



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202139975 A

(43)公開日：中華民國 110 (2021) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：110102316

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 01 月 21 日

(51)Int. Cl. : *A61K9/127 (2006.01)* *A61K9/51 (2006.01)*
A61K47/14 (2006.01) *A61K47/24 (2006.01)*
A61K47/28 (2006.01) *A61K39/12 (2006.01)*
A61K31/7088(2006.01) *A61P31/12 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2020/01/21 歐洲專利局 20152938.5
 2020/01/21 歐洲專利局 20152995.5
 2020/06/11 歐洲專利局 20179434.4

(71)申請人：比利時商 e T h e R N A 免疫治療公司 (比利時) ETHERNA IMMUNOTHERAPIES NV (BE)

比利時

(72)發明人：德科克 史黛芬 DE KOKER, STEFAAN (BE)；畢佛斯 莎娜 BEVERS, SANNE (BE)；施佛勒 雷蒙 米歇 SCHIFFELERS, RAYMOND MICHEL (NL)；柯曼斯 山德 亞歷山大 安東尼斯 KOIJMANS, SANDER ALEXANDER ANTONIUS (NL)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：6 共 52 頁

(54)名稱

脂質奈米顆粒

(57)摘要

本發明係關於脂質奈米顆粒 (LNP) (更具體而言，包含可離子化脂質、磷脂、固醇、PEG 脂質及一或多種核酸者) 之領域。本發明之 LNP 的特徵在於包含小於約 1 mol% 之 C18-PEG2000 脂質。本發明提供該 LNP 用於核酸分子 (特別是 mRNA) 之致免疫性遞送的用途；從而使其高度適用於疫苗，諸如用於治療癌症或感染性疾病。最後，提供用於製備此類 LNP 之方法。

The present invention relates to the field of lipid nanoparticles (LNP); more specifically comprising an ionizable lipid, a phospholipid, a sterol, a PEG lipid and one or more nucleic acids. The LNP's of the present invention are characterized in comprising less than about 1 mol% of a C18-PEG2000 lipid. The present invention provides use of the LNP's for immunogenic delivery of nucleic acid molecules, specifically mRNA; thereby making them highly suitable for use in vaccines, such as for the treatment of cancer or infectious diseases. Finally, methods are provided for preparing such LNP's.

指定代表圖：

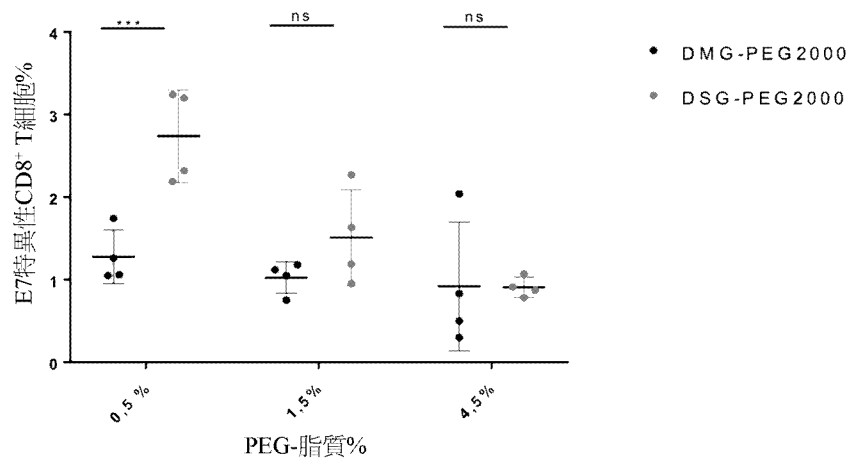


圖1

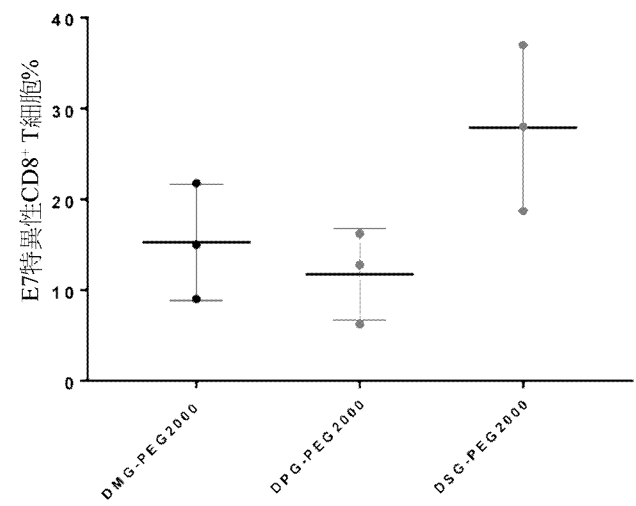


圖2



202139975

【發明摘要】

【中文發明名稱】 脂質奈米顆粒

【英文發明名稱】 LIPID NANOPARTICLES

【中文】

本發明係關於脂質奈米顆粒（LNP）（更具體而言，包含可離子化脂質、磷脂、固醇、PEG脂質及一或多種核酸者）之領域。本發明之LNP的特徵在於包含小於約1 mol%之C18-PEG2000脂質。本發明提供該LNP用於核酸分子（特別是mRNA）之致免疫性遞送的用途；從而使其高度適用於疫苗，諸如用於治療癌症或感染性疾病。最後，提供用於製備此類LNP之方法。

【英文】

The present invention relates to the field of lipid nanoparticles (LNP); more specifically comprising an ionizable lipid, a phospholipid, a sterol, a PEG lipid and one or more nucleic acids. The LNP's of the present invention are characterized in comprising less than about 1 mol% of a C18-PEG2000 lipid. The present invention provides use of the LNP's for immunogenic delivery of nucleic acid molecules, specifically mRNA; thereby making them highly suitable for use in vaccines, such as for the treatment of cancer or infectious diseases. Finally, methods are provided for preparing such LNP's.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 脂質奈米顆粒

【英文發明名稱】 LIPID NANOPARTICLES

【技術領域】

【0001】 本發明係關於脂質奈米顆粒（LNP）（更具體而言，包含可離子化脂質、磷脂、固醇、PEG脂質及一或多種核酸者）之領域。本發明之LNP的特徵在於包含小於約1 mol%之PEG脂質（諸如二C18-PEG2000脂質）。本發明提供該LNP用於核酸分子（特別是mRNA）之致免疫性遞送的用途；從而使其高度適用於疫苗，諸如用於治療癌症或感染性疾病。最後，提供用於製備此類LNP之方法。

【先前技術】

【0002】 生物活性物質之靶向遞送領域中之主要挑戰之一往往為其不穩定性及低細胞穿透潛力。對於核酸分子（尤其是（m）RNA分子）之遞送，情況特別如此。因此，適當的包裝對於充分的保護及遞送至關重要。因此，對於用於包裝生物活性物質（諸如核酸）之方法及組成物有持續的需要。

【0003】 在該方面，基於脂質之奈米顆粒組成物（諸如脂複合體（lipoplex）及脂質體）已用作生物活性物質之包裝載具，以便轉運至細胞及/或細胞內區室中。此等基於脂質之奈米顆粒組成物通常包含不同脂質（諸如陽離子脂質、可離子化脂質、磷脂、結構性脂質（諸如固醇或膽固醇）、聚乙二醇（PEG）脂質等）之混合物（如Reichmuth等人, 2016中所綜述）。

【0004】 已開發出由4種脂質（陽離子或可離子化脂質、磷脂、固醇及PEG化脂質）之混合物構成的基於脂質之奈米顆粒，以用於在全身性投予後將siRNA

及mRNA非致免疫性遞送至肝臟。雖然許多此類脂質組成物為所屬領域中已知的，但用於活體內mRNA遞送者典型地包含至少1.5 mol%之量之PEG脂質，且極常含有基於二C14之PEG脂質（DMG-PEG脂質）。

【0005】 然而，吾等現已意外發現，以低量（亦即小於約1 mol%）存在於LNP中之PEG脂質產生高度適用於在全身性注射LNP後mRNA之致免疫性遞送的奈米顆粒。此外，對於較長鏈PEG脂質（諸如二C18-PEG脂質），此等效果甚至更為明顯。

【發明內容】

【0006】 在第一方面，本發明提供一種mRNA疫苗，其包含一或多種脂質奈米顆粒，該等脂質奈米顆粒包含：

- 可離子化脂質；
- 磷脂；
- 固醇；
- PEG脂質；及
- 一或多種mRNA分子；

其特徵在於該LNP包含小於約1 mol%之該PEG脂質；較佳約且在0.5-0.9 mol%之間之該PEG脂質。

【0007】 在另一方面，本發明提供一種用於mRNA疫苗接種之脂質奈米顆粒（LNP），該LNP包含：

- 可離子化脂質；
- 磷脂；
- 固醇；
- PEG脂質；及

- 一或多種mRNA分子；

其特徵在於該LNP包含小於約1 mol%之該PEG脂質；較佳約且在0.5-0.9 mol%之間之該PEG脂質。

【0008】 在另一方面，本發明提供一種脂質奈米顆粒（LNP），其包含：

- 可離子化脂質；
- 磷脂；
- 固醇；
- PEG脂質；及
- 一或多種核酸分子；

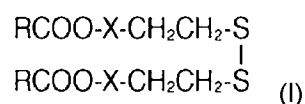
其特徵在於該PEG脂質為二C18-PEG2000脂質；且該LNP包含小於約1 mol%之該PEG脂質。

【0009】 在本發明之一特定實施方式中，該二C18-PEG2000脂質係選自包含以下者之清單：（基於二硬脂醯基的）-PEG2000脂質，諸如DSG-PEG2000脂質或DSPE-PEG2000脂質；或（基於二油醯基的）-PEG2000脂質，諸如DOG-PEG2000脂質或DOPE-PEG2000脂質。

【0010】 在本發明之另一特定實施方式中，該LNP包含約0.5 mol%之該PEG脂質。

【0011】 在本發明之另一特定實施方式中，該可離子化脂質係選自包含以下者之清單：

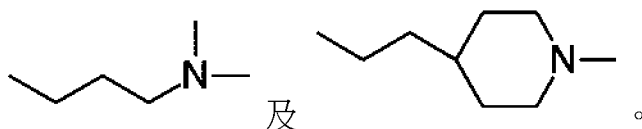
- 1,1'-((2-(4-(2-((2-(雙(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)哌啶-1-基)乙基)胺二基 (azanediyl))雙(十二烷-2-醇) (C12-200)；
 - 二9,12-十八碳二烯基 (linoleyl) 甲基-4-二甲基胺基丁酸酯 (DLin-MC3-DMA)；
- 或
- 式(I)化合物：



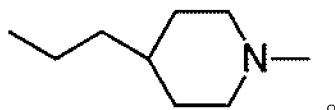
其中：

RCOO係選自包含以下者之清單：肉豆蔻醯基、 α -D-生育酚琥珀醯基、亞麻油醯基及油醯基；且

X係選自包含以下者之清單：



【0012】 在一較佳實施方式中，該可離子化脂質為式(I)之脂質，其中RCOO為 α -D-生育酚琥珀醯基且X為



【0013】 在本發明之另一實施方式中，該磷脂係選自包含以下者之清單：1,2-二油醯基-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DOPE)、1,2-二油醯基-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼 (DOPC) 及其等之混合物。

【0014】 在本發明之另一實施方式中，該固醇係選自包含以下者之清單：膽固醇、麥角固醇、菜油固醇、氧固醇 (oxysterol)、薄孔菌固醇 (antrostrol)、鏈固醇 (desmosterol)、尼卡固醇 (nicasterol)、穀固醇 (sitosterol) 及豆固醇；較佳為膽固醇。

【0015】 在另一特定實施方式中，該LNP包含在30-70 mol%之間之該可離子化脂質；較佳在45-65 mol%之間。

【0016】 在本發明之另一實施方式中，該LNP包含約或小於45 mol%之該固醇。

【0017】 在另一實施方式中，該LNP包含在5-25 mol%之間之磷脂；較佳在4-15 mol%之間。

【0018】 在本發明之一特定實施方式中，該LNP包含：

- 約45-65 mol%之該可離子化脂質；
 - 約4-15 mol%之該磷脂；
 - 約0.5-0.9 mol%之該PEG脂質；及
- 由該固醇之量平衡。

【0019】 在本發明之一極特定實施方式中，該LNP包含：

- 約64 mol%之該可離子化脂質；
 - 約8 mol%之該磷脂；
 - 約0.5-0.9 mol%之該PEG脂質；及
- 由該固醇之量平衡。

【0020】 在本發明之另一極特定實施方式中，該LNP包含：

- 約64 mol%之該可離子化脂質；
 - 約8 mol%之該磷脂；
 - 約0.5 mol%之該PEG脂質；及
- 由該固醇之量平衡。

【0021】 在本發明之另一極特定實施方式中，該LNP包含：

- 約50 mol%之該可離子化脂質；
 - 約6 mol%之該磷脂；
 - 約0.5-0.9 mol%之該PEG脂質；及
- 由該固醇之量平衡。

【0022】 在本發明之另一極特定實施方式中，該LNP包含：

- 約50 mol%之該可離子化脂質；
- 約8 mol%之該磷脂；
- 約0.5-0.9 mol%之該PEG脂質；及

由該固醇之量平衡。

【0023】 在本發明之另一極特定實施方式中，該LNP包含：

- 約60 mol%之該可離子化脂質；
- 約12 mol%之該磷脂；
- 約0.5-0.9 mol%之該PEG脂質；及

由該固醇之量平衡。

【0024】 在本發明之另一實施方式中，該一或多種核酸分子係選自包含mRNA及DNA之清單，較佳為mRNA。

【0025】 在一更特定的實施方式中，該一或多種mRNA分子係選自包含編碼免疫調節多肽之mRNA及/或編碼抗原之mRNA的清單。該編碼免疫調節之mRNA可例如選自包含編碼CD40L、CD70及caTLR4之mRNA分子的清單。

【0026】 在另一方面，本發明提供一種醫藥組成物或疫苗，其包含一或多種如本文所定義之脂質奈米顆粒及可接受之醫藥載劑。

【0027】 本發明亦提供如本文所定義之脂質奈米顆粒、醫藥組成物或疫苗，其用於人類或獸醫學；尤其用於治療癌症或感染性疾病。

【圖式簡單說明】

【0028】 現在具體參照圖式，需強調，所示的細節係以舉例之方式，且僅用於說明性地論述本發明的不同實施方式。其呈現係為了提供咸信對本發明之原理及概念方面最有用及最容易描述的內容。在此方面，未試圖以比基本理解本發明所需者更詳細地展示本發明之結構細節。伴隨圖式之說明使得對所屬技術領域中具有通常知識者而言如何在實踐中體現本發明之數種形式是明顯的。

【0029】

[圖1]：在用mRNA LNP第一次靜脈內免疫接種後量測之E7特異性CD8 T細

胞反應的幅度，該mRNA LNP用LNP組成中不同百分比的DMG-PEG2000及DSG-PEG2000調配。採用Tukey多重比較檢定之二因子ANOVA ns，不顯著；*** $p<0.001$ 。

[圖2]：在用mRNA LNP第二次靜脈內免疫接種後量測之E7特異性CD8 T細胞反應的幅度，該mRNA LNP用恆定百分比之DMG-PEG2000、DPG-PEG2000或DSG-PEG2000 LNP調配。

[圖3]：在用mRNA LNP或合成長肽第四次靜脈內免疫接種後量測之E7特異性CD8 T細胞反應的幅度。採用Tukey多重比較檢定之單因子ANOVA。ns，** $p<0.01$ ，**** $p<0.0001$ 。

[圖4]：DOE驅動之LNP組成的最佳化，以獲得最大T細胞反應。**A**，在用DOE庫中之E7 mRNA LNP進行三次免疫接種（每週間隔）後，血液中之E7特異性T細胞。**B**，描繪與DSG-PEG2000百分比呈函數關係之E7特異性CD8 T細胞反應的圖。在第3次免疫接種後，觀察到PEG-脂質百分比與E7特異性CD8 T細胞反應幅度之間的高度顯著的負相關。**C**，在三次免疫接種（每週間隔）後，血液中之E7特異性T細胞，其中顯示預測的最佳（LNP36）及非最佳DSG-PEG2000 LNP（LNP37）的平均值 $\pm$ SD。藉由採用Sidak多重比較檢定之單因子ANOVA評估統計數據。
*** $p<0.001$

[圖5]：經最佳化之mRNA LNP疫苗誘導定性T細胞反應及強抗腫瘤功效。**A**，血液中E7特異性CD8⁺ T細胞之動力學。**B**，血清中之IFN- γ 隨重複免疫接種而增加。**C**，在三次免疫接種後，脾臟中之脾臟CD8⁺ E7特異性T細胞產生IFN- γ 及TNF- α 。**D**，LNP36免疫小鼠之平均TC-1腫瘤生長。**E**，LNP36免疫小鼠之存活率。**F**，在用LNP36進行兩次免疫接種後之TC-1腫瘤浸潤淋巴細胞（TIL）。**G**，TIL之E7特異性。**A**、**F**、**G**顯示平均值 $\pm$ SD。**B**，盒狀圖。**D**，顯示平均值 $\pm$ SEM。**F**、**G**，藉由採用Tukey多重比較檢定之單因子ANOVA評估統計數據。**E**，藉由Mantel-

Cox對數秩檢定評估統計數據。**, $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns=不顯著

[圖6]：LNP由多種（先天）免疫細胞吸收且活化該等細胞。**A.** 腎臟、肺、心臟、肝臟及脾臟中之螢光素酶活性，以總螢光素酶活性之百分比之形式。**B.** 如藉由注射LNP之小鼠相對於注射TBS緩衝液之小鼠之Cy5 MFI的差異所量測之LNP在多種細胞類型中之攝取。**C.** 腎臟、肺、心臟、肝臟及脾臟中之螢光素酶活性，以總螢光素酶活性之百分比之形式。與非最佳LNP37相比，最佳LNP36顯示脾臟中的螢光素酶活性增加。**D.** 與非最佳LNP37相比，最佳LNP36之細胞攝取更高。**E.** 脾臟中積聚大量的E7 mRNA。**F.** 觀察到血清中IFN- α 及IP-10細胞介素之瞬時增加（在LNP投予後6小時與24小時相比）。**G.** cDC1及cDC2上之CD86表現被非最佳LNP37弱上調，而被最佳LNP36強上調。**A、B、C、D、E、F.** 顯示平均值 $\pm$ SD。

【實施方式】

【0030】 如上文已詳述，本發明提供一種mRNA疫苗，其包含一或多種脂質奈米顆粒，該等脂質奈米顆粒包含：

- 可離子化脂質；
- 磷脂；
- 固醇；
- PEG脂質；及
- 一或多種mRNA分子；

其特徵在於該LNP包含小於約1 mol%之該PEG脂質；較佳約且在0.5-0.9 mol%之間之該PEG脂質。

【0031】 在一特定實施方式中，本發明提供一種mRNA疫苗，其包含一或多種脂質奈米顆粒，該等脂質奈米顆粒包含：

- 約45-65 mol%之可離子化脂質；
- 約4-15 mol%之磷脂；
- 固醇；
- PEG脂質；及
- 一或多種mRNA分子；

其特徵在於該LNP包含小於約1 mol%之該PEG脂質；較佳約且在0.5-0.9 mol%之間之該PEG脂質。

【0032】 本發明亦提供一種用於mRNA疫苗接種中脂質奈米顆粒(LNP)，該LNP包含：

- 可離子化脂質；
- 磷脂；
- 固醇；
- PEG脂質；及
- 一或多種mRNA分子；

其特徵在於該LNP包含小於約1 mol%之該PEG脂質；較佳約且在0.5-0.9 mol%之間之該PEG脂質。

【0033】 在一特定實施方式中，本發明提供一種用於mRNA疫苗接種之脂質奈米顆粒(LNP)，該LNP包含：

- 約45-65 mol%之可離子化脂質；
- 約4-15 mol%之磷脂；
- 固醇；
- PEG脂質；及
- 一或多種mRNA分子；

其特徵在於該LNP包含小於約1 mol%之該PEG脂質；較佳約且在0.5-0.9 mol%之

間之該PEG脂質。

【0034】 因此，本發明提供包含以相對較低量（例如小於約1 mol%；尤其約0.5-0.9 mol%）存在之PEG脂質的LNP，吾等已意外發現此等LNP高度適用於核酸，尤其mRNA之致免疫性遞送。特定言之，發現對於包含長鏈PEG脂質，諸如C18-PEG脂質，甚至更具體而言C18-PEG2000脂質之LNP，此效果更為明顯。

「核酸分子之致免疫性遞送（immunogenic delivery of nucleic acid molecules）」意謂將核酸分子遞送至細胞，由此該等核酸分子與細胞接觸、內化及/或在細胞內表現導致誘導免疫反應。

【0035】 因此，在另一方面，本發明提供一種脂質奈米顆粒（LNP），其包含：

- 可離子化脂質；
- 磷脂；
- 固醇；
- PEG脂質；及
- 一或多種核酸分子；尤其mRNA分子；

其特徵在於該PEG脂質為C18-PEG2000脂質；且該LNP包含小於約1 mol%之該PEG脂質。

【0036】 在一特定實施方式中，本發明提供一種脂質奈米顆粒（LNP），其包含：

- 約45-65 mol%之可離子化脂質；
- 約4-15 mol%之磷脂；
- 固醇；
- PEG脂質；及
- 一或多種核酸分子；

特徵在於該PEG脂質為C18-PEG2000脂質；且該LNP包含小於約1 mol%之該PEG脂質；較佳約且在0.5-09 mol%之間之該PEG脂質。

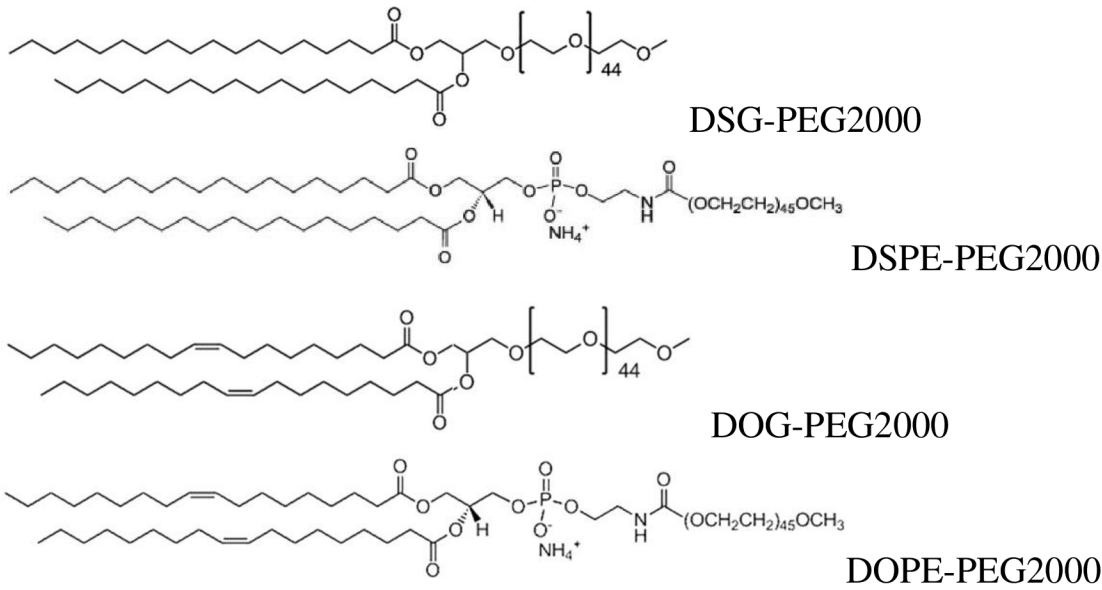
【0037】 脂質奈米顆粒（LNP）一般稱為由不同脂質之組合構成的奈米級顆粒。雖然許多不同類型的脂質可包含在此類LNP中，但本發明之LNP典型地由可離子化脂質、磷脂、固醇及PEG脂質之組合構成。

【0038】 在本申請案之上下文中，無論在何處提供關於如本文所揭示之脂質奈米顆粒的特定實施方式，在此類實施方式中提供之限制同樣適用於作為所主張之mRNA疫苗的一部分或意欲用於mRNA疫苗接種之脂質奈米顆粒。

【0039】 如本文所用，術語「奈米顆粒（nanoparticle）」係指具有使顆粒適用於尤其核酸之全身性，尤其靜脈內投予之直徑，典型地具有小於1000奈米（nm），較佳小於500 nm，甚至更佳小於200 nm，諸如例如在50與200 nm之間；較佳在80與160 nm之間的直徑的任何顆粒。

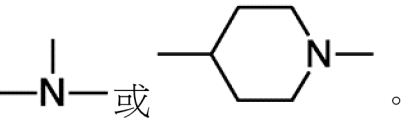
【0040】 在本發明之上下文中，術語「PEG脂質（PEG lipid）」或者「PEG化脂質（PEGylated lipid）」意謂用PEG（聚乙二醇）基團修飾之任何適合的脂質。在本發明之上下文中，特別適合之PEG脂質的特徵在於為二C18-PEG脂質。當在本發明之上下文中，使用術語C18-PEG脂質時，此意謂為二C18-PEG脂質，亦即具有2個C18脂質尾部之脂質。然而，亦可適當地使用較短鏈的PEG脂質，諸如dC14-PEG脂質（例如DMG-PEG，更尤其DMG-PEG2000；或DMPE-PEG，更尤其DMPE-PEG2000）或二C16-PEG脂質。二C18-PEG脂質含有定義脂質分子量之聚乙二醇部分，以及包含18個C原子之脂肪酸尾部。在一特定實施方式中，該二C18-PEG2000脂質係選自包含以下者之清單：（基於二硬脂醯基的）-PEG2000脂質，諸如DSG-PEG2000脂質（2-二硬脂醯基-*rac*-甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000）或DSPE-PEG2000脂質（1,2-二硬脂醯基-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]）；或（基於二油醯基的）-PEG2000脂質，諸如DOG-PEG2000脂質

(1,2-二油醯基-*rac*-甘油)或DOPE-PEG2000脂質(1,2-二油醯基-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[胺基(聚乙二醇)-2000])。

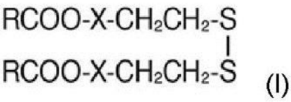


【0041】 在本發明之上下文中，在化合物或脂質之上下文中，術語「可離子化 (ionizable)」(或者陽離子) 意謂在該化合物或脂質中存在任何不帶電的基團，該基團能夠藉由產生離子(通常為H⁺離子)而解離且因此其自身變得帶正電荷。或者，該化合物或脂質中之任何不帶電基團可以產生電子且因此變得帶負電荷。

【0042】 在本發明之上下文中，可適當地使用任何類型之可離子化脂質。具體而言，適合之可離子化脂質為可離子化胺基脂質，其包含經由S-S鍵連接之2個相同或不同的尾部，該等尾部中之每一者包含諸如由以下者表示之可離子化胺：



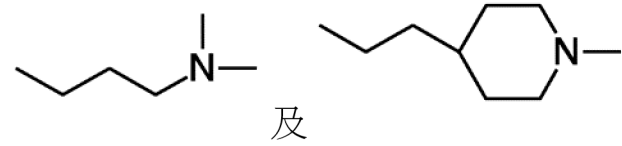
【0043】 在一特定實施方式中，該可離子化脂質為式(I)化合物：



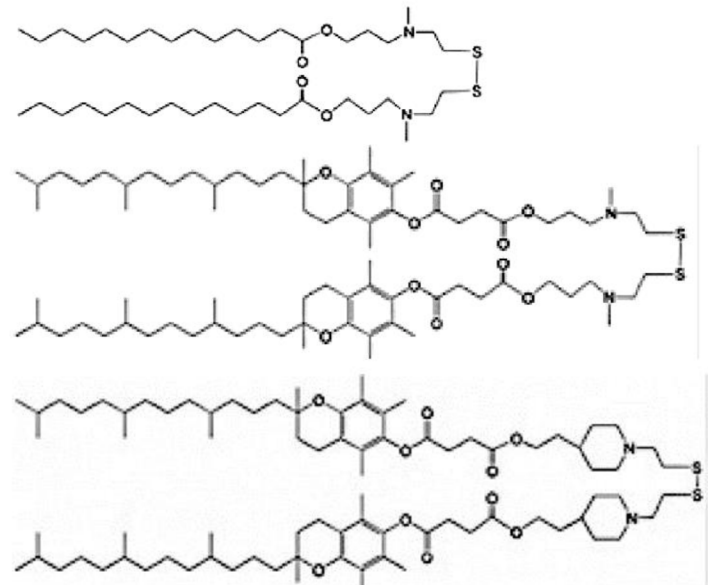
其中：

RCOO係選自包含以下者之清單：肉豆蔻醯基、 α -D-生育酚琥珀醯基、亞麻油醯基及油醯基；且

X係選自包含以下者之清單：

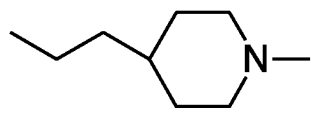


【0044】 此類可離子化脂質可具體由下式中之任一者表示：

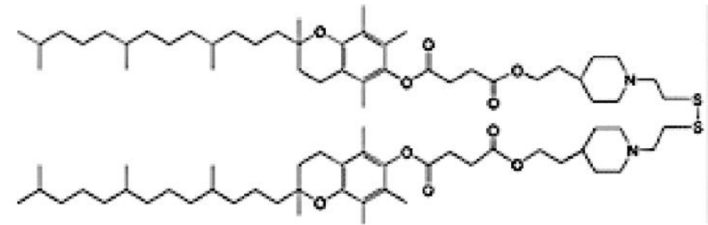


(Coatsome SS-EC)

【0045】 更具體而言，該可離子化脂質為式(I)之脂質，其中RCOO為 α -D-生育酚琥珀醯基且X為

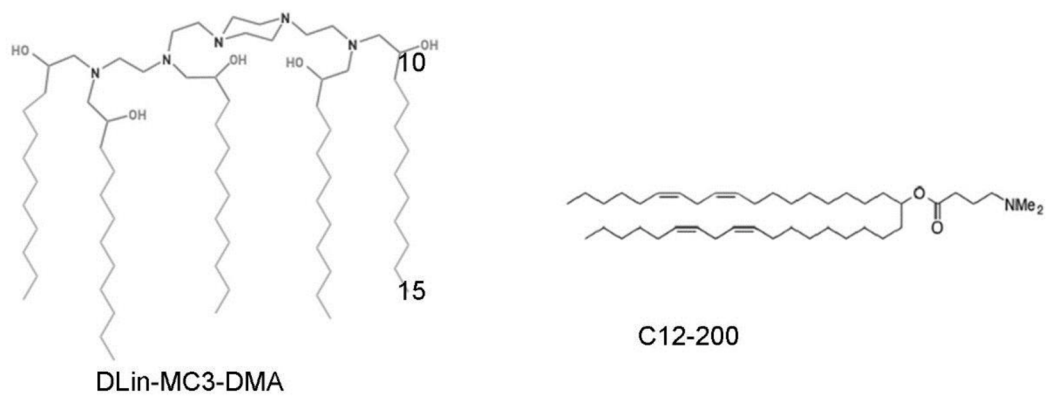


諸如由以下者表示：



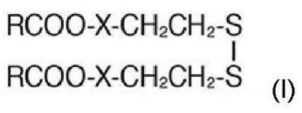
【0046】 其他適合之可離子化脂質可選自1,1'-((2-(4-(2-((2-(雙(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)哌啶-1-基)乙基)胺二基)雙(十二

烷-2-醇) (C12-200) ; 及二9,12-十八碳二烯基甲基-4-二甲基氨基丁酸酯 (DLin-MC3-DMA) 。



【0047】 因此，在一特定實施方式中，本發明提供一種脂質奈米顆粒，其包含：

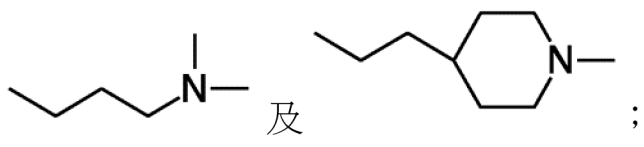
- 式(I)之可離子化脂質；



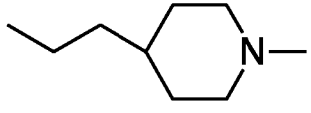
其中：

RCOO係選自包含以下者之清單：肉豆蔻醯基、 α -D-生育酚琥珀醯基、亞麻油醯基及油醯基；且

X係選自包含以下者之清單：



尤其式(I)之脂質，其中RCOO為 α -D-生育酚琥珀醯基且X為



- 磷脂；
- 固醇；
- 以小於約1 mol%存在之二C18-PEG2000脂質；及
- 一或多種核酸分子。

【0048】 在本發明之上下文中，術語「磷脂 (phospholipid)」意謂由兩個疏水性脂肪酸「尾部」及一個由磷酸基組成之親水性「頭部」組成的脂質分子。兩種組分最常由甘油分子接合在一起，因此，在本發明之磷脂中較佳為甘油-磷脂。此外，磷酸基通常用諸如膽鹼（亦即呈現磷酸膽鹼）或乙醇胺（亦即呈現磷酸乙醇胺）之簡單有機分子修飾。

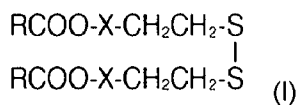
【0049】 在本發明之上下文中，適合之磷脂可選自包含以下者之清單：
 1,2-二油醯基-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DOPE)、1,2-二油醯基-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼 (DOPC)、1,2-二亞麻油醯基-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼 (DLPC)、1,2-二肉豆蔻醯基-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼 (DMPC)、1,2-二油醯基-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼 (DOPC)、1,2-二棕櫚醯基-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼 (DPPC)、1,2-二硬脂醯基-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼 (DSPC)、1,2-二(十一醯基)-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼 (DUPC)、1-棕櫚醯基-2-油醯基-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼 (POPC)、1,2-二-O-十八烯基-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼 (18:0二酰 PC)、1-油醯基-2-膽固醇半琥珀醯基-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼 (OChemPC)、1-十六烷基-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼 (C 16 Lyso PC)、1,2-二亞麻油醯基-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼、1,2-二花生四烯醯基-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼、1,2-二(二十二碳六烯醯基)-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼、1,2-二植烷醯基-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺 (ME 16.0 PE)、1,2-二硬脂醯基-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亞麻油醯基-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亞麻油醯基-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯醯基-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二(二十二碳六烯醯基)-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油醯基-*sn*-甘油-3-磷酸-*rac*-(1-甘油)鈉鹽 (DOPG)、鞘磷脂及其等之混合物。

【0050】 在一更特定實施方式中，該磷脂係選自包含以下者之清單：1,2-二油醯基-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DOPE)、1,2-二油醯基-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼 (DOPC)、1,2-二硬脂醯基-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼 (DSPC) 及其等之混合物。

【0051】 因此，在一特定實施方式中，本發明提供一種脂質奈米顆粒，其

包含：

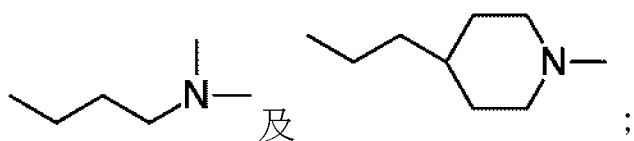
- 式(I)之可離子化脂質；



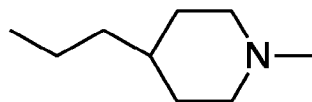
其中：

RCOO係選自包含以下者之清單：肉豆蔻醯基、 α -D-生育酚琥珀醯基、亞麻油醯基及油醯基；且

X係選自包含以下者之清單：



尤其式(I)之脂質，其中RCOO為 α -D-生育酚琥珀醯基且X為

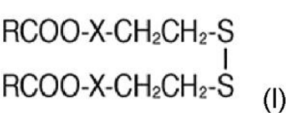


- 磷脂，其選自DOPC及DOPE或其等之混合物；
- 固醇；
- 以小於約1 mol%存在之二C18-PEG2000脂質；及
- 一或多種核酸分子。

【0052】 在本發明之上下文中，術語「固醇 (sterol)」亦稱為類固醇，為在植物、動物及真菌中天然存在或可藉由一些細菌產生之類固醇子群。在本發明之上下文中，可使用任何適合之固醇，諸如選自包含以下者之清單：膽固醇、麥角固醇、菜油固醇、氧固醇、薄孔菌固醇、鏈固醇、尼卡固醇、穀固醇及豆固醇；較佳為膽固醇。

【0053】 因此，在一特定實施方式中，本發明提供一種脂質奈米顆粒，其包含：

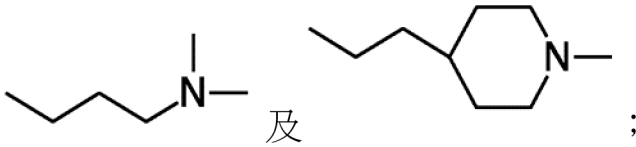
- 式(I)之可離子化脂質；



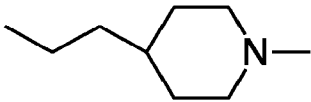
其中：

RCOO係選自包含以下者之清單：肉豆蔻醯基、 α -D-生育酚琥珀醯基、亞麻油醯基及油醯基；且

X係選自包含以下者之清單：



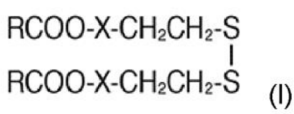
尤其式(I)之脂質，其中RCOO為 α -D-生育酚琥珀醯基且X為



- 磷脂，其選自DOPC及DOPE或其等之混合物；
- 膽固醇；
- 以小於約1 mol%存在之二C18-PEG2000脂質；及
- 一或多種核酸分子。

【0054】 在本發明之一極特定實施方式中，該脂質奈米顆粒包含：

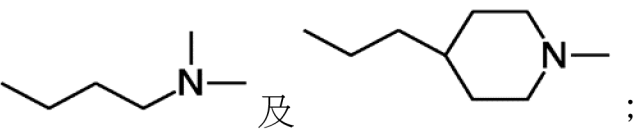
- 式(I)之可離子化脂質；



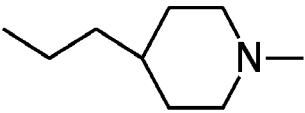
其中：

RCOO係選自包含以下者之清單：肉豆蔻醯基、 α -D-生育酚琥珀醯基、亞麻油醯基及油醯基；且

X係選自包含以下者之清單：



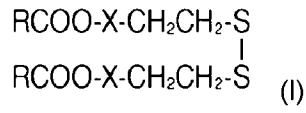
尤其式(I)之脂質，其中RCOO為 α -D-生育酚琥珀醯基且X為



- 磷脂，其選自DOPC及DOPE或其等之混合物；
- 膽固醇；
- 以小於約1 mol%存在之DSG-PEG2000脂質；及
- 一或多種核酸分子。

【0055】 在本發明之另一極特定實施方式中，該脂質奈米顆粒包含：

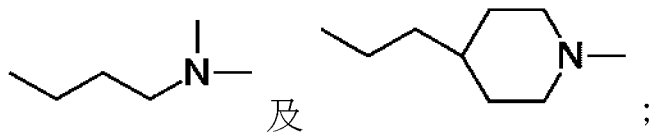
- 式(I)之可離子化脂質；



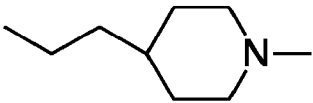
其中：

RCOO係選自包含以下者之清單：肉豆蔻醯基、 α -D-生育酚琥珀醯基、亞麻油醯基及油醯基；且

X係選自包含以下者之清單：



尤其式(I)之脂質，其中RCOO為 α -D-生育酚琥珀醯基且X為



- 磷脂，其選自DOPC及DOPE或其等之混合物；
- 膽固醇；
- 以小於約1 mol%存在之DSPE-PEG2000脂質；及
- 一或多種核酸分子。

【0056】 在本發明之一特定實施方式中，該LNP包含之可離子化脂質與磷脂之比率為約8:1、或者約6:1、約4:1或約2:1。

【0057】 在另一特定實施方式中，該LNP包含約且在30-70 mol%之間之該

可離子化脂質；較佳約且在45與65 mol%之間；諸如約65 mol%、約或高於45 mol%、約或高於50 mol%、約或高於55 mol%、約或高於60 mol%。

【0058】 在另一實施方式中，該LNP包含在4-25 mol%之間之磷脂；較佳在4-15 mol%之間；諸如例如約4 mol%、約5 mol%、約6 mol%、約7 mol%、約8 mol%、約9 mol%、約10 mol%、約11 mol%、約12 mol%、約13 mol%、約14 mol%或約15莫耳%；較佳約且在6 mol%與9 mol%之間。

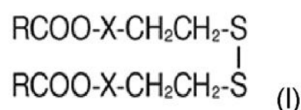
【0059】 因此，在本發明之一特定實施方式中，以下者中之一或多者適用：

- 該LNP包含約且在45 mol%與65 mol%之間之該可離子化脂質；
- 該LNP包含約且在4 mol%與15 mol%之間之該磷脂；
- 該LNP包含約且在0.5 mol%與0.9 mol%之間之該PEG脂質；

由該固醇之量平衡。

【0060】 因此，在本發明之一極特定實施方式中，該LNP包含：

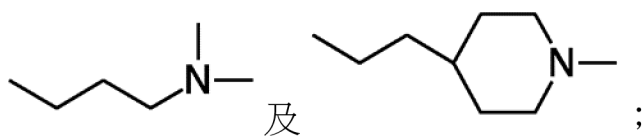
- 約45-65 mol%之式(I)之可離子化脂質；



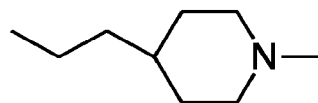
其中：

RCOO係選自包含以下者之清單：肉豆蔻醯基、 α -D-生育酚琥珀醯基、亞麻油醯基及油醯基；且

X係選自包含以下者之清單：



尤其式(I)之脂質，其中RCOO為 α -D-生育酚琥珀醯基且X為



- 約4-15 mol%之磷脂，其選自DOPC及DOPE或其等之混合物；

- 膽固醇達到平衡；
- 約0.5-0.9 mol%之DSG-PEG2000脂質或DSPE-PEG2000脂質；及
- 一或多種核酸分子。

【0061】 當在本發明之上下文中使用mol%時，其意謂指定組分相對於空奈米顆粒（亦即無核酸）的莫耳%。此意謂組分之mol%係相對於該LNP中存在之可離子化脂質、磷脂、固醇及PEG脂質之總量來計算。

【0062】 在另一特定實施方式中，本發明提供一種脂質奈米顆粒，其包含：

- 大於60 mol%之該可離子化脂質；
 - 約8 mol%之該磷脂；
 - 約0.5-0.9 mol%之該PEG脂質；及
- 由該固醇之量平衡。

【0063】 更具體而言，本發明提供一種脂質奈米顆粒，其包含：

- 約64 mol%之該可離子化脂質；
 - 約8 mol%之該磷脂；
 - 約0.5-0.9 mol%之該PEG脂質；及
- 由該固醇之量平衡。

【0064】 更具體而言，本發明提供一種脂質奈米顆粒，其包含：

- 約64 mol%之該可離子化脂質；
 - 約8 mol%之該磷脂；
 - 約0.5 mol%之該PEG脂質；及
- 由該固醇之量平衡。

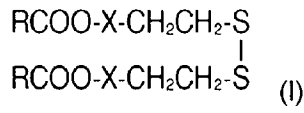
【0065】 在本發明之一極特定實施方式中，該LNP包含：

- 約64.4 mol%之該可離子化脂質；
- 約8 mol%之該磷脂；

- 約27.1 mol%之該固醇；及
- 約0.5 mol%之該PEG脂質。

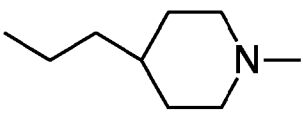
【0066】 因此，在本發明之一極特定實施方式中，該LNP包含：

- 約64.4 mol%之式(I)之可離子化脂質；



其中：

RCOO為α-D-生育酚琥珀醯基且X為



- 約8 mol%之磷脂，其選自DOPC及DOPE或其等之混合物；
- 約27.1 mol%之膽固醇；
- 約0.5 mol%之DSG-PEG2000脂質或DSPE-PEG2000脂質；及
- 一或多種核酸分子。

【0067】 在本發明之上下文中，其他特別適合之LNP的組成表示於表1中。

表1：適合之LNP的組成

編號	可離子化脂質 (mol%)	磷脂 (mol%)	膽固醇 (mol%)	C18-PEG2000脂質 (mol%)
1	50	6	43,5	0.5
2	50	9	40,5	0.5
3	50	12	37,5	0.5
4	50	15	34,5	0.5
5	50	18	31,5	0.5
6	50	21	28,5	0.5
7	50	6	43,3	0.7
8	50	9	40,3	0.7
9	50	12	37,3	0.7
10	50	15	34,3	0.7
11	50	18	31,3	0.7
12	50	21	28,3	0.7
13	50	6	43,1	0.9
14	50	9	40,1	0.9
15	50	12	37,1	0.9
16	50	15	34,1	0.9
17	50	18	31,1	0.9

18	50	21	28,1	0.9
19	55	6	38,5	0.5
20	55	9	35,5	0.5
21	55	12	32,5	0.5
22	55	15	29,5	0.5
23	55	18	26,5	0.5
24	55	21	23,5	0.5
25	55	6	38,3	0.7
26	55	9	35,3	0.7
27	55	12	32,3	0.7
28	55	15	29,3	0.7
29	55	18	26,3	0.7
30	55	21	23,3	0.7
31	55	6	38,1	0.9
32	55	9	35,1	0.9
33	55	12	32,1	0.9
34	55	15	29,1	0.9
35	55	18	26,1	0.9
36	55	21	23,1	0.9
37	60	6	33,5	0.5
38	60	9	30,5	0.5
39	60	12	27,5	0.5
40	60	15	24,5	0.5
41	60	18	21,5	0.5
42	60	21	18,5	0.5
43	60	6	33,3	0.7
44	60	9	30,3	0.7
45	60	12	27,3	0.7
46	60	15	24,3	0.7
47	60	18	21,3	0.7
48	60	21	18,3	0.7
49	60	6	33,1	0.9
50	60	9	30,1	0.9
51	60	12	27,1	0.9
52	60	15	24,1	0.9
53	60	18	21,1	0.9
54	60	21	18,1	0.9
55	65	6	28,5	0.5
56	65	9	25,5	0.5
57	65	12	22,5	0.5
58	65	15	19,5	0.5
59	65	6	28,3	0.7
60	65	9	25,3	0.7
61	65	12	22,3	0.7
62	65	15	19,3	0.7
63	65	6	28,1	0.9
64	65	9	25,1	0.9
65	65	12	22,1	0.9
66	65	15	19,1	0.9

【0068】 其他特別適合之LNP的特徵在於可離子化脂質/磷脂/固醇/C18-PEG2000脂質之比率為：

- 64.4/8/27.1/0.5

- 58/14.5/27/0.5

- 48/25.5/27/0.5

- 53/17.67/28.58/0.75

【0069】 本發明人已發現，本發明之LNP特別適用於核酸之致免疫性遞送。因此，本發明提供包含一或多種核酸分子，諸如DNA或RNA，更具體而言mRNA之LNP。

【0070】 該LNP中核酸之量典型地由N/P比表示，亦即可離子化脂質中之氮原子與核酸中之磷酸基之比。在本發明之上下文中，LNP之N/P比為約且在4:1與16:1之間。

【0071】 在本發明之上下文中，「核酸 (nucleic acid)」為去氧核糖核酸 (DNA) 或較佳核糖核酸 (RNA)，更佳為mRNA。根據本發明，核酸包括基因體DNA、cDNA、mRNA、重組產生及化學合成之分子。根據本發明，核酸可呈單股或雙股且線性或共價閉合形成環之分子形式。核酸可用於引入至細胞中，亦即轉染細胞，例如以RNA形式，該RNA可藉由自DNA模板之試管內轉錄來製備。此外，RNA可在應用前藉由穩定序列、封端及/或多腺苷酸化進行修飾。

【0072】 在本發明之上下文中，術語「RNA」係指包含核糖核苷酸殘基且較佳完全或實質上由核糖核苷酸殘基構成之分子。「核糖核苷酸 (Ribonucleotide)」係指在β-D-呋喃核糖基之2'-位置具有羥基之核苷酸。該術語包括雙股RNA、單股RNA、經分離之RNA (諸如經部分純化之RNA)、基本上純的RNA、合成RNA、重組產生之RNA以及藉由添加、缺失、取代及/或改變一或多個核苷酸而與天然存在之RNA不同的經修飾之RNA。此類改變可包括添加非

核苷酸物質，諸如添加至RNA之末端或內部，例如在RNA之一或多個核苷酸處。RNA分子中之核苷酸亦可包含非標準核苷酸，諸如非天然存在之核苷酸或化學合成之核苷酸或去氧核苷酸。此等改變的RNA可稱為類似物。核酸可包含於載體中。如本文所用，術語「載體 (vector)」包括所屬技術領域中具有通常知識者已知的任何載體，包括質體載體、黏質體載體、噬菌體載體（諸如 λ 噬菌體）、病毒載體（諸如腺病毒或桿狀病毒載體）或人工染色體載體（諸如細菌人工染色體 (BAC)）、人工酵母或天然存在之RNA的類似物。

【0073】 根據本發明，術語「RNA」包括且較佳係指「mRNA」，其意謂「信使RNA (messenger RNA)」且係指可使用DNA作為模板產生且編碼肽或蛋白質的「轉錄本 (transcript)」。mRNA典型地包含5'非翻譯區 (5'-UTR)、蛋白質或肽編碼區及3'非翻譯區 (3'-UTR)。mRNA在細胞中及試管內具有有限的半衰期。較佳地，mRNA係藉由使用DNA模板進行試管內轉錄產生。在本發明之一個實施方式中，RNA係藉由試管內轉錄或化學合成獲得。試管內轉錄方法為所屬技術領域中具有通常知識者已知的。舉例而言，存在多種市售試管內轉錄套組。

【0074】 在本發明之一特定實施方式中，該mRNA分子為編碼免疫調節蛋白之mRNA分子。

【0075】 在本發明之上下文中，術語「編碼免疫調節蛋白之mRNA分子 (mRNA molecules encoding immune modulating proteins)」意謂編碼修改抗原呈現細胞，更尤其樹突狀細胞之功能之蛋白質的mRNA分子。此類分子可選自包含CD40L、CD70、caTLR4、IL-12p70、EL-選擇素、CCR7及/或4-1 BBL、ICOSL、OX40L、IL-21之清單；更尤其CD40L、CD70及caTLR4中之一或多者。本發明方法中所用之免疫刺激因子的較佳組合為CD40L及caTLR4（亦即「DiMix」）。在另一較佳實施方式中，使用CD40L、CD70及caTLR4免疫刺激分子之組合，其在本文中亦稱為「TriMix」。

【0076】 在另一特定實施方式中，該等mRNA分子為編碼抗原及/或疾病特異性蛋白之mRNA分子。

【0077】 根據本發明，術語「抗原 (antigen)」包含任何分子，較佳肽或蛋白質，其包含至少一個將引發免疫反應及/或免疫反應所針對之抗原決定基；因此，術語抗原亦意謂涵蓋來自抗原之最小抗原決定基。如本文所定義，「最小抗原決定基 (minimal epitope)」意謂能夠引發免疫反應之最小結構。較佳地，在本發明之上下文中，抗原為視情況在處理後誘發免疫反應之分子，該免疫反應較佳對抗原或表現抗原之細胞具有特異性。特定言之，「抗原」係指視情況在處理後由MHC分子呈現且與T淋巴細胞 (T細胞) 發生特異性反應之分子。

【0078】 在一特定實施方式中，抗原為目標特異性抗原，其可為腫瘤抗原，或細菌、病毒或真菌抗原。該目標特異性抗原可來源於以下者中之任一者：自目標細胞分離之總mRNA、一或多個特異性目標mRNA分子、目標細胞之蛋白質溶解物、來自目標細胞之特異性蛋白、或合成的目標特異性肽或蛋白質及編碼目標特異性抗原或其衍生肽之合成mRNA或DNA。

【0079】 為了避免任何誤解，本發明之LNP可包含單一mRNA分子，或其可包含多種mRNA分子，諸如一或多種編碼免疫調節蛋白之mRNA分子及/或一或多種編碼抗原及/或疾病特異性蛋白之mRNA分子的組合。

【0080】 在一極特定實施方式中，該等編碼免疫調節分子之mRNA分子可與一或多種編碼抗原及/或疾病特異性蛋白之mRNA分子組合。舉例而言，本發明之LNP可包含編碼免疫刺激分子CD40L、CD70及/或caTLR4 (注入Dimix或Trimix) 之mRNA分子；以及一或多種編碼抗原及/或疾病特異性蛋白之mRNA分子。因此，在一極特定實施方式中，本發明之LNP包含編碼CD40L、CD70及/或caTLR4之mRNA分子；以及一或多種編碼抗原及/或疾病特異性蛋白之mRNA分子。

【0081】 在另一方面，本發明提供一種醫藥組成物，其包含一或多個如本文所定義之LNP。此類醫藥組成物特別適用作疫苗。因此，本發明亦提供一種疫苗，其包含一或多個根據本發明之LNP。

【0082】 在本發明之上下文中，如本文所用之術語「疫苗（vaccine）」意謂意欲提供針對疾病之適應性免疫（抗體及/或T細胞反應）的任何製劑。為此，如本文所意謂之疫苗含有至少一個編碼適應性免疫反應所針對之抗原的mRNA分子。此抗原可以弱化或殺滅形式之微生物、蛋白質或肽、或編碼抗原之核酸的形式存在。在本發明之上下文中，抗原意謂由宿主之免疫系統識別為外來的蛋白質或肽，從而刺激產生針對此類抗原之抗體，目的為對抗此類抗原。疫苗可為預防性的（例如：預防或改善未來由任何天然或「野生」病原體感染之影響），或治療性的（例如，積極治療或減輕進行中的疾病的症狀）。疫苗之投予稱為疫苗接種。

【0083】 本發明之疫苗可用於誘發免疫反應，尤其針對疾病相關抗原或表現疾病相關抗原之細胞的免疫反應，諸如針對癌症之免疫反應。因此，疫苗可用於涉及疾病相關抗原或表現疾病相關抗原之細胞的疾病（諸如癌症）之預防性及/或治療性治療。較佳地，該免疫反應為T細胞反應。在一個實施方式中，疾病相關抗原為腫瘤抗原。由本文所述之奈米顆粒中所包含之RNA編碼的抗原較佳為疾病相關抗原，或引發針對疾病相關抗原或表現疾病相關抗原之細胞的免疫反應。

【0084】 本發明之LNP及疫苗欲專門用於靜脈內投予，亦即直接將液體物質輸注至靜脈中。靜脈內途徑為在全身，亦即全身性遞送流體及藥物之最快方式。因此，本發明提供靜脈內疫苗，以及所揭示之疫苗及LNP用於靜脈內投予之用途。因此，本發明之疫苗及LNP可靜脈內投予。本發明亦提供根據本發明之疫苗及LNP之用途；其中疫苗係靜脈內投予。

【0085】 本發明亦提供用於人類或獸醫學之根據本發明之LNP、醫藥組成物及疫苗。亦打算將根據本發明之LNP、醫藥組成物及疫苗用於人類或獸醫學。最後，本發明提供一種用於預防及治療人類及獸醫學病症之方法，其係藉由向有需要之個體投予根據本發明之LNP、醫藥組成物及疫苗。

【0086】 本發明進一步提供根據本發明之LNP、醫藥組成物或疫苗用於該一或多種核酸分子之致免疫性遞送的用途。因此，本發明之LNP、醫藥組成物及疫苗在治療數種人類及獸醫學病症中非常有用。因此，本發明提供本發明之LNP、醫藥組成物及疫苗，其用於治療癌症或感染性疾病。

【0087】 本發明之脂質奈米顆粒可根據實施例部分中所指定之方案來製備。更一般而言，LNP可使用包含以下者之方法製備：

- 製備包含該可離子化脂質、該磷脂、該固醇、該PEG脂質及適合之醇溶劑的第一醇組成物；
- 製備包含該一或多種核酸及水溶劑之第二水性組成物；
- 在微流體混合裝置中混合該第一及第二組成物。

【0088】 更詳細地，將脂質組分以適合之濃度併入諸如乙醇之醇媒劑中。向其中添加包含核酸之水性組成物，且隨後裝載於微流體混合裝置中。

【0089】 微流體混合之目的為實現多個樣品（亦即脂質相及核酸相）在微尺度裝置中之徹底及快速混合。此類樣品混合典型地藉由增強不同物種流之間的擴散效應來達成。另外，可使用數種微流體混合裝置，諸如例如Lee等人, 2011中所綜述。根據本發明之特別適合之微流體混合裝置為來自 Precision Nanosystems之NanoAssemblr。

【0090】 適用於製備本發明之LNP的其他技術包括將組分分散於適合之分散介質（例如水溶劑及醇溶劑）中，且應用以下方法中之一或多者：乙醇稀釋法、簡單水合法、音波處理、加熱、渦旋、乙醚注射法、法壓法、膽酸法、 Ca^{2+}

融合法、凍融法、逆相蒸發法、T型接合混合、微流體流體動力聚焦、交錯人字形混合及其類似方法。

實施例

實施例1及2之材料及方法

小鼠

【0091】 雌性C57BL/6小鼠係購自Charles River Laboratories（法國）且圈養於具有標準墊料及籠富集之獨立通風的籠子中。動物係根據機構（Vrije Universiteit Brussel）及歐盟動物實驗指南進行維持及處理。小鼠隨意獲取食物及水。實驗在小鼠6至10週齡時開始。小鼠之體重每2天監測一次。

【0092】 在用ADPGK合成長肽（SLP）進行疫苗接種之情況下，以相同的時間間隔給小鼠腹膜內注射含 50 µg ADPGK SLP（GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT（SEQ ID N° 3），Genscript）、50 µg 抗CD40 Mab（Clone FJK45，BioXCell）及100 µg pIC HMW（InvivoGen）之組合的200 µl PBS。

mRNA合成及純化

【0093】 根據如WO2015071295中所述之方案，藉由eTheRNA自eTheRNA質體pEthernA進行試管內轉錄（IVT）來製備加帽的非核苷修飾的E7及ADPGK mRNA。編碼HPV16-E7或ADPGK蛋白之序列在信號序列與人類DC-LAMP之跨膜及細胞質區之間進行同框選殖。此嵌合基因選殖於pEthernA質體中，該質體在5'端富含轉譯強化子且在3'端富含RNA穩定序列。在IVT後，藉由纖維素純化移除dsRNA。纖維素粉係購自Sigma，且在具有16%乙醇之1xSTE（氯化鈉-Tris-EDTA）緩衝液中洗滌。將IVT mRNA（在具有16%乙醇之1xSTE緩衝液中）添加

至經洗滌之纖維素集結粒中，且在室溫下震盪20分鐘。隨後將此溶液帶入真空過濾（Corning）。析出液含有ssRNA部分且用於所有實驗。mRNA品質藉由毛細管凝膠電泳（Agilent, Belgium）來監測。

基於mRNA脂質之奈米顆粒的產生

【0094】 基於脂質之奈米顆粒係藉由使用 NanoAssemblr Benchtop（Precision Nanosystems）以9 mL/min之速度，將乙酸鈉緩衝液（100 mM，pH4）中之mRNA溶液及脂質溶液以2:1之體積比進行微流體混合來產生。脂質溶液含有Coatsome-EC（NOF公司）、DOPE（Avanti）、膽固醇（Sigma）及以下PEG脂質中之一者之混合物：DMG-PEG2000（C14脂質）（Sunbright GM-020，NOF公司）、DPG-PEG2000（C16脂質）（Sunbright GP-020，NOF公司）、DSG-PEG2000（C18脂質）（Sunbright GS-020，NOF公司）。4種脂質以不同的莫耳比混合。使用slide-a-lyzer透析盒（20K MWCO，3 mL，熱固定器）針對TBS（TBS體積比LNP體積大10000倍）透析LNP。用Zetasizer Nano（Malvern）量測尺寸、多分散性及 ζ 電位。mRNA囊封百分比係藉由ribogreen分析（ThermoFisher）量測。

流動式細胞測量術

【0095】 在免疫接種後約6天，自經處理小鼠及對照小鼠採集血液。根據製造商說明書（MBL International），溶解紅血球且用APC標記之E7_(RAHYNIVTF)-四聚體（SEQ ID N° 1）或ADPGK（ASMTNMELM）-四聚體（SEQ ID N° 2）對剩餘白血球進行染色。洗掉過量四聚體。此後，將表面分子之抗體混合物（列於表2）添加至細胞中，且在4°C下培育30分鐘。在LSR Fortessa或Attune細胞計數器上獲取數據且用Flow Jo軟體分析。

表2：用於E7及Adpgk特異性T細胞之數目/百分比之流動式細胞測量術分析的抗體清單

抗體	螢光染料	純系	公司
活力染料	Zombie Aqua	n.a.	BioLegend
CD3	PerCPeF710	17A2	eBioscience (Thermo Fisher)
CD8	V450	53-6.7	BD Horizon

結果

選擇C18-PEG2000及低 %PEG

實施例1-E7抗原

【0096】 小鼠接受單次（圖1）或兩次（圖2）包裝於LNP（50/10/(40-x)/x可離子化脂質/DOPE/膽固醇/PEG-脂質）中之10 µg E7 mRNA的靜脈內投予。在免疫接種後6天測定血液中E7特異性CD8⁺ T細胞之百分比。圖1顯示，具有低百分比PEG（0.5%）之LNP誘導的抗原特異性免疫反應強於具有中等（1.5%）或高（4.5%）PEG百分比之LNP。圖1及圖2均說明DSG-PEG2000（C18）在引發免疫反應方面優於較短碳鏈PEG脂質，如DMG-PEG2000（C14）及DPG-PEG2000（C16）。

實施例2-ADPGK抗原

【0097】 小鼠接受四次包裝於低百分比PEG LNP（50/10/39.5/0.5可離子化脂質/DOPE/膽固醇/PEG-脂質）中之10 µg ADPGK mRNA或50 µg ADPGK合成長肽(SLP)的靜脈內投予。在第四次免疫接種後6天測定血液中ADPGK特異性CD8⁺ T細胞之百分比。DSG-PEG2000（C18）LNP在引發抗原特異性免疫反應方面優於DMG-PEG2000（C14）LNP（圖3）。兩種LNP均比SLP更具致免疫性。

實施例3-6之材料及方法

動物

【0098】 所有的小鼠實驗均在由UMC Utrecht之Utrecht動物福祉機構或Ghent University之動物倫理委員會之批准下進行。動物護理係根據已確立之準則。所有小鼠均無限制地獲得水及標準實驗室動物食物。雌性C57BL/6J小鼠係獲自Charles River Laboratories公司（德國/法國）。μMT小鼠係獲自The Jackson Laboratory（USA）。非人類靈長類動物之非GLP研究係根據當地法規在Chares River Laborotories（法國）進行。

mRNA合成及純化

【0099】 經密碼子最佳化之E7、TriMix及螢光素酶mRNA係藉由eTheRNA自eTheRNA質體試管內轉錄（IVT）來製備。不使用核苷酸修飾。用於DoE中之E7 mRNA經ARCA加帽。所有後續實驗均使用CleanCapped mRNA進行。在IVT後，藉由纖維素純化移除dsRNA。mRNA品質藉由毛細管凝膠電泳（Agilent, Belgium）來監測。

LNP產生及表徵

【0100】 對於生物分佈及細胞攝取研究，LNP以1:1之比率負載有編碼螢火蟲螢光素酶（Fluc）之mRNA（eTheRNA immunotherapies NV）及Cleanscap® Cy5標記之Fluc mRNA（TriLink Biotechnologies）之混合物。對於DoE致免疫性研究，LNP負載有E7 mRNA。所有其他研究均用比率為3:1:1:1之E7、CD40L、CD70及TLR4 mRNA之混合物進行。將mRNA稀釋於100 mM乙酸鈉緩衝液（pH 4）中，且將脂質溶解且稀釋於乙醇中。使用NanoAssemblr Benchtop微流體混合系統（Precision Nanosystems）混合mRNA及脂質溶液，隨後針對Tris緩衝生理鹽水（TBS，20 mM Tris，0.9% NaCl，pH 7.4）透析隔夜。使用Amicon Ultra離心

過濾器（10 kD）濃縮LNP。用Zetasizer Nano（Malvern）量測尺寸、多分散性指數及 ζ 電位。經由ribogreen分析（ThermoFisher）確定mRNA囊封效率。所有LNP之組成彙總於實施例3之表3中。

生物分佈及細胞攝取

【0101】 經由尾部靜脈向小鼠靜脈內注射含10 μ g mRNA之所選LNP調配物。在4小時後，用250 μ L戊巴比妥（6 mg/mL）麻醉小鼠。將血液樣品收集在具有凝膠凝血因子之管（Sarstedt）中。隨後，打開胸腔，切開門靜脈，且經由右心室用7 mL PBS灌注小鼠。移出器官且在液氮中急凍。對於肝臟及脾臟組織，將器官之一部分保持在冰冷的PBS中以進行流動式細胞測量術分析。

細胞攝取

【0102】 將肝臟及脾臟組織置於具有分別含1 mg/mL膠原蛋白酶A（Roche）或20 μ g/mL Liberase TM（Roche）及10 μ g/mL II級DNA酶I（Roche）之RPMI 1640培養基的培養皿中。使用手術刀將組織切碎且在37°C下培育30分鐘。隨後，使組織懸浮液通過100 μ m耐綸細胞過濾器。將肝臟懸浮液以70 x g離心3分鐘以移除實質細胞。將上清液及脾臟懸浮液以500 x g離心7分鐘以集結細胞。將紅血球溶解於ACK緩衝液（Gibco）中5分鐘，用PBS不活化，且隨後通過100 μ m細胞過濾器。細胞用含有1%胎牛血清（FBS）之RPMI 1640洗滌，與錐蟲藍混合其使用Luna-II自動化細胞計數器（Logos Biosystems）計數。將3 x 10⁵個（肝臟）或6 x 10⁵個（脾臟）活細胞接種於96孔盤中，以500 x g集結5分鐘且再懸浮於含有50%亮染色緩衝液（BD Biosciences）及2 μ g/mL TruStain FcX（BioLegend）之2% BSA的PBS溶液（2% PBSA）中。細胞在冰上培育10分鐘，且一式兩份地與含有適用抗體混合液（共三種）之2% PBSA 1:1混合。細胞在室

溫下在震盪器上培育15分鐘，用2% PBSA洗滌兩次且再懸浮於含有0.25 µg/mL 7-AAD活力染色劑（BioLegend）之2% PBSA中。在4雷射BD LSRFortessa流式細胞儀上獲取樣品。使用FlowJo軟體進行分析。

全身分佈

【0103】 解剖約50-100 mg各組織，稱重其置於具有一層約5 mm之1.4 mm 陶瓷珠的2 mL微管（Qiagen）中。對於每mg組織，添加3 µL冷的細胞培養物溶解試劑（Promega），且使用Mini-BeadBeater-8（BioSpec）在4°C下全速均質化組織60秒。將均質物儲存在-80°C下，解凍，在4°C下以10,000 x g離心10分鐘以移除珠粒及碎片，且將上清液再次儲存在-80°C下。將十微升各溶解物一式兩份地等分於白色96孔盤中。使用配備有注射器之SpectraMax iD3盤讀取器，在混合的同時將50 µL螢光素酶分析試劑（Promega）分配於各孔中，隨後延遲2秒且記錄螢光素酶發射10秒。將螢光素酶活性相對於獲自注射TBS之小鼠的器官溶解物的背景信號標準化。

T細胞反應

【0104】 小鼠經由尾部靜脈以每週一次の間隔用含10 µg mRNA之所選LNP進行靜脈內免疫接種。在免疫接種後5至7天採集用於流動式細胞測量術染色之血液。在紅血球溶解後，將細胞與FcR阻斷劑及活力染料一起培育。在培育及洗滌後，添加APC標記之E7（_{RAHYNIVTF}）-四聚體且在室溫下培育30分鐘。洗掉過量四聚體，向細胞中添加表面分子CD3、CD8之抗體混合物且在4°C下培育30分鐘。在3雷射AtuneNxt流式細胞儀或4雷射BD LSRFortessa流式細胞儀上獲取樣品。

【0105】 在第三次免疫接種後7天測定脾臟中細胞內細胞介素的產生。藉

由壓碎脾臟、溶解紅血球且在40 μ M細胞過濾器上過濾樣品來製備脾細胞之單細胞懸浮液。將200,000個細胞/孔/樣品一式兩份地接種於96孔盤中。添加4 μ g E7肽（Genscript）進行刺激，隨後在37°C下培育細胞。在肽刺激1小時後，添加GolgiPlug（BD Cytofix/Cytoperm套組（BD Biosciences））。將細胞再培育4小時。此後，將細胞與FcR阻斷劑及活力染料一起培育。在培育及洗滌後，添加APC標記之E7（_{RAHYNIVTF}）-四聚體且在室溫下培育30分鐘。洗掉過量四聚體，向細胞中添加表面分子CD3及CD8之抗體混合物且在4°C下培育30分鐘。其他步驟係根據BD Cytofix/Cytoperm套組（BD Biosciences）之製造商說明書。滲透後，針對IFN- γ 及TNF- α 對細胞進行染色。在4雷射BD LSRFortessa流式細胞儀上獲取樣品。使用FlowJo軟體進行分析。

免疫細胞活化

【0106】 經由尾部靜脈向小鼠靜脈內注射含5 μ g mRNA之所選LNP。4小時後收穫脾臟進行流動式細胞測量術染色。製備脾細胞之單細胞懸浮液，且在規則震盪下與消化緩衝液（具有DNase-1及膠原蛋白酶III之DMEM）一起培育20分鐘。此後，將樣品與Fc阻斷劑及活力染料一起培育。在培育及洗滌後，細胞用細胞譜系標記物及活化標記物染色。在3雷射AtuneNxt流式細胞儀上獲取樣品。使用FlowJo軟體進行分析。

TC-1腫瘤實驗

【0107】 TC-1細胞係獲自萊頓大學醫學中心（Leiden University Medical Center）。將含50萬個TC-1細胞之50 μ L PBS在小鼠右側腹皮下注射。使用測徑規進行腫瘤量測。腫瘤體積按（最小直徑²×最大直徑）/2來計算。將抗PD-1及同型對照抗體在PBS中新鮮稀釋至每隻小鼠200 μ L中200 μ g之濃度，且進行腹膜內注

射。小鼠接受抗PD-1抗體（單藥療法或與mRNA LNP免疫接種組合）或同型對照（與LNP免疫接種組合）。在第一次mRNA LNP免疫接種後3天開始，每3至4天注射一次抗體，且在最後一次LNP注射後2週結束。為了分析腫瘤浸潤淋巴細胞，在第二次mRNA LNP免疫接種後3天分離腫瘤，且將其置於填充有MACS組織儲存緩衝液（Miltenyi Biotec）之24孔盤中。將腫瘤切碎，且在規則震盪下在消化緩衝液中培育1小時。此後，溶解紅血球且在70 μ M細胞過濾器上過濾所有樣品。藉由ficoll-paque密度梯度純化富集淋巴細胞，隨後進行染色。首先，將細胞與FcR阻斷劑及活力染料一起培育。在培育及洗滌後，添加APC標記之E7（_{RAHYNIVTF}）-四聚體且在室溫下培育30分鐘。洗掉過量四聚體，向細胞中添加表面分子CD45及CD8之抗體混合物且在4°C下培育30分鐘。在3雷射AtuneNxt流式細胞儀上獲取樣品。使用FlowJo軟體進行分析。

發炎性細胞介素

【0108】 將血液樣品收集在具有凝膠凝血因子之管（Sarstedt）中。將凝結的血液樣品以10,000 g離心5分鐘以獲得血清。將血清樣品儲存於-80°C下直至分析。使用ProcartaPlex多重分析（ThermoFisher）測定發炎性細胞介素，諸如IFN- γ 、TNF- α 、IP-10之濃度。將血清樣品在分析緩衝液中稀釋3倍，且與螢光標記之珠粒一起培育120分鐘。根據方案進行其他步驟。在MagPix instrument（Luminex）上獲取樣品。使用ProcartaPlex Analyst軟體分析數據。

實施例3-DOE驅動之LNP組成的最佳化以獲得最大T細胞反應

【0109】 LNP庫係藉由將市售可離子化脂質Coatsome SS-EC與膽固醇、DOPE及PEG化脂質組合來創建。DOPE已為數種經批准之脂質體產品及正在研究的mRNA-疫苗之一部分。對於目前的實驗，探索包含DSG-PEG2000脂質之不

同LNP組成物。據描述，PEG-脂質之差異行為對靜脈內投予後siRNA LNP之藥物動力學及藥力學具有很大的影響。

【0110】 第一LNP庫經設計以解決脂質莫耳比及PEG-脂質化學物質是否確實影響由靜脈內mRNA-LNP疫苗接種引發之T細胞反應，且因此代表可經最佳化以提高疫苗效力的變數。SS-EC、DOPE及PEG-脂質之莫耳百分比視為獨立變數，而膽固醇視為一種填充脂質，以平衡莫耳百分比至100%。藉由使用DOE方法，創建涉及11種LNP之實驗設計（參見表3中之組成）。

	LNP 編號	脂質比率
		CoatsomeSS-EC/DOPE/膽固醇/PEG-脂質
DSG-PEF2000	LNP12	50/15/33.75/1.25
	LNP13	50/5/43.75/1.25
	LNP14	40.5/12.24/46.48/0.78
	LNP15	59.5/12.24/46.48/0.78
	LNP16	40.5/12.24/45.54/1.72
	LNP17	59.5/12.24/26.54/1.72
	LNP18	36.6/7.76/54.39/1.25
	LNP19	63.4/7.76/27.59/1.25
	LNP20	50/7.76/41.66/0.58
	LNP21	50/7.76/40.32/1.92
	LNP22	50/10/38.75/1.25

表3：DoE實驗中DSG-PEG2000 LNP之組成

【0111】 11種脂質比率在實驗域中均勻分佈（數據未示出）。對於致免疫性篩選，在三次靜脈內免疫接種後血液中E7特異性CD8 T細胞之百分比視為最大化的反應變數。為此，所有LNP均包裝編碼人類乳突狀瘤病毒16（HPV16）致癌蛋白E7之mRNA作為抗原。結果證實吾等之假設，亦即CD8 T細胞反應之幅度很大程度上視LNP組成物而定。數種mRNA-LNP疫苗引起超過50%之E7特異性CD8 T細胞反應，而其他mRNA-LNP疫苗幾乎不誘發任何反應（圖4a）。PEG-脂質化學物質及PEG-脂質之莫耳%鑑別為與E7特異性CD8 T細胞反應之幅度有關的關鍵參數。需要低莫耳百分比之PEG-脂質以實現最大T細胞反應（圖4b）。對於基於DSG-PEG2000之LNP，可離子化脂質之百分比亦對致免疫性具有顯著影響。

【0112】 將貝氏回歸建模（Bayesian regression modelling）應用於數據以創建反應表面模型（數據未示出），其可預測某一LNP組成物之致免疫性。PEG-脂質化學物質中之每一者之反應表面模型的品質由決定係數R²反映，其指示模型解釋基於輸入變數（SS-EC、DOPE及PEG-脂質百分比）之T細胞反應變異性的能力。對於DSG-PEG2000 LNP，獲得的平均R²值為0.74。為了驗證模型之預測值，評估2種新的LNP組成物（表4）。

LNP編號	脂質比率
	CoatsomeSS-EC/DOPE/膽固醇/DSG-PEG2000
LNP36	64/8/27.5/0.5
LNP37	42/12/44.5/1.5

表4：DoE實驗中DSG-PEG2000 LNP之組成

【0113】 用LNP36（DSG-PEG2000）免疫接種之小鼠有超過90%的概率引發>30%的E7特異性CD8 T細胞（最佳LNP），而預測LNP37（DSG-PEG2000）產生不良T細胞反應（非最佳LNP）（圖4c）。實驗數據與預測基本相符，因此成功驗證模型。所有用預測的最佳LNP免疫接種之小鼠確實均產生高於30%之E7特異性CD8 T細胞反應，而用LNP37免疫接種之小鼠均未引發高於此臨限值之T細胞反應（圖4c）。

實施例4-最佳mRNA LNP疫苗誘導高幅度T細胞反應

【0114】 癌症免疫療法之成功受多種因素影響，包括T細胞表型、功能及腫瘤浸潤。吾等首先評估由最佳LNP引發之T細胞反應的品質及可加強性。為此，小鼠在第0、7及14天接受三次初次免疫接種，隨後在第50天接受最後一次免疫接種。E7 mRNA補充有TriMix，亦即3種免疫刺激mRNA之混合物Bonehill等人，2008)，其增加T細胞反應之強度。

【0115】 在用E7-TriMix進行3次免疫接種後，血液中出现超過70%之E7特異性T細胞（圖5a）。在第三次免疫接種後五週，E7特異性CD8 T細胞之百分比保持高度升高。在投予最後一次加強免疫接種後，觀察到E7特異性效應T細胞之快

速擴增，因此證明疫苗可加強（圖5a）。每次免疫接種均測得血清中IFN- γ 之濃度較高（圖5b），反映E7特異性T細胞之數目增加。

【0116】 為了評估T細胞功能，吾等在用LNP36進行三次免疫接種後進行細胞內細胞介素染色。同時產生多於一種細胞介素之多功能CD8 T細胞與對感染性疾病及腫瘤之更佳控制相關且佔E7特異性CD8 T細胞之約30%（圖5c）。

實施例5-最佳mRNA LNP疫苗誘發腫瘤消退

【0117】 在藉由HPV16 E6/E7抗原之反轉錄病毒轉導產生之同基因型小鼠腫瘤模型TC-1中評估治療性抗腫瘤功效。當腫瘤之平均直徑達到55 mm³時，開始用LNP36遞送之5 μ g E7-TriMix進行治療。另外，小鼠用抗PD-1（或同型對照抗體）進行處理。PD-1在活化的T細胞上表現，且在與PD-L1相互作用時抑制T細胞功能且誘發耐受性。PD-1檢查點阻斷維持T細胞反應性，且經批准用於患有轉移性或不可切除的復發性HNSCC之患者的一線治療。LNP36疫苗接種使得TC-1腫瘤深入消退（圖5d）且顯著延長存活時間（圖5e），然而停止治療後腫瘤復發。抗PD1單藥療法未給攜帶TC-1之小鼠提供任何治療益處。LNP36免疫接種與抗PD-1之組合確實改善腫瘤生長控制。

【0118】 最後，吾等評估疫苗引發之T細胞到達腫瘤床之能力。用各自的mRNA-LNP疫苗進行兩次疫苗接種致使CD8⁺腫瘤浸潤性T細胞強力浸潤至腫瘤中（圖5f），其中超過70%對E7具有特異性（圖5g）。將抗PD-1添加至疫苗治療並未顯著改變進入腫瘤之E7特異性CD8 T細胞的百分比。

實施例6-最佳LNP增加攝取且活化脾臟中之免疫細胞

【0119】 為了解決所引發之T細胞反應的幅度與器官及細胞類型水準下mRNA攝取及表現之生物分佈之間是否存在相關性，吾等將Cy5標記之螢火蟲螢

光素酶mRNA囊封在先前針對致免疫性進行篩選之DSG-PEG2000 LNP中。在LNP注射後四小時，在分離的肝臟、脾臟、肺臟、心臟及腎臟中量測螢光素酶活性。如所預期，LNP組成物對mRNA表現之強度及器官特異性具有強烈影響。肝臟為主要目標器官，隨後為脾臟，但肝臟與脾臟之比率在LNP之間差異很大（圖6a）。在第三次免疫接種後E7特異性CD8 T細胞反應之幅度與脾臟表現正相關（數據未示出）。

【0120】 吾等接下來評估致免疫性是否與脾臟中特定免疫細胞類型之早期mRNA攝取及活化有關。LNP主要積聚於巨噬細胞及單核球中（圖6b）。在T細胞反應與脾臟巨噬細胞、單核球、漿細胞樣DC（pDC）及B細胞之LNP攝取之間存在強整體相關性（數據未示出）。

【0121】 為了進一步驗證脾臟中之mRNA攝取及表現的重要性，吾等比較最佳、高致免疫性LNP（LNP36）與非最佳、不良致免疫性LNP（LNP37）之生物分佈及細胞攝取概況。相對於非最佳LNP，LNP36顯著增加脾臟中之mRNA表現（圖6c）及脾臟單核球、巨噬細胞及DC之攝取（圖6d）。

【0122】 與用1,5% DSGPEG2000調配之LNP37相比，最佳mRNA LNP組成物LNP36觸發血液中更高的發炎性細胞介素水準及脾臟DC子集上之CD86表現升高（圖6g），表明先天性活化增加（圖6f）。

【0123】 最近，在非人類靈長類動物（NHP）中執行先導研究，以評估最佳LNP（LNP36）之轉譯值。在NHP中，脾臟展示每g組織中E7 mRNA之積聚量最高，其次為肝臟及骨髓（圖6e）。

結論

【0124】 LNP組成為在全身性投予mRNA疫苗後引發之T細胞反應的關鍵決定因素。與含有DPG-PEG2000及DMG-PEG2000之LNP相比，具有DSG-

PEG2000作為LNP穩定化PEG-脂質之LNP引發增加的T細胞反應。此外，將DSG-PEG2000之莫耳百分比降低至0,5-0,9%強烈增加T細胞反應。藉由此類經最佳化之LNP組成物遞送之mRNA疫苗誘發高幅度/高品質T細胞反應，其可藉由重複投予來加強且賦予鼠類同基因型腫瘤模型之抗腫瘤功效。在機理上，最佳LNP組成物之特徵在於脾臟中之mRNA表現增加，涉及各種抗原呈現細胞類型之mRNA攝取增加。最佳LNP調配物觸發脾臟樹突狀細胞之活化增加，且致使血液中之IFN- α 及IP-10的釋放增強。

【符號說明】

無

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種mRNA疫苗，其包含一或多種脂質奈米顆粒，該等脂質奈米顆粒包含：

約45-65 mol%之可離子化脂質；

約4-15 mol%之磷脂；

固醇；

PEG脂質；及

一或多種mRNA分子；

其特徵在於該LNP包含小於約1 mol%之該PEG脂質；較佳約且在0.5-0.9 mol%之間之該PEG脂質。

【請求項2】一種用於mRNA疫苗接種之脂質奈米顆粒（LNP），該LNP包含：

約45-65 mol%之可離子化脂質；

約4-15 mol%之磷脂；

固醇；

PEG脂質；及

一或多種mRNA分子；

其特徵在於該LNP包含小於約1 mol%之該PEG脂質；較佳約且在0.5-0.9 mol%之間之該PEG脂質。

【請求項3】一種脂質奈米顆粒（LNP），其包含：

約45-65 mol%之可離子化脂質；

約4-15 mol%之磷脂；

固醇；

PEG脂質；及

一或多種核酸分子；

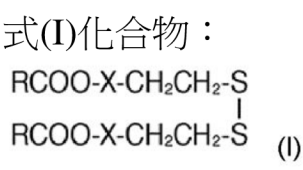
特徵在於該PEG脂質為C18-PEG2000脂質；且該LNP包含小於約1 mol%之該PEG脂質；較佳約且在0.5-09 mol%之間之該PEG脂質。

【請求項4】如請求項3之脂質奈米顆粒，其中該C18-PEG2000脂質係選自包含以下者之清單：(基於二硬脂醯基的)-PEG2000脂質，諸如DSG-PEG2000脂質或DSPE-PEG2000脂質；或(基於二油醯基的)-PEG2000脂質，諸如DOG-PEG2000脂質或DOPE-PEG2000脂質。

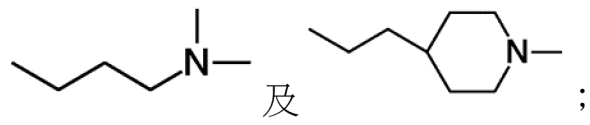
【請求項5】如請求項3至4中任一項之脂質奈米顆粒，其中該可離子化脂質係選自包含以下者之清單：

1,1'-((2-(4-(2-((2-(雙(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)哌啶-1-基)乙基)胺二基 (azanediyl))雙(十二烷-2-醇)(C12-200)；

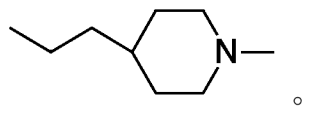
二9,12-十八碳二烯基 (linoleyl) 甲基-4-二甲基胺基丁酸酯 (DLin-MC3-DMA)；
或



其中：
RCOO係選自包含以下者之清單：肉豆蔻醯基、α-D-生育酚琥珀醯基、亞麻油醯基及油醯基；且X係選自包含以下者之清單：



較佳地，該可離子化脂質為式(I)之脂質，其中RCOO為α-D-生育酚琥珀醯基且X為



【請求項6】如請求項3至5中任一項之脂質奈米顆粒，其中該磷脂係選自包含以下者之清單：DOPE、DOPC及其等之混合物。

【請求項7】如請求項3至6中任一項之脂質奈米顆粒，其中該固醇係選自包含以下者之清單：膽固醇、麥角固醇、菜油固醇、氧固醇 (oxysterol)、薄孔菌固醇 (antrosterol)、鏈固醇 (desmosterol)、尼卡固醇 (nicasterol)、穀固醇 (sitosterol) 及豆固醇；較佳為膽固醇。

【請求項8】一種脂質奈米顆粒，其包含：
大於60 mol%之該可離子化脂質；
約8 mol%之該磷脂；
約0.5-0.9 mol%之該PEG脂質；及
由該固醇之量平衡。

【請求項9】一種脂質奈米顆粒，其包含：
約64 mol%之該可離子化脂質；
約8 mol%之該磷脂；
約0.5-0.9 mol%之該PEG脂質；及
由該固醇之量平衡。

【請求項10】一種脂質奈米顆粒，其包含：
約64 mol%之該可離子化脂質；
約8 mol%之該磷脂；
約0.5 mol%之該PEG脂質；及
由該固醇之量平衡。

【請求項11】如請求項3至10中任一項之脂質奈米顆粒，其中該一或多種核酸分子係選自包含mRNA及DNA之清單，較佳為mRNA。

【請求項12】如請求項3至11中任一項之脂質奈米顆粒，其中該一或多種mRNA分子係選自編碼免疫調節多肽之mRNA及/或編碼抗原之mRNA之群。

【請求項13】如請求項12之脂質奈米顆粒，其中該編碼免疫調節之mRNA係

選自包含編碼CD40L、CD70及caTLR4之mRNA分子的清單。

【請求項14】一種醫藥組成物或疫苗，其包含一或多種如請求項3至13中任一項之脂質奈米顆粒及可接受之醫藥載劑。

【請求項15】如請求項3至13中任一項之脂質奈米顆粒或如請求項14之醫藥組成物或疫苗，其用於人類或獸醫學；諸如例如用於治療癌症或感染性疾病。

【發明圖式】

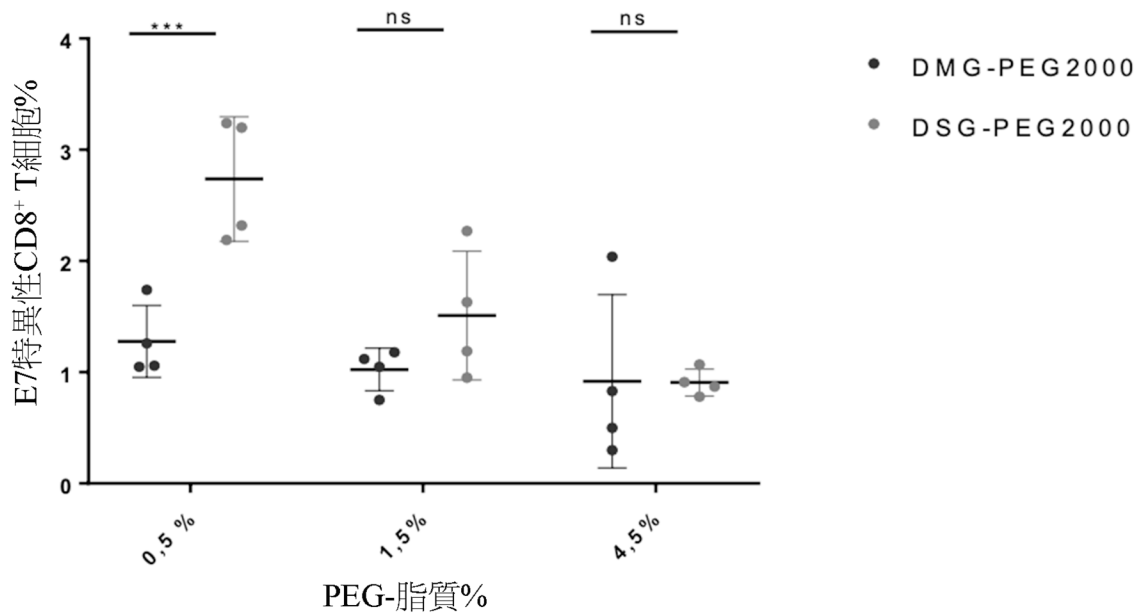


圖1

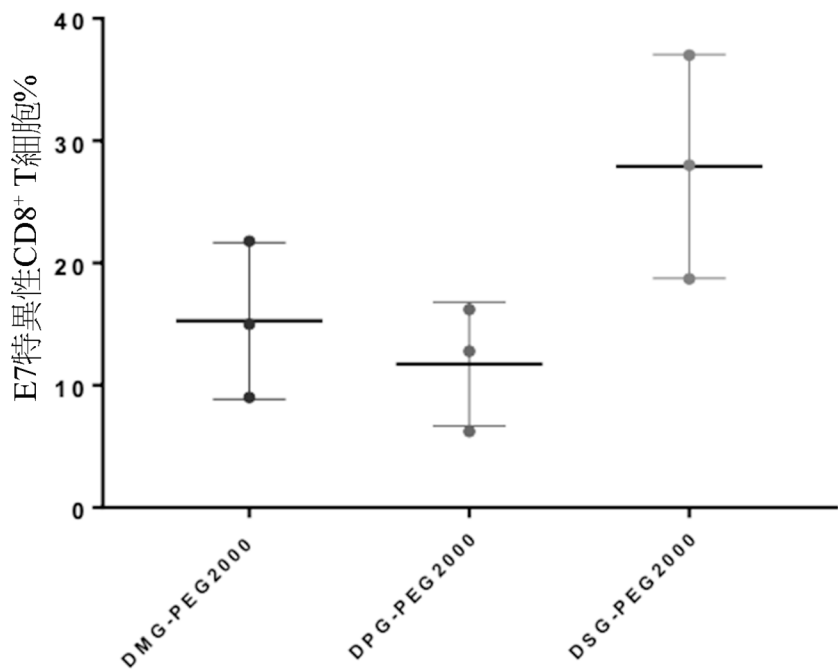


圖2

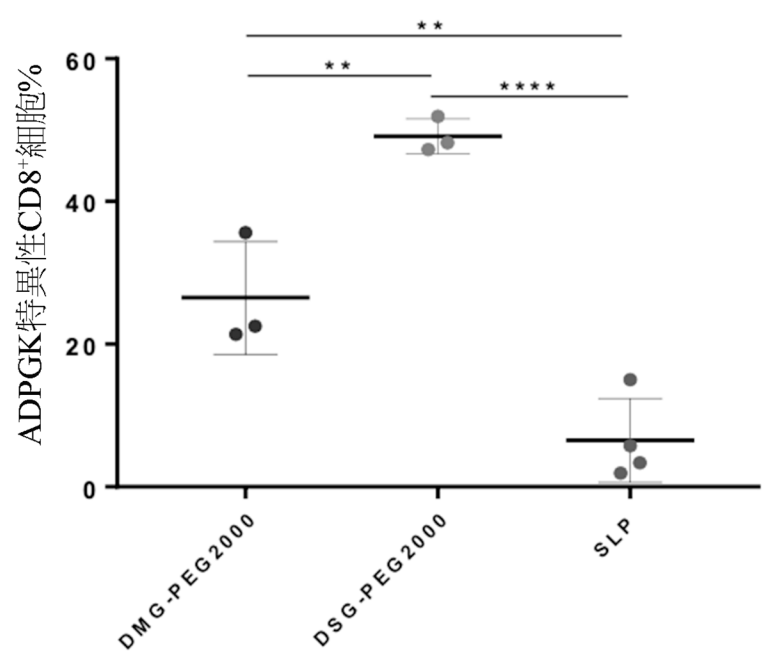


圖3

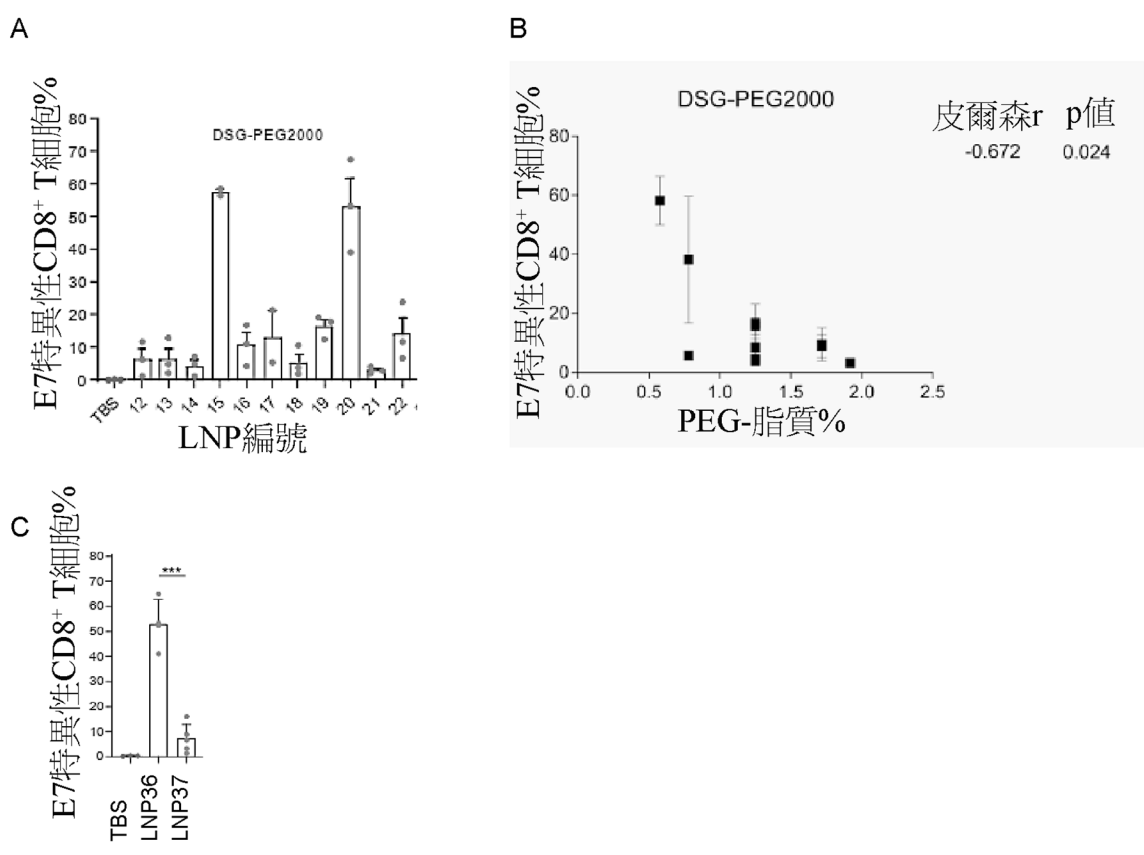


圖4

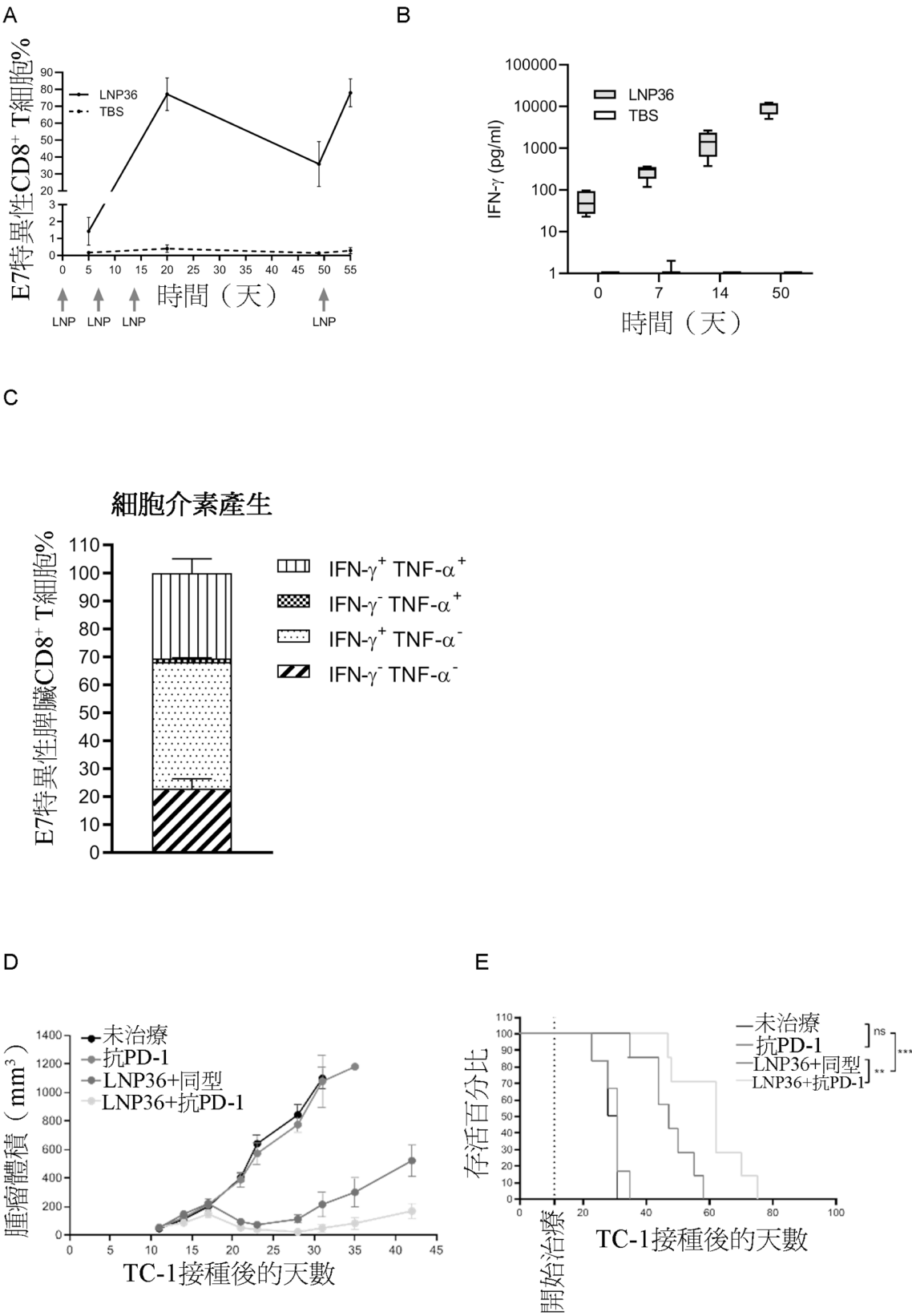


圖5

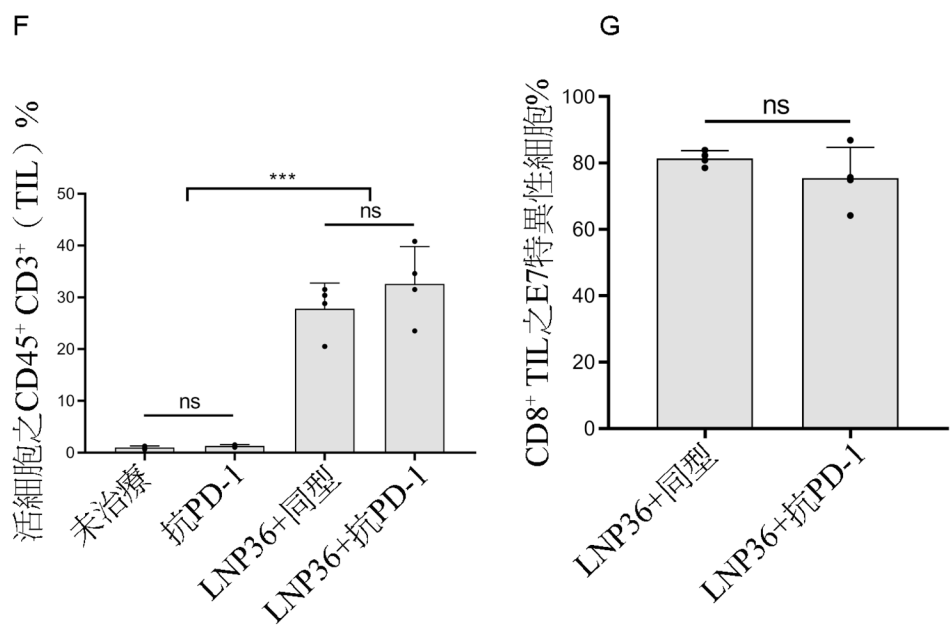


圖5 (續)

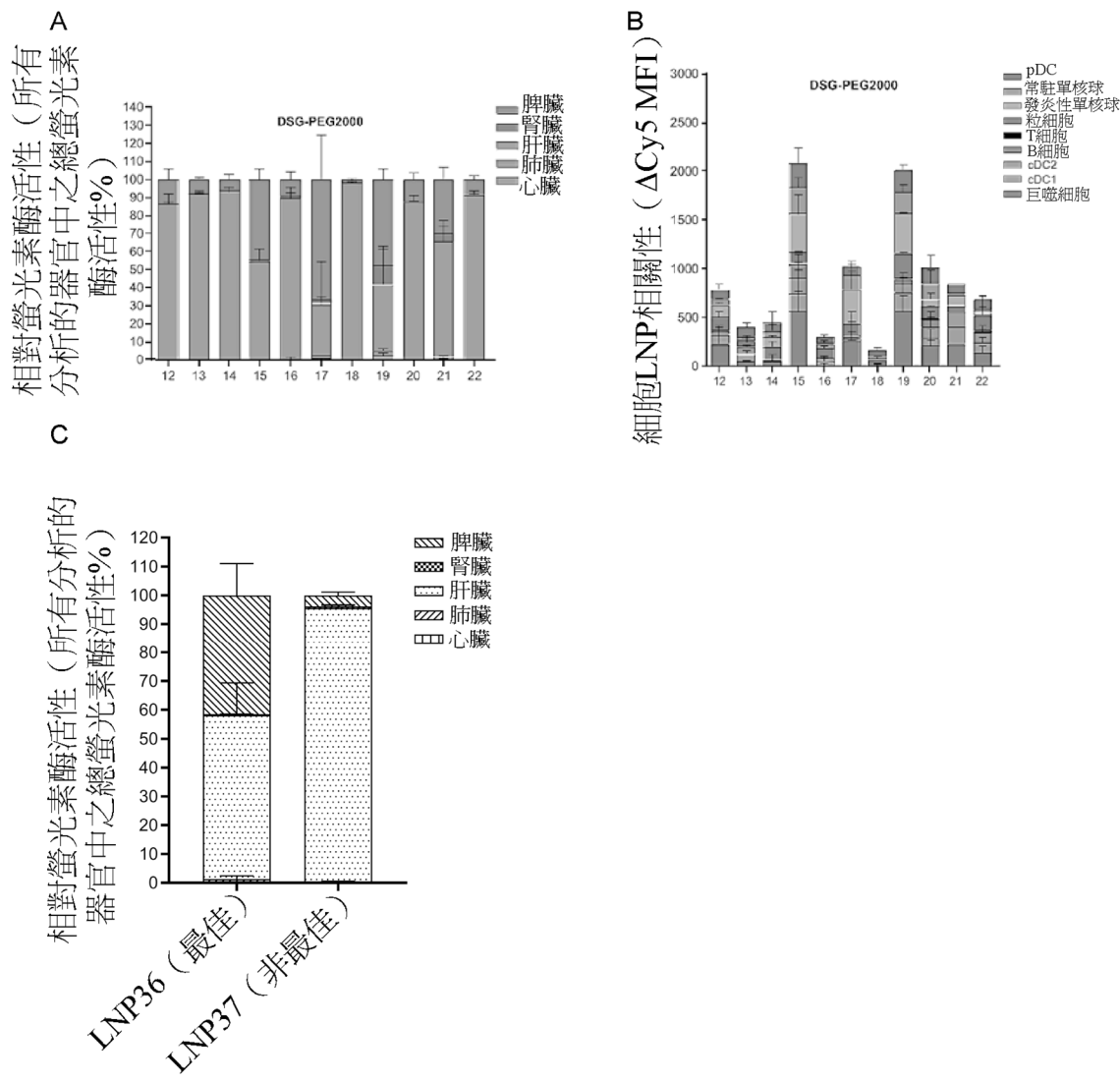


圖6

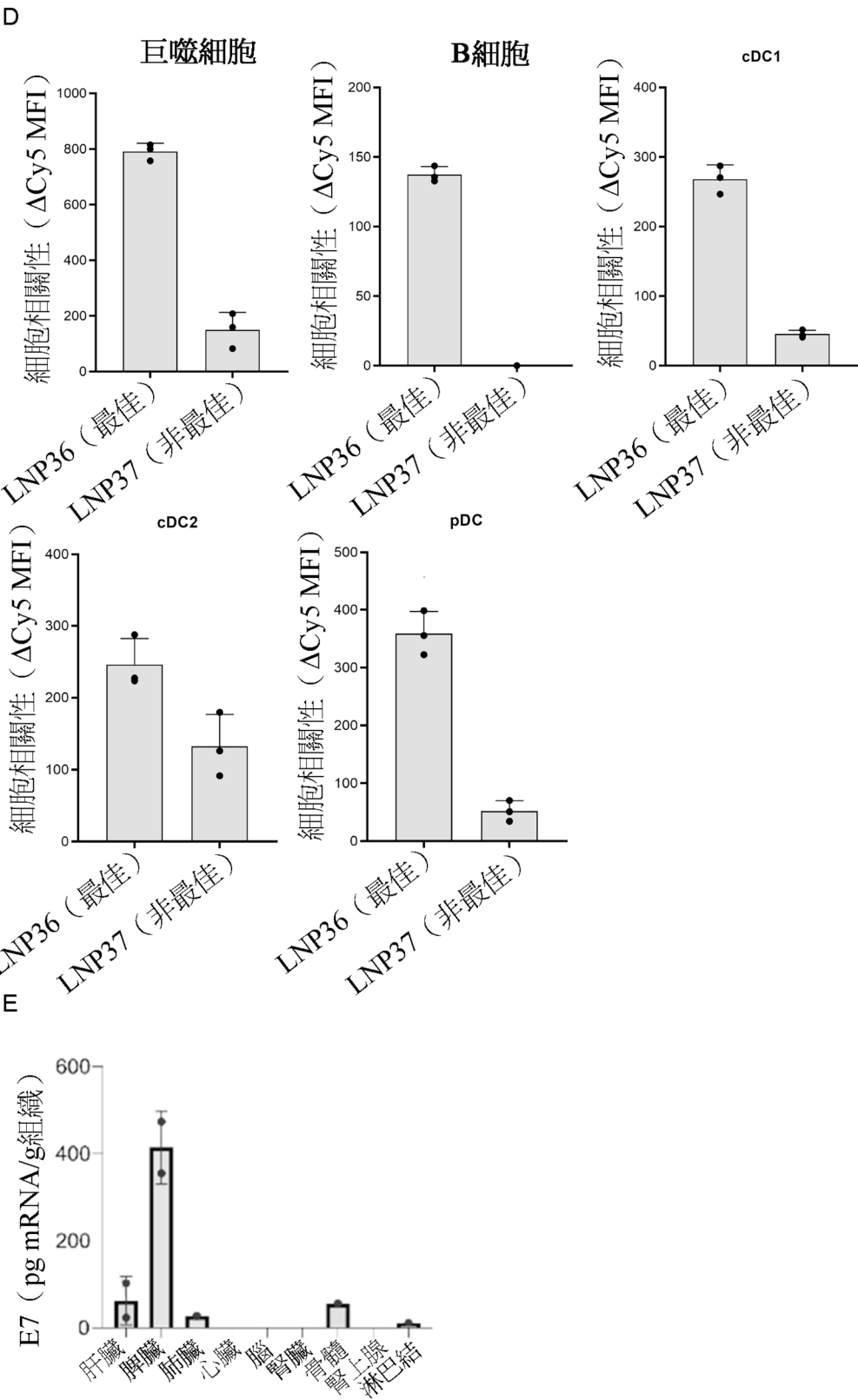
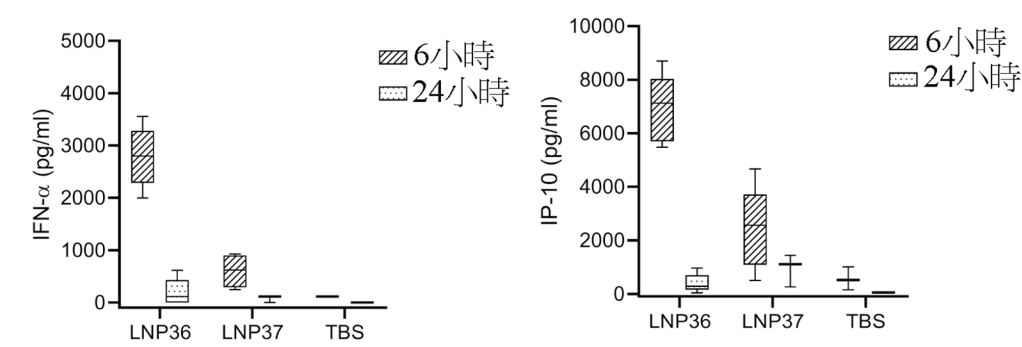


圖6 (續)

F



G

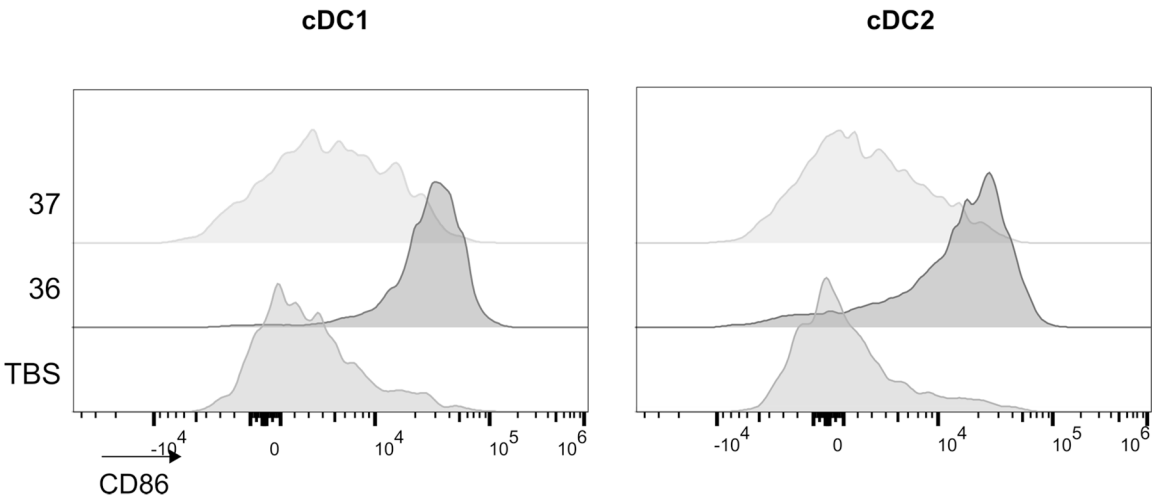


圖6（續）