-0315的LNP

[0517]

制剂 ID	脂质(mol %)			
	ALC-0315 / %	胆固醇/ %	DMG-PEG2000 / %	磷脂/ %
A-0	50	38.5	1.5	10
A-55/1.5	55	43.5	1.5	0
A-55/2.0	55	43.0	2.0	0
A-55/2.5	55	42.5	2.5	0
A-60/1.0	60	39	1.0	0
A-60/1.5	60	38.5	1.5	0
A-60/2.0	60	38.0	2.0	0
A-60/2.5	60	37.5	2.5	0
A-65/1.0	65	34.0	1.0	0
A-65/1.5	65	33.5	1.5	0
A-65/2.0	65	33.0	2.0	0

[0518] 表4.包含脂质C1的LNP

[0519]

制剂 ID	脂质(mol %)			
	C1 / %	胆固醇/ %	DMG-PEG2000 / %	磷脂/ %
C1-0	50	38.5	1.5	10
C1-60/1.0	60	39.0	1.0	0
C1-60/1.5	60	38.5	1.5	0
C1-65/1.0	65	34.0	1.0	0
C1-65/1.5	65	33.5	1.5	0
C1-65/2.0	65	33.0	2.0	0
C1-65/2.5	65	32.5	2.5	0

[0520] 表5.包含脂质-5的LNP的物理化学表征

[0521]

制剂 ID	尺寸(nm)	PDI	EE%
L-0	69.1	0.040	92.1
L-40/1.0	133.0	0.443	77.8
L-40/1.5	124.2	0.252	79.9
L-45/1.0	139.7	0.281	76.1
L-45/1.5	111.4	0.232	89.9
L-45/2.0	73.3	0.194	91.6
L-47.5/1.0	144.3	0.258	81.2
L-47.5/1.5	105.7	0.190	90.8
L-47.5/2.0	79.6	0.161	92.1
L-50/0.6	155.2	0.185	78.3

[0522]

L-50/0.8	150.2	0.244	76.9
L-50/1.0	114.6	0.087	87.3
L-50/1.5	86.7	0.118	91.6
L-50/2.0	70.5	0.052	89.4
L-50/2.5	58.7	0.051	92.1
L-55/0.6	177.3	0.057	91.0
L-55/0.8	141.2	0.052	90.6
L-55/1.0	119.0	0.073	91.9
L-55/1.5	89.8	0.042	91.6
L-55/2.0	79.2	0.024	89.9
L-55/2.5	64.7	0.042	91.9
L-60/0.6	182.7	0.016	91.6
L-60/0.8	154.3	0.007	91.3
L-60/1.0	131.5	0.045	91.7
L-60/1.5	107.2	0.040	89.1
L-60/2.0	93.5	0.010	89.0
L-60/2.5	86.1	0.050	90.1
L-60/2.8	69.9	0.036	87.5
L-60/3.0	67.5	0.034	91.6
L-60/3.5	62.3	0.053	89.5
L-65/1.0	150.8	0.022	89.6
L-65/1.5	125.7	0.002	85.6
L-65/2.0	102.4	0.015	85.0
L-65/2.5	85.0	0.045	89.2
L-67.5/1.5	122.0	0.002	88.6
L-67.5/2.0	107.6	0.095	90.4
L-70/1.5	132.5	0.017	71.2
L-70/2.5	94.3	0.037	83.4

[0523] 表6.包含SM-102的LNP的物理化学表征

[0524]

制剂 ID	尺寸(nm)	PDI	EE%
S-0	68.8	0.016	92.1
S-42.5/1.5	81.0	0.101	92.0
S-45/1.5	112.9	0.162	90.5
S-45/2.0	72.1	0.054	91.6
S-47.5/0.6	165.8	0.004	93.2
S-47.5/0.8	149.0	0.019	92.5
S-47.5/1.0	108.1	0.049	91.9
S-47.5/2.0	77.4	0.082	91.2
S-50/0.6	181.4	0.032	92.1
S-50/0.8	124.3	0.063	92.8
S-50/1.0	124.4	0.106	90.8
S-50/1.5	93.5	0.035	91.6
S-50/2.0	79.5	0.017	92.5
S-50/2.5	70.9	0.019	89.6
S-55/0.6	201.6	0.031	90.8

[0525]

S-55/0.8	167.6	0.002	91.3
S-55/1.0	134.2	0.021	92.8
S-55/1.5	105.3	0.002	92.1
S-55/2.0	85.5	0.005	90.9
S-55/2.5	68.4	0.032	91.7
S-55/2.7	74.4	0.025	89.1
S-60/1.0	142.8	0.008	90.8
S-60/1.5	112.1	0.003	90.4
S-60/2.0	90.5	0.031	91.7
S-60/2.5	80.0	0.029	91.4
S-60/2.7	83.6	0.033	85.0
S-60/3.0	69.0	0.017	91.1
S-65/1.0	153.8	0.022	89.2
S-65/1.5	121.3	0.014	91.2
S-65/2.0	107.7	0.024	90.3
S-67.5/1.5	145.3	0.051	83.4
S-67.5/2.0	110.4	0.052	77.6
S-70/1.5	133.2	0.019	90.6

[0526] 表7.包含ALC-0315的LNP的物理化学表征

[0527]

制剂ID	尺寸(nm)	PDI	EE%
A-0	65.2	0.061	88.9
A-55/1.5	87.81	0.091	85.90
A-55/2.0	77.36	0.036	86.17
A-55/2.5	75.68	0.006	87.78
A-60/1.0	126.2	0.027	87.82
A-60/1.5	103.7	0.008	86.50
A-60/2.0	93.14	0.014	85.94
A-60/2.5	84.05	0.022	83.99
A-65/1.0	148.9	0.019	86.4
A-65/1.5	129.1	0.019	81.8
A-65/2.0	93.1	0.014	85.9

[0528] 表8.包含C1的LNP的物理化学表征

[0529]

制剂 ID	尺寸(nm)	PDI	EE%
C1-0	68.9	0.041	92.39
C1-60/1.0	131.1	0.02	91.39
C1-60/1.5	101.9	0.05	89.44
C1-65/1.0	149.2	0.026	91.95
C1-65/1.5	135.9	0.021	87.26
C1-65/2.0	115.3	0.034	87.13
C1-65/2.5	98.9	0.003	88.03

[0530] 表9.包含脂质C2的LNP

[0531]

制剂 ID	脂质(mol %)			
	C2 / %	胆固醇/ %	DMG-PEG2000 / %	磷脂/ %
C2-0	50	38.5	1.5	10
C2-35/1.5	35	63.5	1.5	0
C2-37.5/1.5	37.5	61	1.5	0
C2-40/1.0	40	59	1	0
C2-40/1.5	40	58.5	1.5	0
C2-40/2.0	40	58	2	0
C2-40/2.5	40	57.5	2.5	0
C2-40/3.0	40	57	3	0
C2-45/0.75	45	54.25	0.75	0
C2-45/1.0	45	54	1	0
C2-45/1.5	45	53.5	1.5	0
C2-45/2.0	45	53	2	0
C2-45/2.5	45	52.5	2.5	0
C2-45/3.0	45	52	3	0
C2-45/3.5	45	51.5	3.5	0
C2-47.5/0.75	47.5	51.75	0.75	0
C2-47.5/1.0	47.5	51.5	1	0
C2-47.5/1.5	47.5	51	1.5	0
C2-47.5/2.0	47.5	50.5	2	0
C2-47.5/2.5	47.5	50	2.5	0
C2-47.5/3.0	47.5	49.5	3	0
C2-50/0.5	50	49.5	0.5	0
C2-50/0.75	50	49.25	0.75	0
C2-50/1.0	50	49	1	0
C2-50/1.5	50	48.5	1.5	0
C2-50/2.0	50	48	2	0
C2-50/2.5	50	47.5	2.5	0
C2-55/1.0	55	44	1	0
C2-55/1.5	55	43.5	1.5	0
C2-55/2.0	55	43	2	0
C2-55/2.5	55	42.5	2.5	0
C2-60/0.5	60	39.5	0.5	0
C2-60/1.0	60	39	1	0
C2-60/1.5	60	38.5	1.5	0
C2-60/2.0	60	38	2	0
C2-60/2.5	60	37.5	2.5	0
C2-65/0.5	65	34.5	0.5	0
C2-65/1.0	65	34	1	0
C2-65/1.5	65	33.5	1.5	0
C2-65/2.0	65	33	2	0
C2-65/2.5	65	32.5	2.5	0

[0532] 表10.包含C2的LNP的物理化学表征

[0533]

制剂ID	尺寸(nm)	PDI	EE%
C2-0	80.7	0.03	96.4
C2-35/1.5	148.5	0.27	77.9

C2-37.5/1.5	130.2	0.27	85.3
C2-40/1.0	124.2	0.01	91.5
C2-40/1.5	95.0	0.06	91.9
C2-40/2.0	78.2	0.09	94.3
C2-40/2.5	71.6	0.06	92.4
C2-40/3.0	60.6	0.07	92.8
C2-45/0.75	160.2	0.11	77.5
C2-45/1.0	130.4	0.02	93.4
C2-45/1.5	103.5	0.06	92.5
C2-45/2.0	88.8	0.04	91.7
C2-45/2.5	79.6	0.04	91.6
C2-45/3.0	68.1	0.06	92.3
C2-45/3.5	61.2	0.07	89.3
C2-47.5/0.75	164.9	0.09	82.0
C2-47.5/1.0	135.7	0.05	90.5
C2-47.5/1.5	110.9	0.11	93.4
C2-47.5/2.0	95.6	0.06	93.2
C2-47.5/2.5	81.51	0.02	91.5
C2-47.5/3.0	72.5	0.09	90.1
C2-50/0.5	188.7	0.05	77.9
C2-50/0.75	168.8	0.08	85.0
C2-50/1.0	142.1	0.02	94.6
C2-50/1.5	124.3	0.01	93.0
C2-50/2.0	104.5	0.02	92.0
C2-50/2.5	81.1	0.02	94.7
C2-55/1.0	156.1	0.00	94.4
C2-55/1.5	129.1	0.11	92.4
C2-55/2.0	114.2	0.01	91.6
C2-55/2.5	91.4	0.03	93.0
C2-60/0.5	235.8	0.02	82.1
C2-60/1.0	173.6	0.00	91.8
C2-60/1.5	140.1	0.01	90.8
C2-60/2.0	118.9	0.03	76.3
C2-60/2.5	99.7	0.04	84.0
C2-65/0.5	286.3	0.03	75.0
C2-65/1.0	211.6	0.03	82.7
C2-65/1.5	160.0	0.01	82.1
C2-65/2.0	133.0	0.07	69.0
C2-65/2.5	111.6	0.01	53.6

[0534] 由C1/胆固醇/DMG-PEG(60%/38.5%/1.5%)组成的LNP和由C1/胆固醇/DMG-PEG(65%/33%/2.0%)组成的LNP的Cyro-TEM图像分别提供于图9A和图9B中。使用Amicon® Ultra-4通过离心将3组分LNP样品浓缩20倍(体积变化)。将样品(3μl)沉积在辉光放电的多孔碳网格(Quantifoil R1.2/1.3)上并且分别使用Vitrobot Mark IV(Thermo Fisher Scientific)仪器进行玻璃化。Cryo-EM成像在200kV加速电压下操作的配备有Ceta 4k x 4k照相机的Talos F200C上进行。结果表明,基于C1的3组分LNP表现出缺乏水性核心的固体球的均匀形态,其不同于多层相固体纳米颗粒或常规脂质体。

[0535] 实施例3:体内蛋白质表达

[0536] 将包封人促红细胞生成素(hEPO)mRNA的具有不同组成(列于表1-4中)的脂质纳米颗粒以0.5mg/kg每周通过尾静脉注射全身施用于6至8周龄的雌性ICR小鼠,并在施用后的特定时间点(例如6小时)对小鼠血液取样。对于同一制剂,包括三至五只小鼠用于施用。在最后一个取样时间点后,通过超剂量CO_2对小鼠实施安乐死。通过在4℃下以5000g离心10分钟,从全血分离出血清,急速冷冻并在-80℃下储存以进行分析。为了评价hEPO表达,使用可商购试剂盒(DEP00,R&D systems;)根据制造商的说明书进行ELISA测定。

[0537] 将GFP编码的mRNA包封在含有具有不同脂质组成的LNP的脂质-5中。将LNP以0.1mg/kg剂量通过肌内注射全身施用于8至10周龄雌性Balb/c小鼠。在肌内施用后6小时收集注射点周围的肌肉,然后用细胞裂解缓冲液进行细胞裂解。使用Pierce BCA蛋白质测定试剂盒检测样品中的总蛋白质。分别采用GFP SimpleStem ELISA试剂盒和小鼠IL-6ELISA试剂盒通过ELISA测定来测定肌肉中的GFP和IL-6。

[0538] 图1显示在体内施用包含脂质-5的三脂质LNP时的归一化hEPO表达水平。脂质-5制剂组也显示出令人印象深刻的体内hEPO表达。使用常规四脂质LNP(L-0)作为参考组以将hEPO表达水平归一化。在脂质-5制剂组中,发现25种不同的LNP制剂具有比常规制剂(L-0)更高的体内hEPO表达水平。在这些制剂中,阳离子脂质(脂质-5)的量在约40mol%至约70mol%的范围内,并且PEG-脂质的量在约0.5mol%至约3.0mol%的范围内。此外,还观察到,与L-0对照相比,这些制剂中的7种使体内基因表达水平提高2倍以上。数据还表明,含有低于40mol%或高于70mol%的量的脂质-5和高于3mol%的PEG-脂质的三脂质LNP制剂具有相对低的体内活性。

[0539] 图2显示在体内施用包含SM-102的三脂质LNP时的归一化hEPO表达水平。当与参考制剂(S-0)相比时,SM-102制剂组在体内hEPO表达方面也显示出明显的益处。在SM-102制剂组中,发现20种测试的LNP制剂具有比常规制剂(S-0)更高的体内hEPO表达水平。在这些制剂中,阳离子脂质(SM-102)的量在约40mol%至约70mol%的范围内,并且PEG-脂质的量在约0.5mol%至约3mol%的范围内。还观察到,与S-0对照相比,这些制剂中的10种使体内基因表达水平提高2倍以上。此外,当与参考制剂(S-0)相比时,所述制剂中的一种显示出超过三倍的体内hEPO表达水平。数据还表明,含有低于40mol%或高于70mol%的量的SM-102和高于3mol%的PEG-脂质的三脂质LNP制剂具有相对低的体内活性。

[0540] 基于结果,包含约40mol%至约70mol%的量的阳离子脂质和低于3mol%的量的PEG-脂质的LNP似乎是三脂质LNP制剂的体内活性优于常规四脂质LNP制剂的一般领域。

[0541] 图3显示在体内施用包含阳离子脂质ALC-0315或C1的三脂质LNP时的归一化hEPO表达水平。在ALC-0315组中,已经制备并表征了十种不同的LNP组合物(表3和表7)。所有10

种含有ALC-0315的LNP制剂均被发现具有比常规制剂(A-0)更高的体内hEPO表达水平。还观察到,与A-0对照相比,这些制剂中的5种使体内基因表达水平提高2倍以上。此外,已经制备并表征了6种包含C1的LNP制剂(表4和表8)。这些LNP制剂显示出比常规制剂(C1-0)更高的体内活性。

[0542] 在美国专利第11,191,849号中,提及在不含PL(不含磷脂)的制剂中将PEG-脂质比率增加至3.3%略微影响了LNP在ApoB沉默活性方面的效率。然而,当使用包含超过3mol%的PEG-脂质的三脂质LNP时,本文所示的数据显示在mRNA递送方面非常不同的情况。图4显示当体内施用包含超过3mol%PEG-脂质的三脂质LNP时的归一化hEPO表达水平。与包含较低水平的PEG-脂质的其它三脂质LNP相比,所有包含超过3mol%的PEG-脂质的制剂均显示出非常低的体内hEPO表达。所有包含超过3mol%PEG-脂质的三脂质LNP的hEPO表达水平均低于常规制剂的hEPO表达水平的50%。

[0543] 表11和图8显示在体内施用包含C2的三脂质LNP时的归一化hEPO表达水平。含有C2的三脂质LNP显示出良好的体内hEPO表达活性。发现十七种测试的LNP制剂具有比常规制剂(C2-0)更高的hEPO表达水平。制剂中的阳离子脂质在约40%至约55%的范围内,而PEG-脂质在约1.0%至约2.5%的范围内。

[0544] 表11.包含C2的LNP的hEPO表达

[0545]

制剂 ID	hEPO (μg/ml)	SEM (μg/ml)	归一化 / %
C2-0	11.4	0.9	100.0
C2-40/1.0	18.4	2.5	160.7
C2-40/1.5	11.7	0.6	102.0
C2-45/1.0	18.0	2.9	157.8
C2-45/1.5	19.5	4.1	170.7
C2-45/2.0	14.2	0.8	123.9
C2-45/2.5	14.4	2.0	126.3
C2-47.5/1.0	16.3	1.0	143.0
C2-47.5/1.5	17.6	1.0	153.6
C2-47.5/2.0	16.7	1.7	146.1
C2-50/1.0	16.3	0.9	142.9
C2-50/1.5	20.1	3.4	176.0
C2-50/2.0	19.1	0.7	167.0
C2-50/2.5	11.6	1.4	101.3
C2-55/1.0	12.2	1.8	107.0
C2-55/1.5	21.5	0.6	188.5
C2-55/2.0	22.9	1.1	200.2
C2-60/1.5	11.5	0.5	100.3
C2-50/0.75	4.3	0.7	37.2
C2-50/3.0	7.0	0.8	61.2
C2-65/1.5	1.9	0.4	16.5

[0546] 实施例4:片段分析

[0547] 如图5A、图5B和图5C所示,进行片段分析(FA)以测试LNP制剂在不同温度下的长期稳定性。使用Rneasy微型试剂盒(50)从LNP中分离mRNA。片段分析在Agilant 5280分析仪上进行。

[0548] LNP可保护RNA免受普遍存在的RNA酶的降解。片段分析中使用了三种包封编码GFP

的mRNA的包含脂质-5的LNP。这些制剂在室温(r.t.)、2℃-8℃或-20℃下储存超过四个月。在室温下,mRNA纯度在所有三种制剂中随时间推移降低。在常规LNP制剂与三脂质LNP制剂之间没有发现明显差异。当这些LNP在2℃-8℃或-20℃下储存时,即使在所有三种测试的制剂中储存四个月后,RNA纯度也未显著降低。这些结果表明,三脂质LNP制剂在保护包封的RNA免于降解方面具有相似或相同的特性。

[0549] 图5D和图5E示出分别在2℃-8℃或-20℃下储存长达400天的含脂质-5的LNP的更新长期稳定性。在两种储存条件下,在一年内均未发现含脂质-5的LNP中mRNA纯度的明显下降。

[0550] 实施例5:肌内施用

[0551] 通过与常规制剂(L-0)比较GFP表达水平,研究了肌内施用包含脂质5的两种LNP(L-50/1.5,L-60/1.5)。如图6A和图6B所示,在肌内施用三脂质LNP(L-50/1.5,L-60/1.5)的组中,GFP表达水平与常规制剂(L-0)相比增加了约2倍。数据表明,三脂质LNP制剂无论是通过肌内注射还是静脉内注射在基因表达方面都具有显著优势。检测细胞因子白细胞介素-6(IL-6)以评价LNP施用对免疫刺激的影响。当将IL-6产生针对GFP表达归一化时,发现在相同的GFP表达水平下,三脂质LNP制剂在体内诱导相对较少的IL-6产生,表明三脂质LNP制剂(L-50/1.5和L-60/1.5)与常规四脂质LNP制剂(L-0)相比具有相对较少的副作用。

[0552] 实施例6:体重变化

[0553] 在施用后,由于LNP的免疫刺激,可在小鼠中诱导一些副作用,如体重变化。含有脂质-5的不同LNP组合物已被用于研究静脉内或肌内施用后的副作用的水平和持续时间。所有LNP制剂均包封编码荧光素酶的mRNA。施用LNP后,在7天的过程中跟踪小鼠体重的变化(图7A和图7B)。对于静脉内施用,三脂质LNP制剂组显示出较低的最大体重减轻和较快的体重恢复。静脉内注射三脂质LNP制剂(L-50/1.5和L-60/1.5)的小鼠组在两天内恢复至100%体重,而静脉内注射常规四脂质LNP制剂(L-0)的小鼠组需要超过四天才能恢复。L-50/1.5组显示出相关更快的体重增加,表明静脉内施用LNP后副作用最小。

[0554] 对于肌内注射,所有三个组在施用一天内迅速失去超过5%的体重,表明在该系统中肌内施用具有比静脉内施用更严重的副作用。类似地,与用常规四脂质LNP制剂(L-0)治疗的组相比,用三脂质LNP制剂(L-50/1.5和L-60/1.5)治疗的小鼠组在肌内施用后恢复其体重所需的时间更少。L-50/1.5和L-60/1.5组需要7天才能完全恢复至其原始体重,而L-0组中的体重仅略有变化。L-50/1.5组中的小鼠体重增加快于其它两个组,表明该制剂引起的副作用相对较少。

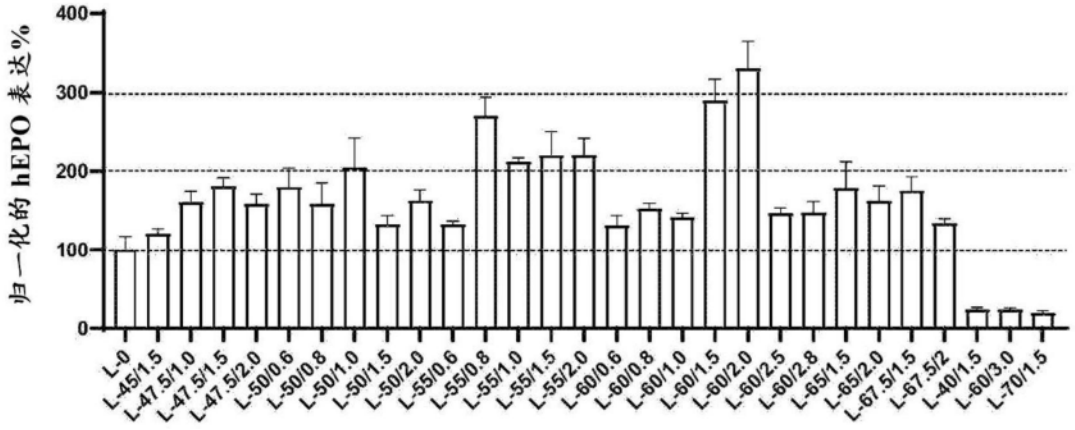

归一化的 hEPO 表达%
400
300
200
100
0
L-0
L-45/1.5
L-47.5/1.0
L-47.5/1.5
L-47.5/2.0
L-50/0.6
L-50/0.8
L-50/1.0
L-50/1.5
L-50/2.0
L-55/0.6
L-55/0.8
L-55/1.0
L-55/1.5
L-55/2.0
L-60/0.6
L-60/0.8
L-60/1.0
L-60/1.5
L-60/2.0
L-60/2.5
L-60/2.8
L-65/1.5
L-65/2.0
L-67.5/1.5
L-67.5/2
L-40/1.5
L-60/3.0
L-70/1.5

图1

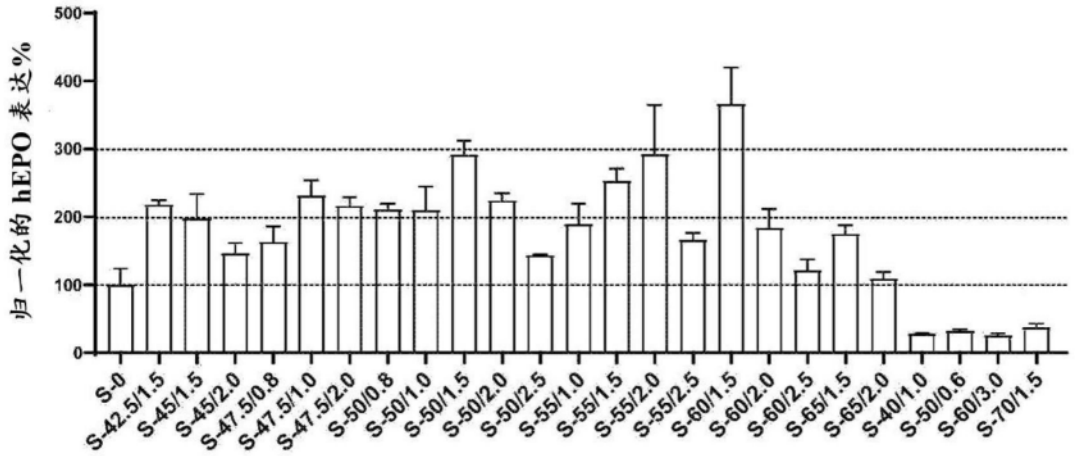

归一化的 hEPO 表达%
500
400
300
200
100
0
S-0
S-42.5/1.5
S-45/1.5
S-45/2.0
S-47.5/0.8
S-47.5/1.0
S-47.5/2.0
S-50/0.8
S-50/1.0
S-50/1.5
S-50/2.0
S-50/2.5
S-55/1.0
S-55/1.5
S-55/2.0
S-55/2.5
S-60/1.5
S-60/2.0
S-60/2.5
S-65/1.5
S-65/2.0
S-40/1.0
S-50/0.6
S-60/3.0
S-70/1.5

图2

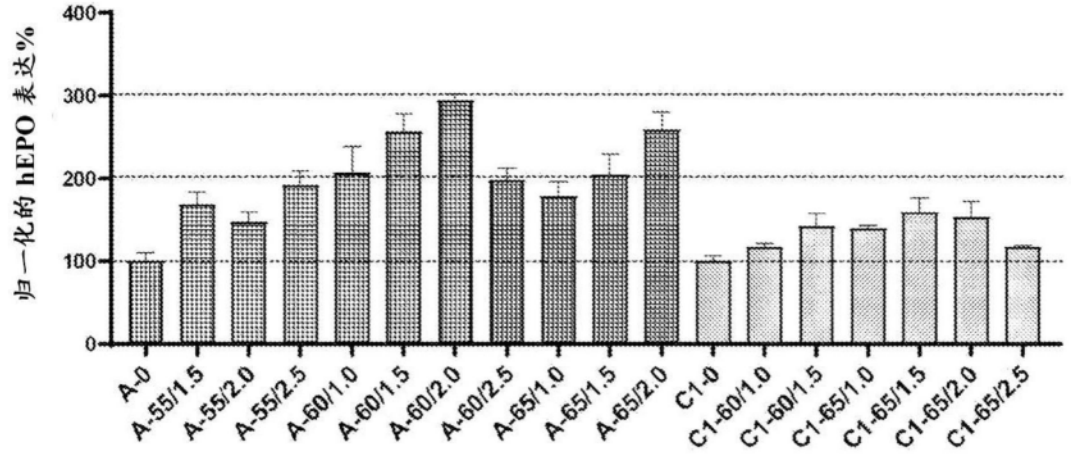

归一化的 hEPO 表达%
400
300
200
100
0
A-0
A-55/1.5
A-55/2.0
A-55/2.5
A-60/1.0
A-60/1.5
A-60/2.0
A-60/2.5
A-65/1.0
A-65/1.5
A-65/2.0
C1-0
C1-60/1.0
C1-60/1.5
C1-65/1.0
C1-65/1.5
C1-65/2.0
C1-65/2.5

图3

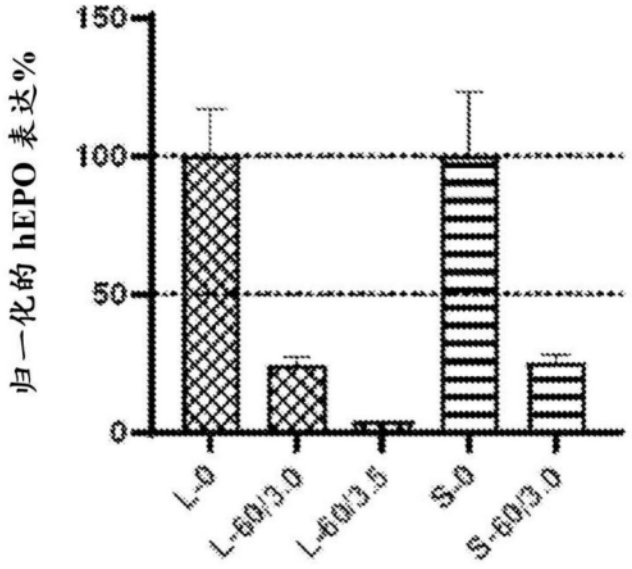

归一化的 hEPO 表达%
150
100
50
0
L-0
L-60/3.0
L-60/3.5
S-0
S-60/3.0

图4

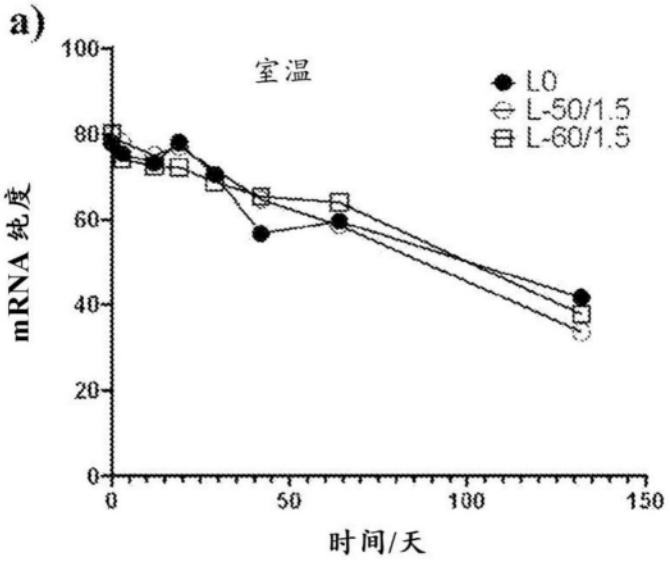

a)
室温
L0
L-50/1.5
L-60/1.5
mRNA 纯度
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
时间/天

图5A

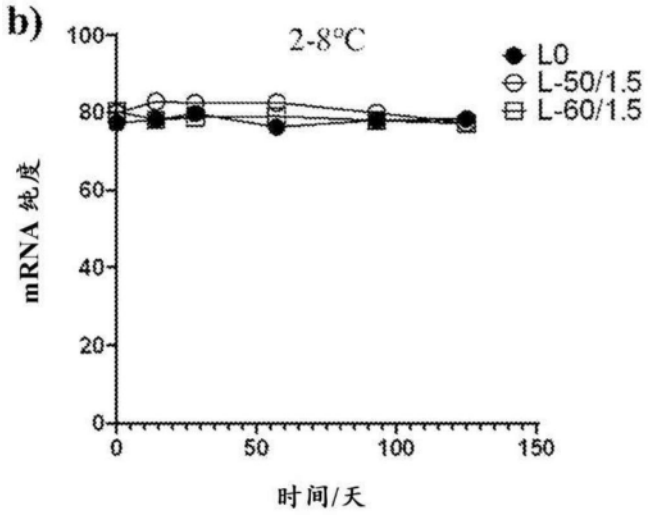

b)
2-8℃
L0
L-50/1.5
L-60/1.5
mRNA 纯度
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
时间/天

图5B

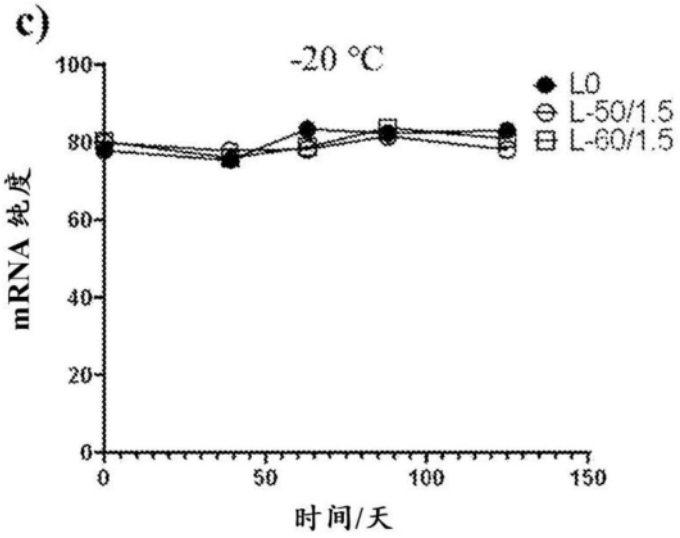

c)
-20 ℃
L0
L-50/1.5
L-60/1.5
mRNA 纯度
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
时间/天

图5C

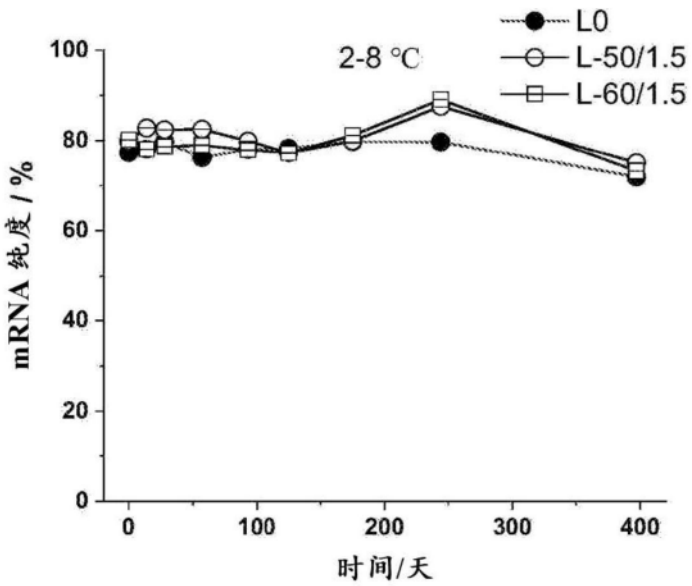

L0
L-50/1.5
L-60/1.5
2-8 ℃
mRNA 纯度 / %
时间/天
0
20
40
60
80
100
0
100
200
300
400

图5D

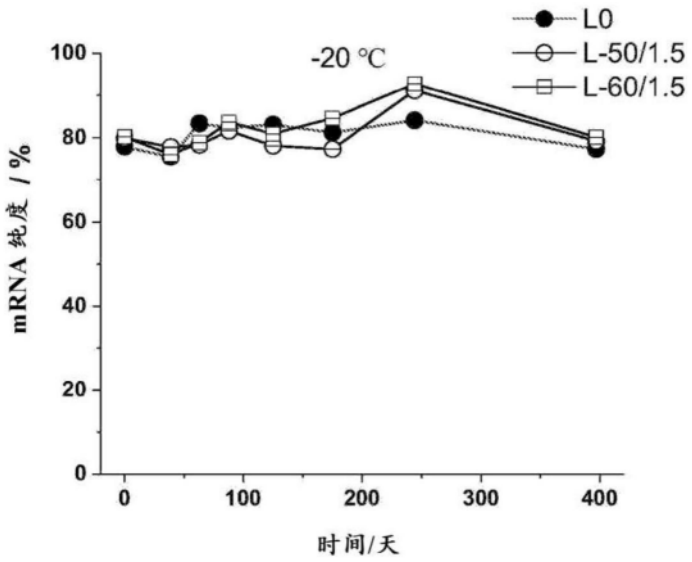

L0
L-50/1.5
L-60/1.5
-20 ℃
mRNA 纯度 / %
时间/天
0
20
40
60
80
100
0
100
200
300
400

图5E

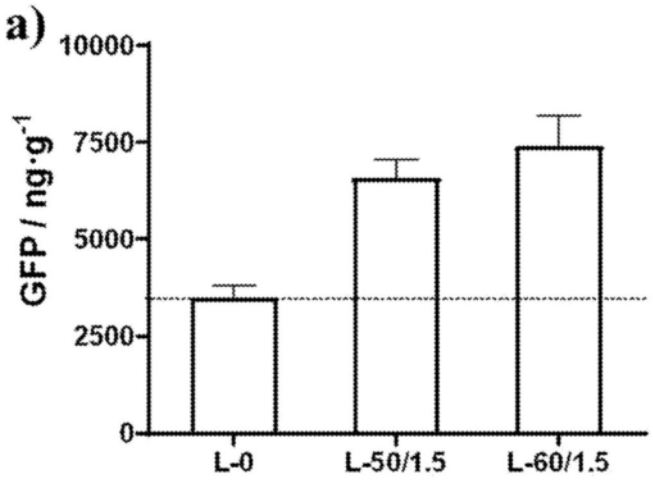

a)
10000
7500
5000
2500
0
GFP / ng·g-1
L-0
L-50/1.5
L-60/1.5

图6A

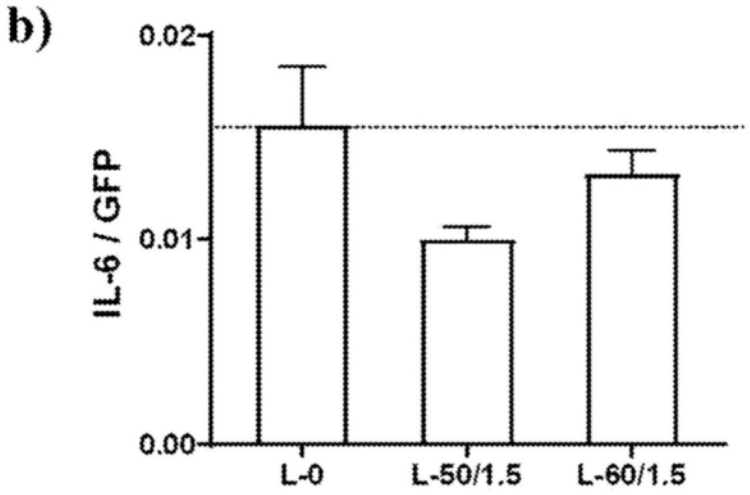

b)
0.02
0.01
0.00
IL-6 / GFP
L-0
L-50/1.5
L-60/1.5

图6B

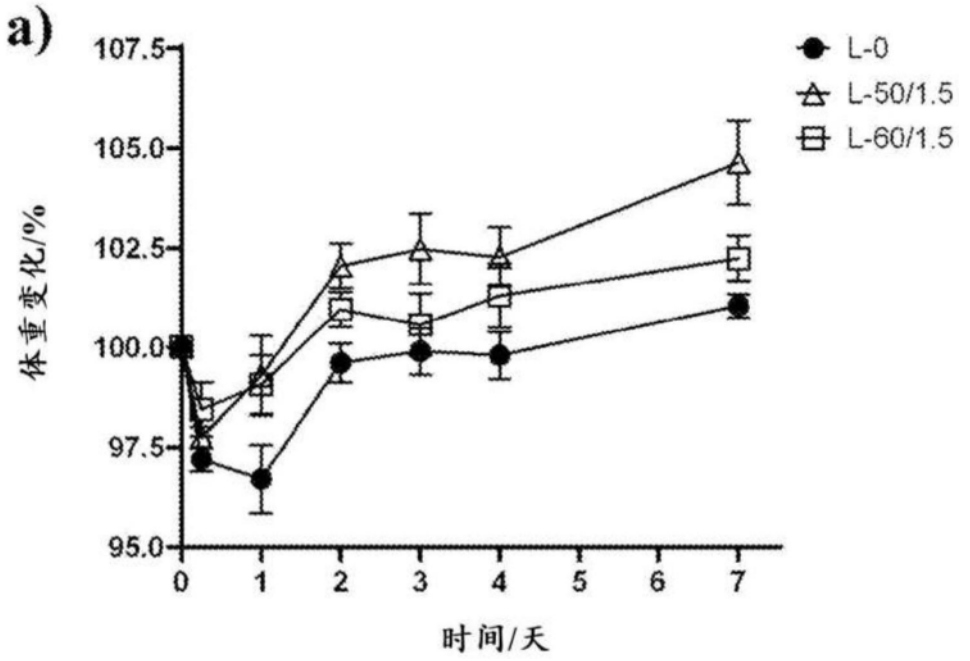

a)
107.5
105.0
102.5
100.0
97.5
95.0
体重变化/%
0
1
2
3
4
5
6
7
时间/天
L-0
L-50/1.5
L-60/1.5

图7A

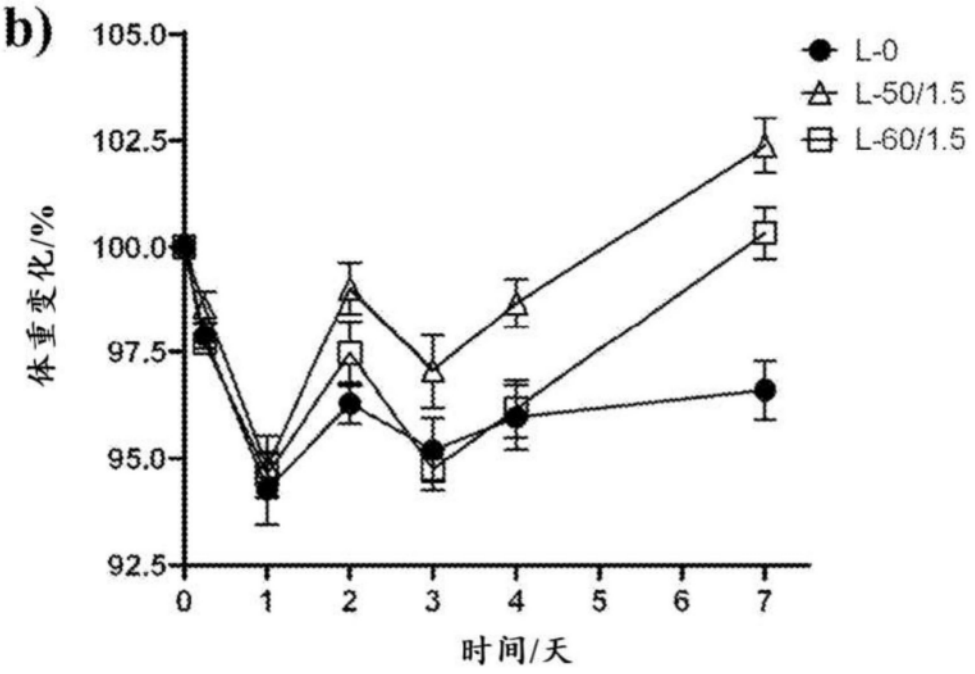

b)
105.0
102.5
100.0
97.5
95.0
92.5
体重变化/%
0
1
2
3
4
5
6
7
时间/天
L-0
L-50/1.5
L-60/1.5

图7B

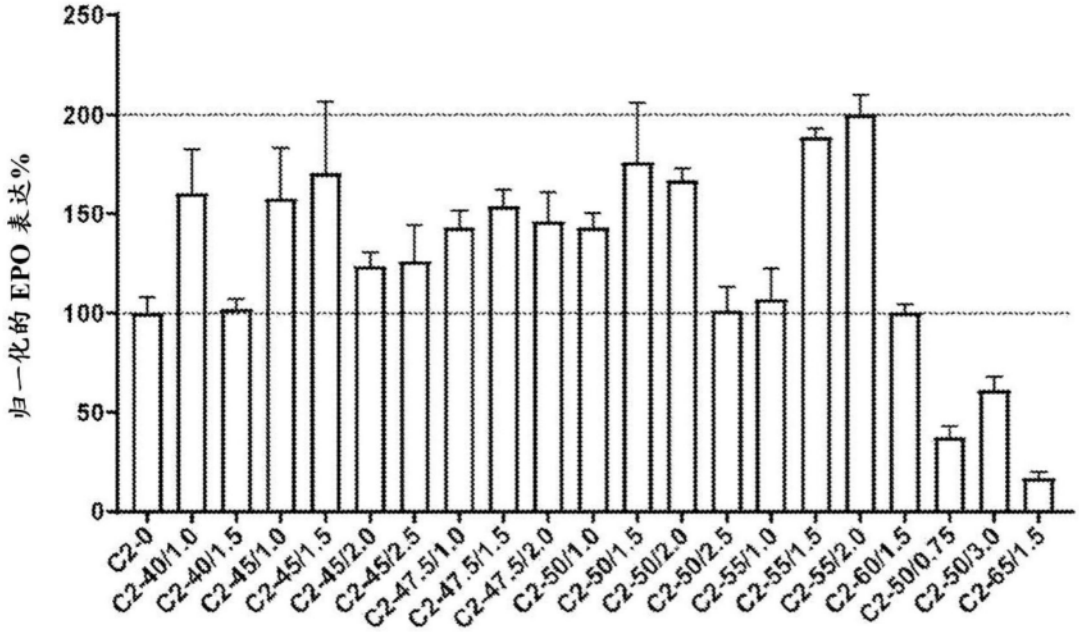


图8

由C1/胆固醇/DMG-PEG (60%/38.5%/1.5%)组成的 LNP的Cyro-TEM 图像

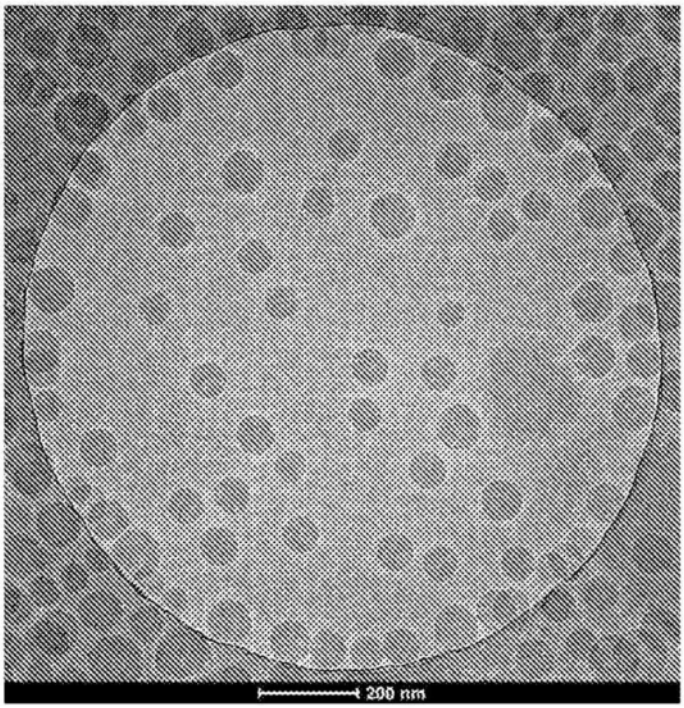


图9A

由 C1/胆固醇/DMG-PEG (65%/33%/2.0% 组成的 LNP 的 Cyro-TEM 图像

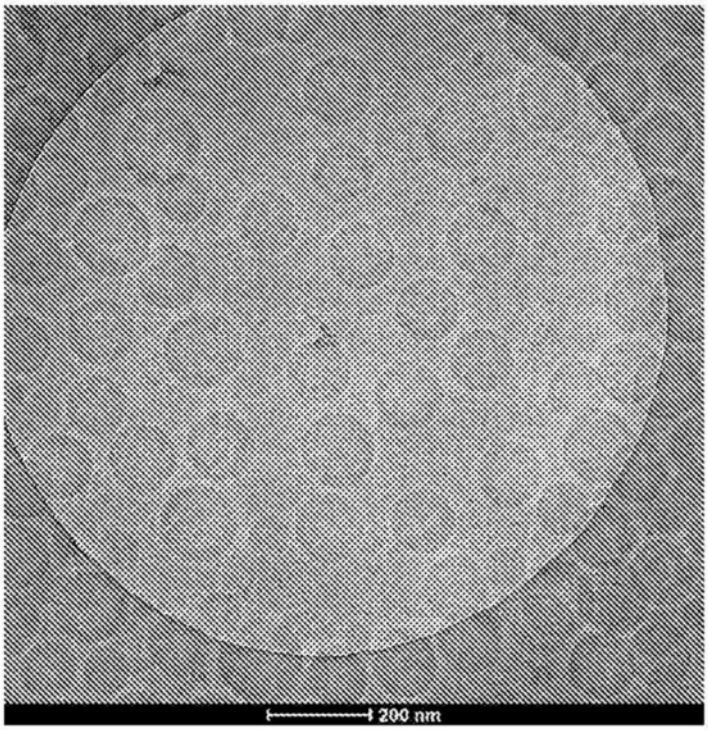


图9B