(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120093931 A
(43)申请公布日 2025.06.06

(21)申请号 202510183613.1

(22)申请日 2019.09.04

(30)优先权数据
62/726,741 2018.09.04 US

(62)分案原申请数据
201980070622.2 2019.09.04

(71)申请人 德克萨斯大学系统董事会
地址 美国德克萨斯州

(72)发明人 程强 魏妥 D·J·西格沃特

(74)专利代理机构 青岛联智专利商标事务所有限公司 37101
专利代理师 阎斌斌 吕东霞

(51)Int.Cl.
A61K 47/18(2017.01)
A61K 47/24(2006.01)
A61K 47/28(2006.01)
A61K 47/14(2017.01)
A61K 47/22(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61K 9/51(2006.01)

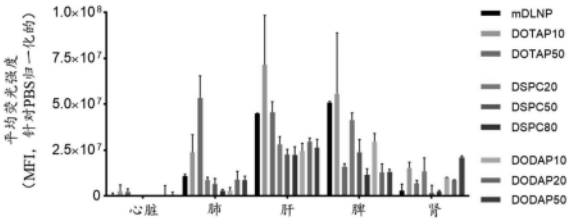
权利要求书5页 说明书80页
序列表（电子公布） 附图41页

(54)发明名称

用于核酸的器官特异性递送的组合物和方法

(57)摘要

本公开内容提供了组合物,其显示核酸组合物向特定器官的优先靶向或递送。在一些实施方案中,所述组合物包含类固醇或甾醇、可电离的阳离子脂质、磷脂、PEG脂质和永久阳离子脂质,它们可以用于递送核酸。本发明还提供了所述组合物在制备用于将治疗剂靶向递送至器官或器官中的细胞的药物中的用途。



CN 120093931 A

1.一种包含与治疗剂组装的脂质纳米颗粒组合物的组合物,所述脂质纳米颗粒组合物包含:

(1)不同于(2)可电离的阳离子脂质的阳离子选择性的器官靶向(SORT)脂质,其中所述阳离子SORT脂质是可电离的阳离子SORT脂质或永久阳离子SORT脂质;其中所述阳离子SORT脂质以5%或更高的摩尔百分比存在于所述脂质纳米颗粒组合物中,其中所述摩尔百分比是基于所述脂质纳米颗粒组合物中存在的脂质的总摩尔确定的;

(2)所述可电离的阳离子脂质;

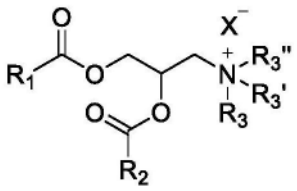
(3)磷脂;

(4)类固醇;和

(5)聚乙二醇-缀合(聚乙二醇化)的脂质;

其中所述可电离的阳离子SORT脂质是1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP);

其中所述永久阳离子SORT脂质具有式(I)、式(II)或式(III)的结构,或其药学上可接受的盐;



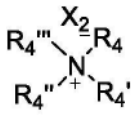
(I)

其中,在式(I)中:

R_1和R_2各自独立地是烷基$_{C8-C24}$、被取代的烷基$_{C8-C24}$、烯基$_{C8-C24}$或被取代的烯基$_{C8-C24}$;

R_3、R_3'和R_3''各自独立地是烷基$_{C\leq6}$或被取代的烷基$_{C\leq6}$;且

X^-是单价阴离子;



(II)

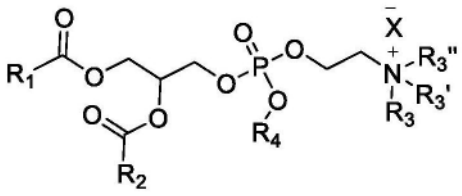
其中,在式(II)中:

R_4和R_4'各自独立地是烷基$_{C6-C24}$、被取代的烷基$_{C6-C24}$、烯基$_{C6-C24}$或被取代的烯基$_{C6-C24}$;

R_4''是烷基$_{C\leq24}$、被取代的烷基$_{C\leq24}$、烯基$_{C\leq24}$或被取代的烯基$_{C\leq24}$;

R_4'''是烷基$_{C1-C8}$、被取代的烷基$_{C1-C8}$、烯基$_{C2-C8}$或被取代的烯基$_{C2-C8}$;且

X_2是单价阴离子;以及



(III)

其中,在式(III)中:

R_1和R_2各自独立地是烷基$_{C8-C24}$、被取代的烷基$_{C8-C24}$、烯基$_{C8-C24}$或被取代的烯基$_{C8-C24}$;

R_3、R_3'和R_3''各自独立地是烷基$_{C\leq6}$或被取代的烷基$_{C\leq6}$;

R_4是烷基$_{C\leq6}$或被取代的烷基$_{C\leq6}$;且

X^-是单价阴离子；

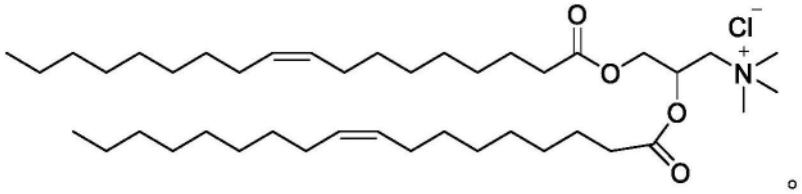
其中所述脂质纳米颗粒组合物的特征在于3至6或从8至13的表观电离常数(pK_a)，由2-(对甲苯氨基)-6-萘磺酸滴定测定法所测定。

2.根据权利要求1所述的组合物，其中所述组合物的特征在于-0.25至-10mV的zeta(ζ)电位，由动态光散射所测定。

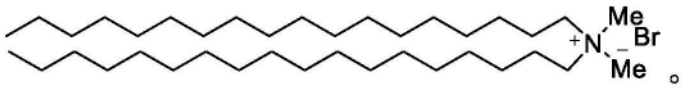
3.根据权利要求1所述的组合物，其中所述阳离子SORT脂质以5％至20％的摩尔百分比存在于所述脂质纳米颗粒组合物中。

4.根据权利要求1所述的组合物，其中所述阳离子SORT脂质以20％至65％的摩尔百分比存在于所述脂质纳米颗粒组合物中。

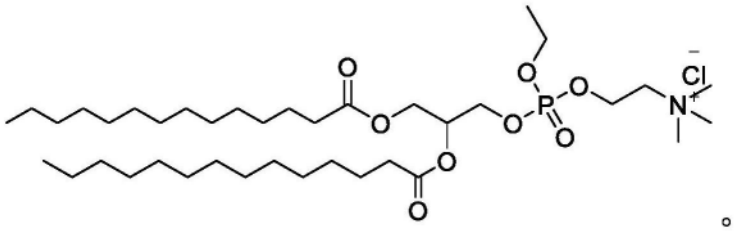
5.根据权利要求1所述的组合物，其中所述永久阳离子SORT脂质具有以下结构式：



6.根据权利要求1所述的组合物，其中所述永久阳离子SORT脂质具有以下结构式：



7.根据权利要求1所述的组合物，其中所述永久阳离子SORT脂质具有以下结构式：



8.根据权利要求1所述的组合物，其中所述可电离的阳离子脂质以5％至30％的摩尔百分比存在于所述脂质纳米颗粒组合物中。

9.根据权利要求8所述的组合物，其中所述可电离的阳离子脂质以15％至30％的摩尔百分比存在于所述脂质纳米颗粒组合物中。

10.根据权利要求1所述的组合物，其中所述可电离的阳离子脂质包含在生理pH带正电荷的铵基团且含有至少两个疏水基团。

11.根据权利要求10所述的组合物，其中所述可电离的阳离子脂质包含至少两个C_6-C_{24}烷基或烯基。

12.根据权利要求1所述的组合物，其中所述磷脂以8％至20％的摩尔百分比存在于所述脂质纳米颗粒组合物中。

13.根据权利要求1所述的组合物，其中所述磷脂以20％至23％的摩尔百分比存在于所述脂质纳米颗粒组合物中。

14.根据权利要求1所述的组合物，其中所述磷脂为1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱。

15.根据权利要求1所述的组合物，其中所述类固醇以39％至46％的摩尔百分比存在于

所述脂质纳米颗粒组合物中。

16.根据权利要求1所述的组合物,其中所述类固醇以15%至39%的摩尔百分比存在于所述脂质纳米颗粒组合物中。

17.根据权利要求1所述的组合物,其中所述类固醇是胆固醇。

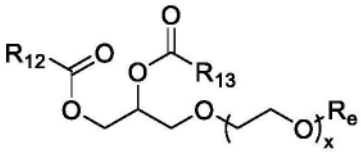
18.根据权利要求1所述的组合物,其中所述聚乙二醇化的脂质以0.5%至10.0%的摩尔百分比存在于所述脂质纳米颗粒组合物中。

19.根据权利要求18所述的组合物,其中所述聚乙二醇化的脂质以3.9%至4.6%的摩尔百分比存在于所述脂质纳米颗粒组合物中。

20.根据权利要求1所述的组合物,其中所述聚乙二醇化的脂质包含1000至10,000道尔顿的聚乙二醇(PEG)组分。

21.根据权利要求1所述的组合物,其中所述聚乙二醇化的脂质是聚乙二醇化的二酰基甘油。

22.根据权利要求1所述的组合物,其中所述聚乙二醇化的脂质具有以下结构式:



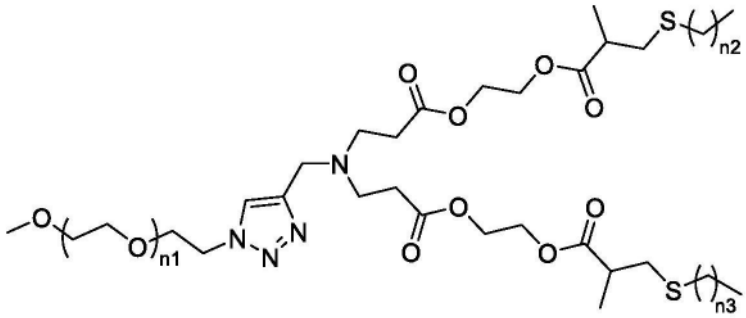
其中:

R_{12}和R_{13}各自独立地是烷基$_{C\leq 24}$、被取代的烷基$_{C\leq 24}$、烯基$_{C\leq 24}$或被取代的烯基$_{C\leq 24}$;

R_e是氢、烷基$_{C\leq 8}$或被取代的烷基$_{C\leq 8}$;且

x是1-250。

23.根据权利要求1所述的组合物,其中所述聚乙二醇化的脂质是二肉豆蔻酰基-sn-甘油或具有以下结构式的化合物:



其中:

n_1是5-250;且

n_2和n_3各自独立地是2-25。

24.根据权利要求1所述的组合物,其中所述治疗剂是小分子。

25.根据权利要求1所述的组合物,其中所述治疗剂是蛋白质。

26.根据权利要求1所述的组合物,其中所述治疗剂是核酸。

27.根据权利要求26所述的组合物,其中所述核酸是治疗性核酸。

28.根据权利要求26所述的组合物,其中所述核酸选自短干扰核糖核酸(siRNA)、微小-核糖核酸(miRNA)、pri-miRNA、信使核糖核酸(mRNA)、成簇的规律间隔的短回文重复序列

(CRISPR)相关的核酸、单指导核糖核酸(sgRNA)、CRISPR-RNA(crRNA)、反式活化crRNA(tracrRNA)、质粒脱氧核糖核酸(pDNA)、转移核糖核酸(tRNA)、反义寡核苷酸(ASO)、指导核糖核酸、双链脱氧核糖核酸(dsDNA)、单链脱氧核糖核酸(ssDNA)、单链核糖核酸(ssRNA)和双链核糖核酸(dsRNA)。

29.根据权利要求26所述的组合物,其中所述核酸以所述核酸与所述脂质纳米颗粒组合物为1:1至1:100的比率存在于所述脂质纳米颗粒组合物中。

30.根据权利要求1所述的组合物,其中所述治疗剂包含蛋白质。

31.根据权利要求30所述的组合物,其中所述治疗剂包含蛋白质和核酸二者。

32.根据权利要求1-31中的任一项所述的组合物,其中所述组合物是进一步包含赋形剂的药物组合物。

33.根据权利要求32所述的组合物,其中所述赋形剂是药学上可接受的赋形剂。

34.包含基因或转录本编辑剂和脂质组合物的组合物在制备用于将基因或转录本编辑剂靶向递送至器官或器官中的细胞的药物中的用途,

其中所述脂质组合物包含:

(1)可电离的阳离子脂质;和

(2)SORT脂质,其为永久阳离子SORT脂质;其中所述组合物被配置为,与不存在所述SORT化合物所实现的相比,在所述器官或所述细胞中提供靶基因或转录本的修饰的表达概况,其中所述器官是肺或脾,并且其中所述细胞选自来自所述肺或所述脾的细胞。

35.根据权利要求34所述的用途,其中所述基因或转录本编辑剂包含酶。

36.根据权利要求35所述的用途,其中所述酶包含CRISPR-相关的蛋白9(Cas9)。

37.根据权利要求35所述的用途,其中所述酶是独立的酶。

38.根据权利要求35所述的用途,其中所述酶是融合酶。

39.根据权利要求34所述的用途,其中所述脂质组合物的表面结合至载脂蛋白E(Apo E)、玻连蛋白或载脂蛋白H(Apo H),由定量质谱法所测定。

40.根据权利要求34所述的用途,其中所述器官或所述器官中的细胞是肺或脾,或肺或脾中的细胞。

41.包含治疗剂和脂质组合物的组合物在制备用于非肝地靶向递送所述治疗剂的药物中的用途,所述脂质组合物包含:

(1)可电离的阳离子脂质;和

(2)不同于所述可电离的阳离子脂质的SORT脂质,其中所述SORT脂质选自由阳离子SORT脂质、两性离子SORT脂质和阴离子SORT脂质组成的组;

其中,当施用给受试者后,所述脂质组合物的表面与载脂蛋白E(Apo E)相互作用的程度低于与非Apo E的内源蛋白相互作用的程度,从而与不存在所述SORT脂质所实现的相比,在肝或肝中的细胞中提供更少量或活性的所述治疗剂。

42.根据权利要求41所述的用途,其中所述施用后,在所述受试者中,所述内源蛋白以比Apo E更大的量结合至所述SORT脂质组合物的所述表面。

43.根据权利要求41所述的用途,其中所述内源蛋白是玻连蛋白、β2-糖蛋白1或载脂蛋白H(Apo H)。

44.根据权利要求41所述的用途,其中所述内源蛋白是β2-糖蛋白1或载脂蛋白H(Apo

H)。

45.根据权利要求41所述的用途,其中所述内源蛋白不是β2-糖蛋白1或载脂蛋白H(Apo H);并且其中在所述受试者中,所述SORT脂质组合物的表面与Apo H相互作用的程度低于与所述内源蛋白相互作用的程度。

46.根据权利要求45所述的用途,其中所述内源蛋白是玻连蛋白。

47.根据权利要求41所述的用途,其中,与不存在所述SORT脂质所实现的相比,所述用途在所述受试者中的非肝器官或所述非肝器官中的细胞中提供更大量或更高活性的所述治疗剂。

48.根据权利要求47所述的用途,其中所述非肝器官或所述非肝器官中的细胞包含肺、脾、骨髓、淋巴结、或任何前述器官中的细胞。

49.根据权利要求48所述的用途,其中所述非肝器官或所述非肝器官中的细胞包含肺或肺中的细胞。

50.根据权利要求48所述的用途,其中所述非肝器官或所述非肝器官中的细胞包含脾、骨髓、淋巴结、或任何前述器官中的细胞。

51.一种组合物,其包含:

(a)化学治疗剂;和

(b)脂质纳米颗粒组合物,其包含:

(1)SORT化合物,其包含阳离子SORT脂质、阴离子SORT脂质或两性离子SORT脂质;以及

(2)可电离的阳离子脂质。

52.一种包含信使RNA(mRNA)和脂质组合物的组合物,其中所述mRNA编码囊性纤维化跨膜调节因子(CFTR)蛋白,其中所述脂质组合物包含:

(i)摩尔百分比为约5%至约50%的两性离子SORT脂质;

(ii)摩尔百分比为至少约5%的可电离的阳离子脂质,其中所述可电离的阳离子脂质包含在约6至约8的pH带正电荷的铵基团以及至少两个C_6-C_{24}烷基或烯基;

(iii)摩尔百分比为约15%至约46%的类固醇或类固醇衍生物;和

(iv)摩尔百分比为约0.5%至约10%的聚合物缀合的脂质;

其中所述摩尔百分比是基于所述脂质组合物中存在的总脂质确定的;其中所述组合物被配制用于吸入递送至肺。

用于核酸的器官特异性递送的组合物和方法

[0001] 本申请是申请号为201980070622.2、申请日为2019年09月04日、发明名称为“用于核酸的器官特异性递送的组合物和方法”的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求2018年9月4日提交的美国临时申请系列号62/726,741的优先权权益，其整个内容特此通过引用并入。

技术领域

[0003] 本公开内容总体上涉及分子生物学领域。更具体地，它涉及治疗剂诸如核酸、蛋白或小分子治疗剂在脂质纳米颗粒中的组织特异性递送。

背景技术

[0004] CRISPR/Cas(成簇的规律间隔的短回文重复序列/CRISPR-相关的蛋白(Cas))技术可以以精确的、序列依赖性的方式编辑基因组，从而产生永久性变化。由于靶向造成疾病的突变的能力，因此它具有一次治愈遗传性疾病的不可思议的前景。迄今为止，成功的编辑已经主要由病毒载体介导，所述病毒载体需要费力地针对每种靶标进行定制，并且由于免疫原性、阻止重复施用的抗体的产生以及对罕见但危险的整合事件的关注，对临床转化提出了挑战。显然仍然需要通过合成纳米颗粒(NP)完成CRISPR/Cas编辑，以扩大基因编辑的安全且有效的应用。

[0005] CRISPR/Cas通过在基因组DNA中形成双链断裂(DSB)的RNA-指导的CRISPR-相关的蛋白9(Cas9)核酸酶或它的同系物实现序列特异性DNA编辑。Cas9由称为单指导RNA(sgRNA)的可编程RNA指导。Cas9/sgRNA复合物识别具有3′前间隔区相邻基序(PAM)序列的互补基因组序列。在DNA裂解后，DSB修复途径实现定向诱变、或缺失靶基因的插入/缺失(插入缺失)。为了治疗效用，瞬时Cas9表达是优选的以限制脱靶基因组改变。由于Cas9蛋白和sgRNA都必须存在于同一细胞中，因此Cas9 mRNA和靶向序列的sgRNA在一个NP中的共同递送是一种有吸引力的方法，特别是对于其中组织渗透和细胞摄取更具挑战性的体内使用。使用病毒、膜变形、核糖核蛋白复合物递送和流体动力学注射的CRISPR/Cas编辑是有功能的，但具有在临床上阻碍体内治疗用途的限制，包括Cas9的持续表达和脱靶编辑。此外，这些递送系统通常对于其中需要编辑的特定器官不是选择性的。例如，大多数脂质纳米颗粒通过肝脏中的生物学过程积累，从而降低了组合物递送进靶器官中的效力。

[0006] 类似地，其它治疗剂诸如蛋白和小分子治疗剂可以受益于器官特异性递送。许多不同类型的化合物诸如化学治疗剂表现出显著的细胞毒性。如果这些化合物可以更好地定向递送至期望的器官，那么将看到更少的脱靶效应。

[0007] 因此，仍然需要开发显示向特定器官的优先递送的新脂质纳米颗粒。

发明内容

[0008] 在一些方面，本公开内容提供了脂质组合物，其显示脂质组合物的器官特异性递送。这些组合物可用于将核酸组分递送至特定器官。

[0009] 在一些方面,本公开内容提供了组合物,其包含:

[0010] (A)治疗剂;和

[0011] (B)脂质纳米颗粒组合物,其包含:

[0012] (1)选择性的器官靶向化合物;

[0013] (2)可电离的阳离子脂质;和

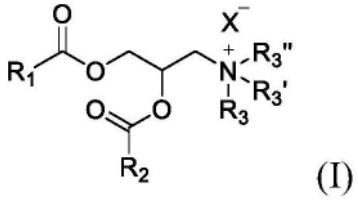
[0014] (3)磷脂;

[0015] 其中所述组合物优先将核酸递送至选自以下的靶器官:肺、心脏、脑、脾、淋巴结、骨、骨髓、骨骼肌、胃、小肠、大肠、肾、膀胱、乳房、肝、睾丸、卵巢、子宫、脾、胸腺、脑干、小脑、脊髓、眼、耳、舌或皮肤。在一些实施方案中,所述靶器官选自肺、心脏、脑、脾、淋巴结、骨、骨髓、骨骼肌、胃、小肠、大肠、肾、膀胱、乳房、睾丸、卵巢、子宫、脾、胸腺、脑干、小脑、脊髓、眼、耳、舌或皮肤。

[0016] 在一些实施方案中,所述靶器官是肺、淋巴结或脾。在一些实施方案中,所述靶器官是肺。在其它实施方案中,所述靶器官是脾。在其它实施方案中,所述靶器官是肝。在其它实施方案中,所述靶器官是淋巴结。

[0017] 在一些实施方案中,所述选择性的器官靶向化合物是永久阳离子脂质。在一些实施方案中,所述永久阳离子脂质以约5%至约20%的脂质纳米颗粒组合物的摩尔百分比存在。在一些实施方案中,所述永久阳离子脂质的摩尔百分比是约12%至约18%。在一些实施方案中,所述永久阳离子脂质的摩尔百分比是约15%。在一些实施方案中,所述永久阳离子脂质以约20%至约65%的脂质纳米颗粒组合物的摩尔百分比存在。在一些实施方案中,所述永久阳离子脂质的摩尔百分比是约40%至约61%。在一些实施方案中,所述永久阳离子脂质的摩尔百分比是约50%。

[0018] 在一些实施方案中,所述永久阳离子脂质包含季铵离子。在一些实施方案中,所述永久阳离子脂质进一步定义为:

[0019] 

(I)

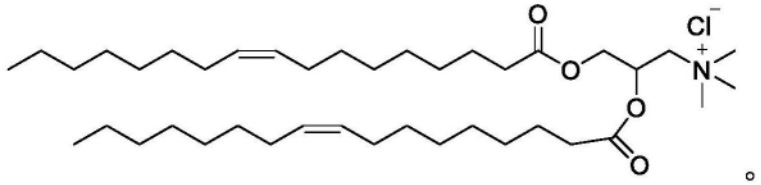
[0020] 其中:

[0021] R_1和R_2各自独立地是烷基$_{(C8-C24)}$、烯基$_{(C8-C24)}$或任一个基团的被取代形式;

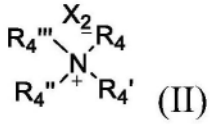
[0022] R_3、R_3'和R_3''各自独立地是烷基$_{(C\leqslant 6)}$或被取代的烷基$_{(C\leqslant 6)}$;

[0023] X^-是单价阴离子。

[0024] 在一些实施方案中,R_1是烯基$_{(C8-C24)}$或被取代的烯基$_{(C8-C24)}$。在一些实施方案中,R_2是烯基$_{(C8-C24)}$或被取代的烯基$_{(C8-C24)}$。在其它实施方案中,R_1是烷基$_{(C8-C24)}$或被取代的烷基$_{(C8-C24)}$。在其它实施方案中,R_2是烷基$_{(C8-C24)}$或被取代的烷基$_{(C8-C24)}$。在一些实施方案中,R_1和R_2两者是相同的。在一些实施方案中,R_3、R_3'和R_3''各自是相同的。在一些实施方案中,R_3、R_3'和R_3''各自是甲基。在一些实施方案中,X^-是卤化物阴离子诸如溴化物或氯化物。在一些实施方案中,所述永久阳离子脂质进一步定义为:

[0025] 

[0026] 在其它实施方案中,所述永久阳离子脂质进一步定义为:

[0027]  (II)

[0028] 其中:

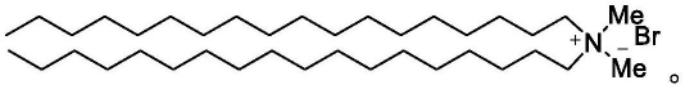
[0029] R_4和R_4'各自独立地是烷基$_{(C6-C24)}$、烯基$_{(C6-C24)}$或任一个基团的被取代形式;

[0030] R_4''是烷基$_{(C\leqslant24)}$、烯基$_{(C\leqslant24)}$或任一个基团的被取代形式;

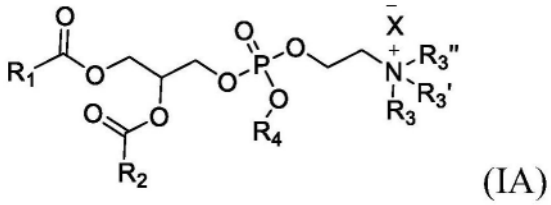
[0031] R_4'''是烷基$_{(C1-C8)}$、烯基$_{(C2-C8)}$或任一个基团的被取代形式;且

[0032] X_2是单价阴离子。

[0033] 在一些实施方案中,R_4是烷基$_{(C6-C24)}$或被取代的烷基$_{(C6-C24)}$诸如十八烷基。在一些实施方案中,R_4'是烷基$_{(C6-C24)}$或被取代的烷基$_{(C6-C24)}$诸如十八烷基。在一些实施方案中,R_4''是烷基$_{(C\leqslant24)}$或被取代的烷基$_{(C\leqslant24)}$。在一些实施方案中,R_4''是烷基$_{(C\leqslant8)}$或被取代的烷基$_{(C\leqslant8)}$诸如甲基。在一些实施方案中,R_4'''是烷基$_{(C1-C8)}$或被取代的烷基$_{(C1-C8)}$诸如甲基。在一些实施方案中,X_2是卤化物诸如氯化物或溴化物。在一些实施方案中,所述永久阳离子脂质进一步定义为:

[0034] 

[0035] 在一些实施方案中,所述永久阳离子脂质进一步定义为:

[0036]  (IA)

[0037] 其中:

[0038] R_1和R_2各自独立地是烷基$_{(C8-C24)}$、烯基$_{(C8-C24)}$或任一个基团的被取代形式;

[0039] R_3、R_3'和R_3''各自独立地是烷基$_{(C\leqslant6)}$或被取代的烷基$_{(C\leqslant6)}$;

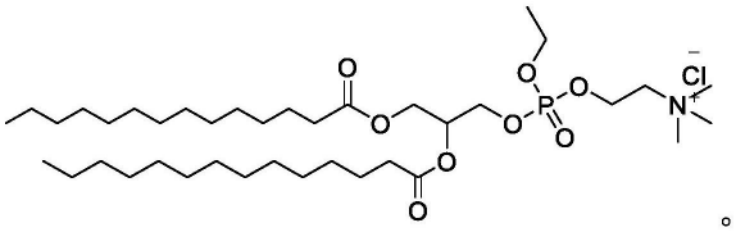
[0040] R_4是烷基$_{(C\leqslant6)}$或被取代的烷基$_{(C\leqslant6)}$;且

[0041] X^-是单价阴离子。

[0042] 在一些实施方案中,R_1是烯基$_{(C8-C24)}$或被取代的烯基$_{(C8-C24)}$。在一些实施方案中,R_2是烯基$_{(C8-C24)}$或被取代的烯基$_{(C8-C24)}$。在其它实施方案中,R_1是烷基$_{(C8-C24)}$或被取代的烷基$_{(C8-C24)}$。在其它实施方案中,R_2是烷基$_{(C8-C24)}$或被取代的烷基$_{(C8-C24)}$。在一些实施方案中,R_1和R_2两者是相同的。

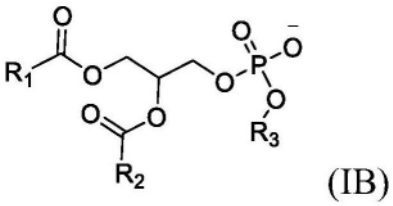
[0043] 在一些实施方案中,R_3、R_3'和R_3''各自是相同的,诸如R_3、R_3'和R_3''各自是甲基。在一些实施方案中,R_4是烷基$_{(C\leqslant6)}$诸如乙基。在一些实施方案中,X^-是卤化物阴离子诸如溴化物或氯化物。

[0044] 在一些实施方案中,所述永久阳离子脂质进一步定义为:

[0045] 。

[0046] 在其它实施方案中,所述选择性的器官靶向化合物是永久阴离子脂质。在一些实施方案中,所述永久阴离子脂质以约5%至约50%的脂质纳米颗粒组合物的摩尔百分比存在。在一些实施方案中,所述永久阴离子脂质的摩尔百分比是约10%至约45%。在一些实施方案中,所述永久阴离子脂质的摩尔百分比是约30%。在一些实施方案中,所述永久阴离子脂质包含磷酸根基团。

[0047] 在一些实施方案中,所述永久阴离子脂质进一步定义为:

[0048]  (IB)

[0049] 其中:

[0050] R_1和R_2各自独立地是烷基$_{(C8-C24)}$、烯基$_{(C8-C24)}$或任一个基团的被取代形式;

[0051] R_3是氢、烷基$_{(C\leqslant6)}$或被取代的烷基$_{(C\leqslant6)}$或$-Y_1-R_4$,其中:

[0052] Y_1是烷二基$_{(C\leqslant6)}$或被取代的烷二基$_{(C\leqslant6)}$;且

[0053] R_4是酰氧基$_{(C\leqslant8-24)}$或被取代的酰氧基$_{(C\leqslant8-24)}$。

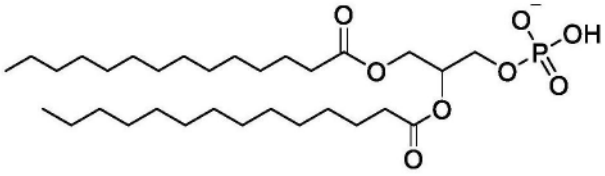
[0054] 在一些实施方案中,R_1是烯基$_{(C8-C24)}$或被取代的烯基$_{(C8-C24)}$。在其它实施方案中,R_2是烯基$_{(C8-C24)}$或被取代的烯基$_{(C8-C24)}$。在其它实施方案中,R_1是烷基$_{(C8-C24)}$或被取代的烷基$_{(C8-C24)}$。在其它实施方案中,R_2是烷基$_{(C8-C24)}$或被取代的烷基$_{(C8-C24)}$。在一些实施方案中,R_1和R_2两者是相同的。

[0055] 在一些实施方案中,R_3是氢。在其它实施方案中,R_3是$-Y_1-R_4$,其中:

[0056] Y_1是烷二基$_{(C\leqslant6)}$或被取代的烷二基$_{(C\leqslant6)}$;且

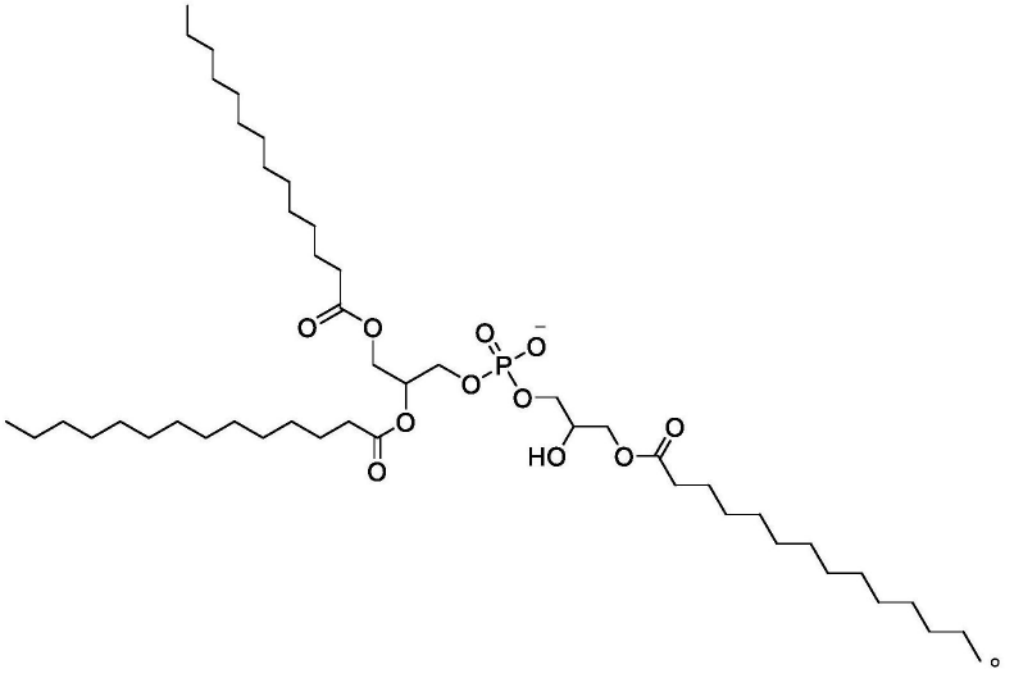
[0057] R_4是酰氧基$_{(C\leqslant8-24)}$或被取代的酰氧基$_{(C\leqslant8-24)}$。

[0058] 在一些实施方案中,Y_1是被取代的烷二基$_{(C\leqslant6)}$诸如2-羟基丙烷二基。在一些实施方案中,R_4是酰氧基$_{(C\leqslant8-24)}$诸如十八碳烯酸酯。在一些实施方案中,所述永久阴离子脂质进一步定义为:



或

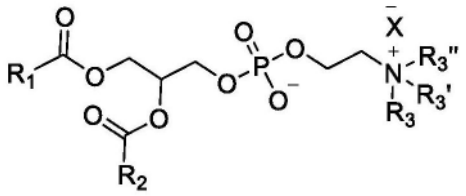
[0059]



[0060] 在其它实施方案中,所述选择性的器官靶向化合物是C_6-C_{24}二酰基磷脂酰胆碱。在一些实施方案中,所述二酰基磷脂酰胆碱以约5%至约50%的脂质纳米颗粒组合物的摩尔百分比存在。在一些实施方案中,所述二酰基磷脂酰胆碱的摩尔百分比是约10%至约45%诸如约30%。

[0061] 在一些实施方案中,所述选择性的器官靶向化合物包含至少两个脂肪酸链、一个季胺和一个阴离子磷酸根基团。在一些实施方案中,所述二酰基磷脂酰胆碱进一步定义为:

[0062]



(IA)

[0063] 其中:

[0064] R_1和R_2各自独立地是烷基$_{(C8-C24)}$、烯基$_{(C8-C24)}$或任一个基团的被取代形式;

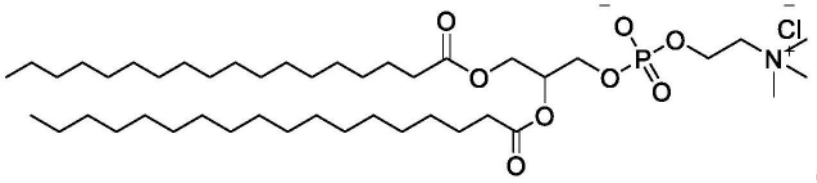
[0065] R_3、R_3'和R_3''各自独立地是烷基$_{(C\leq6)}$或被取代的烷基$_{(C\leq6)}$;且

[0066] X^-是单价阴离子。

[0067] 在一些实施方案中,R_1是烯基$_{(C8-C24)}$或被取代的烯基$_{(C8-C24)}$。在一些实施方案中,R_2是烯基$_{(C8-C24)}$或被取代的烯基$_{(C8-C24)}$。在其它实施方案中,R_1是烷基$_{(C8-C24)}$或被取代的烷基$_{(C8-C24)}$。在其它实施方案中,R_2是烷基$_{(C8-C24)}$或被取代的烷基$_{(C8-C24)}$。在一些实施方案中,R_1和R_2两者是相同的。

[0068] 在一些实施方案中,R_3、R_3'和R_3''各自是相同的。在一些实施方案中,R_3、R_3'和R_3''各

自是甲基。在一些实施方案中,X^-是卤化物阴离子诸如溴化物或氯化物。在一些实施方案中,所述二酰基磷脂酰胆碱进一步定义为:

[0069] 

[0070] 在一些实施方案中,所述可电离的阳离子脂质以约5%至约30%的脂质纳米颗粒组合物的摩尔百分比存在。在一些实施方案中,所述可电离的阳离子脂质的摩尔百分比是约7.5%至约20%。在一些实施方案中,所述可电离的阳离子脂质的摩尔百分比是约11.9%。在一些实施方案中,所述可电离的阳离子脂质以约15%至约30%的脂质纳米颗粒组合物的摩尔百分比存在。在一些实施方案中,所述可电离的阳离子脂质的摩尔百分比是约15%至约25%。在一些实施方案中,所述可电离的阳离子脂质的摩尔百分比是约20.3%。

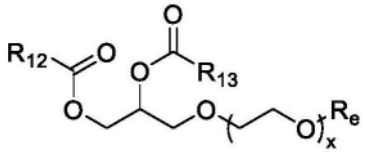
[0071] 在一些实施方案中,所述可电离的阳离子脂质包含在生理pH带正电荷的铵基团且含有至少两个疏水基团。在一些实施方案中,所述铵基团在约6至约8的pH带正电荷。在一些实施方案中,所述可电离的阳离子脂质是树枝状聚合物或树枝块(dendron)。在一些实施方案中,所述可电离的阳离子脂质包含至少两个C6-C24烷基或烯基。在一些实施方案中,所述可电离的阳离子脂质包含至少两个C8-C24烷基。

[0072] 在一些实施方案中,所述磷脂以约8%至约20%的脂质纳米颗粒组合物的摩尔百分比存在。在一些实施方案中,所述磷脂的摩尔百分比是约10%至约14%。在一些实施方案中,所述磷脂的摩尔百分比是约11.9%。在其它实施方案中,所述磷脂以约20%至约23%的脂质纳米颗粒组合物的摩尔百分比存在。在一些实施方案中,所述磷脂的摩尔百分比是约20%至约21%。在一些实施方案中,所述磷脂的摩尔百分比是约20.3%。在一些实施方案中,所述磷脂进一步定义为1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱。在一些实施方案中,所述磷脂是1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺。

[0073] 在一些实施方案中,所述组合物进一步包含类固醇。在一些实施方案中,所述类固醇以约39%至约46%的脂质纳米颗粒组合物的摩尔百分比存在。在一些实施方案中,所述类固醇的摩尔百分比是约40%至约43%。在一些实施方案中,所述类固醇的摩尔百分比是约40.5%。在其它实施方案中,所述类固醇以约15%至约39%的脂质纳米颗粒组合物的摩尔百分比存在。在一些实施方案中,所述类固醇的摩尔百分比是约20%至约27.5%。在一些实施方案中,所述类固醇的摩尔百分比是约23.8%。在一些实施方案中,所述类固醇是胆固醇。

[0074] 在一些实施方案中,所述组合物进一步包含聚乙二醇化的脂质。在一些实施方案中,所述聚乙二醇化的脂质以约0.5%至约10.0%的脂质纳米颗粒组合物的摩尔百分比存在。在一些实施方案中,所述聚乙二醇化的脂质的摩尔百分比是约0.5%至约5.0%。在其它实施方案中,所述聚乙二醇化的脂质的摩尔百分比是约2.0%至约2.8%。在一些实施方案中,所述聚乙二醇化的脂质的摩尔百分比是约2.4%。在其它实施方案中,所述聚乙二醇化的脂质以约3.9%至约4.6%的脂质纳米颗粒组合物的摩尔百分比存在。在一些实施方案中,所述聚乙二醇化的脂质的摩尔百分比是约4.0%至约4.3%。在一些实施方案中,所述聚乙二醇化的脂质的摩尔百分比是约4.1%。在一些实施方案中,所述聚乙二醇化的脂质包含

约1000至约10,000道尔顿的PEG组分。在一些实施方案中,所述PEG脂质是聚乙二醇化的二酰甘油。在一些实施方案中,所述PEG脂质由下式进一步定义:

[0075] 

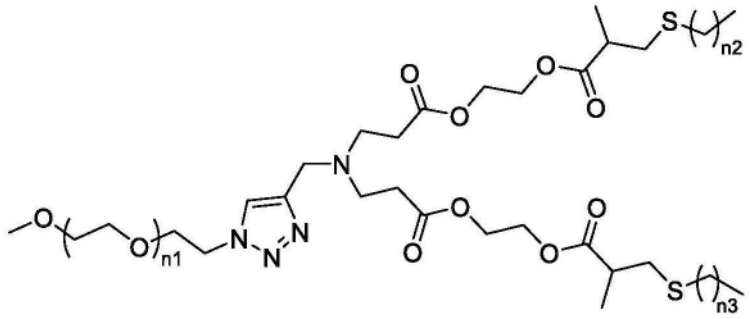
[0076] 其中:

[0077] R_{12}和R_{13}各自独立地是烷基$_{(C\leqslant 24)}$、烯基$_{(C\leqslant 24)}$或这些基团中的任一个的取代形式;

[0078] R_e是氢、烷基$_{(C\leqslant 8)}$或被取代的烷基$_{(C\leqslant 8)}$;且

[0079] x是1-250。

[0080] 在一些实施方案中,所述PEG脂质是二肉豆蔻酰基-sn-甘油或下式的化合物:

[0081] 

[0082] 其中:

[0083] n_1是5-250;且

[0084] n_2和n_3各自独立地是2-25。

[0085] 在一些实施方案中,所述组合物包含胆固醇和DMG-PEG。在一些实施方案中,所述组合物包含DOPE。在其它实施方案中,所述组合物包含DSPC。在一些实施方案中,所述组合物进一步包含DLin-MC3-DMA。在其它实施方案中,所述组合物进一步包含C12-200。在一些实施方案中,所述组合物进一步包含3A5-SC8、3A3-SC8、4A1-SC8、4A3-SC8、具有五个尾巴的5A2-SC8或具有六个尾巴的5A2-SC8。在一些实施方案中,所述组合物进一步包含5A2-SC8。在一些实施方案中,所述组合物进一步包含DOTAP。在一些实施方案中,所述组合物包含胆固醇、DMG-PEG、DSPC、DLin-MC3-DMA和DOTAP。

[0086] 在一些实施方案中,所述治疗剂是小分子诸如选自以下的小分子:抗癌剂、抗真菌剂、精神病学药剂诸如镇痛药、意识水平-改变剂诸如麻醉剂或催眠药、非甾体类抗炎药(NSAIDS)、驱蠕虫药、抗痤疮剂、抗心绞痛药、抗心律不齐药、抗哮喘药、抗细菌剂、抗-良性前列腺肥大药、抗凝血剂、抗抑郁药、抗糖尿病剂、止吐药、抗癫痫药、抗痛风药、抗高血压剂、抗炎剂、抗疟药、抗偏头痛药、抗毒蕈碱剂、抗肿瘤剂、抗肥胖剂、抗骨质疏松剂、抗帕金森综合征药、抗增殖剂、抗原虫剂、抗甲状腺剂、镇咳剂、抗尿失禁剂、抗病毒剂、抗焦虑剂、食欲抑制剂、β-阻滞剂、心脏正性肌力剂、化疗药物、认知增强剂、避孕剂、皮质类固醇、Cox-2抑制剂、利尿剂、勃起功能障碍改善剂、祛痰药、胃肠剂、组胺受体拮抗剂、免疫抑制剂、角质软化剂、脂质调节剂、白三烯抑制剂、大环内酯类、肌肉松弛药、神经安定药、营养剂、麻醉性镇痛剂、蛋白酶抑制剂或镇静剂。在其它实施方案中,所述治疗剂是蛋白。在其它实施方案中,所述治疗剂是核酸诸如治疗性核酸。在一些实施方案中,所述核酸是siRNA、miRNA、初

级-miRNA、信使RNA(mRNA)、成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关的核酸、单指导RNA(sgRNA)、CRISPR-RNA(crRNA)、反式活化crRNA(tracrRNA)、质粒DNA(pDNA)、转移RNA(tRNA)、反义寡核苷酸(ASO)、指导RNA、双链DNA(dsDNA)、单链DNA(ssDNA)、单链RNA(ssRNA)和双链RNA(dsRNA)。在一些实施方案中,所述组合物包含第一核酸和第二核酸。在一些实施方案中,所述第一核酸是信使RNA。在一些实施方案中,所述第二核酸是单指导RNA。在一些实施方案中,所述第一核酸是信使RNA(mRNA)和单指导RNA(sgRNA)。在一些实施方案中,所述核酸以约1:1至约1:100的脂质纳米颗粒组合物:核酸的比率存在。在一些实施方案中,所述比率是约1:10至约1:60。在一些实施方案中,所述比率是约1:40。

[0087] 在一些实施方案中,所述组合物进一步包含蛋白。在一些实施方案中,所述蛋白是与翻译或转录有关的蛋白。在一些实施方案中,所述蛋白与CRISPR过程有关。在一些实施方案中,所述蛋白是CRISPR有关的蛋白。在一些实施方案中,所述蛋白是Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、其同系物或其修饰形式。在一些实施方案中,所述蛋白是Cas9。在一些实施方案中,所述蛋白和所述核酸以约1:1至约1:20的摩尔比存在。在一些实施方案中,所述摩尔比是约1:1至约1:10。在一些实施方案中,所述摩尔比是约1:3至约1:8。

[0088] 在一些实施方案中,所述组合物具有负ζ电位。在一些实施方案中,所述ζ电位是-0.25mV至约-10mV。在一些实施方案中,所述ζ电位是约-0.5mV至约-2mV。在一些实施方案中,所述组合物包含蛋白和核酸两者。在一些实施方案中,所述组合物包含Cas9蛋白和单指导核酸。在一些实施方案中,所述组合物包含Cas9蛋白、单指导核酸和供体DNA。

[0089] 在另一个方面,本公开内容提供了药物组合物,其包含:

[0090] (A)本文描述的组合物;和

[0091] (B)赋形剂。

[0092] 在一些实施方案中,所述药物组合物配制成用于如下施用:口服地、脂肪内地、动脉内地、关节内地、颅内地、真皮内地、病灶内地、肌肉内地、鼻内地、眼内地、心包内地、腹膜内地、胸膜内地、前列腺内地、直肠内地、鞘内地、气管内地、肿瘤内地、脐带内地、阴道内地、静脉内地、膀胱内地、玻璃体内地、以脂质体形式、局部地、粘膜地、胃肠外地、直肠地、结膜下的、皮下地、舌下地、表面局部地(topically)、经颊地、透皮地、阴道地、以乳膏(crèmes)形式、以脂质组合物形式、经由导管、经由灌洗、经由连续输注、经由输注、经由吸入、经由注射、经由局部递送、或经由局部灌注。在一些实施方案中,所述药物组合物配制成用于静脉内或动脉内注射。在一些实施方案中,所述赋形剂是药学上可接受的载体。在一些实施方案中,所述药学上可接受的载体是溶剂或溶液。在一些实施方案中,所述药物组合物配制为单位剂量。

[0093] 在另一个方面,本公开内容提供了包括向细胞递送核酸的调节基因表达的方法,所述方法包括:在足以造成核酸被摄入细胞中的条件下,使所述细胞与本文描述的组合物或药物组合物接触。

[0094] 在一些实施方案中,所述细胞在体外或离体接触。在一些实施方案中,所述细胞在体内接触。在一些实施方案中,所述基因表达的调节足以治疗疾病或病症诸如癌症。

[0095] 在再另一个方面,本公开内容提供了治疗患者中的疾病或病症的方法,所述方法包括给有此需要的患者施用药学有效量的本文描述的组合物或药物组合物,其中所述组合物或药物组合物包含所述疾病或病症的治疗性核酸或蛋白。

[0096] 在一些实施方案中,所述疾病或病症是癌症。在一些实施方案中,所述方法进一步包括向患者施用一种或多种额外的癌症疗法。在一些实施方案中,所述癌症疗法是化疗化合物、外科手术、辐射疗法或免疫疗法。在一些实施方案中,将所述组合物或药物组合物施用给患者一次。在其它实施方案中,将所述组合物或药物组合物施用给患者两次或更多次。在一些实施方案中,所述患者是哺乳动物诸如人。

[0097] 在其它方面,本公开内容提供了制备脂质纳米颗粒的方法,其包括:

[0098] (A)将选择性的器官靶向化合物、可电离的阳离子脂质和磷脂溶解在第一溶液中以形成脂质溶液,其中所述脂质溶液是在有机溶剂中形成;

[0099] (B)将治疗剂溶解在缓冲液中,其中所述缓冲液是具有约6.8至约7.6的pH的缓冲液以形成缓冲的治疗剂溶液;和

[0100] (C)将所述脂质溶液与缓冲的治疗剂溶液混合以形成脂质纳米颗粒。在其它方面,本公开内容提供了制备脂质纳米颗粒的方法,其包括:

[0101] (A)将永久阳离子脂质、可电离的阳离子脂质和磷脂溶解在第一溶液中以形成脂质溶液,其中所述脂质溶液在有机溶剂中形成;

[0102] (B)将治疗剂溶解在缓冲液中,其中所述缓冲液是具有约6.8至约7.6的pH以形成缓冲的治疗剂溶液的缓冲液;和

[0103] (C)将脂质溶液与缓冲的治疗剂溶液混合以形成脂质纳米颗粒。

[0104] 在一些实施方案中,所述有机溶剂是C1-C4醇溶剂诸如乙醇。在一些实施方案中,所述缓冲液是水性PBS缓冲液。在一些实施方案中,所述方法具有大于80%的封装效率。

[0105] 在另一个方面,本公开内容提供了组合物,其包含:

[0106] (A)治疗剂;

[0107] (B)脂质纳米颗粒组合物,其包含:

[0108] (1)可电离的阳离子脂质;

[0109] (2)磷脂;和

[0110] (3)选择性的器官靶向化合物;

[0111] 其中所述器官靶向配体造成所述组合物向肝以外的器官的优先递送。

[0112] 在再另一个方面,本公开内容提供了组合物,其包含:

[0113] (A)治疗剂;

[0114] (B)脂质纳米颗粒组合物,其包含:

[0115] (1)可电离的阳离子脂质;

[0116] (2)磷脂;

[0117] (3)选择性的器官靶向化合物;

[0118] (4)类固醇;和

[0119] (5)PEG脂质;

[0120] 其中所述器官靶向配体造成所述组合物向肝以外的器官的优先递送。

[0121] 在另一个方面,本公开内容提供了包含治疗剂和脂质纳米颗粒组合物的组合物,

所述脂质纳米颗粒组合物包含：

[0122] (A)可电离的阳离子脂质；

[0123] (B)磷脂；和

[0124] (C)选择性的器官靶向化合物；

[0125] 其中所述组合物具有约8至约13的表观pK_a且所述组合物主要将核酸递送至肺。

[0126] 在另一个方面，本公开内容提供了包含治疗剂和脂质纳米颗粒组合物的组合物，所述脂质纳米颗粒组合物包含：

[0127] (A)可电离的阳离子脂质；

[0128] (B)磷脂；

[0129] (C)选择性的器官靶向化合物；

[0130] (D)类固醇；和

[0131] (E)PEG脂质；

[0132] 其中所述组合物具有约8至约13的表观pK_a且所述组合物主要将核酸递送至肺。

[0133] 在另一个方面，本公开内容提供了包含治疗剂和脂质纳米颗粒组合物的组合物，所述脂质纳米颗粒组合物包含：

[0134] (A)可电离的阳离子脂质；

[0135] (B)磷脂；和

[0136] (C)选择性的器官靶向化合物；

[0137] 其中所述组合物具有约3至约6的表观pK_a且所述组合物主要将核酸递送至脾。

[0138] 在再另一个方面，本公开内容提供了包含治疗剂和脂质纳米颗粒组合物的组合物，所述脂质纳米颗粒组合物包含：

[0139] (A)类固醇；

[0140] (B)可电离的阳离子脂质；

[0141] (C)磷脂；

[0142] (D)PEG脂质；和

[0143] (E)选择性的器官靶向化合物；

[0144] 其中所述组合物具有约3至约6的表观pK_a且所述组合物主要将核酸递送至脾。

[0145] 在另一个方面，本公开内容提供了包含治疗剂和脂质纳米颗粒组合物的组合物，所述脂质纳米颗粒组合物包含：

[0146] (A)可电离的阳离子脂质；

[0147] (B)磷脂；和

[0148] (C)C_6-C_{24}二酰基磷脂酰胆碱；

[0149] 其中所述组合物主要将核酸递送至淋巴结。

[0150] 在另一个方面，本公开内容提供了包含治疗剂和脂质纳米颗粒组合物的组合物，所述脂质纳米颗粒组合物包含：

[0151] (A)类固醇；

[0152] (B)可电离的阳离子脂质；

[0153] (C)磷脂；

[0154] (D)PEG脂质；和

[0155] (E)C_6-C_{24}二酰基磷脂酰胆碱;

[0156] 其中所述组合物主要将核酸递送至淋巴结。

[0157] 在再另一个方面,本公开内容提供了包含治疗剂和脂质纳米颗粒组合物的组合物,所述脂质纳米颗粒组合物包含:

[0158] (A)可电离的阳离子脂质;

[0159] (B)磷脂;和

[0160] (C)选择性的器官靶向化合物;

[0161] 其中所述组合物的表面与玻连蛋白相互作用且所述组合物主要将核酸递送至肺。

[0162] 在另一个方面,本公开内容提供了包含治疗剂和脂质纳米颗粒组合物的组合物,所述脂质纳米颗粒组合物包含:

[0163] (A)可电离的阳离子脂质;

[0164] (B)磷脂;

[0165] (C)选择性的器官靶向化合物;

[0166] (D)类固醇;和

[0167] (E)PEG脂质;

[0168] 其中所述组合物的表面与玻连蛋白相互作用且所述组合物主要将核酸递送至肺。

[0169] 在再另一个方面,本公开内容提供了包含治疗剂和脂质纳米颗粒组合物的组合物,所述脂质纳米颗粒组合物包含:

[0170] (A)可电离的阳离子脂质;

[0171] (B)磷脂;和

[0172] (C)选择性的器官靶向化合物;

[0173] 其中所述组合物的表面与Apo H相互作用且所述组合物主要将核酸递送至脾。

[0174] 在另一个方面,本公开内容提供了包含治疗剂和脂质纳米颗粒组合物的组合物,所述脂质纳米颗粒组合物包含:

[0175] (A)类固醇;

[0176] (B)可电离的阳离子脂质;

[0177] (C)磷脂;

[0178] (D)PEG脂质;和

[0179] (E)选择性的器官靶向化合物;

[0180] 其中所述组合物的表面与Apo H相互作用且所述组合物主要将核酸递送至脾。

[0181] 在再另一个方面,本公开内容提供了包含治疗剂和脂质纳米颗粒组合物的组合物,其中存在于组合物的表面处的蛋白冠中的靶向蛋白结合主要存在于靶器官中的靶蛋白,其中所述靶器官不是肝。

[0182] 在一些实施方案中,所述靶向蛋白选自玻连蛋白或β2-糖蛋白I(Apo H)。在一些实施方案中,所述靶向蛋白是玻连蛋白且所述靶器官是肺。在其它实施方案中,所述靶向蛋白是Apo H且所述靶器官是脾。

[0183] 在一些实施方案中,所述脂质纳米颗粒组合物进一步包含选择性的器官靶向化合物,该化合物修饰蛋白冠上的蛋白的结合。在一些实施方案中,所述选择性的器官靶向化合物进一步选自糖、脂质、小分子治疗剂、维生素或蛋白。在一些实施方案中,所述选择性的器

官靶向化合物是脂质诸如永久阳离子脂质、永久阴离子脂质或磷脂酰胆碱。在一些实施方案中,所述脂质纳米颗粒组合物进一步包含可电离的阳离子脂质。在一些实施方案中,所述脂质纳米颗粒组合物进一步包含磷脂。在一些实施方案中,所述脂质纳米颗粒组合物进一步包含类固醇。在一些实施方案中,所述脂质纳米颗粒组合物进一步包含PEG脂质。

[0184] 在另一个方面,本公开内容提供了包含治疗剂和脂质纳米颗粒组合物的组合物,其中所述脂质纳米颗粒组合物包含选择性的器官靶向化合物,且所述选择性的器官靶向化合物导致具有约3至约6的表观pK_a的脂质纳米颗粒组合物。

[0185] 在另一个方面,本公开内容提供了包含治疗剂和脂质纳米颗粒组合物的组合物,其中所述脂质纳米颗粒组合物包含选择性的器官靶向化合物,且所述选择性的器官靶向化合物导致具有约8至约13的表观pK_a的脂质纳米颗粒组合物。

[0186] 就特定组分而言,本文中使用的“基本上没有”在本文中用于表示,特定组分均不被故意地配制在组合物中和/或仅作为污染物或以痕量存在。由组合物的任何非故意污染引起的特定组分的总量优选地低于0.01%。最优选的是其中用标准分析方法不可检测到特定组分的量的组合物。

[0187] 如本文在说明书和权利要求书中所使用的,“一个/种(a)”或“一个/种(an)”可以是指一个/种或多个/种。如本文在说明书和权利要求书中所使用的,当与词语“包含”结合使用时,词语“一个/种(a)”或“一个/种(an)”可以是指一个/种或超过一个/种。如本文中所使用的,在说明书和权利要求书中,“另一个/种(another)”或“另一个/种(a further)”可以是指至少第二个/种或更多个/种。

[0188] 如本文在说明书和权利要求书中所使用的,术语“约”用于指示,值包括用于测定所述值的装置、方法的误差的固有变异,或在研究对象之间存在的变化。

[0189] 从下述详细描述将会明白本公开内容的其它目的、特征和优点。但是,应当理解,尽管详细描述和具体实施例指示了本公开内容的某些实施方案,但是它们仅以说明的方式给出,因为本领域技术人员从该详细描述会明白在本公开内容的精神和范围内的各种变化和修改。

附图说明

[0190] 以下附图形成本说明书的一部分,且被包括以进一步证实本公开内容的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个,结合本文中呈现的具体实施方案的详细描述,可以更好地理解本公开内容。

[0191] 图1A-C:在低剂量静脉内注射以后DOTAP mDLNP制剂介导优异mRNA递送效力和用给定百分比的DOTAP表现出组织特异性递送特征。(图1A)DOTAP mDLNP形成的示意图和DOTAP的结构。将5A2-SC8/DOPE/Chol/DMG-PEG的摩尔比固定为15/15/30/3(命名mDLNP)。然后仅将DOTAP比率从0调至1200以产生一系列DOTAP mDLNP制剂并命名DOTAPY,其中Y代表总脂质中DOTAP的百分比。(图1B)用0.1mg/kg Luc mRNA的剂量在静脉内注射后6h在主要器官中的萤光素酶的离体图像(n=2)。随着DOTAP的摩尔百分比增加,萤光素酶蛋白表达从肝转移到脾,然后转移到肺。(图1C)定量数据证实,DOTAP百分比是组织特异性递送的因素,mDLNP(0%)对肝而言是最好的,DOTAP10-15(在它们之间相似)对脾而言是最好的,且DOTAP50对肺而言是最好的。因为在静脉内注射后仅在肝、脾和肺中检测到萤光素酶表达,

所以计算了每个器官中的相对表达。显然,制剂中的DOTAP(永久阳离子脂质)百分比越高,肝中的发光越少,且当>70%时接近于0。但是,DOTAP百分比越高,肺中的发光越多,且当>70%时接近于100%。DOTAP5-20在脾中显示更高的百分比,且DOTAP10看起来最高。

[0192] 图2A1-2F2:脂质的结构决定了静脉内注射后的mRNA表达概况。通常,随着百分比增加,季脂质将mRNA递送从肝改变到脾、然后改变到肺,且两性离子脂质在更高的百分比帮助将mRNA递送进脾中。但是叔胺脂质不改变mRNA表达器官,而是改善了在肝中的递送效力。为了进一步确认季脂质mDLNP的递送趋势,选择了另外两种季脂质DDAB和EPC进行体内mRNA递送,其修饰策略与DOTAP相同。(图2A1,图2B1)DDAB和EPC表现出它们之间以及与DOTAP的大结构差异,包括在三个对比水平上:疏水尾巴的长度,饱和和不饱和键以及首基的化学结构。形成了含有5%、15%、40%和50%的季脂质的制剂来检测尺寸分布和体内评价(0.1mg/kg,6h,n=2)。(图2A2,图2B2)像DOTAP mDLNP一样,DDAB和EPC也呈现相似的mRNA递送概况。较低的阳离子百分比(5%)将mRNA递送到肝和脾,然后当增加到15%时将更多递送至脾。一旦增加到40%,在肝和脾中几乎观察不到mRNA表达,但是肺表现出高萤光素酶信号,且然后在50%时降低。这些结果与DOTAP mDLNP非常相似,这提示通过季脂质官能化的mDLNP是靶向组织的mRNA递送的通用且可推广的策略。然后就像DOTAP策略一样,将代表性的两性离子脂质DSPC和DOCPe用于评价体内mRNA递送(图2C1,图2D1)。DSPC和DOCPe脂质的结构属于两性离子脂质的一般类别。在静脉内注射之前,通过DLS测试了DSPC和DOCPe mDLNP制剂的尺寸分布。在本文中,DSPC和DOCPe显示了在结构上的两个水平对比:饱和相对于不饱和疏水尾巴,以及电荷位置相对于在首基中。(图2C2,图2D2)令人感兴趣的是,未观察到像季脂质制剂的类似mRNA表达概况。取而代之的是,DSPC和DOCPe在给定范围内(在DSPC中小于80%,和在DOCPe中小于50%)改善了向脾的mRNA递送,无论百分比怎样在肺中未看到任何信号(0.1mg/kg,6h,n=2)。受这些结果启发,用相同策略进一步测试了可电离的叔胺脂质、DODAP和C12-200。除了首基(季胺相对于叔胺)外,DODAP具有与DOTAP相同的结构,C12-200是用于siRNA或mRNA递送的有效类脂质,其具有与DODAP完全不同的结构。(图2E1,图2F1)类似地,两种经修饰的mDLNP的尺寸分布在某些百分比(小于80%)仍然是好的。(图2E2,图2F2)令人惊奇地,DODAP和C12-200不能改变mRNA表达概况(与季脂质或两性离子脂质相比,不同的作用)。取而代之的是,DODAP和C12-200增加了mRNA向肝的递送。支持这一点的是,DODAP20和C12-200显示出比原始mDLNP制剂好得多的递送效力(0.1mg/kg,6h,n=2)。随着DODAP或C12-200的百分比增加(50%或80%),萤光素酶信号下降很多,但是肝仍然是主要器官,而不是脾或肺。

[0193] 图3A-C:为了确定为什么各种脂质可以诱导器官中mRNA表达的巨大差异,然后进行了分布测定和pK_a检测。生物分布和pK_a都对器官中的mRNA表达概况起作用。(图3A)由三种修饰的mDLNP(DOTAP(季脂质)、DSPC(两性离子脂质)和DODAP(叔胺脂质))递送的Cy5.5-Luc mRNA制剂的器官分布。以0.5mg/kg的剂量静脉内注射C57BL/6小鼠,并在注射后6小时成像(n=2)。与原始的mDLNP制剂(无DOTAP)相比,DOTAP改变了mRNA的器官分布,DOTAP10和DOTAP50均可以将mRNA递送到肺中,且DOTAP50增加更多,这可以部分地解释为什么DOTAP制剂在更高的百分比介导肺中的mRNA表达。但是,即使在80%(DSPC)或50%(DODAP)百分比,DSPC和DODAP不能更多地改变mRNA分布。还注意到,如图1和2中所示,对于DOTAP50和DSPC80而言,mRNA保留在肝中,前者是靶向肺的NP,后者是靶向脾的NP。因此,分布不是解释该机制

的唯一因素。(图3B)然后测量了所有测试的和有效的制剂的pK_a,包括原始的mDLNP、DOTAP、DDAB、EPC、DSCP、DOCPe、DODAP和C12-200修饰的制剂。(图3C)最后,基于定义的规则,绘制了pK_a和组织特异性mRNA递送之间的关系。在这里,如表中所示,设计了8条评分规则。显而易见,所有肝靶向制剂具有狭窄的pK_a(~6-7),脾靶向制剂无明显的范围,但肺靶向递送需要高pK_a(>9.25)。

[0194] 图4A-4C:在Td-Tomato和C57BL/6小鼠中都实现了肝和肺基因编辑。(图4A)示意图显示,Cas9 mRNA和sgTom1的共同递送激活了Td-Tomato小鼠中的Td-Tomato表达。(图4B)当分别用mDLNP和DOTAP50制剂处理时,在肝和肺中诱导了Td-Tomato表达。给小鼠静脉内注射mDLNP和DOTAP50制剂以共同递送IVT Cas9 mRNA和修饰的sgTom1(4/1,重量/重量),总剂量为2.5mg/kg(各50μg),然后在处理后第10天检测主要器官的荧光。(图4C)T7E1测定显示,通过体内PTEN编辑进一步证实了组织特异性特征。给C57 BL6小鼠静脉内注射mDLNP、DODAP20或DOTAP50以达到组织特异性基因编辑,总剂量为2.5mg/kg(各50μg),IVT Cas9 mRNA与修饰的sgPTEN的重量比为4/1,且检测时间为处理后第10天。

[0195] 图5A-C:DOTAP mDLNP制剂的表征(n=3)。通过动态光散射(DLS)检测尺寸、PDI(图5A)和ζ电位(图5B)。(图5C)通过Ribogreen RNA测定测试了封装效率(EE%)。

[0196] 图6A-C:DOTAP制剂显示优异的mRNA递送效率,并且对于乙醇或酸性缓冲液没有良好耐受的这些货物(例如蛋白)表现出递送潜力。(图6A)DOTAP mDLNP介导了Huh-7细胞和A549细胞中的高Luc mRNA表达,并揭示5%-50%的DOTAP百分比对于mRNA递送是更好的,且10%是最好的。在转染后24h,以50ng/孔的mRNA的剂量测试了Luc mRNA表达和细胞生存力(n=4)。在这里,在PBS而不是柠檬酸缓冲液中形成DOTAP mDLNP(10mM,pH 4.0)。(图6B和6C)减少的乙醇体积百分比不影响表征和mRNA递送功效。为了测试乙醇对mRNA递送的影响,选择DOTAP25作为模型并形成具有乙醇与PBS的不同体积比(1:3、1:5、1:7.5和1:10)的四种制剂。所有四种制剂在FaDu细胞中显示相似的EE、尺寸和PDI(图6B),并表现出相等的mRNA递送功效(图6C)(50ng/孔的mRNA,24h,n=4)。因此,使用1XPBS(pH 7.4)代替酸性缓冲液(10mM pH 4.0)优化该制剂,并显著降低了乙醇百分比,这提供了以下可能性:DOTAP制剂递送在高乙醇浓度或酸性缓冲液中不能良好耐受的那些货物,例如蛋白。

[0197] 图7:主要器官中的生物分布的定量数据。以0.5mg/kg的剂量给C57BL6小鼠静脉内注射各种Cy5.5-Luc mRNA制剂(n=2)。6小时后将心脏、肺、肝、脾和肾分离、成像并定量。

[0198] 图8A-8C:对于由PBS或柠檬酸缓冲液形成的DOTAP10制剂,尺寸分布和Luc mRNA递送效力没有大差异,但不适用于DSPC50和DODAP50。为了测试缓冲液对体内mRNA递送效力的影响,选择了DOTAP10(季脂质)、DSPC50(两性离子脂质)和DODAP50(叔胺脂质)。以0.1mg/kg的剂量给C57 BL6小鼠静脉内注射每种Luc mRNA制剂,6小时后,将主要器官分离并成像(n=2)。(图8A)在PBS形成的和柠檬酸缓冲液(10mM,pH 4.0)形成的DOTAP10之间,尺寸和递送效力没有太大改变。(图8B和8C)但是,柠檬酸缓冲液形成的DSPC50和DODAP50显著改善了mRNA递送效果,尽管在尺寸分布上没有大差异。可以添加DOTAP(或另一种永久阳离子脂质)用于在中性pH(例如7.4PBS缓冲液)形成LNP。

[0199] 图9:由mDLNP递送的IVT Cas9 mRNA质量测试的蛋白质印迹结果。为了实现组织特异性基因编辑,将Cas9 mRNA和sgRNA设计为共同递送。首先,通过IVT制备Cas9 mRNA,并通过蛋白质印迹分析进行质量测试。在该测定中,由Lipofectamine 2000和商业Cas9 mRNA

(TriLink)两者递送Cas9 pDNA。mDLNP是阳性对照,且mCherry mDLNP是阴性对照。在转染前一天,将293T细胞接种在12孔板中,并在进行蛋白质印迹之前按每种条件处理细胞24小时。IVT Cas9 mRNA的效果比商业mRNA好得多,因此,将IVT Cas9 mRNA用于进行体内基因编辑。

[0200] 图10A和10B:Td-Tomato小鼠中的sgRNA筛选和重量比(Cas9mRNA/sgRNA)优化。为了在Td-Tomato小鼠中达到最大基因编辑,筛选了sgRNA序列,并优化了Cas9 mRNA与sgRNA的重量比。(图10A)Cas9/sgTom1、Cas9/sgTom2和Cas9/sgLoxP mDLNP制剂的尺寸分布以及肝中的td-tomato表达。以3mg/kg的总剂量(Cas9/sgRNA,4/1,重量/重量)给小鼠静脉内注射三种mDLNP,在第7天对器官成像。看起来sgTom1是三种候选物中的领先者。(图10B)选择SgTom1并通过2/1、4/1和6/1的不同重量比(Cas9/sgRNA)关于肝基因编辑进一步测试。以3mg/kg的剂量将mDLNP用于静脉内注射,并在第7天检测td-tomato表达。在该实施例中,4/1的效果优于2/1和6/1。

[0201] 图11A-11G:封装Cas9/sgRNA复合物以后Cas9/sgRNA复合物和DOTNP脂质纳米颗粒的表征。在PBS(pH7.4)中和在柠檬酸盐缓冲液(pH4.2)中的Cas9/sgLUC复合物(mol/mol=1/1)的尺寸(图11A)和ζ电位(图11B)。在柠檬酸盐缓冲液中制备的Cas9/sgLUC复合物的尺寸是非常大的(大于100nm),并且ζ电位是带正电荷的,因此不可能被脂质纳米颗粒封装。但是,在PBS中制备的Cas9/sgLUC复合物的尺寸是紧凑的(小于20nm)并且具有负电荷,因此它能够被脂质纳米颗粒封装。用不同的Cas9/sgRNA摩尔比(1/1、1/3和1/5)制备的Cas9/sgLUC复合物的尺寸(图11C)和ζ电位(图11D)。与Cas9/sgLUC复合物(1/1,mol/mol)相比,较高的摩尔比(1/3和1/5,mol/mol)显示出较小的尺寸和较多的负电荷,这对于脂质纳米颗粒封装是有益的。当以不同的摩尔比(1/1、/3、1/5)制备时,封装Cas9/sgLUC复合物的DOTNP10脂质纳米颗粒(命名DOTNP10-L)的尺寸(图11E)和ζ电位(图11F)。(图11G)DOTNP10-L(1/3,mol/mol)的TEM图像。DOTAP脂质纳米颗粒由五种组分(包括5A2-SC8、胆固醇、DOPE、DMG-PEG和DOTAP)组成。5A2-SC8、胆固醇、DOPE和DMG-PEG的摩尔比是固定的(15:15:30:5,mol/mol),且DOTNPX是指具有不同摩尔百分比的DOTAP的DOTNP。在这里,使用了不同的sgRNA,包括sgLUC、sgGFP、sgTOM、sgPTEN等。为了区分它们,在DOTNP的末尾添加了每个基因的第一个字母。例如,DOTNP10-L是指封装Cas9/sgLUC复合物的DOTNP10脂质纳米颗粒;DOTNP10-G是指封装Cas9/sgGFP复合物的DOTNP10脂质纳米颗粒。

[0202] 图12A-12F:DOTNP脂质纳米颗粒能够将Cas9/sgRNA复合物递送进细胞核并在体外表现出有效的基因编辑。(图12A)与封装Cas9-EGFP/sgLUC复合物(1/3,mol/mol)的DOTNP10一起温育1h、3h、6h和24h后Hela-Luc细胞的共焦图像(使用9nM sgRNA)。绿色:EGFP融合的Cas9蛋白;蓝色:用Hoechst 33342染色的细胞核。红色箭头指示DOTNP10进入细胞核的过程。(图12B)通过TIDE测序分析,与不同摩尔比的DOTNP10-L一起温育3天后在LUC基因座处的插入缺失百分比(使用24nM sgRNA)。封装Cas9/sgGFP的DOTNP10脂质纳米颗粒(DOTNP10-G)用作阴性对照。在这里,使用了两种商业Cas9蛋白(GeneArt Cas9和Truecut Cas9)。(图12C)与不同制剂一起温育的Hela-Luc细胞的T7EI切割测定(使用24nM sgRNA)。1.100bp DNA梯子;2.PBS;3.DOTNP10-G(1/3);4.DOTNP10-L(1/1);5.DOTNP10-L(1/3);6.DOTNP10-L(1/5);7.在柠檬酸盐缓冲液中制备的DOTNP10-L(1/3)。使用了两种商业Cas9蛋白(GeneArt Cas9和Truecut Cas9)。在它们中,当使用Truecut Cas9蛋白时,1/3的摩尔比显示最佳的基因编辑。(图12D)与DOTNP10-L和DOTNP10-G一起温育的SKOV3-GFP细胞的荧光显微术图像

(使用24nM sgRNA)。在这里,将DOTNP10-L用作阴性对照。(图12E)与DOTNP10-L和DOTNP10-G一起温育的SKOV3-GFP细胞的流式细胞计量术分析。(图12F)通过流式细胞计量术测得的与DOTNP10-L和DOTNP10-G一起温育的SKOV3-GFP细胞的平均荧光强度。

[0203] 图13A和13B:DOTNP在体内显示组织特异性的基因编辑。(图13A)在静脉内注射不同制剂(1.5mg/kg sgRNA/小鼠)后7天主要器官中的tdTomato荧光的离体图像。DOTNP5-T是指封装Cas9/sgTom复合物的DOTNP5脂质纳米颗粒;DOTNP10-T是指封装Cas9/sgTom复合物的DOTNP10脂质纳米颗粒;DOTNP50-T是指封装Cas9/sgTom复合物的DOTNP50脂质纳米颗粒。在DOTNP5-T处理组中仅在肝中观察到tdTomato荧光;在DOTNP10-T组中,在肺中可见轻微荧光,且如果将DOTAP剂量进一步增加至50%(DOTNP50-T),则在肺中观察到大部分tdTomato荧光。(图13B)与DOTNP5-P(封装Cas9/sgPTEN复合物的DOTNP5脂质纳米颗粒)、DOTNP10-P(封装Cas9/sgPTEN复合物的DOTNP10脂质纳米颗粒)和DOTNP50-P(封装Cas9/sgPTEN复合物的DOTNP50脂质纳米颗粒)一起温育后肝和肺器官中的T7EI切割测定(2mg/kg sgRNA/小鼠)。结果与通过离体成像获得的结果一致。仅在用DOTNP5-P处理后在肝中检测到基因编辑;当与DOTNP10-P一起温育后,在肝和肺中均得到基因编辑;而在DOTNP50-P处理组中,在肺中观察到大部分基因编辑。

[0204] 图14A和14B显示了MC3 LNP和DOTAP修饰的MC3制剂的细节,包括(图14A)每种组分的结构、(图14B)摩尔比、总脂质与mRNA的重量比、尺寸和PDI。

[0205] 图15A和15B显示了选择DLin-MC3-DMA(图15A)和C12-200(图15B)并以0.1mg/kg的剂量用DOTAP策略评价(6h,n=2)。随着DOTAP百分比从0增加到50%,基于MC3和C12-200的LNP显示出相同的mRNA表达概况,像mDLNP一样,其中萤光素酶信号从肝转移至脾,并最后转移至肺。

[0206] 图16A和16B显示了C12-200 LNP和DOTAP修饰的C12-200制剂的细节,包括(图16A)每种组分的结构、(图16B)摩尔比、总脂质与mRNA的重量比、尺寸和PDI。

[0207] 图17A和17B显示了(图17A)mDLNP的进一步优化。作为mDLNP中的关键脂质,将5A2-SC8用作“第五”脂质以修饰mDLNP以形成四种具有10%至30%的额外百分比的制剂。(图17B)离体萤光素酶图像和定量数据显示,额外的15%至25%的5A2-SC8显著提高了mRNA递送功效,并且20%具有最高信号(0.05mg/kg,6h,n=2)。

[0208] 图18显示了5A2-SC8、DOPE、胆固醇和DMG-PEG的结构。mDLNP是先前工作开发的用于肝靶向治疗剂的有效且安全的mRNA递送载体,它由摩尔比为15/15/30/3的5A2-SC8、DOPE、胆固醇和DME-PEG组成。

[0209] 图19A-19G显示选择性的器官靶向(SORT)允许将脂质纳米颗粒(LNP)系统地和可预测地工程改造以准确地编辑特定器官中的细胞。(19A)向传统的LNP中添加补充组分(称为SORT脂质)系统地改变体内递送概况,并根据SORT脂质的百分比和生物物理学特性介导组织特异性递送。这种通用方法成功地重定向了多种类别的纳米颗粒。此处显示了静脉内地注射0.1mg/kg萤光素酶mRNA的小鼠的生物发光图像,所述萤光素酶mRNA是在肺和脾特异性的DLin-MC3-DMA LNP(Onpattro SNALP)以及肝增强的基于5A2-SC8可降解树枝状聚合物的LNP(DLNP)内。将SORT脂质包含在4-组分5A2-SC8、DLin-MC3-DMA和C12-200 LNP中创建了5-组分SORT LNP。(19B)以5A2-SC8/DOPE/Chol/DMG-PEG/SORT脂质=15/15/30/3/X(mol/mol)的摩尔比配制5A2-SC8 SORT LNP,其中将X从0调节至1200以制备具有0%至100%SORT

脂质(总脂质的分数)的LNP系列。在这里,永久阳离子脂质(DOTAP)的包含根据DOTAP百分比系统地将萤光素酶蛋白表达从肝转移到脾再转移到肺(0.1mg/kg Luc mRNA,6h)。(19C)定量数据证实,SORT脂质百分比是组织特异性递送的因素;0%(mDLNP)对于肝是最佳的;5-15%对于脾是最佳的;且50%对于肺是最佳的。(19D)在每个器官中的相对萤光素酶表达证实,分数表达是可预测调谐的。(19E)阴离子SORT脂质的包含使得能够选择性地将mRNA递送至脾。当将18PA脂质引入mDLNP中达到40%时,仅在脾中观察到萤光素酶表达(0.1mg/kg Luc mRNA,6h)。(19F)以0.1mg/kg Luc mRNA的剂量静脉内注射DLin-MC3-DMA SORT LNP后6小时主要器官中的离体发光图像。随着DOTAP的摩尔百分比增加,萤光素酶表达从肝转移到肺。18PA介导的Luc mRNA向脾的唯一递送。对于修饰的C12-200 LNP(0.1mg/kg,6h),观察到了相同的趋势。(19G)选择的SORT脂质制剂的细节。

[0210] 图20A-20C显示了(20A)DOTAP和18PA SORT LNP的细节,包括摩尔比、摩尔百分比、总脂质与mRNA的重量比、尺寸、PDI和ζ电位。(20B)使用改良的乙醇稀释方法配制LNP。将SORT脂质包含在乙醇相中,并且在LNP形成过程中将sgRNA/mRNA封装。(20C)显示了在标准mDLNP和DOTAP/18PA SORT制剂中使用的脂质的化学结构。对于SORT的开发,基于可降解树枝状聚合物的可电离的阳离子脂质(称作5A2-SC8)是可以递送siRNA/miRNA以延长在MYC-驱动的肝癌的遗传工程改造小鼠模型中的存活并在肝中触发多倍体的LNP的重点(Zhou等人,2016;Zhang等人,2018a;Zhang等人,2018b)。针对mRNA递送优化的LNP摩尔组合物被聚焦至肝命名的mDLNP(Cheng等人,2018)。制备了5A2-SC8/DOPE/胆固醇/DMG-PEG2000=15/15/30/3(mol)的这种靶向肝的基础mRNA制剂,并补充了SORT脂质以制备SORT LNP(细节在20A中)。为了进一步清楚起见,传统的4-组分LNP由可电离的阳离子脂质(在本文中定义为包含pK_a<8的氨基)、两性离子磷脂(定义为带有相等数目的正电荷和负电荷的脂质)、胆固醇和聚(乙二醇)(PEG)脂质(最常见的是PEG2000-DMG)组成。SORT LNP包含第5种脂质,诸如永久阳离子脂质(定义为带正电荷,没有pK_a或pK_a>8)或永久阴离子脂质(定义为带负电荷)。

[0211] 图21A和21B显示了随掺入的DOTAP百分比而变化的在(图21A)Huh-7肝细胞和(图21B)A549肺细胞中DOTAP修饰的SORT mDLNP的体外萤光素酶(Luc)mRNA递送结果。Luc mRNA递送结果显示,具有5%-50%的DOTAP百分比的LNP在Huh-7肝细胞和A549肺细胞中递送了最多的mRNA。具有10% DOTAP的SORT LNP在体外比以前报道的基础mDLNP更有效得多。对于任何制剂均未观察到可察觉的细胞毒性,并且所有都是均匀的(低PDI),具有在90nm至150nm范围内的直径(图20)。表面电荷的测量揭示,DOTAP与mRNA一起封装在内部,而不是封装在LNP表面上,因为当DOTAP小于60%时,ζ电位接近于0。表面电荷仅在高于65%的百分比时才变为正电荷(图20),这揭示可以发现具有选择性组织趋向性的PEG脂质包被的SORT LNP具有接近中性的表面电荷,这是临床转化的属性。在转染前一天将细胞以1×10^4个细胞/孔的密度接种到96孔板中。在处理后24小时以50ng/孔的Luc mRNA的剂量测量Luc mRNA表达和细胞生存力(n=4)。

[0212] 图22A-22C显示了在(22A)DLin-MC3-DMA SNALP(Jayaraman等人,2012)和(22B)C12-200 LLNP(Love等人,2010)中使用的脂质的化学结构。制备了DLin-MC3-DMA/DSPC/胆固醇/DMG-PEG2000=50/10/38.5/1.5(mol)和C12-200/DOPE/胆固醇/DMG-PEG2000=35/16/46.5/2.5(mol)的靶向肝的基础mRNA制剂,并在以后补充SORT脂质以制备SORT LNP。(22C)使用DLin-MC3-DMA和C12-200的其它SORT制剂的表和结果。对于所有DLin-MC3-DMA和

C12-200 LNP,总脂质/mRNA的重量比为20/1(重量/重量)。

[0213] 图23A-23C显示SORT依赖于一般的生物物理特性而不是确切的化学结构。(23A)SORT脂质可分为具有确定的生物物理特性的特定组。永久阳离子SORT脂质(DDAB、EPC和DOTAP)都产生相同的mRNA递送概况(基于SORT脂质百分比,肝至脾至肺)(0.1mg/kg Luc mRNA,6h)。(23B)阴离子SORT脂质(14PA、18BMP、18PA)都产生相同的mRNA递送概况(基于SORT脂质百分比,仅脾)。(23C)具有叔氨基的可电离的阳离子SORT脂质(DODAP,C12-200)增强了肝递送,而在肺中没有任何萤光素酶表达(0.1mg/kg Luc mRNA,6h)。

[0214] 图24A和24B显示了进一步应用SORT以利用可电离的阳离子脂质作为SORT脂质来进一步增强mDLNP肝递送。(24A)SORT的示意图。(24B)5A2-SC8用作SORT脂质,使用SORT方法用额外的5A2-SC8补充基础mRNA mDLNP制剂(5A2-SC8/DOPE/胆固醇/DMG-PEG2000＝15/15/30/3(mol))。离体萤光素酶图像和定量数据显示,当添加额外的15％-25％SORT脂质时,急剧改善了mRNA递送功效。用20％掺入产生了最大表达(0.05mg/kg,6h,n＝2)。因此,SORT允许开发具有增加的效力的第二代mDLNP。

[0215] 图25A和25B显示了评价两性离子SORT脂质的作用。随着SORT脂质掺入的增加,两性离子SORT脂质在靶向肝的mDLNP中的包含改变了从肝到脾的表达。在静脉内注射后,80％DSPC和50％ DOCPe SORT LNP仅将mRNA递送至脾。(25A)SORT方法的示意图。(25B)在静脉内注射后6h,主要器官中的离体发光图像。DSPC和DOCPe(具有不同结构的两性离子脂质)以增加的百分比改善了Luc mRNA向脾中的递送(0.1mg/kg,6h,n＝2)。

[0216] 图26A和26B SORT被评价为“激活”无活性LNP制剂的潜在策略。(26A)用SORT脂质补充无活性C1制剂以测试SORT是否可以赋予活性的示意图。(26B)C1 LNP(无活性LNP)和DOTAP(或DODAP)C1 SORT LNP的详细信息,包括脂质摩尔比、摩尔百分比、总脂质与mRNA的重量比、尺寸和PDI。以允许mRNA封装和有利的生物物理特性(均匀<200nm尺寸)的方式制备C1 LNP。但是,在静脉内注射C1 LNP之后根本没有蛋白表达。因此,询问SORT是否可以“激活”死亡的LNP。评价了DODAP和DOTAP SORT脂质。DODAP@C1 LNP将mRNA递送到脾和肝中,并且DOTAP@C1LNP将mRNA递送到肺和脾中(0.1mg/kg,6h,n＝2)。因此,SORT可以激活死亡的LNP并提供组织选择性。

[0217] 图27A和27B显示SORT改变了LNP生物分布,并揭示了相对表观pK_a和器官特异性之间的关联。(27A)荧光Cy5-标记的mRNA被用来跟踪SORT LNP的生物分布。DOTAP作为SORT脂质的包含增加了在肺中mRNA积累,这部分地解释了将RNA递送至小鼠肺的能力。18PA增加了向脾中的摄取。DODAP稍微增加了肝积累,并减少了脾积累(0.5mg/kg,6h)。应当指出,此数据描述了SORT LNP位置,而不是在细胞内有效递送mRNA的能力。(27B)通过TNS测定法测量了所有67种有效mRNA制剂的相对表观pK_a,并相对于在不同器官中的体内递送效力(通过翻译成蛋白的mRNA进行功能递送)作图。如预期的那样,所有肝靶向制剂具有狭窄的pK_a(6-7)。令人惊奇的是,肺靶向递送需要高pK_a(>9),且较低的pK_a(<6)辅助脾递送。应当指出,所有SORT LNP含有可电离的阳离子脂质(用于胞内体逸出)以及其它带电荷和不带电荷脂质的混合物(其共同介导组织趋向性)。

[0218] 图28A和28B显示Cy5-标记的mRNA被用于跟踪SORT LNP的生物分布。在静脉内注射后DSPC mDLNP的器官分布。(28A)SORT的示意图。(28B)用DSPC mDLNP处理的主要器官的Cy5荧光和定量数据(0.5mg/kg,6h,n＝2)。

[0219] 图29显示改良的TNS测定法被用于测量mRNA制剂的整体/表观pK_a。总共评价了67种NP成功制剂(高体内效力)。当产生50％的归一化信号时,与基础LNP制剂(不添加SORT脂质)相比,估计相对pK_a。TNS测定法在历史上已经用于测量具有单一可电离的阳离子脂质和中性(不可电离的)辅助脂质的LNP,从而产生捕获在自组装LNP内的阳离子脂质的电离行为的值。在这里使用一种改进的方法,因为具有高百分比(>40％)的永久阳离子脂质的SORT LNP(例如DOTAP)不能很好地缓冲电荷,即使它们含有可电离的阳离子脂质。由于含有多种带电荷脂质的SORT LNP的复杂性(而不是在传统LNP中的单一可电离的阳离子脂质),因此重点是在50％的相对信号,该信号与体内组织比活性相关。

[0220] 图30A和30B显示可电离的脂质(例如5A2-SC8)的包含是效力所需要的。含有SORT脂质、但不含可电离的阳离子脂质的LNP是无活性的(in active)。(30A)SORT C2 LNP的示意图。(30B)C2和SORT脂质C2 LNP的细节。离体萤光素酶图像显示,DODAP和DOTAP均无法实现C2 LNP的显著mRNA递送。这些结果指示,成功的mRNA递送需要可电离的氨基脂质(0.1mg/kg,6h,n＝2)。

[0221] 图31A-31E显示了通过Cre mRNA递送SORT LNP在Td-Tomato小鼠中实现的组织特异性基因编辑。(31A)示意图显示,Cre mRNA的递送激活Td-Tom转基因小鼠中的Td-Tom表达。(31B)mDLNP和20％ DODAP LNP特异性地在肝中诱导Td-Tom荧光,且50％ DOTAP LNP选择性地编辑肺。在静脉内注射Cre mRNA负载的LNP(0.3mg/kg)后2天检测了主要器官的Td-Tom荧光。(31C)30％18PA SORT LNP诱导了脾中的基因编辑(注意到在PBS注射的小鼠中的高肝背景荧光)。(31D)使用共焦显微术进一步验证有效的组织编辑。比例尺＝20μm和100μm。(31E)使用FACS定量在肝、肺和脾的确定细胞类型群体内的$TdTom^+$细胞的百分比(第2天,0.3mg/kg)。

[0222] 图32显示B6.Cg-Gt(ROSA)26$Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze}$/J(Ai9)小鼠在TdTom的吸收区域中表现出一些自发荧光。此外,在不同器官之间存在TdTom自发荧光的大差异(n＝2)。肝和肾显示最高信号,而脾显示最低。尽管这不会干扰大多数器官中编辑的检测(当适当调整激发设置以消除背景时),但由于背景脾比其它器官低这么多,因此其确实使脾TdTom表达的检测复杂化。

[0223] 图33A-33C显示,通过共同递送Cas9 mRNA和sgRNA,在Td-Tom转基因小鼠和野生型C57/BL6小鼠中均实现了在脾中的CRISPR/Cas基因编辑。(33A)示意图显示,Cas9 mRNA和sgTom1的共同递送激活Td-Tom小鼠中的Td-Tom表达。(33B)通过脾靶向制剂30％18PA SORT LNP在脾和肝中诱导了Td-Tom表达。定量数据显示,脾中的编辑高于肝中。在以4mg/kg的总剂量用Cas9 mRNA和修饰的sgTom1的共同递送(2/1,重量/重量)进行静脉内处理后第2天,检测了主要器官的Td-Tom荧光。(33C)T7E1测定指示,脾的特异性PTEN编辑是通过Cas9 mRNA(IVT)和sgPTEN的共同递送而获得。以4mg/kg的总剂量向C57/BL6小鼠静脉内注射30％18PA SORT LNP(Cas9 mRNA/sgPTEN,2/1,重量/重量),并在第2天检测PTEN编辑。在该情况下,未观察到肝编辑,从而提示可以实现脾特异性编辑。

[0224] 图34显示通过施用单次0.3mg/kg Cre mRNA剂量,DODAP-20SORT LNP实现了肝细胞中几乎100％的TdTom编辑。如在流式细胞计量术直方图中所示,在TdTom-对照小鼠和TdTom+20％ DODAP处理的小鼠之间存在完全分离。在肝灌注后,与对照肝相比,用20％DODAP SORT LNP处理的小鼠的切除肝令人惊讶地为亮红色。即使没有荧光激发,由于TdTom

表达的完全激活,肝也发红光。给TdTom小鼠注射0.3mg/kg Cre mRNA,然后在2天后处死(n＝3)。通过两步胶原酶灌注分离肝细胞,并通过流式细胞计量术分析TdTom荧光。

[0225] 图35显示了用于分析肺细胞中的TdTom+表达的FACS门控策略。Ghost Red 780用于区分活细胞和死细胞。EpCam+用于定义上皮细胞,CD45+和CD31-用于定义免疫细胞,且CD45-和CD31+用于定义内皮细胞。基于PBS注射的对照小鼠,绘制细胞类型中的Td-Tom+的门控。给Td-Tom小鼠注射Cre mRNA制剂,并在2天后通过流式细胞计量术检测给定细胞类型中的Td-Tom+(n＝3)。

[0226] 图36显示了用于分析脾细胞中的TdTom+表达的FACS门控策略。Ghost Red 780用于区分活细胞和死细胞。CD44+用于区分免疫细胞,然后CD3+和CD11b-用于T细胞,CD3-和CD11b+用于巨噬细胞,CD19+和CD11b-用于B细胞。基于PBS注射的对照小鼠,绘制细胞类型中的Td-Tom+的门控。给Td-Tom小鼠注射Cre mRNA制剂,并在2天后通过流式细胞计量术检测给定细胞类型中的Td-Tomato+(n＝3)。

[0227] 图37A-37G显示了通过共同递送Cas9 mRNA和sgRNA以及通过递送Cas9 RNP,SORT LNP介导Td-Tom转基因小鼠和C57/BL6野生型小鼠的组织特异性的CRISPR/Cas基因编辑。(37A)示意图显示,Cas9 mRNA(或Cas9蛋白)和sgTom1的共同递送激活了Td-Tom转基因小鼠中的Td-Tom表达。(37B)mDLNP和20％ DODAP LNP特异性地在肝中诱导Td-Tom荧光,且50％ DOTAP LNP选择性地编辑肺。在以2.5mg/kg的总剂量静脉内注射Cas9 mRNA和修饰的sgTom1(4/1,重量/重量)后10天,检测Td-Tom荧光。(37C)通过组织切片的共焦成像证实了tdTom表达。比例尺＝20μm和100μm。(37D)将Cas9 mRNA和sgPTEN在SORT LNP中共同递送以选择性编辑C57/BL6小鼠的肝、肺和脾(2.5mg/kg的总剂量(Cas9mRNA/sgPTEN,4/1,重量/重量;在单次注射后10天测量)。T7E1测定指示实现了组织特异性PTEN编辑。(37E)H&E切片以及IHC进一步证实成功的PTEN编辑。透明的细胞质指示在H&E切片中的脂质堆积和IHC图像中的PTEN丢失。比例尺＝60μm。(37F)在7％ DOTAP或55％ DOTAP SORT LNP中的Cas9/sgTom1核糖核蛋白(RNP)复合物的递送分别在肝和肺中特异性地诱导Td-Tom荧光。在以1.5mg/kg sgTom1的剂量静脉内注射Cas9/sgTom1RNP后7天检测Td-Tom荧光。通过组织切片的共焦成像证实了tdTom表达。比例尺＝20μm和100μm。(37G)肝和肺趋向性的SORT LNP也递送Cas9/sgPTEN RNP以选择性地编辑C57/BL6小鼠的肝和肺(1.5mg/kg sgPTEN;在单次注射后7天测量)。T7E1测定指示实现了组织特异性PTEN编辑。

[0228] 图38显示了通过蛋白质印迹评价IVT Cas9 mRNA。在转染前一天将293T细胞接种在12孔板中,在进行蛋白质印迹之前用每种条件处理细胞24小时。通过Lipofectamine 2000递送Cas9 pDNA,并且通过mDLNP递送mRNA。

[0229] 图39A和39B显示了通过Cas9 mRNA和sgRNA共同递送策略优化了IVT Cas9 mRNA与sgTom1的重量比。(39A)示意图显示,Cas9 mRNA和sgTom1的共同递送激活了转基因小鼠中的Td-Tom表达。(39B)在静脉内注射后第7天,对主要器官的Td-Tom荧光成像,表明2/1的Cas9/sgTom1(重量/重量)是最佳的。总RNA剂量为1mg/kg,IVT Cas9 mRNA和修饰的sgTom1被mDLNP共封装。

[0230] 图40A-40I显示了一种模块方案,该方案被开发以实现CRISPR/Cas9核糖核蛋白(RNP)的全身性纳米颗粒递送以用于组织特异性的基因组编辑。(40A)永久阳离子补充组分(例如DOTAP)向传统LNP制剂中的添加使得能够在纳米颗粒形成过程中使用中性缓冲液进

行Cas9/sgRNA复合物的封装和保护。DOTAP百分比介导的组织特异性的基因编辑的精确调整。(40B)在PBS缓冲液(pH 7.4)和柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0)中制备的Cas9/sgLuc RNP的尺寸分布。尺寸增加可能是由于变性。(40C)在PBS和柠檬酸盐缓冲液中制备的封装Cas9/sgLuc RNP的5A2-DOT-10的尺寸分布。不用RNP制备的5A2-DOT-10用作对照。(40D)具有1/1、1/3和1/5的Cas9/sgLuc摩尔比的Cas9/sgRNA RNP的尺寸分布。(40E)具有1/1、1/3和1/5的摩尔比的封装Cas9/sgLuc的5A2-DOT-10的尺寸分布。(40F)Cas9/sgRNA RNP的ζ电位显示电荷降低。(40G)对于具有不同摩尔比的封装Cas9/sgLuc的5A2-DOT-10,没有观察到ζ电位的显著差异。(40H)封装EGFP融合的Cas9/sgRNA的5A2-DOT-10LNP的时间依赖性细胞摄取,显示出细胞质释放和逐渐进入细胞核。(40I)使用特定胞吞作用抑制剂研究了5A2-DOT-10LNP摄取的抑制。AMI:巨胞饮的抑制剂;CMZ:网格蛋白介导的胞吞作用的抑制剂;GEN:胞膜窖介导的胞吞作用的抑制剂;MβCD:脂质筏介导的胞吞作用;4度:能量介导的胞吞作用。

[0231] 图41A-C显示了(41A)5A2-DOT-X LNP的表,该表显示了用于配制5A2-DOT-5(5摩尔%DOTAP)、5A2-DOT-10、5A2-DOT-20、5A2-DOT-30、5A2-DOT-40、5A2-DOT-50和5A2-DOT-60(60摩尔%DOTAP)LNP的摩尔比和百分比。所有LNP的总脂质/sgRNA之比为40:1(重量)。(41B)使用T7EI测定检测了用不同的5A2-DOT-X Cas9/sgLuc RNP制剂处理后HeLa-Luc细胞中的基因编辑。(41C)使用Sanger测序和ICE分析,分析了基因编辑。

[0232] 图42显示了以1/3的摩尔比封装Cas9/sgLuc RNP复合物的5A2-DOT-10的代表性TEM图像。在PBS缓冲液中以2mg/mL的总脂质浓度制备5A2-DOT-10Cas9/sgLuc。将3μL纳米颗粒溶液滴到碳TEM网格上并使其沉积1分钟,然后用滤纸印迹。然后使用透射电子显微术(FEI Tecnai G2 Spirit Biotwin)对TEM网格成像。

[0233] 图43显示了共焦图像,其显示在处理后20小时在Hela-Luc细胞中的PBS(对照)、游离Cas9/sgLuc复合物(对照)和5A2-DOT-10Cas9/sgLuc的细胞摄取。Cas9-EGFP融合蛋白用于跟踪Cas9/sgRNA复合物的亚细胞分布。Cas9/sgLuc复合物在细胞内部未表现出高于背景(PBS)的可检测绿色荧光,而在用5A2-DOT-10处理后检测到亮绿色信号。

[0234] 图44A-44H显示了基因编辑在体外快速地和有效地进行。(44A)从用各种纳米颗粒和对照处理的HeLa-Luc细胞分离的DNA的T7EI切割测定。高效基因编辑由递送Cas9/sgLuc RNP(1/3和1/5)的5A2-DOT-10介导。通过ICE分析定量在Luc基因座处的插入缺失(%)。应当指出,使用低pH柠檬酸盐缓冲液(当前使用的和已建立的方法)制备的LNP的基因编辑为0%。(44B)用各种制剂处理后HeLa-GFP细胞的荧光显微术图像。比例尺=100μm。5A2-DOT-10Cas9/sgGFP处理显著降低了GFP荧光。(44C)用各种制剂处理后HeLa-GFP细胞的流式细胞计量术分析。仅对于5A2-DOT-10Cas9/sgGFP组,GFP阳性细胞的峰完全向左移动,表明几乎所有GFP阳性细胞变黑。(44D)各种处理后HeLa-GFP细胞的时间依赖性GFP荧光强度。用5A2-DOT-10Cas9/sgGFP处理观察到第2天后的永久性GFP荧光丧失,而Sanger测序数据的ICE分析显示,第2天后插入缺失保持在90%以上。(44E和44F)用单独的Cas9/sgGFP、负载Cas9/sgGFP的5A2-SC8、C12-200、含有10%补充性DOTAP的DLin-MC3-DMA LNP制剂、负载Cas9/sgGFP的传统C12-200和DLin-MC3-DMA LNP纳米制剂和负载Cas9/sgGFP的RNAiMAX处理后,HeLa-GFP细胞的平均荧光强度(%)。用所有三种DOTAP修饰的制剂处理后,GFP荧光均显著降低。Sanger测序数据的ICE分析进一步证实,用5A2-DOT-10LNP得到最高的基因编辑效率。平均值±均值标准差(n=3)。使用双侧Student氏t-检验确定统计显著性。†:t值=42.69,

自由度(df)＝4(P<0.0001)；††:t值＝16.75,自由度(df)＝4(P<0.0001)；†††:t值＝37.53,自由度(df)＝4(P<0.0001)。P值<0.05被认为是统计上显著的。(44G)将5A2-DOT-10Cas9/sgGFP LNP在4℃储存2个月。随时间监测纳米颗粒直径和PDI。(44H)用储存的LNP对HeLa-GFP细胞的定期处理显示没有损失活性,表明长期LNP和RNP稳定性以及转移潜力。用24nM sgRNA处理上述实验中的所有细胞。

[0235] 图45A和45B显示了Hela-GFP细胞中不同纳米制剂的基因编辑。(45A)用单独的Cas9/sgGFP、5A2-DOT-10Cas9/sgLuc和5A2-DOT-10Cas9/sgGFP(以40:1的总脂质/sgGFP重量比)处理后Hela-GFP细胞的平均荧光强度(%)。(45B)用以10:1、20:1、30:1和40:1的总脂质/sgGFP重量比制备的5A2-DOT-10Cas9/sgGFP处理后Hela-GFP细胞的平均荧光强度(%)。

[0236] 图46A-46K显示了可推广的RNP递送策略(图40A)对于可电离的阳离子脂质纳米颗粒(DLNP、LLNP、SNALP)和对于在pH 7.4带正电荷的其它阳离子脂质以及对于其它中性缓冲液是通用的。(46A)具有不同可电离脂质的LNP制剂的方案。(46B)具有不同可电离脂质的LNP制剂的细节,包括确定每种组分的摩尔比和百分比以及总脂质与sgRNA的重量比。(46C)在制剂中使用的可电离的阳离子脂质的化学结构,包括5A2-SC8、C12-200和Dlin-MC3-DMA。(46D)用封装在5A2-DOT-10、C12-200-DOT-10和MC3-DOT-10中的Cas9/sgGFP RNP处理后HeLa-GFP细胞的平均荧光强度(%)。用所有三种制剂处理后,GFP荧光显著降低。(46E)具有不同永久阳离子脂质的LNP制剂的制备方案。(46F)具有不同永久阳离子脂质的LNP制剂的细节,包括确定每种组分的摩尔比和百分比以及总脂质与sgRNA的重量比。(46G)在制剂中使用的永久阳离子脂质的化学结构,包括DOTAP、DDAB和EPC。(46H)用封装在5A2-DOT-10、5A2-DDAB-10和5A2-EPC-10中的Cas9/sgGFP RNP处理后HeLa-GFP细胞的平均荧光强度(%)。代替DOTAP,其它阳离子脂质(DDAB和EPC)也能够实现有效的基因编辑。(46I)在不同缓冲液中的LNP制剂的方案。(46J)用使用不同缓冲液配制的5A2-DOT-10处理后HeLa-GFP细胞的平均荧光强度(%),所述缓冲液包括PBS、Opti-MEM、HEPES和柠檬酸盐缓冲液。RNP封装和递送需要中性缓冲液。(46K)使用ICE分析测量了在用使用不同缓冲液制备的5A2-DOT-10Cas9/sgGFP LNP处理后从HeLa-GFP细胞分离的基因组DNA中GFP基因座处的插入缺失(%)。所有中性缓冲液在细胞中均显示出高基因编辑,表明中性缓冲液在纳米颗粒制备中的重要性。请注意,图44E和44F已经在上面图45中再现,以将相关数据组合在一起来提高清晰度。

[0237] 图47A-47J显示了在体内实现了高效的多重基因组编辑。(47A)示意图显示了Cas9/sgTOM RNP的递送如何激活Td-Tomato转基因小鼠中的Td-Tom表达。将5A2-DOT-X LNP局部地(通过肌肉内或脑内注射)和全身性地(通过经尾静脉的静脉内注射)注射进Td-Tom小鼠中。肌肉内(1mg/kg sgTom)(47B)或脑内(0.15mg/kg sgTOM)(47D)注射5A2-DOT-10Cas9/sgTOM后Td-Tom小鼠的体内成像(分别)显示在腿部肌肉或脑组织中的亮红色荧光。通过(47C)肌肉和(47E)脑组织切片的共焦成像进一步证实了成功的CRISPR/Cas基因编辑。与以前用于局部RNP注射的阳性对照RNAiMAX相比,5A2-DOT-10具有更高的基因编辑效率。(47F)在静脉内(IV)注射具有不同摩尔百分比的DOTAP的5A2-DOT-X Cas9/sgTOM LNP之后Td-Tom小鼠的体内成像。Td-Tom荧光(作为DNA编辑的下游读出)显示,低DOTAP百分比有助于肝编辑,而高DOTAP百分比有助于肺编辑(1.5mg/kg sgTOM,IV)。(47G)通过共焦成像进一步证实了成功的CRISPR/Cas基因编辑。(47H)在用封装Cas9/sgPTEN的5A2-DOT-5、5A2-DOT-

10、5A2-DOT-50和5A2-DOT-60全身静脉内处理后,对从肝和肺组织分离的DNA进行了T7EI切割测定。计算并报告插入缺失(%)。(47I)将含有6种靶标的合并sgRNA(sgTOM、sgP53、sgPTEN、sgEml4、sgALK和sgRB1)的5A2-DOT-50LNP(5A2-DOT-50-合并物)以2mg/kg的总RNA剂量(0.33mg/kg每种sgRNA)静脉内施用给td-Tom小鼠。通过体内成像证实在TOM基因座处的基因编辑,并(47J)使用在肺组织上的T7EI切割测定证实其它5个基因座的编辑。

[0238] 图48A-48H显示5A2-DOT-X LNP简化了复杂小鼠模型的生成。(48A)为建立原位肝特异性的癌症模型,每周将封装Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1RNP的5A2-DOT-5LNP注射到成年C57BL/6小鼠中(3次注射,2.5mg/kg的总sgRNA,静脉内,n=4)。在12、15和20周后,处死小鼠并收集肝以分析肿瘤产生。(48B)来自从肝提取的基因组DNA的T7EI切割结果证实了在所有三个基因座处发生的基因编辑。(48C)在注射后20周切离的含有肿瘤的小鼠肝的代表性照片。(48D)H&E以及Ki67染色进一步证实了进行性肿瘤形成。在肿瘤病变中检测到更高的肿瘤增殖生物标志物Ki67表达。比例尺=100μm。(48E)为了创建原位肺特异性癌症模型,将封装Cas9/sgEml4/sgAlk RNP的5A2-DOT-50LNP注射到成年C57BL/6小鼠中一次(2mg/kg)或两次(每周1.5mg/kg,持续2周)(静脉内,n=5)。10、16和24周后,处死小鼠并收集肺以分析肿瘤产生。(48F)来自从肺提取的基因组DNA的T7EI切割结果证实了在Eml4和Alk的基因座处发生的基因编辑。在用5A2-DOT-50LNP处理的所有肺中也检测到了Eml4-Alk重排的PCR扩增子。(48G)通过亚克隆和DNA测序进一步证实了Eml4-Alk重排(预测=SEQ ID NO:50;克隆1=SEQ ID NO:51;克隆2=SEQ ID NO:52;克隆3=SEQ ID NO:53;克隆4=SEQ ID NO:54;克隆5=SEQ ID NO:55;克隆6=SEQ ID NO:56;克隆7=SEQ ID NO:57;克隆8=SEQ ID NO:58)。(48H)H&E以及Ki67染色进一步证实了进行性肿瘤形成。在肺肿瘤病变中检测到更高的肿瘤增殖生物标志物Ki67表达。比例尺=100μm。

[0239] 图49A和49B显示了与化学修饰的和合成的sgRNA(在前3个和最后3个核苷酸中的2'-甲基3'-硫代磷酸酯修饰)相比,通过体外转录(IVT)合成的未修饰sgRNA的基因编辑效率。(49A)用封装在纳米颗粒内的IVT sgRNA和化学修饰的sgRNA处理后,Hela-Luc-Cas9细胞中的相对萤光素酶活性。(49B)检测封装了Cas9/IVT sgRNA和Cas9/化学修饰的sgRNA的纳米颗粒的基因编辑效率的T7EI测定。用修饰的sgRNA处理组清楚地观察到在536bp和184bp的切割带。

[0240] 图50显示了在用封装Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1 RNP的5A2-DOT-5LNP处理后,小鼠肝中P53、PTEN和RB1基因的基因编辑。每周处理持续两周后,用T7EI测定检测在PTEN、P53和RB1基因组基因座处的肝基因组DNA的基因编辑。PBS处理组用作对照。在靶向P53的PCR扩增子的261bp和215bp处检测到切割带;在靶向PTEN的PCR扩增子的345bp和293bp处检测到切割带;在靶向RB1的PCR扩增子的395bp和207bp处检测到切割带。

[0241] 图51显示了在用封装Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1 RNP的5A2-DOT-5LNP处理后,用T7EI测定检测小鼠肝中P53、PTEN和RB1基因的基因编辑。PBS处理和单独5A2-DOT-5(没有Cas9/sgRNA)处理组用作对照。用封装Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1 RNP的5A2-DOT-5LNP处理20周后从小鼠肿瘤提取的基因组DNA的T7EI结果表明,这三个基因的敲除诱导了肿瘤产生,因为在所有三个基因组基因座处检测到切割带。

[0242] 图52显示了在用封装Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1 RNP的5A2-DOT-5LNP处理15周的组中,从小鼠切离的小鼠肝和切离肿瘤的代表照片。

[0243] 图53A-53C显示了用单独5A2-DOT-5LNP(没有Cas9/sgRNA)(对照)处理15周和20周后小鼠肝的H&E以及Ki67染色图像(53A),在用封装Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1 RNP的5A2-DOT-5LNP处理20周的组中从小鼠切离的肿瘤(53B)。单独5A2-DOT-5LNP处理未检测到形态学改变,表明单独的纳米载体不能导致肿瘤。比例尺:100μm。(53C)在用封装Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1 RNP的5A2-DOT-5LNP处理20周后,小鼠肝肿瘤产生的大视图图像。比例尺:500μm。

[0244] 图54A-54D显示了在用封装Cas9/sgEml4/sgAlk RNP的5A2-DOT-50LNP(2mg/kg的总sgRNA)处理7天后,在小鼠肺中产生Eml4-Alk重排。通过T7EI测定,在从小鼠肺提取的基因组DNA中检测到Eml4编辑(54A)和Alk编辑(54B)。(54C)对从小鼠肺提取的基因组DNA进行PCR分析以确定Eml4-Alk倒位。(54D)将PCR扩增子进行亚克隆,并列出6个独立克隆的序列,并在上图呈现代表性色谱图。色谱图与关于Eml4-Alk重排所预测的完全相同。(预测=SEQ ID NO:59;克隆1=SEQ ID NO:59;克隆2=SEQ ID NO:60;克隆4=SEQ ID NO:61;克隆5=SEQ ID NO:61;克隆6=SEQ ID NO:62)

[0245] 图55显示了用单独5A2-DOT-50LNP(没有Cas9/sgRNA)处理10周和16周(LNP剂量等于1mg/kg的总sgRNA)的小鼠肝的H&E以及Ki67染色图像。在注射单独5A2-DOT-50LNP的动物中未检测到形态变化。比例尺:100μm。

[0246] 图56显示了在用封装Cas9/sgEml4/sgAlk RNP的5A2-DOT-50LNP处理24周后小鼠肺肿瘤产生的大视图图像。比例尺:500μm。从H&E以及Ki67染色图像观察到了几个肿瘤病变(突出显示)。

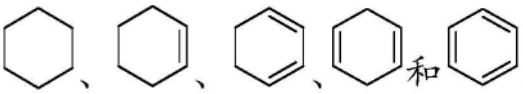
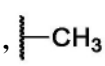
[0247] 图57显示了5A2-DOT-10LNP可以将卵白蛋白(OVA)蛋白有效地递送到HeLa-Luc细胞的细胞质中。在通过共焦显微术成像前,将细胞用游离的罗丹明标记的OVA蛋白和封装罗丹明标记的OVA的5A2-DOT-10LNP处理22h。

具体实施方式

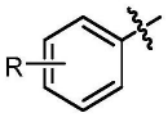
[0248] 本文描述了脂质纳米颗粒(LNP),其由1)永久阳离子脂质、2)可电离的阳离子脂质和3)磷脂组成,并且可以任选地含有胆固醇和脂质PEG或两者。永久阳离子脂质的包含用于将LNP引导至特定器官诸如肺、淋巴结或脾。本文呈现的数据指示,这种作用是普遍的,并且组分是模块化的,每种类别指示5A2-SC8可以被任何可电离的阳离子脂质替代,DOTAP可以被任何阳离子脂质替代,且DOPE可以被任何磷脂替代。在一些实施方案中,也包括胆固醇和脂质PEG,但是不含胆固醇或脂质PEG的制剂是可行的。这些载体可以将mRNA、sgRNA和蛋白递送至体内特定器官,从而解决了一项重大挑战。

[0249] A.化学定义

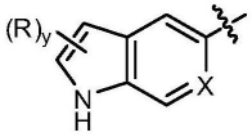
[0250] 当在化学基团的上下文中使用时:“氢”是指-H;“羟基”是指-OH;“氧代”是指=O;“羰基”是指-C(=O)-;“羧基”是指-C(=O)OH(也写作-COOH或-CO_2H);“卤代”独立地指-F、-Cl、-Br或-I;“氨基”是指-NH_2;“羟基氨基”是指-NHOH;“硝基”是指-NO_2;亚氨基是指=NH;“氰基”是指-CN;“异氰酸酯”是指-N=C=O;“叠氮基”是指-N_3;在单价上下文中,“磷酸酯”是指-OP(O)$(OH)_2$或其去质子化形式;在二价上下文中,“磷酸酯”是指-OP(O)(OH)O-或其去质子化形式;“巯基”是指-SH;且“硫代”是指=S;“磺酰基”是指-S$(O)_2$-;“羟基磺酰基”是指-S$(O)_2$OH;“磺酰胺”是指-S$(O)_2NH_2$;且“亚磺酰基”是指-S(O)-。

[0251] 在化学式的上下文中,符号“-”是指单键,“=“是指双键,且“≡”是指三键。符号“----”代表任选的键,其如果存在的话是单键或双键。符号“====”代表单键或双键。因而,例如,式包括。且应当理解,没有一个这样的环原子形成超过一个双键的一部分。此外,应当指出,当连接一个或两个立体原子时,共价键符号“-”未指示任何优选的立体化学。相反,它涵盖所有立体异构体以及其混合物。当垂直穿过键绘制时(例如,对于甲基,),符号“”指示该基团的连接点。应当指出,通常仅以这种方式为较大的基团标识连接点,以帮助读者明确标识连接点。符号“”是指单键,其中连接至楔的粗端的基团“从纸面出来”。符号“”是指单键,其中连接至楔的粗端的基团“进入纸面”。符号““是指单键,其中在双键周围的几何形状(例如,E或Z)未确定。因此,两种选择以及它们的组合都是预期的。在本申请中显示的结构的原子上的任何未定义化合价暗含地表示与该原子键合的氢原子。在碳原子上的粗体点指示,与该碳相连的氢朝向纸平面之外。

[0252] 当基团“R”被描述为在环系统上的“浮动基团”时,例如,在下式中:

[0253] ,

[0254] 则R可以替代与环原子中的任一个相连的任何氢原子,包括所描绘的、暗示的或明确定义的氢,只要形成稳定的结构即可。当基团“R”被描述为在稠合环系统上的“浮动基团”时,例如,在下式中:

[0255] ,

[0256] 则R可以替代与稠合环中的任一个的任何环原子相连的任何氢,除非另有说明。可替换的氢包括所描绘的氢(例如,在上式中与氮连接的氢)、隐含的氢(例如,未显示但理解为存在的上式中的氢)、明确定义的氢以及其存在取决于环原子的身份的任选氢(例如,当X等于-CH-时,与基团X相连的氢),只要形成稳定的结构即可。在所示的例子中,R可以位于稠合环系统的5元或6元环上。在上式中,在括号中包括的基团“R”后面紧跟着的下标字母“y”表示数字变量。除非另有说明,否则此变量可以是0、1、2或大于2的任何整数,仅受限于环或环系统的可替换氢原子的最大数目。

[0257] 对于化学基团和化合物类别,该基团或类别中的碳原子的数目如下指示:“Cn”定义了该基团/类别中的碳原子的确切数目(n)。“C≤n”定义了可以在该基团/类别中的碳原子的最大数目(n),而最小数目对于所讨论的基团/类别而言尽可能小,例如,应当理解,基团“烯基$_{(C\leq8)}$”或类别“烯烃$_{(C\leq8)}$”中的碳原子的最小数目是2。相比之下,“烷氧基$_{(C\leq10)}$”指示具有1-10个碳原子的烷氧基。“Cn-n′”定义了基团中碳原子的最小数目(n)和最大数目(n′)。因而,“烷基$_{(C2-10)}$”表示具有2-10个碳原子的那些烷基。这些碳数指示符可以在其修饰的化学基团或类别之前或之后,并且它可以包括或不包括在括号中,而不表示含义的任

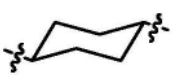
何变化。因而,术语“C5烯烃”、“C5-烯烃”、“烯烃$_{(C5)}$”和“烯烃$_{C5}$”都是同义的。

[0258] 当用于修饰化合物或化学基团时,术语“饱和的”是指该化合物或化学基团不具有碳-碳双键和碳-碳三键,除非如下所述。当该术语用于修饰原子时,它是指该原子不是任何双键或三键的部分。在饱和基团的被取代形式的情况下,可以存在一个或多个碳氧双键或碳氮双键。并且当这样的键存在时,则不排除可能作为酮-烯醇互变异构现象或亚胺/烯胺互变异构现象的一部分出现的碳-碳双键。当术语“饱和的”用于修饰物质的溶液时,它是指没有更多的该物质可以溶解在该溶液中。

[0259] 在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“脂族的”表示如此修饰的化合物或化学基团是无环的或环状的、但非芳族的烃化合物或基团。在脂族化合物/基团中,碳原子可以以直链、支链或非芳族环(脂环族)连接在一起。脂族化合物/基团可以是饱和的(其通过单个碳-碳键连接(烷烃/烷基)),或不饱和的(其具有一个或多个碳-碳双键(烯烃/烯基)或具有一个或多个碳-碳三键(炔烃/炔基))。

[0260] 术语“芳族”当用于修饰化合物或化学基团原子时是指,所述化合物或化学基团含有通过形成环的键的相互作用而稳定化的原子的平面不饱和环。

[0261] 在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“烷基”表示单价饱和脂族基团,其具有碳原子作为连接点,具有直链或支链无环结构,且没有除碳和氢以外的原子。基团-CH_3(Me)、-CH_2CH_3(Et)、-$CH_2CH_2CH_3$(n-Pr或丙基)、-$CH(CH_3)_2$(i-Pr、^{i}Pr或异丙基)、-$CH_2CH_2CH_2CH_3$(n-Bu)、-$CH(CH_3)CH_2CH_3$(仲丁基)、-$CH_2CH(CH_3)_2$(异丁基)、-$C(CH_3)_3$(叔丁基、叔丁基、t-Bu或^{t}Bu)和-$CH_2C(CH_3)_3$(新戊基)是烷基的非限制性例子。在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“烷二基”表示二价饱和脂族基团,其具有1个或2个饱和碳原子作为连接点,具有直链或支链无环结构,没有碳-碳双键或三键,且没有除碳和氢以外的原子。基团-CH_2-(亚甲基)、-CH_2CH_2-、-$CH_2C(CH_3)_2CH_2$-和-$CH_2CH_2CH_2$-是烷二基的非限制性例子。“烷烃”表示具有式H-R的化合物类别,其中R是烷基,该术语如上面所定义。当这些术语中的任一个与“取代的”修饰词一起使用时,一个或多个氢原子已经独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-$C(O)CH_3$、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-$N(CH_3)_2$、-$C(O)NH_2$、-$C(O)NHCH_3$、-$C(O)N(CH_3)_2$、-$OC(O)CH_3$、-$NHC(O)CH_3$、-$S(O)_2OH$或-$S(O)_2NH_2$替换。下述基团是被取代的烷基的非限制性例子:-CH_2OH、-CH_2Cl、-CF_3、-CH_2CN、-$CH_2C(O)OH$、-$CH_2C(O)OCH_3$、-$CH_2C(O)NH_2$、-$CH_2C(O)CH_3$、-CH_2OCH_3、-$CH_2OC(O)CH_3$、-CH_2NH_2、-$CH_2N(CH_3)_2$和-CH_2CH_2Cl。术语“卤代烷基”是被取代的烷基的子集,其中氢原子替换限于卤代(即-F、-Cl、-Br或-I),使得不存在除碳、氢和卤素外的其它原子。基团-CH_2Cl是卤代烷基的一个非限制性例子。术语“氟代烷基”是被取代的烷基的子集,其中氢原子替换限于氟代,使得不存在除碳、氢和氟外的其它原子。基团-CH_2F、-CF_3和-CH_2CF_3是氟代烷基的非限制性例子。

[0262] 在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“环烷基”表示具有碳原子作为连接点的单价饱和脂族基团,所述碳原子形成一个或多个非芳族环结构的一部分,没有碳-碳双键或三键,且没有除碳和氢以外的原子。非限制性例子包括:-$CH(CH_2)_2$(环丙基)、环丁基、环戊基或环己基(Cy)。在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“环烷二基”表示二价饱和脂族基团,其具有2个碳原子作为连接点,没有碳-碳双键或三键,且没有除碳和氢以外的原子。基团是环烷二基基团的一个非限制性例子。“环烷烃”表示具有式H-R的化

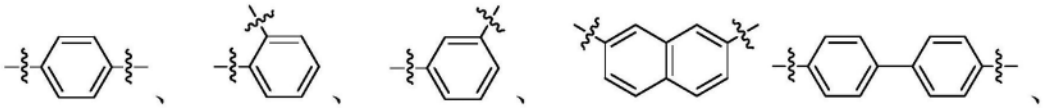
合物类别,其中R是环烷基,该术语如上面所定义。当这些术语中的任一个与“取代的”修饰词一起使用时,一个或多个氢原子已经独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-$N(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-C(O)$NHCH_3$、-C(O)$N(CH_3)_2$、-OC(O)CH_3、-NHC(O)CH_3、-$S(O)_2OH$或-$S(O)_2NH_2$替换。

[0263] 在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“烯基”表示单价不饱和脂族基团,其具有碳原子作为连接点,具有直链或支链无环结构,至少一个非芳族碳-碳双键,没有碳-碳三键,且没有除碳和氢以外的原子。非限制性例子包括:-CH=CH_2(乙烯基)、-CH=$CHCH_3$、-CH=$CHCH_2CH_3$、-$CH_2CH=CH_2$(烯丙基)、-$CH_2CH=CHCH_3$和-CH=CHCH=CH_2。在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“烯烃二基”表示二价不饱和脂族基团,其具有2个碳原子作为连接点,具有直链或支链、直链或支链无环结构,至少一个非芳族碳-碳双键,没有碳-碳三键,且没有除碳和氢以外的原子。基团-CH=CH-、-CH=$C(CH_3)CH_2$-、-CH=$CHCH_2$-和-$CH_2CH=CHCH_2$-是烯烃二基基团的非限制性例子。应当指出,尽管烯烃二基基团是脂族的,但一旦在两端连接,就不排除该基团形成芳族结构的一部分。术语“烯烃”和“链烯烃”是同义的,并且表示具有式H-R的化合物类别,其中R是烯基,该术语如上面所定义。类似地,术语“末端烯烃”和“α-烯烃”是同义的且表示具有刚好一个碳-碳双键的烯烃,其中该键是在分子的末端处的乙烯基的部分。当这些术语中的任一个与“取代的”修饰词一起使用时,一个或多个氢原子已经独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-$N(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-C(O)$NHCH_3$、-C(O)$N(CH_3)_2$、-OC(O)CH_3、-NHC(O)CH_3、-$S(O)_2OH$或-$S(O)_2NH_2$替换。基团-CH=CHF、-CH=CHCl和-CH=CHBr是被取代的烯基的非限制性例子。

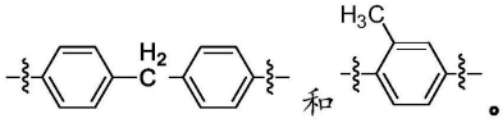
[0264] 在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“炔基”表示单价不饱和脂族基团,其具有碳原子作为连接点,具有直链或支链无环结构,至少一个碳-碳三键,且没有除碳和氢以外的原子。本文中使用的术语炔基不排除一个或多个非芳族碳-碳双键的存在。基团-C≡CH、-C≡CCH_3和-CH_2C≡CCH_3是炔基的非限制性例子。“炔烃”表示具有式H-R的化合物类别,其中R是炔基。当这些术语中的任一个与“取代的”修饰词一起使用时,一个或多个氢原子已经独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-$N(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-C(O)$NHCH_3$、-C(O)$N(CH_3)_2$、-OC(O)CH_3、-NHC(O)CH_3、-$S(O)_2OH$或-$S(O)_2NH_2$替换。

[0265] 在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“芳基”表示具有芳族碳原子作为连接点的单价不饱和芳族基团,所述碳原子形成一个或多个6元芳族环结构的一部分,其中所述环原子都是碳,且其中所述基团不由除碳和氢以外的原子组成。如果存在超过一个环,所述环可以是稠合的或未稠合的。本文中使用的该术语不排除连接至第一个芳族环或存在的任何额外芳族环的一个或多个烷基或芳烷基(碳数限制允许)的存在。芳基基团的非限制性例子包括苯基(Ph)、甲基苯基、(二甲基)苯基、-$C_6H_4CH_2CH_3$(乙基苯基)、萘基和从联苯衍生出的单价基团。在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“芳烃二基”表示具有2个芳族碳原子作为连接点的二价芳族基团,所述碳原子形成一个或多个6元芳族环结构的一部分,其中所述环原子都是碳,且其中所述单价基团不由除碳和氢以外的原子组成。本文中使用的该术语不排除连接至第一个芳族环或存在的任何额外芳族环的一个或多个烷基、芳基或芳烷基(碳数限制允许)的存在。如果存在超过一个环,所述环可以是稠合的或未稠合的。未

稠合的环可以通过以下一种或多种连接:共价键、烷二基或烯烃二基基团(碳数限制允许)。芳烃二基基团的非限制性例子包括:



[0266]

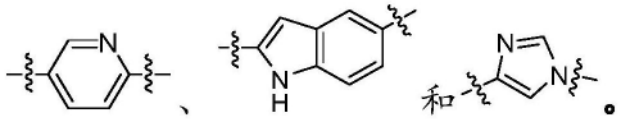


[0267] “芳烃”表示具有式H-R的化合物类别,其中R是芳基,该术语如上面所定义。苯和甲苯是芳烃的非限制性例子。当这些术语中的任一个与“取代的”修饰词一起使用时,一个或多个氢原子已经独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、$-NH_2$、$-NO_2$、$-CO_2H$、$-CO_2CH_3$、-CN、-SH、$-OCH_3$、$-OCH_2CH_3$、$-C(O)CH_3$、$-NHCH_3$、$-NHCH_2CH_3$、$-N(CH_3)_2$、$-C(O)NH_2$、$-C(O)NHCH_3$、$-C(O)N(CH_3)_2$、$-OC(O)CH_3$、$-NHC(O)CH_3$、$-S(O)_2OH$或$-S(O)_2NH_2$替换。

[0268] 在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“芳烷基”表示单价基团-烷二基-芳基,其中术语烷二基和芳基各自以与上面提供的定义一致的方式使用。非限制性例子是:苯基甲基(苄基,Bn)和2-苯基-乙基。当术语芳烷基与“取代的”修饰词一起使用时,来自烷二基和/或芳基基团的一个或多个氢原子已经独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、$-NH_2$、$-NO_2$、$-CO_2H$、$-CO_2CH_3$、-CN、-SH、$-OCH_3$、$-OCH_2CH_3$、$-C(O)CH_3$、$-NHCH_3$、$-NHCH_2CH_3$、$-N(CH_3)_2$、$-C(O)NH_2$、$-C(O)NHCH_3$、$-C(O)N(CH_3)_2$、$-OC(O)CH_3$、$-NHC(O)CH_3$、$-S(O)_2OH$或$-S(O)_2NH_2$替换。取代的芳烷基的非限制性例子是:(3-氯苯基)-甲基和2-氯-2-苯基-乙-1-基。

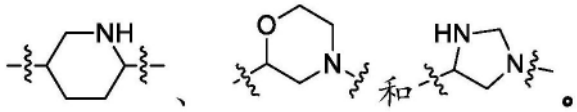
[0269] 在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“杂芳基”表示具有芳族碳原子或氮原子作为连接点的单价芳族基团,所述碳原子或氮原子形成一个或多个芳族环结构的一部分,其中至少一个环原子是氮、氧或硫,且其中所述杂芳基不由除碳、氢、芳族氮、芳族氧和芳族硫以外的原子组成。杂芳基环可以含有1、2、3或4个选自氮、氧和硫的环原子。如果存在超过一个环,则所述环可以是稠合的或未稠合的。本文中使用的该术语不排除连接至芳族环或芳族环系统的一个或多个烷基、芳基和/或芳烷基(碳数限制允许)的存在。杂芳基的非限制性例子包括呋喃基、咪唑基、吲哚基、吲唑基(Im)、异噁唑基、甲基吡啶基、噁唑基、苯基吡啶基、吡啶基(吡啶基)、吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、喹啉基、喹唑啉基、喹喔啉基、三嗪基、四唑基、噻唑基、噻吩基和三唑基。术语“N-杂芳基”表示具有氮原子作为连接点的杂芳基。在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“杂芳烃二基”表示二价芳族基团,其具有2个芳族碳原子、2个芳族氮原子、或1个芳族碳原子和1个芳族氮原子作为2个连接点,所述原子形成一个或多个芳族环结构的一部分,其中至少一个环原子是氮、氧或硫,且其中所述二价基团不由除碳、氢、芳族氮、芳族氧和芳族硫以外的原子组成。如果存在超过一个环,所述环可以是稠合的或未稠合的。未稠合的环可以通过以下一种或多种连接:共价键、烷二基或烯烃二基基团(碳数限制允许)。本文中使用的该术语不排除连接至芳族环或芳族环系统的一个或多个烷基、芳基和/或芳烷基(碳数限制允许)的存在。杂芳烃二基的非限制性例子包括:

[0270]



[0271] “杂芳烃”表示具有式H-R的化合物类别,其中R是杂芳基。吡啶和喹啉是杂芳烃的非限制性例子。当这些术语与“取代的”修饰词一起使用时,一个或多个氢原子已经独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-$N(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-C(O)$NHCH_3$、-C(O)$N(CH_3)_2$、-OC(O)CH_3、-NHC(O)CH_3、-S(O)$_2$OH或-S(O)$_2NH_2$替换。

[0272] 在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“杂环烷基”表示具有碳原子或氮原子作为连接点的单价非芳族基团,所述碳原子或氮原子形成一个或多个非芳族环结构的一部分,其中至少一个环原子是氮、氧或硫,且其中所述杂环烷基不由除碳、氢、氮、氧和硫以外的原子组成。杂环烷基环可以含有1、2、3或4个选自氮、氧或硫的环原子。如果存在超过一个环,则所述环可以是稠合的或未稠合的。本文中使用的该术语不排除连接至环或环系统的一个或多个烷基(碳数限制允许)的存在。并且,该术语不排除一个或多个双键在环或环系统中的存在,前提条件是,得到的基团仍然是非芳族的。杂环烷基的非限制性例子包括氮杂环丙基、氮杂环丁基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢吡喃基、吡喃基、氧杂环丙基和氧杂环丁基。术语“N-杂环烷基”表示具有氮原子作为连接点的杂环烷基。N-吡咯烷基是这样的基团的一个例子。在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“杂环烷二基”表示具有2个碳原子、2个氮原子、或1个碳原子和1个氮原子作为2个连接点的二价环状基团,所述原子形成一个或多个环结构的部分,其中至少一个环原子是氮、氧或硫,且其中所述二价基团不由除碳、氢、氮、氧和硫以外的原子组成。如果存在超过一个环,则所述环可以是稠合的或未稠合的。未稠合的环可以通过以下一种或多种连接:共价键、烷二基或烯烃二基基团(碳数限制允许)。本文中使用的该术语不排除连接至环或环系统的一个或多个烷基(碳数限制允许)的存在。并且,该术语不排除一个或多个双键在环或环系统中的存在,前提条件是,得到的基团仍然是非芳族的。杂环烷二基的非限制性例子包括:

[0273] 

[0274] 当这些术语与“取代的”修饰词一起使用时,一个或多个氢原子已经独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-$N(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-C(O)$NHCH_3$、-C(O)$N(CH_3)_2$、-OC(O)CH_3、-NHC(O)CH_3、-S(O)$_2$OH或-S(O)$_2NH_2$替换。

[0275] 在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“酰基”表示基团-C(O)R,其中R是氢、烷基、环烷基、烯基、芳基、芳烷基或杂芳基,那些术语如上面所定义。基团-CHO、-C(O)CH_3(乙酰基、Ac)、-C(O)CH_2CH_3、-C(O)$CH_2CH_2CH_3$、-C(O)$CH(CH_3)_2$、-C(O)$CH(CH_2)_2$、-C(O)C_6H_5、-C(O)$C_6H_4CH_3$、-C(O)$CH_2C_6H_5$、-C(O) (咪唑基)是酰基基团的非限制性例子。“硫代酰基”以类似的方式定义,除了基团-C(O)R的氧原子已经用硫原子替换,-C(S)R。术语“醛”对应于如上定义的烷烃,其中至少一个氢原子已经被-CHO基团替换。当这些术语中的任一个与“取代的”修饰词一起使用时,一个或多个氢原子(包括直接连接至羰基或硫代羰基的碳原子的氢原子,如果有的话)已经独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-$N(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-C(O)$NHCH_3$、-C(O)N

$(CH_3)_2$、-OC(O)CH_3、-NHC(O)CH_3、-S(O)$_2$OH或-S(O)$_2NH_2$替换。基团-C(O)CH_2CF_3、-CO_2H(羧基)、-CO_2CH_3(甲基羧基)、-$CO_2CH_2CH_3$、-C(O)NH_2(氨基甲酰基)和-CON$(CH_3)_2$是被取代的酰基基团的非限制性例子。

[0276] 在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“烷氧基”表示基团-OR,其中R是烷基,该术语如上面所定义。非限制性例子包括:-OCH_3(甲氧基)、-OCH_2CH_3(乙氧基)、-$OCH_2CH_2CH_3$、-OCH$(CH_3)_2$(异丙氧基)、-OC$(CH_3)_3$(叔-丁氧基)、-OCH$(CH_2)_2$、-O-环戊基和-O-环己基。在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“环烷氧基”、“烯基氧基”、“炔基氧基”、“芳基氧基”、“芳烷氧基”、“杂芳基氧基”、“杂环烷氧基”和“酰氧基”表示定义为-OR的基团,其中R分别是环烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂环烷基和酰基。术语“烷氧基二基”表示二价基团-O-烷二基-、-O-烷二基-O-或-烷二基-O-烷二基-。在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“烷硫基”和“酰基硫基”表示基团-SR,其中R分别是烷基和酰基。术语“醇”对应于如上定义的烷烃,其中至少一个氢原子已经用羟基基团替换。术语“醚”对应于如上定义的烷烃,其中至少一个氢原子已经用烷氧基替换。当这些术语中的任一个与“取代的”修饰词一起使用时,一个或多个氢原子已经独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-N$(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-C(O)$NHCH_3$、-C(O)N$(CH_3)_2$、-OC(O)CH_3、-NHC(O)CH_3、-S(O)$_2$OH或-S(O)$_2NH_2$替换。

[0277] 在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“烷基氨基”表示基团-NHR,其中R是烷基,该术语如上面所定义。非限制性例子包括:-$NHCH_3$和-$NHCH_2CH_3$。在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“二烷基氨基”表示基团-NRR′,其中R和R′可以是相同的或不同的烷基,或R和R′可以一起代表烷二基。二烷基氨基基团的非限制性例子包括:-N$(CH_3)_2$和-N$(CH_3)(CH_2CH_3)$。在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“环烷基氨基”、“烯基氨基”、“炔基氨基”、“芳基氨基”、“芳烷基氨基”、“杂芳基氨基”、“杂环烷基氨基”、“烷氧氨基”和“烷基磺酰基氨基”表示被定义为-NHR的基团,其中R分别是环烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂环烷基、烷氧基和烷基磺酰基。芳基氨基基团的一个非限制性例子是-NHC_6H_5。术语“烷基氨基二基”表示二价基团-NH-烷二基-、-NH-烷二基-NH-或-烷二基-NH-烷二基-。在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“酰氨基”(酰基氨基)表示基团-NHR,其中R是酰基,该术语如上面所定义。酰氨基基团的一个非限制性例子是-NHC(O)CH_3。在没有“取代的”修饰词的情况下使用的术语“烷基亚氨基”表示二价基团=NR,其中R是烷基,该术语如上面所定义。当这些术语中的任一个与“取代的”修饰词一起使用时,连接至碳原子的一个或多个氢原子已经独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-N$(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-C(O)$NHCH_3$、-C(O)N$(CH_3)_2$、-OC(O)CH_3、-NHC(O)CH_3、-S(O)$_2$OH或-S(O)$_2NH_2$替换。基团-NHC(O)OCH_3和-NHC(O)$NHCH_3$是被取代的酰氨基基团的非限制性例子。

[0278] 当在权利要求书和/或说明书中结合术语“包含”使用时,词语“一个/种(a)”或“一个/种(an)”的使用可以表示“一个/种”,但它也与“一个/种或多个/种”、“至少一个/种”以及“一个/种或多于一个/种”的含义一致。

[0279] 贯穿本申请,术语“约”用于表示,值包括用于测定所述值的装置、方法的误差的固有变异、或研究受试者之间存在的变异。

[0280] 如在本申请中使用的,术语“平均分子量”表示每种聚合物物质的摩尔数与该物质

的摩尔质量之间的关系。具体地,每种聚合物分子可具有不同的聚合水平以及因此具有不同的摩尔质量。平均分子量可以用来表示多个聚合物分子的分子量。平均分子量通常与平均摩尔质量同义。具体地,存在三种主要类型的平均分子量:数量平均摩尔质量、重量(质量)平均摩尔质量和Z-平均摩尔质量。在本申请的上下文中,除非另外指出,否则平均分子量代表该式的数量平均摩尔质量或重量平均摩尔质量。在一些实施方案中,平均分子量是数量平均摩尔质量。在一些实施方案中,平均分子量可用于描述存在于脂质中的PEG组分。

[0281] 术语“包含”、“具有”和“包括”是开放式系动词。这些动词中的一个或多个的任何形式或时态,诸如“包含(comprises)”、“包含(comprising)”、“具有(has)”、“具有(having)”、“包括(includes)”和“包括(including)”,也是开放式的。例如,“包含”、“具有”或“包括”一个或多个步骤的任何方法并不限于仅具有那一个或多个步骤,并且还涵盖其它未列出的步骤。

[0282] 当在本说明书和/或权利要求书中使用该术语时,术语“有效的”意指足以实现期望的、预期的或想要的结果。当在用化合物治疗患者或受试者的背景下使用时,“有效量”、“治疗有效量”或“药学有效量”意指所述化合物在对受试者或患者施用以治疗疾病时足以实现对所述疾病的这类治疗的量。

[0283] 本文中使用的术语“IC_{50}”表示获得最大应答的50%的抑制剂量。该定量量度指示将给定的生物过程、生物化学过程或化学过程(或过程的组分,即酶、细胞、细胞受体或微生物)抑制一半所需的特定药物或其它物质(抑制剂)的量。

[0284] 第一化合物的“异构体”是这样的单独化合物:其中每个分子含有与所述第一化合物相同的组分原子,但其中那些原子的三维构型不同。

[0285] 本文中使用的术语“患者”或“受试者”表示活的哺乳动物生物体,诸如人、猴、牛、绵羊、山羊、狗、猫、小鼠、大鼠、豚鼠或其转基因物种。在某些实施方案中,所述患者或受试者是灵长类动物。人类受试者的非限制性例子是成人、青少年、婴儿和胎儿。

[0286] 本文中普遍使用的“药学上可接受的”表示这样的化合物、材料、组合物和/或剂型:其在合理的医学判断范围内适合用于与人类和动物的组织、器官和/或体液接触,而没有过度的毒性、刺激、变应性应答或其它问题或并发症,与合理的收益/风险比相称。

[0287] “药学上可接受的盐”是指如上文所定义的药学上可接受的并且具有期望的药理学活性的本公开内容的化合物的盐。这样的盐包括与以下酸形成的酸加成盐:无机酸诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等;或有机酸诸如1,2-乙烷二磺酸、2-羟基乙磺酸、2-萘磺酸、3-苯基丙酸、4,4′-亚甲基双(3-羟基-2-烯-1-甲酸)、4-甲基二环[2.2.2]辛-2-烯-1-甲酸、乙酸、脂族单和二羧酸、脂族硫酸、芳族硫酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸、环戊烷丙酸、乙磺酸、富马酸、葡萄庚糖酸、葡糖酸、谷氨酸、羟乙酸、庚酸、己酸、羟基萘甲酸、乳酸、月桂基硫酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、甲磺酸、粘康酸、邻-(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、草酸、对氯苯磺酸、苯基-取代的链烷酸、丙酸、对甲苯磺酸、丙酮酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、酒石酸、叔丁基乙酸、三甲基乙酸等。药学上可接受的盐还包括在存在的酸性质子能够与无机碱或有机碱反应时可以形成的碱加成盐。可接受的无机碱包括氢氧化钠、碳酸钠、氢氧化钾、氢氧化铝和氢氧化钙。可接受的有机碱包括乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨丁三醇、N-甲基葡糖胺等。应当认识到,形成本公开内容的任何盐的一部分的特定阴离子或阳离子不是至关重要的,只要所述盐作为整体是药理学上可接受的即可。药学

上可接受的盐的其它例子和它们的制备方法与使用方法呈现于Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,and Use(P.H.Stahl&C.G.Wermuth编,Verlag Helvetica Chimica Acta,2002)。

[0288] 本文中使用的术语“药学上可接受的载体”是指参与运载或运输化学药剂的药学上可接受的材料、组合物或媒介物,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包囊材料。

[0289] “预防(prevention)”或“预防(preventing)”包括:(1)抑制受试者或患者的疾病发作,所述受试者或患者可能有患所述疾病的风险和/或易患所述疾病,但尚未经历或表现出所述疾病的任何或所有病状或征状;和/或(2)减慢受试者或患者中的疾病的病状或征状发作,所述受试者或患者可能有患所述疾病的风险和/或易患所述疾病,但尚未经历或表现出所述疾病的任何或所有病状或征状。

[0290] “重复单元”是某些材料的最简单的结构实体,例如,框架和/或聚合物,无论是有机的、无机的还是金属有机的。在聚合物链的情况下,重复单元沿着链依次连接在一起,就像项链的珠子一样。例如,在聚乙烯-[-CH_2CH_2-]$_n$-中,重复单元是-CH_2CH_2-。下标“n”表示聚合度,也就是说,连接在一起的重复单元的数量。当“n”的值未定义时或在“n”不存在的情况下,它只是指示括号内该式的重复以及材料的聚合性质。重复单元的概念同样适用于重复单元之间的连接性三维地延伸的场合,诸如在金属有机框架、改性聚合物、热固性聚合物等中。在树枝状聚合物的上下文中,重复单元也可以被描述为分支单元、内层或代。类似地,封端基团也可以被描述为表面基团。

[0291] “立体异构体”或“光学异构体”是这样的给定化合物的异构体:其中,相同的原子键合到相同的其它原子,但其中那些原子的三维构型不同。“对映异构体”是给定化合物的立体异构体,其像左手和右手一样是彼此的镜像。“非对映异构体”是给定化合物的并非对映异构体的立体异构体。手性分子含有手性中心(也被称作立构中心或立体中心),它是携带多个基团的分子中的任意点(尽管不一定是原子),使得任意2个基团的互换产生立体异构体。在有机化合物中,手性中心通常是碳、磷或硫原子,尽管其它原子也可能成为有机和无机化合物中的立构中心。分子可以具有多个立构中心,从而产生它的许多立体异构体。在其立体异构现象归因于四面体立体中心(例如,四面体碳)的化合物中,假定可能的立体异构体的总数不会超过2^n,其中n是四面体立构中心的数目。具有对称性的分子经常具有比立体异构体的最大可能数目更小的数目。对映异构体的50:50混合物被称作外消旋混合物。可替换地,可以对映异构地富集对映异构体的混合物,使得一种对映异构体以大于50%的量存在。通常,使用本领域已知的技术,可以拆分或分离对映异构体和/或非对映异构体。预期对于尚未定义其立体化学的任何立构中心或手性轴,该立构中心或手性轴可以以它的R形式、S形式或作为所述R形式和S形式的混合物(包括外消旋混合物和非外消旋混合物)存在。本文中使用的短语“基本上不含有其它立体异构体”是指所述组合物含有≤15%、更优选≤10%、甚至更优选≤5%、或最优选≤1%的另外一种或多种立体异构体。

[0292] “治疗(treatment)”或“治疗(treating)”包括(1)抑制正经历或表现出疾病的病状或征状的受试者或患者中的所述疾病(例如,阻止所述病状和/或征状的进一步发展),(2)改善正经历或表现出疾病的病状或征状的受试者或患者中的所述疾病(例如,逆转所述病状和/或征状),和/或(3)实现正经历或表现出疾病的病状或征状的受试者或患者中的所

述疾病的任何可测量的减轻。

[0293] 以上定义替代在通过引用并入本文的任何参考文献中的任何冲突的定义。但是，对某些术语加以定义的事实不应当被认为表示未被定义的任何术语是不确定的。相反，所使用的所有术语均被认为以使得普通技术人员可以明白范围并实施本公开内容的方式描述本公开内容。

[0294] B.阳离子型可电离脂质

[0295] 在本公开内容的一些方面，提供了包含含有亲脂性和阳离子组分的化合物的组合物，其中所述阳离子组分是可电离的。在一些实施方案中，所述阳离子型可电离脂质含有一个或多个在生理pH质子化但可以在高于8、9、10、11或12的pH去质子化的基团。可电离的阳离子基团可以含有一个或多个能够在生理pH形成阳离子基团的可质子化胺。阳离子型可电离脂质化合物还可以进一步包含一种或多种脂质组分，诸如两种或更多种具有C_6-C_{24}烷基或烯基碳基团的脂肪酸。这些脂质基团可以通过酯键连接，或可以通过迈克尔加成进一步添加至硫原子。在一些实施方案中，这些化合物可以是树枝状聚合物、树枝块(dendron)、聚合物或它们的组合。

[0296] 在一些实施方案中，这些阳离子型可电离脂质是树枝状聚合物，它们是展现规则树枝状分支的聚合物，其通过向核中或从核中依次或按代添加分支层而形成，并且以一个核、至少一个内部分支层和一个表面分支层为特征(参见Petar R.Dvornic和Donald A.Tomalia in Chem.in Britain,641-645,1994年8月)。在其它实施方案中，本文中使用的术语“树枝状聚合物”意图包括、但不限于具有内核、规律连接到该起始核的重复单元的内层(或“代”)以及连接到最外代的封端基团的外表面的分子体系结构。“树枝块(dendron)”是具有从焦点发出的分支的树枝状聚合物物质，所述焦点是核心，或可以直接地或通过连接部分连接到核心以形成更大的树枝状聚合物。在一些实施方案中，树枝状聚合物结构具有从中心核心辐射的重复基团，其对于每个分支用每个重复单元加倍。在一些实施方案中，本文所述的树枝状聚合物可以被描述为小分子、中等尺寸的分子、脂质或脂质样物质。这些术语可用于描述本文所述的具有树枝块(dendron)样外观的化合物(例如从单个焦点辐射的分子)。

[0297] 虽然树枝状聚合物是聚合物，但由于它们具有可控的结构、单一分子量、众多且可控的表面官能团，并且在达到特定代数后在传统上采用球状构象，因此树枝状聚合物可能优于传统聚合物。树枝状聚合物可以通过每个重复单元的依次反应以产生单分散的、树状和/或代结构聚合物结构来制备。单个树枝状聚合物由一个中心核心分子组成，其中树枝状楔形物连接到该中心核心上的一个或多个功能位点。根据在制备过程中使用的组装单体，树枝状聚合物表面层可具有设置在其上的多种官能团，包括阴离子的、阳离子的、亲水的或亲脂的基团。

[0298] 改变核心、重复单元和表面或封端基团的官能团和/或化学特性，可以调节它们的物理特性。可以改变的一些特性包括、但不限于溶解性、毒性、免疫原性和生物附着能力。树枝状聚合物经常通过其代数或分支中重复单元的数量来描述。仅由核心分子组成的树枝状聚合物被称为第0代，而沿着所有分支的每个连续重复单元是第1代、第2代诸如此类，直到封端或表面基团。在一些实施方案中，半代可能仅由与胺的第一缩合反应而不是与硫醇的第二缩合反应产生。

[0299] 树枝状聚合物的制备需要通过系列逐步反应实现的合成控制水平,所述逐步反应包括通过每个连续基团构建树枝状聚合物。树枝状聚合物合成可以是收敛或发散型。在发散型树枝状聚合物合成期间,分子以逐步过程从核心到外周组装,所述逐步过程包括将一代连接到前一代,且然后改变官能团用于下一反应阶段。官能团转化对于防止不受控制的聚合是必要的。这样的聚合将导致并非单分散的高支化分子,并且另外被称为超支化聚合物。由于空间效应,树枝状聚合物重复单元继续反应产生球形或球状分子,直到空间过度拥挤阻止了在特定代的完全反应并破坏了分子的单分散性。因此,在一些实施方案中,具体考虑了G1-G10代的树枝状聚合物。在一些实施方案中,树枝状聚合物包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个重复单元,或其中可导出的任何范围。在一些实施方案中,本文使用的树枝状聚合物是G0、G1、G2或G3。但是,通过减少分支聚合物中的间隔单元可以增加可能的代数(诸如11、12、13、14、15、20或25)。

[0300] 此外,树枝状聚合物具有两种主要的化学环境:由封端代上的特定表面基团产生的环境,和由于更高级结构而可能从本体介质和表面基团屏蔽树枝状结构的内部。由于这些不同的化学环境,树枝状聚合物已经发现了许多不同的潜在用途,包括在治疗用途中。

[0301] 在一些方面,使用丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯基团与胺和硫醇的差异反应性来组装可以用在本组合物中的树枝状聚合物。树枝状聚合物可以包括由丙烯酸酯基团与伯胺或仲胺、以及甲基丙烯酸酯与巯基基团的反应形成的仲或叔胺和硫醚。此外,树枝状聚合物的重复单元可以含有在生理条件下可降解的基团。在一些实施方案中,这些重复单元可以含有一个或多个生发的二醚、酯、酰胺或二硫化物基团。在一些实施方案中,核心分子是只在一个方向上允许树枝状聚合的单胺。在其它实施方案中,核心分子是具有多个不同树枝状分支的多胺,每个分支可以包含一个或多个重复单元。树枝状聚合物可以通过从该核心除去一个或多个氢原子而形成。在一些实施方案中,这些氢原子是在杂原子诸如氮原子上。在一些实施方案中,封端基团是亲脂基团诸如长链烷基或烯基。在其它实施方案中,封端基团是长链卤代烷基或卤代烯基。在其它实施方案中,封端基团是含有可电离基团诸如胺(-NH_2)或羧酸(-CO_2H)的脂族或芳族基团。在其它实施方案中,封端基团是含有一个或多个氢键供体诸如氢氧根基团、酰胺基团或酯的脂族或芳族基团。

[0302] 本公开内容的阳离子型可电离脂质可以含有一个或多个不对称取代的碳或氮原子,并且可以以光学活性的或外消旋的形式分离。因而,除非特别指出具体的立体化学或异构形式,否则意指化学式的所有手性、非对映异构、外消旋形式、差向异构形式和所有几何异构形式。阳离子型可电离脂质可以作为外消旋体和外消旋混合物、单一对映异构体、非对映异构体混合物和各非对映异构体存在。在一些实施方案中,获得单一非对映异构体。本公开内容的阳离子型可电离脂质的手性中心可以具有S或R构型。此外,预期阳离子型可电离脂质中的一种或多种可以作为结构异构体存在。在一些实施方案中,所述化合物具有相同的化学式,但与核心的氮原子的连接性不同。不希望受任何理论约束,据信这样的阳离子型可电离脂质存在,因为起始单体首先与伯胺反应,且然后在统计学上与存在的任何仲胺反应。因此,结构异构体可以呈现完全反应的伯胺,且然后呈现反应的仲胺的混合物。

[0303] 用于表示本公开内容的阳离子型可电离脂质的化学式通常将仅显示可能的几种不同互变异构体中的一种。例如,已知许多类型的酮基与相应的烯醇基平衡存在。类似地,许多类型的亚胺基与烯胺基平衡存在。无论对于给定式描绘哪种互变异构体,并且不管哪

种互变异构体是最普遍的,意指给定化学式的所有互变异构体。

[0304] 本公开内容的阳离子型可电离脂质还可以具有以下优点:与现有技术中已知的化合物(无论是用于本文所述的适应症还是其它方面)相比,它们可以更有效,毒性更小,作用时间更长,更强效,产生更少的副作用,更容易被吸收,和/或具有更好的药代动力学概况(例如,更高的口服生物利用度和/或更低的清除率),和/或具有其它有用的药理学、物理或化学特性。

[0305] 另外,构成本公开内容的阳离子型可电离脂质的原子意图包括这样的原子的所有同位素形式。本文中使用的同位素包括具有相同原子序数但是具有不同质量数的那些原子。作为一般示例而非限制性地,氢的同位素包括氚和氘,且碳的同位素包括^{13}C和^{14}C。

[0306] 应当认识到,形成本文所提供的阳离子型可电离脂质的任何盐形式的一部分的特定阴离子或阳离子不是至关重要的,只要该盐整体上是药理学上可接受的即可。药学上可接受的盐的其它例子和它们的制备方法与使用方法呈现于Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,and Use(2002)中,其通过引用并入本文。

[0307] 在一些实施方案中,所述可电离的阳离子脂质以约20至约23的量存在。在一些实施方案中,所述摩尔百分比是约20、20.5、21、21.5、22、22.5、至约23或其中可导出的任何范围。在其它实施方案中,所述摩尔百分比是约7.5至约20。在一些实施方案中,所述摩尔百分比是约7.5、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、至约20或其中可导出的任何范围。

[0308] C.选择性器官靶向(SORT)化合物

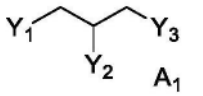
[0309] 在一些方面,本公开内容包含一种或多种选择性器官靶向(SORT)化合物,其导致组合物向特定器官的选择性递送。该化合物可以是脂质、小分子治疗剂、糖、维生素或蛋白。

[0310] 在一些实施方案中,所述选择性器官靶向(SORT)化合物以约2%、4%、5%、10%、15%、20%、22%、24%、26%、28%、30%、32%、34%、36%、38%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、至约70%或其中可导出的任何范围的摩尔比存在于所述组合物中。在一些实施方案中,所述SORT化合物可以以约5%至约40%、约10%至约40%、约20%至约35%、约25%至约35%、或约28%至约34%的量存在。

[0311] 在一些实施方案中,所述SORT化合物可以是脂质。脂质是具有两个或更多个C_6-C_{24}的烷基或烯基链的小分子。小分子治疗剂是含有少于100个非氢原子且重量小于2,000道尔顿的化合物。糖是包含分子式$C_nH_{2n}O_n$(其中n为3至7)的分子,或该式的多个分子的组合。蛋白是包含至少3个氨基酸残基的氨基酸序列。没有正式三级结构的蛋白也可以称为肽。蛋白还可以包含具有三级结构的完整蛋白。维生素是一种大量营养物,且由一种或多种选自维生素A、维生素B_1、维生素B_2、维生素B_3、维生素B_5、维生素B_6、维生素B_7、维生素B_9、维生素B_{12}、维生素C、维生素D、维生素E和维生素K的化合物组成。

[0312] 1.永久阳离子脂质

[0313] 在一些方面,本公开内容提供了具有一种或多种疏水组分和永久阳离子基团的一种或多种脂质。永久阳离子脂质可以含有具有正电荷(不论pH)的基团。可用于永久阳离子脂质中的一种永久阳离子基团是季铵基团。这些永久阳离子脂质包括诸如下式中所述的那些的结构:

[0314]  (I-PCL)

[0315] 其中：

[0316] Y_1、Y_2或Y_3各自独立地是$X_1C(O)R_1$或$X_2N^+R_3R_4R_5$；只要Y_1、Y_2和Y_3中的至少一个是$X_2N^+R_3R_4R_5$；

[0317] R_1是C_1-C_{24}烷基、C_1-C_{24}取代的烷基、C_1-C_{24}烯基、C_1-C_{24}取代的烯基；

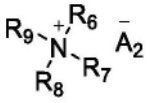
[0318] X_1是O或NR_a，其中R_a是氢、C_1-C_4烷基或C_1-C_4取代的烷基；

[0319] X_2是C_1-C_6烷二基或C_1-C_6取代的烷二基；

[0320] R_3、R_4和R_5各自独立地是C_1-C_{24}烷基、C_1-C_{24}取代的烷基、C_1-C_{24}烯基、C_1-C_{24}取代的烯基；

[0321] A_1是阴离子，其具有的电荷等于化合物中$X_2N^+R_3R_4R_5$基团的数目。

[0322] 在另一个实施方案中，所述永久阳离子脂质由下式进一步定义：

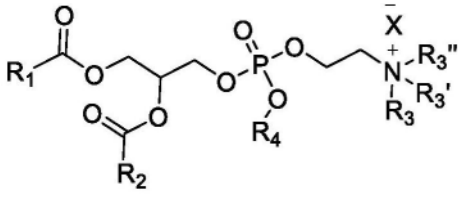
[0323]  (II-PCL)

[0324] 其中：

[0325] R_6-R_9各自独立地是C_1-C_{24}烷基、C_1-C_{24}取代的烷基、C_1-C_{24}烯基、C_1-C_{24}取代的烯基；只要R_6-R_9中的至少一个是C_8-C_{24}的基团；且

[0326] A_2是单价阴离子。

[0327] 在另一个实施方案中，所述永久阳离子脂质由下式进一步定义：

[0328]  (III-PCL)

[0329] 其中：

[0330] R_1和R_2各自独立地是烷基$_{(C8-C24)}$、烯基$_{(C8-C24)}$或任一个基团的被取代形式；

[0331] R_3、R_3'和R_3''各自独立地是烷基$_{(C\leq6)}$或被取代的烷基$_{(C\leq6)}$；

[0332] R_4是烷基$_{(C\leq6)}$或被取代的烷基$_{(C\leq6)}$；且

[0333] X^-是单价阴离子。

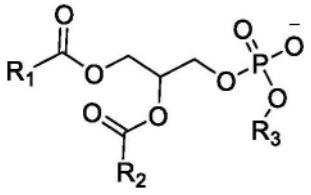
[0334] 在一些实施方案中，所述永久阳离子脂质以总脂质组合物的约4至约16摩尔百分比的量存在。所述组合物可以含有约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15摩尔百分比或其中可导出的任何范围。在其它实施方案中，所述组合物可以包含总脂质组合物的约18至约66摩尔百分比。在一些实施方案中，所述组合物可以含有约18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64或66摩尔百分比或其中可导出的任何范围。

[0335] 2.永久阴离子脂质

[0336] 在一些方面，本公开内容提供了具有一种或多种疏水组分和永久阴离子基团的一种或多种脂质。可以用在永久阴离子脂质中的一种阴离子基团是磷酸根基团。所述磷酸根

基团可以是去质子化且在低于8、9、10、11、12、13或14的pH具有负电荷的化合物。所述疏水组分可以是一个或多个C_6-C_{24}烷基或烯基。所述化合物可以具有一个疏水基团、两个疏水基团或三个疏水基团。

[0337] 在一些实施方案中,所述永久阴离子脂质具有下式的结构:

[0338] 

(IB)

[0339] 其中:

[0340] R_1和R_2各自独立地是烷基$_{(C8-C24)}$、烯基$_{(C8-C24)}$或任一个基团的被取代形式;

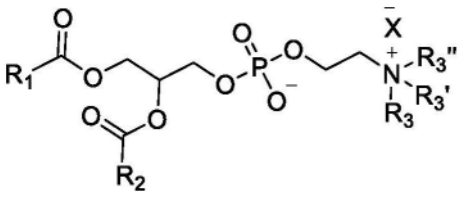
[0341] R_3是氢、烷基$_{(C\leqslant 6)}$或被取代的烷基$_{(C\leqslant 6)}$或$-Y_1-R_4$,其中:

[0342] Y_1是烷二基$_{(C\leqslant 6)}$或被取代的烷二基$_{(C\leqslant 6)}$;且

[0343] R_4是酰氧基$_{(C\leqslant 8-24)}$或被取代的酰氧基$_{(C\leqslant 8-24)}$。

[0344] 3.磷脂酰胆碱

[0345] 在一些方面,本公开内容提供了具有一种或多种疏水组分、阳离子胺基和带负电荷的磷酸根基团的一种或多种脂质。所述阳离子胺基可以是具有三个连接至氮原子的甲基的季胺。所述疏水组分可以是一个或多个C_6-C_{24}烷基或烯基。所述化合物可以具有一个疏水基团、两个疏水基团或三个疏水基团。在一些实施方案中,所述磷脂酰胆碱化合物进一步定义为:

[0346] 

(IA)

[0347] 其中:

[0348] R_1和R_2各自独立地是烷基$_{(C8-C24)}$、烯基$_{(C8-C24)}$或任一个基团的被取代形式;

[0349] R_3、R_3'和R_3''各自独立地是烷基$_{(C\leqslant 6)}$或被取代的烷基$_{(C\leqslant 6)}$;且

[0350] X^-是单价阴离子。

[0351] D.在脂质纳米颗粒中的额外脂质

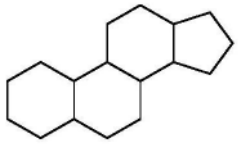
[0352] 在本公开内容的一些方面,将含有一种或多种脂质的组合物与阳离子型可电离脂质混合以产生组合物。在一些实施方案中,将所述阳离子型可电离脂质与1、2、3、4或5种不同类型的脂质混合。考虑可以将阳离子型可电离脂质与单一类型的多种不同脂质混合。在一些实施方案中,所述阳离子型可电离脂质组合物至少包含类固醇或类固醇衍生物、PEG脂质和磷脂。

[0353] 在一些实施方案中,所述脂质纳米颗粒优先递送至靶器官。在一些实施方案中,所述靶器官选自肺、心脏、脑、脾、骨髓、骨、骨骼肌、胃、小肠、大肠、肾、膀胱、乳房、肝、睾丸、卵巢、子宫、脾、胸腺、脑干、小脑、脊髓、眼、耳、舌或皮肤。可替换地,可以将组合物优先递送至靶器官系统,诸如神经系统、心血管系统或呼吸系统或这些器官系统之一的一部分。本文中使用的术语“优先递送”用于表示以施用量的至少25%递送至靶器官或器官系统的组合物。

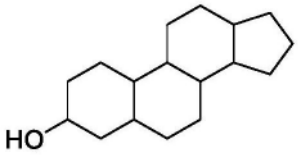
该术语用于表示施用量的至少25％、50％或至少75％递送至靶器官或器官系统的组合物。

[0354] 1.类固醇和类固醇衍生物

[0355] 在本公开内容的一些方面,将阳离子型可电离脂质与一种或多种类固醇或类固醇衍生物混合以产生组合物。在一些实施方案中,所述类固醇或类固醇衍生物包含任何类固醇或类固醇衍生物。如本文中使用的,在一些实施方案中,术语“类固醇”是一类具有四环17碳环状结构的化合物,其可以进一步包含一个或多个取代,所述取代包括烷基、烷氧基、羟基、氧代基、酰基,或在两个或更多个碳原子之间的双键。在一个方面,类固醇的环结构包含三个稠合的环己基环和稠合的环戊基环,如下式所示:

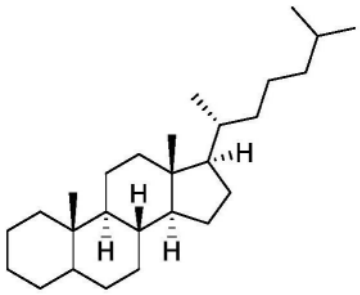
[0356] 。

[0357] 在一些实施方案中,类固醇衍生物包含具有一个或多个非烷基取代的上述环结构。在一些实施方案中,类固醇或类固醇衍生物是甾醇,其中该式进一步定义为:

[0358] 

。

[0359] 在本公开内容的一些实施方案中,所述类固醇或类固醇衍生物是胆甾烷或胆甾烷衍生物。在胆甾烷中,环结构由下式进一步定义:

[0360] 

[0361] 如上所述,胆甾烷衍生物包括一个或多个上述环系统的非烷基取代。在一些实施方案中,所述胆甾烷或胆甾烷衍生物是胆甾烯或胆甾烯衍生物或者甾醇或甾醇衍生物。在其它实施方案中,所述胆甾烷或胆甾烷衍生物是胆甾烯(cholestere)和甾醇或其衍生物。

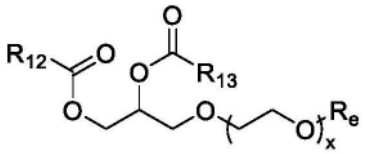
[0362] 在一些实施方案中,所述组合物可以进一步包含约40至约46的类固醇与总脂质组合物的摩尔百分比。在一些实施方案中,所述摩尔百分比是约40、41、42、43、44、45、至约46或其中可导出的任何范围。在其它实施方案中,类固醇相对于总脂质组合物的摩尔百分比是约15至约40。在一些实施方案中,所述摩尔百分比是15、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38或40或其中可导出的任何范围。

[0363] 2.PEG或聚乙二醇化的脂质

[0364] 在本公开内容的一些方面,将所述聚合物与一种或多种聚乙二醇化的脂质(或PEG脂质)混合以产生脂质组合物。在一些实施方案中,本公开内容包括使用已连接有PEG基团的任何脂质。在一些实施方案中,所述PEG脂质是是甘油二酯,其也包含与甘油基团连接的PEG链。在其它实施方案中,所述PEG脂质是含有用PEG链与接头基团连接的一个或多个C6-

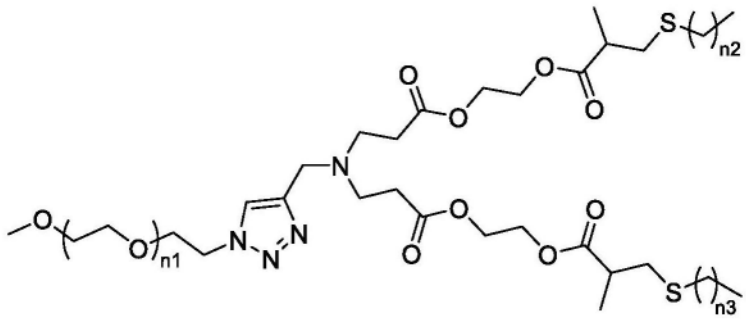
C24长链烷基或烯基或C6-C24脂肪酸基团的化合物。PEG脂质的一些非限制性例子包括PEG修饰的磷脂酰乙醇胺和磷脂酸、PEG缀合的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺和PEG修饰的1,2-二酰氧基丙烷-3-胺、PEG修饰的二酰基甘油和二烷基甘油。在一些实施方案中,PEG修饰的二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺或PEG修饰的二肉豆蔻酰基-sn-甘油。在一些实施方案中,通过脂质的PEG组分的分子量来测量PEG修饰。在一些实施方案中,所述PEG修饰具有约100至约15,000的分子量。在一些实施方案中,所述分子量是约200至约500、约400至约5,000、约500至约3,000、或约1,200至约3,000。PEG修饰的分子量是约100、200、400、500、600、800、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,250、2,500、2,750、3,000、3,500、4,000、4,500、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、12,500至约15,000。美国专利5,820,873、WO 2010/141069或美国专利8,450,298教导了可用于本公开内容中的脂质的一些非限制性例子,所述文献通过引用并入本文。

[0365] 在另一个方面,所述PEG脂质具有下式:

[0366] 

[0367] 其中:R_{12}和R_{13}各自独立地是烷基$_{(C\leqslant 24)}$、烯基$_{(C\leqslant 24)}$或这些基团中的任一个的取代形式;R_e是氢、烷基$_{(C\leqslant 8)}$或被取代的烷基$_{(C\leqslant 8)}$;且x是1-250。在一些实施方案中,R_e是烷基$_{(C\leqslant 8)}$诸如甲基。R_{12}和R_{13}各自独立地是烷基$_{(C\leqslant 4-20)}$。在一些实施方案中,x是5-250。在一个实施方案中,x是5-125或x是100-250。在一些实施方案中,所述PEG脂质是1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油、甲氧基聚乙二醇。

[0368] 在另一个方面,所述PEG脂质具有下式:

[0369] 

[0370] 其中:n_1是1-100之间的整数,且n_2和n_3各自独立地选自1-29之间的整数。在一些实施方案中,n_1是5、10、15、20、25、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100或其中可导出的任何范围。在一些实施方案中,n_1是约30至约50。在一些实施方案中,n_2是5-23。在一些实施方案中,n_2是11至约17。在一些实施方案中,n_3是5-23。在一些实施方案中,n_3是11至约17。

[0371] 在一些实施方案中,所述组合物可以进一步包含约4.0至约4.6的PEG脂质与总脂质组合物的摩尔百分比。在一些实施方案中,所述摩尔百分比是约4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、至约4.6或其中可导出的任何范围。在其它实施方案中,所述摩尔百分比是约1.5至约4.0。在一些实施方案中,所述摩尔百分比是约1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、至约4.0或其中可导出的任何范围。

[0372] 3.磷脂

[0373] 在本公开内容的一些方面,将所述聚合物与一种或多种磷脂混合以产生组合物。在一些实施方案中,也包含磷酸酯基团的任何脂质。在一些实施方案中,所述磷脂是含有一个或两个长链C6-C24烷基或烯基、甘油或鞘氨醇、一个或两个磷酸酯基团和任选的小有机分子的结构。在一些实施方案中,所述小有机分子是氨基酸、糖或氨基取代的烷氧基,诸如胆碱或乙醇胺。在一些实施方案中,所述磷脂是磷脂酰胆碱。在一些实施方案中,所述磷脂是二硬脂酰基磷脂酰胆碱或二油酰基磷脂酰乙醇胺。

[0374] 在一些实施方案中,所述组合物可以进一步包含约20至约23的磷脂与总脂质组合物的摩尔百分比。在一些实施方案中,所述摩尔百分比是约20、20.5、21、21.5、22、22.5、至约23或其中可导出的任何范围。在其它实施方案中,所述摩尔百分比是约7.5至约20。在一些实施方案中,所述摩尔百分比是约7.5、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、至约20或其中可导出的任何范围。

[0375] E.治疗剂

[0376] 1.核酸

[0377] 在本公开内容的一些方面,所述脂质组合物包含一种或多种核酸。在一些实施方案中,所述脂质组合物包含与脂质组合物以约5:1至约1:100的重量比存在的一种或多种核酸。在一些实施方案中,所述核酸与脂质组合物的重量比是约5:1、2.5:1、1:1、1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:60、1:70、1:80、1:90或1:100或其中可导出的任何范围。在一些实施方案中,所述重量比是约1:40。另外,应该清楚,本公开内容不限于本文公开的具体核酸。本公开内容在范围上不限于核酸的任何特定来源、序列或类型,但是,本领域普通技术人员可容易地鉴定各种其它核酸来源中的相关同系物,包括来自非人类物种(例如,小鼠、大鼠、兔、狗、猴、长臂猿、黑猩猩、猿、狒狒、牛、猪、马、绵羊、猫和其它物种)的核酸。预期在本公开内容中使用的核酸可以包含基于天然存在的序列的序列。考虑到遗传密码的简并性,具有至少约50%、通常至少约60%、更通常约70%、最通常约80%、优选至少约90%并且最优选约95%的核苷酸的序列是与天然存在的序列的核苷酸序列相同。在另一个实施方案中,所述核酸是与天然存在的序列互补的序列,或以75%、80%、85%、90%、95%和100%互补。本文涵盖编码250、500、1000、1212、1500、2000、2500、3000或更长的较长多核苷酸。

[0378] 本文使用的核酸可以源自基因组DNA,即,从特定生物体的基因组直接克隆。但是,在优选的实施方案中,所述核酸将包含互补DNA(cDNA)。还涵盖cDNA加天然内含子或来自另一个基因的内含子;这样的经工程改造的分子有时被称为“小基因(mini-genes)”。最低限度上,本公开内容的这些和其它核酸可用作在例如凝胶电泳中的分子量标准。

[0379] 术语“cDNA”意图表示使用信使RNA(mRNA)作为模板制备的DNA。与基因组DNA或从基因组、非加工或部分加工的RNA模板聚合的DNA相比,使用cDNA的优点是,cDNA主要含有相应蛋白的编码序列。可能有时候全部或部分基因组序列是优选的,诸如当非编码区是最佳表达所需时,或者当非编码区诸如内含子将在反义策略中被靶向时。

[0380] 在一些实施方案中,所述核酸包含一个或多个抑制基因或基因产物的表达的反义区段。反义方法利用了核酸倾向于与“互补”序列配对的事实。互补意指多核苷酸是能够根据标准Watson-Crick互补性规则进行碱基配对的多核苷酸。也就是说,较大的嘌呤将与较

小的嘧啶进行碱基配对,以在DNA情况下形成与胞嘧啶配对的鸟嘌呤(G:C)和与胸腺嘧啶配对的腺嘌呤(A:T)的组合,或者在RNA情况下形成与尿嘧啶配对的腺嘌呤(A:U)。在杂交序列中包含较少见的碱基诸如肌苷、5-甲基胞嘧啶、6-甲基腺嘌呤、次黄嘌呤等不会干扰配对。

[0381] 用多核苷酸靶向双链(ds)DNA导致三螺旋形成;靶向RNA将导致双螺旋形成。反义多核苷酸在引入靶细胞中时特异性地结合其靶多核苷酸并干扰转录、RNA加工、运输、翻译和/或稳定性。反义RNA构建体或编码这种反义RNA的DNA可用于在体外或在体内(诸如在包括人类受试者的宿主动物内)抑制宿主细胞内的基因转录或翻译或两者。

[0382] 反义构建体可以设计成结合基因的启动子和其它控制区、外显子、内含子或甚至外显子-内含子边界。预期最有效的反义构建体将包括与内含子/外显子剪接连接点互补的区域。因此,提出一个优选实施方案包括与内含子-外显子剪接连接点的50-200个碱基内的区域具有互补性的反义构建体。已经观察到,一些外显子序列可以被包括在构建体中而不严重影响其靶选择性。所包括的外显子物质的量将根据所用的特定外显子和内含子序列而变化。可以简单地通过如下容易地测试是否包括过多外显子DNA:在体外测试构建体以确定正常细胞功能是否受到影响或者具有互补序列的相关基因的表达是否受到影响。

[0383] 如上所述,“互补”或“反义”是指在其整个长度上基本上互补并且具有非常少的碱基错配的多核苷酸序列。例如,当长度为15个碱基的序列在13或14个位置上具有互补核苷酸时,它们可以被称为互补的。自然地,完全互补的序列将是在其整个长度上完全互补并且没有碱基错配的序列。也涵盖具有较低程度同源性的其它序列。例如,可以设计具有高度同源性的有限区域但也含有非同源区域(例如,核酶;参见下文)的反义构建体。这些分子虽然具有小于50%的同源性,但会在适当条件下结合靶序列。

[0384] 2.经修饰的核苷碱基

[0385] 在一些实施方案中,本公开内容的核酸包含一个或多个经修饰的核苷,所述核苷包含经修饰的糖部分。这样的包含一个或多个糖修饰的核苷的化合物可能具有期望的特性,诸如相对于仅包含含有天然存在的糖部分的核苷的寡核苷酸,增强的核酸酶稳定性或增加的与靶核酸的结合亲和力。在一些实施方案中,经修饰的糖部分是被取代的糖部分。在一些实施方案中,经修饰的糖部分是糖替代物。这样的糖替代物可以包含一个或多个与被取代的糖部分的取代对应的取代。

[0386] 在一些实施方案中,经修饰的糖部分是包含一个或多个非桥连糖取代基的被取代的糖部分,所述非桥连糖取代基包括、但不限于在2'和/或5'位置的取代基。适合于2'-位置的糖取代基的例子包括、但不限于:2'-F、2'-OCH_3(“OMe”或“O-甲基”)和2'-$O(CH_2)_2OCH_3$(“MOE”)。在某些实施方案中,在2'位置的糖取代基选自烯丙基、氨基、叠氮基、硫代、O-烯丙基、O--C_1-C_{10}烷基、O--C_1-C_{10}取代的烷基;OCF_3、$O(CH_2)_2SCH_3$、$O(CH_2)_2$--O--N(Rm)(Rn)和O--CH_2--C(=O)--N(Rm)(Rn),其中每个Rm和Rn独立地是H或被取代的或未被取代的C_1-C_{10}烷基。在5'-位置的糖取代基的例子包括、但不限于:5'-甲基(R或S);5'-乙烯基和5'-甲氧基。在一些实施方案中,被取代的糖包含超过一个非桥连糖取代基,例如,T-F-5'-甲基糖部分(关于另外的5',2'-二取代的糖部分和核苷,参见例如PCT国际申请WO 2008/101157)。

[0387] 包含2'-取代的糖部分的核苷被称作2'-取代的核苷。在一些实施方案中,2'-取代的核苷包含选自以下的2'-取代基:卤素、烯丙基、氨基、叠氮基、SH、CN、OCN、CF_3、OCF_3、O、S或N(R_m)-烷基;O、S或N(R_m)-烯基;O、S或N(R_m)-炔基;O-烷基烯基-O-烷基、炔基、烷芳基、芳烷

基、O-烷芳基、O-芳烷基、O(CH$_2$)$_2$SCH$_3$、O(CH$_2$)$_2$--O--N(R$_m$)(R$_n$)或O--CH$_2$--C(=O)--N(R$_m$)(R$_n$),其中每个R$_m$和R$_n$独立地是H、氨基保护基或被取代的或未被取代的C$_1$-C$_{10}$烷基。这些2'-取代基可以进一步被一个或多个取代基取代,所述取代基独立地选自羟基、氨基、烷氧基、羧基、苄基、苯基、硝基(NO$_2$)、巯基、硫代烷氧基(S-烷基)、卤素、烷基、芳基、烯基和炔基。

[0388] 在一些实施方案中,2'-取代的核苷包含选自以下的2'-取代基:F、NH$_2$、N$_3$、OCF$_3$、O--CH$_3$、O(CH$_2$)$_3$NH$_2$、CH$_2$—CH=CH$_2$、O--CH$_2$—CH=CH$_2$、OCH$_2$CH$_2$OCH$_3$、O(CH$_2$)$_2$SCH$_3$、O--(CH$_2$)$_2$--O--N(R$_m$)(R$_n$)、O(CH$_2$)$_2$O(CH$_2$)$_2$N(CH$_3$)$_2$和N-取代的乙酰胺(O--CH$_2$--C(=O)--N(R$_m$)(R$_n$),其中每个R$_m$和R$_n$独立地是H、氨基保护基或被取代的或未被取代的C$_1$-C$_{10}$烷基。

[0389] 在一些实施方案中,2'-取代的核苷包含含有选自以下的2'-取代基的糖部分:F、OCF$_3$、O--CH$_3$、OCH$_2$CH$_2$OCH$_3$、O(CH$_2$)$_2$SCH$_3$、O(CH$_2$)$_2$--O--N(CH$_3$)$_2$、--O(CH$_2$)$_2$O(CH$_2$)$_2$N(CH$_3$)$_2$和O--CH$_2$--C(=O)--N(H)CH$_3$。

[0390] 在一些实施方案中,2'-取代的核苷包含含有选自F、O--CH$_3$和OCH$_2$CH$_2$OCH$_3$的2'-取代基的糖部分。

[0391] 某些经修饰的糖部分包含桥连糖取代基,所述桥连糖取代基形成第二个环,从而产生二环糖部分。在一些这样的实施方案中,二环糖部分包含在4'和2'呋喃糖环原子之间的桥。这样的4'至2'糖取代基的例子包括、但不限于:--[C(R$_a$)(R$_b$)]$_n$--、--[C(R$_a$)(R$_b$)]$_n$--O--、--C(R$_a$R$_b$)--N(R)--O—或--C(R$_a$R$_b$)--O--N(R)--;4'-CH$_2$-2'、4'-(CH$_2$)$_2$-2'、4'-(CH$_2$)--O-2'(LNA);4'-(CH$_2$)--S-2';4'-(CH$_2$)$_2$--O-2'(ENA);4'-CH(CH$_3$)--O-2'(cEt)和4'-CH(CH$_2$OCH$_3$)--O-2'及其类似物(参见,例如,美国专利7,399,845);4'-C(CH$_3$)(CH$_3$)--O-2'及其类似物,(参见,例如,WO 2009/006478);4'-CH$_2$--N(OCH$_3$)-2'及其类似物(参见,例如,WO2008/150729);4'-CH$_2$--O--N(CH$_3$)-2'(参见,例如,US2004/0171570,公开于2004年9月2日);4'-CH$_2$--O--N(R)-2',和4'-CH$_2$--N(R)--O-2'-,其中每个R独立地是H、保护基或C$_1$-C$_{12}$烷基;4'-CH$_2$--N(R)--O-2',其中R是H、C$_1$-C$_{12}$烷基或保护基(参见,美国专利7,427,672);4'-CH$_2$--C(H)(CH$_3$)-2'(参见,例如,Chattopadhyaya等人,J.Org.Chem.,2009,74,118-134);和4'-CH$_2$--C(=CH$_2$)-2'及其类似物(参见,PCT国际申请WO 2008/154401)。

[0392] 在一些实施方案中,这样的4'至2'桥独立地包含1至4个独立地选自以下的连接基团:--[C(R$_a$)(R$_b$)]$_n$--、--C(R$_a$)=C(R$_b$)--、--C(R$_a$)=N--、--C(=NR$_a$)--、--C(=O)--、--C(=S)--、--O--、--Si(R$_a$)$_2$--、--S(=O)$_x$--和--N(R$_a$)--;其中:

[0393] x是0、1或2;

[0394] n是1、2、3或4;

[0395] 每个R$_a$和R$_b$独立地是H、保护基、羟基、C$_1$-C$_{12}$烷基、被取代的C$_1$-C$_{12}$烷基、C$_2$-C$_{12}$烯基、被取代的C$_2$-C$_{12}$烯基、C$_2$-C$_{12}$炔基、被取代的C$_2$-C$_{12}$炔基、C$_5$-C$_{20}$芳基、被取代的C$_5$-C$_{20}$芳基、杂环残基、被取代的杂环残基、杂芳基、被取代的杂芳基、C$_5$-C$_7$脂环族残基、被取代的C$_5$-C$_7$脂环族残基、卤素、OJ$_1$、NJ$_1$J$_2$、SJ$_1$、N$_3$、COOJ$_1$、酰基(C(=O)--H)、被取代的酰基、CN、磺酰基(S(=O)$_2$-J$_1$)或亚砜基(S(=O)-J$_1$);且

[0396] 每个J$_1$和J$_2$独立地是H、C$_1$-C$_{12}$烷基、被取代的C$_1$-C$_{12}$烷基、C$_2$-C$_{12}$烯基、被取代的C$_2$-C$_{12}$烯基、C$_2$-C$_{12}$炔基、被取代的C$_2$-C$_{12}$炔基、C$_5$-C$_{20}$芳基、被取代的C$_5$-C$_{20}$芳基、酰基(C(=O)--H)、被取代的酰基、杂环残基、被取代的杂环残基、C$_1$-C$_{12}$氨基烷基、被取代的C$_1$-C$_{12}$氨基烷基或保护基。

[0397] 包含二环糖部分的核苷被称为二环核苷或BNA。二环核苷包括、但不限于:(A)α-L-亚甲基氧基(4'-CH_2--O-2')BNA、(B)β-D-亚甲基氧基(4'-CH_2--O-2')BNA(也被称作锁核酸或LNA)、(C)亚乙基氧基(4'-$(CH_2)_2$--O-2')BNA、(D)氨基氧基(4'-CH_2--O--N(R)-2')BNA、(E)氧基氨基(4'-CH_2--N(R)--O-2')BNA、(F)甲基(亚甲基氧基)(4'-$CH(CH_3)$--O-2')BNA(也被称作受限的乙基或cEt)、(G)亚甲基-硫(4'-CH_2--S-2')BNA、(H)亚甲基-氨基(4'-CH2-N(R)-2')BNA、(I)甲基碳环基(4'-CH_2--$CH(CH_3)$-2')BNA、(J)亚丙基碳环基(4'-$(CH_2)_3$-2')BNA和(K)甲氧基(亚乙基氧基)(4'-$CH(CH_2OMe)$-O-2')BNA(也被称作受限的MOE或cMOE)。

[0398] 其它二环糖部分是本领域中已知的,例如:Singh等人,Chem.Commun.,1998,4,455-456;Koshkin等人,Tetrahedron,1998,54,3607-3630;Wahlestedt等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,2000,97,5633-5638;Kumar等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1998,8,2219-2222;Singh等人,J.Org.Chem.,1998,63,10035-10039;Srivastava等人,J.Am.Chem.Soc.,129(26)8362-8379(2007年7月4日);Elayadi等人,Curr.Opinion Invens.Drugs,2001,2,5561;Braasch等人,Chem.Biol.,2001,8,1-7;Orum等人,Curr.Opinion Mol.Ther.,2001,3,239-243;美国专利7,053,207,6,268,490,6,770,748,6,794,499,7,034,133,6,525,191,6,670,461,和7,399,845;WO 2004/106356,WO 1994/14226,WO 2005/021570,和WO 2007/134181;美国专利公开号US2004/0171570,US 2007/0287831,和US2008/0039618;美国系列号12/129,154,60/989,574,61/026,995,61/026,998,61/056,564,61/086,231,61/097,787,和61/099,844;和PCT国际申请号PCT/US2008/064591、PCT/US2008/066154和PCT/US2008/068922。

[0399] 在一些实施方案中,二环糖部分和掺入这样的二环糖部分的核苷进一步由异构构型限定。例如,包含4'-2'亚甲基-氧基桥的核苷可以呈α-L构型或呈β-D构型。先前,α-L-亚甲基氧基(4'-CH_2--O-2')二环核苷已被掺入显示出反义活性的反义寡核苷酸中(Frieden等人,Nucleic Acids Research,2003,21,6365-6372)。

[0400] 在一些实施方案中,被取代的糖部分包含一个或多个非桥连糖取代基和一个或多个桥连糖取代基(例如,5'-取代的和4'-2'桥连的糖;PCT国际申请WO 2007/134181,其中LNA被例如5'-甲基或5'-乙烯基取代)。

[0401] 在一些实施方案中,经修饰的糖部分是糖替代物。在一些这样的实施方案中,天然存在的糖的氧原子被例如硫、碳或氮原子取代。在一些这样的实施方案中,这样的经修饰的糖部分还包含如上所述的桥连和/或非桥连取代基。例如,某些糖替代物包含4'-硫原子和在2'-位置(参见,例如,公开的美国专利申请US2005/0130923)和/或5'位置的取代。作为另外的例子,已经描述了具有4'-2'桥的碳环二环核苷(参见,例如,Freier等人,Nucleic Acids Research,1997,25(22),4429-4443和Albaek等人,J.Org.Chem.,2006,71,7731-7740)。

[0402] 在一些实施方案中,糖替代物包含具有并非5-原子的环。例如,在一些实施方案中,糖替代物包含6元四氢吡喃。这样的四氢吡喃可以进一步被修饰或取代。包含这样的经修饰的四氢吡喃的核苷包括、但不限于己糖醇核酸(HNA)、阿努醇(anitol)核酸(ANA)、甘露醇核酸(MNA)(参见Leumann,C J.Bioorg.和Med.Chem.(2002)10:841-854)和氟代HNA(F-HNA)。

[0403] 在一些实施方案中,提供式VII的经修饰的THP核苷,其中q_1、q_2、q_3、q_4、q_5、q_6和q_7各

自是H。在某些实施方案中，q_1、q_2、q_3、q_4、q_5、q_6和q_7中的至少一个不是H。在一些实施方案中，q_1、q_2、q_3、q_4、q_5、q_6和q_7中的至少一个是甲基。在一些实施方案中，提供式VII的THP核苷，其中R_1和R_2中的一个是F。在某些实施方案中，R_1是氟且R_2是H，R_1是甲氧基且R_2是H，以及R_1是甲氧基乙氧基且R_2是H。

[0404] 本领域还已知许多其它的二环和三环糖替代物环系统，其可用于修饰核苷以掺入反义化合物中(参见，例如，综述文章:Leumann,J.C,Bioorganic和Medicinal Chemistry,2002,10,841-854)。

[0405] 也提供了修饰的组合，不限于诸如2'-F-5'-甲基取代的核苷(关于其它公开的5',2'-二取代的核苷，参见PCT国际申请WO 2008/101157)和用S代替核糖基环氧原子和在2'-位置的进一步取代(参见美国专利公开US 2005/0130923)，或者可替换地二环核酸的5'-取代(参见PCT国际申请WO 2007/134181，其中4'-CH_2--O-2'二环核苷在5'位置被5'-甲基或5'-乙烯基进一步取代)。还已经描述了碳环二环核苷的合成和制备以及其寡聚化和生化研究(参见，例如，Srivastava等人，2007)。

[0406] 在一些实施方案中，本公开内容提供了包含经修饰的核苷的寡核苷酸。那些经修饰的核苷酸可以包括经修饰的糖、经修饰的核苷碱基和/或经修饰的键。选择特定修饰以使得得到的寡核苷酸具有期望的特征。在一些实施方案中，寡核苷酸包含一个或多个RNA样核苷。在一些实施方案中，寡核苷酸包含一个或多个DNA样核苷酸。

[0407] 在一些实施方案中，本公开内容的核苷包含一个或多个未修饰的核苷碱基。在某些实施方案中，本公开内容的核苷包含一个或多个经修饰的核苷碱基。

[0408] 在一些实施方案中，经修饰的核苷碱基选自:如本文所定义的通用碱基、疏水性碱基、混杂碱基、尺寸扩大的碱基和氟化的碱基。如本文所定义的5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2、N-6和O-6取代的嘌呤，包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶;5-丙炔基胞嘧啶;5-羟基甲基胞嘧啶、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-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基CH_3)尿嘧啶和胞嘧啶以及嘧啶碱基的其它炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫基烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代特别是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、2-F-腺嘌呤、2-氨基-腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤、通用碱基、疏水性碱基、混杂碱基、尺寸扩大的碱基和氟化的碱基。其它经修饰的核苷碱基包括三环嘧啶诸如吩噁嗪胞苷([5,4-b][1,4]苯并噁嗪-2(3H)-酮)、吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮)、G夹诸如被取代的吩噁嗪胞苷(例如，9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶并[5,4-13][1,4]苯并噁嗪-2(3H)-酮)、咔唑胞苷(^{2}H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-2-酮)、吡啶并吲哚胞苷(H-吡啶并[3',2':4,5]吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-酮)。经修饰的核苷碱基还可以包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其它杂环代替的那些，例如7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟苷、2-氨基吡啶和2-吡啶酮。其它核苷碱基包括在美国专利3,687,808中公开的那些;在The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering,Kroschwitz,J.I.,编,John Wiley和Sons,1990,858-859中公开的那些;由Englisch等人,1991公开的那些;以及由Sanghvi,Y.S.,1993公开的那些。

[0409] 教导某些上述经修饰的核苷碱基以及其它经修饰的核苷碱基的制备的代表性美国专利包括、但不限于美国专利3,687,808;4,845,205;5,130,302;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121;5,596,091;5,614,617;5,645,985;5,681,941;5,750,692;5,763,588;5,830,653和6,005,096,它们中的每一篇通过引用整体并入本文。

[0410] 在一些实施方案中,本公开内容提供了包含连接的核苷的寡核苷酸。在这样的实施方案中,核苷可以使用任何核苷间键连接在一起。核苷间连接基团的两个主要类别由磷原子的存在或不存在限定。代表性的含磷核苷间键包括、但不限于磷酸二酯(P=O)、磷酸三酯、甲基膦酸酯、氨基磷酸酯和硫代磷酸酯(P=S)。代表性的不含磷的核苷间连接基团包括、但不限于:亚甲基甲基亚氨基(--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--)、硫代二酯(--O--C(O)--S--)、硫羰氨基甲酸酯(--O--C(O)(NH)--S--);硅氧烷(--O--Si(H)$_2$--O--);和N,N'-二甲基肼(--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--)。与天然磷酸二酯键相比,经修饰的键可以用于改变(通常增加)寡核苷酸的核酸酶抗性。在一些实施方案中,具有手性原子的核苷间键可以制备为外消旋混合物或单独的对映异构体。代表性的手性键包括、但不限于烷基膦酸酯和硫代磷酸酯。含磷的和不含磷的核苷间键的制备方法是本领域技术人员众所周知的。

[0411] 本文所述的寡核苷酸含有一个或多个不对称中心,且因此产生对映异构体、非对映异构体和其它立体异构构型,其在绝对立体化学方面可以定义为(R)或(S),α或β(例如对于糖端基异构体),或者(D)或(L)(例如对于氨基酸等)。本文提供的反义化合物中包括所有这样的可能的异构体,以及其外消旋的和光学纯的形式。

[0412] 中性核苷间键包括、但不限于磷酸三酯、甲基膦酸酯、MMI(3'-CH_2--N(CH_3)--O-5')、酰胺-3(3'-CH_2--C(=O)--N(H)-5')、酰胺-4(3'-CH_2--N(H)--C(=O)-5')、甲缩醛(3'-O--CH_2--O-5')和硫代甲缩醛(3'-S--CH_2--O-5')。其它中性核苷间键包括非离子键,其包含硅氧烷(二烷基硅氧烷)、羧酸酯、羧酰胺、硫化物、磺酸酯和酰胺(参见例如:Carbohydrate Modifications in Antisense Research;Y.S.Sanghvi和P.D.Cook,编,ACS Symposium Series 580;第3和4章,40-65)。其它中性核苷间键包括包含混合的N、O、S和CH_2组成部分的非离子键。

[0413] 还可以在寡核苷酸上的其它位置进行另外的修饰,特别是在3'末端核苷酸上的糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。例如,本公开内容的配体缀合的寡核苷酸的一种另外的修饰涉及向寡核苷酸化学连接一个或多个另外的非配体部分或缀合物,其增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取。这样的部分包括、但不限于脂质部分诸如胆固醇部分(Letsinger等人,1989),胆酸(Manoharan等人,1994),硫醚例如己基-5-三苯甲基硫醇(Manoharan等人,1992;Manoharan等人,1993),硫代胆甾醇(Oberhauser等人,1992),脂族链例如十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人,1991;Kabanov等人,1990;Svinarchuk等人,1993),磷脂例如二-十六烷基-消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-O-十六烷基-消旋-甘油-3-H-膦酸酯(Manoharan等人,1995;Shea等人,1990),多胺或聚乙二醇链(Manoharan等人,1995),或金刚烷乙酸(Manoharan等人,1995),棕榈基部分(Mishra等人,1995),或十八烷基胺或己基氨基-羰基-氧基胆甾醇部分(Crooke等人,1996)。

[0414] 教导这样的寡核苷酸缀合物的制备的代表性美国专利包括、但不限于美国专利4,828,979;4,948,882;5,218,105;5,525,465;5,541,313;5,545,730;5,552,538;5,578,

717,5,580,731;5,580,731;5,591,584;5,109,124;5,118,802;5,138,045;5,414,077;5,486,603;5,512,439;5,578,718;5,608,046;4,587,044;4,605,735;4,667,025;4,762,779;4,789,737;4,824,941;4,835,263;4,876,335;4,904,582;4,958,013;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,245,022;5,254,469;5,258,506;5,262,536;5,272,250;5,292,873;5,317,098;5,371,241,5,391,723;5,416,203,5,451,463;5,510,475;5,512,667;5,514,785;5,565,552;5,567,810;5,574,142;5,585,481;5,587,371;5,595,726;5,597,696;5,599,923;5,599,928和5,688,941,它们中的每一篇通过引用并入本文。

[0415] 3.蛋白

[0416] 在一些实施方案中,所述组合物可以进一步包含一种或多种蛋白。一些蛋白可以包括酶诸如核酸酶。本文所述的组合物可以包含一种或多种CRISPR有关的蛋白(例如CRISPR酶),包括Cas蛋白。Cas蛋白的非限制性例子包括Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也被称作Csn1和Csx12)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、其同系物或其修饰形式。这些酶是已知的;例如,化脓链球菌(S.pyogenes)Cas9蛋白的氨基酸序列可以在SwissProt数据库中在登录号Q99ZW2下找到。

[0417] 本文所述的组合物中的蛋白可以是Cas9(例如,来自化脓链球菌或肺炎链球菌(S.pneumonia))。CRISPR酶可以指导一条或两条链在靶序列位置处的切割,诸如在靶序列内和/或在靶序列的互补序列内。可以相对于相应的野生型酶使CRISPR酶突变,使得突变的CRISPR酶缺乏切割含有靶序列的靶多核苷酸的一条或两条链的能力。例如,来自化脓链球菌的Cas9的RuvC I催化结构域中的天冬氨酸-至-丙氨酸置换(D10A)将Cas9从切割两条链的核酸酶转化成切口酶(切割单链)。在一些实施方案中,Cas9切口酶可以与指导序列(例如两个指导序列)组合使用,所述指导序列分别靶向DNA靶标的有义链和反义链。这种组合允许两条链都被切口并用于诱导NHEJ或HDR。

[0418] 在一些实施方案中,本公开内容提供了含有一种或多种治疗性蛋白的化合物。可以被包括在组合物中的治疗性蛋白包括宽范围的分子诸如细胞因子、趋化因子、白介素、干扰素、生长因子、凝固因子、抗凝剂、血液因子、骨形态形成蛋白、免疫球蛋白和酶。特定治疗性蛋白的一些非限制性例子包括促红细胞生成素(EPO)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、α-半乳糖苷酶A、α-L-艾杜糖醛酸酶、促甲状腺素α、N-乙酰基半乳糖胺-4-硫酸酯酶(rhASB)、阿法链道酶、组织型纤溶酶原激活物(TPA)Activase、葡糖脑苷脂酶、干扰素(IF)β-1a、干扰素β-1b、干扰素γ、干扰素α、TNF-α、IL-1至IL-36、人生长激素(rHGH)、人胰岛素(BHI)、人绒毛膜促性腺激素α、达依泊汀α、促卵泡激素(FSH)和因子VIII。

[0419] 4.小分子治疗剂

[0420] 在一些方面,本公开内容提供了包含治疗剂的组合物。所述治疗剂可以是小分子诸如7-甲氧基喋啶、7-甲基喋啶、阿巴卡韦、阿巴芬净、阿巴瑞克、醋丁洛尔、范、对乙酰氨基酚、乙酰苯胺、乙酰唑胺、醋酸已脲、阿维A酯、阿伐斯汀、腺嘌呤、腺苷、阿拉沙星、阿苯达唑、沙丁胺醇、阿氯芬酸、阿地白介素、阿仑珠单抗、阿夫唑嗪、阿利维A酸、阿洛巴比妥、别嘌呤醇、全反式视黄酸(ATRA)、阿洛普令、阿普唑仑、阿普洛尔、六甲蜜胺、氨磷汀、阿米洛利、氨

鲁米特、氨基比林、盐酸胺碘酮、阿米替林、氨氯地平、异戊巴比妥、阿莫地喹、阿莫沙平、苯丙胺、两性霉素、两性霉素B、氨苄西林、氨普那韦、安吖啶、硝酸戊酯、异戊巴比妥、阿那曲唑、氨力农(anrinone)、蒽、蒽环类抗生素、阿普比妥、三氧化二砷、天门冬酰胺酶、阿司匹林、阿司咪唑、阿替洛尔、阿托伐他汀、阿托伐醌、阿特拉嗪、阿托品、阿托品硫唑嘌呤、金诺芬、阿扎胞苷、阿扎丙宗、硫唑嘌呤、阿嗪米特、阿奇霉素、氨曲南、巴氯芬、巴比妥、活卡介苗、贝克拉胺、倍氯米松、苄氟噻嗪、贝那普利(benezepril)、贝尼地平、贝诺酯、苯哌利多、苯他西泮、苯甲酰胺、苯并蒽、苄星青霉素、盐酸苯海索、苄硝唑、苯并二氮杂环庚三烯类、苯甲酸、羟萘苄芬宁、倍他米松、贝伐珠单抗(阿伐他汀)、贝沙罗汀、苯扎贝特、比卡鲁胺、联苯苄唑、比哌立登、比沙可啶、比生群、博来霉素、博来霉素、硼替佐米、布林佐胺、溴西泮、甲磺酸溴隐亭、溴哌利多、溴替唑仑、布地奈德、布美他尼、安非他酮、白消安、布他比妥、氨苯丁酯、盐酸布替萘芬、丁巴比妥、丁巴比妥(正丁巴比妥)、布康唑、硝酸布康唑、对羟基苯甲酸丁酯、咖啡因、骨化二醇、卡泊三烯(calciprotriene)、骨化三醇、卡普睾酮、坎苯达唑、樟脑、喜树碱、喜树碱类似物、坎地沙坦、卡培他滨、辣椒辣素、卡托普利、卡马西平、卡比马唑、虫螨威、卡铂、卡溴脲、卡比马唑(carimazole)、卡莫司汀、头孢孟多、头孢唑林、头孢克肟、头孢他啶、头孢呋辛酯、塞来考昔、头孢拉定、西立伐他汀、塞替利嗪、西妥昔单抗、苯丁酸氮芥、氯霉素、氯氮卓、氯美噻唑、氯喹、氯噻嗪、氯苯那敏、盐酸氯丙胍、氯丙嗪、氯磺丙脲、氯普噻吨、毒死蜱、金霉素、氯噻酮、氯唑沙宗、胆骨化醇、萘、西洛他唑、西咪替丁、桂利嗪、西诺沙星、环丙贝特、盐酸环丙沙星、西沙必利、顺铂、西酞普兰、克拉屈滨、克拉霉素、富马酸氯马斯汀、氯碘羟喹、氯巴占、氯法拉滨、氯法齐明、氯贝丁酯、柠檬酸氯米芬、氯米帕明、氯硝西泮、氯吡格雷、氯噻西泮、克霉唑、克霉唑、氯唑西林、氯氮平、可卡因、可待因、秋水仙碱、粘菌素、缀合的雌激素、皮质酮、可的松、醋酸可的松、赛克力嗪、环己巴比妥、环苯扎林、环丁烷-螺巴比妥酸酯、环乙烷-螺巴比妥酸酯、环庚烷-螺巴比妥酸酯、环己烷-螺巴比妥酸酯、环戊烷-螺巴比妥酸酯、环磷酰胺、环丙烷-螺巴比妥酸酯、环丝氨酸、环孢素、赛庚啶、盐酸赛庚啶、阿糖胞苷、胞嘧啶、达卡巴嗪、更生霉素、达那唑、丹蒽醌、丹曲林钠、氨苯砜、达促红素α、达罗地平、柔红霉素、地考喹酯、脱氢表雄酮、地拉韦啶、脱甲氯环素、地尼白介素、脱氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、右苯丙胺、右氯苯那敏、右芬氟拉明、右丙亚胺、右丙氧芬、泛影酸、地西泮、二氮嗪、双氯酚、2,4-滴丙酸、双氯芬酸、双香豆素、去羟肌苷、二氟尼柳、洋地黄毒苷、地高辛、二氢可待因、二氢马烯雌酮、甲磺酸双氢麦角胺、双碘羟基喹啉、盐酸地尔硫卓、糠酸二氯尼特、茶苯海明、地莫拉明、二硝托胺、薯蓣皂甙元、盐酸地芬诺酯、联苯、双嘧达莫、地红霉素、丙吡胺、双硫仑、敌草隆、多西他赛、多潘立酮、多奈哌齐、多沙唑嗪、盐酸多沙唑嗪、多柔比星(中性)、盐酸多柔比星、多西环素、丙酸屈他雄酮、氟哌利多、二羟丙茶碱、棘球白素、益康唑、硝酸益康唑、依法韦仑、艾力替新、依那普利、恩莫单抗、依诺昔酮、肾上腺素、表鬼臼毒素衍生物、表柔比星、阿法依泊汀、伊普沙坦(eposartan)、去氢马烯雌酮、马烯雌酮、麦角钙化醇、酒石酸麦角胺、厄洛替尼、红霉素、雌二醇、雌莫司汀、雌三醇、雌酮、依他尼酸、乙胺丁醇、炔己蚁胺、乙硫异烟胺、盐酸普罗吩胺、4-氨基苯甲酸乙酯(苯佐卡因)、对羟基苯甲酸乙酯、炔雌醇、依托度酸、依托咪酯、依托泊苷、阿维A酯、依西美坦、非尔氨酯、非洛地平、芬苯达唑、腈苯唑(fenbuconazole)、芬布芬、皮蝇磷、芬氯酸、芬氟拉明、非诺贝特、非诺多巴(fenoldepam)、非诺洛芬钙、苯氧威、拌种咯、芬太尼、芬替康唑、非索非那定、非格司亭、非那雄胺、醋酸氟卡胺、氟尿苷、氟达拉滨、氟康唑、氟康唑、氟胞嘧啶、咯菌

腈、氟氢可的松、醋酸氟氢可的松、氟芬那酸、氟阿尼酮(flunanisone)、盐酸氟桂利嗪、氟尼缩松、氟硝西泮、氟可龙、伏草隆、芴、氟尿嘧啶、盐酸氟西汀、氟甲睾酮、癸酸氟哌噻吨、三氟哌噻吨癸酸酯(fluphenthixol decanoate)、氟西泮、氟比洛芬、丙酸氟替卡松、氟伐他汀、叶酸、福森普利、磷苯妥英钠、夫罗曲坦、呋塞米、氟维司群、呋喃唑酮、加巴喷丁、G-BHC(林旦)、吉非替尼、吉西他滨、吉非贝齐、吉妥珠单抗、格拉非宁、格列本脲、格列齐特、格列美脲、格列吡嗪、格鲁米特、格列本脲、三硝酸甘油酯(硝酸甘油)、醋酸戈舍瑞林、格帕沙星、灰黄霉素、愈创甘油醚、醋酸胍那苄、鸟嘌呤、盐酸卤泛群、氟哌啶醇、氢氯噻嗪、庚巴比妥、橙皮素、六氯苯、己巴比妥、醋酸组氨瑞林、氢化可的松、氢氟噻嗪、羟基脲、莨菪碱、次黄嘌呤、替伊莫单抗、布洛芬、伊达比星、烯丙丁巴比妥、异环磷酰胺、ihydroequilenin、甲磺酸伊马替尼、亚胺培南、吲达帕胺、茚地那韦、吲哚美辛、吲哚洛芬、干扰素α-2a、干扰素α-2b、碘达胺、碘番酸、异菌脲、厄贝沙坦、伊立替康、艾沙康唑、异卡波肼、异康唑、异鸟嘌呤、异烟肼、异丙基巴比妥酸盐、异丙隆、二硝酸异山梨酯、单硝酸异山梨酯、伊拉地平、伊曲康唑、伊曲康唑、伊曲康唑(Itra)、伊维菌素、酮康唑、酮洛芬、酮咯酸、凯林、拉贝洛尔、拉米夫定、拉莫三嗪、毛花苷C、兰索拉唑(lanosprazole)、L-DOPA、来氟米特、来那度胺、来曲唑、亚叶酸、醋酸亮丙瑞林、左旋咪唑、左氧氟沙星、利多卡因、利谷隆、赖诺普利、洛美沙星、洛莫司汀、洛哌丁胺、氯雷他定、劳拉西泮、洛美沙星(lorefloxacin)、氯甲西泮、甲磺酸氯沙坦、洛伐他汀、马来酸麦角乙脲、盐酸马普替林、马吲哚、甲苯达唑、盐酸美克洛嗪、甲氯芬那酸、美达西泮、甲地高辛、醋酸甲羟孕酮、甲芬那酸、盐酸甲氟喹、乙酸甲地孕酮、美法仑、溴美喷酯、甲丙氨酯、美普他酚、巯基嘌呤、美沙拉秦、美司钠、美索达嗪、美雌醇、美沙酮、甲喹酮、美索巴莫、美芬妥英、甲氨蝶呤、甲氧沙林、甲琥胺、甲氯噻嗪、哌甲酯、甲基苯巴比妥、对羟基苯甲酸甲酯、甲泼尼龙、甲睾酮、甲乙哌酮、马来酸美西麦角、甲氧氯普胺、美托拉宗、美托洛尔、甲硝唑、盐酸米安色林、咪康唑、咪达唑仑、米非司酮、米格列醇、米诺环素、米诺地尔、丝裂霉素C、米托坦、米托蒽醌、吗替麦考酚酯、吗茚酮、孟鲁司特、吗啡、盐酸莫西沙星、萘丁美酮、纳多洛尔、纳布啡、萘啶酸、诺龙、并四苯、萘、萘普生、盐酸那拉曲坦、那他霉素、奈拉滨、奈非那韦、奈韦拉平、盐酸尼卡地平、烟酰胺、烟酸、醋硝香豆素、硝苯地平、尼鲁米特、尼莫地平、尼莫唑、尼索地平、硝西泮、呋喃妥因、呋喃西林、尼扎替丁、若莫单抗、炔诺酮、诺氟沙星、炔诺孕酮、盐酸去甲替林、制霉菌素、雌二醇、氧氟沙星、奥氮平、奥美拉唑、奥莫康唑、盐酸昂丹司琼、奥普瑞白介素、奥硝唑、奥沙利铂、奥沙尼喹、双羟萘酸奥克太尔、奥沙普秦、奥沙米特、奥沙西泮、奥卡西平、奥芬达唑、奥昔康唑、氧烯洛尔、羟布宗、盐酸羟苄利明、紫杉醇、帕利夫明、帕米膦酸盐、对氨基水杨酸、泮托拉唑、甲乙双酮、盐酸帕罗西汀、培加酶、培门冬酶、培非司亭、培美曲塞二钠、青霉胺、季戊四醇四硝酸酯、喷他佐辛(pentazocin)、喷他佐辛、戊巴比妥(pentobarbital)、戊巴比妥(pentobarbitone)、喷司他丁、己酮可可碱、奋乃静、奋乃静匹莫齐特、芘、苯乙酰脲、非那西丁、菲、苯茚二酮、苯巴比妥、苯酚巴比妥、酚酞、酚苄明、盐酸酚苄明、苯氧基甲基青霉素、苯琥胺、保泰松、苯妥英、吲哚洛尔、吡格列酮、哌泊溴烷、吡罗昔康、马来酸苯噻啶、铂化合物、普卡霉素、多烯、多粘菌素B、卟菲尔钠钠、泊沙康唑(Posa)、普拉克索、普拉睾酮、普伐他汀、吡喹酮、哌唑嗪、盐酸哌唑嗪、泼尼松龙、泼尼松、扑米酮、丙巴比妥、丙磺舒、普罗布考、丙卡巴肼、丙氯拉嗪、黄体酮、盐酸氯胍、异丙嗪、丙泊酚、残杀威、普萘洛尔、对羟基苯甲酸丙酯、丙硫氧嘧啶、前列腺素、伪麻黄碱、喋啶-2-甲基-硫醇、喋啶-2-硫醇、喋啶-4-甲基-硫醇、喋啶-4-硫醇、喋啶-7-甲基-硫醇、喋啶-7-

硫醇、双羟萘酸噻嘧啶、吡嗪酰胺、苊、吡斯的明、乙胺嘧啶、喹硫平、米帕林、喹那普利、奎尼丁、硫酸奎尼丁、奎宁、硫酸奎宁、雷贝拉唑钠、盐酸雷尼替丁、拉布立酶、雷夫康唑、瑞格列奈、双环辛巴比妥、利血平、维A酸类、利福布汀、利福平、利福喷汀、利美索龙、利培酮、利托那韦、利妥昔单抗、苯甲酸利扎曲普坦、罗非昔布、盐酸罗匹尼罗、罗格列酮、糖精、沙丁胺醇、水杨酰胺、水杨酸、沙奎那韦、沙格司亭、仲丁巴比妥、司可巴比妥、舍他康唑、舍吲哚、盐酸舍曲林、辛伐他汀、西罗莫司、索拉非尼、司帕沙星、螺旋霉素、螺内酯、二氢睾酮、司坦唑醇、司他夫定、己烯雌酚、链佐星、士的宁、硫康唑、硝酸硫康唑、磺胺醋酰、磺胺嘧啶、磺胺甲嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺、磺胺噻唑、舒林酸、磺胺苯酰(sulphabenzamide)、磺胺醋酰(sulphacetamide)、磺胺嘧啶(sulphadiazine)、磺胺多辛(sulphadoxine)、磺胺异噁唑、磺胺甲嘧啶(sulphamerazine)、磺胺甲基异噁唑(sulpha-methoxazole)、磺胺吡啶(sulphapyridine)、柳氮磺吡啶、苯磺唑酮、舒必利、硫噻嗪、琥珀酸舒马普坦、马来酸舒尼替尼、他克林、他克莫司、他布比妥、柠檬酸他莫昔芬、坦索罗辛(tamulosin)、橘皮素(targretin)、紫杉烷、他扎罗汀、替米沙坦、替马西泮、替莫唑胺、替尼泊苷、替诺昔康、特拉唑嗪、盐酸特拉唑嗪、盐酸特比萘芬、硫酸特布他林、特康唑、特非那定、睾内酯、睾酮、四环素、四氢大麻酚、四氧普林、沙利度胺、蒂巴因、可可碱、茶碱、噻苯唑、甲砜霉素、硫鸟嘌呤、硫利达嗪、塞替派、乙苯妥英(thotoin)、胸腺嘧啶、盐酸噻加宾、替勃龙、噻氯匹定、替硝唑、噻康唑、替罗非班、盐酸替扎尼定、妥拉磺脲、甲苯磺丁脲、托卡朋、托吡酯、托泊替康、托瑞米芬、托西莫单抗、曲马多、曲妥珠单抗、盐酸曲唑酮、维A酸、曲安西龙、氨苯蝶啶、三唑仑、三唑类、三氟丙嗪、甲氧苄啶、马来酸曲米帕明、苯并菲、曲格列酮、氨丁三醇、托吡卡胺、曲伐沙星、泰巴氨酯、泛癸利酮(辅酶Q10)、十一碳烯酸、尿嘧啶、尿嘧啶氮芥、尿酸、丙戊酸、戊柔比星、缬沙坦、万古霉素、盐酸文拉法辛、氨己烯酸、戊烯比妥、长春碱、长春新碱、长春瑞滨、伏立康唑、黄嘌呤、扎鲁司特、齐多夫定、齐留通、唑来膦酸盐、唑来膦酸、佐米曲普坦、唑吡坦和佐匹克隆。

[0421] F.试剂盒

[0422] 本公开内容还提供了试剂盒。本文公开的任何组分可以试剂盒的形式组合。在一些实施方案中,所述试剂盒包含如上文或权利要求书中所述的组合物。

[0423] 所述试剂盒通常将包括至少一个小瓶、管、烧瓶、瓶子、注射器或其它容器,其中可以放置组分,并且优选地适当地等分。在试剂盒中存在超过一种组分的情况下,所述试剂盒通常还将含有第二个、第三个或其它额外的容器,其中可以分开放置额外的组分。但是,可以在容器中包含组分的各种组合。在一些实施方案中,所有脂质纳米颗粒组分都组合在单个容器中。在其它实施方案中,一些或所有的脂质纳米颗粒组分提供在分开的容器中。

[0424] 本公开内容的试剂盒通常还将包括用于容纳各种容器的包装,其紧密密封以用于商业销售。这样的包装可以包括在其中保持期望容器的卡纸板或者注塑或吹塑塑料包装。试剂盒也可以包括关于使用试剂盒组分的说明书。说明书可以包括可实现的变体。

[0425] F.实施例

[0426] 包括以下实施例来证实本公开内容的优选实施方案。本领域技术人员应该理解,在以下的实施例中公开的技术代表发明人发现的在本公开内容的实践中良好地起作用的技术,且因而可以视为构成其实践的优选模式。但是,本领域技术人员考虑到本公开内容以后应该理解,可以在所公开的具体实施方案中做出许多改变且仍然获得类似或相似的结

果,而不背离本公开内容的精神和范围。

[0427] 实施例1-DOTAP修饰的脂质纳米颗粒的制备

[0428] 脂质纳米颗粒(LNP)是用于体内核酸递送的最有效载体类别。从历史上看,有效的LNP由4种组分组成:可电离的阳离子脂质、两性离子磷脂、胆固醇和脂质聚(乙二醇)(PEG)。但是,这些LNP仅导致核酸的一般递送,而不是靶向器官或组织的递送。LNP通常仅将RNA递送至肝。因此,寻求新的LNP制剂以尝试提供靶向的核酸递送。

[0429] 将四种标准类型的脂质以15:15:30:3摩尔比混合,添加或不添加永久阳离子脂质。简而言之,通过以表0.1所示的比率混合5A2-SC8(可电离的阳离子的)、DOPE(两性离子的)、胆固醇、DMG-PEG和DOTAP(永久阳离子)来制备LNP。

[0430] 表0.1:修饰的LNP中脂质的摩尔比和百分比.

[0431]

名称	摩尔比					摩尔百分比 (%)					脂质/mRNA (wt/wt)
	5A2-SC8	DOPE	Chol	DMG-PEG	DOTAP	5A2-SC8	DOPE	Chol	DMG-PEG	DOTAP	
mDLNP	15	15	30	3	0	23.8	23.8	47.6	4.8	0.0	40
DOTAP5	15	15	30	3	3.3	22.6	22.6	45.2	4.5	5.0	40
DOTAP10	15	15	30	3	7	21.4	21.4	42.9	4.3	10.0	40
DOTAP15	15	15	30	3	11	20.3	20.3	40.5	4.1	14.9	40
DOTAP20	15	15	30	3	16	19.0	19.0	38.0	3.8	20.3	40
DOTAP25	15	15	30	3	21	17.9	17.9	35.7	3.6	25.0	40
DOTAP30	15	15	30	3	27	16.7	16.7	33.3	3.3	30.0	40
DOTAP35	15	15	30	3	34	15.5	15.5	30.9	3.1	35.1	40
DOTAP40	15	15	30	3	42	14.3	14.3	28.6	2.9	40.0	40
DOTAP45	15	15	30	3	52	13.0	13.0	26.1	2.6	45.2	40
DOTAP50	15	15	30	3	63	11.9	11.9	23.8	2.4	50.0	40
DOTAP55	15	15	30	3	77	10.7	10.7	21.4	2.1	55.0	40
DOTAP60	15	15	30	3	95	9.5	9.5	19.0	1.9	60.1	40
DOTAP65	15	15	30	3	117	8.3	8.3	16.7	1.7	65.0	40
DOTAP70	15	15	30	3	150	7.0	7.0	14.1	1.4	70.4	40
DOTAP75	15	15	30	3	190	5.9	5.9	11.9	1.2	75.1	40
DOTAP80	15	15	30	3	260	4.6	4.6	9.3	0.9	80.5	40
DOTAP85	15	15	30	3	357	3.6	3.6	7.1	0.7	85.0	40
DOTAP90	15	15	30	3	570	2.4	2.4	4.7	0.5	90.0	40
DOTAP95	15	15	30	3	1200	1.2	1.2	2.4	0.2	95.0	40
DOTAP100	0	0	0	0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	40

[0432] 为了制备mDLNP制剂,将5A2-SC8、DOPE、胆固醇和DMG-PEG以给定的摩尔比(15:15:30:3)溶解在乙醇中。将mRNA溶解在柠檬酸盐缓冲液(10mM,pH 4.0)中。然后通过将mRNA以3:1的体积比(mRNA:脂质,v/v)快速混合到脂质溶液中,将mRNA稀释到脂质溶液中以达到40:1的重量比(总脂质:mRNA)。然后将该溶液在室温温育10min。为了形成DOTAP修饰的mDLNP制剂,将mRNA溶解在1×PBS或柠檬酸盐缓冲液(10mM,pH 4.0)中,并迅速混入含有5A2-SC8、DOPE、胆固醇、DMG-PEG和DOTAP的乙醇中,固定40:1的重量比(总脂质:mRNA)和3:1的体积比(mRNA:脂质)。如在表1中所示,每种制剂称为DOTAPX,其中X表示总脂质中的DOTAP摩尔百分比。

[0433] 实施例2-DOTAP修饰的mDLNP制剂的表征.

[0434] 为了表征不同的mDLNP制剂,通过动态光散射检查了尺寸、多分散性指数和ζ电位,对每种制剂分别进行3次。尺寸和多分散性指数显示在图5A中,表明不管DOTAP浓度如何,所有制剂均落在约90nm至约160nm的尺寸范围内,而多分散性指数在约0.1至约0.3变化,表明尺寸的相对均匀。在图5B中显示了每种制剂的ζ电位,并显示,ζ电位通常随DOTAP的浓度而增加。

[0435] 接着,使用Ribogreen RNA测定(Zhao等人,2016)测试封装效率。简而言之,当将

mRNA溶解在酸性缓冲液(10mM柠檬酸盐,pH 4)中时,mRNA被无DOTAP的mDLNP以约85%效率封装(图5C)。需要低pH以质子化可电离的阳离子脂质(例如5A2-SC8、C12-200、DLin-MC3-DMA)中的可电离胺,以允许带负电荷的mRNA的静电络合。对于该图中的所有其它制剂,使用溶解在PBS中的mRNA在pH 7.4进行混合。显然,对于低浓度的DOTAP,封装效率是低的,但是当DOTAP的摩尔百分比高于25%时,封装效率增加至>80%(图5C)。对于具有大于25% DOTAP的摩尔百分比的所有制剂,封装效率是在约80%和约95%之间。因此,使用中性pH PBS混合的潜力是永久阳离子脂质策略的特征。该策略允许组织特异性递送和高Cas9蛋白封装。永久阳离子脂质的添加允许在中性pH形成LNP。这些封装结果是当使用PBS作为缓冲液时的结果。当使用酸性缓冲液(例如柠檬酸盐缓冲液(10mM,pH 4.0))时,则对于0-100% DOTAP的所有制剂,封装效率是高的(>90%)。

[0436] 最后,使用2-(对甲苯氨基)-6-萘磺酸(TNS)测定确定pK_a(图3B)(Zhao等人,2016)。基于定义的规则绘制pK_a和组织特异性mRNA递送之间的关系。如表所示,此处设计了8条规则进行评分。显而易见,肝靶向制剂具有狭窄的pK_a(~6-7),脾靶向制剂没有明显的范围,但肺靶向递送需要高pK_a(>9.25)。综合考虑分布和pK_a检测,结论是,NP的内部电荷是影响mRNA分布的一个因素,并且整体/表观LNP pK_a是决定器官中mRNA介导的蛋白表达概况的另一个因素。

[0437] 实施例3-永久阳离子脂质修饰的mDLNP用于mRNA递送的效力

[0438] 为了检查包括永久阳离子脂质的LNP能够在体外递送活性货物的递送效力,给DOTAP修饰的mDLNP加载编码萤光素酶的mRNA,并用50ng/孔的mRNA转染Huh-7肝细胞和A549腺癌人类肺泡基底上皮细胞。将这些细胞培养24小时,然后检查萤光素酶表达和细胞生存力。如在图6A中所示,对于在体外Huh-7肝细胞中的mRNA递送和表达,5%-50%的DOTAP百分比是更好的,并且10% DOTAP似乎具有最大的萤光素酶递送和表达(图6A)。应当指出,体内递送特征可能不同。通常,由于SORT LNP的其它体内屏障、器官分布和细胞特性,这些研究可能无法用于预测体内活性,也不能用于预测组织趋向性。另外,检查了细胞生存力,并发现10% DOTAP在表现出稳健萤光素酶表达的mDLNP内产生了高生存力(图6A)。用A549肺癌细胞系的相同转染的检查表现出相似的结果,用DOTAP10制剂转染的细胞显示出几乎是任何其它制剂的两倍的荧光,并维持高细胞生存力(图6A)。DOTAP SORT LNP在PBS(pH 7.4)中形成,而不是在柠檬酸缓冲液(10mM,pH 4.0)中形成,但是可以在任一缓冲液系统中形成。这是一个属性,因为它允许封装和递送在乙醇或酸性缓冲液中不稳定的货物,例如蛋白。

[0439] 为了确定制剂中乙醇浓度的影响,选择DOTAP25并用各种乙醇与PBS之比(1:3、1:5、1:7.5和1:10)制备(图6B)。所有四种制剂显示出相似的封装效率、尺寸和PDI(图2B1和图2B2)。还通过用在每种制剂中的50ng/孔的mRNA转染FaDu下咽癌细胞,测量mRNA递送效率。每种制剂的递送效率是相似的,并且对细胞生存力的影响也非常小(图6C)。因此,这些制剂似乎适用于许多细胞类型,包括肝、肺和喉。进一步,该制剂还已成功修改为使用1×PBS(pH 7.4)代替酸性缓冲液(pH 4.0),且这些数据显示可以显著降低乙醇百分比,这提供了DOTAP制剂可以递送对高乙醇浓度和酸性缓冲液敏感得多的货物(例如蛋白)的可能性。

[0440] 接着,为了测试这些mDLNP在体内递送mRNA的能力,给小鼠注射在每种制剂中的0.1mg/kg的Luc mRNA剂量。图1B显示了在每种制剂的静脉内注射后6小时在主要器官中的萤光素酶的离体图像。令人感兴趣的是,随着DOTAP的摩尔百分比的增加,萤光素酶表达从

肝转移到脾,然后转移到肺,这证明了器官特异性递送。对这些数据进行定量,揭示了DOTAP百分比是组织靶向递送的一个因素,并且mDLNP(0% DOTAP)对于肝递送最佳,而5-15%DOTAP对于脾递送最佳,且DOTAP50(50%)对于肺递送最佳(图1B)。假设在静脉内注射后仅在肝、脾和肺中检测到萤光素酶表达,则可以计算在每个器官中表达的萤光素酶的百分比(图1C)。这些数据清楚地指示,随着制剂中DOTAP摩尔百分比的增加,向肝的递送和其中的表达减少,而当DOTAP百分比大于70%时,在肝中看到接近零的表达(图1B,1C)。但是,DOTAP百分比越大,在肺组织中看到越多的发光,当DOTAP百分比大于80%时,在肺中看到接近100%的发光(图1C)。DOTAP 5和30摩尔百分比的浓度在脾组织中显示出更高的发光百分比,而DOTAP10在脾中显示出与其它组织相比最高的相对发光(图1C)。这些结果指示,在注射后,可以针对特定组织递送调整脂质浓度。

[0441] 为了更深入地测试特定DOTAP制剂的器官生物分布,将PBS或肝靶向NP(mDLNP)、脾靶向NP(DOTAP10)和肺靶向NP(DOTAP50)以0.5mg/kg Cy5-Luc mRNA(染料标记的mRNA以跟踪RNA LNP)的剂量注射进C57BL/6小鼠(n=2)。注射后6小时,收集主要器官并成像(图3A)。制剂的器官分布随DOTAP的量而改变,并且随着DOTAP百分比的增加,在肝中的积累逐渐移至肺,但是不管DOTAP百分比如何,在肝中仍然存在NP(图7,图8)。将该数据与图1的数据一起考虑,显然,器官分布不足以分析靶向组织的递送效力(mRNA翻译成蛋白)。进一步考虑这些制剂之间相似的尺寸分布和EE,ζ电位和pK_a可能在靶向组织的mRNA表达中发挥作用。

[0442] 为了理解DOTAP向mDLNP的添加的作用是否有限或者以上显示的分布对于永久阳离子脂质配制的mDLNP是否通用,产生了包含另一种流行的阳离子脂质双十二烷基二甲基溴化铵(DDAB)的mDLNP(图2A1)。DDAB具有两个具有18个碳原子且没有不饱和键的疏水尾巴,并且具有与DOTAP完全不同的首基(图1C)。选择DDAB5、DDAB15、DDAB40和DDAB50制剂用于体内递送(0.1mg/kg,6h,n=2)。与上面的DOTAP制剂相似,即使NP中的DDAB百分比变化了10倍(5%至50%),尺寸分布也几乎没有差异(图2A1)。类似于DOTAP NP,体内萤光素酶表达显示出以下趋势:随着DDAB百分比增加,发光从肝转移到脾,然后转移到肺(图2A2)。

[0443] 用具有首基1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱氯化物的第三种永久阳离子脂质形成mDLNP,该首基具有与DOTAP类似的结构,但具有更短的14个碳疏水尾巴((14:0)EPC)(图2B1)。类似于DDAB策略,制备了(14:0)EPC5、(14:0)EPC15、(14:0)EPC40和(14:0)EPC50制剂,并检查了尺寸分布(图2B1)和体内Luc mRNA递送(0.1mg/kg,6h,n=2)(图2B2)。与上面分析的mDLNP相似,颗粒尺寸通常是均匀的(图2B1),并且正如预期的,随着EPC摩尔百分比增加(14:0),发光从肝转移到脾,然后转移到肺(图2B2)。将所有这些数据综合到一起,包括不同的疏水尾巴、饱和的和不饱和的键以及不同的首基,似乎阳离子脂质配制的mDLNP用于靶向组织的mRNA递送是通用的。

[0444] 为了理解DOTAP向LNP的添加的效果是否对永久阳离子脂质具有特异性,检查了在mDLNP制剂中添加两性离子脂质而不是永久阳离子脂质的效果。测试了两种代表性的两性离子脂质,具有不同化学结构的磷脂:DSPC和DOCPe。另外,还进行了测试以确定两性离子脂质(而不是永久阳离子脂质)的添加是否会影响组织特异性递送效力。图2C1和2D1显示了DSPC和DOCPe脂质(两性离子脂质)的化学结构。带正电荷和带负电荷的功能性首基的位置以及疏水性结构域(饱和相对于不饱和)的位置均存在差异,从而提示,关于两性离子脂质的任何观察到的效果都是普遍的/通用的。用DSPC或DOCPe配制的mDLNP是相似的(图2C1,

2D1)。令人感兴趣的是,将两性离子脂质包含在5-组分修饰的DLNP中并不会像DOTAP和其它永久阳离子脂质那样使蛋白表达概况从肝改变到肺。相反,DSPC和DOCPe在给定范围内都改善了向脾中的mRNA递送(在DSPC中小于80%,且在DOCPe中小于50%)。对于任何百分比,在肺中没有蛋白表达(0.1mg/kg,6h,n=2)(图2C2,2D2)。因此,额外两性离子脂质的包含可以帮助脾递送,但是不能像永久阳离子脂质的包含那样调节从肝到脾到肺的递送效力。

[0445] 为了理解DOTAP向LNP的添加的效果是否对永久阳离子脂质具有特异性,检查了在mDLNP制剂中添加可电离的阳离子脂质而不是永久阳离子脂质的效果。测试了两种具有不同化学结构的代表性的可电离的阳离子脂质:C12-200和DODAP。除了首基(季胺相对于叔胺)外,DODAP具有与DOTAP相同的结构。C12-200是含有可电离的叔胺(也没有季胺)的用于siRNA和mRNA递送的有效类脂质,其具有与DODAP完全不同的结构。(图2E1,2F1)类似地,两种修饰的mDLNP的尺寸分布在某些百分比(小于80%)仍是均匀的。(图2E1,2F1)令人惊奇地,可电离的阳离子脂质在5-组分修饰的DLNP中的包含没有像DOTAP和其它永久阳离子脂质那样使蛋白表达概况从肝改变到脾再改变到肺。相反,将可电离的阳离子脂质包含到DLNP中增加mRNA向肝的mRNA递送效力。与没有额外的可电离的阳离子脂质的原始mDLNP(仅5A2-SC8)(0.1mg/kg,6h,n=2)相比,这些药物显示出好得多的递送效力。随着DODAP或C12-200的百分比增加(50%或80%),萤光素酶信号下降很多,但是肝仍然是主要器官,而不是脾或肺。因此,结论是,器官特异性作用可归因于特定比率的永久阳离子脂质的包含。此外,该数据显示,永久阳离子脂质产生与可电离的阳离子脂质不同的作用。这些数据进一步显示,这些趋势在脂质类别方面是通用的。

[0446] 实施例4-使用共同递送Cas9 mRNA和sgRNA的修饰的mDLNP的CRISPR/Cas9基因编辑

[0447] 首先,对比了三种靶向Td-Tomato小鼠的sgRNA以确定哪种sgRNA在随后的实验中是最有效的。这些sgRNA是sgTom1、sgTom2和sgLoxP。如图10A中所示,sgTom1和sgLoxP被递送并以相似的结果表达,并且在诱导TdTomato方面比sgTom2更成功(图10A)。考虑到sgLoxP(NAG)的弱PAM,最终选择了sgTom1用于进一步实验。

[0448] 鉴于用DOTAP NP显示的组织特异性mRNA(luc mRNA)递送,并且DDAB和EPC修饰的NP都显示出相似的递送趋势,然后将DOTAP修饰的mDLNP用于Cas9 mRNA/sgRNA共同递送,旨在实现组织特异性的基因编辑。为了检查体内共同递送,使用了遗传工程改造的小鼠,其含有存在于所有细胞中的纯合的ROSA26启动子Lox-Stop-Lox tdTomato(tdTO)盒(图4A)。容纳针对LoxP或针对Tom的Cas9-mRNA和sgRNA的DOTAP修饰的mDLNP的共同递送使得能够缺失停止盒和诱导tdTO表达(图4B)。以2.5mg/kg(各50ug)的总剂量给小鼠静脉内注射mDLNP和DOTAP50制剂以共同递送IVT Cas9 mRNA和修饰的sgTom1(4/1,重量/重量),然后在处理后第10天检测主要器官的荧光(图4B)。实现了肝和肺特异性的CRISPR/Cas基因编辑。还实现了脾特异性的编辑。但是,由于非常高的背景红色自发荧光,因此使用此TdTomato报告小鼠无法对脾编辑进行定量。

[0449] 为了进一步检查组织特异性编辑,选择PTEN作为内源性靶标。给C57BL/6小鼠静脉内注射mDLNP、DODAP20或DOTAP50以达到组织特异性基因编辑。总剂量为2.5mg/kg(各50ug),IVT Cas9 mRNA与修饰的sgPTEN的重量比为4/1,且检测时间为治疗后第10天。使用靶向PTEN的sgRNA。T7E1测定显示,用体内PTEN编辑进一步确认了组织特异性特征。(图4C)。

[0450] 实施例5-使用递送Cas9蛋白/sgRNA核糖核蛋白(RNP)的修饰的mDLNP的CRISPR/Cas9基因编辑

[0451] 基于下述发现:永久阳离子脂质(例如DOTAP)向含有可电离的阳离子脂质、两性离子脂质、胆固醇和聚乙二醇化的脂质的传统LNP制剂中的包含,研究了这种制剂方法是否还可以递送对乙醇和/或低pH酸性水性缓冲液敏感的其它货物。DOTAP策略的关键要素是,可以使用中性pH的PBS制备制剂。因此,检查了该方法是否还可以封装和递送大蛋白(诸如Cas9)用于基因编辑应用。因此DOTNP脂质纳米颗粒由五种组分组成:可电离的阳离子脂质(例如5A2-SC8)、两性离子脂质(例如DOPE)、胆固醇、DMG-PEG和永久阳离子脂质(例如DOTAP)的模块化包含。5A2-SC8、胆固醇、DOPE和DMG-PEG的摩尔比是固定的(15:15:30:5,mol/mol),且DOTNPX是指具有不同DOTAP摩尔百分比的DOTNP。

[0452] 检查首先表征的Cas9/sgRNA复合物是否对酸性pH敏感。在PBS(pH 7.4)中和在柠檬酸盐缓冲液(pH 4.2)中测量了Cas9/sgLUC复合物(mol/mol=1/1)的尺寸(直径)(图11A)和ζ电位(图11B)。在柠檬酸盐缓冲液中制备的Cas9/sgLUC复合物的尺寸很大(大于100nm),并且ζ电位是带正电荷的。这两个属性(尺寸大于典型的有效LNP)和正电荷(电荷与具有带正电荷的脂质的复合物不相容)使得其不可能被脂质纳米颗粒有效地封装。但是,在PBS中制备的Cas9/sgLUC复合物的尺寸是紧凑的(小于20nm)并且具有负电荷。因此,当在中性pH配制时,它可以被脂质纳米颗粒封装。接下来,制备和表征了具有不同的Cas9蛋白与sgRNA摩尔比的Cas9/sgRNA复合物。用不同的Cas9/sgRNA摩尔比(1/1、1/3和1/5)制备的Cas9/sgLUC复合物的尺寸(图11C)和ζ电位(图11D)。与Cas9/sgLUC复合物(1/1,mol/mol)相比,较高的摩尔比(1/3和1/5,mol/mol)显示出较小的尺寸和较多的负电荷,这可能对脂质纳米颗粒封装有利。制备组合物并表征封装Cas9/sgRNA复合物后的DOTNP脂质纳米颗粒。当以不同的摩尔比(1/1、/3、1/5)制备时,封装Cas9/sgLUC复合物的DOTNP10脂质纳米颗粒(命名DOTNP10-L)的尺寸(图11E)和ζ电位(图11F)。该数据指示将Cas9/sgRNARNP封装进单分散LNP中。图11G显示了具有封装的RNP的DOTNP10-L(1/3,mol/mol)LNP的TEM图像。在此初步研究之后,使用了不同的sgRNA,包括sgLUC、sgGFP、sgTOM和sgPTEN。为了区分它们,在DOTNP的末尾添加了每个基因的第一个字母。DOTNP10-L是指封装Cas9/sgLUC复合物的DOTNP10脂质纳米颗粒;DOTNP10-G是指封装Cas9/sgGFP复合物的DOTNP10脂质纳米颗粒。

[0453]

	DOTAP10		DSPC50		DODAP50	
	PBS	柠檬酸盐缓冲液	PBS	柠檬酸盐缓冲液	PBS	柠檬酸盐缓冲液
尺寸 (nm)	155.4	85.1	208.9	202.0	153.5	148.0
PDI	0.09	0.21	0.30	0.29	0.08	0.15
EE (%)	34.9	54.9	0	43.7	14.4	36.2

[0454] 表7.用PBS和柠檬酸缓冲液形成的DOTAP10、DSPC50和DODAP50制剂的表征,包括尺寸、PDI和封装效力。

[0455]

名称	正向引物 (5'至3')	反向引物 (5'至3')	长度	注
Cas9	ATATATGGATCCGCCACCATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTC	ATATATGAATTCTTACTTTTTCTTTTTTGCCTGGCCGGCCTTTTTCGTGGCCGCCGGCCTTTTGTCGCCTCCCAG	4233bp	用于IVT克隆
Ca9 Seq-1	CTGAGCGACATCCTGAGAGTGAAC			用于测序以证实整个Cas9序列
Ca9 Seq-2		AGCAGGTCCTCTCTGTTCAG		
Ca9 Seq-3	GACGGCTTCGCCAACAGAAACTTC			
Ca9 Seq-4		TTTGATGCCCTCTTCGATCCG		
Ca9 Seq-5	GGGAGATCGTGTGGGATAAG			
Ca9 Seq-6		ACTTCTTAGGGTCCCAGTCC		
Ca9 Seq-7	AAGAGAGTGATCCTGGCCGAC			
PTEN	ATCCGTCTTCTCCCCATTCCG	GACGAGCTCGCTAATCCAGTG	638bp	用于T7E1测定
IVT sgTom1	TAATACGACTCACTATAGGGAAGTAAAACCTCTACAAATGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	AAAAGCACCGACTCGGTGCC	120bp	用于IVT模板制备。 红色指示sgRNA序列
IVT sgTom2	TAATACGACTCACTATAGGGAAACCTCTACAAATGTGGTAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	AAAAGCACCGACTCGGTGCC	120bp	
IVT sgLoxP	TAATACGACTCACTATAGGGCGTATAGCATACATTATACGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	AAAAGCACCGACTCGGTGCC	120bp	

[0456] 表8.列出了在本研究工作中使用的所有引物,包括PCR产物的长度及其目的(Cas9=SEQ ID NO:3-4;Ca9 Seq-1=SEQ ID NO:5;Ca9 Seq-2=SEQ ID NO:6;Ca9 Seq-3=SEQ ID NO:7;Ca9 Seq-4=SEQ ID NO:8;Ca9 Seq-5=SEQ ID NO:9;Ca9 Seq-6=SEQ ID NO:10;Ca9 Seq-7=SEQ ID NO:11;PTEN=SEQ ID NO:14-15;IVT sgTom1=SEQ ID NO:44-45;IVT sgTom2=SEQ ID NO:46-47;IVT sgLoxP=SEQ ID NO:48-49)

[0457] 为了检查DOTNP脂质纳米颗粒是否可以将Cas9/sgRNA RNP复合物递送到细胞核中并在体外介导有效的基因编辑,进行了一系列实验。首先,通过共焦显微术跟踪含有被绿色荧光EGFP标记的Cas9/sgRNA RNP的DOTNP(图12A)。与封装Cas9-EGFP/sgLUC复合物(1/3,mol/mol)的DOTNP10(使用9nM sgRNA)一起温育1h、3h、6h和24h后,Hela-Luc细胞的图像显示DOTNP被内化到细胞中并且Cas9 RNP运输进细胞核。绿色:EGFP融合的Cas9蛋白;蓝色:被Hoechst 33342染色的细胞核。红色箭头指示DOTNP10进入细胞核的过程。(图12B)

[0458] 接着,检查了DOTNP脂质纳米颗粒是否可以递送Cas9/sgRNA RNP复合物是否可以切割被靶向的萤光素酶DNA。在与不同摩尔比的DOTNP10-L一起温育(使用24nM sgRNA)3天后,使用TIDE测定在LUC基因座处对DNA插入缺失(插入和缺失)的百分比进行定量。封装Cas9/sgGFP的DOTNP10脂质纳米颗粒(DOTNP10-G)用作阴性对照。在这里,使用了两种商业Cas9蛋白(GeneArt Cas9和Truecut Cas9)(图12B)。接着,进行了与不同制剂(24nM sgRNA)一起温育的Hela-Luc细胞的T7EI切割测定,以证明DNA编辑(图12C)。在测试的条件中,当使用Truecut Cas9蛋白时,1/3的摩尔比显示出最佳的基因编辑。接着,使用荧光显微术测试GFP的编辑(图12D)。与DOTNP10-L(对照,不靶向GFP)和DOTNP10-G(靶向GFP)(24nM sgRNA)一起温育的SKOV3-GFP细胞的图像显示在被GFP蛋白表达的消失证实的靶标编辑上。最后,使用流式细胞计量术分析与DOTNP10-L和DOTNP10-G一起温育的SKOV3-GFP细胞(图12E)。(图12F)通过流式细胞计量术得到的与DOTNP10-L和DOTNP10-G一起温育的SKOV3-GFP细胞

的平均荧光强度显示CRSPR/Cas对GFP的编辑。

[0459] 接着,检查了DOTNP脂质纳米颗粒是否可以在体内递送Cas9/sgRNA RNP复合物以实现CRISPR/Cas介导的基因编辑。和以前一样,使用了遗传工程改造的TdTomato小鼠模型。用以下制剂给每只小鼠递送1.5mg/kg的sgRNA:DOTNP5-T是指封装Cas9/sgTom复合物的DOTNP5 LNP;DOTNP10-T是指封装Cas9/sgTom复合物的DOTNP10 LNP;DOTNP50-T是指封装Cas9/sgTom复合物的DOTNP50 LNP。在静脉内注射这些制剂后,在注射后7天在主要器官中离体定量tdTomato荧光(图13A)。仅在DOTNP5-T处理组的肝中观察到tdTomato荧光;在DOTNP10-T组中,肺中看到轻微荧光,且如果将DOTAP的剂量进一步增加至50%(DOTNP50-T),则在肺中观察到大部分tdTomato荧光。因此,类似于上面概述的mRNA递送实验,DOTAP方法还允许Cas9/sgRNA核糖核蛋白(RNP)复合物的组织特异性基因编辑。为了进一步检查递送,递送了包含针对PTEN的sgRNA的LNP。使用肝和肺器官的T7EI切割测定,确定了DOTNP5-P(封装Cas9/sgPTEN复合物的DOTNP5 LNP)、DOTNP10-P(封装Cas9/sgPTEN复合物的DOTNP10 LNP)和DOTNP50-P(封装Cas9/sgPTEN复合物的DOTNP50 LNP)的静脉内注射(2mg/kg sgRNA/小鼠)介导基因编辑(图13B)。结果与通过离体成像获得的结果一致。仅在用DOTNP5-P处理后在肝中检测到基因编辑;当与DOTNP10-P一起温育时,在肝和肺中都获得了基因编辑;而在DOTNP50-P处理组中,在肺中观察到大部分基因编辑。

[0460] 本文提供的数据显示,脂质纳米颗粒可以制备成具有不同的组成,以便将有效负荷特异性地靶向至特定组织。具体地,具有低浓度的永久阳离子脂质(≤10%)的脂质纳米颗粒有效地将核酸递送至肝,而具有小于30%永久阳离子脂质的LNP有效地将核酸递送至脾,具有大于30%永久阳离子脂质的LNP有效地将核酸递送至肺。这些发现似乎是通用的,其中首基、饱和和尾巴长度几乎没有影响。

[0461] 实施例6-另一种脂质向已知的四种脂质组合物中的添加导致递送靶标的改变

[0462] 然后探讨了将“第五种”脂质包含在已建立的4-组分LNP中的方案(方法)的一般性。

[0463] 为了检查永久阳离子脂质(例如DOTAP)的包含是否会改变其它可电离的阳离子脂质的组织特异性,选择了两种众所周知的且充分确立的可电离的阳离子脂质LNP系统。选择DLin-MC3-DMA,并用DSPC、胆固醇和PEG-DMG配制它。产生与Patisiran/Onpattro(Alnylam Pharmaceuticals)相同的摩尔组合物,并补充15%或50%的DOTAP(在Onpattro 4脂质制剂中的额外第5种脂质)(图14)。DLin-MC3-DMA LNP被认为是siRNA和mRNA递送的“黄金标准”。迄今为止,仅显示它们在静脉内施用后递送至肝。如在图15A中所示,DOTAP改变了基于DLin-MC3-DMA的LNP在器官中的mRNA表达概况(0.1mg/kg萤光素酶mRNA,6h)。随着DOTAP的百分比增加,萤光素酶信号从肝转移到脾,且最后转移到肺,这与关于5A2-SC8 mDLNP的现象完全相同。为了进一步研究这种方案的普适性,我们将DOTAP包含在C12-200 LNP中(图16)。虽然DLin-MC3-DMA是具有单个二甲胺首基的两尾脂质,其被认为是稳定的核酸脂质纳米颗粒(SNALP),但C12-200是可以配制进脂质样LNP中的代表性“类脂质”。所有三种都是可电离的阳离子脂质。与使用5A2-SC8和DLin-MC3-DMA的结果相同,15%或50% DOTAP在C12-200 LNP中的包含使mRNA递送后的萤光素酶蛋白表达从肝改变至脾改变至肺(图15B)。因而,第五种脂质方法(诸如添加永久阳离子脂质)可推广至其它可电离的阳离子脂质LNP。

[0464] 实施例7-另一种脂质在已知的四种脂质组合物中的添加导致改善的递送

[0465] 此外,还探讨了该方案(方法)的普遍性,方法是研究额外的可电离的阳离子脂质是否会改善肝递送。

[0466] 为了检查可电离的阳离子脂质是否通常促进肝递送,将额外的5A2-SC8可电离的阳离子脂质作为“第五”脂质包括到含有适当比率的5A2-SC8、DOPE、胆固醇和PEG DMG的LNP中。以10-30的百分比包括额外的5A2-SC8(图17A和图18)。为避免饱和发光,测试了低剂量的0.05mg/kg的mRNA剂量(静脉内,6h)。如在图17B中所示,离体图像和定量数据证实,增加的额外的15%至25%的5A2-SC8确实有助于改善肝中的mRNA递送功效。5A2-SC8^20(5A2-SC8 LNP+20%额外5A2-SC8)使萤光素酶增加到原始mDLNP制剂的2-3倍。

[0467] 实施例8-与选择性器官靶向组合物有关的研究

[0468] 本公开内容描述了一种称为选择性器官靶向(SORT)的策略,该策略允许对纳米颗粒进行系统工程改造以在静脉内(IV)施用后将包括mRNA、Cas9 mRNA/sgRNA和Cas9核糖核蛋白(RNP)复合物在内的多种货物准确递送至小鼠的肺、脾和肝(图19A)。传统LNP由可电离的阳离子脂质、两性离子磷脂、胆固醇和聚(乙二醇)(PEG)脂质组成。本公开内容显示,补充组分(称为SORT化合物或选择性的器官靶向化合物)的添加精确地改变体内RNA递送概况并介导组织特异性的基因递送和编辑,其随着所添加的SORT脂质的百分比和生物物理学特性而变化。本公开内容显示了用于组织特异性递送的理论的证据,确立了该方法可用于各种纳米颗粒系统,并且提供了用于LNP设计以编辑治疗相关细胞的方法。

[0469] 有效的细胞内递送材料通常依赖于可电离的胺结合和释放RNA的最佳平衡(pK_a在6.0-6.5之间)和稳定疏水性的纳米颗粒(Kanasty等人,2013;Jayaraman等人,2012;Nelson等人,2013;Hao等人,2015)。不希望受任何理论约束,据信,内部和/或外部电荷可能是调节组织趋向性的因素。开发的SORT LNP的静脉内施用实现高水平的组织特异性基因编辑。SORT与采用基因编辑机制的各种方法(包括mRNA、Cas9 mRNA/sgRNA和Cas9 RNP(全身性RNP递送))相容。靶向肺的SORT LNP编辑40%的上皮细胞和65%的内皮细胞;靶向脾的SORT LNP编辑13%的B细胞和10%的T细胞;且在单次低剂量注射后,增强的靶向肝的SORT LNP编辑93%的肝细胞。

[0470] A.SORT的发现和开发

[0471] 为了检查内部电荷调节可以介导组织特异性递送的假设,构想了一种策略以在已经建立的LNP组合物(其在肝细胞中验证过效力)中添加第5种脂质。基本原理是在不破坏通常用于介导RNA封装和胞内体逃逸的核心4-组分比率的情况下调整有效的LNP制剂(Wittrup等人,2015;Cheng等人,2018)。

[0472] 检查了将永久阳离子脂质(定义为带正电荷没有pK_a或pK_a>8)添加到在mDLNP中使用的命名为5A2-SC8的可降解树枝状聚合物可电离的(pK_a<8)阳离子脂质(Zhou等人,2016;Zhang等人,2018a;Zhang等人,2018b)中的作用,所述5A2-SC8有效地将富马酰乙酰乙酸水解酶(FAH)mRNA递送至肝细胞并延长了在FAH敲除的小鼠中的存活(Cheng等人,2018)。该最初的基础mDLNP制剂由5A2-SC8、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、胆固醇、DMG-PEG(15/15/30/3,mol/mol)和mRNA(5A2-SC8/mRNA,20/1,重量/重量)组成(图20)。然后通过系统性地将额外永久阳离子脂质的百分比从总脂质的5%增加到100%来形成一系列LNP(图19B和20)。最初选择1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)(一种众所周知的季氨基脂质)作为SORT脂质以添加到LNP制剂中。因此,DOTAP修饰的SORT制剂包含5种脂质组分,

其中5A2-SC8/DOPE/Chol/DMG-PEG固定为15/15/30/3(mol/mol),并且DOTAP以0至1200的摩尔比添加以制备制剂的滴定系列(图20)。

[0473] 然后通过以0.1mg/kg的剂量静脉内(IV)递送萤光素酶(Luc)mRNA来评价SORT修饰的效果。随着DOTAP的摩尔百分数增加,所得的萤光素酶蛋白表达逐渐从肝转移至脾,且然后转移至肺,从而证明了明确且精确的器官特异性递送趋势,其具有允许唯一肺递送的阈值(图19B)。DOTAP百分比是调整组织特异性的关键因素。基础LNP(0%DOTAP)对于肝递送是最佳的,这是预料之中的,因为它们先前已针对肝细胞递送进行了优化(Cheng等人,2018)。通过添加10-15%DOTAP,得到的SORT LNP现在可以将mRNA递送至脾中的细胞。进一步增加永久阳离子SORT脂质,发现50%DOTAP对于肺递送是最佳的(图19C)。值得指出的是,尽管50%DOTAP SORT LNP有效地在体内将mRNA递送至肺,但它们对于体外递送却不那么有效(图21)。此外,50%DOTAP SORT LNP具有中性ζ电位表面电荷(-0.52mV)(图20),表明组织趋向性不是由于与正电荷有关的MPS摄取。计算每个器官中的相对表达,DOTAP作为SORT脂质的应用完全改变了从肝到肺的递送(图19D)。据估计,超过99%的目前静脉内纳米药物被MPS隔离(Wilhelm等人,2016;Gustafson等人,2015),因此这些新的SORT纳米颗粒克服了纳米药物中的一项长期挑战。

[0474] 阐明了永久阳离子SORT脂质的功能作用,不希望受任何理论约束,据信其它脂质的包含也可能改变组织趋向性。为了探索这种潜力,以与DOTAP相似的方式将带负电荷的1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸(18PA)作为SORT脂质掺入(图20)。在10-40%18PA掺入,SORT LNP现在介导了向脾的完全选择性递送,而在任何其它器官中都没有萤光素酶表达(图19E)。因此,带负电荷的SORT脂质允许将其精确递送至脾。这些结果表明,可以通过静脉内注射为特异性组织mRNA递送调整SORT脂质百分比。

[0475] B.SORT可推广至其它LNP类型和脂质类别

[0476] 然后探究了是否可以将SORT方法应用于已建立的4-组分LNP的其它类别以测试SORT是否通用。首先,用DSPC、胆固醇和PEG-DMG配制DLin-MC3-DMA,其具有与FDA-批准的Onpattro(Patisiran)相同的摩尔组成(30)(图22),被认为是siRNA和mRNA递送的“黄金标准”。迄今为止,它们仅显示在静脉内施用后递送至肝,这在这里也得到了证实(图19F)。如预期的,用DOTAP补充DLin-MC3-DMA LNP改变Onpattro制剂的蛋白表达概况。随着SORT脂质百分比增加,萤光素酶信号从肝转移到脾再转移到肺,这与最初测试的5A2-SC8 DLNP的现象完全相同。为了进一步研究该方案的普适性,将DOTAP包括在C12-200 LNP中(图19G和22),这也很好地验证了RNA向肝的递送(Kove等人,2010;Kauffman等人,2015)。与5A2-SC8和DLin-MC3-DMA LNP的结果相同,15%或50%DOTAP在C12-200 LNP中的包含使mRNA递送后的萤光素酶蛋白表达从肝改变至脾改变至肺(图19G和22)。另外,18PA作为SORT脂质的包含反映了5A2-SC8的结果,并且介导了DLin-MC3-DMA SNALP和C12-200 LLNP对于Luc mRNA向脾的唯一递送(图19F-G)。DLin-MC3-DMA是带有单个二甲胺首基的两尾脂质,其形成稳定的核酸脂质纳米颗粒(SNALP),C12-200是形成脂质样LNP(LLNP)的代表性类脂质。因此,显示了SORT方法可推广到其它类型的可电离的阳离子脂质LNP,这将使现有的靶向肝的LNP容易地改变以将mRNA递送至脾或肺。具体而言,SORT技术可以使FDA-批准的Onpattro迅速重新开发用于治疗肺和脾的疾病。

[0477] 为了理解观察到的组织趋向性概况是否对确切化学结构具有特异性或是否可推

广至限定的化学类别,评价了多种永久阳离子、阴离子的、两性离子的和可电离的阳离子的SORT脂质(图23)。首先,用另外两种永久阳离子脂质生成5A2-SC8 LNP:双十二烷基二甲基溴化铵(DDAB)和1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱氯化物(EPC)。这些脂质都含有季氨基,但是在极性首基、接头区域和疏水结构域(例如饱和度)方面存在主要的化学差异。配制并表征了含有5%、15%、40%、50%和100% DDAB或EPC的LNP。体内萤光素酶表达概况与DOTAP LNP的表达概况匹配,其中随着DDAB或EPC百分比增加,其发光活性系统性地从肝转移到脾,然后转移至肺(0.1mg/kg,6h)。一旦百分比增加到40%,仅在肺中观察到高萤光素酶信号(图23A)。生成了1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸(14PA)和sn-(3-油酰基-2-羟基)-甘油-1-磷酸-sn-3'-(1',2'-二油酰基)-甘油(18BMP)作为代表性的阴离子脂质,其具有与18PA相比非常不同的结构。所有阴离子SORT脂质促进了向脾的排他递送(图23B)。这种灵活性提供了通过优化SORT化合物来平衡多种因素(包括功效、选择性和耐受性)的方法。

[0478] 受这些发现启发,将其它可电离的阳离子脂质添加到已建立的制剂中。如所预期的,DODAP或C12-200向5A2-SC8 LNP的添加没有显著改变组织趋向性,但是令人惊讶地确实在20%掺入时将肝递送增强>10倍(图23C)。给已确立的5A2-SC8 LNP补充额外的5A2-SC8作为SORT脂质显著改善肝mRNA递送,在0.05mg/kg的极低剂量产生10^7光子/sec/cm^2。因此,SORT提供了进一步改善靶向肝的LNP系统的新策略(图24)。使用两性离子脂质(DOCPe和DSPC)的效果也被评价为SORT脂质。尽管发现组织趋向性从肝转移至脾,但与阳离子或阴离子SORT脂质的应用相比,它的选择性不那么强(图25)。

[0479] 为了测试SORT方法的局限性,检查了SORT是否可以"激活"原本无活性的制剂。实际上,给完全无活性的制剂补充DODAP或DOTAP导致向脾和肺的组织特异性递送(图26)。综合这些结果,SORT是实现组织靶向递送的模块化且通用策略。

[0480] C.SORT会改变蛋白冠、LNP生物分布和表观pK_a以介导器官特异性递送

[0481] 进行了机制实验以探索将额外的脂质包括在定义的类别中如何以及为什么控制mRNA向不同器官的递送。在逻辑上讲,递送到肺内细胞的LNP应该生物分布(积累)在肺中。递送Cy5-标记的mRNA以跟踪具有肺(DOTAP季氨基脂质)、脾(18PA阴离子脂质和DSPC两性离子脂质)和肝(DODAP可电离的叔氨基脂质)趋向性的含有SORT脂质的5A2-SC8 LNP的体内分布(图27A和28)。以0.5mg/kg Cy5-标记的mRNA的剂量静脉内注射所有LNP,并在6小时后进行成像。如在图27A中所示,DOTAP改变了生物分布,作为DOTAP百分比的函数,肺积累逐渐增加。18PA的掺入增加了向脾中的摄取。DODAP稍微增加了肝积累,并减少了脾积累。令人感兴趣的是,即使肺和脾特异性的SORT LNP仍在肝中积累,但在肝中也根本没有蛋白表达。这表明器官生物分布是器官特异性效力所必需的,但不是解释组织靶向递送的机制的唯一因素。

[0482] 不希望受任何理论约束,据信,在确定的细胞群体中生物分布和活性的变化可能是由于蛋白冠的改变,其中特定蛋白的结合产生了功能活性的生物学身份(identity)。使用定量质谱法分析,发现SORT分子的添加极大地改变最紧密结合的特定蛋白和整体蛋白冠组成。不希望受任何理论约束,据信肺特异性的SORT LNP选择性地和最丰富地结合玻连蛋白,其可以与带正电荷的脂质相互作用并结合在肺的内皮和上皮细胞上高度表达的αvβ3整联蛋白。这种内源性靶向的机制与利用αvβ5整联蛋白来靶向支气管上皮的腺病毒形成直接

对比。脾-特异性的SORT LNP最紧密地结合β2-糖蛋白I,其已被显示与带负电荷的脂质相互作用并可能在脾中与免疫细胞群体的脾定位中起作用。值得指出的是,结合的蛋白的复杂混合物也可能起作用。这种集合效应也被视为靶向多种细胞类型的潜在机制,并且是使用替代SORT分子进一步富集对一个器官中特定细胞类型的特异性的方法。以前已经显示,载脂蛋白E结合DLin-MC3-DMAOnpattro LNP,并且在Apo E敲除的动物中丧失效力。因此,有力的证据表明,Apo E是受体介导的靶向和肝细胞摄取(推测通过LDL受体)所必需的,并且所描述的蛋白冠机制可以控制细胞的特异性和效力。因此,看到mDLNP也与Apo E密切相关是令人鼓舞的,从而提供了其肝细胞效力的进一步证据并增强了蛋白冠测定的有效性。肝增强的SORT LNP保留Apo E结合,但也富含白蛋白,从而提示在肝内的细胞类型的可能繁殖。这些数据累积显示,SORT分子的化学结构可以针对改变器官趋向性和细胞特异性的特定蛋白冠。不希望受任何理论约束,据信,SORT分子的身份可以控制蛋白冠身份,从而提示SORT分子可以包括糖、脂质、小分子治疗剂、维生素、小分子、亲水分子、疏水分子、两亲分子、肽、蛋白等。

[0483] 对表观/总pK_a进行了检查,因为它已被确定为将LNP与功能活性相关联的参数。例如,已经显示,在6.4左右的pK_a对于向肝细胞递送是最佳的(Jayaraman等人,2012)。对于所有有效的体内制剂(67种LNP),使用TNS测定分析了表观pK_a(图27B和29,表1)。因为SORT涉及额外带电荷脂质的包含,得到的TNS滴定曲线捕获更复杂的混合物质LNP的电离行为。这样,当产生50%的归一化信号时,替代性地估计相对pK_a。当相对于组织趋向性绘制相对pK_a时,将SORT LNP分组为限定的表观pK_a范围(图27B)。如预期的,所有有效的肝靶向制剂具有在非常确定的6-7范围内的非常狭窄的pK_a(Jayaraman等人,2012)。所有靶向肺的制剂均位于高pK_a范围(>9)内。相反,脾趋向性SORT LNP分组至低pK_a范围(2-6)。这些结果证实,6-7对于递送至肝是最佳的,但是揭示了高pK_a介导肺递送且低pK_a介导脾递送的发现。应当指出,所有SORT LNP仍含有可电离的阳离子脂质,由于其获得电荷的能力,因此被认为可用于胞内体逃逸(Wittrup等人,2015)。进行了对照实验,并证实可电离的阳离子脂质的包含是效力所需要的(图30)。因此,SORT允许以期望的摩尔比例保留具有效力所需的特定微物质pK_a的分子,而SORT脂质的包含改变表观pK_a。不希望受任何理论约束,据信双部分机制可能起作用。SORT LNP选择性地结合血清中的特定蛋白,其使受体介导的在肺或脾细胞中的效力得以实现,这与脂蛋白颗粒(例如LDL)天然转运胆固醇的方式非常相似。这种受控的且可预测的内源性靶向机制使SORT LNP能够到达非肝靶标。第二部分涉及SORT分子如何改变非肝靶向SORT LNP的特性,使得它们不再具有肝效力的生理化学特性(例如,整体/表观pK_a6.4),这提供精确度。还应注意,其它和更复杂的因素,诸如细胞-特异性的胞吞运输差异,也可能起作用。考虑到结果,建议LNP纳米结构的内部电荷介导生物分布,并且表观pK_a与在特定器官中的蛋白表达概况相关。该特定值可用于继续开发其它的器官特异性纳米颗粒。

[0484] 表1:DDAB、EPC、14PA、18BMP、DODAP、C12-200、5A2-SC8、DSPC和DOCPe修饰的mDLNP制剂(SORT LNP)的细节,包括每种组分的摩尔比和百分比、总脂质与mRNA的重量比、尺寸和PDI。

[0485]

名称	摩尔比					摩尔百分比 (%)					脂质/mRNA (wt/wt)	尺寸 (nm)	PDI
	5A2-SC8	DOPE	Chol	DMG-PEG	X[a]	5A2-SC8	DOPE	Chol	DMG-PEG	X[a]			
5% DDAB	15	15	30	3	3.315	22.62	22.62	45.24	4.52	5.00	40	193.5	0.14
15% DDAB	15	15	30	3	11.12	20.24	20.24	40.47	4.05	15.00	40	167.7	0.13
40% DDAB	15	15	30	3	42	14.29	14.29	28.57	2.86	40.00	40	143.8	0.13
50% DDAB	15	15	30	3	63	11.90	11.90	23.81	2.38	50.00	40	174.7	0.21
100% DDAB	0	0	0	0	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	40	3174.3	0.23
5% EPC	15	15	30	3	3.315	22.62	22.62	45.24	4.52	5.00	40	195.3	0.14
15% EPC	15	15	30	3	11.12	20.24	20.24	40.47	4.05	15.00	40	166.3	0.14
40% EPC	15	15	30	3	42	14.29	14.29	28.57	2.86	40.00	40	116.7	0.15
50% EPC	15	15	30	3	63	11.90	11.90	23.81	2.38	50.00	40	105.7	0.17
100% EPC	0	0	0	0	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	40	455.9	0.32
5% 14PA	15	15	30	3	3.315	22.62	22.62	45.24	4.52	5.00	40	92.8	0.18
10% 14PA	15	15	30	3	7	21.43	21.43	42.86	4.29	10.00	40	98.6	0.18
20% 14PA	15	15	30	3	15.75	19.05	19.05	38.10	3.81	20.00	40	105.7	0.17
30% 14PA	15	15	30	3	27	16.67	16.67	33.33	3.33	30.00	40	107.3	0.19
100% 14PA	0	0	0	0	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	40	2607.3	0.28
5% 18BMP	15	15	30	3	3.315	22.62	22.62	45.24	4.52	5.00	40	112.0	0.13
10% 18BMP	15	15	30	3	7	21.43	21.43	42.86	4.29	10.00	40	131.4	0.10
20% 18BMP	15	15	30	3	15.75	19.05	19.05	38.10	3.81	20.00	40	172.9	0.12
30% 18BMP	15	15	30	3	27	16.67	16.67	33.33	3.33	30.00	40	195.9	0.13
100% 18BMP	0	0	0	0	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	40	87.4	0.21
10% DODAP	15	15	30	3	7	21.43	21.43	42.86	4.29	10.00	40	138.5	0.11
20% DODAP	15	15	30	3	15.75	19.05	19.05	38.10	3.81	20.00	40	122.4	0.18
50% DODAP	15	15	30	3	63	11.90	11.90	23.81	2.38	50.00	40	148.0	0.15
80% DODAP	15	15	30	3	252	4.76	4.76	9.52	0.95	80.00	40	180.4	0.13
100% DODAP	0	0	0	0	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	40	932.8	0.74
10% C12-200	15	15	30	3	7	21.43	21.43	42.86	4.29	10.00	40	179.7	0.11
20% C12-200	15	15	30	3	15.75	19.05	19.05	38.10	3.81	20.00	40	141.3	0.19
50% C12-200	15	15	30	3	63	11.90	11.90	23.81	2.38	50.00	40	156.1	0.16
80% C12-200	15	15	30	3	252	4.76	4.76	9.52	0.95	80.00	40	273.2	0.21
100% C12-200	0	0	0	0	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	40	2505.3	1.00
10% 5A2-SC8	15	15	30	3	7	21.43	21.43	42.86	4.29	10.00	40	127.1	0.14
15% 5A2-SC8	15	15	30	3	11.12	20.24	20.24	40.47	4.05	15.00	40	130.9	0.13
20% 5A2-SC8	15	15	30	3	15.75	19.05	19.05	38.10	3.81	20.00	40	137.6	0.10
25% 5A2-SC8	15	15	30	3	21	17.86	17.86	35.71	3.57	25.00	40	126.0	0.12
30% 5A2-SC8	15	15	30	3	27	16.67	16.67	33.33	3.33	30.00	40	134.7	0.10
20% DSPC	15	15	30	3	15.75	19.05	19.05	38.10	3.81	20.00	40	115.7	0.19
50% DSPC	15	15	30	3	63	11.90	11.90	23.81	2.38	50.00	40	202.0	0.29
80% DSPC	15	15	30	3	252	4.76	4.76	9.52	0.95	80.00	40	1024.7	0.67
100% DSPC	0	0	0	0	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	40	2134.8	0.99
20% DOCPe	15	15	30	3	15.75	19.05	19.05	38.10	3.81	20.00	40	147.7	0.15
50% DOCPe	15	15	30	3	63	11.90	11.90	23.81	2.38	50.00	40	173.6	0.20
80% DOCPe	15	15	30	3	252	4.76	4.76	9.52	0.95	80.00	40	127.7	0.21
100% DOCPe	0	0	0	0	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	40	93.7	0.36

[0486] [a]X代表DDAB、EPC、14PA、18BMP、DODAP、C12-200、5A2-SC8、DSPC和DOCPe。

[0487] D.SORT允许在静脉内施用后肺、肝和脾特异性的基因编辑

[0488] 鉴于SORT LNP的靶向特定器官的能力,这些发现然后通过静脉内注射应用于组织特异性的基因编辑。CRISPR/Cas(成簇的规律间隔的短回文重复序列/CRISPR-相关的蛋白(Cas))技术可以以精确的和序列依赖性的方式编辑基因组,并已被迅速开发用于各种应用,包括用于致病突变的潜在校正(Jinek等人,2012;Cong等人,2013;Mali等人,2013;Hendel等人,2015;Yin等人,2016;Yin等人,2017;Wang等人,2018;Amoasii等人,2018)。基因编辑可以通过局部施用注射来实现(Zuris等人,2015;Sun等人,2015;Chew等人,2016;Staahl等人,2017)。但是,许多严重的遗传性病症是由器官深处的细胞中的突变引起,在该情况下需要校正特定细胞才能治愈疾病。这样的校正可以通过全身施用来最好地实现。最近已经报道,Cas9 mRNA和sgRNA的静脉内共同递送是实现基因编辑的安全且有效的策略(Miller等人,2017;Yin等人,2017;Finn等人,2018)。但是,迄今为止,还没有关于合理工程改造LNP来编辑肝以外的器官中的细胞的报道。

[0489] 为了检查和定量SORT LNP的介导器官特异性基因编辑的能力,利用了遗传工程改

造的tdTomato(tdTom)报告小鼠,其含有LoxP侧接的停止盒(Tabebordbar等人,2016),它防止tdTom蛋白的表达(Staahl等人.,2017)。一旦停止盒被缺失,则tdTom荧光被打开,从而允许检测基因编辑的细胞(图31A)。最初递送Cre重组酶mRNA(Cre mRNA)来激活编辑的细胞中的tdTom。在用肝、肺和脾选择性的SORT LNP治疗的选定器官中,荧光组织容易显现(图31B)。应当指出,必须为每个实验使用单独的对照,因为这些小鼠具有一些背景器官荧光,与其它器官相比在脾中的荧光最弱(图31C和32)。这使得脾特异性的检测在tdTom小鼠模型中区分更具挑战性。当随后编辑内源性PTEN时,脾特异性SORT LNP仅在脾中通过T7E1测定显示干净的DNA切割(图33C),而在肝或肺中没有任何DNA切割。尽管如此,通过组织切片的共焦成像容易看到tdTom阳性细胞(图31D)。

[0490] E.SORT在特异性的和治疗上有关的细胞群体中实现高水平的编辑

[0491] 使用从编辑的器官提取的单个细胞的流式细胞计量术,对肝、肺和脾内的特定细胞类型的基因编辑进行了定量(图31E)。在单次注射0.3mg/kg Cre mRNA后,肝特异性SORT(20% DODAP)5A2-SC8 LNP编辑了肝中所有肝细胞的约93%(图31E和34)。这是迄今为止报道的肝细胞基因编辑的最高水平。在相同剂量下,肺特异性SORT(50% DOTAP)5A2-SC8 LNP编辑了肺中所有上皮细胞的约40%,所有内皮细胞的约65%和免疫细胞的约20%(图31E和35)。鉴于上皮细胞是校正导致囊性纤维化的CFTR中突变的主要目标,因此该结果确立了肺特异性SORT LNP作为引人注目的递送系统,并立即应用于校正CFTR突变。最后,脾特异性SORT(30%18PA)5A2-SC8 LNP编辑了所有B细胞的约13%,所有T细胞的约10%和所有巨噬细胞的约20%(图31E和36)。由于相对于先前的研究提高了选择性,因此脾特异性SORT LNP可以用于治疗非霍奇金B细胞淋巴瘤和其它免疫病症。尽管最初的焦点是在单次低剂量注射定量,但通过施用更高剂量或多次注射可以实现更高水平的编辑。

[0492] F.SORT通过Cas9 mRNA/sgRNA的静脉内共同递送和通过Cas9 RNP的递送允许组织特异性的基因编辑

[0493] 接着检查了SORT LNP通过Cas9 mRNA和sgRNA在单个纳米颗粒中的静脉内共同递送实现组织特异性CRISPR/Cas基因编辑的能力(图37A、38和39、表2)。将靶向肝和肺的SORT LNP以2.5mg/kg的总RNA(4:1mRNA:sgRNA,wt:wt)的剂量注射,并在单次静脉内注射后10天定量基因编辑。如在图37B中所示,对于基础LNP和20% DODAP SORT LNP处理的小鼠,观察到在肝中的强tdTom荧光,并在50% DOTAP SORT LNP处理的小鼠的肺中观察到强荧光。所有结果与Luc mRNA递送结果一致。由于小鼠中脾免疫细胞的快速更新(Kamath等人,2000),将Cas9/sgRNA的重量比优化为2/1(图39),并在注射后两天测试了脾编辑。考虑到背景自发荧光,在30%18PA-处理的小鼠的脾中观察到明亮的tdTom荧光,并且仅在从脾分离的DNA中检测到清晰的T7E1切割带(肝或肺没有编辑)(图33)。然后通过用共焦显微术对组织切片进行成像来确认荧光(图37C)。

[0494] 接着,探索了Cas9 RNP的直接递送,这是合成载体的最具挑战性的策略。永久阳离子SORT脂质的应用使Cas9蛋白/sgtdTom复合物能够被封装并控制组织趋向性。7% DOTAP SORT LNP的静脉内注射实现了肝编辑,而55% DOTAP SORT LNP实现了排它肺编辑(图37F)。这些数据指示,所描述的方法能够实现肝、肺和脾特异性的CRISPR/Cas基因编辑。

[0495] 为了超越报告小鼠,测试了组织特异性LNP的编辑内源性靶标的能力。选择PTEN,因为它是在大多数细胞中表达的非常确定的肿瘤抑制因子。给野生型C57BL/6小鼠注射与

Cas9 mRNA和sgPTEN共装载的SORT LNP(2.5mg/kg的总RNA)。在单次静脉内注射后10天定量插入和缺失(插入缺失)的生成。如在图37D中所示,通过T7E1测定在特定组织中观察到清晰的DNA切割带,表明基础LNP和20％ DODAP SORT LNP在肝中介导有效的PTEN编辑,而在肺或脾中则根本不介导。值得注意的是,50％ DOTAP SORT LNP仅在肺中显示PTEN编辑。为了进一步证实PTEN编辑,进行了组织切片的H&E染色和免疫组织化学(IHC)。如在图37E中所示,组织切片中的细胞明显显示出清晰的细胞质,这是由于脂质积累导致的PTEN丢失的已知表型(Xue等人,2014)。此外,在肝和肺组织的IHC切片中均观察到PTEN的阴性染色,从而为PTEN编辑提供了明确的证据。尽管在tdTom小鼠模型中区分脾特异性的18PA SORT LNP编辑更具挑战性,但是在野生型小鼠中可以通过优化的Cas9/sgPTEN重量比(2/1)和检测时间(2天)观察到清晰的脾PTEN编辑。通过在注射18PA SORT LNP的小鼠上进行的T7E1测定,未观察到肝或肺中的DNA的编辑(图33)。最后,将SORT应用于Cas9 RNP并检查了PTEN的内源编辑。与之前一样,7％和55％的含有Cas9蛋白/sgPTEN的DOTAP SORT LNP分别能够进行肝和肺特异性编辑(图37G)。这些靶向内源基因的结果表明了由合成载体实现的合理指导的组织选择性基因编辑。

[0496] G.材料和方法

[0497] I.材料

[0498] 通过遵循公开的方案合成和纯化5A2-SC8(Zhou等人,2016)、DLin-MC3-DMA(Jayaraman等人,2012)和C12-200(Love等人,2010)。1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)、二甲基双十八烷基铵(DDAB)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(EPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸盐(钠盐)(18PA)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸盐(钠盐)(14PA)、sn-(3-油酰基-2-羟基)-甘油-1-磷酸-sn-3'-(1',2'-二油酰基)-甘油(铵盐)(18:1Hemi BMP,18BMP)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、2-((2,3-双(油酰氧基)丙基)二甲基铵基)乙基乙基磷酸盐(DOCPe)和1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)购自Avanti Polar Lipids。胆固醇购自Sigma-Aldrich。1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-甲氧基(聚((乙二醇)MW 2000)(DMG-PEG2000)购自NOF America Corporation。Cas9蛋白购自Thermo Fisher。ONE-Glo+Tox萤光素酶报告测定试剂盒购自Promega Corporation。Pur-A-Lyzer Midi透析试剂盒(WMCO,3.5kDa)购自Sigma-Aldrich。4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(DAPI)购自Thermo Fisher Scientific。通过体外翻译(IVT)产生Cas9 mRNA。Cy5-标记的荧火虫萤光素酶mRNA(Cy5-Luc mRNA)、未标记的荧火虫萤光素酶mRNA(Luc mRNA)和mCherry mRNA购自TriLink BioTechnologies。D-萤光素(钠盐)购自Gold Biotechnology。改良的sgTom1和sgPTEN(表2)购自Synthego。

[0499] 表2:通过TNS测定测量的SORT LNP的相对表观pKa值

[0500]

基于mDLNP的LNP								基于MC3和C12-200的LNP		基于C1的LNP	
名称	pKa	名称	pKa	名称	pKa	名称	pKa	名称	pKa	名称	pKa
mDLNP	6.46	15% DDAB	7.21	10% 14PA	5.15	50% C12-200	6.89	MC3 LNPs	6.28	20% DODAP C1	5.61
5% DOTAP	6.67	40% DDAB	>11.0	20% 14PA	4.78	10% 5A2-SC8	6.34	15% DOT MC3	6.86	30% DODAP C1	5.53
10% DOTAP	6.92	50% DDAB	>11.0	30% 14PA	3.73	15% 5A2-SC8	6.40	50% DOT MC3	>11	10% DOTAP C1	5.89
15% DOTAP	7.48	5% EPC	6.51	5% 18BMP	5.22	20% 5A2-SC8	6.44	10% 18PA MC3	6.12	20% DOTAP C1	7.55
20% DOTAP	8.49	15% EPC	6.76	10% 18BMP	4.93	25% 5A2-SC8	6.49	20% 18PA MC3	5.66	30% DOTAP C1	>11
30% DOTAP	10.6	40% EPC	9.45	20% 18BMP	4.63	30% 5A2-SC8	6.48	30% 18PA MC3	5.21		
40% DOTAP	>11.0	50% EPC	>11.0	30% 18BMP	4.09	20% DSPC	6.40	C12-200 LNPs	6.64		
50% DOTAP	>11.0	5% 18PA	4.53	10% DODAP	6.22	50% DSPC	6.09	15% DOT C12-200	6.77		
60% DOTAP	>11.0	10% 18PA	4.44	20% DODAP	6.46	80% DSPC	4.84	50% DOT C12-200	>11		
70% DOTAP	>11.0	20% 18PA	4.43	50% DODAP	6.44	20% DOCPe	6.78	10% 18PA C12-200	5.95		
80% DOTAP	>11.0	30% 18PA	3.97	80% DODAP	6.09	50% DOCPe	9.05	20% 18PA C12-200	5.69		
90% DOTAP	>11.0	40% 18PA	3.52	10% C12-200	6.58			30% 18PA C12-200	5.55		
5% DDAB	6.55	5% 14PA	5.34	20% C12-200	6.96						

原始LNP
阳离子脂质+LNP
阴离子脂质+LNP
可电离的脂质+LNP
两性离子脂质+LNP

[0501] II.纳米颗粒形成

[0502] 使用乙醇稀释方法(Zhou等人,2016)形成了加载RNA的LNP制剂。在先前的论文中开发和报道了靶向肝的mRNA制剂(mDLNP)(Cheng等人,2018),并且如先前所述制备基础制剂(Jayaraman等人,2012;Love等人,2010)。除非另有说明,否则将具有指定摩尔比的所有脂质溶解在乙醇中,并将RNA溶解在10mM柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0)中。将两种溶液以3:1的水与乙醇体积比(3:1,水:乙醇,vol:vol)快速混合,以达到40:1的最终重量比(总脂质:mRNA),然后在室温温育10min。为了制备含有阴离子SORT脂质(诸如18PA、14PA和18BMP)的SORT LNP制剂,首先将阴离子脂质溶解在四氢呋喃(THF)中,然后与乙醇中的其它脂质组分混合,最后得到如上所述的含有mRNA缓冲液(10mM,pH 3.0)的制剂。所有制剂均基于额外脂质命名。以DOTAP mDLNP作为一个例子,mDLNP的内部摩尔比是固定的,如公开的论文中报道的那样,具有15/15/30/3的5A2-SC8/DOPE/胆固醇/DMG-PEG(Cheng等人,2018)。将DOTAP作为额外的脂质以指定的量溶解在上述乙醇脂质混合物中,使5A2-SC8/DOPE/胆固醇/DMG-PEG/DOTAP的摩尔比等于15/15/30/3/X,然后遵循上述标准方案与mRNA水溶液迅速混合,最终产生名为Y%DOTAP的SORT LNP,其中Y是指总脂质中DOTAP的摩尔百分比。用上述方法类似地形成具有其它额外脂质的制剂(图20和表3)。对于Cas9/sgRNA核糖核蛋白(RNP)封装,使用1×PBS进行配制,并将Cas9和sgRNA的摩尔比固定在1:3。SORT LNP形成以后,将新鲜LNP制剂用1×PBS稀释至0.5ng/μL mRNA(最终乙醇浓度<5%)用于体外测定和尺寸检测。对于体内实验,将制剂针对1×PBS透析(Pur-A-Lyzer Midi透析试剂盒,WMCO 3.5kDa,Sigma-Aldrich)2h,并用PBS稀释至15μL/g用于静脉内(IV)注射。

[0503] 表3:sgRNA序列

[0504]

名称	序列(5'至3')	PAM (5'至3')	注
sgTom1	AAGTAAAACCTCTACAAATG (SEQ ID NO: 1)	TGG	选择化学修饰的sgTom1和sgPTEN
sgPTEN	AGATCGTTAGCAGAAACAAA (SEQ ID NO: 2)	AGG	

[0505] III.mRNA制剂的表征

[0506] 使用动态光散射(DLS,Malvern MicroV型;He-Ne激光,λ=632nm)测量尺寸分布和多分散性指数(PDI),在用1×PBS稀释后测量ζ电位。为了测量mRNA制剂的表观pK_a,采用了2-(对甲苯氨基)-6-萘磺酸(TNS)测定(Cheng等人,2018;McLaughlin和Harary,1976;Bailey和Cullis,1994;Heyes等人,2005),并作了一些修改。将mRNA制剂(60μM总脂质)和TNS探针(2μM)与一系列含有10mM HEPES、10mM MES(4-吗啉乙磺酸)、10mM乙酸铵和130mM NaCl的缓冲液(pH范围为2.5-11)一起温育5min。在λ_{Ex}=321nm和λ_{Em}=445nm用Tecan平板读数器测量每个孔(黑底96-孔板)的平均荧光强度,并且将数据针对pH 2.5的值归一化。通常,表观pK_a由半数最大荧光时的pH定义。尽管此方法可用于估计大多数所有LNP的LNP总体/表观pK_a,但不能将其用于含有>40%永久阳离子脂质的SORT LNP,因为这些LNP始终带电荷。因此,当产生50%的归一化信号时,而是相比于基础LNP制剂(不添加SORT脂质)估计相对pK_a。这种替代计算不改变大多数LNP的pK_a,但确实允许估算与组织选择性RNA递送的实验结果一致的永久阳离子SORT LNP。因此,可以建议,当LNP含有单一可电离的阳离子脂质时使用标准TNS测定,而对于诸如SORT之类的系统使用替代性的50%归一化信号方法,所述系统含有携带多种电荷状态的多种脂质的复杂混合物。

[0507] IV.体外萤光素酶表达和细胞生存力测试

[0508] 在转染前一天,将Huh-7或A549细胞以每孔1×10^4个细胞的密度接种到白色96-孔平板中。用150μL新鲜DMEM培养基(5%FBS)代替培养基,然后添加50μL Luc mRNA制剂,每孔固定25ng mRNA。温育另外24小时后,基于Promega的标准方案使用ONE-Glo+Tox试剂盒检测mRNA表达和细胞毒性。

[0509] V.动物实验

[0510] 所有动物实验均得到德克萨斯大学西南医学中心机构动物保护和使用委员会(Institution Animal Care and Use Committees of The University of Texas Southwestern Medical Center)的批准,并且与适用的地方、州和联邦法规一致。C57BL/6小鼠获得自UTSW Mouse Breeding Core Facility。B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor$^{tm9(CAG-tdTomato)Hze}$/J小鼠(也被称作Ai9或Ai9(RCL-tdT)小鼠)获得自The Jackson Laboratory(007909)并进行繁殖以维持Cre报告等位基因的纯合表达,所述Cre报告等位基因具有侧接loxP的停止盒,其阻止CAG启动子驱动的红色荧光tdTomato蛋白的转录。在Cre介导的重组后,Ai9小鼠将表达tdTomato荧光。Ai9小鼠在C57BL/6J遗传背景上是同基因的。

[0511] VI.体内Luc mRNA递送和生物分布

[0512] 以0.1或0.05mg/kg的剂量给18-20g重量的C57BL/6小鼠静脉内注射各种Luc mRNA制剂。每组n=2-4。在6小时后,给小鼠腹膜内(IP)注射D-萤光素(150mg/kg),并通过IVIS Lumina系统(Perkin Elmer)进行成像。关于生物分布,以0.5mg/kg的剂量给C57BL/6小鼠静

脉内注射Cy5-Luc mRNA制剂。在注射后6小时进行离体成像(Cy5通道)。

[0513] VII.mRNA合成

[0514] 通过体外转录(IVT)产生优化的Cre重组酶mRNA和Cas9 mRNA。简而言之,分别使用pCAG-CreERT2和pSpCas9(BB)-2A-GFP(PX458)作为PCR模板,通过PCR程序制备NLS-Cre片段和Cas9片段。然后,将这些片段克隆进具有优化的5'(3')-非翻译区(UTR)和聚腺苷酸序列的pCS2+MT载体中。遵循标准方案进行IVT反应,但是用N1-甲基假尿苷-5'-三磷酸代替典型的UTP。最后,通过牛痘加帽酶(Vaccinia Capping Enzyme)和2'-O-甲基转移酶(NEB)给mRNA加帽(Cap-1)。表4显示了本文使用的引物。

[0515] 表4:引物,包括PCR产物的长度及其目的

[0516]

名称	正向引物(5'至3')	反向引物(5'至3')	长度	注
Cas9	ATATATGGATCCGCCACCATGGCCC CAAAGAAGAAGCGGAAGGTC (SEQ ID NO: 3)	ATATATGAATTCTTACTTTTTCT TTTTTGCCTGGCCGGCCTTTTC GTGGCCGCCGGCCTTTTGTCG CCTCCCAG (SEQ ID NO: 4)	4233bp	用于IVT克隆
Ca9 Seq-1	CTGAGCGACATCCTGAGAGTGAAC (SEQ ID NO: 5)			用于测序以证实整个Cas9序列
Ca9 Seq-2		AGCAGGTCCTCTCTGTTCAG (SEQ ID NO: 6)		
Ca9 Seq-3	GACGGCTTCGCCAACAGAAACTTC (SEQ ID NO: 7)			
Ca9 Seq-4		TTTGATGCCCTCTTCGATCCG (SEQ ID NO: 8)		
Ca9 Seq-5	GGGAGATCGTGTGGGATAAG (SEQ ID NO: 9)			
Ca9 Seq-6		ACTTCTTAGGGTCCCAGTCC (SEQ ID NO: 10)		
Ca9 Seq-7	AAGAGAGTGATCCTGGCCGAC (SEQ ID NO: 11)			
NLS-Cre	ATATATGGATCCGCCACCATGCCCA AGAAGAAGAGGAAGGTGGCCAAT TACTGACCGTACACCAAAATTTGC CTG (SEQ ID NO: 12)	ATATATGAATTCTTAATCGCCA TCTCCAGCAG (SEQ ID NO: 13)	1083bp	用于IVT克隆
PTEN	ATCCGTCTTCTCCCCATTCCG (SEQ ID NO: 14)	GACGAGCTCGCTAATCCAGTG (SEQ ID NO: 15)	638bp	用于T7E1测定

[0517] NLS-Cre和Cas9的编码序列如下：

[0518] NLS-Cre：

[0519] ATGCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTGGCCAATTTACTGACCGTACACCAAAATTTGCCTGCATTACCGGT
CGATGCAACGAGTGATGAGGTTCGCAAGAACCTGATGGACATGTTCAGGGATCGCCAGGCGTTTTCTGAGCATACC
TGGAAAATGCTTCTGTCCGTTTGCCGGTCGTGGGCGGCATGGTGCAAGTTGAATAACCGGAAATGGTTTCCCGCAG
AACCTGAAGATGTTCGCGATTATCTTCTATATCTTCAGGCGCGCGGTCTGGCAGTAAAAACTATCCAGCAACATTT
GGGCCAGCTAAACATGCTTCATCGTCGGTCCGGGCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATGCTGTTTCACTGGTTATG
CGGCGTATCCGAAAAGAAAACGTTGATGCCGGTGAACGTGCAAAACAGGCTCTAGCGTTCGAACGCACTGATTTCG
ACCAGGTTCGTTCACTCATGGAAAATAGCGATCGCTGCCAGGATATACGTAATCTGGCATTTCTGGGGATTGCTTA
TAACACCCTGTTACGTATAGCCGAAATTGCCAGGATCAGGGTTAAAGATATCTCACGTACTGACGGTGGGAGAATG
TTAATCCATATTGGCAGAACGAAAACGCTGGTTAGCACCGCAGGTGTAGAGAAGGCACTTAGCCTGGGGGTAACTA
AACTGGTCGAGCGATGGATTTCCGTCTCTGGTGTAGCTGATGATCCGAATAACTACCTGTTTTGCCGGGTCAGAAA
AAATGGTGTTGCCGCGCCATCTGCCACCAGCCAGCTATCAACTCGCGCCCTGGAAGGGATTTTTGAAGCAACTCAT
CGATTGATTTACGGCGCTAAGGATGACTCTGGTCAGAGATACCTGGCCTGGTCTGGACACAGTGCCCGTGTCGGAG
CCGCGCGAGATATGGCCCGCGCTGGAGTTTCAATACCGGAGATCATGCAAGCTGGTGGCTGGACCAATGTAAATAT
TGTCATGAACTATATCCGTAACCTGGATAGTGAAACAGGGGCAATGGTGCGCCTGCTGGAAGATGGCGATTAA(SEQ
ID NO:16)

[0520] SV40 NLS-Cas9-核浆素NLS：

[0521] ATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCGACAAGAAGTACAGCAT
CGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAATTC
AAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAAA
CAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCA
AGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCCTGGTGGAA
GAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCA
CCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGC
CCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTG
TTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGG
CCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAA
TGGCCTGTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAG
GATGCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGT
ACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGA
GATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCTCTATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAA
GCTCTCGTGCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCT
ACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGA
GGAACTGCTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCAC
CAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTTTTACCCATTCCTGAAGGACAACCGGG
AAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTCGC
CTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAAACCATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCC
CAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGC

TGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAGTGAAATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTT
CCTGAGCGGCGAGCAGAAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCAGCTG
AAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCGGCGTGGAAGATCGGTTCAACGCCT
CCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATTATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACAT
TCTGGAAGATATCGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAACCTATGCC
CACCTGTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATACACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGC
TGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACAATCCTGGATTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAG
AAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCCAGGTGTCCGGCCAG
GGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGA
AGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAAGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAA
CCAGACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGGC
AGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGA
ATGGGCGGGATATGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCC
TCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGAC
AACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCC
AGAGAAAGTTCGACAATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCAAGAG
ACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACGAC
GAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATT
TCCAGTTTTACAAAGTGCGCGAGATCAACAACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGGGAAC
CGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAG
ATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCGGCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTT
TCAAGACCGAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGGCGAAACCGGGGA
GATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAGTGCTGAGCATGCCCCAAGTGAATATCGTGAAA
AAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCA
GAAAGAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCTGTGCTGGTGGTGGC
CAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTGAAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGC
AGCTTCGAGAAGAATCCCATCGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGC
TGCCTAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCTGCCGGCGAACTGCAGAAGGG
AAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCC
CCCGAGGATAATGAGCAGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCA
GCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGA
TAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTC
AAGTACTTTGACACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACC
AGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGGAGGCGACAAAAGGCCGGCGGCCACGAA
AAAGGCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGTAA(SEQ ID NO:17)

[0522] VIII.蛋白质印迹

[0523] 通过蛋白质印迹分析了IVT Cas9 mRNA的质量。在转染前一天,将293T细胞以1×10^5个细胞/孔的密度接种到12-孔板中。将细胞用各种制剂以600μL总体积处理另外24h,所述制剂包括mCherry mDLNP(0.5μg mRNA/孔)、mCherry mDLNP(1.0μg mRNA/孔)、IVT Cas9

mDLNP(0.5μg mRNA/孔)、IVT Cas9 mDLNP(1.0μg mRNA/孔)和Lipofectamine2000/Cas9 pDNA(0.5μgpDNA/孔)。用1×PBS洗涤3次后,将100μL裂解缓冲液(50mM Tris HCl,pH7.4,含有150mM NaCl、1mM EDTA和1%TRITON X-100)和1μL蛋白抑制剂混合液(100×,ThermoFisher)加入每个孔中,并在室温摇动20min。将细胞裂解物收集到1.6mL管中,并在4℃离心10min(13,000g)。如果不立即使用,将上清液收集到新管中并在-80℃储存。在进行蛋白质印迹之前,使用BCA测定试剂盒(ThermoFisher)测量蛋白浓度。装载15微克总蛋白,并通过4-20%聚丙烯酰胺凝胶(ThermoFisher)分离。然后将分离的蛋白转移进聚偏乙烯膜(BioRad)中,并在室温用5%BSA(溶解于PBST)封闭1小时。将第一抗体在4℃应用过夜。使用PBST洗涤四次后,将膜在室温用第二抗体温育1小时,然后在用PBST(ThermoFisher)洗涤四次后用ECL底物成像。

[0524] IX.在Td-Tomato小鼠模型中的基因编辑(Cre mRNA)

[0525] 如上所述制备Cre mRNA制剂,并进行静脉内注射(0.3mg/kg Cre mRNA)。两天后,处死小鼠(每组n=4),并通过IVIS Lumina系统(Perkin Elmer)对主要器官成像。

[0526] X.用于流式细胞计量术的细胞分离和染色

[0527] 为了测试每种器官的细胞类型中的Td-Tomato^{+}细胞,在用Cre mRNA制剂(0.3mg/kg)处理2天后进行细胞分离和染色,然后通过流式细胞计量术分析。

[0528] 对于肝细胞分离,如前所述进行两步胶原酶灌注(Cheng等人,2018)。简而言之,将小鼠用异氟烷麻醉并固定。用肝灌注培养基(Thermo Fisher Scientific,17701038)开始灌注7-10min,然后再换成肝消化培养基(Thermo Fisher Scientific,17703034)持续另外7-10min。将肝收集进含有10mL肝消化培养基的平板中,并切割以释放肝细胞。然后将释放的肝细胞收集,并用肝细胞洗涤培养基(Thermo Fisher Scientific,17704024)洗涤两次,并用1×PBS洗涤一次。通过粗滤和低速(50×g)离心进一步分离后,通过FACS Aria II SORP机器(BD Biosciences)分析肝细胞。

[0529] 为了脾细胞类型的分离和染色,将取出的脾用无菌刀片切碎,并在250μL的1×消化培养基(45单位/μL胶原酶I,25单位/μL DNA酶I和30单位/μL透明质酸酶)中匀浆化。将脾溶液转移进含有5-10mL 1×消化培养基的15mL管中。接着,使用70μm过滤器过滤脾溶液,并用1×PBS洗涤一次。通过以300×g的速度离心5min,获得细胞沉淀物。除去上清液,并将细胞沉淀物重新悬浮于2mL 1×RBC裂解缓冲液(BioLegend,420301)中,并在冰上温育5min。温育后,添加4mL细胞染色缓冲液(BioLegend)以停止RBC裂解。将该溶液再次以300×g离心5min以获得细胞沉淀物。将单细胞重新悬浮于细胞染色缓冲液中,并添加到含有抗体(100μL总体积)的流管中。将细胞与抗体一起在暗处在4℃温育20min。将染色的细胞用1mL 1×PBS洗涤两次,然后重新悬浮于500μL 1×PBS中进行流式细胞计量术分析。使用的抗体是Pacific Blue抗-小鼠CD45(BioLegend,103126)、Alexa Fluor 488抗-小鼠/人CD11b(BioLegend,101217)、Alexa Fluor 647抗-小鼠CD19(BioLegend,115522)和PerCP-Cyanine5.5抗-小鼠CD3e(145-2C11)(Tonbo Biosciences,65-0031)。使用Ghost Dye Red 780(Tonbo Biosciences,13-0865-T500)来区分活细胞。

[0530] 为了肺细胞类型的分离和染色,将分离的肺用无菌刀片切碎,且然后转移进含有10mL 2×消化培养基(90单位/μL胶原酶I,50单位/μL DNA酶I和60单位/μL透明质酸酶)的15mL管中,并在摇动下在37℃温育1h。温育后,将任何剩余的肺组织匀浆化。以下步骤与上

述脾方案相似。这里使用的抗体是Pacific Blue抗-小鼠CD45(BioLegend,103126)、Alexa Fluor 488抗-小鼠CD31(BioLegend,102414)和Alexa Fluor 647抗-小鼠CD326(Ep-CAM)(BioLegend,118212)。使用Ghost Dye Red 780(Tonbo Biosciences,13-0865-T500)来区分活细胞。

[0531] XI.在Td-Tomato小鼠模型中的基因编辑(Cas9 mRNA/sgRNA和Cas9/sgRNA RNP)

[0532] 为了评价体内基因编辑,选择Td-Tom小鼠,具有相当的体重和相同的性别。将Cas9 mRNA和sgRNA共同递送给tdTomato(td-Tom)小鼠。将Cas9mRNA/sgTom1(4/1,重量/重量)通过各种制剂共同递送,总RNA剂量等于2.5mg/kg。在静脉内注射后10天,取出主要器官并在IVIS Lumina系统上成像。对于靶向脾的制剂,总RNA剂量为4mg/kg,且Cas9 mRNA与sgTom1的重量比为2/1,检测时间为2天。对于RNP递送,Cas9蛋白与sgRNA的摩尔比固定为1:3,注射剂量为1.5mg/kg RNA,并且检测时间为注射后第7天(每组n＝2-4)。为了证实Td-Tom表达,进一步制备了组织切片并通过共焦显微术成像。简而言之,将组织块嵌入最佳切割温度化合物(OCT)(Sakura Finetek)中,并在Cryostat仪器(Leica Biosystems)上进行冷冻切片(8μm)。将已封固的组织切片用4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI,Vector Laboratories)染色,然后在Zeiss LSM 700上通过共焦显微术成像。

[0533] XII.在C57BL/6小鼠中的基因编辑(Cas9 mRNA/sgPTEN和Cas9/sgRNARNP)

[0534] 为了检查体内的内源基因编辑,选择了PTEN。通过以2.5mg/kg的总剂量共同递送Cas9 mRNA和修饰的sgPTEN(4/1,mRNA/sgRNA,重量/重量),给野生型C57BL/6小鼠静脉内注射各种载体(每组n＝2-4)。10天后,收集组织,并使用PureLink基因组DNA Mini Kit(ThermoFisher)提取基因组DNA。对于靶向脾的制剂,总RNA剂量为4mg/kg,Cas9 mRNA/sgTom1为2/1(重量/重量),且检测时间为注射后2天。为了RNP递送,Cas9蛋白与sgRNA的摩尔比固定为1:3,注射剂量为1.5mg/kg RNA,检测时间为注射后第7天(每组n＝2-4)。获得PTEN PCR产物后,进行T7E1测定(NEB)以通过标准方案确认基因编辑效力。此外,通过H&E染色和免疫组织化学(IHC)对组织切片进行了PTEN编辑的评价。简而言之,将多聚甲醛(PFA)固定的组织包埋在石蜡中,切片,并由UTSW的Molecular Pathology Core进行H&E染色。以标准方式进行4μm切片,并用Elite ABC Kit和DAB Substrate(Vector Laboratories)检测进行IHC。

[0535] 实施例9:使用中性缓冲液的制剂

[0536] 观察到Cas9 RNP在酸性缓冲液中变性,导致流体动力学尺寸从10nm增加到150nm(图40B)。这使RNP难以封装到单分散纳米颗粒中,如果不是不可能的话。这些研究专注于脂质纳米颗粒(LNP),因为它们是在临床前模型中和在人类中(Wood,2018)最有效的一类RNA递送载体(Wang等人,2017;Doudna和Charpentier,2014;Hajj和Whitehead,2017;Sander和Joung,2014)。在LNP的四种组分[可电离的阳离子脂质、两性离子磷脂、胆固醇和聚(乙二醇)(PEG)脂质)]中,pK_a为约6.4的可电离的阳离子脂质对于活性是有用的,因为它们在混合的pH(例如当胺被质子化时pH 4)结合带负电荷的RNA,在细胞摄取前在中性pH失去电荷,且然后随着胞内体中的pH降低而再次获得电荷以与胞内体膜融合并能够释放货物至细胞质。但是,此特征阻止货物在中性pH的有效封装,因为可电离的阳离子脂质在中性pH不带电荷。为了克服该挑战,添加第5种组分,特别是在中性pH带正电荷的阳离子脂质,其允许使用中性缓冲液(而不是酸性缓冲液)封装RNA和蛋白,从而保留RNP的三级结构和稳定性(图

40A)。

[0537] 为了评价该策略,选择5A2-SC8作为可电离的阳离子脂质,因为5A2-SC8 LNP向具有受损的肝功能的小鼠安全地递送短siRNA/miRNA和长mRNA,所述受损的肝功能包括MYC驱动的肝癌(Zhou等人,2016;Zhang等人,2018a;Zhang等人,2018b)或富马酰乙酰乙酸水解酶(FAH)的基因敲除(Cheng等人,2018)。永久阳离子脂质(例如DOTAP)向传统4-组分5A2-SC8LNP制剂中的引入,实际上允许通过将脂质的乙醇溶液与RNP的PBS溶液(1/3,v/v)混合而发生受控自装配。从总脂质的5-60摩尔%评价DOTAP的掺入(图41),其揭示在体外10-20%的较高基因编辑水平和具有<200nm的尺寸的稳定的负载RNP的纳米颗粒的形成(图42)。最初,使用靶向报告萤光素酶的sgRNA(sgLuc),观察到具有10摩尔%DOTAP掺入的LNP尺寸(5A2-DOT-10:5A2-SC8/DOPE/Chol/DMG-PEG/DOTAP=15/15/30/3/7(mol/mol)),使用PBS缓冲液制备的颗粒稍微大于没有RNP负载的纳米颗粒。使用低PH缓冲液制备的相同的LNP没有改变尺寸,这暗示RNP没有被封装(图40C)。为了确定Cas9蛋白和sgRNA之间的最佳摩尔比,制备了1/1、1/3和1/5(mol/mol)的Cas9/sgRNA复合物,其减小了RNP尺寸(图40D)和增加了负电荷(图40F)。封装后,RNP比率没有改变得到的LNP的尺寸或ζ电位(图40E,40G)。所有LNP的表面电荷均为中性,这不仅指示成功的封装,而且还可用于最大程度地减少免疫单核吞噬细胞系统(MPS)系统的体内摄取。为了进一步检查5A2-DOT-10是否可以成功地介导RNP向细胞核中的递送,跟踪了具有封装的荧光EGFP融合的Cas9蛋白的LNP。单独的游离RNP不能进入细胞,因为没有检测到高于背景的绿色荧光(图43)。在5A2-DOT-10处理3小时后,在细胞的细胞质中观察到亮绿色荧光。然后观察到EGFP融合的Cas9蛋白由于核定位信号在Cas9上的存在而在6小时内逐渐进入细胞核(图40H)。胞吞作用是能量依赖性的,并且主要依赖于脂质筏,因为MβCD(基于脂质筏的胞吞作用的抑制剂)的处理显著抑制了纳米颗粒的细胞摄取(图40I)。

[0538] 为了定量基因编辑效力,使用了HeLa-Luc和HeLa-GFP报道细胞。检查不同的Cas9/sgLuc比率,基因编辑在1/3和1/5较高(图44A)。T7内切核酸酶I(T7EI)测定的结果证实,大多数所有靶DNA带(720bp)被切割为两个切割带(536bp和184bp)。用对照处理组未观察到切割带。为了测试需要中性pH缓冲液来封装RNP并保持Cas9功能的假设,还评价了使用pH 4柠檬酸盐缓冲液制备的5A2-DOT-10的基因编辑效率。根本没有观察到切割带(图44A)。通过Sanger测序进一步证实了阴性结果,从而提供了额外证据表明常规的基于酸的配制方法无法产生有效的NP。切换到表达GFP的细胞,封装Cas9/sgGFP的5A2-DOT-10诱导了GFP DNA中的插入缺失并敲除了几乎所有的GFP表达。对照组表现出与PBS处理的细胞相似的荧光强度(图44B),这通过流式细胞计量术证实(图44C和45)。永久性基因编辑通过生长细胞中GFP的无限丢失而显现并通过Sanger测序证实,其中CRISPR编辑的推论(ICE)分析显示插入缺失达到95%(图44D)。着眼于临床转化,对加载RNP的5A2-DOT-10稳定性在4℃监测2个月。LNP没有改变尺寸并且保持均匀(PDI<0.2)(图44G)。5A2-DOT-10纳米颗粒的连续测试揭示恒定的基因编辑活性,即使在储存60天后(图44H)。

[0539] 向经典的4-组分LNP中添加永久阳离子脂质以实现有效RNP递送的策略不限于基于树枝状聚合物的可电离脂质,5A2-SC8。为了证明这一点,在使用其它类型的可电离材料制备的纳米制剂中包括了补充性DOTAP:在FDA-批准的Onpattro中使用的众所周知的DLin-MC3-DMA脂质(Wood,2018)和C12-200类脂质(图46A-B)。即使它们与5A2-SC8相比具有非常

不同的化学结构(图46C),所有DOTAP修饰的纳米颗粒都可以有效地编辑细胞,而先前建立的没有DOTAP的C12-200或MC3制剂显示低编辑效率(图44E)。5A2-DOT-10也实现了比阳性对照RNAiMAX更高的编辑效率。由于5A2-DOT-10LNP比MC3-DOT-10和C12-200-DOT-10更有效,因此所有后续实验均使用5A2-SC8进行。除DOTAP外,还将其它阳离子脂质(包括DDAB和EPC)引入LNP制剂中(图46E-G)。具有不同化学结构的所有三种阳离子脂质的结果是相似的(图46H)。这些结果指示,该策略对于可电离的阳离子脂质纳米颗粒(DLNP、LLNP、SNALP)和在pH 7.4带正电荷的其它阳离子脂质是通用的。因为这种方法允许调整FDA-批准的Onpattro制剂以实现RNP的递送,所以这种方案为临床上可转化的人类疾病的治疗提供了不同的方向。

[0540] 成功的RNP递送的关键是用PBS缓冲液代替标准的酸性缓冲液以维持蛋白稳定性。为了测试此方法是否与其它中性缓冲液相容,配制了在PBS、Opti-MEM培养基和HEPES中的LNP。在柠檬酸盐缓冲液(pH 4)中制备的制剂用作对照(图46I)。使用在所有三种中性缓冲液条件下而非在酸性缓冲液中制备的LNP,实现了显著且等效的基因编辑(>90%)(图44F)。测序结果的ICE分析与通过流式细胞计量术显示的结果一致(图46K)。

[0541] 为了检查体内基因编辑,将封装Cas9/sgTOM复合物的5A2-DOT-10递送至Td-Tomato小鼠模型(图47A)。在这些小鼠中,CRISPR介导的Lox-Stop-Lox盒的缺失打开了成功编辑的细胞中的下游tdTom表达。通过以1mg/kg sgTOM的剂量肌肉内注射将装载有Cas9/sgTOM RNP的5A2-DOT-10LNP注射进小鼠的左腿。由于以前用于直接注射基因编辑(Zuris等人,2015),将与Cas9/sgTOM RNP形成复合物的RNAiMAX用于对比。在用5A2-DOT-10处理的肌肉中观察到比用RNAiMAX处理的小鼠中更高的Td-Tom荧光(图47B)。组织切片的成像进一步证实了基因编辑在5A2-DOT-10处理组中产生更亮的红色荧光(图47C)。将5A2-DOT-10注射到Td-Tom小鼠的脑中(0.15mg/kg sgTOM)。再次,在注射部位附近观察到亮红色信号,从而证实了小鼠脑的编辑(图47D-E)。

[0542] 评价了5A2-DOT-10的改善的稳定性和效力可以介导组织中成功的全身性基因编辑。为了检查这种RNP递送策略,制备了具有不同摩尔百分比的DOTAP(5-60%)的LNP,并将RNP递送给Td-Tom小鼠IV(1.5mg/kg sgTOM)。在注射5A2-DOT-5后7天,仅在肝中观察到Td-Tom荧光。将掺入的DOTAP百分比从5%增加到60%导致从肝到肺的逐渐荧光(CRISPR引导的基因编辑)。5A2-DOT-60主要实现了肺编辑(图47F)。这些结果指示,通过调节内部脂质组分化学和摩尔比,可以以组织特异性的方式实现深层组织编辑。通过组织切片的共焦成像进一步证实了组织特异性编辑(图47G)。然后通过将封装Cas9/sgPTEN RNP的LNP全身性地注射入野生型C57BL/6小鼠中,评价了内源性靶标Pten的编辑。仅在5A2-DOT-5处理的小鼠的肝中以及在5A2-DOT-50和5A2-DOT-60处理的小鼠的肺中检测到清楚的T7EI切割带(图47H)。

[0543] 为了评价是否可能在体内同时编辑多个基因,将Cas9蛋白和六种不同的sgRNA装入5A2-DOT-50。将sgTOM、sgP53、sgPTEN、sgEml4、sgALK和sgRB1装入Cas9蛋白中进行封装。然后,通过尾静脉注射(0.33mg/kg的每种sgRNA)用5A2-DOT-50(合并物)处理Td-Tom小鼠。一周后,在肺中检测到明亮的Td-Tom荧光,指示TOM的基因编辑(图47I)。在所有其它5个基因组基因座处观察到清晰的T7EI切割带,表明5A2-DOT-50能够在低剂量同时地和有效地编辑多个基因(图47J)。定量分析揭示在肺中高达22%的靶标编辑效率(图47和48)。本文使用具有第一个和最后3个核苷酸的末端修饰的sgRNA来增强sgRNA稳定性和再现性(图49)

(Finn等人,2018;Hendel等人,2015)。报告已经显示,与末端修饰的sgRNA相比,对其它核苷酸的精确修饰可以使体内基因编辑增加2-4倍(Finn等人,2018;Yin等人,2017),表明本文报道的编辑效率用进一步sgRNA优化可能更高。尽管如此,5A2-DOT-50的高功效和组织特异性允许用一次注射同时编辑肺中的6个靶标。

[0544] 传统上,通过在胚胎干细胞中的转基因或基因工程而生成动物模型,这既耗时又昂贵。使用CRISPR/Cas对成年小鼠中的肿瘤和其它疾病相关基因的直接突变为模型的快速生成提供了一种可行的方案。这只有使用必须针对每个靶标进行工程改造的昂贵慢病毒并通过向肝内进行流体动力学注射才能实现(Xue等人,2014;Maddalo等人,2014)。由于通常需要多个基因的突变才能产生功能性癌症模型,因此非常期望开发一种廉价且有效的基于非病毒纳米颗粒的多路化方案。由于5A2-DOT-X LNP是有效的,可以同时编辑多个靶标,可以重复施用,并提供组织特异性,因此它们提供了生成多种动物模型的途径。

[0545] 采用5A2-DOT-5同时在肝中选择性地敲除三个肿瘤抑制基因(P53、PTEN和RB1)。这些基因已在许多人类癌症(包括肝癌)中得到鉴定。通过每周静脉内注射2.5mg/kg的总sgRNA持续3周来处理C57BL/6小鼠,并检测小鼠肝中的基因编辑效率(图48A)。通过T7EI测定在处理2、12、15和20周后在所有三个基因基因座观察到清晰的切割带(图48B、50和51)。随着时间的流逝,切割带明亮得多,表明肿瘤生长。当在15周和20周处死小鼠时,在肝上发现了可见的肿瘤,并且在腹腔中发现了几个转移性肿瘤(图48C和52)。还在不同时间点通过H&E染色和靶向肿瘤增殖生物标志物Ki67的IHC染色检测了肿瘤产生(图48D和53)。

[0546] 为了生成挑战性肺癌小鼠模型,聚焦于Eml4-Alk染色体重排,这是在许多实体人类肿瘤(尤其是非小细胞肺癌)中发现的复杂突变(Maddalo等人,2014;Blasco等人,2014)。在Eml4和Alk之间重排后产生的Eml4-Alk融合蛋白促进癌症发展。利用5A2-DOT-50的高功效和肺靶向特异性,注射一次(2mg/kg剂量的总sgRNA)或两次(1.5mg/kg剂量的总sgRNA,每周一次)静脉内剂量并评价肿瘤产生过程(图48E)。在所有检查的时间点,从来自两组小鼠的提取的肺DNA中均可检测到插入缺失产生(图48F和54)。在5A2-DOT-50-处理的小鼠的肺中检测到清晰的基因重排带,从而确认成功产生的染色体重排(图48F和54)。随着时间的流逝,Eml4-Alk重排带明亮得多,表明编辑的细胞的增殖。亚克隆这些PCR扩增子之后的测序结果进一步证实了Eml4-Alk重排(图48G和54)。在H&E染色和Ki67染色起16周和24周后,在肺中观察到几个肿瘤病变(图48H、55和56)。这些结果显示,5A2-DOT-50LNP的单次注射可以成功地产生染色体重排并导致成年小鼠中的肺肿瘤产生。因此,将这些LNP定位以加速多种疾病模型的原位创建。

[0547] B.材料和方法

[0548] I.材料.

[0549] 通过遵循公开的方案合成并纯化5A2-SC8(Zhou等人,2016)、DLin-MC3-DMA(Jayaraman等人,2012)和C12-200(Love等人,2010)。1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)、二甲基双十八烷基铵(DDAB)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(EPC)和1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)购自Avanti Polar Lipids。胆固醇购自Sigma-Aldrich。1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-甲氧基(聚((乙二醇)MW 2000)(DMG-PEG2000)购自NOF America Corporation。ONE-Glo+Tox萤光素酶报告测定试剂盒购自Promega Corporation。Pur-A-Lyzer Midi透析试剂盒

(WMCO,3.5kDa)购自Sigma-Aldrich。4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(DAPI)、Hoechst 33342、DLS Ultramicro比色皿、Lipofectamine RNAiMAX转染试剂和Lab-Tek带腔室盖玻片单元购自Thermo Fisher Scientific。Cas9蛋白和Ki-67单克隆抗体购自Thermofisher。GenCrispr NLS Cas9-EGFP核酸酶购自GenScript。修饰的sgRNA购自Synthego。

[0550] II.Cas9/sgRNA复合物制备.

[0551] 在标记的缓冲液中将Cas9蛋白和sgRNA的单独溶液以等体积混合在一起。混合后,在室温温育5分钟以允许形成RNP,用于完整的Cas9/sgRNA复合物自装配。使用的Cas9蛋白与sgRNA的摩尔比为1/1、1/3和1/5。

[0552] III.优化的纳米颗粒制剂和表征.

[0553] 将可电离的阳离子脂质(5A2-SC8、C12-200或DLin-MC3-DMA)(Zhou等人,2016;Jayaraman等人,2012;Love等人,2010)、两性离子脂质(DOPE或DSPC)、胆固醇、DMG-PEG和永久阳离子脂质(DOTAP、DDAB或EPC)以给定的摩尔比溶解在乙醇中。将Cas9/sgRNA复合物溶解在1×PBS缓冲液中。将在PBS缓冲液中的Cas9/sgRNARNP复合物溶液以3:1的体积比(Cas9/sgRNARNP:脂质,v/v)用移液器快速混合到脂质的乙醇溶液中,使得总脂质与sgRNA的重量比为40:1(重量),然后在室温温育15min。之后,将新鲜的制剂直接表征并用于体外测定。对于动物实验,在局部注射(肌肉内或脑内注射)或全身注射(静脉内注射)之前,将制剂针对1×PBS透析(Pur-A-Lyzer Midi透析试剂盒,WMCO 3.5kDa)1h以除去乙醇。使用动态光散射(DLS,Malvern;He-Ne激光,λ=632nm;检测角=173°)测量纳米制剂的尺寸分布和ζ电位。

[0554] IV.RNAiMAX制剂.

[0555] 为了制备RNAiMAX复合的RNP,在Opti-MEM中制备Cas9/sgRNA复合物,并与在Opti-MEM中稀释的Lipofectamine RNAiMAX转染试剂(以1μL RNAiMAX/μg sgRNA的剂量)轻轻混合。将混合物溶液在室温温育30分钟以完成复合。

[0556] V.标准LNP制剂.

[0557] 为了制备封装RNP的C12-200和MC3 LNP,将柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0)中的Cas9/sgRNARNP复合物溶液以3:1的体积比(Cas9/sgRNARNP:总脂质,v/v)用移液器快速混合到脂质的乙醇溶液中,使得总脂质与sgRNA的重量比为40:1(重量/重量),然后在室温温育15min。对于C12-200 LNP,C12-200/DOPE/Chol/DMG-PEG的摩尔比为35/16/46.5/2.5;对于MC3 LNP,DLin-MC3-DMA/DSPC/Chol/DMG-PEG的摩尔比为50/10/38.5/1.5。

[0558] VI.5A2-DOT-10Cas9/sgLuc处理的细胞摄取和摄取机制

[0559] 为了检查细胞摄取,将HeLa-Luc细胞以2×10^4个细胞/孔的密度接种到Lab-Tek Chambered Coverglass(8孔)中,并在37℃温育过夜。然后,将旧培养基替换为150μL含10%FBS的新鲜DMEM,并用50μL的封装Cas9-EGFP/sgLuc RNP的5A2-DOT-10处理(9nM sgRNA/孔)。在处理后1h、3h、6h和24h,将细胞用PBS洗涤3次,并在37℃用Hoechst(0.1mg/mL)染色15min,然后通过共焦显微术(Zeiss LSM 700)成像。

[0560] 为了检查摄取机制,使用Hela-Luc细胞评价了对胞吞作用途径的特异性抑制的测定。仅5A2-DOT10处理用作对照。将HeLa-Luc细胞以5×10^5个细胞/孔的密度接种在12-孔平板中,并在DMEM完全培养基中温育24小时。然后将细胞用PBS洗涤,且随后与溶解在Opti-MEM中的下述胞吞作用抑制剂之一一起在37℃预温育1h:20μM氯丙嗪(CMZ,网格蛋白介导的

胞吞作用的抑制剂),2mM阿米洛利(AMI,巨胞饮的抑制剂),200μM染料木黄酮(GEN,胞膜窖介导的胞吞作用的抑制剂),5mM甲基-β-环糊精(MβCD,脂质筏介导的胞吞作用的抑制剂)。接着,除去培养基,并用包含5A2-DOT-10Cas9/sgLuc(24nM sgLuc)的完全DMEM培养基替换另外30min。此后,除去培养基,并用PBS洗涤细胞3次。然后收集细胞并通过流式细胞计量术分析。一式三份地进行所有实验。在这里,Cas9-EGFP蛋白用于配制Cas9/sgLuc复合物。为了评价它是否是能量依赖性的胞吞作用,还将细胞在4℃下预温育1h,且然后在通过流式细胞计量术分析之前用含有24nM 5A2-DOT-10Cas9/sgLuc(24nM sgLuc)的完全DMEM培养基处理另外30分钟。

[0561] VII.检测基因组编辑的T7EI测定.

[0562] 为了体外基因组DNA编辑分析,将HeLa-Luc细胞以1.5×10^5个细胞/孔的细胞密度接种到12-孔平板中,并温育过夜。然后,将包含24nM sgRNA的不同纳米制剂添加给细胞。3天后,将细胞收集、洗涤并与2μL蛋白酶K(Thermofisher)一起重新悬浮在50μL的1×被动裂解缓冲液(Promega)中。之后,运行裂解PCR程序(65℃保持15分钟,95℃保持10分钟)以获得细胞裂解物。然后使用下述PCR扩增程序扩增靶向的基因组基因座(95℃保持5分钟;(95℃保持30秒;60-64℃保持30秒;72℃保持1分钟)共40个循环;72℃保持7分钟,且然后保持在4℃)。细胞裂解物用作DNA模板。然后使用PCR纯化试剂盒(Qiagen)纯化扩增子,并将200ng纯化的DNA添加到19μL含1×NEBuffer 2的退火反应物中。然后将PCR产物在热循环仪中使用以下条件退火(95℃保持5分钟,然后将混合物以-2℃/秒的变温速率从95℃冷却至85℃,随后以-0.1℃/秒的变温速率从85℃冷却至25℃,然后保持在4℃),以形成杂双链体DNA。然后,加入1μL T7EI(NEB),并在37℃温育15分钟。然后通过添加1.5uL的0.25M EDTA来停止切割反应。接着,使用2.5%琼脂糖凝胶电泳分析消化的DNA。表5中列出了用于T7EI测定的所有引物。

[0563] 表5:sgRNA序列

[0564]

名称	靶序列(5'至3')	PAM (5'至3')
sgLUC	CTTCGAAATGTCCGTTCGGT (SEQ ID NO: 18)	TGG
sgGFP	GAAGTTCGAGGGCGACACCC (SEQ ID NO: 19)	TGG

[0565]

sgTOM	AAGTAAAACCTCTACAAATG (SEQ ID NO: 20)	TGG
sgPTEN	AGATCGTTAGCAGAAACAAA (SEQ ID NO: 21)	AGG
sgP53	GTGTAATAGCTCCTGCATGG (SEQ ID NO: 22)	GGG
sgRB1	TCTTACCAGGATTCCATCCA (SEQ ID NO: 23)	CGG
sgEml4	CCTGCCCTGAGTAAGCGACA (SEQ ID NO: 24)	CGG
sgAlk	TCCTGGCATGTCTATCTGTA (SEQ ID NO: 25)	AGG

[0566] 对于体内基因组DNA编辑分析,根据生产商的说明书使用PureLink基因组DNAMini Kit(Invitrogen)从组织中提取基因组DNA。随后,前述程序按照上面关于T7EI检测所述。

[0567] 分析片段化的PCR产物,并基于下式计算插入缺失百分比:

[0568] %基因修饰=100×(1-(1-切割分数)$^{1/2}$)

[0569] 其中切割分数是切割产物峰的总和除以切割产物峰和母体峰的总和。[5]

[0570] VIII.检测基因组编辑的Sanger测序.

[0571] 通过德克萨斯大学西南医学中心(UT Southwestern Medical Center)的McDermott Center Sequencing核心设施对T7EI测定的纯化PCR扩增子连同其正向引物进行测序。最后,使用在线分析软件ICE Analysis(它是由Synthego提供的网络工具)分析测序数据。

[0572] IX.在Hela-GFP细胞中的体外基因编辑.

[0573] 在含有10%FBS和1%青霉素/链霉素的DMEM中在37℃/5%CO_2培养HeLa-GFP报道细胞。对于实验,将HeLa-GFP细胞以1.5×10^5个细胞/孔的细胞密度接种到12-孔平板中并温育过夜。然后,将培养基替换为0.5mL新鲜的完全DMEM,且然后添加100uL纳米颗粒分散体(sgRNA的终浓度固定为24nM)。处理后三天,使用荧光显微镜(Keyence)分析细胞。对于流式细胞计量术分析,将细胞收集,用PBS洗涤,重新悬浮于PBS中,并使用BD分析仪LSRFortessa SORP(BD Biosciences)进行分析。

[0574] X.5A2-DOT-10Cas9/sgGFP的稳定性.

[0575] 为了测量稳定性,制备了封装Cas9/sgGFP RNP复合物的5A2-DOT-10LNP,且然后将其在4℃储存2个月。储存不同时间后,测试这些纳米颗粒的尺寸和PDI,且还在HeLa-GFP细胞中通过如下评价其基因编辑效率:添加纳米颗粒(24nM sgRNA剂量),并在3天后定量基因编辑。对于每个时间点,提取并分析了储存的封装Cas9/sgGFP RNP的5A2-DOT-10LNP的等分试样(尺寸、PDI、效力)。

[0576] XI.动物实验.

[0577] 所有动物实验均得到德克萨斯大学西南医学中心机构动物保护和使用委员会(Institution Animal Care and Use Committees of The University of Texas Southwestern Medical Center)的批准,并且与适用的地方、州和联邦法规一致。C57BL/6小鼠得自UTSW Mouse Breeding Core Facility。B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor$^{tm9(CAG-tdTomato)Hze}$/J小鼠(也被称作Ai9或Ai9(RCL-tdT)小鼠)获得自The Jackson Laboratory(007909)并进行繁殖以维持Cre报告等位基因的纯合表达,所述Cre报告等位基因具有侧接loxP的停止盒,其阻止CAG启动子驱动的红色荧光tdTomato蛋白的转录。在Cas9/sgRNARNP介导的基因编辑后,Ai9小鼠将表达tdTomato荧光。Ai9小鼠在C57BL/6J遗传背景上是同基因的。

[0578] XII.体内基因编辑.

[0579] 为了在肌肉中的基因编辑,通过肌肉内注射以1mg/kg sgTOM的剂量向Td-Tomato小鼠的左腿中注射了封装Cas9/sgTOM RNP复合物的5A2-DOT-10LNP。封装Cas9/sgTOM RNP复合物的RNAiMAX被用作阳性对照。处理7天后,收集所有处理组的肌肉组织,并使用IVIS Lumina系统(Perkin Elmer)成像。之后,将肌肉组织包埋入最佳切割温度(OCT)化合物中并切成10μm切片。将切片用4%多聚甲醛(Thermo Fisher Scientific)固定20分钟,使用PBS缓冲液洗涤3次。然后,将一滴含DAPI(Thermo Fisher Scientific)的ProLong Gold Mountant应用在每张载玻片上。放置盖玻片,并通过共焦显微术(Zeiss LSM 700)对载玻片成像。为了在脑中的基因编辑,通过脑内注射以0.15mg/kg sgTOM的剂量向Td-Tomato小鼠注射封装Cas9/sgTOM RNP复合物的5A2-DOT-10LNP。处理6天后,切离脑并使用IVIS Lumina系统成像。按照上述方案制备脑的冷冻切片,并通过共焦显微术成像。

[0580] 为了通过静脉内注射的基因编辑,通过尾静脉注射以1.5mg/kg sgTOM的剂量用含有不同百分比的DOTAP的5A2-DOT-X LNP处理Td-Tomato小鼠。处理7天后,收集所有器官并使用IVIS Lumina系统对其成像。按照上述方案制备这些组织的冷冻切片,并通过共焦显微术成像。

[0581] XIII.关于Eml4-Alk重排的PCR.

[0582] 通过嵌套PCR测试了体内Eml4-Alk重排(Blasco等人,2014)。对于第一轮PCR,将40ng基因组DNA用作模板,PCR程序为在95℃保持5分钟;(95℃保持30秒;64℃保持30秒;72℃保持30秒)共18个循环;72℃保持7分钟,且然后保持在4℃。对于第二轮PCR,将1μl的第一轮PCR产物(100稀释液)用于PCR反应(95℃保持5分钟;(95℃保持30秒;68℃保持30秒;72℃保持30秒)共30个循环;72℃保持7分钟,且然后保持在4℃。在PCR反应中使用的引物列于表6中。

[0583] 表6:引物的列表

[0584]

名称	正向引物(5'至3')	反向引物(5'至3')
LUC	ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGA AAGGCCCGGCGCCATTC (SEQ ID NO: 26)	AACACTTAAAATCGCAGTATCCGGAATG (SEQ ID NO: 27)
GFP	GTGGTGCCCATCCTGGTCGAG (SEQ ID NO: 28)	CGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGC (SEQ ID NO: 29)
PTEN	ATCCGTCTTCTCCCCATTCCG (SEQ ID NO: 30)	GACGAGCTCGCTAATCCAGTG (SEQ ID NO: 31)
P53	ATAGAGACGCTGAGTCCGGTTC (SEQ ID NO: 32)	CCTAAGCCCAAGAGGAAACAGA (SEQ ID NO: 33)
RB1	CTGTGCTGGTGTGTGCAAACTATA (SEQ ID NO: 34)	CTGTCACAGTGAAACTCGTTACTTTGTAT ATC (SEQ ID NO: 35)

[0585]

Eml4	ACAAGGCTCTGGCTTCCATTG (SEQ ID NO: 36)	GATCAAAGCAAGGCCTTGTGCAT (SEQ ID NO: 37)
Alk	TCTGAGCCCCTTCCATCTGACC (SEQ ID NO: 38)	AGCTCAGCAGAAGCTCAGCAG (SEQ ID NO: 39)
Eml4-Alk 倒位(第1轮)	CCCAGTCATCAGTTGCTATGCAATT (SEQ ID NO: 40)	GGGTTTCCTTTGGTTCACAGATCCA (SEQ ID NO: 41)
Eml4-Alk 倒位(第2轮)	CGTTTTTCCACAAGAGCTAAGGCT (SEQ ID NO: 42)	GTGGTTTGGTCACATCTCAGGTG (SEQ ID NO: 43)

[0586] XIV.H&E染色和免疫组织化学(IHC).

[0587] 简而言之,将10％福尔马林溶液固定的组织包埋在石蜡中,切片,并由UTSW的Molecular Pathology Core进行H&E染色。以标准方式进行4μm切片,并用Elite ABC Kit和DAB Substrate(Vector Laboratories)检测用于IHC。

[0588] XV.统计分析.

[0589] 通过GraphPad Prism软件7.04版(GraphPad Software,USA),使用双侧Student氏t-检验进行统计分析。在任何统计检验中均未做出调整。P值<0.05被认为是统计上显著的。

[0590] ***

[0591] 根据本公开内容,无需过多实验可以实现和执行在本文中公开并要求保护的所有方法。尽管已经在优选实施方案的方面描述了本公开内容的组合物和方法,但是本领域技术人员显而易见,可以对所述方法以及本文所述方法的步骤或步骤顺序应用变化,而不背离本公开内容的概念、精神和范围。更具体地,显而易见,可以用在化学上和生理学上均相关的某些药剂替代本文所述的药剂,同时实现相同或类似的结果。本领域技术人员显而易见的所有这样的类似的替代和修改都被认为是在所附权利要求所限定的本公开内容的精神、范围和概念之内。

[0592] 参考文献

[0593] 就它们提供示例性操作细节或其它细节来补充本文所述的那些而言,下述参考文献具体地通过引用并入本文。

[0594] Amoasii等人,Science,362:86-91,2018.

[0595] Bailey和Cullis,Biochemistry,33:12573-12580,1994.

[0596] Blasco等人,Cell Rep.,9:1219-1227,2014.

[0597] Cheng等人,Adv.Mater.,30:e1805308,2018.

[0598] Chew等人,Nature methods,13:868,2016.

[0599] Cong等人,Science,339:819-823,2013.

[0600] Doudna和Charpentier,Science,346:1258096,2014.

[0601] Finn等人,Cell Rep.,22:2227-2235,2018.

[0602] Gustafson等人,Nano Today,10:487-510,2015.

[0603] Hajj和Whitehead,Nat.Rev.Mater.,2:17056,2017.

[0604] Hao等人,J.Am.Chem.Soc.,137:9206-9209,2015.

[0605] Hendel等人,Nat.Biotechnol.,33:985-989,2015.

[0606] Heyes等人,J.Controlled Release,107:276-287,2005.

[0607] Jayaraman等人,Angew.Chem.Int.Ed.,51:8529-8533,2012.

[0608] Jinek等人,Science,337:816-821,2012.

[0609] Kamath等人,J Immunol,165:6762-6770,2000.

[0610] Kanasty等人,Nat.Mater.,12:967-977,2013.

[0611] Kauffman等人,Nano Lett.,15:7300-7306,2015.

[0612] Love等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,107:1864-1869,2010.

[0613] Maddalo等人,Nature,516:423-427,2014.

[0614] Mali等人,Science,339:823-826,2013.

[0615] Miller等人,Angew.Chem.Int.Ed.,56:1059-1063,2017.

[0616] McLaughlin和Harary,Biochemistry,15:1941-1948,1976.

[0617] Nelson等人,ACS Nano,7:8870-8880,2013.

[0618] Sander和Joung,Nat.Biotechnol.,32:347-355,2014.

[0619] Staahl等人,Nat.Biotechnol.,35:431-434,2017.

[0620] Sun等人,Angew.Chem.Int.Ed.,54:12029-12033,2015.

[0621] Tabebordbar等人,Science,351:407-411,2016.

[0622] Wang等人,Chem.Rev.,117:9874-9906,2017.

[0623] Wang等人,Nat.Biotechnol.,2018.

[0624] Wilhelm等人,Nat.Rev.Mater.,1:16014,2016.

[0625] Wittrup等人,Nat.Biotechnol.,33:870-976,2015.

[0626] Wood,Nat.Rev.Neurol.,14:570,2018.

[0627] Xue等人,Nature,514:380-384,2014.

[0628] Yin等人,Nat.Biotechnol.,34:328-333,2016.

[0629] Yin等人,Nat.Biotechnol.,35:1179,2017.

[0630] Zhang等人,Gastroenterology,154:1421-1434,2018a.

[0631] Zhang等人,Dev.Cell,44:447-459,2018b.

[0632] Zhou,等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,113(3):520-525,2016.

[0633] Zuris等人,Nat.Biotechnol.,33:73-80,2015.

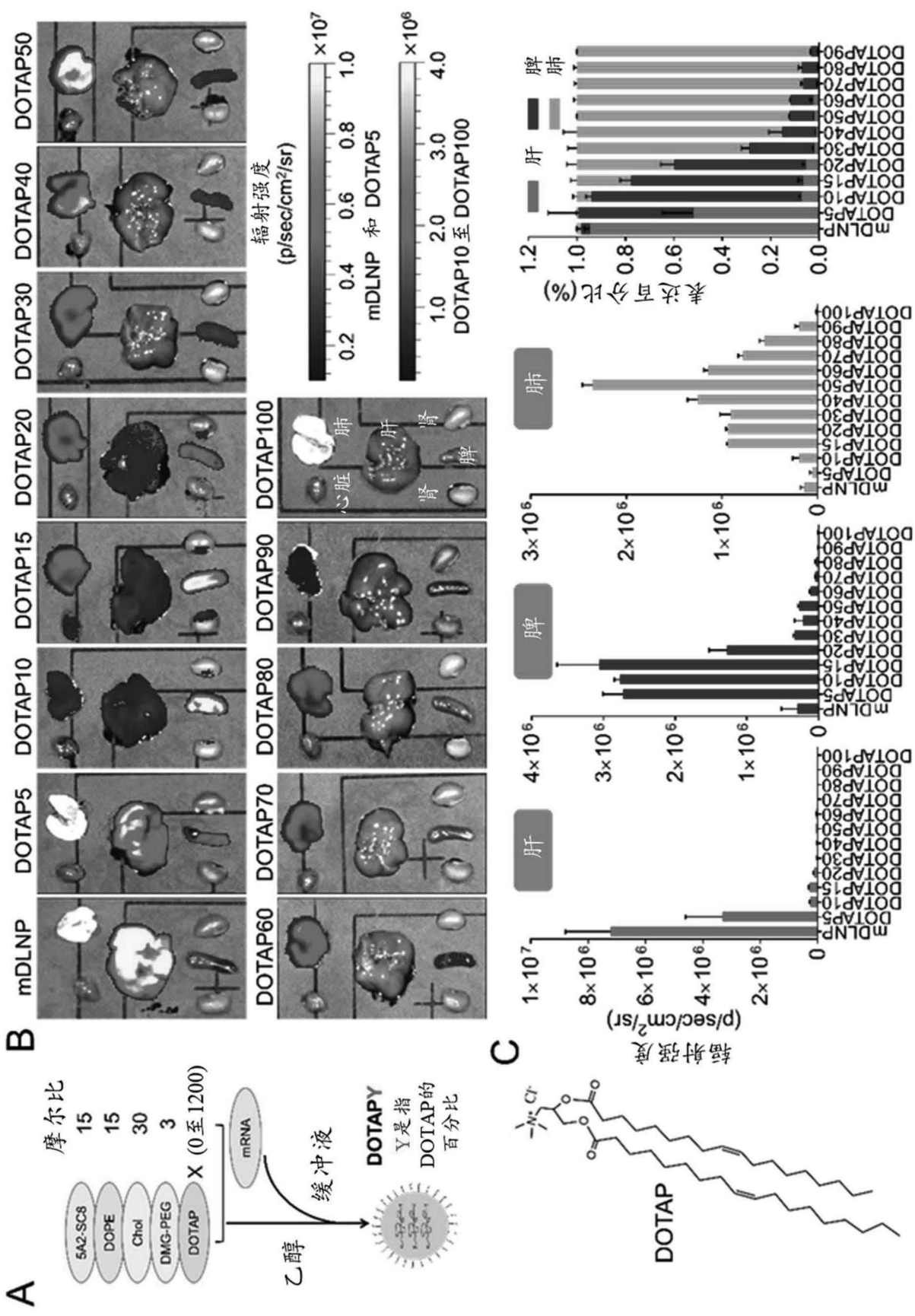

A
摩尔比
5A2-SC8 15
DOPE 15
Chol 30
DMG-PEG 3
DOTAP X (0至1200)
mRNA
乙醇
缓冲液
DOTAPY
Y是指
DOTAP的
百分比
B
mDLNP
DOTAP5
DOTAP10
DOTAP15
DOTAP20
DOTAP30
DOTAP40
DOTAP50
DOTAP60
DOTAP70
DOTAP80
DOTAP90
DOTAP100
辐射强度
(p/sec/cm²/sr)
mDLNP 和 DOTAP5
DOTAP10 至 DOTAP100
心脏
肺
肝
肾
脾
C
DOTAP
肝
脾
肺
辐射强度
(p/sec/cm²/sr)
来自可分比(%)
DLNP
DOTAP5
DOTAP10
DOTAP15
DOTAP20
DOTAP30
DOTAP40
DOTAP50
DOTAP60
DOTAP70
DOTAP80
DOTAP90
DOTAP100

图1A-1C

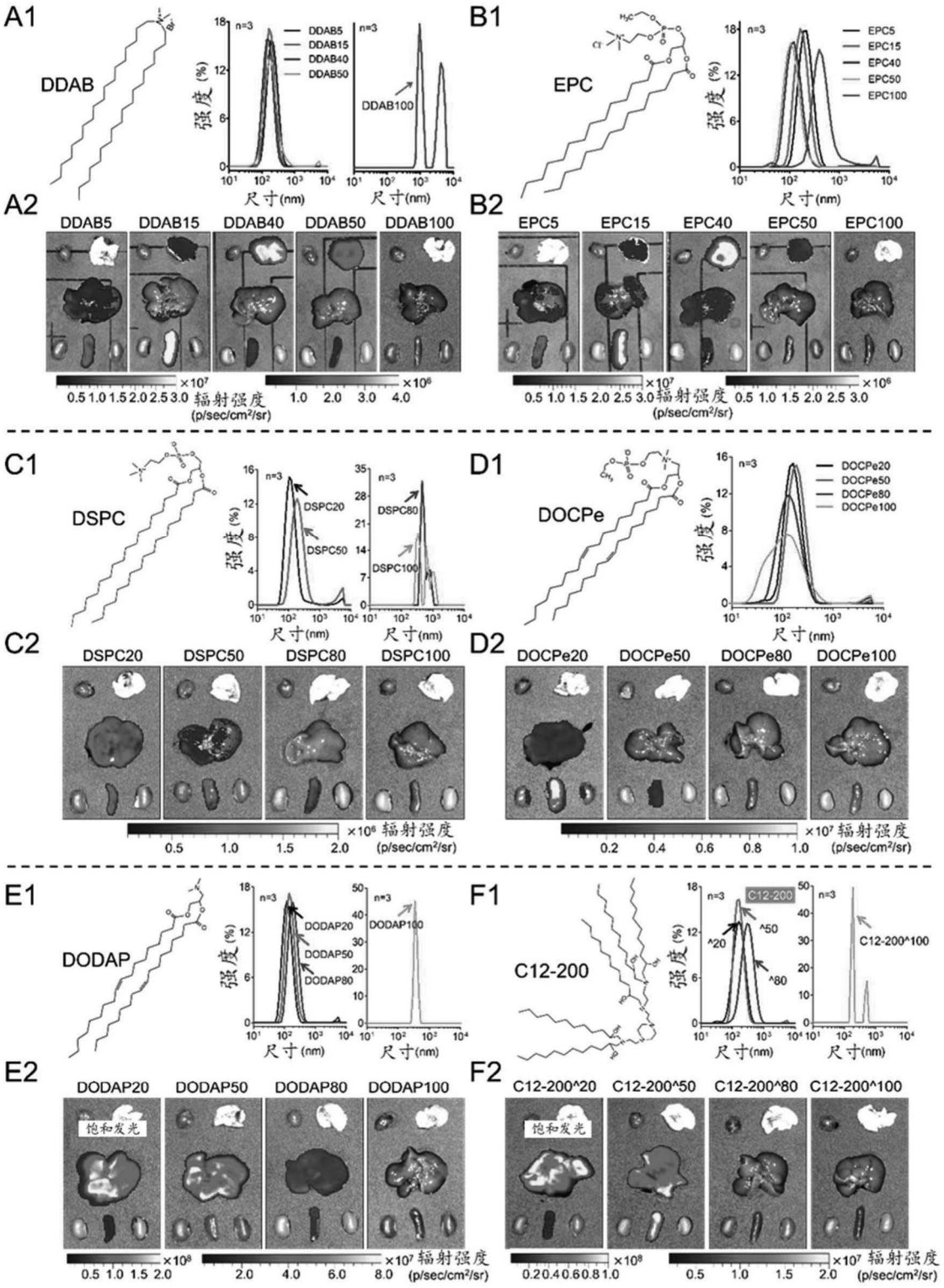

A1
DDAB
n=3
DDAB5
DDAB15
DDAB40
DDAB50
DDAB100
强度(%)
尺寸(nm)
B1
EPC
EPC5
EPC15
EPC40
EPC50
EPC100
A2
DDAB5
DDAB15
DDAB40
DDAB50
DDAB100
辐射强度 (p/sec/cm²/sr)
B2
EPC5
EPC15
EPC40
EPC50
EPC100
C1
DSPC
DSPC20
DSPC50
DSPC80
DSPC100
D1
DOCPe
DOCPe20
DOCPe50
DOCPe80
DOCPe100
C2
DSPC20
DSPC50
DSPC80
DSPC100
D2
DOCPe20
DOCPe50
DOCPe80
DOCPe100
E1
DODAP
DODAP20
DODAP50
DODAP80
DODAP100
F1
C12-200
C12-200
^20
^50
^80
C12-200^100
E2
DODAP20
DODAP50
DODAP80
DODAP100
饱和发光
F2
C12-200^20
C12-200^50
C12-200^80
C12-200^100
饱和发光

图2A1-2F2

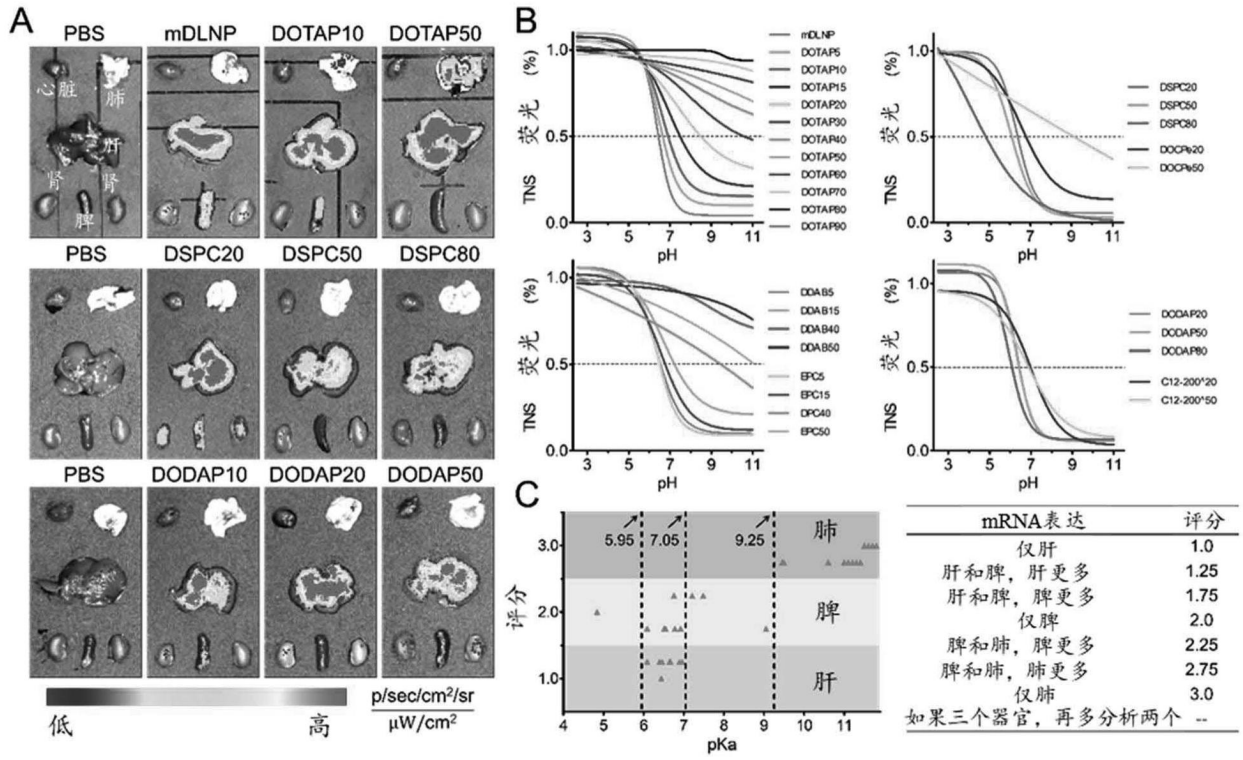

A
PBS
mDLNP
DOTAP10
DOTAP50
心脏
肺
肝
肾
肾
脾
PBS
DSPC20
DSPC50
DSPC80
PBS
DODAP10
DODAP20
DODAP50
低
高
p/sec/cm²/sr
μW/cm²
B
荧光 (%)
TNS
pH
mDLNP
DOTAP5
DOTAP10
DOTAP15
DOTAP20
DOTAP30
DOTAP40
DOTAP50
DOTAP60
DOTAP70
DOTAP80
DOTAP90
DSPC20
DSPC50
DSPC80
DOCPb20
DOCPb50
DDAB5
DDAB15
DDAB40
DDAB60
EPC5
EPC15
DPC40
EPC50
DODAP20
DODAP50
DODAP80
C12-200*20
C12-200*50
C
评分
pKa
5.95
7.05
9.25
肺
脾
肝
mRNA表达 评分
仅肝 1.0
肝和脾，肝更多 1.25
肝和脾，脾更多 1.75
仅脾 2.0
脾和肺，脾更多 2.25
脾和肺，肺更多 2.75
仅肺 3.0
如果三个器官，再多分析两个 --

图3A-3C

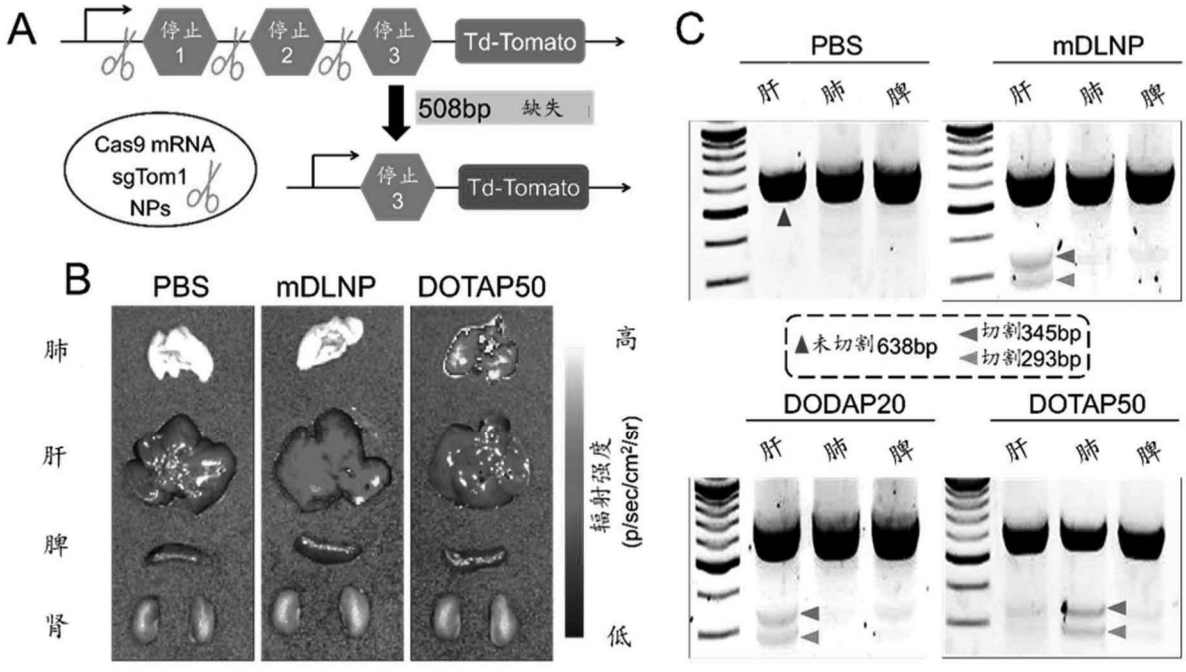

A
停止 1
停止 2
停止 3
Td-Tomato
508bp 缺失
Cas9 mRNA
sgTom1
NPs
停止 3
Td-Tomato
B
PBS
mDLNP
DOTAP50
肺
肝
脾
肾
高
辐射强度 (p/sec/cm²/sr)
低
C
PBS
mDLNP
肝
肺
脾
未切割638bp
切割345bp
切割293bp
DODAP20
DOTAP50

图4A-4C

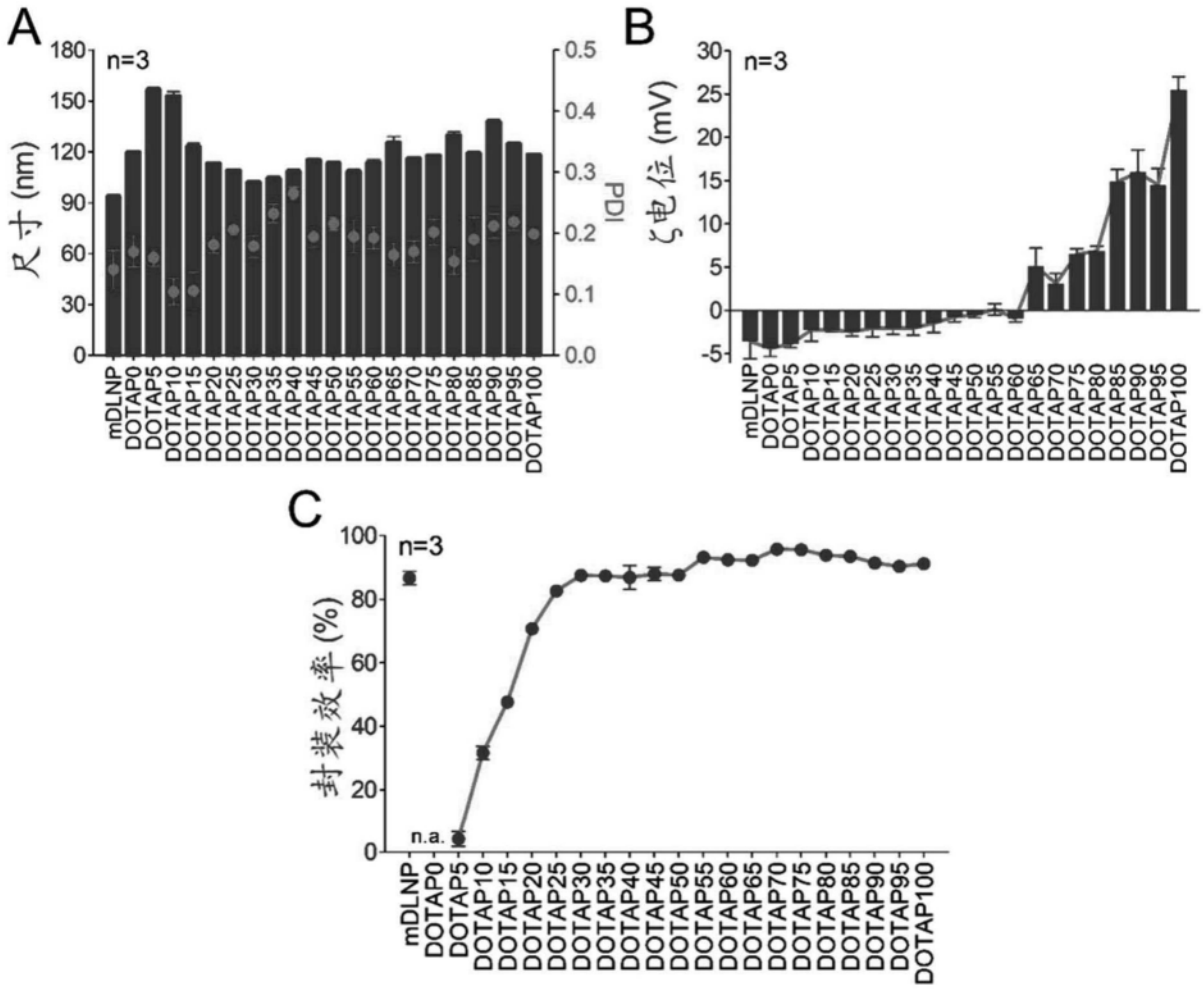
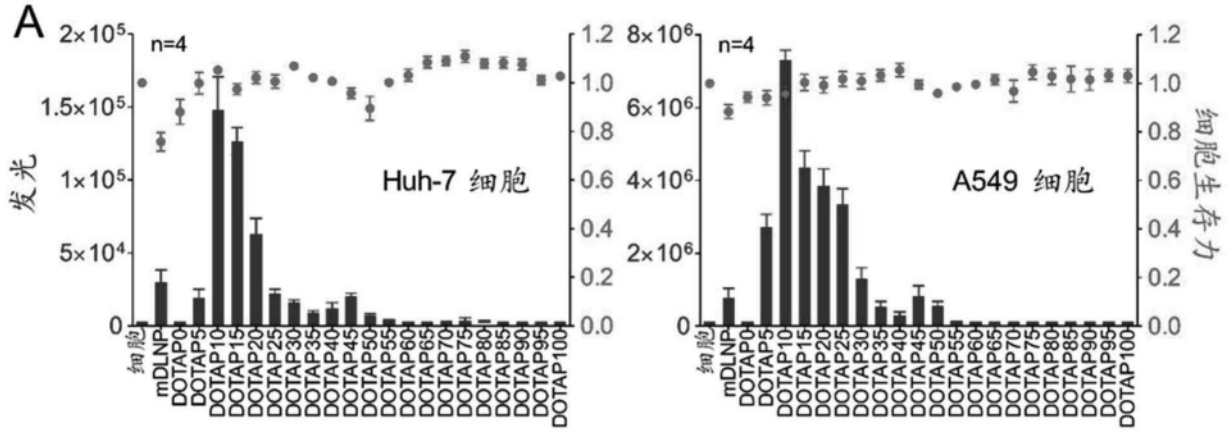

A
n=3
尺寸 (nm)
PDI
B
n=3
ζ电位 (mV)
C
n=3
封装效率 (%)
n.a.
mDLNP
DOTAP0
DOTAP5
DOTAP10
DOTAP15
DOTAP20
DOTAP25
DOTAP30
DOTAP35
DOTAP40
DOTAP45
DOTAP50
DOTAP55
DOTAP60
DOTAP65
DOTAP70
DOTAP75
DOTAP80
DOTAP85
DOTAP90
DOTAP95
DOTAP100

图5A-5C



B

名称	EtOH/PBS (Vol/Vol)	封装效率 (%)
DOTAP25-1/3	1/3	85.84
DOTAP25-1/5	1/5	85.90
DOTAP25-1/7.5	1/7.5	87.12
DOTAP25-1/10	1/10	85.58

名称	尺寸 (nm)	PDI
DOTAP25-1/3	122.75±1.82	0.15±0.03
DOTAP25-1/5	113.95±2.00	0.13±0.01
DOTAP25-1/7.5	127.60±2.45	0.17±0.04
DOTAP25-1/10	130.33±5.64	0.12±0.03

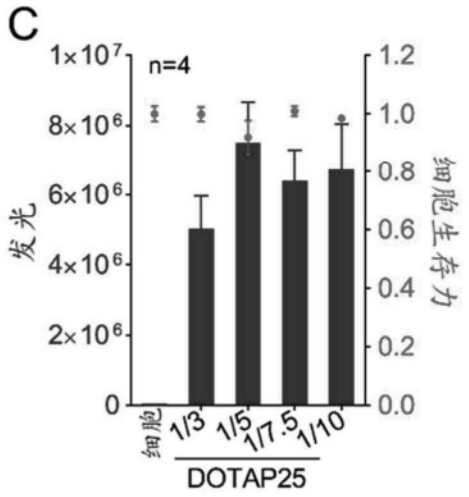


图6A-6C

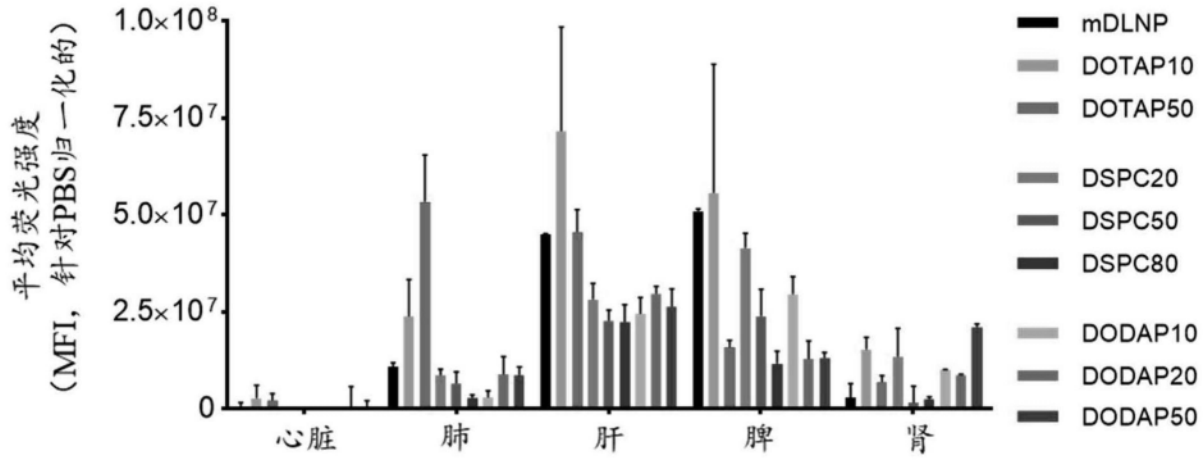


图7

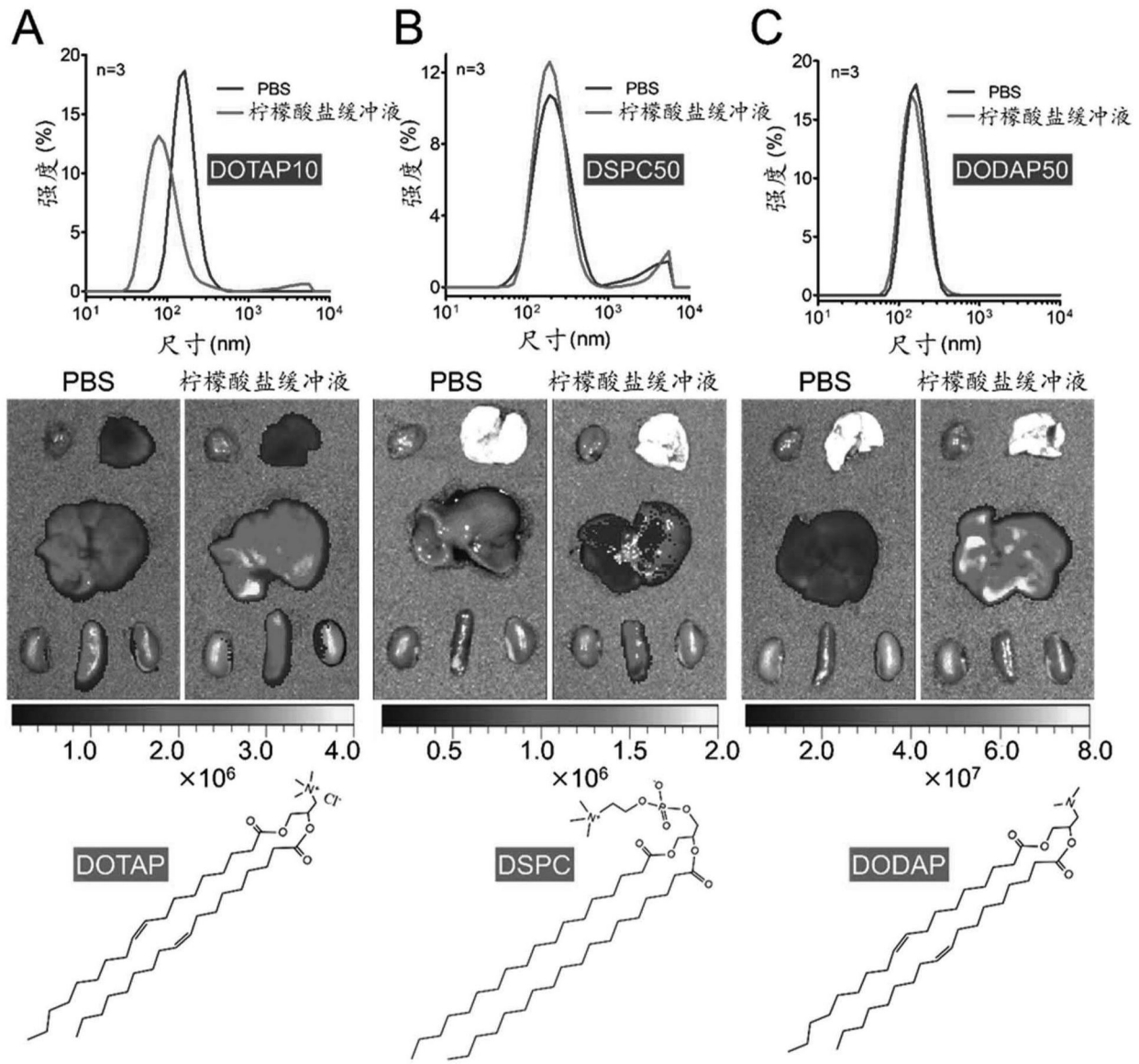

A
B
C
n=3
PBS
柠檬酸盐缓冲液
DOTAP10
DSPC50
DODAP50
强度(%)
尺寸(nm)
PBS
柠檬酸盐缓冲液
×10^6
×10^7
DOTAP
DSPC
DODAP

图8A-8C

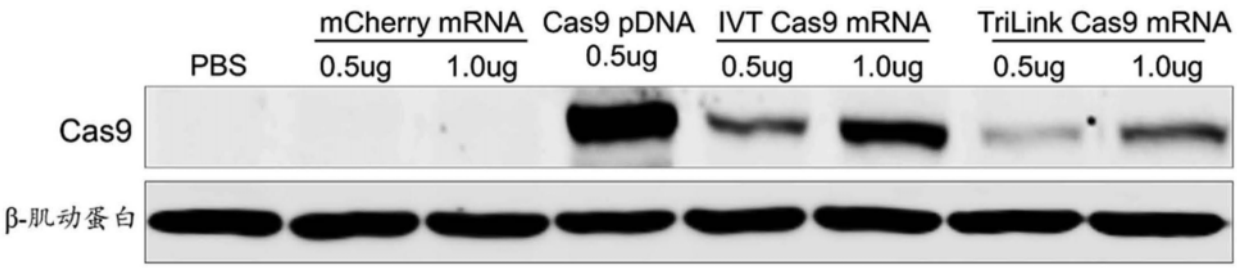

PBS
mCherry mRNA
0.5ug
1.0ug
Cas9 pDNA
0.5ug
IVT Cas9 mRNA
0.5ug
1.0ug
TriLink Cas9 mRNA
0.5ug
1.0ug
Cas9
β-肌动蛋白

图9

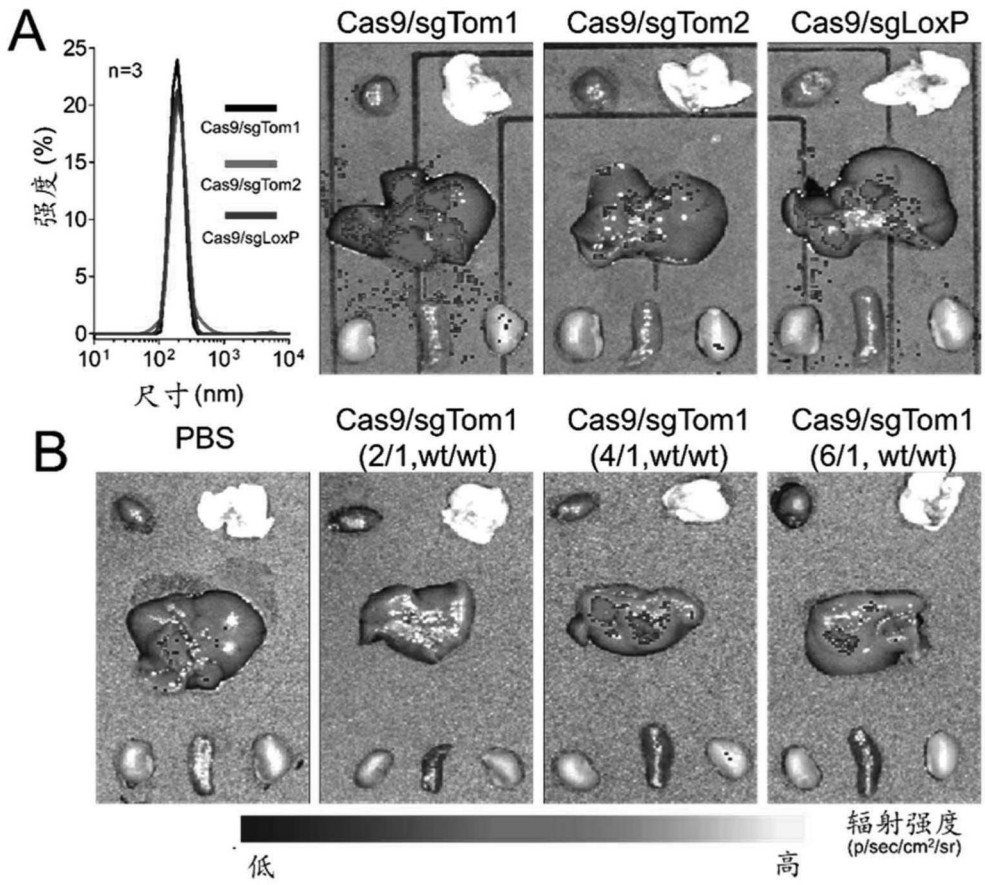

A
n=3
强度(%)
25
20
15
10
5
0
Cas9/sgTom1
Cas9/sgTom2
Cas9/sgLoxP
10^1 10^2 10^3 10^4
尺寸(nm)
Cas9/sgTom1
Cas9/sgTom2
Cas9/sgLoxP
B
PBS
Cas9/sgTom1 (2/1,wt/wt)
Cas9/sgTom1 (4/1,wt/wt)
Cas9/sgTom1 (6/1, wt/wt)
低
高
辐射强度 (p/sec/cm²/sr)

图10A-10B

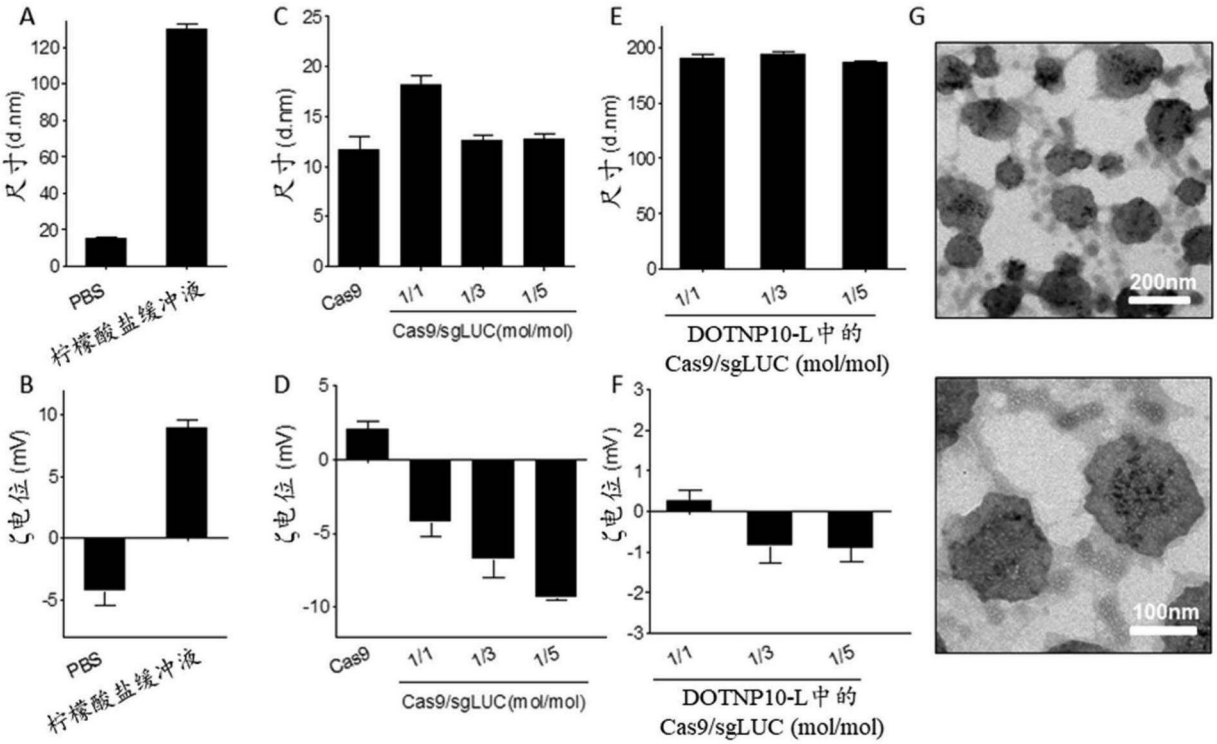

A
尺寸(d.nm)
PBS
柠檬酸盐缓冲液
B
ζ电位 (mV)
C
Cas9
1/1
1/3
1/5
Cas9/sgLUC(mol/mol)
D
E
DOTNP10-L中的
Cas9/sgLUC (mol/mol)
F
G
200nm
100nm

图11A-11G

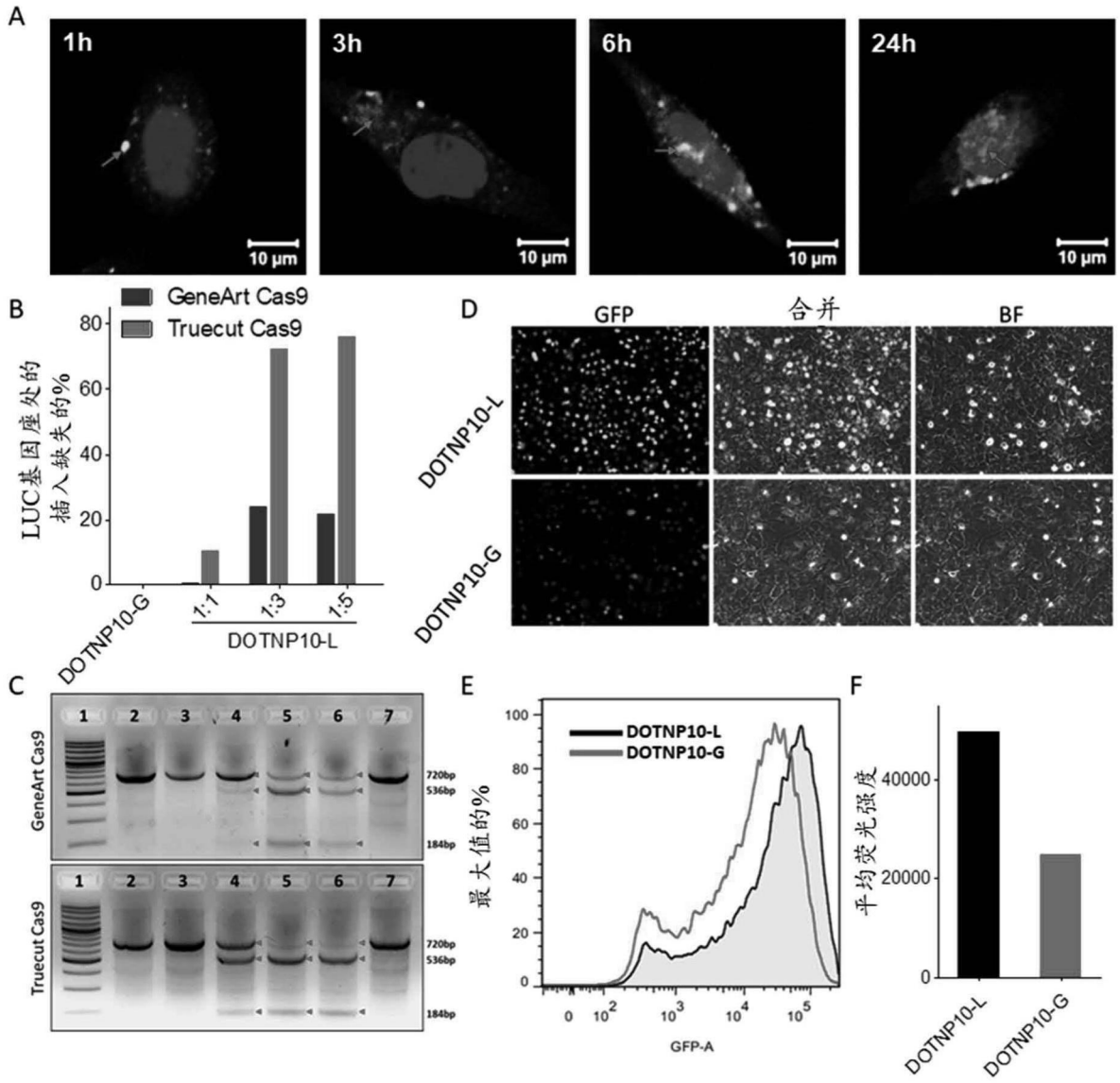

A
1h
3h
6h
24h
10 μm
B
GeneArt Cas9
Truecut Cas9
LUC基因座处的插入缺失的%
DOTNP10-G
1:1
1:3
1:5
DOTNP10-L
C
GeneArt Cas9
Truecut Cas9
720bp
536bp
184bp
D
GFP
合并
BF
DOTNP10-L
DOTNP10-G
E
DOTNP10-L
DOTNP10-G
最大值的%
GFP-A
F
平均荧光强度
DOTNP10-L
DOTNP10-G

图12A-12F

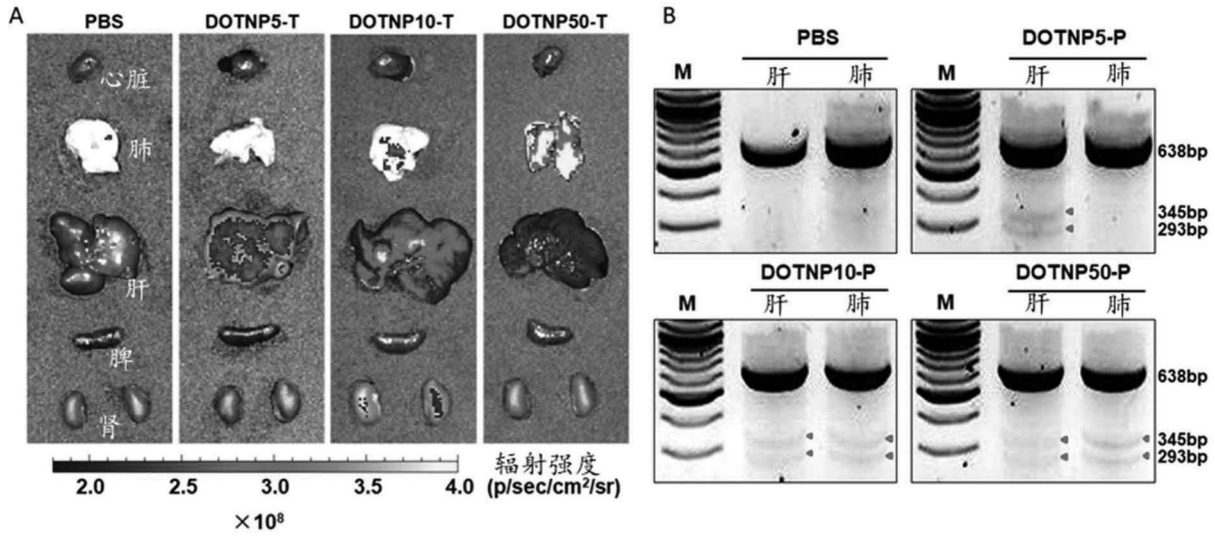
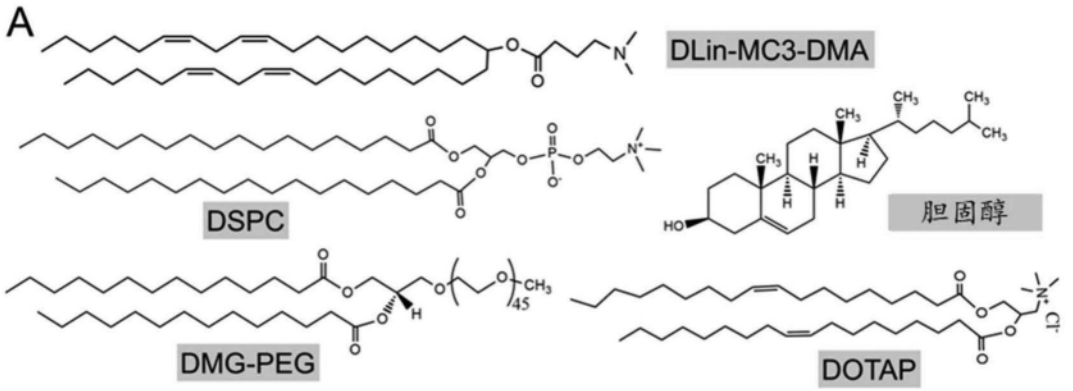


图13A-13B



B

名称	摩尔比					摩尔百分比(%)					脂质/mRNA (wt/wt)	尺寸 (nm)	PDI
	DLin-MC3-DMA	DSPC	Chol	DMG-PEG	DOTAP	DLin-MC3-DMA	DSPC	Chol	DMG-PEG	DOTAP			
MC3	50	10	38	2	0.00	50.00	10.00	38.00	2.00	0.00	20	142.88	0.13
DOTAP15 @MC3	50	10	38	2	17.65	42.50	8.50	32.30	1.70	15.00	20	190.4	0.22
DOTAP50 @MC3	50	10	38	2	100	25.00	5.00	19.00	1.00	50.00	20	115.78	0.15

图14A-14B

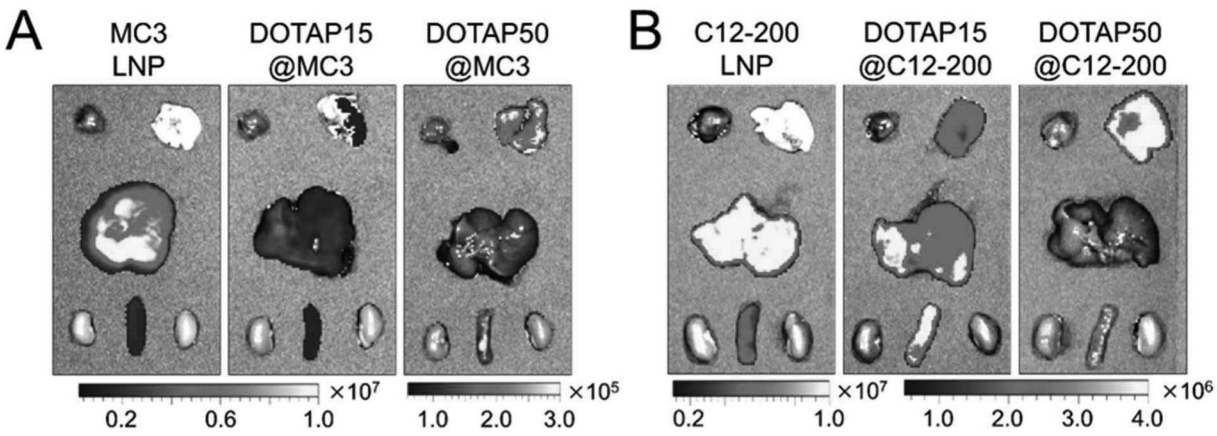
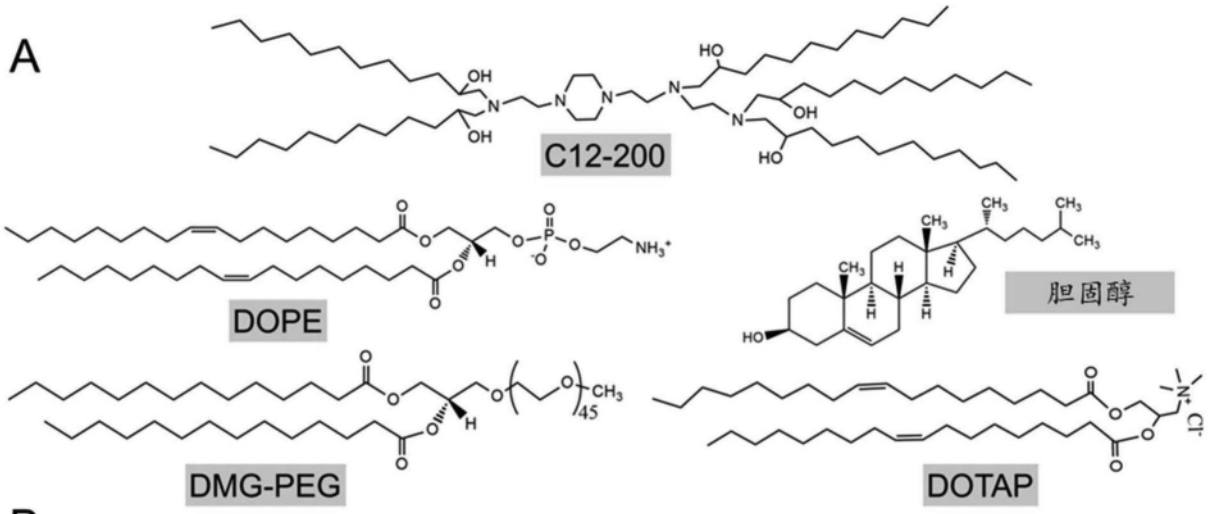


图15A-15B



名称	摩尔比					摩尔百分比(%)					脂质/mRNA (wt/wt)	尺寸 (nm)	PDI
	C12-200	DOPE	Chol	DMG-PEG	DOTAP	C12-200	DOPE	Chol	DMG-PEG	DOTAP			
C12-200	35	16	46.5	2.5	0	35	16	46.5	2.5	0.00	20	145.2	0.11
DOTAP15 @C12-200	35	16	46.5	2.5	17.65	29.75	13.60	39.52	2.12	15.00	20	138.1	0.09
DOTAP50 @C12-200	35	16	46.5	2.5	100	17.5	8	23.25	1.25	50.00	20	112.9	0.13

图16A-16B

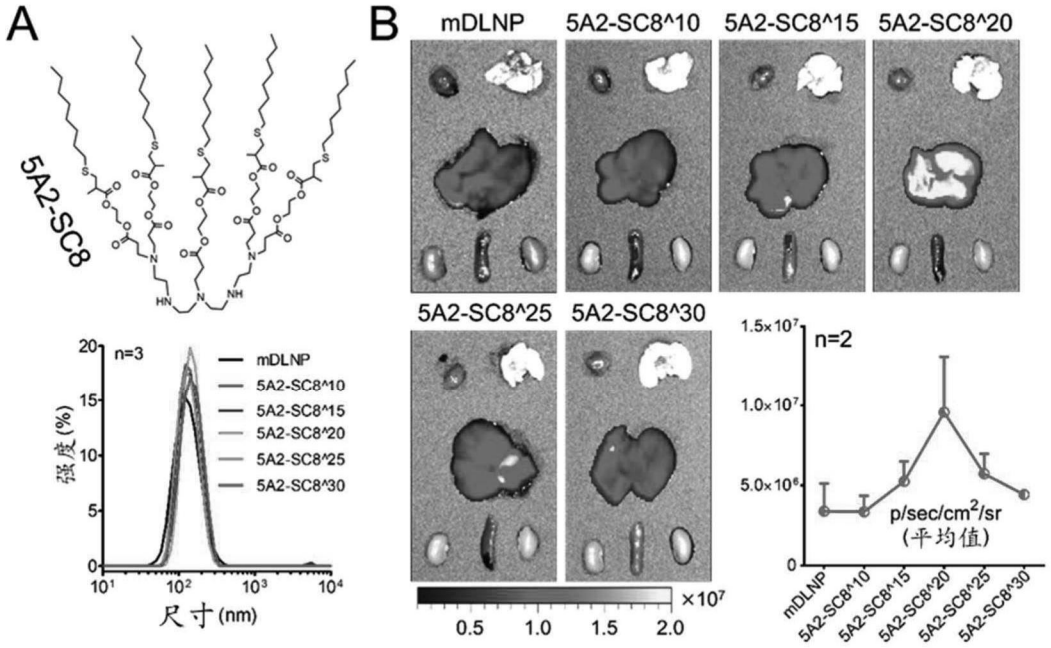

A
5A2-SC8
n=3
mDLNP
5A2-SC8^10
5A2-SC8^15
5A2-SC8^20
5A2-SC8^25
5A2-SC8^30
强度(%)
尺寸(nm)
B
mDLNP
5A2-SC8^10
5A2-SC8^15
5A2-SC8^20
5A2-SC8^25
5A2-SC8^30
×10^7
0.5
1.0
1.5
2.0
n=2
p/sec/cm²/sr
(平均值)

图17A-17B

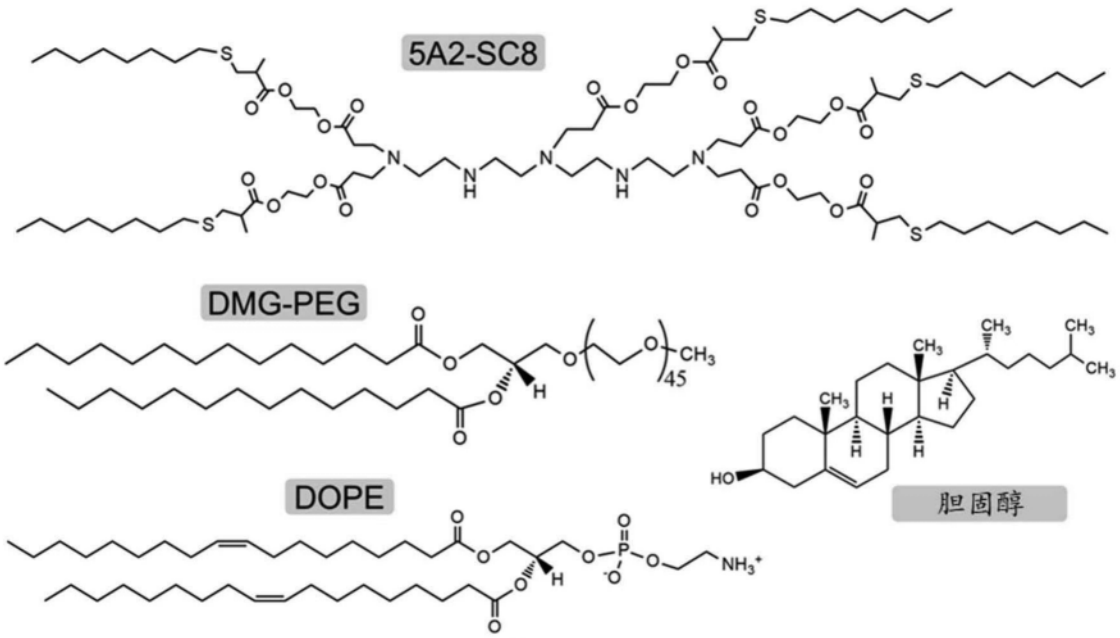
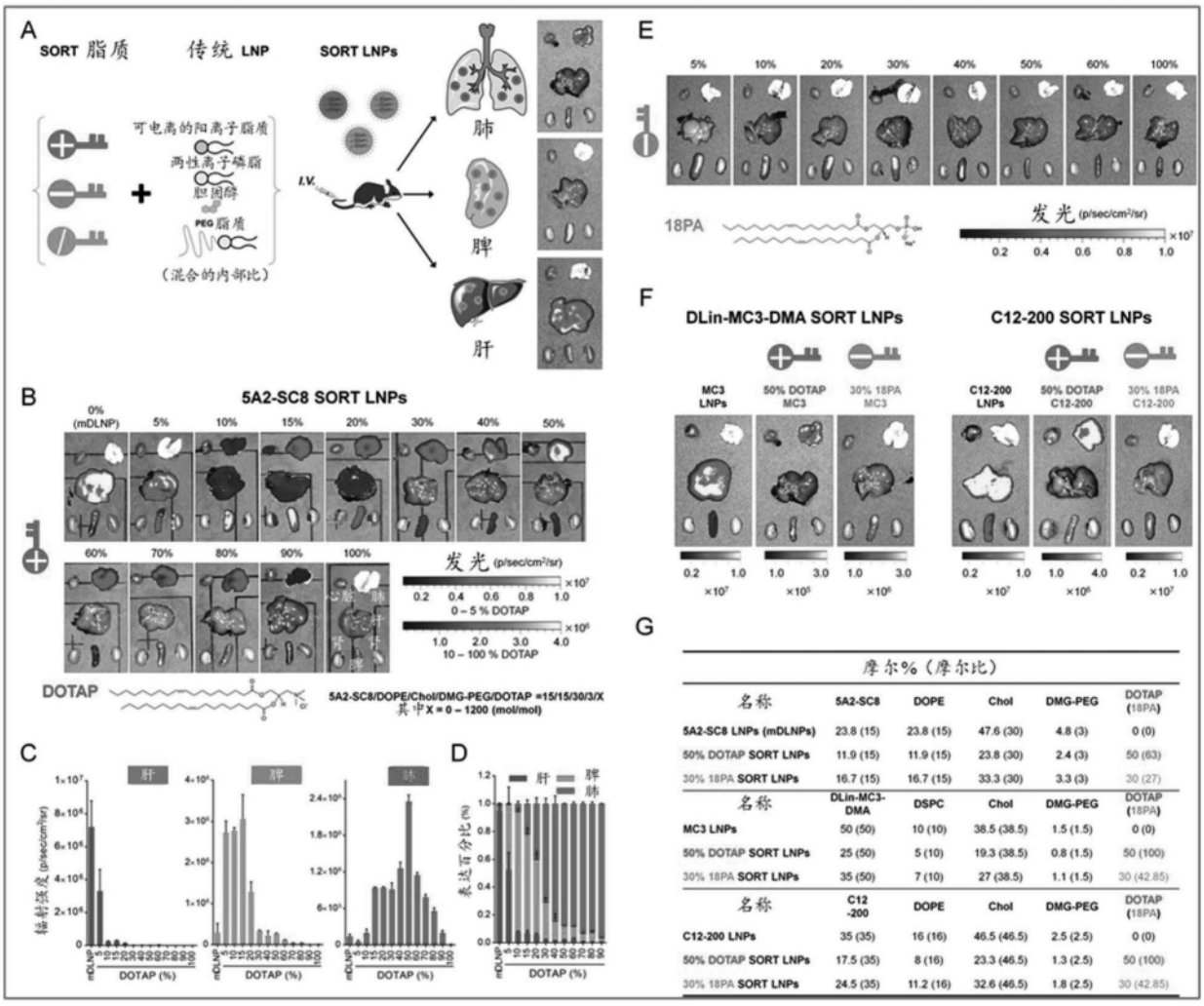

5A2-SC8
DMG-PEG
DOPE
胆固醇

图18



G

摩尔%（摩尔比）

名称	5A2-SC8	DOPE	Chol	DMG-PEG	DOTAP (18PA)
5A2-SC8 LNPs (mDLNPs)	23.8 (15)	23.8 (15)	47.6 (30)	4.8 (3)	0 (0)
50% DOTAP SORT LNPs	11.9 (15)	11.9 (15)	23.8 (30)	2.4 (3)	50 (63)
30% 18PA SORT LNPs	16.7 (15)	16.7 (15)	33.3 (30)	3.3 (3)	30 (27)

名称	DLin-MC3-DMA	DSPC	Chol	DMG-PEG	DOTAP (18PA)
MC3 LNPs	50 (50)	10 (10)	38.5 (38.5)	1.5 (1.5)	0 (0)
50% DOTAP SORT LNPs	25 (50)	5 (10)	19.3 (38.5)	0.8 (1.5)	50 (100)
30% 18PA SORT LNPs	35 (50)	7 (10)	27 (38.5)	1.1 (1.5)	30 (42.85)

名称	C12 -200	DOPE	Chol	DMG-PEG	DOTAP (18PA)
C12-200 LNPs	35 (35)	16 (16)	46.5 (46.5)	2.5 (2.5)	0 (0)
50% DOTAP SORT LNPs	17.5 (35)	8 (16)	23.3 (46.5)	1.3 (2.5)	50 (100)
30% 18PA SORT LNPs	24.5 (35)	11.2 (16)	32.6 (46.5)	1.8 (2.5)	30 (42.85)

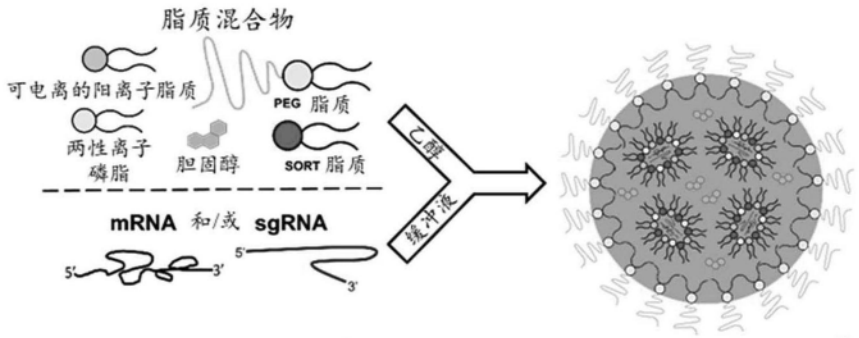
图19A-19G

A

名称	摩尔比					摩尔百分比(%)					总脂质/mRNA (wt/wt)	尺寸 (nm)	PDI	ζ电位 (mV)
	5A2-SC8	DOPE	Chol	DMG-PEG	DOTAP	5A2-SC8	DOPE	Chol	DMG-PEG	DOTAP				
0% (mDLNP)	15	15	30	3	0	23.81	23.81	47.62	4.76	0	40	93.2	0.14	-3.58
5%	15	15	30	3	3.315	22.62	22.62	45.24	4.52	5	40	156.3	0.16	-3.86
10%	15	15	30	3	7	21.43	21.43	42.86	4.29	10	40	152.8	0.10	-2.28
15%	15	15	30	3	11.12	20.24	20.24	40.47	4.05	15	40	123.0	0.11	-2.28
20%	15	15	30	3	15.75	19.05	19.05	38.10	3.81	20	40	113.0	0.18	-2.44
25%	15	15	30	3	21	17.86	17.86	35.71	3.57	25	40	108.8	0.21	-2.07
30%	15	15	30	3	27	16.67	16.67	33.33	3.33	30	40	101.6	0.18	-2.07
35%	15	15	30	3	33.93	15.48	15.48	30.95	3.10	35	40	104.0	0.23	-2.03
40%	15	15	30	3	42	14.29	14.29	28.57	2.86	40	40	108.0	0.27	-1.45
45%	15	15	30	3	51.54	13.10	13.10	26.19	2.62	45	40	115.1	0.19	-0.74
50%	15	15	30	3	63	11.90	11.90	23.81	2.38	50	40	113.1	0.22	-0.52
55%	15	15	30	3	77	10.71	10.71	21.43	2.14	55	40	108.3	0.19	0.13
60%	15	15	30	3	94.5	9.52	9.52	19.05	1.90	60	40	113.5	0.19	-0.94
65%	15	15	30	3	117	8.33	8.33	16.67	1.67	65	40	125.3	0.16	5.13
70%	15	15	30	3	147	7.14	7.14	14.29	1.43	70	40	115.8	0.17	3.11
75%	15	15	30	3	188.95	5.95	5.95	11.91	1.19	75	40	117.7	0.20	6.50
80%	15	15	30	3	252	4.76	4.76	9.52	0.95	80	40	129.7	0.15	6.86
85%	15	15	30	3	357	3.57	3.57	7.14	0.71	85	40	119.1	0.19	14.87
90%	15	15	30	3	567	2.38	2.38	4.76	0.48	90	40	137.6	0.21	15.97
95%	15	15	30	3	1198	1.19	1.19	2.38	0.24	95	40	124.5	0.22	14.50
100%	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	40	118.2	0.20	25.50

名称	5A2-SC8	DOPE	Chol	DMG-PEG	18PA	5A2-SC8	DOPE	Chol	DMG-PEG	18PA	总脂质/mRNA (wt/wt)	尺寸 (nm)	PDI	ζ电位 (mV)
5%	15	15	30	3	3.315	22.62	22.62	45.24	4.52	5	40	95.2	0.13	-1.88
10%	15	15	30	3	7	21.43	21.43	42.86	4.29	10	40	102.7	0.13	-1.55
20%	15	15	30	3	15.75	19.05	19.05	38.10	3.81	20	40	116.6	0.07	-1.74
30%	15	15	30	3	27	16.67	16.67	33.33	3.33	30	40	142.1	0.13	-2.11
40%	15	15	30	3	42	14.29	14.29	28.57	2.86	40	40	165.2	0.14	-5.57
50%	15	15	30	3	63	11.90	11.90	23.81	2.38	50	40	142.4	0.16	-3.07
60%	15	15	30	3	94.5	9.52	9.52	19.05	1.90	60	40	141.0	0.11	-4.60
100%	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	40	73.3	0.53	-38.87

B



C

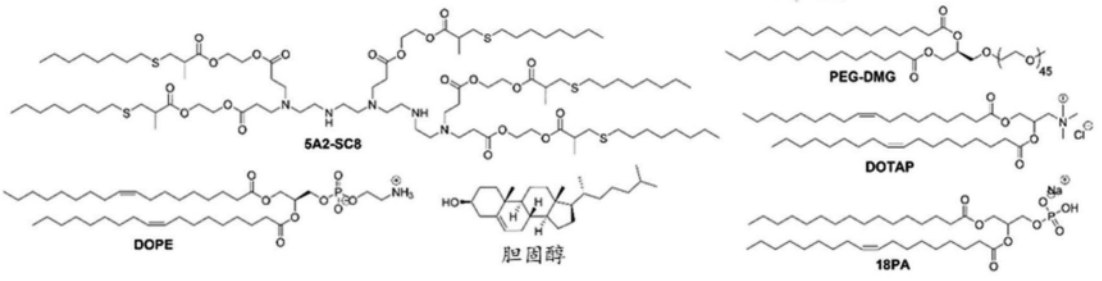


图20A-20C

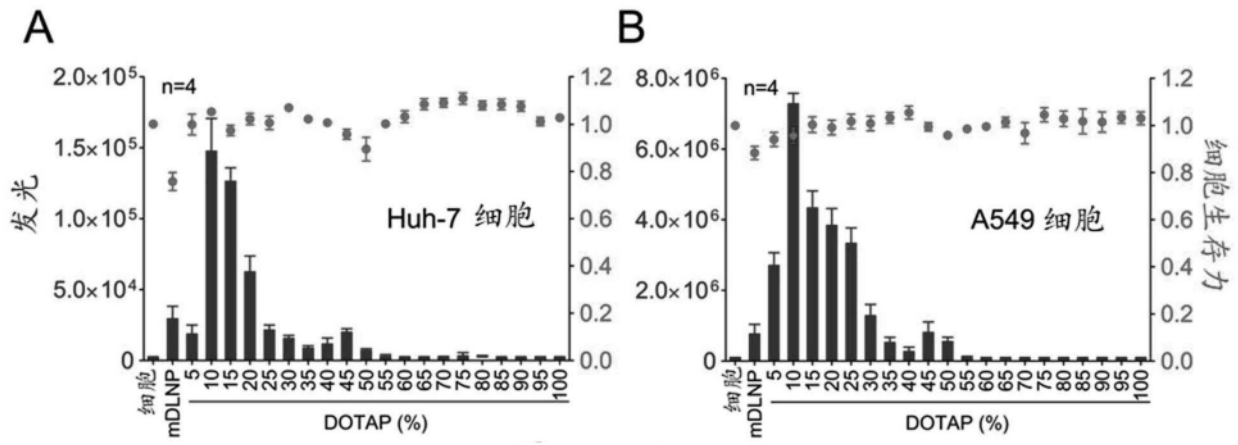
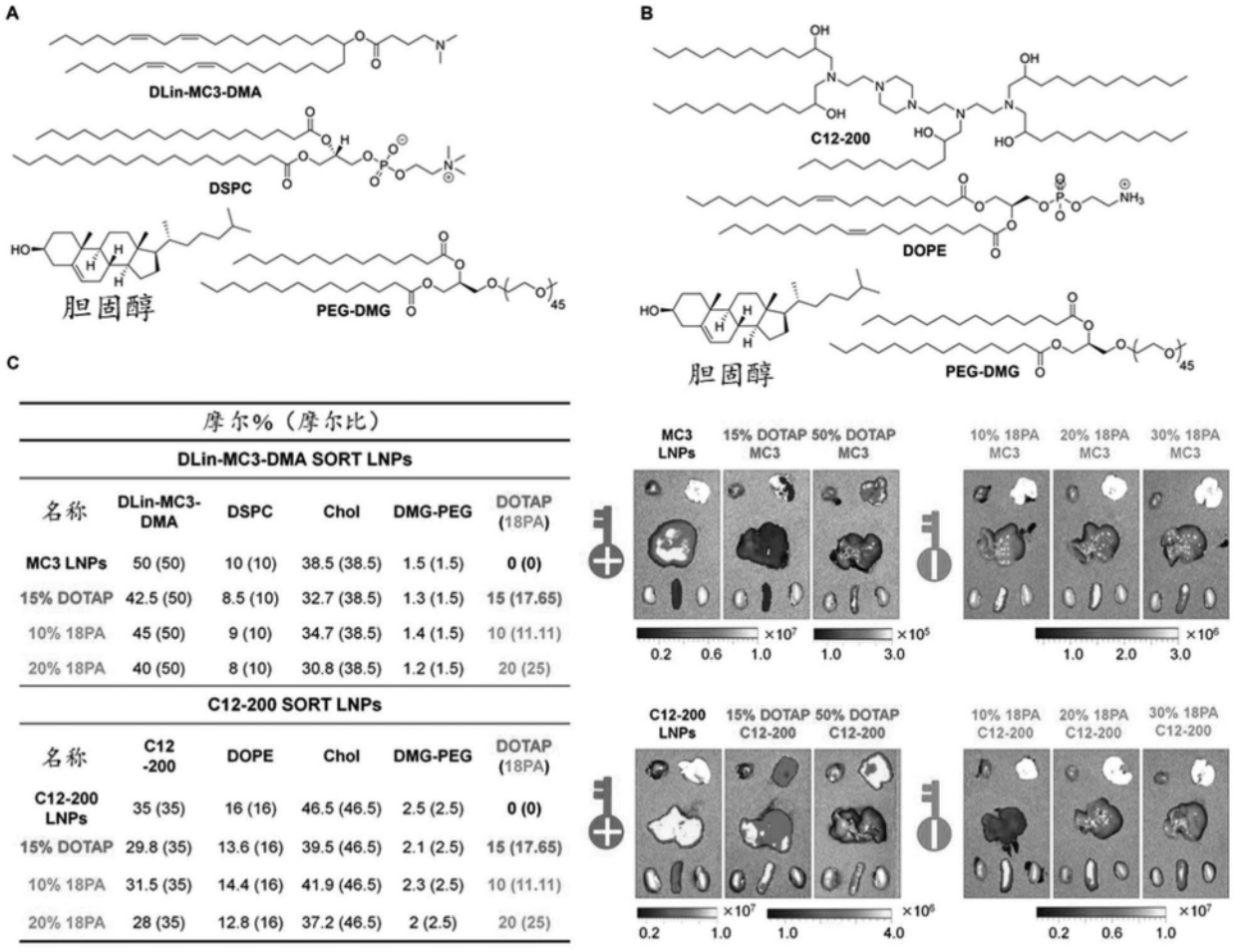


图21A-21B



摩尔%（摩尔比）

DLin-MC3-DMA SORT LNPs

名称	DLin-MC3-DMA	DSPC	Chol	DMG-PEG	DOTAP (18PA)
MC3 LNPs	50 (50)	10 (10)	38.5 (38.5)	1.5 (1.5)	0 (0)
15% DOTAP	42.5 (50)	8.5 (10)	32.7 (38.5)	1.3 (1.5)	15 (17.65)
10% 18PA	45 (50)	9 (10)	34.7 (38.5)	1.4 (1.5)	10 (11.11)
20% 18PA	40 (50)	8 (10)	30.8 (38.5)	1.2 (1.5)	20 (25)

C12-200 SORT LNPs

名称	C12 -200	DOPE	Chol	DMG-PEG	DOTAP (18PA)
C12-200 LNPs	35 (35)	16 (16)	46.5 (46.5)	2.5 (2.5)	0 (0)
15% DOTAP	29.8 (35)	13.6 (16)	39.5 (46.5)	2.1 (2.5)	15 (17.65)
10% 18PA	31.5 (35)	14.4 (16)	41.9 (46.5)	2.3 (2.5)	10 (11.11)
20% 18PA	28 (35)	12.8 (16)	37.2 (46.5)	2 (2.5)	20 (25)

图22A-22C

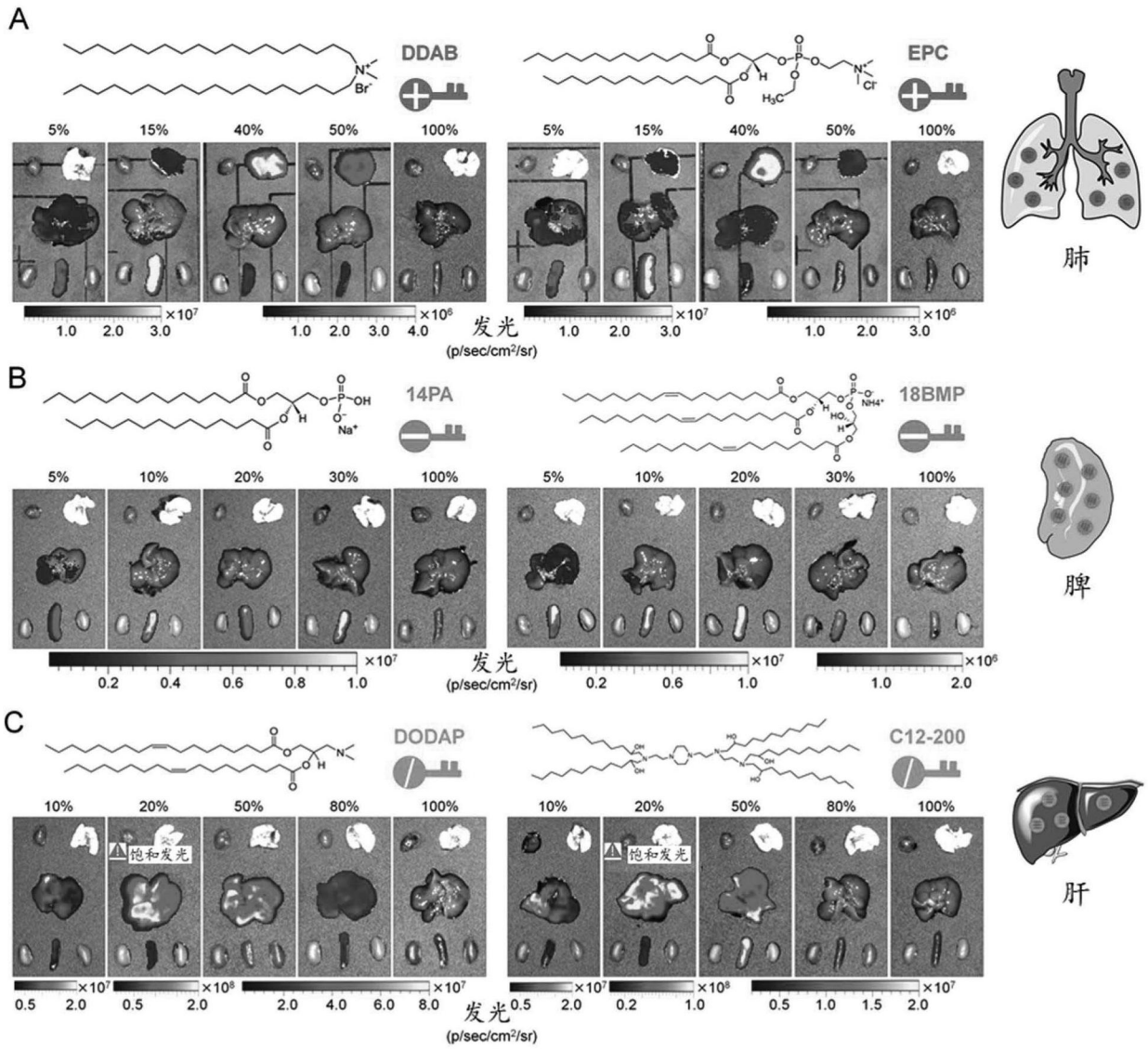

A
DDAB
EPC
5%
15%
40%
50%
100%
×10⁷
×10⁶
1.0 2.0 3.0
1.0 2.0 3.0 4.0
发光
(p/sec/cm²/sr)
肺
B
14PA
18BMP
5%
10%
20%
30%
100%
×10⁷
×10⁶
0.2 0.4 0.6 0.8 1.0
0.2 0.6 1.0
1.0 2.0
发光
(p/sec/cm²/sr)
脾
C
DODAP
C12-200
10%
20%
50%
80%
100%
饱和发光
×10⁷
×10⁸
0.5 2.0
0.5 2.0
2.0 4.0 6.0 8.0
0.2 1.0
0.5 1.0 1.5 2.0
发光
(p/sec/cm²/sr)
肝

图23A-23C

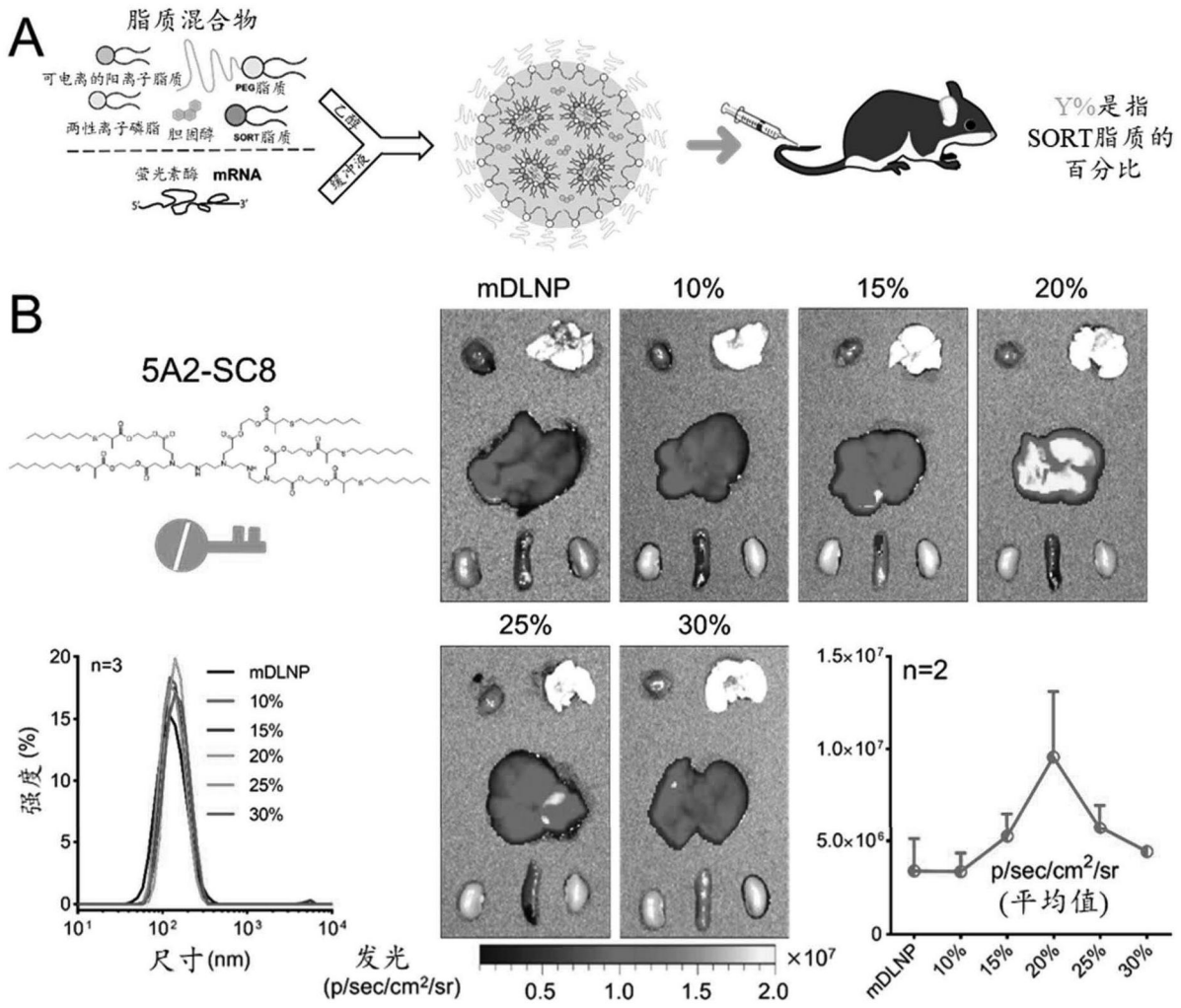

A
脂质混合物
可电离的阳离子脂质
PEG脂质
两性离子磷脂
胆固醇
SORT脂质
萤光素酶 mRNA
乙醇
缓冲液
Y%是指
SORT脂质的
百分比
B
5A2-SC8
mDLNP
10%
15%
20%
25%
30%
n=3
mDLNP
10%
15%
20%
25%
30%
强度(%)
尺寸(nm)
发光
(p/sec/cm²/sr)
×10⁷
n=2
p/sec/cm²/sr
(平均值)

图24A-24B

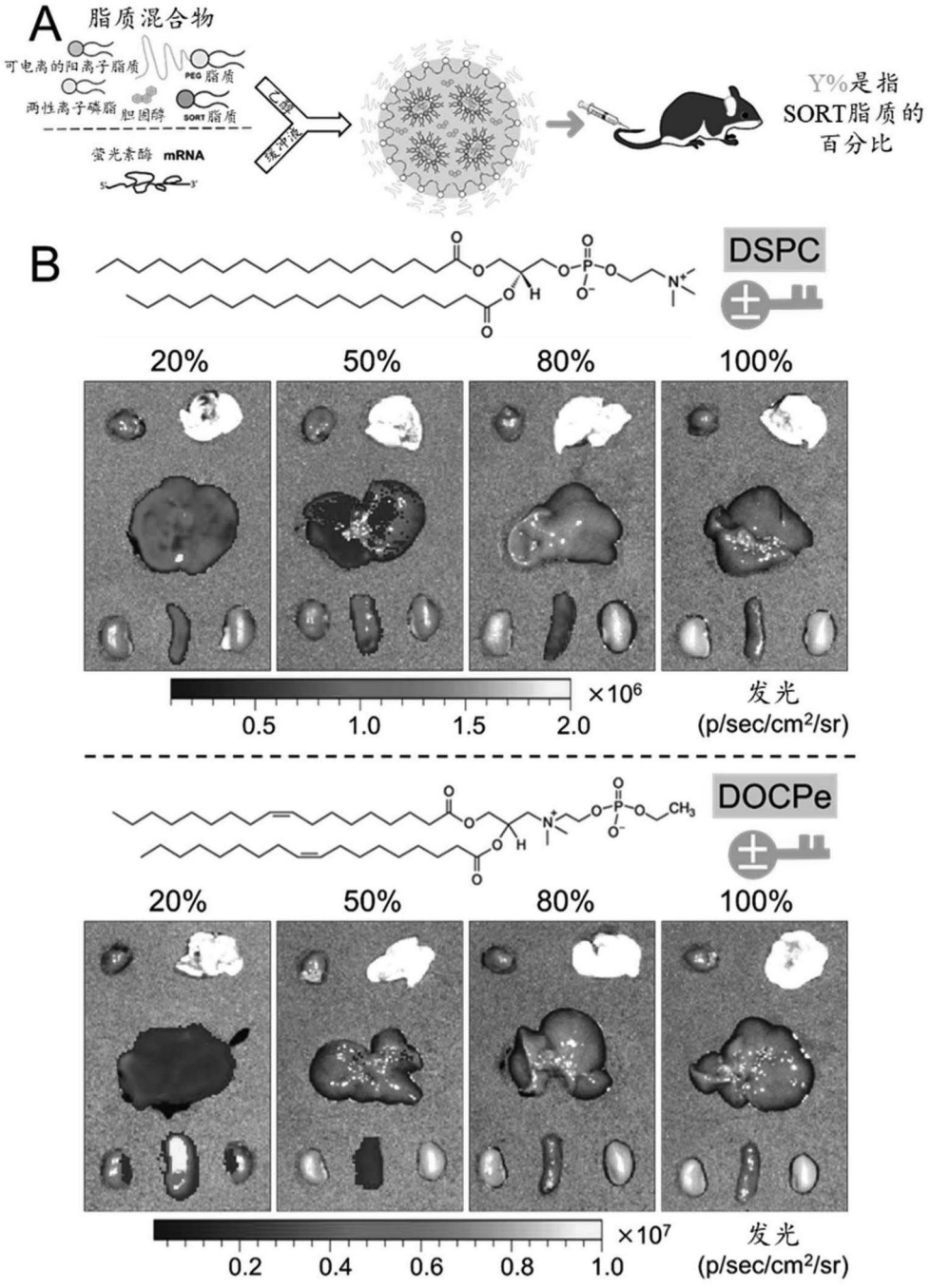
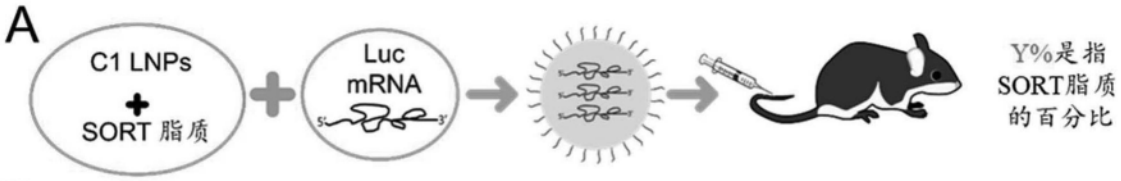

A
脂质混合物
可电离的阳离子脂质
PEG 脂质
两性离子磷脂
胆固醇
SORT 脂质
萤光素酶 mRNA
乙醇
缓冲液
Y%是指
SORT脂质的
百分比
B
DSPC
20%
50%
80%
100%
×10^6
0.5
1.0
1.5
2.0
发光
(p/sec/cm²/sr)
DOCPe
20%
50%
80%
100%
×10^7
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
发光
(p/sec/cm²/sr)

图25A-25B

A



B

名称	摩尔比					摩尔百分比(%)					脂质/mRNA (wt/wt)	尺寸 (nm)	PDI
	5A2-SC8	DSPC	Chol	DMG-PEG	DODAP (DOTAP)	5A2-SC8	DSPC	Chol	DMG-PEG	DODAP (DOTAP)			
C1 LNPs	10	60	26	4	0	10.0	60.0	26.0	4.0	0.0	40	181.4	0.31
10% DODAP C1	10	60	26	4	11.11	9.0	54.0	23.4	3.6	10.0	40	169.3	0.25
20% DODAP C1	10	60	26	4	25	8.0	48.0	20.8	3.2	20.0	40	155.1	0.23
30% DODAP C1	10	60	26	4	42.85	7.0	42.0	18.2	2.8	30.0	40	148.7	0.25
10% DOTAP C1	10	60	26	4	11.11	9.0	54.0	23.4	3.6	10.0	40	239.0	0.40
20% DOTAP C1	10	60	26	4	25	8.0	48.0	20.8	3.2	20.0	40	149.2	0.31
30% DOTAP C1	10	60	26	4	42.85	7.0	42.0	18.2	2.8	30.0	40	132.9	0.33

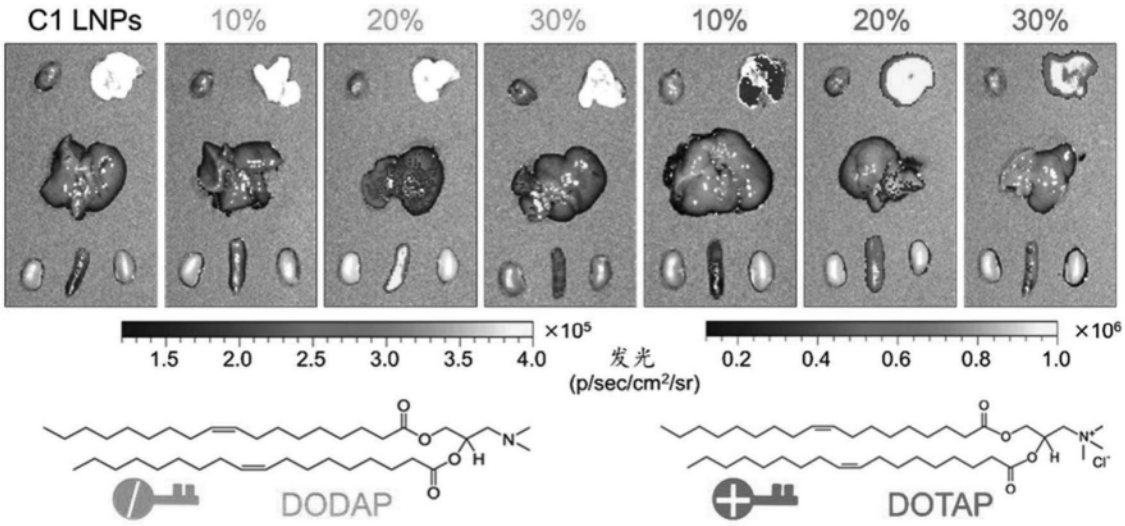
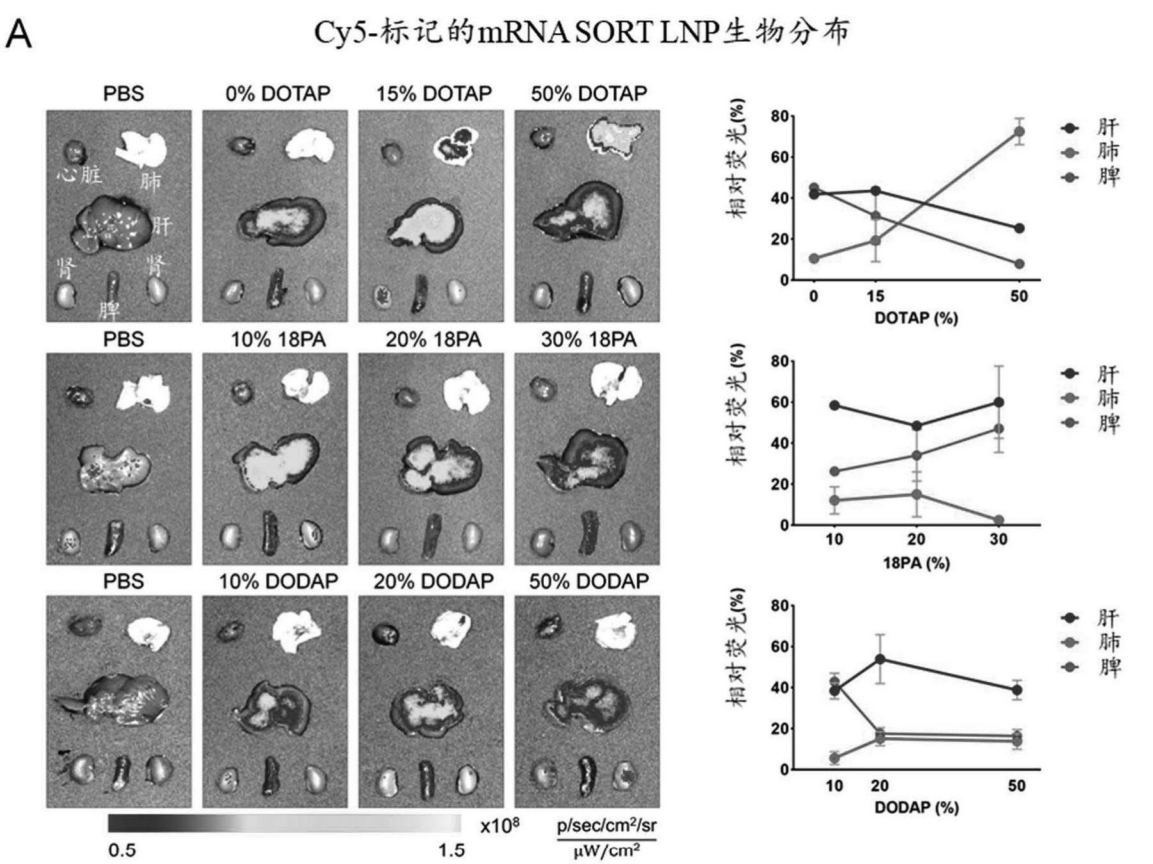


图26A-26B

A



B

pKa与组织特异性效力的关联

蛋白表达	评分
仅肝	1.0
肝和脾，大多数肝	1.25
肝和脾，大多数脾	1.75
仅脾	2.0
脾和肺，大多数脾	2.25
脾和肺，大多数肺	2.75
仅肺	3.0
如果三个器官，分析主要两个	--

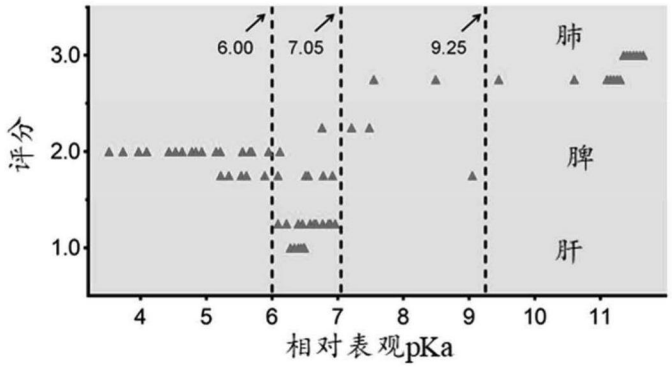


图27A-27B

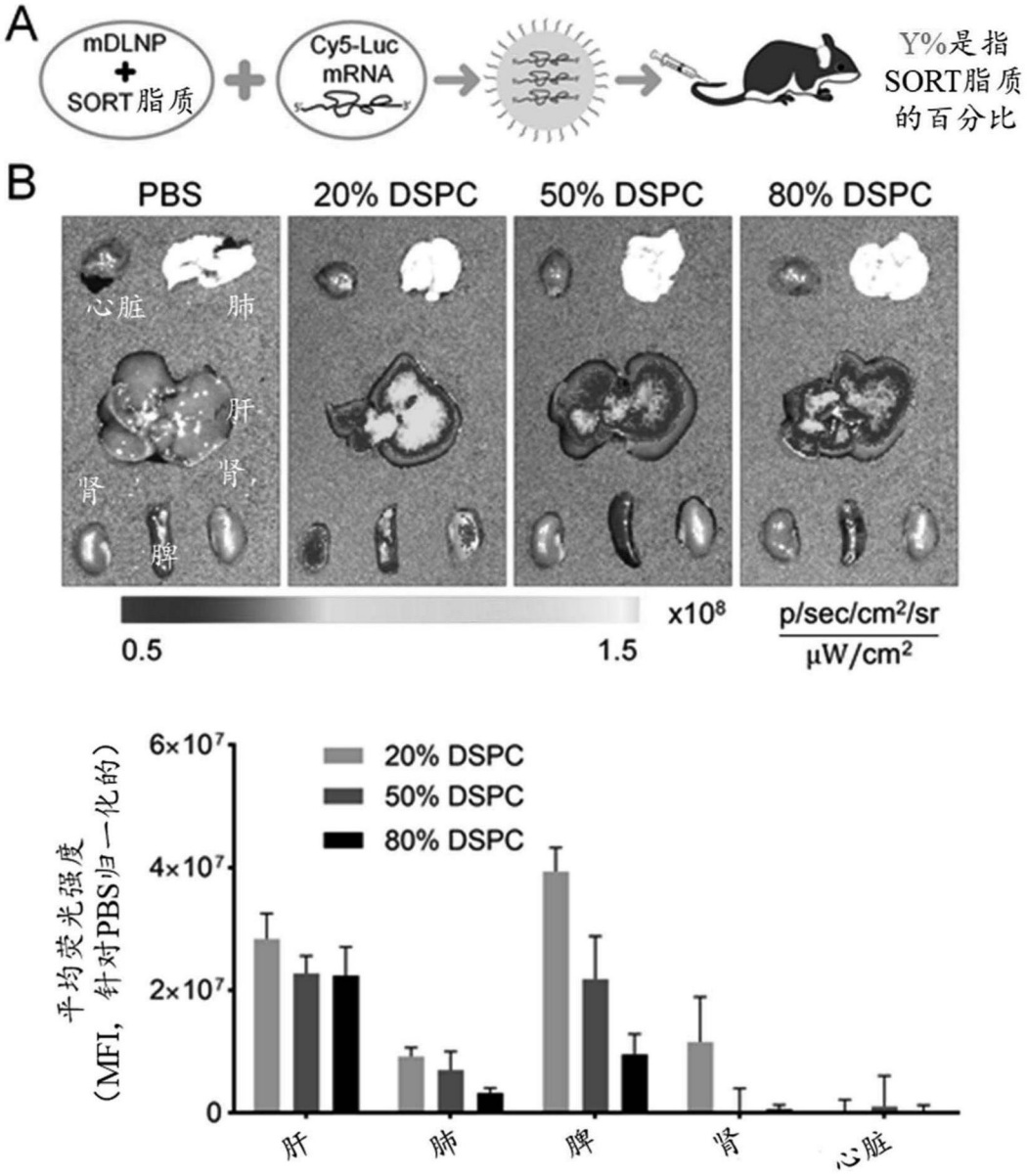

A
mDLNP
+
SORT脂质
Cy5-Luc
mRNA
Y%是指
SORT脂质
的百分比
B
PBS
20% DSPC
50% DSPC
80% DSPC
心脏
肺
肝
肾
肾
脾
x10⁸
0.5
1.5
p/sec/cm²/sr
μW/cm²
平均荧光强度
（MFI，针对PBS归一化的）
6×10⁷
4×10⁷
2×10⁷
0
20% DSPC
50% DSPC
80% DSPC
肝
肺
脾
肾
心脏

图28A-28B

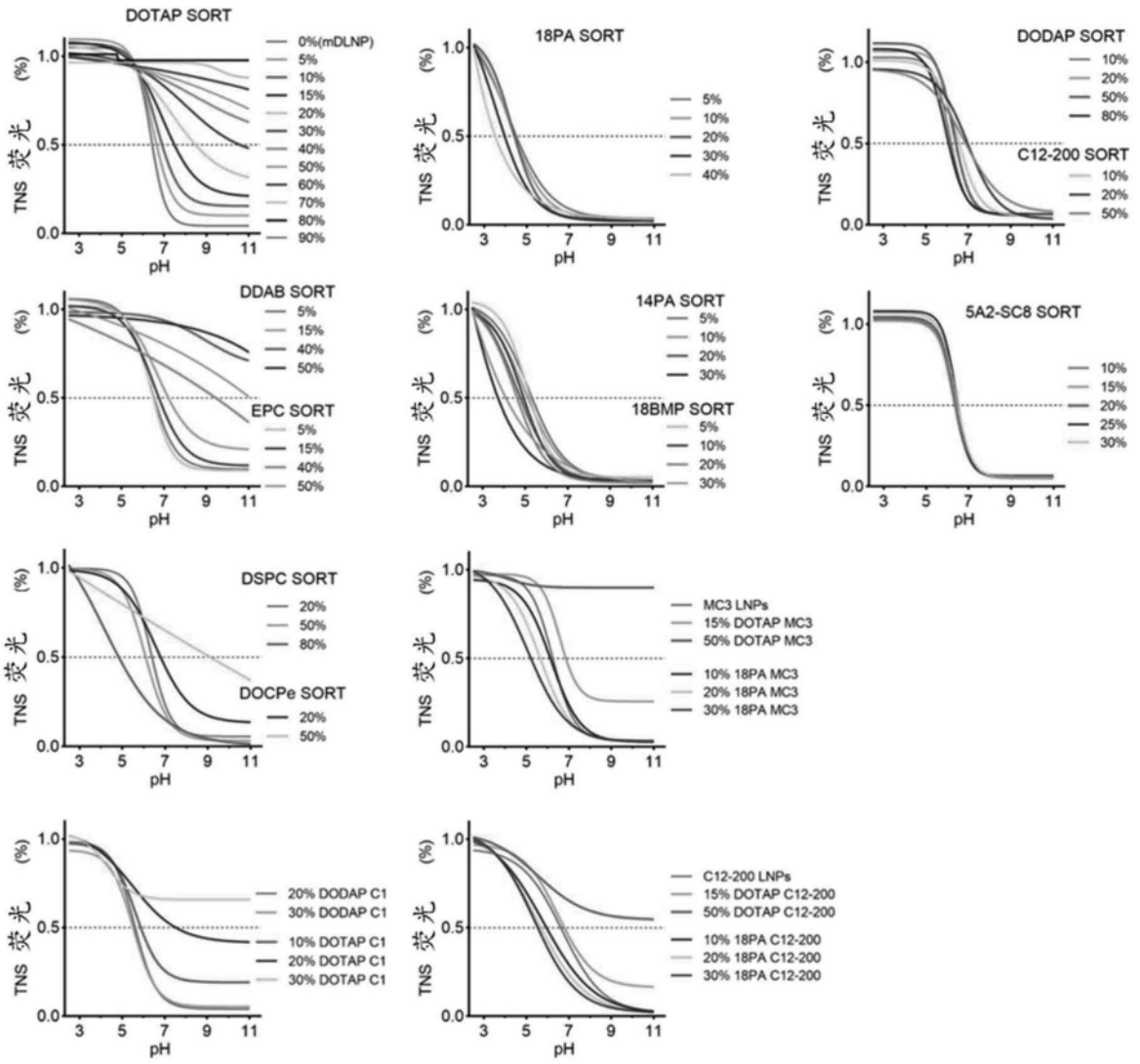
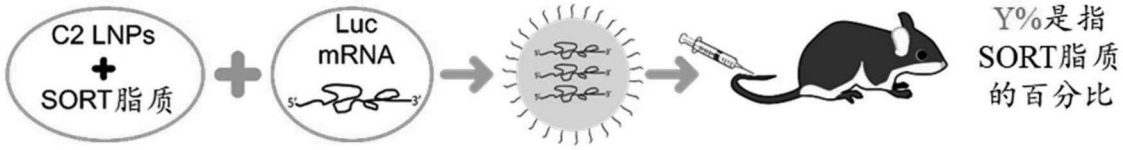

DOTAP SORT
0%(mDLNP)
5%
10%
15%
20%
30%
40%
50%
60%
70%
80%
90%
18PA SORT
5%
10%
20%
30%
40%
DODAP SORT
10%
20%
50%
80%
C12-200 SORT
10%
20%
50%
DDAB SORT
5%
15%
40%
50%
EPC SORT
5%
15%
40%
50%
14PA SORT
5%
10%
20%
30%
18BMP SORT
5%
10%
20%
30%
5A2-SC8 SORT
10%
15%
20%
25%
30%
DSPC SORT
20%
50%
80%
DOCPe SORT
20%
50%
MC3 LNPs
15% DOTAP MC3
50% DOTAP MC3
10% 18PA MC3
20% 18PA MC3
30% 18PA MC3
20% DODAP C1
30% DODAP C1
10% DOTAP C1
20% DOTAP C1
30% DOTAP C1
C12-200 LNPs
15% DOTAP C12-200
50% DOTAP C12-200
10% 18PA C12-200
20% 18PA C12-200
30% 18PA C12-200
TNS 荧光 (%)
pH

图29

A



B

名称	摩尔比					摩尔百分比(%)					总脂质/mRNA (wt/wt)	尺寸 (nm)	PDI
	5A2-SC8	DOPE	Chol	DMG-PEG	DODAP (DOTAP)	5A2-SC8	DOPE	Chol	DMG-PEG	DODAP (DOTAP)			
C2 LNPs	0	15	30	3	0	0.00	31.25	62.50	6.25	0.00	40	85.5	0.14
20% DODAP C2	0	15	30	3	12	0.00	25.00	50.00	5.00	20.00	40	112.1	0.14
30% DODAP C2	0	15	30	3	20.57	0.00	21.88	43.75	4.38	30.00	40	122.9	0.14
40% DODAP C2	0	15	30	3	32	0.00	18.75	37.50	3.75	40.00	40	124.8	0.13
20% DOTAP C2	0	15	30	3	12	0.00	25.00	50.00	5.00	20.00	40	93.9	0.19
30% DOTAP C2	0	15	30	3	20.57	0.00	21.88	43.75	4.38	30.00	40	101.3	0.19
40% DOTAP C2	0	15	30	3	32	0.00	18.75	37.50	3.75	40.00	40	91.2	0.20

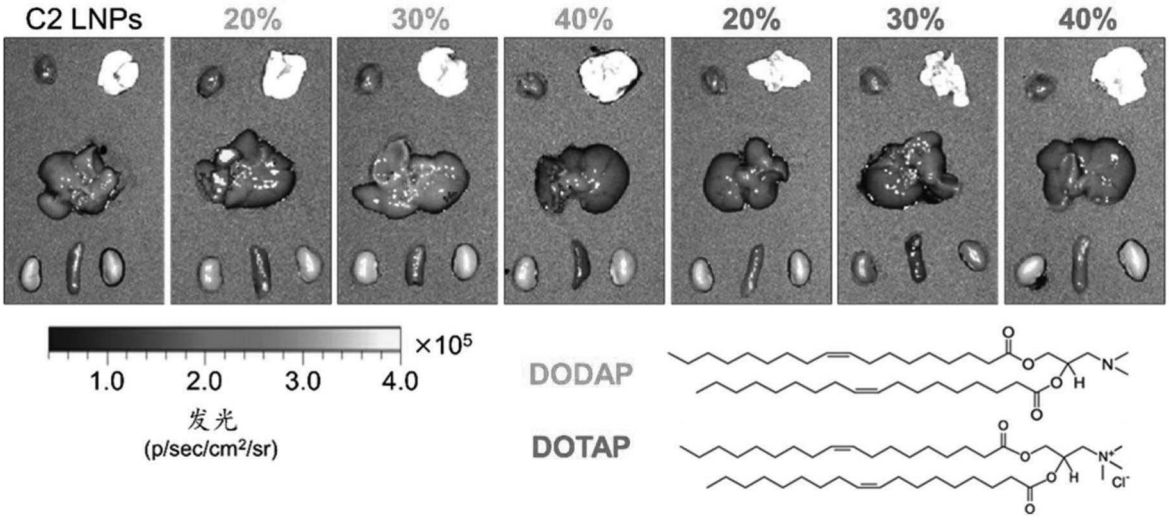


图30A-30B

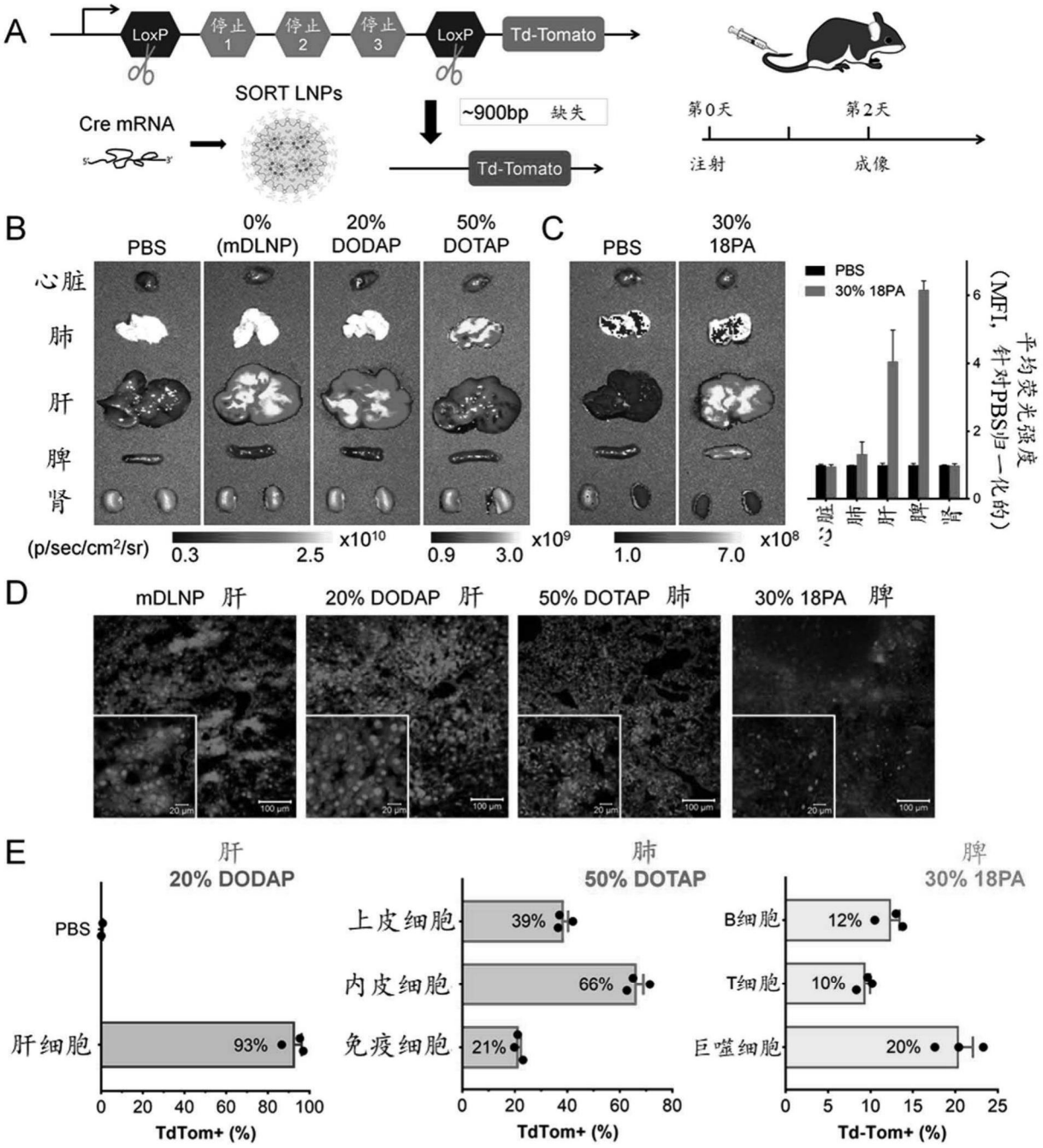

A
LoxP
停止 1
停止 2
停止 3
LoxP
Td-Tomato
SORT LNPs
Cre mRNA
~900bp 缺失
Td-Tomato
第0天
第2天
注射
成像
B
PBS
0% (mDLNP)
20% DODAP
50% DOTAP
心脏
肺
肝
脾
肾
(p/sec/cm²/sr)
0.3
2.5
x10¹⁰
0.9
3.0
x10⁹
C
PBS
30% 18PA
1.0
7.0
x10⁸
PBS
30% 18PA
平均荧光强度 (MFI，针对PBS归一化的)
D
mDLNP 肝
20% DODAP 肝
50% DOTAP 肺
30% 18PA 脾
E
肝
20% DODAP
PBS
肝细胞
93%
TdTom+ (%)
肺
50% DOTAP
上皮细胞
39%
内皮细胞
66%
免疫细胞
21%
TdTom+ (%)
脾
30% 18PA
B细胞
12%
T细胞
10%
巨噬细胞
20%
Td-Tom+ (%)

图31A-31E

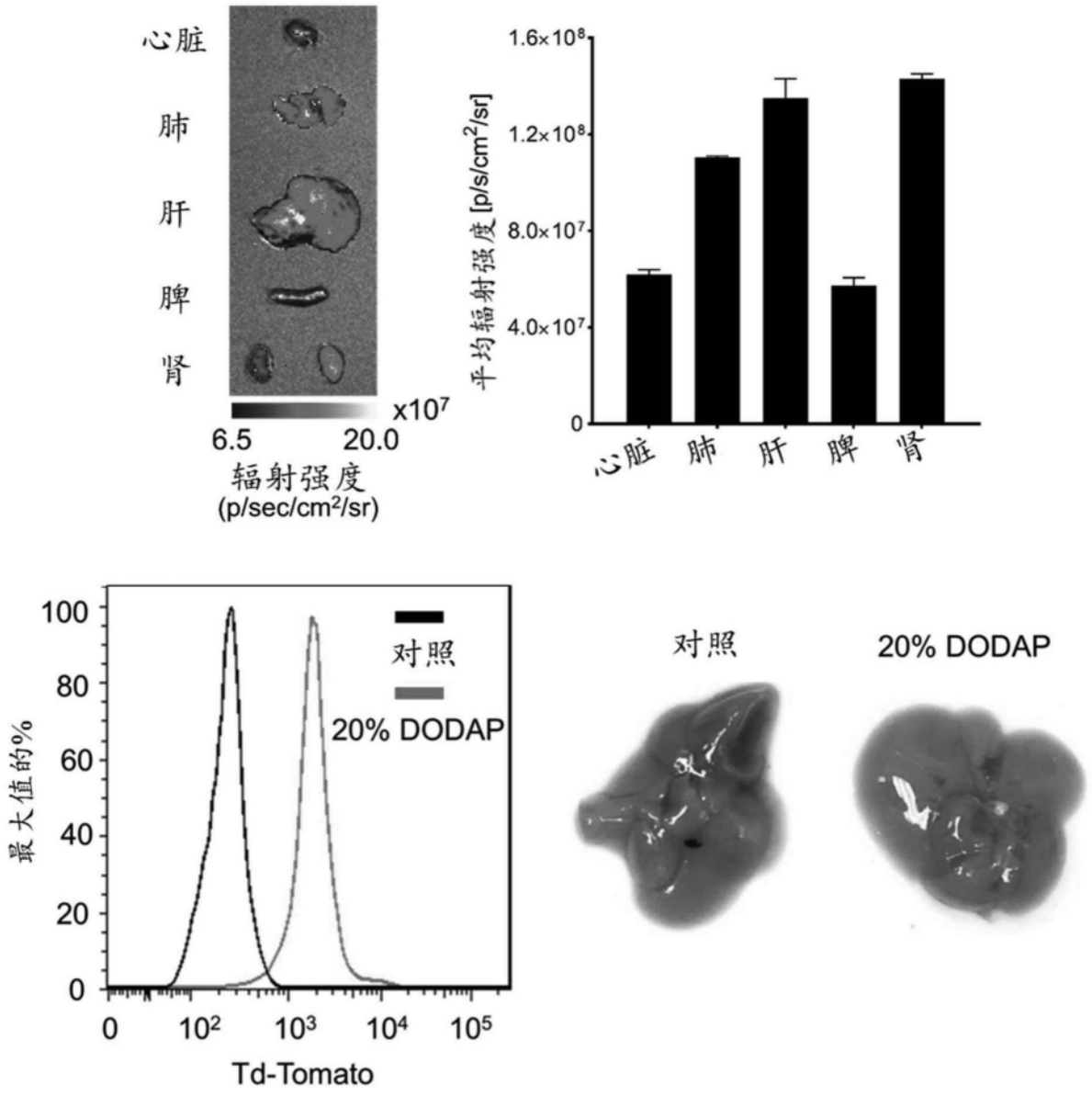

心脏
肺
肝
脾
肾
x10⁷
6.5
20.0
辐射强度
(p/sec/cm²/sr)
平均辐射强度 [p/s/cm²/sr]
1.6×10⁸
1.2×10⁸
8.0×10⁷
4.0×10⁷
0
心脏
肺
肝
脾
肾
最大值的%
100
80
60
40
20
0
对照
20% DODAP
0
10²
10³
10⁴
10⁵
Td-Tomato
对照
20% DODAP

图32

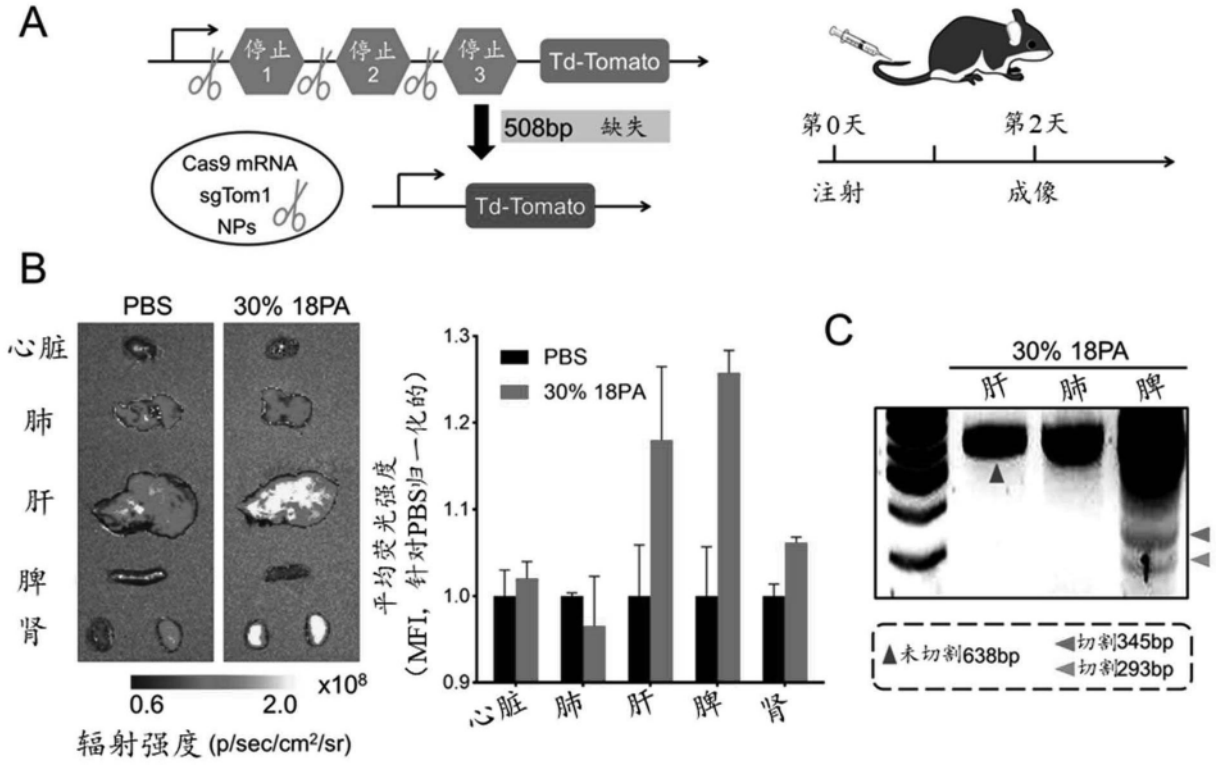

A
停止1
停止2
停止3
Td-Tomato
508bp 缺失
Cas9 mRNA
sgTom1
NPs
Td-Tomato
第0天
第2天
注射
成像
B
PBS
30% 18PA
心脏
肺
肝
脾
肾
0.6
2.0
x10⁸
辐射强度 (p/sec/cm²/sr)
平均荧光强度
(MFI，针对PBS归一化的)
PBS
30% 18PA
心脏 肺 肝 脾 肾
C
30% 18PA
肝 肺 脾
未切割638bp
切割345bp
切割293bp

图33A-33C

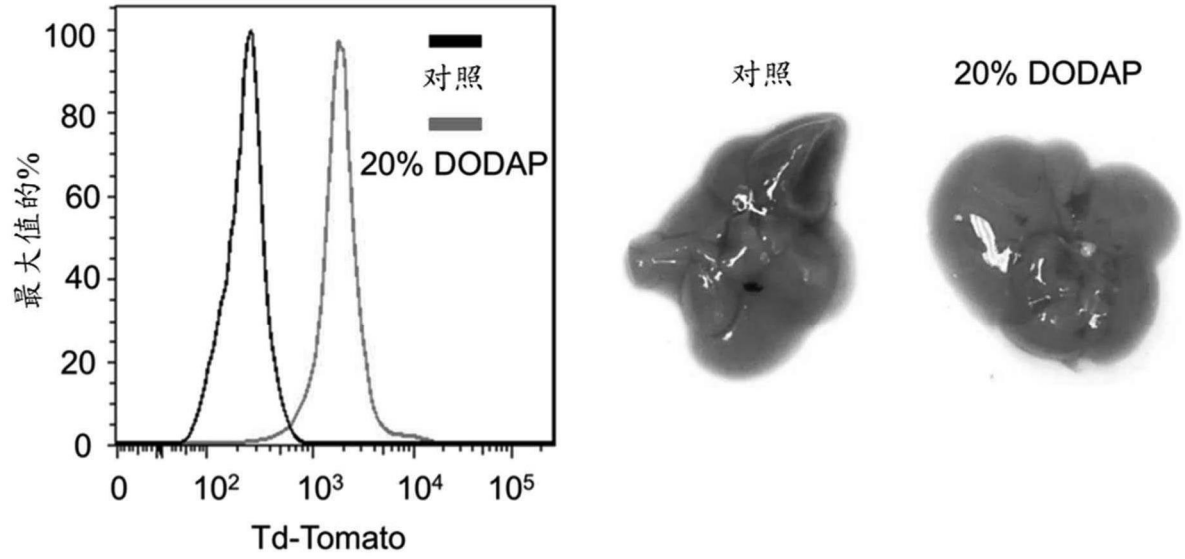

最大值的%
对照
20% DODAP
Td-Tomato
对照
20% DODAP

图34

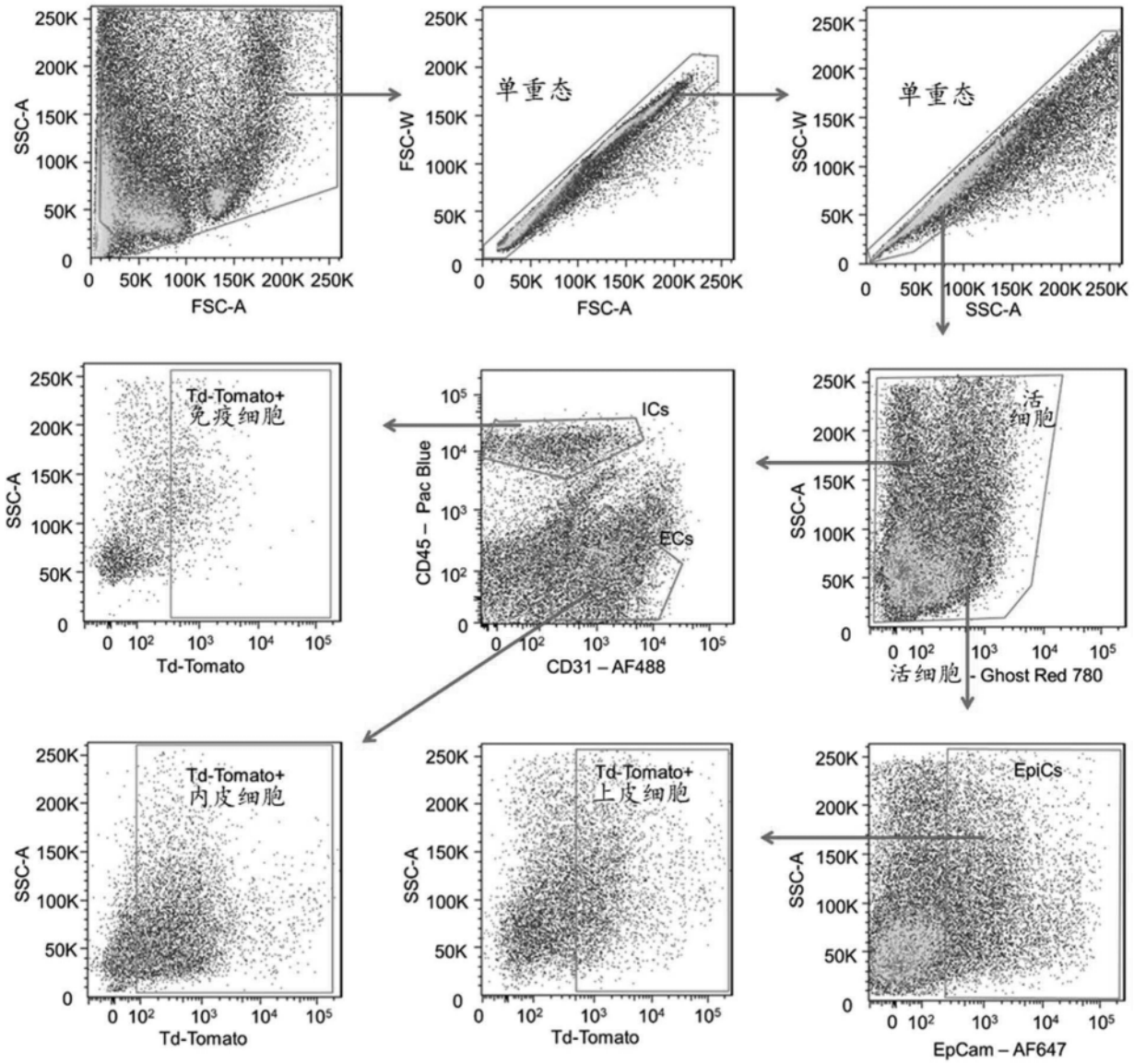

SSC-A
FSC-A
单重态
FSC-W
SSC-W
SSC-A
Td-Tomato+
免疫细胞
Td-Tomato
CD45 – Pac Blue
ICs
ECs
CD31 – AF488
活
细胞
活细胞 - Ghost Red 780
Td-Tomato+
内皮细胞
Td-Tomato+
上皮细胞
EpiCs
EpCam – AF647

图35

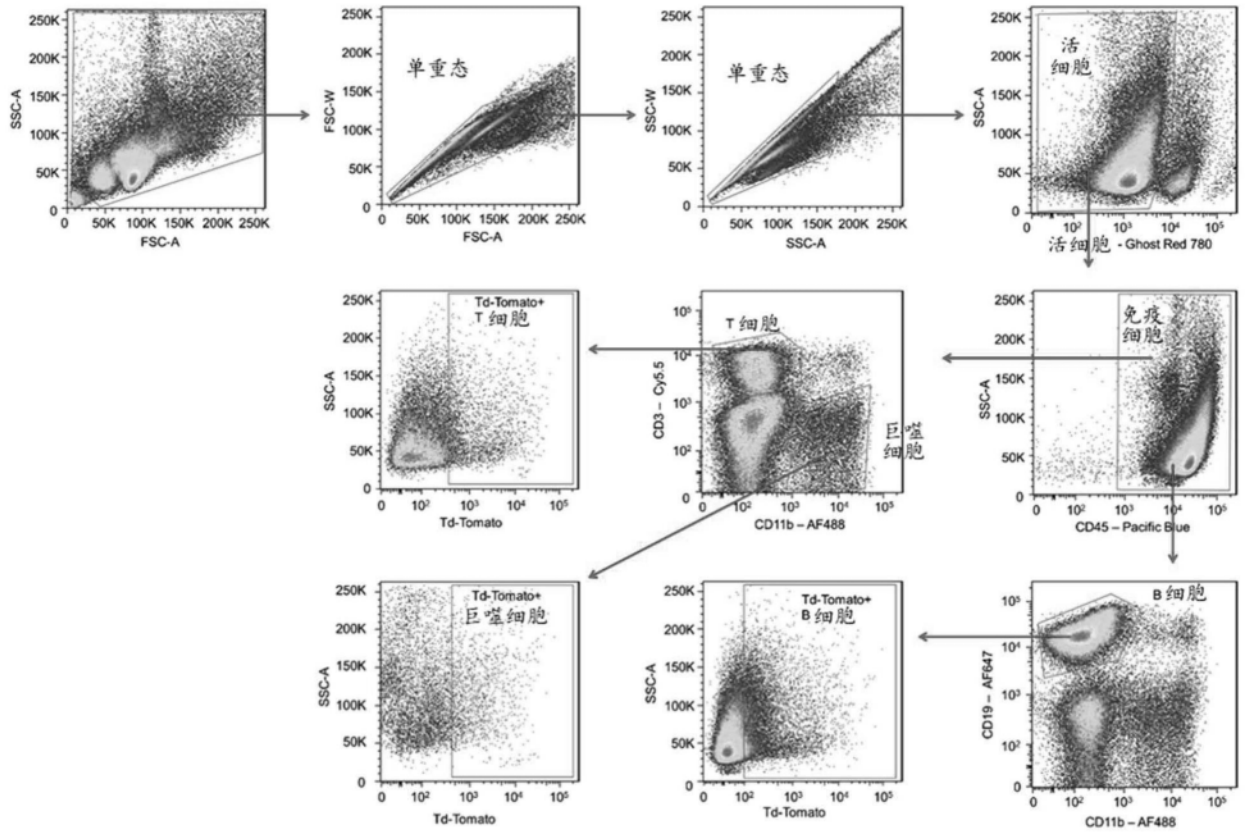

SSC-A
FSC-A
单重态
FSC-W
SSC-W
活细胞
活细胞 - Ghost Red 780
免疫细胞
CD45 – Pacific Blue
T细胞
CD3 – Cy5.5
巨噬细胞
CD11b – AF488
Td-Tomato+
T细胞
Td-Tomato
Td-Tomato+
巨噬细胞
Td-Tomato+
B细胞
B细胞
CD19 – AF647

图36

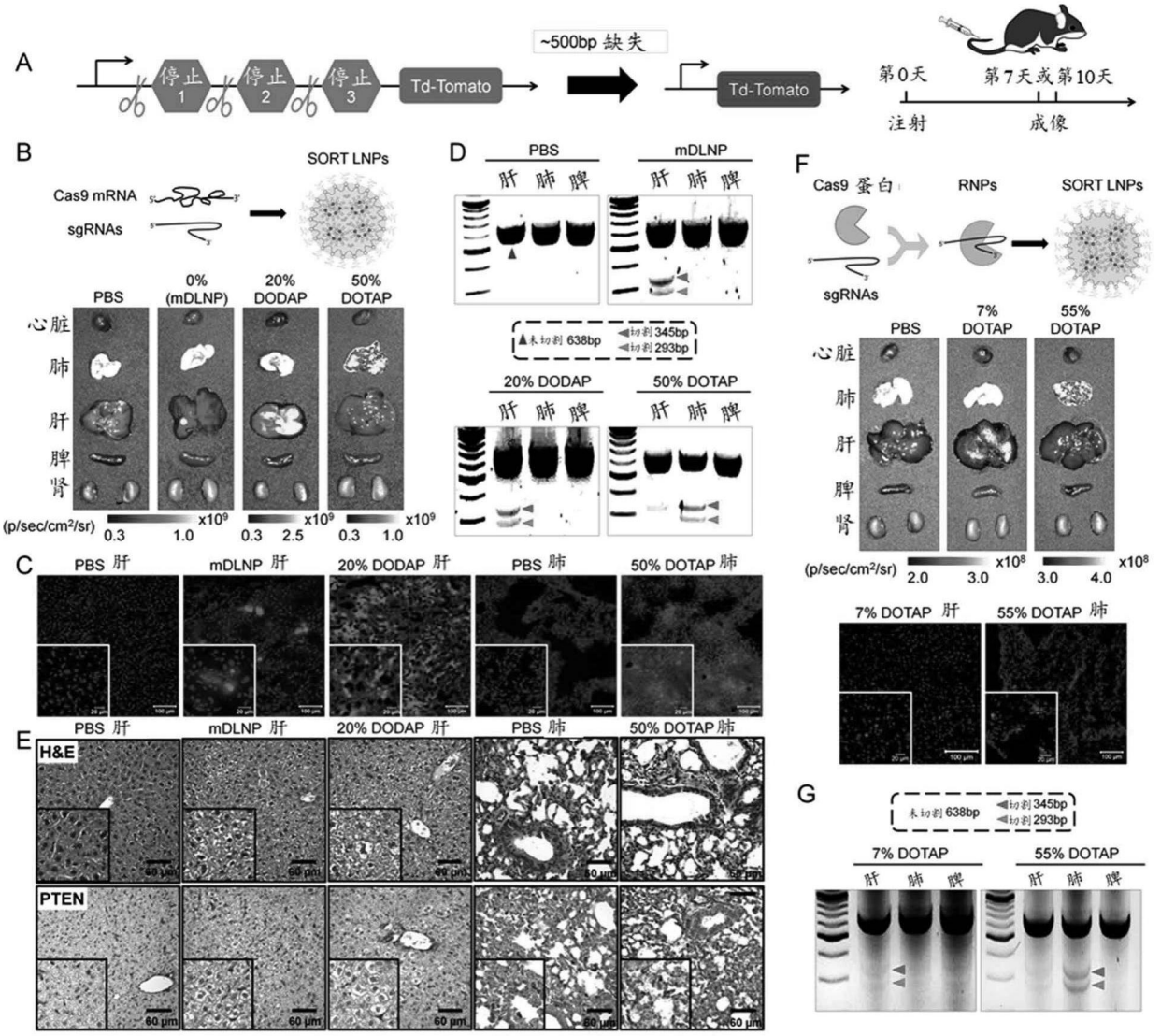

A
停止 1
停止 2
停止 3
Td-Tomato
~500bp 缺失
Td-Tomato
第0天
第7天或第10天
注射
成像
B
SORT LNPs
Cas9 mRNA
sgRNAs
PBS
0% (mDLNP)
20% DODAP
50% DOTAP
心脏
肺
肝
脾
肾
(p/sec/cm²/sr)
x10⁹
0.3 1.0
0.3 2.5
0.3 1.0
C
PBS 肝
mDLNP 肝
20% DODAP 肝
PBS 肺
50% DOTAP 肺
E
H&E
PTEN
60 μm
D
PBS
mDLNP
肝 肺 脾
未切割 638bp
切割 345bp
切割 293bp
20% DODAP
50% DOTAP
F
Cas9 蛋白
RNPs
SORT LNPs
sgRNAs
PBS
7% DOTAP
55% DOTAP
x10⁸
2.0 3.0
3.0 4.0
7% DOTAP 肝
55% DOTAP 肺
G
未切割 638bp
切割 345bp
切割 293bp
7% DOTAP
55% DOTAP

图37A-37G

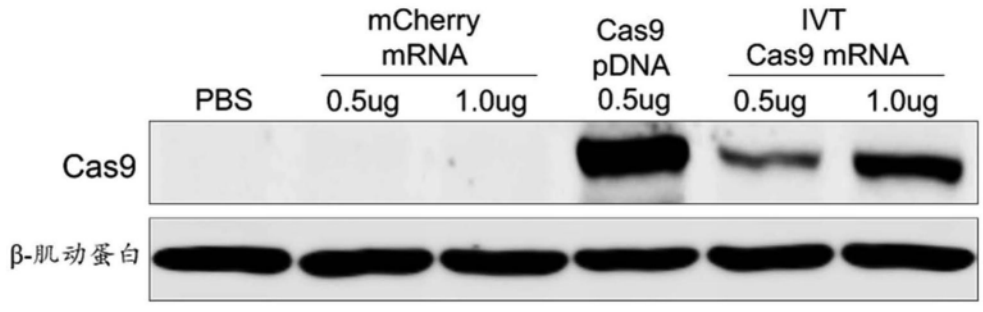

mCherry mRNA
Cas9 pDNA
IVT Cas9 mRNA
PBS
0.5ug
1.0ug
0.5ug
0.5ug
1.0ug
Cas9
β-肌动蛋白

图38

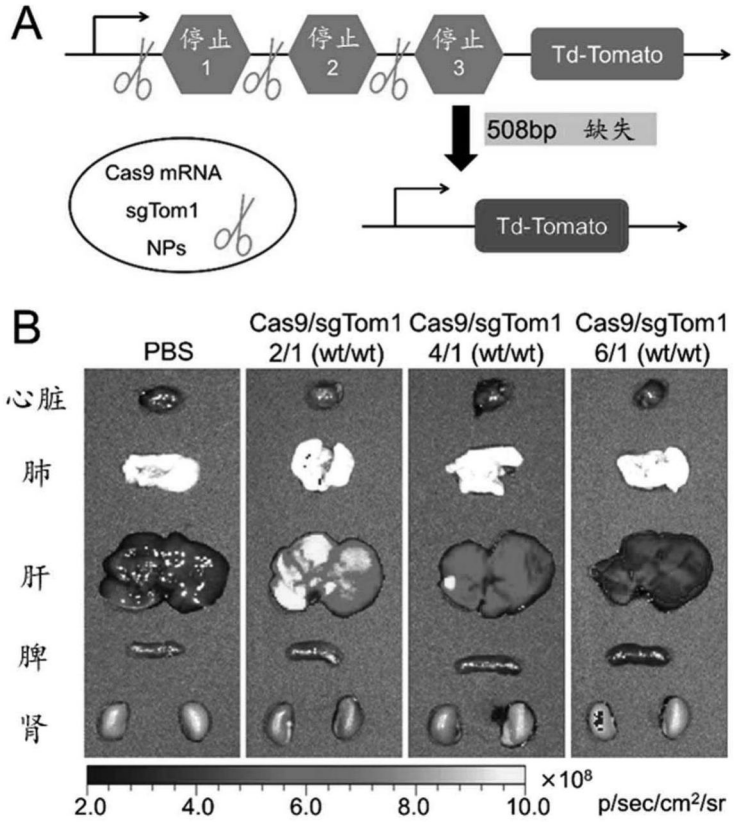

A
停止 1
停止 2
停止 3
Td-Tomato
508bp 缺失
Cas9 mRNA
sgTom1
NPs
Td-Tomato
B
PBS
Cas9/sgTom1 2/1 (wt/wt)
Cas9/sgTom1 4/1 (wt/wt)
Cas9/sgTom1 6/1 (wt/wt)
心脏
肺
肝
脾
肾
×10^8
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
p/sec/cm²/sr

图39A-39B

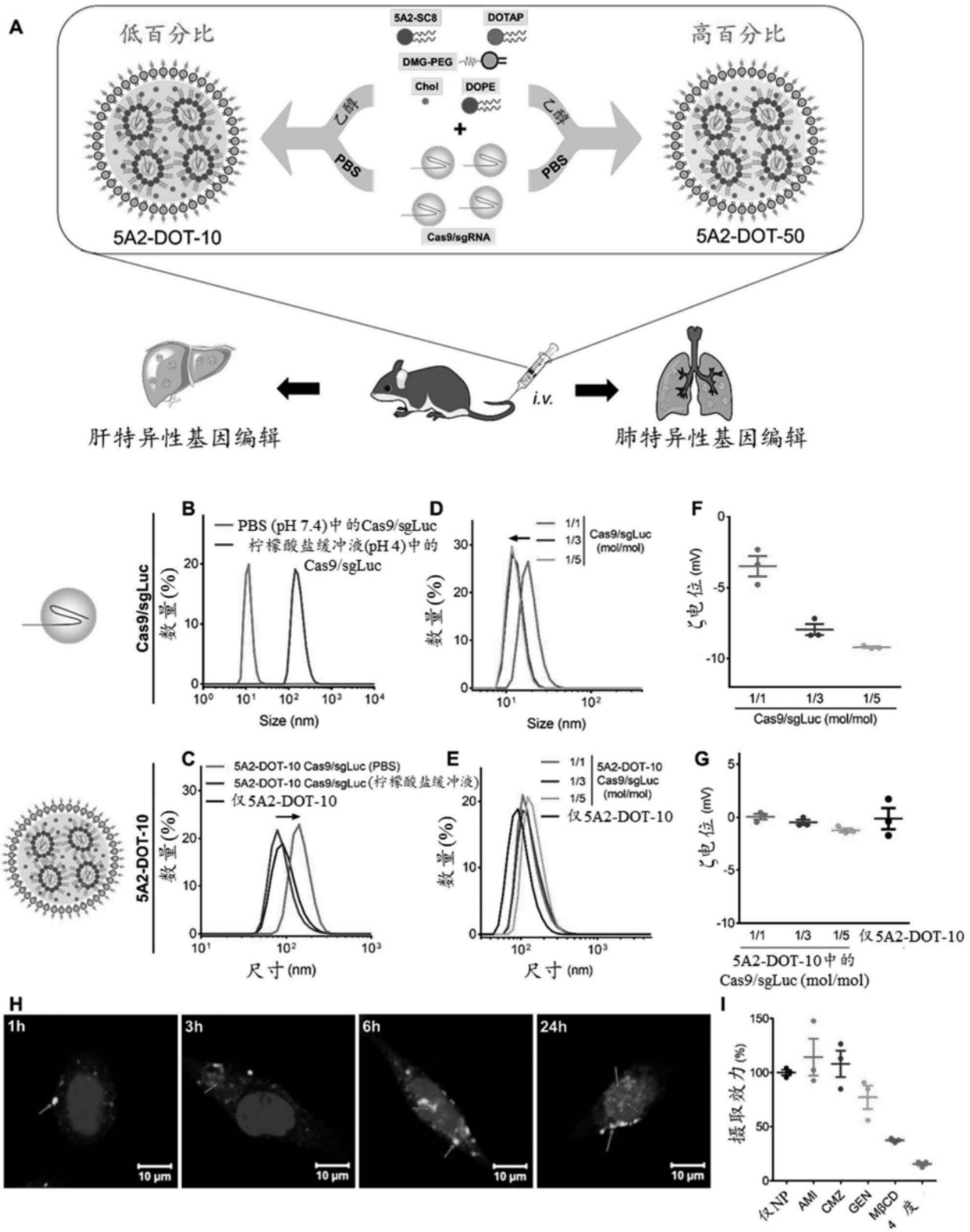

A
低百分比
高百分比
5A2-SC8
DOTAP
DMG-PEG
Chol
DOPE
乙醇
PBS
乙醇
PBS
5A2-DOT-10
Cas9/sgRNA
5A2-DOT-50
i.v.
肝特异性基因编辑
肺特异性基因编辑
B
PBS (pH 7.4)中的Cas9/sgLuc
柠檬酸盐缓冲液(pH 4)中的 Cas9/sgLuc
Cas9/sgLuc
数量(%)
Size (nm)
D
1/1
1/3
1/5
Cas9/sgLuc (mol/mol)
数量(%)
Size (nm)
F
ζ电位 (mV)
1/1
1/3
1/5
Cas9/sgLuc (mol/mol)
C
5A2-DOT-10 Cas9/sgLuc (PBS)
5A2-DOT-10 Cas9/sgLuc(柠檬酸盐缓冲液)
仅5A2-DOT-10
5A2-DOT-10
数量(%)
尺寸(nm)
E
1/1
1/3
1/5
5A2-DOT-10 Cas9/sgLuc (mol/mol)
仅5A2-DOT-10
数量(%)
尺寸(nm)
G
ζ电位 (mV)
1/1
1/3
1/5
仅5A2-DOT-10
5A2-DOT-10中的 Cas9/sgLuc (mol/mol)
H
1h
3h
6h
24h
10 μm
I
摄取效力(%)
仅NP
AMI
CMZ
GEN
MβCD
4 度

图40A-40I

A

名称	摩尔比					摩尔百分比(%)					总脂质 / sgRNA (wt/wt)
	5A2-SC8	DOPE	Chol	DMG-PEG	DOTAP	5A2-SC8	DOPE	Chol	DMG-PEG	DOTAP	
5A2-DOT-5	15	15	30	3	3.3	22.6	22.6	45.2	4.5	5	40
5A2-DOT-10	15	15	30	3	7	21.4	21.4	42.8	4.3	10	40
5A2-DOT-20	15	15	30	3	16	19.1	19.1	38.1	3.8	20.3	40
5A2-DOT-30	15	15	30	3	27	16.7	16.7	33.3	3.3	30	40
5A2-DOT-40	15	15	30	3	42	14.3	14.3	28.6	2.9	40	40
5A2-DOT-50	15	15	30	3	63	11.9	11.9	23.8	2.4	50	40
5A2-DOT-60	15	15	30	3	95	9.5	9.5	19.1	1.9	60.1	40

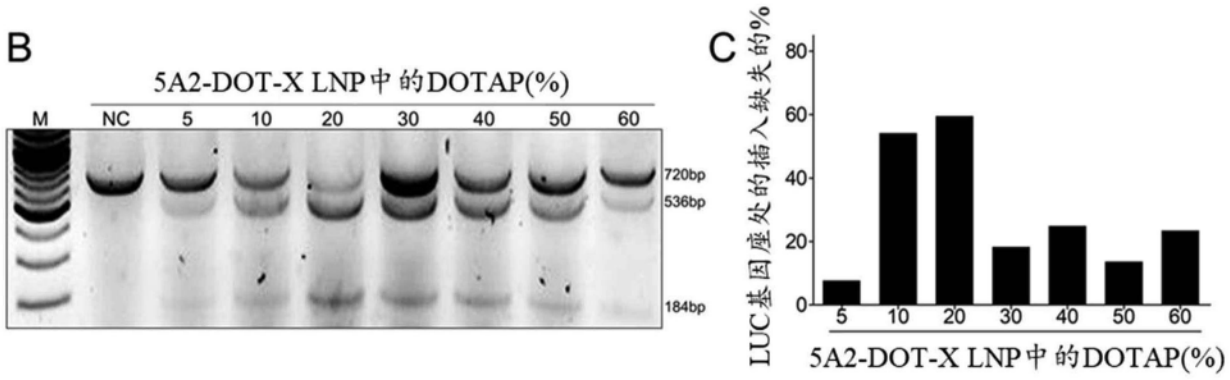


图41A-41C

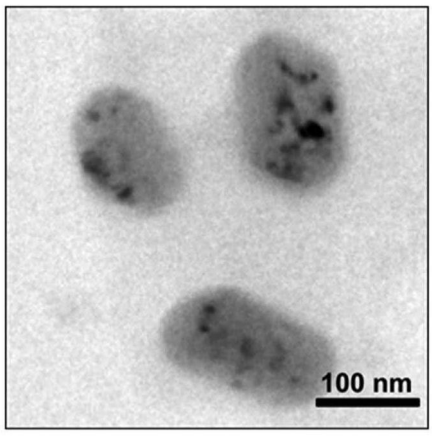


图42

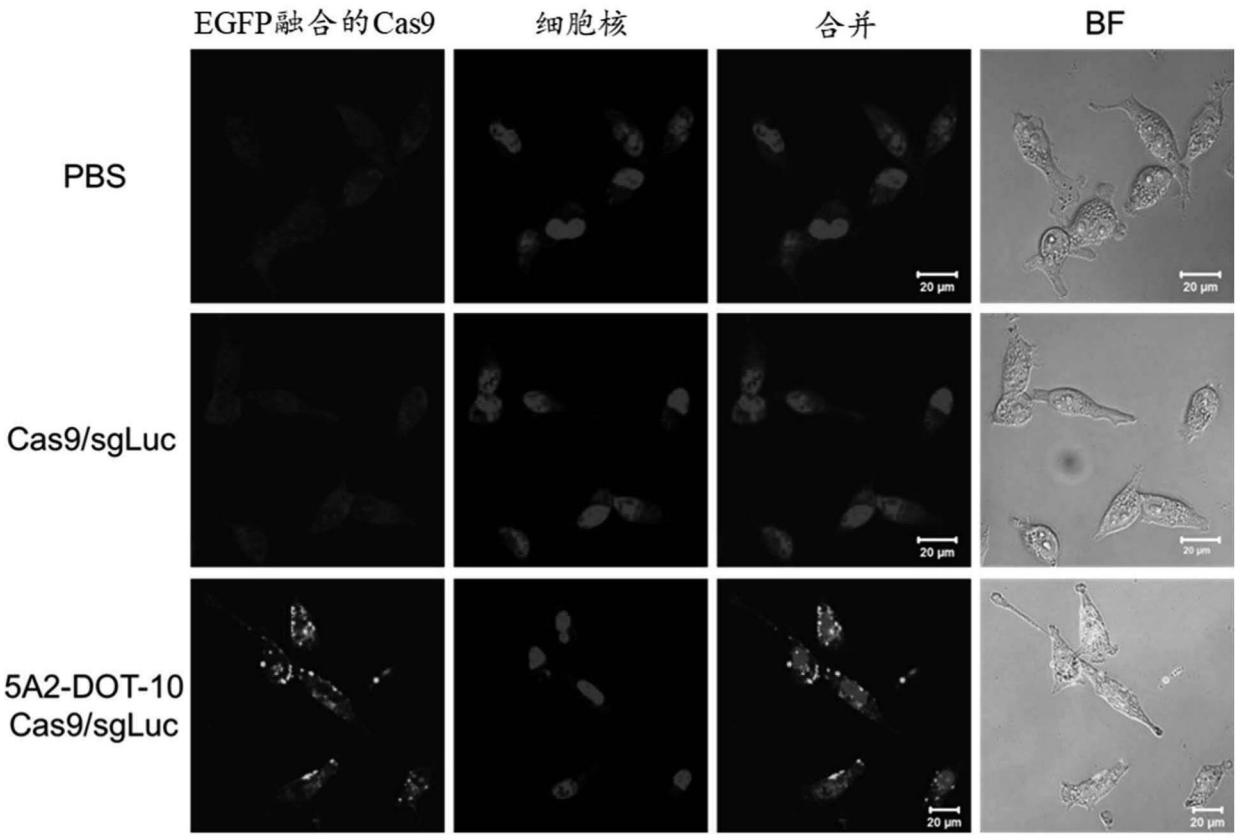
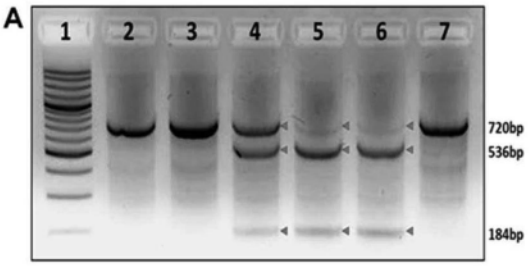
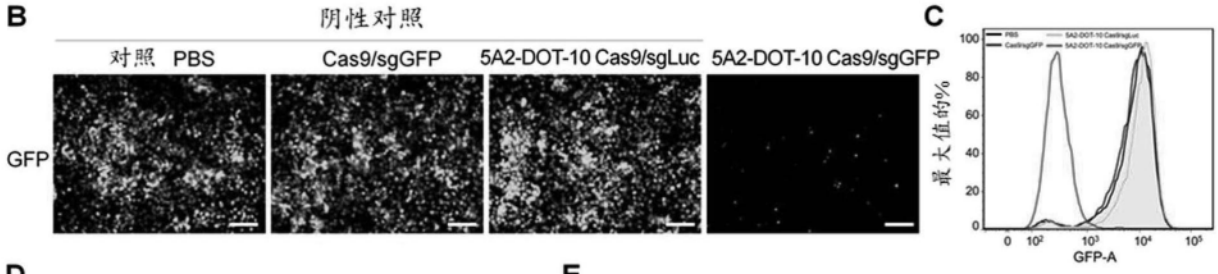
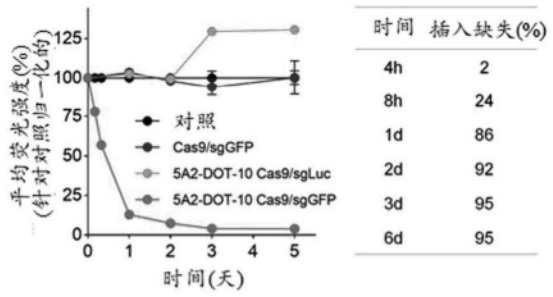

EGFP融合的Cas9
细胞核
合并
BF
PBS
Cas9/sgLuc
5A2-DOT-10
Cas9/sgLuc
20 μm

图43

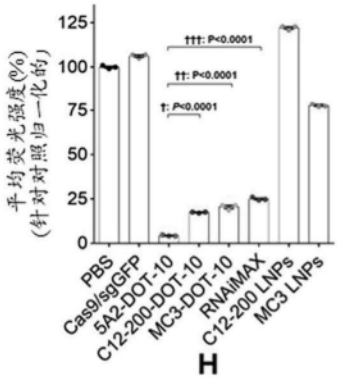


泳道	制剂缓冲液	处理	插入缺失(%)
1		DNA 梯	N/A
2		PBS	0
3	PBS 缓冲液 (pH 7.4)	5A2-DOT-10 Cas9/sgGFP (1/3)	0
4		5A2-DOT-10 Cas9/sgLuc (1/1)	10.5
5		5A2-DOT-10 Cas9/sgLuc (1/3)	72.2
6		5A2-DOT-10 Cas9/sgLuc (1/5)	75.9
7	柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0)	5A2-DOT-10 Cas9/sgLuc (1/3)	0

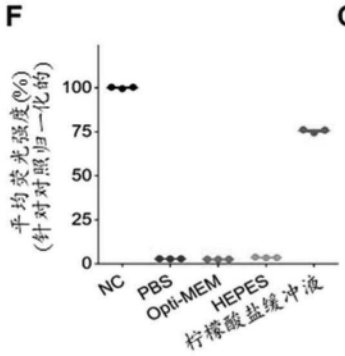


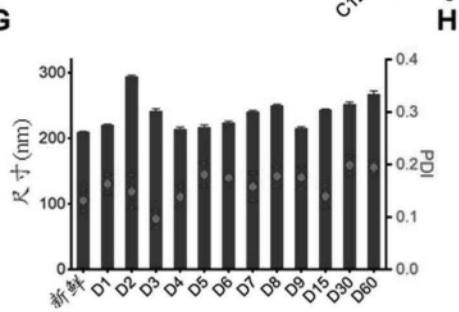


时间	插入缺失(%)
4h	2
8h	24
1d	86
2d	92
3d	95
6d	95



样品	插入缺失(%)
PBS	0
Cas9/sgGFP	1
5A2-DOT-10	93
C12-200-DOT-10	81
MC3-DOT-10	58
RNAiMAX	52
C12-200 LNPs	2
MC3 LNPs	10





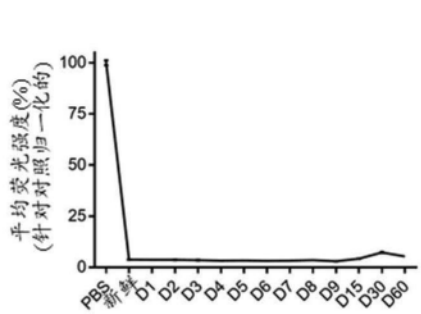


图44A-44H

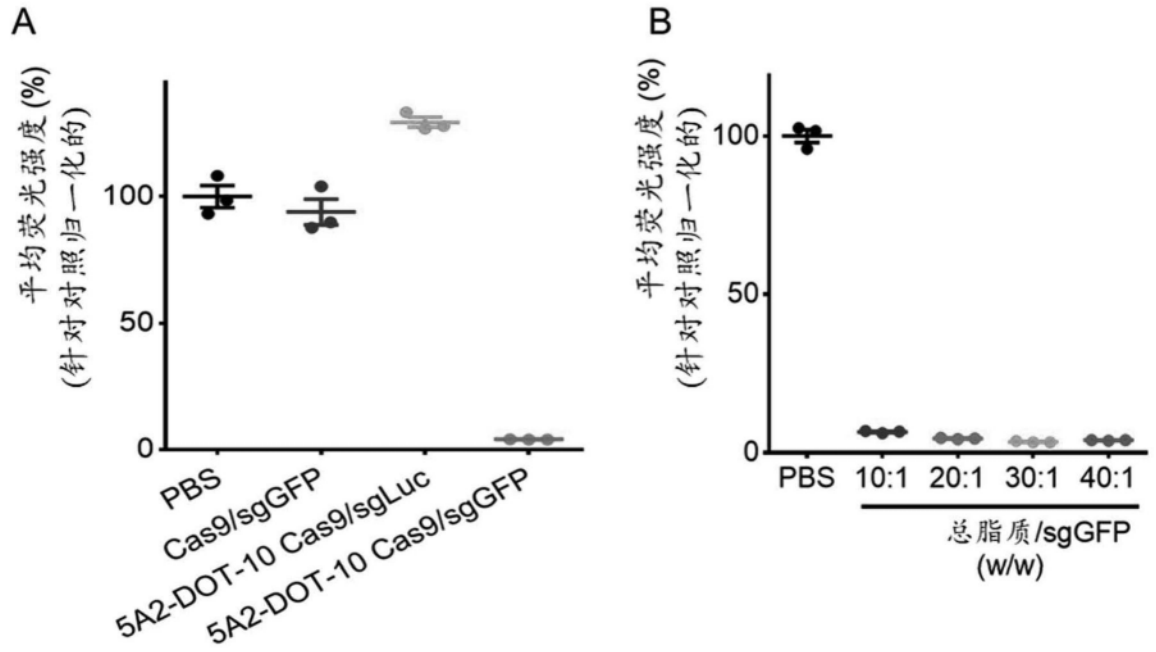
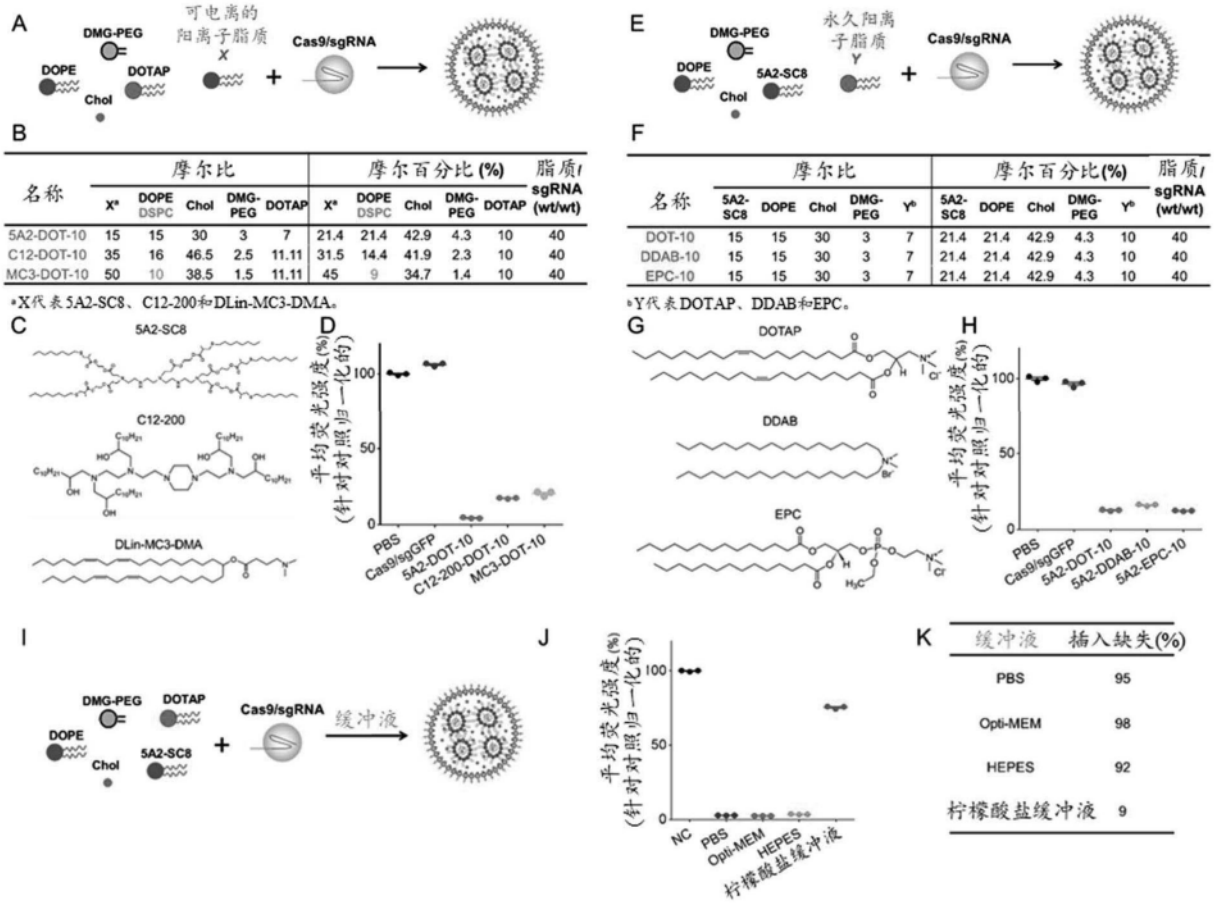


图45A-45B



名称	摩尔比					摩尔百分比(%)					脂质/sgRNA (wt/wt)
	X[a]	DOPE DSPC	Chol	DMG-PEG	DOTAP	X[a]	DOPE DSPC	Chol	DMG-PEG	DOTAP	
5A2-DOT-10	15	15	30	3	7	21.4	21.4	42.9	4.3	10	40
C12-DOT-10	35	16	46.5	2.5	11.11	31.5	14.4	41.9	2.3	10	40
MC3-DOT-10	50	10	38.5	1.5	11.11	45	9	34.7	1.4	10	40

[a]X代表5A2-SC8、C12-200和DLin-MC3-DMA。

名称	摩尔比					摩尔百分比(%)					脂质/sgRNA (wt/wt)
	5A2-SC8	DOPE	Chol	DMG-PEG	Y[b]	5A2-SC8	DOPE	Chol	DMG-PEG	Y[b]	
DOT-10	15	15	30	3	7	21.4	21.4	42.9	4.3	10	40
DDAB-10	15	15	30	3	7	21.4	21.4	42.9	4.3	10	40
EPC-10	15	15	30	3	7	21.4	21.4	42.9	4.3	10	40

[b]Y代表DOTAP、DDAB和EPC。

缓冲液	插入缺失(%)
PBS	95
Opti-MEM	98
HEPES	92
柠檬酸盐缓冲液	9

图46A-46K

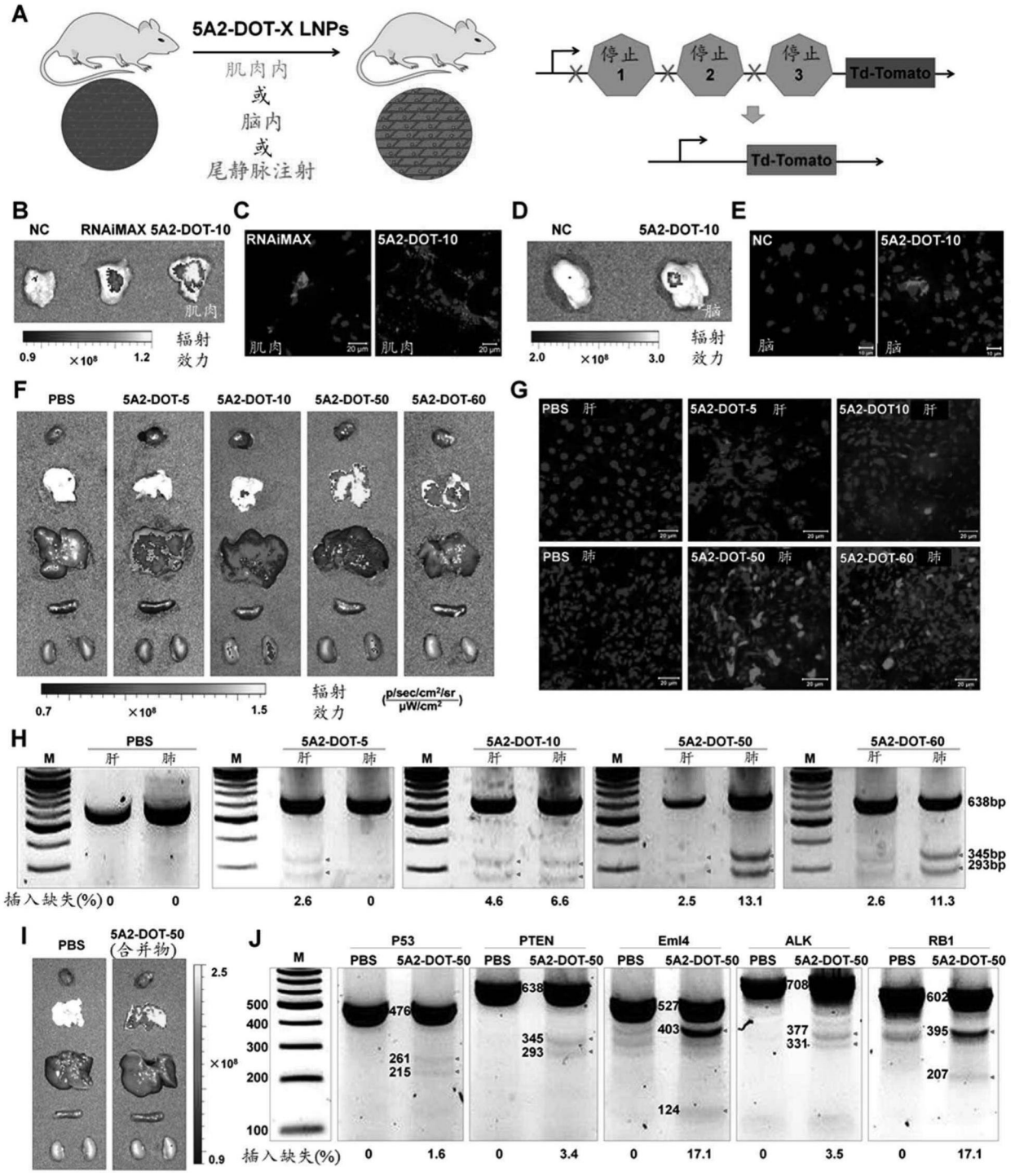

A
5A2-DOT-X LNPs
肌肉内
或
脑内
或
尾静脉注射
停止 1
停止 2
停止 3
Td-Tomato
Td-Tomato
B
NC
RNAiMAX 5A2-DOT-10
肌肉
0.9
×10⁸
1.2
辐射效力
C
RNAiMAX
5A2-DOT-10
肌肉
肌肉
D
NC
5A2-DOT-10
脑
2.0
×10⁸
3.0
辐射效力
E
NC
5A2-DOT-10
脑
脑
F
PBS
5A2-DOT-5
5A2-DOT-10
5A2-DOT-50
5A2-DOT-60
0.7
×10⁸
1.5
辐射效力
(p/sec/cm²/sr / μW/cm²)
G
PBS 肝
5A2-DOT-5 肝
5A2-DOT10 肝
PBS 肺
5A2-DOT-50 肺
5A2-DOT-60 肺
H
M
PBS
肝
肺
5A2-DOT-5
5A2-DOT-10
5A2-DOT-50
5A2-DOT-60
638bp
345bp
293bp
插入缺失(%) 0 0 2.6 0 4.6 6.6 2.5 13.1 2.6 11.3
I
PBS
5A2-DOT-50
(合并物)
2.5
×10⁸
0.9
J
M
P53
PTEN
Eml4
ALK
RB1
PBS
5A2-DOT-50
500
400
300
200
100
476
261
215
638
345
293
527
403
124
708
377
331
602
395
207
插入缺失(%) 0 1.6 0 3.4 0 17.1 0 3.5 0 17.1

图47A-47J

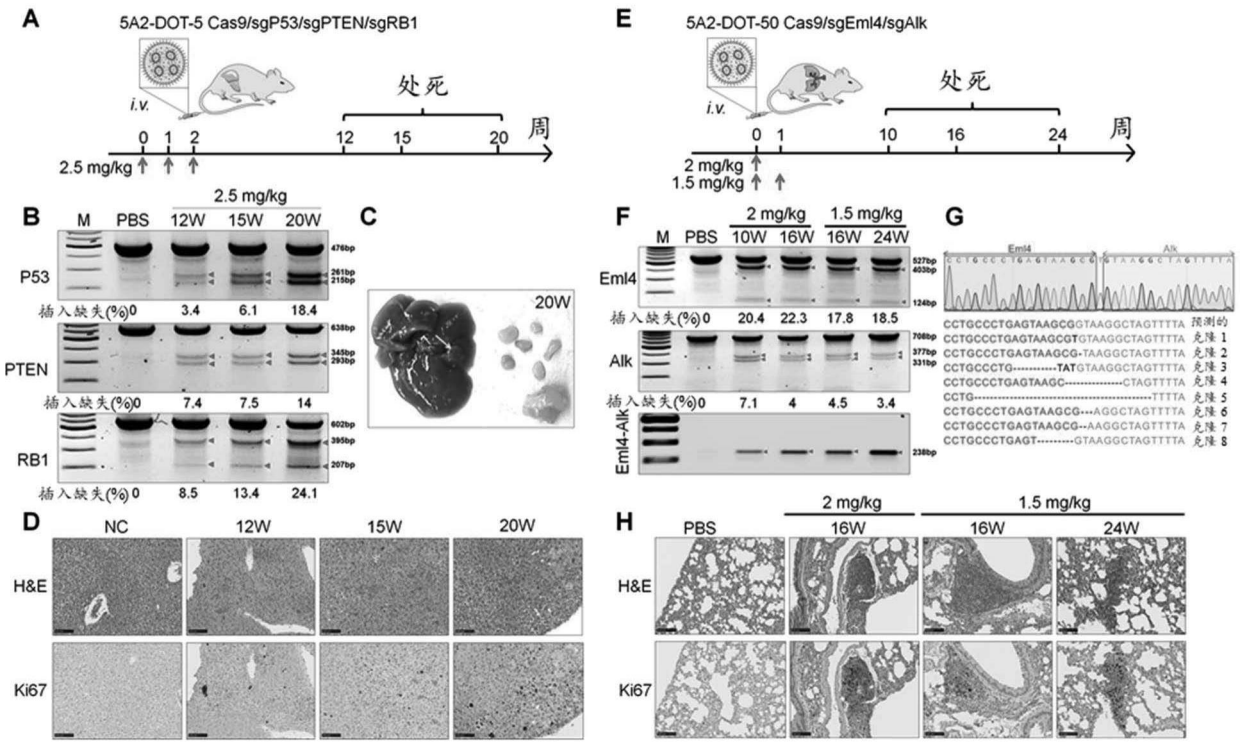


图48A-48H

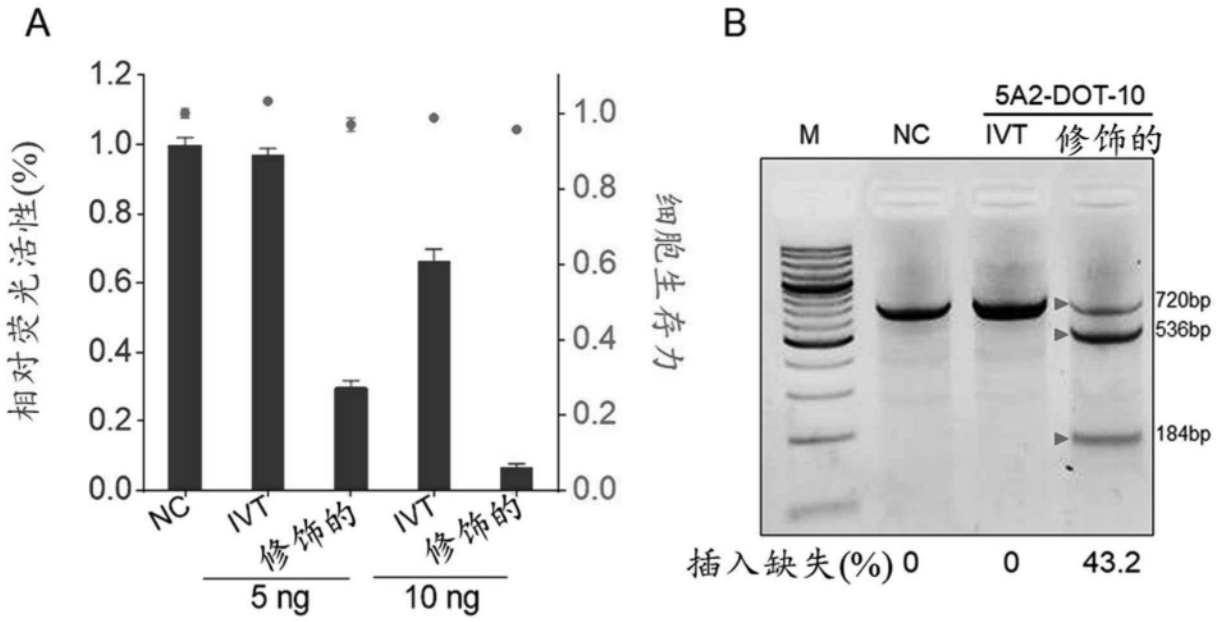


图49A-49B

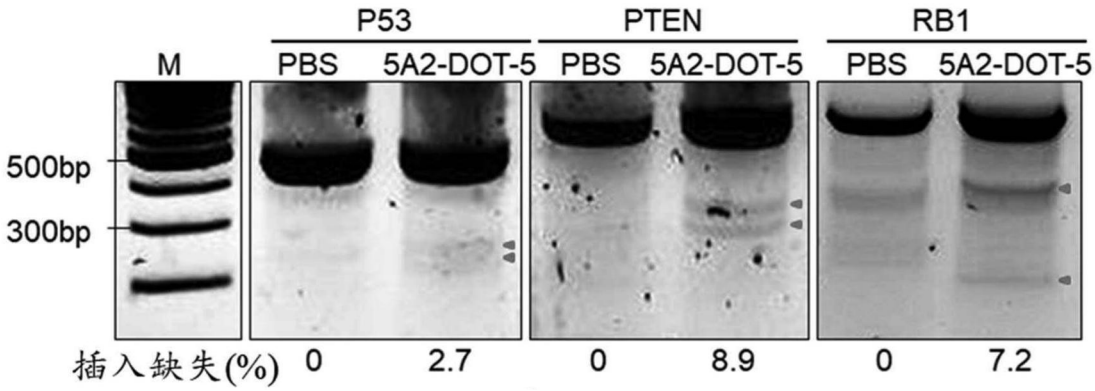

P53
PTEN
RB1
M
PBS
5A2-DOT-5
PBS
5A2-DOT-5
PBS
5A2-DOT-5
500bp
300bp
插入缺失(%)
0
2.7
0
8.9
0
7.2

图50

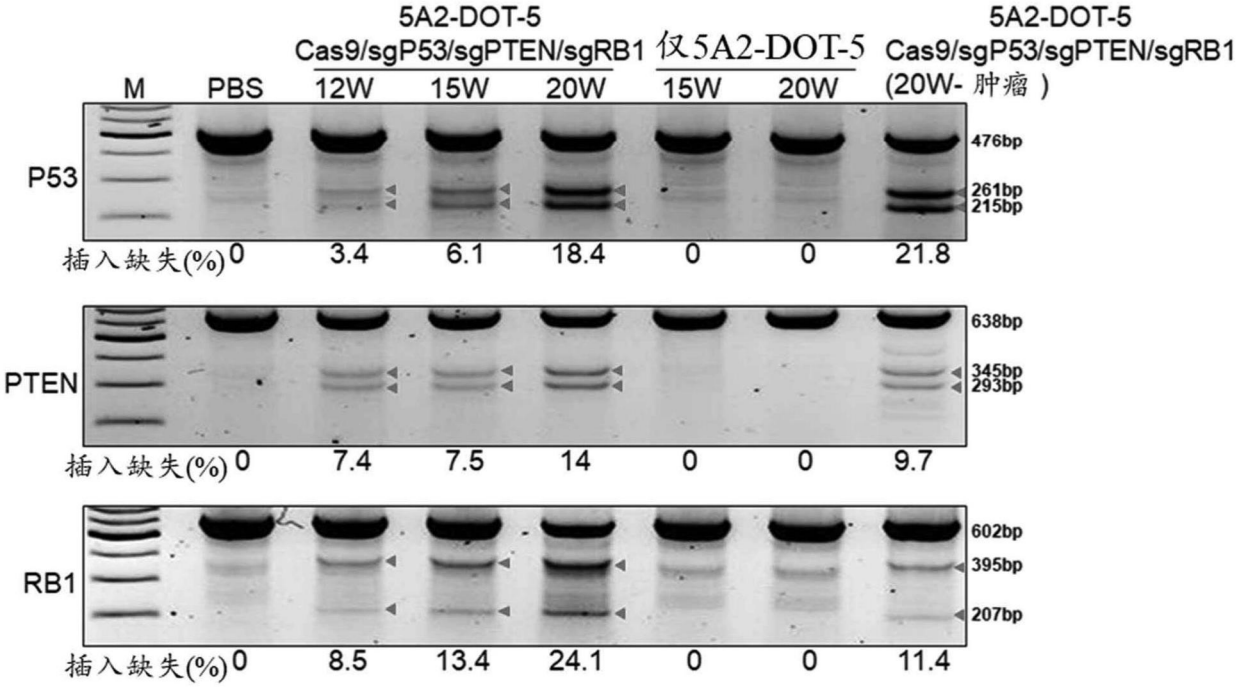

5A2-DOT-5
Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1
仅5A2-DOT-5
5A2-DOT-5
Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1
(20W- 肿瘤)
M
PBS
12W
15W
20W
15W
20W
P53
476bp
261bp
215bp
插入缺失(%)
0
3.4
6.1
18.4
0
0
21.8
PTEN
638bp
345bp
293bp
插入缺失(%)
0
7.4
7.5
14
0
0
9.7
RB1
602bp
395bp
207bp
插入缺失(%)
0
8.5
13.4
24.1
0
0
11.4

图51

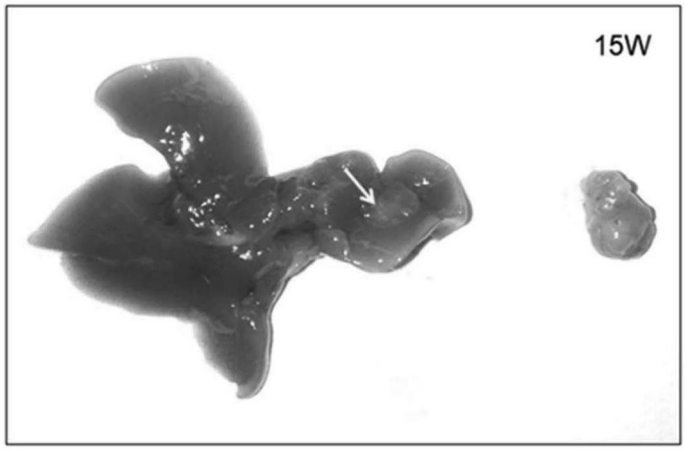

15W

图52

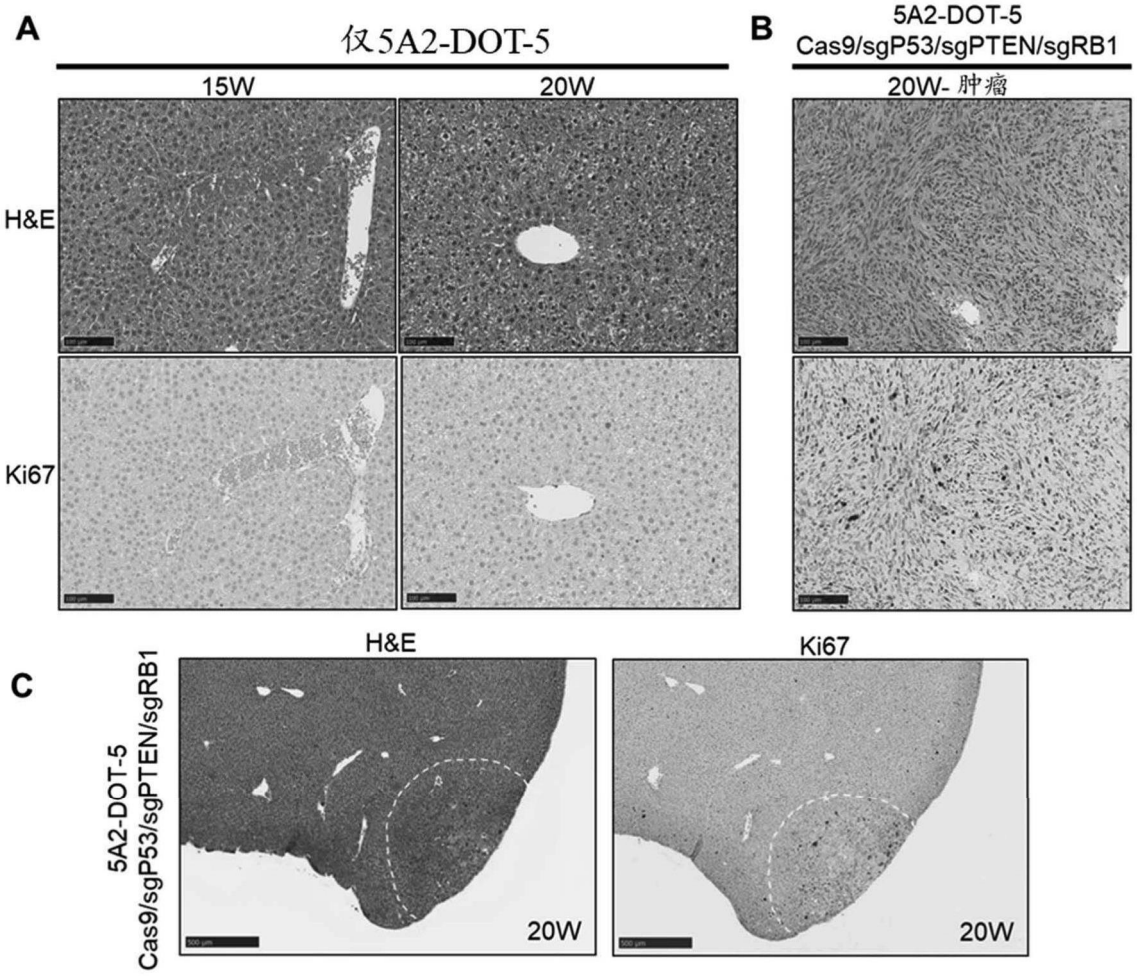

A
仅5A2-DOT-5
15W
20W
H&E
Ki67
B
5A2-DOT-5
Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1
20W- 肿瘤
C
5A2-DOT-5
Cas9/sgP53/sgPTEN/sgRB1
H&E
Ki67
20W
20W

图53A-53C

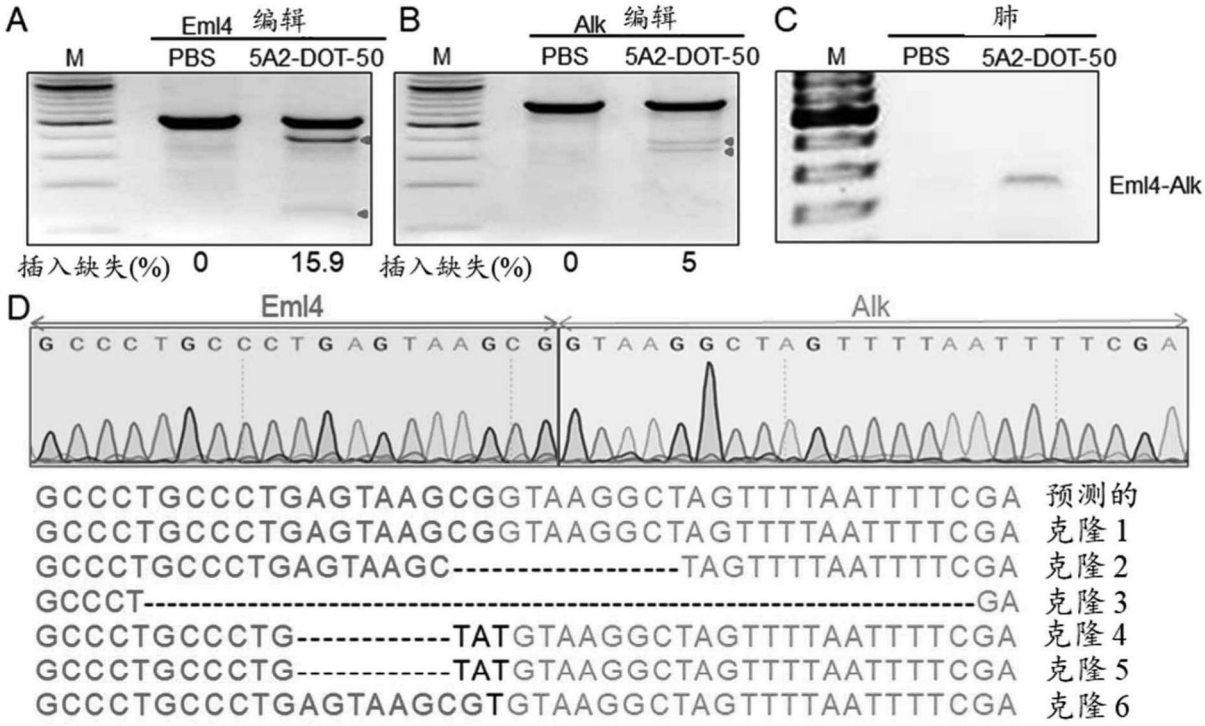

A
Eml4 编辑
M
PBS
5A2-DOT-50
插入缺失(%) 0 15.9
B
Alk 编辑
M
PBS
5A2-DOT-50
插入缺失(%) 0 5
C
肺
M
PBS
5A2-DOT-50
Eml4-Alk
D
Eml4
Alk
GCCCTGCCCTGAGTAAGCGGTAAGGCTAGTTTTAATTTTCGA 预测的
GCCCTGCCCTGAGTAAGCGGTAAGGCTAGTTTTAATTTTCGA 克隆 1
GCCCTGCCCTGAGTAAGC----------TAGTTTTAATTTTCGA 克隆 2
GCCCT----------GA 克隆 3
GCCCTGCCCTG----------TATGTAAGGCTAGTTTTAATTTTCGA 克隆 4
GCCCTGCCCTG----------TATGTAAGGCTAGTTTTAATTTTCGA 克隆 5
GCCCTGCCCTGAGTAAGCGTGTAAGGCTAGTTTTAATTTTCGA 克隆 6

图54A-54D

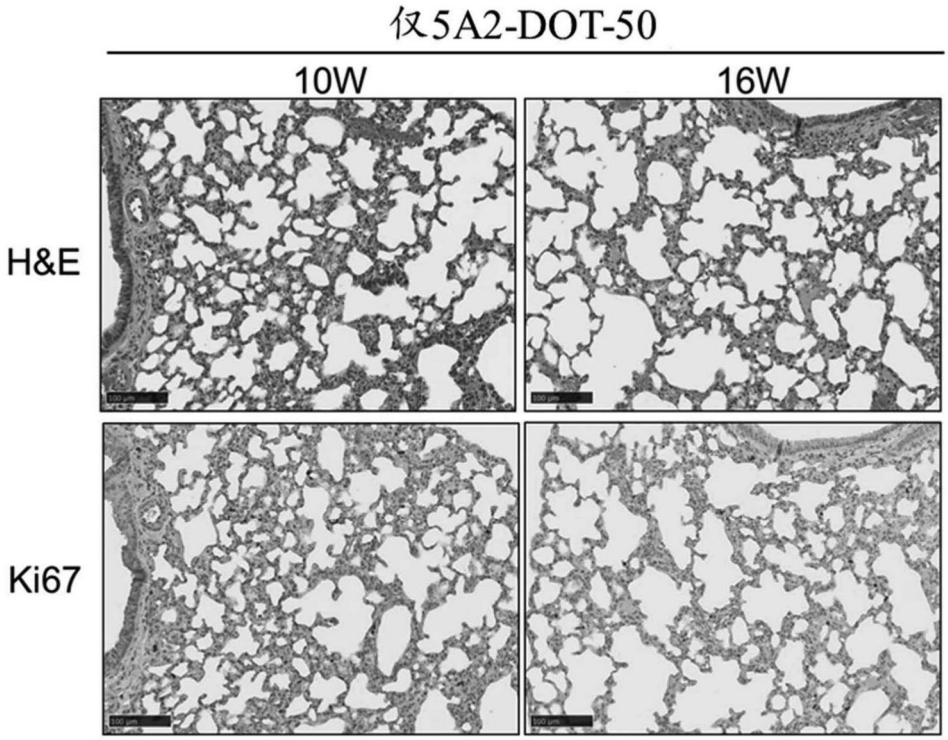

仅5A2-DOT-50
10W
16W
H&E
Ki67

图55

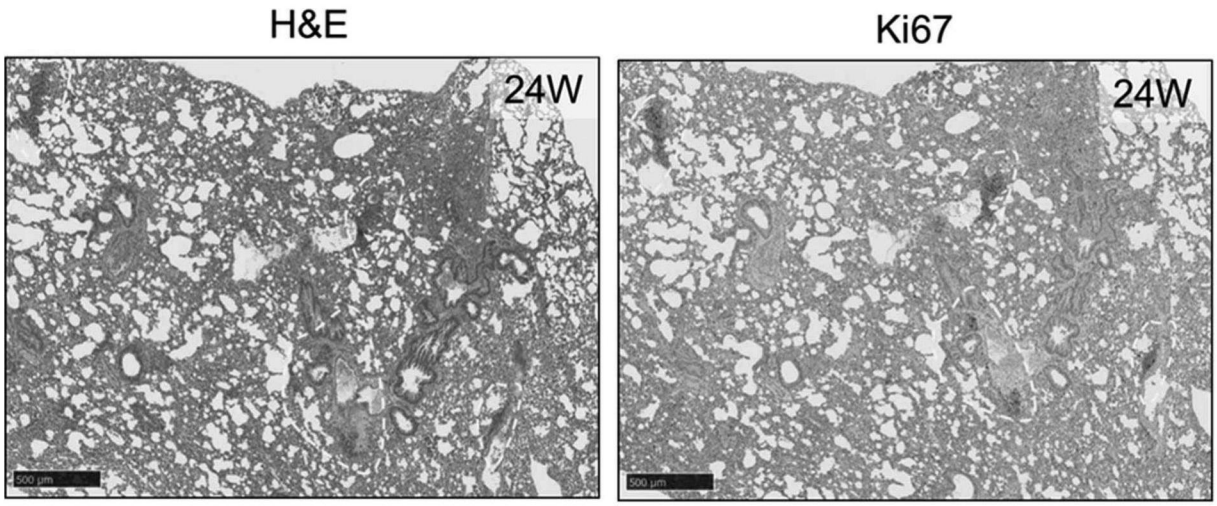

H&E
Ki67
24W
24W
500 μm
500 μm

图56

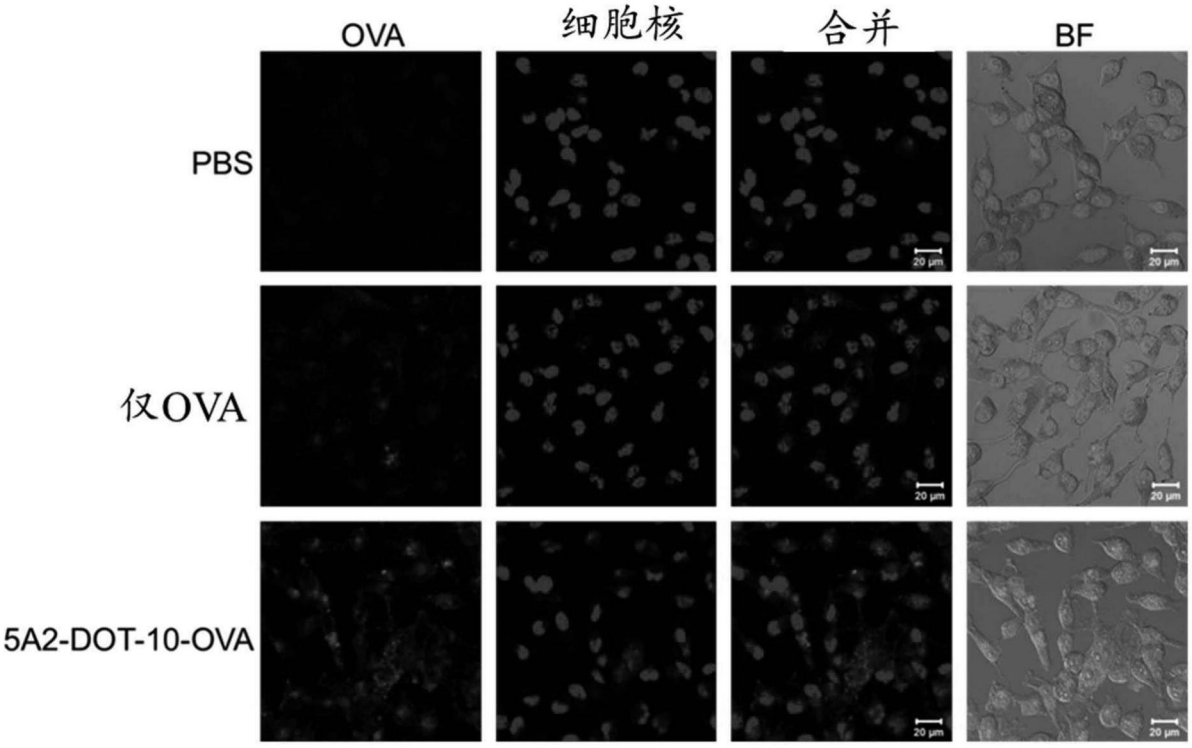

OVA
细胞核
合并
BF
PBS
仅OVA
5A2-DOT-10-OVA
20 μm

图57