(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2023 年 12 月 21 日 (21.12.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2023/241577 A1

(51) 国际专利分类号:
C07C 229/16 (2006.01) *A61K 9/127* (2006.01)
C07C 227/06 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/099945

(22) 国际申请日: 2023 年 6 月 13 日 (13.06.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210667897.8 2022年6月14日 (14.06.2022) CN

(71) 申请人: 杭州高田生物医药有限公司 (**HIGHFIELD BIOPHARMACEUTICALS CORPORATION**) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市滨江区滨安路 658 号 2 幢 2 楼 202 室, Zhejiang 310051 (CN)。

(72) 发明人:吴钪锃(**WU, Kangzeng**); 中国浙江省杭州市滨江区滨安路658号2幢2楼202室, Zhejiang 310051 (CN)。 许风伟(**XU, Fengwei**); 中国浙江省杭州市滨江区滨安路658号2幢2楼202室, Zhejiang 310051 (CN)。 戴永超(**DAI, Yongchao**); 中国浙江省杭州市滨江区滨安路658号2幢2楼202室, Zhejiang 310051 (CN)。 刘雨(**LIU, Yu**); 中国浙江省杭州市滨江区滨安路658号2幢2楼202室, Zhejiang 310051 (CN)。 徐宇虹(**XU, Yuhong**); 中国浙江省杭州市滨江区滨安路658号2幢2楼202室, Zhejiang 310051 (CN)。

(74) 代理人:北京维正专利代理有限公司(**BEIJING WEIZHENG PATENT AGENCY CO., LTD.**); 中国北京市西城区莲花池东路天莲大厦 1101 室, Beijing 100000 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

(54) **Title:** CATIONIC LIPID COMPOUND, AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 阳离子脂质化合物及其制备方法和应用

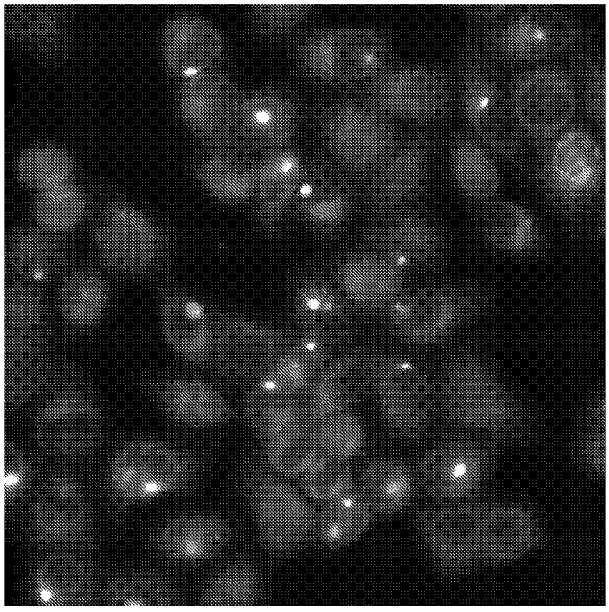


图 12

(57) **Abstract:** The present application relates to the field of drug carriers, and specifically discloses a cationic lipid compound, and a preparation method therefor and a use thereof. The cationic lipid compound comprises a compound represented by formula I; in the formula I, n is equal to 1, 2, 3 or 4; R_1 and R_2 are each independently selected from secondary long-chain alkyl esters represented by formula II; in the formula II, n_1=2, 4 or 6, n_2=5, 7, 9 or 11, and n_3=5, 7, 9 or 11. The cationic lipid compound is combined with phospholipids, cholesterol and polyethylene glycol lipids, such that an LNP carrier may be prepared, and then nucleic acid molecules are

WO 2023/241577 A1

[见续页]

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

wrapped to prepare a corresponding drug. The raw materials for the production of the cationic lipid compound in the present application are easy to obtain, the synthesis steps are simple, the constructed LNP carrier has a good drug delivery effect, the corresponding drug can efficiently enter a target cell or activate an immune response of an organism, and thus the cationic lipid compound has practical application value.

(57) 摘要: 本申请涉及药物载体的领域，具体公开了阳离子脂质化合物及其制备方法和应用，所述阳离子脂质化合物包括式I所示的化合物；式I中，n＝1、2、3或4；R_1和R_2各自独立地选自式II所示的二级长链烷基酯；式II中，n_1＝2、4或6；n_2＝5、7、9或11；n_3＝5、7、9或11。将上述阳离子脂质化合物与磷脂、胆固醇和聚乙二醇脂质组合，可以制成LNP载体，进而包裹核酸分子制成相应的药物。本申请所述的阳离子脂质化合物的生产原料易得，合成步骤简单，构建的LNP载体具有良好的药物递送效果，相应的药物可高效进入靶细胞，或激活机体的免疫应答，具有实际应用的价值。

阳离子脂质化合物及其制备方法和应用

相关申请的交叉引用

本申请要求于2022年6月14日提交的中国专利申请第2022106678978号的优先权。此申请的公开内容在此通过引用整体并入本文。

技术领域

本申请涉及药物载体的技术领域，更具体地说，涉及阳离子脂质化合物及其制备方法和应用。

背景技术

基因治疗（gene therapy）是将目的基因导入患者体内，以纠正或补偿缺陷和异常基因引起的疾病，从而使疾病得到治疗，是现代医学和分子生物学相结合而诞生的新技术。基因治疗作为疾病治疗的新手段，已有一些成功的应用，取得的科学性突破将继续推动基因治疗向主流医疗发展。常见的基因药物有质粒DNA（plasmid DNA，pDNA）、反义寡核苷酸（antisense ODN）、小干扰RNA（siRNA）、小发卡RNA（shRNA）和信使RNA（mRNA）。mRNA是一类包含特定遗传信息的单链核糖核酸，它能够将所携带的遗传信息传递到细胞内的核糖体，并在那里作为模板指导机体合成特定的目标蛋白。相比于难以跨过细胞膜的传统蛋白药物，mRNA 的作用机制使其能够向机体递送跨膜或胞内蛋白，因此使得治疗或预防更多的疾病成为可能。mRNA的上述优势也使其成为未来药物开发的趋势。

基因治疗的关键在于将基因药物在体内输送到靶细胞，使其发挥作用。然而，直接将外源基因引入体内，会被体内的核酸酶降解，在未进入靶细胞之前，便被降解成小分子核苷酸，从而失去治疗作用。因此，实现基因治疗的关键在于构建高效、安全的基因递送系统。

基因载体在运送基因时要经历多个复杂的过程：通过血液循环到达靶细胞、细胞摄取、内涵体逃逸、胞内运动以及载体释放基因物质等，其主要障碍是复杂血液环境的细胞外障碍和溶酶体酶降解的细胞内障碍。因此如何寻找良好的基因载体，使得靶基因到达靶点发挥效用，是基因载体研究者亟待解决的问题。

目前，基因输送载体系统主要分为两大类：一是病毒载体系统，二是非病毒载体系统。病毒载体是一种天然的载体资源，病毒基因组结构简单、转染效率高、靶细胞特异性强，但其导向性差、携带能力低，且具有免疫原性和潜在致瘤性，使其难以达到临床应用的要求。因此，多样性、无免疫原性及易于控制生产的非病毒载体系统近年来备受

关注，并在很多治疗领域有所应用。

常用的非病毒载体系统主要是脂质载体。脂质载体通常含有阳离子脂质的正电荷，通过静电作用与带负电的基因药物结合，从而将基因物质浓缩包装成较小粒径的粒子，形成脂质纳米粒（LNP）。LNP 在基因输送载体的制备和细胞转染方面显示出了其他类型脂质体无法比拟的优势。复合物较小的粒径降低了被体内巨嗜细胞识别、吞噬、清除的机会，提高了药物的体内生物利用度。同时，针对于肿瘤组织，复合物较小的粒径更容易通过渗透和滞留效应从血管内皮细胞间隙透过进入肿瘤实质，增加在肿瘤组织的药物聚集。在转染方面，由于细胞表面略微带有负电，带正电的脂质体更容易吸附到细胞表面，通过内吞等机制进入细胞，大大增加了脂质体的转染能力。

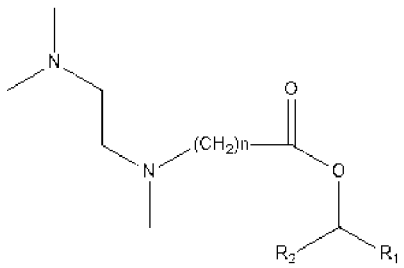
目前，LNP 因其结构简单、操作简便、生物安全性高等特点成为了应用最为广泛的非病毒载体，但大部分 LNP 的制备过程复杂，不易进行放大生产。因此，如何提供一种制备方法简单、治疗效果好的非病毒载体系统，已成为亟待解决的问题。

发明内容

为了提高基因载体的药物递送效果并简化其合成步骤，本申请提供阳离子脂质化合物及其制备方法和应用。此类阳离子脂质化合物带有正电，更易进入细胞内，从而更好地递送药物，产生更好的治疗效果，且合成简单，容易制备，具有实际应用的价值。

第一方面，本申请提供阳离子脂质化合物，采用如下技术方案：

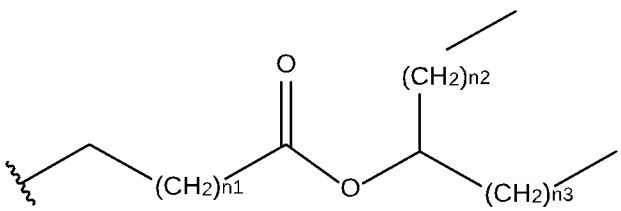
阳离子脂质化合物，所述阳离子脂质化合物包括式 I 所示的化合物；



式 I；

式 I 中，n=1、2、3 或 4；

R_1 和 R_2 各自独立地选自式 II 所示的二级长链烷基酯；



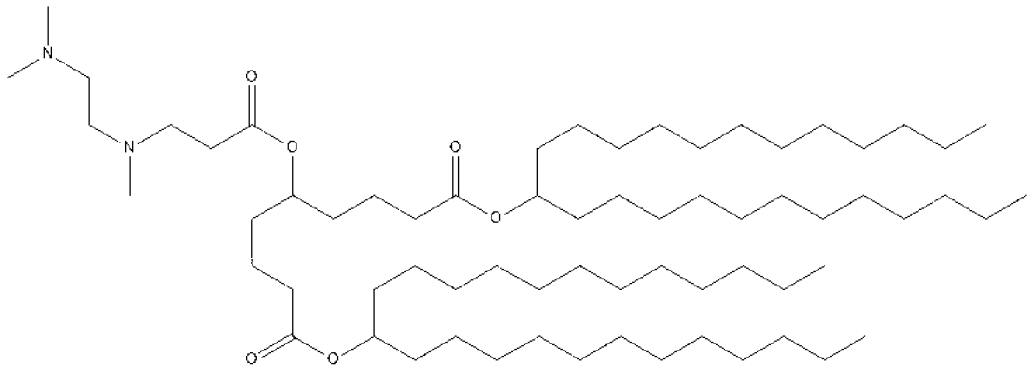
式 II；

式 II 中，n_1=2、4 或 6；n_2=5、7、9 或 11；n_3=5、7、9 或 11；波浪线代表式 II 与式 I 中其他部分的连接点。

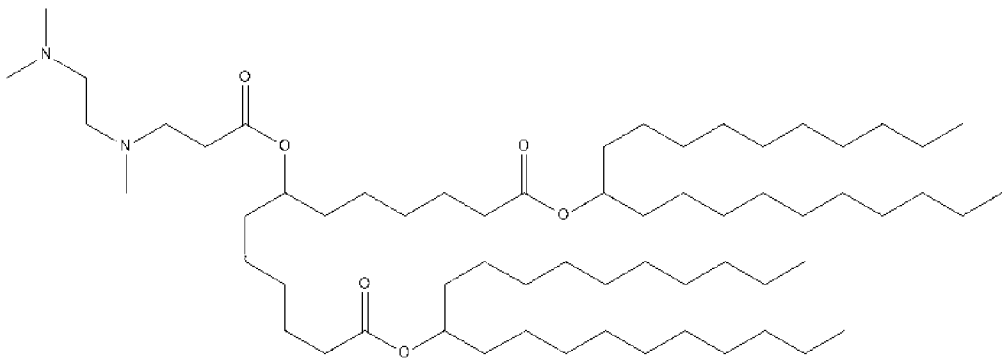
本申请中，将 3-((2-(二甲氨基)乙烷基)(甲基)氨基)丙酸和二级长链烷基酯相结合获得的两亲性衍生物作为基因药物的载体系统中的阳离子脂质组分，其带有正电荷，因此能更好地递送基因药物，达到了更好的基因治疗效果。此类阳离子脂质化合物合成步骤简单，原材料简单易得，可以实现大规模生产。

本申请中，所述阳离子脂质化合物中共含有 3 个酯基，这 3 个酯基的空间位置直接影响阳离子脂质化合物功能的发挥，而烷基链上的碳原子数会影响酯基的空间结构，经试验验证，当 n=1、2、3 或 4，n_1=2、4 或 6，n_2=5、7、9 或 11，n_3=5、7、9 或 11 时，阳离子化合物对基因药物的装载及递送效果最好，从而达到最佳的治疗效果。

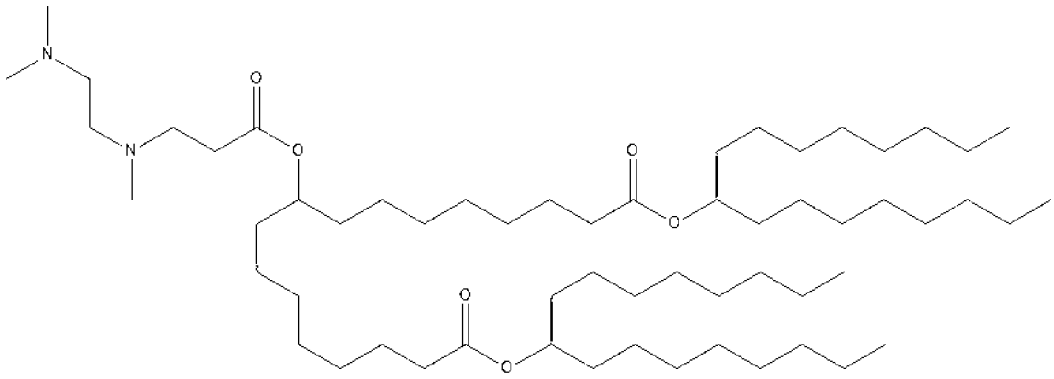
作为优选技术方案，本申请所述阳离子脂质化合物包括式 III、式 IV、式 V、式 VI、式 VII、式 VIII 或式 IX 所示的化合物。



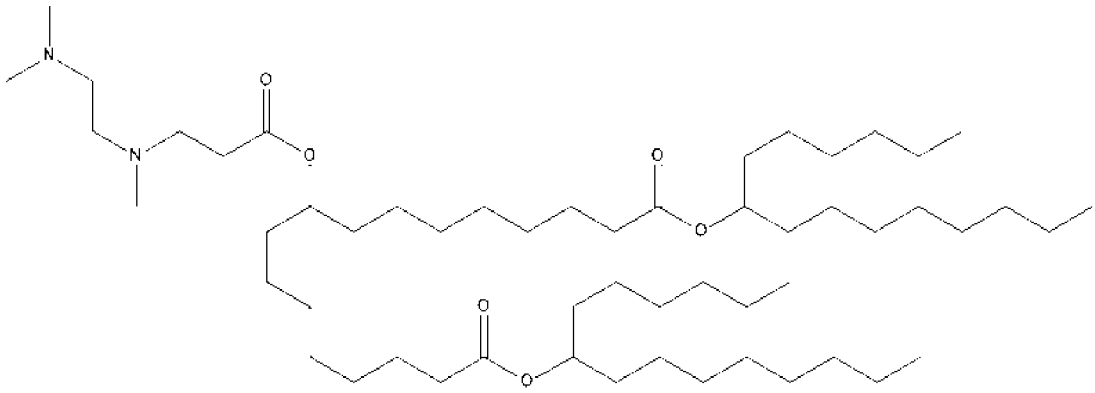
式 III（TM1）。



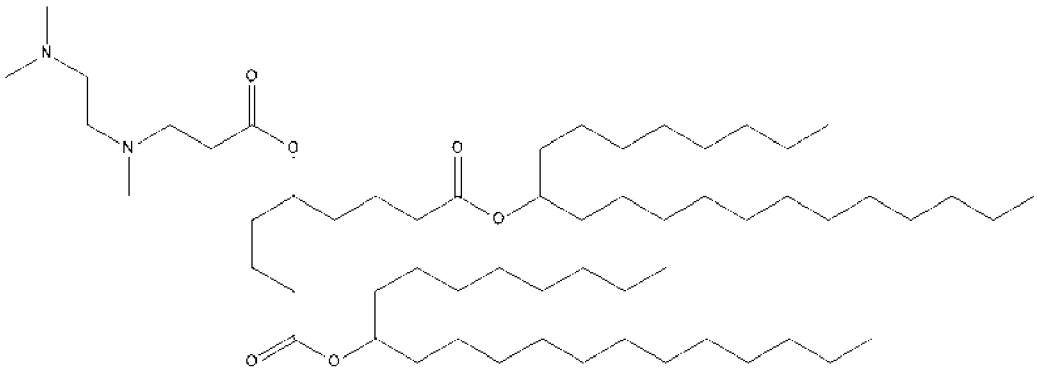
式 IV（TM2）。



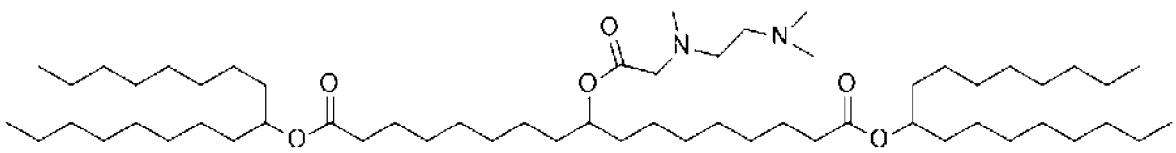
式 V（TM3）。



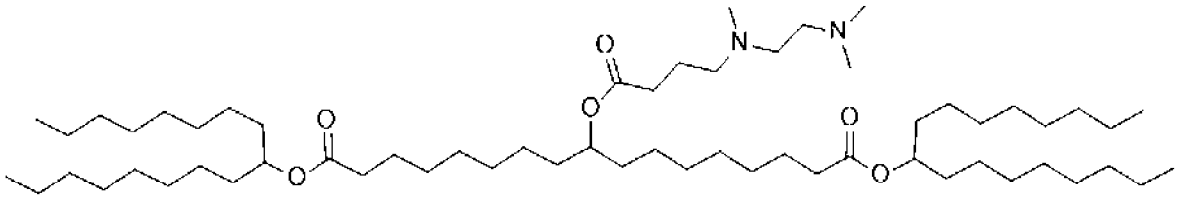
式 VI（TM4）。



式 VII（TM5）



式 VIII （TM6）



式 IX （TM7）。

第二方面，本申请提供一种阳离子脂质化合物的制备方法，采用如下技术方案：

一种阳离子脂质化合物的制备方法，所述阳离子脂质化合物的制备方法包括以下步骤：

以溴代酯类化合物为原料，依次进行烷基化反应、还原反应，

再与酰氯类化合物发生缩合反应，依次进行两步取代反应和一次水解反应，最后与一元仲醇类化合物进行酯化反应，制得所述阳离子脂质化合物。

作为优选技术方案，所述阳离子脂质化合物的制备方法包括以下步骤：

（1）溴代酯类化合物与 TosMIC（对甲苯磺酰基异腈）和 NaH 发生烷基化反应，生成中间产物 2；

（2）中间产物 2 在酸性条件下发生反应，生成中间产物 3；

（3）中间产物 3 与 $NaBH_4$ 发生还原反应，生成中间产物 4；

（4）中间产物 4 与酰氯类化合物发生缩合反应，生成中间产物 5；

（5）中间产物 5 与 NaI 发生取代反应，生成中间产物 6；

（6）中间产物 6 与 N,N,N'-三甲基乙二胺发生取代反应，生成中间产物 7；

（7）中间产物 7 与 LiOH 发生水解反应，生成中间产物 8；

（8）中间产物 8 与一元仲醇类化合物发生酯化反应，得到所述阳离子脂质化合物。

本申请中，步骤（1）中的原材料为溴代酯类化合物，在实际的生产过程中，可根据合成的具体的阳离子脂质化合物的结构进行具体地选择。

优选地，所述溴代酯类化合物包括 8-溴辛酸乙酯、6-溴己酸乙酯或 4-溴丁酸乙酯。

优选地，步骤（1）中，TBAI（四丁基碘化铵）作为反应的催化剂。

优选地，步骤（1）中，反应的溶剂包括 DMSO（二甲基亚砜）溶液。

优选地，步骤（1）中，反应条件为在室温下进行。

优选地，步骤（2）中，反应的溶剂包括 DCM（二氯甲烷）和浓硫酸的混合溶液，二者的体积比为 DCM:浓硫酸=(3.5~8):1。

本申请中，浓硫酸为步骤（2）中反应的进行提供酸性环境。

优选地，步骤（2）中，反应条件为在室温下进行。

在本申请中，中间产物 3 为对称的酮类化合物。

优选地，步骤（3）中，反应的溶剂包括 THF（四氢呋喃）和乙醇的混合溶液，二者的体积比为 THF:乙醇=(2~4):1。

优选地，步骤（3）中，反应条件为在室温下进行。

在本申请中，中间产物 4 为醇类化合物。

在本申请中，步骤（4）中的酰氯类化合物为含有不同碳原子数的、末端未被卤素取代的一类化合物的统称，在实际的生产过程中，可根据合成的具体的阳离子脂质化合物的结构进行具体地选择。

优选地，所述酰氯类化合物包括 3-氯丙酰氯、2-氯乙酰氯、4-氯丁酰氯或 5-氯戊酰氯。

优选地，步骤（4）中，反应的溶剂包括含有吡啶的 DCM 溶液，其中，吡啶的浓度为 73~134 mM。

优选地，步骤（4）中，反应条件为在室温下进行。

优选地，步骤（5）中，反应的溶剂包括丙酮溶液。

优选地，步骤（5）中，反应条件为在 68~72℃下进行，反应的温度例如可以使 68℃、70℃、72℃、68~70℃、68~72℃或 70~72℃等。

优选地，步骤（6）中，反应的溶剂包括 DCM 溶液。

优选地，步骤（6）中，反应条件为在室温下进行。

优选地，步骤（7）中，反应的溶剂包括乙醇和水的混合溶液，二者的体积比为乙醇:水=1:(1.5~3)。

优选地，步骤（7）中，反应条件为在室温下进行。

优选地，步骤（8）中，DMAP（4-二甲氨基吡啶）和 DCC（二环己基碳二亚胺）作为反应的催化剂。

优选地，步骤（8）中，反应的溶剂包括 DCM 溶液。

优选地，步骤（8）中，反应条件为在室温下进行。

在本申请中，在步骤（8）中，所述一元仲醇类化合物为含有不同碳原子数的一元醇，且羟基不在 1 号位上，在实际的生产过程中，可根据合成的具体的阳离子脂质化合物的结构进行具体地选择。

优选地，所述一元仲醇类化合物包括 13-二十五醇、11-二十一醇、9-十七醇、7-十

五醇或 9-二十一醇。

第三方面，本申请提供一种 LNP 载体，采用如下技术方案：

一种 LNP 载体，所述 LNP 载体含有第一方面所述的阳离子脂质化合物中的任意一种或至少两种的组合。

本申请中，所述的 LNP 载体中的阳离子脂质化合物可以为单一的阳离子脂质化合物，也可以为多种阳离子脂质化合物的组合。

优选地，以摩尔分数计，所述阳离子脂质化合物在所述 LNP 载体中的摩尔分数为 15%~70%，例如可以是 15%、30%、45%、60%、70%、15%~30%、15%~45%、15%~60%、15%~70%、30%~45%、30%~60%、30%~70%、45%~60%、45%~70%或 60%~70%等。该摩尔分数是 LNP 载体中脂质材料的摩尔比例，不包括所含药物（如核酸药物）。

本申请中，当所述 LNP 载体中的阳离子脂质化合物为一种时，则其在 LNP 载体中的摩尔分数为 15%~70%（例如，可以是 15%、30%、45%、60%、70%、15%~30%、15%~45%、15%~60%、15%~70%、30%~45%、30%~60%、30%~70%、45%~60%、45%~70%或 60%~70%等）；当所述 LNP 载体中的阳离子脂质化合物为多种的组合时，则多种阳离子脂质化合物的组合的总量在 LNP 载体中的摩尔分数为 15%~70%（例如，可以是 15%、30%、45%、60%、70%、15%~30%、15%~45%、15%~60%、15%~70%、30%~45%、30%~60%、30%~70%、45%~60%、45%~70%或 60%~70%等）。在一些方面，上述的摩尔分数是 LNP 载体中脂质材料的摩尔比例，不包括所含药物（如核酸药物）。

在一些方面，以摩尔分数计，所述 LNP 载体还包括磷脂 5%~30%（例如可以是 5%~20%或 8%~30%）和胆固醇 15%~65%。该摩尔分数是 LNP 载体中脂质材料的摩尔比例，不包括所含药物（如核酸药物）。

在一些方面，以摩尔分数计，所述 LNP 载体还包括磷脂 5%~30%（例如可以是 5%~20%或 8%~30%）、胆固醇 15%~65%和聚乙二醇脂质 1.5%~3%（例如可以是 1%~3%或 0.5%~2%）。该摩尔分数是 LNP 载体中脂质材料的摩尔比例，不包括所含药物（如核酸药物）。

优选地，所述磷脂在所述 LNP 载体中的摩尔分数为 5%~40%，例如可以是 8%、10%、15%、20%、25%、30%、5%~10%、8%~10%、5%~15%、8%~15%、5%~20%、8%~20%、5%~25%、8%~25%、5%~30%、8%~30%、10%~15%、10%~20%、10%~25%、10%~30%、15%~20%、15%~25%、15%~30%、20%~25%、20%~30%或 25%~30%等。该摩尔分数是 LNP 载体中脂质材料的摩尔比例，不包括所含药物（如核酸药物）。

优选地，所述胆固醇在所述LNP载体中的摩尔分数为10%~65%，例如可以是10%，15%、30%、45%、65%、15%~30%、15%~45%、15%~65%、30%~45%、30%~65%或45%~65%等。该摩尔分数是LNP载体中脂质材料的摩尔比例，不包括所含药物（如核酸药物）。

在一些方面，以摩尔分数计，所述LNP载体还包括聚乙二醇脂质，其中所述聚乙二醇脂质在所述LNP载体中的摩尔分数为0.5%~3%，例如可以是1.5%、2%、2.5%、3%、0.5%~2%、1%~2%、1.5%~2%、0.5%~2.5%、1%~2%、1.5%~2.5%、0.5%~3%、1%~2%、1.5%~3%、2%~2.5%、1%~3%、2%~3%或2.5%~3%等。该摩尔分数是LNP中脂质材料的摩尔比例，不包括所含药物（如核酸药物）。

在本申请的一些方面，以摩尔分数计，所述LNP载体包括阳离子脂质化合物15%~70%（例如，可以是15%、30%、45%、60%、70%、30%~70%、15%~30%、15%~45%、15%~60%、15%~70%、30%~45%、30%~60%、30%~70%、45%~60%、45%~70%或60%~70%等）、磷脂5%~30%（例如可以是8%、10%、15%、20%、25%、30%、5%~10%、8%~10%、5%~15%、8%~15%、5%~20%、8%~20%、5%~25%、8%~25%、5%~30%、8%~30%、10%~15%、10%~20%、10%~25%、10%~30%、15%~20%、15%~25%、15%~30%、20%~25%、20%~30%或25%~30%等）和胆固醇10%~65%（例如可以是15%、30%、45%、65%、15%~30%、15%~45%、15%~65%、30%~45%、30%~65%或45%~65%等）。在一些方面，以摩尔分数计，所述LNP载体包括阳离子脂质化合物15%~70%（例如，可以是15%、30%、45%、60%、70%、30%~70%、15%~30%、15%~45%、15%~60%、15%~70%、30%~45%、30%~60%、30%~70%、45%~60%、45%~70%或60%~70%等）、磷脂5%~30%（例如可以是8%、10%、15%、20%、25%、30%、5%~10%、8%~10%、5%~15%、8%~15%、5%~20%、8%~20%、5%~25%、8%~25%、5%~30%、8%~30%、10%~15%、10%~20%、10%~25%、10%~30%、15%~20%、15%~25%、15%~30%、20%~25%、20%~30%或25%~30%等）和胆固醇10%~65%（例如可以是15%、30%、45%、65%、15%~30%、15%~45%、15%~65%、30%~45%、30%~65%或45%~65%等）和聚乙二醇脂质0.5%~2%（例如可以是1.5%、2%、2.5%、3%、0.5%~2%、1%~2%、1.5%~2%、0.5%~2.5%、1%~2%、1.5%~2.5%、0.5%~3%、1%~2%、1.5%~3%、2%~2.5%、2%~3%或2.5%~3%等）。该摩尔分数是LNP中脂质材料的摩尔比例，不包括所含药物（如核酸药物）。

本申请中，通过对LNP载体的组分及其各自的添加量进行优化，产生了协同增益的技术效果，核酸药物的装载量更高，LNP的粒径分布更可控，对靶细胞的转染作用更强，从而提升药物的作用效果，降低毒副作用，治疗效果更好。

第四方面，本申请提供了一种药物，采用如下技术方案：

一种药物，所述药物包括第三方面所述的 LNP 载体。

优选地，所述药物还包括核酸药物。在一些方面，所述药物为基因药物。在一些方面，基因药物包括但不限于质粒 DNA（plasmid DNA，pDNA）、反义寡核苷酸（antisense ODN）、小干扰 RNA（siRNA）、小发卡 RNA（shRNA）和信使 RNA（mRNA）。在一些方面，所属药物为 mRNA。在一些方面，所属药物为编码 SARS-CoV-2 病毒刺突糖蛋白（S 蛋白）mRNA。

优选地，所述药物中，LNP 载体中的阳离子脂质化合物的氮含量与核酸药物中的磷含量的摩尔比（即 N/P 摩尔比）为(2~15):1，例如可以是 2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、(2~3):1、(2~4):1、(2~5):1、(2~6):1、(3~4):1、(3~5):1、(3~6):1、(4~5):1、(4~6):1 或(5~6):1 等。

在一些方面，所述药物中，核酸药物（例如编码 SARS-CoV-2 病毒刺突糖蛋白的 mRNA）占载药 LNP 的质量分数（载药量）为 1%至 10%，例如可以是 1%~7%，1%~6%，2%~6%，2%~5%，或 3%~5%等。

本申请中，阳离子脂质化合物与核酸药物的比例直接影响药物的包封率以及后续的释药效果， 在本申请的另一些方面，当 LNP 载体中的阳离子脂质化合物的氮含量与核酸药物中的磷含量的摩尔比为(2~15):1 时，载药结构具有更好的稳定性，在细胞内释放的效率最好。在本申请的一些方面，经试验验证，当 LNP 载体中的阳离子脂质化合物的氮含量与核酸药物中的磷含量的摩尔比为(2~6):1 时，药物的包封率最高，治疗效果最好，并且可以提高原料的利用率，节约生产成本。在本申请的一些方面， 当核酸药物在载药 LNP 中的质量分数（载药量）为 3%至 10%时，药物的包封率较好，并且可以提高原料的利用率，节约生产成本。

本申请中，所述药物的粒径与粒径分布影响载药能力以及后续的实际应用。在本申请的一些方面，所述药物的平均粒径为 30 nm~300 nm，例如可以是 30 nm~270 nm，30 nm~250 nm，30 nm~200 nm，50 nm~200 nm，50 nm~150 nm，或 60 nm~120 nm 等。在本申请的一些方面，所述药物的 polydispersity（PDI）为小于 0.15，例如可以是小于 0.13，小于 0.12，小于 0.11，小于 0.1，或小于 0.09 等。在本申请的一些方面，所述药物的 polydispersity（PDI）为 0.02~0.25，例如可以是 0.02~0.20，0.05~0.20，0.05~0.25，0.05~0.1，或 0.05~0.25 等。在本申请的一些方面，所属药物的 PDI 小于 0.1。

在本申请的一些方面，所述药物包含 LNP 载体与 mRNA（例如编码 SARS-CoV-2 病毒刺突糖蛋白的 mRNA），其中 mRNA 载药量为 2-6% （wt.）,其中的 LNP 载体包括

60 mol%~70 mol%的 TM3 脂质化合物，7 mol%~12 mol%的磷脂（例如 HSPC），20 mol%~25 mol%的胆固醇，和 1 mol%~2 mol%的 DSPE-PEG2000。在一些方面，上述药物的平均粒径在 150 nm 至 200 nm 之间。在一些方面，上述药物的粒径分布 PDI 小于 0.1。在一些方面，上述药物的包封率大于 85%。在一些方面，上述药物的 N/P 值为 5.5 至 6.5。

在本申请的一些方面，所述药物包含 LNP 载体与核酸药物，其中核酸药物与 LNP 载体的质量比为 5%至 7%，其中的 LNP 载体包括 60 mol%~70 mol% 的 TM3 脂质化合物，10 mol%~15 mol%的磷脂（例如 HSPC），15 mol%~25 mol%的胆固醇，和 1 mol%~2 mol%的 DSPE-PEG2000。在一些方面，上述药物的平均粒径在 50 nm 至 100 nm 之间。在一些方面，上述药物的 PDI 小于 0.1 或小于 0.05。在一些方面，上述药物的包封率大于 80%或大于 90%。

在本申请的一些方面，所述药物包含 LNP 载体与核酸药物，其中核酸药物与 LNP 载体的质量比为 4%至 5%，其中的 LNP 载体包括 60 mol%~70 mol%的 TM3 脂质化合物，5 mol%~8mol%的磷脂（例如 HSPC），25mol%~35 mol%的胆固醇，和 1 mol%~2 mol%的 DSPE-PEG2000。在一些方面，上述药物的平均粒径在 100 nm 至 150 nm 之间。在一些方面，上述药物的 PDI 小于 0.1。在一些方面，上述药物的包封率大于 80%或大于 90%。

在本申请的一些方面，所述药物包含 LNP 载体与核酸药物，其中核酸药物与 LNP 载体的质量比为 4%至 5%，其中的 LNP 载体包括 60 mol%~70 mol% 的 TM3 脂质化合物，10 mol%~15 mol%的磷脂（例如 HSPC），15 mol%~25 mol%的胆固醇，和 2 mol%~3 mol%的 DSPE-PEG2000。在一些方面，上述药物的平均粒径在 100 nm 至 150 nm 之间。在一些方面，上述药物的平均粒径在 100 nm 至 150 nm 之间。在一些方面，上述药物的 PDI 小于 0.1。在一些方面，上述药物的包封率大于 80%或大于 90%。

在本申请的一些方面，所述药物包含 LNP 载体与核酸药物，其中核酸药物与 LNP 载体的质量比为 2%至 3%，其中的 LNP 载体包括 25 mol%~35 mol% 的 TM3 脂质化合物，5 mol%~12 mol%的磷脂（例如 HSPC），50 mol%~60 mol%的胆固醇，和 1 mol%~2 mol%的 DSPE-PEG2000。在一些方面，上述药物的平均粒径在 50 nm 至 100 nm 之间。在一些方面，上述药物的 PDI 小于 0.1。在一些方面，上述药物的包封率大于 80%或大于 90%。

在本申请的一些方面，所述药物包含 LNP 载体与核酸药物，其中核酸药物与 LNP

载体的质量比为 5%至 6%，其中的 LNP 载体包含 35 mol%~45 mol% 的 TM3 脂质化合物，12 mol%~18 mol%的磷脂（例如 HSPC），40mol%~50 mol%的胆固醇，和 0.5 mol%~1 mol%的 DSPE-PEG2000。在一些方面，上述药物的平均粒径在 100 nm 至 150 nm 之间。在一些方面，上述药物的 PDI 小于 0.1。在一些方面，上述药物的包封率大于 80%或大于 90%。

在本申请的一些方面，所述药物包含 LNP 载体与核酸药物（例如编码 SARS-CoV-2 病毒刺突糖蛋白的 mRNA）,其中的 LNP 载体包含 60 mol%~70 mol%的 TM6 脂质化合物，10 mol%~15 mol%的磷脂（例如 HSPC），15 mol%~25 mol%的胆固醇，和 2 mol%~3 mol%的 DSPE-PEG2000。在一些方面，上述药物的平均粒径在 100 nm 至 150 nm 之间。在一些方面，上述药物的粒径分布 PDI 小于 0.1。在一些方面，上述药物的包封率大于 90%。在一些方面，上述药物的其中 N/P 值为 5.5 至 6.2。

在本申请的一些方面，所述药物包含 LNP 载体与核酸药物（例如编码 SARS-CoV-2 病毒刺突糖蛋白的 mRNA），其中 N/P 值为 5.5 至 6.2，其中的 LNP 载体包含 25 mol%~35 mol%的 TM6 脂质化合物，5 mol%~15 mol%的磷脂（例如 HSPC），55 mol%~65 mol%的胆固醇，和 1 mol%~2 mol%的 DSPE-PEG2000。在一些方面，上述药物的平均粒径在 150 nm 至 200 nm 之间。在一些方面，上述药物的粒径分布 PDI 小于 0.1。在一些方面，上述药物的包封率大于 85%。

在本申请的一些方面，所述药物包含 LNP 载体与核酸药物（例如编码 SARS-CoV-2 病毒刺突糖蛋白的 mRNA），其中 N/P 值为 3.8 至 4.2，其中的 LNP 载体包含 45 mol%~55 mol%的 TM6 脂质化合物，5 mol%~15 mol%的磷脂（例如 HSPC），35 mol%~45 mol%的胆固醇，和 1 mol%~2 mol%的 DSPE-PEG2000。在一些方面，上述药物的平均粒径在 50 nm 至 100 nm 之间。在一些方面，上述药物的粒径分布 PDI 小于 0.1。在一些方面，上述药物的包封率大于 85%。

在本申请的一些方面，所述药物包含 LNP 载体与核酸药物（例如编码 SARS-CoV-2 病毒刺突糖蛋白的 mRNA），其中 N/P 值为 5.5 至 6.2，其中的 LNP 载体包含 60 mol%~70 mol%的 TM7 脂质化合物，10 mol%~15 mol%的磷脂（例如 HSPC），15 mol%~25 mol%的胆固醇，和 2 mol%~3 mol%的 DSPE-PEG2000。在一些方面，上述药物的平均粒径在 100 nm 至 150 nm 之间。在一些方面，上述药物的粒径分布 PDI 小于 0.15。在一些方面，上述药物的包封率大于 70%。

在本申请的一些方面，所述药物包含 LNP 载体与核酸药物（例如编码 SARS-CoV-

2 病毒刺突糖蛋白的 mRNA），其中 N/P 值为 5.5 至 6.2，其中的 LNP 载体包含 25 mol%~35 mol%的 TM7 脂质化合物，5 mol%~15 mol%的磷脂（例如 HSPC），55 mol%~65 mol%的胆固醇，和 1 mol%~2 mol%的 DSPE-PEG2000。在一些方面，上述药物的平均粒径在 50 nm 至 1100 nm 之间。在一些方面，上述药物的粒径分布 PDI 小于 0.1。在一些方面，上述药物的包封率大于 95%。

在本申请的一些方面，所述药物包含 LNP 载体与核酸药物（例如编码 SARS-CoV-2 病毒刺突糖蛋白的 mRNA），其中 N/P 值为 3.8 至 4.2，其中的 LNP 载体包含 45 mol%~55 mol%的 TM7 脂质化合物，5 mol%~15 mol%的磷脂（例如 HSPC），35 mol%~45 mol%的胆固醇，和 1 mol%~2 mol%的 DSPE-PEG2000。在一些方面，上述药物的平均粒径在 100 nm 至 150 nm 之间。在一些方面，上述药物的粒径分布 PDI 小于 0.1。在一些方面，上述药物的包封率大于 90%。

在一些方面，本申请中的药物可以用于治疗或预防某些疾病， 比如 COVID 感染，病毒和病菌感染，肿瘤， 代谢疾病，自身免疫疾病，心血管疾病和遗传性疾病。

第五方面，本申请提供上述药物的制备方法，采用如下技术方案：

一种药物的制备方法，所述药物的制备方法包括以下步骤：

称取除阳离子脂质化合物外的其它组分，溶解，制成储备液；

向所述储备液中加入阳离子脂质化合物，混合，得到脂质醇相；

稀释核酸药物，制成核酸水相；

将所述脂质醇相和核酸水相混合，制成药物中间品，透析，得到所述药物。

优选地，磷脂、胆固醇和聚乙二醇脂质溶解时，使用的溶剂包括乙醇（例如无水乙醇）。

优选地，稀释核酸药物时，使用酸性缓冲盐溶液进行稀释， 例如使用 pH=4.0 的酸性缓冲盐溶液进行稀释。

本申请中，使用透析装置进行透析，以除去溶剂。在一些方面，在透析步骤后，本申请的制备方法还包括将 LNP 分散在生物相容的注射缓冲液中。。

第六方面，本申请提供一种疫苗，采用如下技术方案：

一种疫苗，所述疫苗包括第三方面所述的 LNP 载体。

第七方面，本申请提供第一方面所述的阳离子脂质化合物在制备 LNP 载体、药物或疫苗中的应用，或第三方面所述的 LNP 载体在制备药物和/或疫苗中的应用。

综上所述，本申请具有以下有益效果：

1. 本申请将 3-((2-(二甲氨基)乙烷基)(甲基)氨基)丙酸和二级长链烷基酯相结合获得的两亲性衍生物作为基因药物的载体系统中的阳离子脂质组分，其带有正电荷，从而更容易吸附到细胞表面并进入细胞中，传递药物的效率更高，在一些方面使得使基因转染的效率更高，治疗效果更好；生产原材料易得，制备方法简单，合成效率高，为大规模生产创造了条件；

2. 使用上述阳离子脂质化合物制备得到的 LNP 载体具有良好的载药及传递效率，在一些方面，包封率可达 88%以上，与核酸分子制成药物后，可以高效地在体内表达相关的蛋白，从而作为治疗药物发挥治疗疾病的作用，或作为疫苗产生激活免疫的效果，具有广阔的应用前景。在一些方面，使用上述阳离子脂质化合物制备得到的 LNP 载体可以准确高效地进入细胞中并表达相关的蛋白，发挥治疗的效果。

附图说明

图 1 是本申请中阳离子脂质化合物 TM3 的合成路线示意图。

图 2 是本申请制备例 1 中中间产物 2 的氢谱检测结果图片。

图 3 是本申请制备例 1 中中间产物 3 的氢谱检测结果图片。

图 4 是本申请制备例 1 中中间产物 4 的氢谱检测结果图片。

图 5 是本申请制备例 1 中中间产物 5 的氢谱检测结果图片。

图 6 是本申请制备例 1 中中间产物 7 的氢谱检测结果图片。

图 7 是本申请制备例 1 中阳离子脂质化合物 TM3 的氢谱检测结果图片。

图 8 是本申请实施例 1 中药物 TP1 在 293T 细胞内蛋白表达量的检测结果图片。

图 9 是本申请实施例 2 中小鼠血清中抗 S 蛋白抗体滴度的检测结果图片。

图 10 是本申请实施例 3 中的 HG-06 LNP 的冷冻电镜结构图。

图 11 是本申请实施例 3 中的 HG-23 LNP 的冷冻电镜结构图。

图 12 是本申请实施例 3 中的 HG-23 LNP 在荧光标记后进入细胞在内吞体中聚集的图像。

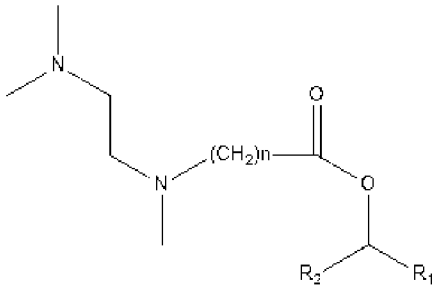
图 13 是本申请实施例中阳离子脂质化合物 TM6 的氢谱检测结果图片。

图 14 是多个处方的 TM6 和 TM7 LNP 的细胞转染的结果比较。

图 15 是多个处方的 TM6 和 TM7 LNP 对小鼠进行免疫后诱导的抗体水平比较。

具体实施方式

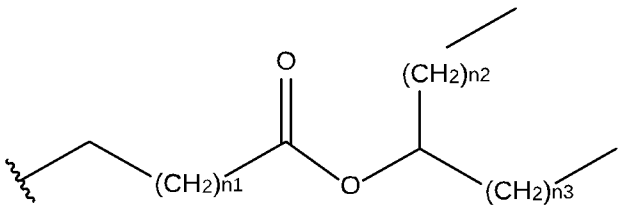
本申请提供了阳离子脂质化合物，所述阳离子脂质化合物包括式 I 所示的化合物；



式 I；

式 I 中，n=1、2、3 或 4；

R_1 和 R_2 各自独立地选自式 II 所示的二级长链烷基酯；



式 II；

式 II 中，n_1=2、4 或 6；n_2=5、7、9 或 11；n_3=5、7、9 或 11；波浪线代表式 II 与式 I 中其他部分的连接点。

在本申请的一些方面，n = 1、2 或 3。

在本申请的一些方面，n = 2。

在本申请的一些方面，R_1 中的 n1 与 R_2 中的 n1 值相同。

具体地，所述阳离子脂质化合物包括式 III 所示的 TM1、式 IV 所示的 TM2、式 V 所示的 TM3、式 VI 所示的 TM4 或式 VII 所示的 TM5。

具体地，本申请以 TM3 为例，说明所述阳离子脂质化合物的制备方法，其合成路线示意图如图 1 所示，具体流程如下：

（1）8-溴辛酸乙酯在 DMSO 溶液中，以 TBAI 作为催化剂，与 TosMIC 和 NaH 在室温条件下发生烷基化反应，生成中间产物 2：

18~22 mmol 8-溴辛酸乙酯溶解于 55~65 mL 无水 DMSO 中，8~15℃下搅拌 5~10 min，加入 8~12 mmol TosMIC，搅拌 5~10 min，分多次加入 23~28 mmol NaH，最后再加入 1.8~2.2 mmol TBAI，缓慢升高至室温，搅拌 1~3 h。

通过 TLC 监测反应进度，待反应完全时，将体系在冰水浴中冷却并加入 145~155 mL 冰水淬灭，再用 DCM 分 3 次萃取，每次 90~110 mL。收集所有有机相，使用 90~110 mL 水清洗，再用饱和碳酸氢钠分 2 次清洗，每次 145~155 mL，干燥浓缩后过硅胶柱纯

化得到中间产物 2。

（2）中间产物 2 在 DCM 和浓硫酸的酸性混合溶液（体积比为(3.5~8):1）中，在室温条件反应，生成中间产物 3：

称取 3.9~4.2 g 中间产物 2，溶解于 45~55 mL 的 DCM 溶液中，搅拌 3~7 min。加入 7~12 mL 浓硫酸，室温条件下搅拌 2~5 h。

通过 TLC 监测反应进度，待反应完全后，向体系中加入 45~55 mL 水，混匀后静置分层，使用 45~55 mL DCM 萃取水层，合并所有有机相，用 45~55 mL 饱和碳酸氢钠洗脱有机相，干燥浓缩后过硅胶柱纯化，得到中间产物 3。

（3）中间产物 3 在 THF 和乙醇的混合溶液（体积比为(2~4):1）中，与 $NaBH_4$ 在室温条件下发生还原反应，生成中间产物 4：

称取 3~5 mmol 中间产物 3 溶解于 45~55 mL THF 和乙醇的混合溶液（体积比为(2~4):1）中，0~4℃搅拌 3~7 min。分多次缓慢加入 3~5 mmol $NaBH_4$，室温下反应 3~5 h。

TLC 检测反应进度，待反应完全后，向体系中加入 90~110 mL 冰水淬灭，使用 DCM 分 3 次萃取，每次 90~110 mL。合并所有有机相，使用 45~55 mL 饱和碳酸氢钠洗脱有机相，干燥浓缩后过硅胶柱纯化，得到中间产物 4。

（4）中间产物 4 在含有吡啶的 DCM 溶液（吡啶的浓度为 73~134 mM）中，与 3-氯丙酰氯在室温条件下发生缩合反应，生成中间产物 5：

称取 4~6 mmol 中间产物 4 溶解于 45~55 mL DCM 溶液中，再加入 4~6 mmol 吡啶，在 0~4℃下搅拌 3~7 min，缓慢加入 7~9 mmol 3-氯丙酰氯，室温下反应 0.5~2 h。

通过 TLC 检测反应进度，待反应完全后，向体系中加入 90~110 mL 冰水淬灭，使用 90~110 mL 水清洗，再用饱和碳酸氢钠溶液分 2 次清洗，每次 140~160 mL，干燥浓缩后过硅胶柱纯化得到中间产物 5。

（5）中间产物 5 在丙酮溶液中，与 NaI 在 68~72℃条件下发生取代反应，生成中间产物 6：

称取 3~5 mmol 中间产物 5 溶解于 45~55 mL 丙酮溶液中，缓慢加入 3~6 mmol NaI，升高温度至 68~72℃，反应 12~18 h。

通过 TLC 检测反应进度，待反应完全后，用 45~55 mL 饱和硫代硫酸钠洗脱有机相，干燥浓缩后过硅胶柱纯化，得到中间产物 6。

（6）中间产物 6 在 DCM 溶液中，与 N,N,N'-三甲基乙二胺在室温条件下发生

取代反应，生成中间产物 7：

称取 3~5 mmol 中间产物 6 溶解于 45~55 mL DCM 溶液中，加入 5~7 mmol N,N,N'-三甲基乙二胺，室温下搅拌反应 1~3 h。

通过 TLC 检测反应进度，待反应完全后，用 45~55 mL 饱和碳酸氢钠洗脱有机相，干燥浓缩后过硅胶柱纯化，得到中间产物 7。

（7）中间产物 7 在乙醇和水的混合溶液（体积比为 1:(1.5~3)）中，与 LiOH 在室温条件下发生水解反应，生成中间产物 8：

称取 4~6 mmol 中间产物 7 和 18~22 mmoL LiOH 溶解于 90~110 mL 的乙醇和水的混合溶液（体积比为 1:(1.5~3)）中，室温条件下搅拌 4~7 h。

通过 TLC 检测反应进度，待反应完全后，旋干乙醇后用 1.5~2.5 M 盐酸酸化至 pH 约为 2，使用 DCM 分 3 次萃取，每次 90~110 mL。合并所有有机相，用 45~55 mL 饱和碳酸氢钠洗脱有机相，干燥浓缩后过硅胶柱纯化，得到中间产物 8。

（8）中间产物 8 在 DCM 溶液中，在 DMAP 及 DCC 的作用下，与 9-十七醇在室温条件下发生酯化反应，生成所述阳离子脂质化合物 TM3：

称取 4~6 mmol 中间产物 8、14~16 mmol DMAP 和 16~20 mmol 9-十七醇溶解于 55~65 mL 的 DCM 中，搅拌 3~7 min，加入 13~17 mmol DCC，室温条件下搅拌过夜。

通过 TLC 检测反应进度，待反应完全后，分 3 次水洗，每次 55~65 mL。再用饱和碳酸氢钠分 2 次清洗，每次 45~55 mL。干燥浓缩后过硅胶柱纯化，得到阳离子脂质化合物 TM3。

本申请还提供了一种 LNP 载体，以摩尔分数计，所述 LNP 载体包括阳离子脂质化合物 15%~70%、磷脂 8%~30%、胆固醇 15%~65%和聚乙二醇脂质 1.5%~3%。

本申请还提供了一种 LNP 载体，以摩尔分数计，所述 LNP 载体包括阳离子脂质化合物 15%~70%、磷脂 8%~40%、和胆固醇 10%~65%。

本申请还提供了一种药物，所述药物包括 LNP 载体和核酸药物，其中，所述药物中，核酸药物的载药量在 1.0-10.0% 之间。在一些方面，LNP 载体中的阳离子脂质化合物的氮含量与核酸药物中的磷含量的摩尔比为 2:1 到 15:1、2:1 到 10:1、2:1 到 6:1、或 4:1 到 6:1。

在一些方面，所述药物可以通过如下方法进行制备：

根据处方准确称取脂质，加入乙醇，在磁力搅拌器上，搅拌溶解。mRNA 原液加入计算量的 pH=4 的柠檬酸盐缓冲液，混合均匀。

用注射器吸取上述脂质乙醇溶液和 mRNA-柠檬酸盐缓冲液水溶液，使用 LNP 混合泵，启动后收集稳定混合阶段的溶液。将上述混合后 mRNA-LNP 中间品加入透析袋，加入 4℃预冷的透析缓冲液，放置于 2-8℃冰箱， 200rpm 搅拌透析过夜。

使用 0.22um 无菌针式过滤器（Millipore）过滤除菌，放置于无菌无酶离心管。使用 Ribogreen 检测试剂（thermo）检测过滤后 mRNA-LNP 的 mRNA 载量和包封率。使用 PCS 检测仪检测过滤后 mRNA-LNP 的 zeta 平均粒径。

在一些方面，所述药物可以通过如下方法进行制备：

称取 1.5~1.8 mg 磷脂、1.7~1.9 mg 胆固醇和 0.8~1 mg 聚乙二醇脂质，在 55~65℃条件下溶解于 0.8~1.5 mL 无水乙醇中，制成储备液；

在室温条件下向所述储备液中加入 13~15 mg 阳离子脂质化合物，混合，得到脂质醇相；

使用酸性缓冲盐溶液稀释核酸药物至终浓度为 0.5~0.7 mg/mL，混合均匀，制成核酸水相；

将所述脂质醇相和核酸水相按体积比为 1:(2~5)在室温下通过混合器混合，制成药物中间品，通过透析装置进行透析，去除溶剂，并置换为含 0.2%~0.5%氯化钠、4%~6%蔗糖的浓度为 18~22 mM 的 Tris 溶液，得到所述药物。

在一些方面，所述药物可以通过如下方法进行制备：

称取 1.5~1.8 mg 磷脂、1.7~1.9 mg 胆固醇和 0.8~1 mg 聚乙二醇脂质，在 55~65℃条件下溶解于 0.8~1.5 mL 无水乙醇中，制成储备液；

在室温条件下向所述储备液中加入 13~15 mg 阳离子脂质化合物，混合，得到脂质醇相；

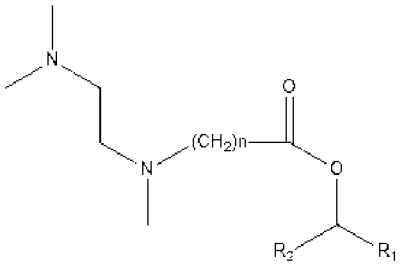
使用酸性缓冲盐溶液稀释核酸药物至终浓度为 0.05~0.3 mg/mL，混合均匀，制成核酸水相；

将所述脂质醇相和核酸水相按体积比为 1:(2~5)在室温下通过混合器混合，制成药物中间品，通过透析装置进行透析，去除溶剂，并置换为含 0.2%~0.5%氯化钠、4%~6%蔗糖的浓度为 18~22 mM 的 Tris 溶液，得到所述药物。

列举的实施例

以下列举的实施例代表本发明的一些方面

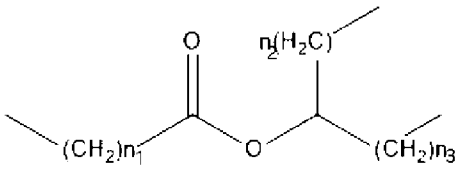
实施例 1. 阳离子脂质化合物，其特征在于，所述阳离子脂质化合物包括式 I 所示的化合物；



式 I；

式 I 中，n=1、2、3 或 4；

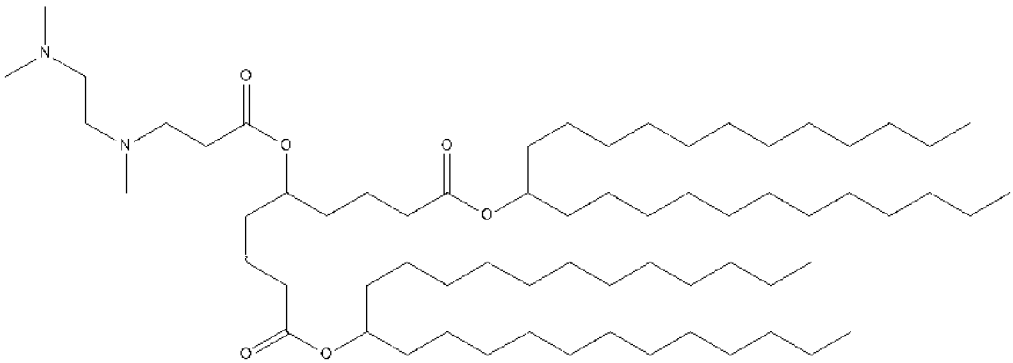
R_1 和 R_2 各自独立地选自式 II 所示的二级长链烷基酯；



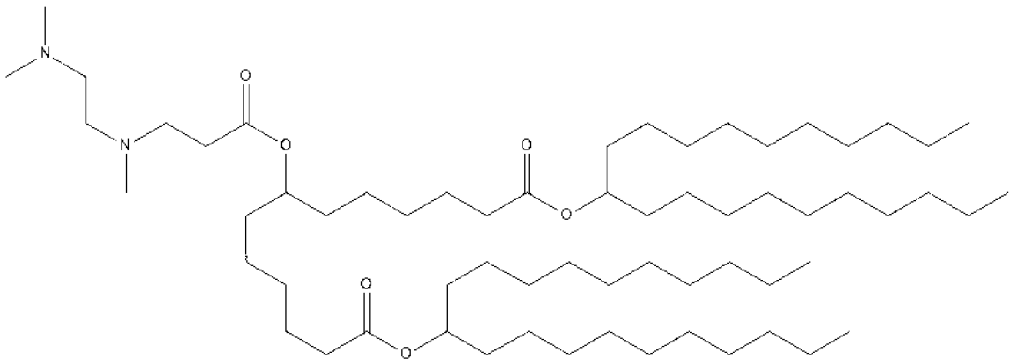
式 II；

式 II 中，n_1=2、4 或 6；n_2=5、7、9 或 11；n_3=5、7、9 或 11。

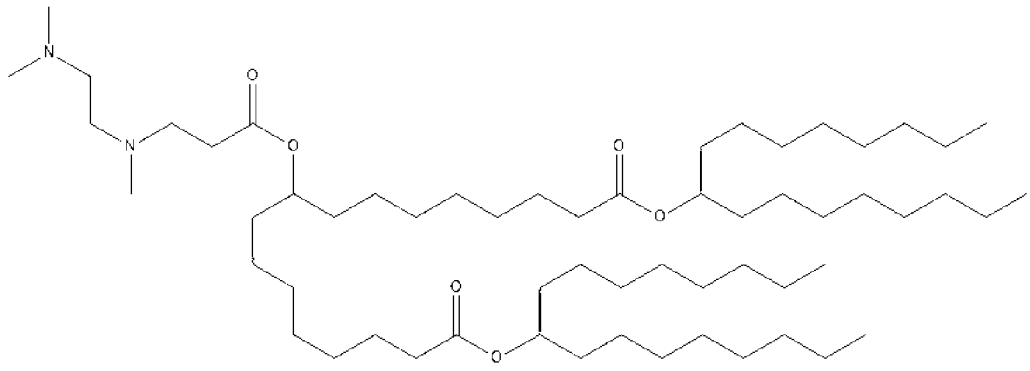
实施例 2. 根据实施例 1 所示的阳离子脂质化合物，其特征在于，所述阳离子脂质化合物包括式 III、式 IV、式 V、式 VI 或式 VII 所示的化合物；



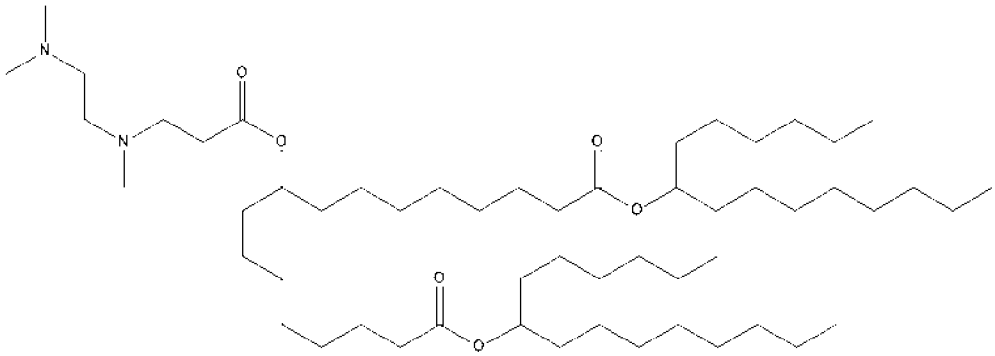
式 III；



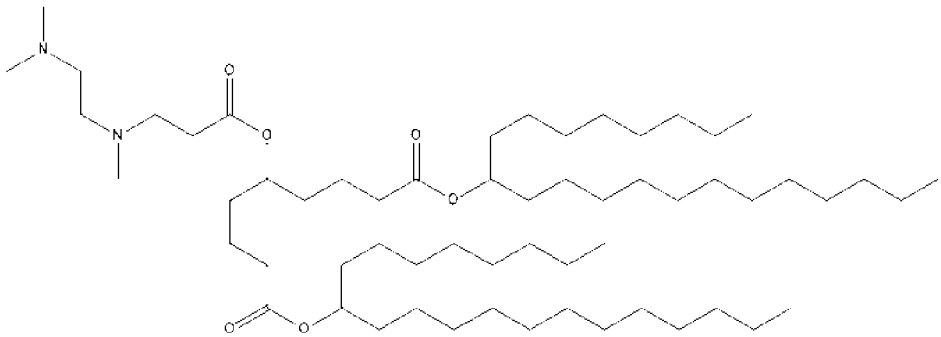
式 IV；



式 V；



式 VI；



式 VII。

实施例 3. 如实施例 1 或 2 所述的阳离子脂质化合物的制备方法，其特征在于，所述阳离子脂质化合物的制备方法包括以下步骤：

以溴代酯类化合物为原料，依次进行烷基化反应、还原反应，

再与酰氯类化合物发生缩合反应，依次进行两步取代反应和一次水解反应，最后与一元仲醇类化合物进行酯化反应，制得所述阳离子脂质化合物。

实施例 4. 一种 LNP 载体，其特征在于，所述 LNP 载体含有实施例 1 或 2 所述的阳离子脂质化合物中的任意一种或至少两种的组合。

实施例 5. 根据实施例 4 所述的 LNP 载体，其特征在于，以摩尔分数计，所述 LNP

载体包括阳离子脂质化合物 15%~70%；

优选的，以摩尔分数计，所述 LNP 载体还包括磷脂 8%~30%、胆固醇 5%~65%和聚乙二醇脂质 1.5%~3%。

实施例 6. 一种药物，其特征在于，所述药物包括实施例 4 或 5 所述的 LNP 载体。

实施例 7. 根据实施例 6 所述的药物，其特征在于，所述药物还包括核酸药物；

优选地，所述药物中，LNP 载体中的阳离子脂质化合物的氮含量与核酸药物中的磷含量的摩尔比为(2~6):1。

实施例 8. 如实施例 6 或 7 所述的药物的制备方法，其特征在于，所述药物的制备方法包括以下步骤：

称取除阳离子脂质化合物外的其它组分，溶解，制成储备液；

向所述储备液中加入阳离子脂质化合物，混合，得到脂质醇相；

稀释核酸药物，制成核酸水相；

将所述脂质醇相和核酸水相混合，制成药物中间品，透析，得到所述药物。

实施例 9. 一种疫苗，其特征在于，所述疫苗包括实施例 4 或 5 所述的 LNP 载体。

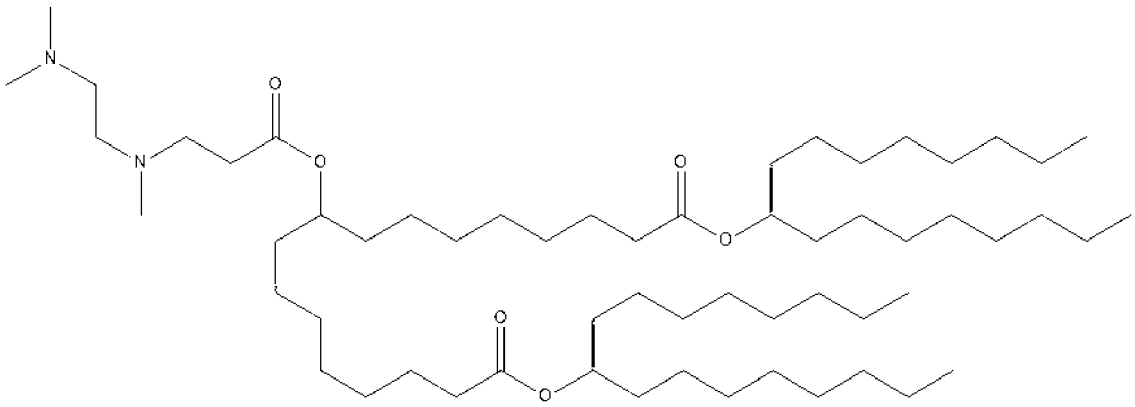
实施例 10. 如实施例 1 或 2 所述的阳离子脂质化合物在制备 LNP 载体、药物或疫苗中的应用，或实施例 4 或 5 所述的 LNP 载体在制备药物和/或疫苗中的应用。

以下结合附图 1~9、制备例 1~2 和实施例 1~2 对本申请作进一步详细说明。

制备例

制备例 1

本制备例提供一种阳离子脂质化合物 TM3，所述阳离子脂质化合物 TM3 的结构式如式 V 所示。



式 V。

所述阳离子脂质化合物 TM3 通过如下方法进行制备，合成路线图如图 1 所示：

（1）8-溴辛酸乙酯在 DMSO 溶液中，以 TBAI 为催化剂，与 TosMIC 和 NaH 在室温条件下发生烷基化反应，生成中间产物 2：

在 500 mL 的单口瓶中，称取 5 g 8-溴辛酸乙酯（20 mmol）溶解于 60 mL 无水 DMSO 中，10℃下搅拌 7 min，加入 1.9 g TosMIC（10 mmol），搅拌 7 min，分多次加入 1 g NaH（25 mmol），最后再加入 0.7g TBAI（2 mmol），由 10℃缓慢升高至室温，搅拌 2 h。

通过 TLC 监测反应进度，待反应完全时，将体系在冰水浴中冷却并加入 150 mL 冰水淬灭，再用 DCM 分 3 次萃取，每次 100 mL。收集所有有机相，使用 100 mL 水清洗，再用饱和碳酸氢钠分 2 次清洗，每次 150 mL，干燥浓缩后过硅胶柱纯化，得到中间产物 2。中间产物 2 的氢谱检测结果如图 2 所示。

（2）中间产物 2 在 DCM 和浓硫酸的酸性混合溶液（体积比为 5:1）中，在室温条件反应，生成中间产物 3：

在 250 mL 的单口瓶中，称取 4.1 g 中间产物 2，溶解于 50 mL 的 DCM 溶液中，搅拌 5 min。加入 10 mL 浓硫酸，室温条件下搅拌 3 h。

通过 TLC 监测反应进度，待反应完全后，向体系中加入 50 mL 水，混匀后静置分层，使用 50 mL DCM 萃取水层，合并所有有机相，用 50 mL 饱和碳酸氢钠洗脱有机相，干燥浓缩后过硅胶柱纯化，得到中间产物 3。中间产物 3 的氢谱检测结果如图 3 所示。

（3）中间产物 3 在 THF 和乙醇的混合溶液（体积比为 3:1）中，与 $NaBH_4$ 在室温条件下发生还原反应，生成中间产物 4：

在 250 mL 的单口瓶中，称取 1.5 g 中间产物 3（4 mmol）溶解于 50 mL THF 和乙醇的混合溶液（体积比为 3:1）中，0℃搅拌 5 min。分多次缓慢加入 0.15 g $NaBH_4$（4 mmol），室温下反应 4 h。

TLC 检测反应进度，待反应完全后，向体系中加入 100 mL 冰水淬灭，使用 DCM 分 3 次萃取，每次 100 mL。合并所有有机相，使用 50 mL 饱和碳酸氢钠洗脱有机相，干燥浓缩后过硅胶柱纯化，得到中间产物 4。中间产物 4 的氢谱检测结果如图 4 所示。

（4）中间产物 4 在含有吡啶的 DCM 溶液中（吡啶的浓度为 100 mM），与 3-氯丙酰氯在室温条件下发生缩合反应，生成中间产物 5：

在 250 mL 的单口瓶中，称取 1.8 g 中间产物 4（5 mmol）溶解于 50 mL DCM 溶液中，再加入 0.4 g 吡啶（5 mmol），在 0℃下搅拌 5 min，缓慢加入 1 g 3-氯丙酰氯（8 mmol），室温下反应 1 h。

通过 TLC 检测反应进度，待反应完全后，向体系中加入 100 mL 冰水淬灭，使用 100 mL 水清洗，再用饱和碳酸氢钠溶液分 2 次清洗，每次 150 mL，干燥浓缩后过硅胶柱纯化得到中间产物 5。中间产物 5 的氢谱检测结果如图 5 所示。

（5）中间产物 5 在丙酮溶液中，与 NaI 在 70℃条件下发生取代反应，生成中间产物 6：

在 250 mL 的单口瓶中，称取 1.8 g 中间产物 5（4 mmol）溶解于 50 mL 丙酮溶液中，缓慢加入 0.8 g NaI（5 mmol），升高温度至 70℃，反应 16 h。

通过 TLC 检测反应进度，待反应完全后，用 50 mL 饱和硫代硫酸钠洗脱有机相，干燥浓缩后过硅胶柱纯化，得到中间产物 6。

（6）中间产物 6 在 DCM 溶液中，与 N,N,N'-三甲基乙二胺在室温条件下发生取代反应，生成中间产物 7：

在 250 mL 的单口瓶中，称取 2.2 g 中间产物 6（4 mmol）溶解于 50 mL DCM 溶液中，加入 0.6 g N,N,N'-三甲基乙二胺（6 mmol），室温下搅拌反应 2 h。

通过 TLC 检测反应进度，待反应完全后，用 50 mL 饱和碳酸氢钠洗脱有机相，干燥浓缩后过硅胶柱纯化，得到中间产物 7。中间产物 7 的氢谱检测结果如图 6 所示。

（7）中间产物 7 在乙醇和水的混合溶液（体积比为 1:2）中，与 LiOH 在室温条件下发生水解反应，生成中间产物 8：

在 250 mL 的单口瓶中，称取 3.8 g 中间产物 7（5 mmol）和 0.5 g LiOH（20 mmoL）溶解于 100 mL 的乙醇和水的混合溶液（体积比为 1:2）中，室温条件下搅拌 5 h。

通过 TLC 检测反应进度，待反应完全后，旋干乙醇后用 2 M 盐酸酸化至 pH 约为 2，使用 DCM 分 3 次萃取，每次 100 mL。合并所有有机相，用 50 mL 饱和碳酸氢钠洗脱有机相，干燥浓缩后过硅胶柱纯化，得到中间产物 8。

（8）中间产物 8 在 DCM 溶液中，在 DMAP 及 DCC 的作用下，与 9-十七醇在室温条件下发生酯化反应，生成所述阳离子脂质化合物 TM3：

在 250 mL 的单口瓶中，称取 3.6 g 中间产物 8（5 mmol）、1.8 g DMAP（15 mmol）和 4.6 g 9-十七醇（18 mmol）溶解于 60 mL 的 DCM 中，搅拌 5 min，加入 3.1 g DCC（15 mmol），室温条件下搅拌过夜。

通过 TLC 检测反应进度，待反应完全后，分 3 次水洗，每次 60 mL。再用饱和碳酸氢钠分 2 次清洗，每次 50 mL。干燥浓缩后过硅胶柱纯化，得到所述阳离子脂质化合物 TM3。TM3 的氢谱检测结果如图 7 所示。

上述反应中，各个步骤获得的产物的质量及得率的统计结果如表 1 所示。

表 1 各个步骤获得的产物的质量及得率的统计结果

产物	质量（g）	得率（%）
中间产物 2	4.7	94
中间产物 3	3.7	62
中间产物 4	1.0	67
中间产物 5	1.9	82
中间产物 6	1.8	81
中间产物 7	1.8	60
中间产物 8	3	83
TM3	3.3	70

制备例 2

本制备例提供一种药物 TP1，其中为核酸药物为编码 SARS-CoV-2 病毒刺突糖蛋白（S 蛋白）mRNA，通过如下方法进行制备：

称取 1.64 mg HSPC、1.83 mg 胆固醇和 0.89 mg DSPE-PEG2000，在 60℃条件下溶解于 1 mL 无水乙醇中，制备为储备液。

在室温条件下向储备液中加入 13.41 mg TM3，混合，得到脂质醇相。

将 1.6 mL 1 mg/mL 的 mRNA 溶解于 1.4 mL pH 4.0 的 D-柠檬酸溶液中，混合均匀，制备为核酸水相。

将 1 mL 脂质醇相与 3 mL 核酸水相在室温下通过混合器混合，制备为药物中间品。

将该中间品通过透析装置去除乙醇和柠檬酸，并置换为含 0.4%氯化钠、5%蔗糖的浓度为 20 mM 的 Tris 溶液，制备为药物 TP1。

性能测试

对制备例 2 制备的药物 TP1 进行性能测试，具体包括粒径检测、分散程度检测和包封率检测。

粒径及分散程度检测

使用激光散射粒度分析仪（PCS，丹东百特 BeNano 180 Zeta pro 激光粒度仪）测定纳米粒子粒径大小及分散程度（PDI），使用 671 nm 固体激光器为入射光，动力学光散射试验在 25℃进行，散射光路采用 173°背散射检测。连续检测 3 次的平均值作为检测数据。

包封率检测

包封率检测采用荧光定量的检测方法，使用 Quant-it™ RiboGreen RNA Assay Kit 作为检测试剂盒。加入 Triton 破乳后释放制剂中核酸，加入特异性核酸染料 ribogreen，通过 ALLSHENG Feyond-A300 酶标仪，设置激发光波长为 470 nm，发射光波长为 525 nm，检测样品吸光度值，通过标准曲线计算总核酸含量；进一步，通过不加 Triton 处理的 LNP 样品，加入特异性核酸染料 ribogreen，通过 ALLSHENG Feyond-A300 酶标仪，设置激发光波长为 470 nm，发射光波长为 525 nm，检测样品吸光度值，通过标准曲线计算游离核酸含量，公式如下：

包封率=(总核酸含量-游离核酸含量)/总核酸含量×100%。

粒径、分散以及包封率的检测结果如表 2 所示。

表 2 TP1 的粒径、分散以及包封率的检测结果

药物	N/P	TM3	HSPC	胆固醇	DSPE-PEG2000	粒径	PDI	包封率
TP1	6	66.4%	9.8%	22.3%	1.5%	169 nm	0.07	88%

由表 2 可以看出，按照制备例 2 的配方和方法制备得到的药物 TP1 的平均粒径为 169nm，PDI 为 0.07. 具有适宜的粒径大小和均一的粒径分布，同时也具有较高的包封率，表明其具有良好的载药能力，为后续的实际应用创造了条件。

制备例 3

本制备例提供了七种药物的制备，其中核酸药物为编码荧光素酶的 mRNA。 具体的脂质处方信息如表 3 所示。

表 3. 七种含 TM3 的 LNP 药物的脂质处方信息

	HG-06	HG-10	HG-21	HG-23	HG-25	HG-28	HG-30
TM3	65.5%	64%	65%	29.7%	29.67%	40.52%	40.52%
HSPC	13%	6.7%	13.05%	10.47%	10.59%	14.28%	14.28%
胆固醇	20%	27%	19.65%	58.32%	58.27%	44.51%	44.51%
DMG-PEG	1.5%	1.5%	2.31%	1.51%	1.47%	0.69%	0.69%

制备方法：根据以上处方，准确称取脂质，加入无水乙醇，在磁力搅拌器上，搅拌溶解。mRNA 原液加入计算量的 pH=4 的柠檬酸盐缓冲液，混合均匀。用注射器吸取上述脂质

乙醇溶液和 mRNA-柠檬酸盐缓冲液水溶液，使用 LNP 混合泵，启动后收集稳定混合阶段的溶液。将上述混合后 mRNA-LNP 中间品加入透析袋，加入 4℃预冷的透析缓冲液，放置于 2-8℃冰箱， 200rpm 搅拌透析过夜。使用 0.22um 无菌针式过滤器（Millipore）过滤除菌，放置于无菌无酶离心管。

使用 Ribogreen 检测试剂（thermo）检测过滤后 mRNA-LNP 的 mRNA 载量和包封率。使用 PCS 检测仪检测过滤后 mRNA-LNP 的 zeta 平均粒径。检测结果如表 4 所示。

表 4 七种含 TM3 的药物的粒径以及包封率的检测结果

	HG5-06	HG5-10	HG5-21	HG5-23	HG5-25	HG5-28	HG5-30
载药量 (wt.)	5.75%	4.64%	4.52%	2.81%	4.52%	5.65%	1.32%
包封率	98.6%	96.3%	>97.0%	99.0%	98.6%	99.0%	98.5%
平均粒径	82.23	106.25	110.12	59.32	80.62	122.84	145.86
PDI	0.046	0.056	0.039	0.076	0.006	0.039	0.042

冷冻电镜：（取 2.5 μL LNP 溶液滴上 grid (Quantifoil Cu R1.2/1.3, 300 mesh),，用 Vitrobot Mark IV (ThermoFisher Scientific) 制备冷冻电镜样品。用 Talos F200C equipped with a Ceta 4k × 4k camera 成像。药物 HG5-06 的冷冻电镜图片如图 10 所示。药物 HG5-023 的冷冻电镜图片如图 11 所示。

制备例 4

采用与制备例 3 相似的方法，本制备例提供了含有 TM6 和 TM7 的药物的制备，其中核酸药物为编码 SARS-CoV-2 病毒刺突糖蛋白（S 蛋白）mRNA。TM7 的核磁共振图谱如图 12 所示。

制备所得的 LNP 的处方信息和粒径和包封率信息如表 5 所示。

表 5 含 TM6 和 TM7 的药物及粒径等检测结果

	Cationic lipid	HSPC	Chol	PEG-DMG	包封率	粒径	PDI

HG5-06-TM6	50%	10%	38.5%	1.5%	95.26	117.94	0.085
HG5-21-TM6	65%	13.05%	19.65%	2.31%	85.46	164.12	0.041
HG5-23-TM6	29.7%	10.47%	58.32%	1.51%	98.44	88.21	0.097
HG5-06-TM7	50%	10%	38.5%	1.5%	96.95	107.11	0.065
HG5-21-TM7	65%	13.05%	19.65%	2.31%	77.57	202.03	0.121
HG5-23-TM7	29.7%	10.47%	58.32%	1.51%	98.9	76.28	0.055

实施例 1

本实施例对制备例 2 制备的药物 TP1 在体外培养细胞内的表达量进行检测，步骤如下：

（1）细胞的培养和收集：

人胚肾细胞株 293 衍生株 293T 细胞系由实验室传代获得，采用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基培养，每周传代 2~3 次。取细胞密度约为 80%的细胞进行铺板，细胞计数后使用培养基调整细胞浓度为 2×10^5/mL，在 48 孔板中，每孔加入 0.5 mL 上述细胞液，即每孔细胞数量约为 1×10^5。每组设置 3 个复孔，空白对照组也设置 3 个复孔。

（2）细胞与药物共孵育：

根据 mRNA 的荧光检测总 mRNA 浓度，每孔加入含 1 μg mRNA 的药物，分别孵育 18、24、48 和 72 h，观察不同孵育时间内蛋白的表达量。

（3）蛋白表达检测：

将细胞培养板在 800 g 下离心 5 min，取上清，分别用 ddH_2O 稀释 10 倍、50 倍和 100 倍，制备为待测样品。根据表达的蛋白，以 SARS-CoV-2 病毒刺突糖蛋白（S 蛋白）为标准品绘制标准曲线，采用 ELISA 方法进行检测。

（4）结果分析：

用待测样品的 OD 值减去空白对照的 OD 值，以校准标准曲线的吸光度值。以标准浓度为 x 轴绘制标准曲线，根据标准曲线计算样本 OD 值所对应的 S 蛋白的浓度。

药物 TP1 在 293T 细胞内蛋白表达量的检测结果如图 8 所示。由图 8 可以看出，药物 TP1 能够有效地转入 293T 细胞中并表达 S 蛋白，并且随着孵育时间的增加，表达量也持续增加，且蛋白的表达量也与剂量呈正相关。上述结果表明 LNP 载体可以将药物

转入细胞中并释放，从而用于相关疾病的治疗中，具有实际应用的价值。

实施例 2

本实施例对制备例 2 制备的药物 TP1 在体内的免疫原性进行检测，步骤如下：

取 6 只 6~8 周的雌性 BALB/c 小鼠，分别在第 1 天和第 14 天通过肌肉（i.m.）注射药物 TP1。在首次给药后第 10、21、28 和 35 天用 ELISA 方法检测小鼠血清中的抗 S 蛋白抗体滴度。

小鼠血清中抗 S 蛋白抗体滴度的检测结果如图 9 所示。由图 9 可以看出，在首次给药后第 10 天已有抗体产生，在第 14 天给予加强针后，第 21 天抗体表达量有显著增加，并且随着时间的推移持续表达，第 35 天时仍有表达。上述结果表明，所述药物可以有效激活动物的免疫应答，给药后动物体内的抗体滴度有显著提升，因而可作为疫苗，刺激机体产生相应的免疫应答，效果显著。

实施例 3

本实施例对制备例 4 中的不同处方的 TM6 药物和 TM7 药物在细胞和动物模型中的药效进行了考察。

制剂体外细胞转染活性评价：于 37℃融化冻存的细胞，并移到 5 mL 培养液中，1000 rpm 离心 5 min 后弃去上清并用培养液重悬细胞，取 10μL 用台泮蓝染色后计数/活率并将余下细胞悬液移到细胞培养瓶中，放置于 37℃培养箱静置培养。待细胞增长至约 90%丰度时，消化离心收集细胞，重悬后计数，调整细胞浓度为 2*10^5/ml,48 孔板（corning）每孔加入 0.5ml 细胞悬液。根据具体实验进行设组，每组设置 3-4 个复孔。每孔加入 1ug mRNA 对应的 mRNA-LNP, 给药后吹摇细胞培养板，放回细胞培养相继续培养。细胞培养 24 小时候，将细胞培养上清液移取到相应 EP 管中，1300 rpm 离心 5 min 后用于检测。

报告基因浓度检测：将上述细胞培养收集样品按照一定比例稀释，稀释比例通过预实验确定。稀释后样品采用 Elisa kit 检测。

附图 14 对多种脂质处方的 TM6 和 TM7 药物的细胞转染效果进行了比较，并与含有 TM3 的类似脂质处方的药物进行了对照，含有 TM6 和 TM7 的药物的转染活性略高于含有 TM3 的药物。但是 HG-23 号脂质处方的 TM3 药物活性也很高。总的来说，TM 系列的阳离子构成的 LNP，虽然在不同的脂质配比条件下粒径有一定的差别，但是细胞转染活性均表现较好。

我们进一步地对这些药物的小鼠体内免疫效果进行了评价。 动物模型为 6-8 周雌

性 Balb/c 小鼠，饲养于 SPF 级动物饲养中心。根据试验方案，i.m.给药，每组 n=6，每只给药量为 10ug。免疫二周后，通过麻醉后眼眶采血，收集 50ul 左右全血于 1.5mL EP 管中，室温放置 0.5h 后 7000g 离心 10min, 收集按照一定比例稀释后，采用（SARS-Cov2-2 Spike RBD Antibody Titer Assay Kit(mouse) SinoBiological）检测 OD 值。结果见附图 15。

根据小鼠实验的结果分析，三种不同结构的脂质及其处方诱导抗 COVID S 蛋白的抗体的滴度相当，其中 TM6 的 HG-06 号处方和 TM7 的 HG-23 号处方均表现优异，具有临床开发价值。

实施例 4：TMEA 为 CN 105085292 B 中公开的阳离子脂质结构，与 TM3 的亲水和可电离端基相同，都是 3-((2-(二甲氨基)乙烷基)(甲基)氨基)丙酸，但疏水结构不同。所以我们对其构建的载 mRNA LNP 进行了对比。表 6 比较了三种不同的脂质处方，可以看到，TM3 得到的 LNP 的体内蛋白表达活性都远好于 TMEA LNP。

体内蛋白表达实验选用 6-8 周 Balb/c 小鼠，每只小鼠静注给药 10ug 核酸的 LNP 药物，于给药后 6 小时取血样，用 Elisa 试剂盒检测血清中的蛋白含量。

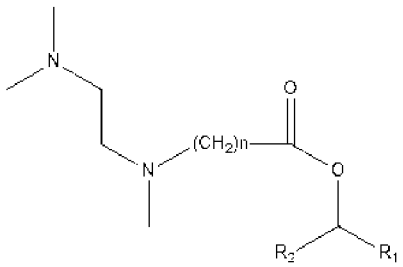
表 6. TMEA 和 TM3 脂质的比较研究

	TMEAa	TMEAb	TMEAc	TM3a	TM3b	TM3c
TMEA	50.0%	40.0%	65.5%	/	/	/
TM3	/	/	/	50.0%	40.0%	65.5%
DSPC	10.0%	18.5%	13.0%	10.0%	18.5%	13.0%
CHOL	38.5%	40.0%	20.0%	38.5%	40.0%	20.0%
DMG-PEG2000	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
粒径（nm）	107.45	99.23	89.54	81.79	70.97	62.11
PDI	0.096	0.145	0.191	0.054	0.104	0.088
包封率	95.16%	94.08%	97.50%	96.94%	96.89%	98.91
体内蛋白表达（ng/ml）	942±488	753±195	229±43	7861±3004	2454±691	1211±622

本具体实施例仅仅是对本申请的解释，其并不是对本申请的限制，本领域技术人员在阅读完本说明书后可以根据需要对本实施例做出没有创造性贡献的修改，但只要在本申请的权利要求范围内都受到专利法的保护。

权利要求

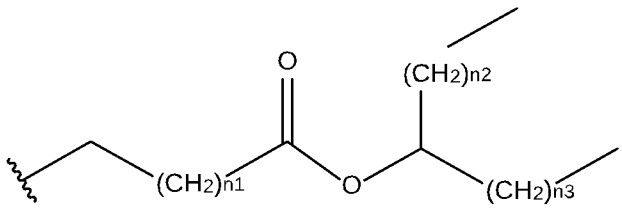
1. 阳离子脂质化合物，其特征在于，所述阳离子脂质化合物包括式 I 所示的化合物；



式 I；

式 I 中，n=1、2、3 或 4；

R_1 和 R_2 各自独立地选自式 II 所示的二级长链烷基酯；



式 II；

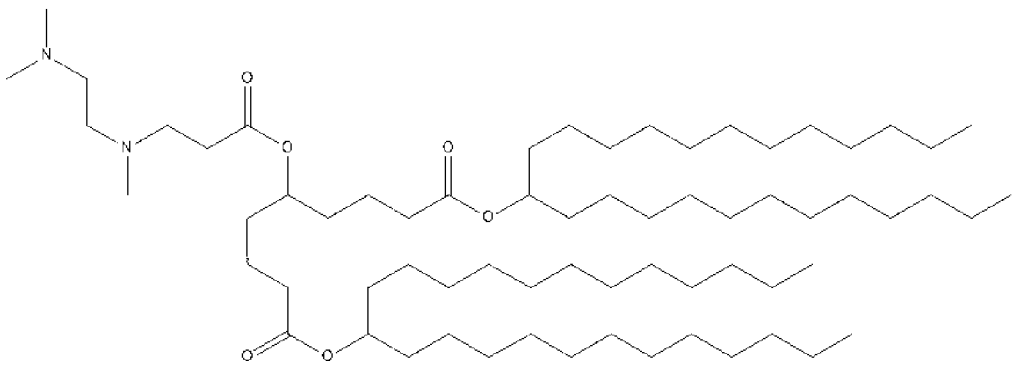
式 II 中，n_1=2、4 或 6；n_2=5、7、9 或 11；n_3=5、7、9 或 11；波浪线代表式 II 与式 I 中其他部分的连接点。

2. 根据权利要求 1 中任一项所示的阳离子脂质化合物，其中 n = 1、2 或 3。

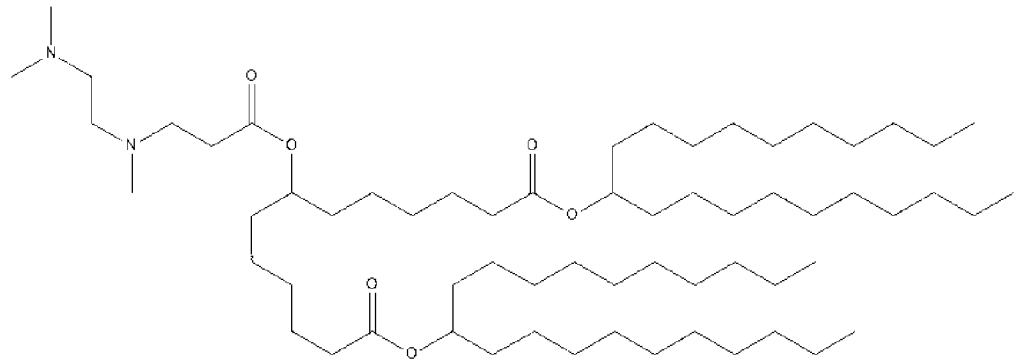
3. 根据权利要求 1 或 2 中任一项所示的阳离子脂质化合物，其中 n =2。

4. 根据权利要求 1 到 3 中任一项所示的阳离子脂质化合物，其中 R_1 中的 n1 与 R_2 中的 n1 值相同。

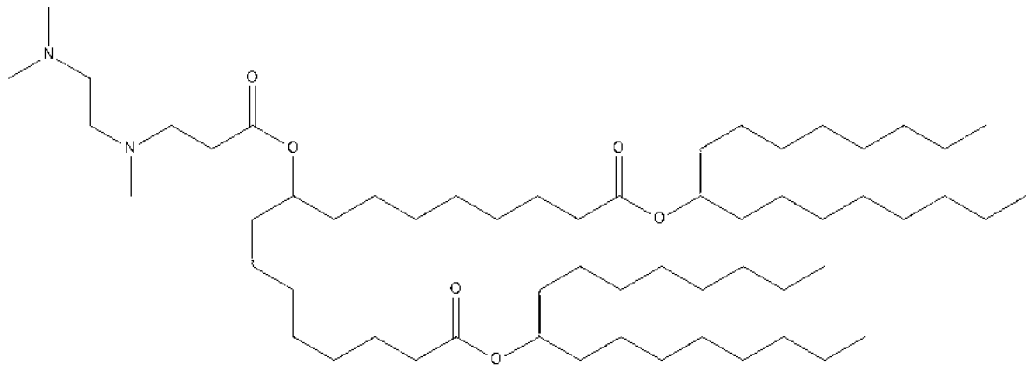
5. 根据权利要求 1 所示的阳离子脂质化合物，其特征在于，所述阳离子脂质化合物包括式 III、式 IV、式 V、式 VI、式 VII、式 VIII 或式 IX 所示的化合物；



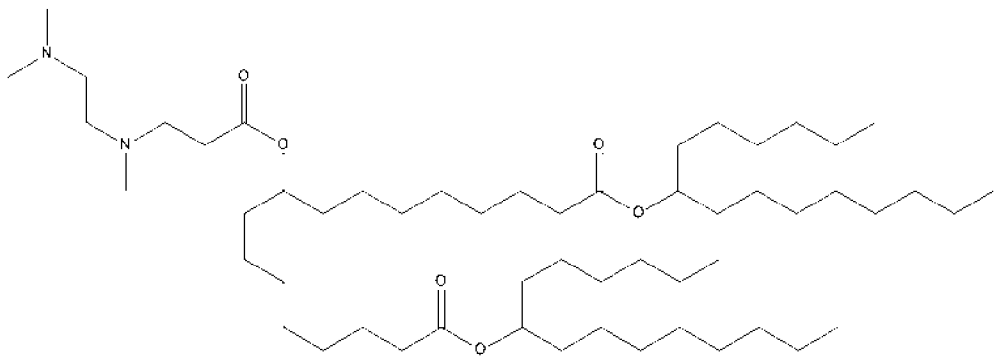
式 III；



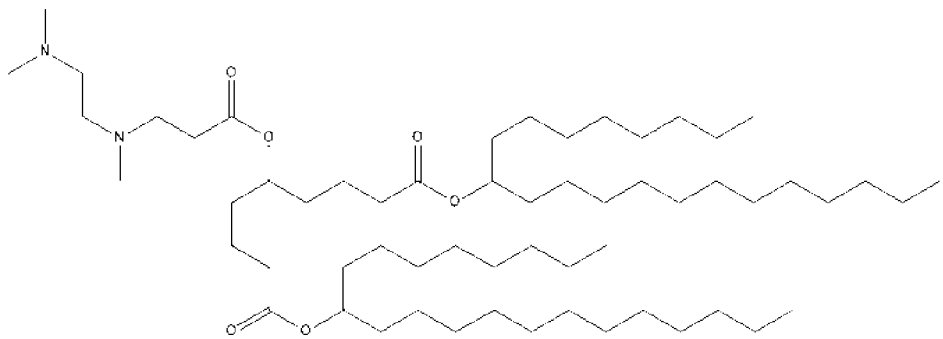
式 IV；



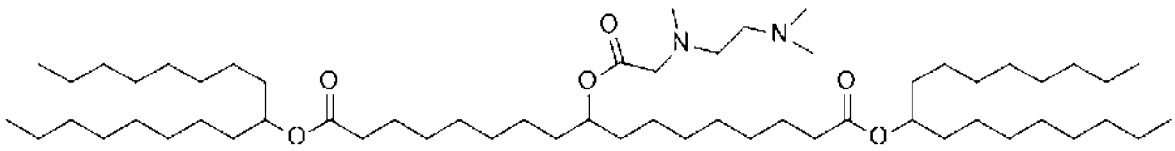
式 V；



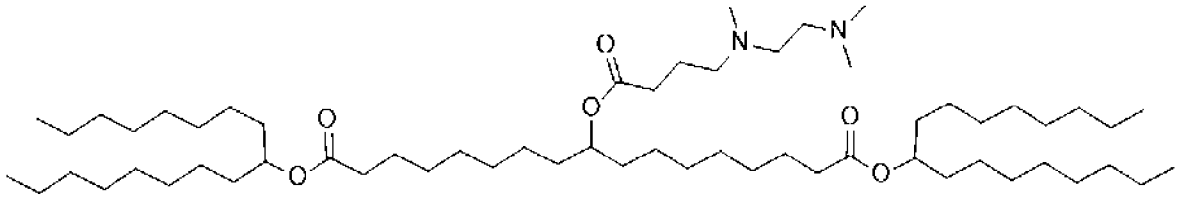
式 VI；



式 VII



式 VIII



式 IX。

6. 如权利要求 1 到 5 中任一项所述的阳离子脂质化合物的制备方法，其特征在于，所述阳离子脂质化合物的制备方法包括以下步骤：

以溴代酯类化合物为原料，依次进行烷基化反应、还原反应，

再与酰氯类化合物发生缩合反应，依次进行两步取代反应和一次水解反应，最后与一元仲醇类化合物进行酯化反应，制得所述阳离子脂质化合物。

7. 一种 LNP 载体，其特征在于，所述 LNP 载体含有权利要求 1 到 5 中任一项所述的阳离子脂质化合物中的任意一种或至少两种的组合。

8. 根据权利要求 7 所述的 LNP 载体，其特征在于，以摩尔分数计，所述 LNP 载体包括阳离子脂质化合物 15%~70%；

优选的，以摩尔分数计，所述 LNP 载体还包括磷脂 5%~40%和胆固醇 10%~65%。

9. 一种药物，其特征在于，所述药物包括权利要求 7 或 8 所述的 LNP 载体。

10. 根据权利要求 9 所述的药物，其特征在于，所述药物还包括核酸药物；

优选地，所述药物中，LNP 载体中的阳离子脂质化合物的氮含量与核酸药物中的磷含量的摩尔比为 2:1 到 15:1。

11. 根据权利要求 10 所述的药物，其中 LNP 载体中的阳离子脂质化合物的氮含量与核酸药物中的磷含量的摩尔比为 4:1 到 6:1。

12. 根据权利要求 9 所述的药物，特征在于，所述药物还包括核酸药物；

优选地，所述药物中，核酸药物在含药 LNP 中的质量分数（载药量）在 1.0-15.0%之间。特别优选的，核酸药物的载药量在 3.0-8.0 wt.%之间。

13. 如权利要求 9 到 12 中任一项所述的药物的制备方法，其特征在于，所述药物

的制备方法包括以下步骤：

称取除阳离子脂质化合物外的其它组分，溶解，制成储备液；

向所述储备液中加入阳离子脂质化合物，混合，得到脂质醇相；

稀释核酸药物，制成核酸水相；

将所述脂质醇相和核酸水相混合，制成药物中间品，透析，得到所述药物。

14. 一种疫苗，其特征在于，所述疫苗包括权利要求 7 或 8 所述的 LNP 载体。

15. 如权利要求 1 到 5 中任一项所述的阳离子脂质化合物在制备 LNP 载体、药物或疫苗中的应用，或权利要求 7 或 8 所述的 LNP 载体在制备药物和/或疫苗中的应用。

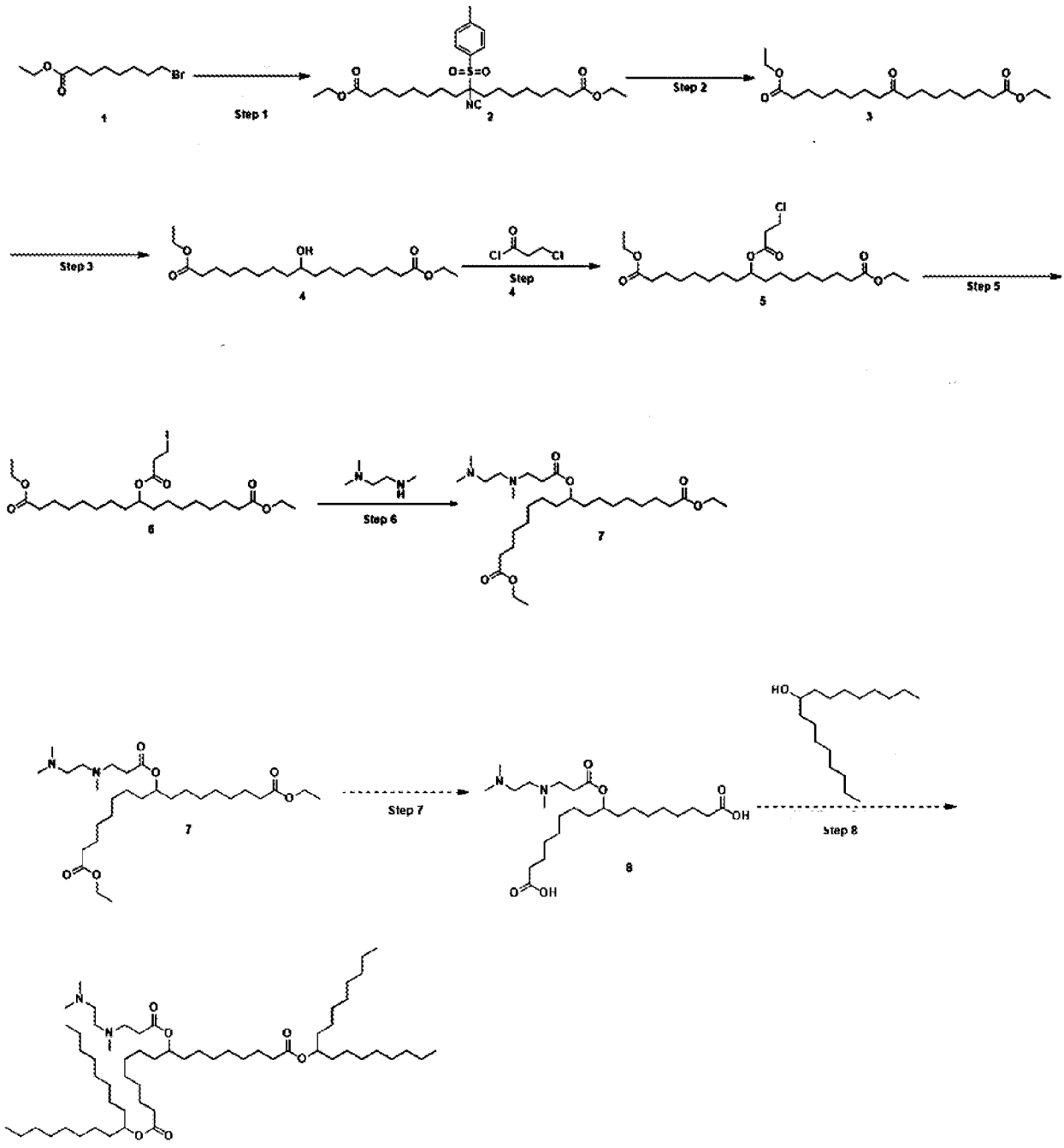

Br
1
Step 1
O=S=O
NC
2
Step 2
3
Step 3
OH
4
Cl
Cl
Step 4
Cl
5
Step 5
6
Step 6
7
7
Step 7
8
OH
OH
HO
Step 8

图 1

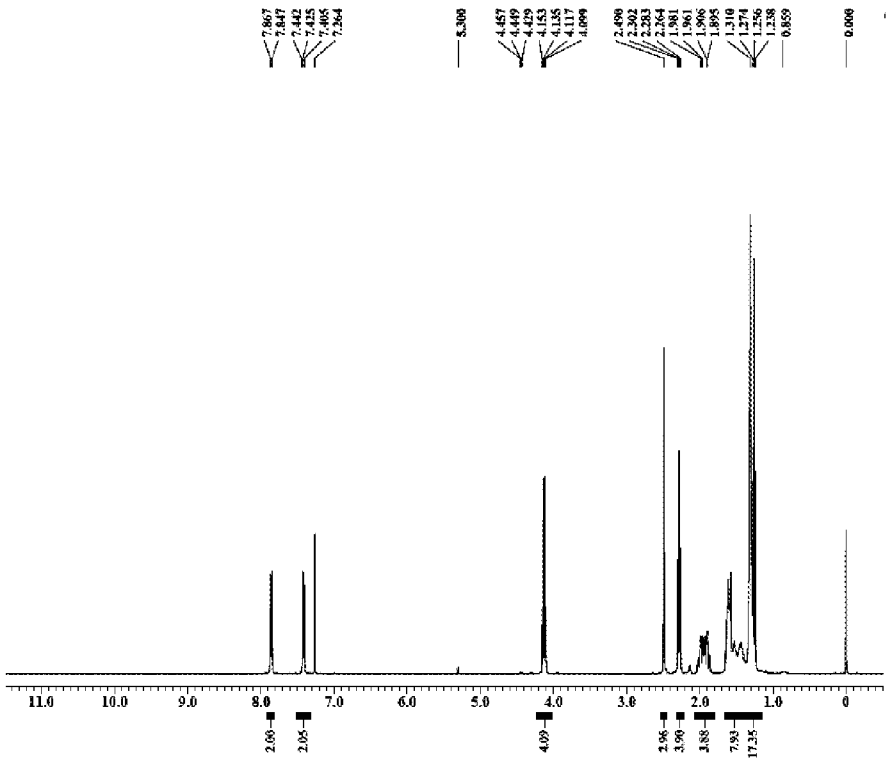


图 2

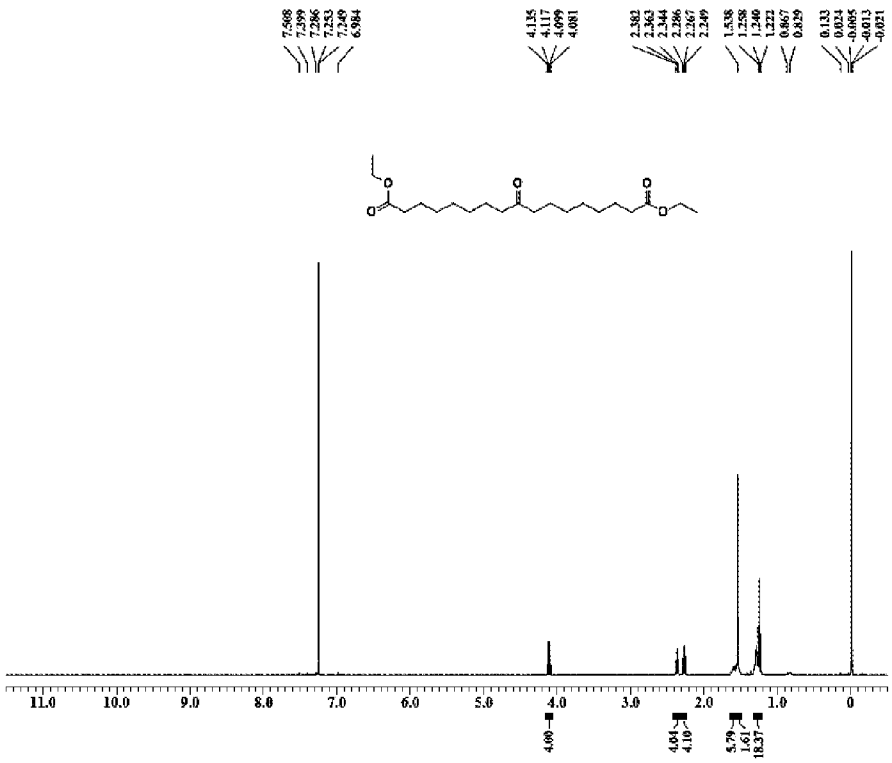


图 3

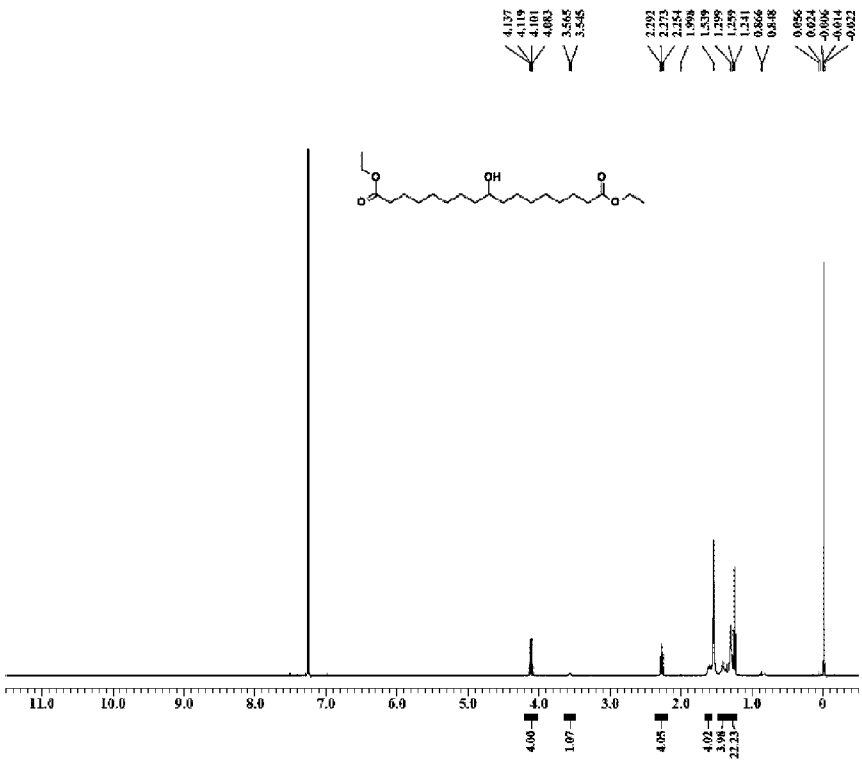


图 4

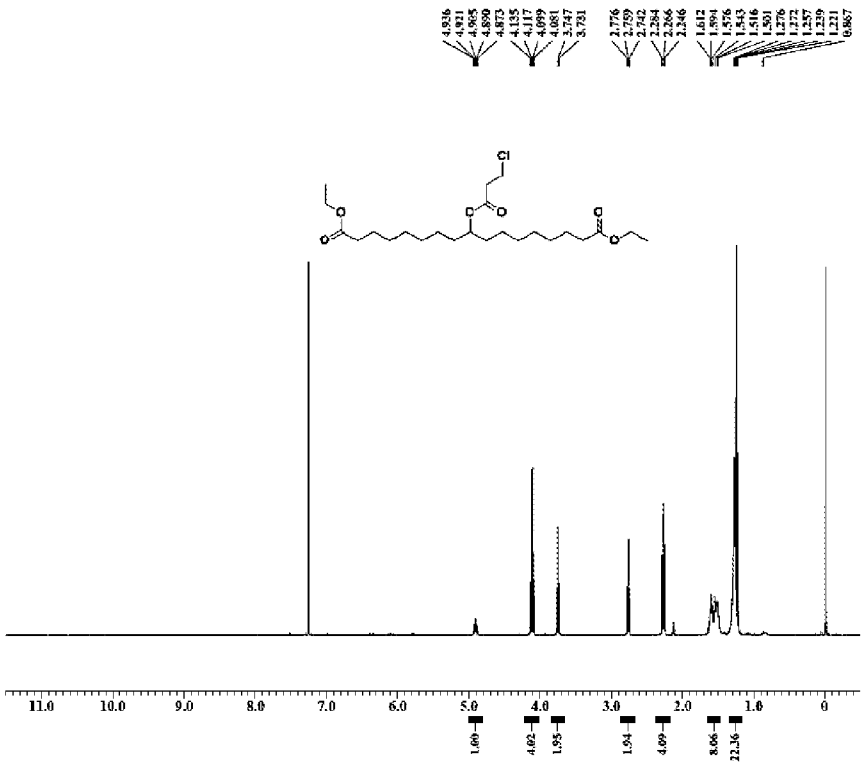


图 5

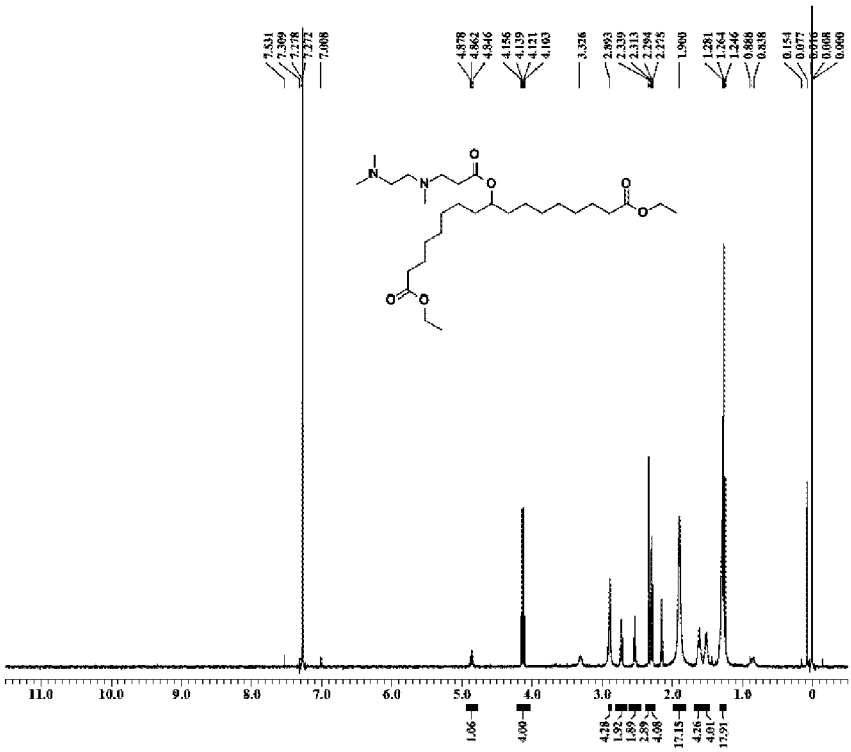


图 6

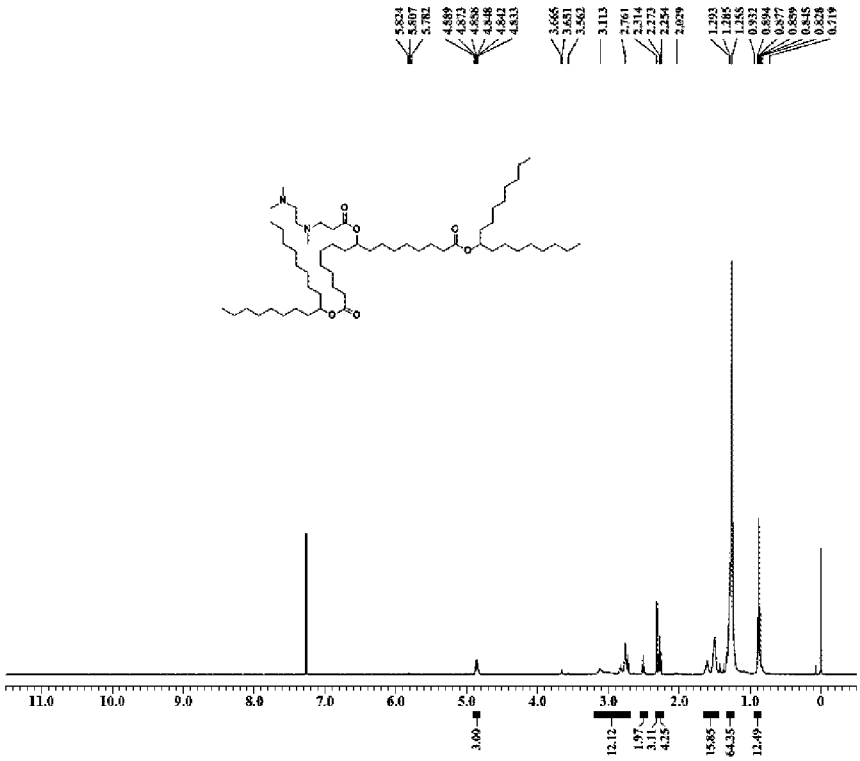


图 7

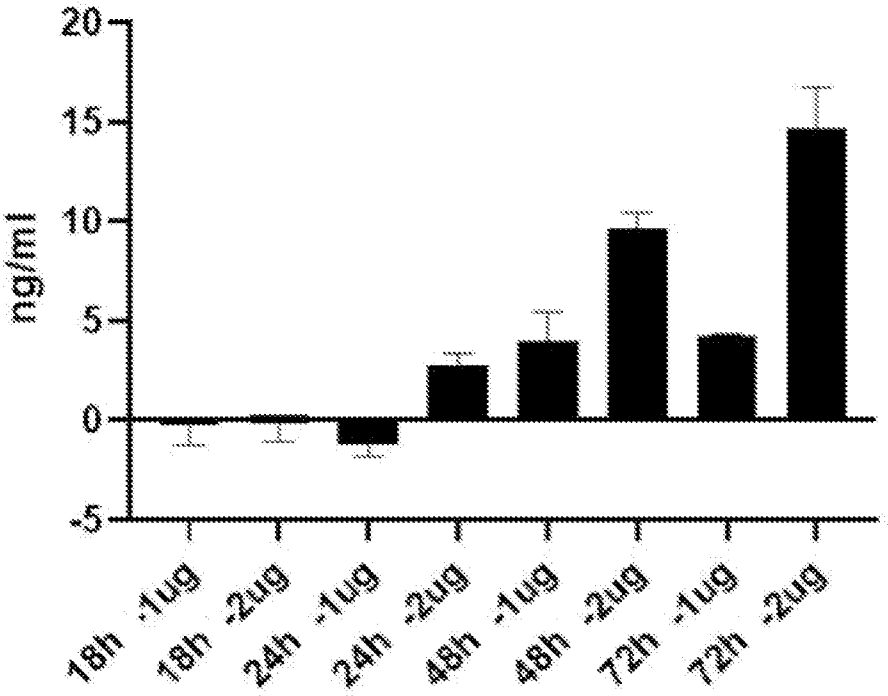

20
15
10
5
0
-5
ng/ml
18h .1u9
18h .2u9
24h .1u9
24h .2u9
48h .1u9
48h .2u9
72h .1u9
72h .2u9

图 8

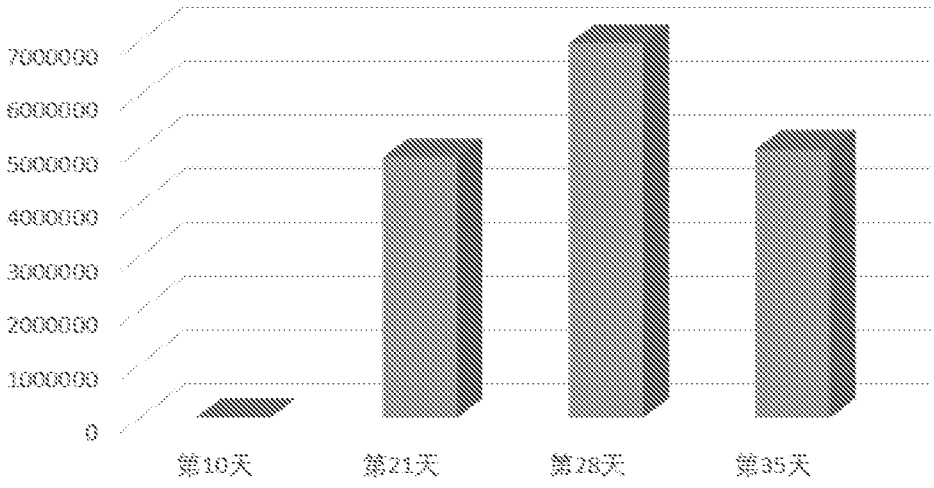

7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
第14天
第21天
第28天
第35天

图 9

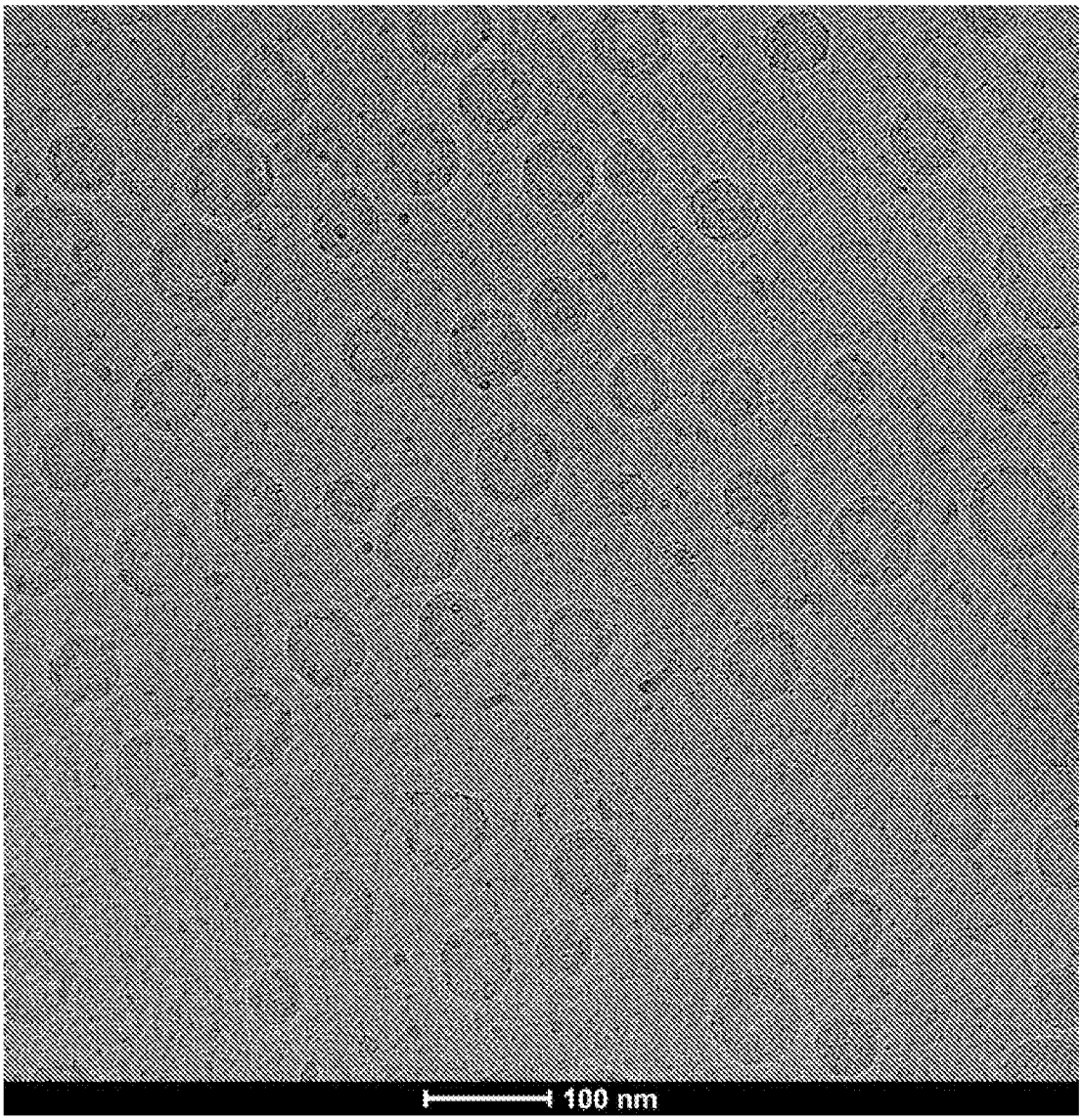


图 10

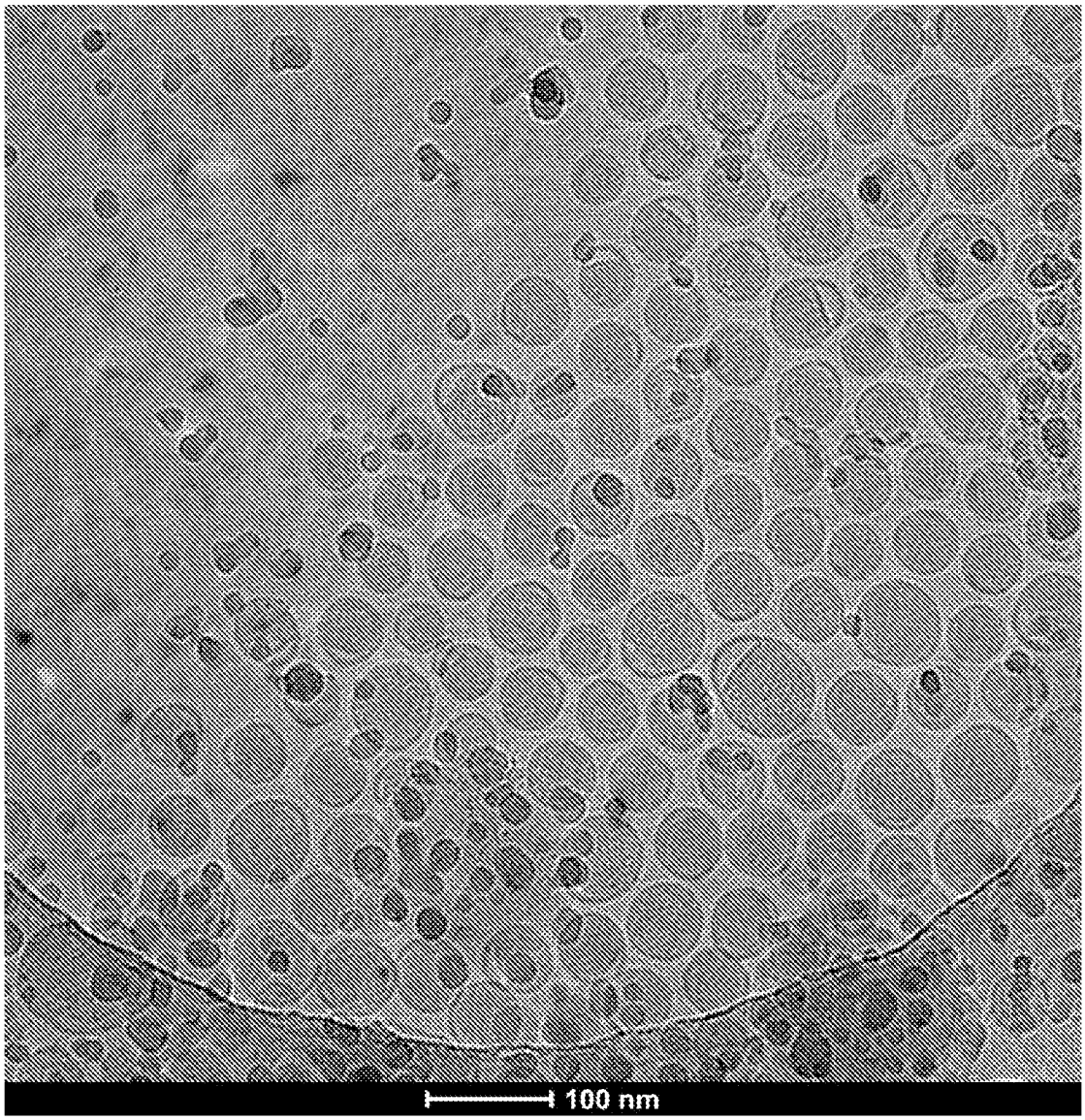


图 11

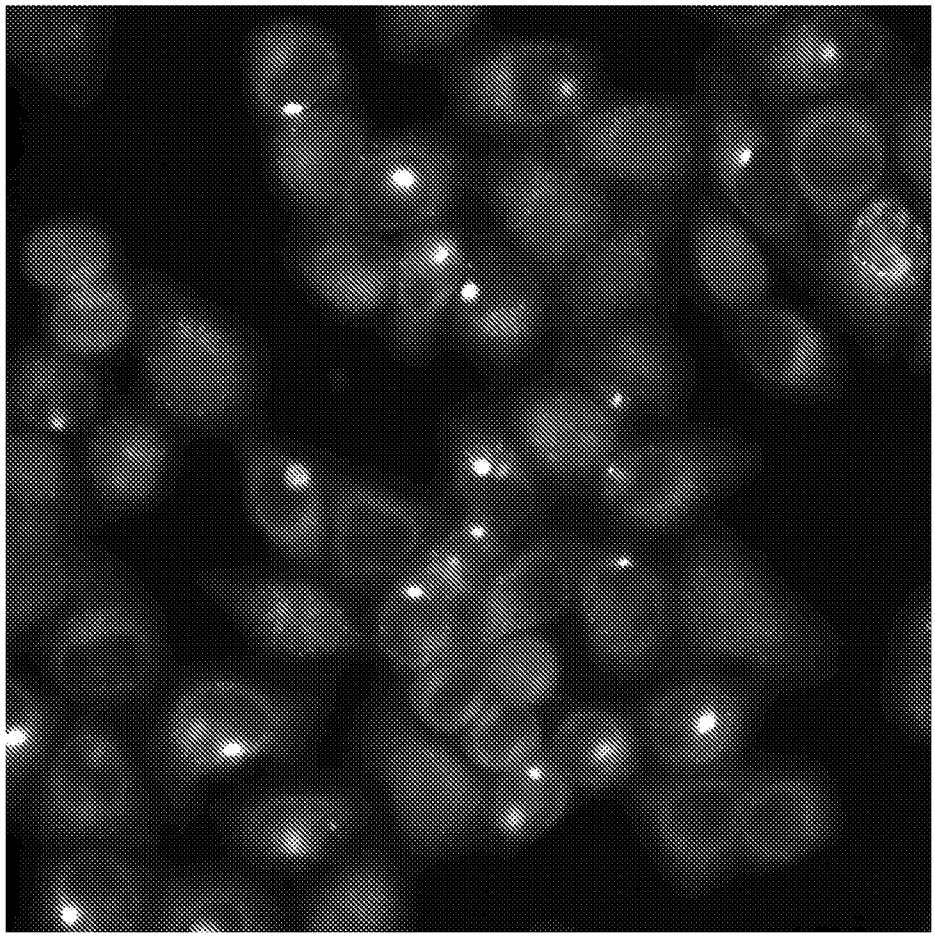


图 12

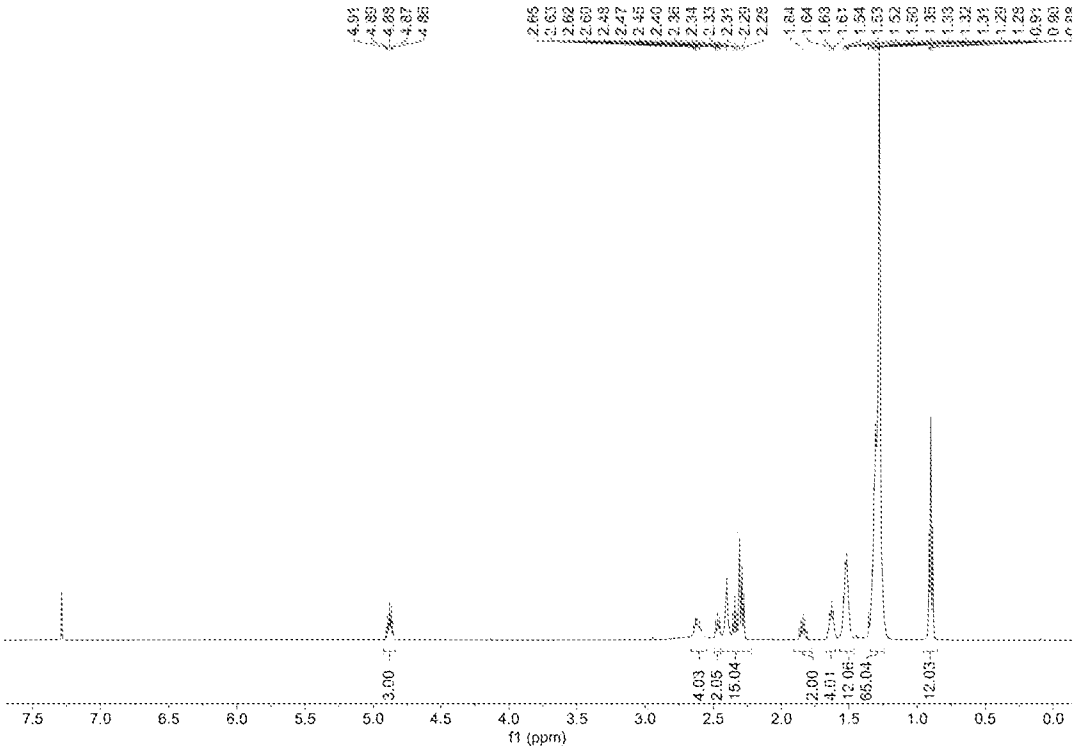

f1 (ppm)

图 13

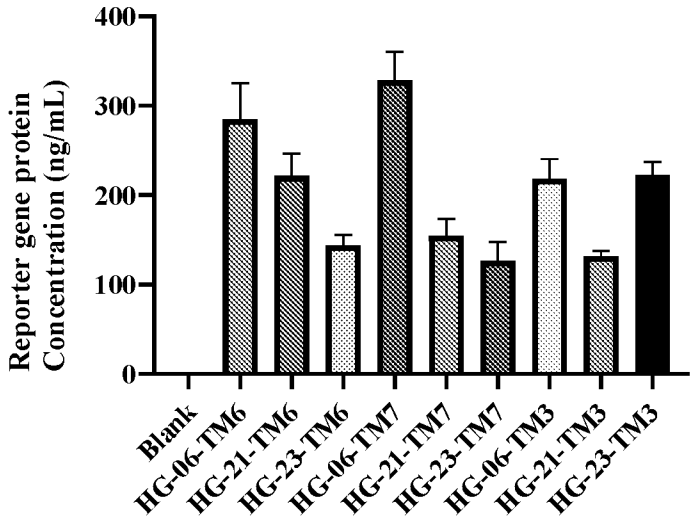

Reporter gene protein Concentration (ng/mL)
400
300
200
100
0
Blank
HG-06-TM6
HG-21-TM6
HG-23-TM6
HG-06-TM7
HG-21-TM7
HG-23-TM7
HG-06-TM3
HG-21-TM3
HG-23-TM3

图 14

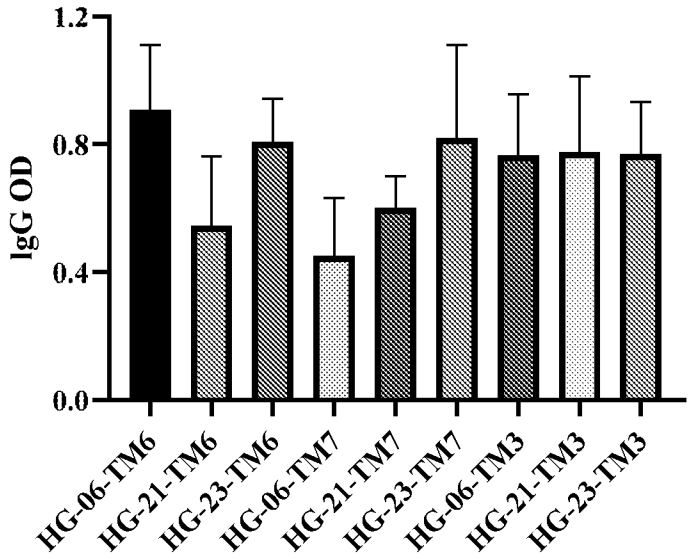

1.2
0.8
0.4
0.0
IgG OD
HG-06-TM6
HG-21-TM6
HG-23-TM6
HG-06-TM7
HG-21-TM7
HG-23-TM7
HG-06-TM3
HG-21-TM3
HG-23-TM3

图 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/099945

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07C229/16(2006.01)i; C07C227/06(2006.01)i; A61K9/127(2006.01)i; A61K48/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07C229; C07C227; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNTXT; DWPI; ENTXT; STN(REG, CAPLUS): 杭州高田, 脂质, 核酸, 阳离子, 脂质纳米粒, LNP, lipid, liposome, nanoparticle, cationic, nucleic acid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101643418 A (HUNAN SHINEWAY ENTERPRISE CO., LTD.) 10 February 2010 (2010-02-10) entire document	1-15
A	CN 102625696 A (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC.) 01 August 2012 (2012-08-01) entire document	1-15
A	CN 103096875 A (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC.) 08 May 2013 (2013-05-08) entire document	1-15
A	CN 104321304 A (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS, INC.) 28 January 2015 (2015-01-28) entire document	1-15
A	CN 105085292 A (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY) 25 November 2015 (2015-11-25) claims 1-6, and description, paragraphs 0017-0018 and 0008	1-15
A	CN 111164068 A (TOSHIBA CORP.) 15 May 2020 (2020-05-15) entire document	1-15

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 September 2023	**22 September 2023**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 113164379 A (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC.) 23 July 2021 (2021-07-23) entire document	1-15
A	US 2004077888 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA et al.) 22 April 2004 (2004-04-22) entire document	1-15
A	US 2021198200 A1 (MODERNATX INC.) 01 July 2021 (2021-07-01) entire document	1-15
A	WO 2021030701 A1 (ACUITAS THERAPEUTICS INC.) 18 February 2021 (2021-02-18) entire document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/099945

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 101643418 A	10 February 2010	None	
CN 102625696 A	01 August 2012	US 2012183602 A1	19 July 2012
		US 8802644 B2	12 August 2014
		PT 2440183 T	30 October 2018
		SG 10201912450 XA	30 March 2020
		EP 3431076 A1	23 January 2019
		EP 3431076 B1	06 October 2021
		KR 20200006176 A	17 January 2020
		KR 102205886 B1	21 January 2021
		JP 2015232048 A	24 December 2015
		JP 6132321 B2	24 May 2017
		AU 2019204984 A1	01 August 2019
		AU 2019204984 B2	28 January 2021
		LT 2440183 T	10 August 2018
		JP 2018141019 A	13 September 2018
		JP 6592144 B2	16 October 2019
		KR 20170091798 A	09 August 2017
		KR 101987962 B1	11 June 2019
		MX 2011013320 A	28 February 2012
		EA 201791744 A2	30 March 2018
		EA 201791744 A3	31 July 2018
		CA 2764609 A1	16 December 2010
		CA 2764609 C	02 October 2018
		DK 3431076 T3	20 December 2021
		MX 342785 B	12 October 2016
		PL 3431076 T3	31 January 2022
		HUE 056773 T2	28 March 2022
		HK 1212620 A1	17 June 2016
		US 2015166465 A1	18 June 2015
		US 9394234 B2	19 July 2016
		ES 2689168 T3	08 November 2018
		PT 3431076 T	26 October 2021
		WO 2010144740 A1	16 December 2010
		CY 1120641 T1	11 December 2019
		SI 3431076 T1	29 April 2022
		HRP 20181221 T1	05 October 2018
		JP 2017122126 A	13 July 2017
		JP 6359719 B2	18 July 2018
		NZ 596958 A	30 April 2014
		SG 10201403054 SA	30 October 2014
		JP 2012530059 A	29 November 2012
		JP 5819291 B2	24 November 2015
		PL 2440183 T3	31 January 2019
		IL 290077 A	01 March 2022
		DK 2440183 T3	01 October 2018
		EP 2440183 A1	18 April 2012
		EP 2440183 A4	27 February 2013
		EP 2440183 B1	18 July 2018
		TR 201811076 T4	27 August 2018
		NZ 622843 A	30 October 2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/099945

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		KR	20120081065	A	18 July 2012
		KR	101766408	B1	10 August 2017
		KR	20230098713	A	04 July 2023
		LT	3431076	T	25 October 2021
		NZ	712719	A	31 March 2017
		KR	20190065474	A	11 June 2019
		KR	102066189	B1	14 January 2020
		EA	201190306	A1	30 January 2013
		EA	024960	B1	30 November 2016
		HRP	20211619	T1	04 February 2022
		CA	3014827	A1	16 December 2010
		KR	20210008938	A	25 January 2021
		KR	102374518	B1	16 March 2022
		IL	244945	A0	31 May 2016
		IL	244945	B	30 June 2020
		AU	2021201228	A1	11 March 2021
		AU	2021201228	B2	07 July 2022
		KR	20220038506	A	28 March 2022
		HUE	038796	T2	28 November 2018
		IL	274826	A	30 July 2020
		US	2010324120	A1	23 December 2010
		US	8158601	B2	17 April 2012
		EA	201690312	A1	31 August 2016
		EA	028860	B1	31 January 2018
		SI	2440183	T1	30 October 2018
		MX	2019010340	A	14 October 2019
		AU	2010259984	A1	12 January 2012
		AU	2010259984	B2	09 March 2017
		US	2017143631	A1	25 May 2017
		AU	2017202702	A1	18 May 2017
		AU	2017202702	B2	02 May 2019
		SG	176786	A1	30 January 2012
		ES	2901627	T3	23 March 2022
		IL	216876	A0	29 February 2012
		IL	216876	A	21 April 2016
		MX	367665	B	30 August 2019
CN 103096875 A	08 May 2013	US	2018065920	A1	08 March 2018
		US	10266484	B2	23 April 2019
		SG	186085	A1	30 January 2013
		AU	2018203382	A1	31 May 2018
		AU	2011261247	A1	20 December 2012
		AU	2011261247	B2	25 August 2016
		JP	2013533224	A	22 August 2013
		JP	5893611	B2	23 March 2016
		DK	2575764	T3	07 August 2017
		US	2012027803	A1	02 February 2012
		US	9012498	B2	21 April 2015
		AU	2016210739	A1	25 August 2016
		KR	20190039347	A	10 April 2019
		KR	20130082141	A	18 July 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/099945

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		KR	101967411	B1	10 April 2019
		IL	259334	A	31 July 2018
		IL	259334	B1	01 March 2023
		IL	259334	B2	01 July 2023
		CA	2800401	A1	08 December 2011
		CA	2800401	C	15 September 2020
		EP	2575764	A2	10 April 2013
		EP	2575764	B1	19 April 2017
		IL	300109	A	01 March 2023
		ES	2634087	T3	26 September 2017
		IL	223207	A0	03 February 2013
		IL	223207	B	31 May 2018
		AU	2020200286	A1	06 February 2020
		AU	2020200286	B2	17 March 2022
		US	2016009637	A1	14 January 2016
		US	9682922	B2	20 June 2017
		NZ	605079	A	28 August 2015
		EP	3254672	A1	13 December 2017
		MX	2012014079	A	05 April 2013
		MX	341332	B	16 August 2016
		WO	2011153493	A2	08 December 2011
		WO	2011153493	A3	19 January 2012
		JP	2016121174	A	07 July 2016
		JP	6409011	B2	17 October 2018
		JP	2019011345	A	24 January 2019
		AU	2022204146	A1	30 June 2022
CN 104321304 A	28 January 2015	ES	2898912	T3	09 March 2022
		HUE	041494	T2	28 May 2019
		RS	58077	B1	28 February 2019
		US	2023109183	A1	06 April 2023
		WO	2013126803	A1	29 August 2013
		NZ	700075	A	27 May 2016
		RU	2020111326	A	29 April 2020
		LT	2817287	T	27 December 2018
		MX	2014010211	A	10 August 2015
		MX	356904	B	07 June 2018
		IL	290931	A	01 April 2022
		PT	2817287	T	28 December 2018
		KR	20220045089	A	12 April 2022
		DK	2817287	T3	02 January 2019
		PL	2817287	T3	31 October 2019
		UA	120026	C2	25 September 2019
		JP	2021014462	A	12 February 2021
		JP	7110297	B2	01 August 2022
		US	2017007702	A1	12 January 2017
		US	10561732	B2	18 February 2020
		RU	2014138476	A	10 April 2016
		RU	2718053	C2	30 March 2020
		AU	2013222179	A1	09 October 2014
		AU	2013222179	B2	24 August 2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/099945

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				HK	1202855	A1	09 October 2015
				JP	2018039844	A	15 March 2018
				JP	6789918	B2	25 November 2020
				SG	11201405157	PA	30 October 2014
				IL	276924	A	29 October 2020
				KR	20140129263	A	06 November 2014
				KR	102075810	B1	10 February 2020
				KR	20210041135	A	14 April 2021
				KR	102384791	B1	08 April 2022
				JP	2022140533	A	26 September 2022
				JP	2015509505	A	30 March 2015
				JP	6275655	B2	07 February 2018
				EP	3988104	A1	27 April 2022
				BR	112014020824	A2	20 June 2017
				BR	112014020824	B1	04 October 2022
				CY	1121232	T1	29 May 2020
				HRP	20182156	T1	22 February 2019
				SI	2817287	T1	28 February 2019
				CA	2865412	A1	29 August 2013
				CA	2865412	C	19 July 2022
				US	2020306378	A1	01 October 2020
				US	11395854	B2	26 July 2022
				KR	20200016396	A	14 February 2020
				KR	102239887	B1	13 April 2021
				ZA	201406896	B	25 May 2016
				PH	12014501901	B1	24 November 2014
				US	2015064242	A1	05 March 2015
				US	9352042	B2	31 May 2016
				EP	2817287	A1	31 December 2014
				EP	2817287	B1	03 October 2018
				IL	234266	A0	02 November 2014
				IL	234266	B	30 September 2020
				ES	2702874	T3	06 March 2019
				EP	3473611	A1	24 April 2019
				EP	3473611	B1	20 October 2021
CN	105085292	A	25 November 2015		None		
CN	111164068	A	15 May 2020	JP	2022025076	A	09 February 2022
				JP	7209066	B2	19 January 2023
				US	2023099139	A1	30 March 2023
				JPWO	2020039631	A1	22 October 2020
				JP	6997862	B2	10 February 2022
				EP	3842412	A1	30 June 2021
				EP	3842412	A4	15 June 2022
				JP	2023016905	A	02 February 2023
				WO	2020039631	A1	27 February 2020
				US	2020270217	A1	27 August 2020
				US	11548857	B2	10 January 2023
CN	113164379	A	23 July 2021	DK	3860561	T3	07 August 2023
				KR	20210069698	A	11 June 2021
				CA	3114435	A1	09 April 2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/099945

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				WO	2020072324	A1	09 April 2020
				JP	2022508511	A	19 January 2022
				AU	2019351809	A1	20 May 2021
				US	2022370356	A1	24 November 2022
				EP	4218722	A2	02 August 2023
				EP	3860561	A1	11 August 2021
				EP	3860561	B1	21 June 2023
US	2004077888	A1	22 April 2004	WO	03101952	A2	11 December 2003
				WO	03101952	A3	10 June 2004
				AU	2003243360	A1	19 December 2003
US	2021198200	A1	01 July 2021	WO	2018232120	A1	20 December 2018
				EP	3638678	A1	22 April 2020
WO	2021030701	A1	18 February 2021	JP	2022544652	A	20 October 2022
				CO	2022002685	A2	19 April 2022
				KR	20220053599	A	29 April 2022
				IL	290477	A	01 April 2022
				CL	2022000351	A1	03 February 2023
				CR	20220108	A	27 May 2022
				US	2023097090	A1	30 March 2023
				BR	112022002708	A2	31 May 2022
				CA	3150458	A1	18 February 2021
				ECSP	22018209	A	29 July 2022
				AU	2020328596	A1	31 March 2022
				EP	4013385	A1	22 June 2022
				JOP	20220037	A1	30 January 2023
				MX	2022001720	A	11 March 2022
				PE	20220968	A1	10 June 2022
				DE	112020003843	T5	19 May 2022
				DOP	2022000038	A	31 January 2023
				GB	2600859	A	11 May 2022
				ES	2918001	A2	13 July 2022

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/099945

A. 主题的分类

C07C229/16(2006.01)i; C07C227/06(2006.01)i; A61K9/127(2006.01)i; A61K48/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07C229; C07C227; A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNTXT;DWPI;ENTXT;STN(REG,CAPLUS):杭州高田，脂质，核酸，阳离子，脂质纳米粒，LNP,lipid,liposome,nanoparticle,cationic,nucleic acid

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 101643418 A (湖南先伟实业有限公司) 2010年2月10日 (2010-02-10) 全文	1-15
A	CN 102625696 A (阿尔尼拉姆医药品有限公司) 2012年8月1日 (2012-08-01) 全文	1-15
A	CN 103096875 A (阿尔尼拉姆医药品有限公司) 2013年5月8日 (2013-05-08) 全文	1-15
A	CN 104321304 A (普洛体维生物治疗公司) 2015年1月28日 (2015-01-28) 全文	1-15
A	CN 105085292 A (上海交通大学) 2015年11月25日 (2015-11-25) 权利要求1-6，说明书第0017-0018段，第0008段	1-15
A	CN 111164068 A (株式会社东芝) 2020年5月15日 (2020-05-15) 全文	1-15
A	CN 113164379 A (阿尔尼拉姆医药品有限公司) 2021年7月23日 (2021-07-23) 全文	1-15

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"D" 申请人在国际申请中引证的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2023年9月19日	2023年9月22日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	受权官员 王颖 电话号码 (+86) 010-62086304

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/099945

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	US 2004077888 A1 (UNIV CALIFORNIA等) 2004年4月22日 (2004 - 04 - 22) 全文	1-15
A	US 2021198200 A1 (MODERNATX INC) 2021年7月1日 (2021 - 07 - 01) 全文	1-15
A	WO 2021030701 A1 (ACUITAS THERAPEUTICS INC) 2021年2月18日 (2021 - 02 - 18) 全文	1-15

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/099945

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101643418	A	2010年2月10日	无			
CN	102625696	A	2012年8月1日	US	2012183602	A1	2012年7月19日
				US	8802644	B2	2014年8月12日
				PT	2440183	T	2018年10月30日
				SG	10201912450	XA	2020年3月30日
				EP	3431076	A1	2019年1月23日
				EP	3431076	B1	2021年10月6日
				KR	20200006176	A	2020年1月17日
				KR	102205886	B1	2021年1月21日
				JP	2015232048	A	2015年12月24日
				JP	6132321	B2	2017年5月24日
				AU	2019204984	A1	2019年8月1日
				AU	2019204984	B2	2021年1月28日
				LT	2440183	T	2018年8月10日
				JP	2018141019	A	2018年9月13日
				JP	6592144	B2	2019年10月16日
				KR	20170091798	A	2017年8月9日
				KR	101987962	B1	2019年6月11日
				MX	2011013320	A	2012年2月28日
				EA	201791744	A2	2018年3月30日
				EA	201791744	A3	2018年7月31日
				CA	2764609	A1	2010年12月16日
				CA	2764609	C	2018年10月2日
				DK	3431076	T3	2021年12月20日
				MX	342785	B	2016年10月12日
				PL	3431076	T3	2022年1月31日
				HUE	056773	T2	2022年3月28日
				HK	1212620	A1	2016年6月17日
				US	2015166465	A1	2015年6月18日
				US	9394234	B2	2016年7月19日
				ES	2689168	T3	2018年11月8日
				PT	3431076	T	2021年10月26日
				WO	2010144740	A1	2010年12月16日
				CY	1120641	T1	2019年12月11日
				SI	3431076	T1	2022年4月29日
				HRP	20181221	T1	2018年10月5日
				JP	2017122126	A	2017年7月13日
				JP	6359719	B2	2018年7月18日
				NZ	596958	A	2014年4月30日
				SG	10201403054	SA	2014年10月30日
				JP	2012530059	A	2012年11月29日
				JP	5819291	B2	2015年11月24日
				PL	2440183	T3	2019年1月31日
				IL	290077	A	2022年3月1日
				DK	2440183	T3	2018年10月1日
				EP	2440183	A1	2012年4月18日
				EP	2440183	A4	2013年2月27日
				EP	2440183	B1	2018年7月18日
				TR	201811076	T4	2018年8月27日
				NZ	622843	A	2015年10月30日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/099945

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				KR	20120081065	A	2012年7月18日
				KR	101766408	B1	2017年8月10日
				KR	20230098713	A	2023年7月4日
				LT	3431076	T	2021年10月25日
				NZ	712719	A	2017年3月31日
				KR	20190065474	A	2019年6月11日
				KR	102066189	B1	2020年1月14日
				EA	201190306	A1	2013年1月30日
				EA	024960	B1	2016年11月30日
				HRP	20211619	T1	2022年2月4日
				CA	3014827	A1	2010年12月16日
				KR	20210008938	A	2021年1月25日
				KR	102374518	B1	2022年3月16日
				IL	244945	A0	2016年5月31日
				IL	244945	B	2020年6月30日
				AU	2021201228	A1	2021年3月11日
				AU	2021201228	B2	2022年7月7日
				KR	20220038506	A	2022年3月28日
				HUE	038796	T2	2018年11月28日
				IL	274826	A	2020年7月30日
				US	2010324120	A1	2010年12月23日
				US	8158601	B2	2012年4月17日
				EA	201690312	A1	2016年8月31日
				EA	028860	B1	2018年1月31日
				SI	2440183	T1	2018年10月30日
				MX	2019010340	A	2019年10月14日
				AU	2010259984	A1	2012年1月12日
				AU	2010259984	B2	2017年3月9日
				US	2017143631	A1	2017年5月25日
				AU	2017202702	A1	2017年5月18日
				AU	2017202702	B2	2019年5月2日
				SG	176786	A1	2012年1月30日
				ES	2901627	T3	2022年3月23日
				IL	216876	A0	2012年2月29日
				IL	216876	A	2016年4月21日
				MX	367665	B	2019年8月30日
CN	103096875	A	2013年5月8日	US	2018065920	A1	2018年3月8日
				US	10266484	B2	2019年4月23日
				SG	186085	A1	2013年1月30日
				AU	2018203382	A1	2018年5月31日
				AU	2011261247	A1	2012年12月20日
				AU	2011261247	B2	2016年8月25日
				JP	2013533224	A	2013年8月22日
				JP	5893611	B2	2016年3月23日
				DK	2575764	T3	2017年8月7日
				US	2012027803	A1	2012年2月2日
				US	9012498	B2	2015年4月21日
				AU	2016210739	A1	2016年8月25日
				KR	20190039347	A	2019年4月10日
				KR	20130082141	A	2013年7月18日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/099945

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				KR	101967411	B1	2019年4月10日
				IL	259334	A	2018年7月31日
				IL	259334	B1	2023年3月1日
				IL	259334	B2	2023年7月1日
				CA	2800401	A1	2011年12月8日
				CA	2800401	C	2020年9月15日
				EP	2575764	A2	2013年4月10日
				EP	2575764	B1	2017年4月19日
				IL	300109	A	2023年3月1日
				ES	2634087	T3	2017年9月26日
				IL	223207	A0	2013年2月3日
				IL	223207	B	2018年5月31日
				AU	2020200286	A1	2020年2月6日
				AU	2020200286	B2	2022年3月17日
				US	2016009637	A1	2016年1月14日
				US	9682922	B2	2017年6月20日
				NZ	605079	A	2015年8月28日
				EP	3254672	A1	2017年12月13日
				MX	2012014079	A	2013年4月5日
				MX	341332	B	2016年8月16日
				WO	2011153493	A2	2011年12月8日
				WO	2011153493	A3	2012年1月19日
				JP	2016121174	A	2016年7月7日
				JP	6409011	B2	2018年10月17日
				JP	2019011345	A	2019年1月24日
				AU	2022204146	A1	2022年6月30日
CN	104321304	A	2015年1月28日	ES	2898912	T3	2022年3月9日
				HUE	041494	T2	2019年5月28日
				RS	58077	B1	2019年2月28日
				US	2023109183	A1	2023年4月6日
				WO	2013126803	A1	2013年8月29日
				NZ	700075	A	2016年5月27日
				RU	2020111326	A	2020年4月29日
				LT	2817287	T	2018年12月27日
				MX	2014010211	A	2015年8月10日
				MX	356904	B	2018年6月7日
				IL	290931	A	2022年4月1日
				PT	2817287	T	2018年12月28日
				KR	20220045089	A	2022年4月12日
				DK	2817287	T3	2019年1月2日
				PL	2817287	T3	2019年10月31日
				UA	120026	C2	2019年9月25日
				JP	2021014462	A	2021年2月12日
				JP	7110297	B2	2022年8月1日
				US	2017007702	A1	2017年1月12日
				US	10561732	B2	2020年2月18日
				RU	2014138476	A	2016年4月10日
				RU	2718053	C2	2020年3月30日
				AU	2013222179	A1	2014年10月9日
				AU	2013222179	B2	2017年8月24日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/099945

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				HK	1202855	A1	2015年10月9日
				JP	2018039844	A	2018年3月15日
				JP	6789918	B2	2020年11月25日
				SG	11201405157	PA	2014年10月30日
				IL	276924	A	2020年10月29日
				KR	20140129263	A	2014年11月6日
				KR	102075810	B1	2020年2月10日
				KR	20210041135	A	2021年4月14日
				KR	102384791	B1	2022年4月8日
				JP	2022140533	A	2022年9月26日
				JP	2015509505	A	2015年3月30日
				JP	6275655	B2	2018年2月7日
				EP	3988104	A1	2022年4月27日
				BR	112014020824	A2	2017年6月20日
				BR	112014020824	B1	2022年10月4日
				CY	1121232	T1	2020年5月29日
				HRP	20182156	T1	2019年2月22日
				SI	2817287	T1	2019年2月28日
				CA	2865412	A1	2013年8月29日
				CA	2865412	C	2022年7月19日
				US	2020306378	A1	2020年10月1日
				US	11395854	B2	2022年7月26日
				KR	20200016396	A	2020年2月14日
				KR	102239887	B1	2021年4月13日
				ZA	201406896	B	2016年5月25日
				PH	12014501901	B1	2014年11月24日
				US	2015064242	A1	2015年3月5日
				US	9352042	B2	2016年5月31日
				EP	2817287	A1	2014年12月31日
				EP	2817287	B1	2018年10月3日
				IL	234266	A0	2014年11月2日
				IL	234266	B	2020年9月30日
				ES	2702874	T3	2019年3月6日
				EP	3473611	A1	2019年4月24日
				EP	3473611	B1	2021年10月20日
CN	105085292	A	2015年11月25日		无		
CN	111164068	A	2020年5月15日	JP	2022025076	A	2022年2月9日
				JP	7209066	B2	2023年1月19日
				US	2023099139	A1	2023年3月30日
				JPWO	2020039631	A1	2020年10月22日
				JP	6997862	B2	2022年2月10日
				EP	3842412	A1	2021年6月30日
				EP	3842412	A4	2022年6月15日
				JP	2023016905	A	2023年2月2日
				WO	2020039631	A1	2020年2月27日
				US	2020270217	A1	2020年8月27日
				US	11548857	B2	2023年1月10日
CN	113164379	A	2021年7月23日	DK	3860561	T3	2023年8月7日
				KR	20210069698	A	2021年6月11日
				CA	3114435	A1	2020年4月9日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/099945

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				WO	2020072324	A1	2020年4月9日
				JP	2022508511	A	2022年1月19日
				AU	2019351809	A1	2021年5月20日
				US	2022370356	A1	2022年11月24日
				EP	4218722	A2	2023年8月2日
				EP	3860561	A1	2021年8月11日
				EP	3860561	B1	2023年6月21日
US	2004077888	A1	2004年4月22日	WO	03101952	A2	2003年12月11日
				WO	03101952	A3	2004年6月10日
				AU	2003243360	A1	2003年12月19日
US	2021198200	A1	2021年7月1日	WO	2018232120	A1	2018年12月20日
				EP	3638678	A1	2020年4月22日
WO	2021030701	A1	2021年2月18日	JP	2022544652	A	2022年10月20日
				CO	2022002685	A2	2022年4月19日
				KR	20220053599	A	2022年4月29日
				IL	290477	A	2022年4月1日
				CL	2022000351	A1	2023年2月3日
				CR	20220108	A	2022年5月27日
				US	2023097090	A1	2023年3月30日
				BR	112022002708	A2	2022年5月31日
				CA	3150458	A1	2021年2月18日
				ECSP	22018209	A	2022年7月29日
				AU	2020328596	A1	2022年3月31日
				EP	4013385	A1	2022年6月22日
				JOP	20220037	A1	2023年1月30日
				MX	2022001720	A	2022年3月11日
				PE	20220968	A1	2022年6月10日
				DE	112020003843	T5	2022年5月19日
				DOP	2022000038	A	2023年1月31日
				GB	2600859	A	2022年5月11日
				ES	2918001	A2	2022年7月13日