



(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 202139976 A

(43)公開日：中華民國 110 (2021) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：110103606

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 01 月 29 日

(51)Int. Cl.：

*A61K9/127 (2006.01)**A61K47/10 (2006.01)**A61K47/12 (2006.01)**A61K47/14 (2006.01)**C12N15/88 (2006.01)*

(30)優先權：2020/01/31 美國

62/968,337

(71)申請人：美商現代公司 (美國) MODERNATX, INC. (US)

美國

(72)發明人：史密斯 麥可 SMITH, MIKE (US)；奧爾 傑森 AUER, JASON (US)；斯金納 布里 SKINNER, BRIE (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：148 項 圖式數：4 共 269 頁

(54)名稱

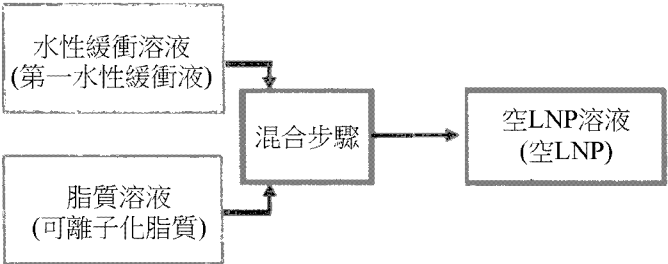
製備脂質奈米顆粒之方法

(57)摘要

本發明提供產生脂質奈米顆粒(LNP)調配物之方法及其所產生之 LNP 調配物。本發明亦提供與所產生之 LNP 調配物相關之治療及診斷用途。

The present disclosure provides methods of producing lipid nanoparticle (LNP) formulations and the produced LNP formulations thereof. The present disclosure also provides therapeutic and diagnostic uses related to the produced LNP formulations.

指定代表圖：



【圖2】



202139976

【發明摘要】

【中文發明名稱】

製備脂質奈米顆粒之方法

【英文發明名稱】

METHODS OF PREPARING LIPID NANOPARTICLES

【中文】

本發明提供產生脂質奈米顆粒(LNP)調配物之方法及其所產生之LNP調配物。本發明亦提供與所產生之LNP調配物相關之治療及診斷用途。

【英文】

The present disclosure provides methods of producing lipid nanoparticle (LNP) formulations and the produced LNP formulations thereof. The present disclosure also provides therapeutic and diagnostic uses related to the produced LNP formulations.

【指定代表圖】

圖2

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

製備脂質奈米顆粒之方法

【英文發明名稱】

METHODS OF PREPARING LIPID NANOPARTICLES

【技術領域】

【0001】 本發明提供產生核酸脂質奈米顆粒(LNP)之新穎方法、其所產生的調配物以及相關治療及/或診斷用途，諸如涉及核酸脂質奈米顆粒遞送一或多種治療劑及/或預防劑(諸如核酸)至哺乳動物細胞或器官及/或在哺乳動物細胞或器官中產生多肽之方法。

【先前技術】

【0002】 有效地靶向遞送諸如小分子藥物、蛋白質及核酸之生物活性物質代表了一種持續的醫學挑戰。詳言之，由於該等物質之相對不穩定性及低細胞滲透性，使得核酸至細胞之遞送變得困難。因此，需要開發促進諸如核酸之治療劑及預防劑遞送至細胞之方法及組合物。

【0003】 已證明含脂質之奈米顆粒或脂質奈米顆粒、脂質體及脂質體複合物有效地作為諸如小分子藥物、蛋白質及核酸之生物活性物質轉運至細胞及/或細胞內隔室中之媒劑。儘管多種該等含脂質之奈米顆粒已得到證明，仍缺乏安全性、功效及特異性之改良。

【發明內容】

【0004】 在一些態樣中，本發明提供一種製備空脂質奈米顆粒(空LNP)之方法，該方法包含：

i) 混合步驟，包含使可離子化脂質與第一緩衝劑混合，由此形成

空LNP，其中該空LNP包含約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質。

【0005】 在一些態樣中，本發明提供一種製備空脂質奈米顆粒(空LNP)之方法，該方法包含：

i) 混合步驟，包含使可離子化脂質與第一緩衝劑混合，由此形成空LNP。

【0006】 在一些實施例中，該混合步驟包含使包含可離子化脂質之脂質溶液與包含第一緩衝劑之水性緩衝溶液混合，由此形成包含空LNP之空脂質奈米顆粒溶液(空LNP溶液)。

【0007】 在一些態樣中，本發明提供一種空LNP，其包含約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質。

【0008】 在一些態樣中，本發明提供一種包含空LNP之空LNP溶液，其中該空LNP包含約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質。

【0009】 在一些態樣中，本發明提供一種製備與核酸締合之負載脂質奈米顆粒(負載LNP)之方法，該方法包含：

ii) 裝載步驟，包含使核酸與空LNP混合，由此形成負載LNP。

【0010】 在一些態樣中，本發明提供一種製備與核酸締合之負載脂質奈米顆粒(負載LNP)之方法，該方法包含：

i) 混合步驟，包含使可離子化脂質與第一緩衝劑混合，由此形成空LNP；及

ii) 裝載步驟，包含使核酸與空LNP混合，由此形成負載LNP。

【0011】 在一些態樣中，本發明提供一種製備包含核酸之負載脂質奈米顆粒(負載LNP)之方法，該方法包含：

ii) 裝載步驟，包含使核酸與空LNP混合，由此形成負載LNP。

【0012】 在一些態樣中，本發明提供一種製備包含核酸之負載脂質奈米顆粒(負載LNP)之方法，該方法包含：

i) 混合步驟，包含使可離子化脂質與第一緩衝劑混合，由此形成空LNP；及

ii) 裝載步驟，包含使核酸與空LNP混合，由此形成負載LNP。

【0013】 在一些態樣中，本發明提供一種製備包含治療劑之負載脂質奈米顆粒(負載LNP)之方法，該方法包含：

ii) 裝載步驟，包含使治療劑與空LNP混合，由此形成負載LNP。

【0014】 在一些態樣中，本發明提供一種製備包含治療劑之負載脂質奈米顆粒(負載LNP)之方法，該方法包含：

i) 混合步驟，包含使可離子化脂質與第一緩衝劑混合，由此形成空LNP；及

ii) 裝載步驟，包含使治療劑與空LNP混合，由此形成負載LNP。

【0015】 在一些實施例中，該裝載步驟包含使包含核酸之核酸溶液與空LNP溶液混合，由此形成包含負載LNP之負載脂質奈米顆粒溶液(負載LNP溶液)。

【0016】 在一些態樣中，本發明方法進一步包含：

iii) 處理空LNP溶液或負載LNP溶液，由此形成脂質奈米顆粒調配物(LNP調配物)。

【0017】 在一些態樣中，本發明提供藉由本發明方法製備之空LNP。

【0018】 在一些態樣中，本發明提供藉由本發明方法製備之空LNP溶液。

【0019】 在一些態樣中，本發明提供藉由本發明方法製備之負載LNP。

【0020】 在一些態樣中，本發明提供藉由本發明方法製備之負載LNP溶液。

【0021】 在一些態樣中，本發明提供藉由本發明方法製備之LNP調配物。

【0022】 在一些態樣中，本發明提供一種包含本發明之脂質奈米顆粒(LNP)之製劑。

【0023】 在一些態樣中，本發明提供一種包含本發明之脂質奈米顆粒(LNP)之製劑，其中該等LNP實質上不含治療劑或預防劑，且其中該製劑包含具有在約2 mM與約40 mM之間的濃度之乙酸鹽緩衝液。

【0024】 在一些態樣中，本發明提供一種包含脂質奈米顆粒(LNP)之製劑，其中

(a) 該等LNP包含：

約40 mol%至約50 mol%可離子化脂質，

約30 mol%至約50 mol%結構脂質，

約5 mol%至約20 mol%磷脂，及

約0.1 mol%至約1.25 mol% PEG脂質；

(b) 該等LNP實質上不含治療劑或預防劑；且

(c) 該製劑包含具有在約2 mM與約40 mM之間的濃度之乙酸鹽緩衝液。

【0025】 在一些態樣中，本發明提供一種治療或預防疾病或病症之方法，該方法包含向有需要之個體投與本發明之負載LNP。

【0026】 在一些態樣中，本發明提供一種治療或預防疾病或病症之方法，該方法包含向有需要之個體投與本發明之負載LNP溶液。

【0027】 在一些態樣中，本發明提供一種治療或預防疾病或病症之方法，該方法包含向有需要之個體投與本發明之LNP調配物。

【0028】 在一些態樣中，本發明提供一種用於治療或預防個體之疾病或病症之負載LNP。

【0029】 在一些態樣中，本發明提供一種用於治療或預防個體之疾病或病症之負載LNP溶液。

【0030】 在一些態樣中，本發明提供一種用於治療或預防個體之疾病或病症之LNP調配物。

【0031】 在一些態樣中，本發明提供負載LNP在製造用於治療或預防疾病或病症之藥劑中之用途。

【0032】 在一些態樣中，本發明提供負載LNP溶液在製造用於治療或預防疾病或病症之藥劑中之用途。

【0033】 在一些態樣中，本發明提供一種醫藥套組，其包含空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物。

【0034】 在一些態樣中，本發明提供一種醫藥套組，其包含空LNP及核酸溶液。在一些態樣中，本發明提供一種醫藥套組，其包含空LNP溶液及核酸溶液。

【0035】 在一些態樣中，本發明提供一種包含空LNP之容器。在一些態樣中，本發明提供一種包含空LNP及核酸溶液之容器。在一些態樣中，本發明提供一種包含空LNP溶液之容器。在一些態樣中，本發明提供一種包含空LNP溶液及核酸溶液之容器。在一些實施例中，該容器為聚四

氟乙烯(PTFE)袋。

【0036】 除非另外規定，否則本文所用之所有技術及科學術語均具有如本發明所屬領域之一般技術者通常所理解之相同意義。儘管與本文所述之彼等類似或等效的方法及材料可用於本發明之實踐或測試中，但下文描述合適方法及材料。本文所提及之所有公開案、專利申請案、專利及其他參考文獻均以引用之方式整體併入。當發生衝突時，將以本說明書(包括定義)為準。另外，該等材料、方法及實例僅為說明性的且不意欲為限制性的。

【0037】 本發明之其他特徵及優勢將由下文實施方式及申請專利範圍顯而易知。

【圖式簡單說明】

【0038】 本專利或申請檔案含有至少一張彩色附圖。帶有彩色附圖之本專利或專利申請公開案之副本將由專利局在要求且支付必要費用後提供。

【0039】

圖1係證明負載LNP之直徑隨PEG添加之mol%變化的圖表。

圖2係說明製備包含空LNP之空LNP溶液之一般過程的圖。

圖3係說明由包含空LNP之空LNP溶液製備LNP調配物之一般過程的圖。

圖4係說明製備LNP調配物之一般過程的圖。

【實施方式】

相關申請案

【0040】 本申請案主張2020年1月31日提出申請之美國臨時申請案

第62/968,337號之優先權及權益，該臨時申請案之完整內容以引用之方式併入本文中。

【0041】 本發明部分地基於以下發現：如本文所揭示之製造脂質奈米顆粒(LNP)或脂質奈米顆粒調配物(LNP調配物)之方法可影響及/或規定該等脂質奈米顆粒內的某些組分之分佈，且此分佈可影響及/或規定脂質奈米顆粒之物理(例如穩定性)及/或生物(例如功效、細胞內遞送、免疫原性)特性。

【0042】 在一些實施例中，本發明方法減輕所產生之脂質奈米顆粒(LNP)或脂質奈米顆粒調配物(LNP調配物)之非所需特性變化。在一些實施例中，如與藉由可比較方法(例如，不具有本發明方法之一或多個步驟的方法)產生之LNP或LNP調配物相比，本發明方法減輕所產生之脂質奈米顆粒(LNP)或脂質奈米顆粒調配物(LNP調配物)之非所需特性變化。

【0043】 在一些實施例中，非所需特性變化係由脂質奈米顆粒調配物(LNP調配物)或脂質奈米顆粒(LNP)上之應力引起的。在一些實施例中，該應力在產生、純化、包裝、儲存、運輸及/或使用脂質奈米顆粒調配物(LNP調配物)或脂質奈米顆粒期間經誘導。在一些實施例中，該應力為熱、剪切、過度攪拌、膜濃度極化(電荷狀態變化)、脫水、冷凍應力、乾燥應力、冷凍/解凍應力及/或噴霧應力。在一些實施例中，該應力在儲存脂質奈米顆粒調配物(LNP調配物)或脂質奈米顆粒(LNP)期間經誘導。

【0044】 在一些實施例中，非所需特性變化為LNP調配物之物理穩定性的降低。在一些實施例中，非所需特性變化為LNP調配物中之雜質及/或亞可見顆粒之量的增加，或LNP之平均大小的增加。

【0045】 在一些實施例中，非所需特性變化為LNP調配物之化學穩

定性的降低。在一些實施例中，非所需特性變化為LNP調配物中之核酸(例如RNA (例如mRNA))之完整性的降低。

【0046】 在一些實施例中，非所需特性變化為LNP調配物之生物特性的降低。在一些實施例中，非所需特性變化為LNP調配物之功效、細胞內遞送及/或免疫原性的降低。

【0047】 在一些實施例中，藉由本發明方法產生之LNP調配物比藉由可比較方法產生之LNP調配物更穩定(例如，LNP之平均大小不隨時間增加)。

【0048】 在一些實施例中，藉由本發明方法產生之LNP的平均直徑係藉由可比較方法產生之LNP調配物的平均LNP直徑之約99%或更低、約98%或更低、約97%或更低、約96%或更低、約95%或更低、約90%或更低、約85%或更低、約80%或更低、約75%或更低、約70%或更低、約65%或更低、約60%或更低、約55%或更低、約50%或更低、約40%或更低、約30%或更低、約20%或更低或約10%或更低。

【0049】 在一些實施例中，本發明之脂質奈米顆粒(LNP)具有約15 nm至約150 nm、約20 nm至約125 nm、約25 nm至約100 nm、約30 nm至約80 nm、約35 nm至約70 nm、約40 nm至約60 nm或約45 nm至約50 nm之平均直徑。

【0050】 在一些實施例中，藉由本發明方法產生之空LNP的平均直徑係藉由可比較方法產生之空LNP的平均直徑之約99%或更低、約98%或更低、約97%或更低、約96%或更低、約95%或更低、約90%或更低、約85%或更低、約80%或更低、約75%或更低、約70%或更低、約65%或更低、約60%或更低、約55%或更低、約50%或更低、約40%或更低、約

30%或更低、約20%或更低或約10%或更低。

【0051】 在一些實施例中，本發明之空LNP具有約15 nm至約150 nm、約20 nm至約125 nm、約25 nm至約100 nm、約30 nm至約80 nm、約35 nm至約70 nm、約40 nm至約60 nm或約45 nm至約50 nm之平均直徑。

【0052】 在一些實施例中，藉由本發明方法產生之LNP調配物的功效、細胞內遞送及/或免疫原性高於藉由可比較方法產生之LNP調配物的功效、細胞內遞送及/或免疫原性。

【0053】 在一些實施例中，藉由本發明方法產生之LNP調配物的功效、細胞內遞送及/或免疫原性比藉由可比較方法產生之LNP調配物的功效、細胞內遞送及/或免疫原性高約5%或更高、約10%或更高、約15%或更高、約20%或更高、約30%或更高、約40%或更高、約50%或更高、約60%或更高、約70%或更高、約80%或更高或約90%或更高。在一些實施例中，藉由本發明方法產生之LNP調配物的功效、細胞內遞送及/或免疫原性比藉由可比較方法產生之LNP調配物的功效、細胞內遞送及/或免疫原性高約1倍或更高、約2倍或更高、約3倍或更高、約4倍或更高、約5倍或更高、約10倍或更高、約20倍或更高、約30倍或更高、約40倍或更高、約50倍或更高、約100倍或更高、約200倍或更高、約300倍或更高、約400倍或更高、約500倍或更高、約1000倍或更高、約2000倍或更高、約3000倍或更高、約4000倍或更高、約5000倍或更高或約10000倍或更高。

【0054】 在一些實施例中，藉由本發明方法產生之LNP調配物展現高於藉由可比較方法產生之LNP調配物的核酸表現(例如mRNA表現)之核

酸表現(例如mRNA表現)。

【0055】 在一些實施例中，藉由本發明方法產生之LNP調配物展現比藉由可比較方法產生之LNP調配物的核酸表現(例如mRNA表現)高約5%或更高、約10%或更高、約15%或更高、約20%或更高、約30%或更高、約40%或更高、約50%或更高、約60%或更高、約70%或更高、約80%或更高或約90%或更高之核酸表現(例如mRNA表現)。在一些實施例中，藉由本發明方法產生之LNP調配物展現比藉由可比較方法產生之LNP調配物的核酸表現(例如mRNA表現)高約1倍或更高、約2倍或更高、約3倍或更高、約4倍或更高、約5倍或更高、約10倍或更高、約20倍或更高、約30倍或更高、約40倍或更高、約50倍或更高、約100倍或更高、約200倍或更高、約300倍或更高、約400倍或更高、約500倍或更高、約1000倍或更高、約2000倍或更高、約3000倍或更高、約4000倍或更高、約5000倍或更高或約10000倍或更高之核酸表現(例如mRNA表現)。

【0056】 本發明提供新穎「床邊(bedside)」及/或「定點照護(point-of-care)」調配物，由此mRNA可經封裝於早期製備之預形成之囊泡(例如，空LNP)內。此產生模式在臨床供應之背景中具有優勢，因為此等囊泡(例如，空LNP)可在臨床化合物設定中在與mRNA重組之前單獨地產生及儲存。特定言之，床邊調配物可促進增加之穩定性，因為mRNA及空的原材料(例如，空LNP)可儲存於獨立最佳化條件下。由於LNP製備獨立於負荷(cargo)存在，過程複雜性及產品成本可降低，從而為多種mRNA或活性劑構築體提供一種平台方法。空LNP加上mRNA形式可在本文中稱為「事後裝載」(PHL)、「事後添加」或「事後」。

【0057】 本發明部分地基於以下努力：探索事後裝載之基本原理，

且在空LNP產生之後的時間尺度上研究mRNA添加之影響及條件。在脂質沉澱之後，mRNA添加之時間已向上變化了七個數量級(例如1 ms至10,000,000 ms)，而未不利地影響調配物之物理化學特性(例如粒徑、囊封、形態及/或結構完整性)。鑑於習知mRNA作為脂質沉澱反應之入口水流內的關鍵組分包括在內，物理化學特性之相似性令人驚訝且不直觀。此外，經常描述寡核苷酸參與早期顆粒組裝步驟。經驗實驗之結果表明，mRNA囊封在時間尺度上之存在可顯著長於脂質沉澱/顆粒形成，而未不利地影響LNP物理化學特性。彼等實驗證明，脂質顆粒形成及後續mRNA囊封可分為兩個反應步驟。如本文所述之事後裝載的概念可使得能夠獨立地控制及/或最佳化每個步驟。此外，事後裝載可使得能夠在時間尺度(例如，空LNP產生之後的數月或數年)上進行mRNA添加，從而使得能夠產生定點照護調配物。

【0058】 長期以來，尚未開發出以適合臨床供應之規模產生預形成之空脂質奈米顆粒(空LNP)之製程。本發明部分地基於確定有利於規模化產生之多種過程參數，包括但不限於脂質濃度、PEG-脂質或聚合物脂質的量、溫度、緩衝液組成(例如，離子強度、pH、抗衡離子)及乙醇含量。

【0059】 本發明部分地基於以下發現：如本文所揭示之產生脂質奈米顆粒(LNP)或脂質奈米顆粒(LNP)調配物之方法可影響及/或規定該等脂質奈米顆粒內的某些組分之分佈，且此分佈可影響及/或規定脂質奈米顆粒之物理(例如穩定性)及/或生物(例如功效、細胞內遞送、免疫原性)特性。

【0060】 在一些實施例中，本發明產生包含具有有利組分分佈之脂質奈米顆粒之組合物。

【0061】 在一些實施例中，藉由本發明方法產生之LNP調配物展現高於藉由可比較方法產生之LNP調配物的核酸表現(例如mRNA表現)之核酸表現(例如mRNA表現)。

【0062】 在一些實施例中，藉由本發明方法產生之LNP調配物展現比藉由可比較方法製備之LNP調配物的核酸表現(例如mRNA表現)高約5%或更高、約10%或更高約15%或更高、約20%或更高、約30%或更高、約40%或更高、約50%或更高、約60%或更高、約70%或更高、約80%或更高或約90%或更高之核酸表現(例如mRNA表現)。在一些實施例中，藉由本發明方法產生之LNP調配物展現比藉由可比較方法製備之LNP調配物的核酸表現(例如mRNA表現)高約1倍或更高、約2倍或更高、約3倍或更高、約4倍或更高、約5倍或更高、約10倍或更高、約20倍或更高、約30倍或更高、約40倍或更高、約50倍或更高、約100倍或更高、約200倍或更高、約300倍或更高、約400倍或更高、約500倍或更高、約1000倍或更高、約2000倍或更高、約3000倍或更高、約4000倍或更高、約5000倍或更高或約10000倍或更高之核酸表現(例如mRNA表現)。

本發明方法

【0063】 本發明提供一種產生空脂質奈米顆粒(空LNP)之方法，該方法包含：i)混合步驟，包含使可離子化脂質與第一緩衝劑混合，由此形成空LNP，其中該空LNP包含約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質或其他聚合物脂質。

【0064】 在一些實施例中，該混合步驟包含使包含可離子化脂質之脂質溶液與包含第一緩衝劑之水性緩衝溶液混合，由此形成包含空LNP之空脂質奈米顆粒溶液(空LNP溶液)。

【0065】 在一些態樣中，本發明提供一種製備與核酸締合之負載脂質奈米顆粒(負載LNP)之方法，該方法包含：ii)裝載步驟，包含使核酸與空LNP混合，由此形成負載LNP。

【0066】 在本發明方法之一些實施例中，該裝載步驟包含使包含核酸之核酸溶液與空LNP溶液混合，由此形成包含負載LNP之負載脂質奈米顆粒溶液(負載LNP溶液)。

【0067】 在本發明方法之一些實施例中，空LNP或空LNP溶液在無保存或儲存之情況下經歷裝載步驟。

【0068】 在本發明方法之一些實施例中，空LNP或空LNP溶液在保存一段時期之後經歷裝載步驟。

【0069】 在本發明方法之一些實施例中，空LNP或空LNP溶液在保存約1分鐘、約2分鐘、約3分鐘、約4分鐘、約5分鐘、約10分鐘、約20分鐘、約30分鐘、約40分鐘、約50分鐘、約1小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時、約9小時、約10小時、約11小時、約12小時、約18小時或約24小時之後經歷裝載步驟。

【0070】 在本發明方法之一些實施例中，空LNP或空LNP溶液在儲存約1小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時、約9小時、約10小時、約11小時、約12小時、約18小時、約1天、約2天、約3天、約4天、約5天、約6天、約1週、約2週、約3週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約1年、約2年、約3年、約4年或約5年之後經歷裝載步驟。

【0071】 在本發明方法之一些實施例中，在形成之後，空LNP或空

LNP溶液在未儲存或保存一段時期之情況下經歷裝載步驟。

【0072】 在一些態樣中，本發明方法進一步包含：iii)處理空LNP溶液或負載LNP溶液，由此形成脂質奈米顆粒調配物(LNP調配物)。

【0073】 在一些態樣中，本發明方法進一步包含處理負載LNP溶液，由此形成負載脂質奈米顆粒調配物(負載LNP調配物)。

【0074】 在一些態樣中，本發明方法進一步包含處理空LNP溶液，由此形成空脂質奈米顆粒調配物(空LNP調配物)。

【0075】 與其他產生技術(例如薄膜再水合/擠壓)形成對比，乙醇滴沉澱(ethanol-drop precipitation)已成為用於產生核酸脂質奈米顆粒之工業標準(例如「標準製程」)。沉澱反應因其連續性、可擴展性及易用性而受到青睞。彼等製程通常使用高能混合器(例如T型接頭、受限衝擊射流、微流體混合器、渦旋混合器)以可控制方式將脂質(在乙醇中)引入合適反溶劑(亦即，水)中，從而驅動液體過飽和及自發沉澱成脂質顆粒。在一些實施例中，所用之渦旋混合器係描述於美國專利申請案第62/799,636號及第62/886,592號中之彼等，該等美國專利申請案以引用之方式整體併入本文中。在一些實施例中，所用之微流體混合器係描述於PCT申請案第WO/2014/172045號中之彼等，該PCT申請案以引用之方式整體併入本文中。

【0076】 在本發明方法之一些實施例中，該混合步驟用T形接頭、受限衝擊射流、微流體混合器或渦旋混合器執行。

【0077】 在一些實施例中，該裝載步驟用T形接頭、受限衝擊射流、微流體混合器或渦旋混合器執行。

【0078】 在本發明方法之一些實施例中，該混合步驟在小於約

30°C、小於約28°C、小於約26°C、小於約24°C、小於約22°C、小於約20°C或小於約環境溫度之溫度下執行。

【0079】 在本發明方法之一些實施例中，該裝載步驟在小於約30°C、小於約28°C、小於約26°C、小於約24°C、小於約22°C、小於約20°C或小於約環境溫度之溫度下執行。

【0080】 在本發明方法之一些實施例中，該處理空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟包含第一添加步驟，該第一添加步驟包含將聚乙二醇脂質(PEG脂質)添加至空LNP溶液或負載LNP溶液中。

【0081】 在本發明方法之一些實施例中，第一添加步驟包含將包含PEG脂質之聚乙二醇溶液(PEG溶液)添加至空LNP溶液或負載LNP溶液中。

【0082】 在本發明方法之一些實施例中，該處理空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟包含第二添加步驟，該第二添加步驟包含將聚乙二醇脂質(PEG脂質)添加至空LNP溶液或負載LNP溶液中。

【0083】 在本發明方法之一些實施例中，第二添加步驟包含將包含PEG脂質之聚乙二醇溶液(PEG溶液)添加至空LNP溶液或負載LNP溶液中。

【0084】 在本發明方法之一些實施例中，第一添加步驟包含將約0.1 mol%至約3.0 mol% PEG、約0.2 mol%至約2.5 mol% PEG、約0.5 mol%至約2.0 mol% PEG、約0.75 mol%至約1.5 mol% PEG、約1.0 mol%至約1.25 mol% PEG添加至空LNP或負載LNP中。

【0085】 在本發明方法之一些實施例中，第一添加步驟包含將約0.1 mol%至約3.0 mol% PEG、約0.2 mol%至約2.5 mol% PEG、約0.5 mol%

至約2.0 mol% PEG、約0.75 mol%至約1.5 mol% PEG、約1.0 mol%至約1.25 mol% PEG添加至空LNP或負載LNP中。

【0086】 在一些實施例中，第一添加步驟包含將約1.75 mol% PEG脂質添加至空LNP或負載LNP中。

【0087】 在本發明方法之一些實施例中，第二添加步驟包含將約0.1 mol%至約3.0 mol% PEG、約0.2 mol%至約2.5 mol% PEG、約0.5 mol%至約2.0 mol% PEG、約0.75 mol%至約1.5 mol% PEG、約1.0 mol%至約1.25 mol% PEG添加至空LNP或負載LNP中。

【0088】 在本發明方法之一些實施例中，第二添加步驟包含將約0.1 mol%至約3.0 mol% PEG、約0.2 mol%至約2.5 mol% PEG、約0.5 mol%至約2.0 mol% PEG、約0.75 mol%至約1.5 mol% PEG、約1.0 mol%至約1.25 mol% PEG添加至空LNP或負載LNP中。

【0089】 在本發明方法之一些實施例中，第二添加步驟包含將約1.0 mol% PEG脂質添加至空LNP或負載LNP中。

【0090】 在本發明方法之一些實施例中，第一添加步驟在小於約30°C、小於約28°C、小於約26°C、小於約24°C、小於約22°C、小於約20°C或小於約環境溫度之溫度下執行。

【0091】 在本發明方法之一些實施例中，第二添加步驟在小於約30°C、小於約28°C、小於約26°C、小於約24°C、小於約22°C、小於約20°C或小於約環境溫度之溫度下執行。

【0092】 在本發明方法之一些實施例中，該處理空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含選自過濾、pH調節、緩衝液交換、稀釋、透析、濃縮、冷凍、凍乾、儲存及包裝之至少一個步驟。

【0093】 在本發明方法之一些實施例中，該處理空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含pH調節。

【0094】 在本發明方法之一些實施例中，pH調節包含添加第二緩衝劑，該第二緩衝劑係選自由乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液及tris緩衝液組成之群。

【0095】 在本發明方法之一些實施例中，第一添加步驟在pH調節之前執行。

【0096】 在本發明方法之一些實施例中，第一添加步驟在pH調節之後執行。

【0097】 在本發明方法之一些實施例中，第二添加步驟在pH調節之前執行。

【0098】 在本發明方法之一些實施例中，第二添加步驟在pH調節之後執行。

【0099】 在本發明方法之一些實施例中，該處理空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含過濾。

【0100】 在本發明方法之一些實施例中，該過濾為切向流過濾(TFF)。

【0101】 在本發明方法之一些實施例中，該過濾自LNP溶液中移除有機溶劑(例如醇或乙醇)。在一些實施例中，在移除有機溶劑(例如醇或乙醇)之後，該LNP溶液轉化為在中性pH、pH 6.5至7.8、pH 6.8至pH 7.5，較佳地pH 7.0至pH 7.2下(例如磷酸鹽或HEPES緩衝液)緩衝之溶液。在一些實施例中，該LNP溶液轉化為在約7.0 pH至約7.2 pH下緩衝之溶液。在一些實施例中，所得LNP溶液在儲存或使用之前，例如藉由過濾

(例如，經由0.1-0.5 μm 過濾器)滅菌。

【0102】 在本發明方法之一些實施例中，該處理空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含緩衝液交換。

【0103】 在本發明方法之一些實施例中，緩衝液交換包含添加包含第三緩衝劑之水性緩衝溶液。

【0104】 在一些實施例中，第一添加步驟在緩衝液交換之前執行。

【0105】 在本發明方法之一些實施例中，第一添加步驟在緩衝液交換之後執行。

【0106】 在本發明方法之一些實施例中，第二添加在緩衝液交換之前執行。

【0107】 在本發明方法之一些實施例中，第二添加步驟在緩衝液交換之後執行。

【0108】 在本發明方法之一些實施例中，該處理空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含稀釋。

【0109】 在一些實施例中，該處理空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含透析。

【0110】 在本發明方法之一些實施例中，該處理空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含濃縮。

【0111】 在本發明方法之一些實施例中，該處理空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含冷凍。

【0112】 在本發明方法之一些實施例中，該處理空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含凍乾。

【0113】 在本發明方法之一些實施例中，該凍乾包含在約-100°C至

約0°C、約-80°C至約-10°C、約-60°C至約-20°C、約-50°C至約-25°C或約-40°C至約-30°C之溫度下冷凍負載LNP溶液。

【0114】 在本發明方法之一些實施例中，該凍乾進一步包含乾燥冷凍之負載LNP溶液以形成凍乾之空LNP或凍乾之負載LNP。

【0115】 在本發明方法之一些實施例中，乾燥在介於約50毫托至約150毫托範圍內之真空下執行。

【0116】 在一些實施例中，乾燥在約-35°C至約-15°C下執行。

【0117】 在本發明方法之一些實施例中，乾燥在約室溫至約25°C下執行。

【0118】 在本發明方法之一些實施例中，該處理空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含儲存空LNP溶液或負載LNP溶液。

【0119】 在一些實施例中，該處理空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含包裝。

【0120】 如本文所用，「包裝」可指藥物產品呈其最終狀態儲存，或空LNP、負載LNP、空LNP溶液、負載LNP溶液或LNP調配物在置於最終封裝中之前的過程中儲存。儲存及/或包裝模式包括但不限於無菌袋中冷藏、小瓶中之冷藏或冷凍調配物、小瓶及注射器中之凍乾調配物等。

【0121】 在本發明方法之一些實施例中，該包裝空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟包含以下步驟中之一或多者：

iib) 向空LNP溶液或負載LNP溶液中添加冷凍保護劑；

iic) 凍乾空LNP溶液或負載LNP溶液，由此形成凍乾之LNP組合物；

iid) 儲存凍乾之LNP組合物的空LNP溶液或負載LNP溶液；及

ii) 向空LNP溶液、負載LNP溶液或凍乾之LNP組合物中添加緩衝溶液，由此形成LNP調配物。

【0122】 在本發明方法之一些實施例中，該冷凍保護劑在凍乾之前添加至空LNP溶液或負載LNP溶液中。在一些實施例中，該冷凍保護劑包含一或多種冷凍保護劑，且該一或多種冷凍保護劑中之每一者獨立地為多元醇(例如二醇或三元醇，諸如丙二醇(亦即，1,2-丙二醇)、1,3-丙二醇、甘油、(+/-)-2-甲基-2,4-戊二醇、1,6-己二醇、1,2-丁二醇、2,3-丁二醇、乙二醇或二乙二醇)、非清潔劑磺基甜菜鹼(例如NDSB-201 (3-(1-吡啶基)-1-丙烷磺酸酯)、滲壓劑(例如L-脯胺酸或三甲胺N-氧化物二水合物)、聚合物(例如聚乙二醇200 (PEG 200)、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 3350、PEG 4000、PEG 8000、PEG 10000、PEG 20000、聚乙二醇單甲醚550 (mPEG 550)、mPEG 600、mPEG 2000、mPEG 3350、mPEG 4000、mPEG 5000、聚乙烯吡咯啶酮(例如聚乙烯吡咯啶酮K 15)、新戊四醇丙氧基化物或聚丙二醇P 400)、有機溶劑(例如二甲亞砜(DMSO)或乙醇)、糖(例如D-(+)-蔗糖、D-山梨糖醇、海藻糖、D-(+)-麥芽糖單水合物、間赤藻糖醇、木糖醇、肌醇、D-(+)-蜜三糖五水合物、D-(+)-海藻糖二水合物或D-(+)-葡萄糖單水合物)或鹽(例如，乙酸鋰、氯化鋰、甲酸鋰、硝酸鋰、硫酸鋰、乙酸鎂、氯化鈉、甲酸钠、丙二酸钠、硝酸鈉、硫酸鈉或其任何水合物)或其任何組合。在一些實施例中，該冷凍保護劑包含蔗糖。在一些實施例中，該冷凍保護劑及/或賦形劑為蔗糖。

【0123】 在一些實施例中，空LNP溶液、負載LNP溶液或凍乾之LNP組合物在添加緩衝溶液之前儲存於約-40°C至約0°C、約-35°C至約-5°C、約-30°C至約-10°C、約-25°C至約-15°C、約-22°C至約-18°C或約-

21°C至約-19°C之溫度下。

脂質溶液

【0124】 在一些實施例中，本發明方法提供脂質溶液。

【0125】 在一些實施例中，該脂質溶液包含可離子化脂質。

【0126】 在一些實施例中，該脂質溶液進一步包含磷脂、PEG脂質、結構脂質或其任何組合。

【0127】 在一些實施例中，該脂質溶液進一步包含囊封劑。

【0128】 在一些實施例中，該脂質溶液包含可離子化脂質。在一些實施例中，該脂質溶液包含濃度大於約0.01 mg/mL、約0.05 mg/mL、約0.06 mg/mL、約0.07 mg/mL、約0.08 mg/mL、約0.09 mg/mL、約0.1 mg/mL、約0.15 mg/mL、約0.2 mg/mL、約0.3 mg/mL、約0.4 mg/mL、約0.5 mg/mL、約0.6 mg/mL、約0.7 mg/mL、約0.8 mg/mL、約0.9 mg/mL或約1.0 mg/mL之可離子化脂質。在一些實施例中，該脂質溶液包含濃度為約0.01 mg/mL至約1.0 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.9 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.8 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.7 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.6 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.5 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.4 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.3 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.2 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.1 mg/mL、約0.05 mg/mL至約1.0 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.9 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.8 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.7 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.6 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.5 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.4 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.3 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.2 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.1 mg/mL、約0.1 mg/mL至約1.0 mg/mL、約0.2 mg/mL至約0.9 mg/mL、約0.3

mg/mL至約0.8 mg/mL、約0.4 mg/mL至約0.7 mg/mL或約0.5 mg/mL至約0.6 mg/mL之可離子化脂質。在一些實施例中，該脂質溶液包含濃度為至多約5.0 mg/mL、至多約4.0 mg/mL、至多約3.0 mg/mL、至多約2.0 mg/mL、至多約1.0 mg/mL、至多約0.09 mg/mL、至多約0.08 mg/mL、至多約0.07 mg/mL、至多約0.06 mg/mL或至多約0.05 mg/mL之可離子化脂質。

【0129】 在一些實施例中，該脂質溶液包含可離子化脂質。在一些實施例中，該脂質溶液包含濃度大於約0.1 mg/mL、大於約0.5 mg/mL、大於約0.6 mg/mL、大於約0.7 mg/mL、大於約0.8 mg/mL、大於約0.9 mg/mL、大於約1.0 mg/mL、大於約1.5 mg/mL、大於約2.0 mg/mL、大於約3.0 mg/mL、大於約4.0 mg/mL、大於約5.0 mg/mL、大於約6.0 mg/mL、大於約7.0 mg/mL、大於約8.0 mg/mL、大於約9.0 mg/mL、大於約10 mg/mL、大於約11 mg/mL、大於約12 mg/mL、大於約13 mg/mL、大於約14 mg/mL、大於約15 mg/mL、大於約20 mg/mL、大於約25 mg/mL或大於約30 mg/mL之可離子化脂質。在一些實施例中，該脂質溶液包含濃度為約0.1 mg/mL至約20.0 mg/mL、約0.1 mg/mL至約19 mg/mL、約0.1 mg/mL至約18 mg/mL、約0.1 mg/mL至約17 mg/mL、約0.1 mg/mL至約16 mg/mL、約0.1 mg/mL至約15 mg/mL、約0.1 mg/mL至約14 mg/mL、約0.1 mg/mL至約13 mg/mL、約0.1 mg/mL至約12 mg/mL、約0.1 mg/mL至約11 mg/mL、約0.5 mg/mL至約10.0 mg/mL、約0.5 mg/mL至約9 mg/mL、約0.5 mg/mL至約8 mg/mL、約0.5 mg/mL至約7 mg/mL、約0.5 mg/mL至約6 mg/mL、約0.5 mg/mL至約5.0 mg/mL、約0.5 mg/mL至約4 mg/mL、約0.5 mg/mL至約3 mg/mL、約0.5 mg/mL至約

2 mg/mL、約0.5 mg/mL至約1 mg/mL、約1 mg/mL至約20 mg/mL、約1 mg/mL至約15 mg/mL、約1 mg/mL至約12 mg/mL、約1 mg/mL至約10 mg/mL或約1 mg/mL至約8 mg/mL之可離子化脂質。在一些實施例中，該脂質溶液包含濃度為至多約30 mg/mL、約25 mg/mL、約20 mg/mL、約18 mg/mL、約16 mg/mL、約15 mg/mL、約14 mg/mL、約12 mg/mL、約10 mg/mL、約8 mg/mL、約6 mg/mL、約5.0 mg/mL、約4.0 mg/mL、約3.0 mg/mL、約2.0 mg/mL、約1.0 mg/mL、約0.09 mg/mL、約0.08 mg/mL、約0.07 mg/mL、約0.06 mg/mL或約0.05 mg/mL之可離子化脂質。

【0130】 在一些實施例中，該脂質溶液包含在水性緩衝液及/或有機溶液中之可離子化脂質。在一些實施例中，該脂質溶液進一步包含緩衝劑及/或鹽。例示性合適緩衝劑包括但不限於硫酸銨、碳酸氫鈉、檸檬酸鈉、乙酸鈉、磷酸鉀、磷酸鈉、HEPES及其類似物。在一些實施例中，該脂質溶液包含濃度為約0.1 mM至約100 mM、約0.5 mM至約90 mM、約1.0 mM至約80 mM、約2 mM至約70 mM、約3 mM至約60 mM、約4 mM至約50 mM、約5 mM至約40 mM、約6 mM至約30 mM、約7 mM至約20 mM、約8 mM至約15 mM、約9 mM至約12 mM之緩衝劑。在一些實施例中，該脂質溶液包含濃度為或大於約0.1 mM、約0.5 mM、約1 mM、約2 mM、約4 mM、約6 mM、約8 mM、約10 mM、約15 mM、約20 mM、約25 mM、約30 mM、約35 mM、約40 mM、約45 mM或約50 mM之緩衝劑。例示性合適鹽包括但不限於氯化鉀、氯化鎂、氯化鈉及其類似物。

【0131】 在一些實施例中，該脂質溶液之pH為約4.5至約7.0、約4.6至約7.0、約4.8至約7.0、約5.0至約7.0、約5.5至約7.0、約6.0至約7.0、

約6.0至約6.9、約6.0至約6.8、約6.0至約6.7、約6.0至約6.6、約6.0至約6.5。在一些實施例中，該脂質溶液之pH為約7.0至約8.0、約7.1至約7.8、約7.2至約7.6或約7.3至約7.5。

【0132】 在一些實施例中，合適脂質溶液之pH為4.5或不大於4.5、4.6或不大於4.6、4.7或不大於4.7、4.8或不大於4.8、4.9或不大於4.9、5.0或不大於5.0、5.2或不大於5.2、5.4或不大於5.4、5.6或不大於5.6、5.8或不大於5.8、6.0或不大於6.0、6.1或不大於6.1、6.2或不大於6.2、6.3或不大於6.3、6.4或不大於6.4、6.5或不大於6.5、6.6或不大於6.6、6.7或不大於6.7、6.8或不大於6.8、6.9或不大於6.9或7.0或不大於7.0。

【0133】 在一些實施例中，相對於該脂質溶液之總體積，該脂質溶液包含約1體積%至約50體積%之第一有機溶劑。在一些實施例中，相對於脂質奈米顆粒調配物之總體積，該脂質溶液包含約2體積%至約45體積%之該有機溶劑。在一些實施例中，相對於脂質奈米顆粒調配物之總體積，該脂質溶液包含約3體積%至約40體積%之該有機溶劑。在一些實施例中，相對於脂質奈米顆粒調配物之總體積，該脂質溶液包含約4體積%至約35體積%之該有機溶劑。在一些實施例中，相對於脂質奈米顆粒調配物之總體積，該脂質溶液包含約5體積%至約33體積%之該有機溶劑。

【0134】 在一些實施例中，該第一有機溶劑為醇。

【0135】 在一些實施例中，該有機溶劑為乙醇。

緩衝劑

【0136】 在一些實施例中，本發明方法提供緩衝劑。在一些實施例中，本發明方法提供第一緩衝劑、第二緩衝劑、第三緩衝劑或其組合。

【0137】 在一些實施例中，第一水性緩衝溶液包含第一緩衝劑。在

一些實施例中，合適溶液可進一步包含一或多種緩衝劑及/或鹽。例示性緩衝劑包括但不限於硫酸銨、碳酸氫鈉、檸檬酸鈉、乙酸鈉、磷酸鉀、參(羥基甲基)胺基甲烷(tris)、磷酸鈉、HEPES及其類似物。在一些實施例中，第一水性緩衝溶液包含濃度為約0.1 nM至約100 mM、約0.5 nM至約90 mM、約1.0 nM至約80 mM、約2 nM至約70 mM、約3 nM至約60 mM、約4 nM至約50 mM、約5 nM至約40 mM、約6 nM至約30 mM、約7 nM至約20 mM、約8 nM至約15 mM、約9-12 mM之第一緩衝劑。在一些實施例中，第一水性緩衝溶液包含濃度為約0.1 mM或大於約0.1 mM、約0.5 mM或大於約0.5 mM、約1 mM或大於約1 mM、約2 mM或大於約2 mM、約4 mM或大於約4 mM、約6 mM或大於約6 mM、約8 mM或大於約8 mM、約10 mM或大於約10 mM、約15 mM或大於約15 mM、約20 mM或大於約20 mM、約25 mM或大於約25 mM、約30 mM或大於約30 mM、約35 mM或大於約35 mM、約40 mM或大於約40 mM、約45 mM或大於約45 mM或約50 mM或大於約50 mM之第一緩衝劑。例示性合適鹽包括但不限於氯化鉀、氯化鎂、氯化鈉及其類似物。

【0138】 在一些實施例中，第一緩衝劑包含第一水性緩衝液。在一些實施例中，合適溶液可進一步包含一或多種水性緩衝液及/或鹽。例示性合適水性緩衝液包括但不限於硫酸銨、碳酸氫鈉、檸檬酸鈉、乙酸鈉、磷酸鉀、參(羥基甲基)胺基甲烷(tris)、磷酸鈉、HEPES及其類似物。在一些實施例中，第一水性緩衝液包含濃度為約0.1 nM至約100 mM、約0.5 nM至約90 mM、約1.0 nM至約80 mM、約2 nM至約70 mM、約3 nM至約60 mM、約4 nM至約50 mM、約5 nM至約40 mM、約6 nM至約30 mM、約7 nM至約20 mM、約8 nM至約15 mM、約9-12 mM之水性緩衝液。在

一些實施例中，第一水性緩衝液包含濃度為約0.1 mM或大於約0.1 mM、約0.5 mM或大於約0.5 mM、約1 mM或大於約1 mM、約2 mM或大於約2 mM、約4 mM或大於約4 mM、約6 mM或大於約6 mM、約8 mM或大於約8 mM、約10 mM或大於約10 mM、約15 mM或大於約15 mM、約20 mM或大於約20 mM、約25 mM或大於約25 mM、約30 mM或大於約30 mM、約35 mM或大於約35 mM、約40 mM或大於約40 mM、約45 mM或大於約45 mM或約50 mM或大於約50 mM之水性緩衝液。例示性合適鹽包括但不限於氯化鉀、氯化鎂、氯化鈉及其類似物。

【0139】 在一些實施例中，第一水性緩衝溶液之pH為約4.5至約7.0、約4.6至約7.0、約4.8至約7.0、約5.0至約7.0、約5.5至約7.0、約6.0至約7.0、約6.0至約6.9、約6.0至約6.8、約6.0至約6.7、約6.0至約6.6、約6.0至約6.5。在一些實施例中，第一水性緩衝溶液之pH為4.5或不大於4.5、4.6或不大於4.6、4.7或不大於4.7、4.8或不大於4.8、4.9或不大於4.9、5.0或不大於5.0、5.2或不大於5.2、5.4或不大於5.4、5.6或不大於5.6、5.8或不大於5.8、6.0或不大於6.0、6.1或不大於6.1、6.2或不大於6.2、6.3或不大於6.3、6.4或不大於6.4、6.5或不大於6.5、6.6或不大於6.6、6.7或不大於6.7、6.8或不大於6.8、6.9或不大於6.9或7.0或不大於7.0。

【0140】 在一些實施例中，第一緩衝劑之pH為約4.5至約7.0、約4.6至約7.0、約4.8至約7.0、約5.0至約7.0、約5.5至約7.0、約6.0至約7.0、約6.0至約6.9、約6.0至約6.8、約6.0至約6.7、約6.0至約6.6、約6.0至約6.5。在一些實施例中，第一緩衝劑之pH為4.5或不大於4.5、4.6或不大於4.6、4.7或不大於4.7、4.8或不大於4.8、4.9或不大於4.9、5.0或不大於

5.0、5.2或不大於5.2、5.4或不大於5.4、5.6或不大於5.6、5.8或不大於5.8、6.0或不大於6.0、6.1或不大於6.1、6.2或不大於6.2、6.3或不大於6.3、6.4或不大於6.4、6.5或不大於6.5、6.6或不大於6.6、6.7或不大於6.7、6.8或不大於6.8、6.9或不大於6.9或7.0或不大於7.0。

【0141】 在一些實施例中，第一水性緩衝液係選自由乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液及tris緩衝液組成之群。

【0142】 在一些實施例中，該緩衝劑係選自由乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液及tris緩衝液組成之群。

【0143】 在一些實施例中，第一水性緩衝溶液包含大於約1 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約2 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約5 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約10 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約15 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約20 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約25 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，或大於約30 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris。

【0144】 在一些實施例中，第一水性緩衝溶液包含約1 mM至約30 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，約2 mM至約20 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，約3 mM至約10 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，約4 mM至約8 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，或約5 mM至約6 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris。

【0145】 在一些實施例中，第一水性緩衝溶液包含約5 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris。

【0146】 在一些實施例中，第一水性緩衝溶液包含約5 mM乙酸

鹽，其中該水性緩衝溶液之pH為約5.0。

【0147】 在一些實施例中，第二水性緩衝溶液包含第二緩衝劑。在一些實施例中，合適溶液可進一步包含一或多種緩衝劑及/或鹽。例示性合適緩衝劑包括但不限於硫酸銨、碳酸氫鈉、檸檬酸鈉、乙酸鈉、磷酸鉀、參(羥基甲基)胺基甲烷(tris)、磷酸鈉、HEPES及其類似物。在一些實施例中，第二水性緩衝溶液包含濃度為約0.1 mM至約100 mM、約0.5 mM至約90 mM、約1.0 mM至約80 mM、約2 mM至約70 mM、約3 mM至約60 mM、約4 mM至約50 mM、約5 mM至約40 mM、約6 mM至約30 mM、約7 mM至約20 mM、約8 mM至約15 mM、約9 mM至約12 mM之緩衝劑。在一些實施例中，第二水性緩衝溶液包含濃度為約0.1 mM或大於約0.1 mM、約0.5 mM或大於約0.5 mM、約1 mM或大於約1 mM、約2 mM或大於約2 mM、約4 mM或大於約4 mM、約6 mM或大於約6 mM、約8 mM或大於約8 mM、約10 mM或大於約10 mM、約15 mM或大於約15 mM、約20 mM或大於約20 mM、約25 mM或大於約25 mM、約30 mM或大於約30 mM、約35 mM或大於約35 mM、約40 mM或大於約40 mM、約45 mM或大於約45 mM或約50 mM或大於約50 mM之緩衝劑。例示性合適鹽包括但不限於氯化鉀、氯化鎂、氯化鈉及其類似物。

【0148】 在一些實施例中，第二緩衝劑包含第二水性緩衝液。在一些實施例中，合適溶液可進一步包含一或多種水性緩衝液及/或鹽。例示性合適水性緩衝液包括但不限於硫酸銨、碳酸氫鈉、檸檬酸鈉、乙酸鈉、磷酸鉀、參(羥基甲基)胺基甲烷(tris)、磷酸鈉、HEPES及其類似物。在一些實施例中，第二水性緩衝液包含濃度為約0.1 mM至約100 mM、約0.5 mM至約90 mM、約1.0 mM至約80 mM、約2 mM至約70 mM、約3

mM至約60 mM、約4 mM至約50 mM、約5 mM至約40 mM、約6 mM至約30 mM、約7 mM至約20 mM、約8 mM至約15 mM、約9 mM至約12 mM之水性緩衝液。在一些實施例中，第二水性緩衝液包含濃度為約0.1 mM或大於約0.1 mM、約0.5 mM或大於約0.5 mM、約1 mM或大於約1 mM、約2 mM或大於約2 mM、約4 mM或大於約4 mM、約6 mM或大於約6 mM、約8 mM或大於約8 mM、約10 mM或大於約10 mM、約15 mM或大於約15 mM、約20 mM或大於約20 mM、約25 mM或大於約25 mM、約30 mM或大於約30 mM、約35 mM或大於約35 mM、約40 mM或大於約40 mM、約45 mM或大於約45 mM或約50 mM或大於約50 mM之水性緩衝液。例示性合適鹽包括但不限於氯化鉀、氯化鎂、氯化鈉及其類似物。

【0149】 在一些實施例中，第二緩衝劑之pH為約4.5至約7.0、約4.6至約7.0、約4.8至約7.0、約5.0至約7.0、約5.5至約7.0、約6.0至約7.0、約6.0至約6.9、約6.0至約6.8、約6.0至約6.7、約6.0至約6.6、約6.0至約6.5。在一些實施例中，第二緩衝劑之pH為4.5或不大於4.5、4.6或不大於4.6、4.7或不大於4.7、4.8或不大於4.8、4.9或不大於4.9、5.0或不大於5.0、5.2或不大於5.2、5.4或不大於5.4、5.6或不大於5.6、5.8或不大於5.8、6.0或不大於6.0、6.1或不大於6.1、6.2或不大於6.2、6.3或不大於6.3、6.4或不大於6.4、6.5或不大於6.5、6.6或不大於6.6、6.7或不大於6.7、6.8或不大於6.8、6.9或不大於6.9或7.0或不大於7.0。

【0150】 在一些實施例中，第二水性緩衝溶液之pH為約4.5至約7.0、約4.6至約7.0、約4.8至約7.0、約5.0至約7.0、約5.5至約7.0、約6.0至約7.0、約6.0至約6.9、約6.0至約6.8、約6.0至約6.7、約6.0至約6.6、約6.0至約6.5。在一些實施例中，第二水性緩衝溶液之pH為4.5或不大於

4.5、4.6或不大於4.6、4.7或不大於4.7、4.8或不大於4.8、4.9或不大於4.9、5.0或不大於5.0、5.2或不大於5.2、5.4或不大於5.4、5.6或不大於5.6、5.8或不大於5.8、6.0或不大於6.0、6.1或不大於6.1、6.2或不大於6.2、6.3或不大於6.3、6.4或不大於6.4、6.5或不大於6.5、6.6或不大於6.6、6.7或不大於6.7、6.8或不大於6.8、6.9或不大於6.9或7.0或不大於7.0。

【0151】 在一些實施例中，第二緩衝劑係選自由乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液及tris緩衝液組成之群。

【0152】 在一些實施例中，第二水性緩衝液係選自由乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液及tris緩衝液組成之群。

【0153】 在一些實施例中，第二水性緩衝液為tris緩衝液。

【0154】 在一些實施例中，第二緩衝劑為tris緩衝液。

【0155】 在一些實施例中，第二緩衝劑之pH在約6.5至約8.5、約7.0至約8.0、約7.2至約7.8或約7.4至約7.6範圍內。

【0156】 在一些實施例中，第二水性緩衝液之pH在約6.5至約8.5、約7.0至約8.0、約7.2至約7.8或約7.4至約7.6範圍內。

【0157】 在一些實施例中，第二水性緩衝液之pH為約7.5。

【0158】 在一些實施例中，第二緩衝劑之pH為約7.5。

【0159】 在一些實施例中，第三水性緩衝溶液包含第三緩衝劑。在一些實施例中，合適溶液可進一步包含一或多種水性緩衝液及/或鹽。例示性合適緩衝劑包括但不限於硫酸銨、碳酸氫鈉、檸檬酸鈉、乙酸鈉、磷酸鉀、參(羥基甲基)胺基甲烷(tris)、磷酸鈉、HEPES及其類似物。在一些實施例中，第三水性緩衝溶液包含濃度為約0.1 mM至約100 mM、約

0.5 mM至約90 mM、約1.0 mM至約80 mM、約2 mM至約70 mM、約3 mM至約60 mM、約4 mM至約50 mM、約5 mM至約40 mM、約6 mM至約30 mM、約7 mM至約20 mM、約8 mM至約15 mM、約9 mM至約12 mM之第三緩衝劑。在一些實施例中，第三水性緩衝溶液包含濃度為約0.1 mM或大於約0.1 mM、約0.5 mM或大於約0.5 mM、約1 mM或大於約1 mM、約2 mM或大於約2 mM、約4 mM或大於約4 mM、約6 mM或大於約6 mM、約8 mM或大於約8 mM、約10 mM或大於約10 mM、約15 mM或大於約15 mM、約20 mM或大於約20 mM、約25 mM或大於約25 mM、約30 mM或大於約30 mM、約35 mM或大於約35 mM、約40 mM或大於約40 mM、約45 mM或大於約45 mM或約50 mM或大於約50 mM之第三緩衝劑。例示性合適鹽包括但不限於氯化鉀、氯化鎂、氯化鈉及其類似物。

【0160】 在一些實施例中，第三緩衝劑包含第三水性緩衝液。在一些實施例中，合適溶液可進一步包含一或多種水性緩衝液及/或鹽。例示性合適水性緩衝液包括但不限於硫酸銨、碳酸氫鈉、檸檬酸鈉、乙酸钠、磷酸鉀、參(羥基甲基)胺基甲烷(tris)、磷酸鈉、HEPES及其類似物。在一些實施例中，第三水性緩衝液包含濃度為約0.1 mM至約100 mM、約0.5 mM至約90 mM、約1.0 mM至約80 mM、約2 mM至約70 mM、約3 mM至約60 mM、約4 mM至約50 mM、約5 mM至約40 mM、約6 mM至約30 mM、約7 mM至約20 mM、約8 mM至約15 mM、約9 mM至約12 mM之水性緩衝液。在一些實施例中，第三水性緩衝液包含濃度為或大於約0.1 mM、約0.5 mM、約1 mM、約2 mM、約4 mM、約6 mM、約8 mM、約10 mM、約15 mM、約20 mM、約25 mM、約30 mM、約35 mM、約40 mM、約45 mM或約50 mM之水性緩衝液。例示性合適鹽包括

但不限於氯化鉀、氯化鎂、氯化鈉及其類似物。

【0161】 在一些實施例中，第三水性緩衝液之pH為約4.5至約7.0、約4.6至約7.0、約4.8至約7.0、約5.0至約7.0、約5.5至約7.0、約6.0至約7.0、約6.0至約6.9、約6.0至約6.8、約6.0至約6.7、約6.0至約6.6、約6.0至約6.5。在一些實施例中，第三緩衝劑之pH為4.5或不大於4.5、4.6或不大於4.6、4.7或不大於4.7、4.8或不大於4.8、4.9或不大於4.9、5.0或不大於5.0、5.2或不大於5.2、5.4或不大於5.4、5.6或不大於5.6、5.8或不大於5.8、6.0或不大於6.0、6.1或不大於6.1、6.2或不大於6.2、6.3或不大於6.3、6.4或不大於6.4、6.5或不大於6.5、6.6或不大於6.6、6.7或不大於6.7、6.8或不大於6.8、6.9或不大於6.9或7.0或不大於7.0。

【0162】 在一些實施例中，第三水性緩衝液係選自由乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液及tris緩衝液組成之群。

【0163】 在一些實施例中，第三水性緩衝液之pH在約6.5至約8.5、約7.0至約8.0、約7.2至約7.8或約7.4至約7.6範圍內。

【0164】 在一些實施例中，第三水性緩衝液之pH為約7.5。

核酸及活性劑溶液

【0165】 在一些實施例中，本發明方法提供包含治療劑及/或預防劑之活性劑溶液。該治療劑及/或預防劑可呈溶液形式提供以混合或添加至脂質奈米顆粒或脂質奈米顆粒溶液中，使得該治療劑及/或預防劑可經囊封於脂質奈米顆粒中。

【0166】 在一些實施例中，該治療劑及/或預防劑為能夠引起免疫反應之疫苗或化合物。

【0167】 在一些實施例中，該治療劑及/或預防劑為核酸。

【0168】 在一些實施例中，本發明方法提供包含核酸之核酸溶液。該核酸可呈溶液形式提供以混合或添加至脂質奈米顆粒或脂質奈米顆粒溶液中，使得該核酸可經囊封於脂質奈米顆粒中。

【0169】 在一些實施例中，該核酸溶液包含欲以各種濃度經囊封之核酸。在一些實施例中，該核酸溶液包含濃度為大於約0.01 mg/mL、約0.05 mg/mL或大於約0.05 mg/mL、約0.06 mg/mL或大於約0.06 mg/mL、約0.07 mg/mL或大於約0.07 mg/mL、約0.08 mg/mL或大於約0.08 mg/mL、約0.09 mg/mL或大於約0.09 mg/mL、約0.1 mg/mL或大於約0.1 mg/mL、約0.15 mg/mL或大於約0.15 mg/mL、約0.2 mg/mL或大於約0.2 mg/mL、約0.3 mg/mL或大於約0.3 mg/mL、約0.4 mg/mL或大於約0.4 mg/mL、約0.5 mg/mL或大於約0.5 mg/mL、約0.6 mg/mL或大於約0.6 mg/mL、約0.7 mg/mL或大於約0.7 mg/mL、約0.8 mg/mL或大於約0.8 mg/mL、約0.9 mg/mL或大於約0.9 mg/mL或約1.0 mg/mL或大於約1.0 mg/mL之核酸。在一些實施例中，該核酸溶液包含濃度為約0.01 mg/mL至約1.0 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.9 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.8 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.7 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.6 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.5 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.4 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.3 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.2 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.1 mg/mL、約0.05 mg/mL至約1.0 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.9 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.8 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.7 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.6 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.5 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.4 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.3 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.2 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.1 mg/mL、約0.1 mg/mL至約1.0

mg/mL、約0.2 mg/mL至約0.9 mg/mL、約0.3 mg/mL至約0.8 mg/mL、約0.4 mg/mL至約0.7 mg/mL或約0.5 mg/mL至約0.6 mg/mL之核酸。在一些實施例中，該核酸溶液可包含濃度為至多約5.0 mg/mL、至多約4.0 mg/mL、至多約3.0 mg/mL、至多約2.0 mg/mL、至多約1.0 mg/mL、至多約0.09 mg/mL、至多約0.08 mg/mL、至多約0.07 mg/mL、至多約0.06 mg/mL或至多約0.05 mg/mL之核酸。在一些實施例中，該核酸溶液包含約0.001至約1.0 mg/mL之核酸、約0.0025至約0.5 mg/mL之核酸或約0.005至約0.2 mg/mL之核酸。在一些實施例中，該核酸溶液包含約0.005至約0.2 mg/mL之核酸。

【0170】 在一些實施例中，該核酸溶液包含在水性緩衝液中之核酸。在一些實施例中，合適核酸溶液可進一步包含緩衝劑及/或鹽。例示性合適緩衝劑包括但不限於硫酸銨、碳酸氫鈉、檸檬酸鈉、乙酸钠、磷酸鉀、磷酸鈉、參(羥基甲基)胺基甲烷(tris)、HEPES及其類似物。在一些實施例中，該核酸溶液包含濃度為約0.1 mM至約100 mM、約0.5 mM至約90 mM、約1.0 mM至約80 mM、約2 mM至約70 mM、約3 mM至約60 mM、約4 mM至約50 mM、約5 mM至約40 mM、約6 mM至約30 mM、約7 mM至約20 mM、約8 mM至約15 mM、約9 mM至約12 mM之緩衝劑。在一些實施例中，該核酸溶液包含濃度為約0.1 mM或大於約0.1 mM、大於約0.5 mM、大於約1 mM、大於約2 mM、大於約4 mM、大於約6 mM、大於約8 mM、大於約10 mM、大於約15 mM、大於約20 mM、大於約25 mM、大於約30 mM、大於約35 mM、大於約40 mM、大於約45 mM或大於約50 mM之緩衝劑。例示性合適鹽包括但不限於氯化鉀、氯化鎂、氯化鈉及其類似物。

【0171】 在一些實施例中，該核酸溶液之pH為約4.5至約7.0、約4.6至約7.0、約4.8至約7.0、約5.0至約7.0、約5.5至約7.0、約6.0至約7.0、約6.0至約6.9、約6.0至約6.8、約6.0至約6.7、約6.0至約6.6、約6.0至約6.5。在一些實施例中，該核酸溶液之pH為約4.5至約6.5、約4.8至約6.25、約4.8至約6.0、約5.0至約5.8或約5.2至約5.5。在一些實施例中，該核酸溶液之pH為約5.0至約6.0、約5.1至約5.75或約5.2至約5.5。在一些實施例中，該核酸溶液之pH為約4.5至約6.5、約4.8至約6.25、約4.8至約6.0、約5.0至約5.8或約5.2至約5.5。在一些實施例中，合適核酸溶液之pH為4.5或不大於4.5、4.6或不大於4.6、4.7或不大於4.7、4.8或不大於4.8、4.9或不大於4.9、5.0或不大於5.0、5.2或不大於5.2、5.4或不大於5.4、5.6或不大於5.6、5.8或不大於5.8、6.0或不大於6.0、6.1或不大於6.1、6.2或不大於6.2、6.3或不大於6.3、6.4或不大於6.4、6.5或不大於6.5、6.6或不大於6.6、6.7或不大於6.7、6.8或不大於6.8、6.9或不大於6.9或7.0或不大於7.0。

【0172】 在一些實施例中，該核酸溶液包含乙酸鹽緩衝液。

【0173】 在一些實施例中，該核酸溶液包含約1 mM至約200 mM乙酸鹽緩衝液、約2 mM至約180 mM乙酸鹽緩衝液、約3 mM至約160 mM乙酸鹽緩衝液、約4 mM至約150 mM乙酸鹽緩衝液、約4 mM至約140 mM乙酸鹽緩衝液、約5 mM至約130 mM乙酸鹽緩衝液、約6 mM至約120 mM乙酸鹽緩衝液、約7 mM至約110 mM乙酸鹽緩衝液、約8 mM至約100 mM乙酸鹽緩衝液、約9 mM至約90 mM乙酸鹽緩衝液、約10 mM至約80 mM乙酸鹽緩衝液、約15 mM至約70 mM乙酸鹽緩衝液、約20 mM至約60 mM乙酸鹽緩衝液、約25 mM至約50 mM乙酸鹽緩衝液或約30 mM至約40 mM乙

酸鹽緩衝液。

【0174】 在一些實施例中，該核酸溶液包含約8.8 mM乙酸鹽緩衝液。

【0175】 在一些實施例中，該核酸溶液包含約130 mM乙酸鹽緩衝液。

空脂質奈米顆粒(空LNP)

【0176】 在一些態樣中，本發明提供藉由本文所揭示之方法製備之空脂質奈米顆粒(空LNP)。

【0177】 在一些態樣中，本發明提供包含聚合物脂質之空LNP。

【0178】 在一些態樣中，本發明提供一種空LNP，其包含約0.1 mol%至約2.5 mol%、約0.2 mol%至約2.25 mol%、約0.25 mol%至約2.0 mol%、約0.5 mol%至約1.75 mol%、約0.75 mol%至約1.5 mol%或約1.0 mol%至約1.25 mol%聚合物脂質。

【0179】 在一些態樣中，本發明提供一種空LNP，其包含約0.1 mol%至約0.5 mol%聚合物脂質。

【0180】 在一些實施例中，該聚合物脂質為PEG脂質。

【0181】 在一些實施例中，該聚合物脂質並非PEG脂質。

【0182】 在一些實施例中，該聚合物脂質為兩親性聚合物-脂質結合物。

【0183】 在一些實施例中，該聚合物脂質為PEG-脂質結合物。

【0184】 在一些實施例中，該聚合物脂質為界面活性劑。

【0185】 在一些實施例中，該聚合物脂質為Brij或OH-PEG-硬脂酸酯。

【0186】 在一些態樣中，本發明提供一種空LNP，其包含約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質。

【0187】 在一些實施例中，該空LNP進一步包含約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質、磷脂、結構脂質或其任何組合。

【0188】 在一些實施例中，該空LNP包含約3.0 mol% PEG脂質或更少、約2.75 mol% PEG脂質或更少、約2.5 mol% PEG脂質或更少、約2.25 mol% PEG脂質或更少、約2.0 mol% PEG脂質或更少、約1.75 mol% PEG脂質或更少、約1.5 mol% PEG脂質或更少、約1.25 mol% PEG脂質或更少、約1.0 mol% PEG脂質或更少、約0.9 mol% PEG脂質或更少、約0.8 mol% PEG脂質或更少、約0.7 mol% PEG脂質或更少、約0.6 mol% PEG脂質或更少、約0.5 mol% PEG脂質或更少、約0.4 mol% PEG脂質或更少、約0.3 mol% PEG脂質或更少、約0.2 mol% PEG脂質或更少或約0.1 mol% PEG脂質或更少。

【0189】 在一些實施例中，該空LNP包含約0 mol%至約3.0 mol% PEG脂質、約0.1 mol%至約2.5 mol% PEG脂質、約0.2 mol%至約2.25 mol% PEG脂質、約0.25 mol%至約2.0 mol% PEG脂質、約0.5 mol%至約1.75 mol% PEG脂質、約0.75 mol%至約1.5 mol% PEG脂質或約1.0 mol%至約1.25 mol% PEG脂質。

【0190】 在一些實施例中，該空LNP包含約0.050 mol%至約0.5 mol% PEG脂質。

【0191】 在一些實施例中，該空LNP包含約30 mol%至約60 mol%可離子化脂質；約0 mol%至約30 mol%磷脂；約15 mol%至約50 mol%結構脂質；及約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質。

【0192】 在一些實施例中，該空LNP包含約30 mol%至約60 mol%可離子化脂質；約0 mol%至約30 mol%磷脂；約15 mol%至約50 mol%結構脂質；及約0.1 mol%至約10 mol% PEG脂質。

【0193】 在一些實施例中，該空LNP之平均脂質奈米顆粒直徑為約200 nm或更小、約175 nm或更小、約150 nm或更小、約125 nm或更小、約100 nm或更小、約90 nm或更小、約80 nm或更小、約75 nm或更小、約70 nm或更小、約65 nm或更小、約60 nm或更小、約55 nm或更小、約50 nm或更小、約45 nm或更小、約40 nm或更小、約35 nm或更小、約30 nm或更小、約25 nm或更小或約20 nm或更小。

【0194】 在一些實施例中，該空LNP之平均脂質奈米顆粒直徑為約20 nm至約150 nm、約25 nm至約125 nm、約30 nm至約110 nm、約35 nm至約100 nm、約40 nm至約90 nm、約45 nm至約80 nm或約50 nm至約70 nm。

【0195】 在一些實施例中，空LNP之平均脂質奈米顆粒直徑為約25 nm至約45 nm。

空脂質奈米顆粒溶液(空LNP溶液)

【0196】 在一些實施例中，本發明提供一種藉由本文所揭示之方法製備之空脂質奈米顆粒溶液(空LNP溶液)。

【0197】 在一些實施例中，該空LNP溶液包含空LNP。在一些實施例中，該空LNP溶液包含濃度為大於約0.01 mg/mL、約0.05 mg/mL、約0.06 mg/mL、約0.07 mg/mL、約0.08 mg/mL、約0.09 mg/mL、約0.1 mg/mL、約0.15 mg/mL、約0.2 mg/mL、約0.3 mg/mL、約0.4 mg/mL、約0.5 mg/mL、約0.6 mg/mL、約0.7 mg/mL、約0.8 mg/mL、約0.9

mg/mL或約1.0 mg/mL之空LNP。在一些實施例中，該空LNP溶液包含濃度為約0.01 mg/mL至約1.0 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.9 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.8 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.7 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.6 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.5 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.4 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.3 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.2 mg/mL、約0.01 mg/mL至約0.1 mg/mL、約0.05 mg/mL至約1.0 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.9 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.8 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.7 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.6 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.5 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.4 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.3 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.2 mg/mL、約0.05 mg/mL至約0.1 mg/mL、約0.1 mg/mL至約1.0 mg/mL、約0.2 mg/mL至約0.9 mg/mL、約0.3 mg/mL至約0.8 mg/mL、約0.4 mg/mL至約0.7 mg/mL或約0.5 mg/mL至約0.6 mg/mL之空LNP。在一些實施例中，該空LNP溶液包含濃度為至多約5.0 mg/mL、至多約4.0 mg/mL、至多約3.0 mg/mL、至多約2.0 mg/mL、至多約1.0 mg/mL、至多約0.09 mg/mL、至多約0.08 mg/mL、至多約0.07 mg/mL、至多約0.06 mg/mL或至多約0.05 mg/mL之空LNP。

【0198】 在一些實施例中，該空LNP溶液包含在水性緩衝液中之空LNP。在一些實施例中，該空LNP溶液可進一步包含緩衝劑及/或鹽。例示性合適緩衝劑包括但不限於硫酸銨、碳酸氫鈉、檸檬酸鈉、乙酸鈉、磷酸鉀、磷酸鈉、HEPES及其類似物。在一些實施例中，該空LNP溶液包含濃度為約0.1 mM至約100 mM、約0.5 mM至約90 mM、約1.0 mM至約80 mM、約2 mM至約70 mM、約3 mM至約60 mM、約4 mM至約50 mM、約5 mM至約40 mM、約6 mM至約30 mM、約7 mM至約20 mM、

約8 mM至約15 mM、約9 mM至約12 mM之緩衝劑。在一些實施例中，該空LNP溶液包含濃度為或大於約0.1 mM、約0.5 mM、約1 mM、約2 mM、約4 mM、約6 mM、約8 mM、約10 mM、約15 mM、約20 mM、約25 mM、約30 mM、約35 mM、約40 mM、約45 mM或約50 mM之緩衝劑。例示性合適鹽包括但不限於氯化鉀、氯化鎂、氯化鈉及其類似物。

【0199】 在一些實施例中，該空LNP溶液之pH為約4.5至約7.0、約4.6至約7.0、約4.8至約7.0、約5.0至約7.0、約5.5至約7.0、約6.0至約7.0、約6.0至約6.9、約6.0至約6.8、約6.0至約6.7、約6.0至約6.6、約6.0至約6.5。在一些實施例中，合適空LNP溶液之pH為4.5或不大於4.5、4.6或不大於4.6、4.7或不大於4.7、4.8或不大於4.8、4.9或不大於4.9、5.0或不大於5.0、5.2或不大於5.2、5.4或不大於5.4、5.6或不大於5.6、5.8或不大於5.8、6.0或不大於6.0、6.1或不大於6.1、6.2或不大於6.2、6.3或不大於6.3、6.4或不大於6.4、6.5或不大於6.5、6.6或不大於6.6、6.7或不大於6.7、6.8或不大於6.8、6.9或不大於6.9或7.0或不大於7.0。

【0200】 在一些實施例中，該空LNP溶液之pH在約4.5至約6.25、約4.6至約6.0、約4.8至約5.8、約5.0至約5.75、約5.0至約5.5範圍內。

【0201】 在一些實施例中，該空LNP溶液包含約5 mM乙酸鹽緩衝液，其中該乙酸鹽緩衝液之pH為約5.0。

【0202】 在一些實施例中，該空LNP溶液包含乙酸鹽緩衝液。

【0203】 在一些實施例中，空LNP溶液進一步包含第一有機溶劑。

【0204】 在一些實施例中，該第一有機溶劑為醇。

【0205】 在一些實施例中，該醇為乙醇。

【0206】 在一些實施例中，該空LNP溶液進一步包含張力劑。

負載脂質奈米顆粒(負載LNP)

【0207】 在一些實施例中，本發明提供一種藉由本文所揭示之方法製備之負載脂質奈米顆粒(負載LNP)。

【0208】 在一些實施例中，該負載LNP進一步包含約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質、磷脂、結構脂質或其任何組合。

【0209】 在一些實施例中，該負載LNP包含約3.0 mol% PEG脂質或更少、約2.75 mol% PEG脂質或更少、約2.5 mol% PEG脂質或更少、約2.25 mol% PEG脂質或更少、約2.0 mol% PEG脂質或更少、約1.75 mol% PEG脂質或更少、約1.5 mol% PEG脂質或更少、約1.25 mol% PEG脂質或更少、約1.0 mol% PEG脂質或更少、約0.9 mol% PEG脂質或更少、約0.8 mol% PEG脂質或更少、約0.7 mol% PEG脂質或更少、約0.6 mol% PEG脂質或更少、約0.5 mol% PEG脂質或更少、約0.4 mol% PEG脂質或更少、約0.3 mol% PEG脂質或更少、約0.2 mol% PEG脂質或更少或約0.1 mol% PEG脂質或更少。

【0210】 在一些實施例中，該負載LNP包含約0 mol%至約3.0 mol% PEG脂質、0.1 mol%至約2.5 mol% PEG脂質、約0.2 mol%至約2.25 mol% PEG脂質、約0.25 mol%至約2.0 mol% PEG脂質、約0.5 mol%至約1.75 mol% PEG脂質、約0.75 mol%至約1.5 mol% PEG脂質或約1.0 mol%至約1.25 mol% PEG脂質。

【0211】 在一些實施例中，該負載LNP包含約0.050 mol%至約0.5 mol% PEG脂質。

【0212】 在一些實施例中，該負載LNP包含約30 mol%至約60 mol%可離子化脂質；約0 mol%至約30 mol%磷脂；約15 mol%至約50

mol%結構脂質；及約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質。

【0213】 在一些實施例中，該負載LNP包含約30 mol%至約60 mol%可離子化脂質；約0 mol%至約30 mol%磷脂；約15 mol%至約50 mol%結構脂質；及約0.1 mol%至約10 mol% PEG脂質。

【0214】 在一些實施例中，該負載LNP之平均脂質奈米顆粒直徑為約200 nm或更小、約175 nm或更小、約150 nm或更小、約125 nm或更小、約100 nm或更小、約90 nm或更小、約80 nm或更小、約75 nm或更小、約70 nm或更小、約65 nm或更小、約60 nm或更小、約55 nm或更小、約50 nm或更小、約45 nm或更小、約40 nm或更小、約35 nm或更小、約30 nm或更小、約25 nm或更小或約20 nm或更小。

【0215】 在一些實施例中，該負載LNP之平均脂質奈米顆粒直徑為約20 nm至約150 nm、約25 nm至約125 nm、約30 nm至約110 nm、約35 nm至約100 nm、約40 nm至約90 nm、約45 nm至約80 nm或約50 nm至約70 nm。

【0216】 在一些實施例中，負載LNP之平均脂質奈米顆粒直徑為約25 nm至約45 nm。

負載脂質奈米顆粒溶液(負載LNP溶液)

【0217】 在一些實施例中，本發明提供一種藉由本文所揭示之方法製備之負載LNP溶液。

【0218】 在一些實施例中，該負載LNP溶液包含負載LNP。在一些實施例中，該負載LNP溶液包含濃度為大於約0.01 mg/mL、約0.05 mg/mL、約0.06 mg/mL、約0.07 mg/mL、約0.08 mg/mL、約0.09 mg/mL、約0.1 mg/mL、約0.15 mg/mL、約0.2 mg/mL、約0.3 mg/mL、

約0.4 mg/mL、約0.5 mg/mL、約0.6 mg/mL、約0.7 mg/mL、約0.8 mg/mL、約0.9 mg/mL或約1.0 mg/mL之負載LNP。在一些實施例中，該負載LNP溶液包含濃度為約0.01 mg/mL至約1.0 mg/mL、0.01 mg/mL至約0.9 mg/mL、0.01 mg/mL至約0.8 mg/mL、0.01 mg/mL至約0.7 mg/mL、0.01 mg/mL至約0.6 mg/mL、0.01 mg/mL至約0.5 mg/mL、0.01 mg/mL至約0.4 mg/mL、0.01 mg/mL至約0.3 mg/mL、0.01 mg/mL至約0.2 mg/mL、0.01 mg/mL至約0.1 mg/mL、0.05 mg/mL至約1.0 mg/mL、0.05 mg/mL至約0.9 mg/mL、0.05 mg/mL至約0.8 mg/mL、0.05 mg/mL至約0.7 mg/mL、0.05 mg/mL至約0.6 mg/mL、0.05 mg/mL至約0.5 mg/mL、0.05 mg/mL至約0.4 mg/mL、0.05 mg/mL至約0.3 mg/mL、0.05 mg/mL至約0.2 mg/mL、0.05 mg/mL至約0.1 mg/mL、0.1 mg/mL至約1.0 mg/mL、0.2 mg/mL至約0.9 mg/mL、0.3 mg/mL至約0.8 mg/mL、0.4 mg/mL至約0.7 mg/mL或0.5 mg/mL至約0.6 mg/mL之負載LNP。在一些實施例中，該負載LNP溶液包含濃度為至多約5.0 mg/mL、至多約4.0 mg/mL、至多約3.0 mg/mL、至多約2.0 mg/mL、至多約1.0 mg/mL、至多約0.09 mg/mL、至多約0.08 mg/mL、至多約0.07 mg/mL、至多約0.06 mg/mL或至多約0.05 mg/mL之負載LNP。

【0219】 在一些實施例中，該負載LNP溶液包含在水性緩衝液中之負載LNP。在一些實施例中，該負載LNP溶液可進一步包含緩衝劑及/或鹽。例示性合適緩衝劑包括但不限於硫酸銨、碳酸氫鈉、檸檬酸鈉、乙酸钠、磷酸鉀、磷酸鈉、HEPES及其類似物。在一些實施例中，該負載LNP溶液包含濃度為約0.1 mM至約100 mM、約0.5 mM至約90 mM、約1.0 mM至約80 mM、約2 mM至約70 mM、約3 mM至約60 mM、約4 mM

至約50 mM、約5 mM至約40 mM、約6 mM至約30 mM、約7 mM至約20 mM、約8 mM至約15 mM、約9 mM至約12 mM之緩衝劑。在一些實施例中，該負載LNP溶液包含濃度為或大於約0.1 mM、0.5 mM、1 mM、2 mM、4 mM、6 mM、8 mM、10 mM、15 mM、20 mM、25 mM、30 mM、35 mM、40 mM、45 mM或50 mM之緩衝劑。例示性合適鹽包括但不限於氯化鉀、氯化鎂、氯化鈉及其類似物。

【0220】 在一些實施例中，該負載LNP溶液之pH為約4.5至約7.0、約4.6至約7.0、約4.8至約7.0、約5.0至約7.0、約5.5至約7.0、約6.0至約7.0、約6.0至約6.9、約6.0至約6.8、約6.0至約6.7、約6.0至約6.6或約6.0至約6.5。在一些實施例中，合適負載LNP溶液之pH為4.5或不大於4.5、4.6或不大於4.6、4.7或不大於4.7、4.8或不大於4.8、4.9或不大於4.9、5.0或不大於5.0、5.2或不大於5.2、5.4或不大於5.4、5.6或不大於5.6、5.8或不大於5.8、6.0或不大於6.0、6.1或不大於6.1、6.2或不大於6.2、6.3或不大於6.3、6.4或不大於6.4、6.5或不大於6.5、6.6或不大於6.6、6.7或不大於6.7、6.8或不大於6.8、6.9或不大於6.9或7.0或不大於7.0。

【0221】 在一些實施例中，該負載LNP溶液之pH在約4.5至約6.25、約4.6至約6.0、約4.8至約5.8、約5.0至約5.75或約5.0至約5.5範圍內。

【0222】 在一些實施例中，該負載LNP溶液包含約5 mM乙酸鹽緩衝液，其中該乙酸鹽緩衝液之pH為約5.0。

【0223】 在一些實施例中，該負載LNP溶液包含乙酸鹽緩衝液。

【0224】 在一些實施例中，負載LNP溶液進一步包含第一有機溶劑。

【0225】 在一些實施例中，該第一有機溶劑為醇。

【0226】 在一些實施例中，該醇為乙醇。

【0227】 在一些實施例中，該負載LNP溶液進一步包含張力劑。

脂質奈米顆粒調配物(LNP調配物)

【0228】 在一些實施例中，本發明提供藉由本文所揭示之方法製備之脂質奈米顆粒調配物(LNP調配物)。

【0229】 在一些實施例中，該LNP調配物包含約30-60 mol%可離子化脂質；約0 mol%至約30 mol%磷脂；約15 mol%至約50 mol%結構脂質；及約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質。

【0230】 在一些實施例中，該LNP調配物包含約30 mol%至約60 mol%可離子化脂質；約0 mol%至約30 mol%磷脂；約15 mol%至約50 mol%結構脂質；及約0.1 mol%至約10 mol% PEG脂質。

【0231】 在一些實施例中，該LNP調配物之平均脂質奈米顆粒直徑為約200 nm或更小、約175 nm或更小、約150 nm或更小、約125 nm或更小、約100 nm或更小、約90 nm或更小、約80 nm或更小、約75 nm或更小、約70 nm或更小、約65 nm或更小、約60 nm或更小、約55 nm或更小、約50 nm或更小、約45 nm或更小、約40 nm或更小、約35 nm或更小、約30 nm或更小、約25 nm或更小或約20 nm或更小。

【0232】 在一些實施例中，該LNP調配物之平均脂質奈米顆粒直徑為約20 nm至約150 nm、約25 nm至約125 nm、約30 nm至約110 nm、約35 nm至約100 nm、約40 nm至約90 nm、約45 nm至約80 nm或約50 nm至約70 nm。

【0233】 在一些實施例中，LNP調配物之平均脂質奈米顆粒直徑為

約25 nm至約45 nm。

【0234】 在一些實施例中，該LNP調配物之pH係在約5.0至約6.0、約5.1至約5.75或約5.2至約5.5範圍內。

投與LNP調配物

【0235】 在一些實施例中，該投與包含：(i)提供包含治療劑及/或預防劑之pH在約4.5至約7.0範圍內的活性劑溶液，及包含空LNP之pH在約4.5至約6.5範圍內的空LNP溶液，該空LNP包含可離子化脂質；(ii)藉由混合該空LNP溶液及該活性劑溶液來形成包含囊封該治療劑及/或預防劑之負載LNP的LNP調配物，使得該LNP調配物之pH在約4.5至約小於7.0範圍內；及(iii)在混合之後小於約72小時，將該LNP調配物投與至患者。

【0236】 在一些實施例中，第一pH及第二pH係在約7.0至約8.1，或約7.1至約7.8，或約7.2至約7.7，或約7.3至約7.6，或約7.4至約7.5範圍內。

【0237】 在一些實施例中，第一pH及第二pH係在約4.5至約6.5，或約4.6至約6.0，或約4.8至約5.5範圍內。

【0238】 在一些實施例中，該投與在混合之後小於約72小時執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約60小時執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約48小時執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約36小時執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約24小時執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約20小時執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約16小時執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約12小時執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約8小時執行。

【0239】 在一些實施例中，該投與在混合之後小於約120分鐘執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約100分鐘執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約90分鐘執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約80分鐘執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約70分鐘執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約60分鐘執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約50分鐘執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約40分鐘執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約30分鐘執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約20分鐘執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約15分鐘執行。在一些實施例中，該投與在混合之後小於約10分鐘執行。

【0240】 在一些實施例中，水性緩衝溶液之pH及脂質奈米顆粒調配物之pH大約相同。

【0241】 在一些實施例中，相對於脂質奈米顆粒調配物之總體積，該LNP調配物包含約1體積%至約50體積%之該有機溶劑。在一些實施例中，相對於該LNP調配物之總體積，該LNP調配物包含約2體積%至約45體積%之該有機溶劑。在一些實施例中，相對於該LNP調配物之總體積，該LNP調配物包含約3體積%至約40體積%之該有機溶劑。在一些實施例中，相對於該LNP調配物之總體積，該LNP調配物包含約4體積%至約35體積%之該有機溶劑。在一些實施例中，相對於該LNP調配物之總體積，該LNP調配物包含約5體積%至約33體積%之該有機溶劑。

【0242】 在一些實施例中，該有機溶劑為醇。

【0243】 在一些實施例中，該有機溶劑為乙醇。

【0244】 在一些實施例中，該有機溶劑包含第一有機溶劑及第二有

機溶劑。

【0245】 在一些實施例中，該第一有機溶劑為醇且該第二有機溶劑為醇。

【0246】 在一些實施例中，該第一有機溶劑為乙醇且該第二有機溶劑為苶醇。

【0247】 在一些實施例中，該第一有機溶劑與該第二有機溶劑之 wt/wt 比率係在約 100:1 至約 1:1，或約 50:1 至約 1:1，或約 20:1 至約 1:1，或約 10:1 至約 1:1 範圍內。

【0248】 在一些實施例中，該有機溶液進一步包含潤濕劑。如本文所用，潤濕劑可指增加、降低或改良液體維持與諸如固體表面及/或液體表面之表面接觸之能力之劑。

【0249】 在一些實施例中，該潤濕劑為有機溶劑。

【0250】 在一些實施例中，該潤濕劑為二甲亞砜(DMSO)。

【0251】 在一些實施例中，該潤濕劑與該有機溶劑之 wt/wt 比率係在約 1000:1 至約 1:1，或約 500:1 至約 5:1，或約 100:1 至約 10:1 範圍內。

【0252】 在一些實施例中，該水性緩衝溶液係選自由乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液及 tris 緩衝液組成之群的至少一者。在一些實施例中，該水性緩衝溶液可為適用於維持生理 pH 之任何緩衝液。在一些實施例中，該水性緩衝溶液可為適用於維持適用於投與至患者之 pH 的任何緩衝液。在一些實施例中，該患者為哺乳動物患者。在一些實施例中，該患者為人類患者。

【0253】 在一些實施例中，該水性緩衝溶液進一步包含張力劑。如本文所用，張力劑可指增加、降低或改良有效滲透壓梯度(如由兩種溶液

之水勢所定義)或溶質溶解於溶液中之相對濃度之劑，該相對濃度影響擴散之方向及程度。

【0254】 在一些實施例中，該空LNP溶液或負載LNP溶液進一步包含張力劑。

【0255】 在一些實施例中，該張力劑為糖。

【0256】 在一些實施例中，該糖為蔗糖。

【0257】 在一些實施例中，該空LNP溶液或負載LNP溶液進一步包含約0.01 g/mL至約1.0 g/mL、約0.05 g/mL至約0.5 g/mL、約0.1 g/mL至約0.4 g/mL、約0.15 g/mL至約0.3 g/mL或約0.2 g/mL至約0.25 g/mL之張力劑。

【0258】 在一些實施例中，該空LNP溶液或負載LNP溶液進一步包含約0.2 g/mL至約0.25 g/mL之張力劑。

空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液及LNP調配物之例示性實施例

【0259】 在一些實施例中，本發明之空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物包含複數種LNP，其中該負載LNP或LNP調配物包含核酸及可離子化脂質。

【0260】 本文進一步揭示用於本發明方法之合適核酸。在一些實施例中，該核酸為RNA (例如mRNA)。

【0261】 本文進一步揭示用於本發明方法之合適可離子化脂質。

【0262】 在一些實施例中，該空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物進一步包含磷脂、PEG脂質、結構脂質或其任何組合。本文進一步揭示用於本發明方法之合適磷脂、PEG脂質及結構脂

質。

【0263】 在一些實施例中，本發明之空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物包括至少一種脂質奈米顆粒組分。脂質奈米顆粒可包括脂質組分及一或多種額外組分，諸如治療劑及/或預防劑，諸如核酸。LNP可經設計用於一或多種特定應用或標靶。LNP之要素可基於特定應用或標靶，及/或基於一或多種要素之功效、毒性、費用、易用性、可用性或其他特徵進行選擇。同樣，LNP之特定調配物可根據例如特定要素組合之功效及毒性經選擇用於特定應用或標靶。LNP調配物之功效及耐受性可受該調配物之穩定性影響。

【0264】 該空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物之脂質組分可包括例如根據式(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-II)、(IL-IIa)、(IL-IIb)、(IL-IIc)、(IL-IId)、(IL-IIe)、(IL-IIf)、(IL-IIg)、(IL-VI)、(IL-VIIa)、(IL-VIIIa)、(IL-VIIIb)、(IL-VIIb-1)、(IL-VIIb-2)、(IL-VIIb-3)、(IL-VIIc)、(IL-VIIId)、(IL-VIIIc)、(IL-VIIId)、(IL-VIVa)、(IL-VIVb)、(IL-III)、(IL-IIIa1)、(IL-IIIa2)、(IL-IIIa3)、(IL-IIIa4)、(IL-IIIa5)、(IL-IIIa6)、(IL-IIIa7)或(IL-IIIa8)之脂質、磷脂(諸如不飽和脂質，例如DOPE或DSPC)、PEG脂質及結構脂質。該空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物之脂質組分可包括例如根據式(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-II)、(IL-IIa)、(IL-IIb)、(IL-IIc)、(IL-IId)、(IL-IIe)、(IL-IIf)、(IL-IIg)、(IL-VI)、(IL-VIIa)、(IL-VIIIa)、(IL-VIIIb)、(IL-VIIb-1)、(IL-VIIb-2)、(IL-VIIb-3)、(IL-VIIc)、(IL-VIIId)、(IL-VIIIc)、(IL-VIIId)、(IL-VIVa)、(IL-VIVb)、(IL-III)、(IL-IIIa1)、(IL-IIIa2)、(IL-IIIa3)、(IL-IIIa4)、(IL-IIIa5)、

(IL-IIIa6)、(IL-IIIa7)或(IL-IIIa8)之脂質、磷脂(諸如不飽和脂質，例如DOPE或DSPC)及結構脂質。該脂質組分之要素可以特定分率提供。

【0265】 在一些實施例中，該空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物之脂質組分包括根據式(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-II)、(IL-IIa)、(IL-IIb)、(IL-IIc)、(IL-IId)、(IL-IIe)、(IL-IIf)、(IL-IIg)、(IL-VI)、(IL-VIIa)、(IL-VIIIa)、(IL-VIIIb)、(IL-VIIb-1)、(IL-VIIb-2)、(IL-VIIb-3)、(IL-VIIc)、(IL-VIIId)、(IL-VIIIc)、(IL-VIIId)、(IL-VIVa)、(IL-VIVb)、(IL-III)、(IL-IIIa1)、(IL-IIIa2)、(IL-IIIa3)、(IL-IIIa4)、(IL-IIIa5)、(IL-IIIa6)、(IL-IIIa7)或(IL-IIIa8)之脂質、磷脂、PEG脂質及結構脂質。在一些實施例中，該空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物之脂質組分包括約30 mol%至約60 mol%之式(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-II)、(IL-IIa)、(IL-IIb)、(IL-IIc)、(IL-IId)、(IL-IIe)、(IL-IIf)、(IL-IIg)、(IL-VI)、(IL-VIIa)、(IL-VIIIa)、(IL-VIIIb)、(IL-VIIb-1)、(IL-VIIb-2)、(IL-VIIb-3)、(IL-VIIc)、(IL-VIIId)、(IL-VIIIc)、(IL-VIIId)、(IL-VIVa)、(IL-VIVb)、(IL-III)、(IL-IIIa1)、(IL-IIIa2)、(IL-IIIa3)、(IL-IIIa4)、(IL-IIIa5)、(IL-IIIa6)、(IL-IIIa7)或(IL-IIIa8)化合物、約0 mol%至約30 mol%磷脂、約18.5 mol%至約48.5 mol%結構脂質及約0 mol%至約10 mol% PEG脂質，其限制條件在於總mol%不超過100%。在一些實施例中，該空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物之脂質組分包括約35 mol%至約55 mol%之式(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-II)、(IL-IIa)、(IL-IIb)、(IL-IIc)、(IL-IId)、(IL-IIe)、(IL-IIf)、(IL-IIg)、(IL-VI)、(IL-VIIa)、(IL-VIIIa)、(IL-VIIIb)、(IL-VIIb-1)、(IL-VIIb-2)、(IL-

VIIb-3)、(IL-VIIc)、(IL-VIIId)、(IL-VIIIc)、(IL-VIIId)、(IL-VIVa)、(IL-VIVb)、(IL-III)、(IL-IIIa1)、(IL-IIIa2)、(IL-IIIa3)、(IL-IIIa4)、(IL-IIIa5)、(IL-IIIa6)、(IL-IIIa7)或(IL-IIIa8)化合物、約5 mol%至約25 mol%磷脂、約30 mol%至約40 mol%結構脂質及約0 mol%至約10 mol% PEG脂質。在一特定實施例中，該脂質組分包括約50 mol%該化合物、約10 mol%磷脂、約38.5 mol%結構脂質及約1.5 mol% PEG脂質。在另一特定實施例中，該脂質組分包括約40 mol%該化合物、約20 mol%磷脂、約38.5 mol%結構脂質及約1.5 mol% PEG脂質。在一些實施例中，該磷脂可為DOPE或DSPC。在一些實施例中，該PEG脂質可為PEG-DMG及/或該結構脂質可為膽固醇。

【0266】 脂質奈米顆粒可經設計用於一或多種特定應用或標靶。在一些實施例中，LNP可經設計以遞送諸如RNA之治療劑及/或預防劑至哺乳動物體內之特定細胞、組織、器官或系統或其組。脂質奈米顆粒之生理化學特性可發生改變以便增加針對特定身體標靶之選擇性。例如，粒徑可基於不同器官之開窗大小加以調節。包括於LNP中之治療劑及/或預防劑亦可基於一或多個所需遞送標靶進行選擇。在一些實施例中，治療劑及/或預防劑可針對特定適應症、疾患、疾病或病症及/或針對向特定細胞、組織、器官或系統或其組之遞送(例如，局部或特異性遞送)進行選擇。在一些實施例中，LNP可包括編碼所關注之多肽之mRNA，其能夠在細胞內轉譯以產生該所關注之多肽。此一組合物可經設計以特異性地遞送至特定器官。在一些實施例中，組合物可經設計以特異性地遞送至哺乳動物肝臟。

【0267】 LNP中之治療劑及/或預防劑的量可取決於該脂質奈米顆粒

之大小、組成、所需標靶及/或應用或其他特性，以及取決於該治療劑及/或預防劑之特性。在一些實施例中，可用於LNP中之RNA的量可取決於該RNA之大小、序列及其他特徵。LNP中之治療劑及/或預防劑及其他要素(例如脂質)的相對量亦可變化。在一些實施例中，LNP中之脂質組分與治療劑及/或預防劑(諸如核酸)之wt/wt比率可為約5:1至約60:1，諸如5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1及60:1。在一些實施例中，脂質組分與治療劑及/或預防劑之wt/wt比率可為約10:1至約40:1。在一些實施例中，該wt/wt比率為約20:1。LNP中之治療劑及/或預防劑的量可例如使用吸收光譜法(例如，紫外-可見光譜)進行量測。

【0268】 在一些實施例中，LNP包括一或多種RNA，且該一或多種RNA、脂質及其量可經選擇以提供特定N:P比率。該組合物之N:P比率係指一或多種脂質中之氮原子與RNA中之磷酸酯基的數目之莫耳比率。一般而言，較低N:P比率為較佳的。該一或多種RNA、脂質及其量可經選擇以提供約2:1至約30:1之N:P比率，諸如2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、12:1、14:1、16:1、18:1、20:1、22:1、24:1、26:1、28:1或30:1。在一些實施例中，該N:P比率可為約2:1至約8:1。在一些實施例中，該N:P比率為約5:1至約8:1。在一些實施例中，該N:P比率可為約5.0:1、約5.5:1、約5.67:1、約6.0:1、約6.5:1或約7.0:1。在一些實施例中，該N:P比率可為約5.67:1。

【0269】 在一些實施例中，包括LNP之調配物可進一步包括鹽，諸如氯化物鹽。

【0270】 在一些實施例中，包括LNP之調配物可進一步包括糖，諸如二醣。在一些實施例中，該調配物進一步包括糖，但不包括鹽，諸如氯化物鹽。

物理特性

【0271】 本發明之LNP之物理特性可藉由多種方法表徵。在一些實施例中，可使用顯微術(例如，透射電子顯微術或掃描電子顯微術)來檢查LNP之形態及大小分佈。可使用動態光散射或電位分析法(例如電位滴定)來量測 ζ 電位。動態光散射亦可用於測定粒徑。亦可使用諸如Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK)之儀器來量測LNP之多種特徵，諸如粒徑、多分散性指數及 ζ 電位。

【0272】 該空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物之平均LNP直徑可在數十nm與數百nm之間，例如藉由動態光散射(DLS)所量測。在一些實施例中，該空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物之平均LNP直徑之平均脂質奈米顆粒直徑為約200 nm或更小、約175 nm或更小、約150 nm或更小、約125 nm或更小、約100 nm或更小、約90 nm或更小、約80 nm或更小、約75 nm或更小、約70 nm或更小、約65 nm或更小、約60 nm或更小、約55 nm或更小、約50 nm或更小、約45 nm或更小、約40 nm或更小、約35 nm或更小、約30 nm或更小、約25 nm或更小或約20 nm或更小。在一些實施例中，該空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物之平均LNP直徑之平均脂質奈米顆粒直徑為約20 nm至約150 nm、約25 nm至約125 nm、約30 nm至約110 nm、約35 nm至約100 nm、約40 nm至約90 nm、約45 nm至約80 nm或約50 nm至約70 nm。在一些實施例中，該空LNP、

空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物之平均LNP直徑之平均脂質奈米顆粒直徑為約15 nm至約55 nm、約20 nm至約50 nm、約25 nm至約45 nm或約30 nm至約40 nm。

【0273】 在一些實施例中，該空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物之平均LNP直徑之平均脂質奈米顆粒直徑為約25 nm至約45 nm。

【0274】 在一些實施例中，該空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物之平均LNP直徑可為約70 nm至約100 nm。在一特定實施例中，該空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物之平均LNP直徑可為約80 nm。在一些實施例中，該空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物之平均LNP直徑可為約100 nm。

【0275】 在一些實施例中，該空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物之平均LNP直徑介於約1 mm至約500 mm、約5 mm至約200 mm、約10 mm至約100 mm、約20 mm至約80 mm、約25 mm至約60 mm、約30 mm至約55 mm、約35 mm至約50 mm或約38 mm至約42 mm範圍內。

【0276】 在一些實施例中，如與藉由可比較方法產生之空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物相比，該空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物之平均LNP直徑為約99%或更低、約98%或更低、約97%或更低、約96%或更低、約95%或更低、約90%或更低、約85%或更低、約80%或更低、約75%或更低、約70%或更低、約65%或更低、約60%或更低、約55%或更低、約50%或更

低、約40%或更低、約30%或更低、約20%或更低或約10%或更低。

【0277】 LNP可為相對均質的。多分散性指數可用於指示LNP之均質性，例如脂質奈米顆粒之粒徑分佈。小(例如小於0.3)多分散性指數一般地指示狹窄粒徑分佈。LNP可具有約0至約0.25之多分散性指數，諸如0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24或0.25。在一些實施例中，LNP之多分散性指數可為約0.10至約0.20。

【0278】 治療劑及/或預防劑(諸如核酸)之囊封效率描述了相對於所提供之初始量，在製備之後經LNP囊封或以其他方式與LNP締合的治療劑及/或預防劑之量。高囊封效率係合乎需要的(例如，接近100%)。囊封效率可例如藉由比較在用一或多種有機溶劑或清潔劑破碎脂質奈米顆粒之前及之後含有脂質奈米顆粒之溶液中的治療劑及/或預防劑之量來量測。可使用陰離子交換樹脂來量測溶液中的游離治療劑及/或預防劑(例如RNA)之量。可使用螢光來量測溶液中的游離治療劑及/或預防劑(例如RNA)之量。關於本文所述之脂質奈米顆粒，治療劑及/或預防劑之囊封效率可為至少50%，例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些實施例中，囊封效率可為至少80%。在一些實施例中，囊封效率可為至少90%。在一些實施例中，囊封效率可為至少95%。

【0279】 LNP可視情況包含一或多個塗層。在一些實施例中，LNP可經調配成具有塗層之膠囊、膜或錠劑。包括本文所述之組合物之膠囊、膜或錠劑可具有任何可用的大小、拉伸強度、硬度或密度。

定義

【0280】如本文所用，術語「烷基(alkyl)」或「烷基(alkyl group)」意謂包括一或多個碳原子(例如，一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個、十一個、十二個、十三個、十四個、十五個、十六個、十七個、十八個、十九個、二十個或二十個以上碳原子)之直鏈或分支鏈、飽和烴，其視情況經取代。注記「C₁₋₁₄烷基」意謂視情況經取代之包括1-14個碳原子之直鏈或分支鏈、飽和烴。除非另外規定，否則本文所述之烷基係指未經取代及經取代烷基。

【0281】如本文所用，術語「烯基(alkenyl)」或「烯基(alkenyl group)」意謂包括兩個或更多個碳原子(例如，兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個、十一個、十二個、十三個、十四個、十五個、十六個、十七個、十八個、十九個、二十個或二十個以上碳原子)及至少一個雙鍵之直鏈或分支鏈烴，其視情況經取代。注記「C₂₋₁₄烯基」意謂視情況經取代之包括2-14個碳原子及至少一個碳-碳雙鍵之直鏈或分支鏈烴。烯基可包括一個、兩個、三個、四個或四個以上碳-碳雙鍵。在一些實施例中，C₁₈烯基可包括一或多個雙鍵。包括兩個雙鍵之C₁₈烯基可為亞油烯基。除非另外規定，否則本文所述之烯基係指未經取代及經取代烯基。

【0282】如本文所用，術語「炔基(alkynyl)」或「炔基(alkynyl group)」意謂包括兩個或更多個碳原子(例如，兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個、十一個、十二個、十三個、十四個、十五個、十六個、十七個、十八個、十九個、二十個或二十個以上碳原子)及至少一個碳-碳參鍵之直鏈或分支鏈烴，其視情況經取代。注記

「C₂₋₁₄炔基」意謂視情況經取代之包括2-14個碳原子及至少一個碳-碳參鍵之直鏈或分支鏈烴。炔基可包括一個、兩個、三個、四個或四個以上碳-碳參鍵。例如，C₁₈炔基可包括一或多個碳-碳參鍵。除非另外規定，否則本文所述之炔基係指未經取代及經取代炔基。

【0283】如本文所用，術語「碳環(carbocycle)」或「碳環基(carbocyclic group)」意謂視情況經取代之包括一或多個碳原子環之單環或多環系統。環可為三員、四員、五員、六員、七員、八員、九員、十員、十一員、十二員、十三員、十四員、十五員、十六員、十七員、十八員、十九員或二十員環。注記「C₃₋₆碳環」意謂包括具有3-6個碳原子之單環的碳環。碳環可包括一或多個碳-碳雙鍵或參鍵且可為非芳族的或芳族的(例如，環烷基或芳基)。碳環之實例包括環丙基、環戊基、環己基、苯基、萘基及1,2-二氫萘基。如本文所用，術語「環烷基」意謂非芳族碳環且可或可不包括任何雙鍵或參鍵。除非另外規定，否則本文所述之碳環係指未經取代及經取代碳環基，亦即視情況經取代之碳環。在一些實施例中，碳環為C₃₋₈環烷基。在一些實施例中，碳環為C₃₋₆環烷基。在一些實施例中，碳環為C₆₋₁₀芳基。

【0284】「芳基」包括具有芳族性之基團，包括具有至少一個芳環且在該環結構中不含任何雜原子之「結合」或多環系統。實例包括苯基、苄基、1,2,3,4-四氫萘基等。在一些實施例中，「芳基」係具有芳族性之C₆₋₁₀碳環(例如，「芳基」為C₆₋₁₀芳基)。

【0285】如本文所用，術語「雜環(heterocycle)」或「雜環基(heterocyclic group)」意謂視情況經取代之包括一或多個環之單環或多環系統，其中至少一個環包括至少一個雜原子。雜原子可為例如氮、氧或硫

原子。環可為三員、四員、五員、六員、七員、八員、九員、十員、十一員、十二員、十三員或十四員環。雜環可包括一或多個雙鍵或參鍵且可為非芳族的或芳族的(例如，雜環烷基或雜芳基)。雜環之實例包括咪唑基、咪唑啉基、噁唑基、噁唑啉基、噻唑基、噻唑啉基、吡唑啉基、吡唑基、異噁唑啉基、異噁唑基、異噻唑啉基、異噻唑基、嗎啉基、吡咯基、吡咯啉基、呋喃基、四氫呋喃基、噻吩基、吡啉基、哌啉基、喹啉基及異喹啉基。如本文所用，術語「雜環烷基」意謂非芳族雜環且可或可不包括任何雙鍵或參鍵。除非另外規定，否則本文所述之雜環係指未經取代及經取代雜環基，亦即視情況經取代之雜環。在一些實施例中，該雜環為4至12員雜環烷基。在一些實施例中，該雜環為5員或6員雜芳基。

【0286】「雜芳基」為如上文所定義之芳基，除了在環結構中具有一至四個雜原子，且亦可稱作「芳基雜環」或「雜芳族物」。如本文所用，術語「雜芳基」意欲包括穩定的5員、6員或7員單環或7員、8員、9員、10員、11員或12員雙環芳族雜環，該雜環由碳原子及獨立地選自由氮、氧、硫及硼組成之群之一或多個雜原子，例如1個或1-2個或1-3個或1-4個或1-5個或1-6個雜原子或例如1、2、3、4、5或6個雜原子組成。氮原子可經取代或未經取代(亦即N或NR，其中R為H或如所定義之其他取代基)。氮及硫雜原子可視情況氧化(亦即N→O及S(O)_p，其中p = 1或2)。應注意，芳族雜環中之S及O原子的總數係不超過1。

【0287】雜芳基之實例包括吡咯、呋喃、噻吩、噻唑、異噻唑、咪唑、三唑、四唑、吡唑、噁唑、異噁唑、吡啉、吡嗪、噻嗪、嘧啉及其類似物。

【0288】此外，術語「芳基」及「雜芳基」包括多環芳基及雜芳

基，例如三環、雙環，例如萘、苯并噁唑、苯并二噁唑、苯并噻唑、苯并咪唑、苯并噻吩、喹啉、異喹啉、萘啉(naphthrydine)、吲哚、苯并呋喃、嘌呤、苯并呋喃、去氮雜嘌呤、吲哚。

【0289】如本文所用，「生物可降解基團」係可促進哺乳動物實體中之脂質的更快速代謝之基團。生物可降解基團可選自由但不限於-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、芳基及雜芳基組成之群。如本文所用，「芳基」係視情況經取代之包括一或多個芳環之碳環基。芳基之實例包括苯基及萘基。如本文所用，「雜芳基」係視情況經取代之包括一或多個芳環之雜環基。雜芳基之實例包括吡咯基、呋喃基、噻吩基、咪唑基、噁唑基及噻唑基。芳基及雜芳基均可視情況經取代。在一些實施例中，M及M'可選自由視情況經取代之苯基、噁唑及噻唑組成之非限制性群。在本文中之各式中，M及M'可獨立地選自上文生物可降解基團之清單。除非另外規定，否則本文所述之芳基或雜芳基係指未經取代及經取代基團，亦即視情況經取代之芳基或雜芳基。

【0290】除非另外規定，否則烷基、烯基及環基(例如，碳環基及雜環基)可視情況經取代。視情況選用之取代基可選自由但不限於鹵素原子(例如，鹵化物、溴化物、氟化物或碘化物基團)、羧酸(例如-C(O)OH)、醇(例如羥基、-OH)、酯(例如-C(O)OR或-OC(O)R)、醛(例如-C(O)H)、羰基(例如-C(O)R，或者由C=O表示)、鹵基鹵(例如-C(O)X，其中X係選自溴化物、氟化物、氯化物及碘化物之鹵化物)、碳酸酯(例如-OC(O)OR)、烷氧基(例如-OR)、縮醛(例如-C(OR)₂R'''，其中各OR係可相同或不同之烷氧基且R'''為烷基或烯基)、磷酸酯(例如P(O)₄³⁻)、硫醇

(例如-SH)、亞磺(例如-S(O)R)、亞磺酸(例如-S(O)OH)、磺酸(例如-S(O)₂OH)、硫醛(例如-C(S)H)、硫酸酯(例如S(O)₄²⁻)、磺醯基(例如-S(O)₂-)、醯胺(例如-C(O)NR₂或-N(R)C(O)R)、疊氮基(例如-N₃)、硝基(例如-NO₂)、氰基(例如-CN)、異氰基(例如-NC)、醯氧基(例如-OC(O)R)、胺基(例如-NR₂、-NRH或-NH₂)、胺甲醯基(例如-OC(O)NR₂、-OC(O)NRH或-OC(O)NH₂)、磺醯胺(例如-S(O)₂NR₂、-S(O)₂NRH、-S(O)₂NH₂、-N(R)S(O)₂R、-N(H)S(O)₂R、-N(R)S(O)₂H或-N(H)S(O)₂H)、烷基、烯基及環基(例如，碳環基或雜環基)組成之群。在前述任一者中，R係如本文所定義之烷基或烯基。在一些實施例中，該等取代基自身可進一步經例如一個、兩個、三個、四個、五個或六個如本文所定義之取代基取代。在一些實施例中，C₁₋₆烷基可進一步經一個、兩個、三個、四個、五個或六個如本文所述之取代基取代。

【0291】 含氮之本發明化合物可藉由用氧化劑(例如3-氯過氧基苯甲酸(*m*CPBA)及/或過氧化氫)處理而轉化為N-氧化物以提供其他本發明化合物。因此，當價態及結構允許時，所有所顯示且主張之含氮化合物均被視為包括如所示之化合物及其N-氧化物衍生物(其可經指定為N-O或N⁺-O⁻)。此外，在其他情況下，本發明化合物中之氮可轉化為N-羥基或N-烷氧基化合物。例如，N-羥基化合物可藉由利用諸如*m*-CPBA之氧化劑氧化親本胺來製備。當價態及結構允許時，所有所顯示且主張之含氮化合物亦被視為涵蓋如所示之化合物及其N-羥基(亦即N-OH)及N-烷氧基(亦即N-OR，其中R為經取代或未經取代C₁-C₆烷基、C₁-C₆烯基、C₁-C₆炔基、3-14員碳環或3-14員雜環)衍生物。

【0292】 如本文所用，如應用於一或多個所關注之值的術語「大

約」及「約」係指類似於所陳述之參考值之值。在一些實施例中，除非另外規定或在其他方面自本文顯而易知(除了該數字將超過可能之值之100%的情況)，否則術語「大約」或「約」係指值之範圍，該範圍屬於所陳述之參考值在任一方向上(大於或小於)的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更低。在一些實施例中，當在LNP之脂質組分中之既定化合物的量之背景中使用時，「約」可意謂所陳述之值的+/-10%。例如，包括具有約40%之既定化合物之脂質組分的LNP可包括30-50%之該化合物。

【0293】如本文所用，術語「化合物」意欲包括所描繪之結構的所有異構體及同位素。「同位素」係指具有相同原子序數但由於原子核中不同數目之中子而具有不同質量數之原子。在一些實施例中，氫之同位素包括氕及氘。此外，本發明之化合物、鹽或複合物可與溶劑或水分子組合製備以藉由常規方法形成溶劑合物及水合物。

【0294】如本文所用，術語「接觸(contacting)」意謂在兩個或更多個實體之間建立物理連接。在一些實施例中，使哺乳動物細胞與LNP接觸意謂使該哺乳動物細胞與奈米顆粒共享物理連接。活體內及離體使細胞與外部實體接觸之方法係生物學技術中熟知的。在一些實施例中，使LNP與安置於哺乳動物內之哺乳動物細胞接觸可藉由變化之投與途徑(例如，靜脈內、肌肉內、皮內及皮下)執行且可涉及變化量之脂質奈米顆粒。此外，超過一種哺乳動物細胞可由LNP接觸。

【0295】如本文所用，術語「可比較方法」係指關於所比較之方法，具有可比較參數或步驟(例如，產生本發明之LNP調配物)之方法。在

一些實施例中，「可比較方法」係具有有所比較之方法之步驟i)、ia)、iaa)、ib)、ii)、iia)、iib)、iic)、iid)及iie)中的一或多者之方法。在一些實施例中，「可比較方法」係不具有有所比較之方法之步驟i)、ia)、iaa)、ib)、ii)、iia)、iib)、iic)、iid)及iie)中的一或多者之方法。在一些實施例中，「可比較方法」係不具有有所比較之方法之步驟ia)及ib)中的一或多者之方法。在一些實施例中，「可比較方法」係使用核酸之水溶性鹽之方法。在一些實施例中，「可比較方法」係使用不包含有機溶劑可溶性核酸之有機溶液之方法。在一些實施例中，「可比較方法」係包含在投與脂質奈米顆粒調配物之前處理脂質奈米顆粒之方法。

【0296】如本文所用，術語「遞送(delivering)」意謂向目的地提供實體。在一些實施例中，向個體遞送治療劑及/或預防劑可涉及向該個體投與包括該治療劑及/或預防劑之LNP(例如，藉由靜脈內、肌肉內、皮內或皮下途徑)。向哺乳動物或哺乳動物細胞投與LNP可涉及使一或多種細胞與脂質奈米顆粒接觸。

【0297】如本文所用，術語「增強之遞送(enhanced delivery)」意謂與對照奈米顆粒向所關注之標靶組織遞送治療劑及/或預防劑的水準(例如MC3、KC2或DLinDMA)相比，由奈米顆粒向所關注之標靶組織(例如，哺乳動物肝臟)遞送更多(例如，至少1.5倍多、至少2倍多、至少3倍多、至少4倍多、至少5倍多、至少6倍多、至少7倍多、至少8倍多、至少9倍多、至少10倍多)治療劑及/或預防劑。奈米顆粒向特定組織遞送之水準可藉由比較組織中產生的蛋白質之量與該組織之重量，比較組織中的治療劑及/或預防劑之量與該組織之重量，比較組織中產生的蛋白質之量與該組織中的總蛋白質之量，或比較組織中的治療劑及/或預防劑之量與該

組織中的總治療劑及/或預防劑之量來量測。應理解，奈米顆粒向標靶組織之增強之遞送無需在所治療的個體中測定，其可在諸如動物模型(例如大鼠模型)之替代物中測定。

【0298】如本文所用，術語「特異性遞送(specific delivery)」、「特異性地遞送(specifically deliver)」或「特異性地遞送(specifically delivering)」意謂與脫靶組織(例如，哺乳動物脾)相比，由奈米顆粒向所關注之標靶組織(例如，哺乳動物肝臟)遞送更多(例如，至少1.5倍多、至少2倍多、至少3倍多、至少4倍多、至少5倍多、至少6倍多、至少7倍多、至少8倍多、至少9倍多、至少10倍多)治療劑及/或預防劑。奈米顆粒向特定組織遞送之水準可藉由比較組織中產生的蛋白質之量與該組織之重量，比較組織中的治療劑及/或預防劑之量與該組織之重量，比較組織中產生的蛋白質之量與該組織中的總蛋白質之量，或比較組織中的治療劑及/或預防劑之量與該組織中的總治療劑及/或預防劑之量來量測。在一些實施例中，關於腎血管靶向，若在治療劑及/或預防劑之全身性投與之後與遞送至肝臟或脾之量相比，每1 g組織1.5倍、2倍、3倍、5倍、10倍、15倍或20倍多的治療劑及/或預防劑遞送至腎，則如與肝臟及脾相比，治療劑及/或預防劑特異性地提供至哺乳動物腎。應理解，奈米顆粒特異性地遞送至標靶組織之能力無需在所治療的個體中測定，其可在諸如動物模型(例如大鼠模型)之替代物中測定。

【0299】如本文所用，「囊封效率(encapsulation efficiency)」係指相對於用於製備LNP之治療劑及/或預防劑的初始總量，變成LNP之一部分之治療劑及/或預防劑的量。在一些實施例中，若在最初提供至組合物之總計100 mg治療劑及/或預防劑中有97 mg治療劑及/或預防劑經囊封於

LNP 中，則囊封效率可給出為 97%。如本文所用，「囊封(encapsulation)」可指完全、實質性或部分封閉、限制、圍繞或包裝。

【0300】如本文所用，「囊封(encapsulation)」、「囊封(encapsulated)」、「負載(loaded)」及「締合(associated)」可指完全、實質性或部分封閉、限制、圍繞或包裝。如本文所用，「囊封」或「締合(association)」可指將個別核酸分子限制於奈米顆粒內及/或在個別核酸分子與奈米顆粒之間建立生理化學聯繫的過程。如本文所用，「空奈米顆粒」可指實質上不含治療劑或預防劑之奈米顆粒。如本文所用，「空奈米顆粒」或「空脂質奈米顆粒」可指實質上不含核酸之奈米顆粒。如本文所用，「空奈米顆粒」可指實質上僅由脂質組分組成之奈米顆粒。如本文所用，「空奈米顆粒」或「空脂質奈米顆粒」可指實質上不含核苷酸或多肽之奈米顆粒。如本文所用，「空奈米顆粒」或「空脂質奈米顆粒」可指實質上僅由脂質組分組成之奈米顆粒。如本文所用，「負載奈米顆粒」或「負載脂質奈米顆粒」(亦稱作「完全奈米顆粒」或「完全脂質奈米顆粒」)可指包含空奈米顆粒之組分及治療劑或預防劑之奈米顆粒。如本文所用，「負載奈米顆粒」或「負載脂質奈米顆粒」(亦稱作「完全奈米顆粒」或「完全脂質奈米顆粒」)可指包含空奈米顆粒之組分及核苷酸或多肽之奈米顆粒。如本文所用，「負載奈米顆粒」或「負載脂質奈米顆粒」(亦稱作「完全奈米顆粒」或「完全脂質奈米顆粒」)可指包含空奈米顆粒之組分及核酸之奈米顆粒。

【0301】如本文所用，核酸序列之「表現」係指 mRNA 轉譯成多肽或蛋白質及/或多肽或蛋白質之轉譯後修飾。

【0302】如本文所用，術語「活體外」係指事件發生於人工環境

中，例如試管或反應容器中、細胞培養物中、皮氏培養皿等中，而非發生於生物體(例如動物、植物或微生物)內。

【0303】如本文所用，術語「活體內」係指事件發生於生物體(例如動物、植物或微生物或其細胞或組織)內。

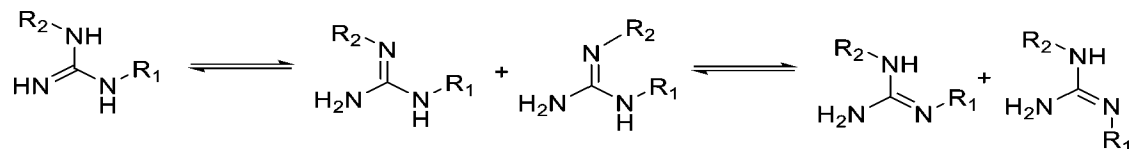
【0304】如本文所用，術語「離體」係指事件發生於生物體(例如動物、植物或微生物或其細胞或組織)外部。離體事件可發生於自天然(例如活體內)環境最低程度地改變之環境中。

【0305】如本文所用，術語「異構體」意謂化合物之任何幾何異構體、互變異構體、兩性離子、立體異構體、對映異構體或非對映異構體。化合物可包括一或多個對掌性中心及/或雙鍵且可因此作為立體異構體，諸如雙鍵異構體(亦即，幾何E/Z異構體)或非對映異構體(例如，對映異構體(亦即，(+))或(-))或順式/反式異構體)存在。本發明涵蓋本文所述之化合物的任何及所有異構體，包括立體異構體純形式(例如，幾何異構體純、對映異構體純或非對映異構體純)以及對映異構體及立體異構體混合物(例如外消旋物)。化合物之對映異構體及立體異構體混合物以及將其解析成其組分對映異構體或立體異構體之方式係熟知的。

【0306】「互變異構體」係平衡存在且易於自一種異構體形式轉化成另一異構體形式之兩種或更多種結構異構體之一。此轉化導致氫原子之形式遷移，伴隨相鄰的共軛雙鍵之轉換。互變異構體作為溶液中之互變異構體集合的混合物存在。在其中可能發生互變異構之溶液中，將達到互變異構體之化學平衡。互變異構體之精確比率取決於數種因素，包括溫度、溶劑及pH。可藉由互變異構相互轉化之互變異構體的概念係稱作互變異構現象。

【0307】 在可能存在的數種類型之互變異構現象中，通常觀察到兩種。在酮-烯醇互變異構現象中，發生電子及氫原子之同時位移。由於糖鏈分子中之醛基(-CHO)與該同一分子中之一羥基(-OH)反應使其呈如由葡萄糖展現之環狀(環形)形式，發生環鏈互變異構現象。

【0308】 常見互變異構體對係：酮-烯醇、醯胺-腈、內醯胺-內醯亞胺、雜環中(例如，諸如鳥嘌呤、胸腺嘧啶及胞嘧啶之核鹼基中)之醯胺-亞胺酸互變異構現象、亞胺-烯胺及烯胺-烯胺。二取代胍中之互變異構現象的實例顯示於下文中。



【0309】 應理解，本發明化合物可描繪為不同的互變異構體。亦應理解，當化合物具有互變異構體形式時，所有互變異構體形式均意欲包括於本發明之範圍內，且該等化合物之命名不排除任何互變異構體形式。

【0310】 如本文所用，「脂質組分」係包括一或多種脂質之脂質奈米顆粒中之彼組分。在一些實施例中，該脂質組分可包括一或多種陽離子/可離子化、PEG化、結構或其他脂質，諸如磷脂。

【0311】 如本文所用，「連接體」係連接兩個部分之部分，例如帽物質之兩個核苷之間的連接。連接體可包括一或多個基團，包括但不限於磷酸酯基(例如，磷酸酯、硼烷磷酸酯、硫代磷酸酯、硒代磷酸酯及磷酯)、烷基、醯胺化物或甘油。在一些實施例中，帽類似物之兩個核苷可在其5'位置處由三磷酸酯基或由包括兩個磷酸酯部分及一個硼烷磷酸酯部分之鏈連接。

【0312】 如本文所用，「投與方法」可包括靜脈內、肌肉內、皮

內、皮下或向個體遞送組合物之其他方法。可選擇一種投與方法以靶向遞送(例如，特異性地遞送)至身體之特定區或系統。

【0313】 如本文所用，「經修飾」意謂非天然。在一些實施例中，RNA可為經修飾RNA。亦即，RNA可包括一或多個非天然存在之核鹼基、核苷、核苷酸或連接體。「經修飾」物質亦可在本文中稱作「改變之」物質。物質可以化學方式、在結構上或在功能上經修飾或改變。在一些實施例中，經修飾核鹼基物質可包括一或多種非天然存在之取代。

【0314】 如本文所用，「N:P比率」係例如在包括脂質組分及RNA之LNP中的脂質中之可離子化(在生理pH範圍中)氮原子:RNA中之磷酸酯基的莫耳比率。

【0315】 如本文所用，「脂質奈米顆粒」係包含一或多種脂質之組合物。脂質奈米顆粒典型地關於微米或更小級別定大小且可包括脂質雙層。除非另外規定，否則如本文所用之脂質奈米顆粒涵蓋脂質奈米顆粒(LNP)、脂質體(例如脂質囊泡)及脂質體複合物。在一些實施例中，LNP可為含有具有500 nm或更小之直徑之脂質雙層的脂質體。

【0316】 如本文所用，「天然存在」意謂無人工輔助而存在於自然界中。

【0317】 如本文所用，「患者」係指可尋求或需要治療、要求治療、正在接受治療、將接受治療之個體，或處於針對特定疾病或疾患受過訓練的專業人員之護理下的個體。

【0318】 如本文所用，「PEG脂質」或「PEG化脂質」係指包含聚乙二醇組分之脂質。

【0319】 如本文所用，「聚合物脂質」係指在化學結構中包含重複

次單元之脂質。在一些實施例中，該聚合物脂質係包含聚合物組分之脂質。在一些實施例中，該聚合物脂質為PEG脂質。在一些實施例中，該聚合物脂質並非PEG脂質。在一些實施例中，該聚合物脂質為Brij或OH-PEG-硬脂酸酯。

【0320】 片語「醫藥學上可接受」在本文中用於指在合理醫學判斷之範圍內適合與人類及動物組織接觸使用而無過量毒性、刺激、過敏性反應或其他問題或併發症，與合理效益/風險比率相稱之彼等化合物、材料、組合物及/或劑型。

【0321】 如本文所用，片語「醫藥學上可接受之賦形劑」係指除本文所述之化合物以外(例如，能夠懸浮、複合或溶解該活性化合物之媒劑)且具有在患者中實質上無毒且非炎性之特性的任何成分。賦形劑可包括例如：抗黏劑、抗氧化劑、黏合劑、塗層、壓縮助劑、崩解劑、染料(顏色)、潤膚劑、乳化劑、填充劑(稀釋劑)、成膜劑或塗層、調味劑、芳香劑、助流劑(流動增強劑)、潤滑劑、防腐劑、印刷油墨、吸附劑、懸浮或分散劑、甜味劑及水合水。例示性賦形劑包括但不限於：丁基化羥基甲苯(BHT)、碳酸鈣、磷酸鈣(一氫)、硬脂酸鈣、交聯羧甲纖維素、交聯聚乙炔吡咯啉酮、檸檬酸、交聯聚維酮、半胱胺酸、乙基纖維素、明膠、羥基丙基纖維素、羥基丙基甲基纖維素、乳糖、硬脂酸鎂、麥芽糖醇、甘露糖醇、甲硫胺酸、甲基纖維素、對羥基苯甲酸甲酯、微晶纖維素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯啉酮、聚維酮、預膠凝澱粉、對羥基苯甲酸丙酯、視黃醇棕櫚酸酯、蟲膠、二氧化矽、羧基甲基纖維素鈉、檸檬酸鈉、乙醇酸澱粉鈉、山梨糖醇、澱粉(玉米)、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化鈦、維他命A、維他命E (α -生育酚)、維他命C、木糖醇及本文所揭示之其他物質。

【0322】 在本說明書中，該化合物之結構式在一些情況下為方便起見表示特定異構體，但本發明包括所有異構體，諸如幾何異構體、基於不對稱碳之光學異構體、立體異構體、互變異構體及其類似物，應理解並非所有異構體均可具有相同活性水準。此外，關於由該式表示之化合物，可存在晶體多態性。應注意，任何晶形、晶形混合物或其酐或水合物均包括於本發明之範圍中。

【0323】 術語「晶體多晶型物」、「多晶型物」或「晶形」意謂晶體結構，其中化合物(或其鹽或溶劑合物)可以不同的晶體堆積排列結晶，該等晶體堆積排列均具有相同元素組成。不同晶形通常具有不同的X射線繞射圖案、紅外光譜、熔點、密度、硬度、晶體形狀、光學及電學特性、穩定性及溶解度。再結晶溶劑、結晶速率、儲存溫度及其他因素可使一種晶形佔優勢。該等化合物之晶體多晶型物可藉由在不同條件下結晶來製備。

【0324】 組合物亦可包括一或多種化合物之鹽。鹽可為醫藥學上可接受之鹽。如本文所用，「醫藥學上可接受之鹽」係指所揭示之化合物的衍生物，其中母體化合物藉由將現有酸或鹼部分轉化為其鹽形式(例如，藉由使游離鹼基與合適有機酸反應)而發生改變。醫藥學上可接受之鹽之實例包括但不限於鹼性殘基(諸如胺)之無機酸或有機酸鹽；酸性殘基(諸如羧酸)之鹼鹽或有機鹽；及其類似物。代表性酸加成鹽包括乙酸鹽、己二酸鹽、褐藻酸鹽、抗壞血酸鹽、天冬胺酸鹽、苯磺酸鹽、苯甲酸鹽、硫酸氫鹽、硼酸鹽、丁酸鹽、樟腦酸鹽、樟腦磺酸鹽、檸檬酸鹽、環戊烷丙酸鹽、二葡萄糖酸鹽、十二烷基硫酸鹽、乙烷磺酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡萄糖酸鹽、甘油磷酸鹽、半硫酸鹽、庚酸鹽、己酸鹽、氫溴酸鹽、鹽酸鹽、

氫碘酸鹽、2-羥基-乙烷磺酸鹽、乳糖酸鹽、乳酸鹽、月桂酸鹽、月桂基硫酸鹽、蘋果酸鹽、順丁烯二酸鹽、丙二酸鹽、甲烷磺酸鹽、2-萘磺酸鹽、菸鹼酸鹽、硝酸鹽、油酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、雙羥萘酸鹽、果膠酸鹽、過硫酸鹽、3-苯基丙酸鹽、磷酸鹽、苦味酸鹽、特戊酸鹽、丙酸鹽、硬脂酸鹽、琥珀酸鹽、硫酸鹽、酒石酸鹽、硫氰酸鹽、甲苯磺酸鹽、十一烷酸鹽、戊酸鹽及其類似物。代表性鹼金屬或鹼土金屬鹽包括鈉、鋰、鉀、鈣、鎂及其類似物；以及無毒銨、四級銨及胺陽離子，包括但不限於銨、四甲基銨、四乙基銨、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺及其類似物。本發明之醫藥學上可接受之鹽包括由例如無毒無機酸或有機酸形成的母體化合物之習知無毒鹽。本發明之醫藥學上可接受之鹽可藉由習知化學方法由含有鹼性或酸性部分的母體化合物合成。一般而言，該等鹽可藉由使此等化合物之游離酸或鹼形式與化學計量之量的適當鹼或酸在水中或在有機溶劑中或在兩者之混合物中反應來製備。在一些實施例中，非水性介質為乙醚、乙酸乙酯、乙醇、異丙醇或乙腈。合適鹽之清單可見於 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 17 版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, 第 1418 頁, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P.H. Stahl及C.G. Wermuth (編), Wiley-VCH, 2008, 及 Berge 等人, Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977) 中, 該等文獻中之每一者均以引用之方式整體併入本文中。

【0325】如本文所用，「磷脂」係包括磷酸酯部分及一或多個碳鏈(諸如不飽和脂肪酸鏈)之脂質。磷脂可包括一或多個多重(例如，雙或參)鍵(例如，一或多個不飽和)。磷脂或其類似物或衍生物可包括膽鹼。磷脂或其類似物或衍生物可不包括膽鹼。特定磷脂可促進融合至膜。在一些實

施例中，陽離子磷脂可與膜(例如，細胞或細胞內膜)之一或多種帶負電的磷脂相互作用。磷脂融合至膜可允許含脂質之組合物的一或多種要素傳遞通過膜，從而允許例如將該一或多種要素遞送至細胞。

【0326】如本文所用，「多分散性指數」係描述系統之粒徑分佈之均質性的比率。例如小於0.3之小值指示狹窄粒徑分佈。

【0327】如本文所用，兩親性「聚合物」係包含寡聚物或聚合物之兩親性化合物。在一些實施例中，兩親性聚合物可包含寡聚物片段，諸如兩個或更多個PEG單體單元。在一些實施例中，本文所述之兩親性聚合物可為PS 20。

【0328】如本文所用，術語「多肽」或「所關注之多肽」係指典型地藉由肽鍵接合之胺基酸殘基的聚合物，其可天然地(例如，經分離或經純化)或以合成方式產生。

【0329】如本文所用，「RNA」係指可天然或非天然存在之核糖核酸。在一些實施例中，RNA可包括經修飾及/或非天然存在之組分，諸如一或多種核鹼基、核苷、核苷酸或連接體。RNA可包括帽結構、鏈終止核苷、莖環、polyA序列及/或聚腺苷酸化信號。RNA可具有編碼所關注之多肽之核苷酸序列。在一些實施例中，RNA可為信使RNA (mRNA)。編碼特定多肽之mRNA之轉譯(例如，哺乳動物細胞內部的mRNA之活體內轉譯)可產生編碼多肽。RNA可選自由小干擾RNA (siRNA)、不對稱干擾RNA (aiRNA)、微小RNA (miRNA)、Dicer-受質RNA (dsRNA)、小髮夾RNA (shRNA)、mRNA、長鏈非編碼RNA (lncRNA)及其混合物組成之非限制性群。

【0330】如本文所用，「單一單位劑量」係以一個劑量/同時/單一

途徑/單一接觸點(亦即，單一投與事件)投與之任何治療劑之劑量。

【0331】如本文所用，「分次劑量」係將單一單位劑量或總每日劑量分成兩個或更多個劑量。

【0332】如本文所用，「總每日劑量」係以24小時時期給出或開具處方之量。其可作為單一單位劑量投與。

【0333】如本文所用，術語「個體」係指可例如出於實驗、診斷、預防及/或治療目的投與根據本發明之組合物或調配物之任何生物體。典型個體包括動物(例如哺乳動物，諸如小鼠、大鼠、兔、非人類靈長類動物及人類)及/或植物。

【0334】如本文所用，「 T_x 」係指LNP、LNP溶液、凍乾LNP組合物或LNP調配物之核酸完整性(例如mRNA完整性)降級至用於製備該LNP、LNP溶液、凍乾LNP組合物或LNP調配物的核酸(例如mRNA)之初始完整性之約X所持續的時間量。例如，「 $T_{80\%}$ 」係指LNP、LNP溶液、凍乾LNP組合物或LNP調配物之核酸完整性(例如mRNA完整性)降級至用於製備該LNP、LNP溶液、凍乾LNP組合物或LNP調配物的核酸(例如mRNA)之初始完整性之約80%所持續的時間量。另舉一例，「 $T_{1/2}$ 」係指LNP、LNP溶液、凍乾LNP組合物或LNP調配物之核酸完整性(例如mRNA完整性)降級至用於製備該LNP、LNP溶液、凍乾LNP組合物或LNP調配物的核酸(例如mRNA)之初始完整性之約1/2所持續的時間量。

【0335】如本文所用，「靶向細胞」係指所關注之任何一或多種細胞。該等細胞可發現於生物體之活體外、活體內、原位或者組織或器官中。該生物體可為動物。在一些實施例中，該生物體為哺乳動物。在一些實施例中，該生物體為人類。在一些實施例中，該生物體為患者。

【0336】如本文所用，「標靶組織」係指所關注之任何一或多種組織類型，其中治療劑及/或預防劑之遞送將導致所需的生物及/或藥理效應。所關注之標靶組織之實例包括特定組織、器官及系統或其組。在特定應用中，標靶組織可為腎、肺、脾、在血管中(例如，冠狀動脈內或股動脈內)之血管內皮或腫瘤組織(例如，經由腫瘤內注射)。「脫靶組織」係指任何一或多種組織類型，其中編碼蛋白之表現不會導致所需的生物及/或藥理效應。在特定應用中，脫靶組織可包括肝臟及脾。

【0337】術語「治療劑」或「預防劑」係指當投與至個體時具有治療、診斷及/或預防效應及/或引起所需的生物及/或藥理效應之任何劑。治療劑亦稱作「活性劑(active)」或「活性劑(active agent)」。此類劑包括但不限於細胞毒素、放射性離子、化學治療劑、小分子藥物、蛋白質及核酸。

【0338】如本文所用，術語「治療有效量」意謂欲遞送之劑(例如，核酸、藥物、組合物、治療劑、診斷劑、預防劑等)的量，該量當投與至罹患或易經受感染、疾病、病症及/或疾患之個體時足以治療該感染、疾病、病症及/或疾患，改良其症狀，診斷、預防該感染、疾病、病症及/或疾患，及/或延遲其發作。

【0339】如本文所用，「轉染」係指將物質(例如RNA)引入至細胞中。轉染可例如活體外、離體或活體內發生。

【0340】如本文所用，術語「治療」係指部分地或完全地緩解、改善、改良、減輕特定感染、疾病、病症及/或疾患，延遲其發作，抑制其進展，降低其嚴重程度，及/或降低其一或多種症狀或特徵之發生率。在一些實施例中，「治療」癌症可指抑制腫瘤之生存、生長及/或擴散。出

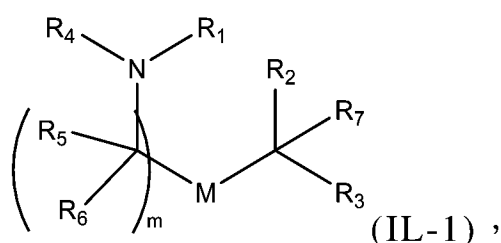
於減少發展與疾病、病症及/或疾患相關之病理之風險的目的，治療可投與至未展現疾病、病症及/或疾患之病徵的個體，及/或投與至僅展現疾病、病症及/或疾患之早期病徵的個體。

【0341】如本文所用，「 ζ 電位」係例如顆粒組合物中之脂質之動電位。

可離子化脂質

【0342】本發明提供可離子化脂質。在一些實施例中，可離子化脂質包括中央胺部分及至少一個生物可降解基團。在一些實施例中，可離子化脂質為胺基脂質。本文所述之脂質可有利地用於脂質奈米顆粒及脂質奈米顆粒調配物以將治療劑及/或預防劑(諸如核酸)遞送至哺乳動物細胞或器官。

【0343】在一些態樣中，本發明之可離子化脂質可為一或多種式(IL-1)化合物：



或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中：

R^1 係選自由 C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 及 $-R''M'R'$ 組成之群；

R^2 及 R^3 係獨立地選自由 H、 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 及 $-R^*OR''$ 組成之群，或 R^2 及 R^3 連同其所附接之原子形成雜環或碳環；

R^4 係選自由氫、 C_{3-6} 碳環、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、-

$(\text{CH}_2)_o\text{C}(\text{R}^{10})_2(\text{CH}_2)_{n-o}\text{Q}$ 、 $-\text{CHQR}$ 、 $-\text{CQ}(\text{R})_2$ 及未經取代 C_{1-6} 烷基組成之群，其中Q係選自碳環、雜環、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CX}_2\text{H}$ 、 $-\text{CXH}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{S}(\text{O})_2\text{R}$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{R}^8$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{S}(\text{O})_2\text{R}^8$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OR}$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{C}(=\text{NR}^9)\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{C}(=\text{CHR}^9)\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 、 $-\text{N}(\text{OR})\text{C}(\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{N}(\text{OR})\text{S}(\text{O})_2\text{R}$ 、 $-\text{N}(\text{OR})\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 、 $-\text{N}(\text{OR})\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{N}(\text{OR})\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{N}(\text{OR})\text{C}(=\text{NR}^9)\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{N}(\text{OR})\text{C}(=\text{CHR}^9)\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^9)\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^9)\text{R}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})\text{OR}$ 及 $-\text{C}(\text{R})\text{N}(\text{R})_2\text{C}(\text{O})\text{OR}$ ，各o係獨立地選自1、2、3及4，且各n係獨立地選自1、2、3、4及5；

各 R^5 係獨立地選自由OH、 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基及H組成之群；

各 R^6 係獨立地選自由OH、 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基及H組成之群；

M及M'係獨立地選自 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-\text{M}''-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$ 、 $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{S})-$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{S}-$ 、 $-\text{SC}(\text{S})-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})-$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}')\text{O}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}-\text{S}-$ 、芳基及雜芳基，其中M''為鍵、 C_{1-13} 烷基或 C_{2-13} 烯基；

R^7 係選自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基及H組成之群；

R^8 係選自由 C_{3-6} 碳環及雜環組成之群；

R^9 係選自由H、CN、 NO_2 、 C_{1-6} 烷基、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R})_2$ 、 C_{2-6} 烯基、 C_{3-6} 碳環及雜環組成之群；

R^{10} 係選自由H、OH、 C_{1-3} 烷基及 C_{2-3} 烯基組成之群；

各R係獨立地選自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、 $(\text{CH}_2)_q\text{OR}^*$ 及H組成之

群，

且各q係獨立地選自1、2及3；

各R'係獨立地選自由C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''及H組成之群；

各R''係獨立地選自由C₃₋₁₅烷基及C₃₋₁₅烯基組成之群；

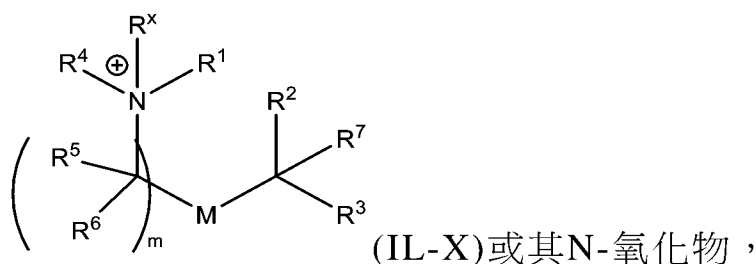
各R*係獨立地選自由C₁₋₁₂烷基及C₂₋₁₂烯基組成之群；

各Y獨立地為C₃₋₆碳環；

各X係獨立地選自由F、Cl、Br及I組成之群；且

m係選自5、6、7、8、9、10、11、12及13；且其中當R⁴為-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR或-CQ(R)₂時，則(i)當n為1、2、3、4或5時，Q不為-N(R)₂，或(ii)當n為1或2時，Q不為5員、6員或7員雜環烷基。

【0344】 在一些態樣中，本發明之可離子化脂質可為一或多種式(IL-X)化合物：



或其鹽或異構體，其中

或其鹽或異構體，其中

R¹係選自由C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR''、-YR''及-R''M'R'組成之群；

R²及R³係獨立地選自由H、C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''及-R*OR''組成之群，或R²及R³連同其所附接之原子形成雜環或

碳環；

R^4 係選自由氫、 C_{3-6} 碳環、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-(CH_2)_oC(R^{10})_2(CH_2)_{n-o}Q$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ(R)_2$ 及未經取代 C_{1-6} 烷基組成之群，其中 Q 係選自碳環、雜環、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $N(R)R^8$ 、 $-N(R)S(O)_2R^8$ 、 $-O(CH_2)_nOR$ 、 $-N(R)C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(=CHR^9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)R$ 、 $-N(OR)S(O)_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR^9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR^9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 及 $-C(R)N(R)_2C(O)OR$ ，各 o 係獨立地選自1、2、3及4，且各 n 係獨立地選自1、2、3、4及5；

R^x 係選自由 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 $-(CH_2)_vOH$ 及 $-(CH_2)_vN(R)_2$ 組成之群，

其中 v 係選自1、2、3、4、5及6；

各 R^5 係獨立地選自由 OH 、 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基及 H 組成之群；

各 R^6 係獨立地選自由 OH 、 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基及 H 組成之群；

M 及 M' 係獨立地選自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)-M''-C(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基及雜芳基，其中 M'' 為鍵、 C_{1-13} 烷基或 C_{2-13} 烯基；

R^7 係選自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基及 H 組成之群；

R⁸係選自由C₃₋₆碳環及雜環組成之群；

R⁹係選自由H、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、-OR、-S(O)₂R、-S(O)₂N(R)₂、C₂₋₆烯基、C₃₋₆碳環及雜環組成之群；

R¹⁰係選自由H、OH、C₁₋₃烷基及C₂₋₃烯基組成之群；

各R係獨立地選自由C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、(CH₂)_qOR*及H組成之群，

且各q係獨立地選自1、2及3；

各R'係獨立地選自由C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''及H組成之群；

各R''係獨立地選自由C₃₋₁₅烷基及C₃₋₁₅烯基組成之群；

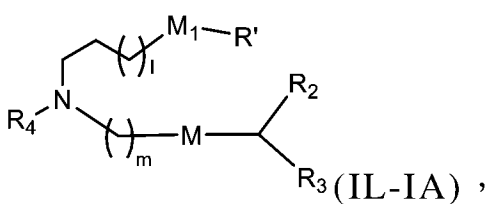
各R*係獨立地選自由C₁₋₁₂烷基及C₂₋₁₂烯基組成之群；

各Y獨立地為C₃₋₆碳環；

各X係獨立地選自由F、Cl、Br及I組成之群；且

m係選自5、6、7、8、9、10、11、12及13。

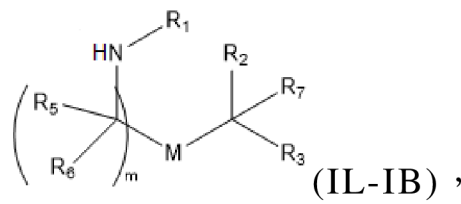
【0345】 在一些實施例中，式(IL-I)化合物之子集包括式(IL-IA)之彼等：



或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中l係選自1、2、3、4及5；m係選自5、6、7、8及9；M₁為鍵或M'；R⁴為氫、未經取代C₁₋₃烷基、-(CH₂)_oC(R¹⁰)₂(CH₂)_{n-o}Q或-(CH₂)_nQ，其中Q為OH、-NHC(S)N(R)₂、-NHC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)R⁸、-NHC(=NR⁹)N(R)₂、-NHC(=CHR⁹)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-

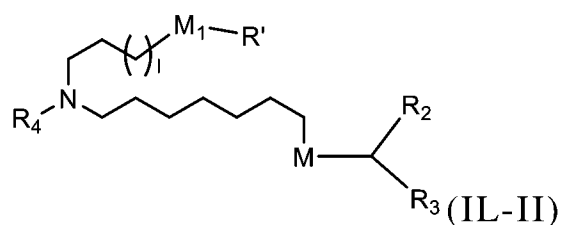
$N(R)C(O)OR$ 、雜芳基或雜環烷基； M 及 M' 係獨立地選自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)-M''-C(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S-S-$ 、芳基及雜芳基；且 R^2 及 R^3 係獨立地選自由 H 、 C_{1-14} 烷基及 C_{2-14} 烯基組成之群。例如， m 為5、7或9。例如， Q 為 OH 、 $-NHC(S)N(R)_2$ 或 $-NHC(O)N(R)_2$ 。例如， Q 為 $-N(R)C(O)R$ 或 $-N(R)S(O)_2R$ 。

【0346】 在一些實施例中，式(I)化合物之子集包括式(IL-IB)之彼等：



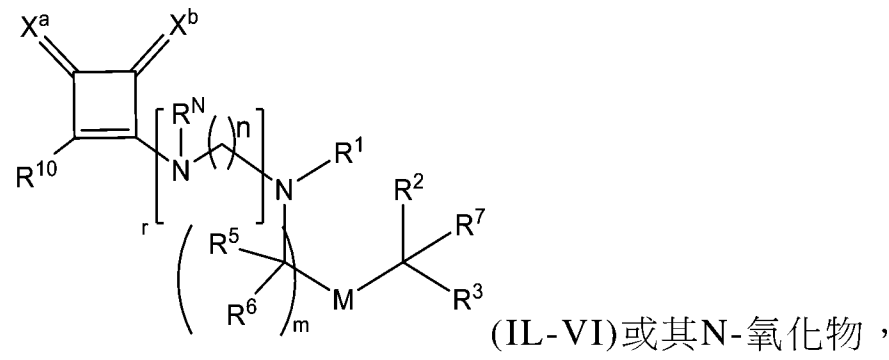
或其 N -氧化物或其鹽或異構體，其中所有變數均如本文所定義。在一些實施例中， m 係選自5、6、7、8及9； R_4 為氫、未經取代 C_{1-3} 烷基或 $(CH_2)_nQ$ ，其中 Q 為 $-OH$ 、 $-NHC(S)N(R)_2$ 、 $-NHC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $-NHC(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-NHC(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、雜芳基或雜環烷基； M 及 M' 係獨立地選自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)-M''-C(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S-S-$ 、芳基及雜芳基；且 R_2 及 R_3 係獨立地選自由 H 、 C_{1-14} 烷基及 C_{2-14} 烯基組成之群。在一些實施例中， m 為5、7或9。在一些實施例中， Q 為 OH 、 $-NHC(S)N(R)_2$ 或 $-NHC(O)N(R)_2$ 。在一些實施例中， Q 為 $-N(R)C(O)R$ 或 $-N(R)S(O)_2R$ 。

【0347】 在一些實施例中，式(IL-I)化合物之子集包括式(IL-II)之彼等：



或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中1係選自1、2、3、4及5；M1為鍵或M'；R₄為氫、未經取代C₁₋₃烷基或-(CH₂)_nQ，其中n為2、3或4，且Q為 -OH、-NHC(S)N(R)₂、-NHC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)R₈、-NHC(=NR₉)N(R)₂、-NHC(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、雜芳基或雜環烷基；M及M'係獨立地選自 -C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)-M''-C(O)O-、-C(O)N(R')-、-P(O)(OR')O-、-S-S-、芳基及雜芳基；且R₂及R₃係獨立地選自由H、C₁₋₁₄烷基及C₂₋₁₄烯基組成之群。

【0348】 在一些態樣中，本發明之可離子化脂質可為一或多種式 (IL-VI)化合物：



或其鹽或異構體，其中
R¹係選自由C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR''、-YR''及-R''M'R'組成之群；
R²及R³係獨立地選自由H、C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''及-R*OR''組成之群，或R²及R³連同其所附接之原子形成雜環或碳環；

各 R^5 係獨立地選自由OH、 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基及H組成之群；

各 R^6 係獨立地選自由OH、 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基及H組成之群；

M及M'係獨立地選自-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)-M''-C(O)O-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基及雜芳基，其中M''為鍵、 C_{1-13} 烷基或 C_{2-13} 烯基；

R^7 係選自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基及H組成之群；

各R係獨立地選自由H、 C_{1-3} 烷基及 C_{2-3} 烯基組成之群；

R^N 為H或 C_{1-3} 烷基；

各R'係獨立地選自由 C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、-R*YR''、-YR''及H組成之群；

各R''係獨立地選自由 C_{3-15} 烷基及 C_{3-15} 烯基組成之群；

各R*係獨立地選自由 C_{1-12} 烷基及 C_{2-12} 烯基組成之群；

各Y獨立地為 C_{3-6} 碳環；

各X係獨立地選自由F、Cl、Br及I組成之群；

X^a 及 X^b 各自獨立地為O或S；

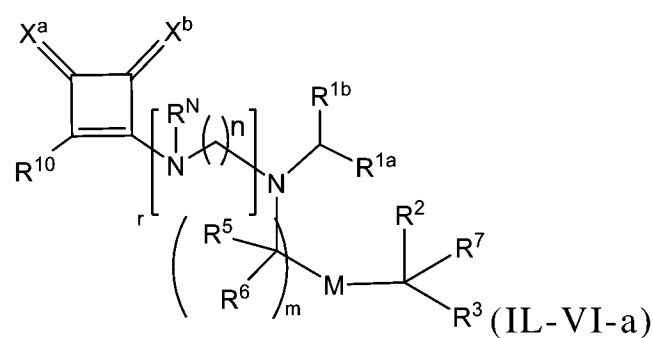
R^{10} 係選自由H、鹵基、-OH、R、-N(R)₂、-CN、-N₃、-C(O)OH、-C(O)OR、-OC(O)R、-OR、-SR、-S(O)R、-S(O)OR、-S(O)₂OR、-NO₂、-S(O)₂N(R)₂、-N(R)S(O)₂R、-NH(CH₂)_{t1}N(R)₂、-NH(CH₂)_{p1}O(CH₂)_{q1}N(R)₂、-NH(CH₂)_{s1}OR、-N((CH₂)_{s1}OR)₂、碳環、雜環、芳基及雜芳基組成之群；

m係選自5、6、7、8、9、10、11、12及13；

n係選自1、2、3、4、5、6、7、8、9及10；

- r為0或1；
- t¹係選自1、2、3、4及5；
- p¹係選自1、2、3、4及5；
- q¹係選自1、2、3、4及5；且
- s¹係選自1、2、3、4及5。

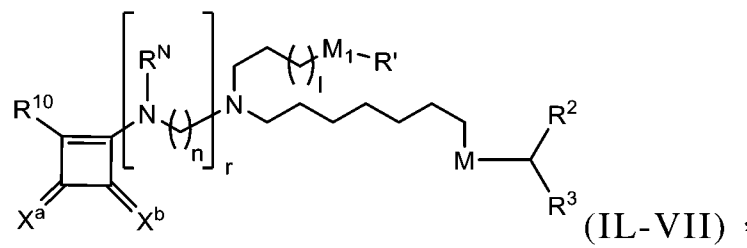
【0349】 在一些實施例中，式(IL-VI)化合物之子集包括式(IL-VI-a)之彼等：



或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中

- R^{1a}及R^{1b}係獨立地選自由C₁₋₁₄烷基及C₂₋₁₄烯基組成之群；且
- R²及R³係獨立地選自由C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''及-R*OR''組成之群，或R²及R³連同其所附接之原子形成雜環或碳環。

【0350】 在另一實施例中，式(IL-VI)化合物之子集包括式(IL-VII)之彼等：

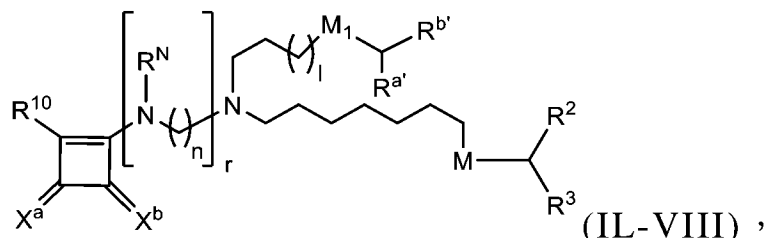


或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中

- l係選自1、2、3、4及5；
- M₁為鍵或M'；且

R^2 及 R^3 係獨立地選自由H、 C_{1-14} 烷基及 C_{2-14} 烯基組成之群。

【0351】 在另一實施例中，式(IL-VI)化合物之子集包括式(IL-VIII)之彼等：



或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中

1係選自1、2、3、4及5；

M_1 為鍵或 M' ；且

$R^{a'}$ 及 $R^{b'}$ 係獨立地選自由 C_{1-14} 烷基及 C_{2-14} 烯基組成之群；且

R^2 及 R^3 係獨立地選自由 C_{1-14} 烷基及 C_{2-14} 烯基組成之群。

【0352】 式(IL-I)、(IL-IA)、(IL-VI)、(IL-VI-a)、(IL-VII)或(IL-VIII)中任一者之化合物在適用時包括以下特徵中之一或多者。

【0353】 在一些實施例中， M_1 為 M' 。

【0354】 在一些實施例中，M及 M' 獨立地為-C(O)O-或-OC(O)-。

【0355】 在一些實施例中，M及 M' 中之至少一者為-C(O)O-或-OC(O)-。

【0356】 在某些實施例中，M及 M' 中之至少一者為-OC(O)-。

【0357】 在某些實施例中，M為-OC(O)-且 M' 為-C(O)O-。在一些實施例中，M為-C(O)O-且 M' 為-OC(O)-。在某些實施例中，M及 M' 各自為-OC(O)-。在一些實施例中，M及 M' 各自為-C(O)O-。

【0358】 在某些實施例中，M及 M' 中之至少一者為-OC(O)- M'' -C(O)O-。

【0359】 在一些實施例中，M及M'獨立地為-S-S-。

【0360】 在一些實施例中，M及M'中之至少一者為-S-S-。

【0361】 在一些實施例中，M及M'之一為-C(O)O-或-OC(O)-且另一者為-S-S-。例如，M為-C(O)O-或-OC(O)-且M'為-S-S-，或M'為-C(O)O-或-OC(O)-且M為-S-S-。

【0362】 在一些實施例中，M及M'之一為-OC(O)-M''-C(O)O-，其中M''為鍵、C₁₋₁₃烷基或C₂₋₁₃烯基。在其他實施例中，M''為C₁₋₆烷基或C₂₋₆烯基。在某些實施例中，M''為C₁₋₄烷基或C₂₋₄烯基。例如，在一些實施例中，M''為C₁烷基。例如，在一些實施例中，M''為C₂烷基。例如，在一些實施例中，M''為C₃烷基。例如，在一些實施例中，M''為C₄烷基。例如，在一些實施例中，M''為C₂烯基。例如，在一些實施例中，M''為C₃烯基。例如，在一些實施例中，M''為C₄烯基。

【0363】 在一些實施例中，l為1、3或5。

【0364】 在一些實施例中，R⁴為氫。

【0365】 在一些實施例中，R⁴不為氫。

【0366】 在一些實施例中，R⁴為未經取代甲基或-(CH₂)_nQ，其中Q為OH、-NHC(S)N(R)₂、-NHC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R或-N(R)S(O)₂R。

【0367】 在一些實施例中，Q為OH。

【0368】 在一些實施例中，Q為-NHC(S)N(R)₂。

【0369】 在一些實施例中，Q為-NHC(O)N(R)₂。

【0370】 在一些實施例中，Q為-N(R)C(O)R。

【0371】 在一些實施例中，Q為-N(R)S(O)₂R。

【0372】 在一些實施例中，Q為-O(CH₂)_nN(R)₂。

【0373】 在一些實施例中，Q為 $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OR}$ 。

【0374】 在一些實施例中，Q為 $-\text{N}(\text{R})\text{R}^8$ 。

【0375】 在一些實施例中，Q為 $-\text{NHC}(=\text{NR}^9)\text{N}(\text{R})_2$ 。

【0376】 在一些實施例中，Q為 $-\text{NHC}(=\text{CHR}^9)\text{N}(\text{R})_2$ 。

【0377】 在一些實施例中，Q為 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$ 。

【0378】 在一些實施例中，Q為 $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 。

【0379】 在一些實施例中，n為2。

【0380】 在一些實施例中，n為3。

【0381】 在一些實施例中，n為4。

【0382】 在一些實施例中， M_1 不存在。

【0383】 在一些實施例中，至少一個 R^5 為羥基。例如，一個 R^5 為羥基。

【0384】 在一些實施例中，至少一個 R^6 為羥基。例如，一個 R^6 為羥基。

【0385】 在一些實施例中， R^5 及 R^6 之一為羥基。例如，一個 R^5 為羥基且各 R^6 為氫。例如，一個 R^6 為羥基且各 R^5 為氫。

【0386】 在一些實施例中， R^x 為 C_{1-6} 烷基。在一些實施例中， R^x 為 C_{1-3} 烷基。例如， R^x 為甲基。例如， R^x 為乙基。例如， R^x 為丙基。

【0387】 在一些實施例中， R^x 為 $-(\text{CH}_2)_v\text{OH}$ 且v為1、2或3。例如， R^x 為甲醯基。例如， R^x 為乙醯基。例如， R^x 為丙醯基。

【0388】 在一些實施例中， R^x 為 $-(\text{CH}_2)_v\text{N}(\text{R})_2$ ，v為1、2或3且各R為H或甲基。例如， R^x 為甲胺基、甲基甲胺基或二甲基甲胺基。例如， R^x 為胺基甲基、甲基胺基甲基或二甲基胺基甲基。例如， R^x 為胺基乙基、甲

基胺基乙基或二甲基胺基乙基。例如， R^x 為胺基丙基、甲基胺基丙基或二甲基胺基丙基。

【0389】 在一些實施例中， R' 為 C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 或 $-YR''$ 。

【0390】 在一些實施例中， R^2 及 R^3 獨立地為 C_{3-14} 烷基或 C_{3-14} 烯基。

【0391】 在一些實施例中， R^{1b} 為 C_{1-14} 烷基。在一些實施例中， R^{1b} 為 C_{2-14} 烷基。在一些實施例中， R^{1b} 為 C_{3-14} 烷基。在一些實施例中， R^{1b} 為 C_{1-8} 烷基。在一些實施例中， R^{1b} 為 C_{1-5} 烷基。在一些實施例中， R^{1b} 為 C_{1-3} 烷基。在一些實施例中， R^{1b} 係選自 C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_3 烷基、 C_4 烷基及 C_5 烷基。例如，在一些實施例中， R^{1b} 為 C_1 烷基。例如，在一些實施例中， R^{1b} 為 C_2 烷基。例如，在一些實施例中， R^{1b} 為 C_3 烷基。例如，在一些實施例中， R^{1b} 為 C_4 烷基。例如，在一些實施例中， R^{1b} 為 C_5 烷基。

【0392】 在一些實施例中， R^1 不同於 $-(CHR^5R^6)_m-M-CR^2R^3R^7$ 。

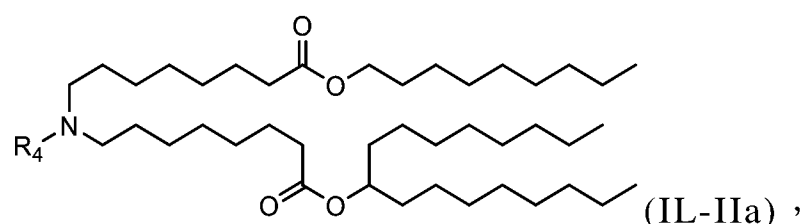
【0393】 在一些實施例中， $-CHR^{1a}R^{1b}-$ 不同於 $-(CHR^5R^6)_m-M-CR^2R^3R^7$ 。

【0394】 在一些實施例中， R^7 為H。在一些實施例中， R^7 係選自 C_{1-3} 烷基。例如，在一些實施例中， R^7 為 C_1 烷基。例如，在一些實施例中， R^7 為 C_2 烷基。例如，在一些實施例中， R^7 為 C_3 烷基。在一些實施例中， R^7 係選自 C_4 烷基、 C_4 烯基、 C_5 烷基、 C_5 烯基、 C_6 烷基、 C_6 烯基、 C_7 烷基、 C_7 烯基、 C_9 烷基、 C_9 烯基、 C_{11} 烷基、 C_{11} 烯基、 C_{17} 烷基、 C_{17} 烯基、 C_{18} 烷基及 C_{18} 烯基。

【0395】 在一些實施例中， Rb' 為 C_{1-14} 烷基。在一些實施例中， Rb' 為 C_{2-14} 烷基。在一些實施例中， Rb' 為 C_{3-14} 烷基。在一些實施例中，

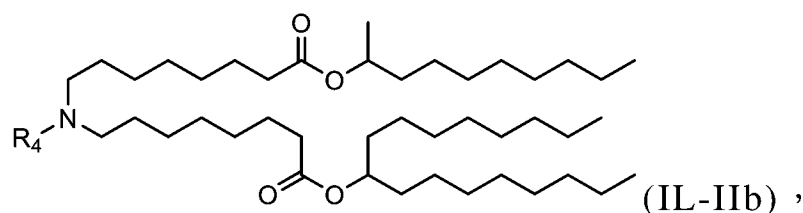
$R^{b'}$ 為 C_{1-8} 烷基。在一些實施例中， $R^{b'}$ 為 C_{1-5} 烷基。在一些實施例中， $R^{b'}$ 為 C_{1-3} 烷基。在一些實施例中， $R^{b'}$ 係選自 C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_3 烷基、 C_4 烷基及 C_5 烷基。例如，在一些實施例中， $R^{b'}$ 為 C_1 烷基。例如，在一些實施例中， $R^{b'}$ 為 C_2 烷基。例如，在一些實施例中， $R^{b'}$ 為 C_3 烷基。例如，在一些實施例中， $R^{b'}$ 為 C_4 烷基。

【0396】 在一個實施例中，式(IL-I)化合物具有式(IL-IIa)：



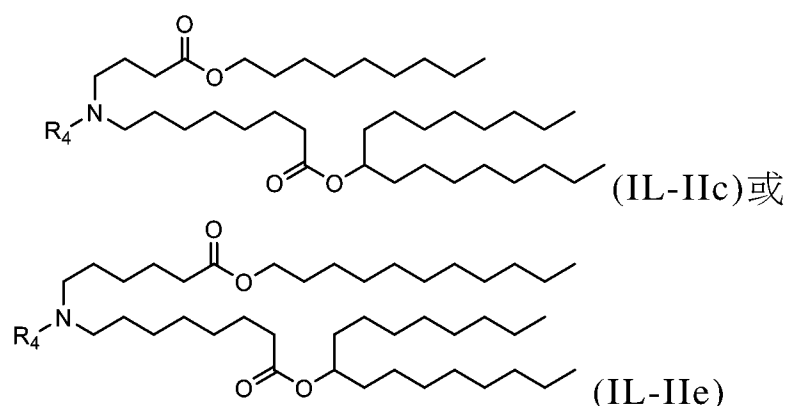
或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中 R_4 如本文所述。

【0397】 在另一實施例中，式(IL-I)化合物具有式(IL-IIb)：



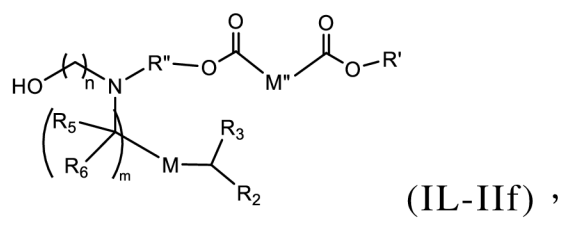
或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中 R_4 如本文所述。

【0398】 在另一實施例中，式(IL-I)化合物具有式(IL-IIc)或(IL-IIe)：



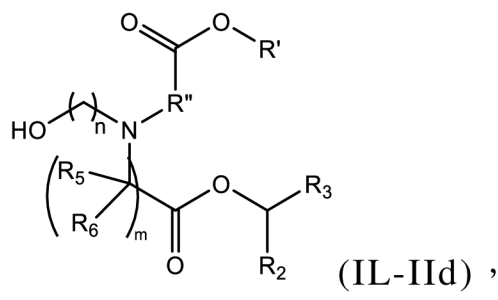
或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中 R_4 如本文所述。

【0399】 在另一實施例中，式(IL-I)化合物具有式(IL-IIf)：



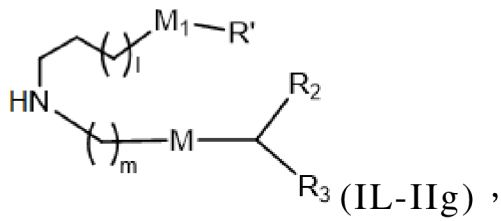
或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中M為-C(O)O-或-OC(O)-，M''為C₁₋₆烷基或C₂₋₆烯基，R₂及R₃係獨立地選自由C₅₋₁₄烷基及C₅₋₁₄烯基組成之群，且n係選自2、3及4。

【0400】 在又一實施例中，式(IL-I)化合物具有式(IL-II d)：



或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中n為2、3或4；且m、R'、R''及R₂-R₆如本文所述。在一些實施例中，R₂及R₃中之每一者可獨立地選自由C₅₋₁₄烷基及C₅₋₁₄烯基組成之群。

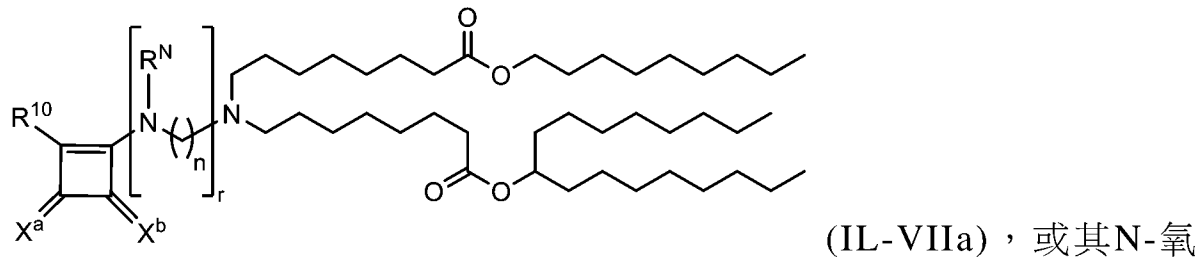
【0401】 在又一實施例中，式(IL-I)化合物具有式(IL-II g)：



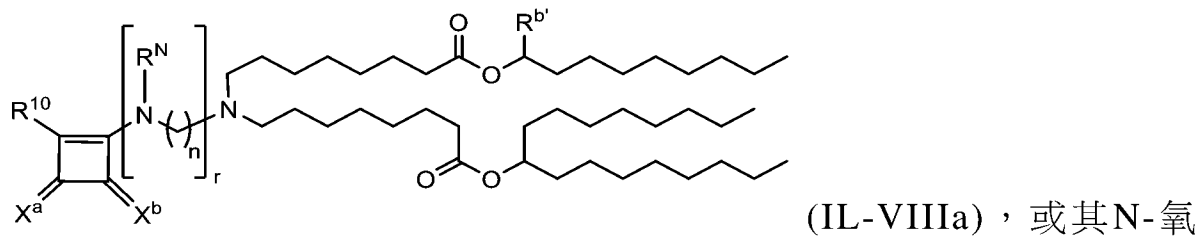
或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中l係選自1、2、3、4及5；m係選自5、6、7、8及9；M₁為鍵或M'；M及M'係獨立地選自-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)-M''-C(O)O-、-C(O)N(R')-、-P(O)(OR')O-、-S-S-、芳基及雜芳基；且R₂及R₃係獨立地選自由H、C₁₋₁₄烷基及C₂₋₁₄烯基組成之群。在一些實施例中，M''為C₁₋₆烷基(例如C₁₋₄烷基)或C₂₋₆烯基(例如C₂₋₄烯基)。在一些實施例中，R₂及R₃係獨立地選自由C₅₋₁₄烷基及C₅₋₁₄烯基組

成之群。

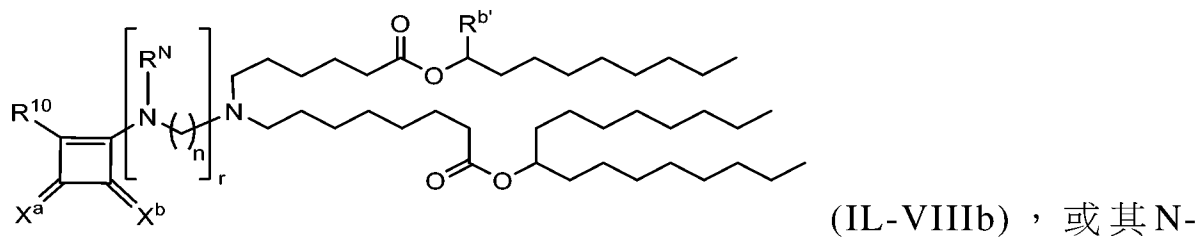
【0402】 在另一實施例中，式(IL-VI)化合物之子集包括式(IL-VIIa)之彼等：



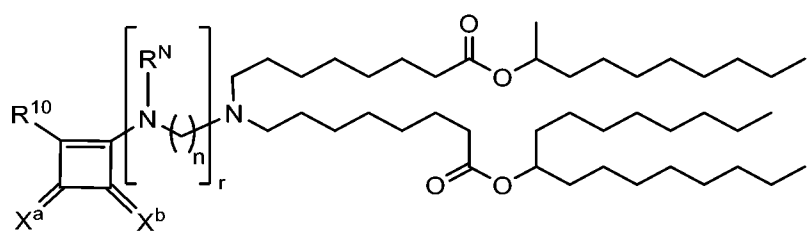
【0403】 在另一實施例中，式(VI)化合物之子集包括式(IL-VIIIa)之彼等：



【0404】 在另一實施例中，式(IL-VI)化合物之子集包括式(IL-VIIIb)之彼等：



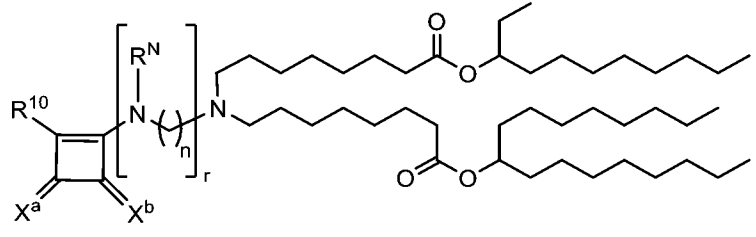
【0405】 在另一實施例中，式(IL-VI)化合物之子集包括式(IL-VIIb-1)之彼等：



(IL-VIIb-1)，或其N-

氧化物或其鹽或異構體。

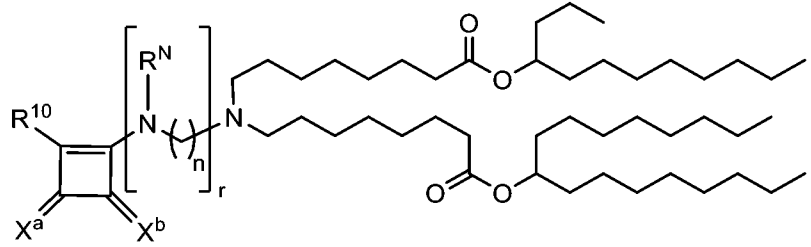
【0406】 在另一實施例中，式(IL-VI)化合物之子集包括式(IL-VIIb-2)之彼等：



(IL-VIIb-2)，或其N-氧

化物或其鹽或異構體。

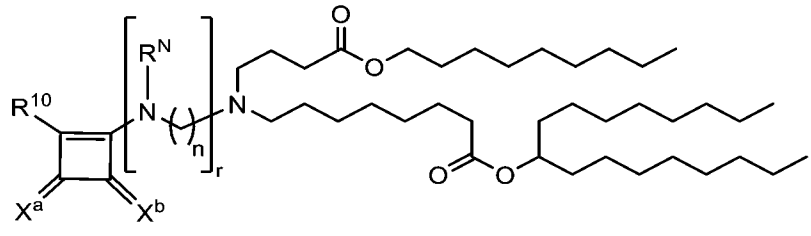
【0407】 在另一實施例中，式(IL-VI)化合物之子集包括式(IL-VIIb-3)之彼等：



(IL-VIIb-3)，或其N-

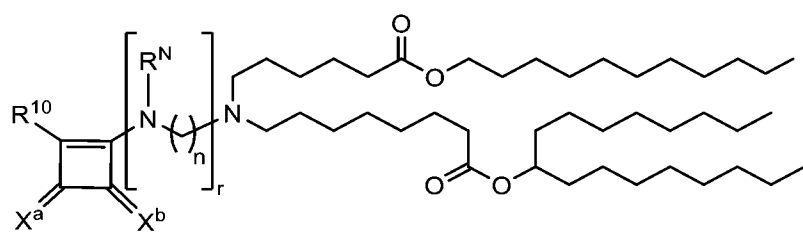
氧化物或其鹽或異構體。

【0408】 在另一實施例中，式(IL-VI)化合物之子集包括式(IL-VIIc)之彼等：



(IL-VIIc)。

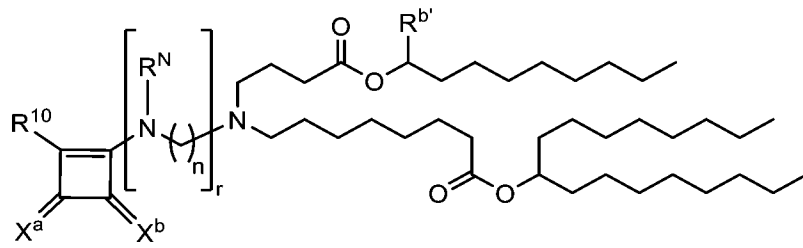
【0409】 在另一實施例中，式(IL-VI)化合物之子集包括式(IL-VIIId)之彼等：



(IL-VIIId)，或其N-氧

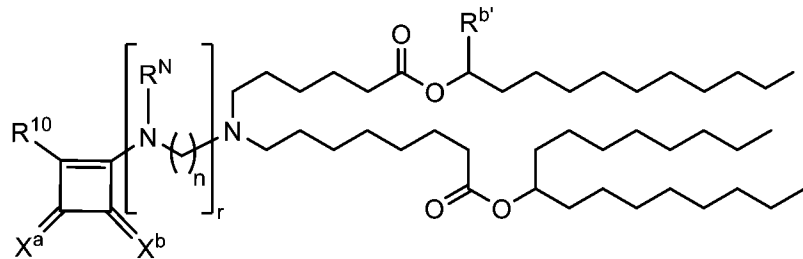
化物或其鹽或異構體。

【0410】 在另一實施例中，式(IL-VI)化合物之子集包括式(IL-VIIIc)之彼等：



(IL-VIIIc)。

【0411】 在另一實施例中，式(IL-VI)化合物之子集包括式(IL-VIIIId)之彼等：



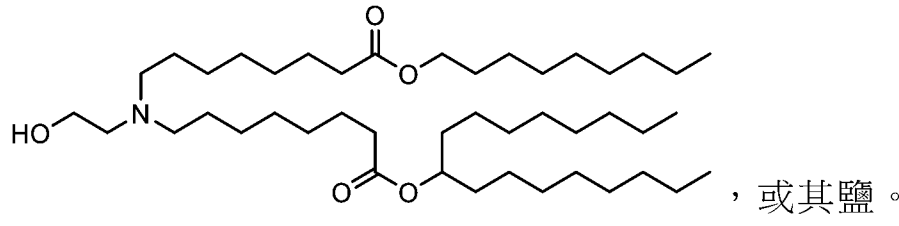
(IL-VIIIId)，或其N-

氧化物或其鹽或異構體。

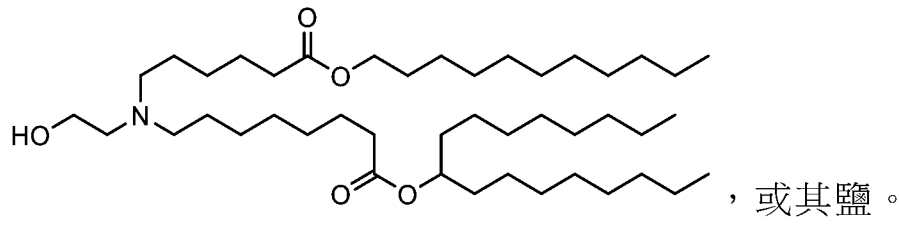
【0412】 在一些實施例中，可離子化脂質係描述於PCT申請案第 PCT/US2020/051613 號、第 PCT/US2020/051613 號及第 PCT/US2020/051629號，及PCT公開案第 WO 2017/049245號、第 WO 2018/170306號、第WO 2018/170336號、第WO 2020/061367號中之一或多種化合物。

【0413】 在一些實施例中，可離子化脂質係選自描述於美國申請案第62/475,166號中之化合物1-280。

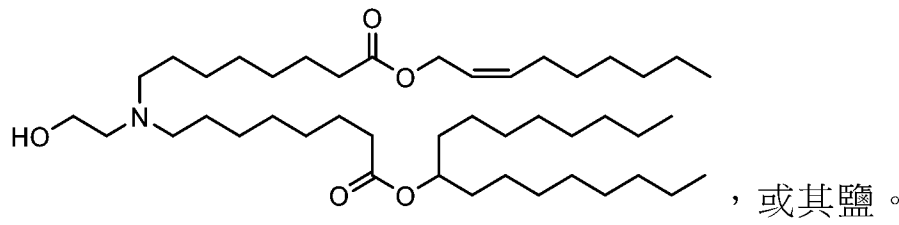
【0414】 在一些實施例中，可離子化脂質為



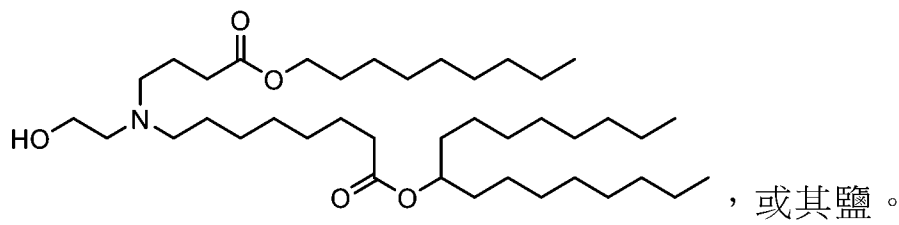
【0415】 在一些實施例中，可離子化脂質為



【0416】 在一些實施例中，可離子化脂質為

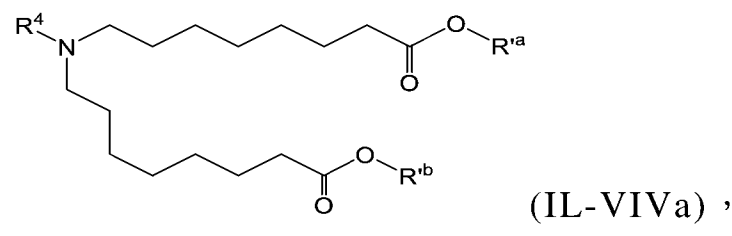


【0417】 在一些實施例中，可離子化脂質為



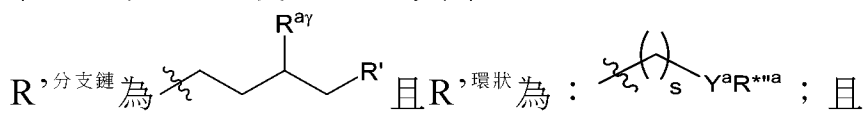
【0418】 在一些態樣中，本發明之可離子化脂質可為式(IL-VIVa)

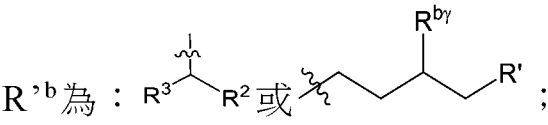
化合物中之一或更多者：



或其N-氧化物或其鹽或異構體，

其中R'a為R'分支鏈或R'環狀；其中





其中  表示附接點；

其中 $R^{a'}$ 及 $R^{b'}$ 各自獨立地為 C_{2-12} 烷基或 C_{2-12} 烯基；

R^2 及 R^3 各自獨立地選自由 C_{1-14} 烷基及 C_{2-14} 烯基組成之群；

R^4 為 $-(CH_2)_2OH$ ；

各 R' 獨立地為 C_{1-12} 烷基或 C_{2-12} 烯基；

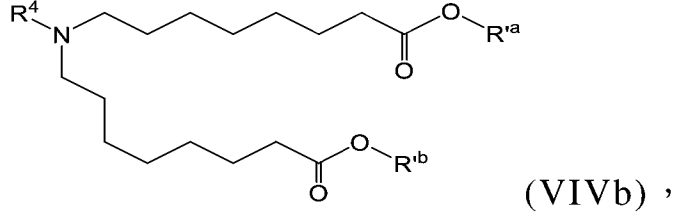
Y^a 為 C_{3-6} 碳環；

$R^{*''a}$ 係選自由 C_{1-15} 烷基及 C_{2-15} 烯基組成之群；且

s 為 2 或 3。

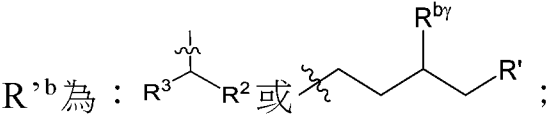
【0419】 在一些態樣中，本發明之可離子化脂質可為式 (IL-VIVb)

化合物中之一或多个：



或其 N-氧化物或其鹽或異構體，

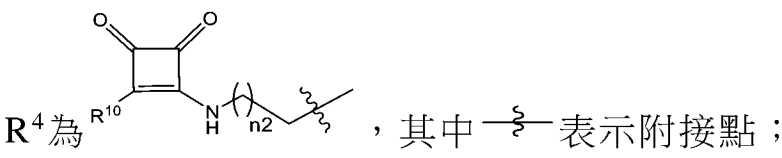
其中 $R^{a'}$ 為 $R^{a'}$ 分支鏈 或 $R^{a'}$ 環狀；其中



其中  表示附接點；

其中 $R^{a'}$ 及 $R^{b'}$ 各自獨立地為 C_{2-12} 烷基或 C_{2-12} 烯基；

R^2 及 R^3 各自獨立地選自由 C_{1-14} 烷基及 C_{2-14} 烯基組成之群；



R^{10} 為 $N(R)_2$ ；各 R 獨立地選自由 C_{1-6} 烷基、 C_{2-3} 烯基及 H 組成之群；且 n_2 係選自由 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 組成之群；

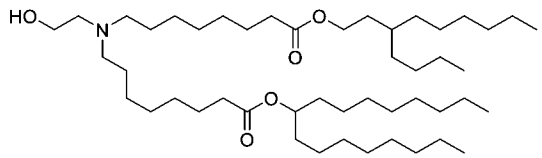
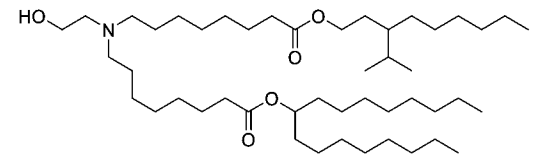
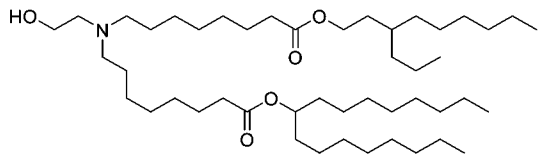
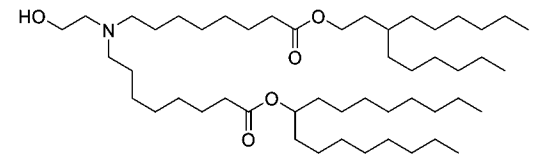
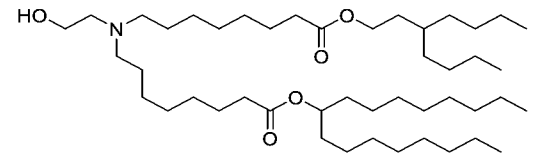
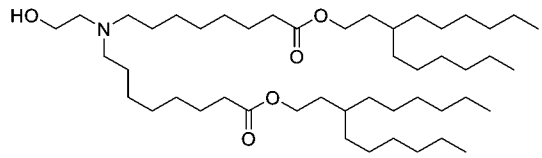
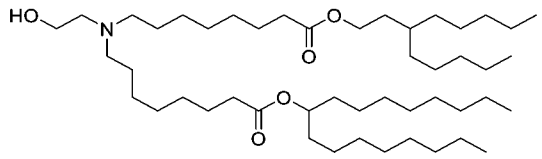
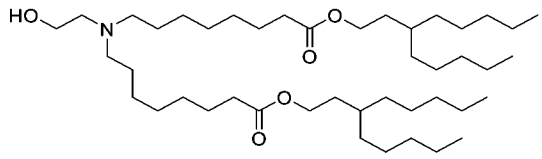
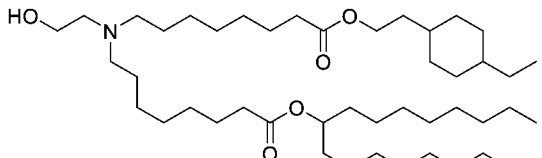
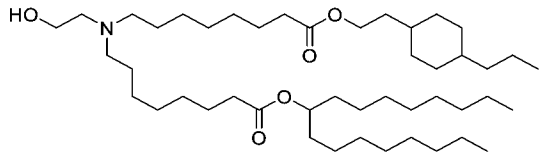
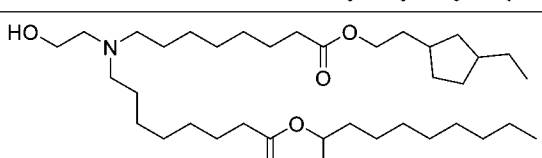
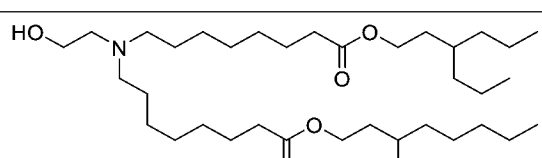
各 R' 獨立地為 C_{1-12} 烷基或 C_{2-12} 烯基；

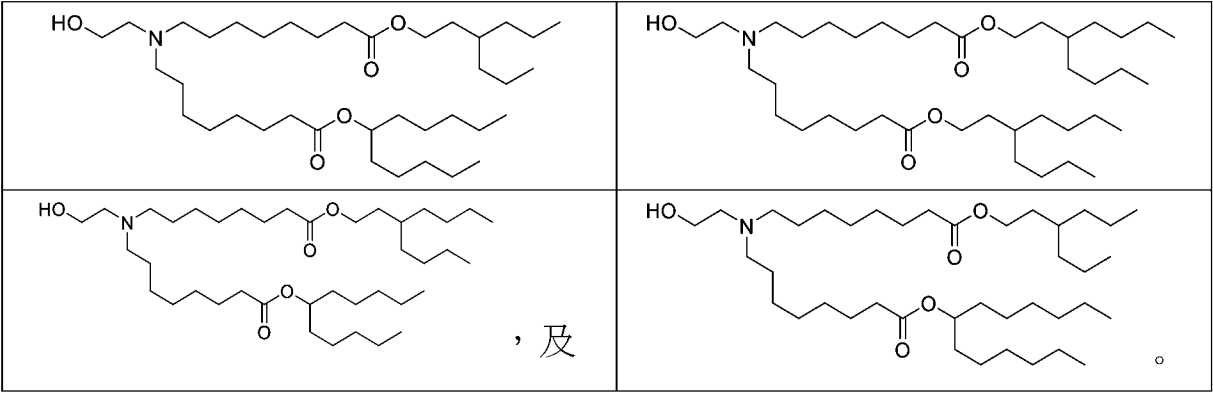
Y^a 為 C_{3-6} 碳環；

$R^{*''a}$ 係選自由 C_{1-15} 烷基及 C_{2-15} 烯基組成之群；且

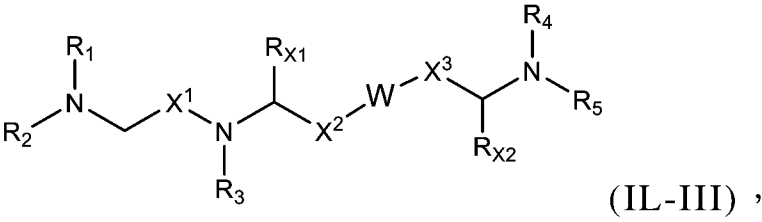
s 為 2 或 3。

【0420】 在一些實施例中，可離子化脂質係選自：

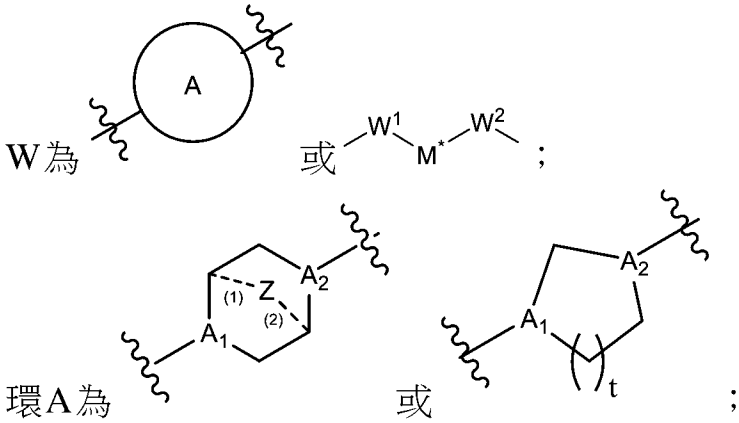
	
	
	
	
	
	



【0421】 在一些態樣中，本發明之可離子化脂質可為式(IL-III)化合物中之一或多者：



或其鹽或異構體，其中，



t為1或2；

A₁及A₂各自獨立地選自CH或N；

Z為CH₂或不存在，其中當Z為CH₂時，虛線(1)及(2)各自表示單鍵；且當Z不存在時，虛線(1)及(2)均不存在；

R₁、R₂、R₃、R₄及R₅係獨立地選自由C₅₋₂₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R''MR'、-R*YR''、-YR''及-R*OR''組成之群；

R_{X1}及R_{X2}各自獨立地為H或C₁₋₃烷基；

各 M 係獨立地選自由 -C(O)O- 、 -OC(O)- 、 -OC(O)O- 、 -C(O)N(R')- 、 -N(R')C(O)- 、 -C(O)- 、 -C(S)- 、 -C(S)S- 、 -SC(S)- 、 -CH(OH)- 、 -P(O)(OR')O- 、 -S(O)₂- 、 -C(O)S- 、 -SC(O)- 、 芳基及雜芳基組成之群；

M*為C₁-C₆烷基，

W¹及W²各自獨立地選自由-O-及-N(R₆)-組成之群；

各R₆係獨立地選自由H及C₁₋₅烷基組成之群；

X¹、X²及X³係獨立地選自由鍵、-CH₂-、-(CH₂)₂-、-CHR-、-CHY-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-(CH₂)_n-C(O)-、-C(O)-(CH₂)_n-、-(CH₂)_n-C(O)O-、-OC(O)-(CH₂)_n-、-(CH₂)_n-OC(O)-、-C(O)O-(CH₂)_n-、-CH(OH)-、-C(S)-及-CH(SH)-組成之群；

各Y獨立地為C₃₋₆碳環；

各R*係獨立地選自由C₁₋₁₂烷基及C₂₋₁₂烯基組成之群；

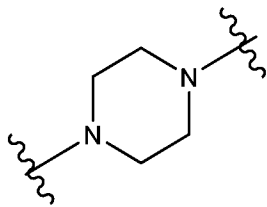
各R係獨立地選自由C₁₋₃烷基及C₃₋₆碳環組成之群；

各R'係獨立地選自由C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基及H組成之群；

各R''係獨立地選自由C₃₋₁₂烷基、C₃₋₁₂烯基及-R*MR'組成之群；

且

n為整數1-6；

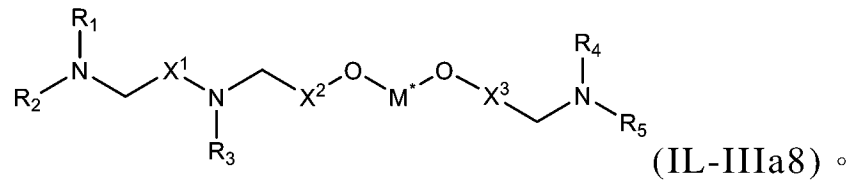
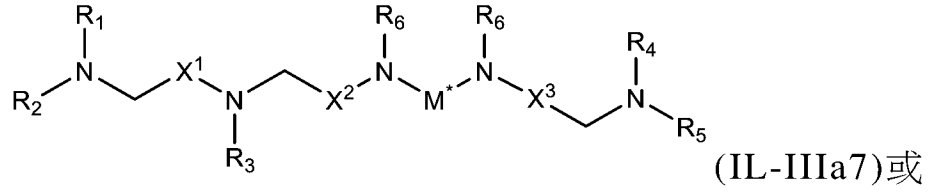
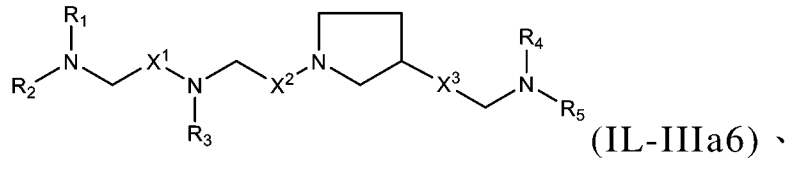
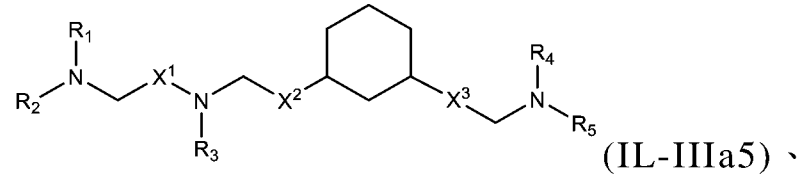
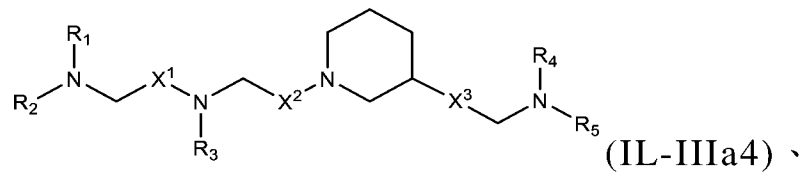
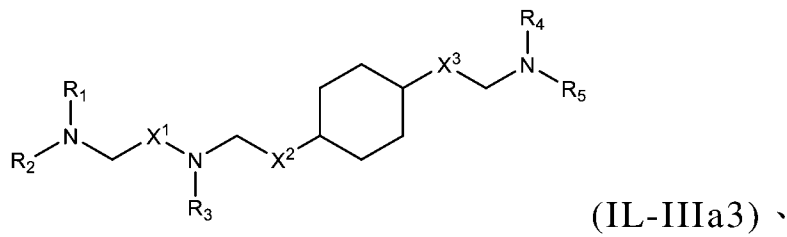
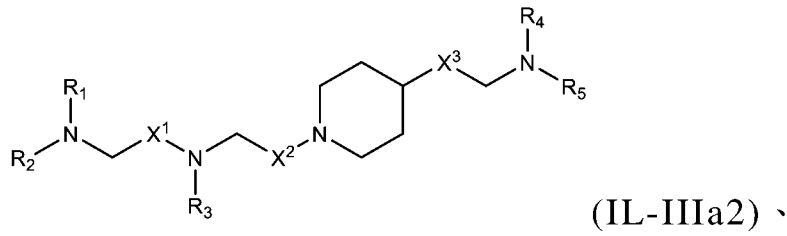
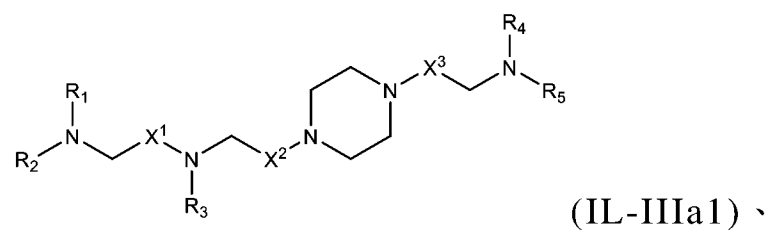


其中當環A為 時，則

- i) X¹、X²及X³中之至少一者不為-CH₂-；及/或
- ii) R₁、R₂、R₃、R₄及R₅中之至少一者為-R''MR'。

【0422】 在一些實施例中，該化合物具有式(IL-IIIa1)-(IL-IIIa8)中
第 97 頁(發明說明書)

之任一者：

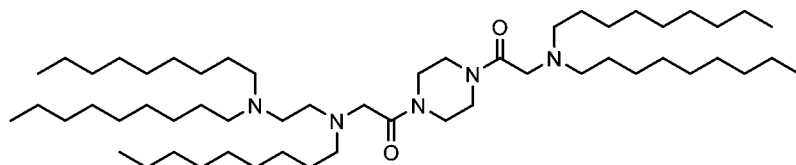


【0423】 在一些實施例中，可離子化脂質係描述於PCT公開案第 WO 2017/112865號、第WO 2018/232120號中之一或多種化合物。

【0424】 在一些實施例中，可離子化脂質係選自描述於PCT公開案第WO 2018/232120號中之化合物1-156。

【0425】 在一些實施例中，可離子化脂質係選自描述於PCT公開案第WO 2017/112865號中之化合物1-16、42-66、68-76及78-156。

【0426】 在一些實施例中，可離子化脂質為



，或其鹽。

【0427】 根據式(IL-1)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-II)、(IL-IIa)、(IL-IIb)、(IL-IIc)、(IL-IId)、(IL-IIe)、(IL-IIf)、(IL-IIg)、(IL-VI)、(IL-VIIa)、(IL-VIIa)、(IL-VIIb)、(IL-VIIb-1)、(IL-VIIb-2)、(IL-VIIb-3)、(IL-VIIc)、(IL-VIIId)、(IL-VIIId)、(IL-VIIId)、(IL-VIVa)、(IL-VIVb)、(IL-III)、(IL-IIIa1)、(IL-IIIa2)、(IL-IIIa3)、(IL-IIIa4)、(IL-IIIa5)、(IL-IIIa6)、(IL-IIIa7)或(IL-IIIa8)之脂質的中央胺部分可在生理pH下質子化。因此，脂質可在生理pH下具有正電荷或部分正電荷。此類脂質可稱作陽離子或可離子化(胺基)脂質。脂質亦可為兩性離子的，亦即具有正電荷及負電荷兩者之中性分子。

【0428】 在一些實施例中，可離子化脂質係選自由3-(雙十二烷基胺基)-N1,N1,4-三(十二烷基)-1-哌嗪乙胺(KL10)、N1-[2-(雙十二烷基胺基)乙基]-N1,N4,N4-三(十二烷基)-1,4-哌嗪二乙胺(KL22)、14,25-雙十三烷基-15,18,21,24-四氮雜-三十八烷(KL25)、1,2-二亞油烯基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLin-DMA)、2,2-二亞油烯基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-DMA)、4-(二甲基胺基)丁酸三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基酯(DLin-MC3-DMA)、2,2-二亞油烯基-4-(2-二甲基胺基乙基)-[1,3]-二

氧戊環(DLin-KC2-DMA)、1,2-二油烯基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DODMA)、2-({8-[(3 β)-膽固-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA)、(2R)-2-({8-[(3 β)-膽固-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA (2R))及(2S)-2-({8-[(3 β)-膽固-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA (2S))組成之群。

聚乙二醇(PEG)脂質

【0429】如本文所用，術語「PEG脂質」係指經聚乙二醇(PEG)修飾之脂質。PEG脂質之非限制性實例包括經PEG修飾之磷脂醯乙醇胺及磷脂酸、PEG-神經醯胺結合物(例如PEG-CerC14或PEG-CerC20)、經PEG修飾之二烷基胺及經PEG修飾之1,2-二醯氧基丙-3-胺。此類脂質亦稱作PEG化脂質。在一些實施例中，PEG脂質可為PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC或PEG-DSPE脂質。

【0430】在一些實施例中，PEG脂質包括但不限於1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(PEG-DMG)、1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[胺基(聚乙二醇)] (PEG-DSPE)、PEG-二硬脂基甘油(PEG-DSG)、PEG-二棕櫚油烯基、PEG-二油烯基、PEG-二硬脂基、PEG-二醯基咪唑雙醯胺(PEG-DAG)、PEG-二棕櫚醯基磷脂醯乙醇胺(PEG-DPPE)或PEG-1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-胺(PEG-c-DMA)。

【0431】在一個實施例中，PEG脂質係選自由經PEG修飾之磷脂醯乙醇胺、經PEG修飾之磷脂酸、經PEG修飾之神經醯胺、經PEG修飾之二烷基胺、經PEG修飾之二醯基甘油、經PEG修飾之二烷基甘油及其混合物

組成之群。

【0432】 在一些實施例中，PEG脂質之脂質部分包括長度為約C₁₄至約C₂₂之彼等。在一些實施例中，PEG脂質之脂質部分包括長度為約C₁₄至約C₁₆之彼等。在一些實施例中，PEG部分(例如mPEG-NH₂)之大小為約1000、2000、5000、10,000、15,000或20,000道爾頓。在一個實施例中，PEG脂質為PEG_{2k}-DMG。

【0433】 在一個實施例中，本文所述之脂質奈米顆粒可包含PEG脂質，其為不可擴散PEG。不可擴散PEG之非限制性實例包括PEG-DSG及PEG-DSPE。

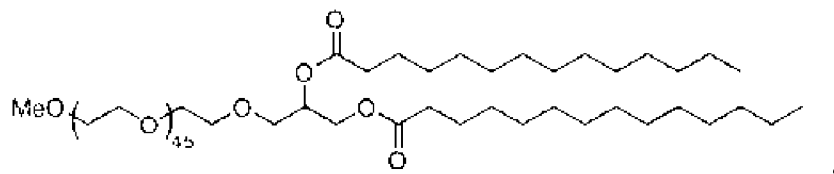
【0434】 PEG脂質係此項技術中已知的，諸如描述於美國專利第8158601號及國際公開案第WO 2015/130584 A2號中之彼等，該等文獻以引用之方式整體併入本文中。

【0435】 一般而言，本文所述之各式之一些其他脂質組分(例如PEG脂質)可如2016年12月10日提出申請之標題為「Compositions and Methods for Delivery of Therapeutic Agents」的國際專利申請案第PCT/US2016/000129號中所述般合成，該案以引用之方式整體併入。

【0436】 脂質奈米顆粒或脂質奈米顆粒調配物之脂質組分可包括一或多種包含聚乙二醇之分子，諸如PEG或經PEG修飾之脂質。此類物質可替代地稱作PEG化脂質。PEG脂質係經聚乙二醇修飾之脂質。PEG脂質可選自包括經PEG修飾之磷脂醯乙醇胺、經PEG修飾之磷脂酸、經PEG修飾之神經醯胺、經PEG修飾之二烷基胺、經PEG修飾之二醯基甘油、經PEG修飾之二烷基甘油及其混合物的非限制性群。在一些實施例中，PEG脂質可為PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC

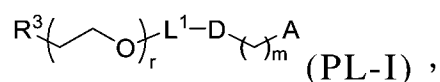
或PEG-DSPE脂質。

【0437】 在一些實施例中，經PEG修飾之脂質係PEG DMG之經修飾形式。PEG-DMG具有以下結構：



【0438】 在一個實施例中，可用於本發明之PEG脂質可為描述於國際公開案第WO2012099755號中的PEG化脂質，該案之內容以引用之方式整體併入本文中。本文所述之此等例示性PEG脂質中的任一者均可經修飾以在PEG鏈上包含羥基。在一些實施例中，PEG脂質為PEG-OH脂質。如本文一般所定義，「PEG-OH脂質」(本文中亦稱作「羥基-PEG化脂質」)係在脂質上具有一或多個羥基(-OH)之PEG化脂質。在一些實施例中，PEG-OH脂質在PEG鏈上包括一或多個羥基。在一些實施例中，PEG-OH或羥基-PEG化脂質在PEG鏈之末端包含-OH基團。每種可能性代表本發明之一單獨實施例。

【0439】 在一些實施例中，可用於本發明之PEG脂質為式(PL-I)化合物。本文提供式(PL-I)化合物：



或其鹽，其中：

R^3 為-OR⁰；

R⁰為氫、視情況經取代之烷基或氧保護基；

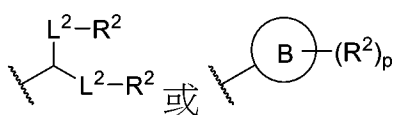
r為1與100之間的整數，包括1及100；

L¹為視情況經取代之C₁₋₁₀伸烷基，其中該視情況經取代之C₁₋₁₀伸烷基的至少一個亞甲基獨立地經視情況經取代之伸碳環基、視情況

經取代之伸雜環基、視情況經取代之伸芳基、視情況經取代之伸雜芳基、 $-O-$ 、 $-N(R^N)-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)O-$ 或 $-NR^NC(O)N(R^N)-$ 置換；

D係藉由點擊化學獲得之部分或在生理條件下可裂解之部分；

m為0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

A具有下式：；

L^2 之各情況獨立地為鍵或視情況經取代之 C_{1-6} 伸烷基，其中該視情況經取代之 C_{1-6} 伸烷基的一個亞甲基單元視情況經 $-O-$ 、 $-N(R^N)-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)O-$ 或 $-NR^NC(O)N(R^N)-$ 置換；

R^2 之各情況獨立地為視情況經取代之 C_{1-30} 烷基、視情況經取代之 C_{1-30} 烯基或視情況經取代之 C_{1-30} 炔基；視情況，其中 R^2 的一或多個亞甲基單元獨立地經視情況經取代之伸碳環基、視情況經取代之伸雜環基、視情況經取代之伸芳基、視情況經取代之伸雜芳基、 $-N(R^N)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)-$ 、 $-NR^NC(O)N(R^N)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)O-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(=NR^N)-$ 、 $-C(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(=NR^N)-$ 、 $-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(S)-$ 、 $-NR^NC(S)N(R^N)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-OS(O)-$ 、 $-S(O)O-$ 、 $-OS(O)O-$ 、 $-OS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2O-$ 、 $-OS(O)_2O-$ 、 $-N(R^N)S(O)-$ 、 $-S(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)N(R^N)-$ 、 $-OS(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R^N)-$ 、

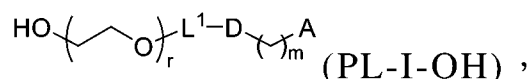
$N(R^N)S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-OS(O)_2N(R^N)-$ 或 $-N(R^N)S(O)_2O-$ 置換；

R^N 之各情況獨立地為氫、視情況經取代之烷基或氮保護基；

環B為視情況經取代之碳環基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基或視情況經取代之雜芳基；且

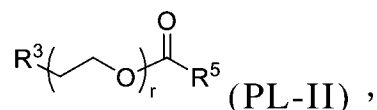
p為1或2。

【0440】 在一些實施例中，式(PL-I)化合物為PEG-OH脂質(亦即， R^3 為 $-OR^0$ ，且 R^0 為氫)。在一些實施例中，式(PL-I)化合物具有式(PL-I-OH)：



或其鹽。

【0441】 在一些實施例中，可用於本發明之PEG脂質為PEG化脂肪酸。在一些實施例中，可用於本發明之PEG脂質為式(PL-II)化合物。本文提供式(PL-II)化合物：



或其鹽，其中：

R^3 為 $-OR^0$ ；

R^0 為氫、視情況經取代之烷基或氧保護基；

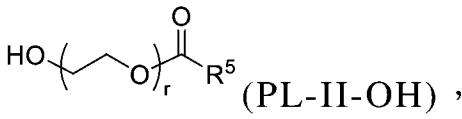
r為1與100之間的整數，包括1及100；

R^5 為視情況經取代之 C_{10-40} 烷基、視情況經取代之 C_{10-40} 烯基或視情況經取代之 C_{10-40} 炔基；且視情況， R^5 的一或多個亞甲基單元經視情況經取代之伸碳環基、視情況經取代之伸雜環基、視情況經取代之伸芳基、視情況經取代之伸雜芳基、 $-N(R^N)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)-$ 、 $-NR^NC(O)N(R^N)-$ 、 $-C(O)O-$ 、

OC(O)-、-OC(O)O-、-OC(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)O-、-C(O)S-、-SC(O)-、-C(=NR^N)-、-C(=NR^N)N(R^N)-、-NR^NC(=NR^N)-、-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-、-C(S)-、-C(S)N(R^N)-、-NR^NC(S)-、-NR^NC(S)N(R^N)-、-S(O)-、-OS(O)-、-S(O)O-、-OS(O)O-、-OS(O)₂-、-S(O)₂O-、-OS(O)₂O-、-N(R^N)S(O)-、-S(O)N(R^N)-、-N(R^N)S(O)N(R^N)-、-OS(O)N(R^N)-、-N(R^N)S(O)O-、-S(O)₂-、-N(R^N)S(O)₂-、-S(O)₂N(R^N)-、-N(R^N)S(O)₂N(R^N)-、-OS(O)₂N(R^N)-或-N(R^N)S(O)₂O-置換；且

R^N之各情況獨立地為氫、視情況經取代之烷基或氮保護基。

【0442】 在一些實施例中，式(PL-II)化合物具有式(PL-II-OH)：



或其鹽，其中：

r為1與100之間的整數；

R⁵為視情況經取代之C₁₀₋₄₀烷基、視情況經取代之C₁₀₋₄₀烯基或視情況經取代之C₁₀₋₄₀炔基；且視情況，R⁵的一或多個亞甲基單元經視情況經取代之伸碳環基、視情況經取代之伸雜環基、視情況經取代之伸芳基、視情況經取代之伸雜芳基、-N(R^N)-、-O-、-S-、-C(O)-、-C(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)-、-NR^NC(O)N(R^N)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-OC(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)O-、-C(O)S-、-SC(O)-、-C(=NR^N)-、-C(=NR^N)N(R^N)-、-NR^NC(=NR^N)-、-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-、-C(S)-、-C(S)N(R^N)-、-NR^NC(S)-、-NR^NC(S)N(R^N)-、-S(O)-、-OS(O)-、-S(O)O-、-OS(O)O-、-OS(O)₂-、-S(O)₂O-、-OS(O)₂O-、-N(R^N)S(O)-、-S(O)N(R^N)-、-

$N(R^N)S(O)N(R^N)-$ 、 $-OS(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-OS(O)_2N(R^N)-$ 或 $-N(R^N)S(O)_2O-$ 置換；且

R^N 之各情況獨立地為氫、視情況經取代之烷基或氮保護基。

【0443】 在一些實施例中， r 為10至80之間、20至70之間、30至60之間或40至50之間的整數。

【0444】 在一些實施例中， r 為45。

【0445】 在一些實施例中， R^5 為 C_{17} 烷基。

【0446】 在其他實施例中，式(PL-II)化合物為：



或其鹽。

【0447】 在一個實施例中，式(PL-II)化合物為



【0448】 在一些態樣中，本文所述之醫藥組合物之脂質組成不包含PEG脂質。

【0449】 在一些實施例中，PEG脂質可為描述於美國申請案第62/520,530號中之一或多種PEG脂質。

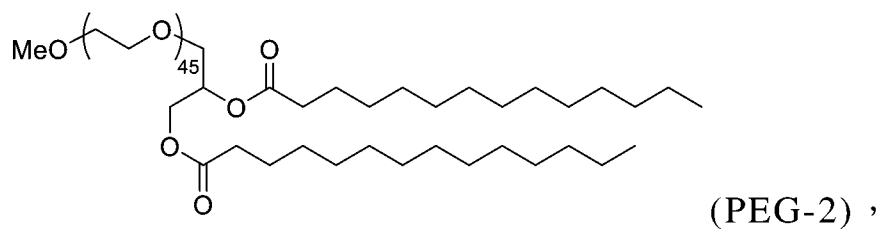
【0450】 在一些實施例中，PEG脂質為式(PL-III)化合物：



或其鹽或異構體，其中 s 為1與100之間的整數。

【0451】 在一些實施例中，PEG脂質為下式之化合物：

第 106 頁(發明說明書)



或其鹽或異構體。

結構脂質

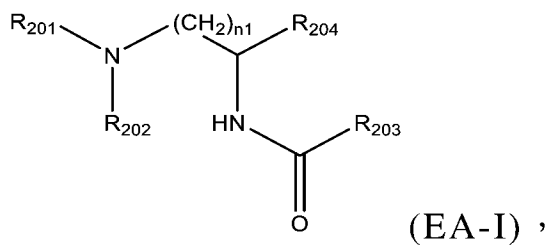
【0452】 如本文所用，術語「結構脂質」係指固醇且亦指含有固醇部分之脂質。

【0453】 在脂質奈米顆粒中併入結構脂質可幫助減輕顆粒中之其他脂質的聚集。結構脂質可選自包括但不限於膽固醇、糞固醇、植固醇、麥角固醇、菜油固醇、豆固醇、菜子固醇、番茄鹼、番茄苷、熊果酸、 α -生育酚、藿烷、植物固醇、類固醇及其混合物之群。在一些實施例中，結構脂質為兩種或更多種組分之混合物，各組分獨立地選自膽固醇、糞固醇、植固醇、麥角固醇、菜油固醇、豆固醇、菜子固醇、番茄鹼、番茄苷、熊果酸、 α -生育酚、藿烷、植物固醇及類固醇。在一些實施例中，結構脂質為固醇。在一些實施例中，結構脂質為兩種或更多種固醇之混合物。如本文所定義，「固醇」係由類固醇組成之類固醇子組。在一些實施例中，結構脂質為類固醇。在一些實施例中，結構脂質為膽固醇。在一些實施例中，結構脂質為膽固醇之類似物。在一些實施例中，結構脂質為 α -生育酚。

【0454】 在一些實施例中，結構脂質可為描述於美國申請案第 62/520,530 號中之一或多種結構脂質。

囊封劑

【0455】 在本發明之一些實施例中，該囊封劑為式(EA-I)化合物：



或其鹽或異構體，其中

R₂₀₁ 及 R₂₀₂ 各自獨立地選自由 H、C₁-C₆ 烷基、C₂-C₆ 烯基及 (C=NH)N(R₁₀₁)₂ 組成之群，其中各 R₁₀₁ 係獨立地選自由 H、C₁-C₆ 烷基及 C₂-C₆ 烯基組成之群；

R₂₀₃ 係選自由 C₁-C₂₀ 烷基及 C₂-C₂₀ 烯基組成之群；

R₂₀₄ 係選自由 H、C₁-C₂₀ 烷基、C₂-C₂₀ 烯基、C(O)(OC₁-C₂₀ 烷基)、C(O)(OC₂-C₂₀ 烯基)、C(O)(NHC₁-C₂₀ 烷基)及 C(O)(NHC₂-C₂₀ 烯基)組成之群；

n₁ 係選自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10。

【0456】 在一些實施例中，R₂₀₁ 及 R₂₀₂ 各自獨立地選自由 H 及 CH₃ 組成之群。

【0457】 在一些實施例中，R₂₀₁ 及 R₂₀₂ 各自獨立地選自由 (C=NH)NH₂ 及 (C=NH)N(CH₃)₂ 組成之群。

【0458】 在一些實施例中，R₂₀₃ 係選自由 C₁-C₂₀ 烷基、C₈-C₁₈ 烷基及 C₁₂-C₁₆ 烷基組成之群。

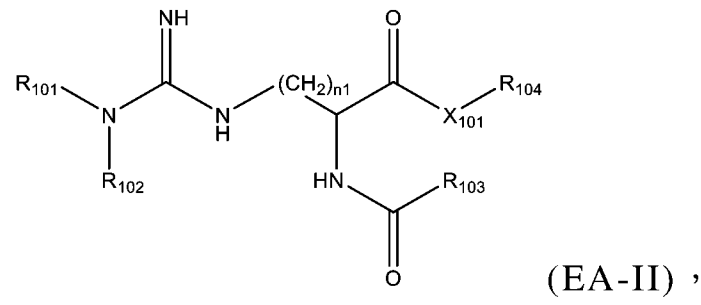
【0459】 在一些實施例中，R₂₀₄ 係選自由 H、C₁-C₂₀ 烷基、C₂-C₂₀ 烯基、C(O)(OC₁-C₂₀ 烷基)、C(O)(OC₂-C₂₀ 烯基)、C(O)(NHC₁-C₂₀ 烷基)及 C(O)(NHC₂-C₂₀ 烯基)；C₈-C₁₈ 烷基、C₈-C₁₈ 烯基、C(O)(OC₈-C₁₈ 烷基)、C(O)(OC₈-C₁₈ 烯基)、C(O)(NHC₈-C₁₈ 烷基)及 C(O)(NHC₈-C₁₈ 烯基)；及 C₁₂-C₁₆ 烷基、C₁₂-C₁₆ 烯基、C(O)(OC₁₂-C₁₆ 烷基)、C(O)(OC₁₂-C₁₆ 烯基)；及

基)、C(O)(NHC₁₂-C₁₆烷基)及C(O)(NHC₁₂-C₁₆烯基)組成之群；

【0460】 在一些實施例中，n1係選自1、2、3、4、5、6、7、8、9及10；n1係選自1、2、3、4、5及6；n1係選自2、3及4。

【0461】 在一些實施例中，n1為3。

【0462】 在本發明之一些實施例中，該囊封劑為式(EA-II)化合物：



或其鹽或異構體，其中

X₁₀₁為鍵、NH或O；

R₁₀₁及R₁₀₂各自獨立地選自由H、C₁-C₆烷基及C₂-C₆烯基組成之群；

R₁₀₃及R₁₀₄各自獨立地選自由C₁-C₂₀烷基及C₂-C₂₀烯基組成之群；
且

n1係選自1、2、3、4、5、6、7、8、9及10。

【0463】 在一些實施例中，X₁₀₁為鍵。

【0464】 在一些實施例中，X₁₀₁為NH。

【0465】 在一些實施例中，X₁₀₁為O。

【0466】 在一些實施例中，R₁₀₁及R₁₀₂各自獨立地選自由H及CH₃組成之群。

【0467】 在一些實施例中，R₁₀₃係選自由C₁-C₂₀烷基、C₈-C₁₈烷基及C₁₂-C₁₆烷基組成之群。

【0468】 在一些實施例中，R₁₀₄係選自由C₁-C₂₀烷基、C₈-C₁₈烷基

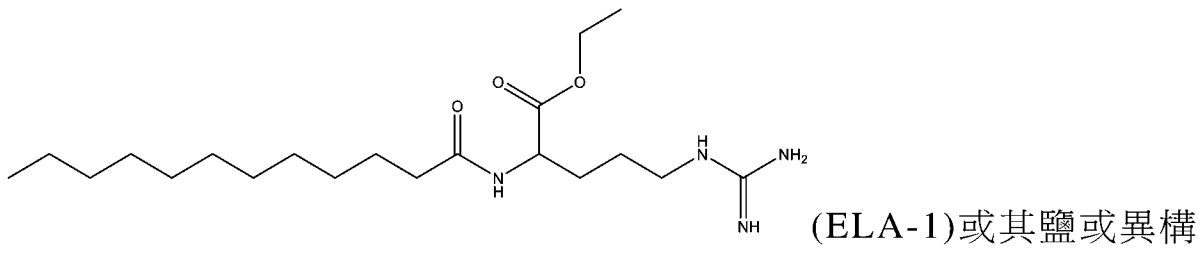
及C₁₂-C₁₆烷基組成之群。

【0469】 在一些實施例中，n1係選自1、2、3、4、5、6、7、8、9及10；n1係選自1、2、3、4、5及6；n1係選自2、3及4。

【0470】 在一些實施例中，n1為3。

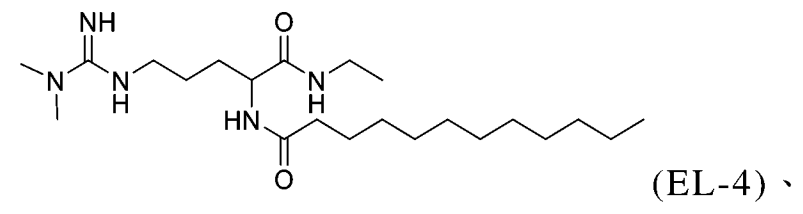
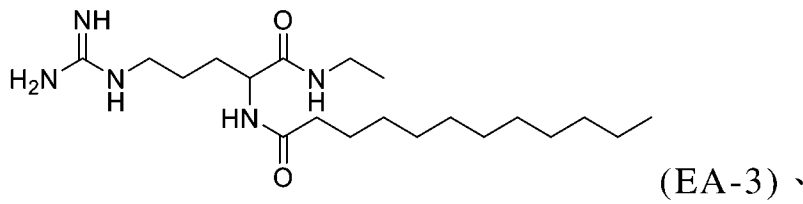
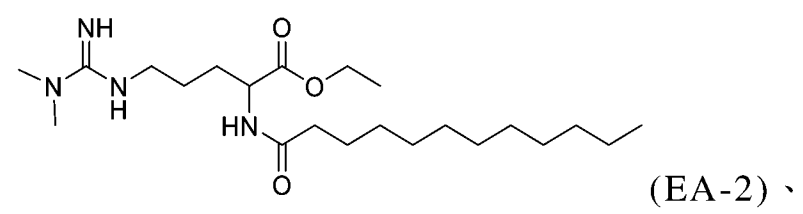
【0471】 例示性囊封劑包括但不限於月桂醯精胺酸乙酯、肉豆蔻醯精胺酸乙酯、棕櫚醯精胺酸乙酯、膽固醇-精胺酸乙酯、油酸精胺酸乙酯、癸酸精胺酸乙酯及辛酸精胺酸乙酯。

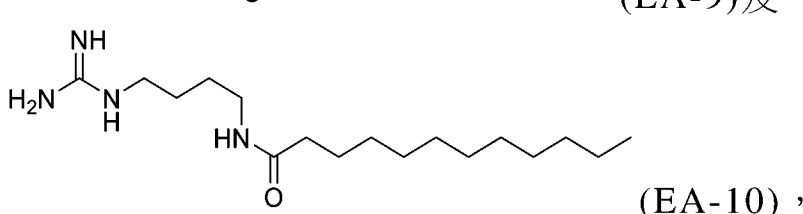
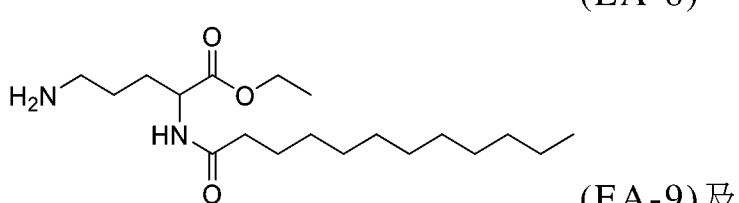
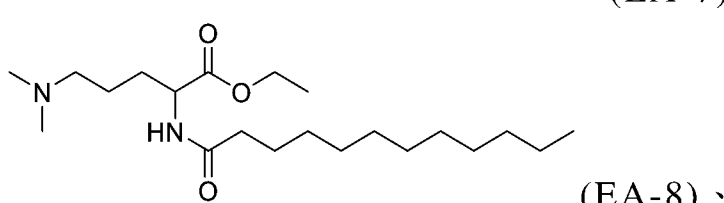
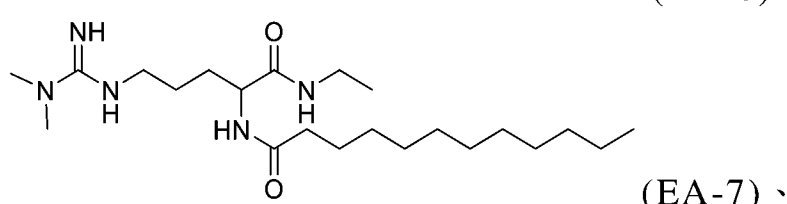
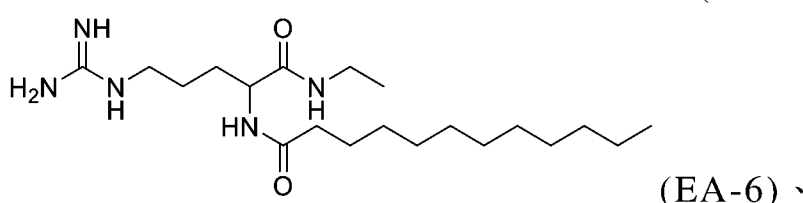
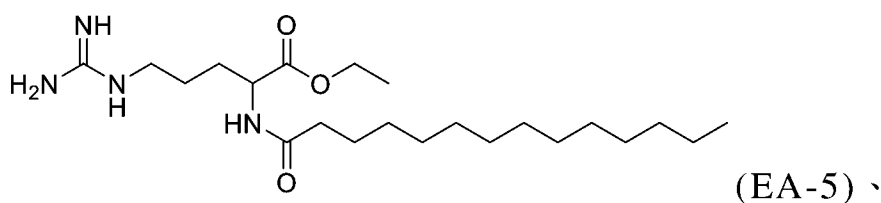
【0472】 在某些實施例中，該囊封劑為月桂醯精胺酸乙酯



體。

【0473】 在某些實施例中，該囊封劑係選自由以下組成之群的至少一種化合物：





或其鹽及異構體，諸如游離鹼、TFA鹽及/或HCl鹽。

磷脂

【0474】 磷脂可組裝成一或多個脂質雙層。一般而言，磷脂包含一個磷脂部分及一或多個脂肪酸部分。

【0475】 磷脂部分可選自例如由磷脂醯膽鹼、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯甘油、磷脂醯絲胺酸、磷脂酸、2-溶血磷脂醯膽鹼及鞘磷脂組成之非限制性群。

【0476】 脂肪酸部分可選自例如由月桂酸、肉豆蔻酸、肉豆蔻油

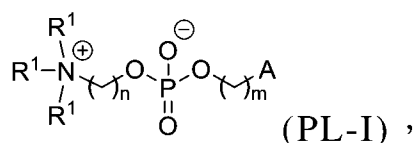
酸、棕櫚酸、棕櫚油酸、硬脂酸、油酸、亞麻油酸、 α -次亞麻油酸、芥子酸、植烷酸、花生酸、花生油酸、二十碳五烯酸、二十二酸、二十二碳五烯酸及二十二碳六烯酸組成之非限制性群。

【0477】 特定磷脂可促進融合至膜。在一些實施例中，陽離子磷脂可與膜(例如，細胞或細胞內膜)之一或多種帶負電的磷脂相互作用。磷脂融合至膜可允許含脂質之組合物(例如LNP)的一或多種要素(例如治療劑)傳遞通過膜，從而允許例如將該一或多種要素遞送至標靶組織。

【0478】 亦預期非天然磷脂物質，包括具有包括分支、氧化、環化及炔在內之修飾及取代之天然物質。在一些實施例中，磷脂可經一或多種炔(例如，其中一或多個雙鍵經參鍵置換之烯基)官能化或與該一或多種炔交聯。在適當反應條件下，炔基可在暴露於疊氮化物時經歷銅催化之環加成。此類反應可用於官能化奈米顆粒組合物之脂質雙層以促進膜滲透或細胞識別，或可用於使奈米顆粒組合物結合於可用組分，諸如靶向或成像部分(例如染料)。

【0479】 磷脂包括但不限於甘油磷脂，諸如磷脂醯膽鹼、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、磷脂醯甘油及磷脂酸。磷脂亦包括磷酸鞘脂，諸如鞘磷脂。

【0480】 在一些實施例中，可用於或潛在可用於本發明之磷脂為DSPC之類似物或變異體。在一些實施例中，可用於或潛在可用於本發明之磷脂為式(PL-I)化合物：

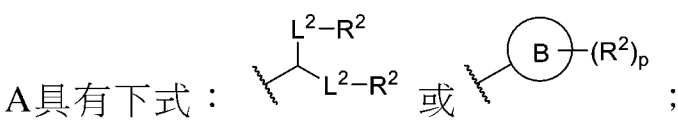


或其鹽，其中：

各 R^1 獨立地為視情況經取代之烷基；或視情況，兩個 R^1 與介入原子接合在一起以形成視情況經取代之單環碳環基或視情況經取代之單環雜環基；或視情況，三個 R^1 與介入原子接合在一起以形成視情況經取代之雙環碳環基或視情況經取代之雙環雜環基；

n 為1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m 為0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；



L^2 之各情況獨立地為鍵或視情況經取代之 C_{1-6} 伸烷基，其中該視情況經取代之 C_{1-6} 伸烷基的一個亞甲基單元視情況經-O-、-N(R^N)-、-S-、-C(O)-、-C(O)N(R^N)-、-NR ^{N} C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-OC(O)N(R^N)-、-NR ^{N} C(O)O-或-NR ^{N} C(O)N(R^N)-置換；

R^2 之各情況獨立地為視情況經取代之 C_{1-30} 烷基、視情況經取代之 C_{1-30} 烯基或視情況經取代之 C_{1-30} 炔基；視情況，其中 R^2 的一或多個亞甲基單元獨立地經視情況經取代之伸碳環基、視情況經取代之伸雜環基、視情況經取代之伸芳基、視情況經取代之伸雜芳基、-N(R^N)-、-O-、-S-、-C(O)-、-C(O)N(R^N)-、-NR ^{N} C(O)-、-NR ^{N} C(O)N(R^N)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-OC(O)N(R^N)-、-NR ^{N} C(O)O-、-C(O)S-、-SC(O)-、-C(=NR ^{N})-、-C(=NR ^{N})N(R^N)-、-NR ^{N} C(=NR ^{N})-、-NR ^{N} C(=NR ^{N})N(R^N)-、-C(S)-、-C(S)N(R^N)-、-NR ^{N} C(S)-、-NR ^{N} C(S)N(R^N)-、-S(O)-、-OS(O)-、-S(O)O-、-OS(O)O-、-OS(O) $_2$ -、-S(O) $_2$ O-、-OS(O) $_2$ O-、-N(R^N)S(O)-、-S(O)N(R^N)-、-N(R^N)S(O)N(R^N)-、

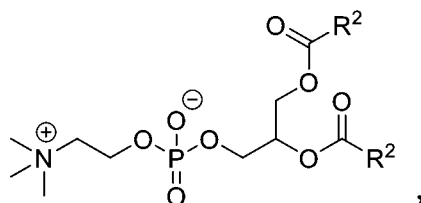
-OS(O)N(R^N)- 、 -N(R^N)S(O)O- 、 -S(O)₂- 、 -N(R^N)S(O)₂- 、
-S(O)₂N(R^N)- 、 -N(R^N)S(O)₂N(R^N)- 、 -OS(O)₂N(R^N)- 或
-N(R^N)S(O)₂O-置換；

R^N之各情況獨立地為氫、視情況經取代之烷基或氮保護基；

環B為視情況經取代之碳環基、視情況經取代之雜環基、視情況經
取代之芳基或視情況經取代之雜芳基；且

p為1或2；

其限制條件在於該化合物不具有下式：



其中R²之各情況獨立地為未經取代烷基、未經取代烯基或未經取
代炔基。

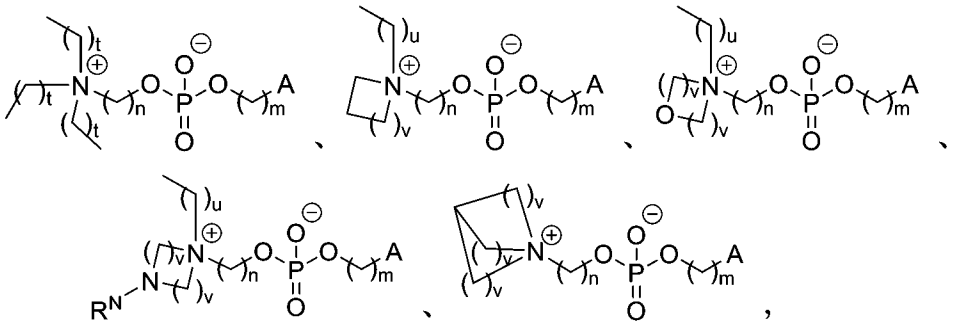
【0481】 在一些實施例中，磷脂可為描述於美國申請案第
62/520,530號中之一或多種磷脂。

【0482】 在一些實施例中，磷脂可選自由1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-
3-磷酸膽鹼(DSPC)、1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-
二亞油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DLPC)、1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-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(十一烷醯基)-sn-甘油-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 Diether PC)、1-油醯基-2-膽固醇基半
琥珀醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(OChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸
膽鹼(C16 Lyso PC)、1,2-二亞麻醯基-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、1,2-二亞油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亞麻醯基-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-外消旋-(1-甘油)鈉鹽(DOPG)及鞘磷脂組成之非限制性群。在一些實施例中，LNP包括DSPC。在一些實施例中，LNP包括DOPE。在一些實施例中，LNP包括DSPC及DOPE兩者。

i) 磷脂頭修飾

【0483】 在一些實施例中，可用於或潛在可用於本發明之磷脂包含經修飾之磷脂頭(例如，經修飾之膽鹼基團)。在一些實施例中，具有經修飾之頭之磷脂係具有經修飾之四級胺的DSPC或其類似物。在一些實施例中，在式(PL-I)之實施例中，至少一個R¹不為甲基。在一些實施例中，至少一個R¹不為氫或甲基。在一些實施例中，式(PL-I)化合物係以下各式之一：



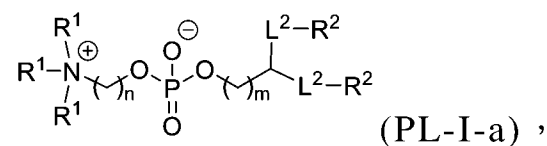
或其鹽，其中：

各t獨立地為1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

各u獨立地為0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；且

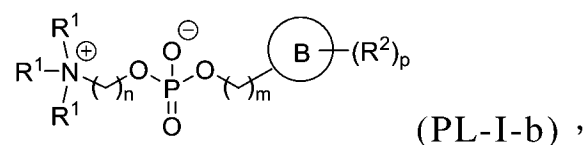
各v獨立地為1、2或3。

【0484】 在一些實施例中，式(PL-I)化合物具有式(PL-I-a)：



或其鹽。

【0485】 在一些實施例中，可用於或潛在可用於本發明之磷脂包含替代甘油酯部分之環狀部分。在一些實施例中，可用於本發明之磷脂為 DSPC 或其類似物，具有替代甘油酯部分之環狀部分。在一些實施例中，式(PL-I)化合物具有式(PL-I-b)：

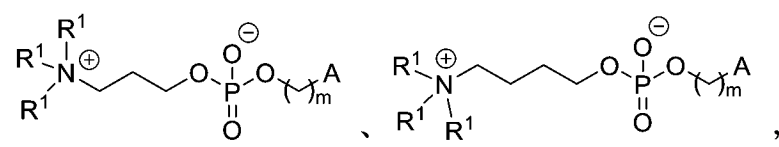


或其鹽。

ii) 磷脂尾修飾

【0486】 在一些實施例中，可用於或潛在可用於本發明之磷脂包含經修飾之尾。在一些實施例中，可用於或潛在可用於本發明之磷脂為 DSPC 或其類似物，具有經修飾之尾。如本文所述，「經修飾之尾」可為具有較短或較長脂族鏈、引入分支鏈之脂族鏈、引入取代基之脂族鏈、其中一或多個亞甲基由環狀或雜原子基團置換之脂族鏈或其任何組合的尾。在一些實施例中，(PL-I)化合物具有式(PL-I-a)，或其鹽，其中 R^2 之至少一種情況為 R^2 之各情況為視情況經取代之 C_{1-30} 烷基，其中 R^2 的一或多個亞甲基單元獨立地經視情況經取代之伸碳環基、視情況經取代之伸雜環基、視情況經取代之伸芳基、視情況經取代之伸雜芳基、 $-\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$ 、 $-\text{SC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^N)-$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^N)\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(=\text{NR}^N)-$ 、

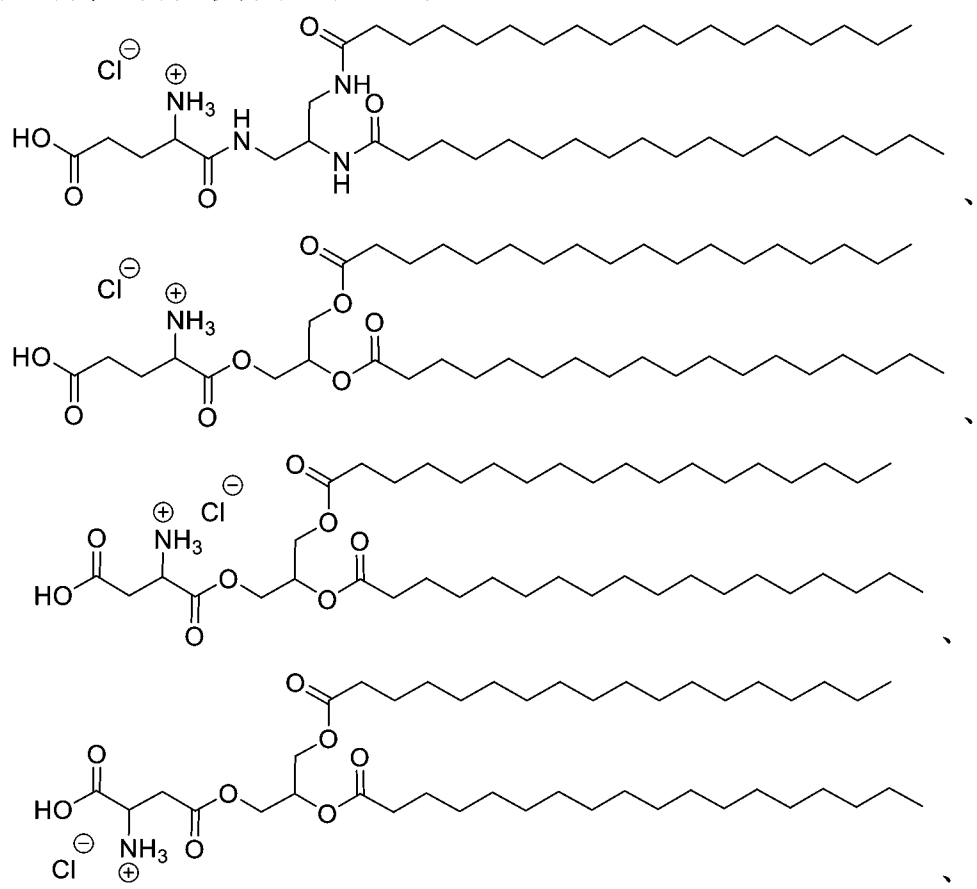
【0488】 在一些實施例中，可用於或潛在可用於本發明之磷脂包含經修飾之磷酸膽鹼部分，其中連接四級胺至磷鹽基的烷基鏈不為伸乙基(例如，n不為2)。因此，在一些實施例中，可用於或潛在可用於本發明之磷脂為式(PL-I)化合物，其中n為1、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些實施例中，式(PL-I)化合物具有以下各式之一：

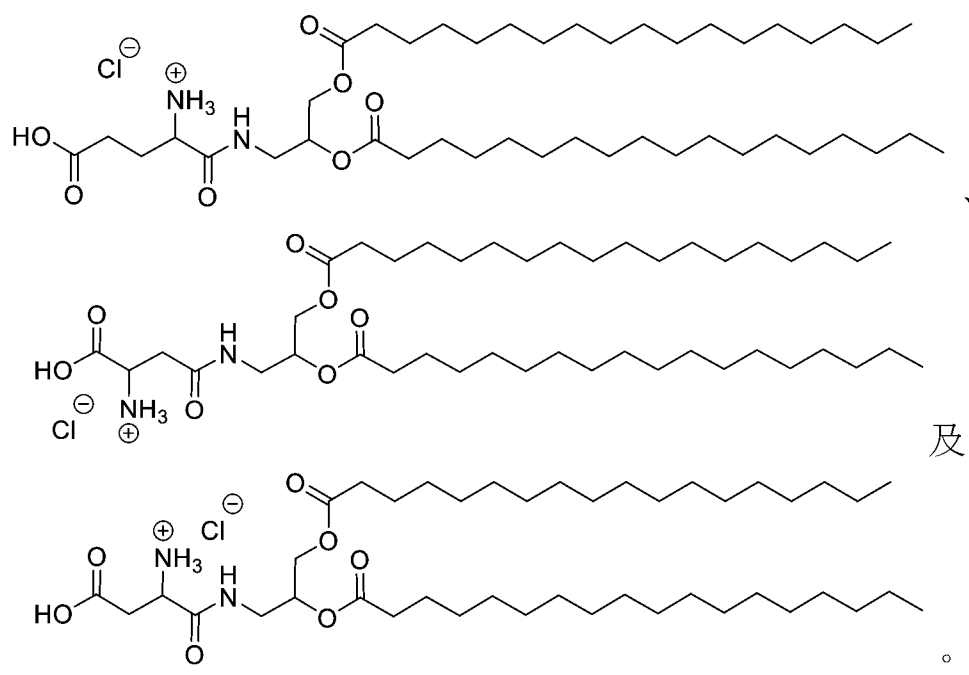


或其鹽。

替代脂質

【0489】 在一些實施例中，替代脂質替代本發明之磷脂來使用。此類替代脂質之非限制性實例包括以下：





佐劑

【0490】 在一些實施例中，包括本文所述之一或多種脂質的LNP可進一步包括一或多種佐劑，例如哌喃葡萄糖基脂質佐劑(GLA)、CpG寡去氧核苷酸(例如A或B類)、poly(I:C)、氫氧化鋁及Pam3CSK4。

治療劑

【0491】 脂質奈米顆粒(例如，空LNP或負載LNP)可包括一或多種治療劑及/或預防劑。本發明提供向哺乳動物細胞或器官遞送治療劑及/或預防劑、在哺乳動物細胞中產生所關注之多肽及治療有需要之哺乳動物的疾病或病症之方法，該等方法包含向哺乳動物投與包括治療劑及/或預防劑之脂質奈米顆粒(例如空LNP或負載LNP)及/或使哺乳動物細胞與包括治療劑及/或預防劑之脂質奈米顆粒(例如空LNP或負載LNP)接觸。

【0492】 治療劑及/或預防劑包括生物學活性物質且替代地稱作「活性劑」。治療劑及/或預防劑可為一旦遞送至細胞或器官即在該細胞、器官或其他身體組織或系統中引起所需變化之物質。此類物質可用於治療一或多種疾病、病症或疾患。在一些實施例中，治療劑及/或預防劑係可用

於治療特定疾病、病症或疾患之小分子藥物。

【0493】 在一些實施例中，治療劑及/或預防劑係疫苗、引起免疫反應之化合物(例如，編碼蛋白質或多肽或肽之聚核苷酸或核酸分子或蛋白質或多肽或肽)及/或另一治療劑及/或預防劑。疫苗包括能夠提供針對與傳染病相關之一或多種疾患的免疫性且可包括編碼傳染病源性抗原及/或抗原決定基之mRNA的化合物及製劑。疫苗亦包括引導針對癌細胞之免疫反應且可包括編碼腫瘤細胞源性抗原、抗原決定基及/或新抗原決定基之mRNA的化合物及製劑。在一些實施例中，疫苗及/或能夠引起免疫反應之化合物經由本發明組合物在肌肉內投與。

【0494】 在其他實施例中，治療劑及/或預防劑為蛋白質，例如增加或置換所關注之天然存在之蛋白質所需的蛋白質。此類蛋白質或多肽可為天然存在的，或可使用此項技術中已知之方法經修飾，例如以增加半衰期。例示性蛋白質為細胞內、跨膜或分泌性的。

聚核苷酸及核酸

【0495】 在一些實施例中，治療劑係增強(亦即，增加、刺激、上調)蛋白質表現之劑。可用於增強蛋白質表現之治療劑類型之非限制性實例包括RNA、mRNA、dsRNA、CRISPR/Cas9技術、ssDNA及DNA(例如表現載體)。上調蛋白質表現之劑可上調天然存在或非天然存在之蛋白質(例如已經修飾以改良半衰期之嵌合蛋白，或包含所需胺基酸變化之蛋白質)的表現。例示性蛋白質包括細胞內、跨膜或分泌性蛋白質、肽或多肽。

【0496】 在一些實施例中，治療劑為DNA治療劑。該DNA分子可為雙鏈DNA、單鏈DNA(ssDNA)或作為部分雙鏈DNA之分子(亦即，具有

雙鏈部分及單鏈部分)。在一些情況下，該DNA分子為三鏈的或為部分三鏈的(亦即，具有三鏈部分及雙鏈部分)。該DNA分子可為環狀DNA分子或直鏈DNA分子。

【0497】 DNA治療劑可為能夠將基因轉移至細胞中，例如編碼轉錄物且可表現轉錄物之DNA分子。在其他實施例中，該DNA分子為合成分子，例如活體外產生之合成DNA分子。在一些實施例中，該DNA分子為重組分子。非限制性例示性DNA治療劑包括質體表現載體及病毒表現載體。

【0498】 本文所述之DNA治療劑(例如DNA載體)可包括多種不同特徵。本文所述之DNA治療劑(例如DNA載體)可包括非編碼DNA序列。例如，DNA序列可包括針對基因之至少一種調控元件，例如啟動子、增強子、終止元件、聚腺苷酸化信號元件、剪接信號元件及其類似元件。在一些實施例中，該非編碼DNA序列為內含子。在一些實施例中，該非編碼DNA序列為轉座子。在一些實施例中，本文所述之DNA序列可具有可操作性連接至轉錄活性基因之非編碼DNA序列。在其他實施例中，本文所述之DNA序列可具有未連接至基因之非編碼DNA序列，亦即該非編碼DNA未調控該DNA序列上之基因。

【0499】 在一些實施例中，在本發明之負載LNP中，該一或多種治療劑及/或預防劑為核酸。在一些實施例中，該一或多種治療劑及/或預防劑係選自由核糖核酸(RNA)及去氧核糖核酸(DNA)組成之群。

【0500】 例如，在一些實施例中，當該等治療劑及/或預防劑為DNA時，該DNA係選自由雙鏈DNA、單鏈DNA (ssDNA)、部分雙鏈DNA、三鏈DNA及部分三鏈DNA組成之群。在一些實施例中，該DNA係

選自由環狀DNA、直鏈DNA及其混合物組成之群。

【0501】 在一些實施例中，在本發明之負載LNP中，該一或多種治療劑及/或預防劑係選自由質體表現載體、病毒表現載體及其混合物組成之群。

【0502】 例如，在一些實施例中，當該等治療劑及/或預防劑為RNA時，該RNA係選自由單鏈RNA、雙鏈RNA (dsRNA)、部分雙鏈RNA及其混合物組成之群。在一些實施例中，該RNA係選自由環狀RNA、直鏈RNA及其混合物組成之群。

【0503】 例如，在一些實施例中，當該等治療劑及/或預防劑為RNA時，該RNA係選自由短干擾RNA (siRNA)、不對稱干擾RNA (aiRNA)、RNA干擾(RNAi)分子、微小RNA (miRNA)、antagomir、反義RNA、核糖核酸酵素、Dicer-受質RNA (dsRNA)、小髮夾RNA (shRNA)、信使RNA (mRNA)、鎖核酸(LNA)及CRISPR/Cas9技術及其混合物組成之群。

【0504】 例如，在一些實施例中，當該等治療劑及/或預防劑為RNA時，該RNA係選自由小干擾RNA (siRNA)、不對稱干擾RNA (aiRNA)、微小RNA (miRNA)、Dicer-受質RNA (dsRNA)、小髮夾RNA (shRNA)、信使RNA (mRNA)及其混合物組成之群。

【0505】 在一些實施例中，該一或多種治療劑及/或預防劑為mRNA。在一些實施例中，該一或多種治療劑及/或預防劑為經修飾mRNA (mmRNA)。

【0506】 在一些實施例中，該一或多種治療劑及/或預防劑係併入微小RNA結合位點(miR結合位點)之mRNA。此外，在一些實施例中，

mRNA包括莖環、鏈終止核苷、polyA序列、聚腺苷酸化信號及/或5'帽結構中之一或多者。

【0507】 mRNA可為天然或非天然存在之mRNA。mRNA可如下文所述包括一或多個經修飾核鹼基、核苷或核苷酸，在該情況下其可稱作「經修飾mRNA」或「mmRNA」。如本文所述，「核苷」係定義為含有與有機鹼(例如，嘌呤或嘧啶)或其衍生物(本文中亦稱作「核鹼基」)組合之糖分子(例如，戊糖或核糖)或其衍生物的化合物。如本文所述，「核苷酸」係定義為包括磷酸酯基之核苷。

【0508】 mRNA可包括5'未轉譯區(5'-UTR)、3'未轉譯區(3'-UTR)及/或編碼區(例如開放閱讀框)。mRNA可包括任何合適數目之鹼基對，包括數十個(例如，10、20、30、40、50、60、70、80、90或100個)、數百個(例如，200、300、400、500、600、700、800或900個)或數千個(例如，1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000個)鹼基對。任何數目(例如，全部、一些或無)之核鹼基、核苷或核苷酸均可為規範物質之類似物，經取代、經修飾或以其他方式非天然存在。在某些實施例中，特定核鹼基類型之全部可經修飾。在一些實施例中，全部尿嘧啶或尿苷均經修飾。當全部核鹼基、核苷或核苷酸經修飾(例如，全部尿嘧啶或尿苷)時，該mRNA可稱作「完全經修飾」，例如針對尿嘧啶或尿苷。

【0509】 在一些實施例中，如本文所述之mRNA可包括5'帽結構、鏈終止核苷酸、視情況選用之Kozak序列(亦稱作Kozak共有序列)、莖環、polyA序列及/或聚腺苷酸化信號。

【0510】 5'帽結構或帽物質係包括藉由連接體接合之兩個核苷部分

的化合物且可選自天然存在之帽、非天然存在之帽或帽類似物或抗-反向帽類似物(ARCA)。帽物質可包括一或多個經修飾核苷及/或連接體部分。例如，天然mRNA帽可包括鳥嘌呤核苷酸及在7位置處甲基化之鳥嘌呤(G)核苷酸，由該等核苷酸之5'位置處的三磷酸酯鍵接合，例如m7G(5')ppp(5')G，通常書寫為m7GpppG。帽物質亦可為抗-反向帽類似物。可能的帽物質之非限制性清單包括m7GpppG、m7Gpppm7G、m73'dGpppG、m27,O3'GpppG、m27,O3'GppppG、m27,O2'GppppG、m7Gpppm7G、m73'dGpppG、m27,O3'GpppG、m27,O3'GppppG及m27,O2'GppppG。

【0511】 mRNA可替代地或另外包括鏈終止核苷。例如，鏈終止核苷可包括在其糖基之2'及/或3'位置處去氧之彼等核苷。此類物質可包括3'去氧腺苷(蛹蟲草菌素)、3'去氧尿苷、3'去氧胞嘧啶、3'去氧鳥苷、3'去氧胸嘧啶及2',3'二去氧核苷(諸如2',3'二去氧腺苷、2',3'二去氧尿苷、2',3'二去氧胞嘧啶、2',3'二去氧鳥苷及2',3'二去氧胸嘧啶)。在一些實施例中，將鏈終止核苷酸併入至mRNA中例如3'-末端處可導致該mRNA之穩定化。

【0512】 mRNA可替代地或另外包括莖環，諸如組蛋白莖環。莖環可包括2、3、4、5、6、7、8個或8個以上核苷酸鹼基對。例如，莖環可包括4、5、6、7或8個核苷酸鹼基對。莖環可位於mRNA之任何區中。例如，莖環可位於未轉譯區(5'未轉譯區或3'未轉譯區)、編碼區或polyA序列或尾中、之前或之後。在一些實施例中，莖環可影響mRNA之一或多種功能，諸如轉譯起始、轉譯效率及/或轉錄終止。

【0513】 mRNA可替代地或另外包括polyA序列及/或聚腺苷酸化信

號。polyA序列可完全地或主要包含腺嘌呤核苷酸或其類似物或衍生物。poly A序列亦可包含穩定化核苷酸或類似物。例如，poly A序列可包括去氧胸苷作為穩定化核苷酸或類似物，例如反向(或反向鍵)去氧胸苷(dT)。關於使用反向dT及其他穩定化poly A序列修飾之詳情可發現於例如WO2017/049275 A2中，該案之內容以引用之方式併入本文中。polyA序列可為與mRNA之3'末轉譯區相鄰定位之尾。在一些實施例中，polyA序列可影響mRNA之核輸出、轉譯及/或穩定性。

【0514】 mRNA可替代地或另外包括微小RNA結合位點。微小RNA結合位點(或miR結合位點)可用於調控多種組織或細胞類型中之mRNA表現。在例示性實施例中，miR結合位點係經工程改造成mRNA之3' UTR序列以調控(例如，增強) mRNA在表現同源miR之細胞或組織中之降解。此類調控可用於調控或控制mRNA之「脫靶」表現，亦即活體內在非所需細胞或組織中之表現。關於使用mir結合位點之詳情可發現於例如WO 2017/062513 A2中，該案之內容以引用之方式併入本文中。

【0515】 在一些實施例中，mRNA係包含第一編碼區及第二編碼區之雙順反子mRNA，該等編碼區具有包含允許第一與第二編碼區之間之內部轉譯起始之內部核糖體進入位點(IRES)序列之介入序列，或具有編碼自裂解肽(諸如2A肽)之介入序列。IRES序列及2A肽典型地用於增強來自同一載體之多種蛋白質之表現。多種IRES序列為此項技術中已知且可獲得的且可加以使用，包括例如腦心肌炎病毒IRES。

【0516】 在一些實施例中，本發明之mRNA包含一或多個經修飾核鹼基、核苷或核苷酸(稱作「經修飾mRNA」或「mmRNA」)。在一些實施例中，經修飾mRNA可具有可用特性，包括如與參考未經修飾mRNA相

比，增強之穩定性、細胞內保留、增強之轉譯及/或缺乏其中引入該 mRNA 之細胞的先天免疫反應之實質誘導。因此，經修飾 mRNA 之使用可增強蛋白質產生效率、核酸之細胞內保留，以及具有降低的免疫原性。

【0517】 在一些實施例中，mRNA 包括一或多個(例如，1、2、3 或 4 個)不同的經修飾核鹼基、核苷或核苷酸。在一些實施例中，mRNA 包括一或多個(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 個或 100 個以上)不同的經修飾核鹼基、核苷或核苷酸。在一些實施例中，相對於相應的未經修飾 mRNA，經修飾 mRNA 可在其中引入該 mRNA 之細胞中具有降低之降解。

【0518】 在一些實施例中，經修飾核鹼基係經修飾尿嘧啶。具有經修飾尿嘧啶之例示性核鹼基及核苷包括假尿苷(ψ)、吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮雜-尿苷、6-氮雜-尿苷、2-硫代-5-氮雜-尿苷、2-硫代-尿苷(s2U)、4-硫代-尿苷(s4U)、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羥基-尿苷(ho5U)、5-胺基烯丙基-尿苷、5-鹵基-尿苷(例如，5-碘-尿苷或 5-溴-尿苷)、3-甲基-尿苷(m3U)、5-甲氧基-尿苷(mo5U)、尿苷 5-氧乙酸(cmo5U)、尿苷 5-氧乙酸甲酯(mcmo5U)、5-羧基甲基-尿苷(cm5U)、1-羧基甲基-假尿苷、5-羧基羥基甲基-尿苷(chm5U)、5-羧基羥基甲基-尿苷甲酯(mchm5U)、5-甲氧基羧基甲基-尿苷(mcm5U)、5-甲氧基羧基甲基-2-硫代-尿苷(mcm5s2U)、5-胺基甲基-2-硫代-尿苷(nm5s2U)、5-甲基胺基甲基-尿苷(mnm5U)、5-甲基胺基甲基-2-硫代-尿苷(mnm5s2U)、5-甲基胺基甲基-2-硒并-尿苷(mnm5se2U)、5-胺甲醯基甲基-尿苷(ncm5U)、5-羧基甲基胺基甲基-尿苷(cnm5U)、5-羧基甲基胺基甲基-2-硫代-尿苷(cnm5s2U)、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-尿苷(τ m5U)、1-牛磺酸

甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷($\tau m5s2U$)、1-牛磺酸甲基-4-硫代-假尿苷、5-甲基-尿苷($m5U$ ，亦即具有核鹼基去氧胸腺嘧啶)、1-甲基-假尿苷($m1\psi$)、5-甲基-2-硫代-尿苷($m5s2U$)、1-甲基-4-硫代-假尿苷($m1s4\psi$)、4-硫代-1-甲基-假尿苷、3-甲基-假尿苷($m3\psi$)、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-去氮雜-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-去氮雜-假尿苷、二氫尿苷(D)、二氫假尿苷、5,6-二氫尿苷、5-甲基-二氫尿苷($m5D$)、2-硫代-二氫尿苷、2-硫代-二氫假尿苷、2-甲氧基-尿苷、2-甲氧基-4-硫代-尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、N1-甲基-假尿苷、3-(3-胺基-3-羧基丙基)尿苷($acp3U$)、1-甲基-3-(3-胺基-3-羧基丙基)假尿苷($acp3\psi$)、5-(異戊烯基胺基甲基)尿苷($inm5U$)、5-(異戊烯基胺基甲基)-2-硫代-尿苷($inm5s2U$)、 α -硫代-尿苷、2'-O-甲基-尿苷(Um)、5,2'-O-二甲基-尿苷($m5Um$)、2'-O-甲基-假尿苷(ψm)、2-硫代-2'-O-甲基-尿苷($s2Um$)、5-甲氧基羰基甲基-2'-O-甲基-尿苷($mcm5Um$)、5-胺甲醯基甲基-2'-O-甲基-尿苷($ncm5Um$)、5-羧基甲基胺基甲基-2'-O-甲基-尿苷($cmnm5Um$)、3,2'-O-二甲基-尿苷($m3Um$)及5-(異戊烯基胺基甲基)-2'-O-甲基-尿苷($inm5Um$)、1-硫代-尿苷、去氧胸腺嘧啶、2'-F-阿拉伯糖-尿苷、2'-F-尿苷、2'-OH-阿拉伯糖-尿苷、5-(2-甲氧羰基乙烯基)尿苷及5-[3-(1-E-丙烯基胺基)]尿苷。

【0519】 在一些實施例中，經修飾核鹼基係經修飾胞嘧啶。具有經修飾胞嘧啶之例示性核鹼基及核苷包括5-氮雜-胞苷、6-氮雜-胞苷、假異胞苷、3-甲基-胞苷($m3C$)、N4-乙醯基-胞苷($ac4C$)、5-甲醯基-胞苷($f5C$)、N4-甲基-胞苷($m4C$)、5-甲基-胞苷($m5C$)、5-鹵基-胞苷(例如5-碘-胞苷)、5-羥基甲基-胞苷($hm5C$)、1-甲基-假異胞苷、吡咯并-胞苷、吡咯

并-假異胞苷、2-硫代-胞苷(s2C)、2-硫代-5-甲基-胞苷、4-硫代-假異胞苷、4-硫代-1-甲基-假異胞苷、4-硫代-1-甲基-1-去氮雜-假異胞苷、1-甲基-1-去氮雜-假異胞苷、澤布拉林(zebularine)、5-氮雜-澤布拉林、5-甲基-澤布拉林、5-氮雜-2-硫代-澤布拉林、2-硫代-澤布拉林、2-甲氧基-胞苷、2-甲氧基-5-甲基-胞苷、4-甲氧基-假異胞苷、4-甲氧基-1-甲基-假異胞苷、立西啉(k2C)、 α -硫代-胞苷、2'-O-甲基-胞苷(Cm)、5,2'-O-二甲基-胞苷(m5Cm)、N4-乙醯基-2'-O-甲基-胞苷(ac4Cm)、N4,2'-O-二甲基-胞苷(m4Cm)、5-甲醯基-2'-O-甲基-胞苷(f5Cm)、N4,N4,2'-O-三甲基-胞苷(m42Cm)、1-硫代-胞苷、2'-F-阿拉伯糖-胞苷、2'-F-胞苷及2'-OH-阿拉伯糖-胞苷。

【0520】 在一些實施例中，經修飾核鹼基係經修飾腺嘌呤。具有經修飾腺嘌呤之例示性核鹼基及核苷包括 α -硫代-腺苷、2-胺基-嘌呤、2, 6-二胺基嘌呤、2-胺基-6-鹵基-嘌呤(例如2-胺基-6-氯-嘌呤)、6-鹵基-嘌呤(例如6-氯-嘌呤)、2-胺基-6-甲基-嘌呤、8-疊氮基-腺苷、7-去氮雜-腺嘌呤、7-去氮雜-8-氮雜-腺嘌呤、7-去氮雜-2-胺基-嘌呤、7-去氮雜-8-氮雜-2-胺基-嘌呤、7-去氮雜-2,6-二胺基嘌呤、7-去氮雜-8-氮雜-2,6-二胺基嘌呤、1-甲基-腺苷(m1A)、2-甲基-腺嘌呤(m2A)、N6-甲基-腺苷(m6A)、2-甲基硫代-N6-甲基-腺苷(ms2m6A)、N6-異戊烯基-腺苷(i6A)、2-甲基硫代-N6-異戊烯基-腺苷(ms2i6A)、N6-(順-羥基異戊烯基)腺苷(io6A)、2-甲基硫代-N6-(順-羥基異戊烯基)腺苷(ms2io6A)、N6-甘胺醯基胺甲醯基-腺苷(g6A)、N6-蘇胺醯基胺甲醯基-腺苷(t6A)、N6-甲基-N6-蘇胺醯基胺甲醯基-腺苷(m6t6A)、2-甲基硫代-N6-蘇胺醯基胺甲醯基-腺苷(ms2g6A)、N6,N6-二甲基-腺苷(m62A)、N6-羥基正顯胺醯基胺甲醯基-腺苷(hn6A)、

2-甲基硫代-N6-羥基正纈胺鹼基胺甲鹼基-腺苷(ms2hn6A)、N6-乙鹼基-腺苷(ac6A)、7-甲基-腺嘌呤、2-甲基硫代-腺嘌呤、2-甲氧基-腺嘌呤、 α -硫代-腺苷、2'-O-甲基-腺苷(Am)、N6,2'-O-二甲基-腺苷(m6Am)、N6,N6,2'-O-三甲基-腺苷(m62Am)、1,2'-O-二甲基-腺苷(m1Am)、2'-O-核糖基腺苷(磷酸酯)(Ar(p))、2-胺基-N6-甲基-嘌呤、1-硫代-腺苷、8-疊氮基-腺苷、2'-F-阿拉伯糖-腺苷、2'-F-腺苷、2'-OH-阿拉伯糖-腺苷及N6-(19-胺基-五氧雜十九烷基)-腺苷。

【0521】 在一些實施例中，經修飾核鹼基係經修飾鳥嘌呤。具有經修飾鳥嘌呤之例示性核鹼基及核苷包括 α -硫代-鳥苷、肌苷(I)、1-甲基-肌苷(m1I)、懷俄苷(imG)、甲基懷俄苷(mimG)、4-去甲基-懷俄苷(imG-14)、異懷俄苷(imG2)、懷丁苷(yW)、過氧懷丁苷(o2yW)、羥基懷丁苷(OhyW)、修飾不足之羥基懷丁苷(OhyW*)、7-去氮雜-鳥苷、辮苷(Q)、環氧辮苷(oQ)、半乳糖基-辮苷(galQ)、甘露糖基-辮苷(manQ)、7-氘基-7-去氮雜-鳥苷(preQ0)、7-胺基甲基-7-去氮雜-鳥苷(preQ1)、古嘌呤(G+)、7-去氮雜-8-氮雜-鳥苷、6-硫代-鳥苷、6-硫代-7-去氮雜-鳥苷、6-硫代-7-去氮雜-8-氮雜-鳥苷、7-甲基-鳥苷(m7G)、6-硫代-7-甲基-鳥苷、7-甲基-肌苷、6-甲氧基-鳥苷、1-甲基-鳥苷(m1G)、N2-甲基-鳥苷(m2G)、N2,N2-二甲基-鳥苷(m22G)、N2,7-二甲基-鳥苷(m2,7G)、N2, N2,7-二甲基-鳥苷(m2,2,7G)、8-側氧基-鳥苷、7-甲基-8-側氧基-鳥苷、1-甲基-6-硫代-鳥苷、N2-甲基-6-硫代-鳥苷、N2,N2-二甲基-6-硫代-鳥苷、 α -硫代-鳥苷、2'-O-甲基-鳥苷(Gm)、N2-甲基-2'-O-甲基-鳥苷(m2Gm)、N2,N2-二甲基-2'-O-甲基-鳥苷(m22Gm)、1-甲基-2'-O-甲基-鳥苷(m1Gm)、N2,7-二甲基-2'-O-甲基-鳥苷(m2,7Gm)、2'-O-甲基-肌苷(Im)、1,2'-O-二甲基-

肌苷(mIIm)、2'-O-核糖基鳥苷(磷酸酯) (Gr(p))、1-硫代-鳥苷、O6-甲基-鳥苷、2'-F-阿拉伯糖-鳥苷及2'-F-鳥苷。

【0522】 在一些實施例中，本發明之mRNA包括一或多種前述經修飾核鹼基之組合(例如，2、3或4種前述經修飾核鹼基之組合。)

【0523】 在一些實施例中，經修飾核鹼基係假尿苷(ψ)、N1-甲基假尿苷(m1 ψ)、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-去氫雜-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氫雜-尿苷、2-硫代-二氫假尿苷、2-硫代-二氫尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氫雜-尿苷、二氫假尿苷、5-甲氧基尿苷或2'-O-甲基尿苷。在一些實施例中，本發明之mRNA包括一或多種前述經修飾核鹼基之組合(例如，2、3或4種前述經修飾核鹼基之組合。) 在一些實施例中，經修飾核鹼基為N1-甲基假尿苷(m1 ψ)且本發明之mRNA係完全地經N1-甲基假尿苷(m1 ψ)修飾。在一些實施例中，N1-甲基假尿苷(m1 ψ)表示mRNA中之75-100%尿嘧啶。在一些實施例中，N1-甲基假尿苷(m1 ψ)表示mRNA中之100%尿嘧啶。

【0524】 在一些實施例中，經修飾核鹼基係經修飾胞嘧啶。具有經修飾胞嘧啶之例示性核鹼基及核苷包括N4-乙醯基-胞苷(ac4C)、5-甲基-胞苷(m5C)、5-鹵基-胞苷(例如5-碘-胞苷)、5-羥基甲基-胞苷(hm5C)、1-甲基-假異胞苷、2-硫代-胞苷(s2C)、2-硫代-5-甲基-胞苷。在一些實施例中，本發明之mRNA包括一或多種前述經修飾核鹼基之組合(例如，2、3或4種前述經修飾核鹼基之組合。)

【0525】 在一些實施例中，經修飾核鹼基係經修飾腺嘌呤。具有經修飾腺嘌呤之例示性核鹼基及核苷包括7-去氫雜-腺嘌呤、1-甲基-腺苷

(m1A)、2-甲基-腺嘌呤(m2A)、N6-甲基-腺苷(m6A)。在一些實施例中，本發明之mRNA包括一或多種前述經修飾核鹼基之組合(例如，2、3或4種前述經修飾核鹼基之組合。)

【0526】 在一些實施例中，經修飾核鹼基係經修飾鳥嘌呤。具有經修飾鳥嘌呤之例示性核鹼基及核苷包括肌苷(I)、1-甲基-肌苷(m1I)、懷俄苷(imG)、甲基懷俄苷(mimG)、7-去氮雜-鳥苷、7-氰基-7-去氮雜-鳥苷(preQ0)、7-胺基甲基-7-去氮雜-鳥苷(preQ1)、7-甲基-鳥苷(m7G)、1-甲基-鳥苷(m1G)、8-側氧基-鳥苷、7-甲基-8-側氧基-鳥苷。在一些實施例中，本發明之mRNA包括一或多種前述經修飾核鹼基之組合(例如，2、3或4種前述經修飾核鹼基之組合。)

【0527】 在一些實施例中，經修飾核鹼基係1-甲基-假尿苷(m1ψ)、5-甲氧基-尿苷(mo5U)、5-甲基-胞苷(m5C)、假尿苷(ψ)、α-硫代-鳥苷或α-硫代-腺苷。在一些實施例中，本發明之mRNA包括一或多種前述經修飾核鹼基之組合(例如，2、3或4種前述經修飾核鹼基之組合。)

【0528】 在一些實施例中，mRNA包含假尿苷(ψ)。在一些實施例中，mRNA包含假尿苷(ψ)及5-甲基-胞苷(m5C)。在一些實施例中，mRNA包含1-甲基-假尿苷(m1ψ)。在一些實施例中，mRNA包含1-甲基-假尿苷(m1ψ)及5-甲基-胞苷(m5C)。在一些實施例中，mRNA包含2-硫代尿苷(s2U)。在一些實施例中，mRNA包含2-硫代尿苷及5-甲基-胞苷(m5C)。在一些實施例中，mRNA包含5-甲氧基-尿苷(mo5U)。在一些實施例中，mRNA包含5-甲氧基-尿苷(mo5U)及5-甲基-胞苷(m5C)。在一些實施例中，mRNA包含2'-O-甲基尿苷。在一些實施例中，mRNA包含2'-O-甲基尿苷及5-甲基-胞苷(m5C)。在一些實施例中，mRNA包含N6-甲基

-腺苷(m6A)。在一些實施例中，mRNA包含N6-甲基-腺苷(m6A)及5-甲基-胞苷(m5C)。

【0529】 在某些實施例中，本發明之mRNA係針對特定修飾均一地經修飾(亦即，完全地經修飾、通過整個序列經修飾)。例如，mRNA可均一地經N1-甲基假尿苷(m1ψ)或5-甲基-胞苷(m5C)修飾，意謂mRNA序列中之所有尿苷或所有胞嘧啶核苷均經N1-甲基假尿苷(m1ψ)或5-甲基-胞苷(m5C)置換。同樣，本發明之mRNA可藉由用經修飾殘基(諸如上文所陳述之彼等)置換而針對存在於該序列中的任何類型之核苷殘基均一地經修飾。

【0530】 在一些實施例中，本發明之mRNA可在編碼區(例如，編碼多肽之開放閱讀框)中經修飾。在其他實施例中，mRNA可在除編碼區之外的區中經修飾。例如，在一些實施例中，提供5'-UTR及/或3'-UTR，其中任一者或兩者可獨立地含有一或多種不同的核苷修飾。在此類實施例中，核苷修飾亦可存在於編碼區中。

【0531】 本發明之mmRNA可包括針對糖、核鹼基及/或核苷間鍵之修飾的組合。此等組合可包括本文所述之任何一或多種修飾。

【0532】 在列出單一修飾之情況下，所列出之核苷或核苷酸表示100%之彼A、U、G或C核苷酸或核苷已經修飾。在列出百分率之情況下，此等表示所存在之A、U、G或C三磷酸酯的總量中該百分率之彼特定A、U、G或C核鹼基三磷酸酯。例如，組合：25% 5-胺基烯丙基-CTP + 75% CTP/25% 5-甲氧基-UTP + 75% UTP係指聚核苷酸，其中25%之胞嘧啶三磷酸酯為5-胺基烯丙基-CTP，而75%之胞嘧啶為CTP；而25%之尿嘧啶為5-甲氧基UTP，而75%之尿嘧啶為UTP。在未列出經修飾UTP之情況

下，則天然存在之ATP、UTP、GTP及/或CTP用於該聚核苷酸中發現的彼等核苷酸之100%位點中。在此實例中，所有GTP及ATP核苷酸均保持未經修飾。

【0533】 本發明之mRNA或其區可經密碼子最佳化。密碼子最佳化方法係此項技術中已知的且可用於多種目的：匹配宿主生物體中之密碼子頻率以確保適當折疊，使GC含量產生偏好以增加mRNA穩定性或降低二級結構，使可削弱基因建構或表現之串聯重複序列密碼子或鹼基連串降至最低，定製轉錄及轉譯控制區，插入或移除蛋白質轉運序列，移除/添加編碼蛋白中之轉譯後修飾位點(例如糖基化位點)，添加、移除或改組蛋白域，插入或刪除限制位點，修飾核糖體結合位點及mRNA降解位點，調節轉譯速率以允許蛋白質之多個域適當地折疊，或降低或消除聚核苷酸內之問題二級結構。密碼子最佳化工具、算法及服務係此項技術中已知的；非限制性實例包括來自GeneArt (Life Technologies)、DNA2.0 (Menlo Park, CA)之服務及/或專屬方法。在一些實施例中，mRNA序列使用最佳化算法經最佳化，例如以最佳化哺乳動物細胞中之表現或增強mRNA穩定性。

【0534】 在某些實施例中，本發明包括與任何本文所述之聚核苷酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性之聚核苷酸。

【0535】 本發明之mRNA可藉由此項技術中可獲得之方式，包括但不限於活體外轉錄(IVT)及合成方法產生。可使用酶(IVT)、固相、液相、組合合成方法、小區合成及接合方法。在一些實施例中，mRNA使用IVT酶合成方法製得。因此，本發明亦包括可用於活體外轉錄本文所述之mRNA之聚核苷酸，例如DNA、構築體及載體。

【0536】 非天然經修飾核鹼基可在合成期間或合成後引入至聚核苷酸(例如，mRNA)中。在某些實施例中，修飾可在核苷間鍵、嘌呤或嘧啶鹼基或糖上。在特定實施例中，修飾可引入於聚核苷酸鏈之末端處或該聚核苷酸鏈中之別處；使用化學合成或使用聚合酶。

【0537】 酶或化學接合方法可用於使聚核苷酸或其區與不同的功能部分(諸如靶向或遞送劑、螢光標記、液體、奈米顆粒等)結合。

用於降低蛋白質表現之治療劑

【0538】 在一些實施例中，治療劑係降低(亦即，減少、抑制、下調)蛋白質表現之治療劑。可用於降低蛋白質表現之治療劑的類型之非限制性實例包括併入微小RNA結合位點(miR結合位點)之mRNA、微小RNA(miRNA)、antagomir、小(短)干擾RNA (siRNA) (包括shortmer及dicer-受質RNA)、RNA干擾(RNAi)分子、反義RNA、核糖核酸酵素、小髮夾RNA (shRNA)、鎖核酸(LNA)及CRISPR/Cas9技術。

感應序列及微小RNA (miRNA)結合位點

【0539】 感應序列包括例如微小RNA (miRNA)結合位點、轉錄因子結合位點、結構化mRNA序列及/或基序、經工程改造以充當內源核酸結合分子之假受體的人工結合位點及其組合。感應序列之非限制性實例描述於美國公開案2014/0200261中，該案之內容以引用之方式整體併入本文中。

【0540】 在一些實施例中，本發明之包含編碼多肽之開放閱讀框(ORF)的聚核糖核苷酸(例如核糖核酸(RNA)，例如信使RNA (mRNA))進一步包含感應序列。在一些實施例中，感應序列為miRNA結合位點。

【0541】 miRNA係19-25個核苷酸長之非編碼RNA，其結合於聚核

糖核苷酸且藉由降低該聚核糖核苷酸之穩定性或藉由抑制其轉譯來下調基因表現。miRNA序列包含「種子」區，亦即成熟miRNA之位置2-8之區中的序列。miRNA種子可包含成熟miRNA之位置2-8或2-7。在一些實施例中，miRNA種子可包含7個核苷酸(例如，成熟miRNA之核苷酸2-8)，其中相應miRNA結合位點中的種子互補位點側接與miRNA位置1相對之腺苷(A)。在一些實施例中，miRNA種子可包含6個核苷酸(例如，成熟miRNA之核苷酸2-7)，其中相應miRNA結合位點中的種子互補位點側接與miRNA位置1相對之腺苷(A)。參見例如Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP; Mol Cell. 2007年7月6日;27(1):91-105。可進行標靶細胞或組織之miRNA譜剖繪，以確定miRNA存在或不存在於細胞或組織中。在一些實施例中，本發明之聚核糖核苷酸(例如核糖核酸(RNA)，例如信使RNA (mRNA))包含一或多個微小RNA標靶序列、微小RNA序列或微小RNA種子。此類序列可對應於任何已知之微小RNA，諸如美國公開案US2005/0261218及美國公開案US2005/0059005中教示之彼等，該等公開案中的每一者之內容均以引用之方式整體併入本文中。

【0542】 如本文所用，術語「微小RNA (miRNA或miR)結合位點」係指聚核糖核苷酸內(例如DNA內或RNA轉錄物內，包括5'UTR及/或3'UTR中)之序列，其與整個miRNA或其區具有充足互補性以與miRNA相互作用、締合或結合。在一些實施例中，本發明之包含編碼多肽之ORF的聚核糖核苷酸進一步包含miRNA結合位點。在例示性實施例中，聚核糖核苷酸(例如核糖核酸(RNA)，例如信使RNA (mRNA))之5'UTR及/或3'UTR包含miRNA結合位點。

【0543】 與miRNA具有充足互補性之miRNA結合位點係指互補程度足以促進miRNA介導之聚核糖核苷酸調控，例如miRNA介導之聚核糖核苷酸之轉譯抑制或降解。在本發明之例示性態樣中，與miRNA具有充足互補性之miRNA結合位點係指互補程度足以促進miRNA介導之聚核糖核苷酸降解，例如miRNA指導的RNA誘導之沉默複合物(RISC)介導之mRNA裂解。miRNA結合位點可與例如19-25個核苷酸之miRNA序列、19-23個核苷酸之miRNA序列或22個核苷酸之miRNA序列具有互補性。miRNA結合位點可僅與miRNA之一部分互補，例如與天然存在之miRNA序列之全長的小於1、2、3或4個核苷酸之部分互補。在一些實施例中，所需調控為mRNA降解。在一些實施例中，miRNA結合位點具有充分或完全互補性(例如，在天然存在之miRNA之長度的全部或大部分上充分互補或完全互補)。在一些實施例中，mRNA降解具有充分或完全互補性。

【0544】 在一些實施例中，miRNA結合位點包括與miRNA種子序列具有互補性(例如，部分或完全互補性)之序列。在一些實施例中，miRNA結合位點包括與miRNA種子序列具有完全互補性之序列。在一些實施例中，miRNA結合位點包括與miRNA序列具有互補性(例如，部分或完全互補性)之序列。在一些實施例中，miRNA結合位點包括與miRNA序列具有完全互補性之序列。在一些實施例中，miRNA結合位點與miRNA序列具有完全互補性，但具有1、2或3個核苷酸取代、末端添加及/或截短。

【0545】 在一些實施例中，miRNA結合位點之長度與相應miRNA相同。在一些實施例中，在5'末端、3'末端或兩個末端處，miRNA結合位點比相應miRNA短一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八

個、九個、十個、十一個或十二個核苷酸。在其他實施例中，在5'末端、3'末端或兩個末端處，微小RNA結合位點比相應微小RNA短兩個核苷酸。比相應miRNA短的miRNA結合位點仍能夠使併入一或多個miRNA結合位點之mRNA降解或防止mRNA轉譯。

【0546】 在一些實施例中，miRNA結合位點結合於相應成熟miRNA，該成熟miRNA係含有Dicer之活性RISC之一部分。在另一實施例中，miRNA結合位點與RISC中之相應miRNA的結合使含有miRNA結合位點之mRNA降解或防止mRNA經轉譯。在一些實施例中，miRNA結合位點與miRNA具有充足互補性，使得包含miRNA之RISC複合物裂解包含miRNA結合位點之聚核糖核苷酸。在一些實施例中，miRNA結合位點具有不完美互補性，使得包含miRNA之RISC複合物誘導包含miRNA結合位點之聚核糖核苷酸中的不穩定性。在另一實施例中，miRNA結合位點具有不完美互補性，使得包含miRNA之RISC複合物抑制包含miRNA結合位點之聚核糖核苷酸的轉錄。

【0547】 在一些實施例中，miRNA結合位點與相應miRNA具有一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個、十一個或十二個錯配。

【0548】 在一些實施例中，miRNA結合位點具有分別與相應miRNA之至少約十個、至少約十一個、至少約十二個、至少約十三個、至少約十四個、至少約十五個、至少約十六個、至少約十七個、至少約十八個、至少約十九個、至少約二十個或至少約二十一個相鄰核苷酸互補的至少約十個、至少約十一個、至少約十二個、至少約十三個、至少約十四個、至少約十五個、至少約十六個、至少約十七個、至少約十八個、至少

約十九個、至少約二十個或至少約二十一個相鄰核苷酸。

【0549】 藉由將一或多個miRNA結合位點工程改造至本發明之聚核糖核苷酸中，該聚核糖核苷酸可經靶向用於降解或減少之轉譯，只要可獲得所討論之miRNA。這可減少遞送聚核糖核苷酸時之脫靶效應。在一些實施例中，若本發明之聚核糖核苷酸不欲遞送至組織或細胞，而是終止於組織或細胞，則若miRNA之一或多個結合位點經工程改造至該聚核糖核苷酸之5'UTR及/或3'UTR中，則該組織或細胞中之豐富miRNA可抑制所關注之基因的表現。

【0550】 相反，miRNA結合位點可自其中天然存在該等結合位點之聚核糖核苷酸序列中移除，以便增加特定組織中之蛋白質表現。在一些實施例中，針對特定miRNA之結合位點可自聚核糖核苷酸中移除以改良含有miRNA之組織或細胞中的蛋白質表現。

【0551】 在一個實施例中，本發明之聚核糖核苷酸可在5'UTR及/或3'UTR中包括至少一個miRNA結合位點，以便將細胞毒性或細胞保護性mRNA治療劑引導至特定細胞，諸如但不限於正常細胞及/或癌細胞。在另一實施例中，本發明之聚核糖核苷酸可在5'-UTR及/或3'-UTR中包括兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個或十個以上miRNA結合位點，以便將細胞毒性或細胞保護性mRNA治療劑引導至特定細胞，諸如但不限於正常細胞及/或癌細胞。

【0552】 對多種組織中之表現的調控可藉由引入或移除一或多個miRNA結合位點來實現。可基於疾病之miRNA表現模式及/或其譜剖繪來決定移除或插入miRNA結合位點。已報導了miRNA之鑑別、miRNA結合位點及其表現模式及在生物學中之作用(例如，Bonauer等人，Curr Drug

Targets 2010 11:943-949 ; Anand及Cheresh Curr Opin Hematol 2011 18:171-176 ; Contreras及Rao Leukemia 2012 26:404-413 (2011年12月20日. doi: 10.1038/leu.2011.356) ; Bartel Cell 2009 136:215-233 ; Landgraf等人, Cell, 2007 129:1401-1414 ; Gentner及Naldini, Tissue Antigens. 2012 80:393-403及其中所有參考文獻；該等文獻中的每一者均以引用之方式整體併入本文中)。

【0553】 miRNA及miRNA結合位點可對應於任何已知序列，包括描述於美國公開案第2014/0200261號、第2005/0261218號及第2005/0059005號中之非限制性實例，該等公開案中的每一者均以引用之方式整體併入本文中。

【0554】 其中已知miRNA調控mRNA且由此調控蛋白質表現之組織之實例包括但不限於肝臟(miR-122)、肌肉(miR-133、miR-206、miR-208)、內皮細胞(miR-17-92、miR-126)、骨髓細胞(miR-142-3p、miR-142-5p、miR-16、miR-21、miR-223、miR-24、miR-27)、脂肪組織(let-7、miR-30c)、心臟(miR-1d、miR-149)、腎(miR-192、miR-194、miR-204)及肺上皮細胞(let-7、miR-133、miR-126)。

【0555】 特定言之，已知miRNA差異性表現於免疫細胞(亦稱作造血細胞)，諸如抗原呈遞細胞(APC) (例如樹突狀細胞及巨噬細胞)、巨噬細胞、單核細胞、B淋巴細胞、T淋巴細胞、粒細胞、天然殺手細胞等中。免疫細胞特異性miRNA牽涉於免疫原性、自身免疫性、對感染之免疫反應、發炎以及在基因療法及組織/器官移植之後的非所需免疫反應中。免疫細胞特異性miRNA亦調控造血細胞(免疫細胞)之發育、增殖、分化及細胞凋亡的多個態樣。在一些實施例中，miR-142及miR-146僅在免

疫細胞中表現，尤其在骨髓樹突狀細胞中很豐富。已證明，對聚核糖核苷酸之免疫反應可藉由向該聚核糖核苷酸之3'-UTR中添加miR-142結合位點來關閉，使得能夠在組織及細胞中進行更穩定基因轉移。miR-142有效地降解抗原呈遞細胞中之外源性聚核糖核苷酸且抑制經轉導細胞之細胞毒性消除(例如，Annoni A等人，blood, 2009, 114, 5152-5161；Brown BD等人，Nat med. 2006, 12(5), 585-591；Brown BD等人，blood, 2007, 110(13): 4144-4152，該等文獻中的每一者均以引用之方式整體併入本文中)。

【0556】 抗原介導之免疫反應可指由外來抗原觸發之免疫反應，該等外來抗原在進入生物體時由抗原呈遞細胞處理且呈現於抗原呈遞細胞之表面上。T細胞可識別呈遞之抗原且誘導表現該抗原之細胞的細胞毒性消除。

【0557】 將miR-142結合位點引入本發明之聚核糖核苷酸的5'UTR及/或3'UTR中可藉由miR-142介導之降解選擇性地抑制抗原呈遞細胞中之基因表現，從而限制抗原呈遞細胞(例如樹突狀細胞)中之抗原呈遞且由此防止在遞送該聚核糖核苷酸之後出現抗原介導的免疫反應。該聚核糖核苷酸接著穩定表現於標靶組織或細胞中而不會觸發細胞毒性消除。

【0558】 在一個實施例中，已知表現於免疫細胞、尤其抗原呈遞細胞中之miRNA的結合位點可經工程改造至本發明之聚核糖核苷酸中，以藉由miRNA介導之RNA降解抑制該聚核糖核苷酸在抗原呈遞細胞中的表現，從而抑制抗原介導之免疫反應。該聚核糖核苷酸在其中未表現免疫細胞特異性miRNA之非免疫細胞中維持表現。在一些實施例中，為了防止針對肝臟特異性蛋白之免疫原性反應，可移除任何miR-122結合位點且

miR-142 (及/或mirR-146)結合位點可經工程改造至本發明之聚核糖核苷酸的5'UTR及/或3'UTR中。

【0559】 為了進一步驅動APC及巨噬細胞中之選擇性降解及抑制，本發明之聚核糖核苷酸可在5'UTR及/或3'UTR中包括另一負調控元件，單獨或與miR-142及/或miR-146結合位點組合。作為非限制性實例，另一負調控元件為組成性衰減元件(CDE)。

【0560】 免疫細胞特異性miRNA包括但不限於hsa-let-7a-2-3p、hsa-let-7a-3p、hsa-7a-5p、hsa-let-7c、hsa-let-7e-3p、hsa-let-7e-5p、hsa-let-7g-3p、hsa-let-7g-5p、hsa-let-7i-3p、hsa-let-7i-5p、miR-10a-3p、miR-10a-5p、miR-1184、hsa-let-7f-1--3p、hsa-let-7f-2--5p、hsa-let-7f-5p、miR-125b-1-3p、miR-125b-2-3p、miR-125b-5p、miR-1279、miR-130a-3p、miR-130a-5p、miR-132-3p、miR-132-5p、miR-142-3p、miR-142-5p、miR-143-3p、miR-143-5p、miR-146a-3p、miR-146a-5p、miR-146b-3p、miR-146b-5p、miR-147a、miR-147b、miR-148a-5p、miR-148a-3p、miR-150-3p、miR-150-5p、miR-151b、miR-155-3p、miR-155-5p、miR-15a-3p、miR-15a-5p、miR-15b-5p、miR-15b-3p、miR-16-1-3p、miR-16-2-3p、miR-16-5p、miR-17-5p、miR-181a-3p、miR-181a-5p、miR-181a-2-3p、miR-182-3p、miR-182-5p、miR-197-3p、miR-197-5p、miR-21-5p、miR-21-3p、miR-214-3p、miR-214-5p、miR-223-3p、miR-223-5p、miR-221-3p、miR-221-5p、miR-23b-3p、miR-23b-5p、miR-24-1-5p、miR-24-2-5p、miR-24-3p、miR-26a-1-3p、miR-26a-2-3p、miR-26a-5p、miR-26b-3p、miR-26b-5p、miR-27a-3p、miR-27a-5p、miR-27b-3p、miR-27b-5p、miR-28-

3p、miR-28-5p、miR-2909、miR-29a-3p、miR-29a-5p、miR-29b-1-5p、miR-29b-2-5p、miR-29c-3p、miR-29c-5p、miR-30e-3p、miR-30e-5p、miR-331-5p、miR-339-3p、miR-339-5p、miR-345-3p、miR-345-5p、miR-346、miR-34a-3p、miR-34a-5p、miR-363-3p、miR-363-5p、miR-372、miR-377-3p、miR-377-5p、miR-493-3p、miR-493-5p、miR-542、miR-548b-5p、miR-548c-5p、miR-548i、miR-548j、miR-548n、miR-574-3p、miR-598、miR-718、miR-935、miR-99a-3p、miR-99a-5p、miR-99b-3p及miR-99b-5p。此外，可藉由微陣列雜交及切片機分析在免疫細胞中鑑別新穎miRNA（例如，Jima DD等人，Blood, 2010, 116:e118-e127；Vaz C等人，BMC Genomics, 2010, 11,288，其中每一者之內容以引用之方式整體併入本文中。）

【0561】 已知表現於肝臟中之miRNA包括但不限於miR-107、miR-122-3p、miR-122-5p、miR-1228-3p、miR-1228-5p、miR-1249、miR-129-5p、miR-1303、miR-151a-3p、miR-151a-5p、miR-152、miR-194-3p、miR-194-5p、miR-199a-3p、miR-199a-5p、miR-199b-3p、miR-199b-5p、miR-296-5p、miR-557、miR-581、miR-939-3p及miR-939-5p。針對任何肝臟特異性miRNA之miRNA結合位點均可經引入至本發明之聚核糖核苷酸中或自本發明之聚核糖核苷酸移除以調控該聚核糖核苷酸在肝臟中的表現。肝臟特異性miRNA結合位點可單獨或另外與本發明之聚核糖核苷酸中的免疫細胞(例如APC) miRNA結合位點組合經工程改造。

【0562】 已知表現於肺中之miRNA包括但不限於let-7a-2-3p、let-7a-3p、let-7a-5p、miR-126-3p、miR-126-5p、miR-127-3p、miR-127-

5p、miR-130a-3p、miR-130a-5p、miR-130b-3p、miR-130b-5p、miR-133a、miR-133b、miR-134、miR-18a-3p、miR-18a-5p、miR-18b-3p、miR-18b-5p、miR-24-1-5p、miR-24-2-5p、miR-24-3p、miR-296-3p、miR-296-5p、miR-32-3p、miR-337-3p、miR-337-5p、miR-381-3p及miR-381-5p。任何肺特異性miRNA之miRNA結合位點均可經引入至本發明之聚核糖核苷酸中或自本發明之聚核糖核苷酸移除以調控該聚核糖核苷酸在肺中的表現。肺特異性miRNA結合位點可單獨或另外與本發明之聚核糖核苷酸中的免疫細胞(例如APC) miRNA結合位點組合經工程改造。

【0563】 已知表現於心臟中之miRNA包括但不限於miR-1、miR-133a、miR-133b、miR-149-3p、miR-149-5p、miR-186-3p、miR-186-5p、miR-208a、miR-208b、miR-210、miR-296-3p、miR-320、miR-451a、miR-451b、miR-499a-3p、miR-499a-5p、miR-499b-3p、miR-499b-5p、miR-744-3p、miR-744-5p、miR-92b-3p及miR-92b-5p。任何心臟特異性微小RNA之miRNA結合位點均可經引入至本發明之聚核糖核苷酸中或自本發明之聚核糖核苷酸移除以調控該聚核糖核苷酸在心臟中的表現。心臟特異性miRNA結合位點可單獨或另外與本發明之聚核糖核苷酸中的免疫細胞(例如APC) miRNA結合位點組合經工程改造。

【0564】 已知表現於神經系統中之miRNA包括但不限於miR-124-5p、miR-125a-3p、miR-125a-5p、miR-125b-1-3p、miR-125b-2-3p、miR-125b-5p、miR-1271-3p、miR-1271-5p、miR-128、miR-132-5p、miR-135a-3p、miR-135a-5p、miR-135b-3p、miR-135b-5p、miR-137、miR-139-5p、miR-139-3p、miR-149-3p、miR-149-5p、miR-153、miR-181c-3p、miR-181c-5p、miR-183-3p、miR-183-5p、miR-190a、miR-

190b、miR-212-3p、miR-212-5p、miR-219-1-3p、miR-219-2-3p、miR-23a-3p、miR-23a-5p、miR-30a-5p、miR-30b-3p、miR-30b-5p、miR-30c-1-3p、miR-30c-2-3p、miR-30c-5p、miR-30d-3p、miR-30d-5p、miR-329、miR-342-3p、miR-3665、miR-3666、miR-380-3p、miR-380-5p、miR-383、miR-410、miR-425-3p、miR-425-5p、miR-454-3p、miR-454-5p、miR-483、miR-510、miR-516a-3p、miR-548b-5p、miR-548c-5p、miR-571、miR-7-1-3p、miR-7-2-3p、miR-7-5p、miR-802、miR-922、miR-9-3p及miR-9-5p。富集於神經系統中之miRNA進一步包括特異性地表現於神經元中之彼等，包括但不限於miR-132-3p、miR-132-5p、miR-148b-3p、miR-148b-5p、miR-151a-3p、miR-151a-5p、miR-212-3p、miR-212-5p、miR-320b、miR-320e、miR-323a-3p、miR-323a-5p、miR-324-5p、miR-325、miR-326、miR-328、miR-922，及特異性地表現於神經膠質細胞中之彼等，包括但不限於miR-1250、miR-219-1-3p、miR-219-2-3p、miR-219-5p、miR-23a-3p、miR-23a-5p、miR-3065-3p、miR-3065-5p、miR-30e-3p、miR-30e-5p、miR-32-5p、miR-338-5p及miR-657。任何CNS特異性miRNA之miRNA結合位點均可經引入至本發明之聚核糖核苷酸中或自本發明之聚核糖核苷酸移除以調控該聚核糖核苷酸在神經系統中的表現。神經系統特異性miRNA結合位點可單獨或另外與本發明之聚核糖核苷酸中的免疫細胞(例如APC) miRNA結合位點組合經工程改造。

【0565】 已知表現於胰臟中之miRNA包括但不限於miR-105-3p、miR-105-5p、miR-184、miR-195-3p、miR-195-5p、miR-196a-3p、miR-196a-5p、miR-214-3p、miR-214-5p、miR-216a-3p、miR-216a-

5p、miR-30a-3p、miR-33a-3p、miR-33a-5p、miR-375、miR-7-1-3p、miR-7-2-3p、miR-493-3p、miR-493-5p及miR-944。任何胰臟特異性miRNA之miRNA結合位點均可經引入至本發明之聚核糖核苷酸中或自本發明之聚核糖核苷酸移除以調控該聚核糖核苷酸在胰臟中的表現。胰臟特異性miRNA結合位點可單獨或另外與本發明之聚核糖核苷酸中的免疫細胞(例如APC) miRNA結合位點組合經工程改造。

【0566】 已知表現於腎中之miRNA包括但不限於miR-122-3p、miR-145-5p、miR-17-5p、miR-192-3p、miR-192-5p、miR-194-3p、miR-194-5p、miR-20a-3p、miR-20a-5p、miR-204-3p、miR-204-5p、miR-210、miR-216a-3p、miR-216a-5p、miR-296-3p、miR-30a-3p、miR-30a-5p、miR-30b-3p、miR-30b-5p、miR-30c-1-3p、miR-30c-2-3p、miR-30c-5p、miR-324-3p、miR-335-3p、miR-335-5p、miR-363-3p、miR-363-5p及miR-562。任何腎特異性miRNA之miRNA結合位點均可經引入至本發明之聚核糖核苷酸中或自本發明之聚核糖核苷酸移除以調控該聚核糖核苷酸在腎中的表現。腎特異性miRNA結合位點可單獨或另外與本發明之聚核糖核苷酸中的免疫細胞(例如APC) miRNA結合位點組合經工程改造。

【0567】 已知表現於肌肉中之miRNA包括但不限於let-7g-3p、let-7g-5p、miR-1、miR-1286、miR-133a、miR-133b、miR-140-3p、miR-143-3p、miR-143-5p、miR-145-3p、miR-145-5p、miR-188-3p、miR-188-5p、miR-206、miR-208a、miR-208b、miR-25-3p及miR-25-5p。任何肌肉特異性miRNA之miRNA結合位點均可經引入至本發明之聚核糖核苷酸中或自本發明之聚核糖核苷酸移除以調控該聚核糖核苷酸在肌肉中的

表現。肌肉特異性miRNA結合位點可單獨或另外與本發明之聚核糖核苷酸中的免疫細胞(例如APC) miRNA結合位點組合經工程改造。

【0568】 miRNA亦差異性表現於不同類型之細胞，諸如但不限於內皮細胞、上皮細胞及脂肪細胞中。

【0569】 已知表現於內皮細胞中之miRNA包括但不限於let-7b-3p、let-7b-5p、miR-100-3p、miR-100-5p、miR-101-3p、miR-101-5p、miR-126-3p、miR-126-5p、miR-1236-3p、miR-1236-5p、miR-130a-3p、miR-130a-5p、miR-17-5p、miR-17-3p、miR-18a-3p、miR-18a-5p、miR-19a-3p、miR-19a-5p、miR-19b-1-5p、miR-19b-2-5p、miR-19b-3p、miR-20a-3p、miR-20a-5p、miR-217、miR-210、miR-21-3p、miR-21-5p、miR-221-3p、miR-221-5p、miR-222-3p、miR-222-5p、miR-23a-3p、miR-23a-5p、miR-296-5p、miR-361-3p、miR-361-5p、miR-421、miR-424-3p、miR-424-5p、miR-513a-5p、miR-92a-1-5p、miR-92a-2-5p、miR-92a-3p、miR-92b-3p及miR-92b-5p。藉由深度測序分析在內皮細胞中發現了許多新穎miRNA (例如Voellenkle C等人，RNA, 2012, 18, 472-484，以引用之方式整體併入本文中)。任何內皮細胞特異性miRNA之miRNA結合位點均可經引入至本發明之聚核糖核苷酸中或自本發明之聚核糖核苷酸移除以調控該聚核糖核苷酸在內皮細胞中的表現。

【0570】 已知表現於上皮細胞中之miRNA包括但不限於let-7b-3p、let-7b-5p、miR-1246、miR-200a-3p、miR-200a-5p、miR-200b-3p、miR-200b-5p、miR-200c-3p、miR-200c-5p、miR-338-3p、miR-429、miR-451a、miR-451b、miR-494、miR-802及miR-34a、miR-34b-5p、miR-34c-5p、miR-449a、miR-449b-3p、miR-449b-5p (在呼吸道纖毛上

皮細胞中具特異性)、let-7家族、miR-133a、miR-133b、miR-126 (在肺上皮細胞中具特異性)、miR-382-3p、miR-382-5p (在腎上皮細胞中具特異性)及miR-762 (在角膜上皮細胞中具特異性)。任何上皮細胞特異性miRNA之MiRNA結合位點均可經引入至本發明之聚核糖核苷酸中或自本發明之聚核糖核苷酸移除以調控該聚核糖核苷酸在上皮細胞中的表現。

【0571】此外，一大組miRNA富集於胚胎幹細胞中，從而控制幹細胞自更新以及多種細胞譜系(諸如神經細胞、心臟、造血細胞、皮膚細胞、骨原細胞及肌肉細胞)之發育及/或分化(例如，Kuppusamy KT等人，Curr. Mol Med, 2013, 13(5), 757-764；Vidigal JA及Ventura A, Semin Cancer Biol. 2012, 22(5-6), 428-436；Goff LA等人，PLoS One, 2009, 4:e7192；Morin RD等人，Genome Res,2008,18, 610-621；Yoo JK等人，Stem Cells Dev. 2012, 21(11), 2049-2057，其中每一者均以引用之方式整體併入本文中)。胚胎幹細胞中之豐富miRNA包括但不限於let-7a-2-3p、let-a-3p、let-7a-5p、let7d-3p、let-7d-5p、miR-103a-2-3p、miR-103a-5p、miR-106b-3p、miR-106b-5p、miR-1246、miR-1275、miR-138-1-3p、miR-138-2-3p、miR-138-5p、miR-154-3p、miR-154-5p、miR-200c-3p、miR-200c-5p、miR-290、miR-301a-3p、miR-301a-5p、miR-302a-3p、miR-302a-5p、miR-302b-3p、miR-302b-5p、miR-302c-3p、miR-302c-5p、miR-302d-3p、miR-302d-5p、miR-302e、miR-367-3p、miR-367-5p、miR-369-3p、miR-369-5p、miR-370、miR-371、miR-373、miR-380-5p、miR-423-3p、miR-423-5p、miR-486-5p、miR-520c-3p、miR-548e、miR-548f、miR-548g-3p、miR-548g-5p、miR-548i、miR-548k、miR-548l、miR-548m、miR-548n、miR-548o-3p、

miR-548o-5p 、 miR-548p 、 miR-664a-3p 、 miR-664a-5p 、 miR-664b-3p 、 miR-664b-5p 、 miR-766-3p 、 miR-766-5p 、 miR-885-3p 、 miR-885-5p,miR-93-3p 、 miR-93-5p 、 miR-941,miR-96-3p 、 miR-96-5p 、 miR-99b-3p及miR-99b-5p。藉由深度測序在人類胚胎幹細胞中發現了許多經預測之新穎miRNA (例如Morin RD等人, Genome Res,2008,18, 610-621 ; Goff LA等人, PLoS One, 2009, 4:e7192 ; Bar M等人, Stem cells, 2008, 26, 2496-2505 , 其中每一者之內容以引用之方式整體併入本文中)。

【0572】 在一個實施例中，胚胎幹細胞特異性miRNA之結合位點可包括於本發明之聚核糖核苷酸的3'UTR中或自本發明之聚核糖核苷酸的3'UTR移除，以調節胚胎幹細胞之發育及/或分化，以抑制退化性狀態(例如退化性疾病)下之幹細胞的衰老，或刺激疾病狀態下之幹細胞(例如癌症幹細胞)的衰老及細胞凋亡。

【0573】 進行了許多miRNA表現研究，以剖繪miRNA在多種癌細胞/組織及其他疾病中之差異性表現。一些miRNA異常地過表現於某些癌細胞中，而另一些則表現不足。在一些實施例中，miRNA差異性地表現於癌細胞(WO2008/154098 、 US2013/0059015 、 US2013/0042333 、 WO2011/157294)；癌症幹細胞(US2012/0053224)；胰臟癌及疾病(US2009/0131348 、 US2011/0171646 、 US2010/0286232 、 US8389210)；哮喘及發炎(US8415096)；前列腺癌(US2013/0053264)；肝細胞癌(WO2012/151212 、 US2012/0329672 、 WO2008/054828 、 US8252538)；肺癌細胞(WO2011/076143 、 WO2013/033640 、 WO2009/070653 、 US2010/0323357)；皮膚T細胞淋巴瘤

(WO2013/011378)；結腸直腸癌細胞(WO2011/0281756、WO2011/076142)；癌症陽性淋巴結(WO2009/100430、US2009/0263803)；鼻咽癌(EP2112235)；慢性阻塞性肺病(US2012/0264626、US2013/0053263)；甲狀腺癌(WO2013/066678)；卵巢癌細胞(US2012/0309645、WO2011/095623)；乳癌細胞(WO2008/154098、WO2007/081740、US2012/0214699)、白血病及淋巴瘤(WO2008/073915、US2009/0092974、US2012/0316081、US2012/0283310、WO2010/018563，其中每一者之內容以引用之方式整體併入本文中。)

【0574】作為非限制性實例，在某些癌症及/或腫瘤細胞中過表現之miRNA的miRNA結合位點可自本發明之聚核糖核苷酸的3'UTR移除，從而恢復受到癌細胞中過表現之miRNA抑制之表現，因此改良相應生物學功能，例如轉錄刺激及/或抑制、細胞週期停滯、細胞凋亡及細胞死亡。其中miRNA表現未上調之正常細胞及組織將保持不受影響。

【0575】MiRNA亦可調控複雜生物學過程，諸如血管生成(例如miR-132)(Anand及Cheresh Curr Opin Hematol 2011 18:171-176)。在本發明之聚核糖核苷酸中，可移除或引入牽涉於此類過程中之miRNA結合位點，以便針對生物學相關細胞類型或相關生物學過程調適該聚核糖核苷酸之表現。在本文中，本發明之聚核糖核苷酸係定義為營養缺陷型聚核糖核苷酸。

肽/多肽治療劑

【0576】在一些實施例中，治療劑為肽治療劑。在一些實施例中，治療劑為多肽治療劑。

【0577】 在一些實施例中，該肽或多肽係天然來源的，例如自天然來源分離。在其他實施例中，該肽或多肽為合成分子，例如活體外產生之合成肽或多肽。在一些實施例中，該肽或多肽為重組分子。在一些實施例中，該肽或多肽為嵌合分子。在一些實施例中，該肽或多肽為融合分子。在一些實施例中，該組合物之肽或多肽治療劑為天然存在之肽或多肽。在一些實施例中，該組合物之肽或多肽治療劑為天然存在之肽或多肽的經修飾形式(例如，與其野生型、天然存在之肽或多肽配對物相比，含有少於3個、少於5個、少於10個、少於15個、少於20個或少於25個胺基酸取代、缺失或添加)。

【0578】 在一些實施例中，在本發明之負載LNP中，該一或多種治療劑及/或預防劑為聚核苷酸或多肽。

基因體編輯技術

【0579】 在一些實施例中，該核酸適用於基因體編輯技術。

【0580】 在一些實施例中，該基因體編輯技術係規律成簇間隔短迴文重複序列(CRISPR)或轉錄活化子樣效應子核酸酶(TALEN)。

【0581】 在一些實施例中，該核酸係選自由CRISPR RNA (crRNA)、反式活化crRNA (tracrRNA)、單嚮導RNA (sgRNA)及DNA修復模板組成之群的適用於基因體編輯技術之至少一種核酸。

疫苗

【0582】 在一些實施例中，該治療劑及/或預防劑為RNA (例如，信使RNA (mRNA))之核糖核酸(RNA)癌症疫苗，其可安全地引導身體的細胞機制產生所關注之幾乎任何癌症蛋白或其片段。在一些實施例中，該RNA為經修飾RNA。例如，本發明之RNA疫苗可用於誘導針對癌症之平

衡免疫反應(包含細胞免疫及體液免疫兩者)，而無插入性突變誘發之可能性風險。

【0583】 該等RNA疫苗可用於多種設定中，視癌症之流行率或未滿足之醫學需要的程度或水平而定。該等RNA疫苗可用於治療及/或預防多種階段或轉移程度之癌症。該等RNA疫苗具有卓越特性，因為與包括癌症疫苗之替代抗癌療法相比，其產生大得多的抗體效價且更早產生反應。雖然不希望受理論束縛，但咸信呈mRNA聚核苷酸形式之RNA疫苗係更好地經設計以在轉譯時產生適當蛋白質構形，因為該等RNA疫苗選用天然細胞機制。與離體製造且可觸發非所需細胞反應之傳統疫苗不同，該等RNA疫苗以更天然方式呈遞至細胞系統。

【0584】 本發明之一些實施例提供包括至少一種具有開放閱讀框之核糖核酸(RNA)聚核苷酸之癌症疫苗，該開放閱讀框編碼至少一種癌症抗原多肽或其免疫原性片段{例如，能夠誘導針對癌症之免疫反應的免疫原性片段)。其他實施例包括至少一種具有開放閱讀框之核糖核酸(RNA)聚核苷酸，該開放閱讀框編碼能夠誘導針對癌症之免疫反應的兩種或更多種抗原或抗原決定基。

【0585】 本發明在一些態樣中係具有編碼癌症抗原之開放閱讀框的mRNA及具有編碼免疫檢查點調節劑之開放閱讀框的mRNA之疫苗。在一些實施例中，該免疫檢查點調節劑為抑制性檢查點多肽。在一些實施例中，該抑制性檢查點多肽係特異性地結合於選自由PD-1、TIM-3、VISTA、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR及LAG3組成之群的分子之抗體或其片段。在一些實施例中，該抑制性檢查點多肽為抗CTLA4或抗PD1抗體。視情況，該疫苗包括脂質奈米顆粒。在

一些實施例中，將具有編碼癌症抗原之開放閱讀框的mRNA之疫苗投與至個體。在其他實施例中，檢查點抑制劑在3-10週後投與。在一些實施例中，檢查點抑制劑在4週後投與。

【0586】 在其他態樣中，本發明係具有編碼至少2種癌症抗原之開放閱讀框的mRNA及脂質奈米顆粒載劑之個人化癌症疫苗，其中該至少2種癌症抗原為患者特異性癌症抗原。在一些實施例中，脂質奈米顆粒之平均直徑為50-200 nm。

【0587】 在其他態樣中，本發明係具有編碼至少2種癌症抗原之開放閱讀框的mRNA之個人化癌症疫苗，其中該至少2種癌症抗原代表患者之抗原。在一些實施例中，患者之抗原為外來體鑑別的患者之抗原。在一些實施例中，單一mRNA編碼該等癌症抗原。在其他實施例中，複數種mRNA編碼該等癌症抗原。

【0588】 在其他實施例中，各mRNA可編碼5-10種癌症抗原或單一癌症抗原。在一些實施例中，該mRNA編碼2-100種癌症抗原。在其他實施例中，mRNA編碼10-100、20-100、50-100、100-200、300-400、500-600、600-700、700-800、900-1,000或1,000-10,000種癌症抗原。

【0589】 在一些實施例中，

- a) 編碼各癌症抗原之mRNA中散佈有裂解敏感性位點；
- b) 編碼各癌症抗原之mRNA在無連接體之情況下直接彼此連接；
- c) 編碼各癌症抗原之mRNA用單一核苷酸連接體彼此連接；
- d) 各癌症抗原包含25-35個胺基酸且包括位於中央之SNP突變；
- e) 至少30%之癌症抗原對來自個體之I類MHC分子具有最高親和力；
- f) 至少30%之癌症抗原對來自個體之II類MHC分子具有最高親和

力；

g) 至少50%之癌症抗原對HLA-A、HLA-B及/或DRB 1具有IC₅₀ >500 nM之預測結合親和力；

h) mRNA編碼20種癌症抗原；

i) 50%之癌症抗原對I類MHC具有結合親和力且50%之癌症抗原對II類MHC具有結合親和力；及/或

j) 編碼癌症抗原之mRNA係經安排，使得該等癌症抗原經排序以使假抗原決定基減至最少。

【0590】 在一些實施例中，各癌症抗原包含31個胺基酸且包括位於中央之SNP突變，在該SNP突變之每一側上具有15個側接胺基酸。

【0591】 在一些實施例中，該疫苗為個人化癌症疫苗且其中該癌症抗原為個體特異性癌症抗原。在一些實施例中，個體特異性癌症抗原可代表個體之腫瘤樣品的外顯子組，或個體之腫瘤樣品的轉錄物組。在一些實施例中，個體特異性癌症抗原可代表個體之外來體。

【0592】 在一些實施例中，開放閱讀框進一步編碼一或多種傳統癌症抗原。在一些實施例中，傳統癌症抗原為非突變型抗原。在一些實施例中，傳統癌症抗原為突變型抗原。

【0593】 在一些實施例中，該mRNA疫苗進一步包含具有編碼一或多種傳統癌症抗原之開放閱讀框的mRNA。

【0594】 在一些實施例中，單一mRNA編碼該等癌症抗原。在其他實施例中，複數種mRNA編碼該等癌症抗原。在一些實施例中，各癌症抗原為10-50個胺基酸長。在其他實施例中，各癌症抗原為15-20個胺基酸長。在其他實施例中，癌症抗原為20-50、25-100、100-200、200-300、

300-400、400-500、500-1,000或1,000-10,000個胺基酸長。

【0595】 在一些實施例中，該等疫苗進一步包含佐劑。

【0596】 本發明之一些實施例提供在脂質奈米顆粒內調配的包括至少一種核糖核酸(RNA)聚核苷酸之癌症疫苗，該至少一種核糖核酸(RNA)聚核苷酸具有編碼至少一種癌症多肽之開放閱讀框、至少一個5'末端帽及至少一種化學修飾。在一些實施例中，5'末端帽為7mG(5')ppp(5')NlmpNp。

【0597】 在一些實施例中，至少一種化學修飾係選自假尿苷、N1-甲基假尿苷、N1-乙基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-去氮雜-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮雜-尿苷、2-硫代-二氫假尿苷、2-硫代-二氫尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮雜-尿苷、二氫假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷及2'-O-甲基尿苷。在一些實施例中，經化學修飾之核苷酸的併入程度已經最佳化以改良對疫苗調配物之免疫反應。

【0598】 在一些實施例中，脂質奈米顆粒(例如，本發明之空LNP或負載LNP)包含陽離子脂質、經PEG修飾之脂質、固醇及非陽離子脂質。在一些實施例中，陽離子脂質為可離子化陽離子脂質，且非陽離子脂質為中性脂質，且固醇為膽固醇。在一些實施例中，陽離子脂質係選自2,2-二亞油烯基-4-二甲基胺基乙基-[1,3]-二氧戊環(DLin-KC2-DMA)、二亞油烯基-甲基-4-二甲基胺基丁酸酯(DLin-MC3- DMA)及9-((4-(二甲基胺基)丁醯基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)。

【0599】 在一些實施例中，該脂質奈米顆粒調配物包括免疫增強劑

(例如TLR促效劑)以增強疫苗(調配物)之免疫原性。

【0600】 在一些實施例中，開放閱讀框中之100%尿嘧啶具有化學修飾。在一些實施例中，化學修飾係在尿嘧啶之5-位處。在一些實施例中，化學修飾為N1-甲基假尿苷。

【0601】 在其他實施例中，編碼APC再編程分子之mRNA包括於該疫苗中或與該疫苗共投與。該APC再編程分子可為CIITA、伴侶蛋白(諸如CLIP、HLA-DO、HLA-DM)、共刺激分子(諸如CD40、CD80、CD86)、CIITA片段(諸如CIITA之胺基酸26-137)或與CIITA具有80%序列一致性之蛋白質。

【0602】 在其他態樣中，提供一種在個體中引發免疫反應之方法，該方法藉由自個體之樣品鑑別至少2種癌症抗原，其中該至少2種癌症抗原包括選自由移碼突變及重組組成之群的突變，且向該個體投與具有編碼該至少2種癌症抗原之開放閱讀框的mRNA疫苗。

【0603】 在一些實施例中，自個體之外來體鑑別該等癌症抗原。在一些實施例中，自該外來體鑑別2-100種抗原。在其他實施例中，該mRNA疫苗具有編碼該2-100種抗原之開放閱讀框。單一mRNA或複數種mRNA可編碼該等抗原。

【0604】 在一些實施例中，該等抗原為癌症抗原。該等癌症抗原可具有選自點突變、移碼突變及重組之突變。該方法可進一步涉及藉由外顯子組分析確認該等癌症抗原為個體特異性的。

【0605】 在一些實施例中，該方法可進一步涉及藉由轉錄物組分析確認該等癌症抗原為個體特異性的。

【0606】 在一些實施例中，該方法亦涉及在投與該mRNA疫苗之後

至少一個月，自個體之樣品鑑別至少2種癌症抗原以產生癌症抗原之第二集合，且向該個體投與具有編碼癌症抗原之第二集合之開放閱讀框的mRNA疫苗。

【0607】 在其他實施例中，個體之樣品為腫瘤樣品。

【0608】 在其他態樣中，本發明包含一種在個體中引發免疫反應之方法，該方法藉由自個體之樣品鑑別至少2種癌症抗原以產生癌症抗原之第一集合，向該個體投與具有編碼癌症抗原之第一集合之開放閱讀框的mRNA疫苗，在投與該mRNA疫苗之後至少一個月，自個體之樣品鑑別至少2種癌症抗原以產生癌症抗原之第二集合，且向該個體投與具有編碼癌症抗原之第二集合之開放閱讀框的mRNA疫苗。

【0609】 在一些實施例中，具有編碼抗原之第二集合之開放閱讀框的mRNA疫苗在具有編碼癌症抗原之第一集合之開放閱讀框的mRNA疫苗之後6個月至1年投與至該個體。在其他實施例中，具有編碼抗原之第二集合之開放閱讀框的mRNA疫苗在具有編碼癌症抗原之第一集合之開放閱讀框的mRNA疫苗之後1-2年投與至該個體。

【0610】 在一些實施例中，單一mRNA具有編碼該等癌症抗原之開放閱讀框。在其他實施例中，複數種mRNA編碼該等抗原。在一些實施例中，癌症抗原之第二集合包括2-100種抗原。在其他實施例中，該等癌症抗原具有選自點突變、移碼突變及重組之突變。

【0611】 在其他態樣中，本發明包含一種在個體中引發免疫反應之方法，該方法藉由自個體之樣品鑑別至少2種癌症抗原，向該個體投與具有編碼該至少2種癌症抗原之開放閱讀框的mRNA，且向該個體投與癌症治療劑。在一些實施例中，該癌症治療劑為靶向療法。該靶向療法可為

BRAF 抑制劑，諸如維羅非尼 (vemurafenib)(PLX4032) 或達拉非尼 (dabrafenib)。

【0612】在其他實施例中，該癌症治療劑為T-細胞治療劑。該T-細胞治療劑可為檢查點抑制劑，諸如抗PD-1抗體或抗CTLA-4抗體。在一些實施例中，該抗PD-1抗體為BMS-936558 (納武單抗(nivolumab))。在其他實施例中，該抗CTLA-4抗體為伊匹單抗(ipilimumab)。在其他實施例中，該T-細胞治療劑為OX40L。在其他實施例中，該癌症治療劑係包含基於群體之腫瘤特異性抗原之疫苗。

【0613】在其他實施例中，該癌症治療劑係包含具有編碼一或多種傳統癌症抗原之開放閱讀框的mRNA之疫苗。

【0614】在一些實施例中，具有編碼該至少2種癌症抗原之開放閱讀框的mRNA與該癌症治療劑同時投與至該個體。在一些實施例中，具有編碼該至少2種癌症抗原之開放閱讀框的mRNA在投與該癌症治療劑之前投與至該個體。在一些實施例中，具有編碼該至少2種癌症抗原之開放閱讀框的mRNA在投與該癌症治療劑之後投與至該個體。

【0615】在本發明之其他態樣中，提供一種方法，該方法包含使具有編碼癌症抗原之開放閱讀框的mRNA與脂質奈米顆粒調配物混合以產生mRNA癌症疫苗，及在混合之24小時內向個體投與該mRNA癌症疫苗。在一些實施例中，該mRNA癌症疫苗在混合之12小時內投與至該個體。在其他實施例中，該mRNA癌症疫苗在混合之1小時內投與至該個體。在一些實施例中，該mRNA癌症疫苗編碼2-100種癌症抗原或10-100種癌症抗原。

【0616】在一些實施例中，該疫苗為個人化癌症疫苗且其中該癌症

抗原為個體特異性癌症抗原。

【0617】 在一些實施例中，單一mRNA編碼該等癌症抗原。在其他實施例中，複數種mRNA編碼該等癌症抗原。在其他實施例中，各mRNA編碼5-10種癌症抗原或單一癌症抗原。在其他實施例中，各癌症抗原為10-50個胺基酸長或15-20個胺基酸長。

【0618】 本文進一步提供癌症疫苗在製造用於在個體中誘導抗原特異性免疫反應之方法中的藥劑中之用途，該方法包含以有效產生抗原特異性免疫反應之量向該個體投與該癌症疫苗。

【0619】 在其他態樣中，提供一種治療有需要之個體的癌症之方法，該方法藉由自分離自該個體之外來體鑑別至少2種癌症抗原；基於所鑑別的抗原，產生具有編碼該等抗原之開放閱讀框的mRNA疫苗；且向該個體投與該mRNA疫苗，其中該mRNA疫苗在該個體中誘導腫瘤特異性免疫反應，由此治療該個體的癌症。在其他態樣中，本發明係可根據如下方法製備之RNA疫苗，該方法涉及自分離自個體之外來體鑑別至少2種癌症抗原；根據所鑑別的抗原，產生具有編碼該等抗原之開放閱讀框的mRNA疫苗。

【0620】 在本發明之態樣中，提供一種在個體中引發針對癌症抗原之免疫反應之方法。該方法涉及向個體投與包含至少一種具有編碼至少一種抗原多肽或其免疫原性片段之開放閱讀框的RNA聚核苷酸之RNA疫苗，由此在個體中誘導對該抗原多肽或其免疫原性片段具特異性之免疫反應，其中在疫苗接種之後，個體中的抗抗原多肽抗體效價相對於接種有預防有效劑量之針對癌症之傳統疫苗的個體中之抗抗原多肽抗體效價有所增加。「抗抗原多肽抗體」係特異性地結合於抗原多肽之血清抗體。

【0621】 預防有效劑量係在臨床上可接受之水準下預防癌症進展之治療有效劑量。在一些實施例中，治療有效劑量係該疫苗之包裝插頁中列出之劑量。如本文所用之傳統疫苗係指除本發明之mRNA疫苗以外的疫苗。例如，傳統疫苗包括但不限於活微生物疫苗、滅活微生物疫苗、次單元疫苗、蛋白抗原疫苗、DNA疫苗等。在例示性實施例中，傳統疫苗係已獲得監管批准及/或由國家藥物監管機構(例如美國食品及藥物管理局(FDA)或歐洲藥品管理局(EMA.))登記之疫苗。

【0622】 在一些實施例中，在疫苗接種之後，個體中之抗抗原多肽抗體效價相對於接種有預防有效劑量之針對癌症之傳統疫苗的個體中之抗抗原多肽抗體效價增加1 log至10 log。

【0623】 在一些實施例中，在疫苗接種之後，個體中之抗抗原多肽抗體效價相對於接種有預防有效劑量之針對癌症之傳統疫苗的個體中之抗抗原多肽抗體效價增加1 log。

【0624】 在一些實施例中，在疫苗接種之後，個體中之抗抗原多肽抗體效價相對於接種有預防有效劑量之針對癌症之傳統疫苗的個體中之抗抗原多肽抗體效價增加2 log。

【0625】 在一些實施例中，在疫苗接種之後，個體中之抗抗原多肽抗體效價相對於接種有預防有效劑量之針對癌症之傳統疫苗的個體中之抗抗原多肽抗體效價增加3 log。

【0626】 在一些實施例中，在疫苗接種之後，個體中之抗抗原多肽抗體效價相對於接種有預防有效劑量之針對癌症之傳統疫苗的個體中之抗抗原多肽抗體效價增加5 log。

【0627】 在一些實施例中，在疫苗接種之後，個體中之抗抗原多肽

抗體效價相對於接種有預防有效劑量之針對癌症之傳統疫苗的個體中之抗原多肽抗體效價增加10 log。

【0628】 在本發明之其他態樣中，提供一種在個體中引發針對癌症抗原之免疫反應之方法。該方法涉及向個體投與包含至少一種具有編碼至少一種抗原多肽或其免疫原性片段之開放閱讀框的RNA聚核苷酸之RNA疫苗，由此在個體中誘導對抗原多肽或其免疫原性片段具特異性之免疫反應，其中個體中的免疫反應等於接種有相對於該RNA疫苗2倍至100倍劑量水準之針對癌症抗原之傳統疫苗的個體中之免疫反應。

【0629】 在一些實施例中，個體中的免疫反應等於接種有相對於該RNA疫苗兩倍劑量水準之傳統疫苗的個體中之免疫反應。

【0630】 在一些實施例中，個體中的免疫反應等於接種有相對於該RNA疫苗三倍劑量水準之傳統疫苗的個體中之免疫反應。

【0631】 在一些實施例中，個體中的免疫反應等於接種有相對於該RNA疫苗4倍劑量水準之傳統疫苗的個體中之免疫反應。

【0632】 在一些實施例中，個體中的免疫反應等於接種有相對於該RNA疫苗5倍劑量水準之傳統疫苗的個體中之免疫反應。在一些實施例中，個體中的免疫反應等於接種有相對於該RNA疫苗10倍劑量水準之傳統疫苗的個體中之免疫反應。

【0633】 在一些實施例中，個體中的免疫反應等於接種有相對於該RNA疫苗50倍劑量水準之傳統疫苗的個體中之免疫反應。

【0634】 在一些實施例中，個體中的免疫反應等於接種有相對於該RNA疫苗100倍劑量水準之傳統疫苗的個體中之免疫反應。

【0635】 在一些實施例中，個體中的免疫反應等於接種有相對於該

RNA疫苗10倍至1000倍劑量水準之傳統疫苗的個體中之免疫反應。

【0636】 在一些實施例中，個體中的免疫反應等於接種有相對於該RNA疫苗100倍至1000倍劑量水準之傳統疫苗的個體中之免疫反應。

【0637】 在其他實施例中，藉由確定個體中之抗體效價來評估免疫反應。

【0638】 在其他態樣中，本發明包含一種在個體中引發免疫反應之方法，該方法藉由向個體投與包含至少一種具有編碼至少一種癌症抗原多肽或其免疫原性片段之開放閱讀框的RNA聚核苷酸之RNA疫苗，由此在個體中誘導對該抗原多肽或其免疫原性片段具特異性之免疫反應，其中個體中的免疫反應相對於接種有預防有效劑量之針對癌症抗原之傳統疫苗的個體中誘導之免疫反應早2天至10週經誘導。在一些實施例中，個體中的免疫反應在接種有相對於該RNA疫苗2倍至100倍劑量水準之預防有效劑量之傳統疫苗的個體中經誘導。

【0639】 在一些實施例中，個體中的免疫反應相對於接種有預防有效劑量之傳統疫苗的個體中誘導之免疫反應早2天經誘導。

【0640】 在一些實施例中，個體中的免疫反應相對於接種有預防有效劑量之傳統疫苗的個體中誘導之免疫反應早3天經誘導。在一些實施例中，個體中的免疫反應相對於接種有預防有效劑量之傳統疫苗的個體中誘導之免疫反應早1週經誘導。

【0641】 在一些實施例中，個體中的免疫反應相對於接種有預防有效劑量之傳統疫苗的個體中誘導之免疫反應早2週經誘導。

【0642】 在一些實施例中，個體中的免疫反應相對於接種有預防有效劑量之傳統疫苗的個體中誘導之免疫反應早3週經誘導。

【0643】 在一些實施例中，個體中的免疫反應相對於接種有預防有效劑量之傳統疫苗的個體中誘導之免疫反應早5週經誘導。

【0644】 在一些實施例中，個體中的免疫反應相對於接種有預防有效劑量之傳統疫苗的個體中誘導之免疫反應早10週經誘導。

【0645】 一種在個體中引發針對癌症之免疫反應之方法，該方法藉由向個體投與具有編碼第一抗原多肽之開放閱讀框的癌症RNA疫苗，其中該RNA聚核苷酸不包括穩定化元件，且其中佐劑未與該疫苗共調配或共投與。

【0646】 在其他態樣中，本發明包含一種產生編碼包含1000個與3000個之間核苷酸之多聯體癌症抗原的mRNA之方法，該方法藉由

(a) 使包含編碼該多聯體癌症抗原之開放閱讀框的第一聚核苷酸及包含5'-UTR之第二聚核苷酸與結合於固體支撐物之聚核苷酸結合；

(b) 在合適條件下使第二聚核苷酸之3'末端接合至第一聚核苷酸之5'末端，其中合適條件包含DNA連接酶，由此產生第一接合產物；

(c) 在合適條件下使包含3'-UTR之第三聚核苷酸的5'末端接合至第一接合產物之3'末端，其中合適條件包含RNA連接酶，由此產生第二接合產物；及

(d) 自該固體支撐物釋放第二接合產物，由此產生編碼包含1000個與3000個之間核苷酸之多聯體癌症抗原的mRNA。在所提供之組合物或方法中的任一者之一些實施例中，mRNA編碼一或多種複發性多態現象。在一些實施例中，該一或多種複發性多態現象包含p53中之復發性體細胞癌突變。在一些此類實施例中，p53中之一或多種複發性體細胞癌突變係選自由以下組成之群：

- (1) 在鄰近密碼子p.T125之規範5'剪接位點處的突變；
- (2) 在鄰近密碼子p.331之規範5'剪接位點處的突變；
- (3) 在鄰近密碼子p.126之規範3'剪接位點處的突變；
- (4) 在鄰近密碼子p.224之規範5'剪接位點處的突變，從而誘導一個隱含的替代內含子5'剪接位點。

【0647】 在一個實施例中，本發明提供一種包含編碼開放閱讀框(ORF)之mRNA的癌症治療疫苗，該開放閱讀框(ORF)編碼新抗原肽(1)-(4)中之一或多者。在一個實施例中，本發明提供基於含有任何上述突變之患者的腫瘤，選擇性投與含有或編碼肽(1)-(4)中之一或多者之疫苗。在一個實施例中，本發明提供基於含有任何上述突變之個體的腫瘤及含有經預測結合於所得新抗原之相應HLA等位基因之個體的正常HLA類型之雙重標準選擇性投與疫苗。

【0648】 在本發明之其他態樣中，提供一種用個人化mRNA癌症疫苗治療個體之方法，該方法藉由自個體分離樣品，藉由分析來自樣品的患者轉錄物組及/或患者外顯子組來鑑別新抗原決定基之集合以產生患者特異性突變組，基於MHC結合強度、MHC結合多樣性、預測之免疫原性程度、低自身反應性及/或T細胞反應性選擇用於來自該突變組之疫苗的新抗原決定基之集合，製備編碼新抗原決定基之集合的mRNA疫苗且在自個體分離樣品之兩個月內向個體投與該mRNA疫苗。在一些實施例中，在自個體分離樣品之一個月內向個體投與該mRNA疫苗。

【0649】 在其他態樣中，本發明包含一種鑑別用於個人化mRNA癌症疫苗之新抗原決定基之集合的方法，該個人化mRNA癌症疫苗具有一或多種編碼新抗原決定基之集合之聚核苷酸，該方法藉由a. 藉由分析患者轉

錄物組及患者外顯子組來鑑別患者特異性突變組，b. 基於以下至少三者使用針對該等新抗原決定基之加權值自該突變組選擇15-500種新抗原決定基之子集：在患者RNA-seq中評估基因或轉錄物層面之表現；變異體調用信賴度評分；RNA-seq等位基因特異性表現；保守對非保守胺基酸取代；點突變之位置(針對增加之TCR銜接的定中心評分)；點突變之位置(針對差異性HLA結合之錨定評分)；自主性：使用患者WES資料，<100%核心抗原決定基同源性；針對8聚體-11聚體之HLA-A及-B IC50；針對15聚體-20聚體之HLA-DRB 1 IC50；混雜評分(亦即，經預測結合之患者HLA的數目)；針對8聚體-11聚體之HLA-C IC50；針對15聚體-20聚體之HLA-DRB3-5 IC50；針對15聚體-20聚體之HLA-DQB 1/A1 IC50；針對15聚體-20聚體之HLA-DPB 1/A1 IC50；I類對II類比例；所涵蓋之患者HLA-A、-B及DRB 1同種異型的多樣性；點突變對複雜抗原決定基(例如移碼)之比例；及/或假抗原決定基HLA結合評分，及c. 基於最高加權值自該子集選擇用於個人化mRNA癌症疫苗之新抗原決定基之集合，其中新抗原決定基之集合包含15-40種新抗原決定基。

【0650】 在一些實施例中，本文所述之核酸疫苗係經化學修飾。在其他實施例中，該等核酸疫苗係未經修飾的。

【0651】 其他態樣提供用於對個體接種疫苗之組合物及方法，其包含向個體投與核酸疫苗，該核酸疫苗包含一或多種具有編碼第一抗原多肽或多聯體多肽之開放閱讀框的RNA聚核苷酸，其中該RNA聚核苷酸不包括穩定化元件，且其中佐劑未與該疫苗共調配或共投與。

【0652】 在其他態樣中，本發明係用於對個體接種疫苗之組合物或方法，其包含向個體投與核酸疫苗，該核酸疫苗包含一或多種具有編碼第

一抗原多肽之開放閱讀框的RNA聚核苷酸，其中10 ug/kg與400 ug/kg之間劑量之該核酸疫苗投與至個體。在一些實施例中，RNA聚核苷酸之劑量為每劑1-5 ug、5-10 ug、10-15 ug、15-20 ug、10-25 ug、20-25 ug、20-50 ug、30-50 ug、40-50 ug、40-60 ug、60-80 ug、60-100 ug、50-100 ug、80-120 ug、40-120 ug、40-150 ug、50-150 ug、50-200 ug、80-200 ug、100-200 ug、120-250 ug、150-250 ug、180-280 ug、200-300 ug、50-300 ug、80-300 ug、100-300 ug、40-300 ug、50-350 ug、100-350 ug、200-350 ug、300-350 ug、320-400 ug、40-380 ug、40-100 ug、100-400 ug、200-400 ug或300-400 ug。在一些實施例中，該核酸疫苗藉由皮內或肌肉內注射投與至個體。在一些實施例中，該核酸疫苗在第二百零天投與至個體。在一些實施例中，第二劑量之該核酸疫苗在第二十天投與至個體。

【0653】 在一些實施例中，25微克劑量之RNA聚核苷酸包括於投與至個體之核酸疫苗中。在一些實施例中，100微克劑量之RNA聚核苷酸包括於投與至個體之核酸疫苗中。在一些實施例中，50微克劑量之RNA聚核苷酸包括於投與至個體之核酸疫苗中。在一些實施例中，75微克劑量之RNA聚核苷酸包括於投與至個體之核酸疫苗中。在一些實施例中，150微克劑量之RNA聚核苷酸包括於投與至個體之核酸疫苗中。在一些實施例中，400微克劑量之RNA聚核苷酸包括於投與至個體之核酸疫苗中。在一些實施例中，200微克劑量之RNA聚核苷酸包括於投與至個體之核酸疫苗中。在一些實施例中，與遠側淋巴結相比，該RNA聚核苷酸以高100倍水準積聚於局部淋巴結中。在其他實施例中，該核酸疫苗係經化學修飾且在其他實施例中，該核酸疫苗未經化學修飾。

【0654】 本發明之態樣提供一種核酸疫苗，其包含一或多種具有編碼第一抗原多肽或多聯體多肽之開放閱讀框的RNA聚核苷酸，其中該RNA聚核苷酸不包括穩定化元件，及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑，其中佐劑未包括於該疫苗中。在一些實施例中，該穩定化元件為組蛋白莖環。在一些實施例中，該穩定化元件係相對於野生型序列具有增加之GC含量之核酸序列。

【0655】 本發明之態樣提供核酸疫苗，其包含一或多種具有編碼第一抗原多肽之開放閱讀框的RNA聚核苷酸，其中該RNA聚核苷酸存在於用於活體內投與至宿主之調配物中，該調配物賦予之抗體效價優於針對用於可接受百分率之人類個體的第一抗原之血清保護之準則。在一些實施例中，由本發明之mRNA疫苗產生的抗體效價為中和抗體效價。在一些實施例中，該中和抗體效價大於蛋白疫苗。在其他實施例中，由本發明之mRNA疫苗產生的中和抗體效價大於佐劑蛋白疫苗。在其他實施例中，由本發明之mRNA疫苗產生的中和抗體效價為1,000-10,000、1,200-10,000、1,400-10,000、1,500-10,000、1,000-5,000、1,000-4,000、1,800-10,000、2000-10,000、2,000-5,000、2,000-3,000、2,000-4,000、3,000-5,000、3,000-4,000或2,000-2,500。中和效價通常表述為實現斑塊數目之50%減少所需的最高血清稀釋度。

【0656】 在某些態樣中，本發明疫苗(例如，LNP經囊封之mRNA疫苗)在接種疫苗之個體的血液或血清中產生預防及/或治療有效水準、濃度及/或效價之抗原特異性抗體。如本文所定義，術語抗體效價係指在個體(例如人類個體)中產生之抗原特異性抗體之量。在例示性實施例中，抗體效價係表述為最大稀釋度(在連續稀釋中)之倒數，其仍產生陽性結果。在

例示性實施例中，藉由酶聯免疫吸附劑分析(ELISA)測定或量測抗體效價。在例示性實施例中，藉由中和分析，例如藉由微量中和分析測定或量測抗體效價。在某些態樣中，抗體效價量測值係表述為比率，諸如1:40、1:100等。

【0657】 在本發明之例示性實施例中，有效疫苗產生大於1:40、大於1:100、大於1:400、大於1:1000、大於1:2000、大於1:3000、大於1:4000、大於1:500、大於1:6000、大於1:7500、大於1:10000之抗體效價。在例示性實施例中，截至疫苗接種之後10天、截至疫苗接種之後20天、截至疫苗接種之後30天、截至疫苗接種之後40天或截至疫苗接種之後50天或50天以上產生或實現該抗體效價。在例示性實施例中，在向個體投與單一劑量之疫苗之後產生或實現該效價。在其他實施例中，在多個劑量之後，例如在第一及第二劑量(例如，加強劑量)之後產生或實現該效價。

【0658】 在本發明之例示性態樣中，抗原特異性抗體以 $\mu\text{g/ml}$ 為單位來度量，或以IU/L (國際單位/公升)或mIU/ml (毫國際單位/ml)為單位來度量。在本發明之例示性實施例中，有效疫苗產生 $>0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $>0.1 \mu\text{g/ml}$ 、 $>0.2 \mu\text{g/ml}$ 、 $>0.35 \mu\text{g/ml}$ 、 $>0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $>1 \mu\text{g/ml}$ 、 $>2 \mu\text{g/ml}$ 、 $>5 \mu\text{g/ml}$ 或 $>10 \mu\text{g/ml}$ 。在本發明之例示性實施例中，有效疫苗產生 $>10 \text{ mIU/ml}$ 、 $>20 \text{ mIU/ml}$ 、 $>50 \text{ mIU/ml}$ 、 $>100 \text{ mIU/ml}$ 、 $>200 \text{ mIU/ml}$ 、 $>500 \text{ mIU/ml}$ 或 $>1000 \text{ mIU/ml}$ 。在例示性實施例中，截至疫苗接種之後10天、截至疫苗接種之後20天、截至疫苗接種之後30天、截至疫苗接種之後40天或截至疫苗接種之後50天或50天以上產生或實現該抗體水準或濃度。在例示性實施例中，在向個體投與單一劑量之疫苗之後產生或實現

該水準或濃度。在其他實施例中，在多個劑量之後，例如在第一及第二劑量(例如，加強劑量)之後產生或實現該水準或濃度。在例示性實施例中，藉由酶聯免疫吸附劑分析(ELISA)測定或量測抗體水準或濃度。在例示性實施例中，藉由中和分析，例如藉由微量中和分析測定或量測抗體水準或濃度。亦提供核酸疫苗，其包含一或多種具有編碼第一抗原多肽或多聯體多肽之開放閱讀框的RNA聚核苷酸，其中該RNA聚核苷酸存在於用於活體內投與至宿主之調配物中，從而引發比由具有穩定化元件或用佐劑調配且編碼第一抗原多肽之mRNA疫苗引發的抗體效價持續更長時間之高抗體效價。在一些實施例中，該RNA聚核苷酸係經調配以在單次投與之一週內產生中和抗體。在一些實施例中，佐劑係選自陽離子肽及免疫刺激核酸。在一些實施例中，陽離子肽為魚精蛋白。

【0659】 多個態樣提供包含一或多種具有開放閱讀框之RNA聚核苷酸的核酸疫苗，該一或多種RNA聚核苷酸包含至少一種化學修飾或視情況無核苷酸修飾，該開放閱讀框編碼第一抗原多肽或多聯體多肽，其中該RNA聚核苷酸存在於用於活體內投與至宿主之調配物中，使得宿主中之抗原表現水準顯著超過由具有穩定化元件或用佐劑調配且編碼第一抗原多肽之mRNA疫苗產生的抗原表現水準。

【0660】 其他態樣提供包含一或多種具有開放閱讀框之RNA聚核苷酸的核酸疫苗，該一或多種RNA聚核苷酸包含至少一種化學修飾或視情況無核苷酸修飾，該開放閱讀框編碼第一抗原多肽或多聯體多肽，其中該疫苗具有與未經修飾之mRNA疫苗產生相等抗體效價所需相比少至少10倍之RNA聚核苷酸。在一些實施例中，該RNA聚核苷酸以25-100微克之劑量存在。

【0661】 本發明之態樣亦提供疫苗使用單位，其包含10 ug與400 ug之間的一或多種具有開放閱讀框之RNA聚核苷酸及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑，該一或多種RNA聚核苷酸包含至少一種化學修飾或視情況無核苷酸修飾，該開放閱讀框編碼第一抗原多肽或多聯體多肽，其經調配以遞送至人類個體。在一些實施例中，該疫苗進一步包含陽離子脂質奈米顆粒。

【0662】 本發明之態樣提供在個體或個體群體中產生、維持或恢復針對腫瘤之抗原記憶的方法，該等方法包含向該個體或個體群體投與抗原記憶加強核酸疫苗，該核酸疫苗包含：(a) 至少一種RNA聚核苷酸，該聚核苷酸包含至少一種化學修飾或視情況無核苷酸修飾及兩個或更多個密碼子最佳化開放閱讀框，該等開放閱讀框編碼參考抗原多肽之集合；及(b) 視情況選用之醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。在一些實施例中，該疫苗經由選自由肌肉內投與、皮內投與及皮下投與組成之群的途徑投與至個體。在一些實施例中，該投與步驟包含使個體之肌肉組織與適用於注射該組合物之器件接觸。在一些實施例中，該投與步驟包含使個體之肌肉組織與適用於與電穿孔組合注射該組合物之器件接觸。

【0663】 本發明之態樣提供對個體接種疫苗之方法，該等方法包含以對個體接種疫苗之有效量向個體投與25 ug/kg與400 ug/kg之間的單一劑量之核酸疫苗，該核酸疫苗包含一或多種具有編碼第一抗原多肽或多聯體多肽之開放閱讀框的RNA聚核苷酸。

【0664】 其他態樣提供包含一或多種具有開放閱讀框之RNA聚核苷酸的核酸疫苗，該一或多種RNA聚核苷酸包含至少一種化學修飾，該開放閱讀框編碼第一抗原多肽或多聯體多肽，其中該疫苗具有與未經修飾之

mRNA疫苗產生相等抗體效價所需相比少至少10倍之RNA聚核苷酸。在一些實施例中，該RNA聚核苷酸以25-100微克之劑量存在。

【0665】 其他態樣提供包含LNP調配之具有開放閱讀框之RNA聚核苷酸的核酸疫苗，該RNA聚核苷酸不包含核苷酸修飾(未經修飾)，該開放閱讀框編碼第一抗原多肽或多聯體多肽，其中該疫苗具有與未在LNP中調配的未經修飾之mRNA疫苗產生相等抗體效價所需相比少至少10倍之RNA聚核苷酸。在一些實施例中，該RNA聚核苷酸以25-100微克之劑量存在。

【0666】 在其他態樣中，本發明涵蓋一種治療60歲或更老之老年個體的方法，該方法包含以對個體接種疫苗之有效量向該個體投與包含一或多種具有開放閱讀框之RNA聚核苷酸的核酸疫苗，該開放閱讀框編碼抗原多肽或多聯體多肽。

【0667】 在其他態樣中，本發明涵蓋一種治療17歲或更年輕之年輕個體的方法，該方法包含以對個體接種疫苗之有效量向該個體投與包含一或多種具有開放閱讀框之RNA聚核苷酸的核酸疫苗，該開放閱讀框編碼抗原多肽或多聯體多肽。

【0668】 在其他態樣中，本發明涵蓋一種治療成年個體之方法，該方法包含以對個體接種疫苗之有效量向該個體投與包含一或多種具有開放閱讀框之RNA聚核苷酸的核酸疫苗，該開放閱讀框編碼抗原多肽或多聯體多肽。

【0669】 在一些態樣中，本發明包含一種對個體接種包括至少兩種編碼抗原之核酸序列之組合疫苗的方法，其中該疫苗之劑量為組合治療劑量，其中編碼抗原之各個別核酸的劑量為亞治療劑量。在一些實施例中，

該組合劑量係投與至個體之核酸疫苗中的25微克RNA聚核苷酸。在一些實施例中，該組合劑量係投與至個體之核酸疫苗中的100微克RNA聚核苷酸。在一些實施例中，該組合劑量係投與至個體之核酸疫苗中的50微克RNA聚核苷酸。在一些實施例中，該組合劑量係投與至個體之核酸疫苗中的75微克RNA聚核苷酸。在一些實施例中，該組合劑量係投與至個體之核酸疫苗中的150微克RNA聚核苷酸。在一些實施例中，該組合劑量係投與至個體之核酸疫苗中的400微克RNA聚核苷酸。在一些實施例中，編碼抗原之各個別核酸的亞治療劑量為1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20微克。在其他實施例中，該核酸疫苗係經化學修飾且在其他實施例中，該核酸疫苗未經化學修飾。

其他組分

【0670】除了前述部分中所述之彼等以外，LNP（例如，本發明之空LNP或負載LNP）亦可包括一或多種組分。在一些實施例中，LNP（例如，本發明之空LNP或負載LNP）可包括一或多種小疏水性分子，諸如維他命（例如，維他命A或維他命E）或固醇。

【0671】脂質奈米顆粒（例如，本發明之空LNP或負載LNP）亦可包括一或多種滲透性增強劑分子、碳水化合物、聚合物、表面改變劑或其他組分。滲透性增強劑分子可為例如美國專利申請公開案第2005/0222064號所述之分子。碳水化合物可包括單糖（例如葡萄糖）及多醣（例如糖原及其衍生物及類似物）。

【0672】聚合物可包括於LNP中及/或用於囊封或部分地囊封LNP。聚合物可為生物可降解的及/或生物相容性的。聚合物可選自但不限於聚胺、聚醚、聚醯胺、聚酯、聚胺基甲酸酯(polycarbamate)、聚脲、聚碳酸

酯、聚苯乙烯、聚醯亞胺、聚砜、聚胺基甲酸酯(polyurethane)、聚乙炔、聚乙烯、聚乙烯亞胺、聚異氰酸酯、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯腈及聚丙烯酸酯。在一些實施例中，聚合物可包括聚(己內酯)(PCL)、乙烯乙酸乙烯酯聚合物(EVA)、聚(乳酸)(PLA)、聚(L-乳酸)(PLLA)、聚(乙醇酸)(PGA)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、聚(L-乳酸-共-乙醇酸)(PLLGA)、聚(D,L-丙交酯)(PDLA)、聚(L-丙交酯)(PLLA)、聚(D,L-丙交酯-共-己內酯)、聚(D,L-丙交酯-共-己內酯-共-乙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-PEO-共-D,L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-PPO-共-D,L-丙交酯)、聚氰基丙烯酸烷酯、聚胺基甲酸酯、聚-L-離胺酸(PLL)、甲基丙烯酸羥基丙酯(HPMA)、聚乙二醇、聚-L-麩胺酸、聚(羥基酸)、聚酞、聚原酸酯、聚(酯醯胺)、聚醯胺、聚(酯醚)、聚碳酸酯、聚伸烷基(諸如聚乙烯及聚丙烯)、聚伸烷基二醇(諸如聚(乙二醇)(PEG))、聚氧化烯(PEO)、聚伸烷基對苯二甲酸酯(諸如聚(對苯二甲酸乙二酯))、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯醚、聚乙烯酯(諸如聚(乙酸乙烯酯))、聚鹵化乙烯(諸如聚(氯乙烯)(PVC))、聚乙烯吡咯啉酮(PVP)、聚矽氧烷、聚苯乙烯、聚胺基甲酸酯、衍生化纖維素(諸如烷基纖維素、羥基烷基纖維素、纖維素醚、纖維素酯、硝基纖維素、羥基丙基纖維素、羧基甲基纖維素)、丙烯酸聚合物(諸如聚((甲基)丙烯酸甲酯)(PMMA)、聚((甲基)丙烯酸乙酯)、聚((甲基)丙烯酸丁酯)、聚((甲基)丙烯酸異丁酯)、聚((甲基)丙烯酸己酯)、聚((甲基)丙烯酸異癸酯)、聚((甲基)丙烯酸月桂酯)、聚((甲基)丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸異丙酯)、聚(丙烯酸異丁酯)、聚(丙烯酸十八烷酯)及其共聚物及混合物)、聚二噁烷酮及其共聚物、聚羥基烷酸酯、聚丙烯富馬酸酯、聚甲醛、泊洛沙姆、聚氧胺、聚(原酸)酯、聚(丁

酸)、聚(戊酸)、聚(丙交酯-共-己內酯)、三亞甲基碳酸酯、聚(*N*-丙烯醯基嗎啉) (PAcM)、聚(2-甲基-2-噁唑啉) (PMOX)、聚(2-乙基-2-噁唑啉) (PEOZ)及聚甘油。

【0673】 表面改變劑可包括但不限於陰離子蛋白(例如牛血清白蛋白)、界面活性劑(例如陽離子界面活性劑，諸如二甲基二(十八烷基)-溴化銨)、糖或糖衍生物(例如環糊精)、核酸、聚合物(例如肝素、聚乙二醇及泊洛沙姆)、化痰劑(例如乙醯基半胱胺酸、艾蒿、菠羅蛋白酶、木瓜蛋白酶、大青屬(clerodendrum)、溴己新(bromhexine)、羧甲司坦(carbocisteine)、依普拉酮(eprazinone)、美司納(mesna)、胺溴索(ambroxol)、索布瑞醇(sobrerol)、多米奧醇(domiodol)、來托司坦(letosteine)、司替羅寧(stepronin)、硫普羅寧(tiopronin)、凝溶膠蛋白、胸腺素β4、阿法鏈道酶(dornase alfa)、奈替克新(neltenexine)及厄多司坦(erdosteine))及DNA酶(例如rhDNase)。表面改變劑可安置於奈米顆粒內及/或LNP之表面上(例如，藉由塗佈、吸附、共價連接或其他方法)。

【0674】 LNP (例如，本發明之空LNP或負載LNP)亦可包含一或多種官能化脂質。在一些實施例中，脂質可經炔基官能化，該炔基當在適當反應條件下暴露於疊氮化物時可經歷環加成反應。詳言之，脂質雙層可以此方式經可用於促進膜滲透、細胞識別或成像之一或多種基團官能化。LNP (例如，本發明之空LNP或負載LNP)之表面亦可與一或多種可用抗體結合。可用於靶向細胞遞送、成像及膜滲透之官能基及結合物係此項技術中熟知的。

【0675】 除了此等組分以外，脂質奈米顆粒(例如，本發明之空LNP或負載LNP)亦可包括可用於醫藥組合物之任何物質。在一些實施例中，

脂質奈米顆粒可包括一或多種醫藥學上可接受之賦形劑或附屬成分，諸如但不限於一或多種溶劑、分散介質、稀釋劑、分散助劑、懸浮助劑、造粒助劑、崩解劑、填充劑、助流劑、液體媒劑、黏合劑、表面活性劑、等張劑、增稠或乳化劑、緩衝劑、潤滑劑、油、防腐劑及其他物質。亦可包括諸如蠟、乳酪、著色劑、塗佈劑、調味劑及芳香劑之賦形劑。醫藥學上可接受之賦形劑係此項技術中熟知的(參見例如Remington之*The Science and Practice of Pharmacy*, 第21版, A. R. Gennaro; Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006)。

【0676】稀釋劑之實例可包括但不限於碳酸鈣、碳酸鈉、磷酸鈣、磷酸二鈣、硫酸鈣、磷酸氫鈣、磷酸鈉、乳糖、蔗糖、纖維素、微晶纖維素、高嶺土、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、氯化鈉、乾澱粉、玉米澱粉、粉糖及/或其組合。造粒劑及分散劑可選自由馬鈴薯澱粉、玉米澱粉、木薯澱粉、乙醇酸澱粉鈉、黏土、褐藻酸、瓜爾膠、柑橘渣、瓊脂、膨潤土、纖維素及木製品、天然海綿、陽離子交換樹脂、碳酸鈣、矽酸鹽、碳酸鈉、交聯聚(乙烯-吡咯啉酮)(交聯聚維酮)、羧基甲基澱粉鈉(乙醇酸澱粉鈉)、羧基甲基纖維素、交聯羧基甲基纖維素鈉(交聯羧基纖維素)、甲基纖維素、預膠凝澱粉(澱粉1500)、微晶澱粉、水不溶性澱粉、羧基甲基纖維素鈣、矽酸鎂鋁(VEEGUM®)、月桂基硫酸鈉、四級銨化合物及/或其組合組成之非限制性清單。

【0677】表面活性劑及/或乳化劑可包括但不限於天然乳化劑(例如，阿拉伯膠、瓊脂、褐藻酸、褐藻酸鈉、黃蓍膠、克羅珠克(chondrux)、膽固醇、黃原膠、果膠、明膠、蛋黃、酪蛋白、羊毛脂、膽固醇、蠟及卵磷脂)、膠質黏土(例如，膨潤土[矽酸鋁]及VEEGUM® [矽

酸鎂鋁))、長鏈胺基酸衍生物、高分子量醇(例如，硬脂醇、鯨蠟醇、油醇、三乙酸甘油酯單硬脂酸酯、乙二醇二硬脂酸酯、甘油單硬脂酸酯及丙二醇單硬脂酸酯、聚乙烯醇)、卡波姆(例如，羧聚乙烯、聚丙烯酸、丙烯酸聚合物及羧基乙烯基聚合物)、角叉菜膠、纖維素衍生物(例如，羧基甲基纖維素鈉、粉狀纖維素、羥基甲基纖維素、羥基丙基纖維素、羥基丙基甲基纖維素、甲基纖維素)、山梨醇酐脂肪酸酯(例如，聚氧乙烯山梨醇酐單月桂酸酯[TWEEN®20]、聚氧乙烯山梨醇酐[TWEEN® 60]、聚氧乙烯山梨醇酐單油酸酯[TWEEN®80]、山梨醇酐單棕櫚酸酯[SPAN®40]、山梨醇酐單硬脂酸酯[SPAN®60]、山梨醇酐三硬脂酸酯[SPAN®65]、甘油單油酸酯、山梨醇酐單油酸酯[SPAN®80])、聚氧乙烯酯(例如，聚氧乙烯單硬脂酸酯[MYRJ® 45]、聚氧乙烯氫化蓖麻油、聚乙氧基化蓖麻油、聚氧亞甲基硬脂酸酯及SOLUTOL®)、蔗糖脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯(例如CREMOPHOR®)、聚氧乙烯醚(例如，聚氧乙烯月桂基醚[BRIJ® 30])、聚(乙烯-吡咯啉酮)、二乙二醇單月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、油酸鈉、油酸鉀、油酸乙酯、油酸、月桂酸乙酯、月桂基硫酸鈉、PLURONIC®F 68、POLOXAMER® 188、西曲溴銨、西吡氯銨、苯紫氯銨、多庫酯鈉及/或其組合。

【0678】黏合劑可為澱粉(例如，玉米澱粉及澱粉糊)；明膠；糖(例如，蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糊精、糖蜜、乳糖、乳糖醇、甘露糖醇)；天然及合成膠(例如，阿拉伯膠、褐藻酸鈉、愛爾蘭苔提取物、潘瓦爾膠(panwar gum)、茄替膠、伊莎珀爾果殼之黏液、羧基甲基纖維素、甲基纖維素、乙基纖維素、羥基乙基纖維素、羥基丙基纖維素、羥基丙基甲基纖維素、微晶纖維素、纖維素乙酸酯、聚(乙烯-吡咯啉酮)、矽酸鎂鋁

(VEEGUM®)及落葉松阿拉伯半乳聚糖)；褐藻酸鹽；聚氧化乙烯；聚乙二醇；無機鈣鹽；矽酸；聚甲基丙烯酸酯；蠟；水；醇；及其組合，或任何其他合適之黏合劑。

【0679】防腐劑之實例可包括但不限於抗氧化劑、螯合劑、抗微生物防腐劑、抗真菌防腐劑、醇防腐劑、酸性防腐劑及/或其他防腐劑。抗氧化劑之實例包括但不限於 α 生育酚、抗壞血酸、抗壞血酸棕櫚酸酯、丁基化羥基茴香醚、丁基化羥基甲苯、一硫代甘油、偏亞硫酸氫鉀、丙酸、沒食子酸丙酯、抗壞血酸鈉、亞硫酸氫鈉、偏亞硫酸氫鈉及/或亞硫酸鈉。螯合劑之實例包括乙二胺四乙酸(EDTA)、檸檬酸單水合物、依地酸二鈉、依地酸二鉀、依地酸、富馬酸、蘋果酸、磷酸、依地酸鈉、酒石酸及/或依地酸三鈉。抗微生物防腐劑之實例包括但不限於苯紮氯銨、苧索氯銨、苧醇、布羅波爾、溴棕三甲銨、西吡氯銨、洛赫西定、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲苯酚、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶、咪脲、苯酚、苯氧乙醇、苯基乙醇、硝酸苯汞、丙二醇及/或硫柳汞。抗真菌防腐劑之實例包括但不限於對羥基苯甲酸丁酯、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯、苯甲酸、羥基苯甲酸、苯甲酸鉀、山梨酸鉀、苯甲酸鈉、丙酸鈉及/或山梨酸。醇防腐劑之實例包括但不限於乙醇、聚乙二醇、苧醇、苯酚、酚類化合物、雙酚、氯丁醇、羥基苯甲酸酯及/或苯基乙醇。酸性防腐劑之實例包括但不限於維他命A、維他命C、維他命E、 β -胡蘿蔔素、檸檬酸、乙酸、去氫抗壞血酸、抗壞血酸、山梨酸及/或植酸。其他防腐劑包括但不限於生育酚、乙酸生育酚、甲磺酸去鐵胺、溴棕三甲銨、丁基化羥基茴香醚(BHA)、丁基化羥基甲苯(BHT)、乙二胺、月桂基硫酸鈉(SLS)、月桂基醚硫酸鈉(SLES)、亞硫酸氫鈉、偏亞硫酸氫

鈉、亞硫酸鉀、偏亞硫酸氫鉀、GLYDANT PLUS®、PHENONIP®、對
羥基苯甲酸甲酯、GERMALL® 115、GERMABEN®II、NEOLONE™、
KATHON™及/或EUXYL®。

【0680】緩衝劑之實例包括但不限於檸檬酸鹽緩衝溶液、乙酸鹽緩
衝溶液、磷酸鹽緩衝溶液、氯化銨、碳酸鈣、氯化鈣、檸檬酸鈣、葡乳醛
酸鈣、葡庚糖酸鈣、葡萄糖酸鈣、d-葡萄糖酸、甘油磷酸鈣、乳酸鈣、乳
糖酸鈣、丙酸、乙醯丙酸鈣、戊酸、磷酸氫鈣、磷酸、磷酸三鈣、二羥基
磷酸鈣(calcium hydroxide phosphate)、乙酸鉀、氯化鉀、葡萄糖酸鉀、
鉀混合物、磷酸氫二鉀、磷酸二氫鉀、磷酸鉀混合物、乙酸鈉、碳酸氫
鈉、氯化鈉、檸檬酸鈉、乳酸鈉、磷酸氫二鈉、磷酸二氫鈉、磷酸鈉混合
物、緩血酸胺、胺基-磺酸酯緩衝液(例如HEPES)、氫氧化鎂、氫氧化
鋁、褐藻酸、無熱原質水、等張生理食鹽水、林格氏溶液、乙醇及/或其
組合。潤滑劑可選自由硬脂酸鎂、硬脂酸鈣、硬脂酸、矽石、滑石、麥
芽、甘油山嶺酸酯、氫化植物油、聚乙二醇、苯甲酸鈉、乙酸鈉、氯化
鈉、白胺酸、月桂基硫酸鎂、月桂基硫酸鈉及其組合組成之非限制性群。

【0681】油之實例包括但不限於扁桃仁、杏仁、鱷梨、巴西棕櫚、
佛手柑、黑加侖籽、琉璃苣、刺檜、甘菊、芥花、香菜、卡瑙巴、蓖麻、
肉桂、可可、椰子、魚肝、咖啡、玉米、棉籽、鵝鵝、桉樹、月見草、
魚、亞麻仁、香草醇、葫蘆、葡萄子、榛子、海索草、肉豆蔻酸異丙酯、
荷荷巴、夏威夷核果、熏衣草花、薰衣草、檸檬、山蒼子、澳洲堅果、錦
葵、芒果核、池花籽、貂、肉豆蔻、橄欖、橙、大西洋胸棘鯛、棕櫚、棕
櫚仁、桃仁、花生、罌粟籽、南瓜籽、油菜籽、米糠、迷迭香、紅花、白
檀、山茶花、咸油、沙棘、芝麻、乳木果油、矽酮、大豆、向日葵、茶

樹、薊、椿花、香根草、胡桃及小麥胚芽油以及硬脂酸丁酯、辛酸三酸甘油酯、癸酸三酸甘油酯、環甲基矽酮、癸二酸二乙酯、二甲矽油360、西甲矽油、肉豆蔻酸異丙酯、礦物油、辛基十二醇、油醇、矽酮油及/或其組合。

醫藥組合物

【0682】 包含脂質奈米顆粒之調配物可全部或部分地經調配為醫藥組合物。醫藥組合物可包括一或多種脂質奈米顆粒。在一些實施例中，醫藥組合物可包括一或多種脂質奈米顆粒，其包括一或多種不同的治療劑及/或預防劑。醫藥組合物可進一步包括一或多種醫藥學上可接受之賦形劑或附屬成分，諸如本文所述之彼等。關於醫藥組合物及劑之調配及製造的一般準則可例如在Remington之*The Science and Practice of Pharmacy*, 第21版, A. R. Gennaro; Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006中獲得。習知賦形劑及附屬成分可用於任何醫藥組合物，除非任何習知賦形劑或附屬成分可與本發明調配物中之LNP的一或多種組分不相容。若賦形劑或附屬成分與該調配物之LNP之組分的組合可導致任何非所需生物效應或在其他方面導致有害效應，則該賦形劑或附屬成分可與LNP之該組分不相容。

【0683】 在一些實施例中，一或多種賦形劑或附屬成分可構成包括LNP之醫藥組合物的總質量或體積之超過50%。在一些實施例中，該一或多種賦形劑或附屬成分可構成醫藥組合物之50%、60%、70%、80%、90%或90%以上。在一些實施例中，醫藥學上可接受之賦形劑為至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%純。在一些實施例中，賦形劑獲得批准用於人類及用於獸醫用途。在一些實施例中，賦形

劑獲得美國食品及藥物管理局批准。在一些實施例中，賦形劑為醫藥級。在一些實施例中，賦形劑滿足美國藥典(USP)、歐洲藥典(EP)、英國藥典及/或國際藥典之標準。

【0684】 根據本發明之醫藥組合物中的該一或多種脂質奈米顆粒、該一或多種醫藥學上可接受之賦形劑及/或任何額外成分之相對量將視所治療之個體的身份、體格及/或狀況且進一步視欲投與該組合物之途徑而變化。舉例而言，醫藥組合物包含0.1%與100% (wt/wt)之間的一或多種脂質奈米顆粒。作為另一實例，醫藥組合物包含0.1%與15% (wt/vol)之間的一或多種兩親性聚合物(例如0.5%、1%、2.5%、5%、10%或12.5% w/v)。

【0685】 在一些實施例中，本發明之脂質奈米顆粒及/或醫藥組合物係經冷藏或經冷凍用於儲存及/或裝運(例如，儲存於4°C或更低溫度，諸如約-150°C與約0°C之間或約-80°C與約-20°C之間的溫度(例如，約-5°C、-10°C、-15°C、-20°C、-25°C、-30°C、-40°C、-50°C、-60°C、-70°C、-80°C、-90°C、-130°C或-150°C)下。例如，包含一或多種脂質奈米顆粒之醫藥組合物係在例如約-20°C、-30°C、-40°C、-50°C、-60°C、-70°C或-80°C下經冷藏用於儲存及/或裝運之溶液或固體(例如，經由凍乾)。在某些實施例中，本發明亦係關於一種藉由將脂質奈米顆粒及/或其醫藥組合物儲存於4°C或更低溫度，諸如約-150°C與約0°C之間或約-80°C與約-20°C之間的溫度，例如約-5°C、-10°C、-15°C、-20°C、-25°C、-30°C、-40°C、-50°C、-60°C、-70°C、-80°C、-90°C、-130°C或-150°C)下來增加脂質奈米顆粒之穩定性之方法。

【0686】 脂質奈米顆粒及/或包括一或多種脂質奈米顆粒之醫藥組合

物可投與至任何患者或個體，包括可受益於藉由向一或多種特定細胞、組織、器官或系統或其組(諸如腎系統)遞送治療劑及/或預防劑而提供之治療效應的彼等患者或個體。儘管本文所提供之對於脂質奈米顆粒及包括脂質奈米顆粒之醫藥組合物的描述原則上係有關適於投與至人類之組合物，熟練技術人員應理解此類組合物一般適用於投與至任何其他哺乳動物。應充分瞭解，可對適於投與至人類之組合物進行修飾以便使該等組合物適用於投與至多種動物，且普通熟練獸醫藥理學家僅需常規(若存在)實驗即可設計及/或執行此類修飾。預期投與該等組合物之個體包括但不限於人類、其他靈長類動物及其他哺乳動物，包括商業上相關哺乳動物，諸如牛、豬、馬、綿羊、貓、犬、小鼠及/或大鼠。

【0687】 包括一或多種脂質奈米顆粒之醫藥組合物可藉由藥理學技術中已知或今後開發之任何方法來製備。一般而言，此類製備方法包括使活性成分與賦形劑及/或一或多種其他輔助成分締合，且接著有需要或必要時，將產物分成、成形及/或封裝成所需單一劑量或多劑量單元。

【0688】 根據本發明之醫藥組合物可大批、作為單一單位劑量及/或作為複數個單一單位劑量經製備、封裝及/或銷售。如本文所用，「單位劑量」係包含預定量之活性成分(例如，脂質奈米顆粒)之醫藥組合物的個別量。活性成分之量一般等於將投與至個體之活性成分的劑量，及/或此一劑量之合宜分率，諸如此一劑量之一半或三分之一。

【0689】 醫藥組合物可以適用於多種投與途徑及方法之多種形式製備。在一些實施例中，醫藥組合物可以液體劑型(例如，乳液、微乳液、奈米乳液、溶液、懸浮液、糖漿及酞劑)、可注射形式、固體劑型(例如，膠囊、錠劑、丸劑、散劑及顆粒)、用於表面及/或經皮投與之劑型(例如，

軟膏、糊劑、乳膏、洗劑、凝膠、散劑、溶液、噴霧劑、吸入劑及貼片)、懸浮液、散劑及其他形式製備。

【0690】 用於經口及非經腸投與之液體劑型包括但不限於醫藥學上可接受之乳液、微乳液、奈米乳液、溶液、懸浮液、糖漿及/或酞劑。除了活性成分以外，液體劑型亦包含此項技術中通常使用之惰性稀釋劑，諸如水或其他溶劑、增溶劑及乳化劑，諸如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苧醇、苯甲酸苧酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲醯胺、油(詳言之，棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄欖油、蓖麻油及芝麻油)、甘油、四氫糠醇、聚乙二醇以及山梨醇酐之脂肪酸酯及其混合物。除了惰性稀釋劑以外，經口組合物亦可包括額外治療劑及/或預防劑、額外劑(諸如潤濕劑、乳化及懸浮劑、甜味劑、調味劑及/或芳香劑)。在關於非經腸投與之某些實施例中，組合物與諸如Cremophor[®]、醇、油、經修飾油、二醇、聚山梨醇酯、環糊精、聚合物及/或其組合物之增溶劑混合。

【0691】 可注射製劑(例如無菌可注射水性或油質懸浮液)可根據已知技術使用合適之分散劑、潤濕劑及/或懸浮劑進行調配。無菌可注射製劑可為無毒非經腸可接受之稀釋劑及/或溶劑中的無菌可注射溶液、懸浮液及/或乳液，例如1,3-丁二醇中之溶液。可使用的可接受之媒劑及溶劑有水、林格氏溶液(U.S.P.)及等張氯化鈉溶液。無菌、不揮發油慣常地用作溶劑或懸浮介質。出於此目的，可使用任何溫和不揮發油，包括合成單酸甘油酯或二酸甘油酯。諸如油酸之脂肪酸可用於可注射劑之製備。

【0692】 可注射調配物可例如藉由經由細菌截留過濾器過濾，及/或藉由併入呈可在使用之前溶解或分散於無菌水或其他無菌可注射介質中之無菌固體組合物形式的滅菌劑來滅菌。

【0693】 為了延長活性成分之效應，通常可需要減慢自皮下或肌肉內注射吸收該活性成分。此可藉由使用具有弱水溶性之結晶或非晶形材料的液體懸浮液實現。藥物之吸收速率則取決於其溶解速率，而其溶解速率又可取決於晶體大小及結晶形式。或者，非經腸投與之藥物形式的延遲吸收藉由使該藥物溶解或懸浮於油媒劑中來實現。可注射儲槽形式係藉由在諸如聚丙交酯-聚乙交酯之生物可降解聚合物中形成該藥物之微囊封基質而製得。視藥物與聚合物之比率及所用之特定聚合物的性質而定，可控制藥物釋放之速率。其他生物可降解聚合物之實例包括聚(原酸酯)及聚(酐)。儲槽可注射調配物係藉由將該藥物截留於可與身體組織相容之脂質體或微乳液中來製備。

【0694】 用於直腸或陰道投與之組合物典型地為栓劑，其可藉由混合組合物與合適之非刺激性賦形劑而製備，該等賦形劑諸如可可脂、聚乙二醇或栓劑蠟，其在環境溫度下為固體，但在體溫下為液體且因此在直腸或陰道腔中融化且釋放活性成分。

【0695】 用於經口投與之固體劑型包括膠囊、錠劑、丸劑、薄膜、散劑及顆粒。在該等固體劑型中，活性成分與至少一種惰性、醫藥學上可接受之賦形劑，諸如檸檬酸鈉或磷酸二鈣及/或填充劑或增量劑(例如，澱粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇及矽酸)、黏合劑(例如，羧基甲基纖維素、褐藻酸鹽、明膠、聚乙烯吡咯啉酮、蔗糖及阿拉伯膠)、保濕劑(例如甘油)、崩解劑(例如，瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或木薯澱粉、褐藻酸、特定矽酸鹽及碳酸鈉)、溶液延遲劑(例如石蠟)、吸收促進劑(例如四級銨化合物)、濕潤劑(例如鯨蠟醇及甘油單硬脂酸酯)、吸收劑(例如高嶺土及膨潤土、矽酸鹽)及潤滑劑(例如，滑石、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、固體聚乙二

醇、月桂基硫酸鈉)及其混合物混合。在膠囊、錠劑及丸劑之情況下，該劑型可包含緩衝劑。

【0696】 相似類型之固體組合物可在使用諸如乳糖(lactose/milk sugar)以及高分子量聚乙二醇及其類似物之賦形劑的軟及硬填充明膠膠囊中用作填充劑。錠劑、糖衣藥丸、膠囊、丸劑及顆粒之固體劑型可用包衣及殼，諸如腸溶包衣及醫藥調配技術中熟知之其他包衣製備。其可視情況包含乳濁劑且可具有使其僅釋放活性成分之組成。在一些實施例中，固體組合物可視情況包含乳濁劑且可具有如下組成，該組成使其視情況以延遲方式在腸道之特定部分中釋放活性成分。可使用之包埋組合物的實例包括聚合物質及蠟。相似類型之固體組合物可在使用諸如乳糖(lactose/milk sugar)以及高分子量聚乙二醇及其類似物之賦形劑的軟及硬填充明膠膠囊中用作填充劑。

【0697】 用於組合物之表面及/或經皮投與之劑型可包括軟膏、糊劑、乳膏、洗劑、凝膠、散劑、溶液、噴霧劑、吸入劑及/或貼片。一般而言，活性成分在無菌條件下與可需要之醫藥學上可接受之賦形劑及/或任何所需防腐劑及/或緩衝液混合。另外，本發明預期經皮貼片之使用，該等經皮貼片通常具有向身體提供化合物的控制遞送之附加優勢。此類劑型可例如藉由使該化合物溶解及/或分散於適當介質中來製備。或者或另外，速率可藉由提供速率控制膜及/或藉由在聚合物基質及/或凝膠中分散該化合物來控制。

【0698】 用於遞送本文所述之皮內醫藥組合物之合適器件包括短針器件，諸如美國專利4,886,499；5,190,521；5,328,483；5,527,288；4,270,537；5,015,235；5,141,496；及5,417,662中所述之彼等。皮內組

合物可藉由限制針進入皮膚中之有效穿透長度之器件，諸如PCT公開案WO 99/34850中所述之彼等及其功能等效物來投與。經由液體射流注射器及/或經由刺穿角質層且產生到達真皮之射流的針向真皮遞送液體組合物之射流注射器件係合適的。射流注射器件描述於例如美國專利5,480,381；5,599,302；5,334,144；5,993,412；5,649,912；5,569,189；5,704,911；5,383,851；5,893,397；5,466,220；5,339,163；5,312,335；5,503,627；5,064,413；5,520,639；4,596,556；4,790,824；4,941,880；4,940,460；PCT公開案WO 97/37705及WO 97/13537中。使用壓縮氣體來加速呈粉末形式之疫苗通過皮膚外層到達真皮之彈道粉末/顆粒遞送器件係合適的。或者或另外，習知注射器可用於皮內投與之經典曼托方法(mantoux method)中。

【0699】 適用於表面投與之調配物包括但不限於液體及/或半液體製劑，諸如搽劑、洗劑、水包油及/或油包水乳液(諸如乳膏、軟膏及/或糊劑及/或溶液及/或懸浮液)。可表面投與之調配物可例如包含約1%至約10% (wt/wt)活性成分，不過活性成分之濃度可高達該活性成分在溶劑中之溶解度極限。用於表面投與之調配物可進一步包含一或多種本文所述之額外成分。

【0700】 醫藥組合物可以適用於經由口腔進行肺部投與之調配物形式進行製備、封裝及/或銷售。該種調配物可包括包含活性成分之乾燥顆粒。該等組合物便利地呈乾粉形式以使用包含乾粉儲集器之器件(推進劑流可經引導至其中以分散粉末)及/或使用自推進溶劑/粉末分配容器(諸如包含溶解及/或懸浮於密封容器中之低沸點推進劑中的活性成分之器件)進行投與。乾粉組合物可包括固體細粉稀釋劑，諸如糖，且便利地以單位劑

型提供。

【0701】 低沸點推進劑一般包括在大氣壓力下具有低於65°F之沸點之液體推進劑。一般而言，該推進劑可構成該組合物之50%至99.9% (wt/wt)，且活性成分可構成該組合物之0.1%至20% (wt/wt)。推進劑可進一步包含額外成分，諸如液體非離子及/或固體陰離子界面活性劑及/或固體稀釋劑(其可具有與包含活性成分之顆粒相同級別的粒徑)。

【0702】 經調配用於肺部遞送之醫藥組合物可提供呈溶液及/或懸浮液之小液滴形式的活性成分。該等調配物可作為視情況無菌且包含活性成分之水性及/或稀醇溶液及/或懸浮液經製備、封裝及/或銷售，且可便利地使用任何噴霧及/或霧化器件進行投與。該等調配物可進一步包含一或多種額外成分，包括但不限於調味劑(諸如糖精鈉)、揮發油、緩衝劑、表面活性劑及/或防腐劑(諸如羥基苯甲酸甲酯)。由此投與途徑提供之小液滴可具有在約1 nm至約200 nm範圍內之平均直徑。

【0703】 本文中描述為可用於肺部遞送之調配物可用於鼻內遞送醫藥組合物。適用於鼻內投與之另一調配物係包含活性成分且具有約0.2 μm至500 μm之平均顆粒的粗粉。該種調配物係以其中採取鼻吸之方式，亦即藉由通過鼻道自保持接近鼻子之粉末容器快速吸入來投與。

【0704】 適用於鼻投與之調配物可例如包含約低達0.1% (wt/wt)且高達100% (wt/wt)之活性成分，且可包含一或多種本文所述之額外成分。醫藥組合物可以適用於經頰投與之調配物形式進行製備、封裝及/或銷售。此類調配物可例如呈使用習知方法製得之錠劑及/或口含錠形式，且可例如0.1%至20% (wt/wt)活性成分，餘下包含經口可溶解及/或可降解組合物且視情況包含一或多種本文所述之額外成分。或者，適用於經頰投與

之調配物可包括包含活性成分之粉末及/或煙霧化及/或霧化溶液及/或懸浮液。當分散時，此類粉狀、煙霧化及/或煙霧化調配物可具有在約0.1 nm至約200 nm範圍內之平均顆粒及/或小液滴大小，且可進一步包含一或多種本文所述之任何額外成分。

【0705】 醫藥組合物可以適用於眼科投與之調配物形式進行製備、封裝及/或銷售。此類調配物可例如呈包括例如活性成分於水性或油性液體賦形劑中之0.1/1.0% (wt/wt)溶液及/或懸浮液之滴眼劑形式。此類滴劑可進一步包含緩衝劑、鹽及/或一或多種其他本文所述之任何額外成分。可用之其他眼科可投與調配物包括包含呈微晶形式及/或呈脂質體製劑之活性成分的彼等。滴耳劑及/或滴眼劑預期在本發明之範圍內。

在細胞中產生多肽之方法

【0706】 本發明提供在哺乳動物細胞中產生所關注之多肽之方法。產生多肽之方法涉及使細胞與包含包括編碼所關注之多肽之mRNA的LNP之本發明調配物接觸。在細胞與脂質奈米顆粒接觸時，該mRNA可在細胞中溶解且轉譯以產生所關注之多肽。

【0707】 一般而言，使哺乳動物細胞與包括編碼所關注之多肽之mRNA的LNP接觸之步驟可活體內、離體、在培養物中或活體外執行。與細胞接觸的脂質奈米顆粒之量及/或其中mRNA之量可取決於所接觸的細胞或組織之類型、投與方式、脂質奈米顆粒及其中mRNA之生理化學特徵(例如，大小、電荷及化學組成)及其他因素。一般而言，有效量之脂質奈米顆粒將允許細胞中之有效多肽產生。關於效率之度量可包括多肽轉譯(由多肽表現指示)、mRNA降解之水準及免疫反應指示劑。

【0708】 使包括mRNA之LNP與細胞接觸的步驟可涉及或引起轉

染。LNP之脂質組分中包括的磷脂可例如藉由與細胞或細胞內膜相互作用及/或融合而促進轉染及/或增加轉染效率。轉染可允許細胞內之mRNA轉譯。

【0709】 在一些實施例中，本文所述之脂質奈米顆粒可在治療上使用。例如，LNP中包括之mRNA可編碼治療多肽(例如，在可轉譯區中)且在接觸及/或進入(例如，轉染至)細胞中時產生該治療多肽。在其他實施例中，LNP中包括之mRNA可編碼可改良或增加個體的免疫性之多肽。在一些實施例中，mRNA可編碼粒細胞-集落刺激因子或曲妥珠單抗(trastuzumab)。

【0710】 在一些實施例中，LNP中包括之mRNA可編碼重組多肽，該重組多肽可置換可實質上不存在於與脂質奈米顆粒接觸之細胞中的一或多種多肽。該一或多種實質上不存在之多肽可歸因於編碼基因或其調控路徑之基因突變而缺乏。或者，藉由mRNA轉譯產生之重組多肽可拮抗存在於細胞中、細胞之表面上或自細胞分泌之內源蛋白的活性。拮抗性重組多肽可需要抗擊由該內源蛋白之活性引起的有害效應，諸如改變之活性或藉由突變引起之定位。在另一替代中，藉由mRNA轉譯產生之重組多肽可間接地或直接地拮抗存在於細胞中、細胞之表面上或自細胞分泌之生物部分的活性。經拮抗之生物部分可包括但不限於脂質(例如膽固醇)、脂蛋白(例如低密度脂蛋白)、核酸、碳水化合物及小分子毒素。藉由mRNA轉譯產生之重組多肽可經工程改造以定位於細胞內，諸如特定隔室(諸如細胞核)內，或可經工程改造以自細胞分泌或易位至細胞之質膜。

【0711】 在一些實施例中，使細胞與包括mRNA之LNP接觸可降低細胞對外源核酸之先天免疫反應。細胞可與包括第一量之包括可轉譯區的

第一外源mRNA之第一脂質奈米顆粒接觸且可測定該細胞對該第一外源mRNA之先天免疫反應的水準。隨後，該細胞可與包括第二量之該第一外源mRNA之第二組合物接觸，該第二量係與該第一量相比較少量之該第一外源mRNA。或者，該第二組合物可包括第一量之不同於該第一外源mRNA之第二外源mRNA。使該細胞與第一及第二組合物接觸之步驟可重複一或多次。另外，可視情況測定細胞中之多肽產生(例如轉譯)效率，且該細胞可重複地與第一/或第二組合物再接觸，直至實現標靶蛋白產生效率。

向細胞及器官遞送治療劑之方法

【0712】 本發明提供向哺乳動物細胞或器官遞送治療劑及/或預防劑(諸如核酸)之方法。向細胞遞送治療劑及/或預防劑涉及向個體投與包含包括該治療劑及/或預防劑(諸如核酸)之LNP的本發明調配物，其中該組合物之投與涉及使該細胞與該組合物接觸。在一些實施例中，蛋白質、細胞毒性劑、放射性離子、化學治療劑或核酸(諸如RNA，例如mRNA)可遞送至細胞或器官。在治療劑及/或預防劑為mRNA之情況下，在細胞與脂質奈米顆粒接觸時，可轉譯mRNA可在細胞中轉譯以產生所關注之多肽。然而，實質上不可轉譯之mRNA亦可遞送至細胞。實質上不可轉譯之mRNA可用作疫苗及/或可隔絕細胞之轉譯組分以降低其他物質在細胞中之表現。

【0713】 在一些實施例中，LNP可靶向特定類型或類別之細胞(例如，特定器官或其系統之細胞)。在一些實施例中，包括所關注之治療劑及/或預防劑的LNP可特異性地遞送至哺乳動物肝臟、腎、脾、股骨或肺。特異性遞送至特定類別之細胞、器官或其系統或組暗示例如在將LNP

投與至哺乳動物時，相對於其他目的地，較高比例的包括治療劑及/或預防劑之脂質奈米顆粒經遞送至所關注之目的地(例如組織)。在一些實施例中，特異性遞送可導致如與另一目的地(例如脾)相比，靶向目的地(例如所關注之組織，諸如肝臟)之每1 g組織中治療劑及/或預防劑之量的超過2倍、5倍、10倍、15倍或20倍增加。在一些實施例中，所關注之組織係選自由肝臟、腎、肺、脾、股骨、在血管中(例如，冠狀動脈內或股動脈內)之血管內皮或腎及腫瘤組織(例如，經由腫瘤內注射)組成之群。

【0714】 作為靶向或特異性遞送之另一實例，編碼細胞表面上的蛋白結合搭配物(例如，抗體或其功能片段、骨架蛋白或肽)或受體之mRNA可包括於LNP中。mRNA可另外或替代地用於指導脂質、碳水化合物或其他生物部分之合成及細胞外定位。或者，LNP之其他治療劑及/或預防劑或要素(例如脂質或配位體)可基於其對特定受體(例如低密度脂蛋白受體)之親和力加以選擇，使得LNP可更容易地與包括該等受體之標靶細胞群體相互作用。在一些實施例中，配位體可包括但不限於特定結合對之成員、抗體、單株抗體、Fv片段、單鏈Fv (scFv)片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、單域抗體、駱駝化抗體及其片段、人類化抗體及其片段以及其多價形式；包括單特異性或雙特異性抗體之多價結合試劑，諸如二硫化物穩定化Fv片段、scFv串聯、雙功能抗體、三功能抗體或四功能抗體；及適體、受體及融合蛋白。

【0715】 在一些實施例中，配位體可為表面結合抗體，其可允許細胞靶向特異性之調整。此為尤其可用的，因為高度特異性抗體可關於所需靶向位點針對所關注之抗原決定基產生。在一個實施例中，多種抗體表現於細胞之表面上，且各抗體可對所需標靶具有不同特異性。此類方法可增

加靶向相互作用之親合力及特異性。

【0716】 配位體可例如由熟習生物技術者基於細胞之所需定位或功能進行選擇。

【0717】 在一些實施例中，LNP可靶向肝細胞。諸如阿樸脂蛋白E (apoE)之阿樸脂蛋白已顯示與身體中的含中性或近中性脂質之脂質奈米顆粒締合，且已知與發現於肝細胞之表面上的受體(諸如低密度脂蛋白受體(LDLR))締合。因此，投與至個體之包括具有中性或近中性電荷之脂質組分的LNP可在個體之身體中獲得apoE且可隨後以靶向方式向包括LDLR之肝細胞遞送治療劑及/或預防劑(例如RNA)。

治療疾病及病症之方法

【0718】 在一些態樣中，本發明提供一種治療或預防疾病或病症之方法，該方法包含向有需要之個體投與本文所述之空LNP。

【0719】 在一些態樣中，本發明提供一種治療或預防疾病或病症之方法，該方法包含向有需要之個體投與本文所述之空LNP溶液。

【0720】 在一些態樣中，本發明提供一種治療或預防疾病或病症之方法，該方法包含向有需要之個體投與本文所述之負載LNP。

【0721】 在一些態樣中，本發明提供一種治療或預防疾病或病症之方法，該方法包含向有需要之個體投與本文所述之負載LNP溶液。

【0722】 在一些態樣中，本發明提供一種治療或預防疾病或病症之方法，該方法包含向有需要之個體投與本文所述之LNP調配物。

【0723】 在一些態樣中，本發明提供一種用於治療或預防個體之疾病或病症的本文所揭示之空LNP。

【0724】 在一些態樣中，本發明提供一種用於治療或預防個體之疾

病或病症的本文所揭示之空LNP溶液。

【0725】 在一些態樣中，本發明提供一種用於治療或預防個體之疾病或病症的本文所揭示之負載LNP。

【0726】 在一些態樣中，本發明提供一種用於治療或預防個體之疾病或病症的本文所揭示之負載LNP溶液。

【0727】 在一些態樣中，本發明提供一種用於治療或預防個體之疾病或病症的本文所揭示之LNP調配物。

【0728】 在一些態樣中，本發明提供本文所揭示之空LNP的用途，其係用於製造用以治療或預防疾病或病症之藥劑。

【0729】 在一些態樣中，本發明提供本文所揭示之空LNP溶液的用途，其係用於製造用以治療或預防疾病或病症之藥劑。

【0730】 在一些態樣中，本發明提供本文所揭示之負載LNP的用途，其係用於製造用以治療或預防疾病或病症之藥劑。

【0731】 在一些態樣中，本發明提供本文所揭示之負載LNP溶液的用途，其係用於製造用以治療或預防疾病或病症之藥劑。

【0732】 在一些態樣中，本發明提供一種向個體投與本文所揭示之空LNP之方法。

【0733】 在一些態樣中，本發明提供一種向個體投與本文所揭示之空LNP溶液之方法。

【0734】 在一些態樣中，本發明提供一種向個體投與本文所揭示之負載LNP之方法。

【0735】 在一些態樣中，本發明提供一種向個體投與本文所揭示之負載LNP溶液之方法。

【0736】 在一些態樣中，本發明提供一種向個體投與本文所揭示之LNP調配物之方法。

【0737】 脂質奈米顆粒可用於治療疾病、病症或疾患。詳言之，此類組合物可用於治療特徵在於缺失或異常蛋白或多肽活性之疾病、病症或疾患。在一些實施例中，包含包括編碼缺失或異常多肽之mRNA的LNP之本發明調配物可投與或遞送至細胞。mRNA之後續轉譯可產生該多肽，由此降低或消除由於該多肽不存在引起之問題或由該多肽引起之異常活性。因為轉譯可快速地發生，故該等方法及組合物可用於治療急性疾病、病症或疾患，諸如敗血症、中風及心肌梗塞。LNP中包括之治療劑及/或預防劑亦可能夠改變既定物質之轉錄速率，由此影響基因表現。

【0738】 本發明提供涉及投與包括一或多種治療劑及/或預防劑(諸如核酸)之脂質奈米顆粒及包括該等脂質奈米顆粒之醫藥組合物的方法。關於本發明之特徵及實施例，術語治療劑及預防劑在本文中可互換使用。其治療組合物或成像、診斷或預防組合物可使用有效用於預防、治療、診斷疾病、病症及/或疾患或使疾病、病症及/或疾患成像及/或任何其他目的之任何合理量及任何投與途徑投與至個體。投與至既定個體之特定量可視該個體之物種、年齡及一般狀況；投與目的；特定組成；投與模式；及其類似因素而變化。為便於投與及劑量之均一性，根據本發明之組合物可以劑量單位形式經調配。然而，應瞭解，本發明組合物之總每日用量將由主治醫師在合理醫學判斷之範圍內決定。針對任何特定患者之特定治療有效、預防有效或在其他方面適當之劑量水準(例如，用於成像)將取決於多種因素，包括所治療之病症的嚴重程度及鑑別(若存在)；所用之一或多種治療劑及/或預防劑；所用特定組成；患者之年齡、體重、一般健康狀

況、性別及飲食；投與時間、投與途徑及所用的特定醫藥組合物之排泄速率；治療持續時間；與所用的特定醫藥組合物組合或同時使用之藥物；及醫學領域中熟知之類似因素。

【0739】 包括一或多種治療劑及/或預防劑(諸如核酸)之LNP可藉由任何途徑投與。在一些實施例中，包括一或多種本文所述之脂質奈米顆粒的組合物(包括預防、診斷或成像組合物)藉由多種途徑中之一或多者投與，包括經口、靜脈內、肌肉內、動脈內、髓內、鞘內、皮下、心室內、經皮或皮內、皮間、直腸、陰道內、腹膜內、表面(例如，藉由散劑、軟膏、乳膏、凝膠、洗劑及/或滴劑)、黏膜、鼻、頰、腸、玻璃體內、腫瘤內、舌下、鼻內；藉由氣管內滴注、支氣管滴注及/或吸入；作為經口噴霧劑及/或散劑、鼻噴霧劑及/或氣霧劑，及/或經由門靜脈導管。在一些實施例中，組合物可靜脈內、肌肉內、皮內、動脈內、腫瘤內、皮下或藉由吸入投與。然而，考慮到藥物遞送科學之可能進展，本發明涵蓋藉由任何適當途徑遞送或投與本文所述之組合物。一般而言，最適當投與途徑將取決於多種因素，包括包含一或多種治療劑及/或預防劑之脂質奈米顆粒的性質(例如，其在諸如血流及胃腸道之多種身體環境中的穩定性)、患者狀況(例如，該患者是否能夠耐受特定投與途徑)等。

【0740】 在某些實施例中，根據本發明之組合物可以既定劑量中足以遞送約0.0001 mg/kg至約10 mg/kg、約0.001 mg/kg至約10 mg/kg、約0.005 mg/kg至約10 mg/kg、約0.01 mg/kg至約10 mg/kg、約0.05 mg/kg至約10 mg/kg、約0.1 mg/kg至約10 mg/kg、約1 mg/kg至約10 mg/kg、約2 mg/kg至約10 mg/kg、約5 mg/kg至約10 mg/kg、約0.0001 mg/kg至約5 mg/kg、約0.001 mg/kg至約5 mg/kg、約0.005 mg/kg至約5 mg/kg、約

0.01 mg/kg至約5 mg/kg、約0.05 mg/kg至約5 mg/kg、約0.1 mg/kg至約5 mg/kg、約1 mg/kg至約5 mg/kg、約2 mg/kg至約5 mg/kg、約0.0001 mg/kg至約2.5 mg/kg、約0.001 mg/kg至約2.5 mg/kg、約0.005 mg/kg至約2.5 mg/kg、約0.01 mg/kg至約2.5 mg/kg、約0.05 mg/kg至約2.5 mg/kg、約0.1 mg/kg至約2.5 mg/kg、約1 mg/kg至約2.5 mg/kg、約2 mg/kg至約2.5 mg/kg、約0.0001 mg/kg至約1 mg/kg、約0.001 mg/kg至約1 mg/kg、約0.005 mg/kg至約1 mg/kg、約0.01 mg/kg至約1 mg/kg、約0.05 mg/kg至約1 mg/kg、約0.1 mg/kg至約1 mg/kg、約0.0001 mg/kg至約0.25 mg/kg、約0.001 mg/kg至約0.25 mg/kg、約0.005 mg/kg至約0.25 mg/kg、約0.01 mg/kg至約0.25 mg/kg、約0.05 mg/kg至約0.25 mg/kg或約0.1 mg/kg至約0.25 mg/kg之治療劑及/或預防劑(例如mRNA)的劑量水準投與，其中1 mg/kg (mpk)劑量提供1 mg治療劑及/或預防劑/1 kg個體體重。在一些實施例中，可投與約0.001 mg/kg至約10 mg/kg之劑量的LNP之治療劑及/或預防劑(例如mRNA)。在其他實施例中，可投與約0.005 mg/kg至約2.5 mg/kg之劑量的治療劑及/或預防劑。在某些實施例中，可投與約0.1 mg/kg至約1 mg/kg之劑量。在其他實施例中，可投與約0.05 mg/kg至約0.25 mg/kg之劑量。劑量可以相同或不同量每天投與一或多次，以獲得所需水準之mRNA表現及/或治療、診斷、預防或成像效應。所需劑量可例如一天三次、一天二次、一天一次、每隔一天、每三天、每週、每兩週、每三週或每四週遞送。在某些實施例中，所需劑量可使用多次投與(例如兩次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次或十四次以上投與)經遞送。在一些實施例中，單一劑量可例如在手術程序之前或之後或在急性疾病、病症或疾患之情形中

投與。

【0741】 包括一或多種治療劑及/或預防劑(諸如核酸)之脂質奈米顆粒可與一或多種其他治療劑、預防劑、診斷劑或成像劑組合使用。

「與.....組合(in combination with)」不意欲暗示該等劑必須同時投與及/或經調配用於一起遞送，不過此等遞送方法係在本發明之範圍內。在一些實施例中，可組合投與包括一或多種不同的治療劑及/或預防劑之一或多種脂質奈米顆粒。組合物可與一或多種其他所需治療劑或醫學程序並行地、在一或多種其他所需治療劑或醫學程序之前或之後投與。一般而言，各劑將以針對彼劑確定之劑量及/或時程投與。在一些實施例中，本發明涵蓋其組合物或成像、診斷或預防組合物與改良其生物可用性、降低及/或修飾其代謝、抑制其排泄及/或修飾其在身體內之分佈的劑組合遞送。

【0742】 應進一步理解，組合使用之治療、預防、診斷或成像活性劑可在單一組合物中一起投與，或在不同組合物中分開地投與。一般而言，預期組合使用之劑將以不超過其個別地使用時之水準的水準使用。在一些實施例中，組合使用之水準可低於個別地使用之彼等。

【0743】 用於組合方案中之療法(治療劑或程序)的特定組合將考慮到所需治療劑及/或程序之可相容性以及欲實現的所需治療效應。亦應理解，所用療法可對同一病症實現所需效應(例如，可用於治療癌症之組合物可與化學治療劑並行地投與)，或其可實現不同效應(例如，對諸如輸注相關反應之任何不良效應的控制)。

【0744】 LNP可與劑組合使用以增加該組合物之有效性及/或治療窗。該種劑可為例如消炎化合物、類固醇(例如皮質類固醇)、斯他汀(statin)、雌二醇、BTK抑制劑、S1P1促效劑、糖皮質激素受體調節劑

(GRM) 或抗組織胺。在一些實施例中，LNP可與地塞米松(dexamethasone)、甲胺喋呤(methotrexate)、乙醯胺酚(acetaminophen)、H1受體阻斷劑或H2受體阻斷劑組合使用。在一些實施例中，一種治療有需要之個體或向個體(例如哺乳動物)遞送治療劑及/或預防劑之方法可涉及在投與LNP之前用一或多種劑預治療該個體。在一些實施例中，個體可用可用量(例如，10 mg、20 mg、30 mg、40 mg、50 mg、60 mg、70 mg、80 mg、90 mg、100 mg或任何其他可用量)之地塞米松、甲胺喋呤、乙醯胺酚、H1受體阻斷劑或H2受體阻斷劑預治療。預治療可在脂質奈米顆粒之投與之前24小時或更少小時(例如，24小時、20小時、16小時、12小時、8小時、4小時、2小時、1小時、50分鐘、40分鐘、30分鐘、20分鐘或10分鐘)發生且可以例如增加的劑量發生一次、兩次或兩次以上。

【0745】熟習此項技術者將認識到，或能夠僅使用常規實驗確定根據本文所述之發明的特定實施例之多種等效物。本發明範圍不意欲局限於以上實施方式，而是如隨附申請專利範圍中所陳述。

【0746】除非相反指示或在其他方面自本文顯而易見，否則在申請專利範圍中，諸如「一個(種)」及「該(等)」之冠詞可意謂一個(種)或超過一個(種)。除非相反指示或在其他方面自本文顯而易見，否則在一組之一或多個成員之間包括「或」的技術方案或描述在該等組成員中之一者、超過一者或全部存在於、用於既定產物或過程中或以其他方式與既定產物或過程相關時被視為滿足條件的。本發明包括如下實施例，其中確切地該組之一成員存在於、用於既定產物或過程中或以其他方式與既定產物或過程相關。本發明包括如下實施例，其中該等組成員中之超過一者或全部存在於、用於既定產物或過程中或以其他方式與既定產物或過程相關。

【0747】亦應注意，術語「包含(comprising)」意欲為開放性的且允許但不需要包括額外要素或步驟。當術語「包含」在本文中使用时，因此亦涵蓋且揭示術語「基本上由.....組成」及「由.....組成」。在本發明中，在組合物係描述為具有、包括或包含特定組分之情況下，預期組合物亦基本上由所陳述之組分組成，或由所陳述之組分組成。同樣，在方法或製程係描述為具有、包括或包含特定製程步驟之情況下，該等製程亦基本上由所陳述之製程步驟組成，或由所陳述之製程步驟組成。此外，應理解步驟之次序或關於執行某些動作之次序並不重要，只要本發明保持可操作。此外，兩個或更多個步驟或動作可同時進行。

【0748】在給出範圍之情況下，包括終點。此外，亦應理解除非另外指示或在其他方面自本文及普通熟習此項技術者之理解顯而易知，否則以範圍表述的值可在本發明之不同實施例中假設所陳述之範圍內的任何特定值或子範圍，除非本文另外清楚地指示，否則達到該範圍之下限之單位的十分之一。

【0749】另外，應理解屬先前技術的本發明之任何特定實施例均可明確地自申請專利範圍之任何一或多項排除。由於此類實施例被認為係普通熟習此項技術者所知的，故可將其排除在外，即使本文中未明確陳述該排除。

【0750】所有引用之來源(例如，參考文獻、公開案、專利申請案、資料庫、資料庫入口及本文所引用之技術)均以引用之方式併入本申請案中，即使在引用中未明確陳述。在引用之來源與本申請案之陳述有衝突的情況下，應以本申請案中之陳述為準。

【0751】已經描述了本發明，以下實例作為說明而非作為限制提

供。

等效物

【0752】 本發明之一或多個實施例的詳情陳述於以上伴隨描述中。儘管類似於或等效於本文所述之彼等的任何方法及材料亦可用於實踐或測試本發明，但現在描述較佳方法及材料。本發明之其他特徵、目標及優勢將自該描述及申請專利範圍顯而易知。在本說明書及隨附申請專利範圍中，除非本文另外清楚地指示，否則單數形式包括複數個提及物。除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語均具有與本發明所屬領域之一般技術者通常所理解相同的含義。本說明書中所引用之所有專利及公開案均以引用之方式併入。

【0753】 前述描述已僅出於說明目的提供且不意欲將本發明局限於所揭示之精確形式，而是由隨附於此之申請專利範圍提供。

列舉之實施例

實施例1. 一種製備空脂質奈米顆粒(空LNP)之方法，其包含：

i) 混合步驟，包含使可離子化脂質與第一緩衝劑混合，由此形成該空LNP，其中該空LNP包含約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質。

實施例2. 實施例1之方法，其中該混合步驟包含使包含該可離子化脂質之脂質溶液與包含該第一緩衝劑之水性緩衝溶液混合，由此形成包含該空LNP之空脂質奈米顆粒溶液(空LNP溶液)。

實施例3. 一種空LNP，其包含約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質。

實施例4. 一種包含空LNP之空LNP溶液，其中該空LNP包含約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質。

實施例5. 一種製備與核酸締合之負載脂質奈米顆粒(負載LNP)之方法，其包含：

ii) 裝載步驟，包含使核酸與空LNP混合，由此形成該負載LNP。

實施例6. 前述實施例中任一者之方法，其中該裝載步驟包含使包含該核酸之核酸溶液與該空LNP溶液混合，由此形成包含該負載LNP之負載脂質奈米顆粒溶液(負載LNP溶液)。

實施例7. 前述實施例中任一者之方法，其中在形成之後，該空LNP或該空LNP溶液在無保存或儲存之情況下經歷該裝載步驟。

實施例8. 前述實施例中任一者之方法，其中該空LNP或該空LNP溶液在保存一段時期之後經歷該裝載步驟。

實施例9. 前述實施例中任一者之方法，其中該空LNP或該空LNP溶液在儲存一段時期之後經歷該裝載步驟。

實施例10. 前述實施例中任一者之方法，其中在形成之後，該空LNP或該空LNP溶液在未儲存或保存一段時期之情況下經歷該裝載步驟。

實施例11. 前述實施例中任一者之方法，其進一步包含：

iii)處理該空LNP溶液或負載LNP溶液，由此形成脂質奈米顆粒調配物(LNP調配物)。

實施例12. 一種藉由前述實施例中任一者之方法製備之空LNP。

實施例13. 一種藉由前述實施例中任一者之方法製備之空LNP溶液。

實施例14. 一種藉由前述實施例中任一者之方法製備之負載LNP。

實施例15. 一種藉由前述實施例中任一者之方法製備之負載LNP溶液。

實施例16. 一種藉由前述實施例中任一者之方法製備之LNP調配物。

實施例17. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP或該負載LNP進一步包含約0.1-0.5 mol% PEG脂質、磷脂、結構脂質或其任何組合。

實施例18. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該處理該空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟包含第一添加步驟，該第一添加步驟包含將聚乙二醇脂質(PEG脂質)添加至該空LNP或該負載LNP中。

實施例19. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一添加步驟包含將包含該PEG脂質之聚乙二醇溶液(PEG溶液)添加至該空LNP溶液或負載LNP溶液中。

實施例20. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該處理該空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟包含第二添加步驟，該第二添加步驟包含將聚乙二醇脂質(PEG脂質)添加至該空LNP或該負載LNP中。

實施例21. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第二添加步驟包含將包含該PEG脂質之聚乙二醇溶液(PEG溶液)添加至該空LNP溶液或負載LNP溶液中。

實施例22. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一添加步驟包含將約0.1

mol%至約3.0 mol% PEG、約0.2 mol%至約2.5 mol% PEG、約0.5 mol%至約2.0 mol% PEG、約0.75 mol%至約1.5 mol% PEG、約1.0 mol%至約1.25 mol% PEG添加至該空LNP或該負載LNP中。

實施例23. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一添加步驟包含將約0.1 mol%至約3.0 mol% PEG、約0.2 mol%至約2.5 mol% PEG、約0.5 mol%至約2.0 mol% PEG、約0.75 mol%至約1.5 mol% PEG、約1.0 mol%至約1.25 mol% PEG添加至該空LNP或該負載LNP中。

實施例24. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一添加步驟包含將約1.75 mol% PEG脂質添加至該空LNP或該負載LNP中。

實施例25. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第二添加步驟包含將約0.1 mol%至約3.0 mol% PEG、約0.2 mol%至約2.5 mol% PEG、約0.5 mol%至約2.0 mol% PEG、約0.75 mol%至約1.5 mol% PEG、約1.0 mol%至約1.25 mol% PEG添加至該空LNP或該負載LNP中。

實施例26. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第二添加步驟包含將約0.1 mol%至約3.0 mol% PEG、約0.2 mol%至約2.5 mol% PEG、約0.5 mol%至約2.0 mol% PEG、約0.75 mol%至約1.5 mol% PEG、約1.0 mol%至約1.25 mol% PEG添加至該空LNP或該負載LNP中。

實施例27. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第二添加步驟包含將約1.0

mol% PEG脂質添加至該空LNP或該負載LNP中。

實施例28. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP或該負載LNP包含約3.0 mol% PEG脂質或更少、約2.75 mol% PEG脂質或更少、約2.5 mol% PEG脂質或更少、約2.25 mol% PEG脂質或更少、約2.0 mol% PEG脂質或更少、約1.75 mol% PEG脂質或更少、約1.5 mol% PEG脂質或更少、約1.25 mol% PEG脂質或更少、約1.0 mol% PEG脂質或更少、約0.9 mol% PEG脂質或更少、約0.8 mol% PEG脂質或更少、約0.7 mol% PEG脂質或更少、約0.6 mol% PEG脂質或更少、約0.5 mol% PEG脂質或更少、約0.4 mol% PEG脂質或更少、約0.3 mol% PEG脂質或更少、約0.2 mol% PEG脂質或更少或約0.1 mol% PEG脂質或更少。

實施例29. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP或該負載LNP包含約0 mol%至約3.0 mol% PEG脂質、0.1 mol%至約2.5 mol% PEG脂質、約0.2 mol%至約2.25 mol% PEG脂質、約0.25 mol%至約2.0 mol% PEG脂質、約0.5 mol%至約1.75 mol% PEG脂質、約0.75 mol%至約1.5 mol% PEG脂質或約1.0 mol%至約1.25 mol% PEG脂質。

實施例30. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP或該負載LNP包含約0 mol%至約0.5 mol% PEG脂質。

實施例31. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該處理該空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含選自過濾、pH調節、緩衝液交換、稀釋、透

析、濃縮、冷凍、凍乾、儲存及包裝之至少一個步驟。

實施例32. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該處理該空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含pH調節。

實施例33. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該pH調節包含添加第二緩衝劑。

實施例34. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，該第二緩衝劑包含第二水性緩衝液。

實施例35. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，該第二水性緩衝液係選自由乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液及tris緩衝液組成之群。

實施例36. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第二水性緩衝液為tris緩衝液。

實施例37. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第二水性緩衝液之pH在約6.5至約8.5、約7.0至約8.0、約7.2至約7.8或約7.4至約7.6範圍內。

實施例38. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第二水性緩衝液之pH為約7.5。

實施例39. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負

載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一添加步驟在該pH調節之前執行。

實施例40. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一添加步驟在該pH調節之後執行。

實施例41. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第二添加步驟在該pH調節之前執行。

實施例42. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第二添加步驟在該pH調節之後執行。

實施例43. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該處理該空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含過濾。

實施例44. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該過濾為切向流過濾。

實施例45. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該處理該空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含緩衝液交換。

實施例46. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該緩衝液交換包含添加包含第三緩衝劑之水性緩衝溶液。

實施例47. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負

載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第三緩衝劑包含第三水性緩衝液。

實施例48. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第三水性緩衝液係選自由乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液及tris緩衝液組成之群。

實施例49. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第三水性緩衝液之pH在約6.5至約8.5、約7.0至約8.0、約7.2至約7.8或約7.4至約7.6範圍內。

實施例50. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第三水性緩衝液之pH為約7.5。

實施例51. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一添加步驟在該緩衝液交換之前執行。

實施例52. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一添加步驟在該緩衝液交換之後執行。

實施例53. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第二添加步驟在該緩衝液交換之前執行。

實施例54. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第二添加步驟在該緩衝液交換之後執行。

實施例55. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該處理該空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含稀釋。

實施例56. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該處理該空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含透析。

實施例57. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該處理該空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含濃縮。

實施例58. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該處理該空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含冷凍。

實施例59. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該處理該空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含凍乾。

實施例60. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該凍乾包含在約-100°C至約0°C、約-80°C至約-10°C、約-60°C至約-20°C、約-50°C至約-25°C或約-40°C至約-30°C之溫度下冷凍該負載LNP溶液。

實施例61. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該凍乾進一步包含乾燥該冷凍之負載LNP溶液以形成凍乾之空LNP或凍乾之負載LNP。

實施例62. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負

載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該乾燥在介於約50毫托至約150毫托範圍內之真空下執行。

實施例63. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該乾燥在約-35°C至約-15°C下執行。

實施例64. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該乾燥在約室溫至約25°C下執行。

實施例65. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該處理該空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含儲存。

實施例66. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該儲存包含在約-80°C、約-78°C、約-76°C、約-74°C、約-72°C、約-70°C、約-65°C、約-60°C、約-55°C、約-50°C、約-45°C、約-40°C、約-35°C或約-30°C之溫度下儲存該空LNP或該負載LNP持續至少1天、至少2天、至少1週、至少2週、至少4週、至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少6個月、至少8個月或至少1年。

實施例67. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該儲存包含在約-40°C、約-35°C、約-30°C、約-25°C、約-20°C、約-15°C、約-10°C、約-5°C、約0°C、約5°C、約10°C、約15°C、約20°C或約25°C之溫度下儲存該空LNP或該負載LNP持續至少1天、至少2天、至少1週、至少2週、至少4週、至

少1個月、至少2個月、至少3個月、至少6個月、至少8個月或至少1年。

實施例68. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該儲存包含在約-40°C至約0°C、約-35°C至約-5°C、約-30°C至約-10°C、約-25°C至約-15°C、約-22°C至約-18°C或約-21°C至約-19°C之溫度下儲存該空LNP或該負載LNP持續至少1天、至少2天、至少1週、至少2週、至少4週、至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少6個月、至少8個月或至少1年。

實施例69. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該儲存包含在約-20°C之溫度下儲存該空LNP或該負載LNP持續至少1天、至少2天、至少1週、至少2週、至少4週、至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少6個月、至少8個月或至少1年。

實施例70. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該處理該空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含包裝。

實施例71. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該混合步驟用T形接頭、受限衝擊射流、微流體混合器或渦旋混合器執行。

實施例72. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該裝載步驟用T形接頭、受限衝擊射流、微流體混合器或渦旋混合器執行。

實施例73. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該混合步驟在小於約30°C、小

於約28°C、小於約26°C、小於約24°C、小於約22°C、小於約20°C或小於約環境溫度之溫度下執行。

實施例74. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該裝載步驟在小於約30°C、小於約28°C、小於約26°C、小於約24°C、小於約22°C、小於約20°C或小於約環境溫度之溫度下執行。

實施例75. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一添加步驟在小於約30°C、小於約28°C、小於約26°C、小於約24°C、小於約22°C、小於約20°C或小於約環境溫度之溫度下執行。

實施例76. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第二添加步驟在小於約30°C、小於約28°C、小於約26°C、小於約24°C、小於約22°C、小於約20°C或小於約環境溫度之溫度下執行。

實施例77. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該混合步驟與該第一添加步驟之間的滯留時間係在約1.0毫秒至約60分鐘、約2.0毫秒至約30分鐘、約3.0毫秒至約15分鐘、約4.0毫秒至約10分鐘、約5.0毫秒至約5分鐘、約10.0毫秒至約2分鐘、約100.0毫秒至約1.0分鐘、約1000毫秒至約1.0分鐘範圍內。

實施例78. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該水性緩衝溶液之pH在約4.5至約6.5、約4.6至約6.0、約4.7至約5.75、約4.8至約5.5或約4.9至約5.25

範圍內。

實施例79. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該水性緩衝溶液之pH為約5.0。

實施例80. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該脂質溶液之pH在約7.0至約8.0、約7.1至約7.8、約7.2至約7.6或約7.3至約7.5範圍內。

實施例81. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP溶液之pH在約4.5至約6.25、約4.6至約6.0、約4.8至約5.8、約5.0至約5.75、約5.0至約5.5範圍內。

實施例82. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該核酸溶液之pH在約4.5至約6.5、約4.8至約6.25、約4.8至約6.0、約5.0至約5.8或約5.2至約5.5範圍內。

實施例83. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該核酸溶液、該空LNP溶液及該LNP調配物之pH在約5.0至約6.0、約5.1至約5.75或約5.2至約5.5範圍內。

實施例84. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該負載LNP溶液之pH在約4.5至約6.0、約4.6至約5.8、約4.8至約5.6、約5.0至約5.5或約5.1至約5.4範圍內。

實施例85. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該脂質溶液進一步包含第一有機溶劑。

實施例86. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP溶液或負載LNP溶液進一步包含第一有機溶劑。

實施例87. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一有機溶劑為醇。

實施例88. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一有機溶劑為乙醇。

實施例89. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一緩衝劑包含第一水性緩衝液。

實施例90. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一水性緩衝液係選自由乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液及tris緩衝液組成之群。

實施例91. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一水性緩衝液包含大於約10 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約15 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約20 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約25 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，或大於約30 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris。

實施例92. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負

載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一水性緩衝液包含大於約1 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約2 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約5 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約10 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約15 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約20 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約25 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，或大於約30 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris。

實施例93. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一水性緩衝液包含約1 mM至約30 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，約2 mM至約20 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，約3 mM至約10 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，約4 mM至約8 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，或約5 mM至約6 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris。

實施例94. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一水性緩衝液包含約5 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris。

實施例95. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該第一水性緩衝液包含約5 mM乙酸鹽，其中該水性緩衝溶液之pH為約5.0。

實施例96. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP溶液或負載LNP溶液進一步包含張力劑。

實施例97. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負

載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP溶液或負載LNP溶液在用張力劑進行該裝載步驟之前經儲存。

實施例98. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該張力劑為糖。

實施例99. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該糖為蔗糖。

實施例100. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP溶液或負載LNP溶液進一步包含約0.01 g/mL至約1.0 g/mL、約0.05 g/mL至約0.5 g/mL、約0.1 g/mL至約0.4 g/mL、約0.15 g/mL至約0.3 g/mL或約0.2 g/mL至約0.25 g/mL張力劑。

實施例101. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP溶液或負載LNP溶液進一步包含約0.2 g/mL至約0.25 g/mL張力劑。

實施例102. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP溶液或負載LNP溶液進一步包含約0.2 g/mL蔗糖。

實施例103. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該核酸溶液包含約0.01至約1.0 mg/mL之該核酸、約0.05至約0.5 mg/mL之該核酸或約0.1至約0.25 mg/mL之該核酸。

實施例104. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該核酸溶液包含約0.001至約

1.0 mg/mL之該核酸、約0.0025至約0.5 mg/mL之該核酸或約0.005至約0.2 mg/mL之該核酸。

實施例105. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該核酸溶液包含約0.005至約0.2 mg/mL之該核酸。

實施例106. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該核酸溶液之德拜屏蔽長度(Debye screen length)為約0.1 nm至約10 nm、約0.2 nm至約8 nm、約0.3至約7 nm、約0.4 nm至約6 nm、約0.5 nm至約5 nm、約0.75 nm至約4 nm或約1 nm至約3 nm。

實施例107. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該核酸溶液之德拜屏蔽長度為約1 nm至約3 nm。

實施例108. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該核酸溶液包含選自由乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液及tris緩衝液組成之群的緩衝液。

實施例109. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該核酸溶液包含乙酸鹽緩衝液。

實施例110. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該核酸溶液包含約1 mM至約200 mM乙酸鹽緩衝液、約2 mM至約180 mM乙酸鹽緩衝液、約3 mM至約

160 mM乙酸鹽緩衝液、約4 mM至約150 mM乙酸鹽緩衝液、約4 mM至約140 mM乙酸鹽緩衝液、約5 mM至約130 mM乙酸鹽緩衝液、約6 mM至約120 mM乙酸鹽緩衝液、約7 mM至約110 mM乙酸鹽緩衝液、約8 mM至約100 mM乙酸鹽緩衝液、約9 mM至約90 mM乙酸鹽緩衝液、約10 mM至約80 mM乙酸鹽緩衝液、約15 mM至約70 mM乙酸鹽緩衝液、約20 mM至約60 mM乙酸鹽緩衝液、約25 mM至約50 mM乙酸鹽緩衝液或約30 mM至約40 mM乙酸鹽緩衝液。

實施例111. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該核酸溶液包含約8.8 mM乙酸鹽緩衝液。

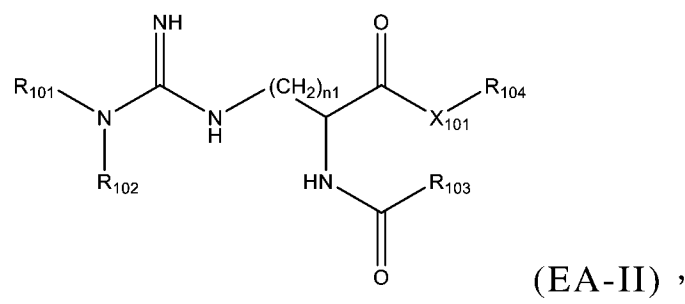
實施例112. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該核酸溶液包含約130 mM乙酸鹽緩衝液。

實施例113. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該核酸溶液及該空LNP溶液在該裝載步驟期間以約5:1至約7:1、約4:1至約6:1、約3:1至約5:1或約2:1至約4:1之體積流量比率混合。

實施例114. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該核酸溶液及該空LNP溶液在該裝載步驟期間以約3:1之體積流量比率混合。

實施例115. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP溶液或負載LNP溶液包含乙酸鹽緩衝液。

物：



或其鹽或異構體，其中

X_{101} 為鍵、NH或O；

R_{101} 及 R_{102} 各自獨立地選自由H、 C_1 - C_6 烷基及 C_2 - C_6 烯基組成之群；

R_{103} 及 R_{104} 各自獨立地選自由 C_1 - C_{20} 烷基及 C_2 - C_{20} 烯基組成之群；
且

n_1 係選自1、2、3、4、5、6、7、8、9及10。

實施例120. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該囊封劑為月桂鹽精胺酸乙酯或其鹽或異構體。

實施例121. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該LNP調配物與該核酸之wt/wt比率在約5:1至約60:1範圍內。

實施例122. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該LNP調配物與該核酸之wt/wt比率在約10:1至約50:1範圍內。

實施例123. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該脂質溶液、該空LNP、該空LNP溶液、該負載LNP、該負載LNP溶液及/或該LNP調配物進一步包含

磷脂、PEG脂質、結構脂質或其任何組合。

實施例124. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP、該負載LNP及/或該LNP調配物包含

約30-60 mol%可離子化脂質；

約0-30 mol%磷脂；

約15-50 mol%結構脂質；及

約0.1-0.5 mol% PEG脂質。

實施例125. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP、該負載LNP及/或該LNP調配物包含

約30-60 mol%可離子化脂質；

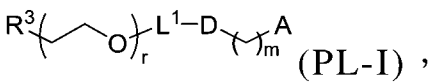
約0-30 mol%磷脂；

約15-50 mol%結構脂質；及

約0.01-10 mol% PEG脂質。

實施例126. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該PEG脂質係選自由經PEG修飾之磷脂醯乙醇胺、經PEG修飾之磷脂酸、經PEG修飾之神經醯胺、經PEG修飾之二烷基胺、經PEG修飾之二醯基甘油及經PEG修飾之二烷基甘油組成之群。

實施例127. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該PEG脂質為式(PL-I)化合物：



或其鹽，其中：

R^3 為-OR⁰；

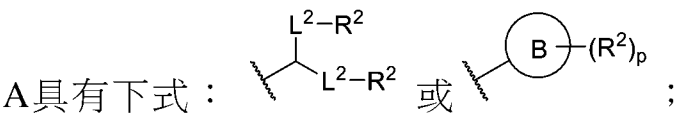
R⁰為氫、視情況經取代之烷基或氧保護基；

r為1與100之間的整數，包括1及100；

L¹為視情況經取代之C₁₋₁₀伸烷基，其中該視情況經取代之C₁₋₁₀伸烷基的至少一個亞甲基獨立地經視情況經取代之伸碳環基、視情況經取代之伸雜環基、視情況經取代之伸芳基、視情況經取代之伸雜芳基、-O-、-N(R^N)-、-S-、-C(O)-、-C(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-OC(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)O-或-NR^NC(O)N(R^N)-置換；

D係藉由點擊化學獲得之部分或在生理條件下可裂解之部分；

m為0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；



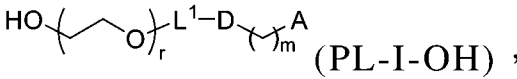
L²之各情況獨立地為鍵或視情況經取代之C₁₋₆伸烷基，其中該視情況經取代之C₁₋₆伸烷基的一個亞甲基單元視情況經-O-、-N(R^N)-、-S-、-C(O)-、-C(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-OC(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)O-或-NR^NC(O)N(R^N)-置換；

R²之各情況獨立地為視情況經取代之C₁₋₃₀烷基、視情況經取代之C₁₋₃₀烯基或視情況經取代之C₁₋₃₀炔基；視情況，其中R²的一或多個亞甲基單元獨立地經視情況經取代之伸碳環基、視情況經取代之伸雜環基、視情況經取代之伸芳基、視情況經取代之伸雜芳基、-N(R^N)-、-O-、-S-、-C(O)-、-C(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)-、-

NR^NC(O)N(R^N)- 、 -C(O)O- 、 -OC(O)- 、 -OC(O)O- 、 -OC(O)N(R^N)- 、 -NR^NC(O)O- 、 -C(O)S- 、 -SC(O)- 、 -C(=NR^N)- 、 -C(=NR^N)N(R^N)- 、 -NR^NC(=NR^N)- 、 -NR^NC(=NR^N)N(R^N)- 、 -C(S)- 、 -C(S)N(R^N)- 、 -NR^NC(S)- 、 -NR^NC(S)N(R^N)- 、 -S(O)- 、 -OS(O)- 、 -S(O)O- 、 -OS(O)O- 、 -OS(O)₂- 、 -S(O)₂O- 、 -OS(O)₂O- 、 -N(R^N)S(O)- 、 -S(O)N(R^N)- 、 -N(R^N)S(O)N(R^N)- 、 -OS(O)N(R^N)- 、 -N(R^N)S(O)O- 、 -S(O)₂- 、 -N(R^N)S(O)₂- 、 -S(O)₂N(R^N)- 、 -N(R^N)S(O)₂N(R^N)-或-N(R^N)S(O)₂O-置換；

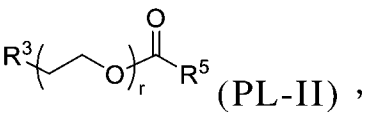
R^N之各情況獨立地為氫、視情況經取代之烷基或氮保護基；
環B為視情況經取代之碳環基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基或視情況經取代之雜芳基；且
p為1或2。

實施例128. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該PEG脂質為式(PL-I-OH)化合物：



或其鹽。

實施例129. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該PEG脂質為式(PL-II)化合物：



或其鹽，其中：

R³為-OR^O；

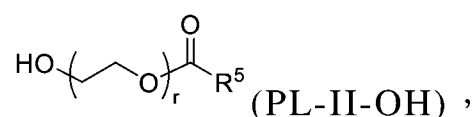
R^0 為氫、視情況經取代之烷基或氧保護基；

r 為1與100之間的整數；

R^5 為視情況經取代之 C_{10-40} 烷基、視情況經取代之 C_{10-40} 烯基或視情況經取代之 C_{10-40} 炔基；且視情況， R^5 的一或多個亞甲基經視情況經取代之伸碳環基、視情況經取代之伸雜環基、視情況經取代之伸芳基、視情況經取代之伸雜芳基、 $-N(R^N)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)-$ 、 $-NR^NC(O)N(R^N)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)O-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(=NR^N)-$ 、 $-C(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(=NR^N)-$ 、 $-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(S)-$ 、 $-NR^NC(S)N(R^N)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-OS(O)-$ 、 $-S(O)O-$ 、 $-OS(O)O-$ 、 $-OS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2O-$ 、 $-OS(O)_2O-$ 、 $-N(R^N)S(O)-$ 、 $-S(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)N(R^N)-$ 、 $-OS(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-OS(O)_2N(R^N)-$ 或 $-N(R^N)S(O)_2O-$ 置換；且

R^N 之各情況獨立地為氫、視情況經取代之烷基或氮保護基。

實施例130. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該PEG脂質為式(PL-II-OH)化合物：



或其鹽，其中：

r 為1與100之間的整數；

R^5 為視情況經取代之 C_{10-40} 烷基、視情況經取代之 C_{10-40} 烯基或視

情況經取代之 C_{10-40} 炔基；且視情況， R^5 之一或多個亞甲基經視情況經取代之伸碳環基、視情況經取代之伸雜環基、視情況經取代之伸芳基、視情況經取代之伸雜芳基、 $-N(R^N)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)-$ 、 $-NR^NC(O)N(R^N)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(O)O-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(=NR^N)-$ 、 $-C(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(=NR^N)-$ 、 $-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)N(R^N)-$ 、 $-NR^NC(S)-$ 、 $-NR^NC(S)N(R^N)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-OS(O)-$ 、 $-S(O)O-$ 、 $-OS(O)O-$ 、 $-OS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2O-$ 、 $-OS(O)_2O-$ 、 $-N(R^N)S(O)-$ 、 $-S(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)N(R^N)-$ 、 $-OS(O)N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-N(R^N)S(O)_2N(R^N)-$ 、 $-OS(O)_2N(R^N)-$ 或 $-N(R^N)S(O)_2O-$ 置換；且

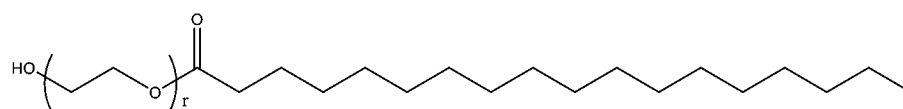
R^N 之各情況獨立地為氫、視情況經取代之烷基或氫保護基。

實施例131. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中 r 為40與50之間的整數。

實施例132. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中 r 為45。

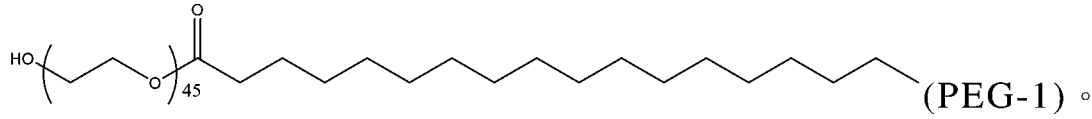
實施例133. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中 R^5 為 C_{17} 烷基。

實施例134. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該PEG脂質為式(PL-II)化合物：

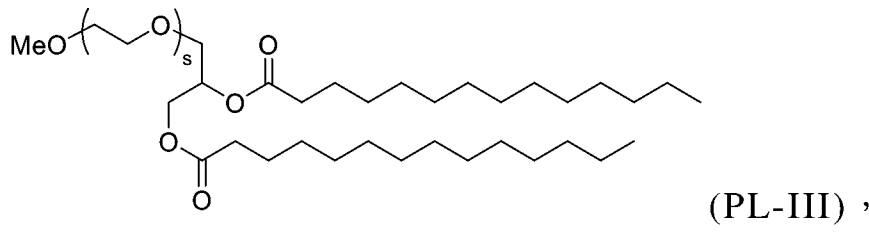


或其鹽。

實施例135. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該PEG脂質為式(PL-II)化合物

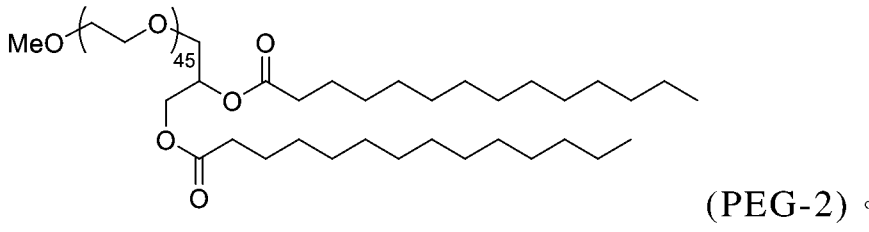


實施例136. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該PEG脂質為式(PL-III)化合物：



或其鹽或異構體，其中s為1與100之間的整數。

實施例137. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該PEG脂質為下式化合物：



實施例138. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該結構脂質係選自由膽固醇、糞固醇、植固醇、麥角固醇、菜油固醇、豆固醇、菜子固醇、番茄鹼、熊果酸、 α -生育酚及其衍生物組成之群。

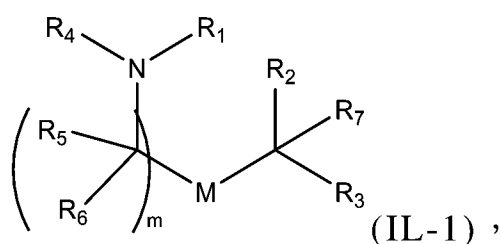
實施例139. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該磷脂係選自由1,2-二亞油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DLPC)、1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼

(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(十一烷醯基)-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 Diether PC)、1-油醯基-2-膽固醇基半琥珀醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(OChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(C16 Lyso PC)、1,2-二亞麻醯基-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、1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、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、1,2-二亞油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亞麻醯基-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-外消旋-(1-甘油)鈉鹽(DOPG)、鞘磷脂及其衍生物組成之群。

實施例140. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該磷脂為1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DSPC)。

實施例141. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該可離子化脂質包含可離子化胺基脂質。

實施例142. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該可離子化脂質為式(IL-1)化合物：



或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中：

R_1 係選自由 C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 及 $-R''M'R'$ 組成之群；

R_2 及 R_3 係獨立地選自由H、 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 及 $-R^*OR''$ 組成之群，或 R_2 及 R_3 連同其所附接之原子形成雜環或碳環；

R_4 係選自由氫、 C_{3-6} 碳環、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ(R)_2$ 及未經取代 C_{1-6} 烷基組成之群，其中Q係選自碳環、雜環、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $N(R)S(O)_2R_8$ 、 $-O(CH_2)_nOR$ 、 $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)R$ 、 $-N(OR)S(O)_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 及 $-C(R)N(R)_2C(O)OR$ ，且各n係獨立地選自1、2、3、4及5；

各 R_5 係獨立地選自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基及H組成之群；

各 R_6 係獨立地選自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基及H組成之群；

M及M'係獨立地選自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)-M''-C(O)O-$ 、 $-$

C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基及雜芳基，其中M''為鍵、C₁₋₁₃烷基或C₂₋₁₃烯基；

R₇係選自由C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基及H組成之群；

R₈係選自由C₃₋₆碳環及雜環組成之群；

R₉係選自由H、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、-OR、-S(O)₂R、-S(O)₂N(R)₂、C₂₋₆烯基、C₃₋₆碳環及雜環組成之群；

各R係獨立地選自由C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基及H組成之群；

各R'係獨立地選自由C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''及H組成之群；

各R''係獨立地選自由C₃₋₁₅烷基及C₃₋₁₅烯基組成之群；

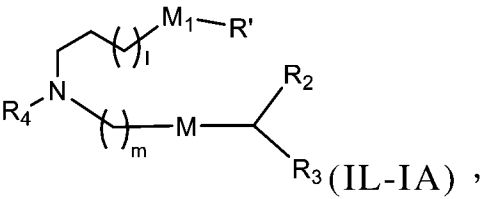
各R*係獨立地選自由C₁₋₁₂烷基及C₂₋₁₂烯基組成之群；

各Y獨立地為C₃₋₆碳環；

各X係獨立地選自由F、Cl、Br及I組成之群；且

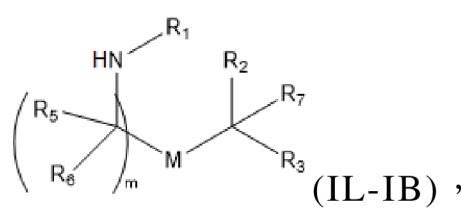
m係選自5、6、7、8、9、10、11、12及13；且其中當R₄為-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR或-CQ(R)₂時，則(i)當n為1、2、3、4或5時，Q不為-N(R)₂，或(ii)當n為1或2時，Q不為5員、6員或7員雜環烷基。

實施例143. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該可離子化脂質為式(IL-IA)化合物：



或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中l係選自1、2、3、4及5；m係選自5、6、7、8及9；M₁為鍵或M'；R₄為氫、未經取代C₁₋₃烷基或-(CH₂)_nQ，其中Q為OH、-NHC(S)N(R)₂、-NHC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)R₈、-NHC(=NR₉)N(R)₂、-NHC(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、雜芳基或雜環烷基；M及M'係獨立地選自-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)-M''-C(O)O-、-C(O)N(R')-、-P(O)(OR')O-、-S-S-、芳基及雜芳基；且R₂及R₃係獨立地選自由H、C₁₋₁₄烷基及C₂₋₁₄烯基組成之群。在一些實施例中，m為5、7或9。在一些實施例中，Q為OH、-NHC(S)N(R)₂或-NHC(O)N(R)₂。在一些實施例中，Q為-N(R)C(O)R或-N(R)S(O)₂R。

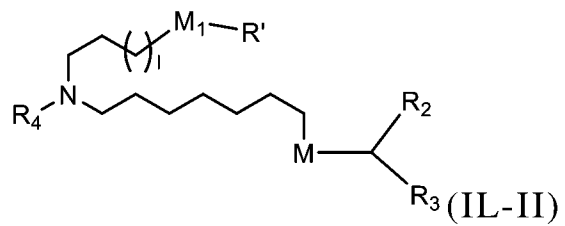
實施例144. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該可離子化脂質為式(IL-IB)化合物：



或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中所有變數均如本文所定義。在一些實施例中，m係選自5、6、7、8及9；R₄為氫、未經取代C₁₋₃烷基或-(CH₂)_nQ，其中Q為-OH、-NHC(S)N(R)₂、-NHC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)R₈、-NHC(=NR₉)N(R)₂、-NHC(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、雜芳基或雜環烷基；M及M'係獨立地選自-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)-M''-C(O)O-、-C(O)N(R')-、-P(O)(OR')O-、-S-S-、芳基及雜芳基；且R₂及R₃係獨立地選自由H、C₁₋₁₄烷基及C₂₋₁₄烯基組成之群。在一些實施例中，m為5、7或9。

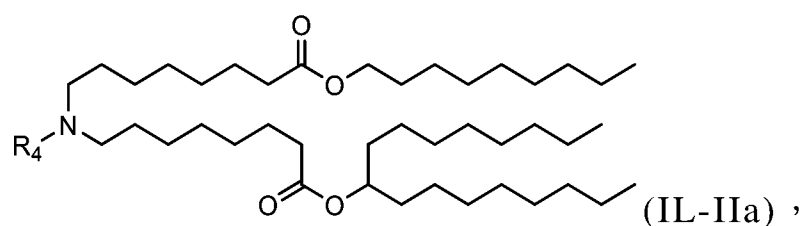
9。在一些實施例中，Q為OH、-NHC(S)N(R)₂或-NHC(O)N(R)₂。在一些實施例中，Q為-N(R)C(O)R或-N(R)S(O)₂R。

實施例145. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該可離子化脂質為式(IL-II)化合物：



或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中l係選自1、2、3、4及5；M1為鍵或M'；R₄為氫、未經取代C₁₋₃烷基或-(CH₂)_nQ，其中n為2、3或4，且Q為 -OH、-NHC(S)N(R)₂、-NHC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)R₈、-NHC(=NR₉)N(R)₂、-NHC(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、雜芳基或雜環烷基；M及M'係獨立地選自 -C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)-M''-、C(O)O-、-C(O)N(R')-、-P(O)(OR')O-、-S-S-、芳基及雜芳基；且R₂及R₃係獨立地選自由H、C₁₋₁₄烷基及C₂₋₁₄烯基組成之群。

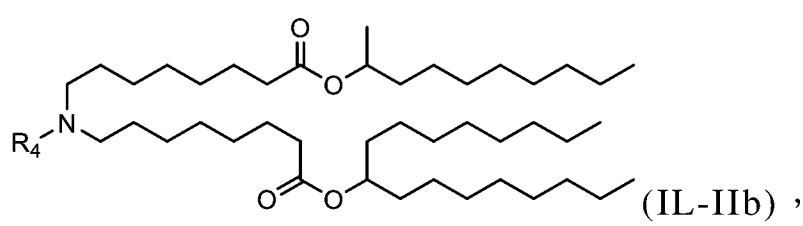
實施例146. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該可離子化脂質為式(IL-IIa)化合物：



或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中R₄如本文所述。

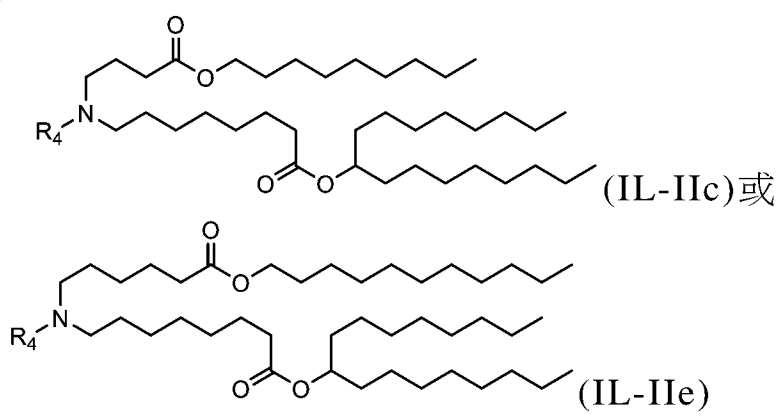
實施例147. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負

載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該可離子化脂質為式(IL-IIb)化合物：



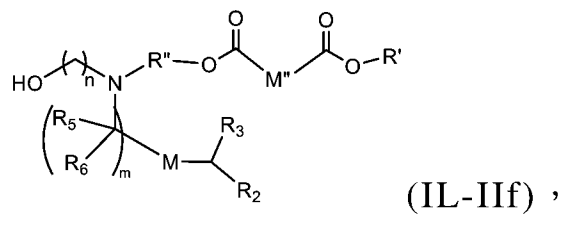
或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中R₄如本文所述。

實施例148. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該可離子化脂質為式(IL-IIc)或(IL-IIe)化合物：



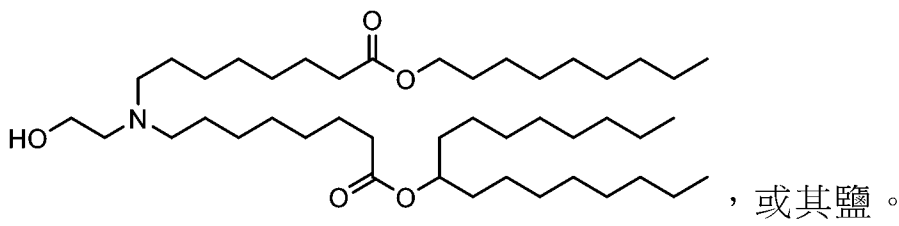
或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中R₄如本文所述。

實施例149. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該可離子化脂質為式(IL-IIf)化合物：

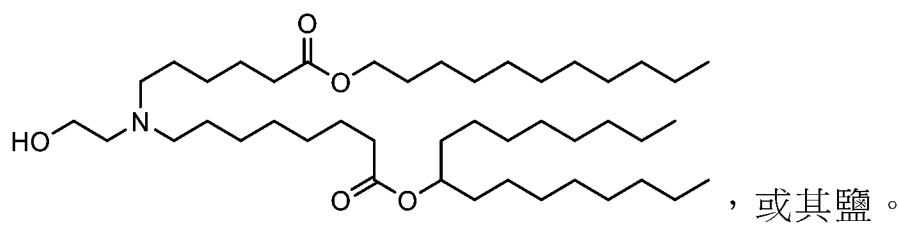


或其N-氧化物或其鹽或異構體，其中M為-C(O)O-或-OC(O)-，M''為C₁₋₆烷基或C₂₋₆烯基，R₂及R₃係獨立地選自由C₅₋₁₄烷基及C₅₋₁₄烯基組成之群，且n係選自2、3及4。

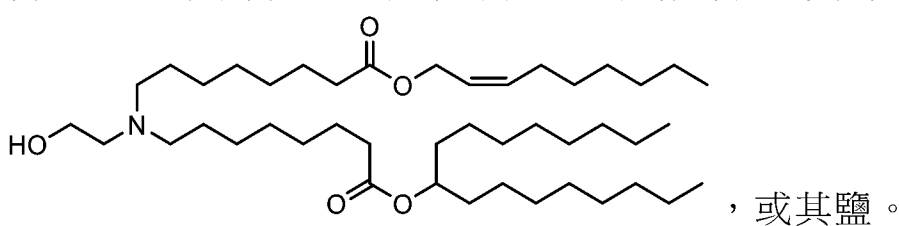
載 LNP、負載 LNP 溶液或 LNP 調配物，其中該可離子化脂質為



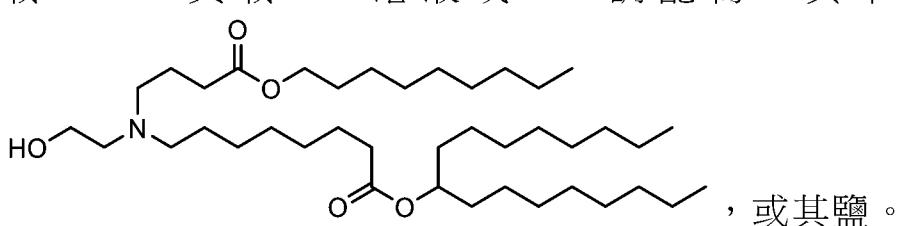
實施例153. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該可離子化脂質為



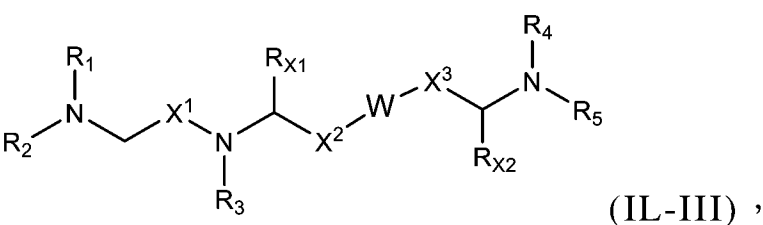
實施例154. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載 LNP、負載 LNP 溶液或 LNP 調配物，其中該可離子化脂質為



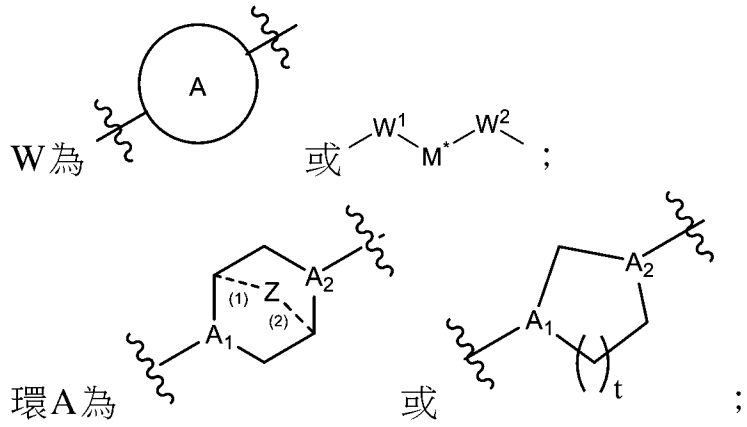
實施例155. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載 LNP、負載 LNP 溶液或 LNP 調配物，其中該可離子化脂質為



實施例156. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該可離子化脂質為式(IL-III)化合物：



或其鹽或異構體，其中，



t為1或2；

A₁及A₂各自獨立地選自CH或N；

Z為CH₂或不存在，其中當Z為CH₂時，虛線(1)及(2)各自表示單鍵；且當Z不存在時，虛線(1)及(2)均不存在；

R₁、R₂、R₃、R₄及R₅係獨立地選自由C₅₋₂₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R''MR'、-R*YR''、-YR''及-R*OR''組成之群；

R_{X1}及R_{X2}各自獨立地為H或C₁₋₃烷基；

各M係獨立地選自由-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-C(O)S-、-SC(O)-、芳基及雜芳基組成之群；

M*為C₁-C₆烷基，

W¹及W²各自獨立地選自由-O-及-N(R₆)-組成之群；

各R₆係獨立地選自由H及C₁₋₅烷基組成之群；

X^1 、 X^2 及 X^3 係獨立地選自由鍵、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-\text{CHR}-$ 、 $-\text{CHY}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{OC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})-$ 、 $-\text{C}(\text{S})-$ 及 $-\text{CH}(\text{SH})-$ 組成之群；

各Y獨立地為 C_{3-6} 碳環；

各 R^* 係獨立地選自由 C_{1-12} 烷基及 C_{2-12} 烯基組成之群；

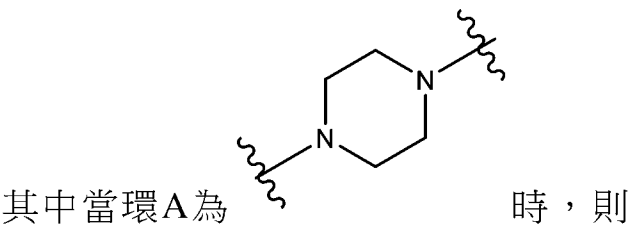
各R係獨立地選自由 C_{1-3} 烷基及 C_{3-6} 碳環組成之群；

各 R' 係獨立地選自由 C_{1-12} 烷基、 C_{2-12} 烯基及H組成之群；

各 R'' 係獨立地選自由 C_{3-12} 烷基、 C_{3-12} 烯基及 $-\text{R}^*\text{MR}'$ 組成之群；

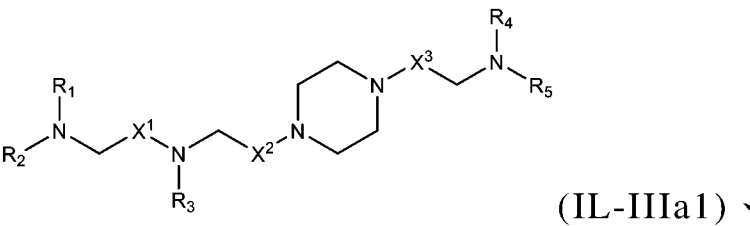
且

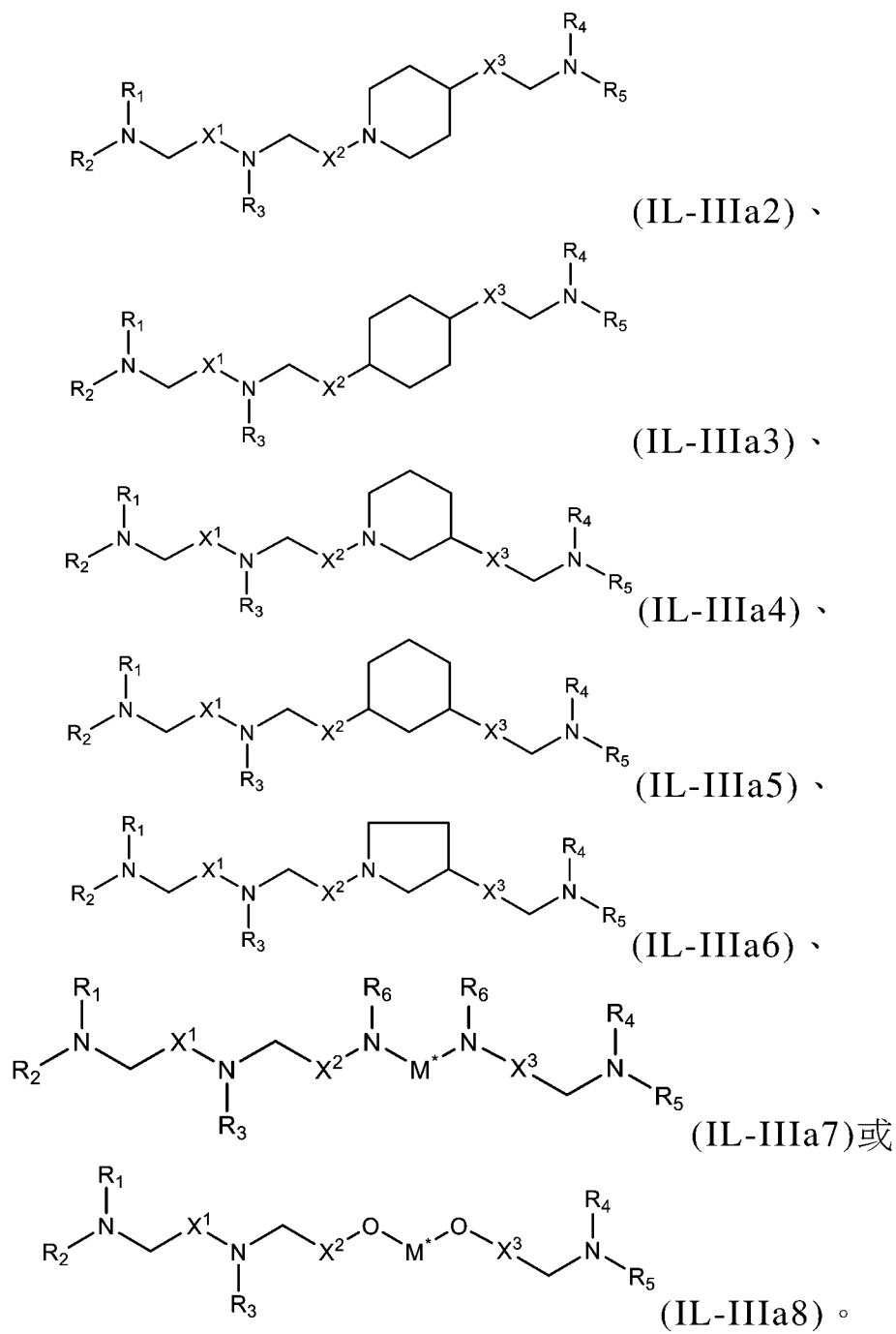
n為整數1-6；



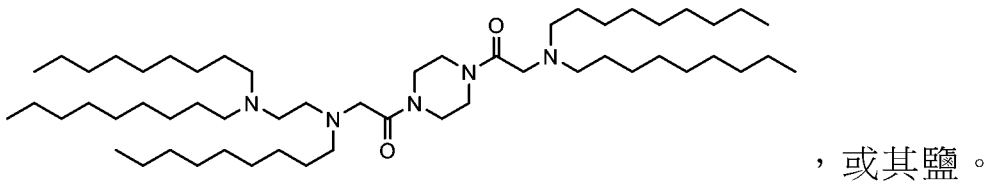
- i) X^1 、 X^2 及 X^3 中之至少一者不為 $-\text{CH}_2-$ ；及/或
- ii) R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及 R_5 中之至少一者為 $-\text{R}''\text{MR}'$ 。

實施例157. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該可離子化脂質為式(IL-IIIa1)-(IL-IIIa8)中任一者之化合物：





實施例158. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該可離子化脂質為



實施例159. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該可離子化脂質係選自由3-

(雙十二烷基胺基)-N1,N1,4-三(十二烷基)-1-哌嗪乙胺(KL10)、N1-[2-(雙十二烷基胺基)乙基]-N1,N4,N4-三(十二烷基)-1,4-哌嗪二乙胺(KL22)、14,25-雙十三烷基-15,18,21,24-四氮雜-三十八烷(KL25)、1,2-二亞油烯基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLin-DMA)、2,2-二亞油烯基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-DMA)、4-(二甲基胺基)丁酸三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基酯(DLin-MC3-DMA)、2,2-二亞油烯基-4-(2-二甲基胺基乙基)-[1,3]-二氧戊環(DLin-KC2-DMA)、1,2-二油烯基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DODMA)、2-({8-[(3 β)-膽固-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA)、(2R)-2-({8-[(3 β)-膽固-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA (2R))及(2S)-2-({8-[(3 β)-膽固-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA (2S))組成之群。

實施例160. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該核酸為核糖核酸。

實施例161. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該核糖核酸係選自由小干擾RNA (siRNA)、不對稱干擾RNA (aiRNA)、微小RNA (miRNA)、Dicer-受質RNA (dsRNA)、小髮夾RNA (shRNA)、信使RNA (mRNA)及長鏈非編碼RNA (lncRNA)組成之群的至少一種核糖核酸。

實施例162. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該核酸為信使RNA (mRNA)。

實施例163. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該mRNA包括選自由莖環、鏈終止核苷、polyA序列、聚腺苷酸化信號及5'帽結構組成之群的至少一個基序。

實施例164. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該mRNA為至少30個核苷酸長。

實施例165. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該mRNA為至少300個核苷酸長。

實施例166. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該LNP調配物之N:P比率為約1.1:1至約30.1。

實施例167. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該LNP調配物之N:P比率為約2:1至約20:1。

實施例168. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該LNP調配物之N:P比率為約2:1至約10:1或約2:1至約5:1。

實施例169. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該LNP包含約0.01至約500 mg/mL之該核酸、約0.1至約100 mg/mL、約0.25至約50 mg/mL、約0.5至約10 mg/mL或約1.0至約10 mg/mL之該核酸。

實施例170. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP、該負載LNP及/或該LNP調配物之多分散性指數(PDI)為約0.01至約0.25。

實施例171. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該LNP調配物之囊封效率為至少約50%、至少約60%、至少約70%、至少約80%或至少約90%。

實施例172. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該LNP調配物之囊封效率為至少約85%、至少約90%或至少約95%。

實施例173. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該LNP調配物之囊封效率為至少約90%、至少約92%、至少約94%、至少約96%或至少約98%。

實施例174. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該LNP調配物之核酸表現(例如mRNA表現)為約20%或更高、約25%或更高、約30%或更高、約35%或更高、約40%或更高、約45%或更高、約50%或更高、約55%或更高、約60%或更高、約65%或更高、約70%或更高、約75%或更高、約80%或更高、約85%或更高、約90%或更高、約95%或更高、約96%或更高、約97%或更高、約98%或更高或約99%或更高。

實施例175. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP、該負載LNP及/或該LNP調配物之平均脂質奈米顆粒直徑為約200 nm或更小、約175 nm或更小、約150 nm或更小、約125 nm或更小、約100 nm或更小、約90 nm

或更小、約80 nm或更小、約75 nm或更小、約70 nm或更小、約65 nm或更小、約60 nm或更小、約55 nm或更小、約50 nm或更小、約45 nm或更小、約40 nm或更小、約35 nm或更小、約30 nm或更小、約25 nm或更小或約20 nm或更小。

實施例176. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP、該負載LNP及/或該LNP調配物之平均脂質奈米顆粒直徑為約20 nm至約150 nm、約25 nm至約125 nm、約30 nm至約110 nm、約35 nm至約100 nm、約40 nm至約90 nm、約45 nm至約80 nm或約50 nm至約70 nm。

實施例177. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP、該負載LNP及/或該LNP調配物之平均脂質奈米顆粒直徑為約15 nm至約55 nm、約20 nm至約50 nm、約25 nm至約45 nm或約30 nm至約40 nm。

實施例178. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該空LNP、該負載LNP及/或該LNP調配物之平均脂質奈米顆粒直徑為約25 nm至約45 nm。

實施例179. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該LNP調配物在約-5-25°C、約0-10°C或約2-8°C下儲存持續至少1天、至少2天、至少1週、至少2週、至少4週、至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少6個月、至少8個月或至少1年之後，該空LNP、該空LNP溶液、該負載LNP、該負載LNP溶液及/或該LNP調配物之多分散性指數(PDI)增加小於約0.25、小於約0.20、小於約0.15、小於約0.10、小於約0.05、小於約0.04、小於約

0.03、小於約0.02或小於約0.01。

實施例180. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該LNP調配物在約-100°C至約80°C、約-80°C至約60°C、約-40°C至約40°C、約-20°C至約30°C、約-5°C至約25°C、約0°C至約10°C或約2°C至約8°C下儲存持續至少1天、至少2天、至少1週、至少2週、至少4週、至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少6個月、至少8個月或至少1年之後，該空LNP、該空LNP溶液、該負載LNP、該負載LNP溶液及/或該LNP調配物之多分散性指數(PDI)增加小於約25%、小於約20%、小於約15%、小於約10%、小於約5%、小於約4%、小於約3%、小於約2%或小於約1%。

實施例181. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該LNP調配物在約-100°C至約80°C、約-80°C至約60°C、約-40°C至約40°C、約-20°C至約30°C、約-5°C至約25°C、約0°C至約10°C或約2°C至約8°C下儲存持續至少1天、至少2天、至少1週、至少2週、至少4週、至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少6個月、至少8個月或至少1年之後，該空LNP、該空LNP溶液、該負載LNP、該負載LNP溶液及/或該LNP調配物具有小於約25%囊封效率減少、小於約20%減少、小於約15%減少、小於約10%減少、小於約5%減少、小於約4%減少、小於約3%減少、小於約2%減少或小於約1%囊封效率減少。

實施例182. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中如與藉由可比較方法產生之LNP調配物相比，該空LNP、該負載LNP及/或該LNP調配物之平均脂質

奈米顆粒直徑為約99%或更低、約98%或更低、約97%或更低、約96%或更低、約95%或更低、約90%或更低、約85%或更低、約80%或更低、約75%或更低、約70%或更低、約65%或更低、約60%或更低、約55%或更低、約50%或更低、約40%或更低、約30%或更低、約20%或更低或約10%或更低。

實施例183. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該LNP調配物之囊封效率比藉由可比較方法產生之LNP調配物的囊封效率高約5%或更高、約10%或更高、約15%或更高、約20%或更高、約30%或更高、約40%或更高、約50%或更高、約60%或更高、約70%或更高、約80%或更高、約90%或更高、約1倍或更高、約2倍或更高、約3倍或更高、約4倍或更高、約5倍或更高、約10倍或更高、約20倍或更高、約30倍或更高、約40倍或更高、約50倍或更高、約100倍或更高、約200倍或更高、約300倍或更高、約400倍或更高、約500倍或更高、約1000倍或更高、約2000倍或更高、約3000倍或更高、約4000倍或更高、約5000倍或更高或約10000倍或更高。

實施例184. 前述實施例中任一者之方法、空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物，其中該LNP調配物之核酸表現(例如mRNA表現)比藉由可比較方法產生之LNP調配物的核酸表現(例如mRNA表現)高約5%或更高、約10%或更高、約15%或更高、約20%或更高、約30%或更高、約40%或更高、約50%或更高、約60%或更高、約70%或更高、約80%或更高、約90%或更高、約1倍或更高、約2倍或更高、約3倍或更高、約4倍或更高、約5倍或更高、約10倍或更高、約20倍或更高、約30倍或更高、約40倍或更高、約50倍或更高、約100倍或更

高、約200倍或更高、約300倍或更高、約400倍或更高、約500倍或更高、約1000倍或更高、約2000倍或更高、約3000倍或更高、約4000倍或更高、約5000倍或更高或約10000倍或更高。

實施例185. 一種治療或預防疾病或病症之方法，該方法包含向有需要之個體投與前述實施例中任一者之空LNP。

實施例186. 一種治療或預防疾病或病症之方法，該方法包含向有需要之個體投與前述實施例中任一者之空LNP溶液。

實施例187. 一種治療或預防疾病或病症之方法，該方法包含向有需要之個體投與前述實施例中任一者之負載LNP。

實施例188. 一種治療或預防疾病或病症之方法，該方法包含向有需要之個體投與前述實施例中任一者之負載LNP溶液。

實施例189. 一種治療或預防疾病或病症之方法，該方法包含向有需要之個體投與前述實施例中任一者之LNP調配物。

實施例190. 前述實施例中任一者之方法，其中該投與非經腸執行。

實施例191. 前述實施例中任一者之方法，其中該投與肌肉內、皮內、皮下及/或靜脈內執行。

實施例192. 前述實施例中任一者之空LNP，其用於治療或預防個體之疾病或病症。

實施例193. 前述實施例中任一者之空LNP溶液，其用於治療或預防個體之疾病或病症。

實施例194. 前述實施例中任一者之負載LNP，其用於治療或預防個體之疾病或病症。

實施例195. 前述實施例中任一者之負載LNP溶液，其用於治療或預

防個體之疾病或病症。

實施例196. 前述實施例中任一者之LNP調配物，其用於治療或預防個體之疾病或病症。

實施例197. 一種前述實施例中任一者之空LNP的用途，其係用於製造用以治療或預防疾病或病症之藥劑。

實施例198. 一種前述實施例中任一者之空LNP溶液的用途，其係用於製造用以治療或預防疾病或病症之藥劑。

實施例199. 一種前述實施例中任一者之負載LNP的用途，其係用於製造用以治療或預防疾病或病症之藥劑。

實施例200. 一種前述實施例中任一者之負載LNP溶液的用途，其係用於製造用以治療或預防疾病或病症之藥劑。

實施例201. 一種醫藥套組，其包含前述實施例中任一者之空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種製備包含空脂質奈米顆粒(空LNP)之空脂質奈米顆粒溶液(空LNP溶液)之方法，其包含：

(i) 混合步驟，包含使包含可離子化脂質、磷脂、PEG脂質及結構脂質的脂質溶液與包含第一緩衝劑之水性緩衝溶液混合，由此形成包含該空LNP之該空LNP溶液，其中該空LNP包含約0.1 mol%至約0.5 mol%之該PEG脂質，

其中該空LNP溶液包含乙酸鹽緩衝液且其pH在約4.6至約6.0範圍內。

【請求項2】

如請求項1之方法，其進一步包含處理該空LNP溶液。

【請求項3】

一種製備包含負載脂質奈米顆粒(負載LNP)之負載脂質奈米顆粒溶液(負載LNP溶液)之方法，其包含：

(i) 混合步驟，包含使包含可離子化脂質、磷脂、PEG脂質及結構脂質的脂質溶液與包含第一緩衝劑之水性緩衝溶液混合，由此形成包含空LNP之空LNP溶液，其中該空LNP包含約0.1 mol%至約0.5 mol%之該PEG脂質，其中該空LNP溶液包含乙酸鹽緩衝液且其pH在約4.6至約6.0範圍內；及

(ii) 裝載步驟，包含使包含核酸之核酸溶液與該空LNP溶液混合，由此形成包含負載LNP之負載LNP溶液。

【請求項4】

如前述請求項中任一項之方法，其進一步包含處理該負載LNP溶液，由此形成脂質奈米顆粒調配物(LNP調配物)。

【請求項5】

如前述請求項中任一項之方法，其中該處理該負載LNP溶液之步驟包含第一添加步驟，該第一添加步驟包含將聚乙二醇脂質(PEG脂質)添加至該負載LNP中。

【請求項6】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第一添加步驟包含將包含該PEG脂質之聚乙二醇溶液(PEG溶液)添加至該負載LNP溶液中。

【請求項7】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第一添加步驟包含將約0.1 mol%至約3.0 mol% PEG、約0.2 mol%至約2.5 mol% PEG、約0.5 mol%至約2.0 mol% PEG、約0.75 mol%至約1.5 mol% PEG或約1.0 mol%至約1.25 mol% PEG添加至該空LNP或該負載LNP中。

【請求項8】

如前述請求項中任一項之方法，其中該處理該空LNP溶液之步驟進一步包含pH調節。

【請求項9】

如前述請求項中任一項之方法，其中該pH調節包含添加第二緩衝劑。

【請求項10】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第二緩衝劑包含第二水性緩衝溶液。

【請求項11】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第二水性緩衝液係選自由乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液及tris緩衝液組成之群。

【請求項12】

如前述請求項中任一項之方法，其中該處理該空LNP溶液之步驟進一步包含過濾。

【請求項13】

如前述請求項中任一項之方法，其中該過濾藉由切向流過濾執行。

【請求項14】

如前述請求項中任一項之方法，其中該處理該負載LNP溶液之步驟進一步包含緩衝液交換。

【請求項15】

如前述請求項中任一項之方法，其中該緩衝液交換包含添加包含第三緩衝劑之水性緩衝溶液。

【請求項16】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第三緩衝劑包含第三水性緩衝溶液。

【請求項17】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第三水性緩衝溶液係選自由乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液及tris緩衝液組成之群。

【請求項18】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第三水性緩衝溶液之pH在約6.5至約8.5、約7.0至約8.0、約7.2至約7.8或約7.4至約7.6範圍內。

【請求項19】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第三水性緩衝溶液之pH為約7.5。

【請求項20】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第一添加步驟在該緩衝液交換之前執行。

【請求項21】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第一添加步驟在該緩衝液交換之後執行。

【請求項22】

如前述請求項中任一項之方法，其中該處理該負載LNP溶液之步驟包含第二添加步驟，該第二添加步驟包含將聚乙二醇脂質(PEG脂質)添加至該負載LNP中。

【請求項23】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第二添加步驟在該緩衝液交換之前執行。

【請求項24】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第二添加步驟在該緩衝液交換之後執行。

【請求項25】

如前述請求項中任一項之方法，其中該處理該空LNP溶液之步驟進一步包含稀釋該空LNP溶液。

【請求項26】

如前述請求項中任一項之方法，其中該處理該空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含冷凍該空LNP溶液或負載LNP溶液。

【請求項27】

如前述請求項中任一項之方法，其中該處理該空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含凍乾該空LNP溶液或負載LNP溶液。

【請求項28】

如前述請求項中任一項之方法，其中該處理該空LNP溶液或負載LNP溶液之步驟進一步包含儲存該空LNP溶液或負載LNP溶液。

【請求項29】

如前述請求項中任一項之方法，其中該混合步驟用T形接頭、受限衝擊射流、微流體混合器或渦旋混合器執行。

【請求項30】

如前述請求項中任一項之方法，其中該裝載步驟用T形接頭、受限衝擊射流、微流體混合器或渦旋混合器執行。

【請求項31】

如前述請求項中任一項之方法，其中該水性緩衝溶液之pH在約4.5至約6.5、約4.6至約6.0、約4.7至約5.75、約4.8至約5.5或約4.9至約5.25範圍內。

【請求項32】

如前述請求項中任一項之方法，其中該水性緩衝溶液之pH為約5.0。

【請求項33】

如前述請求項中任一項之方法，其中該空LNP溶液之pH在約4.8至約5.8、約5.0至約5.75或約5.0至約5.5範圍內。

【請求項34】

如前述請求項中任一項之方法，其中該核酸溶液之pH在約4.5至約6.5、約4.8至約6.25、約4.8至約6.0、約5.0至約5.8或約5.2至約5.5範圍內。

【請求項35】

如前述請求項中任一項之方法，其中該核酸溶液、該空LNP溶液及該LNP調配物之pH在約5.0至約6.0、約5.1至約5.75或約5.2至約5.5範圍內。

【請求項36】

如前述請求項中任一項之方法，其中該負載LNP溶液之pH在約4.5至約6.0、約4.6至約5.8、約4.8至約5.6、約5.0至約5.5或約5.1至約5.4範圍內。

【請求項37】

如前述請求項中任一項之方法，其中該脂質溶液進一步包含第一有機溶劑。

【請求項38】

如前述請求項中任一項之方法，其中該空LNP溶液或負載LNP溶液進一步包含第一有機溶劑。

【請求項39】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第一有機溶劑為醇。

【請求項40】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第一有機溶劑為乙醇。

【請求項41】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第一緩衝劑包含第一水性緩衝溶液。

【請求項42】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第一水性緩衝液係選自由乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液及tris緩衝液組成之群。

【請求項43】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第一水性緩衝溶液包含大於約1 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約2 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約5 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約10 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約15 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約20 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，大於約25 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，或大於約30 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris。

【請求項44】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第一水性緩衝溶液包含約1 mM至約30 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，約2 mM至約20 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，約3 mM至約10 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，約4 mM至約8 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris，或約5 mM至約6 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris。

【請求項45】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第一水性緩衝溶液包含約5 mM檸檬酸鹽、乙酸鹽、磷酸鹽或tris。

【請求項46】

如前述請求項中任一項之方法，其中該第一水性緩衝溶液包含約5 mM乙酸鹽，其中該水性緩衝溶液之pH為約5.0。

【請求項47】

如前述請求項中任一項之方法，其中該空LNP溶液或負載LNP溶液進一步包含張力劑。

【請求項48】

如前述請求項中任一項之方法，其中該張力劑為糖。

【請求項49】

如前述請求項中任一項之方法，其中該糖為蔗糖。

【請求項50】

如前述請求項中任一項之方法，其中該空LNP溶液或負載LNP溶液包含約0.01 g/mL至約1.0 g/mL、約0.05 g/mL至約0.5 g/mL、約0.1 g/mL至約0.4 g/mL、約0.15 g/mL至約0.3 g/mL或約0.2 g/mL至約0.25 g/mL之張力劑。

【請求項51】

如前述請求項中任一項之方法，其中該空LNP溶液或負載LNP溶液進一步包含約0.2 g/mL至約0.25 g/mL之張力劑。

【請求項52】

如前述請求項中任一項之方法，其中該空LNP溶液或負載LNP溶液進一步包含約0.2 g/mL之蔗糖。

【請求項53】

如前述請求項中任一項之方法，其中該核酸溶液包含約0.01至約1.0 mg/mL之該核酸、約0.05至約0.5 mg/mL之該核酸或約0.1至約0.25

mg/mL之該核酸。

【請求項54】

如前述請求項中任一項之方法，其中該核酸溶液之德拜屏蔽長度 (Debye screen length) 為約0.1 nm至約10 nm、約0.2 nm至約8 nm、約0.3 nm至約7 nm、約0.4 nm至約6 nm、約0.5 nm至約5 nm、約0.75 nm至約4 nm或約1 nm至約3 nm。

【請求項55】

如前述請求項中任一項之方法，其中該核酸溶液包含選自由乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液及tris緩衝液組成之群的緩衝液。

【請求項56】

如前述請求項中任一項之方法，其中該核酸溶液包含乙酸鹽緩衝液。

【請求項57】

如前述請求項中任一項之方法，其中該核酸溶液包含約1 mM至約200 mM乙酸鹽緩衝液、約2 mM至約180 mM乙酸鹽緩衝液、約3 mM至約160 mM乙酸鹽緩衝液、約4 mM至約150 mM乙酸鹽緩衝液、約4 mM至約140 mM乙酸鹽緩衝液、約5 mM至約130 mM乙酸鹽緩衝液、約6 mM至約120 mM乙酸鹽緩衝液、約7 mM至約110 mM乙酸鹽緩衝液、約8 mM至約100 mM乙酸鹽緩衝液、約9 mM至約90 mM乙酸鹽緩衝液、約10 mM至約80 mM乙酸鹽緩衝液、約15 mM至約70 mM乙酸鹽緩衝液、約20 mM至約60 mM乙酸鹽緩衝液、約25 mM至約50 mM乙酸鹽緩衝液或約30 mM至約40 mM乙酸鹽緩衝液。

【請求項58】

如前述請求項中任一項之方法，其中該核酸溶液及該空LNP溶液在該裝載步驟期間以約5:1至約7:1、約4:1至約6:1、約3:1至約5:1或約2:1至約4:1之體積流量比率混合。

【請求項59】

如前述請求項中任一項之方法，其中該負載LNP溶液包含乙酸鹽緩衝液。

【請求項60】

如前述請求項中任一項之方法，其中該脂質溶液、該空LNP、該空LNP溶液、該負載LNP、該負載LNP溶液及/或該LNP調配物進一步包含囊封劑。

【請求項61】

如前述請求項中任一項之方法，其中該脂質溶液、該空LNP溶液、該負載LNP、該負載LNP溶液及/或該LNP調配物進一步包含磷脂、PEG脂質、結構脂質或其任何組合。

【請求項62】

如前述請求項中任一項之方法，其中該空LNP包含
約30-60 mol%可離子化脂質；
約0-30 mol%磷脂；
約15-50 mol%結構脂質；及
約0.1-0.5 mol% PEG脂質。

【請求項63】

如前述請求項中任一項之方法，其中該PEG脂質係選自由經PEG修

飾之磷脂醯乙醇胺、經PEG修飾之磷脂酸、經PEG修飾之神經醯胺、經PEG修飾之二烷基胺、經PEG修飾之二醯基甘油及經PEG修飾之二烷基甘油組成之群。

【請求項64】

如前述請求項中任一項之方法，其中該結構脂質係選自由膽固醇、糞固醇、植固醇、麥角固醇、菜油固醇、豆固醇、菜子固醇、番茄鹼、熊果酸、 α -生育酚及其衍生物組成之群。

【請求項65】

如前述請求項中任一項之方法，其中該磷脂係選自由1,2-二亞油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DLPC)、1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-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(十一烷醯基)-sn-甘油-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 Diether PC)、1-油醯基-2-膽固醇基半琥珀醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(OChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(C16 Lyso PC)、1,2-二亞麻醯基-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、1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、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、1,2-二亞油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亞麻醯基-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-外消旋-(1-甘油)鈉鹽(DOPG)、

鞘磷脂及其衍生物組成之群。

【請求項66】

如前述請求項中任一項之方法，其中該可離子化脂質包含可離子化胺基脂質。

【請求項67】

如前述請求項中任一項之方法，其中該核酸為核糖核酸。

【請求項68】

如前述請求項中任一項之方法，其中該核糖核酸係選自由小干擾RNA (siRNA)、不對稱干擾RNA (aiRNA)、微小RNA (miRNA)、Dicer-受質RNA (dsRNA)、小髮夾RNA (shRNA)、信使RNA (mRNA)及長鏈非編碼RNA (lncRNA)組成之群的至少一種核糖核酸。

【請求項69】

如前述請求項中任一項之方法，其中該核酸為信使RNA (mRNA)。

【請求項70】

如前述請求項中任一項之方法，其中該mRNA包括選自由莖環、鏈終止核苷、polyA序列、聚腺苷酸化信號及5'帽結構組成之群的至少一個基序。

【請求項71】

如前述請求項中任一項之方法，其中該mRNA為至少30個核苷酸長。

【請求項72】

如前述請求項中任一項之方法，其中該mRNA為至少300個核苷酸長。

【請求項73】

如前述請求項中任一項之方法，其中該LNP調配物之N:P比率為約1.1:1至約30.1。

【請求項74】

如前述請求項中任一項之方法，其中該LNP調配物之N:P比率為約2:1至約20:1。

【請求項75】

如前述請求項中任一項之方法，其中該LNP調配物之N:P比率為約2:1至約10:1或約2:1至約5:1。

【請求項76】

如前述請求項中任一項之方法，其中該LNP調配物包含約0.01至約500 mg/mL之該核酸、約0.1至約100 mg/mL、約0.25至約50 mg/mL、約0.5至約10 mg/mL或約1.0至約10 mg/mL之該核酸。

【請求項77】

一種空LNP，其包含約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質。

【請求項78】

一種藉由如前述請求項中任一項之方法製備之空LNP。

【請求項79】

一種藉由如前述請求項中任一項之方法製備之空LNP溶液。

【請求項80】

一種包含空LNP之空LNP溶液，其中該空LNP包含約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質。

【請求項81】

一種藉由如前述請求項中任一項之方法製備之負載LNP。

【請求項82】

一種藉由如前述請求項中任一項之方法製備之負載LNP溶液。

【請求項83】

一種藉由如前述請求項中任一項之方法製備之LNP調配物。

【請求項84】

一種治療或預防疾病或病症之方法，該方法包含向有需要之個體投與如前述請求項中任一項之負載LNP。

【請求項85】

一種治療或預防疾病或病症之方法，該方法包含向有需要之個體投與如前述請求項中任一項之負載LNP溶液。

【請求項86】

一種治療或預防疾病或病症之方法，該方法包含向有需要之個體投與如前述請求項中任一項之LNP調配物。

【請求項87】

如前述請求項中任一項之方法，其中該投與非經腸執行。

【請求項88】

如前述請求項中任一項之方法，其中該投與肌肉內、皮內、皮下及/或靜脈內執行。

【請求項89】

如前述請求項中任一項之負載LNP，其用於治療或預防個體之疾病或病症。

【請求項90】

如前述請求項中任一項之負載LNP溶液，其用於治療或預防個體之疾病或病症。

【請求項91】

如前述請求項中任一項之LNP調配物，其用於治療或預防個體之疾病或病症。

【請求項92】

一種如前述請求項中任一項之負載LNP的用途，其係用於製造用以治療或預防疾病或病症之藥劑。

【請求項93】

一種如前述請求項中任一項之負載LNP溶液的用途，其係用於製造用以治療或預防疾病或病症之藥劑。

【請求項94】

一種如前述請求項中任一項之LNP調配物的用途，其係用於製造用以治療或預防疾病或病症之藥劑。

【請求項95】

一種醫藥套組，其包含如請求項77至83中任一項之空LNP、空LNP溶液、負載LNP、負載LNP溶液或LNP調配物。

【請求項96】

一種空LNP，其包含約0.1 mol%至約1.25 mol% PEG脂質。

【請求項97】

一種空LNP，其包含約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質。

【請求項98】

如前述請求項中任一項之空LNP，其進一步包含可離子化脂質。

【請求項99】

如前述請求項中任一項之空LNP，其進一步包含磷脂及結構脂質。

【請求項100】

一種空LNP，其包含約30-60 mol%可離子化脂質；約0-30 mol%磷脂；約15-50 mol%結構脂質；及約0.1-10 mol% PEG脂質。

【請求項101】

一種空LNP溶液，其包含如前述請求項中任一項之空LNP。

【請求項102】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其進一步包含乙酸鹽緩衝液。

【請求項103】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其進一步包含張力劑。

【請求項104】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該張力劑為蔗糖。

【請求項105】

一種空LNP溶液，其包含：

- (i) 包含約0.1 mol%至約1.25 mol% PEG脂質之空LNP；及
- (ii) 乙酸鹽緩衝液。

【請求項106】

一種空LNP溶液，其包含：

- (i) 包含約0.1 mol%至約1.25 mol% PEG脂質之空LNP；
- (ii) 乙酸鹽緩衝液；及
- (iii) 蔗糖。

【請求項107】

一種空LNP溶液，其包含：

- (i) 包含約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質之空LNP；及
- (ii) 乙酸鹽緩衝液。

【請求項108】

一種空LNP溶液，其包含：

- (i) 包含約0.1 mol%至約0.5 mol% PEG脂質之空LNP；
- (ii) 乙酸鹽緩衝液；及
- (iii) 蔗糖。

【請求項109】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其pH值為約4.5至約6.25、約4.6至約6.0、約4.8至約5.8、約5.0至約5.75或約5.0至約5.5。

【請求項110】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其包含約5 mM乙酸鹽緩衝液，其中該乙酸鹽緩衝液之pH為約5.0。

【請求項111】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其包含約0.2 g/mL之蔗糖。

【請求項112】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該空LNP包含約30 mol%至約60 mol%該可離子化脂質、約0 mol%至約30 mol%該磷脂、約15 mol%至約50 mol%該結構脂質及約0.1 mol%至約0.5 mol%該PEG脂質。

【請求項113】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該空LNP包含約40 mol%

至約60 mol%該可離子化脂質、約5 mol%至約20 mol%該磷脂、約30 mol%至約50 mol%該結構脂質及約0.1 mol%至約1.25 mol%該PEG脂質。

【請求項114】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該PEG脂質以約0.2 mol%至約0.7 mol%之濃度存在。

【請求項115】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該PEG脂質以約0.5 mol%之濃度存在。

【請求項116】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該空LNP溶液包含具有在約2 mM與約40 mM之間的濃度之乙酸鹽緩衝液。

【請求項117】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該空LNP溶液包含具有在約2 mM與約30 mM之間的濃度之乙酸鹽緩衝液。

【請求項118】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該空LNP溶液包含具有在約2 mM與約20 mM之間的濃度之乙酸鹽緩衝液。

【請求項119】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該空LNP溶液包含具有在約2 mM與約10 mM之間的濃度之乙酸鹽緩衝液。

【請求項120】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該空LNP溶液包含具有約5 mM濃度之乙酸鹽緩衝液。

【請求項121】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該緩衝液之pH比該可離子化脂質之pKa小至少1個單位。

【請求項122】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該緩衝液之pH小於5.5。

【請求項123】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該緩衝液之pH為約5.0。

【請求項124】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該空LNP溶液之pH比該可離子化脂質之pKa小至少1個單位。

【請求項125】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該空LNP溶液之pH小於5.5。

【請求項126】

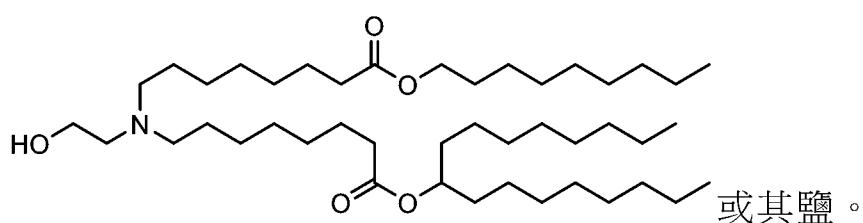
如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該空LNP溶液之pH為約5.0。

【請求項127】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該等LNP包含約45 mol%至約50 mol%可離子化脂質。

【請求項128】

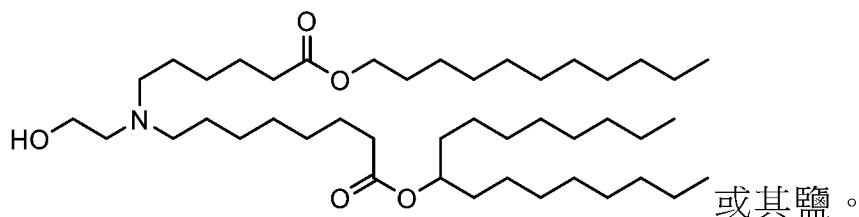
如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該可離子化脂質為



第 19 頁(發明申請專利範圍)

【請求項129】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該可離子化脂質為



【請求項130】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該PEG脂質為PEG_{2k}-DMG。

【請求項131】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該結構脂質為膽固醇。

【請求項132】

如前述請求項中任一項之空LNP溶液，其中該磷脂為1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DSPC)。

【請求項133】

一種包含脂質奈米顆粒(LNP)之製劑，其中：

(a) 該等LNP包含

約40 mol%至約50 mol%可離子化脂質，

約30 mol%至約50 mol%結構脂質，

約5 mol%至約20 mol%磷脂，及

約0.1 mol%至約1.25 mol% PEG脂質；

(b) 該等LNP實質上不含治療劑或預防劑；且

(c) 該製劑包含具有在約2 mM與約40 mM之間的濃度之乙酸鹽緩衝液。

【請求項134】

如前述請求項中任一項之製劑，其中該PEG脂質以約0.2 mol%至約0.7 mol%之濃度存在。

【請求項135】

如前述請求項中任一項之製劑，其中該PEG脂質以約0.5 mol%之濃度存在。

【請求項136】

如前述請求項中任一項之製劑，其中該製劑包含具有在約2 mM與約30 mM之間的濃度之乙酸鹽緩衝液。

【請求項137】

如前述請求項中任一項之製劑，其中該製劑包含具有在約2 mM與約20 mM之間的濃度之乙酸鹽緩衝液。

【請求項138】

如前述請求項中任一項之製劑，其中該製劑包含具有在約2 mM與約10 mM之間的濃度之乙酸鹽緩衝液。

【請求項139】

如前述請求項中任一項之製劑，其中該製劑包含具有約5 mM濃度之乙酸鹽緩衝液。

【請求項140】

如前述請求項中任一項之製劑，其中該緩衝液之pH比該可離子化脂質之pKa小至少1個單位。

【請求項141】

如前述請求項中任一項之製劑，其中該緩衝液之pH小於5.5。

【請求項142】

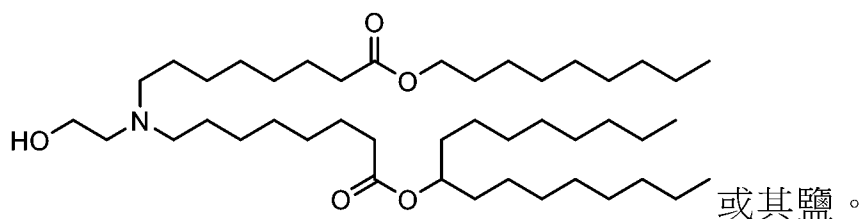
如前述請求項中任一項之製劑，其中該緩衝液之pH為約5.0。

【請求項143】

如前述請求項中任一項之製劑，其中該等LNP包含約45 mol%至約50 mol%可離子化脂質。

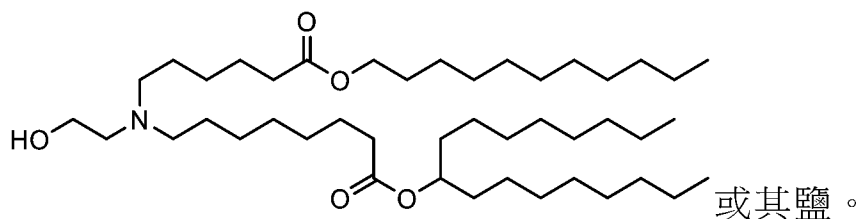
【請求項144】

如前述請求項中任一項之製劑，其中該可離子化脂質為



【請求項145】

如前述請求項中任一項之製劑，其中該可離子化脂質為



【請求項146】

如前述請求項中任一項之製劑，其中該PEG脂質為PEG_{2k}-DMG。

【請求項147】

如前述請求項中任一項之製劑，其中該結構脂質為膽固醇。

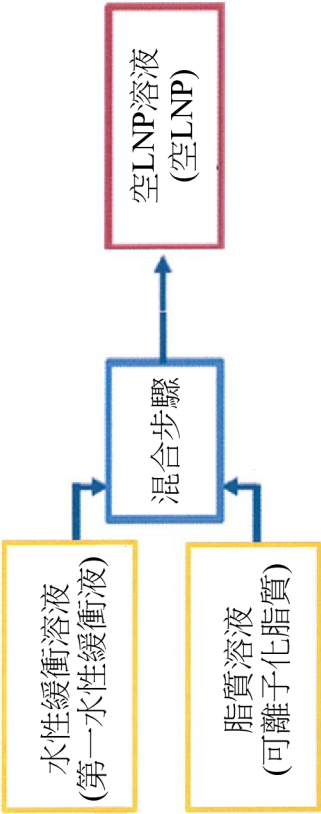
【請求項148】

如前述請求項中任一項之製劑，其中該磷脂為1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DSPC)。

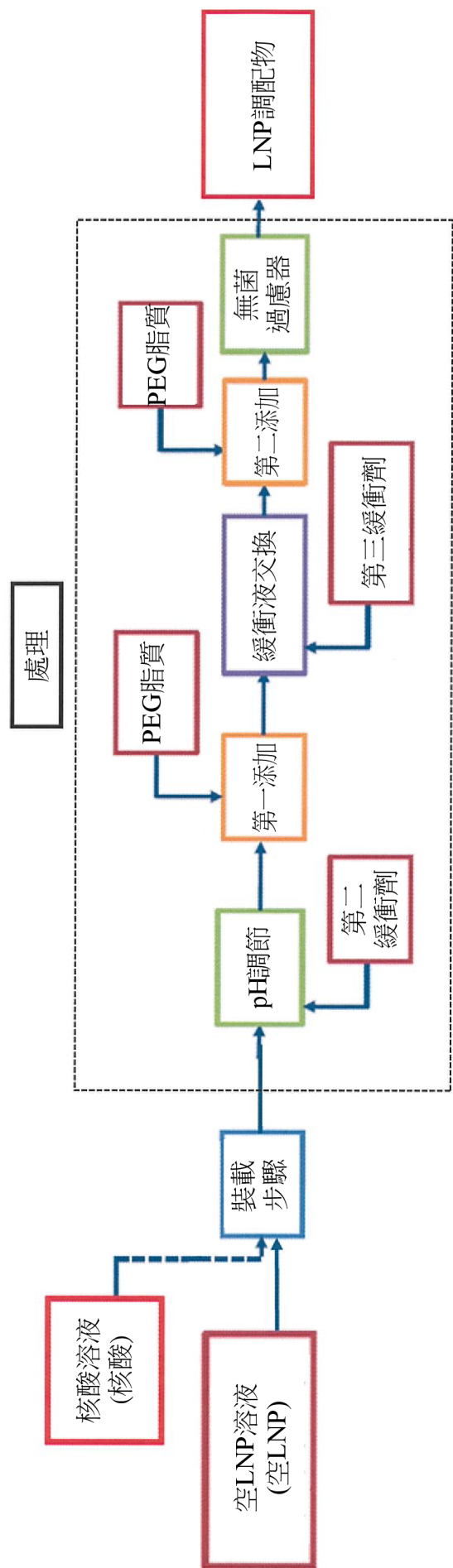
【發明圖式】



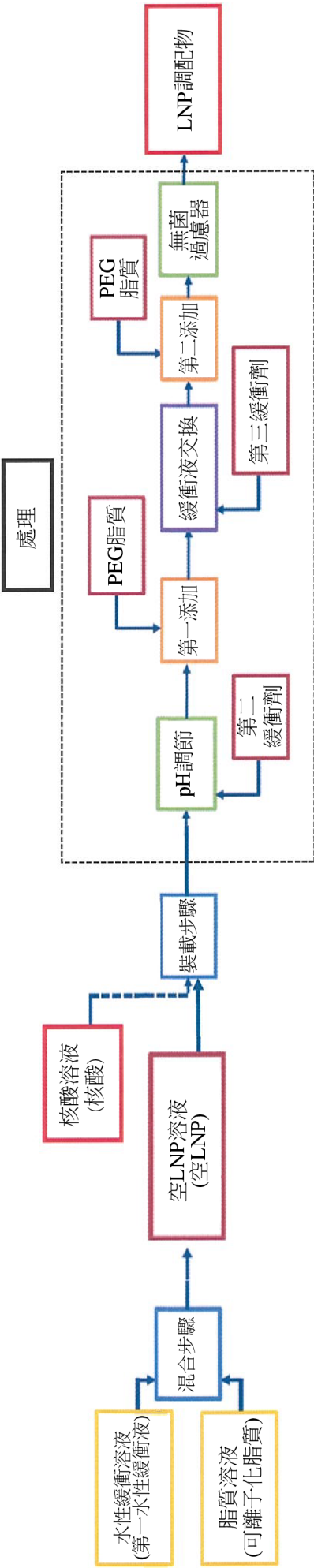
【圖1】



【圖2】



【圖3】



【圖4】