(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114390921 B
(45)授权公告日 2024.11.08

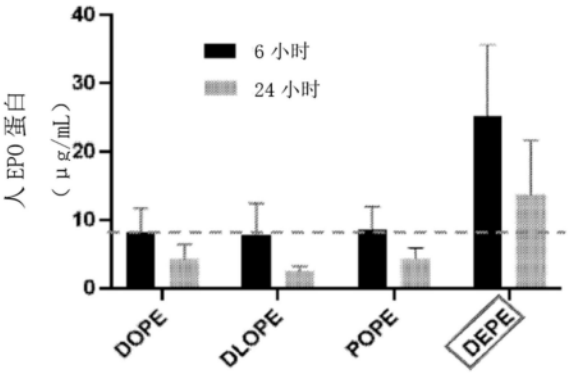
(21)申请号 202080062330.7
(22)申请日 2020.07.08
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114390921 A
(43)申请公布日 2022.04.22
(30)优先权数据
62/871,513 2019.07.08 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.03.04
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/041122 2020.07.08
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/007278 EN 2021.01.14
(73)专利权人 川斯勒佰尔公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 S·卡夫 A·萨罗德 F·德罗莎
(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
专利代理师 顾云峰 吴瑜
(51)Int.Cl.
A61K 9/51(2006.01)
A61K 47/60(2017.01)
A61K 47/69(2017.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
C12N 15/88(2006.01)
(56)对比文件
EP 3315125 A1,2018.05.02
WO 2018/089801 A1,2018.05.17
审查员 魏秀丽
权利要求书9页 说明书60页 附图2页

(54)发明名称

改善的负载MRNA的脂质纳米颗粒和其制备方法

(57)摘要

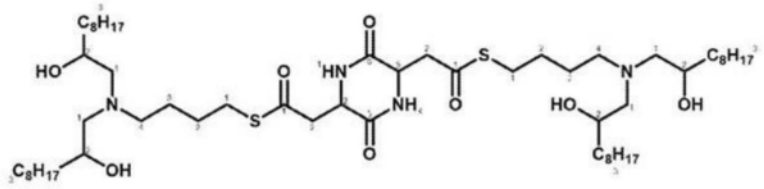
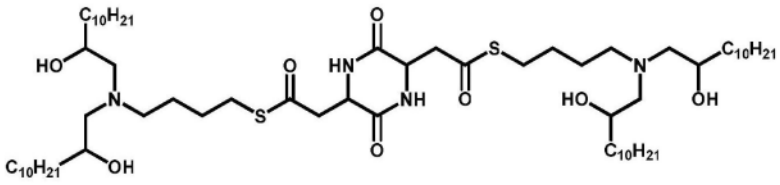
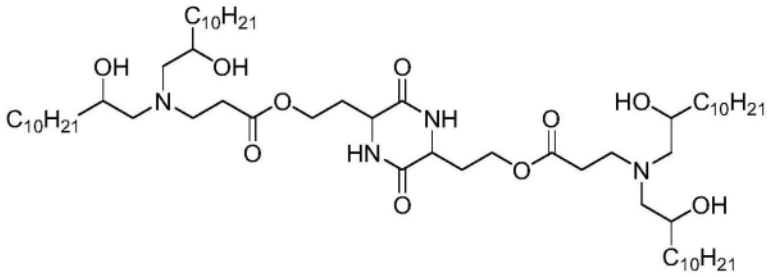
本发明提供了一种包封mRNA的改进的脂质纳米颗粒调配物,其包含DEPE作为辅助脂质。

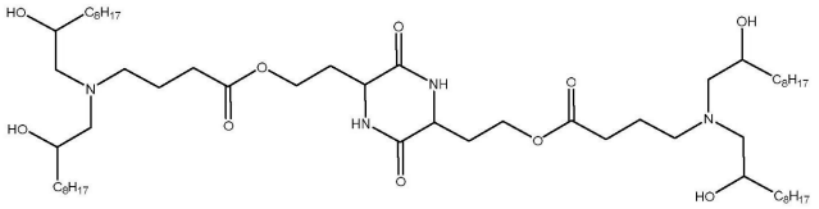
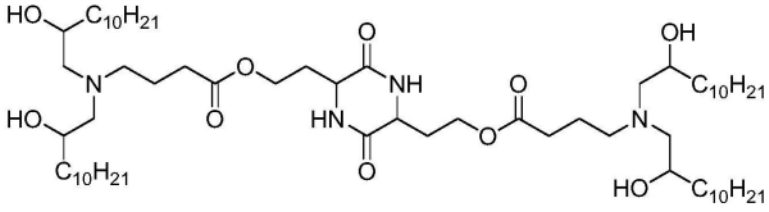
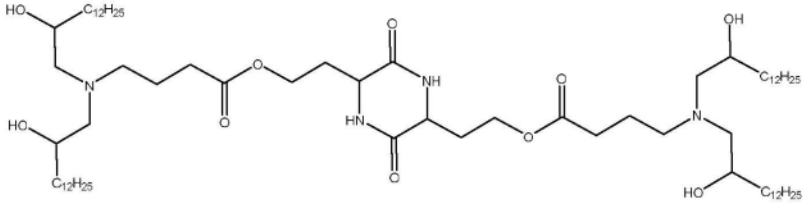
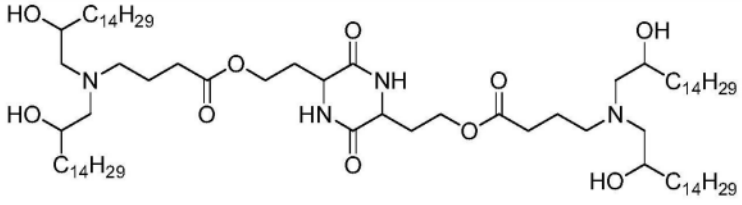


CN 114390921 B

1.一种组合物,包括用于向有需要的受试者递送mRNA的脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒包封所述mRNA并包含一种或多种阳离子脂质、一种或多种PEG修饰的脂质和一种或多种辅助脂质,其中

所述一种或多种阳离子脂质中的至少一种是或者包含下表中的任一化合物:

名称	结构
cDD-TE-4-E10	
cDD-TE-4-E12 （化合物 1）	
cHse-E-2-E12	

cHse-E-3-E10 （化合物 2）	
cHse-E-3-E12	
cHse-E-3-E14 （化合物 3）	
cHse-E-3-E16	

所述一种或多种辅助脂质中的至少一种是或者包含1,2-二芥酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DEPE),

DEPE以脂质纳米颗粒中总脂质的25摩尔％至35摩尔％的浓度存在,

并且所述组合物中大于70％的纳米颗粒的尺寸范围为75nm至150nm。

2.如权利要求1所述的组合物,其中与包含具有相同脂质组分和量的脂质纳米颗粒的第二组合物中的相同mRNA的表达相比,向所述受试者施用所述组合物导致所述mRNA的表达增强,不同之处在于所述第二组合物中的脂质纳米颗粒包含一种或多种不同的辅助脂质并且不包含DEPE。

3.如权利要求2所述的组合物,其中所述一种或多种不同的辅助脂质选自二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLOPE)、和1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(POPE)和/或其组合。

4.如权利要求2或3所述的组合物,其中所述表达相对于所述第二组合物的脂质纳米颗粒增强至少两倍。

5.如权利要求1所述的组合物,其中所述一种或多种PEG修饰的脂质中的至少一种是或者包含长度为最多5kDa的聚乙二醇链,所述聚乙二醇链共价连接至具有长度为C_6-C_{20}的烷基链的脂质。

6.如权利要求1所述的组合物,其中所述脂质纳米颗粒还包含一种或多种固醇。

7.如权利要求6所述的组合物,其中所述一种或多种固醇中的至少一种是或者包含基于胆固醇的脂质。

8.如权利要求7所述的组合物,其中所述基于胆固醇的脂质是胆固醇或PEG化的胆固醇。

9.如权利要求1所述的组合物,其中所述mRNA编码肽。

10.如权利要求9所述的组合物,其中所述肽为多肽。

11.如权利要求9或10所述的组合物,其中所述mRNA被全身递送,并且在施用后24小时或更长时间在肝脏或血清中可检测到所翻译的肽或多肽。

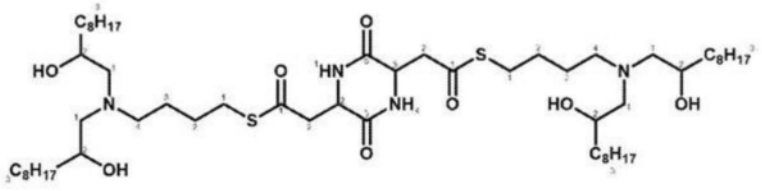
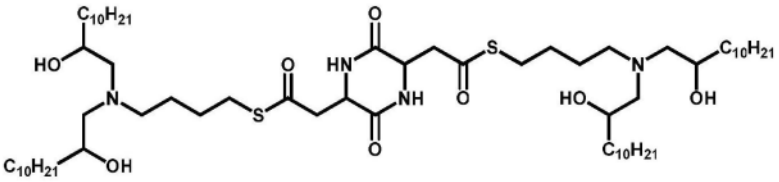
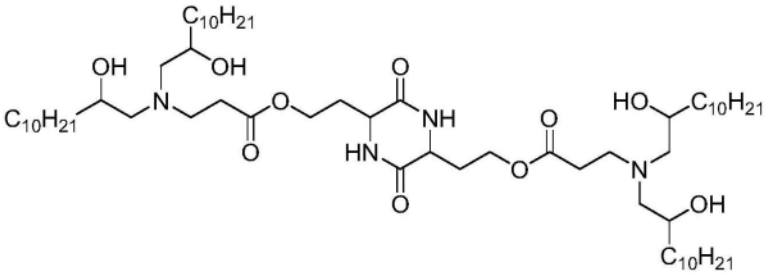
12.如权利要求10所述的组合物,其中所述多肽是治疗性多肽。

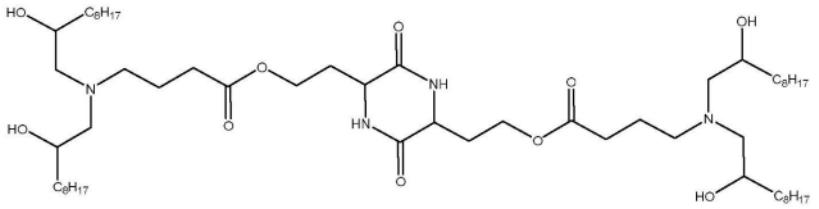
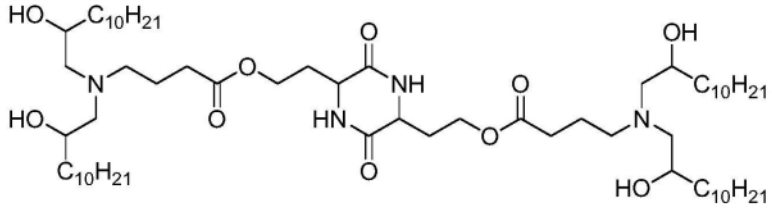
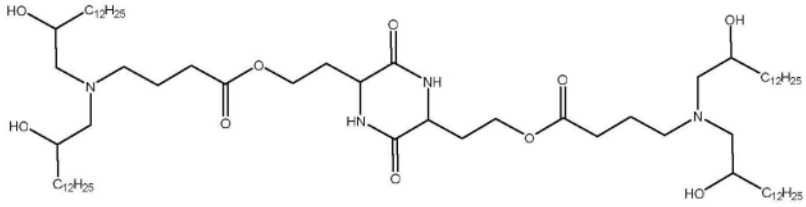
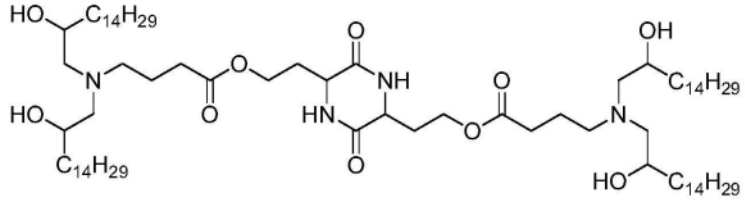
13.如权利要求12所述的组合物,其中所述治疗性多肽是(a)抗体轻链或抗体重链,或(b)所述受试者中不存在或缺乏的多肽。

14.如权利要求9所述的组合物,其中所述肽是抗原。

15.一种脂质纳米颗粒在制备用于向有需要的受试者递送mRNA的药物中的用途,所述递送包括向所述受试者施用所述脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒包封所述mRNA并包含一种或多种阳离子脂质、一种或多种PEG修饰的脂质和一种或多种辅助脂质,其中

所述一种或多种阳离子脂质中的至少一种是或者包含下表中的任一化合物:

名称	结构
cDD-TE-4-E10	
cDD-TE-4-E12 （化合物 1）	
cHse-E-2-E12	

cHse-E-3-E10（化合物2）	
cHse-E-3-E12	
cHse-E-3-E14（化合物3）	
cHse-E-3-E16	

所述一种或多种辅助脂质中的至少一种是或者包含1,2-二芥酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DEPE),

DEPE以脂质纳米颗粒中总脂质的25摩尔%至35摩尔%的浓度存在,

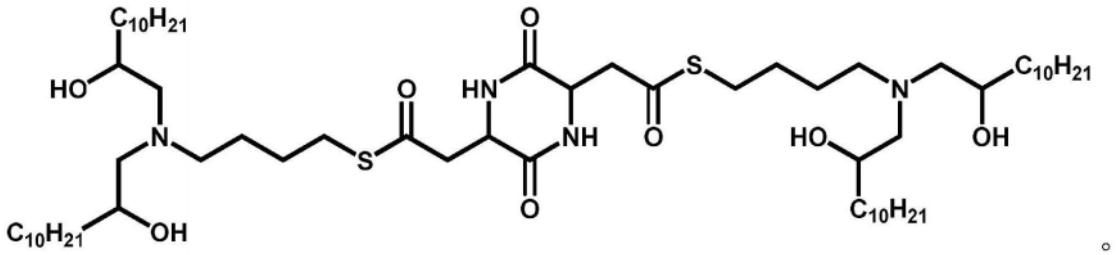
并且大于70%的纳米颗粒的尺寸范围为75nm至150nm。

16.如权利要求15所述的用途,其中与包含具有相同脂质组分和量的脂质纳米颗粒的第二药物中的相同mRNA的表达相比,向所述受试者施用所述药物导致所述mRNA的表达增强,不同之处在于所述第二药物中的脂质纳米颗粒包含一种或多种不同的辅助脂质并且不包含DEPE。

17.如权利要求16所述的用途,其中所述不同的辅助脂质选自二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLOPE)、和1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(POPE)和/或其组合。

18.如权利要求16或17所述的用途,其中表达相对于所述第二药物中的脂质纳米颗粒增强至少两倍。

19.如权利要求15所述的用途,其中所述一种或多种阳离子脂质中的至少一种是或者包含化合物1:



化合物 1

20.如权利要求15所述的用途,其中所述一种或多种PEG修饰的脂质中的至少一种是或者包含长度为最多5kDa的聚乙二醇链,所述聚乙二醇链共价连接至具有长度为C_6-C_{20}的烷基链的脂质。

21.如权利要求15所述的用途,其中所述脂质纳米颗粒还包括一种或多种固醇。

22.如权利要求21所述的用途,其中所述一种或多种固醇中的至少一种是或者包含基于胆固醇的脂质。

23.如权利要求22所述的用途,其中所述基于胆固醇的脂质是胆固醇或PEG化的胆固醇。

24.如权利要求15所述的用途,其中所述mRNA编码肽。

25.如权利要求24所述的用途,其中所述肽是多肽。

26.如权利要求25所述的用途,其中所述多肽是治疗性多肽。

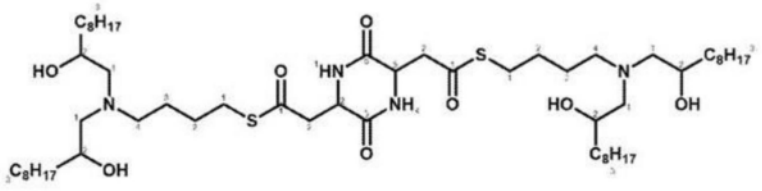
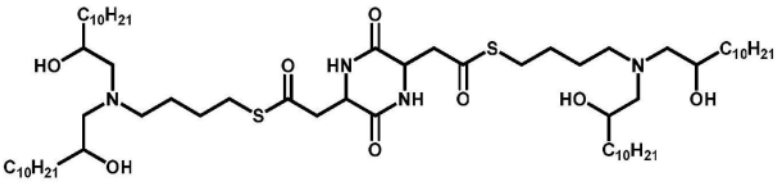
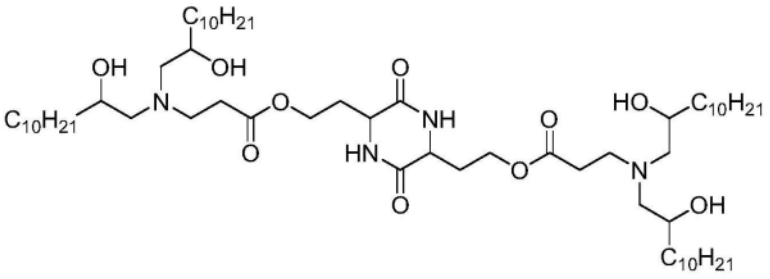
27.如权利要求26所述的用途,其中所述治疗性多肽是(a)抗体轻链或抗体重链,或(b)所述受试者中不存在或缺乏的多肽。

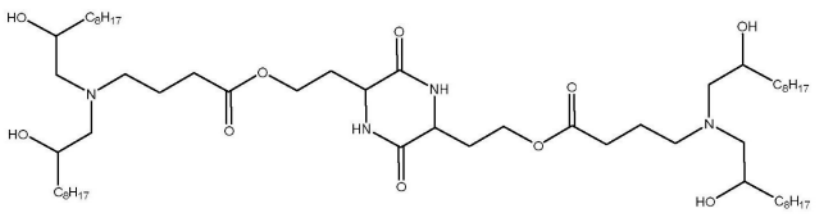
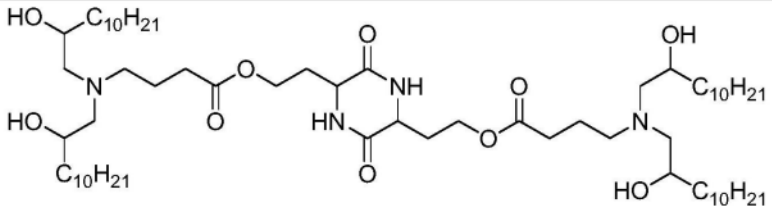
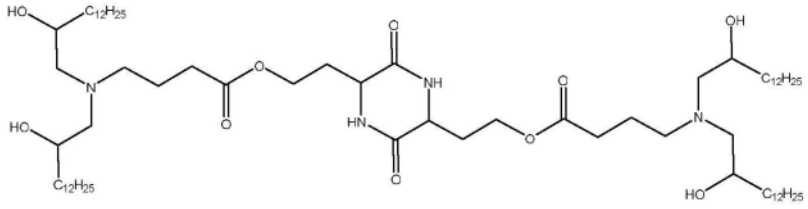
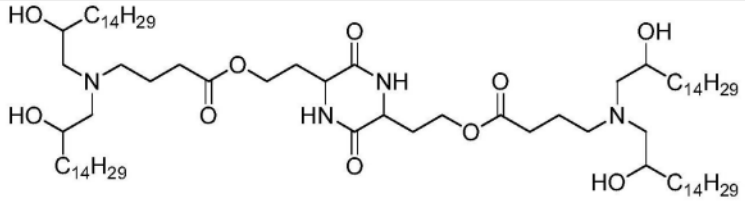
28.如权利要求24所述的用途,其中所述肽是抗原。

29.一种用于制备包封mRNA的脂质纳米颗粒的方法,所述方法包括

(a)提供一种或多种阳离子脂质、一种或多种PEG修饰的脂质和一种或多种辅助脂质的混合物,其中所述一种或多种阳离子脂质中的至少一种是或者包含

下表中的任一化合物:

名称	结构
cDD-TE-4-E10	
cDD-TE-4-E12 （化合物 1）	
cHse-E-2-E12	

cHse-E-3-E10（化合物2）	
cHse-E-3-E12	
cHse-E-3-E14（化合物3）	
cHse-E-3-E16	

并且所述一种或多种辅助脂质中的至少一种是或者包含1,2-二芥酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DEPE),并且DEPE以所述混合物中总脂质的25摩尔％至35摩尔％的浓度存在;以及

(b)由步骤(a)中提供的所述混合物形成脂质纳米颗粒;

其中所述方法还包括将所述mRNA包封到所述脂质纳米颗粒中,其中在步骤(b)中形成所述脂质纳米颗粒之前或之后进行包封,并且其中大于70％的纳米颗粒的尺寸范围为75nm至150nm。

30.如权利要求29所述的方法,其中包封所述mRNA的所述脂质纳米颗粒是稳定的。

31.如权利要求29或30所述的方法,其中所述辅助脂质不包括二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLOPE)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(POPE)和/或其组合中的任一者。

32.如权利要求29所述的方法,其中所述混合物中的所述一种或多种PEG修饰的脂质中的至少一种是或者包含长度为最多5kDa的聚乙二醇链,所述聚乙二醇链共价连接至具有长

度为C_6-C_{20}的烷基链的脂质。

33.如权利要求29所述的方法,其中所述混合物还包含一种或多种固醇。

34.如权利要求33所述的方法,其中所述一种或多种固醇中的至少一种是或者包含基于胆固醇的脂质。

35.如权利要求34所述的方法,其中所述基于胆固醇的脂质是胆固醇或PEG化的胆固醇。

36.如权利要求29所述的方法,其中所述mRNA编码治疗性多肽。

37.如权利要求29所述的方法,其中将所述mRNA包封在预先形成的脂质纳米颗粒中。

38.如权利要求29所述的方法,其中所述方法还包括在包封所述mRNA之前和/或之后使所述脂质纳米颗粒经受切向流过滤(TFF)。

39.如权利要求29所述的方法,其中所述方法还包括在海藻糖溶液中配制所述脂质纳米颗粒。

改善的负载MRNA的脂质纳米颗粒和其制备方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年7月8日提交的美国临时申请序列号62/871,513的优先权,该临时申请的公开内容据此以引用的方式并入。

技术领域

[0003] 本发明涉及脂质介导的mRNA递送;以及脂质化合物和包含其此类化合物的组合物。特别地,本发明涉及此类化合物和组合物的方法和用途,并且涉及用于制备此类化合物和组合物的方法。

背景技术

[0004] 信使RNA疗法(MRT)正在成为治疗或预防多种疾病的越来越重要的方法。MRT涉及向需要所述疗法的受试者施用信使RNA(mRNA),以提供在受试者体内产生由mRNA编码的蛋白质。脂质纳米颗粒用于包封mRNA以实现mRNA的有效体内递送。

[0005] 已经进行了许多努力来鉴定可以使用脂质纳米颗粒增强mRNA的细胞内递送和/或表达的新颖方法和组合物,其可以适合于可规模化且成本有效的制造方法。同时,重要的是,任何这种对mRNA细胞内递送和/或表达的增强也保持或改善与脂质介导的mRNA递送相关的组合物的安全性和耐受性。

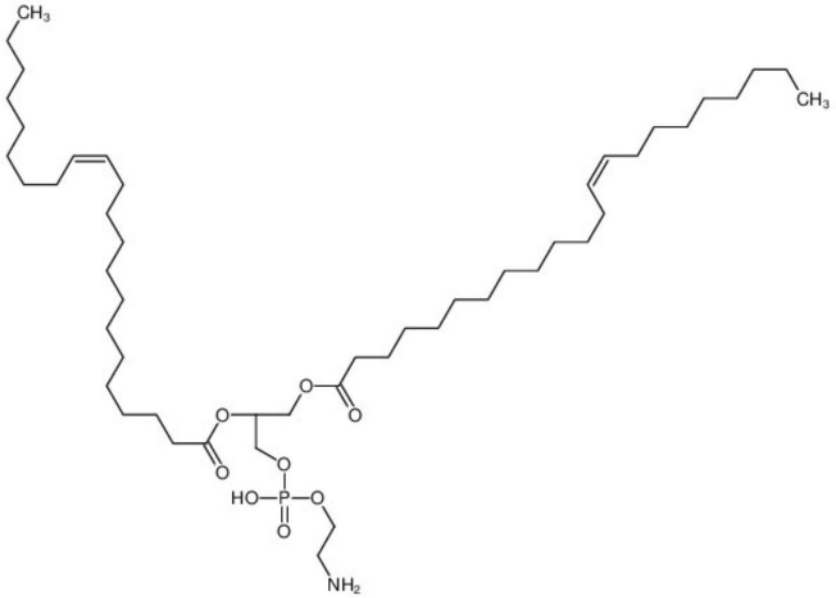
[0006] 已发现包含一种或多种阳离子脂质、一种或多种PEG修饰的脂质和一种或多种包封mRNA的辅助脂质的多组分脂质纳米颗粒对于在体内实现mRNA的递送和表达是特别有效的。近期研究的重点是发现用于mRNA递送的新型阳离子脂质。多组分脂质纳米颗粒的其他组分几乎没有受到关注。持续需要改善mRNA的脂质纳米颗粒递送以实现mRNA的细胞内递送和/或表达。同时,期望新的脂质纳米颗粒调配物维持或改善安全性和耐受性。

发明内容

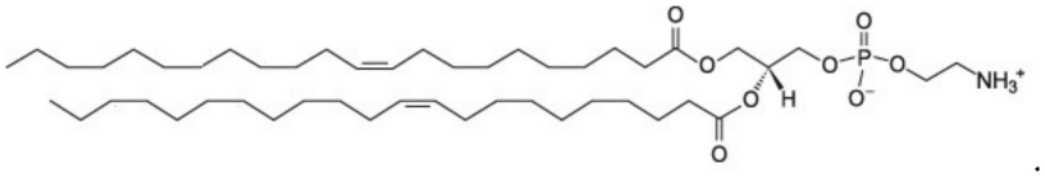
[0007] 本发明人已惊讶地发现,体内mRNA的递送和/或表达可通过优化包封mRNA的多组分脂质体的辅助脂质组分而显著改善。特别是,本发明基于以下发现:相对于包含作为辅助脂质之一的二油酰基磷酰乙醇胺(DOPE)的常规脂质体,在包含一种或多种阳离子脂质、一种或多种PEG修饰的脂质和一种或多种辅助脂质的包封mRNA的脂质纳米颗粒调配物中存在的作为辅助脂质的1,2-二芥酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DEPE)可使体内mRNA的递送和/或表达增加超过两倍。含DEPE的脂质纳米颗粒在安全性和耐受性方面是可比较的含DOPE的脂质纳米颗粒(如通过肝毒性标记物如ALT和AST所评估)。

[0008] 因此,本发明的一个方面是提供一种用于向有需要的受试者递送mRNA的脂质纳米颗粒,其中所述脂质纳米颗粒包含一种或多种阳离子脂质、一种或多种PEG修饰的脂质和一种或多种包封mRNA的辅助脂质,其中所述一种或多种辅助脂质包括1,2-二芥酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DEPE)。当施用于受试者时,脂质纳米颗粒中的DEPE提供mRNA的增强表达。

[0009] 在本发明的实施方案中,DEPE 1,2-二芥酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DEPE)在结构上由以下结构表示:

[0010] 

[0011] 或由以下结构表示:

[0012] 

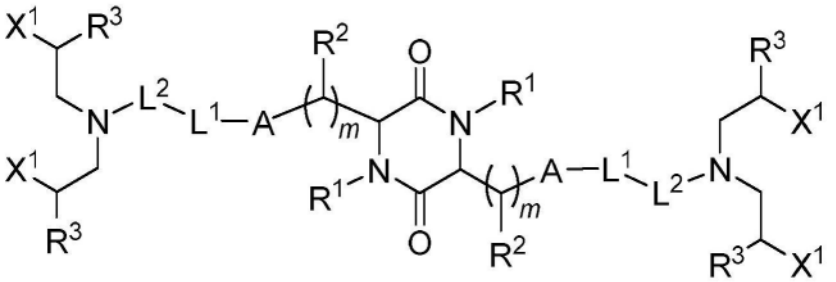
[0013] 在本发明的实施方案中,与来自具有相同脂质组分和量的第二脂质纳米颗粒的相同mRNA的表达相比,mRNA的表达增强更多,不同之处在于其包含不同的一种或多种辅助脂质并且不包含DEPE。在某些实施方案中,增强的表达相对于第二脂质纳米颗粒增加两倍或更多。在一些实施方案中,第二脂质纳米颗粒中的不同的一种或多种辅助脂质包括二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLOPE)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(POPE)和/或其组合。

[0014] 在某些实施方案中,脂质纳米颗粒中的DEPE以脂质纳米颗粒中总脂质的至少0.5摩尔%的浓度存在,例如以0.5摩尔%至50摩尔%的浓度存在,特别是以10摩尔%至45摩尔%的浓度存在。更典型地,脂质纳米颗粒中的DEPE以脂质纳米颗粒中总脂质的25摩尔%至35摩尔%的浓度存在。

[0015] 在一些实施方案中,一种或多种阳离子脂质是或者包括cKK-E12。

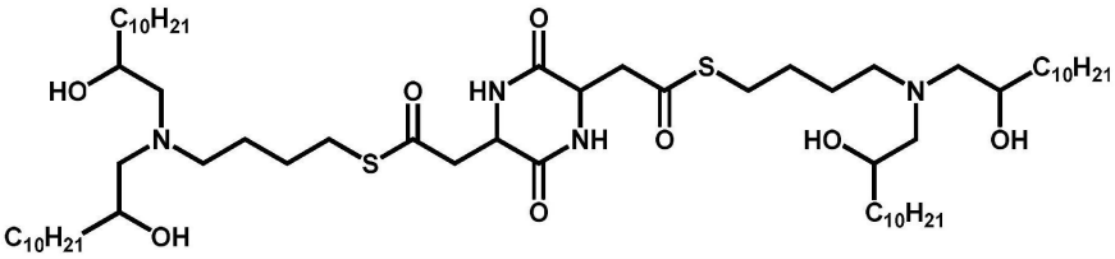
[0016] 在某些实施方案中,一种或多种阳离子脂质是或者包括ICE(咪唑胆固醇酯)。

[0017] 在某些实施方案中,一种或多种阳离子脂质是或者包括下式的阳离子脂质:

[0018] 

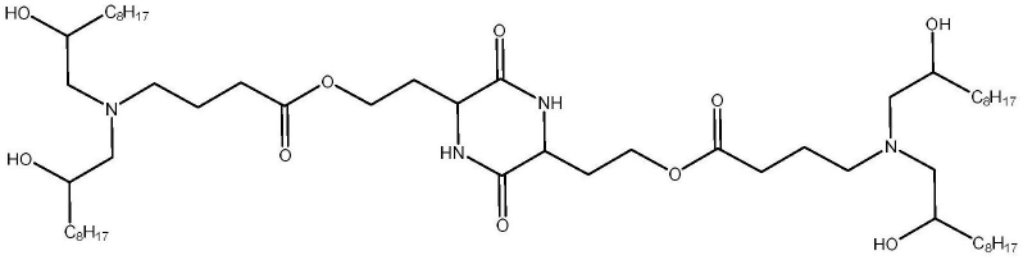
[0019] 或其药学上可接受的盐；

[0020] 其中每个R^1和R^2独立地是H或C_1-C_6脂族；每个m独立地是具有1至4的值的整数；每个A独立地是共价键或亚芳基；每个L^1独立地是酯、硫酯、二硫键或酸酐基团；每个L^2独立地是C_2-C_{10}脂族；每个X^1独立地是H或OH；并且每个R^3独立地是C_6-C_{20}脂族。在一个具体实施方案中，一种或多种阳离子脂质是或者包括以下化合物：

[0021] 

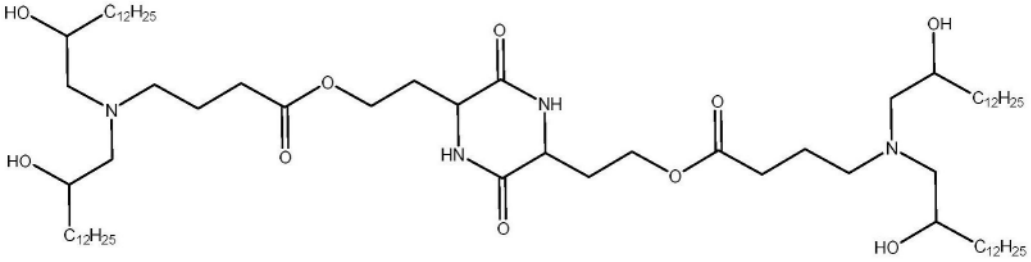
[0022] (化合物1)

[0023] 或其药学上可接受的盐。在另一个具体实施方案中，一种或多种阳离子脂质是或者包括以下化合物：

[0024] 

[0025] (化合物2)

[0026] 或其药学上可接受的盐。在另一个具体实施方案中，一种或多种阳离子脂质是或者包括以下化合物：

[0027] 

[0028] (化合物3)

[0029] 或其药学上可接受的盐。在某些实施方案中，一种或多种PEG修饰的脂质是或者包含长度为最多5kDa的聚乙二醇链，所述聚乙二醇链共价连接至具有长度为C_6-C_{20}的烷基链的脂质。

[0030] 在一些实施方案中，包封mRNA并且包含作为辅助脂质的DEPE的脂质纳米颗粒还包含阳离子脂质，所述阳离子脂质包含具有C_6-C_{20}长度的烷基链。在一些实施方案中，阳离子脂质包含一至四条各自具有C_8-C_{16}长度的烷基链。在一些实施方案中，阳离子脂质包含一至四条各自具有C_{10}-C_{16}长度的烷基链。在一些实施方案中，阳离子脂质包含一至四条各自具有C_{10}-C_{14}长度的烷基链。在一些实施方案中，阳离子脂质包含一至四条各自具有C_{10}长度的烷基链。在一些实施方案中，阳离子脂质包含一至四条各自具有C_{12}长度的烷基链。在一些实

施方案中,阳离子脂质包含一至四条各自具有C_{16}长度的烷基链。

[0031] 在一些实施方案中,包封mRNA并且包含作为辅助脂质的DEPE的脂质纳米颗粒还包含阳离子脂质,所述阳离子脂质包含一至四条各自具有C_6-C_{20}长度的脂族链。在一些实施方案中,阳离子脂质包含一至四条各自具有C_8-C_{16}长度的脂族链。在一些实施方案中,阳离子脂质包含一至四条各自具有C_{10}-C_{14}长度的脂族链。在一些实施方案中,阳离子脂质包含一至四条各自具有C_{10}长度的脂族链。在一些实施方案中,阳离子脂质包含一至四条各自具有C_{12}长度的脂族链。在一些实施方案中,阳离子脂质包含一至四条各自具有C_{16}长度的脂族链。

[0032] 在一些实施方案中,包封mRNA并且包含作为辅助脂质的DEPE的脂质纳米颗粒还包含一种或多种阳离子脂质,所述阳离子脂质是或者包括类脂质。在一些实施方案中,类脂质包含四条脂族链。在一些实施方案中,四条类脂质脂族链中的每一条的长度独立地为C_6-C_{20}。在一些实施方案中,四条类脂质脂族链中的每一条的长度独立地为C_8-C_{16}。在一些实施方案中,四条类脂质脂族链中的每一条的长度独立地为C_{10}-C_{14}。在一些实施方案中,四条类脂质脂族链中的每一条的长度独立地为C_{10}或C_{12}。在一些实施方案中,所有四条类脂质脂族链的长度为C_6。在一些实施方案中,所有四条类脂质脂族链的长度为C_8。在一些实施方案中,所有四条类脂质脂族链的长度为C_{10}。在一些实施方案中,所有四条类脂质脂族链的长度为C_{12}。在一些实施方案中,所有四条类脂质脂族链的长度为C_{14}。在一些实施方案中,所有四条类脂质脂族链的长度为C_{16}。在一些实施方案中,所有四条类脂质脂族链的长度为C_{18}。在一些实施方案中,所有四条类脂质脂族链的长度为C_{20}。在一些实施方案中,四条类脂质脂族链中的至少两条的长度为C_6。在一些实施方案中,四条类脂质脂族链中的至少两条的长度为C_8。在一些实施方案中,四条类脂质脂族链中的至少两条的长度为C_{10}。在一些实施方案中,四条类脂质脂族链中的至少两条的长度为C_{12}。在一些实施方案中,四条类脂质脂族链中的至少两条的长度为C_{14}。在一些实施方案中,四条类脂质脂族链中的至少两条的长度为C_{16}。在一些实施方案中,四条类脂质脂族链中的至少两条的长度为C_{18}。在一些实施方案中,四条类脂质脂族链中的至少两条的长度为C_{20}。

[0033] 在一些实施方案中,包封mRNA并且包含作为辅助脂质的DEPE的脂质纳米颗粒还包含类脂质,所述类脂质包含具有C_6-C_{20}长度的烷基链。在一些实施方案中,类脂质包含具有C_8-C_{16}长度的烷基链。在一些实施方案中,类脂质包含具有C_{10}-C_{14}长度的烷基链。在一些实施方案中,类脂质包含具有C_{10}长度的烷基链。在一些实施方案中,类脂质包含具有C_{12}长度的烷基链。在一些实施方案中,类脂质包含具有C_{16}长度的烷基链。

[0034] 在某些实施方案中,脂质纳米颗粒还包含一种或多种固醇。在一些实施方案中,一种或多种固醇是或者包括基于胆固醇的脂质,例如胆固醇或PEG化的胆固醇。

[0035] 在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含一种或多种阳离子脂质、一种或多种PEG修饰的脂质、一种或多种非阳离子脂质和一种或多种包封mRNA的基于胆固醇的脂质。例如,在本发明的一个典型实施方案中,脂质纳米颗粒的脂质组分包含四种类型的脂质,所述四种类型的脂质包括阳离子脂质(例如,cKK-E12、化合物1、化合物2或化合物3)、PEG修饰的脂质(例如,DMG-PEG2K)、非阳离子脂质(DEPE)和基于胆固醇的脂质(例如,胆固醇)。在一些实施方案中,阳离子脂质与非阳离子脂质与基于胆固醇的脂质与PEG修饰的脂质在脂质纳米颗粒中的比率可以在约30-60:25-35:20-30:1-15之间。

[0036] 在一些实施方案中,脂质纳米颗粒的脂质组分包含阳离子脂质(例如ICE)、PEG修饰的脂质(例如DMG-PEG2K)、非阳离子脂质(DEPE)。在一些实施方案中,阳离子脂质与非阳离子脂质与PEG修饰的脂质的比率可以在约50-60:45-30:5-10之间。

[0037] 由本发明的脂质纳米颗粒递送的mRNA是编码在体内翻译为治疗性蛋白质的蛋白质的mRNA。在某些实施方案中,编码蛋白质的mRNA编码多肽。在一些实施方案中,多肽是治疗性多肽。在一些实施方案中,治疗性多肽是抗体轻链或抗体重链。在一些实施方案中,治疗性多肽是受试者中不存在或缺乏的多肽。在某些实施方案中,编码蛋白质的mRNA编码肽。在一些实施方案中,肽是抗原。

[0038] 在另一个方面,本发明提供一种用于改善mRNA向有需要的受试者的递送的方法,所述方法包括向受试者施用包封mRNA的脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒包含一种或多种阳离子脂质、一种或多种PEG修饰的脂质和一种或多种辅助脂质,其中所述一种或多种辅助脂质包含1,2-二芥酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DEPE)。当施用于受试者时,脂质纳米颗粒中的DEPE提供mRNA的增强表达。

[0039] 在一些实施方案中,mRNA编码在体内翻译为治疗性蛋白质或肽的蛋白质。在一些实施方案中,系统地递送编码蛋白质或肽的mRNA。在一些实施方案中,在施用后6小时或更长时间在肝脏中可检测到翻译的蛋白质或肽。在一些实施方案中,在施用后12小时或更长时间在肝脏中可检测到翻译的蛋白质或肽。在一些实施方案中,在施用后18小时或更长时间在肝脏中可检测到翻译的蛋白质或肽。在一些实施方案中,在施用后24小时或更长时间在肝脏中可检测到翻译的蛋白质或肽。在一些实施方案中,在施用后36小时或更长时间在肝脏中可检测到翻译的蛋白质或肽。在一些实施方案中,在施用后48小时或更长时间在肝脏中可检测到翻译的蛋白质或肽。在一些实施方案中,在施用后72小时或更长时间在肝脏中可检测到翻译的蛋白质或肽。在一些实施方案中,在施用后6小时或更长时间在血清中可检测到翻译的蛋白质或肽。在一些实施方案中,在施用后12小时或更长时间在血清中可检测到翻译的蛋白质或肽。在一些实施方案中,在施用后18小时或更长时间在血清中可检测到翻译的蛋白质或肽。在一些实施方案中,在施用后24小时或更长时间在血清中可检测到翻译的蛋白质或肽。在一些实施方案中,在施用后36小时或更长时间在血清中可检测到翻译的蛋白质或肽。在一些实施方案中,在施用后48小时或更长时间在血清中可检测到翻译的蛋白质或肽。在一些实施方案中,在施用后72小时或更长时间在肝脏中可检测到翻译的蛋白质或肽。

[0040] 在另一方面,本发明提供了一种包封mRNA的脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒包含一种或多种阳离子脂质、一种或多种PEG修饰的脂质和一种或多种辅助脂质,其中一种或多种辅助脂质包含1,2-二芥酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DEPE),所述脂质纳米颗粒用于治疗或预防受试者的疾病或病症的方法中,其中mRNA编码适合于治疗或预防受试者的疾病或病症的肽、多肽或蛋白质。在一个相关方面,本发明涉及包封mRNA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,其中脂质纳米颗粒包含一种或多种阳离子脂质、一种或多种PEG修饰的脂质和一种或多种辅助脂质,所述一种或多种辅助脂质包含1,2-二芥酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DEPE),并且其中mRNA编码适合于治疗或预防受试者的疾病或病症的肽、多肽或蛋白质。在一个实施方案中,mRNA编码受试者中不存在或缺乏的多肽或蛋白质,其中疾病或病症是所述多肽或蛋白质的缺乏。在另一个实施方

案中,mRNA编码抗体轻链或抗体重链,并且受试者患有可以通过向受试者施用包含所述轻链或所述重链的抗体来治疗的疾病或病症。在另一个实施方案中,mRNA编码肽、多肽或蛋白质,其中所述肽、多肽或蛋白质能够在所述受试者中诱导免疫应答,以便治疗或预防疾病或病症。

[0041] 本发明人还发现,使用DEPE作为辅助脂质使得有可能在DOPE用作辅助脂质之一时配制不形成稳定脂质体的多组分调配物。因此,在又一方面,本发明提供了一种用于制备包封mRNA的脂质纳米颗粒的方法,所述方法包括(a)提供一种或多种阳离子脂质、一种或多种PEG修饰的脂质和一种或多种辅助脂质的混合物,其中所述一种或多种辅助脂质包括1,2-二芥酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DEPE),以及(b)由步骤(a)中提供的混合物形成脂质纳米颗粒,其中方法还包括将mRNA包封到脂质纳米颗粒中,其中可以在步骤(b)中形成脂质纳米颗粒之前或之后进行包封。包封mRNA的所得脂质纳米颗粒是稳定的。在一个实施方案中,用于制备根据本发明的脂质纳米颗粒的方法特别排除了一种或多种辅助脂质的使用,所述辅助脂质选自二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLOPE)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(POPE)和其组合。在一个实施方案中,DEPE以10摩尔%至50摩尔%的浓度存在于混合物中。在一个实施方案中,混合物中的一种或多种PEG修饰的脂质包括长度为最多5kDa的聚乙二醇链,所述聚乙二醇链共价连接至具有长度为C_6-C_{20}的烷基链的脂质。在一些实施方案中,一种或多种阳离子脂质、一种或多种PEG修饰的脂质和一种或多种辅助脂质的混合物还包含一种或多种脂质,诸如基于胆固醇的脂质。在一个实施方案中,基于胆固醇的脂质是胆固醇和/或PEG化的胆固醇。在一个实施方案中,mRNA编码治疗性肽、多肽或蛋白质。在一些实施方案中,将mRNA包封于预先形成的脂质纳米颗粒中。在一些实施方案中,用于制备根据本发明的脂质纳米颗粒的方法还包括在包封mRNA之前和/或之后使脂质纳米颗粒经受切向流过滤(TFF)。在一些实施方案中,所述方法还包括在海藻糖溶液中配制脂质纳米颗粒。

[0042] 不希望受任何特定理论的束缚,本发明人认为,DEPE衍生物,特别是具有不同脂质链长度或组成的DEPE衍生物,提供了与本文针对DEPE所述的相同优点。为方便起见,本发明的前述概述和详细描述仅参考DEPE。然而,应理解,DEPE的脂质链的微小变化不影响其优越特性,并且此类DEPE衍生物明确包含在本发明内。

[0043] 在下述详细描述、附图和权利要求书中,本发明的其他特征、目的和优点是显而易见的。然而,应理解,详细描述、附图和权利要求书虽然指出了本发明的实施方案,但仅以说明性方式而非限制性方式给出。在本发明的范围内的各种变化和修改对于所属领域的技术人员将变得显而易见。

附图说明

[0044] 图1描绘了包含DEPE和其他辅助脂质的mRNA LNP中EPO蛋白表达的示例性图形表示。

[0045] 图2描绘了包含DEPE和其他辅助脂质的mRNA LNP的血清ALT和AST的给药后水平的示例性图形表示。

具体实施方式

[0046] 以下实施方案及其方面结合旨在为示例性和说明性,而不限制范围的系统、组合物和方法进行描述和说明。

[0047] 定义

[0048] 本发明提供了一种用于制造包封在脂质纳米颗粒(LNP)调配物中的mRNA以产生mRNA治疗组合物的改进方法。

[0049] 为了使本发明更容易理解,首先在下文定义了某些术语。下述术语和其他术语的另外定义阐述在整个本说明书中。

[0050] 氨基酸:如本文所用,术语"氨基酸"在其最广泛的意义上是指可以并入多肽链中的任何化合物和/或物质。在一些实施方案中,氨基酸具有一般结构H_2N-C(H)(R)-COOH。在一些实施方案中,氨基酸是天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,氨基酸是合成氨基酸;在一些实施方案中,氨基酸是d-氨基酸;在一些实施方案中,氨基酸是l-氨基酸。"标准氨基酸"是指在天然存在的肽中通常发现的二十种标准L-氨基酸中的任一种。"非标准氨基酸"是指除标准氨基酸以外的任何氨基酸,无论其是合成制备的还是从天然来源获得的。如本文所用,"合成氨基酸"涵盖化学修饰的氨基酸,包括但不限于盐、氨基酸衍生物(诸如酰胺)和/或取代物。氨基酸,包括肽中的羧基和/或氨基末端氨基酸,可以通过甲基化、酰胺化、乙酰化、保护基和/或用其他化学基团取代来修饰,这些化学基团可以改变肽的循环半衰期,而不会对其活性产生不利影响。氨基酸可以参与二硫键。氨基酸可包含一种或多种翻译后修饰,诸如与一种或多种化学实体(例如,甲基基团、乙酸根基团、乙酰基基团、磷酸根基团、甲酰基部分、类异戊二烯基团、硫酸根基团、聚乙二醇部分、脂质部分、碳水化合物部分、生物素部分等)结合。术语"氨基酸"与"氨基酸残基"可互换使用,并且可以指游离氨基酸和/或肽的氨基酸残基。无论该术语是指游离氨基酸还是肽的残基,从使用该术语的上下文将是显而易见的。

[0051] 动物:如本文所用,术语"动物"是指动物界的任何成员。在一些实施方案中,"动物"是指处于任何发育阶段的人。在一些实施方案中,"动物"是指处于任何发育阶段的非人动物。在某些实施方案中,非人动物是哺乳动物(例如,啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴子、狗、猫、绵羊、牛、灵长类和/或猪)。在一些实施方案中,动物包括但不限于哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物、鱼、昆虫和/或蠕虫。在一些实施方案中,动物可以是转基因动物、基因工程动物和/或克隆物。

[0052] 大约或约:如本文所用,当应用于一个或多个目的值时,术语"大约"或"约"指与所述参考值相似的值。在某些实施方案中,术语"大约"或"约"指落入所述值任一方向(大于或小于)中的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的一系列值,除非另有说明或从上下文中另外显而易见的(除非该数字超过可能值的100%)。

[0053] 组合:如本文所用,术语"组合"与混合或掺混可互换使用。组合是指将具有不同性质的离散LNP颗粒组合在同一溶液中,例如合并mRNA-LNP和空LNP,以获得mRNA-LNP组合物。在一些实施方案中,两种LNP的组合以被组合的组分的特定比率执行。在一些实施方案中,从组合获得的所得组合物具有不同于其组分中的任何一者或两者的特性。

[0054] 递送:如本文所用,术语"递送"涵盖局部递送和全身递送。例如,mRNA的递送涵盖

其中将mRNA递送至靶组织并且编码的蛋白质或肽在靶组织内表达且保留的情况(也称为“局部分布”或“局部递送”),以及其中将mRNA递送至靶组织并且编码的蛋白质或肽表达且分泌到患者的循环系统(例如血清)内,并且全身分布且被其他组织吸收的情况(也称为“全身分布”或“全身递送”)。

[0055] 功效:如本文所用,术语“功效”或语法等同形式是指与编码相关蛋白质或肽的mRNA的递送有关的生物学相关终点的改善。在一些实施方案中,生物学终点是在施用之后的某些时间点针对氯化铵攻击的保护。

[0056] 包封:如本文所用,术语“包封”或语法等同形式是指将单独的mRNA分子限制在纳米颗粒内的过程。

[0057] 表达:如本文所用,mRNA的“表达”是指将mRNA翻译成肽(例如,抗原)、多肽或蛋白质(例如,酶),并且如上下文所指示还可以包括肽、多肽或完全组装的蛋白质(例如酶)的翻译后修饰。在本申请中,术语“表达”和“产生”以及语法等同形式可互换使用。

[0058] 改善、增加或减少:如本文所用,术语“改善”、“增加”或“减少”或语法等同形式表示相对于基线测量值,诸如在本文所述治疗开始之前同一个体的测量值,或在没有本文所述治疗的情况下对照样品或受试者(或多个对照样品或受试者)的测量值的值。“对照样品”是除测试物品之外经受与测试样品相同条件的样品。“对照受试者”是患有与所治受试者相同形式的疾病,其年龄与所治受试者大约相同的受试者。

[0059] 杂质:如本文使用的,术语“杂质”是指在限定量的液体、气体或固体内,与目标材料或化合物的化学组成不同的物质。杂质也被称为污染物。

[0060] 体外:如本文所用,术语“体外”是指在人工环境中,例如在试管或反应容器中,在细胞培养物中等,而不是在多细胞生物体内发生的事件。

[0061] 体内:如本文所用,术语“体内”是指在多细胞生物体诸如人和非人动物内发生的事件。在基于细胞的系统的上下文中,该术语可用于指在活细胞内发生的事件(与例如体外系统相反)。

[0062] 分离的:如本文所用,术语“分离的”是指(1)与最初生产时(无论是天然的和/或在实验环境中)与之相关联的至少一些组分分离,和/或(2)由人工生产、制备和/或制造的物质和/或实体。分离的物质和/或实体可以与最初与它们相关联的其他组分的约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或大于约99%分离。在一些实施方案中,分离的试剂的纯度为约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或超过99%。如本文所用,如果一种物质基本上不含其他组分,则该物质是“纯的”。如本文所用,分离的物质和/或实体的纯度百分比的计算不应包括赋形剂(例如,缓冲剂、溶剂、水等)。

[0063] 局部分布或递送:如本文使用的,术语“局部分布”、“局部递送”或语法等价物指组织特异性递送或分布。通常,局部分布或递送需要由mRNA编码的肽或蛋白质(例如酶)在细胞内或伴随有限分泌被翻译且表达,其避免进入患者的循环系统。

[0064] 信使RNA(mRNA):如本文所用,术语“信使RNA(mRNA)”是指编码至少一种肽、多肽或蛋白质的多核苷酸。如本文所用,mRNA涵盖经修饰的和未经修饰的RNA二者。mRNA可以含有一个或多个编码和非编码区。mRNA可以从天然来源纯化,使用重组表达系统来产生和任选

地纯化,化学合成等。在适当的情况下,例如在化学合成分子的情况下,mRNA可以包含核苷类似物,诸如具有化学修饰的碱基或糖、骨架修饰等的类似物。除非另有说明,否则mRNA序列的显示方向为5'至3'。在一些实施方案中,mRNA是或包含天然核苷(例如,腺苷、鸟苷、胞苷、尿苷);核苷类似物(例如,2-氨基腺苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯并嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C-5丙炔基胞苷、C-5丙炔基-尿苷、2-氨基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基尿苷、C5-丙炔基胞苷、C5-甲基胞苷、2-氨基腺苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-氧代腺苷、8-氧代鸟苷、O(6)-甲基鸟苷、2-硫代胞苷、假尿苷和5-甲基胞苷);化学修饰的碱基;生物修饰的碱基(例如,甲基化碱基);插入的碱基;改性糖(例如,2'-氟核糖、核糖、2'-脱氧核糖、阿拉伯糖和己糖);和/或修饰的磷酸基团(例如,硫代磷酸酯和5'-N-亚磷酰胺键)。

[0065] 核酸:如本文所用,术语"核酸"在其最广泛的意义上是指掺入或可以掺入多核苷酸链中的任何化合物和/或物质。在一些实施方案中,核酸是由磷酸二酯键掺入或可以由磷酸二酯键掺入多核苷酸链的化合物和/或物质。在一些实施方案中,"核酸"是指单独的核酸残基(例如,核苷酸和/或核苷)。在一些实施方案中,"核酸"是指包含单个核酸残基的多核苷酸链。在一些实施方案中,"核酸"涵盖RNA以及单链和/或双链DNA和/或cDNA。此外,术语"核酸"、"DNA"、"RNA"和/或类似术语包括核酸类似物,即具有除磷酸二酯骨架以外的类似物。

[0066] 患者:如本文所用,术语"患者"或"受试者"是指可以例如出于实验目的、诊断目的、预防目的、美容目的和/或治疗目的向其施用所提供的组合物的任何生物体。典型的患者包括动物(例如,哺乳动物,诸如小鼠、大鼠、兔子、非人类灵长类和/或人类)。在一些实施方案中,患者是人。人包括产前和产后形式。

[0067] 药学上可接受的:如本文所用,术语"药学上可接受的"是指与合理的受益/风险比相称在合理的医学判断范围内适用于与人和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症的物质。

[0068] 药学上可接受的盐:药学上可接受的盐是本领域熟知的。例如,S.M.Berge等人在J.Pharmaceutical Sciences(1977)66:1-19中详细描述了药学上可接受的盐。本发明化合物的药学上可接受的盐包括衍生自合适的无机和有机酸和碱的那些盐。药学上可接受的无毒性酸加成盐的实例是氨基与无机酸(如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和过氯酸)或有机酸(如乙酸、草酸、顺丁烯二酸、酒石酸、柠檬酸、丁二酸或丙二酸)形成的盐,或通过使用所属领域中所用的其他方法(如离子交换)形成的盐。其他药学可接受的盐包括己二酸盐、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、二葡糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、延胡索酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐、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、扑酸盐、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、对甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等等。衍生自适当碱的盐包括碱金属盐、碱土金属盐、铵盐和$N^+(C_{1-4}烷基)_4$盐。代表性的碱金属盐或碱土金属盐包括钠盐、锂盐、钾盐、钙盐、镁盐等。其他药学上可接受的盐包括当适当时使用抗衡离子诸如卤离子、氢氧

根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、磺酸根和芳基磺酸根形成的无毒的铵、季铵和胺阳离子。其他药学上可接受的盐包括由胺的季铵化形成的盐，所述季铵化使用适当的亲电试剂例如卤代烷进行，以形成季铵化烷基化氨基盐。

[0069] 效力：如本文所用，术语“效力”或语法等同形式是指mRNA编码的蛋白质或肽的表达水平和/或所得生物效应。

[0070] 盐：如本文所用，术语“盐”是指确实由或可能由酸与碱之间的中和反应产生的离子化合物。

[0071] 全身分布或递送：如本文所用，术语“全身分布”、“全身递送”或语法等同形式是指影响整个身体或整个生物体的递送或分布机制或方法。通常，全身分布或递送经由身体的循环系统(例如血流)完成。与“局部分布或递送”的定义形成对比。

[0072] 受试者：如本文所用，术语“受试者”是指人或任何非人动物(例如，小鼠、大鼠、兔、狗、猫、牛、猪、绵羊、马或灵长类动物)。人包括产前和产后形式。在许多实施方案中，受试者是人。受试者可以是患者，该患者是指向医疗提供者提出进行疾病诊断或治疗的人。术语“受试者”在本文中可与“个体”或“患者”互换使用。受试者可以患有或易患有疾病或病症，但是可以显示出或可以不显示出该疾病或病症的症状。

[0073] 基本上：如本文所用，术语“基本上”是指表现出全部或接近全部范围或程度的目标特征或特性的定性条件。生物学领域的普通技术人员将理解，生物学和化学现象很少(如果曾经有)完成和/或继续完成或达到或避免绝对结果。因此，在本文中使用术语“基本上”来捕获许多生物学和化学现象中固有的潜在完整性缺失。

[0074] 靶组织：如本文所用，术语“靶组织”是指受待治疗的疾病影响的任何组织。在一些实施方案中，靶组织包括展示疾病相关病理学、症状或特征的那些组织。

[0075] 治疗指数：如本文所用，“治疗指数”是药物在血液中变得有毒时的浓度与其有效时的浓度的比率。治疗指数越大，药物越安全。

[0076] 治疗：如本文所用，术语“治疗(treat/treatment/treating)”是指用于使特定疾病、病状和/或病况的一种或多种症状或特征部分或完全缓解、改善、减轻、抑制、预防、延迟其发作，降低其严重性和/或降低其发病率的任何方法。为了降低发展与疾病有关的病理的风险，可以向未表现出疾病征兆和/或仅表现出疾病早期征兆的受试者施用治疗。

[0077] 产率：如本文所用，术语“产率”是指与作为起始材料的总mRNA相比，包封后回收的mRNA的百分比。在一些实施方案中，术语“回收率”与术语“产率”可互换使用。

[0078] 脂族：如本文所用，术语脂族是指C_1-C_{40}烃，并且包括饱和烃和不饱和烃。脂族可以是直链、支链或环状的。例如，C_1-C_{20}脂族可以包括C_1-C_{20}烷基(例如，直链或支链的C_1-C_{20}饱和烷基)、C_2-C_{20}烯基(例如，直链或支链的C_4-C_{20}二烯基、直链或支链的C_6-C_{20}三烯基等)和C_2-C_{20}炔基(例如，直链或支链的C_2-C_{20}炔基)。C_1-C_{20}脂族可以包括C_3-C_{20}环状脂族(例如，C_3-C_{20}环烷基、C_4-C_{20}环烯基或C_8-C_{20}环炔基)。在某些实施方案中，脂族可以包括一个或多个环状脂族和/或一个或多个杂原子诸如氧、氮或硫，并且可以任选地被一个或多个取代基诸如烷基、卤素、烷氧基、羟基、氨基、芳基、醚、酯或酰胺取代。脂族基团是未取代的或被一个或多个如本文所述的取代基取代。例如，脂族可以被卤素、-COR’、-CO_2H、-CO_2R’、-CN、-OH、-OR’、-OCOR’、-OCO_2R’、-NH_2、-NHR’、-N(R’)$_2$、-SR’或-SO_2R’中的一个或多个(例如1、2、3、4、5或6个独立选择的取代基)取代，其中R’的每个实例独立地为C_1-C_{20}脂族(例如，C_1-C_{20}烷基、

C_1-C_{15}烷基、C_1-C_{10}烷基或C_1-C_3烷基)。在实施方案中,R'独立地为未取代的烷基(例如,未取代的C_1-C_{20}烷基、C_1-C_{15}烷基、C_1-C_{10}烷基或C_1-C_3烷基)。在实施方案中,R'独立地为未取代的C_1-C_3烷基。在实施方案中,脂族是未取代的。在实施方案中,脂族不包括任何杂原子。

[0079] 烷基:如本文所用,术语"烷基"意指无环的直链和支链烃基团,例如,"C_1-C_{20}烷基"是指具有1至20个碳的烷基基团。烷基基团可以是直链或支链的。烷基基团的实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、叔戊基、己基、异己基等。考虑到本公开的有益效果,其他烷基基团对于本领域技术人员将是显而易见的。烷基基团可以是未取代的或被一个或多个如本文所述的取代基取代。例如,烷基基团可以被卤素、-COR'、-CO_2H、-CO_2R'、-CN、-OH、-OR'、-OCOR'、-OCO_2R'、-NH_2、-NHR'、-N(R')$_2$、-SR'或-SO_2R'中的一个或多个(例如,1、2、3、4、5或6个独立选择的取代基)取代,其中R'的每个实例独立地为C_1-C_{20}脂族(例如,C_1-C_{20}烷基、C_1-C_{15}烷基、C_1-C_{10}烷基或C_1-C_3烷基)。在实施方案中,R'独立地为未取代的烷基(例如,未取代的C_1-C_{20}烷基、C_1-C_{15}烷基、C_1-C_{10}烷基或C_1-C_3烷基)。在实施方案中,R'独立地为未取代的C_1-C_3烷基。在实施方案中,烷基是被取代的(例如,被1、2、3、4、5或6个如本文所述的取代基基团取代)。在实施方案中,烷基基团被-OH基团取代,并且在本文中也可以称为"羟烷基"基团,其中前缀表示-OH基团,并且"烷基"如本文所述。

[0080] 烯基:如本文所用,"烯基"意指具有一个或多个不饱和碳-碳双键的任何直链或支链烃链,该不饱和碳-碳双键可以存在于沿着链的任何稳定点,例如,"C_2-C_{20}烯基"是指具有2至20个碳的烯基基团。例如,烯基包括丙-2-烯基、丁-2-烯基、丁-3-烯基、2-甲基丙-2-烯基、己-2-烯基、己-5-烯基、2,3-二甲基丁-2-烯基等。在实施方案中,烯基包含1、2或3个碳-碳双键。在实施方案中,烯基包含单个碳-碳双键。在实施方案中,多个双键(例如,2个或3个)是共轭的。烯基基团可为未取代的或被一个或多个本文所述的取代基取代。例如,烯基基团可以被卤素、-COR'、-CO_2H、-CO_2R'、-CN、-OH、-OR'、-OCOR'、-OCO_2R'、-NH_2、-NHR'、-N(R')$_2$、-SR'或-SO_2R'中的一个或多个(例如,1、2、3、4、5或6个独立选择的取代基)取代,其中R'的每个实例独立地为C_1-C_{20}脂族(例如,C_1-C_{20}烷基、C_1-C_{15}烷基、C_1-C_{10}烷基或C_1-C_3烷基)。在实施方案中,R'独立地为未取代的烷基(例如,未取代的C_1-C_{20}烷基、C_1-C_{15}烷基、C_1-C_{10}烷基或C_1-C_3烷基)。在实施方案中,R'独立地为未取代的C_1-C_3烷基。在实施方案中,烯基是未取代的。在实施方案中,烯基是被取代的(例如,被1、2、3、4、5或6个如本文所述的取代基基团取代)。在实施方案中,烯基基团被-OH基团取代,并且在本文中也可以称为"羟烯基"基团,其中前缀表示-OH基团,并且"烯基"如本文所述。

[0081] 炔基:如本文所用,"炔基"意指直链构型或支链构型的任何烃链,其在沿着链的任何稳定点具有一个或多个碳-碳三键,例如,"C_2-C_{20}炔基"是指具有2个至20个碳的炔基基团。炔基基团的实例包括丙-2-炔基、丁-2-炔基、丁-3-炔基、戊-2-炔基、3-甲基戊-4-炔基、己-2-炔基、己-5-炔基等。在实施方案中,炔基包含一个碳-碳三键。炔基基团可以是未取代的或被一个或多个如本文所述的取代基取代。例如,炔基基团可以被卤素、-COR'、-CO_2H、-CO_2R'、-CN、-OH、-OR'、-OCOR'、-OCO_2R'、-NH_2、-NHR'、-N(R')$_2$、-SR'或-SO_2R'中的一个或多个(例如,1、2、3、4、5或6个独立选择的取代基)取代,其中R'的每个实例独立地为C_1-C_{20}脂族(例如,C_1-C_{20}烷基、C_1-C_{15}烷基、C_1-C_{10}烷基或C_1-C_3烷基)。在实施方案中,R'独立地为未取代的烷基(例如,未取代的C_1-C_{20}烷基、C_1-C_{15}烷基、C_1-C_{10}烷基或C_1-C_3烷基)。在实施方案中,R'

独立地为未取代的C_1-C_3烷基。在实施方案中,炔基是未取代的。在实施方案中,炔基是被取代的(例如,被1、2、3、4、5或6个如本文所述的取代基基团取代)。

[0082] 芳基:单独使用或作为如"芳烷基"中的较大部分的一部分使用的术语"芳基"是指具有总共六至十四个环成员的单环、双环或三环碳环环系统,其中所述环系统具有与分子其余部分的单个连接点,该系统中的至少一个环是芳族的,并且其中该系统中的每个环含有4至7个环成员。在实施方案中,芳基基团具有6个环碳原子("C_6芳基";例如,苯基)。在一些实施方案中,芳基基团具有10个环碳原子("C_{10}芳基";例如,萘基,诸如1-萘基和2-萘基)。在一些实施方案中,芳基基团具有14个环碳原子("C_{14}芳基";例如,蒽基)。"芳基"还包括其中如上定义的芳环与一个或多个碳环或杂环基团稠合的环系统,其中连接基团或连接点在芳环上,并且在这种情况下,碳原子的数量继续表示芳环系统中碳原子的数量。示例性芳基包括苯基、萘基和蒽。

[0083] 亚芳基:如本文所用,术语"亚芳基"是指二价的芳基基团(即,具有与分子的两个连接点)。示例性亚芳基包括亚苯基(例如,未取代的亚苯基或取代的亚苯基)。

[0084] 本发明的组合物

[0085] 在一些实施方案中,本发明提供了包含LNP和mRNA的组合物,所述组合物在施用于受试者时在体内诱导显著更高水平的mRNA表达,而不改变受试者的耐受性或应激水平。通过肝酶天冬氨酸转氨酶(AST)和/或丙氨酸氨基转移酶(ALT)的升高来确定耐受性或应激。在一些实施方案中,特定调配物提供了制造优点,诸如制造过程的容易性,例如,利用常见预先形成的LNP储备溶液等。

[0086] 本发明的观察结果显示,当通过在步骤(a)中将mRNA与预先形成的空LNP混合而形成的mRNA-LNP与步骤(b)中预先形成的LNP进一步组合以形成mRNA-LNP组合物时,所得组合物的效力与步骤(a)的mRNA-LNP相比显著增加。这尤其值得注意,因为即使在预先形成的LNP是空的(即,不包含mRNA)并且包含与mRNA-LNP相同的脂质组分时,也观察到效力增加。此外,即使在预先形成的LNP仅包含已知是多核苷酸转染的弱促进剂的中性脂质的情况下,也观察到mRNA编码的蛋白质的表达增加。

[0087] 因此,在不损害体内耐受性的情况下可实现增加的mRNA-LNP组合物的效力的事实是本发明方法在治疗设计方面的突出优点。

[0088] 本发明的这个方面允许至少两个显著优点,(i)提供每剂量的mRNA治疗组合物中较低量的mRNA,或降低给药频率,以实现相同的生物效应,从而增加组合物的治疗指数;(ii)开发一个简单、灵活、可扩展和/或高通量的制造方法,其中一个或多个预先形成的LNP可以批量制备,并且可用于多个混合和组合步骤以实现如本发明中所述的所需调配物。

[0089] 本发明提供了一种方法,其中通过将mRNA与预先形成的空LNP混合而制备的mRNA-LNP与预先形成的LNP进一步组合,其中本发明的所得mRNA-LNP组合物导致mRNA编码的蛋白质的体内表达增加。在一些方面,该方法是制造方法,所述方法包括以下步骤:(a)在允许形成mRNA-LNP的条件下将预先形成的空LNP与mRNA混合;(b)将步骤(a)中形成的mRNA-LNP与预先形成的LNP组合,从而制造包含包封mRNA的脂质纳米颗粒的组合物。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒至少包含阳离子脂质、非阳离子脂质和PEG修饰的脂质。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒可以包含中性脂质,具有或不具有阳离子脂质。

[0090] 在一些实施方案中,mRNA编码蛋白质或肽。

[0091] 在一些实施方案中,步骤(b)中的预先形成的LNP是空LNP。在一些实施方案中,步骤(b)中的预先形成的LNP包含mRNA。在一些实施方案中,步骤(b)中的预先形成的LNP包含编码蛋白质或肽的mRNA。在一些实施方案中,步骤(b)中的预先形成的LNP包含与步骤(a)中形成的mRNA-LNP中相同的编码相同蛋白质或多肽的mRNA。在一些实施方案中,步骤(b)中的预先形成的LNP包含编码与步骤(a)中形成的mRNA-LNP不同的蛋白质或多肽的不同mRNA。

[0092] 在一些实施方案中,步骤(a)中的空LNP和步骤(b)中的预先形成的LNP是不同的异质脂质纳米颗粒。例如,步骤(a)中的空LNP可以包含阳离子脂质HGT-5003,并且步骤(b)中的预先形成的LNP包含阳离子脂质ICE。在另一个实例中,步骤(a)中的空LNP可以包含阳离子脂质ICE,并且步骤(b)中的预先形成的LNP包含阳离子脂质DOTAP。在又一个实例中,步骤(a)中的空LNP可以包含阳离子脂质HGT-4001,并且步骤(b)中的预先形成的LNP包含阳离子脂质ckk-E12。适用于LNP的各种脂质和用于生成所述脂质的方法在以下相应章节中描述,并且本文涵盖形成LNP的脂质的任何组合。

[0093] 在一个实施方案中,步骤(b)中生成的mRNA-LNP组合物可以包含第一脂质纳米颗粒和第二脂质纳米颗粒;其中第一脂质纳米颗粒和第二脂质纳米颗粒具有相同的脂质组合物,其中至少一些第一脂质纳米颗粒包含mRNA。在一个实施方案中,步骤(b)中生成的mRNA-LNP组合物可以包含第一脂质纳米颗粒和第二脂质纳米颗粒;其中第一脂质纳米颗粒和第二脂质纳米颗粒具有不同的脂质组合物。例如,mRNA-LNP组合物可以包含含有阳离子脂质ICE的第一脂质纳米颗粒和含有阳离子脂质DOTAP的第二脂质纳米颗粒。在一些实施方案中,在步骤(b)中生成的mRNA-LNP组合物可以包含含有阳离子脂质C12-200的第一脂质纳米颗粒和含有阳离子脂质DLinKC2DMA的第二脂质纳米颗粒。因此,本文涵盖适用于产生如下文相应章节中所述的LNP的各种脂质的任何组合。

[0094] 在一些实施方案中,步骤(a)的空LNP或步骤(b)的预先形成LNP都不包含阳离子脂质。在一些实施方案中,空LNP或预先形成的LNP包含中性脂质和/或PEG修饰的脂质。

[0095] 脂质纳米颗粒(LNP)

[0096] 本发明尤其提供一种用于mRNA治疗剂的组合物,其中mRNA被包封在递送媒介物中用于体内有效的细胞摄取和加工。如本文中所用,术语“递送媒介物”、“转运媒介物”、“纳米颗粒”或语法等同形式可互换使用。递送媒介物可以与一种或多种另外的核酸、载体、靶向配体或稳定试剂组合配制,或者在药物组合物中配制,在所述药物组合物中所述递送媒介物与合适的赋形剂混合。用于配制和施用药物的技术可在"Remington's Pharmaceutical Sciences,"Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,最新版本中找到。特定的递送媒介物根据其促进将核酸转染至靶细胞的能力来选择。

[0097] 在一些实施方案中,合适的递送媒介物是脂质体递送媒介物,例如脂质纳米颗粒(LNP)或脂质体。在一些实施方案中,脂质体包含一种或多种阳离子脂质。在一些实施方案中,脂质体包含一种或多种阳离子脂质、一种或多种非阳离子脂质、一种或多种基于胆固醇的脂质和一种或多种PEG修饰的脂质。在一些实施方案中,脂质体包含一种或多种阳离子脂质、一种或多种非阳离子脂质和一种或多种PEG修饰的脂质。在一些实施方案中,脂质体包含不超过四种不同的脂质组分。在一些实施方案中,脂质体包含不超过三种不同的脂质组分。在一些实施方案中,一种不同的脂质组分是基于固醇的阳离子脂质。在一个典型实施方案中,本发明的LNP是包封mRNA的脂质体。合适的脂质体的脂质组分包含阳离子脂质(例如,

cKK-E12、化合物1、化合物2或化合物3)、非阳离子脂质(DEPE)、基于胆固醇的脂质(例如,胆固醇)和PEG修饰的脂质(DMG-PEG2K)。或者,合适的脂质体的脂质组分包含基于固醇的阳离子脂质(例如ICE)、非阳离子脂质(DEPE)和PEG修饰的脂质(例如DMG-PEG2K)。

[0098] 在一些实施方案中,脂质纳米颗粒中的DEPE提供编码蛋白质或肽的mRNA的增强表达,特别是与含有DOPE的脂质纳米颗粒相比,所述含有DOPE的脂质纳米颗粒在组成上(就脂质组分和个别脂质组分的摩尔比而言)与含有DEPE的脂质纳米颗粒中原本相同。在一些实施方案中,相对于含有DOPE的脂质纳米颗粒,由含有DEPE的脂质纳米颗粒递送的编码蛋白质的mRNA的表达增强至少两倍。mRNA的增强表达可以通过向测试动物(例如,小鼠)施用含有DEPE的脂质纳米颗粒和具有不同辅助脂质(例如,DOPE)的相同配制的脂质纳米颗粒来确定,例如通过尾静脉注射,并且在一个或多个时间点(例如,在施用后4、6、8、12、18或24小时)监测mRNA的表达来测定。

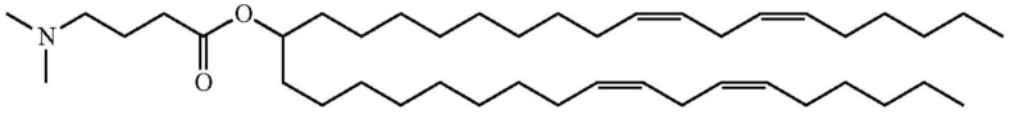
[0099] 在一些实施方案中,mRNA编码在体内翻译成治疗性蛋白质的蛋白质。在一些实施方案中,编码蛋白质的mRNA编码多肽。在一些实施方案中,多肽是治疗性多肽。在一些实施方案中,治疗性多肽是抗体轻链或抗体重链。在一些实施方案中,治疗性多肽在施用mRNA的受试者中不存在或缺乏。在一些实施方案中,编码蛋白质的mRNA编码肽。在一些实施方案中,肽是抗原。

[0100] 在一些实施方案中,本发明的含DEPE的脂质纳米颗粒在施用于受试者时是安全的和可耐受的。例如,本发明的含DEPE的脂质纳米颗粒在施用于受试者时不会导致任何可辨别的肝毒性。用于评估肝毒性的合适标记物是ALT和AST。

[0101] 阳离子脂质

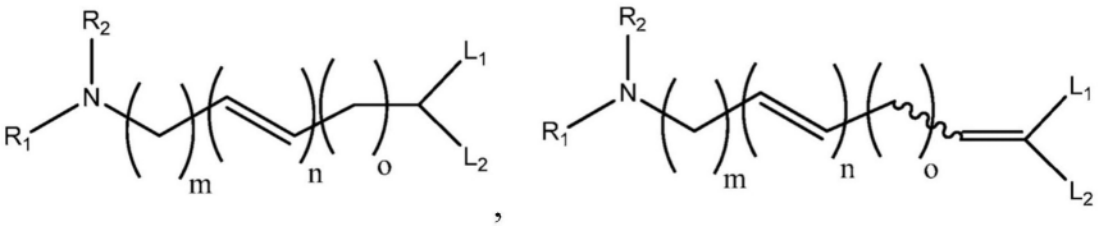
[0102] 如本文所用,短语"阳离子脂质"是指在选定pH诸如生理pH下具有净正电荷的多种脂质物质中的任何一种。

[0103] 用于本发明的组合物和方法的合适的阳离子脂质包括如国际专利公开WO 2010/144740中所述的阳离子脂质,该专利公开以引用的方式并入本文。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括阳离子脂质、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯,所述阳离子脂质具有以下化合物结构:

[0104] 

[0105] 及其药学上可接受的盐。

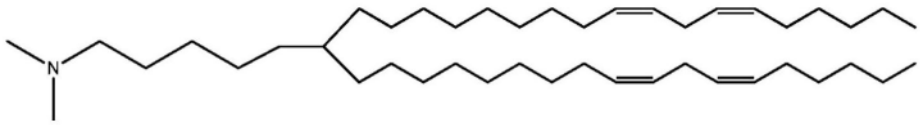
[0106] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括如国际专利公开WO 2013/149140中所述的可电离阳离子脂质,该专利公开以引用的方式并入本文。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括下式之一的阳离子脂质:

[0107] 

,

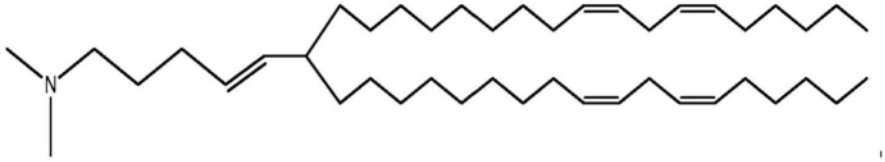
[0108] 或其药学上可接受的盐,其中R_1和R_2各自独立地选自由以下项组成的组:氢、任选

地取代的不同饱和或不饱和的C_1-C_{20}烷基和任选地取代的不同饱和或不饱和的C_6-C_{20}酰基;其中L_1和L_2各自独立地选自由以下项组成的组:氢、任选地取代的C_1-C_{30}烷基、任选地取代的不同不饱和的C_1-C_{30}烯基和任选地取代的C_1-C_{30}炔基;其中m和o各自独立地选自由以下项组成的组:零和任何正整数(例如,其中m为三);并且其中n为零或任何正整数(例如,其中n为一)。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括阳离子脂质(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-15,18-二烯-1-胺("HGT5000"),所述阳离子脂质具有以下化合物结构:

[0109] 

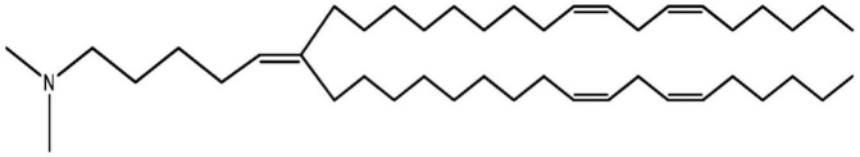
[0110] (HGT-5000)

[0111] 及其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括阳离子脂质(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-4,15,18-三烯-1-胺("HGT5001"),所述阳离子脂质具有以下化合物结构:

[0112] 

[0113] (HGT-5001)

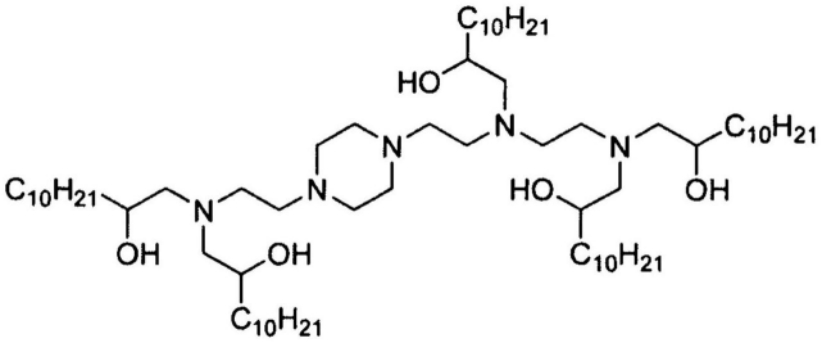
[0114] 及其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括阳离子脂质和(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-5,15,18-三烯-1-胺("HGT5002"),所述阳离子脂质具有以下化合物结构:

[0115] 

[0116] (HGT-5002)

[0117] 及其药学上可接受的盐。

[0118] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括在国际专利公开WO 2010/053572中描述为氨基醇类脂质的阳离子脂质,该专利公开以引用的方式并入本文。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

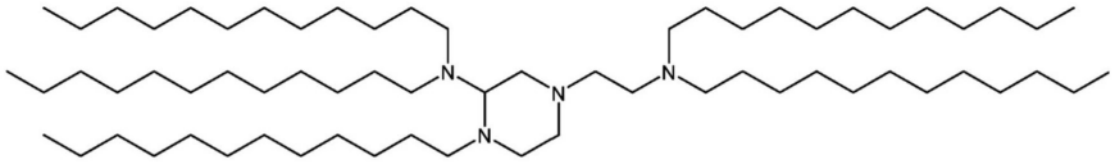
[0119] 

[0120] 及其药学上可接受的盐。

[0121] 在一些实施方案中,本发明的组合物和方法中使用的类脂质包括通过使市售胺与亲脂性丙烯酸酯、丙烯酰胺或环氧化物反应而合成。在一些实施方案中,类脂质衍生自胺86(N,N-双(2-羟乙基)乙烯二胺)和胺87(N-(3-氨基丙基)二乙胺)。类脂质作为潜在的一类新型核酸递送试剂具有若干优点:(i)用于合成类脂质的化学方法简单且经济,(ii)已开发结构多样性文库,(iii)可由筛选类脂质文库累积的大型数据集来构建递送系统的结构与功能之间的相关性。这些反应的简单性允许通过改变胺的类型以及尾部(或碳臂链)的长度和类型(丙烯酰胺/丙烯酸酯/环氧化物)来构建结构多样化的类脂质文库。

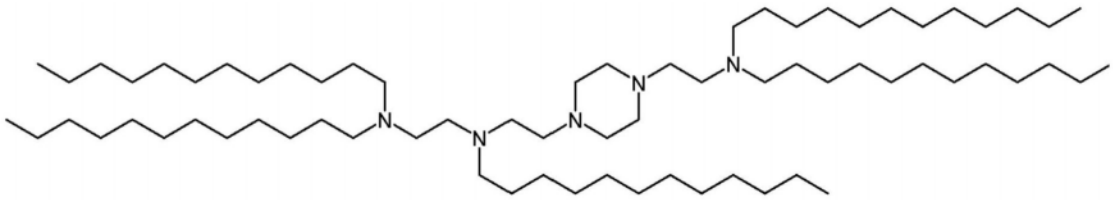
[0122] 在一些实施方案中,类脂质包含约2-20条碳臂链。在一些实施方案中,类脂质包含约5-18条碳臂链。在一些实施方案中,类脂质包含约10-16条碳臂链。在一些实施方案中,类脂质包含约10-14条碳臂链。在一些实施方案中,类脂质包含约10-12条碳臂链。在一些实施方案中,类脂质包含约10条碳臂链。在一些实施方案中,类脂质包含约12条碳臂链。在一些实施方案中,类脂质包含约14条碳臂链。在一些实施方案中,类脂质包含约16条碳臂链。

[0123] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括如国际专利公开WO 2016/118725中所述的阳离子脂质,该专利公开以引用的方式并入本文。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0124] 

[0125] 及其药学上可接受的盐。

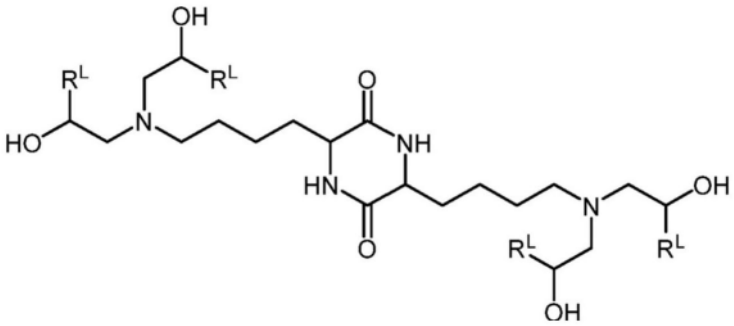
[0126] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括如国际专利公开WO 2016/118724中所述的阳离子脂质,该专利公开以引用的方式并入本文。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0127] 

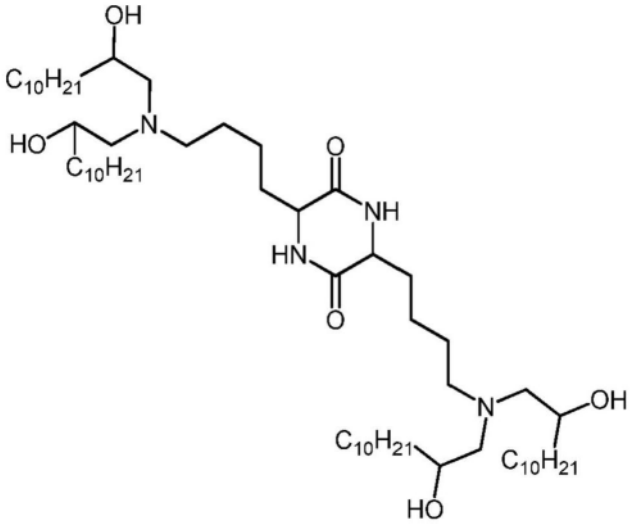
[0128] 及其药学上可接受的盐。

[0129] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括具有通式14,25-二-十三烷基15,18,21,24-四氮杂-三十八烷的阳离子脂质及其药学上可接受的盐。

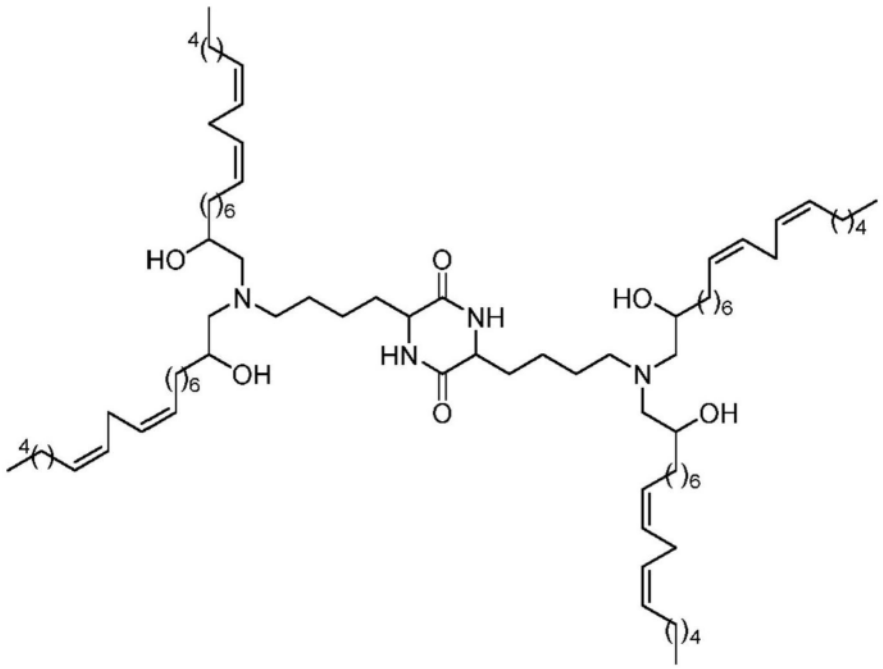
[0130] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括如国际专利公开WO 2013/063468和WO 2016/205691中所述的阳离子脂质,这些专利公开中的每个以引用的方式并入本文。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有下式的阳离子脂质:

[0131] 

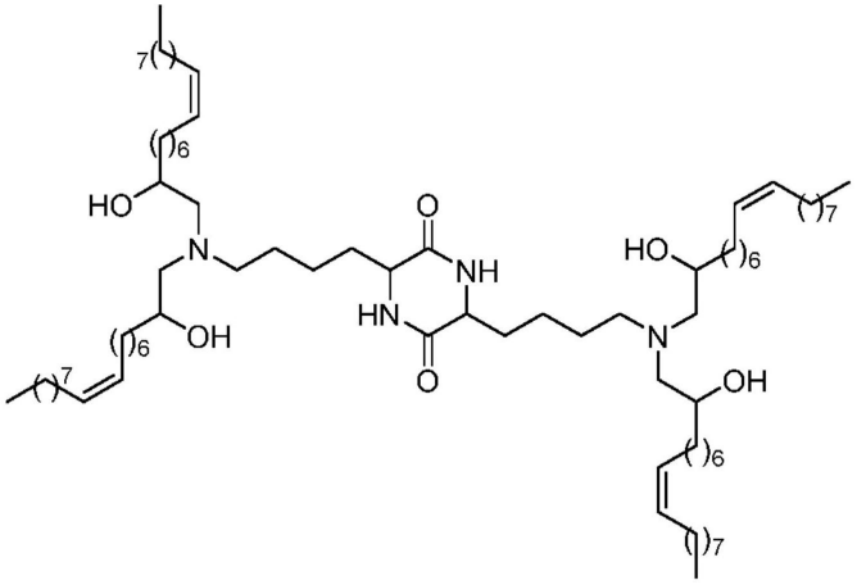
[0132] 或其药学上可接受的盐,其中R^L的每个实例独立地是任选地取代的C_6-C_{40}烯基。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0133] 

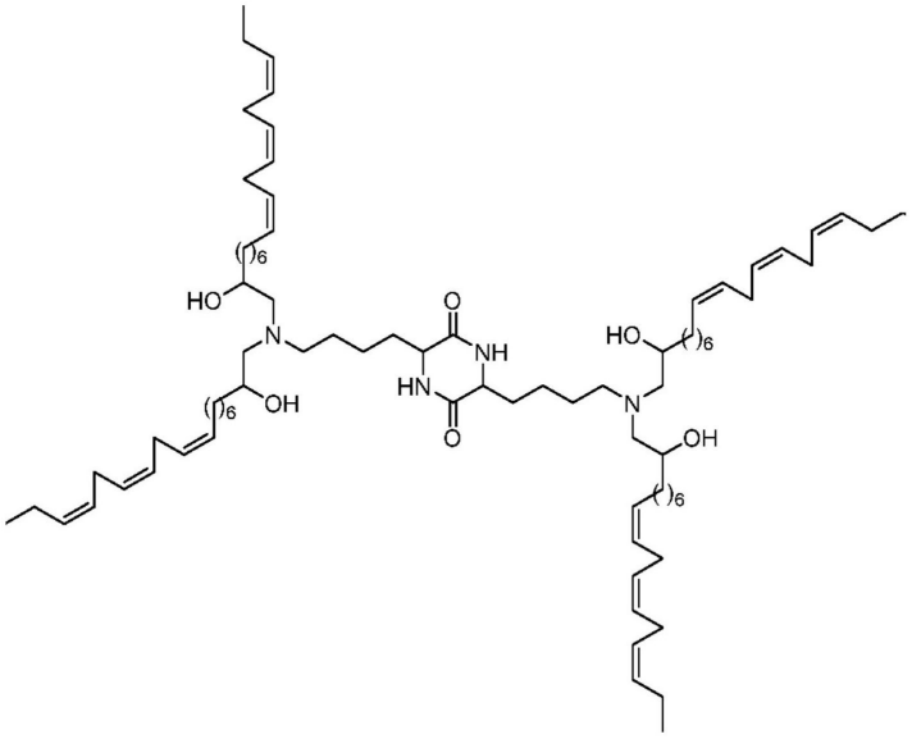
[0134] 及其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0135] 

[0136] 及其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

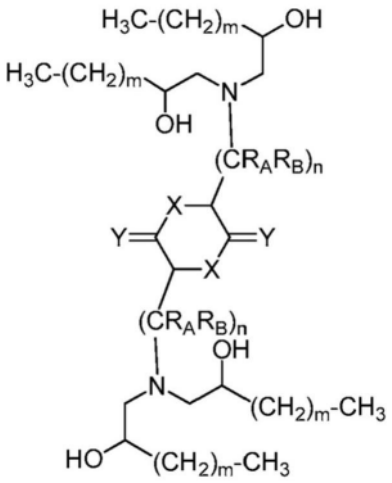
[0137] 

[0138] 及其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

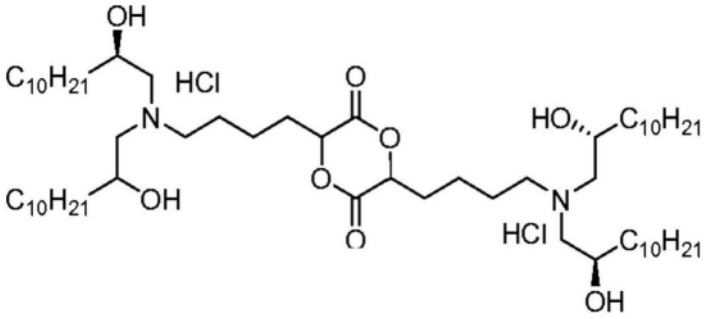
[0139] 

[0140] 及其药学上可接受的盐。

[0141] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括如国际专利公开WO 2015/184256中所述的阳离子脂质,该专利公开以引用的方式并入本文。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有下式的阳离子脂质:

[0142] 

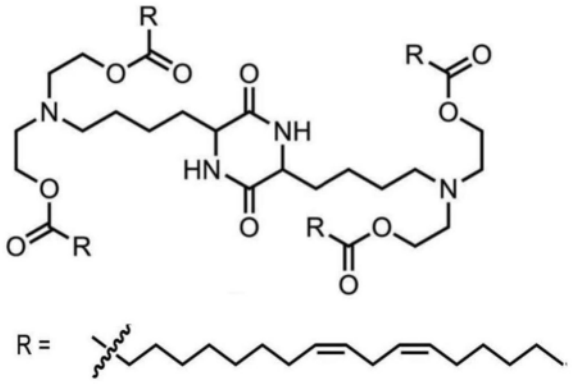
[0143] 或其药学上可接受的盐,其中每个X独立地是O或S;每个Y独立地是O或S;每个m独立地为0至20;每个n独立为1至6;每个R_A独立地是氢、任选地取代的C1-50烷基、任选地取代的C2-50烯基、任选地取代的C2-50炔基、任选地取代的C3-10碳环基、任选地取代的3-14元杂环基、任选地取代的C6-14芳基、任选地取代的5-14元杂芳基或卤素;并且每个R_B独立地是氢、任选地取代的C1-50烷基、任选地取代的C2-50烯基、任选地取代的C2-50炔基、任选地取代的C3-10碳环基、任选地取代的3-14元杂环基、任选地取代的C6-14芳基、任选地取代的5-14元杂芳基或卤素。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质"靶标23":

[0144] 

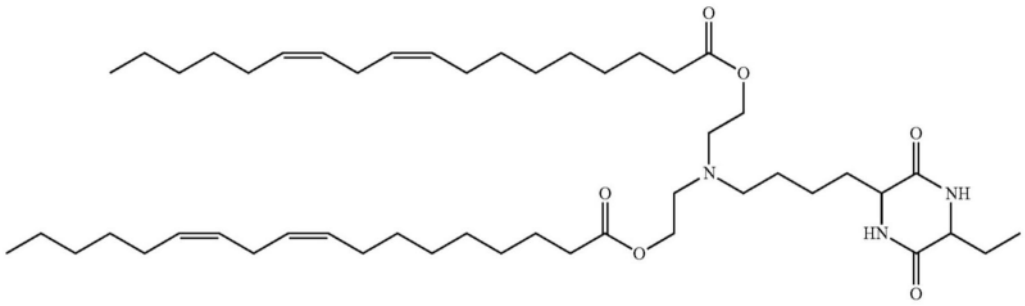
[0145] (靶标23)

[0146] 及其药学上可接受的盐。

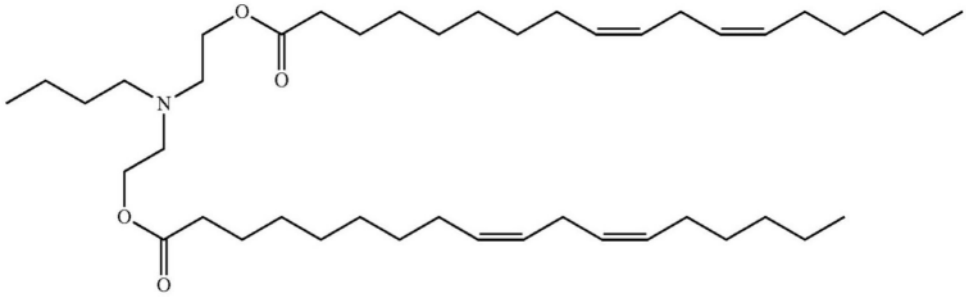
[0147] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括如国际专利公开WO 2016/004202中所述的阳离子脂质,该专利公开以引用的方式并入本文。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0148] 

[0149] 或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

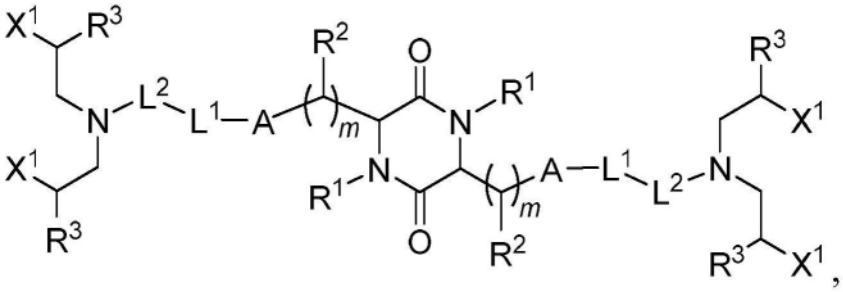
[0150] 

[0151] 或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

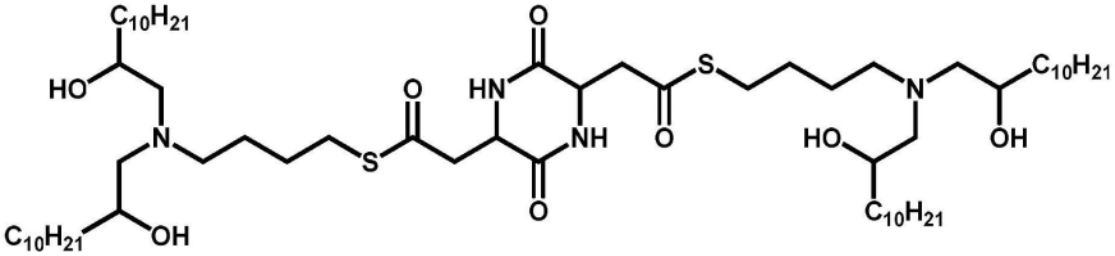
[0152] 

[0153] 或其药学上可接受的盐。

[0154] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括如美国临时专利申请序列号62/758,179中所述的阳离子脂质,该临时专利申请以引用的方式并入本文。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有下式的阳离子脂质:

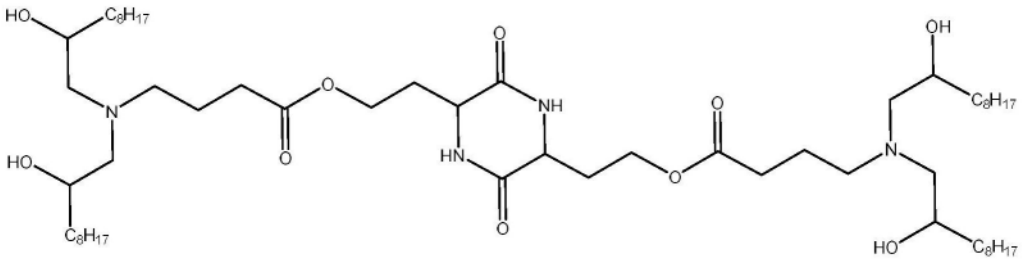
[0155] 

[0156] 或其药学上可接受的盐,其中每个R^1和R^2独立地是H或C_1-C_6脂族;每个m独立地为具有1至4的值的整数;每个A独立地是共价键或亚芳基;每个L^1独立地是酯、硫酯、二硫键或酸酐基团;每个L^2独立地是C_2-C_{10}脂族;每个X^1独立地是H或OH;并且每个R^3独立地是C_6-C_{20}脂族。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有下式的阳离子脂质:

[0157] 

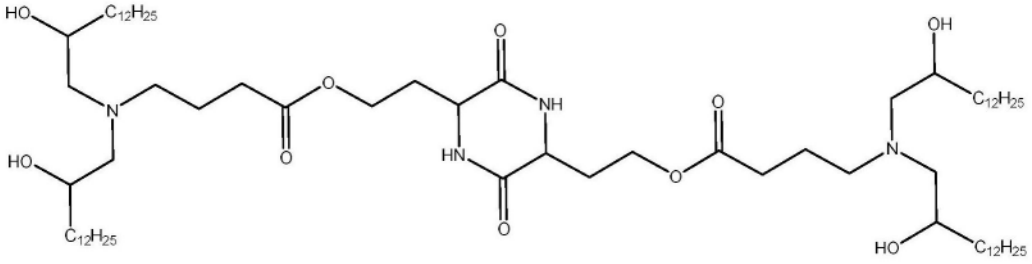
[0158] (化合物1)

[0159] 或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有下式的阳离子脂质:

[0160] 

[0161] (化合物2)

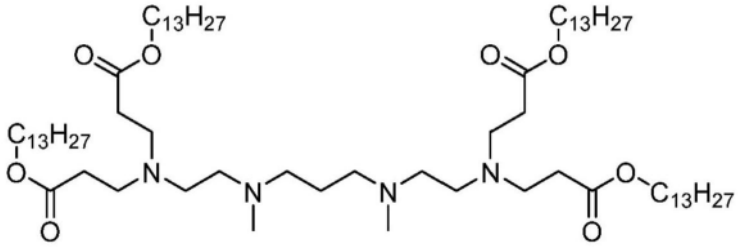
[0162] 或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有下式的阳离子脂质:

[0163] 

[0164] (化合物3)

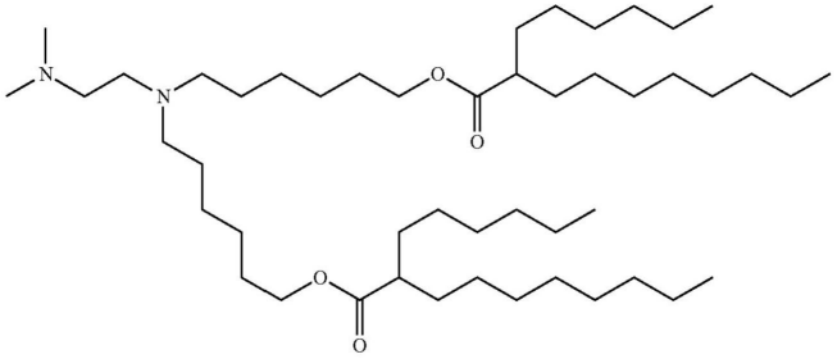
[0165] 或其药学上可接受的盐。

[0166] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括如J.McClellan,M.C.King,Cell 2010,141,210-217和Whitehead等人,Nature Communications(2014)5:4277中所述的阳离子脂质,这些文献以引用的方式并入本文。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法的阳离子脂质包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

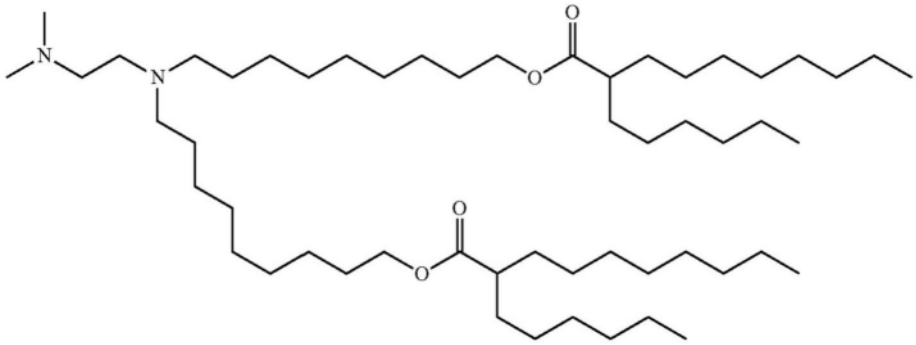
[0167] 

[0168] 及其药学上可接受的盐。

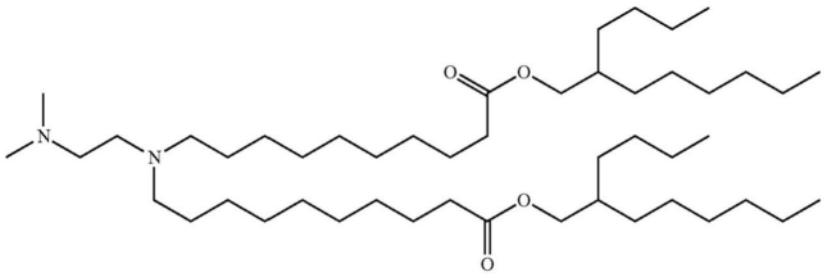
[0169] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括如国际专利公开WO 2015/199952中所述的阳离子脂质,该专利公开以引用的方式并入本文。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0170] 

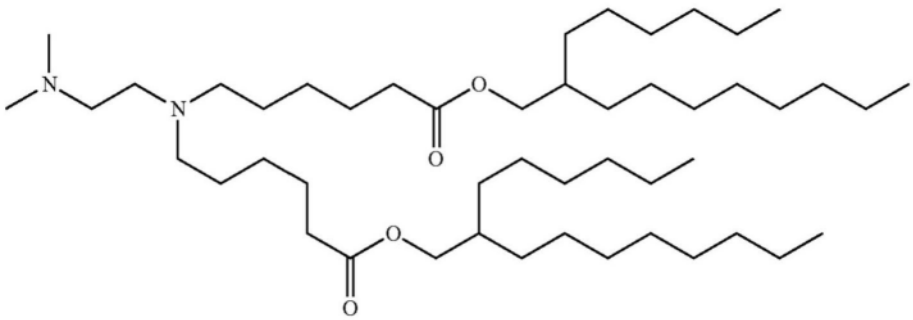
[0171] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0172] 

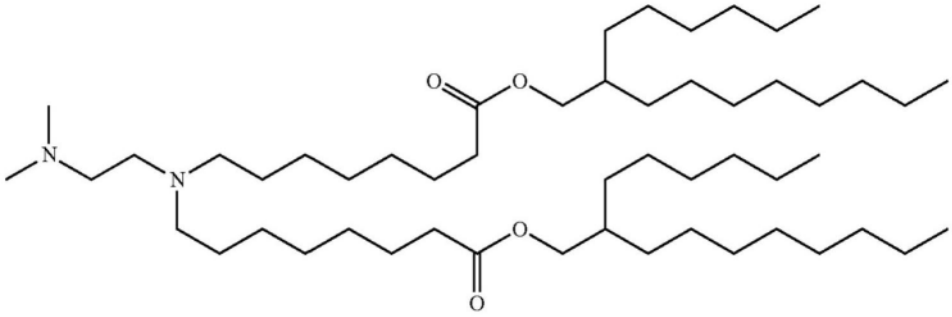
[0173] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0174] 

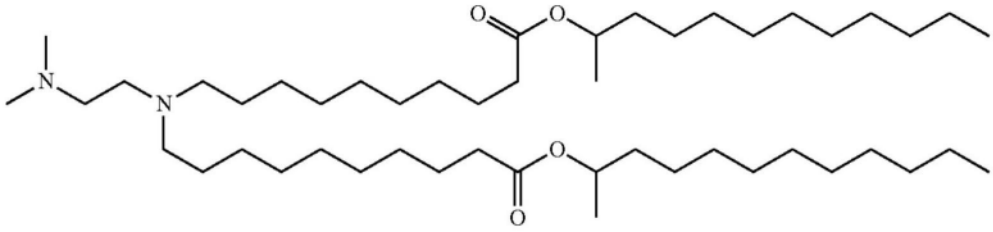
[0175] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0176] 

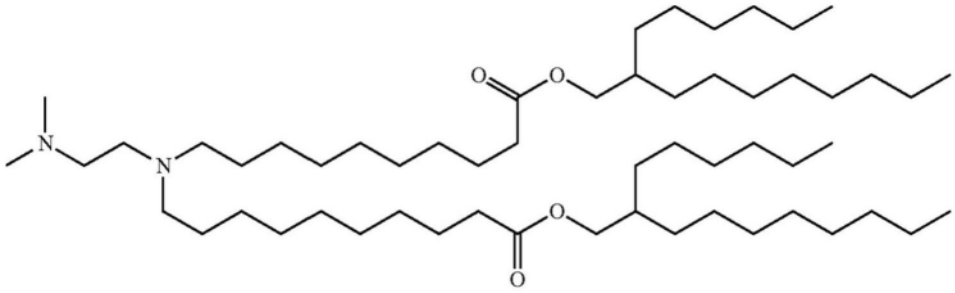
[0177] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0178] 

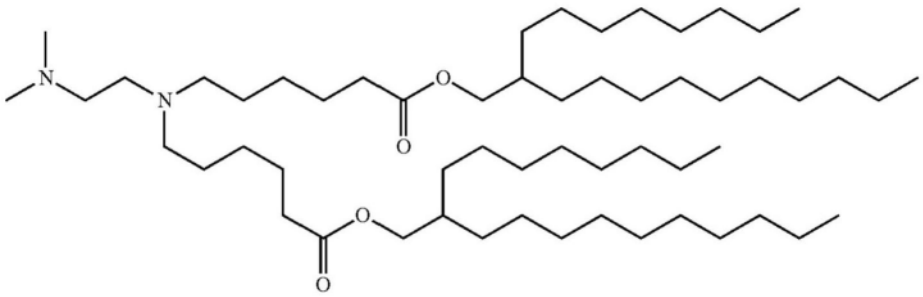
[0179] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0180] 

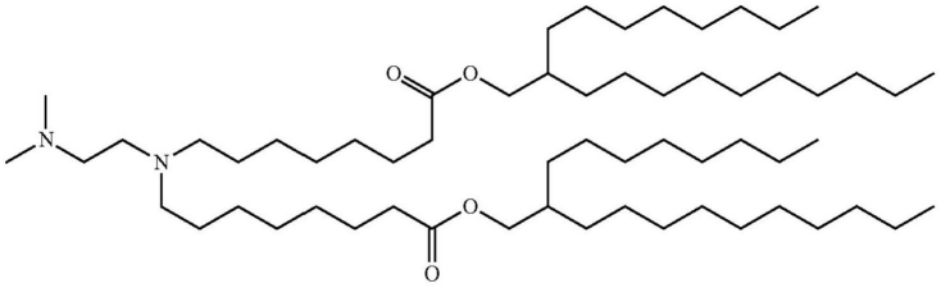
[0181] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0182] 

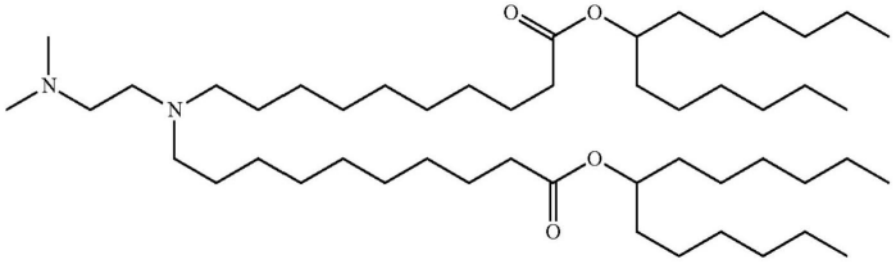
[0183] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0184] 

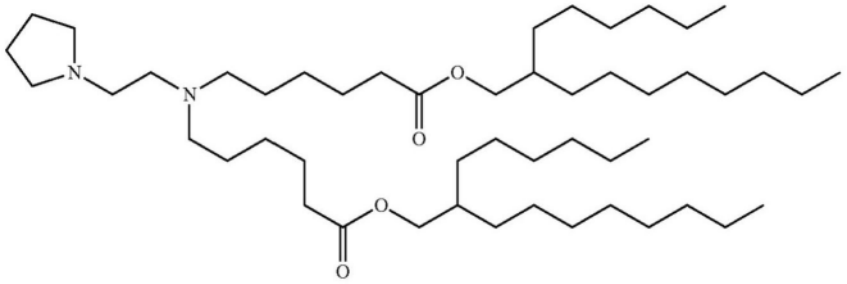
[0185] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0186] 

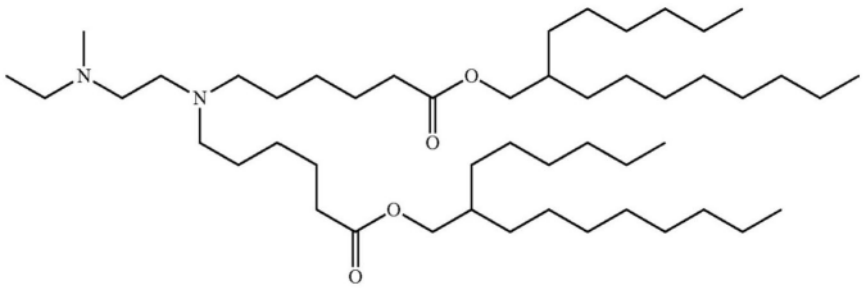
[0187] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0188] 

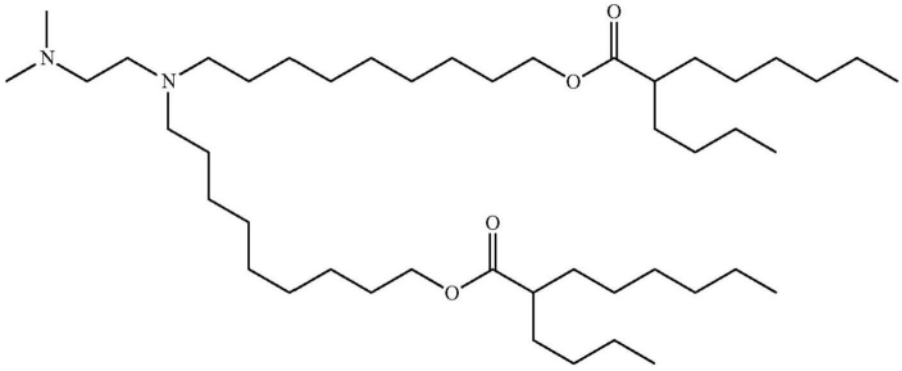
[0189] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0190] 

[0191] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

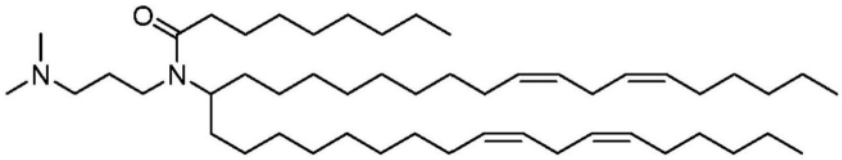
[0192] 

[0193] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

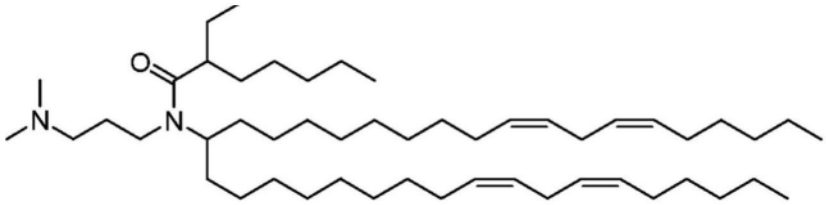
[0194] 

[0195] 及其药学上可接受的盐。

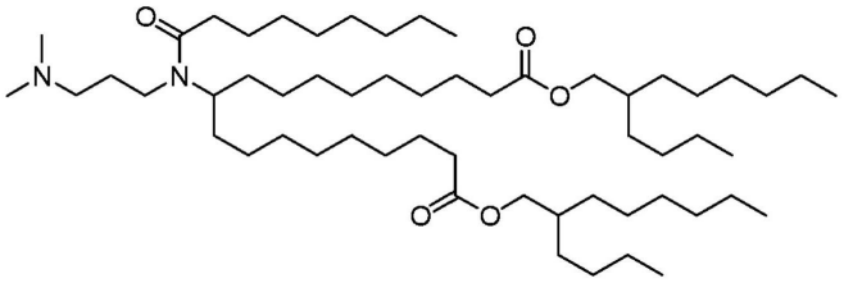
[0196] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括如国际专利公开WO 2017/004143中所述的阳离子脂质,该专利公开以引用的方式并入本文。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0197] 

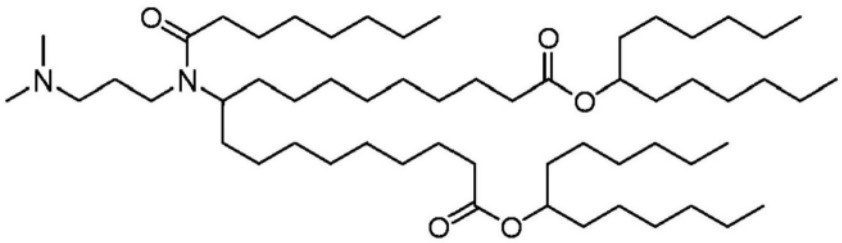
[0198] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0199] 

[0200] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

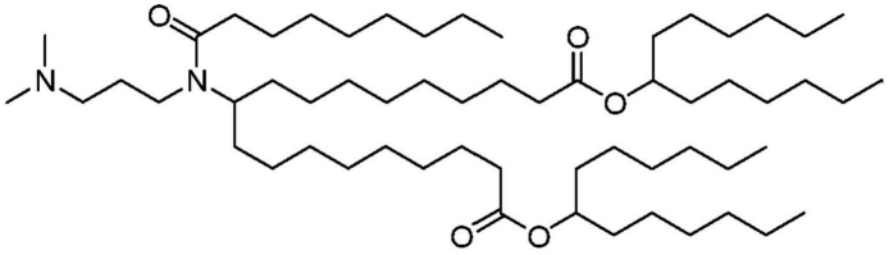
[0201] 

[0202] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

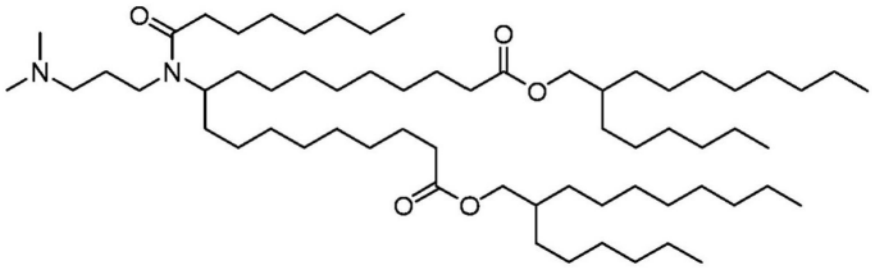
[0203] 

[0204] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以

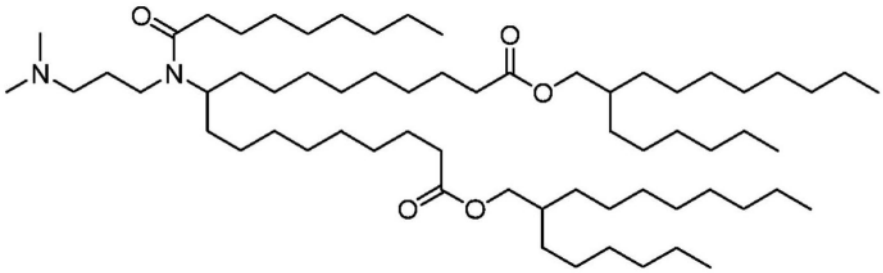
下化合物结构的阳离子脂质：

[0205] 

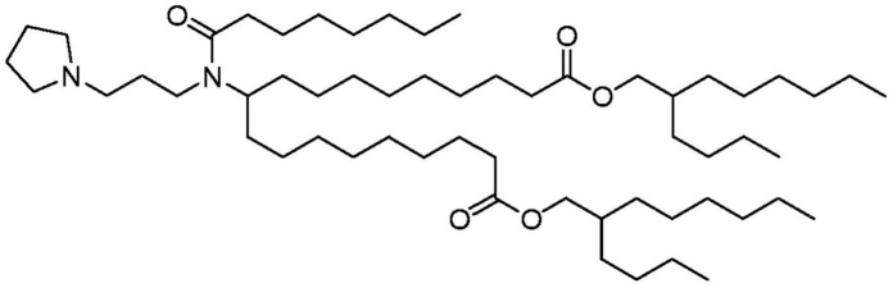
[0206] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中，本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质：

[0207] 

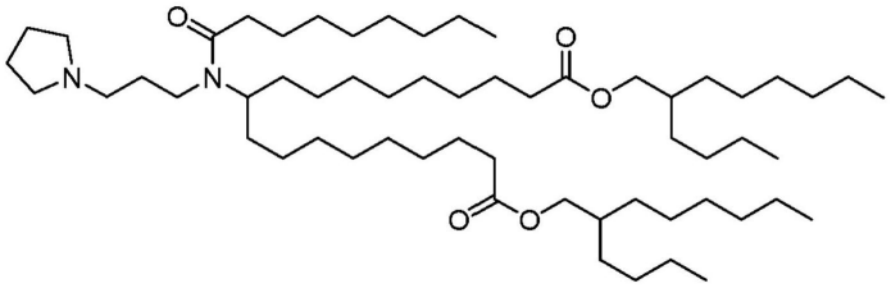
[0208] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中，本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质：

[0209] 

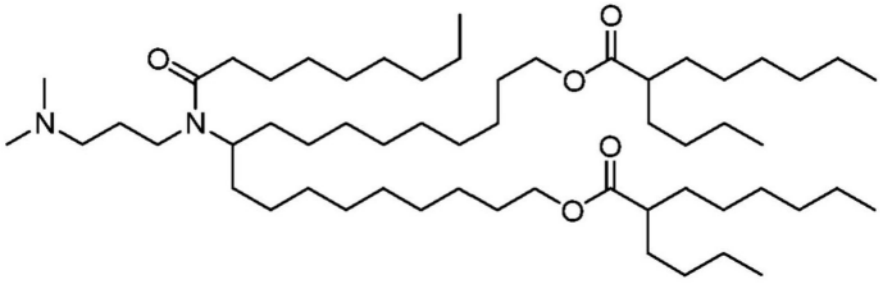
[0210] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中，本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质：

[0211] 

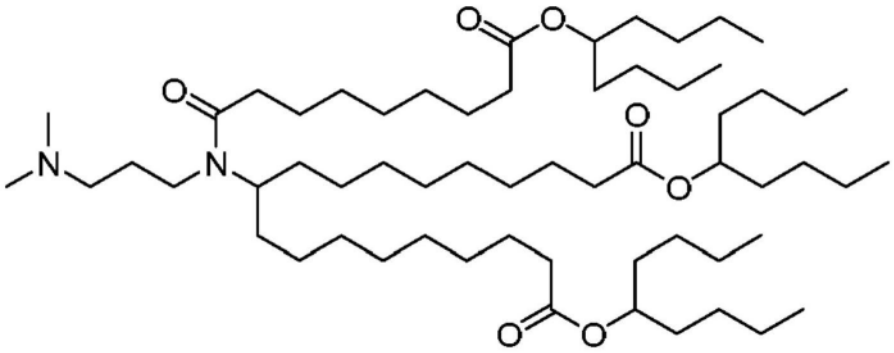
[0212] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中，本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质：

[0213] 

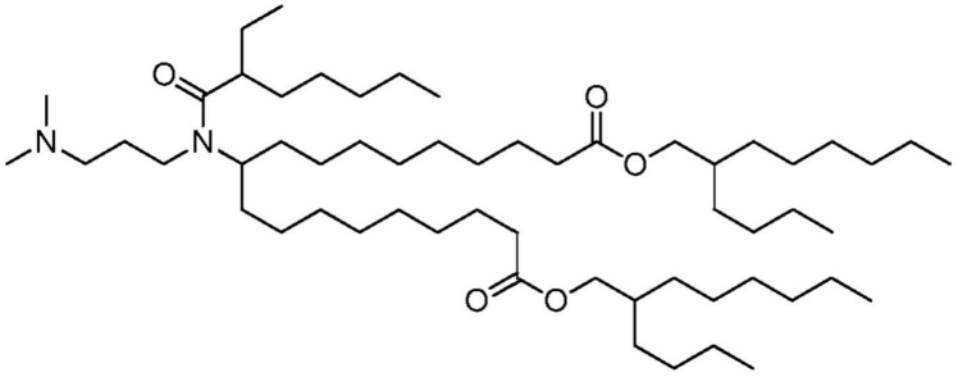
[0214] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0215] 

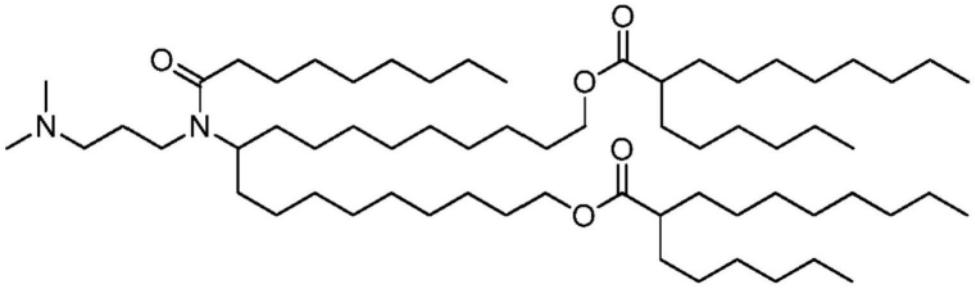
[0216] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0217] 

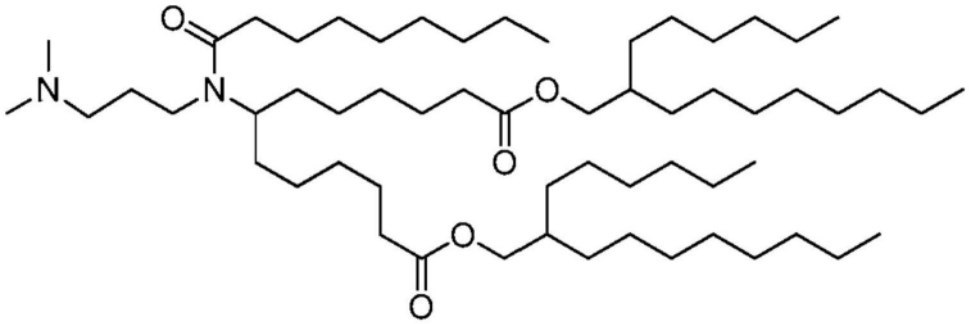
[0218] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0219] 

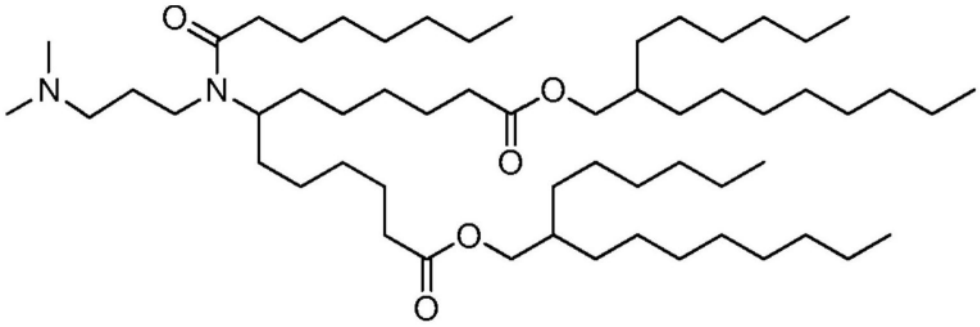
[0220] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0221] 

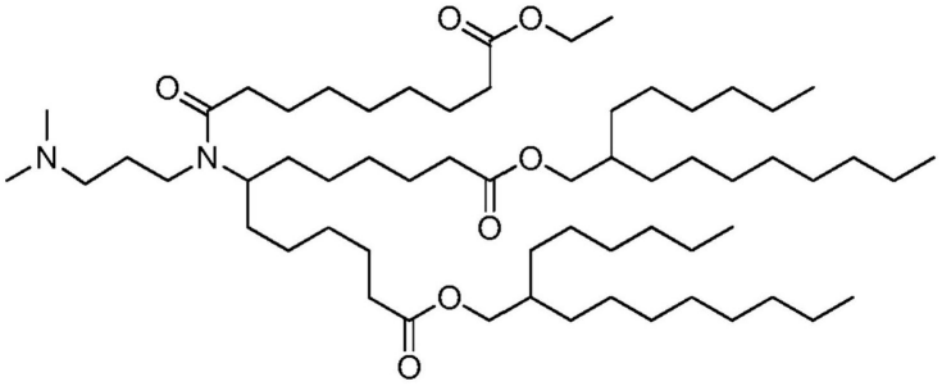
[0222] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0223] 

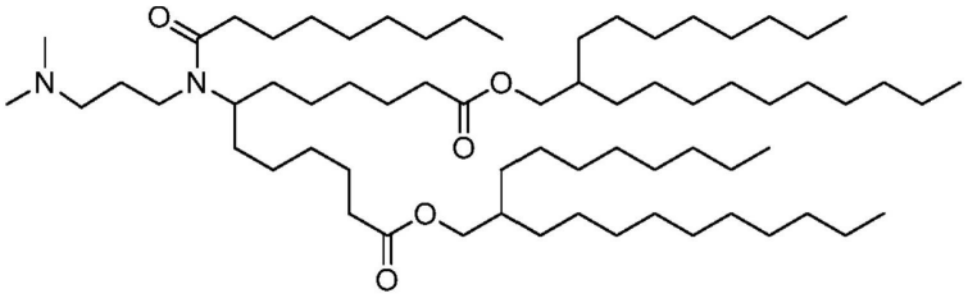
[0224] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0225] 

[0226] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

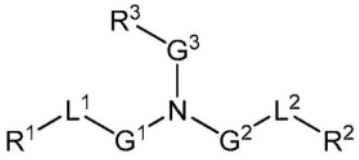
[0227] 

[0228] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0229] 

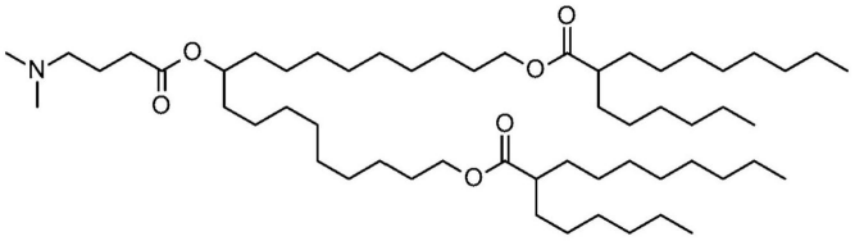
[0230] 及其药学上可接受的盐。

[0231] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括如国际专利公开WO 2017/075531中所述的阳离子脂质,该专利公开以引用的方式并入本文。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有下式的阳离子脂质:

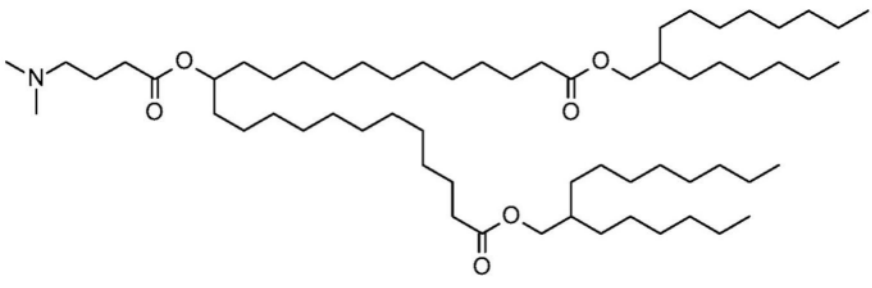
[0232] 

[0233] 或其药学上可接受的盐,其中L^1或L^2中的一者是-O(C=O)-、-(C=O)O-、-C(=O)-、-O-、-S(O)$_x$-、-S-S-、-C(=O)S-、-SC(=O)-、-NR^aC(=O)-、-C(=O)NR^a-、NR^aC(=O)NR^a-、-OC(=O)NR^a-或-NR^aC(=O)O-;并且L^1或L^2中的另一者是-O(C=O)-、-(C=O)O-、-C(=O)-、-O-、-S(O)$_x$-、-S-S-、-C(=O)S-、SC(=O)-、-NR^aC(=O)-、-C(=O)NR^a-、NR^aC(=O)NR^a-、-OC(=O)NR^a-或-NR^aC(=O)O-或直接键;G^1和G^2各自独立地是未取代的C_1-C_{12}亚烷基或C_1-C_{12}亚烯基;G^3是C_1-C_{24}亚烷基、C_1-C_{24}亚烯基、C_3-C_8亚环烷基、C_3-C_8亚环烯基;R^a是H或C_1-C_{12}烷基;R^1和R^2各自独立地是C_6-C_{24}烷基或C_6-C_{24}烯基;R^3是H、OR^5、CN、-C(=O)OR^4、-OC(=O)R^4或-NR^5 C(=O)R^4;R^4是C_1-C_{12}烷基;R^5是H或C_1-C_6烷基;并且x为0、1或2。

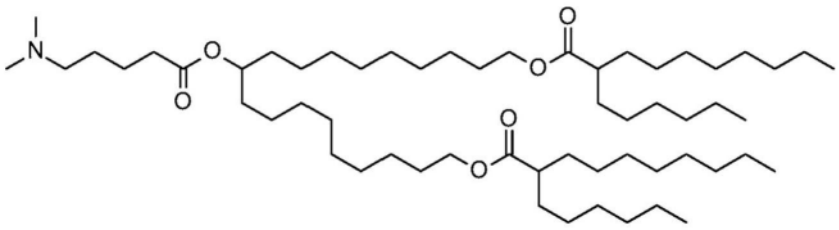
[0234] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括如国际专利公开WO 2017/117528中所述的阳离子脂质,该专利公开以引用的方式并入本文。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0235] 

[0236] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

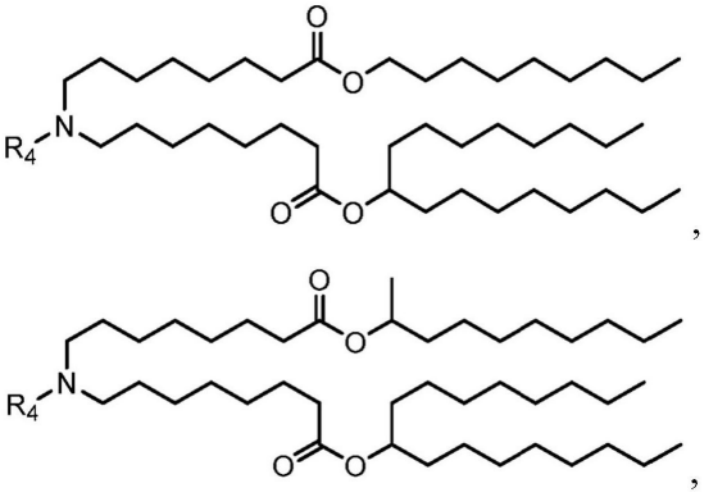
[0237] 

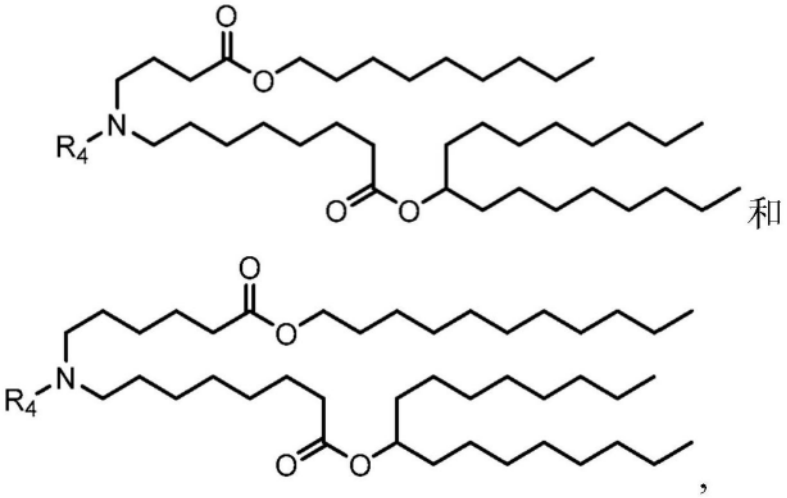
[0238] 及其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0239] 

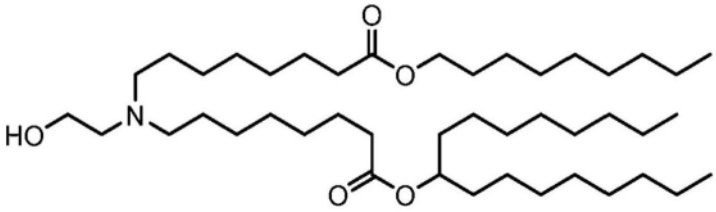
[0240] 及其药学上可接受的盐。

[0241] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括如国际专利公开WO 2017/049245中所述的阳离子脂质,该专利公开以引用的方式并入本文。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法的阳离子脂质包括具有下式之一的化合物:

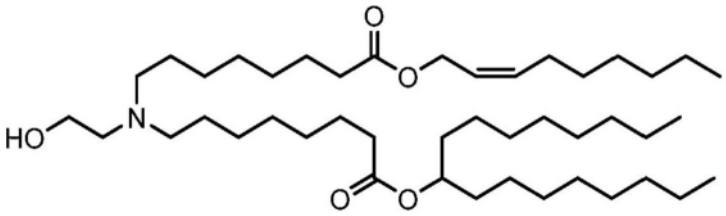
[0242] 

[0243] 

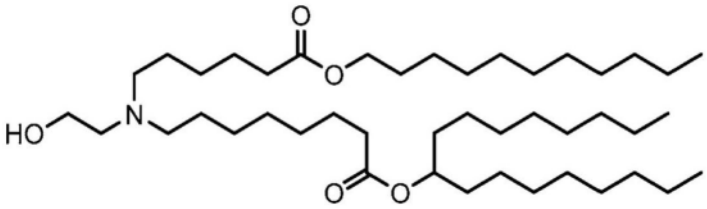
[0244] 及其药学上可接受的盐。对于这四个通式中的任一者,R_4独立地选自-$(CH_2)_nQ$和-$(CH_2)_nCHQR$;Q选自由以下项组成的组:-OR、-OH、-$O(CH_2)_nN(R)_2$、-OC(O)R、-CX_3、-CN、-N(R)C(O)R、-N(H)C(O)R、-N(R)S(O)$_2$R、-N(H)S(O)$_2$R、-N(R)C(O)N(R)$_2$、-N(H)C(O)N(R)$_2$、-N(H)C(O)N(H)(R)、-N(R)C(S)N(R)$_2$、-N(H)C(S)N(R)$_2$、-N(H)C(S)N(H)(R)和杂环;并且n为1、2或3。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0245] 

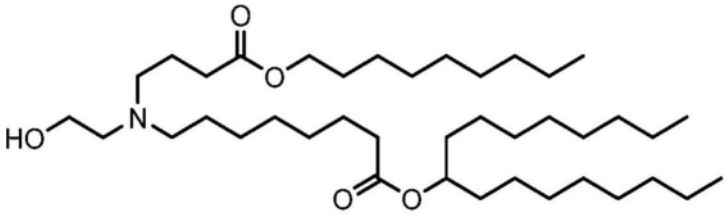
[0246] 及其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0247] 

[0248] 及其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

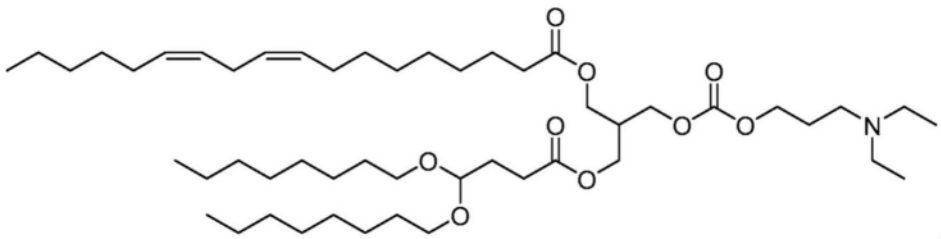
[0249] 

[0250] 及其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

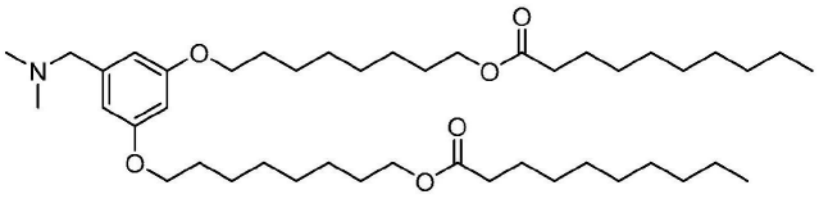
[0251] 

[0252] 及其药学上可接受的盐。

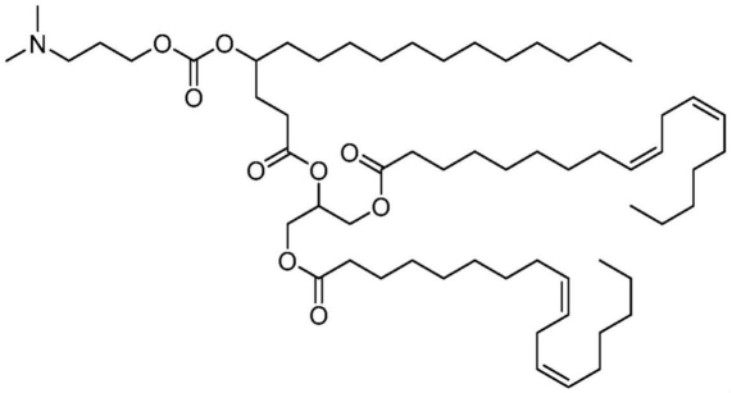
[0253] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括如国际专利公开WO 2017/173054和WO 2015/095340中所述的阳离子脂质,这些专利公开中的每个以引用的方式并入本文。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0254] 

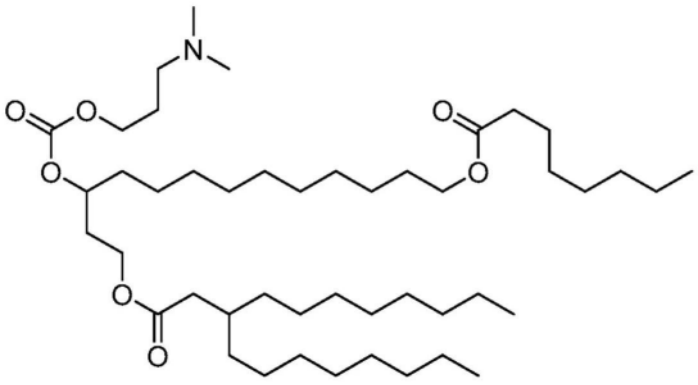
[0255] 及其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

[0256] 

[0257] 及其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

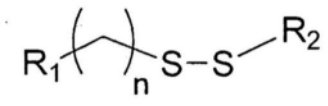
[0258] 

[0259] 及其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质:

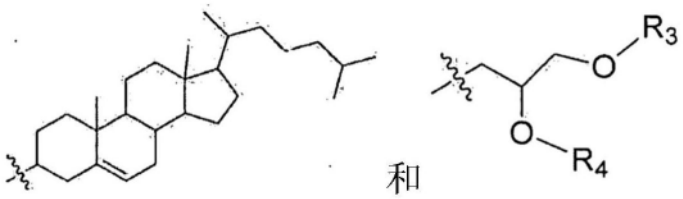
[0260] 

[0261] 及其药学上可接受的盐。

[0262] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括如国际专利公开WO 2012/170889中所述的可切割阳离子脂质,该专利公开以引用的方式并入本文。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有下式的阳离子脂质:

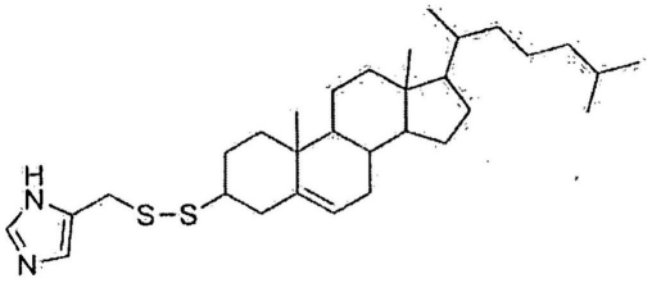
[0263] ,

[0264] 其中R_1选自由以下项组成的组:咪唑、胍、氨基、亚胺、烯胺、任选地取代的烷基氨基(例如,烷基氨基,诸如二甲基氨基)和吡啶基;其中R_2选自由以下两个通式之一组成的组:

[0265] 

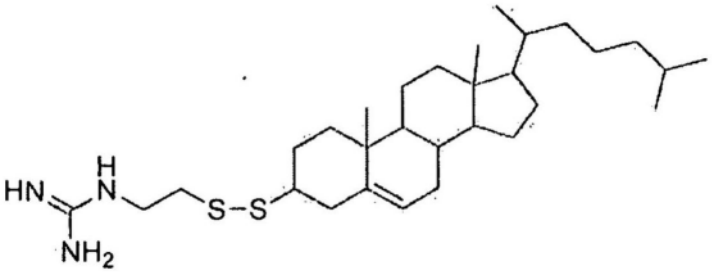
和

[0266] 并且其中R_3和R_4各自独立地选自由以下项组成的组:任选地取代的不同饱和或不饱和的C_6-C_{20}烷基和任选地取代的不同饱和或不饱和的C_6-C_{20}酰基;并且其中n为零或任何正整数(例如,一、二、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、二十或更多)。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质"HGT4001":

[0267] 

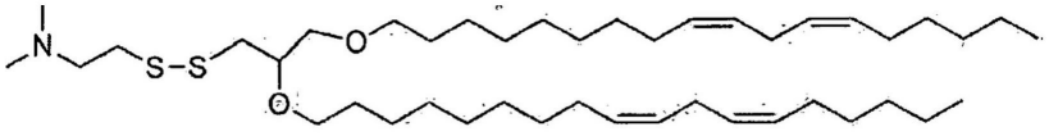
[0268] (HGT4001)

[0269] 及其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质"HGT4002":

[0270] 

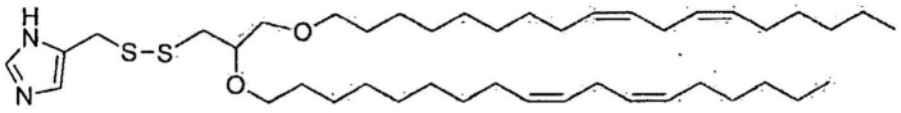
[0271] (HGT4002)

[0272] 及其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质"HGT4003":

[0273] 

[0274] (HGT4003)

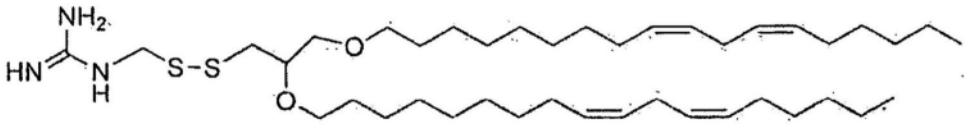
[0275] 及其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以下化合物结构的阳离子脂质"HGT4004":

[0276] 

[0277] (HGT4004)

[0278] 及其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有以

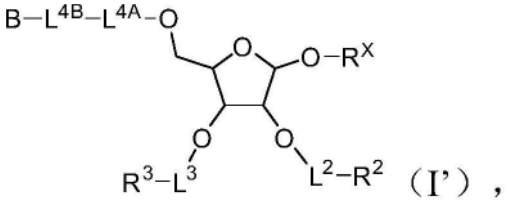
下化合物结构的阳离子脂质“HGT4005”：

[0279] 

[0280] (HGT4005)

[0281] 及其药学上可接受的盐。

[0282] 用于本发明的组合物和方法的其他合适的阳离子脂质包括如2018年5月16日提交的美国临时申请号62/672,194中所述的可切割阳离子脂质,该临时申请以引用的方式并入本文。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括阳离子脂质,所述阳离子脂质为美国临时申请号62/672,194中所述的通式中的任一者或者结构(1a)-(21a)和(1b)-(21b)以及(22)-(237)中的任一者。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括具有根据式(I')的结构的阳离子脂质,

[0283]  (I'),

[0284] 其中:

[0285] R^X独立地为-H、$-L^1-R^1$或$-L^{5A}-L^{5B}-B'$;

[0286] L^1、L^2和L^3中的每个独立地为共价键、-C(O)-、-C(O)O-、-C(O)S-或$-C(O)NR^L-$;

[0287] 每个L^{4A}和L^{5A}独立地为-C(O)-、-C(O)O-或$-C(O)NR^L-$;

[0288] 每个L^{4B}和L^{5B}独立地为C_1-C_{20}亚烷基、C_2-C_{20}亚烯基或C_2-C_{20}亚炔基;

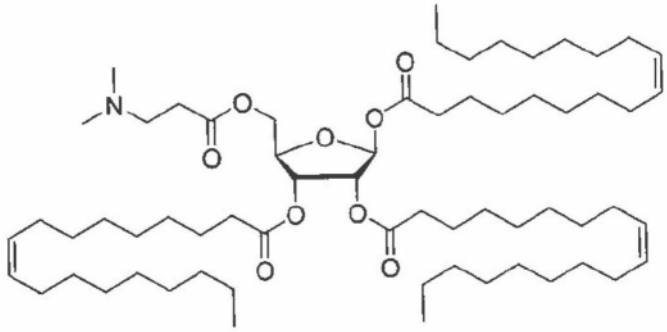
[0289] 每个B和B'为NR^4R^5或5元至10元含氮的杂芳基;

[0290] 每个R^1、R^2和R^3独立地为C_6-C_{30}烷基、C_6-C_{30}烯基或C_6-C_{30}炔基;

[0291] 每个R^4和R^5独立地为氢、C_1-C_{10}烷基;C_2-C_{10}烯基;或C_2-C_{10}炔基;并且

[0292] 每个R^L独立地为氢、C_1-C_{20}烷基、C_2-C_{20}烯基或C_2-C_{20}炔基。

[0293] 在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括阳离子脂质,所述阳离子脂质为62/672,194的化合物(139),所述化合物具有以下化合物结构:

[0294]  (“18:1碳尾核糖脂质”)。

[0295] 在一些实施方案中,本发明的组合物和方法包括阳离子脂质、N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(“DOTMA”)。(Feigner等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.84,7413(1987);美国专利号4,897,355,该专利以引用方式并入本文)。适用于本发明的组合物和方法的其他阳离子脂质包括例如5-羧基精胺基甘氨酸双十八烷基酰胺(“DOGS”);2,3-二

油烯基氧基-N-[2-(精胺-羧胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙铵(“DOSPA”)(Behr等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.86,6982(1989),美国专利号5,171,678;美国专利号5,334,761);1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(“DODAP”);1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(“DOTAP”)。

[0296] 适用于本发明的组合物和方法的附加的示例性阳离子脂质还包括:1,2-二硬脂酰氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(“DSDMA”);1,2-二油烯基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(“DODMA”);1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(“DLinDMA”);1,2-二亚油烯基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(“DLenDMA”);N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(“DODAC”);N,N-二硬脂酰基-N,N-二甲基溴化铵(“DDAB”);N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(“DMRIE”);3-二甲基氨基-2-(胆甾-5-烯-3-β-氧基丁烷-4-氧基)-1-(顺式,顺式-9,12-十八碳二烯氧基)丙烷(“CLinDMA”);2-[5'-(胆甾-5-烯-3-β-氧基)-3'-氧杂戊氧基)-3-二甲基1-1-(顺式,顺式-9',1-2'-十八碳二烯氧基)丙烷(“CpLinDMA”);N,N-二甲基-3,4-二油烯基氧基苄胺(“DMOBA”);1,2-N,N'-二油烯基氨甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(“DOcarbDAP”);2,3-二亚油酰氧基-N,N-二甲基丙基胺(“DLinDAP”);1,2-N,N'-二亚油基氨甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(“DLincarbDAP”);1,2-二亚油酰基氨甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(“DLinCDAP”);2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(“DLin-K-DMA”);2-((8-[(3P)-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]丙烷-1-胺(“辛基-CLinDMA”);(2R)-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]丙烷-1-胺(“辛基-CLinDMA(2R)”);(2S)-2-((8-[(3P)-胆甾-5-烯-3-基氧基]辛基)氧基)-N,fsl-二甲基3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]丙烷-1-胺(“辛基-CLinDMA(2S)”);2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(“DLin-K-XTC2-DMA”);和2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,1 2-二烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基乙胺(“DLin-KC2-DMA”)(参见WO 2010/042877,该专利以引用方式并入本文;Semple等人,Nature Biotech.28:172-176(2010))。(Heyes,J.,等人.,J Controlled Release 107:276-287(2005);Morrissey,DV.,等人.,Nat.Biotechnol.23(8):1003-1007(2005);国际专利公开WO 2005/121348)。在一些实施方案中,一种或多种阳离子脂质包含咪唑、二烷基氨基或胍鎓部分中的至少一种。

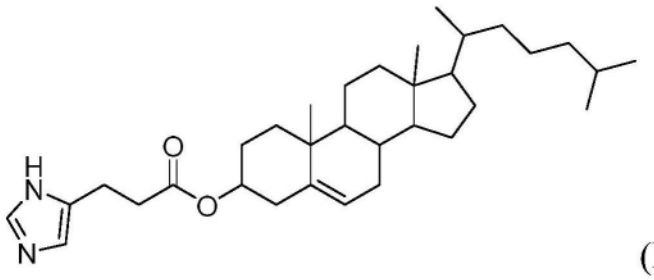
[0297] 在一些实施方案中,适用于本发明的组合物和方法的一种或多种阳离子脂质包括2,2-二亚油基1-4-二甲基氨基乙基1-[1,3]-二氧戊环(“XTC”);(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊二烯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-胺(“ALNY-100”)和/或4,7,13-三(3-氧代-3-(十一烷基氨基)丙基)-N1,N16-二-十一烷基-4,7,10,13-四氮杂十六烷-1,16-二酰胺(“NC98-5”)。

[0298] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含一种或多种阳离子脂质,所述阳离子脂质以重量计占组合物(例如脂质纳米颗粒)中的总脂质含量的至少约5%、10%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%。在一些实施方案中,本发明的组合物包含一种或多种阳离子脂质,所述阳离子脂质以摩尔%计占组合物(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质含量的至少约5%、10%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%。在一些实施方案中,本发明的组合物包含一种或多种阳离子脂质,所述阳离子脂质以重量计占组合物(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质含量的约30-70%(例如,约30-65%、约

30-60％、约30-55％、约30-50％、约30-45％、约30-40％、约35-50％、约35-45％或约35-40％)。在一些实施方案中,本发明的组合物包含一种或多种阳离子脂质,所述阳离子脂质以摩尔％计占组合物(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质含量的约30-70％(例如,约30-65％、约30-60％、约30-55％、约30-50％、约30-45％、约30-40％、约35-50％、约35-45％或约35-40％)。

[0299] 在一些实施方案中,作为本文所述的阳离子脂质的代替或除本文所述的阳离子脂质之外,可以使用基于固醇的阳离子脂质。合适的基于固醇的阳离子脂质是含二烷基氨基、咪唑和胍的基于固醇的阳离子脂质。例如,某些实施方案涉及包含一种或多种包含咪唑的基于固醇的阳离子脂质的组合物,所述阳离子脂质例如咪唑胆固醇酯或“ICE”脂质(3S,10R,13R,17R)-10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚烷-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基3-(1H-咪唑-4-基)丙酸酯,如以下结构(I)所表示。在某些实施方案中,用于递送编码功能蛋白的RNA(例如,mRNA)的脂质纳米颗粒可以包含一种或多种基于咪唑的阳离子脂质,例如咪唑胆固醇酯或“ICE”脂质(3S,10R,13R,17R)-10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚烷-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基3-(1H-咪唑-4-基)丙酸酯,如以下结构所表示:

[0300]



(ICE)

[0301] 在一些实施方案中,脂质体中阳离子脂质的百分比可大于10％、大于20％、大于30％、大于40％、大于50％、大于60％或大于70％。在一些实施方案中,阳离子脂质按重量计占脂质体的约30-50％(例如,约30-45％、约30-40％、约35-50％、约35-45％或约35-40％。在一些实施方案中,阳离子脂质(例如,ICE脂质)以摩尔比计占脂质体的约30％、约35％、约40％、约45％或约50％。

[0302] 非阳离子脂质

[0303] 如本文所用,短语“非阳离子脂质”是指任何中性、两性离子或阴离子脂质,其在本文中也称作“辅助脂质”。如本文所用,短语“阴离子脂质”是指在选定pH诸如生理pH下携带净负电荷的多种脂质物质中的任何一种。

[0304] 本发明涉及包含一种或多种非阳离子辅助脂质的mRNA-LNP,所述一种或多种非阳离子辅助脂质包含1,2-二芥酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DEPE)。在一些实施方案中,DEPE是mRNA-LNP中唯一的非阳离子辅助脂质。在其他实施方案中,mRNA-LNP的辅助脂质部分包含DEPE和胆固醇。

[0305] 不希望受任何特定理论的束缚,与DEPE不同的某些DEPE衍生物的脂质链长度或组成也包含在本发明内。例如,发明人已发现长度为10-20个碳的烷基链或炔链特别适合于mRNA-LNP的形成。在一些实施方案中,具有长度为16-20个碳的烷基链或炔链的DEPE衍生物是特别优选的。或者,长度为10-14个碳的烷基链或烯链的DEPE衍生物,例如具有10、12或14个碳的DEPE衍生物,可能特别适合于本发明的实践。

[0306] 可包括于mRNA-LNP中的其他非阳离子脂质或辅助脂质包括但不限于二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰-磷脂酰乙醇胺(POPE)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(POPE)、4-(N-马来酰亚胺甲基)-环已烷-1-甲酸二油酰-磷脂酰乙醇胺(DOPE-mal)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二豆蔻酰磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、磷脂酰丝氨酸、鞘脂、脑苷脂、神经节苷脂、16-0-单甲基PE、16-0-二甲基PE、18-1-反式PE、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)或其混合物。

[0307] 在一些实施方案中,此类非阳离子脂质可以单独使用,但是优选地与其他脂质(例如,阳离子脂质)组合使用。在一些实施方案中,非阳离子脂质可以占脂质体中存在的总脂质的约5%至约90%、或约10%至约70%的摩尔比。在一些实施方案中,非阳离子脂质是中性脂质,即在其下配制和/或施用组合物的条件下不携带净电荷的脂质。在一些实施方案中,脂质体中非阳离子脂质的百分比可大于5%、大于10%、大于20%、大于30%或大于40%。

[0308] 基于胆固醇的脂质

[0309] 在一些实施方案中,组合物(例如脂质体组合物)包含一种或多种基于胆固醇的脂质。例如,用于实践本发明的合适的基于胆固醇的脂质是胆固醇。其他合适的基于胆固醇的脂质包括例如DC-Chol(N,N-二甲基-N-乙基羧酰胺胆固醇)、1,4-双(3-N-油烯基氨基-丙基)哌嗪(Gao等人,Biochem.Biophys.Res.Comm.179,280(1991);Wolf等人,BioTechniques 23,139(1997);美国专利号5,744,335)或咪唑胆固醇酯(ICE)。

[0310] 在一些实施方案中,基于胆固醇的脂质可以以脂质体中存在的总脂质的约1%至约30%或约5%至约20%的摩尔比(摩尔%)存在。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒中基于胆固醇的脂质的百分比可以大于约5摩尔%、大于约10摩尔%、大于约20摩尔%、大于约30摩尔%或大于约40摩尔%。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒中基于胆固醇的脂质的百分比可以不超过约5摩尔%、不超过约10摩尔%、不超过约20摩尔%、不超过约30摩尔%或不超过约40摩尔%。

[0311] 在一些实施方案中,基于胆固醇的脂质可以以脂质体中存在的总脂质的约1%至约30%或约5%至约20%的重量比(重量%)存在。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒中基于胆固醇的脂质的百分比可以大于约5重量%、大于约10重量%、大于约20重量%、大于约30重量%或大于约40重量%。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒中基于胆固醇的脂质的百分比可以不超过约5重量%、不超过约10重量%、不超过约20重量%、不超过约30重量%或不超过约40重量%。

[0312] PEG化的脂质

[0313] 在一些实施方案中,合适的脂质溶液包含一种或多种PEG化的脂质,在本文中也称作PEG修饰的脂质。用于实践本发明的合适的PEG修饰或PEG化的脂质是1,2-二豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲氧基聚乙二醇-2000(DMG-PEG2K)。例如,本发明还设想了聚乙二醇(PEG)修饰的磷脂和衍生化的脂质(诸如衍生化的神经酰胺(PEG-CER),包括N-辛酰基-鞘氨醇-1-[琥珀酰(甲氧基聚乙二醇)-2000](C8 PEG-2000神经酰胺))的使用。设想的PEG修饰的脂质包括但不限于长度为最多2kDa、最多3kDa、最多4kDa或最多5kDa的聚乙二醇链,所述聚乙二

醇链共价连接至具有C_6-C_{20}长度的烷基链的脂质。在一些实施方案中,PEG修饰的或PEG化的脂质是PEG化的胆固醇或PEG-2K。在一些实施方案中,特别有用的可交换脂质是具有较短的酰基链(例如,C_{14}或C_{18})的PEG-神经酰胺。此类组分的添加可以防止复合物聚集,并且还可以提供延长循环寿命和增加脂质-核酸组合物至靶组织的递送的手段(Klibanov等人.(1990)FEBS Letters,268(1):235-237),或者可以选择它们以在体内迅速地从调配物中交换出来(参见美国专利号5,885,613)。特别有用的可交换脂质是具有较短酰基链(例如,C_{14}或C_{18})的PEG-神经酰胺。本发明的PEG修饰的磷脂和衍生化的脂质可以按摩尔比计占脂质体转移媒介物中存在的总脂质的约0%至约20%、约0.5%至约20%、约1%至约15%、约4%至约10%、或约2%。

[0314] 在合适脂质溶液中,PEG修饰的磷脂和衍生化的脂质可以按重量计或按摩尔计占总脂质的不大于约0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%或5%。在一些实施方案中,在合适的脂质溶液中,PEG修饰的脂质可以按重量计或按摩尔浓度计占总脂质的约5%或更少。在一些实施方案中,在合适的脂质溶液中,PEG修饰的脂质可以按重量计或按摩尔浓度计占总脂质的约4%或更少。在一些实施方案中,在合适的脂质溶液中,PEG修饰的脂质通常按重量计或按摩尔浓度计占总脂质的3%或更少。在一些实施方案中,在合适的脂质溶液中,PEG修饰的脂质通常按重量计或按摩尔浓度计占总脂质的2%或更少。在一些实施方案中,在合适的脂质溶液中,PEG修饰的脂质通常按重量计或按摩尔浓度计占总脂质的1%或更少。在一些实施方案中,在合适的脂质溶液中,PEG修饰的脂质按重量计或按摩尔浓度计占总脂质的约1-5%、约1-4%、约1-3%或约1-2%。在一些实施方案中,在合适的脂质溶液中,PEG修饰的脂质按重量计或按摩尔浓度计占总脂质的约0.01-3%(例如,约0.01-2.5%、0.01-2%、0.01-1.5%、0.01-1%)。

[0315] 摩尔脂质比率

[0316] 根据各种实施方案,包含脂质纳米颗粒的阳离子脂质、非阳离子脂质和/或PEG修饰的脂质的选择,以及这些脂质与彼此的相对摩尔比基于所选择的脂质的特征、预期靶细胞的性质、待递送的mRNA的特征。额外的考虑因素包括例如,烷基链的饱和度以及所选脂质的大小、电荷、pH、pKa、融合性和耐受性。因此,可相应地调节摩尔比。

[0317] 可以用于制备并包含在预先形成的脂质纳米颗粒中的各种脂质组合,即阳离子脂质、非阳离子脂质、PEG修饰的脂质和任选地胆固醇,在文献和本文中有描述。例如,合适的脂质溶液可以含有cKK-E12、DEPE、胆固醇和DMG-PEG2K;C12-200、DEPE、胆固醇和DMG-PEG2K;HGT5000、DEPE、胆固醇和DMG-PEG2K;HGT5001、DEPE、胆固醇和DMG-PEG2K;cKK-E12、DPPC、胆固醇和DMG-PEG2K;C12-200、DPPC、胆固醇和DMG-PEG2K;HGT5000、DPPC、胆固醇和DMG-PEG2K;HGT5001、DPPC、胆固醇和DMG-PEG2K;或ICE、DEPE和DMG-PEG2K。。脂质的其他组合在本领域中描述,例如,PCT/US17/61100,于2017年11月10日提交,公开号为WO 2018/089790;标题为“Novel ICE-based Lipid Nanoparticle Formulation for Delivery of mRNA,”;PCT/US18/21292,于2018年3月7日提交,公开号为WO 2018/165257,标题为“PolyAnionic Delivery of Nucleic Acids”;PCT/US18/36920,于2018年6月11日提交,标题为“Poly(Phosphoesters)for Delivery of Nucleic Acids”;美国临时申请62/676,147,于2018年5月24日提交;标题为“hioester Cationic Lipids”;美国临时申请62/677,821,于2018年5月30日提交,标题为“Cationic Lipids Comprising a Steroidal

Moiety";美国临时申请62/677,809,于2018年5月30日提交,标题为"Macrocyclic Lipids";美国临时申请62/677,818,于2018年5月30日提交,标题为"Vitamin K Cationic Lipids";美国临时申请62/677,828,于2018年5月30日提交,标题为"Vitamin D Cationic Lipids";美国临时申请62/677,851,于2018年5月30日提交,标题为"Vitamin A Cationic Lipids";美国临时申请62/677,855,于2018年5月30日提交,标题为"Vitamin E Cationic Lipids";所述临时申请的公开内容在此以全文引用的方式包括在内。

[0318] 在各种实施方案中,阳离子脂质(例如,cKK-E12、化合物1、化合物2或化合物3、C12-200、ICE和/或HGT4003)以摩尔比计占脂质体的约30-60%(例如,约30-55%、约30-50%、约30-45%、约30-40%、约35-50%、约35-45%或约35-40%)。在一些实施方案中,阳离子脂质(例如,cKK-E12、化合物1、化合物2或化合物3、C12-200、ICE和/或HGT4003)的百分比以摩尔比计等于或大于脂质体的约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%或约60%。

[0319] 在一些实施方案中,阳离子脂质与非阳离子脂质与基于胆固醇的脂质与PEG修饰的脂质的比率可以分别地在约30-60:25-35:20-30:1-15之间。在一些实施方案中,阳离子脂质与非阳离子脂质与基于胆固醇的脂质与PEG修饰的脂质的比率分别地为大约40:30:20:10。在一些实施方案中,阳离子脂质与非阳离子脂质与基于胆固醇的脂质与PEG修饰的脂质的比率分别地为大约40:30:25:5。在一些实施方案中,阳离子脂质与非阳离子脂质与基于胆固醇的脂质与PEG修饰的脂质的比率分别地为大约40:32:25:3。在一些实施方案中,阳离子脂质与非阳离子脂质与基于胆固醇的脂质与PEG修饰的脂质的比率为大约50:25:20:5。在一些实施方案中,固醇脂质与非阳离子脂质与PEG修饰的脂质的比率为50:45:5。在一些实施方案中,固醇脂质与非阳离子脂质与PEG修饰的脂质的比率为50:40:10。在一些实施方案中,固醇脂质与非阳离子脂质与PEG修饰的脂质的比率为55:40:5。在一些实施方案中,固醇脂质与非阳离子脂质与PEG修饰的脂质的比率为55:35:10。在一些实施方案中,固醇脂质与非阳离子脂质与PEG修饰的脂质的比率为60:35:5。在一些实施方案中,固醇脂质与非阳离子脂质与PEG修饰的脂质的比率为60:30:10。

[0320] 在一些实施方案中,用于本发明的合适的脂质体包含ICE:DEPE摩尔比>1:1的ICE和DEPE。在一些实施方案中,ICE:DEPE摩尔比<2.5:1。在一些实施方案中,ICE:DEPE摩尔比在1:1和2.5:1之间。在一些实施方案中,ICE:DEPE摩尔比为大约1.5:1。在一些实施方案中,ICE:DEPE摩尔比为大约1.7:1。在一些实施方案中,ICE:DEPE摩尔比为大约2:1。在一些实施方案中,用于本发明的合适的脂质体包含ICE:DMG-PEG-2K摩尔比>10:1的ICE和DMG-PEG-2K。在一些实施方案中,ICE:DMG-PEG-2K摩尔比<16:1。在一些实施方案中,ICE:DMG-PEG-2K摩尔比为大约12:1。在一些实施方案中,ICE:DMG-PEG-2K摩尔比为大约14:1。在一些实施方案中,用于本发明的合适的脂质体包含DEPE:DMG-PEG-2K摩尔比>5:1的DEPE和DMG-PEG-2K。在一些实施方案中,DEPE:DMG-PEG-2K摩尔比<11:1。在一些实施方案中,DEPE:DMG-PEG-2K摩尔比为大约7:1。在一些实施方案中,DEPE:DMG-PEG-2K摩尔比为大约10:1。

[0321] 在一些实施方案中,用于本发明的合适的脂质体包含ICE:DEPE:DMG-PEG-2K摩尔比为50:45:5的ICE、DEPE和DMG-PEG-2K。在一些实施方案中,用于本发明的合适的脂质体包含ICE:DEPE:DMG-PEG-2K摩尔比为50:40:10的ICE、DEPE和DMG-PEG-2K。在一些实施方案中,用于本发明的合适的脂质体包含ICE:DEPE:DMG-PEG-2K摩尔比为55:40:5的ICE、DEPE和

DMG-PEG-2K。在一些实施方案中,用于本发明的合适的脂质体包含ICE:DEPE:DMG-PEG-2K摩尔比为55:35:10的ICE、DEPE和DMG-PEG-2K。在一些实施方案中,用于本发明的合适的脂质体包含ICE:DEPE:DMG-PEG-2K摩尔比为60:35:5的ICE、DEPE和DMG-PEG-2K。在一些实施方案中,用于本发明的合适的脂质体包含ICE:DEPE:DMG-PEG-2K摩尔比为60:30:10的ICE、DEPE和DMG-PEG-2K。

[0322] 聚合物

[0323] 在一些实施方案中,使用聚合物作为载体,单独或与包括本文所述的各种脂质的其他载体组合,配制合适的递送媒介物。因此,在一些实施方案中,如本文所用,脂质体递送媒介物还涵盖包含聚合物的纳米颗粒。合适的聚合物可包括例如聚丙烯酸酯、聚氰基丙烯酸烷基酯、聚丙交酯、聚丙交酯-聚乙交酯共聚物、聚己内酯、葡聚糖、白蛋白、明胶、海藻酸盐、胶原、壳聚糖、环糊精、鱼精蛋白、PEG化鱼精蛋白、PLL、PEG化PLL和聚乙烯亚胺(PEI)。当存在PEI时,它可为分子量范围为10至40kDa的支化PEI,例如25kDa的支化PEI(Sigma#408727)。

[0324] 信使RNA(mRNA)

[0325] 本发明可以用于包封任何mRNA。mRNA通常被认为是将信息从DNA携带到核糖体的RNA类型。通常,在真核生物体中,mRNA加工包括在5'末端添加一个“帽”,并且在3'末端添加一个“尾巴”。典型的帽是7-甲基鸟苷帽,其是通过5'-5'-三磷酸键与第一个转录的核苷酸连接的鸟苷。帽的存在对于提供对存在于大多数真核细胞中的核酸酶的抗性很重要。尾巴的添加通常是聚腺苷酸化事件,由此聚腺苷酰基部分被添加到mRNA分子的3'末端。这种“尾巴”的存在用于保护mRNA免受核酸外切酶降解。信使RNA被核糖体翻译成组成蛋白质的一系列氨基酸。

[0326] 可以根据多种已知方法中的任一种合成mRNA。例如,可以经由体外转录(IVT)来合成根据本发明的mRNA。简而言之,IVT通常使用线性或环状DNA模板进行,该模板包含启动子、三磷酸核糖核苷酸库、可能包含DTT和镁离子的缓冲系统以及适当的RNA聚合酶(例如,T3、T7或SP6RNA聚合酶)、DNase I、焦磷酸酶和/或RNAse抑制剂。确切条件将根据具体应用而改变。

[0327] 在一些实施方案中,可以在调配和包封之前纯化体外合成的mRNA,以除去不期望的杂质(包括在mRNA合成过程中使用的各种酶和其他试剂)。

[0328] 本发明可以用于调配和包封各种长度的mRNA。在一些实施方案中,本发明可以用于调配和包封长度等于或大于约1kb、1.5kb、2kb、2.5kb、3kb、3.5kb、4kb、4.5kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、11kb、12kb、13kb、14kb、15kb或20kb的体外合成的mRNA。在一些实施方案中,本发明可以用于调配和包封长度在约1-20kb、约1-15kb、约1-10kb、约5-20kb、约5-15kb、约5-12kb、约5-10kb、约8-20kb或约8-15kb范围内的体外合成的mRNA。

[0329] 本发明可以用于调配和包封未经修饰的mRNA或者含有通常增强稳定性的一个或多个修饰的mRNA。在一些实施方案中,修饰选自经修饰的核苷酸、经修饰的糖磷酸骨架以及5'和/或3'非翻译区。

[0330] 在一些实施方案中,mRNA的修饰可以包括RNA的核苷酸的修饰。根据本发明的经修饰的mRNA可以包括例如主链修饰、糖修饰或碱基修饰。在一些实施方案中,mRNA可以从天然存在的核苷酸和/或核苷酸类似物(经修饰的核苷酸)合成,所述天然存在的核苷酸和/或核

苷酸类似物包括但不限于嘌呤(腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G))或嘧啶(胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)、尿嘧啶(U))以及嘌呤和嘧啶的经修饰的核苷酸类似物或衍生物,诸如1-甲基-腺嘌呤、2-甲基-腺嘌呤、2-甲硫基-N-6-异戊烯基-腺嘌呤、N6-甲基-腺嘌呤、N6-异戊烯基-腺嘌呤、2-硫代-胞嘧啶、3-甲基-胞嘧啶、4-乙酰基-胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、1-甲基-鸟嘌呤、2-甲基-鸟嘌呤、2,2-二甲基-鸟嘌呤、7-甲基-鸟嘌呤、肌苷、1-甲基-肌苷、假尿嘧啶(5-尿嘧啶)、二氢尿嘧啶、2-硫代-尿嘧啶、4-硫代-尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代-尿嘧啶、5-(羧羟甲基)-尿嘧啶、5-氟-尿嘧啶、5-溴-尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-尿嘧啶、5-甲基-2-硫代-尿嘧啶、5-甲基-尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、5-甲基氨基甲基-尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫代-尿嘧啶、5'-甲氧基羰基甲基-尿嘧啶、5-甲氧基-尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧乙酸(v)、1-甲基-假尿嘧啶、Q核苷、β-D-甘露糖基-Q核苷、怀丁苷和氨基磷酸酯、硫代磷酸酯、肽核苷酸、甲基膦酸酯、7-脱氮鸟苷、5-甲基胞嘧啶、假尿苷、5-甲基胞苷和肌苷。此类类似物的制备是本领域的技术人员已知的,例如来自美国专利号4,373,071、美国专利号4,401,796、美国专利号4,415,732、美国专利号4,458,066、美国专利号4,500,707、美国专利号4,668,777、美国专利号4,973,679、美国专利号5,047,524、美国专利号5,132,418、美国专利号5,153,319、美国专利号5,262,530和5,700,642,这些专利的全部公开内容以引用的方式包括于本文中。

[0331] 通常,mRNA合成包括在5'末端上添加"帽"和在3'末端上添加"尾"。帽的存在对于提供对存在于大多数真核细胞中的核酸酶的抗性很重要。"尾巴"的存在用于保护mRNA免受核酸外切酶降解。

[0332] 因此,在一些实施方案中,mRNA包括5'帽结构。通常按如下方式添加5'帽:首先,RNA末端磷酸酶从5'核苷酸除去一个末端磷酸基团,剩下两个末端磷酸酯;然后通过鸟苷酸转移酶将三磷酸鸟苷(GTP)添加到末端磷酸酯中,产生5'5'5三磷酸酯键;并且然后用甲基转移酶将鸟嘌呤的7-氮甲基化。2'-O-甲基化也可以出现在7-甲基鸟苷三磷酸残基之后的第一碱基和/或第二碱基处。帽结构的实例包括但不限于m7GpppNp-RNA、m7GpppNmp-RNA和m7GpppNmpNmp-RNA(其中m表示2'-O-甲基残基)。

[0333] 在一些实施方案中,mRNA包括5'和/或3'非翻译区。在一些实施方案中,5'非翻译区包括一个或多个影响mRNA的稳定性或翻译的元件,例如铁应答元件。在一些实施方案中,5'非翻译区的长度可以在约50和500个核苷酸之间。

[0334] 在一些实施方案中,3'非翻译区包括一个或多个聚腺苷酸化信号,影响mRNA在细胞中定位稳定性的蛋白质结合位点,或一个或多个miRNA结合位点。在一些实施方案中,3'非翻译区的长度可以在50和500个核苷酸之间或更长。

[0335] 虽然在一些实施方案中体外转录反应所提供的mRNA是所期望的,但是在本发明的范围内设想了mRNA的其他来源,包括从细菌、真菌、植物和/或动物产生的mRNA。

[0336] 本发明可以用于调配和包封编码各种蛋白质的mRNA。适合用于本发明的mRNA的非限制性实例包括编码脊髓运动神经元1(SMN)、α-半乳糖苷酶(GLA)、精氨琥珀酸合成酶(ASS1)、鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)、因子IX(FIX)、苯丙氨酸羟化酶(PAH)、促红细胞生成素(EPO)、囊性纤维化跨膜传导受体(CFTR)和萤火虫萤光素酶(FFL)的mRNA。下面列出了本文所公开的示例性mRNA序列:

[0337] 脂质纳米颗粒(LNP)的形成

[0338] 还提供了一种用于制备包封mRNA的脂质纳米颗粒的方法,所述方法包括(a)提供一种或多种阳离子脂质、一种或多种PEG修饰的脂质和一种或多种辅助脂质的混合物,其中所述一种或多种辅助脂质包含1,2-二芥酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DEPE),以及(b)由步骤(a)中提供的混合物形成脂质纳米颗粒,其中方法还包括将mRNA包封到脂质纳米颗粒中,其中可以在步骤(b)中形成脂质纳米颗粒之前或之后进行包封。包封mRNA的所得脂质纳米颗粒是稳定的(例如,在冻融之前和之后保持相同的mRNA包封,或在冻融之前和之后保持在相同的mRNA包封的10%以内)。在一个实施方案中,用于制备根据本发明的脂质纳米颗粒的方法特别排除了一种或多种辅助脂质的使用,所述辅助脂质选自二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLOPE)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(POPE)和其组合。

[0339] 各种包封方法描述于公开的美国申请号US 2011/0244026、公开的美国申请号US 2016/0038432、公开的美国申请号US 2018/0153822、公开的美国申请号US 2018/0125989和2019年7月23日提交的美国临时申请号62/877,597中,并且可以被用于实践本发明,所有这些申请均以引用的方式并入本文。如本文所用,方法A是指通过将mRNA与脂质混合物混合而无需首先将脂质预先形成为脂质纳米颗粒来包封mRNA的常规方法,如US2016/0038432中所述。如本文所用,方法B或"再混合"是指通过将预先形成的脂质纳米颗粒与mRNA混合来包封信使RNA(mRNA)的方法,如US2018/0153822中所述。"逐步下降再混合"或"逐步上升再混合"是基于"再混合"方法的改进方法,如美国临时申请63/021,319中所述。"逐步下降再混合"涉及将预先形成的空脂质纳米颗粒的悬浮液与按顺序添加的mRNA溶液批次混合。mRNA溶液批次的每次添加产生具有不同阳离子脂质与mRNA摩尔比("N/P")的中间混合物,从高N/P比开始,并且在最终调配物中降低至较低N/P比。在"逐步上升再混合"中,以阳离子脂质与mRNA的等摩尔比开始,将预先形成的空脂质纳米颗粒的悬浮液分批添加到mRNA溶液中。例如,添加四个批次的预先形成的空脂质纳米颗粒,直到达到4(阳离子脂质)比1(mRNA)的比率为止。

[0340] 在一个实施方案中,DEPE以10摩尔%至50摩尔%的浓度存在于混合物中。更典型地,混合物中的DEPE以混合物中总脂质的25摩尔%至35摩尔%的浓度存在。在一个实施方案中,混合物中的一种或多种PEG修饰的脂质包括长度为最多5kDa的聚乙二醇链,所述聚乙二醇链共价连接至具有长度为C_6-C_{20}的烷基链的脂质。在一些实施方案中,一种或多种阳离子脂质、一种或多种PEG修饰的脂质和一种或多种辅助脂质的混合物还包含一种或多种脂质,诸如基于胆固醇的脂质。在一个实施方案中,基于胆固醇的脂质是胆固醇和/或PEG化的胆固醇。在一些实施方案中,阳离子脂质与辅助脂质与基于胆固醇的脂质与PEG修饰的脂质的比率可以分别地在约30-60:25-35:20-30:1-15之间。

[0341] 在一些实施方案中,通过将溶解在乙醇中的脂质与水性溶液(脂质溶液)混合来形成空的预先形成的脂质纳米颗粒。在一些实施方案中,脂质包括一种或多种阳离子脂质、一种或多种非阳离子脂质和一种或多种PEG脂质。在一些实施方案中,脂质还含有一种或多种胆固醇脂质。在一些实施方案中,脂质存在于乙醇储备溶液中。通过将那些脂质混合而形成预先形成的脂质纳米颗粒。通常,在一些实施方案中,将含有溶解的脂质的脂质溶液和水性溶液或缓冲溶液混合到溶液中,使得脂质可以形成没有mRNA的纳米颗粒(即空的预先形成的脂质纳米颗粒)。

[0342] 脂质溶液

[0343] 根据本发明,脂质溶液含有适用于形成用于包封mRNA的脂质纳米颗粒的脂质混合物。在一些实施方案中,合适的脂质溶液是基于乙醇的。例如,合适的脂质溶液可以含有溶解在纯乙醇(即,100%乙醇)中的期望脂质的混合物。在另一个实施方案中,合适的脂质溶液是基于异丙醇的。在另一个实施方案中,合适的脂质溶液是基于二甲基亚砜的。在另一个实施方案中,合适的脂质溶液是合适溶剂(包括但不限于乙醇、异丙醇和二甲基亚砜)的混合物。

[0344] 合适的脂质溶液可以含有各种浓度的所需脂质的混合物。例如,合适的脂质溶液可以含有总浓度为约0.01mg/ml、0.02mg/ml、0.03mg/ml、0.04mg/ml、0.05mg/ml、0.06mg/ml、0.07mg/ml、0.08mg/ml、0.09mg/ml、0.1mg/ml、0.5mg/ml、1.0mg/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、15mg/ml、20mg/ml、30mg/ml、40mg/ml、50mg/ml或100mg/ml的所需脂质的混合物。在一些实施方案中,合适的脂质溶液可以含有总浓度在约0.1-100mg/ml、0.5-90mg/ml、1.0-80mg/ml、1.0-70mg/ml、1.0-60mg/ml、1.0-50mg/ml、1.0-40mg/ml、1.0-30mg/ml、1.0-20mg/ml、1.0-15mg/ml、1.0-10mg/ml、1.0-9mg/ml、1.0-8mg/ml、1.0-7mg/ml、1.0-6mg/ml或1.0-5mg/ml范围内的所需脂质的混合物。在一些实施方案中,合适的脂质溶液可以含有总浓度为至多约100mg/ml、90mg/ml、80mg/ml、70mg/ml、60mg/ml、50mg/ml、40mg/ml、30mg/ml、20mg/ml或10mg/ml的所需脂质的混合物。

[0345] 任何所需脂质可以任何适用于包封mRNA的比率混合。在一些实施方案中,合适的脂质溶液含有所需脂质的混合物,所述所需脂质包括阳离子脂质、辅助脂质(例如,非阳离子脂质和/或胆固醇脂质)和/或PEG化的脂质。在一些实施方案中,合适的脂质溶液含有所需脂质的混合物,所述所需脂质包括一种或多种阳离子脂质、一种或多种辅助脂质(例如,非阳离子脂质和/或胆固醇脂质)和一种或多种PEG化的脂质。在一些实施方案中,合适的脂质溶液含有所需脂质的混合物,所述所需脂质包括一种或多种中性脂质、一种或多种辅助脂质和一种或多种PEG化的脂质。

[0346] 在一些实施方案中,可以将用于制备本发明的纳米颗粒调配物的空的(即,不含mRNA的)预先形成的脂质纳米颗粒调配物在约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%或约50%的海藻糖溶液中稳定地冷冻。在一些实施方案中,将mRNA添加至空的脂质纳米颗粒中可以产生不需要任何下游纯化或加工并且可以以冷冻形式稳定地储存的最终调配物。

[0347] mRNA-LNP的形成

[0348] 如本文所用,用于形成mRNA负载的脂质纳米颗粒(mRNA-LNP)的方法与术语“mRNA包封”或其语法变体可互换使用。在一些实施方案中,通过将mRNA溶液与脂质溶液混合来形成mRNA-LNP,其中在混合之前,将mRNA溶液和/或脂质溶液加热至高于环境温度的预定温度(参见2015年7月2日提交的标题为“Encapsulation of messenger RNA”的美国专利申请序列号14/790,562,以及2014年7月2日提交的临时美国专利申请序列号62/020,163,这些专利申请的公开内容据此整体并入)。

[0349] 通常,任何所需脂质可以以适用于形成mRNA-LNP的任何比率混合。在一些实施方案中,合适的脂质溶液含有所需脂质的混合物,所述所需脂质包括阳离子脂质、辅助脂质

(例如,非阳离子脂质和/或胆固醇脂质)和/或PEG化的脂质。在一些实施方案中,合适的脂质溶液含有所需脂质的混合物,所述所需脂质包括一种或多种阳离子脂质、一种或多种辅助脂质(例如,非阳离子脂质和/或胆固醇脂质)和一种或多种PEG化的脂质。在一些实施方案中,合适的脂质溶液含有所需脂质的混合物,所述所需脂质包括一种或多种中性脂质、一种或多种辅助脂质和一种或多种PEG化的脂质。

[0350] 在一些实施方案中,将mRNA溶液和预先形成的脂质纳米颗粒溶液混合到溶液中,使得mRNA变成被包封在脂质纳米颗粒中。这种溶液也被称为调配物或包封溶液。用于通过将预先形成的脂质纳米颗粒与mRNA混合来包封mRNA的方法先前已描述于以WO2018/089801公布的于2017年11月10日作为PCT/US17/61113提交的早期发明中;以及同时提交的美国专利申请序列号15/809,68中,两者的标题均为"Improved Process of Preparing mRNA-Loaded Lipid Nanoparticles"。本申请的全部内容在此以引用的方式并入。

[0351] 合适的调配物或包封溶液包括溶剂,诸如乙醇。例如,合适的调配物或包封溶液包括约10%乙醇、约15%乙醇、约20%乙醇、约25%乙醇、约30%乙醇、约35%乙醇或约40%乙醇。在一些实施方案中,合适的调配物或包封溶液包括溶剂,诸如异丙醇。例如,合适的调配物或包封溶液包括约10%异丙醇、约15%异丙醇、约20%异丙醇、约25%异丙醇、约30%异丙醇、约35%异丙醇或约40%异丙醇。

[0352] 在一些实施方案中,合适的调配物或包封溶液包括溶剂,诸如二甲基亚砜。例如,合适的调配物或包封溶液包括约10%二甲基亚砜、约15%二甲基亚砜、约20%二甲基亚砜、约25%二甲基亚砜、约30%二甲基亚砜、约35%二甲基亚砜或约40%二甲基亚砜。

[0353] 在一些实施方案中,合适的调配物或包封溶液也可以含有缓冲剂或盐。示例性的缓冲剂可以包括HEPES、硫酸铵、碳酸氢钠、柠檬酸钠、乙酸钠、磷酸钾和磷酸钠。示例性的盐可以包括氯化钠、氯化镁和氯化钾。在一些实施方案中,可以将用于制备这种新型纳米颗粒调配物的空的预先形成的脂质纳米颗粒调配物在10%海藻糖溶液中稳定地冷冻。

[0354] 在一些实施方案中,在添加mRNA期间不存在乙醇、柠檬酸盐缓冲液和其他去稳定剂,并且因此所述调配物不需要任何进一步的下游加工。在一些实施方案中,通过此新颖方法制备的脂质纳米颗粒调配物包含海藻糖溶液中的预先形成的脂质纳米颗粒。缺乏去稳定剂和海藻糖溶液的稳定性增加了按比例增加调配物和生产包封mRNA的脂质纳米颗粒的容易度。

[0355] mRNA溶液

[0356] 可以在溶液中提供mRNA以与脂质溶液混合,使得可以将mRNA包封在脂质纳米颗粒中。合适的mRNA溶液可以是含有待以低于1mg/ml的各种浓度包封的mRNA的任何水性溶液。例如,合适的mRNA溶液可以含有浓度为或小于约0.01mg/ml、0.02mg/ml、0.03mg/ml、0.04mg/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mRNA。

[0357] 通常,合适的mRNA溶液还可以含有缓冲剂和/或盐。一般来讲,缓冲剂可以包括HEPES、硫酸铵、碳酸氢钠、柠檬酸钠、乙酸钠、磷酸钾和磷酸钠。在一些实施方案中,缓冲剂的合适浓度可以在约0.1mM至100mM、0.5mM至90mM、1.0mM至80mM、2mM至70mM、3mM至60mM、4mM至50mM、5mM至40mM、6mM至30mM、7mM至20mM、8mM至15mM或9至12mM的范围内。在一些实施

方案中,缓冲剂的合适浓度为或大于约0.1mM、0.5mM、1mM、2mM、4mM、6mM、8mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM或50mM。

[0358] 示例性的盐可包括氯化钠、氯化镁和氯化钾。在一些实施方案中,mRNA溶液中盐的合适浓度可以在约1mM至500mM、5mM至400mM、10mM至350mM、15mM至300mM、20mM至250mM、30mM至200mM、40mM至190mM、50mM至180mM、50mM至170mM、50mM至160mM、50mM至150mM或50mM至100mM的范围内。在合适的mRNA溶液中的盐浓度为或大于约1mM、5mM、10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM或100mM。

[0359] 在一些实施方案中,合适的mRNA溶液可以具有在约3.5-6.5、3.5-6.0、3.5-5.5.、3.5-5.0、3.5-4.5、4.0-5.5、4.0-5.0、4.0-4.9、4.0-4.8、4.0-4.7、4.0-4.6或4.0-4.5范围内的pH。在一些实施方案中,合适的mRNA溶液可以具有等于或不大于约3.5、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.1、6.3和6.5的pH。

[0360] 可以使用各种方法来制备适用于本发明的mRNA溶液。在一些实施方案中,可以将mRNA直接溶解在本文所述的缓冲溶液中。在一些实施方案中,可以通过在与脂质溶液混合以进行包封之前将mRNA储备溶液与缓冲溶液混合来产生mRNA溶液。在一些实施方案中,可以通过在与脂质溶液混合以进行包封之前立即将mRNA储备溶液与缓冲溶液混合来产生mRNA溶液。在一些实施方案中,合适的mRNA储备溶液可以在水中含有浓度为或大于约0.2mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.8mg/ml、1.0mg/ml、1.2mg/ml、1.4mg/ml、1.5mg/ml、or 1.6mg/ml、2.0mg/ml、2.5mg/ml、3.0mg/ml、3.5mg/ml、4.0mg/ml、4.5mg/ml或5.0mg/ml的mRNA。

[0361] 在一些实施方案中,使用泵将mRNA储备溶液与缓冲溶液混合。示例性的泵包括但不限于齿轮泵、蠕动泵和离心泵。

[0362] 通常,以比mRNA储备溶液的流速更大的流速混合缓冲溶液。例如,可以比mRNA储备溶液的流速大至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍或20倍的流速混合缓冲溶液。在一些实施方案中,根据本发明的方法包括以下步骤:首先通过将柠檬酸盐缓冲液与mRNA储备溶液混合来产生mRNA溶液。在某些实施方案中,合适的柠檬酸盐缓冲液含有约10mM柠檬酸盐、约150mM NaCl、pH为约4.5。在一些实施方案中,合适的mRNA储备溶液含有浓度为或大于约1mg/ml、约10mg/ml、约50mg/ml或约100mg/ml的mRNA。

[0363] 在一些实施方案中,以在约100-300ml/分钟、300-600ml/分钟、600-1200ml/分钟、1200-2400ml/分钟、2400-3600ml/分钟、3600-4800ml/分钟或4800-6000ml/分钟之间范围内的流速混合柠檬酸盐缓冲液。在一些实施方案中,以约220ml/分钟、约600ml/分钟、约1200ml/分钟、约2400ml/分钟、约3600ml/分钟、约4800ml/分钟或约6000ml/分钟的流速混合柠檬酸盐缓冲液。

[0364] 在一些实施方案中,以在约10-30ml/分钟、约30-60ml/分钟、约60-120ml/分钟、约120-240ml/分钟、约240-360ml/分钟、约360-480ml/分钟或约480-600ml/分钟之间范围内的流速混合mRNA储备溶液。在一些实施方案中,以约20ml/分钟、约40ml/分钟、约60ml/分钟、约80ml/分钟、约100ml/分钟、约200ml/分钟、约300ml/分钟、约400ml/分钟、约500ml/分钟或约600ml/分钟的流速混合mRNA储备溶液。

[0365] 在一些实施方案中,以在约100-6000ml/分钟(例如,约100-300ml/分钟、300-600ml/分钟、600-1200ml/分钟、1200-2400ml/分钟、2400-3600ml/分钟、3600-4800ml/分

钟、4800-6000ml/分钟或60-420ml/分钟)之间范围内的流速混合缓冲溶液。在一些实施方案中,以为或大于约60ml/分钟、100ml/分钟、140ml/分钟、180ml/分钟、220ml/分钟、260ml/分钟、300ml/分钟、340ml/分钟、380ml/分钟、420ml/分钟、480ml/分钟、540ml/分钟、600ml/分钟、1200ml/分钟、2400ml/分钟、3600ml/分钟、4800ml/分钟或6000ml/分钟的流速混合缓冲溶液。

[0366] 在一些实施方案中,以在约10-600ml/分钟(例如,约5-50ml/分钟、约10-30ml/分钟、约30-60ml/分钟、约60-120ml/分钟、约120-240ml/分钟、约240-360ml/分钟、约360-480ml/分钟或约480-600ml/分钟)之间范围内的流速混合mRNA储备溶液。在一些实施方案中,以为或大于约5ml/分钟、10ml/分钟、15ml/分钟、20ml/分钟、25ml/分钟、30ml/分钟、35ml/分钟、40ml/分钟、45ml/分钟、50ml/分钟、60ml/分钟、80ml/分钟、100ml/分钟、200ml/分钟、300ml/分钟、400ml/分钟、500ml/分钟或600ml/分钟的流速混合mRNA储备溶液。

[0367] 在一些实施方案中,使用泵系统将预先形成的脂质纳米颗粒和mRNA混合。在一些实施方案中,泵系统包含无脉冲流量泵。在一些实施方案中,泵系统是齿轮泵。在一些实施方案中,合适的泵是蠕动泵。在一些实施方案中,合适的泵是离心泵。在一些实施方案中,使用泵系统的方法是大规模进行的。例如,在一些实施方案中,所述方法包括使用如本文所述的泵将至少约1mg、5mg、10mg、50mg、100mg、500mg或1000mg mRNA的溶液与预先形成的脂质纳米颗粒的溶液混合,以产生包封在脂质纳米颗粒中的mRNA。在一些实施方案中,将mRNA与预先形成的脂质纳米颗粒混合的过程提供了根据本发明的组合物,所述组合物含有至少约1mg、5mg、10mg、50mg、100mg、500mg或1000mg的包封的mRNA。

[0368] 在一些实施方案中,以在约25-75ml/分钟、约75-200ml/分钟、约200-350ml/分钟、约350-500ml/分钟、约500-650ml/分钟、约650-850ml/分钟或约850-1000ml/分钟的范围内的流速混合包含预先形成的脂质纳米颗粒的溶液。在一些实施方案中,以约50ml/分钟、约100ml/分钟、约150ml/分钟、约200ml/分钟、约250ml/分钟、约300ml/分钟、约350ml/分钟、约400ml/分钟、约450ml/分钟、约500ml/分钟、约550ml/分钟、约600ml/分钟、约650ml/分钟、约700ml/分钟、约750ml/分钟、约800ml/分钟、约850ml/分钟、约900ml/分钟、约950ml/分钟或约1000ml/分钟的流速混合包含预先形成的脂质纳米颗粒的溶液。

[0369] 在一些实施方案中,将mRNA以在约25-75ml/分钟、约75-200ml/分钟、约200-350ml/分钟、约350-500ml/分钟、约500-650ml/分钟、约650-850ml/分钟或约850-1000ml/分钟范围内的流速混合在溶液中。在一些实施方案中,将mRNA以约50ml/分钟、约100ml/分钟、约150ml/分钟、约200ml/分钟、约250ml/分钟、约300ml/分钟、约350ml/分钟、约400ml/分钟、约450ml/分钟、约500ml/分钟、约550ml/分钟、约600ml/分钟、约650ml/分钟、约700ml/分钟、约750ml/分钟、约800ml/分钟、约850ml/分钟、约900ml/分钟、约950ml/分钟或约1000ml/分钟的流速混合在溶液中。

[0370] 在一些实施方案中,使用泵系统进行将包封mRNA的脂质纳米颗粒与预先形成的脂质颗粒组合的步骤。可使用泵进行此类组合。在一些实施方案中,以在约25-75ml/分钟、约75-200ml/分钟、约200-350ml/分钟、约350-500ml/分钟、约500-650ml/分钟、约650-850ml/分钟或约850-1000ml/分钟范围内的流速将包封mRNA的脂质纳米颗粒与预先形成的脂质纳米颗粒混合。在一些实施方案中,将mRNA以约50ml/分钟、约100ml/分钟、约150ml/分钟、约200ml/分钟、约250ml/分钟、约300ml/分钟、约350ml/分钟、约400ml/分钟、约450ml/分钟、

约500ml/分钟、约550ml/分钟、约600ml/分钟、约650ml/分钟、约700ml/分钟、约750ml/分钟、约800ml/分钟、约850ml/分钟、约900ml/分钟、约950ml/分钟或约1000ml/分钟的流速混合在溶液中。

[0371] 在一些实施方案中,在不存在任何泵的情况下进行脂质纳米颗粒和mRNA的混合。

[0372] 在一些实施方案中,根据本发明的方法包括将一种或多种溶液加热(即,将来自热源的热量施加至溶液)至高于环境温度的温度(或维持在高于环境温度的温度下)的步骤,所述一种或多种溶液是包含预先形成的脂质纳米颗粒的溶液、包含mRNA的溶液和包含脂质纳米颗粒包封的mRNA的混合溶液。在一些实施方案中,所述方法包括在混合步骤之前加热mRNA溶液和预先形成的脂质纳米颗粒溶液中的一者或两者的步骤。在一些实施方案中,所述方法包括在混合步骤期间加热以下中的一种或多种:包含预先形成的脂质纳米颗粒的溶液、包含mRNA的溶液和包含脂质纳米颗粒包封的mRNA的溶液。在一些实施方案中,所述方法包括在混合步骤之后加热脂质纳米颗粒包封的mRNA的步骤。在一些实施方案中,一种或多种溶液被加热到的温度(或一种或多种溶液所维持的温度)为或大于约30℃、37℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃或70℃。在一些实施方案中,将一种或多种溶液加热到的温度在约25-70℃、约30-70℃、约35-70℃、约40-70℃、约45-70℃、约50-70℃或约60-70℃的范围内。在一些实施方案中,一种或多种溶液被加热到的高于环境温度的温度为约65℃。

[0373] 在一些实施方案中,根据本发明的方法包括将包含预先形成的脂质纳米颗粒的溶液、包含mRNA的溶液和包含脂质纳米颗粒包封的mRNA的混合溶液中的一种或多种维持在环境温度下(即,不将来自热源的热量施加至溶液)。在一些实施方案中,所述方法包括在混合步骤之前将mRNA溶液和预先形成的脂质纳米颗粒溶液中的一者或两者维持在环境温度下的步骤。在一些实施方案中,所述方法包括在混合步骤期间将以下中的一种或多种维持在环境温度下:包含预先形成的脂质纳米颗粒的溶液、包含mRNA的溶液和包含脂质纳米颗粒包封的mRNA的溶液。在一些实施方案中,所述方法包括在混合步骤之后将脂质纳米颗粒包封的mRNA维持在环境温度下的步骤。在一些实施方案中,一种或多种溶液所维持的环境温度为或小于约35℃、30℃、25℃、20℃或16℃。在一些实施方案中,一种或多种溶液所述维持的环境温度在约15-35℃、约15-30℃、约15-25℃、约15-20℃、约20-35℃、约25-35℃、约30-35℃、约20-30℃、约25-30℃或约20-25℃的范围内。在一些实施方案中,一种或多种溶液所维持的环境温度为20-25℃。

[0374] 在一些实施方案中,根据本发明的方法包括在环境温度下进行以下步骤:将包含预先形成的脂质纳米颗粒的溶液和包含mRNA的溶液混合以形成包封mRNA的脂质纳米颗粒。

[0375] 在一些实施方案中,大于约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的纯化的纳米颗粒具有小于约150nm(例如,小于约145nm、约140nm、约135nm、约130nm、约125nm、约120nm、约115nm、约110nm、约105nm、约100nm、约95nm、约90nm、约85nm、约80nm、约75nm、约70nm、约65nm、约60nm、约55nm、或约50nm)的尺寸。在一些实施方案中,基本上所有的纯化纳米颗粒都具有小于150nm(例如,小于约145nm、约140nm、约135nm、约130nm、约125nm、约120nm、约115nm、约110nm、约105nm、约100nm、约95nm、约90nm、约85nm、约80nm、约75nm、约70nm、约65nm、约60nm、约55nm、或约50nm)的尺寸。在一些实施方案中,大于约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的纯化纳米颗粒具有在50-150nm范围内的尺寸。在一些实施方案中,基本上所有的纯化纳米颗粒具

有在50-150nm范围内的尺寸。在一些实施方案中,大于约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的纯化纳米颗粒具有在80-150nm范围内的尺寸。在一些实施方案中,基本上所有的纯化纳米颗粒具有在80-150nm范围内的尺寸。

[0376] 在一些实施方案中,根据本发明的方法导致大于约90%、95%、96%、97%、98%或99%的包封率。在一些实施方案中,根据本发明的方法导致大于约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的mRNA回收率。

[0377] 在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以20:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10或1:20的比率组合。将脂质纳米颗粒组合的方法如上文所述用于将脂质纳米颗粒与mRNA混合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以20:1的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以19:1的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以15:1的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以10:1的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以9:1的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以8:1的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以7:1的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以6:1的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以5:1的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以4:1的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以3:1的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以2:1的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以1:1的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以1:2的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以1:3的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以1:4的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以1:5的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以1:6的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以1:7的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以1:8的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以1:9的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以1:10的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以1:12的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先形成的脂质颗粒以1:15的比率组合。在一些实施方案中,包封mRNA的脂质纳米颗粒与方法的步骤(b)中的预先

形成的脂质颗粒以1:20的比率组合。

[0378] 纯化

[0379] 在一些实施方案中,纯化和/或浓缩空的预先形成的脂质纳米颗粒或mRNA-LNP。可以使用各种纯化方法。在一些实施方案中,通过切向流过滤(TFF)方法纯化脂质纳米颗粒。在一些实施方案中,通过基于重力的正向流过滤(NFF)纯化脂质纳米颗粒。在一些实施方案中,通过任何其他合适的过滤方法纯化脂质纳米颗粒。在一些实施方案中,通过离心纯化脂质纳米颗粒。在一些实施方案中,通过色谱方法纯化脂质纳米颗粒。

[0380] 药物调配物和治疗用途

[0381] 包含mRNA-LNP的组合物可以在所需缓冲液例如PBS中配制。

[0382] 根据本发明的方法产生具有较高效力和功效的mRNA-LNP组合物,从而允许更低的剂量,从而使治疗指数向正方向移动。在一些实施方案中,根据本发明的方法产生具有小粒度(例如,小于150nm)的均质mRNA-LNP。

[0383] 因此,本发明提供包含本文所述的mRNA-LNP的组合物。在一些实施方案中,组合物中大多数的纯化纳米颗粒(即大于约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的纯化纳米颗粒)具有小于约150nm(例如,约145nm、约140nm、约135nm、约130nm、约125nm、约120nm、约115nm、约110nm、约105nm、约100nm、约95nm、约90nm、约85nm或约80nm)的尺寸。在一些实施方案中,基本上所有的mRNA-LNP都具有小于约150nm(例如,约145nm、约140nm、约135nm、约130nm、约125nm、约120nm、约115nm、约110nm、约105nm、约100nm、约95nm、约90nm、约85nm或约80nm)的尺寸。具有小于100nm的尺寸的脂质纳米颗粒是特别合适的,因为它们可以穿透肝脏穿孔并进入肝细胞。类似地,具有约100nm或更小的尺寸的脂质纳米颗粒容易雾化,并且当使用雾化施用于受试者时可以深入渗透到肺中。

[0384] 另外,通过本发明的方法获得了具有窄的粒度范围的更均匀的纳米颗粒。例如,在本发明提供的组合物中,大于约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的纳米颗粒具有在约75-150nm(例如,约75-145nm、约75-140nm、约75-135nm、约75-130nm、约75-125nm、约75-120nm、约75-115nm、约75-110nm、约75-105nm、约75-100nm、约75-95nm、约75-90nm或75-85nm)范围内的尺寸。在一些实施方案中,基本上所有的纯化纳米颗粒具有在约75-150nm(例如,约75-145nm、约75-140nm、约75-135nm、约75-130nm、约75-125nm、约75-120nm、约75-115nm、约75-110nm、约75-105nm、约75-100nm、约75-95nm、约75-90nm或75-85nm)范围内的尺寸。

[0385] 在一些实施方案中,本发明提供的组合物中的纳米颗粒的分散度或分子尺寸异质性量度(PDI)为小于约0.23(例如,小于约0.23、0.22、0.21、0.20、0.19、0.18、0.17、0.16、0.15、0.14、0.13、0.12、0.11、0.10、0.09或0.08)。在特定实施方案中,PDI小于约0.16。

[0386] 在一些实施方案中,根据本发明的组合物含有至少约1mg、5mg、10mg、100mg、500mg或1000mg的包封的mRNA。在一些实施方案中,根据本发明的方法导致大于约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的mRNA回收率。

[0387] 在一些实施方案中,本发明的组合物中的mRNA保持大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的完整性。在一些实施方案中,mRNA具有100%的完整性。

[0388] 在一些实施方案中,调配根据本发明的组合物以便将特定剂量的组合施用于受试

者。在一些实施方案中,以约5mg/kg mRNA或小于5mg/kg mRNA(即,小于4mg/kg mRNA、小于3mg/kg、小于2mg/kg、1.0mg/kg、0.6mg/kg、0.5mg/kg、0.3mg/kg、0.016mg/kg、0.05mg/kg和0.016mg/kg的mRNA)的剂量浓度调配如本文所述的mRNA脂质纳米颗粒的组合物。在一些实施方案中,以小于4mg/kg mRNA脂质纳米颗粒的剂量浓度调配如本文所述的mRNA脂质纳米颗粒的组合物。在一些实施方案中,以小于3mg/kg mRNA脂质纳米颗粒的剂量浓度调配如本文所述的mRNA脂质纳米颗粒的组合物。在一些实施方案中,以小于2mg/kg mRNA脂质纳米颗粒的剂量浓度调配如本文所述的mRNA脂质纳米颗粒的组合物。在一些实施方案中,以小于1mg/kg mRNA脂质纳米颗粒的剂量浓度调配如本文所述的mRNA脂质纳米颗粒的组合物。在一些实施方案中,以小于0.6mg/kg mRNA脂质纳米颗粒的剂量浓度调配如本文所述的mRNA脂质纳米颗粒的组合物。在一些实施方案中,以小于0.5mg/kg mRNA脂质纳米颗粒的剂量浓度调配如本文所述的mRNA脂质纳米颗粒的组合物。在一些实施方案中,以小于0.3mg/kg mRNA脂质纳米颗粒的剂量浓度调配如本文所述的mRNA脂质纳米颗粒的组合物。在一些实施方案中,以小于0.2mg/kg mRNA脂质纳米颗粒的剂量浓度调配如本文所述的mRNA脂质纳米颗粒的组合物。在一些实施方案中,以小于0.1mg/kg mRNA脂质纳米颗粒的剂量浓度调配如本文所述的mRNA脂质纳米颗粒的组合物。在一些实施方案中,以小于0.0.08mg/kg mRNA脂质纳米颗粒的剂量浓度调配如本文所述的mRNA脂质纳米颗粒的组合物。在一些实施方案中,以小于0.06mg/kg mRNA脂质纳米颗粒的剂量浓度调配如本文所述的mRNA脂质纳米颗粒的组合物。在一些实施方案中,以小于0.0.05mg/kg mRNA脂质纳米颗粒的剂量浓度调配如本文所述的mRNA脂质纳米颗粒的组合物。在一些实施方案中,以小于0.01mg/kg mRNA脂质纳米颗粒的剂量浓度调配如本文所述的mRNA脂质纳米颗粒的组合物。

[0389] 在某些实施方案中,实现治疗效果所需的mRNA的量降低至少约10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、95%或99%。在某些实施方案中,实现治疗效果所需的多核苷酸的量降低至少二倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍、十二倍、十五倍、二十倍或二十五倍或更多。

[0390] 因此,在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码肽或多肽的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述治疗组合物用于递送至人类受试者或治疗人类受试者。在一些实施方案中,包含纯化mRNA的治疗组合物用于递送至受试者肺部或肺细胞中。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备治疗组合物的方法,所述治疗组合物包含编码在受试者中可能是缺陷的或无功能的内源蛋白的纯化mRNA。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备治疗组合物的方法,所述治疗组合物包含编码在受试者中可能是缺陷的或无功能的内源蛋白的纯化mRNA。

[0391] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码肽或多肽的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述治疗组合物用于递送至或治疗受试者的肺或肺细胞。在某些实施方案中,本发明可用于制备编码囊性纤维化跨膜传导调节因子CFTR的mRNA的方法。CFTR mRNA被递送至需要用于治疗囊性纤维化的治疗组合物的受试者的肺部。

[0392] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码肽或多肽的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述治疗组合物用于递送至或治疗受试者的肝脏或肝细胞。此类肽和多肽可包括与尿素循环障碍相关的、与溶酶体贮积症相关的、与糖原贮积症相关的、与氨基酸代谢紊乱相关的、与脂质代谢或纤维化紊乱相关的、与甲基丙二酸血症相关或与任何其他代

谢紊乱相关的那些,对于所述代谢紊乱,以富集的全长mRNA递送至或治疗肝脏或肝细胞提供治疗有益效果。

[0393] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码与尿素循环障碍相关的蛋白质的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码精氨琥珀酸合成酶1蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码氨基甲酰磷酸合成酶I蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码精氨琥珀酸裂合酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码精氨酸酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。

[0394] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码与溶酶体贮积症相关的蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码α半乳糖苷酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码葡萄糖脑苷脂酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码异氰酸酯-2-硫酸酯酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码艾杜糖苷酸酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码N-乙酰基-α-D-葡糖胺苷酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码乙酰肝素N-硫酸酯酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码半乳糖胺-6硫酸酯酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码β-半乳糖苷酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码溶酶体脂肪酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备治疗组合物的方法,所述治疗组合物包含编码芳基硫酸酯酶B(N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸酯酶)蛋白的纯化mRNA。在某些实施方案中,本发明提供了用于生产包含编码转录因子EB(TFEB)的纯化mRNA的治疗组合物的方法。

[0395] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码与糖原贮积症相关的蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码酸性α-葡糖苷酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码葡萄糖-6-磷酸酶(G6PC)蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码肝糖原磷酸化酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码肌肉磷酸甘油酸突变酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码糖原解支化酶的纯化mRNA的治疗组合物的方法。

[0396] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码与氨基酸代谢相关的蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码苯丙氨酸羟化酶的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码戊二酰-CoA脱氢酶的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码丙酰基-CoA羧化酶的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施

方案中,本发明提供了用于制备包含编码草酸酶丙氨酸-乙醛酸氨基转移酶的纯化mRNA的治疗组合物的方法。

[0397] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码与脂质代谢或纤维化疾病相关的蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码mTOR抑制剂的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码ATPase磷脂转运8B1(ATP8B1)蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码一种或多种NF-κB抑制剂的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述抑制剂诸如I-κBα、干扰素相关的发育调节剂1(IFRD1)和Sirtuin 1(SIRT1)中的一种或多种。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码PPAR-γ蛋白或活性变体的纯化mRNA的治疗组合物的方法。

[0398] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码与甲基丙二酸血症相关的蛋白质的纯化mRNA的治疗组合物的方法。例如,在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码甲基丙二酰辅酶A突变酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码甲基丙二酰辅酶A差向异构酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。

[0399] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述治疗组合物递送至肝脏或治疗肝脏可以提供治疗有益效果。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码ATP7B蛋白(也被称为Wilson病蛋白)的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码胆色素原脱氨酶的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码一种或多种凝固酶的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述凝固酶诸如因子VIII、因子IX、因子VII和因子X。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码人血色素沉着症(HFE)蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。

[0400] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码肽或多肽的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述治疗组合物用于递送至或治疗受试者的心血管疾病或心血管细胞。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码血管内皮生长因子A蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码松弛素蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码骨形态发生蛋白-9蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码骨形态发生蛋白-2受体蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。

[0401] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码肽或多肽的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述治疗组合物用于递送至或治疗受试者的肌肉或肌肉细胞。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码肌营养不良蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码人源线粒体蛋白(frataxin)的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码肽或多肽的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述治疗组合物用于递送至或治疗受试者的心肌或心肌细胞。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码调节肌肉组织或肌肉细胞中钾通道和钠通道中的一者或两者的蛋白质的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码调节肌肉组织或肌肉细胞中Kv7.1通道的蛋白质的

纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码调节肌肉组织或肌肉细胞中Nav1.5通道的蛋白质的纯化mRNA的治疗组合物的方法。

[0402] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码肽或多肽的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述治疗组合物用于递送至或治疗受试者的神经系统或神经系统细胞。例如,在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码存活运动神经元1蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。例如,在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码存活运动神经元2蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码人源线粒体蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码ATP结合盒亚家族D成员1(ABCD1)蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码CLN3蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。

[0403] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码肽或多肽的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述治疗组合物用于递送至或治疗受试者的血液或骨髓或者血细胞或骨髓细胞。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码β球蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码布鲁顿酪氨酸激酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码一种或多种凝固酶的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述凝固酶诸如因子VIII、因子IX、因子VII和因子X。

[0404] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码肽或多肽的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述治疗组合物用于递送至或治疗受试者的肾脏或肾脏细胞。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码IV型胶原α5链(COL4A5)蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。

[0405] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码肽或多肽的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述治疗组合物用于递送至或治疗受试者的眼或眼细胞。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码ATP结合盒亚家族A成员4(ABCA4)蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码视黄醛壳素蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码视网膜色素上皮特异性65kDa(RPE65)蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码290kDa的中心体蛋白(CEP290)的纯化mRNA的治疗组合物的方法。

[0406] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码肽或多肽的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述治疗组合物用于向受试者或受试者的细胞递送疫苗或用疫苗治疗。例如,在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码来自诸如病毒之类的传染物的抗原的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码来自流感病毒的抗原的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码来自呼吸道合胞病毒的抗原的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码来自狂犬病病毒的抗原的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码来自巨细胞病毒的抗原的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码来自

轮状病毒的抗原的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码来自肝炎病毒的抗原的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述肝炎病毒诸如甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒或丙型肝炎病毒。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码来自人乳头瘤病毒的抗原的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码来自单纯疱疹病毒的抗原的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述单纯疱疹病毒诸如单纯疱疹病毒1或单纯疱疹病毒2。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码来自人免疫缺陷病毒的抗原的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述人免疫缺陷病毒诸如1型人免疫缺陷病毒或2型人免疫缺陷病毒。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码来自人间质肺炎病毒的抗原的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码来自人副流感病毒的抗原的纯化mRNA的治疗组合物的方法,所述人副流感病毒诸如1型人副流感病毒、2型人副流感病毒或3型人副流感病毒。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码来自疟疾病毒的抗原的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码来自寨卡病毒的抗原的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码来自基孔肯雅病毒的抗原的纯化mRNA的治疗组合物的方法。

[0407] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含纯化mRNA的治疗组合物的方法,该纯化mRNA编码与受试者的癌症相关的抗原或从受试者的癌细胞中鉴定的抗原。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含纯化mRNA的治疗组合物的方法,该纯化mRNA编码从受试者自身的癌细胞确定的抗原,即提供个性化的癌症疫苗。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码从突变KRAS基因表达的抗原的纯化mRNA的治疗组合物的方法。

[0408] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码抗体的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,抗体可以是双特异性抗体。在某些实施方案中,抗体可以是融合蛋白的一部分。在一些实施方案中,所述方法的步骤(b)中的两个独立的mRNA-LNP包含编码抗体轻链和重链的mRNA。在一些实施方案中,本发明的mRNA-LNP组合物可包括含有不同脂质组成的不相同LNP和包封编码抗体轻链或重链的mRNA的组合。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码针对OX40的抗体的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码针对VEGF的抗体的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码针对组织坏死因子α的抗体的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码针对CD3的抗体的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码针对CD19的抗体的纯化mRNA的治疗组合物的方法。

[0409] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码免疫调节剂的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码白介素12的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码白介素23的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码白介素36γ的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含纯化mRNA的治疗组合物的方法,该纯化mRNA编码一种或多种干扰素基因(STING)蛋白刺激物的组成型活性变体。

[0410] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码核酸内切酶的纯化mRNA的治

疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含纯化mRNA的治疗组合物的方法,该纯化mRNA编码RNA指导的DNA核酸内切酶蛋白,诸如Cas 9蛋白。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码大范围核酸酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码转录激活因子样效应子核酸酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码锌指核酸酶蛋白的纯化mRNA的治疗组合物的方法。

[0411] 在某些实施方案中,本发明提供了用于制备包含编码用于治疗眼睛疾病的纯化mRNA的治疗组合物的方法。在一些实施方案中,所述方法用于制备包含编码视网膜劈裂蛋白的纯化mRNA的治疗组合物。

[0412] 实施例

[0413] 虽然已根据某些实施方案特异性地描述了本发明的某些化合物、组合物和方法,但以下实施例仅用于说明本发明,且不打算对其进行限制。虽然已根据某些实施方案特异性地描述了本发明的某些化合物、组合物和方法,但以下实施例仅用于说明本发明,且不打算对其进行限制。

[0414] 除非另外说明,否则下述实施例中所述的mRNA-LNP测试制品含有采用一种或多种阳离子脂质、一种或多种辅助脂质(例如,非阳离子脂质,诸如DEPE或DOPE)、一种或多种PEG化的脂质和任选地一种或多种固醇(诸如设计成包封mRNA的胆固醇)包封在具有多种比率的多组分脂质混合物中的mRNA。

[0415] 实施例1.mRNA的制备

[0416] mRNA的体外转录

[0417] 除非另有描述,否则使用T7聚合酶或SP6聚合酶经由体外转录(IVT)合成mRNA。简而言之,在SP6聚合酶IVT反应中,对于每克转录的mRNA,用无RNase的水制备反应,所述反应含有20mg线性化的双链DNA质粒和RNA聚合酶特异性启动子、SP6 RNA聚合酶、RNase抑制剂、焦磷酸酶、5mM NTP、10mM DTT和反应缓冲液(10x-250mM Tris-HCl,pH 7.5,20mM亚精胺,50mM NaCl),然后在37℃下温育60min。然后通过添加DNase I和DNase I缓冲液(10x-100mM Tris-HCl、5mM $MgCl_2$和25mM $CaCl_2$,pH 7.6)以促进用于纯化的制剂中双链DNA模板的消化来淬灭反应。

[0418] mRNA的5’加帽

[0419] 除非另有描述,否则IVT转录的mRNA通过包括帽结构作为IVT反应的一部分或在随后的酶促步骤中在其5’末端上进行加帽。对于作为IVT反应的一部分的加帽,帽类似物可以作为第一个“碱基”掺入新生RNA链中。帽类似物可以是Cap 0、Cap1、Cap 2、$^{m6}A_m$或非天然帽。或者,可以例如通过使用鸟苷酸转移酶添加5’N^7-甲基鸟苷酸Cap 0结构并使用2’O-甲基转移酶在倒数第二个核苷酸的2’O位置处添加甲基产生Cap 1结构而在IVT后酶促修饰未加帽和纯化的体外转录(IVT)mRNA以包括帽,如Fechter,P.;Brownlee,G.G.“Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins”J.Gen.Virology 2005,86,1239-1249所述。

[0420] mRNA的3’加尾

[0421] 除非另有描述,否则IVT转录的mRNA通过在线性化质粒中包括尾巴模板(其作为IVT反应的一部分使mRNA加尾)或在随后的酶促步骤中在其3’末端上进行加尾。对于作为

IVT反应的一部分的加尾,将聚T或类似的加尾特征掺入pDNA模板中,使得作为IVT过程的一部分在mRNA上形成聚A尾部或类似的适当尾。或者,可以在IVT反应之后,例如使用聚A聚合酶,将聚A尾以酶促方式添加到IVT产生的mRNA的3’末端中。

[0422] 实施例2.脂质纳米颗粒(LNP)的制备和mRNA的包封

[0423] 根据方法B进行LNP制备和mRNA在包含化合物3作为阳离子脂质的LNP中的包封。方法B进一步描述于美国公开专利申请号US2018153822中,所述公开专利申请用于所有目的以引用的方式并入本文。如上所述,LNP制剂是多组分脂质混合物,其包含一种或多种阳离子脂质、一种或多种辅助脂质(例如,非阳离子脂质,诸如DEPE或DOPE)、一种或多种PEG化的脂质以及一种或多种固醇,诸如设计成包封如实施例1中所述获得的mRNA的胆固醇。

[0424] 如本文所用,方法A是指其中LNP由脂质的多组分混合物形成,并且mRNA在单个步骤中包封在形成LNP的那些中的常规方法。

[0425] 方法B是指通过将预先形成的LNP与mRNA混合来包封mRNA的方法。首先通过在不存在mRNA的情况下将溶解在溶剂如乙醇中的多组分脂质混合物与柠檬酸盐缓冲液瞬时混合来制备预先形成的LNP。两股流的混合导致空脂质纳米颗粒的形成,这是一个自组装过程。所得的调配物在含有醇的柠檬酸盐缓冲液中提供了空脂质纳米颗粒,将其进行缓冲液交换(例如,通过切向流过滤(TFF))以在10%重量/体积海藻糖溶液缓冲液中提供空脂质纳米颗粒。然后,混合水溶液中的空脂质纳米颗粒和mRNA以形成包封在脂质纳米颗粒内的mRNA。

[0426] 具体地,为了制备空脂质纳米颗粒,以表2-1中描述的比率使用DEPE或DOPE作为辅助脂质,连同化合物3作为阳离子脂质,DMG-PEG2K用作PEG修饰的脂质和胆固醇。

[0427] 表2-1.使用DEPE与DOPE的脂质纳米颗粒形成

[0428]

测试制品	mRNA	LNP辅助脂质	LNP脂质摩尔比(化合物3:DMG-PEG2K:胆固醇:辅助脂质)	N/P比	粒度(nm)	多分散指数(PDI)	包封%
1	EPO	DOPE	40:3:25:32	4	n/a	n/a	n/a
2	EPO	DEPE	40:3:25:32	4	152	0.14	68.7

[0429] 令人惊讶的是,发现不能使用DOPE作为非阳离子辅助脂质来配制具有化合物3作为阳离子脂质的这些多组分脂质混合物,但当使用DEPE代替DOPE作为非阳离子辅助脂质时形成稳定的脂质体。

[0430] 实施例3.用DEPE增强LNP中mRNA的体内产生

[0431] 该实施例说明使用包含DEPE作为辅助脂质的LNP的LNP包封的mRNA的效价出人意料地增加。

[0432] 如实施例1中所述合成编码EPO的mRNA。使用如实施例2中所述的方法B,将mRNA包封到包含不同辅助脂质但其他方面相同的LNP中(参见下表3-1)。具体地,每种包封mRNA的LNP包含不同的辅助脂质,但包含相同的阳离子脂质(化合物1)、相同的PEG修饰的脂质(DMG-PEG2K)、相同的固醇化合物(胆固醇)、相同摩尔比的那些脂质、相同的mRNA(EPO mRNA)、相同的N/P比=4(即,阳离子脂质与mRNA的摩尔比)、相同的mRNA浓度(0.2mg/mL),并且根据相同方法(方法B)制备。所得mRNA-LNP的特征提供于表3-1中。

[0433] 表3-1.EPO mRNA-LNP的特征

[0434]

测试制品	mRNA	LNP辅助脂质	LNP脂质摩尔比（化合物1:DMG-PEG2K:胆固醇:辅助脂质）	N/P比	浓度mg/mL	粒度（nm）	多分散指数（PDI）	包封%
1	EPO	DOPE	40:3:25:32	4	0.2	112	0.144	92.5
2	EPO	DLOPE	40:3:25:32	4	0.2	107	0.146	91.3
3	EPO	POPE	40:3:25:32	4	0.2	121	0.145	96.5
4	EPO	DEPE	40:3:25:32	4	0.2	120	0.129	98.4

[0435] 通过尾静脉注射(n＝5,CD-1小鼠6-8周龄)以1mg/kg mRNA的剂量以5mL/kg的剂量体积向小鼠静脉内施用包含包封在具有不同辅助脂质(表3-1中的1-4)的LNP中的mRNA的四种测试制品中的每一种。在施用后6小时,通过剪尾收集中期全血。在施用后24小时,对所有动物实施安乐死,随后进行胸廓切开术和终末血液采集。根据制造商说明,通过ELISA试剂盒(R&D系统目录号DEP00)测定血清样本中的人促红素(hEPO)水平。另外,根据标准技术,通过ELISA测量血清ALT和AST水平。EPO蛋白表达和ALT/AST结果分别在表3-2中提供并且在图1和图2中以图形方式描绘。

[0436] 表3-2.实施例3的体内实验计划

[0437]

测试制品	LNP辅助脂质	给药后6小时mRNA的蛋白质表达ug/mL（标准偏差）	给药后24小时mRNA的蛋白质表达ug/mL（标准偏差）	给药后24小时的ALT U/L（标准偏差）	给药后24小时的AST U/L（标准偏差）
1	DOPE	8.30（3.45）	4.44（2.09）	41.9（4.6）	87.0（8.9）
2	DLOPE	7.92（4.59）	2.61（0.72）	31.9（8.3）	93.4（12.3）
3	POPE	8.65（3.40）	4.45（1.56）	38.8（8.2）	106.8（5.4）
4	DEPE	25.23（10,45）	13.75（7.95）	40.3（5.6）	95.1（8.8）

[0438] 如表3-2和图1中所示,与来自包含其他辅助脂质但在其他方面相同的mRNA LNP的蛋白质表达相比,包含DEPE作为辅助脂质的mRNA LNP提供了显著更高的体内蛋白质表达。具体地,在给药后六小时,包含DEPE的mRNA LNP提供了体内蛋白质表达,其在相同时间点增强至超过100％,即高于来自包含除DEPE以外的辅助脂质(例如DOPE、DLOPE或POPE)的mRNA LNP的蛋白质表达的两倍以上。类似地,在给药后24小时,包含DEPE的mRNA LNP提供了体内蛋白质表达,其在相同时间点增强至超过100％,即高于来自包含除DEPE以外的辅助脂质(例如DOPE、DLOPE或POPE)的mRNA LNP的蛋白质表达的两倍以上。

[0439] 此外,还如表3-2和图2中所示,对于所有mRNA LNP,无论辅助脂质如何,给药后24小时的ALT和AST水平基本上相似,表明包含DEPE作为辅助脂质的mRNA LNP与包含除DEPE之

外的辅助脂质(例如,DOPE、DLOPE或POPE)的mRNA LNP具有相似的安全性和耐受性,同时显著更有效。

[0440] 实施例4.使用DEPE或DOPE作为辅助脂质制备脂质纳米颗粒(LNP)

[0441] 该实施例说明,相对于包含(DOPE)作为辅助脂质的常规脂质体,在包封mRNA的脂质纳米颗粒(mRNA-LNP)调配物中使用DEPE作为辅助脂质,可在体内提供最多两倍以上的mRNA的蛋白质表达。还观察到,与具有DOPE作为辅助脂质的相同mRNA-LNP相比,具有DEPE作为辅助脂质的mRNA-LNP提供增加的包封效率。值得注意的是,在包含不同阳离子脂质的多种mRNA-LNP中观察到这种增强的表达和这种增强的包封效率。

[0442] 在这些研究中,编码OTC的mRNA被包封在包含DEPE或DOPE作为辅助脂质和表4中列出的各种阳离子脂质的LNP中。表4中描述的每种阳离子脂质包含具有C_{10}、C_{12}、$_C$14或C_{16}长度的四个烷基链,如每种脂质的描述中结尾两位数字所示。阳离子脂质:DMG-PEG2K:胆固醇:辅助脂质的摩尔比为约40:3:25:32。对于研究的体内部分,经由尾静脉注射将1mg/kg每种配制的mRNA-LNP递送至小鼠。在24小时,处死小鼠,并且从每只小鼠的肝匀浆评价编码OTC的mRNA的体内表达。下表中提供平均蛋白质表达。

[0443] 表4.使用DEPE与DOPE作为辅助脂质的LNP的蛋白质表达和包封效率

[0444]

阳离子脂质	蛋白表达（ng/mL）		包封%	
	DOPE	DEPE	DOPE	DEPE
cDD-TE-4-E10	86.44	516.96	87.49	95.53
cDD-TE-4-E12	96.39	764.91	85.73	91.6
cDD-TE-4-E14	81.85	69.05	71.84	70.9
cHse-E-2-E10	128.892	100.37	82	96.74
cHse-E-2-E12	226.887	248.68	81	99.33
cHse-E-3-E10	1706.15	4462.86	84.8	96.9
cHse-E-3-E12	1411.27	3190.32	85.11	97.52
cHse-E-3-E14	聚集体	1617.88	聚集体	90.6
cHse-E-3-E16	低包封率	135.68	低包封率	67.4

[0445] 表4证实,与DOPE相比,当使用DEPE作为辅助脂质时,包封效率更高。另外,令人惊讶地观察到,具有某些类脂质作为阳离子脂质的多组分脂质混合物甚至不能使用DOPE配制,但当使用DEPE作为辅助脂质时形成稳定的脂质体。表4还证实,与包含DOPE辅助脂质但其他方面相同的mRNA LNP的蛋白质表达相比,包含DEPE作为辅助脂质的mRNA LNP显示出显著更高的体内蛋白质表达。当各种阳离子脂质用于LNP中时,情况也是如此。

[0446] 实施例5.与其他辅助脂质相比,通过使用DEPE作为辅助脂质来增强体内蛋白质表达

[0447] 该实施例说明,相对于使用其他类型的辅助脂质的脂质纳米颗粒,在包封mRNA的脂质纳米颗粒(mRNA-LNP)中使用DEPE作为辅助脂质可以增加体内mRNA的表达,跨越用于制备mRNA-LNP的多种处理的包封。

[0448] 在这些研究中,编码OTC的mRNA以摩尔脂质比包封于LNP中(N/P＝4),所述LNP包含DMG-PEG-2000作为PEG修饰的脂质、cDD-TE-4-E12作为阳离子脂质、胆固醇以及多种不同辅助脂质之一,包括DEPE,如表5-1、表5-2、表5-3和表5-4所示。通过使用四种不同包封工艺中

的一种来制备每种mRNA-LP调配物:用于表5-1中所述调配物的常规工艺、用于表5-2中所述调配物的再混合工艺、用于表5-3中所述调配物的逐步上升再混合工艺或用于表5-4中所述调配物的逐步下降再混合工艺。评估mRNA-LPP的LNP尺寸、多分散性和包封百分比,每个结果在下表中给出。对于研究的体内部分,经由尾静脉注射将1mg/kg每种配制的mRNA-LNP递送至小鼠(n=5)。在24小时,处死小鼠,并且从每只小鼠的肝匀浆评价编码OTC的mRNA的体内表达。下表中提供平均蛋白质表达。

[0449] 表5-1.经由常规包封辅助剂制备的具有不同辅助脂质的mRNA-LNP

[0450]

脂质	脂质比率(PEG:阳离子脂质:胆固醇:辅助脂质)	尺寸(nm)	PdI	包封(%)	蛋白质表达(ng/mg)平均值	蛋白质表达(ng/mg)SD
DEPE	**3:40:25:32**	**78**	**0.17**	**98**	**1454**	**755**
DEPE	**2:40:25:33**	**76**	**0.15**	**100**	**1634**	**522**
DOPE	1.5:40:26.5:32	80	0.09	99	618	440
PE20:4	3:40:25:32	81	0.22	92	0	0

[0451] 表5-2.经由再混合包封制备的具有不同辅助脂质的mRNA-LNP

[0452]

辅助脂质	脂质比率(PEG:阳离子脂质:胆固醇:辅助脂质)	尺寸(nm)	PdI	包封(%)	蛋白质表达(ng/mg)平均值	蛋白质表达(ng/mg)SD
DEPE	**3:40:25:32**	**120**	**0.17**	**92**	**765**	**290**
DOPE	3:40:25:32	111	0.19	86	96	41
16:0-18:2 PE	3:40:25:32	115	0.15	64	0	0
16:0-20:4 PE	3:40:25:32	109	0.14	68	0	0
16:0-22:6 PE	3:40:25:32	95	0.13	79	0	0
DOCP	3:40:25:32	80	0.194	83	0	0
DOCPe	3:40:25:32	110	0.24	65	0	0
PE20:4	3:40:25:32	105	0.16	97	0	0

[0453] 表5-3.经由逐步上升再混合包封制备的具有不同辅助脂质的mRNA-LNP

[0454]

辅助脂质	脂质比率(PEG:阳离子脂质:胆固醇:辅助脂质)	尺寸(nm)	PdI	包封(%)	蛋白质表达(ng/mg)平均值	蛋白质表达(ng/mg)SD
DEPE	**3:40:25:32**	**124**	**0.12**	**96**	**1258**	**342**
DOPE	3:40:27:30	138	0.18	93	579	302
18:0-18:2 PE	3:40:25:32	115	0.12	87	0	0
18:0-20:4 PE	3:40:25:32	87	0.12	79	0	0

[0455] 表5-4.经由逐步下降再混合包封制备的具有不同辅助脂质的mRNA-LNP

[0456]

辅助脂质	脂质比率（PEG:阳离子脂质:胆固醇:辅助脂质）	尺寸（nm）	PdI	包封（%）	蛋白质表达（ng/mg）平均值	蛋白质表达（ng/mg）SD
DEPE	**3:40:25:32**	**118**	**0.10**	**96**	**1247**	**223**
DOPE	3:40:27:30	124	0.16	90	527	288
DOCPe	3:40:25:32	115	0.24	64	0	0

[0457] 表5-1、表5-2、表5-3和表5-4各自显示了24小时后包封在LNP中并且递送至小鼠组的mRNA的蛋白质表达水平。如图所示，仅用辅助脂质DOPE或DEPE制备的LNP在不同包封过程中提供蛋白质表达方面的效力。值得注意的是，当使用DEPE作为辅助脂质来制备LNP时，体内蛋白质表达最高，而与用于制备mRNA-LNP的包封方法无关。

[0458] 如本领域技术人员可理解，包含DEPE作为辅助脂质的mRNA LNP的这种显著增强的效力但相当的安全性和功效为递送作为治疗剂的mRNA提供了显著优点。

[0459] 等同形式

[0460] 本领域的技术人员将认识到，或仅仅使用常规实验就能够确定本文描述的本发明的具体实施方案的许多等同形式。本发明的范围并非旨在限于以上说明书，而是如以下权利要求书中所述。

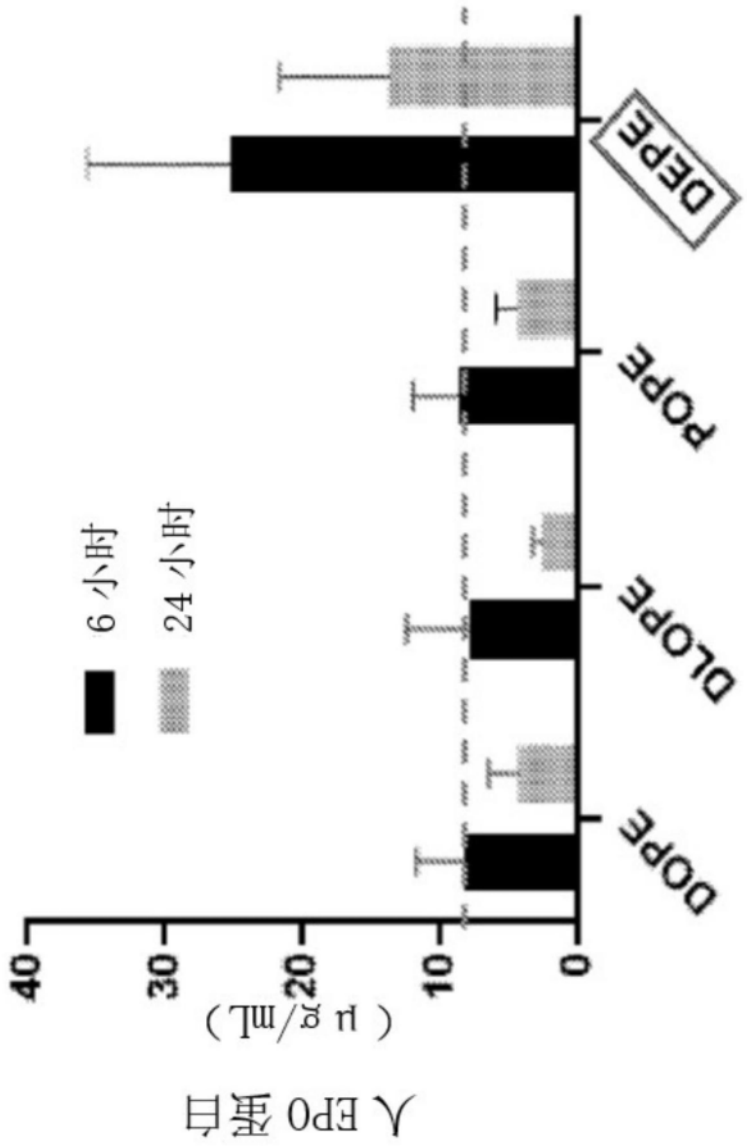


图1

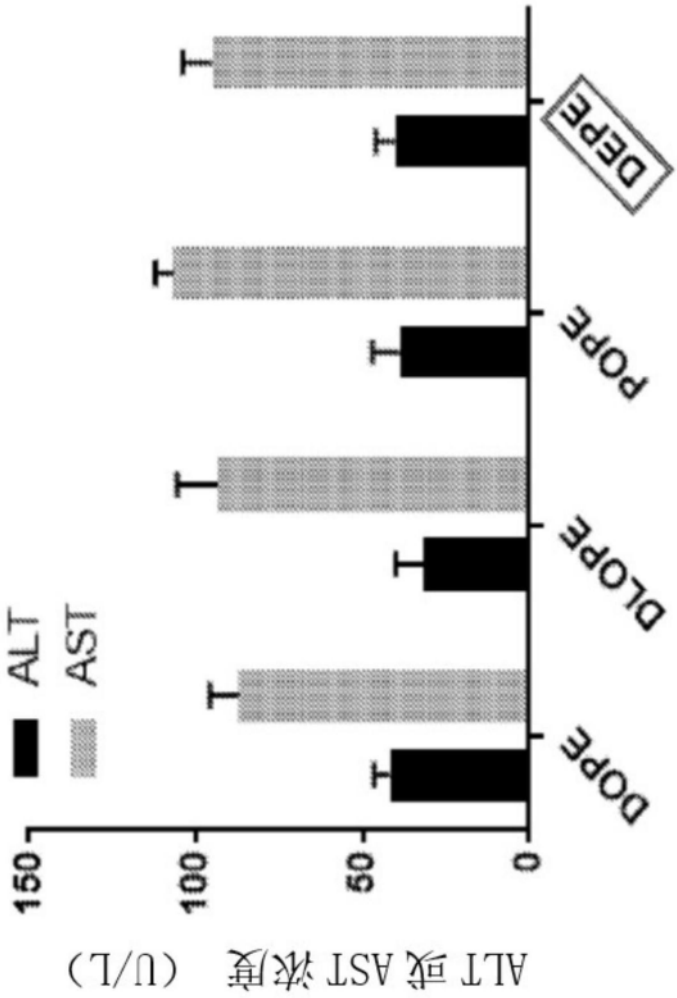


图2