



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118201605 A

(43) 申请公布日 2024.06.14

(21) 申请号 202280071413.1

索纳尔·德什潘德

(22) 申请日 2022.10.25

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限  
责任公司 11219

(30) 优先权数据

63/271,595 2021.10.25 US

专利代理师 辛怡 杨青

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.04.24

(51) Int. Cl.

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/078659 2022.10.25

A61K 31/7088 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/076902 EN 2023.05.04

(71) 申请人 杜克大学

地址 美国

(72) 发明人 阿舒托什·奇尔科提 索曼·萨哈

帕鲁尔·司罗熙

安格斯·哈科纳尔

权利要求书3页 说明书28页

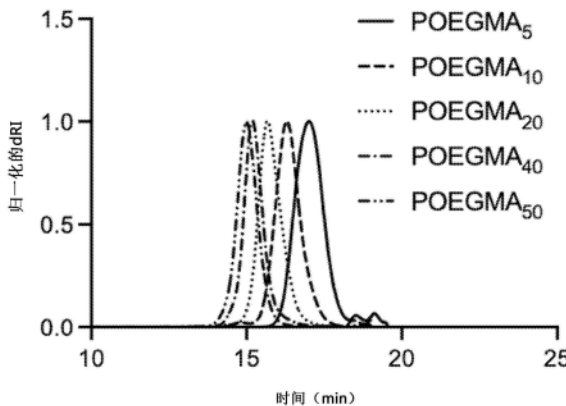
序列表(电子公布) 附图42页

(54) 发明名称

基于POEGMA的脂质纳米粒子

(57) 摘要

本文公开了包含POEGMA-脂质偶联物的脂质纳米粒子,其可以有效地包封和递送治疗剂,而没有基于PEG的对应物所遭受的免疫后果。示例性脂质纳米粒子包含可离子化脂质、磷脂、甾醇、POEGMA-脂质偶联物和治疗剂。本文还公开了包含基于POEGMA的脂质纳米粒子的药物组合物、治疗疾病或障碍的方法和将治疗剂递送到细胞的方法。



1. 一种脂质纳米粒子,其包含:  
可离子化脂质;  
磷脂;  
甾醇;  
少于10mol%的聚[寡聚(乙二醇)醚甲基丙烯酸酯](POEGMA)-脂质偶联物,其中所述POEGMA具有小于100kDa的数均分子量;和  
治疗剂。
2. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中所述POEGMA具有聚(甲基丙烯酸甲酯)骨架和多个共价附连到所述骨架的侧链,每个侧链包含2至9个串联重复的乙二醇(EG)单体。
3. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子相对于包含聚乙二醇(PEG)的脂质纳米粒子具有降低的免疫应答。
4. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子对受试者中预先存在的抗PEG抗体没有反应性。
5. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中所述POEGMA-脂质偶联物的脂质包含C<sub>2-40</sub>烃链。
6. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中所述POEGMA-脂质偶联物的脂质通过三唑、酰胺、酯、醚或烃接头与所述POEGMA偶联。
7. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中所述POEGMA具有约1kDa至约50kDa的数均分子量。
8. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子包含约0.1mol%至约10mol%的所述POEGMA-脂质偶联物。
9. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中所述可离子化脂质包含(十七烷-9-基-8-((2-羟基乙基)(6-酮基-6-(十一烷氧基)己基)氨基)辛酸酯)(SM-102)、3,6-双({4-[双(2-羟基十二烷基)氨基]丁基})哌嗪-2,5-二酮(cKK-E12)、1-亚油酰基-2-亚油基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亚油基苯氨甲酰氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLm-DAP)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLin-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-DMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵丙烷(DODAP)、N,N-二甲基-(2,3-二油基氧基)丙胺(DODMA)、双十八烷基酰胺基甘油基羧基精胺(DOGS)、精胺胆甾醇氨基甲酸酯(GL-67)、双胍-亚精胺-胆甾醇(BGTC)、3b-(N-(N<sup>A</sup>N'-二甲基氨基乙烷-氨甲酰基胆甾醇)(DC-Chol)、N-叔丁基-N'-十四烷基氨基-丙脒(diC14-脒)、二甲基双十八烷基溴化铵(DDAB)、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟基乙基溴化铵(DMR1E)、N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、二油基氧基丙基-3-二甲基羟基乙基溴化铵(DORIE)、N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N-2-(精胺甲酰胺基)乙基)-N,N-二甲基三氟乙酸铵(DOSPA)、2-二油酰基三甲基丙烷氯化铵(DOTAP)、N-(1-(23-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、氨基丙基-二甲基-双(十二烷基氧基)-丙烷溴化铵(GAP-DLRIE)、1,2-二油酰基-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、(4-羟基丁基)氮烷二基]二(己烷-6,1-二基)双(2-己基癸酸酯)(ALC-0315)或其组合。

10. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中所述可离子化脂质包含(十七烷-9-基-8-((2-羟基乙基)(6-酮基-6-(十一烷氧基)己基)氨基)辛酸酯)(SM-102)。

11. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子包含约20mol%至约65mol%的所述可离子化脂质。

12. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中所述磷脂包含二硬脂酰基-sn-甘油基-磷酸乙醇胺、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-甲酸盐(DOPE-mal)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺、二甲基-磷脂酰乙醇胺、18-1-反式PE、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、卵磷脂酰胆碱(EPC)、二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)、鞘磷脂(SM)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油(DMPG)、二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、二芥酰基磷脂酰胆碱(DEPC)、棕榈酰基油酰基磷脂酰甘油(POPG)、二反油酰基-磷脂酰乙醇胺(DEPE)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DMPC)、卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂类、二鲸蜡基磷酸酯、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰胆碱或其组合。

13. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子包含约5mol%至约25mol%的所述磷脂。

14. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中所述甾醇包含胆甾醇、菜油甾醇、antrosterol、链甾醇、nicasterol、豆甾醇、谷甾醇、氧化甾醇、C<sub>4-10</sub>甾醇、麦角甾醇、胆甾-4-烯-3-酮或其组合。

15. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子包含约10mol%至约50mol%的所述甾醇。

16. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中所述治疗剂是包含siRNA、miRNA、反义寡核苷酸、shRNA、mRNA、tRNA、rRNA、CircRNA、DNA或其组合的核酸。

17. 根据权利要求16所述的脂质纳米粒子,其中所述核酸包含siRNA、mRNA或其组合。

18. 一种脂质纳米粒子,其包含:

(十七烷-9-基-8-((2-羟基乙基)(6-酮基-6-(十一烷氧基)己基)氨基)辛酸酯)(SM-102);

DSPC;

胆甾醇;

约0.25mol%至约3mol%的聚[寡聚(乙二醇)醚甲基丙烯酸酯](POEGMA)-脂质偶联物,其中所述POEGMA具有约1kDa至约50kDa的数均分子量;和

mRNA。

19. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子具有约4:1至约16:1的N:P比例。

20. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子具有约30nm至约300nm的直径。

21. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其中当通过荧光测量时,所述脂质纳米粒子具有大于或等于75%的治疗剂包封效率。

22. 根据权利要求1所述的脂质纳米粒子,其进一步包含靶向配体。

23. 一种药物组合物,其包含:

一种或多种根据权利要求1所述的脂质纳米粒子;和  
药学上可接受的赋形剂。

24. 一种在有需要的受试者中治疗疾病或障碍的方法,所述方法包括向所述受试者给药任选地与药学上可接受的赋形剂组合的有效量的一种或多种根据权利要求1所述的脂质纳米粒子。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述一种或多种脂质纳米粒子相对于包含聚乙二醇(PEG)的脂质纳米粒子具有降低的免疫应答,与所述受试者中预先存在的抗PEG抗体没有反应性,或其组合。

26. 根据权利要求24所述的方法,其中所述疾病或障碍是传染病、亨廷顿病、肌肉萎缩症、自身免疫疾病或癌症。

27. 一种将治疗剂递送到细胞的方法,所述方法包括将所述细胞与一种或多种根据权利要求1所述的脂质纳米粒子接触,由此将所述治疗剂递送到所述细胞。

## 基于POEGMA的脂质纳米粒子

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年10月25日提交的美国临时专利申请第63/271,595号的优先权,所述临时申请整体通过引用并入本文。

[0003] 对电子序列表的引用

[0004] 电子序列表(名称:028193-9376-W001\_Sequence\_Listing.xml;大小:9,210个字节;创建日期:2022年10月25日)的内容整体通过引用并入本文。

### 技术领域

[0005] 本公开涉及包含POEGMA-脂质偶联物的脂质纳米粒子及其在生物医学应用例如药物递送中的用途。

### 背景技术

[0006] 脂质纳米粒子(LNP)由于其生物相容性、与有效载荷的高效复合、细胞摄取和成功的内体逃逸,已成为核酸递送(例如mRNA)的有前途的载体。由于在有效保护mRNA和将mRNA运输到细胞中发挥的作用,LNP作为COVID-19mRNA疫苗的重要组分一直备受关注。LNP通常包含PEG化的脂质,其可以为LNP提供隐身特性。由于调理作用减少和溶解度提高,具有PEG涂层的LNP与天然LNP相比具有长得多的血浆半衰期。不幸的是,PEG化LNP的体内给药有几个局限性,包括免疫原性、过敏性副反应以及被诱导和预先存在的PEG抗体的清除增强。由于PEG的不可生物降解的结构和RES的清除作用,PEG的重复给药也可能在主要器官中形成液泡。此外,PEG的不耐受已导致几项临床试验提前终止,几种治疗剂也退出市场。根据CDC,PEG已被鉴定为导致对基于LNP的Pfizer-BioNTech冠状病毒疫苗的过敏反应的主要组分之一。

### 发明内容

[0007] 一方面,公开了脂质纳米粒子,其包含:可离子化脂质;磷脂;甾醇;少于10mol%的聚[寡聚(乙二醇)醚甲基丙烯酸酯](POEGMA)-脂质偶联物,其中所述POEGMA具有小于100kDa的数均分子量;和治疗剂。

[0008] 另一方面,公开了脂质纳米粒子,其包含:(十七烷-9-基-8-((2-羟基乙基)(6-酮基-6-(十一烷氧基)己基)氨基)辛酸酯)(SM-102);DSPC;胆甾醇;约0.25mol%至约3mol%的POEGMA-脂质偶联物,其中所述POEGMA具有约1kDa至约50kDa的数均分子量;和mRNA。

[0009] 另一方面,公开了药物组合物,其包含一种或多种本文所公开的脂质纳米粒子和药学上可接受的赋形剂。

[0010] 另一方面,公开了在有需要的受试者中治疗疾病或障碍的方法,所述方法包括向所述受试者给药任选地与药学上可接受的赋形剂组合的有效量的一种或多种本文所公开的脂质纳米粒子。

[0011] 另一方面,公开了将治疗剂递送到细胞的方法,所述方法包括将所述细胞与一种

或多种本文所公开的脂质纳米粒子接触,由此将所述治疗剂递送到所述细胞。

### 附图说明

[0012] 图1示出了示例性叠氮基聚[寡聚(乙二醇)醚甲基丙烯酸酯](POEGMA)的凝胶渗透色谱-多角度光散射(GPC-MALS)(图1A)和反相高效液相色谱(HPLC)(图1B)迹线。

[0013] 图2示出了示例性POEGMA-脂质偶联物(POEGMAL)的纯化和表征。图2A:POEGMAL的纯化的示意图。图2B:POEGMA化脂质的典型TLC迹线。图2C:POEGMA<sub>10</sub>和POEGMAL<sub>10</sub>的物理外观。图2D:在 $\delta 0.5-2.5$ 和 $\delta 7.3-7.8$ 之间的理论质子数与通过质子NMR获得的相应实验确定值的比率。

[0014] 图3示出了示例性LNP的动态光散射分析。图3A-图3C:空白LNP。不含mRNA的各种LNP的流体动力学半径(图3A)、多分散性(图3B)和粒度分布(图3C)。图3D-图3F:含有mRNA的LNP。含有mRNA的各种LNP的流体动力学半径(图3D)、多分散性(图3E)和粒度分布(图3F)。

[0015] 图4示出了在示例性LNP内包封的mRNA的表征和定量。图4A:在添加Triton X-100之前(-)和之后(+)各种LNP的凝胶电泳。图4B:Ribogreen测定法的示意图。图4C:通过Ribogreen测定法测量的mRNA包封效率的%。 $*P<0.01$ , $**P<0.001$ ;双向ANOVA(Tukey's多重比较检验)。

[0016] 图5示出了对于示例性LNP而言,用于提高萤光素酶mRNA包封效率(EE)的脂质比率的分析。图5A:在POEGMAL<sub>10-50</sub>和SM-102的各种mol%下LNP的EE。在0.5(图5B)、1.5(图5C)和2.5(图5D)mol%下各种LNP的EE与流体动力学半径之间的关系。图5E:在针对PBS透析后示例性LNP的EE。

[0017] 图6示出了在POEGMAL<sub>5</sub>的各种mol%下,在针对PBS透析后示例性LNP的萤光素酶mRNA EE。图6A:半径;图6B:多分散性的%;和图6C:包封的%。

[0018] 图7示出了在针对PBS透析后LNP<sub>POEGMAL5</sub>(上图)和LNP<sub>POEGMAL10</sub>(下图)的低温透射电子显微镜(Cryo-TEM)图像。

[0019] 图8示出了提高LNP<sub>POEGMAL10</sub>包封治疗相关的成熟全长SAR COV-2mRNA的EE的参数分析。针对PBS透析之前(图8A)和之后(图8B)的EE。图8C:针对所指示的缓冲剂透析后的流体动力学半径。N:P(图8D)、LNP制备期间的乙醇分数(图8E)和脂质mol%(图8F)对mRNA包封的影响。

[0020] 图9示出了示例性LNP的Cluc mRNA货物在HEK293T细胞中的表达。图9A:在500ng mRNA下相对于Lipofectamine 2000的相对表达;图9B:在300ng mRNA下相对于Lipofectamine 2000的相对表达;图9C:在500ng下,在各种N:P下的原始AUC值;图9D:在300ng下,在各种N:P下的原始AUC值。

[0021] 图10示出了在连续处理48h后LNP对HEK293T细胞的毒性。

[0022] 图11示出了在4:1至8:1范围内的电荷比(N:P)下,示例性LNP的各种量的CLuc mRNA货物在HEK 293T细胞中的表达,圆形:LNP<sub>POEGMAL5</sub>,正方形:LNP<sub>POEGMAL10</sub>,三角形:LNP<sub>PEG-DMG</sub>。图11A:500ng mRNA,在8:1下;图11B:500ng mRNA,在6:1下;图11C:500ng mRNA,在4:1下;图11D:300ng mRNA,在8:1下;图11E:300ng mRNA,在6:1下;图11F:300ng mRNA,在4:1下。

[0023] 图12示出了RNase保护测定。在添加RNase后,将示例性LNP温育0.5h。添加顺序显

示在左侧的表格中,凝胶在右侧。所有的示例性LNP均保护Cluc mRNA货物抵抗RNase。

## 具体实施方式

[0024] 本文公开了POEGMA化脂质,其可用于制造隐身LNP,用于以超过85%的EE包封治疗剂例如全长模型萤光素酶mRNA和治疗相关的SARS COV-2mRNA。对LNP生产的参数例如乙醇分数、电荷比(N:P)、脂质mol%和缓冲剂交换的研究揭示了每种参数可以如何影响LNP的EE。所述POEGMA化LNP也为mRNA提供了抵抗RNase的必要保护,这是成功的体内递送的先决条件。此外,在报告物mRNA表达测定中,具有10kDa POEGMA化脂质的LNP的性能优于Moderna的生物相似的LNP制剂。这是有前景的,因为它为POEGMA化LNP平台用于体内mRNA疫苗递送,同时潜在地避免PEG的免疫原性,提供了一个强有力的案例。

### [0025] 1. 定义

[0026] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。在有冲突的情况下,以包括定义在内的本文件为准。本文公开的材料、方法和实例仅为说明性而非限制性的。与本文中描述的方法和材料类似或等效的方法和材料可用于所公开的发明的实践或测试。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均整体通过引用并入本文。

[0027] 本文所使用的术语“包含”、“包括”、“具有”、“可以”、“含有”及其变化形式旨在作为开放式过渡性短语、术语或词语,不排除额外的行为或结构的可能性。没有具体数目的指称包括复数指称物,除非上下文另有明确规定。本公开还设想了“包含”本文呈现的实施方式或要素、“由其组成”和“基本上由其组成”的其他实施方式,无论是否明确阐述。

[0028] 与数量相关联使用的修饰语“约”包括所陈述的值,并具有由上下文决定的含义(例如,它至少包括与所述特定数量的测量相关的误差程度)。修饰语“约”也应被视为公开了由两个端点的绝对值定义的范围。例如,表述“约2至约4”也公开了“2至4”的范围。术语“约”可能是指所指示的数字的正负10%。例如,“约10%”可能指示9%至11%的范围,并且“约1”可能意味着0.9-1.1。“约”的其他含义可能从上下文变得显而易见,例如四舍五入,因此,例如“约1”也可能是指0.5至1.4。

[0029] 对于本文中数值范围的叙述而言,明确设想了介于其间的每个具有相同精度的中间数字。例如,对于6-9的范围而言,除了6和9之外还设想了数字7和8,并且对于6.0-7.0的范围而言,明确设想了数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

[0030] 术语“抗原”是指能够被抗体或T细胞受体结合的分子。术语“抗原”也涵盖T细胞表位。此外,抗原能够被免疫系统识别和/或能够诱导体液免疫应答和/或细胞免疫应答,导致B淋巴细胞和/或T淋巴细胞的活化。在某些实施方式中,所述抗原含有Th细胞表位或与其连接。抗原可以具有一个或多个表位(B表位和T表位)。抗原可以包括多肽、多核苷酸、碳水化合物、脂质、小分子、聚合物、聚合物偶联物及其组合。抗原也可以是几种单独抗原的混合物。

[0031] 术语“抗原性”是指抗原特异性结合T细胞受体或抗体的能力,并包括抗原对受试者中预先存在的抗体的反应性。

[0032] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指足以实现有益或所需生物学和/或临床结果的量。

[0033] 术语“免疫原性”是指抗原诱导免疫应答的能力,并包括抗原在受试者中产生抗体的固有能力和/或抗原在受试者中产生抗体的能力。本文所使用的术语“抗原性”和“免疫原性”是指免疫系统的不同方面,并且是不可互换的。

[0034] 本文所使用的术语“mRNA”是指信使核糖核酸。mRNA可以是天然存在的或非天然存在的。例如,mRNA可能包括修饰的和/或非天然存在的组分,如一个或多个核苷碱基、核苷、核苷酸或接头。mRNA可以包括帽结构、链终止核苷、茎环、polyA序列和/或多腺苷酸化信号。mRNA可以具有编码多肽的核苷酸序列。mRNA的翻译,例如mRNA在哺乳动物细胞内的体内翻译,可以产生多肽。传统上,mRNA分子的基本组分至少包括编码区、5'-非翻译区(5'-UTR)、3'-UTR、5'-帽和polyA序列。

[0035] 本文所使用的术语“N:P比例”是指脂质中可离子化(在生理pH范围内)的氮原子与核酸(例如RNA)中的磷酸基团的摩尔比。

[0036] 本文所使用的术语“核酸”在其最广泛的意义上使用,并涵盖包括核苷酸聚合物的任何化合物和/或物质。这些聚合物通常被称为多核苷酸。示例性核酸或多核苷酸包括但不限于核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、DNA-RNA杂交体、RNAi诱导剂、RNAi试剂、siRNA、shRNA、miRNA、反义RNA、核酶、催化性DNA、诱导三螺旋形成的RNA、苏糖核酸(TNA)、二醇核酸(GNA)、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA,包括具有β-D-核糖构型的LNA、具有α-L-核糖构型的α-LNA(LNA的非对映异构体)、具有2'-氨基官能化的2'-氨基-LNA和具有2'-氨基官能化的2'-氨基-α-LNA)或其杂交体。核酸可以通过化学合成方法或重组方法获得。

[0037] 本文所使用的术语“磷脂”是指包括磷酸部分和一个或多个碳链(例如不饱和脂肪酸链)的脂质。磷脂可以包括一个或多个多重键(例如双键或叁键)(例如一个或多个不饱和性)。

[0038] 本文所使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可以互换使用,是指通过肽键连接在一起的一串至少三个氨基酸。肽可以含有天然氨基酸、非天然氨基酸(即在自然界中不存在但可以掺入到多肽链中的化合物)和/或氨基酸类似物。此外,肽中的一个或多个氨基酸可以被修饰,例如通过添加化学实体如碳水化合物基团、磷酸基团、法尼基、异法尼基、脂肪酸基团、用于偶联、官能化或其他修饰的接头等。修饰可以包括肽的环化、D-氨基酸的掺入等。

[0039] 本文所使用的术语“RNA”是指天然或非天然存在的核糖核酸。例如,RNA可以包括修饰的和/或非天然存在的组分,如一个或多个核苷碱基、核苷、核苷酸或接头。RNA可以包括帽结构、链终止核苷、茎环、polyA序列和/或多腺苷酸化信号。RNA可以具有编码感兴趣的多肽的核苷酸序列。例如,RNA可以是信使RNA(mRNA)。RNA可以选自但不限于小干扰RNA(siRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、Dicer底物RNA(dsRNA)、小发夹RNA(snRNA)、mRNA、单链引导RNA(sgRNA)、cas9 mRNA及其混合物。

[0040] 术语“治疗”是指保护受试者免受疾病的影响,如预防、抑制、阻遏、改善或完全消除疾病。预防疾病涉及在疾病发作之前向受试者给药本公开的偶联物。抑制疾病涉及在疾病诱导后但在其临床出现之前向受试者给药本公开的偶联物。阻遏或改善疾病涉及在疾病的临床出现之后向受试者给药本公开的偶联物。

[0041] 术语“受试者”包括人类和哺乳动物(例如小鼠、大鼠、猪、猫、狗和马)。本公开的典型受试者可以包括哺乳动物,特别是灵长类动物和人类。对于兽医应用而言,适合的受试者可以包括例如牲畜,例如牛、绵羊、山羊、奶牛、猪等;家禽,例如鸡、鸭、鹅、火鸡等,以及驯养

动物,尤其是宠物,例如狗和猫。对于研究应用而言,适合的受试者可以包括哺乳动物,例如啮齿类动物(例如小鼠、大鼠、仓鼠)、兔、灵长类动物和猪例如近交系猪等。

#### [0042] 2. 脂质纳米粒子

[0043] 本文公开了包含POEGMA-脂质偶联物的脂质纳米粒子(LNP)。所述脂质纳米粒子可以包含可离子化脂质、磷脂、甾醇、POEGMA-脂质偶联物和治疗剂。所述脂质纳米粒子可以促进将所述治疗剂例如核酸引入到细胞、组织、器官、受试者等中。所述脂质纳米粒子还可以包含靶向配体,其可以促进与靶细胞的相互作用。例如,所述靶向配体可以与靶细胞特异性相互作用(例如与靶细胞表面上的细胞外蛋白特异性相互作用),以改善所述脂质纳米粒子在给药后的定位。示例性靶向配体包括但不限于适体、碳水化合物、蛋白质、抗体、单链可变片段等。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子进一步包含靶向配体。此外,所述脂质纳米粒子的组分可以是其药学上可接受的盐。

[0044] 当所述治疗剂包括核酸时,可以选择所述脂质(例如可离子化脂质)的量和所述核酸的量,以提供特定的N:P比例。所述脂质纳米粒子的N:P比例是指一种或多种脂质中的氮原子与核酸中的磷酸基团数量的摩尔比。可以选择所述一种或多种核酸、脂质及其量,以提供约2:1至约20:1,例如约3:1至约19:1、约4:1至约18:1、约5:1至约17:1、约4:1至约16:1、约6:1至约16:1、约7:1至约15:1、约8:1至约14:1、约9:1至约13:1、约7:1至约12:1、约5:1至约14:1、约8:1至约12:1、约2:1至约12:1或约3:1至约12:1的N:P比例。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子具有大于2:1、大于3:1、大于4:1、大于5:1、大于6:1、大于7:1、大于8:1、大于9:1、大于10:1或大于11:1的N:P比例。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子具有小于20:1、小于19:1、小于18:1、小于17:1、小于16:1、小于15:1、小于14:1、小于13:1、小于12:1或小于11:1的N:P比例。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子具有约10:1的N:P比例。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子具有约8:1的N:P比例。

[0045] 所述脂质纳米粒子可以具有可变的粒度,其可以取决于包含在所述脂质纳米粒子中的脂质组分。例如,所述脂质纳米粒子可以具有约30nm至约300nm,例如约35nm至约250nm、约40nm至约200nm、约30nm至约150nm、约30nm至约100nm、约35nm至约90nm、约40nm至约80nm或约35nm至约125nm的直径。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子具有大于30nm、大于35nm、大于40nm、大于45nm或大于50nm的直径。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子具有小于300nm、小于250nm、小于200nm、小于150nm或小于100nm的直径。

[0046] 脂质纳米粒子的 $\zeta$ 电位可用于指示所述组合物的电动电位。例如, $\zeta$ 电位可以描述脂质纳米粒子的表面电荷。具有相对低的正或负电荷的脂质纳米粒子通常是合乎需要的,因为带更高电荷的物质可能与体内的细胞、组织和其他元素不期望地相互作用。所述脂质纳米粒子可以具有约-10mV至约+20mV,例如约-10mV至约+15mV、约-10mV至约+10mV、约-10mV至约+5mV、约0mV至约+5mV或约-5mV至约+10mV的 $\zeta$ 电位。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子具有大于-5mV、大于0mV、大于+1mV、大于+2mV、大于+3mV或大于+4mV的 $\zeta$ 电位。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子具有小于+20mV、小于+19mV、小于+18mV、小于+17mV、小于+16mV或小于+15mV的 $\zeta$ 电位。

[0047] 治疗剂的包封效率描述了在制备后被包封或以其他方式与脂质纳米粒子结合的治疗剂的量相对于所提供的初始量。理想情况下,所述包封效率高。包封效率可以例如通过对在用一种或多种有机溶剂或去污剂破坏脂质纳米粒子之前和之后在含有所述脂质纳米

粒子的溶液中治疗剂的量进行比较来测量。可以使用荧光来测量溶液中游离治疗剂(例如RNA)的量。对于本文中描述的脂质纳米粒子而言,治疗剂分子的包封效率可以大于或等于50%、大于或等于55%、大于或等于60%、大于或等于65%、大于或等于70%、大于或等于75%、大于或等于80%、大于或等于85%、大于或等于90%、大于或等于95%或大于或等于99%或为约100%。在某些实施方式中,所述包封效率大于或等于75%。在某些实施方式中,所述包封效率大于或等于85%。在某些实施方式中,所述包封效率为约70%至约99%,例如约70%至约90%、约75%至约95%或约75%至约99%。

[0048] 脂质纳米粒子可以通过各种方法来表征。例如,可以使用显微镜(例如透射电子显微镜或扫描电子显微镜)来检查脂质纳米粒子的形态和尺寸分布。可以使用动态光散射或电位测定法(例如电位滴定)来测量 $\zeta$ 电位。也可以利用动态光散射来确定粒度。也可以使用诸如Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK)的仪器来测量脂质纳米粒子的多种特征,例如粒度、多分散性指数和 $\zeta$ 电位。

[0049] 由于包含POEGMA-脂质偶联物,与PEG-脂质偶联物相比,所公开的脂质纳米粒子可能具有有利的免疫应答特性。例如,相对于包含PEG的脂质纳米粒子,所述脂质纳米粒子可以具有降低的免疫应答。降低或消除的免疫应答可以包括所述脂质纳米粒子的降低或消除的抗原性、降低或消除的免疫原性或两者。还可以看出所述脂质纳米粒子的有益的免疫相互作用,因为所述脂质纳米粒子可能与受试者中预先存在的抗PEG抗体没有反应性。因此,所公开的脂质纳米粒子可以与受试者的免疫系统具有有益的相互作用。脂质纳米粒子与受试者免疫系统的相互作用的分析可以如PCT/US2022/023158(被公开为WO 2022/212911)中所述进行评估,其整体通过引用并入本文。

[0050] 所述脂质纳米粒子可以通过多种不同技术来制备。一种示例性技术包括醇注入法。例如,可以将所述可离子化脂质、磷脂、甾醇和POEGMA-脂质偶联物添加到醇中以形成第一混合物。所述醇可以是乙醇。可以将所述第一混合物注射到第二混合物中以提供脂质纳米粒子混合物。所述第二混合物可以包括所述治疗剂和缓冲剂(例如柠檬酸盐缓冲剂)。所述脂质纳米粒子混合物可以在提供之后进行透析。A. POEGMA-脂质偶联物

[0051] 所述POEGMA-脂质偶联物包括POEGMA和脂质。所述POEGMA-脂质偶联物可以使所述偶联物具有有利的隐身和免疫系统特性。所述脂质纳米粒子可以包括一种类型的POEGMA-脂质偶联物(例如单个偶联物),或者可以包括至少2种、至少3种、至少4种或至少5种不同类型的POEGMA-脂质偶联物。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子包括2至5种不同类型的POEGMA-脂质偶联物。作为实例,所述脂质纳米粒子可以包括至少两种不同的POEGMA-脂质偶联物,它们的区别在于所述POEGMA的分子量、所述脂质的烃长度或两者。这些变化(例如分子量和烃链长度等)在下文中更多地讨论,所述POEGMA和脂质可以以1:1的化学计量摩尔比包含。例如,所述偶联物可以包括附连到1个脂质分子的1个POEGMA分子。

[0052] 所述POEGMA具有聚(甲基丙烯酸甲酯)骨架和共价附连到所述骨架的多个侧链。所述侧链是乙二醇(EG)的寡聚物。例如,每个侧链可以包括2至9个串联重复的EG单体,例如2至8个串联重复的EG单体、2至7个串联重复的EG单体、2至6个串联重复的EG单体、2至5个串联重复的EG单体或2至4个串联重复的EG单体。在某些实施方式中,每个侧链包括3个串联重复的EG单体。

[0053] 在同一个POEGMA分子内相邻的侧链可以是相同的,也可以不同。例如,一个侧链可

以具有3个串联重复的EG单体,而另一个侧链(在同一个POEGMA分子中)可以具有4个串联重复的EG单体。

[0054] 每个侧链可以具有第一末端和第二末端。所述第一末端可以共价附连到所述骨架。所述第二末端可以是游离的。所述第二末端可以被修饰。在某些实施方式中,每个第二末端独立地包括烷基、酯、胺、酰胺或羧基。在某些实施方式中,每个第二末端包括烷基。在某些实施方式中,每个第二末端包括C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基。在某些实施方式中,每个第二末端包括甲基。在某些实施方式中,每个第二末端不包括羟基。每个侧链的第二末端可以与同一POEGMA分子中相邻侧链的第二末端相同或不同。在某些实施方式中,在整个所述POEGMA中每个侧链的第二末端是相同的。在某些实施方式中,至少一个侧链的第二末端不同于至少一个相邻侧链的第二末端。

[0055] 此外,所述骨架可以具有第一末端和第二末端。

[0056] 所述POEGMA可以具有可变的分子量。例如,所述POEGMA可以具有约1kDa至约100kDa,例如约1kDa至约85kDa、约1kDa至约75kDa、约1kDa至约60kDa、约1kDa至约50kDa、约2kDa至约45kDa、约3kDa至约40kDa、约4kDa至约35kDa、约5kDa至约30kDa、约1kDa至约30kDa、约1kDa至约25kDa、约1kDa至约20kDa、约1kDa至约15kDa、约1kDa至约12kDa或约1kDa至约10kDa的数均分子量。在某些实施方式中,所述POEGMA具有大于1kDa、大于2kDa、大于3kDa、大于4kDa、大于5kDa、大于6kDa、大于7kDa、大于8kDa、大于9kDa或大于10kDa的数均分子量。在某些实施方式中,所述POEGMA具有小于100kDa、小于90kDa、小于80kDa、小于70kDa、小于60kDa、小于50kDa、小于40kDa、小于30kDa、小于20kDa、小于15kDa、小于12kDa或小于10kDa的数均分子量。在某些实施方式中,所述POEGMA具有约10kDa的数均分子量。所述POEGMA的分子量可以通过本领域中使用的技术例如SEC、与多角度光散射组合的SEC、凝胶渗透色谱等测量。

[0057] 所述偶联物的脂质可以是能够与所述POEGMA偶联并允许其偶联物包含在所述脂质纳米粒子中的任何适合的脂质。所述脂质可以是饱和的或不饱和的。所述脂质可以包括不同长度的烃链。烃链中的碳原子数可以用前缀“C<sub>x-y</sub>”或“C<sub>x</sub>-C<sub>y</sub>-”指示,其中x是烃链中碳原子的最小数目,y是最大数目。因此,例如,“C<sub>6-22</sub>烃链”或“C<sub>6</sub>-C<sub>22</sub>烃链”是指含有6至22个碳原子的烃链。所述脂质可以包括C<sub>2-40</sub>烃链,例如C<sub>2-35</sub>烃链、C<sub>2-30</sub>烃链、C<sub>2-25</sub>烃链、C<sub>2-20</sub>烃链、C<sub>4-40</sub>烃链、C<sub>10-40</sub>烃链、C<sub>6-22</sub>烃链、C<sub>10-28</sub>烃链、C<sub>12-20</sub>烃链、C<sub>10-22</sub>烃链、C<sub>12-30</sub>烃链、C<sub>14-40</sub>烃链、C<sub>12-18</sub>烃链或C<sub>8-18</sub>烃链。在某些实施方式中,所述POEGMA-脂质偶联物的脂质具有长度大于4个碳、长度大于6个碳、长度大于8个碳、长度大于10个碳、长度大于12个碳或长度大于14个碳的烃链。在某些实施方式中,所述POEGMA-脂质偶联物的脂质具有长度小于40个碳、长度小于36个碳、长度小于32个碳、长度小于30个碳、长度小于24个碳或长度小于20个碳的烃链。

[0058] 所述脂质可以包括一个烃链或多个烃链。例如,所述脂质可以包括1至5个单独的烃链,例如1至4个单独的烃链、2至5个单独的烃链、1至3个单独的烃链或2至4个单独的烃链。在某些实施方式中,所述脂质包括多于1个单独的烃链、多于2个单独的烃链或多于3个单独的烃链。在某些实施方式中,所述脂质包括少于5个单独的烃链、少于4个单独的烃链或少于3个单独的烃链。具有超过一个烃链的脂质可以具有如上所述不同长度的烃链。此外,包括多个烃链的实施方式可以包括长度全都相同的单独的烃链,或者所述脂质可以包括不同长度的单独的烃链。

[0059] 所述脂质还可以包括许多不同的官能团,允许在将所述脂质与POEGMA偶联时具有灵活性。例如,所述脂质可以包括三唑、酰胺、酯、醚、炔接头和其他适合的偶联接头。在某些实施方式中,所述脂质通过三唑、酰胺、酯、醚或炔接头与POEGMA偶联。在某些实施方式中,所述POEGMA-脂质偶联物的脂质包括1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺、1,2-二肉豆蔻基丙基-3-胺或其组合。不同接头策略的进一步讨论在下文中讨论。

[0060] 所述POEGMA-脂质偶联物可以以不同的量包含在所述脂质纳米粒子中。例如,所述脂质纳米粒子可以包含约0.1mol%至约10mol%,例如约0.2mol%至约9.5mol%、约0.3mol%至约9mol%、约0.4mol%至约8.5mol%、约0.1mol%至约8mol%、约0.1mol%至约7.5mol%、约0.1mol%至约7mol%、约0.1mol%至约6.5mol%、约0.1mol%至约6mol%、约0.1mol%至约5.5mol%、约0.1mol%至约5mol%、约0.2mol%至约7mol%、约0.2mol%至约6mol%、约0.3mol%至约6mol%、约0.3mol%至约5.5mol%、约0.1mol%至约5mol%、约0.1mol%至约4.5mol%、约0.1mol%至约4mol%、约0.1mol%至约3.5mol%、约0.1mol%至约3mol%、约0.1mol%至约2.5mol%、约0.1mol%至约2mol%、约0.1mol%至约1.5mol%、约0.1mol%至约1mol%或约0.1mol%至约0.75mol%的POEGMA-脂质偶联物。在这里和整个本文中,Mol%是指组分例如这里的POEGMA-脂质偶联物相对于所述脂质纳米粒子的脂质组分(例如可离子化脂质、磷脂、甾醇和POEGMA-脂质偶联物)的总量的摩尔百分率。

[0061] 在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子包含大于0.1mol%、大于0.15mol%、大于0.2mol%、大于0.25mol%、大于0.3mol%、大于0.35mol%、大于0.4mol%、大于0.45mol%、大于0.5mol%、大于1mol%、大于2mol%、大于3mol%、大于4mol%或大于5mol%的POEGMA-脂质偶联物。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子包含小于10mol%、小于9.5mol%、小于9mol%、小于8.5mol%、小于8mol%、小于7.5mol%、小于7mol%、小于6.5mol%、小于6mol%、小于5.5mol%、小于5mol%、小于4.5mol%、小于4mol%、小于3.5mol%、小于3mol%、小于2.5mol%、小于2mol%、小于1.5mol%、小于1mol%、小于0.9mol%、小于0.8mol%、小于0.75mol%或小于0.6mol%的POEGMA-脂质偶联物。

[0062] 所述POEGMA可以通过本领域内已知的任何适合的偶联策略与所述脂质偶联。例如,所述脂质和所述POEGMA可以各自独立地具有彼此互补的官能团,使得它们可以在适当条件下在所述官能团之间形成共价键。可以形成共价键的代表性互补官能团包括但不限于胺和活化酯、胺和异氰酸酯、胺和异硫氰酸酯、胺和碳酸酯、用于形成二硫化物的硫醇、用于形成烯胺的醛和胺,以及用于通过Staudinger连接形成酰胺的叠氮化物。适合偶联的官能团还包括生物正交官能团。生物正交官能团可以选择性地与互补的生物正交官能团反应。生物正交官能团包括但不限于用于通过点击化学反应形成三唑的叠氮化物和炔烃、反式环辛烯(TCO)和四嗪(Tz)(例如1,2,4,5-四嗪)等。在某些实施方式中,所述脂质和POEGMA各自独立地包括生物正交官能团。在某些实施方式中,所述脂质用二苯并环辛炔官能化,所述POEGMA用叠氮化物官能化,或两者兼而有之。取决于官能团,在所述脂质和POEGMA之间可以形成不同的键或连接。所述POEGMA可以在其骨架或侧链上官能化。

[0063] 关于POEGMA、其合成及其应用的进一步讨论,可以在美国专利第8,497,356号和美国专利第10,364,451号中找到,两者整体通过引用并入本文。

[0064] B. 可离子化脂质

[0065] 所述脂质纳米粒子可以包含一种或多种可离子化脂质。“可离子化脂质”(或阳离子脂质)是指在生理pH(例如约7.4的pH)下具有正电荷或部分正电荷的脂质。可离子化脂质也可以是两性离子,即具有正电荷和负电荷两者的中性分子。所述脂质纳米粒子可以包括一种类型的可离子化脂质(例如单个可离子化脂质),或者可以包括至少2种、至少3种、至少4种或至少5种不同类型的可离子化脂质。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子包括2至5种不同类型的可离子化脂质。

[0066] 示例性可离子化脂质包括但不限于(十七烷-9-基-8-((2-羟基乙基)(6-酮基-6-(十一烷氧基)己基)氨基)辛酸酯)(SM-102)、3,6-双({4-[双(2-羟基十二烷基)氨基]丁基})哌嗪-2,5-二酮(cKK-E12)、1-亚油酰基-2-亚油基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亚油基苯氨甲酰氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLm-DAP)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLin-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-DMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵丙烷(DODAP)、N,N-二甲基-(2,3-二油基氧基)丙胺(DODMA)、双十八烷基酰胺基甘油基羧基精胺(DOGS)、精胺胆甾醇氨基甲酸酯(GL-67)、双胍-亚精胺-胆甾醇(BGTC)、3b-(N-(N<sup>A</sup>N'-二甲基氨基乙基)-氨甲酰基胆甾醇(DC-Chol)、N-叔丁基-N'-十四烷基氨基-丙脒(diC14-脒)、二甲基双十八烷基溴化铵(DDAB)、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟基乙基溴化铵(DMR1E)、N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、二油基氧基丙基-3-二甲基羟基乙基溴化铵(DORIE)、N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N-2-(精胺甲酰胺基)乙基)-N,N-二甲基三氟乙酸铵(DOSPA)、2-二油酰基三甲基丙烷氯化铵(DOTAP)、N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N-三甲基氯化铵(DOT<sup>M</sup>A)、氨基丙基-二甲基-双(十二烷基氧基)-丙烷溴化铵(GAP-DLR1E)、1,2-二油酰基-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE)和(4-羟基丁基)氮烷二基]二(己烷-6,1-二基)双(2-己基癸酸酯)(ALC-0315)。

[0067] 在某些实施方式中,所述可离子化脂质包括(十七烷-9-基-8-((2-羟基乙基)(6-酮基-6-(十一烷氧基)己基)氨基)辛酸酯)(SM-102)、(4-羟基丁基)氮烷二基]二(己烷-6,1-二基)双(2-己基癸酸酯)(ALC-0315)或其组合。在某些实施方式中,所述可离子化脂质包括(十七烷-9-基-8-((2-羟基乙基)(6-酮基-6-(十一烷氧基)己基)氨基)辛酸酯)(SM-102)。

[0068] 所述可离子化脂质可以以不同的量包括在所述脂质纳米粒子中。例如,所述脂质纳米粒子可以包含约20mol%至约65mol%,例如约25mol%至约60mol%、约25mol%至约65mol%、约30mol%至约65mol%、约40mol%至约65mol%、约45mol%至约65mol%、约20mol%至约55mol%、约20mol%至约50mol%、约20mol%至约45mol%、约30mol%至约60mol%、约35mol%至约55mol%、约20mol%至约65mol%、约40mol%至约55mol%或约45mol%至约55mol%的可离子化脂质。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子包含多于20mol%、多于25mol%、多于30mol%、多于35mol%、多于40mol%、多于45mol%、多于50mol%或多于55mol%的可离子化脂质。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子包含少于65mol%、少于60mol%、少于58mol%、少于56mol%、少于54mol%、少于52mol%、少于50mol%或少于45mol%的可离子化脂质。

### [0069] C. 磷脂

[0070] 所述脂质纳米粒子可以包含一种或多种磷脂。通常,磷脂可以包括磷脂部分和一个或多个脂肪酸部分。所述脂质纳米粒子可以包括一种类型的磷脂(例如单个磷脂),或者可以包括至少2种、至少3种、至少4种或至少5种不同类型的磷脂。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子包括2至5种不同类型的磷脂。

[0071] 示例性磷脂包括但不限于二硬脂酰基-sn-甘油基-磷酸乙醇胺、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-甲酸盐(DOPE-mal)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺、二甲基-磷脂酰乙醇胺、18-1-反式PE、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、卵磷脂酰胆碱(EPC)、二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)、鞘磷脂(SM)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油(DMPG)、二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、二芥酰基磷脂酰胆碱(DEPC)、棕榈酰基油酰基磷脂酰甘油(POPG)、二反油酰基-磷脂酰乙醇胺(DEPE)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DMPC)、卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂类、二鲸蜡基磷酸酯、溶血磷脂酰胆碱和二亚油酰基磷脂酰胆碱。

[0072] 在某些实施方式中,所述磷脂包括DSPC、DPPE、DMPG、DOPC、DPPC、DOPG或其组合。在某些实施方式中,所述磷脂包括DSPC、DPPE、DOPC或其组合。在某些实施方式中,所述磷脂包括DSPC。在某些实施方式中,所述磷脂是DSPC。

[0073] 所述磷脂可以以不同的量包括在所述脂质纳米粒子中。例如,所述脂质纳米粒子可以包括约5mol%至约25mol%,例如约6mol%至约20mol%、约7mol%至约18mol%、约8mol%至约16mol%、约5mol%至约20mol%、约5mol%至约15mol%、约6mol%至约15mol%、约6mol%至约12mol%、约8mol%至约12mol%或约9mol%至约11mol%的磷脂。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子包括多于5mol%、多于6mol%、多于7mol%、多于8mol%、多于9mol%、多于10mol%或多于15mol%的磷脂。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子包括少于20mol%、少于19mol%、少于18mol%、少于17mol%、少于16mol%、少于15mol%、少于14mol%、少于13mol%、少于12mol%、少于11mol%或少于10mol%的磷脂。

### [0074] D. 甾醇

[0075] 所述脂质纳米粒子可以包括一种或多种甾醇。术语“甾醇”是指甾类的一个亚组,也被称为类固醇。甾醇通常分为两类:(1)植物甾醇,和(2)动物甾醇。所述脂质纳米粒子可以包括一种类型的甾醇(例如单种甾醇),或者可以包括至少2种、至少3种、至少4种或至少5种不同类型的甾醇。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子包括2至5种不同类型的甾醇。在某些实施方式中,所述甾醇包括动物甾醇。

[0076] 甾醇的实例包括但不限于胆甾醇、菜油甾醇、antrosterol、链甾醇、nicasterol、豆甾醇、谷甾醇、氧化甾醇、C<sub>4-10</sub>甾醇、麦角甾醇和胆甾-4-烯-3-酮。在某些实施方式中,所述甾醇包括胆甾醇、菜油甾醇、antrosterol、链甾醇、nicasterol、豆甾醇、谷甾醇、氧化甾

醇、C<sub>4-10</sub>甾醇、麦角甾醇、胆甾-4-烯-3-酮或其组合。在某些实施方式中,所述甾醇包括胆甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、谷甾醇、C<sub>4-10</sub>甾醇、麦角甾醇、胆甾-4-烯-3-酮或其组合。

[0077] 在某些实施方式中,所述甾醇包括胆甾醇。在某些实施方式中,所述甾醇是胆甾醇。所述胆甾醇可以是胆甾醇本身或其盐或酯,例如胆甾醇琥珀酸、胆甾醇硫酸酯、胆甾醇半琥珀酸酯、胆甾醇邻苯二甲酸酯、胆甾醇磷酸酯、胆甾醇戊酸酯、胆甾醇乙酸酯、胆甾醇油酸酯、胆甾醇亚油酸酯、胆甾醇肉豆蔻酸酯、胆甾醇棕榈酸酯、胆甾醇花生酸酯或胆甾醇磷酸胆碱。

[0078] 所述甾醇可以包括胆甾醇的衍生物。胆甾醇的示例性衍生物包括但不限于二氢胆甾醇、内-胆甾醇、表-胆甾醇、链甾醇、胆甾烷醇、胆甾烷酮、胆甾烯酮、胆甾醇基-2'-羟基乙基醚、胆甾醇基-4'-羟基丁基醚、3 $\beta$ [N-(N'-二甲基氨基乙基)氨基]胆甾醇(DC-Chol)、24(S)-羟基胆甾醇、25-羟基胆甾醇、25(R)-27-羟基胆甾醇、22-氧杂胆甾醇、23-氧杂胆甾醇、24-氧杂胆甾醇、环阿屯醇、22-酮基甾醇、20-羟基甾醇、7-羟基胆甾醇、19-羟基胆甾醇、22-羟基胆甾醇、25-羟基胆甾醇、7-脱氢胆甾醇、5 $\alpha$ -胆甾-7-烯-3 $\beta$ -醇、3,6,9-三氧杂辛-1-醇-胆甾醇基-3e-醇、脱氢麦角甾醇、脱氢表雄甾酮、羊毛甾醇、二氢羊毛甾醇、羊毛甾烯醇、光甾醇、谷钙化醇、钙泊三醇、粪甾醇、胆钙化醇、羽扇豆醇、麦角钙化醇、22-二氢麦角钙化醇、麦角甾醇、菜籽甾醇、番茄碱、番茄苷、乌索酸、胆酸、鹅去氧胆酸、酵母甾醇、薯蓣皂苷配基、岩藻甾醇、粪生甾醇和粪生甾醇或其盐或酯。

[0079] 所述甾醇可以以不同的量包括在所述脂质纳米粒子中。例如,所述脂质纳米粒子可以包括约10mol%至约50mol%,例如约15mol%至约45mol%、约20mol%至约40mol%、约25mol%至约40mol%、约30mol%至约40mol%、约35mol%至约45mol%、约35mol%至约40mol%、约20mol%至约50mol%、约25mol%至约50mol%、约30mol%至约50mol%、约15mol%至约40mol%或约15mol%至约35mol%的甾醇。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子包括多于10mol%、多于15mol%、多于20mol%、多于25mol%、多于30mol%或多于35mol%的甾醇。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子包括少于50mol%、少于45mol%、少于42mol%、少于40mol%、少于38mol%或少于35mol%的甾醇。

#### [0080] E. 治疗剂

[0081] 所述脂质纳米粒子可以包含一种或多种治疗剂。示例性治疗剂包括但不限于核酸和阴离子多肽。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子包含核酸、阴离子多肽或两者。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子包含核酸或阴离子多肽。

[0082] 所述脂质纳米粒子可以包含一种或多种核酸。核酸可用于例如在细胞中生产多肽。核酸的实例包括但不限于siRNA、miRNA、反义寡核苷酸、shRNA、mRNA、tRNA、rRNA、CircRNA和DNA。在某些实施方式中,所述核酸包括siRNA、miRNA、反义寡核苷酸、shRNA、mRNA、tRNA、rRNA、CircRNA、DNA或其组合。在某些实施方式中,所述核酸包括siRNA、miRNA、反义寡核苷酸、shRNA、mRNA、tRNA、rRNA、CircRNA或DNA。在某些实施方式中,所述核酸包括siRNA、miRNA、反义寡核苷酸、shRNA、mRNA、tRNA、rRNA或CircRNA。在某些实施方式中,所述核酸包括siRNA、mRNA或其组合。在某些实施方式中,所述核酸包括siRNA或mRNA。在某些实施方式中,所述核酸包括mRNA。在某些实施方式中,所述核酸是mRNA。mRNA可以编码感兴趣的多肽,包括任何天然或非天然存在的多肽或以其他方式修饰的多肽。由mRNA编码的多肽可以具有任何尺寸,并且可以具有任何二级结构或活性。在某些实施方式中,由mRNA编码的

多肽当在细胞中表达时可能具有治疗效果。

[0083] 所述核酸可以是RNA。RNA的实例包括但不限于信使RNA (mRNA) (例如编码感兴趣的蛋白质)、修饰的mRNA (mmRNA)、并入微小RNA结合位点 (miR结合位点) 的mRNA、包含功能性RNA元件的修饰的RNA、微小RNA (miRNA)、antagomir、小(短)干扰RNA (siRNA) (包括shortmer和dicer底物RNA)、RNA干扰 (RNAi) 分子、反义RNA、核酶、小发夹RNA (shRNA)、锁核酸 (LNA) 和CRISPR/Cas9技术。

[0084] 在某些实施方式中,所述核酸包括SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或其组合。在某些实施方式中,所述核酸包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2。

[0085] 核酸和阴离子多肽可以在商业上购买。或者,核酸可以从DNA模板通过体外转录来制备。从DNA模板提供核酸的技术和方法可以通过本领域中已知的技术以及例如实施例中描述的技术来完成。所述核酸可以在应用前通过稳定化序列、加帽和多腺苷酸化进行修饰。此外,阴离子多肽可以通过化学合成和/或重组方法制备。

[0086] 在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子包含:(十七烷-9-基-8-((2-羟基乙基)(6-酮基-6-(十一烷氧基)己基)氨基)辛酸酯) (SM-102); DSPC; 胆甾醇; 约0.25mol% 至约3mol% 的聚[寡聚(乙二醇)醚甲基丙烯酸酯] (POEGMA) - 脂质偶联物,其中所述POEGMA具有约1kDa至约50kDa的数均分子量; 和mRNA。

[0087] 3. 药物组合物

[0088] 本文进一步公开了包含一种或多种脂质纳米粒子的药物组合物。所述药物组合物可以进一步包含药学上可接受的赋形剂。本文所使用的术语“药学上可接受的赋形剂”是指任何类型的无毒、惰性固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料或制剂助剂。可以充当药学上可接受的赋形剂的材料的一些实例是糖类,例如但不限于乳糖、葡萄糖和蔗糖; 淀粉,例如但不限于玉米淀粉和马铃薯淀粉; 纤维素及其衍生物,例如但不限于羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素; 黄蓍胶粉; 麦芽; 明胶; 滑石; 赋形剂,例如但不限于可可脂和栓剂用蜡; 油类,例如但不限于花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油; 二醇类,例如丙二醇; 酯类,例如但不限于油酸乙酯和月桂酸乙酯; 琼脂; 缓冲剂,例如但不限于氢氧化镁和氢氧化铝; 褐藻酸; 无热原水; 等渗盐水; 林格氏溶液; 乙醇、柠檬酸盐缓冲剂和磷酸盐缓冲剂,以及其他无毒相容的润滑剂例如但不限于月桂基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和香料,根据配方师的判断也可以存在于所述组合物中的防腐剂和抗氧化剂。所述组合物的给药途径和所述组合物的形式可以决定待使用的赋形剂的类型。

[0089] 所述药学上可接受的赋形剂可以占包括脂质纳米粒子在内的药物组合物的总质量或体积的大于50%。例如,所述药学上可接受的赋形剂可以占药物组合物的约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或更多。在某些实施方式中,药学上可接受的赋形剂的纯度为至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%。在某些实施方式中,所述药学上可接受的赋形剂被批准用于人类和兽医用途。在某些实施方式中,所述药学上可接受的赋形剂由美国食品药品监督管理局 (United States Food and Drug Administration) 批准。在某些实施方式中,所述药学上可接受的赋形剂是药物级的。在某些实施方式中,所述药学上可接受的赋形剂符合美国药典 (USP)、欧洲药典 (EP)、英国药典和/或国际药典的标准。

[0090] 药物组合物和药剂的配制和制造的一般性指南可以在例如《Remington药理学科学与实践》(Remington's The Science and Practice of Pharmacy)第21版, A.R.Gennaro;Lippincott,Williams&Wilkins,Baltimore,Md.,2006中获得,其整体通过引用并入本文。常规赋形剂和辅助成分可用于任何药物组合物中,除非任何常规赋形剂或辅助成分可能与脂质纳米粒子的一种或多种组分不相容。如果赋形剂或辅助成分与脂质纳米粒子的组分的组合可能导致任何不希望的生物效应或其他有害效应,则所述赋形剂和辅助成分可能与所述脂质纳米粒子的组分不相容。

[0091] 在某些实施方式中,所述药学上可接受的赋形剂包括缓冲剂、增溶剂、溶剂、抗微生物防腐剂、抗氧化剂、悬浮剂、片剂或胶囊稀释剂、片剂崩解剂或其组合。在某些实施方式中,所述药学上可接受的赋形剂包括缓冲剂、增溶剂、溶剂、抗微生物防腐剂、抗氧化剂、悬浮剂、片剂或胶囊稀释剂、或片剂崩解剂。

[0092] 在某些实施方式中,所述药学上可接受的赋形剂包括缓冲剂。在某些实施方式中,所述缓冲剂包含柠檬酸盐和醇。在某些实施方式中,所述缓冲剂是约70%至约80% mM柠檬酸盐-乙醇缓冲剂。在某些实施方式中,所述缓冲剂针对另一种缓冲剂进行透析。在某些实施方式中,所述缓冲剂针对tris-乙酸盐缓冲剂进行透析。

[0093] 所述药物组合物可以适合于给药到药学领域的技术人员公知的受试者(例如患者,其可能是人或非人)。所述药物组合物可以被制备成用于给药到受试者。考虑到诸如特定受试者的年龄、性别、体重和状况以及给药途径的因素,此类药物组合物可以以医学领域的技术人员公知的剂量和技术给药。

[0094] 所述组合物可以预防性或治疗性给药。在预防性给药中,所述组合物可以以足以诱导响应的量给药。在治疗性应用中,所述组合物可以以足以引发治疗效果的量给药到有需要的受试者。足以实现这一目的的量被定义为“治疗有效剂量”。对这种用途有效的量将取决于例如给药的偶联物方案的具体组成、给药方式、疾病的阶段和严重程度、患者的总体健康状态以及处方医生的判断。

[0095] 所述组合物可以方便地以单剂量呈现,或呈现为以适当间隔给药的分剂量,例如呈现为每天两个、三个、四个或更多个子剂量。所述子剂量本身可以进一步划分,例如分成多次分立的松散间隔的给药。

[0096] 正如对于本领域技术人员而言显而易见的,待给药的有用体内剂量和具体给药方式将根据年龄、体重、痛苦的严重程度、治疗的受试者、使用的具体化合物以及使用这些化合物的具体用途而变。有效剂量水平、即实现所需结果所需的剂量水平的确定,可以由本领域技术人员使用常规方法例如人类临床试验、体内研究和体外研究来完成。

[0097] 剂量的量和间隔可以单独地调整,以提供所述生物活性药剂的足以维持调节作用的血浆水平或最低有效浓度(MEC)。每种药剂的MEC有所不同,但可以从体内和/或体外数据进行估算。实现MEC所需的剂量将取决于个体特征和给药途径。然而,本领域技术人员公知的测定法可用于确定血浆浓度。剂量间隔也可以使用MEC值来确定。组合物可以使用在10-90%、例如30-90%之间或50-90%之间的时间内将血浆水平维持在MEC之上的方案来给药。在局部给药或选择性摄取的情况下,药物的有效局部浓度可能与血浆浓度无关。

[0098] 所述药物组合物可以根据例如受试者的不同特征和给药途径而以不同的剂量给药。在某些实施方式中,本公开的药物组合物可以在给定药剂中足以递送约0.0001mg/kg

至约10mg/kg、约0.001mg/kg至约10mg/kg、约0.005mg/kg至约10mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、约0.1mg/kg至约10mg/kg、约1mg/kg至约10mg/kg、约2mg/kg至约10mg/kg、约5mg/kg至约10mg/kg、约0.0001mg/kg至约5mg/kg、约0.001mg/kg至约5mg/kg、约0.005mg/kg至约5mg/kg、约0.01mg/kg至约5mg/kg、约0.1mg/kg至约10mg/kg、约1mg/kg至约5mg/kg、约2mg/kg至约5mg/kg、约0.0001mg/kg至约1mg/kg、约0.001mg/kg至约1mg/kg、约0.005mg/kg至约1mg/kg、约0.01mg/kg至约1mg/kg或约0.1mg/kg至约1mg/kg的剂量水平给药,其中1mg/kg的剂量为每1kg受试者体重提供1mg的治疗剂或脂质纳米粒子。在某些实施方式中,可以给药剂量为约0.005mg/kg至约5mg/kg的本公开的治疗剂或脂质纳米粒子。

[0099] 应当注意的是,主治医师会知道如何以及何时因毒性或器官功能障碍而终止、中断或调整给药。相反,如果临床响应不充分(排除毒性),主治医师也会知道将治疗调整到更高的水平。在感兴趣的障碍的治疗中给药剂量的大小将随着待治疗的症状的严重程度和给药途径而变。此外,剂量以及可能的剂量频率,也将根据个体患者的年龄、体重和响应而变。在兽医学中可以使用与上文讨论的可比的程序。

#### [0100] 4. 方法

[0101] 本文还公开了使用所述脂质纳米粒子及其药物组合物的方法。所述脂质纳米粒子、POEGMA-脂质偶联物、可离子化脂质、磷脂、甾醇、治疗剂和药物组合物的描述也可应用于本文公开的治疗和向细胞递送治疗剂的方法。

#### [0102] A. 治疗疾病或障碍的方法

[0103] 进一步提供了在有需要的受试者中治疗疾病或障碍的方法。所述方法可以包括向所述受试者给药有效量的本文所公开的一种或多种脂质纳米粒子。所述脂质纳米粒子可以任选地与药学上可接受的赋形剂组合(例如作为所公开的药物组合物)给药。

[0104] 所述公开的脂质纳米粒子可以促进在细胞、组织、器官或受试者中产生多肽。因此,许多疾病或障碍可以从这种能力获益。示例性的疾病或障碍包括但不限于传染病、亨廷顿病、肌肉萎缩症、自身免疫疾病和癌症。在某些实施方式中,所述疾病或障碍是传染病、癌症或自身免疫疾病。在某些实施方式中,所述疾病或障碍是传染病,例如病毒。

[0105] 在某些实施方式中,所述方法可以调节患有传染病的受试者中的免疫应答,从而增强所述受试者中对抗所述传染病病原体的免疫应答。可以治疗的传染病的非限制性实例包括由病毒、细菌、真菌、酵母和寄生虫病原体引起的传染病。示例性病毒包括但不限于甲型和乙型流感病毒、寨卡病毒、狂犬病病毒、RSV、基孔肯雅病毒、巨细胞病毒、人偏肺病毒、埃博拉病毒、HIV-1和SARS-CoV-2。

[0106] 所述方法可用于调节免疫应答,例如以疫苗所用的方式。在某些实施方式中,所述脂质纳米粒子的核酸可以提供能够刺激免疫细胞例如树突状细胞或髓系细胞的活化或活性的多肽。例如,所述核酸可以编码作为抗原例如疫苗抗原(例如病毒抗原、细菌抗原、肿瘤抗原)的多肽。在某些实施方式中,与脂质纳米粒子结合/被脂质纳米粒子包封的核酸(例如mRNA)编码感兴趣的抗原,例如癌抗原或传染病抗原(例如细菌抗原、病毒抗原、真菌抗原、原生动植物抗原或寄生虫抗原)。

[0107] 在某些实施方式中,所述方法用于刺激患有癌症的受试者中的免疫应答,从而增强所述受试者中对抗癌症的免疫应答。可以治疗的癌症的非限制性实例包括肾上腺皮质癌、晚期癌症、肛门癌、再生障碍性贫血、胆道癌、膀胱癌、骨癌、骨转移、脑肿瘤、脑癌、乳腺

癌、儿童癌症、原发不明的癌症、卡斯特曼病、宫颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、尤因家族肿瘤、眼癌、胆囊癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质肿瘤、妊娠滋养细胞病、霍奇金病、卡波西肉瘤、肾细胞癌、喉和下咽癌、急性淋巴细胞性白血病、急性髓系白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓系白血病、慢性粒单核细胞白血病、骨髓增生异常综合征(包括难治性贫血和难治性血细胞减少症)、骨髓增生性肿瘤或疾病(包括真红细胞增多症、原发性血小板增多症和原发性骨髓纤维化)、肝癌(例如肝细胞癌)、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肺类癌肿瘤、皮肤淋巴瘤、恶性间皮瘤、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良综合征、鼻腔和鼻窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、口腔和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体瘤、前列腺癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、成人软组织肉瘤、基底细胞和鳞状细胞皮肤癌、黑色素瘤、小肠癌、胃癌、睾丸癌、喉癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、华氏巨球蛋白血症、维尔姆斯瘤和由癌症治疗引起的继发性癌症。

[0108] 在某些实施方式中,所述方法用于调节具有异常免疫活性的受试者,包括患有自身免疫疾病、过敏性疾病或炎性反应的受试者中的免疫应答。可以治疗的自身免疫疾病的非限制性实例包括类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、炎性肠病(包括溃疡性结肠炎和克罗恩病)、1型糖尿病、多发性硬化症、银屑病、格雷夫斯病、桥本甲状腺炎、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、格林-巴利综合征、重症肌无力、肾小球肾炎和血管炎。

[0109] 正如别处讨论的,所述脂质纳米粒子及其药物组合物可以具有有利的免疫特性。例如,在给药后,所述脂质纳米粒子及其药物组合物相对于包含PEG的脂质纳米粒子可以具有降低的免疫应答;可能不与所述受试者中预先存在的抗PEG抗体反应;或其组合。

[0110] B. 向细胞递送治疗剂的方法

[0111] 还提供了向细胞递送治疗剂的方法。所述方法可以包括通过将所述细胞与本文公开的一种或多种脂质纳米粒子或其药物组合物接触,将治疗剂递送到细胞。在某些实施方式中,所述治疗剂是核酸。通过将所述细胞与所述脂质纳米粒子接触,所述粒子可以通过例如内吞作用被内化,并且所述核酸(例如mRNA)可以在所述细胞中翻译以产生感兴趣的多肽。

[0112] 接触所述细胞可以在体内、离体、在培养物中或体外进行。与细胞接触的脂质纳米粒子的量和/或其中的治疗剂的量可以取决于所接触的细胞或组织的类型、给药方式、所述脂质纳米粒子和其中的治疗剂的理化特征(例如大小、电荷和化学组成)以及其他因素。有效量的所述脂质纳米粒子或其药物组合物可以允许在所述细胞中高效地产生多肽。效率的度量可以包括多肽翻译(由多肽的表达指示)、mRNA降解水平和/或免疫应答指标。

[0113] 可以靶向或递送到的细胞的类型通常没有限制。因此,在本文公开的方法中可以使用多种细胞类型。示例性的细胞包括但不限于肝细胞、上皮细胞、造血细胞、内皮细胞、肺细胞、骨细胞、干细胞、间充质细胞、神经细胞、心脏细胞、脂肪细胞、血管平滑肌细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞、 $\beta$ 细胞、垂体细胞、滑膜衬里细胞、卵巢细胞、睾丸细胞、成纤维细胞、B细胞、T细胞、网织红细胞、白细胞、粒细胞和肿瘤细胞。

[0114] 正如别处讨论的,所述脂质纳米粒子中包含的核酸(例如mRNA)可以编码作为抗原例如疫苗抗原(例如病毒抗原、细菌抗原、肿瘤抗原)的多肽。在某些实施方式中,所述与脂质纳米粒子结合/被脂质纳米粒子包封的核酸编码抗原,例如癌症抗原或传染病抗原。

[0115] 在某些实施方式中,所述包括在脂质纳米粒子中的核酸可以编码重组多肽,其可

以代替在与所述脂质纳米粒子接触的细胞中基本上不存在的一种或多种多肽。所述一种或多种基本上不存在的多肽可能由于编码基因或其调控途径的遗传突变而缺乏。或者,通过所述核酸的翻译产生的重组多肽可以拮抗存在于所述细胞中、表面上或从所述细胞分泌的内源蛋白质的活性。拮抗性重组多肽对于对抗由所述内源蛋白质的活性(例如由突变引起的活性或定位改变)引起的有害作用而言是合乎需要的。在某些实施方式中,通过所述核酸的翻译产生的重组多肽可以间接或直接拮抗存在于所述细胞中、表面上或从所述细胞分泌的生物部分的活性。被拮抗的生物部分可以包括但不限于脂质(例如胆甾醇)、脂蛋白(例如低密度脂蛋白)、核酸、碳水化合物和小分子毒素。通过所述核酸的翻译产生的重组多肽可以被工程化改造,以定位在所述细胞内,例如在特定的区室例如细胞核内,或者可以被工程化改造以从所述细胞分泌或易位到所述细胞的质膜。

[0116] 由于所述治疗疾病或障碍的方法可以包括将治疗剂递送到细胞,因此将治疗剂递送到细胞的方法的描述也可应用于治疗疾病或障碍的方法。同样,治疗疾病或障碍的方法的描述可以(在适用时)应用于将治疗剂递送到细胞的方法。

[0117] 所公开的发明具有由下述非限制性实施例所示的多个方面。

[0118] 5. 实施例

[0119] 实施例1

[0120] 材料和方法

[0121] 一般性材料。除非另有说明,否则所有化学品均购自Millipore Sigma (St. Louis, MO)。所有溶剂均购自VWR International (Radnor, PA)。1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-二苯并环辛基(16DBC0 PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)和胆甾醇购自Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL)。(十七烷-9-基-8-((2-羟基乙基)(6-酮基-6-(十一烷氧基)己基)氨基)辛酸酯)[SM-102]从SINOPEG(中国)获得。编码海萤萤光素酶(CLuc)基因的pCMV-CLuc2、HiScribe™T7 ARCA mRNA试剂盒和Monarch® RNA清理试剂盒购自New England BioLabs (Ipswich, MA)。Quant-it™ RiboGreen RNA测定试剂盒、Pierce™海萤萤光素酶发光测定试剂盒、Lipofectamine 2000和柠檬酸盐缓冲剂从Thermo Fisher获得。LDH-Glo™细胞毒性测定试剂盒和蛋白酶K购自Promega。

[0122] 叠氨基POEGMA (POEGMA<sub>5-50</sub>)的合成。将三乙二醇甲醚甲基丙烯酸酯通过碱性氧化铝,以除去自由基抑制剂。将溴化铜(II)和三(2-吡啶基甲基)胺(TPMA)在超纯水中混合,以制备终浓度为0.01M CuBr<sub>2</sub>和0.08M TPMA的催化复合物。在置于冰浴上的舒伦克烧瓶中添加下述物质:三乙二醇甲醚甲基丙烯酸酯(10mmol, 2.26mL), 甲醇(5.8mL), Cu催化复合物(0.01mmol, 1mL), NaCl水溶液(2mmol, 4mL 0.5M NaCl), 叠氨基乙基-2-溴异丁酸酯(0.1mmol, 16.4μL), 并将烧瓶用隔膜密封。在单独的舒伦克烧瓶中制备抗坏血酸在超纯水中的新鲜溶液(64mM, 2mL)。将两个烧瓶在冰浴中保持冷却,并用氩气吹扫45分钟以除去氧气。在脱氧后,使用注射泵在惰性气氛下将抗坏血酸溶液以0.001mL/min的速率连续注入到聚合烧瓶中不同的时间,以获得不同的分子量。将得到的溶液用空气吹扫1小时以猝灭反应,然后针对水透析4天。然后将透析过的溶液冷冻干燥,以获得作为黏稠凝胶的叠氨基POEGMA,将其储存在-20°C下。合成不同MW的叠氨基POEGMA的条件提供在下面的表1中:

[0123] 表1:不同MW的叠氨基POEGMA的反应条件

	聚合物	摩尔比		反应时间 (min)
		单体	引发剂	
	<b>POEGMA<sub>5</sub></b>	50	1	75
[0124]	<b>POEGMA<sub>10</sub></b>	100	1	90
	<b>POEGMA<sub>20</sub></b>	150	1	140
	<b>POEGMA<sub>40</sub></b>	200	1	180
	<b>POEGMA<sub>50</sub></b>	200	1	210

[0125] 凝胶渗透色谱-多角度光散射 (GPC-MALS)。使用GPC-MALS表征POEGMA聚合物的大小和分散性。所有GPC实验均在室温下,在两个内联柱 (Agilent PLgel mixed-C柱105 Å, 7.5×300mm, 5μm, 零件号PL1110-6500) 上,使用THF (用100ppm BHT稳定) 作为洗脱剂进行。使用Agilent 1260Infinity Isocratic泵设定1ml/min的流速。使用内联Wyatt-DAWN TREOS MALS检测器和Wyatt-Optilab DSP折射率检测器测定分子量。使用Wyatt Astra软件中内置的在线100%质量回收假设方法,确定浓度和质量已知的样品的折射率增量 (dn/dc) 值。使用内联Agilent 1260Infinity UV检测器测量UV吸光度。用于GPC-MALS分析的所有样品均通过将2mg样品溶解在1ml HPLC级THF中,并通过0.2μm孔径的无机膜注射器过滤器 (Whatman, Anotop™ 10) 过滤来制备。

[0126] POEGMA化脂质 (POEGMAL<sub>5-50</sub>) 的合成。将100mg叠氨基POEGMA<sub>10-50</sub>以20mg/mL的浓度溶解在氯仿中。添加5摩尔过量的16DBC0 PE,并将所述溶液在37°C摇床中温育24h。使用薄层色谱监测反应,使用10%甲醇/氯仿 (v/v) 作为流动相。24h后,将反应混合物蒸发,并且除了POEGMAL<sub>5</sub>之外,从10%氯仿己烷混合物中重新沉淀。对于POEGMAL<sub>5</sub>而言,使用10%甲醇己烷混合物。3-4轮的重新沉淀得到纯的POEGMA化脂质,得率>90%。

[0127] 反相高效液相色谱 (HPLC)。通过反相HPLC评估POEGMA<sub>5-50</sub>的纯度,使用Phenomenex C18柱作为固定相,并使用1mL/min的甲醇作为流动相。使用内联UV检测器在230nm处检测化合物。

[0128] NMR波谱。NMR在Bruker 16.4Tesla波谱仪 (Bruker, UK) 上使用BBO室温探针进行。将POEGMAL<sub>5-50</sub>溶解在CDCl<sub>3</sub>中,并通过一维<sup>1</sup>H光谱分析对溶液进行研究。使用MestReNova x64处理数据。

[0129] mRNA的合成和琼脂糖凝胶电泳。使用HiScribe™T7 ARCA mRNA试剂盒 (带加尾) (NEB目录号:E2060S),遵照制造商的方案合成编码海萤萤光素酶 (CLuc) 基因的体外转录的mRNA。简单来说,将编码报告基因萤光素酶的质粒pCMV-CLuc2 (NEB目录号:N0321) 用XbaI (20个单位/μg DNA) 在37°C下线性化30min,并使用Oligo Clean&Concentrator离心柱 (Zymo Research目录号:D4060) 纯化。在基因下游将质粒线性化避免了由T7 RNA聚合酶产生的不均匀转录物。使用1μg线性化质粒、2μL T7 RNA聚合酶和1X核糖核苷酸混合物 (最终为1mM GTP, 4mM抗反接帽类似物, 1.25mM CTP, 1.25mM UTP, >1.25mM ATP) 设置20μL体外转录 (IVT) 反应。将所述反应在37°C下温育30min。然后使用浓度为0.2U/μL的DNase I消化IVT反应中的DNA模板,并在37°C下温育30min。然后在100μL反应中,使用5μL Poly (A) 聚合

酶在1X poly(A)缓冲剂中进行Poly(A)加尾。反应在37°C下进行30min。使用Monarch®RNA清理试剂盒(NEB目录号:T2050)纯化合成的成熟mRNA,并洗脱在20μL RNA储存缓冲剂(Invitrogen目录号:AM7001)中。

[0130] 使用Gibson组装在内部对用于SARS-CoV2刺突蛋白mRNA的DNA模板进行组装。将编码SARS-CoV-2刺突蛋白(1-1273,K986P和V987P)以及非翻译区(UTR)的gblock与UTR一起组装到pCMV载体中。具体而言,为了提高mRNA稳定性和翻译效率,(i)将带有Kozak序列的人α-珠蛋白5' UTR并入到蛋白质编码序列的上游中,(ii)将源自线粒体编码的12S rRNA(mtRNR1)和split的氨基端增强子(AES)的3' UTR串联并入到下游中,并且(iii)为了共转录加尾,将用10nt接头中断的poly-A尾(A30LA70,L=GCAUAUGACU)并入到模板的3'末端处。这些元件在从WHO International“Non-proprietary Names Programme”获得的mRNA序列的基础上选择。T7启动子序列也被修饰,用于使用CleanCap-AG(Cap1)进行共转录加帽,并引入BbsI位点用于无痕失控转录。通过Sanger测序验证模板序列,并将质粒转化到NEB-5-alpha感受态细胞中。使用Qiagen的质粒纯化试剂盒纯化pCMV-SARS-Cov2s质粒,并使用BbsI将其线性化。典型的IVT反应包括1X转录缓冲剂(40mM HEPES-KOH(pH=7.5),2mM亚精胺,10mM DTT)中的T7 RNA聚合酶、无机焦磷酸酶、制造商(Aldevron)推荐浓度的核糖核酸酶抑制剂、核苷酸三磷酸(NTP,各2.5mM或5mM)、Cleancap AG(3' OMe)(80%的GTP)和MgCl<sub>2</sub>,并在37°C下温育2h或4h。为了最小化副产物,对Mg:NTP比例、总NTP浓度和温育时间进行优化。使用NEB的Monarch mRNA纯化试剂盒纯化mRNA,并使用Nanodrop进行定量。在添加RNA载样染料并将样品在65°C下变性10min后,通过在130mV下在TAE缓冲剂中运行1%琼脂糖凝胶电泳30min,来验证mRNA质量。所述凝胶通过SyBr安全染色进行成像。

[0131] 脂质纳米粒子(LNP)的配制。使用广泛使用的乙醇注射法制备LNP(参见Duong等,用于药物递送的固体脂质纳米粒子和纳米结构化脂质载体的制备以及溶剂注射法的制备参数的影响(Preparation of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Drug Delivery and the Effects of Preparation Parameters of Solvent Injection Method),Molecules 2020,25(20),1-36;和Ganesan等,脂质纳米粒子:用于口服药物递送的固体脂质纳米粒子和纳米结构化脂质载体的不同制备技术、表征、障碍和生产策略(Lipid Nanoparticles:Different Preparation Techniques,Characterization,Hurdles,and Strategies for the Production of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Oral Drug Delivery),Sustain.Chem.Pharm.2017,6,37-56,两者均整体通过引用并入本文)。简单来说,将可离子化脂质SM-102、DSPC、胆甾醇和隐身脂质(PEG-DMG或POEGMAL<sub>5-50</sub>)以50:10:38.5:0.5-2.5mol%溶解在乙醇中。将含有上述脂质混合物的乙醇溶液(1体积)快速注射到4体积的含有mRNA的10mM柠檬酸盐缓冲剂(pH 4)中,氮(来自SM-102)与磷(来自mRNA)的摩尔比(N:P)为4:1-8:1。除非另有提及,否则LNP<sub>POEGMAL5-50</sub>以N:P 8:1制备,而LNP<sub>PEG-DMG</sub>以6:1制备。将得到的溶液针对PBS透析24h,并在4°C下储存。

[0132] 缓冲剂组合物。将下述缓冲剂用于装载有mRNA的LNP<sub>POEGMAL(n)</sub>和LNP<sub>PEG-DMG</sub>的透析:A)Pfizer:10mM Tris缓冲剂,300mM蔗糖,pH 7.4。B)Moderna:Tris(0.5mg/mL),Tris-HCl(2.5mg/mL),冰乙酸(0.042mg/mL),三水合乙酸钠(0.2mg/mL),蔗糖(87mg/mL)。

[0133] 动态光散射(DLS)研究。使用温度编程的DynaPro微量取样器(Wyatt Technology,

Santa Barbara, CA), 通过动态光散射 (DLS) 确定所有LNP的流体动力学半径 ( $R_h$ ) 和多分散性。样品在PBS中制备, 并过滤 (0.2 $\mu$ m纤维素滤器) 到具有透明平底黑色96孔板中。在25 $^{\circ}$ C下进行至少15次采集, 并使用DYNAMICS v7软件 (Wyatt technology) 通过自相关函数的正则化拟合来分析收集的数据。

[0134] Ribogreen测定。对未透析的样品进行Ribogreen测定。根据制造商的方案, 使用Ribogreen测定试剂盒在Tris-EDTA缓冲剂中, 在含有或不含1% Triton X-100的情况下评估了LNP的mRNA。将LNP样品与1% Triton X-100在RT下温育5min, 以允许LNP的破坏。使用下述公式计算包封效率: 包封的% =  $(RFU_f - RFU_i) / RFU_f * 100$ , 其中 $RFU_i$ 和 $RFU_f$ 分别是向LNP添加Tritonx-100之前和之后的相对荧光单位。

[0135] 细胞培养。HEK293T细胞从杜克大学核心培养设施 (Duke University Core Culture facility) 获得。细胞在增补有10%胎牛血清 (热失活的, Gibco) 和2mM L-谷氨酰胺 (Gibco) 的Dulbecco改良Eagle培养基 (DMEM) 中培养。将细胞维持在37 $^{\circ}$ C下的5%  $CO_2$ 培养箱中。

[0136] 萤光素酶表达测定。所述测定使用Pierce<sup>TM</sup>海萤萤光素酶发光测定试剂盒 (Thermo Scientific), 按照制造商推荐的方案进行。简单来说, 将HEK293T ( $1 \times 10^4$ 个细胞/孔) 在96孔板中铺板, 并在37 $^{\circ}$ C下在5%  $CO_2$ 中温育。除去培养基, 将细胞用在100 $\mu$ L Opti-MEM培养基/孔中制备的300ng或500ng mRNA处理, 并在37 $^{\circ}$ C下和5%  $CO_2$ 中温育。按照制造商的方案使用Lipofectamine 2000。在预定的时间点, 通过将5 $\mu$ L来自转染细胞的培养基添加到25 $\mu$ L在伴随试剂盒提供的测定缓冲剂中的1X Vargulin中, 来监测萤光素酶的表达。在室温下温育10min后, 使用BioTek Synergy H1混合多模式读板器在463nm处对发光进行定量。

[0137] 细胞毒性测定。在处理之前16h, 将HEK293T细胞以3000个细胞/孔接种在96孔板中。将细胞用一定浓度范围内的各种LNP处理。在处理48h后, 使用LDH-glo测定试剂盒按照制造商的说明书评估从膜受损的细胞释放的乳酸脱氢酶 (LDH)。

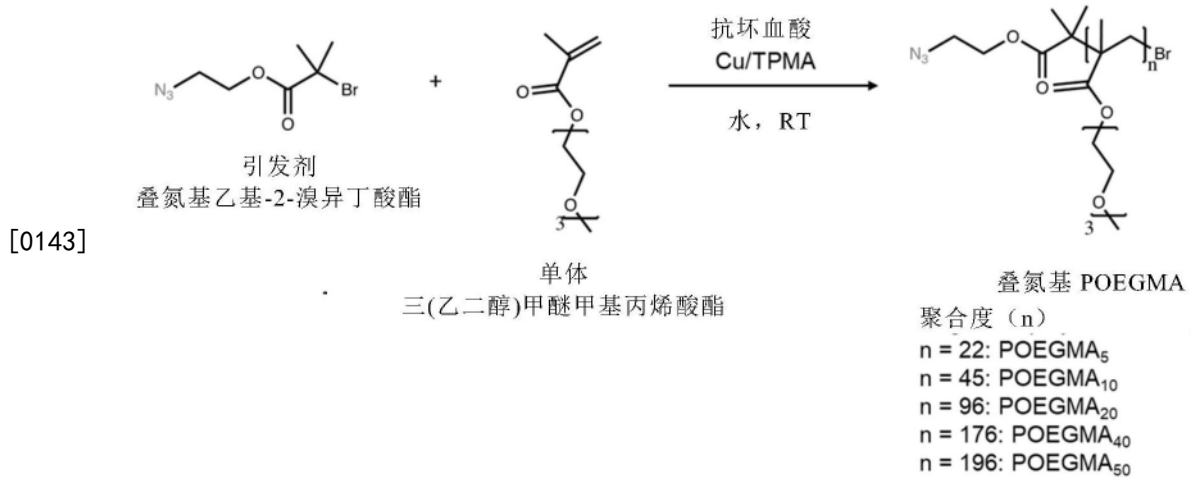
[0138] RNase保护测定。在添加终浓度为0.1%的Triton-X之前或之后, 将含有300ng CLuc mRNA的LNP与333pg RNase/ $\mu$ g mRNA在37 $^{\circ}$ C下温育2h。最后, 通过将样品与50mM TrisHCl/CaCl<sub>2</sub>缓冲剂中的1X蛋白酶K在55 $^{\circ}$ C下温育20min, 将RNase猝灭。如前所述将样品在1%琼脂糖凝胶上运行。

[0139] 实施例2

[0140] 叠氨基POEGMA (POEGMA<sub>5-50</sub>) 的合成和表征

[0141] 使用两个构建块 (POEGMA聚合物和脂肪酸尾部) 的点击偶联来合成POEGMA化脂质 (POEGMAL)。DBCO修饰的脂肪酸尾部 (16:0DBCO PE) 是商业获得的, 而叠氮化物修饰的POEGMA聚合物在内部合成 (方案1)。简单来说, 将铜 (II) - 三 (2-吡啶基甲基) 胺 (TPMA) 催化复合物与三乙二醇甲醚甲基丙烯酸酯和叠氨基乙基-2-溴异丁酸酯在惰性气氛下, 在冰浴中温育。通过将抗坏血酸的新鲜溶液连续添加到烧瓶中来引发反应。在完成反应后, 通过用空气吹扫所述混合物来猝灭反应。叠氨基POEGMA通过针对水透析进行纯化, 并作为冻干的黏稠凝胶储存。

[0142] 方案1: 叠氨基POEGMA的合成



[0144] 合成了MW在5-50kDa范围内的叠氨基POEGMA的五种变体。通过凝胶渗透色谱-多角度光散射 (GPC-MALS) 评估叠氨基POEGMA的数据分子量 ( $M_n$ )、重均分子量 ( $M_w$ ) 和多分散性 ( $\mathcal{D}$ )。来自GPC-MALS的结果确认了叠氨基POEGMA的大小和狭窄的多分散性(表2和图1A)。通过从POEGMA的 $M_w$ 中减去聚合引发剂的 $M_w$ 并用得到的质量除以单体单元的平均 $M_w$ ,来计算聚合度(n)(表2)。也使用反相高效液相色谱(HPLC)评估了叠氨基POEGMA的纯度。所有POEGMA在230nm处的HPLC迹线证实纯度大于95%(图1B)。通过计算与预期结构紧密一致的各种质子的积分比,用<sup>1</sup>H NMR进一步确认了所述结构。最后,通过将叠氨基-POEGMA与过量的DBC0-PEG<sub>4</sub>反应,确认了叠氮化物掺入。DBC0在308nm处具有与其浓度成正比的特征吸光度。由于DBC0与POEGMA聚合物的叠氨基以接近100%的效率反应,因此计算未反应的DBC0的浓度能够确定反应混合物中叠氮化物的浓度。在44h时叠氨基POEGMA<sub>5-50</sub>与DBC0-PEG<sub>4</sub>的反应表明在所有POEGMA聚合物中叠氮化物含量大于90%。

[0145] 表2:通过GPC-MALS表征POEGMA

叠氨基 POEGMA	$M_n$ (kDa)	$M_w$ (kDa)	$\mathcal{D}$	n
POEGMA <sub>5</sub>	4.8	5.3	1.10	22
POEGMA <sub>10</sub>	9.1	10.6	1.16	45
POEGMA <sub>20</sub>	20.4	22.5	1.11	96
POEGMA <sub>40</sub>	36.9	41.0	1.11	176
POEGMA <sub>50</sub>	41.6	45.7	1.10	196

[0147] 实施例3

[0148] POEGMA-脂质 (POEGMAL<sub>5-50</sub>) 的合成和表征

[0149] 通过应变催化的叠氮化物-炔烃环加成 (SPAAC) 将叠氨基POEGMA<sub>5-50</sub>与5摩尔过量的16DBC0 PE在氯仿中点击偶联,以获得POEGMA-脂质偶联物 (POEGMAL<sub>5-50</sub>)。在反应后24小时,通过用过量己烷从甲醇中再沉淀5kDa POEGMAL或从氯仿中再沉淀10-50kDa POEGMAL来纯化产物(图2A)。最后将沉积物重新溶解在甲醇中,并进行反相HPLC。典型的薄层色谱板示出在图2B中。POEGMAL<sub>10</sub>迁移得比POEGMA<sub>10</sub>更慢。此外,叠氨基POEGMA的典型物理外观是透明的,而POEGMAL是不透明的(图2C)。在HPLC迹线中不存在未反应的POEGMA<sub>5-50</sub>峰表明

POEGMA<sub>5-50</sub>和16DBCO PE在相应的反应中被完全消耗。正如预期,在添加疏水性脂质残基后,与POEGMA相比,POEGMAL的保留时间增加。

[0150] 为了进一步确认偶联,进行了<sup>1</sup>H NMR分析。最终POEGMA-脂质偶联物的NMR谱图具有POEGMA<sub>5-50</sub>和16DBCO PE两者的迹线,表明偶联成功。POEGMAL<sub>5-50</sub>中 $\delta \sim 7.3-7.8$ ppm处芳香族质子的存在表明DBCO修饰的脂肪酸尾部成功地整合到POEGMA骨架上。POEGMA<sub>5-50</sub>和16DBCO PE脂质具有几个难以去卷积的重叠区域,并且只有16DBCO PE的芳香族区域(化学位移 $\delta \sim 7.3-7.8$ ppm)远离该重叠区域。因此,使用 $\delta \sim 0.5-2.5$ ppm之间和 $7.3-7.8$ 之间的积分比( $I_{0.5-2.5}/I_{7.3-7.8}$ )来计算质子比率(图2D)。理论比率和实验比率之间的差异可能是因为(i)在 $\delta \sim 0.5-2.5$ ppm中质子数大于 $\delta \sim 7.3-7.8$ ppm中,这可以抑制灵敏度;和/或(ii)  $\delta \sim 7.3-7.8$ ppm区域中的残留溶剂峰可能干扰计算。然而,所有这些数据共同有力地表明POEGMA化脂质的合成和纯化是成功的。

[0151] 实施例4

[0152] 脂质纳米粒子(LNP)的配制和表征

[0153] 使用乙醇注射方法,使用四种不同的共脂质(%mol显示在括号中)配制了LNP:(i)可离子化脂质(SM102),其有助于包封mRNA,提供稳定性,并有助于粒子的成功内体逃逸(50mol%);(ii)DSPC(10mol%);(iii)胆甾醇(38.5mol%);和(iv)隐身脂质(1.5mol%),其是可商购的PEG-DMG或内部合成的POEGMA化脂质。这种脂质比例是为PEG化脂质专门定制的,并为使用POEGMA化脂质配制LNP提供了良好的起点。将含有PEG-DMG的LNP制剂用作基准,并且这种脂质组合物也被用于Moderna的mRNA COVID19疫苗中。值得注意的是,将10-50kDa的POEGMAL用于MW和脂质比率对LNP的mRNA包封效率的作用的初步研究,并在研究后期引入了POEGMAL5。将溶解在小体积乙醇中的脂质快速注射到含有萤光素酶mRNA的柠檬酸盐缓冲剂(pH 4)中以获得LNP。然后将LNP与PBS在4°C下进行缓冲剂交换。还合成了一组不含任何mRNA的LNP。使用动态光散射(DLS)来表征纳米粒子的形成。正如在图3A和图3B中概述的,当使用隐身脂质时,获得了稳定的LNP。不含PEG化或POEGMA化脂质的LNP看起来更浑浊,具有高的多分散性,并且表现出 $R_h > 600$ nm。相反,所有其他LNP都是半透明的,并且具有低于100nm  $R_h$ 的窄的多分散性(图3A、图3B和图3C)。对于PEG-DMG、POEGMAL<sub>10</sub>和POEGMAL<sub>20</sub>而言,mRNA的包封不显著改变纳米粒子的尺寸。具有POEGMAL<sub>40</sub>和POEGMAL<sub>50</sub>的LNP的 $R_h$ 在mRNA包封后分别增加1.3倍和1.9倍(图3D、图3E和图3F)。

[0154] 实施例5

[0155] mRNA包封效率的定量

[0156] 首先使用琼脂糖电泳迁移率偏移测定法(EMSA)对LNP的mRNA包封效率进行定性评估。由于只有游离的mRNA(而不是LNP mRNA)通过琼脂糖凝胶迁移,因此可以分辨制剂中的游离mRNA和LNP mRNA。通过用表面活性剂例如Triton-X(其释放包封的mRNA)破坏LNP,在琼脂糖凝胶上估算了包封和游离的mRNA的总量。在所述实验中,将同等浓度的游离mRNA用作对照。电泳实验还指示了mRNA在制备和储存过程中的任何降解。正如可以从图4A看到的,所有LNP都包封了相当量的mRNA。LNP<sub>POEGMAL40</sub>和LNP<sub>PEG-DMG</sub>在处理和储存过程中显著减少了mRNA的降解。另一方面,在LNP<sub>POEGMAL50</sub>的情况下,mRNA被降解。对于LNP<sub>POEGMAL10-20</sub>而言,只有游离的mRNA被降解,而包封的mRNA没有被降解。这表明在LNP<sub>POEGMAL40</sub>的情况下,未包封的mRNA在溶液中不是完全游离的,而是与LNP弱结合,否则它将像在LNP<sub>POEGMAL10-20</sub>的情况下一样被降解。

接下来,使用Ribogreen测定法定量POEGMA化LNP中mRNA的包封百分比,并以PEG化LNP的包封百分比作为基准。为了消除处理和储存的影响,在制备后不透析制剂的情况下立即对包封进行评估。DLS确认,在透析前和透析后LNP的尺寸保持相似。Ribogreen是一种有机染料,仅与游离mRNA结合,而不与LNP结合的mRNA或降解的核苷酸结合。在未结合状态下,Ribogreen具有很少或没有荧光,但当与游离mRNA结合时表现出强烈的荧光(图4B)。与LNP混合的Ribogreen的相对荧光单位(RFU)与LNP溶液中游离mRNA的量成正比,而用1% Triton-X破裂的LNP中Ribogreen的RFU与总mRNA(游离和包封的mRNA之和)成正比。因此,可以使用Ribogreen的相对荧光吸光度来计算包封的%。正如从图4C明显看到的,LNP<sub>POEGMAL50</sub>的包封效率最低,为~12%。相反,与LNP<sub>POEGMAL50</sub>相比,LNP<sub>POEGMAL40</sub>的LNP包封效率提高~4.5倍,LNP<sub>POEGMAL20</sub>提高4.1倍,LNP<sub>POEGMAL10</sub>提高3.8倍。含有POEGMAL<sub>40</sub>的LNP显示出56%的明显包封,仅比PEG-DMG低1.5倍。这种较低的包封效率是可以预期的,因为用于制备所述LNP的脂质比率是针对PEG化的LNP定制的。

#### [0157] 实施例6

#### [0158] LNP的分析和表征以最大化mRNA包封

[0159] 为了获得改进的包封效率(EE),设计了一次一因子(OFAT)研究来分析可以稳定地形成纳米粒子并同时最大化EE的POEGMAL和SM-102的摩尔分数。改变POEGMAL<sub>10-50</sub>和SM-102的mol%,并在用EMSA透析之前测量mRNA包封。正如可以从图5A看出的,POEGMAL<sub>10</sub>和POEGMAL<sub>20</sub>表现出≥75%的可观负载,其被设置为向下选择LNP候选物的阈值。改变SM-102的mol%影响EE。EE与纳米粒度分布之间的关系被描绘在图5B、图5C和图5D中。所有POEGMAL在所有mol%下均形成稳定的单分散纳米粒子,而与它们的EE无关。将所选的候选物(在图5A中圈出)针对PBS透析,并用DLS和Ribogreen测定法进行表征。尽管所有选择的候选物都形成稳定的纳米粒子,但0.5mol%的POEGMAL<sub>10</sub>的LNP显示出~2.5倍的尺寸增加,并且该制剂显示出稳定且可重复的EE>85%(图5E)。受这一事实激励,使用不同mol%的POEGMA<sub>5</sub>进行了OFAT研究,以评估进一步降低POEMAL的MW是否提高EE。所有制剂都表现出稳定的纳米粒子,其半径低于100nm,多分散性<30%。在所有摩尔%下,在透析之前EE>90%,但发现0.5mol%在透析之后表现出最高的EE(图6A和图6B)。总之,0.5mol%的POEGMAL<sub>5</sub>和POEGMAL<sub>10</sub>都形成稳定的LNP,其即使在透析后也能保留超过85%的mRNA。因此,决定通过cryo-TEM对这两种制剂进行成像。正如可以从图7看出的,两者都形成了球形纳米粒子。

#### [0160] 实施例7

#### [0161] 治疗相关mRNA的包封

[0162] 接下来,对LNP系统进行了探索,以包封治疗相关的SARS COV-2刺突蛋白mRNA。编码全长SARS-COV-2刺突糖蛋白的mRNA可以从WHO International“Non-proprietary Names Programme”获得。这个mRNA据推测被用于Pfizer的COVID19疫苗。使用T7 RNA聚合酶体外转录的参数以提高mRNA产量并最小化副产物(长转录物和dsRNA)的形成。所使用的制剂是为萤光素酶mRNA定制的——0.5mol% POEGMA<sub>5和10</sub>,N:P为8:1,20%乙醇,针对PBS透析。使用LNP<sub>POEGMAL5</sub>时透析后的EE受损,仅表现出~30%的EE。这并不完全出乎意料,原因有三:(i) SARS COV-2mRNA的尺寸为萤光素酶mRNA的2倍大;(ii) 透析缓冲剂不是最佳的,以及(iii) 制备方法、脂质和N:P比例可能不是有效的。用LNP<sub>POEGMAL10</sub>探测所有这些挑战(图8)。首先,评估了透析缓冲剂的作用(图8A和图8B)。由于所述制剂是Moderna的生物类似物,因此它在为

Moderna LNP疫苗定制的缓冲剂中显示出改善的EE (~ 67%) (图8B)。此外,LNP的尺寸保持不变(图8C)。因此,将Moderna缓冲剂用于后续分析。其次,在N:P和乙醇浓度的一定范围内评估了EE。可以看出,N:P 10:1(图8D)和30%乙醇(图8E)可用于包封所述mRNA,将透析后EE推至超过80%。第三,设计了类似的OFAT研究,并发现0.5mol%仍然是POEGMAL<sub>10</sub>的最有效的脂质浓度(图8F)。还评估了在较高的N:P比例下可能提高并可能导致LNP毒性升高的表面电位。有趣的是,表面电荷没有显著增加,表明在较高的N:P下,LNP的mRNA含量正在增加并中和了电荷。所有透析过的制剂的表面电荷都低于10mV。在该范围内的 $\zeta$ 电位被认为是接近中性的。总之,这些数据表明,LNP<sub>POEGMAL10</sub>可以以高EE (~ 85%)成功地包封模型萤光素酶mRNA以及治疗相关的SARS COV-2mRNA。

[0163] 实施例8

[0164] LNP的体外性能

[0165] 最后,受到本发明的LNP系统可以充当递送SARS COV-2mRNA疫苗的替代品这一事实的激励,进行了下述评估:(i)在HEK293T细胞中的毒性;(ii)在一段时间内在HEK293T细胞系中表达萤光素酶mRNA的效能;和(iii)保护所述mRNA对抗RNase的能力。这些实验共同作为一个模型筛选平台,广泛用于mRNA疫苗研究,以证明其潜在的体内效用。此外,使用Moderna生物类似物LNP<sub>PEG-DMG</sub>和/或Lipofectamine 2000作为LNP性能的基准。用LDH测定法评估了LNP对HEK293T细胞的毒性。即使在连续处理48h后,所有LNP也均显示出极小的毒性(图10)。为了评估萤光素酶表达,用N:P比例为4:1-8:1、mRNA量为300-500ng的各种LNP处理HEK293T细胞。如图11A、图11B、图11C、图11D、图11E和图11F中所概述的,LNP<sub>POEGMAL5</sub>和LNP<sub>POEGMAL10</sub>在96h内均显示出显著的萤光素酶表达。发现LNP<sub>POEGMAL10</sub>好于LNP<sub>POEGMAL5</sub>。在对于LNP<sub>POEGMAL10</sub>而言8:1的N:P和对于LNP<sub>PEG-DMG</sub>而言6:1的N:P下,两种制剂的性能都优于Lipofectamine 2000(图9A和图9B)。表达的差异在300ng的mRNA下变得更加显著,其中LNP<sub>POEGMAL10</sub>与lipofectamine 2000相比显示出超过300%的萤光素酶活性,并且性能优于Moderna生物类似物LNP<sub>PEG-DMG</sub>。在~3天的时间段内测量萤光素酶的表达,并允许使用梯形规则测量曲线下面积(AUC)。如图9C和图9D中所概括的,LNP<sub>POEGMAL10</sub>在所有N:P比例下都优于LNP<sub>POEGMAL5</sub>。同样重要的观察结果是,当使用更大量的mRNA(500ng)时,LNP<sub>POEGMAL10</sub>和LNP<sub>PEG-DMG</sub>都显示出相似的AUC。然而,在较低的mRNA量(300ng)下,LNP<sub>POEGMAL10</sub>的性能优于Moderna生物类似物LNP<sub>PEG-DMG</sub>,在相同的N:P 6:1下具有的~2倍高的AUC,并且在N:P 8:1下,LNP<sub>POEGMAL10</sub>与LNP<sub>PEG-DMG</sub>相比显示出2.3倍高的AUC。最后,研究了LNP保护mRNA货物抵抗RNase的功效。这是决定LNP-mRNA疫苗的成功临床前和临床转化的一个重要参数。mRNA很容易被细胞外RNase消化,导致体内性能较差。进行了一项内部测定,其中将LNP-mRNA疫苗候选物与高浓度RNase一起温育。在添加RNase之前或之后加入LNP破裂剂。在温育时间后,用蛋白酶K猝灭过量的RNase。正如图12中所概述的,所有候选LNP都能够提供针对RNase的显著保护。对照游离mRNA和在添加RNase之前添加Triton-X的组显示出mRNA完全降解。总之,这些数据表明POEGMA化LNP可以充当mRNA疫苗递送平台,并具有成功临床转化的高潜力。

[0166] 应当理解,上述详细描述和随附的实施例仅仅是说明性的,不应被视为对本发明范围的限制。

[0167] 对于本领域技术人员来说,对所公开的实施方式的各种变化和修改将是显而易见的。此类变化和修改,包括但不限于与本发明的化学结构、取代基、衍生物、中间体、合成、组

合物、制剂或使用有关的变化和修改,可以在不偏离本发明的精神和范围的情况下做出。

[0168] 出于完整性的原因,本发明的各个方面被阐述在下述编号条款中:

[0169] 条款1.一种脂质纳米粒子,其包含:可离子化脂质;磷脂;甾醇;少于10mol%的聚[寡聚(乙二醇)醚甲基丙烯酸酯](POEGMA)-脂质偶联物,其中所述POEGMA具有小于100kDa的数均分子量;和治疗剂。

[0170] 条款2.根据条款1所述的脂质纳米粒子,其中所述POEGMA具有聚(甲基丙烯酸甲酯)骨架和多个共价附连到所述骨架的侧链,每个侧链包含2至9个串联重复的乙二醇(EG)单体。

[0171] 条款3.根据条款1或条款2所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子相对于包含聚乙二醇(PEG)的脂质纳米粒子具有降低的免疫应答。

[0172] 条款4.根据条款1-3中任一项所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子对受试者中预先存在的抗PEG抗体没有反应性。

[0173] 条款5.根据条款1-4中任一项所述的脂质纳米粒子,其中所述POEGMA-脂质偶联物的脂质包含C<sub>2-40</sub>烃链。

[0174] 条款6.根据条款1-5中任一项所述的脂质纳米粒子,其中所述POEGMA-脂质偶联物的脂质通过三唑、酰胺、酯、醚或烃接头与所述POEGMA偶联。

[0175] 条款7.根据条款1-6中任一项所述的脂质纳米粒子,其中所述POEGMA具有约1kDa至约50kDa的数均分子量。

[0176] 条款8.根据条款1-7中任一项所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子包含约0.1mol%至约10mol%的所述POEGMA-脂质偶联物。

[0177] 条款9.根据条款1-8中任一项所述的脂质纳米粒子,其中所述可离子化脂质包含(十七烷-9-基-8-((2-羟基乙基)(6-酮基-6-(十一烷氧基)己基)氨基)辛酸酯)(SM-102)、3,6-双({4-[双(2-羟基十二烷基)氨基]丁基})哌嗪-2,5-二酮(cKK-E12)、1-亚油酰基-2-亚油基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亚油基苯基甲酰氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLm-DAP)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLin-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-DMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA)、1,2-二油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DODAP)、N,N-二甲基-(2,3-二油基氧基)丙胺(DODMA)、双十八烷基酰胺基甘油基羧基精胺(DOGS)、精胺胆甾醇氨基甲酸酯(GL-67)、双胍-亚精胺-胆甾醇(BGTC)、3b-(N-(N<sup>A</sup>N'-二甲基氨基乙基)-氨甲酰基胆甾醇(DC-Chol)、N-叔丁基-N'-十四烷基氨基-丙脒(diC14-脒)、二甲基双十八烷基溴化铵(DDAB)、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟基乙基溴化铵(DMR1E)、N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、二油基氧基丙基-3-二甲基羟基乙基溴化铵(DORIE)、N-(1-(2,3-二油基氧基3)丙基)-N-2-(精胺甲酰基)乙基)-N,N-二甲基三氟乙酸铵(DOSPA)、2-二油酰基三甲基丙烷氯化铵(DOTAP)、N-(1-(23-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、氨基丙基-二甲基-双(十二烷基氧基)-丙烷溴化铵(GAP-DLR1E)、1,2-二油酰基-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、(4-羟基丁基)氮烷二基]二(己烷-6,1-二基)双(2-己基癸酸酯)(ALC-0315)或其

组合。

[0178] 条款10.根据条款1-9中任一项所述的脂质纳米粒子,其中所述可离子化脂质包含(十七烷-9-基-8-((2-羟基乙基)(6-酮基-6-(十一烷氧基)己基)氨基)辛酸酯)(SM-102)。

[0179] 条款11.根据条款1-10中任一项所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子包含约20mol%至约65mol%的所述可离子化脂质。

[0180] 条款12.根据条款1-11中任一项所述的脂质纳米粒子,其中所述磷脂包含二硬脂酰基-sn-甘油基-磷酸乙醇胺、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-甲酸盐(DOPE-mal)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺、二甲基-磷脂酰乙醇胺、18-1-反式PE、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、卵磷脂酰胆碱(EPC)、二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)、鞘磷脂(SM)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油(DMPG)、二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、二芥酰基磷脂酰胆碱(DEPC)、棕榈酰基油酰基磷脂酰甘油(POPG)、二反油酰基-磷脂酰乙醇胺(DEPE)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DMPC)、卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂类、二鲸蜡基磷酸酯、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰胆碱或其组合。

[0181] 条款13.根据条款1-12中任一项所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子包含约5mol%至约25mol%的所述磷脂。

[0182] 条款14.根据条款1-13中任一项所述的脂质纳米粒子,其中所述甾醇包含胆甾醇、菜油甾醇、antrosterol、链甾醇、nicasterol、豆甾醇、谷甾醇、氧化甾醇、C<sub>4-10</sub>甾醇、麦角甾醇、胆甾-4-烯-3-酮或其组合。

[0183] 条款15.根据条款1-14中任一项所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子包含约10mol%至约50mol%的所述甾醇。

[0184] 条款16.根据条款1-15中任一项所述的脂质纳米粒子,其中所述治疗剂是包含siRNA、miRNA、反义寡核苷酸、shRNA、mRNA、tRNA、rRNA、CircRNA、DNA或其组合的核酸。

[0185] 条款17.根据条款16所述的脂质纳米粒子,其中所述核酸包含siRNA、mRNA或其组合。

[0186] 条款18.一种脂质纳米粒子,其包含:(十七烷-9-基-8-((2-羟基乙基)(6-酮基-6-(十一烷氧基)己基)氨基)辛酸酯)(SM-102);DSPC;胆甾醇;约0.25mol%至约3mol%的聚[寡聚(乙二醇)醚甲基丙烯酸酯](POEGMA)-脂质偶联物,其中所述POEGMA具有约1kDa至约50kDa的数均分子量;和mRNA。

[0187] 条款19.根据条款1-18中任一项所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子具有约4:1至约16:1的N:P比例。

[0188] 条款20.根据条款1-19中任一项所述的脂质纳米粒子,其中所述脂质纳米粒子具有约30nm至约300nm的直径。

[0189] 条款21.根据条款1-20中任一项所述的脂质纳米粒子,其中当通过荧光测量时,所述脂质纳米粒子具有大于或等于75%的治疗剂包封效率。

[0190] 条款22.根据条款1-21中任一项所述的脂质纳米粒子,其进一步包含靶向配体。

[0191] 条款23.一种药物组合物,其包含:

[0192] 一种或多种根据条款1-22中任一项所述的脂质纳米粒子;和药学上可接受的赋形剂。

[0193] 条款24.一种在有需要的受试者中治疗疾病或障碍的方法,所述方法包括向所述受试者给药任选地与药学上可接受的赋形剂组合的有效量的一种或多种根据条款1-22中任一项所述的脂质纳米粒子。

[0194] 条款25.根据条款24所述的方法,其中所述一种或多种脂质纳米粒子相对于包含聚乙二醇(PEG)的脂质纳米粒子具有降低的免疫应答,与所述受试者中预先存在的抗PEG抗体没有反应性,或其组合。

[0195] 条款26.根据条款24或25所述的方法,其中所述疾病或障碍是传染病、亨廷顿病、肌肉萎缩症、自身免疫疾病或癌症。

[0196] 条款27.一种将治疗剂递送到细胞的方法,所述方法包括将所述细胞与一种或多种根据条款1-22中任一项所述的脂质纳米粒子接触,由此将所述治疗剂递送到所述细胞。

[0197] 序列

[0198] SEQ ID NO:1海萤萤光素酶mRNA:

[0199] GGGAGACCCAAGCUUGGUACCGAGCUCGGAUCCGCCACCAUGAAGACCUUAAUUCUUGCCGUUGCAU  
AGUCUACUGCGCCACUGUUCAUUGCCAGGACUGUCCUACGAACCUGAUCCACCAAACACAGUCCAACUCCUGU  
GAAGCUAAAAGAAGGAGAAUGUAUUGAUAGCAGCUGUGGCACCUGCACGAGAGACAUACUAUCAGAUGGACUGUGU  
AAAAUAAACCAGGAAAAACAUGUUGCCGAAUGUGUCAGUAUGUAAUUGAAUGCAGAGUAGAGGCCGCAGGAUGGU  
UAGAACAUCUAUGGAAAGAGAUUCCAGUUCAGGAACCUGGUACAUCGUGUUGGGUCAAGGAACCAAGGGCGGC  
GACUGGAAGGUGUCCAUCACCCUGGAGAACCUGGAUGGAACCAAGGGGGCUGUGCUGACCAAGACAAGACUGGAAG  
UGGCUGGAGACAUCAUUGACAUCGCUCAAGCUACUGAGAAUCCCAUCACUGUAAACGGUGGAGCUGACCCUAUCAU  
CGCCAACCCGUACACCAUCGGCGAGGUCACCAUCGCUGUUGUUGAGAUGCCAGGCUUCAACUACCCGUCUUGAG  
UUCUCAAACUGAUCGUGAUCGACAUCUCCUCGGAGGAAGAUCUGUAAAGAAUCGCCCCAGACACAGCAAACAAAGGAA  
UGAUCUCUGGCCUCUGUGGAGAUCUAAAAUGAUGGAAGAUACAGACUUCACUUCAGAUCCAGAACAACUCGCUAU  
UCAGCCUAAAGAUCAACCAGGAGUUUGACGGUUGUCCACUCUAUGGAAAUCCUGAUGACGUUGCAUACUGCAAAGGU  
CUUCUGGAGCCGUACAAGGACAGCUGCCGCAACCCCAUCAACUUCUACUACACCAUCUCCUGCGCCUUCGCCC  
GCUGUAUGGGUGGAGACGAGCGAGCCUCACACGUGCUGCUUGACUACAGGGAGACGUGCGCUGCUCCCGAAACUAG  
AGGAACCGUGUUUUGUCUGGACAUACUUCUACGAUACAUUUGACAAAGCAAGAUACCAAUUCAGGGUCCUGC  
AAGGAGAUUCUUAUGGCCGCCGACUGUUCUGGAACACUUGGGAUGUGAAGGUUCACACAGGAUUGUUGACUCU  
ACACUGAAGUAGAGAAAGUACGAAUCAGGAAACAUCGACUGUAGUAGAACUCAUUGUUGAUGGAAAACAGAUUCU  
GGUUGGAGGAGAAGCCGUGUCCGUCCCGUACAGCUCUCAGAACACUCCAUCUACUGGCAAGAUGGUGACAUACUG  
ACUACAGCCAUCUACCUAGCUCUGGUGGUCUAGUUCUACUACUACUACUACUACUACUACUACUACUACUACUACU  
CAUUCGAUGGUAAGACUUGCGGUUUUGCGGUAACUACAACCAGGAUUUCAGUGAUGAUUCUUUUGAUGCUGAAGG  
AGCCUGUGAUCUGACCCCAACCCACCGGAUGCACCGAAGAACAGAAACCUGAAGCUGAACGACUCUGCAAUAGU  
CUCUUCGCCGUCAAAGUGAUCUUGAUCAGAAAUGUAACGUGUGCCACAAGCCUGACCGUGUCGAACGAUGCAUGU

ACGAGUAUUGCCUGAGGGGACAACAGGGUUUCUGUGACCACGCAUGGGAGUUCAAGAAAGAAUGCUACAUAAGCA  
UGGAGACACCCUAGAAGUACCAGAUGAAUGCAAUAGGCGGCCGAAUAAAAUAUCUUUAUUUUAUUAUACAUCUGU  
GUGUUGGUUUUUUGUGUGUCUAG (A) 200-300

[0200] SEQ ID NO: 2 SARS-COV2 刺突蛋白 mRNA:

[0201] AGGAAUAAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGUUCGUGUCCUG  
GUGCUGCUGCCUCUGGUGUCCAGCCAGUGUGUGAACCUGACCACCAGAACACAGCUGCCUCCAGCCUACACCAACAG  
CUUUACCAGAGGCGUGUACUACCCCGACAAGGUGUUCAGAUCCAGCGUGCUGCACUCUACCCAGGACCUGUCCUGC  
CUUUCUUCAGCAACGUGACCUGGUUCCACGCCAUCCAGUGUCCGGCACCAUUGGCACCAAGAGAUUCGACAACCCC  
GUGCUGCCCUUCAACGACGGGGUGUACUUUGCCAGCACCGAGAAGUCCAACAUAUCAGAGGCUGGAUCUUCGGCAC  
CACACUGGACAGCAAGACCCAGAGCCUGCUGAUCGUGAACAACGCCACCAACGUGGUCAUCAAGUGUGCGAGUUC  
AGUUCUGCAACGACCCCUUCCUGGGCGUCUACUACCACAAGAACAACAAGAGCUGGAUGGAAAGCGAGUUCGGGUG  
UACAGCAGCGCCAACAACUGCACCUUCGAGUACGUGUCCAGCCUUUCCUGAUGGACCUGGAAGGCAAGCAGGGCAA  
CUUCAAGAACCUGCGGAGUUCGUGUUUAGAACAUCGACGGCUACUUAAGAUCUACAGCAAGCACACCCCUAUCA  
ACCUCGUGCGGGAUUCGCCUCAGGGCUUCUCUGCUCUGGAACCCUGGUGGAUCUGCCAUCCGCAUCAACAUCACC  
CGGUUCAGACACUGCUGGCCCUGCACAGAAGCUACCUGACACCUGGCGAUAGCAGCAGCGGAUGGACAGCUGGUGC  
CGCCGCUUACUUAUGUGGGCUACCUCGAGCCUAGAACCUUCCUGCUGAAGUACAACGAGAACGGCACCAUCACCGACG  
CCGUGGAUUGUCUCUGGAUCCUCUGAGCGAGACAAAAGUGCACCCUGAAGUCCUACCCGUGGAAAAGGGCAUCUAC  
CAGACCAGCAACUUCGGGUGCAGCCCACCGAAUCCAUCGUGCGGUUCCCCAAUAUCACCAUUCUGUGCCCUUCGG  
CGAGGUGUCAAUGCCACCAGAUUCGCCUCUGUGUACGCCUGAACCAGGCGGAUCAGCAAUUGCGUGGCCGACU  
ACUCCGUGCUGUACAACUCCGCCAGCUUCAGCACCUUCAAGUGCUACGGCGUGUCCCUACCAAGCUGAACGACCUG  
UGCUUCACAAACGUGUACGCCGACAGCUUCGUGAUCGGGGGAGAUGAAGUGCGGCAGAUUGCCCCUGGACAGACAGG  
CAAGAUCGCCGACUACAACUACAAGCUGCCCGACGACUUCACCGGCUGUGUGAUUGCCUGGAACAGCAACAACCCUGG  
ACUCCAAGUCGGCGGAACUACAUAUACCUGUACCGGCUGUCCCGAAGUCCAUCUGAAGCCCUUCGAGCGGGAC  
AUCUCCACCAGAUCAUCAGGCCGGCAGCACCCCUUGUAACGGCGUGGAAGGCUUACAUCGCUACUUCCCACUGCA  
GUCCUACGGCUUCAGCCCACAAUUGGCGUGGGCUAUCAGCCUACAGAGUGGUGGUGCUGAGCUUCGAACUGCUGC  
AUGCCCCUGCCACAGUGUGCGGCCCUAAGAAAAGCACCAUUCUGUGAAGAACAUAUGCGUGAACUUAACUUAAC  
GGCCUGACCGGCACCGGCGUGCUGACAGAGACAACAAGAAGUCCUGCCAUUCCAGCAGUUUGGCCGGGAUAUCGC  
CGAUACCACAGACGCCGUUAGAGAUCCCCAGACACUGGAAAUCCUGGACAUCACCCCUUGCAGCUUCGGCGGAGUGU  
CUGUGAUCACCCUUGGCACCAACACCAGCAAUCAGGUGGCAGUGCUGUACCAGGACGUGAACUGUACCGAAGUGCCC  
GUGGCCAUUCACGCCGUAUCAGCUGACACCUACAUGGCGGGUGUACUCCACCGGCAGCAAUGUGUUUCAGACCAGAGC  
CGGCUGUCUGAUCGGAGCCGAGCACGUGAACAUAAGCUACGAGUGCGACAUCCCCAUCGGCGCUGGAAUCUGCGCCA  
GCUACCAGACACAGACAAACAGCCCUCCGAGAGCCAGAAGCGUGGCCAGCCAGAGCAUCAUUGCCUACACAAUGUCU  
CUGGGCGCCGAGAACAGCGUGGCCUACUCCAACAACUCUAUCGCUAUCCCCACCAACUUCACCAUCAGCGUGACCAC  
AGAGAUCUGCCUGUGUCCAUGACCAAGACCAGCGUGGACUGCACCAUGUACAUCUGCGGGCAUUCACCGGAGUGCU  
CCAACCUUGCUGCUGCAGUACGGCAGCUUCUGCACCCAGCUGAAUAGAGCCCUGACAGGGAUCGCCGUGGAACAGGAC  
AAGAACACCCAAGAGGUGUUCGCCCAAGUGAAGCAGAUCAACAAGACCCCUCCAUAUCAAAGGACUUCGGCGGCUUCA  
UUUCAGCCAGAUUCUGCCCGAUCCUAGCAAGCCCAGCAAGCGGAGCUUCAUCGAGGACCUGCUGUUAACAAGUGA  
CACUGGCCGACGCCGCUUCAUCAAGCAGUAUGGCGAUUGUCUGGGCGACAUCGCCCGAGGGAUCUGAUUUGCGCC  
CAGAAGUUUAACGGACUGACAGUGCUGCCUCCUCUGCUGACCGAUGAGAUGAUCGCCAGUACACAUCUGCCUGCU

GGCCGGCACAAUCACAAGCGGCUGGACAUUUGGAGCAGGCGCCGCUCUGCAGAUCCCCUUUGCUAUGCAGAUGGCCU  
ACCGGUUCAACGGCAUCGGAGUGACCCAGAAUGUGCGUGUACGAGAACCAGAAGCUGAUCGCCAACAGUUCAACAGC  
GCCAUCGGCAAGAUCAGGACAGCCUGAGCAGCACAGCAAGCGCCCUGGGAAAGCUGCAGGACGUGGUCAACCAGAA  
UGCCCAGGCACUGAACACCCUGGUCAAGCAGCUGUCCUCCAACUUCGGCGCCAUCAGCUCUGUGCUGAACGAUAUCC  
UGAGCAGACUGGACCCUCCUGAGGCCGAGGUGCAGAUCGACAGACUGAUCACAGGCAGACUGCAGAGCCUCCAGACA  
UACGUGACCCAGCAGCUGAUCAGAGCCGCCGAGAUUAGAGCCUCUGCCAAUCUGGCCGCCACCAAGAUGUCUGAGUG  
UGUGCUGGGCCAGAGCAAGAGAGUGGACUUUUGCGGCAAGGGCUACCACCUGAUGAGCUUCCUCAGUCUGCCCCUC  
ACGGCGUGGUGUUUCUGCACGUGACAUAUGUGCCCGCUCAAGAGAAGAAUUCACCACCGCUCAGCCAUCUGCCAC  
GACGGCAAAGCCCACUUUCCUAGAGAAGGCGUGUUCGUGUCCAACGGCACCCAUUGGUUCGUGACACAGCGGAACUU  
CUACGAGCCCCAGAUCAUACCCACCGACAACACCUUCGUGUCUGGCAACUGCGACGUCGUGAUCGGCAUUGUGAACA  
AUACCGUGUACGACCCUCUGCAGCCGAGCUGGACAGCUUCAAGAGGAACUGGACAAGUACUUUAAGAACCACACA  
AGCCCCGACGUGGACCUGGGCGAUUUCAGCGGAAUCAUUGCCAGCGUCGUGAACAUCCAGAAAGAGAUCCGACCGCU  
GAACGAGGUGGCCAAGAAUCUGAACGAGAGCCUGAUCGACCUGCAAGAACUGGGGAAGUACGAGCAGUACAUCAAGU  
GGCCCUGGUACAUCUGGCUGGGCUUUUUCGCCGACUGAUUGCCAUCGUGAUGGUCACAAUCAUGCUGUGUUGCAUG  
ACCAGCUGCUGUAGCUGCCUGAAGGGCUGUUGUAGCUGUGGCAGCUGCUGCAAGUUCGACGAGGACGAUUCUGAGCC  
CGUGCUGAAGGGCGUGAAACUGCACUACACAUGAUGACUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCU  
UCCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCGACCUCGGGUCCAGGUAUGCUCACCACCUGCCCCACUCACC  
ACCUCUGCUAGUUCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGG  
GAAACAGCAGUGAUUAACCUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCG  
UGCCAGCCACACCCUGGAGCUAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAUAUGACUAAAAAAAAAAAA  
AA

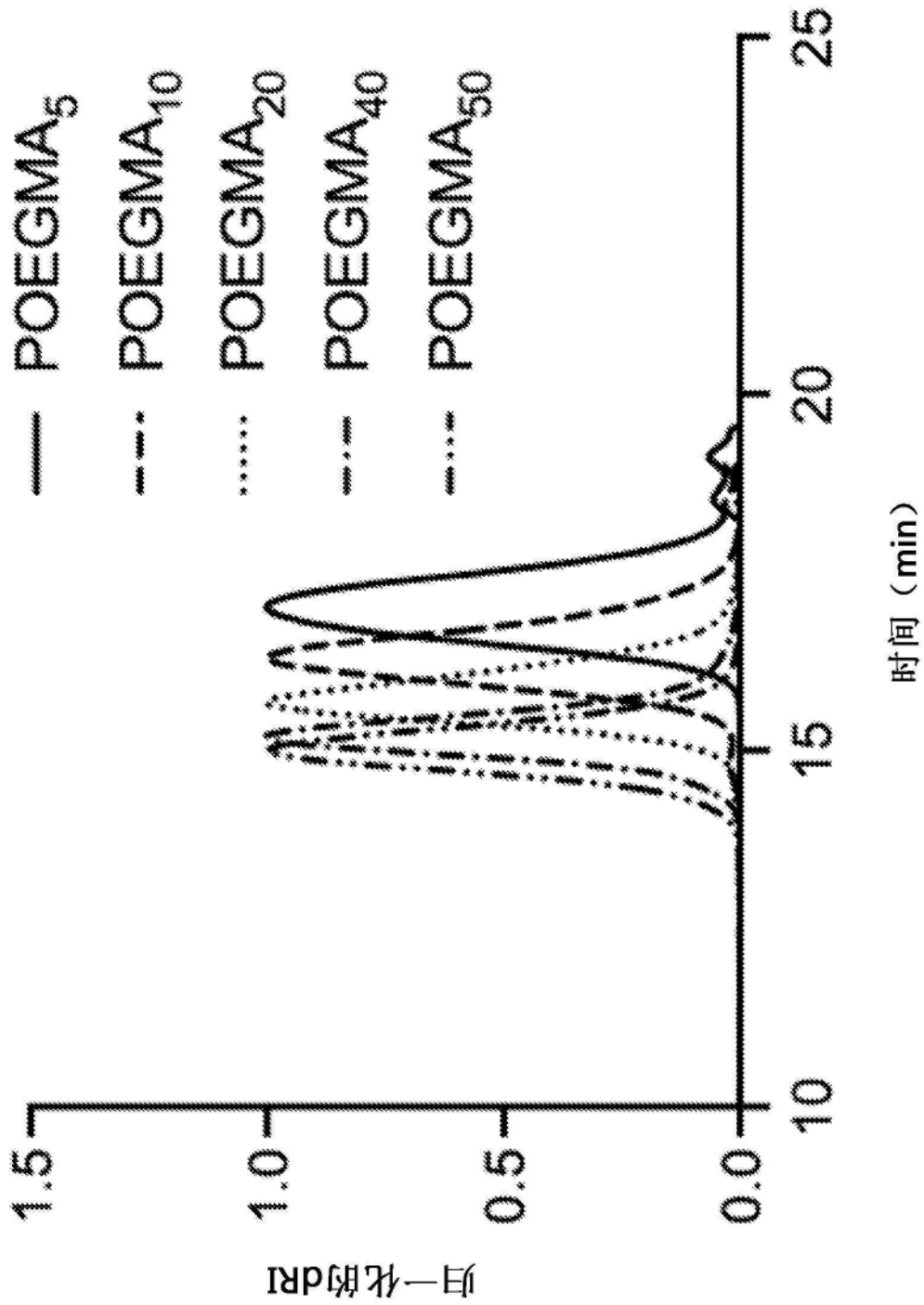


图1A

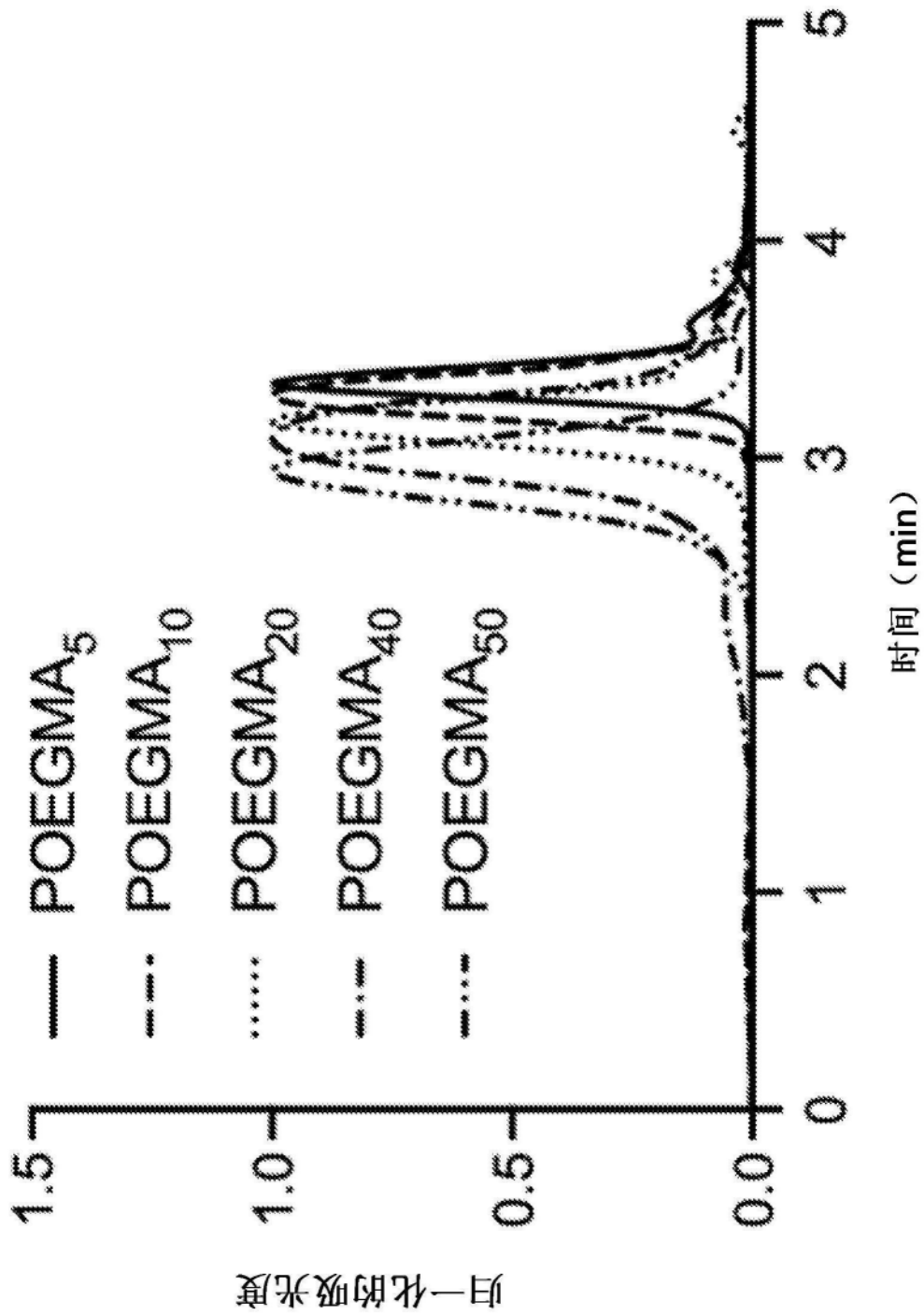


图1B

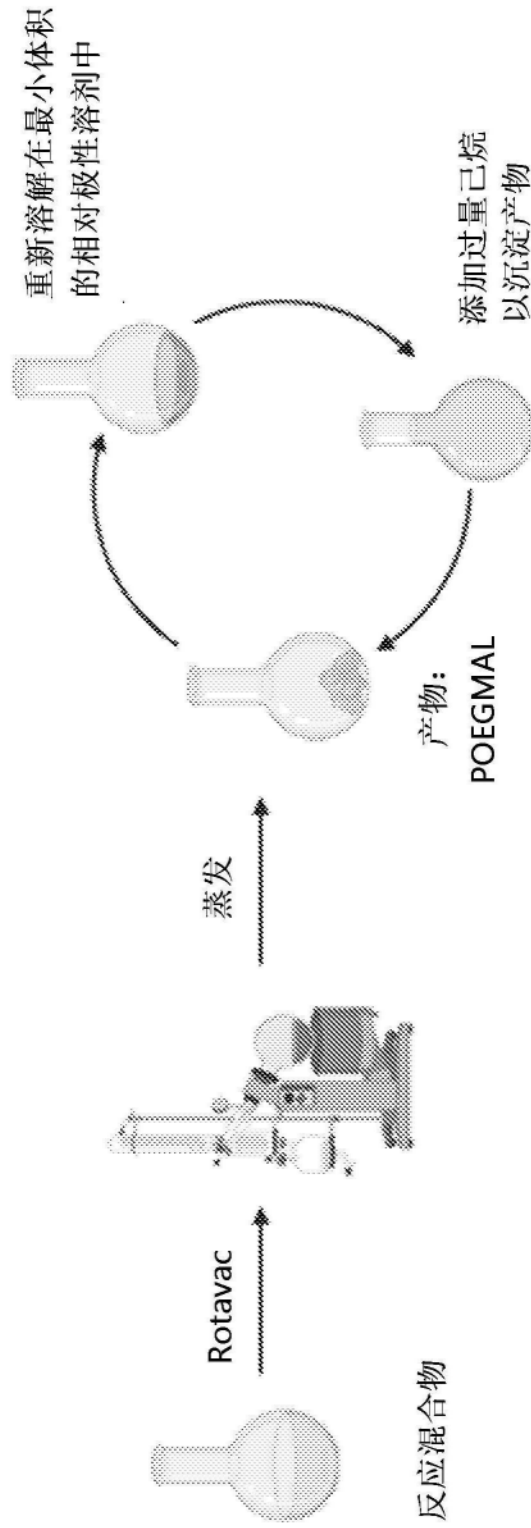


图2A

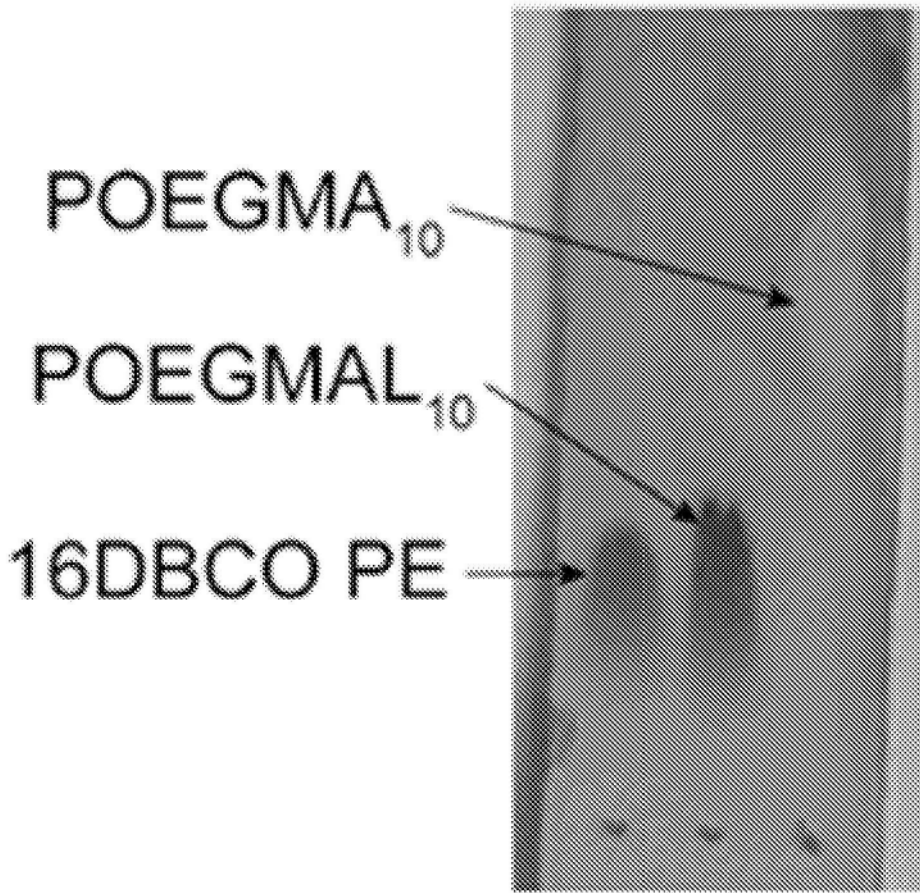


图2B



图2C

化合物	n	计算的			计算的比率 ( $\delta$ 0.5-2.5/ $\delta$ 7.3-7.8)	实验比率 (来自NMR $I_{0.5-2.5}/I_{7.3-7.8}$ )	误差的 %	
		质子数 $\delta$ 0.5-2.5	质子数 $\delta$ 7.3-7.8	计算的比率 ( $\delta$ 0.5-2.5/ $\delta$ 7.3-7.8)				
		POEGMA	DBCO	POEGMA	DBCO			
POEGMAL <sub>5</sub>	22	110	66	0	8	22	23	-4.5
POEGMAL <sub>10</sub>	45	225	66	0	8	36	31	-13.8
POEGMAL <sub>20</sub>	96	480	66	0	8	69	77	11.5
POEGMAL <sub>40</sub>	176	880	66	0	8	118	103	-12.7
POEGMAL <sub>90</sub>	196	980	66	0	8	131	127	-3.0

图2D

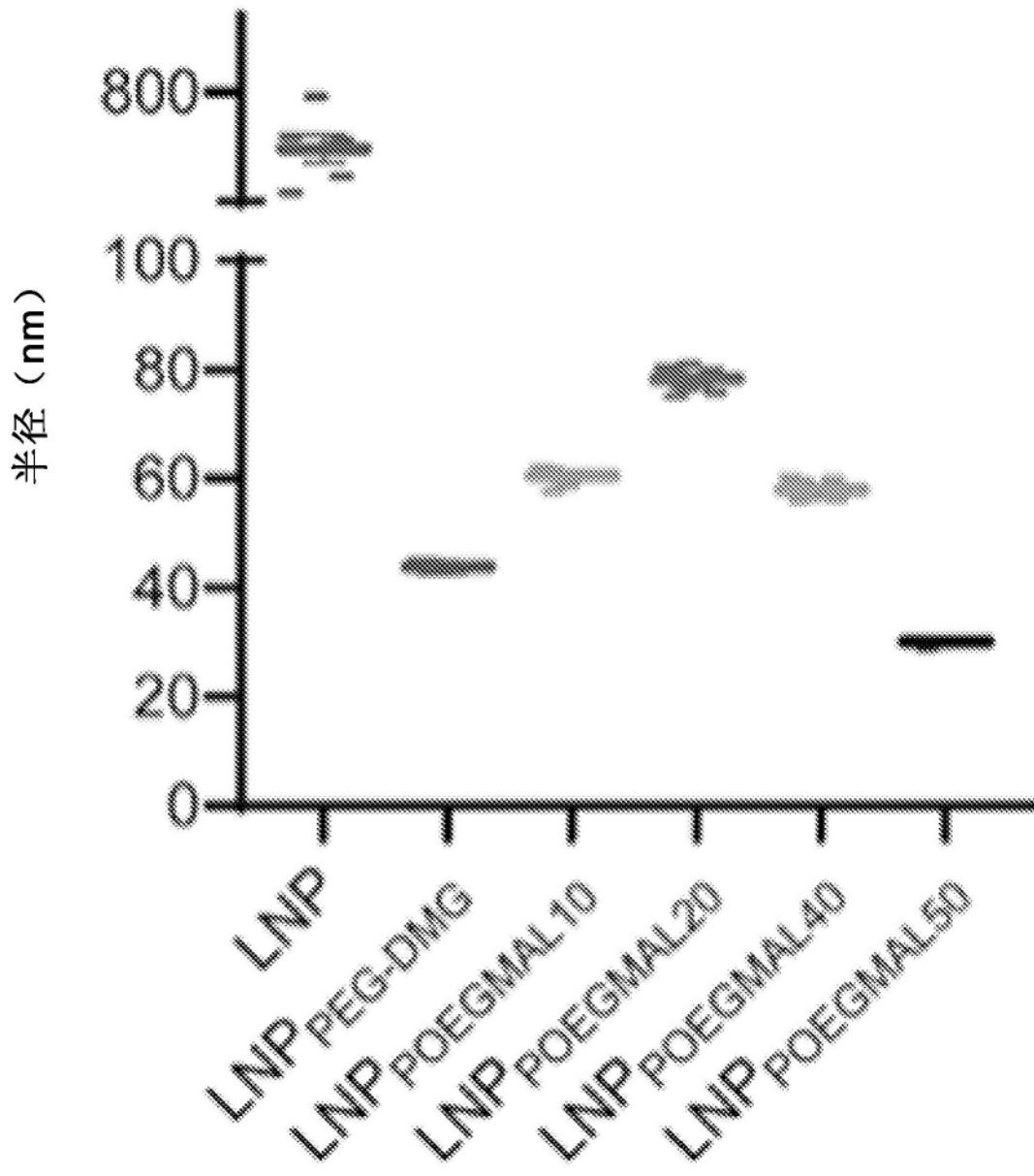


图3A

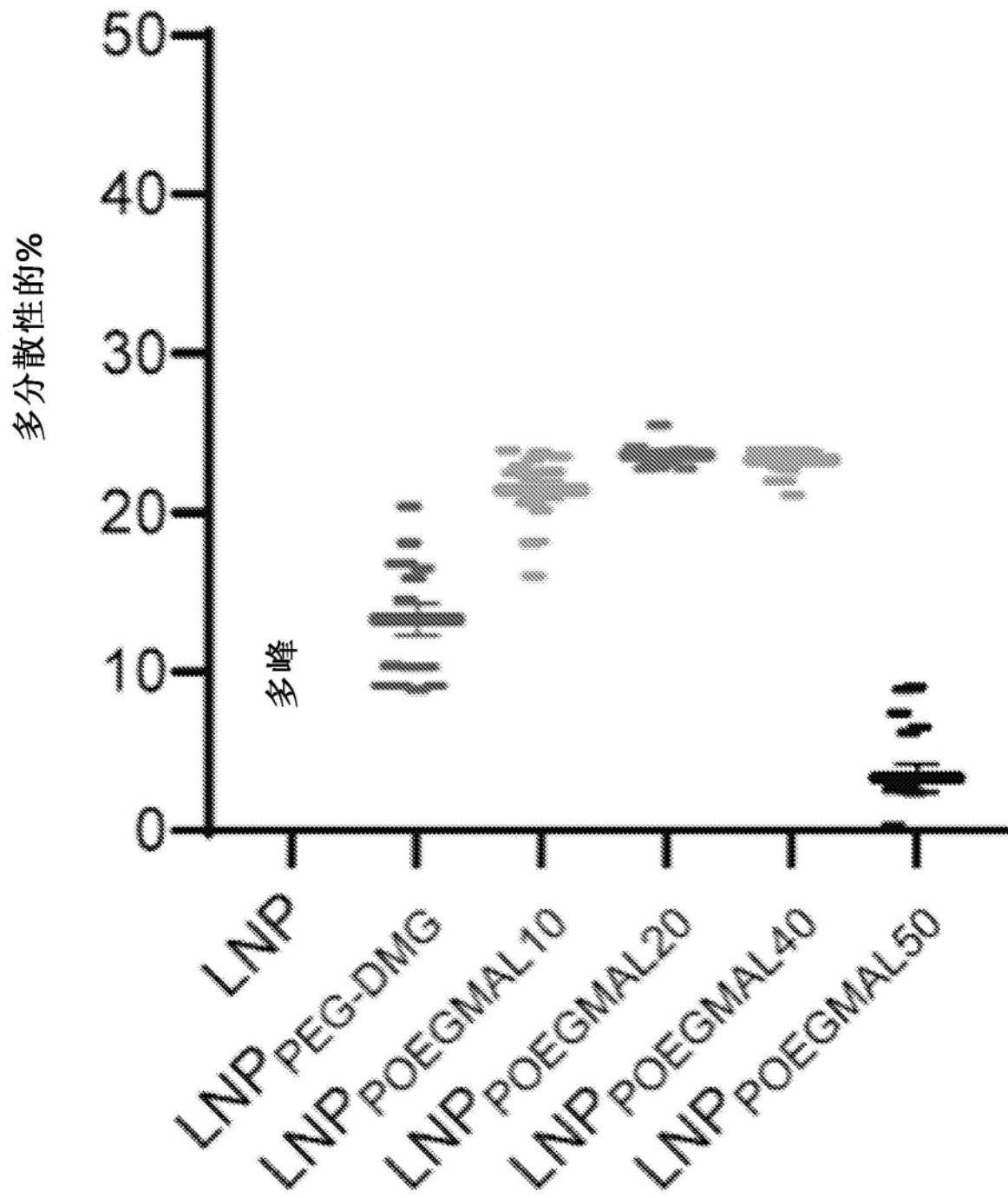


图3B

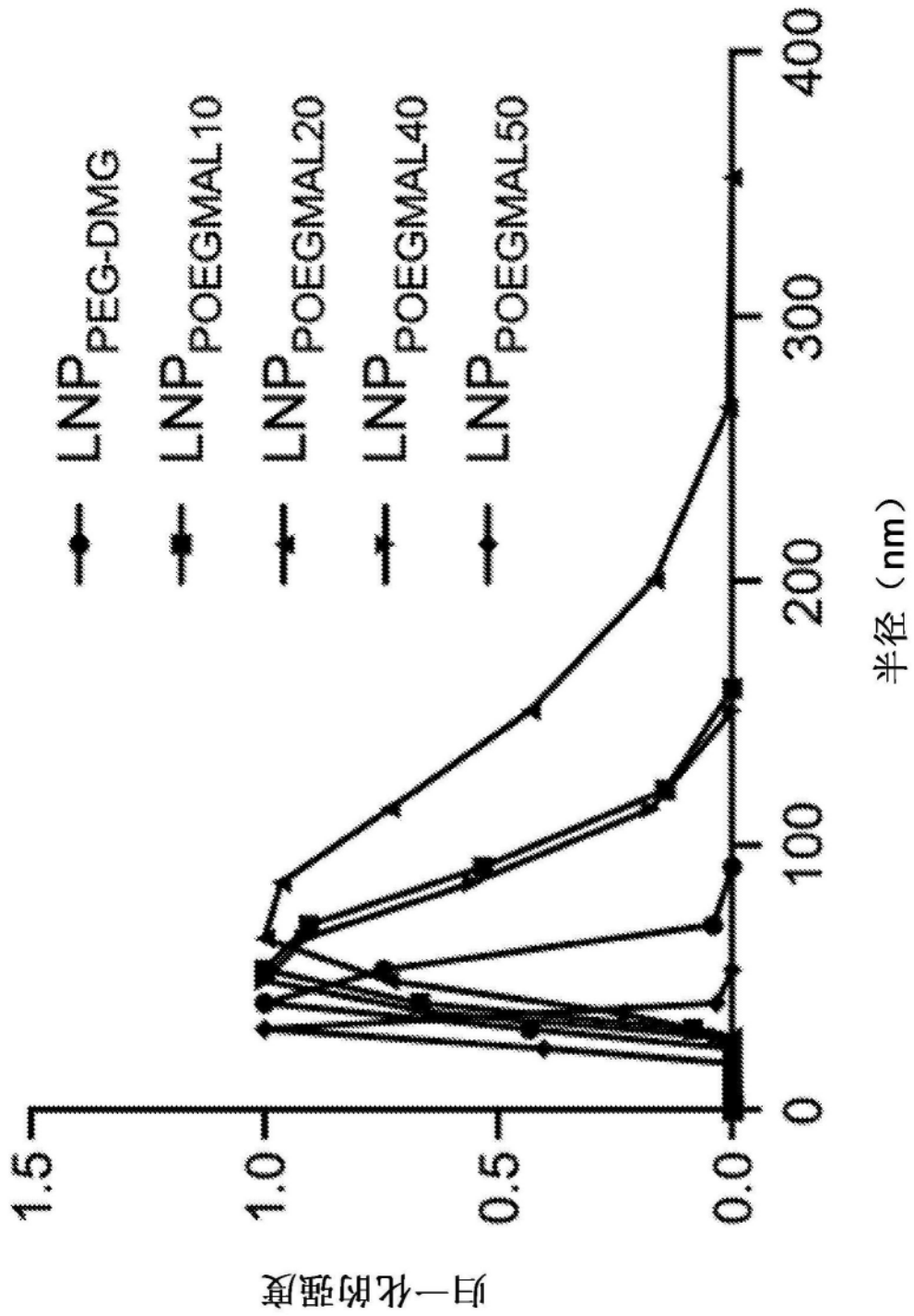


图3C

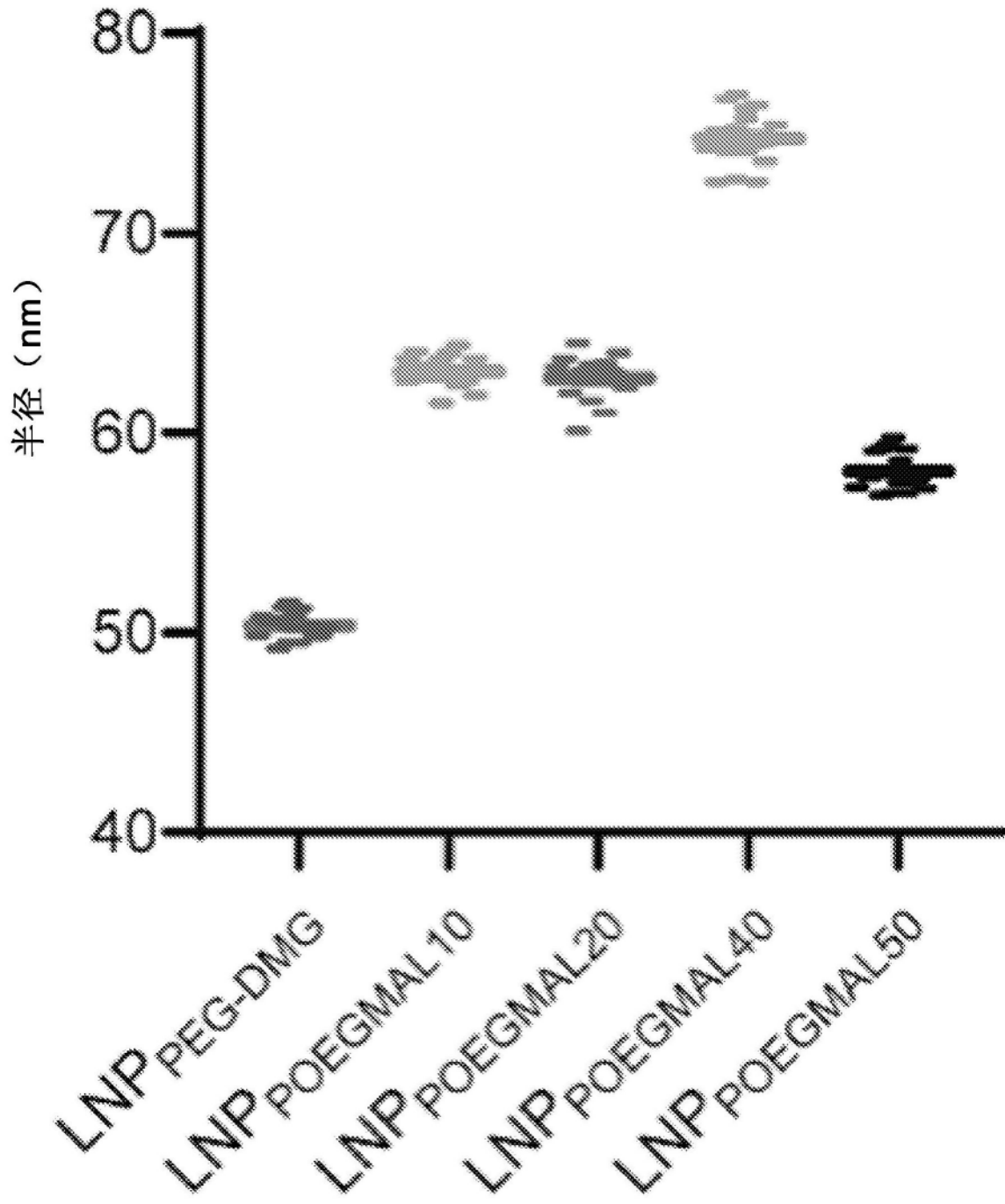


图3D

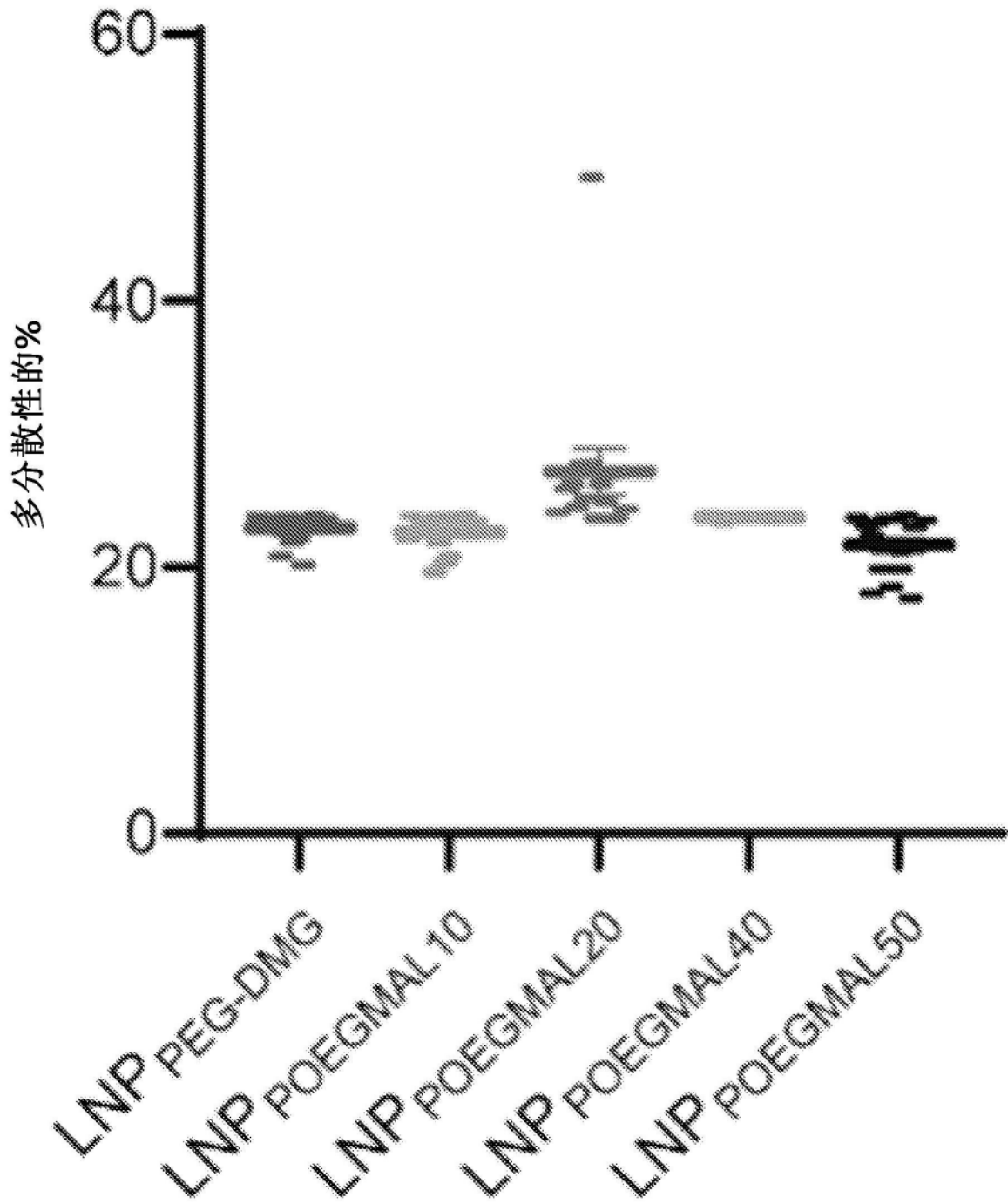


图3E

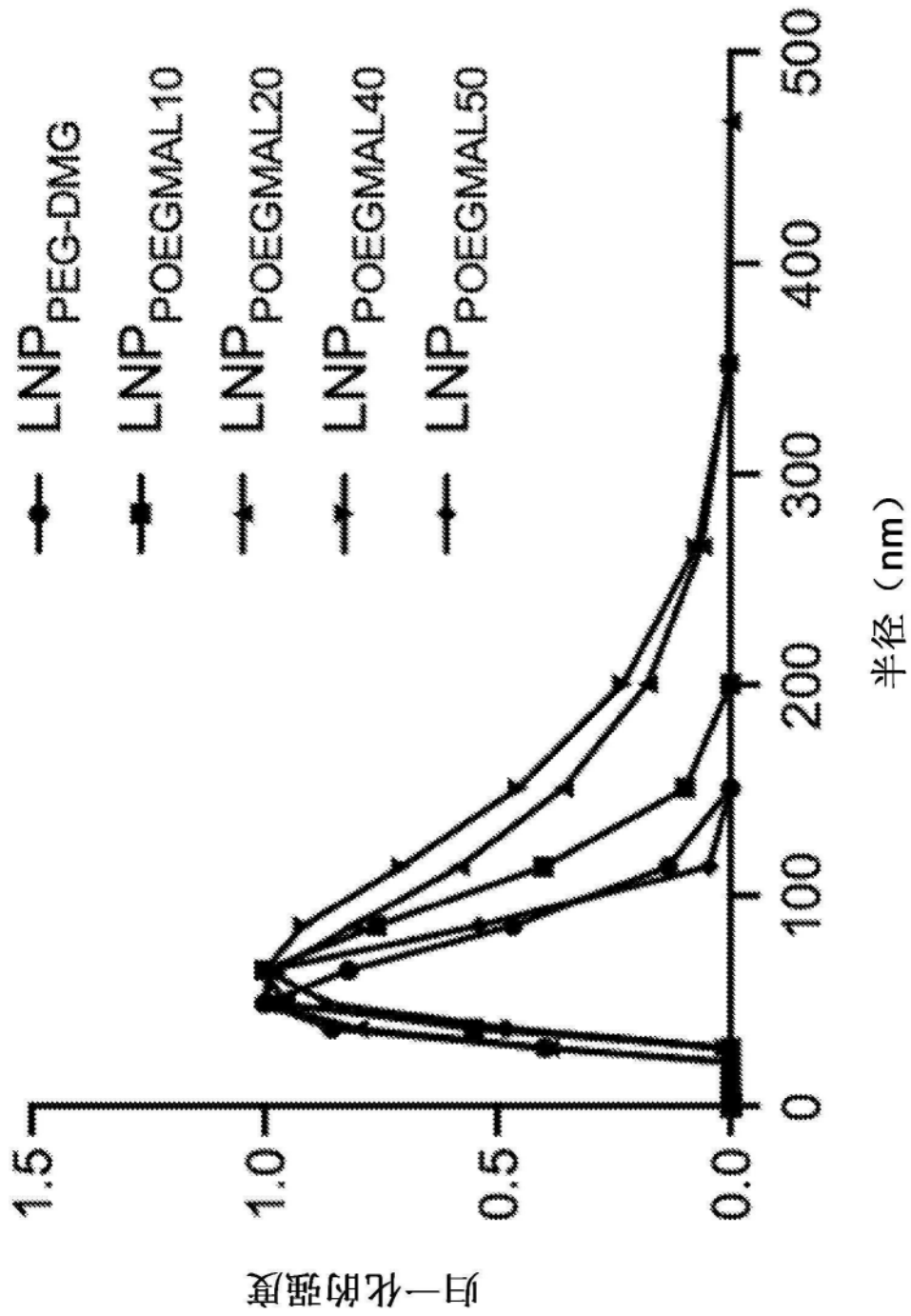


图3F

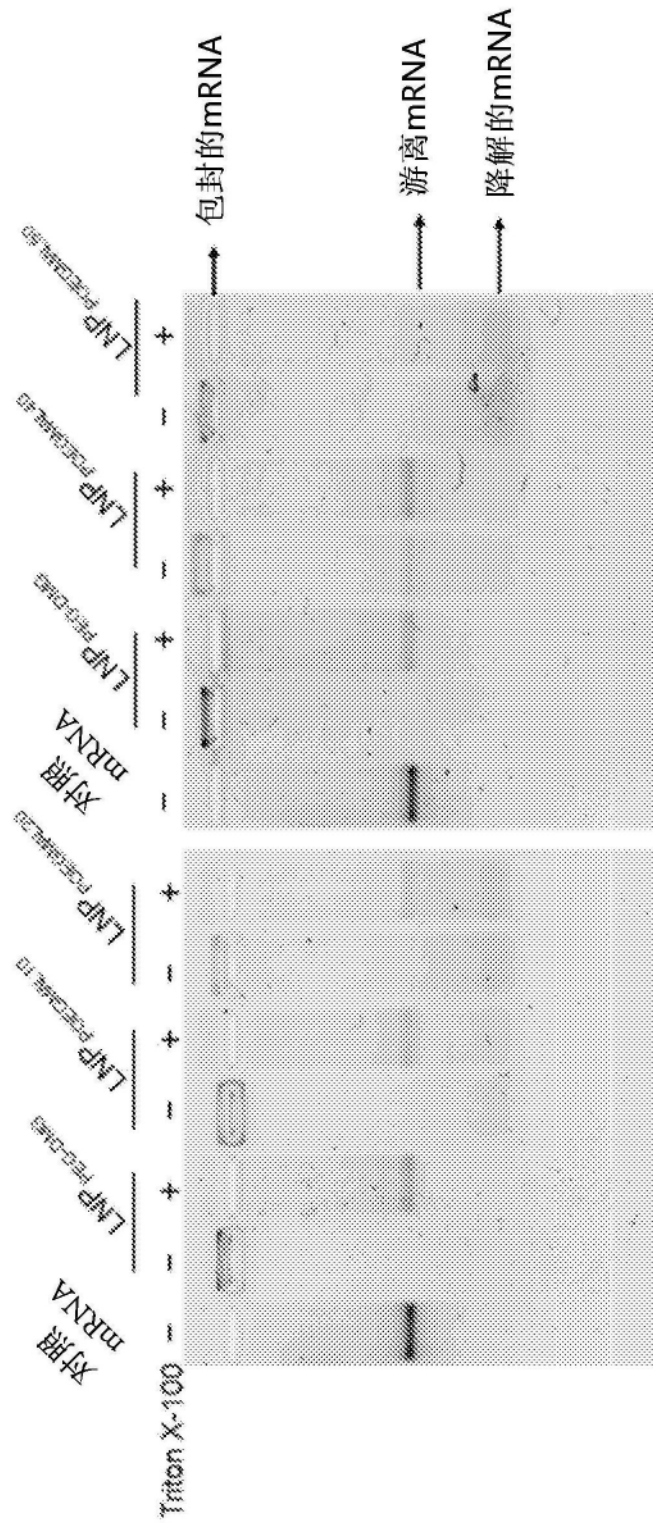


图4A

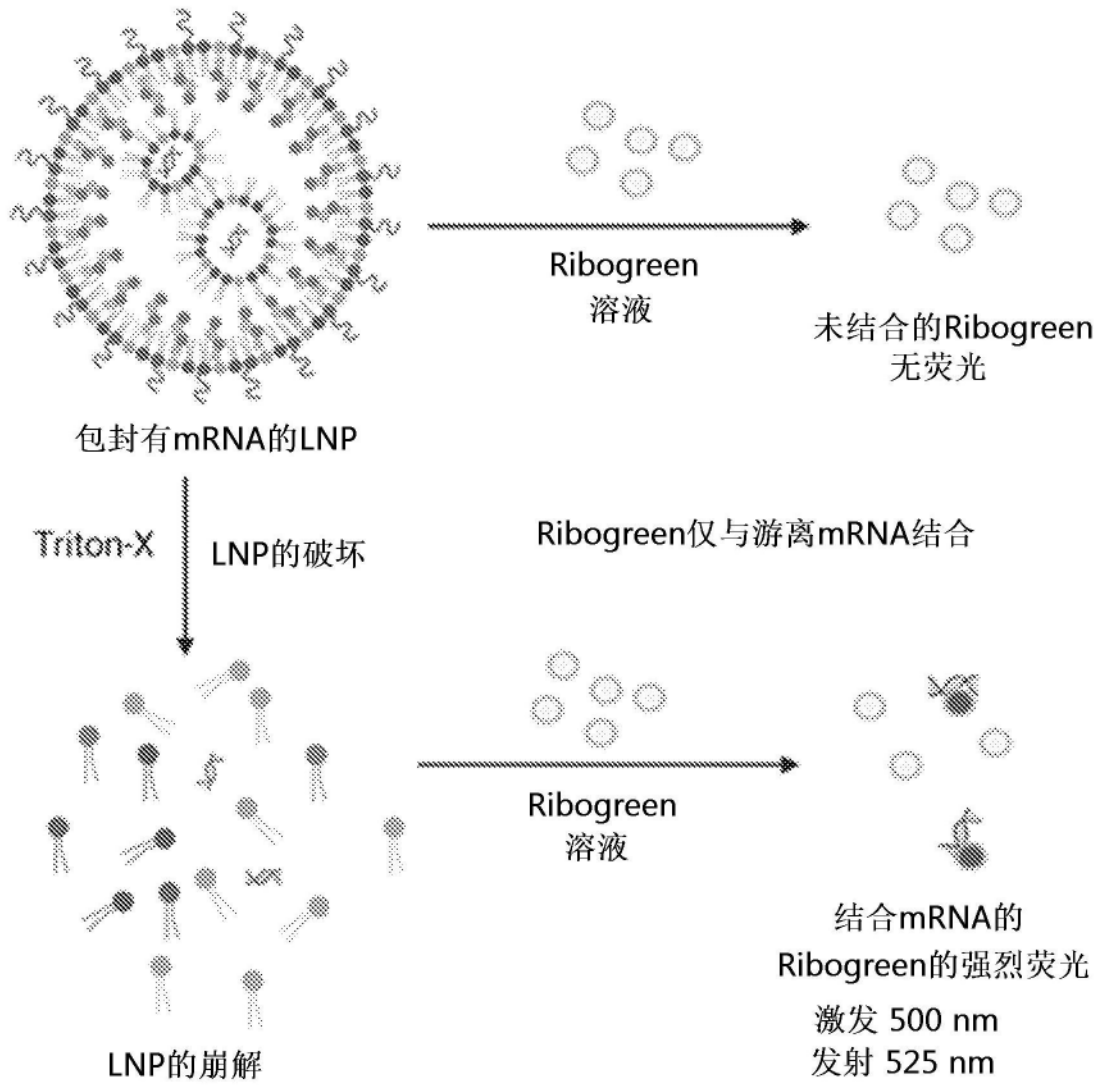


图4B

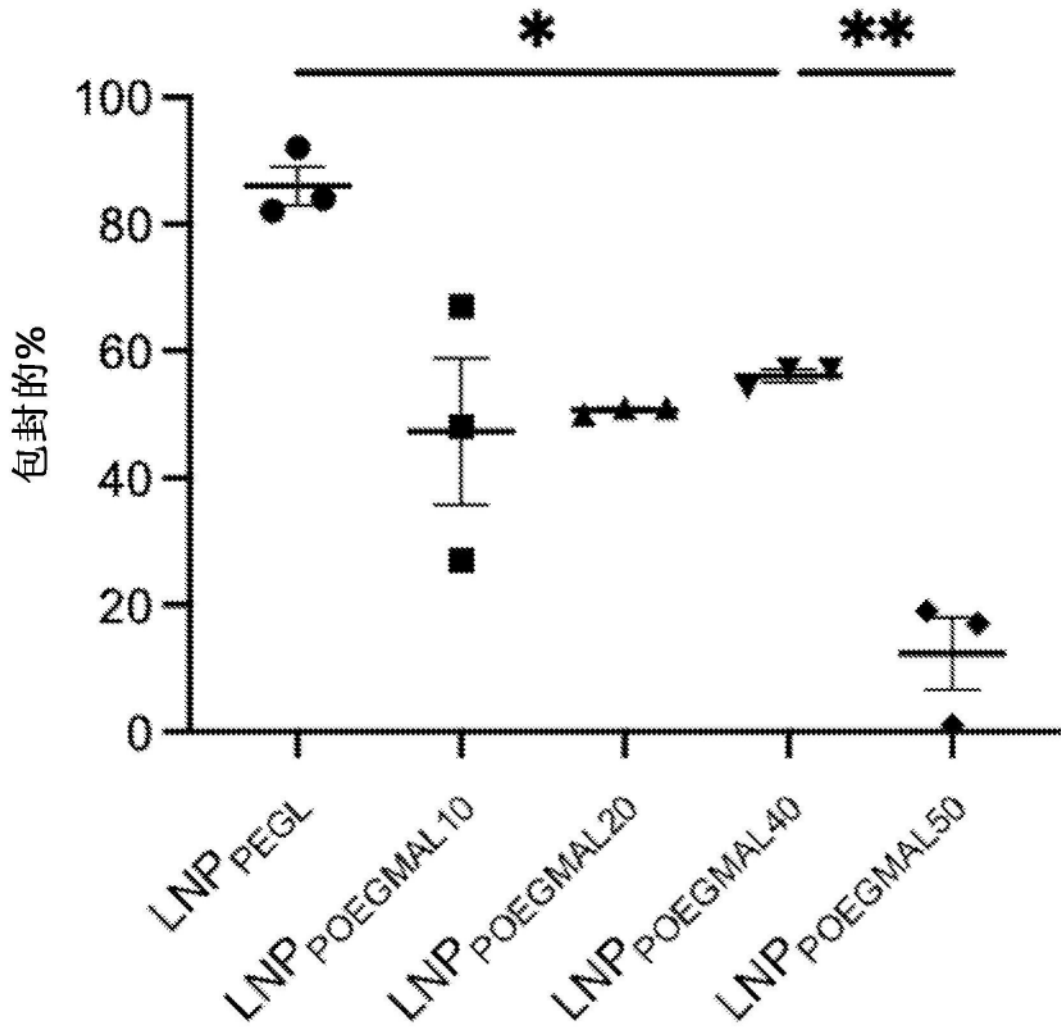


图4C

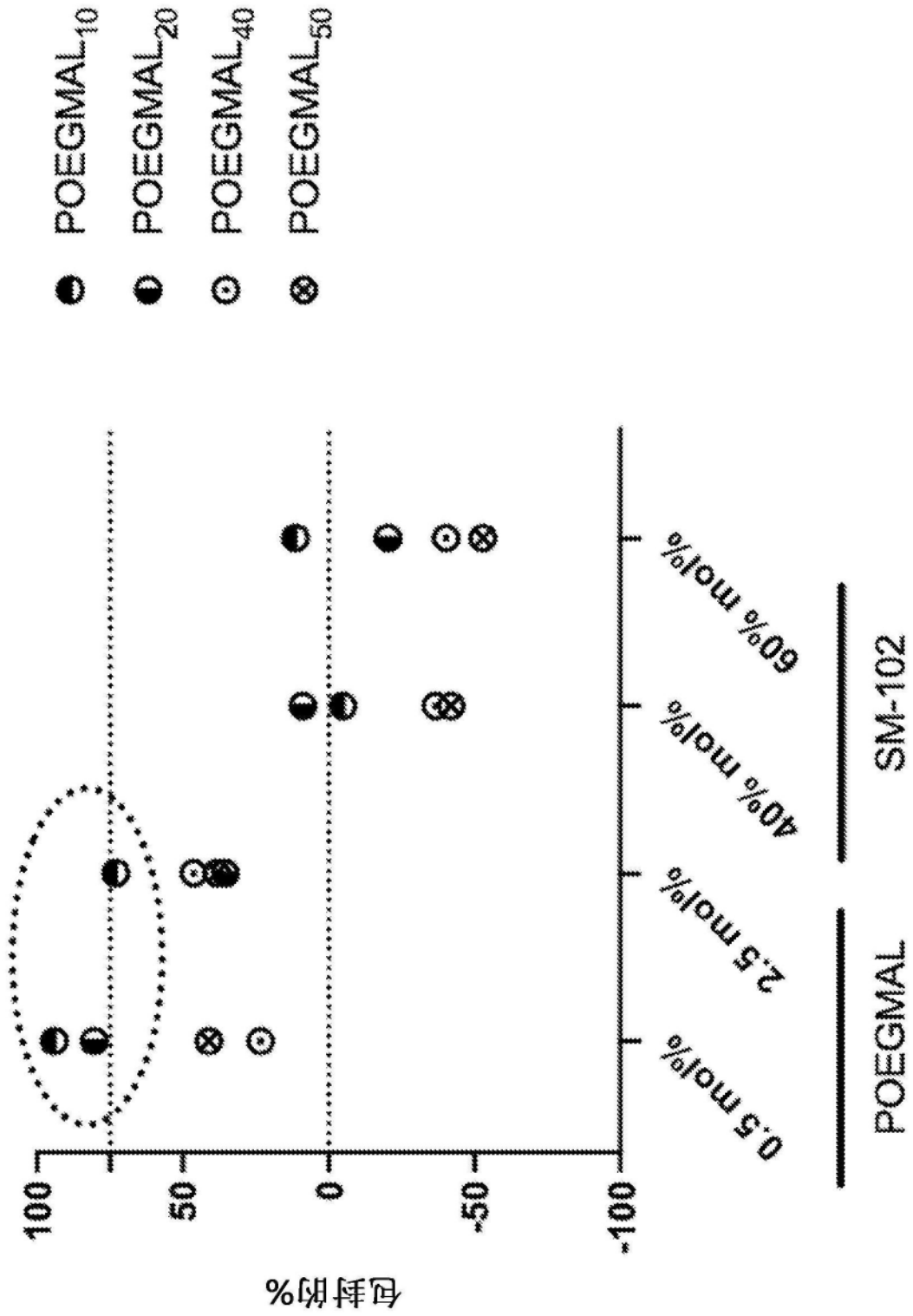


图5A

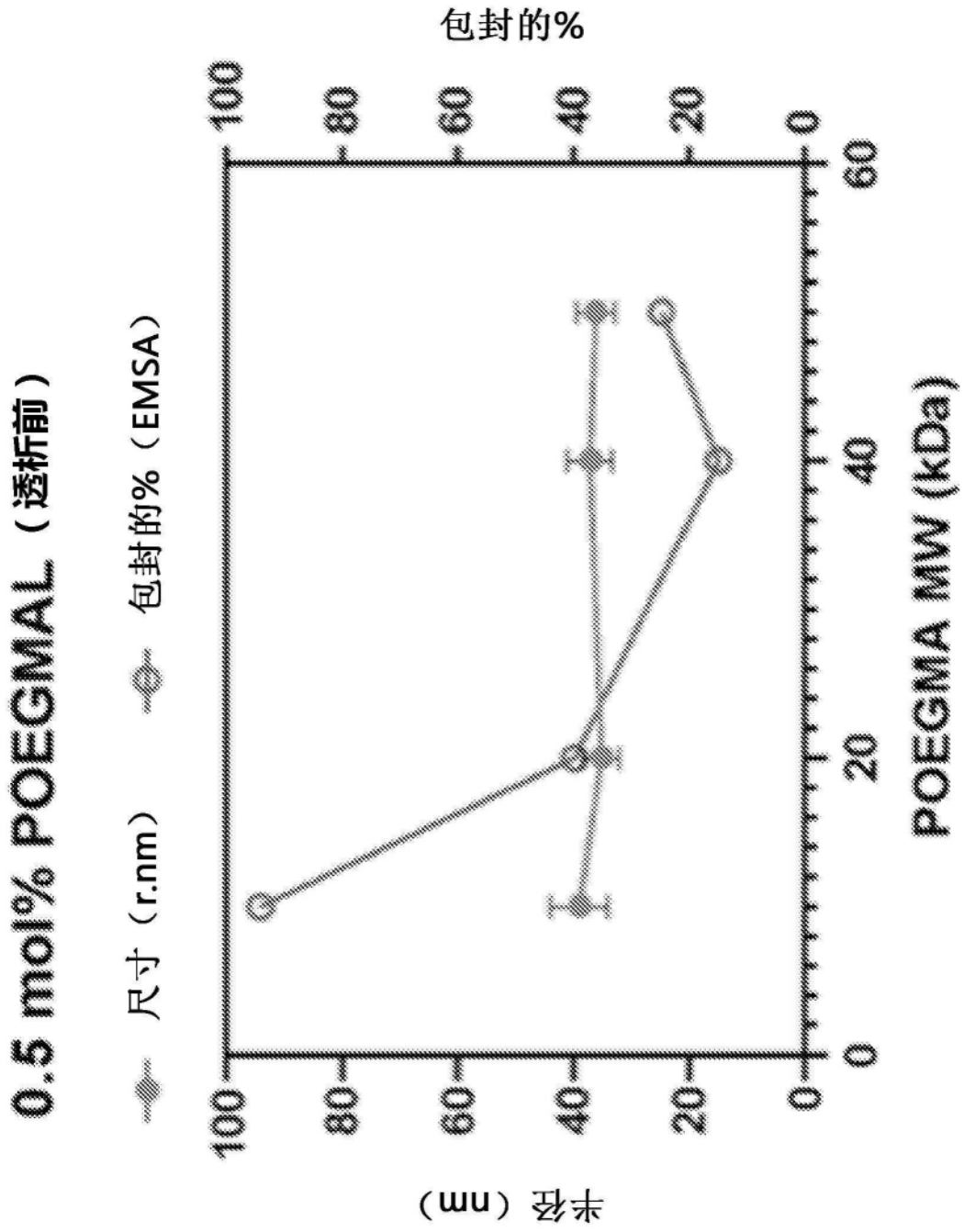


图5B

### 1.5 mol% POEGMAL (透析前)

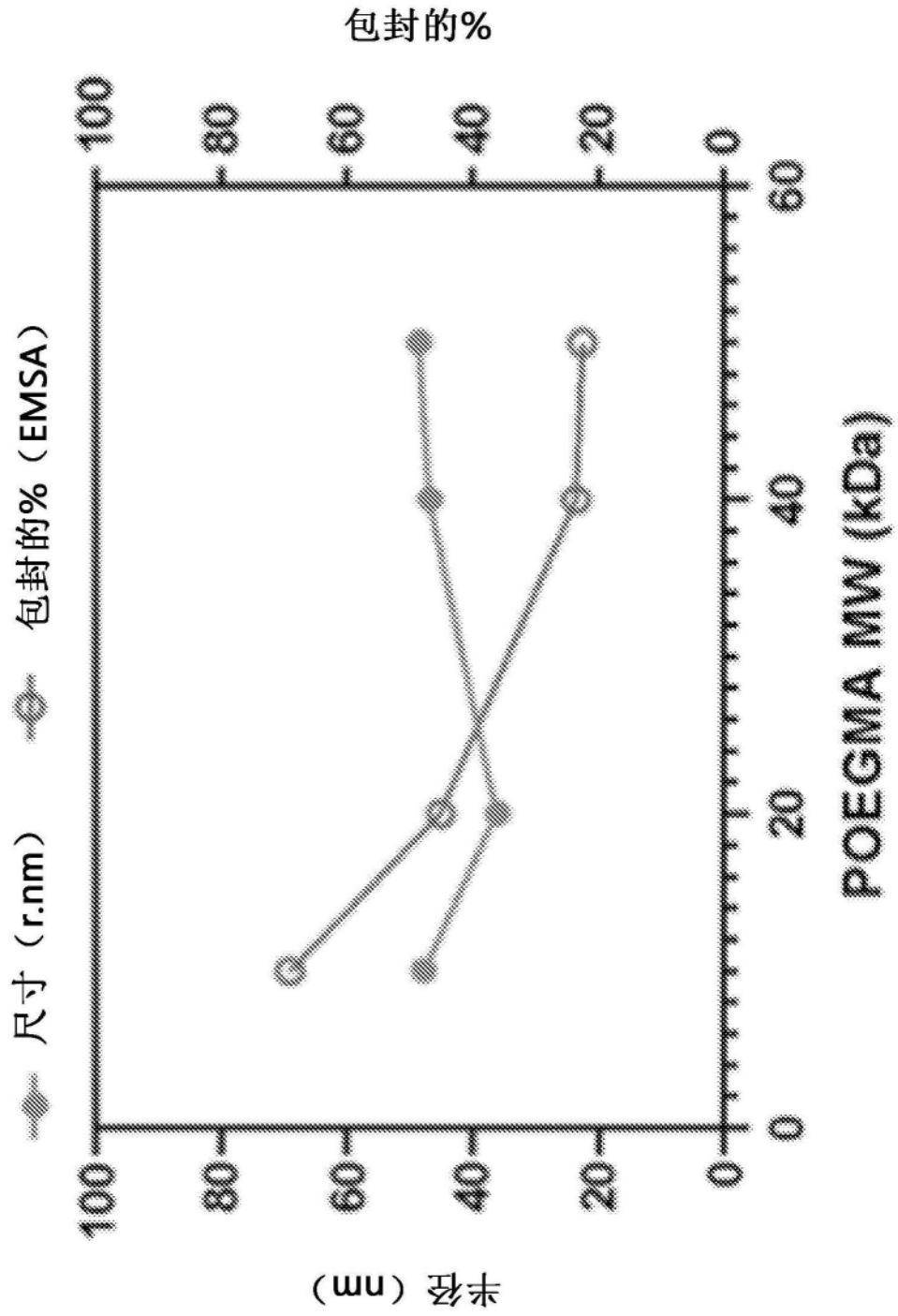


图5C

### 2.5 mol% POEGMAL (透析前)

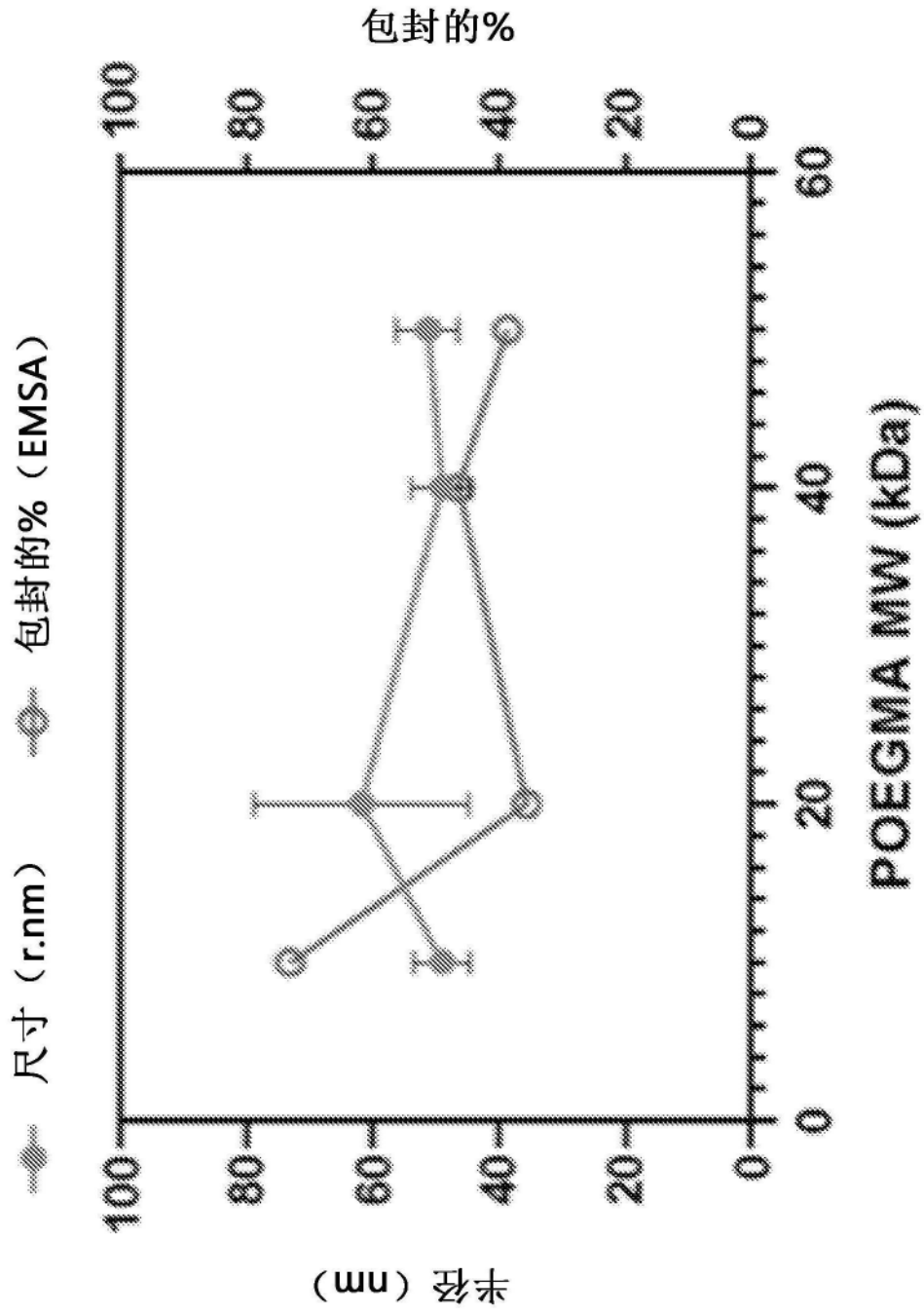


图5D

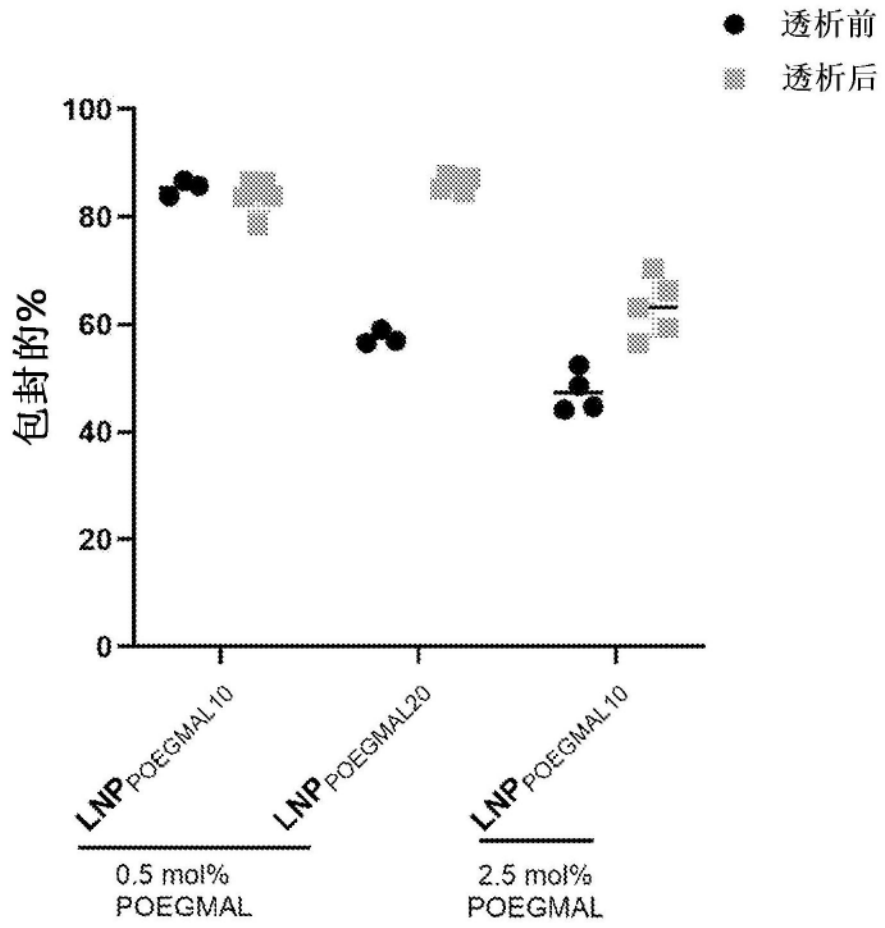


图5E

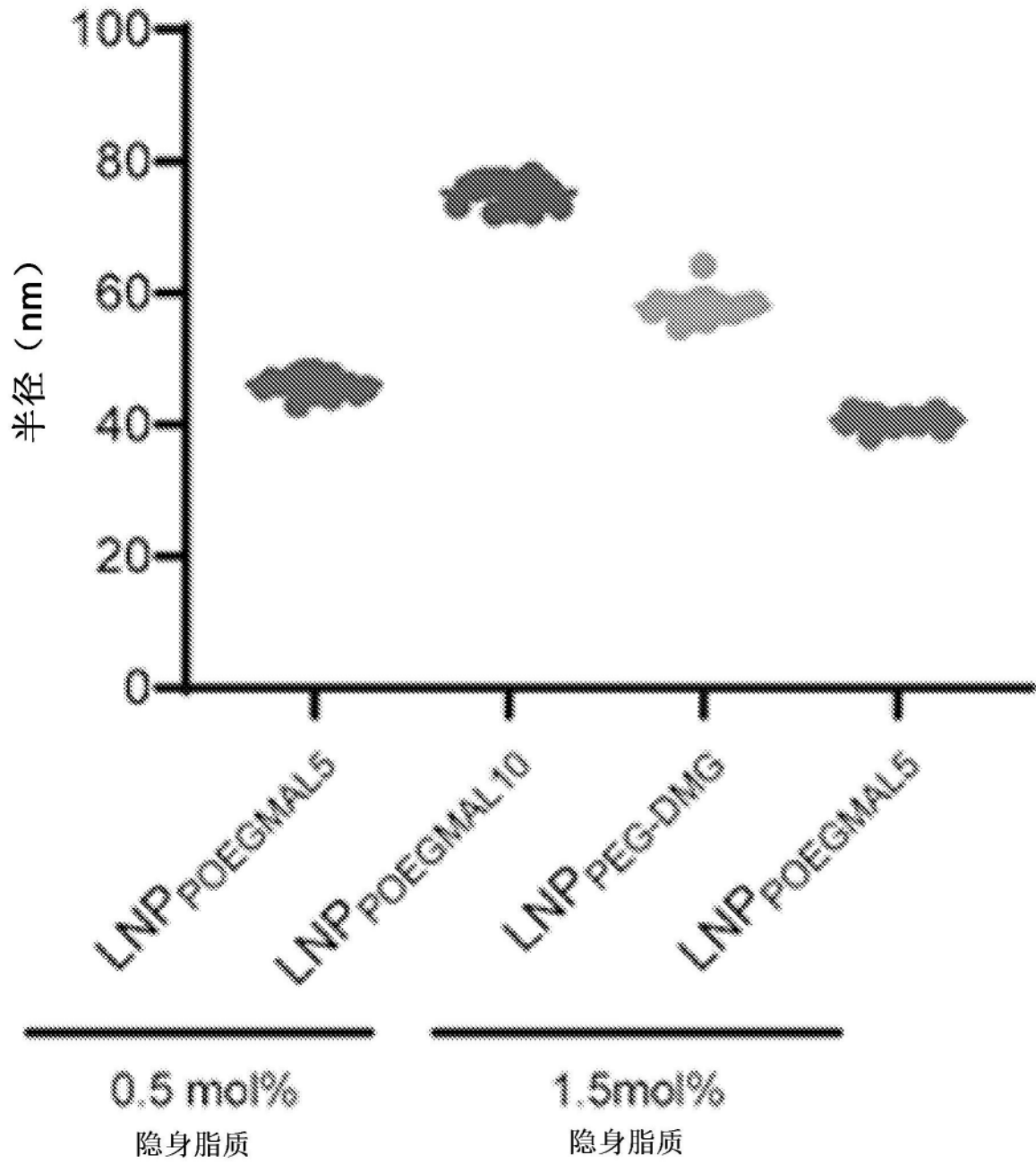


图6A

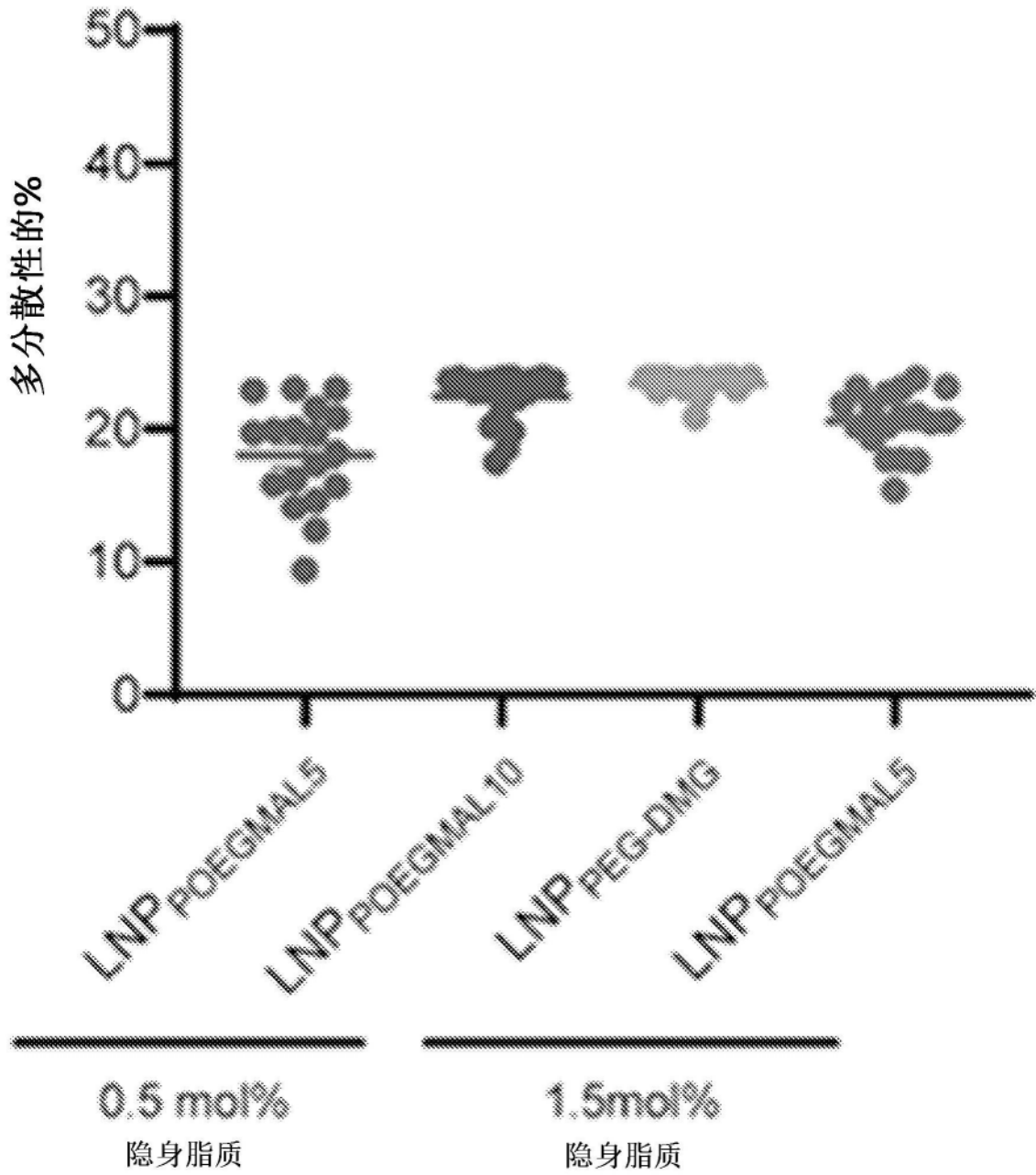


图6B

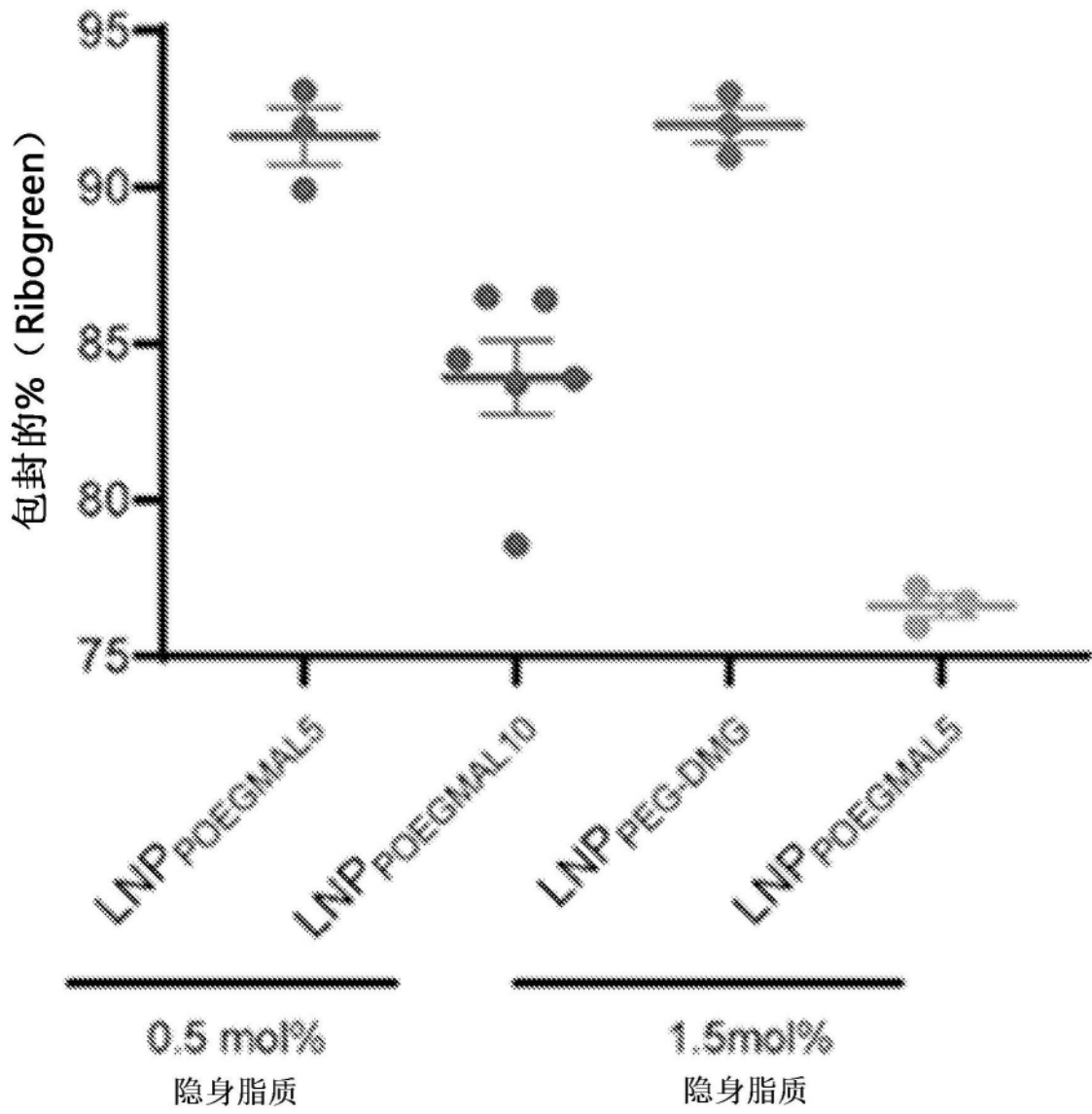


图6C

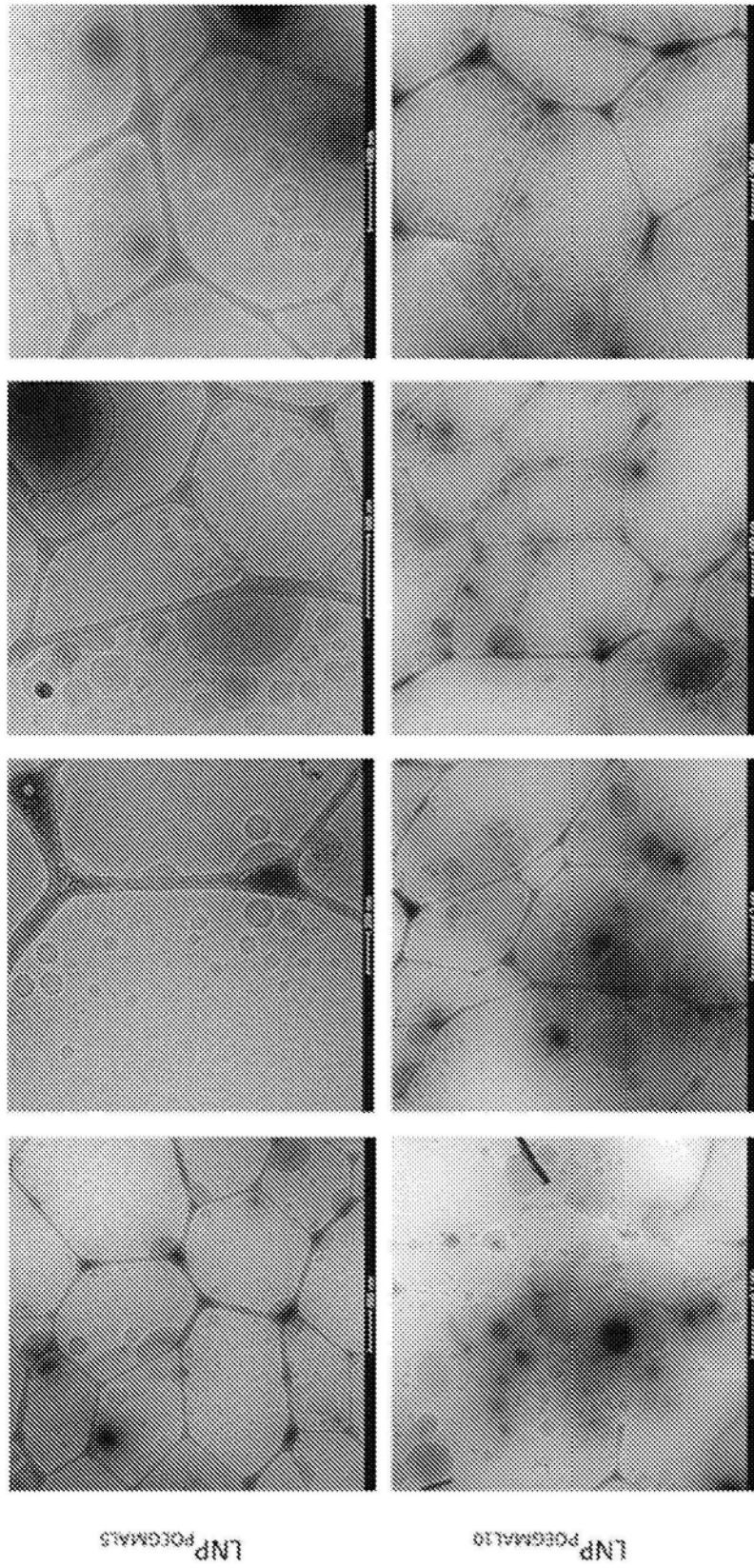


图7

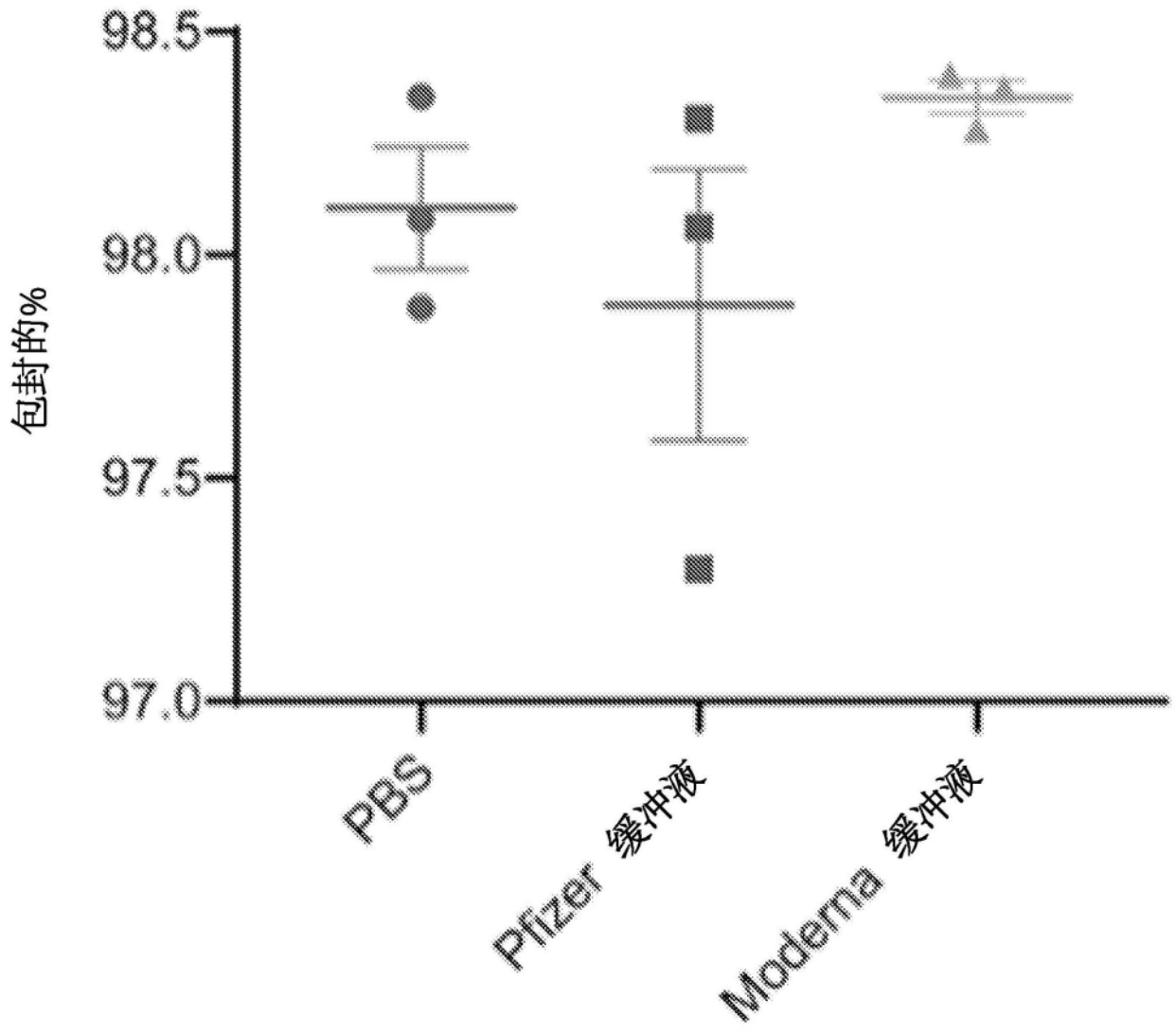


图8A

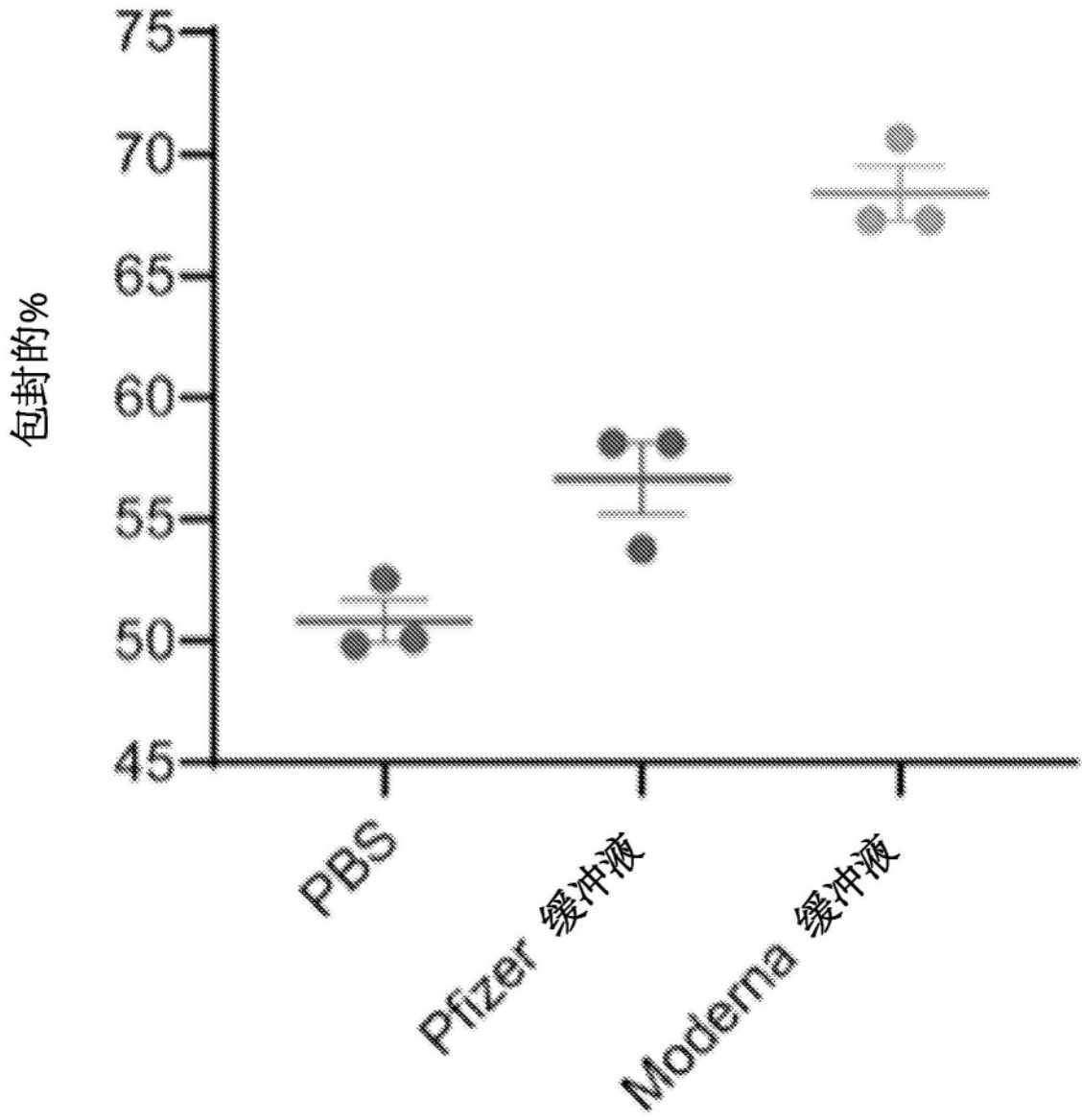


图8B

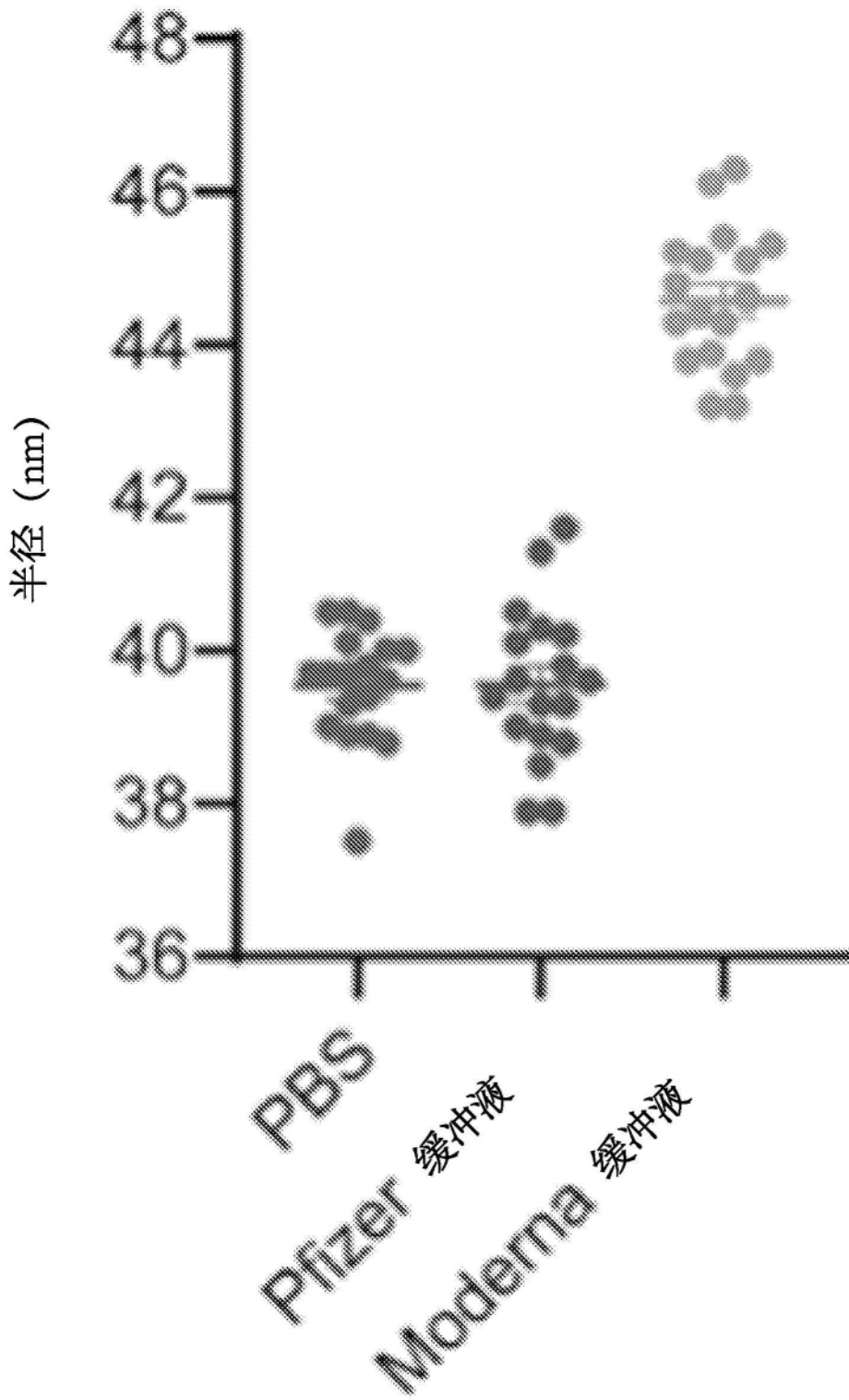


图8C

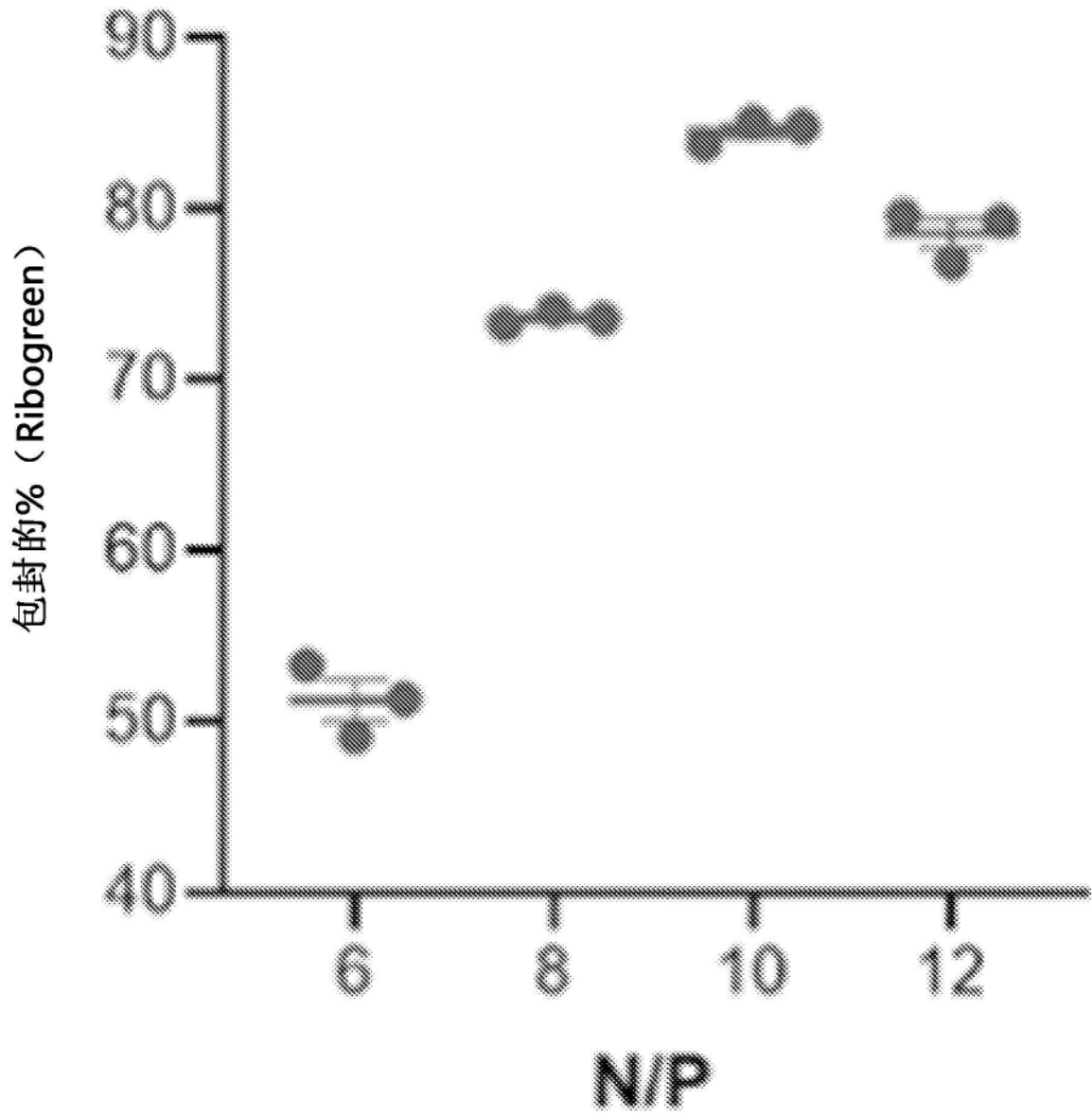
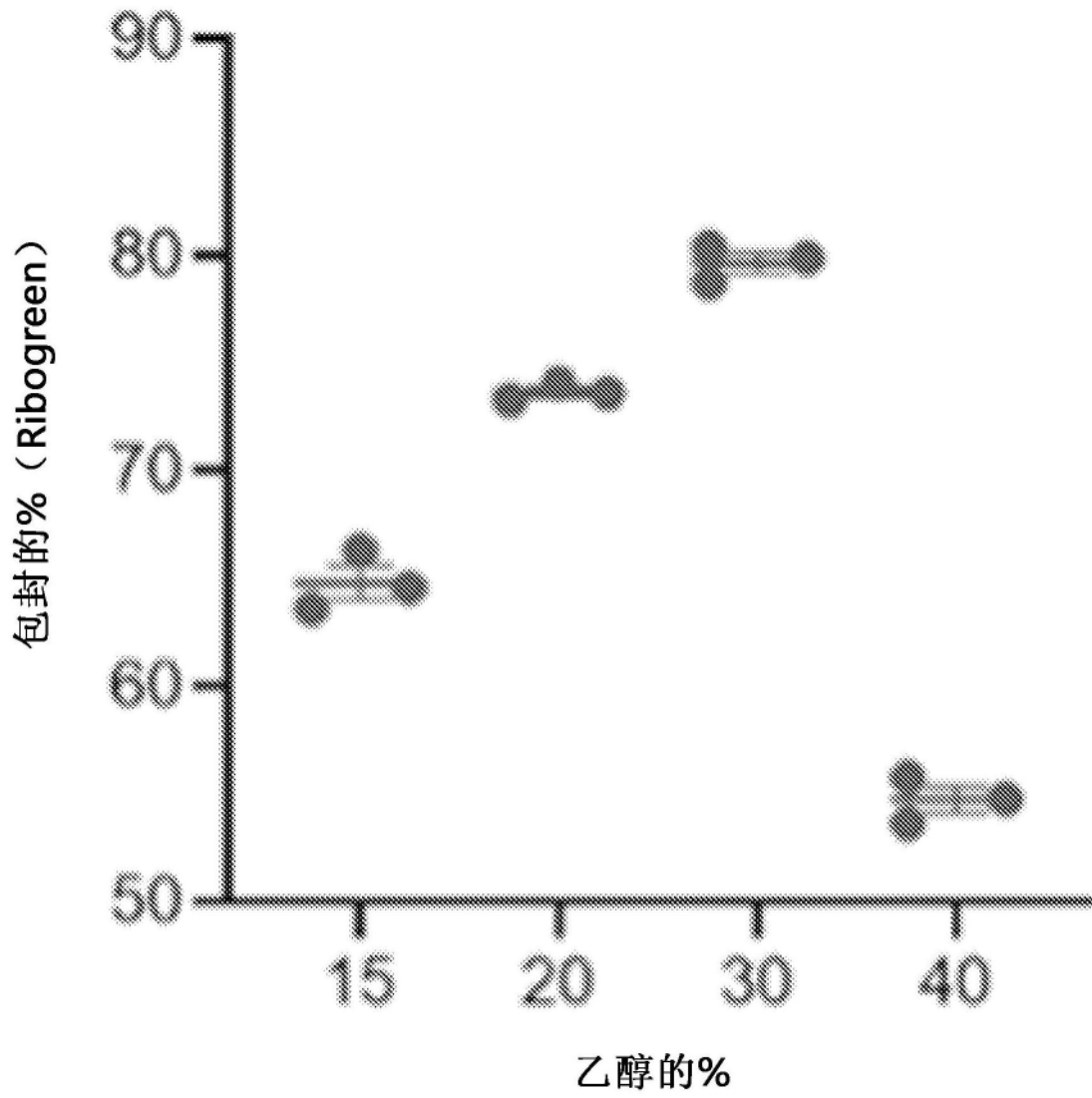


图8D



所有值均为透析后

图8E

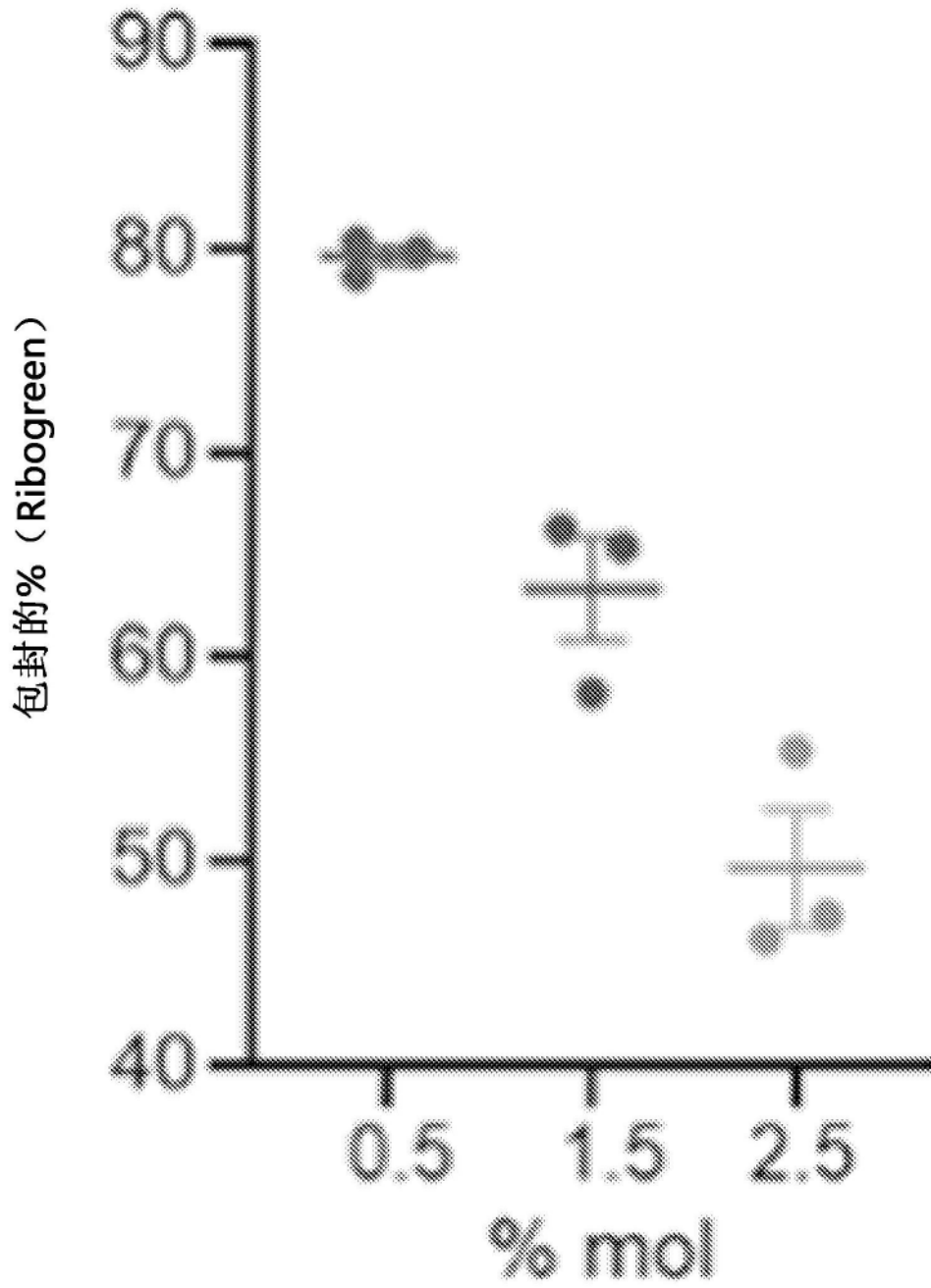


图8F

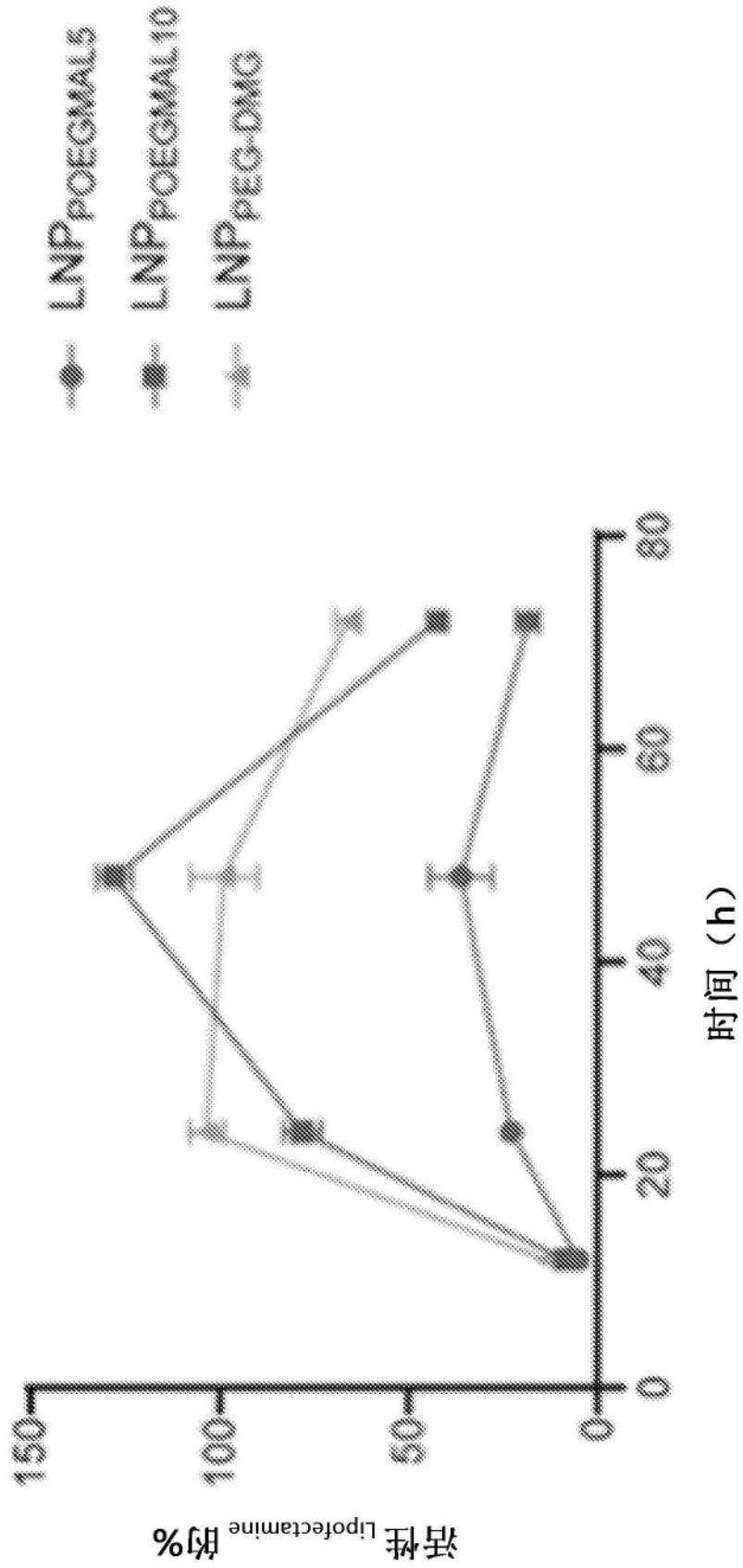


图9A

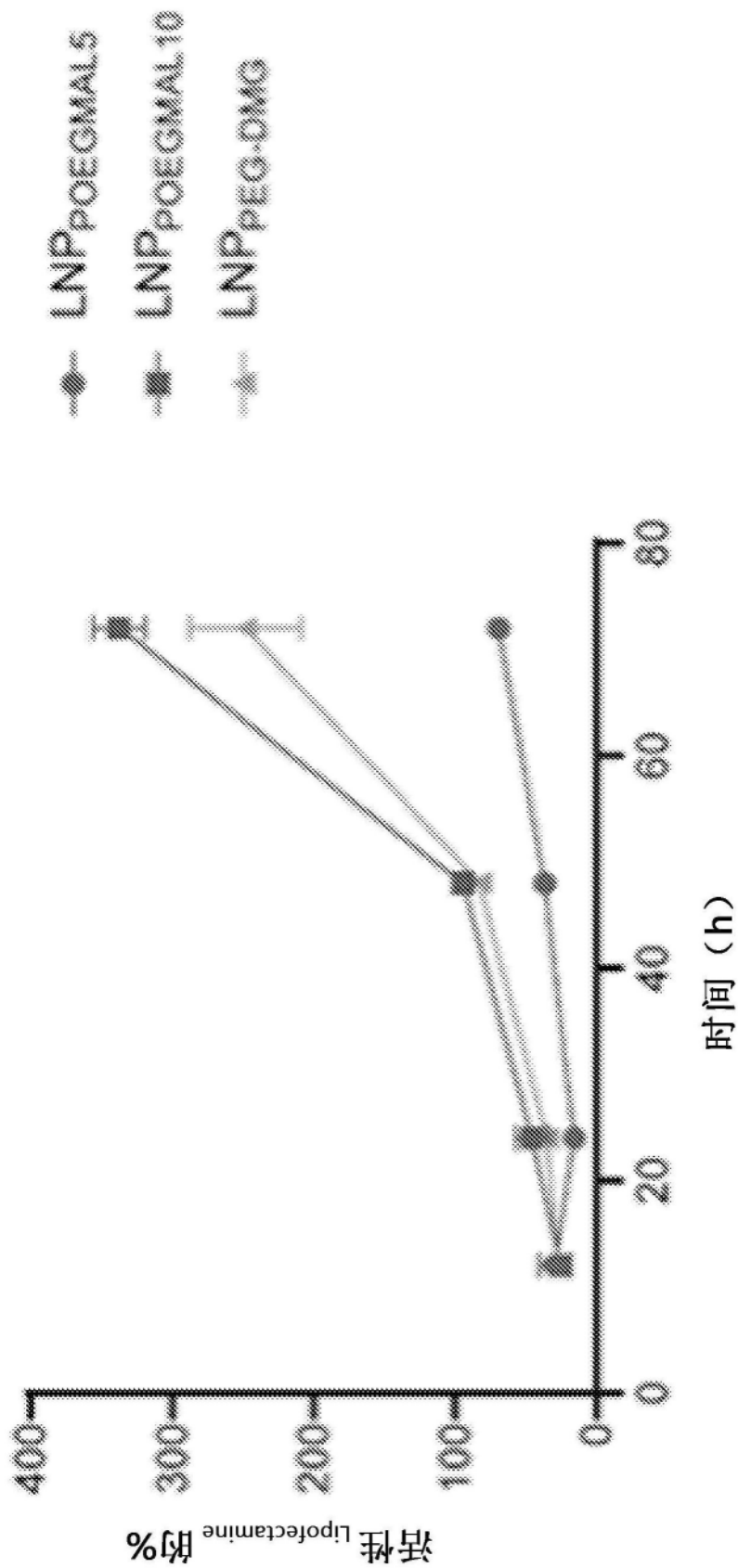


图9B

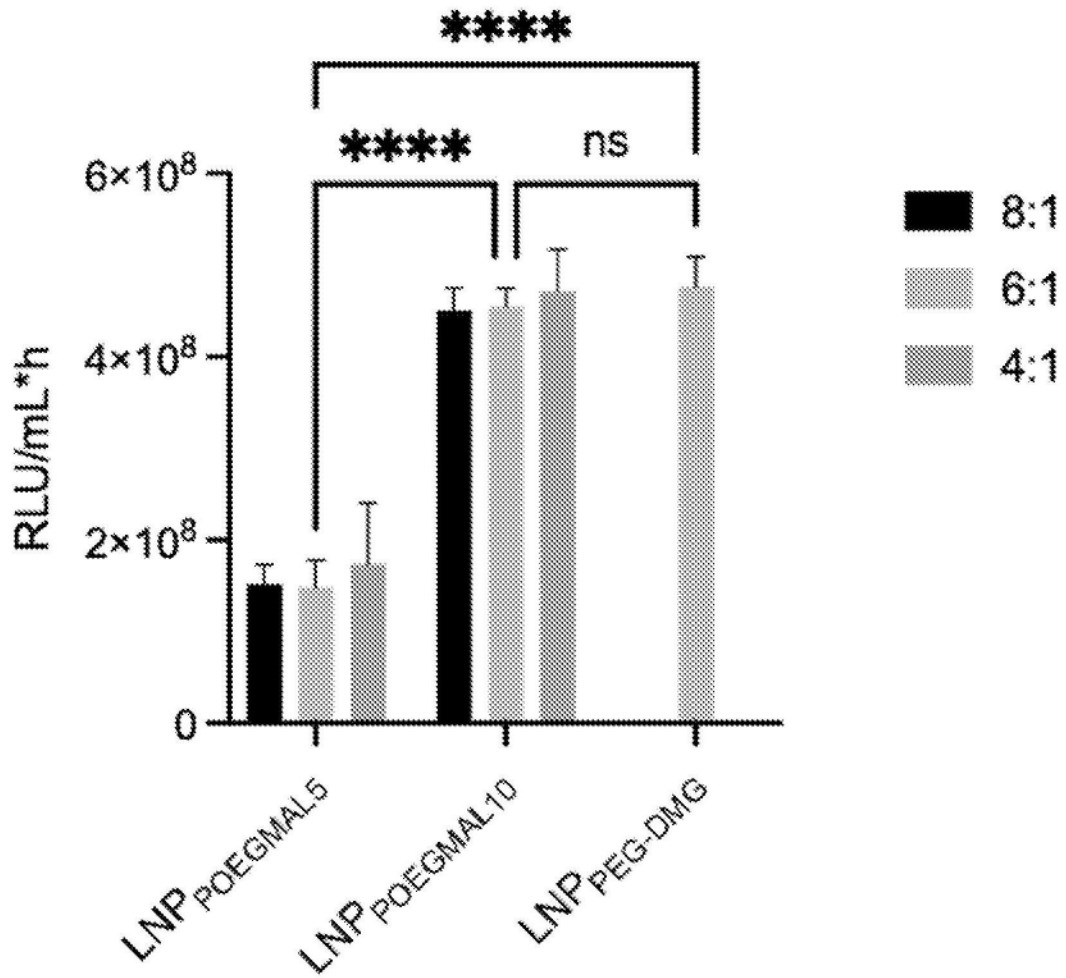


图9C

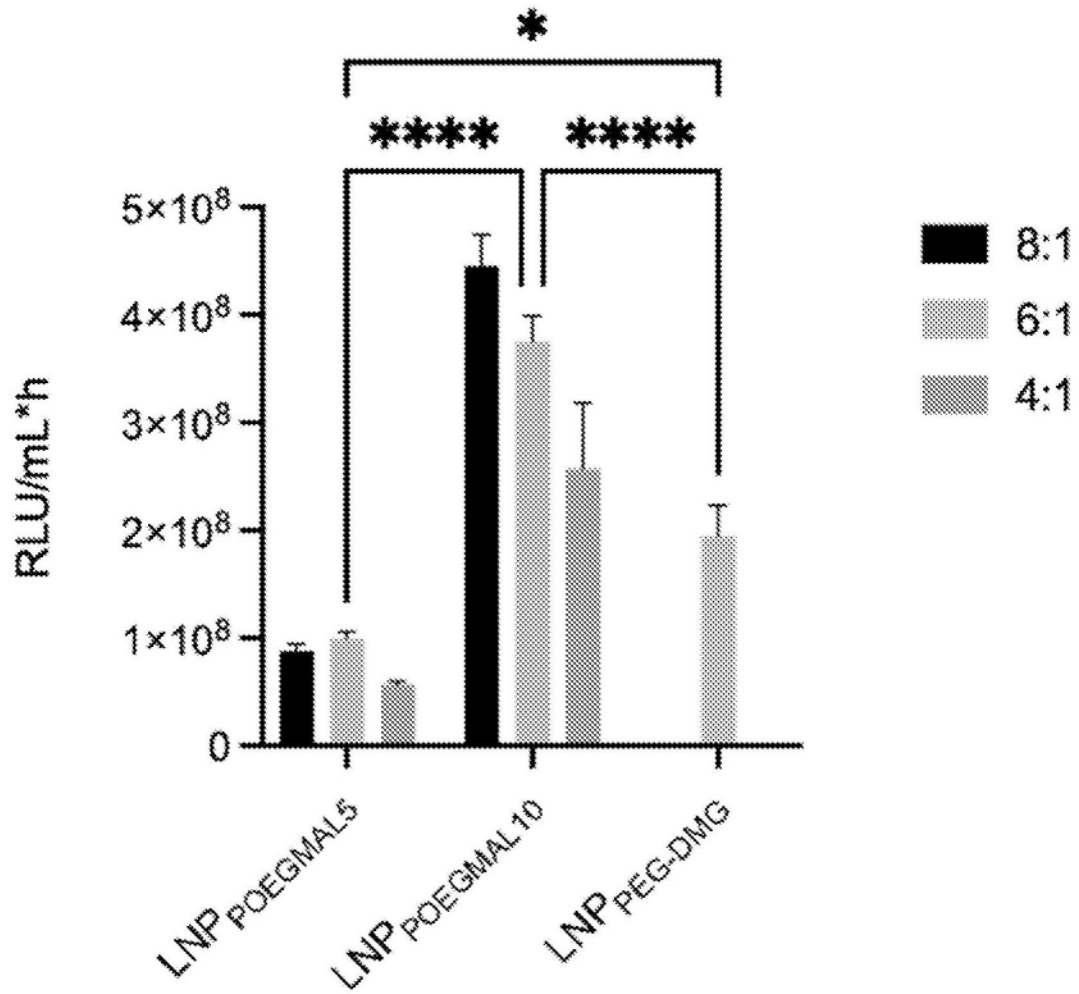


图9D

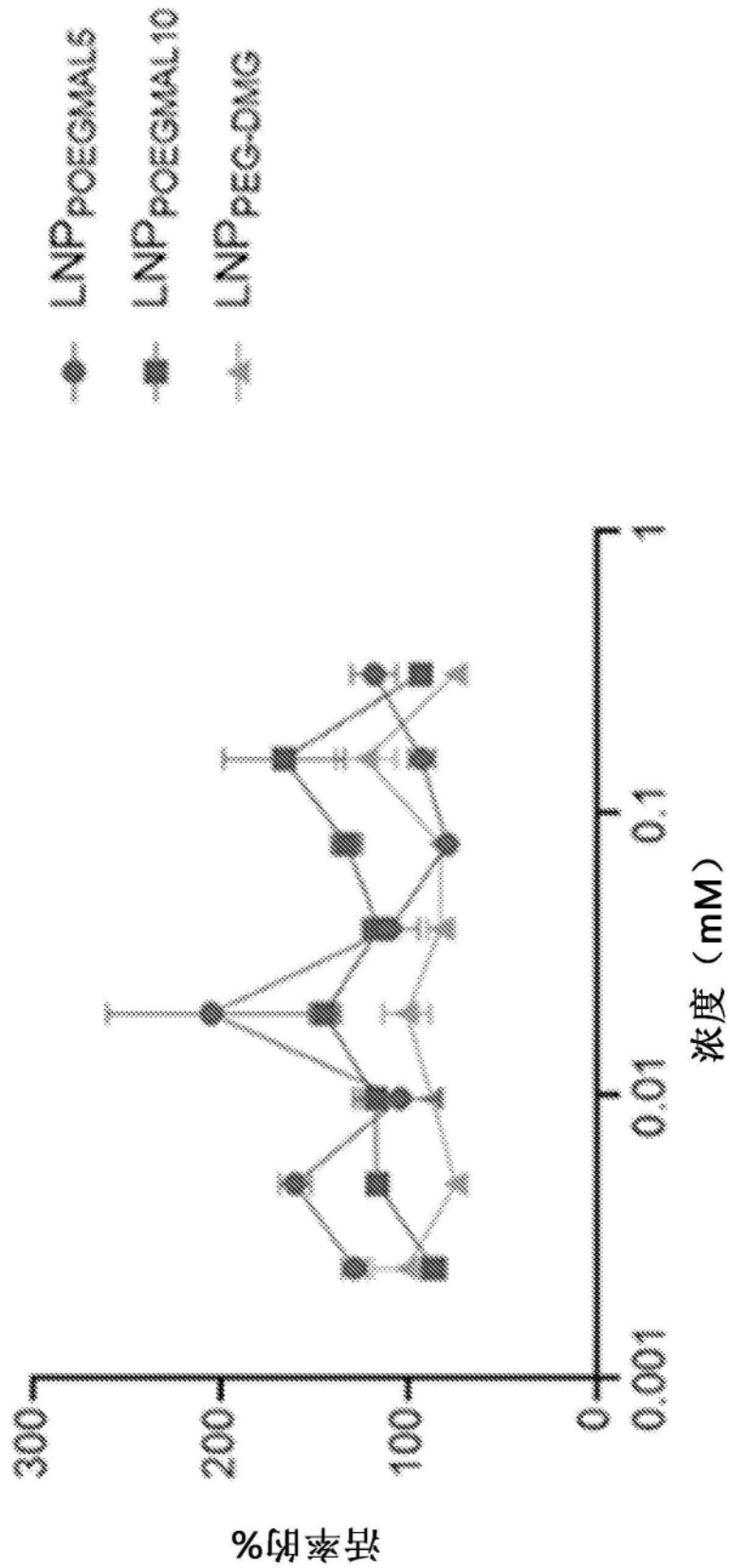


图10

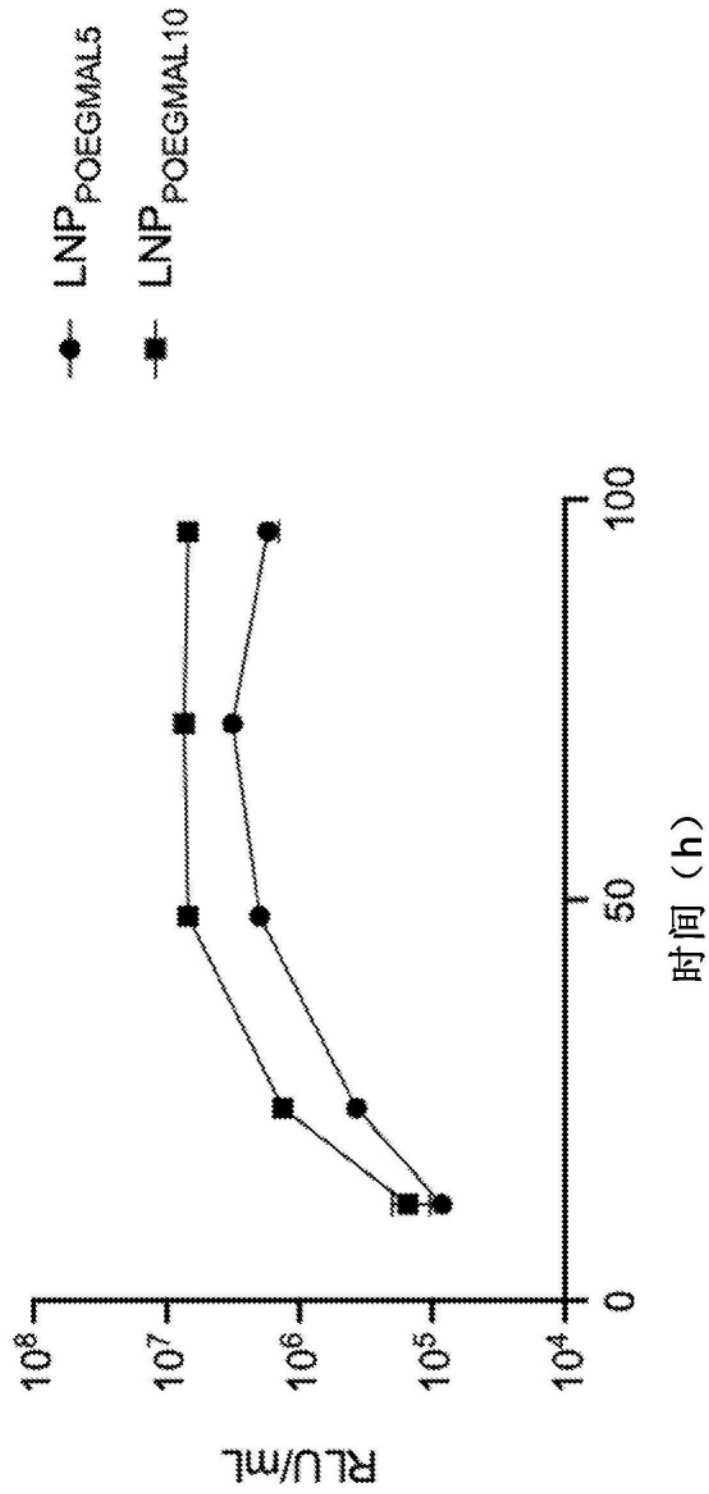


图11A

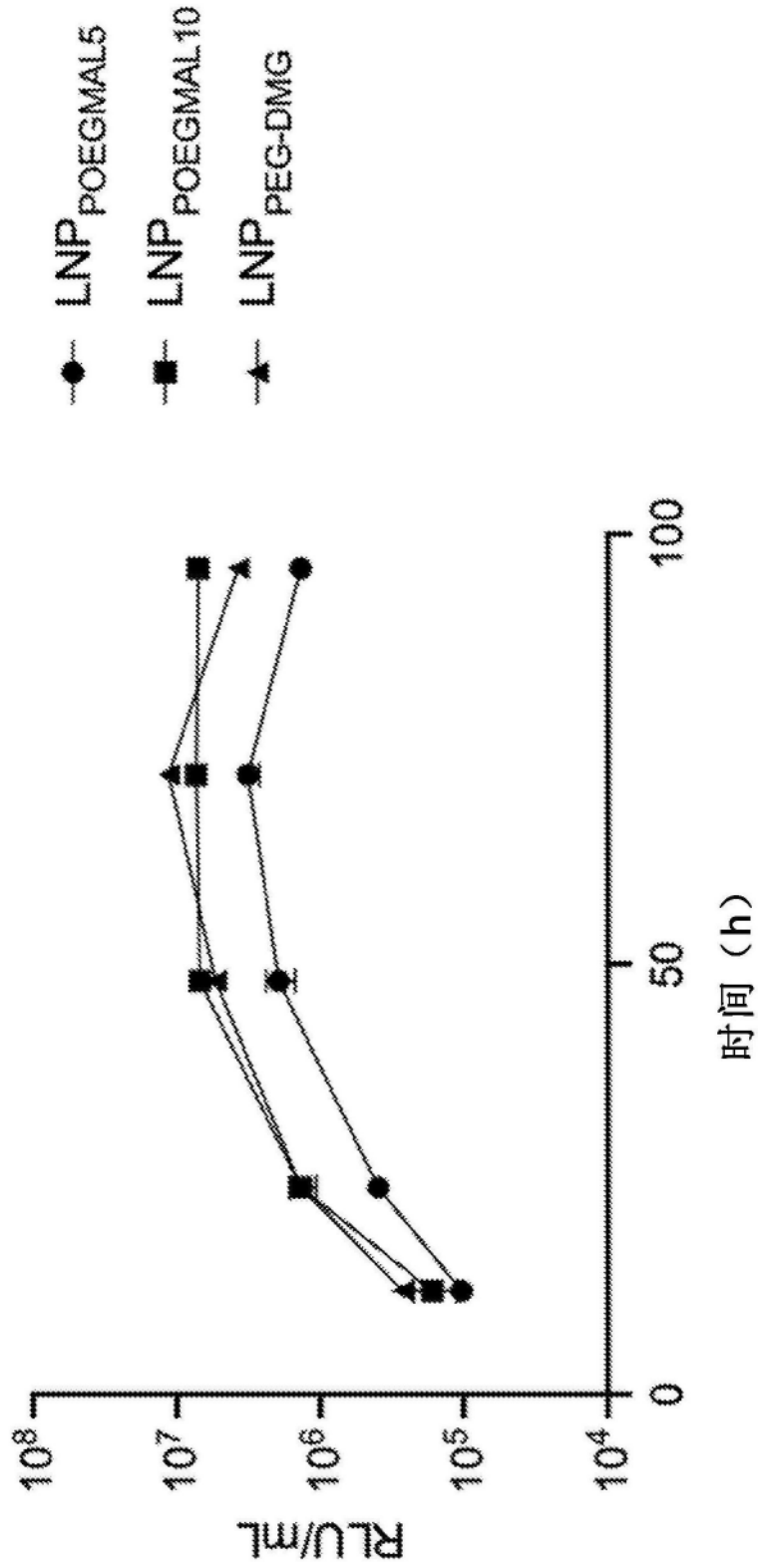


图11B

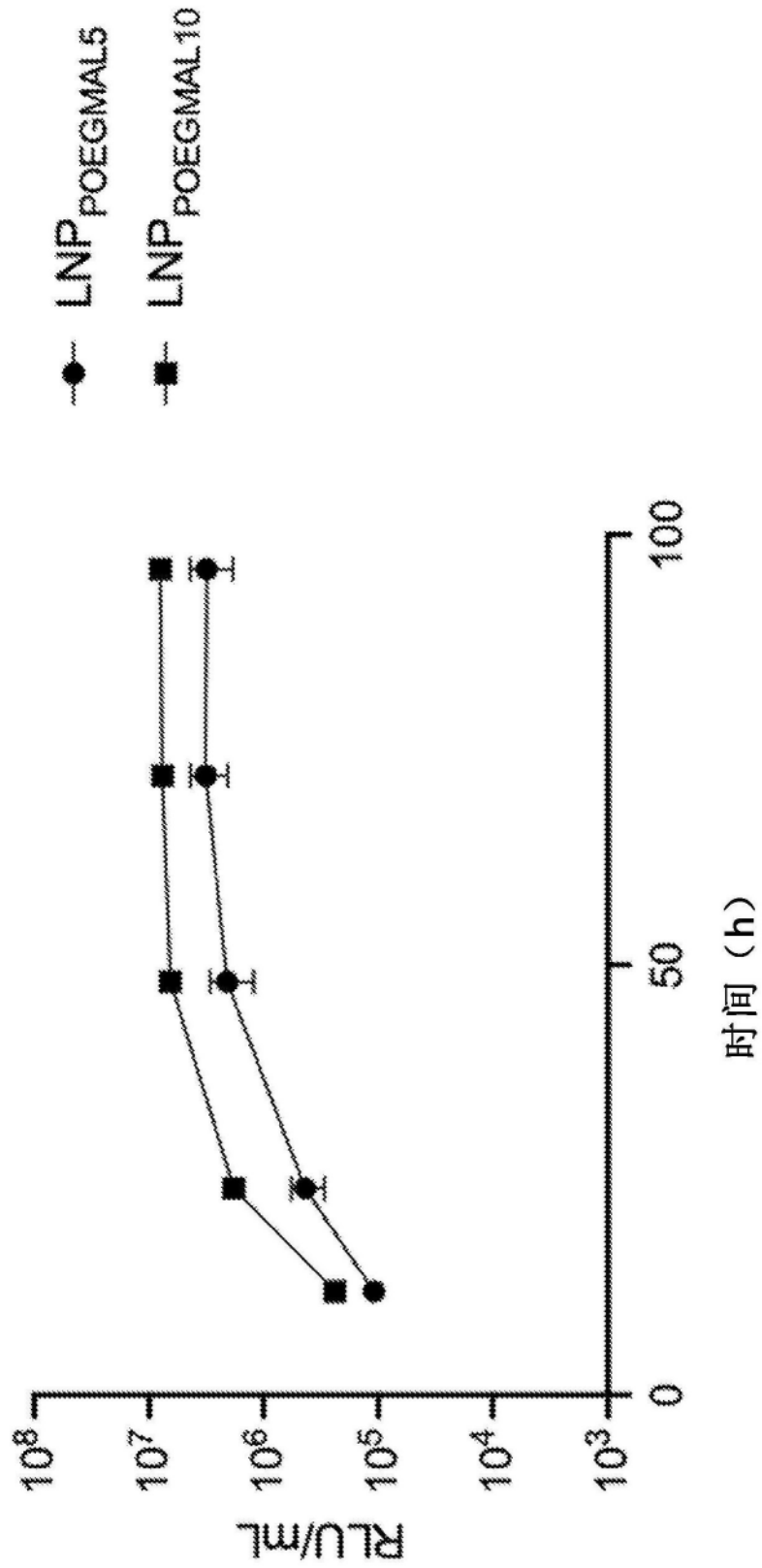


图11C

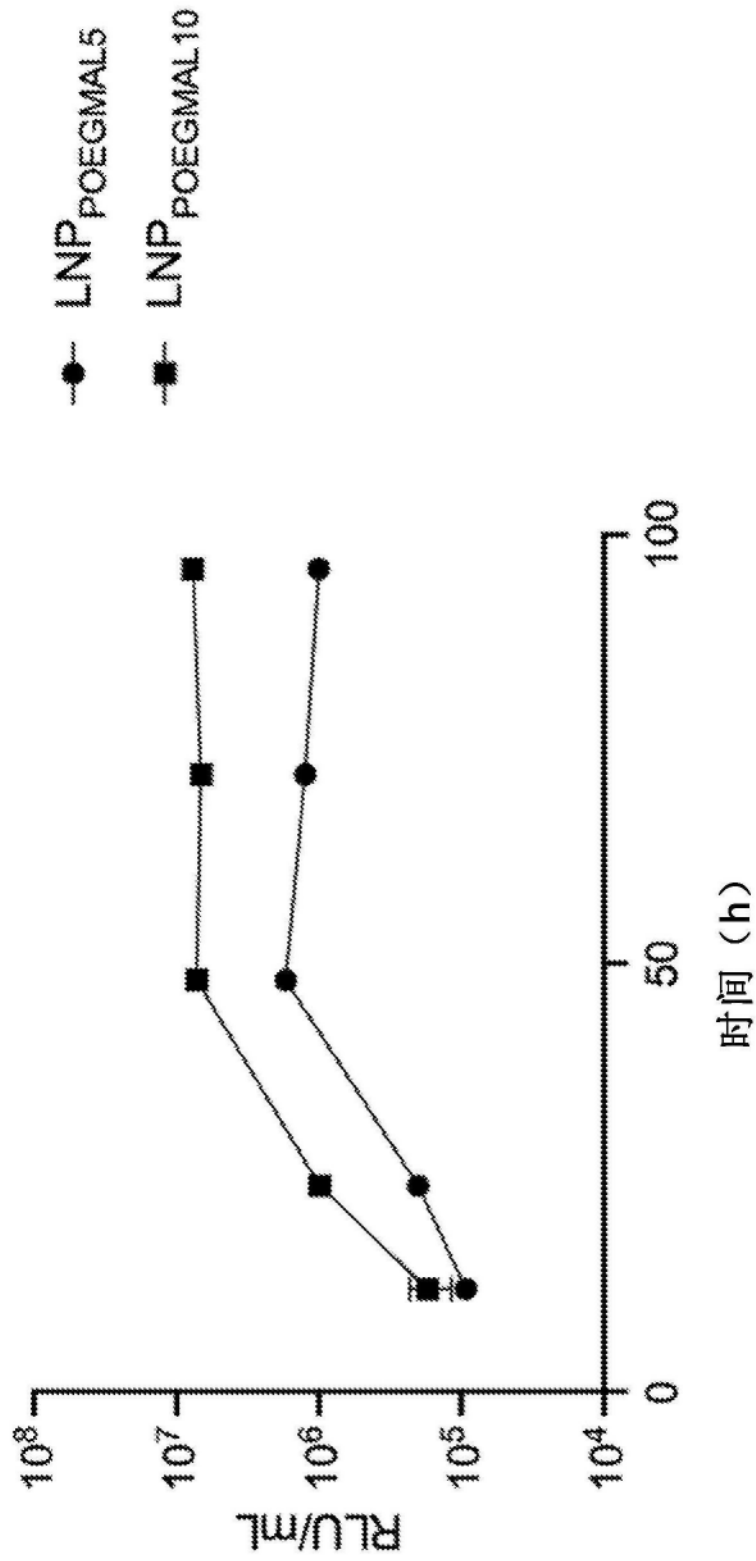


图11D

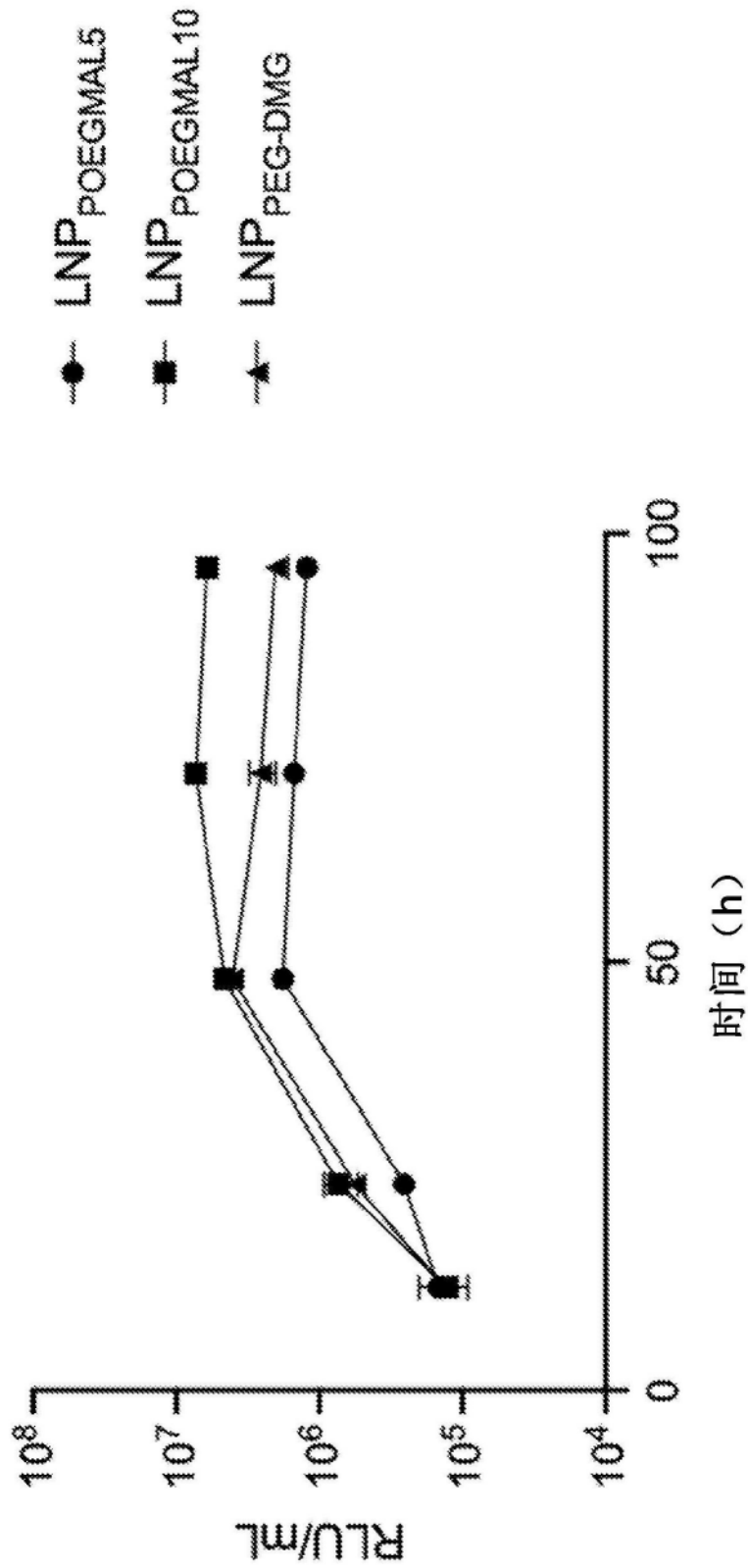


图11E

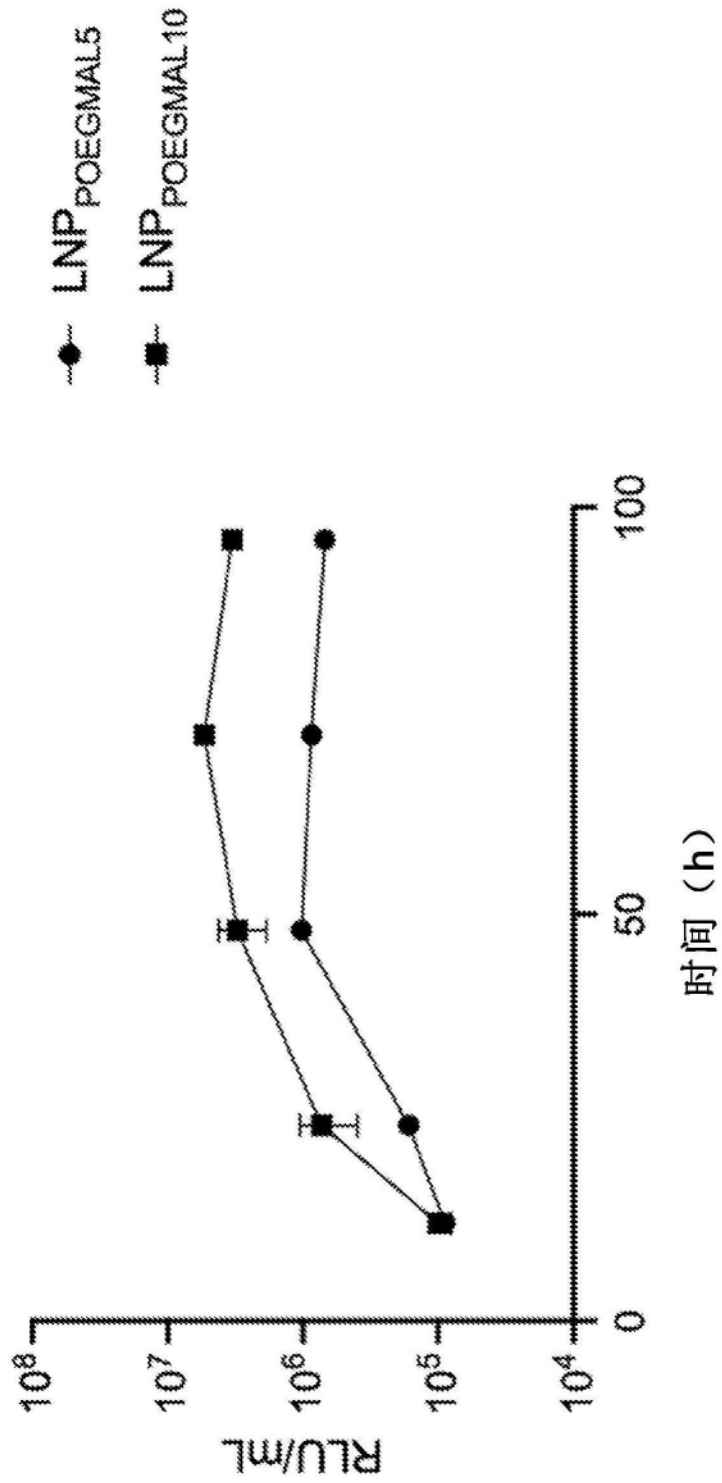
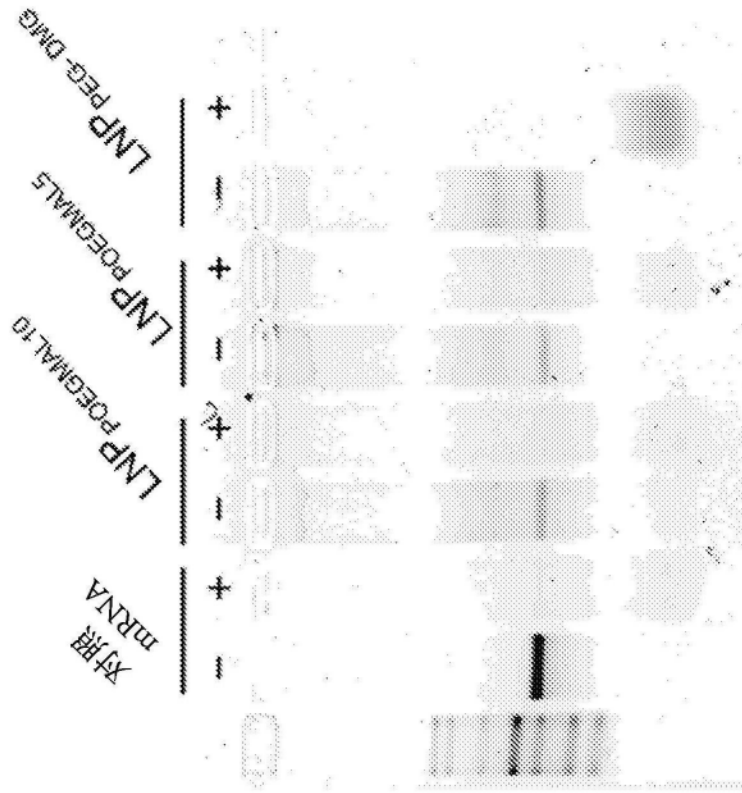


图11F



添加的顺序	符号	
	+	*
1	样品	样品
2	Triton-X	缓冲液
3	RNase	RNase
4	蛋白酶K	蛋白酶K
5	缓冲液	Triton-X

图12