(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113840926 A
(43)申请公布日 2021.12.24

(21)申请号 202080036934.4
(22)申请日 2020.03.18
(30)优先权数据
62/820,496 2019.03.19 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.11.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/023442 2020.03.18
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/191103 EN 2020.09.24
(71)申请人 阿克丘勒斯治疗公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 普里亚·卡马利
帕玛纳·奇伍库拉
约瑟夫·E·佩恩 包艳洁
(74)专利代理机构 北京市万慧达律师事务所 11111
代理人 赵洁 王蕊
(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
A61K 9/51(2006.01)
A61K 47/10(2006.01)

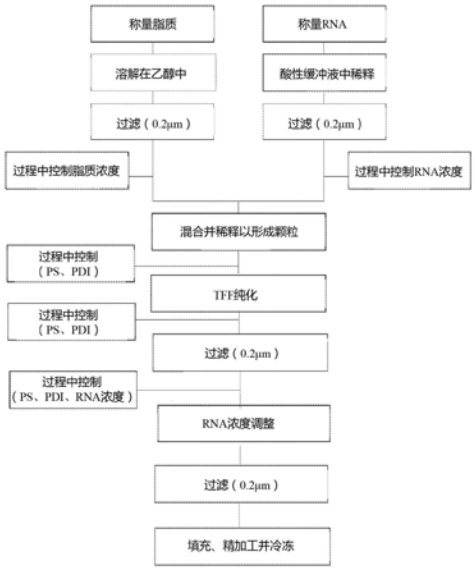
权利要求书3页 说明书60页 附图5页

(54)发明名称

脂质包封的RNA纳米颗粒的制备方法

(57)摘要

一种生产脂质包封的RNA纳米颗粒的方法，该方法包括以下步骤：a)使包含RNA的水溶液流过内径(ID)为约0.1″至0.132″的第一管；b)以通过第一管的水溶液的流速的三分之一，使包含脂质的乙醇溶液流过ID为约0.005″至0.02″的第二管，其中脂质包含阳离子脂质；以及c)通过使乙醇溶液和水溶液流入混合模块中，而混合乙醇溶液与水溶液，该混合模块由垂直连接到第一管的第二管组成；其中混合产生了在第一管中流动的输出溶液，输出溶液包含在约10％至75％乙醇v/v中的RNA和脂质的湍流，并且其中脂质包封的RNA纳米颗粒具有双层结构。



CN 113840926 A

1.一种生产脂质包封的RNA纳米颗粒的方法,所述方法包括以下步骤:

a)使包含RNA的水溶液流过内径(ID)为约0.1″至0.132″的第一管;

b)以通过第一管的水溶液的流速的三分之一,使包含脂质的乙醇溶液流过ID为约0.005″至0.02″的第二管,其中所述脂质包含阳离子脂质;以及

c)通过使乙醇溶液和水溶液流入混合模块中,而混合乙醇溶液与水溶液,所述混合模块由垂直连接到第一管的第二管组成;

其中,所述混合产生了在所述第一管中流动的输出溶液,所述输出溶液包含在约10%至75%乙醇v/v中的RNA和脂质的湍流,并且其中所述脂质包封的RNA纳米颗粒具有双层结构。

2.根据权利要求1所述的方法,其中输出具有至少200ml/min的流速。

3.根据权利要求1所述的方法,其中输出的流速具有至少2,000的雷诺数。

4.根据权利要求1的方法,其中所述水溶液由第一HPLC泵以至少10psi、25psi、50psi、75psi或100psi的背压泵送通过所述第一管,并且所述乙醇溶液由第二HPLC泵以至少40psi、80psi、150psi、300psi或400psi的背压泵送通过所述第二管。

5.根据权利要求1所述的方法,其中,所述第一管的ID为0.132″,所述第二管的ID为0.007″、0.01″或0.02″。

6.根据权利要求1所述的方法,其中,所述水溶液以至少30ml/min、45ml/min、60ml/min、75ml/min、90ml/min、105ml/min、120ml/min、150ml/min、225ml/min、262.5ml/min、300ml/min或450ml/min的流速泵送;所述乙醇溶液以至少10ml/min、15ml/min、20ml/min、25ml/min、30ml/min、35ml/min、40ml/min、50ml/min、60ml/min或75ml/min、87.5ml/min、100ml/min或150ml/min的流速泵送。

7.根据权利要求1所述的方法,其中所述水溶液、乙醇溶液、输出溶液保持在15-20℃。

8.根据权利要求1所述的方法,其中,所述混合模块由不锈钢制成,并且由垂直安装在所述第一管上的所述第二管组成,其中所述第一管具有穿过壁的开口,其中所述开口为所述第二管的外径的尺寸,并且其中所述第二管安装在所述开口上,以允许所述第二管中的乙醇溶液连续移动到所述第一管中的水溶液中。

9.根据权利要求1所述的方法,所述方法还包括:泵送稀释缓冲液通过第三管,并且通过在Y型连接器区域中将所述稀释缓冲液引入输出溶液,来混合所述稀释缓冲液与所述输出溶液,以产生稀释的输出溶液,其中所述Y型连接器将所述第三管连接至第一管。

10.根据权利要求9所述的方法,其中所述稀释缓冲液包含:

a)约10mM至20mM之间的Tris缓冲液、约45mM至55mM之间的NaCl和约8%至10%之间的蔗糖,pH在约7.4至8.5之间;或

b)40mM至90mM之间的磷酸盐缓冲液,pH在约6.0-6.5之间;并且第三稀释缓冲液包含约20mM之间;以及,然后

c)20mM至50mM之间的HEPES缓冲液、约50mM至300mM之间的NaCl、约0%至15%之间的蔗糖,pH在约7.4至8.5之间。

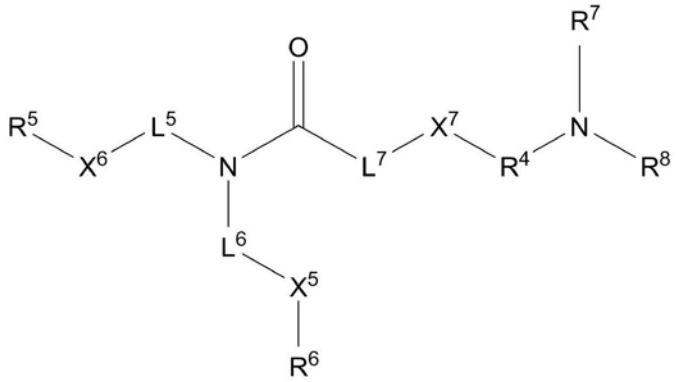
11.根据权利要求9所述的方法,其中所述稀释的输出溶液包含:6.25%乙醇;8.25%乙醇;8.3%乙醇;或者,12.5%乙醇。

12.根据权利要求9所述的方法,其中所述稀释缓冲液以400-900ml/min的流速泵送通

过第三管。

13.根据权利要求9所述的方法，其中所述第三管的ID为0.25″。

14.根据权利要求1所述的方法，其中阳离子脂质具有式I的结构：



(I)

或其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中

R^5和R^6各自独立地选自直链或支化C_1-C_{31}烷基、C_2-C_{31}烯基或C_2-C_{31}炔基以及胆固醇基构成的组；

L^5和L^6各自独立地选自直链C_1-C_{20}烷基和C_2-C_{20}烯基构成的组；

X^5为-C(O)O-或-OC(O)-；

X^6为-C(O)O-或-OC(O)-；

X^7为S或O；

L^7不存在或为低级烷基；

R^4为直链或支化C_1-C_6烷基；以及

R^7和R^8各自独立地选自氢和直链或支化C_1-C_6烷基构成的组。

15.根据权利要求1所述的方法，其中所述脂质包封的RNA纳米颗粒的平均粒度小于约100nm。

16.根据权利要求1所述的方法，其中所述脂质包封的RNA纳米颗粒的脂质部分包含约48mol％至约66mol％的阳离子脂质、约2mol％至约12mol％的DSPC、约25mol％至约42mol％的胆固醇和约0.5mol％至约3mol％的PEG2000-DMG。

17.根据权利要求1所述的方法，其中所述脂质包封的RNA纳米颗粒的总脂质:RNA重量比为约50:1至约3:1。

18.根据权利要求1所述的方法，其中所述脂质包封的RNA纳米颗粒包含阳离子脂质:DOTAP(1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷):DSPC:胆固醇:PEG的摩尔百分比为25:25:10:38.5:1.5、25:25:10:37:3、25:25:10:35:5、20:20:7:51.5:1.5、25:20:10:42:3、20:30:13:32:5、25:20:10:40:5、25:25:13:35.5:1.5、25:30:7:35:3、30:20:13:34:3、30:25:7:33:3、30:30:10:25.8:1.5、15:20:13:49:3、20:20:13:44:3、20:25:13:39:3、15:25:13:44:3、20:25:13:39:3、25:25:13:34:3、30:20:13:34:3或30:30:13:29:3。

19.根据权利要求1所述的方法，其中所述脂质包封的RNA纳米颗粒包含约20w/w％至60w/w％的阳离子脂质、约5w/w％至30w/w％的辅助脂质、约0w/w％至60w/w％的胆固醇和约0.5w/w％至15w/w％的聚乙二醇-脂质缀合物(PEG)。

20.根据权利要求1所述的方法，其中所述RNA选自以下构成的组：tRNA(转运RNA)、snRNA(小核RNA)、rRNA(核糖体RNA)、mRNA(信使RNA)、反义RNA、siRNA(小干扰RNA)和自我复

制型RNA。

脂质包封的RNA纳米颗粒的制备方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年3月19日提交的美国临时申请62/820,496的优先权,其全部内容通过引用合并于此。

背景技术

[0003] 脂质由于其形成包封RNA的脂质纳米颗粒的能力而用作核糖核酸(RNA)递送的材料,用于在肠胃外给药后递送至靶细胞。(Zimmermann,2006,Nature,doi:10.1038/nature04688)。

[0004] 已知有不同的生产脂质包封的RNA纳米颗粒的方法。例如,WO2001/005373公开了使用乙醇注射型方法制备脂质包封的RNA纳米颗粒的技术,其中使用静态混合器提供湍流环境,在囊泡形成后将其与治疗分子结合。US2004/0142025公开了使用非湍流混合和一系列连续逐步稀释形成脂质包封的RNA纳米颗粒的技术。US6,843,942公开了一种形成颗粒的非湍流混合方法,该方法将有机溶液管中的脂质通过孔口喷入流过孔口的核酸水溶液中。US9,005,654公开了使用湍流混合将siRNA包封在脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle,LNP)中,由此脂质和RNA作为反向流以大约相等的速率从相对的臂进入T形混合室,以产生包含囊泡的45-60%的乙醇溶液,收集该溶液然后进一步稀释(直接稀释法)。US9,404,127公开了通过直接稀释法生产的大部分LNP具有非层状形态,即非双层结构。

[0005] 有需要改进配制脂质包封的RNA纳米颗粒的方法和装置,包括可靠地按比例放大至大量生产同时优化粒径和同质性的能力。

发明内容

[0006] 本文公开了一种生产脂质包封的RNA纳米颗粒的方法,其包括以下步骤:a)使包含RNA的水溶液流过内径(inner diameter,ID)为约0.1″至0.132″的第一管;b)以通过第一管的水溶液的流速的三分之一,使包含脂质的乙醇溶液流过ID为约0.005″至0.02″的第二管,其中脂质包含阳离子脂质;以及c)通过使乙醇溶液和水溶液流入混合模块中,而混合乙醇溶液和水溶液,该混合模块由垂直连接到第一管的第二管组成;其中混合产生了在第一管中流动的输出溶液,输出溶液包含在约10%至75%乙醇v/v中的RNA和脂质的湍流,并且其中所述脂质包封的RNA纳米颗粒具有双层结构。

[0007] 在一些实施例中,输出流速至少为200ml/min。在另一实施例中,组合流的雷诺数为至少2,000。

[0008] 在一些实施例中,水溶液由第一HPLC泵泵送通过第一管,优选具有至少10psi、25psi、50psi、75psi或100psi的背压。优选地,第一管的ID为0.132″,并且水溶液以至少30ml/min、45ml/min、60ml/min、75ml/min、90ml/min、105ml/min、120ml/min、150ml/min、225ml/min、262.5ml/min、300ml/min或450ml/min的流速泵送。

[0009] 在一些实施例中,乙醇溶液由第二HPLC泵泵送通过第二管,优选具有至少40psi、80psi、150psi、300psi或400psi的背压。优选地,第二管的ID为0.007″、0.01″或0.02″;并且

乙醇溶液以至少10ml/min、15ml/min、20ml/min、25ml/min、30ml/min、35ml/min、40ml/min、50ml/min、60ml/min或75ml/min、87.5ml/min、100ml/min或150ml/min的流速泵送。

[0010] 优选地，水溶液和乙醇溶液保持在15-20℃。

[0011] 在一些实施例中，混合模块由垂直安装在第一管上的第二管组成，其中第一管具有穿过壁的开口，其中开口为第二管的外径的尺寸，并且其中第二管安装在开口上以允许第二管中的第二溶液连续移动到第一管中的第一溶液中。混合模块优选地由不锈钢管组成。

[0012] 在一些实施例中，本文公开的方法还包括：通过第三管泵送稀释缓冲液；并且通过在Y型连接器区域中将稀释缓冲液引入到输出溶液中，来混合稀释缓冲液与输出溶液，以产生稀释的输出溶液。优选地，稀释缓冲液包括：15mM的Tris、50mM的NaCl、9％的蔗糖，pH为7.5；10mM的Tris，50mM的NaCl，9％的蔗糖，pH为7.5；50mM的磷酸盐，pH为6.0；20mM的HEPES，50mM的NaCl，9％的蔗糖，pH为7.4；或50mM的HEPES、50mM的NaCl、9％的蔗糖，pH为7.4。优选地，稀释的输出溶液包含：6.25％乙醇；8.25％乙醇；或12.5％乙醇。

[0013] 在一些实施例中，Y型连接器成约45°的角度。优选地，Y型连接器由聚醚醚酮(PEEK)组成。

[0014] 在一些实施例中，稀释缓冲液以400-900ml/min的流速泵送通过第三管，并且第三管的ID为0.25″。

[0015] 在另一方面，本文公开了通过本文公开的方法生产的脂质包封的RNA纳米颗粒。

[0016] 在另一方面，公开了包含脂质包封的RNA纳米颗粒，其包含RNA并通过包含以下步骤的方法产生：a)使包含RNA的水溶液流过内径(ID)为约0.1″至0.132″的第一管；b)以通过第一管的水溶液的流速的三分之一，使包含脂质的乙醇溶液流过ID为约0.005″至0.02″的第二管，其中脂质包含阳离子脂质；以及c)通过使乙醇溶液和水溶液流入混合模块中，而混合乙醇溶液和水溶液，该混合模块由垂直连接到第一管的第二管组成；其中混合产生了在第一管中流动的输出溶液，输出溶液包含在10％至75％乙醇v/v中的RNA和脂质的湍流。通过本文公开的方法产生的脂质包封的RNA纳米颗粒具有双层结构，即层状形态。优选地，脂质包封的RNA纳米颗粒的平均粒径为小于70nm、80nm、90nm或100nm；其多分散指数(polydispersity index，PDI)为小于0.09、0.07或0.05；并且包封率大于94％、96％或98％RNA。优选地，批次大小是0.05至至少30g的RNA，并且批次之间的平均粒径的差异性小于10％。

[0017] 在又一方面，本文公开了用于生产包含RNA的脂质纳米颗粒的装置，该装置包含：ID为约0.1″至0.132″的第一管，第一管在一端与第一HPLC泵连接，在另一端与混合模块连接，其中第一HPLC泵配置为以至少150ml/min的流速将包含RNA的水溶液泵送通过第一管；与第一HPLC泵连接的第一储液器，其中第一储液器含有水溶液；ID为约0.005″至0.02″的第二管，其在一端与第二HPLC泵连接，在另一端与混合模块连接，其中第二HPLC泵配置为以大于50ml/min的流速将包含脂质的乙醇溶液泵送通过第二管，并且其中第二管在混合模块处垂直地与第一管连接；连接到第二HPLC泵的第二储液器，其中第二储液器含有乙醇溶液，其中该装置配置成通过在混合模块内的一区域中将乙醇溶液引入到水溶液中来混合乙醇溶液与水溶液，以产生输出溶液；并且其中输出溶液的流动产生湍流。

[0018] 在一些实施例中，本文公开的设备优选地具有混合模块，其中第二管延伸穿过第

一管的壁并且部分地进入第一管的内部;或者第二管延伸到第一管的壁并与第一连接管。

附图说明

[0019] 图1示出了生产脂质纳米颗粒的方法的一个实施例的流程图。脂质溶解在乙醇中,RNA溶解在含水酸性缓冲液(例如柠檬酸缓冲液)中,两者都经过过滤灭菌。通过本文所描述的方法混合溶液以形成颗粒,分析颗粒的PDI和粒径(particle size,PS)。颗粒被浓缩并通过切向流过滤(tangential flow filtration,TFF)纯化以除去乙醇和未结合的RNA,并再次监测PDI和PS。然后根据测量的总RNA浓度调节颗粒的浓度。将颗粒过滤灭菌、填充、精加工并冷冻。

[0020] 图2示出了示例性脂质RNA制剂的表格,包括粒径。

[0021] 图3示出了示例性脂质RNA制剂的表格,包括粒径和批次大小。

[0022] 图4示出了用于生产脂质包封的RNA纳米颗粒的装置。包含RNA的水溶液由HPLC泵通过包含下述区域的管进行输送,这些区域是0.03″ID的PEEK管、0.05″ID的PEEK连接器、0.0625″的硅管、0.122″ID的硅管和0.132″ID的不锈钢的。包含脂质的有机溶液由HPLC泵通过管输送,例如,包括0.03″ID的PEEK管、0.02″ID的PEEK连接器、0.01″ID不锈钢的区域。有机溶液在混合区中以90度角泵入水溶液中。0.122″ID硅管将混合的脂质-RNA出口输送到0.25″ID聚丙烯管,该聚丙烯以45度角在稀释区域中与稀释缓冲液合并。在稀释区域中与稀释缓冲液以45度角合并的管可以串联稀释,以包括管的1、2、3或4个稀释区域以45度角进行稀释处理。稀释过程后,将稀释的颗粒收集在保持在15-20℃的不锈钢夹套容器中。使用蠕动泵、隔膜泵或离心泵通过切向流过滤进一步处理颗粒。

[0023] 图5更详细地示出了混合模块。缓冲液中的核酸通过第一(例如,0.100-0.132″ID)不锈钢管的输入臂输送。脂质在乙醇中通过垂直附接到第一管的第二(例如,0.005-0.010″ID)不锈钢管输送。第一管的壁中的孔允许液体从第二管输送到第一管的内部。由混合得到的脂质包封的RNA纳米颗粒通过第一管的输出臂离开。

[0024] 图6A示出了实例1中所描述的方法的可扩展性。对于0.05g、0.5g、1g、3g、15g和30g RNA的批次,粒径保持在不超过80nm。

[0025] 图6B示出了通过实例1中所描述方法生产的脂质纳米颗粒的再现性。对于一个15g批次和三个30g批次,粒径保持小于80nm。

[0026] 图7示出了脂质包封的RNA纳米颗粒的冷冻-TEM图像。左图示出了负载RNA的纳米颗粒,其大多数是球形单层结构。放大倍数52000X,比例尺200nm。右图示出了110000X的高放大倍数,比例尺为100nm。

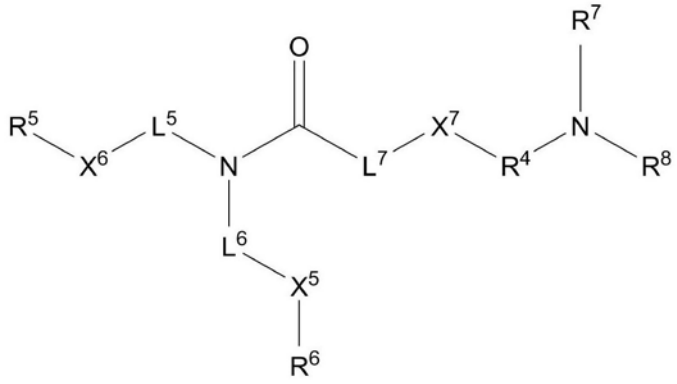
具体实施方式

[0027] 应当理解,从本公开内容中本领域技术人员将清楚了解本主题技术的各种配置,其中通过说明的方式示出和描述了本主题技术的各种配置。如将认识到的,本主题技术能够具有其他和不同的配置,并且其若干细节能够在各种其他方面进行修改,所有这些都不偏离本主题技术的范围。因此,发明内容、附图和具体实施方式应在本质上认为是说明性的而非限制性的。

[0028] 申请人已经发现了使用湍流混合脂质和单链或双链核糖核酸(ssRNA或dsRNA)以

产生脂质包封的RNA纳米颗粒的方法，该RNA纳米颗粒提供小于100nm的近单分散颗粒，该颗粒具有层状形态，即包括双层结构。该方法可放大到超过30g的RNA。通过本文所描述方法生产的包含RNA的脂质包封的RNA纳米颗粒可用于在体内递送RNA，并且在动物模型中静脉内给药后具有改进的安全性和功效。

[0029] 在一方面，本文公开了一种生产脂质包封的RNA纳米颗粒的方法，该方法包括以下步骤：a)使包含RNA的水溶液流过内径(ID)为约0.1″至0.132″的第一管；b)以通过第一管的水溶液的流速的三分之一，使包含脂质的乙醇溶液流过ID为约0.005″至0.02″的第二管，其中脂质包含阳离子脂质；以及c)通过使乙醇溶液和水溶液流入混合模块中，而混合乙醇溶液和水溶液，该混合模块由垂直连接到第一管的第二管组成；其中混合产生了在第一管中流动的输出溶液，输出溶液包含在约10％至75％乙醇v/v中的RNA和脂质的湍流，并且其中脂质包封的RNA纳米颗粒具有双层结构，且脂质包含式I的阳离子脂质：

[0030] 

(I)

[0031] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物，其中R^5和R^6各自独立地选自以下构成的组：直链或支化C_1-C_{31}烷基、C_2-C_{31}烯基或C_2-C_{31}炔基和胆固醇基；L^5和L^6各自独立地选自直链C_1-C_{20}烷基和C_2-C_{20}烯基构成的组；X^5为-C(O)O-或-OC(O)-；X^6为-C(O)O-或-OC(O)-；X^7为S或O；L^7不存在或为低级烷基；R^4为直链或支化C_1-C_6烷基；R^7和R^8各自独立选自氢和直链或支化C_1-C_6烷基构成的组。

[0032] 在另一方面，本文公开了通过本文提出的方法生产的脂质包封的RNA纳米颗粒。

[0033] 在又一方面，本文公开了通过一种方法生产的脂质包封的RNA纳米颗粒，其中该方法包括以下步骤：a)使包含RNA的水溶液流过内径(ID)为约0.1″至0.132″的第一管；b)以通过第一管的水溶液的流速的三分之一，使包含脂质的乙醇溶液流过ID为约0.005″至0.02″的第二管，其中脂质包含阳离子脂质；以及c)通过使乙醇溶液和水溶液流入混合模块中，而混合乙醇溶液和水溶液，该混合模块由垂直连接到第一管的第二管组成；其中混合产生了在第一管中流动的输出溶液，输出溶液包含在约10％至75％乙醇v/v中的RNA和脂质的湍流，并且其中脂质包封的RNA纳米颗粒具有双层结构，并且其中脂质包封的RNA纳米颗粒具有双层结构且脂质包含式I的阳离子脂质。

[0034] 在一些实施例中，在第一管中流动的输出溶液包含在约10％至约50％乙醇v/v中的RNA和脂质的湍流。

[0035] 在一些实施例中，在第一管中流动的输出溶液包含在约16％至约50％乙醇v/v中的RNA和脂质的湍流。

[0036] 在一些实施例中，在第一管中流动的输出溶液包含约10％、15％、20％、25％、

30％、35％、40％、44％、50％、55％、60％、70％或75％乙醇v/v的RNA和脂质的湍流。

[0037] 在一些实施例中，输出的流速为至少200ml/min。

[0038] 在一些实施例中，输出的流速具有至少2,000的雷诺数。

[0039] 在一些实施例中，水溶液由第一HPLC泵泵送通过第一管。

[0040] 在一些实施例中，以至少10psi、25psi、50psi、75psi或100psi的背压泵送水溶液。

[0041] 在一些实施例中，第一管的ID为0.132″。

[0042] 在一些实施例中，以至少30ml/min、45ml/min、60ml/min、75ml/min、90ml/min、105ml/min、120ml/min、150ml/min、225ml/min、262.5ml/min、300ml/min或450ml/min的流速泵送水溶液。

[0043] 在一些实施例中，包含RNA的水溶液包含约2mM至50mM的柠檬酸盐缓冲液，pH在约3.0至4.5之间。

[0044] 在一些实施例中，包含RNA的水溶液还包含约10mM至200mM的NaCl。

[0045] 在一些实施例中，乙醇溶液由第二HPLC泵泵送通过第二管。

[0046] 在一些实施例中，乙醇溶液以至少40psi、80psi、150psi、300psi或400psi的背压泵送。

[0047] 在一些实施例中，第二管的ID为0.007″、0.01″或0.02″。

[0048] 在一些实施例中，乙醇溶液以至少10ml/min、15ml/min、20ml/min、25ml/min、30ml/min、35ml/min、40ml/min、50ml/min、60ml/min或75ml/min、87.5ml/min、100ml/min或150ml/min的流速泵送。

[0049] 在一些实施例中，第一和第二混合物保持在15-20℃。

[0050] 在一些实施例中，混合模块由垂直安装在第一管上的第二管组成，其中第一管具有穿过壁的开口，其中开口大约为第二管的外径的尺寸，并且其中第二管装配在开口上以允许第二管中的第二溶液连续移动到第一管中的第一溶液中。

[0051] 在一些实施例中，混合模块由不锈钢管组成。

[0052] 在一些实施例中，该方法还包括：泵送稀释缓冲液通过第三管，并且通过在Y型连接器区域中将稀释缓冲液引入到输出溶液中来混合稀释缓冲液与输出溶液，以产生稀释的输出溶液。

[0053] 在一些实施例中，该方法还包括：泵送第一稀释缓冲液通过第三管，并且通过在第一Y型连接器区域中将第一稀释缓冲液引入到输出溶液中来混合第一稀释缓冲液与输出溶液，以产生第一稀释的输出溶液。

[0054] 在一些实施例中，第一稀释缓冲液包含约10mM-20mM的Tris缓冲液、约45mM-55mM的NaCl和约8％-10％的蔗糖，pH在约7.4至8.5之间。

[0055] 在有些实施例中，第一稀释缓冲液包含约10mM-20mM的Tris缓冲液、约45mM-55mM的NaCl和约8％-10％的蔗糖，pH在约7.4至8.5之间，RNA为siRNA。

[0056] 在一些实施例中，该方法还包括：泵送第二稀释缓冲液通过第四管，并且通过在第二Y型连接器区域中将第二稀释缓冲液引入第一稀释的输出溶液中来混合第二稀释缓冲液与第一稀释的输出溶液，以产生第二稀释的输出溶液。

[0057] 在一些实施例中，第一稀释缓冲液包含约40mM至90mM的磷酸盐缓冲液，pH在约6.0至6.5之间；第二稀释缓冲液包含约20mM至50mM的HEPES缓冲液、约50mM至300mM的NaCl、约

0％至15％的蔗糖，pH在约7.4至8.5之间。

[0058] 在一些实施例中，第二稀释缓冲液包含约20mM至50mM的HEPES缓冲液、约50mM至300mM的NaCl、约0％至15％的蔗糖，pH在约7.4至8.5之间。

[0059] 在一些实施例中，第二稀释缓冲液还包含约25mM至100mM的NaCl。

[0060] 在一些实施例中，第一稀释缓冲液包含约40mM至90mM的磷酸盐缓冲液，pH在约6.0至6.5之间，RNA是mRNA。

[0061] 在一些实施例中，第一稀释缓冲液包含约40mM至90mM的磷酸盐缓冲液，pH在约6.0至6.5之间；第二稀释缓冲液包含约20mM至50mM的HEPES缓冲液、约50mM至300mM的NaCl、约0％至15％的蔗糖，pH在约7.4至8.5之间，RNA是mRNA。

[0062] 在一些实施例中，稀释缓冲液包含约：5至25mM的Tris、15至75mM的NaCl、约3％至12％的蔗糖，pH在约7.0至8.5之间；约5至20mM的Tris、约20至70mM的NaCl、约3％至12％的蔗糖，pH在约7.0至8.5之间；约20至65mM的磷酸盐，pH约5.5至8.0；约10至30mM的HEPES、约25至75mM的NaCl、约5至12％的蔗糖，pH在约7.0至8.5之间；或者，约25至65mM的HEPES、约25至65mM的NaCl、约3％至12％的蔗糖，pH在约7.0至8.5之间。在一些实施例中，稀释缓冲液包含：15mM的Tris、50mM的NaCl、9％的蔗糖，pH为7.5；10mM的Tris、50mM的NaCl、9％的蔗糖，pH为7.5；45mM的磷酸盐，pH为6.0；20mM的HEPES，50mM的NaCl，9％的蔗糖，pH在约7.4和8.0之间；或者，50mM的HEPES、50mM的NaCl、9％的蔗糖，pH在约7.4和8.0之间。在一些实施例中，稀释缓冲液包含：15mM的Tris、50mM的NaCl、9％的蔗糖，pH为7.5；10mM的Tris、50mM的NaCl、9％的蔗糖，pH为7.5；45mM的磷酸盐，pH为6.0；20mM的HEPES、50mM的NaCl，9％的蔗糖，pH为7.4至8.0；或者，50mM的HEPES、50mM的NaCl、9％的蔗糖，pH为7.4至8.0。

[0063] 在一些实施例中，稀释的输出溶液包含：6.25％乙醇；8.25％乙醇；8.3％乙醇；或者，12.5％乙醇。

[0064] 在一些实施例中，Y型连接器以大约45°的角度连接。

[0065] 在一些实施例中，Y型连接器由聚醚醚酮组成。

[0066] 在一些实施例中，稀释缓冲液以400-900ml/min的流速泵送通过第三管。

[0067] 在一些实施例中，第三管的ID为0.25″。

[0068] 在一些实施例中，脂质纳米颗粒包封的RNA是与脂质混合的RNA的至少70％、75％、80％或85％。

[0069] 在一些实施例中，脂质包封的RNA纳米颗粒中的脂质是与RNA混合的脂质的至少70％、75％、80％或85％。

[0070] 在一些实施例中，X^7为S。

[0071] 在一些实施例中，R^7和R^8各自独立地选自甲基、乙基和异丙基构成的组。

[0072] 在一些实施例中，L^5和L^6各自独立地为C_1-C_{10}烷基。在一些实施例中，L^5为C_1-C_3烷基，L^6为C_1-C_5烷基。在一些实施例中，L^6为C_1-C_2烷基。在一些实施例中，L^5和L^6各自为直链C_7烷基。在一些实施例中，L^5和L^6各自为直链C_9烷基。

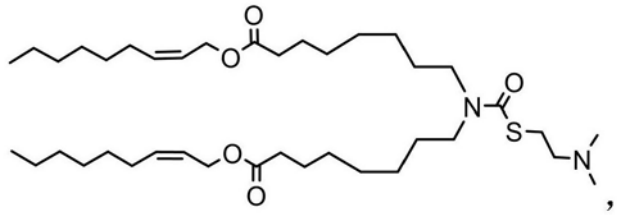
[0073] 在一些实施例中，R^5和R^6各自独立地为烯基。在一些实施例中，R^6为烯基。在一些实施例中，R^6为C_2-C_9烯基。在一些实施例中，R^5和R^6的烯基各自独立地包含单个双键。在一些实施例中，R^5和R^6各自为烷基。在一些实施例中，R^5为支化的烷烃。在一些实施例中，R^5和R^6各自独立选自C_9烷基、C_9烯基和C_9炔基组成的组。在一些实施例中，R^5和R^6各自独立选自C_{11}烷基、

C_{11}烯基和C_{11}炔基组成的组。在一些实施例中，R^5和R^6各自独立选自C_7烷基、C_7烯基和C_7炔基组成的组。在一些实施例中，R^5为$-CH((CH_2)_pCH_3)_2$或$-CH((CH_2)_pCH_3)((CH_2)_{p-1}CH_3)$，其中p为4-8。在一些实施例中，p为5且$L^5$为$C_1$-$C_3$烷基。在一些实施例中，p为6且$L^5$为$C_3$烷基。在一些实施例中，p为7。在一些实施例中，p为8且L^5为C_1-C_3烷基。在一些实施例中，R^5由$-CH((CH_2)_pCH_3)((CH_2)_{p-1}CH_3)$组成，其中p为7或8。

[0074] 在一些实施例中，R^4为亚乙基或亚丙基。在一些实施例中，R^4为正亚丙基或亚异丁基(isobutylene)。

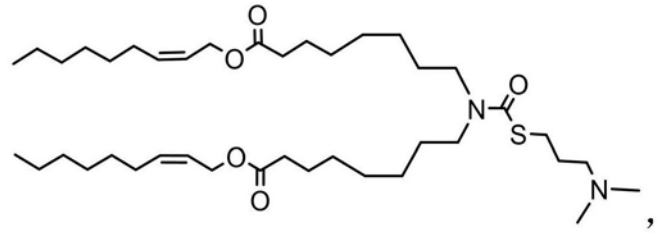
[0075] 在一些实施例中，L^7不存在，R^4为亚乙基，X^7为S，R^7和R^8各自为甲基。在一些实施例中，L^7不存在，R^4为正亚丙基，X^7为S，R^7和R^8各自为甲基。在一些实施例中，L^7不存在，R^4为亚乙基，X^7为S，R^7和R^8各自为乙基。

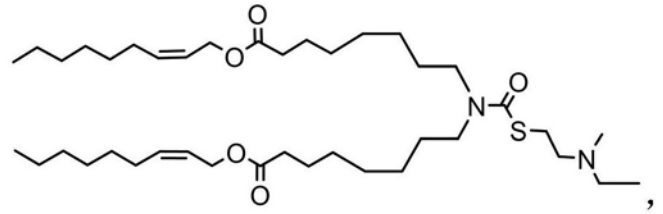
[0076] 在一些实施例中，阳离子脂质选自以下组成的组：

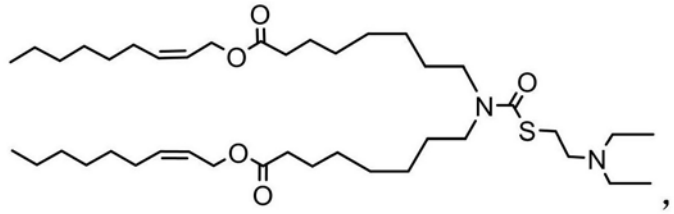
[0077] 

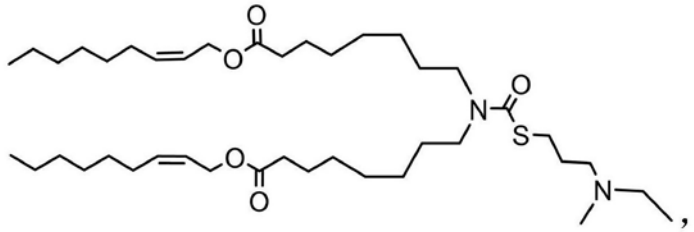
，

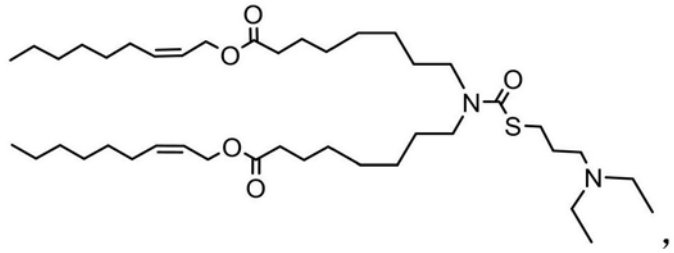
[0078]

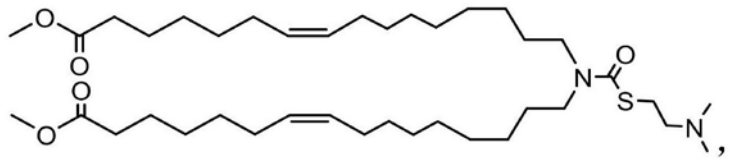


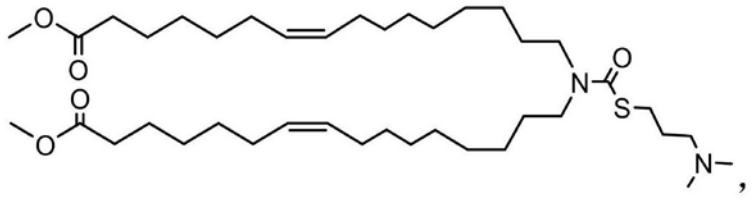




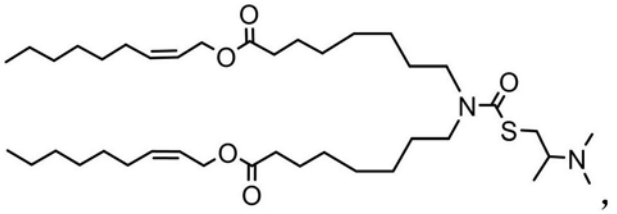


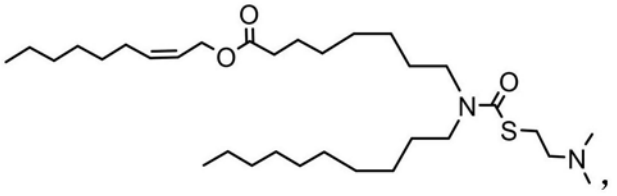


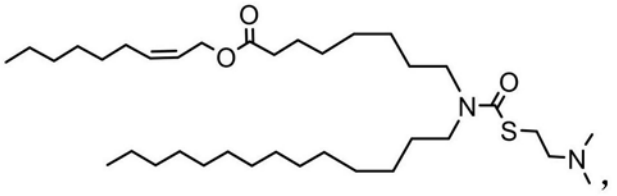


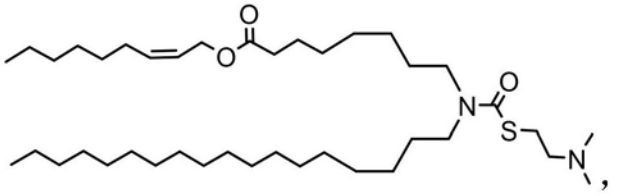


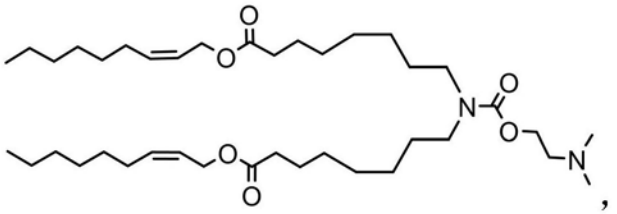
[0079]

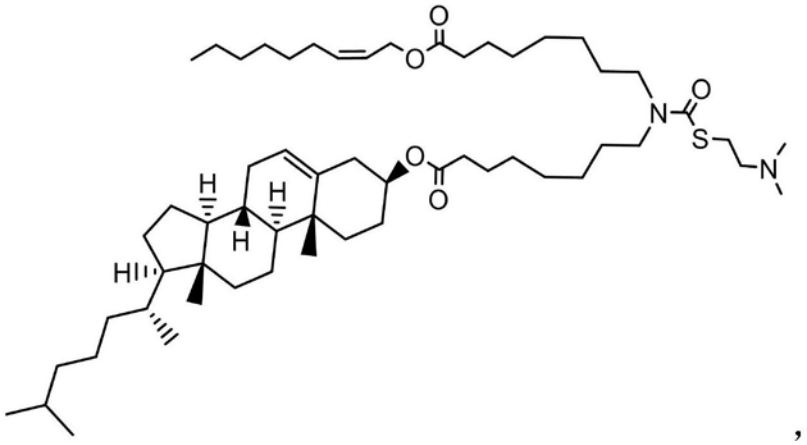


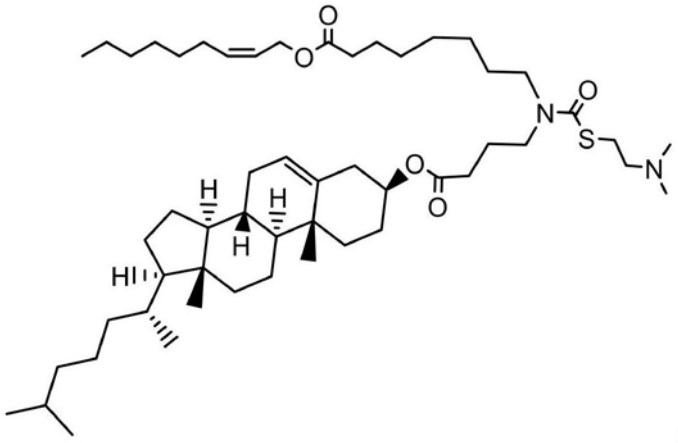


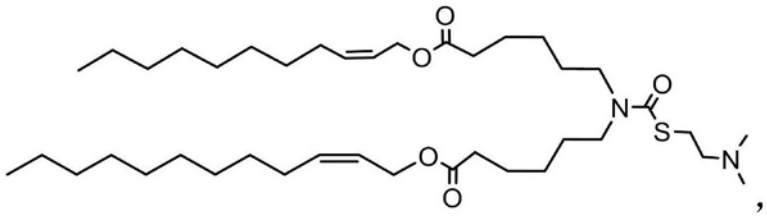


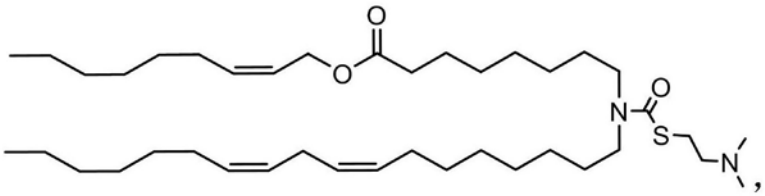


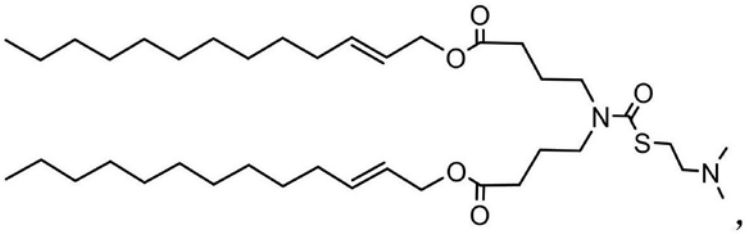




[0080] ，

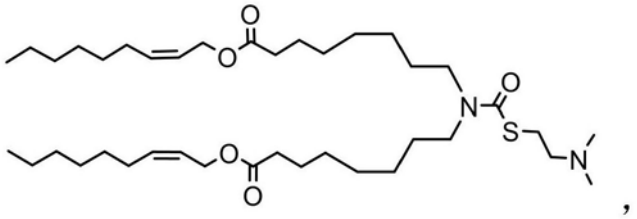
，

[0081] ，以及

[0082] ，

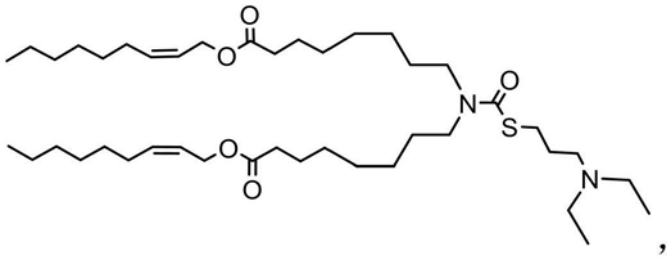
[0083] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

[0084] 在一些实施例中，阳离子脂质为

[0085] ，

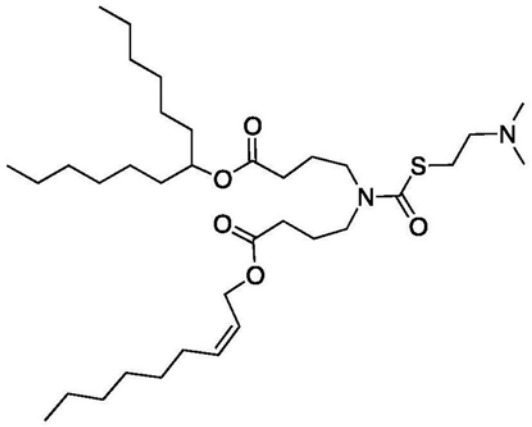
[0086] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

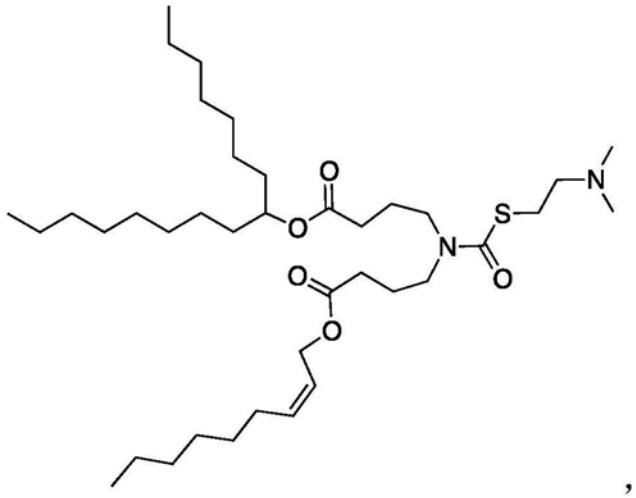
[0087] 在一些实施例中，阳离子脂质为

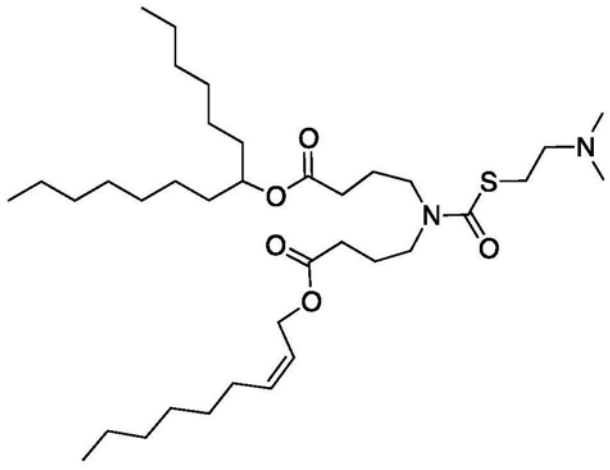
[0088] 

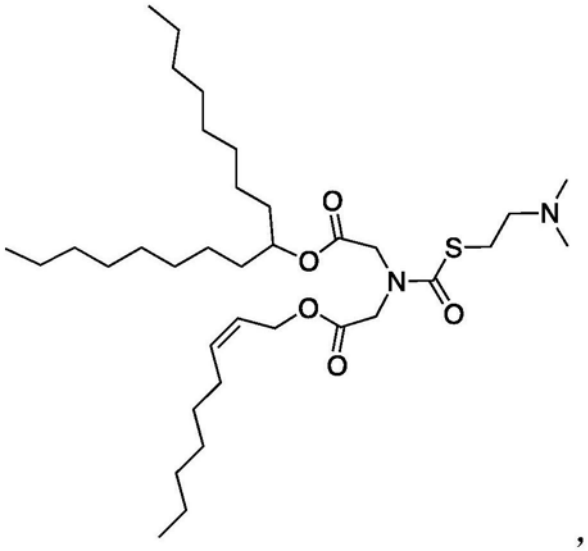
[0089] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

[0090] 在一些实施例中,脂质选自以下构成的组:



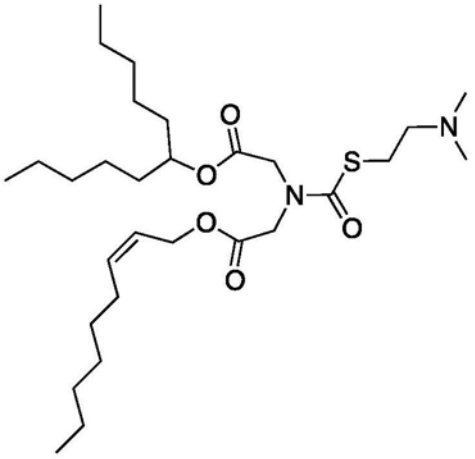
[0091] 



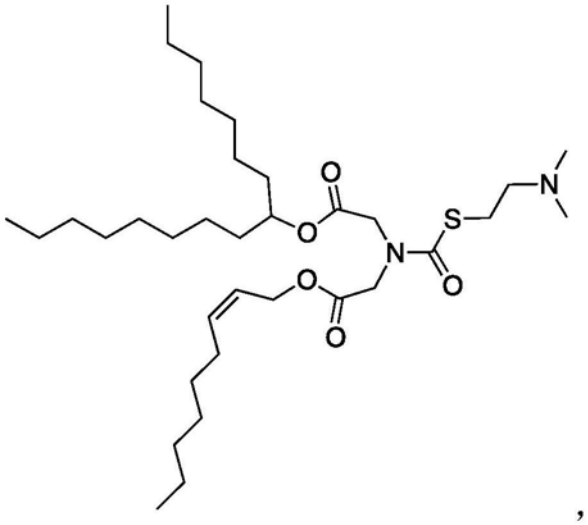


,

[0092]

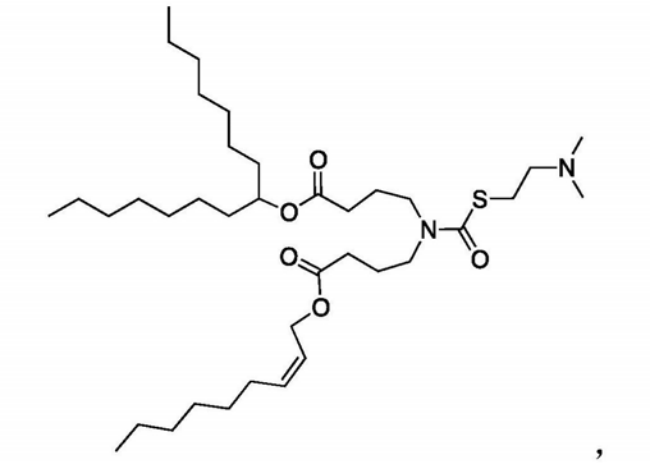


,

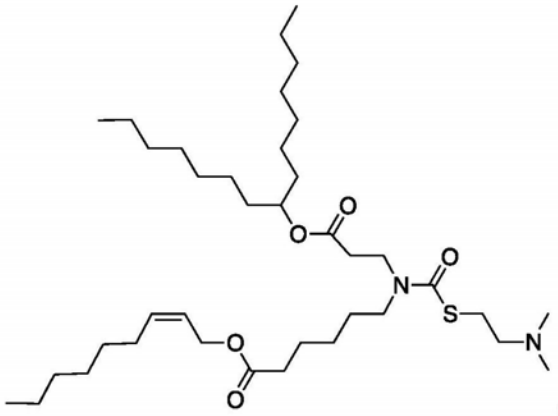


,

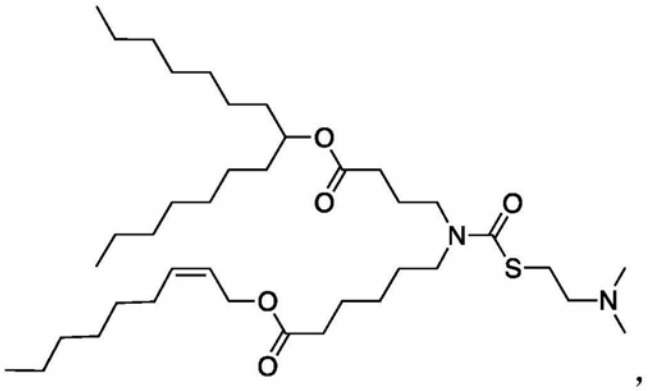
[0093]



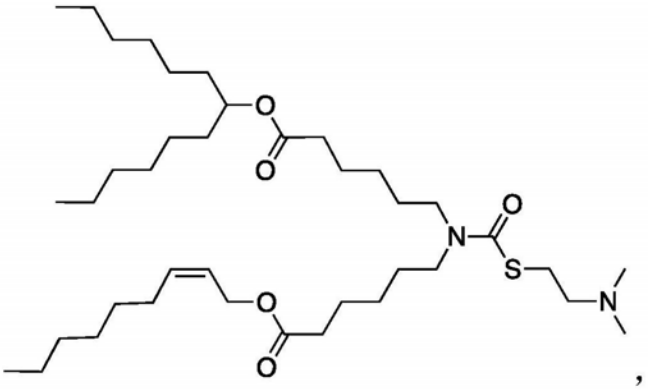
,



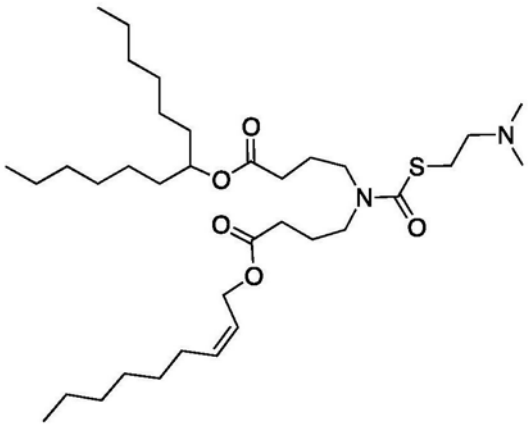
,



,

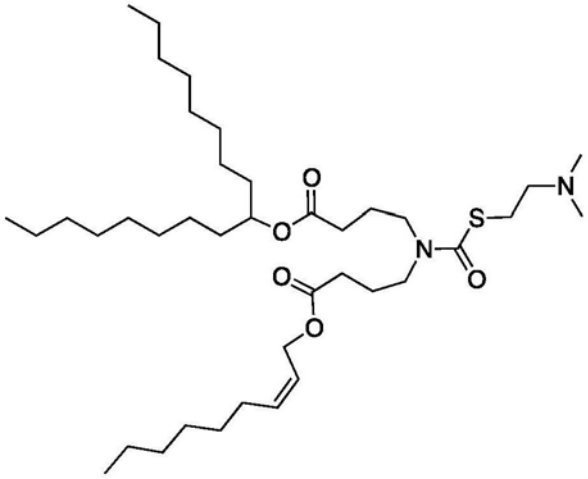


,

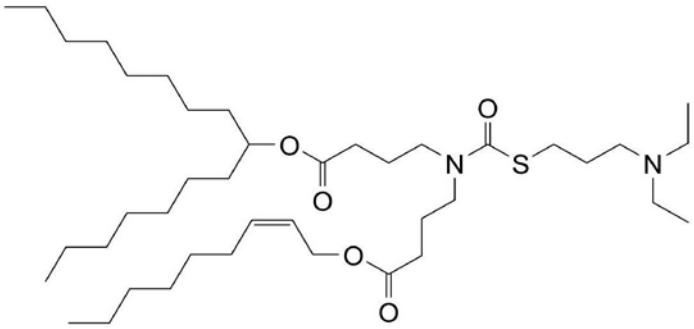


，

[0094]

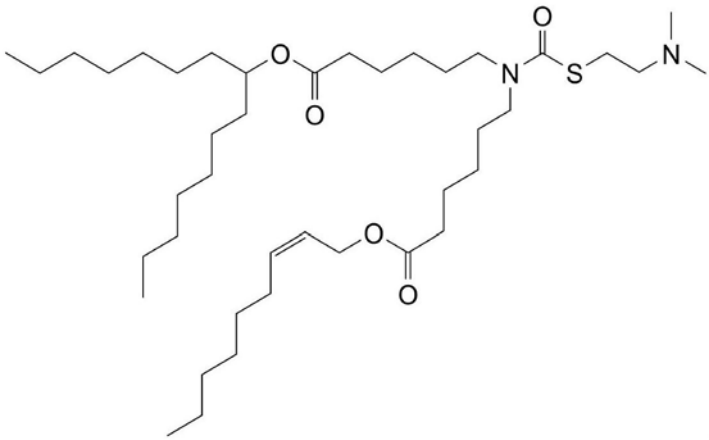


，



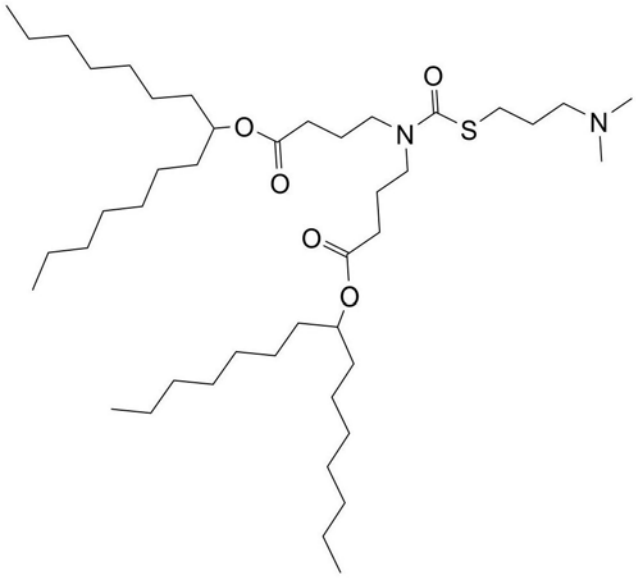
，

[0095]



以及

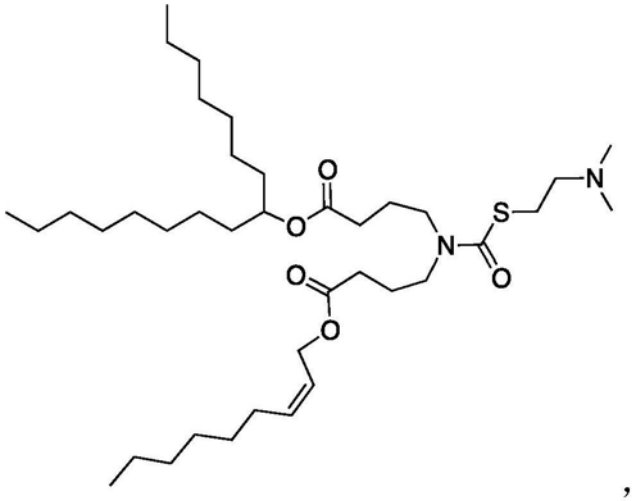
，

[0096] 

，

[0097] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

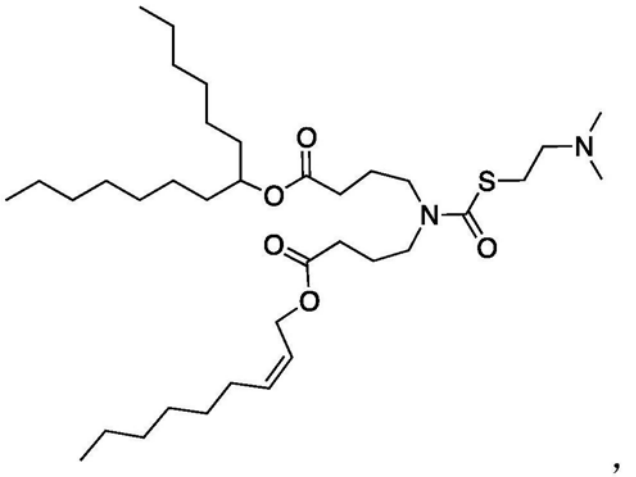
[0098] 在一些实施例中，阳离子脂质为

[0099] 

，

[0100] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

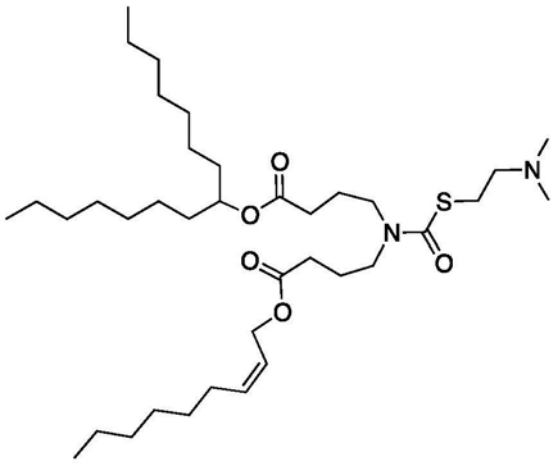
[0101] 在一些实施例中，阳离子脂质为

[0102] 

，

[0103] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

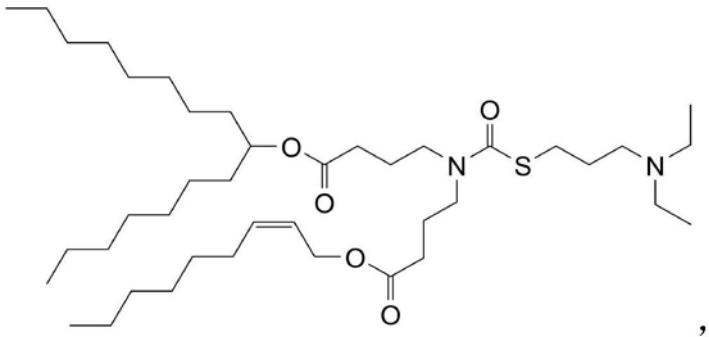
[0104] 在一些实施例中,阳离子脂质为

[0105] 

,

[0106] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

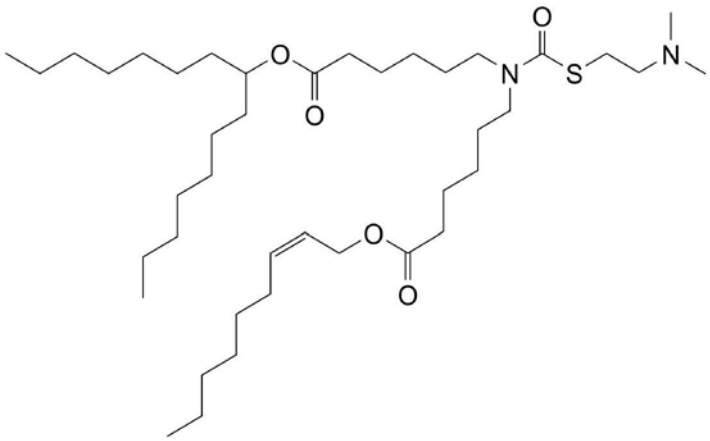
[0107] 在一些实施例中,阳离子脂质为

[0108] 

,

[0109] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

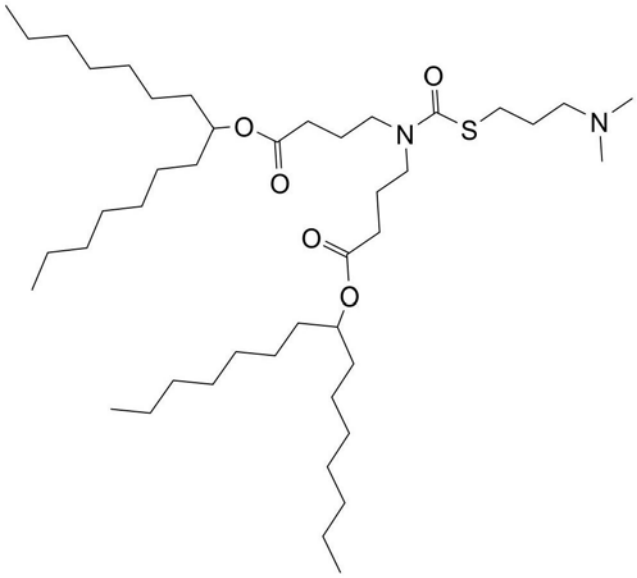
[0110] 在一些实施例中,阳离子脂质为

[0111] 

,

[0112] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

[0113] 在一些实施例中,阳离子脂质为

[0114] 

，

[0115] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

[0116] 在一些实施例中，脂质包封的RNA纳米颗粒的平均粒径小于约100nm。在一些实施例中，脂质包封的RNA纳米颗粒的平均粒径为约55nm至约85nm。

[0117] 在一些实施例中，脂质包封的RNA纳米颗粒包封至少约50％的RNA。在一些实施例中，脂质包封的RNA纳米颗粒包封至少约85％的RNA。

[0118] 在一些实施例中，脂质包封的RNA纳米颗粒还包含辅助脂质，辅助脂质选自以下构成的组：二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)和磷脂酰胆碱(PC)。

[0119] 在一些实施例中，辅助脂质是二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)。

[0120] 在一些实施例中，脂质包封的RNA纳米颗粒还包含胆固醇。

[0121] 在一些实施例中，脂质包封的RNA纳米颗粒还包含聚乙二醇(PEG)-脂质缀合物。在一些实施例中，PEG-脂质缀合物是PEG-DMG。在一些实施例中，PEG-DMG是PEG2000-DMG(二肉豆蔻酰甘油)。

[0122] 在一些实施例中，脂质包封的RNA纳米颗粒的脂质部分包含约48mol％至约66mol％的可电离的阳离子脂质、约2mol％至约12mol％的DSPC、约25mol％至约42mol％的胆固醇和约0.5mol％至约3mol％的PEG2000-DMG。在一些实施例中，脂质包封的RNA纳米颗粒的脂质部分包含约50mol％至约61mol％的可电离的阳离子脂质、约5mol％至约9mol％的DSPC、约29mol％至约38mol％的胆固醇和约1mol％至约2mol％的PEG2000-DMG。在一些实施例中，脂质包封的RNA纳米颗粒的脂质部分包含约56mol％至约58mol％的可电离的阳离子脂质、约6mol％至约8mol％的DSPC、约31mol％至约34mol％的胆固醇和约1.25mol％至约1.75mol％的PEG2000-DMG。

[0123] 在一些实施例中，脂质包封的RNA纳米颗粒的总脂质:RNA重量比为约50:1至约3:1。在一些实施例中，脂质包封的RNA纳米颗粒的总脂质:RNA重量比为约50:1至约5:1。在一些实施例中，脂质包封的RNA纳米颗粒的总脂质:RNA重量比为约50:1至约10:1。在一些实施例中，脂质包封的RNA纳米颗粒的总脂质:RNA重量比为约40:1至约20:1。在一些实施例中，脂质包封的RNA纳米颗粒的总脂质:RNA重量比为约35:1至约25:1。在一些实施例中，脂质包

封的RNA纳米颗粒的总脂质:RNA重量比为约28:1至约32:1。在一些实施例中,脂质包封的RNA纳米颗粒的总脂质:RNA重量比为约29:1至约31:1。

[0124] 在一些实施例中,脂质包封的RNA纳米颗粒包含阳离子脂质:DOTAP:DSPC:胆固醇:PEG的摩尔百分比为25:25:10:38.5:1.5、25:25:10:37:3、25:25:10:35:5、20:20:7:51.5:1.5、25:20:10:42:3、20:30:13:32:5、25:20:10:40:5、25:25:13:35.5:1.5、25:30:7:35:3、30:20:13:34:3、30:25:7:33:3、30:30:10:25.8:1.5、15:20:13:49:3、20:20:13:44:3、20:25:13:39:3、15:25:13:44:3、20:25:13:39:3、25:25:13:34:3、30:20:13:34:3或30:30:13:29:3。

[0125] 在一些实施例中,脂质包封的RNA纳米颗粒包含约20w/w%至60w/w%的阳离子脂质。在一些实施例中,脂质包封的RNA纳米颗粒包含小于约90w/w%的阳离子脂质。

[0126] 在一些实施例中,脂质包封的RNA纳米颗粒包含约5w/w%至30w/w%的辅助脂质。

[0127] 在一些实施例中,脂质包封的RNA纳米颗粒包含约0w/w%至60w/w%的胆固醇。

[0128] 在一些实施例中,脂质包封的RNA纳米颗粒包含约0.5w/w%至15w/w%的聚乙二醇(PEG)。

[0129] 在一些实施例中,脂质包封的RNA纳米颗粒包含约5w/w%至25w/w%的中性脂质。

[0130] 在一些实施例中,脂质包封的RNA纳米颗粒包含约0w/w%至30w/w%的磷脂。

[0131] 在一些实施例中,脂质包封的RNA纳米颗粒包含摩尔比为约1.5:1至9:1的胆固醇:RNA。

[0132] 在一些实施例中,脂质包封的RNA纳米颗粒包含摩尔比为约0.5:1至5:1的PEG:mRNA。

[0133] 在一些实施例中,脂质包封的RNA纳米颗粒包含摩尔比为约0.25:1至4:1的辅助脂质:RNA。

[0134] 在一些实施例中,脂质包封的RNA纳米颗粒包含摩尔比为约1:1至7:1的阳离子脂质:RNA。在一些实施例中,脂质包封的RNA纳米颗粒包含约10w/w%至98w/w%的式I的阳离子脂质。在一些实施例中,脂质包封的RNA纳米颗粒包含摩尔比为约5.4:1至15.4:1的阳离子脂质:RNA。在一些实施例中,脂质包封的RNA纳米颗粒包含如图2所示的阳离子脂质Mol%和/或阳离子脂质:RNA的比率。在一些实施方案中,脂质包封的RNA纳米颗粒包含如图3所示的阳离子脂质组成和/或脂质Mol%。

[0135] 在一些实施例中,RNA选自以下构成的组:tRNA(转运RNA)、snRNA(小核RNA)、rRNA(核糖体RNA)、mRNA(信使RNA)、反义RNA、siRNA(小干扰RNA)和自我复制型RNA。

[0136] 在一些实施例中,平均粒径小于70nm、80nm、90nm或100nm。

[0137] 在一些实施例中,多分散指数小于0.05、0.07或0.09。

[0138] 在一些实施例中,包封的RNA的百分比大于90%、94%、96%或98%。

[0139] 在一些实施例中,批次大小为0.05至100g的RNA。在一些实施例中,批次大小为0.05至30g的RNA。

[0140] 在一些实施例中,批次之间的平均粒径的差异性小于10%。

[0141] 天然核苷酸和修饰核苷酸

[0142] 优选地,本文所描述的mRNA包含一个或多个化学修饰的核苷酸。核酸单体的例子包括非天然的、修饰的和化学修饰的核苷酸,包括本领域已知的任何此类核苷酸。核苷酸可

以在碱基部分或糖部分进行人工修饰。在自然界，大多数多核苷酸包含“未修饰的”或“天然的”核苷酸，包括：嘌呤碱基——腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)，以及嘧啶碱基——胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。这些碱基通常在1’位固定到核糖或脱氧核糖上。使用包含化学修饰的核苷酸的mRNA多核苷酸已显示改进mRNA表达、表达率、半衰期和/或表达的蛋白质浓度。包含化学修饰的核苷酸的mRNA多核苷酸也已经用于优化蛋白质定位，从而避免有害的生物反应(bio-response)，例如免疫应答(immune response)和/或降解途径。

[0143] 修饰的或化学修饰的核苷酸的例子包括：5-羟基胞苷、5-烷基胞苷、5-羟烷基胞苷、5-羧基胞苷、5-甲酰基胞苷、5-烷氧基胞苷、5-炔基胞苷、5-卤代胞苷、2-硫代胞苷、N^4-烷基胞苷、N^4-氨基胞苷、N^4-乙酰基胞苷和N^4,N^4-二烷基胞苷。

[0144] 修饰的或化学修饰的核苷酸的例子包括：5-羟基胞苷、5-甲基胞苷、5-羟甲基胞苷、5-羧基胞苷、5-甲酰基胞苷、5-甲氧基胞苷、5-丙炔基胞苷、5-溴胞苷、5-碘胞苷、2-硫代胞苷；N^4-甲基胞苷、N^4-氨基胞苷、N^4-乙酰基胞苷和N^4,N^4-二甲基胞苷。

[0145] 修饰的或化学修饰的核苷酸的例子包括：5-羟基尿苷、5-烷基尿苷、5-羟烷基尿苷、5-羧基尿苷、5-羧烷基酯尿苷、5-甲酰基尿苷、5-烷氧基尿苷、5-炔基尿苷、5-卤代尿苷、2-硫代尿苷和6-烷基尿苷。

[0146] 修饰的或化学修饰的核苷酸的例子包括：5-羟基尿苷、5-甲基尿苷、5-羟甲基尿苷、5-羧基尿苷、5-羧甲基酯尿苷、5-甲酰基尿苷、5-甲氧基尿苷(本文也称为“5MeOU”)、5-丙炔基尿苷、5-溴尿苷、5-氟尿苷、5-碘尿苷、2-硫代尿苷和6-甲基尿苷。

[0147] 修饰的或化学修饰的核苷酸的例子包括：5-甲氧羰甲基-2-硫代尿苷、5-甲基氨甲基-2-硫代尿苷、5-氨基甲酰甲基尿苷、5-氨基甲酰甲基-2’-O-甲基尿苷、1-甲基-3-(3-氨基-3-羧丙基)假尿苷、5-甲基氨甲基-2-硒代尿苷、5-羧甲基尿苷、5-甲基二氢尿苷、5-牛磺酸甲基尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代尿苷、5-(异戊烯基氨基甲基)尿苷、2’-O-甲基假尿苷、2-硫代-2’O-甲基尿苷和3,2’-O-二甲基尿苷。

[0148] 修饰的或化学修饰的核苷酸的例子包括：N^6-甲基腺苷、2-氨基腺苷、3-甲基腺苷、8-氮杂腺苷、7-去氮腺苷、8-氧腺苷(8-oxoadenosine)、8-溴腺苷、2-甲硫基-N^6-甲基腺苷、N^6-异戊烯基腺苷，2-甲硫基-N^6-异戊烯基腺苷、N^6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷、2-甲硫基-N^6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷、N^6-甘氨酸氨基甲酰基腺苷(N^6-glycinylcarbamoyladenosine)、N^6-苏氨酸氨基甲酰基-腺苷(N^6-threonylcarbamoyl-adenosine)、N^6-甲基-N^6-苏氨酸氨基甲酰基-腺苷、2-甲硫基-N^6-苏氨酸氨基甲酰基-腺苷、N^6,N^6-二甲基腺苷、N^6-羟基正缬氨酰氨基甲酰基腺苷(N^6-hydroxynorvalylcarbamoyladenosine)、2-甲硫基-N^6-羟基正缬氨酰氨基甲酰基-腺苷、N^6-乙酰基-腺苷、7-甲基-腺嘌呤、2-甲硫基-腺嘌呤、2-甲氧基-腺嘌呤、α-硫代-腺苷、2’-O-甲基-腺苷、N^6,2’-O-二甲基-腺苷、N^6,N^6,2’-O-三甲基-腺苷、1,2’-O-二甲基-腺苷、2’-O-核糖基腺苷、2-氨基-N^6-甲基-嘌呤、1-硫代-腺苷、2’-F-阿糖腺苷、2’-F-腺苷、2’-OH-阿糖腺苷，和N^6-(19-氨基-五氧杂十九烷基)-腺苷。

[0149] 修饰的或化学修饰的核苷酸的例子包括：N^1-烷基鸟苷、N^2-烷基鸟苷、噻吩并鸟苷(thienoguanosines)、7-去氮鸟苷、8-氧鸟苷(8-oxoguanosines)、8-溴鸟苷、O6-烷基鸟苷、黄苷、肌苷和N^1-烷基肌苷。

[0150] 修饰的或化学修饰的核苷酸的例子包括：N^1-甲基鸟苷、N^2-甲基鸟苷、噻吩并鸟苷、

7-去氮鸟苷、8-氧鸟苷、8-溴鸟苷、O6-甲基鸟苷、黄苷、肌苷和N1-甲基肌苷。

[0151] 修饰的或化学修饰的核苷酸的例子包括假尿苷。假尿苷的例子包括:N^1-烷基假尿苷、N^1-环烷基假尿苷、N^1-羟基假尿苷、N^1-羟烷基假尿苷、N^1-苯基假尿苷、N^1-苯基烷基假尿苷、N^1-氨基烷基假尿苷、N^3-烷基假尿苷、N^6-烷基假尿苷、N^6-烷氧基假尿苷、N^6-羟基假尿苷、N^6-羟烷基假尿苷、N^6-吗啉代假尿苷、N^6-苯基假尿苷和N^6-卤代假尿苷。假尿苷的例子包括:N^1-烷基-N^6-烷基假尿苷、N^1-烷基-N^6-烷氧基假尿苷、N^1-烷基-N^6-羟基假尿苷、N^1-烷基-N^6-羟烷基假尿苷、N^1-烷基-N^6-吗啉代假尿苷、N^1-烷基-N^6-苯基假尿苷和N^1-烷基-N^6-卤代假尿苷。在这些例子中,烷基、环烷基和苯基取代基可以是未取代的,或进一步取代有烷基、卤素、卤代烷基、氨基或硝基取代基。

[0152] 假尿苷的例子包括:N^1-甲基假尿苷(本文也称为"N^1MPU")、N^1-乙基假尿苷、N^1-丙基假尿苷、N^1-环丙基假尿苷、N^1-苯基假尿苷、N^1-氨基甲基假尿苷、N^3-甲基假尿苷、N^1-羟基假尿苷和N^1-羟甲基假尿苷。

[0153] 核酸单体的例子包括修饰的和化学修饰的核苷酸,包括本领域已知的任何此类核苷酸。

[0154] 修饰的和化学修饰的核苷酸单体的例子包括本领域已知的任何此类核苷酸,例如,2'-O-甲基核糖核苷酸、2'-O-甲基嘌呤核苷酸、2'-脱氧-2'-氟核糖核苷酸、2'-脱氧-2'-氟嘧啶核苷酸、2'-脱氧核糖核苷酸、2'-脱氧嘌呤核苷酸、通用碱基核苷酸、5-C-甲基-核苷酸和反向脱氧碱基单体残基。

[0155] 修饰的和化学修饰的核苷酸单体的例子包括:3'-末端稳定的核苷酸、3'-甘油基核苷酸、3'-反向脱碱基核苷酸和3'-反向胸苷。

[0156] 修饰的和化学修饰的核苷酸单体的例子包括:锁核酸核苷酸(LNA)、2'-O,4'-C-亚甲基-(D-呋喃核糖基)核苷酸、2'-甲氧基乙氧基(MOE)核苷酸、2'-甲基-硫代-乙基、2'-脱氧-2'-氟核苷酸和2'-O-甲基核苷酸。在一个示例性实施例中,修饰的单体是锁核酸核苷酸(LNA)。

[0157] 修饰的和化学修饰的核苷酸单体的例子包括2',4'-约束的(constrained)2'-O-甲氧基乙基(cMOE)和2'-O-乙基(cEt)修饰的DNA。

[0158] 修饰的和化学修饰的核苷酸单体的例子包括:2'-氨基核苷酸、2'-O-氨基核苷酸、2'-C-烯丙基核苷酸和2'-O-烯丙基核苷酸。

[0159] 修饰的和化学修饰的核苷酸单体的例子包括N^6-甲基腺苷核苷酸。

[0160] 修饰的和化学修饰的核苷酸单体的例子包括具有以下修饰碱基的核苷酸单体:5-(3-氨基)丙基尿苷、5-(2-巯基)乙基尿苷、5-溴尿苷;8-溴鸟苷或7-去氮腺苷。

[0161] 修饰的和化学修饰的核苷酸单体的例子包括2'-O-氨丙基取代的核苷酸。

[0162] 修饰的和化学修饰的核苷酸单体的例子包括用2'-R、2'-OR、2'-卤素、2'-SR或2'-氨基取代核苷酸的2'-OH基团,其中R可以是H、烷基、烯基或炔基。

[0163] 上面描述的碱基修饰的例子可以与核苷或核苷酸结构的另外修饰组合,包括糖修饰和连接(linkage)修饰。某些修饰的或化学修饰的核苷酸单体可以在自然界中找到。

[0164] 优选的核苷酸修饰包括N^1-甲基假尿苷和5-甲氧基尿苷。

[0165] 5'端帽

[0166] mRNA(或自我复制型RNA)的5'末端上的帽结构,存在于所有真核生物(和一些病

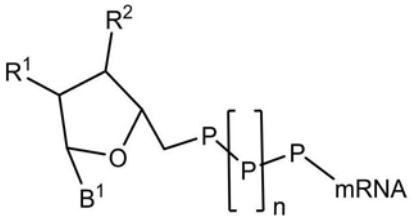
毒)中,对于稳定体内mRNA很重要。天然存在的帽结构包括核糖-鸟苷残基,核糖-鸟苷残基在鸟嘌呤碱基的N7位被甲基化。这种7-甲基鸟苷(m^7G)通过5'-至5'-三磷酸链在mRNA分子的5'-末端连接。m^7Gppp片段在5'末端的存在对于mRNA成熟是必要的,因为它保护mRNA不被外切核酸酶降解,促进mRNA从细胞核到细胞质的转运,并在翻译起始复合物的组装中起关键作用(Cell 9:645-653,(1976);Nature266:235,(1977);Federation of Experimental Biologists Society Letter96:1-11,(1978);Cell 40:223-24,(1985);Prog.Nuc.Acid Res.35:173-207,(1988);Ann.Rev.Biochem.68:913-963,(1999);and J Biol.Chem.274:30337-3040,(1999))。

[0167] 只有那些携带帽结构的mRNA在帽依赖性翻译中是有活性的;mRNA的"断头(decapitation)"导致其蛋白质合成的模板活性几乎完全丧失(Nature,255:33-37,(1975);J.Biol.Chem.,vol.253:5228-5231,(1978);and Proc.Natl.Acad.Sci.USA,72:1189-1193,(1975))。

[0168] 真核mRNA的另一要素是在转录物位置1(帽1)存在2'-O-甲基核苷残基,在一些情况下,在转录物位置1和2(帽2)存在。mRNA的2'-O-甲基化提供了更高的体内mRNA翻译效率(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:3952-3956(1980)),并进一步提高了5'端加帽的mRNA的核酸酶稳定性。具有帽1(和帽2)的mRNA是独特的标记,其允许细胞识别真正的mRNA 5'端,并且在一些情况下,区分源自感染性遗传因子(genetic element)的转录物(Nucleic Acid Research 43:482-492(2015))。

[0169] 5'端帽结构的一些例子和制备包含5'端帽结构的mRNA的方法在WO2015/051169A2、WO2015/061491、US2018/0273576以及美国专利号8,093,367、8,304,529和U.S.10,487,105中给出。在一些实施例中,5'端帽是本领域已知的m^7GpppAmpG。在一些实施例中,5'端帽是本领域已知的m^7GpppG或m^7GpppGm。下面提供5'端帽结构的实施例的结构式。

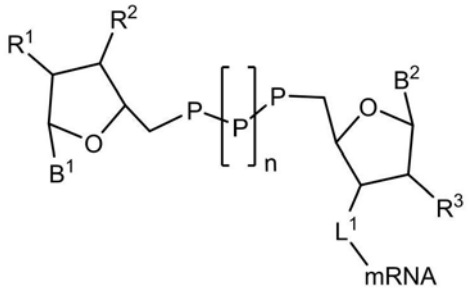
[0170] 在一些实施例中,本文所描述的mRNA包含具有式(帽I)结构的5'端帽。

[0171] 

(帽 I)

[0172] 其中B^1是天然或修饰的核碱基;R^1和R^2各自独立地选自卤素、OH和OCH_3;每个P独立地选自磷酸酯、硫代磷酸酯(phophorothioate)和硼烷基磷酸酯(boranophosphate)组成的组;n为0、1、2或3;mRNA代表在其5'末端连接的本公开的mRNA。在一些实施例中,B^1为G、m^7G或A。在一些实施例中,n为0。在一些实施例中,B^1为A或m^6A,R^1为OCH_3;其中G为鸟嘌呤,m^7G为7-甲基鸟嘌呤,A为腺嘌呤,m^6A为N^6-甲基腺嘌呤。

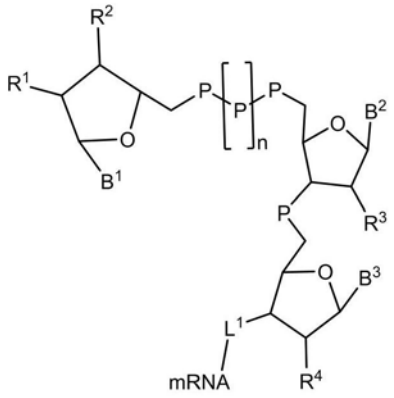
[0173] 在一些实施例中,本文所描述的mRNA包含具有式(帽II)结构的5'端帽。

[0174] 

（帽 II）

[0175] 其中B^1和B^2各自独立地为天然或修饰的核碱基;R^1、R^2和R^3各自独立地选自卤素、OH和OCH_3;每个P独立地选自磷酸酯、硫代磷酸酯和硼烷基磷酸酯组成的组;mRNA代表在其5'末端连接的本公开的mRNA;n为0、1、2或3;L^1为磷酸酯、硫代磷酸酯或硼烷基磷酸酯,其中R^1、R^2和R^3中的至少一个为OH。在一些实施例中,B^1为G、m^7G或A。在一些实施例中,n为0。在一些实施例中,B^1为A或m^6A,R^1为OCH_3;其中G为鸟嘌呤,m^7G为7-甲基鸟嘌呤,A为腺嘌呤,m^6A为N^6-甲基腺嘌呤。

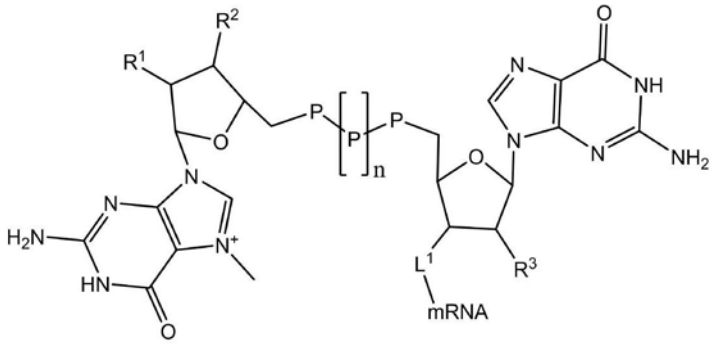
[0176] 在一些实施例中,本文所描述的mRNA包含具有式(帽III)结构的5'端帽。

[0177] 

（帽 III）

[0178] 其中B^1、B^2和B^3各自独立地为天然或修饰的核碱基;R^1、R^2、R^3和R^4各自独立选自卤素、OH和OCH_3;每个P独立地选自磷酸酯、硫代磷酸酯和硼烷基磷酸酯组成的组;mRNA代表在其5'末端连接的本公开的mRNA;n为0、1、2或3;L^1为磷酸酯、硫代磷酸酯或硼烷基磷酸酯,其中R^1、R^2、R^3和R^4中的至少一个为OH。在一些实施例中,B^1为G、m^7G或A,在一些实施例中,B^1为A或m^6A,R^1为OCH_3;其中G为鸟嘌呤,m^7G为7-甲基鸟嘌呤,A为腺嘌呤,m^6A为N^6-甲基腺嘌呤。在一些实施例中,n为1。

[0179] 在一些实施例中,本文所描述的mRNA包含具有式(帽IV)结构的m^7GpppG 5'端帽类似物。

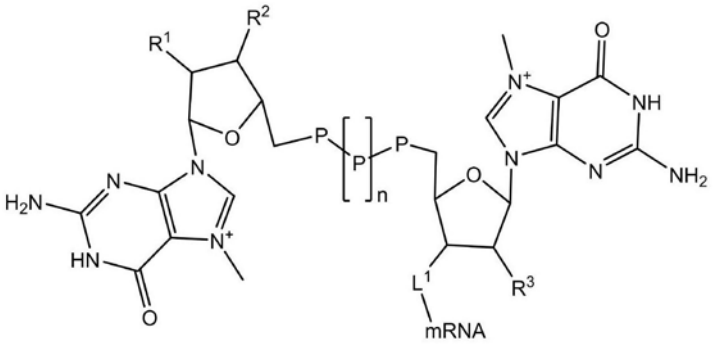
[0180] 

（帽 IV）

[0181] 其中,R^1、R^2和R^3各自独立地选自卤素、OH和OCH_3;每个P独立地选自磷酸酯、硫代磷

酸酯和硼烷基磷酸酯组成的组;mRNA代表在其5'末端连接的本公开的mRNA;n为0、1、2或3;L^1为磷酸酯、硫代磷酸酯或硼烷基磷酸酯,其中R^1、R^2和R^3中的至少一个为OH。在一些实施例中,5'端帽为m^7GpppG,其中R^1、R^2和R^3各自为OH,n为1,L^1为磷酸酯。在一些实施例中,n为1。在一些实施例中,n为1。在一些实施例中,R^1和R^2各自为OH,R^3为OCH_3,每个P为磷酸酯,由此形成磷酸二酯键,mRNA为在其5'端连接的本公开内容的mRNA,n为1,L^1为磷酸酯。

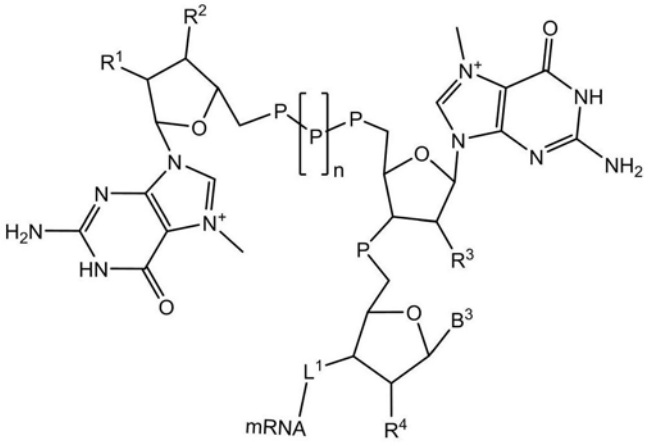
[0182] 在一些实施例中,本文所描述的mRNA包含具有式(帽V)结构的m^7Gpppm^7G 5'端帽类似物。

[0183] 

(帽 V)

[0184] 其中,R^1、R^2和R^3各自独立地选自卤素、OH和OCH_3;每个P独立地选自磷酸酯、硫代磷酸酯和硼烷基磷酸酯组成的组;mRNA代表在其5'末端连接的本公开的mRNA;n为0、1、2或3;L^1为磷酸酯、硫代磷酸酯或硼烷基磷酸酯,其中R^1、R^2和R^3中的至少一个为OH。在一些实施例中,n为0。

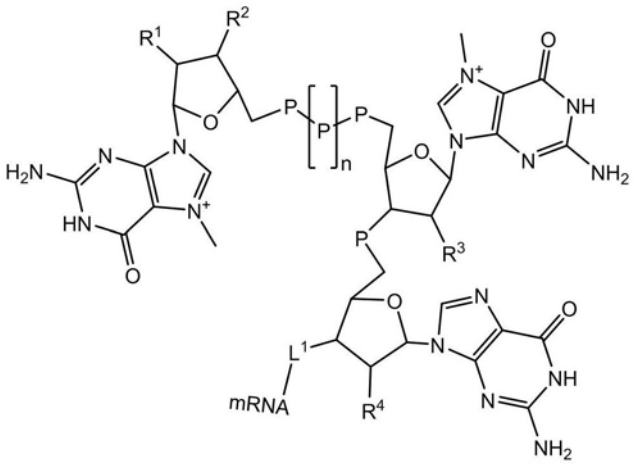
[0185] 在一些实施例中,本文所描述的mRNA包含m^7Gpppm^7GpN——5'端帽类似物,其中N为天然或修饰的核苷酸,5'端帽类似物具有式(帽VI)的结构。

[0186] 

(帽 VI)

[0187] 其中B^3为天然或修饰的核碱基;R^1、R^2、R^3和R^4各自独立选自卤素、OH和OCH_3;每个P独立地选自磷酸酯、硫代磷酸酯和硼烷基磷酸酯组成的组;mRNA代表在其5'末端连接的本公开的mRNA;n为0、1、2或3;L^1为磷酸酯、硫代磷酸酯或硼烷基磷酸酯,其中R^1、R^2、R^3和R^4中的至少一个为OH。在一些实施例中,B^1为G、m^7G或A,在一些实施例中,B^1为A或m^6A,R^1为OCH_3;其中G为鸟嘌呤,m^7G为7-甲基鸟嘌呤,A为腺嘌呤,m^6A为N^6-甲基腺嘌呤。在一些实施例中,n为1。

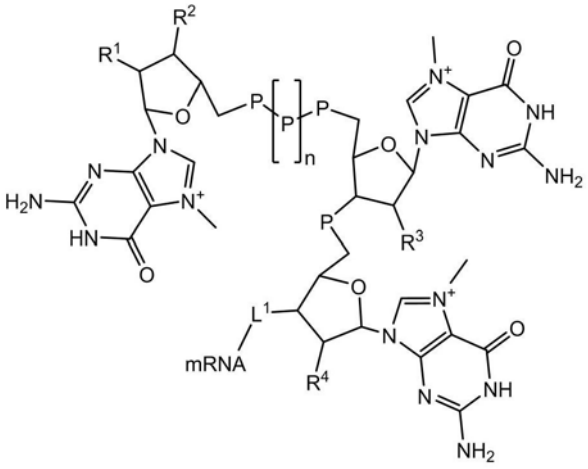
[0188] 在一些实施例中,本文所描述的mRNA包含具有式(帽VII)结构的m^7Gpppm^7GpG 5'端帽类似物。

[0189] 

（帽 VII）

[0190] 其中，R^1、R^2、R^3和R^4各自独立地选自卤素、OH和OCH_3；每个P独立地选自磷酸酯、硫代磷酸酯和硼烷基磷酸酯组成的组；mRNA代表在其5'末端连接的本公开的mRNA；n为0、1、2或3；L^1为磷酸酯、硫代磷酸酯或硼烷基磷酸酯，其中R^1、R^2、R^3和R^4中的至少一个为OH。在一些实施例中，n为1。

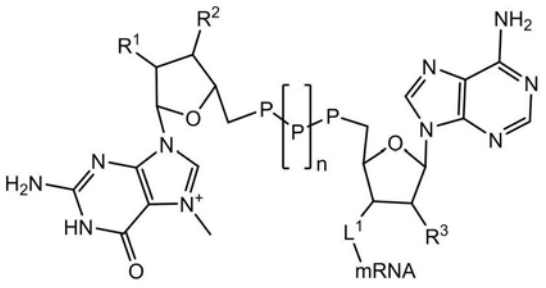
[0191] 在一些实施例中，本文所描述的mRNA包含具有式(帽VIII)结构的$m^7Gpppm^7Gpm^7G$ 5'端帽类似物。

[0192] 

（帽 VIII）

[0193] 其中，R^1、R^2、R^3和R^4各自独立地选自卤素、OH和OCH_3；每个P独立地选自磷酸酯、硫代磷酸酯和硼烷基磷酸酯组成的组；mRNA代表在其5'末端连接的本公开的mRNA；n为0、1、2或3；L^1为磷酸酯、硫代磷酸酯或硼烷基磷酸酯，其中R^1、R^2、R^3和R^4中的至少一个为OH。在一些实施例中，n为1。

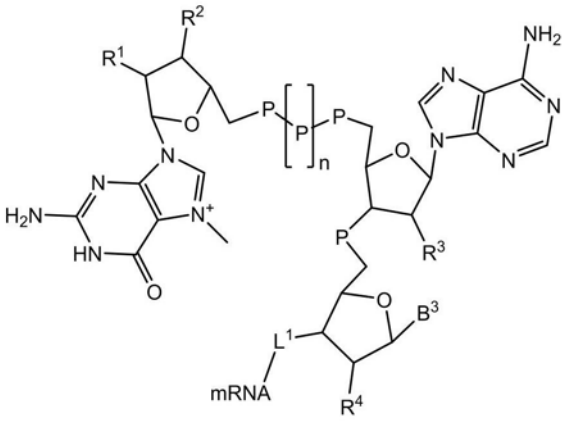
[0194] 在一些实施例中，本文所描述的mRNA包含具有式(帽IX)结构的m^7GpppA 5'端帽类似物。

[0195] 

（帽 IX）

[0196] 其中，R^1、R^2和R^3各自独立地选自卤素、OH和OCH_3；每个P独立地选自磷酸酯、硫代磷酸酯和硼烷基磷酸酯组成的组；mRNA代表在其5'末端连接的本公开的mRNA；n为0、1、2或3；L^1为磷酸酯、硫代磷酸酯或硼烷基磷酸酯，其中R^1、R^2和R^3中的至少一个为OH。在一些实施例中，n为1。

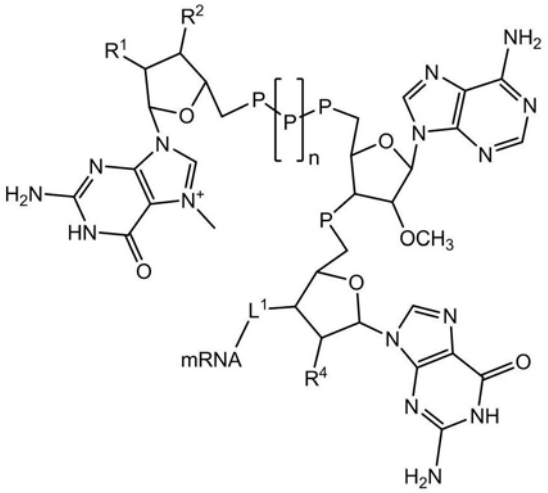
[0197] 在一些实施例中，本文所描述的mRNA包含m^7GpppApN 5'端帽类似物，其中N为天然或修饰的核苷酸，并且5'端帽具有式(帽X)的结构。

[0198] 

（帽 X）

[0199] 其中B^3为天然或修饰的核碱基；R^1、R^2、R^3和R^4各自独立选自卤素、OH和OCH_3；每个P独立地选自磷酸酯、硫代磷酸酯和硼烷基磷酸酯组成的组；mRNA代表在其5'末端连接的本公开的mRNA；n为0、1、2或3；L^1为磷酸酯、硫代磷酸酯或硼烷基磷酸酯，其中R^1、R^2、R^3和R^4中的至少一个为OH。在一些实施例中，B^3为G、m^7G、A或m^6A；其中G为鸟嘌呤，m^7G为7-甲基鸟嘌呤，A为腺嘌呤，m^6A为N^6-甲基腺嘌呤。在一些实施例中，n为1。

[0200] 在一些实施例中，本文所描述的mRNA包含具有式(帽XI)结构的m^7GpppAmpG 5'端帽类似物。

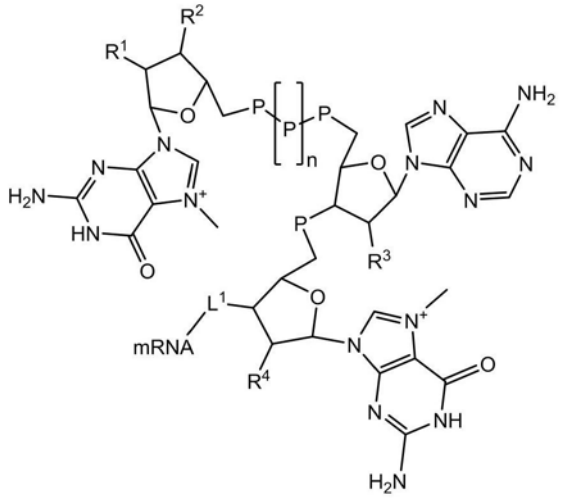
[0201] 

（帽 XI）

[0202] 其中，R^1、R^2和R^4各自独立地选自卤素、OH和OCH_3；每个P独立地选自磷酸酯、硫代磷酸酯和硼烷基磷酸酯组成的组；mRNA代表在其5'末端连接的本公开的mRNA；n为0、1、2或3；L^1为磷酸酯、硫代磷酸酯或硼烷基磷酸酯，其中R^1、R^2和R^4中的至少一个为OH。在一些实施例中，式帽XI的化合物为m^7GpppAmpG，其中R^1、R^2和R^4各自为OH，n为1，L^1为磷酸酯连接。在一些实施例中，n为1。

[0203] 在一些实施例中，本文所描述的mRNA包含具有式(帽XII)结构的m^7GpppApm^7G 5'端

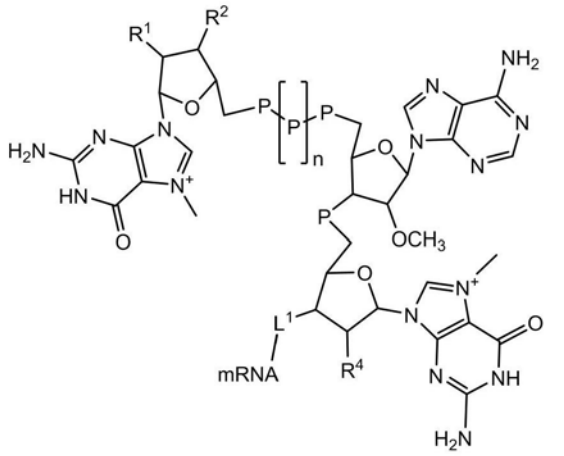
帽类似物。

[0204] 

（帽 XII）

[0205] 其中，R^1、R^2、R^3和R^4各自独立地选自卤素、OH和OCH_3；每个P独立地选自磷酸酯、硫代磷酸酯和硼烷基磷酸酯组成的组；mRNA代表在其5'末端连接的本公开的mRNA；n为0、1、2或3；L^1为磷酸酯、硫代磷酸酯或硼烷基磷酸酯，其中R^1、R^2、R^3和R^4中的至少一个为OH。在一些实施例中，n为1。

[0206] 在一些实施例中，本文所描述的mRNA包含具有式(Cap XIII)结构的$m^7GpppAmpm^7G$ 5'端帽类似物。

[0207] 

（帽 XIII）

[0208] 其中，R^1、R^2和R^4各自独立地选自卤素、OH和OCH_3；每个P独立地选自磷酸酯、硫代磷酸酯和硼烷基磷酸酯组成的组；mRNA代表在其5'末端连接的本公开的mRNA；n为0、1、2或3；L^1为磷酸酯、硫代磷酸酯或硼烷基磷酸酯，其中R^1、R^2和R^4中的至少一个为OH。在一些实施例中，n为1。

[0209] RNA可以含有如US2018/0105551A1中描述的5'三核苷酸帽结构，在此通过引用将其整体并入本文。

[0210] 天然RNA可以具有磷酸骨架(phosphate backbone)。本文所描述的RNA可以包含其它类型的骨架和碱基，包括肽核酸、硫代磷酸酯(phosphothionates)、氨基磷酸酯、硫代磷酸酯(phosphorothioate)和/或甲基膦酸酯连接。

[0211] 阳离子脂质

[0212] 脂质制剂优选地包括适于形成阳离子脂质体或脂质纳米颗粒的阳离子脂质。阳离

子脂质被广泛研究用于核酸递送,因为它们可以与带负电荷的膜结合并诱导摄取。通常,阳离子脂质是两亲性分子,其含有一个正亲水性头基、两个(或更多个)亲脂性尾基、或一个类固醇部分以及这两个域之间的连接物。优选地,阳离子脂质在大约生理pH下携带净正电荷。阳离子脂质体传统上已经是寡核苷酸(包括质粒DNA、反义寡核苷酸和siRNA/小发夹RNA-shRNA)最常用的非病毒递送系统。阳离子脂质,例如DOTAP(1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷)和DOTMA(N[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基-甲基硫酸铵)可以通过静电相互作用与带负电荷的核酸形成复合物或脂质复合物(lipoplexes),提供高的体外转染效率。

[0213] 在本申请公开的脂质制剂及其制备方法中,阳离子脂质可以是,例如,N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、1,2-二油酰基三甲基铵丙烷氯化物(DOTAP)(也称为N-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵和1,2-二油基氧基-3-三甲基铵丙烷氯化物盐)、N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油基氧基丙胺(DODMA)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二-y-亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(γ-DLenDMA)、1,2-二亚油基氨基甲酰氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油基氧基-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚油基氧基-3-吗啉代丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油基硫-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-二亚油基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亚油基氧基-3-三甲基氨基丙烷氯盐(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油酰基-3-三甲基氨基丙烷氯盐(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚油基氧基-3-(N-甲基哌嗪)丙烷(DLin-MPZ)、或3-(N,N-二亚油基氨基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亚油基氧亚基-3-(2-N,N-二甲氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲胺基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA),或其类似物,(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-双((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊-[d][1,3]二氧杂-5-胺、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲氨基)丁酸甲酯(MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基氮烷二基)双十二烷-2-醇(C12-200)、2,2-二亚油基-4(2-二甲氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-C2-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲氨基甲基[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲氨基)丁酸甲酯(DLin-M-C3-DMA)、3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(MC3醚)、4-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丁-2-胺(MC4醚),或其任何组合。其它阳离子脂质包括但不限于N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、3P-(N-(N',N'-二甲基氨基乙基)-氨基甲酰基)胆固醇(DC-Choi)、N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N-2(精氨酸基酰胺)乙基-N,N-二甲基三氟乙酸铵(DOSPA)、双十八烷基氨基甘氨酰羧基精胺(DOGS)、1,2-二油基-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)、N-(1,2-二肉豆蔻氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)和2,2-二亚油基-4-二甲氨基乙基)[1,3]-二氧戊环(XTC)。此外,可以使用阳离子脂质的商业制剂,例如LIPOFECTIN(包括DOTMA和DOPE,可从GIBCO/BRL获得)和Lipofectamine(包括DOSPA和DOPE,可从GIBCO/BRL获得)。

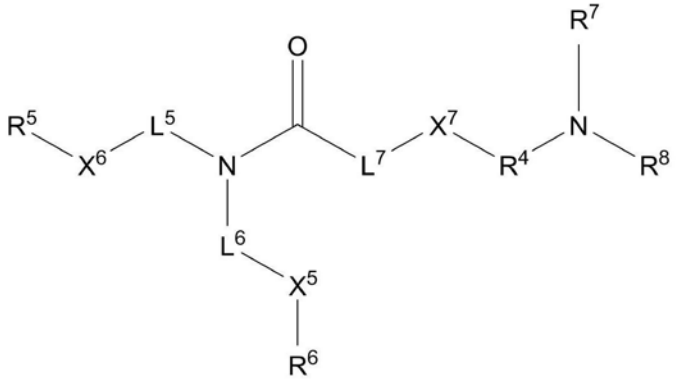
[0214] 其他合适的阳离子脂质公开于:国际公开号WO09/086558、WO09/127060、WO10/048536、WO10/054406、WO10/088537、WO10/129709和WO2011/153493;美国专利公开号2011/0256175、2012/0128760和2012/0027803;美国专利号8,158,601;以及Love et al.,PNAS,107(5),1864-69,2010,其内容通过引用并入本文。

[0215] 其它合适的阳离子脂质包括具有替代脂肪酸基团和其它二烷基氨基的那些,包括其中烷基取代基不同的那些(例如,N-乙基-N-甲基氨基,和N-丙基-N-乙基氨基-)。这些脂质是称为氨基脂质的阳离子脂质子类的一部分。在本文所描述的脂质制剂的一些实施例中,阳离子脂质为氨基脂质。通常,具有较低饱和的酰基链的氨基脂质更容易被调控尺寸,特别是当出于过滤灭菌的目的必须将复合物调控尺寸至低于约0.3微米时。可以使用含有碳链长度在C14至C22范围内的不饱和脂肪酸的氨基脂质。其它支架也可用于分离氨基和氨基脂质的脂肪酸或脂肪烷基部分。

[0216] 在一些实施例中,脂质制剂及其制备方法包含根据专利申请PCT/EP2017/064066的具有式I的阳离子脂质。在此上下文中,PCT/EP2017/064066的公开内容也通过引用并入本文。

[0217] 在一些实施例中,本公开的氨基或阳离子脂质是可电离的且具有至少一个可质子化或可去质子化基团("可电离的阳离子脂质"),使得所述脂质在等于或低于生理pH(例如,pH为7.4)的pH下带正电荷,并且在第二pH(优选等于或高于生理pH)下是中性的。当然,应当理解,作为pH的函数的质子的加入或除去是平衡过程,并且提及带电或中性脂质是指主要种类的性质,不需要脂质的全部以带电或中性形式存在。具有多于一个可质子化或可去质子化基团的脂质,或两性离子的脂质,不排除用于本公开。在某些实施例中,可质子化脂质具有约4至约11的范围内可质子化基团的pKa。在一些实施例中,可电离的阳离子脂质具有约5至约7的pKa。在一些实施例中,可电离的阳离子脂质的pKa为约6至约7。

[0218] 在一些实施例中,脂质制剂及其制备方法包含式I的可电离阳离子脂质:

[0219] 

(I)

[0220] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物,其中R^5和R^6各自独立选自直链或支化C_1-C_{31}烷基、C_2-C_{31}烯基或C_2-C_{31}炔基和胆固醇基;L^5和L^6各自独立地选自直链C_1-C_{20}烷基和C_2-C_{20}烯基组成的组;X^5为-C(O)O-,由此形成-C(O)O-R^6,或者X^5为-OC(O)-由此形成-OC(O)-R^6;X^6为-C(O)O-由此形成-C(O)O-R^5,或者X^6为-OC(O)-由此形成-OC(O)-R^5;X^7为S或O;L^7不存在或低级烷基;R^4为直链或支化的C_1-C_6烷基;R^7和R^8各自独立地选自氢和直链或支化C_1-C_6烷基构成的组。

[0221] 在一些实施例中,X^7为S。

[0222] 在一些实施例中，X^5为-C(O)O-，由此形成-C(O)O-R^6，X^6为-C(O)O-，由此形成-C(O)O-R^5。

[0223] 在一些实施例中，R^7和R^8各自独立地选自甲基、乙基和异丙基构成的组。

[0224] 在一些实施例中，L^5和L^6各自独立地为C_1-C_{10}烷基。在一些实施例中，L^5为C_1-C_3烷基，和L^6为C_1-C_5烷基。在一些实施例中，L^6为C_1-C_2烷基。在一些实施例中，L^5和L^6各自为直链C_7烷基。在一些实施例中，L^5和L^6各自为直链C_9烷基。

[0225] 在一些实施例中，R^5和R^6各自独立地为烯基。在一些实施例中，R^6为烯基。在一些实施例中，R^6为C_2-C_9烯基。在一些实施例中，烯基包含单个双键。在一些实施例中，R^5和R^6各自为烷基。在一些实施例中，R^5为支化的烷基。在一些实施例中，R^5和R^6各自独立选自C_9烷基、C_9烯基和C_9炔基组成的组。在一些实施例中，R^5和R^6各自独立选自C_{11}烷基、C_{11}烯基和C_{11}炔基组成的组。在一些实施例中，R^5和R^6各自独立选自C_7烷基、C_7烯基和C_7炔基组成的组。在一些实施例中，R^5为$-CH((CH_2)_pCH_3)_2$或$-CH((CH_2)_pCH_3)((CH_2)_{p-1}CH_3)$，其中p为4-8。在一些实施例中，p为5且$L^5$为$C_1$-$C_3$烷基。在一些实施例中，p为6且$L^5$为$C_3$烷基。在一些实施例中，p为7。在一些实施例中，p为8且L^5为C_1-C_3烷基。在一些实施例中，R^5由$-CH((CH_2)_pCH_3)((CH_2)_{p-1}CH_3)$组成，其中p为7或8。

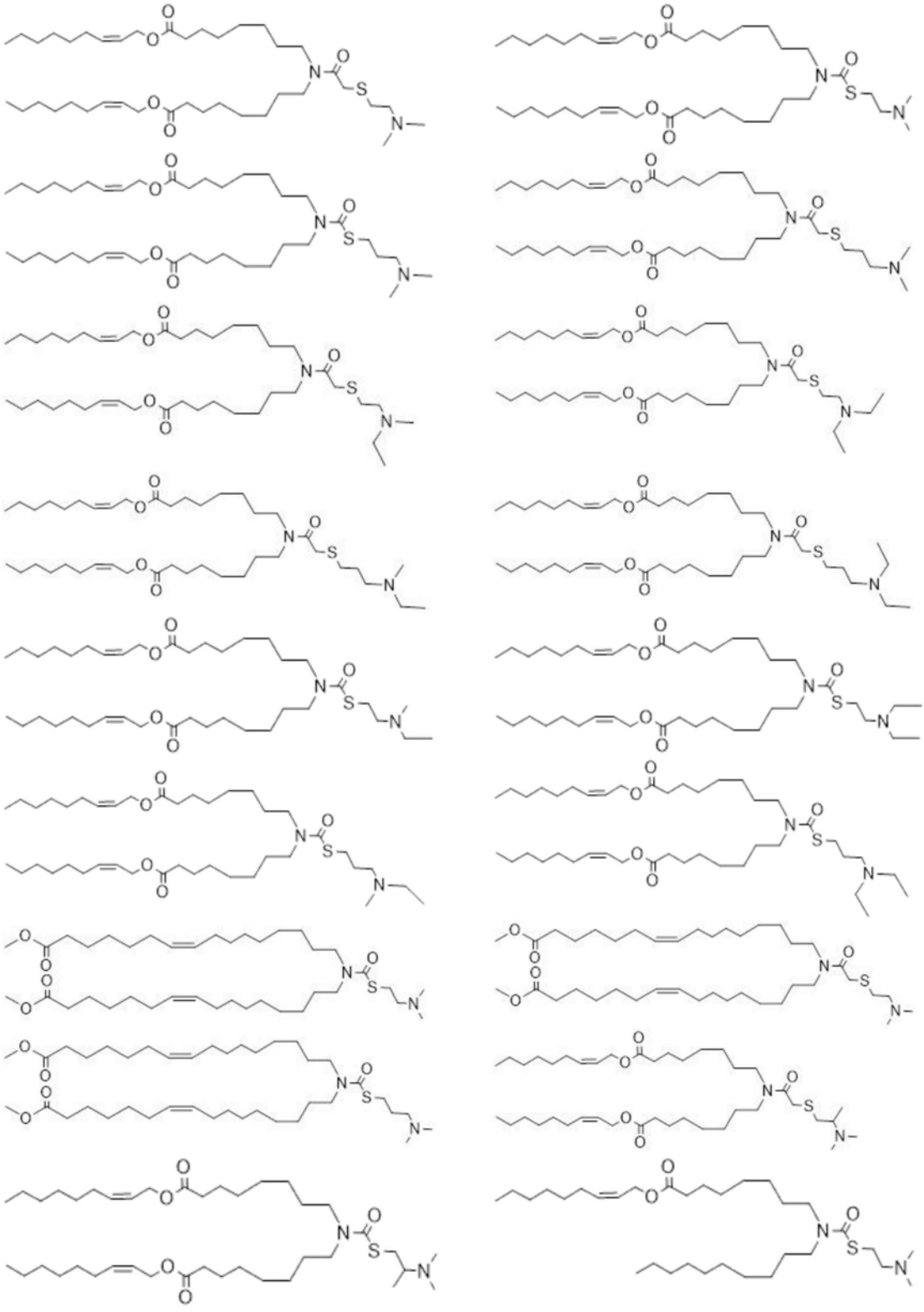
[0226] 在一些实施例中，R^4为亚乙基或亚丙基。在一些实施例中，R^4为正亚丙基或亚异丁基。

[0227] 在一些实施例中，L^7不存在，R^4为亚乙基，X^7为S，R^7和R^8各自为甲基。在一些实施例中，L^7不存在，R^4为正亚丙基，X^7为S，R^7和R^8各自为甲基。在一些实施例中，L^7不存在，R^4为亚乙基，X^7为S，R^7和R^8各自为乙基。

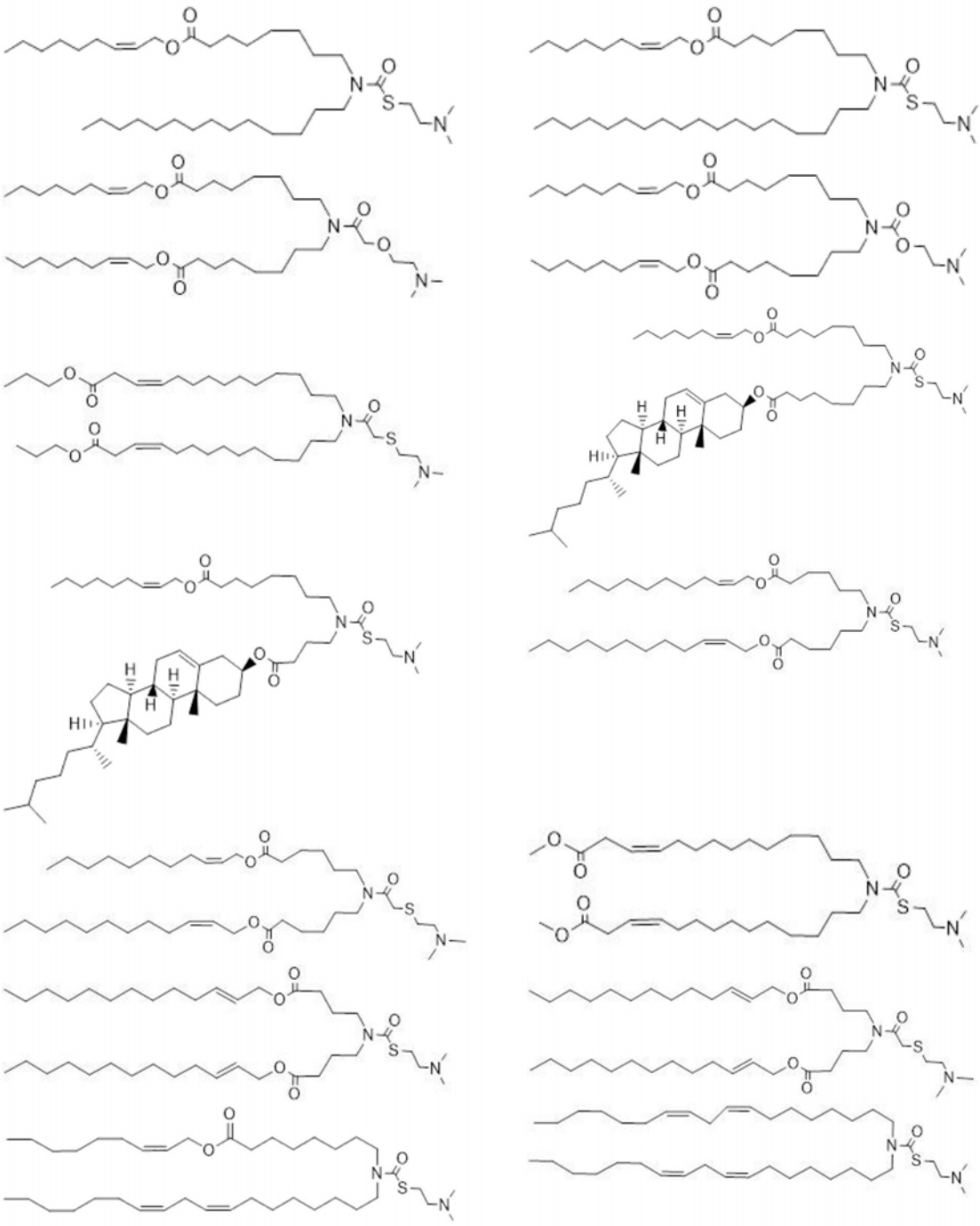
[0228] 在一些实施例中，X^7为S，X^5为-C(O)O-，由此形成-C(O)O-R^6，X^6为-C(O)O-，由此形成-C(O)O-R^5，L^5和L^6各自独立为线性C_3-C_7烷基，L^7不存在，R^5为$-CH((CH_2)_pCH_3)_2$，R^6为C_7-C_{12}烯基。在一些进一步的实施例中，p为6，R^6为C_9烯基。

[0229] 在一些实施例中，脂质制剂及其制备方法包含选自由以下构成的组的可电离阳离子脂质：

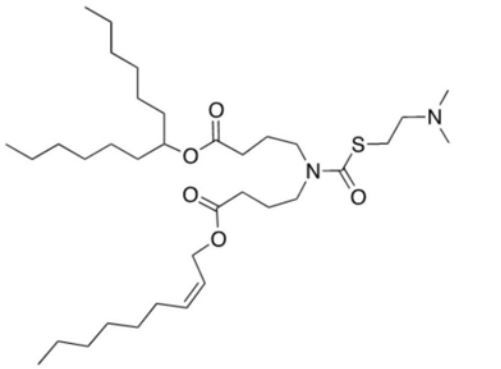
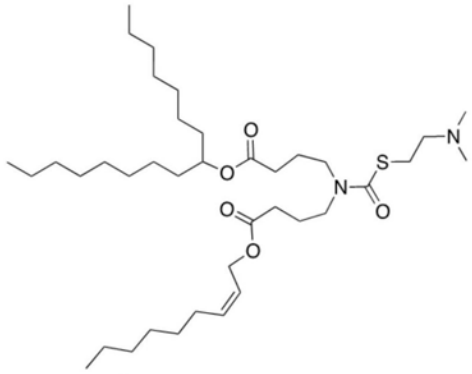
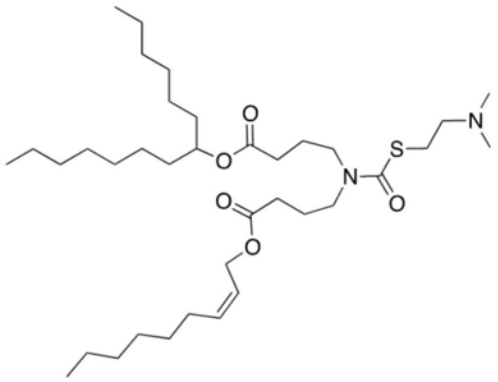
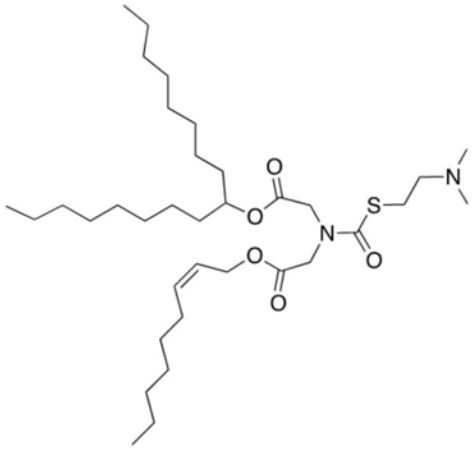
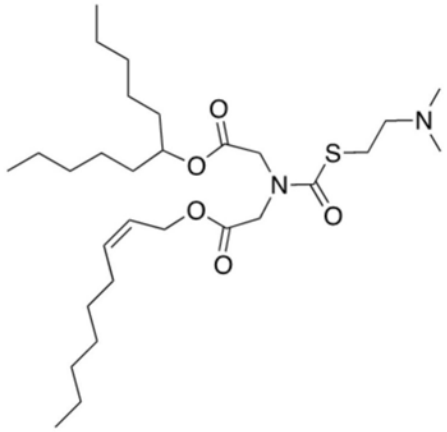
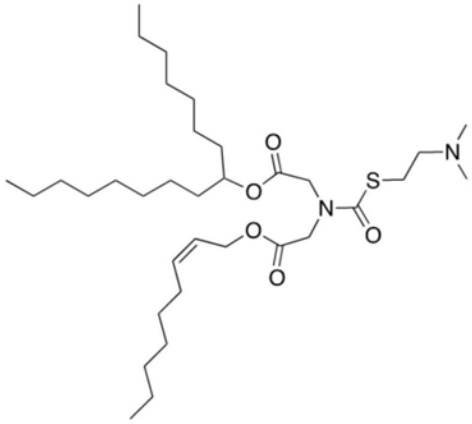
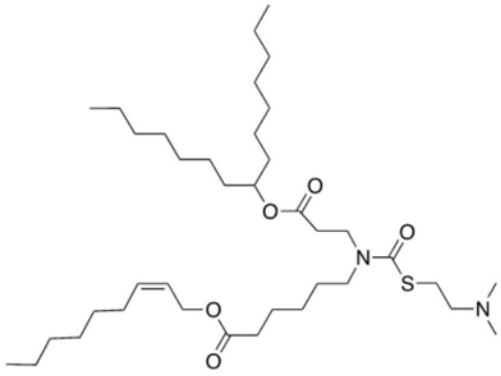
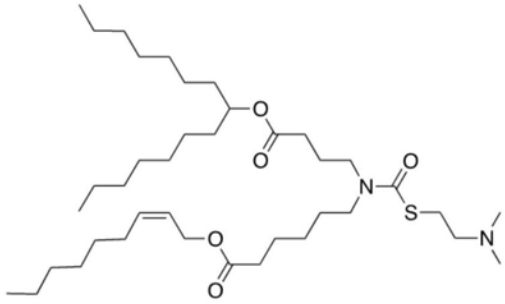
[0230]

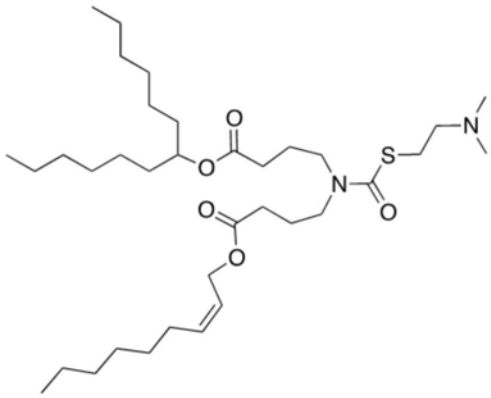


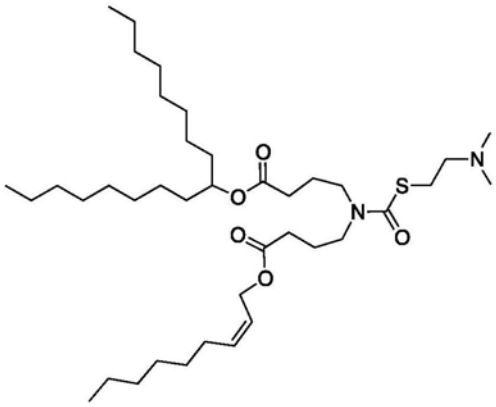
[0231]

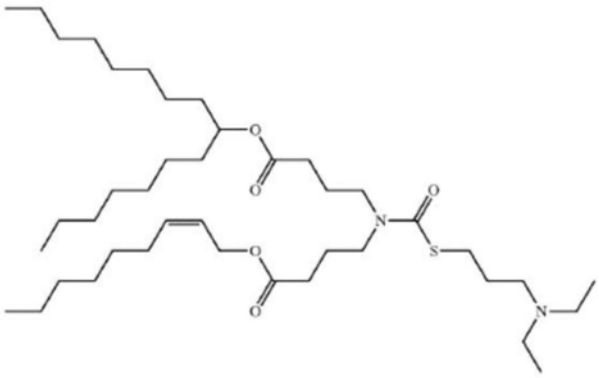


[0232]

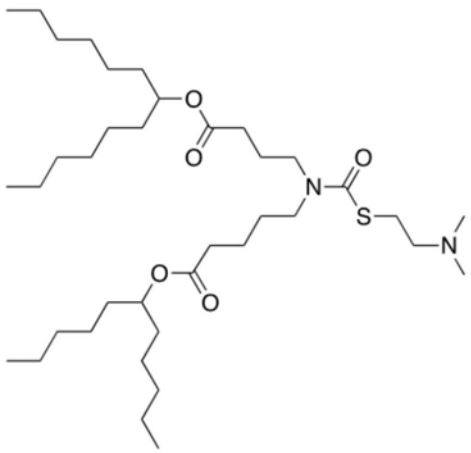









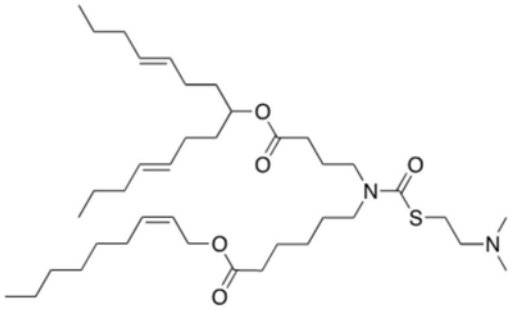


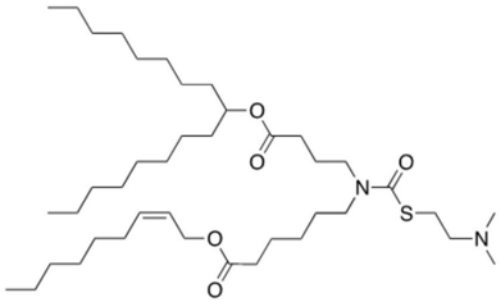


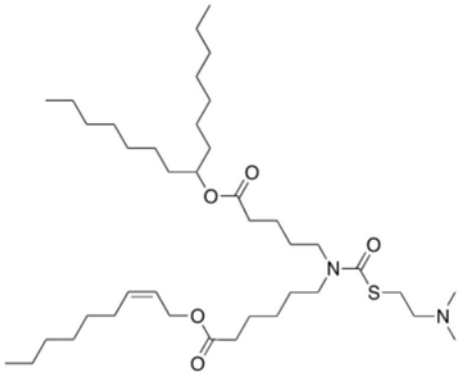


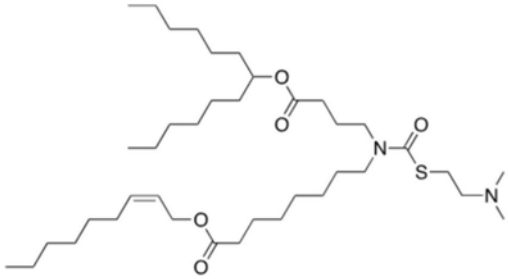
[0233]

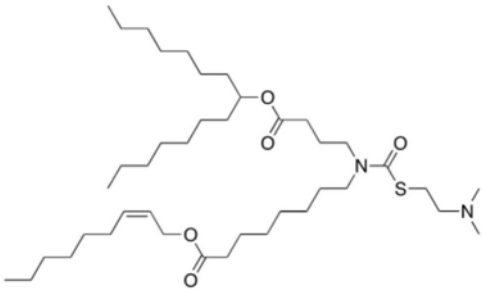


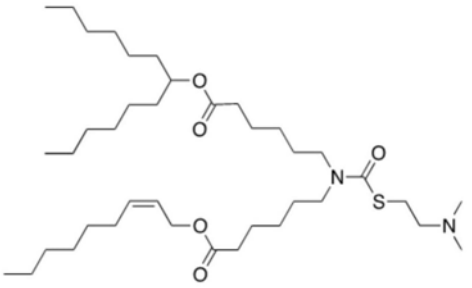


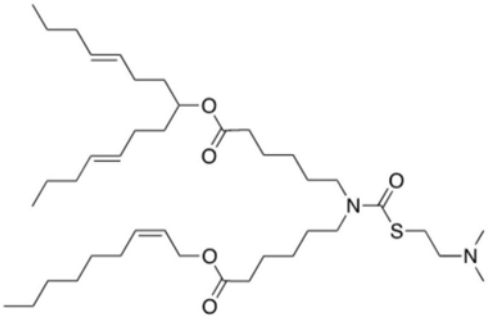




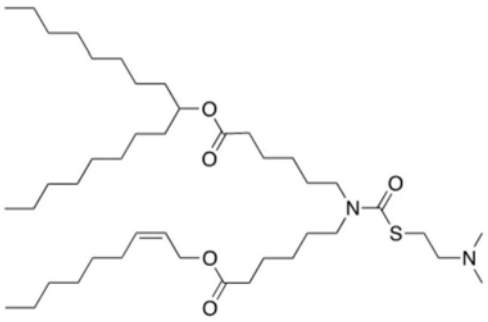


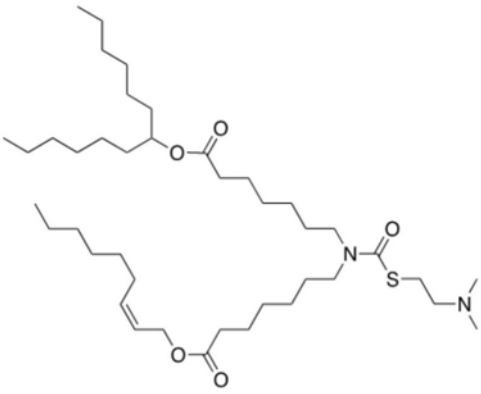


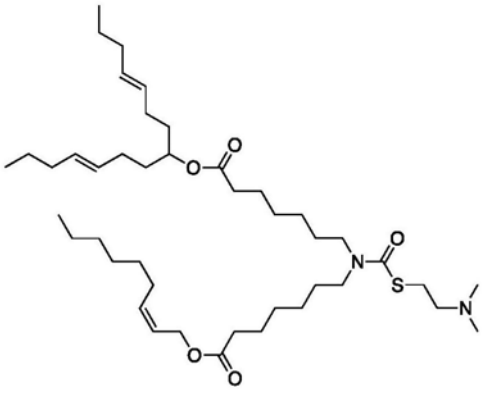


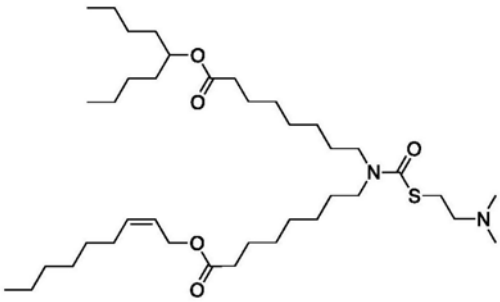


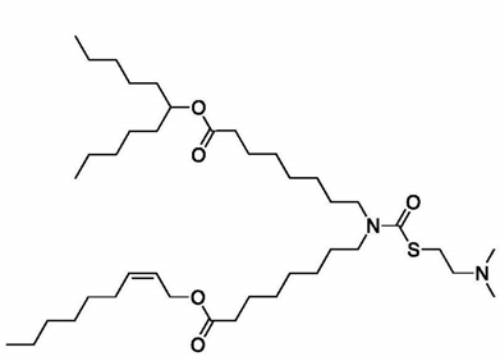
[0234]

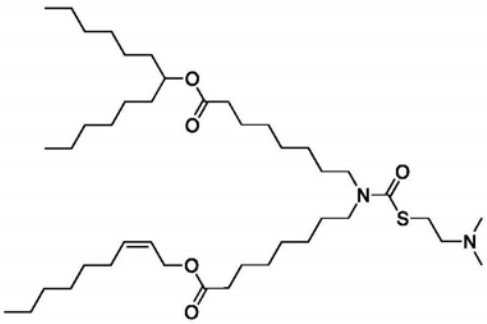


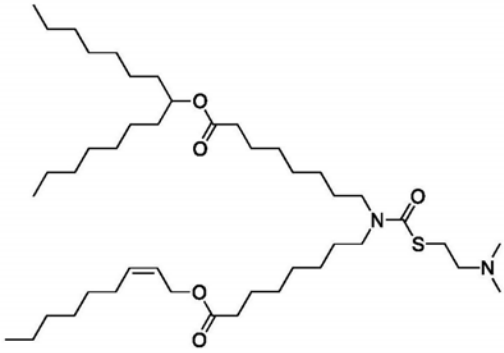


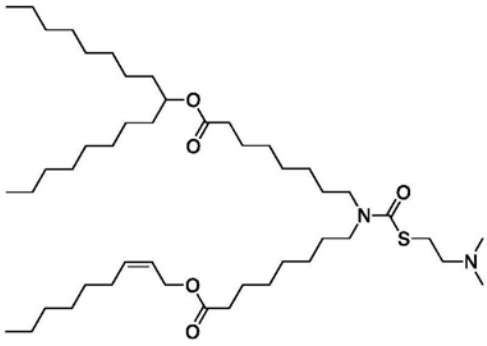




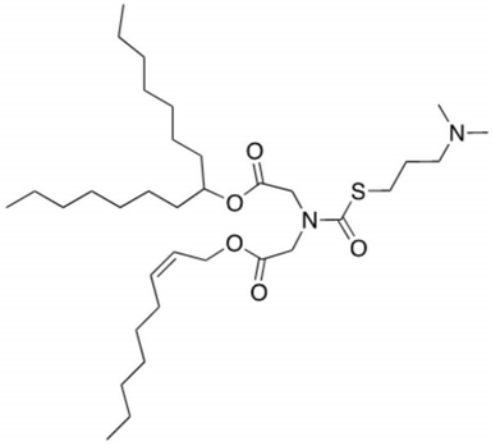


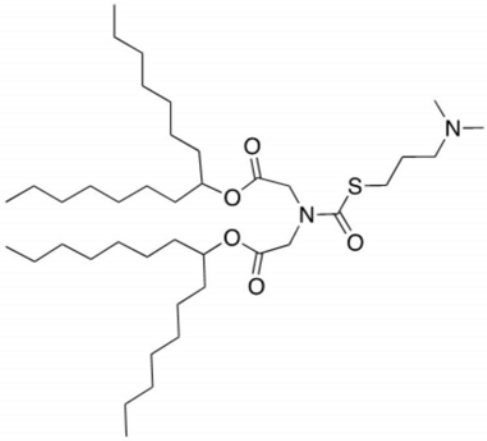


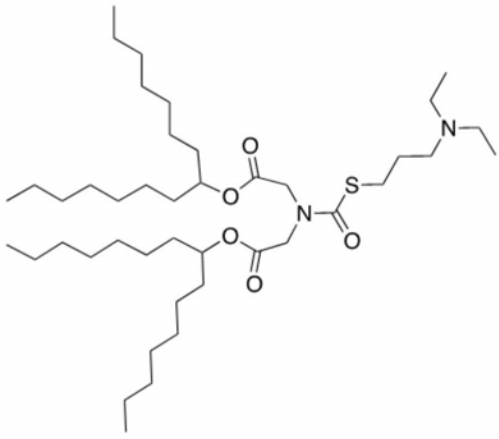


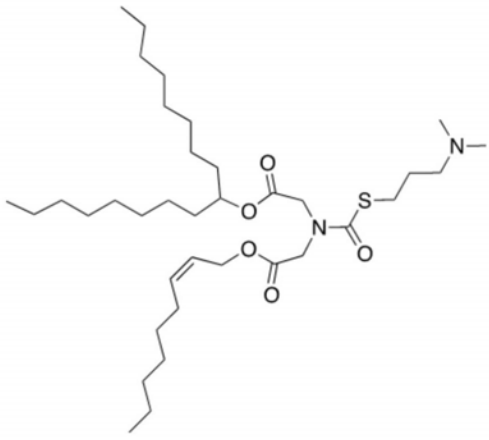


[0235]

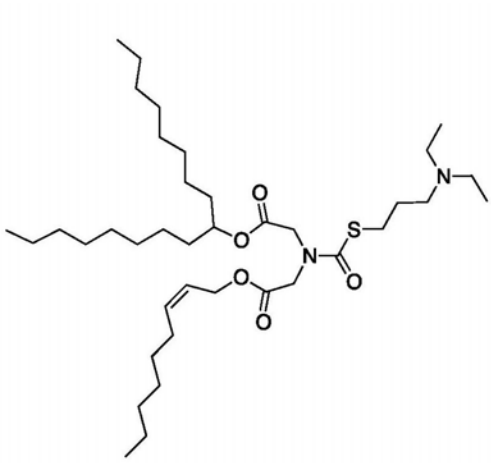
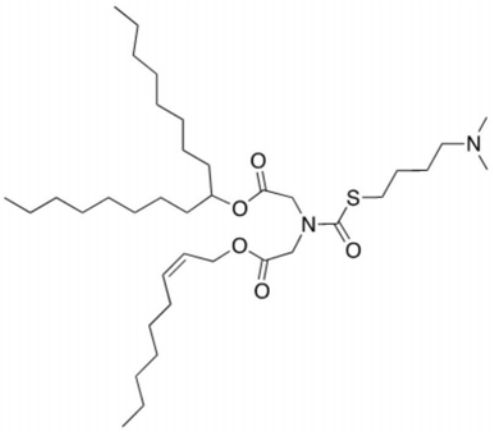
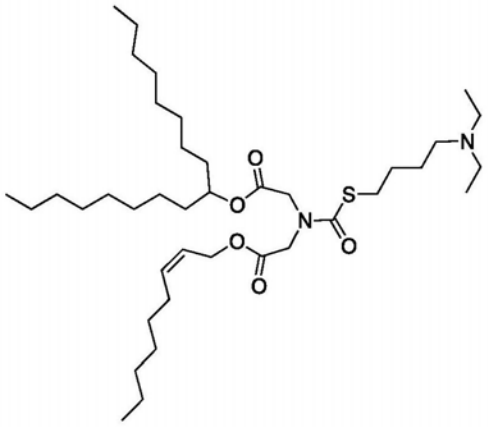
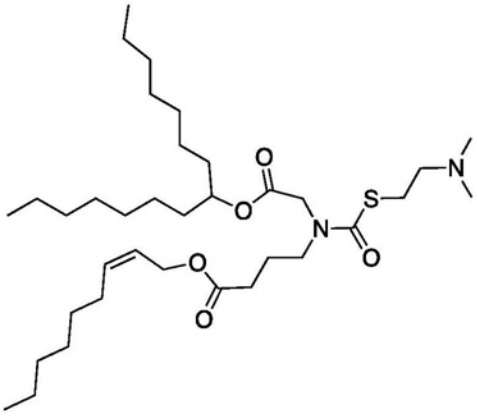
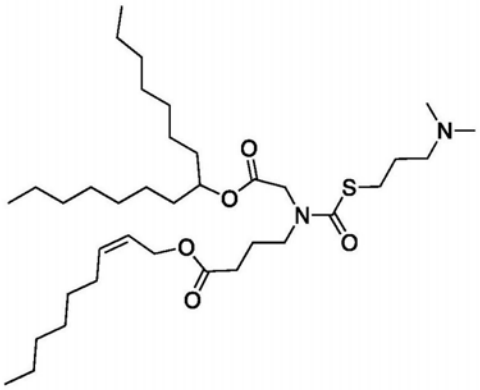
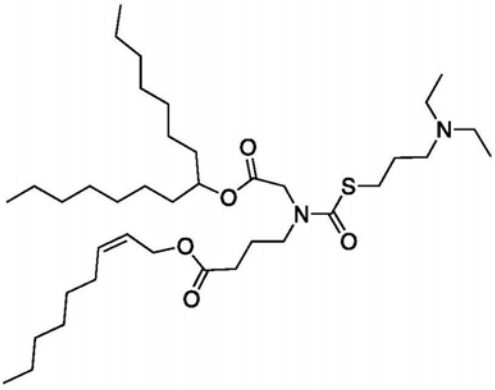
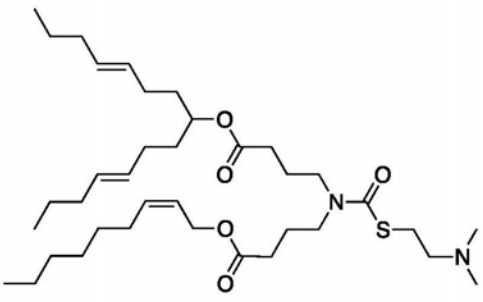
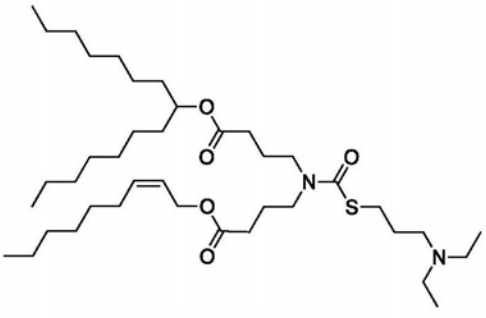


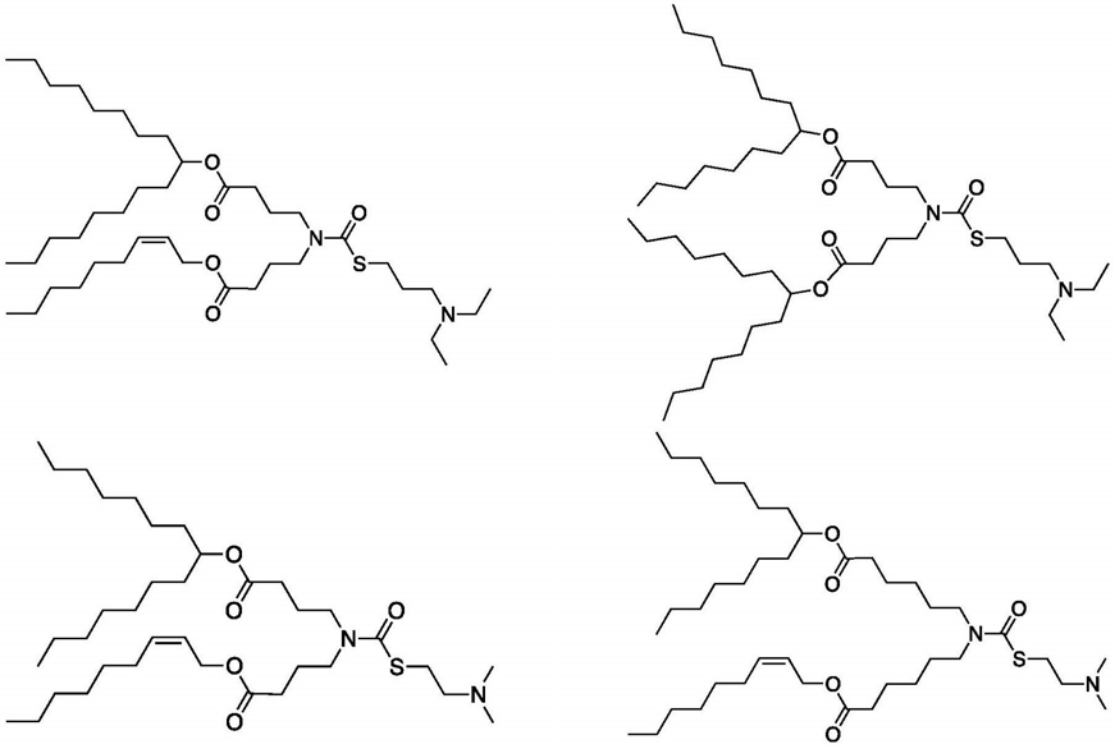




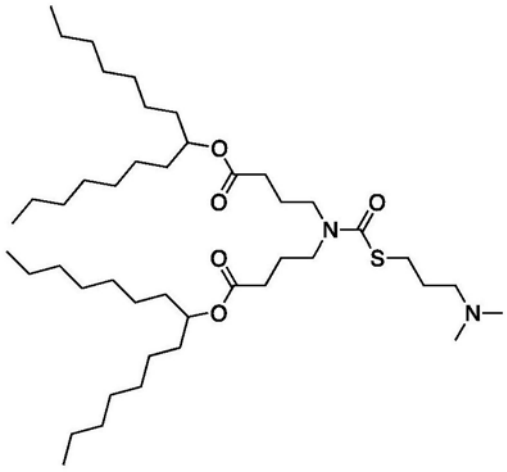


[0236]

[0237] 

[0238] 以及

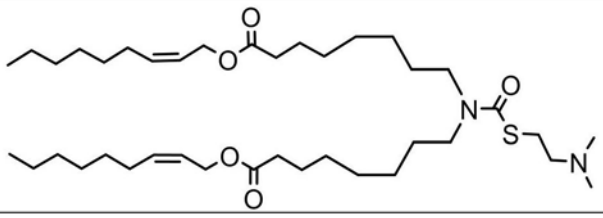
[0239] 

。

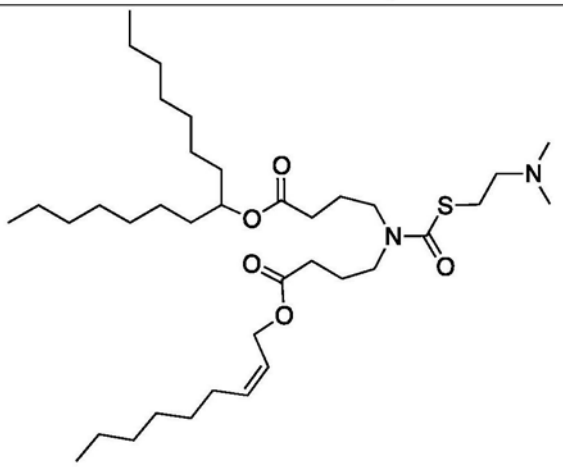
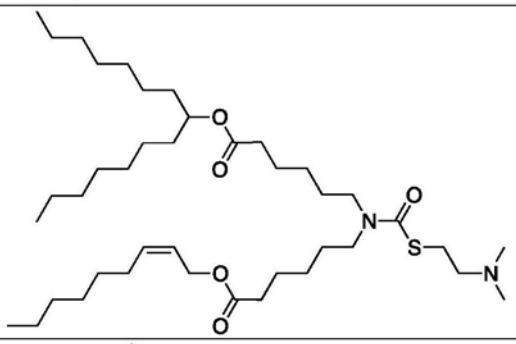
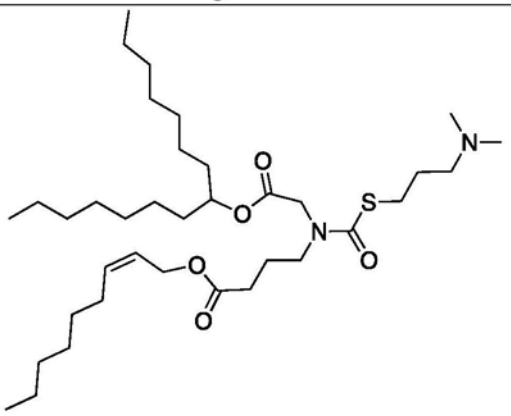
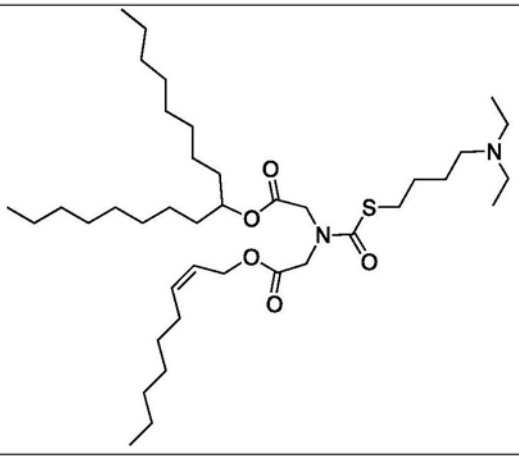
[0240] 在一些实施例中,脂质制剂可包含选自如下表1中所示的脂质#1至脂质#9构成的组的可电离阳离子脂质:

[0241] 表1

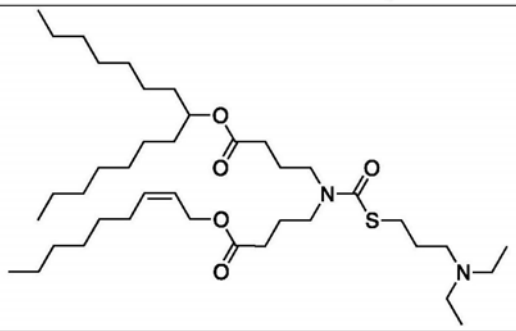
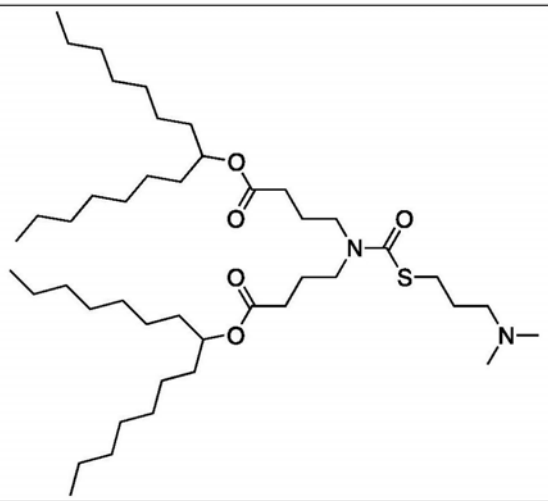
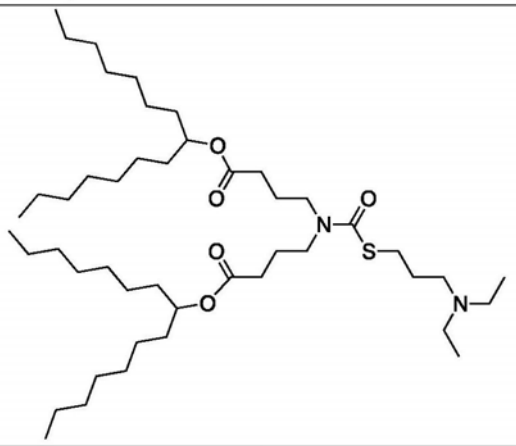
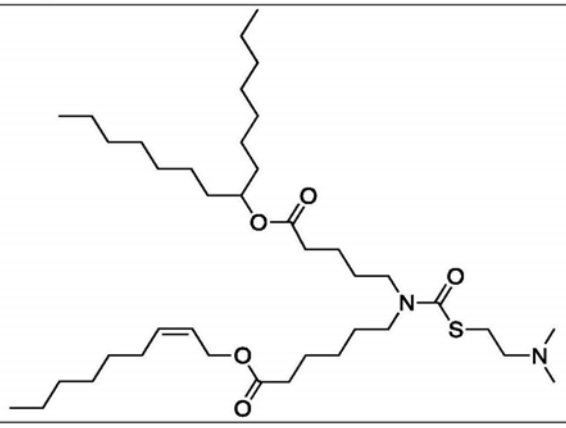
[0242]

脂质#	结构
1	

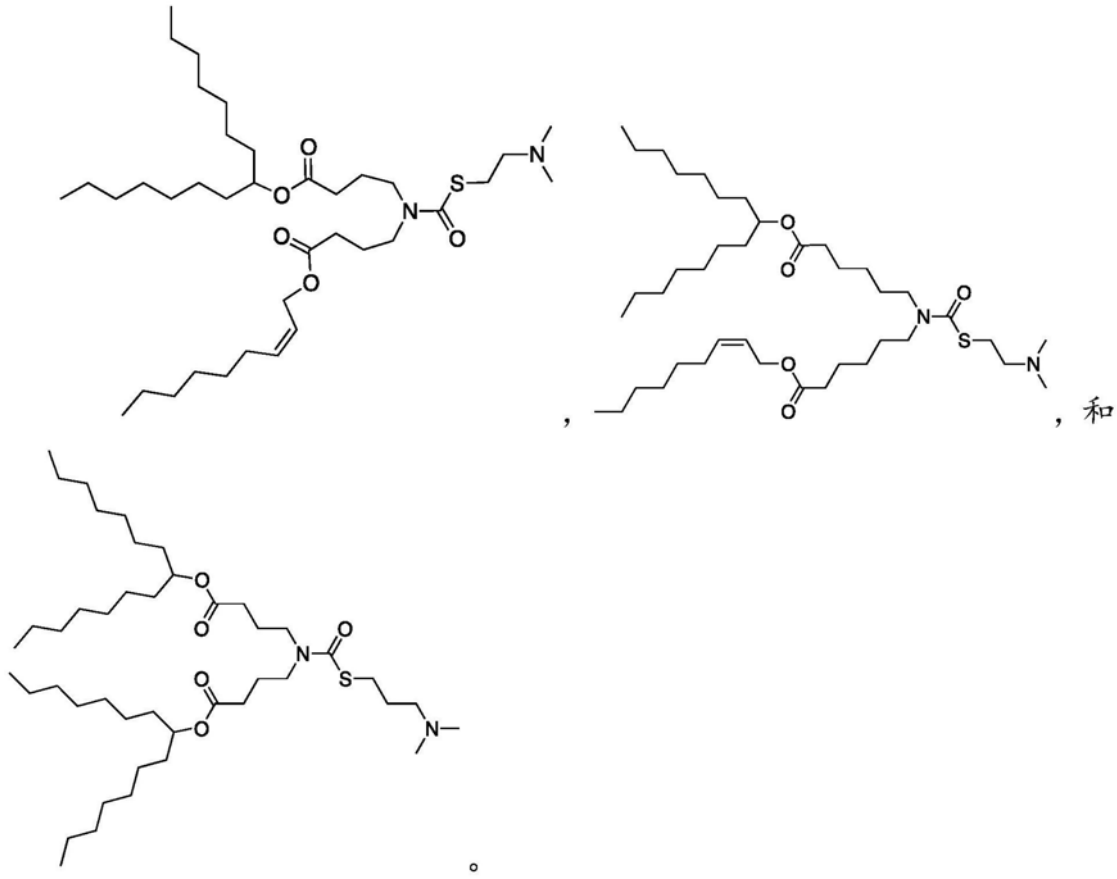
[0243]

脂质#	结构
2	
3	
4	
5	

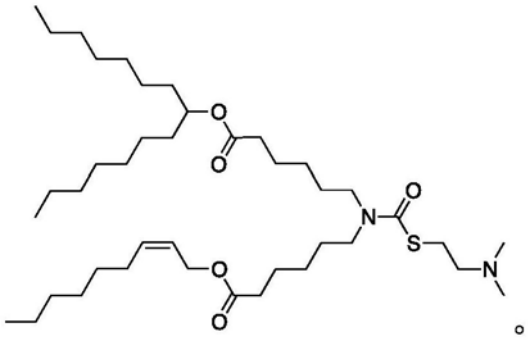
[0244]

脂质#	结构
6	
7	
8	
9	

[0245] 在一些实施例中,脂质制剂包含结构选自下述的可电离的阳离子脂质或其药学上可接受的盐:

[0246] 

[0247] 在一些优选的实施例中，脂质制剂包含结构如下的可电离的阳离子脂质或其药学上可接受的盐：

[0248] 

[0249] 在实施例中，可明确排除本文所述的任何一种或多种脂质。

[0250] 辅助脂质和固醇

[0251] 本公开的mRNA-脂质制剂及其制备方法可以包含辅助脂质，辅助脂质可以称为中性辅助脂质、非阳离子脂质、非阳离子辅助脂质、阴离子脂质、阴离子辅助脂质或中性脂质。已经发现，如果制剂中存在辅助脂质，则脂质制剂，特别是阳离子脂质体和脂质纳米颗粒具有增加的细胞摄取。(Curr.Drug Metab.2014;15(9):882-92)。例如，一些研究已经指出中性和两性离子脂质，例如1,2-二油酰sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DOPC)、二油酰-磷脂酰-乙醇胺(DOPE)和1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DSPC)，比阳离子脂质更易融合(即，促进融合)，可以影响脂质-核酸复合物的多态性特征，促进从层状向六角相的转变，从而诱导细胞膜的融合和破裂。(Nanomedicine(Lond).2014Jan;9(1):105-20)。此外，使用辅助脂质可以帮助减少使用许多常见阳离子脂质的任何潜在的有害影响，例如毒性和免疫原性。

[0252] 适用于本公开的脂质制剂的非阳离子脂质及其制备方法的非限制性例子包括磷脂，例如卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、双十六烷基磷酸酯、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰-磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰-磷脂酰乙醇胺(POPE)、棕榈酰油酰-磷脂酰甘油(POPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰-磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰-磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰-磷脂酰乙醇胺(DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺、二甲基-磷脂酰乙醇胺、二乙酰-磷脂酰乙醇胺(DEPE)、硬脂酰-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰磷脂酰胆碱，以及它们的混合物。也可使用其它二酰基磷脂酰胆碱和二酰基磷脂酰乙醇胺磷脂。这些脂质中的酰基优选是衍生自具有C_{10}-C_{24}碳链的脂肪酸的酰基，例如月桂酰、肉豆蔻酰、棕榈酰、硬脂酰或油酰。

[0253] 非阳离子脂质的其它例子包括固醇，例如胆固醇及其衍生物。一项研究得出结论，作为辅助脂质，胆固醇增加了与核酸连接的脂质层的电荷间距，使得电荷分布更紧密地匹配核酸的电荷分布。(J.R.Soc.Interface.2012Mar 7;9(68):548-561)。胆固醇衍生物的非限制性例子包括：极性类似物，例如5α-胆固烷醇、5α-粪固醇、胆固醇基-(2'-羟基)-乙基醚、胆固醇基-(4'-羟基)-丁基醚和6-酮胆甾烷醇；非极性类似物，诸如5α-胆甾烷、胆甾烯酮、5α-胆甾烷酮、5α-胆甾烷酮和癸酸胆固醇酯；以及它们的混合物。在优选的实施例中，胆固醇衍生物为极性类似物，例如胆固醇基(4'-羟基)-丁基醚。

[0254] 在一些实施例中，存在于脂质制剂中的辅助脂质包含一种或多种磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物，或由其组成。在其它实施例中，存在于脂质制剂中的中性脂质包含一种或多种磷脂，或由一种或多种磷脂组成，例如不含胆固醇的脂质制剂。在其它一些实施例中，存在于脂质制剂中的中性脂质包含胆固醇或其衍生物，或由其组成，例如，不含磷脂的脂质制剂。

[0255] 辅助脂质的其它例子包括不含磷的脂质，例如硬脂胺、十二烷基胺、十六烷基胺、乙酰基棕榈酸酯、甘油蓖麻油酸酯、硬脂酸十六烷基酯、肉豆蔻酸异丙酯、两性丙烯酸类聚合物、三乙醇胺-十二烷基硫酸酯、烷基-芳基硫酸酯、聚乙氧基化脂肪酸酰胺、双十八烷基双甲基溴化铵、神经酰胺和鞘磷脂。

[0256] 在一些实施例中，辅助脂质占存在于脂质制剂中的总脂质的约2mol％至约20mol％、约3mol％至约18mol％、约4mol％至约16mol％、约5mol％至约14mol％、约6mol％至约12mol％、约5mol％至约10mol％、约5mol％至约9mol％，或约2mol％、约3mol％、约4mol％、约5mol％、约6mol％、约7mol％、约8mol％、约9mol％、约10mol％、约11mol％或约12mol％(或其任何分数或其中的范围)。

[0257] 脂质制剂中的胆固醇或胆固醇衍生物及其制备方法可以占存在于脂质制剂中的总脂质的至多约40mol％、约45mol％、约50mol％、约55mol％或约60mol％。在一些实施例中，胆固醇或胆固醇衍生物占存在于脂质制剂中的总脂质的约15mol％至约45mol％、约20mol％至约40mol％、约25mol％至约35mol％、或约28mol％至约35mol％；或者约25mol％、约26mol％、约27mol％、约28mol％、约29mol％、约30mol％、约31mol％、约32mol％、约33mol％、约34mol％、约35mol％、约36mol％或约37mol％。

[0258] 在一些实施例中，混合物中的磷脂组分可占存在于脂质制剂中的总脂质的约2mol％至约20mol％、约3mol％至约18mol％、约4mol％至约16mol％、约5mol％至约14mol％、约6mol％至约12mol％、约5mol％至约10mol％、约5mol％至约9mol％，或约2mol％、约3mol％、约4mol％、约5mol％、约6mol％、约7mol％、约8mol％、约9mol％、约10mol％、约11mol％或约12mol％(或其任何分数或其中的范围)。

[0259] 存在于脂质制剂中的辅助脂质的百分比及其制备方法是目标量，并且制剂中存在的辅助脂质的实际量可以变化，例如以±5mol％变化。

[0260] 含有阳离子脂质化合物或可电离的阳离子脂质化合物的脂质制剂，按摩尔计可以为约30-70％阳离子脂质化合物、约25-40％胆固醇、约2-15％辅助脂质和约0.5-5％聚乙二醇(PEG)脂质，其中百分比为与制剂中存在的总脂质的百分比。在一些实施例中，组合物为约40-65％的阳离子脂质化合物、约25-35％的胆固醇、约3-9％的辅助脂质和约0.5-3％的PEG-脂质，其中百分比为与制剂中存在的总脂质的百分比。

[0261] 制剂可以是脂质颗粒制剂，例如含有：8-30％核酸化合物、5-30％辅助脂质和0-20％胆固醇；4-25％阳离子脂质、4-25％辅助脂质、2-25％胆固醇、10-35％胆固醇-PEG和5％胆固醇-胺；或2-30％阳离子脂质、2-30％辅助脂质、1-15％胆固醇、2-35％胆固醇-PEG和1-20％胆固醇-胺；或至多90％阳离子脂质和2-10％辅助脂质，或甚至100％阳离子脂质。

[0262] 脂质缀合物

[0263] 本文所描述的脂质包封的RNA纳米颗粒还可以包含脂质缀合物。缀合脂质在防止颗粒聚集上是有用的。合适的缀合脂质包括但不限于：PEG-脂质缀合物、阳离子-聚合物-脂质缀合物，及其混合物。此外，脂质递送载体可通过将配体(例如抗体、肽和碳水化合物)附接到其表面或到附接的PEG链的末端，而用于特定靶向(Front Pharmacol.2015Dec 1;6:286)。

[0264] 在优选的实施例中，脂质缀合物是PEG-脂质。在脂质制剂中包含聚乙二醇(PEG)作为涂层或表面配体，这种技术被称为聚乙二醇化(PEGylation)，有助于保护纳米颗粒免受免疫系统的打击，并使其逃避网状内皮系统(reticuloendothelial system,RES)的摄取(Nanomedicine(Lond).2011Jun;6(4):715-28)。聚乙二醇化已广泛用于通过物理、化学和生物机制稳定脂质制剂及其有效载荷。类似洗涤剂的PEG脂质(例如PEG-DSPE)可以进入脂质制剂以在表面上形成水合层和空间屏障。基于聚乙二醇化的程度，表面层通常可分为两种类型，刷状和蘑菇状层。对于PEG-DSPE稳定的制剂，PEG将在低程度的聚乙二醇化(通常小于5mol％)下呈现蘑菇构象，并且随着PEG-DSPE的含量增加超过一定水平时将转变为刷构象(Journal ofNanomaterials.2011;2011:12)。已经显示，聚乙二醇化的增加使得脂质制剂的循环半衰期显著提高(Annu.Rev.Biomed.Eng.2011Aug 15;13():507-30;J.Control Release.2010Aug 3;145(3):178-81).

[0265] PEG-脂质的合适例子包括但不限于：PEG与二烷氧基丙基偶联(PEG-DAA)、PEG与二酰基甘油偶联(PEG-DAG)、PEG与磷脂(如磷脂酰乙醇胺)偶联(PEG-PE)、PEG与神经酰胺缀合、PEG与胆固醇或其衍生物缀合，以及它们的混合物。

[0266] PEG是乙烯PEG重复单元的直链水溶性聚合物，具有两个末端羟基。PEG按其分子量分类，包括以下：单甲氧基聚乙二醇(MePEG-OH)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯(MePEG-S)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯(MePEG-S-NHS)、单甲氧基聚乙二醇-胺(MePEG-

NH2)、单甲氧基聚乙二醇-三氟乙基磺酸酯(MePEG-TRES)、单甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基(MePEG-IM)以及含有端部羟基而非端部甲氧基的此类化合物(例如,HO-PEG-S、HO-PEG-S-NHS、HO-PEG-NH_2)。

[0267] 本文所描述的PEG-脂质缀合物的PEG部分可以包含范围从约550道尔顿至约10,000道尔顿的平均分子量。在某些情况下,PEG部分具有约750道尔顿至约5,000道尔顿(例如,约1,000道尔顿至约5,000道尔顿,约1,500道尔顿至约3,000道尔顿,约750道尔顿至3,000道尔顿,约750道尔顿至约2,000道尔顿)的平均分子量。在优选的实施例中,PEG部分具有约2,000道尔顿或约750道尔顿的平均分子量。平均分子量可以是在所述范围内的任何值或子值,包括端点。

[0268] 在某些情况下,PEG可选地可以被烷基、烷氧基、酰基或芳基取代。PEG可以直接缀合至脂质,或者可以经由连接基团部分连接到脂质。可使用适于将PEG偶联至脂质的任何连接基团部分,包括例如含非酯基的连接基团部分和含酯基的连接基团部分。在一个优选的实施例中,连接基团部分为含非酯基的连接基团部分。合适的含非酯基的连接基团部分包括但不限于:酰氨基(-C(O)NH-)、氨基(-NR-)、羰基(-C(O)-)、氨基甲酸酯(-NHC(O)O-)、脲(-NHC(O)NH-)、二硫基(-S-S-)、醚(-O-)、琥珀酰基(-(O)CCH_2CH_2C(O)-)、琥珀酰胺基(-NHC(O)CH_2CH_2C(O)NH-)、醚以及它们的组合(例如既含有氨基甲酸酯连接基团部分又含有酰氨基连接基团部分的连接基团)。在优选实施例中,使用氨基甲酸酯连接基团将PEG偶联到脂质。

[0269] 在其它实施例中,使用含酯基的连接基团部分将PEG偶联到脂质。合适的含酯基的连接基团部分包括:例如,碳酸酯(-OC(O)O-)、琥珀酰基、磷酸酯(-O-(O)OH-O-)、磺酸酯以及它们的组合。

[0270] 具有不同链长和饱和度的多种酰基链基团的磷脂酰乙醇胺可缀合至PEG以形成脂质缀合物。此类磷脂酰乙醇胺是可商购获得的,或者可使用本领域技术人员已知的常规技术分离或合成。含有碳链长度在C10至C20范围内的饱和或不饱和脂肪酸的磷脂酰乙醇胺是优选的。也可以使用具有单-或双-不饱和脂肪酸以及饱和及不饱和脂肪酸的混合物的磷脂酰乙醇胺。合适的磷脂酰乙醇胺包括但不限于:二肉豆蔻酰基-磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二棕榈酰基-磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)和二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(DSPE)。

[0271] 在一些实施例中,PEG-DAA缀合物是PEG-二癸氧基丙基(C_{10})缀合物、PEG-二月桂氧基丙基(C_{12})缀合物、PEG-二肉豆蔻氧基丙基(C_{14})缀合物,PEG-二棕榈氧基丙基(C_{16})缀合物或PEG-二硬脂氧基丙基(C_{18})缀合物。在这些实施例中,PEG优选地具有约750或约2,000道尔顿的平均分子量。在特定的实施例中,PEG的端部羟基被甲基基团取代。

[0272] 除了上述之外,可使用其它亲水性聚合物代替PEG。可用于代替PEG的合适聚合物的例子包括但不限于:聚乙烯吡咯烷酮、聚甲基恶唑啉、聚乙基恶唑啉、聚羟丙基、甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺和聚二甲基丙烯酰胺、聚乳酸、聚乙醇酸和衍生纤维素——例如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素。

[0273] 在一些实施例中,脂质缀合物(例如,PEG-脂质)占存在于脂质制剂中的总脂质的约0.1mol%至约2mol%、约0.5mol%至约2mol%、约1mol%至约2mol%、约0.6mol%至约1.9mol%、约0.7mol%至约1.8mol%、约0.8mol%至约1.7mol%、约0.9mol%至约

1.6mol％、约0.9mol％至约1.8mol％、约1mol％至约1.8mol％、约1mol％至约1.7mol％、约1.2mol％至约1.8mol％、约1.2mol％至约1.7mol％、约1.3mol％至约1.6mol％、或约1.4mol％至约1.6mol％(或其任何分数或其中的范围)。在其它实施例中,脂质缀合物(例如PEG-脂质)占存在于脂质制剂及其制备方法中的总脂质的约0.5％、0.6％、0.7％、0.8％、0.9％、1.0％、1.2％、1.3％、1.4％、1.5％、1.6％、1.7％、1.8％、1.9％、2.0％、2.5％、3.0％、3.5％、4.0％、4.5％或5％(或其任何分数或其中的范围)。该量可以是在所述范围内的任何值或子值,包括端点。

[0274] 存在于本公开的脂质制剂及其制备方法中的脂质缀合物(例如PEG-脂质)的百分比是目标量,并且制剂中存在的脂质缀合物的实际量可以变化,例如以±0.5mol％变化。本领域普通技术人员将理解,脂质缀合物的浓度可根据所用的脂质缀合物和脂质制剂要发生融合的速率而变化。脂质包封的RNA纳米颗粒的形成

[0275] 图1是本文所描述的生产脂质包封的RNA纳米颗粒的方法的代表性流程图的例子。

[0276] 混合层的几何形状由以下组成:用于输送水溶液的第一管,其内径(ID)大于0.1”,优选ID大于0.132”;以及用于输送乙醇溶液的第二管,其由大于0.005”优选大于0.01”的ID组成;其中第二(有机)管以垂直角度或接近垂直角度与第一(水)管相交。混合期间的输出流速至少为200ml/min,优选至少为300ml/min。

[0277] 本文所描述的方法提供了包含治疗性RNA的RNA水溶液,例如在良好操作规范(Good Manufacturing Practice,GMP)下制备,治疗性RNA溶解于包含缓冲液(例如柠檬酸盐)的水溶液中。本方法还提供了一种包含一种或多种脂质的有机溶液,例如在GMP下合成的临床级脂质,其通过将脂质溶解在水混溶性的有机溶剂中来生产。在本文所描述的方法中,水混溶性有机溶剂优选是低级烷醇,例如乙醇。优选地,将两种溶液过滤灭菌并调节它们的浓度。

[0278] 将有机脂质溶液与包含核酸的水溶液混合以形成具有层状形态(即包括脂质双层)的脂质包封的RNA纳米颗粒。一方面,核酸包封在脂质包封的RNA纳米颗粒中,形成了层状结构。

[0279] 本文所描述的方法涉及在混合环境中将脂质溶液连续引入到水溶液中,优选地在混合模块中垂直地引入。混合将脂质溶液用水溶液稀释至20％、22.5％、25％、27.5％或30％乙醇,优选25％乙醇,并使得在湍流中形成脂质包封的RNA纳米颗粒。

[0280] 在形成脂质包封的RNA纳米颗粒之后,用缓冲液将混合物连续稀释至7.5％、10％、12.5％或15％——优选小于12.5％的乙醇,这进一步稳定了脂质包封的RNA纳米颗粒并增加核酸的包封。

[0281] 通过切向流过滤,优选通过中空纤维滤器,浓缩脂质包封的RNA纳米颗粒。对浓缩的脂质包封的RNA纳米颗粒进行超滤步骤以除去烷醇并替换缓冲液。通过稀释调节核酸浓度。将所得的制剂过滤灭菌并装入小瓶中。现在将使用如图1中提出的步骤在下文中更详细地讨论该过程。脂质溶解和RNA溶出(Dissolution)

[0282] 在一个实施例中,通过本文所描述的方法生产的脂质包封的RNA纳米颗粒呈RNA和脂质的多分子组装体的形式,其中RNA至少部分通过与阳离子脂质的离子配对而被包封。

[0283] 通过本文所描述方法制备的包含RNA的脂质包封的纳米颗粒的优选尺寸为直径约50-200nm,优选地,具有如下尺寸分布:平均尺寸(例如直径)为约70nm至约150nm,更优选地

平均尺寸小于约100nm。

[0284] 在某些方面，本文描述的脂质纳米颗粒包括四种脂质组分：辅助脂质；胆固醇；PEG-脂质；和可电离的阳离子脂质。优选地，辅助脂质为DSPC，PEG-脂质为PEG-DMG，可电离的阳离子脂质为一种可电离的阳离子脂质。在某些实施例中，溶解脂质的有机溶剂浓度为约45％v/v至约90％v/v。在某些优选的方面，有机溶剂为低级烷醇。合适的低级烷醇包括，例如，甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、戊醇、它们的异构体和它们的组合。溶剂优选为浓度为约50-90％v/v的乙醇。优选地，脂质占约1mL/g至约5mL/g的体积。

[0285] 使用例如顶置式搅拌器在合适的温度下溶解脂质。在一个方面，溶液的总脂质浓度为约49.4mg/mL。在某些优选的方面，RNA包含在水溶液(例如缓冲液)中并稀释至终浓度。优选地，在柠檬酸盐缓冲液中终浓度为约0.55mg/mL，pH为约3.5。

[0286] RNA优选为双链RNA(dsRNA)、mRNA或自我复制型RNA。dsRNA的大小为10个碱基对至数百个碱基，优选地少于30个碱基对，最优选地少于25个碱基对。mRNA的大小为在单链中10至几千个碱基。

[0287] 脂质包封的RNA纳米颗粒形成步骤

[0288] 在制备有机溶液和水溶液之后，使用下面详细描述的装置将它们混合在一起。简言之，该装置由用于输送RNA水溶液的第一管和用于输送有机脂质溶液的第二管组成，其中第二管在混合模块内与第一管垂直相交。两种溶液通过单独的HPLC泵泵送通过各自的管，并在混合模块内在第一管的区域中垂直混合。优选地，以比有机脂质溶液大2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.25倍或3.5倍、优选3.0倍的速率泵送RNA水溶液。在混合区中混合两种溶液后，形成脂质包封的RNA纳米颗粒。

[0289] 混合模块的区域中的第一管的泵速和尺寸提供了涉及湍流的混合过程。在流体动力学中，湍流(turbulence，或turbulent flow)是以压力和流速的混沌变化为特征的流体运动。这与层流形成对比，层流发生在流体在平行层中流动时，这些层之间没有中断。湍流总是高度不规则的，且湍流中容易获得的能量供应倾向于加速流体混合物的均化(混合)。导致流动中增强的混合以及提高的质量、动量和能量传输速率的特性称为“扩散性”。湍流的其他特征包括“旋转性”，因为湍流具有强大的三维涡旋生成机制，称为涡旋拉伸和“耗散”，因为当动能通过黏性剪切应力转换为内能时，湍流迅速消散。湍流混合主要由流体中的包裹的小规模(与母流相比)随机运动主导，这些运动使包裹之间的关系更近或更远，并可能更精细地将其划分和混合。本文所描述的用于混合脂质溶液和水溶液的方法提供了RNA在脂质纳米颗粒中的包封(包封与颗粒的形成同时形成)，包封效率大于95％。

[0290] 脂质纳米颗粒通常在室温下形成，但根据本公开，脂质纳米颗粒可在升高的温度下形成。对缓冲剂组成没有整体要求。事实上，本公开的方法和装置可以通过将乙醇中的脂质与水溶液中的RNA混合来配制脂质囊泡。

[0291] 在一个实施例中，当溶解在有机溶剂(例如乙醇)中的脂质通过与缓冲水溶液混合以逐步方式稀释时，脂质纳米颗粒形成，首先通过在混合模块中将水溶液流和脂质流混合在一起，至有机溶剂的最终浓度优选在25-40％之间。所得的脂质、溶剂和溶质浓度可以在囊泡形成过程中保持恒定。在初始形成之后，通过加入缓冲液进一步稀释初始脂质-RNA混合物，优选稀释至约6.0％、6.25％、7.0％、7.5％、10％、12.5％或15％有机溶剂，最优选6.25％、6.25％、7.0％、7.5％、10％或12.5％。

[0292] 本文所描述的连续方法是完全可扩展的。在一个方面，形成平均直径小于约80nm的脂质包封的RNA纳米颗粒，无需机械能过程，例如膜挤出、超声处理或微流化。

[0293] 脂质包封的RNA纳米颗粒

[0294] 本文公开的脂质包封的RNA纳米颗粒包含纳米颗粒或脂质分子的双层。除了阳离子脂质(例如可电离的阳离子脂质)之外，脂质包封的RNA纳米颗粒还包含中性脂质或聚合物。

[0295] 在一些实施例中，RNA完全包封在脂质纳米颗粒的脂质部分内，使得脂质包封的RNA纳米颗粒中的RNA在水溶液中可抵抗核酸酶降解。在其它实施例中，本文所描述的脂质包封的RNA纳米颗粒对哺乳动物(例如人)基本上是无毒的。脂质包封的RNA纳米颗粒的平均直径通常为30nm至150nm、40nm至150nm、50nm至150nm、60nm至130nm、70nm至110nm或70nm至90nm。本文所描述的脂质包封的RNA纳米颗粒通常还具有1:1至100:1、1:1至50:1、2:1至25:1、3:1至20:1、5:1至15:1、或5:1至10:1、或10:1至14:1、或9:1至20:1的脂质:RNA比(质量/质量比)。在一些实施例中，组合物具有在约50:1至10:1之间的总脂质:RNA重量比。在一些实施例中，组合物具有在约40:1至20:1之间的总脂质:RNA重量比。在一些实施例中，组合物具有在约35:1至25:1之间的总脂质:RNA重量比。在一些实施例中，组合物具有在约28:1至32:1之间的总脂质:RNA重量比。

[0296] 在优选的实施例中，脂质颗粒包含RNA、阳离子脂质(例如，本文所描述的一种或多种阳离子脂质或其盐)、磷脂和抑制颗粒聚集的缀合脂质(例如，一种或多种PEG-脂质缀合物)。脂质包封的RNA纳米颗粒还可以包括胆固醇。脂质包封的RNA纳米颗粒可以包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种不同的RNA，其表达一种或多种多肽。

[0297] 在脂质包封的RNA纳米颗粒中，RNA可以完全包封在颗粒的脂质部分内，从而保护RNA免受核酸酶降解。在优选的实施例中，脂质包封的RNA纳米颗粒包含完全包封在颗粒的脂质部分内的RNA，从而保护RNA免受核酸酶降解。在某些情况下，在将脂质颗粒在37℃下暴露于核酸酶至少20、30、45或60分钟后，脂质颗粒中的RNA基本上不降解。在某些其它情况下，脂质颗粒在37℃下在血清中培养至少30、45或60分钟或至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34或36小时后，脂质颗粒中的RNA基本上不降解。在其它实施例中，RNA与脂质包封的RNA纳米颗粒的阳离子脂质络合。本公开的制剂的益处之一是脂质包封的RNA纳米颗粒对哺乳动物(例如人)基本上是无毒的。

[0298] 在其它实施例中，本公开提供了包含多种核酸-脂质颗粒的核酸-脂质颗粒组合物。

[0299] 脂质颗粒包含完全包封在颗粒的脂质部分内的RNA，使得30％至100％、40％至100％、50％至100％、60％至100％、70％至100％、80％至100％、90％至100％、30％至95％、40％至95％、50％至95％、60％至95％、70％至95％、80％至95％、85％至95％、90％至95％、30％至90％、40％至90％、50％至90％、60％至90％、70％至90％、80％至90％、或至少30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％(或其中任何分数或其中的范围)的颗粒具有包封在其中的RNA。

[0300] 根据脂质包封的RNA纳米颗粒的预期用途，可以改变组分的比例，并且可以使用本领域已知的分析来测量特定制剂的递送效率。

[0301] 脂质包封的RNA纳米颗粒的稀释

[0302] 在将有机脂质溶液混合到RNA水溶液中后，如果在去除游离RNA之前进一步稀释脂质包封的RNA纳米颗粒的悬浮液，可以增强RNA包封的程度。在一个实施例中，缓冲液可以是两体积的15mM的Tris、50mM的NaCl、9％蔗糖——pH为7.5，以将乙醇浓度降低到8.25％。在另一个实施例中，缓冲液可以是三体积的10mM的Tris、50mM的NaCl、9％蔗糖——pH为7.5，以将乙醇浓度降低到6.25％。在另一个实施例中，缓冲液可以是一体积的50mM磷酸盐缓冲液——pH为6.0，以将乙醇浓度降低至12.5％。在另一个实施例中，缓冲液可以是两体积的50mM磷酸盐缓冲液——pH为6.0，以将乙醇浓度降低至8.3％。在另一个实施例中，缓冲液可以是三体积的50mM磷酸盐缓冲液——pH为6.0，以将乙醇浓度降低到6.25％。在另一个实施例中，缓冲液可以是三体积的20mM的HEPES、50mM的NaCl、9％蔗糖——pH为7.4，以将乙醇浓度降低到6.25％。在另一个实施例中，缓冲液可以是1-3体积的50mM磷酸盐缓冲液——pH为6.0，三体积的10mM的Tris、50mM的NaCl、9％蔗糖——pH为7.5，以将乙醇浓度降低到6.25％。

[0303] 然后可选地将稀释的脂质包封的RNA纳米颗粒收集到保持在15-20℃的容器中，并在进行第二稀释步骤(用10mM的Tris、50mM的NaCl、9％蔗糖——pH为7.5)或浓缩步骤之前，允许所述颗粒培养几分钟至两小时。

[0304] 样品浓缩

[0305] 稀释的脂质包封的RNA纳米颗粒可以被浓缩，例如通过切向流过滤(TFF)，使用中空纤维膜(mPES Kros膜，加利福尼亚州，兰乔多明格兹，仕必纯公司(Spectrum Laboratories,Inc.,))，可选地通过蠕动泵或4-活塞-隔膜泵或离心泵(基于磁悬浮原理)。用于这种浓缩技术的方法是本领域已知的，并且对于普通技术人员是显而易见的。

[0306] 去除游离RNA和缓冲液置换

[0307] 浓缩后可以对7-10倍体积的10mM的Tris、50mM的NaCl、9％蔗糖——pH为7.5进行渗滤，以去除有机溶剂和未结合的RNA。优选地，通过热交换器加入渗滤缓冲液，使得产物温度保持在15-20℃。该制剂可以进一步浓缩以达到>3mg/mL的总配制RNA浓度。

[0308] 无菌过滤

[0309] 然后可以通过IPRP-HPLC(Ion Pair Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography，离子对反相-高效液相色谱)测量脂质包封的RNA纳米颗粒制剂中的RNA浓度，并通过用含有甘油的10mM Tris、50mM NaCl、9％蔗糖——pH为7.5进行稀释将RNA浓度调节至～2mg/mL(1.85至2.3mg/mL)，使得制剂中甘油的终浓度为5％。渗滤的脂质包封的RNA纳米颗粒通过0.2μm灭菌级过滤器(PES)以56-69mg/mL的脂质浓度进行无菌过滤。

[0310] 无菌填充

[0311] 然后可将过滤的制剂无菌填充到玻璃小瓶中，加塞、加盖并放置于-20或-70±5℃。

[0312] 装置

[0313] 本文的描述提供了用于执行上述过程的装置。图4是根据本文描述的一个实施例的装置的代表性示意图的例子。

[0314] 包含RNA的水溶液由HPLC泵输送通过管，例如，包含0.03″ID的PEEK管、0.05″ID的PEEK连接器、0.0625″硅管以及0.122″ID硅管和0.132″ID不锈钢管的区域。包含脂质的有机

溶液由HPLC泵输送通过管，例如，包含0.03″ID的PEEK管、0.02″ID的PEEK连接器、0.01″ID不锈钢的区域。在混合模块中以90度角将有机溶液泵入水溶液中。因此，将包含脂质的有机溶液以垂直于水溶液流动的流动引入水溶液中。这种以直角流动方向的引入发生在例如图5中所示的混合模块中，并且产生湍流混合——在仔细调节以确保以可接受的方式(粒径、分散性和包封效率)形成RNA的脂质纳米颗粒包封的条件下。然后，含有混合脂质-RNA的管将脂质包封的RNA纳米粒输送至第二混合区域，例如，通过0.25″ID聚丙烯管，其在稀释区域中与稀释缓冲液以45度角合并，稀释的脂质包封的RNA纳米颗粒被收集在保持为15-20℃的不锈钢夹套容器中。使用例如隔膜泵或离心泵通过切向流过滤进一步处理颗粒。

[0315] 在一个实施例中，混合区域为混合模块，在混合模块中有机脂质溶液被输送到RNA水溶液的流中，优选以约90°的角度。输送RNA水溶液的第一0.132″(3.35mm)ID不锈钢管在其两端中间的管壁上有一个孔。第二0.01″ID、0.0625″OD的管通过第一管壁上的孔填充而垂直安装，以允许液体从第二管输送到第一管的内部(见图5)。在优选方面中，使用优选为有机脂质溶液流速三倍的RNA水溶液流速制备脂质包裹的RNA纳米粒的明确形状和可重复尺寸。也可通过改变流体管线的流速(例如，以在某些情况下确保充分混合)来制备具有明确形状和可重复尺寸的囊泡。

[0316] 图5示出了根据一个实施例的混合模块和关联的流体动力学。与现有系统相比，本公开提供了湍流和增加的剪切速率。例如，本公开有利地在混合环境中提供了湍流(N_{re}＞2000)，其在约0.1L/min至约0.3L/min的流速(两个流动管线)下具有约500/s至约3300/s的剪切速率。

[0317] 本文的描述提供了一种具有切向流过滤的装置，其使用中空纤维膜(mPES Kros膜，加利福尼亚州，兰乔多明格兹，仕必纯公司)和4-活塞-隔膜泵或离心泵。

[0318] 药物组合物

[0319] 本文所述的脂质包封的RNA纳米颗粒可用作药物组合物中的组分。除了脂质包封的RNA纳米颗粒之外，这些组合物通常还包含药学上可接受的载体。对药学上可接受的载体的全面讨论可见于Gennaro(2000)Remington:The Science andPractice ofPharmacy.(雷明顿:药学科学与实践)20th edition,ISBN:0683306472，在此通过引用将其整体并入本文。

[0320] 本文所描述的药物组合物可以包括在淡水(例如注射用水)中或在缓冲液中，例如磷酸盐缓冲液、Tris缓冲液、硼酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液或柠檬酸盐缓冲液。缓冲盐通常包括在5-20mM范围内。

[0321] 如本文所描述的药物组合物的pH可在5.0至9.5之间，例如6.0至8.0之间。

[0322] 如本文所述的药物组合物可包括钠盐(例如氯化钠)以提供张力。钠盐可以是浓度为10±2mg/ml——例如约9mg/ml的NaCl。

[0323] 本文所描述的药物组合物可以包括金属离子螯合剂。这些可通过除去可加速磷酸二酯水解的离子来延长RNA稳定性，例如EDTA、EGTA、BAPTA或喷替酸中的一种或多种。此类螯合剂的浓度优选为10-500μM，例如0.1mM。柠檬酸盐，例如柠檬酸钠，也可用作螯合剂，同时有利地还提供缓冲活性。

[0324] 如本文所描述的药物组合物的渗透摩尔量优选在200mOsm/kg至400mOsm/kg之间，例如240-360mOsm/kg之间，或290-310mOsm/kg之间。

[0325] 如本文所描述的药物组合物优选地包括一种或多种防腐剂，例如硫柳汞或2-苯氧基乙醇。最优选无汞组合物。

[0326] 如本文所描述的药物组合物优选是无菌的。

[0327] 如本文所描述的药物组合物优选是无热原(non-pyrogenic)的，例如，每剂含有＜1EU(内毒素单位，标准量度)，优选每剂＜0.1EU。

[0328] 如本文所描述的药物组合物优选不含谷蛋白。

[0329] 如本文所描述的药物组合物可以单位剂量形式制备。在一些实施例中，单位剂量可具有0.1-1.0mL之间的体积，例如约0.5mL。

[0330] 该组合物可以制备成注射剂，作为溶液或悬浮液。该组合物可以制备成用于肺部给药，例如通过吸入器，使用细喷雾。该组合物可制备成用于鼻、耳或眼给药，例如作为喷雾剂或滴剂。

[0331] 根据需要，药物组合物包含免疫有效量的脂质纳米颗粒以及任何其他组分。

[0332] 本文所描述的药物组合物也适于通过递送设备给药，例如注射器、雾化器、喷雾器、吸入器或皮肤贴片，递送设备可用于将组合物给药至脊椎动物受试者。

[0333] 如本文所描述的脂质包封的RNA纳米颗粒不含核糖体。

[0334] 定义

[0335] 术语“大约/约”(approximately或about)，当应用于一个或多个感兴趣的值时，是指与所述提及值相似的值。在某些实施例中，除非另有说明或从上下文中明显看出，否则术语“大约”或“约”是指落在所述值的+/-10％内的值范围(除非这种数字将超过可能值的100％)。

[0336] 术语“关联”、“缀合”、“连接”、“附接”和“拴系”当用于两个或多个部分时，是指这些部分直接或通过一个或多个用作连接剂的另外部分彼此物理关联或连接，以形成足够稳定的结构，使得所述部分在使用该结构的条件下(例如生理条件下)保持物理关联。“关联”不必严格通过直接共价化学键合。它也可以提出离子键或氢键或基于杂交的连接足够稳定，使“关联的”实体保持物理关联。

[0337] 在权利要求中，除非有相反的指示或从上下文中明显可见，否则例如“一个/种(a/an)”和“该/所述”的冠词可以表示一个或多于一个。如果一个、多于一个或所有的组成员存在于、用于给定的产品或方法中或以其它方式与给定的产品或方法相关，则认为在一个或多个组成员之间包括“或”的权利要求或说明书是满足的，除非有相反的指示指出或以其它方式从上下文显而易见。本公开包括这样的实施例，其中该组的恰好一个成员存在于、用于给定的产品或方法中或以其它方式与给定的产品或方法相关。本公开包括这样的实施例，其中该组的多于一个或所有的组成员存在于、用于给定的产品或方法中或以其它方式与给定的产品或方法相关。

[0338] 如本文所用，术语“酰基”表示如本文定义的氢或烷基(例如，卤代烷基)通过如本文定义的羰基连接至母体分子基团，并且示例为甲酰基(即，羧醛基)、乙酰基、三氟乙酰基、丙酰基、丁酰基等。示例性的未取代的酰基包括1至7、1至11或1至21个碳。在一些实施例中，如本文所述烷基进一步取代有1、2、3或4个取代基。

[0339] 除非另有说明，本文所用的术语“烯基”表示含有一个或多个碳-碳双键的2至20个碳(例如2至6或2至10个碳)的单价直链或支化基团，并且示例为乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯

基、2-甲基-1-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基等。烯基包括顺式和反式异构体。烯基可以可选地取代有1、2、3或4个取代基，所述取代基独立地选自如本文所定义的氨基、芳基、环烷基或杂环基(例如，杂芳基)，或本文所描述的任何示例性烷基取代基。

[0340] 除非另有说明，术语“烷氧基”表示式-OR的化学取代基，其中R为C_{1-20}烷基(例如C_{1-6}或C_{1-10}烷基)。示例性的烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基(例如正丙氧基和异丙氧基)、叔丁氧基等。在一些实施例中，烷基可进一步取代有1、2、3或4个如本文定义的取代基(例如，羟基或烷氧基)。

[0341] 除非另有说明，本文所用的术语“烷基”包括1至20个碳(例如1至10或1至6个碳)的直链和支化饱和基团。烷基示例为甲基、乙基、正丙基和异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基和叔丁基、新戊基等。术语“低级烷基”是指链中具有一至六个碳的基团，该链可以是直链或支化的。合适的烷基的非限制性例子包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、正戊基和己基。

[0342] 如本文所用，术语“炔基”表示含有碳-碳三键的2至20个碳原子(例如，2至4、2至6或2至10个碳)的单价直链或支化基团，并且示例为乙炔基、1-丙炔基等。炔基可以可选地取代有1、2、3或4个取代基，如本文所定义，所述取代基独立地选自芳基、环烷基或杂环基(例如杂芳基)，或本文所描述的任何示例性烷基取代基。

[0343] 术语“两亲脂质”或“两亲性脂质”是指其中脂质材料的疏水部分朝疏水相取向，而亲水部分朝向水相取向的材料。亲水性特征源于极性或带电基团的存在，例如碳水化合物、磷酸根、羧基、硫酸根、氨基、巯基、硝基、羟基和其他类似基团。疏水性可通过包括非极性基团来赋予，所述非极性基团包括但不限于长链饱和及不饱和脂族烃基以及被一个或多个芳基、脂环基或杂环基团取代的此类基团。两亲化合物的例子包括但不限于磷脂、氨基脂和鞘脂。

[0344] 术语“阴离子脂质”是指在生理pH下带负电的脂质。这些脂质包括但不限于磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二烷酰基磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰基磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰基磷脂酰乙醇胺、赖氨酰基磷脂酰甘油、棕榈酰基磷脂酰甘油(POPG)和与中性脂质连接的其它阴离子修饰基团。

[0345] “反义”是干扰DNA和/或RNA功能的多核苷酸。这可能导致表达的抑制。

[0346] “水溶液”是指全部或部分包含水的组合物。

[0347] 术语“背压”是指与通过导管的期望的流体流动相反的阻力或力，导致摩擦损失和压降。流体被引导，趋向于远离高压区域并向低压区域流动。

[0348] 术语“包括/包含”旨在是开放的，允许但不要求包括附加的元素或步骤。当术语“包括/包含”在本文中使用时，术语“由...组成”因此也因此被涵盖和公开。

[0349] 术语“组合物”是指包含特定量的特定成分的产品，以及直接或间接由特定量的特定成分的组合产生的任何产品。

[0350] 术语“可商购的化学品”和本文所描述实例中使用的化学品可获自标准商业来源，其中此类来源包括，例如Acros Organics(宾夕法尼亚州，匹兹堡)，Sigma-Adrich Chemical(威斯康星州，密尔沃基)，Avocado Research(英国，兰开夏郡)，Bionet(英国，康沃尔郡)，Boron Molecular(北卡罗来纳州，科研三角园)，Combi-Blocks(加利福尼亚州，圣迭戈)，Eastman Organic Chemicals，Eastman Kodak Company(纽约州，罗契斯特市)，

Fisher Scientific Co.(宾夕法尼亚州,匹兹堡)Frontier Scientific(犹他州,洛根市),ICN Biomedicals,Inc.(加利福尼亚州,科斯塔梅萨)Lancaster Synthesis(新罕布什尔州,温德姆),Maybridge Chemical Co.(英国,康沃尔郡),Pierce Chemical Co.(罗克福德,伊利诺伊州),Riedel de Haen(德国,汉诺威),Spectrum Quality Product,Inc.(新泽西州,新宾士威克),TCI America(俄勒冈州,波特兰)和Wako Chemicals USA,Inc.(弗吉尼亚州,里士满)。

[0351] 核酸序列的术语“表达”是指以下事件中的一种或多种:(1)从DNA序列产生RNA模板(例如,通过转录);(2)RNA转录物的加工(例如,通过剪接、编辑、5’端帽形成和/或3’末端加工);(3)将RNA翻译成多肽或蛋白质;以及(4)多肽或蛋白质的翻译后修饰。

[0352] “完全包封”是指核酸-脂质颗粒中的RNA在暴露于血清或会显著降解游离RNA的核酸酶检验之后不会显著降解。当完全包封时,在通常降解100%游离核酸的处理中,优选颗粒中少于25%的核酸被降解,更优选少于10%,且最优选颗粒中少于5%的核酸被降解。“完全包封”还意味着在体内给药时,核酸-脂质颗粒不会迅速分解为他它们的组成部分。

[0353] 在核酸的情况下,可以通过进行不可透膜的荧光染料排斥法来确定完全包封,方法使用当与核酸结合时具有增强的荧光的染料。通过将染料加入到脂质体制剂,测量所得荧光,并将其与加入少量非离子洗涤剂时观察到的荧光进行比较来确定包封。洗涤剂介导的脂质体双层的破坏释放出包封的核酸,使其与不可透膜的染料相互作用。核酸包封可以计算为$E=(I_0-I)/I_0$,其中I和I_0是指在添加洗涤剂之前和之后的荧光强度。

[0354] “基因”是指这样的核酸(例如DNA)序列,其包含产生多肽或前体(例如单纯疱疹病毒)所必需的编码序列。只要保留全长多肽或其片段的所需活性或功能特性(例如,酶活性、配体结合、信号转导等),则可通过全长编码序列或编码序列的任何部分对多肽进行编码。

[0355] 术语“疏水性脂质”是指具有非极性基团的化合物,所述非极性基团包括但不限于,长链饱和及不饱和脂族烃基,并且可选地被一个或多个芳基、脂环基或杂环基取代的此类基团。合适的例子包括但不限于,二酰基甘油、二烷基甘油、N-N-二烷基氨基、1,2-二酰氧基-3-氨基丙烷和1,2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0356] “免疫有效”量或剂量是足以在受试者中诱导免疫反应从而在受试者体内建立免疫的量或剂量。免疫可以通过例如抗体滴度测试来验证,以确定在受试者体内是否检测到足够的针对某种感染性疾病的抗体。

[0357] “层状形态”是指双层结构。本文公开的脂质颗粒的层状形态、双层结构可以使用分析技术(例如通过冷冻-TEM图像)来确定。

[0358] 术语“脂质”是指包含脂肪酸酯的有机化合物,其特征为不溶于水但溶于许多有机溶剂。脂质通常分为至少三类:(1)“简单脂质”,其包括脂肪和油以及蜡;(2)“复合脂质”,其包括磷脂和糖脂;以及(3)“衍生脂质”,例如类固醇。

[0359] 术语“脂质缀合物”是指抑制脂质颗粒聚集的缀合脂质。此类脂质缀合物包括但不限于:PEG-脂质缀合物,例如,PEG-脂质缀合物,例如,PEG与二烷氧基丙基偶联(例如,PEG-DAA缀合物)、PEG与二酰基甘油偶联(例如,PEG-DAG缀合物)、PEG与胆固醇偶联、PEG与磷脂酰乙醇胺偶联以及PEG与神经酰胺缀合、阳离子PEG脂质,聚恶唑啉(POZ)-脂质缀合物,聚酰胺低聚物,以及它们的混合物。PEG或POZ可直接缀合至脂质或可经由连接基团部分连接到脂质。可使用适于将PEG或POZ偶联至脂质的任何连接基团部分,包括例如不含酯基的连接

基团部分和含酯基的连接基团部分。在某些优选的实施例中，使用不含酯基的连接基团部分，诸如酰胺或氨基甲酸酯。

[0360] 术语“脂质递送载体”是指可用于将治疗性核酸(例如mRNA)递送至感兴趣的靶位点(例如细胞、组织、器官等)的脂质制剂。脂质递送载体可以是核酸-脂质颗粒，其可以由阳离子脂质、非阳离子脂质(例如磷脂)、防止颗粒聚集的缀合脂质(例如PEG-脂质)和可选的胆固醇形成。通常，可将治疗性核酸(例如，mRNA)包封在颗粒的脂质部分中，从而保护它免于酶促降解。

[0361] “脂质纳米颗粒”是可用于递送化合物的任何脂质组合物，包括但不限于脂质体，其包含脂质双层，作为单层或多层结构，其中RNA通过与阳离子脂质的离子配对而至少部分被包封。当脂质纳米颗粒为质体时，认为其具有水性内部。其它脂质纳米颗粒具有固体内部，其中脂质层(其可以是双层或单层)与包封的材料(例如核酸)直接关联。

[0362] “脂质包封的”可以指提供具有完全包封、部分包封或者这两者的化合物的脂质制剂，其中RNA(或另一种核酸)不能通过RNA酶介导的水解或染料插层所接触。

[0363] 术语“信使RNA”(mRNA)是指任何这样的多核苷酸：其编码感兴趣的蛋白质或多肽，以及其能够在体外、体内、原位或离体被翻译以产生编码的感兴趣的蛋白质或多肽。

[0364] 术语“中性脂质”是指在选定的pH下以不带电或中性的两性离子形式存在的脂质种类。在生理pH下，这类脂质包括，例如，二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂和二酰基甘油。

[0365] 术语“非阳离子脂质”是指本文所述的两亲性脂质、中性脂质或阴离子脂质。

[0366] 术语“核酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸以及它们的聚合物。该术语涵盖含有已知核苷酸类似物或修饰的主链残基或连接的核酸，其是合成的、天然存在的和非天然存在的，其具有与参考核酸相似的结合性质并且以类似于参考核苷酸的方式代谢。此类类似物的例子包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性-甲基膦酸酯、2'-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。

[0367] 术语“核苷酸”是指包括具有本领域已知的天然碱基(标准)或修饰碱基的核苷酸。此类碱基通常位于核苷酸糖部分的1'位。核苷酸通常包含碱基、糖和磷酸酯基团。核苷酸可未被修饰或在糖、磷酸酯和/或碱基部分处被修饰(也可互换地称为核苷酸类似物、修饰的核苷酸、非天然核苷酸、非标准核苷酸等；参见，例如，Usman和McSwiggen，同上；Eckstein等人，PCT国际公布WO92/07065；Usman等人，PCT国际公布WO93/15187；Uhlman和Peyman，同上，所有文献均以引用方式并入本文。)存在本领域已知的修饰核酸碱基的若干示例，如Limbach,et al,Nucleic Acids Res.22:2183,1994所汇总的。可以引入核酸分子的碱基修饰的一些非限制性例子包括：肌苷、嘌呤、吡啶-4-酮、吡啶-2-酮、苯基、假尿嘧啶、2,4,6-三甲氧基苯、3-甲基尿嘧啶、二氢尿苷、萘基、氨基苯基、5-烷基胞苷(例如，5-甲基胞苷)、5-烷基尿苷(例如，核糖胸苷)、5-卤代尿苷(例如，5-溴尿苷)或6-氮杂嘧啶或6-烷基嘧啶(例如，6-甲基尿苷)、丙炔等(Burgin,et al.,Biochemistry 35:14090,1996；Uhlman&Peyman，同上)。在这方面，所谓“修饰碱基”意指在1'位的腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶以外的核苷酸碱基或它们的等同物。

[0368] “有机脂质溶液”是指全部或部分包含具有脂质的有机溶剂的组合物。有机脂质溶液优选地包含烷醇，最优选乙醇。

[0369] 本文所用的短语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内，适用于与人类和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症，与合理的效益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0370] 本文所用的短语“药学上可接受的赋形剂”是指除本文所述化合物之外的任何成分(例如，能够悬浮或溶解活性化合物的载体)，并且具有对患者基本无毒和非炎性的性质。赋形剂可以包括，例如：抗黏剂、抗氧化剂、黏合剂、包衣、压缩助剂、崩解剂、染料(着色剂)、润肤剂、乳化剂、填充剂(稀释剂)、成膜剂或包衣、调味剂、芳香剂、助流剂(流动增强剂)、润滑剂、防腐剂、印刷油墨、吸附剂、悬浮剂或分散剂、甜味剂和水合水。示例性赋形剂包括但不限于：丁基化羟基甲苯(BHT)、碳酸钙、磷酸钙(磷酸氢钙)、硬脂酸钙、交联羧甲基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、交聚维酮、半胱氨酸、乙基纤维素、明胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乳糖、硬脂酸镁、麦芽糖醇、甘露醇、甲硫氨酸、甲基纤维素、对羟基苯甲酸甲酯、微晶纤维素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、预胶化淀粉、对羟基苯甲酸丙酯、棕榈酸视黄酯、虫胶、二氧化硅、羧甲基纤维素钠、柠檬酸钠、羧基乙酸淀粉钠、山梨醇、淀粉(玉米)、硬脂酸、蔗糖、滑石粉、二氧化钛、维生素A、维生素E、维生素C和木糖醇。

[0371] 短语“药学上可接受的盐”是指所公开的化合物的衍生物，其中通过将现有的酸或碱部分转化为其盐形式(例如，通过使游离碱基团与合适的有机酸反应)来修饰母体化合物。药学上可接受的盐的例子包括但不限于：碱性残基，如胺的无机或有机酸盐；酸性残基，如羧酸的碱金属盐或有机盐；等等。代表性的酸加成盐包括：乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。代表性的碱金属或碱土金属盐包括：钠、锂、钾、钙、镁等，以及无毒的铵、季铵和胺阳离子，包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。本公开的药学上可接受的盐包括例如由无毒无机或有机酸形成的母体化合物的常规无毒盐。本公开的药学上可接受的盐可由含有碱性或酸性部分的母体化合物通过常规化学方法合成。通常，可以通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计算量的适当碱或酸在水中或在有机溶剂中或在两者的混合物中反应来制备此类盐；通常，非水介质如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈是优选的。合适的盐列表见于：Remington’s Pharmaceutical Sciences(雷明登氏药学全书)，17th ed.，Mack Publishing Company，Easton，Pa.，1985，p.1418；Pharmaceutical Salts:Properties，Selection，and Use(药用盐：特性、选择和使用)，P.H.Stahl and C.G.Wermuth(eds.)，Wiley-VCH，2008，and Berge et al.，Journal of Pharmaceutical Science，66，1-19(1977)，其各自通过引用整体并入本文。

[0372] “核糖核酸”或“RNA”指含有至少两个核糖核苷酸的聚合物。“核糖核苷酸”含有核糖、碱基和磷酸基团。核苷酸通过磷酸基团连接在一起。“碱基”包括嘌呤和嘧啶，其进一步包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷和天然类似物，以及嘌呤

和嘧啶的和合成衍生物，其包括但不限于，放置新的反应基团(例如但不限于胺、醇、硫醇、羧化物和卤代烷)的修饰。

[0373] RNA可以是寡核苷酸RNA、tRNA(转运RNA)、snRNA(小核RNA)、rRNA(核糖体RNA)、mRNA(信使RNA)、反义RNA、siRNA(小干扰RNA)、自我复制型RNA、核酶、嵌合序列或这些组的衍生物的形式。RNA可以包括(除任何5'端帽结构之外)一个或多个具有修饰的核碱基的核苷酸，包括：m5C(5-甲基胞苷)、m5U(5-甲基尿苷)、m6A(N6-甲基腺苷)、s2U(2-硫代尿苷)、um(2'-O-甲基尿苷)、m1A(1-甲基腺苷)；m2A(2-甲基腺苷)；am(2'-O-甲基腺苷)；ms2m6A(2-甲硫基-N6-甲基腺苷)；i6A(N6-异戊烯基腺苷)；ms2i6A(2-甲硫基-N6异戊烯基腺苷)；io6A(N6(顺式-羟基异戊烯基)腺苷)；ms2io6A(2-甲硫基-N6(顺式-羟基异戊烯基)腺苷)；g6A(N6-甘氨酰氨基甲酰基腺苷)；t6A(N6-苏氨酰氨基甲酰基腺苷)；ms2t6A(2-甲硫基-N6-苏氨酰氨基甲酰基腺苷)；m6t6A(N6-甲基-N6-苏氨酰基甲酰基腺苷)；hn6A(N6-羟基正缬氨酰氨基甲酰基腺苷)；ms2hn6A(2-甲硫基-N6-羟基正缬氨酰氨基甲酰基腺苷)；Ar(p)(2'-O-核糖基腺苷(磷酸))；I(肌苷)；m11(1-甲基肌苷)；m'Im(1,2'-O-二甲基肌苷)；m3C(3-甲基胞苷)；Cm(2T-O-甲基胞苷)；s2C(2-硫代胞苷)；ac4C(N4-乙酰基胞苷)；f5C(5-甲酰化胞苷(5-fonnylcytidine))；m5Cm(5,2-O-二甲基胞苷)；ac4Cm(N4乙酰基2TO甲基胞苷)；k2C(赖胞苷)；m1G(1-甲基鸟苷)；m2G(N2-甲基鸟苷)；m7G(7-甲基鸟苷)；Gm(2'-O-甲基鸟苷)；m22G(N2,N2-二甲基鸟苷)；m2Gm(N2,2'-O-二甲基鸟苷)；m22Gm(N2,N2,2'-O-三甲基鸟苷)；Gr(p)(2'-O-核糖基鸟苷(磷酸))；yW(怀丁苷)；o2yW(过氧化怀丁苷)；OHyW(羟基怀丁苷)；OHyW*(欠修饰的羟基怀丁苷)；imG(怀俄苷)；mimG(甲基鸟苷)；Q(辫苷)；oQ(环氧辫苷)；galQ(半乳糖-辫苷)；manQ(甘露糖-辫苷)；preQo(7-氰基-7-去氮鸟苷)；preQi(7-氰基-7-去氮鸟苷)；G*(古嘌苷)；D(二氢尿苷)；m5Um(5,2'-O-二甲基尿苷)；s4U(4-硫代尿苷)；m5s2U(5-甲基-2-硫代尿苷)；s2Um(2-硫代-2'-O-甲基尿苷)；acp3U(3(3-氨基-3-羧基丙)尿苷)；ho5U(5-羟基尿苷)；mo5U(5-甲氧基尿苷)；cmo5U(尿苷5-羟乙酸)；mcmo5U(尿苷5-羟乙酸甲酯)；chm5U(5(羧羟甲基)尿苷))；mchm5U(5(羧羟甲基)尿苷甲基酯)；mcm5U(5-甲氧羰基甲基尿苷)；mcm5Um(S-甲氧羰甲基-2-O-甲基尿苷)；mcm5s2U(5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷)；nm5s2U(5-氨基甲基-2-硫代尿苷)；mnm5U(5-甲基氨甲基尿苷)；mnm5s2U(5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷)；mnm5se2U(5-甲基氨基甲基-2-硒尿苷)；ncm5U(5-氨基甲酰甲基尿苷)；ncm5Um(5-氨基甲酰甲基-2'-O-甲基尿苷)；cmnm5U(5-羧甲基氨甲基尿苷)；cnmm5Um(5-羧甲基氨甲基-2-L-O-甲基尿苷)；cmnm5s2U(5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷)；m62A(N6,N6-二甲基腺苷)；Tm(2'-O-甲基肌苷)；m4C(N4-甲基胞苷)；m4Cm(N4,2-O-二甲基胞苷)；hm5C(5-羟甲基胞苷)；m3U(3-甲基尿苷)；cm5U(5-羧甲基尿苷)；m6Am(N6,T-O-二甲基腺苷)；rn62Am(N6,N6,O-2-三甲基腺苷)；m2'7G(N2,7-二甲基鸟苷)；m2'2'7G(N2,N2,7-三甲基鸟苷)；m3Um(3,2T-O-二甲基尿苷)；m5D(5-甲基二氢尿苷)；f5Cm(5-甲酰基-2'-O-甲基胞苷)；m1Gm(1,2'-O-二甲基鸟苷)；m'Am(1,2-O-二甲基腺苷)；益立诺甲基尿苷(irinomethyluridine)；tm5s2U(S-牛磺酸甲基-2-硫代尿苷))；imG-14(4-去甲基鸟苷)；imG2(异鸟苷)；或ac6A(N6-乙酰基腺苷)、次黄嘌呤、肌苷、8-氧代-腺嘌呤、及其7-取代衍生物、二氢尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-氨基尿嘧啶、5(C1-C6)-烷基尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、5(C2-C6)-烯基尿嘧啶、5(C_2-C_6)-炔基尿嘧啶、5(羟甲基)尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羟基胞嘧啶、5(C1-C6)-烷基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5

(C2-C6)-烯基胞嘧啶、5(C2-C6)-炔基胞嘧啶、5-氯胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、N2-二甲基鸟嘌呤、7-去氮鸟嘌呤、8-氮鸟嘌呤、7-去氮-7-取代鸟嘌呤、7-去氮鸟嘌呤、7-去氮-7-(C2-C6)炔基鸟嘌呤、7-去氮-8-取代鸟嘌呤、8-羟基鸟嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、8-氧代鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、2,4-二氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、8-氮杂嘌呤、取代的7-去氮嘌呤、7-去氮-7-取代嘌呤、7-去氮-8-取代嘌呤、或者脱碱基核苷酸。

[0374] RNA可以包含一个或多个UNA分子,例如在美国专利号8,314,227、9,051,570、9,303,260、9,297,009和9,340,789以及美国专利公开号2016/0168567中公开的,其全部内容并入本文。

[0375] RNA或自我复制型RNA可包括一个或多个修饰的嘧啶核碱基,例如假尿苷和/或5-甲基胞嘧啶残基。

[0376] “自我复制型RNA”是指当从哺乳动物释放到细胞中时,即使没有任何蛋白质,也能通过自身转录(通过产生自身的反义拷贝)产生多个子RNA。自我复制型RNA分子通常是正链分子,其在释放至细胞后可直接翻译,这种翻译提供了依赖于RNA的RNA聚合酶,然后产生所释放RNA的反义和正义转录物。子RNA以及共线性亚基因组转录物可以自行翻译以提供编码的蛋白质(例如抗原或免疫原)的原位表达,或者它们可以被转录以提供与释放的RNA同义的额外转录物,这些转录物被翻译以现场提供蛋白质的表达。该转录序列的总体结果是引入的RNA复制子的数量大量扩增,以这种方式编码的蛋白质成为转染细胞的主要产物。WO2012/006369和US2018/0104359中描述了自我复制型RNA的例子,其内容通过引用并入本文。

[0377] “湍流”在本文中根据混合区域的几何形状以及包含RNA的水溶液和包含脂质混合物的乙醇溶液的流速来定义。在混合过程中,雷诺数至少为2000,其中雷诺数Re定义为

[0378] $Re=DV\rho/\mu$

[0379] 其中:ρ为在水中包含0-25%乙醇的溶液的密度(g/cm^3),V为溶液相对于管的速度(cm/s),D为管道的ID(cm),μ为溶液的动态黏度(g/(cm·s))。Tilton,Fluid andParticle Dynamics(流体和颗粒动力学),PERRY'S CHEMICALENGINEERS'HANDBOOK(Greened.,8thed.2008)(在此全文并入本文)第6-51页。雷诺数Re在2000至2500的范围内(Tilton,6-14)发生湍流转变。例如,在ID=0.132″的管中,流速为300ml/min时,Re为2100(D=0.30cm,V=70cm/sec,ρ=96g/cm^3,μ=0.01gm/(cmsec)(Poling,PhysicalandChemicalData(物理和化学数据),inPERRY'S,分别为2-117和2-448)考虑到管的速度分布,中心线速度v作为半径为R(D/2)的圆管中径向位置r的函数定义为:

[0380] $v=2V(1-r^2/R^2)$

[0381] 其中最大速度是抛物线剖面的有效速度的两倍(Tilton,6-11)。例如,流速为300ml/min时,管中心的雷诺数为4200。因此,确定这样一个流速是可能的,在这个流速中至少在管的中心产生湍流,并且在相当大的程度上向管壁产生湍流。

[0382] 实例

[0383] 实例1:流速对粒径的影响

[0384] 如图1所示,制备含有浓度为0.55mg/mL的siRNA的储液器和含有浓度为49.4mg/mL的总脂质的另一储液器。

[0385] 脂质组合物在以下范围内配制,阳离子脂质:DSPC:胆固醇:PEG-DMG为48-60:5-

10:28-38:0.5-3.0mol%。总脂质与RNA的比例为25:1至30:1,wt:wt。

[0386] 用HPLC泵通过具有0.01″脂质入口的管,将脂质溶液以25至87.5ml/min的流速由储液器泵送通过混合模块。用HPLC泵通过具有0.132″siRNA入口的管将siRNA溶液由储液器泵送通过模块。siRNA的流速为脂质流速的三倍,混合后的输出为25%EtOH溶液。将输出溶液进一步在缓冲液中稀释,并通过切向流过滤(TFF)除去游离RNA和乙醇。图1、4和5示意性地示出了整个过程,其中图1概括了生产步骤,图4示出了装置示意图,图5提供了本公开的混合模块的图示。

[0387] 测量了脂质包封的RNA纳米颗粒的各种性质,包括平均粒径(nm)、多分散指数(PDI)和包封率。对于所有测试条件,制剂产率均>80%。结果如表2所示。

[0388] 表2:混合过程中的不同流速

[0389]

流速, ml/min			平均粒径(nm)	PDI	%包封率	产率(%)	RNA 与脂质比 (wt/wt)
脂质	siRNA	总					
25	75	100	106.9	0.09	99.1	76	0.03
50	150	200	75.7	0.08	99.4	82	0.03
75	225	300	71.2	0.07	99.3	85	0.03
87.5	262.5	350	66.4	0.08	98.7	80	0.03

[0390] 结果显示,增加脂质和RNA的流速降低了平均粒径,同时将PDI保持在<0.1,并将包封率保持在约99%。

[0391] 实例2:过程可扩展性和再现性

[0392] 对于从1升至220升的批次体积,使用300ml/min的合计流速遵循实例1的条件。结果示于表3。

[0393] 表3:物理化学特性的可扩展性和再现性

[0394]

批次体积(L)	平均粒径(nm)	PDI	siRNA 的%包封率	RNA/脂质比 (wt/wt)
1.8	75.4	0.07	96.9	0.03
3.5	73.6	0.04	98.7	0.03
7.3	73.7	0.04	99.1	0.03
22	76.1	0.04	99.1	0.03
110	76.0	0.06	99.0	0.03
220	76.0	0.06	99.0	0.03
220	75.3	0.05	99.0	0.03
220	75.0	0.04	99.0	0.03

[0395] 结果表明,本文公开的使用湍流的方法可从1.8升扩展至220升。通过扩展,关键理化和生物学特性不变。图7提供了冷冻-TEM(transmission electron microscopy,透射电子显微镜)显微照片,其显示在220L批次中产生的颗粒尺寸均匀,具有单层形态。

[0396] 使用实例1中公开的条件,通过在300ml/min流速下将处理的RNA的量从0.05改变至30克,并测量粒径、PDI和%包封率来测量本文公开的方法的可扩展性。结果如图6A所示。结果表明,在从0.5克放大到30克的过程中,颗粒的尺寸保持在70至80nm之间。

[0397] 通过独立地制备几批30g RNA脂质纳米颗粒来测量该方法的再现性。结果如图6B所示。结果证明了批次的再现性,其中获得了70-80nm的粒径。

[0398] 在1.8-220L的所有规模中,最终的制剂产率均>80%。

[0399] 通过静脉(i.v.)注射到Balb/c小鼠的尾静脉中,由本文公开的方法在220L批次中产生的颗粒的影响。结果示于表4。

[0400] 表4

[0401]

方法	剂量15mg/kg	剂量20mg/kg
湍流	耐受良好	耐受良好

[0402] 结果显示,湍流产生的脂质包封的RNA纳米颗粒在高达至少20mg/kg的剂量下是耐受的。

[0403] 实例3:改变siRNA浓度的影响

[0404] 使用实例1的方法,脂质流速为75ml/min,siRNA流速为225ml/min,总流速为300ml/min。稀释前siRNA的过程中浓度在0.083mg/ml至0.41mg/ml之间变化,脂质的浓度成比例增加以保持RNA:脂质比。结果示于表5。

[0405] 表5:混合期间不同的过程中浓度

[0406]

批次号	siRNA 浓度（mg/ml）	总脂质浓度（ug/ml）	平均粒径（nm）	PDI	%包封率	RNA/脂质比（wt/wt）
5	0.41	12.22	70.3	0.08	96.8	0.03
6	0.33	9.84	67.9	0.08	98.3	0.03
7	0.25	7.46	67.1	0.09	97.8	0.03
8	0.17	5.07	68.1	0.10	97.0	0.03
9	0.083	2.48	68.2	0.10	97.3	0.03

[0407] 结果显示,可以改变RNA的过程中浓度而不改变粒径或RNA的包封率。

[0408] 实例4:模块尺寸的影响

[0409] 使用0.03的RNA:脂质比(wt:wt),遵循实例1的条件。通过改变流速从40到600ml/min,测量改变模块入口直径的影响,结果如表6所示。监测入口压力,并测量所得脂质包封的RNA颗粒的PDI大小和包封率。

[0410] 表6:不同的模块入口直径

[0411]

批次号	入口 ID（寸）		入口压力（psi）		流速（ml/min）			平均粒径（nm）	PDI	%包封率	RNA/脂质比（wt/wt）
	脂质	siRNA	脂质	siRNA	脂质	siRNA	总				
10	0.005	0.132	209	0	10	30	40	131	0.09	98.1	0.03
11			386	0	15	45	60	94.07	0.14	98.5	0.03
12			622	0	20	60	80	70.83	0.10	98.2	0.03
13	0.007		172	0	25	75	100	97.74	0.12	98.6	0.03
14			244	3	30	90	120	84.88	0.14	98.6	0.03
15			439	8	35	105	140	72.62	0.12	98.5	0.03
16			617	14	40	120	160	64.28	0.09	97.7	0.03
17	0.001		5	0	25	75	100	106.9	0.09	99.1	0.03
18			96	27	50	150	200	75.7	0.08	99.4	0.03
19			343	75	75	225	300	69.06	0.11	98.0	0.03
20			477	101	87.5	262.5	350	66.38	0.08	98.7	0.03
21	0.002		0	100	75	225	300	135.6	0.08	98.8	0.03
22			2	170	100	300	400	119.6	0.12	98.2	0.03
23			56	345	150	450	600	100.4	0.16	98.6	0.03
24	0.005	0.1	186	0	10	30	40	136.8	0.11	98.0	0.03
25			350	0	15	45	60	104.6	0.16	98.1	0.03
26			566	0	20	60	80	81.24	0.03	97.5	0.03

[0412] 结果表明,在不改变组成的情况下,仅通过改变混合模块的脂质和/或siRNA入口的ID,就可以产生不同尺寸的纳米颗粒,且具有>=99%包封率和>=80%产率。

[0413] 实例5:生产含有mRNA或自我复制型RNA的脂质包封的RNA纳米颗粒

[0414] 遵循实例1的条件,使用具有0.01″脂质入口和0.132″siRNA入口的模块,脂质流速

为75ml/min、mRNA流速为225ml/min、总流速为300ml/min。使用从265kDa到3,858kDa不同大小的单链mRNA,保持RNA/总脂质(wt/wt)比为0.025到0.035。使用的RNA为含有复制子区域的mRNA或自我复制型RNA。

[0415] 表7:不同的核酸大小(mRNA)

[0416]

批次号	mRNA 的 MW Da	mRNA 长度（核苷酸数）	平均粒径（nm）	PDI	%包封率	RNA/脂质比（wt/wt）
27	265,213	827	73.3	0.09	95.2	0.03
28	677,000	2,080	73.0	0.08	94.2	0.03
29	1,389,000	4,269	73.0	02.06	95.0	0.03
30	1,782,362	5,489	82.1	0.08	96.1	0.03
31	3,857,750	11,870	93.4	0.20	96.5	0.03

[0417] 表7中所示的结果显示,使用本文所述的方法,可以以约95-97％的包封率包装高达约0.8至12千碱基(kb)的mRNA。所得颗粒的大小仅在mRNA长度大于5.5kb时增加。

[0418] 实例6:生产含有mRNA或自我复制型RNA的脂质包封的RNA纳米颗粒

[0419] 遵循实例1的条件,使用具有0.01″脂质入口和0.132″siRNA入口的模块,脂质流速为75ml/min、mRNA流速为225ml/min、总流速为300ml/min。使用从265kDa到3,858kDa不同大小的单链mRNA,保持RNA/总脂质(wt/wt)比为0.025到0.035。使用的RNA为含有复制子区域的mRNA或自我复制型RNA。

[0420] 实例6:脂质包封的纳米颗粒的体内生物活性

[0421] 使用本文所描述的方法配制含有EPO mRNA或FVII siRNA的脂质包封的RNA纳米颗粒,然后分别注射到Balb/c小鼠(6-8周龄)中。然后评估小鼠血清或血浆中红细胞生成素(EPO)蛋白和FVII蛋白水平,以确定这些纳米颗粒的生物活性。

[0422] 使用脂质库的肝脏定向的体内筛选,测试了一系列化合物,这些化合物促进肝细胞中高水平的siRNA介导的基因沉默,所述细胞包含肝实质。因子VII,一种凝血因子,是用于测定递送至肝脏的功能性siRNA的合适靶基因。由于该因子在肝细胞中特异性产生,因此基因沉默表明成功递送至实质,而不是递送至网状内皮系统的细胞(例如,Kupffer细胞)。此外,因子VII是一种分泌蛋白质,其可以在血清中容易测量,无需对动物实施安乐死。可以通过测量蛋白质的水平而容易地确定mRNA水平的沉默。这是因为蛋白质的半衰期短(2-5小时)。配制了具有针对因子VII的siRNA的组合物。雌性C57BL/6小鼠(6-8周龄)用于FVII siRNA敲低(knockdown,KD)实验。

[0423] 遵循实例1的过程。如上文所描述测量小鼠体内生物活性。结果示于表8。

[0424] 表8:脂质包封的RNA纳米颗粒的体内结果

[0425]

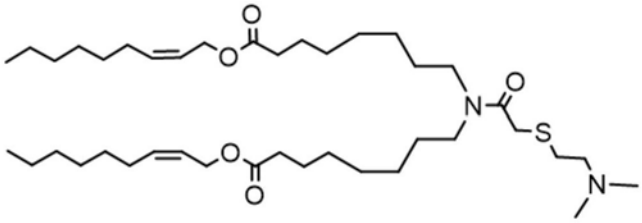
RNA 类型	脂质 mol%	目标 API/总脂质（wt/wt）	流速（ml/min）			平均粒径（nm）	PDI	%包封率	小鼠体内生物活性
			脂质	RNA	总				
epo mRNA	50:7:40:3	0.028	75	225	300	81.6	0.11	96.1	47ng/ml EPO 蛋白@ 0.3 mg/kg mRMA
FVII siRNA	58:7:33.5:1.5	0.034	50	150	200	68.9	0.08	93.7	92.5% FVII mRNA 敲低@ 0.2 mg/kg siRNA

[0426] 结果表明,在使用本文所描述的方法配制的含有EPO mRNA或FVII siRNA的脂质辅助(lipid-enabled)的RNA纳米颗粒中,EPO mRNA介导的表达和FVII siRNA介导的FVII表达的敲低(KD)是有效的。

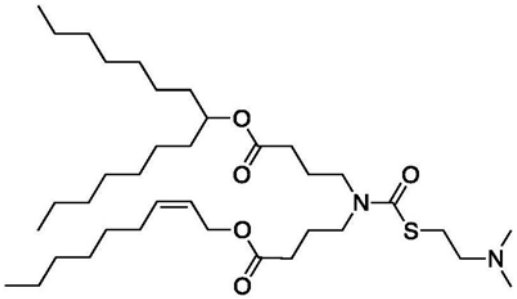
[0427] 实例7:使用不同脂质组合物的脂质包封的mRNA颗粒的体内生物活性

[0428] 使用本文所述的方法,分别配制了含有EPO mRNA的不同脂质组成的脂质辅助的RNA纳米颗粒。可电离的阳离子脂质有所不同:将表1中的脂质1与脂质2、脂质3和脂质9进行比较。可电离阳离子脂质的结构如下所示。制剂的组成如表9所示。

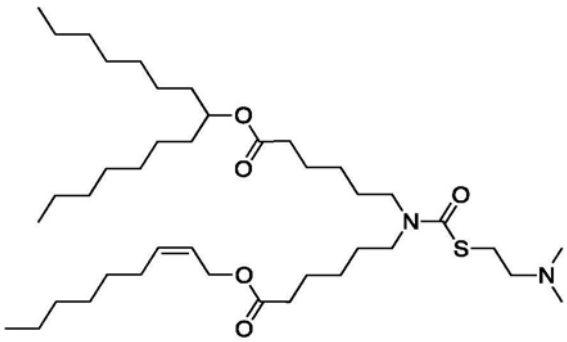
[0429] 脂质1



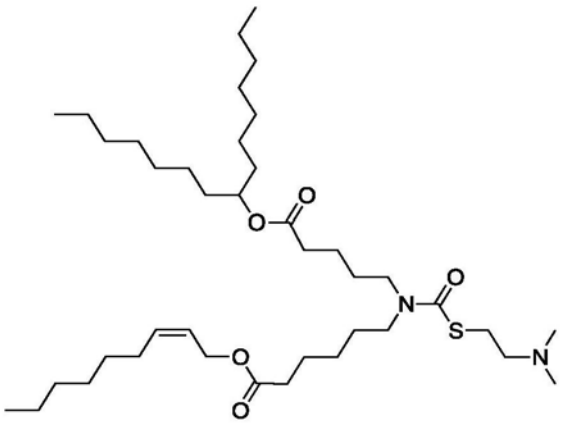
[0430] 脂质2



[0431] 脂质3



[0432] 脂质9



[0433] 在雌性Balb/c小鼠(6-8周龄)中单次给药0.3mg/kg mRNA后,测量血清中EPO蛋白质表达(ng/ml)。PBS阴性对照产生2ng/ml的EPO表达。比较结果示于表9中。

[0434] 表9:脂质包封的RNA纳米颗粒的体内结果

[0435]

脂质组成	脂质 mol%	RNA/脂质比（wt/wt）	RMA（mg/ml）	平均粒径（nm）	PDI	%包封率	EPO 蛋白质表达（ng/ml）
脂质 1：DSPC:PEG_DMG	48-60: 5-10: 35-45: 1-4	0.03	0.14	81.4	0.07	92.1	95
脂质 2：DSPC:PEG_DMG	48-60: 5-10: 28-38: 0.5-3.0	0.03	0.17	68.1	0.16	93.4	92
脂质 3：DSPC:PEG_DMG		0.03		73.7	0.08	94.9	146
脂质 9：DSPC:PEG_DMG		0.03		71.1	0.10	94.9	154

[0436] 结果显示，尽管粒径是相当的，但在具有不同可电离阳离子脂质和组成的脂质辅助的EPO mRNA纳米颗粒中，EPO蛋白质表达显著不同。使用本文所描述的方法，制备的所有脂质辅助的EPO mRNA纳米颗粒都是有效的。观察到测试组合物的产率＞85％。

[0437] 进一步考虑

[0438] 提供上述描述是为了使本领域技术人员能够实践本文所述的各种配置。可以有许多其它方式来实现本主题技术。在不脱离本主题技术的范围的情况下，可以与所示的功能和元件不同地划分本文描述的各种功能和元件。对这些配置的各种修改对于本领域的技术人员将是明显的，且本文所定义的一般原理可应用于其它配置。因此，在不脱离本主题技术的范围的情况下，本领域普通技术人员可以对本主题技术进行许多改变和修改。

[0439] 尽管详细描述包含许多细节，但是这些细节不应解释为限制本主题技术的范围，而仅应解释为说明本主题技术的不同实例和方面。应当理解，本主题技术的范围包括上文没有详细讨论的其他实施例。在不脱离本公开的范围的情况下，可以对本文公开的主题技术的方法和装置的布置、操作和细节进行各种其他修改、改变和变化。此外，装置或方法不必为了包含在本公开的范围而解决通过本公开的不同实施例可解决的每个问题(或拥有可实现的每个优点)。本文中使用的“可以”及其派生词应当理解为“可能”或“可选地”的含义，而不是肯定的能力。

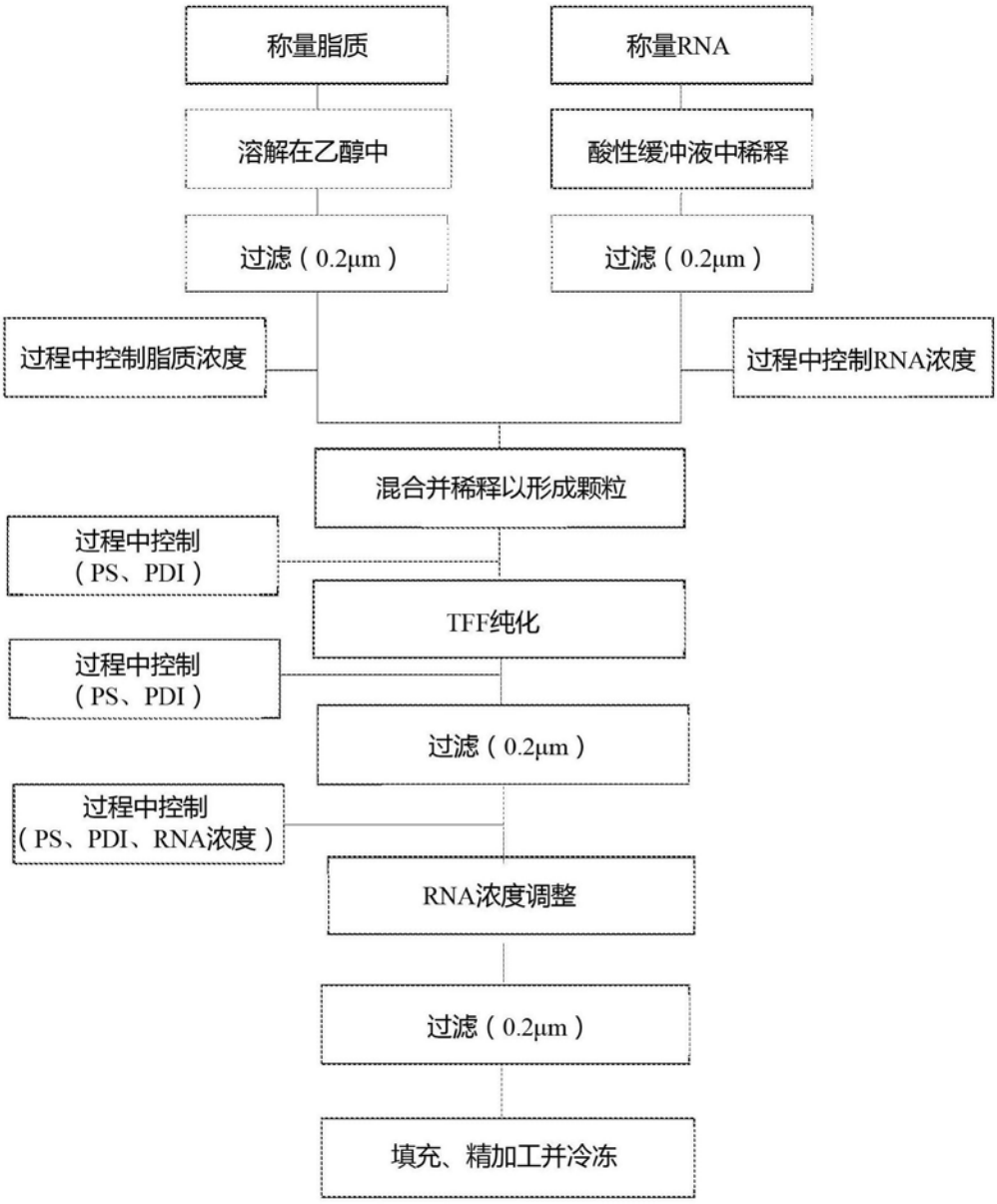

称量脂质
称量RNA
溶解在乙醇中
酸性缓冲液中稀释
过滤（0.2μm）
过滤（0.2μm）
过程中控制脂质浓度
过程中控制RNA浓度
混合并稀释以形成颗粒
过程中控制
（PS、PDI）
TFF纯化
过程中控制
（PS、PDI）
过滤（0.2μm）
过程中控制
（PS、PDI、RNA浓度）
RNA浓度调整
过滤（0.2μm）
填充、精加工并冷冻

图1

			脂质Mol%										
实例 #	mRNA长度（核苷酸数）	mRNA MW	DOTAP	脂质	DSPC	CHOL	PEG	mRNA/脂质（wt/wt）	N/P	粒径（nm）	PDI	%包封率	mRNA纯度（%）
1	4867	1582818	25	25	10	38.5	1.5	0.09	3	99.7	0.1	97.6	75.0
2	4867	1582818	25	25	10	38.5	1.5	0.07	4	87.7	0.1	99.3	79.0
3	4867	1582818	25	25	10	38.5	1.5	0.05	5	85.9	0.1	99.7	80.0
4	4867	1582818	25	25	10	38.5	1.5	0.04	6	81.2	0.2	99.8	76.0
5	4867	1582818	25	25	10	37	3	0.06	4	72.9	0.2	99.5	82.0
6	4867	1582818	25	25	10	35	5	0.06	4	72.0	0.1	99.5	77.0
7	4867	1582818	25	25	10	38.5	1.5	0.06	4	82.4	0.1	99.2	78.0
8	4867	1582818	25	25	10	38.5	1.5	0.05	5	81.8	0.1	99.4	80.0
9	4867	1582818	20	20	7	51.5	1.5	0.06	4	80.3	0.1	99.5	77.0
10	4867	1582818	20	25	10	42	3	0.06	4	84.4	0.2	97.2	74.0
11	4867	1582818	20	30	13	32	5	0.06	4	80.8	0.1	94.7	64.0
12	4867	1582818	25	20	10	40	5	0.05	4	70.2	0.1	99.7	74.0
13	4867	1582818	25	25	13	35.5	1.5	0.06	4	87.7	0.1	98.8	78.0
14	4867	1582818	25	30	7	35	3	0.07	4	81.2	0.1	95.8	72.0
15	4867	1582818	30	20	13	34	3	0.06	4	70.2	0.2	99.5	76.0
16	4867	1582818	30	25	7	33	3	0.06	4	71.7	0.2	97.9	72.0
17	4867	1582818	30	30	10	25.8	1.5	0.07	4	85.9	0.1	99.2	76.0
18	4867	1582818	20	15	13	49	3	0.05	4	68.8	0.2	98.6	76.9
19	4867	1582818	20	20	13	44	3	0.05	4	73.5	0.1	99.4	78.9
20	4867	1582818	20	25	13	39	3	0.06	4	78.6	0.1	98.9	76.2
21	4867	1582818	25	15	13	44	3	0.05	4	67.2	0.1	98.5	73.5
22	4867	1582818	25	20	13	39	3	0.06	4	71.2	0.2	99.5	78.8
23	4867	1582818	25	25	13	34	3	0.06	4	75.2	0.1	99.3	79.1
24	4867	1582818	30	20	13	34	3	0.06	4	72.7	0.2	99.4	78.0
25	4867	1582818	30	30	13	29	3	0.07	4	78.2	0.2	99.4	79.0

图2

批次大小(mRNA, 单位:g)	mRNA尺寸（核苷酸数）	mRNA MW	脂质组成	脂质Mol%	粒径（nm）	PDI	%包封率	%产率
0.10	1331	435111	脂质:DSPC:胆固醇:PEG2000-DMG	50:7:41.5:1.5	64.9	0.16	97.3	78%
0.25	1331	435111	脂质:DSPC:胆固醇:PEG2000-DMG	50:7:41.5:1.5	67.5	0.11	97.8	84%
1.00	1331	435111	脂质:DSPC:胆固醇:PEG2000-DMG	50:7:41.5:1.5	64	0.07	95.5	88%
3.00	1331	435111	脂质:DSPC:胆固醇:PEG2000-DMG	50:7:41.5:1.5	64.4	0.08	97.5	82%
10.00	1331	435111	脂质:DSPC:胆固醇:PEG2000-DMG	50:7:41.5:1.5	63.2	0.10	96.4	88%

图3

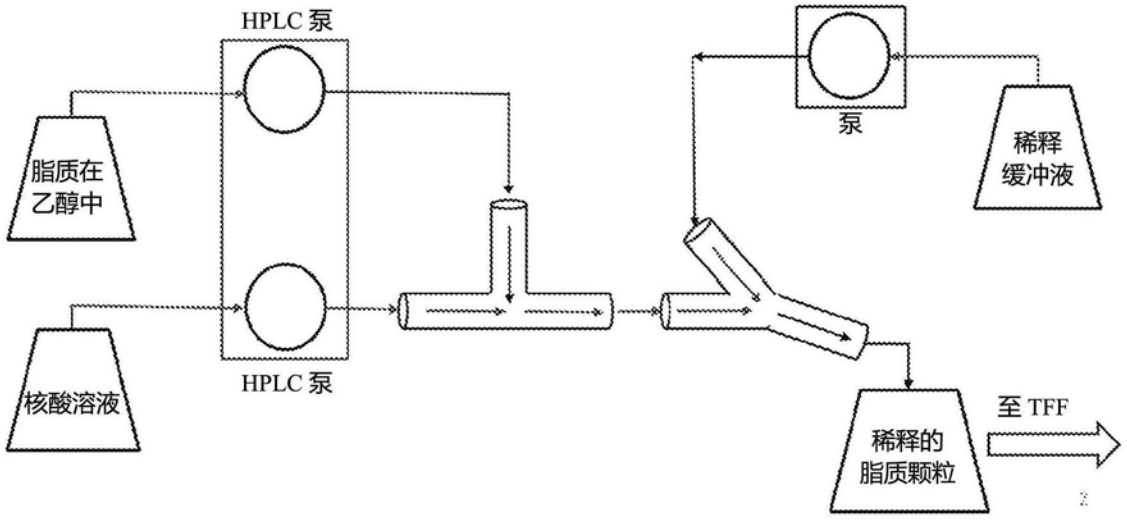

HPLC 泵
脂质在
乙醇中
核酸溶液
HPLC 泵
泵
稀释
缓冲液
稀释的
脂质颗粒
至 TFF

图4

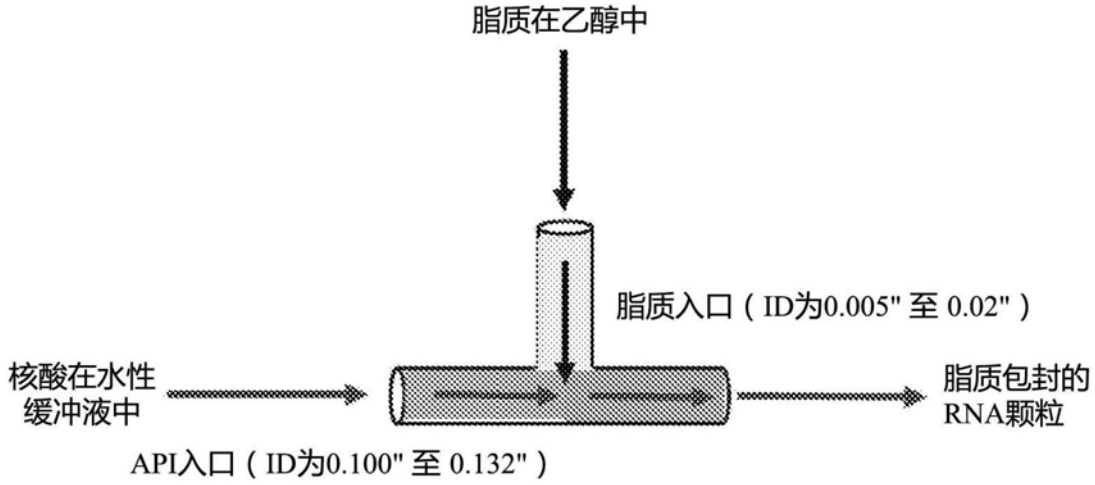

脂质在乙醇中
脂质入口（ID为0.005" 至 0.02"）
核酸在水性
缓冲液中
脂质包封的
RNA颗粒
API入口（ID为0.100" 至 0.132"）

图5

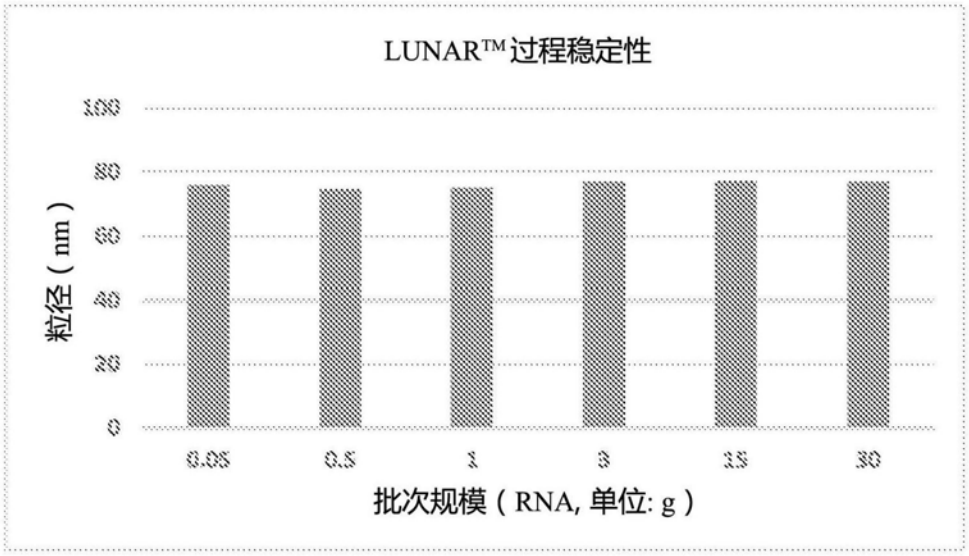

LUNAR™过程稳定性
粒径（nm）
100
80
60
40
20
0
0.05
0.5
1
3
15
30
批次规模（RNA，单位：g）

图6A

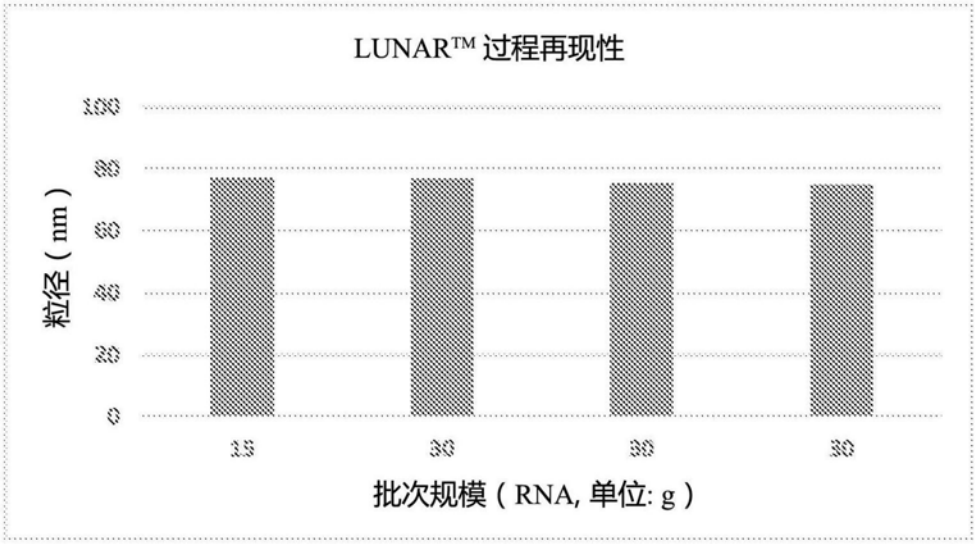

LUNAR™过程再现性
粒径（nm）
100
80
60
40
20
0
15
30
30
30
批次规模（RNA，单位：g）

图6B

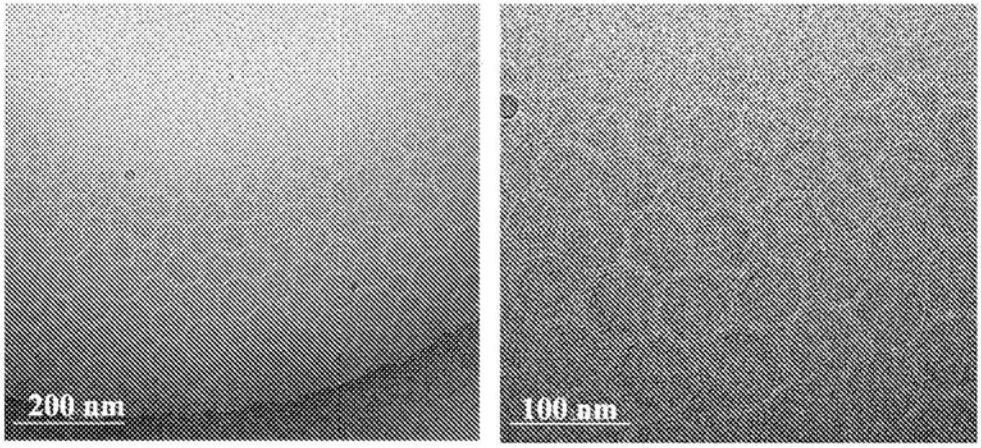


图7