(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116940324 A
(43)申请公布日 2023.10.24

(21)申请号 202280012579.6
(22)申请日 2022.01.11
(30)优先权数据
63/136,501 2021.01.12 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.07.31
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/012023 2022.01.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/155149 EN 2022.07.21
(71)申请人 西北大学
地址 美国伊利诺斯州
(72)发明人 查德·A·米尔金
安德鲁·约瑟夫·西内格拉
(74)专利代理机构 北京德琦知识产权代理有限公司 11018
专利代理师 潘怀仁 康泉
(51)Int.Cl.
A61K 8/14(2006.01)

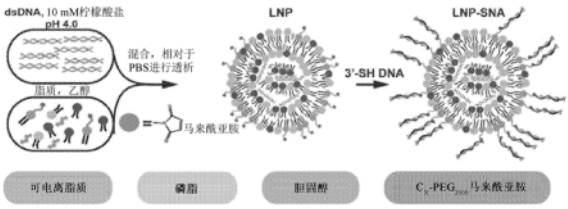
权利要求书5页 说明书32页
序列表1页 附图9页

(54)发明名称

脂质纳米颗粒球形核酸

(57)摘要

为了治疗疾病,需要将DNA和RNA治疗剂递送到靶组织并提供持久益处,而无副作用。脂质纳米颗粒球形核酸通过使用用于纳米颗粒靶向和组织特异性的DNA和RNA序列来解决这一未满足的需求。与脂质颗粒(装载有核酸)或甚至常规SNA(脂质体和金核)两者相比,脂质SNA结构具有显著不同的生物分布特性。



CN 116940324 A

1.一种脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNA),其包括脂质纳米颗粒核和寡核苷酸壳,所述寡核苷酸壳包含与所述脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸,

所述脂质纳米颗粒核包括包封的寡核苷酸、可电离脂质、磷脂、甾醇和脂质-聚乙二醇(脂质-PEG)缀合物,

其中所述寡核苷酸壳中的至少10%的所述寡核苷酸通过所述脂质-PEG缀合物与所述脂质纳米颗粒核的外部共价连接。

2.根据权利要求1所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳包括约5个至约1000个寡核苷酸。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳包括约100个至约1000个寡核苷酸。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳包括约400个寡核苷酸。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳中的每个寡核苷酸的长度为约5个至约100个核苷酸。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳中的每个寡核苷酸的长度为约10个至约50个核苷酸。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳中的每个寡核苷酸的长度为约25个核苷酸。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳中的每个寡核苷酸具有相同的核苷酸序列。

9.根据权利要求1至7中任一项所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳包括至少两个具有不同核苷酸序列的寡核苷酸。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳包含单链、双链DNA寡核苷酸或其组合。

11.根据权利要求1至9中任一项所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳包含单链、双链RNA寡核苷酸或其组合。

12.根据权利要求1至9中任一项所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳包含单链DNA寡核苷酸、双链DNA寡核苷酸、单链RNA寡核苷酸、双链RNA寡核苷酸或其组合。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳中的至少一个寡核苷酸为靶向寡核苷酸。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳中的每个寡核苷酸为靶向寡核苷酸。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳中的至少一个寡核苷酸包括$(GGT)_n$核苷酸序列或由其组成,其中n为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更大。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳中的每个寡核苷酸包括$(GGT)_n$核苷酸序列或由其组成,其中n为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更大。

17.根据权利要求15或权利要求16所述的LNP-SNA,其中n为7。

18.根据权利要求1至17中任一项所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳中的至少一个寡核苷酸为适体。

19.根据权利要求1至18中任一项所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳中的至少一个寡核苷酸包括可检测标志物。

20.根据权利要求1至19中任一项所述的LNP-SNA,其中所述寡核苷酸壳包括抑制性寡核苷酸、免疫刺激性寡核苷酸、基因编辑底物DNA或RNA或其组合。

21.根据权利要求20所述的LNP-SNA,其中所述抑制性寡核苷酸为反义寡核苷酸、小干扰RNA(siRNA)、适体、短发夹RNA(shRNA)、酶型DNA或酶型适体。

22.根据权利要求20或权利要求21所述的LNP-SNA,其中所述免疫刺激性寡核苷酸为含CpG基序的寡核苷酸、双链DNA寡核苷酸或单链RNA寡核苷酸。

23.根据权利要求1至22中任一项所述的LNP-SNA,其中所述包封的寡核苷酸包含DNA、RNA或其组合。

24.根据权利要求1至23中任一项所述的LNP-SNA,其中所述包封的寡核苷酸为抑制性寡核苷酸、mRNA、免疫刺激性寡核苷酸、编码基因编辑蛋白的mRNA或DNA或RNA基因编辑底物。

25.根据权利要求24所述的LNP-SNA,其中所述抑制性寡核苷酸为反义寡核苷酸、小干扰RNA(siRNA)、适体、短发夹RNA(shRNA)、酶型DNA或酶型适体。

26.根据权利要求24或权利要求25所述的LNP-SNA,其中所述免疫刺激性寡核苷酸为含CpG基序的寡核苷酸。

27.根据权利要求1至26中任一项所述的LNP-SNA,其中所述包封的寡核苷酸的长度为约5个至约5000个核苷酸。

28.根据权利要求1至27中任一项所述的LNP-SNA,其中所述包封的寡核苷酸的长度为约10个至约4500个核苷酸。

29.根据权利要求1至28中任一项所述的LNP-SNA,其中所述包封的寡核苷酸的长度为约1500个核苷酸。

30.根据权利要求1至29中任一项所述的LNP-SNA,其中所述脂质纳米颗粒核包括多个包封的寡核苷酸。

31.根据权利要求30所述的LNP-SNA,其中所述多个包封的寡核苷酸中的至少一个寡核苷酸包括可检测标志物。

32.根据权利要求30或权利要求31所述的LNP-SNA,其中所述多个包封的寡核苷酸包括抑制性寡核苷酸、mRNA、免疫刺激性寡核苷酸、编码基因编辑蛋白的mRNA、DNA或RNA基因编辑底物或其组合。

33.根据权利要求32所述的LNP-SNA,其中所述抑制性寡核苷酸为反义寡核苷酸、小干扰RNA(siRNA)、适体、短发夹RNA(shRNA)、酶型DNA或酶型适体。

34.根据权利要求32或权利要求33所述的LNP-SNA,其中所述免疫刺激性寡核苷酸为含CpG基序的寡核苷酸、双链DNA(dsDNA)、双链RNA或单链RNA(ssRNA)。

35.根据权利要求30至32中任一项所述的LNP-SNA,其中所述多个包封的寡核苷酸中的每个寡核苷酸的长度为约10个至约50个核苷酸。

36.根据权利要求30至35中任一项所述的LNP-SNA,其中所述多个包封的寡核苷酸中的

每个寡核苷酸的长度为约50个核苷酸。

37.根据权利要求30至36中任一项所述的LNP-SNA,其中所述多个包封的寡核苷酸中的每个寡核苷酸具有相同的核苷酸序列。

38.根据权利要求30至36中任一项所述的LNP-SNA,其中所述多个包封的寡核苷酸包括至少两个具有不同核苷酸序列的寡核苷酸。

39.根据权利要求1至38中任一项所述的LNP-SNA,其中所述可电离脂质为二亚油基甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、C12-200、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)或其组合。

40.根据权利要求1至39中任一项所述的LNP-SNA,其中所述可电离脂质为二亚油基甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)。

41.根据权利要求1至40中任一项所述的LNP-SNA,其中所述LNP-SNA包括的所述可电离脂质的摩尔分数为所述LNP-SNA中的总脂质的约50%。

42.根据权利要求1至41中任一项所述的LNP-SNA,其中所述磷脂为1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二(十六酰基)磷脂酰胆碱(DPPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或其组合。

43.根据权利要求1至42中任一项所述的LNP-SNA,其中所述磷脂为1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

44.根据权利要求1至43中任一项所述的LNP-SNA,其中所述LNP-SNA包括的所述磷脂的摩尔分数为所述LNP-SNA中的总脂质的约1%至约25%。

45.根据权利要求1至44中任一项所述的LNP-SNA,其中所述LNP-SNA包括的所述磷脂的摩尔分数为或约为所述LNP-SNA中的总脂质的3.5%。

46.根据权利要求1至45中任一项所述的LNP-SNA,其中所述甾醇为3β-羟基胆甾-5-烯(胆固醇)、9,10-断胆甾-5,7,10(19)-三烯-3β-醇(维生素D3)、9,10-断麦角甾-5,7,10(19),22-四烯-3β-醇(维生素D2)、钙泊三醇、24-乙基-5,22-胆甾二烯-3β-醇(豆甾醇)、22,23-二氢豆甾醇(β-谷甾醇)、3,28-二羟基-羽扇豆醇(桦木醇)、羽扇豆醇、熊果酸、齐墩果酸、24α-甲基胆固醇(菜油甾醇)、24-乙基胆甾醇-5,24(28)E-二烯-3β-醇(岩藻甾醇)、24-甲基胆甾-5,22-二烯-3β-醇(菜籽甾醇)、24-甲基胆甾-5,7,22-三烯-3β-醇(麦角甾醇)、9,11-去氢麦角甾醇、胡萝卜甾醇或用一个或多个氨基酸修饰的任何前述甾醇。

47.根据权利要求1至46中任一项所述的LNP-SNA,其中所述LNP-SNA包括的所述甾醇的摩尔分数为所述LNP-SNA中的总脂质的约25%至约45%。

48.根据权利要求1至47中任一项所述的LNP-SNA,其中所述LNP-SNA包括的所述甾醇的摩尔分数为或约为所述LNP-SNA中的总脂质的45%。

49.根据权利要求1至48中任一项所述的LNP-SNA,其中所述甾醇为胆固醇。

50.根据权利要求49所述的LNP-SNA,其中所述LNP-SNA包括的所述胆固醇的摩尔分数为或约为所述LNP-SNA中的总脂质的45%。

51.根据权利要求1至50中任一项所述的LNP-SNA,其中所述脂质-聚乙二醇(脂质-PEG)缀合物包括2000道尔顿(Da)聚乙二醇。

52.根据权利要求1至51中任一项所述的LNP-SNA,其中所述脂质-聚乙二醇(脂质-PEG)缀合物为脂质-PEG-马来酰亚胺。

53.根据权利要求52所述的LNP-SNA,其中所述脂质-PEG-马来酰亚胺为与2000Da聚乙二醇马来酰亚胺缀合的1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPPE)、与2000Da聚乙二醇马来酰亚胺缀合的1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DMPE)或其组合。

54.根据权利要求1至53中任一项所述的LNP-SNA,其中所述LNP-SNA包括的所述脂质-PEG缀合物的摩尔分数为所述LNP-SNA中的总脂质的约1.5%至约3.5%。

55.根据权利要求1至54中任一项所述的LNP-SNA,其中所述LNP-SNA包括的所述脂质-PEG缀合物的摩尔分数为或约为所述LNP-SNA中的总脂质的1.5%。

56.根据权利要求1至55中任一项所述的LNP-SNA,其中所述可电离脂质与所述包封的寡核苷酸之间的质量比为约20:1至约5:1。

57.根据权利要求1至56中任一项所述的LNP-SNA,其进一步包括包封于所述脂质纳米颗粒核中的治疗剂。

58.根据权利要求1至57中任一项所述的LNP-SNA,其进一步包括与所述脂质纳米颗粒核的外部连接的治疗剂。

59.根据权利要求57或权利要求58所述的LNP-SNA,其中所述治疗剂为抗体或抗体片段、小分子、肽、抗生素、生长因子、激素、干扰素、白介素、抗真菌剂、抗病毒剂、化疗剂或其组合。

60.根据权利要求1至59中任一项所述的LNP-SNA,其进一步包括与所述脂质纳米颗粒核的外部连接的靶向肽、靶向抗体或其组合。

61.一种组合物,其包括多个根据权利要求1至60中任一项所述的脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNA)。

62.根据权利要求61所述的组合物,其进一步包括治疗剂。

63.一种抑制基因表达的方法,所述方法包括将编码基因产物的多核苷酸与根据权利要求1至60中任一项所述的脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNA)或根据权利要求61或权利要求62所述的组合物杂交的步骤,其中所述多核苷酸与所述寡核苷酸壳中的一个或多个寡核苷酸之间的杂交发生在所述多核苷酸的一定长度上,其互补程度足以抑制所述基因产物的表达。

64.根据权利要求63所述的方法,其中所述基因产物的表达在体内受到抑制。

65.根据权利要求63所述的方法,其中所述基因产物的表达在体外受到抑制。

66.一种用于上调toll样受体(TLR)活性的方法,所述方法包括使具有所述toll样受体的细胞与根据权利要求1至60中任一项所述的脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNA)或根据权利要求61或权利要求62所述的组合物接触。

67.根据权利要求66所述的方法,其中所述寡核苷酸壳包括一个或多个寡核苷酸,所述一个或多个寡核苷酸为TLR激动剂。

68.根据权利要求66或权利要求67所述的方法,其中所述toll样受体为toll样受体1、toll样受体2、toll样受体3、toll样受体4、toll样受体5、toll样受体6、toll样受体7、toll样受体8、toll样受体9、toll样受体10、toll样受体11、toll样受体12、toll样受体13或其组合。

69.一种用于下调toll样受体(TLR)活性的方法,所述方法包括使具有所述toll样受体的细胞与根据权利要求1至60中任一项所述的脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNA)或根据权

利要求61或权利要求62所述的组合物接触。

70.根据权利要求69所述的方法，其中所述寡核苷酸壳包括一个或多个寡核苷酸，所述一个或多个寡核苷酸为TLR拮抗剂。

71.根据权利要求69或权利要求70所述的方法，其中所述toll样受体为toll样受体1、toll样受体2、toll样受体3、toll样受体4、toll样受体5、toll样受体6、toll样受体7、toll样受体8、toll样受体9、toll样受体10、toll样受体11、toll样受体12、toll样受体13或其组合。

72.根据权利要求66至71中任一项所述的方法，其在体外执行。

73.根据权利要求66至71中任一项所述的方法，其在体内执行。

74.一种治疗病症的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1至60中任一项所述的脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNA)或根据权利要求61或权利要求62所述的组合物，其中所述施用治疗所述病症。

75.根据权利要求74所述的方法，其中所述病症为癌症、传染病、自身免疫性疾病或其组合。

脂质纳米颗粒球形核酸

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C.§119(e)要求于2021年1月12日提交的美国临时专利申请第63/136,501号的优先权权益,所述美国临时专利申请以全文引用的方式并入本文。

[0003] 政府权益声明

[0004] 本发明是根据美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的授权号CA208783、CA221747和CA199091在政府支持下进行的。政府享有本发明中的某些权利。

[0005] 通过引用并入以电子方式提交的材料

[0006] 作为本公开的一部分的序列表与说明书作为文本文件同时提交。含有序列表的文本文件的名称为“2021-002_Seqlisting.txt”,所述文件创建于2022年1月10日,并且大小为643字节。序列表的主题以全文引用的方式并入本文。

背景技术

[0007] 核酸(DNA和RNA)在治疗和诊断两者中有许多潜在的应用,但是在临床相关剂量下的有效递送仍然是一个挑战。这些分子的结构对其递送产生限制。这些限制包含:被核酸酶快速降解、较差的生物分布特性、在靶组织中的低累积以及在细胞区室内的隔离。为了解决这些问题,已经探索了许多不同的核酸纳米颗粒载体结构。

[0008] 脂质纳米颗粒可用于促进寡核苷酸的细胞内递送和胞质识别以及信使RNA的表达。然而,其靶向特定组织的能力被认为依赖于内源性脂质运输通路(参见例如Akinc等人,《分子疗法(Molecular Therapy)》(2010)18:1357-1364)。为了尝试解决这一限制,通常需要对脂质结构或甾醇进行广泛筛选[参见例如Love等人,《美国国家科学院院刊(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)》(2010)107:1864-1869;以及Patel等人,《自然通讯(Nature Communications)》(2020)983]。虽然这些研究揭示了纳米颗粒结构与其分布特性之间的一些关系,但仍需要开发一种具有可预测纳米颗粒靶向能力的系统。

发明内容

[0009] 许多疾病可以通过基于核酸(DNA或RNA)的治疗剂来治疗,所述治疗剂可沉默有害基因,替换丢失的基因并编辑患者DNA中的突变。然而,在体内,活性序列通常不能到达靶组织和细胞。脂质纳米颗粒(LNP)是一些最有效的核酸载体。虽然LNP载体可有效地递送到容易到达的靶标,但通常需要筛选数千种不同的载体结构,以发现血流和肝以外的细胞群的显著增强。球形核酸(SNA)结构通过使用现有纳米颗粒结构表面上的短DNA序列靶向其递送来促进这种方法。径向定向的外部序列改变了纳米颗粒在体内的目的地以及其活性两者。外部DNA序列靶向相关LNP的递送,所述LNP具有用于基因沉默、基因替换或基因编辑的包封的核酸。外部DNA序列提供了LNP将被递送到的“地址”。由于DNA序列组合可以形成许多不同的结构,因此这种策略为LNP结构提供了增加靶向、刺激响应性和诊断能力的许多选项。

[0010] 本文所述的技术的应用包含但不限于:

[0011] ●递送RNA以促进治疗性蛋白表达

[0012] ●递送用于治疗性基因沉默的小干扰RNA(siRNA)

[0013] ●递送用于基因组编辑的多条DNA和RNA链

[0014] ●递送用于诊断的DNA和RNA探针

[0015] ●递送设计用于调节免疫系统的DNA和RNA链

[0016] ●共同递送DNA或RNA治疗剂与其它药物

[0017] ●靶向递送包封的药物

[0018] 本文所述的技术的优势包含但不限于：

[0019] ●脂质纳米颗粒(LNP)结构存在，所述结构可递送不同的DNA、RNA序列

[0020] ●无副作用地递送到靶组织是本领域的中心问题

[0021] ●靶向LNP的两种主要方法：1.)合成新的脂质结构和LNP组合物；以及2.)用靶向肽、抗体装饰LNP表面

[0022] ●脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNA)用DNA和/或RNA序列装饰LNP的表面

[0023] ●LNP-SNA表面上的DNA和RNA序列增强了纳米颗粒的功能并改变了其组织靶向

[0024] ●这代表一个高度模块化的平台，因为DNA和RNA可以形成许多不同的结构，并且理论上可以被设计成以高特异性结合任何靶标

[0025] ●DNA和RNA可用作传感器，并且可以用于从脂质纳米颗粒设计治疗和诊断(治疗诊断学)结构

[0026] 因此，在一些方面，本公开提供了一种脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNA)，其包括脂质纳米颗粒核和寡核苷酸壳，所述寡核苷酸壳包含与所述脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸，所述脂质纳米颗粒核包括包封的寡核苷酸、可电离脂质、磷脂、甾醇和脂质-聚乙二醇(脂质-PEG)缀合物，其中所述寡核苷酸壳中的至少10％的所述寡核苷酸通过所述脂质-PEG缀合物与所述脂质纳米颗粒核的外部共价连接。在各个实施例中，所述寡核苷酸壳中的至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或至少95％的所述寡核苷酸通过所述脂质-PEG缀合物与所述脂质纳米颗粒核的外部共价连接。在一些实施例中，所述寡核苷酸壳中的100％的所述寡核苷酸通过所述脂质-PEG缀合物与所述脂质纳米颗粒核的外部共价连接。在一些实施例中，所述寡核苷酸壳包括约5个至约1000个寡核苷酸。在一些实施例中，所述寡核苷酸壳包括约100个至约1000个寡核苷酸。在另外的实施例中，所述寡核苷酸壳包括约400个寡核苷酸。在各个实施例中，所述寡核苷酸壳中的每个寡核苷酸的长度为约5个至约100个核苷酸。在另外的实施例中，所述寡核苷酸壳中的每个寡核苷酸的长度为约10个至约50个核苷酸。在一些实施例中，所述寡核苷酸壳中的每个寡核苷酸的长度为约25个核苷酸。在一些实施例中，所述寡核苷酸壳中的每个寡核苷酸具有相同的核苷酸序列。在一些实施例中，所述寡核苷酸壳包括至少两个具有不同核苷酸序列的寡核苷酸。在各个实施例中，所述寡核苷酸壳包含单链、双链DNA寡核苷酸或其组合。在另外的实施例中，所述寡核苷酸壳包含单链、双链RNA寡核苷酸或其组合。在一些实施例中，所述寡核苷酸壳包含单链DNA寡核苷酸、双链DNA寡核苷酸、单链RNA寡核苷酸、双链RNA寡核苷酸或其组合。在一些实施例中，所述寡核苷酸壳中的至少一个寡核苷酸为靶向寡核苷酸。在另外的实施例中，所述寡核苷酸壳中的每个寡核苷酸为靶向寡核苷酸。在一些实施例中，所述寡核苷酸壳中的至少一个寡核苷酸包括$(GGT)_n$核苷酸序列或由其组成，其

中n为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更大。在一些实施例中，所述寡核苷酸壳中的每个寡核苷酸包括$(GGT)_n$核苷酸序列或由其组成，其中n为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更大。在一些实施例中，n为7。在一些实施例中，所述寡核苷酸壳中的至少一个寡核苷酸为适体。在一些实施例中，所述寡核苷酸壳中的至少一个寡核苷酸包括可检测标志物。在另外的实施例中，所述寡核苷酸壳包括抑制性寡核苷酸、免疫刺激性寡核苷酸、基因编辑底物DNA或RNA或其组合。在仍另外的实施例中，所述抑制性寡核苷酸为反义寡核苷酸、小干扰RNA(siRNA)、适体、短发夹RNA(shRNA)、酶型DNA或酶型适体。在一些实施例中，所述免疫刺激性寡核苷酸为含CpG基序的寡核苷酸、双链DNA寡核苷酸、双链RNA寡核苷酸或单链RNA寡核苷酸。在一些实施例中，所述包封的寡核苷酸包含DNA、RNA或其组合。在另外的实施例中，所述包封的寡核苷酸为抑制性寡核苷酸、mRNA、免疫刺激性寡核苷酸、编码基因编辑蛋白的mRNA或DNA或RNA基因编辑底物。在一些实施例中，所述抑制性寡核苷酸为反义寡核苷酸、小干扰RNA(siRNA)、适体、短发夹RNA(shRNA)、酶型DNA或酶型适体。在另外的实施例中，所述免疫刺激性寡核苷酸为含CpG基序的寡核苷酸。在另外的实施例中，所述免疫刺激性寡核苷酸为含CpG基序的寡核苷酸、双链DNA(dsDNA)、双链RNA或单链RNA(ssRNA)。在各个实施例中，所述包封的寡核苷酸的长度为约5个至约5000个核苷酸。在另外的实施例中，所述包封的寡核苷酸的长度为约10个至约4500个核苷酸。在仍另外的实施例中，所述包封的寡核苷酸的长度为约1500个核苷酸。在一些实施例中，所述脂质纳米颗粒核包括多个包封的寡核苷酸。在一些实施例中，所述多个包封的寡核苷酸中的至少一个寡核苷酸包括可检测标志物。在各个实施例中，所述多个包封的寡核苷酸包括抑制性寡核苷酸、mRNA、免疫刺激性寡核苷酸、编码基因编辑蛋白的mRNA、DNA或RNA基因编辑底物或其组合。在另外的实施例中，所述抑制性寡核苷酸为反义寡核苷酸、小干扰RNA(siRNA)、适体、短发夹RNA(shRNA)、酶型DNA或酶型适体。在另外的实施例中，所述免疫刺激性寡核苷酸为含CpG基序的寡核苷酸、双链DNA(dsDNA)、双链RNA或单链RNA(ssRNA)。在一些实施例中，所述多个包封的寡核苷酸中的每个寡核苷酸的长度为约10个至约50个核苷酸。在另外的实施例中，所述多个包封的寡核苷酸中的每个寡核苷酸的长度为约50个核苷酸。在一些实施例中，所述多个包封的寡核苷酸中的每个寡核苷酸具有相同的核苷酸序列。在一些实施例中，所述多个包封的寡核苷酸包括至少两个具有不同核苷酸序列的寡核苷酸。在一些实施例中，所述可电离脂质为二亚油基甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、C12-200、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)或其组合。在一些实施例中，所述可电离脂质为二亚油基甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)。在一些实施例中，所述LNP-SNA包括的所述可电离脂质的摩尔分数为或约为所述LNP-SNA中的总脂质的50％。在另外的实施例中，所述磷脂为1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二(十六酰基)磷脂酰胆碱(DPPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或其组合。在一些实施例中，所述磷脂为1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。在另外的实施例中，所述LNP-SNA包括的所述磷脂的摩尔分数为所述LNP-SNA中的总脂质的约1％至约25％。在一些实施例中，所述LNP-SNA包括的所述磷脂的摩尔分数为或约为所述LNP-SNA中的总脂质的3.5％。在一些实施例中，所述甾醇为3β-羟基胆甾-5-烯(胆固醇)、9,10-断胆甾-5,7,10(19)-三烯-3β-醇(维生素D3)、9,10-断麦角甾-5,7,10(19),22-四烯-3

β-醇(维生素D2)、钙泊三醇、24-乙基-5,22-胆甾二烯-3β-醇(豆甾醇)、22,23-二氢豆甾醇(β-谷甾醇)、3,28-二羟基-羽扇豆醇(桦木醇)、羽扇豆醇、熊果酸、齐墩果酸、24α-甲基胆固醇(菜油甾醇)、24-乙基胆甾醇-5,24(28)E-二烯-3β-醇(岩藻甾醇)、24-甲基胆甾-5,22-二烯-3β-醇(菜籽甾醇)、24-甲基胆甾-5,7,22-三烯-3β-醇(麦角甾醇)、9,11-去氢麦角甾醇、胡萝卜甾醇或用一个或多个氨基酸修饰的任何前述甾醇。在一些实施例中,所述LNP-SNA包括的所述甾醇的摩尔分数为所述LNP-SNA中的总脂质的约25%至约45%。在一些实施例中,所述LNP-SNA包括的所述甾醇的摩尔分数为或约为所述LNP-SNA中的总脂质的45%。在另外的实施例中,所述甾醇为胆固醇。在仍另外的实施例中,所述LNP-SNA包括的所述胆固醇的摩尔分数为或约为所述LNP-SNA中的总脂质的45%。在一些实施例中,所述脂质-聚乙二醇(脂质-PEG)缀合物包括2000道尔顿(Da)聚乙二醇。在一些实施例中,所述脂质-聚乙二醇(脂质-PEG)缀合物为脂质-PEG-马来酰亚胺。在另外的实施例中,所述脂质-PEG-马来酰亚胺为与2000Da聚乙二醇马来酰亚胺缀合的1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPPE)、与2000Da聚乙二醇马来酰亚胺缀合的1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DMPE)或其组合。在一些实施例中,所述LNP-SNA包括的所述脂质-PEG缀合物的摩尔分数为所述LNP-SNA中的总脂质的约1.5%至约3.5%。在一些实施例中,所述LNP-SNA包括的所述脂质-PEG缀合物的摩尔分数为或约为所述LNP-SNA中的总脂质的1.5%。在各个实施例中,所述可电离脂质与所述包封的寡核苷酸之间的质量比为约20:1至约5:1。在一些实施例中,本公开的LNP-SNA进一步包括包封于所述脂质纳米颗粒核中的治疗剂。在另外的实施例中,本公开的LNP-SNA进一步包括与所述脂质纳米颗粒核的外部连接的治疗剂。在另外的实施例中,所述治疗剂为抗体或抗体片段、小分子、肽、抗生素、生长因子、激素、干扰素、白介素、抗真菌剂、抗病毒剂、化疗剂或其组合。在一些实施例中,本公开的LNP-SNA进一步包括与所述脂质纳米颗粒核的外部连接的靶向肽、靶向抗体或其组合。

[0027] 在一些方面,本公开提供了一种组合物,其包括多个本公开的脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNA)。在一些实施例中,本公开的组合物进一步包括治疗剂。

[0028] 在一些方面,本公开提供了一种抑制基因表达的方法,所述方法包括将编码基因产物的多核苷酸与本公开的脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNA)或组合物杂交的步骤,其中所述多核苷酸与所述寡核苷酸壳中的一个或多个寡核苷酸之间的杂交发生在所述多核苷酸的一定长度上,其互补程度足以抑制所述基因产物的表达。在一些实施例中,所述基因产物的表达在体内受到抑制。在一些实施例中,所述基因产物的表达在体外受到抑制。

[0029] 在一些方面,本公开提供了一种用于上调toll样受体(TLR)活性的方法,所述方法包括使具有所述toll样受体的细胞与本公开的脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNA)或组合物接触。在一些实施例中,所述寡核苷酸壳包括一个或多个寡核苷酸,所述一个或多个寡核苷酸为TLR激动剂。在另外的实施例中,所述toll样受体为toll样受体1、toll样受体2、toll样受体3、toll样受体4、toll样受体5、toll样受体6、toll样受体7、toll样受体8、toll样受体9、toll样受体10、toll样受体11、toll样受体12、toll样受体13或其组合。在一些实施例中,所述方法在体外执行。在一些实施例中,所述方法在体内执行。

[0030] 在一些方面,本公开提供了一种用于下调toll样受体(TLR)活性的方法,所述方法包括使具有所述toll样受体的细胞与本公开的脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNA)或组合物接触。在一些实施例中,所述寡核苷酸壳包括一个或多个寡核苷酸,所述一个或多个寡核苷

酸为TLR拮抗剂。在另外的实施例中，所述toll样受体为toll样受体1、toll样受体2、toll样受体3、toll样受体4、toll样受体5、toll样受体6、toll样受体7、toll样受体8、toll样受体9、toll样受体10、toll样受体11、toll样受体12、toll样受体13或其组合。在一些实施例中，所述方法在体外执行。在一些实施例中，所述方法在体内执行。

[0031] 在一些方面，本公开提供了一种治疗病症的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的本公开的脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNA)或组合物，其中所述施用治疗所述病症。在一些实施例中，所述病症为癌症、传染病、自身免疫性疾病或其组合。

附图说明

[0032] 图1描绘了LNP-SNA的合成。通过乙醇稀释法形成装载有核酸的LNP。将溶解在pH 4.0的10mM柠檬酸钠缓冲液中的DNA或RNA以3:1的体积比混合到含脂质和胆固醇的乙醇中。接下来，将含有脂质-PEG-马来酰亚胺(红色圆圈)的LNP与3'-SH DNA(蓝色)在室温下混合2小时，从而得到LNP-SNA。

[0033] 图2示出了具有包封的mRNA的LNP-SNA的表征。(A)包含3.5％的DOPE、45％的胆固醇、50％的D-Lin-MC3-DMa和1.5％的DMPE-PEG(2000)-马来酰亚胺与包封的Luc2 mRNA的LNP-SNA的三次NanoSight运行的平均值的图。(B)同一SNA的Cryo-TEM图像。

[0034] 图3示出了DNA与LNP的缀合，并证实了LNP-SNA的形成。在室温下振荡2小时后，在TAE缓冲液中运行的1％琼脂糖凝胶证实了T21 DNA与LNP的缀合。将一当量的用Cy5.5标记的T21-SH DNA序列添加到含有3.5mol％C14-PEG(2000)-马来酰亚胺的调配物中。在比游离Cy5.5 DNA(泳道1)的MW更高的MW下存在条带表明它们与脂质-PEG缀合。

[0035] 图4示出了细胞测定中LNP-SNA的活性。(A)在Raw 264.7细胞系中与游离dsDNA混合的B-33LNP-SNA、2'3'-cGAMP和B-33LNP-SNA的IRF3诱导(红色色带代表95％的C.I.，n＝3个生物学上独立的复制品)。(B)与具有包封的siGFP对照的B-35调配物相比，B-35SNA沉默U87-MG-Luc2细胞系中的Luc2表达(24小时，使用CellTiter-Fluor™测定相对于细胞活力归一化，n＝3个生物学上独立的复制品)。(C)与表面没有缀合DNA的等效LNP调配物相比，B-35SNA增强了Luc2基因沉默(24小时，相对于未经处理的细胞发光归一化，单尾学生t检验，*＝$p<0.05$，**＝$p<0.01$，n＝3个生物学上独立的复制品)。

[0036] 图5示出了在C57BL/6小鼠中使用LNP-SNA mRNA递送到主要器官。与等效LNP相比，LNP-SNA增强了肝mRNA表达。通过侧尾静脉施用0.1mg kg^{-1}Luc mRNA后6小时，在采集的器官中检测到发光。LNP-SNA在mRNA表达的背景下表现出器官特异性功能。在施用0.1mg kg^{-1}Luc mRNA后6小时，在采集的器官中检测到发光。(单尾学生t检验，*＝$p<0.05$，每个点代表生物学上独立的复制品，其中每个处理使用4至7个生物学上独立的复制品)。

[0037] 图6示出，LNP-SNA mRNA表达谱为序列依赖性的。(A)通过处理在肝、肺和脾中的荧光素酶(Luc)mRNA。在通过Luc mRNA施用0.1mg kg^{-1}的LNP或LNP-SNA的B-19调配物后6小时，在采集的器官中检测到发光。(B)LNP和T-SNA表现出显著的肝mRNA表达，而G-SNA则没有。(C)G-SNA在脾中表现出的mRNA表达水平与LNP和T-SNA在脾中表现出的mRNA表达水平相当。(T-SNA为用T21-SH DNA功能化的LNP，G-SNA为用(GGT)7-SH DNA序列功能化的LNP，N＝4个生物学上独立的复制品)。

[0038] 图7提供了实例2中所述的Cre系统的描绘。

[0039] 图8示出，用外部(GGT)7DNA序列功能化的LNP-SNA不会引起显著的肝基因组编辑。在注射0.3mg kg^{-1}Cre mRNA后2天，Ai14小鼠的肝流式细胞术数据示出了这一点。(A)内皮细胞中tdTom阳性细胞的确定。(B)肝细胞中的tdTom阳性细胞；(C)肝B细胞中的tdTom阳性细胞；(D)库普弗细胞(Kupffer cell)中的tdTom阳性细胞。

[0040] 图9示出，用GGT序列功能化的LNP-SNA通过Cre mRNA在脾单核细胞中引起基因组编辑。图9描绘了在注射0.3mg kg^{-1}Cre mRNA后2天Ai14小鼠的脾流式细胞术数据。

[0041] 图10描绘了实验结果，示出(GGT)7外部序列和DOPE辅助脂质允许增强LNP-SNA向主要脾细胞类型的递送。

具体实施方式

[0042] 为了治疗疾病，需要将DNA和RNA治疗剂递送到靶组织并提供持久益处，而无副作用。脂质纳米颗粒球形核酸通过使用用于纳米颗粒靶向和组织特异性的DNA和RNA序列来解决这一未满足的需求。与脂质颗粒(装载有核酸)或甚至常规SNA(脂质体和金核)两者相比，脂质SNA结构具有显著不同的生物分布特性。

[0043] 如本文所用，“靶向寡核苷酸”为将LNP-SNA引导到特定组织和/或特定细胞类型的寡核苷酸。在一些实施例中，靶向寡核苷酸为适体。因此，在一些实施例中，本公开的LNP-SNA包括与脂质纳米颗粒核的外部连接的适体，其中所述适体被设计成与某一细胞类型表面上的一个或多个受体结合。在一些实施例中，靶向寡核苷酸包括$(GGT)_n$核苷酸序列或由其组成，其中n为或至少为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更大。在另外的实施例中，靶向寡核苷酸包括$(GGT)_n$核苷酸序列或由其组成，其中n小于2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。在另外的实施例中，靶向寡核苷酸包括$(GGT)_n$核苷酸序列或由其组成，其中n为7。在一些实施例中，靶向寡核苷酸为肽寡核苷酸缀合物或寡核苷酸-小分子缀合物。

[0044] 如本文所用，“免疫刺激性寡核苷酸”为可以刺激(例如，诱导或增强)免疫应答的寡核苷酸。免疫刺激性寡核苷酸的典型实例为含CpG基序的寡核苷酸、单链RNA寡核苷酸、双链RNA寡核苷酸和双链DNA寡核苷酸。“CpG基序”为胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸序列。单链RNA序列可以由toll样受体8和9识别，双链RNA序列可以由toll样受体3识别，并且双链DNA可以由toll样受体3和环状GMP-AMP合酶(cGAS)识别。

[0045] 术语“抑制性寡核苷酸”是指减少蛋白质的产生或表达的寡核苷酸，如通过干扰将mRNA翻译成核糖体中的蛋白质，或与编码一个或多个靶向蛋白的基因或mRNA充分互补的寡核苷酸，所述一个或多个靶向蛋白与一个或多个靶向基因或mRNA特异性结合(杂交)，由此降低靶蛋白的表达或生物活性。抑制性寡核苷酸包含但不限于分离的或合成的短发夹RNA(shRNA或DNA)、反义寡核苷酸(例如，反义RNA或DNA、嵌合反义DNA或RNA)、miRNA和miRNA模拟物、小干扰RNA(siRNA)、先天免疫受体的DNA或RNA抑制剂、适体、酶型DNA或酶型适体。

[0046] 如在本说明书和所附权利要求中所使用的，除非上下文另外明确指示，否则单数形式“一个/一种(a/an)”以及“所述(the)”包含复数指代物。

[0047] 如本文所用，术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”是可互换的。

[0048] 如本文所用，当用于修饰特定值或范围时，术语“约”通常表示在所述值或范围的20％以内，例如在10％、5％、4％、3％、2％或1％以内。

[0049] 除非另有说明，否则本文所考虑的所有范围包含两个端点以及端点之间的所有数字。与范围相关的“约”或“大约”的使用适用于所述范围的两端。因此，“约20至30”旨在涵盖“约20至约30”，至少包含指定的端点。

[0050] 脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNAS)

[0051] 脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNA)包含用寡核苷酸装饰的脂质纳米颗粒核。脂质纳米颗粒核包括包封的寡核苷酸、可电离脂质、磷脂、甾醇和脂质-聚乙二醇(脂质-PEG)缀合物。由于核和壳特性的组合，因此构建体在核酸递送方面具有优于常规脂质体SNA和金SNA的优点，例如但不限于此。寡核苷酸壳中的寡核苷酸可以在各个方向上定向。在一些实施例中，寡核苷酸径向向外定向。寡核苷酸壳包括一个或多个与脂质纳米颗粒核的外表面连接的寡核苷酸。寡核苷酸壳的球形架构赋予优于传统核酸递送方法的独特优势，包含不依赖于转染剂进入几乎所有细胞、对核酸酶降解的抗性、基于序列的功能、靶向和诊断。

[0052] 在一些方面，本公开提供了一种脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNA)，其包括脂质纳米颗粒核和寡核苷酸壳，所述寡核苷酸壳包含与所述脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸，所述脂质纳米颗粒核包括包封的寡核苷酸、可电离脂质、磷脂、甾醇和脂质-聚乙二醇(脂质-PEG)缀合物，其中所述寡核苷酸壳中的至少10％的所述寡核苷酸通过所述脂质-PEG缀合物与所述脂质纳米颗粒核的外部共价连接。在各个实施例中，LNP-SNA包括与所述脂质纳米颗粒核的外部连接的靶向肽、靶向抗体或其组合。此类靶向肽为例如但不限于与靶细胞的表面标志物结合的抗体Fab片段和被设计成在不同pH环境中带电的肽。在各个实施例中，一个或多个基因编辑寡核苷酸被包封于LNP-SNA的脂质纳米颗粒核中。此类基因编辑寡核苷酸为例如但不限于编码基因编辑蛋白的信使RNA(mRNA)、DNA或RNA基因编辑底物(例如，向导RNA)或其组合。

[0053] 因此，所述脂质纳米颗粒核包括包封的寡核苷酸、可电离脂质、磷脂、甾醇和脂质-聚乙二醇(脂质-PEG)缀合物。在一些实施例中，所述可电离脂质为二亚油基甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、C12-200、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)、类似的脂质/类脂结构或其组合。在一些实施例中，所述可电离脂质为二亚油基甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)。在一些实施例中，所述磷脂为1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二(十六酰基)磷脂酰胆碱(DPPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或其组合。在本公开的任何方面或实施例中，所述磷脂为1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。在另外的实施例中，所述甾醇为3β-羟基胆甾-5-烯(胆固醇)、9,10-断胆甾-5,7,10(19)-三烯-3β-醇(维生素D3)、9,10-断麦角甾-5,7,10(19),22-四烯-3β-醇(维生素D2)、钙泊三醇、24-乙基-5,22-胆甾二烯-3β-醇(豆甾醇)、22,23-二氢豆甾醇(β-谷甾醇)、3,28-二羟基-羽扇豆醇(桦木醇)、羽扇豆醇、熊果酸、齐墩果酸、24α-甲基胆固醇(菜油甾醇)、24-乙基胆甾醇-5,24(28)E-二烯-3β-醇(岩藻甾醇)、24-甲基胆甾-5,22-二烯-3β-醇(菜籽甾醇)、24-甲基胆甾-5,7,22-三烯-3β-醇(麦角甾醇)、9,11-去氢麦角甾醇、胡萝卜甾醇或用一个或多个氨基酸修饰的任何前述甾醇。在一些实施例中，所述脂质-聚乙二醇(脂质-PEG)缀合物包括2000道尔顿(Da)聚乙二醇。在另外的实施例中，所述脂质-聚乙二醇(脂质-PEG)缀合物为脂质-PEG-马来酰亚胺。在仍另外的实施例中，所述脂质-PEG-马来酰亚胺为与2000Da聚乙二醇马来酰亚胺缀合的1,2-二棕榈

酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPPE)、与2000Da聚乙二醇马来酰亚胺缀合的1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DMPE)或其组合。

[0054] LNP-SNA的大小的范围可以为约1纳米(nm)至约500nm、约1nm至约400nm、约1nm至约300nm、约1nm至约200nm、约1nm至约150nm、约1nm至约100nm、约1nm至约90nm，直径为约1nm至约80nm，直径为约1nm至约70nm，直径为约1nm至约60nm，直径为约1nm至约50nm，直径为约1nm至约40nm，直径为约1nm至约30nm，直径为约1nm至约20nm，直径为约1nm至约10nm，直径为约10nm至约150nm，直径为约10nm至约140nm，直径为约10nm至约130nm，直径为约10nm至约120nm，直径为约10nm至约110nm，直径为约10nm至约100nm，直径为约10nm至约90nm，直径为约10nm至约80nm，直径为约10nm至约70nm，直径为约10nm至约60nm，直径为约10nm至约50nm，直径为约10nm至约40nm，直径为约10nm至约30nm或直径为约10nm至约20nm。在一些实施例中，所述LNP-SNA的直径为、至少为或小于约100nm、90nm、80nm、70nm、60nm、50nm、40nm、30nm、20nm或10nm(或当存在多个LNP-SNA时的平均直径)。在一些实施例中，所述多个LNP-SNA的大小为约10nm至约150nm(平均直径)，平均直径为约10nm至约140nm，平均直径为约10nm至约130nm，平均直径为约10nm至约120nm，平均直径为约10nm至约110nm，平均直径为约10nm至约100nm，平均直径为约10nm至约90nm，平均直径为约10nm至约80nm，平均直径为约10nm至约70nm，平均直径为约10nm至约60nm，平均直径为约10nm至约50nm，平均直径为约10nm至约40nm，平均直径为约10nm至约30nm，平均直径为约10nm至约20nm，平均直径为约40nm至约150nm，平均直径为约40nm至约100nm，平均直径为约40nm至约90nm，平均直径为约40nm至约80nm，平均直径为约50nm至约200nm，平均直径为约50nm至约150nm，平均直径为约50nm至约100nm，平均直径为约50nm至约90nm或平均直径为约50nm至约80nm。在一些实施例中，所述LNP-SNA的直径(或多个LNP-SNA的平均直径)为约40nm至约150nm、约50至约200nm或约40至约100nm。在一些实施例中，方法中使用的纳米颗粒的大小根据其特定用途或应用的需要而变化。大小的变化有利地用于优化LNP-SNA的某些物理特性，例如，如本文所述的寡核苷酸可以连接到的表面积的量。应当理解，LNP-SNA的前述直径可以适用于脂质纳米颗粒核本身的直径，或者适用于脂质纳米颗粒核和与其连接的寡核苷酸壳的直径。

[0055] 寡核苷酸

[0056] 本公开提供了脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNA)，其包括脂质纳米颗粒核和寡核苷酸壳，所述寡核苷酸壳与所述脂质纳米颗粒核的外部连接。如本文所述，所述脂质纳米颗粒核包括包封的寡核苷酸。在本公开的任何方面或实施例中，寡核苷酸包括$(GGT)_n$核苷酸序列或由其组成，其中n为或至少为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更大。在另外的实施例中，靶向寡核苷酸包括$(GGT)_n$核苷酸序列或由其组成，其中n小于2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。在另外的实施例中，寡核苷酸包括$(GGT)_n$核苷酸序列或由其组成，其中n为7。在各个实施例中，$(GGT)_n$序列位于寡核苷酸的5'端或3'端上。在各个实施例中，$(GGT)_n$序列位于纳米颗粒核的近侧或远侧。在各个实施例中，$(GGT)_n$序列位于与纳米颗粒核连接的寡核苷酸端上，$(GGT)_n$序列位于未与纳米颗粒核连接的寡核苷酸端上或两者。在各个实施例中，寡核苷酸壳包括抑制性寡核苷酸、免疫刺激性寡核苷酸、靶向寡核苷酸或其组合。在各个实施例中，本公开的寡核苷酸包含DNA寡核苷酸、RNA寡核苷酸、其经修饰形式或其组合。在本文所述的任何方面或实施例中，寡核苷酸为单链、双链或部分双链。在本公开的任何方面或实施例中，寡核苷酸包括可检测标志物。

[0057] 如本文所述,本公开还考虑了寡核苷酸的经修饰形式,所述经修饰形式包含具有至少一个经修饰的核苷酸间键的寡核苷酸。在一些实施例中,所述寡核苷酸全部或部分为肽核酸。其它经修饰的核苷酸间键包含至少一个硫代磷酸酯键。仍其它经修饰的寡核苷酸包含包括一个或多个通用碱基的寡核苷酸。“通用碱基”是指能够通过形成氢键取代与核酸中的A、C、G、T和U中的任何一个结合而不引起显著的结构不稳定的分子。并入有通用碱基类似物的寡核苷酸能够起到例如杂交中的探针的作用。通用碱基的实例包含但不限于5’-硝基吲哚-2’-脱氧核糖核苷、3-硝基吡咯、肌苷和次黄嘌呤。

[0058] 如本文所用,术语“核苷酸”或其复数可与如本文所讨论的以及本领域在其它方面已知的经修饰的形式互换。如本文所用,术语“核碱基”或其复数可与如本文所讨论的以及本领域在其它方面已知的经修饰的形式互换。核苷酸或核碱基包括天然存在的核碱基A、G、C、T和U。非天然存在的核碱基包含例如但不限于黄嘌呤、二氨基嘌呤、8-氧代-N6-甲基腺嘌呤、7-脱氮黄嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、N4,N4-乙醇胞嘧啶、N’,N’-乙醇-2,6-二氨基嘌呤、5-甲基胞嘧啶(mC)、5-(C3-C6)-炔基-胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、假异胞嘧啶、2-羟基-5-甲基-4-三唑并吡啶、异胞嘧啶、异鸟嘌呤、肌苷和以下中描述的“非天然存在的”核碱基:Benner等人,美国专利第5,432,272号以及Susan M.Freier和Karl-Heinz Altmann,1997,《核酸研究(Nucleic Acids Research)》,第25卷:第4429-4443页。术语“核碱基”还不仅包含已知的嘌呤和嘧啶杂环,还包含其杂环类似物和互变异构体。另外的天然和非天然存在的核碱基包含以下中公开的核碱基:美国专利第3,687,808号(Merigan等人);Sanghvi,《反义研究与应用(Research and Application)》,S.T.Crooke和B.Lebleu编辑,CRC出版社(CRC Press),1993,第15章;Englisch等人,1991,《德国应用化学(Angewandte Chemie)》,国际版,30:613-722(尤其参见第622页和第623页以及《聚合物科学和工程化简明百科全书(Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering)》,J.I.Kroschwitz编辑,约翰威利父子出版公司(John Wiley&Sons),1990,第858-859页,Cook,《抗癌药物设计(Anti-Cancer Drug Design)》1991,6,585-607,所述文献中的每一个特此以全文引用的方式并入)。在各个方面,寡核苷酸还包含作为一种类别的非天然存在的核苷酸的一个或多个“核苷碱基”或“碱基单元”,其包含如杂环化合物等可以如核碱基一样发挥作用的化合物,所述化合物包含在最经典的意义上不是核苷碱基但用作核苷碱基的某些“通用碱基”。通用碱基包含3-硝基吡咯、任选地经取代的吲哚(例如,5-硝基吲哚)和任选地经取代的次黄嘌呤。其它期望的通用碱基包含吡咯、二唑或三唑衍生物,包含本领域已知的那些通用碱基。

[0059] 寡核苷酸的实例包含含有经修饰的骨架或非天然核苷酸间键的寡核苷酸。具有经修饰的骨架的寡核苷酸包含在所述骨架中保留磷原子的寡核苷酸以及在所述骨架中不具有磷原子的寡核苷酸。在其核苷间骨架中不具有磷原子的经修饰的寡核苷酸被视为在“寡核苷酸”的含义内。

[0060] 含有磷原子的经修饰的寡核苷酸骨架包含例如硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其它烷基膦酸酯(包含3’-亚烷基膦酸酯、5’-亚烷基膦酸酯以及手性膦酸酯、亚膦酸酯)、磷酰胺酯(包含3’-氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酰胺酯、硫代羰基磷酰胺酯、硫代烷基膦酸酯、硫代羰基烷基磷酸三酯、硒磷酸酯和具有正常3’-5’键的硼烷磷酸酯、这些酯的2’-5’连接的类似物和具有反向极性的那些酯,其中一个或多个核苷酸间键为3’到3’、5’到5’或2’到2’键。还考虑了具有反向极性的在3’-

最核苷酸间键处包括单个3'到3'键的寡核苷酸，即可以为无碱基的单个反向核苷残基(核苷酸丢失或具有代替其的羟基)。也考虑了盐、混合盐和游离酸形式。教导以上含磷键的制备的代表性美国专利包含美国专利第3,687,808号；第4,469,863号；第4,476,301号；第5,023,243号；第5,177,196号；第5,188,897号；第5,264,423号；第5,276,019号；第5,278,302号；第5,286,717号；第5,321,131号；第5,399,676号；第5,405,939号；第5,453,496号；第5,455,233号；第5,466,677号；第5,476,925号；第5,519,126号；第5,536,821号；第5,541,306号；第5,550,111号；第5,563,253号；第5,571,799号；第5,587,361号；第5,194,599号；第5,565,555号；第5,527,899号；第5,721,218号；第5,672,697号；以及第5,625,050号，所述美国专利的公开内容通过引用并入本文。

[0061] 其中不包含磷原子的经修饰的寡核苷酸骨架具有由以下形成的骨架：短链烷基或环烷基核苷间键、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键。这些骨架包含具有吗啉代键的骨架；硅氧烷骨架；硫化物、亚砜和砜骨架；甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架；亚甲基甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架；核糖乙酰基骨架；含烯烃的骨架；氨基磺酸酯骨架；亚甲基亚氨基和亚甲基肼基骨架；磺酸酯和磺酰胺骨架；酰胺骨架；以及其它具有混合的N、O、S和CH_2组分部分的骨架。参见例如美国专利第5,034,506号；第5,166,315号；第5,185,444号；第5,214,134号；第5,216,141号；第5,235,033号；第5,264,562号；第5,264,564号；第5,405,938号；第5,434,257号；第5,466,677号；第5,470,967号；第5,489,677号；第5,541,307号；第5,561,225号；第5,596,086号；第5,602,240号；第5,610,289号；第5,602,240号；第5,608,046号；第5,610,289号；第5,618,704号；第5,623,070号；第5,663,312号；第5,633,360号；第5,677,437号；第5,792,608号；第5,646,269号；以及第5,677,439号，所述美国专利的公开内容以全文引用的方式并入本文。

[0062] 在仍另外的实施例中，寡核苷酸模拟物，其中核苷酸单元的一个或多个糖和/或一个或多个核苷酸间键两者都被“非天然存在的”基团替代。维持寡核苷酸的碱基以进行杂交。在一些方面，此实施例考虑了肽核酸(PNA)。在PNA化合物中，寡核苷酸的糖骨架被含酰胺的骨架替代。参见例如美国专利第5,539,082号；第5,714,331号；和第5,719,262号；以及Nielsen等人，1991，《科学(Science)》254:1497-1500，其公开内容通过引用并入本文。

[0063] 在仍另外的实施例中，寡核苷酸提供有硫代磷酸酯骨架和具有杂原子骨架并且包含以下的寡核苷：美国专利第5,489,677号和第5,602,240号中描述的-CH_2-NH-O-CH_2-、-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-、-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-、-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-和-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-。还考虑了美国专利第5,034,506号中描述的具有吗啉代骨架结构的寡核苷酸。

[0064] 在各种形式中，寡核苷酸中的两个连续单体之间的键由选自以下的2个至4个，期望地3个基团/原子组成：-CH_2-、-O-、-S-、-NR^H-、>C=O、>C=NR^H、>C=S、-Si(R″)$_2$-、-SO-、-S(O)$_2$-、-P(O)$_2$-、-PO(BH_3)-、-P(O,S)-、-P(S)$_2$-、-PO(R″)-、-PO(OCH_3)-和-PO(NHR^H)-，其中R^H选自氢和C_{1-4}-烷基，并且R”选自C_{1-6}-烷基和苯基。此类键的说明性实例为-CH_2-CH_2-CH_2-、-CH_2-CO-CH_2-、-CH_2-CHOH-CH_2-、-O-CH_2-O-、-O-CH_2-CH_2-、-O-CH_2-CH=(当用作后续单体的键时包含R^5)、-CH_2-CH_2-O-、-NR^H-CH_2-CH_2-、-CH_2-CH_2-NR^H-、-CH_2-NR^H-CH_2-、-O-CH_2-CH_2-NR^H-、-NR^H-CO-O-、-NR^H-CO-NR^H-、-NR^H-CS-NR^H-、-NR^H-C(=NR^H)-NR^H-、-NR^H-CO-CH_2-NR^H-O-CO-O-、-O-CO-CH_2-O-、-O-CH_2-CO-O-、-CH_2-CO-NR^H-、-O-CO-NR^H-、-NR^H-CO-CH_2-、-O-CH_2-CO-NR^H-、-O-CH_2-CH_2-NR^H-、-CH=N-O-、-CH_2-NR^H-O-、-CH_2-O-N=(当用作后续单体的键时包含R^5)、-CH_2-

O-NR^H-、-CO-NR^H-CH_2-、-CH_2-NR^H-O-、-CH_2-NR^H-CO-、-O-NR^H-CH_2-、-O-NR^H、-O-CH_2-S-、-S-CH_2-O-、-CH_2-CH_2-S-、-O-CH_2-CH_2-S-、-S-CH_2-CH＝(当用作后续单体的键时包含R^5)、-S-CH_2-CH_2-、-S-CH_2-CH_2--O-、-S-CH_2-CH_2-S-、-CH_2-S-CH_2-、-CH_2-SO-CH_2-、-CH_2-SO_2-CH_2-、-O-SO-O-、-O-S(O)$_2$-O-、-O-S(O)$_2$-CH_2-、-O-S(O)$_2$-NR^H-、-NR^H-S(O)$_2$-CH_2-;-O-S(O)$_2$-CH_2-、-O-P(O)$_2$-O-、-O-P(O,S)-O-、-O-P(S)$_2$-O-、-S-P(O)$_2$-O-、-S-P(O,S)-O-、-S-P(S)$_2$-O-、-O-P(O)$_2$-S-、-O-P(O,S)-S-、-O-P(S)$_2$-S-、-S-P(O)$_2$-S-、-S-P(O,S)-S-、-S-P(S)$_2$-S-、-O-PO(R")-O-、-O-PO(OCH_3)-O-、-O-PO(OCH_2CH_3)-O-、-O-PO(OCH_2CH_2S-R)-O-、-O-PO(BH_3)-O-、-O-PO(NHR^N)-O-、-O-P(O)$_2$-NR^H H-、-NR^H-P(O)$_2$-O-、-O-P(O,NR^H)-O-、-CH_2-P(O)$_2$-O-、-O-P(O)$_2$-CH_2-和-O-Si(R")$_2$-O-;其中考虑了-CH_2-CO-NR^H-、-CH_2-NR^H-O-、-S-CH_2-O-、-O-P(O)$_2$-O-O-P(-O,S)-O-、-O-P(S)$_2$-O-、-NR^H P(O)$_2$-O-、-O-P(O,NR^H)-O-、-O-PO(R")-O-、-O-PO(CH_3)-O-和-O-PO(NHR^N)-O-,其中R^H选自氢和C_{1-4}-烷基,并且R"选自C_{1-6}-烷基和苯基。另外的说明性实例在以下中给出:Mesmaeker等人,《结构生物学最新观点(Current Opinion in Structural Biology)》1995,5:343-355;以及Susan M.Freier和Karl-Heinz Altmann,《核酸研究》1997,第25卷,第4429-4443页。

[0065] 美国专利申请第20040219565号中详细描述了寡核苷酸的仍其它经修饰的形式,所述美国专利申请的公开内容以全文引用的方式并入本文。

[0066] 经修饰的寡核苷酸还可以含有一个或多个经取代的糖部分。在某些方面,寡核苷酸包括位于2'位置处的以下之一:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基;其中烷基、烯基和炔基可以为经取代的或未经取代的C_1至C_{10}烷基或C_2至C_{10}烯基和炔基。其它实施例包含O[$(CH_2)_n$O]$_m$$CH_3$、O$(CH_2)_n$$OCH_3$、O$(CH_2)_n$$NH_2$、O$(CH_2)_n$$CH_3$、O$(CH_2)_n$$ONH_2$和O$(CH_2)_n$ON[$(CH_2)_n$$CH_3$]$_2$,其中n和m为1至约10。其它寡核苷酸包括位于2'位置处的以下之一:C_1至C_{10}低级烷基、经取代的低级烷基、烯基、炔基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH_3、OCN、Cl、Br、CN、CF_3、OCF_3、$SOCH_3$、SO_2CH_3、ONO_2、NO_2、N_3、NH2、杂环烷基、杂环烷芳基、氨烷基氨基、聚烷基氨基、经取代的甲硅烷基或RNA切割基团。一方面,修饰包含2'-甲氧基乙氧基(2'-O-$CH_2CH_2OCH_3$,也被称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(Martin等人,《瑞士化学学报(Helv.Chim.Acta)》,1995,78,486-504),即烷氧基烷氧基。其它修饰包含2'-二甲基氨基氧基乙氧基,即O$(CH_2)_2$ON$(CH_3)_2$基团,也被称为2'-DMAOE,以及2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(在本领域中也被称为2'-O-二甲基-氨基-乙氧基-乙基或2'-DMAEOE),即2'-O-CH_2-O-CH_2-N$(CH_3)_2$。

[0067] 仍其它修饰包含2'-甲氧基(2'-O-CH_3)、2'-氨基丙氧基(2'-O$CH_2CH_2CH_2NH_2$)、2'-烯丙基(2'-CH_2-CH＝CH_2)、2'-O-烯丙基(2'-O-CH_2-CH＝CH_2)和2'-氟(2'-F)。2'-修饰可以处于阿拉伯糖(上)位置或核糖(下)位置中。一方面,2'-阿拉伯糖修饰为2'-F。类似修饰也可以在寡核苷酸的其它位置处进行,例如,在3'末端核苷酸上的糖的3'位置处或在2'-5'连接的寡核苷酸中以及5'末端核苷酸的5'位置中。寡核苷酸还可以具有糖模拟物,如替代戊呋喃糖基糖的环丁基部分。参见例如美国专利第4,981,957号;第5,118,800号;第5,319,080号;第5,359,044号;第5,393,878号;第5,446,137号;第5,466,786号;第5,514,785号;第5,519,134号;第5,567,811号;第5,576,427号;第5,591,722号;第5,597,909号;第5,610,300号;第5,627,053号;第5,639,873号;第5,646,265号;第5,658,873号;第5,670,633号;第5,792,747号;以及第5,700,920号,所述美国专利的公开内容以全文引用的方式并入。

[0068] 在一些方面，糖的修饰包含锁核酸(LNA)，其中2'-羟基与糖环的3'或4'碳原子连接，由此形成双环糖部分。在某些方面，所述键为桥接2'氧原子和4'碳原子的亚甲基(-CH_2-)$_n$基团，其中n为1或2。LNA和其制备描述于WO 98/39352和WO 99/14226中。

[0069] 经修饰的核苷酸描述于EP 1 072 679和WO 97/12896号中，其公开内容通过引用并入本文中。经修饰的核碱基包含但不限于5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基以及其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基以及其它烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶以及2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶以及嘧啶碱基的其它炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤基、8-氨基、8-硫基、8-硫烷基、8-羟基以及其它经8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤基，尤其是5-溴、5-三氟甲基以及其它经5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基-腺嘌呤、8-氮鸟嘌呤和8-氮腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。经进一步修饰的碱基包含三环嘧啶，如吩噁嗪胞苷(1H-嘧啶[5,4-b][1,4]苯并噁嗪-2(3H)-酮)、吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮)、G-clamps，如经取代的吩噁嗪胞苷(例如，9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并-嗪-2(3H)-酮)、咔唑胞苷(2H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-2-酮)、吡啶并吲哚胞苷(H-吡啶并[3',2':4,5]吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-酮)。经修饰的碱基还可以包含其中嘌呤或嘧啶碱基被其它杂环置换的碱基，例如7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、2-氨基吡啶和2-吡啶酮。另外的核碱基包含美国专利第3,687,808号中公开的核碱基、在《聚合物科学和工程化简明百科全书》第858-859页，Kroschwitz,J.I.编辑，约翰威利父子出版公司，1990中公开的核碱基、在Englisch等人，1991，《德国应用化学》，国际版，30:613中公开的核碱基以及在Sanghvi,Y.S.，第15章，《反义研究与应用》，第289-302页，Crooke,S.T.和Lebleu,B.编辑，CRC出版社，1993中公开的核碱基。这些碱基中的某些碱基可用于增加结合亲和力并且包含经5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和经N-2、N-6和O-6取代的嘌呤，包含2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。已经示出5-甲基胞嘧啶取代将核酸双链体稳定性提高0.6-1.2℃并且在某些方面与2'-O-甲氧基乙基糖修饰结合。参见美国专利第3,687,808号、美国专利第4,845,205号；第5,130,302号；第5,134,066号；第5,175,273号；第5,367,066号；第5,432,272号；第5,457,187号；第5,459,255号；第5,484,908号；第5,502,177号；第5,525,711号；第5,552,540号；第5,587,469号；第5,594,121号；第5,596,091号；第5,614,617号；第5,645,985号；第5,830,653号；第5,763,588号；第6,005,096号；第5,750,692号；以及第5,681,941号，所述美国专利的公开内容通过引用并入本文中。

[0070] 制备预定序列的多核苷酸的方法是众所周知的。参见例如Sambrook等人，《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:ALaboratory Manual)》(第2版1989)和F.Eckstein(编辑)《寡核苷酸和类似物(Oligonucleotides and Analogues)》，第1版(纽约的牛津大学出版社(Oxford University Press,New York)，1991)。固相合成方法对于多核糖核苷酸和多脱氧核糖核苷酸两者均为优选的(合成DNA的众所周知的方法也可用于合成RNA)。多核糖核苷酸也可以以酶方式制备。也可以将非天然存在的核碱基并入到多核苷酸中。参见例如美国专利第7,223,833号；Katz，《美国化学学会杂志(J.Am.Chem.Soc.)》，74:2238(1951)；Yamane等人，《美国化学学会杂志》，83:2599(1961)；Kosturko等人，《生物化学

(Biochemistry)》,13:3949(1974);Thomas,《美国化学学会杂志》,76:6032(1954);Zhang等人,《美国化学学会杂志》,127:74-75(2005);以及Zimmermann等人,《美国化学学会杂志》,124:13684-13685(2002)。

[0071] 在各个方面,本公开的寡核苷酸(例如,寡核苷酸壳中的寡核苷酸或包封的寡核苷酸)或其经修饰形式的长度通常为约10个核苷酸至约100个核苷酸。更具体地,本公开的寡核苷酸的长度为约5个至约90个核苷酸,长度为约5个至约80个核苷酸,长度为约5个至约70个核苷酸,长度为约5个至约60个核苷酸,长度为约5个至约50个核苷酸,长度为约5个至约45个核苷酸,长度为约5个至约40个核苷酸,长度为约5个至约35个核苷酸,长度为约5个至约30个核苷酸,长度为约5个至约25个核苷酸,长度为约5个至约20个核苷酸,长度为约5个至约15个核苷酸,长度为约5个至约10个核苷酸,长度为约10个至约90个核苷酸,长度为约10个至约80个核苷酸,长度为约10个至约70个核苷酸,长度为约10个至约60个核苷酸,长度为约10个至约50个核苷酸,长度为约10个至约45个核苷酸,长度为约10个至约40个核苷酸,长度为约10个至约35个核苷酸,长度为约10个至约30个核苷酸,长度为约10个至约25个核苷酸,长度为约10个至约20个核苷酸,长度为约10个至约15个核苷酸,长度为约18个至约28个核苷酸,长度为约15个至约26个核苷酸,并且具体地公开了大小长度居中的所有寡核苷酸,达到寡核苷酸能够实现期望结果的程度。在另外的实施例中,本公开的寡核苷酸(例如,包封的寡核苷酸)的长度为约5个核苷酸至约5000个核苷酸。在另外的实施例中,本公开的寡核苷酸的长度为约5个至约4000个核苷酸,长度为约5个至约3500个核苷酸,长度为约5个至约3000个核苷酸,长度为约5个至约2500个核苷酸,长度为约5个至约2000个核苷酸,长度为约5个至约1500个核苷酸,长度为约5个至约1000个核苷酸,长度为约5个至约900个核苷酸,长度为约5个至约800个核苷酸,长度为约5个至约700个核苷酸,长度为约5个至约600个核苷酸,长度为约5个至约500个核苷酸,长度为约5个至约450个核苷酸,长度为约5个至约400个核苷酸,长度为约5个至约350个核苷酸,长度为约5个至约300个核苷酸,长度为约5个至约250个核苷酸,长度为约5个至约200个核苷酸,长度为约5个至约150个核苷酸,长度为约5个至约100个核苷酸,长度为约5个至约90个核苷酸,长度为约5个至约80个核苷酸,长度为约5个至约70个核苷酸,长度为约5个至约60个核苷酸,长度为约5个至约50个核苷酸,长度为约5个至约40个核苷酸,长度为约5个至约30个核苷酸,长度为约5个至约20个核苷酸,长度为约5个至约10个核苷酸,并且具体地公开了大小长度居中的所有寡核苷酸,达到寡核苷酸能够实现期望结果的程度。因此,在各个实施例中,本公开的寡核苷酸的长度为或至少为5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个、100个、200个、300个、400个、500个、600个、700个、800个、900个、1000个、1200个、1500个、1700个、2000个、2500个、3000个、3500个、4000个、4500个、5000个或更多个核苷酸。在另外的实施例中,本公开的寡核苷酸的长度少于6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26

个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个、100个、200个、300个、400个、500个、600个、700个、800个、900个、1000个、1500个、2000个、2500个、3000个、3500个、4000个、4500个、5000个或更多个核苷酸。在各个实施例中，与LNP-SNA的脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸壳包括多个寡核苷酸，所述多个寡核苷酸全部具有相同长度/序列，而在一些实施例中，所述多个寡核苷酸包括一个或多个寡核苷酸，所述一个或多个寡核苷酸相对于所述多个寡核苷酸中的至少一个其它寡核苷酸具有不同的长度和/或序列。在各个实施例中，脂质纳米颗粒核包括包封于其中的多个寡核苷酸，所述多个寡核苷酸全部具有相同长度/序列，而在一些实施例中，所述脂质纳米颗粒核包括包封于其中的多个寡核苷酸，所述多个寡核苷酸包括一个或多个寡核苷酸，所述一个或多个寡核苷酸相对于所述多个寡核苷酸中的至少一个其它寡核苷酸具有不同的长度和/或序列。例如但不限于，在一些实施例中，脂质纳米颗粒核包括编码基因编辑核酸内切酶(例如，cas9)的mRNA，其与包封于其中用于基因编辑的底物向导RNA结合。

[0072] 在一些实施例中，寡核苷酸(例如，寡核苷酸壳中的寡核苷酸和/或包封于脂质纳米颗粒中的寡核苷酸)为适体。因此，本文所述的寡核苷酸的所有特征和方面(例如，长度、类型(DNA、RNA、其经修饰形式)、间隔子的任选存在)也适用于适体。适体为寡核苷酸序列，所述寡核苷酸序列可以被演化以与各种所关注的目标分析物结合。适体可以为单链、双链或部分双链。

[0073] 将如本文所述的可检测标志物(例如，荧光团、放射性标记)和治疗剂(例如，抗体)与寡核苷酸连接的方法是本领域已知的。

[0074] 在各个方面，本公开的LNP-SNA具有与多个靶标(例如，多核苷酸、蛋白质)结合的能力。在一些实施例中，LNP-SNA进一步包括一个或多个寡核苷酸，所述一个或多个寡核苷酸为本文所述的抑制性寡核苷酸。在各个实施例中，此类抑制性寡核苷酸存在于与脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸壳中、包封于脂质纳米颗粒核中或两者。因此，在一些实施例中，本公开的LNP-SNA包括一个或多个寡核苷酸，所述一个或多个寡核苷酸具有与靶多核苷酸充分互补的序列以在所使用的条件下杂交。在一些实施例中，LNP-SNA包括两个或更多个不相同的寡核苷酸，即，至少一个寡核苷酸与至少一个其它寡核苷酸的不同之处在于其具有不同的长度和/或不同的序列。例如，如果靶向特异性多核苷酸，则单个LNP-SNA具有与同一靶标的多个拷贝结合的能力。在一些实施例中，单个LNP-SNA具有与不同靶标结合的能力。因此，在各个方面，单个LNP-SNA可以在用于抑制多于一种基因产物表达的方法中使用。因此，在各个实施例中，寡核苷酸用于靶向特异性多核苷酸，无论是在靶多核苷酸中的一个或多个特异性区处，还是在靶多核苷酸的整个长度上，根据需要可以实现所期望水平的基因表达抑制。

[0075] 在一些实施例中，LNP-SNA进一步包括一个或多个寡核苷酸，所述一个或多个寡核苷酸为如本文所述的免疫刺激性寡核苷酸。在各个实施例中，此类免疫刺激性寡核苷酸存在于与脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸壳中、包封于脂质纳米颗粒核中或两者。因

此，在本公开的各个方面和实施例中，本公开的LNP-SNA具有免疫刺激活性、基因表达抑制活性或两者。在本公开的任何方面或实施例中，免疫刺激性寡核苷酸为含CpG基序的寡核苷酸。在各个实施例中，含CpG基序的寡核苷酸为A类CpG寡核苷酸、B类CpG寡核苷酸或C类CpG寡核苷酸。在各个实施例中，LNP-SNA包括抑制性寡核苷酸、免疫刺激性寡核苷酸、靶向寡核苷酸或其混合物。

[0076] 脂质纳米颗粒表面/包封密度：足以使纳米颗粒稳定的表面密度和获得纳米颗粒和寡核苷酸的期望组合的表面密度所需的条件可以凭经验确定。通常，本公开的寡核苷酸以至少约2pmole/cm^2的表面密度与脂质纳米颗粒核的外部连接。在一些方面，表面密度为约或至少为约15pmol/cm^2。还提供了方法，其中寡核苷酸以以下表面密度与脂质纳米颗粒核的外部结合：至少2pmol/cm^2、至少3pmol/cm^2、至少4pmol/cm^2、至少5pmol/cm^2、至少6pmol/cm^2、至少7pmol/cm^2、至少8pmol/cm^2、至少9pmol/cm^2、至少10pmol/cm^2、至少约15pmol/cm2、至少约19pmol/cm^2、至少约20pmol/cm^2、至少约25pmol/cm^2、至少约30pmol/cm^2、至少约35pmol/cm^2、至少约40pmol/cm^2、至少约45pmol/cm^2、至少约50pmol/cm^2、至少约55pmol/cm^2、至少约60pmol/cm^2、至少约65pmol/cm^2、至少约70pmol/cm^2、至少约75pmol/cm^2、至少约80pmol/cm^2、至少约85pmol/cm^2、至少约90pmol/cm^2、至少约95pmol/cm^2、至少约100pmol/cm^2、至少约125pmol/cm^2、至少约150pmol/cm^2、至少约175pmol/cm^2、至少约200pmol/cm^2、至少约250pmol/cm^2、至少约300pmol/cm^2、至少约350pmol/cm^2、至少约400pmol/cm^2、至少约450pmol/cm^2、至少约500pmol/cm^2、至少约550pmol/cm^2、至少约600pmol/cm^2、至少约650pmol/cm^2、至少约700pmol/cm^2、至少约750pmol/cm^2、至少约800pmol/cm^2、至少约850pmol/cm^2、至少约900pmol/cm^2、至少约950pmol/cm^2、至少约1000pmol/cm^2或更大。可替代地，与脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸的密度是通过与LNP-SNA连接的寡核苷酸的数量来测量的。关于与LNP-SNA连接的寡核苷酸的表面密度，经考虑，如本文所述的LNP-SNA包括与脂质纳米颗粒核的外部连接的约1个至约2,500个、或约或约1个至约1,000个、或约1个至约500个寡核苷酸。在各个实施例中，LNP-SNA包括与脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸壳中约10个至约500个、或约10个至约450个、或约10个至约400个、或约10个至约300个、或约10个至约200个、或约10个至约190个、或约10个至约180个、或约10个至约170个、或约10个至约160个、或约10个至约150个、或约10个至约140个、或约10个至约130个、或约10个至约120个、或约10个至约110个、或约10个至约100、或10个至约90个、或约10个至约80个、或约10个至约70个、或约10个至约60个、或约10个至约50个、或约10个至约40个、或约10个至约30个或约10个至约20个寡核苷酸。在一些实施例中，LNP-SNA包括与脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸壳中约80个至约500个或约80个至约400个寡核苷酸。在另外的实施例中，LNP-SNA包括与脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸壳中至少约5个、10个、20个、30个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、105个、110个、115个、120个、125个、130个、135个、140个、145个、150个、155个、160个、165个、170个、175个、180个、185个、190个、195个、200个、250个、300个、350个、400个、450个、500个、550个、600个、650个、700个、750个、800个、850个、900个、950个或1000个寡核苷酸。在另外的实施例中，LNP-SNA包括与脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸壳中1个、2个、3个、4个、5个、10个、20个、30个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、105个、110个、115个、120个、125个、127个、

130个、135个、140个、145个、150个、155个、160个、165个、170个、175个、180个、185个、190个、195个、200个、300个、400个、500个、600个、700个、800个、900个或1000个寡核苷酸或由其组成。在仍另外的实施例中，与LNP-SNA的脂质纳米颗粒核连接的寡核苷酸壳包括2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、50个、100个、200个、300个、400个、500个或更多个寡核苷酸。在一些实施例中，与LNP-SNA的脂质纳米颗粒核连接的寡核苷酸壳包括约400个寡核苷酸。在一些实施例中，与LNP-SNA的脂质纳米颗粒核连接的寡核苷酸壳包括约或至少约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、100个、150个、200个、250个、300个、350个、400个、450个、500个、550个、600个或更多个寡核苷酸或由其组成。在各个实施例中，约2个至约1000个、或约2个至约500个寡核苷酸、或约100个至约1000个寡核苷酸、或约50个至约1000个寡核苷酸、或约100个至约500个寡核苷酸与脂质纳米颗粒核的外表面连接。在仍另外的实施例中，约10个至约1000个、或约10个至约750个、或约10个至约500个、或约10个至约400个、或约10个至约250个、或约10个至约100个、或约50个至约1000个、或约50个至约750个、或约50个至约500个、或约50个至约250个、或约100个至约1000个、或约100个至约500个、或约2个至约90个、或约2个至约80个、或约2个至约70个、或约2个至约60个、或约2个至约50个、或约2个至约40个、或约2个至约30个、或约2个至约20个、或约2个至约10个、或约10个至约100个、或约10个至约90个、或约10个至约80个、或约10个至约70个、或约10个至约60个、或约10个至约50个、或约10个至约40个、或约10个至约30个、或约10个至约20个、或约20个至约100个、或约20个至约90个、或约20个至约80个、或约20个至约70个、或约20个至约60个、或约20个至约50个、或约20个至约40个、或约20个至约30个寡核苷酸与脂质纳米颗粒核的外表面连接。在仍另外的实施例中，至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个寡核苷酸与脂质纳米颗粒核的外部连接。关于包封于脂质纳米颗粒核中的寡核苷酸的密度，经考虑，如本文所述的LNP-SNA包括约1个至约250个、约1个至约220个、约1个至约200个、约1个至约150个、约1个至约120个、约1个至约100个、约1个至约90个、约1个至约80个、约1个至约70个、约1个至约60个、约1个至约50个、约1个至约40个、约1个至约30个、约1个至约20个、约1个至约10个或约1个至约5个包封于脂质纳米颗粒核中的寡核苷酸。在另外的实施例中，本公开的LNP-SNA包括约10个至约250个、约10个至约220个、约10个至约200个、约10个至约150个、约10个至约120个、约10个至约100个、约10个至约90个、约10个至约80个、约10个至约70个、约10个至约60个、约10个至约50个、约10个至约40个、约10个至约30个或约10个至约20个包封于脂质纳米颗粒核中的寡核苷酸。在另外的实施例中，本公开的LNP-SNA包括约或至少约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、100个、120个、150个、170个、200个、220个、250个或更多个包封于脂质纳米颗粒核中的寡核苷酸或由其组成。在另外的实施例中，本公开的LNP-SNA包括少于2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、100个、120个、150个、170个、200个、220个或250个包封于

脂质纳米颗粒核中的寡核苷酸。

[0077] 间隔子:在一些方面,寡核苷酸通过间隔子(并且在一些实施例中,另外通过接头)与脂质纳米颗粒核连接。如本文所用,"间隔子"意指用于增加纳米颗粒与寡核苷酸之间的距离,或当以多个拷贝与纳米颗粒连接时增加单独寡核苷酸之间的距离的部分。因此,无论寡核苷酸具有相同的序列还是不同的序列,考虑间隔子定位于串联的单独寡核苷酸之间。

[0078] 在一些方面,当存在时,间隔子为有机部分。在一些方面,间隔子为聚合物,包含但不限于水溶性聚合物、核酸、多肽、寡糖、碳水化合物、脂质、乙二醇或其组合。在本公开的任何方面或实施例中,间隔子为基于低聚(乙二醇)的间隔子。在各个实施例中,寡核苷酸包括1、2、3、4、5或更多个间隔子(例如,间隔子-18(六乙二醇))部分。在另外的实施例中,间隔子为基于烷烃的间隔子(例如,C12)。在一些实施例中,间隔子为寡核苷酸间隔子(例如,T5)。寡核苷酸间隔子可以具有不干扰寡核苷酸执行预期功能(例如,刺激免疫应答或抑制基因表达)的能力的任何序列。在某些方面,寡核苷酸间隔子的碱基为所有腺苷酸、所有胸苷酸、所有胞苷酸、所有鸟苷酸、所有尿苷酸或所有其它经修饰的碱基。

[0079] 在各个实施例中,间隔子的长度是或等于至少约2个核苷酸、至少约3个核苷酸、至少约4个核苷酸、至少约5个核苷酸、5个至10个核苷酸、10个核苷酸、20个核苷酸、10个至30个核苷酸或甚至大于30个核苷酸。

[0080] 寡核苷酸与脂质纳米颗粒核的连接:考虑根据本公开使用的寡核苷酸包含通过任何方式(例如,共价或非共价连接)与纳米颗粒核连接的寡核苷酸。在本公开的任何方面或实施例中,通过将寡核苷酸与脂质-聚乙二醇(脂质-PEG)缀合物共价连接,将寡核苷酸与脂质纳米颗粒核的外部连接。在一些实施例中,寡核苷酸壳中的10%或至少10%的寡核苷酸通过脂质-PEG缀合物与脂质纳米颗粒核的外部共价连接。在另外的实施例中,寡核苷酸壳中的至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的寡核苷酸通过脂质-PEG缀合物与脂质纳米颗粒核的外部共价连接。在一些实施例中,寡核苷酸壳中的20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的寡核苷酸通过脂质-PEG缀合物与脂质纳米颗粒核的外部共价连接。在仍另外的实施例中,寡核苷酸壳中的少于20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的寡核苷酸通过脂质-PEG缀合物与脂质纳米颗粒核的外部共价连接。在一些实施例中,寡核苷酸壳中的一个或多个寡核苷酸通过脂质锚定基团与脂质纳米颗粒核的外部连接。在各个实施例中,脂质锚定基团与寡核苷酸的5'端或3'端连接。在各个实施例中,脂质锚定基团为胆固醇或生育酚。

[0081] 不论寡核苷酸与脂质纳米颗粒核连接的方式如何,在各个方面,连接都是通过5'键、3'键、某种类型的内部键或这些连接的任意组合实现的。在一些实施例中,寡核苷酸与纳米颗粒共价连接。在另外的实施例中,寡核苷酸与纳米颗粒非共价连接。在另外的实施例中,寡核苷酸通过共价键和非共价键的组合与纳米颗粒连接。

[0082] 连接方法对于本领域普通技术人员来说是已知的,并且描述于美国公开第2009/0209629号中,所述美国公开以全文引用的方式并入本文。将RNA与纳米颗粒连接的方法总体上描述于PCT/US2009/65822中,所述文献以全文引用的方式并入本文。将寡核苷酸与脂质体颗粒缔合的方法描述于美国专利申请公开第20160310425号中,所述美国专利申请公开以全文引用的方式并入本文。

[0083] LNP-SNA合成

[0084] 如本文所述，本公开的LNP-SNA通常包括脂质纳米颗粒核，所述脂质纳米颗粒核包括包封的寡核苷酸和与所述脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸壳，其中所述寡核苷酸壳中的至少10％的所述寡核苷酸通过脂质-PEG缀合物与所述脂质纳米颗粒核的外部共价连接。因此，合成本公开的LNP-SNA，使得寡核苷酸包封于脂质纳米颗粒核中，并且寡核苷酸壳与脂质纳米颗粒核的外部连接。在本文(例如，实例1)中详细描述了LNP-SNA的合成并在图1中总体上描绘。

[0085] 一般地并且举例来说，脂质纳米颗粒(LNP)可以通过将脂质和甾醇稀释于乙醇中来调配。将待包封的核酸分别溶解在低pH(例如，pH 4.0)缓冲液中。将可电离脂质与包封的核酸的质量比维持在所需范围内(例如，20:1至5:1)。为了形成脂质纳米颗粒核，将含核酸的低pH缓冲液以所需体积比(例如，3:1)与乙醇溶液快速混合。在此过程中，低pH缓冲液使可电离脂质变成带净正电荷，从而驱使带负电荷的寡核苷酸包封。混合后，将纳米颗粒相对于1x PBS透析以去除乙醇和残余缓冲液。最后，为了由LNP形成LNP-SNA，通过将寡核苷酸与LNP以所需比率(例如，1:1)的寡核苷酸与包括缀合位点的脂质-PEG缀合物混合，将一个或多个寡核苷酸与脂质纳米颗粒核的外部连接。

[0086] 在本公开的任何方面或实施例中，脂质纳米颗粒核的组分包含可电离脂质、磷脂、甾醇、包封的寡核苷酸和脂质-聚乙二醇(脂质-PEG)缀合物。可以使用各种量的每种组分来产生脂质纳米颗粒核。在一些实施例中，所述LNP-SNA的所述脂质纳米颗粒核包括的可电离脂质的摩尔分数为所述LNP-SNA中的总脂质的约50％。在一些实施例中，所述可电离脂质为二亚油基甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)。在一些实施例中，所述LNP-SNA的所述脂质纳米颗粒核包括的磷脂的摩尔分数为或约为所述LNP-SNA中的总脂质的约1％至约25％、或约2％至约5％、或约5％至约20％、或约10％至约25％、或约10％至约20％。在另外的实施例中，所述LNP-SNA的所述脂质纳米颗粒核包括的磷脂的摩尔分数为、至少约为或小于所述LNP-SNA中的总脂质的约1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％、20％、21％、22％、23％、24％或25％。在一些实施例中，所述LNP-SNA的所述脂质纳米颗粒核包括的磷脂的摩尔分数为或约为所述LNP-SNA中的总脂质的3.5％。在各个实施例中，所述磷脂为1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二(十六酰基)磷脂酰胆碱(DPPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或其组合。在一些实施例中，所述磷脂为1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。在一些实施例中，所述甾醇为胆固醇。在一些实施例中，所述LNP-SNA的所述脂质纳米颗粒核包括的甾醇的摩尔分数为所述LNP-SNA中的总脂质的约20％至约50％、或约25％至约45％、或约20％至约35％、或约20％至约30％或约25％至约35％。在另外的实施例中，所述LNP-SNA的所述脂质纳米颗粒核包括的甾醇的摩尔分数为、至少约为或小于所述LNP-SNA中的总脂质的约20％、21％、22％、23％、24％、25％、26％、27％、28％、29％、30％、31％、32％、33％、34％、35％、36％、37％、38％、39％、40％、41％、42％、43％、44％、45％、46％、47％、48％、49％或50％。在一些实施例中，所述LNP-SNA的所述脂质纳米颗粒核包括的甾醇的摩尔分数为、至少约为或小于约45％。在一些实施例中，所述甾醇为胆固醇。在一些实施例中，所述LNP-SNA包括的所述胆固醇的摩尔分数为或约为所述LNP-SNA中的总脂质的45％。在一些实施例中，所述脂质-聚乙二醇(脂质-PEG)缀合物包括2000道尔顿(Da)聚乙二醇。在另外的实施例中，所述脂质-聚乙二醇(脂

质-PEG)缀合物为脂质-PEG-马来酰亚胺。在仍另外的实施例中,所述脂质-PEG-马来酰亚胺为与2000Da聚乙二醇马来酰亚胺缀合的1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPPE)、与2000Da聚乙二醇马来酰亚胺缀合的1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DMPE)或其组合。在一些实施例中,所述LNP-SNA包括的所述脂质-PEG缀合物的摩尔分数为所述LNP-SNA中的总脂质的约1%至约5%、或约1%至约4%、或约1.5%至约5%、或约1.5%至约4%、或约1%至约3.5%、或约1.5%至约3%、或约1%至约2%或约1%至约2.5%。在另外的实施例中,所述LNP-SNA的所述脂质纳米颗粒核包括的所述脂质-PEG缀合物的摩尔分数为、至少约为或小于所述LNP-SNA中的总脂质的约1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%或5%。在一些实施例中,所述LNP-SNA的所述脂质纳米颗粒核包括的所述脂质-PEG缀合物的摩尔分数为、至少约为或小于所述LNP-SNA中的总脂质的约1.5%。在一些实施例中,所述脂质-PEG缀合物为与2000Da聚乙二醇马来酰亚胺缀合的1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DMPE)。在一些实施例中,所述LNP-SNA中的所述可电离脂质与所述包封的寡核苷酸之间的质量比为约5:1。在另外的实施例中,所述LNP-SNA中的所述可电离脂质与所述包封的寡核苷酸之间的质量比为约20:1、15:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:1。

[0087] LNP-SNA在基因调节/疗法中的用途

[0088] 经考虑,在本公开的任何方面或实施例中,如本文所公开的LNP-SNA具有调节基因表达的能力。因此,在一些实施例中,本公开的LNP-SNA包括脂质纳米颗粒核和与所述脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸壳,其中所述寡核苷酸壳包括一个或多个具有基因调节活性(例如,抑制靶基因表达或靶细胞识别)的寡核苷酸。在一些实施例中,与LNP-SNA的脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸壳包括一个或多个寡核苷酸,所述一个或多个寡核苷酸为如本文所述的抑制性寡核苷酸。在一些实施例中,抑制性寡核苷酸包封于LNP-SNA的脂质纳米颗粒核中。在一些实施例中,抑制性寡核苷酸包封于LNP-SNA的脂质纳米颗粒核中,并且与LNP-SNA的脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸壳包括一个或多个寡核苷酸,所述一个或多个寡核苷酸为抑制性寡核苷酸。因此,在一些实施例中,本公开提供了用于抑制基因产物表达的方法,并且此类方法包括其中靶基因产物的表达与在不存在LNP-SNA的情况下的基因产物表达相比被抑制约或至少约5%、约或至少约10%、约或至少约15%、约或至少约20%、约或至少约25%、约或至少约30%、约或至少约35%、约或至少约40%、约或至少约45%、约或至少约50%、约或至少约55%、约或至少约60%、约或至少约65%、约或至少约70%、约或至少约75%、约或至少约80%、约或至少约85%、约或至少约90%、约或至少约95%、约或至少约96%、约或至少约97%、约或至少约98%、约或至少约99%或100%的方法。换言之,所提供的方法涵盖引起基本上任何程度的靶基因产物表达抑制的方法。

[0089] 抑制程度在体内由体液样品或活检样品或通过本领域熟知的成像技术来确定。可替代地,抑制程度在细胞培养测定中确定,通常作为可以在体内预期的抑制程度的可预测量度,所述可预测量度是通过使用特定类型的LNP-SNA和特异性寡核苷酸产生的。

[0090] 因此,提供了在基因调节疗法中利用本公开的LNP-SNA的方法。该方法包括将编码基因产物的靶多核苷酸与LNP-SNA的一个或多个寡核苷酸杂交的步骤,所述一个或多个寡核苷酸与所述靶多核苷酸的全部或一部分互补,其中所述靶多核苷酸与所述寡核苷酸之间的杂交发生在所述靶多核苷酸的一定长度上,其互补程度足以抑制所述基因产物的表达。基因表达的抑制可以在体内或体外发生。

[0091] 在各个实施例中,本公开的方法中使用的抑制性寡核苷酸为RNA、DNA或其经修饰形式。在各个实施例中,所述抑制性寡核苷酸为反义DNA、小干扰RNA(siRNA)、适体、短发夹RNA(shRNA)、酶型DNA或酶型适体。

[0092] LNP-SNA在免疫调节中的用途

[0093] Toll样受体(TLR)是一类在岗哨细胞中表达的蛋白质,所述岗哨细胞在先天免疫系统的调节中起关键作用。哺乳动物免疫系统使用两种通用策略来对抗传染病。病原体暴露会迅速触发先天免疫应答,所述先天免疫应答的特征在于产生免疫刺激性细胞因子、趋化因子和多反应性IgM抗体。先天免疫系统通过暴露于由多种感染性微生物表达的病原体相关分子模式(PAMP)而被激活。PAMP的识别是由Toll样受体家族成员介导的。对特异性寡核苷酸做出应答的TLR受体,如TLR 4、TLR 8和TLR 9,位于被称为内体的特殊细胞内区室内。例如但不限于TLR 4、TLR 8和TLR 9受体的调节机制基于DNA-蛋白质相互作用。

[0094] 如本文所述,含有与在细菌DNA中发现的CpG基序相似的CpG基序的合成免疫刺激性寡核苷酸刺激TLR受体的相似应答。因此,本公开的CpG寡核苷酸具有作为TLR激动剂发挥作用的能力。本公开所考虑的其它TLR激动剂包含但不限于单链RNA和小分子(例如,R848(雷西莫特(Resiquimod)))。因此,免疫调节性寡核苷酸具有多种潜在的治疗用途,包含治疗免疫缺陷和癌症。因此,在一些实施例中,本公开的LNP-SNA在用于调节toll样受体(TLR)活性的方法中使用。

[0095] 在另外的实施例中,本公开的LNP-SNA包括寡核苷酸,所述寡核苷酸为TLR拮抗剂。在一些实施例中,TLR拮抗剂为单链DNA(ssDNA)。

[0096] 在一些实施例中,免疫系统的下调涉及敲除负责Toll样受体表达的基因。这种反义方法涉及使用本公开的LNP-SNA来抑制任何toll样蛋白的表达。

[0097] 因此,在一些实施例中,公开了利用如本文所述的LNP-SNA来调节toll样受体的方法。所述方法通过分别使用TLR激动剂或TLR拮抗剂来上调或下调Toll样受体活性。所述方法包括使具有toll样受体的细胞与本公开的LNP-SNA接触,由此调节toll样受体的活性和/或表达。经调节的toll样受体包含以下中的一个或多个:toll样受体1、toll样受体2、toll样受体3、toll样受体4、toll样受体5、toll样受体6、toll样受体7、toll样受体8、toll样受体9、toll样受体10、toll样受体11、toll样受体12和/或toll样受体13。

[0098] LNP-SNA在治疗病症中的用途

[0099] 在一些实施例中,本公开的LNP-SNA用于治疗病症。如本文所用,“治疗(treating)”或“治疗(treating)”是指消除、减少或改善病症或其一种或多种症状。因此,在一些方面,本公开提供了治疗病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者(例如,人类受试者)施用有效量的本公开的LNP-SNA,其中所述施用治疗所述病症。在各个实施例中,所述病症为癌症、传染病、自身免疫性疾病或其组合。LNP-SNA的“有效量”是足以例如实现基因编辑、抑制基因表达和/或激活先天免疫应答的量。因此,本文还考虑了激活先天免疫应答的方法,此类方法包括以有效激活有需要的受试者的先天免疫应答的量向所述受试者施用本公开的LNP-SNA。

[0100] 本公开的LNP-SNA可以通过任何合适的途径施用,如肠胃外施用、肌内注射、皮下注射、皮内施用和/或粘膜施用,如口服或鼻内施用。另外的施用途径包含但不限于静脉内、腹膜内、鼻内施用、阴道内、直肠内和口服施用。本公开还考虑了不同施用途径的组合,分别

或同时施用。

[0101] LNP-SNAS在检测中的用途

[0102] 在一些实施例中，本公开的LNP-SNA可用于纳米耀斑技术。纳米耀斑先前已在用于对活细胞内的靶分子水平进行荧光检测的多核苷酸功能化纳米颗粒的背景下进行描述(在美国专利申请公开第20100129808号中描述，所述美国专利申请公开以全文引用的方式并入本文)。在该系统中，“耀斑”被可检测地标记，并且在一些实施例中为用可检测标志物标记的双链寡核苷酸的一条链(或单链寡核苷酸的一部分)，并且被进入的靶多核苷酸置换或从LNP-SNA中释放。因此，经考虑，纳米耀斑技术可用于本文所述的LNP SNA的上下文中。

[0103] 组合物

[0104] 本公开还提供了包括本公开的LNP-SNA或其多个的组合物。在一些实施例中，所述组合物进一步包括药学上可接受的载体。术语“载体”是指在其中向受试者施用如本文所描述的SNA的媒剂。可以使用与根据本公开的LNP-SNA相容的任何常规介质或药剂。术语载体涵盖稀释剂、赋形剂、佐剂和其组合。

[0105] 治疗剂

[0106] 本文所提供的LNP-SNA任选地进一步包括治疗剂或其多种。在各个实施例中，治疗剂简单地与和LNP-SNA的脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸壳中的寡核苷酸缔合，和/或治疗剂与LNP-SNA的脂质纳米颗粒核缔合，和/或治疗剂包封于LNP-SNA的脂质纳米颗粒核中。在一些实施例中，治疗剂与未和脂质纳米颗粒核连接的寡核苷酸壳中的寡核苷酸端缔合(例如，如果寡核苷酸通过其3’端与脂质纳米颗粒核连接，则治疗剂与寡核苷酸的5’端缔合)。可替代地，在一些实施例中，治疗剂与和脂质纳米颗粒核连接的寡核苷酸壳中的寡核苷酸端缔合(例如，如果寡核苷酸通过其3’端与脂质纳米颗粒核连接，则治疗剂与寡核苷酸的3’端缔合)。在一些实施例中，治疗剂与寡核苷酸壳中的寡核苷酸共价缔合，所述寡核苷酸与LNP-SNA的脂质纳米颗粒核的外部连接。在一些实施例中，治疗剂与寡核苷酸壳中的寡核苷酸非共价缔合，所述寡核苷酸与LNP-SNA的脂质纳米颗粒核的外部连接。然而，应当理解，本公开提供了LNP-SNA，其中一种或多种治疗剂与和LNP-SNA的脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸壳中的寡核苷酸共价和非共价缔合。还应理解，非共价缔合包含杂交、蛋白质结合和/或疏水相互作用。在一些实施例中，治疗剂与本公开的LNP-SNA分开施用。因此，在一些实施例中，在本公开的LNP-SNA之前、之后或同时施用治疗剂以治疗病症。

[0107] 本公开所考虑的治疗剂包含但不限于蛋白质(例如，治疗性蛋白)、生长因子、激素、干扰素、白介素、抗体或抗体片段、小分子、肽、抗生素、抗真菌剂、抗病毒剂、化疗剂或其组合。

[0108] 如本文所用，术语“小分子”是指化合物或药物或任何其它低分子量有机化合物，无论是天然的还是合成的。“低分子量”意指分子量小于1500道尔顿，通常在100至700道尔顿之间的化合物。

[0109] 可检测标志物

[0110] 在本公开的任何方面或实施例中，寡核苷酸(例如，与LNP-SNA的脂质纳米颗粒核的外部连接的寡核苷酸壳中的一个或多个寡核苷酸，和/或包封于LNP-SNA的脂质纳米颗粒核中的一个或多个寡核苷酸)包括可检测标志物(例如，荧光团和/或放射性标记)。将可检测标志物与寡核苷酸或纳米颗粒核连接的方法是本领域已知的。

[0111] 在一些实施例中,可检测标志物与脂质纳米颗粒核缔合。例如但不限于,本公开的脂质纳米颗粒核可以用荧光团标记。在一些实施例中,脂质纳米颗粒核、与脂质纳米颗粒核的外部连接的一个或多个寡核苷酸和/或包封于脂质纳米颗粒核内的一个或多个寡核苷酸都包括荧光团,并且荧光团可以全部相同,或者一个或多个荧光团可以不同。

[0112] 参考文献

[0113] 1.)Hajj,K.A.;Whitehead,K.A.翻译工具:用于治疗性mRNA递送的非病毒材料(Tools for Translation:Non-Viral Materials for Therapeutic MRNA Delivery.)《自然评论-材料(Nature Reviews Materials)》.自然出版集团(Nature Publishing Group)2017年9月12日,第1至17页。

[0114] 2.)Sahin,U.;Karikó,K.;Türeci,Ö.基于mRNA的治疗剂--开发一类新药物(MRNA-Based Therapeutics-Developing a New Class of Drugs.)《自然评论-药物发现(Nature Reviews Drug Discovery)》.自然出版集团2014年1月1日,第759至780页。

[0115] 3.)Rosi,N.L.;Giljohann,D.A.;Thaxton,C.S.;Lytton-Jean,A.K.R.;Han,M.S.;Mirkin,C.A.用于细胞内基因调节的经寡核苷酸修饰的金纳米颗粒(Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles for Intracellular Gene Regulation.)《科学(Science)》(80-.).2006,312(5776),1027-1030。

[0116] 4.)Jensen,S.A.;Day,E.S.;Ko,C.H.;Hurley,L.A.;Luciano,J.P.;Kouri,F.M.;Merkel,T.J.;Luthi,A.J.;Patel,P.C.;Cutler,J.I.;Daniel,W.L.;Scott,A.W.;Rotz,M.W.;Meade,T.J.;Giljohann,D.A.;Mirkin,C.A.;Stegh,A.H.球形核酸纳米颗粒缀合物作为基于RNAi的胶质母细胞瘤疗法(Spherical Nucleic Acid Nanoparticle Conjugates as an RNAi-Based Therapy for Glioblastoma.)《科学转化医学(Sci.Transl.Med.)》2013,5(209),209ra152。

[0117] 5.)Ferrer,J.R.;Sinegra,A.J.;Ivancic,D.;Yeap,X.Y.;Qiu,L.;Wang,J.J.;Zhang,Z.J.;Wertheim,J.A.;Mirkin,C.A.脂质体球形核酸的结构依赖性生物分布(Structure-Dependent Biodistribution of Liposomal Spherical Nucleic Acids.)《ACS纳米(ACS Nano)》2020,14(2),1682-1693。

[0118] 6.)Banga,R.J.;Chernyak,N.;Narayan,S.P.;Nguyen,S.T.;Mirkin,C.A.脂质体球形核酸(Liposomal Spherical Nucleic Acids.)《美国化学学会杂志(J.Am.Chem.Soc.)》2014,136(28),9866-9869。

[0119] 7.)Sprangers,A.J.;Hao,L.;Banga,R.J.;Mirkin,C.A.用于调节细胞核中的长非编码RNA的脂质体球形核酸(Liposomal Spherical Nucleic Acids for Regulating Long Noncoding RNAs in the Nucleus.)《微尺度(Small)》2017,13(10),1602753。

[0120] 8.)Maier,M.A.;Jayaraman,M.;Matsuda,S.;Liu,J.;Barros,S.;Querbes,W.;Tam,Y.K.;Ansell,S.M.;Kumar,V.;Qin,J.;Zhang,X.;Wang,Q.;Panesar,S.;Hutabarat,R.;Carioto,M.;Hettinger,J.;Kandasamy,P.;Butler,D.;Rajeev,K.G.;Pang,B.;Charisse,K.;Fitzgerald,K.;Mui,B.L.;Du,X.;Cullis,P.;Madden,T.D.;Hope,M.J.;Manoharan,M.;Akinc,A.可生物降解脂质能够快速消除用于RNAi治疗剂的系统递送的脂质纳米颗粒(Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics.)《分子治疗(Mol.Ther.)》2013,21(8),

1570-1578。

[0121] 9.)Semple,S.C.;Akinc,A.;Chen,J.;Sandhu,A.P.;Mui,B.L.;Cho,C.K.;Sah,D.W.Y.;Stebbing,D.;Crosley,E.J.;Yaworski,E.;Hafez,I.M.;Dorkin,J.R.;Qin,J.;Lam,K.;Rajeev,K.G.;Wong,K.F.;Jeffs,L.B.;Nechev,L.;Eisenhardt,M.L.;Jayaraman,M.;Kazem,M.;Maier,M.A.;Srinivasulu,M.;Weinstein,M.J.;Chen,Q.;Alvarez,R.;Barros,S.A.;De,S.;Klimuk,S.K.;Borland,T.;Kosovrasti,V.;Cantley,W.L.;Tam,Y.K.;Manoharan,M.;Ciufolini,M.A.;Tracy,M.A.;De Fougerolles,A.;MacLachlan,I.;Cullis,P.R.;Madden,T.D.;Hope,M.J.用于SiRNA递送的阳离子脂质的合理设计(Rational Design of Cationic Lipids for SiRNA Delivery.)《自然生物技术(Nat.Biotechnol.)》2010,28(2),172-176。

[0122] 10.)Jayaraman,M.;Ansell,S.M.;Mui,B.L.;Tam,Y.K.;Chen,J.;Du,X.;Butler,D.;Eltepu,L.;Matsuda,S.;Narayanannair,J.K.;Rajeev,K.G.;Hafez,I.M.;Akinc,A.;Maier,M.A.;Tracy,M.A.;Cullis,P.R.;Madden,T.D.;Manoharan,M.;Hope,M.J.最大化SiRNA脂质纳米颗粒用于体内肝脏基因沉默的效力(Maximizing the Potency of SiRNA Lipid Nanoparticles for Hepatic Gene Silencing in Vivo.)《德国应用化学(Angew.Chemie)》国际版,2012,51(34),8529-8533。

[0123] 11.)Love,K.T.;Mahon,K.P.;Levins,C.G.;Whitehead,K.A.;Querbes,W.;Dorkin,J.R.;Qin,J.;Cantley,W.;Qin,L.L.;Racie,T.;Frank-Kamenetsky,M.;Yip,K.N.;Alvarez,R.;Sah,D.W.Y.;De Fougerolles,A.;Fitzgerald,K.;Koteliansky,V.;Akinc,A.;Langer,R.;Anderson,D.G.用于低剂量体内基因沉默的类脂质材料(Lipid-like Materials for Low-Dose,in Vivo Gene Silencing.)《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.)》2010,107(5),1864-1869。

[0124] 12.)Akinc,A.;Zumbuehl,A.;Goldberg,M.;Leshchiner,E.S.;Busini,V.;Hossain,N.;Bacallado,S.A.;Nguyen,D.N.;Fuller,J.;Alvarez,R.;Borodovsky,A.;Borland,T.;Constien,R.;De Fougerolles,A.;Dorkin,J.R.;Narayanannair Jayaprakash,K.;Jayaraman,M.;John,M.;Koteliansky,V.;Manoharan,M.;Nechev,L.;Qin,J.;Racie,T.;Raitcheva,D.;Rajeev,K.G.;Sah,D.W.Y.;Soutschek,J.;Toudjarska,I.;Vornlocher,H.P.;Zimmermann,T.S.;Langer,R.;Anderson,D.G.用于递送RNAi治疗剂的类脂质材料的组合文库(ACombinatorial Library of Lipid-like Materials for Delivery of RNAi Therapeutics.)《自然生物技术》2008,26(5),561-569。

[0125] 13.)Sago,C.D.;Lokugamage,M.P.;Islam,F.Z.;Krupczak,B.R.;Sato,M.;Dahlman,J.E.通过体内定向演化鉴定的将RNA递送到骨髓的纳米颗粒(Nanoparticles That Deliver RNAto Bone Marrow Identified by in Vivo Directed Evolution.)《美国化学学会杂志》2018,140(49),17095-17105。

[0126] 14.)Cheng,Q.;Wei,T.;Farbiak,L.;Johnson,L.T.;Dilliard,S.A.;Siegwart,D.J.用于组织特异性mRNA递送和CRISPR-Cas基因编辑的选择性器官靶向(SORT)纳米颗粒(Selective Organ Targeting(SORT)Nanoparticles for Tissue-Specific MRNADelivery and CRISPR-Cas Gene Editing.)《自然纳米技术(Nat.Nanotechnol.)》2020,1-8。

[0127] 15.)Chinen,A.B.;Guan,C.M.;Mirkin,C.A.球形核酸纳米颗粒缀合物增强G-四链体形成并增加血清蛋白相互作用(Spherical Nucleic Acid Nanoparticle Conjugates Enhance G-Quadruplex Formation and Increase Serum Protein Interactions.)《德国应用化学》国际版,2015,54(2),527-531。

[0128] 16.)Akinc,A.;Querbes,W.;De,S.;Qin,J.;Frank-Kamenetsky,M.;Jayaprakash,K.N.;Jayaraman,M.;Rajeev,K.G.;Cantley,W.L.;Dorkin,J.R.;Butler,J.S.;Qin,L.;Racie,T.;Sprague,A.;Fava,E.;Zeigerer,A.;Hope,M.J.;Zerial,M.;Sah,D.W.;Fitzgerald,K.;Tracy,M.A.;Manoharan,M.;Koteliansky,V.;Fougerolles,A.De;Maier,M.A.使用基于内源性和外源性配体机制的RNAi治疗剂的靶向递送(Targeted Delivery of RNAi Therapeutics with Endogenous and Exogenous Ligand-Based Mechanisms.)《分子疗法(Mol.Ther.)》2010,18(7),1357-1364。

[0129] 17.)Lokugamage,M.P.;Sago,C.D.;Gan,Z.;Krupczak,B.R.;Dahlman,J.E.在不使用靶向配体的情况下受约束的纳米颗粒在体内将SiRNA和SgRNA递送到T细胞(Constrained Nanoparticles Deliver SiRNAand SgRNAto T Cells In Vivo without Targeting Ligands.)《先进材料(Adv.Mater.)》2019,31(41),1902251。

[0130] 18.)Patel,S.;Ashwanikumar,N.;Robinson,E.;Xia,Y.;Mihai,C.;Griffith III,J.P.;Hou,S.;Esposito,A.A.;Ketova,T.;Welsher,K.;Joyal,J.L.;Almarsson,O.;Sahay,G.脂质纳米颗粒中的天然存在的胆固醇类似物诱导多态形状并增强mRNA的细胞内递送(Naturally occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA.)《自然通讯(Nat.Comm.)》2020,11。

[0131] 19.)Wang等人,用脂质纳米颗粒递送寡核苷酸(Delivery of oligonucleotides with lipid nanoparticles.)《先进药物递送综述(Advanced Drug Delivery Reviews)》87:68-80(2015)。

[0132] 20.)Alfagih等人,用于基于mRNA的疫苗的作为佐剂的纳米颗粒和纳米递送系统(Nanoparticles as adjuvants and nanodelivery systems for mRNA-based vaccines.)《药剂学(Pharmaceutics)》13:45(1-27)(2021)。

[0133] 21.)Veiga等人,用于白细胞中的RNA治疗和免疫调节的靶向脂质纳米颗粒(Targeted lipid nanoparticles for RNAtherapeutics and immunomodulation in leukocytes.)《先进药物递送综述》159:364-376(2020)。

[0134] 22.)Cheng等人,用于组织特异性mRNA递送和CRISPR-Cas基因编辑的选择性器官靶向(SORT)纳米颗粒《自然纳米技术》15:313-320(2020)。

[0135] 23.)Lokugamage等人,在不使用靶向配体的情况下受约束的纳米颗粒在体内将siRNA和sgRNA递送到T细胞《先进材料》31(41):e1902251。

[0136] 以下实例仅为说明本公开而给出,而不以任何方式限制本公开的范围。

[0137] 实例

[0138] 实例1

[0139] 为了形成脂质纳米颗粒(LNP),将该结构的组分溶解在总浓度为20mM至80mM的乙醇中。这些组分分为四个不同类别:可电离脂质、磷脂、甾醇和脂质-PEG-马来酰亚胺。每个

纳米颗粒结构包含来自每个类别的一种组分。每种组分的摩尔分数为:可电离脂质,50%;磷脂,1.4%-23.5%;甾醇,25%-45%;脂质-PEG马来酰亚胺,1.5%-3.5%。所用的可电离脂质为二亚油基甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)。所用的磷脂为1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)和1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。所用的甾醇为胆固醇。所用的脂质-PEG-马来酰亚胺为:与2000Da聚乙二醇马来酰亚胺缀合的1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPPE)和1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DMPE)。将待包封的核酸溶解在pH 4.0的10mM柠檬酸钠缓冲液中。所用的可电离脂质与核酸之间使用的质量比为5:1。为了包封核酸,使用移液管尖端将核酸与含LNP组分的乙醇中以3:1的体积比混合(图1)。混合后,将LNP在3000Da分子量截止膜中相对于磷酸盐缓冲盐水透析2小时。

[0140] 脂质纳米颗粒球形核酸(LNP-SNA)是通过将巯基封端的DNA序列与经透析的LNP表面上的脂质-PEG-马来酰亚胺缀合而形成的。在pH 8.3至8.5下,使用100mM1,4-二硫苏糖醇(DTT)将在1-O-二甲氧基三苯甲基-丙基-二硫化物,1'-琥珀酰-lcaa-CPG上合成的DNA还原以形成3'巯基。

[0141] 在使用Sephadex G-25柱去除DTT之后,将一当量的DNA与在室温下振荡2小时的LNP混合,以形成pH 7.2至7.6的含LNP-SNA的磷酸盐缓冲盐水。使用纳米颗粒跟踪分析和低温电子显微镜确认了LNP-SNA的直径和结构(图2)。

[0142] 在与LNP反应后,DNA在琼脂糖凝胶上的迁移率降低,证实了缀合(图3),在细胞测定中,在dsDNA和siRNA递送的背景下评估了LNP-SNA活性。在设计用于响应cGAS STING通路激活的Raw 264.7细胞系中,与没有表现出激活的2'3'-cGAMP(4.75μM)和游离DNA相比,LNP SNA表现出28.1nM的临界浓度(图4A)。在表达荧光素酶(Luc2)的U87细胞系中,siLuc2递送被用作LNP-SNA介导的基因沉默的概念验证。与浓度为25nM至50nM的siGFP对照LNP-SNA相比,含有siLuc2的LNP-SNA使Luc2表达沉默大约90%(图4B)。与等效LNP结构相比,在U87-Luc2细胞系中,LNP-SNA在50nM和100nM浓度下使Luc2沉默大约5%(图4C)。

[0143] 在C57BL/6小鼠中评估LNP-SNA功能和靶向。用荧光素酶mRNA调配LNP-SNA和等效LNP。在通过尾静脉注射0.1mg kg-1的mRNA后,在6小时后评估发光。LNP-SNA表现出脾特异性mRNA表达并且在肝中未检测到表达(图5)。相比之下,LNP在肝中表现出高程度的mRNA表达,并且在脾中的表达水平与LNP-SNA相似,这表明更大的脱靶肝毒性潜力。图5示出,SNA表面上的DNA序列的存在在观察到mRNA表达的地方发生了变化。除了改变等效LNP的递送外,还可以通过改变表面DNA的序列组成来微调递送。图6表明,在具有表面富含G和富含T的DNA序列的LNP-SNA之间实现了mRNA表达的显著差异。

[0144] 材料与方法

[0145] 使用自动化固相载体亚磷酰胺合成(型号:MM12,生物自动化公司(BioAutomation))来合成DNA。通过反相高压液相色谱法(HPLC,安捷伦科技有限公司(Agilent Technologies))纯化序列,并使用基质辅助激光解吸电离飞行时间(MALDI-ToF,Bruker Autoflex III)进行表征。下表1中列出了用于实验的DNA序列和脂质纳米颗粒组合物。萤火虫荧光素酶mRNA购自三联生物技术公司(TriLink Biotechnologies)。

[0146] DLin-MC3-DMA购自MedChemExpress公司(MedChemExpress)。DMPE-PEG(2000)马来酰亚胺、DPPE-PEG-(2000)马来酰亚胺和DSPE-PEG(2000)马来酰亚胺购自Nanocs公司

(Nanocs)。胆固醇和Triton™-X-100购自西格玛公司(Sigma)。DOPC、DSPC、18:1DAP和DOPE购自阿凡提极地脂质公司(Avanti Polar lipids,Inc)。Lipofectamine™2000、Quant-iT™PicoGreen™dsDNA试剂、Quant-iT™RiboGreen™试剂和20X TE缓冲液购自赛默飞世尔公司(ThermoFisher)。D-荧光素购自黄金生物技术公司(Gold Biotechnologies),并且Luc mRNA购自三联生物技术公司。

[0147] LNP-SNA调配物:LNP是使用乙醇稀释法调配的[Cheng等人,基于树枝状大分子的脂质纳米颗粒在I型肝肾酪氨酸血症小鼠模型中递送治疗性FAH mRNA以使肝功能正常化并延长生存期(Dendrimer-Based Lipid Nanoparticles Deliver Therapeutic FAH mRNA to Normalize Liver Function and Extend Survival in a Mouse Model of Hepatorenal Tyrosinemia Type I.)《先进材料》30(52):e1805308(2018)]。简而言之,将脂质和胆固醇溶解在100%乙醇中。将dsDNA溶解在pH 4.0的10mM柠檬酸盐中,可电离脂质:dsDNA的质量比为5.0。在制备两种溶液后,用移液管快速将DNA与乙醇溶液以3:1的体积比混合。混合后,在Pierce™3K MWCO微透析板(赛默飞世尔公司)中将NP相对于1xPBS透析两次,持续60分钟。随后,将NP添加到含有1当量冻干的硫醇封端的DNA序列的微离心管中,并在室温下以700rpm振荡过夜,以促进马来酰亚胺功能化的PEG脂质与巯基封端的DNA的反应。

[0148] LNP-SNA表征:使用装配有NanoSight样品助剂的Malvern NanoSight NS300通过纳米颗粒跟踪分析(NTA)确定LNP-SNA大小和纳米颗粒浓度。将纳米颗粒以1:1000稀释于水中,并以50微升/分钟通过微流体运行。使用NTA软件确定大小,手动设置检测阈值以避免背景。分别通过改良型Quant-iT™PicoGreen™和Quant-iT™RiboGreen™(英杰公司(Invitrogen))测定来确定dsDNA和RNA的包封效率。简而言之,用包封的核酸产生两条独立的标准曲线。一个在1X TE缓冲液中,而另一个含有补充有0.1%Triton™-X-100的1X TE。从每种纳米颗粒产生两个样品,一个稀释于TE中,而另一个用0.1%Triton™-X-100稀释于TE中。随后,将100μL 1X PicoGreen™(dsDNA)或RiboGreen™添加到标准品和样品顶部上,并且使用酶标仪测量每个样品的荧光。根据TE标准曲线确定游离核酸的浓度,并且通过在0.1%Triton™-X-100中裂解的颗粒确定总核酸的浓度。由此,根据以下公式计算包封效率:([Triton-X]-[TE])/([Triton-X])或([总量]-[游离])/([总量])。

[0149] 用于测量cGAS-STING通路激活的细胞测定:Raw Lucia™ISG(Raw 264.7)细胞系购自Invivogen公司(Invivogen)。对于体外实验,Zeocin™、Normocin™和QUANTI-Luc™也购自Invivogen公司。根据制造商的说明书培养所有细胞系。未执行细胞系验证。测试所有细胞系的支原体污染,并使其在37℃下在含有5%CO_2的湿润气氛中生长。

[0150] 将指定的纳米颗粒调配物和对照稀释于Opti-MEM(吉博科公司(Gibco))中,并以一式三份平板接种于96孔板中。随后,以每孔100,000个细胞将细胞平板接种于纳米颗粒处理的顶部上。温育24小时后,去除20μL培养基,并且根据制造商的方案,使用Quanti-Luc™试剂(Invivogen公司)对IRF3诱导进行定量。为了将活细胞的数量相对于所获得的IRF3诱导量归一化,使用了PrestoBlue™HS细胞可渗透活力试剂(赛默飞世尔公司)。在去除20μL培养基以进行Quanti-Luc™测量后,去除另外的培养基,使得板内的体积为90μL。每孔添加10μL PrestoBlue™,并且将板温育15分钟,此时根据制造商的方案读取荧光。然后,在逐孔基础上,将IRF3诱导(发光)相对于活细胞(PrestoBlue™荧光)归一化。

[0151] LNP-SNA在细胞测定中递送siRNA:B16-F10-Luc2和U87-Luc2细胞系从ATCC获得,并根据制造商的说明书进行培养。为了评估siRNA介导的基因沉默,将来自cGAS-STING通路筛选的前5个LNP-SNA候选物用siLuc2调配,与用siGFP调配的对照LNP-SNA配对。因此,基因沉默可以被读出为由于Luc2的沉默而引起的发光减少。

[0152] 将指定的纳米颗粒调配物和经转染的siRNA对照稀释于Opti-MEM(吉博科公司)中,并以一式三份平板接种于96孔板中。随后,以每孔50,000个细胞将细胞平板接种于纳米颗粒处理的顶部上。温育24小时后,去除120μL培养基,并且添加20μLCellTiter Fluor™试剂(普洛麦格公司(Promega))以测量每个孔内的活细胞的数量。在37℃下温育30分钟后,根据制造商的方案读取荧光。随后用100uL的PBS洗涤孔三次。使用荧光素酶测定系统(普洛麦格公司)读取Luc2发光。以任意单位评估相对于CellTiter-Fluor™活力归一化的Luc2基因沉默。

[0153] 动物处理:从美国杰克逊实验室(The Jackson Laboratory)获得8-12周龄的雌性小鼠(C57Bl/6),并将其维持在常规的饲养室中。使用的所有动物均按照西北大学机构动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee at Northwestern University)根据方案IS00010970批准的方法和程序进行处理。

[0154] 荧光素酶(Luc2)mRNA表达:Cleancap®荧光素酶mRNA购自三联生物技术公司。向小鼠单次团注注射0.1mg kg^{-1}的含mRNA的调配物。6小时后,向小鼠腹膜内注射150mg kg^{-1}的D-荧光素。随后,处死动物,并且采集主要器官并将其浸泡在300μg/mL的D-荧光素溶液中。然后使用IVIS光谱仪(珀金埃尔默公司(Perkin-Elmer))对单独器官进行成像。

[0155] 表1.用于本文所述的实验的DNA序列和脂质纳米颗粒组合物。

[0156]

NP编号	磷脂	可电离脂质	脂质-PEG	表面DNA	磷脂%	胆固醇%	可电离脂质%	脂质-PEG%	EE（%）	大小（nm）	标准偏差（nm）
A_1	DOPC	DLin-MC3-DMA	C18	T21	10	35	50	5	82	159	79
A_2	DOPC	18:1 DAP	C14	T21	24	25	50	1	84	279	107
A_3	DOPC	DLin-MC3-DMA	C18	T21	20	25	50	5	67	227	81
A_4	DOPC	18:1 DAP	C14	T21	14	35	50	1	85	221	105
A_5	DOPC	18:1 DAP	C18	T21	12.5	35	50	2.5	86	203	85
A_6	DOPC	DLin-MC3-DMA	C14	T21	22.5	25	50	2.5	74	246	91
A_7	DOPC	DLin-MC3-DMA	C16	T21	12.5	35	50	2.5	78	195	87
A_8	DOPC	18:1 DAP	C16	T21	22.5	25	50	2.5	83	190	91
A_9	DOPC	DLin-MC3-DMA	C14	T21	10	35	50	5	56	236	71
A_10	DOPC	18:1 DAP	C18	T21	24	25	50	1	88	277	91
A_11	DOPC	DLin-MC3-DMA	C16	T21	22.5	25	50	2.5	71	222	71
A_12	DOPC	18:1 DAP	C16	T21	12.5	35	50	2.5	87	178	83
A_13	DOPC	18:1 DAP	C16	T21	20	25	50	5	85	231	81
A_14	DOPC	DLin-MC3-DMA	C16	T21	14	35	50	1	79	227	60

[0157]

A_15	DOPC	18:1 DAP	C16	T21	10	35	50	5	83	187	84
A_16	DOPC	DLin-MC3-DMA	C16	T21	24	25	50	1	71	229	69
A_17	DOPC	18:1 DAP	C14	T21	24	25	50	1	83	209	81
A_18	DOPC	DLin-MC3-DMA	C18	T21	10	35	50	5	80	144	79
B_1	DSPC	DLin-MC3-DMA	C16	GGT7	12.5	35	50	2.5	100	194	80
B_2	DSPC	DLin-MC3-DMA	C16	GGT7	12.5	35	50	2.5	103	197	73
B_3	DOPE	DLin-MC3-DMA	C14	GGT7	22.5	25	50	2.5	77	220	77
B_4	DOPE	DLin-MC3-DMA	C14	GGT7	22.5	25	50	2.5	84	217	76
B_5	DOPC	DLin-MC3-DMA	C16	T21	1.5	45	50	3.5	95	202	73
B_6	DOPC	DLin-MC3-DMA	C16	T21	1.5	45	50	3.5	97	184	76
B_7	DOPE	DLin-MC3-DMA	C16	GGT7	21.5	25	50	3.5	94	194	66
B_8	DSPC	DLin-MC3-DMA	C14	T21	22.5	25	50	2.5	93	274	82
B_9	DOPE	DLin-MC3-DMA	C16	GGT7	13.5	35	50	1.5	98	218	78
B_10	DSPC	DLin-MC3-DMA	C16	GGT7	23.5	25	50	1.5	101	317	94
B_11	DOPE	DLin-MC3-DMA	C14	T21	12.5	35	50	2.5	86	232	75
B_12	DOPC	DLin-MC3-DMA	C14	GGT7	1.5	45	50	3.5	91	233	79
B_13	DOPE	DLin-MC3-DMA	C16	T21	3.5	45	50	1.5	98	194	71
B_14	DOPC	DLin-MC3-DMA	C16	GGT7	22.5	25	50	2.5	99	225	82
B_15	DSPC	DLin-MC3-DMA	C14	T21	3.5	45	50	1.5	92	239	82
B_16	DSPC	DLin-MC3-DMA	C14	T21	11.5	35	50	3.5	93	242	77
B_17	DSPC	DLin-MC3-DMA	C14	GGT7	2.5	45	50	2.5	75	276	70

[0158]

B_18	DOPE	DLin-MC3-DMA	C14	T21	23.5	25	50	1.5	72	303	70
B_19	DOPE	DLin-MC3-DMA	C14	GGT7	3.5	45	50	1.5	73	229	93
B_20	DOPC	DLin-MC3-DMA	C14	GGT7	12.5	35	50	2.5	76	231	89
B_21	DOPC	DLin-MC3-DMA	C16	GGT7	11.5	35	50	3.5	79	210	76
B_22	DSPC	DLin-MC3-DMA	C16	T21	2.5	45	50	2.5	79	229	79
B_23	DOPC	DLin-MC3-DMA	C14	T21	21.5	25	50	3.5	75	220	76
B_24	DSPC	DLin-MC3-DMA	C14	GGT7	13.5	35	50	1.5	80	239	81
B_25	DOPC	DLin-MC3-DMA	C16	T21	23.5	25	50	1.5	80	240	95
B_26	DSPC	DLin-MC3-DMA	C16	GGT7	1.5	45	50	3.5	76	237	83
B_27	DOPE	DLin-MC3-DMA	C14	T21	1.5	45	50	3.5	74	266	91
B_28	DSPC	DLin-MC3-DMA	C16	T21	11.5	35	50	3.5	72	243	83
B_29	DOPE	DLin-MC3-DMA	C14	GGT7	11.5	35	50	3.5	72	270	84
B_30	DOPC	DLin-MC3-DMA	C14	T21	2.5	45	50	2.5	76	295	84
B_31	DOPE	DLin-MC3-DMA	C16	T21	22.5	25	50	2.5	74	223	79
B_32	DOPC	DLin-MC3-DMA	C14	T21	13.5	35	50	1.5	77	277	90
B_33	DOPC	DLin-MC3-DMA	C16	GGT7	3.5	45	50	1.5	79	187	72
B_34	DOPE	DLin-MC3-DMA	C16	GGT7	2.5	45	50	2.5	76	214	81
B_35	DSPC	DLin-MC3-DMA	C14	GGT7	21.5	25	50	3.5	79	206	72
B_36	DOPC	DLin-MC3-DMA	C16	T21	12.5	35	50	2.5	80	232	73
B_37	DOPC	DLin-MC3-DMA	C14	GGT7	23.5	25	50	1.5	81	203	76
C_1	DOPC	DLin-MC3-DMA	C16	GGT7	2.5	45	50	2.5	85	212	88

[0159]

C_2	DOPC	DLin-MC3-DMA	C16	GGT7	1.5	45	50	3.5	90	167	106
C_3	DSPC	DLin-MC3-DMA	C16	GGT7	3.5	45	50	1.5	86	147	99
C_4	DOPE	DLin-MC3-DMA	C16	GGT7	3.5	45	50	1.5	87	102	62

[0160] 表1中列出的百分比表示最终LNP-SNA中的各种组分的量(摩尔百分比)。

[0161] C14、C16和C18为脂质烷基链的长度。脂质的名称如下:DMPE-PEG-马来酰亚胺(C14)、DPPE-PEG-马来酰亚胺(C16)和DSPE-PEG-马来酰亚胺(C18)。

[0162] “T21”是指序列5’-TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT T-3’(SEQ ID NO:1)

[0163] “GGT7”是指序列5’-GGTGGTGGTG GTGGTGGTGG T-3’(SEQ ID NO:2)

[0164] “EE%”是指包封效率。

[0165] 实例2

[0166] Ai14小鼠实验

[0167] 一般动物处理和特定细胞类型分离方案

[0168] 动物处理:从美国杰克逊实验室获得8-12周龄的雌性小鼠(C57Bl/6J(#000664)和LSL Tomato/Ai14(#007914)),并将其维持在常规的饲养室中。使用的所有动物均按照西北大学机构动物护理和使用委员会批准的方法和程序进行处理。

[0169] 细胞分离:采集器官,并在37℃下在5000U/mL胶原酶I的消化混合物中温育30分钟。随后,将器官切成大约3毫米厚的小薄片,并推过70μm的过滤器。随后,使用ACK裂解缓冲液在RT(赛默飞世尔公司)下裂解红细胞5分钟,并且对细胞进行计数并将其重新悬浮于含2.5%牛血清白蛋白的PBS中。

[0170] 使用磁分离分离源自每个器官的所关注的细胞类型。使用EasySep™试剂盒(Stemcell™技术公司(Stemcell™ Technologies))分离脾巨噬细胞和B细胞。使用相同的EasySep™试剂盒分离肝B细胞。通过以200x g离心来分离肝细胞。

[0171] 对于Ai14小鼠:通过Cre mRNA以0.3mg kg^{-1}的剂量向Ai14小鼠静脉内注射LNP和LNP-SNA(图7)。图7描绘了使用Ai14小鼠进行细胞群水平基因组编辑的测定。Ai14小鼠表达位于floxed终止盒下游的tdTom(图7A)。Cre重组酶的表达去除终止盒,从而开启tdTom表达。这可以通过流式细胞术检测到,其中对表达tdTom的靶细胞群的高于背景的百分比进行定量。这被表示为tdTom+细胞的百分比。

[0172] 注射后两天,处死动物,并且使用上述细胞分离方案分离所关注的细胞类型。一旦制备了单个细胞群,就在流式细胞仪上运行细胞。在PBS处理的小鼠上进行门控,每种细胞类型中的基因组编辑根据具有可检测的tdTomato荧光的细胞的百分比进行定量(图8)。图9示出,用GGT序列功能化的LNP-SNA通过Cre mRNA在脾单核细胞中引起基因组编辑。

[0173] 对于DNA条形码实验

[0174] LNP-SNA在C57BL/6J小鼠中的合成和施用:LNP-SNA和裸LNP的小文库用下表2中所示的组合物创建。每个LNP或LNP-SNA包封独特的56个碱基DNA条形码,从而鉴定每个颗粒。在定量每个颗粒内的条形码的量后,将等量的条形码汇集到0.1mg kg^{-1}的总剂量中,并注射到C57BL/6J小鼠中。在2天的循环期后,使用上述方案通过磁分离来分离所关注的细胞类型,并进行DNA分离和测序(如下所述)。

[0175] 表2.LNP-SNA条形码研究中使用的调配物。

[0176]

条形码编号	磷脂	磷脂%	胆固醇%	D-Lin-MC3-DMA%	PEG-马来酰亚胺%	PEG_长度	DNA序列
1	DOPC	24	25	50	1	C16	(GGT)7
2	DOPC	3.5	45	50	1.5	C16	(GGT)7
3	DOPE	2.5	45	50	2.5	C16	(GGT)7
4	DSPC	21.5	25	50	3.5	C14	(GGT)7
5	DOPC	1.5	45	50	3.5	C16	(GGT)7
6	DOPC	24	25	50	1	C16	不适用
7	DOPC	3.5	45	50	1.5	C16	不适用
8	DOPE	2.5	45	50	2.5	C16	不适用
9	DSPC	21.5	25	50	3.5	C14	不适用
10	DOPC	1.5	45	50	3.5	C16	不适用

[0177] DNA分离和下一代测序:对于所关注的细胞类型,使用Clarity OTX™柱(菲罗门公司(Phenomenex))分离DNA。使用PCR-Cleanup试剂盒(新英格兰生物实验室股份有限公司(New England Biolabs,Inc.))对样品进行冻干和清洁。随后,根据先前的方案进行巢式PCR[Paunovska,K.;Sago,C.D.;Monaco,C.M.;Hudson,W.H.;Castro,M.G.;Rudoltz,T.G.;Kalathoor,S.;Vanover,D.A.;Santangelo,P.J.;Ahmed,R.;Bryksin,A.V.;Dahlman,J.E.由数百个纳米颗粒介导的体外和体内核酸递送的直接比较揭示了弱相关性(ADirect Comparison of in Vitro and in Vivo Nucleic Acid Delivery Mediated by Hundreds of Nanoparticles Reveals a Weak Correlation.)《纳米快报(Nano Lett.)》2018,18(3),2148-2157.https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b00432]。通用引物用于扩增条形码序列,随后是用于索引样品和添加Nextera XT化学的衔接子序列。使用Illumina NextSeq™对样品进行测序。

[0178] NGS数据分析:使用自定义R脚本分析序列文件。首先,对读段进行预处理以过滤出衔接子引物序列以及短于40个碱基的读段。接下来,对读段进行处理,使得不存在含有质量评分低于20的读段。最后,通过搜索条形码序列的反向补体,对每个样品内的每个条形码进行计数。使用每个样品中的每个条形码的读段数量,将数量相对于输入归一化。这用于将每个条形码的读段数量相对于最初注射的数量进行归一化。随后,递送被定量为“归一化的递送”或每个条形码的归一化的读段百分比相对于样品中的总读段数量的百分比。

[0179] 图10示出,(GGT)7外部序列和DOPE辅助脂质允许增强LNP-SNA向主要脾细胞类型的递送。使用DNA条形码技术评估对脾的递送。LNP-SNA用56个核苷酸长的条形码进行索引,使用图10左图中所描绘的策略进行扩增和索引。LNP和LNP-SNA结构的递送被评估为源自每种所关注的细胞类型的总条形码读段的百分比。在此,发现LNP-SNA在脾中的富集是通过呈递(GGT)7外部序列并含有辅助脂质DOPE来实现的。

序列表

<110> 西北大学(Northwestern University)
<120> 脂质纳米颗粒球形核酸
<130> 30938/2021-002/PCT
<150> US 63/136,501
<151> 2021-01-12
<160> 2
<170> PatentIn 3.5版
<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多核苷酸
<400> 1
ttttttttttt ttttttttttt t 21
<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多核苷酸
<400> 2
ggtggtggtg gtggtggtgg t 21

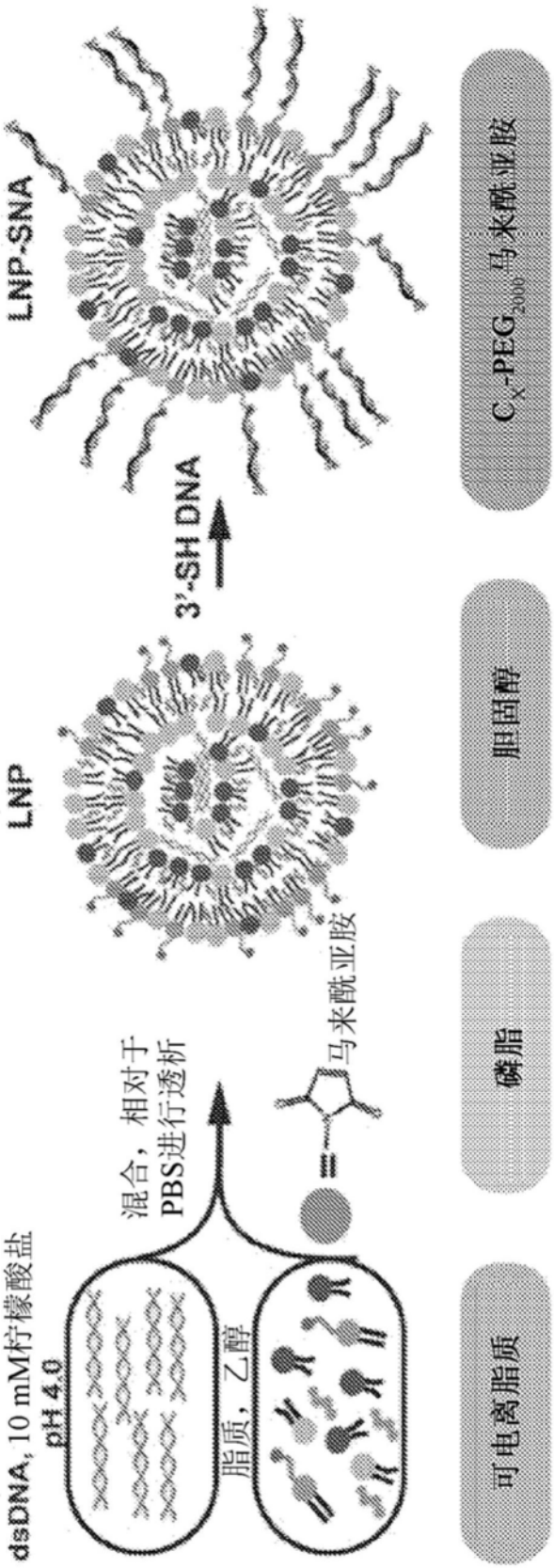

dsDNA，10 mM柠檬酸盐
pH 4.0
脂质，乙醇
混合，相对于
PBS进行透析
马来酰亚胺
LNP
3'-SH DNA
LNP-SNA
可电离脂质
磷脂
胆固醇
C_X-PEG_{2000}-马来酰亚胺

图1

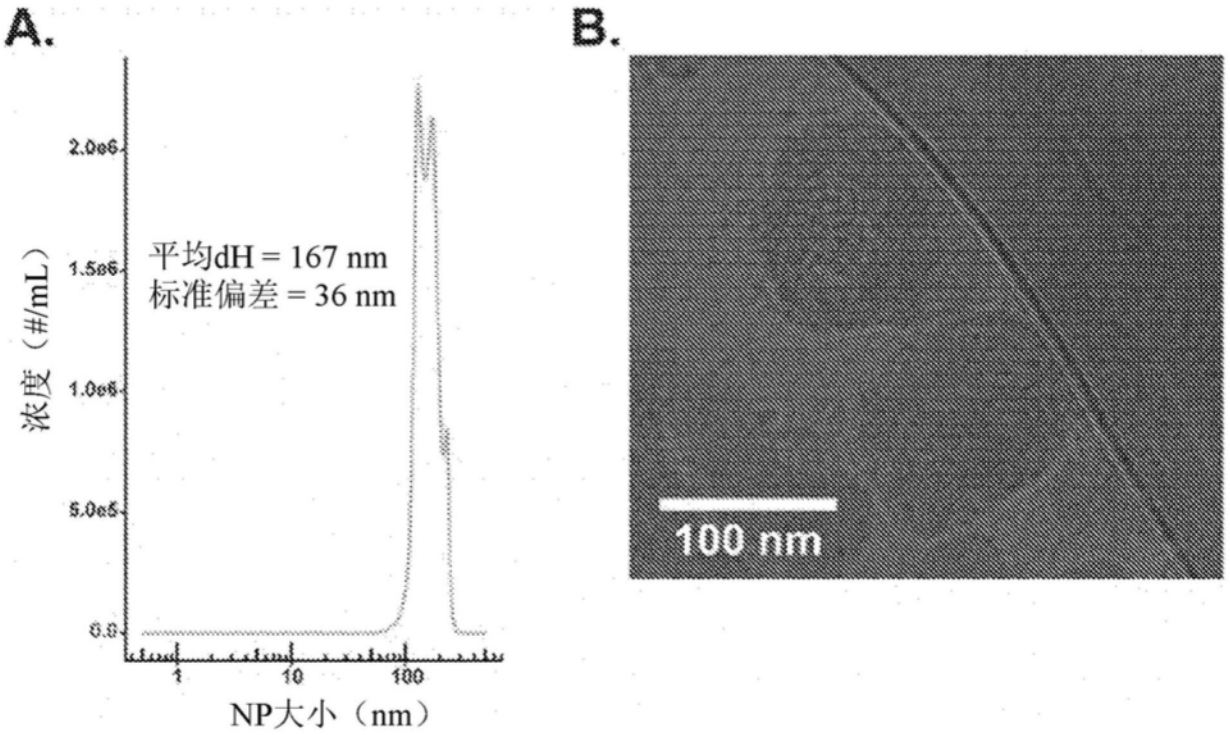

A.
B.
2.0e6
1.5e6
1.0e6
5.0e5
0.0
浓度（#/mL）
平均dH = 167 nm
标准偏差 = 36 nm
1
10
100
NP大小（nm）
100 nm

图2

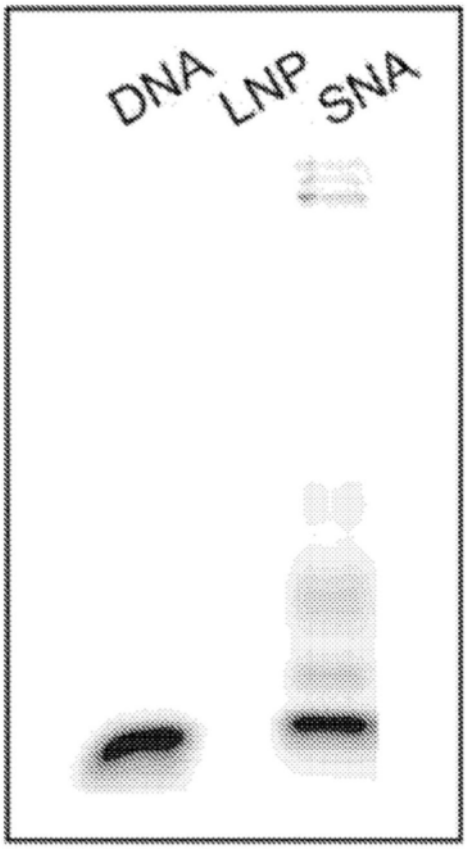

DNA
LNP
SNA

图3

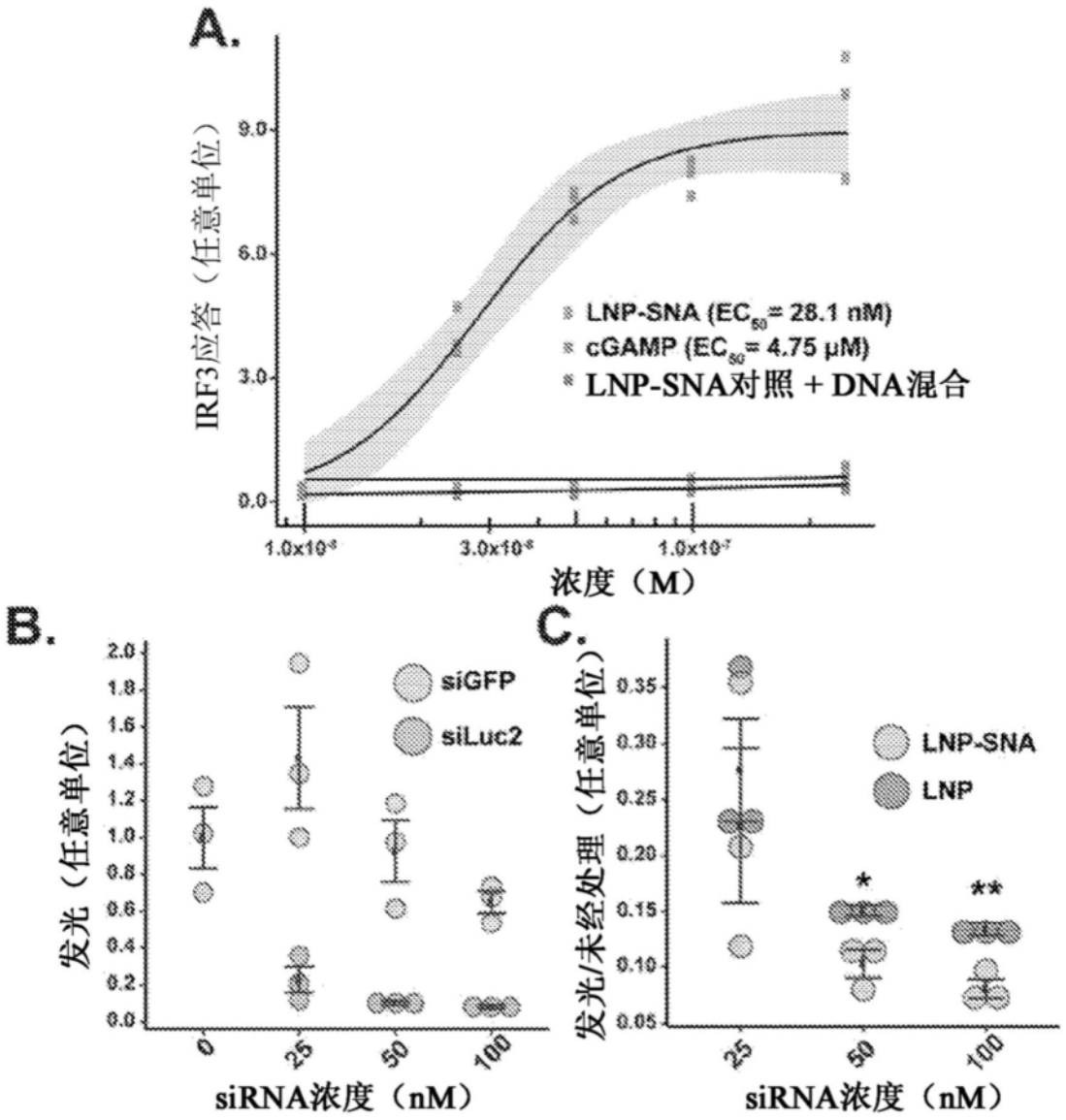

A.
IRF3应答（任意单位）
9.0
6.0
3.0
0.0
LNP-SNA (EC50= 28.1 nM)
cGAMP (EC50= 4.75 μM)
LNP-SNA对照 + DNA混合
1.0x10-9
3.0x10-8
1.0x10-7
浓度（M）
B.
发光（任意单位）
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
siGFP
siLuc2
0
25
50
100
siRNA浓度（nM）
C.
发光/未经处理（任意单位）
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
LNP-SNA
LNP
*
**
25
50
100
siRNA浓度（nM）

图4

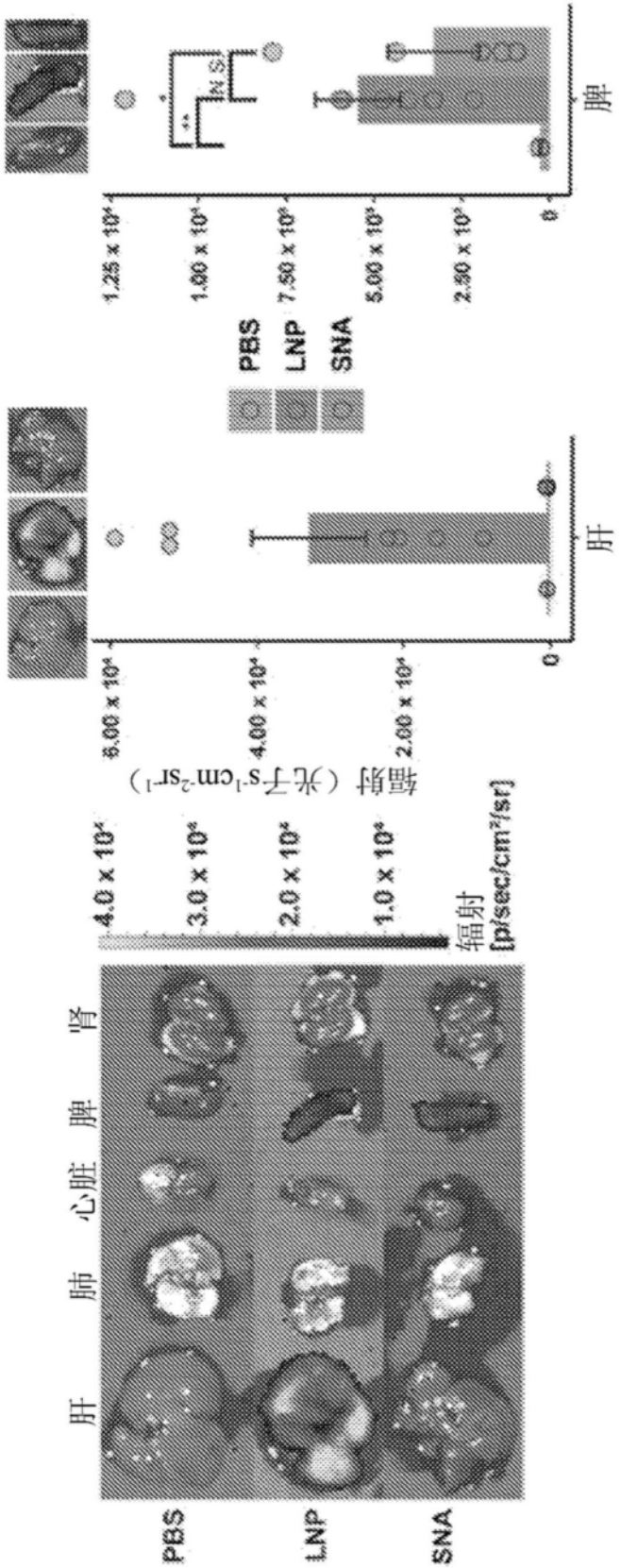

肝
肺
心脏
脾
肾
PBS
LNP
SNA
辐射
[p/sec/cm²/sr]
4.0 x 10⁴
3.0 x 10⁴
2.0 x 10⁴
1.0 x 10⁴
辐射（光子·s⁻¹cm⁻²sr⁻¹）
6.00 x 10⁴
4.00 x 10⁴
2.00 x 10⁴
0
肝
PBS
LNP
SNA
1.25 x 10⁴
1.00 x 10⁴
7.50 x 10³
5.00 x 10³
2.50 x 10³
0
**
N.S
脾

图5

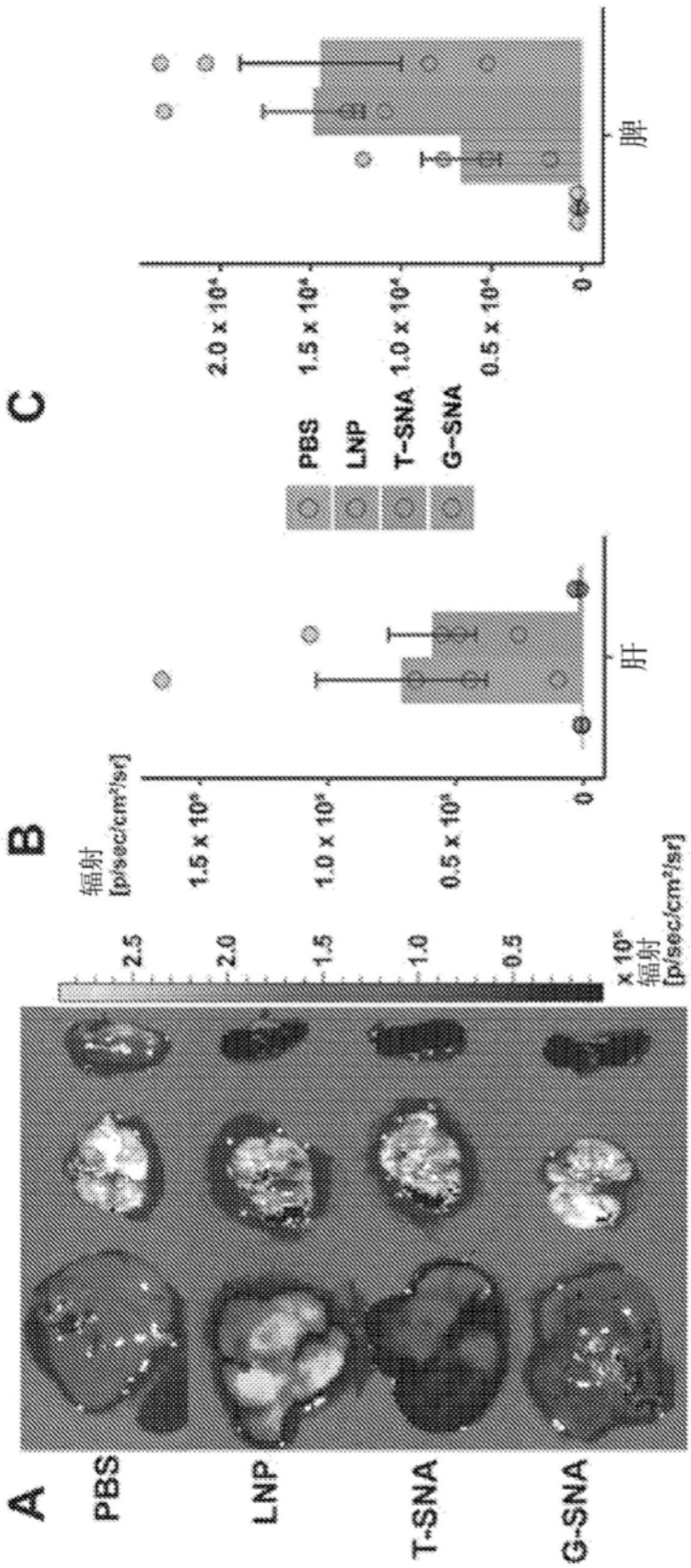

A
PBS
LNP
T-SNA
G-SNA
B
辐射 [p/sec/cm²/sr]
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
× 10⁵
辐射 [p/sec/cm²/sr]
1.5 x 10⁵
1.0 x 10⁵
0.5 x 10⁵
0
肝
C
2.0 x 10⁴
1.5 x 10⁴
1.0 x 10⁴
0.5 x 10⁴
0
PBS
LNP
T-SNA
G-SNA
脾

图6

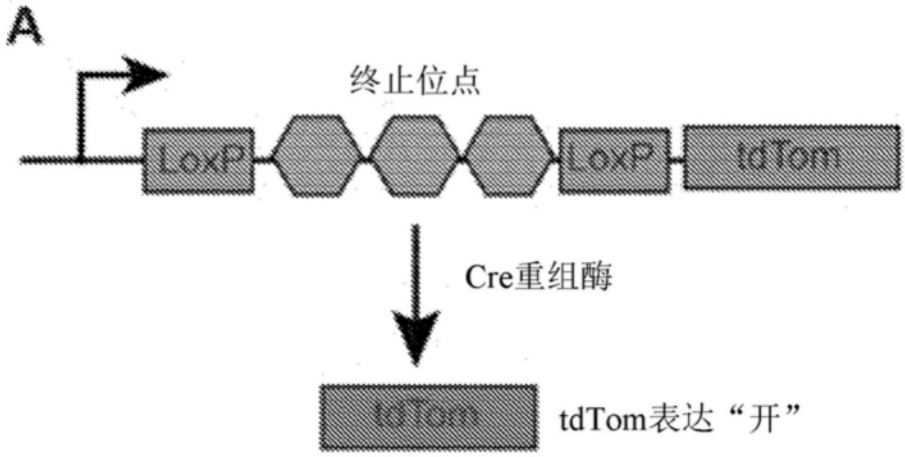


图7

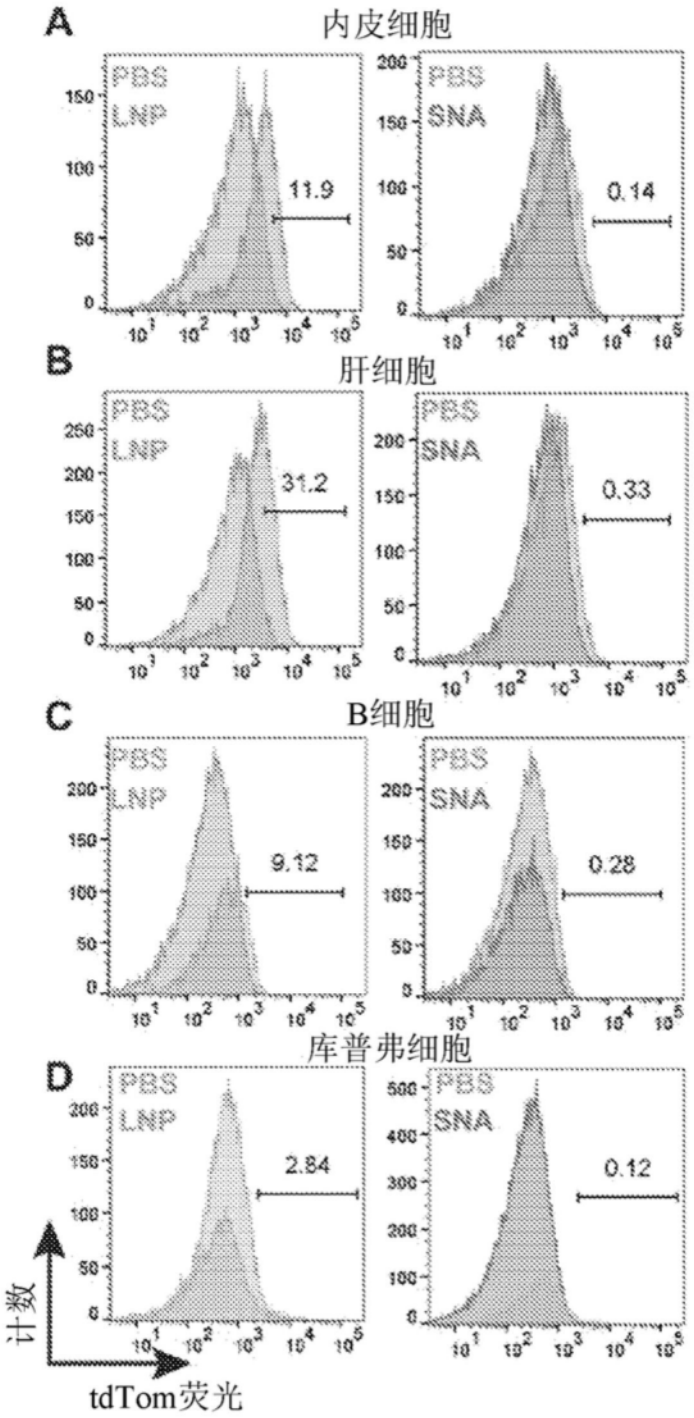

A
内皮细胞
PBS
LNP
11.9
PBS
SNA
0.14
B
肝细胞
PBS
LNP
31.2
PBS
SNA
0.33
C
B细胞
PBS
LNP
9.12
PBS
SNA
0.28
D
库普弗细胞
PBS
LNP
2.84
PBS
SNA
0.12
计数
tdTom荧光

图8

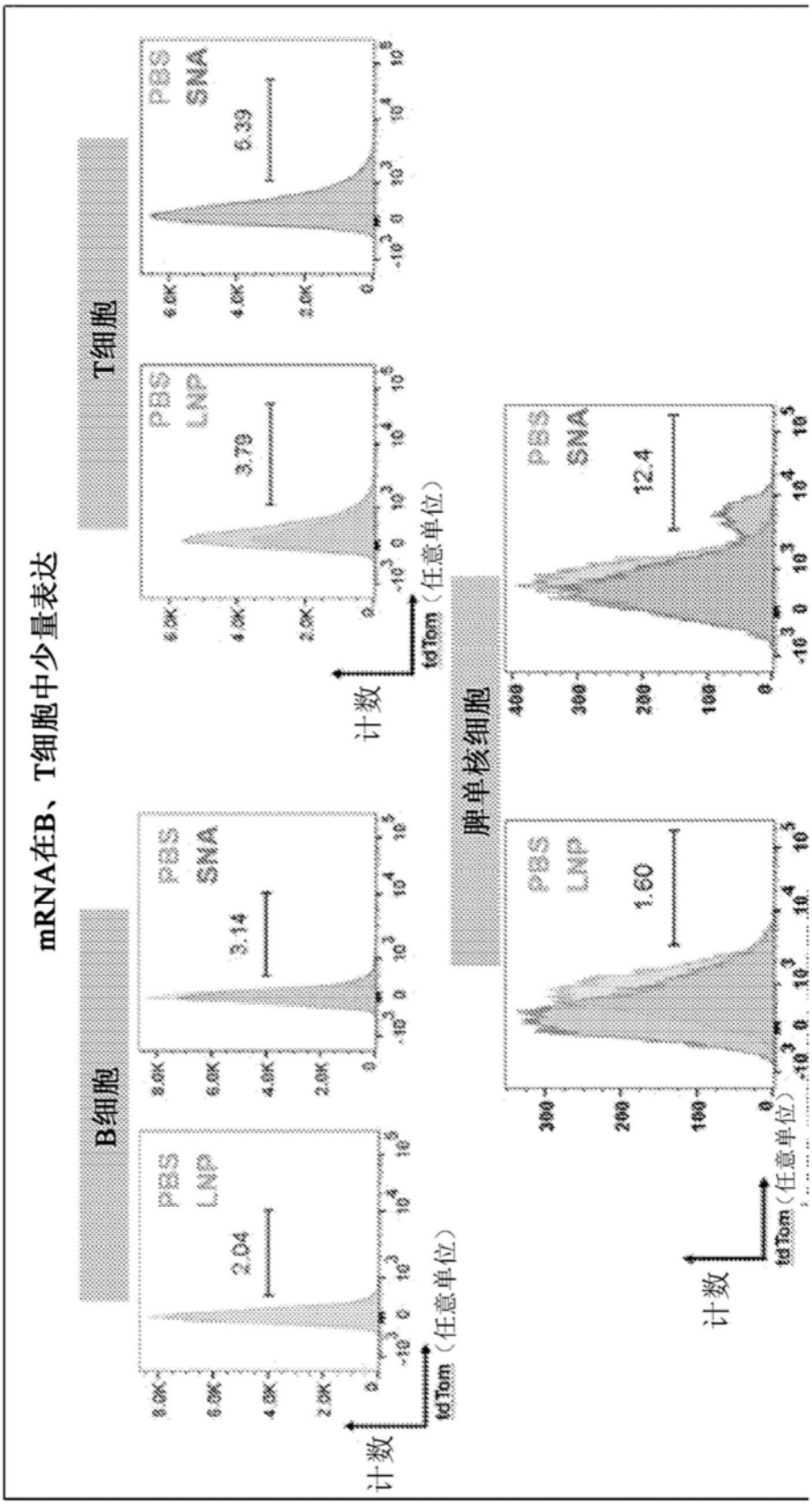

mRNA在B、T细胞中少量表达
B细胞
T细胞
脾单核细胞
PBS
LNP
SNA
2.04
3.14
3.79
6.39
1.60
12.4
计数
tdTom（任意单位）

图9

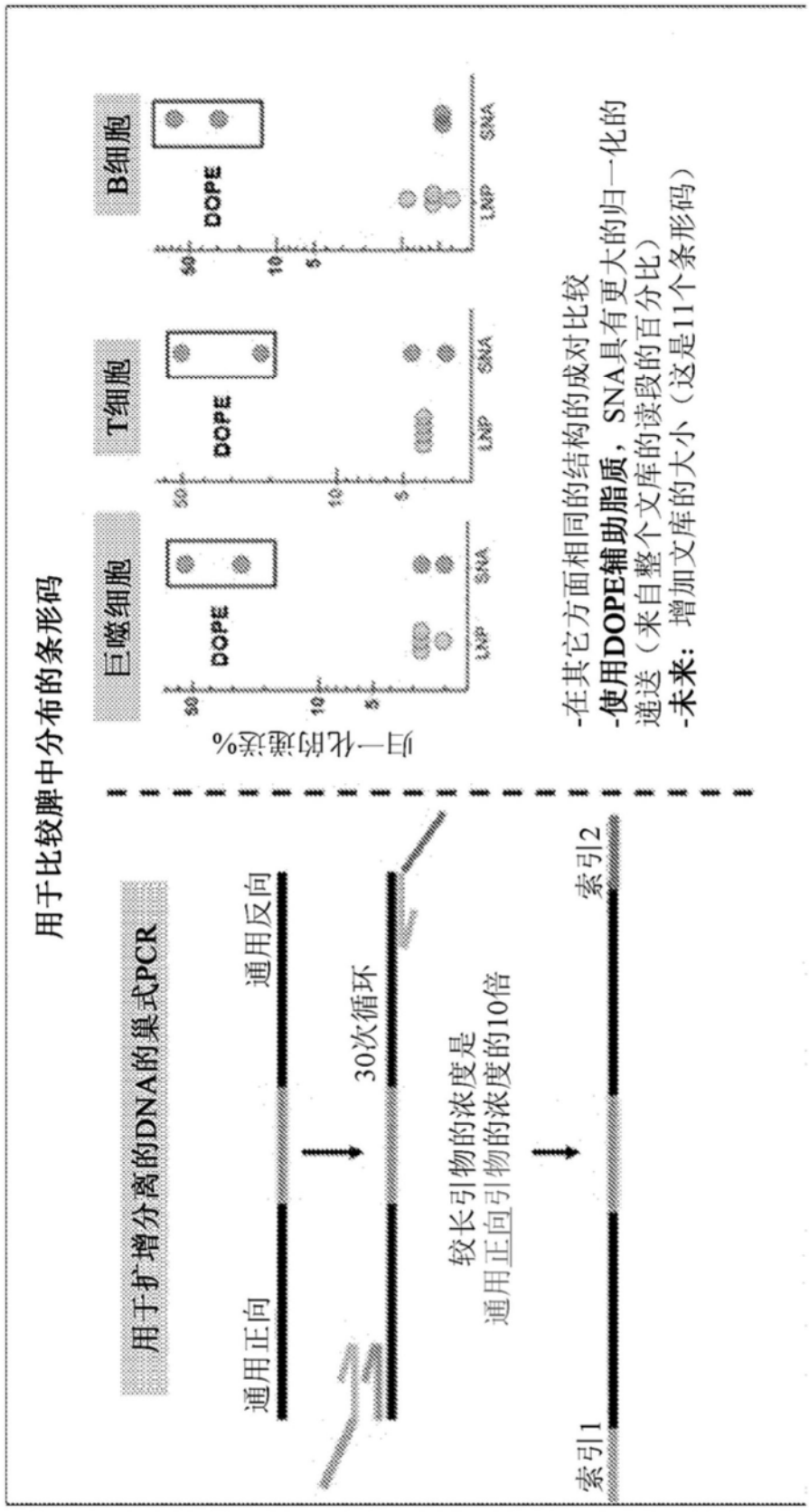

用于比较脾中分布的条形码
用于扩增分离的DNA的巢式PCR
通用正向
通用反向
30次循环
较长引物的浓度是
通用正向引物的浓度的10倍
索引1
索引2
巨噬细胞
T细胞
B细胞
DOPE
LNP
SNA
50
10
5
归一化的递送%
-在其它方面相同的结构的成对比较
-使用DOPE辅助脂质，SNA具有更大的归一化的递送（来自整个文库的读段的百分比）
-未来：增加文库的大小（这是11个条形码）

图10