



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113941011 A

(43) 申请公布日 2022.01.18

(21) 申请号 202111203977.X

(22) 申请日 2021.10.15

(71) 申请人 浙江汇科泽华生物技术有限公司

地址 311200 浙江省杭州市萧山经济技术
开发区建设二路666号信息港六期3幢
3层301-1室

(72) 发明人 范伦祥 陈波

(74) 专利代理机构 浙江千克知识产权代理有限
公司 33246

代理人 黎双华

(51) Int.Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 47/54 (2017.01)

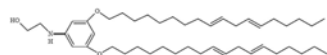
权利要求书1页 说明书10页
序列表1页 附图3页

(54) 发明名称

一种含可离子化阳离子脂质的纳米脂质体
颗粒及制备方法

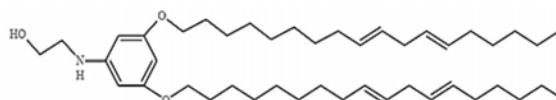
(57) 摘要

本发明一种含可离子化阳离子脂质的纳米脂质体颗粒及其制备方法,由治疗剂和包封治疗剂的脂质体组成,所述脂质体的组分包括可离子化阳离子脂质,所述可离子化阳离子脂质为具有式I结构的化合物或其衍生物:

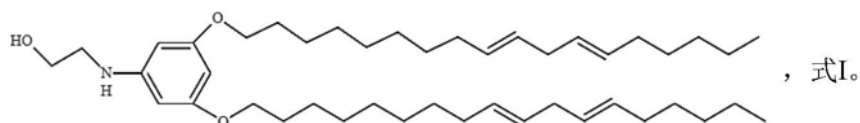


式I 本发明的纳米脂

质体颗粒包裹mRNA后,在生理条件下呈弱负电,与血液中呈负电的蛋白,补体等发生静电排斥,机体内减少蛋白的吸附,降低LNP的聚集,同时减少由于吸附补体造成的补体诱导的免疫反应,一方面降低了LNP的免疫原性,另一方面可以减少LNP被机体免疫系统的非特异性清除,延长LNP在血液中的循环时间,增加递送效率。且纳米脂质体颗粒在体内的代谢速率快,保留时间短,产生的副作用小。



1. 一种含可离子化阳离子脂质的纳米脂质体颗粒,其特征在于,由治疗剂和包封治疗剂的脂质体组成,所述脂质体的组分包括可离子化阳离子脂质,所述可离子化阳离子脂质为具有式I结构的化合物或其衍生物:



2. 如权利要求1所述的纳米脂质体颗粒,其特征在于,所述脂质体的组分还包括脂质A、脂质B、脂质C;

所述脂质A为1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-双十一碳酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二-0-十八碳烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-油酰基-2-胆甾醇基半琥珀酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二亚油烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-外消旋-(1-甘油)钠盐、鞘磷脂中一种或多种;

所述脂质B为结构脂质,所述结构脂质为胆固醇、粪甾醇、谷甾醇、麦角甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、菜籽甾醇、番茄碱、熊果酸、 α -生育酚中的一种或多种;

所述脂质C为PEG或PEG修饰的脂质,所述PEG为聚乙二醇。

3. 如权利要求2所述的纳米脂质体颗粒,其特征在于,所述PEG修饰的脂质为PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油、PEG修饰的二烷基甘油中的一种或多种。

4. 如权利要求2所述的纳米脂质体颗粒,其特征在于,所述脂质体的组分具体为:40-65%的可离子化阳离子脂质,5-25%脂质A,25-55%的脂质B,0.5-15%的脂质C。

5. 如权利要求1所述的纳米脂质体颗粒,其特征在于,所述治疗剂包括核酸。

6. 如权利要求5所述的纳米脂质体颗粒,其特征在于,所述核酸包括mRNA。

7. 如权利要求1任一项所述的纳米脂质体颗粒,其特征在于,纳米脂质体颗粒中的N:P的比率为2-30:1,所述N:P为可离子化阳离子脂质中的氮原子与治疗剂mRNA中的磷酸基团的摩尔比。

8. 如权利要求1所述的纳米脂质体颗粒,其特征在于,纳米脂质体颗粒的平均直径为50-150nm。

9. 一种纳米脂质体颗粒的制备方法,其特征在于,采用将用于编码蛋白的mRNA包封在纳米脂质体颗粒内的方法制备如权利要求1所述的纳米脂质体颗粒。

10. 如权利要求9的一种纳米脂质体颗粒的制备方法,其特征在于,具体步骤包括:

将脂质体溶解于乙醇中,将mRNA溶解于柠檬酸缓冲液中,按照N:P为2-30:1的比例,将柠檬酸缓冲液和乙醇均匀混合制备成纳米脂质体颗粒。

一种含可离子化阳离子脂质的纳米脂质体颗粒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于纳米脂质体颗粒领域,具体为一种含可离子化阳离子脂质的纳米脂质体颗粒及制备方法。

背景技术

[0002] 基于信使RNA (mRNA) 的药物,由于其研发周期短,纯化简单,生产成本低等特点,使其相较于传统的蛋白药物和小分子药物具有巨大的优势;同时,mRNA在胞质中翻译表达,不进入细胞核,因此没有插入,整合基因组,诱导突变的潜在风险,安全性高,这使mRNA药物相较于基因治疗同样具有巨大的优势。而且mRNA在细胞内能够被降解,体内的半衰期可以通过各种修饰和递送方法来调节,以及mRNA的固有的免疫源性较低并且同样可以通过mRNA的修饰来进一步降低其免疫源性,从而进一步提高mRNA药物的安全性。mRNA的巨大潜能以及优势使其成为新一代核酸药物的新宠。

[0003] 但是mRNA药物仍然存在诸多问题。首先,裸mRNA很容易被机体和自然界无处不在的RNA酶降解;同时,富含磷酸基团的mRNA呈负电与呈负电的细胞膜相互排斥,难以进入细胞,因此,mRNA需要一个高效,安全的载体既能保护mRNA不被RNA酶降解,又能将mRNA高效的递送至细胞质中。目前,常用的mRNA递送载体分为病毒载体和非病毒载体两大类。虽然病毒载体递送效率较高,但是病毒载体面临研发周期长,成本高的难题;同时,病毒载体免疫源性较高,容易产生强烈的免疫反应;而且病毒载体存在着诱导癌变的风险。可用于递送mRNA的非病毒载体可分为:鱼精蛋白,脂质体,脂丛,树突细胞,无极纳米粒子等。其中纳米脂质体颗粒具有许多的优势:首先纳米脂质体颗粒可以通过自组装形成球形结构并将mRNA包裹在内部,从而保护mRNA不被核酶降解;其次,纳米脂质体颗粒由包括磷脂在内的脂组成类似细胞膜结构的双分子层结构,与细胞膜有很好的融合性,容易进入细胞,递送效率较高;而且,纳米脂质体颗粒作为载体不受宿主限制,适应性较广,可以递送不同大小和类型的mRNA。因此,目前公认最有前景、应用最广的mRNA递送载体是纳米脂质体颗粒(LNP)。

[0004] 对于分子量较小的非自复制mRNA,常用的是可离子化阳离子脂质组成的纳米脂质体颗粒;而自复制mRNA由于分子量大,结构复杂等特性,难以包裹,对递送载体的要求也高,普通的可离子化阳离子脂质组成的纳米脂质体颗粒难以保证良好的包封效果以及较高的递送效率。因此,目前市场上很少有能同时很好递送自复制和非自复制mRNA的LNP载体。

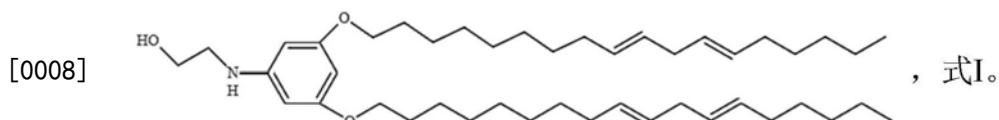
发明内容

[0005] 针对上述现有技术中存在的无法同时递送自复制和非自复制mRNA的LNP载体的不足,本发明提供一种含可离子化阳离子脂质的纳米脂质体颗粒及制备方法,本发明的纳米脂质体颗粒可以很好的同时递送自复制和非自复制mRNA的LNP载体。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0007] 一种含有可离子化阳离子脂质的纳米脂质体颗粒,由治疗剂和包封治疗剂的脂质体组成,所述脂质体的组分包括可离子化阳离子脂质,所述可离子化阳离子脂质为具有式I

结构的化合物或其衍生物:



[0009] 该新型可离子化阳离子脂质的头部有一个叔胺基,能够在酸性环境中结合氢离子,成为正电基团,从而通过静电吸引作用结合mRNA带负电的磷酸基团;另外一方面,胺基前面连接了一个羟基,这可以大大增加头部的亲水性,促进头部与mRNA的结合,同时,羟基可以在酸性条件下与mRNA的碱基形成氢键,进一步增加该可离子化阳离子脂质与mRNA的结合效果,因此,该脂质组成的纳米脂质体颗粒可以很好的包裹mRNA,特别是自复制mRNA,实现很高的包封率。

[0010] 该新型可离子化阳离子脂质是用苯环加醚的形式来连接头部和尾巴。苯环是一个较稳定的结构,能够维持脂整体结构的稳定性,增加由该脂组成的纳米脂质体颗粒的稳定性,特别是在机体内,延长在血液中的循环时间,可以增加纳米脂质体颗粒的递送效率。醚结构促进完成递送后的脂在体内的代谢速率,避免脂长期保留在体内,诱导机体的免疫反应以及副反应。增加了纳米脂质体颗粒的耐受性。

[0011] 该新型可离子化阳离子脂质的尾巴是不饱和脂肪酸,一方面,不饱和脂肪酸的相变温度较低,有助于纳米脂质体颗粒在内小体中发生构象改变,破坏内小体膜的稳定性,促进mRNA的内体逃逸效率;另一方面,不饱和脂肪酸与内小体的膜有很好的生物相容性以及稳定性,可以促进纳米脂质体颗粒与内小体的膜的融合,促进内小体逃逸,从而增加递送效率。

[0012] 该新型可离子化阳离子脂质整体由毒性较小的基团组成,不饱和烷基尾巴通过醚键连接苯环,头部为胺基连接醇羟基,从而实现整体结构的可降解,毒性小。

[0013] 优选的,所述脂质体的组分还包括脂质A、脂质B、脂质C;

[0014] 所述脂质A为1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱,1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-双十一碳酰基-sn-甘油-磷酸胆碱、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二-0-十八碳烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-油酰基-2-胆甾醇基半琥珀酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二亚油烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酸-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-外消旋-(1-甘油)钠盐、鞘磷脂中一种或多种;

[0015] 所述脂质B为结构脂质,所述结构脂质为胆固醇、粪甾醇、谷甾醇、麦角甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、菜籽甾醇、番茄碱、熊果酸、 α -生育酚中的一种或多种;

[0016] 所述脂质C为PEG或PEG修饰的脂质,所述PEG为聚乙二醇。

[0017] 优选的,所述PEG修饰的脂质为PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油、PEG修饰的二烷基甘油中的一

种或多种。

[0018] 优选的,所述脂质体的组分具体为:40-65%的可离子化阳离子脂质,5-25%脂质A,25-55%的脂质B,0.5-15%的脂质C。

[0019] 优选的,所述治疗剂包括核酸。

[0020] 优选的,所述核酸包括mRNA。

[0021] 优选的,纳米脂质体颗粒中的N:P的比率为2-30:1,所述N:P为可离子化阳离子脂质中的氮原子与治疗剂mRNA中的磷酸基团的摩尔比。

[0022] 优选的,所述N:P的比率为5-20:1。

[0023] 优选的,所述N:P的比率为10:1。

[0024] 优选的,纳米脂质体颗粒的平均直径为50-150nm。

[0025] 本发明还提供上述一种纳米脂质体颗粒的制备方法,采用将用于编码蛋白的mRNA包封在纳米脂质体颗粒内的方法制备上述纳米脂质体颗粒。

[0026] 优选的,具体步骤包括:

[0027] 将脂质体溶解于乙醇中,将mRNA溶解于柠檬酸缓冲液中,按照N:P为2-30:1的比例,将柠檬酸缓冲液和乙醇均匀混合制备成纳米脂质体颗粒。

[0028] 本发明具有以下有益效果:

[0029] 本发明所使用的可离子化阳离子脂质是一种基于醚,羟基以及叔胺的可离子化脂质。在酸性条件下,带正电的胺基可以与mRNA呈负电的磷酸基团通过静电吸引发生耦合;同时羟基以及酚结构易于和mRNA的碱基形成氢键从而增强该可离子化阳离子脂质与mRNA的耦合作用,从而高效的包裹mRNA。因此,对于分子量大,结构复杂,难以包裹的自复制mRNA,本发明的纳米脂质体颗粒同样有很好的包封效果,这是纳米脂质体颗粒难以实现的。

[0030] 常规阳离子脂质体颗粒,包裹mRNA后,在生理条件下呈正电,易吸附血清中的蛋白,发生聚集;易诱导免疫反应,被免疫细胞吞噬、清除,在血液中的循环时间较短,递送效率较低。与常规阳离子脂质体颗粒相比,本发明的纳米脂质体颗粒包裹mRNA后,在生理条件下呈弱负电,与血液中呈负电的蛋白,补体等发生静电排斥,机体内减少蛋白的吸附,降低LNP的聚集,同时减少由于吸附补体造成的补体诱导的免疫反应,一方面降低了LNP的免疫原性,另一方面可以减少LNP被机体免疫系统的非特异性清除,延长LNP在血液中的循环时间,增加递送效率。

[0031] 采用本发明可离子化阳离子脂质组成的LNP相变温度较低,在内涵体的酸性环境中易于从磷脂双分子的层状结构变为倒六角形结构,同时与内涵体的膜有较好的融合性,这两种特性均有助于LNP在内涵中能够高效的破坏内涵体膜的稳定性和LNP自身的稳定性,促进mRNA从内涵体中逃逸到胞质中启动翻译,因此该递送系统有较高的内涵体逃逸效率。

[0032] 本发明的可离子化阳离子脂质由一些毒性较小的基团组成,由它组成的纳米脂质体颗粒在体内产生免疫原性较小,不仅降低了体内由纳米脂质体颗粒诱导的副反应,而且减少了固有免疫激活所导致的机体对mRNA疫苗的清除作用,因此,该载体有良好的生物相容性以及耐受性。由此载体递送的mRNA疫苗递送效率高,可以多次给药,而且副作用小。

[0033] 本发明的纳米脂质体颗粒相较于一般的递送自扩增mRNA的阳离子脂质体,该可离子化阳离子脂质在体内更容易被机体降解,纳米脂质体颗粒在体内的代谢速率快,保留时间短,产生的副作用小。

附图说明

- [0034] 图1本发明实施例可离子化阳离子脂质(化合物A,L5)结构示意图
- [0035] 图2本发明实施例DSPC结构示意图
- [0036] 图3本发明实施例胆固醇结构示意图
- [0037] 图4本发明实施例DMG-PEG(或DMG-PEG 2000)结构示意图
- [0038] 图5本发明实施例载体TC-83结构示意图
- [0039] 图6本发明实施例整个载体示意图
- [0040] 图7本发明实施例Zeta电位分析仪测定数据谱图
- [0041] 图8本发明实施例荧光强度标准曲线谱图
- [0042] 图9本发明实施例显微镜下的荧光观测谱图

具体实施方式

[0043] 以下将参照附图,对本发明的优选实施案例进行详细描述。除非另外确切定义,本文所使用的所有技术和科学术语具有与本披露所属领域的技术人员通常所理解的相同的意义。除非另有说明,本文采用或考虑的技术是本领域普通技术人员熟知的标准方法、或按照制造厂商所建议的条件进行。除非另外说明,本披露的实践将使用本领域技术范围内的微生物学、组织培养、分子生物学、化学、生物化学以及重组DNA技术的常规技术。这些材料、方法、和实例仅是说明性的并且不是限制性的。以下通过说明的方式呈现,并非旨在限制本披露的范围。

[0044] 在一些实施例中,在说明书中阐述的数字参数(权利要求全部并入其中)是近似值,其可以根据由特定实施例寻求获得的期望性质而变化。在一些实施例中,这些数值参数应该按照报告的有效数字的数量以及通过应用普通的舍入技术(rounding technique)来解释。虽然阐述本披露的一些实施例的广泛范围的数字范围和参数是近似值,但是在具体实例中阐述的数值被尽可能地精确地报道。在本披露的一些实施例中呈现的数值可含有由其各自测试测量中发现的标准偏差必然导致的某些误差。本文中对数值范围的描述仅旨在用作逐个提及落入所述范围内的各个独立值的一种简化方法。除非在本文中另有说明,否则将各个独立的值并入说明书中,就如同在本文中对它进行了逐个描述一样。

[0045] 为方便,这里收集了在整个申请(包括本说明书、实例和所附权利要求书)中使用的某些术语。除非另外定义,本文所使用的所有技术和科学术语具有与本披露所属领域的技术人员通常所理解的相同的意义。

[0046] 在一些实施例中,用于描述和要求保护本披露的某些实施例的表达成分的数量、性质(例如分子量)、反应条件和结果等的数字应理解为在某些情况下被术语“约”修饰。本领域普通技术人员将在限定值的上下文中理解术语“约”的含义。在一些实施例中,术语“约”用于表示一个值包括用于确定所述值的设备或方法的平均值的标准偏差。在一些实施例中,在说明书中阐述的数字参数(权利要求全部并入其中)是近似值,其可以根据由特定实施例寻求获得的期望性质而变化。在一些实施例中,这些数值参数应该按照报告的有效数字的数量以及通过应用普通的舍入技术(rounding technique)来解释。虽然阐述本披露的一些实施例的广泛范围的数字范围和参数是近似值,但是在具体实例中阐述的数值被尽可能地精确地报道。在本披露的一些实施例中呈现的数值可含有由其各自测试测量中发现

的标准偏差必然导致的某些误差。

[0047] 术语“化合物”包括所示结构的所有同位素和异构体。“同位素”是指具有相同原子序数但质量数不同的原子,其由核中不同数目的中子产生。例如,氢的同位素包括氕和氘。此外,本披露的化合物、盐或复合物可以与溶剂或水分子组合制备,以通过常规方法形成溶剂化物或水合物。“异构体”意指化合物的任何几何异构体、互变异构体、两性离子、立体异构体、对映异构体或非对映异构体。化合物可以包括一个或多个手性中心和/或双键,因此可以立体异构体(例如双键异构体或非对映异构体)存在。本披露涵盖本文所述化合物的任何和所有异构体,所述异构体包括立体异构纯形式以及对映体和立体异构体混合物,例如外消旋体。化合物的对映体和立体异构体混合物以及将它们分解成其组分对映体或立体异构体的方法是本领域熟知的。

[0048] 术语“包含”、“具有”和“包括”是开放式连接动词。这些动词中的一个或多个的任何形式或时态例如“包含(comprises、comprising)”、“具有(has、having)”、“包括(includes、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不限于仅具有那一个或多个步骤,并且还可以涵盖其他未列出的步骤。类似地,“包含”、“具有”或“包括”一个或多个特征的任何组合物不限于仅具有那一个或多个特征并且可以涵盖其他未列出的特征。本文关于某些实施例提供的任何和所有实例或示例性语言(例如“例如”)的应用仅旨在更好地说明本披露,而不对另外要求保护的本披露范围做出限制。说明书中的语言不应当被解释为指示任何未要求保护的要素为实践本披露所必需的。

[0049] 术语“由……组成”是指如本文所述的组合物、方法、及其对应的组分,其排除在该实施例的这个说明中没有描述的任何要素。

[0050] 如本文所用,术语“递送”意指向目的地提供实体。例如,向细胞递送治疗剂可涉及向细胞施用包含至少一种包含mRNA的纳米颗粒的药物组合物。

[0051] 如本文所用,核酸序列的“表达”是指一个或多个以下事件:(1)从DNA序列产生RNA模板(例如通过转录);(2)RNA转录物的加工(例如通过剪接、编辑、5'帽形成和/或3'末端加工);(3)将RNA翻译成多肽或蛋白质;和(4)多肽或蛋白质的翻译后修饰。

[0052] 如本文所用,术语“脂质组分”是包括一种或多种脂质的纳米颗粒的组分。例如,脂质组分可以包括一种或多种可离子化阳离子脂质、脂质A、脂质B、脂质C。在一个实施例中,脂质组分包含化合物A(图1)。

[0053] 如本文所用,“纳米颗粒”是包含一种或多种脂质和一种或多种治疗剂的颗粒。纳米颗粒的尺寸量级通常为微米或更小,并且可包括脂质双层。在一些实施例中,通过DLS(动态光散射)纳米颗粒的平均直径(例如,等效直径)为约70nm与约150nm之间,例如直径为约80nm与约120nm之间、90nm与110nm之间。在一些实施例中,纳米颗粒的平均动力学直径为约90nm、91nm、92nm、93nm、94nm、95nm、96nm、97nm、98nm、99nm、100nm、101nm、102nm、103nm、104nm、105nm、106nm、107nm、108nm、109nm或110nm。在一些实施例中,治疗剂是mRNA。在一些实施例中,纳米颗粒包含如图1所示的化合物A(L5)和mRNA。

[0054] 如本文所用,“多分散指数(PDI)”是纳米颗粒样品中纳米颗粒尺寸分布的量度。在一些实施例中,多分散指数为约0.10与0.20之间,例如约0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19或0.20。

[0055] 如本文所用,“总脂”、“总脂质”是乙醇装载法合成脂质体纳米颗粒时,先期溶解并

混合在乙醇中的所有脂质,包括可离子化阳离子脂质、脂质A、脂质B、脂质C及其他脂质。在一个实施案例中,总脂包括化合物A(L5,图1)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC,图2)、胆固醇(图3),及DMG-PEG(图4)。

[0056] 如本文所用,N:P(N/P比)是可离子化阳离子脂质中的氮原子与治疗剂mRNA中的磷酸基团的摩尔比。

[0057] 如本文所用,“mRNA:总脂体积比”、“mRNA:总脂质体积比”是脂质合成时,mRNA与脂质组分(包括可离子化阳离子脂质、脂质A、脂质B、脂质C及其他脂质)混合时,二者的体积比。在一个实施案例中mRNA:总脂体积比为2。

[0058] 如本文所用,“mRNA:总脂质流速比”、“总流速”、“Start waste”、“End waste”是在Precision Nanosystems微流控纳米颗粒制备系统ignite上制备可离子化阳离子脂质时,仪器的设定参数,其定义符合Precision Nanosystems对其基本定义,其结果为实验调整所得。在一个实施案例中mRNA:总脂质流速比为2,总流速为12mL/min,Start waste为0.35mL,End waste为0.05mL。

[0059] 如本文所用如本文使用,术语“核酸”在其最广泛的意义上包括包含通过磷酸二酯键连接的核苷酸聚合物的任何化合物和/或物质。这些聚合物通常称为寡核苷酸或多核苷酸,这取决于大小。术语“多核苷酸序列”和“核苷酸序列”在本文中也可互换使用。

[0060] 如本文使用,“蛋白质”是基本上由20个氨基酸中的任何氨基酸组成的聚合物。虽然“多肽”通常用于提及相对较大的多肽,而“肽”通常用于提及小多肽,但本领域中这些术语的使用重叠并且是变化的。本文中术语“肽”、“蛋白质”和“多肽”有时可以互换使用。

[0061] 本实施例提供一种含可离子化阳离子脂质的纳米脂质体颗粒及制备方法:

[0062] 自扩增mRNA的制备:

[0063] 将绿色荧光蛋白(EGFP)的基因序列(如SEQ ID NO:1所示)插入到具有自我复制功能的载体TC-83中,该载体包含T7启动子,5'端帽子,5'端UTR,非结构蛋白(nsP),3'端UTR,poly(A)尾巴等结构。

[0064] 图5为TC-83结构示意图,图6为整个载体示意图。

[0065] 制备步骤如下:

[0066] 1.将扩增后的质粒TC-83-EGFP用酶BspQ1(NEB,酶的用量1U/ug DNA),在37℃反应1小时,将质粒酶切线性化。

[0067] 2.酶切线性化完全后,用异丙醇-醋酸钠(V/V=9:1)沉淀至少30min,12000g离心10min,用预冷的70%乙醇洗涤,风干,用无核酸酶水溶解成约1ug/u1的线性DNA溶液。

[0068] 3.以线性化的TC-83-EGFP为模板,在T7 RNA聚合酶体外转录试剂盒(NEB)体系下转录合成mRNA。

[0069] 反应体系如表1:

[0070] 表1

	组分	添加量	浓度
	水	11.5 μ l	
	10X T7 反应缓冲液 (NEB)	2 μ l	
	4 种核糖核苷酸混合物(10mM)	1 μ l	每种核糖核苷酸的终浓度 0.5 mM
[0071]	线性化 DNA 模板 (1ug/ μ l)	2 μ l	
	RNA 酶抑制剂	0.5 μ l	终浓度 1 U/ μ l
	二硫苏糖醇(100mM)	1 μ l	终浓度 5 mM
	T7 RNA 聚合酶	2 μ l	
	总体积	20 μ l	

[0072] 4. 37℃条件下反应1小时。

[0073] 5. 反应完成后,用DNase 1 (NEB,酶用量1U/ μ g DNA),在37℃反应1小时,去除模板DNA。

[0074] 6. DNA模板去除后,向溶液中加入0.6倍体积的氯化锂,在-20℃沉淀至少30min后,12000g离心15min,用预冷的70%乙醇洗涤,风干,用无核酸酶水溶解成合适浓度的mRNA溶液。

[0075] 7. 取10ug的mRNA溶液在无核酸酶的1.5ml离心管中稀释至15 μ l,在65℃条件下5min,然后迅速放在冰上5min,去除mRNA的二级结构。

[0076] 8. 将上步所得的mRNA溶液,在体外加帽试剂盒 (NEB) 体系下,给mRNA加帽。

[0077] 9. 加帽体系如表2:

[0078] 表2

	步骤 8 中得到的 mRNA	15.0 μ l
	10X 加帽反应缓冲液 (NEB)	2.0 μ l
	鸟苷三磷酸(10 mM)	1.0 μ l
[0079]	S 腺苷甲硫氨酸 (2 mM, dilute 32 mM stock to 2 mM)	1.0 μ l
	牛痘病毒加帽酶	1.0 μ l
	总体积	20 μ l

[0080] 在37℃条件下反应30min。

[0081] 10. 加帽反应完成后,向溶液中加入0.6倍体积的氯化锂溶液,在-20℃沉淀至少30min,12000g离心15min,去上清,用预冷的70%乙醇洗涤,风干,用无核酸酶水溶解至合适的浓度并在-80℃保存。

[0082] 纳米脂质体颗粒包裹mRNA:

[0083] 将化合物A(即L5, 博纳新材料, 图1)或D-Lin-MC3-DMA(阿万蒂极性脂质公司(Avanti Polar Lipids))、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC, 阿万蒂极性脂质公司(Avanti Polar Lipids), 图2)、胆固醇(阿万蒂极性脂质公司(Avanti Polar Lipids), 图3)和聚乙二醇改性的脂质(来自阿万蒂极性脂质公司(Avanti Polar Lipids)的DMG-PEG2000, 图4)溶解在无水乙醇中, 制备成储备溶液。

[0084] 按表1的摩尔比, 在无水乙醇中混合化合物A、DSPC、胆固醇, 及DMG-PEG(图1), 至总脂质浓度为12mM。用柠檬酸缓冲液(pH=3.0)将mRNA稀释至所需的体积, mRNA中磷与最终制剂中的化合物A中氮的摩尔比为10即(N/P=10), 实施方案示于表3。

[0085] 表3

[0086]	化合物 A	DSPC	胆固醇	DMG-PEG	N/P 比	柠檬酸 pH
	40 %	10 %	48 %	2 %	10	3.0

[0087] 采用乙醇装载法的原理, 在ignite(Precision Nanosystems)微流控纳米颗粒制备系统上制备可离子化阳离子脂质, 总流速为12mL/min, Start waste及End waste分别为0.35mL和0.05mL, 实施方案示于表4。

[0088] 表4

[0089]	化合物 A	mRNA: 总脂 体积比	mRNA: 总脂 流速比	总流速 (mL/min)	Start waste (mL)	End waste (mL)
	40 %	2	2	12	0.35	0.05

[0090] 用0.22μm的滤膜除菌过滤后, NanoBrook Omni多角度粒度与高灵敏度Zeta电位分析仪测定其有效粒径、多分散指数(PDI)及Zeta电位, 如图7所示。

[0091] 用Quant-iT™RiboGreen™RNA定量检测试剂盒(Life Technology)精确测定mRNA的浓度, 该试剂盒中的荧光染料可以高效的结合mRNA并发出荧光, 因此, 测定的荧光强度与样品中的mRNA浓度呈正相关。通过标准曲线可以建立mRNA浓度与测定的荧光强度之间的线性关系。根据样品的荧光读值就可以计算出mRNA的浓度。而染料不能穿透LNP去结合包裹在LNP中的mRNA, 因此在不破坏LNP结构时, 测定的最终浓度是游离在LNP之外, 没有被包裹的mRNA的浓度; 而5% (v/v) Triton X-100可以破坏LNP的结构将包裹在LNP中的mRNA释放出来, 因此, 在用5% (v/v) Triton X-100破坏LNP后测定的mRNA浓度是样品中总的mRNA的浓度。通过比较不添加5% (v/v) Triton X-100时, LNP样品中mRNA的浓度和添加5% (v/v) Triton X-100时, LNP样品中mRNA的浓度, 就可以计算出包裹在LNP中的mRNA的浓度, 从而计算出LNP的封装率。

[0092] 其计算公式为:

[0093] 封装率EE% = $(1 - C_{\text{mRNA (无Triton X-100)}} \div C_{\text{mRNA (Triton X-100)}}) \times 100\%$

[0094] 由于Triton X-100会影响测量时的荧光读值, 为了排除Triton X-100的干扰, 测定mRNA浓度时, 需要制作两个标准曲线。标准曲线1使用1xTE buffer稀释标准品, 用于测定的LNP体系中游离的mRNA的浓度。标准曲线2使用5% Triton X-100稀释标准品, 用于测定裂解LNP后总的mRNA的浓度。

[0095] 测量标准曲线1(图8a)时, 采用的标准品的浓度示于表3。

[0096] 表3

	2 $\mu\text{g/mL}$ RNA 标准品体积(μL)	TE 缓冲液 的体积 (μL)	RNA 标准品的终浓度(ng/mL)
[0097]	100	0	1000
	75	25	750
	50	50	500
	25	75	250
	10	90	100
	5	95	50
	1	99	10
	0	100	0

[0098] 根据表3中的标准品以及最终的荧光读值,制作标准曲线1并根据标准曲线的线性关系计算出游离的mRNA浓度。

[0099] 测量标准曲线2 (图8b) 时,采用标准品的浓度示于表4。

[0100] 表4

	2 $\mu\text{g/mL}$ RNA 标准品(含 5%Triton X-100)体积 (μL)	1xTE(含 5%Triton X-100)缓冲液的体积 (μL)	RNA 标准品(含 5%Triton X-100)的终浓度 (ng/mL)
[0101]	100	0	1000
	75	25	750
	50	50	500
	25	75	250
	10	90	100
	5	95	50
	1	99	10
	0	100	0

[0102] 根据表4中标准品以及最终的荧光读值,制作标准曲线2并根据标准曲线2的线性关系计算出总的mRNA浓度。

[0103] 依据图8的标准曲线的线性关系,计算出LNP溶液中游离的mRNA浓度 C_{mRNA} (无 Triton X-100) 以及总的mRNA浓度 C_{mRNA} (Triton X-100), 根据以上公式算出LNP的包封率 $\text{EE}\% = 97\%$ 。

[0104] 综合以上结果,得到包裹mRNA后的LNP相关理化性质,示于表5。

[0105] 表5

LNP 组成	N/P	流速比 (mRNA : lipid)	有效 粒径 (nm)	多分 散指 数 (PDI)	Zeta 电 位 (mV)	包封率 (EE%)
L5:DSPC:胆固醇: DMG-PEG2000 (40:10:48:2)	10	2: 1	93.55	0.054	-3.40	97

[0107] 在另一个实施方案中,包含化合物A (L5) 的具体描述如下:

- [0108] 脂质的比率(以摩尔百分比表示):
- [0109] 可离子化阳离子脂质:mRNA比率为10;
- [0110] mRNA:总脂质体积比为2:1;
- [0111] mRNA:总脂质流速比为2:1;
- [0112] 总流速:12mL/min;
- [0113] Start waste:0.35mL;
- [0114] End waste:0.05mL;
- [0115] 柠檬酸缓冲(pH=6.0);
- [0116] 40/10/48/2(化合物A(L5):DSPC:胆固醇:DMG-PEG)
- [0117] LNP递送自复制mRNA-EGFP至293FT细胞并检测EGFP在细胞中的表达水平
- [0118] 将包裹了自复制mRNA的LNP首先使用无RNA酶的1xPBS缓冲液在4度条件下透析18h,将LNP中的乙醇和柠檬酸缓冲液替换成1xPBS;然后使用15mL超滤管(Millipore)进行浓缩,最后使用0.22um的膜(Millipore)对LNP进行过滤除菌。将合适量的LNP加入到生长状况良好,密度合适的293FT细胞中,细胞放在37℃5%的CO₂条件下培养。通过SDPTOP ICX41倒置荧光显微镜观测不同时间点293FT细胞中绿色荧光蛋白的产生,结果显示,LNP有良好的递送效果并且具有一定的时间效应,荧光蛋白的表达时间较长,如图9。
- [0119] 以上未涉及之处,均适用于现有技术及本领域技术人员的常规技术手段。
- [0120] 以上所述仅是对本发明的优选实施例及原理进行了详细说明,对本领域的普通技术人员而言,依据本发明提供的思想,在具体实施方式上会有改变之处,而这些改变也应视为本发明的保护范围。

序列表

<110> 浙江汇科泽华生物技术有限公司

<120> 一种含可离子化阳离子脂质的纳米脂质体颗粒及制备方法

<160> 1

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 716

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```
atgtccaagg gcgaggaaact gttcacgggc gtcgtcccga tcctcgtcga actcgatggc 60
gacgtcaacg gccacaagtt ctccgtcagc ggtgaagggtg aaggcgacgc cacctacggc 120
aagctcaccc ttaagttcat ctgcaccacc ggcaaactgc cgggtgccgtg gccgacgctg 180
gtcacgaccc tcacgtatgg cgttcagtgc ttctcgcgct acccggacca catgaagcag 240
cacgatttct tcaagtcggc gatgccggaa ggctacgtcc aggaacgcac gatctttctt 300
aaggacgatg gcaactacaa gacccgcgcc gaagtcaagt tcgagggcga cagccttgtg 360
aatcgcacgc aacttaaggg catcgacttc aaggaagatg gcaacatcct cggccacaag 420
ctggagtata actacaattc gcacaacgtc tacatcatgg ctgacaagca gaagaatgg 480
atcaaggtta acttcaagat ccgccacaac atcgaagacg gtcctcgcca gctggcggac 540
cactatcagc agaacacccc gatcggcgac ggcccggttc tcctcccga taaccactac 600
ctcagcacgc agtcggcgct gtcgaaggac ccgaatgaaa agcgcgacca catggtcctt 660
ctggagttcg tgaccgcggc gggcatcacg cacggcatgg acgaacttta caagta 716
```

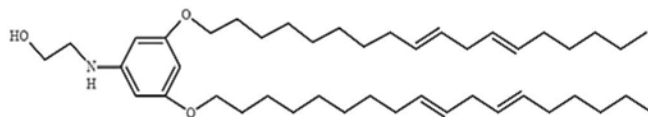


图1

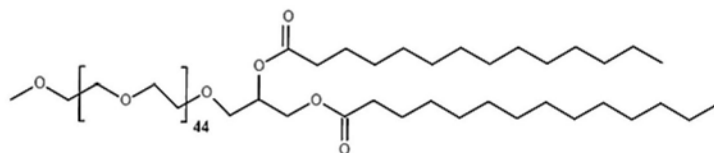


图2

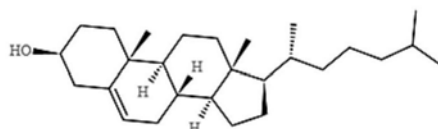


图3

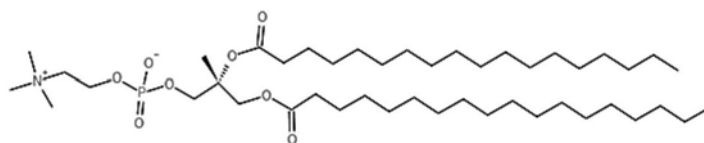


图4

Self-amplifying mRNA (replicon)

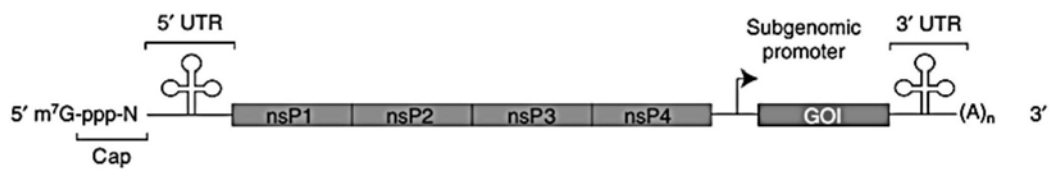


图5

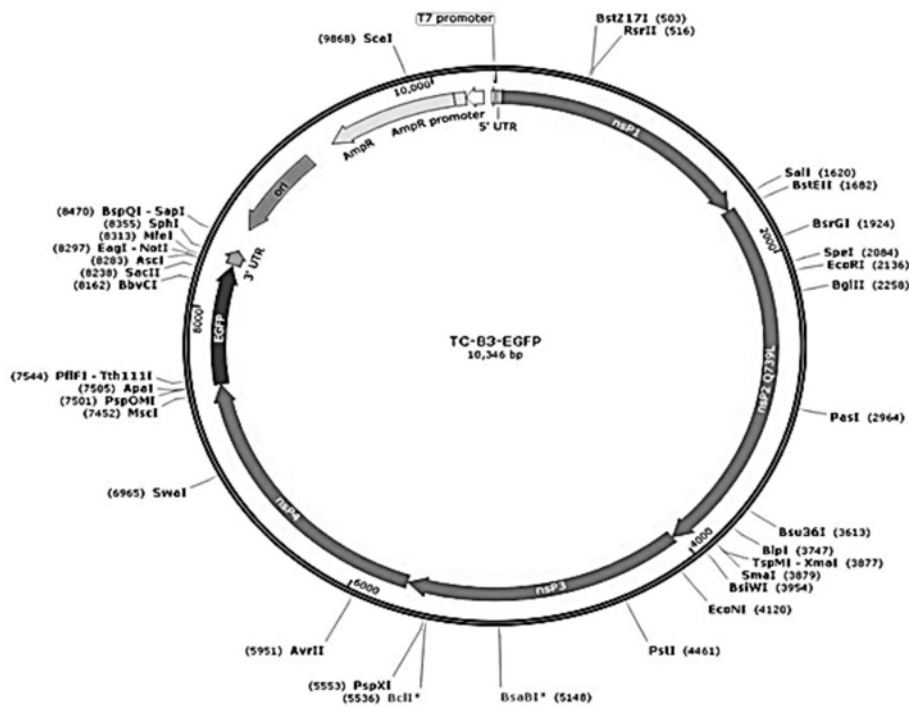


图6

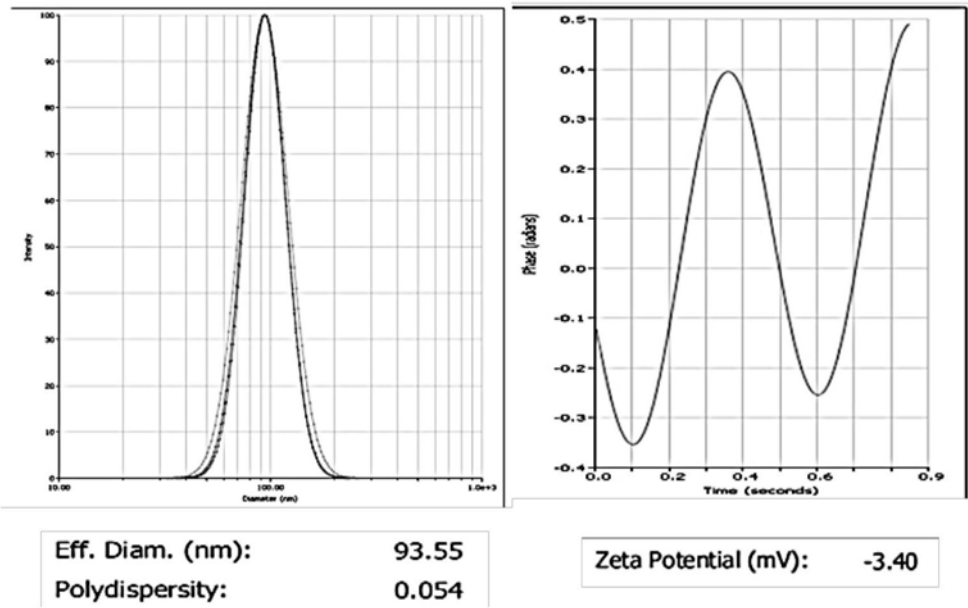


图7

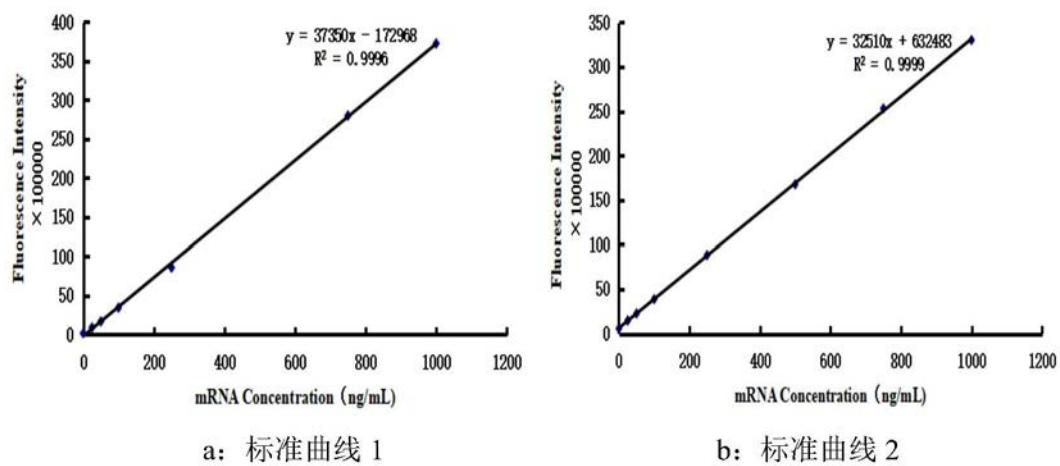


图8

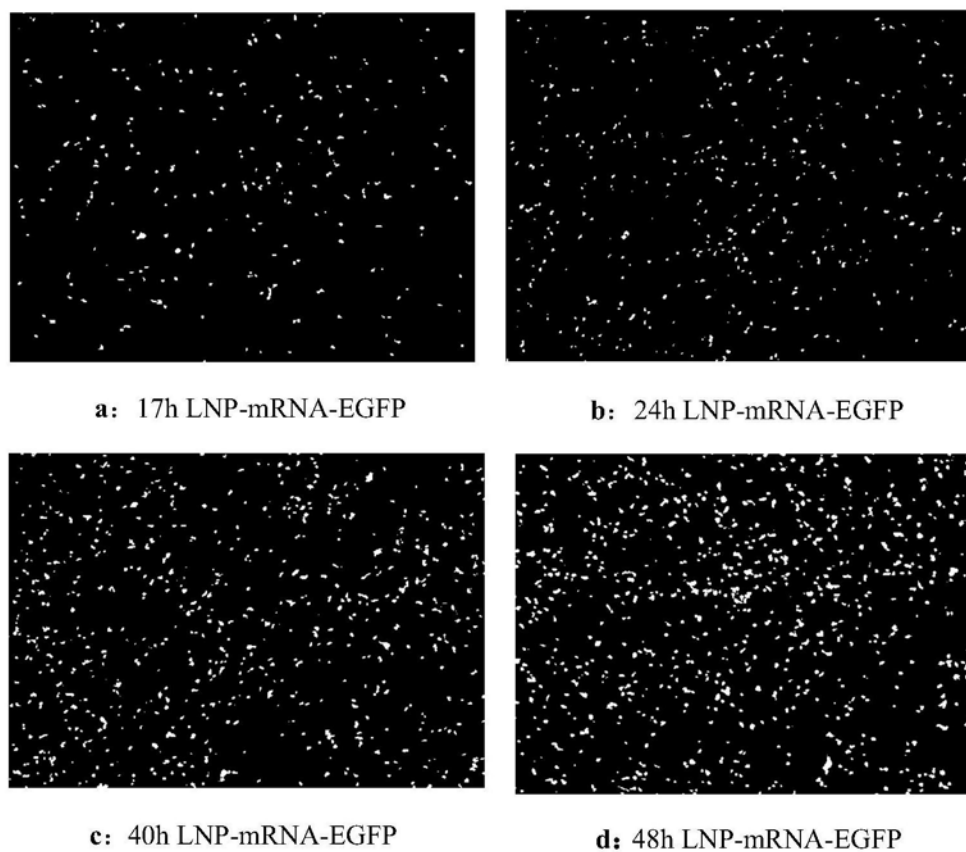


图9