



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113939282 A

(43) 申请公布日 2022.01.14

(21) 申请号 202080026093.9

(22) 申请日 2020.01.31

(30) 优先权数据

62/799620 2019.01.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.09.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/016082 2020.01.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/160397 EN 2020.08.06

(71) 申请人 摩登纳特斯有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 M·史密斯 A·霍和塔 J·奥尔

B·斯金纳

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 黄登高 彭昶

(51) Int.Cl.

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/69 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

权利要求书20页 说明书101页

序列表1页 附图37页

(54) 发明名称

制备脂质纳米颗粒的方法

(57) 摘要

本公开提供生产脂质纳米颗粒(LNP)制剂的方法及其生产的LNP制剂。本公开还提供与所述的LNP制剂有关的治疗和诊断用途。

1. 一种生产脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂的方法, 所述方法包括:

将包含可离子化的脂质的脂质溶液与包含第一缓冲剂的水性缓冲溶液混合, 从而形成包含脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒溶液; 以及

将包含核酸的核酸溶液添加到所述脂质纳米颗粒溶液中, 从而形成包含与所述核酸缔合的所述脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂。

2. 一种对患者施用脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂的方法, 所述方法包括:

提供pH在约4.5至约8.0范围内的包含治疗和/或预防剂的活性剂溶液和pH在约4.5至约6.5范围内的包含脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒溶液, 所述脂质纳米颗粒包含可离子化的脂质;

通过混合所述脂质纳米颗粒溶液和所述活性剂溶液来形成包含与所述治疗和/或预防剂缔合的所述脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂, 使得所述脂质纳米颗粒制剂的pH在约4.5至约小于8.0的范围内; 以及

在所述混合后对所述患者施用所述脂质纳米颗粒制剂。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒溶液的所述脂质纳米颗粒是空脂质纳米颗粒。

4. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述治疗和/或预防剂是疫苗或能够引发免疫反应的化合物。

5. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述治疗和/或预防剂是核酸。

6. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质溶液、所述脂质纳米颗粒 (LNP) 和/或所述脂质纳米颗粒制剂还包含PEG脂质。

7. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒包含少于约2.5摩尔%的PEG脂质。

8. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒包含少于约0.5摩尔%的PEG脂质。

9. 如相应权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒包含约0.05摩尔%至少于约0.5摩尔%的PEG脂质。

10. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒制剂包含少于2.5摩尔%的PEG脂质。

11. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒制剂包含少于0.5摩尔%的PEG脂质。

12. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒制剂包含约0.05摩尔%至少于约0.5摩尔%的PEG脂质。

13. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒制剂的PEG脂质的摩尔%高于所述脂质纳米颗粒的PEG脂质的摩尔%。

14. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒制剂的PEG脂质的摩尔%低于所述脂质纳米颗粒的PEG脂质的摩尔%。

15. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒溶液的所述脂质纳米颗粒具有小于约150nm、小于约125nm、小于约100nm、小于约90nm、小于约80nm、小于约75nm、小于约70nm、小于约65nm、小于约60nm、小于约55nm、小于约50nm、小于约45nm、小于约

40nm、小于约35nm或小于约30nm的平均脂质纳米颗粒直径。

16. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒溶液的所述脂质纳米颗粒具有约25nm至约125nm、约30nm至约110nm、约35nm至约100nm、约40nm至约90nm、约45nm至约80nm或约50nm至约70nm的平均脂质纳米颗粒直径。

17. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述水性缓冲溶液的pH在约4.5至约6.5、约4.6至约6.0、约4.7至约5.75、约4.8至约5.5或约4.9至约5.25的范围内。

18. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质溶液的pH在约7.0至约8.0、约7.1至约7.8、约7.2至约7.6或约7.3至约7.5的范围内。

19. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述核酸溶液的pH在约4.5至约6.5、约4.8至约6.25、约4.8至约6.0、约5.0至约5.8或约5.2至约5.5的范围内。

20. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述活性剂溶液的pH在约4.5至约6.5、约4.8至约6.25、约4.8至约6.0、约5.0至约5.8或约5.2至约5.5的范围内。

21. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒溶液的pH在约4.5至约6.25、约4.6至约6.0、约4.8至约5.8、约5.0至约5.75、约5.0至约5.5的范围内。

22. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒制剂的pH在约4.5至约6.0、约4.6至约5.8、约4.8至约5.6、约5.0至约5.5或约5.1至约5.4的范围内。

23. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒溶液的pH小于所述可离子化的脂质的pKa。

24. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒溶液的pH比所述可离子化的脂质的pKa相差小于一个pH单位。

25. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒制剂的pH小于所述可离子化的脂质的pKa。

26. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒制剂的pH比所述可离子化的脂质的pKa相差小于一个pH单位。

27. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述活性剂溶液和所述脂质纳米颗粒溶液的pH大致相同。

28. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述活性剂溶液和所述脂质纳米颗粒制剂的pH大致相同。

29. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒溶液和所述脂质纳米颗粒制剂的pH大致相同。

30. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述活性剂溶液、所述脂质纳米颗粒溶液和所述脂质纳米颗粒制剂的pH大致相同。

31. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述活性剂溶液、所述脂质纳米颗粒溶液和所述脂质纳米颗粒制剂的pH在约5.0至约6.0、约5.1至约5.75或约5.2至约5.5的范围内。

32. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述水性缓冲溶液的pH和所述核酸溶液的pH大致相同。

33. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述核酸溶液的pH和所述脂质纳米颗粒制剂的pH大致相同。

34. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中在低于约30℃、低于约28℃、低于约26℃、低于约24℃、低于约22℃、低于约20℃或低于约环境温度的温度下进行所述混合。

35. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中在低于约30℃、低于约28℃、低于约26℃、低于约24℃、低于约22℃、低于约20℃或低于约环境温度的温度下进行所述添加。

36. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述混合与所述添加之间的停留时间在约1.0毫秒至约60分钟、约2.0毫秒至约30分钟、约3.0毫秒至约15分钟、约4.0毫秒至约10分钟、约5.0毫秒至约5分钟、约10.0毫秒至约2分钟、约100.0毫秒至约1.0分钟、约1000毫秒至约1.0分钟的范围内。

37. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中在所述混合后不到约72小时、在所述混合后不到约60小时、在所述混合后不到约48小时、在所述混合后不到约36小时、在所述混合后不到约24小时、在所述混合后不到约20小时、在所述混合后不到约16小时、在所述混合后不到约12小时、在所述混合后不到约8小时进行所述施用。

38. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中在所述混合后不到约120分钟、在所述混合后不到约100分钟、在所述混合后不到约90分钟、在所述混合后不到约80分钟、在所述混合后不到约70分钟、在所述混合后不到约60分钟、在所述混合后不到约50分钟、在所述混合后不到约40分钟、在所述混合后不到约30分钟、在所述混合后不到约20分钟、在所述混合后不到约15分钟、在所述混合后不到约10分钟进行所述施用。

39. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其还包括处理所述脂质纳米颗粒制剂。

40. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述核酸是核糖核酸。

41. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述核糖核酸是至少一种选自由小干扰RNA (siRNA)、不对称干扰RNA (aiRNA)、微RNA (miRNA)、Dicer-底物RNA (dsRNA)、小发夹RNA (shRNA)、信使RNA (mRNA) 和长非编码RNA (lncRNA) 组成的组的核糖核酸。

42. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述核酸是信使RNA (mRNA)。

43. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述疫苗包含具有编码癌抗原的开放阅读框的mRNA。

44. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述疫苗是个性化癌症疫苗, 且其中所述癌抗原是受试者特异性癌抗原。

45. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述疫苗还包含具有编码免疫检查点调节剂的开放阅读框的mRNA。

46. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述个性化癌症疫苗包含编码至少2个癌抗原表位的开放阅读框。

47. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述mRNA编码2-100种癌抗原。

48. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述mRNA编码10-100种癌抗原。

49. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述mRNA编码10-1000种癌抗原。

50. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述mRNA编码一种或多种复发性多态性。

51. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述复发性多态性包含p53中的复发性体细胞癌突变。

52. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述mRNA包括至少一个选自由茎环、链

终止核苷、聚A序列、聚腺苷酸化信号和5'帽结构组成的组的基序。

53. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述核酸适用于基因组编辑技术。

54. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述基因组编辑技术是成簇规则间隔短回文重复序列(CRISPR)或转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)。

55. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述核酸是至少一种适用于选自由CRISPR RNA(crRNA)、反式激活crRNA(tracrRNA)、单导向RNA(sgRNA)和DNA修复模板组成的组的基因组编辑技术的核酸。

56. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述mRNA的长度为至少30个核苷酸。

57. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述mRNA的长度为至少300个核苷酸。

58. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质溶液和/或所述脂质纳米颗粒溶液还包含第一有机溶剂。

59. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述水性缓冲溶液、核酸溶液和/或所述脂质纳米颗粒溶液包含第一水性缓冲液。

60. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述水性缓冲溶液、核酸溶液和/或所述脂质纳米颗粒溶液还包含第二水性缓冲液、第二有机溶剂或两者。

61. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一水性缓冲液和所述第二水性缓冲液相同。

62. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一水性缓冲液和所述第二水性缓冲液不同。

63. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一有机溶剂和所述第二有机溶剂相同。

64. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一有机溶剂和所述第二有机溶剂不同。

65. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一水性缓冲液和所述第二水性缓冲液是至少一种选自由乙酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液和tris缓冲液组成的组的缓冲液。

66. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一水性缓冲液和所述第二水性缓冲液包含大于约10mM的柠檬酸盐、乙酸盐或磷酸盐;大于约15mM的柠檬酸盐、乙酸盐或磷酸盐;大于约20mM的柠檬酸盐、乙酸盐或磷酸盐;大于约25mM的柠檬酸盐、乙酸盐或磷酸盐;或大于约30mM的柠檬酸盐、乙酸盐或磷酸盐。

67. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述核酸溶液包含约0.01至约1.0mg/mL的所述核酸、约0.05至约0.5mg/mL的所述核酸或约0.1至约0.25mg/mL的所述核酸。

68. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一有机溶剂、所述第二有机溶剂或两者是醇。

69. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一有机溶剂、所述第二有机溶剂或两者是乙醇。

70. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质溶液、所述核酸溶液或两者还包含第三有机溶剂。

71. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第三有机溶剂是醇。

72. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述第三有机溶剂是苯醇。

73. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述核酸溶液包含小于35体积%的所述第二有机溶剂、小于30体积%的所述第二有机溶剂、小于25体积%的所述第二有机溶剂或小于20体积%的所述第二有机溶剂。

74. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述核酸溶液包含大于约65体积%的所述第二水性缓冲液、大于约70体积%的所述第二水性缓冲液、大于约75体积%的所述第二水性缓冲液或大于约80体积%的所述第二水性缓冲液。

75. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述处理包括至少一个选自由过滤、pH调节、缓冲液交换、透析、浓缩、冷冻、冻干或包装组成的组的步骤。

76. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其不进一步包括在添加所述核酸溶液之前处理所述脂质纳米颗粒或者在所述施用之前处理所述脂质纳米颗粒制剂。

77. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其还包括在添加所述核酸溶液之前处理所述脂质纳米颗粒或者在所述施用之前处理所述脂质纳米颗粒制剂。

78. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述处理包括至少一个选自由过滤、pH调节、缓冲液交换、透析、浓缩、冷冻、冻干或包装组成的组的步骤。

79. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述过滤是切向流过滤。

80. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述处理移除有机溶剂。

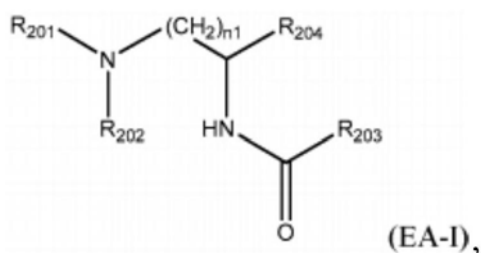
81. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述处理后的PEG脂质的摩尔%高于所述处理前。

82. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述处理后的PEG脂质的摩尔%低于所述处理前。

83. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述混合包括湍流混合和/或微流体混合。

84. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质溶液、所述脂质纳米颗粒(LNP) 溶液和/或所述脂质纳米颗粒(LNP) 制剂还包含包封剂。

85. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述包封剂是式(EA-I) 的化合物:



或其盐或异构体, 其中

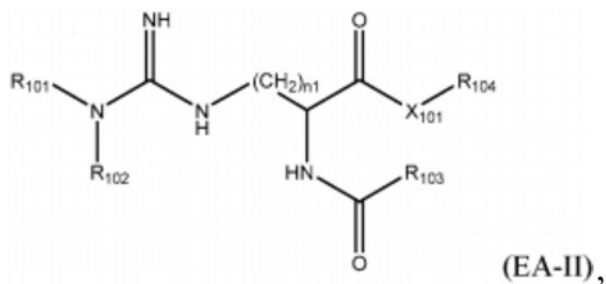
R_{201} 和 R_{202} 各自独立地选自由 H 、 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基和 $(\text{C}=\text{NH})\text{N}(\text{R}_{101})_2$ 组成的组, 其中每个 R_{101} 独立地选自由 H 、 C_1 - C_6 烷基和 C_2 - C_6 烯基组成的组;

R_{203} 选自由 C_1 - C_{20} 烷基和 C_2 - C_{20} 烯基组成的组;

R_{204} 选自由 H 、 C_1 - C_{20} 烷基、 C_2 - C_{20} 烯基、 $\text{C}(\text{O})(\text{OC}_1\text{-C}_{20}\text{烷基})$ 、 $\text{C}(\text{O})(\text{OC}_2\text{-C}_{20}\text{烯基})$ 、 $\text{C}(\text{O})(\text{NHC}_1\text{-C}_{20}\text{烷基})$ 和 $\text{C}(\text{O})(\text{NHC}_2\text{-C}_{20}\text{烯基})$ 组成的组;

$n1$ 选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10。

86. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述包封剂是式 (EA-II) 的化合物:



或其盐或异构体, 其中

X_{101} 是键、NH 或 O;

R_{101} 和 R_{102} 各自独立地选自由 H、 C_1 - C_6 烷基和 C_2 - C_6 烯基组成的组;

R_{103} 和 R_{104} 各自独立地选自由 C_1 - C_{20} 烷基和 C_2 - C_{20} 烯基组成的组; 且

n_1 选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10。

87. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述包封剂是月桂酰精氨酸乙酯或其盐或异构体。

88. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂与所述核酸的重量/重量比率在约 5:1 至约 60:1 的范围内。

89. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂与所述核酸的重量/重量比率在约 10:1 至约 50:1 的范围内。

90. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质溶液还包含磷脂、PEG 脂质、结构脂质或其任何组合。

91. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒还包含磷脂、PEG 脂质、结构脂质或其任何组合。

92. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒制剂还包含磷脂、PEG 脂质、结构脂质或其任何组合。

93. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒和/或脂质纳米颗粒制剂包含

约 30-60 摩尔%的可离子化的脂质;

约 0-30 摩尔%的磷脂;

约 15-50 摩尔%的结构脂质; 和

约 0.01-10 摩尔%的 PEG 脂质。

94. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒和/或脂质纳米颗粒制剂包含

约 30-60 摩尔%的可离子化的脂质;

约 0-30 摩尔%的磷脂;

约 15-50 摩尔%的结构脂质; 和

约 0.01-2.5 摩尔%的 PEG 脂质。

95. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒和/或脂质纳米颗粒制剂包含

约 40-60 摩尔%的可离子化的脂质;

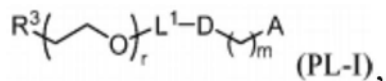
约5-15摩尔%的磷脂；

约35-45摩尔%的结构脂质；

约0.01-2.0摩尔%的PEG脂质。

96. 如前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述PEG脂质选自由PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油和PEG修饰的二烷基甘油组成的组。

97. 如前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述PEG脂质是式 (PL-I) 的化合物：



或其盐，其中：

R_3 是 $-\text{OR}^0$ ；

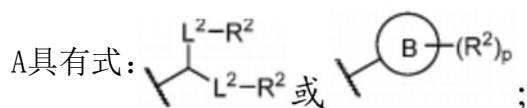
R^0 是氢、任选取代的烷基或氧保护基团；

r 是1与100之间的整数，包括1和100；

L^1 是任选取代的 C_{1-10} 亚烷基，其中所述任选取代的 C_{1-10} 亚烷基的至少一个亚甲基独立地被任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、 O 、 $\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 S 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{NR}^{\text{N}}\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{NR}^{\text{N}}\text{C}(\text{O})\text{O}$ 或 $\text{NR}^{\text{N}}\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 替代；

D 是通过点击化学获得的部分或在生理条件下可裂解的部分；

m 是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；



L^2 的每个实例独立地为键或任选取代的 C_{1-6} 亚烷基，其中所述任选取代的 C_{1-6} 亚烷基的一个亚甲基单元任选被 O 、 $\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 S 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{NR}^{\text{N}}\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{NR}^{\text{N}}\text{C}(\text{O})\text{O}$ 或 $\text{NR}^{\text{N}}\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 替代；

R^2 的每个实例独立地为任选取代的 C_{1-30} 烷基、任选取代的 C_{1-30} 烯基或任选取代的 C_{1-30} 炔基；任选其中 R^2 的一个或多个亚甲基单元独立地被任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、 $\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 O 、 S 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{NR}^{\text{N}}\text{C}(\text{O})$ 、 $-\text{NR}^{\text{N}}\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{NR}^{\text{N}}\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{S}$ 、 $\text{SC}(\text{O})$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{N}})$ 、 $\text{C}(=\text{NR}^{\text{N}})\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{NR}^{\text{N}}\text{C}(=\text{NR}^{\text{N}})$ 、 $\text{NR}^{\text{N}}\text{C}(=\text{NR}^{\text{N}})\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{C}(\text{S})$ 、 $\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{NR}^{\text{N}}\text{C}(\text{S})$ 、 $\text{NR}^{\text{N}}\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{S}(\text{O})$ 、 $\text{OS}(\text{O})$ 、 $\text{S}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OS}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OS}(\text{O})_2$ 、 $\text{S}(\text{O})_2\text{O}$ 、 $\text{OS}(\text{O})_2\text{O}$ 、 $\text{N}(\text{R}^{\text{N}})\text{S}(\text{O})$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{N}(\text{R}^{\text{N}})\text{S}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{OS}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{N}(\text{R}^{\text{N}})\text{S}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{S}(\text{O})_2$ 、 $\text{N}(\text{R}^{\text{N}})\text{S}(\text{O})_2$ 、 $\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{N}(\text{R}^{\text{N}})\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{OS}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 或 $\text{N}(\text{R}^{\text{N}})\text{S}(\text{O})_2\text{O}$ 替代；

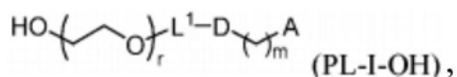
R^{N} 的每个实例独立地为氢、任选取代的烷基或氮保护基团；

环B是任选取代的碳环基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基；

且

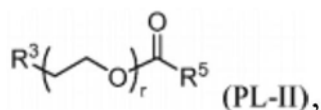
p 是1或2。

98. 如前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述PEG脂质是式 (PL-I-OH) 的化合物：



或其盐。

99. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述PEG脂质是式 (PL-II) 的化合物:



或其盐, 其中:

R_3 是 $-\text{OR}^0$;

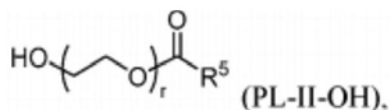
R^0 是氢、任选取代的烷基或氧保护基团;

r 是 1 与 100 之间的整数;

R^5 是任选取代的 C_{10-40} 烷基、任选取代的 C_{10-40} 烯基或任选取代的 C_{10-40} 炔基; 且任选 R^5 的一个或多个亚甲基被任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、 $\text{N}(\text{R}^N)$ 、 O 、 S 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{S}$ 、 $\text{SC}(\text{O})$ 、 $\text{C}(=\text{NR}^N)$ 、 $\text{C}(=\text{NR}^N)\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(=\text{NR}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(=\text{NR}^N)\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{C}(\text{S})$ 、 $\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{S})$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{S}(\text{O})$ 、 $\text{OS}(\text{O})$ 、 $\text{S}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OS}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OS}(\text{O})_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{O}$ 、 $\text{OS}(\text{O})_2\text{O}$ 、 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})$ 、 $\text{S}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{OS}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{OS}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)$ 或 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})_2\text{O}$ 替代; 且

R^N 的每个实例独立地为氢、任选取代的烷基或氮保护基团。

100. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述PEG脂质是式 (PL-II-OH) 的化合物:



或其盐, 其中:

r 是 1 与 100 之间的整数;

R^5 是任选取代的 C_{10-40} 烷基、任选取代的 C_{10-40} 烯基或任选取代的 C_{10-40} 炔基; 且任选 R^5 的一个或多个亚甲基被任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、 $\text{N}(\text{R}^N)$ 、 O 、 S 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{S}$ 、 $\text{SC}(\text{O})$ 、 $\text{C}(=\text{NR}^N)$ 、 $\text{C}(=\text{NR}^N)\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(=\text{NR}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(=\text{NR}^N)\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{C}(\text{S})$ 、 $\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{S})$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{S}(\text{O})$ 、 $\text{OS}(\text{O})$ 、 $\text{S}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OS}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OS}(\text{O})_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{O}$ 、 $\text{OS}(\text{O})_2\text{O}$ 、 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})$ 、 $\text{S}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{OS}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{OS}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)$ 或 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})_2\text{O}$ 替代; 且

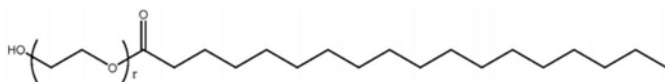
R^N 的每个实例独立地为氢、任选取代的烷基或氮保护基团。

101. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中 r 是 40 与 50 之间的整数。

102. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中 r 是 45。

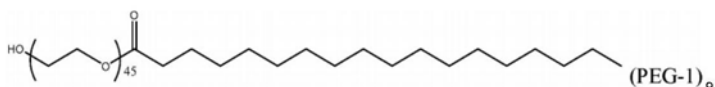
103. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中 R^5 是 C_{17} 烷基。

104. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述PEG脂质是式 (PL-II) 的化合物是:

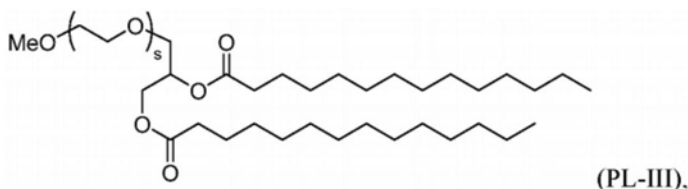


或其盐。

105. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述PEG脂质是式 (PL-II) 的化合物是

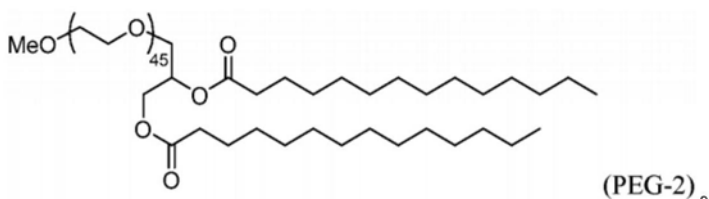


106. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述PEG脂质是式 (PL-III) 的化合物:



或其盐或异构体, 其中s是1与100之间的整数。

107. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述PEG脂质是下式的化合物:



108. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述结构脂质选自由胆固醇、粪固醇、谷固醇、麦角固醇、菜油固醇、豆固醇、菜籽固醇、番茄碱、乌索酸、 α -生育酚及其衍生物组成的组。

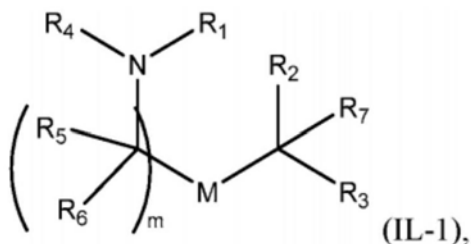
109. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述磷脂选自由以下组成的组: 1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DMPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DPPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DSPC)、1,2-二-十一烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DUPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (POPC)、1,2-二-0-十八烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (18:0DietherPC)、1-油酰基-2-胆固醇基半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (OChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (C16 Lyso PC)、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二-二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DOPE)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (ME 16.0 PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二-二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-rac-(1-甘油) 钠盐 (DOPG)、鞘磷脂及其衍生物。

110. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述磷脂是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DSPC)。

111. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述可离子化的脂质包括可离子化的氨基脂质。

112. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述可离子化的脂质是式 (IL-1) 的化

合物:



或它们的N-氧化物或其盐或异构体,其中:

R_1 选自自由 C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''M'R'$ 组成的组;

R_2 和 R_3 独立地选自自由H、 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R^*OR''$ 组成的组,或者 R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环;

R_4 选自自由氢、 C_{3-6} 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ(R)_2$ 和未取代的 C_{1-6} 烷基组成的组,其中Q选自碳环、杂环、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $-N(R)S(O)_2R_8$ 、 $-O(CH_2)_nOR$ 、 $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)R$ 、 $-N(OR)S(O)_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 和 $-C(R)N(R)_2C(O)OR$,且每个n独立地选自1、2、3、4和5;

每个 R_5 独立地选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组;

每个 R_6 独立地选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组;

M和M'独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)-M''-C(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基和杂芳基,其中M''是键、 C_{1-13} 烷基或 C_{2-13} 烯基;

R_7 选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组;

R_8 选自自由 C_{3-6} 碳环和杂环组成的组;

R_9 选自自由H、CN、 NO_2 、 C_{1-6} 烷基、 $-OR$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2N(R)_2$ 、 C_{2-6} 烯基、 C_{3-6} 碳环和杂环组成的组;

每个R独立地选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组;

每个R'独立地选自自由 C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和H组成的组;

每个R''独立地选自自由 C_{3-15} 烷基和 C_{3-15} 烯基组成的组;

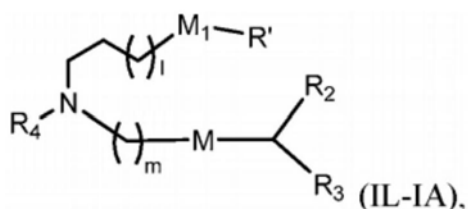
每个R*独立地选自自由 C_{1-12} 烷基和 C_{2-12} 烯基组成的组;

每个Y独立地为 C_{3-6} 碳环;

每个X独立地选自自由F、Cl、Br和I组成的组;且

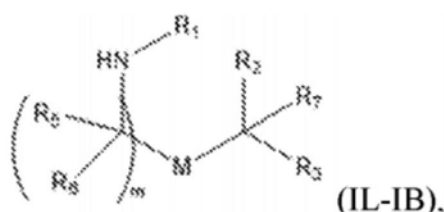
m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13;且其中当 R_4 是 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 或 $-CQ(R)_2$ 时,则(i)当n是1、2、3、4或5时,Q不是 $-N(R)_2$,或者(ii)当n是1或2时,Q不是5、6或7元杂环烷基。

113.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述可离子化的脂质是式(IL-IA)的化合物:



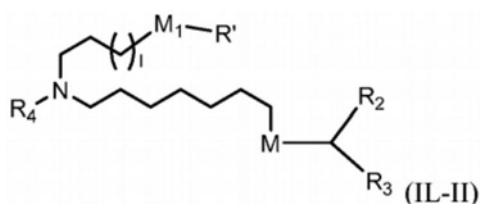
或其N-氧化物或其盐或异构体,其中 l 选自1、2、3、4和5; m 选自5、6、7、8和9; M_1 是键或 M' ; R_4 是氢、未取代的 C_{1-3} 烷基或 $-(CH_2)_nQ$,其中 Q 是OH、 $-NHC(S)N(R)_2$ 、 $-NHC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $-NHC(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-NHC(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、杂芳基或杂环烷基; M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)-M''-C(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S-S-$ 、芳基和杂芳基;且 R_2 和 R_3 独立地选自由H、 C_{1-14} 烷基和 C_{2-14} 烯基组成的组;在一些实施方案中, m 是5、7或9;在一些实施方案中, Q 是OH、 $-NHC(S)N(R)_2$ 或 $-NHC(O)N(R)_2$;在一些实施方案中, Q 是 $-N(R)C(O)R$ 或 $-N(R)S(O)_2R$ 。

114. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述可离子化的脂质是式(IL-IB)的化合物:



或其N-氧化物或其盐或异构体,其中所有变量如本文所定义;在一些实施方案中, m 选自5、6、7、8和9; R_4 是氢、未取代的 C_{1-3} 烷基或 $-(CH_2)_nQ$,其中 Q 是OH、 $-NHC(S)N(R)_2$ 、 $-NHC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $-NHC(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-NHC(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、杂芳基或杂环烷基; M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)-M''-C(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S-S-$ 、芳基和杂芳基;且 R_2 和 R_3 独立地选自由H、 C_{1-14} 烷基和 C_{2-14} 烯基组成的组;在一些实施方案中, m 是5、7或9;在一些实施方案中, Q 是OH、 $-NHC(S)N(R)_2$ 或 $-NHC(O)N(R)_2$;在一些实施方案中, Q 是 $-N(R)C(O)R$ 或 $-N(R)S(O)_2R$ 。

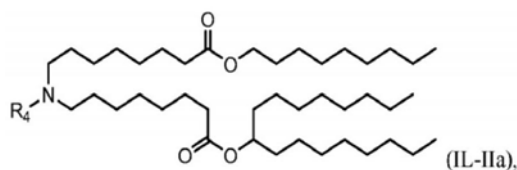
115. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述可离子化的脂质是式(IL-II)的化合物:



或其N-氧化物或其盐或异构体,其中 l 选自1、2、3、4和5; M_1 是键或 M' ; R_4 是氢、未取代的 C_{1-3} 烷基或 $-(CH_2)_nQ$,其中 n 是2、3或4,且 Q 是OH、 $-NHC(S)N(R)_2$ 、 $-NHC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $-NHC(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-NHC(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、杂芳基或杂环烷基; M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)-M''-C(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S-S-$ 、芳基和杂芳基;且 R_2 和 R_3 独立地选自由H、 C_{1-14} 烷基和 C_{2-14} 烯基组成的组。

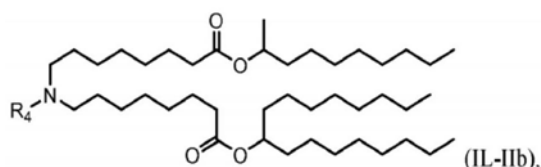
116. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述可离子化的脂质是式(IL-IIa)的

化合物:



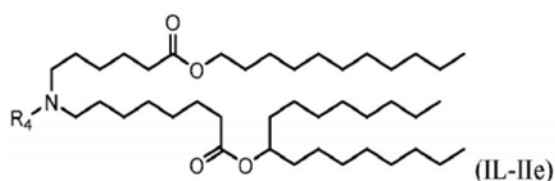
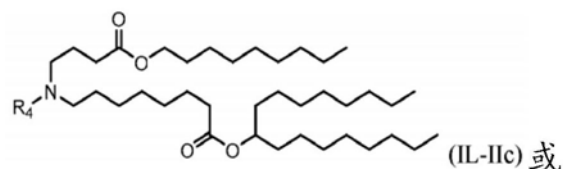
或它们的N-氧化物或其盐或异构体,其中 R_4 如本文所述。

117. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述可离子化的脂质是式 (IL-IIb) 的化合物:



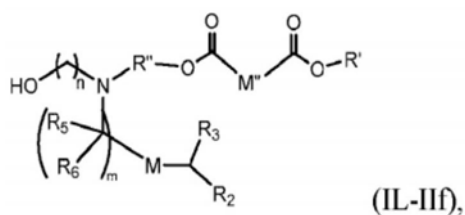
或它们的N-氧化物或其盐或异构体,其中 R_4 如本文所述。

118. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述可离子化的脂质是式 (IL-IIc) 或 (IL-IIe) 的化合物:



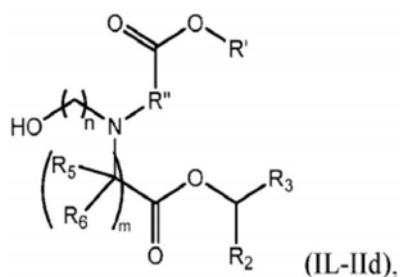
或它们的N-氧化物或其盐或异构体,其中 R_4 如本文所述。

119. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述可离子化的脂质是式 (IL-IIIf) 的化合物:



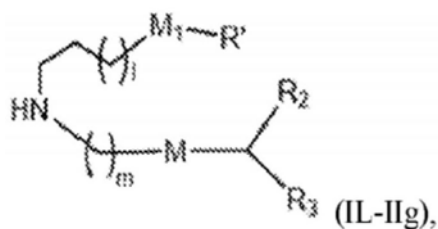
或它们的N-氧化物或其盐或异构体,其中M是 $-C(O)O-$ 或 $-OC(O)-$, M'' 是 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烯基, R_2 和 R_3 独立地选自由 C_{5-14} 烷基和 C_{5-14} 烯基组成的组,且n选自2、3和4。

120. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述可离子化的脂质是式 (IL-IIId) 的化合物:



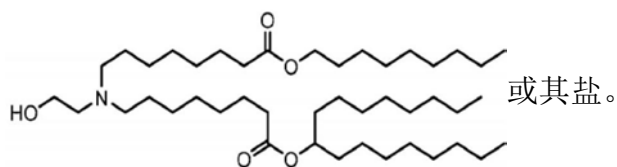
或它们的N-氧化物或其盐或异构体,其中n是2、3或4;且m、R'、R''和R₂至R₆如本文所述;在一些实施方案中,R₂和R₃中的每一者可独立地选自由C₅₋₁₄烷基和C₅₋₁₄烯基组成的组。

121. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述可离子化的脂质是式(IL-IIg)的化合物:

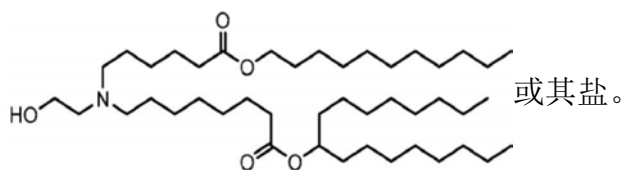


或它们的N-氧化物或其盐或异构体,其中l选自1、2、3、4和5;m选自5、6、7、8和9;M₁是键或M';M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)-M''-C(O)O-、-C(O)N(R')-、-P(O)(OR')O-、-S-S-、芳基和杂芳基;且R₂和R₃独立地选自由H、C₁₋₁₄烷基和C₂₋₁₄烯基组成的组;在一些实施方案中,M''是C₁₋₆烷基(例如,C₁₋₄烷基)或C₂₋₆烯基(例如C₂₋₄烯基);在一些实施方案中,R₂和R₃独立地选自由C₅₋₁₄烷基和C₅₋₁₄烯基组成的组。

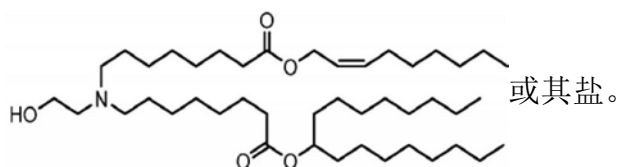
122. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述可离子化的脂质是



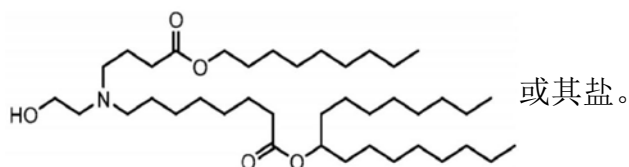
123. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述可离子化的脂质是



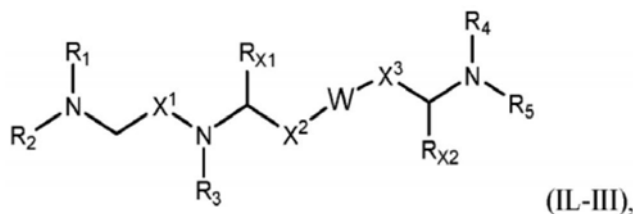
124. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述可离子化的脂质是



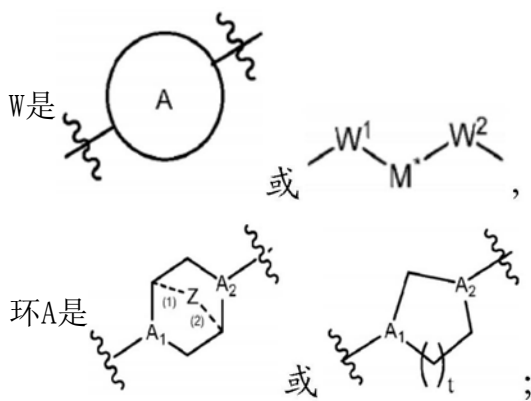
125. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述可离子化的脂质是



126. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述可离子化的脂质是式(IL-III)的化合物:



或其盐或异构体,其中,



t是1或2;

A₁和A₂各自独立地选自CH或N;

Z是CH₂或不存在,其中当Z是CH₂时,虚线(1)和(2)各自代表单键;且当Z不存在时,虚线(1)和(2)都不存在;

R₁、R₂、R₃、R₄和R₅独立地选自由C₅₋₂₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R''MR'、-R*YR''、-YR''和-R*OR''组成的组;

R_{X1}和R_{X2}各自独立地为H或C₁₋₃烷基;

每个M独立地选自由-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-C(O)S-、-SC(O)-、芳基和杂芳基组成的组;

M*是C₁-C₆烷基,

W¹和W²各自独立地选自由-O-和-N(R₆)-组成的组;

每个R₆独立地选自由H和C₁₋₅烷基组成的组;

X¹、X²和X³独立地选自由键、-CH₂-、-(CH₂)₂-、-CHR-、-CHY-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-(CH₂)_n-C(O)-、-C(O)-(CH₂)_n-、-(CH₂)_n-C(O)O-、-OC(O)-(CH₂)_n-、-(CH₂)_n-OC(O)-、-C(O)O-(CH₂)_n-、-CH(OH)-、-C(S)-和-CH(SH)-组成的组;

每个Y独立地为C₃₋₆碳环;

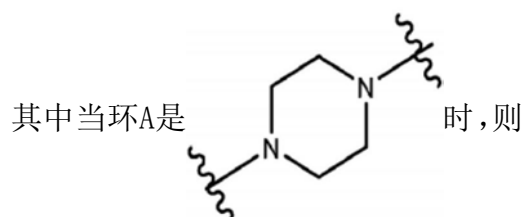
每个R*独立地选自由C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基组成的组;

每个R独立地选自由C₁₋₃烷基和C₃₋₆碳环组成的组；

每个R' 独立地选自由C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基和H组成的组；

每个R''独立地选自由C₃₋₁₂烷基、C₃₋₁₂烯基和-R*MR' 组成的组；且

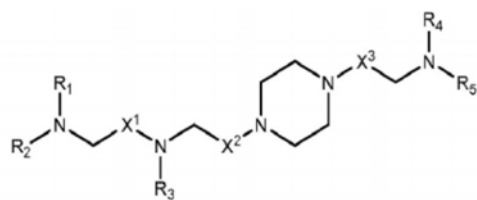
n是1-6的整数；



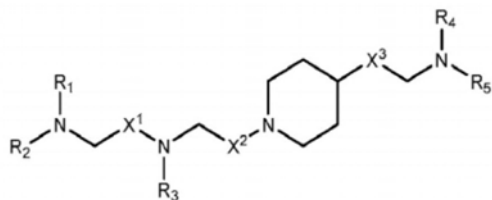
i) X¹、X²和X³中的至少一者不是-CH₂-；和/或

ii) R₁、R₂、R₃、R₄和R₅中的至少一者是-R''MR'。

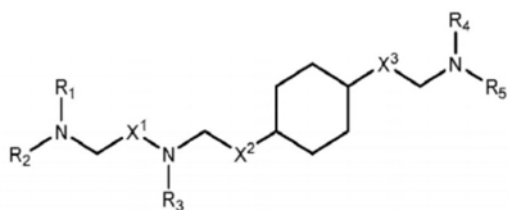
127. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述可离子化的脂质是式(IL-IIIa1) - (IL-IIIa8) 中任一者的化合物:



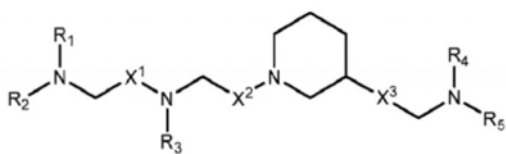
(IL-IIIa1)、



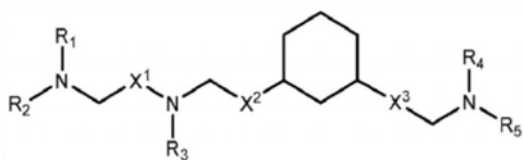
(IL-IIIa2)、



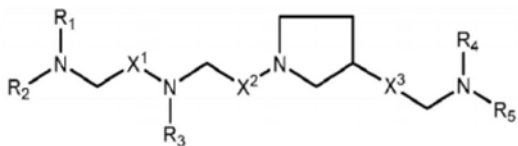
(IL-IIIa3)、



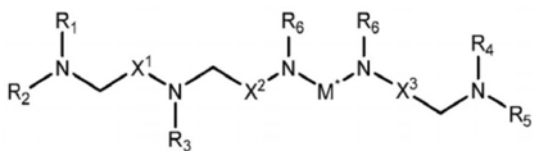
(IL-IIIa4)、



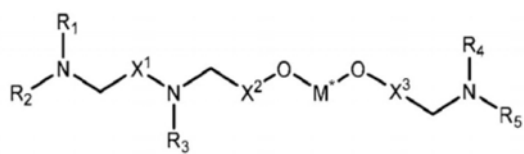
(IL-IIIa5)、



(IL-IIIa6)、

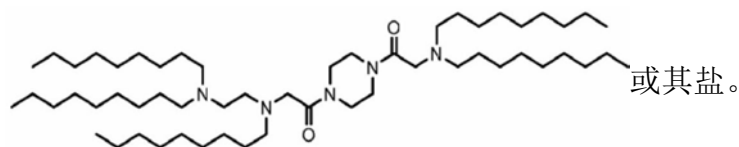


(IL-IIIa7)或



(IL-IIIa8)。

128. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述可离子化的脂质是



129. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述可离子化的脂质选自由3-(二-十二烷基氨基)-N1,N1,4-三-十二烷基-1-哌嗪乙胺(KL10)、N1-[2-(二-十二烷基氨基)乙基]-N1,N4,N4-三-十二烷基-1,4-哌嗪二乙胺(KL22)、14,25-二-十三烷基-15,18,21,24-四氮杂-三十八烷(KL25)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLin-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)、4-(二甲基氨基)丁酸三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(DLin-MC3-DMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、1,2-二油酰氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DODMA)、2-({8-[(3 β)-胆甾-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA)、(2R)-2-({8-[(3 β)-胆甾-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA (2R)) 和 (2S)-2-({8-[(3 β)-胆甾-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA (2S)) 组成的组。

130. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂具有约1.1:1至约30.1的N:P比率。

131. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂具有约2:1至约20:1的N:P比率。

132. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂具有约2:1至约10:1或约2:1至约5:1的N:P比率。

133. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂包含约0.01至约500mg/mL的所述核酸、约0.1至约100mg/mL、约0.25至约50mg/mL、约0.5至约10mg/mL或约1.0至约10mg/mL的所述核酸。

134. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒具有约40nm至约150nm的平均脂质纳米颗粒直径。

135. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂具有约40nm至约150nm的平均脂质纳米颗粒直径。

136. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒具有约0.01至约0.25的多分散性指数(PDI)。

137. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂具有约0.01至约0.25的多分散性指数(PDI)。

138. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%的包封效率。

139. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂具有至少约85%、至少约90%或至少约95%的包封效率。

140. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂具有至少约90%、至少约92%、至少约94%、至少约96%或至少约98%的包封效率。

141. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂的核酸

表达(例如,mRNA表达)为约20%或更高、约25%或更高、约30%或更高、约35%或更高、约40%或更高、约45%或更高、约50%或更高、约55%或更高、约60%或更高、约65%或更高、约70%或更高、约75%或更高、约80%或更高、约85%或更高、约90%或更高、约95%或更高、约96%或更高、约97%或更高、约98%或更高或者约99%或更高。

142.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂在约-5-25℃、约0-10℃或约2-8℃下储存至少1天、至少2天、至少1周、至少2周、至少4周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少8个月或至少1年后,所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂的平均脂质纳米颗粒直径增加小于约25nm、小于约20nm、小于约15nm、小于约10nm、小于约5nm、小于约4nm、小于约3nm、小于约2nm或小于约1nm。

143.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒溶液在约-5-25℃、约0-10℃或约2-8℃下储存至少1天、至少2天、至少1周、至少2周、至少4周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少8个月或至少1年后,所述脂质纳米颗粒溶液的所述空脂质纳米颗粒的平均脂质纳米颗粒直径增加小于约25nm、小于约20nm、小于约15nm、小于约10nm、小于约5nm、小于约4nm、小于约3nm、小于约2nm或小于约1nm。

144.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂在约-5-25℃、约0-10℃或约2-8℃下储存至少1天、至少2天、至少1周、至少2周、至少4周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少8个月或至少1年后,所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂的平均脂质纳米颗粒直径增加小于约25%、小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%或小于约1%。

145.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒溶液在约-5-25℃、约0-10℃或约2-8℃下储存至少1天、至少2天、至少1周、至少2周、至少4周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少8个月或至少1年后,所述脂质纳米颗粒溶液的所述空脂质纳米颗粒的平均脂质纳米颗粒直径增加小于约25%、小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%或小于约1%。

146.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂在约-5-25℃、约0-10℃或约2-8℃下储存至少1天、至少2天、至少1周、至少2周、至少4周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少8个月或至少1年后,所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂的多分散性指数(PDI)增加小于约0.25、小于约0.20、小于约0.15、小于约0.10、小于约0.05、小于约0.04、小于约0.03、小于约0.02或小于约0.01。

147.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒溶液在约-5-25℃、约0-10℃或约2-8℃下储存至少1天、至少2天、至少1周、至少2周、至少4周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少8个月或至少1年后,所述脂质纳米颗粒溶液的所述空脂质纳米颗粒的多分散性指数(PDI)增加小于约0.25、小于约0.20、小于约0.15、小于约0.10、小于约0.05、小于约0.04、小于约0.03、小于约0.02或小于约0.01。

148.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂在约-5-25℃、约0-10℃或约2-8℃下储存至少1天、至少2天、至少1周、至少2周、至少4周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少8个月或至少1年后,所述脂质纳米颗粒(LNP)制剂的多分散性指数(PDI)增加小于约25%、小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%或小于约1%。

149. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒溶液在约-5-25℃、约0-10℃或约2-8℃下储存至少1天、至少2天、至少1周、至少2周、至少4周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少8个月或至少1年后, 所述脂质纳米颗粒溶液的所述空脂质纳米颗粒的多分散性指数(PDI) 增加小于约25%、小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%或小于约1%。

150. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒(LNP) 制剂在约-5-25℃、约0-10℃或约2-8℃下储存至少1天、至少2天、至少1周、至少2周、至少4周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少8个月或至少1年后, 所述脂质纳米颗粒(LNP) 制剂的包封效率降低小于约25%、降低小于约20%、降低小于约15%、降低小于约10%、降低小于约5%、降低小于约4%、降低小于约3%、降低小于约2%或包封效率降低小于约1%。

151. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒(LNP) 制剂在约-5-25℃、约0-10℃或约2-8℃下储存至少1天、至少2天、至少1周、至少2周、至少4周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少8个月或至少1年后, 所述脂质纳米颗粒(LNP) 制剂具有小于约25%的核酸表达(例如, mRNA表达) 减少、小于约20%的减少、小于约15%的减少、小于约10%的减少、小于约5%的减少、小于约4%的减少、小于约3%的减少、小于约2%的减少或小于约1%的核酸表达(例如, mRNA表达) 减少。

152. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒(LNP) 制剂的平均脂质纳米颗粒直径与通过相当的方法生产的脂质纳米颗粒(LNP) 制剂相比为约99%或更小、约98%或更小、约97%或更小、约96%或更小、约95%或更小、约90%或更小、约85%或更小、约80%或更小、约75%或更小、约70%或更小、约65%或更小、约60%或更小、约55%或更小、约50%或更小、约40%或更小、约30%或更小、约20%或更小或者约10%或更小。

153. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒(LNP) 制剂的包封效率比通过相当的方法生产的脂质纳米颗粒(LNP) 制剂的包封效率高约5%或更高、约10%或更多、约15%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、约1倍或更多、约2倍或更多、约3倍或更多、约4倍或更多、约5倍或更多、约10倍或更多、约20倍或更多、约30倍或更多、约40倍或更多、约50倍或更多、约100倍或更多、约200倍或更多、约300倍或更多、约400倍或更多、约500倍或更多、约1000倍或更多、约2000倍或更多、约3000倍或更多、约4000倍或更多、约5000倍或更多或者约10000倍或更多。

154. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述脂质纳米颗粒(LNP) 制剂的核酸表达(例如, mRNA表达) 比通过相当的方法生产的脂质纳米颗粒(LNP) 制剂的核酸表达(例如, mRNA表达) 高约5%或更高、约10%或更多、约15%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、约1倍或更多、约2倍或更多、约3倍或更多、约4倍或更多、约5倍或更多、约10倍或更多、约20倍或更多、约30倍或更多、约40倍或更多、约50倍或更多、约100倍或更多、约200倍或更多、约300倍或更多、约400倍或更多、约500倍或更多、约1000倍或更多、约2000倍或更多、约3000倍或更多、约4000倍或更多、约5000倍或更多或者约10000倍或更多。

155. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中以肠胃外方式进行所述施用。

156. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中肌内、皮内、皮下和/或静脉内进行所

述施用。

157. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其还包括在混合及施用装置的第一入口处接收所述活性剂溶液。

158. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其还包括在混合及施用装置的第二入口处接收所述脂质纳米颗粒溶液。

159. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中在混合及施用装置的混合器部位处进行所述混合。

160. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中经由混合及施用装置的出口进行所述施用。

161. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述混合及施用装置的所述第一入口、所述第二入口、所述混合部位和/或所述出口流体连接。

162. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述提供、所述形成、所述混合和/或所述施用均采用单个混合及施用装置进行。

163. 一种脂质纳米颗粒, 其通过前述权利要求中任一项所述的方法制备。

164. 一种脂质纳米颗粒溶液, 其通过前述权利要求中任一项所述的方法制备。

165. 一种脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂, 其通过前述权利要求中任一项所述的方法制备。

166. 一种治疗或预防疾病或病症的方法, 所述方法包括对有需要的受试者施用前述权利要求中任一项所述的脂质纳米颗粒。

167. 一种治疗或预防疾病或病症的方法, 所述方法包括对有需要的受试者施用前述权利要求中任一项所述的脂质纳米颗粒溶液。

168. 一种治疗或预防疾病或病症的方法, 所述方法包括对有需要的受试者施用前述权利要求中任一项所述的脂质纳米颗粒制剂。

169. 前述权利要求中任一项所述的脂质纳米颗粒, 其用于治疗或预防受试者的疾病或病症。

170. 前述权利要求中任一项所述的脂质纳米颗粒溶液, 其用于治疗或预防受试者的疾病或病症。

171. 前述权利要求中任一项所述的脂质纳米颗粒制剂, 其用于治疗或预防受试者的疾病或病症。

172. 前述权利要求中任一项所述的脂质纳米颗粒在制造用于治疗或预防受试者的疾病或病症的药物中的用途。

173. 前述权利要求中任一项所述的脂质纳米颗粒溶液在制造用于治疗或预防受试者的疾病或病症的药物中的用途。

174. 前述权利要求中任一项所述的脂质纳米颗粒制剂在制造用于治疗或预防受试者的疾病或病症的药物中的用途。

175. 一种药盒, 其包含根据前述权利要求中任一项所述的活性剂溶液和根据前述权利要求中任一项所述的脂质纳米颗粒溶液。

176. 如权利要求175所述的药盒, 其还包括根据前述权利要求中任一项所述的混合及施用装置。

制备脂质纳米颗粒的方法

相关申请

本申请要求2019年1月31日提交的62/799,620号美国临时申请的优先权和权益，该临时申请的全部内容以引用的方式并入本文。

技术领域

本公开提供生产核酸脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂的新方法、其生产的制剂以及相关的治疗和/或诊断用途，如涉及核酸脂质纳米颗粒向哺乳动物细胞或器官递送一种或多种治疗剂和/或预防剂 (如核酸) 和/或在哺乳动物细胞或器官中产生多肽的方法。

背景技术

诸如小分子药物、蛋白质和核酸的生物活性物质的有效靶向递送在医学上一直是具有挑战性的。特别地，向细胞递送核酸因这类物质的相对不稳定性和低细胞渗透性而变得困难。因此，需要开发有利于向细胞递送治疗剂和预防剂 (如核酸) 的方法和组合物。

含脂质的纳米颗粒或脂质纳米颗粒、脂质体和脂质复合物 (lipoplex) 已被证明可有效地作为生物活性物质 (如小分子药物、蛋白质和核酸) 进入细胞和/或细胞内区室的转运媒介物。尽管已经证实有多种这类含脂质的纳米颗粒，但仍然缺乏安全性、功效和特异性方面的改进。

关于序列表的说明

与本申请相关的序列表以文本格式代替纸质副本提供，并且特此以引用的方式并入本说明书。包含序列表的文本文件的名称为MRNA_062_001W0_ST25.txt。该文本文件为614字节，创建于2020年1月30日，并且以电子方式提交。

发明内容

在一些方面，本公开提供生产脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂的方法，所述方法包括：i) 将包含可离子化的脂质的脂质溶液与包含第一缓冲剂的水性缓冲溶液混合，从而形成包含脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒溶液；以及ii) 将包含核酸的核酸溶液添加到所述脂质纳米颗粒溶液中，从而形成包含与所述核酸缔合的所述脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂。

在一些方面，本公开提供对患者施用脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂的方法，所述方法包括：i) 提供pH在约4.5至约8.0范围内的包含治疗和/或预防剂的活性剂溶液和pH在约4.5至约6.5范围内的包含脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒溶液，所述脂质纳米颗粒包含可离子化的脂质；ii) 通过混合所述脂质纳米颗粒溶液和所述活性剂溶液来形成包含与所述治疗和/或预防剂缔合的所述脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂，使得所述脂质纳米颗粒制剂的pH在约4.5至约小于8.0的范围内；以及iii) 在所述混合后对所述患者施用所述脂质纳米颗粒制剂。

根据另一方面，本公开涉及通过本文所述的任何实施方案的方法制备的脂质纳米

颗粒 (LNP) 制剂。

根据另一方面,本公开涉及治疗或预防疾病或病症的方法,所述方法包括根据本文所述的任一实施方案的方法对有需要的受试者施用脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂。

根据另一方面,本公开涉及治疗或预防疾病或病症的方法,所述方法包括对有需要的受试者施用通过本文所述的任一实施方案的方法制备的脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂。

根据另一方面,本公开涉及根据本文所述的任何实施方案的活性剂溶液、根据本文所述的任何实施方案的脂质纳米颗粒溶液和包括根据本文所述的任何实施方案的活性剂溶液、脂质纳米颗粒溶液和/或混合及施用装置的药盒。

在一些方面,本公开提供通过本文公开的方法制备的脂质纳米颗粒。

在一些方面,本公开提供通过本文公开的方法制备的脂质纳米颗粒溶液。

在一些方面,本公开提供通过本文公开的方法制备的脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂。

在一些方面,本公开提供治疗或预防疾病或病症的方法,所述方法包括对有需要的受试者施用本文所述的脂质纳米颗粒。

在一些方面,本公开提供治疗或预防疾病或病症的方法,所述方法包括对有需要的受试者施用本文所述的脂质纳米颗粒溶液纳米颗粒。

在一些方面,本公开提供治疗或预防疾病或病症的方法,所述方法包括对有需要的受试者施用本文所述的脂质纳米颗粒制剂纳米颗粒。

在一些方面,本公开提供用于治疗或预防受试者的疾病或病症的本文所述的脂质纳米颗粒。

在一些方面,本公开提供用于治疗或预防受试者的疾病或病症的本文所述的脂质纳米颗粒溶液。

在一些方面,本公开提供用于治疗或预防受试者的疾病或病症的本文所述的脂质纳米颗粒制剂。

在一些方面,本公开提供本文所述的脂质纳米颗粒在制造用于治疗或预防受试者的疾病或病症的药物中的用途。

在一些方面,本公开提供本文所述的脂质纳米颗粒溶液在制造用于治疗或预防受试者的疾病或病症的药物中的用途。

在一些方面,本公开提供本文所述的脂质纳米颗粒制剂在制造用于治疗或预防受试者的疾病或病症的药物中的用途。

除另有定义外,本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。尽管在本公开的实践或测试中可使用与本文所述的那些类似或等同的方法和材料,但下文描述了合适的方法和材料。本文提到的所有出版物、专利申请、专利及其它参考文献均以全文引用的方式并入。在有冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。此外,所述材料、方法和实施例仅是说明性的,并不旨在进行限制。

本公开的其它特征和优点从以下具体实施方式和权利要求中将显而易见。

附图说明

图1是显示当在LNP产生后以较长的时间量程引入mRNA时观察到相当或增加的mRNA包封(即,增加的停留时间)的图示。经由Ribogreen荧光测定评价包封。

图2是显示相对于对照(虚线)当在LNP产生后以较长的时间量程引入mRNA时观察到相当或增加的mRNA包封(即,增加的停留时间)的图示。经由离子交换(AEX)测定评价包封。

图3是低温-EM图像,展示相对于在初始颗粒形成期间包括mRNA的标准过程(“标准”),采用事后装载(“PHL”)过程模式观察到相当的颗粒形态。

图4是小角x射线散射(SAXS)分析,展示相对于标准批次过程在事后装载过程批次中增加的结构特征($q \sim 1.3 \text{ nm}^{-1}$,计算的D-间距为5-6nm)。

图5是展示PHL过程相对于标准过程的体内性能的图,显示了在预防性疫苗背景下PHL的增加的第一剂量反应(初免后3周),并展示了2周加强后观察到的相当的总IgG。A-D条目反映标准过程的替代形式作为比较。

图6是展示LNP分散体的初始直径对mRNA包封的影响并显示直径减小的LNP批次导致mRNA包封增加的图示。

图7是经由动态光散射(DLS)表征展示乙醇含量和温度是影响LNP多分散性指数(PDI)的关键参数的模型拟合,其中模型拟合使得能够计算有利于低PDI的过程条件的有利范围(例如,30%乙醇,40°C),从而使得能够获得小的均匀颗粒和有利的组合物。

图8是经由DLS表征展示乙醇含量和温度是影响LNP直径的关键参数的模型拟合,其中模型拟合使得能够计算过程条件的有利范围,以有利于通过本文所述的过程将粒度控制在mRNA包封的有利范围内(<100nm),从而使得能够获得小的均匀颗粒和有利的组合物。

图9是通过小角x射线散射(SAXS)分析展示空LNP产生的过程影响结构特征的图示,显示了所有过程条件都导致颗粒在 $q = 1.4 \text{ nm}^{-1}$ 下具有显著特征(计算的D-间距 $\sim 4 \text{ nm}$)。没有熟化的过程A在 $q = 0.45$ 下产生另外的特征(计算的D-间距 $\sim 14 \text{ nm}$)。经由低温-TEM分析,此特征与样品中的小脂质体群体或胶束结构相关。与过程A相比,包含熟化时间的过程B和C显示出改善的多分散性(经由DLS分析)和结构均匀性(经由低温-TEM分析)。

图10是展示经由本文所述的过程装载的mRNA产生在 $q = 1.3 \text{ nm}^{-1}$ 下显示出具有显著特征的高结构度的颗粒的图示(计算的D-间距 $\sim 5 \text{ nm}$)。与过程A相比,利用有利于熟化时间和低PDI的最佳过程条件的过程B和C显示出多分散性降低和结构均匀性改善。

图11是展示对于用本文所述的程序产生的批次,相对于过程A(标准)采用过程B(熟化增加)观察到颗粒均匀性改善的低温-EM图像。

图12是展示LNP形成的连续纳米沉淀过程的示例性过程流程图。

图13是展示蔗糖对LNP分散体表现出低温保护作用的图示,使得能够在冷冻/解冻应力之后保持粒径,并且有利的蔗糖浓度经确定为>15重量%。

图14是展示对于在mRNA添加之前经历冷冻/解冻应力的脂质纳米颗粒,包含低温保护赋形剂蔗糖使得能够经由本文所述的过程(Ribogreen测定)完全包封mRNA的图示。

图15A是展示在液态($\sim 50 \text{ nm}$)通过纳米颗粒跟踪分析(NTA)表征的LNP的标准初级群体的图示。

图15B是展示在使制剂(乙酸盐-蔗糖)经受冻干并在蒸馏去离子水中重构后保存初级纳米颗粒群体的图示。

图16是展示液体和冻干/重构产品LNP制剂的颗粒分布的重叠的图示。

图17是展示与pH5.75相比对于pH5.0的冻干制剂观察到体外表达增加的图示。

图18是展示在现场混合过程中组合之前通过改变mRNA和LNP溶液pH值来确定有利的pH的图示。在 $\text{pH} < 6.0$ 下有利地实现粒度控制。

图19是展示在本文所述的过程中组合之前通过改变mRNA和LNP溶液pH值来确定有利的pH的图示,并且在 $\text{pH} < 6.0$ 下实现包封增加(Ribogreen测定)。

图20是展示在本文所述的过程中组合之前通过改变mRNA和LNP溶液pH值来确定有利的pH的图示,并且在 $\text{pH} < 6.0$ 下实现包封增加(AEX测定)。

图21是展示在本文所述的过程中通过一起改变LNP和mRNA溶液内的NaCl的摩尔浓度来评估离子强度敏感性的图示,并且有利于mRNA包封的有利浓度 $< 200\text{mM}$ 。

图22是展示采用本文所述的过程观察到mRNA包封中的低批次间可变性并且装载mRNA的LNP在老化24小时后显示出一致的mRNA包封的图示。

图23是经由DLS测量展示注射流速对粒度的影响的图示,其中将mRNA的溶液直接注射到含有LNP的缓冲溶液的小瓶中,并且所得粒径对注射速率敏感。

图24是展示注射流速对mRNA包封的影响的图示(Ribogreen测定),其中将mRNA的溶液直接注射到含有LNP的缓冲溶液的小瓶中。

图25的图示展示经由本文所述的过程装载的mRNA脂质纳米颗粒制剂包含在 $q = 1.3\text{nm}^{-1}$ 下显示出具有显著的特征的高结构度的颗粒(计算的D-间距 $\sim 5\text{nm}$),并且在变化的流速下观察到相当的结构特征(样品9-14)。

图26是展示在与mRNA混合后在LNP溶液中添加递增水平的PEG-脂质缀合物减小粒度的图示。

图27是展示在LNP溶液中添加递增水平的PEG-脂质缀合物不影响mRNA包封的图示。

图28的图示展示经由本文所述的过程装载的mRNA脂质纳米颗粒制剂包含在 $q = 1.3\text{nm}^{-1}$ 下显示出具有显著的特征的高结构度的颗粒(计算的D-间距 $\sim 5\text{nm}$),并且在混合步骤中包括的摩尔%的PEG-脂质观察到相当的结构特征。

图29A是展示在本文所述的混合过程中在LNP溶液中添加递增水平的PEG-脂质缀合物降低对注射流速的敏感性的图示。

图29B是展示在本文所述的混合过程中在LNP溶液中添加递增水平的PEG-脂质缀合物降低对注射流速的敏感性的图示。

图30是展示在LNP溶液中添加递增水平的PEG-脂质缀合物增加包封的图示(Ribostar测定)。

图31是展示混合产物的中和导致mRNA包封增加(AEX测定)并且可通过添加浓磷酸钠溶液至目标pH值来实现中和的图示。

图32是展示Ribogreen测定不能检测对混合产物的pH中和的敏感性并且通过添加浓磷酸钠溶液至目标pH值来实现中和的图示。

图33是展示混合产物的中和导致LNP直径增加($\sim 10\text{nm}$)并且通过添加浓磷酸钠溶液至目标pH值来实现中和的图示。

图34的图示展示经由本文所述的过程装载的mRNA脂质纳米颗粒制剂包含在 $q = 1.3\text{nm}^{-1}$ 下显示出具有显著的特征的高结构度的颗粒(计算的D-间距 $\sim 5\text{nm}$),并且通过中和观察到在 1.3nm^{-1} 处的略微降低,而且混合产物的中和导致在 0.3nm^{-1} 下结构特征的降低(D-

间距~21nm)。

图35是展示本文所述的混合配制过程(“PHL过程”)相对于对照(“基准过程”)效力增加的图示,显示了与标准过程模式相比采用本文所述的混合过程的抗原特异性T细胞反应增加。

具体实施方式

本公开部分地基于如下发现:如本文所公开的生产脂质纳米颗粒(LNP)或脂质纳米颗粒(LNP)制剂的方法可影响和/或决定脂质纳米颗粒内的某些组分的分布,并且这种分布可影响和/或决定脂质纳米颗粒的物理(例如,稳定性)和/或生物学(例如功效、细胞内递送、免疫原性)特性。

在一些实施方案中,本公开的方法减轻所生产的脂质纳米颗粒(LNP)或脂质纳米颗粒(LNP)制剂的不期望的特性变化。在一些实施方案中,本公开的方法减轻所生产的脂质纳米颗粒(LNP)或脂质纳米颗粒(LNP)制剂与通过相当的方法(例如,没有如本文公开的一个或多个步骤的方法)生产的LNP或LNP制剂相比不期望的特性变化。

在一些实施方案中,不期望的特性变化是由脂质纳米颗粒制剂或脂质纳米颗粒上的应力引起的。在一些实施方案中,应力是在生产、纯化、包装、储存、运输和/或使用脂质纳米颗粒制剂或脂质纳米颗粒期间诱导的。在一些实施方案中,应力是热、剪切、过度搅动、膜浓差极化(电荷状态的变化)、脱水、冷冻应力、干燥应力、冷冻/解冻应力和/或雾化应力。在一些实施方案中,应力是在储存脂质纳米颗粒制剂或脂质纳米颗粒期间诱导的。

在一些实施方案中,不期望的特性变化是LNP制剂的物理稳定性的降低。在一些实施方案中,不期望的特性变化是LNP制剂中杂质和/或亚可见颗粒的量的增加或LNP的平均尺寸的增加。

在一些实施方案中,本公开的方法减轻所生产的LNP制剂与通过如本文公开的相当的方法生产的LNP制剂相比物理稳定性的降低(例如,LNP的平均尺寸的增加)。

在一些实施方案中,与通过如本文公开的相当的方法生产的LNP制剂的平均LNP直径相比,通过本公开的方法生产的LNP制剂的平均LNP直径为约99%或更小、约98%或更小、约97%或更小、约96%或更小、约95%或更小、约90%或更小、约85%或更小、约80%或更小、约75%或更小、约70%或更小、约65%或更小、约60%或更小、约55%或更小、约50%或更小、约40%或更小、约30%或更小、约20%或更小或者约10%或更小。

在一些实施方案中,不期望的特性变化是LNP制剂的化学稳定性的降低。在一些实施方案中,不期望的特性变化是LNP制剂中核酸(例如,RNA(例如,mRNA))的完整性的降低。

在一些实施方案中,不期望的特性变化是LNP制剂的生物学特性的降低。在一些实施方案中,不期望的特性变化是LNP制剂的功效、细胞内递送和/或免疫原性的降低。

在一些实施方案中,通过本公开的方法生产的LNP制剂的功效、细胞内递送和/或免疫原性高于通过如本文公开的相当的方法生产的LNP制剂的功效、细胞内递送和/或免疫原性。

在一些实施方案中,通过本公开的方法生产的LNP制剂的功效、细胞内递送和/或免疫原性比通过相当的方法生产的LNP制剂的功效、细胞内递送和/或免疫原性高约5%或更高、约10%或更多、约15%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%

或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、约1倍或更多、约2倍或更多、约3倍或更多、约4倍或更多、约5倍或更多、约10倍或更多、约20倍或更多、约30倍或更多、约40倍或更多、约50倍或更多、约100倍或更多、约200倍或更多、约300倍或更多、约400倍或更多、约500倍或更多、约1000倍或更多、约2000倍或更多、约3000倍或更多、约4000倍或更多、约5000倍或更多或者约10000倍或更多。

在一些实施方案中,通过本公开的方法生产的LNP制剂表现出的核酸表达(例如,mRNA表达)高于通过相当的方法生产的LNP制剂的核酸表达(例如,mRNA表达)。

在一些实施方案中,通过本公开的方法生产的LNP制剂表现出的核酸表达(例如,mRNA表达)比通过相当的方法生产的LNP制剂的核酸表达(例如,mRNA表达)高约5%或更高、约10%或更多、约15%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、约1倍或更多、约2倍或更多、约3倍或更多、约4倍或更多、约5倍或更多、约10倍或更多、约20倍或更多、约30倍或更多、约40倍或更多、约50倍或更多、约100倍或更多、约200倍或更多、约300倍或更多、约400倍或更多、约500倍或更多、约1000倍或更多、约2000倍或更多、约3000倍或更多、约4000倍或更多、约5000倍或更多或者约10000倍或更多。

传统上,已经由对mRNA水溶液和脂质在乙醇中的溶液进行高能混合来生产装载信使RNA的脂质纳米颗粒(mRNA-LNP)。水溶液是该方法中使用的脂质的不良溶剂,其最常见的是阳离子脂质、磷脂、结构脂质和PEG脂质的混合物。因此混合脂质导致脂质自组装成纳米颗粒,例如直径小于100nm的纳米颗粒。

另外,最近在“床边(bedside)”和/或“护理点(point-of-care)”制剂方面的努力令人鼓舞,由此可以将mRNA包封在较早日期制备的预制囊泡内。这种生产模式在临床供应方面提供了优势,因为空LNP囊泡可在临床化合物环境中与mRNA重组之前单独地生产并储存。具体地,床边制剂可促进稳定性提高,因为mRNA和空原料可在单独优化的条件下储存。过程复杂性和货物成本可得到降低,因为LNP制备的进行与货物无关,从而实现用于多种mRNA或活性剂构建体的平台方法。空LNP加上mRNA的模式可以被称为“事后装载”(PHL)、“事后添加”或“事后”。

本公开部分地基于探索事后装载的基本原理和研究在空LNP产生后按时间量程进行mRNA添加的影响和条件的努力。脂质沉淀后进行mRNA添加的时间变化超过七个数量级(例如,1ms至10,000,000ms),而不会不利地影响制剂的物理化学特性(例如,粒度、包封、形态和/或结构完整性)。考虑到mRNA在常规上是作为关键组分包括在脂质沉淀反应的入口水性流内,因此物理化学特性的相似性是意外和不直观的。进一步地,寡核苷酸经常被描述为参与早期的颗粒组装步骤。来自经验性实验的结果表明mRNA包封可以比脂质沉淀/颗粒形成显著更长的时间量程进行,而不会不利地影响LNP物理化学特性。那些实验证明脂质颗粒形成和随后的mRNA包封可以分成两个反应步骤。如本文所述的事后装载的概念可以实现单独对每个步骤进行控制和/或优化。进一步地,事后装载可以使得能够按实现护理点制剂的时间量程进行mRNA添加(例如,在空LNP产生之后的数月或数年)。

在过去,尚未开发出以适于临床供应的规模产生预制空脂质纳米颗粒(LNP)的方法。本公开部分地基于确定有利于进行规模化生产的多种过程参数的努力,这些参数包括但不限于脂质浓度、温度、缓冲液组成(例如,离子强度、pH、抗衡离子)和乙醇含量,以允许

进行粒度控制,同时

本公开部分地基于如下发现:如本文所公开的生产脂质纳米颗粒(LNP)或脂质纳米颗粒(LNP)制剂的方法可影响和/或决定脂质纳米颗粒内某些组分的分布,并且这种分布可影响和/或决定脂质纳米颗粒的物理(例如,稳定性)和/或生物学(例如功效、细胞内递送、免疫原性)特性。

在一些实施方案中,本公开产生包含具有有利的组分分布的脂质纳米颗粒的组合物。

在一些实施方案中,通过本公开的方法生产的LNP制剂表现出的核酸表达(例如,mRNA表达)高于通过相当的方法生产的LNP制剂的核酸表达(例如,mRNA表达)。

在一些实施方案中,与通过相当的方法生产的LNP制剂相比,通过本公开的方法生产的LNP制剂在通过小角x射线散射分析体外/体内活性时显示出期望的结构特征。

在一些实施方案中,与通过相当的方法生产的LNP制剂相比,通过本公开的方法生产的LNP制剂在通过小角x射线散射分析体外/体内活性时显示出期望的结构特征。

在一些实施方案中,与通过相当的方法生产的LNP制剂相比,通过本公开的方法生产的LNP制剂通过低温-TEM分析显示出更均匀的结构特征。

在一些实施方案中,通过本公开的方法生产的LNP制剂表现出的核酸表达(例如,mRNA表达)比通过相当的方法制备的LNP制剂的核酸表达(例如,mRNA表达)高约5%或更高、约10%或更多约15%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、约1倍或更多、约2倍或更多、约3倍或更多、约4倍或更多、约5倍或更多、约10倍或更多、约20倍或更多、约30倍或更多、约40倍或更多、约50倍或更多、约100倍或更多、约200倍或更多、约300倍或更多、约400倍或更多、约500倍或更多、约1000倍或更多、约2000倍或更多、约3000倍或更多、约4000倍或更多、约5000倍或更多或者约10000倍或更多。

生产脂质纳米颗粒(LNP)组合物的方法和由其生产的LNP组合物

与其它生产技术(例如,薄膜再水化/挤出)相反,乙醇滴沉淀已成为产生稳定的核酸脂质纳米颗粒(SNALP)的工业标准。沉淀反应因其连续性质、可扩展性和易于采用的原因而受到青睐。这些方法通常使用高能混合器(例如,T形接头、封闭冲击射流、涡流混合器)以可控方式向合适的反溶剂(即水)中引入脂质(在乙醇中),从而驱动液体过饱和并自发沉淀成脂质颗粒。

本公开提供生产脂质纳米颗粒组合物的方法,所述方法包括:i)将包含可离子化的脂质的脂质溶液与包含第一水性缓冲液的水性缓冲溶液混合,从而形成空脂质纳米颗粒;以及ii)将包含核酸的核酸溶液添加到所述脂质纳米颗粒中,从而形成包含包封所述核酸的脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒(LNP)制剂。

脂质溶液

在一些实施方案中,本公开的方法提供脂质溶液。

在一些实施方案中,脂质溶液可包含可离子化的脂质。在一些实施方案中,脂质溶液可包含浓度大于约0.01mg/mL、0.05mg/mL、0.06mg/mL、0.07mg/mL、0.08mg/mL、0.09mg/mL、0.1mg/mL、0.15mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL或1.0mg/mL的可离子化的脂质。在一些实施方案中,脂质溶液可包含浓

度在约0.01-1.0mg/mL、0.01-0.9mg/mL、0.01-0.8mg/mL、0.01-0.7mg/mL、0.01-0.6mg/mL、0.01-0.5mg/mL、0.01-0.4mg/mL、0.01-0.3mg/mL、0.01-0.2mg/mL、0.01-0.1mg/mL、0.05-1.0mg/mL、0.05-0.9mg/mL、0.05-0.8mg/mL、0.05-0.7mg/mL、0.05-0.6mg/mL、0.05-0.5mg/mL、0.05-0.4mg/mL、0.05-0.3mg/mL、0.05-0.2mg/mL、0.05-0.1mg/mL、0.1-1.0mg/mL、0.2-0.9mg/mL、0.3-0.8mg/mL、0.4-0.7mg/mL或0.5-0.6mg/mL范围内的可离子化的脂质。在一些实施方案中,脂质溶液可包含浓度高达约5.0mg/mL、4.0mg/mL、3.0mg/mL、2.0mg/mL、1.0mg/mL、0.09mg/mL、0.08mg/mL、0.07mg/mL、0.06mg/mL或0.05mg/mL的可离子化的脂质。

在一些实施方案中,脂质溶液可包含可离子化的脂质。在一些实施方案中,脂质溶液可包含浓度大于约0.1mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL、1.0mg/mL、1.5mg/mL、2.0mg/mL、3.0mg/mL、4.0mg/mL、5.0mg/mL、6.0mg/mL、7.0mg/mL、8.0mg/mL、9.0mg/mL、10mg/mL、11mg/mL、12mg/mL、13mg/mL、14mg/mL、15mg/mL、20mg/mL、25mg/mL或30mg/mL的可离子化的脂质。在一些实施方案中,脂质溶液可包含浓度在约0.1-20.0mg/mL、0.1-19mg/mL、0.1-18mg/mL、0.1-17mg/mL、0.1-16mg/mL、0.1-15mg/mL、0.1-14mg/mL、0.1-13mg/mL、0.1-12mg/mL、0.1-11mg/mL、0.5-10.0mg/mL、0.5-9mg/mL、0.5-8mg/mL、0.5-7mg/mL、0.5-6mg/mL、0.5-5.0mg/mL、0.5-4mg/mL、0.5-3mg/mL、0.5-2mg/mL、0.5-1mg/mL、1-20mg/mL、1-15mg/mL、1-12mg/mL、1-10mg/mL或1-8mg/mL范围内的可离子化的脂质。在一些实施方案中,脂质溶液可包含浓度高达约30mg/mL、25mg/mL、20mg/mL、18mg/mL、16mg/mL、15mg/mL、14mg/mL、12mg/mL、10mg/mL、8mg/mL、6mg/mL、5.0mg/mL、4.0mg/mL、3.0mg/mL、2.0mg/mL、1.0mg/mL、0.09mg/mL、0.08mg/mL、0.07mg/mL、0.06mg/mL或0.05mg/mL的可离子化的脂质。

在一些实施方案中,脂质溶液包含在水性缓冲液和/或有机溶液中的可离子化的脂质。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒溶液可还包含缓冲剂和/或盐。示例性的合适缓冲剂包括但不限于硫酸铵、碳酸氢钠、柠檬酸钠、乙酸钠、磷酸钾、磷酸钠、HEPES等。在一些实施方案中,脂质溶液包含浓度在约0.1-100mM、约0.5-90mM、约1.0-80mM、约2-70mM、约3-60mM、约4-50mM、约5-40mM、约6-30mM、约7-20mM、约8-15mM、约9-12mM范围内的缓冲剂。在一些实施方案中,脂质溶液包含浓度为或大于约0.1mM、0.5mM、1mM、2mM、4mM、6mM、8mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM或50mM的缓冲剂。示例性合适的盐包括但不限于氯化钾、氯化镁、氯化钠等。在一些实施方案中,脂质溶液包含浓度在约1-500mM、约5-400mM、约10-350mM、约15-300mM、约20-250mM、约30-200mM、约40-190mM、约50-180mM、约50-170mM、约50-160mM、约50-150mM或约50-100mM范围内的盐。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒溶液包含浓度为或大于约1mM、5mM、10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM或100mM的盐。

在一些实施方案中,脂质溶液可具有在约4.5至约7.0、约4.6至约7.0、约4.8至约7.0、约5.0至约7.0、约5.5至约7.0、约6.0至约7.0、约6.0至约6.9、约6.0至约6.8、约6.0至约6.7、约6.0至约6.6、约6.0至约6.5范围内的pH。在一些实施方案中,合适的脂质溶液的pH可以为或不大于4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

水性缓冲溶液

在一些实施方案中,水性缓冲溶液包含水性缓冲剂。在一些实施方案中,合适的溶

液可还包含一种或多种缓冲剂和/或盐。示例性合适的缓冲剂包括但不限于硫酸铵、碳酸氢钠、柠檬酸钠、乙酸钠、磷酸钾、磷酸钠、HEPES等。在一些实施方案中,水性缓冲溶液包含浓度在约0.1-100mM、约0.5-90mM、约1.0-80mM、约2-70mM、约3-60mM、约4-50mM、约5-40mM、约6-30mM、约7-20mM、约8-15mM、约9-12mM范围内的缓冲剂。在一些实施方案中,水性缓冲溶液包含浓度为或大于约0.1mM、0.5mM、1mM、2mM、4mM、6mM、8mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM或50mM的缓冲剂。示例性合适的盐包括但不限于氯化钾、氯化镁、氯化钠等。在一些实施方案中,水性缓冲溶液包含浓度在约1-500mM、约5-400mM、约10-350mM、约15-300mM、约20-250mM、约30-200mM、约40-190mM、约50-180mM、约50-170mM、约50-160mM、约50-150mM或约50-100mM范围内的盐。在一些实施方案中,核酸溶液包含浓度为或大于约1mM、5mM、10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM或100mM的盐。

在一些实施方案中,水性缓冲溶液的pH可在约4.5至约7.0、约4.6至约7.0、约4.8至约7.0、约5.0至约7.0、约5.5至约7.0、约6.0至约7.0、约6.0至约6.9、约6.0至约6.8、约6.0至约6.7、约6.0至约6.6、约6.0至约6.5范围内。在一些实施方案中,合适的水性缓冲溶液的pH可以为或不大于4.5、4.6、4.7、4.8、4.95、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

核酸或活性剂溶液

在一些实施方案中,本公开的方法提供包含治疗和/或预防剂的活性剂溶液。可以在要被混合或添加到脂质纳米颗粒或脂质纳米颗粒溶液中的溶液中提供治疗和/或预防剂,使得治疗和/或预防剂可以被包封在脂质纳米颗粒中。

在一些实施方案中,治疗和/或预防剂是疫苗或能够引发免疫反应的化合物。

在一些实施方案中,治疗和/或预防剂是核酸。

在一些实施方案中,本公开的方法提供包含核酸的核酸溶液。可以在要被混合或添加到脂质纳米颗粒或脂质纳米颗粒溶液中的溶液中提供核酸,使得核酸可以被包封在脂质纳米颗粒中。

在一些实施方案中,核酸溶液可包含要以各种浓度被包封的核酸。在一些实施方案中,核酸溶液可包含浓度大于约0.01mg/mL、0.05mg/mL、0.06mg/mL、0.07mg/mL、0.08mg/mL、0.09mg/mL、0.1mg/mL、0.15mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL或1.0mg/mL的核酸。在一些实施方案中,核酸溶液可包含浓度在约0.01-1.0mg/mL、0.01-0.9mg/mL、0.01-0.8mg/mL、0.01-0.7mg/mL、0.01-0.6mg/mL、0.01-0.5mg/mL、0.01-0.4mg/mL、0.01-0.3mg/mL、0.01-0.2mg/mL、0.01-0.1mg/mL、0.05-1.0mg/mL、0.05-0.9mg/mL、0.05-0.8mg/mL、0.05-0.7mg/mL、0.05-0.6mg/mL、0.05-0.5mg/mL、0.05-0.4mg/mL、0.05-0.3mg/mL、0.05-0.2mg/mL、0.05-0.1mg/mL、0.1-1.0mg/mL、0.2-0.9mg/mL、0.3-0.8mg/mL、0.4-0.7mg/mL或0.5-0.6mg/mL范围内的核酸。在一些实施方案中,核酸溶液可包含浓度高达约5.0mg/mL、4.0mg/mL、3.0mg/mL、2.0mg/mL、1.0mg/mL、0.09mg/mL、0.08mg/mL、0.07mg/mL、0.06mg/mL或0.05mg/mL的核酸。

在一些实施方案中,核酸溶液包含在水性缓冲液中的核酸。在一些实施方案中,合适的核酸溶液可还包含缓冲剂和/或盐。示例性合适的缓冲剂包括但不限于硫酸铵、碳酸氢钠、柠檬酸钠、乙酸钠、磷酸钾、磷酸钠、HEPES等。在一些实施方案中,核酸溶液包含浓度在约0.1-100mM、约0.5-90mM、约1.0-80mM、约2-70mM、约3-60mM、约4-50mM、约5-40mM、约6-

30mM、约7-20mM、约8-15mM、约9-12mM范围内的缓冲剂。在一些实施方案中，核酸溶液包含浓度为或大于约0.1mM、0.5mM、1mM、2mM、4mM、6mM、8mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM或50mM的缓冲剂。示例性合适的盐包括但不限于氯化钾、氯化镁、氯化钠等。在一些实施方案中，核酸溶液包含浓度在约1-500mM、约5-400mM、约10-350mM、约15-300mM、约20-250mM、约30-200mM、约40-190mM、约50-180mM、约50-170mM、约50-160mM、约50-150mM或约50-100mM范围内的盐。在一些实施方案中，核酸溶液包含浓度为或大于约1mM、5mM、10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM或100mM的盐。

在一些实施方案中，核酸溶液的pH可在约4.5至约7.0、约4.6至约7.0、约4.8至约7.0、约5.0至约7.0、约5.5至约7.0、约6.0至约7.0、约6.0至约6.9、约6.0至约6.8、约6.0至约6.7、约6.0至约6.6、约6.0至约6.5范围内。在一些实施方案中，合适的核酸溶液的pH可以为或不大于4.5、4.6、4.7、4.8、4.95、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

脂质纳米颗粒溶液

在一些实施方案中，本公开的方法提供包含治疗和/或预防剂的脂质纳米颗粒溶液。可以在要被混合或添加到脂质纳米颗粒或脂质纳米颗粒溶液中的溶液中提供治疗和/或预防剂，使得治疗和/或预防剂可以被包封在脂质纳米颗粒中。

在一些实施方案中，本公开的方法提供包含空脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒溶液。可以在要被混合或添加到脂质纳米颗粒或脂质纳米颗粒溶液中的溶液中提供脂质纳米颗粒，使得核酸可以被包封在脂质纳米颗粒中。

在一些实施方案中，脂质纳米颗粒溶液可包含空脂质纳米颗粒。在一些实施方案中，脂质纳米颗粒溶液可包含浓度大于约0.01mg/mL、0.05mg/mL、0.06mg/mL、0.07mg/mL、0.08mg/mL、0.09mg/mL、0.1mg/mL、0.15mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL或1.0mg/mL的脂质纳米颗粒。在一些实施方案中，脂质纳米颗粒溶液可包含浓度在约0.01-1.0mg/mL、0.01-0.9mg/mL、0.01-0.8mg/mL、0.01-0.7mg/mL、0.01-0.6mg/mL、0.01-0.5mg/mL、0.01-0.4mg/mL、0.01-0.3mg/mL、0.01-0.2mg/mL、0.01-0.1mg/mL、0.05-1.0mg/mL、0.05-0.9mg/mL、0.05-0.8mg/mL、0.05-0.7mg/mL、0.05-0.6mg/mL、0.05-0.5mg/mL、0.05-0.4mg/mL、0.05-0.3mg/mL、0.05-0.2mg/mL、0.05-0.1mg/mL、0.1-1.0mg/mL、0.2-0.9mg/mL、0.3-0.8mg/mL、0.4-0.7mg/mL或0.5-0.6mg/mL范围内的脂质纳米颗粒。在一些实施方案中，脂质纳米颗粒溶液可包含浓度高达约5.0mg/mL、4.0mg/mL、3.0mg/mL、2.0mg/mL、1.0mg/mL、0.09mg/mL、0.08mg/mL、0.07mg/mL、0.06mg/mL或0.05mg/mL的空脂质纳米颗粒。

在一些实施方案中，脂质纳米颗粒溶液包含在水性缓冲液中的脂质纳米颗粒。在一些实施方案中，脂质纳米颗粒溶液可还包含缓冲剂和/或盐。示例性合适的缓冲剂包括但不限于硫酸铵、碳酸氢钠、柠檬酸钠、乙酸钠、磷酸钾、磷酸钠、HEPES等。在一些实施方案中，脂质纳米颗粒溶液包含浓度在约0.1-100mM、约0.5-90mM、约1.0-80mM、约2-70mM、约3-60mM、约4-50mM、约5-40mM、约6-30mM、约7-20mM、约8-15mM、约9-12mM范围内的缓冲剂。在一些实施方案中，脂质纳米颗粒溶液包含浓度为或大于约0.1mM、0.5mM、1mM、2mM、4mM、6mM、8mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM或50mM的缓冲剂。示例性合适的盐包括但不限于氯化钾、氯化镁、氯化钠等。在一些实施方案中，脂质纳米颗粒溶液包含浓度在约

1-500mM、约5-400mM、约10-350mM、约15-300mM、约20-250mM、约30-200mM、约40-190mM、约50-180mM、约50-170mM、约50-160mM、约50-150mM或约50-100mM范围内的盐。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒溶液包含浓度为或大于约1mM、5mM、10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM或100mM的盐。

在一些实施方案中,脂质纳米颗粒溶液的pH可在约4.5至约7.0、约4.6至约7.0、约4.8至约7.0、约5.0至约7.0、约5.5至约7.0、约6.0至约7.0、约6.0至约6.9、约6.0至约6.8、约6.0至约6.7、约6.0至约6.6、约6.0至约6.5范围内。在一些实施方案中,合适的脂质纳米颗粒溶液的pH可以为或不大于4.5、4.6、4.7、4.8、4.95、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

提供LNP溶液

在一些方面,本公开提供生产脂质纳米颗粒(LNP)制剂的方法,所述方法包括:(i)将包含可离子化的脂质的脂质溶液与包含第一缓冲剂的水性缓冲溶液混合,从而形成包含脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒溶液;以及(ii)将包含核酸的核酸溶液添加到所述脂质纳米颗粒溶液中,从而形成包含包封所述核酸的所述脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒(LNP)制剂。

本文还公开了用于本公开的方法的合适的核酸。在一些实施方案中,核酸是RNA(例如,mRNA)。

本文还公开了用于本公开的方法的合适的可离子化的脂质。

在一些实施方案中,LNP还包含磷脂、PEG脂质、结构脂质或其任何组合。本文还公开了用于本公开的方法的合适的磷脂、PEG脂质和结构脂质。

在一些实施方案中,提供LNP溶液的步骤包括混合水性缓冲溶液和脂质溶液,其中所述脂质溶液包含在有机溶剂中的可离子化的脂质。

处理LNP溶液

如本文所用的术语“处理”包括用以进行纯化、pH调节、缓冲液交换和/或浓缩LNP的一个或多个步骤。

在一些实施方案中,处理LNP溶液的步骤包括:

ii a) 过滤LNP溶液。

在一些实施方案中,过滤从LNP溶液中移除有机溶剂(例如,醇或乙醇)。在一些实施方案中,处理包括切向流过滤(TFF)。在一些实施方案中,在移除有机溶剂(例如醇或乙醇)后,LNP溶液转化为在中性pH、pH6.5至7.8、pH6.8至pH7.5(例如,pH7.0至pH7.2)下缓冲的溶液(例如,磷酸盐或HEPES缓冲液)。在一些实施方案中,在储存或使用前例如通过过滤(例如,通过0.1-0.5 μ m过滤器)对所得LNP溶液进行灭菌。

在一些实施方案中,处理LNP溶液的步骤还包括包装LNP溶液。

如本文所用,“包装”可以指将药物产品以其最终状态储存或者在将LNP放入到最终包装中之前对它们进行过程中储存。储存和/或包装方式包括但不限于无菌袋冷藏、小瓶冷藏或冷冻制剂、小瓶和注射器冻干制剂等。

在一些实施方案中,包装LNP溶液的步骤包括以下步骤中的一个或多个步骤:

ii b) 向LNP溶液中添加冷冻保护剂;

ii c) 将LNP溶液冻干,从而形成冻干的LNP组合物;

ii d) 储存冻干的LNP组合物的LNP溶液;以及

iii) 向LNP溶液或冻干的LNP组合物中添加缓冲溶液, 从而形成LNP制剂。

在一些实施方案中, 在冻干之前向LNP溶液中添加冷冻保护剂。在一些实施方案中, 冷冻保护剂包含一种或多种冷冻保护剂, 并且一种或多种冷冻保护剂中的每一者独立地为多元醇(例如, 二醇或三醇, 如丙二醇(即, 1,2-丙二醇)、1,3-丙二醇、甘油、(+/-)-2-甲基-2,4-戊二醇、1,6-己二醇、1,2-丁二醇、2,3-丁二醇、乙二醇或二乙二醇)、非洗涤剂磺基甜菜碱(例如, NDSB-201 (3-(1-吡啶并)-1-丙烷磺酸盐)、渗透物(例如, L-脯氨酸或三甲胺N-氧化物二水合物)、聚合物(例如, 聚乙二醇200 (PEG200)、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG3350、PEG4000、PEG8000、PEG10000、PEG20000、聚乙二醇单甲醚550 (mPEG550)、mPEG600、mPEG2000、mPEG3350、mPEG4000、mPEG5000、聚乙烯吡咯烷酮(例如, 聚乙烯吡咯烷酮K15)、季戊四醇丙氧基化物或聚丙二醇P400)、有机溶剂(例如, 二甲亚砜(DMSO)或乙醇)、糖(例如, D-(+)-蔗糖、D-山梨糖醇、海藻糖、D-(+)-麦芽糖一水合物、内消旋赤藓糖醇、木糖醇、肌醇、D-(+)-棉子糖五水合物、D-(+)-海藻糖二水合物或D-(+)-葡萄糖一水合物)或盐(例如, 乙酸锂、氯化锂、甲酸锂、硝酸锂、硫酸锂、乙酸镁、氯化钠、甲酸钠、丙二酸钠、硝酸钠、硫酸钠或其任何水合物)或其任何组合。在一些实施方案中, 冷冻保护剂包含蔗糖。在一些实施方案中, 冷冻保护剂和/或赋形剂是蔗糖。

在一些实施方案中, 在合适的玻璃容器(例如, 10mL圆筒玻璃小瓶)中进行冻干。在一些实施方案中, 玻璃容器在短时间段内承受在低于-40℃与高于室温之间的极端温度变化, 和/或被切割成均匀的形状。在一些实施方案中, 冻干的步骤包括在高于约-40℃且例如低于约-30℃的温度下冷冻LNP溶液, 从而形成冷冻的LNP溶液; 以及干燥冷冻的LNP溶液以形成冻干的LNP组合物。在一些实施方案中, 冷冻步骤导致温度经约6分钟线性降低至最终温度, 例如按每分钟约1℃从20℃至-40℃。在一些实施方案中, 可使用12-15%的蔗糖, 并且在约50毫托至约150毫托范围内的真空下进行干燥步骤, 例如首先在约-35℃至约-15℃范围内的低温下, 然后在室温至约25℃的较高温度下, 并且例如在三至七天内完成干燥步骤。在一些实施方案中, 在约50毫托至约100毫托范围内的真空下进行干燥步骤, 例如首先在约-15℃至约0℃范围内的低温下, 然后在较高温度下。

在一些实施方案中, 在添加缓冲溶液之前, 将LNP溶液或冻干的LNP组合物在约-80℃、约-78℃、约-76℃、约-74℃、约-72℃、约-70℃、约-65℃、约-60℃、约-55℃、约-50℃、约-45℃、约-40℃、约-35℃或约-30℃的温度下储存。

在一些实施方案中, 在添加缓冲溶液之前, 将LNP溶液或冻干的LNP组合物在约-40℃、约-35℃、约-30℃、约-25℃、约-20℃、约-15℃、约-10℃、约-5℃、约0℃、约5℃、约10℃、约15℃、约20℃或约25℃的温度下储存。

在一些实施方案中, 在添加缓冲溶液之前, 将LNP溶液或冻干的LNP组合物在约-40℃至约0℃、约-35℃至约-5℃、约-30℃至约-10℃、约-25℃至约-15℃、约-22℃至约-18℃或约-21℃至约-19℃范围内的温度下储存。

在一些实施方案中, 在添加缓冲溶液之前, 将LNP溶液或冻干的LNP组合物在约-20℃的温度下储存。

施用LNP制剂

在一些方面, 本公开涉及对患者施用脂质纳米颗粒(LNP)制剂的方法, 所述方法包括: (i) 提供pH在约4.5至约7.0范围内的包含治疗和/或预防剂的活性剂溶液和pH在约4.5

至约6.5范围内的包含脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒溶液,所述脂质纳米颗粒包含可离子化的脂质;(ii)通过混合所述脂质纳米颗粒溶液和所述活性剂溶液来形成包含包封所述治疗和/或预防剂的所述脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂,使得所述脂质纳米颗粒制剂的pH在约4.5至约小于7.0范围内;以及(iii)在所述混合后不到约72小时对所述患者施用所述脂质纳米颗粒制剂。

在一些实施方案中,第一pH和第二pH在约7.0至约8.1或约7.1至约7.8或约7.2至约7.7或约7.3至约7.6或约7.4至约7.5范围内。

在一些实施方案中,第一pH和第二pH在约4.5至约6.5或约4.6至约6.0或约4.8至约5.5范围内。

在一些实施方案中,在混合后不到约72小时,例如混合后不到约60小时,例如混合后不到约48小时,例如混合后不到约36小时,例如混合后不到约24小时,例如混合后不到约20小时,例如混合后不到约16小时,例如混合后不到约12小时,例如混合后不到约8小时进行施用。

在一些实施方案中,在混合后不到约120分钟,例如混合后不到约100分钟,例如混合后不到约90分钟,例如混合后不到约80分钟,例如混合后不到约70分钟,例如混合后不到约60分钟,例如混合后不到约50分钟,例如混合后不到约40分钟,例如混合后不到约30分钟,例如混合后不到约20分钟,例如混合后不到约15分钟,例如混合后不到约10分钟进行施用。

在一些实施方案中,在混合与施用之间不处理脂质纳米颗粒制剂。

在一些实施方案中,本公开的方法不包括在混合与施用之间进行pH调节。

在一些实施方案中,在混合与施用之间不过滤脂质纳米颗粒制剂。

在一些实施方案中,所述方法还包括在混合及施用装置的第一入口处接收有机溶液。

在一些实施方案中,所述方法还包括在混合及施用装置的第二入口处接收水性缓冲溶液。

在一些实施方案中,在混合及施用装置的混合器部位处进行混合。

在一些实施方案中,经由混合及施用装置的出口施用脂质纳米颗粒制剂。

在一些实施方案中,所述提供、所述形成、所述混合和所述施用均采用单个混合及施用装置例如流体连接的混合及施用装置进行。

在一些实施方案中,混合及施用装置包括双筒注射器。

在一些实施方案中,混合及施用装置包括选自由K-注射器和L-注射器组成的组中的至少一者。

在一些实施方案中,混合及施用装置包括在混合器部位的静态混合器。

在一些实施方案中,所述静态混合器是螺旋静态混合器。

在一些实施方案中,水性缓冲溶液的pH和脂质纳米颗粒制剂的pH大致相同。

在一些实施方案中,相对于脂质纳米颗粒制剂的总体积,脂质纳米颗粒制剂包含按体积计约1%至按体积计约50%的有机溶剂,例如相对于脂质纳米颗粒制剂的总体积包含按体积计约2%至按体积计约45%、例如按体积计约3%至按体积计约40%、例如按体积计约4%至按体积计约35%、例如按体积计约5%至按体积计约33%的有机溶剂。

在一些实施方案中,所述有机溶剂是醇。

在一些实施方案中,所述有机溶剂是乙醇。

在一些实施方案中,所述有机溶剂包含第一有机溶剂和第二有机溶剂。

在一些实施方案中,第一有机溶剂是醇,且第二有机溶剂是醇。

在一些实施方案中,第一有机溶剂是乙醇,且第二有机溶剂是苄醇。

在一些实施方案中,第一有机溶剂与第二有机溶剂的重量/重量比率在约100:1至约1:1或约50:1至约1:1或约20:1至约1:1或约10:1至约1:1范围内。

在一些实施方案中,有机溶液还包含润湿剂。如本文所用,润湿剂可指提高、降低或改善液体保持与表面(如固体表面和/或液体表面)接触的能力的剂。

在一些实施方案中,所述润湿剂是有机溶剂。

在一些实施方案中,所述润湿剂是二甲亚砜(DMSO)。

在一些实施方案中,润湿剂与有机溶剂的重量/重量比率在约1000:1至约1:1或约500:1至约5:1或约100:1至约10:1的范围内。

在一些实施方案中,水性缓冲溶液是选自由乙酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液和tris缓冲液组成的组中的至少一者。在一些实施方案中,水性缓冲溶液可以是适于维持生理pH的任何缓冲液。在一些实施方案中,水性缓冲溶液可以是适于维持适合对患者(例如,哺乳动物患者,例如人患者)施用的pH的任何缓冲液。

在一些实施方案中,水性缓冲溶液还包含张度剂。如本文所用,张度剂可指提高、降低或改善有效渗透压梯度的剂,所述有效渗透压梯度如由两种溶液的水势或溶解在溶液中的溶质的相对浓度(影响扩散的方向和程度)所定义。

在一些实施方案中,张度剂是糖。

在一些实施方案中,糖是蔗糖。

稳定化盐

如本文所用的术语“稳定化盐”是指适用于本公开的方法和/或本公开的LNP制剂的盐。在一些实施方案中,当根据本公开的方法使用时,与通过相当的方法(例如,不涉及使用稳定化盐的方法(例如,没有步骤ia)和/或步骤iia)的方法,没有步骤ia)、步骤iia)、步骤iic)和/或步骤iid))生产的LNP制剂相比,稳定化盐减轻了所生产的脂质纳米颗粒LNP制剂的不期望的特性变化。

在一些实施方案中,稳定化盐对核酸(例如,mRNA的PO₄-主链)的亲和力高于相当的钠盐(例如,具有与稳定化盐相同的阴离子的钠盐)对核酸的亲和力。

在一些实施方案中,稳定化盐对核酸(例如,mRNA的PO₄-主链)的亲和力比相当的钠盐(例如,具有与稳定化盐相同的阴离子的钠盐)对核酸的亲和力高约5%或更高、约10%或更多、约15%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、约1倍或更多、约2倍或更多、约3倍或更多、约4倍或更多、约5倍或更多、约10倍或更多、约20倍或更多、约30倍或更多、约40倍或更多、约50倍或更多、约100倍或更多、约200倍或更多、约300倍或更多、约400倍或更多、约500倍或更多、约1000倍或更多、约2000倍或更多、约3000倍或更多、约4000倍或更多、约5000倍或更多或者约10000倍或更多。

在一些实施方案中,稳定化盐是碱金属盐或碱土金属盐,例如锂盐、钠盐、钾盐、铍

盐、镁盐或钙盐。

在一些实施方案中,稳定化盐是碱金属盐,例如锂盐、钠盐或钾盐。

在一些实施方案中,稳定化盐是锂盐。

在一些实施方案中,稳定化盐是氟化物盐、溴化物盐、溴酸盐、高溴酸盐、氯化物盐、亚氯酸盐、氢氧化物盐、过氯酸盐、高氯酸盐、碘化物盐、碘酸盐、高碘酸盐、叠氮化物盐、碳酸盐、磷酸盐或硫酸盐。在一些实施方案中,稳定化盐是氟化物盐、氯化物盐、溴化物盐或碘化物盐。

在一些实施方案中,稳定化盐是氯化物盐。

在一些实施方案中,稳定化盐是氟化锂、溴化锂、溴酸锂、高溴酸锂、氯化锂、亚氯酸锂、氢氧化锂、过氯酸锂、高氯酸锂、碘化锂、碘酸锂、高碘酸锂、叠氮化锂、碳酸锂、磷酸锂或硫酸锂。在一些实施方案中,稳定化盐是氟化锂、氯化锂、溴化锂或碘化锂。

在一些实施方案中,稳定化盐是氯化锂。

在一些实施方案中,稳定化盐是乙酸盐、己二酸盐、邻氨基苯甲酸盐、抗坏血酸盐、苯甲酸盐、丁酸盐、肉桂酸盐、柠檬酸盐、癸酸盐、乙基己酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、谷氨酸盐、异丁酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、苹果酸盐、丙二酸盐、辛酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、邻苯二甲酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、山梨酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐或戊酸盐。

在一些实施方案中,稳定化盐是乙酸盐。

在一些实施方案中,稳定化盐是乙酸锂、己二酸锂、邻氨基苯甲酸锂、抗坏血酸锂、苯甲酸锂、丁酸锂、肉桂酸锂、柠檬酸锂、癸酸锂、乙基己酸锂、甲酸锂、富马酸锂、葡糖酸锂、谷氨酸锂、异丁酸锂、乳酸锂、月桂酸锂、苹果酸锂、丙二酸锂、辛酸锂、草酸锂、棕榈酸锂、邻苯二甲酸锂、新戊酸锂、丙酸锂、水杨酸锂、山梨酸锂、硬脂酸锂、琥珀酸锂、酒石酸锂或戊酸锂。

在一些实施方案中,稳定化盐是乙酸锂。

在一些实施方案中,稳定化盐是碱土金属盐,例如铍盐、镁盐或钙盐。

在一些实施方案中,稳定化盐是钙盐。

在一些实施方案中,稳定化盐是氟化钙、溴化钙、溴酸钙、高溴酸钙、氯化钙、亚氯酸钙、氢氧化钙、过氯酸钙、高氯酸钙、碘化钙、碘酸钙、高碘酸钙、叠氮化钙、碳酸钙、磷酸钙或硫酸钙。

在一些实施方案中,稳定化盐是乙酸钙、己二酸钙、邻氨基苯甲酸钙、抗坏血酸钙、苯甲酸钙、丁酸钙、肉桂酸钙、柠檬酸钙、癸酸钙、乙基己酸钙、甲酸钙、富马酸钙、葡糖酸钙、谷氨酸钙、异丁酸钙、乳酸钙、月桂酸钙、苹果酸钙、丙二酸钙、辛酸钙、草酸钙、棕榈酸钙、邻苯二甲酸钙、新戊酸钙、丙酸钙、水杨酸钙、山梨酸钙、硬脂酸钙、琥珀酸钙、酒石酸钙或钙戊酸。

要理解的是,除了本文具体公开的盐之外,本领域中已知的多种盐(例如,市售的)也可适合作为稳定化盐。关于本公开的方法或LNP制剂的盐的有效性可由技术人员例如通过将所生产的LNP制剂与通过相当的方法生产的LNP制剂进行比较来确定。

第一和第二缓冲液

在一些实施方案中,第一缓冲液的pH值大于第二缓冲液的pH值。

在一些实施方案中,第一缓冲液的pH值为约7.0或更高、约7.25或更高、约7.5或更高、约7.75或更高或者约8.0或更高。

在一些实施方案中,第一缓冲液的pH值在约7.0至约10、约7.5至约9.5、约7.75至约9.25或约8至约9范围内。

在一些实施方案中,第一缓冲液包含第一缓冲剂。

在一些实施方案中,第一缓冲剂能够通过冻干被基本上移除。

在一些实施方案中,第一缓冲剂能够通过冻干被完全移除。

在一些实施方案中,第一缓冲剂通过冻干被基本上移除。

在一些实施方案中,约50%或更高、约60%或更高、约70%或更高、约80%或更高、约90%或更高、约95%或更高、约98%或更高、约99%或更高、约99.5%或更高、约99.8%或更高、约99.9%或更高或者约99.95%或更高的第一缓冲剂通过冻干被移除。

在一些实施方案中,第一缓冲剂在**mmHg下具有**或更低、**或更低或者**或更低的升华点。

在一些实施方案中,第一缓冲剂是三乙基铵盐。

在一些实施方案中,第一缓冲剂是三乙基碳酸氢铵。

在一些实施方案中,第一缓冲液中三乙基碳酸氢铵的浓度在约1mM至约200mM、约5mM至约100mM、约10mM至约50mM或约15mM至约25mM范围内。

在一些实施方案中,第一缓冲液中三乙基碳酸氢铵的浓度为约20mM。

在一些实施方案中,第二缓冲液的pH值为约9.0或更低、约8.75或更低、约8.5或更低、约8.25或更低、约8.0或更低、约7.75或更低、约7.5或更低、约7.25或更低或者约7.0或更低。

在一些实施方案中,第二缓冲液的pH值在约7.0至约9.0、约7.25至约8.75、约7.5至约8.5或约7.75至约8.25范围内。

在一些实施方案中,第二缓冲液是水。在一些实施方案中,第二缓冲液包含三(羟甲基)氨基甲烷。

在一些实施方案中,第二缓冲液中三(羟甲基)氨基甲烷的浓度在约1mM至约200mM、约5mM至约100mM、约10mM至约50mM或约15mM至约25mM范围内。

在一些实施方案中,第二缓冲液中三(羟甲基)氨基甲烷的浓度为约20mM。

LNP制剂和脂质纳米颗粒(LNP)

在一些方面,通过本文公开的方法制备本公开的LNP制剂。

在一些方面,本公开的LNP制剂包含许多LNP,其中LNP包含核酸和可离子化的脂质。

本文还公开了用于本公开的方法的合适的核酸。在一些实施方案中,核酸是RNA(例如,mRNA)。

本文还公开了用于本公开的方法的合适的可离子化的脂质。

在一些实施方案中,LNP还包含磷脂、PEG脂质、结构脂质或其任何组合。本文还公开了用于本公开的方法的合适的磷脂、PEG脂质和结构脂质。

在一些实施方案中,本公开的LNP制剂包括至少一种脂质纳米颗粒组分。脂质纳米颗粒可包括脂质组分和一种或多种另外的组分,如治疗剂和/或预防剂,如核酸。可以针对

一种或多种特定的应用或靶标设计LNP。可基于特定的应用或靶标和/或基于一种或多种元素的功效、毒性、费用、易用性、可用性或其它特征来选择LNP的元素。类似地,可以根据例如特定的元素组合的功效和毒性针对特定应用或靶标来选择LNP的特定制剂。LNP制剂的功效和耐受性可能受制剂稳定性的影响。

LNP的脂质组分可包括例如根据式(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-II)、(IL-IIa)、(IL-IIb)、(IL-IIc)、(IL-IId)、(IL-IIe)、(IL-IIf)、(IL-IIg)、(IL-III)、(IL-IIIa1)、(IL-IIIa2)、(IL-IIIa3)、(IL-IIIa4)、(IL-IIIa5)、(IL-IIIa6)、(IL-IIIa7)或(IL-IIIa8)的脂质、磷脂(如不饱和脂质,例如DOPE或DSPC)、PEG脂质和结构脂质。LNP的脂质组分可包括例如根据式(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-II)、(IL-IIa)、(IL-IIb)、(IL-IIc)、(IL-IId)、(IL-IIe)、(IL-IIf)、(IL-IIg)、(IL-III)、(IL-IIIa1)、(IL-IIIa2)、(IL-IIIa3)、(IL-IIIa4)、(IL-IIIa5)、(IL-IIIa6)、(IL-IIIa7)或(IL-IIIa8)的脂质、磷脂(如不饱和脂质,例如DOPE或DSPC)和结构脂质。可按特定的分数提供脂质组分的元素。

在一些实施方案中,LNP的脂质组分包括根据式(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-II)、(IL-IIa)、(IL-IIb)、(IL-IIc)、(IL-IId)、(IL-IIe)、(IL-IIf)、(IL-IIg)、(IL-III)、(IL-IIIa1)、(IL-IIIa2)、(IL-IIIa3)、(IL-IIIa4)、(IL-IIIa5)、(IL-IIIa6)、(IL-IIIa7)或(IL-IIIa8)的脂质、磷脂、PEG脂质和结构脂质。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒的脂质组分包括约30摩尔%至约60摩尔%的式(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-II)、(IL-IIa)、(IL-IIb)、(IL-IIc)、(IL-IId)、(IL-IIe)、(IL-IIf)、(IL-IIg)、(IL-III)、(IL-IIIa1)、(IL-IIIa2)、(IL-IIIa3)、(IL-IIIa4)、(IL-IIIa5)、(IL-IIIa6)、(IL-IIIa7)或(IL-IIIa8)的化合物、约0摩尔%至约30摩尔%的磷脂、约18.5摩尔%至约48.5摩尔%的结构脂质和约0摩尔%至约10摩尔%的PEG脂质,条件是总摩尔%不超过100%。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒的脂质组分包括约35摩尔%至约55摩尔%的式(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-II)、(IL-IIa)、(IL-IIb)、(IL-IIc)、(IL-IId)、(IL-IIe)、(IL-IIf)、(IL-IIg)、(IL-III)、(IL-IIIa1)、(IL-IIIa2)、(IL-IIIa3)、(IL-IIIa4)、(IL-IIIa5)、(IL-IIIa6)、(IL-IIIa7)或(IL-IIIa8)的化合物、约5摩尔%至约25摩尔%的磷脂、约30摩尔%至约40摩尔%的结构脂质和约0摩尔%至约10摩尔%的PEG脂质。在特定的实施方案中,脂质组分包括约50摩尔%的所述化合物、约10摩尔%的磷脂、约38.5摩尔%的结构脂质和约1.5摩尔%的PEG脂质。在另一特定的实施方案中,脂质组分包括约40摩尔%的所述化合物、约20摩尔%的磷脂、约38.5摩尔%的结构脂质和约1.5摩尔%的PEG脂质。在一些实施方案中,磷脂可以是DOPE或DSPC。在一些实施方案中,PEG脂质可以是PEG-DMG,和/或结构脂质可以是胆固醇。

可针对一种或多种特定的应用或靶标设计脂质纳米颗粒。在一些实施方案中,LNP可以被设计成向哺乳动物体内的特定细胞、组织、器官或系统或其群组递送治疗剂和/或预防剂,如RNA。可以改变脂质纳米颗粒的生理化学特性,以便提高对特定身体靶标的选择性。例如,可基于不同器官的窗孔尺寸来调节粒度。也可基于所需的一个或多个递送靶标来选择LNP中包括的治疗剂和/或预防剂。在一些实施方案中,可针对特定的适应症、疾患、疾病或病症和/或针对向特定的细胞、组织、器官或系统或其群组的递送(例如,局部或特异性递送)来选择治疗剂和/或预防剂。在一些实施方案中,LNP可包括编码所关注的多肽的mRNA,其能够在细胞内被翻译以产生所关注的多肽。这种组合物可以被设计成特异性递送至特定的器官。在一些实施方案中,组合物可以被设计成特异性递送至哺乳动物肝脏。

LNP中的治疗剂和/或预防剂的量可取决于脂质纳米颗粒的尺寸、组成、所需靶标和/或应用或其它特性以及治疗剂和/或预防剂的特性。在一些实施方案中,可用在LNP中的RNA的量可取决于RNA的大小、序列及其它特征。LNP中的治疗剂和/或预防剂及其它元素(例如,脂质)的相对量也可以变化。在一些实施方案中,LNP中脂质组分与治疗剂和/或预防剂(如核酸)的重量/重量比率可以为约5:1至约60:1,如5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1和60:1。在一些实施方案中,脂质组分与治疗剂和/或预防剂的重量/重量比率可以为约10:1至约40:1。在一些实施方案中,重量/重量比率为约20:1。可例如采用吸收光谱法(例如,紫外-可见光谱法)来测量LNP中治疗剂和/或预防剂的量。

在一些实施方案中,LNP包括一种或多种RNA,并且可选择一种或多种RNA、脂质及其量以提供特定的N:P比率。组合物的N:P比率是指一种或多种脂质中的氮原子与RNA中的磷酸酯基团数目的摩尔比。一般来说,较低的N:P比率是优选的。可选择一种或多种RNA、脂质及其量以提供约2:1至约30:1的N:P比率,如2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、12:1、14:1、16:1、18:1、20:1、22:1、24:1、26:1、28:1或30:1。在一些实施方案中,N:P比率可以为约2:1至约8:1。在一些实施方案中,N:P比率为约5:1至约8:1。在一些实施方案中,N:P比率可以为约5.0:1、约5.5:1、约5.67:1、约6.0:1、约6.5:1或约7.0:1。在一些实施方案中,N:P比率可以为约5.67:1。

在一些实施方案中,包括LNP的制剂可还包括盐,如氯化物盐。

在一些实施方案中,包括LNP的制剂可还包括糖,如二糖。在一些实施方案中,所述制剂还包括糖,但不包括盐,如氯化物盐。

物理特性

可以通过多种方法表征本公开的LNP的物理特性。在一些实施方案中,显微镜检查(例如,透射电子显微镜检查或扫描电子显微镜检查)可用于检查LNP的形态和尺寸分布。动态光散射或电位测定法(例如,电位滴定法)可用于测量 ζ 电位。动态光散射也可用于测定粒度。诸如Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK)的仪器也可用于测量LNP的多种特性,如粒度、多分散性指数和 ζ 电位。

LNP制剂的平均LNP直径可在数十nm与数百nm之间,例如通过动态光散射(DLS)测量。在一些实施方案中,LNP制剂的平均LNP直径可以为约40nm至约150nm,如约40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm。在一些实施方案中,LNP制剂的平均LNP直径可以为约50nm至约100nm、约50nm至约90nm、约50nm至约80nm、约50nm至约70nm、约50nm至约60nm、约60nm至约100nm、约60nm至约90nm、约60nm至约80nm、约60nm至约70nm、约70nm至约100nm、约70nm至约90nm、约70nm至约80nm、约80nm至约100nm、约80nm至约90nm或约90nm至约100nm。在一些实施方案中,LNP制剂的平均LNP直径可以为约70nm至约100nm。在特定的实施方案中,LNP制剂的平均LNP直径可以为约80nm。在一些实施方案中,LNP制剂的平均LNP直径可以为约100nm。

在一些实施方案中,LNP制剂的平均LNP直径在约1mm至约500mm、约5mm至约200mm、约10mm至约100mm、约20mm至约80mm、约25mm至约60mm、约30mm至约55mm、约35mm至约50mm或约38mm至约42mm范围内。

在一些实施方案中,与通过相当的方法生产的LNP制剂相比,LNP制剂的平均LNP直径为约99%或更小、约98%或更小、约97%或更小、约96%或更小、约95%或更小、约90%或更小、约85%或更小、约80%或更小、约75%或更小、约70%或更小、约65%或更小、约60%或更小、约55%或更小、约50%或更小、约40%或更小、约30%或更小、约20%或更小或者约10%或更小。

LNP可以是相对均匀的。多分散性指数可用于指示LNP的均匀性,例如脂质纳米颗粒的粒度分布。小(例如,小于0.3)的多分散性指数通常指示窄的粒度分布。LNP的多分散性指数可以为约0至约0.25,如0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24或0.25。在一些实施方案中,LNP的多分散性指数可以为约0.10至约0.20。

LNP的 ζ 电位可用于指示组合物的电动电位。在一些实施方案中, ζ 电位可描述LNP的表面电荷。具有相对低的电荷(正或负)的脂质纳米颗粒通常是可取的,因为带较高电荷的物质可能会不利地与体内的细胞、组织及其它元素相互作用。在一些实施方案中,LNP的 ζ 电位可以为约-10mV至约+20mV、约-10mV至约+15mV、约-10mV至约+10mV、约-10mV至约+5mV、约-10mV至约0mV、约-10mV至约-5mV、约-5mV至约+20mV、约-5mV至约+15mV、约-5mV至约+10mV、约-5mV至约+5mV、约-5mV至约0mV、约0mV至约+20mV、约0mV至约+15mV、约0mV至约+10mV、约0mV至约+5mV、约+5mV至约+20mV、约+5mV至约+15mV或约+5mV至约+10mV。

治疗剂和/或预防剂(如核酸)包封的效率描述相对于所提供的初始量在制备后被包封或以其它方式与LNP缔合的治疗剂和/或预防剂的量。包封效率可取的是高的(例如,接近100%)。可例如通过比较含有脂质纳米颗粒的溶液在用一种或多种有机溶剂或洗涤剂破碎脂质纳米颗粒之前和之后其中的治疗剂和/或预防剂的量来测量包封效率。阴离子交换树脂可用于测量溶液中游离治疗剂和/或预防剂(例如,RNA)的量。荧光可用于测量溶液中游离治疗剂和/或预防剂(例如,RNA)的量。对于本文所述的脂质纳米颗粒,治疗剂和/或预防剂的包封效率可以为至少50%,例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些实施方案中,包封效率可以为至少80%。在一些实施方案中,包封效率可以为至少90%。在一些实施方案中,包封效率可以为至少95%。

LNP可任选包含一个或多个包衣。在一些实施方案中,LNP可配制在具有包衣的胶囊、薄膜或片剂中。包括本文所述的组合物的胶囊、薄膜或片剂可具有任何适用的尺寸、拉伸强度、硬度或密度。

化学特性

可通过多种方法表征本公开的LNP、LNP溶液、冻干的LNP组合物或LNP制剂的化学特性。在一些实施方案中,电泳(例如,毛细管电泳)或色谱法(例如,反相液相色谱法)可用于检查mRNA完整性。

在一些实施方案中,本公开的LNP、LNP溶液、冻干的LNP组合物或LNP制剂的LNP完整性为约20%或更高、约25%或更高、约30%或更高、约35%或更高、约40%或更高、约45%或更高、约50%或更高、约55%或更高、约60%或更高、约65%或更高、约70%或更高、约75%或更高、约80%或更高、约85%或更高、约90%或更高、约95%或更高、约96%或更高、约97%或更高、约98%或更高或者约99%或更高。

在一些实施方案中,本公开的LNP、LNP溶液、冻干的LNP组合物或LNP制剂的LNP完整性比通过相当的方法生产的LNP、LNP溶液、冻干的LNP组合物或LNP制剂的LNP完整性高约5%或更高、约10%或更多、约15%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、约1倍或更多、约2倍或更多、约3倍或更多、约4倍或更多、约5倍或更多、约10倍或更多、约20倍或更多、约30倍或更多、约40倍或更多、约50倍或更多、约100倍或更多、约200倍或更多、约300倍或更多、约400倍或更多、约500倍或更多、约1000倍或更多、约2000倍或更多、约3000倍或更多、约4000倍或更多、约5000倍或更多或者约10000倍或更多。

在一些实施方案中,本公开的LNP、LNP溶液、冻干的LNP组合物或LNP制剂的 $T_{80\%}$ 为约12个月或更长、约15个月或更长、约18个月或更长、约21个月或更长、约24个月或更长、约27个月或更长、约30个月或更长、约33个月或更长、约36个月或更长、约48个月或更长、约60个月或更长、约72个月或更长、约84个月或更长、约96个月或更长、约108个月或更长、约120个月或更长。

在一些实施方案中,本公开的LNP、LNP溶液、冻干的LNP组合物或LNP制剂的 $T_{80\%}$ 比通过相当的方法生产的LNP、LNP溶液、冻干的LNP组合物或LNP制剂的 $T_{80\%}$ 长约5%或更高、约10%或更多、约15%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、约1倍或更多、约2倍或更多、约3倍或更多、约4倍或更多、约5倍或更多。

在一些实施方案中,本公开的LNP、LNP溶液、冻干的LNP组合物或LNP制剂的 $T_{1/2}$ 为约12个月或更长、约15个月或更长、约18个月或更长、约21个月或更长、约24个月或更长、约27个月或更长、约30个月或更长、约33个月或更长、约36个月或更长、约48个月或更长、约60个月或更长、约72个月或更长、约84个月或更长、约96个月或更长、约108个月或更长、约120个月或更长。

在一些实施方案中,本公开的LNP、LNP溶液、冻干的LNP组合物或LNP制剂的 $T_{1/2}$ 比通过相当的方法生产的LNP、LNP溶液、冻干的LNP组合物或LNP制剂的 $T_{1/2}$ 长约5%或更高、约10%或更多、约15%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、约1倍或更多、约2倍或更多、约3倍或更多、约4倍或更多、约5倍或更多。

定义

如本文所用,术语“烷基”或“烷基基团”意指包括一个或多个碳原子(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三、十四、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个或更多碳原子)的直链或支链饱和烃,其任选被取代。符号“ C_{1-14} 烷基”意指包括1-14个碳原子的任选取代的直链或支链饱和烃。除另有规定外,本文所述的烷基是指未取代的和取代的烷基两者。

如本文所用,术语“烯基”或“烯基基团”意指包括两个或更多个碳原子(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三、十四、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个或更多碳原子)和至少一个双键的直链或支链烃,其任选被取代。符号“ C_{2-14} 烯基”意指包括2-14个碳原子和至少一个碳-碳双键的任选取代的直链或支链烃。烯基可包括一个、两个、三个、四个或更多的碳-碳双键。在一些实施方

案中, C_{18} 烯基可包括一个或多个双键。包括两个双键的 C_{18} 烯基可以是亚油基。除另有规定外, 本文所述的烯基是指未取代的和取代的烯基两者。

如本文所用, 术语“碳环”或“碳环基团”意指包括一个或多个碳原子环的任选取代的单环或多环体系。环可以是三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、十五、十六、十七、十八、十九或二十元环。符号“ C_{3-6} 碳环”意指包括具有3-6个碳原子的单环的碳环。碳环可包括一个或多个碳-碳双键或三键, 并且可以是非芳族的或芳族的(例如, 环烷基或芳基)。碳环的实例包括环丙基、环戊基、环己基、苯基、萘基和1,2-二氢萘基。如本文所用的术语“环烷基”意指非芳族碳环, 并且可以包括或不包括任何双键或三键。除另有规定外, 本文所述的碳环是指未取代的和取代的碳环基团两者, 即任选取代的碳环。

如本文所用, 术语“杂环”或“杂环基团”意指包括一个或多个环的任选取代的单环或多环体系, 其中至少一个环包括至少一个杂原子。杂原子可以是例如氮、氧或硫原子。环可以是三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三或十四元环。杂环可包括一个或多个双键或三键, 并且可以是非芳族的或芳族的(例如, 杂环烷基或杂芳基)。杂环的实例包括咪唑基、咪唑烷基、噁唑基、噁唑烷基、噻唑基、噻唑烷基、吡唑基、吡唑基、异噁唑基、异噁唑基、异噻唑基、异噻唑基、吗啉基、吡咯基、吡咯烷基、呋喃基、四氢呋喃基、苯硫基、吡啶基、哌啶基、喹啉基和异喹啉基。如本文所用的术语“杂环烷基”意指非芳族杂环, 并且可以包括或不包括任何双键或三键。除另有规定外, 本文所述的杂环是指未取代的和取代的杂环基团两者, 即任选取代的杂环。

如本文所用, “可生物降解基团”是可促进脂质在哺乳动物实体中更快代谢的基团。可生物降解基团可选自但不限于由 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、

$-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、芳基和杂芳基组成的组。如本文所用, “芳基”是包括一个或多个芳族环的任选取代的碳环基团。芳基的实例包括苯基和萘基。如本文所用, “杂芳基”是包括一个或多个芳族环的任选取代的杂环基团。杂芳基的实例包括吡咯基、呋喃基、苯硫基、咪唑基、噁唑基和噻唑基。芳基和杂芳基均可任选取被取代。在一些实施方案中, M和M' 可选自由任选取代的苯基、噁唑和噻唑组成的非限制性组。在本文的式中, M和M' 可独立地选自上列的可生物降解基团。除另有规定外, 本文所述的芳基或杂芳基是指未取代的和取代的基团两者, 即任选取代的芳基或杂芳基。

除另有规定外, 烷基、烯基和环基(例如, 碳环基和杂环基)可任选取被取代。任选的取代基可选自但不限于由以下组成的组: 卤素原子(例如, 氯化物、溴化物、氟化物或碘化物基团)、羧酸(例如, $-C(O)OH$)、醇(例如, 羟基, $-OH$)、酯(例如, $-C(O)OR$ 或 $-OC(O)R$)、醛(例如, $-C(O)H$)、羰基(例如, $-C(O)R$, 或者由 $C=O$ 表示)、酰卤(例如, $-C(O)X$, 其中X是选自溴化物、氟化物、氯化物和碘化物的卤化物)、碳酸酯(例如, $-OC(O)OR$)、烷氧基(例如, $-OR$)、缩醛(例如, $-C(OR)_2R''$), 其中每个OR为可以是相同或不同的烷氧基, 且R''是烷基或烯基)、磷酸酯(例如, $P(O)_4^{3-}$)、硫醇(例如, $-SH$)、亚砷(例如, $-S(O)R$)、亚磺酸(例如, $-S(O)OH$)、磺酸(例如, $-S(O)_2OH$)、硫醛(例如, $-C(S)H$)、硫酸酯(例如, $S(O)_4^{2-}$)、磺酰基(例如, $-S(O)_2-$)、酰胺(例如, $-C(O)NR_2$ 或 $-N(R)C(O)R$)、叠氮基(例如, $-N_3$)、硝基(例如, $-NO_2$)、氰基(例如, $-CN$)、异氰基(例如, $-NC$)、酰氧基(例如, $-OC(O)R$)、氨基(例如, $-NR_2$ 、 $-NRH$ 或 $-NH_2$)、氨基甲酰基(例如, $-OC(O)NR_2$ 、 $-OC(O)NRH$ 或 $-OC(O)NH_2$)、磺酰胺(例如, $-S(O)_2NR_2$ 、 $-S(O)_2NRH$ 、 $-S(O)_2NH_2$ 、 $-N$

(R)S(O)₂R、-N(H)S(O)₂R、-N(R)S(O)₂H或-N(H)S(O)₂H)、烷基、烯基和环基(例如,碳环基或杂环基)。在前述任一者中,R是如本文所定义的烷基或烯基。在一些实施方案中,取代基本身可以被例如一个、两个、三个、四个、五个或六个如本文所定义的取代基进一步取代。在一些实施方案中,C₁₋₆烷基可以被一个、两个、三个、四个、五个或六个如本文所述的取代基进一步取代。

约、大约:如本文所用,应用于一个或多个所关注的值的术语“大约”和“约”是指与规定的参考值类似的值。在一些实施方案中,术语“大约”或“约”是指在任一方向上(大于或小于)落入规定的参考值的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小以内的值的范围,除非另有规定,或者不然从上下文中显而易见(除非这种数值将超过可能值的100%)。在一些实施方案中,当在LNP的脂质组分中的给定化合物的量的背景下使用时,“约”可意指所述值的+/-10%。例如,包括具有约40%的给定化合物的脂质组分的LNP可包括30-50%的所述化合物。

如本文所用,术语“化合物”旨在包括所描述的结构的所有异构体和同位素。“同位素”是指原子序数相同、但由于原子核中的中子数不同而导致质量数不同的原子。在一些实施方案中,氢的同位素包括氘和氚。进一步地,可通过常规方法与溶剂或水分子组合来制备本公开的化合物、盐或络合物以形成溶剂合物和水合物。

如本文所用,术语“接触”意指在两个或更多个实体之间建立物理连接。在一些实施方案中,使哺乳动物细胞与LNP接触意指使哺乳动物细胞和纳米颗粒共有物理连接。使细胞与外部实体在体内和离体接触的方法是生物学领域中熟知的。在一些实施方案中,可通过不同的施用途径(例如,静脉内、肌内、皮内和皮下)使LNP和置于哺乳动物体内的哺乳动物细胞进行接触,并且可涉及不同量的脂质纳米颗粒。此外,LNP可接触一种以上的哺乳动物细胞。

如本文所用,术语“相当的方法”是指具有与被比较的方法(例如,生产本公开的LNP制剂)相当的参数或步骤的方法。在一些实施方案中,“相当的方法”是具有被比较的方法的步骤i)、ia)、iaa)、ib)、ii)、iia)、iib)、iic)、iid)和iie)中的一个或多个步骤的方法。在一些实施方案中,“相当的方法”是没有被比较的方法的步骤i)、ia)、iaa)、ib)、ii)、iia)、iib)、iic)、iid)和iie)中的一个或多个步骤的方法。在一些实施方案中,“相当的方法”是没有被比较的方法的步骤ia)和ib)中的一个或多个步骤的方法。在一些实施方案中,“相当的方法”是采用核酸的水溶性盐的方法。在一些实施方案中,“相当的方法”是采用不包含有机溶剂可溶性核酸的有机溶液的方法。在一些实施方案中,“相当的方法”是包括在施用脂质纳米颗粒制剂之前处理脂质纳米颗粒的方法。

如本文所用,术语“递送”意指向目标提供实体。在一些实施方案中,向受试者递送治疗剂和/或预防剂可涉及对受试者施用包括治疗剂和/或预防剂的LNP(例如,通过静脉内、肌内、皮内或皮下途径)。对哺乳动物或哺乳动物细胞施用LNP可涉及使一种或多种细胞与脂质纳米颗粒接触。

如本文所用,“增强的递送”意指与通过对照纳米颗粒向所关注的靶组织(例如,MC3、KC2或DLinDMA)递送治疗剂和/或预防剂的水平相比,通过纳米颗粒向所关注的靶组织(例如,哺乳动物肝脏)递送更多(例如,至少1.5倍多、至少2倍多、至少3倍多、至少4倍多、至少5倍多、至少6倍多、至少7倍多、至少8倍多、至少9倍多、至少10倍多)的治疗剂和/或预防

剂。可通过将组织中产生的蛋白质的量与所述组织的重量进行比较、将组织中的治疗剂和/或预防剂的量与所述组织的重量进行比较、将组织中的蛋白质的量与所述组织中的蛋白质总量进行比较或将组织中的治疗剂和/或预防剂的量与所述组织中的治疗剂和/或预防剂总量进行比较来测量纳米颗粒向特定组织的递送水平。将要理解的是,纳米颗粒向靶组织的增强递送不需要在被治疗的受试者中测定,其可在替代物如动物模型(例如,大鼠模型)中测定。

如本文所用,术语“特异性递送”、“特异性地递送(向递送/向递送ing)”意指与脱靶组织(例如,哺乳动物脾脏)相比,通过纳米颗粒向所关注的靶组织(例如,哺乳动物肝脏)递送更多(例如,至少1.5倍多、至少2倍多、至少3倍多、至少4倍多、至少5倍多、至少6倍多、至少7倍多、至少8倍多、至少9倍多、至少10倍多)的治疗剂和/或预防剂。可通过将组织中产生的蛋白质的量与所述组织的重量进行比较、将组织中的治疗剂和/或预防剂的量与所述组织的重量进行比较、将组织中的蛋白质的量与所述组织中的蛋白质总量进行比较或将组织中的治疗剂和/或预防剂的量与所述组织中的治疗剂和/或预防剂总量进行比较来测量纳米颗粒向特定组织的递送水平。在一些实施方案中,对于肾血管靶向,如果与全身性施用治疗剂和/或预防剂之后递送至肝脏或脾脏的治疗剂和/或预防剂相比,1.5、2倍、3倍、5倍、10倍、15倍或20倍多的治疗剂和/或预防剂/1g组织被递送至肾脏,则治疗剂和/或预防剂被特异性地提供至哺乳动物肾脏。将要理解的是,纳米颗粒向靶组织特异性递送的能力不需要在被治疗的受试者中测定,其可在替代物如动物模型(例如,大鼠模型)中测定。

如本文所用,“包封效率”是指相对于制备LNP使用的治疗剂和/或预防剂的初始总量而言成为LNP的一部分的治疗剂和/或预防剂的量。在一些实施方案中,如果初始提供给组合物的总共100mg治疗剂和/或预防剂中的97mg治疗剂和/或预防剂被包封在LNP中,则可以给出包封效率为97%。

如本文所用,“包封”、“包封的”、“装载的”和“缔合的”可指完全、基本上或部分封闭、限制、围绕或包裹。如本文所用,“包封”或“缔合”可指将个别核酸分子限制在纳米颗粒内和/或在个别核酸分子与纳米颗粒之间建立生理化学关系的过程。如本文所用,“空纳米颗粒”可指基本上不含治疗或预防剂的纳米颗粒。如本文所用,“空纳米颗粒”可指基本上不含核酸的纳米颗粒。如本文所用,“空纳米颗粒”可指基本上仅由脂质组分组成的纳米颗粒。

如本文所用,核酸序列的“表达”是指将mRNA翻译成多肽或蛋白质和/或多肽或蛋白质的翻译后修饰。

如本文所用,术语“体外”是指在人工环境中发生的事件,例如在试管或反应容器中、在细胞培养物中、在培替氏培养皿中等,而不是在生物体(例如,动物、植物或微生物)内。

如本文所用,术语“体内”是指在生物体(例如,动物、植物或微生物或其细胞或组织)内发生的事件。

如本文所用,术语“离体”是指在生物体(例如,动物、植物或微生物或其细胞或组织)外部发生的事件。离体事件可在与天然(例如,体内)环境变化最小的环境中发生。

如本文所用,术语“异构体”意指化合物的任何几何异构体、互变异构体、两性离子、立体异构体、对映异构体或非对映异构体。化合物可包括一个或多个手性中心和/或双键,且因此可作为立体异构体存在,如双键异构体(即,几何E/Z异构体)或非对映异构体(例

如,对映异构体(即,(+)或(-))或顺式/反式异构体)。本公开涵盖本文所述的化合物的任何及所有异构体,包括立体异构纯形式(例如,几何纯、对映异构纯或非对映异构纯)以及对映异构和立体异构混合物,例如外消旋体。化合物的对映异构和立体异构混合物以及将它们拆分成它们的组成对映异构体或立体异构体的方法是熟知的。

如本文所用,“脂质组分”是脂质纳米颗粒的包括一种或多种脂质的组分。在一些实施方案中,脂质组分可包括一种或多种阳离子/可离子化、PEG化、结构或其它脂质,如磷脂。

如本文所用,“接头”是连接两个部分的部分,例如帽物质的两个核苷之间的连接。接头可包括一个或多个基团,包括但不限于磷酸酯基团(例如,磷酸酯、硼代磷酸酯、硫代磷酸酯、硒代磷酸酯和膦酸酯)、烷基、酰胺化物或甘油。在一些实施方案中,帽类似物的两个核苷可在它们的5'位置通过三磷酸酯基团或通过包括两个磷酸酯部分和硼代磷酸酯部分的链连接。

如本文所用,“施用方法”可包括静脉内、肌内、皮内、皮下或向受试者递送组合物的其它方法。可以选择施用方法以向身体的特定区域或系统靶向递送(例如,特异性递送)。

如本文所用,“修饰的”意指非天然的。在一些实施方案中,RNA可以是修饰的RNA。也就是说,RNA可包括一个或多个非天然存在的核碱基、核苷、核苷酸或接头。“修饰的”物质在本文中也可以被称为“改变的”物质。物质可以在化学、结构或功能上被修饰或改变。在一些实施方案中,修饰的核碱基物质可包括一个或多个非天然存在的取代。

如本文所用,“N:P比率”是脂质中可离子化的(在生理pH范围内)氮原子与RNA中(例如,包括脂质组分和RNA的LNP中)的磷酸酯基团的摩尔比。

如本文所用,“脂质纳米颗粒”是包含一种或多种脂质的组合物。脂质纳米颗粒的尺寸通常为微米或更小的数量级,并且可包括脂质双层。除另有规定外,如本文所用的脂质纳米颗粒涵盖脂质纳米颗粒(LNP)、脂质体(例如,脂质囊泡)和脂质复合物。在一些实施方案中,LNP可以是具有直径为500nm或更小的脂质双层的脂质体。

如本文所用,“天然存在的”意指在自然界中存在而没有人工辅助。

如本文所用,“患者”是指可能寻求或需要治疗、要求治疗、正在接受治疗、将要接受治疗的受试者,或由针对特定疾病或疾患受过训练的专业人员护理的受试者。

如本文所用,“PEG脂质”或“PEG化脂质”是指包含聚乙二醇组分的脂质。

短语“药学上可接受的”在本文中用于指在合理的医学判断范围内适合与人和动物的组织接触使用而没有过度的毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症、与合理的益处/风险比相称的那些化合物、物质、组合物和/或剂型。

如本文所用的短语“药学上可接受的赋形剂”是指除本文所述的化合物之外的任何成分(例如,能够悬浮、络合或溶解活性化合物的媒介物),并且具有在患者体内基本上无毒和非炎性的特性。赋形剂可包括例如:抗粘附剂、抗氧化剂、粘结剂、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、香料、助流剂(流动增强剂)、润滑剂、防腐剂、印刷油墨、吸附剂、悬浮或分散剂、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(二)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、交联维酮、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、甘露糖醇、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、羟基乙酸淀粉钠、山梨糖醇、淀粉(玉米)、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化钛、维生素A、维生素E(α -生育酚)、维生素C、木糖醇和本文公开的其它物质。

组合物还可包括一种或多种化合物的盐。盐可以是药学上可接受的盐。如本文所用,“药学上可接受的盐”是指所公开的化合物的衍生物,其中通过将存在的酸或碱部分转化为其盐形式(例如,通过使游离的碱基团与合适的有机酸反应)来改变母体化合物。药学上可接受的盐的实例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、海藻酸盐、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、二葡萄糖酸盐、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、乳糖醛酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、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的无机或有机酸形成的母体化合物的常规无毒盐。可通过常规的化学方法由含有碱性或酸性部分的母体化合物合成本公开的药学上可接受的盐。一般地,可通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计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这类盐;一般地,非水介质如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈是优选的。合适的盐的列表参见Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版,Mack Publishing Company,Easton, Pa.,1985,第1418页,Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use,P.H.Stahl和C.G.Wermuth(编),Wiley-VCH,2008,和Berge等人,Journal of Pharmaceutical Science,66,1-19(1977),其每一者以全文引用的方式并入本文。

如本文所用,“磷脂”是包括磷酸酯部分和一个或多个碳链(如不饱和脂肪酸链)的脂质。磷脂可包括一个或多个多重(例如,双或三)键(例如,一个或多个不饱和度)。磷脂或其类似物或衍生物可包括胆碱。磷脂或其类似物或衍生物可以不包括胆碱。特定的磷脂可促进与膜的融合。在一些实施方案中,阳离子磷脂可与膜(例如,细胞膜或细胞内膜)的一种或多种带负电荷的磷脂相互作用。磷脂与膜的融合可允许含脂质的组合物的一种或多种元素通过膜,从而允许例如将一种或多种元素递送至细胞。

如本文所用,“多分散性指数”是描述系统的粒度分布的均匀性的比率。小的值(例如,小于0.3)指示窄的粒度分布。

如本文所用,两亲性“聚合物”是包含低聚物或聚合物的两亲性化合物。在一些实施方案中,两亲性聚合物可包含低聚物片段,如两个或更多个PEG单体单元。在一些实施方案中,本文所述的两亲性聚合物可以是PS20。

如本文所用,术语“多肽”或“所关注的多肽”是指通常通过肽键连接的氨基酸残基的聚合物,其可以是天然(例如,分离或纯化)或合成产生的。

如本文所用,“RNA”是指可以是天然或非天然存在的核糖核酸。在一些实施方案中,RNA可包括修饰的和/或非天然存在的组分,如一种或多种核碱基、核苷、核苷酸或接头。RNA可包括帽结构、链终止核苷、茎环、聚A序列和/或聚腺苷酸化信号。RNA可具有编码所关注的多肽的核苷酸序列。在一些实施方案中,RNA可以是信使RNA(mRNA)。编码特定多肽的mRNA的翻译(例如,哺乳动物细胞内部mRNA的体内翻译)可产生编码的多肽。RNA可选自由小干扰RNA(siRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、Dicer-底物RNA(dsRNA)、小发夹RNA(shRNA)、mRNA、长非编码RNA(lncRNA)及其混合物组成的非限制性组。

如本文所用,“单一单位剂量”是以一个剂量/一次/单一途径/单一接触点(即单次施用事件)施用的任何治疗剂的剂量。

如本文所用,“分割剂量”是将单一单位剂量或总日剂量分成两个或多个剂量。

如本文所用,“总日剂量”是在24小时内给予或开具的量。其可作为单一单位剂量施用。

如本文所用,术语“受试者”是指可例如用于实验、诊断、预防和/或治疗目的而施用根据本公开的组合物或制剂的任何生物体。典型的受试者包括动物(例如,哺乳动物,如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和人)和/或植物。

如本文所用,“ T_x ”是指LNP、LNP溶液、冻干的LNP组合物或LNP制剂的核酸完整性(例如,mRNA完整性)降解至用于制备LNP、LNP溶液、冻干的LNP组合物或LNP制剂的核酸(例如,mRNA)的初始完整性的约X所持续的时间量。例如,“ $T_{80\%}$ ”是指LNP、LNP溶液、冻干的LNP组合物或LNP制剂的核酸完整性(例如,mRNA完整性)降解至用于制备LNP、LNP溶液、冻干的LNP组合物或LNP制剂的核酸(例如,mRNA)的初始完整性的约80%所持续的时间量。对于另一实例,“ $T_{1/2}$ ”是指LNP、LNP溶液、冻干的LNP组合物或LNP制剂的核酸完整性(例如,mRNA完整性)降解至用于制备LNP、LNP溶液、冻干的LNP组合物或LNP制剂的核酸(例如,mRNA)的初始完整性的约1/2所持续的时间量。

如本文所用,“靶向细胞”是指任何一种或多种所关注的细胞。细胞可见于生物体的体外、体内、原位或组织或器官中。生物体可以是动物,例如哺乳动物,例如人,例如患者。

如本文所用,“靶组织”是指任何一种或多种所关注的组织类型,其中治疗剂和/或预防剂的递送将导致所需的生物学和/或药理学效果。所关注的靶组织的实例包括特定的组织、器官和系统或其群组。在特定的应用中,靶组织可以是肾脏、肺、脾脏、血管中的血管内皮(例如,冠状动脉内或股动脉内)或肿瘤组织(例如,经由肿瘤内注射)。“脱靶组织”是指任何一种或多种组织类型,其中编码蛋白质的表达不会导致所需的生物学和/或药理学效果。在特定的应用中,脱靶组织可包括肝脏和脾脏。

术语“治疗剂”或“预防剂”是指当对受试者施用时具有治疗、诊断和/或预防效果和/或引发所需的生物学和/或药理学效果的任何剂。治疗剂也被称为“活性物质”或“活性剂”。这类剂包括但不限于细胞毒素、放射性离子、化学治疗剂、小分子药物、蛋白质和核酸。

如本文所用,术语“治疗有效量”意指要递送的剂(例如,核酸、药物、组合物、治疗剂、诊断剂、预防剂等)的量,当对患有或易患感染、疾病、病症和/或疾患的受试者施用,该量足以治疗、改善感染、疾病、病症和/或疾患的症状、诊断、预防和/或延迟感染、疾病、病症和/或疾患的发作。

如本文所用,“转染”是指将物质(例如,RNA)引入到细胞中。转染可例如在体外、离

体或在体内进行。

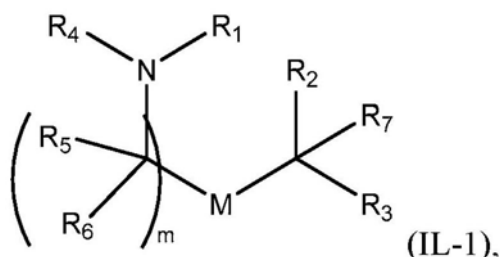
如本文所用,术语“治疗”是指部分或完全减弱、减轻、改善、缓解特定感染、疾病、病症和/或疾患的一种或多种症状或特征、延迟其发作、抑制其进展、降低其严重程度和/或降低其发病率。在一些实施方案中,“治疗”癌症可指抑制肿瘤的存活、生长和/或扩散。出于降低发生与疾病、病症和/或疾患相关的病理的风险,可以对未表现出疾病、病症和/或疾患迹象的受试者和/或对仅表现出疾病、病症和/或疾患的早期迹象的受试者施用治疗。

如本文所用,“ζ电位”是例如颗粒组合物中的脂质的电动电位。

可离子化的脂质

本公开提供可离子化的脂质,例如包括中心胺部分和至少一个可生物降解基团的可离子化的脂质。本文所述的脂质可有利地用在脂质纳米颗粒和脂质纳米颗粒制剂中,用于向哺乳动物细胞或器官递送治疗剂和/或预防剂,如核酸。

在一些方面,本公开的可离子化的脂质可以是一种或多种式(IL-1)的化合物:



或它们的N-氧化物或其盐或异构体,其中:

R^1 选自自由 C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''M'R'$ 组成的组;

R^2 和 R^3 独立地选自自由H、 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R^*OR''$ 组成的组,或者 R^2 和 R^3 与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环;

R^4 选自自由氢、 C_{3-6} 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-(CH_2)_oC(R^{10})_2(CH_2)_{n-o}Q$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ$ (R)₂和未取代的 C_{1-6} 烷基组成的组,其中Q选自碳环、杂环、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(R)R^8$ 、 $-N(R)S(O)_2R^8$ 、 $-O(CH_2)_nOR$ 、 $-N(R)C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(=CHR^9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)R$ 、 $-N(OR)S(O)_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR^9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR^9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 和 $-C(R)N(R)_2C(O)OR$,每个o独立地选自1、2、3和4,且每个n独立地选自1、2、3、4和5;

每个 R^5 独立地选自自由OH、 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组;

每个 R^6 独立地选自自由OH、 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组;

M和M'独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)-M''-C(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基和杂芳基,其中M''是键、 C_{1-13} 烷基或 C_{2-13} 烯基;

R^7 选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组;

R^8 选自自由 C_{3-6} 碳环和杂环组成的组;

R^9 选自自由H、CN、 NO_2 、 C_{1-6} 烷基、 $-OR$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2N(R)_2$ 、 C_{2-6} 烯基、 C_{3-6} 碳环和杂环组成的组;

R^{10} 选自自由H、OH、 C_{1-3} 烷基和 C_{2-3} 烯基组成的组；

每个R独立地选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、 $(CH_2)_q OR^*$ 和H组成的组，

且每个q独立地选自1、2和3；

每个R'独立地选自自由 C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和H组成的组；

每个R''独立地选自自由 C_{3-15} 烷基和 C_{3-15} 烯基组成的组；

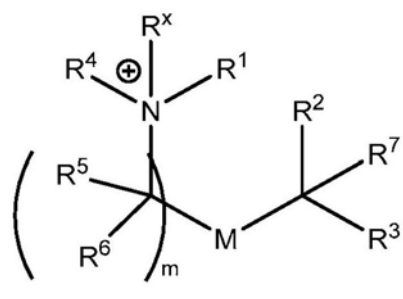
每个 R^* 独立地选自自由 C_{1-12} 烷基和 C_{2-12} 烯基组成的组；

每个Y独立地为 C_{3-6} 碳环；

每个X独立地选自自由F、Cl、Br和I组成的组；且

m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13；并且其中当 R^4 是 $-(CH_2)_n Q$ 、 $-(CH_2)_n CHQR$ 、 $-CHQR$ 或 $-CQ(R)_2$ 时，则(i)当n是1、2、3、4或5时，Q不是 $-N(R)_2$ ，或(ii)当n是1或2时，Q不是5、6或7元杂环烷基。

在一些方面，本公开的可离子化的脂质可以是一种或多种式(IL-X)的化合物：



或其N-氧化物或其盐或异构体，其中

(IL-X)

或其盐或异构体，其中

R^1 选自自由 C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''M'R'$ 组成的组；

R^2 和 R^3 独立地选自自由H、 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R^*OR''$ 组成的组，或者 R^2 和 R^3 与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环；

R^4 选自自由氢、 C_{3-6} 碳环、 $-(CH_2)_n Q$ 、 $-(CH_2)_n CHQR$ 、 $-(CH_2)_o C(R^{10})_2 (CH_2)_{n-o} Q$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ(R)_2$ 和未取代的 C_{1-6} 烷基组成的组，其中Q选自碳环、杂环、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_n N(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(R)R^8$ 、 $-N(R)S(O)_2R^8$ 、 $-O(CH_2)_n OR$ 、 $-N(R)C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(=CHR^9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)R$ 、 $-N(OR)S(O)_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR^9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR^9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 和 $-C(R)N(R)_2C(O)OR$ ，每个o独立地选自1、2、3和4，且每个n独立地选自1、2、3、4和5；

R^x 选自自由 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 $-(CH_2)_v OH$ 和 $-(CH_2)_v N(R)_2$ 组成的组，

其中v选自1、2、3、4、5和6；

每个 R^5 独立地选自自由OH、 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组；

每个 R^6 独立地选自自由OH、 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组；

M和M'独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)-M''-C(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基和杂芳基，其中M''是键、 C_{1-13} 烷基或 C_{2-13} 烯基；

R^7 选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组；

R^8 选自由 C_{3-6} 碳环和杂环组成的组；

R^9 选自由H、CN、 NO_2 、 C_{1-6} 烷基、 $-OR$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2N(R)_2$ 、 C_{2-6} 烯基、 C_{3-6} 碳环和杂环组成的组；

R^{10} 选自由H、OH、 C_{1-3} 烷基和 C_{2-3} 烯基组成的组；

每个R独立地选自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、 $(CH_2)_qOR^*$ 和H组成的组，

且每个q独立地选自1、2和3；

每个 R' 独立地选自由 C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和H组成的组；

每个 R'' 独立地选自由 C_{3-15} 烷基和 C_{3-15} 烯基组成的组；

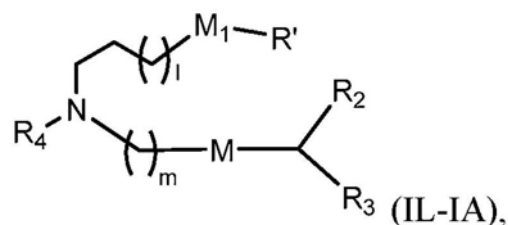
每个 R^* 独立地选自由 C_{1-12} 烷基和 C_{2-12} 烯基组成的组；

每个Y独立地为 C_{3-6} 碳环；

每个X独立地选自由F、Cl、Br和I组成的组；且

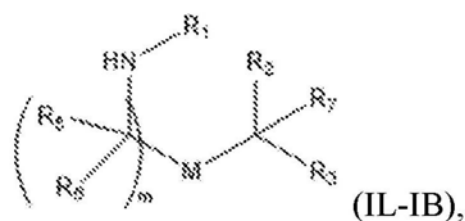
m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13。

在一些实施方案中，式 (IL-I) 的化合物的亚组包括式 (IL-IA) 的化合物：



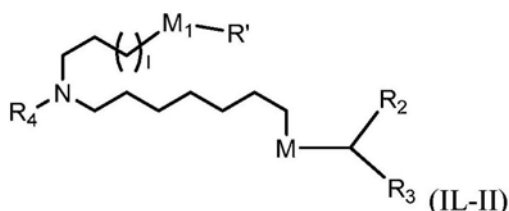
或其N-氧化物或其盐或异构体，其中1选自1、2、3、4和5；m选自5、6、7、8和9； M_1 是键或 M' ； R^4 是氢、未取代的 C_{1-3} 烷基、 $-(CH_2)_oC(R^{10})_2(CH_2)_{n-o}Q$ 或 $-(CH_2)_nQ$ ，其中Q是OH、 $-NHC(S)N(R)_2$ 、 $-NHC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)R^8$ 、 $-NHC(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-NHC(=CHR^9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、杂芳基或杂环烷基；M和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)-M''-C(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S-S-$ 、芳基和杂芳基；且 R^2 和 R^3 独立地选自由H、 C_{1-14} 烷基和 C_{2-14} 烯基组成的组。例如，m是5、7或9。例如，Q是OH、 $-NHC(S)N(R)_2$ 或 $-NHC(O)N(R)_2$ 。例如，Q是 $-N(R)C(O)R$ 或 $-N(R)S(O)_2R$ 。

在一些实施方案中，式 (I) 的化合物的亚组包括式 (IL-IB) 的化合物：



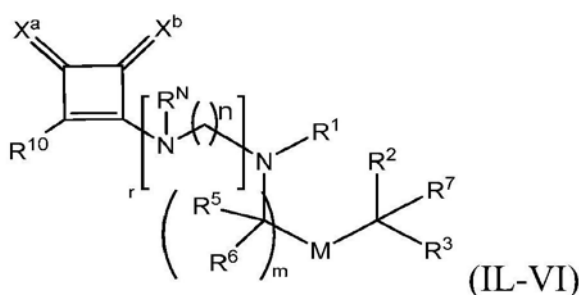
或其N-氧化物或其盐或异构体，其中所有变量如本文所定义。在一些实施方案中，m选自5、6、7、8和9； R_4 是氢、未取代的 C_{1-3} 烷基或 $-(CH_2)_nQ$ ，其中Q是 $-OH$ 、 $-NHC(S)N(R)_2$ 、 $-NHC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)R^8$ 、 $-NHC(=NR^9)N(R)_2$ 、 $-NHC(=CHR^9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、杂芳基或杂环烷基；M和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)-M''-C(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S-S-$ 、芳基和杂芳基；且 R_2 和 R_3 独立地选自由H、 C_{1-14} 烷基和 C_{2-14} 烯基组成的组。在一些实施方案中，m是5、7或9。在一些实施方案中，Q是OH、 $-NHC(S)N(R)_2$ 或 $-NHC(O)N(R)_2$ 。在一些实施方案中，Q是 $-N(R)C(O)R$ 或 $-N(R)S(O)_2R$ 。

在一些实施方案中，式 (IL-I) 的化合物的亚组包括式 (IL-II) 的化合物：



或其N-氧化物或其盐或异构体,其中1选自1、2、3、4和5;M1是键或M';R₄是氢、未取代的C₁₋₃烷基或-(CH₂)_nQ,其中n是2、3或4,且Q是-OH、-NHC(S)N(R)₂、-NHC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)R₈、-NHC(=NR₉)N(R)₂、-NHC(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、杂芳基或杂环烷基;M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)-M''-C(O)O-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-P(O)(OR')O-、-S-S-、芳基和杂芳基;且R₂和R₃独立地选自由H、C₁₋₁₄烷基和C₂₋₁₄烯基组成的组。

在一些方面,本公开的可离子化的脂质可以是一种或多种式(IL-VI)的化合物:



n选自1、2、3、4、5、6、7、8、9和10；

r是0或1；

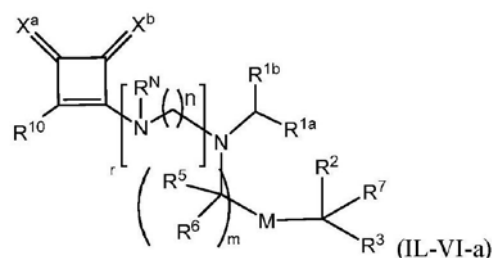
t^1 选自1、2、3、4和5；

p^1 选自1、2、3、4和5；

q^1 选自1、2、3、4和5；且

s^1 选自1、2、3、4和5。

在一些实施方案中，式 (IL-VI) 的化合物的亚组包括式 (IL-VI-a) 的化合物：

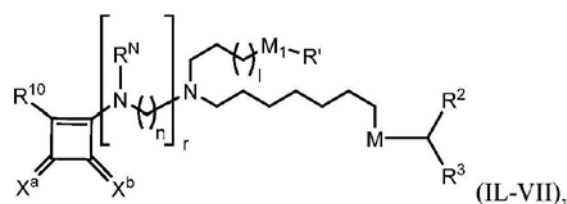


或其N-氧化物或其盐或异构体，其中

R^{1a} 和 R^{1b} 独立地选自由 C_{1-14} 烷基和 C_{2-14} 烯基组成的组；且

R^2 和 R^3 独立地选自由 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR^*$ 、 $-YR^*$ 和 $-R^*OR^*$ 组成的组，或者 R^2 和 R^3 与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环。

在另一实施方案中，式 (IL-VI) 的化合物的亚组包括式 (IL-VII) 的化合物：



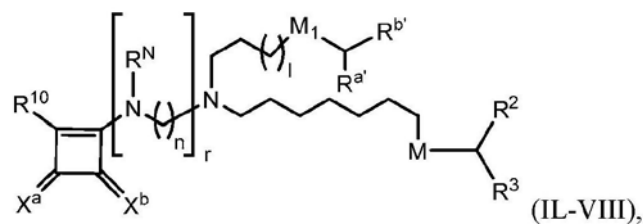
或其N-氧化物或其盐或异构体，其中

l选自1、2、3、4和5；

M_1 是键或 M' ；且

R^2 和 R^3 独立地选自由H、 C_{1-14} 烷基和 C_{2-14} 烯基组成的组。

在另一实施方案中，式 (IL-VI) 的化合物的亚组包括式 (IL-VIII) 的化合物：



或其N-氧化物或其盐或异构体，其中

l选自1、2、3、4和5；

M_1 是键或 M' ；且

$R^{a'}$ 和 $R^{b'}$ 独立地选自由 C_{1-14} 烷基和 C_{2-14} 烯基组成的组；且

R^2 和 R^3 独立地选自由 C_{1-14} 烷基和 C_{2-14} 烯基组成的组。

当适用时，式 (IL-I)、(IL-IA)、(IL-VI)、(IL-VI-a)、(IL-VII) 或 (IL-VIII) 中任一者的化合物包括以下特征中的一者或多者。

在一些实施方案中, M_1 是 M' 。

在一些实施方案中, M 和 M' 独立地为 $-C(O)O-$ 或 $-OC(O)-$ 。

在一些实施方案中, M 和 M' 中的至少一者是 $-C(O)O-$ 或 $-OC(O)-$ 。

在某些实施方案中, M 和 M' 中的至少一者是 $-OC(O)-$ 。

在某些实施方案中, M 是 $-OC(O)-$, 且 M' 是 $-C(O)O-$ 。在一些实施方案中, M 是 $-C(O)O-$, 且 M' 是 $-OC(O)-$ 。在某些实施方案中, M 和 M' 各自是 $-OC(O)-$ 。在一些实施方案中, M 和 M' 各自是 $-C(O)O-$ 。

在某些实施方案中, M 和 M' 中的至少一者是 $-OC(O)-M''-C(O)O-$ 。

在一些实施方案中, M 和 M' 独立地为 $-S-S-$ 。

在一些实施方案中, M 和 M' 中的至少一者是 $-S-S-$ 。

在一些实施方案中, M 和 M' 中的一者是 $-C(O)O-$ 或 $-OC(O)-$, 且另一者是 $-S-S-$ 。例如, M 是 $-C(O)O-$ 或 $-OC(O)-$, 且 M' 是 $-S-S-$, 或者 M' 是 $-C(O)O-$ 或 $-OC(O)-$, 且 M 是 $-S-S-$ 。

在一些实施方案中, M 和 M' 中的一者是 $-OC(O)-M''-C(O)O-$, 其中 M'' 是键、 C_{1-13} 烷基或 C_{2-13} 烯基。在其它实施方案中, M'' 是 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烯基。在某些实施方案中, M'' 是 C_{1-4} 烷基或 C_{2-4} 烯基。例如, 在一些实施方案中, M'' 是 C_1 烷基。例如, 在一些实施方案中, M'' 是 C_2 烷基。例如, 在一些实施方案中, M'' 是 C_3 烷基。例如, 在一些实施方案中, M'' 是 C_4 烷基。例如, 在一些实施方案中, M'' 是 C_2 烯基。例如, 在一些实施方案中, M'' 是 C_3 烯基。例如, 在一些实施方案中, M'' 是 C_4 烯基。

在一些实施方案中, l 是 1、3 或 5。

在一些实施方案中, R^4 是氢。

在一些实施方案中, R^4 不是氢。

在一些实施方案中, R^4 是未取代的甲基或 $-(CH_2)_nQ$, 其中 Q 是 OH 、 $-NHC(S)N(R)_2$ 、 $-NHC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 或 $-N(R)S(O)_2R$ 。

在一些实施方案中, Q 是 OH 。

在一些实施方案中, Q 是 $-NHC(S)N(R)_2$ 。

在一些实施方案中, Q 是 $-NHC(O)N(R)_2$ 。

在一些实施方案中, Q 是 $-N(R)C(O)R$ 。

在一些实施方案中, Q 是 $-N(R)S(O)_2R$ 。

在一些实施方案中, Q 是 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 。

在一些实施方案中, Q 是 $-O(CH_2)_nOR$ 。

在一些实施方案中, Q 是 $-N(R)R^8$ 。

在一些实施方案中, Q 是 $-NHC(=NR^9)N(R)_2$ 。

在一些实施方案中, Q 是 $-NHC(=CHR^9)N(R)_2$ 。

在一些实施方案中, Q 是 $-OC(O)N(R)_2$ 。

在一些实施方案中, Q 是 $-N(R)C(O)OR$ 。

在一些实施方案中, n 是 2。

在一些实施方案中, n 是 3。

在一些实施方案中, n 是 4。

在一些实施方案中, M_1 不存在。

在一些实施方案中,至少一个 R^5 是羟基。例如,一个 R^5 是羟基。

在一些实施方案中,至少一个 R^6 是羟基。例如,一个 R^6 是羟基。

在一些实施方案中, R^5 和 R^6 中的一者是羟基。例如,一个 R^5 是羟基,且每个 R^6 是氢。例如,一个 R^6 是羟基,且每个 R^5 是氢。

在一些实施方案中, R^x 是 C_{1-6} 烷基。在一些实施方案中, R^x 是 C_{1-3} 烷基。例如, R^x 是甲基。例如, R^x 是乙基。例如, R^x 是丙基。

在一些实施方案中, R^x 是 $-(CH_2)_vOH$,且 v 是1、2或3。例如, R^x 是甲酰基。例如, R^x 是乙酰基。例如, R^x 是丙酰基。

在一些实施方案中, R^x 是 $-(CH_2)_vN(R)_2$, v 是1、2或3,且每个 R 是H或甲基。例如, R^x 是甲氨基、甲基甲氨基或二甲基甲氨基。例如, R^x 是氨基甲烷基、甲基氨基甲烷基或二甲基氨基甲烷基。例如, R^x 是氨基乙烷基、甲基氨基乙烷基或二甲基氨基乙烷基。例如, R^x 是氨基丙烷基、甲基氨基丙烷基或二甲基氨基丙烷基。

在一些实施方案中, R' 是 C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 或 $-YR''$ 。

在一些实施方案中, R^2 和 R^3 独立地为 C_{3-14} 烷基或 C_{3-14} 烯基。

在一些实施方案中, R^{1b} 是 C_{1-14} 烷基。在一些实施方案中, R^{1b} 是 C_{2-14} 烷基。在一些实施方案中, R^{1b} 是 C_{3-14} 烷基。在一些实施方案中, R^{1b} 是 C_{1-8} 烷基。在一些实施方案中, R^{1b} 是 C_{1-5} 烷基。在一些实施方案中, R^{1b} 是 C_{1-3} 烷基。在一些实施方案中, R^{1b} 选自 C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_3 烷基、 C_4 烷基和 C_5 烷基。例如,在一些实施方案中, R^{1b} 是 C_1 烷基。例如,在一些实施方案中, R^{1b} 是 C_2 烷基。例如,在一些实施方案中, R^{1b} 是 C_3 烷基。例如,在一些实施方案中, R^{1b} 是 C_4 烷基。例如,在一些实施方案中, R^{1b} 是 C_5 烷基。

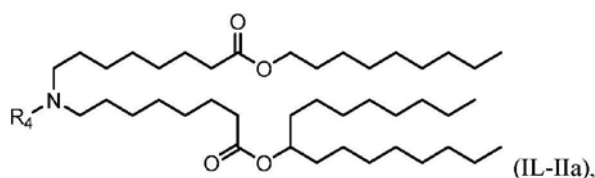
在一些实施方案中, R^1 与 $-(CHR^5R^6)_m-M-CR^2R^3R^7$ 不同。

在一些实施方案中, $-CHR^{1a}R^{1b}-$ 与 $-(CHR^5R^6)_m-M-CR^2R^3R^7$ 不同。

在一些实施方案中, R^7 是H。在一些实施方案中, R^7 选自 C_{1-3} 烷基。例如,在一些实施方案中, R^7 是 C_1 烷基。例如,在一些实施方案中, R^7 是 C_2 烷基。例如,在一些实施方案中, R^7 是 C_3 烷基。在一些实施方案中, R^7 选自 C_4 烷基、 C_4 烯基、 C_5 烷基、 C_5 烯基、 C_6 烷基、 C_6 烯基、 C_7 烷基、 C_7 烯基、 C_9 烷基、 C_9 烯基、 C_{11} 烷基、 C_{11} 烯基、 C_{17} 烷基、 C_{17} 烯基、 C_{18} 烷基和 C_{18} 烯基。

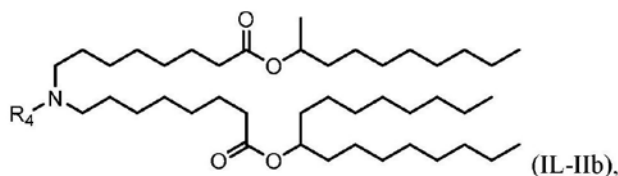
在一些实施方案中, $R^{b'}$ 是 C_{1-14} 烷基。在一些实施方案中, $R^{b'}$ 是 C_{2-14} 烷基。在一些实施方案中, $R^{b'}$ 是 C_{3-14} 烷基。在一些实施方案中, $R^{b'}$ 是 C_{1-8} 烷基。在一些实施方案中, $R^{b'}$ 是 C_{1-5} 烷基。在一些实施方案中, $R^{b'}$ 是 C_{1-3} 烷基。在一些实施方案中, $R^{b'}$ 选自 C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_3 烷基、 C_4 烷基和 C_5 烷基。例如,在一些实施方案中, $R^{b'}$ 是 C_1 烷基。例如,在一些实施方案中, $R^{b'}$ 是 C_2 烷基。例如,一些实施方案, $R^{b'}$ 是 C_3 烷基。例如一些实施方案, $R^{b'}$ 是 C_4 烷基。

在一些实施方案中,式(IL-I)的化合物具有式(IL-IIa):



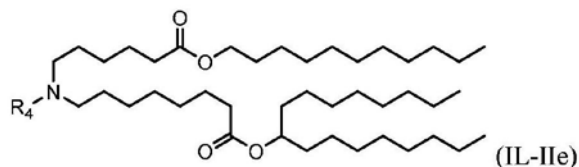
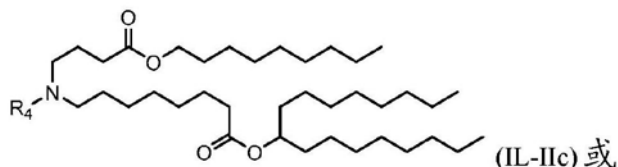
或它们的N-氧化物或其盐或异构体,其中 R_4 如本文所述。

在另一实施方案中,式(IL-I)的化合物具有式(IL-IIb):



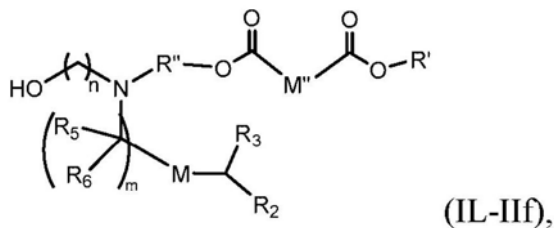
或它们的N-氧化物或其盐或异构体,其中 R_4 如本文所述。

在另一实施方案中,式 (IL-I) 的化合物具有式 (IL-IIc) 或 (IL-IIe) :



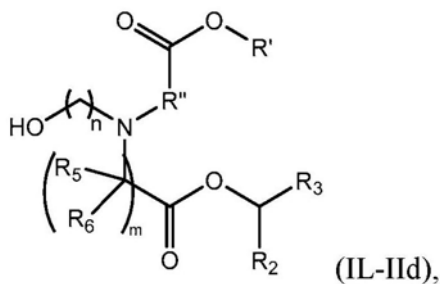
或它们的N-氧化物或其盐或异构体,其中 R_4 如本文所述。

在另一实施方案中,式 (IL-I) 的化合物具有式 (IL-IIf) :



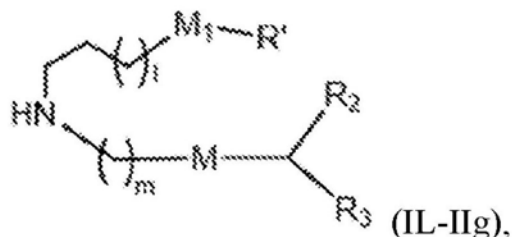
或它们的N-氧化物或其盐或异构体,其中M是-C(O)O-或-OC(O)-,M'是 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烯基, R_2 和 R_3 独立地选自 C_{5-14} 烷基和 C_{5-14} 烯基组成的组,且n选自2、3和4。

在进一步的实施方案中,式 (IL-I) 的化合物具有式 (IL-IIId) :



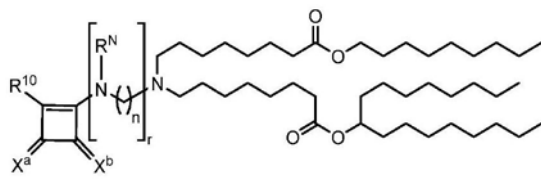
或它们的N-氧化物或其盐或异构体,其中n是2、3或4;且m、R'、R''和 R_2 至 R_6 如本文所述。在一些实施方案中, R_2 和 R_3 中的每一者可独立地选自 C_{5-14} 烷基和 C_{5-14} 烯基组成的组。

在进一步的实施方案中,式 (IL-I) 的化合物具有式 (IL-IIg) :



或它们的N-氧化物或其盐或异构体,其中1选自1、2、3、4和5;m选自5、6、7、8和9; M_1 是键或 M' ;M和 M' 独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)- M'' -C(O)O-、-C(O)N(R')-、-P(O)(OR')O-、-S-S-、芳基和杂芳基;且 R_2 和 R_3 独立地选自自由H、 C_{1-14} 烷基和 C_{2-14} 烯基组成的组。在一些实施方案中, M'' 是 C_{1-6} 烷基(例如, C_{1-4} 烷基)或 C_{2-6} 烯基(例如, C_{2-4} 烯基)。在一些实施方案中, R_2 和 R_3 独立地选自自由 C_{5-14} 烷基和 C_{5-14} 烯基组成的组。

在另一实施方案中,式(IL-VI)的化合物的亚组包括式(IL-VIIa)的化合物:

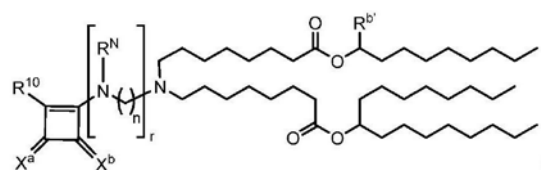


或其N-氧化物或其盐或异构

(IL-VIIa)

体。

在另一实施方案中,式(VI)的化合物的亚组包括式(IL-VIIIa)的化合物:

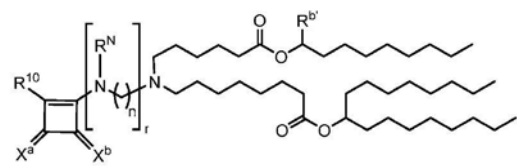


或其N-氧化物或其盐或异构

(IL-VIIIa)

体。

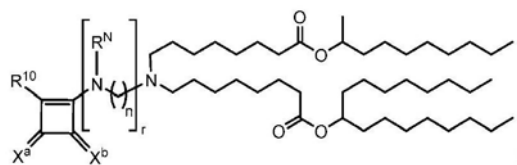
在另一实施方案中,式(IL-VI)的化合物的亚组包括式(IL-VIIIb)的化合物:



或其N-氧化物或其盐或异构体。

(IL-VIIIb)

在另一实施方案中,式(IL-VI)的化合物的亚组包括式(IL-VIIb-1)的化合物:

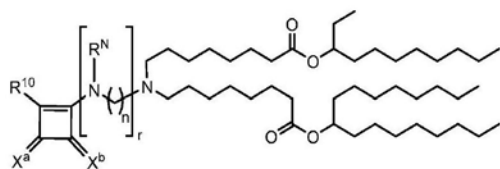


或其N-氧化物或其盐或异构

(IL-VIIb-1)

体。

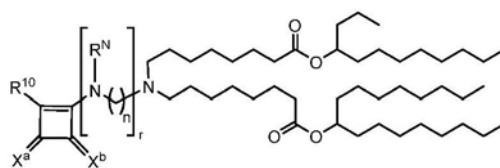
在另一实施方案中,式(IL-VI)的化合物的亚组包括式(IL-VIIb-2)的化合物:



或其N-氧化物或其盐或异构体。

(IL-VIIb-2)

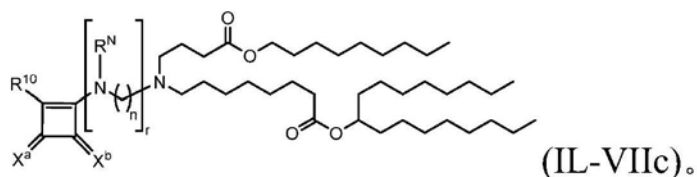
在另一实施方案中,式(IL-VI)的化合物的亚组包括式(IL-VIIb-3)的化合物:



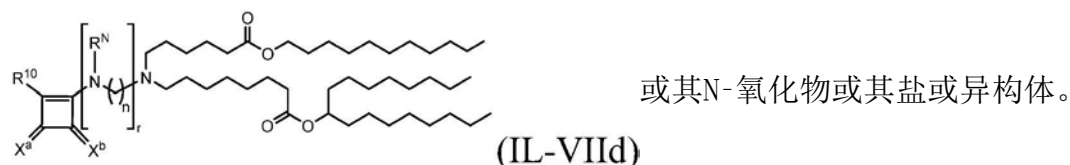
或其N-氧化物或其盐或异构体。

(IL-VIIb-3)

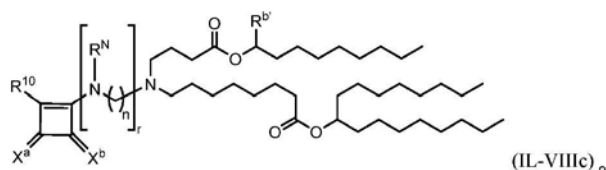
在另一实施方案中,式(IL-VI)的化合物的亚组包括式(IL-VIIc)的化合物:



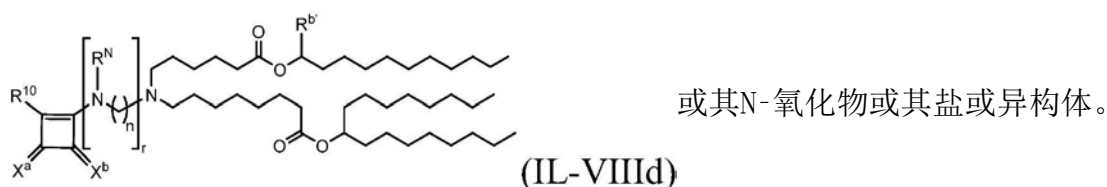
在另一实施方案中,式(IL-VI)的化合物的亚组包括式(IL-VIIId)的化合物:



在另一实施方案中,式(IL-VI)的化合物的亚组包括式(IL-VIIIc)的化合物:



在另一实施方案中,式(IL-VI)的化合物的亚组包括式(IL-VIIIId)的化合物:

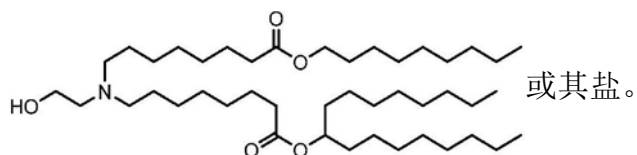


当适用时,式(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-II)、(IL-IIa)、(IL-IIb)、(IL-IIc)、(IL-IIId)、(IL-IIe)、(IL-IIIf)、(IL-IIIf)、(IL-IIIf)、(IL-IIIf)、(IL-IIIf)、(IL-III)、(IL-VI)、(IL-VI-a)、(IL-VII)、(IL-VIII)、(IL-VIIa)、(IL-VIIIa)、(IL-VIIIb)、(IL-VIIb-1)、(IL-VIIb-2)、(IL-VIIb-3)、(IL-VIIc)、(IL-VIIId)、(IL-VIIIc)或(IL-VIIIId)中的任一者的化合物包括以下特征中的一者或多者。

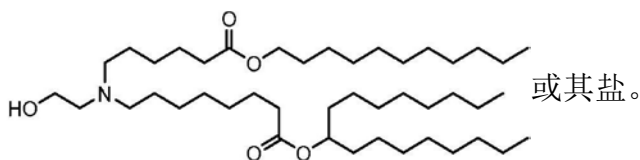
在一些实施方案中,可离子化的脂质是62/220,091、62/252,316、62/253,433、62/266,460、62/333,557、62/382,740、62/393,940、62/471,937、62/471,949、62/475,140和62/475,166号美国申请以及PCT/U S2016/052352号PCT申请中描述的化合物中的一者或多者。

在一些实施方案中,可离子化的脂质选自62/475,166号美国申请中描述的化合物1-280。

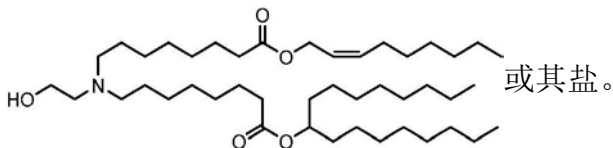
在一些实施方案中,可离子化的脂质是



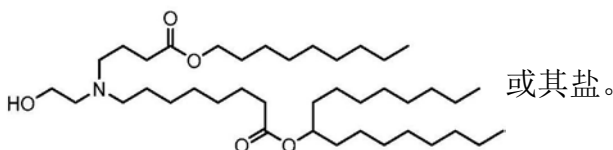
在一些实施方案中,可离子化的脂质是



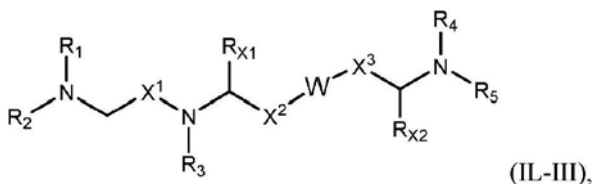
在一些实施方案中,可离子化的脂质是



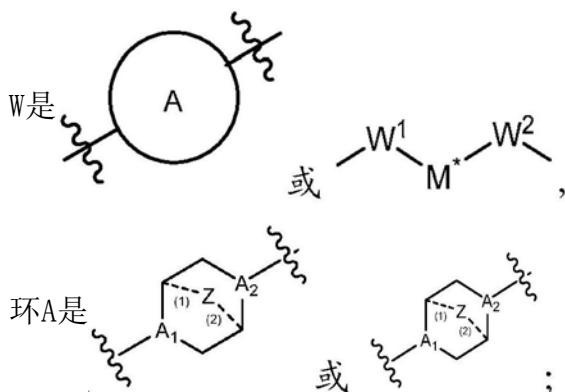
在一些实施方案中,可离子化的脂质是



在一些方面,本公开的可离子化的脂质可以是一种或多种式 (IL-III) 的化合物:



或其盐或异构体,其中,



t是1或2;

A_1 和 A_2 各自独立地选自CH或N;

Z是 CH_2 或不存在,其中当Z是 CH_2 时,虚线(1)和(2)各自代表单键;且当Z不存在时,虚线(1)和(2)都不存在;

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 独立地选自由 C_{5-20} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R''MR'$ 、 $-R''YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''OR''$ 组成的组;

R_{X1} 和 R_{X2} 各自独立地为H或 C_{1-3} 烷基;

每个M独立地选自由 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-SC(O)-$ 、芳基和杂芳基组成的组;

M^* 是 C_1-C_6 烷基,

W^1 和 W^2 各自独立地选自由-O-和-N(R_6)-组成的组；

每个 R_6 独立地选自由H和 C_{1-5} 烷基组成的组；

X^1 、 X^2 和 X^3 独立地选自由键、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-CHR-$ 、 $-CHY-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-(CH_2)_n-C(O)-$ 、 $-C(O)-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-OC(O)-$ 、 $-C(O)O-(CH_2)_n-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-C(S)-$ 和 $-CH(SH)-$ 组成的组；

每个Y独立地为 C_{3-6} 碳环；

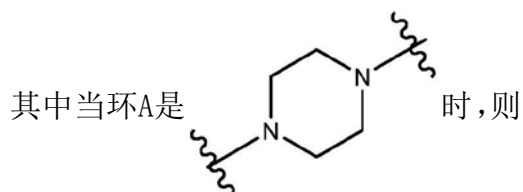
每个 R^* 独立地选自由 C_{1-12} 烷基和 C_{2-12} 烯基组成的组；

每个R独立地选自由 C_{1-3} 烷基和 C_{3-6} 碳环组成的组；

每个 R' 独立地选自由 C_{1-12} 烷基、 C_{2-12} 烯基和H组成的组；

每个 R'' 独立地选自由 C_{3-12} 烷基、 C_{3-12} 烯基和 $-R^*MR'$ 组成的组；且

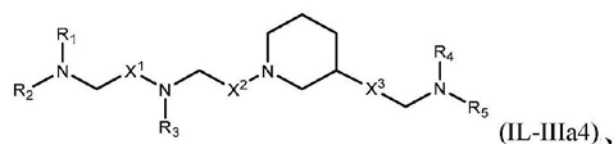
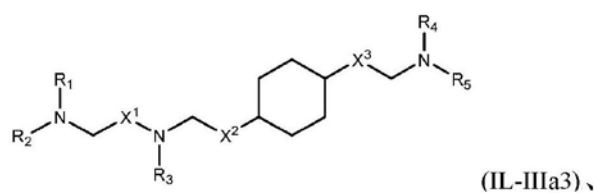
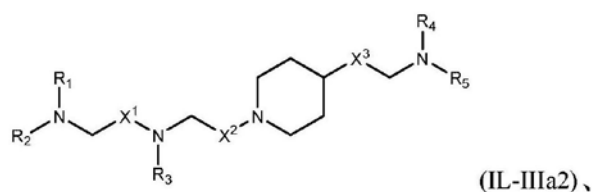
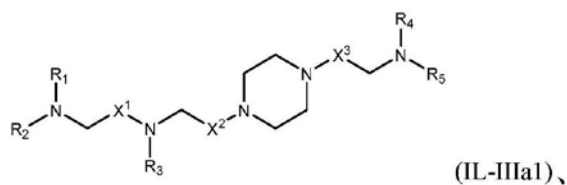
n是1-6的整数；

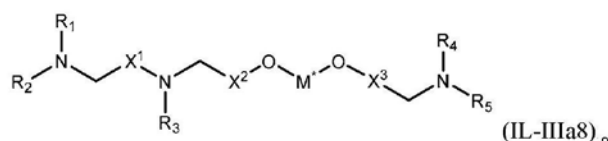
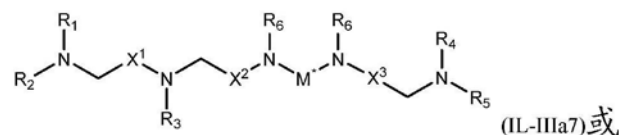
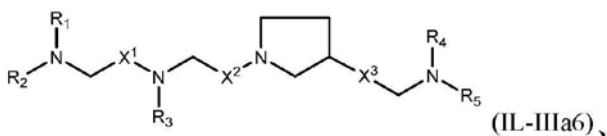
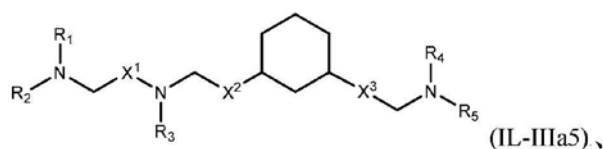


i) X^1 、 X^2 和 X^3 中的至少一者不是 $-CH_2-$ ；和/或

ii) R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 中的至少一者是 $-R''MR'$ 。

在一些实施方案中，化合物具有式(IL-IIIa1) - (IL-IIIa8) 中的任一者：



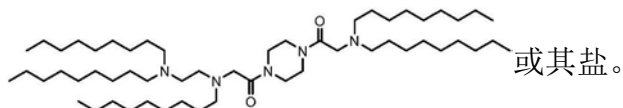


在一些实施方案中,可离子化的脂质是62/271,146、62/338,474、62/413,345和62/519,826号美国申请、PCT/US2019/052009号PCT申请以及W02017/112865、W02017/049245和W02018/170306号国际公布中描述的化合物中的一者或多者。

在一些实施方案中,可离子化的脂质选自62/519,826号美国申请中描述的化合物1-156。

在一些实施方案中,可离子化的脂质选自62/519,826号美国申请中描述的化合物1-16、42-66、68-76和78-156。

在一些实施方案中,可离子化的脂质是



根据式(IL-1)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-II)、(IL-IIa)、(IL-IIb)、(IL-IIc)、(IL-IId)、(IL-IIe)、(IL-IIf)、(IL-IIg)、(IL-III)、(IL-IIIa1)、(IL-IIIa2)、(IL-IIIa3)、(IL-IIIa4)、(IL-IIIa5)、(IL-IIIa6)、(IL-IIIa7)或(IL-IIIa8)的脂质的中心胺部分可以在生理pH下被质子化。因此,脂质在生理pH下可具有正电荷或部分正电荷。这类脂质可以被称为阳离子或可离子化的(氨基)脂质。脂质也可以是两性离子的,即具有正电荷和负电荷两者的中性分子。

在一些实施方案中,可离子化的脂质选自由以下组成的组:3-(二-十二烷基氨基)-N1,N1,4-三-十二烷基-1-哌嗪乙胺(KL10)、N1-[2-(二-十二烷基氨基)乙基]-N1,N4,N4-三-十二烷基-1,4-哌嗪二乙胺(KL22)、14,25-二-十三烷基-15,18,21,24-四氮杂-三十八烷(KL25)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLin-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)、4-(二甲基氨基)丁酸三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(DLin-MC3-DMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、1,2-二油酰氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DODMA)、2-({8-[(3β)-胆甾-5-

烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA)、(2R)-2-({8-[(3 β)-胆甾-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA (2R)) 和 (2S)-2-({8-[(3 β)-胆甾-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA (2S))。

聚乙二醇(PEG)脂质

如本文所用,术语“PEG脂质”是指聚乙二醇(PEG)修饰的脂质。PEG脂质的非限制性实例包括PEG修饰的磷脂酰乙醇胺和磷脂酸、PEG-神经酰胺缀合物(例如,PEG-CerC14或PEG-CerC20)、PEG修饰的二烷基胺和PEG修饰的1,2-二酰氧基丙-3-胺。这类脂质也被称为PEG化脂质。在一些实施方案中,PEG脂质可以是PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC或PEG-DSPE脂质。

在一些实施方案中,PEG脂质包括但不限于1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(PEG-DMG)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](PEG-DSPE)、PEG-二硬脂酰基甘油(PEG-DSG)、PEG-二棕榈油基、PEG-二油酰基、PEG-二硬脂酰基、PEG-二酰基甘氨酸酰胺(PEG-DAG)、PEG-二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(PEG-DPPE)或PEG-1,2-二肉豆蔻酰基丙-3-胺(PEG-c-DMA)。

在一些实施方案中,PEG脂质选自自由PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油、PEG修饰的二烷基甘油及其混合物组成的组。

在一些实施方案中,PEG脂质的脂质部分包括长度为约C₁₄至约C₂₂、例如长度为约C₁₄至约C₁₆的部分。在一些实施方案中,PEG部分(例如mPEG-NH₂)的大小为约1000、2000、5000、10,000、15,000或20,000道尔顿。在一些实施方案中,PEG脂质是PEG_{2k}-DMG。

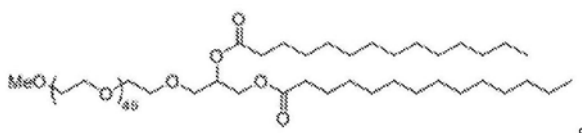
在一些实施方案中,本文所述的脂质纳米颗粒可包含为非扩散PEG的PEG脂质。非扩散PEG的非限制性实例包括PEG-DSG和PEG-DSPE。

PEG脂质是本领域中已知的,如8158601号美国专利和WO 2015/130584 A2号国际公布中描述的那些,上述的全部内容以引用的方式并入本文。

一般来说,可以如2016年12月10日提交的标题为“Compositions and Methods for Delivery of Therapeutic Agents”的PCT/US2016/000129号国际专利申请中所述来合成本文所述的各种化学式的一些其它脂质组分(例如,PEG脂质),该申请以全文引用的方式并入。

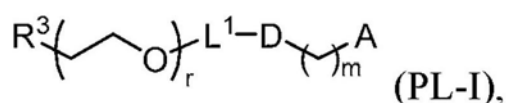
脂质纳米颗粒或脂质纳米颗粒制剂的脂质组分可包括一种或多种包含聚乙二醇的分子,如PEG或PEG修饰的脂质。这类物质或者可以被称为PEG化脂质。PEG脂质是用聚乙二醇修饰的脂质。PEG脂质可选自包括PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油、PEG修饰的二烷基甘油及其混合物的非限制性组。在一些实施方案中,PEG脂质可以是PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC或PEG-DSPE脂质。

在一些实施方案中,PEG修饰的脂质是PEGDMG的修饰形式。PEG-DMG具有以下结构:



在一些实施方案中,可用于本发明的PEG脂质可以是W02012099755号国际公布中描述的PEG化脂质,该公布的内容以全文引用的方式并入本文。本文所述的这些示例性PEG脂质中的任一者可以被修饰以在PEG链上包含羟基。在一些实施方案中,PEG脂质是PEG-OH脂质。如本文一般所定义,“PEG-OH脂质”(本文也称为“羟基-PEG化脂质”)是在脂质上具有一个或多个羟基(-OH)基团的PEG化脂质。在一些实施方案中,PEG-OH脂质在PEG链上包括一个或多个羟基。在一些实施方案中,PEG-OH或羟基-PEG化脂质在PEG链的末端包含-OH基团。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

在一些实施方案中,可用于本发明的PEG脂质是式(PL-I)的化合物。本文提供了式(PL-I)的化合物:



或其盐,其中:

R^3 是 $-\text{OR}^0$;

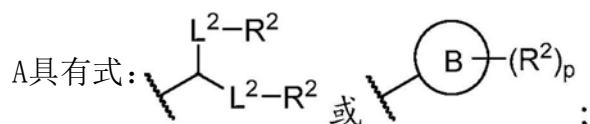
R^0 是氢、任选取代的烷基或氧保护基团;

r 是1与100之间的整数,包括1和100;

L^1 是任选取代的 C_{1-10} 亚烷基,其中任选取代的 C_{1-10} 亚烷基的至少一个亚甲基独立地被任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、 O 、 $\text{N}(\text{R}^N)$ 、 S 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{O}$ 或 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 替代;

D 是通过点击化学获得的部分或在生理条件下可裂解的部分;

m 是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;



L^2 的每个实例独立地为键或任选取代的 C_{1-6} 亚烷基,其中任选取代的 C_{1-6} 亚烷基的一个亚甲基单元任选被 O 、 $\text{N}(\text{R}^N)$ 、 S 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{O}$ 或 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 替代;

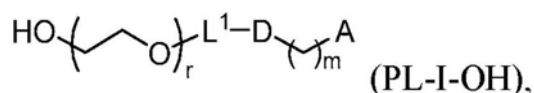
R^2 的每个实例独立地为任选取代的 C_{1-30} 烷基、任选取代的 C_{1-30} 烯基或任选取代的 C_{1-30} 炔基;任选其中 R^2 的一个或多个亚甲基单元独立地被任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、 $\text{N}(\text{R}^N)$ 、 O 、 S 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{S}$ 、 $\text{SC}(\text{O})$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^N)$ 、 $\text{C}(=\text{NR}^N)\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(=\text{NR}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(=\text{NR}^N)\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{C}(\text{S})$ 、 $\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{S})$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{S}(\text{O})$ 、 $\text{OS}(\text{O})$ 、 $\text{S}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OS}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OS}(\text{O})_2$ 、 $\text{S}(\text{O})_2\text{O}$ 、 $\text{OS}(\text{O})_2\text{O}$ 、 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{OS}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{OS}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)$ 或 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})_2\text{O}$ 替代;

R^N 的每个实例独立地为氢、任选取代的烷基或氮保护基团；

环B是任选取代的碳环基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基；且

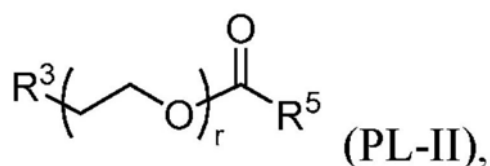
p是1或2。

在一些实施方案中，式 (PL-I) 的化合物是PEG-OH脂质 (即， R^3 是 $-OR^0$ ，且 R^0 是氢)。在一些实施方案中，式 (PL-I) 的化合物具有式 (PL-I-OH)：



或其盐。

在一些实施方案中，可用于本发明的PEG脂质是PEG化脂肪酸。在一些实施方案中，可用于本发明的PEG脂质是式 (PL-II) 的化合物。本文提供了式 (PL-II) 的化合物：



或其盐，其中：

R^3 是 $-OR^0$ ；

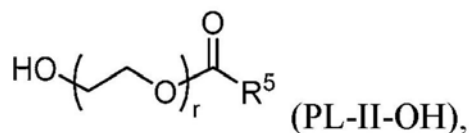
R^0 是氢、任选取代的烷基或氧保护基团；

r是1与100之间的整数，包括1和100；

R^5 是任选取代的 C_{10-40} 烷基、任选取代的 C_{10-40} 烯基或任选取代的 C_{10-40} 炔基；且任选 R^5 的一个或多个亚甲基被任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、 $N(R^N)$ 、O、S、C(O)、 $-C(O)N(R^N)$ 、 $NR^NC(O)$ 、 $NR^NC(O)N(R^N)$ 、C(O)O、OC(O)、OC(O)O、OC(O)N(R^N)、 $-NR^NC(O)O$ 、C(O)S、SC(O)、C(=NR^N)、C(=NR^N)N(R^N)、 $NR^NC(=NR^N)$ 、 $NR^NC(=NR^N)N(R^N)$ 、C(S)、C(S)N(R^N)、 $NR^NC(S)$ 、 $NR^NC(S)N(R^N)$ 、S(O)、OS(O)、S(O)O、OS(O)O、OS(O)₂、 $-S(O)_2O$ 、OS(O)₂O、N(R^N)S(O)、S(O)N(R^N)、N(R^N)S(O)N(R^N)、OS(O)N(R^N)、N(R^N)S(O)O、S(O)₂、N(R^N)S(O)₂、S(O)₂N(R^N)、N(R^N)S(O)₂N(R^N)、OS(O)₂N(R^N)或N(R^N)S(O)₂O替代；且

R^N 的每个实例独立地为氢、任选取代的烷基或氮保护基团。

在一些实施方案中，式 (PL-II) 的化合物具有式 (PL-II-OH)：



或其盐，其中：

r是1与100之间的整数；

R^5 是任选取代的 C_{10-40} 烷基、任选取代的 C_{10-40} 烯基或任选取代的 C_{10-40} 炔基；且任选 R^5 的一个或多个亚甲基被任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、 $N(R^N)$ 、O、S、C(O)、 $-C(O)N(R^N)$ 、 $NR^NC(O)$ 、 $NR^NC(O)N(R^N)$ 、C(O)O、OC(O)、OC(O)O、OC(O)N(R^N)、 $-NR^NC(O)O$ 、C(O)S、SC(O)、C(=NR^N)、C(=NR^N)N(R^N)、 $NR^NC(=NR^N)$ 、 $NR^NC(=NR^N)N(R^N)$ 、C(S)、C(S)N(R^N)、 $NR^NC(S)$ 、 $NR^NC(S)N(R^N)$ 、S(O)、OS(O)、S(O)O、OS(O)O、OS(O)₂、 $-S(O)_2O$ 、OS(O)₂O、N(R^N)S(O)、S(O)N(R^N)、N(R^N)S(O)N(R^N)、OS(O)N(R^N)、N(R^N)S(O)O、S

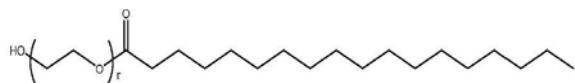
(O)₂、N(R^N)S(O)₂、S(O)₂N(R^N)、N(R^N)S(O)₂N(R^N)、OS(O)₂N(R^N)或N(R^N)S(O)₂O替代；且R^N的每个实例独立地为氢、任选取代的烷基或氮保护基团。

在一些实施方案中，r是10至80之间、20至70之间、30至60之间或40至50之间的整数。

在一些实施方案中，r是45。

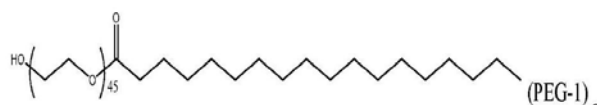
在一些实施方案中，R⁵是C₁₇烷基。

又在其它实施方案中，式(PL-II)的化合物是：



或其盐。

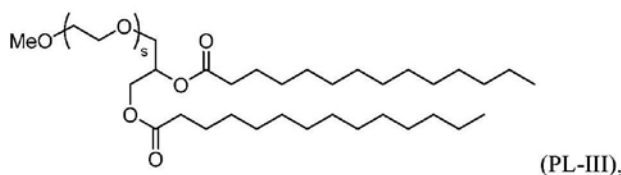
在一些实施方案中，式(PL-II)的化合物是



在一些方面，本文所述的药物组合物的脂质组成不包含PEG脂质。

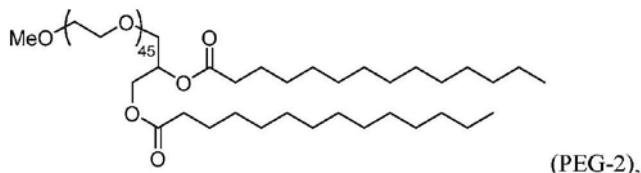
在一些实施方案中，PEG脂质可以是62/520,530号美国申请中描述的一种或多种PEG脂质。

在一些实施方案中，PEG脂质是式(PL-III)的化合物：



或其盐或异构体，其中s是1与100之间的整数。

在一些实施方案中，PEG脂质是下式的化合物：



或其盐或异构体。

结构脂质

如本文所用，术语“结构脂质”是指固醇，也指含有固醇部分的脂质。

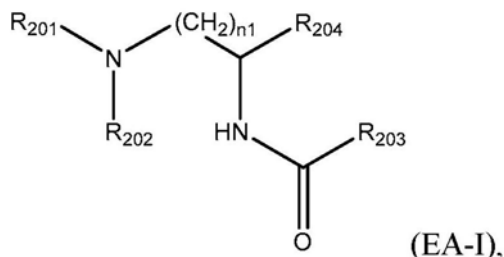
在脂质纳米颗粒中掺入结构脂质可有助于减轻颗粒中其它脂质的聚集。结构脂质可选自包括但不限于胆固醇、粪固醇(fecosterol)、谷固醇、麦角固醇、菜油固醇、豆固醇、菜籽固醇、番茄碱、番茄素、乌索酸、α-生育酚、藿烷、植物固醇、类固醇及其混合物的组。在一些实施方案中，结构脂质是各自独立地选自胆固醇、粪固醇、谷固醇、麦角固醇、菜油固醇、豆固醇、菜籽固醇、番茄碱、番茄素、乌索酸、α-生育酚、藿烷、植物固醇和类固醇的两种或更多种组分的混合物。在一些实施方案中，结构脂质是固醇。在一些实施方案中，结构脂质是两种或更多种固醇的混合物。如本文所定义，“固醇”是由类固醇组成的类固醇亚组。在一些实施方案中，结构脂质是类固醇。在一些实施方案中，结构脂质是胆固醇。在一些实施

方案中,结构脂质是胆固醇的类似物。在一些实施方案中,结构脂质是 α -生育酚。

在一些实施方案中,结构脂质可以是62/520,530号美国申请中描述的一种或多种结构脂质。

包封剂

在本公开的一些实施方案中,包封剂是式(EA-I)的化合物:



或其盐或异构体,其中

R_{201} 和 R_{202} 各自独立地选自由H、 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基和 $(C=NH)N(R_{101})_2$ 组成的组,其中每个 R_{101} 独立地选自由H、 C_1 - C_6 烷基和 C_2 - C_6 烯基组成的组;

R_{203} 选自由 C_1 - C_{20} 烷基和 C_2 - C_{20} 烯基组成的组;

R_{204} 选自由H、 C_1 - C_{20} 烷基、 C_2 - C_{20} 烯基、 $C(O)(OC_1-C_{20})$ 烷基、 $C(O)(OC_2-C_{20})$ 烯基、 $C(O)(NHC_1-C_{20})$ 烷基和 $C(O)(NHC_2-C_{20})$ 烯基组成的组;

n_1 选自1、2、3、4、5、6、7、8、9和10。

在一些实施方案中, R_{201} 和 R_{202} 各自独立地选自由H和 CH_3 组成的组。

在一些实施方案中, R_{201} 和 R_{202} 各自独立地选自由 $(C=NH)NH_2$ 和 $(C=NH)N(CH_3)_2$ 组成的组

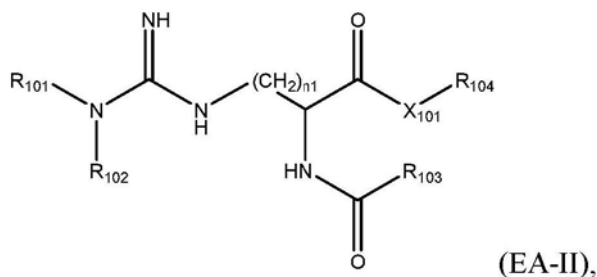
在一些实施方案中, R_{203} 选自由 C_1 - C_{20} 烷基、 C_8 - C_{18} 烷基和 C_{12} - C_{16} 烷基组成的组。

在一些实施方案中, R_{204} 选自由H、 C_1 - C_{20} 烷基、 C_2 - C_{20} 烯基、 $C(O)(OC_1-C_{20})$ 烷基、 $C(O)(OC_2-C_{20})$ 烯基、 $C(O)(NHC_1-C_{20})$ 烷基和 $C(O)(NHC_2-C_{20})$ 烯基; C_8 - C_{18} 烷基、 C_8 - C_{18} 烯基、 $C(O)(OC_8-C_{18})$ 烷基、 $C(O)(OC_8-C_{18})$ 烯基、 $C(O)(NHC_8-C_{18})$ 烷基和 $C(O)(NHC_8-C_{18})$ 烯基;以及 C_{12} - C_{16} 烷基、 C_{12} - C_{16} 烯基、 $C(O)(OC_{12}-C_{16})$ 烷基、 $C(O)(OC_{12}-C_{16})$ 烯基、 $C(O)(NHC_{12}-C_{16})$ 烷基和 $C(O)(NHC_{12}-C_{16})$ 烯基组成的组;

在一些实施方案中, n_1 选自1、2、3、4、5、6、7、8、9和10; n_1 选自1、2、3、4、5和6; n_1 选自2、3和4。

在一些实施方案中, n_1 是3。

在本公开的一些实施方案中,包封剂是式(EA-II)的化合物:



或其盐或异构体,其中

X_{101} 是键、NH或O;

R_{101} 和 R_{102} 各自独立地选自由H、 C_1 - C_6 烷基和 C_2 - C_6 烯基组成的组；
 R_{103} 和 R_{104} 各自独立地选自由 C_1 - C_{20} 烷基和 C_2 - C_{20} 烯基组成的组；且
 $n1$ 选自1、2、3、4、5、6、7、8、9和10。

在一些实施方案中， X_{101} 是键。

在一些实施方案中， X_{101} 是NH。

在一些实施方案中， X_{101} 是O。

在一些实施方案中，

R_{101} 和 R_{102} 各自独立地选自由H和 CH_3 组成的组。

在一些实施方案中， R_{103} 选自由 C_1 - C_{20} 烷基、 C_8 - C_{18} 烷基和 C_{12} - C_{16} 烷基组成的组。

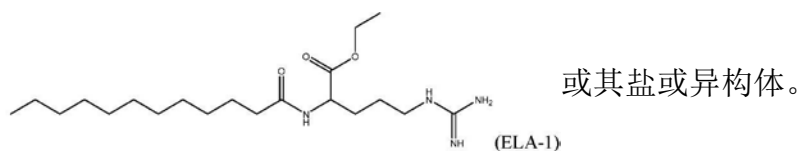
在一些实施方案中， R_{104} 选自由 C_1 - C_{20} 烷基、 C_8 - C_{18} 烷基和 C_{12} - C_{16} 烷基组成的组。

在一些实施方案中， $n1$ 选自1、2、3、4、5、6、7、8、9和10； $n1$ 选自1、2、3、4、5和6； $n1$ 选自2、3和4。

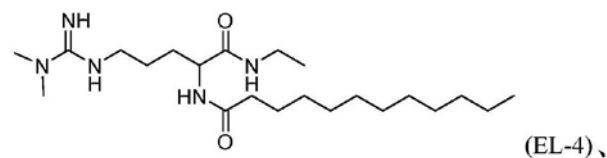
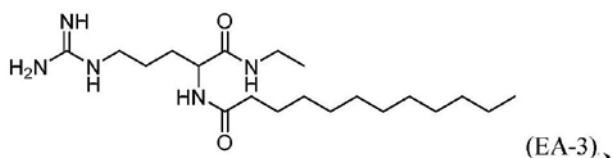
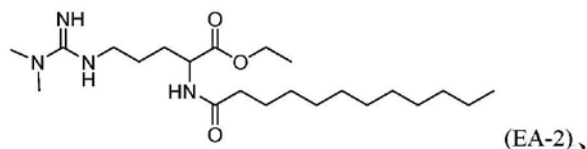
在一些实施方案中， $n1$ 是3。

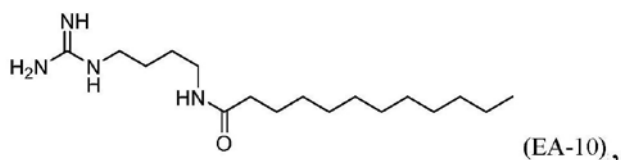
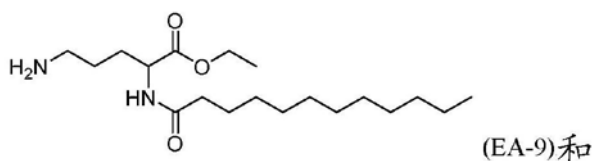
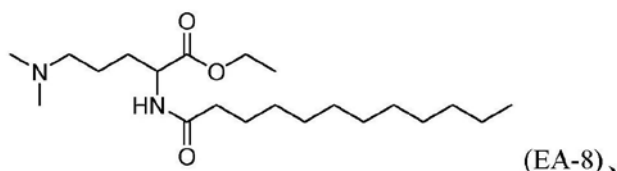
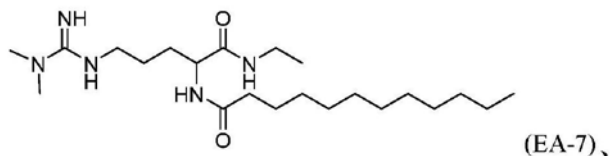
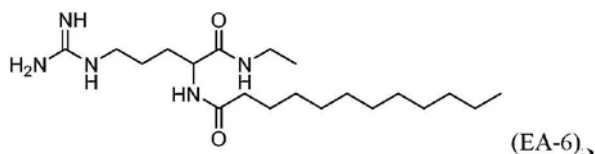
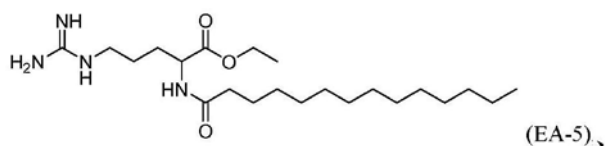
示例性包封剂包括但不限于月桂酰精氨酸乙酯、肉豆蔻酰精氨酸乙酯、棕榈酰精氨酸乙酯、胆固醇-精氨酸乙酯、油酸精氨酸乙酯、癸酸精氨酸乙酯和辛酸精氨酸乙酯。

在某些实施方案中，包封剂是月桂酰精氨酸乙酯，



在某些实施方案中，包封剂是选自由以下组成的组的至少一种化合物：





或其盐和异构体, 举例如游离碱、TFA盐和/或HCl盐。

磷脂

磷脂可组装成一个或多个脂质双层。一般来说, 磷脂包含磷脂部分和一个或多个脂肪酸部分。

磷脂部分可选自例如由磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、2-溶血磷脂酰胆碱和鞘磷脂组成的非限制性组。

脂肪酸部分可选自例如由月桂酸、肉豆蔻酸、肉豆蔻油酸、棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、 α -亚麻酸、芥酸、植烷酸、花生酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、山萘酸、二十二碳五烯酸和二十二碳六烯酸组成的非限制性组。

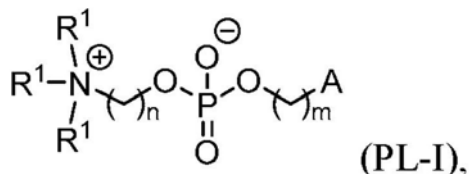
特定的磷脂可促进与膜的融合。在一些实施方案中, 阳离子磷脂可与膜(例如, 细胞膜或细胞内膜)的一种或多种带负电荷的磷脂相互作用。磷脂与膜的融合可允许含脂质的组合物(例如, LNP)的一种或多种元素(例如, 治疗剂)通过膜, 从而允许例如将一种或多种元素递送至靶组织。

也考虑了非天然磷脂物质, 包括具有修饰和取代(包括支化、氧化、环化和炔烃)的

天然物质。在一些实施方案中,磷脂可用一种或多种炔烃(例如,其中一个或多个双键被三键替代的烯基)官能化或交联。在适当的反应条件下,炔基团在暴露于叠氮化物时可经历铜催化的环加成。这类反应可用于使纳米颗粒组合物的脂质双层官能化,以促进膜渗透或细胞识别,或用于使纳米颗粒组合物与有用组分如靶向或成像部分(例如,染料)缀合。

磷脂包括但不限于甘油磷脂,如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油和磷脂酸。磷脂还包括鞘磷脂(phosphosphingolipid),如鞘磷脂(sphingomyelin)。

在一些实施方案中,可用于或可能用于本发明的磷脂是DSPC的类似物或变体。在一些实施方案中,可用于或可能用于本发明的磷脂是式(PL-I)的化合物:

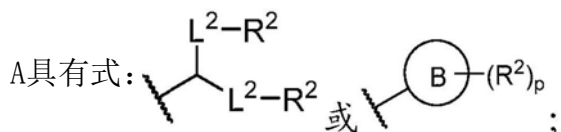


或其盐,其中:

每个 R^1 独立地为任选取代的烷基;或者任选两个 R^1 与居间原子连接在一起形成任选取代的单环碳环基或任选取代的单环杂环基;或者任选三个 R^1 与居间原子连接在一起形成任选取代的双环碳环基或任选取代的双环杂环基;

n 是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

m 是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;



L^2 的每个实例独立地为键或任选取代的 C_{1-6} 亚烷基,其中任选取代的 C_{1-6} 亚烷基的一个亚甲基单元任选被 $-\text{O}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 或 $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)-$ 替代;

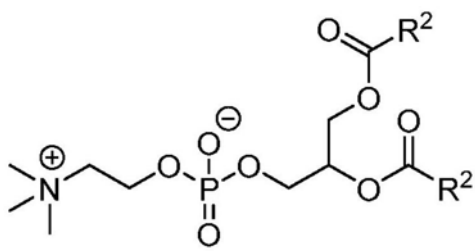
R^2 的每个实例独立地为任选取代的 C_{1-30} 烷基、任选取代的 C_{1-30} 烯基或任选取代的 C_{1-30} 炔基;任选其中 R^2 的一个或多个亚甲基单元独立地被任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、 $-\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$ 、 $-\text{SC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^N)-$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^N)\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(=\text{NR}^N)-$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(=\text{NR}^N)\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{C}(\text{S})-$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(\text{S})-$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{OS}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OS}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OS}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{O}-$ 、 $-\text{OS}(\text{O})_2\text{O}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{OS}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)-$ 、 $-\text{OS}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)-$ 或 $-\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})_2\text{O}-$ 替代;

R^N 的每个实例独立地为氢、任选取代的烷基或氮保护基团;

环B是任选取代的碳环基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基;且

p 是1或2;

条件是所述化合物不具有下式:



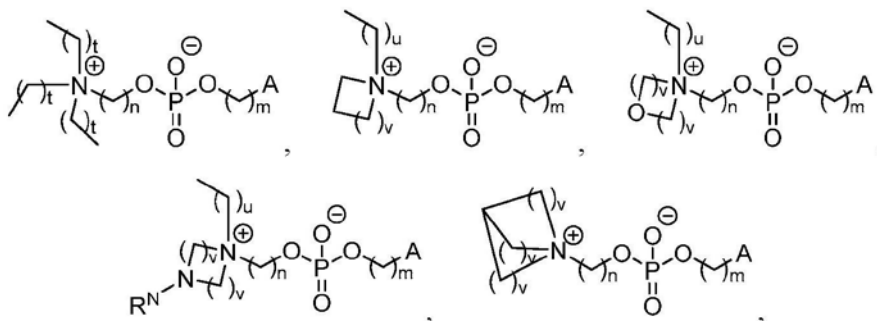
其中 R^2 的每个实例独立地为未取代的烷基、未取代的烯基或未取代的炔基。

在一些实施方案中,磷脂可以是62/520,530号美国申请中描述的一种或多种磷脂。

在一些实施方案中,磷脂可选自由1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二-十一烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DUPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二-0-十八烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0DietherPC)、1-油酰基-2-胆固醇半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(0ChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16LysoPC)、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二-二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME16.0PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二-二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-rac-(1-甘油)钠盐(DOPG)和鞘磷脂组成的非限制性组。在一些实施方案中,LNP包括DSPC。在一些实施方案中,LNP包括DOPE。LNP包括DSPC和DOPE两者。

i) 磷脂头修饰

在一些实施方案中,可用于或可能用于本发明的磷脂包含修饰的磷脂头(例如,修饰的胆碱基团)。在一些实施方案中,具有修饰头的磷脂是具有修饰的季胺的DSPC或其类似物。在一些实施方案中,在式(PL-I)的实施方案中, R^1 中的至少一者不是甲基。在一些实施方案中, R^1 中的至少一者不是氢或甲基。在一些实施方案中,式(PL-I)的化合物是下式中的一者:



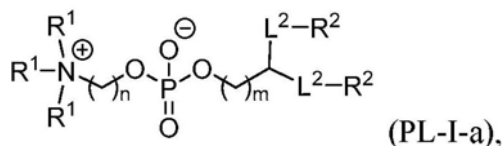
或其盐,其中:

每个 t 独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

每个 u 独立地为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;且

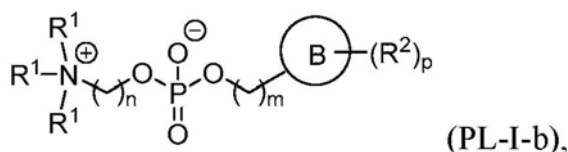
每个 v 独立地为1、2或3。

在一些实施方案中,式(PL-I)的化合物具有式(PL-I-a):



或其盐。

在一些实施方案中,可用于或可能用于本发明的磷脂包含环状部分代替甘油酯部分。在一些实施方案中,可用于本发明的磷脂是具有代替甘油酯部分的环状部分的DSPC或其类似物。在一些实施方案中,式(PL-I)的化合物具有式(PL-I-b):

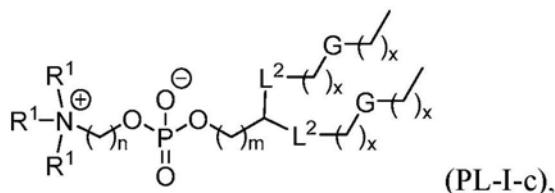


或其盐。

ii) 磷脂尾修饰

在一些实施方案中,可用于或可能用于本发明的磷脂包含修饰的尾。在一些实施方案中,可用于或可能用于本发明的磷脂是具有修饰的尾的DSPC或其类似物。如本文所述,“修饰的尾”可以是具有更短或更长的脂族链、引入了分支的脂族链、引入了取代基的脂族链、其中一个或多个亚甲基被环状或杂原子基团替代的脂族链或其任何组合的尾。在一些实施方案中,在一些实施方案中, (PL-I) 的化合物具有式 (PL-I-a), 或其盐, 其中 R^2 的至少一个实例为 R^2 的每个实例是任选取代的 C_{1-30} 烷基, 其中 R^2 的一个或多个亚甲基单元独立地被任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、-N(R^N)-、-O-、-S-、-C(O)-、-C(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)-、-NR^NC(O)N(R^N)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-OC(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)O-、-C(O)S-、-SC(O)-、-C(=NR^N)-、-C(=NR^N)N(R^N)-、-NR^NC(=NR^N)-、-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-、-C(S)-、-C(S)N(R^N)-、-NR^NC(S)-、-NR^NC(S)N(R^N)-、-S(O)-、-OS(O)-、-S(O)O-、-OS(O)O-、-OS(O)₂-、-S(O)₂O-、-OS(O)₂O-、-N(R^N)S(O)-、-S(O)N(R^N)-、-N(R^N)S(O)N(R^N)-、-OS(O)N(R^N)-、-N(R^N)S(O)O-、-S(O)₂-、-N(R^N)S(O)₂-、-S(O)₂N(R^N)-、-N(R^N)S(O)₂N(R^N)-、-OS(O)₂N(R^N)-或-N(R^N)S(O)₂O-替代。

在一些实施方案中,式 (PL-I) 的化合物具有式 (PL-I-c):



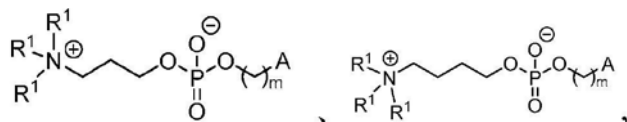
或其盐,其中:

每个x独立地为0-30之间的整数,包括0和30;且

G的每个实例独立地选自由以下组成的组:任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、-N(R^N)-、-O-、-S-、-C(O)-、-C(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)-、-NR^NC(O)N(R^N)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-OC(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)O-、-C(O)

S-、-SC(O)-、-C(=NR^N)-、-C(=NR^N)N(R^N)-、-NR^NC(=NR^N)-、-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-、-C(S)-、-C(S)N(R^N)-、-NR^NC(S)-、-NR^NC(S)N(R^N)-、-S(O)-、-OS(O)-、-S(O)O-、-OS(O)O-、-OS(O)₂-、-S(O)₂O-、-OS(O)₂O-、-N(R^N)S(O)-、-S(O)N(R^N)-、-N(R^N)S(O)N(R^N)-、-OS(O)N(R^N)-、-N(R^N)S(O)O-、-S(O)₂-、-N(R^N)S(O)₂-、-S(O)₂N(R^N)-、-N(R^N)S(O)₂N(R^N)-、-OS(O)₂N(R^N)-或-N(R^N)S(O)₂O-。每种可能性代表本发明单独的实施方案。

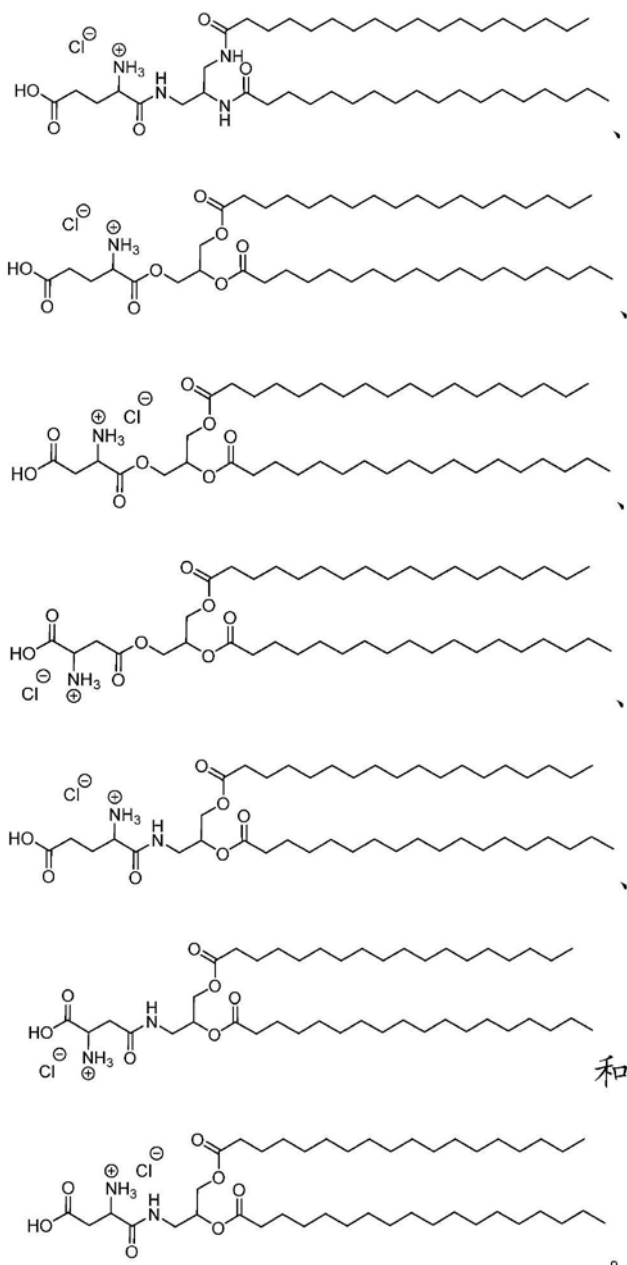
在一些实施方案中,可用于或可能用于本发明的磷脂包含修饰的磷酸胆碱部分,其中连接季胺与磷酰基的烷基链不是亚乙基(例如,n不是2)。因此,在一些实施方案中,可用于或可能用于本发明的磷脂是式(PL-I)的化合物,其中n是1、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些实施方案中,式(PL-I)的化合物具有下式中的一者:



或其盐。

替代的脂质

在一些实施方案中,使用替代的脂质代替本公开的磷脂。这类替代脂质的非限制性实例包括以下:



佐剂

在一些实施方案中,包括本文所述的一种或多种脂质的LNP可还包括一种或多种佐剂,例如吡喃葡萄糖基脂质佐剂(GLA)、CpG寡脱氧核苷酸(例如,A类或B类)、聚(I:C)、氢氧化铝和Pam3CSK4。

治疗剂

脂质纳米颗粒可包括一种或多种治疗剂和/或预防剂,如核酸。本公开的特征在于向哺乳动物细胞或器官递送治疗剂和/或预防剂(如核酸)、在哺乳动物细胞中产生所关注的多肽以及治疗有需要的哺乳动物的疾病或病症的方法,包括对哺乳动物施用包括治疗剂和/或预防剂(如核酸)的LNP和/或使哺乳动物细胞与包括治疗剂和/或预防剂(如核酸)的LNP接触。

治疗剂和/或预防剂包括生物活性物质,或者被称为“活性剂”。治疗剂和/或预防剂可以是一旦递送至细胞或器官就会在细胞、器官或其它身体组织或系统中带来期望的变

化的物质。这类物质可用于治疗一种或多种疾病、病症或疾患。在一些实施方案中，治疗剂和/或预防剂是可用于治疗特定疾病、病症或疾患的小分子药物。可用于脂质纳米颗粒的药物的实例包括但不限于抗肿瘤剂(例如，长春新碱、多柔比星、米托蒽醌、喜树碱、顺铂、博来霉素、环磷酰胺、甲氨蝶呤和链脲佐菌素)、抗肿瘤剂(例如，放线菌素D、长春新碱、长春碱、阿糖胞苷、蒽环类药物、烷化剂、铂化合物、抗代谢物和核苷类似物，如甲氨蝶呤和嘌呤及嘧啶类似物)、抗感染剂、局部麻醉剂(例如，地布卡因和氯丙嗪)、 β -肾上腺素能阻滞剂(例如，普萘洛尔、噻吗洛尔和拉贝洛尔)、抗高血压药(例如，可乐定和胍屈嗪)、抗抑郁药(例如，丙咪嗪、阿米替林和多虑平)、抗惊厥药(例如，苯妥英)、抗组胺药(例如，苯海拉明、氯苯吡胺和异丙嗪)、抗生素/抗细菌剂(例如，庆大霉素、环丙沙星和头孢西丁)、抗真菌剂(例如，咪康唑、特康唑、益康唑、异康唑、布康唑、克霉唑、伊曲康唑、制霉菌素、萘替芬和两性霉素B)、抗寄生虫药、激素、激素拮抗剂、免疫调节剂、神经递质拮抗剂、抗青光眼药、维生素、麻醉剂和成像剂。

在一些实施方案中,治疗剂和/或预防剂是细胞毒素、放射性离子、化学治疗剂、疫苗、引发免疫反应的化合物和/或别的治疗剂和/或预防剂。细胞毒素或细胞毒性剂包括可能对细胞有害的任何剂。实例包括但不限于紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基蒽二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、地卡因(teracaine)、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、美登木素生物碱,例如美登醇、拉奇霉素(CC-1065)及其类似物或同系物。放射性离子包括但不限于碘(例如,碘125或碘131)、铈89、磷、钷、铯、铊、钋、磷酸盐、钴、钷90、钷153和钷。疫苗包括能够针对与传染性疾病如流感、麻疹、人乳头瘤病毒(HPV)、狂犬病、脑膜炎、百日咳、破伤风、瘟疫、肝炎和结核病相关的一种或多种疾患提供免疫力的化合物和制剂,并且可包括编码源于传染性疾病的抗原和/或表位的mRNA。疫苗还包括引导针对癌细胞的免疫反应的化合物和制剂,并且可包括编码源于肿瘤细胞的抗原、表位和/或新表位的mRNA。引发免疫反应的化合物可包括但不限于疫苗、皮质类固醇(例如,地塞米松)及其它物质。

在一些实施方案中,治疗剂和/或预防剂是蛋白质。可用于本公开的纳米颗粒的治疗性蛋白质包括但不限于庆大霉素、阿米卡星、胰岛素、促红细胞生成素(EPO)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、因子VIR、促黄体激素释放激素(LHRH)类似物、干扰素、肝素、乙型肝炎表面抗原、伤寒疫苗和霍乱疫苗。在一些实施方案中,经由包括根据式(IL-I)、(IL-IA)、(IL-IB)、(IL-II)、(IL-IIa)、(IL-IIb)、(IL-IIc)、(IL-IId)、(IL-IIe)、(IL-IIIf)、(IL-IIg)、(IL-III)、(IL-IIIa1)、(IL-IIIa2)、(IL-IIIa3)、(IL-IIIa4)、(IL-IIIa5)、(IL-IIIa6)、(IL-IIIa7)或(IL-IIIa8)的化合物(例如化合物3、18、20、26或29)的组合物肌肉施用疫苗和/或能够引发免疫反应的化合物。其它治疗剂和/或预防剂包括但不限于抗代谢物(例如,甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶达卡巴嗪)、烷化剂(例如,双氯乙基甲胺、噻替哌苯丁酸氮芥、拉奇霉素(CC-1065)、美法仑、卡莫司汀(BSNU)、洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素C和顺式-二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类药物(例如,柔红霉素(以前的道诺霉素)和多柔比星)、抗生素(例如,更生霉素(以前的放线菌素)、博来霉素、光神霉素和蒽霉素(AMC))和抗有丝分裂剂(例如,长春新碱、长春碱、紫杉醇和美登木素生物碱)。

多核苷酸和核酸

在一些实施方案中,治疗剂是多核苷酸或核酸(例如,核糖核酸或脱氧核糖核酸)。术语“多核苷酸”在其最广泛的意义上包括并入或可并入到寡核苷酸链中的任何化合物和/或物质。根据本公开使用的示例性多核苷酸包括但不限于脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA),包括信使RNA(mRNA)、其杂交体、RNAi诱导剂、RNAi剂、siRNA、shRNA、miRNA、反义RNA、核糖酶、催化性DNA、诱导三股螺旋形成的RNA、适体、载体等中的一者或多者。在一些实施方案中,治疗剂和/或预防剂是RNA。可用于本文所述的组合物和方法的RNA可选自但不限于由短聚物(shortmer)、安塔够妙(antagomir)、反义物、核糖酶、小干扰RNA(siRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、Dicer-底物RNA(dsRNA)、小发夹RNA(shRNA)、转移RNA(tRNA)、信使RNA(mRNA)及其混合物组成的组。在一些实施方案中,RNA是mRNA。

在一些实施方案中,治疗剂和/或预防剂是mRNA。mRNA可编码任何所关注的多肽,包括任何天然或非天然存在的或以其它方式修饰的多肽。由mRNA编码的多肽可以是任何大小的,并且可具有任何二级结构或活性。在一些实施方案中,由mRNA编码的多肽在细胞中表达时可具有治疗效果。

在一些实施方案中,治疗剂和/或预防剂是siRNA。siRNA可以能够选择性地敲低或下调所关注的基因的表达。在一些实施方案中,可以选择siRNA,以在对有需要的受试者施用包括siRNA的LNP后沉默与特定疾病、病症或疾患相关的基因。siRNA可包含与编码所关注的基因或蛋白质的mRNA序列互补的序列。在一些实施方案中,siRNA可以是免疫调节siRNA。

在一些实施方案中,治疗剂和/或预防剂是shRNA或编码其的载体或质粒。在将适当的构建体递送至细胞核后,shRNA可在靶细胞内产生。与shRNA相关的构建体和机制是相关领域中熟知的。

可用于本公开的核酸和多核苷酸通常包括编码所关注的多肽的连接核苷的第一区(例如,编码区)、位于第一区的5'-末端的第一侧翼区(例如,5'-UTR)、位于第一区的3'-末端的第二侧翼区(例如,3'-UTR)至少一个5'-帽区和3'-稳定区。在一些实施方案中,核酸或多核苷酸还包括聚A区或Kozak序列(例如,在5'-UTR中)。在一些情况下,多核苷酸可含有一个或多个能够从多核苷酸中切除的内含子核苷酸序列。在一些实施方案中,多核苷酸或核酸(例如,mRNA)可包括5'帽结构、链终止核苷酸、茎环、聚A序列和/或聚腺苷酸化信号。核酸的任一区域可包括一种或多种替代组分(例如,替代核苷)。在一些实施方案中,3'-稳定区可含有替代核苷,如L-核苷、反式胸苷或2'-O-甲基核苷和/或编码区,5'-UTR、3'-UTR,或者帽区可包括替代核苷,如5-取代尿苷(例如,5-甲氧基尿苷)、1-取代假尿苷(例如,1-甲基-假尿苷)和/或5-取代胞苷(例如,5-甲基-胞苷)。

一般地,多核苷酸的最短长度可以是足以编码二肽的多核苷酸序列的长度。在另一实施方案中,多核苷酸序列的长度足以编码三肽。在另一实施方案中,多核苷酸序列的长度足以编码四肽。在另一实施方案中,多核苷酸序列的长度足以编码五肽。在另一实施方案中,多核苷酸序列的长度足以编码六肽。在另一实施方案中,多核苷酸序列的长度足以编码七肽。在另一实施方案中,多核苷酸序列的长度足以编码八肽。在另一实施方案中,多核苷酸序列的长度足以编码九肽。在另一实施方案中,多核苷酸序列的长度足以编码十肽。

替代多核苷酸序列可以编码的二肽的实例包括但不限于肌肽和鹅肌肽。

在一些情况下,多核苷酸的长度大于30个核苷酸。在另一实施方案中,多核苷酸分

子的长度大于35个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少40个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少45个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少50个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少55个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少60个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少80个核苷酸。在别的实施方案中,所述长度为至少90个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少100个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少120个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少140个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少160个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少180个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少200个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少250个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少300个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少350个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少400个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少450个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少500个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少600个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少700个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少800个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少900个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1000个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1100个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1200个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1300个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1400个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1500个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1600个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1800个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少2000个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少2500个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少3000个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少4000个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少5000个核苷酸或大于5000个核苷酸。

核酸和多核苷酸可包括一种或多种天然存在的组分,包括规范核苷酸A(腺苷)、G(鸟苷)、C(胞嘧啶)、U(尿苷)或T(胸苷)中的任一者。在一些实施方案中,所有或基本上所有包含(a) 5' -UTR、(b) 开放阅读框(ORF)、(c) 3' -UTR、(d) 聚A尾及(上述a、b、c或d)的任何组合的核苷酸包含天然存在的规范核苷酸A(腺苷)、G(鸟苷)、C(胞嘧啶)、U(尿苷)或T(胸苷)。

核酸和多核苷酸可包括一种或多种如本文所述的替代组分,其赋予有用的特性,包括稳定性提高和/或缺乏对引入多核苷酸的细胞的先天免疫反应的实质性诱导。在一些实施方案中,相对于相应的未改变的多核苷酸或核酸,替代的多核苷酸或核酸在引入多核苷酸或核酸的细胞中表现出降解减少。这些替代物质可提高蛋白质产生的效率、多核苷酸的细胞内保留和/或接触的细胞的活力,以及具有降低的免疫原性。

多核苷酸和核酸可以是天然或非天然存在的。多核苷酸和核酸可包括一个或多个修饰的(例如,改变的或替代的)核碱基、核苷、核苷酸或其组合。可用于LNP的核酸和多核苷酸可包括任何有用的修饰或改变,如对核碱基、糖或核苷间键(例如,对连接磷酸酯、对磷酸二酯键、对磷酸二酯主链)的修饰或改变。在一些实施方案中,改变(例如,一个或多个改变)存在于核碱基、糖和核苷间键中的每一者中。根据本公开的改变可以是核糖核酸(RNA)改变为脱氧核糖核酸(DNA),例如呋喃核糖基环的2' -OH取代为2' -H、苏糖核酸(TNA)、二醇核酸(GNA)、肽核酸(PNA)、锁定核酸(LNA)或其杂交体。本文描述了另外的改变。

多核苷酸和核酸可以或不沿着分子的整个长度均匀地改变。在一些实施方案中,一种或多种或所有类型的核苷酸(例如,嘌呤或嘧啶,或者A、G、U、C中的任何一者或多者

或全部)可以或可以不在多核苷酸或核酸中或在其给定的预定序列区中均匀地改变。在一些情况下,多核苷酸(或其给定的序列区)中的所有核苷酸X都被改变,其中X可以是核苷酸A、G、U、C中的任一者,或组合A+G、A+U、A+C、G+U、G+C、U+C、A+G+U、A+G+C、G+U+C或A+G+U+C中的任一者。

不同的糖改变和/或核苷间键(例如,主链结构)可存在于多核苷酸中的不同位置。本领域普通技术人员将要理解的是,核苷酸类似物或其它改变可位于多核苷酸的任何位置,使得多核苷酸的功能基本上不降低。改变也可以是5' -或3' -末端改变。在一些实施方案中,多核苷酸包括在3' -末端的改变。多核苷酸可含有约1%至约100%的替代核苷酸(相对于总核苷酸含量,或相对于一种或多种类型的核苷酸,即A、G、U或C中的任何一者或多者)或任何中间百分比(例如,1%至20%、1%至25%、1%至50%、1%至60%、1%至70%、1%至80%、1%至90%、1%至95%、10%至20%、10%至25%、10%至50%、10%至60%、10%至70%、10%至80%、10%至90%、10%至95%、10%至100%、20%至25%、20%至50%、20%至60%、20%至70%、20%至80%、20%至90%、20%至95%、20%至100%、50%至60%、50%至70%、50%至80%、50%至90%、50%至95%、50%至100%、70%至80%、70%至90%、70%至95%、70%至100%、80%至90%、80%至95%、80%至100%、90%至95%、90%至100%和95%至100%)。将要理解的是,任何剩余的百分比是因为规范核苷酸(例如,A、G、U或C)的存在。

多核苷酸可含有最少零和最多100%的替代核苷酸,或任何中间百分比,如至少5%的替代核苷酸、至少10%的替代核苷酸、至少25%的替代核苷酸、至少50%的替代核苷酸、至少80%的替代核苷酸或至少90%的替代核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸可含有替代的嘧啶,如替代的尿嘧啶或胞嘧啶。在一些实施方案中,多核苷酸中至少5%、至少10%、至少25%、至少50%、至少80%、至少90%或100%的尿嘧啶被替代尿嘧啶(例如,5-取代的尿嘧啶)替代。替代尿嘧啶可以被具有单一独特结构的化合物替代,或者可以被具有不同结构(例如,2、3、4或更多种独特结构)的多种化合物替代。在一些情况下,多核苷酸中至少5%、至少10%、至少25%、至少50%、至少80%、至少90%或100%的胞嘧啶被替代胞嘧啶(例如,5-取代的胞嘧啶)替代。替代胞嘧啶可以被具有单一独特结构的化合物替代,或者可以被具有不同结构(例如,2、3、4或更多种独特结构)的多种化合物替代。

在一些实施方案中,核酸基本上不诱导引入多核苷酸(例如,mRNA)的细胞的先天免疫反应。诱导的先天免疫反应的特征包括1)促炎性细胞因子的表达增加,2)细胞内PRR(RIG-I、MDA5等)的激活,和/或3)蛋白质翻译终止或减少。

核酸可任选包括其它剂(例如,RNAi诱导剂、RNAi剂、siRNA、shRNA、miRNA、反义RNA、核糖酶、催化DNA、tRNA、诱导三股螺旋形成的RNA、适体、载体)。在一些实施方案中,核酸可包括一种或多种具有一个或多个替代核苷或核苷酸的信使RNA(mRNA)(即,替代mRNA分子)。

在一些实施方案中,核酸(例如,mRNA)分子、配方、组合物或与其相关的方法包含一种或多种多核苷酸,所述多核苷酸包含如WO 2002/098443、WO2003/051401、WO2008/052770、WO2009127230、WO2006122828、WO2008/083949、WO2010088927、WO2010/037539、WO2004/004743、WO2005/016376、WO2006/024518、WO2007/095976、WO2008/014979、WO2008/077592、WO2009/030481、WO2009/095226、WO2011069586、WO2011026641、WO2011/144358、

W02012019780、W02012013326、W02012089338、W02012113513、W02012116811、W02012116810、W02013113502、W02013113501、W02013113736、W02013143698、W02013143699、W02013143700、W02013/120626、W02013120627、W02013120628、W02013120629、W02013174409、W02014127917、W02015/024669、W02015/024668、W02015/024667、W02015/024665、W02015/024666、W02015/024664、W02015101415、W02015101414、W02015024667、W0 2015062738、W02015101416中所述的特征,上述文献均以引用的方式并入本文。

核碱基替代物

替代核苷和核苷酸可包括替代核碱基。核酸的核碱基是有机碱基,如嘌呤或嘧啶或其衍生物。核碱基可以是规范碱基(例如,腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶)。这些核碱基可以被改变或完全替代,以提供特性增强的多核苷酸分子,例如稳定性(如对核酸酶的抗性)提高。非规范或修饰的碱基可包括例如一个或多个取代或修饰,包括但不限于烷基、芳基、卤基、氧代、羟基、烷氧基和/或硫代取代;一个或多个稠环或开环;氧化;和/或还原。

替代核苷酸碱基配对不仅涵盖标准的腺嘌呤-胸腺嘧啶、腺嘌呤-尿嘧啶或鸟嘌呤-胞嘧啶碱基对,而且还涵盖在核苷酸和/或替代核苷酸之间形成的碱基对,包括非标准或替代碱基,其中氢键供体和氢键受体的排列允许在非标准碱基与标准碱基之间或在两个互补的非标准碱基结构之间形成氢键合。这种非标准碱基配对的一个实例是替代核苷酸肌苷与腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶之间的碱基配对。

在一些实施方案中,核碱基是替代尿嘧啶。具有替代尿嘧啶的示例性核碱基和核苷包括但不限于假尿苷(ψ)、吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮杂-尿嘧啶、6-氮杂-尿嘧啶、2-硫代-5-氮杂-尿嘧啶、2-硫代-尿嘧啶(s^2U)、4-硫代-尿嘧啶(s^4U)、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羟基-尿嘧啶(ho^5U)、5-氨基烯丙基-尿嘧啶、5-卤-尿嘧啶(例如,5-碘-尿嘧啶或5-溴-尿嘧啶)、3-甲基-尿嘧啶(m^3U)、5-甲氧基-尿嘧啶(mo^5U)、尿嘧啶5-氧乙酸(cmo^5U)、尿嘧啶5-氧乙酸甲酯($mcmo^5U$)、5-羧甲基-尿嘧啶(cm^5U)、1-羧甲基-假尿苷、5-羧基羟甲基-尿嘧啶(chm^5U)、5-羧基羟甲基-尿嘧啶甲酯($mchm^5U$)、5-甲氧羰基甲基-尿嘧啶(mcm^5U)、5-甲氧羰基甲基-2-硫代-尿嘧啶(mcm^5s^2U)、5-氨基甲基-2-硫代-尿嘧啶(nm^5s^2U)、5-甲基氨基甲基-尿嘧啶(mn^5U)、5-甲基氨基甲基-2-硫代-尿嘧啶(mn^5s^2U)、5-甲基氨基甲基-2-硒代-尿嘧啶(mn^5se^2U)、5-氨基甲酰基甲基-尿嘧啶(ncm^5U)、5-羧甲基氨基甲基-尿嘧啶($cmnm^5U$)、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代-尿嘧啶($cmnm^5s^2U$)、5-丙炔基-尿嘧啶、1-丙炔基-假尿嘧啶、5-牛磺酸甲基-尿嘧啶(τm^5U)、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿嘧啶(τm^5s^2U)、1-牛磺酸甲基-4-硫代-假尿苷、5-甲基-尿嘧啶(m^5U ,即具有核碱基脱氧胸腺嘧啶)、1-甲基-假尿苷($m^1\psi$)、5-甲基-2-硫代-尿嘧啶(m^5s^2U)、1-甲基-4-硫代-假尿苷($m^1s^4\psi$)、4-硫代-1-甲基-假尿苷、3-甲基-假尿苷($m^3\psi$)、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、二氢尿嘧啶(D)、二氢假尿苷、5,6-二氢尿嘧啶、5-甲基-二氢尿嘧啶(m^5D)、2-硫代-二氢尿嘧啶、2-硫代-二氢假尿苷、2-甲氧基-尿嘧啶、2-甲氧基-4-硫代-尿嘧啶、4-甲氧基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、N1-甲基-假尿苷、3-(3-氨基-3-羧丙基)尿嘧啶(acp^3U)、1-甲基-3-(3-氨基-3-羧丙基)假尿苷($acp^3\psi$)、5-(异戊烯基氨基甲基)尿嘧啶(inm^5U)、5-(异戊烯基氨基甲基)-2-硫代-尿嘧啶(inm^5s^2U)、5,2'-O-二甲基-尿苷

(m⁵Um)、2-硫代-2'-O-甲基-尿苷(s²Um)、5-甲氧羰基甲基-2'-O-甲基-尿苷(mcm⁵Um)、5-氨基甲酰基甲基-2'-O-甲基-尿苷(ncm⁵Um)、5-羧甲基氨基甲基-2'-O-甲基-尿苷(cmm⁵Um)、3,2'-O-二甲基-尿苷(m³Um)和5-(异戊烯基氨基甲基)-2'-O-甲基-尿苷(inm⁵Um)、1-硫代-尿嘧啶、脱氧胸苷、5-(2-羰基甲氧基乙烯基)-尿嘧啶、5-(氨基甲酰基羟甲基)-尿嘧啶、5-氨基甲酰基甲基-2-硫代-尿嘧啶、5-羧甲基-2-硫代-尿嘧啶、5-氰甲基-尿嘧啶、5-甲氧基-2-硫代-尿嘧啶和5-[3-(1-E-丙烯基氨基)]尿嘧啶。

在一些实施方案中,核碱基是替代胞嘧啶。具有替代胞嘧啶的示例性核碱基和核苷包括但不限于5-氮杂-胞嘧啶、6-氮杂-胞嘧啶、假异胞苷、3-甲基-胞嘧啶(m3C)、N4-乙酰基-胞嘧啶(ac4C)、5-甲酰基-胞嘧啶(f5C)、N4-甲基-胞嘧啶(m4C)、5-甲基-胞嘧啶(m5C)、5-卤-胞嘧啶(例如,5-碘-胞嘧啶)、5-羟甲基-胞嘧啶(hm5C)、1-甲基-假异胞苷、吡咯并-胞嘧啶、吡咯并-假异胞苷、2-硫代-胞嘧啶(s2C)、2-硫代-5-甲基-胞嘧啶、4-硫代-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、折布拉林(zebularine)、5-氮杂-折布拉林、5-甲基-折布拉林、5-氮杂-2-硫代-折布拉林、2-硫代-折布拉林、2-甲氧基-胞嘧啶、2-甲氧基-5-甲基-胞嘧啶、4-甲氧基-假异胞苷、4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷、赖西丁(k2C)、5,2'-O-二甲基-胞苷(m5Cm)、N4-乙酰基-2'-O-甲基-胞苷(ac4Cm)、N4,2'-O-二甲基-胞苷(m4Cm)、5-甲酰基-2'-O-甲基-胞苷(f5Cm)、N4,N4,2'-O-三甲基-胞苷(m42Cm)、1-硫代-胞嘧啶、5-羟基-胞嘧啶、5-(3-叠氮基丙基)-胞嘧啶和5-(2-叠氮基乙基)-胞嘧啶。

在一些实施方案中,核碱基是替代腺嘌呤。具有替代腺嘌呤的示例性核碱基和核苷包括但不限于2-氨基-嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-卤-嘌呤(例如,2-氨基-6-氯-嘌呤)、6-卤-嘌呤(例如,6-氯-嘌呤)、2-氨基-6-甲基-嘌呤、8-叠氮基-腺嘌呤、7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤、7-脱氮-2-氨基-嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2-氨基-嘌呤、7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、1-甲基-腺嘌呤(m1A)、2-甲基-腺嘌呤(m2A)、N6-甲基-腺嘌呤(m6A)、2-甲硫基-N6-甲基-腺嘌呤(ms2m6A)、N6-异戊烯基-腺嘌呤(i6A)、2-甲硫基-N6-异戊烯基-腺嘌呤(ms2i6A)、N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺嘌呤(io6A)、2-甲硫基-N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺嘌呤(ms2io6A)、N6-甘氨酸基氨基甲酰基-腺嘌呤(g6A)、N6-苏氨酸基氨基甲酰基-腺嘌呤(t6A)、N6-甲基-N6-苏氨酸基氨基甲酰基-腺嘌呤(m6t6A)、2-甲硫基-N6-苏氨酸基氨基甲酰基-腺嘌呤(ms2g6A)、N6,N6-二甲基-腺嘌呤(m62A)、N6-羟基正缬氨酸基氨基甲酰基-腺嘌呤(hn6A)、2-甲硫基-N6-羟基正缬氨酸基氨基甲酰基-腺嘌呤(ms2hn6A)、N6-乙酰基-腺嘌呤(ac6A)、7-甲基-腺嘌呤、2-甲硫基-腺嘌呤、2-甲氧基-腺嘌呤、N6,2'-O-二甲基-腺苷(m6Am)、N6,N6,2'-O-三甲基-腺苷(m62Am)、1,2'-O-二甲基-腺苷(m1Am)、2-氨基-N6-甲基-嘌呤、1-硫代-腺嘌呤、8-叠氮基-腺嘌呤、N6-(19-氨基-五氧杂十九烷基)-腺嘌呤、2,8-二甲基-腺嘌呤、N6-甲酰基-腺嘌呤和N6-羟甲基-腺嘌呤。

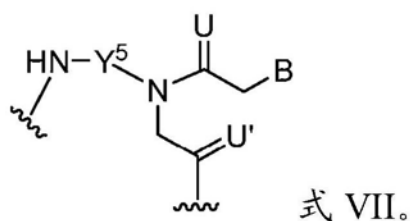
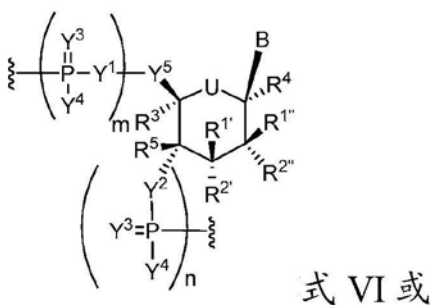
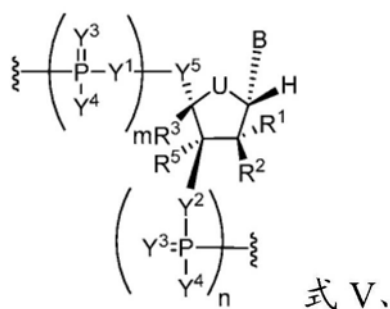
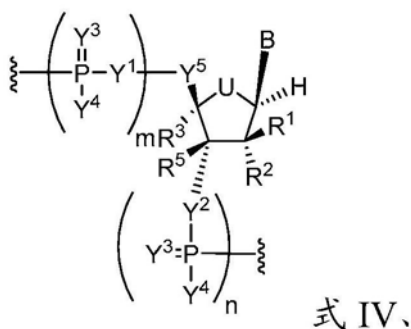
在一些实施方案中,核碱基是替代鸟嘌呤。具有替代鸟嘌呤的示例性核碱基和核苷包括但不限于肌苷(I)、1-甲基-肌苷(m1I)、怀俄苷(imG)、甲基怀俄苷(mimG)、4-去甲基-怀俄苷(imG-14)、异怀俄苷(imG2)、怀丁苷(yW)、过氧怀丁苷(o2yW)、羟基怀丁苷(OHyW)、欠修饰羟基怀丁苷(OHyW*)、7-脱氮-鸟嘌呤、薊苷(Q)、环氧薊苷(oQ)、半乳糖基-薊苷(galQ)、甘露糖基-薊苷(manQ)、7-氰基-7-脱氮-鸟嘌呤(preQ0)、7-氨基-7-脱氮-鸟嘌呤

(preQ1)、古嘌呤(G⁺)、7-脱氮-8-氮杂-鸟嘌呤、6-硫代-鸟嘌呤、6-硫代-7-脱氮-鸟嘌呤、6-硫代-7-脱氮-8-氮杂-鸟嘌呤、7-甲基-鸟嘌呤(m7G)、6-硫代-7-甲基-鸟嘌呤、7-甲基-肌苷、6-甲氧基-鸟嘌呤、1-甲基-鸟嘌呤(m1G)、N2-甲基-鸟嘌呤(m2G)、N2,N2-二甲基-鸟嘌呤(m22G)、N2,7-二甲基-鸟嘌呤(m2,7G)、N2,N2,7-二甲基-鸟嘌呤(m2,2,7G)、8-氧代-鸟嘌呤、7-甲基-8-氧代-鸟嘌呤、1-甲基-6-硫代-鸟嘌呤、N2-甲基-6-硫代-鸟嘌呤、N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟嘌呤、N2-甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m2Gm)、N2,N2-二甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m22Gm)、1-甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m1Gm)、N2,7-二甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m2,7Gm)、2'-O-甲基-肌苷(Im)、1,2'-O-二甲基-肌苷(m1Im)、1-硫代-鸟嘌呤和0-6-甲基-鸟嘌呤。

核苷酸的替代核碱基可独立地为嘌呤、嘧啶、嘌呤或嘧啶类似物。在一些实施方案中,核碱基可以是腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶或次黄嘌呤的替代物。在另一实施方案中,核碱基可以还包括碱基的天然存在的及合成的衍生物,包括但不限于吡唑并[3,4-d]嘧啶、5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基及其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基及其它烷基衍生物、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫代尿嘧啶;8-卤(例如,8-溴)、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基及其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤;5-卤特别是5-溴、5-三氟甲基及其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶;7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、脱氮鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤、脱氮腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮腺嘌呤、吡唑并[3,4-d]嘧啶、咪唑并[1,5-a]1,3,5三嗪酮、9-脱氮嘌呤、咪唑并[4,5-d]吡嗪、咪唑并[4,5-d]嘧啶、吡嗪-2-酮、1,2,4-三嗪、哒嗪;或1,3,5三嗪。当使用简写A、G、C、T或U来描述核苷酸时,每个字母是指代表性碱基和/或其衍生物,例如,A包括腺嘌呤或腺嘌呤类似物,例如7-脱氮腺嘌呤)。

糖的改变

核苷包括糖分子(例如,5-碳或6-碳糖,如戊糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖或其脱氧衍生物)与核碱基组合,而核苷酸是含有核苷和磷酸酯基团或替代基团(例如,硼代磷酸酯、硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、膦酸酯、烷基、酰胺化物和甘油)的核苷。核苷或核苷酸可以是规范物质,例如包括规范核碱基、糖和(在核苷酸的情况下)磷酸酯基团的核苷或核苷酸,或者可以是包括一种或多种替代组分的替代核苷或核苷酸。在一些实施方案中,替代核苷和核苷酸可以在核苷或核苷酸的糖上改变。在一些实施方案中,替代核苷或核苷酸包括以下结构:



在式IV、V、VI和VII的每一者中，

m和n中的每一者独立地为0至5的整数，

U和U' 中的每一者独立地为O、S、N(R^U)_{nu}或C(R^U)_{nu}，其中nu是0至2的整数，且每个R^U独立地为H、卤基或任选取代的烷基；

R^{1'}、R^{2'}、R^{1''}、R^{2''}、R¹、R²、R³、R⁴和R⁵中的每一者如果存在的话独立地为H、卤基、羟基、硫醇、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基，或者不存在；其中R³与R^{1'}、R^{1''}、R^{2'}、R^{2''}或R⁵中的一者或多者的组合(例如，R^{1'}和R³的组合、R^{1''}和R³的组合、R^{2'}和R³的组合、R^{2''}和R³的组合或R⁵和R³的组合)可连接在一起形成任选取代的亚烷基或任选取代的亚杂烷基，并且并且与它们所连接的碳合起来提供任选取代的杂环基(例如，双环、三环或四环杂环基)；其中R⁵与R^{1'}、R^{1''}、R^{2'}或R^{2''}中的一者或多者的组合(例如，

$R^{1'}$ 和 R^5 的组合、 $R^{1''}$ 和 R^5 的组合、 $R^{2'}$ 和 R^5 的组合或 $R^{2''}$ 和 R^5 的组合) 可连接在一起形成任选取代的亚烷基或任选取代的亚杂烷基, 并且与它们所连接的碳合起来提供任选取代的杂环基(例如, 双环、三环或四环杂环基); 且其中 R^4 和 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 、 $R^{2'}$ 、 $R^{2''}$ 、 R^3 或 R^5 中的一者或多者的组合可连接在一起形成任选取代的亚烷基或任选取代的亚杂烷基, 并且与它们所连接的碳合起来提供任选取代的杂环基(例如, 双环、三环或四环杂环基); m' 和 m'' 中的每一者独立地为 0 至 3 的整数(例如, 0 至 2、0 至 1、1 至 3 或 1 至 2);

Y^1 、 Y^2 和 Y^3 中的每一者独立地为 O、S、Se、 $-\text{NR}^{\text{N1}}-$ 、任选取代的亚烷基或任选取代的亚杂烷基, 其中 R^{N1} 是 H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的芳基, 或者不存在;

每个 Y^4 独立地为 H、羟基、硫醇、硼烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或任选取代的氨基;

每个 Y^5 独立地为 O、S、Se、任选取代的亚烷基(例如, 亚甲基) 或任选取代的亚杂烷基; 且

B 是修饰或未修饰的核碱基。

在一些实施方案中, 2'-羟基 (OH) 可以被修饰或被许多不同的取代基替代。2'-位置的示例性取代包括但不限于 H、叠氮基、卤基(例如, 氟基)、任选取代的 C_{1-6} 烷基(例如, 甲基); 任选取代的 C_{1-6} 烷氧基(例如, 甲氧基或乙氧基); 任选取代的 C_{6-10} 芳氧基; 任选取代的 C_{3-8} 环烷基; 任选取代的 C_{6-10} 芳基- C_{1-6} 烷氧基、任选取代的 C_{1-12} (杂环基) 氧基; 糖(例如, 核糖、戊糖或本文所述的任何糖); 聚乙二醇 (PEG)、 $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OR}$, 其中 R 是 H 或任选取代的烷基, 且 n 是 0 至 20 的整数(例如, 0 至 4、0 至 8、0 至 10、0 至 16、1 至 4、1 至 8、1 至 10、1 至 16、1 至 20、2 至 4、2 至 8、2 至 10、2 至 16、2 至 20、4 至 8、4 至 10、4 至 16 和 4 至 20); “锁定” 核酸 (LNA), 其中 2'-羟基通过 C_{1-6} 亚烷基或 C_{1-6} 亚杂烷基桥与同一核糖的 4'-碳连接, 其中示例性桥包括亚甲基、亚丙基、醚或氨基桥; 如本文所定义的氨基烷基; 如本文所定义的氨基烷氧基; 如本文所定义的氨基; 和如本文所定义的氨基酸。

一般地, RNA 包括糖基核糖, 其是具有氧的 5 元环。示例的非限制性替代核苷酸包括核糖中氧的替代(例如, 用 S、Se 或亚烷基, 如亚甲基或亚乙基); 双键的添加(例如, 用环戊烯基或环己烯基替代核糖); 核糖的环缩(例如, 形成环丁烷或氧杂环丁烷的 4 元环); 核糖的扩环(例如, 形成具有另外的碳或杂原子的 6 或 7 元环, 如脱水己糖醇、阿卓糖醇、甘露糖醇、环己烷基、环己烯基和吗啉代(其也具有氨基磷酸酯主链)); 多环形式(例如, 三环和“未锁定”形式, 如二醇核酸 (GNA)(例如, R-GNA 或 S-GNA, 其中核糖被与磷酸二酯键连接的二醇单元替代)、苏糖核酸 (TNA, 其中核糖被 α -L-苏呋喃糖基--(3'→2') 替代) 和肽核酸 (PNA, 其中 2-氨基-乙基-甘氨酸键替代核糖和磷酸二酯主链)。

在一些实施方案中, 糖基团含有一个或多个具有核糖中相应碳的相反立体化学构型的碳。因此, 多核苷酸分子可包括含有例如阿拉伯糖或 L-核糖作为糖的核苷酸。

在一些实施方案中, 多核苷酸包括至少一种核苷, 其中糖是 L-核糖、2'-O-甲基-核糖、2'-氟-核糖、阿拉伯糖、己糖醇、LNA 或 PNA。

核苷间键上的改变

可在核苷间键(例如, 磷酸酯主链)上改变替代核苷酸。在本文中, 在多核苷酸主链

的背景下,短语“磷酸酯”和“磷酸二酯”可互换使用。主链磷酸酯基团可通过用不同的取代基替代一个或多个氧原子来改变。

替代核苷酸可包括将未改变的磷酸酯部分用如本文所述的另一核苷间键大批替代。替代磷酸酯基团的实例包括但不限于硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、硼代磷酸酯、硼代磷酸酯、氢膦酸酯、氨基磷酸酯、二氨基磷酸酯、烷基或芳基膦酸酯和磷酸三酯。二硫代磷酸酯的两个非连接氧均被硫替代。磷酸酯接头也可通过用氮(桥连的氨基磷酸酯)、硫(桥连的硫代磷酸酯)和碳(桥连的亚甲基-膦酸酯)替代连接氧来改变。

替代核苷和核苷酸可包括用硼烷部分(BH_3)、硫(硫代)、甲基、乙基和/或甲氧基替代一个或多个非桥连氧。作为非限制性实例,在同一位置(例如, α (α)、 β (β) 或 γ (γ) 位置)的两个非桥连氧可以被硫(硫代)和甲氧基替代。

提供磷酸酯部分(例如, α -硫代磷酸酯)的 α 位置处的一个或多个氧原子的替代以通过非天然硫代磷酸酯主链键向RNA和DNA赋予稳定性(如针对外切核酸酶和内切核酸酶)。硫代磷酸酯DNA和RNA具有增加的核酸酶抗性,随后在细胞环境中具有更长的半衰期。

本文描述了根据本公开可以使用的其它核苷间键,包括不含磷原子的核苷间键。

内部核糖体进入位点

多核苷酸可含有内部核糖体进入位点(IRES)。IRES可作为单独的核糖体结合位点,或者可作为mRNA的多个核糖体结合位点之一。含有一个以上功能性核糖体结合位点的多核苷酸可编码由核糖体独立翻译的几种肽或多肽(例如,多顺反子mRNA)。当多核苷酸提供有IRES时,进一步任选提供第二可翻译区。根据本公开可以使用的IRES序列的实例包括但不限于来自小核糖核酸病毒(例如,FMDV)、瘟病毒(CFFV)、脊髓灰质炎病毒(PV)、脑心肌炎病毒(ECMV)、口蹄疫病毒(FMDV)、丙型肝炎病毒(HCV)、经典猪瘟病毒(CSFV)、鼠白血病病毒(MLV)、猿免疫缺陷病毒(SIV)或蟋蟀麻痹病毒(CrPV)的那些。

5'-帽结构

多核苷酸(例如,mRNA)可包括5'-帽结构。多核苷酸的5'-帽结构参与核输出和增加的多核苷酸稳定性,并且结合mRNA帽结合蛋白(CBP),后者负责细胞中的多核苷酸稳定性和通过CBP与聚A结合蛋白缔合以形成成熟环状mRNA物质的翻译能力。帽进一步协助在mRNA剪接期间移除5'-近端内含子。

内源性多核苷酸分子可以是5'-端加帽的,从而在多核苷酸的末端鸟苷帽残基与5'-末端转录的有义核苷酸之间产生5'-ppp-5'-三磷酸酯键。此5'-鸟苷酸帽然后可以被甲基化以产生N7-甲基-鸟苷酸残基。多核苷酸的5'端的末端和/或前末端转录的核苷酸的核糖也可任选被2'-O-甲基化。通过水解和切割鸟苷酸帽结构的5'-脱帽可靶向多核苷酸分子(如mRNA分子)进行降解。

多核苷酸的改变可产生不可水解的帽结构,其防止脱帽并因此增加多核苷酸半衰期。因为帽结构水解需要切割5'-ppp-5'磷酸二酯键,所以在加帽反应期间可以使用替代核苷酸。在一些实施方案中,来自NewEnglandBiolabs(Ipswich,MA)的牛痘加帽酶可根据制造商的说明书与 α -硫代-鸟苷核苷酸一起使用,以在5'-ppp-5'帽中产生硫代磷酸酯键。可以使用另外的替代鸟苷核苷酸,如 α -甲基-膦酸酯和硒代-磷酸酯核苷酸。

另外的改变包括但不限于糖的2'-羟基上的多核苷酸(如上所述)的5'-末端和/或5'-前末端核苷酸的核糖的2'-O-甲基化。多种不同的5'-帽结构可用于产生多核苷酸如

mRNA分子的5'-帽。

5'-帽结构包括W02008127688、W0 2008016473和W0 2011015347号国际专利公布中描述的那些,上述公布中的每一者的帽结构以引用的方式并入本文。

帽类似物在本文中也称为合成帽类似物、化学帽、化学帽类似物或结构或功能帽类似物,其在化学结构上不同于天然(即,内源性、野生型或生理学)5'-帽,同时保留帽功能。帽类似物可化学(即,非酶促)或酶促合成和/或连接至多核苷酸。

例如,抗反向帽类似物(ARCA)帽含有通过5'-5'-三磷酸酯基团连接的两个鸟苷,其中一个鸟苷含有N7-甲基以及3'-O-甲基(即,N7,3'-O-二甲基-鸟苷-5'-三磷酸酯-5'-鸟苷, m^7G -3'mppp-G,其可等效地称为3'-O-Me- m^7G (5')ppp(5')G)。另一未改变的鸟苷的3'-O原子成为与加帽多核苷酸(例如,mRNA)的5'-末端核苷酸连接。N7-和3'-O-甲基化鸟苷提供加帽多核苷酸(例如,mRNA)的末端部分。

另一种示例性帽是mCAP,其类似于ARCA,但在鸟苷上具有2'-O-甲基(即,N7,2'-O-二甲基-鸟苷-5'-三磷酸酯-5'-鸟苷, m^7Gm -ppp-G)。

帽可以是二核苷酸帽类似物。作为非限制性实例,二核苷酸帽类似物可以在不同的磷酸酯位置处用硼代磷酸酯基团或硒代磷酸酯基团修饰,如8,519,110号美国专利中描述的二核苷酸帽类似物,其帽结构以引用的方式并入本文。

或者,帽类似物可以是本领域中已知和/或本文所述的N7-(4-氯苯氧基乙基)取代的二核苷酸帽类似物。N7-(4-氯苯氧基乙基)取代的二核苷酸帽类似物的非限制性实例包括N7-(4-氯苯氧基乙基)-G(5')ppp(5')G和N7-(4-氯苯氧基乙基)-m3'-OG(5')ppp(5')G帽类似物(参见例如Kore等人在Bioorganic&MedicinalChemistry201321:4570-4574中描述的各种帽类似物及合成帽类似物的方法;其帽结构以引用的方式并入本文)。在其它情况下,可用于本公开的多核苷酸的帽类似物是4-氯/溴苯氧基乙基类似物。

虽然帽类似物允许在体外转录反应中同时对多核苷酸进行加帽,但仍有多达20%的转录物未加帽。这以及帽类似物与由内源性细胞转录机制产生的多核苷酸的内源性5'-帽结构的结构差异可导致翻译能力降低和细胞稳定性降低。

为了产生更真实的5'-帽结构,也可以使用酶对替代多核苷酸进行转录后加帽。如本文所用,短语“更真实”是指在结构或功能上紧密反映或模拟内源或野生型特征的特征。也就是说,与现有技术的合成特征或类似物相比,“更真实的”特征更能代表内源性的野生型天然或生理细胞功能和/或结构,或者在一个或多个方面优于相应的内源性野生型天然或生理特征。可用于本公开的多核苷酸的更真实的5'-帽结构的非限制性实例尤其是与本领域中已知的合成5'-帽结构(或与野生型天然或生理5'-帽结构)相比帽结合蛋白的结合增强、半衰期增加、对5'-内切核酸酶的敏感性降低和/或5'-脱帽减少的那些。在一些实施方案中,重组痘苗病毒加帽酶和重组2'-O-甲基转移酶可在多核苷酸的5'-末端核苷酸与鸟苷帽核苷酸之间产生规范的5'-5'-三磷酸酯键,其中帽鸟苷含有N7-甲基化,且多核苷酸的5'-末端核苷酸含有2'-O-甲基。这种结构被称为Cap1结构。与例如本领域中已知的其它5'帽类似物结构相比,此帽导致翻译能力、细胞稳定性更高,且细胞促炎性细胞因子的激活降低。其它示例性帽结构包括7mG(5')ppp(5')N,pN 2p(Cap0)、7mG(5')ppp(5')N1mpNp(Cap1)、7mG(5')-ppp(5')N1mpN 2mp(Cap2)和m(7)Gpppm(3)(6,6,2')Apm(2')Apm(2')Cpm(2)(3,2')Up(Cap4)。

因为替代多核苷酸可进行转录后加帽,并且因为此过程更有效,所以几乎100%的替代多核苷酸可以被加帽。这与当帽类似物在体外转录反应过程中与多核苷酸连接时的~80%形成对比。

5'-末端帽可包括内源帽或帽类似物。5'-末端帽可包括鸟苷类似物。有用的鸟苷类似物包括肌苷、N1-甲基-鸟苷、2'-氟-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、8-氧代-鸟苷、2-氨基-鸟苷、LNA-鸟苷和2-叠氮基-鸟苷。

在一些情况下,多核苷酸含有修饰的5'-帽。5'-帽上的修饰可提高多核苷酸的稳定性,增加多核苷酸的半衰期,并且可提高多核苷酸翻译效率。修饰的5'-帽可包括但不限于以下修饰中的一者或多者:在加帽三磷酸鸟苷(GTP)的2'-和/或3'-位置进行修饰、用亚甲基部分(CH₂)替代糖环氧(其产生碳环)、在帽结构的三磷酸酯桥部分上进行修饰或在核碱基(G)部分上进行修饰。

5'-UTR

5'-UTR可作为多核苷酸(例如,mRNA)的侧翼区提供。5'-UTR可与多核苷酸中所见的编码区同源或异源。多个5'-UTR可包括在侧翼区中,并且可以是相同或不同的序列。侧翼区的任何部分(包括没有部分)可以是密码子优化的,并且在密码子优化之前和/或之后,任何部分可独立地含有一个或多个不同的结构或化学改变。

以引用的方式并入本文的61/775,509号美国临时申请的表21以及61/829,372号美国临时申请的表21和表22中所示为替代多核苷酸(例如,mRNA)的起始和终止位点的列表。在表21中,每个5'-UTR(5'-UTR-005至5'-UTR68511)由其起始和终止位点相对于其天然或野生型(同源)转录物(ENST;ENSEMBL数据库中使用的标识符)来标识。

为了改变多核苷酸(例如,mRNA)的一种或多种特性,可以对与替代多核苷酸(例如,mRNA)的编码区异源的5'-UTR进行工程化。然后可以将多核苷酸(例如,mRNA)施用于细胞、组织或生物体,并且可测量诸如蛋白质水平、定位和/或半衰期的结果,以评价异源5'-UTR可能对替代多核苷酸(mRNA)产生的有益效果。可以利用5'-UTR的变体,其中向末端添加或在末端移除一个或多个核苷酸,包括A、T、C或G。5'-UTR也可以被密码子优化或以本文所述的任何方式改变。

5'-UTR、3'-UTR和翻译增强子元件(TEE)

多核苷酸(例如,mRNA)的5'-UTR可包括至少一个翻译增强子元件。术语“翻译增强子元件”是指增加由多核苷酸产生的多肽或蛋白质的量的序列。作为非限制性实例,TEE可位于转录启动子与起始密码子之间。在5'-UTR中具有至少一个TEE的多核苷酸(例如,mRNA)可以在5'-UTR处包括帽。进一步地,至少一个TEE可位于经历帽依赖性或非依赖性翻译的多核苷酸(例如,mRNA)的5'-UTR中。

在一些方面,TEE是UTR中的保守元件,其可促进多核苷酸的翻译活性,如但不限于帽依赖性或非依赖性翻译。Panek等人(Nucleic Acids Research,2013,1-10)先前已展示了这些序列在包括人在内的14个物种中的保守性。

在一个非限制性实例中,已知的TEE可位于Gtx同源结构域蛋白的5'-前导序列中(Chappell等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101:9590-9594,2004,其TEE以引用的方式并入本文)。

在另一非限制性实例中,在2009/0226470和2013/0177581号美国专利公布、

W02009/075886、W02012/009644和W01999/024595号国际专利公布、6,310,197和6,849,405号美国专利中公开了TEE,上述专利文献中的每一者的TEE序列以引用的方式并入本文。

在又一非限制性实例中,TEE可以是内部核糖体进入位点(IRES)、HCV-IRES或IRES元件,如但不限于7,468,275号美国专利、2007/0048776和2011/0124100号美国专利公布以及W02007/025008和W02001/055369号国际专利公布中描述的那些,上述专利文献中的每一者的IRES序列以引用的方式并入本文。IRES元件可包括但不限于Chappell等人(Proc.Natl.Acad.Sci.USA101:9590-9594,2004)和Zhou等人(PNAS102:6273-6278,2005)以及在2007/0048776和2011/0124100号美国专利公布及W02007/025008号国际专利公布中描述的Gtx序列(例如,Gtx9-nt、Gtx8-nt、Gtx7-nt),上述专利文献中的每一者的IRES序列以引用的方式并入本文。

“翻译增强子多核苷酸”是本文中示例和/或本领域中公开(参见例如6,310,197、6,849,405、7,456,273、7,183,395号美国专利、2009/0226470、2007/0048776、2011/0124100、2009/0093049、2013/0177581号美国专利公布、W02009/075886、W02007/025008、W02012/009644、W02001/055371 W0 1999/024595号国际专利公布以及2610341和2610340号欧洲专利;上述专利文献中的每一者的TEE序列以引用的方式并入本文)的一种或多种特定的TEE或其变体、同源物或功能衍生物。特定TEE的一个或多个拷贝可存在于多核苷酸(例如,mRNA)中。翻译增强子多核苷酸中的TEE可以按一个或多个序列区段组织起来。序列区段可包含本文示例的一个或多个特定TEE,每个TEE以一个或多个拷贝存在。当翻译增强子多核苷酸中存在多个序列区段时,它们可以是同源的或异源的。因此,翻译增强子多核苷酸中的多个序列区段可包含相同或不同类型的本文示例的特定TEE、相同或不同拷贝数的每一特定TEE和/或每个序列区段内TEE的相同或不同组织。

多核苷酸(例如,mRNA)可包括至少一个W0 1999/024595、W02012/009644、W02009/075886、W02007/025008、W0 1999/024595号国际专利公布、2610341和2610340号欧洲专利公布、6,310,197、6,849,405、7,456,273、7,183,395号美国专利以及2009/0226470、2011/0124100、2007/0048776、2009/0093049和2013/0177581号美国专利公布中描述的TEE,上述专利中的每一者的TEE序列以引用的方式并入本文。TEE可位于多核苷酸(例如,mRNA)的5'-UTR中。

多核苷酸(例如,mRNA)可包括至少一个TEE,其与2009/0226470、2007/0048776、2013/0177581和2011/0124100号美国专利公布、W0 1999/024595、W02012/009644、W02009/075886和W02007/025008号国际专利公布、2610341和2610340号欧洲专利公布、6,310,197、6,849,405、7,456,273、7,183,395号美国专利中描述的TEE具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的同一性,上述专利中的每一者的TEE序列以引用的方式并入本文。

多核苷酸(例如,mRNA)的5'-UTR可包括至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少30个、至少35个、至少40个、至少45个、至少50个、至少55个或多于60个TEE序列。多核苷酸(例如,mRNA)的5'-UTR中的TEE序列可以是相同或不同的TEE序列。TEE序列可以是诸如ABABAB、AABBAABBAABB或ABCABCABC或其变体的模式,重复

一次、两次或三次以上。在这些模式中,每个字母A、B或C代表在核苷酸水平上的不同TEE序列。

在一些情况下,5'-UTR可包括间隔区以分隔两个TEE序列。作为非限制性实例,间隔区可以是15个核苷酸的间隔区和/或本领域中已知的其它间隔区。作为另一非限制性实例,5'-UTR可包括在5'-UTR中重复至少一次、至少两次、至少3次、至少4次、至少5次、至少6次、至少7次、至少8次、至少9次或9次以上的TEE序列-间隔区模块。

在其它情况下,分隔两个TEE序列的间隔区可包括本领域中已知的其它序列,其可调节本公开的多核苷酸(例如,mRNA)的翻译,如但不限于miR序列(例如,miR结合位点和miR种子)。作为非限制性实例,用于分隔两个TEE序列的每个间隔区可包括不同的miR序列或miR序列的组成部分(例如,miR种子序列)。

在一些情况下,多核苷酸(例如,mRNA)的5'-UTR中的TEE可包括至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或超过99%的以下专利中公开的TEE序列:2009/0226470、2007/0048776、2013/0177581和2011/0124100号美国专利公布、W01999/024595、W02012/009644、W02009/075886和W02007/025008号国际专利公布、2610341和2610340号欧洲专利公布、以及6,310,197、6,849,405、7,456,273和7,183,395号美国专利,上述专利文献中的每一者的TEE序列以引用的方式并入本文。在另一实施方案中,本公开的多核苷酸(例如,mRNA)的5'-UTR中的TEE可包括以下专利中公开的TEE序列的5-30个核苷酸片段、5-25个核苷酸片段、5-20个核苷酸片段、5-15个核苷酸片段、5-10个核苷酸片段:2009/0226470、2007/0048776、2013/0177581和2011/0124100号美国专利公布、W01999/024595、W02012/009644、W02009/075886和W02007/025008号国际专利公布、2610341和2610340号欧洲专利公布以及6,310,197、6,849,405、7,456,273和7,183,395号美国专利;上述专利文献中的每一者的TEE序列以引用的方式并入本文。

在某些情况下,本公开的多核苷酸(例如,mRNA)的5'-UTR中的TEE可包括至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或超过99%的以下文献中公开的TEE序列:Chappell等人(Proc.Natl.Acad.Sci.USA101:9590-9594,2004)和Zhou等人(PNAS102:6273-6278,2005)、Wellensiek等人(Genome-wide profiling of human cap-independent translation-enhancing elements,Nature Methods,2013;DOI:10.1038/NMETH.2522)公开的补充表1和补充表2;上述文献中的每一者的TEE序列以引用的方式并入本文。在另一实施方案中,本公开的多核苷酸(例如,mRNA)的5'-UTR中的TEE可包括以下文献中公开的TEE序列的5-30个核苷酸片段、5-25个核苷酸片段、5-20个核苷酸片段、5-15个核苷酸片段、5-10个核苷酸片段:Chappell等人(Proc.Natl.Acad.Sci.USA101:9590-9594,2004)和Zhou等人(PNAS102:6273-6278,2005)、Wellensiek等人(Genome-wide profiling of human cap-independent translation-enhancing elements,Nature Methods,2013;DOI:10.1038/NMETH.2522)公开的补充表1和补充表2;上述文献中的每一者的TEE序列以引用的方式并入本文。

在一些情况下,多核苷酸(例如,mRNA)的5'-UTR中使用的TEE是IRES序列,如但不

限于7,468,275号美国专利和W02001/055369号国际专利公布中描述的那些,上述专利文献中的每一者的TEE序列以引用的方式并入本文。

在一些情况下,多核苷酸(例如,mRNA)的5'-UTR中使用的TEE可通过2007/0048776和2011/0124100号美国专利公布以及W02007/025008和W02012/009644号国际专利公布中描述的方法来标识,上述专利文献中的每一者的方法以引用的方式并入本文。

在一些情况下,本公开的多核苷酸(例如,mRNA)的5'-UTR中使用的TEE可以是7,456,273和7,183,395号美国专利、2009/0093049号美国专利公布以及W02001/055371号国际公布中描述的转录调控元件,上述专利文献中的每一者的TEE序列以引用的方式并入本文。转录调控元件可通过本领域中已知的方法标识,如但不限于7,456,273和7,183,395号美国专利、2009/0093049号美国专利公布和W02001/055371号国际公布中描述的方法,上述专利文献中的每一者的方法以引用的方式并入本文。

又在其它情况下,多核苷酸(例如,mRNA)的5'-UTR中使用的TEE是7,456,273和7,183,395号美国专利、2009/0093049号美国专利公布和W02001/055371号国际公布中描述的多核苷酸或其部分,上述专利文献中的每一者的TEE序列以引用的方式并入本文。

包括至少一个本文所述的TEE的5'-UTR可并入单顺反子序列中,如但不限于载体系统或多核苷酸载体。作为非限制性实例,载体系统或多核苷酸载体可包括7,456,273和7,183,395号美国专利、2007/0048776、2009/0093049和2011/0124100号美国专利公布以及W02007/025008和W02001/055371号国际专利公布中描述的那些,上述专利文献中的每一者的TEE序列以引用的方式并入本文。

本文所述的TEE可位于多核苷酸(例如,mRNA)的5'-UTR和/或3'-UTR中。位于3'-UTR中的TEE可以与位于和/或描述用于并入5'-UTR中的TEE相同和/或不同。

在一些情况下,多核苷酸(例如,mRNA)的3'-UTR可包括至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少30个、至少35个、至少40个、至少45个、至少50个、至少55个或超过60个TEE序列。本公开的多核苷酸(例如,mRNA)的3'-UTR中的TEE序列可以是相同或不同的TEE序列。TEE序列可以是诸如ABABAB、AABBAABBAABB或ABCABCABC或其变体的模式,重复一次、两次或三次以上。在这些模式中,每个字母A、B或C代表在核苷酸水平上的不同TEE序列。

在一种情况下,3'-UTR可包括间隔区以分隔两个TEE序列。作为非限制性实例,间隔区可以是15个核苷酸的间隔区和/或本领域中已知的其它间隔区。作为另一非限制性实例,3'-UTR可包括在3'-UTR中重复至少一次、至少两次、至少3次、至少4次、至少5次、至少6次、至少7次、至少8次、至少9次或9次以上的TEE序列-间隔区模块。

在其它情况下,分隔两个TEE序列的间隔区可包括本领域中已知的其它序列,其可调节本公开的多核苷酸(例如,mRNA)的翻译,如但不限于本文所述的miR序列(例如,miR结合位点和miR种子)。作为非限制性实例,用于分隔两个TEE序列的每个间隔区可包括不同的miR序列或miR序列的组成部分(例如,miR种子序列)。

在一些实施方案中,本公开的多核糖核苷酸包含miR和/或TEE序列。在一些实施方案中,将miR序列和/或TEE序列并入到本公开的多核糖核苷酸中可改变茎环区的形状,这可

以增加和/或减少翻译。参见例如Kedde等人,Nature Cell Biology 201012(10):1014-20,以全文引用的方式并入本文)。

感应序列和微RNA(miRNA)结合位点

感应序列包括例如微RNA(miRNA)结合位点、转录因子结合位点、结构化mRNA序列和/或基序、经工程化以充当内源核酸结合分子的假受体的人工结合位点及其组合。美国公布2014/0200261中描述了感应序列的非限制性实例,其内容以全文引用的方式并入本文。

在一些实施方案中,包含编码多肽的开放阅读框(ORF)的本公开的多核糖核苷酸(例如,核糖核酸(RNA),例如信使RNA(mRNA))还包含感应序列。在一些实施方案中,感应序列是miRNA结合位点。

miRNA是19-25个核苷酸长的非编码RNA,其与多核糖核苷酸结合,并通过降低稳定性或通过抑制多核糖核苷酸的翻译来下调基因表达。miRNA序列包含“种子”区,即成熟miRNA的2-8位区中的序列。miRNA种子可包含成熟miRNA的2-8或2-7位。在一些实施方案中,miRNA种子可包含7个核苷酸(例如,成熟miRNA的核苷酸2-8),其中相应miRNA结合位点中的种子互补位点侧接与miRNA位置1相对的腺苷(A)。在一些实施方案中,miRNA种子可包含6个核苷酸(例如,成熟miRNA的核苷酸2-7),其中相应miRNA结合位点中的种子互补位点侧接与miRNA位置1相对的腺苷(A)。参见例如Grimson A、Farh KK、Johnston WK、Garrett-Engele P、Lim LP、Bartel DP;Mol Cell.2007 Jul6;27(1):91-105。可进行靶细胞或组织的miRNA图谱分析,以确定细胞或组织中是否存在miRNA。在一些实施方案中,本公开的多核糖核苷酸(例如,核糖核酸(RNA),例如信使RNA(mRNA))包含一个或多个微RNA靶序列、微RNA序列或微RNA种子。这类序列可对应于任何已知的微RNA,如美国公布US2005/0261218和美国公布US2005/0059005中教导的那些,上述公布中的每一者的内容以全文引用的方式并入本文。

如本文所用,术语“微RNA(miRNA或miR)结合位点”是指多核糖核苷酸内的序列,例如在DNA内或RNA转录物内,包括在5'UTR和/或3'UTR中,其与miRNA的全部或区域具有足够的互补性,以与miRNA相互作用、缔合或结合。在一些实施方案中,包含编码多肽的ORF的本公开的多核糖核苷酸还包含miRNA结合位点。在示例性实施方案中,多核糖核苷酸(例如,核糖核酸(RNA),例如信使RNA(mRNA))的5'UTR和/或3'UTR包含miRNA结合位点。

与miRNA具有足够互补性的miRNA结合位点是指互补性程度足以促进miRNA介导的多核糖核苷酸的调控,例如miRNA介导的多核糖核苷酸的翻译抑制或降解。在本公开的示例性方面,与miRNA具有足够互补性的miRNA结合位点是指互补性程度足以促进miRNA介导的多核糖核苷酸的降解,例如miRNA引导的RNA诱导的沉默复合物(RISC)介导的mRNA的切割。miRNA结合位点可与例如19-25个核苷酸的miRNA序列、19-23个核苷酸的miRNA序列或22个核苷酸的miRNA序列具有互补性。miRNA结合位点可仅与miRNA的一部分互补,例如与例如与小于天然存在的miRNA序列的全长的1、2、3或4个核苷酸的部分互补。当所需调控是mRNA降解时,全或完全互补性(例如,在天然存在的miRNA的全部或大部分长度上的全互补性或完全互补性)。

在一些实施方案中,miRNA结合位点包括与miRNA种子序列具有互补性(例如,部分或完全互补性)的序列。在一些实施方案中,miRNA结合位点包括与miRNA种子序列具有完全互补性的序列。在一些实施方案中,miRNA结合位点包括与miRNA序列具有互补性(例如,部分或完全互补性)的序列。在一些实施方案中,miRNA结合位点包括与miRNA序列具有完全互

补性的序列。在一些实施方案中,除了1、2或3个核苷酸取代、末端添加和/或截短,miRNA结合位点与miRNA序列具有完全互补性。

在一些实施方案中,miRNA结合位点与相应miRNA的长度相同。在一些实施方案中,miRNA结合位点在5'末端、3'末端或两者处比相应miRNA短一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个或十二个核苷酸。仍在其它实施方案中,微RNA结合位点在5'末端、3'末端或两者处比相应微RNA短两个核苷酸。比相应miRNA短的miRNA结合位点仍然能够降解并入一个或多个miRNA结合位点的mRNA或阻止mRNA翻译。

在一些实施方案中,miRNA结合位点与作为含有Dicer的活性RISC的一部分的相应成熟miRNA结合。在另一实施方案中,miRNA结合位点与RISC中相应miRNA的结合使含有miRNA结合位点的mRNA降解或阻止mRNA被翻译。在一些实施方案中,miRNA结合位点与miRNA具有足够的互补性,使得包含miRNA的RISC复合物切割包含miRNA结合位点的多核糖核苷酸。在一些实施方案中,miRNA结合位点具有不完全互补性,使得包含miRNA的RISC复合物诱导包含miRNA结合位点的多核糖核苷酸的不稳定性。在另一实施方案中,miRNA结合位点具有不完全互补性,使得包含miRNA的RISC复合物抑制包含miRNA结合位点的多核糖核苷酸的转录。

在一些实施方案中,miRNA结合位点与相应的miRNA具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个或十二个错配。

在一些实施方案中,miRNA结合位点具有分别与相应miRNA的至少约十个、至少约十一个、至少约十二个、至少约十三个、至少约十四个、至少约十五个、至少约十六个、至少约十七个、至少约十八个、至少约十九个、至少约二十个或至少约二十一个连续核苷酸互补的至少约十个、至少约十一个、至少约十二个、至少约十三个、至少约十四个、至少约十五个、至少约十六个、至少约十七个、至少约十八个、至少约十九个、至少约二十个或至少约二十一个连续核苷酸。

通过将一个或多个miRNA结合位点工程化到本公开的多核糖核苷酸中,多核糖核苷酸可以被靶向降解或减少的翻译,只要所讨论的miRNA是可用的。这可降低递送多核糖核苷酸时的脱靶效应。在一些实施方案中,如果本公开的多核糖核苷酸并不旨在向组织或细胞递送但最终到达那里,则如果将miRNA的一个或多个结合位点工程化到多核糖核苷酸的5'UTR和/或3'UTR中,那么在组织或细胞中丰富的miRNA可抑制所关注的基因的表达。

相反,miRNA结合位点可以从它们天然存在的多核糖核苷酸序列中被移除,以便增加特定组织中的蛋白质表达。在一些实施方案中,可以从多核糖核苷酸中移除特定miRNA的结合位点,以提高含有miRNA的组织或细胞中的蛋白质表达。

在一些实施方案中,本公开的多核糖核苷酸可在5'UTR和/或3'UTR中包括至少一个miRNA结合位点,以便将细胞毒性或细胞保护性mRNA治疗剂引导至特定的细胞,如但不限于正常细胞和/或癌细胞。在另一实施方案中,本公开的多核糖核苷酸可在5'-UTR和/或3'-UTR中包括两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个miRNA结合位点,以便将细胞毒性或细胞保护性mRNA治疗剂引导至特定的细胞,如但不限于正常细胞和/或癌细胞。

可以通过引入或移除一个或多个miRNA结合位点来实现多种组织中的表达的调控。可基于miRNA表达模式和/或它们在疾病中的图谱分析来决定是否移除或插入miRNA结

合位点。已经报道了miRNA的标识、miRNA结合位点及其表达模式和在生物学中的作用(例如 Bonauer等人,Curr Drug Targets 201011:943-949;Anand和Cheresh Curr Opin Hematol 2011 18:171-176;Contreras和Rao Leukemia 2012 26:404-413 (2011年12月20日.doi: 10.1038/leu.2011.356);Bartel Cell 2009 136:215-233;Landgraf等人,Cell,2007129: 1401-1414;Gentner 和Naldini,Tissue Antigens.201280:393-403,以及其中的所有参考文献;上述文献中的每一者以全文引用的方式并入本文)。

miRNA和miRNA结合位点对应于任何已知的序列,包括2014/0200261、2005/0261218和2005/0059005号美国公布中描述的非限制性实例,上述专利文献中的每一者以全文引用的方式并入本文。

已知miRNA调控mRNA并因此调控蛋白质表达的组织的实例包括但不限于肝脏(miR-122)、肌肉(miR-133、miR-206、miR-208)、内皮细胞(miR-17-92、miR-126)、骨髓细胞(miR-142-3p、miR-142-5p、miR-16、miR-21、miR-223、miR-24、miR-27)、脂肪组织(let-7、miR-30c)、心脏(miR-1d、miR-149)、肾脏(miR-192、miR-194、miR-204)和肺上皮细胞(let-7、miR-133、miR-126)。

具体地,已知miRNA在免疫细胞(也称为造血细胞)如抗原呈递细胞(APC)(例如,树突细胞和巨噬细胞)、巨噬细胞、单核细胞、B淋巴细胞、T淋巴细胞、粒细胞、自然杀伤细胞等中差异表达。免疫细胞特异性miRNA参与免疫原性、自身免疫、对感染的免疫反应、炎症以及基因治疗和组织/器官移植后不需要的免疫反应。免疫细胞特异性miRNA还调控造血细胞(免疫细胞)的发育、增殖、分化和凋亡的许多方面。在一些实施方案中,miR-142和miR-146仅仅在免疫细胞中表达,特别是在髓样树突细胞中丰富。已经证明可以通过向多核糖核苷酸的3'-UTR中添加miR-142结合位点来关闭对多核糖核苷酸的免疫反应,从而在组织和细胞中实现更稳定的基因转移。miR-142有效地降解抗原呈递细胞中的外源性多核糖核苷酸,并抑制转导细胞的细胞毒性消除(例如,Annoni A等人,blood,2009,114,5152-5161;Brown BD等人,Nat med.2006,12(5),585-591;Brown BD等人,blood,2007,110(13):4144-4152,上述文献中的每一者以全文引用的方式并入本文)。

抗原介导的免疫反应可以指由外来抗原触发的免疫反应,当外来抗原进入生物体时,其被抗原呈递细胞处理,并在抗原呈递细胞的表面上展示。T细胞可识别呈递的抗原,并诱导表达抗原的细胞的细胞毒性消除。

将miR-142结合位点引入到本公开的多核糖核苷酸的5'UTR和/或3'UTR中可通过miR-142介导的降解选择性地抑制抗原呈递细胞中的基因表达,限制抗原呈递细胞(例如,树突细胞)中的抗原呈递,从而在递送多核糖核苷酸后防止抗原介导的免疫反应。然后多核糖核苷酸在靶组织或细胞中稳定表达而不会触发细胞毒性消除。

在一些实施方案中,可以将已知在免疫细胞(特别是抗原呈递细胞)中表达的miRNA的结合位点工程化到本公开的多核糖核苷酸中,以通过miRNA介导的RNA降解来抑制多核糖核苷酸在抗原呈递细胞中的表达,从而抑制抗原介导的免疫反应。在不表达免疫细胞特异性miRNA的非免疫细胞中维持多核糖核苷酸的表达。在一些实施方案中,在一些实施方案中,为防止针对肝脏特异性蛋白质的免疫原性反应,可以移除任何miR-122结合位点,并且可以将miR-142(和/或miR-146)结合位点工程化到本公开的多核糖核苷酸的5'UTR和/或3'UTR中。

为进一步驱动APC和巨噬细胞中的选择性降解和抑制,本公开的多核糖核苷酸可单独或与miR-142和/或miR-146结合位点组合在5'UTR和/或3'UTR中包括进一步的负调控元件。作为非限制性实例,进一步的负调控元件是组成型衰变元件(CDE)。

免疫细胞特异性miRNA包括但不限于hsa-let-7a-2-3p、hsa-let-7a-3p、hsa-7a-5p、hsa-let-7c、hsa-let-7e-3p、hsa-let-7e-5p、hsa-let-7g-3p、hsa-let-7g-5p、hsa-let-7i-3p、hsa-let-7i-5p、miR-10a-3p、miR-10a-5p、miR-1184、hsa-let-7f-1--3p、hsa-let-7f-2--5p、hsa-let-7f-5p、miR-125b-1-3p、miR-125b-2-3p、miR-125b-5p、miR-1279、miR-130a-3p、miR-130a-5p、miR-132-3p、miR-132-5p、miR-142-3p、miR-142-5p、miR-143-3p、miR-143-5p、miR-146a-3p、miR-146a-5p、miR-146b-3p、miR-146b-5p、miR-147a、miR-147b、miR-148a-5p、miR-148a-3p、miR-150-3p、miR-150-5p、miR-151b、miR-155-3p、miR-155-5p、miR-15a-3p、miR-15a-5p、miR-15b-5p、miR-15b-3p、miR-16-1-3p、miR-16-2-3p、miR-16-5p、miR-17-5p、miR-181a-3p、miR-181a-5p、miR-181a-2-3p、miR-182-3p、miR-182-5p、miR-197-3p、miR-197-5p、miR-21-5p、miR-21-3p、miR-214-3p、miR-214-5p、miR-223-3p、miR-223-5p、miR-221-3p、miR-221-5p、miR-23b-3p、miR-23b-5p、miR-24-1-5p、miR-24-2-5p、miR-24-3p、miR-26a-1-3p、miR-26a-2-3p、miR-26a-5p、miR-26b-3p、miR-26b-5p、miR-27a-3p、miR-27a-5p、miR-27b-3p、miR-27b-5p、miR-28-3p、miR-28-5p、miR-2909、miR-29a-3p、miR-29a-5p、miR-29b-1-5p、miR-29b-2-5p、miR-29c-3p、miR-29c-5p、miR-30e-3p、miR-30e-5p、miR-331-5p、miR-339-3p、miR-339-5p、miR-345-3p、miR-345-5p、miR-346、miR-34a-3p、miR-34a-5p、miR-363-3p、miR-363-5p、miR-372、miR-377-3p、miR-377-5p、miR-493-3p、miR-493-5p、miR-542、miR-548b-5p、miR548c-5p、miR-548i、miR-548j、miR-548n、miR-574-3p、miR-598、miR-718、miR-935、miR-99a-3p、miR-99a-5p、miR-99b-3p和miR-99b-5p。此外,可通过微阵列杂交和切片机分析在免疫细胞中标识新的miRNA(例如, JimaDD等人, Blood, 2010, 116: e118-e127; VazC等人, BMC Genomics, 2010, 11, 288, 上述文献中的每一者的内容以全文引用的方式并入本文)。

已知在肝脏中表达的miRNA包括但不限于miR-107、miR-122-3p、miR-122-5p、miR-1228-3p、miR-1228-5p、miR-1249、miR-129-5p、miR-1303、miR-151a-3p、miR-151a-5p、miR-152、miR-194-3p、miR-194-5p、miR-199a-3p、miR-199a-5p、miR-199b-3p、miR-199b-5p、miR-296-5p、miR-557、miR-581、miR-939-3p和miR-939-5p。可以将来自任何肝脏特异性miRNA的miRNA结合位点引入到本公开的多核糖核苷酸中或从本公开的多核糖核苷酸中移除,以调节多核糖核苷酸在肝脏中的表达。肝脏特异性miRNA结合位点可单独或进一步与本公开的多核糖核苷酸中的免疫细胞(例如, APC) miRNA结合位点组合进行工程化。

已知在肺中表达的miRNA包括但不限于let-7a-2-3p、let-7a-3p、let-7a-5p、miR-126-3p、miR-126-5p、miR-127-3p、miR-127-5p、miR-130a-3p、miR-130a-5p、miR-130b-3p、miR-130b-5p、miR-133a、miR-133b、miR-134、miR-18a-3p、miR-18a-5p、miR-18b-3p、miR-18b-5p、miR-24-1-5p、miR-24-2-5p、miR-24-3p、miR-296-3p、miR-296-5p、miR-32-3p、miR-337-3p、miR-337-5p、miR-381-3p和miR-381-5p。可以将来自任何肺特异性miRNA的miRNA结合位点引入到本公开的多核糖核苷酸中或从本公开的多核糖核苷酸中移除,以调节多核糖核苷酸在肺中的表达。肺特异性miRNA结合位点可单独或进一步与本公开的多核糖核苷酸中的免疫细胞(例如, APC) miRNA结合位点组合进行工程化。

已知在心脏中表达的miRNA包括但不限于miR-1、miR-133a、miR-133b、miR-149-3p、miR-149-5p、miR-186-3p、miR-186-5p、miR-208a、miR-208b、miR-210、miR-296-3p、miR-320、miR-451a、miR-451b、miR-499a-3p、miR-499a-5p、miR-499b-3p、miR-499b-5p、miR-744-3p、miR-744-5p、miR-92b-3p和miR-92b-5p。可以将来自任何心脏特异性miRNA的miRNA结合位点引入到本公开的多核糖核苷酸中或从本公开的多核糖核苷酸中移除,以调节多核糖核苷酸在心脏中的表达。心脏特异性miRNA结合位点可单独或进一步与本公开的多核糖核苷酸中的免疫细胞(例如,APC)miRNA结合位点组合进行工程化。

已知在神经系统中表达的miRNA包括但不限于miR-124-5p、miR-125a-3p、miR-125a-5p、miR-125b-1-3p、miR-125b-2-3p、miR-125b-5p、miR-1271-3p、miR-1271-5p、miR-128、miR-132-5p、miR-135a-3p、miR-135a-5p、miR-135b-3p、miR-135b-5p、miR-137、miR-139-5p、miR-139-3p、miR-149-3p、miR-149-5p、miR-153、miR-181c-3p、miR-181c-5p、miR-183-3p、miR-183-5p、miR-190a、miR-190b、miR-212-3p、miR-212-5p、miR-219-1-3p、miR-219-2-3p、miR-23a-3p、miR-23a-5p、miR-30a-5p、miR-30b-3p、miR-30b-5p、miR-30c-1-3p、miR-30c-2-3p、miR-30c-5p、miR-30d-3p、miR-30d-5p、miR-329、miR-342-3p、miR-3665、miR-3666、miR-380-3p、miR-380-5p、miR-383、miR-410、miR-425-3p、miR-425-5p、miR-454-3p、miR-454-5p、miR-483、miR-510、miR-516a-3p、miR-548b-5p、miR-548c-5p、miR-571、miR-7-1-3p、miR-7-2-3p、miR-7-5p、miR-802、miR-922、miR-9-3p和miR-9-5p。在神经系统中富集的miRNA还包括在神经元中特异性表达的那些,包括但不限于miR-132-3p、miR-132-5p、miR-148b-3p、miR-148b-5p、miR-151a-3p、miR-151a-5p、miR-212-3p、miR-212-5p、miR-320b、miR-320e、miR-323a-3p、miR-323a-5p、miR-324-5p、miR-325、miR-326、miR-328、miR-922,和在神经胶质细胞中特异性表达的那些,包括但不限于miR-1250、miR-219-1-3p、miR-219-2-3p、miR-219-5p、miR-23a-3p、miR-23a-5p、miR-3065-3p、miR-3065-5p、miR-30e-3p、miR-30e-5p、miR-32-5p、miR-338-5p和miR-657。可以将来自任何CNS特异性miRNA的miRNA结合位点引入到本公开的多核糖核苷酸中或从本公开的多核糖核苷酸中移除,以调节多核糖核苷酸在神经系统中的表达。神经系统特异性miRNA结合位点可单独或进一步与本公开的多核糖核苷酸中的免疫细胞(例如,APC)miRNA结合位点组合进行工程化。

已知在胰腺中表达的miRNA包括但不限于miR-105-3p、miR-105-5p、miR-184、miR-195-3p、miR-195-5p、miR-196a-3p、miR-196a-5p、miR-214-3p、miR-214-5p、miR-216a-3p、miR-216a-5p、miR-30a-3p、miR-33a-3p、miR-33a-5p、miR-375、miR-7-1-3p、miR-7-2-3p、miR-493-3p、miR-493-5p和miR-944。可以将来自任何胰腺特异性miRNA的miRNA结合位点引入到本公开的多核糖核苷酸中或从本公开的多核糖核苷酸中移除,以调节多核糖核苷酸在胰腺中的表达。胰腺特异性miRNA结合位点可单独或进一步与本公开的多核糖核苷酸中的免疫细胞(例如,APC)miRNA结合位点组合进行工程化。

已知在肾脏中表达的miRNA包括但不限于miR-122-3p、miR-145-5p、miR-17-5p、miR-192-3p、miR-192-5p、miR-194-3p、miR-194-5p、miR-20a-3p、miR-20a-5p、miR-204-3p、miR-204-5p、miR-210、miR-216a-3p、miR-216a-5p、miR-296-3p、miR-30a-3p、miR-30a-5p、miR-30b-3p、miR-30b-5p、miR-30c-1-3p、miR-30c-2-3p、miR-30c-5p、miR-324-3p、miR-335-3p、miR-335-5p、miR-363-3p、miR-363-5p和miR-562。可以将来自任何肾脏特异性miRNA的miRNA结合位点引入到本公开的多核糖核苷酸中或从本公开的多核糖核苷酸中移除,以调

节多核糖核苷酸在肾脏中的表达。肾脏特异性miRNA结合位点可单独或进一步与本公开的多核糖核苷酸中的免疫细胞(例如,APC)miRNA结合位点组合进行工程化。

已知在肌肉中表达的miRNA包括但不限于let-7g-3p、let-7g-5p、miR-1、miR-1286、miR-133a、miR-133b、miR-140-3p、miR-143-3p、miR-143-5p、miR-145-3p、miR-145-5p、miR-188-3p、miR-188-5p、miR-206、miR-208a、miR-208b、miR-25-3p和miR-25-5p。可以将来自任何肌肉特异性miRNA的miRNA结合位点引入到本公开的多核糖核苷酸中或从本公开的多核糖核苷酸中移除,以调节多核糖核苷酸在肌肉中的表达。肌肉特异性miRNA结合位点可单独或进一步与本公开的多核糖核苷酸中的免疫细胞(例如,APC)miRNA结合位点组合进行工程化。

miRNA也在不同类型的细胞中差异表达,如但不限于内皮细胞、上皮细胞和脂肪细胞。

已知在内皮细胞中表达的miRNA包括但不限于let-7b-3p、let-7b-5p、miR-100-3p、miR-100-5p、miR-101-3p、miR-101-5p、miR-126-3p、miR-126-5p、miR-1236-3p、miR-1236-5p、miR-130a-3p、miR-130a-5p、miR-17-5p、miR-17-3p、miR-18a-3p、miR-18a-5p、miR-19a-3p、miR-19a-5p、miR-19b-1-5p、miR-19b-2-5p、miR-19b-3p、miR-20a-3p、miR-20a-5p、miR-217、miR-210、miR-21-3p、miR-21-5p、miR-221-3p、miR-221-5p、miR-222-3p、miR-222-5p、miR-23a-3p、miR-23a-5p、miR-296-5p、miR-361-3p、miR-361-5p、miR-421、miR-424-3p、miR-424-5p、miR-513a-5p、miR-92a-1-5p、miR-92a-2-5p、miR-92a-3p、miR-92b-3p和miR-92b-5p。通过深度测序分析在内皮细胞中发现了许多新的miRNA(例如,VoellenkleC等人,RNA,2012,18,472-484,以全文引用的方式并入本文)。可以将来自任何内皮细胞特异性miRNA的miRNA结合位点引入到本公开的多核糖核苷酸中或从本公开的多核糖核苷酸中移除,以调节多核糖核苷酸在内皮细胞中的表达。

已知在上皮细胞中表达的miRNA包括但不限于let-7b-3p、let-7b-5p、miR-1246、miR-200a-3p、miR-200a-5p、miR-200b-3p、miR-200b-5p、miR-200c-3p、miR-200c-5p、miR-338-3p、miR-429、miR-451a、miR-451b、miR-494、miR-802和miR-34a、miR-34b-5p、miR-34c-5p、miR-449a、miR-449b-3p、呼吸道纤毛上皮细胞中特异性的miR-449b-5p、let-7家族、miR-133a、miR-133b、肺上皮细胞中特异性的miR-126、miR-382-3p、肾上皮细胞中特异性的miR-382-5p和角膜上皮细胞中特异性的miR-762。可以将来自任何上皮细胞特异性miRNA的miRNA结合位点引入到本公开的多核糖核苷酸中或从本公开的多核糖核苷酸中移除,以调节多核糖核苷酸在上皮细胞中的表达。

此外,胚胎干细胞中富集了大量miRNA,其控制干细胞自我更新以及诸如神经细胞、心肌细胞、造血细胞、皮肤细胞、成骨细胞和肌细胞的各种细胞系的发育和/或分化(例如,Kuppusamy KT等人,Curr.Mol Med,2013,13(5),757-764;Vidigal JA和Ventura A,Semin Cancer Biol.2012,22(5-6),428-436;Goff LA等人,PLoS One,2009,4:e7192;Morin RD等人,Genome Res,2008,18,610-621;Yoo JK等人,Stem Cells Dev.2012,21(11),2049-2057,上述文献中的每一者以全文引用的方式并入本文)。在胚胎干细胞中丰富的MiRNA包括但不限于let-7a-2-3p、let-a-3p、let-7a-5p、let7d-3p、let-7d-5p、miR-103a-2-3p、miR-103a-5p、miR-106b-3p、miR-106b-5p、miR-1246、miR-1275、miR-138-1-3p、miR-138-2-3p、miR-138-5p、miR-154-3p、miR-154-5p、miR-200c-3p、miR-200c-5p、miR-

290、miR-301a-3p、miR-301a-5p、miR-302a-3p、miR-302a-5p、miR-302b-3p、miR-302b-5p、miR-302c-3p、miR-302c-5p、miR-302d-3p、miR-302d-5p、miR-302e、miR-367-3p、miR-367-5p、miR-369-3p、miR-369-5p、miR-370、miR-371、miR-373、miR-380-5p、miR-423-3p、miR-423-5p、miR-486-5p、miR-520c-3p、miR-548e、miR-548f、miR-548g-3p、miR-548g-5p、miR-548i、miR-548k、miR-548l、miR-548m、miR-548n、miR-548o-3p、miR-548o-5p、miR-548p、miR-664a-3p、miR-664a-5p、miR-664b-3p、miR-664b-5p、miR-766-3p、miR-766-5p、miR-885-3p、miR-885-5p、miR-93-3p、miR-93-5p、miR-941、miR-96-3p、miR-96-5p、miR-99b-3p和miR-99b-5p。许多预测的新miRNA是通过人胚胎干细胞中的深度测序发现的(例如,Morin RD等人,Genome Res,2008,18,610-621;Goff LA等人,PLoS One,2009,4:e7192;Bar M等人,Stem cells,2008,26,2496-2505,上述文献中的每一者的内容以全文引用的方式并入本文)。

在一些实施方案中,胚胎干细胞特异性miRNA的结合位点可包括在本公开的多核糖核苷酸的3'UTR中或从本公开的多核糖核苷酸的3'UTR中移除,以调节胚胎干细胞的发育和/或分化,抑制退行性疾患(例如,退行性疾病)中的干细胞的衰老,或刺激处于疾病状态的干细胞(例如,癌症干细胞)的衰老和凋亡。

进行了许多miRNA表达研究以分析miRNA在各种癌细胞/组织及其它疾病中的差异表达。一些miRNA在某些癌细胞中异常过度表达,而另一些则表达不足。在一些实施方案中,miRNA在癌细胞(WO2008/154098、US2013/0059015、US2013/0042333、WO2011/157294);癌症干细胞(US2012/0053224);胰腺癌和疾病(US2009/0131348、US2011/0171646、US2010/0286232、US8389210);哮喘和炎症(US8415096);前列腺癌(US2013/0053264);肝细胞癌(WO2012/151212、US2012/0329672、WO2008/054828、US8252538);肺癌细胞(WO2011/076143、WO2013/033640、WO2009/070653、US2010/0323357);皮肤T细胞淋巴瘤(WO2013/011378);结直肠癌细胞(WO2011/0281756、WO2011/076142);癌症阳性淋巴结(WO2009/100430、US2009/0263803);鼻咽癌(EP2112235);慢性阻塞性肺病(US2012/0264626、US2013/0053263);甲状腺癌(WO2013/066678);卵巢癌细胞(US2012/0309645、WO2011/095623);乳腺癌细胞(WO2008/154098、WO2007/081740、US2012/0214699)、白血病和淋巴瘤(WO2008/073915、US2009/0092974、US2012/0316081、US2012/0283310、WO2010/018563中差异表达,上述专利文献中的每一者的内容以全文引用的方式并入本文)。

作为非限制性实例,可以从本公开的多核糖核苷酸的3'UTR中移除在某些癌症和/或肿瘤细胞中过度表达的miRNA的miRNA结合位点,恢复在癌细胞中被过度表达的miRNA抑制的表达,从而改善相应的生物学功能,例如转录刺激和/或抑制、细胞周期阻滞、凋亡和细胞死亡。miRNA表达未上调的正常细胞和组织将保持不受影响。

MiRNA还可以调节复杂的生物学过程,如血管生成(例如,miR-132)(Anand和Cheresh Curr Opin Hematol 2011 18:171-176)。在本公开的多核糖核苷酸中,可移除或引入参与这类过程的miRNA结合位点,以便使多核糖核苷酸的表达适应生物学相关的细胞类型或相关的生物学过程。在此背景下,本公开的多核糖核苷酸被定义为营养缺陷型多核糖核苷酸。

茎环

多核苷酸(例如,mRNA)可包括茎环,如但不限于组蛋白茎环。茎环可以是长度为约

25或约26个核苷酸的核苷酸序列,如但不限于W02013/103659号国际专利公布中描述的那些,该专利文献以引用的方式并入本文。组蛋白茎环可相对于编码区位于3' (例如,在编码区的3'-末端)。作为非限制性实例,茎环可位于本文所述的多核苷酸的3'-端。在一些情况下,多核苷酸(例如,mRNA)包括一个以上茎环(例如,两个茎环)。W02012/019780和W0201502667号国际专利公布中描述了茎环序列的实例,上述专利文献的茎环序列以引用的方式并入本文。在一些情况下,多核苷酸包括茎环序列CAAAGGCTCTTTTCAGAGCCACCA (SEQ ID NO:1)。在其它情况下,多核苷酸包括茎环序列CAAAGGCUCUUUCAGAGCCACCA (SEQ ID NO:2)。

茎环可位于多核苷酸的第二末端区中。作为非限制性实例,茎环可位于第二末端区中的非翻译区(例如,3'-UTR)内。

在一些情况下,包括组蛋白茎环的多核苷酸(如但不限于mRNA)可通过添加3'-稳定化区(例如,包括至少一个链终止核苷的3'-稳定化区)来稳定。不希望受理论的束缚,添加至少一个链终止核苷可减慢多核苷酸的降解,并因此可增加多核苷酸的半衰期。

在其它情况下,包括组蛋白茎环的多核苷酸(如但不限于mRNA)可通过改变多核苷酸的3'-区来稳定,这可防止和/或抑制寡(U)的添加(参见例如W02013/103659号国际专利公布)。

又在其它情况下,包括组蛋白茎环的多核苷酸(如但不限于mRNA)可通过添加以3'-脱氧核苷、2',3'-二脱氧核苷、3'-O-甲基核苷、3'-O-乙基核苷、3'-阿拉伯糖核苷及本领域中已知和/或本文所述的其它替代核苷终止的寡核苷酸来稳定。

在一些情况下,本公开的多核苷酸可包括组蛋白茎环、聚A区和/或5'-帽结构。组蛋白茎环可在聚A区之前和/或之后。包括组蛋白茎环和聚A区序列的多核苷酸可包括本文所述的链终止核苷。

在其它情况下,本公开的多核苷酸可包括组蛋白茎环和5'-帽结构。5'-帽结构可包括但不限于本文所述和/或本领域中已知的那些。

在一些情况下,保守茎环区可包括本文所述的miR序列。作为非限制性实例,茎环区可包括本文所述的miR序列的种子序列。在另一非限制性实例中,茎环区可包括miR-122种子序列。

在某些情况下,保守茎环区可包括本文所述的miR序列,并且还可包括TEE序列。

在一些情况下,miR序列和/或TEE序列的并入会改变茎环区的形状,这可增加和/或减少翻译。(参见例如Kedde等人,A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3'UTR controls miR-221 and miR-22 accessibility.Nature CellBiology.2010,以全文引用的方式并入本文)。

多核苷酸可包括至少一个组蛋白茎环和一个聚A区或聚腺苷酸化信号。W02013/120497、W02013/120629、W02013/120500、W02013/120627、W02013/120498、W02013/120626、W02013/120499和W02013/120628号国际专利公布中描述了编码至少一个组蛋白茎环和聚A区或聚腺苷酸化信号的多核苷酸序列的非限制性实例,上述专利文献中的每一者的序列以引用的方式并入本文。在某些情况下,编码组蛋白茎环和聚A区或聚腺苷酸化信号的多核苷酸可编码病原体抗原或其片段,如W02013/120499和W02013/120628号国际专利公布中描述的多核苷酸序列,上述两者的序列以引用的方式并入本文。在其它情况下,编码组蛋白茎环

和聚A区或聚腺苷酸化信号的多核苷酸可编码治疗性蛋白质,如W02013/120497和W02013/120629号国际专利公布中描述的多核苷酸序列,上述两者的序列以引用的方式并入本文。在一些情况下,编码组蛋白茎环和聚A区或聚腺苷酸化信号的多核苷酸可编码肿瘤抗原或其片段,如W02013/120500和W02013/120627号国际专利公布中描述的多核苷酸序列,上述两者的序列以引用的方式并入本文。在其它情况下,编码组蛋白茎环和聚A区或聚腺苷酸化信号的多核苷酸可编码变应原性抗原或自身免疫性自体抗原,如W02013/120498和W02013/120626号国际专利公布中描述的多核苷酸序列,上述两者的序列以引用的方式并入本文。

聚A区

多核苷酸或核酸(例如,mRNA)可包括聚A序列和/或聚腺苷酸化信号。聚A序列可完全或大部分由腺嘌呤核苷酸或其类似物或衍生物组成。聚A序列可以是位置邻近核酸的3'非翻译区的尾。

在RNA加工期间,通常将腺苷核苷酸的长链(聚A区)添加到信使RNA(mRNA)中以高分子的稳定性。转录后立即切割转录物的3'-端以释放3'-羟基。然后聚A聚合酶将腺苷核苷酸链添加到RNA中。该过程被称为聚腺苷酸化,其添加了长度在100与250个残基之间的聚A区。

独特的聚A区长度可以为本公开的替代多核苷酸提供某些优点。

一般地,本公开的聚A区的长度为至少30个核苷酸长。在另一实施方案中,聚A区长度为至少35个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少40个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少45个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少55个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少60个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少70个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少80个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少90个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少100个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少120个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少140个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少160个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少180个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少200个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少250个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少300个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少350个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少400个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少450个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少500个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少600个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少700个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少800个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少900个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1000个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1100个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1200个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1300个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1400个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1500个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1600个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1700个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1800个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少1900个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少2000个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少2500个核苷酸。在另一实施方案中,所述长度为至少3000个核苷酸。

在一些情况下,聚A区在本文所述的替代多核苷酸分子上的长度可以是80个核苷

酸、120个核苷酸、160个核苷酸。

在其它情况下,聚A区在本文所述的替代多核苷酸分子上的长度可以是20、40、80、100、120、140或160个核苷酸。

在一些情况下,相对于总替代多核苷酸的长度来设计聚A区。这种设计可基于替代多核苷酸的编码区的长度、替代多核苷酸(如mRNA)的特定特征或区域的长度或基于由替代多核苷酸表达的最终产物的长度。当相对于替代多核苷酸的任何特征(例如,除了包括聚A区的mRNA部分)时,聚A区的长度可以比另外的特征大10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。聚A区也可以被设计为其所属的替代多核苷酸的一部分。在此背景下,聚A区可以是构建体总长度或构建体减去聚A区的总长度的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%或更多。

在某些情况下,用于聚A结合蛋白的工程化结合位点和/或多核苷酸(例如,mRNA)的缀合可用于增强表达。工程化结合位点可以是感应序列,其可作为多核苷酸(例如,mRNA)的局部微环境的配体的结合位点起作用。作为非限制性实例,多核苷酸(例如,mRNA)可包括至少一个工程化结合位点以改变聚A结合蛋白(PABP)及其类似物的结合亲和力。至少一个工程化结合位点的并入可增加PABP及其类似物的结合亲和力。

另外,多个不同的多核苷酸(例如,mRNA)可使用在聚A区的3'-末端的替代核苷酸通过3'-端与PABP(聚A结合蛋白)连接在一起。可在相关细胞系中进行转染实验,并且可以在转染后12小时、24小时、48小时、72小时和第7天通过ELISA测定蛋白质产生。作为非限制性实例,转染实验可用于评价由于添加至少一个工程化结合位点而对PABP或其类似物结合亲和力的影响。

在某些情况下,聚A区可用于调节翻译起始。虽然不希望受理论的束缚,但聚A区募集PABP,PABP又可与翻译起始复合物相互作用,因此可能是蛋白质合成所必需的。

在一些情况下,本公开中也可使用聚A区来防止3'-5'-外切核酸酶消化。

在一些情况下,多核苷酸(例如,mRNA)可包括聚A-G四联体(Quartet)。G-四联体是由DNA和RNA中的富G序列形成的四个鸟苷核苷酸的环状氢键合阵列。在此实施方案中,G-四联体在聚A区的端部并入。可以测定所得多核苷酸(例如,mRNA)的稳定性、蛋白质产生及其它参数,包括在不同时间点的半衰期。已发现聚A-G四联体导致的蛋白质产生相当于单独使用120个核苷酸的聚A区所见的至少75%。

在一些情况下,多核苷酸(例如,mRNA)可包括聚A区,并且可通过添加3'-稳定化区来稳定。具有聚A区的多核苷酸(例如,mRNA)可还包括5'-帽结构。

在其它情况下,多核苷酸(例如,mRNA)可包括聚A-G四联体。具有聚A-G四联体的多核苷酸(例如,mRNA)可还包括5'-帽结构。

在一些情况下,可用于稳定包括聚A区或聚A-G四联体的多核苷酸(例如,mRNA)的3'-稳定化区可以是但不限于WO2013/103659号国际专利公布中描述的那些,其聚A区和聚A-G四联体以引用的方式并入本文。在其它情况下,本公开可使用的3'-稳定化区包括链终止核苷,如3'-脱氧腺苷(虫草素)、3'-脱氧尿苷、3'-脱氧胞嘧啶、3'-脱氧鸟苷、3'-脱氧胸腺嘧啶、2',3'-二脱氧核苷如2',3'-二脱氧腺苷、2',3'-二脱氧尿苷、2',3'-二脱氧胞嘧啶、2',3'-二脱氧鸟苷、2',3'-二脱氧胸腺嘧啶、2'-脱氧核苷或O-甲基核苷。

在其它情况下,包括聚A区或聚A-G四联体的多核苷酸(如但不限于mRNA)可通过改

变多核苷酸的3'-区来稳定,这可防止和/或抑制寡(U)的添加(参见例如W02013/103659号国际专利公布)。

又在其它情况下,包括聚A区或聚A-G四联体的多核苷酸(如但不限于mRNA)可通过添加以3'-脱氧核苷、2',3'-二脱氧核苷3'-O-甲基核苷、3'-O-乙基核苷、3'-阿拉伯糖苷及本领域中已知和/或本文所述的其它替代核苷终止的寡核苷酸来稳定。

链终止核苷

核酸可包括链终止核苷。在一些实施方案中,链终止核苷可包括在它们的糖基团的2'和/或3'位置处脱氧产生的那些核苷。这类物质可包括3'-脱氧腺苷(虫草素)、3'-脱氧尿苷、3'-脱氧胞嘧啶、3'-脱氧鸟苷、3'-脱氧胸腺嘧啶和2',3'-二脱氧核苷如2',3'-二脱氧腺苷、2',3'-二脱氧尿苷、2',3'-二脱氧胞嘧啶、2',3'-二脱氧鸟苷和2',3'-二脱氧胸腺嘧啶。

基因组编辑技术

在一些实施方案中,所述核酸适用于基因组编辑技术。

在一些实施方案中,基因组编辑技术是成簇规则间隔短回文重复序列(CRISPR)或转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)。

在一些实施方案中,所述核酸是至少一种适用于选自由CRISPR RNA(crRNA)、反式激活crRNA(tracrRNA)、单导向RNA(sgRNA)和DNA修复模板组成的组的基因组编辑技术的核酸。

疫苗

在一些实施方案中,治疗剂和/或预防剂是RNA(例如,信使RNA(mRNA))的核糖核酸(RNA)癌症疫苗,其可以安全地指导身体的细胞机制产生几乎任何所关注的癌症蛋白质或其片段。在一些实施方案中,RNA是修饰的RNA。本公开的RNA疫苗可用于诱导针对癌症的平衡免疫反应,包括细胞和体液免疫,而没有例如插入诱变的可能性风险。

根据癌症的流行程度或医疗需求未满足的程度或水平,RNA疫苗可用于各种情况。RNA疫苗可用于治疗和/或预防各种转移阶段或程度的癌症。RNA疫苗具有优越的特性,因为它们产生的抗体滴度大得多,并且比包括癌症疫苗在内的替代抗癌疗法更早产生反应。虽然不希望受理论的束缚,但据信作为mRNA多核苷酸的RNA疫苗被更好地设计成在翻译后产生适当的蛋白质构象,因为RNA疫苗选择采用了天然细胞机制。与离体制造并可能触发不需要的细胞反应的传统疫苗不同,RNA疫苗以更天然的方式呈现给细胞系统。

本公开的一些实施方案提供了包括至少一种核糖核酸(RNA)多核苷酸的癌症疫苗,所述核糖核酸(RNA)多核苷酸具有编码至少一种癌抗原多肽或其免疫原性片段(例如,能够诱导针对癌症的免疫反应的免疫原性片段)的开放阅读框。其它实施方案包括至少一种具有编码能够诱导针对癌症的免疫反应的两种或更多种抗原或表位的开放阅读框的核糖核酸(RNA)多核苷酸。

本发明在一些方面是具有编码癌抗原的开放阅读框的mRNA和具有编码免疫检查点调节剂的开放阅读框的mRNA的疫苗。在一些实施方案中,免疫检查点调节剂是抑制性检查点多肽。在一些实施方案中,抑制性检查点多肽是与选自由PD-1、TIM-3、VISTA、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR和LAG3组成的组的分子特异性结合的抗体或其片段。在一些实施方案中,抑制性检查点多肽是抗CTLA4或抗PD1抗体。任选地,疫苗包括脂质纳米颗

粒。在一些实施方案中,对受试者施用具有编码癌抗原的开放阅读框的mRNA的疫苗。在其它实施方案中,3-10周后检查点抑制剂。在一些实施方案中,4周后施用检查点抑制剂。

在其它方面,本发明是具有编码至少2种癌抗原的开放阅读框的mRNA和脂质纳米颗粒载体的个性化癌症疫苗,其中所述至少2种癌抗原是患者特异性癌抗原。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒具有50-200nm的平均直径。

又在其它方面,本发明是具有编码至少2种癌抗原的开放阅读框的mRNA的个性化癌症疫苗,其中所述至少2种癌抗原代表患者的抗原。在一些实施方案中,患者的抗原是患者的外来体标识抗原。在一些实施方案中,单一mRNA编码癌抗原。在其它实施方案中,多种mRNA编码癌抗原。

在其它实施方案中,每种mRNA可编码5-10种癌抗原或单一癌抗原。在一些实施方案中,mRNA编码2-100种癌抗原。在一些实施方案中,mRNA编码10-100、20-100、50-100、100-200、300-400、500-600、600-700、700-800、900-1,000或1,000-10,000种癌抗原。

在一些实施方案中,

- a) 编码每种癌抗原的mRNA被切割敏感位点穿插;
- b) 编码每种癌抗原的mRNA在没有接头的情况下彼此直接连接;
- c) 编码每种癌抗原的mRNA用单一核苷酸接头彼此连接;
- d) 每种癌抗原包含25-35个氨基酸,并且包括位于中心的SNP突变;
- e) 至少30%的癌抗原对来自受试者的I类MHC分子具有最高亲和力;
- f) 至少30%的癌抗原对来自受试者的II类MHC分子具有最高亲和力;
- g) 至少50%的癌抗原对HLA-A、HLA-B和/或DRB1具有 $IC_{50} > 500$ nM的预测结合亲和力;
- h) mRNA编码20种癌抗原;
- i) 50%的癌抗原对I类MHC具有结合亲和力,且50%的癌抗原对II类MHC具有结合亲和力;和/或
- j) 编码癌抗原的mRNA被排列成使得癌抗原有序化以使假表位最小化。

在一些实施方案中,每种癌抗原包含31个氨基酸,并且包括位于中心的SNP突变,在SNP突变的每侧具有15个侧翼氨基酸。

在一些实施方案中,疫苗是个性化癌症疫苗,且其中癌抗原是受试者特异性癌抗原。在一些实施方案中,受试者特异性癌抗原可代表受试者的肿瘤样品的外显子组或受试者的肿瘤样品的转录组。在一些实施方案中,受试者特异性癌抗原可代表受试者的外来体。

在一些实施方案中,开放阅读框进一步编码一种或多种传统癌抗原。在一些实施方案中,传统癌抗原是非突变抗原。在一些实施方案中,传统癌抗原是突变抗原。

在一些实施方案中,mRNA疫苗还包含具有编码一种或多种传统癌抗原的开放阅读框的mRNA。

在一些实施方案中,单一mRNA编码癌抗原。在其它实施方案中,多种mRNA编码癌抗原。在一些实施方案中,每种癌抗原的长度为10-50个氨基酸。在其它实施方案中,每种癌抗原的长度为15-20个氨基酸。在其它实施方案中,癌抗原长度为20-50、25-100、100-200、200-300、300-400、400-500、500-1,000或1,000-10,000个氨基酸。

在一些实施方案中,疫苗还包含佐剂。

本公开的一些实施方案提供了配制在脂质纳米颗粒内的包括至少一种核糖核酸

(RNA)多核苷酸的癌症疫苗,所述核糖核酸(RNA)多核苷酸具有编码至少一种癌症多肽的开放阅读框、至少一个5'末端帽和至少一个化学修饰。在一些实施方案中,5'末端帽是7mG(5')ppp(5')N1mpNp。

在一些实施方案中,至少一个化学修饰选自假尿苷、假尿苷、N1-甲基假尿苷、N1-乙基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷和2'-O-甲基尿苷。在一些实施方案中,已优化了化学修饰核苷酸的并入程度以改善对疫苗制剂的免疫反应。

在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含阳离子脂质、PEG修饰的脂质、固醇和非阳离子脂质。在一些实施方案中,阳离子脂质是可离子化的阳离子脂质,且非阳离子脂质是中性脂质,并且固醇是胆固醇。在一些实施方案中,阳离子脂质选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、4-二甲基氨基丁酸二亚油基-甲酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)。

在一些实施方案中,脂质纳米颗粒制剂包括免疫增强剂(例如,TLR激动剂)以增强疫苗(制剂)的免疫原性。

在一些实施方案中,开放阅读框中100%的尿嘧啶具有化学修饰。在一些实施方案中,化学修饰在尿嘧啶的5-位。在一些实施方案中,化学修饰是N1-甲基假尿苷。

在其它实施方案中,编码APC重编程分子的mRNA包括在疫苗中或与疫苗共同施用。APC重编程分子可以是CIITA、伴侣蛋白如CLIP、HLA-DQ、HLA-DM;共刺激分子如CD40、CD80、CD86;CIITA片段如CIITA的氨基酸26-137或与CIITA具有80%序列同一性的蛋白质。

在其它方面提供了如下方法,通过标识来自受试者的样品的至少2种癌抗原在受试者中引发免疫反应,其中所述至少2种癌抗原包括选自由移码突变和重组组成的组的突变,并对受试者施用具有编码所述至少2种癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。

在一些实施方案中,从受试者的外来体中标识癌抗原。在一些实施方案中,从外来体中标识出2-100种抗原。在其它实施方案中,mRNA疫苗具有编码2-100种抗原的开放阅读框。单一mRNA或多种mRNA可编码抗原。

在一些实施方案中,抗原是癌抗原。癌抗原可具有选自点突变、移码突变和重组的突变。所述方法可进一步涉及通过外显子组分析确认癌抗原是受试者特异性的。

在一些实施方案中,所述方法可进一步涉及通过转录组分析确认癌抗原是受试者特异性的。

在一些实施方案中,所述方法还涉及在施用mRNA疫苗后至少一个月从受试者的样品中标识出至少2种癌抗原以产生第二组癌抗原,并对受试者施用具有编码第二组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。

在其它实施方案中,受试者的样品是肿瘤样品。

在其它方面,本发明包括通过如下方式在受试者中引发免疫反应的方法,从受试者的样品中标识出至少2种癌抗原以产生第一组癌抗原,对受试者施用具有编码第一组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗,在施用所述mRNA疫苗后至少一个月从受试者的样品中标识出至少2种癌抗原以产生第二组癌抗原,并对受试者施用具有编码第二组癌抗原的开放阅

读框的mRNA疫苗。

在一些实施方案中,在施用具有编码第一组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗后6个月至1年对受试者施用具有编码第二组抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。在其它实施方案中,在施用具有编码第一组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗后1-2年对受试者施用具有编码第二组抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。

在一些实施方案中,单一mRNA具有编码癌抗原的开放阅读框。在其它实施方案中,多种mRNA编码抗原。在一些实施方案中,第二组癌抗原包括2-100种抗原。在其它实施方案中,癌抗原具有选自点突变、移码突变和重组的突变。

在其它方面,本发明包括通过如下方式在受试者中引发免疫反应的方法,从受试者的样品中标识出至少2种癌抗原,对受试者施用具有编码所述至少2种癌抗原的开放阅读框的mRNA,并对受试者施用癌症治疗剂。在一些实施方案中,癌症治疗剂是靶向疗法。靶向疗法可以是BRAF抑制剂,如维莫非尼(PLX4032)或达拉非尼。

在其它实施方案中,癌症治疗剂是T细胞治疗剂。T细胞治疗剂可以是检查点抑制剂,如抗PD-1抗体或抗CTLA-4抗体。在一些实施方案中,抗PD-1抗体是BMS-936558(纳武单抗)。在其它实施方案中,抗CTLA-4抗体是伊匹单抗。在其它实施方案中,T细胞治疗剂是OX40L。又在其它实施方案中,癌症治疗剂是包含基于人群的肿瘤特异性抗原的疫苗。

在其它实施方案中,癌症治疗剂是包含具有编码一种或多种传统癌抗原的开放阅读框的mRNA的疫苗。

在一些实施方案中,将具有编码至少2种癌抗原的开放阅读框的mRNA与癌症治疗剂同时对受试者施用。在一些实施方案中,在施用癌症治疗剂前对受试者施用具有编码至少2种癌抗原的开放阅读框的mRNA。在一些实施方案中,在施用癌症治疗剂后对受试者施用具有编码至少2种癌抗原的开放阅读框的mRNA。

在本发明的其它方面提供了一种方法,包括将具有编码癌抗原的开放阅读框的mRNA与脂质纳米颗粒制剂混合以产生mRNA癌症疫苗,并在混合的24小时内对受试者施用所述mRNA癌症疫苗。在一些实施方案中,在混合的12小时内对受试者施用所述mRNA癌症疫苗。在其它实施方案中,在混合的1小时内对受试者施用所述mRNA癌症疫苗。在一些实施方案中,所述mRNA癌症疫苗编码2-100种癌抗原或10-100种癌抗原。

在一些实施方案中,疫苗是个性化癌症疫苗,且其中癌抗原是受试者特异性癌抗原。

在一些实施方案中,单一mRNA编码癌抗原。在其它实施方案中,多种mRNA编码癌抗原。在其它实施方案中,每种mRNA编码5-10种癌抗原或单一癌抗原。又在其它实施方案中,每种癌抗原长度为10-50个氨基酸或长度为15-20个氨基酸。

本文进一步提供了癌症疫苗在制造用于在受试者中诱导抗原特异性免疫反应的方法的药物中的用途,所述方法包括以有效产生抗原特异性免疫反应的量对受试者施用所述癌症疫苗。

在其它方面提供了通过如下方式治疗有需要的受试者的癌症的方法,从分离自受试者的外来体中标识出至少2种癌抗原;基于标识的抗原生产具有编码所述抗原的开放阅读框的mRNA疫苗;并对受试者施用所述mRNA疫苗,其中所述mRNA疫苗在受试者中诱导肿瘤特异性免疫反应,从而治疗受试者的癌症。在其它方面,本发明是可根据涉及如下的方法生

产的RNA疫苗,从分离自受试者的外来体中标识出至少2种癌抗原;基于标识的抗原制备具有编码所述抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。

在本发明的若干方面中提供了在受试者中引发针对癌抗原的免疫反应的方法。所述方法涉及对受试者施用包含至少一种RNA多核苷酸的RNA疫苗,所述RNA多核苷酸具有编码至少一种抗原性多肽或其免疫原性片段的开放阅读框,从而在受试者中诱导对所述抗原性多肽或其免疫原性片段特异性的免疫反应,其中接种之后受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度相对于用预防有效剂量的针对癌症的传统疫苗接种的受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度增加。“抗抗原性多肽抗体”是与抗原性多肽特异性结合的血清抗体。

预防有效剂量是在临床可接受的水平上防止癌症进展的治疗有效剂量。在一些实施方案中,治疗有效剂量是在疫苗的包装说明书中列出的剂量。如本文所用的传统疫苗是指不同于本发明的mRNA疫苗的疫苗。例如,传统疫苗包括但不限于活微生物疫苗、灭活微生物疫苗、亚单位疫苗、蛋白抗原疫苗、DNA疫苗等。在示例性实施方案中,传统疫苗是已经获得监管批准和/或由国家药品监管机构例如美国食品和药品管理局(FDA)或欧洲药品管理局(EMA)注册的疫苗。

在一些实施方案中,接种之后受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度相对于用预防有效剂量的针对癌症的传统疫苗接种的受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度增加1log至10log。

在一些实施方案中,接种之后受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度相对于用预防有效剂量的针对癌症的传统疫苗接种的受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度增加1log。

在一些实施方案中,接种之后受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度相对于用预防有效剂量的针对癌症的传统疫苗接种的受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度增加2log。

在一些实施方案中,接种之后受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度相对于用预防有效剂量的针对癌症的传统疫苗接种的受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度增加3log。

在一些实施方案中,接种之后受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度相对于用预防有效剂量的针对癌症的传统疫苗接种的受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度增加5log。

在一些实施方案中,接种之后受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度相对于用预防有效剂量的针对癌症的传统疫苗接种的受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度增加10log。

在本发明的其它方面提供了在受试者中引发针对癌抗原的免疫反应的方法。所述方法涉及对受试者施用包含至少一种RNA多核苷酸的RNA疫苗,所述RNA多核苷酸具有编码至少一种抗原性多肽或其免疫原性片段的开放阅读框,从而在受试者中诱导对抗原性多肽或其免疫原性片段特异性的免疫反应,其中受试者中的免疫反应相当于以相对于所述RNA疫苗2倍至100倍的剂量水平用针对癌抗原的传统疫苗接种的受试者中的免疫反应。

在一些实施方案中,受试者中的免疫反应相当于以相对于所述RNA疫苗两倍的剂量水平用传统疫苗接种的受试者中的免疫反应。

在一些实施方案中,受试者中的免疫反应相当于以相对于所述RNA疫苗三倍的剂量水平用传统疫苗接种的受试者中的免疫反应。

在一些实施方案中,受试者中的免疫反应相当于以相对于所述RNA疫苗4倍的剂量水平用传统疫苗接种的受试者中的免疫反应。

在一些实施方案中,受试者中的免疫反应相当于以相对于所述RNA疫苗5倍的剂量

水平用传统疫苗接种的受试者中的免疫反应。在一些实施方案中,受试者中的免疫反应相当于以相对于所述RNA疫苗10倍的剂量水平用传统疫苗接种的受试者中的免疫反应。

在一些实施方案中,受试者中的免疫反应相当于以相对于所述RNA疫苗50倍的剂量水平用传统疫苗接种的受试者中的免疫反应。

在一些实施方案中,受试者中的免疫反应相当于以相对于所述RNA疫苗100倍的剂量水平用传统疫苗接种的受试者中的免疫反应。

在一些实施方案中,受试者中的免疫反应相当于以相对于所述RNA疫苗10倍至1000倍的剂量水平用传统疫苗接种的受试者中的免疫反应。

在一些实施方案中,受试者中的免疫反应相当于以相对于所述RNA疫苗100倍至1000倍的剂量水平用传统疫苗接种的受试者中的免疫反应。

在其它实施方案中,通过测定受试者中的抗体滴度来评估免疫反应。

在其它方面,本发明包括通过如下方式在受试者中引发免疫反应的方法,对受试者施用包含至少一种RNA多核苷酸的RNA疫苗,所述RNA多核苷酸具有编码至少一种癌抗原性多肽或其免疫原性片段的开放阅读框,从而在受试者中诱导对抗原性多肽或其免疫原性片段特异性的免疫反应,其中免疫反应在受试者中的诱导相对于用预防有效剂量的针对癌抗原的传统疫苗接种的受试者中诱导的免疫反应早2天至10周。在一些实施方案中,在用预防有效剂量的传统疫苗以相对于所述RNA疫苗2倍至100倍的剂量水平接种的受试者中诱导受试者的免疫反应。

在一些实施方案中,免疫反应在受试者中的诱导相对于用预防有效剂量的传统疫苗接种的受试者中诱导的免疫反应早2天。

在一些实施方案中,免疫反应在受试者中的诱导相对于用预防有效剂量的传统疫苗接种的受试者中诱导的免疫反应早3天。在一些实施方案中,免疫反应在受试者中的诱导相对于用预防有效剂量的传统疫苗接种的受试者中诱导的免疫反应早1周。

在一些实施方案中,免疫反应在受试者中的诱导相对于用预防有效剂量的传统疫苗接种的受试者中诱导的免疫反应早2周。

在一些实施方案中,免疫反应在受试者中的诱导相对于用预防有效剂量的传统疫苗接种的受试者中诱导的免疫反应早3周。

在一些实施方案中,免疫反应在受试者中的诱导相对于用预防有效剂量的传统疫苗接种的受试者中诱导的免疫反应早5周。

在一些实施方案中,免疫反应在受试者中的诱导相对于用预防有效剂量的传统疫苗接种的受试者中诱导的免疫反应早10周。

一种通过对受试者施用具有编码第一抗原性多肽的开放阅读框的癌症RNA疫苗而在受试者中引发针对癌症的免疫反应的方法,其中RNA多核苷酸不包括稳定化元件,且其中佐剂不与所述疫苗共同配制或共同施用。

又在其它方面,本发明包括产生编码包含1000个与3000个之间的核苷酸的多联体癌抗原的mRNA的方法,所述方法通过

(a) 使包含编码多联体癌抗原的开放阅读框的第一多核苷酸和包含5'-UTR的第二多核苷酸与缀合至固体支持物的多核苷酸结合;

(b) 在合适的条件下使第二多核苷酸的3'-末端与第一多核苷酸的5'-末端连接,

其中合适的条件包括DNA连接酶,从而产生第一连接产物;

(c) 在合适的条件下使包含3'-UTR的第三多核苷酸的5'末端与第一连接产物的3'-末端连接,其中合适的条件包括RNA连接酶,从而产生第二连接产物;以及

(d) 自固体支持物释放第二连接产物,从而产生编码包含1000个与3000个之间的核苷酸的多联体癌抗原的mRNA。在所提供的组合物或方法中的任一者的一些实施方案中,所述mRNA编码一种或多种复发性多态性(recurrent polymorphism)。在一些实施方案中,一种或多种复发性多态性包含p53中的复发性体细胞癌突变。在一些这类实施方案中,p53中的一种或多种复发性体细胞癌突变选自以下组成的组:

(1) 在邻近密码子p.T125的规范5'剪接位点的突变;

(2) 在邻近密码子p.331的规范5'剪接位点的突变;

(3) 在邻近密码子p.126的规范3'剪接位点的突变;

(4) 在邻近密码子p.224的规范5'剪接位点的突变,诱导了隐蔽的替代内含子5'剪接位点。

在一些实施方案中,本发明提供了包含编码开放阅读框(ORF)的mRNA的癌症治疗性疫苗,所述开放阅读框编码新抗原肽(1)至(4)中的一者或多者。在一些实施方案中,本发明提供了基于含有任何上述突变的患者的肿瘤而选择性施用含有或编码肽(1)-(4)中的一者或多者的疫苗。在一些实施方案中,本发明提供了基于含有任何上述突变的受试者的肿瘤和含有预测与所得新抗原结合的相应HLA等位基因的受试者的正常HLA类型的双重标准而选择性施用疫苗。

在本发明的其它方面提供了通过如下方式用个性化mRNA癌症疫苗治疗受试者的方法,从受试者中分离样品,通过分析来自样品的患者转录组和/或患者外显子组来标识一组新表位以产生患者特异性突变组,基于MHC结合强度、MHC结合多样性、预测的免疫原性程度、低自行反应性和/或T细胞反应性从突变组中选择用于疫苗的一组新表位,制备编码新表位组的mRNA疫苗,并在从受试者中分离样品的两个月内对受试者施用mRNA疫苗。在一些实施方案中,在从受试者中分离样品的一个月内对受试者施用mRNA疫苗。

在其它方面,本发明包括通过如下方式标识用于个性化mRNA癌症疫苗的一组新表位的方法,所述疫苗具有一种或多种编码新表位组的多核苷酸,a.通过分析患者转录组和患者外显子组来标识患者特异性突变组,b.基于以下中的至少三项使用新表位的加权值从突变组中选择15-500个新表位的亚组:患者RNA测序中的基因或转录物水平表达的评估;变体调用置信度得分;RNA测序等位基因特异性表达;保守与非保守氨基酸取代;点突变的位置(增加的TCR接合的居中得分);点突变的位置(差异HLA结合的锚定得分);自身性:与患者WES数据的核心表位同源性<100%;8聚体-11聚体的HLA-A和-BIC50;15聚体-20聚体的HLA-DRB 1 IC50;混杂度得分(即预测结合的患者HLA数);8聚体-11聚体的HLA-C IC50;15聚体-20聚体的HLA-DRB3-5 IC50;15聚体-20聚体的HLA-DQB 1/A1 IC50;15聚体-20聚体的HLA-DPB 1/A1 IC50;I类与II类比例;涵盖的患者HLA-A、-B和DRB 1同种异型的多样性;点突变与复杂表位(例如移码)的比例;和/或假表位HLA结合得分,和c.基于最高加权值从亚组中选择用于个性化mRNA癌症疫苗的新表位组,其中新表位组包含15-40个新表位。

在一些实施方案中,本文所述的核酸疫苗是化学修饰的。在其它实施方案中,核酸疫苗是未修饰的。

又其它方面提供了用于对受试者进行疫苗接种的组合物和方法,包括对受试者施用核酸疫苗,所述核酸疫苗包含一种或多种具有编码第一抗原性多肽或多联体多肽的开放阅读框的RNA多核苷酸,其中所述RNA多核苷酸不包括稳定化元件,且其中佐剂不与疫苗共同配制或共同施用。

在其它方面,本发明是用于对受试者进行疫苗接种的组合物或方法,包括对受试者施用核酸疫苗,所述核酸疫苗包含一种或多种具有编码第一抗原性多肽的开放阅读框的RNA多核苷酸,其中对受试者施用剂量在10ug/kg与400ug/kg之间的核酸疫苗。在一些实施方案中, RNA多核苷酸的剂量为每剂1-5ug、5-10ug、10-15ug、15-20ug、10-25ug、20-25ug、20-50ug、30-50ug、40-50ug、40-60ug、60-80ug、60-100ug、50-100ug、80-120ug、40-120ug、40-150ug、50-150ug、50-200ug、80-200ug、100-200ug、120-250ug、150-250ug、180-280ug、200-300ug、50-300ug、80-300ug、100-300ug、40-300ug、50-350ug、100-350ug、200-350ug、300-350ug、320-400ug、40-380ug、40-100ug、100-400ug、200-400ug或300-400ug。在一些实施方案中,通过皮内或肌内注射对受试者施用核酸疫苗。在一些实施方案中,在第零天对受试者施用核酸疫苗。在一些实施方案中,在第二十一天对受试者施用第二剂核酸疫苗。

在一些实施方案中,对受试者施用的核酸疫苗中包括25微克剂量的RNA多核苷酸。在一些实施方案中,对受试者施用的核酸疫苗中包括100微克剂量的RNA多核苷酸。在一些实施方案中,对受试者施用的核酸疫苗中包括50微克剂量的RNA多核苷酸。在一些实施方案中,对受试者施用的核酸疫苗中包括75微克剂量的RNA多核苷酸。在一些实施方案中,对受试者施用的核酸疫苗中包括150微克剂量的RNA多核苷酸。在一些实施方案中,对受试者施用的核酸疫苗中包括400微克剂量的RNA多核苷酸。在一些实施方案中,对受试者施用的核酸疫苗中包括200微克剂量的RNA多核苷酸。在一些实施方案中,与远端淋巴结相比, RNA多核苷酸在局部淋巴结中以100倍高的水平积累。在其它实施方案中,核酸疫苗是化学修饰的,而在其它实施方案中,核酸疫苗不是化学修饰的。

本发明的若干方面提供了包含一种或多种RNA多核苷酸和药学上可接受的载体或赋形剂的核酸疫苗,所述RNA多核苷酸具有编码第一抗原性多肽或多联体多肽的开放阅读框,其中所述RNA多核苷酸不包括稳定化元件,其中疫苗中不包括佐剂。在一些实施方案中,稳定化元件是组蛋白茎环。在一些实施方案中,稳定化元件是相对于野生型序列GC含量增加的核酸序列。

本发明的若干方面提供了包含一种或多种RNA多核苷酸的核酸疫苗,所述RNA多核苷酸具有编码第一抗原性多肽的开放阅读框,其中所述RNA多核苷酸存在于用于向宿主体内施用的制剂中,其为可接受百分比的人受试者赋予优于第一抗原的血清保护标准的抗体滴度。在一些实施方案中,由本发明的mRNA疫苗产生的抗体滴度是中和抗体滴度。在一些实施方案中,中和抗体滴度大于蛋白质疫苗。在其它实施方案中,由本发明的mRNA疫苗产生的中和抗体滴度大于含佐剂的蛋白质疫苗。又在其它实施方案中,由本发明的mRNA疫苗产生的中和抗体滴度为1,000-10,000、1,200-10,000、1,400-10,000、1,500-10,000、1,000-5,000、1,000-4,000、1,800-10,000、2000-10,000、2,000-5,000、2,000-3,000、2,000-4,000、3,000-5,000、3,000-4,000或2,000-2,500。中和滴度通常表示为斑块数减少达到50%所需的最高血清稀释度。

在优选的方面,本发明的疫苗(例如,包封LNP的mRNA疫苗)在接种的受试者的血液

或血清中产生预防和/或治疗有效水平、浓度和/或滴度的抗原特异性抗体。如本文所定义，术语抗体滴度是指在受试者(例如，人受试者)中产生的抗原特异性抗体的量。在示例性实施方案中，抗体滴度表示为仍然给出阳性结果的最大稀释度(在连续稀释中)的倒数。在示例性实施方案中，通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)确定或测量抗体滴度。在示例性实施方案中，通过中和测定法确定或测量抗体滴度，例如通过微量中和测定法。在某些方面，抗体滴度测量以比率表示，如1:40、1:100等。

在本发明的示例性实施方案中，有效疫苗产生大于1:40、大于1:100、大于1:400、大于1:1000、大于1:2000、大于1:3000、大于1:4000、大于1:500、大于1:6000、大于1:7500、大于1:10000的抗体滴度。在示例性实施方案中，在接种之后10天、接种之后20天、接种之后30天、接种之后40天或接种之后50天或更多天产生或达到所述抗体滴度。在示例性实施方案中，在对受试者施用单剂量疫苗之后产生或达到所述滴度。在其它实施方案中，在多剂量之后产生或达到所述滴度，例如在第一和第二剂量(例如，加强剂量)之后。

在本发明的示例性方面，以 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 为单位来测量或以IU/L(国际单位每升)或mIU/ml(毫国际单位每ml)为单位来测量抗原特异性抗体。在本发明的示例性实施方案中，有效疫苗产生 $>0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $>0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $>0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $>0.35\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $>0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $>1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $>2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $>5\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 $>10\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在本发明的示例性实施方案中，有效疫苗产生 $>10\text{mIU}/\text{ml}$ 、 $>20\text{mIU}/\text{ml}$ 、 $>50\text{mIU}/\text{ml}$ 、 $>100\text{mIU}/\text{ml}$ 、 $>200\text{mIU}/\text{ml}$ 、 $>500\text{mIU}/\text{ml}$ 或 $>1000\text{mIU}/\text{ml}$ 。在示例性实施方案中，在接种之后10天、接种之后20天、接种之后30天、接种之后40天或接种之后50天或更多天产生或达到所述抗体水平或浓度。在示例性实施方案中，在对受试者施用单剂量疫苗之后产生或达到所述水平或浓度。在其它实施方案中，在多剂量之后产生或达到所述水平或浓度，例如在第一和第二剂量(例如，加强剂量)之后。在示例性实施方案中，通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)确定或测量抗体水平或浓度。在示例性实施方案中，通过中和测定法确定或测量抗体水平或浓度，例如通过微量中和测定法。还提供了包含一种或多种RNA多核苷酸的核酸疫苗，所述RNA多核苷酸具有编码第一抗原性多肽或多联体多肽的开放阅读框，其中所述RNA多核苷酸存在于用于对宿主体内施用的制剂中，以引发比由具有稳定化元件或与佐剂一起配制并编码第一抗原性多肽的mRNA疫苗引发的抗体滴度持续更久的高抗体滴度。在一些实施方案中，配制RNA多核苷酸，以在单次施用的一周内产生中和抗体。在一些实施方案中，佐剂选自阳离子肽和免疫刺激性核酸。在一些实施方案中，阳离子肽是鱼精蛋白。

若干方面提供了包含一种或多种RNA多核苷酸的核酸疫苗，所述RNA多核苷酸具有包含至少一个化学修饰或任选没有核苷酸修饰的开放阅读框，所述开放阅读框编码第一抗原性多肽或多联体多肽，其中所述RNA多核苷酸存在于用于对宿主体内施用的制剂中，使得宿主中的抗原表达水平显著超过由具有稳定化元件或与佐剂一起配制并编码第一抗原性多肽的mRNA疫苗产生的抗原表达水平。

其它方面提供了包含一种或多种RNA多核苷酸的核酸疫苗，所述RNA多核苷酸具有包含至少一个化学修饰或任选没有核苷酸修饰的开放阅读框，所述开放阅读框编码第一抗原性多肽或多联体多肽，其中所述疫苗的RNA多核苷酸比未修饰的mRNA疫苗产生相当抗体滴度所需的RNA多核苷酸低至少10倍。在一些实施方案中，RNA多核苷酸以25-100微克的剂量存在。

本发明的若干方面还提供了配制成向人受试者递送的使用单位疫苗，其包含10 μg

与400ug之间的一种或多种RNA多核苷酸和药学上可接受的载体或赋形剂,所述RNA多核苷酸具有包含至少一个化学修饰或任选没有核苷酸修饰的开放阅读框,所述开放阅读框编码第一抗原性多肽或多联体多肽。在一些实施方案中,疫苗还包含阳离子脂质纳米颗粒。

本发明的若干方面提供了在个体或群体的群体中产生、维持或恢复对肿瘤的抗原记忆的方法,包括对所述个体或群体施用抗原记忆增强核酸疫苗,其包含(a)至少一种RNA多核苷酸,所述多核苷酸包含至少一个化学修饰或任选没有核苷酸修饰和两个或更多个密码子优化的开放阅读框,所述开放阅读框编码一组参考抗原性多肽,和(b)任选药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中,经由选自由肌内施用、皮内施用和皮下施用的途径对个体施用所述疫苗。在一些实施方案中,施用步骤包括使受试者的肌肉组织与适于注射组合物的装置接触。在一些实施方案中,施用步骤包括使受试者的肌肉组织同与电穿孔组合的适于注射组合物的装置接触。

本发明的若干方面提供了对受试者接种疫苗的方法,包括以对受试者接种疫苗有效的量对受试者施用25ug/kg与400ug/kg之间的单剂量的核酸疫苗,所述核酸疫苗包含一种或多种具有编码第一抗原性多肽或多联体多肽的开放阅读框的RNA多核苷酸。

其它方面提供了包含一种或多种RNA多核苷酸的核酸疫苗,所述RNA多核苷酸具有包含至少一个化学修饰的开放阅读框,所述开放阅读框编码第一抗原性多肽或多联体多肽,其中所述疫苗的RNA多核苷酸比未修饰的mRNA疫苗产生相当抗体滴度所需的RNA多核苷酸低至少10倍。在一些实施方案中,RNA多核苷酸以25-100微克的剂量存在。

其它方面提供了包含LNP配制的RNA多核苷酸的核酸疫苗,所述RNA多核苷酸具有不包含核苷酸修饰(未修饰)的开放阅读框,所述开放阅读框编码第一抗原性多肽或

多联体多肽,其中所述疫苗的RNA多核苷酸比不在LNP中配制的未修饰的mRNA疫苗产生相当抗体滴度所需的RNA多核苷酸低至少10倍。在一些实施方案中,RNA多核苷酸以25-100微克的剂量存在。

在其它方面,本发明包括治疗60岁或以上的老年受试者的方法,包括以对受试者接种疫苗有效的量对受试者施用包含一种或多种RNA多核苷酸的核酸疫苗,所述RNA多核苷酸具有编码抗原性多肽或多联体多肽的开放阅读框。

在其它方面,本发明包括治疗17岁或以下的年轻受试者的方法,包括以对受试者接种疫苗有效的量对受试者施用包含一种或多种RNA多核苷酸的核酸疫苗,所述RNA多核苷酸具有编码抗原性多肽或多联体多肽的开放阅读框。

在其它方面,本发明包括治疗成年受试者的方法,包括以对受试者接种疫苗有效的量对受试者施用包含一种或多种RNA多核苷酸的核酸疫苗,所述RNA多核苷酸具有编码抗原性多肽或多联体多肽的开放阅读框。

在一些方面,本发明包括用组合疫苗接种受试者的方法,所述组合疫苗包括至少两个编码抗原的核酸序列,其中所述疫苗的剂量是组合治疗剂量,其中编码抗原的每种单独核酸的剂量是亚治疗剂量。在一些实施方案中,组合剂量是对受试者施用的核酸疫苗中的25微克RNA多核苷酸。在一些实施方案中,组合剂量是对受试者施用的核酸疫苗中的100微克RNA多核苷酸。在一些实施方案中,组合剂量是对受试者施用的核酸疫苗中的50微克RNA多核苷酸。在一些实施方案中,组合剂量是对受试者施用的核酸疫苗中的75微克RNA多核苷酸。在一些实施方案中,组合剂量是对受试者施用的核酸疫苗中的150微克RNA多核苷酸。

酸。在一些实施方案中,组合剂量是对受试者施用的核酸疫苗中的400微克RNA多核苷酸。在一些实施方案中,编码抗原的每种单独核酸的亚治疗剂量是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20微克。在其它实施方案中,所述核酸疫苗是化学修饰的,而在其它实施方案中,所述核酸疫苗不是化学修饰的。

其它组分

除了前述部分中描述的那些之外,LNP还可包括一种或多种组分。在一些实施方案中,LNP可包括一种或多种小的疏水性分子,如维生素(例如,维生素A或维生素E)或固醇。

脂质纳米颗粒还可包括一种或多种渗透性增强剂分子、碳水化合物、聚合物、表面改变剂或其它组分。渗透性增强剂分子可以是例如2005/0222064号美国专利申请公布描述的分子。碳水化合物可包括单糖(例如,葡萄糖)和多糖(例如,糖原及其衍生物和类似物)。

聚合物可包括在LNP中和/或用于包封或部分包封LNP。聚合物可以是可生物降解的和/或生物相容的。聚合物可选自但不限于聚胺、聚醚、聚酰胺、聚酯、聚氨基甲酸酯、聚脲、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚酰亚胺、聚砜、聚氨酯、聚乙炔、聚乙烯、聚乙烯亚胺、聚异氰酸酯、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯腈和聚芳酯。在一些实施方案中,聚合物可包括聚(己内酯)(PCL)、乙烯乙酸乙烯酯聚合物(EVA)、聚(乳酸)(PLA)、聚(L-乳酸)(PLLA)、聚(乙醇酸)(PGA)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、聚(L-乳酸-共-乙醇酸)(PLLGA)、聚(D,L-丙交酯)(PDLA)、聚(L-丙交酯)(PLLA)、聚(D,L-丙交酯-共-己内酯)、聚(D,L-丙交酯-共-己内酯-共-乙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-PEO-共-D,L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-PPG-共-D,L-丙交酯)、聚氰基丙烯酸烷基酯、聚氨酯、聚-L-赖氨酸(PLL)、甲基丙烯酸羟丙酯(HPMA)、聚乙二醇、聚-L-谷氨酸、聚(羟基酸)、聚酐、聚原酸酯、聚(酯酰胺)、聚酰胺、聚(酯醚)、聚碳酸酯、聚亚烷基如聚乙烯和聚丙烯、聚亚烷基二醇如聚(乙二醇)(PEG)、聚环氧烷(PEO)、聚对苯二甲酸亚烷基酯如聚(对苯二甲酸乙二醇酯)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯醚、聚乙烯酯如聚(乙酸乙烯酯)、聚乙烯卤化物如聚(氯乙烯)(PVC)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚硅氧烷、聚苯乙烯、聚氨酯、衍生化纤维素如烷基纤维素、羟烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、丙烯酸的聚合物如聚((甲基)丙烯酸甲酯)(PMMA)、聚((甲基)丙烯酸乙酯)、聚((甲基)丙烯酸丁酯)、聚((甲基)丙烯酸异丁酯)、聚((甲基)丙烯酸己酯)、聚((甲基)丙烯酸异癸酯)、聚((甲基)丙烯酸月桂酯)、聚((甲基)丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)、聚(丙烯酸十八酯)及其共聚物和混合物、聚二噁烷酮及其共聚物、聚羟基烷酸酯、聚富马酸亚丙酯、聚甲醛、泊洛沙姆、泊洛沙胺、聚(原)酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)、聚(丙交酯-共-己内酯)、三亚甲基碳酸酯、聚(N-丙烯酰基吗啉)(PAcM)、聚(2-甲基-2-噁唑啉)(PMOX)、聚(2-乙基-2-噁唑啉)(PEOZ)和聚甘油。

表面改变剂可包括但不限于阴离子蛋白质(例如,牛血清白蛋白)、表面活性剂(例如,阳离子表面活性剂,如二甲基二-十八烷基溴化铵)、糖或糖衍生物(例如,环糊精)、核酸、聚合物(例如,肝素、聚乙二醇和泊洛沙姆)、粘液溶解剂(例如,乙酰半胱氨酸、艾蒿、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、大青属(clerodendrum)、溴己新、羧甲司坦、依普拉酮、美司钠、氨溴索、索布瑞醇、多米奥醇、来托司坦、司替罗宁、硫普罗宁、凝胶溶素、胸腺素 β 4、阿法链道酶、奈替克新和厄多司坦)以及DNase(例如,rhDNase)。表面改变剂可布置在纳米颗粒内和/或LNP的表面上(例如,通过包衣、吸附、共价连接或其它方法)。

LNP还可包含一种或多种官能化脂质。在一些实施方案中,脂质可用炔烃基团官能

化,所述炔烃基团当在适当反应条件下暴露于叠氮化物时可经历环加成反应。特别地,脂质双层可按这种方式用一个或多个可用于促进膜渗透、细胞识别或成像的基团官能化。LNP的表面也可与一种或多种有用的抗体缀合。可用于靶向细胞递送、成像和膜渗透的官能团和缀合物是本领域中熟知的。

除了这些组分之外,脂质纳米颗粒还可包括可用于药物组合物的任何物质。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒可包括一种或多种药学上可接受的赋形剂或辅助成分,如但不限于一种或多种溶剂、分散介质、稀释剂、分散助剂、悬浮助剂、造粒助剂、崩解剂、填充剂、助流剂、液体媒介物、粘结剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、缓冲剂、润滑剂、油、防腐剂及其它物质。还可以包括赋形剂,如蜡、黄油、着色剂、包衣剂、调味剂和芳香剂。药学上可接受的赋形剂是本领域中熟知的(参见例如Remington's The Science and Practice of Pharmacy,第21版,A.R.Gennaro;Lippincott,Williams&Wilkins,Baltimore,MD,2006)。

稀释剂的实例可包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、磷酸钠乳糖、蔗糖、纤维素、微晶纤维素、高岭土、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、氯化钠、干淀粉、玉米淀粉、粉状糖和/或其组合。造粒剂和分散剂可选自由以下组成的非限制性列表:马铃薯淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉、羟甲基淀粉钠、粘土、海藻酸、瓜尔胶、柑橘渣、琼脂、膨润土、纤维素和木制品、天然海绵、阳离子交换树脂、碳酸钙、硅酸盐、碳酸钠、交联聚(乙烯基吡咯烷酮)(交联维酮)、羧甲基淀粉钠(羧基淀粉钠)、羧甲基纤维素、交联羧甲基纤维素钠(交联羧甲基纤维素)、甲基纤维素、预胶化淀粉(淀粉1500)、微晶淀粉、水不溶性淀粉、羧甲基纤维素钙、硅酸镁铝(VEEGUM®)、月桂基硫酸钠、季铵化合物和/或其组合。

表面活性剂和/或乳化剂可包括但不限于天然乳化剂(例如,阿拉伯胶、琼脂、海藻酸、海藻酸钠、黄蓍胶、软骨胶、胆固醇、黄原胶、果胶、明胶、蛋黄、酪蛋白、羊毛脂、胆固醇、蜡和卵磷脂)、胶体粘土(例如,膨润土[硅酸铝]和VEEGUM®[硅酸镁铝])、长链氨基酸衍生物、高分子量醇(例如,硬脂醇、鲸蜡醇、油醇)、三醋精单硬脂酸酯、乙二醇二硬脂酸酯、甘油单硬脂酸酯和丙二醇单硬脂酸酯、聚乙烯醇)、卡波姆(例如,羧基聚甲烯、聚丙烯酸、丙烯酸聚合物和羧乙烯基聚合物)、角叉菜胶、纤维素衍生物(例如,羧甲基纤维素钠、粉状纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素)、脱水山梨糖醇脂肪酸酯(例如,聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯[TWEEN®20]、聚氧乙烯脱水山梨糖醇[TWEEN®60]、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯[TWEEN®80]、脱水山梨糖醇单棕榈酸酯[SPAN®40]、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯[SPAN®60]、脱水山梨糖醇三硬脂酸酯[SPAN®65]、甘油单油酸酯、脱水山梨糖醇单油酸酯[SPAN®80])、聚氧乙烯酯(例如,聚氧乙烯单硬脂酸酯[MYRJ®45]、聚氧乙烯氢化蓖麻油、聚乙氧基化蓖麻油、聚甲醛硬脂酸酯和SOLUTOL®)、蔗糖脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯(例如,CREMOPHOR®)、聚氧乙烯醚(例如,聚氧乙烯月桂基醚[BRIJ®30])、聚(乙烯基吡咯烷酮)、二乙二醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、油酸钠、油酸钾、油酸乙酯、油酸、月桂酸乙酯、月桂基硫酸钠、PLURONIC®F68、POLOXAMER®188、西曲溴铵、西吡氯铵、苯扎氯铵、多库酯钠和/或其组合。

结合剂可以是淀粉(例如,玉米淀粉和淀粉糊);明胶;糖(例如,蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糊精、糖蜜、乳糖、乳糖醇、甘露糖醇);天然及合成树胶(例如,阿拉伯树胶、海藻酸钠、爱尔兰藓提取物、潘瓦尔胶(panwargum)、茄替胶、isapol果壳粘液、羧甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素、乙酸纤维素、聚(乙烯基吡咯烷酮)、硅酸镁铝(VEEGUM®)和落叶松阿拉伯半乳聚糖);海藻酸盐;聚环氧乙烷;聚乙二醇;无机钙盐;硅酸;聚甲基丙烯酸酯;蜡;水;醇;及其组合,或任何其它合适的结合剂。

防腐剂的实例可包括但不限于抗氧化剂、螯合剂、抗微生物防腐剂、抗真菌防腐剂、醇防腐剂、酸性防腐剂和/或其它防腐剂。抗氧化剂的实例包括但不限于 α -生育酚、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚、丁基羟基甲苯、一硫代甘油、焦亚硫酸钾、丙酸、没食子酸丙酯、抗坏血酸钠、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠和/或亚硫酸氢钠。螯合剂的实例包括乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸一水合物、依地酸二钠、依地酸二钾、依地酸、富马酸、苹果酸、磷酸、依地酸钠、酒石酸和/或依地酸三钠。抗微生物防腐剂的实例包括但不限于苯扎氯铵、苜蓿素氯铵、苜蓿醇、溴硝醇、西曲溴铵、西吡氯铵、氯己定、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲酚、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶、伊咪脲、苯酚、苯氧基乙醇、苯基乙醇、苯基硝酸汞、丙二醇和/或硫柳汞。抗真菌防腐剂的实例包括但不限于对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸、羟基苯甲酸、苯甲酸钾、山梨酸钾、苯甲酸钠、丙酸钠和/或山梨酸。醇防腐剂的实例包括但不限于乙醇、聚乙二醇、苜蓿醇、苯酚、酚类化合物、双酚、氯丁醇、羟基苯甲酸酯和/或苯基乙醇。酸性防腐剂的实例包括但不限于维生素A、维生素C、维生素E、 β -胡萝卜素、柠檬酸、乙酸、脱氢抗坏血酸、抗坏血酸、山梨酸和/或植酸。其它防腐剂包括但不限于生育酚、生育酚乙酸酯、deteroxime甲磺酸酯、西曲溴铵、丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、乙二胺、月桂基硫酸钠(SLS)、月桂基醚硫酸钠(SLES)、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钾、焦亚硫酸钾、GLYDANT PLUS®、PHENONIP®、对羟基苯甲酸甲酯、GERMALL® 115、GERMABEN® II、NEOLONE™、KATHON™和/或EUXYL®。

缓冲剂的实例包括但不限于柠檬酸盐缓冲溶液、醋酸盐缓冲溶液、磷酸盐缓冲溶液、氯化铵、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、葡乳醛酸钙、葡庚糖酸钙、葡糖酸钙、d-葡糖酸、甘油磷酸钙、乳酸钙、乳糖醛酸钙、丙酸、乙酰丙酸钙、戊酸、磷酸氢钙、磷酸、磷酸三钙、磷酸氢氧化钙(calcium hydroxide phosphate)、乙酸钾、氯化钾、葡糖酸钾、钾混合物、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸钾混合物、乙酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、柠檬酸钠、乳酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸钠混合物、氨丁三醇、氨基磺酸盐缓冲液(例如,HEPES)、氢氧化镁、氢氧化铝、海藻酸、无热原水、等渗盐水、林格氏溶液、乙醇和/或其组合。润滑剂可选自由硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、二氧化硅、滑石、麦芽、甘油山萘酸酯、氢化植物油、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、亮氨酸、月桂基硫酸镁、月桂基硫酸钠及其组合组成的非限制性组。

油的实例包括但不限于杏仁、杏核油、鳄梨、巴巴苏、佛手柑、黑加仑籽、琉璃苣、杜松、甘菊、卡诺拉、葛缕子、巴西棕榈、蓖麻、肉桂、可可脂、椰子、鳕鱼肝、咖啡、玉米、棉籽、鹌鹑、桉树、月见草、鱼、亚麻籽、香叶醇、葫芦、葡萄籽、榛子、海索草、肉豆蔻酸异丙酯、荷荷巴、夏威夷核果、醒目薰衣草、薰衣草、柠檬、山鸡椒、夏威夷果仁、锦葵、芒果籽、白芒花籽、

貂、肉豆蔻、橄榄、橙、橘棘鲷、棕榈、棕榈仁、桃仁、花生、罂粟籽、南瓜籽、油菜籽、米糠、迷迭香、红花、檀香、sasquana、香薄荷、海鼠李、芝麻、乳木果油、硅酮、大豆、向日葵、茶树、蓟、丝蓆绮、香根草、胡桃和麦胚油以及硬脂酸丁酯、辛酸甘油三酯、癸酸甘油三酯、环甲硅油、癸二酸二乙酯、二甲硅油360、西甲硅油、肉豆蔻酸异丙酯、矿物油、辛基十二烷醇、油醇、硅油和/或其组合。

药物组合物

包含脂质纳米颗粒的制剂可全部或部分配制为药物组合物。药物组合物可包括一种或多种脂质纳米颗粒。在一些实施方案中，药物组合物可包括一种或多种脂质纳米颗粒，所述脂质纳米颗粒包括一种或多种不同的治疗剂和/或预防剂。药物组合物可还包括一种或多种药学上可接受的赋形剂或辅助成分，如本文所述的那些。关于药物组合物和剂的配制和制造的一般指南可见于Remington's The Science and Practice of Pharmacy,第21版,A.R.Gennaro;Lippincott,Williams&Wilkins,Baltimore,MD,2006。常规赋形剂和辅助成分可用于任何药物组合物中，除非任何常规赋形剂或辅助成分可能与本公开的制剂中的LNP的一种或多种组分不相容。赋形剂或辅助成分可能会与制剂的LNP的组分不相容，如果其与组分或LNP的组合可能导致任何不期望的生物学效果或在其它方面不利的效果的话。

在一些实施方案中，一种或多种赋形剂或辅助成分可占包括LNP的药物组合物的总质量或体积的超过50%。在一些实施方案中，一种或多种赋形剂或辅助成分可占药物惯例的50%、60%、70%、80%、90%或更多。在一些实施方案中，药学上可接受的赋形剂是至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%纯的。在一些实施方案中，赋形剂被批准用于人和兽用。在一些实施方案中，赋形剂被美国食品和药品管理局批准。在一些实施方案中，赋形剂是药物级的。在一些实施方案中，赋形剂符合美国药典(USP)、欧洲药典(EP)、英国药典和/或国际药典的标准。

根据本公开的药物组合物中的一种或多种脂质纳米颗粒、一种或多种药学上可接受的赋形剂和/或任何附加成分的相对量将有所变化，这取决于所治疗的受试者的特质、体格和/或疾患，并且进一步取决于组合物的施用途径。举例来说，药物组合物可包含0.1%与100% (重量/重量) 之间的一种或多种脂质纳米颗粒。作为另一实例，药物组合物可包含0.1%与15% (重量/体积) 之间的一种或多种两亲性聚合物 (例如，0.5%、1%、2.5%、5%、10%或12.5%w/v)。

在一些实施方案中，将本公开的脂质纳米颗粒和/或药物组合物冷藏或冷冻以用于储存和/或运输 (例如，在4℃或更低的温度下储存，如约-150℃与约0℃之间或约-80℃与约-20℃之间的温度 (例如，约-5℃、-10℃、-15℃、-20℃、-25℃、-30℃、-40℃、-50℃、-60℃、-70℃、-80℃、-90℃、-130℃或-150℃)。例如，包含一种或多种脂质纳米颗粒的药物组合物是在例如约-20℃、-30℃、-40℃、-50℃、-60℃、-70℃或-80℃下冷藏储存和/或运输的溶液或固体 (例如，经由冻干)。在某些实施方案中，本公开还涉及提高脂质纳米颗粒的稳定性和通过将脂质纳米颗粒和/或其药物组合物在4℃或更低的温度下储存的方法，所述温度如在约-150℃与约0℃之间或约-80℃与约-20℃之间，例如约-5℃、-10℃、-15℃、-20℃、-25℃、-30℃、-40℃、-50℃、-60℃、-70℃、-80℃、-90℃、-130℃或-150℃)。

可以对任何患者或受试者施用脂质纳米颗粒和/或包括一种或多种脂质纳米颗粒的药物组合物，包括可受益于通过向一种或多种特定细胞、组织、器官或系统或其群组 (如

肾系统)递送治疗剂和/或预防剂而提供治疗效果的那些患者或受试者。虽然本文提供的脂质纳米颗粒和包括脂质纳米颗粒的药物组合物的描述主要是针对适合对人施用的组合物,但技术人员将要理解的是,这类组合物通常适合对任何其它哺乳动物施用。改变适合对人施用的组合物以便使所述组合物适合对各种动物施用是很好理解的,并且普通熟练的兽医药理学家仅通过普通的实验(如果有的话)便可以设计和/或进行这种改变。考虑施用组合物的受试者包括但不限于人、其它灵长类动物及其它哺乳动物,包括商业相关的哺乳动物,如牛、猪、马、绵羊、猫、狗、小鼠和/或大鼠。

可通过药理学领域中已知或今后开发的任何方法制备包括一种或多种脂质纳米颗粒的药物组合物。一般来说,这类制备方法包括将活性成分与赋形剂和/或一种或多种其它辅助成分结合,然后如果需要或必要的话,将产品分割、成型和/或包装成所需的单剂量或多剂量单位。

根据本公开的药物组合物可作为单一单位剂量和/或作为多个单一单位剂量进行批量制备、包装和/或出售。如本文所用,“单位剂量”是包含预定量的活性成分(例如,脂质纳米颗粒)的药物组合物的离散量。活性成分的量通常等于将对受试者施用的活性成分的剂量和/或这种剂量的适宜分数,举例如这种剂量的一半或三分之一。

可以按适于多种施用途径和方法的多种形式制备药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物可制备成液体剂型(例如,乳液、微乳液、纳米乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酞剂)、可注射形式、固体剂型(例如,胶囊、片剂、丸剂、粉末和颗粒)、外用和/或透皮施用的剂型(例如,软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、粉末、溶液、喷雾剂、吸入剂和贴剂)、悬浮液、粉末及其它形式。

用于口服和肠胃外施用的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳液、微乳液、纳米乳液、溶液、悬浮液、糖浆和/或酞剂。除了活性成分之外,液体剂型还可以包含本领域中常用的惰性稀释剂举例如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯及其混合物。除了惰性稀释剂,口服组合物还可包括另外的治疗剂和/或预防剂、另外的剂如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂和/或芳香剂。在用于肠胃外施用的某些实施方案中,将组合物与增溶剂如Cremophor[®]、醇、油、改性油、二醇、聚山梨醇酯、环糊精、聚合物和/或其组合混合。

可根据已知的技术使用合适的分散剂、润湿剂和/或悬浮剂配制可注射制剂,例如无菌可注射水性或油质悬浮液。无菌可注射制剂可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂和/或溶剂中的无菌可注射溶液、悬浮液和/或乳液,例如为在1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的媒介物和溶剂有水、林格氏溶液U.S.P.和等渗氯化钠溶液。无菌不挥发性油常规用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以使用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。脂肪酸如油酸可用于制备注射剂。

可例如通过经细菌截留过滤器进行过滤和/或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂来对可注射制剂进行灭菌,可在使用之前将所述灭菌剂溶解或分散在无菌水或其它无菌可注射介质中。

为了延长活性成分的作用,通常可取的是减慢来自皮下或肌肉注射的活性成分的

吸收。这可通过使用水溶性差的结晶或无定形物质的液体悬浮液来实现。药物的吸收速率则取决于其溶出速率,而溶出速率又可取决于晶粒大小和结晶形式。或者,通过将药物溶解或悬浮在油媒介物中来实现肠胃外施用的药物形式的延迟吸收。通过在可生物降解的聚合物如聚丙交酯-聚乙交酯中形成药物的微胶囊化基质制成可注射的储库形式。根据药物与聚合物的比率和所使用的特定聚合物的性质,可以控制药物释放的速率。其它可生物降解聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。通过将药物包埋在与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备储库可注射制剂。

用于直肠或阴道施用的组合物通常是栓剂,其可通过将组合物与合适的非刺激性赋形剂如可可脂、聚乙二醇或栓剂蜡混合来制备,这些赋形剂在环境温度下为固体,但在体温下为液体,因此在直肠或阴道腔中融化并释放活性成分。

用于口服施用的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、薄膜、粉末和颗粒。在这类固体剂型中,活性成分与至少一种惰性药学上可接受的赋形剂如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或填充剂或增量剂(例如,淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和硅酸)、粘结剂(例如,羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶)、保湿剂(例如,甘油)、崩解剂(例如,琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠)、溶液阻滞剂(例如,石蜡)、吸收促进剂(例如,季铵化合物)、润湿剂(例如,鲸蜡醇和甘油单硬脂酸酯)、吸收剂(例如,高岭土和膨润土、硅酸盐)和润滑剂(例如,滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠)及其混合物混合。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型可包含缓冲剂。

相似类型的固体组合物可用作使用诸如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇等的赋形剂的软填充和硬填充明胶胶囊中的填充剂。片剂、糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒的固体剂型可制备有包衣和外壳,如肠溶包衣和药物配制领域中熟知的其它包衣。它们可任选包含遮光剂,并且可以是这样的组合物,即它们仅或优先在肠道的某一部分中任选以延迟方式释放活性成分。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。相似类型的固体组合物可用作使用诸如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇等的赋形剂的软填充和硬填充明胶胶囊中的填充剂。

外用和/或透皮施用组合物的剂型可包括软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、粉末、溶液、喷雾剂、吸入剂和/或贴剂。一般地,活性成分在无菌条件下与药学上可接受的赋形剂和/或任何需要的防腐剂和/或可能需要的缓冲剂混合。另外,本公开考虑使用透皮贴剂,其通常具有提供化合物向身体的受控递送的附加优点。可例如通过将化合物溶解和/或分配在适当介质中来制备这类剂型。或者或另外,可通过提供速率控制膜和/或通过将化合物分散在聚合物基质和/或凝胶中来控制速率。

用于递送本文所述的皮内药物组合物的合适装置包括短针装置,如美国专利4,886,499;5,190,521;5,328,483;5,527,288;4,270,537;5,015,235;5,141,496;和5,417,662中描述的那些。可通过限制针进入皮肤的有效穿透长度的装置施用皮内组合物,如PCT公布W0 99/34850中描述的那些及其功能等同装置。经由液体喷射注射器和/或经由刺穿角质层并产生到达真皮的喷射的针向真皮递送液体组合物的喷射注射装置是合适的。例如美国专利5,480,381;5,599,302;5,334,144;5,993,412;5,649,912;5,569,189;5,704,911;5,383,851;5,893,397;5,466,220;5,339,163;5,312,335;5,503,627;5,064,413;5,520,639;4,596,556;4,790,824;4,941,880;4,940,460;以及PCT公布W0 97/37705和W0 97/

13537中描述了喷射注射装置。使用压缩气体来加速粉末形式的疫苗穿过皮肤的外层到达真皮的弹道粉末/颗粒递送装置是合适的。或者或另外,常规注射器可用于皮内施用的经典芒图法中。

适于外用施用的制剂包括但不限于液体和/或半液体制剂,如擦剂、洗剂、水包油和/或油包水乳液,如乳膏、软膏和/或糊剂,和/或溶液和/或悬浮液。可外用施用的制剂可例如包含约1%至约10% (重量/重量) 的活性成分,尽管活性成分的浓度可与活性成分在溶剂中的溶解度极限一样高。用于外用施用的制剂可还包含一种或多种本文所述的附加成分。

药物组合物可按适于经由口腔进行肺部施用的制剂形式制备、包装和/或出售。这种制剂可包含有包含活性成分的干燥颗粒。这类组合物方便地呈干粉形式,用于使用包括干粉储存器的装置和/或使用自推进溶剂/粉末分配容器进行施用,推进剂流可被引导至干粉储存器以分散粉末,所述自推进溶剂/粉末分配容器如在密封容器中包含溶解和/或悬浮在低沸点推进剂中的活性成分的装置。干粉组合物可包括固体细粉稀释剂如糖,并且方便地以单位剂型提供。

低沸点推进剂通常包括在大气压下沸点低于65°F的液体推进剂。通常推进剂可占组合物的50%至99.9% (重量/重量),而活性成分可占组合物的0.1%至20% (重量/重量)。推进剂可还包含附加成分,如液体非离子和/或固体阴离子表面活性剂和/或固体稀释剂(其可具有与包含活性成分的颗粒相同数量级的粒度)。

配制用于肺部递送的药物组合物可提供溶液和/或悬浮液的液滴形式的活性成分。这类制剂可作为任选无菌的包含活性成分的水性和/或稀释醇溶液和/或悬浮液制备、包装和/或出售,并且可方便地使用任何雾化和/或喷雾装置进行施用。这类制剂可还包含一种或多种附加成分,包括但不限于调味剂如糖精钠、挥发油、缓冲剂、表面活性剂和/或防腐剂如羟基苯甲酸甲酯。通过这种施用途径提供的液滴的平均直径可在约1nm至约200nm的范围内。

本文描述为可用于肺部递送的制剂可用于鼻内递送药物组合物。适于鼻内施用的另一种制剂是包含活性成分并且平均颗粒为约0.2μm至500μm的粗粉。这种制剂以吸鼻烟的方式施用,即通过从靠近鼻子的粉末容器中通过鼻腔通道快速吸入。

适于经鼻施用的制剂可例如包含约少至0.1% (重量/重量) 和多至100% (重量/重量) 的活性成分,并且可包含一种或多种本文所述的附加成分。药物组合物可按适于口腔施用的制剂形式制备、包装和/或出售。这类制剂可例如呈采用常规方法制成的片剂和/或锭剂的形式,并且可包含例如0.1%至20% (重量/重量) 的活性成分,余量包含口服可溶解和/或可降解的成分和任选一种或多种本文所述的附加成分。或者,适于口腔施用的制剂可包含有包含活性成分的粉末和/或雾化和/或雾化溶液和/或悬浮液。这类粉状、气雾化和/或雾化制剂在分散时可具有约0.1nm至约200nm范围内的平均颗粒和/或液滴尺寸,并且可还包含一种或多种本文所述的任何附加成分。

药物组合物可按适于眼科施用的制剂形式制备、包装和/或出售。这类制剂可例如呈滴眼液的形式,包括例如活性成分在水性或油性液体赋形剂中的0.1/1.0% (重量/重量) 溶液和/或悬浮液。这类滴液可还包含缓冲剂、盐和/或一种或多种本文所述的其它任何附加成分。其它有用的可眼科施用的制剂包括包含呈微晶形式和/或脂质体制剂形式的活性

成分的那些。滴耳液和/或滴眼液被认为在本公开的范围內。

在细胞中产生多肽的方法

本公开提供了在哺乳动物细胞中产生所关注的多肽的方法。产生多肽的方法涉及使细胞与包含LNP的本公开的制剂接触,所述LNP包括编码所关注的多肽的mRNA。在细胞与脂质纳米颗粒接触后,mRNA可被吸收并在细胞中翻译,以产生所关注的多肽。

一般来说,使哺乳动物细胞与包括编码所关注的多肽的mRNA的LNP接触的步骤可在体内、离体、在培养物中或在体外进行。与细胞接触的脂质纳米颗粒的量和/或其中的mRNA的量可取决于所接触的细胞或组织的类型、施用方式、其中的脂质纳米颗粒和mRNA的物理化学特性(例如,尺寸、电荷和化学组成)及其它因素。一般来说,有效量的脂质纳米颗粒将允许在细胞中有效产生多肽。效率的量度可包括多肽翻译(由多肽表达指示)、mRNA降解的水平和免疫反应指标。

使包括mRNA的LNP与细胞接触的步骤可涉及或引起转染。在LNP的脂质组分中包括的磷脂可例如通过与细胞膜或细胞内膜相互作用和/或融合而促进转染和/或提高转染效率。转染可允许mRNA在细胞内翻译。

在一些实施方案中,本文所述的脂质纳米颗粒可在治疗上使用。例如,包括在LNP中的mRNA可编码治疗性多肽(例如,在可翻译区中),并在接触和/或进入(例如,转染)细胞后产生治疗性多肽。在其它实施方案中,包括在LNP中的mRNA可编码可改善或提高受试者的免疫力的多肽。在一些实施方案中,mRNA可编码粒细胞集落刺激因子或曲妥珠单抗。

在一些实施方案中,包括在LNP中的mRNA可编码重组多肽,所述重组多肽可替代一种或多种在与脂质纳米颗粒接触的细胞中可能基本上不存在的多肽。一种或多种基本上不存在的多肽的缺失可能是由于编码基因的基因突变或其调控途径所致。或者,通过mRNA的翻译产生的重组多肽可拮抗存在于细胞中、细胞的表面上或由细胞分泌的内源性蛋白质的活性。可能需要拮抗性重组多肽来对抗由内源性蛋白质的活性引起的不利作用,如由突变引起的活性或定位改变。在另一替代方式中,通过mRNA的翻译产生的重组多肽可间接或直接拮抗存在于细胞中、细胞的表面上或由细胞分泌的生物部分的活性。拮抗的生物部分可包括但不限于脂质(例如,胆固醇)、脂蛋白(例如,低密度脂蛋白)、核酸、碳水化合物和小分子毒素。通过mRNA的翻译产生的重组多肽可以被工程化以定位在细胞内,如特定区室如细胞核内,或者可以被工程化以从细胞中分泌或易位至细胞的质膜。

在一些实施方案中,使细胞与包括mRNA的LNP接触可降低细胞对外源核酸的先天免疫反应。可以使细胞与包括第一量的第一外源mRNA的第一脂质纳米颗粒接触,所述第一外源mRNA包括可翻译区,并且可测定细胞对第一外源mRNA的先天免疫反应的水平。随后,可以使细胞与包括第二量的第一外源mRNA的第二组合物接触,与第一量相比,第二量是第一外源mRNA的较少量。或者,第二组合物可包括第一量的不同于第一外源mRNA的第二外源mRNA。使细胞与第一和第二组合物接触的步骤可重复一次或多次。另外,可任选测定细胞中多肽产生(例如,翻译)的效率,并且可使细胞与第一和/或第二组合物反复再接触,直至达到目标蛋白质产生效率。

向细胞和器官递送治疗剂的方法

本公开提供了向哺乳动物细胞或器官递送治疗剂和/或预防剂(如核酸)的方法。向细胞递送治疗剂和/或预防剂涉及对受试者施用本公开的包含LNP的制剂,所述LNP包括

治疗剂和/或预防剂,如核酸,其中组合物的施用涉及使细胞与组合物接触。在一些实施方案中,可以向细胞或器官递送蛋白质、细胞毒性剂、放射性离子、化学治疗剂或核酸(如RNA,例如mRNA)。在治疗剂和/或预防剂是mRNA的情况下,在细胞与脂质纳米颗粒接触后,可翻译的mRNA可以在细胞中被翻译以产生所关注的多肽。然而,也可以向细胞递送基本上不可翻译的mRNA。基本上不可翻译的mRNA可用作疫苗,和/或可隔离细胞的翻译组分以减少细胞中其它物质的表达。

在一些实施方案中,LNP可靶向特定类型或类别的细胞(例如,特定器官或其系统的细胞)。在一些实施方案中,可以向哺乳动物肝脏、肾脏、脾脏、股骨或肺特异性递送包括所关注的治疗剂和/或预防剂的LNP。向特定类别的细胞、器官或其系统或群组特异性递送意味着例如在对哺乳动物施用LNP后,更高比例的包括治疗剂和/或预防剂的脂质纳米颗粒被递送至所关注的目的处(例如,组织)(相对于其它目的处)。在一些实施方案中,特异性递送可导致靶向目的处的每1g组织(例如,所关注的组织,如肝脏)的治疗剂和/或预防剂的量与另一目的处(例如,脾脏)相比增加大于2倍、5倍、10倍、15倍或20倍。在一些实施方案中,所关注的组织选自由以下组成的组:肝脏、肾脏、肺、脾脏、股骨、血管中的血管内皮(例如,冠状动脉内或股动脉内)或肾脏以及肿瘤组织(例如,经由肿瘤内注射)。

作为靶向或特异性递送的另一实例,LNP中可包括编码蛋白质结合伴侣(例如,抗体或其功能片段、支架蛋白或肽)或细胞表面上的受体的mRNA。mRNA可另外地或替代地用于指导脂质、碳水化合物或其它生物部分的合成和细胞外定位。或者,其它治疗剂和/或预防剂或LNP的其它要素(例如,脂质或配体)可基于它们对特定受体(例如,低密度脂蛋白受体)的亲和力进行选择,使得LNP可以更容易与靶细胞群体(包括受体)相互作用。在一些实施方案中,配体可包括但不限于特异性结合对的成员、抗体、单克隆抗体、Fv片段、单链Fv(scFv)片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、单结构域抗体、骆驼化抗体及其片段、人源化抗体及其片段及其多价形式;多价结合试剂,包括单或双特异性抗体,如二硫键稳定的Fv片段、scFv串联体、双抗体、三抗体或四抗体;以及适体、受体和融合蛋白。

在一些实施方案中,配体可以是表面结合的抗体,其可允许调节细胞靶向特异性。这是特别有用的,因为可以针对所需靶向位点所关注的表位提升高特异性抗体。在一些实施方案中,多种抗体在细胞的表面上表达,并且每种抗体对所需靶标可具有不同的特异性。这类方法可增加靶向相互作用的亲合力和特异性。

可例如由生物学领域的技术人员基于所需的细胞定位或功能来选择配体。在一些实施方案中,雌激素受体配体如他莫昔芬可以将细胞靶向雌激素依赖性乳腺癌细胞,所述细胞在细胞表面上具有增加数量的雌激素受体。配体/受体相互作用的其它非限制性实例包括CCR1(例如,用于治疗类风湿性关节炎和/或多发性硬化中的发炎关节组织或大脑)、CCR7、CCR8(例如,靶向淋巴组织)、CCR6、CCR9、CCR10(例如,靶向肠组织)、CCR4、CCR10(例如,用于靶向皮肤)、CXCR4(例如,用于一般增强的移行)、HCELL(例如,用于治疗炎症和炎症病症,骨髓)、 $\alpha 4\beta 7$ (例如,用于肠粘膜靶向)和VLA-4/NCAM-1(例如,靶向内皮细胞)。一般来说,本文所述的方法和组合物中可利用涉及靶向(例如,癌症转移)的任何受体。

靶向的细胞可包括但不限于肝细胞、上皮细胞、造血细胞、上皮细胞、内皮细胞、肺细胞、骨细胞、干细胞、间充质细胞、神经细胞、心肌细胞、脂肪细胞、血管平滑肌细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞、 β 细胞、垂体细胞、滑膜衬里细胞、卵巢细胞、睾丸细胞、成纤维细胞、B细

胞、T细胞、网织红细胞、白细胞、粒细胞和肿瘤细胞。

在一些实施方案中，LNP可靶向肝细胞。已显示载脂蛋白如载脂蛋白E (apoE) 与体内中性或接近中性的含脂质的脂质纳米颗粒缔合，并且已知与受体如肝细胞表面上所见的低密度脂蛋白受体 (LDLR) 缔合。因此，对受试者施用包括具有中性或接近中性的电荷的脂质组分的LNP可在受试者体内获得apoE，并且可随后以靶向方式将治疗剂和/或预防剂(例如，RNA)递送至包括LDLR的肝细胞。

治疗疾病和病症的方法

脂质纳米颗粒可用于治疗疾病、病症或疾患。特别地，这类组合物可用于治疗以蛋白质或多肽活性缺失或异常为特征的疾病、病症或疾患。在一些实施方案中，可以向细胞施用或递送本公开的包含LNP的制剂，所述LNP包括编码缺失或异常多肽的mRNA。mRNA的后续翻译可产生多肽，从而减少或消除由于多肽不存在或由多肽引起的异常活性引起的问题。因为翻译可快速发生，所以所述方法和组合物可用于治疗急性疾病、病症或疾患，如败血症、中风和心肌梗塞。LNP中包括的治疗剂和/或预防剂也可能能够改变给定物质的转录速率，从而影响基因表达。

以功能失调或异常蛋白质或多肽活性为特征的疾病、病症和/或疾患(可针对其施用组合物)包括但不限于罕见疾病、传染性疾病(既作为疫苗又作为治疗剂)、癌症和增殖性疾病、遗传性疾病(例如，囊性纤维化)、自身免疫性疾病、糖尿病、神经退行性疾病、心血管和肾血管疾病以及代谢疾病。多种疾病、病症和/或疾患的特征可在于蛋白质活性缺失(或显著降低，使得不存在适当的蛋白质功能)。这类蛋白质可能不存在，或者它们可能基本上没有功能。功能失调蛋白的一个具体实例是囊性纤维化跨膜传导调节蛋白(CFTR)基因的错义突变变体，其产生CFTR蛋白的功能失调蛋白质变体，该变体导致囊性纤维化。本公开提供了通过施用包括RNA和脂质组分的LNP治疗受试者的这类疾病、病症和/或疾患的方法，所述脂质组分包括根据式(I)的脂质、磷脂(任选不饱和)、PEG脂质和结构脂质，其中所述RNA可以是编码拮抗或以其它方式克服受试者的细胞中存在的异常蛋白质活性的多肽的mRNA。

本公开提供了涉及施用包括一种或多种治疗和/或预防剂(如核酸)的脂质纳米颗粒的方法和包括所述脂质纳米颗粒的药物组合物。关于本公开的特征和实施方案，术语治疗剂和预防剂在本文中可互换使用。可以采用对疾病、病症和/或疾患进行预防、治疗、诊断或成像和/或任何其它目的有效的任何合理的量和任何施用途对受试者施用治疗性组合物或其成像、诊断或预防性组合物。对给定受试者施用的具体量可以变化，这取决于受试者的种类、年龄和一般状况；施用目的；特定的组合物；施用模式；等等。为了易于施用和剂量均匀，可以按剂量单位形式配制根据本公开的组合物。然而将要理解的是，本公开的组合物的每日总用量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。对于任何特定患者的具体治疗有效、预防有效或在其它方面适当的剂量水平(例如，用于成像)将取决于多种因素，包括所治疗的病症(如果有的话)的严重程度和特性；所使用的一种或多种治疗剂和/或预防剂；所使用的具体组合物；患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食；所使用的具体药物组合物的施用时间、施用途和排泄速率；治疗的持续时间；与所使用的具体药物组合物组合或同时使用的药物；以及医学领域中熟知的类似因素。

可以通过任何途径施用包括一种或多种治疗剂和/或预防剂(如核酸)的LNP。在一些实施方案中，通过多种途径中的一种或多种来施用包括本文所述的一种或多种脂质纳米

颗粒的组合物,包括预防、诊断或成像组合物,所述途径包括口服、静脉内、肌内、动脉内、髓内、鞘内、皮下、心室内、透皮或皮内、皮间、直肠、阴道内、腹膜内、外用(例如,通过粉末、软膏、乳膏、凝胶、洗剂和/或滴液)、粘膜、鼻、口腔、肠、玻璃体内、瘤内、舌下、鼻内;通过气管内滴注、支气管滴注和/或吸入;作为口服喷雾剂和/或粉末、鼻腔喷雾剂和/或气雾剂和/或通过门静脉导管。在一些实施方案中,组合物可静脉内、肌内、皮内、动脉内、瘤内、皮下或通过吸入施用。然而,考虑到药物递送方面可能的科学进展,本公开涵盖通过任何适当的途径递送或施用本文所述的组合物。一般来说,最适当的施用途径将取决于多种因素,包括:包括一种或多种治疗剂和/或预防剂的脂质纳米颗粒的性质(例如,其在各种身体环境如血流和胃肠道中的稳定性)、患者的状况(例如,患者是否能够耐受特定的施用途径)等。

在某些实施方案中,可按如下剂量水平施用根据本公开的组合物,所述剂量水平足以在给定的剂量中递送约0.0001mg/kg至约10mg/kg、约0.001mg/kg至约10mg/kg、约0.005mg/kg至约10mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、约0.05mg/kg至约10mg/kg、约0.1mg/kg至约10mg/kg、约1mg/kg至约10mg/kg、约2mg/kg至约10mg/kg、约5mg/kg至约10mg/kg、约0.0001mg/kg至约5mg/kg、约0.001mg/kg至约5mg/kg、约0.005mg/kg至约5mg/kg、约0.01mg/kg至约5mg/kg、约0.05mg/kg至约5mg/kg、约0.1mg/kg至约5mg/kg、约1mg/kg至约5mg/kg、约2mg/kg至约5mg/kg、约0.0001mg/kg至约2.5mg/kg、约0.001mg/kg至约2.5mg/kg、约0.005mg/kg至约2.5mg/kg、约0.01mg/kg至约2.5mg/kg、约0.05mg/kg至约2.5mg/kg、约0.1mg/kg至约2.5mg/kg、约1mg/kg至约2.5mg/kg、约2mg/kg至约2.5mg/kg、约0.0001mg/kg至约1mg/kg、约0.001mg/kg至约1mg/kg、约0.005mg/kg至约1mg/kg、约0.01mg/kg至约1mg/kg、约0.05mg/kg至约1mg/kg、约0.1mg/kg至约1mg/kg、约0.0001mg/kg至约0.25mg/kg、约0.001mg/kg至约0.25mg/kg、约0.005mg/kg至约0.25mg/kg、约0.01mg/kg至约0.25mg/kg、约0.05mg/kg至约0.25mg/kg或约0.1mg/kg至约0.25mg/kg的治疗剂和/或预防剂(例如, mRNA),其中1mg/kg (mpk) 的剂量为每1kg受试者体重提供1mg治疗剂和/或预防剂。在一些实施方案中,施用LNP的剂量可以为约0.001mg/kg至约10mg/kg治疗剂和/或预防剂(例如, mRNA)。在其它实施方案中,施用的剂量可以为约0.005mg/kg至约2.5mg/kg治疗剂和/或预防剂。在某些实施方案中,施用的剂量可以为约0.1mg/kg至约1mg/kg。在其它实施方案中,施用的剂量可以为约0.05mg/kg至约0.25mg/kg。可按相同或不同的量每天一次或多次施用剂量,以获得所需水平的mRNA表达和/或治疗、诊断、预防或成像效果。所需剂量的递送可以是例如一天三次、一天两次、一天一次、每隔一天、每三天、每周、每两周、每三周或每四周。在某些实施方案中,可采用多次施用(例如,两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次或更多次施用)来递送所需剂量。在一些实施方案中,可例如在手术程序之前或之后或在急性疾病、病症或疾患的情况下施用单剂量。

包括一种或多种治疗剂和/或预防剂(如核酸)的脂质纳米颗粒可与一种或多种其它治疗剂、预防剂、诊断剂或成像剂组合使用。所谓“与……组合”并不旨在所述剂必须同时施用和/或配制用于一起递送,尽管这些递送方法也在本公开的范围内。在一些实施方案中,可以组合施用一种或多种包括一种或多种不同治疗剂和/或预防剂的脂质纳米颗粒。组合物的施用可以与一种或多种其它所需的治疗剂或医学程序同时、在其之前或之后进行。一般来说,每种剂将以针对该剂确定的剂量和/或时间表来施用。在一些实施方案中,本公开涵盖将组合物或其成像、诊断或预防组合物与改善其生物利用度、减少和/或改变其代

谢、抑制其排泄和/或改变其在体内的分布的剂组合递送。

进一步要理解的是,组合使用的治疗、预防、诊断或成像活性剂可在单一组合物中一起施用或在不同组合物中分开施用。一般来说,预期组合使用的剂将以不超过它们单独使用的水平使用。在一些实施方案中,组合使用的水平可低于单独使用的水平。

在组合方案中采用的疗法(治疗剂或程序)的特定组合将考虑所需治疗剂和/或程序的相容性以及要达到的所需治疗效果。还要理解的是,采用的疗法可针对相同的病症获得所需效果(例如,可用于治疗癌症的组合物可与化学治疗剂同时施用),或者它们可获得不同的效果(例如,控制任何副作用,如与输注有关的反应)。

LNP可与提高组合物的有效性和/或治疗窗的剂组合使用。这种剂可以是例如抗炎化合物、类固醇(例如,皮质类固醇)、他汀、雌二醇、BTK抑制剂、S1P1激动剂、糖皮质激素受体调节剂(GRM)或抗组胺剂。在一些实施方案中,LNP可与地塞米松、甲氨蝶呤、醋氨酚、H1受体阻滞剂或H2受体阻滞剂组合使用。在一些实施方案中,治疗有需要的受试者或向受试者(例如,哺乳动物)递送治疗剂和/或预防剂的方法可涉及在施用LNP之前用一种或多种剂对受试者进行预治疗。在一些实施方案中,可以用有用量(例如,10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg或任何其它有用量)的地塞米松、甲氨蝶呤、醋氨酚、H1受体阻滞剂或H2受体阻滞剂对受试者进行预治疗。预治疗可在施用脂质纳米颗粒前24小时或更短时间(例如,24小时、20小时、16小时、12小时、8小时、4小时、2小时、1小时、50分钟、40分钟、30分钟、20分钟或10分钟)进行,并且可按例如递增剂量进行一次、两次或更多次。

本领域技术人员仅采用常规实验就会认识到有或能够确定出根据本文所述的公开内容的具体实施方案的许多等同方案。本公开的范围并不旨在限于以上的描述,而是如所附权利要求中所阐述。

在权利要求中,诸如“一个(种)”和“该(所述)”的冠词可意指一个(种)或一个(种)以上,除非有相反的指示或从上下文来看明显不然。如果一个、一个以上或所有组成员存在于、用于或以其它方式相关于给定的产品或方法,则认为在组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求或描述是满足的,除非有相反的指示或从上下文来看明显不然。本公开包括其中恰好一个组成员存在于、用于或以其它方式相关于给定的产品或方法的实施方案。本公开包括其中一个以上或所有组成员存在于、用于或以其它方式相关于给定的产品或方法的实施方案。

还要注意的,术语“包含”旨在为开放性的,并且允许但不要求包括另外的要素或步骤。当在本文中使用术语“包含”时,术语“基本上由……组成”和“由……组成”也因此被涵盖和公开。在整个说明书中,在组合物被描述为具有、包括或包含特定组分的情况下,预期组合物也基本上由或由所列举的组分组成。类似地,在方法或过程被描述为具有、包括或包含特定过程步骤的情况下,过程也基本上由或由所列举的过程步骤组成。进一步地,应当理解的是,只要保持本发明可操作,则步骤的顺序或执行某些动作的顺序是无关紧要的。此外,可以同时两个或更多个步骤或动作。

在给出范围的情况下,端点是包括的。此外,要理解的是,除另指出或从上下文和本领域普通技术人员的理解来看明显不然外,以范围表示的值在本公开的不同实施方案中可采取所述范围内的任何特定值或子范围,精确到所述范围下限单位的十分位,除非上下文明确另有规定。

此外,要理解的是,本公开落入现有技术范围内的任何特定实施方案可以从任何一项或多项权利要求中明确排除。由于这类实施方案被认为是本领域普通技术人员已知的,因此即使在本文中未明确阐述排除,它们也可以被排除。

所有引用的来源,例如参考文献、出版物、专利申请、数据库、数据库条目和本文引用的技术,即使在引述中没有明确说明,也都以引用的方式并入本申请。在引用的来源和本申请的说明冲突的情况下,以本申请中的说明为准。

已经描述了本公开,以说明而非限制的方式提供以下实施例。

实施例

实施例1:事后装载研究

设立初始实验以阐述事后装载 (PHL) 效应。例如,实验描述了向该过程的上游部分 (即紧接在脂质沉淀之后,下游 $\sim 1\text{ms}$ 至 $1,800,000\text{ms}$) 内预先形成的囊泡中添加mRNA。例如,参见图1-5。

图1是显示当以较长的LNP停留时间引入mRNA时观察到相当的或增加的mRNA包封的图示。经由Ribogreen荧光测定法评价包封。

图2是显示当以相对于对照 (虚线) 较长的LNP停留时间引入mRNA时观察到相当的或显著增加的mRNA包封的图示。经由离子交换 (AEX) 测定法评价包封。

图3是低温-EM图像,展示相对于在初始颗粒形成期间包括mRNA的标准过程 (“标准”),采用事后装载 (“PHL”) 过程模式观察到相当的颗粒形态。

图4是小角x射线散射 (SAXS) 分析,展示相对于标准批次过程在事后装载过程批次中增加的结构特征 ($q \sim 1.3\text{nm}^{-1}$,计算的D-间距为5-6nm)。

图5是展示PHL过程相对于标准过程的体内性能的图,显示了在预防性疫苗背景下PHL的增加的第一剂量反应 (初免后3周),并展示了2周加强后观察到的相当的总IgG。A-D条目反映标准过程的替代形式作为比较。

实施例2:事后装载的“床边”或“现场混合”应用

其次,将PHL概念应用于“床边”或“现场混合”实施方案,其涉及颗粒形成与mRNA包封之间更显著的时间延迟 (即数月至数年)。简言之,将空LNP在不存在mRNA的情况下进行处理,储存,并在使用之前与mRNA货物混合。开发了可扩展的空LNP过程。最初,粒度是现场混合过程中有效混合和mRNA包封的关键参数,由此小直径 ($<100\text{nm}$) 的LNP导致在现场混合过程期间mRNA包封改善。为了控制LNP直径和多分散性,开发了连续可扩展的纳米沉淀过程。颗粒熟化 (即经由聚结生长) 被确定为驱动均匀性和窄多分散性指数的关键因素。实验设计优化上游纳米沉淀条件,由此在第二个乙醇滴加步骤 (乙酸盐稀释) 之前,温度和%乙醇 (混合比率) 随着固定总停留时间而变化,以达到目标12.5%乙醇。颗粒熟化在 $<15\%$ 乙醇下受阻。调节过程温度和%乙醇使得能够控制粒度和降低多分散性。例如,参见图6-35。

图6是展示LNP分散体的初始直径对mRNA包封的影响并显示直径减小的LNP批次导致mRNA包封增加的图示。

图7是经由动态光散射 (DLS) 表征展示乙醇含量和温度是影响LNP多分散性指数 (PDI) 的关键参数的模型拟合,其中模型拟合使得能够计算有利于低PDI的过程条件的有利范围 (例如,30%乙醇,40℃)。

图8是经由DLS表征展示乙醇含量和温度是影响LNP直径的关键参数的模型拟合,

其中模型拟合使得能够计算过程条件的有利范围,以有利于通过本文所述的过程将粒度控制在mRNA包封的有利范围内(<100nm)。

图9是通过小角x射线散射(SAXS)分析展示空LNP产生的过程影响结构特征的图示,显示了所有过程条件都导致颗粒在 $q=1.4\text{nm}^{-1}$ 下具有显著特征(计算的D-间距 $\sim 4\text{nm}$)。没有熟化的过程A在 $q=0.45$ 下产生另外的特征(计算的D-间距 $\sim 14\text{nm}$)。经由低温-TEM分析,此特征与样品中的小脂质体群体或胶束结构相关。与过程A相比,包含熟化时间的过程B和C显示出改善的多分散性(经由DLS分析)和结构均匀性(经由低温-TEM分析)。

图10是展示经由本文所述的过程装载的mRNA产生在 $q=1.3\text{nm}^{-1}$ 下显示出具有显著特征的高结构度的颗粒的图示(计算的D-间距 $\sim 5\text{nm}$)。与过程A相比,利用有利于熟化时间和低PDI的最佳过程条件的过程B和C显示出多分散性降低和结构均匀性改善。

图11是展示对于用本文所述的程序产生的批次,相对于过程A(标准)采用过程B(熟化增加)观察到颗粒均匀性改善的低温-EM图像。

图12是展示LNP形成的连续纳米沉淀过程的示例性过程流程图。

图13是展示蔗糖对LNP分散体表现出低温保护作用的图示,使得能够在冷冻/解冻应力之后保持粒径,并且有利的蔗糖浓度经确定为>15重量%。

图14是展示包含低温保护赋形剂蔗糖使得能够经由本文所述的过程(Ribogreen测定)完全包封mRNA的图示。

图15A和15B是展示在液态($\sim 50\text{nm}$)通过纳米颗粒跟踪分析(NTA)表征的LNP的标准初级群体(15A)和在使制剂(乙酸盐-蔗糖)经受冻干并在蒸馏去离子水中重构后保存初级纳米颗粒群体(15B)的图示。

图16是展示液体和冻干/重构产品LNP制剂的颗粒分布的重叠的图示。

图17是展示与pH5.75相比对于pH5.0的冻干制剂观察到体外表达增加的图示。

图18是展示在现场混合过程中组合之前通过改变mRNA和LNP溶液pH值来确定有利的pH的图示。在 $\text{pH}<6.0$ 下有利地实现粒度控制。

图19是展示在本文所述的过程中组合之前通过改变mRNA和LNP溶液pH值来确定有利的pH的图示,并且在 $\text{pH}<6.0$ 下实现包封增加(Ribogreen测定)。

图20是展示在本文所述的过程中组合之前通过改变mRNA和LNP溶液pH值来确定有利的pH的图示,并且在 $\text{pH}<6.0$ 下实现包封增加(AEX测定)。

图21是展示在本文所述的过程中通过一起改变LNP和mRNA溶液内的NaCl的摩尔浓度来评估离子强度敏感性的图示,并且有利于mRNA包封的有利浓度<200mM。

图22是展示采用本文所述的过程观察到mRNA包封中的低批次间可变性并且装载mRNA的LNP在老化24小时后显示出一致的mRNA包封的图示。

图23是经由DLS测量展示注射流速对粒度的影响的图示,其中将mRNA的溶液直接注射到含有LNP的缓冲溶液的小瓶中,并且所得粒径对注射速率敏感。

图24是展示注射流速对mRNA包封的影响的图示(Ribogreen测定),其中将mRNA的溶液直接注射到含有LNP的缓冲溶液的小瓶中。

图25的图示展示经由本文所述的过程装载的mRNA脂质纳米颗粒制剂包含显示出高结构度的颗粒,在 $q=1.3\text{nm}^{-1}$ 下具有显著的特征(计算的D-间距 $\sim 5\text{nm}$),并且在变化的流速下观察到相当的结构特征(样品9-14)。

图26是展示在与mRNA混合后在LNP溶液中添加递增水平的PEG-脂质缀合物减小粒度的图示。

图27是展示在LNP溶液中添加递增水平的PEG-脂质缀合物不影响mRNA包封的图示。

[0732] 图28的图示展示经由本文所述的过程装载的mRNA脂质纳米颗粒制剂包含显示出高结构度的颗粒,在 $q=1.3\text{nm}^{-1}$ 下具有显著的特征(计算的D-间距 $\sim 5\text{nm}$),并且在混合步骤中包括摩尔%的PEG-脂质观察到相当的结构特征。

图29是展示在本文所述的混合过程中在LNP溶液中添加递增水平的PEG-脂质缀合物降低对注射流速的敏感性的图示。

图30是展示在LNP溶液中添加递增水平的PEG-脂质缀合物增加包封的图示(Ribostar测定)。

图31是展示混合产物的中和导致mRNA包封增加(AEX测定)并且可通过添加浓磷酸钠溶液至目标pH值来实现中和的图示。

图32是展示Ribogreen测定不能检测对混合产物的pH中和的敏感性并且通过添加浓磷酸钠溶液至目标pH值来实现中和的图示。

图33是展示混合产物的中和导致LNP直径增加($\sim 10\text{nm}$)并且通过添加浓磷酸钠溶液至目标pH值来实现中和的图示。

图34的图示展示经由本文所述的过程装载的mRNA脂质纳米颗粒制剂包含显示出高结构度的颗粒,在 $q=1.3\text{nm}^{-1}$ 下具有显著的特征(计算的D-间距 $\sim 5\text{nm}$),并且通过中和观察到在 1.3nm^{-1} 处的略微降低,而且混合产物的中和导致在 0.3nm^{-1} 下结构特征的降低(D-间距 $\sim 21\text{nm}$)。

图35是展示本文所述的混合配制过程(“PHL过程”)相对于对照(“基准过程”)效力增加的图示,显示了与标准过程模式相比采用本文所述的混合过程的抗原特异性T细胞反应增加。

等同方案

上面所附的描述中阐述了本发明的一个或多个实施方案的细节。尽管在本公开的实践或测试中可采用与本文的描述类似或等同的任何方法和材料,但现在描述的是优选的方法和材料。根据说明书和权利要求书可显而易见本公开的其它特征、目的和优点。在说明书和所附权利要求书中,单数形式包括复数指代项,除非上下文明确另有规定。除另有定义外,本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。本说明书中引用的所有专利和出版物以引用的方式并入。

前面的描述仅仅是为了说明的目的而给出的,并不旨在将本发明限制为所公开的确切形式,而本发明由所附权利要求限定。

序列表

<110> 摩登纳特斯有限公司 (ModernaTX, Inc.)

<120> 制备脂质纳米颗粒的方法

<130> MRNA-062/001W0

<150> 62/799,620

<151> 2019-01-31

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 茎环序列

<400> 1

caaaggctct tttcagagcc acca

24

<210> 2

<211> 24

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 茎环序列

<400> 2

caaaggcucu uuucagagcc acca

24

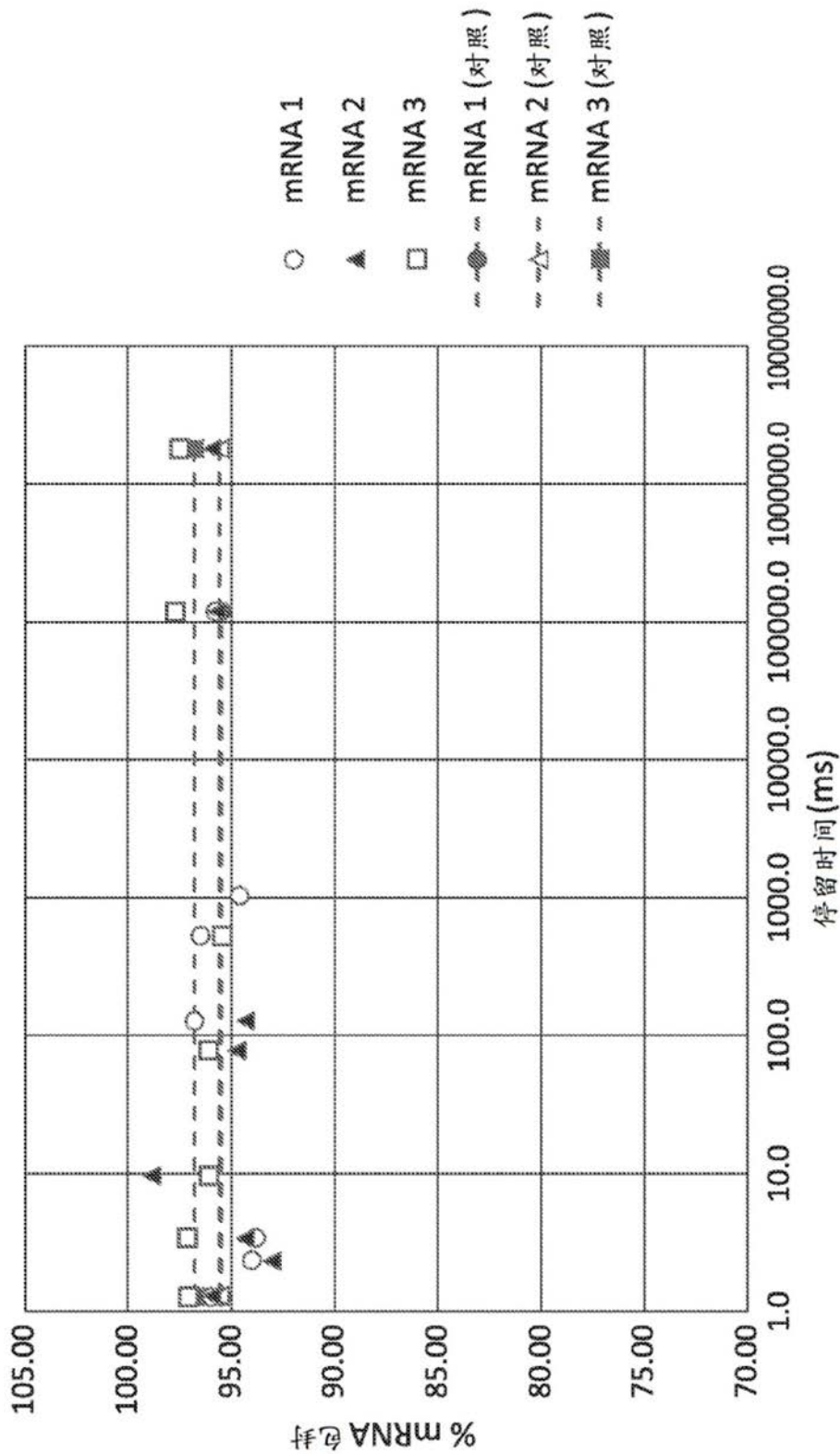


图1

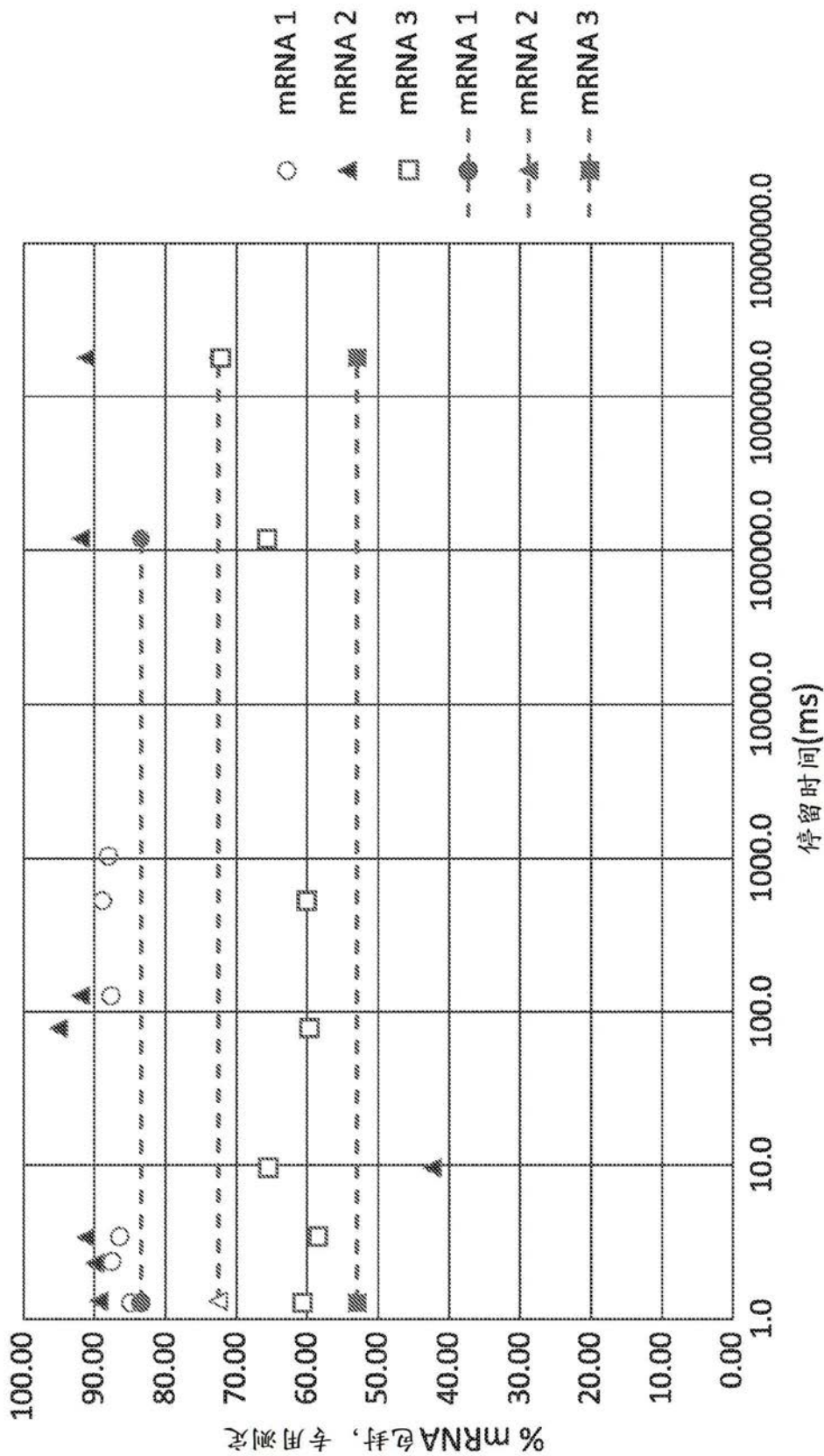


图2

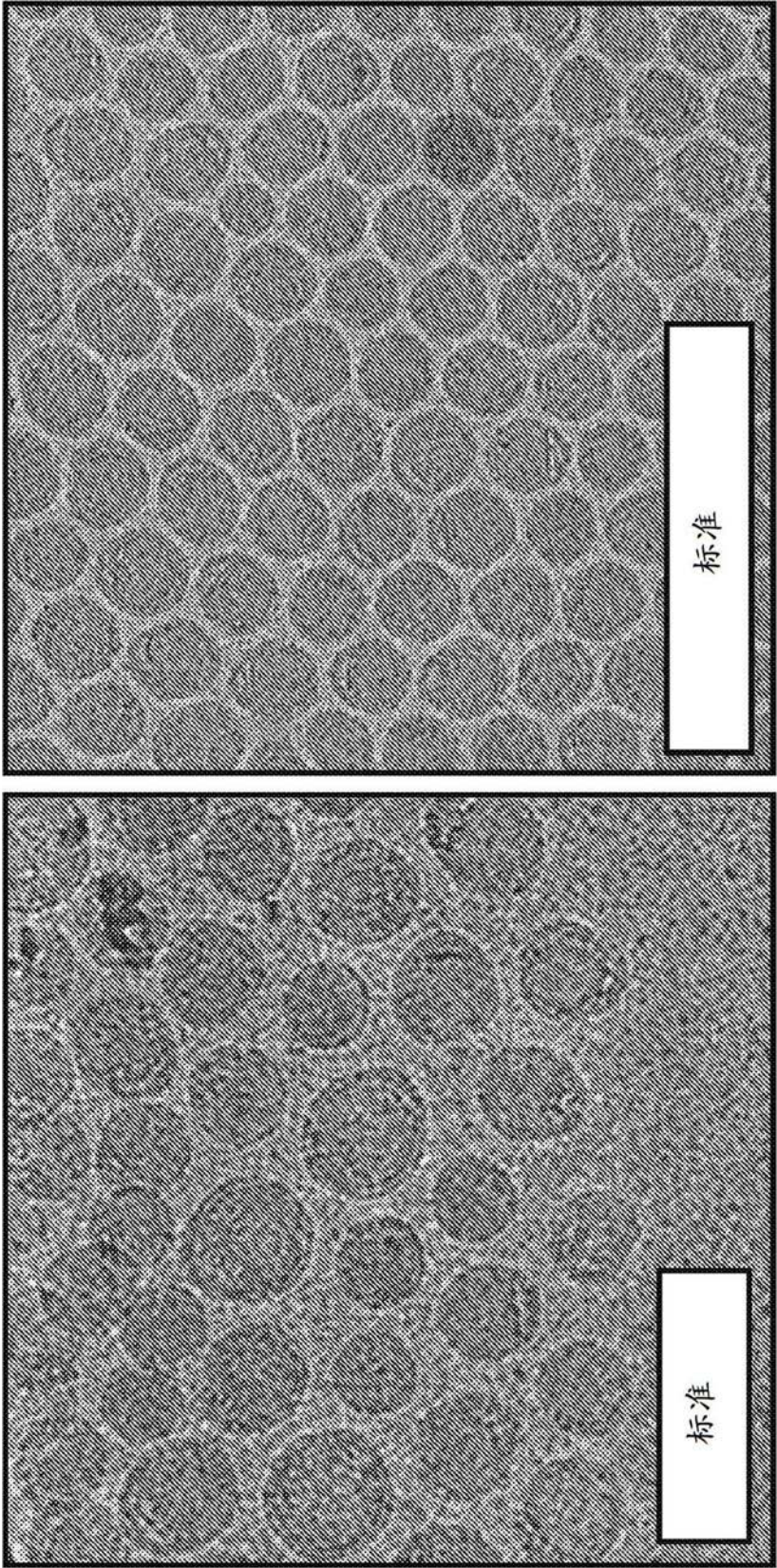


图3

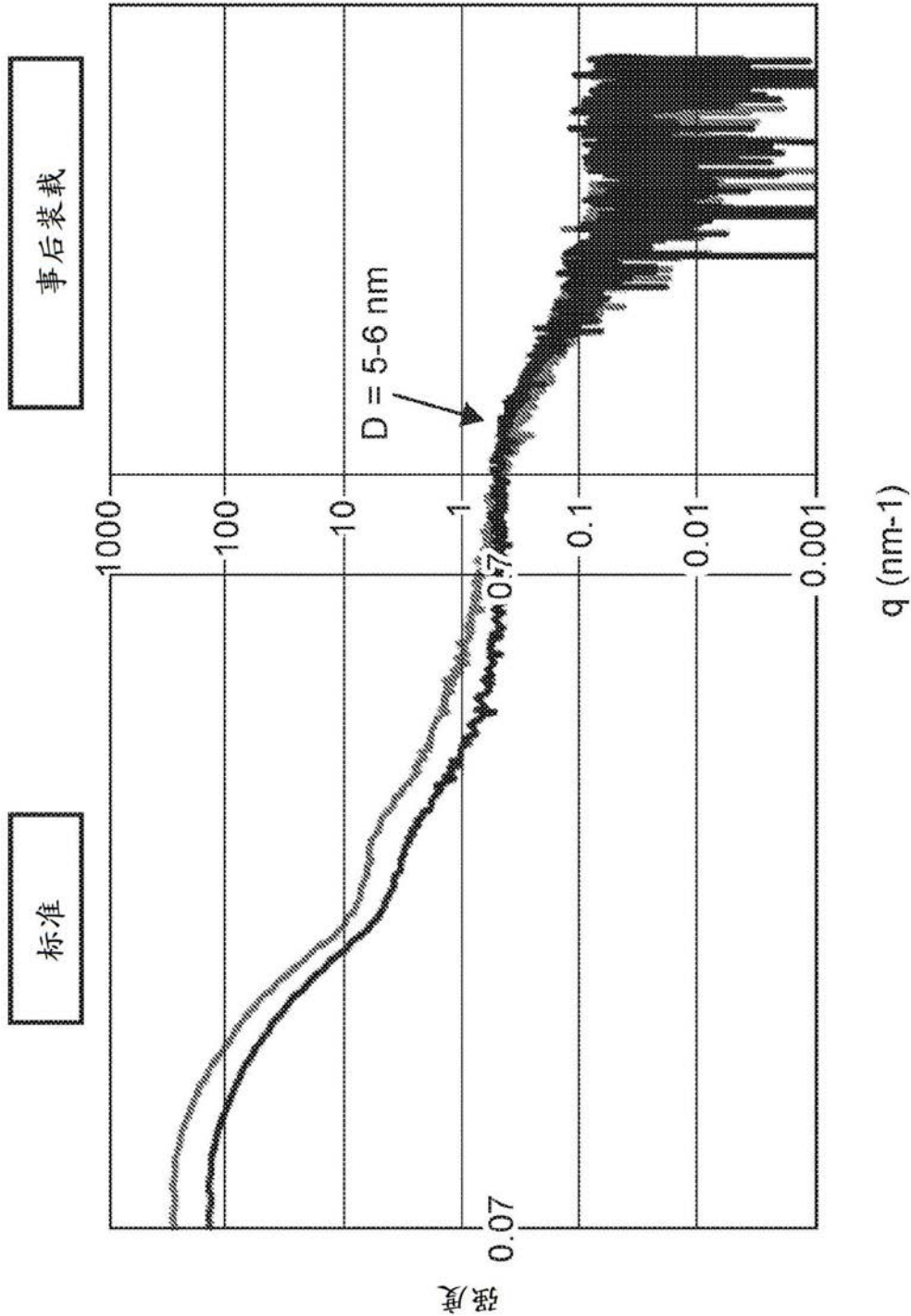


图4

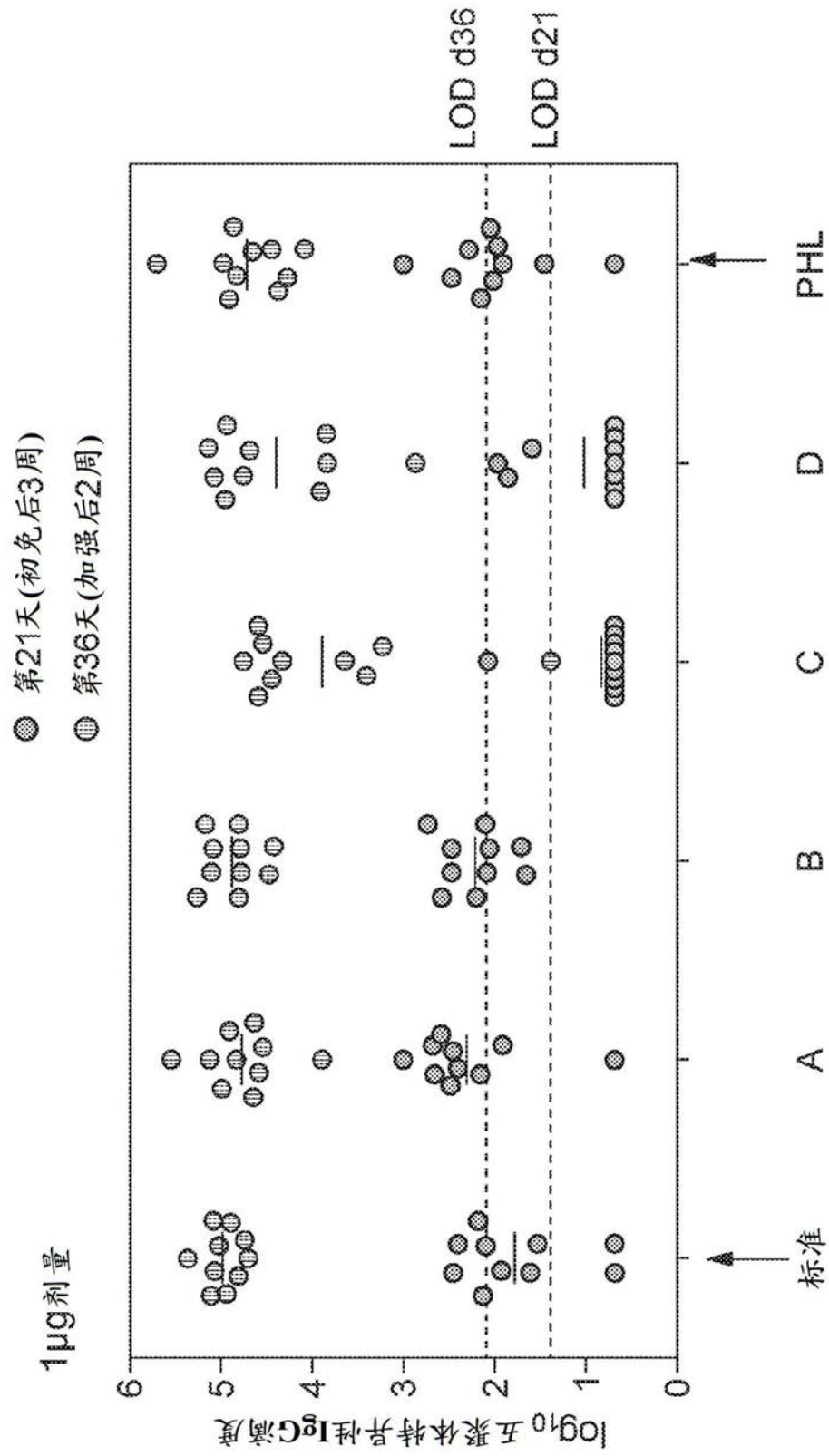


图5

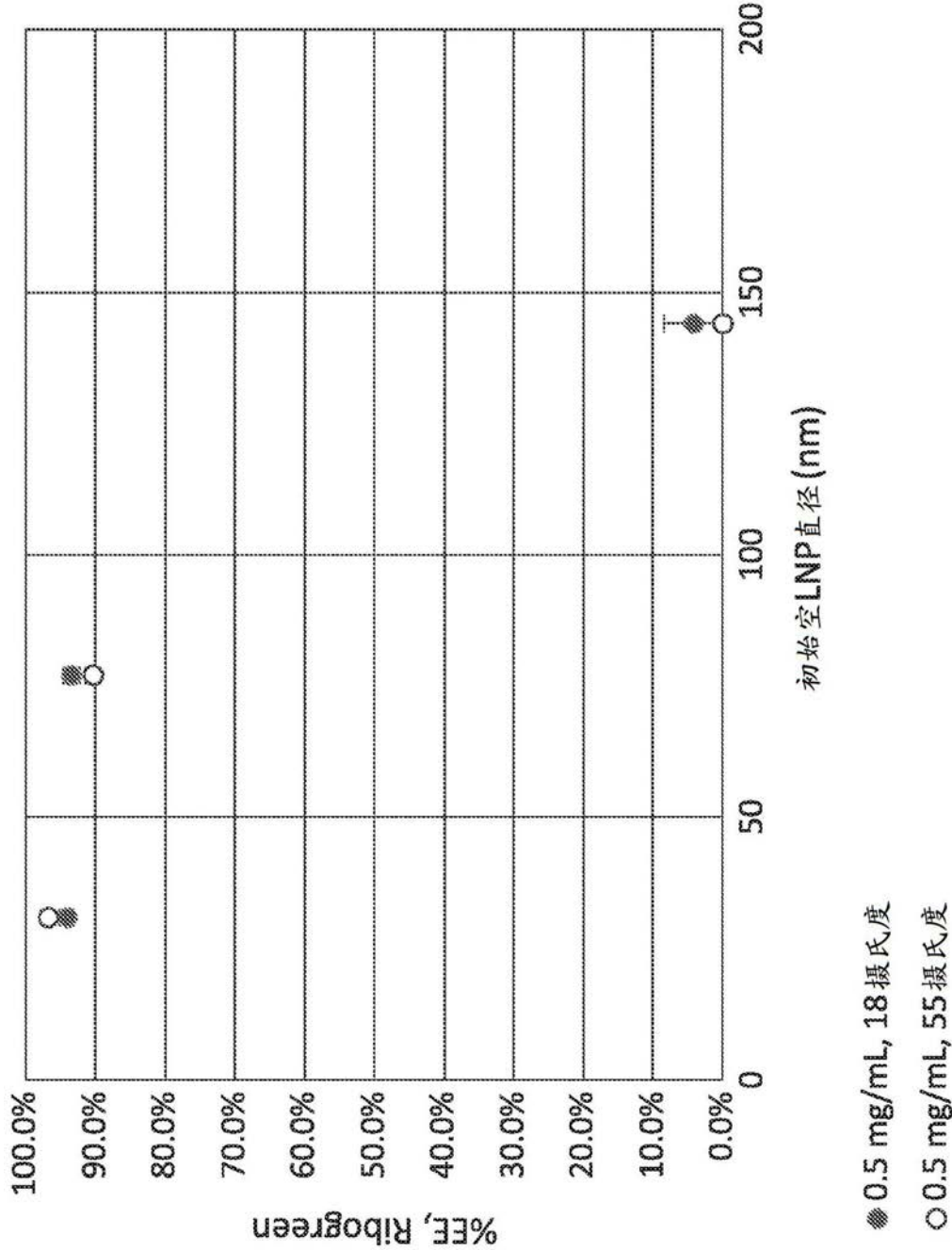


图6

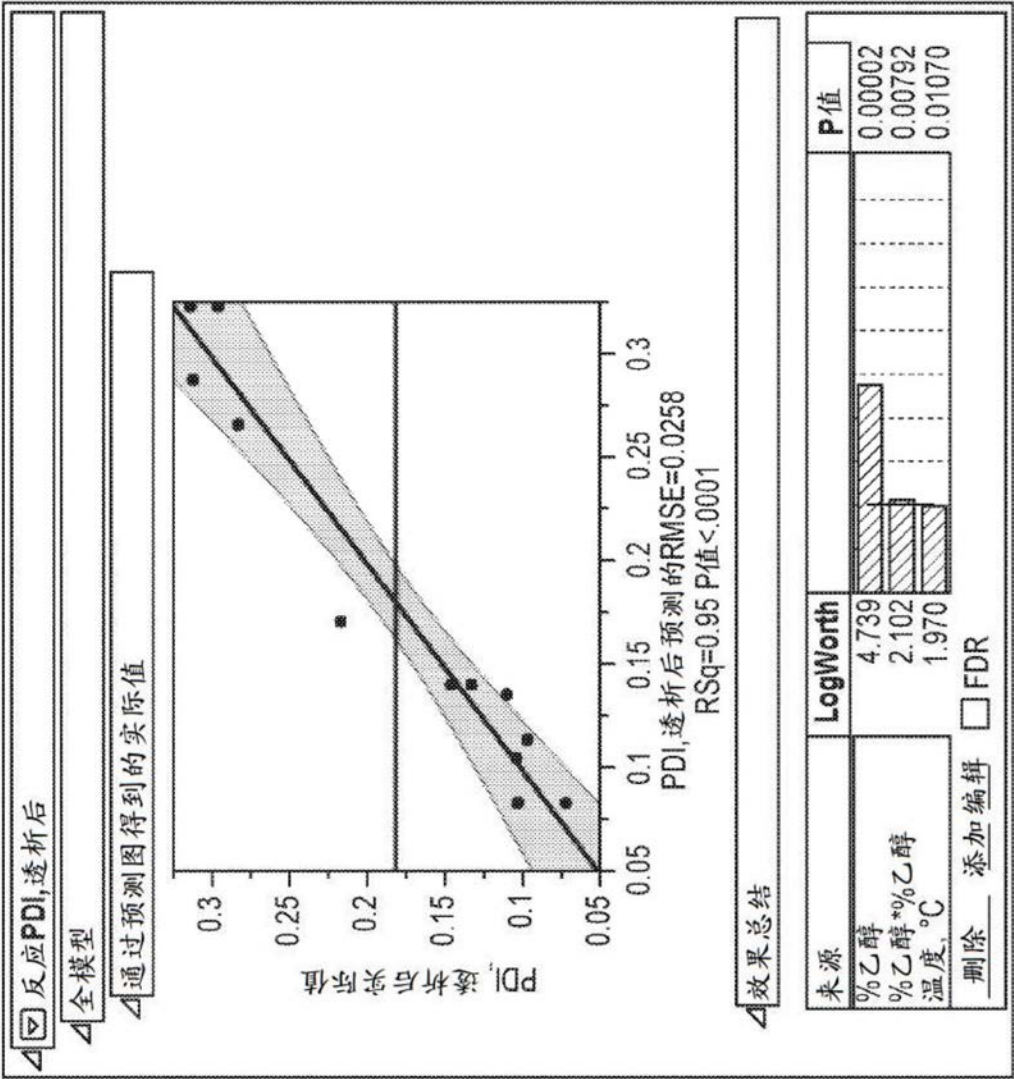


图7

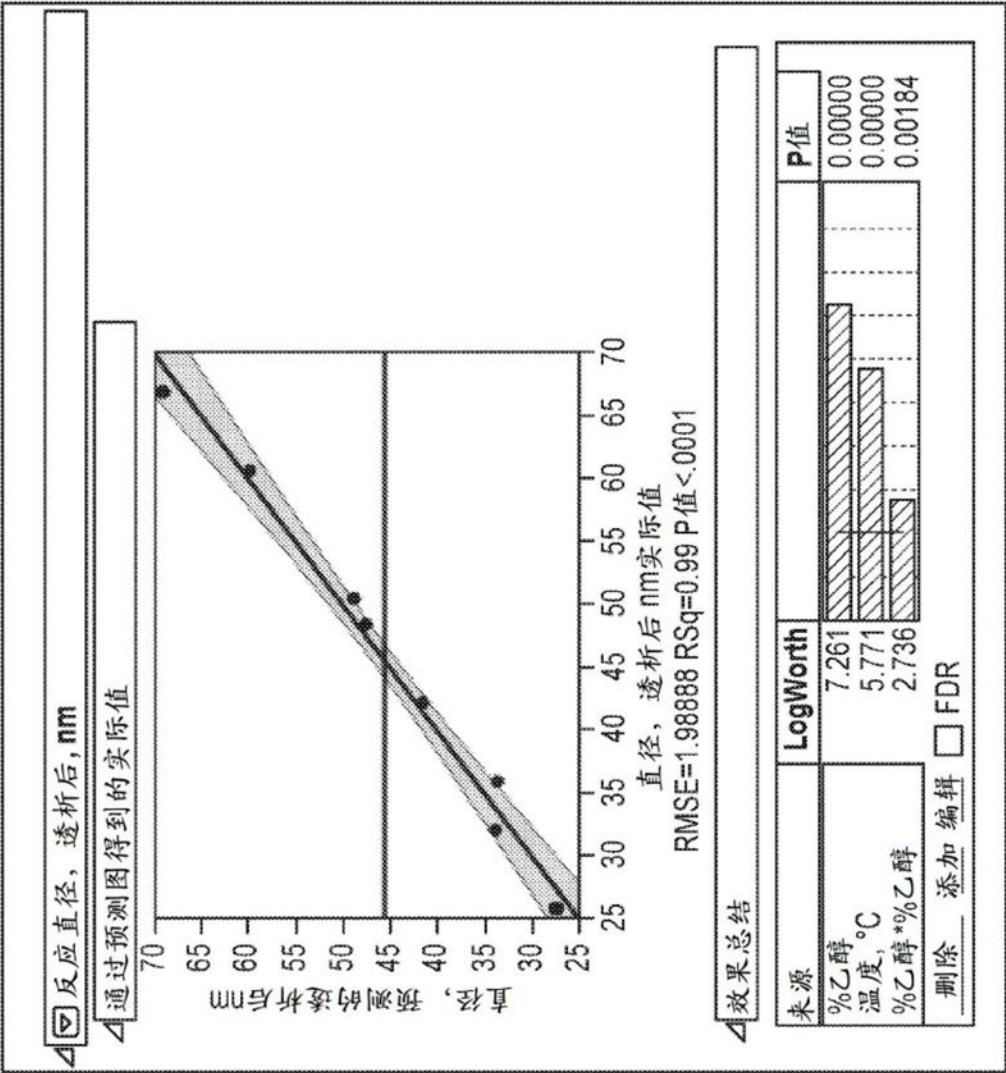


图8

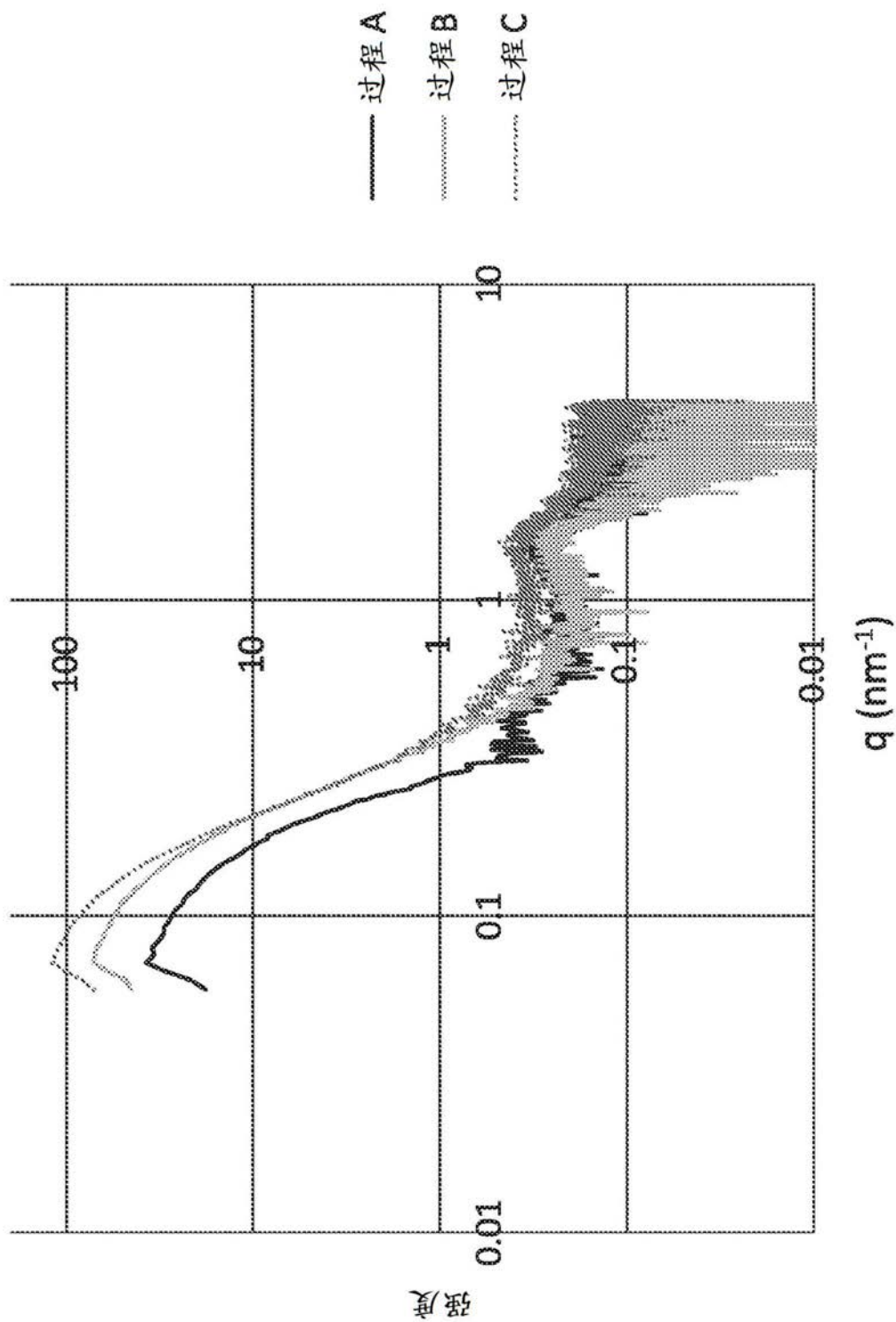


图9

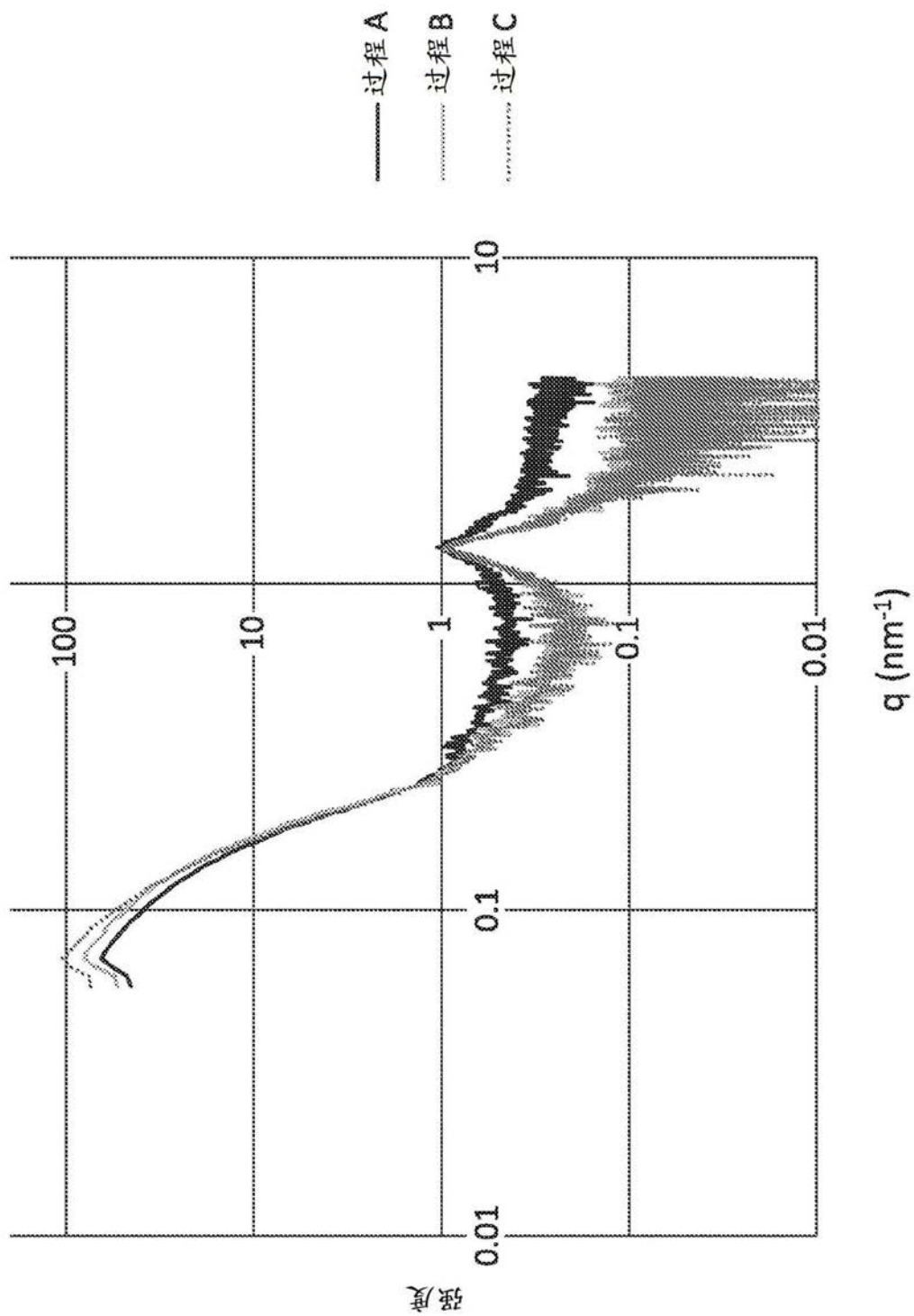


图10

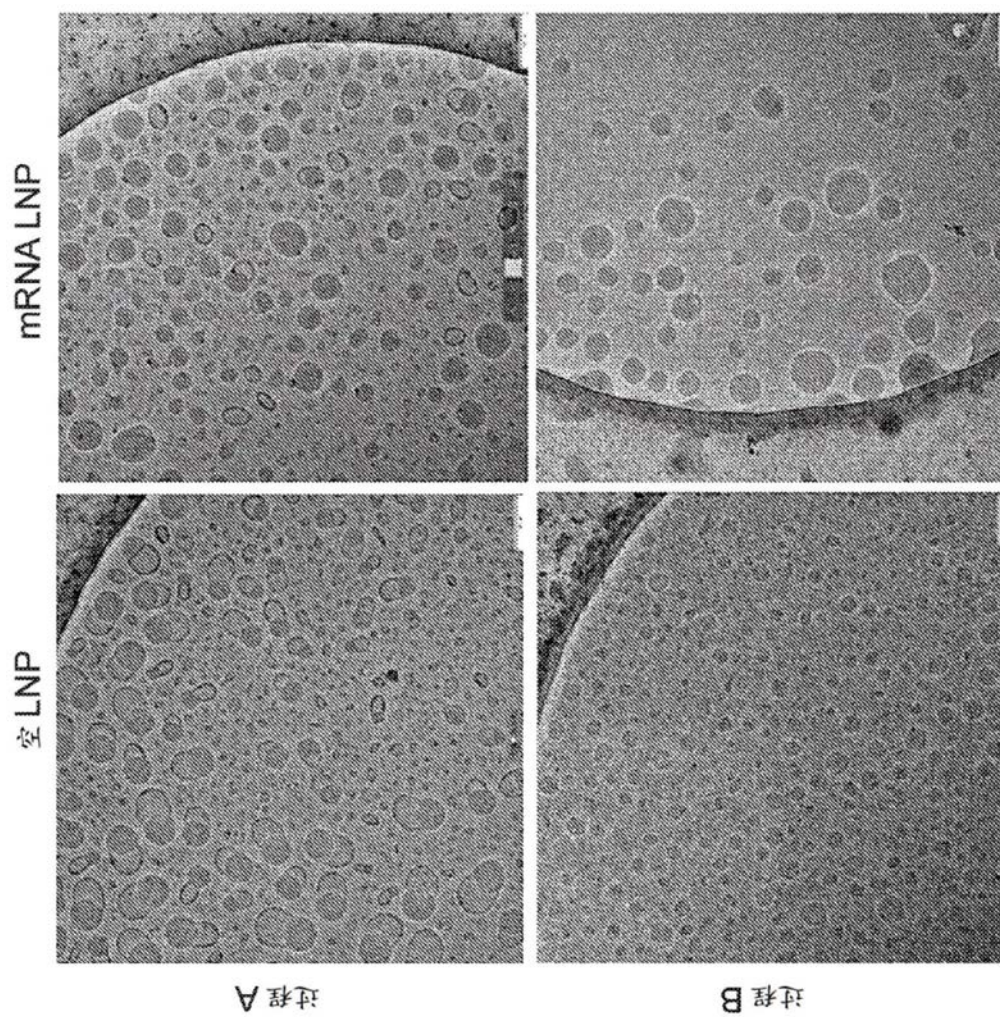


图11

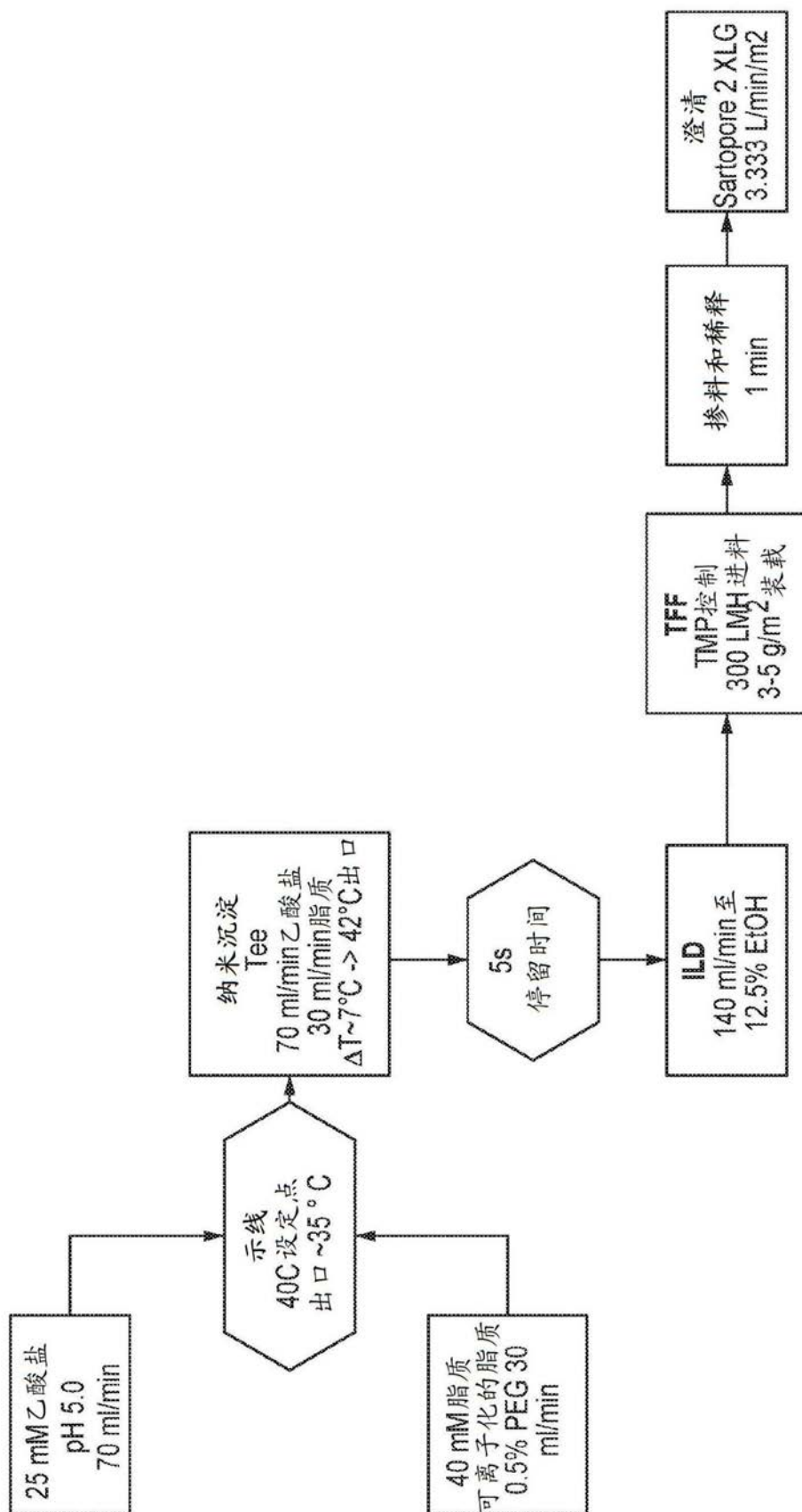


图12

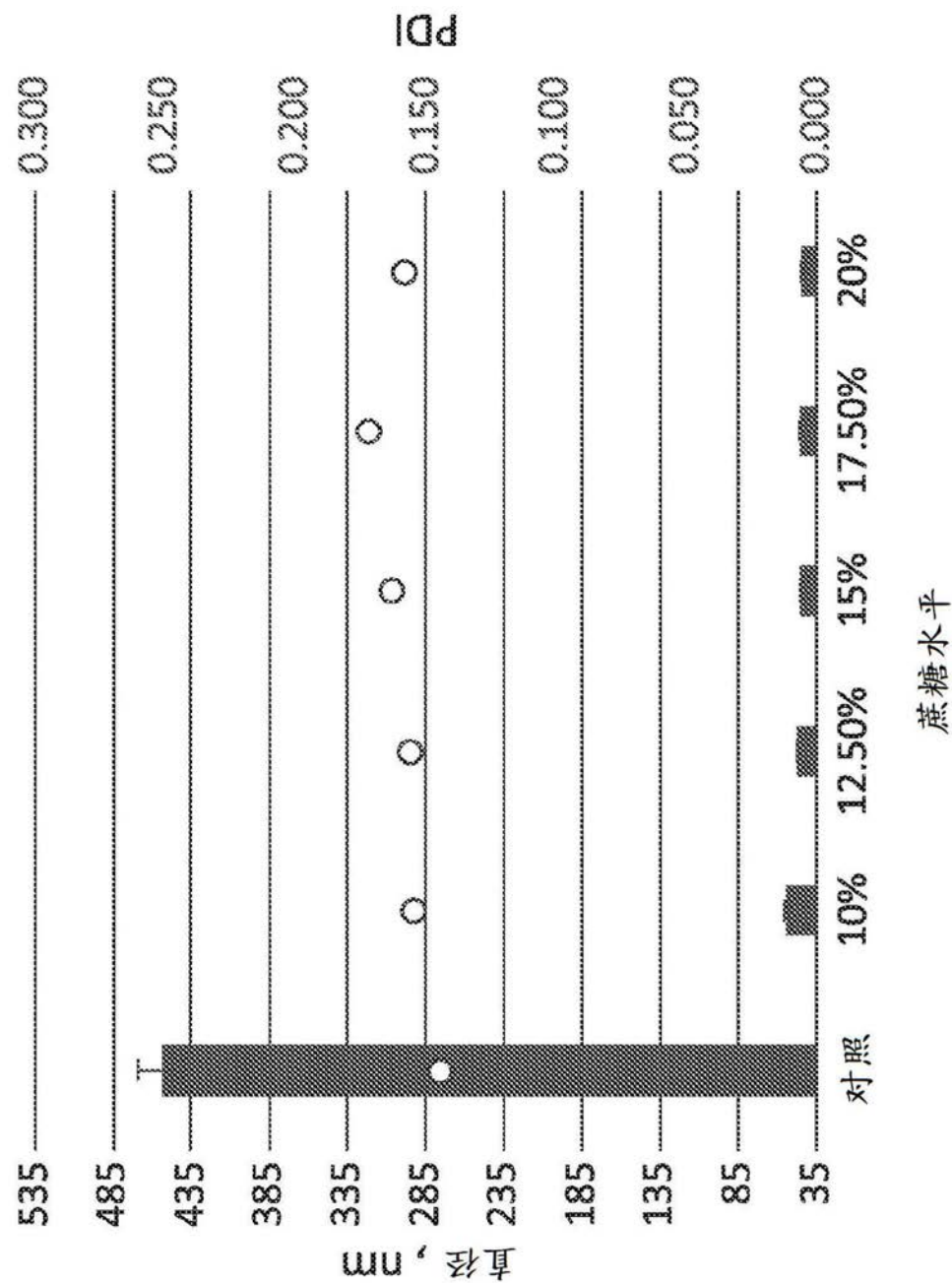


图13

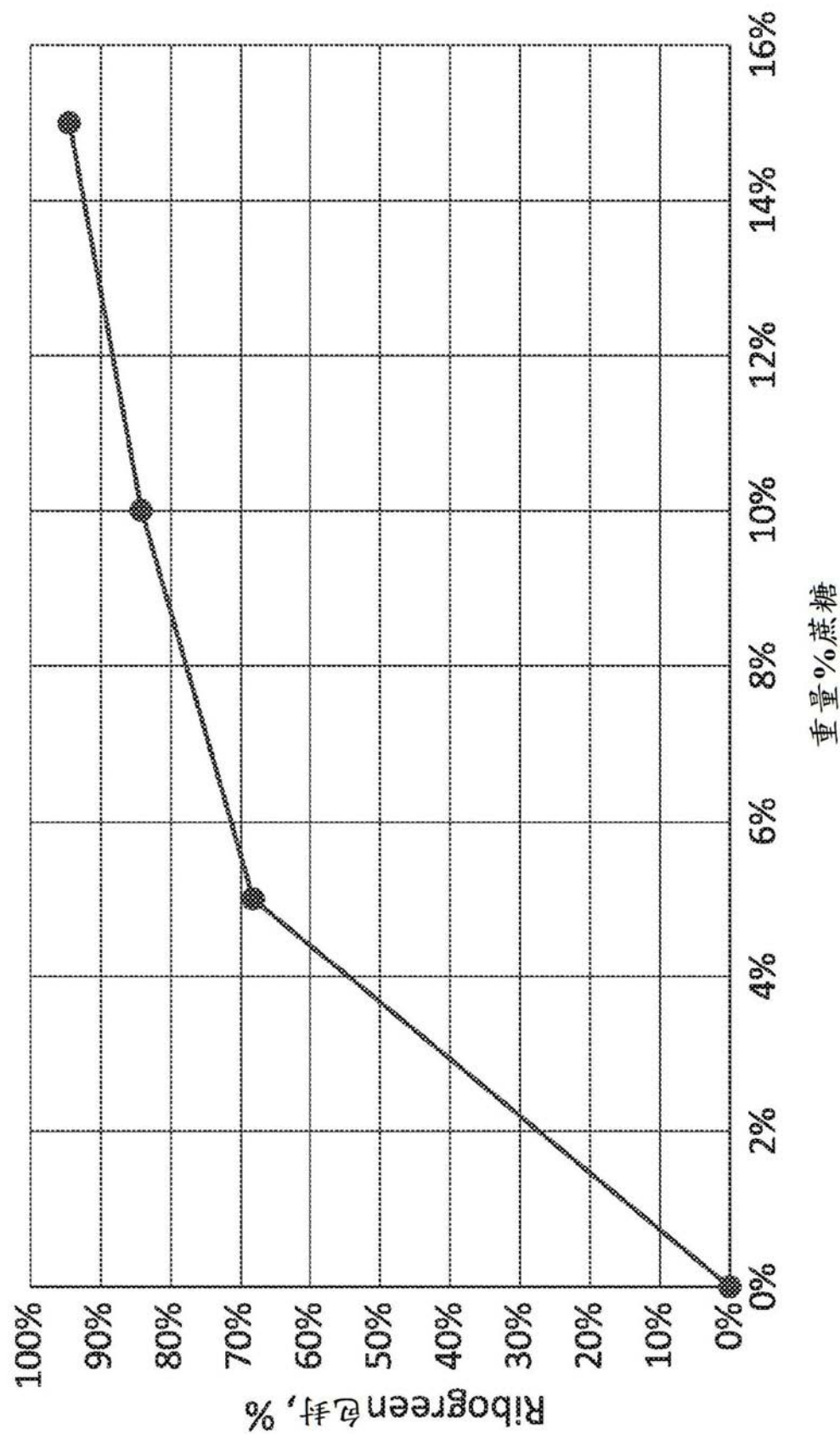


图14

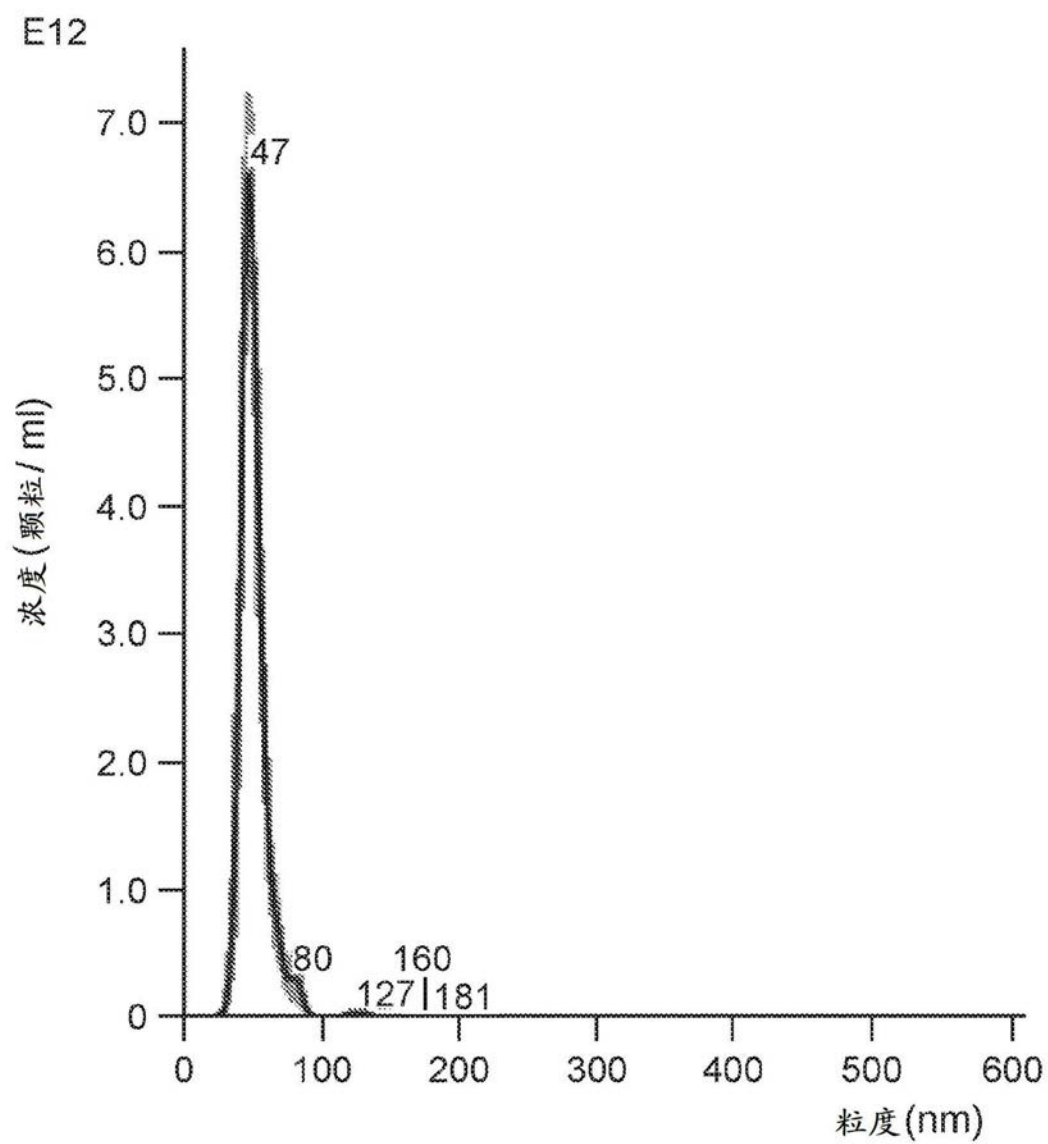


图15A

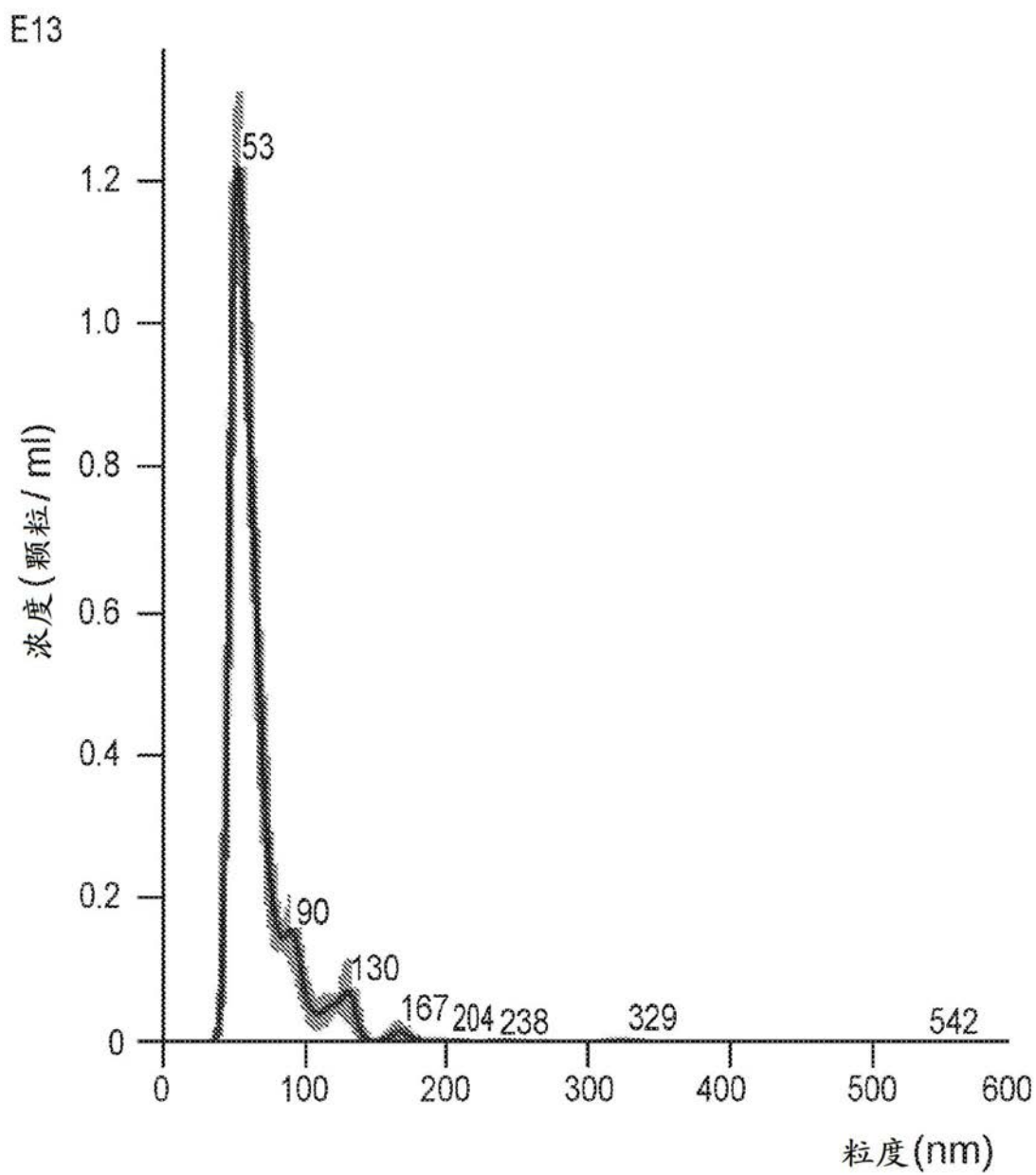


图15B

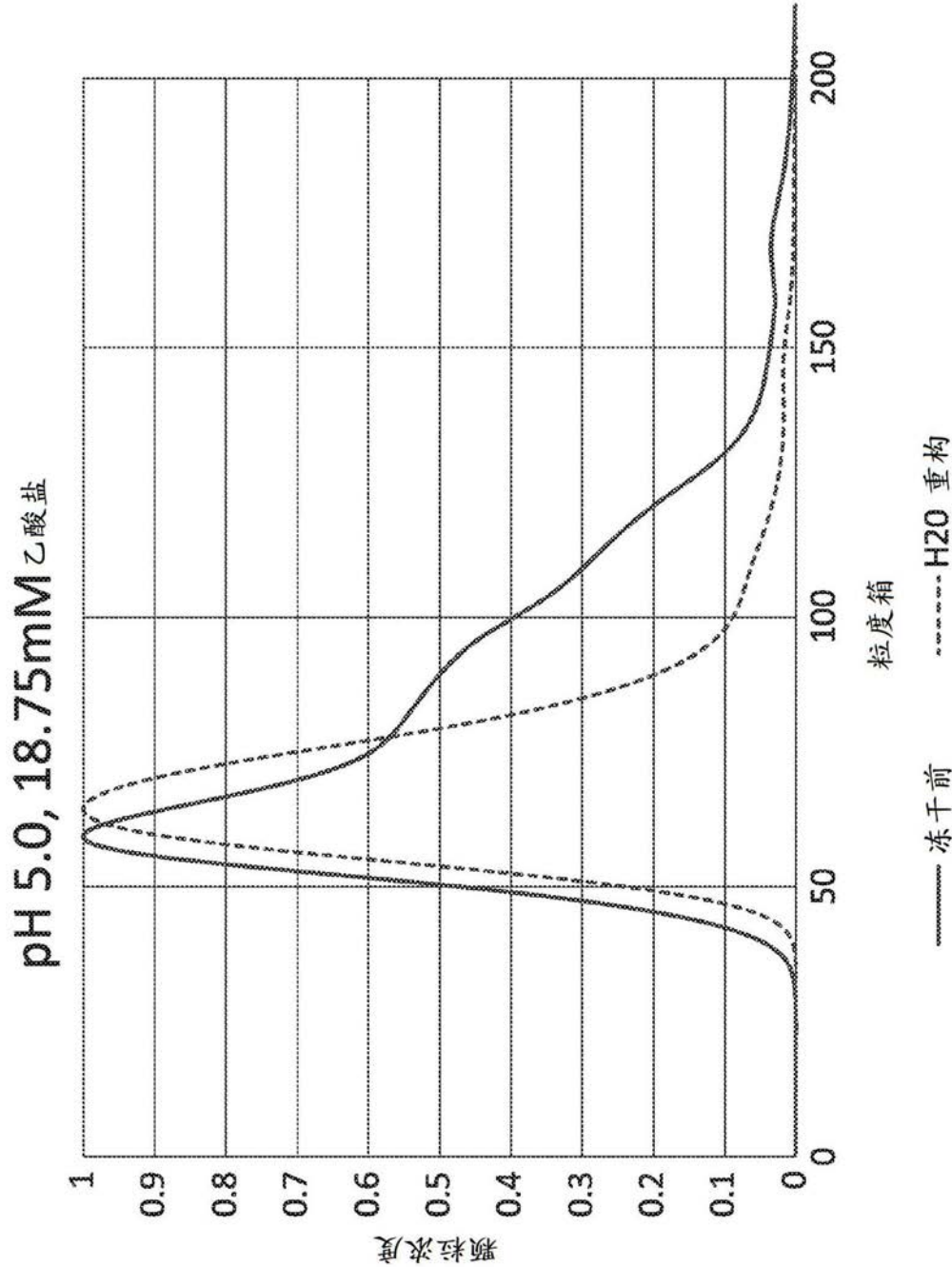


图16

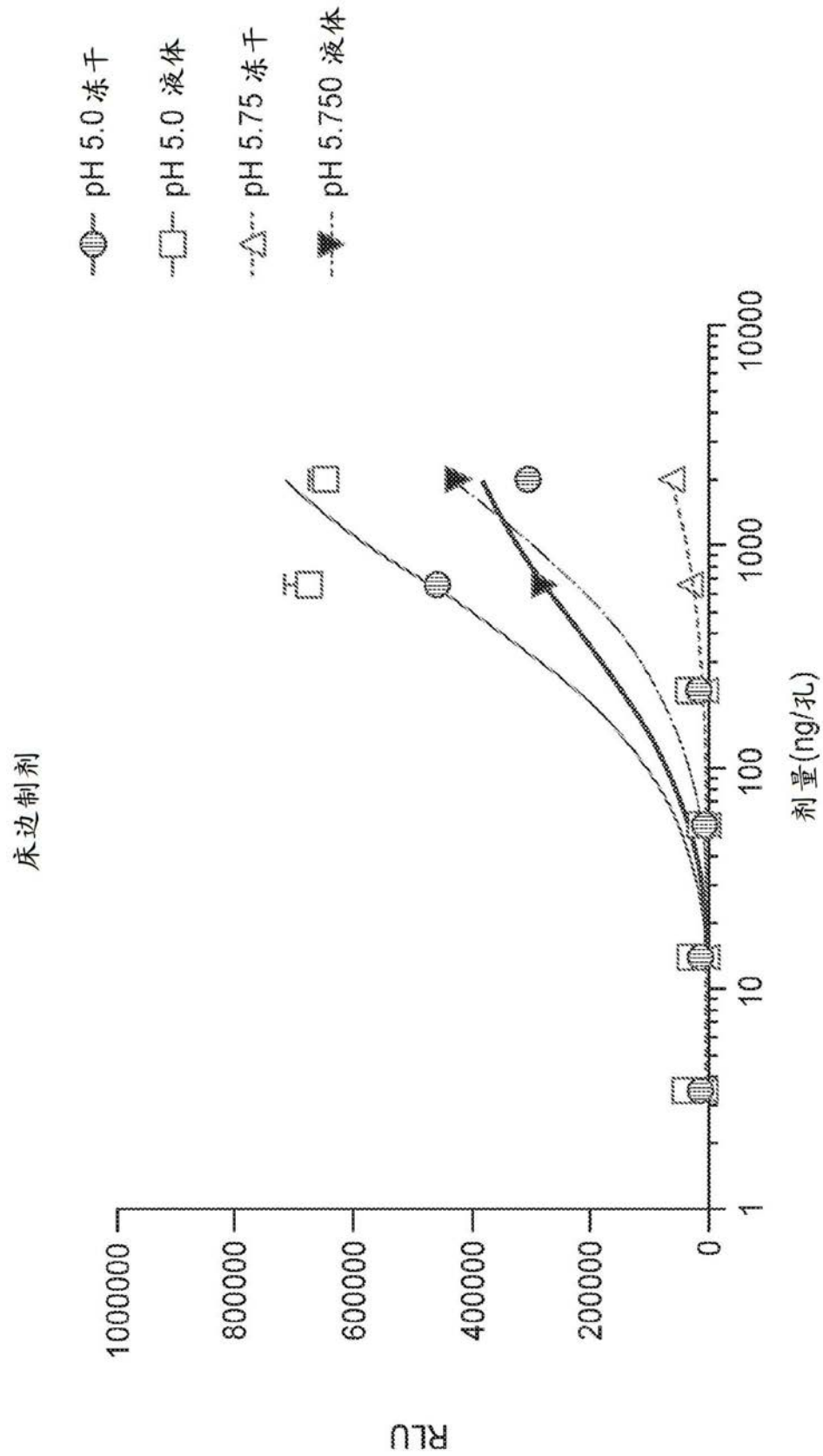


图17

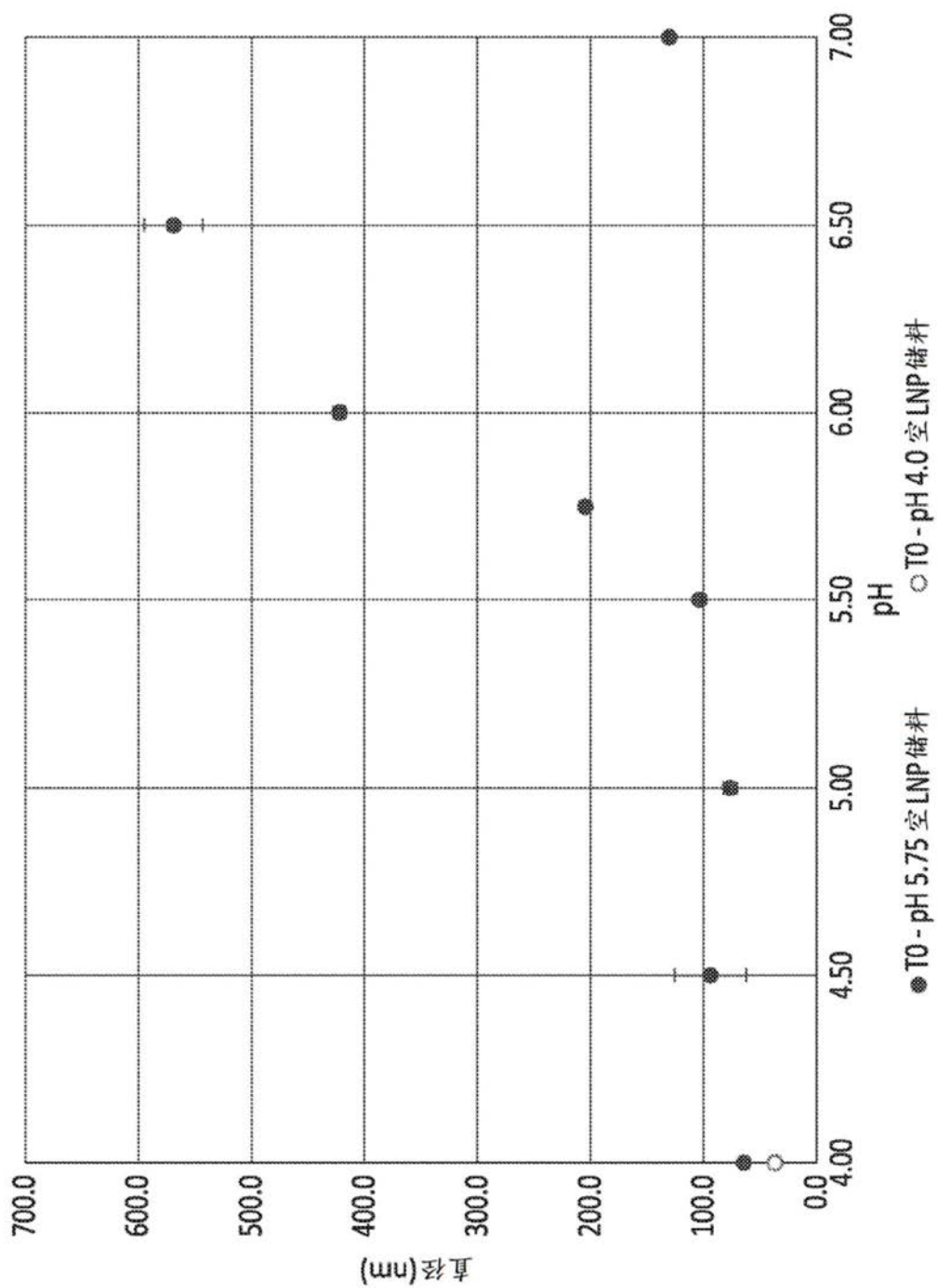


图18

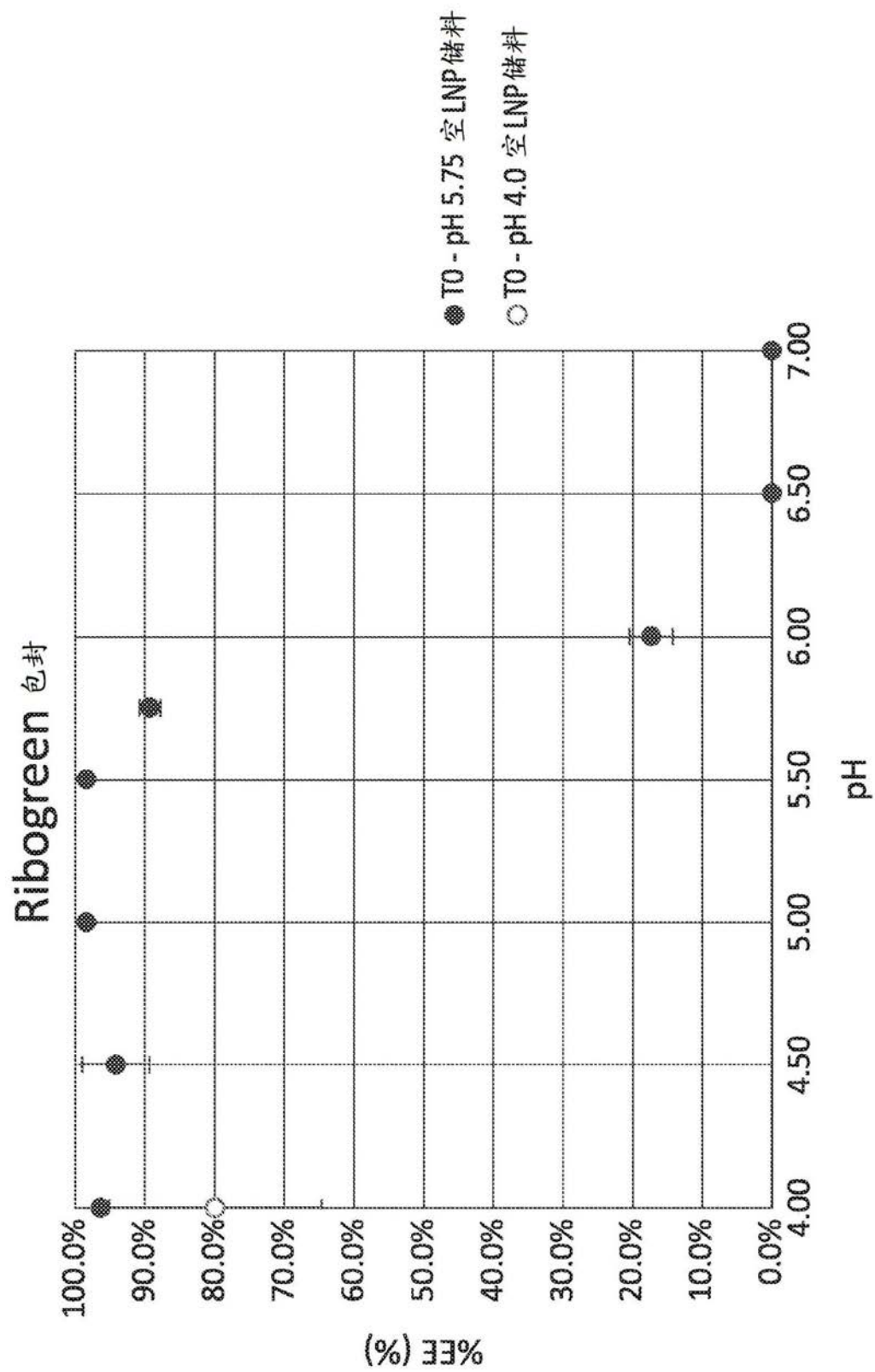


图19

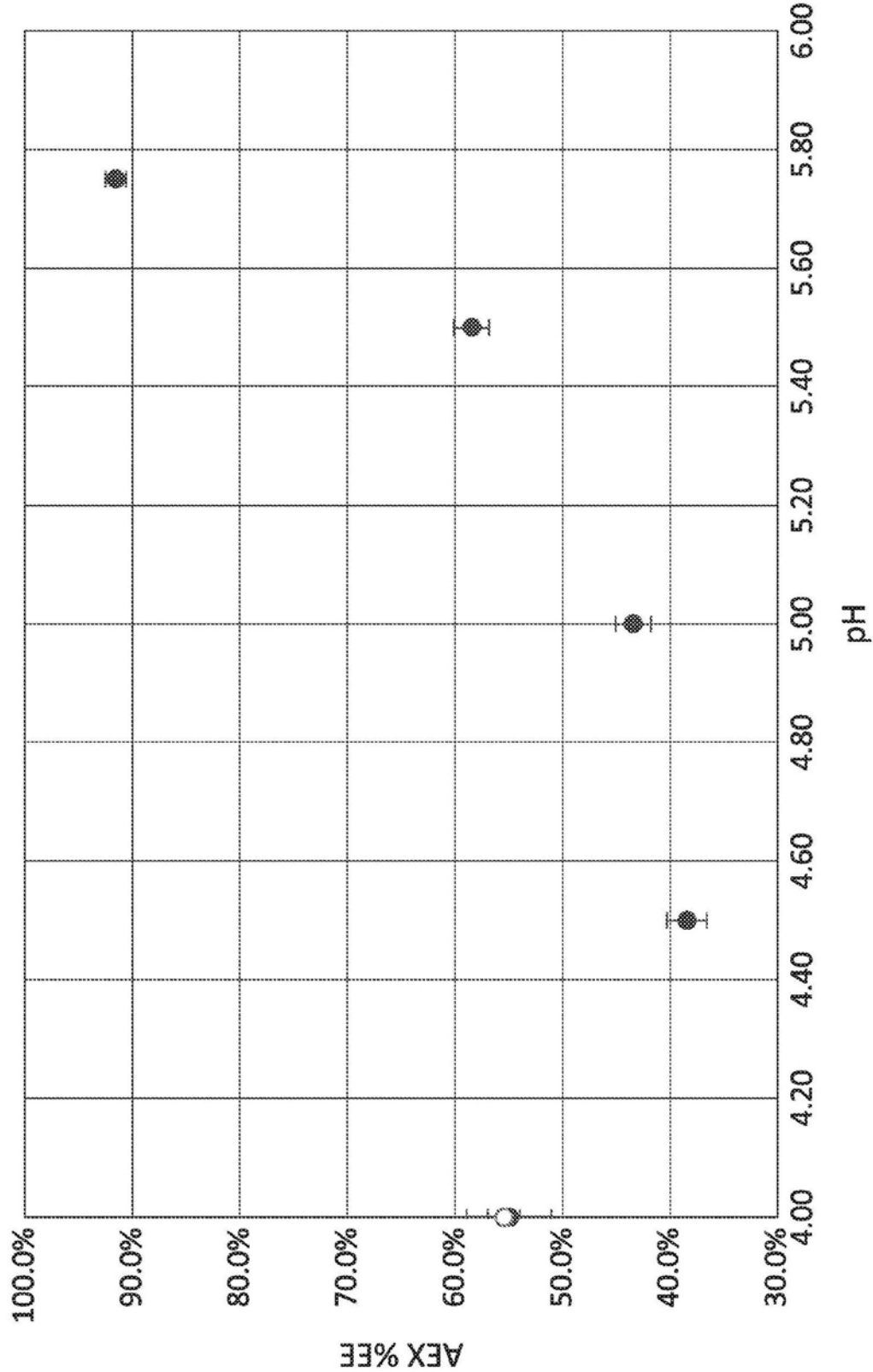


图20

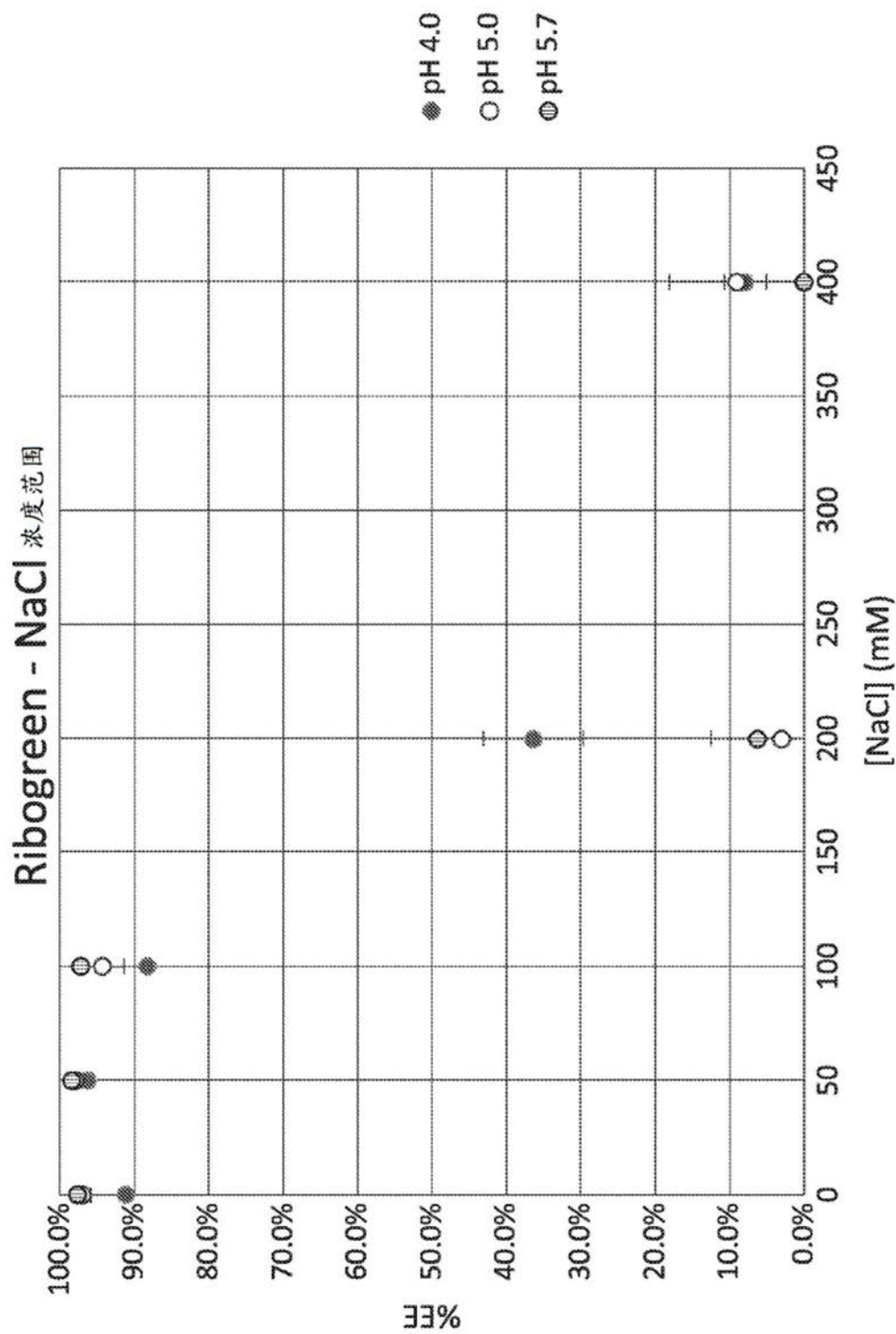


图21

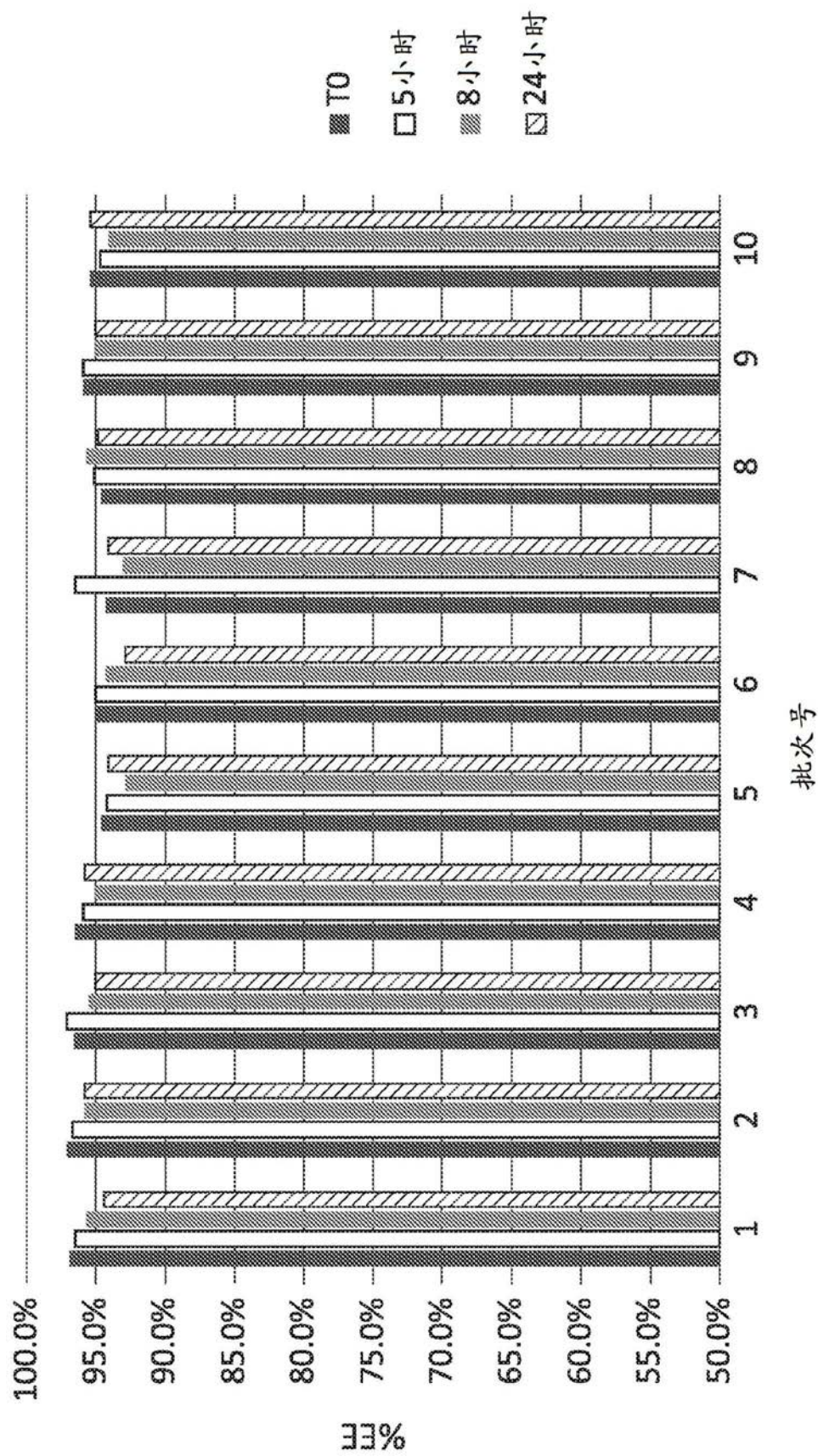


图22

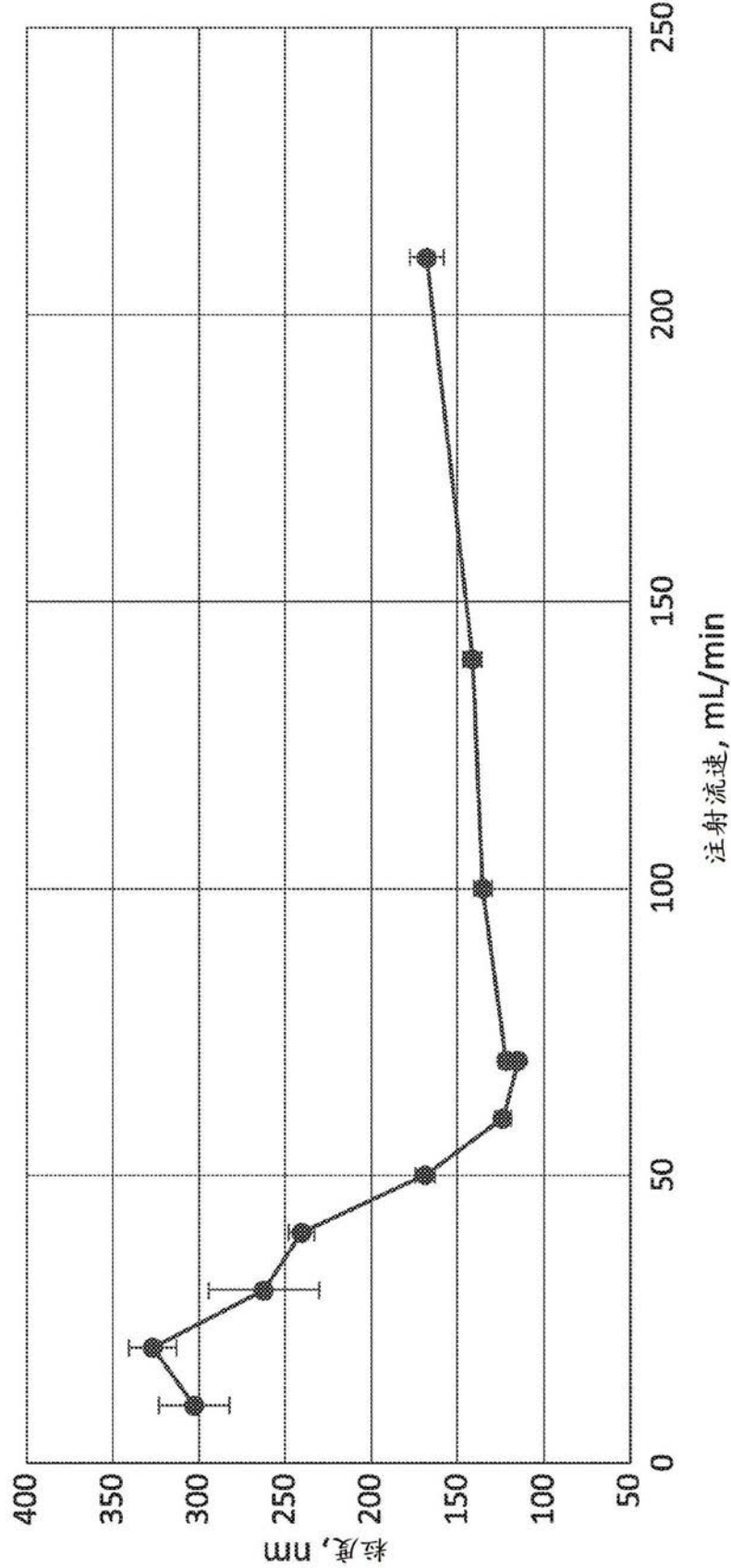


图23

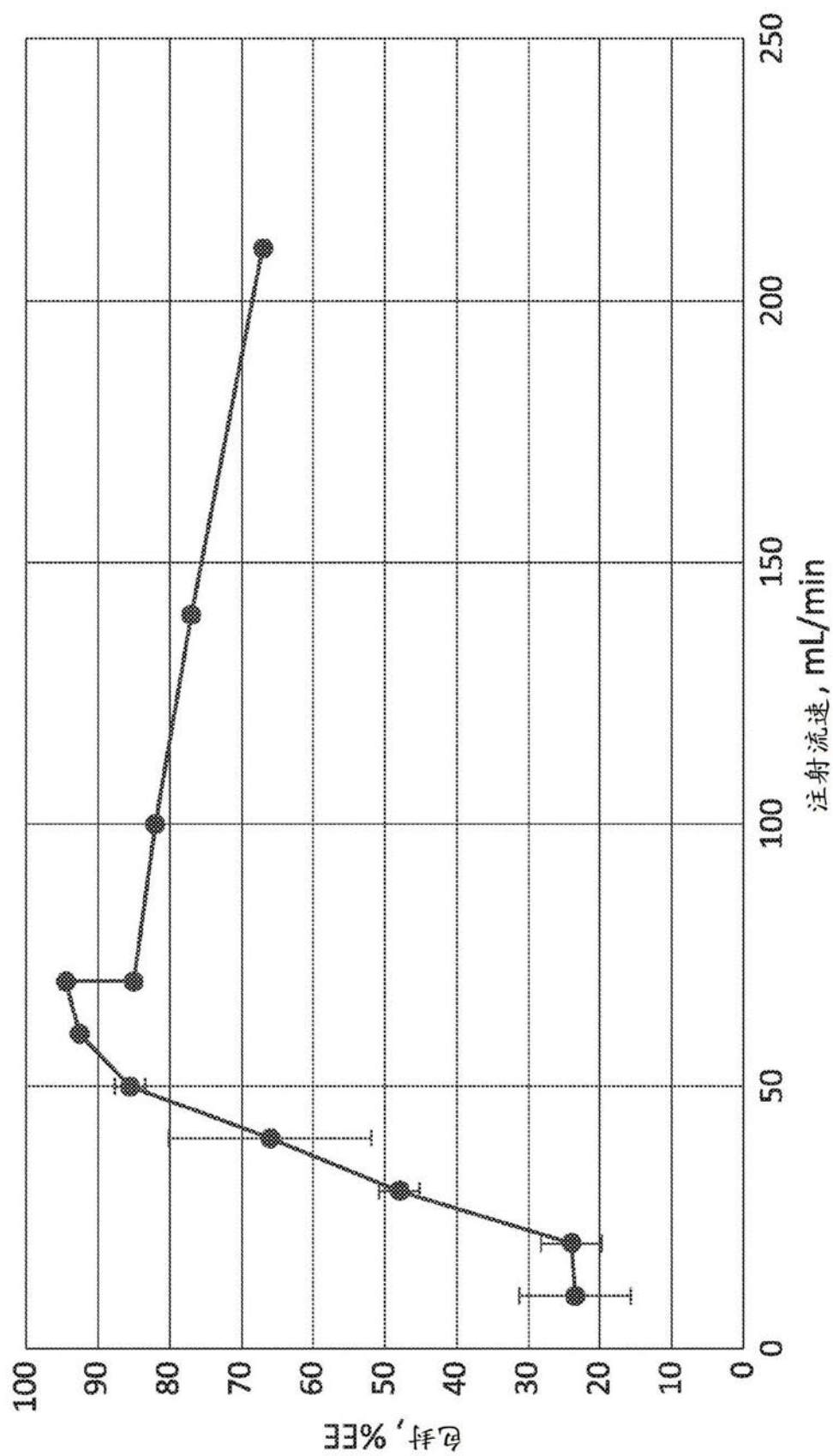


图24

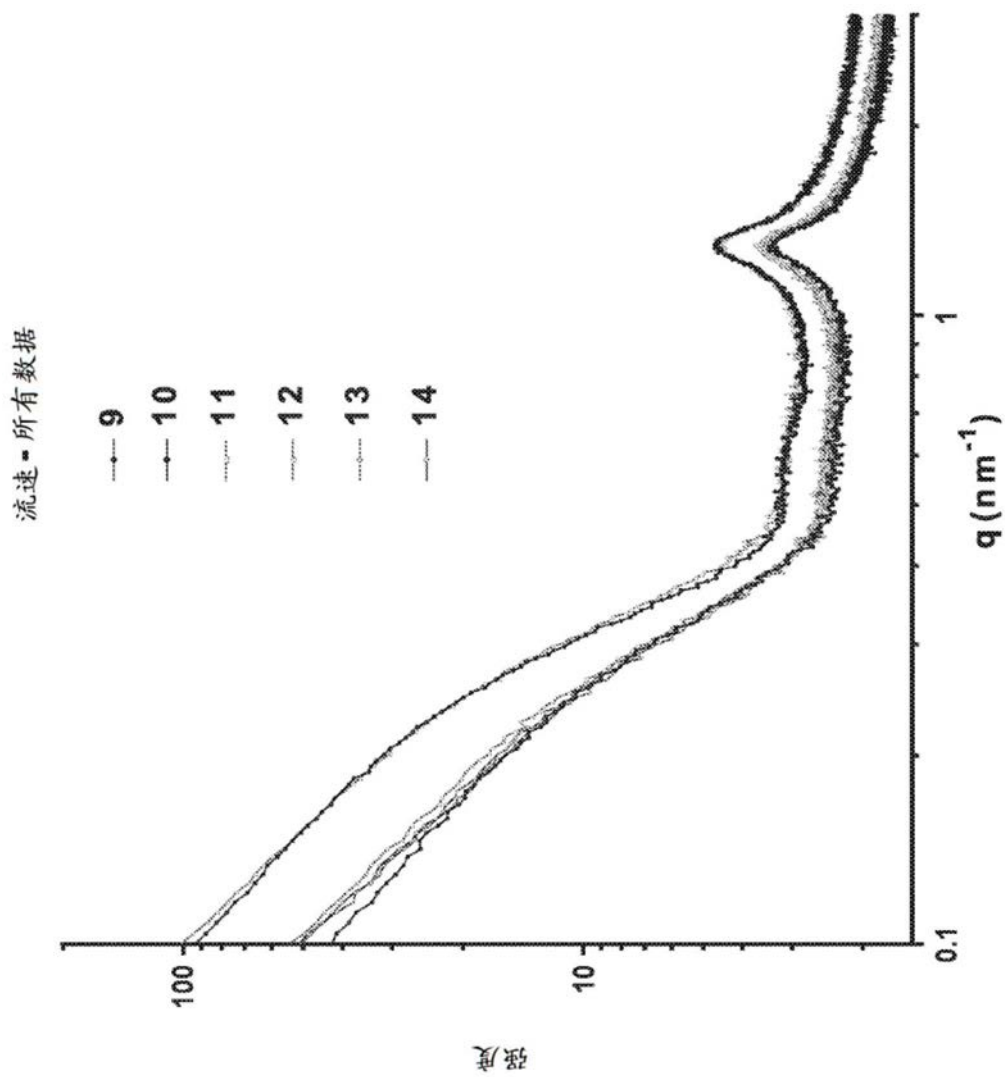


图25

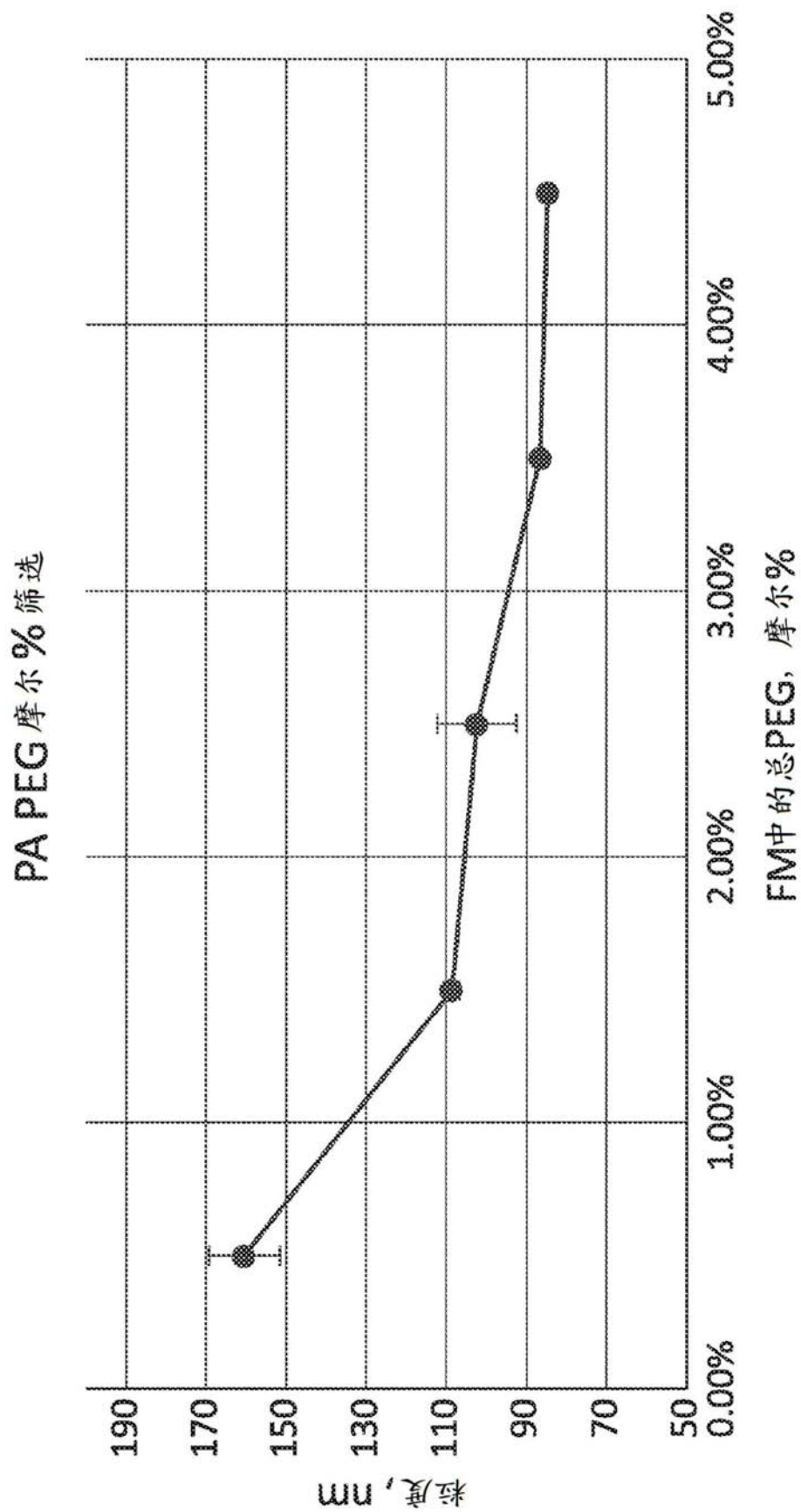


图26

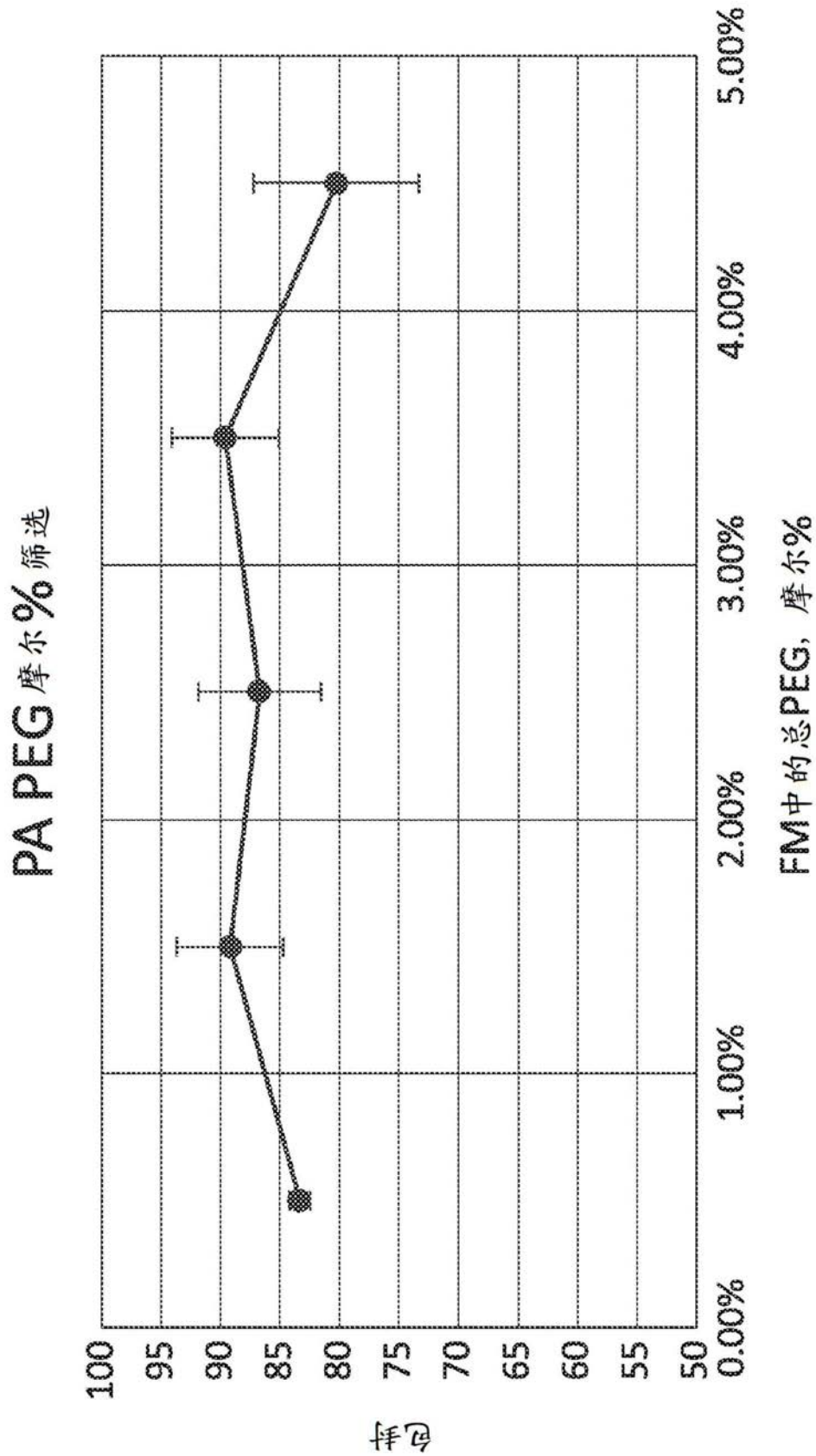


图27

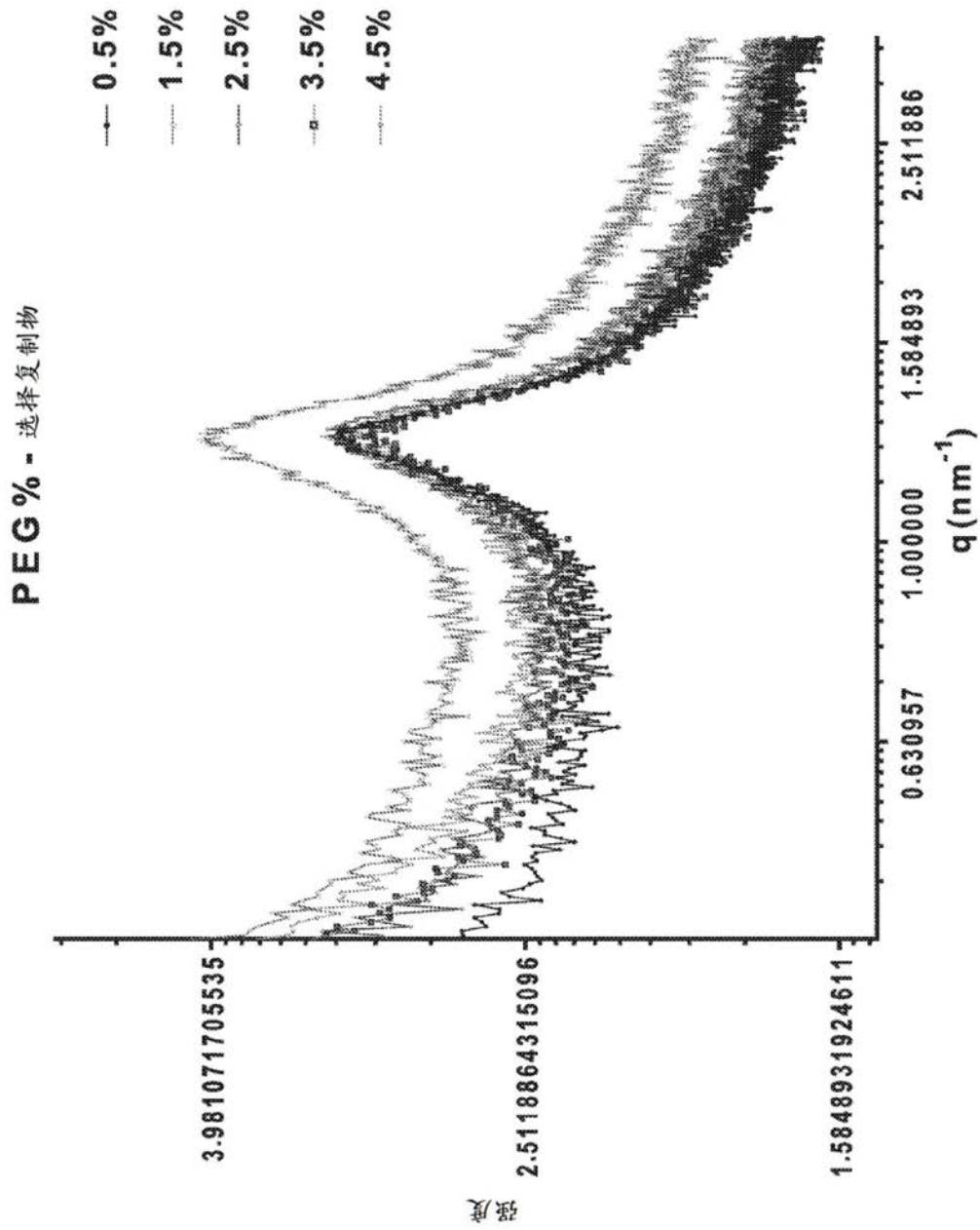


图28

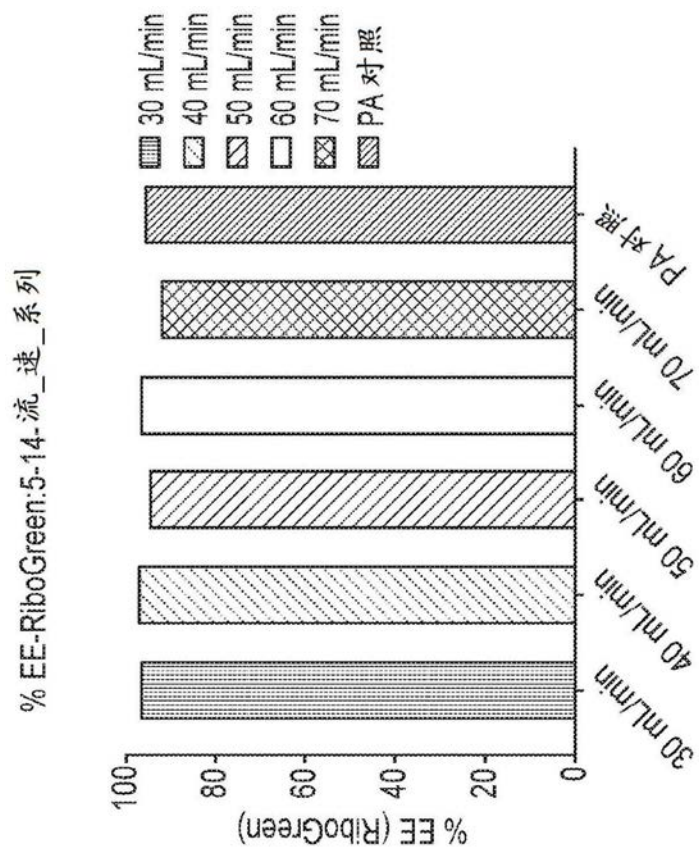


图29A

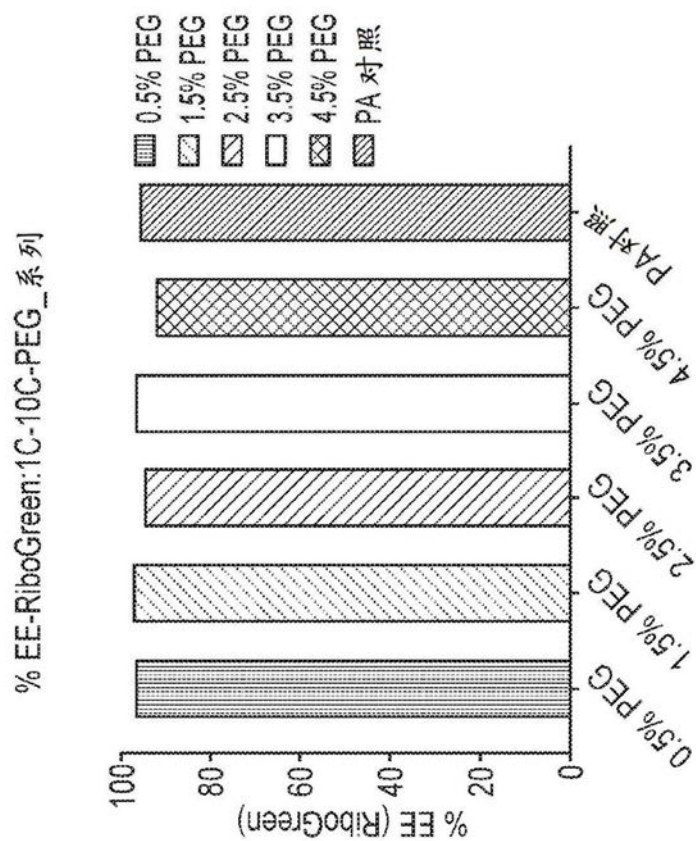


图29B

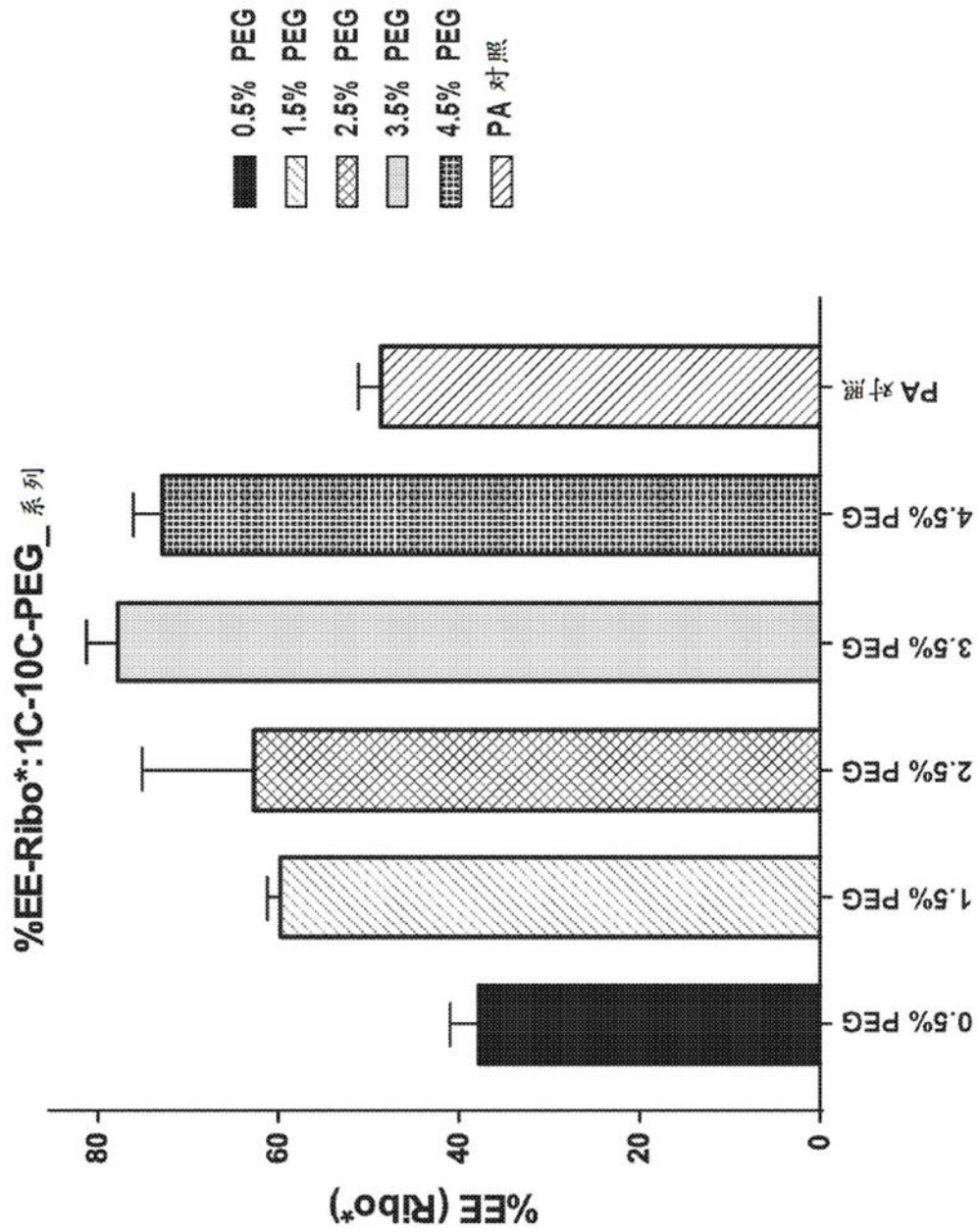


图30

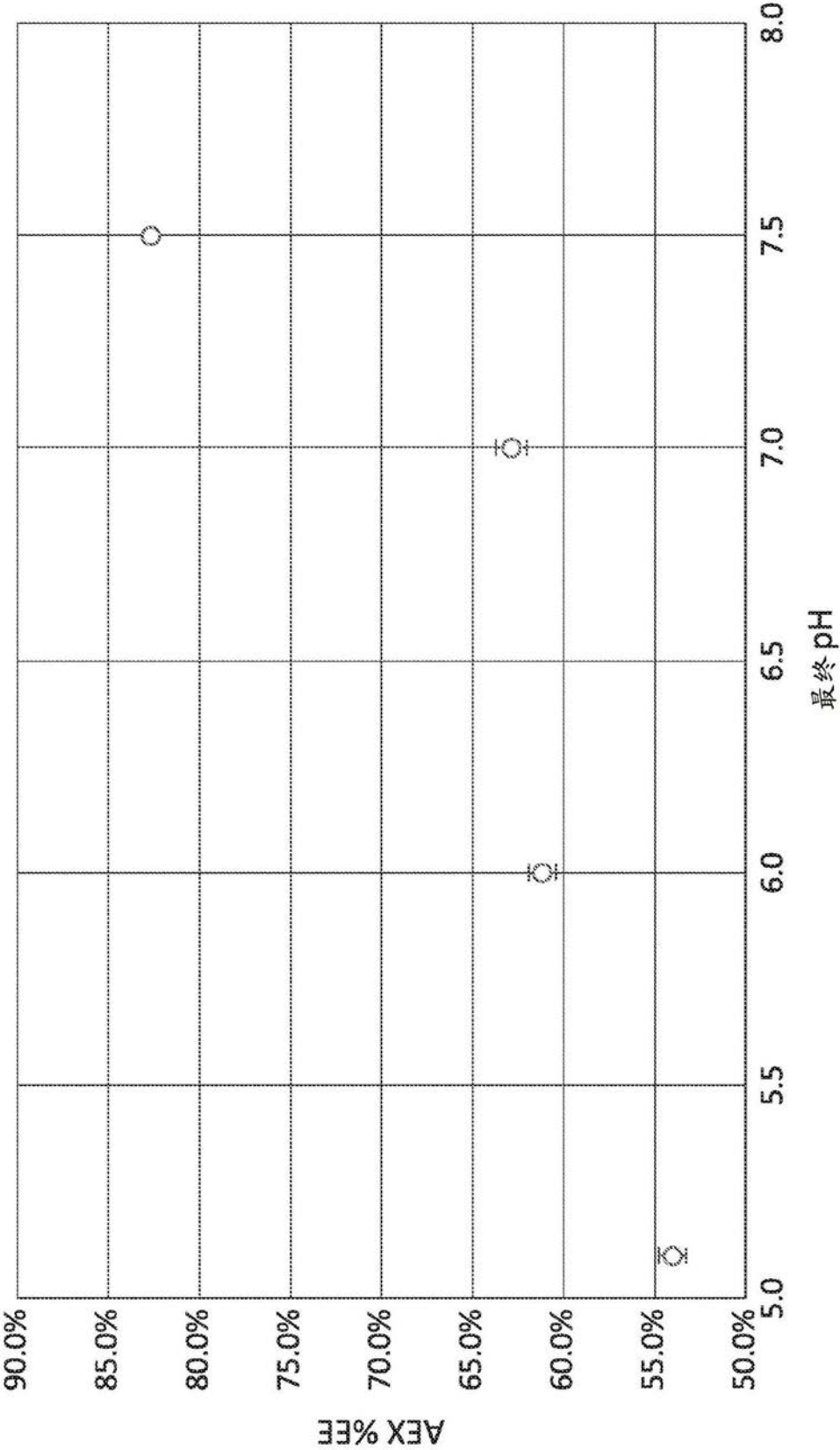


图31

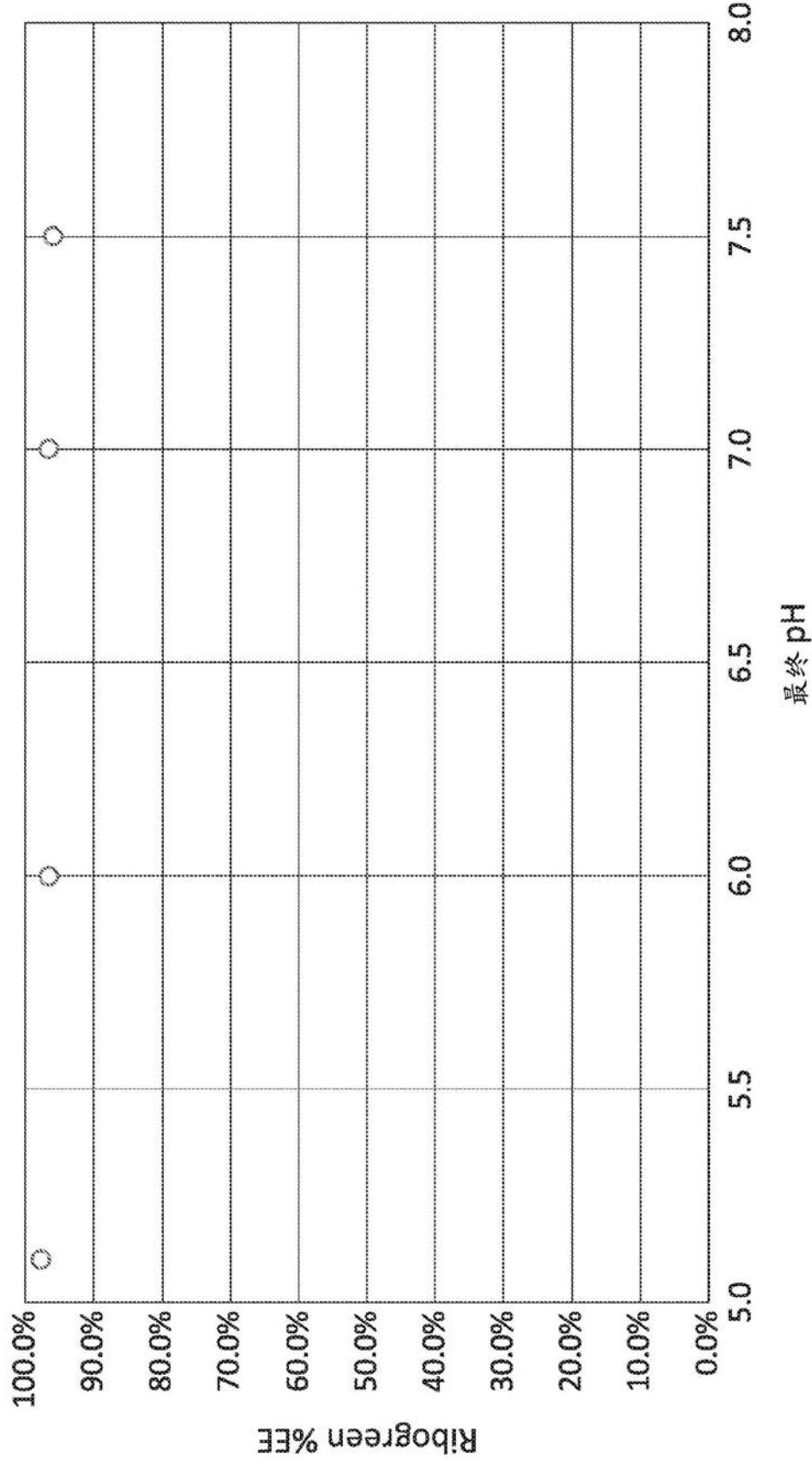


图32

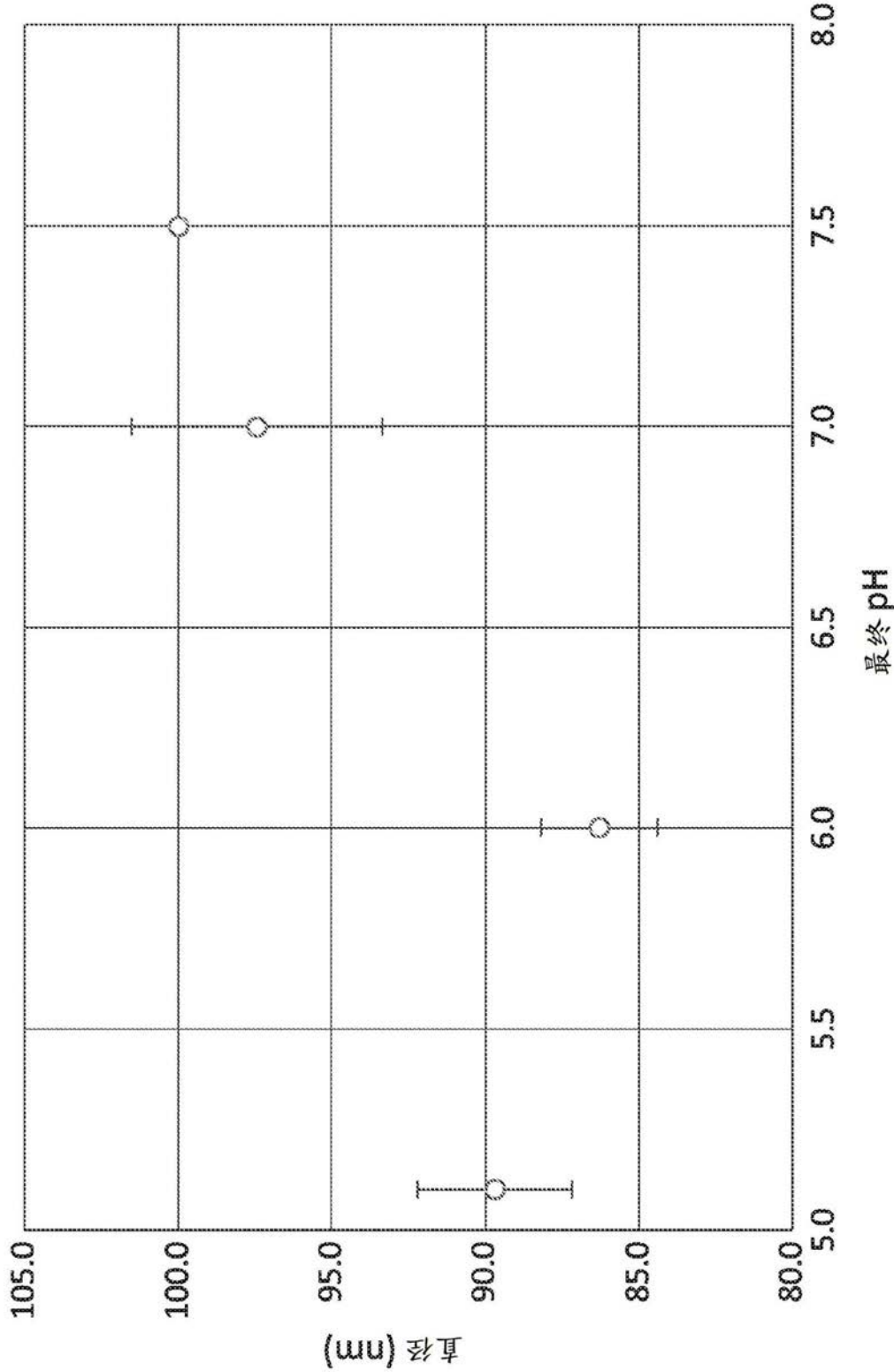


图33

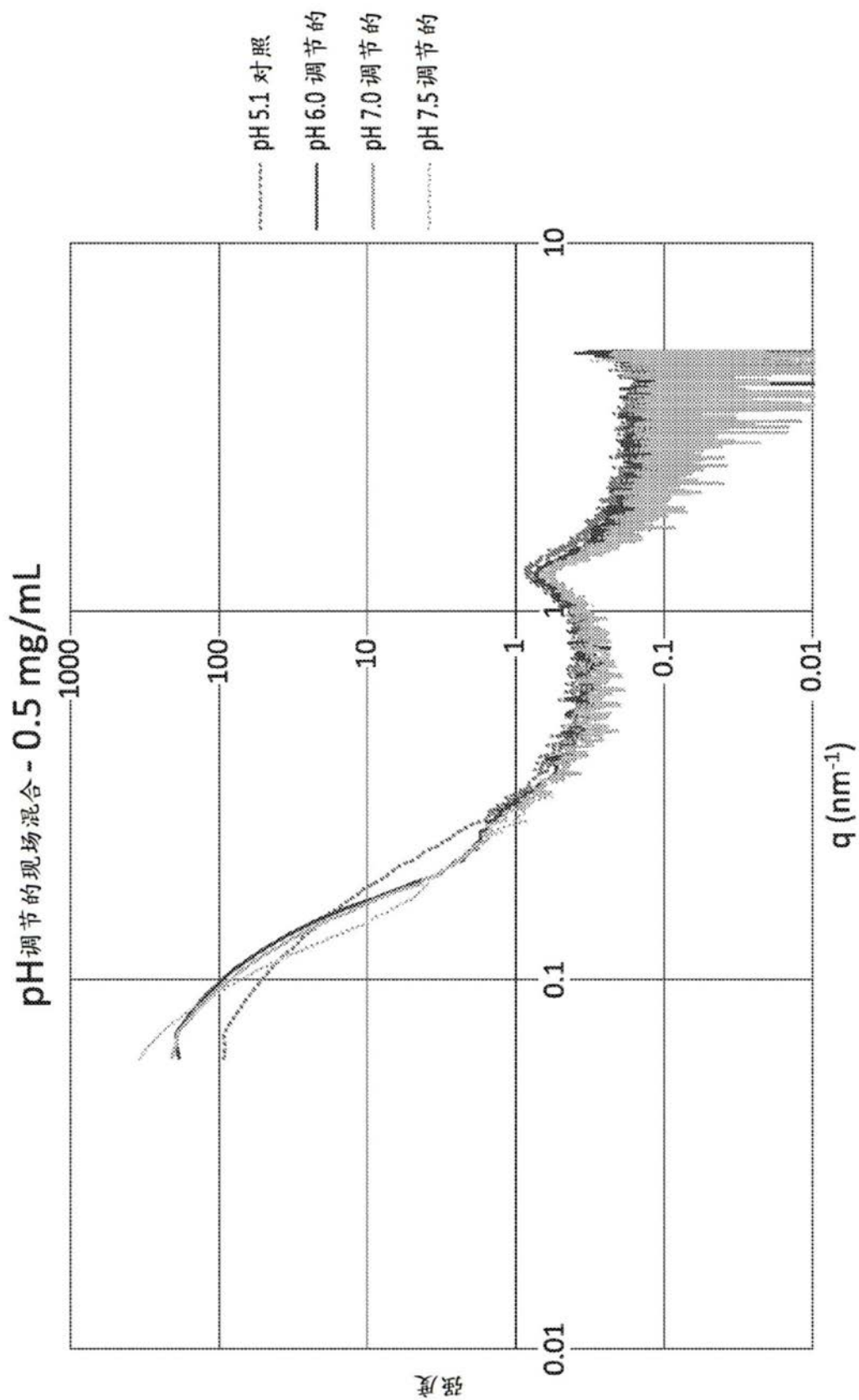


图34

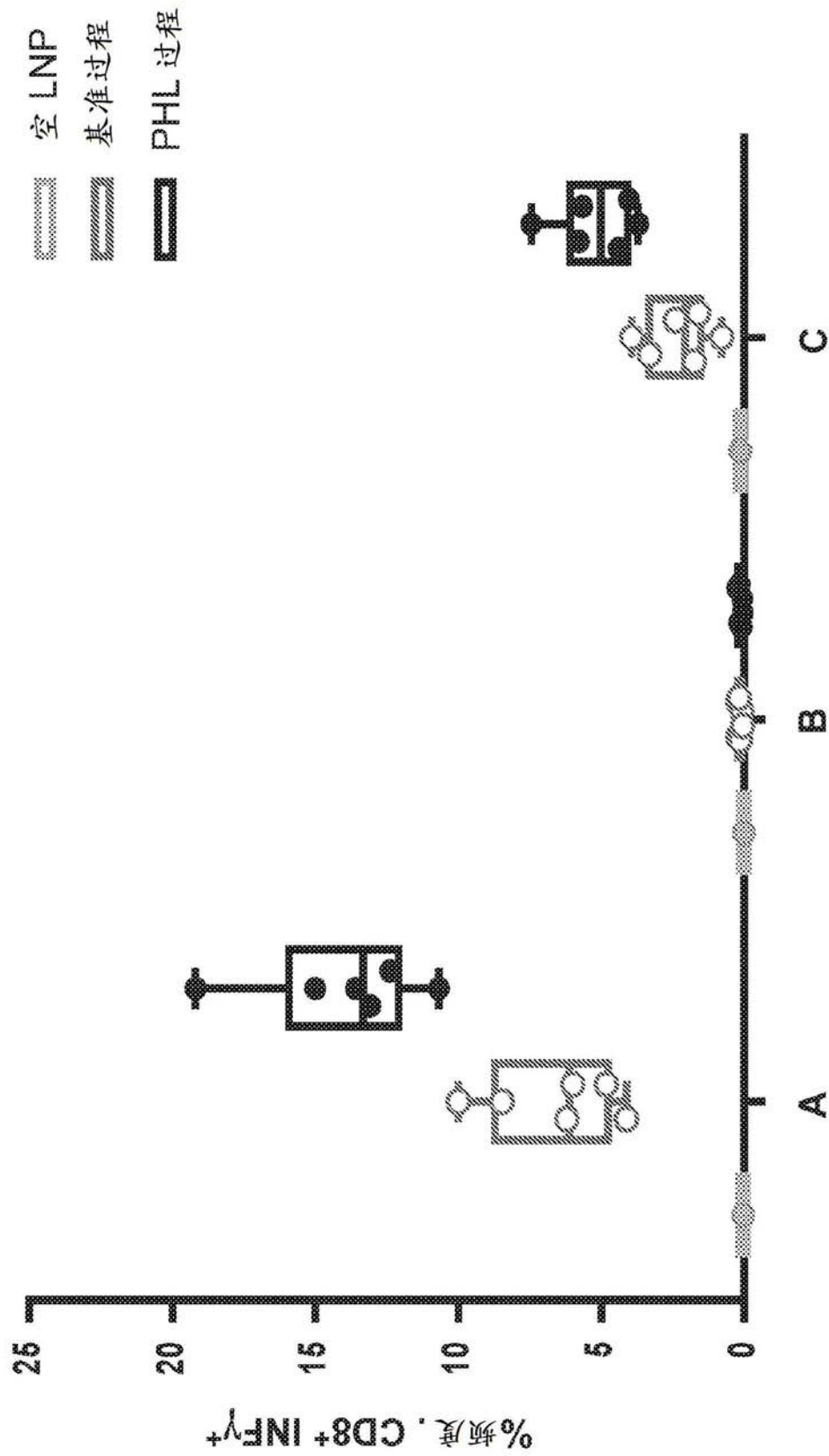


图35