(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117355335 A
(43)申请公布日 2024.01.05

(21)申请号 202180069932.X
(22)申请日 2021.08.23
(30)优先权数据
63/068,944 2020.08.21 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.04.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/047203 2021.08.23
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/040641 EN 2022.02.24
(71)申请人 得克萨斯大学体系董事会
地址 美国得克萨斯
(72)发明人 D·J·西格瓦特 S·刘 X·于 Q·程 T·魏
(74)专利代理机构 北京商专永信知识产权代理事务所(普通合伙) 11400
专利代理师 张函 方挺
(51)Int.Cl.
A61K 45/06(2006.01)

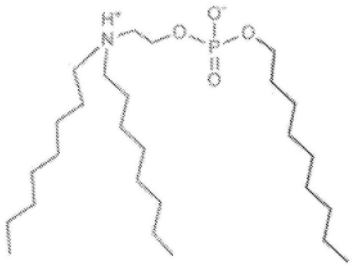
权利要求书5页 说明书47页
序列表2页 附图72页

(54)发明名称

功能性的可电离的磷脂

(57)摘要

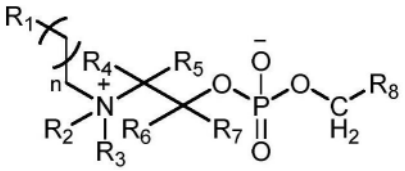
本文提供了可电离的磷脂及其相关的组合物和方法。在某些方面,本文提供的可电离的磷脂可以被配制在含有核酸和一种或多种辅助赋形剂的组合物中。在某些方面,这些组合物也可以与治疗性核酸一起用于治疗疾病或障碍。



9A1P9

CN 117355335 A

1.一种合成的可电离的磷脂,其包含式(I):



式(I);

其中:

R_1选自由以下成员组成的集合:C2-C20未被取代的烷基、C2-C20被取代的烷基、C2-C20未被取代的烯基、C2-C20被取代的烯基、C2-C20未被取代的炔基、C2-C20被取代的炔基、C4-C20未被取代的环烷基和C4-C20被取代的环烷基;

R_2和R_3独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C20未被取代的烷基、C1-C20被取代的烷基、C1-C20未被取代的烯基、C1-C20被取代的烯基、C1-C20未被取代的炔基、C1-C20被取代的炔基、C4-C20未被取代的环烷基和C4-C20被取代的环烷基;

R_4、R_5、R_6和R_7独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C8未被取代的烷基、C1-C8被取代的烷基、C1-C8未被取代的烯基、C1-C8被取代的烯基、C1-C8未被取代的炔基和C1-C8被取代的炔基;

R_8选自由以下成员组成的集合:C3-C21未被取代的烷基、C3-C21被取代的烷基、C3-C21未被取代的烯基、C3-C21被取代的烯基、C3-C21未被取代的炔基和C3-C21被取代的炔基;且

n是1-4的整数。

2.根据权利要求1所述的合成的可电离的磷脂,

其中R_1选自由以下成员组成的集合:C2-C16未被取代的烷基、C2-C16被取代的烷基或C4-C12被取代的环烷基;

R_2和R_3独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C16未被取代的烷基、C1-C16被取代的烷基或C4-C16被取代的环烷基;

R_4、R_5、R_6和R_7独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C4未被取代的烷基或C1-C4被取代的烷基;

R_8选自C3-C18未被取代的烷基;且

n是1-3的整数。

3.根据权利要求1所述的合成的可电离的磷脂,

其中R_1是C2-C15未被取代的烷基;

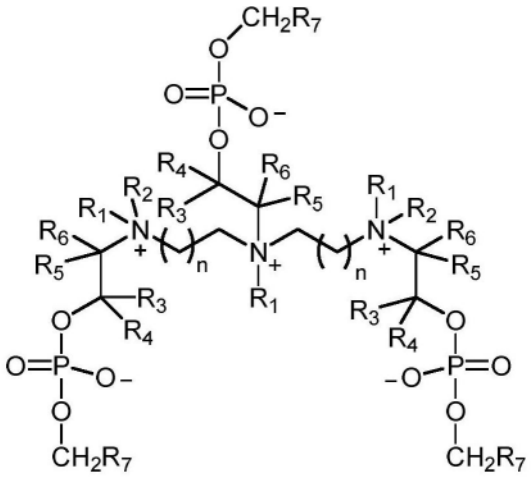
R_2和R_3独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C16被取代的烷基或C4-C16被取代的环烷基;

R_4、R_5、R_6和R_7独立地选自由以下成员组成的集合:H、甲基或乙基;

R_8选自C4-C16未被取代的烷基;且

n是1-2的整数。

4.一种合成的可电离的磷脂,其包含式(II):



式(II);

其中R_1和R_2独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C8被取代的烷基或C1-C8未被取代的烷基;

R_3、R_4、R_5和R_6独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C8未被取代的烷基或C1-C8被取代的烷基;

R_7选自由以下成员组成的集合:C3-C21未被取代的烷基或C3-C21被取代的烷基;且

n是1-4的整数。

5.根据权利要求4所述的合成的可电离的磷脂,

其中R_1和R_2独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C6被取代的烷基或C1-C6未被取代的烷基;

R_3、R_4、R_5和R_6独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C4未被取代的烷基或C1-C4被取代的烷基;

R_7选自由以下成员组成的集合:C3-C18未被取代的烷基或C3-C18被取代的烷基;且

n是1-3的整数。

6.根据权利要求4所述的合成的可电离的磷脂,

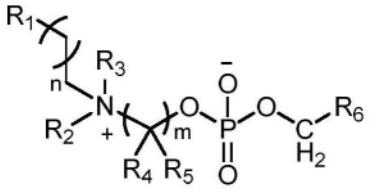
其中R_1和R_2独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C4被取代的烷基或C1-C4未被取代的烷基;

R_3、R_4、R_5和R_6独立地选自由以下成员组成的集合:H、甲基或乙基;

R_7选自由以下成员组成的集合:C3-C15未被取代的烷基或C3-C15被取代的烷基;且

n是1-2的整数。

7.一种可电离的磷脂,其包含式(III):



式(III);

其中:

R_1选自由以下成员组成的集合:C2-C20未被取代的烷基、C2-C20被取代的烷基、C2-C20

未被取代的烯基、C2-C20被取代的烯基、C2-C20未被取代的炔基、C2-C20被取代的炔基、C4-C20未被取代的环烷基或C4-C20被取代的环烷基；

R_2和R_3独立地选自由以下成员组成的集合：H、C1-C20未被取代的烷基、C1-C20被取代的烷基、C1-C20未被取代的烯基、C1-C20被取代的烯基、C1-C20未被取代的炔基、C1-C20被取代的炔基、C4-C20未被取代的环烷基或C4-C20被取代的环烷基；

R_4和R_5独立地选自由以下成员组成的集合：H、C1-C8未被取代的烷基、C1-C8被取代的烷基、C1-C8未被取代的烯基、C1-C8被取代的烯基、C1-C8未被取代的炔基或C1-C8被取代的炔基；

R_6选自由以下成员组成的集合：C3-C21未被取代的烷基、C3-C21被取代的烷基、C3-C21未被取代的烯基、C3-C21被取代的烯基、C3-C21未被取代的炔基或C3-C21被取代的炔基；

n是1-4的整数；且

m是1-4的整数。

8.根据权利要求7所述的可电离的磷脂，其中R_1选自由以下成员组成的集合：C2-C16未被取代的烷基、C2-C16被取代的烷基、C2-C16未被取代的烯基、C2-C16被取代的烯基、C2-C16未被取代的炔基、C2-C16被取代的炔基、C4-C16未被取代的环烷基或C4-C16被取代的环烷基；

R_2和R_3独立地选自由以下成员组成的集合：H、C1-C16未被取代的烷基、C1-C16被取代的烷基、C1-C16未被取代的烯基、C1-C16被取代的烯基、C1-C16未被取代的炔基、C1-C16被取代的炔基、C4-C16未被取代的环烷基或C4-C16被取代的环烷基；

R_4和R_5独立地选自由以下成员组成的集合：H、C1-C6未被取代的烷基、C1-C6被取代的烷基、C1-C6未被取代的烯基、C1-C6被取代的烯基、C1-C6未被取代的炔基或C1-C6被取代的炔基；

R_6选自由以下成员组成的集合：C3-C18未被取代的烷基、C3-C18被取代的烷基、C3-C18未被取代的烯基、C3-C18被取代的烯基、C3-C18未被取代的炔基或C3-C18被取代的炔基；

n是1-3的整数；且

m是1-3的整数。

9.一种合成的可电离的磷脂，其包含至少一个磷酸酯基团和至少一个两性离子，其中所述至少一个两性离子包含pH可转换的两性离子。

10.根据权利要求9所述的合成的可电离的磷脂，所述磷脂进一步包含疏水结构域。

11.根据权利要求9或权利要求10所述的合成的可电离的磷脂，所述磷脂进一步包含一个或多个疏水尾巴。

12.根据权利要求9-11中的任一项所述的合成的可电离的磷脂，所述磷脂进一步包含至少一个叔胺。

13.根据权利要求9-12所述的合成的可电离的磷脂，其中所述一个或多个疏水尾巴由1个疏水尾巴至10个疏水尾巴组成。

14.根据权利要求9-13中的任一项所述的合成的可电离的磷脂，其中所述一个或多个疏水尾巴中的每一个是烷基尾巴，所述烷基尾巴包含8个碳至16个碳、8个碳至10个碳、9个碳至12个碳、13个碳至16个碳、8个碳至16个碳的烷基链长度或它们的任何组合。

15.根据权利要求9-13中的任一项所述的合成的可电离的磷脂，其中所述一个或多个

疏水尾巴中的至少一个是烷基尾巴,所述烷基尾巴包含8个碳至16个碳、8个碳至10个碳、9个碳至12个碳、13个碳至16个碳、8个碳至16个碳的烷基链长度或它们的任何组合。

16.一种药物组合物,其包含根据权利要求1-15所述的合成的可电离的磷脂中的任一种。

17.根据权利要求16所述的组合物,所述组合物进一步包含辅助脂质。

18.根据权利要求17所述的组合物,其中所述辅助脂质选自由以下成员组成的集合:两性离子辅助脂质、可电离的阳离子辅助脂质和永久阳离子辅助脂质。

19.根据权利要求17所述的组合物,其中所述辅助脂质选自由以下成员组成的集合:1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、N-甲基双十八烷基胺(MDOA)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)、二甲基双十八烷基溴化铵盐(DDAB)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)和它们的任何组合。

20.根据权利要求16-19中的任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含胆甾醇或胆甾醇衍生物。

21.根据权利要求16-20中的任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油-3-甲氧基(聚(乙二醇-2000))(DMG-PEG2000)。

22.根据权利要求16-21中的任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含55:30:45摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)和胆甾醇。

23.根据权利要求16-21中的任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含25:30:30摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、N-甲基双十八烷基胺(MDOA)和胆甾醇。

24.根据权利要求16-21中的任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含25:30:30摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)和胆甾醇。

25.根据权利要求16-21中的任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含25:30:30摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、5A2-SC8和胆甾醇。

26.根据权利要求16-21中的任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含60:30:40摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、二甲基双十八烷基溴化铵盐(DDAB)和胆甾醇。

27.根据权利要求16-21中的任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含60:30:40摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)和胆甾醇。

28.根据权利要求16-27中的任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含装载物。

29.根据权利要求28所述的组合物,其中所述装载物选自由以下成员组成的集合:活性药物成分、核酸、mRNA、sgRNA、CRISPR/Cas9DNA序列、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化剂样效应物核酸酶(TALEN)、siRNA、miRNA、tRNA、ssDNA、碱基编辑器、肽、蛋白、CRISPR/Cas核糖核蛋白(RNP)复合物和它们的任何组合。

30.根据权利要求16-29中的任一项所述的组合物,所述组合物被配制成用于胃肠外施用、静脉内施用、口服施用、局部施用或它们的任何组合。

31.一种药物组合物,所述组合物包含:

负载有装载物的脂质纳米颗粒(LNP),

其中所述LNP包含:

根据权利要求1-15中的任一项所述的可电离的磷脂;或

一种或多种多尾的可电离的磷脂,所述一种或多种多尾的可电离的磷脂包含pH-可转换的两性离子和三个疏水尾巴。

32.根据权利要求16-31中的任一项所述的药物组合物,其中所述装载物被设置在所述LNP的核心内。

33.根据权利要求16-31中的任一项所述的药物组合物,其中所述一种或多种多尾的可电离的磷脂形成基本上包封所述装载物的纳米颗粒结构。

34.根据权利要求16-33中的任一项所述的药物组合物,其中所述装载物选自由以下成员组成的集合:活性药物成分、核酸、mRNA、sgRNA、CRISPR/Cas9 DNA序列、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化剂样效应物核酸酶(TALEN)、siRNA、miRNA、tRNA、ssDNA、碱基编辑器、肽、蛋白、cirRNA、CRISPR/Cas核糖核蛋白(RNP)复合物和它们的任何组合。

35.一种向受试者递送活性药物成分的方法,所述方法包含给所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求16-34中的任一项所述的药物组合物,其中所述装载物是活性药物成分。

36.一种用于在受试者中的基因编辑的mRNA或mRNA/sgRNA的体内递送方法,所述方法包含给所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求16-34中的任一项所述的药物组合物。

37.一种在受试者的脾、肝和/或肺中造成选择性蛋白表达的方法,所述方法包含给所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求16-34中的任一项所述的药物组合物,其中所述装载物是mRNA。

38.一种方法,其包含给受试者施用根据权利要求13-34中的任一项所述的药物组合物,其用于在所述受试者中进行基因递送、基因编辑、药物递送、mRNA递送、CRISPR/Cas9基因编辑、锌指核酸酶(ZFN)基因编辑、碱基编辑器基因编辑、转录活化剂样效应物核酸酶(TALEN)基因编辑。

39.一种用于在受试者中的组织特异性装载物递送的方法,所述方法包含给所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求16-34中的任一项所述的药物组合物。

40.根据权利要求39所述的方法,其中所述装载物包含mRNA、CRISPR/Cas或它们的任何组合。

功能性的可电离的磷脂

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年8月21日提交的标题为“FUNCTIONAL IONIZABLE PHOSPHOLIPIDS(功能性的可电离的磷脂)”的美国临时专利申请号63/068,944的优先权,该申请特别通过引用整体并入本文。

[0003] 对政府支持的致谢

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院颁布的授权号EB025192下在政府支持下完成。政府享有本发明的某些权利。

[0005] 通过引用并入以电子方式提供的序列表

[0006] 序列表的电子版本与本文一起提交,其内容通过引用整体并入。电子文件为2千字节大小,且标题为106546-697678_UTSD 3759_SequenceListing_ST25.txt。

[0007] 背景

[0008] 领域

[0009] 本公开内容涉及功能性的、合成的可电离的磷脂,包含所公开的合成的可电离的磷脂的药物组合物,以及用于在受试者中的基因编辑、选择性蛋白表达、mRNA递送和/或活性药物成分递送,以及其它用途的方法。本公开内容还涉及药物组合物,其包括负载装载物(cargo)的脂质纳米颗粒(LNP)。

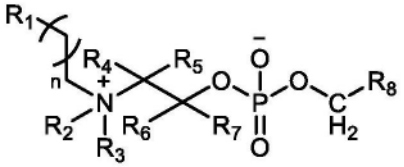
[0010] 相关技术的讨论

[0011] 基因组编辑技术具有许多合乎需要的治疗特征,所述特征为设计精准医学治疗物来治疗人疾病提供了独特的机会。但是,克服生物屏障仍然是将这些治疗剂有效递送至其期望的细胞和组织靶标的一个主要挑战。目前,脂质纳米颗粒(LNP)是用于跨细胞膜递送基因编辑治疗物的最常用媒介物。尽管用于基因递送的最有效的LNP依赖于可电离的胺作为关键的生理化学参数,但许多LNP仍然具有差的胞内体逃逸(endosomal escape)能力,从而导致大量基因治疗装载物无法发挥作用。因此,本领域需要用于递送基因编辑治疗物的改进的LNP。

[0012] 概述

[0013] 提供以下简要描述以指示本文公开的主题的性质。虽然下文描述了本公开内容的某些方面,但该概述无意限制本公开内容的范围。

[0014] 本公开内容至少部分地基于用于纳米颗粒和脂质纳米颗粒(LNP)中的合成的可电离的磷脂的鉴定。在某些实施方案中,合成的可电离的磷脂可以包含式(I):

[0015] 

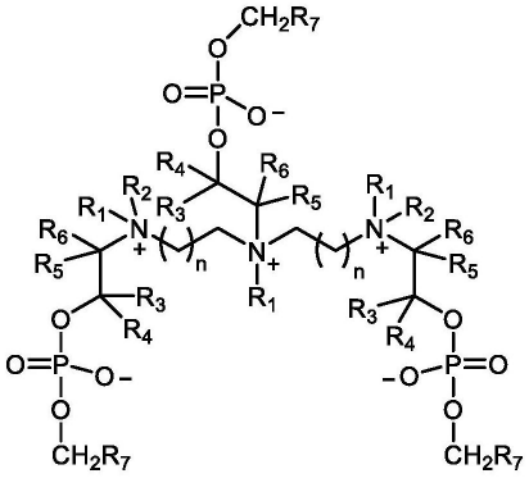
式(I);

[0016] 其中:R_1选自由以下成员组成的集合:C2-C20未被取代的烷基、C2-C20被取代的烷基、C2-C20未被取代的烯基、C2-C20被取代的烯基、C2-C20未被取代的炔基、C2-C20被取代

的炔基、C4-C20未被取代的环烷基和C4-C20被取代的环烷基；R_2和R_3独立地选自由以下成员组成的集合：H、C1-C20未被取代的烷基、C1-C20被取代的烷基、C1-C20未被取代的烯基、C1-C20被取代的烯基、C1-C20未被取代的炔基、C1-C20被取代的炔基、C4-C20未被取代的环烷基和C4-C20被取代的环烷基；R_4、R_5、R_6和R_7独立地选自由以下成员组成的集合：H、C1-C8未被取代的烷基、C1-C8被取代的烷基、C1-C8未被取代的烯基、C1-C8被取代的烯基、C1-C8未被取代的炔基和C1-C8被取代的炔基；R_8选自由以下成员组成的集合：C3-C21未被取代的烷基、C3-C21被取代的烷基、C3-C21未被取代的烯基、C3-C21被取代的烯基、C3-C21未被取代的炔基和C3-C21被取代的炔基；且n是1-4的整数。在某些实施方案中，本文中合成的可电离的磷脂可以包含式(I)：其中R_1选自由以下成员组成的集合：C2-C16未被取代的烷基、C2-C16被取代的烷基或C4-C12被取代的环烷基；R_2和R_3独立地选自由以下成员组成的集合：H、C1-C16未被取代的烷基、C1-C16被取代的烷基或C4-C16被取代的环烷基；R_4、R_5、R_6和R_7独立地选自由以下成员组成的集合：H、C1-C4未被取代的烷基或C1-C4被取代的烷基；R_8选自C3-C18未被取代的烷基；且n是1-3的整数。在某些实施方案中，本文中合成的可电离的磷脂可以包含式(I)：其中R_1是C2-C15未被取代的烷基；R_2和R_3独立地选自由以下成员组成的集合：H、C1-C16被取代的烷基或C4-C16被取代的环烷基；R_4、R_5、R_6和R_7独立地选自由以下成员组成的集合：H、甲基或乙基；R_8选自C4-C16未被取代的烷基；且n是1-2的整数。

[0017] 在某些实施方案中，本文中合成的可电离的磷脂可以包含式(II)：

[0018]



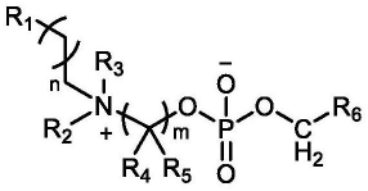
式(II)；

[0019] 其中R_1和R_2独立地选自由以下成员组成的集合：H、C1-C8被取代的烷基或C1-C8未被取代的烷基；R_3、R_4、R_5和R_6独立地选自由以下成员组成的集合：H、C1-C8未被取代的烷基或C1-C8被取代的烷基；R_7选自由以下成员组成的集合：C3-C21未被取代的烷基或C3-C21被取代的烷基；且n是1-4的整数。在某些实施方案中，本文中合成的可电离的磷脂可以包含式(II)：其中R_1和R_2独立地选自由以下成员组成的集合：H、C1-C6被取代的烷基或C1-C6未被取代的烷基；R_3、R_4、R_5和R_6独立地选自由以下成员组成的集合：H、C1-C4未被取代的烷基或C1-C4被取代的烷基；R_7选自由以下成员组成的集合：C3-C18未被取代的烷基或C3-C18被取代的烷基；且n是1-3的整数。在某些实施方案中，本文中合成的可电离的磷脂可以包含式(II)：其中R_1和R_2独立地选自由以下成员组成的集合：H、C1-C4被取代的烷基或C1-C4未被取代的烷基；R_3、R_4、R_5和R_6独立地选自由以下成员组成的集合：H、甲基或乙基；R_7选自由以下成

员组成的集合:C3-C15未被取代的烷基或C3-C15被取代的烷基;且n是1-2的整数。

[0020] 在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以包含式(II):其中R_1和R_2独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C8被取代的烷基、C1-C8未被取代的烷基、C2-C8未被取代的烯基、C2-C8被取代的烯基、C2-C8未被取代的炔基或C2-C8被取代的炔基;R_3、R_4、R_5和R_6独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C8被取代的烷基、C1-C8未被取代的烷基、C1-C8未被取代的烯基、C2-C8被取代的烯基、C2-C8未被取代的炔基或C2-C8被取代的炔基;R_7选自由以下成员组成的集合:C3-C21未被取代的烷基、C3-C21被取代的烷基、C3-C21未被取代的烯基、C3-C21被取代的烯基、C3-C21未被取代的炔基或C3-C21被取代的炔基;且n是1-4的整数。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以包含式(II):其中R_1和R_2独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C6被取代的烷基、C1-C6未被取代的烷基、C2-C6未被取代的烯基、C2-C6被取代的烯基、C2-C6未被取代的炔基或C2-C6被取代的炔基;R_3、R_4、R_5和R_6独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C4未被取代的烷基、C1-C4被取代的烷基、C2-C4未被取代的烯基、C2-C4被取代的烯基、C2-C4未被取代的炔基或C2-C4被取代的炔基;R_7选自由以下成员组成的集合:C3-C18未被取代的烷基或C3-C18被取代的烷基;且n是1-3的整数。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以包含式(II):其中R_1和R_2独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C4被取代的烷基或C1-C4未被取代的烷基;R_3、R_4、R_5和R_6独立地选自由以下成员组成的集合:H、甲基或乙基;R_7选自由以下成员组成的集合:C3-C15未被取代的烷基或C3-C15被取代的烷基;且n是1-2的整数。

[0021] 在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以包含式(III):

[0022] 

式(III);

[0023] 其中:R_1选自由以下成员组成的集合:C2-C20未被取代的烷基、C2-C20被取代的烷基、C2-C20未被取代的烯基、C2-C20被取代的烯基、C2-C20未被取代的炔基、C2-C20被取代的炔基、C4-C20未被取代的环烷基或C4-C20被取代的环烷基;R_2和R_3独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C20未被取代的烷基、C1-C20被取代的烷基、C1-C20未被取代的烯基、C1-C20被取代的烯基、C1-C20未被取代的炔基、C1-C20被取代的炔基、C4-C20未被取代的环烷基或C4-C20被取代的环烷基;R_4和R_5独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C8未被取代的烷基、C1-C8被取代的烷基、C1-C8未被取代的烯基、C1-C8被取代的烯基、C1-C8未被取代的炔基或C1-C8被取代的炔基;R_6选自由以下成员组成的集合:C3-C21未被取代的烷基、C3-C21被取代的烷基、C3-C21未被取代的烯基、C3-C21被取代的烯基、C3-C21未被取代的炔基或C3-C21被取代的炔基;n是1-4的整数;且m是1-4的整数。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以包含式(III):其中R_1选自由以下成员组成的集合:C2-C16未被取代的烷基、C2-C16被取代的烷基、C2-C16未被取代的烯基、C2-C16被取代的烯基、C2-C16未被取代的炔基、C2-C16被取代的炔基、C4-C16未被取代的环烷基或C4-C16被取代的环烷基;R_2和R_3独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C16未被取代的烷基、C1-C16被取代的烷基、

C1-C16未被取代的烯基、C1-C16被取代的烯基、C1-C16未被取代的炔基、C1-C16被取代的炔基、C4-C16未被取代的环烷基或C4-C16被取代的环烷基;R_4和R_5独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C6未被取代的烷基、C1-C6被取代的烷基、C1-C6未被取代的烯基、C1-C6被取代的烯基、C1-C6未被取代的炔基或C1-C6被取代的炔基;R_6选自由以下成员组成的集合:C3-C18未被取代的烷基、C3-C18被取代的烷基、C3-C18未被取代的烯基、C3-C18被取代的烯基、C3-C18未被取代的炔基或C3-C18被取代的炔基;n是1-3的整数;且m是1-3的整数。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以包含式(III):其中R_1是C2-C15未被取代的烷基;R_2和R_3独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C16被取代的烷基或C4-C16被取代的环烷基;R_4和R_5独立地选自由以下成员组成的集合:H、甲基或乙基;R_6选自C4-C16未被取代的烷基;n是1-2的整数;且m是1-2的整数。

[0024] 在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以包含至少一个磷酸酯基团和至少一个两性离子,其中所述至少一个两性离子包含pH可转换的两性离子和/或不可逆的两性离子。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以进一步包含至少一个叔胺。

[0025] 在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以进一步包含疏水结构域。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以进一步包含一个或多个疏水尾巴(tail)。在某些实施方案中,本文中的合成的可电离的磷脂包含一个或多个疏水尾巴,其可以由一个疏水尾巴组成。在某些实施方案中,本文中的合成的可电离的磷脂包含一个或多个疏水尾巴,其可以由两个疏水尾巴组成。在某些实施方案中,本文中的合成的可电离的磷脂包含一个或多个疏水尾巴,其可以由三个疏水尾巴组成。在某些实施方案中,本文中的合成的可电离的磷脂包含一个或多个疏水尾巴,其可以由四个疏水尾巴组成。在某些实施方案中,本文中的合成的可电离的磷脂包含一个或多个疏水尾巴,其可以由五个疏水尾巴组成。在某些实施方案中,本文中的合成的可电离的磷脂包含一个或多个疏水尾巴,其可以由六个疏水尾巴组成。在某些实施方案中,本文中的合成的可电离的磷脂包含一个或多个疏水尾巴,其可以由七个疏水尾巴组成。在某些实施方案中,本文中的合成的可电离的磷脂包含一个或多个疏水尾巴,其可以由八个疏水尾巴组成。在某些实施方案中,本文中的合成的可电离的磷脂包含一个或多个疏水尾巴,其可以由九个疏水尾巴组成。在某些实施方案中,本文中的合成的可电离的磷脂包含一个或多个疏水尾巴,其可以由十个疏水尾巴组成。

[0026] 在某些实施方案中,本文中包含一个或多个疏水尾巴的合成的可电离的磷脂可以包含一个或多个具有烷基尾巴的疏水尾巴,所述烷基尾巴包含8个碳至16个碳的烷基链长度。在某些实施方案中,本文中包含一个或多个疏水尾巴的合成的可电离的磷脂可以包含一个或多个具有烷基尾巴的疏水尾巴,所述烷基尾巴包含8个碳至10个碳的烷基链长度。在某些实施方案中,本文中包含一个或多个疏水尾巴的合成的可电离的磷脂可以包含一个或多个具有9个碳至12个碳的烷基链长度的疏水尾巴。在某些实施方案中,本文中包含一个或多个疏水尾巴的合成的可电离的磷脂可以包含一个或多个具有13个碳至16个碳的烷基链长度的疏水尾巴。在某些实施方案中,本文中包含一个或多个疏水尾巴的合成的可电离的磷脂可以包含一个或多个具有8个碳至16个碳的烷基链长度的疏水尾巴。在某些实施方案中,本文中包含一个或多个疏水尾巴的合成的可电离的磷脂可以包含一个或多个具有烷基尾巴的疏水尾巴,所述烷基尾巴包含8个碳至10个碳的烷基链长度。在某些实施方案中,本文中包含一个或多个疏水尾巴的合成的可电离的磷脂可以包含一个或多个具有烷基尾巴

的疏水尾巴,所述烷基尾巴包含9个碳至12个碳的烷基链长度。在某些实施方案中,本文中包含一个或多个疏水尾巴的合成的可电离的磷脂可以包含一个或多个具有烷基尾巴的疏水尾巴,所述烷基尾巴包含13个碳至16个碳的烷基链长度。

[0027] 在某些实施方案中,本公开内容提供了药物组合物。在某些实施方案中,本文中的药物组合物可以包含本文中公开的合成的可电离的磷脂中的任一种。

[0028] 在某些实施方案中,本文中的组合物(例如,药物组合物、纳米颗粒、LNP)可以进一步包含至少一种辅助脂质。在某些实施方案中,本文中的组合物可以进一步包含至少一种辅助脂质,其选自由以下成员组成的集合:1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、N-甲基双十八烷基胺(MDOA)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)、二甲基双十八烷基溴化铵盐(DDAB)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)、或它们的任何组合。在某些实施方案中,本文中的组合物可以进一步包含至少一种辅助脂质,其选自由以下成员组成的集合:两性离子辅助脂质、可电离的阳离子辅助脂质、永久阳离子辅助脂质或它们的任何组合。在某些实施方案中,本文中的组合物可以包含两性离子辅助脂质,其可以包含1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。在某些实施方案中,本文中的组合物可以进一步包含至少一种可电离的阳离子辅助脂质,其包含至少一种选自由以下成员组成的集合的脂质:N-甲基双十八烷基胺(MDOA)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)、和它们的任何组合。在某些实施方案中,本文中的组合物可以进一步包含至少一种永久阳离子辅助脂质,其包含至少一种选自由以下成员组成的集合的脂质:二甲基双十八烷基溴化铵盐(DDAB)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)、和它们的任何组合。

[0029] 在某些实施方案中,本文中的组合物可以进一步包含胆甾醇和/或胆甾醇衍生物。在某些实施方案中,本文中的组合物可以进一步包含1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油-3-甲氧基(聚(乙二醇-2000))(DMG-PEG2000)。在某些实施方案中,本文中的组合物可以进一步包含55:30:45摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)和胆甾醇。在某些实施方案中,本文中的组合物可以进一步包含25:30:30摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、N-甲基双十八烷基胺(MDOA)和胆甾醇。在某些实施方案中,本文中的组合物可以进一步包含25:30:30摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)和胆甾醇。在某些实施方案中,本文中的组合物可以进一步包含25:30:30摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、5A2-SC8和胆甾醇。在某些实施方案中,本文中的组合物可以进一步包含60:30:40摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、二甲基双十八烷基溴化铵盐(DDAB)和胆甾醇。在某些实施方案中,本文中的组合物可以进一步包含60:30:40摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)和胆甾醇。在某些实施方案中,本文中的组合物可以进一步包含1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油-3-甲氧基(聚(乙二醇-2000))(DMG-PEG2000)。

[0030] 在某些实施方案中,本文中的组合物可以进一步包含至少一种装载物。在某些实施方案中,本文中的组合物可以进一步包含至少一种装载物,其中所述装载物是mRNA。在某些实施方案中,本文中的组合物可以进一步包含至少一种装载物,其中所述装载物选自由以下成员组成的集合:活性药物成分、核酸、mRNA、sgRNA、CRISPR/Cas9DNA序列、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化剂样效应物核酸酶(TALEN)、siRNA、miRNA、tRNA、ssDNA、碱基编辑器(base editor)、肽、蛋白、CRISPR/Cas核糖核蛋白(RNP)复合物和它们的任何组合。

[0031] 在某些实施方案中,本文中的组合物可以被配制成用于胃肠外施用。在某些实施方案中,本文中的组合物可以被配制成用于静脉内施用。在某些实施方案中,本文中的组合物可以被配制成用于局部施用。

[0032] 在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含负载有装载物的脂质纳米颗粒(LNP),其中所述LNP包含本文中公开的任何可电离的磷脂或本文中公开的一种或多种多尾的可电离的磷脂,其中所述一种或多种多尾的可电离的磷脂包含pH-可转换的两性离子和三个疏水尾巴。

[0033] 在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含一种或多种多尾的可电离的磷脂,所述磷脂包含一个叔胺、一个磷酸酯基团和三个烷基尾巴。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含一种或多种多尾的可电离的磷脂,其中所述三个疏水尾巴或所述三个烷基尾巴可以具有8个碳至16个碳的烷基链长度。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含一种或多种多尾的可电离的磷脂,其中所述三个疏水尾巴或所述三个烷基尾巴可以具有8个碳至10个碳的烷基链长度。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含一种或多种多尾的可电离的磷脂,其中所述三个疏水尾巴或所述三个烷基尾巴可以具有9个碳至12个碳的烷基链长度。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含一种或多种多尾的可电离的磷脂,其中所述三个疏水尾巴或所述三个烷基尾巴可以具有13个碳至16个碳的烷基链长度。

[0034] 在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含装载物,其中所述装载物是mRNA,且其中所述药物组合物提供在肝中的选择性蛋白表达。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含装载物,其中所述装载物是mRNA,且其中所述药物组合物提供在脾中的选择性蛋白表达。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含装载物,其中所述装载物是mRNA,且其中所述药物组合物提供在肺中的选择性蛋白表达。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含装载物,其中所述装载物是mRNA,且其中所述药物组合物提供在皮肤中的选择性蛋白表达。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含装载物,其中所述装载物是mRNA。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含装载物,其中所述装载物被设置在所述LNP的核心内。

[0035] 在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含一种或多种多尾的可电离的磷脂,其中所述一种或多种多尾的可电离的磷脂形成基本上包封所述装载物的纳米颗粒结构。

[0036] 在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以用于在受试者中的基因递送。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以用于在受试者中的基因编辑。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以用于在受试者中的药物递送。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以用于在受试者中的mRNA递送。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以用于在受试者中的CRISPR/Cas9基因编辑。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以用于在受试者中的锌指核酸酶(ZFN)基因编辑。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以用于在受试者中的碱基编辑器基因编辑。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以用于在受试者中的转录活化剂样效应物核酸酶(TALEN)基因编辑。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以用于在受试者中的组织特异性mRNA递送。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以用于在受试者中的组织特

异性CRISPR/Cas9基因编辑。

[0037] 在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种装载物,其中所述至少一种装载物可以选自由以下成员组成的集合:活性药物成分、核酸、mRNA、sgRNA、CRISPR/Cas9 DNA序列、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化剂样效应物核酸酶(TALEN)、siRNA、miRNA、tRNA、ssDNA、碱基编辑器、肽、蛋白、cirRNA、CRISPR/Cas核糖核蛋白(RNP)复合物和它们的任何组合。

[0038] 在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种纳米颗粒。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP,其中所述至少一种LNP进一步包含至少一种辅助脂质。

[0039] 在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP,其中所述至少一种LNP是用于器官选择性递送的多组分LNP,所述多组分LNP包含多尾的可电离的磷脂和一种或多种辅助脂质。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述装载物是mRNA,且其中所述一种或多种辅助脂质可以实现在皮肤、脾、肝和/或肺中的选择性蛋白表达。

[0040] 在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述一种或多种辅助脂质可以选自由以下成员组成的集合:1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、N-甲基双十八烷基胺(MDOA)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)、二甲基双十八烷基溴化铵盐(DDAB)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)和它们的任何组合。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述一种或多种辅助脂质可以选自由以下成员组成的集合:两性离子辅助脂质、可电离的阳离子辅助脂质和永久阳离子辅助脂质。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述两性离子辅助脂质可以包含1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述可电离的阳离子辅助脂质可以包含至少一种选自由以下成员组成的集合的脂质:N-甲基双十八烷基胺(MDOA)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)、5A2-SC8和它们的任何组合。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述永久阳离子辅助脂质可以包含至少一种选自由以下成员组成的集合的脂质:二甲基双十八烷基溴化铵盐(DDAB)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)和它们的任何组合。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述LNP可以进一步包含胆甾醇或胆甾醇衍生物。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述LNP可以进一步包含1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油-3-甲氧基(聚(乙二醇-2000))(DMG-PEG2000)。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述LNP可以包含55:30:45摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)和胆甾醇。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述LNP可以包含25:30:30摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、N-

甲基双十八烷基胺(MDOA)和胆甾醇。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述LNP可以包含25:30:30摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)和胆甾醇。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述LNP可以包含25:30:30摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、5A2-SC8和胆甾醇。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述LNP可以包含60:30:40摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、二甲基双十八烷基溴化铵盐(DDAB)和胆甾醇。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述LNP可以包含60:30:40摩尔比的一种或多种多尾的可电离的磷脂、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)和胆甾醇。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述LNP可以进一步包含1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油-3-甲氧基(聚(乙二醇-2000))(DMG-PEG2000)。

[0041] 在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述LNP可以能够造成装载物从靶细胞中的胞内体释放。

[0042] 在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述药物组合物可以被配制成用于胃肠外施用。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述药物组合物可以被配制成用于胃肠外施用,其中所述胃肠外施用包含选自由以下成员组成的集合的至少一种:皮下施用、皮内施用、腹膜内施用、鞘内施用和肌肉内施用。

[0043] 在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述药物组合物可以被配制成用于静脉内施用。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述药物组合物可以被配制成用于口服施用。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物可以包含至少一种LNP、装载物、一种或多种辅助脂质,其中所述药物组合物可以被配制成用于局部施用。

[0044] 在某些实施方案中,本公开内容提供了向受试者递送活性药物成分的方法。在某些实施方案中,本文中向受试者递送活性药物成分的方法可以包含给所述受试者施用治疗有效量的如在本文中公开的包含装载物的任何药物组合物,其中所述装载物是活性药物成分。

[0045] 在某些实施方案中,本公开内容提供了向受试者递送用于在受试者中的基因编辑的mRNA或mRNA/sgRNA的方法。在某些实施方案中,本文中向受试者递送用于在受试者中的基因编辑的mRNA或mRNA/sgRNA的方法可以包含给所述受试者施用治疗有效量的如在本文中公开的包含装载物的任何药物组合物,其中所述装载物是mRNA。

[0046] 在某些实施方案中,本公开内容提供了在受试者的肝中造成选择性蛋白表达的方法。在某些实施方案中,在受试者的肝中造成选择性蛋白表达的方法可以包含给所述受试者施用治疗有效量的本文中的药物组合物,其中所述装载物可以是mRNA且其中所述三个疏水尾巴或所述三个烷基尾巴可以具有9个碳至12个碳的烷基链长度。在某些实施方案中,本公开内容提供了在受试者的脾中造成选择性蛋白表达的方法。在某些实施方案中,在受试

者的脾中造成选择性蛋白表达的方法可以包含给所述受试者施用治疗有效量的本文中的药物,其中所述装载物可以是mRNA且其中所述三个疏水尾巴或所述三个烷基尾巴可以具有13个碳至16个碳的烷基链长度。在某些实施方案中,本公开内容提供了在受试者的脾、肝、皮肤和/或肺中造成选择性蛋白表达的方法。在某些实施方案中,在受试者的脾、肝、皮肤和/或肺中造成选择性蛋白表达的方法可以包含给所述受试者施用治疗有效量的本文中的药物组合物,其中所述装载物是mRNA。

[0047] 在某些实施方案中,本公开内容提供了用于在受试者中的基因递送的方法,所述方法包含给所述受试者施用治疗有效量的本文中公开的药物组合物。在某些实施方案中,本公开内容提供了用于在受试者中的基因编辑的方法,所述方法包含给所述受试者施用治疗有效量的本文中公开的药物组合物。在某些实施方案中,本公开内容提供了用于在受试者中的药物递送的方法,所述方法包含给所述受试者施用治疗有效量的本文中公开的药物组合物。在某些实施方案中,本公开内容提供了用于在受试者中的RNA递送的方法,所述方法包含给所述受试者施用治疗有效量的本文中公开的药物组合物。在某些实施方案中,本公开内容提供了用于在受试者中的CRISPR/Cas9基因编辑的方法,所述方法包含给所述受试者施用治疗有效量的本文中公开的药物组合物。在某些实施方案中,本公开内容提供了用于在受试者中的锌指核酸酶(ZFN)基因编辑的方法,所述方法包含给所述受试者施用治疗有效量的本文中公开的药物组合物。在某些实施方案中,本公开内容提供了用于在受试者中的碱基编辑器基因编辑的方法,所述方法包含给所述受试者施用治疗有效量的本文中公开的药物组合物。在某些实施方案中,本公开内容提供了用于在受试者中的转录活化剂样效应物核酸酶(TALEN)基因编辑的方法,所述方法包含给所述受试者施用治疗有效量的本文中公开的药物组合物。

[0048] 在某些实施方案中,本公开内容提供了用于在受试者中的组织特异性mRNA递送的方法,所述方法包含给所述受试者施用治疗有效量的本文中公开的药物组合物。在某些实施方案中,本公开内容提供了用于在受试者中的组织特异性CRISPR/Cas9基因编辑的方法,所述方法包含给所述受试者施用治疗有效量的本文中公开的药物组合物。

[0049] 在某些实施方案中,本文中的方法可以包含通过胃肠外施用将本文中公开的任何组合物施用给所述受试者。在某些实施方案中,本文中的方法可以包含通过静脉内施用将本文中公开的任何组合物施用给所述受试者。在某些实施方案中,本文中的方法可以包含通过局部施用将本文中公开的任何组合物施用给所述受试者。

[0050] 在某些实施方案中,本文提供了试剂盒。本文中公开的试剂盒可以与任何组合物一起使用和/或用于实施本文中公开的任何方法。

[0051] 另外的实施方案和特征在随后的描述中进行了部分阐述,并且在检查说明书后对本领域技术人员将变得显而易见或者可以通过本公开内容的实践获知。通过参考形成本公开内容的一部分的说明书的其余部分和附图,可以实现对本公开内容的性质和优点的进一步理解。

[0052] 附图简述

[0053] 专利或申请文件含有至少一幅彩色绘制的图。具有彩图的该专利或专利申请公开文本的复印件将在请求并支付必要的费用后由专利局(the Office)提供。

[0054] 参考以下附图和数据图表将更充分地理解描述,所述附图和数据图表被呈现为本

公开内容的各种实施方案且不应被解释为本公开内容的范围的完整列举,其中:

[0055] 图1A-1D描绘了iPhos脂质的组合文库,所述iPhos脂质经过化学合成和研究,并且其导致阐明了增强的胞内体逃逸作用的物理机制。图1A描绘了有效的iPhos脂质由一个可电离的胺、一个磷酸酯基团和三个疏水烷基尾巴组成;并且在进入酸性胞内体/溶酶体后,叔胺的质子化诱导两性离子头基,其可以容易地插入到膜中。图1B描绘了大多数生物膜磷脂具有两性离子并呈层状相;并且当将iPhos脂质混合并插入到胞内体膜中时,由小离子对头和多个疏水尾巴形成的圆锥形形状使得能够实现六角形相转化。图1C描绘了iPhos的合成途径:将烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子(Pm)缀合到胺(nA)上以得到iPhos(nAxPm);其中在"nAxPm"中的"x"指示在一个胺分子上修饰的Pm分子的数目。图1D描绘了用于iPhos合成的28种胺nA和13种烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物Pm分子的列表。

[0056] 图2A-2E描绘了具有一个pH-可转换的两性离子和三个尾巴的iPhos脂质对于体外萤光素酶mRNA递送最有效。图2A描绘了在IGROV1细胞中iPLNP(50ng mRNA,n=3)的处理后萤光素酶表达的热图。计数RLU>10,000用于命中率计算。图2B描绘了在酸性胞内体环境中具有不同数目的两性离子和尾巴的iPhos的代表性化学结构。图2C描绘了具有单个两性离子和多个两性离子的iPhos的相对命中率。图2D描绘了具有单个两性离子和不同数目的尾巴的iPhos(1A1P4-18A1P16)的相对命中率。图2E描绘了在有效的iPhos(7A1P4-13A1P16)中,起始胺的尾巴长度影响最终的体外效力。

[0057] 图3A-G描绘了胞内体逃逸的模型膜研究,证明了与化学结构相关的iPhos脂质介导的RNA递送的机制。图3A描绘了17A和10A1P10在pH 5.5的溶血;并且两性离子可以显著有益于胞内体逃逸;统计显著性:***,P<0.001;**,P<0.01;*,P<0.05。图3B描绘了9A1P9和10A1P10在不同pH的溶血;统计显著性:***,P<0.001;**,P<0.01;*,P<0.05。图3C描绘了iPLNP在不同pH的溶血;统计显著性:***,P<0.001;**,P<0.01;*,P<0.05。图3D描绘了10A1P10和iPLNP的脂质融合和膜破裂,其在pH 5.5通过FRET测定确定;统计显著性:***,P<0.001;**,P<0.01;*,P<0.05。图3E描绘了在pH 5.5与阴离子胞内体模拟物混合10分钟以后通过FRET表征确定的iPLNP解离;并且单个两性离子显示出比多个两性离子更高的脂质融合和iPLNP解离效率;统计显著性:***,P<0.001;**,P<0.01;*,P<0.05。图3F描绘了在pH 5.5不同时间间隔的10A1P10iPLNP解离,并将数据显示为平均值±SD;n=3。图3G描绘了在pH 5.5不同时间间隔的10A1P10 iPLNP解离;统计显著性:***,P<0.001;**,P<0.01;*,P<0.05。将图3B-G中的数据呈现为平均值±s.d.(n=3个生物学上独立的样品)。

[0058] 图4A-4D描绘了结构-活性研究,其揭示iPhos脂质的化学结构和烷基长度控制着体内效力和器官选择性。图4A描绘了在低Fluc mRNA剂量(0.1mg kg^{-1})的51种iPhos脂质的体内评价;并且在C57BL/6小鼠的静脉内注射后6h记录各种器官的生物发光图像;H:心脏,Lu:肺,Li:肝,K:肾,S:脾。图4B描绘了在有效的10A1P4-12A1P16 iPhos中,在胺侧的疏水链长度显著影响体内mRNA递送效率。图4C描绘了在磷酸酯基团侧具有不同烷基链长度的iPhos在肝中的mRNA表达;并且9-12个碳长度是最有效的。图4D描绘了在磷酸酯基团侧具有不同烷基链长度的iPhos在脾中的mRNA表达;并且13-16个烷基链长度是最有效的。

[0059] 图5A-5N描绘了iPhos是一种优于传统使用的磷脂的平台技术,其可以与不同辅助脂质一起应用于iPLNP中以实现器官选择性RNA递送。图5A描绘了在酸性胞内体环境中iPhos 9A1P9的建议结构。图5B描绘了记录的肝中萤光素酶表达的图像(Fluc mRNA,0.25mg

kg^{-1}),表明iPhos 9A1P9在mRNA递送方面优于基准DOPE和DSPC;H:心脏、Lu:肺、Li:肝、K:肾、S:脾。图5C描绘了记录的肝中萤光素酶表达的量化(Fluc mRNA,0.25mg kg^{-1}),表明iPhos 9A1P9在mRNA递送方面优于基准DOPE和DSPC;将数据显示为平均值±SD;n=3;统计显著性:***,P<0.001;**,P<0.01;*,P<0.05。图5D描绘了含有两性离子辅助脂质的iPLNP,其介导脾中的mRNA表达;并且体内评价表明,具有辅助脂质DOPE的9A1P9 iPLNP在脾中是有效的(Fluc mRNA,0.25mg kg^{-1})。图5E描绘了含有两性离子辅助脂质的iPLNP,其介导在脾中的mRNA表达,并且体内量化表明,具有辅助脂质DOPE的9A1P9 iPLNP在脾中是有效的(Fluc mRNA,0.25mg kg^{-1})。图5F描绘了导致在肝中的mRNA翻译的含有可电离的阳离子辅助脂质的iPLNP,和通过具有不同的可电离的阳离子辅助脂质的9A1P9 iPLNP的Fluc mRNA表达的器官选择性(如所测定的)(Fluc mRNA,对于MDOA和DODAP为0.25mg kg^{-1};对于5A2-SC8为0.05mg kg^{-1})。图5G描绘了导致在肝中的mRNA翻译的含有可电离的阳离子辅助脂质的iPLNP,和通过具有不同的可电离的阳离子辅助脂质的9A1P9 iPLNP的Fluc mRNA表达的量化(如所测定的)(Fluc mRNA,对于MDOA和DODAP为0.25mg kg^{-1};对于5A2-SC8为0.05mg kg^{-1})。图5H描绘了诱导在肺中的mRNA转染的含有永久阳离子辅助脂质的iPLNP,和通过使用永久阳离子辅助脂质DDAB和DOTAP的9A1P9 iPLNP的Fluc mRNA表达的器官图像(如所评价的)(Fluc mRNA,0.25mg kg^{-1})。图5I描绘了诱导在肺中的mRNA转染的含有永久阳离子辅助脂质的iPLNP,和通过使用永久阳离子辅助脂质DDAB和DOTAP的9A1P9 iPLNP的Fluc mRNA表达的量化(如所评价的)(Fluc mRNA,0.25mg kg^{-1})。图5J描绘了能够选择性地在肝或肺中实现Cre mRNA递送的9A1P9 iPLNP和Cre-LoxP小鼠模型的示意图,该模型通过将Cre-重组酶mRNA翻译成Cre蛋白以删除停止来表达tdTomato,用于分别在肝和肺中介导tdTomato表达(Cre mRNA,0.25mg kg^{-1})。图5K描绘了能够选择性地在肝中实现Cre mRNA递送的9A1P9-5A2-SC8 iPLNP。图5L描绘了能够选择性地在肺中实现Cre mRNA递送的9A1P9-DDAB iPLNP。图5M描绘了表现出比阳性对照DLin-MC3-DMA LNP高得多的mRNA递送效率的9A1P9-5A2-SC8 iPLNP和在肝中的萤光素酶表达的图像(如所记录的)(Fluc mRNA,0.05mg kg^{-1})。图5N描绘了表现出比阳性对照DLin-MC3-DMA LNP高得多的mRNA递送效率的9A1P9-5A2-SC8iPLNP和在肝中的萤光素酶表达的量化(如所记录的)(Fluc mRNA,0.05mg kg^{-1});将数据显示为平均值±SD;n=3;统计显著性:***,P<0.001;**,P<0.01;*,P<0.05。

[0060] 图6A-6N描绘了共同递送Cas9 mRNA和sgRNA,从而选择性地在肝和肺中实现CRISPR/Cas9基因编辑的iPLNP。图6A描绘了Cas9mRNA和sgTom1的共同递送的示意图,其删除了停止盒并活化了tdTomato蛋白。图6B描绘了能够特异性地在肝中实现基因编辑的9A1P9-5A2-SC8 iPLNP。图6C描绘了含有Cas9 mRNA和sgTom1的9A1P9-5A2-SC8 iPLNP向Ai9小鼠的静脉内施用后,其中在肝中观察到tdTomato阳性细胞。比例条,50μm。图6D描绘了能够特异性地在肺中实现基因编辑的9A1P9-DDAB iPLNP。图6E描绘的共焦荧光图像显示了在施用9A1P9-DDAB iPLNP之后在肺中的tdTomato阳性细胞。比例条,50μm。图6F描绘了器官选择性的基因编辑的T7E1测定,其中将含有Cas9 mRNA和sgPTEN的9A1P9-5A2-SC8和9A1P9-DDAB iPLNP静脉内施用进C57BL/6小鼠,分别实现在肝和肺中的CRISPR/Cas9基因编辑。对于所有的CRISPR/Cas9基因编辑测定,使用4:1的Cas9 mRNA/sgRNA重量比和0.75mg kg^{-1}的总RNA剂量。图6G描绘了通过受控微流体混合制备的9A1P9-5A2-SC8iPLNP(肝特异性的,Fluc mRNA,0.05mg kg^{-1}),其导致减小的iPLNP尺寸,并保留了效力和器官选择性。图6H描绘

了9A1P9-5A2-SC8iPLNP,其表现出小尺寸并完全保留了精确的器官选择性。图6I描绘了在每次注射之后6小时进行的全身成像,证实了9A1P9-5A2-SC8iPLNP(Fluc mRNA,0.05mg kg^{-1})允许重复给药,而不丧失效力。图6J描绘了在每次注射之后6小时进行的萤光素酶表达的量化,证实了9A1P9-5A2-SC8 iPLNP(Fluc mRNA,0.05mg kg^{-1})允许重复给药,而不丧失效力。图6K-6N描绘了肝标志物测量(BUN(图6K);CREA(图6L);ATL(图6M);和AST(图6N)),证实了9A1P9-5A2-SC8和9A1P9-DDAB iPLNP在体内被良好耐受。将数据呈现为平均值±s.d.,并通过双尾不成对t检验分析统计显著性:****,P<0.0001;***,P<0.001;**,P<0.01;*,P<0.05;NS,P>0.05。所有的数据来自n=3个生物学上独立的小鼠。

[0061] 图7A-7M描绘了烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子P4-P16的^{1}H NMR谱($CDCl_3$)。相应的醇向产物的转化收率分别为90.8%(P4;图7A)、96.8%(P5;图7B)、96.8%(P6;图7C)、96.0%(P7;图7D)、93.0%(P8;图7E)、87.0%(P9;图7F)、93.0%(P10;图7G)、95.3%(P11;图7H)、93.8%(P12;图7I)、95.3%(P13;图7K)、87.8%(P14;图7J)、92.3%(P15;图7L)、88.5%(P16;图7M)。从峰a(4H,在Pm分子中的-OCH_2CH_2O-)和峰e(3H,在Pm和相应醇分子中的-$CH_2CH_2CH_3$)的积分计算转化收率。

[0062] 图8描绘了使用不同的胺起始材料的iPhos合成。具有一个伯胺、仲胺或叔胺基团的胺引入单个两性离子。具有几个胺基团的胺引入多个两性离子。

[0063] 图9描绘了P10(DMSO-d6)和选择的iPhos($CDCl_3$)的^{1}H NMR谱。在70℃在DMSO-d6中搅拌以后记录P10的波谱,并且它保持几乎不变。对于iPhos,使反应在DMSO-d6中在70℃发生3天,并且反应后亚甲基基团的消失的峰a(4.4ppm)表明几乎所有P10都已被胺基团消耗。此外,活性较低的P16也可以与胺完全反应。

[0064] 图10描绘了用含有Fluc mRNA的iPLNP处理过的IGROV1细胞的细胞存活率。大部分的iPhos表现出可忽略的细胞毒性。

[0065] 图11描绘了根据本公开内容的一个实施方案的9A1P9在$CDCl_3$中的^{1}H NMR谱;^{1}H NMR($CDCl_3$,ppm)δ0.87(m,9H,-$CH_2CH_2CH_2CH_3$),1.25(m,32H,-$OCH_2CH_2(CH_2)_6CH_3$和-$N(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3)_2$),1.55-1.84(m,6H,-$OCH_2CH_2(CH_2)_6CH_3$和-$N(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3)_2$),2.80(m,4H,-$N(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3)_2$),3.87(m,2H,-$NCH_2CH_2O$-),3.96-4.28(m,4H,-$NCH_2CH_2O$-和-$OCH_2CH_2(CH_2)_6CH_3$)。^{13}C NMR($CDCl_3$,ppm)δ14.08,14.10,22.61,22.66,26.00,27.00,27.03,29.16,29.22,29.25,29.32,29.45,29.49,29.62,31.73,31.77,47.72.^{31}P NMR($CDCl_3$,ppm)δ-0.91,0.94。计算的质量m/z 491.4,实测$[M+H]^+$(LC-MS)m/z 492.4。

[0066] 图12描绘了根据本公开内容的一个实施方案的10A1P10在$CDCl_3$中的^{1}H NMR谱;^{1}H NMR($CDCl_3$,ppm)δ0.87(t,9H,-$CH_2CH_2CH_2CH_3$),1.25(m,42H,-$OCH_2CH_2(CH_2)_7CH_3$和-$N(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3)_2$),1.57-1.85(m,6H,-$OCH_2CH_2(CH_2)_7CH_3$和-$N(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3)_2$),2.81(m,4H,-$N(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3)_2$),3.87(m,2H,-$NCH_2CH_2O$-),3.94-4.30(m,4H,-$NCH_2CH_2O$-和-$OCH_2CH_2(CH_2)_7CH_3$)。^{13}C NMR($CDCl_3$,ppm)δ14.10,22.68,26.00,27.01,27.05,29.28,29.32,29.35,29.46,29.51,29.57,29.62,31.86,31.89,47.61.^{31}P NMR($CDCl_3$,ppm)δ-1.08,0.86。计算的质量m/z 561.5,实测$[M+H]^+$(LC-MS)m/z 563.6。

[0067] 图13描绘了根据本公开内容的一个实施方案的9A1P15在$CDCl_3$中的^{1}H NMR谱;通过

柱快速色谱法,少量DMSO保留在产物中,但是它不影响9A1P15作用;^{1}H NMR(CDCl$_3$,ppm)δ0.86(m,9H,-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$),1.24(m,44H,-OCH$_2$CH$_2$(CH$_2$)$_{12}$CH$_3$和-N(CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$)$_2$),1.56-1.86(m,6H,-OCH$_2$CH$_2$(CH$_2$)$_{12}$CH$_3$和-N(CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$)$_2$),2.81(m,4H,-N(CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$)$_2$),3.86(m,2H,-NCH$_2$CH$_2$O-),3.94-4.30(m,4H,-NCH$_2$CH$_2$O-和-OCH$_2$CH$_2$(CH$_2$)$_{12}$CH$_3$)。^{13}C NMR(CDCl$_3$,ppm)δ14.07,14.11,22.61,22.68,25.87,26.96,27.01,29.16,29.19,29.23,29.35,29.47,29.65,29.70,31.72,31.76,47.49.^{31}P NMR(CDCl$_3$,ppm)δ-0.95,0.80;计算的质量m/z 575.5,实测[M+H]$^+$(LC-MS)m/z 576.6。

[0068] 图14描绘了根据本公开内容的一个实施方案的10A1P16在CDCl$_3$中的^{1}H NMR谱;^{1}H NMR(CDCl$_3$,ppm)δ0.87(t,9H,-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$),1.25(m,54H,-OCH$_2$CH$_2$(CH$_2$)$_{13}$CH$_3$和-N(CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$)$_2$),1.54-1.78(m,6H,-OCH$_2$CH$_2$(CH$_2$)$_{13}$CH$_3$和-N(CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$)$_2$),2.76(m,4H,-N(CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$)$_2$),3.85(m,2H,-NCH$_2$CH$_2$O-),3.95-4.28(m,4H,-NCH$_2$CH$_2$O-和-OCH$_2$CH$_2$(CH$_2$)$_{13}$CH$_3$)。^{13}C NMR(CDCl$_3$,ppm)δ14.11,22.68,25.91,27.10,27.20,29.31,29.34,29.56,29.59,29.64,29.66,29.72,31.88,31.91,47.78.^{31}P NMR(CDCl$_3$,ppm)δ-1.00,0.76;计算的质量m/z 645.6,实测[M+H]$^+$(LC-MS)m/z 646.6。

[0069] 图15A-15C描绘了选择的iPLNP的颗粒尺寸和多分散性指数(PDI)(图15A)、ζ电位(图15B)和mRNA结合效率(图15C)。纯化9A1P9、10A1P10、9A1P15和10A1P16,并且它们的iPLNP显示出约150nm的尺寸。

[0070] 图16A-16B描绘了选择的iPLNP的pKa,其中图16A描绘了9A1P9、9A1P15、10A1P10、10A1P16,且图16B描绘了16A1P10和25A3P9。

[0071] 图17A-17C描绘了在iPhos的胺基团侧的不同尾巴长度影响体内mRNA表达效率。图17A描绘了在注射后6小时各种器官的生物发光成像。给C57BL/6小鼠静脉内注射以0.1mg/kg FLuc mRNA的iPLNP,并在注射后6小时将发光量化。图17B描绘了7A1P11-11A1P11的结构。图17C描绘了在胺基团侧的烷基链长度对体内mRNA递送效率的影响。过短(4-6)和过长(>10)碳长度都会介导在肝中降低的效力。8和10个碳的长度倾向于表现出高Fluc mRNA表达。

[0072] 图18A-18C描绘了在iPhos的磷酸酯基团侧的不同尾巴长度影响器官选择性mRNA表达。图18A描绘了在注射后6小时各种器官的生物发光成像。给C57BL/6小鼠静脉内注射以0.1mg/kg FLuc mRNA的iPLNP。图18B描绘了10A1P4-10A1P16的结构。图18C描绘了在磷酸酯基团侧的烷基链长度对器官选择性的影响。短碳长度(4-8)在体内没有显示效力。九个和十个碳长度倾向于介导主要在肝中的高Fluc mRNA表达。令人感兴趣的是,较长的碳长度(13-16)将大部分的Fluc mRNA表达改变至脾。

[0073] 图19A-19C描绘了10A1P4-10A1P16 iPLNP的颗粒尺寸(图19A)、ζ电位(图19B)和pKa(图19C)。10A1P4-10A1P16 iPLNP通常带负电荷,并显示出约200nm的尺寸。这些纳米颗粒显示出6.0至6.5的pKa。

[0074] 图20A-20C描绘了9A1P15和10A1P16 iPLNP的体内评价。图20A描绘了在酸性胞内体环境中的9A1P15和10A1P16的结构。图20B描绘了C57BL/6小鼠,给其静脉内注射以0.25mg/kg FLuc mRNA的iPLNP并且在注射后6小时对发光量化。图20C描绘了如通过平均光

亮度记录的各种器官中萤光素酶表达的量化。

[0075] 图21A-21C描绘了9A1P9/mRNA重量比影响体内效力。图21A描绘了在酸性胞内体环境中的9A1P9的结构。图21B描绘了具有重量比为9:1(摩尔比11622:1)和18:1(摩尔比23244:1)的9A1P9/mRNA的评价。将iPhos:MDOA:胆甾醇:DMG-PEG2000摩尔比固定在25:30:30:1。给C57BL/6小鼠静脉内注射以0.25mg/kg FLuc mRNA的iPLNP,并在注射后6小时将发光量化。图21C描绘了如通过平均光亮度记录的肝中萤光素酶表达的量化(n=3)。

[0076] 图22描绘了辅助脂质的结构。可电离的阳离子脂质包括MDOA、DODAP和5A2-SC8;永久阳离子脂质包括DDAB和DOTAP。将两性离子脂质DOPE用作辅助脂质。

[0077] 图23A-23E描绘了具有不同辅助脂质的9A1P9 iPLNP的表征。评估了具有不同辅助脂质的9A1P9 iPLNP的(图23A)颗粒尺寸、PDI、(图23B)ζ电位、(图23C)mRNA结合效率、(图23D)pKa和(图23E)在IGROV-1细胞中的体外mRNA递送效率(25ng mRNA)。9A1P9:MDOA(DODAP或5A2-SC8):胆甾醇:DMG-PEG2000(摩尔比)=25:30:30:1。9A1P9:DDAB(或DOTAP):胆甾醇:DMG-PEG2000(摩尔比)=60:30:40:0.4。9A1P9:DOPE:胆甾醇:DMG-PEG2000(摩尔比)=55:30:45:0.2;对于所有的制剂,9A1P9:mRNA(w/w)=18:1。

[0078] 图24A-24C描绘了Cy5-mRNA的器官分布。给C57BL/6小鼠静脉内注射PBS(图24A)或iPLNP 9A1P9-5A2-SC8(图24B)或9A1P9-DDAB(图24C)(以0.25mg/kg Cy5-mRNA)并在6小时以后拍摄图像。对于iPLNP制剂,使用25:30:30:1的9A1P9:5A2-SC8:胆甾醇:DMG-PEG2000摩尔比和60:30:40:0.4的9A1P9:DDAB:胆甾醇:DMG-PEG2000摩尔比;将9A1P9/mRNA(w/w)固定在18/1。

[0079] 图25A-25B描绘了9A1P9-5A2-SC8(图25A)和9A1P9-DDAB(图25B)iPLNP,其分别在肝和肺中表现出高mRNA递送效率。使用25:30:30:1的9A1P9:5A2-SC8:胆甾醇:DMG-PEG2000(摩尔比)(Fluc mRNA,0.05mg/kg)和60:30:40:0.4的9A1P9:DDAB:胆甾醇:DMG-PEG2000(摩尔比)(Fluc mRNA,0.25mg/kg)。将9A1P9:mRNA重量比固定在18:1。给C57BL/6小鼠静脉内注射iPLNP并在6小时以后拍摄图像。

[0080] 图26A-26C描绘了不同的器官选择性iPLNP对Fluc蛋白表达的动力学分析。将9A1P9-5A2-SC8(肝特异性的,0.05mg kg-1FlucmRNA;图26A)、9A1P9-DDAB(肺特异性的,0.25mg kg-1Fluc mRNA;图26B)和10A1P16-MDOA(脾特异性的,0.25mg kg-1Fluc mRNA;图26C)iPLNP静脉内地施用给C57BL/6小鼠。在3小时、6小时、12小时和24小时后将器官成像。将数据呈现为平均值±s.d.(n=3个生物学上独立的小鼠)。

[0081] 图27A-27C描绘了9A1P9-5A2-SC8 iPLNP在肝细胞中实现了约91%tdTomato编辑。图27A描绘了在Ai9小鼠中静脉内施用的9A1P9-5A2-SC8 iPLNP(Cre mRNA,0.25mg kg-1)。48小时以后,分离肝细胞并通过流式细胞计量术进行分析。图27B描绘了静脉内注射给Ai9小鼠的DLin-MC3-DMA LNP(Cre mRNA,0.25mg kg-1)。48小时以后,分离肝细胞并通过流式细胞计量术进行分析。图27C描绘了9A1P9-5A2-SC8 iPLNP和DLin-MC3-DMA LNP的合并结果。所有的数据来自n=3个生物学上独立的小鼠。

[0082] 图28描绘了tdTomato阳性肺细胞的百分比。使用FACS设门策略分析肺细胞中的tdTomato表达。简而言之,利用Ghost Red 780区分活细胞和死细胞。将EpCam+用于定义上皮细胞,将CD45+和CD31-用于定义免疫细胞,并将CD45-和CD31+用于定义内皮细胞。基于注射PBS的对照Ai9小鼠绘制细胞类型中tdTomato+的门。给Ai9小鼠静脉内注射9A1P9-DDAB

iPLNP(Cre mRNA,0.25mg kg^{-1}),并在48小时后通过流式细胞计量术检测给定细胞类型中的tdTomato+。将数据呈现为平均值±s.d.(n=3个生物学上独立的小鼠)。

[0083] 图29描绘了tdTomato阳性的脾细胞的百分比。使用FACS设门策略分析脾细胞中的tdTomato表达。简而言之,利用Ghost Red 780区分活细胞和死细胞。将CD45+用于区分免疫细胞,然后将CD3+和CD11b-用于T细胞,将CD3-和CD11b+用于巨噬细胞,并将CD19+和CD11b-用于B细胞。基于注射PBS的对照小鼠绘制细胞类型中tdTomato+的门。给Ai9小鼠静脉内注射10A1P16-MDOA iPLNP(Cre mRNA,0.5mg kg^{-1}),并在48小时后通过流式细胞计量术检测给定细胞类型中的tdTomato+。将数据呈现为平均值±s.d.(n=3个生物学上独立的小鼠)。

[0084] 图30A-30B描绘了NanoAssemblr微流体混合系统可以如何用于减小iPLNP尺寸。使用NanoAssemblr微流体混合系统制备10A1P16-MDOA iPLNP,其表现出低于100nm的小尺寸。在降低iPLNP直径后,完全保留了高体内mRNA递送效率和精确器官选择性(图30A)。10A1P16-MDOA iPLNP(Fluc mRNA,0.25mg kg-1)介导脾中的mRNA翻译(图30B)。(n=3个生物学上独立的小鼠)。

[0085] 图31A-31D描绘了肝标志物测量(BUN(图31A);CREA(图31B);ATL(图31C);和AST(图31D)),证实了负载mRNA的10A1P16-MDOA iPLNP在体内具有良好的耐受性。将10A1P16-MDOA(脾特异性的)iPLNP静脉内地(IV)施用给C57BL/6小鼠(0.25mg kg-1)。将脂多糖(LPS,5mg kg-1,IP)用作阳性对照,并将PBS(IV)用作阴性对照。在注射后24小时,评价肾功能(BUN和CREA)和肝功能(ALT和AST)。LPS处理的小鼠表现出严重的肾和肝损伤。在10A1P16-MDOA iPLNP和PBS组之间没有显著差异。将数据呈现为平均值±s.d.(n=3个生物学上独立的小鼠)。通过双尾不成对t检验分析统计显著性:****,P<0.0001;***,P<0.001;**,P<0.01;*,P<0.05。

[0086] 图32A-32B描绘了iPLNP能够有效递送pDNA和siRNA。图32A描绘了用于递送pCMV-Luc pDNA的9A1P9-5A2-SC8 iPLNP和9A1P9-DDAB iPLNP。每孔应用12.5ng和25ng pDNA。将结果归一化为未处理的细胞。图32B描绘了高效地递送siLuc(siRNA)的9A1P9-5A2-SC8 iPLNP和9A1P9-DDAB iPLNP。每孔应用12.5ng和25ng siRNA。将数据呈现为平均值±s.d.(n=3个生物学上独立的样品)。

[0087] 图33A-33B描绘了iPLNP能够有效递送mRNA至皮下组织。图33A描绘了将含有Cre重组酶(CRE)mRNA的PBS、9A1-P9、9A1-P15和10A1-P16皮下注射进Ai9小鼠中以后,其中在注射后44小时通过IVIS观察到tdTomato阳性细胞。图33B描绘了在皮下注射含有Cre重组酶(CRE)mRNA的PBS、9A1-P9、9A1-P15和10A1-P16后44小时,Ai9小鼠的皮下组织(例如,皮肤)中tdTomato表达的量化。

[0088] 详细描述

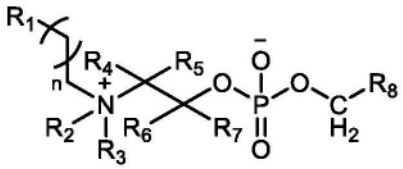
[0089] 下面的详细描述参考了解释本公开内容的各种实施方案的附图。附图和描述旨在足够详细地描述本公开内容的方面和实施方案,以使本领域技术人员能够实践本公开内容。可以利用其它组件,并且可以做出变化而不脱离本公开内容的范围。因此,以下描述不应被理解为限制性含义。本公开内容的范围仅由所附权利要求连同这样的权利要求所赋予的等同方案的全部范围限定。

[0090] 本公开内容至少部分地基于用于用在脂质纳米颗粒(LNP)中的合成的可电离的磷脂的鉴定。因此,本公开内容提供了合成的可电离的磷脂组合物及其制备方法,包含本文中

合成的可电离的磷脂的LNP组合物及其制备方法,使用本文中公开的组合物的方法,和用于实践本文中公开的方法的试剂盒。

[0091] I.合成的可电离的磷脂

[0092] 本公开内容提供了一类新的合成的可电离的磷脂。在某些实施方案中,本文提供的合成的可电离的磷脂可以具有式(I):

[0093] 

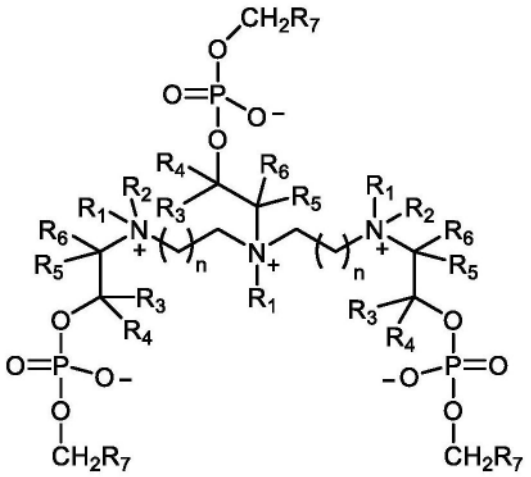
式(I);

[0094] 其中:R_1选自由以下成员组成的集合:C2-C20未被取代的烷基、C2-C20被取代的烷基、C2-C20未被取代的烯基、C2-C20被取代的烯基、C2-C20未被取代的炔基、C2-C20被取代的炔基、C4-C20未被取代的环烷基和C4-C20被取代的环烷基;R_2和R_3独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C20未被取代的烷基、C1-C20被取代的烷基、C1-C20未被取代的烯基、C1-C20被取代的烯基、C1-C20未被取代的炔基、C1-C20被取代的炔基、C4-C20未被取代的环烷基和C4-C20被取代的环烷基;R_4、R_5、R_6和R_7独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C8未被取代的烷基、C1-C8被取代的烷基、C1-C8未被取代的烯基、C1-C8被取代的烯基、C1-C8未被取代的炔基和C1-C8被取代的炔基;R_8选自由以下成员组成的集合:C3-C21未被取代的烷基、C3-C21被取代的烷基、C3-C21未被取代的烯基、C3-C21被取代的烯基、C3-C21未被取代的炔基和C3-C21被取代的炔基;且n是1-4的整数。

[0095] 在至少一些情况下,R_1选自由以下成员组成的集合:C2-C16未被取代的烷基、C2-C16被取代的烷基或C4-C12被取代的环烷基;R_2和R_3独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C16未被取代的烷基、C1-C16被取代的烷基或C4-C16被取代的环烷基;R_4、R_5、R_6和R_7独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C4未被取代的烷基或C1-C4被取代的烷基;R_8选自C3-C18未被取代的烷基;且n是1-3的整数。

[0096] 在其它情况下,R_1是C2-C15未被取代的烷基;R_2和R_3独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C16被取代的烷基或C4-C16被取代的环烷基;R_4、R_5、R_6和R_7独立地选自由以下成员组成的集合:H、甲基或乙基;R_8选自C4-C16未被取代的烷基;且n是1-2的整数。

[0097] 在某些实施方案中,本文提供的合成的可电离的磷脂可以具有式(II):

[0098] 

式(II);

[0099] 其中R_1和R_2独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C8被取代的烷基或C1-C8未被取代的烷基;R_3、R_4、R_5和R_6独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C8未被取代的烷基或C1-C8被取代的烷基;R_7选自由以下成员组成的集合:C3-C21未被取代的烷基或C3-C21被取代的烷基;且n是1-4的整数。

[0100] 在某些情况下,R_1和R_2独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C6被取代的烷基或C1-C6未被取代的烷基;R_3、R_4、R_5和R_6独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C4未被取代的烷基或C1-C4被取代的烷基;R_7选自由以下成员组成的集合:C3-C18未被取代的烷基或C3-C18被取代的烷基;且n是1-3的整数。

[0101] 在某些情况下,R_1和R_2独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C4被取代的烷基或C1-C4未被取代的烷基;R_3、R_4、R_5和R_6独立地选自由以下成员组成的集合:H、甲基或乙基;R_7选自由以下成员组成的集合:C3-C15未被取代的烷基或C3-C15被取代的烷基;且n是1-2的整数。

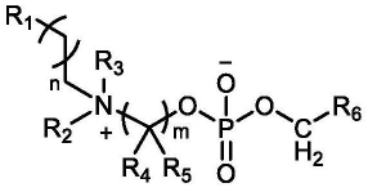
[0102] 在其它情况下,R_1和R_2独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C8被取代的烷基、C1-C8未被取代的烷基、C2-C8未被取代的烯基、C2-C8被取代的烯基、C2-C8未被取代的炔基或C2-C8被取代的炔基;R_3、R_4、R_5和R_6独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C8被取代的烷基、C1-C8未被取代的烷基、C1-C8未被取代的烯基、C2-C8被取代的烯基、C2-C8未被取代的炔基或C2-C8被取代的炔基;R_7选自由以下成员组成的集合:C3-C21未被取代的烷基、C3-C21被取代的烷基、C3-C21未被取代的烯基、C3-C21被取代的烯基、C3-C21未被取代的炔基或C3-C21被取代的炔基;且n是1-4的整数。

[0103] 在再其它情况下,R_1和R_2独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C6被取代的烷基、C1-C6未被取代的烷基、C2-C6未被取代的烯基、C2-C6被取代的烯基、C2-C6未被取代的炔基或C2-C6被取代的炔基;R_3、R_4、R_5和R_6独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C4未被取代的烷基、C1-C4被取代的烷基、C2-C4未被取代的烯基、C2-C4被取代的烯基、C2-C4未被取代的炔基或C2-C4被取代的炔基;R_7选自由以下成员组成的集合:C3-C18未被取代的烷基或C3-C18被取代的烷基;且n是1-3的整数。

[0104] 在又其它情况下,R_1和R_2独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C4被取代的烷基或C1-C4未被取代的烷基;R_3、R_4、R_5和R_6独立地选自由以下成员组成的集合:H、甲基或乙

基;R_7选自由以下成员组成的集合:C3-C15未被取代的烷基或C3-C15被取代的烷基;且n是1-2的整数。

[0105] 在某些实施方案中,本文提供的合成的可电离的磷脂可以具有式(III):

[0106] 

式(III);

[0107] 其中:R_1选自由以下成员组成的集合:C2-C20未被取代的烷基、C2-C20被取代的烷基、C2-C20未被取代的烯基、C2-C20被取代的烯基、C2-C20未被取代的炔基、C2-C20被取代的炔基、C4-C20未被取代的环烷基或C4-C20被取代的环烷基;R_2和R_3独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C20未被取代的烷基、C1-C20被取代的烷基、C1-C20未被取代的烯基、C1-C20被取代的烯基、C1-C20未被取代的炔基、C1-C20被取代的炔基、C4-C20未被取代的环烷基或C4-C20被取代的环烷基;R_4和R_5独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C8未被取代的烷基、C1-C8被取代的烷基、C1-C8未被取代的烯基、C1-C8被取代的烯基、C1-C8未被取代的炔基或C1-C8被取代的炔基;R_6选自由以下成员组成的集合:C3-C21未被取代的烷基、C3-C21被取代的烷基、C3-C21未被取代的烯基、C3-C21被取代的烯基、C3-C21未被取代的炔基或C3-C21被取代的炔基;n是1-4的整数;且m是1-4的整数。

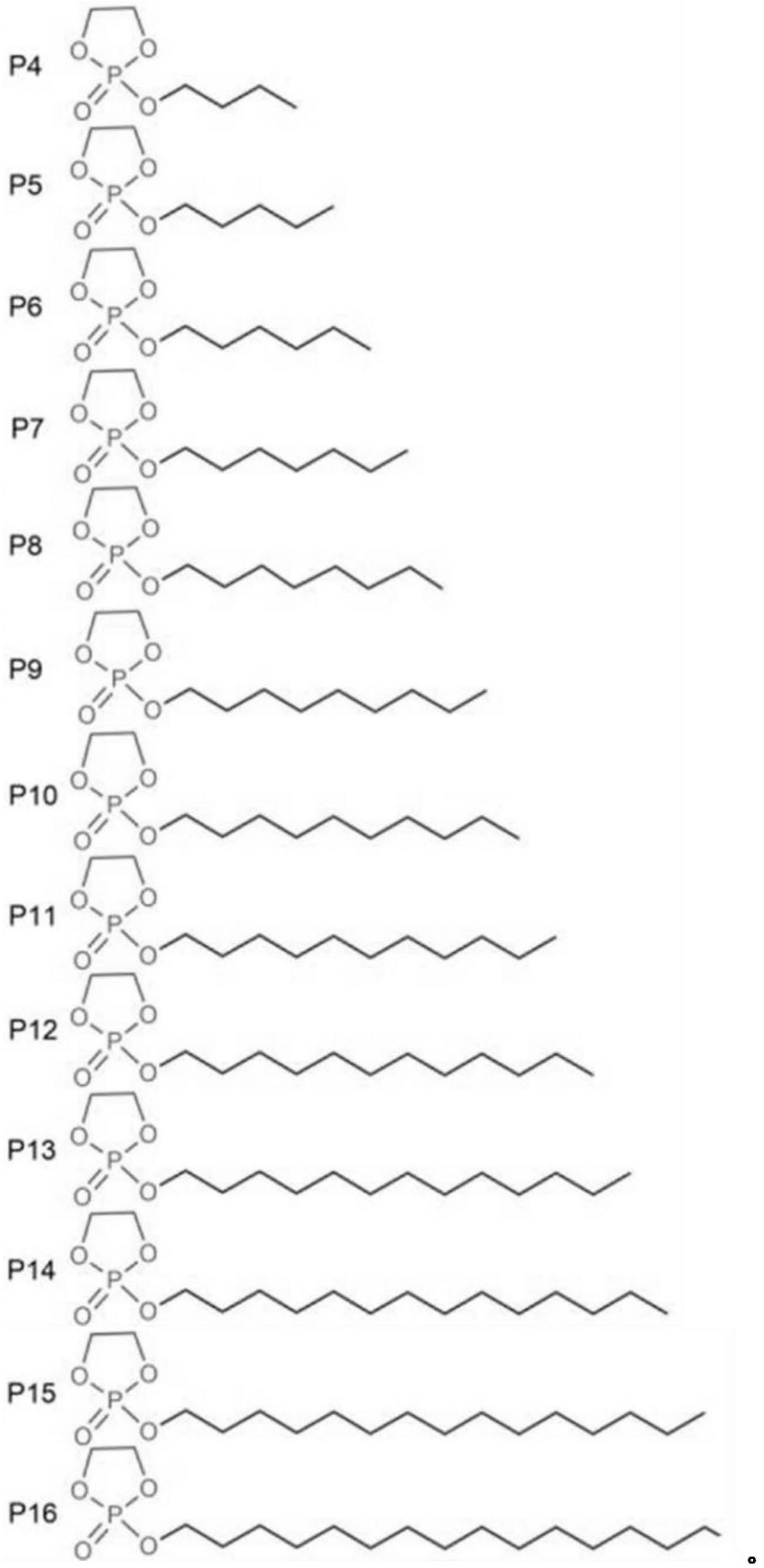
[0108] 在某些情况下,R_1选自由以下成员组成的集合:C2-C16未被取代的烷基、C2-C16被取代的烷基、C2-C16未被取代的烯基、C2-C16被取代的烯基、C2-C16未被取代的炔基、C2-C16被取代的炔基、C4-C16未被取代的环烷基或C4-C16被取代的环烷基;R_2和R_3独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C16未被取代的烷基、C1-C16被取代的烷基、C1-C16未被取代的烯基、C1-C16被取代的烯基、C1-C16未被取代的炔基、C1-C16被取代的炔基、C4-C16未被取代的环烷基或C4-C16被取代的环烷基;R_4和R_5独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C6未被取代的烷基、C1-C6被取代的烷基、C1-C6未被取代的烯基、C1-C6被取代的烯基、C1-C6未被取代的炔基或C1-C6被取代的炔基;R_6选自由以下成员组成的集合:C3-C18未被取代的烷基、C3-C18被取代的烷基、C3-C18未被取代的烯基、C3-C18被取代的烯基、C3-C18未被取代的炔基或C3-C18被取代的炔基;n是1-3的整数;且m是1-3的整数。

[0109] 在其它情况下,R_1是C2-C15未被取代的烷基;R_2和R_3独立地选自由以下成员组成的集合:H、C1-C16被取代的烷基或C4-C16被取代的环烷基;R_4和R_5独立地选自由以下成员组成的集合:H、甲基或乙基;R_6选自C4-C16未被取代的烷基;n是1-2的整数;且m是1-2的整数。

[0110] 在某些实施方案中,本文提供的合成的可电离的磷脂可以具有式(IV):

[0111] nAxPm式(IV);

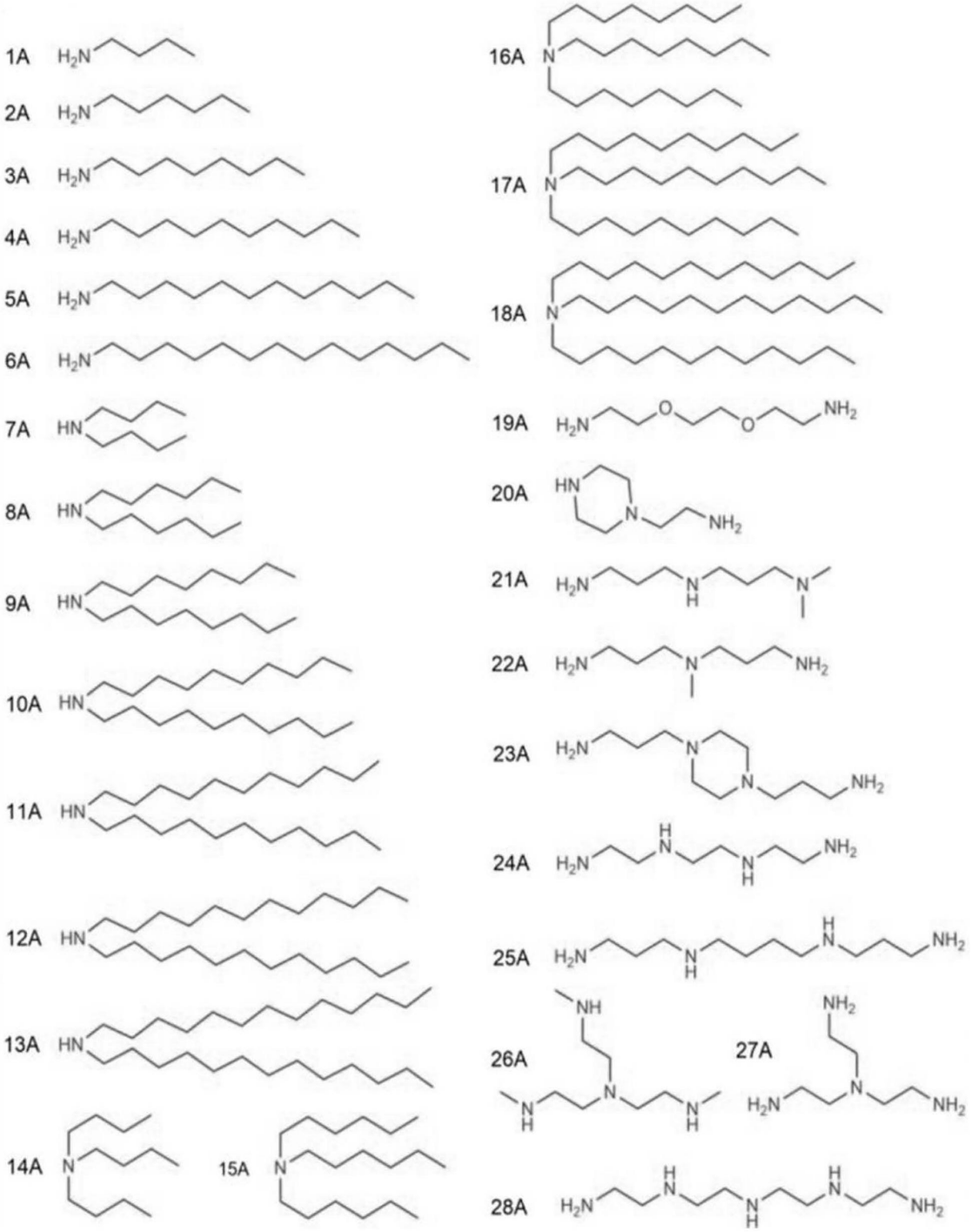
[0112] 其中:“Pm”表示烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子,“nA”表示胺,且在“nAxPm”中的“x”表示在一个胺分子上修饰的Pm分子的数目。在某些方面,本文中合成的可电离的磷脂可以具有式(IV),其中Pm可以包含选自以下的一种或多种:

[0113] 

。

[0114] 在某些方面,本文中合成的可电离的磷脂可以具有式(IV),其中nA可以包含选自以下的一种或多种:

[0115]



[0116] 在某些实施方案中,本文提供的具有nAxPm式(IV)的合成的可电离的磷脂可以包括:1AxP4、1AxP5、1AxP6、1AxP7、1AxP8、1AxP9、1AxP10、1AxP11、1AxP12、1AxP13、1AxP14、1AxP15、1AxP16、2AxP4、2AxP5、2AxP6、2AxP7、2AxP8、2AxP9、2AxP10、2AxP11、2AxP12、2AxP13、2AxP14、2AxP15、2AxP16、3AxP4、3AxP5、3AxP6、3AxP7、3AxP8、3AxP9、3AxP10、3AxP11、3AxP12、3AxP13、3AxP14、3AxP15、3AxP16、4AxP4、4AxP5、4AxP6、4AxP7、4AxP8、4AxP9、4AxP10、4AxP11、4AxP12、4AxP13、4AxP14、4AxP15、4AxP16、5AxP4、5AxP5、5AxP6、5AxP7、5AxP8、5AxP9、5AxP10、5AxP11、5AxP12、5AxP13、5AxP14、5AxP15、5AxP16、6AxP4、6AxP5、6AxP6、6AxP7、6AxP8、6AxP9、6AxP10、6AxP11、6AxP12、6AxP13、6AxP14、6AxP15、6AxP16、7AxP4、7AxP5、7AxP6、7AxP7、7AxP8、7AxP9、7AxP10、7AxP11、7AxP12、7AxP13、

7AxP14、7AxP15、7AxP16、8AxP4、8AxP5、8AxP6、8AxP7、8AxP8、8AxP9、8AxP10、8AxP11、8AxP12、8AxP13、8AxP14、8AxP15、8AxP16、9AxP4、9AxP5、9AxP6、9AxP7、9AxP8、9AxP9、9AxP10、9AxP11、9AxP12、9AxP13、9AxP14、9AxP15、9AxP16、10AxP4、10AxP5、10AxP6、10AxP7、10AxP8、10AxP9、10AxP10、10AxP11、10AxP12、10AxP13、10AxP14、10AxP15、10AxP16、11AxP4、11AxP5、11AxP6、11AxP7、11AxP8、11AxP9、11AxP10、11AxP11、11AxP12、11AxP13、11AxP14、11AxP15、11AxP16、12AxP4、12AxP5、12AxP6、12AxP7、12AxP8、12AxP9、12AxP10、12AxP11、12AxP12、12AxP13、12AxP14、12AxP15、12AxP16、13AxP4、13AxP5、13AxP6、13AxP7、13AxP8、13AxP9、13AxP10、13AxP11、13AxP12、13AxP13、13AxP14、13AxP15、13AxP16、14AxP4、14AxP5、14AxP6、14AxP7、14AxP8、14AxP9、14AxP10、14AxP11、14AxP12、14AxP13、14AxP14、14AxP15、14AxP16、15AxP4、15AxP5、15AxP6、15AxP7、15AxP8、15AxP9、15AxP10、15AxP11、15AxP12、15AxP13、15AxP14、15AxP15、15AxP16、16AxP4、16AxP5、16AxP6、16AxP7、16AxP8、16AxP9、16AxP10、16AxP11、16AxP12、16AxP13、16AxP14、16AxP15、16AxP16、17AxP4、17AxP5、17AxP6、17AxP7、17AxP8、17AxP9、17AxP10、17AxP11、17AxP12、17AxP13、17AxP14、17AxP15、17AxP16、18AxP4、18AxP5、18AxP6、18AxP7、18AxP8、18AxP9、18AxP10、18AxP11、18AxP12、18AxP13、18AxP14、18AxP15、18AxP16、19AxP4、19AxP5、19AxP6、19AxP7、19AxP8、19AxP9、19AxP10、19AxP11、19AxP12、19AxP13、19AxP14、19AxP15、19AxP16、20AxP4、20AxP5、20AxP6、20AxP7、20AxP8、20AxP9、20AxP10、20AxP11、20AxP12、20AxP13、20AxP14、20AxP15、20AxP16、21AxP4、21AxP5、21AxP6、21AxP7、21AxP8、21AxP9、21AxP10、21AxP11、21AxP12、21AxP13、21AxP14、21AxP15、21AxP16、22AxP4、22AxP5、22AxP6、22AxP7、22AxP8、22AxP9、22AxP10、22AxP11、22AxP12、22AxP13、22AxP14、22AxP15、22AxP16、23AxP4、23AxP5、23AxP6、23AxP7、23AxP8、23AxP9、23AxP10、23AxP11、23AxP12、23AxP13、23AxP14、23AxP15、23AxP16、24AxP4、24AxP5、24AxP6、24AxP7、24AxP8、24AxP9、24AxP10、24AxP11、24AxP12、24AxP13、24AxP14、24AxP15、24AxP16、25AxP4、25AxP5、25AxP6、25AxP7、25AxP8、25AxP9、25AxP10、25AxP11、25AxP12、25AxP13、25AxP14、25AxP15、25AxP16、26AxP4、26AxP5、26AxP6、26AxP7、26AxP8、26AxP9、26AxP10、26AxP11、26AxP12、26AxP13、26AxP14、26AxP15、26AxP16、27AxP4、27AxP5、27AxP6、27AxP7、27AxP8、27AxP9、27AxP10、27AxP11、27AxP12、27AxP13、27AxP14、27AxP15、27AxP16、28AxP4、28AxP5、28AxP6、28AxP7、28AxP8、28AxP9、28AxP10、28AxP11、28AxP12、28AxP13、28AxP14、28AxP15、28AxP16,其中在“nAxPm”中的“x”表示在一个胺分子上修饰的Pm分子的数目。

[0117] 在某些方面,本文提供的具有nAxPm式(IV)的合成的可电离的磷脂可以包括:7A1P4、7A1P5、7A1P6、7A1P7、7A1P8、7A1P9、7A1P10、7A1P11、7A1P12、7A1P13、7A1P14、7A1P15、7A1P16、8A1P4、8A1P5、8A1P6、8A1P7、8A1P8、8A1P9、8A1P10、8A1P11、8A1P12、8A1P13、8A1P14、8A1P15、8A1P16、9A1P4、9A1P5、9A1P6、9A1P7、9A1P8、9A1P9、9A1P10、9A1P11、9A1P12、9A1P13、9A1P14、9A1P15、9A1P16、10A1P4、10A1P5、10A1P6、10A1P7、10A1P8、10A1P9、10A1P10、10A1P11、10A1P12、10A1P13、10A1P14、10A1P15、10A1P16、11A1P4、11A1P5、11A1P6、11A1P7、11A1P8、11A1P9、11A1P10、11A1P11、11A1P12、11A1P13、11A1P14、11A1P15、11A1P16、12A1P4、12A1P5、12A1P6、12A1P7、12A1P8、12A1P9、12A1P10、12A1P11、12A1P12、12A1P13、12A1P14、12A1P15、12A1P16、13A1P4、13A1P5、13A1P6、13A1P7、13A1P8、13A1P9、13A1P10、13A1P11、13A1P12、13A1P13、13A1P14、13A1P15、13A1P16或它们的任何组合。在某

些方面,本文提供的具有nAxPm式(IV)的合成的可电离的磷脂可以包括:9A1P9、9A1P15、10A1P10、10A1P16或它们的任何组合。

[0118] 在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂是pH-可转换的。本文中使用的"pH-可转换的"表示这样的脂质:其构象在确定的pH值范围质子化后发生改变。在某些方面,本文中合成的可电离的磷脂在细胞质pH(例如,约7.0至约7.5)是pH-可转换的。在某些方面,本文中合成的可电离的磷脂在胞内体和/或溶酶体腔pH(例如,约6.5至约4.5)是pH-可转换的。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂在从约4.0至约8.0范围内的pH(例如,约4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)是pH-可转换的。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂是不可逆的(即,不是pH-可转换的)。

[0119] 在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以包含至少一个磷酸酯基团和至少一个两性离子。两性离子(也被称作内盐或偶极离子)是一种整体中性的物质,其中两个或多个原子带有相反的形式电荷。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以具有至少一个两性离子。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以具有多个两性离子(例如,超过一个两性离子)。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以具有约1至约10(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10)个两性离子。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以具有至少一个不可逆的两性离子。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以具有至少一个pH-可转换的两性离子。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以具有多个pH-可转换的两性离子(例如,超过一个pH-可转换的两性离子)。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以具有约1至约10(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10)个pH-可转换的两性离子。

[0120] 在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以包含至少一个磷酸酯基团、至少一个两性离子和至少一个疏水结构域。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以具有至少一个尾巴。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以是多尾的(即,可以具有超过一个尾巴)。在某些实施方案中,公开的多尾的可电离的磷脂可以具有胞内体膜不稳定。

[0121] 在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以具有至少一个疏水尾巴。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以具有超过一个疏水尾巴。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以具有约1至约10(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10)个疏水尾巴。在某些实施方案中,本公开内容提供了pH-可转换的、多尾的可电离的磷脂。

[0122] 在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以具有至少一个疏水尾巴,其中所述疏水尾巴是烷基尾巴。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以具有超过一个烷基尾巴。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以具有约1至约10(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10)个烷基尾巴。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以具有至少一个烷基尾巴,所述尾巴包含约5个碳至约20(例如,约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20)个碳的烷基链长度。在某些方面,本文中合成的可电离的磷脂可以具有至少一个烷基尾巴,所述尾巴包含约8个碳至约16个碳的烷基链长度。在某些方面,本文中合成的可电离的磷脂可以具有至少一个烷基尾巴,所述尾巴包含约8个碳至约10个碳的烷基链长度。在某些方面,本文中合成的可电离的磷脂可以具有至少一个烷基尾巴,所述尾巴包含约9个碳至约12个碳的烷基链长度。在某些方面,本文中合成的可电离的磷脂

可以具有至少一个烷基尾巴,所述尾巴包含约13个碳至约16个碳的烷基链长度。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以具有多个烷基尾巴,其中所有烷基尾巴的长度是相同的。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以具有多个烷基尾巴,其中所有烷基尾巴的长度彼此不同。

[0123] 在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以包含至少一个磷酸酯基团、至少一个两性离子、至少一个疏水结构域和至少一个叔胺。本文中使用的叔胺表示这样的胺:其中氮原子直接键合至三个不能是羰基碳的任何杂化的碳。在某些实施方案中,在包含至少一个叔胺的本文中合成的可电离的磷脂中,所述叔胺在生理pH(例如,约7.0至约7.5)不会被质子化。在某些方面,本文中合成的可电离的磷脂中叔胺的质子化缺乏可以造成合成的可电离的磷脂带负电荷。在某些方面,本文中合成的可电离的磷脂中叔胺的质子化缺乏可以造成合成的可电离的磷脂难以融合到细胞膜中。在某些实施方案中,在包含至少一个叔胺的本文中合成的可电离的磷脂中,所述叔胺可以在胞内体pH(例如,约6.5至约4.5)被质子化。在某些方面,本文中合成的可电离的磷脂中叔胺的质子化可以形成至少一个两性离子头。

[0124] 在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以包含一个叔胺、一个磷酸酯基团和三个疏水尾巴。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以包含一个叔胺、一个磷酸酯基团和三个疏水尾巴,其中所述疏水尾巴可以包含约10个碳至约12个碳的烷基链长度。

[0125] 本公开内容提供了制备本文中公开的合成的可电离的磷脂的方法。本领域技术人员将理解,在化学合成中已知的标准技术适合用于本文中用途。在某些实施方案中,制备本文中合成的可电离的磷脂的方法可以包含通过正交反应用胺(例如,1A-28A)和烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子(例如,P4-P16)合成。在某些实施方案中,在制备本文中合成的可电离的磷脂的方法中,每个烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子(例如,P4-P16)可以将至少一个磷酸酯基团和至少一个疏水烷基链引入到合成的可电离的磷脂中。在某些实施方案中,在制备本文中合成的可电离的磷脂的方法中,伯胺、仲胺和/或叔胺可以消耗约1当量的本文中的烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子(例如,P4-P16)。在某些方面,具有单个伯胺、仲胺或叔胺的本文中的胺(例如,1A-18A)可以与约1.1当量的烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子(例如,P4-P16)反应以得到具有根据本文式IV的nA1Pm的合成的可电离的磷脂。在某些方面,具有多个胺基团的本文中的胺(例如,19A-28A)可以与约2.2当量的烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子(例如,P4-P16)反应以得到具有根据本文式IV的nA2Pm的合成的可电离的磷脂。在某些方面,具有多个胺基团的本文中的胺(例如,19A-28A)可以与约3.3当量的烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子(例如,P4-P16)反应以得到具有根据本文式IV的nA3Pm的合成的可电离的磷脂。在某些方面,具有多个胺基团的本文中的胺(例如,19A-28A)可以与约4.4当量的烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子(例如,P4-P16)反应以得到具有根据本文式IV的nA4Pm的合成的可电离的磷脂。在某些方面,具有多个胺基团的本文中的胺(例如,19A-28A)可以与约5.5当量的烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子(例如,P4-P16)反应以得到具有根据本文式IV的nA5Pm的合成的可电离的磷脂。

[0126] 在某些实施方案中,可以在高度极性的有机溶剂中进行制备本文中合成的可电离的磷脂的方法。用于本文中用途的高度极性的有机溶剂的非限制性例子可以包括水(H_2O)、

甲醇(CH3OH)、二甲亚砜(DMSO;C2H6OS)、二甲基甲酰胺(C3H7NO)、乙腈(C2H3N)等。在某些实施方案中,可以在DMSO中进行制备本文中合成的可电离的磷脂的方法。

[0127] 在某些实施方案中,制备本文中合成的可电离的磷脂的方法可以包含约0.1g mL^{-1}至约1.0g mL^{-1}(例如,约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0g mL^{-1})起始材料(例如,胺(例如,1A-28A)和烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子(例如,P4-P16))。在某些方面,制备本文中合成的可电离的磷脂的方法可以包含约0.3g mL^{-1}起始材料(例如,胺(例如,1A-28A)和烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子(例如,P4-P16))。

[0128] 在某些实施方案中,制备本文中合成的可电离的磷脂的方法可以包含在高度极性的有机溶剂中搅拌起始材料(例如,胺(例如,1A-28A)和烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子(例如,P4-P16))约1至约5天(例如,约1、2、3、4、5天)。在某些方面,制备本文中合成的可电离的磷脂的方法可以包含在高度极性的有机溶剂中搅拌起始材料(例如,胺(例如,1A-28A)和烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子(例如,P4-P16))约3天。

[0129] 在某些实施方案中,制备本文中合成的可电离的磷脂的方法可以包含在高度极性的有机溶剂中在约60℃至约80℃(例如,约60、65、70、75、80℃)搅拌起始材料(例如,胺(例如,1A-28A)和烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子(例如,P4-P16))。在某些方面,制备本文中合成的可电离的磷脂的方法可以包含在高度极性的有机溶剂中在约70℃搅拌起始材料(例如,胺(例如,1A-28A)和烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子(例如,P4-P16))。

[0130] 在某些实施方案中,制备本文中合成的可电离的磷脂的方法可以包含纯化。适合用于本文中用途的纯化方法的非限制性例子可以包括柱色谱法、真空干燥、低压冻干法、柱分级分离等。

[0131] II.纳米颗粒和脂质纳米颗粒

[0132] 本公开内容提供了用于用在纳米颗粒和/或脂质纳米颗粒(LNP)中的一类新的合成的可电离的磷脂。术语"纳米颗粒"表示包含亲脂核心的结构,所述亲脂核心被包封所述核心的亲水相包围。在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以用于形成一种或多种纳米颗粒。由本文中的纳米颗粒的不同亲脂性和亲水性组分产生的离子相互作用可以产生独立的和/或可观察到的物理性能。在某些实施方案中,本文中的纳米颗粒可以具有等于或小于约1.0μm(例如,约1000nm、750nm、500nm、250nm、150nm 100nm、75nm、50nm、25nm、10nm、7.5nm、5nm、2.5nm、1.0nm)的平均尺寸。"平均尺寸"被理解为包含亲脂相和亲水相的纳米颗粒群体的平均直径。可以通过本领域技术人员已知的标准方法测量本文中的纳米颗粒的平均尺寸,并且其例如在下面的实验部分中描述。在某些实施方案中,本文中的纳米颗粒可以具有等于或小于1.0μm、或介于1.0nm与1000nm之间、或介于100nm与350nm之间的平均颗粒尺寸。本领域技术人员可以理解,纳米颗粒的平均尺寸可以受以下因素影响:脂质组分的量(例如,以更大的量,所得尺寸等于或更大),表面活性剂的量(例如,以更大的量或更高的分子量,尺寸等于或更小),和/或制备方法的参数,诸如,但不限于搅拌的速度和类型、两个相的温度、混合相的持续时间等。

[0133] 在某些实施方案中,本文中的纳米颗粒可以具有表面电荷,其量级可以从约-50mV至约+80mV变化。通过本领域技术人员已知的标准方法,可以测量本文中的纳米颗粒的表面电荷。在某些方面,可以通过Z电位来测量本文中的纳米颗粒的表面电荷。

[0134] 在某些实施方案中,当本文中的纳米颗粒与一种或多种细胞接触时,本文中的纳

米颗粒可以穿透进一种或多种细胞中。在某些实施方案中,当本文中的纳米颗粒与一种或多种细胞接触时,本文中的纳米颗粒可以将一种或多种生物活性的分子、小分子和/或基因编辑疗法施用至一种或多种细胞。在某些实施方案中,当本文中的纳米颗粒与一种或多种组织接触时,本文中的纳米颗粒可以穿透进一种或多种组织。在某些实施方案中,当本文中的纳米颗粒与一种或多种组织接触时,本文中的纳米颗粒可以将一种或多种生物活性的分子、小分子和/或基因编辑疗法施用至一种或多种组织。在某些实施方案中,当本文中的纳米颗粒与一种或多种器官接触时,本文中的纳米颗粒可以穿透进一种或多种器官。在某些实施方案中,当本文中的纳米颗粒与一种或多种器官接触时,本文中的纳米颗粒可以将一种或多种生物活性的分子、小分子和/或基因编辑疗法施用至一种或多种细胞。在某些实施方案中,本文中的纳米颗粒可以穿透进特定细胞类型、组织类型、器官或它们的任何组合。在某些方面,本文中的纳米颗粒可以穿透进皮肤细胞、肺细胞、肝细胞、脾细胞或它们的任何组合。在某些方面,本文中的纳米颗粒可以穿透进皮肤组织、肺组织、肝组织、脾组织或它们的任何组合。在某些方面,本文中的纳米颗粒可以穿透进皮肤、肺、肝、脾或它们的任何组合。

[0135] 在某些实施方案中,本文中合成的可电离的磷脂可以用于形成一种或多种LNP。LNP是由可电离的脂质制成的球形囊泡,其在低pH可以带正电荷(实现RNA络合),并在生理pH可以呈中性(与带正电荷的脂质诸如脂质体相比,减少潜在的毒性效应)。LNP可以通过胞吞作用被细胞吸收,并且脂质在低pH的电离度(很可能)可以实现胞内体逃逸,这允许将装载物释放到细胞质中。

[0136] 在某些实施方案中,本文中公开的合成的可电离的磷脂中的任一种可以用于形成LNP。在某些实施方案中,本文中的LNP可以包括一种或多种多尾的可电离的磷脂。在某些实施方案中,一种或多种多尾的可电离的磷脂中的每一种可以包括一个叔胺、一个磷酸酯基团和超过一个疏水尾巴。在某些方面,一种或多种多尾的可电离的磷脂中的每一种可以包括至少一个叔胺、至少一个磷酸酯基团和超过一个疏水尾巴,其中所述疏水尾巴可以包含约5个碳至约20(例如,约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20)个碳的烷基链长度。在某些方面,一种或多种多尾的可电离的磷脂中的每一种可以包括至少一个叔胺、至少一个磷酸酯基团和超过一个疏水尾巴,其中所述疏水尾巴可以包含约10个碳至约12个碳的烷基链长度。在某些方面,一种或多种多尾的可电离的磷脂中的每一种可以包括至少一个叔胺、至少一个磷酸酯基团和三个疏水尾巴,其中所述疏水尾巴可以包含约10个碳至约12个碳的烷基链长度。

[0137] 在某些实施方案中,本文中的LNP可以包括本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂,所述磷脂具有选自以下的nAxPm式(IV):1AxP4、1AxP5、1AxP6、1AxP7、1AxP8、1AxP9、1AxP10、1AxP11、1AxP12、1AxP13、1AxP14、1AxP15、1AxP16、2AxP4、2AxP5、2AxP6、2AxP7、2AxP8、2AxP9、2AxP10、2AxP11、2AxP12、2AxP13、2AxP14、2AxP15、2AxP16、3AxP4、3AxP5、3AxP6、3AxP7、3AxP8、3AxP9、3AxP10、3AxP11、3AxP12、3AxP13、3AxP14、3AxP15、3AxP16、4AxP4、4AxP5、4AxP6、4AxP7、4AxP8、4AxP9、4AxP10、4AxP11、4AxP12、4AxP13、4AxP14、4AxP15、4AxP16、5AxP4、5AxP5、5AxP6、5AxP7、5AxP8、5AxP9、5AxP10、5AxP11、5AxP12、5AxP13、5AxP14、5AxP15、5AxP16、6AxP4、6AxP5、6AxP6、6AxP7、6AxP8、6AxP9、6AxP10、6AxP11、6AxP12、6AxP13、6AxP14、6AxP15、6AxP16、7AxP4、7AxP5、7AxP6、7AxP7、7AxP8、

7AxP9、7AxP10、7AxP11、7AxP12、7AxP13、7AxP14、7AxP15、7AxP16、8AxP4、8AxP5、8AxP6、8AxP7、8AxP8、8AxP9、8AxP10、8AxP11、8AxP12、8AxP13、8AxP14、8AxP15、8AxP16、9AxP4、9AxP5、9AxP6、9AxP7、9AxP8、9AxP9、9AxP10、9AxP11、9AxP12、9AxP13、9AxP14、9AxP15、9AxP16、10AxP4、10AxP5、10AxP6、10AxP7、10AxP8、10AxP9、10AxP10、10AxP11、10AxP12、10AxP13、10AxP14、10AxP15、10AxP16、11AxP4、11AxP5、11AxP6、11AxP7、11AxP8、11AxP9、11AxP10、11AxP11、11AxP12、11AxP13、11AxP14、11AxP15、11AxP16、12AxP4、12AxP5、12AxP6、12AxP7、12AxP8、12AxP9、12AxP10、12AxP11、12AxP12、12AxP13、12AxP14、12AxP15、12AxP16、13AxP4、13AxP5、13AxP6、13AxP7、13AxP8、13AxP9、13AxP10、13AxP11、13AxP12、13AxP13、13AxP14、13AxP15、13AxP16、14AxP4、14AxP5、14AxP6、14AxP7、14AxP8、14AxP9、14AxP10、14AxP11、14AxP12、14AxP13、14AxP14、14AxP15、14AxP16、15AxP4、15AxP5、15AxP6、15AxP7、15AxP8、15AxP9、15AxP10、15AxP11、15AxP12、15AxP13、15AxP14、15AxP15、15AxP16、16AxP4、16AxP5、16AxP6、16AxP7、16AxP8、16AxP9、16AxP10、16AxP11、16AxP12、16AxP13、16AxP14、16AxP15、16AxP16、17AxP4、17AxP5、17AxP6、17AxP7、17AxP8、17AxP9、17AxP10、17AxP11、17AxP12、17AxP13、17AxP14、17AxP15、17AxP16、18AxP4、18AxP5、18AxP6、18AxP7、18AxP8、18AxP9、18AxP10、18AxP11、18AxP12、18AxP13、18AxP14、18AxP15、18AxP16、19AxP4、19AxP5、19AxP6、19AxP7、19AxP8、19AxP9、19AxP10、19AxP11、19AxP12、19AxP13、19AxP14、19AxP15、19AxP16、20AxP4、20AxP5、20AxP6、20AxP7、20AxP8、20AxP9、20AxP10、20AxP11、20AxP12、20AxP13、20AxP14、20AxP15、20AxP16、21AxP4、21AxP5、21AxP6、21AxP7、21AxP8、21AxP9、21AxP10、21AxP11、21AxP12、21AxP13、21AxP14、21AxP15、21AxP16、22AxP4、22AxP5、22AxP6、22AxP7、22AxP8、22AxP9、22AxP10、22AxP11、22AxP12、22AxP13、22AxP14、22AxP15、22AxP16、23AxP4、23AxP5、23AxP6、23AxP7、23AxP8、23AxP9、23AxP10、23AxP11、23AxP12、23AxP13、23AxP14、23AxP15、23AxP16、24AxP4、24AxP5、24AxP6、24AxP7、24AxP8、24AxP9、24AxP10、24AxP11、24AxP12、24AxP13、24AxP14、24AxP15、24AxP16、25AxP4、25AxP5、25AxP6、25AxP7、25AxP8、25AxP9、25AxP10、25AxP11、25AxP12、25AxP13、25AxP14、25AxP15、25AxP16、26AxP4、26AxP5、26AxP6、26AxP7、26AxP8、26AxP9、26AxP10、26AxP11、26AxP12、26AxP13、26AxP14、26AxP15、26AxP16、27AxP4、27AxP5、27AxP6、27AxP7、27AxP8、27AxP9、27AxP10、27AxP11、27AxP12、27AxP13、27AxP14、27AxP15、27AxP16、28AxP4、28AxP5、28AxP6、28AxP7、28AxP8、28AxP9、28AxP10、28AxP11、28AxP12、28AxP13、28AxP14、28AxP15、28AxP16,其中在“nAxPm”中的“x”表示在一个胺分子上修饰的Pm分子的数目。

[0138] 在某些实施方案中,本文中的LNP可以包括本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂,所述磷脂具有选自以下的nAxPm式(IV):7A1P4、7A1P5、7A1P6、7A1P7、7A1P8、7A1P9、7A1P10、7A1P11、7A1P12、7A1P13、7A1P14、7A1P15、7A1P16、8A1P4、8A1P5、8A1P6、8A1P7、8A1P8、8A1P9、8A1P10、8A1P11、8A1P12、8A1P13、8A1P14、8A1P15、8A1P16、9A1P4、9A1P5、9A1P6、9A1P7、9A1P8、9A1P9、9A1P10、9A1P11、9A1P12、9A1P13、9A1P14、9A1P15、9A1P16、10A1P4、10A1P5、10A1P6、10A1P7、10A1P8、10A1P9、10A1P10、10A1P11、10A1P12、10A1P13、10A1P14、10A1P15、10A1P16、11A1P4、11A1P5、11A1P6、11A1P7、11A1P8、11A1P9、11A1P10、11A1P11、11A1P12、11A1P13、11A1P14、11A1P15、11A1P16、12A1P4、12A1P5、12A1P6、12A1P7、12A1P8、12A1P9、12A1P10、12A1P11、12A1P12、12A1P13、12A1P14、12A1P15、12A1P16、13A1P4、13A1P5、13A1P6、13A1P7、13A1P8、13A1P9、13A1P10、13A1P11、13A1P12、13A1P13、13A1P14、

13A1P15、13A1P16或它们的任何组合。在某些方面,本文中的LNP可以包括本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂,所述磷脂具有选自以下的nAxPm式(IV):9A1P9、9A1P15、10A1P10、10A1P16或它们的任何组合。

[0139] LNP通常含有:促进细胞结合的辅助脂质,填充脂质之间的空隙的胆甾醇,和减少血清蛋白的调理素作用和网状内皮清除的聚乙二醇(PEG)。

[0140] 在某些实施方案中,本文中的LNP可以包括本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂和至少一种辅助脂质。在某些实施方案中,本文中的LNP可以包括本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂和选自以下的至少一种辅助脂质:1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、N-甲基双十八烷基胺(MDOA)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)、二甲基双十八烷基溴化铵盐(DDAB)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)和它们的任何组合。在某些实施方案中,本文中的LNP可以包括本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂和至少一种两性离子辅助脂质(例如,DOPE)、可电离的阳离子辅助脂质(例如,MDOA、DODAP)、永久阳离子辅助脂质(例如,DDAB、DOTAP)或它们的任何组合。

[0141] 在某些实施方案中,本文中的LNP可以包括本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂和至少一种胆甾醇和/或胆甾醇衍生物。本文中使用的"胆甾醇衍生物"表示基本上由胆甾醇结构组成的任何化合物,包括其加合物(addition)、取代物(substitution)和/或缺失物(deletion)。本文中的术语胆甾醇衍生物还可以包括本领域普遍公认的类固醇激素和胆汁酸。适合用于本文中用途的胆甾醇衍生物的非限制性例子可以包括二氢胆甾醇、对映胆甾醇(ent-cholesterol)、表胆甾醇(epi-cholesterol)、链甾醇、胆甾烷醇、胆甾烷酮、胆甾烯酮、谷甾醇、胆甾醇基-2′-羟基乙基醚、胆甾醇基-4′-羟基丁基醚、3β-[N-(N′N′-二甲基氨基乙基)氨甲酰基胆甾醇(DC-Chol)、24(S)-羟基胆甾醇、25-羟基胆甾醇、25(R)-27-羟基胆甾醇、22-氧杂胆甾醇、23-氧杂胆甾醇、24-氧杂胆甾醇、环阿屯醇、22-酮甾醇、20-羟基甾醇、7-羟基胆甾醇、19-羟基胆甾醇、22-羟基胆甾醇、25-羟基胆甾醇、7-脱氢胆甾醇、5α-胆甾-7-烯-3β-醇、3,6,9-三氧杂辛烷-1-醇-胆甾醇基-3e-醇、脱氢麦角甾醇、脱氢表雄酮、羊毛甾醇、二氢羊毛甾醇、羊毛甾烯醇、光甾醇、谷钙化醇(sitocalciferol)、卡泊三醇、粪甾醇、胆骨化醇、羽扇醇、麦角钙化醇、22-二氢麦角钙化醇、麦角甾醇、菜籽甾醇、番茄碱、番茄素、熊果酸、胆酸、鹅去氧胆酸、酵母甾醇、薯蓣皂甙配基、岩藻甾醇、粪生甾醇(fecosterol)或粪生甾醇或其盐或酯。

[0142] 在某些实施方案中,本文中的LNP可以包括本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂和至少一种PEG或PEG-修饰的脂质。本文中使用的PEG-修饰的脂质或"PEG脂质"表示用聚乙二醇(PEG)修饰的脂质。这样的物质可以可替代地被称作PEG化的脂质。适合用于本文中用途的PEG-修饰的脂质的非限制性例子可以包括PEG-修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG-修饰的磷脂酸、PEG-修饰的神经酰胺(PEG-CER)、PEG-修饰的二烷基胺、PEG-修饰的二酰基甘油(PEG-DAG)、PEG-修饰的二烷基甘油、及其混合物。例如,但不限于,用于本文中用途的PEG-修饰的脂质可以是PEG-c-DOMG(R-3-[(ω-甲氧基聚(乙二醇)2000)氨甲酰基]-1,2-二肉豆蔻基氧基-丙基-3-胺聚(乙二醇));PEG-DMG(1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油-3-甲氧基聚乙二醇聚(乙二醇));PEG-DLPE(1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷酰基甘油钠盐-聚(乙二醇));PEG-DMPE(二甲基-2-(二甲基膦基)乙基膦-聚(乙二醇));PEG-DPPC(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱-聚(乙二醇));PEG-DSPE(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-聚

(乙二醇));PEG-DPPE(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[单甲氧基聚(乙二醇))等。

[0143] 在某些实施方案中,用于本文中用途的PEG-修饰的脂质可以包含具有从约1000道尔顿至约20,000道尔顿的尺寸的PEG部分。在某些方面,用于本文中用途的PEG-修饰的脂质可以包含具有约1000道尔顿、约2000道尔顿、约5000道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿或约20,000道尔顿的尺寸的PEG部分。在某些方面,本文中的LNP可以包括本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂和至少一种PEG或PEG-修饰的脂质,其中所述PEG部分可以具有约2000道尔顿的尺寸。用于制备本文描述的LNP的有用PEG-脂质的例子包括、但不限于1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-350](mPEG 350PE);1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-550](mPEG 550PE);1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-750](mPEG 750PE);1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-1000](mPEG 1000PE);1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](mPEG 2000PE);1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-3000](mPEG 3000PE);1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-5000](mPEG 5000PE);N-酰基-鞘氨醇-1-[琥珀酰(甲氧基聚乙二醇)750](mPEG 750神经酰胺);N-酰基-鞘氨醇-1-[琥珀酰(甲氧基聚乙二醇)2000](mPEG 2000神经酰胺);和N-酰基-鞘氨醇-1-[琥珀酰(甲氧基聚乙二醇)5000](mPEG 5000神经酰胺)。在某些方面,本文中的LNP可以包括本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂和1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油-3-甲氧基(聚(乙二醇-2000))(DMG-PEG2000)。

[0144] 构成LNP的可电离的脂质、辅助脂质、胆甾醇和PEG的相对量可以实质上影响脂质纳米颗粒的效力。在某些实施方案中,本文中的LNP可以包括55:30:45、25:30:30或60:30:40摩尔比的本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂、至少一种辅助脂质和至少一种胆甾醇和/或胆甾醇衍生物。本领域技术人员将理解,可以根据需要优化本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂、至少一种辅助脂质和至少一种胆甾醇和/或胆甾醇衍生物的摩尔比,特别是对于本文中的LNP的给定应用和/或施用途径。在某些方面,本文中的LNP可以包括55:30:45摩尔比的本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)和胆甾醇。在某些方面,本文中的LNP可以包括25:30:30摩尔比的本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂、N-甲基双十八烷基胺(MDOA)和胆甾醇。在某些方面,本文中的LNP可以包括25:30:30摩尔比的本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)和胆甾醇。在某些方面,本文中的LNP可以包括25:30:30摩尔比的本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂、5A2-SC8和胆甾醇。在某些方面,本文中的LNP可以包括60:30:40摩尔比的本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂、二甲基双十八烷基溴化铵盐(DDAB)和胆甾醇。在某些方面,本文中的LNP可以包括60:30:40摩尔比的本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)和胆甾醇。

[0145] 在某些实施方案中,本文中的LNP可以包括本文提供的一种或多种合成的可电离的磷脂以靶向一种或多种细胞类型。在某些实施方案中,包含本文提供的合成的可电离的磷脂的LNP可以使所述LNP对一种或多种细胞类型具有选择性。在某些实施方案中,包含本文提供的合成的可电离的磷脂的LNP可以使LNP在一种或多种选择性细胞类型处卸载装载

物。在某些实施方案中,本文中的LNP可以选择性地靶向一种或多种细胞类型。在某些实施方案中,本文中的LNP可以选择性地靶向皮肤细胞、脾细胞、肝细胞、肺细胞或它们的组合。在某些实施方案中,本文中的LNP可以选择性地靶向一种或多种组织类型。在某些实施方案中,本文中的LNP可以选择性地靶向皮肤、脾、肝、肺或它们的组合。在某些方面,本文中的包含合成的可电离的磷脂9A1P9和辅助脂质5A2-SC8的LNP可以选择性地靶向肝。在某些方面,本文中的包含合成的可电离的磷脂9A1P9和辅助脂质DDAB的LNP可以选择性地靶向肺。在某些方面,本文中的包含合成的可电离的磷脂10A1P16和辅助脂质MDOA的LNP可以选择性地靶向脾。

[0146] LNP尺寸可以影响脂质纳米颗粒在体内的行为。在一些描述中,例如,在直径是相关测量值的情况下,诸如在具有可测量直径的球形和其它形状囊泡中,术语“尺寸”和“直径”可互换使用。可以通过动态光散射(DLS)和/或纳米颗粒追踪分析(NTA)来确定本文公开的LNP的尺寸。

[0147] 在某些实施方案中,本文中的LNP的直径或尺寸可以为约20nm至约1000nm。在某些实施方案中,本文中的LNP的尺寸可以为约20nm至约200nm。在某些实施方案中,本文中的LNP的尺寸可以为约20nm至约190nm或约25nm至约190nm。在某些实施方案中,本文中的LNP的尺寸可以为约30nm至约180nm。在某些实施方案中,本文中的LNP的尺寸可以为约35nm至约170nm。在某些实施方案中,本文中的LNP的尺寸可以为约40nm至约160nm。在某些实施方案中,本文中的LNP的尺寸可以为约50nm至约150nm、约60nm至约140nm、约70nm至约130nm、约80nm至约120nm或约90nm至约110nm。在某些实施方案中,本文中的LNP的尺寸或直径可以为约20nm、约25nm、约30nm、约35nm、约40nm、约45nm、约50nm、约55nm、约60nm、约65nm、约70nm、约75nm、约80nm、约85nm、约90nm、约95nm、约100nm、约105nm、约110nm、约115nm、约120nm、约125nm、约130nm、约135nm、约140nm、约145nm、约150nm、约155nm、约160nm、约165nm、约170nm、约175nm、约180nm、约185nm、约190nm、约195nm或约200nm。

[0148] 在某些实施方案中,在LNP组合物或多个LNP中的平均LNP尺寸可以为约20nm至约1000nm(例如,约20、40、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000)的直径平均尺寸。在某些实施方案中,在LNP组合物或多个LNP中的LNP尺寸可以是均匀的,直径尺寸为约20nm至约1000nm(例如,约20、40、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000)。在某些实施方案中,在LNP组合物或多个LNP中的LNP尺寸可以是均匀的,直径平均尺寸为约20nm至约1000nm(例如,约20、40、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000)。在某些实施方案中,在LNP组合物或多个LNP中的LNP尺寸可以是均匀的,其中约50%至约99%的LNP的平均直径平均尺寸为约20nm至约1000nm(例如,约20、40、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000)。

[0149] 在某些实施方案中,本文中包含一种或多种合成的可电离的磷脂的LNP可以具有负电荷。在某些实施方案中,本文中包含一种或多种合成的可电离的磷脂的LNP可以在细胞外(例如,在血清中)具有负电荷。在某些实施方案中,本文中包含一种或多种合成的可电离的磷脂的LNP可以具有负表面ζ电位。在某些实施方案中,本文中包含一种或多种合成的可电离的磷脂的LNP可以具有在从约-20mV至约-0.5mV范围内的负表面ζ电位。在某些实施方

案中,本文中包含一种或多种合成的可电离的磷脂的LNP可以具有约-20mV、约-15mV、约-10mV、约-5mV、约-2.5mV、约-1.0mV或约-0.5mV的负表面ζ电位。

[0150] 在某些实施方案中,本文中包含一种或多种合成的可电离的磷脂的LNP可以不具有电荷(例如,净神经电荷)。在某些实施方案中,本文中包含一种或多种合成的可电离的磷脂的LNP可以在细胞内(例如,在细胞腔中)不具有电荷。在某些实施方案中,本文中包含一种或多种合成的可电离的磷脂的LNP可以在细胞外具有负电荷,并且在LNP穿过细胞膜进入细胞腔之后不带电荷。在某些实施方案中,本文中包含一种或多种合成的可电离的磷脂的LNP可以在细胞外具有负表面ζ电位,并且在LNP穿过细胞膜进入细胞腔之后不具有表面电荷。在某些实施方案中,本文中包含一种或多种合成的可电离的磷脂的LNP可以在细胞外具有在从约-20mV至约-0.5mV范围内的负表面ζ电位,并且在LNP穿过细胞膜进入细胞腔之后不具有表面电荷(例如,约0mV)。

[0151] 在某些实施方案中,本文中包含一种或多种合成的可电离的磷脂的LNP可以具有适合用于体内用途的pKa。在某些实施方案中,本文中包含一种或多种合成的可电离的磷脂的LNP可以具有在从约5.5至约7.5范围内(例如,约5.5、6.0、6.5、7.0、7.5)的pKa。

[0152] 多种方法可以用于制备本文描述的LNP。这样的方法是本领域已知的或本文中公开的,例如,Lichtenberg和Barenholz在Methods of Biochemical Analysis,第33卷,337-462(1988)中描述的方法。也参见Szoka等人,Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9:467(1980);美国专利号4,235,871、4,501,728和4,837,028;Liposomes,Marc J.Ostro,编,Marcel Dekker,Inc.,New York,1983,第1章;和Hope,等人,Chem.Phys.Lip.40:89(1986),它们中的每一篇的有关公开内容通过引用并入本文。

[0153] 本文描述的任何LNP可以用作媒介物用于携带生物分子(装载物)以促进生物分子向受试者的递送。除了本文公开的LNP的其它优越特征外,LNP可以保护在其中装载的装载物免于降解,例如免于被酶消化。因此,本文还提供了负载装载物的LNP,其可以用于为了诊断和/或治疗目的将装载的装载物递送至受试者。在某些方面,所述装载物可以是治疗剂。在某些方面,所述装载物可以是基因编辑试剂。

[0154] 在某些实施方案中,本公开内容提供了负载装载物的LNP或负载治疗物的LNP。术语“负载装载物的LNP”、“负载治疗物的LNP”或“负载治疗剂的LNP”意在包括负载一种或多种装载物,包括治疗剂、诊断剂和用于用在基因编辑中的试剂。如本文中使用的,在提及“负载装载物的LNP”、“负载治疗物的LNP”或“负载治疗剂的LNP”时使用的术语“负载(loaded)”或“负载(loading)”表示具有一种或多种装载物(其可以是生物分子诸如治疗剂、诊断剂、用于用在基因编辑中的试剂)的LNP,所述装载物(1)被包封在LNP内;(2)与LNP的脂质膜混在一起(associate with)或被部分地嵌入LNP的脂质膜内(即部分地伸出到LNP的内部);(3)与脂质膜的外部部分和相关组分混在一起或被结合到脂质膜的外部部分和相关组分(即,部分地伸出或完全在LNP之外);或(4)完全被设置在LNP的脂质膜内(即完全被包含在脂质膜内)。

[0155] 术语“负载装载物”表示向LNP负载、添加或包括外源性装载物或治疗物的过程,使得上述(1)-(4)所得的负载装载物的或负载治疗物的囊泡中的任何一种或多种得以完成。因此,在某些实施方案中,所述装载物被包封在LNP内。在某些实施方案中,所述装载物与LNP的脂质膜混在一起或被部分地嵌入LNP的脂质膜内(即,部分地伸出到囊泡内部)。在某

些实施方案中,所述装载物与脂质膜的外部部分混在一起或被结合到脂质膜的外部部分(即,部分地伸出到LNP之外)。在某些实施方案中,所述装载物完全被设置在囊泡的脂质膜内(即,完全被包含在脂质膜内)。本文中使用的术语“装载物”意在包括可以被负载进入LNP中或被LNP负载的任何生物分子或试剂,包括例如生物制品(例如,肽、蛋白、抗体、适体(aptamer)、核酸、寡物(oilgo))、小分子、治疗剂和/或诊断剂。

[0156] 在某些实施方案中,一种或多种装载物可以存在于LNP的内部或内表面上。在某些实施方案中,存在于LNP的内部或内表面上的一种或多种装载物可以与LNP混在一起,例如,通过化学相互作用、电磁相互作用、疏水相互作用、静电相互作用、范德华相互作用、连接、键合(氢键、离子键、共价键等)。在某些实施方案中,本文中的LNP可以包封一种或多种装载物。

[0157] 在某些实施方案中,本文中的LNP可以负载有单一装载物,例如,单一治疗剂。在某些实施方案中,本文中的LNP可以负载有两种(或更多种)不同装载物。在某些实施方案中,本文中的LNP可以负载有单一装载物或两种(或更多种)不同装载物的两个或更多个分子或拷贝。在某些实施方案中,本文中的LNP可以负载有单一装载物或两种(或更多种)不同装载物的三个或更多个分子或拷贝。在某些实施方案中,本文中的LNP可以负载有单一装载物或两种(或更多种)不同装载物的2-5个分子或拷贝。在某些实施方案中,本文中的LNP和/或其药物组合物可以负载有单一装载物或两种(或更多种)不同装载物的1-4,000、10-4,000、50-3,500、100-3,000、200-2,500、300-1,500、500-1,200、750-1,000、1-2,000、1-1,000、1-500、10-400、50-300、1-250、1-100、2-50、2-25、2-15、2-10、3-50、3-25、3-25、3-10、4-50、4-25、4-15、4-10、5-50、5-25、5-15或5-10个分子或拷贝,或其间的任何增量。

[0158] 本领域已知的将装载物负载到LNP中的方法可以用于将装载物负载到本公开内容的LNP中。适合用于本文中用途的将装载物负载到LNP中的方法的非限制性例子包括pH梯度、金属离子梯度、跨膜梯度、表面负载、融合负载等。本文描述的负载装载物的LNP中的装载物可以是任何类型。在某些实施方案中,本文中的LNP的装载物可以选自由以下成员组成的集合:活性药物成分、核酸、ncRNA、siRNA、miRNA、tRNA、mRNA、shRNA、sgRNA、CRISPR/Cas9 DNA序列、CRISPR/Cas12 DNA序列、CRISPR/Cas13序列、作用于RNA(ADAR)序列的腺苷脱氨酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化剂样效应物核酸酶(TALEN)、碱基编辑器、单链DNA(ssDNA)、质粒DNA(pDNA)、环状RNA(circRNA)、反义寡核苷酸(AO)、小分子药物、蛋白和它们的任何组合。

[0159] 在某些实施方案中,本文的负载装载物的LNP中的装载物可以是生物分子。本文中使用的术语“生物分子”与术语“生物学治疗剂”互换使用。在某些实施方案中,本文的负载装载物的LNP中的装载物可以是小分子。在某些实施方案中,本文的负载装载物的LNP中的装载物可以是活性药物成分。

[0160] 在某些实施方案中,本文中的LNP可以包含这样的装载物(例如,生物分子):其为蛋白、肽、适体、抗体、抗体片段或它们的任何组合。在某些实施方案中,本文中的LNP可以包含这样的装载物(例如,生物分子):其为核酸。在某些方面,核酸装载物可以是,例如,寡核苷酸治疗剂,诸如单链或双链寡核苷酸治疗剂。在某些实施例中,所述寡核苷酸治疗剂可以是单链或双链DNA、iRNA、shRNA、siRNA、mRNA、非编码RNA(ncRNA)、反义物诸如反义RNA、miRNA、吗啉代寡核苷酸、肽-核酸(PNA)或ssDNA(具有天然的和修饰的核苷酸,包括、但不限

于LNA、BNA、2'-O-Me-RNA、2'-MEO-RNA、2'-F-RNA)或其类似物或缀合物。在某些实施方案中,本文中的负载装载物的LNP中的装载物可以是mRNA。

[0161] 在某些实施方案中,本文中的LNP可以用于递送CRISPR-Cas系统。"CRISPR/Cas"系统或"CRISPR/Cas介导的基因编辑"表示II型CRISPR/Cas系统(例如,CRISPR/Cas9)、V型CRISPR/Cas系统(例如,CRISPR/Cas12)和/或VI型CRISPR/Cas系统(例如,CRISPR/Cas13),其已经针对基因组编辑/工程进行过改造。它通常包含"指导"RNA(gRNA)和非特异性的CRISPR-相关的内切核酸酶(例如,Cas9、Cas12、Cas13或其任何变体)。"指导RNA(gRNA)"在本文中与"短指导RNA(sgRNA)"或"单一指导RNA(sgRNA)"互换使用。sgRNA是一种短的合成RNA,它由Cas结合所必需的"支架"序列和用户定义的约20个核苷酸"间隔物"或"靶向"序列组成,后者定义了要修饰的基因组靶标。通过改变在sgRNA中存在的靶向序列,可以改变Cas的基因组靶标。在某些实施方案中,本文中的LNP可以包含具有CRISPR-Cas系统的一种或多种组分的装载物。在某些实施方案中,具有CRISPR-Cas系统的一种或多种组分的装载物可以包括mRNA、sgRNA、CRISPR/Cas DNA序列CRISPR/Cas核糖核蛋白(RNP)复合物和它们的任何组合。

[0162] III.药物组合物

[0163] 本公开内容也提供了药物组合物,所述药物组合物包含在本文中描述的任何LNP以及药学上可接受的载体或赋形剂,所述LNP可以包封也在本文中描述的一种或多种装载物。所述药物组合物中的载体必须是"可接受的",其含义是,它与所述组合物的活性成分相容,并且优选地能够稳定活性成分并且对待治疗的受试者无害。药学上可接受的赋形剂(载体)包括本领域众所周知的缓冲剂。参见,例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy第20版(2000)Lippincott Williams和Wilkins,K.E.Hoover编,其公开内容通过引用并入。

[0164] 在某些实施方案中,本文中的药物组合物可以包含呈低压冻干制剂或水溶液形式的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在使用的剂量和浓度对接受者无毒,并且可以包含缓冲剂诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖类、二糖类和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或葡聚糖;螯合剂诸如EDTA;糖类诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子诸如钠;金属配合物(例如,Zn-蛋白配合物);和/或非离子型表面活性剂,诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0165] 取决于施用途径和药物形式,本文可以使用不同的载体和/或赋形剂。用于本文中用途的赋形剂包括、但不限于抗黏剂、黏合剂、包衣崩解剂、填充剂、调味剂(诸如甜味剂)和着色剂、助流剂、润滑剂、防腐剂、吸着剂。本文描述的载体和/或赋形剂还可以包括媒介物和/或稀释剂,其中:"媒介物"表示通常作为溶剂或载体起作用的各种介质中的任一种;"稀释剂"表示用于稀释组合物的活性成分的稀释剂;合适的稀释剂包括可以降低药物制品的黏度的任何物质。

[0166] 根据所选的药物形式选择载体和/或赋形剂的类型和量;合适的药物形式是液体系统如溶液、输注液、混悬液;半固体系统如胶体、凝胶、糊剂或乳膏(creme);固体系统如粉剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、小丸剂、微颗粒剂、小片剂、微胶囊剂、微小丸剂(micropellet)、栓剂;等。使用本领域众所周知的技术,可以适当地配制上述系统中的每一个以用于正常、延迟或加速释放。

[0167] 根据标准技术、以及本文描述的那些技术,可以制备包含本文描述的LNP的药物组合物。在某些实施例中,所述药物组合物被配制用于胃肠外施用,包括小管内施用、静脉内施用、皮下施用、皮内施用、腹膜内施用、鞘内施用和肌肉内施用。在某些实施例中,可以通过快速推注(bolus injection)或输注静脉内地施用本文中的药物组合物。用于用在本发明中的合适制剂参见Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Company,Philadelphia,Pa.,第17版(1985),其公开内容通过引用并入。

[0168] 在某些实施方案中,本文中的药物组合物可以被配制用于注射,诸如静脉内输注。使用合适的分散剂或润湿剂(诸如吐温80)或助悬剂,根据本领域已知的技术,可以配制无菌的可注射的组合物,例如,无菌的可注射的水性或油性混悬液。无菌的可注射的制品还可以是在无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌的可注射的溶液或混悬液,例如,作为在1,3-丁二醇中的溶液。可以采用的可接受的媒介物和溶剂包括甘露醇、水、林格氏溶液和等渗的氯化钠溶液。另外,无菌的不挥发性油常规地用作溶剂或悬浮介质(例如,合成的甘油单酯或甘油二酯)。脂肪酸(诸如油酸和它的甘油酯衍生物)可用于制备注射剂,天然的药学上可接受的油(诸如橄榄油或蓖麻油)也是如此,特别是其聚氧乙基化形式。这些油溶液或混悬液还可以含有长链醇稀释剂或分散剂、或羧甲基纤维素或类似的分散剂。其它常用的表面活性剂诸如吐温或司盘或通常用于药物制造的其它类似的乳化剂或生物利用度增强剂。

[0169] 在某些实施方案中,本文描述的药物组合物可以呈单位剂型诸如片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、颗粒、溶液或混悬液或栓剂,用于口服、胃肠外或直肠施用或通过吸入或吹入法施用。为了制备固体组合物诸如片剂,本文公开的LNP可以与药物载体(例如,常规压片成分诸如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨醇、滑石粉、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或树胶)和其它药物稀释剂(例如水)混合,以形成含有本发明的化合物或其无毒的药学上可接受的盐的均匀混合物的固体预制剂组合物。当将这些预制剂组合物称为均匀时,是指活性成分均匀地分散在整个组合物中,使得可以容易地将所述组合物细分为同样有效的单位剂型诸如片剂、丸剂和胶囊剂。然后将该固体预制剂组合物细分为上述类型的单位剂型,其含有0.1至约500mg的本发明的活性成分。可以将该新组合物的片剂或丸剂涂覆或以其它方式混合,以得到提供具有长效作用的剂型。例如,片剂或丸剂可以包含内剂量和外剂量组分,后者是前者的外壳形式。两种组分可以被肠溶层隔开,所述肠溶层用于抵抗在胃中的崩解并允许内部组分完整地进入十二指肠或延迟释放。多种材料可用于这样的肠溶层或包衣,这样的材料包括许多聚合物酸和聚合物酸与诸如以下材料的混合物:紫胶、鲸蜡醇和醋酸纤维素。

[0170] 在某些实施方案中,本文描述的药物组合物可以是乳剂。使用商购可得的脂肪乳剂,诸如Intralipid™、Liposyn™、Infonutrol™、Lipofundin™和Lipiphysan™,可以制备合适的乳剂。本文中的LNP可以添加到预混合的乳剂组合物中,或者可替换地可以添加到油(例如,大豆油、红花油、棉籽油、芝麻油、玉米油或扁桃仁油)中,并且在与磷脂(例如卵磷

脂、大豆磷脂或大豆卵磷脂)和水混合后形成乳剂。应当理解,可以加入其它成分,例如甘油或葡萄糖,以调节乳剂的张度。合适的乳剂通常含有至多20%油,例如,在5-20%之间。脂肪乳剂可以包含0.1至1.0μm、特别是0.1至0.5μm之间的脂肪滴,并且具有在5.5至8.0范围内的pH。所述乳剂组合物可以是通过将LNP与Intralipid™或其组分(大豆油、卵磷脂、甘油和水)混合而制备的那些。在某些实施方案中,本文描述的药物组合物可以是用于局部施用(例如,用于治疗皮肤)的乳剂。

[0171] IV.使用方法

[0172] 在某些实施方案中,本公开内容也提供了将一种或多种装载物(例如,核酸分子、活性药物成分)引入到细胞中的方法,其包括使所述细胞与本文中公开的组合物接触。在某些实施方案中,本文中的方法可以包括将本文中的一种或多种装载物(例如,核酸分子、活性药物成分)递送至细胞,包括使所述细胞或细胞层与本文公开的LNP接触。在该方法的某些实施方案中,本文中的LNP可以将一种或多种异源分子递送至细胞。根据这些实施方案,本文中的LNP可以将一种或多种治疗性异源分子递送至细胞。在某些实施例中,使用本文中的方法递送至细胞的一种或多种治疗性异源分子可以是治疗性蛋白、治疗性DNA和/或治疗性RNA。在某些实施方案中,所述治疗性蛋白可以是单克隆抗体或融合蛋白。在某些实施方案中,所述治疗性DNA和/或RNA可以是反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、mRNA、DNA寡核苷酸等。在某些方面,本文中的LNP可以将一种或多种治疗性mRNA递送至细胞。

[0173] 在某些实施方案中,本公开内容也提供了将装载物(例如,核酸分子、活性药物成分)引入到细胞中的方法,包括使所述细胞与本文中公开的LNP和/或药物组合物接触。在某些实施方案中,本文中的方法可以包括将装载物(例如,核酸分子、活性药物成分)递送至特定细胞类型。在某些实施方案中,本文中的方法可以包括将装载物(例如,核酸分子、活性药物成分)递送至选自肝细胞、肺细胞、脾细胞和/或皮肤细胞的特定细胞类型。在某些实施方案中,本文中的方法可以包括将装载物(例如,核酸分子、活性药物成分)递送至肝细胞,包括使所述肝细胞与本文中公开的LNP接触。在某些实施方案中,本文中的方法可以包括将装载物(例如,核酸分子、活性药物成分)递送至肺细胞,包括使所述肺细胞与本文中公开的LNP接触。在某些实施方案中,本文中的方法可以包括将装载物(例如,核酸分子、活性药物成分)递送至脾细胞,包括使所述脾细胞与本文中公开的LNP接触。在某些实施方案中,本文中的方法可以包括将装载物(例如,核酸分子、活性药物成分)递送至皮肤细胞,包括使所述皮肤细胞与本文中公开的LNP接触。在某些实施方案中,本公开内容也提供了将装载物(例如,核酸分子、活性药物成分)引入到肺组织、肝组织、脾组织、皮肤组织或它们的任何组合中的方法,包括使所述细胞与本文中公开的LNP和/或组合物接触。

[0174] 本文中的LNP和/或药物组合物中的任一种可以用于将治疗剂、诊断剂或基因编辑系统递送至期望的靶位点。在某些实施方案中,本文中的LNP和/或药物组合物可以用于将治疗剂、诊断剂或基因编辑系统递送至肺、肝、皮肤和/或脾。

[0175] 在某些实施方案中,本文中的LNP和/或药物组合物中的任一种可以用于递送治疗剂、诊断剂或基因编辑系统以治疗和/或预防在受试者中的疾病、病症或障碍。为了实践该用途,可以将有效量的包含本文中的LNP的药物组合物通过合适的途径(诸如本文描述的那些)施用给需要治疗的受试者(例如,哺乳动物受试者、人受试者)。同样为了实践该用途,可以将有效量的包含本文描述的LNP(其包封治疗剂、诊断剂或基因编辑系统)中的任一种的

药物组合物通过合适的途径(诸如本文描述的那些)施用给需要治疗的受试者(例如,人受试者)。本文中使用的"有效量"表示单独地或与一种或多种其它活性剂组合地对受试者赋予治疗效果所需的每种活性剂的量。正如本领域技术人员所认识到的,有效量根据施用途径、赋形剂使用和与其它活性剂的共同使用而变化。当然,这样的量将取决于正在治疗的特定病症、病症的严重程度、个体患者参数(包括年龄、身体状况、尺寸、性别和重量)、治疗的持续时间、并行疗法的性质(如果有的话)、具体的施用途径、以及在健康从业人员的知识和专门技能范围内的类似因素。这些因素是本领域普通技术人员众所周知的,并且仅需常规实验即可解决。通常优选的是,使用最大剂量的单独组分或其组合,也就是说,根据合理的医学判断最高的安全剂量。但是,本领域普通技术人员将理解,患者可能出于医学原因、心理学原因或出于几乎任何其它原因而坚持较低剂量或可耐受的剂量。

[0176] 在某些实施方案中,本文描述的合成的可电离的磷脂、LNP、药物组合物和方法可以用于治疗肺病或肺障碍。适合用于通过本文中的方法治疗的肺疾病和/或肺障碍的非限制性例子可以包括慢性阻塞性肺疾病(COPD)、哮喘、急性气管支气管炎、肺炎、结核病、肺癌、流感感染、SARS-CoV2感染、表面活性蛋白缺乏、囊性纤维化、α-1抗胰蛋白酶(AAT)缺乏症等。

[0177] 在某些实施方案中,本文描述的合成的可电离的磷脂、LNP、药物组合物和方法可以用于治疗肝疾病或肝障碍。适合用于通过本文中的方法治疗的肝疾病和/或肝障碍的非限制性例子可以包括苯丙酮尿症(PKU)、鸟氨酸氨甲酰基转移酶(OTC)缺乏症、精氨酸酶-1缺乏症、α-1抗胰蛋白酶缺乏症、酪氨酸血症1型(HT1)、黏多糖贮积病、血友病、高胆甾醇血症、肝硬化、肝癌、非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)、肝细胞癌(HCC)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)等。

[0178] 在某些实施方案中,本文描述的合成的可电离的磷脂、LNP、药物组合物和方法可以用于治疗脾疾病或脾障碍。适合用于通过本文中的方法治疗的脾疾病和/或脾障碍的非限制性例子可以包括遗传性球形红细胞增多症、戈谢病、镰状细胞病、β-地中海贫血等。

[0179] 在某些实施方案中,本文描述的合成的可电离的磷脂、LNP、药物组合物和方法可以用于治疗皮肤疾病或皮肤障碍。适合用于通过本文中的方法治疗的皮肤疾病和/或皮肤障碍的非限制性例子可以包括大疱性表皮松解症(EB)、先天性甲肥厚、黑素瘤、鱼鳞病、Hailey-Hailey病、舍格伦-拉松综合征(SLS)、着色性干皮病(XP)、伤口愈合、内瑟顿综合征等。

[0180] V.试剂盒

[0181] 本公开内容也提供了试剂盒,其用于将治疗剂、诊断剂或基因编辑系统递送至靶位点(例如,细胞或组织)或用于在有此需要的受试者中治疗/预防疾病、障碍和/或病症。这样的试剂盒可以包括一个或多个容器,所述容器包含本文描述的药物组合物中的任一种。

[0182] 在某些实施方案中,所述试剂盒可以包含用于根据本文描述的方法中的任一种使用的说明书。所包括的说明书可以包含对药物组合物的施用的描述,所述施用用于递送包封在其中的治疗剂、诊断剂或基因编辑系统或用于根据本文描述的方法中的任一种治疗受试者。与本文描述的包含LNP的药物组合物的使用有关的说明书通常包括关于用于预期治疗的剂量、给药计划和施用途径的信息。

[0183] 所述容器可以是单位剂量,散包装(例如,多剂量包装)或亚-单位剂量。在本发明

的试剂盒中供应的说明书通常是在标签或包装插页(例如,在试剂盒中包括的纸质片材)上的书面说明,但是机器可读的指令(例如,在磁或光存储盘上承载的指令)也是可接受的。可以提供用于实践本文描述的方法中的任一种的说明书。

[0184] 如本文描述的试剂盒处于合适的包装中。合适的包装包括、但不限于管形瓶、瓶子、罐、柔性包装(例如,密封的Mylar或塑料袋)等。也考虑用于与特定装置(诸如吸入器、鼻施用装置(例如,雾化器)或输注装置诸如微型泵)联合使用的包装。在某些实施方案中,合适的包装可以是自动注射器。自动注射器是一次性使用的、用完即丢弃的、装载弹簧的注射器。试剂盒可以具有无菌的访问口(例如所述容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的管形瓶)。所述容器也可以具有无菌的访问口(例如所述容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的管形瓶)。

[0185] 本文描述的试剂盒可以任选地提供另外的组分诸如缓冲剂和解释信息。通常,试剂盒包含容器和在所述容器上或与所述容器混在一起的标签或包装插页。在某些实施方案中,本公开内容提供了包含上述试剂盒的内容物的制成品。

[0186] 一般技术

[0187] 除非另外指出,否则本发明的实践将采用分子生物学的常规技术(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,它们是在本领域的技术范围内。这样的技术在文献中进行了充分解释,所述文献诸如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版(Sambrook,等人,1989)Cold Spring Harbor Press;Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait,编,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis,编,1998)Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney,编,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths,和D.G.Newell,编,1993-8)J.Wiley和Sons;Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.);Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell,编);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos,编,1987);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel,等人,编,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis,等人,编,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人,编,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley和Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:a practical approach(D.Catty.,编,IRL Press,1988-1989);Monoclonal antibodies:a practical approach(P.Shepherd和C.Dean,编,Oxford University Press,2000);Using antibodies:alaboratory manual(E.Harlow和D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra,编,Harwood Academic Publishers,1995)。

[0188] 无需进一步阐述,据信,本领域技术人员基于上述描述可以在其最大程度上利用本发明。因此,以下具体实施方案应当被解释为仅仅示例性的,并且不以任何方式限制本公开内容的其余部分。为了本文提及的目的或主题,本文中引用的所有出版物通过引用并入。

实施例

[0189] 包括下述实施例以证明本公开内容的优选实施方案。本领域技术人员应该理解，在以下实施例中公开的技术代表发明人发现的在本公开内容的实践中较好地起作用的技术，并因此可以认为构成用于其实践的优选模式。但是，本领域技术人员考虑到本公开内容以后应该理解，可以对所公开的具体实施方案做出许多改变并且仍然获得相同或相似的结果，而不脱离本公开内容的精神和范围。

[0190] 实施例1.iPhos的文库经过合理设计，具有膜不稳定机制，可以实现卓越的胞内体逃逸

[0191] 根据本公开内容，合理设计了合成的可电离的磷脂(“iPhos脂质”或“iPhos”)，其含有可电离的胺、磷酸酯基团和三个疏水尾巴。预测由胺基和磷酸酯基团构成的小两性离子在不同pH是可逆的。在生理pH(约7.4)，叔胺基团不会被质子化，并且带负电荷的iPhos将难以融合到膜中。相反，在进入酸性胞内体后，叔胺被质子化以形成两性离子头(图1A)。在研究底物范围后，发现三个疏水尾巴体比两条链更容易介导膜相转化。因此，作用机理不同于经典的基因递送载体，因为合成的iPhos脂质可以整体插入天然磷脂膜中，优选的小离子对与呈现圆锥形形状的大尾巴体偶联，以促进六角形H_{II}相形成(图1B)。

[0192] 为了克服合成途径中的先前限制，我们专注于开环反应，所述反应可以产生具有化学复杂性的多种产物以满足上述设计指南。胺(nA)与烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物(Pm)的组合反应产生了572种iPhos脂质(称为nAxPm)(图1C)，其中“x”表示在一个胺分子上修饰的Pm分子的数目。通过从具有不同烷基链长度的相应醇酯化2-氯-2-氧代-1,3,2-二氧杂磷杂环戊烷(COP)来合成Pm分子(图7A-7M)。伯胺、仲胺和叔胺基团都可以触发Pm开环以引入不同的两性离子(图8)。为了控制疏水尾巴和两性离子数目，使用具有不同烷基链和胺基团数目的胺(图1D和图9)。iPhos的化学设计是独特的，因为通过这种策略，除了基团数目外，两性离子种类(pH可转换的和不可逆的)也变得可用，从而极大地拓宽了磷脂的结构和种类。

[0193] 实施例2.体外筛选表明，顶级iPhos具有pH-可转换的两性离子和三个尾巴

[0194] 根据本公开内容，为了评价mRNA递送的潜力，使用iPhos脂质纳米颗粒(iPLNP)转染卵巢癌细胞IGROV-1。使用乙醇稀释法将iPhos、辅助脂质、胆甾醇和1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油-3-甲氧基(聚(乙二醇-2000))(DMG-PEG2000)(25:30:30:1mol/mol)混合以配制iPLNP。一种结构简单的脂质即N-甲基双十八烷基胺(MDOA)首先被用作辅助脂质，以在初始筛选中证明iPhos功能。因此，iPLNP可以被视为与传统LNP不同的概念，在iPLNP中模块重点反而放在两性离子(功能活性iPhos)脂质上，而所有其它脂质变成辅助脂质。具有不同数目和种类的两性离子和尾巴的所有初始iPhos脂质均表现出低毒性(图10)。从体外筛选热图得出的结论是，具有单个两性离子的iPhos(1A1P4-18A1P16)显示出比具有多个两性离子的iPhos(19A2P4-28A5P16)更高的mRNA效力(图2A-2C)。原因可能与多个两性离子如何构建更大的头部，使得膜相转化困难有关。为了进一步探索具有单个两性离子的iPhos的SAR，双尾的材料(1A1P4-6A1P16)表现出差得多的效力，因为小尾巴体未能与天然膜磷脂形成圆锥形形状。iPhos 14A1P4-18A1P16具有永久两性离子，并在胞内体内化后缺乏结构灵活性。令人鼓舞的是，由一个叔胺、一个磷酸酯基团和三个疏水尾巴组成的iPhos(7A1P4-13A1P16)显示出如预期的最高mRNA递送效率，命中率为约60％(图2D)。小两性离子头和大尾巴体促进

了膜融合和从层状至六角形H_{II}的相转化。在这些iPhos脂质中,胺尾巴长度非常重要,并且10-12链长的命中率高达92％(图2E)。这些观察结果与以前报道的可电离的氨基脂质和类脂质文库相反,其中效力通常与多胺核心和更高数目的烷基尾巴相关[24-26]。这些结果表明,iPhos脂质可能通过与可电离的氨基脂质不同的机制起作用。接下来,纯化了一些选定的顶级iPhos脂质(9A1P9、9A1P15、10A1P10和10A1P16)(图11-14),并且得到的iPLNP表现出用于胞吞的合适的颗粒尺寸(约150nm),用"于血清蛋白抵抗的轻微负表面ζ电位(约-5mV),以及用于体内测定的合适的pKa(6.0-6.5)(图15A-C和图16A-16B)。这些能力赋予合成的iPhos脂质巨大的体内应用潜力。

[0195] 实施例3.模型膜研究揭示了与化学结构相关的iPhos介导的胞内体破裂的机制

[0196] 根据本公开内容,首先通过溶血模型评价了iPhos脂质和iPLNP的膜破坏活性[23,27]。检查了含有pH-可转换的两性离子头和三个尾巴的顶级iPhos脂质(9A1P9和10A1P10)。10A1P10表现出与具有简单叔胺的17A相比显著更高的溶血作用,证实了两性离子在膜融合和破裂中的优越性(图3A)。此外,与中性生理环境相比,9A1P9、10A1P10和有关的iPLNP在酸性胞内体隔室中显示出更高的膜破坏活性(图3B-3C)。

[0197] 随后,利用荧光共振能量转移(FRET)测定来评价iPhos脂质膜融合和iPLNP解离。两种DOPE-缀合的FRET探针即7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑(NBD-PE)和丽丝胺罗丹明B(Rho-PE)被配制成单个模拟胞内体的脂质体,从而由于向罗丹明的FRET导致减弱的NBD荧光。一旦脂质融合发生,在两个探针之间产生的更大距离导致NBD信号增加[28]。如在图3D中所示,10A1P10 iPLNP表现出比25A3P9 iPLNP更高的脂质融合,证实了与多个两性离子相比,小的单个两性离子头显示出更强的插入和破坏胞内体膜的趋势。之后,进一步使用FRET探针研究iPLNP,并且一旦与模拟胞内体的脂质体混合,10A1P10iPLNP比25A3P9 iPLNP更容易分解以释放mRNA(图3E-3G)。这些结果证实,除了大尾巴体之外,在iPhos脂质中的pH-可转换的小两性离子头对于胞内体逃逸是必不可少的。

[0198] 实施例4.iPhos的体内SAR证实,化学结构和烷基长度控制效力和器官选择性

[0199] 根据本公开内容,由于体内递送的额外障碍,并非所有已知的具有体外活性的载体都被转化到动物模型中[29,30]。此外,将siRNA/miRNA(18-22bp)与长mRNA(1,000-6,000nt)对比,需要较弱的静电结合,从而允许在细胞内化后的mRNA释放[12]。因此,iPhos脂质的化学性质可能具有胜过阳离子脂质的固有优点,并在mRNA递送系统中发挥关键作用。

[0200] 从体外筛选中选择51种有效的iPhos脂质,并在0.1mg kg^{-1}的低mRNA剂量评价体内递送(图4A)。含有多个两性离子的iPhos脂质无法在体内递送mRNA。进一步建立SAR,具有一个叔胺、一个磷酸酯基团和三个烷基尾巴的iPhos脂质是最有效的。令人感兴趣的是,烷基链长度极大地影响效力和器官选择性。在胺侧的链长度决定了效力,并且8至10个碳长度介导体内mRNA高表达(图4B和图17)。令人惊讶的是,发现在磷酸酯基团旁边的烷基长度影响在选择性器官中的mRNA转染(图4C-4D)。较短的链(9-12个碳)显示在肝中的mRNA翻译,而较长的链(13-16个碳)将蛋白表达转移到脾。10A1P4-10A1P16的体内评估也明确支持这一推论(图18)。在此之后,评价了这些iPLNP的纳米颗粒尺寸、ζ电位和pKa,其中没有观察到明显差异(图19)。然后以更高剂量(mRNA,0.25mg kg^{-1})评价基于iPhos的iPLNP(图20和21)。仍实现了器官选择性,即9A1P9 iPLNP显示出主要在肝中的mRNA表达,而9A1P15和10A1P16 iPLNP介导在脾中mRNA翻译。SAR为开发具有器官选择性和特异性的其它有效载体材料提供

了指南。

[0201] 实施例5.合成的iPhos脂质显示出与各种辅助脂质的广泛相容性以介导组织选择性的基因递送和编辑

[0202] 根据本公开内容,当用于含有简单辅助脂质MDOA的iPLNP中时,最初鉴定出顶级表现的脂质9A1P9。为了确认iPhos 9A1P9是iPLNP的最重要和最有活性的组分,进行了一系列实验。首先,发现与最好的目前使用的磷脂DOPE和DSPC相比,9A1P9表现出40至965倍高的体内效力(图5A-5C)。其次,在我们的9A1P9 iPLNP mRNA递送系统中评估了多种其它已建立的脂质作为辅助脂质,以显示广泛的适用性。两性离子脂质(DOPE)、可电离的阳离子脂质(MDOA、DODAP和5A2-SC8[26])和永久阳离子脂质(DDAB和DOTAP)被作为辅助脂质进行了研究(图22)。组合物的摩尔比通过正交设计方法[12,31]确定并如表1所示。所有配制的iPLNP表现出适当的直径、ζ电位、mRNA结合、pKa和高体外mRNA递送效率(图23)。

[0203] 表1.用于器官选择性mRNA表达的iPLNP组合物和比率.

[0204]

辅助脂质	摩尔比				9A1P9/mRNA (w/w)
	9A1P9	辅助脂质	胆甾醇	DMG-PEG2000	
DOPE	55	30	45	0.2	18/1
MDOA	25	30	30	1	18/1
DODAP	25	30	30	1	18/1
5A2-SC8	25	30	30	1	18/1
DDAB	60	30	40	0.4	18/1
DOTAP	60	30	40	0.4	18/1

[0205] 与不同辅助脂质偶联的9A1P9实现了器官选择性。具有两性离子的、可电离的阳离子的和永久阳离子辅助脂质的9A1P9 iPLNP能够实现分别在脾、肝和肺中的选择性mRNA表达(图5D-5I)。进一步研究了两种高度有效的制剂,并且体内生物分布结果揭示,9A1P9-5A2-SC8和9A1P9-DDAB iPLNP分别介导在肝和肺中的高积累(图24A-24C)。由于iPhos脂质可以以模块方式增强已经有效的制剂,因此确定9A1P9-5A2-SC8和9A1P9-DDAB组合特异性地分别在肝(约10^8个光子$s^{-1}cm^{-2}sr^{-1}$,0.05mg kg^{-1})和肺(约10^8个光子$s^{-1}cm^{-2}sr^{-1}$,0.25mg kg^{-1})中表现出超高水平的mRNA表达(图5F-5I和图25)。递送Cre-重组酶mRNA(Cre mRNA),仍然保留了高效力和器官选择性(图5J-5L)。与“黄金标准”DLin-MC3-DMA(用于FDA批准的Onpattro)LNP相比,9A1P9-5A2-SC8 iPLNP仍显示出13倍高的体内mRNA递送效率(图5M-5N)。因此,iPLNP不同于传统的阳离子脂质LNP,并且兼具高效力以及可控的器官选择性。动力学分析揭示,蛋白表达迅速发生并在注射后约6小时达到峰值(图26A-26C)。

[0206] 该模型接下来用于量化在肝、肺和脾器官中的特定细胞类型的转染。在递送Cre mRNA后,肝选择性的9A1P9-5A2-SC8 iPLNP介导mRNA递送至所有肝细胞的约91%(图27A-27C)。肺选择性的9A1P9-DDAB iPLNP转染了约34%的所有内皮细胞、约20%的所有上皮细胞和约13%的免疫细胞(图28)。脾选择性的10A1P16-MDOA iPLNP转染了约30%的所有巨噬细胞和6%的所有B细胞(图29)。这里提出的iPLNP代表了最有效的mRNA递送系统之一,并且具有用于器官选择性CRISPR/Cas9基因编辑的具有巨大潜力。

[0207] 实施例6.9A1P9 iPLNP实现了肝或肺选择性的CRISPR/Cas9基因编辑

[0208] 根据本公开内容,尽管LNP已被用于递送mRNA,但仍然几乎没有关于成功体内递送Cas9 mRNA/sgRNA用于CRISPR/Cas基因编辑的报道,更不用说精确递送到特定器官[1]。由于iPLNP系统显示出高mRNA递送效率和器官选择性,接下来利用它共同递送Cas9mRNA和sgRNA用于基因编辑。将含有4:1重量比的Cas9 mRNA和Tom1 sgRNA(sgTom1)的9A1P9-5A2-SC8和9A1P9-DDAB iPLNP以0.75mg kg^{-1}的总RNA剂量静脉内地(IV)施用进Ai9小鼠中,其会删除停止盒并活化tdTomato蛋白(图6A)。在9A1P9-5A2-SC8 iPLNP施用后,通过离体器官成像特异性地在肝中观察到荧光tdTomato蛋白(图6B)。通过共焦荧光显微术进行的切片器官分析显示在肝组织中的tdTomato阳性细胞(图6C)。类似地,9A1P9-DDAB iPLNP诱导在肺中的特异性基因编辑(图6D-6E)。此后,将PTEN sgRNA(sgPTEN)与Cas9 mRNA共同递送,用于靶向内源基因的在C57BL/6小鼠中的基因编辑(Cas9 mRNA/sgPTEN重量比,4:1;总RNA剂量,0.75mg kg^{-1})。T7E1测定显示了分别通过9A1P9-5A2-SC8和9A1P9-DDAB iPLNP在肝和肺中的有效靶基因编辑(图6F)。在特定器官中的CRISPR/Cas9基因编辑一直是研究和临床转化中的一项长期挑战。在该研究中,高效的和器官选择性的基因编辑拓宽了iPLNP在多种遗传性疾病中的应用。

[0209] 考虑到潜在的临床前活动,使用受控微流体混合以更大规模制造先导iPLNP。对混合速度和体积比的精确控制可以实现更小的9A1P9-5A2-SC8 iPLNP(77.2nm,肝特异性的)、9A1P9-DDAB iPLNP(108.1nm,肺特异性的)和10A1P16-MDOA iPLNP(96.1nm,脾特异性的)的制备。重要的是,在降低iPLNP直径后,完全保留了高体内mRNA递送效率和精确的器官选择性(图6G-6H和图30A-30B)。此外,iPLNP允许重复给药,其中在每次重复注射后保持高效力(图6I-6J)。肝功能酶和组织切片组织学的分析表明,这些iPLNP在试验剂量显示出可忽略的体内毒性(图6K-6N和图31A-31D)。这些结果突出了iPLNP系统在未来应用中的潜力。

[0210] 实施例7.iPLNP在皮下注射后实现核酸递送.

[0211] 使用乙醇稀释法配制iPLNP。每种iPLNP的脂质组分的摩尔比如下:25:30:30:1,iPhos脂质:胆甾醇:DODAP:PEG-DMG。将iPhos脂质与Cre重组酶(CRE)mRNA的重量比固定在18:1。将5μg的CRE mRNA iPLNP皮下注射到Ai9小鼠中。在皮下注射CRE mRNA iPLNP后44小时,使用IVIS对小鼠进行tdTomato信号成像。9A1-P9、9A1-P15和10A1-P16 iPLNP能够将CRE mRNA递送至细胞以实现基因编辑,其中编辑DNA以开启红色荧光报告物tdTomato蛋白的表达(图33A-33B)。

[0212] 实施例1-7的讨论

[0213] CRISPR/Cas9基因编辑系统因其在遗传性疾病治疗方面的巨大潜力而受到越来越多的关注。尽管细胞使用磷脂构建膜并介导转运,但大多数用于基因递送的有效脂质纳米颗粒都依赖于可电离的胺作为关键的生理化学参数,以通过电荷获取来介导胞内体逃逸。在载体开发中,合成的两性离子脂质在很大程度上尚未被探索,尽管由于它们与生物膜的同源性(homology),它们可能容易实现胞内体膜融合和渗漏。尽管已经报道两性离子有利于纳米颗粒的稳定性、RNA包封、细胞摄取和药代动力学,但目前的磷脂因缺乏化学结构灵活性而受到限制。

[0214] 因此,本公开内容旨在使用化学合成开发新的磷脂,这揭示了非常有吸引力的候选物以插入到生物膜中以实现从胞内体的有效装载物逃逸。同时,可以较好地定制磷脂的结构和功能,特别是允许酸性胞内体破裂并防止在生理环境中的血液溶血作用。iPhos脂质

的合理设计包括pH-可转换的小两性离子头和和三尾巴体。这种独特的结构使其易于插入到天然存在的膜磷脂中并诱导相转化以实现从胞内体的RNA释放。SAR揭示,iPhos链长度可以控制体内mRNA递送效率和器官选择性。此外,在我们的iPLNP系统中评价了多种现有的两性离子的、可电离的阳离子的和永久阳离子辅助脂质,该系统选择性地在脾、肝和肺中介导mRNA翻译。最终,利用顶级9A1P9-5A2-SC8和9A1P9-DDAB iPLNP来共同递送mRNA和sgRNA以编辑报告基因和内源基因,并实现了具有长期挑战性的器官选择性CRISPR/Cas9基因编辑。此外,这些iPLNP显示出广泛的适用性以递送其它核酸,包括质粒DNA和siRNA(图32A-32B)。这些特性赋予合成的可电离的磷脂用于治疗多种遗传性疾病同时具有最小的副作用的巨大的希望。

[0215] 在实施例1-7中使用的材料和方法

[0216] 材料-用于合成的化学品和试剂。2-氯-2-氧代-1,3,2-二氧杂磷杂环戊烷(COP)和三乙胺(TEA)购自Fisher Scientific。胺、醇、胆甾醇(chol)和N-甲基双十八烷基胺(MDOA)购自Sigma-Aldrich。1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(钠盐)(DOPS)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-(7-硝基-2-1,3-苯并噁二唑-4-基)(铵盐)(NBD-PE)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-(丽丝胺罗丹明B磺酰基)(铵盐)(N-Rh-PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、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(氯化物盐)(DOTAP)和二甲基双十八烷基铵(溴化物盐)(DDAB)购自Avanti Lipids。1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油-3-甲氧基(聚(乙二醇))-2000(DMG-PEG2000)得自NOF America。根据我们之前的文献报告制备可电离的阳离子脂质5A2-SC8。DLin-MC3-DMA购自MedKoo Biosciences,并按照文献报道的配制细节使用。有机溶剂购自Sigma-Aldrich。

[0217] 材料-用于生物学测定的试剂。Dulbecco氏改良的磷酸盐缓冲盐水(PBS)、RPMI-1640培养基、胎牛血清(FBS)和胰蛋白酶-EDTA(0.25%)购自Sigma-Aldrich。荧火虫萤光素酶信使RNA(mRNA)、Cre mRNA和Cas9 mRNA购自TriLink Biotechnologies。Quant-iT RiboGreen RNA测定试剂盒购自Life Technologies。ONE-Glo+Tox萤光素酶测定试剂盒购自Promega。D-萤光素荧火虫,钠盐一水合物购自Gold Biotechnology。

[0218] 烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子P4-P16的合成。用具有不同烷基链长度的相应醇,通过2-氯-2-氧代-1,3,2-二氧杂磷杂环戊烷(COP)的酯化来合成P4-P16。例如,为了制备P4,将1-丁醇(30mmol)和三乙胺(TEA,30mmol)溶解在25mL无水四氢呋喃(THF)中。然后,在-15℃向混合物中逐滴加入COP(30mmol)在10mL THF中的溶液。此后,在25℃继续反应12小时。将混合物过滤以除去三乙胺盐酸盐,并通过旋转蒸发浓缩滤液以产生P4。使用各自的醇并遵循上述一般方案合成P5-P10分子。对于P11-P16合成,在0℃将COP加入到相应的醇中,并且其它程序保持相同。所有的P4-P16合成产生超过90%的产率。

[0219] 可电离的磷脂(iPhos)文库的一般合成。通过正交反应用胺(1A-28A)和烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子(Pm,m=4-16)合成iPhos(nAxPm)。“x”表示在一个胺分子上修饰的Pm分子数目,并且每个Pm分子可以引入一个磷酸酯基团和一个疏水烷基链到iPhos中。每个伯胺、仲胺或叔胺被设计为消耗1当量的烷基化的二氧杂磷杂环戊烷氧化物分子Pm。对于具有单个伯胺、仲胺或叔胺的胺nA(n=1-18),使1.1当量的Pm与胺反应以得到

nA1Pm。对于具有多个胺基团的nA(n＝19-28),每个胺基团被设计为最多引入一个两性离子。简而言之,使胺与2.2当量、3.3当量、4.4当量和5.5当量的Pm反应,分别生成nA2Pm、nA3Pm、nA4Pm和nA5Pm iPhos。在无水二甲亚砜(DMSO)中以0.3g/mL的起始材料浓度进行所有反应。将混合物在70℃搅拌3天,然后通过真空干燥除去DMSO。

[0220] 使用粗制的iPhos进行初始mRNA递送(体外和体内筛选)实验。将选定的顶级iPhos(例如9A1P9、10A1P10、9A1P15和10A1P16)通过柱快速色谱法纯化,并用于另外的表征(包括尺寸、ζ电位、mRNA结合、pKa、溶血、FRET研究等)和体内评价。将产物用在甲醇中的3%氯仿至在甲醇中的10%氯仿的溶剂梯度洗脱和分级分离。将最终的iPhos通过旋转蒸发浓缩并在真空下干燥24小时。

[0221] 体外iPhos纳米颗粒(iPLNP)配制和表征。通过乙醇稀释法制备iPLNP。在柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液(10mM,pH 4.4)中稀释mRNA。在乙醇中制备含有合成的iPhos、MDOA、胆甾醇和DMG-PEG2000的脂质混合物。通过移液器以3:1的水溶液:乙醇体积比快速混合两种溶液。温育15分钟后,将纳米颗粒用1X PBS缓冲液稀释3倍用于体外mRNA递送。

[0222] 对于颗粒尺寸和RiboGreen mRNA结合测量,将纳米颗粒用1XPBS缓冲液稀释5倍。用经过10倍1X PBS缓冲液稀释的纳米颗粒记录ζ电位。将具有He-Ne激光器(λ＝632nm)的Zetasizer Nano ZS(Malvern)用于颗粒尺寸和ζ电位测量。通过动态光散射(DLS)测量颗粒尺寸,并通过电泳光散射测定ζ电位。

[0223] 使用2-(对甲基苯胺)-6-萘磺酸(TNS)测定确定pKa。通过TNS测定确定每种iPLNP的pKa。在PBS中配制包含合成的iPhos/MDOA/胆甾醇/DMG-PEG2000(25/30/30/1mol%)的iPLNP,总脂质浓度为0.6mM。将TNS在milliQ水中制备为100μM储备溶液。在96-孔平板中,用含有10mM 4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)、10mM 4-吗啉乙磺酸(MES)、10mM乙酸铵和130mM NaCl的缓冲溶液,将纳米颗粒稀释至每孔100μL体积中6μM总脂质,其中pH范围为2.5至11。将TNS储备溶液加入到每个孔中以产生5μM的终浓度。之后,分别使用321nm和445nm的激发和发射波长读出平板。对荧光数据应用S形拟合分析,并将pKa测量为产生半数最大荧光强度的pH。

[0224] 溶血测定。通过在10,000×g离心5分钟从新鲜收集的全血中分离出小鼠红细胞(RBC),然后将RBC用PBS缓冲液(pH 7.4)洗涤5次。之后,将RBC分别悬浮于pH 7.4和5.5的PBS中。使用上述体外iPLNP配制方法配制iPLNP。将脂质溶解在氯仿中,旋转蒸发,并真空干燥另外2小时以得到薄脂质膜。然后,加入PBS(pH 7.4)并声处理20分钟以获得颗粒悬浮液。将RBC悬浮液加入到96-孔平板中,并将计算的iPLNP或脂质加入到孔中。在37℃温育1小时后,将RBC溶液在10,000×g离心5分钟,并收集含有血红蛋白的上清液。用微量培养板读数器在540nm波长评价血红蛋白含量。将在PBS中温育的该RBC悬浮液设定为阴性对照,并将在Triton-X溶液(1重量%)中温育的RBC悬浮液设定为阳性对照。

[0225] 通过荧光共振能量转移(FRET)测定进行的脂质混合和融合表征。通过FRET测定确定脂质与模拟胞内体的阴离子脂质体的混合和融合。将DOPE-缀合的FRET探针NBD-PE和N-Rh-PE配制到相同的模拟胞内体的纳米颗粒中,从而由于向罗丹明的FRET导致减弱的NBD荧光。一旦发生脂质融合,则由于两个探针之间的较大距离,NBD信号将会增加。如下制备模拟胞内体的阴离子脂质体:在氯仿中混合DOPS:DOPC:DOPE:NBD-PE:N-Rh-PE(摩尔比25:25:48:1:1),然后旋转蒸发并再真空干燥2小时以产生薄脂质膜。随后将干燥的膜通过声处理

20分钟重新悬浮在PBS(pH 7.4)中,并将总脂质浓度固定在1mM。使用上述体外iPLNP配制方法配制iPLNP,其中iPhos浓度为1mM。将iPhos 10A1P10溶解在氯仿中,并旋转蒸发以产生薄脂质膜。然后,加入PBS(pH 7.4)并声处理20分钟以得到颗粒悬浮液(10mM)。具有多个两性离子的25A3P10在声处理后未能形成颗粒悬浮液,因此仅评价了25A3P10 iPLNP的脂质融合。将PBS(pH 5.5)加入到黑色96-孔平板(100μL/孔)中,并将1μL的模拟胞内体的阴离子脂质体(1mM)加入到每个孔中。然后将10μL iPLNP或1μL脂质悬浮液加入到孔中。在37℃温育5分钟后,在Ex/Em=465/520nm在微量培养板读数器上进行荧光测量(F)。只有在PBS中的模拟胞内体的阴离子脂质体被设定为阴性对照(F_{min})。与Triton-X溶液(2重量%)一起温育的含有探针的脂质被设定为阳性对照(F_{max})。将脂质融合(%)计算为$(F-F_{min})/(F_{max}-F_{min})*100\%$。

[0226] 通过FRET测定确定的iPLNP解离。通过混合iPLNP和模拟胞内体的阴离子脂质体来测量iPLNP解离。将DOPE-缀合的FRET探针NBD-PE和N-Rh-PE配制到相同的iPLNP中。使用iPhos:MDOA:胆甾醇:DMG-PEG2000:NBD-PE:N-Rh-PE脂质混合物(摩尔比25:30:30:1:0.86:0.86)制备iPLNP,最终的总脂质浓度为1mM。其它程序与上述体外iPLNP配制方法相同。如下制备模拟胞内体的阴离子脂质体:在氯仿中混合DOPS:DOPC:DOPE(摩尔比25:25:50),然后旋转蒸发并再真空干燥2小时以产生薄脂质膜。随后将干燥的膜通过声处理20分钟重新悬浮在PBS(pH 7.4)中,并将总脂质浓度固定在10mM。将PBS(pH 5.5)加入到黑色96-孔平板(100μL/孔)中,并向每个孔中添加1μL iPLNP。然后将1μL模拟胞内体的阴离子脂质体加入到孔中。在37℃温育10分钟(或其它注明的时间间隔)后,在Ex/Em=465/520nm在微量培养板读数器上进行荧光测量(F)。将在PBS中的iPLNP(含NBD-PE和N-Rh-PE在内)设定为阴性对照(F_{min})。将与Triton-X溶液(2重量%)一起温育的iPLNP(含NBD-PE和N-Rh-PE在内)设定为阳性对照(F_{max})。将iPLNP解离(%)计算为$(F-F_{min})/(F_{max}-F_{min})*100\%$。

[0227] 细胞培养。在含有10% FBS和1%青霉素/链霉素(P/S)的RPMI-1640培养基中培养人卵巢腺癌细胞(IGROV1)。在控湿气氛中在37℃和5% CO_2下培养细胞。

[0228] 用于mRNA递送的iPhos的体外筛选。在白色不透明96-孔平板中以1x 10^4个细胞/孔(100μL补充了10% FBS和1% P/S的RPMI-1640培养基)的密度接种IGROV1细胞。24小时后,使用上述体外iPLNP配制方法在96-孔平板中通过用多通道移液器快速混合水相和乙醇相(v/v=3:1)制备具有Fluc mRNA的纳米颗粒。以11622:1的合成的iPhos:mRNA摩尔比以及25:30:30:1的脂质混合物合成的iPhos:MDOA:胆甾醇:DMG-PEG2000摩尔比制备iPLNP。11622:1的合成的iPhos:mRNA摩尔比是固定的,其中10A1P4-12A1P16:mRNA显示出10±2.5的平均重量比。这可以确保每种iPLNP具有相同摩尔的脂质混合物。除非另有说明,否则所述比率也用于其它表征和体内评价。使用每孔50ng mRNA。然后,使用150μL新鲜细胞培养基代替先前的培养基,并将配制的iPLNP加入到细胞中。再温育24小时后,使用ONE-Glo+Tox萤光素酶测定试剂盒评价萤光素酶表达和细胞存活率。一式三份进行所有转染测定,并报告平均值和标准差。

[0229] 体内iPLNP配制和表征。将mRNA在柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液(10mM,pH 3.2)中稀释。在乙醇中制备含有合成的iPhos、MDOA、胆甾醇和DMG-PEG2000的脂质混合物。用移液器以3:1的水溶液:乙醇体积比快速混合两相。温育15分钟后,将iPLNP在Pur-A-Lyzer midi透析室(Sigma-Aldrich)中针对1X PBS进行透析以供体内使用。

[0230] 动物实验。所有实验均由德克萨斯大学西南医学中心(The University of Texas Southwestern Medical Center)的机构动物护理和使用委员会批准,并符合适用的地方、州和联邦法规。雌性C57BL/6小鼠购自UT西南动物育种中心。B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor$^{tm9(CAG-tdTomato)Hze}$/J小鼠(也被称作Ai9或Ai9(RCL-tdT)小鼠)得自Jackson实验室(007909),并被培育以维持Cre报告等位基因的纯合表达,该等位基因具有一个LoxP-侧接的停止盒,它阻止CAG启动子驱动的红色荧光tdTomato蛋白的转录。在Cre介导的重组之后,Ai9小鼠将表达tdTomato荧光。Ai9小鼠在C57BL/6J遗传背景上是同类的。

[0231] 体内萤光素酶mRNA递送。对于iPhos体内筛选,按照上述体内iPLNP配制方法制备含有Fluc mRNA的纳米颗粒。除非另外指出,否则制剂的比例与体外筛选的制剂的比例一致。简而言之,以11622:1的合成的iPhos:Fluc mRNA摩尔比以及25:30:30:1的脂质混合物合成的iPhos:MDOA:胆甾醇:DMG-PEG2000摩尔比制备iPLNP。然后,通过静脉内(IV)注射将纳米颗粒施用给雌性C57BL/6小鼠(6-8周龄)。6小时后,通过活体动物生物发光成像评价萤光素酶表达。简而言之,将小鼠在异氟烷下麻醉,并腹膜内注射100μL的D-萤光素(GoldBio,在PBS中30mg/mL)底物。在麻醉下5分钟后,在IVIS Lumina系统(Perkin Elmer)上成像萤光素酶活性。之后,将器官分离并用相同的方法成像。使用Living Image分析软件(Perkin Elmer)处理图像。

[0232] 将iPhos 9A1P9用于与商业磷脂DOPE和DSPC进行对比。给C57BL/6小鼠静脉内注射在0.25mg/kg FLuc mRNA的纳米颗粒,并在注射后6小时量化发光。使用25:30:30:1的9A1P9:MDOA:胆甾醇:DMG-PEG2000摩尔比以及18:1的9A1P9/mRNA重量比。对于商业磷脂对比,利用等摩尔的DOPE或DSPC替代9A1P9。与上述相同地进行其它程序。

[0233] 对于具有不同辅助脂质的9A1P9 iPLNP,使用了55:30:45:0.2的9A1P9:DOPE:胆甾醇:DMG-PEG2000(摩尔比)、25:30:30:1的9A1P9:MDOA(DODAP或5A2-SC8):胆甾醇:DMG-PEG2000(摩尔比)以及60:30:40:0.4的9A1P9:DDAB(或DOTAP):胆甾醇:DMG-PEG2000(摩尔比)。对于所有制剂,将9A1P9:mRNA重量比固定在18:1。与上述相同地进行其它程序。

[0234] 体内Cre mRNA递送。按照上述体内iPLNP配制方法制备含有Cre mRNA的纳米颗粒。之后,通过静脉内注射将纳米颗粒施用给Ai9小鼠。48小时后,处死小鼠,并分离器官并在IVIS Spectrum体内成像系统(Perkin Elmer)上成像。

[0235] 体内生物分布。按照上述体内iPLNP配制方法制备含有Cy5-标记的Fluc mRNA(Cy5-mRNA,0.25mg/kg)的纳米颗粒。通过静脉内注射将iPLNP施用给雌性C57BL/6小鼠(6-8周龄)。6小时后,处死小鼠,并分离器官并在IVIS Spectrum体内成像系统(Perkin Elmer)上成像。

[0236] Cas9 mRNA和sgTom1的体内共同递送以实现基因编辑。按照上述体内iPLNP配制方法制备含有Cas9 mRNA和修饰的sgTom1(mRNA/sgRNA重量比4:1,总RNA剂量0.75mg/kg)的纳米颗粒。将25:30:30:1的9A1P9:5A2-SC8:胆甾醇:DMG-PEG2000(摩尔比)和60:30:40:0.4的9A1P9:DDAB:胆甾醇:DMG-PEG2000(摩尔比)分别用于9A1P9-5A2-SC8 iPLNP和9A1P9-DDAB iPLNP。将9A1P9/RNA重量比固定在18:1。之后,通过静脉内注射将iPLNP施用给Ai9小鼠。PBS组用作阴性对照。10天后,处死小鼠并分离器官并在IVIS Spectrum体内成像系统(Perkin Elmer)上成像。然后,将组织包埋在最佳切割温度(OCT)化合物中并切成10μm切片。将这些切片在室温用4%低聚甲醛固定20分钟,并用PBS洗涤3次。之后,应用一滴含DAPI的Prolong

Gold Mountant,并在这些载玻片上盖上盖玻片。然后将这些载玻片通过共焦显微术(Zeiss LSM 700)成像。

[0237] 在C57BL/6小鼠中体内共同递送Cas9 mRNA和sgPTEN用于基因编辑。选择PTEN来检查体内内源基因编辑。按照上述体内iPLNP配制方法制备含有Cas9 mRNA和修饰的sgPTEN(mRNA/sgRNA重量比4:1,总RNA剂量0.75mg/kg)的iPLNP。将25:30:30:1的9A1P9:5A2-SC8:胆甾醇:DMG-PEG2000(摩尔比)和60:30:40:0.4的9A1P9:DDAB:胆甾醇:DMG-PEG2000(摩尔比)分别用于9A1P9-5A2-SC8iPLNP和9A1P9-DDAB iPLNP。将9A1P9/RNA重量比固定在18:1。之后,通过静脉内注射将iPLNP施用给野生型C57BL/6小鼠(6-8周龄)。10天后,收集组织,并用PureLink Genomic DNA Mini Kit(ThermoFisher)提取基因组DNA。获得PTEN PCR产物后,通过标准方案进行T7E1测定(NEB)以确认基因编辑效力。此外,基于以下公式通过ImageJ评价PTEN的基因编辑效力:插入或删除(indel)(%)=100x(1-(1-切割的分数)^0.5),其中切割的分数=(片段1+片段2)/(片段1+片段2+亲本片段)。本文使用的sgRNA序列和PCR引物分别提供在表2和表3中。

[0238] 表2.sgRNA序列

[0239]

名称	靶序列(5'至3')	PAM(5'至3')
sgTOM	AAGTAAAACCTCTACAAATG(SEQ ID NO:1)	TGG
sgPTEN	AGATCGTTAGCAGAAACAAA(SEQ ID NO:2)	AGG

[0240] 表3.PCR引物

[0241]

名称	序列(5'至3')	长度	目的
PTEN_正向	AAGCAGGCCCAGTCTCTG (SEQ ID NO: 3)	582 bp	用于T7E1测定
PTEN_反向	GACGAGCTCGCTAATCCAGTG (SEQ ID NO: 4)		

[0242] 统计分析。使用GraphPad Prism版本7(GraphPad Software)进行统计分析。双尾未配对学生t-检验用于对比两组,单因素方差分析用于对比多个重复组。P-值<0.05(*)、P<0.01(**)和P<0.001(***)被认为是统计上显著的。

[0243] 在实施例1-7中使用的引文

[0244] 1.Wang,H.X.等人.CRISPR/Cas9-based genome editing for disease modeling and therapy:Challenges and opportunities for nonviral delivery.Chem.Rev.117,9874-9906(2017).

[0245] 2.Hajj,K.A.和Whitehead,K.A.Tools for translation:Non-viral materials for therapeutic mRNA delivery.Nat.Rev.Mater.2,17056(2017).

[0246] 3.Jinek,M.等人.A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.Science 337,816-821(2012).

[0247] 4.Cong,L.等人.Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.Science 339,819-823(2013).

[0248] 5.Mali,P.等人.RNA-guided human genome engineering via Cas9.Science 339,823-826(2013).

[0249] 6.Yin,H.等人.Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral in vivo genome editing.Nat.Biotechnol.35,1179(2017).

[0250] 7.Liu,S.等人.Highly branched poly(β-amino ester)delivery of minicircle DNA for transfection of neurodegenerative disease related cells.Nat.Commun.10,3307(2019).

[0251] 8.Zhou,J.等人.Biodegradable poly(amine-co-ester)terpolymers for targeted gene delivery.Nat.Mater.11,82-90(2012).

[0252] 9.Liu,S.等人.Bioreducible zinc(II)-coordinative polyethylenimine with low molecular weight for robust gene delivery of primary and stem cells.J.Am.Chem.Soc.139,5102-5109(2017).

[0253] 10.Kanasty,R.,Dorkin,J.R.,Vegas,A.和Anderson,D.Delivery materials for siRNA therapeutics.Nat.Mater.12,967-977(2013).

[0254] 11.Semple,S.C.等人.Rational design of cationic lipids for siRNA delivery.Nat.Biotechnol.28,172-176(2010).

[0255] 12.Cheng,Q.等人.Dendrimer-based lipid nanoparticles deliver therapeutic FAH mRNA to normalize liver function and extend survival in a mouse model of hepatorenal tyrosinemia type I.Adv.Mater.30,e1805308(2018).

[0256] 13.van Meer,G.,Voelker,D.R.和Feigenson,G.W.Membrane lipids:Where they are and how they behave.Nat.Rev.Mol.Cell Biol.9,112-124(2008).

[0257] 14.Sahay,G.,Alakhova,D.Y.和Kabanov,A.V.Endocytosis of nanomedicines.J.Controlled Release 145,182-195(2010).

[0258] 15.Gilleron,J.等人.Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery,intracellular trafficking and endosomal escape.Nat.Biotechnol.31,638-646(2013).

[0259] 16.Sahay,G.等人.Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling.Nat.Biotechnol.31,653-658(2013).

[0260] 17.Wittrup,A.等人.Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown.Nat.Biotechnol.33,870-876(2015).

[0261] 18.Miller,J.B.和Siegwart,D.J.Design of synthetic materials for intracellular delivery of RNAs:From siRNA-mediated gene silencing to CRISPR/Cas gene editing.Nano Res.11,5310-5337(2018).

[0262] 19.Truong,B.等人.Lipid nanoparticle-targeted mRNA therapy as a treatment for the inherited metabolic liver disorder arginase deficiency.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.116,21150-21159(2019).

[0263] 20.Mout,R.,Ray,M.,Lee,Y.W.,Scaletti,F.和Rotello,V.M.In vivo delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic gene editing:Progress and challenges.Bioconjugate Chem.28,880-884(2017).

[0264] 21.Luther,D.C.,Lee,Y.W.,Nagaraj,H.,Scaletti,F.和Rotello,V.M.Delivery approaches for CRISPR/Cas9 therapeutics in vivo:Advances and challenges.Expert Opin.Drug Deliv.15,905-913(2018).

[0265] 22.Miller,J.B.等人.Non-viral CRISPR/Cas gene editing in vitro and in

vivo enabled by synthetic nanoparticle co-delivery of Cas9 mRNA and sgRNA.Angew.Chem.Int.Ed.56,1059-1063(2017).

[0266] 23.Alabi,C.A.等人.Multiparametric approach for the evaluation of lipid nanoparticles for siRNA delivery.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.110,12881-12886(2013).

[0267] 24.Akinc,A.等人.A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics.Nat.Biotechnol.26,561-569(2008).

[0268] 25.Love,K.等人.Lipid-like materials for low-dose,in vivo gene silencing.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.107,1864-1869(2010).

[0269] 26.Zhou,K.等人.Modular degradable dendrimers enable small RNAs to extend survival in an aggressive liver cancer model.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.113,520-525(2016).

[0270] 27.Wei,T.等人.Anticancer drug nanomicelles formed by self-assembling amphiphilic dendrimer to combat cancer drug resistance.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.112,2978-2983(2015).

[0271] 28.Zhang,Y.等人.The development of an in vitro assay to screen lipid based nanoparticles for siRNA delivery.J.Controlled Release 174,7-14(2014).

[0272] 29.Cheng,Y.,Yumul,R.C.和Pun,S.H.Virus-inspired polymer for efficient in vitro and in vivo gene delivery.Angew.Chem.Int.Ed.55,12013-12017(2016).

[0273] 30.Zhou,D.等人.The transition from linear to highly branched poly(beta-amino ester)s:Branching matters for gene delivery.Science Adv.2,e1600102(2016).

[0274] 31.Li,B.等人.An orthogonal array optimization of lipid-like nanoparticles for mRNA delivery in vivo.Nano Lett.15,8099-8107(2015).

序列表

<110> 德克萨斯大学体系董事会

D•J•西格瓦特

S•刘

X•于

Q•程

T•魏

<120> 功能性的可电离的磷脂

<130> 106546-697678 (UTSD 3759)

<150> US 63/068,944

<151> 2020-08-21

<160> 4

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgTOM (sgRNA)

<400> 1

aagtaaaacc tctacaaatg 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgPTEN (sgRNA)

<400> 2

agatcgttag cagaaacaaa 20

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PTEN_正向 (PCR引物)

<400> 3

aagcaggccc agtctctg 18

<210> 4

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> PTEN_ 反向 (PCR引物)
<400> 4
gacgagctcg ctaatccagt g 21

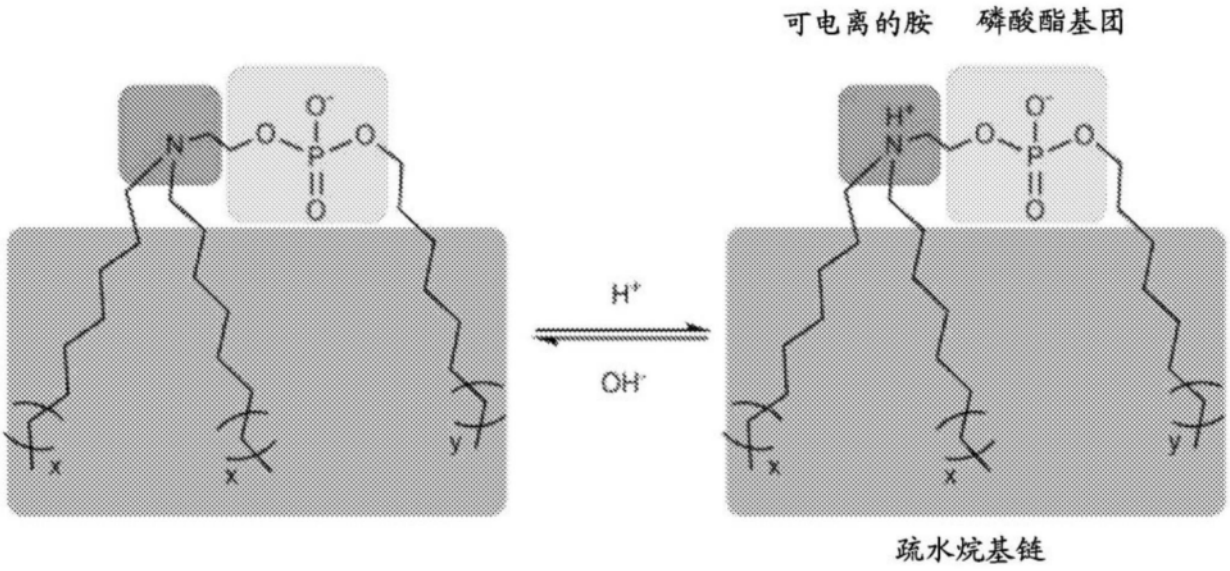

可电离的胺
磷酸酯基团
H+
OH-
疏水烷基链

图1A

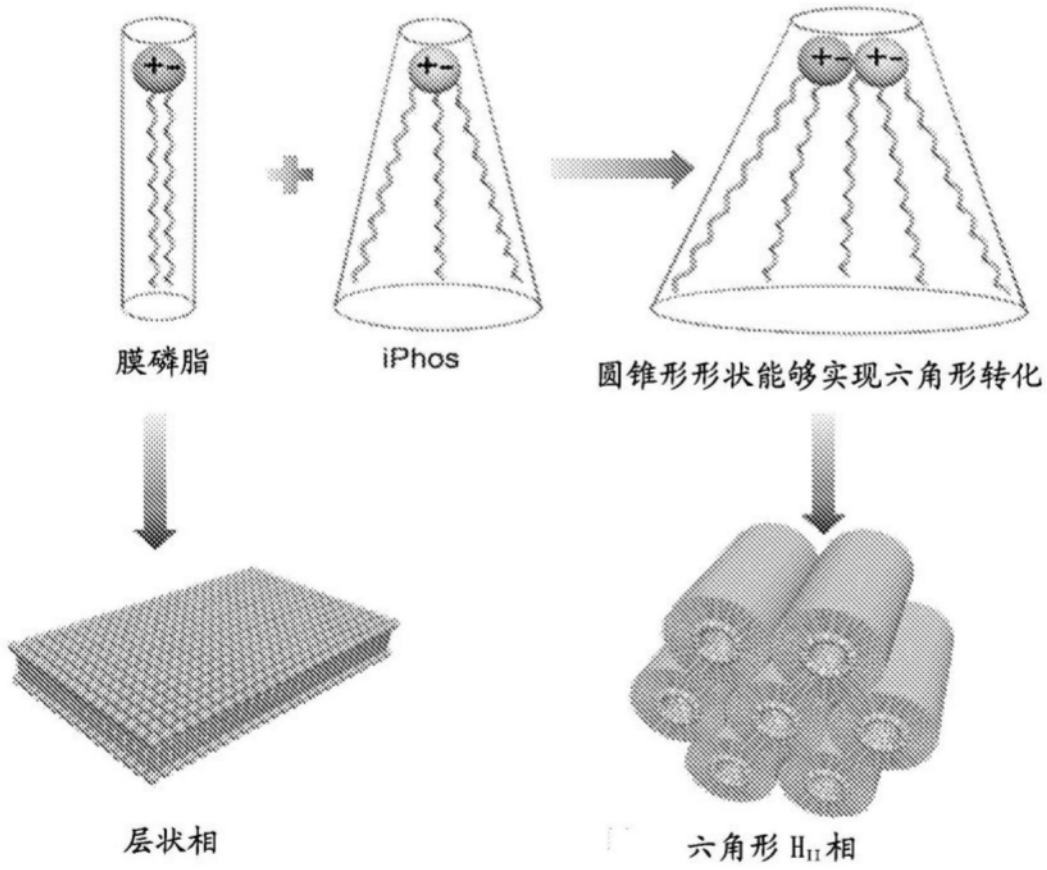

膜磷脂
iPhos
圆锥形形状能够实现六角形转化
层状相
六角形 H_{II} 相

图1B

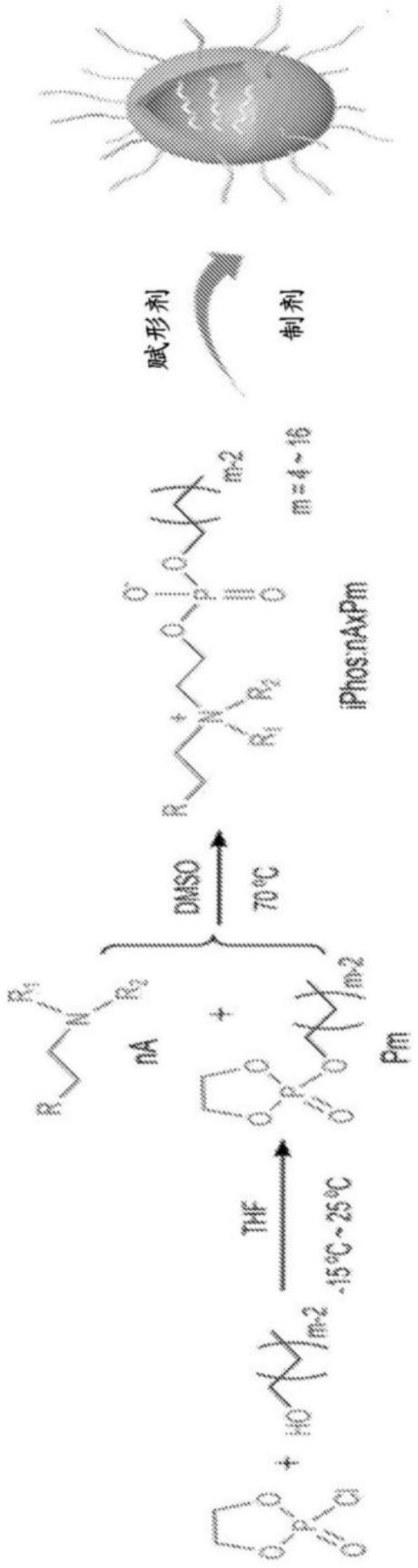


图1C

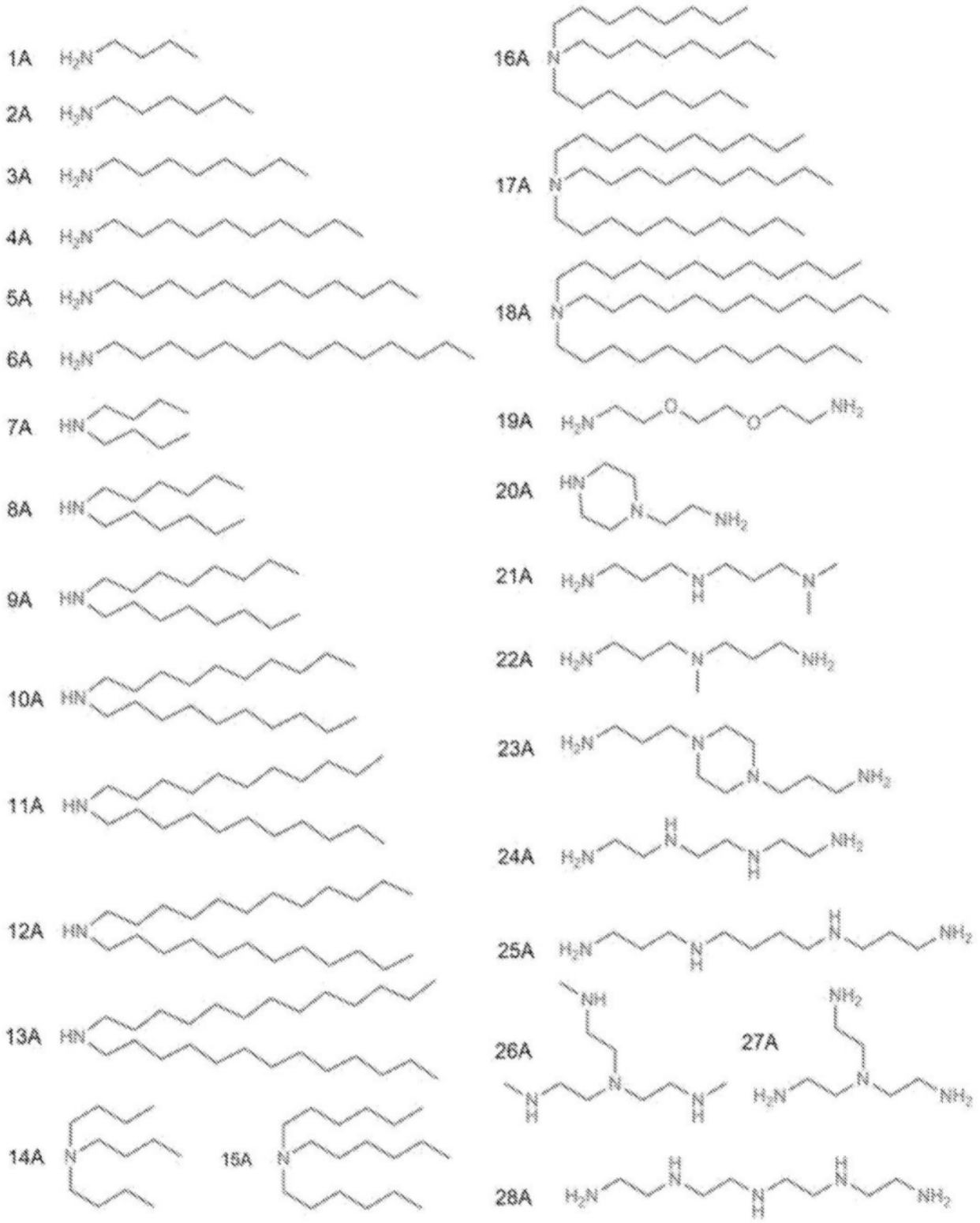

1A
2A
3A
4A
5A
6A
7A
8A
9A
10A
11A
12A
13A
14A
15A
16A
17A
18A
19A
20A
21A
22A
23A
24A
25A
26A
27A
28A

图1D-部分1

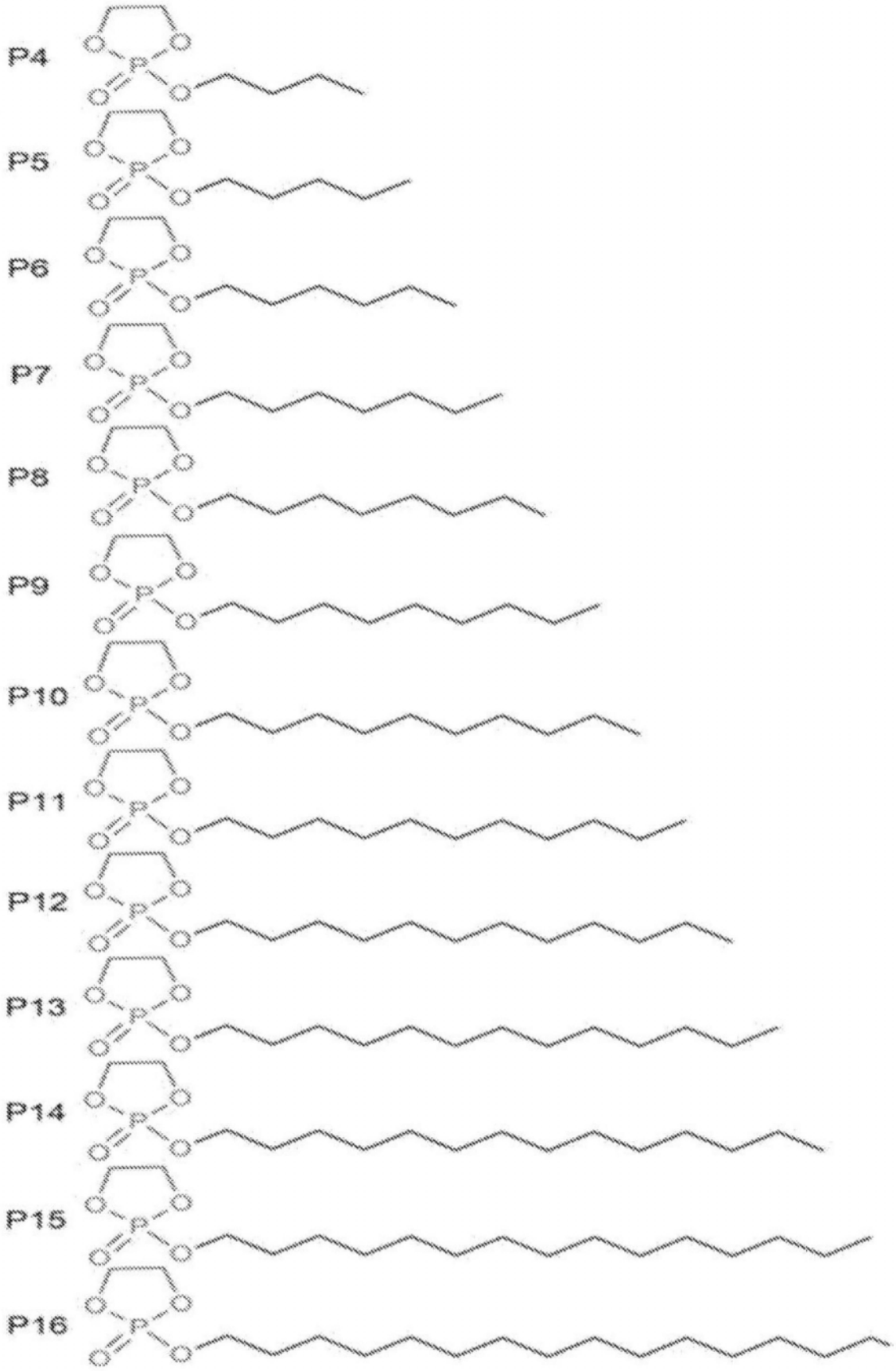


图1D-部分2

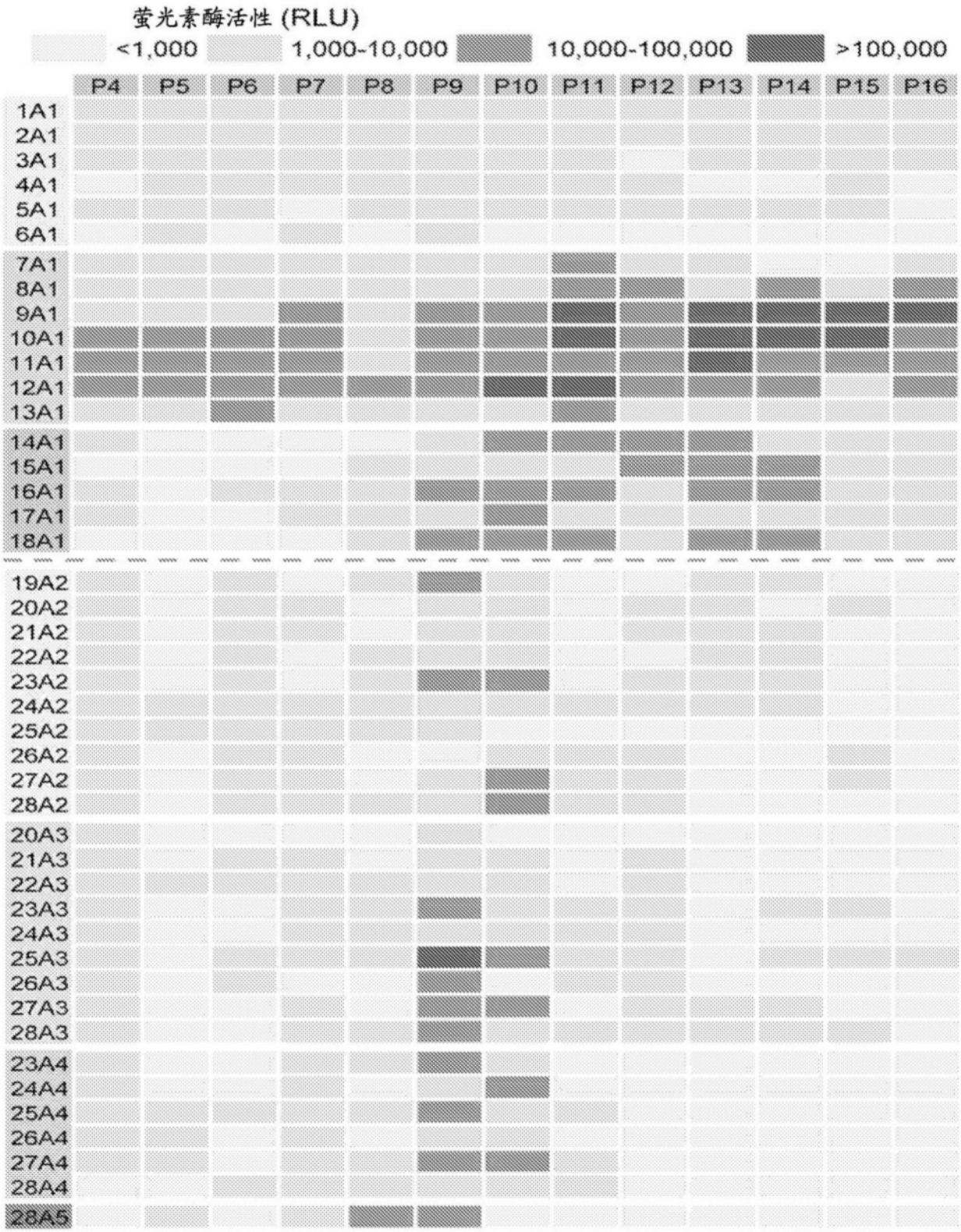

萤光素酶活性 (RLU)
<1,000
1,000-10,000
10,000-100,000
>100,000
P4 P5 P6 P7 P8 P9 P10 P11 P12 P13 P14 P15 P16
1A1 2A1 3A1 4A1 5A1 6A1
7A1 8A1 9A1 10A1 11A1 12A1 13A1
14A1 15A1 16A1 17A1 18A1
19A2 20A2 21A2 22A2 23A2 24A2 25A2 26A2 27A2 28A2
20A3 21A3 22A3 23A3 24A3 25A3 26A3 27A3 28A3
23A4 24A4 25A4 26A4 27A4 28A4
28A5

图2A

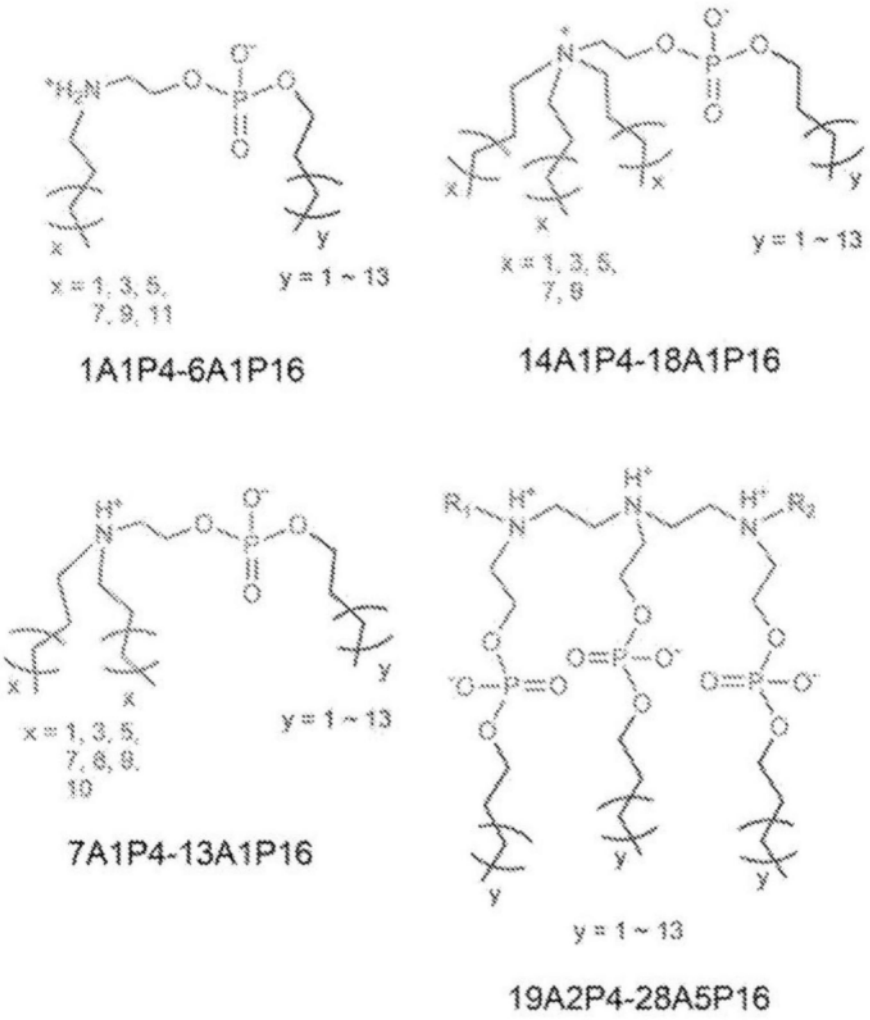

x = 1, 3, 5, 7, 9, 11
y = 1 ~ 13
1A1P4-6A1P16
x = 1, 3, 5, 7, 8
y = 1 ~ 13
14A1P4-18A1P16
x = 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10
y = 1 ~ 13
7A1P4-13A1P16
y = 1 ~ 13
19A2P4-28A5P16

图2B

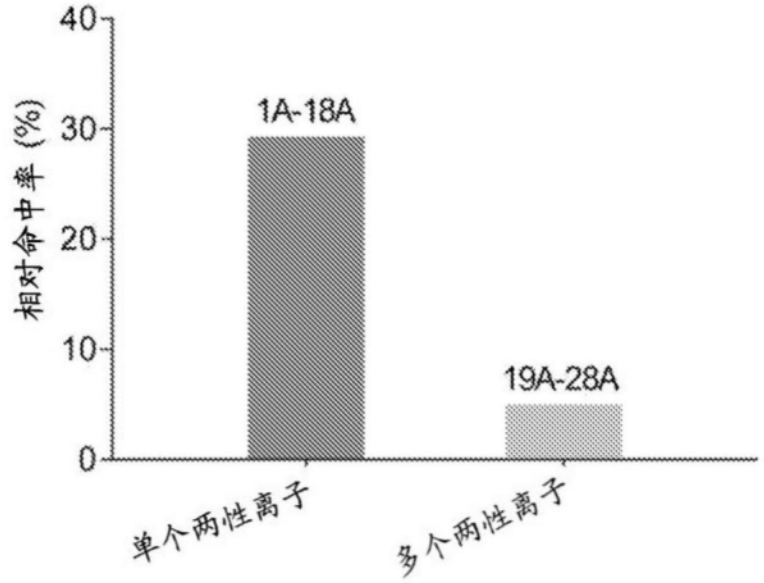

40
30
20
10
0
相对命中率 (%)
1A-18A
19A-28A
单个两性离子
多个两性离子

图2C

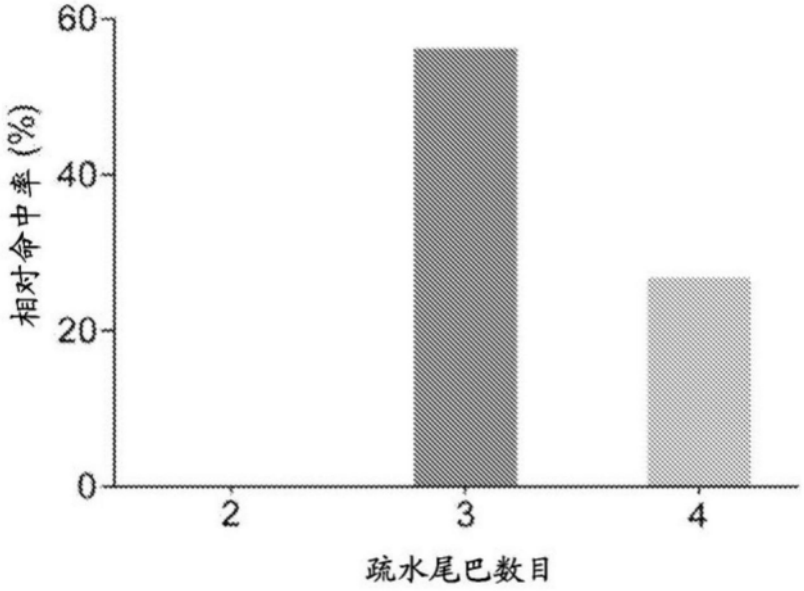

60
40
20
0
相对命中率 (%)
2
3
4
疏水尾巴数目

图2D

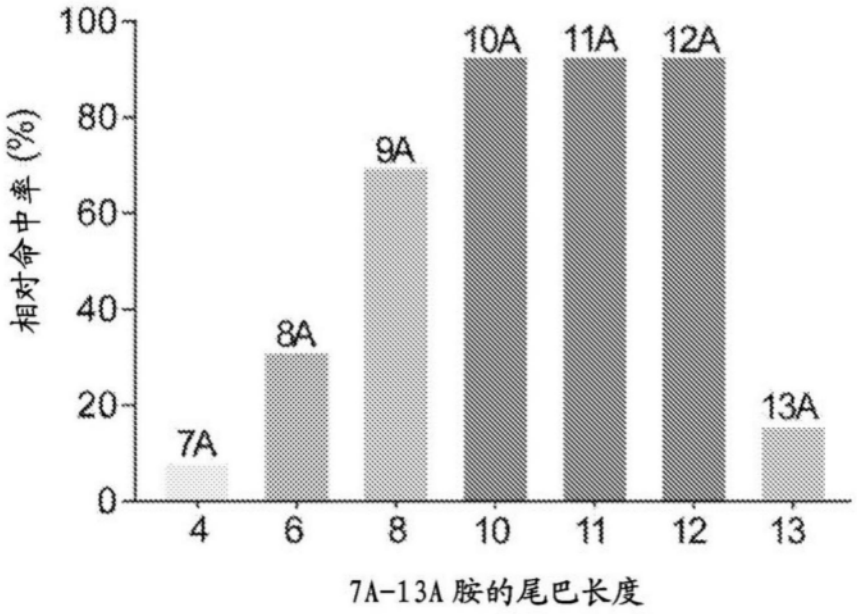

100
80
60
40
20
0
相对命中率 (%)
7A
8A
9A
10A
11A
12A
13A
4
6
8
10
11
12
13
7A-13A 胺的尾巴长度

图2E

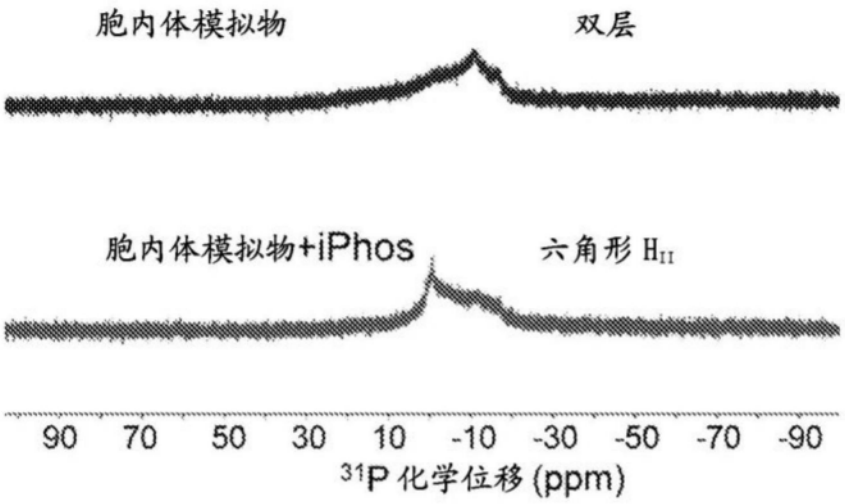

胞内体模拟物
双层
胞内体模拟物+iPhos
六角形 HII
90
70
50
30
10
-10
-30
-50
-70
-90
31P 化学位移 (ppm)

图3A

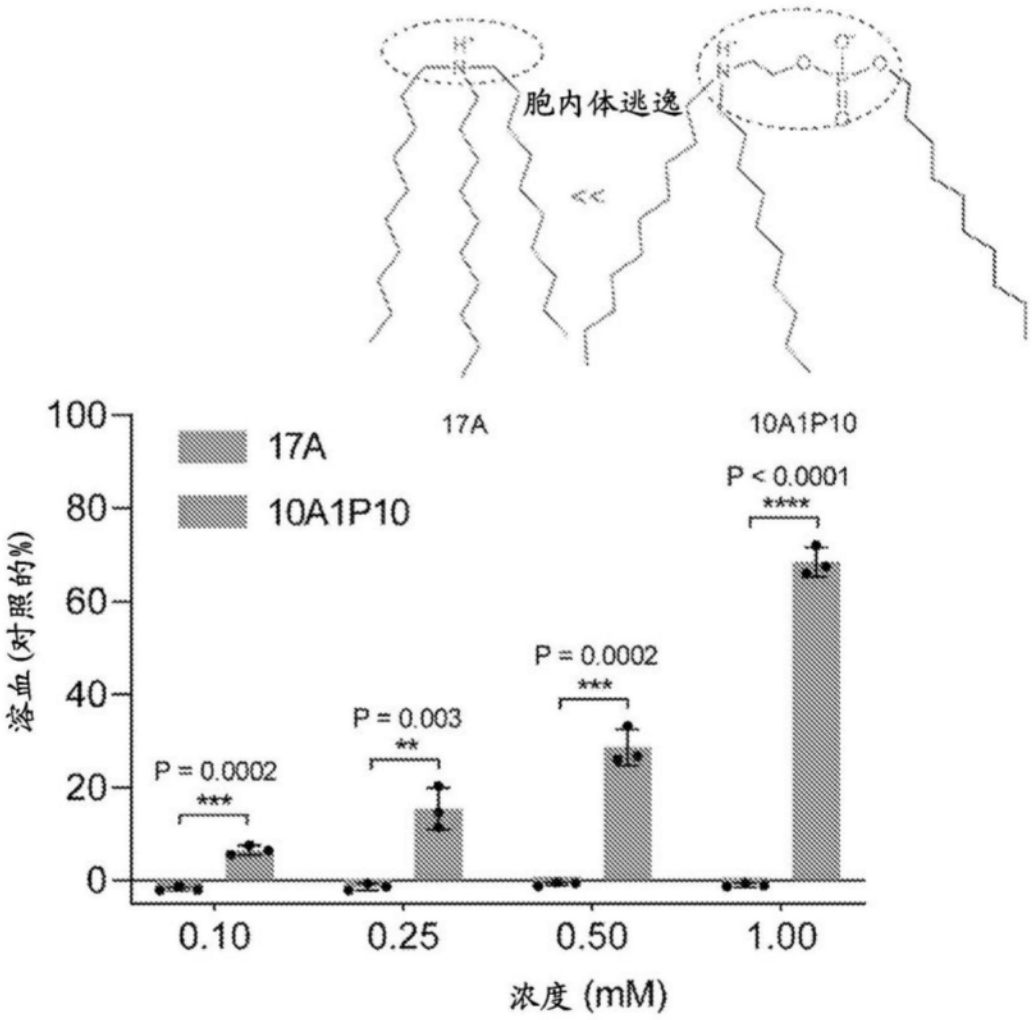


图3B

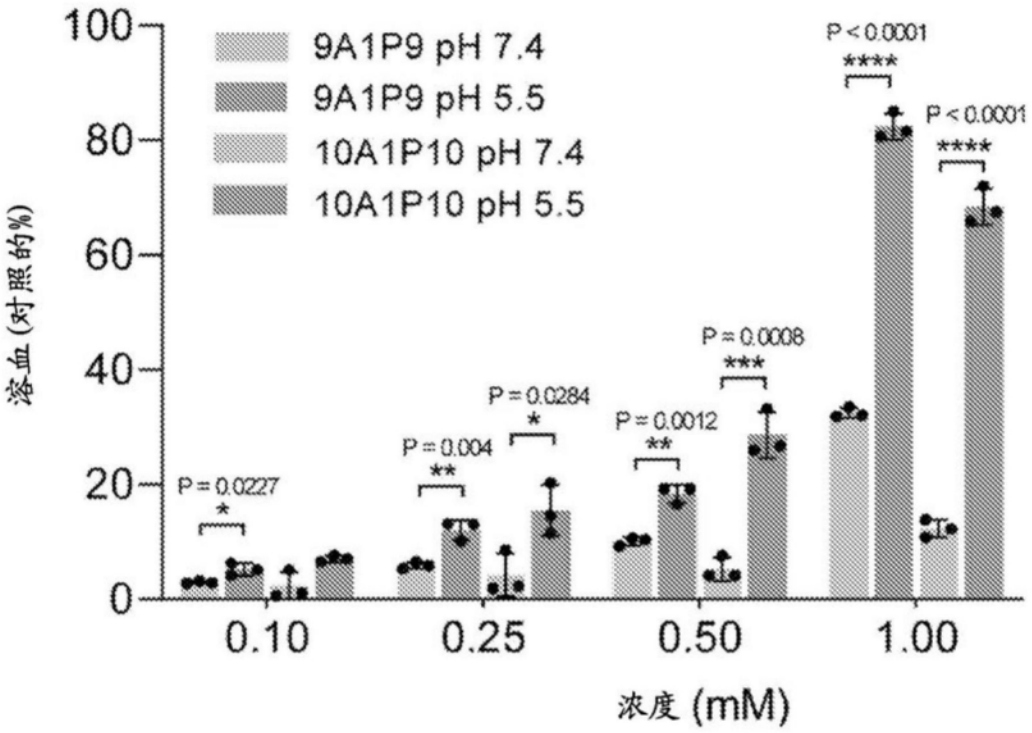

9A1P9 pH 7.4
9A1P9 pH 5.5
10A1P10 pH 7.4
10A1P10 pH 5.5
溶血(对照的%)
浓度 (mM)
0.10
0.25
0.50
1.00
P = 0.0227
P = 0.004
P = 0.0284
P = 0.0012
P = 0.0008
P < 0.0001
P < 0.0001

图3C

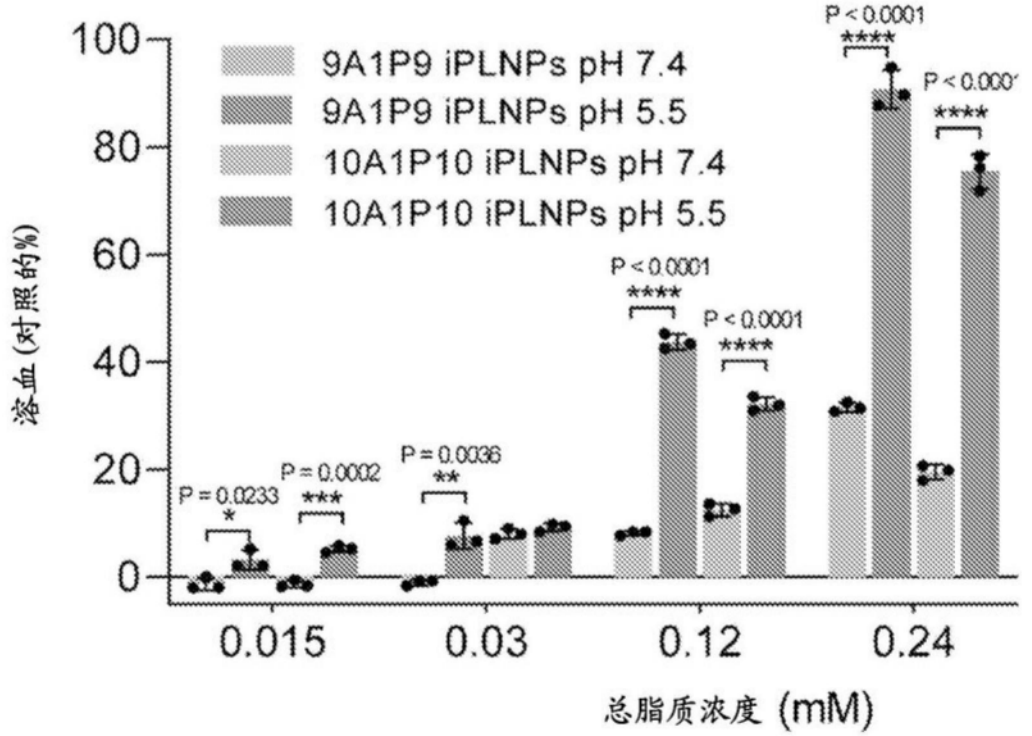

9A1P9 iPLNPs pH 7.4
9A1P9 iPLNPs pH 5.5
10A1P10 iPLNPs pH 7.4
10A1P10 iPLNPs pH 5.5
溶血(对照的%)
总脂质浓度 (mM)
0.015
0.03
0.12
0.24
P = 0.0233
P = 0.0002
P = 0.0036
P < 0.0001
P < 0.0001
P < 0.0001

图3D

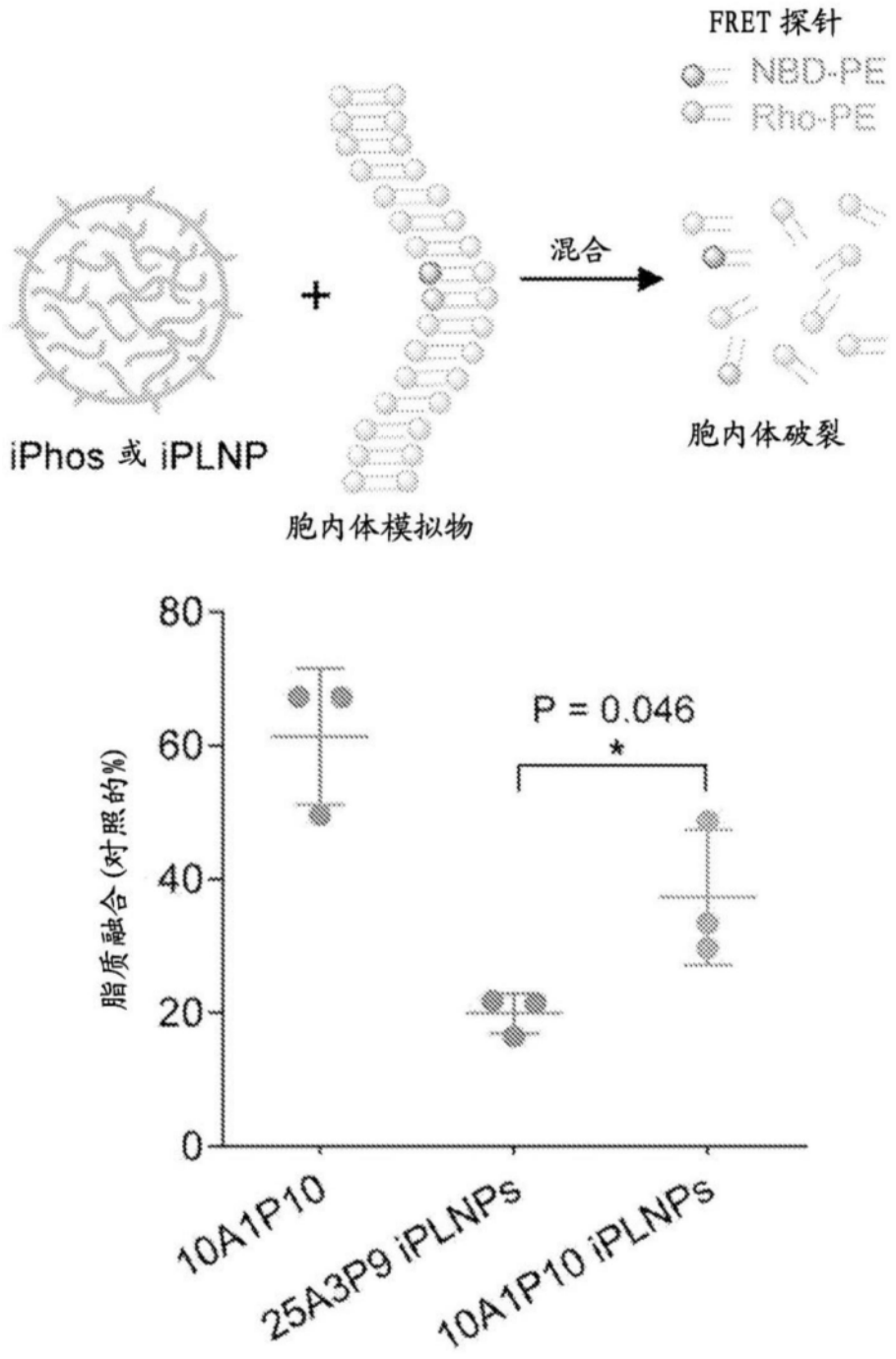

FRET 探针
NBD-PE
Rho-PE
混合
iPhos 或 iPLNP
胞内体模拟物
胞内体破裂
80
60
40
20
0
脂质融合(对照的%)
P = 0.046
*
10A1P10
25A3P9 iPLNPs
10A1P10 iPLNPs

图3E

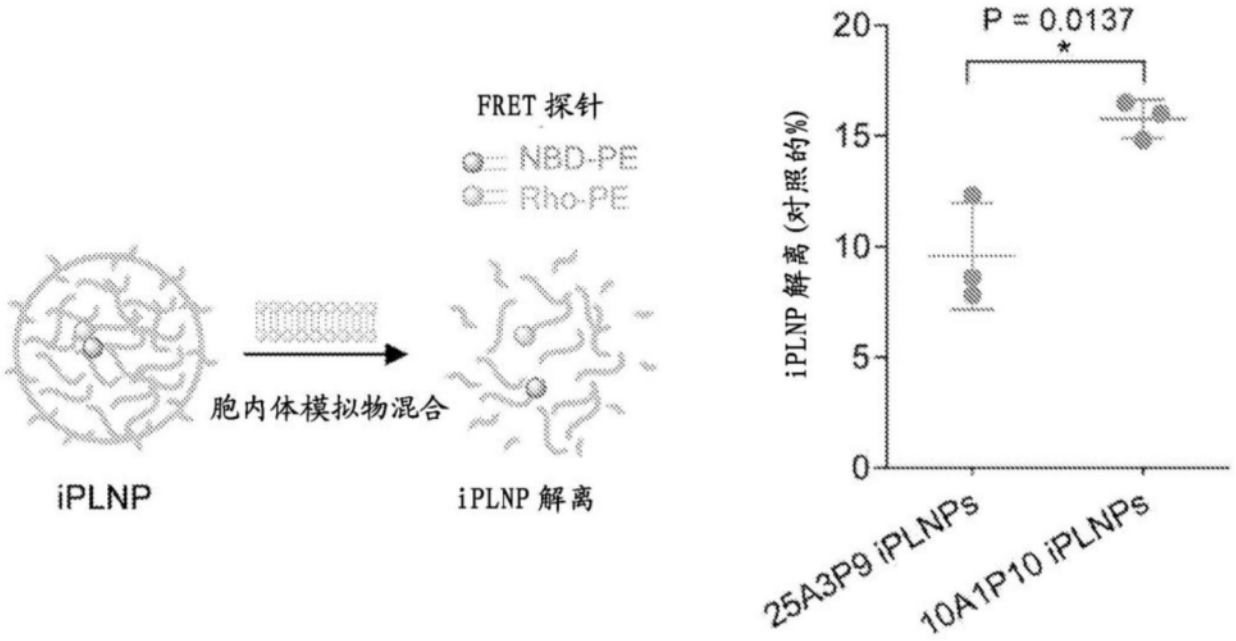

FRET 探针
NBD-PE
Rho-PE
胞内体模拟物混合
iPLNP
iPLNP 解离
P = 0.0137
*
iPLNP 解离 (对照的%)
20
15
10
5
0
25A3P9 iPLNPs
10A1P10 iPLNPs

图3F

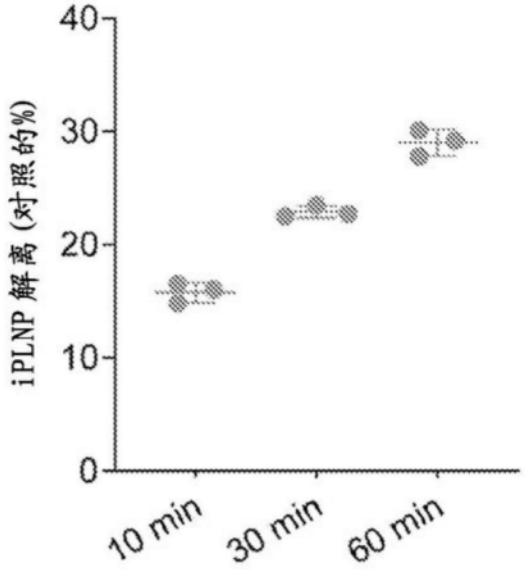

iPLNP 解离 (对照的%)
40
30
20
10
0
10 min
30 min
60 min

图3G

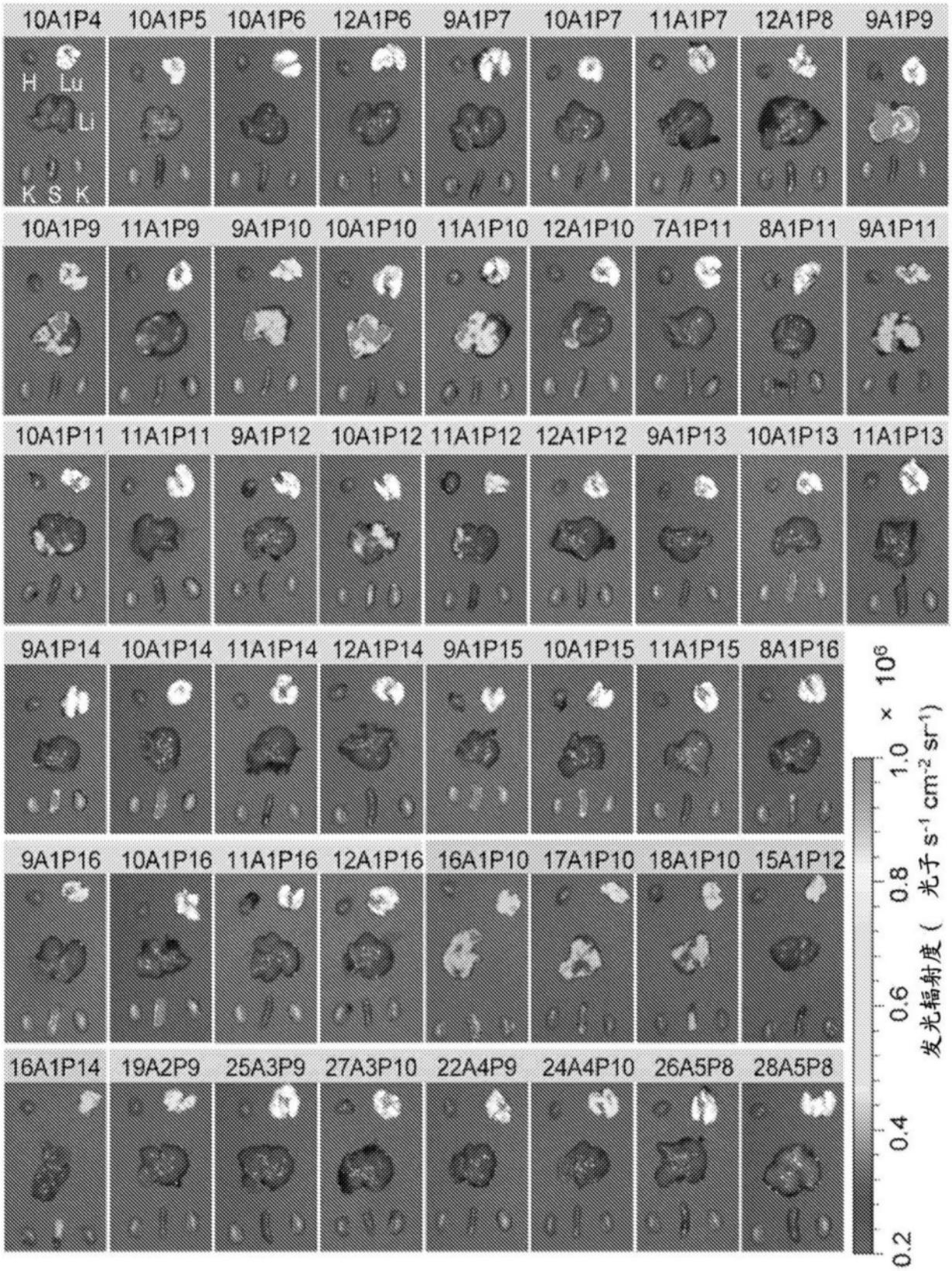

10A1P4
10A1P5
10A1P6
12A1P6
9A1P7
10A1P7
11A1P7
12A1P8
9A1P9
H
Lu
Li
K S K
10A1P9
11A1P9
9A1P10
10A1P10
11A1P10
12A1P10
7A1P11
8A1P11
9A1P11
10A1P11
11A1P11
9A1P12
10A1P12
11A1P12
12A1P12
9A1P13
10A1P13
11A1P13
9A1P14
10A1P14
11A1P14
12A1P14
9A1P15
10A1P15
11A1P15
8A1P16
9A1P16
10A1P16
11A1P16
12A1P16
16A1P10
17A1P10
18A1P10
15A1P12
16A1P14
19A2P9
25A3P9
27A3P10
22A4P9
24A4P10
26A5P8
28A5P8
发光辐射度 (光子 s-1 cm-2 sr-1)
× 10^6
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2

图4A

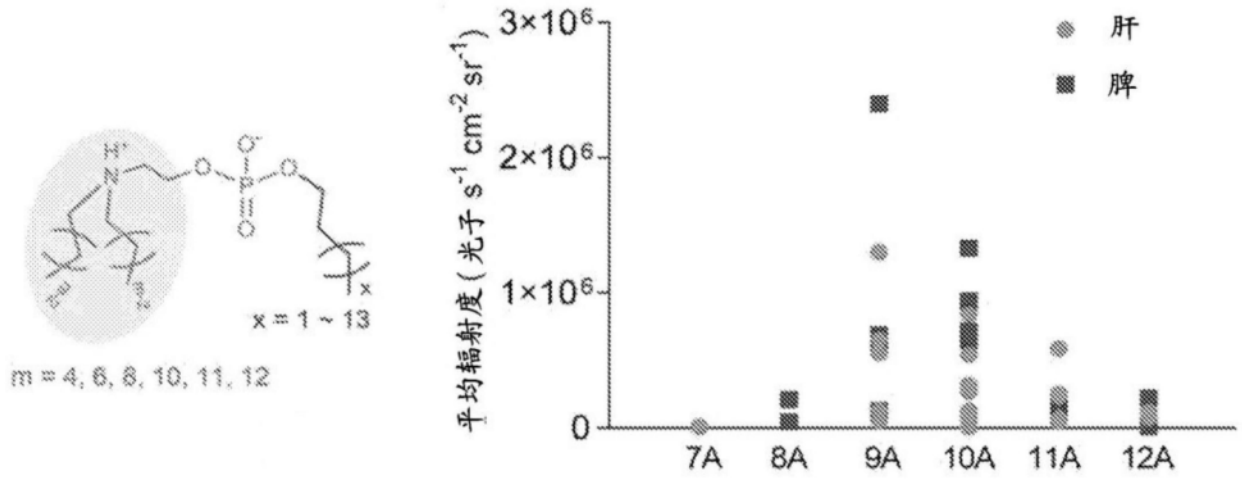

x = 1 ~ 13
m = 4, 6, 8, 10, 11, 12
平均辐射度(光子 s-1 cm-2 sr-1)
3×10^6
2×10^6
1×10^6
0
肝
脾
7A
8A
9A
10A
11A
12A

图4B

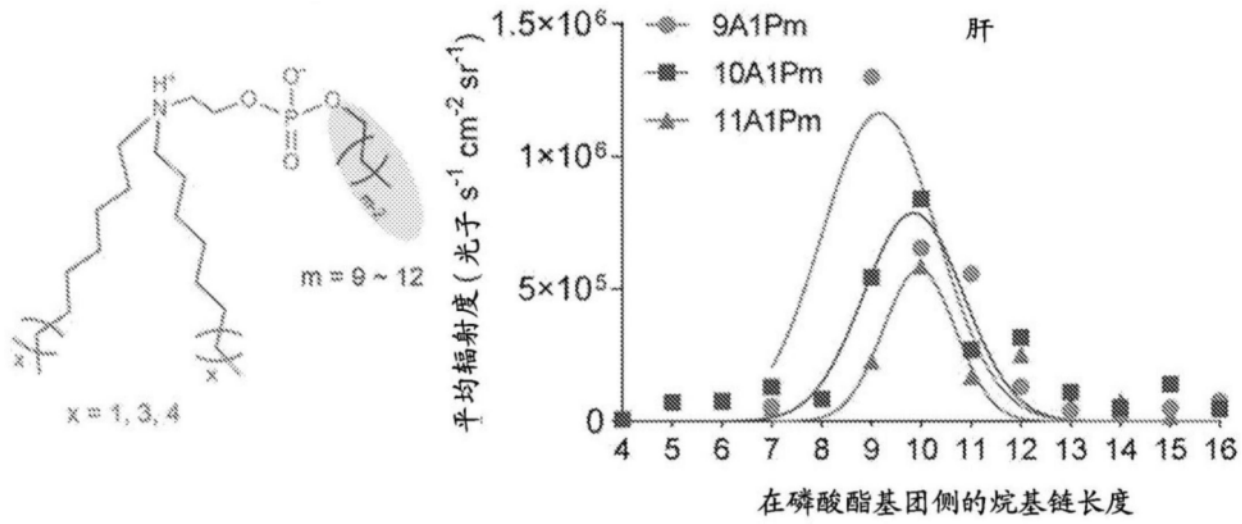

m = 9 ~ 12
x = 1, 3, 4
平均辐射度(光子 s-1 cm-2 sr-1)
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
9A1Pm
10A1Pm
11A1Pm
肝
4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
在磷酸酯基团侧的烷基链长度

图4C

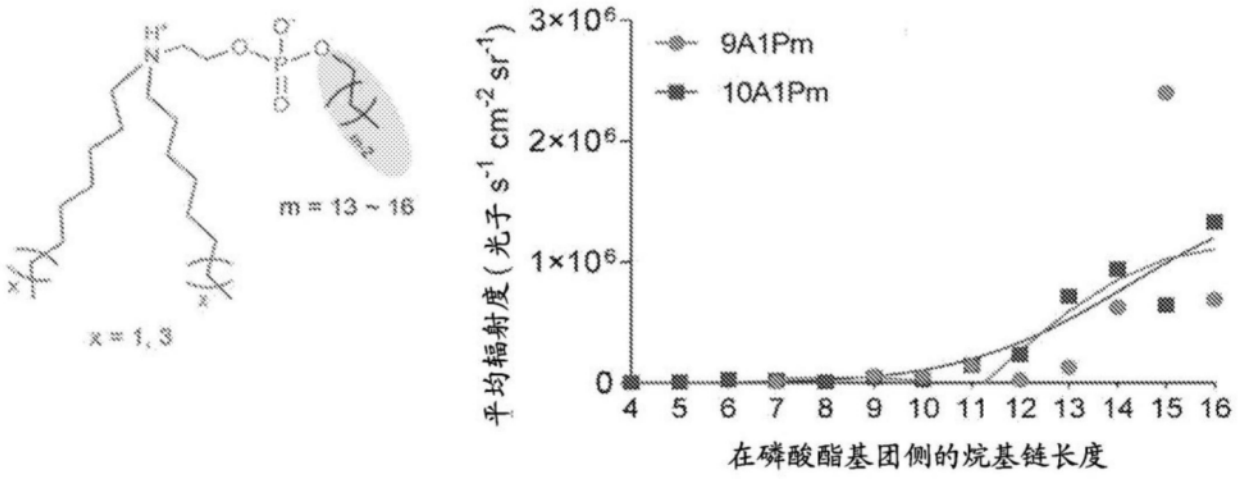

m = 13 ~ 16
x = 1, 3
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
9A1Pm
10A1Pm
平均辐射度（光子 s⁻¹ cm⁻² sr⁻¹）
4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
在磷酸酯基团侧的烷基链长度

图4D

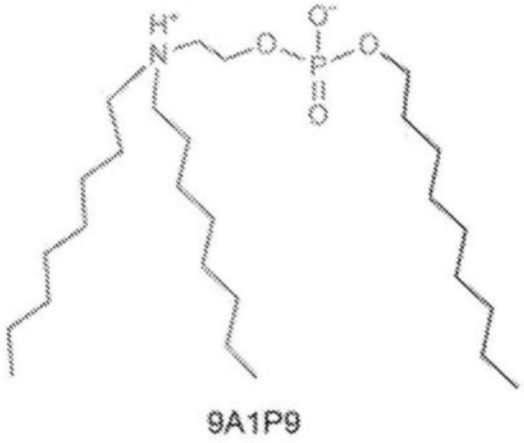

9A1P9

图5A

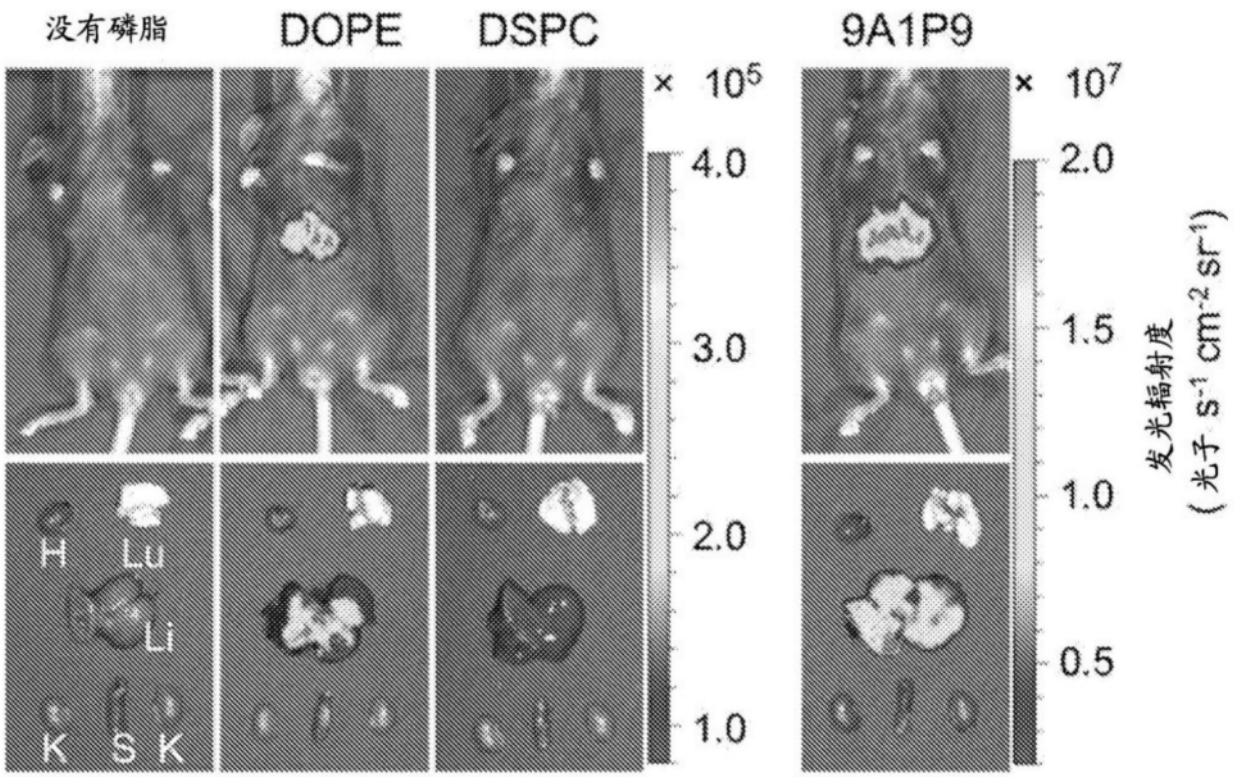

没有磷脂
DOPE
DSPC
9A1P9
× 10^5
4.0
3.0
2.0
1.0
× 10^7
2.0
1.5
1.0
0.5
发光辐射度
(光子 s^-1 cm^-2 sr^-1)
H
Lu
Li
K
S
K

图5B

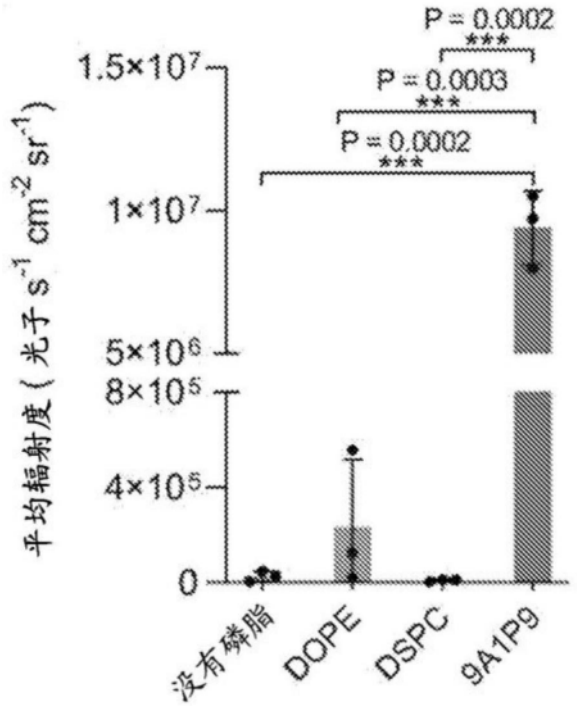

P = 0.0002
***
P = 0.0003
***
P = 0.0002
***
1.5×10^7
1×10^7
5×10^6
8×10^5
4×10^5
0
平均辐射度 (光子 s^-1 cm^-2 sr^-1)
没有磷脂
DOPE
DSPC
9A1P9

图5C

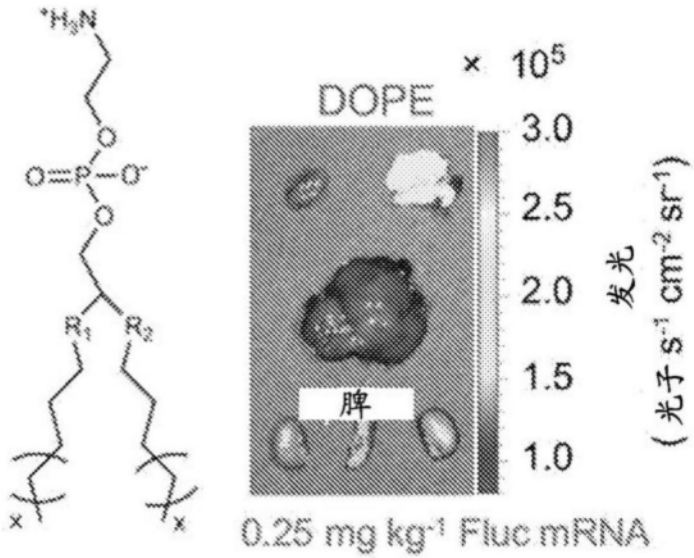

DOPE
× 10^5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
发光
(光子 s^-1 cm^-2 sr^-1)
脾
0.25 mg kg^-1 Fluc mRNA

图5D

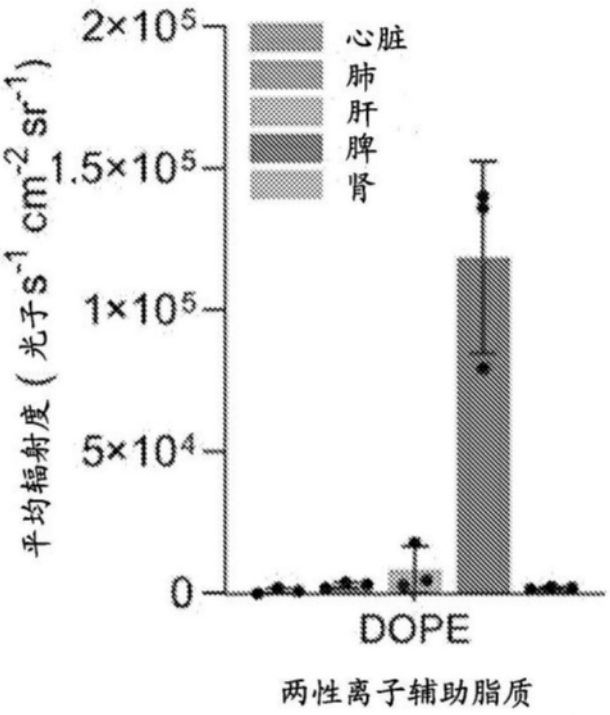

2×10^5
1.5×10^5
1×10^5
5×10^4
0
平均辐射度 (光子 s^-1 cm^-2 sr^-1)
心脏
肺
肝
脾
肾
DOPE
两性离子辅助脂质

图5E

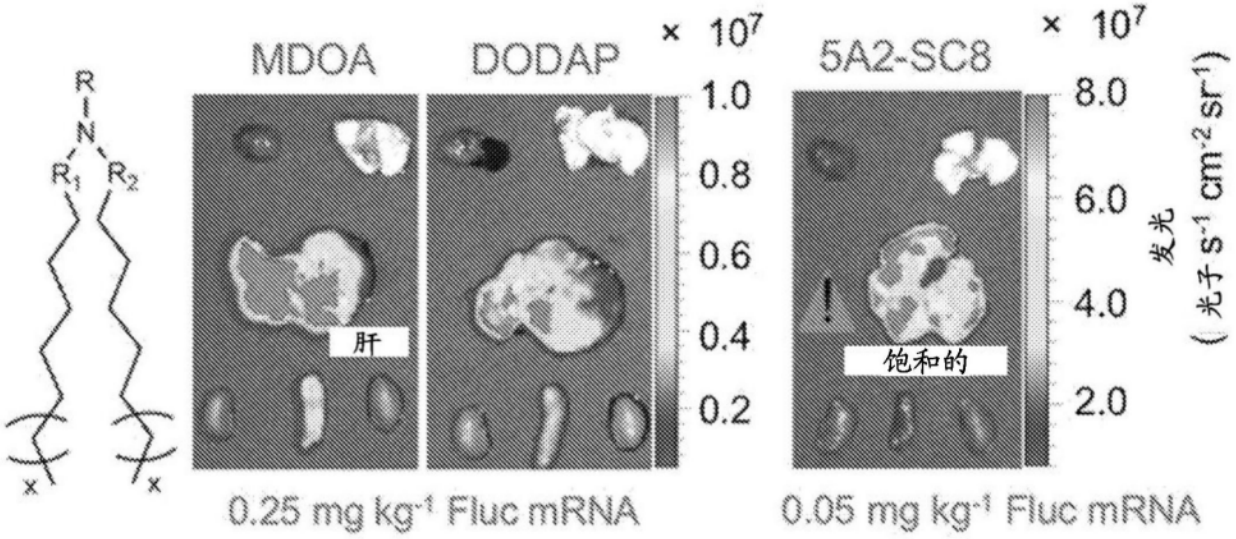

MDOA
DODAP
5A2-SC8
× 10^7
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
8.0
6.0
4.0
2.0
发光
(光子 s-1 cm-2 sr-1)
肝
饱和的
0.25 mg kg-1 Fluc mRNA
0.05 mg kg-1 Fluc mRNA

图5F

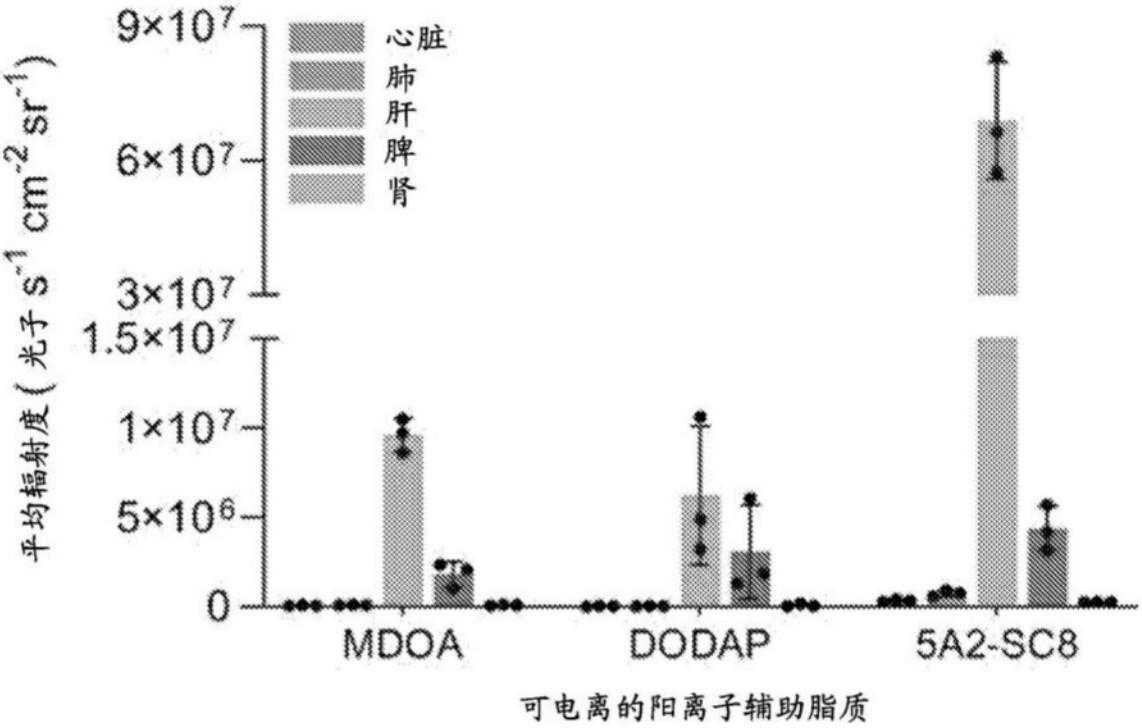

平均辐射度 (光子 s-1 cm-2 sr-1)
9×10^7
6×10^7
3×10^7
1.5×10^7
1×10^7
5×10^6
0
心脏
肺
肝
脾
肾
MDOA
DODAP
5A2-SC8
可电离的阳离子辅助脂质

图5G

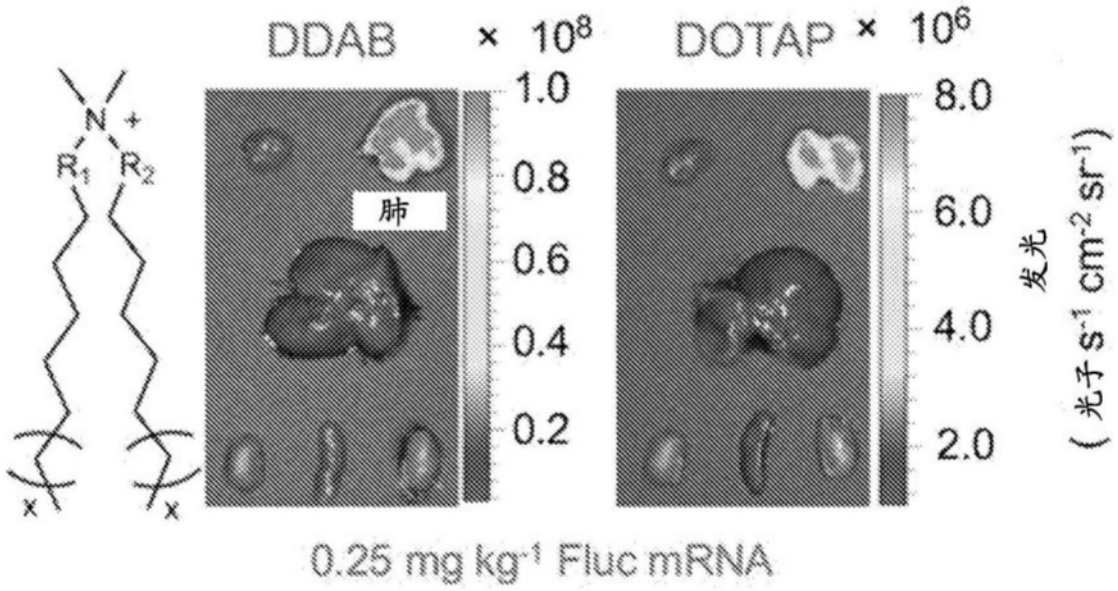

DDAB
× 10^8
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
肺
DOTAP
× 10^6
8.0
6.0
4.0
2.0
发光
(光子 s^-1 cm^-2 sr^-1)
0.25 mg kg^-1 Fluc mRNA

图5H

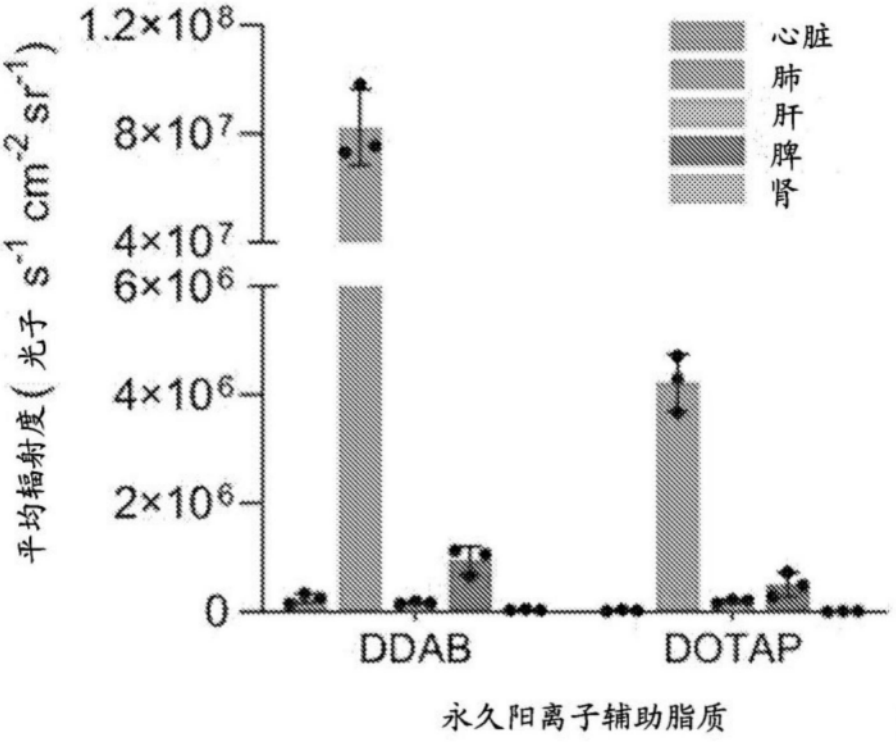

1.2×10^8
8×10^7
4×10^7
6×10^6
4×10^6
2×10^6
0
平均辐射度(光子 s^-1 cm^-2 sr^-1)
心脏
肺
肝
脾
肾
DDAB
DOTAP
永久阳离子辅助脂质

图5I

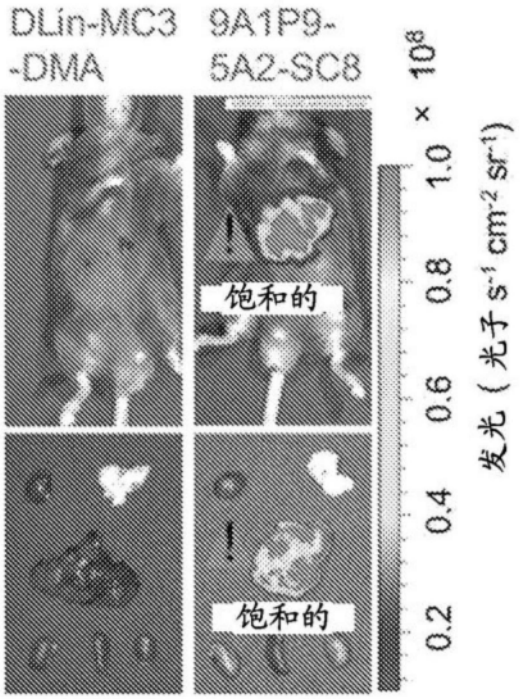

DLin-MC3
-DMA
9A1P9-
5A2-SC8
饱和的
饱和的
× 10^8
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
发光（光子 s-1 cm-2 sr-1）

图5J

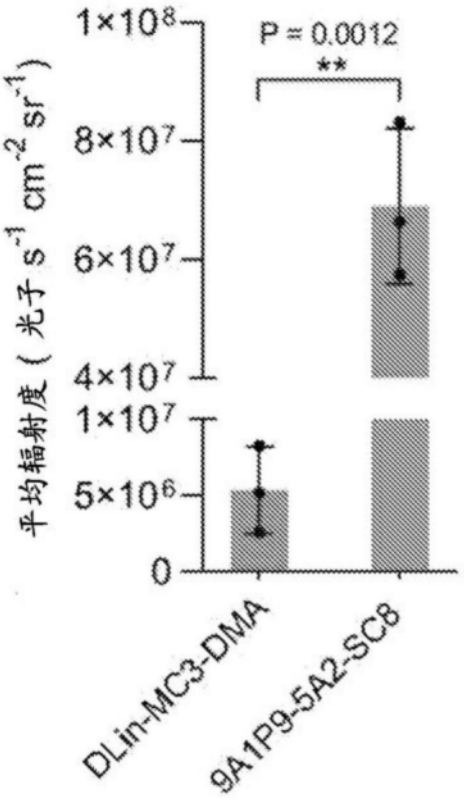

P = 0.0012
**
1×10^8
8×10^7
6×10^7
4×10^7
1×10^7
5×10^6
0
平均辐射度（光子 s-1 cm-2 sr-1）
DLin-MC3-DMA
9A1P9-5A2-SC8

图5K


LoxP
停止
LoxP
tdTomato
Cre
LoxP
tdTomato

图5L

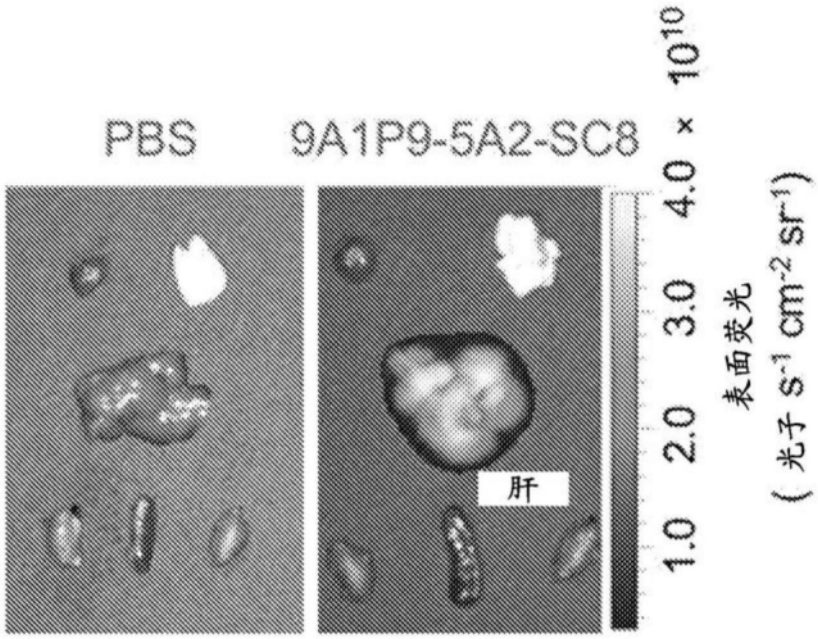

PBS
9A1P9-5A2-SC8
肝
1.0
2.0
3.0
4.0 × 10^10
表面荧光
(光子 s^-1 cm^-2 sr^-1)

图5M

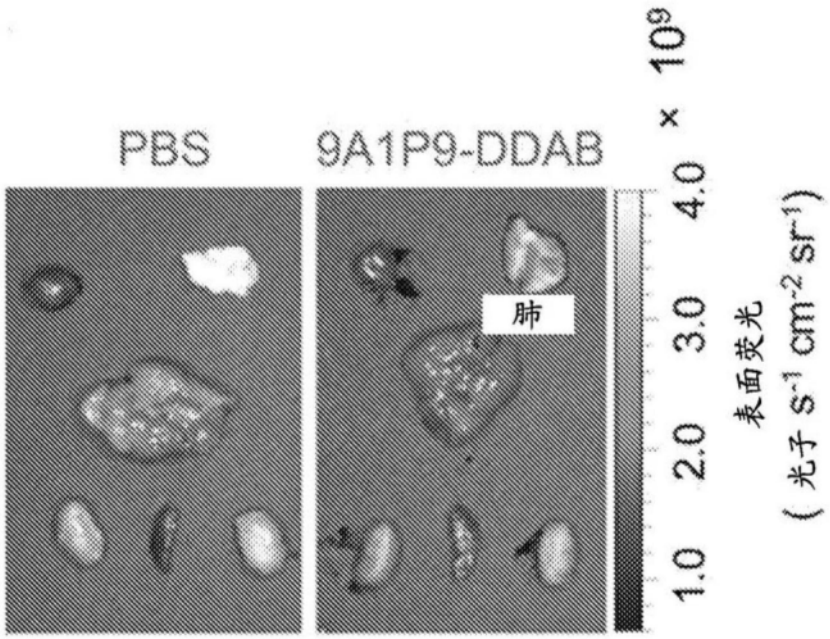

PBS
9A1P9-DDAB
肺
× 10⁹
4.0
3.0
2.0
1.0
表面荧光
(光子 s⁻¹ cm⁻² sr⁻¹)

图5N

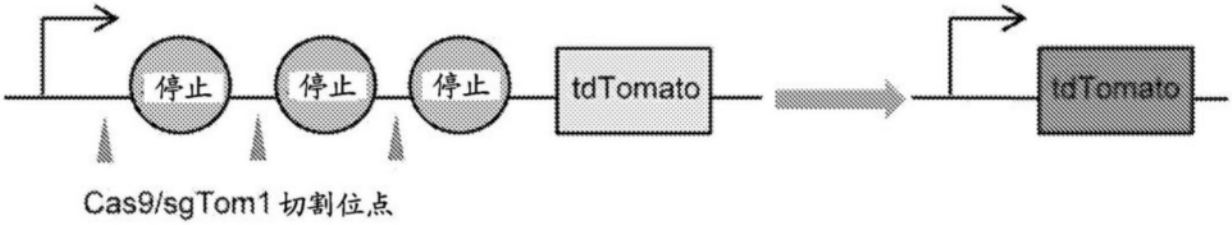

停止
停止
停止
tdTomato
tdTomato
Cas9/sgTom1 切割位点

图6A

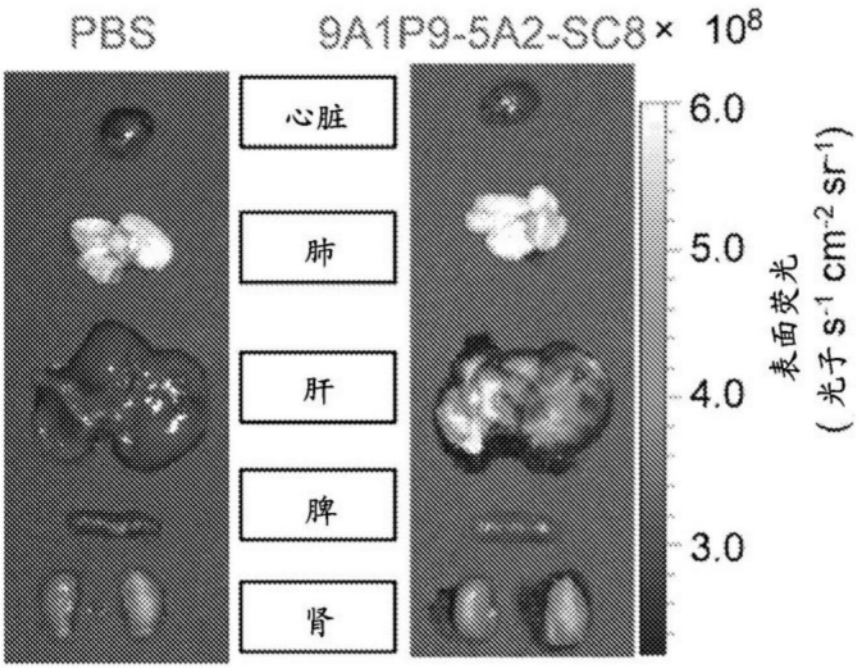

PBS
9A1P9-5A2-SC8
× 10^8
心脏
肺
肝
脾
肾
6.0
5.0
4.0
3.0
表面荧光
(光子 s^-1 cm^-2 sr^-1)

图6B

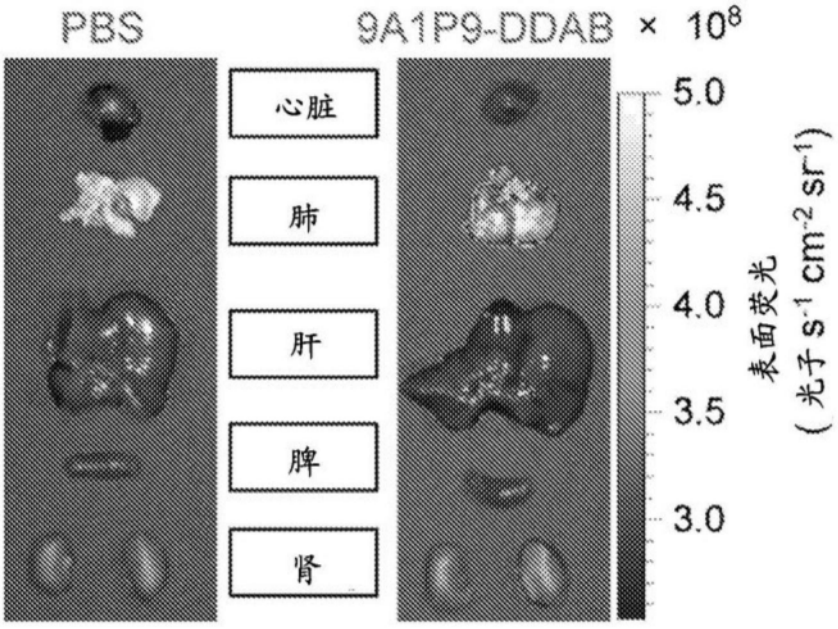

PBS
9A1P9-DDAB
× 10^8
心脏
肺
肝
脾
肾
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
表面荧光
(光子 s^-1 cm^-2 sr^-1)

图6C

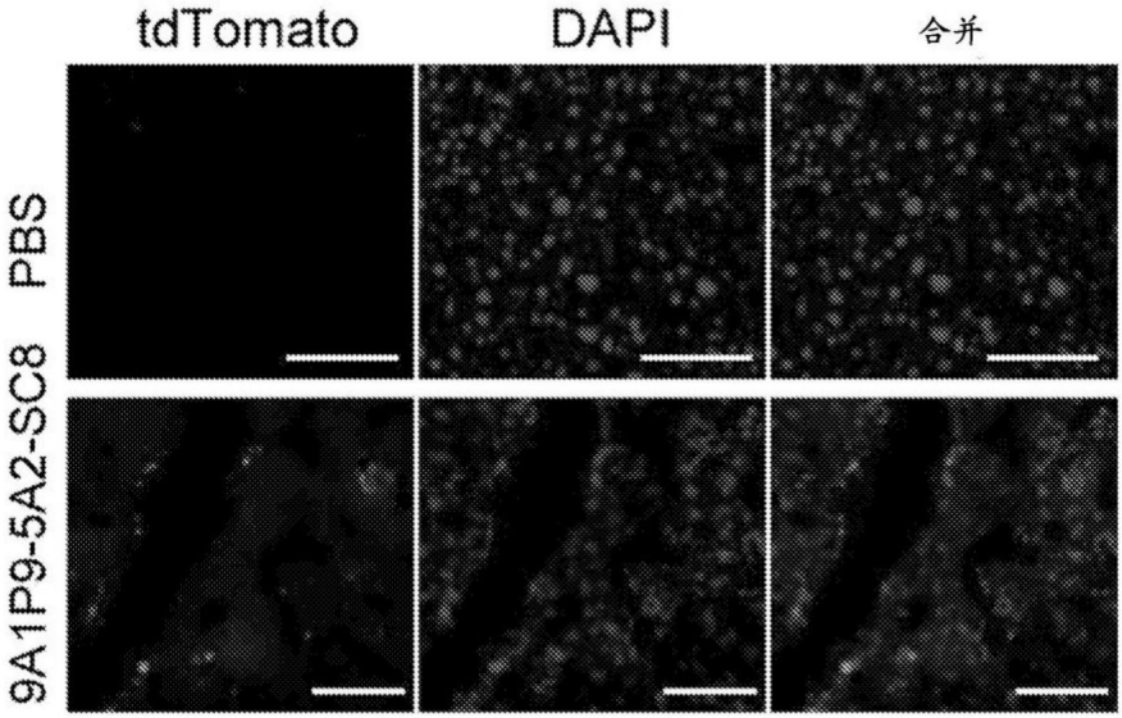

tdTomato
DAPI
合并
PBS
9A1P9-5A2-SC8

图6D

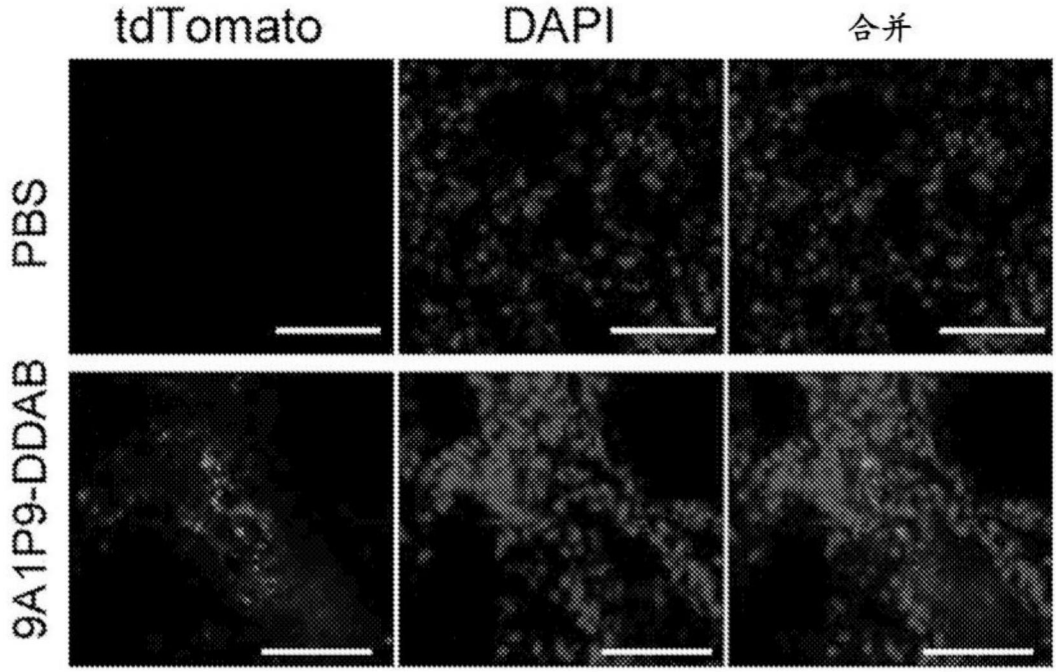

tdTomato
DAPI
合并
PBS
9A1P9-DDAB

图6E

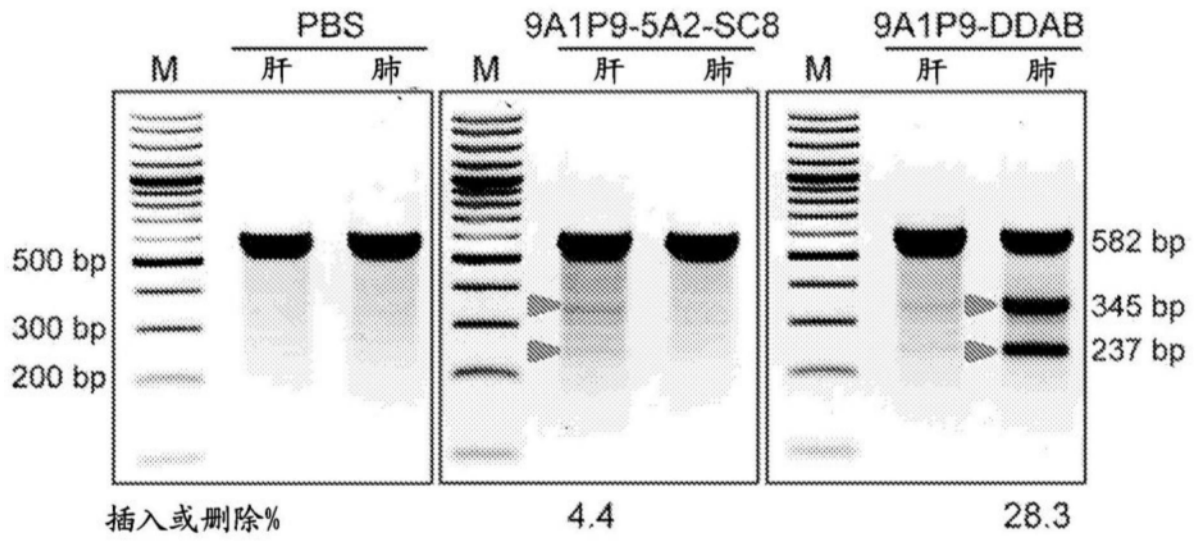

PBS
9A1P9-5A2-SC8
9A1P9-DDAB
M
肝
肺
500 bp
300 bp
200 bp
582 bp
345 bp
237 bp
插入或删除%
4.4
28.3

图6F

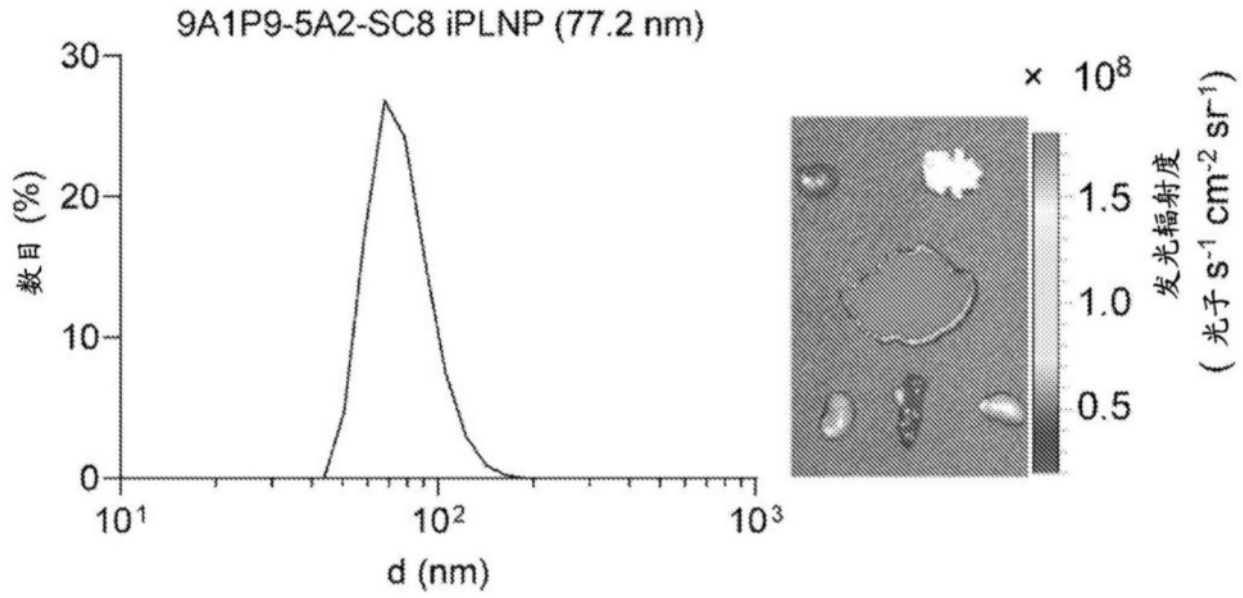

9A1P9-5A2-SC8 iPLNP (77.2 nm)
数目 (%)
30
20
10
0
10¹
10²
10³
d (nm)
× 10⁸
1.5
1.0
0.5
发光辐射度
(光子 s⁻¹ cm⁻² sr⁻¹)

图6G

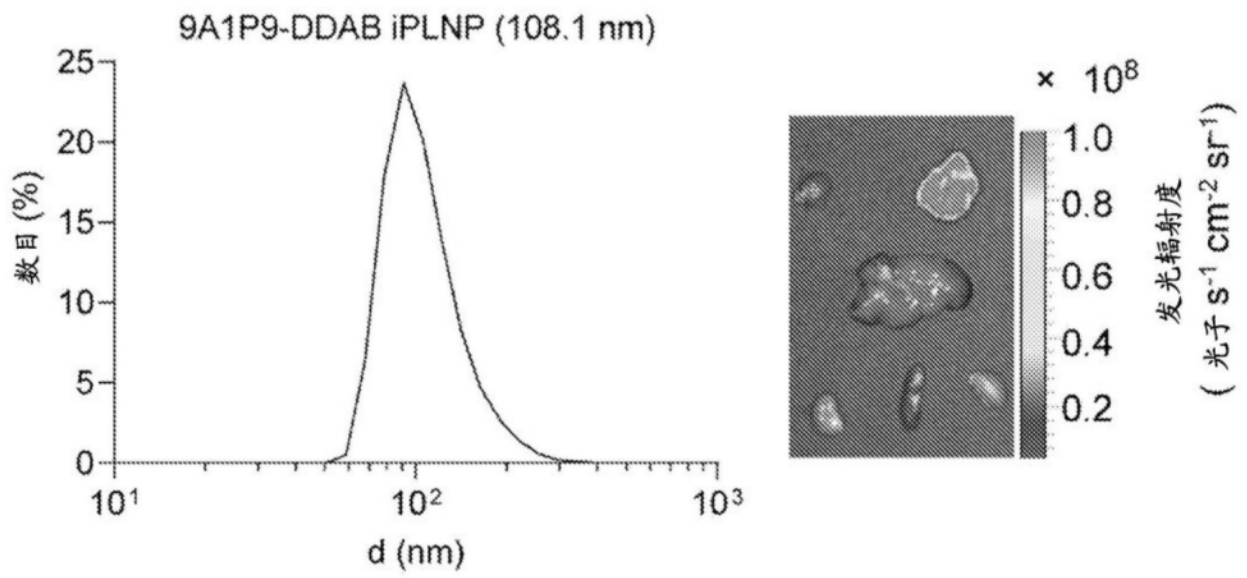

9A1P9-DDAB iPLNP (108.1 nm)
数目 (%)
25
20
15
10
5
0
10^1
10^2
10^3
d (nm)
× 10^8
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
发光辐射度
(光子 s^{-1} cm^{-2} sr^{-1})

图6H

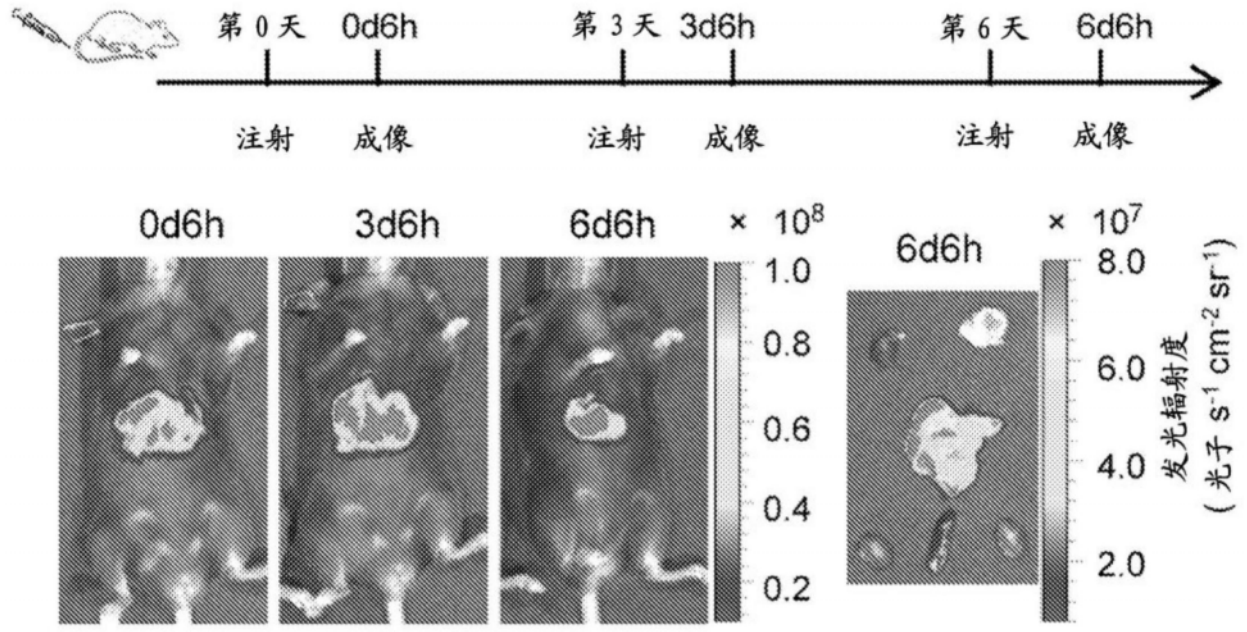

第 0 天
0d6h
第 3 天
3d6h
第 6 天
6d6h
注射
成像
注射
成像
注射
成像
0d6h
3d6h
6d6h
× 10^8
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
6d6h
× 10^7
8.0
6.0
4.0
2.0
发光辐射度
(光子 s^{-1} cm^{-2} sr^{-1})

图6I

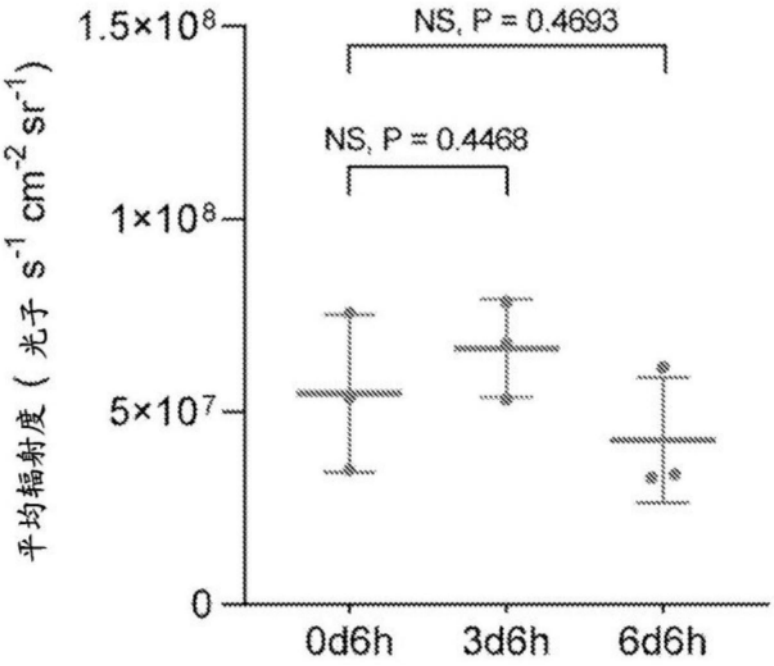

NS, P = 0.4693
NS, P = 0.4468
1.5×10^8
1×10^8
5×10^7
0
平均辐射度（光子 s^-1 cm^-2 sr^-1）
0d6h
3d6h
6d6h

图6J

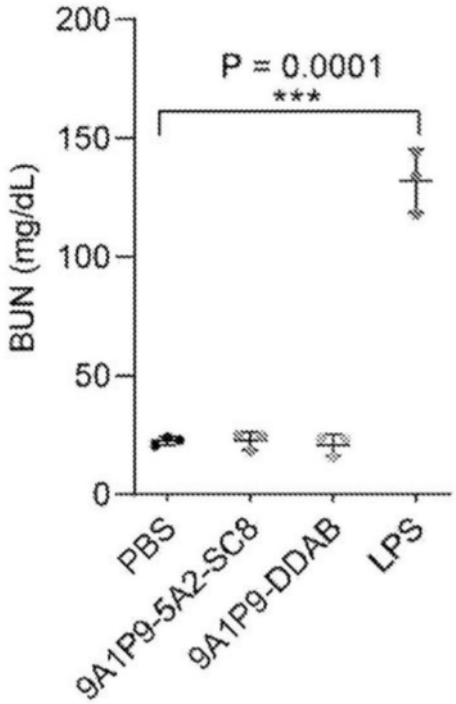

P = 0.0001
***
200
150
100
50
0
BUN (mg/dL)
PBS
9A1P9-5A2-SC8
9A1P9-DDAB
LPS

图6K

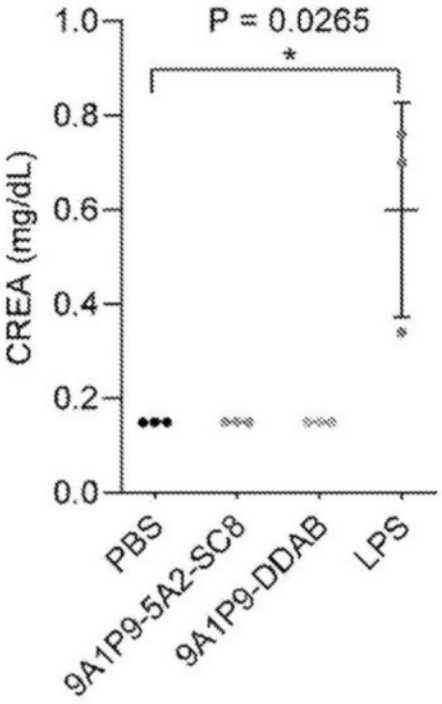

P = 0.0265
*
CREA (mg/dL)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
PBS
9A1P9-5A2-SC8
9A1P9-DDAB
LPS

图6L

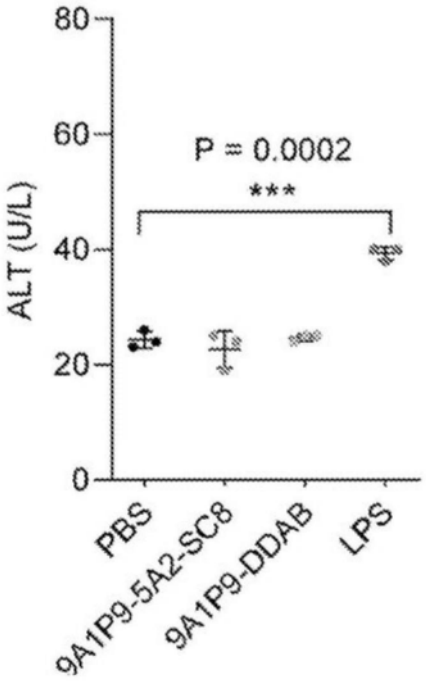

P = 0.0002
***
ALT (U/L)
80
60
40
20
0
PBS
9A1P9-5A2-SC8
9A1P9-DDAB
LPS

图6M

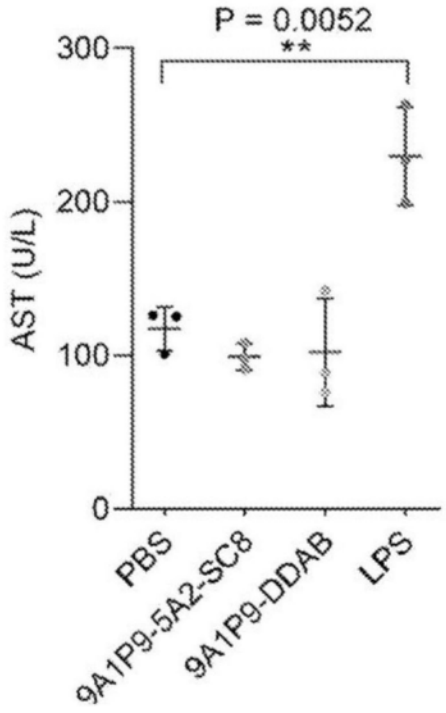

P = 0.0052
**
300
200
100
0
AST (U/L)
PBS
9A1P9-5A2-SC8
9A1P9-DDAB
LPS

图6N

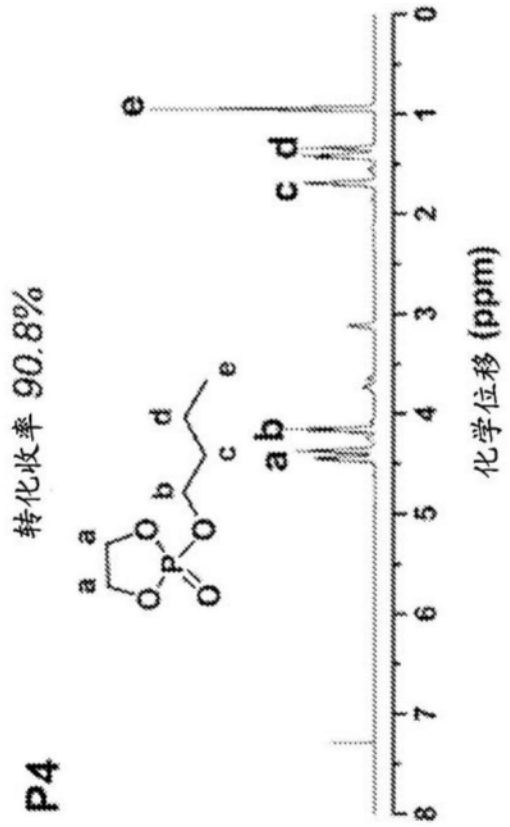

P4
转化收率 90.8%
a a
b
c
d
e
a b
c d
e
0
1
2
3
4
5
6
7
8
化学位移 (ppm)

图7A

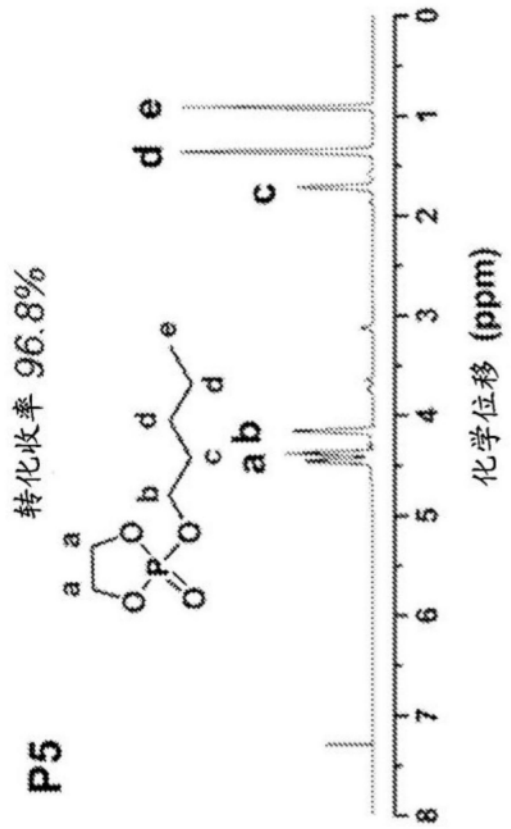


图7B

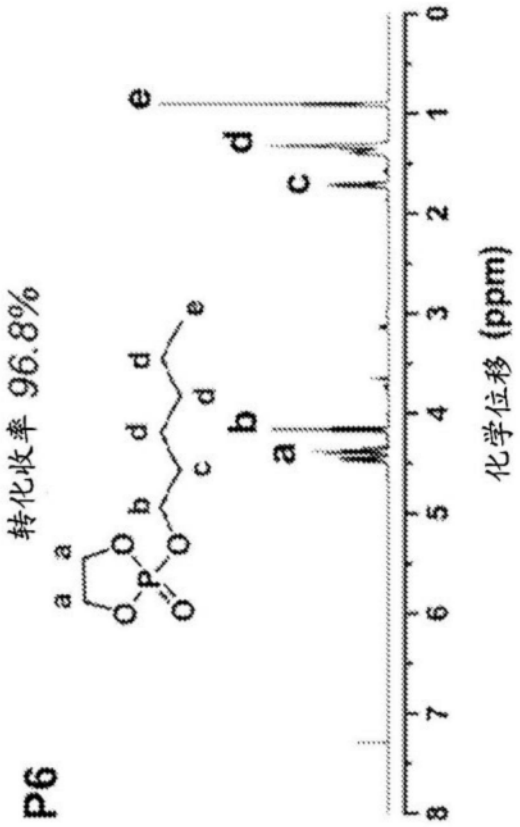


图7C

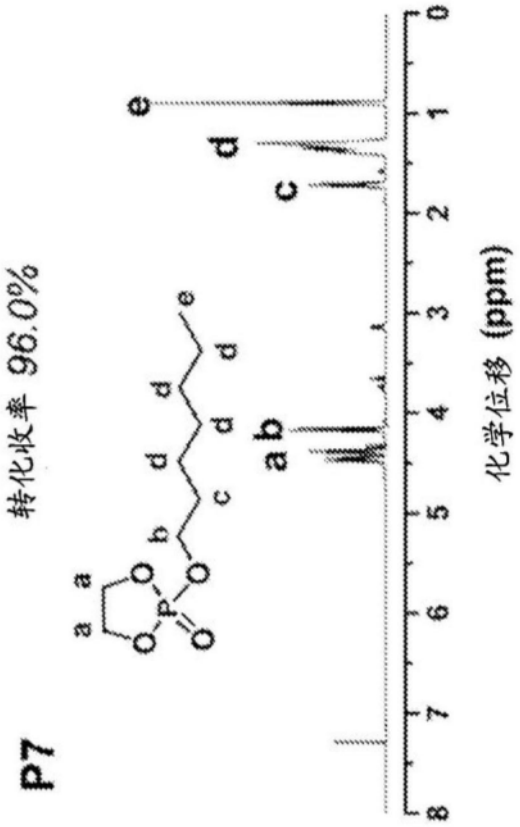


图7D

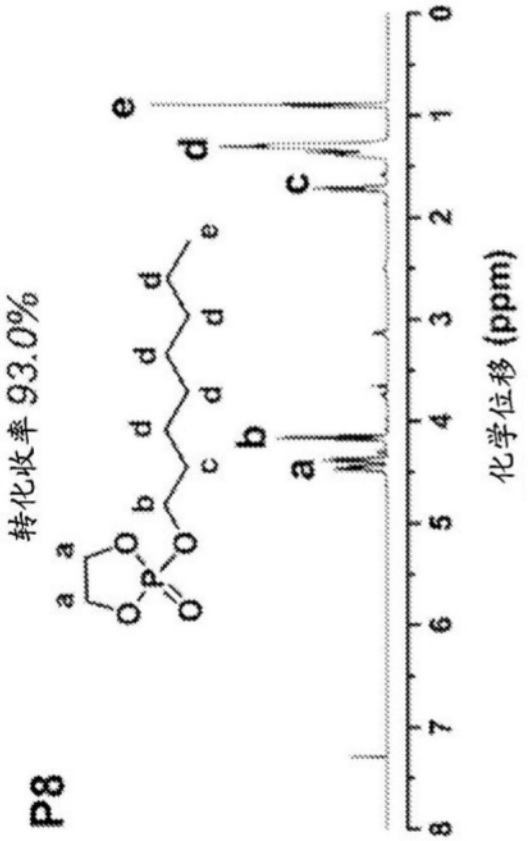


图7E

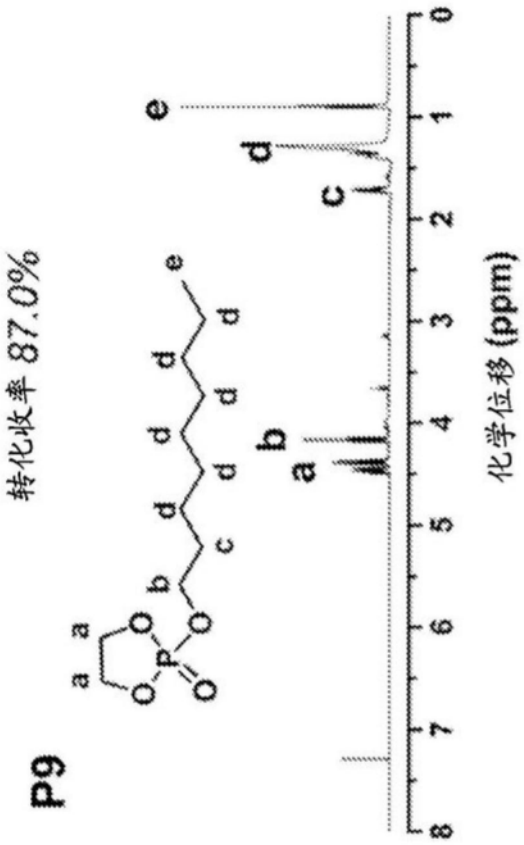


图7F

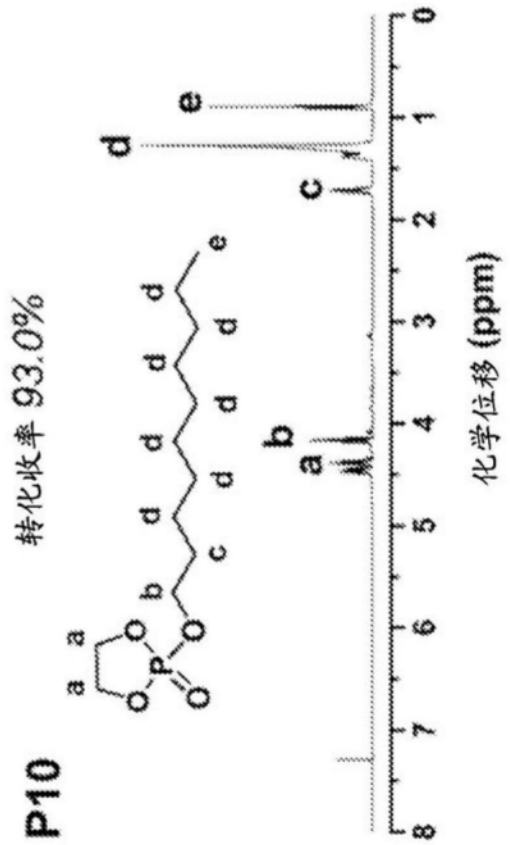


图7G

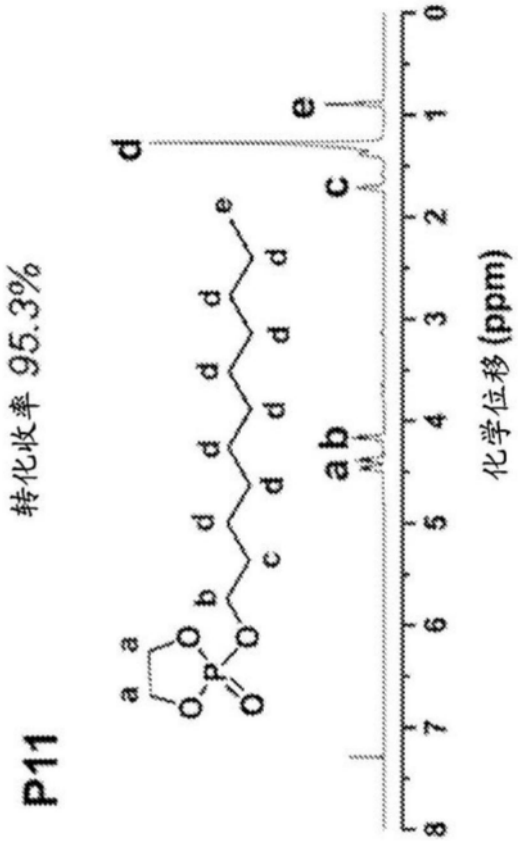

P11
转化收率 95.3%
d
e
c
a b
化学位移 (ppm)
0 1 2 3 4 5 6 7 8

图7H

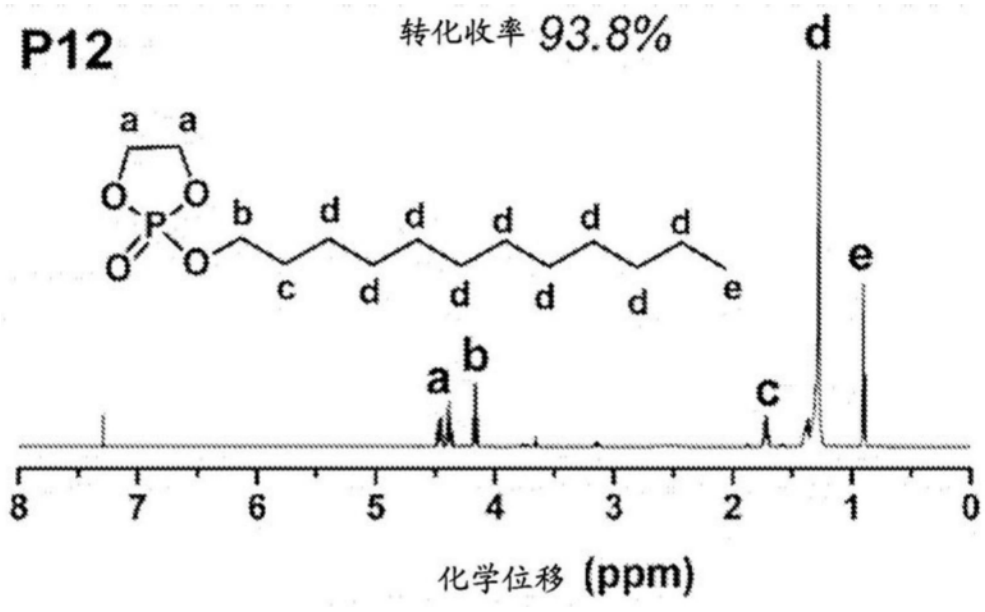

P12
转化收率 93.8%
d
e
a b
c
化学位移 (ppm)
8 7 6 5 4 3 2 1 0

图7I

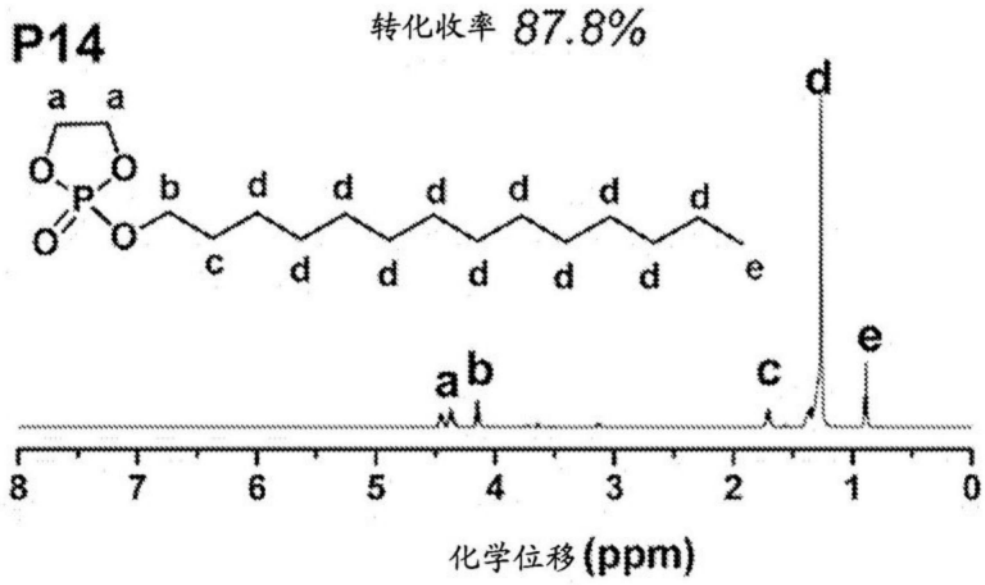

P14
转化收率 87.8%
a a
O
O
P
O
O
b d d d d d d
c d d d d d e
d
e
a b
c
8 7 6 5 4 3 2 1 0
化学位移 (ppm)

图7J

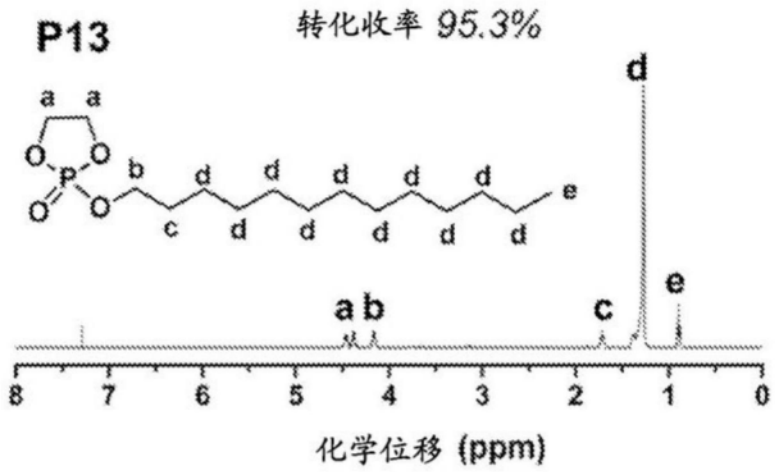

P13
转化收率 95.3%
a a
O
O
P
O
O
b d d d d d e
c d d d d d
d
e
a b
c
8 7 6 5 4 3 2 1 0
化学位移 (ppm)

图7K

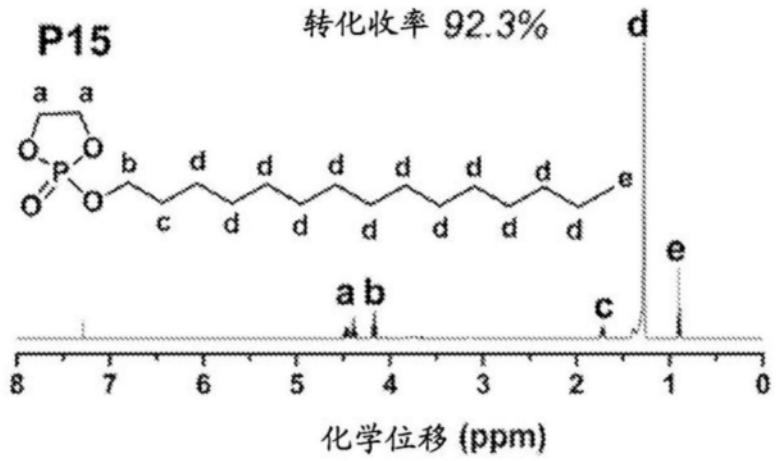

P15
转化收率 92.3%
a a
O
O
P
O
O
b d d d d d d e
c d d d d d d
d
e
a b
c
8 7 6 5 4 3 2 1 0
化学位移 (ppm)

图7L

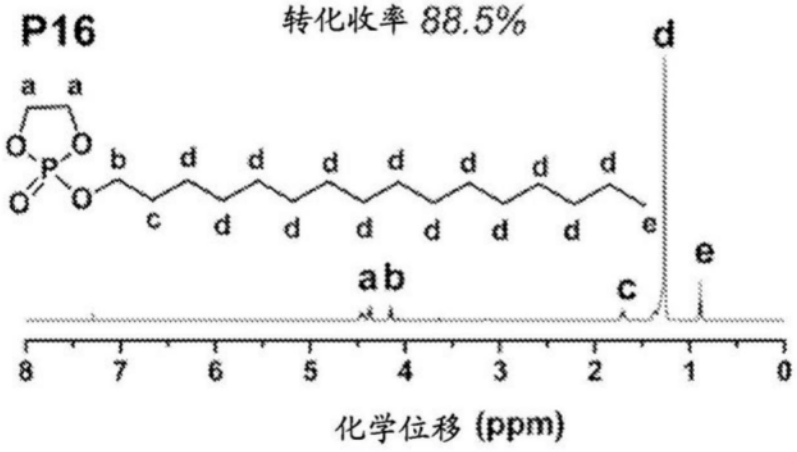

P16
转化收率 88.5%
a a
O
O
P
O
O
b d d d d d d d
c d d d d d d e
d
e
a b
c
8 7 6 5 4 3 2 1 0
化学位移 (ppm)

图7M

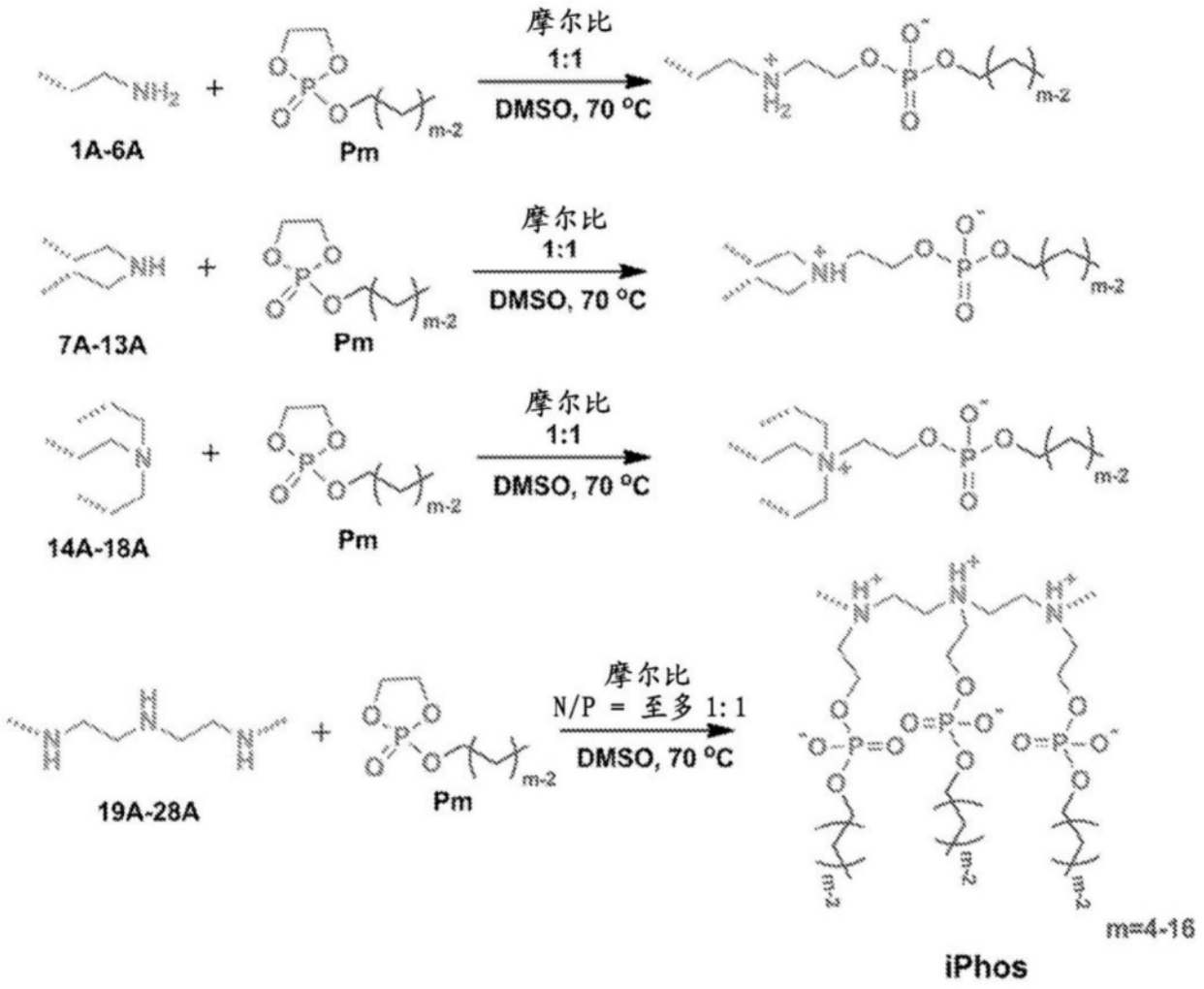

摩尔比
1:1
DMSO, 70 °C
1A-6A
Pm
7A-13A
14A-18A
摩尔比
N/P = 至多 1:1
19A-28A
m=4-16
iPhos

图8

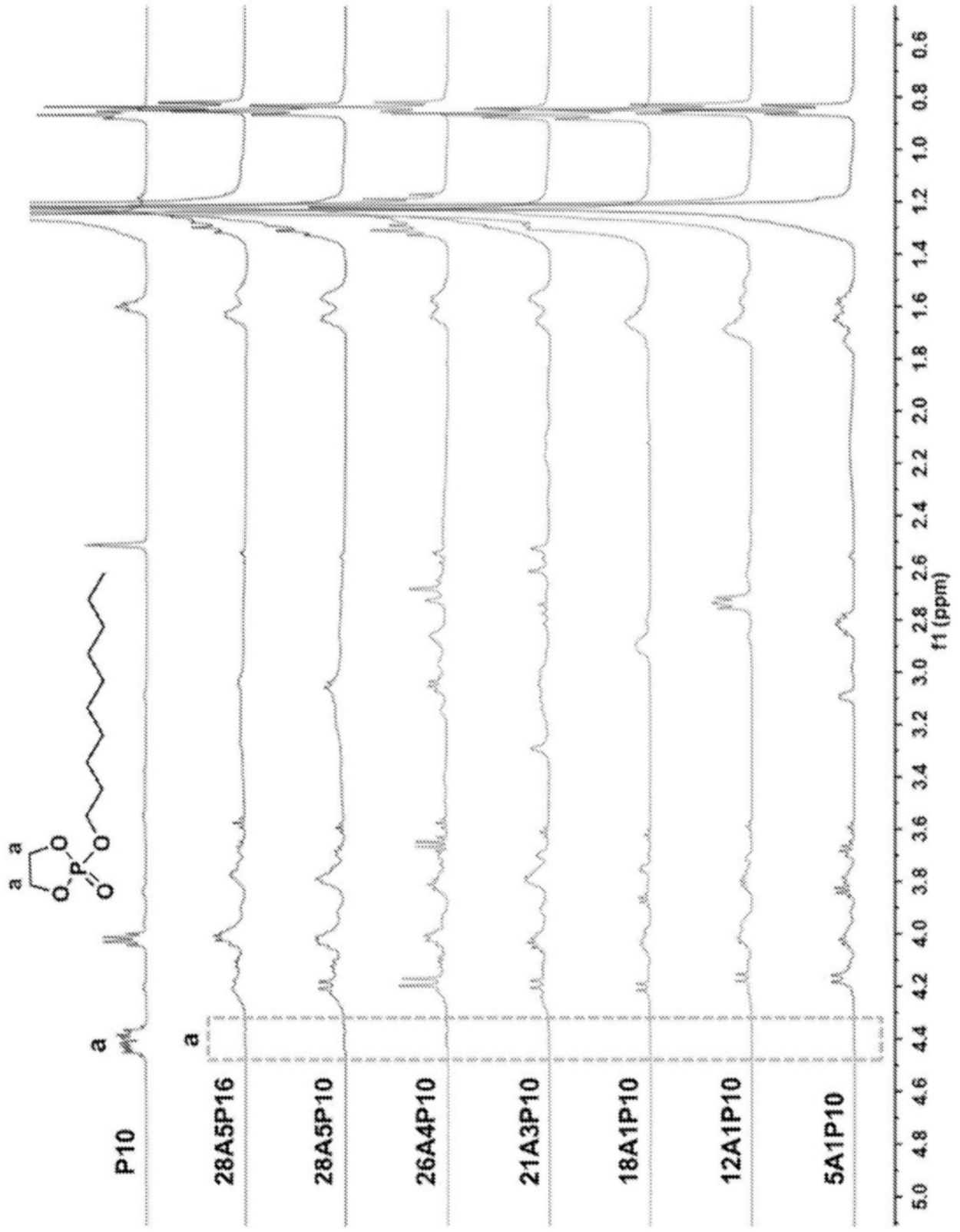

a a
a
a
P10
28A5P16
28A5P10
26A4P10
21A3P10
18A1P10
12A1P10
5A1P10
5.0 4.8 4.6 4.4 4.2 4.0 3.8 3.6 3.4 3.2 3.0 2.8 2.6 2.4 2.2 2.0 1.8 1.6 1.4 1.2 1.0 0.8 0.6
f1 (ppm)

图9

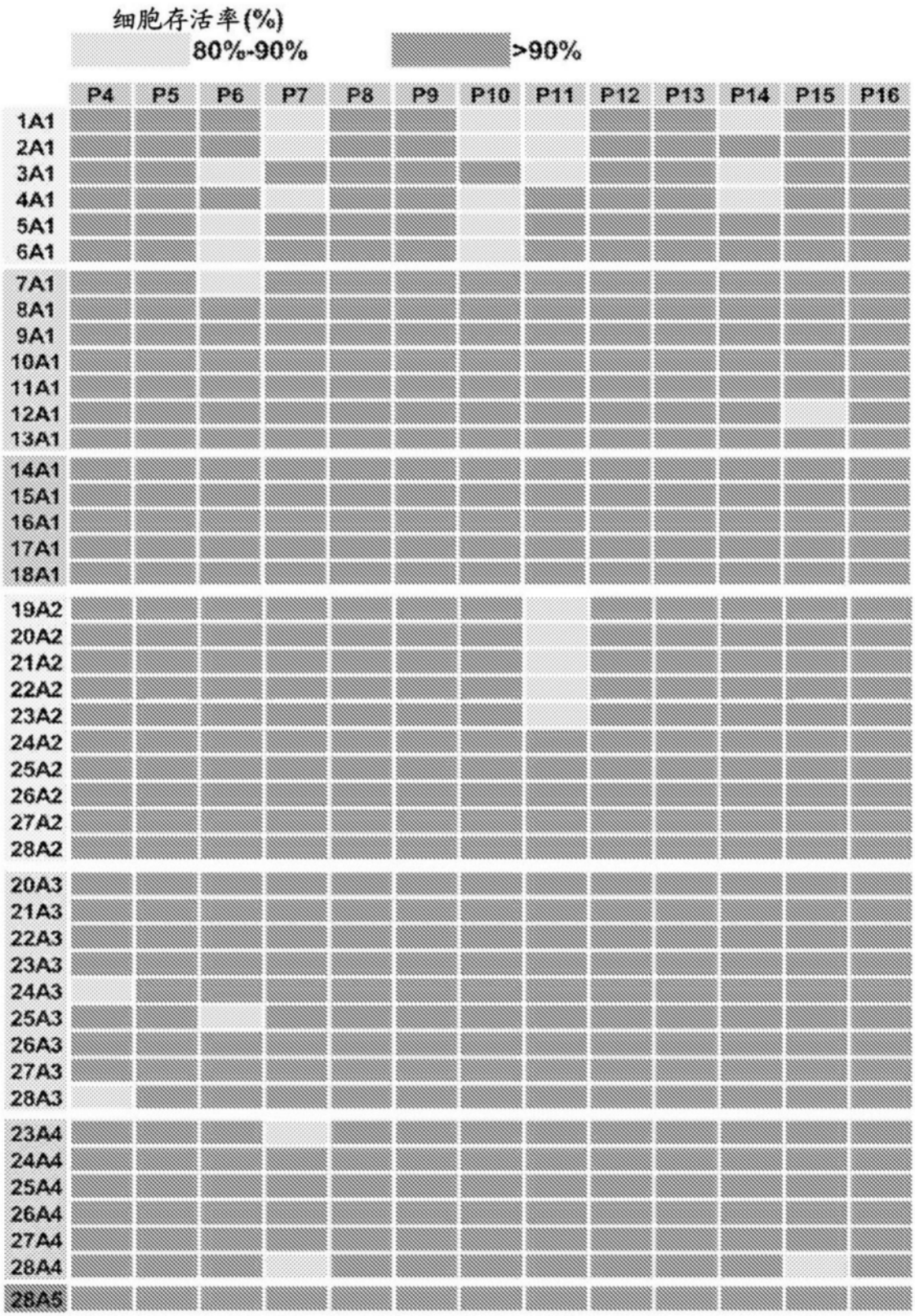

细胞存活率(%)
80%-90%
>90%
P4 P5 P6 P7 P8 P9 P10 P11 P12 P13 P14 P15 P16
1A1 2A1 3A1 4A1 5A1 6A1
7A1 8A1 9A1 10A1 11A1 12A1 13A1
14A1 15A1 16A1 17A1 18A1
19A2 20A2 21A2 22A2 23A2 24A2 25A2 26A2 27A2 28A2
20A3 21A3 22A3 23A3 24A3 25A3 26A3 27A3 28A3
23A4 24A4 25A4 26A4 27A4 28A4
28A5

图10

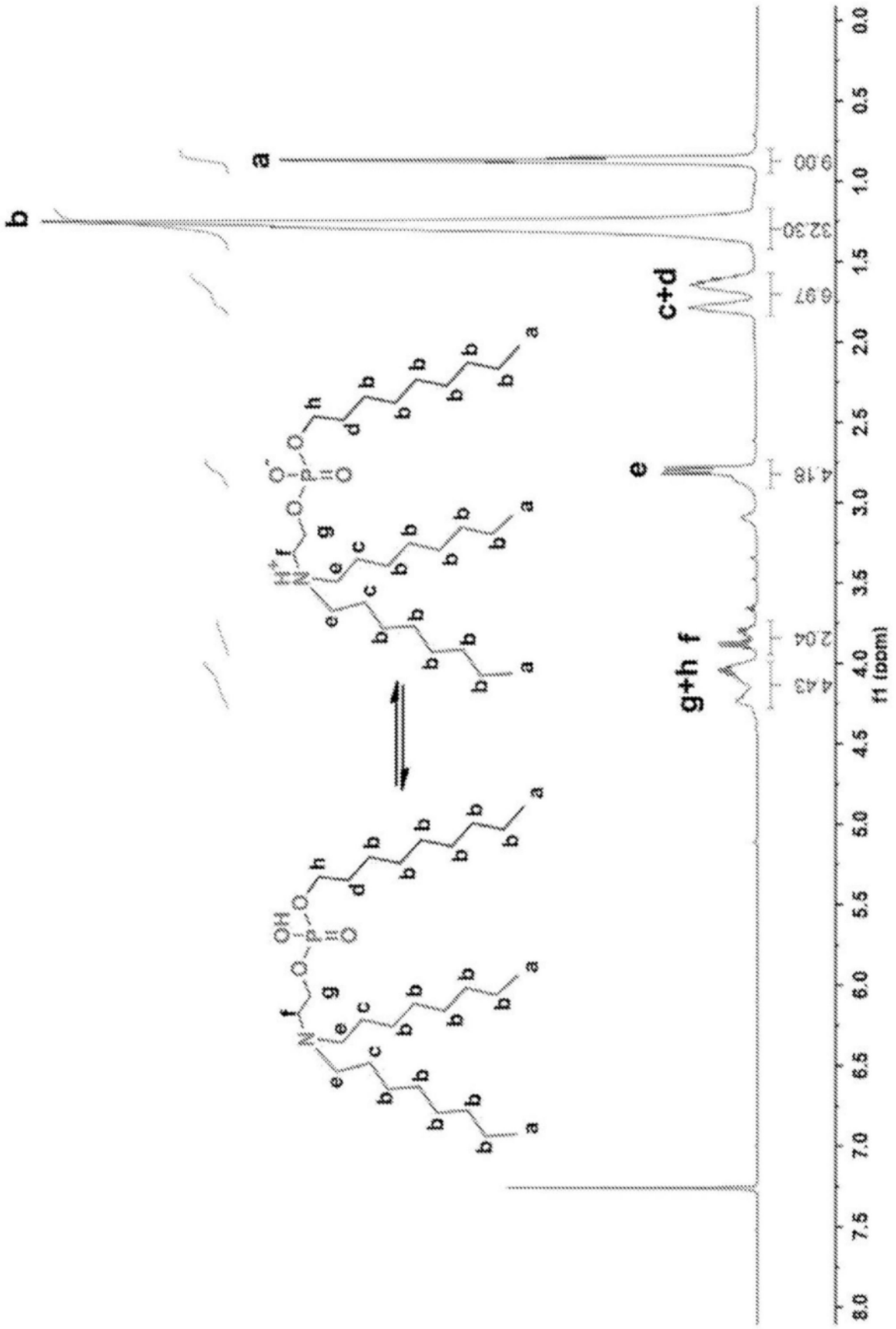


图11

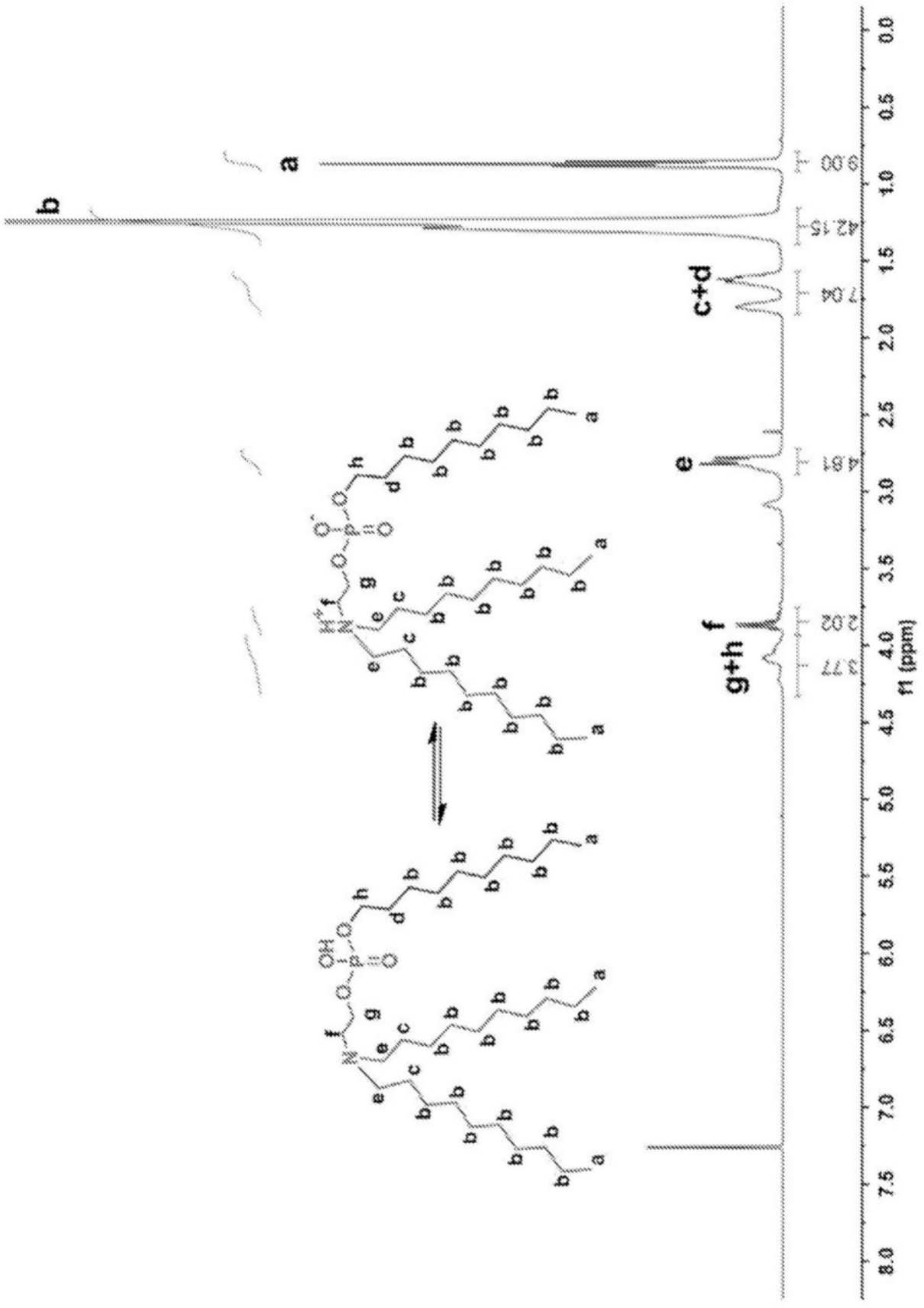


图12

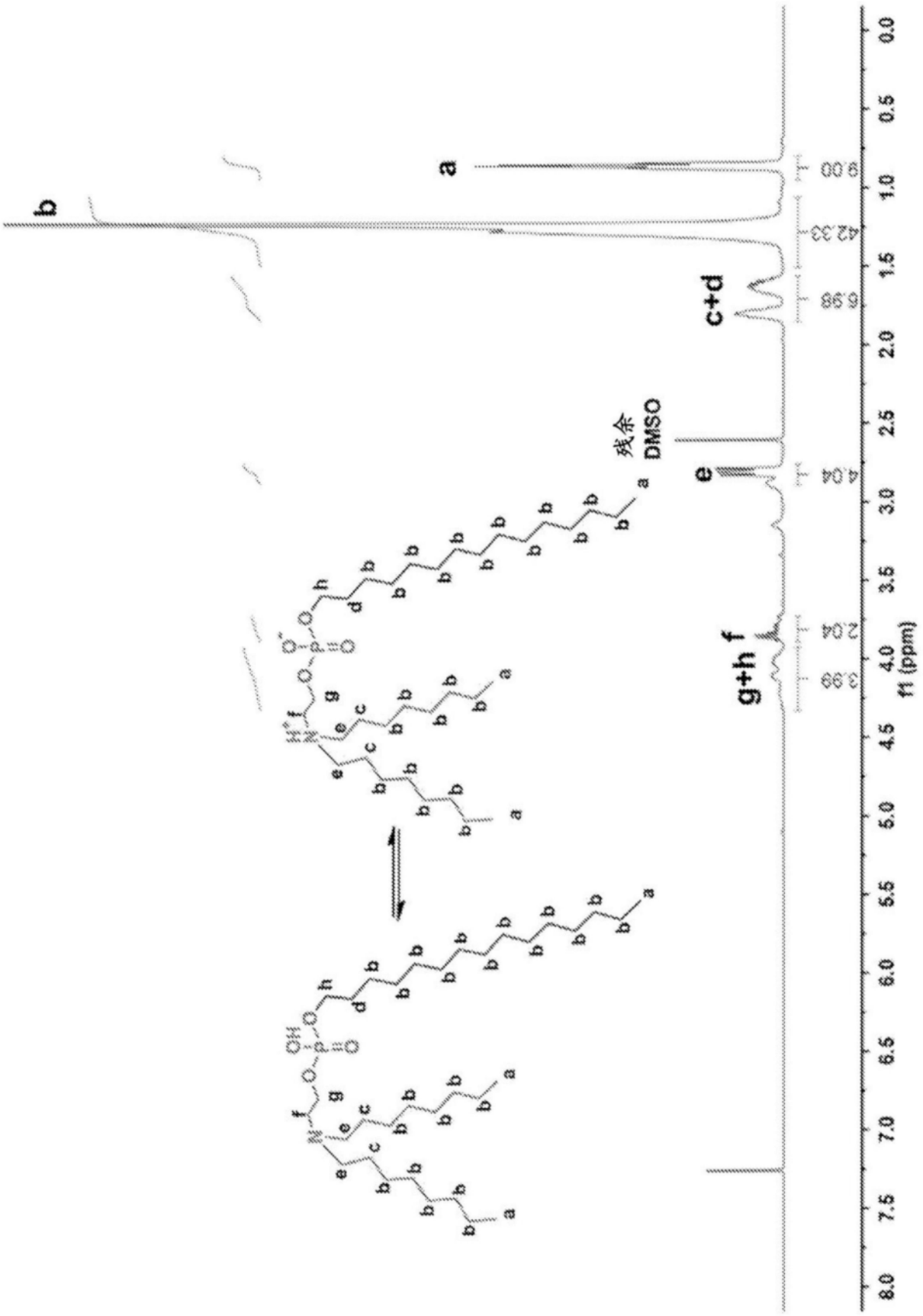


图13

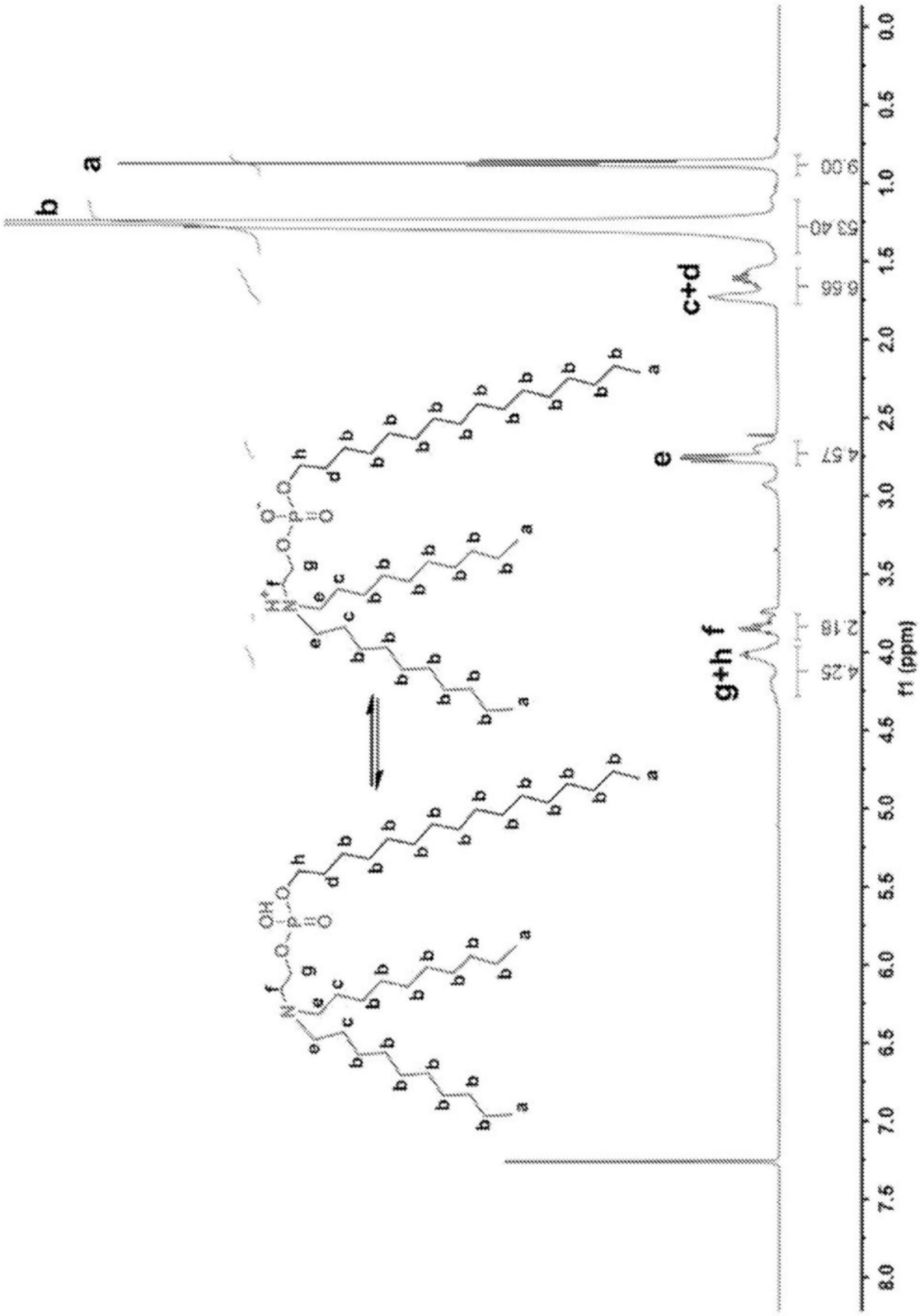


图14

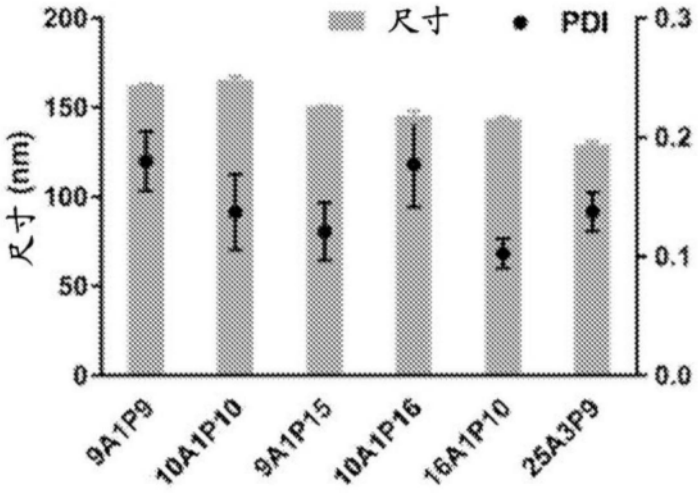

尺寸
PDI
尺寸 (nm)
200
150
100
50
0
0.3
0.2
0.1
0.0
9A1P9
10A1P10
9A1P15
10A1P16
16A1P10
25A3P9

图15A

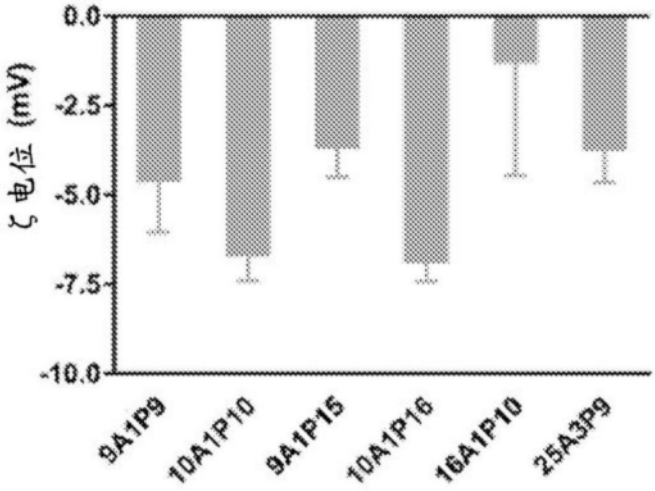

ζ电位 (mV)
0.0
-2.5
-5.0
-7.5
-10.0
9A1P9
10A1P10
9A1P15
10A1P16
16A1P10
25A3P9

图15B

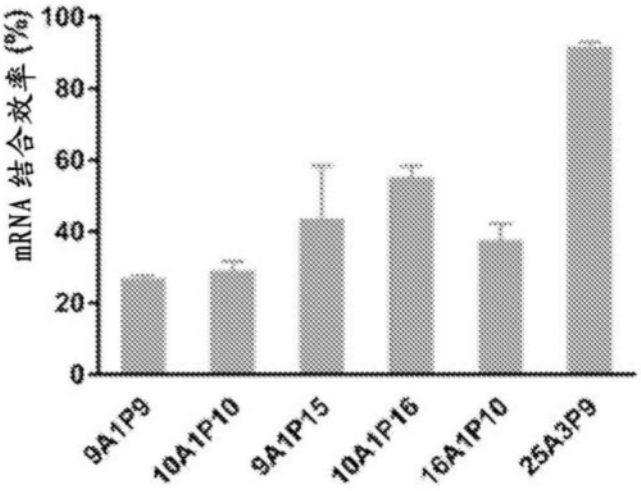

mRNA 结合效率 (%)
100
80
60
40
20
0
9A1P9
10A1P10
9A1P15
10A1P16
16A1P10
25A3P9

图15C

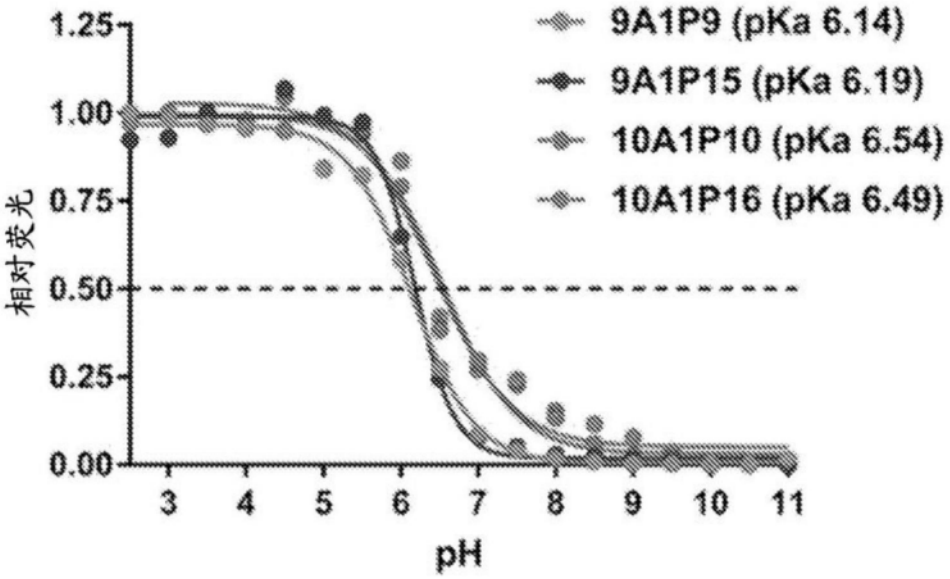

9A1P9 (pKa 6.14)
9A1P15 (pKa 6.19)
10A1P10 (pKa 6.54)
10A1P16 (pKa 6.49)
相对荧光
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
3
4
5
6
7
8
9
10
11
pH

图16A

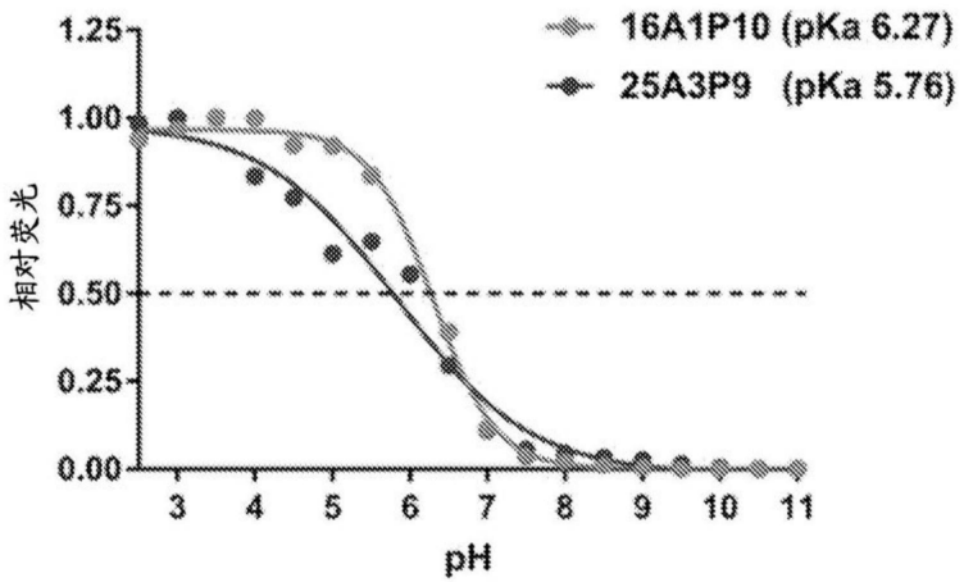

16A1P10 (pKa 6.27)
25A3P9 (pKa 5.76)
相对荧光
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
3
4
5
6
7
8
9
10
11
pH

图16B

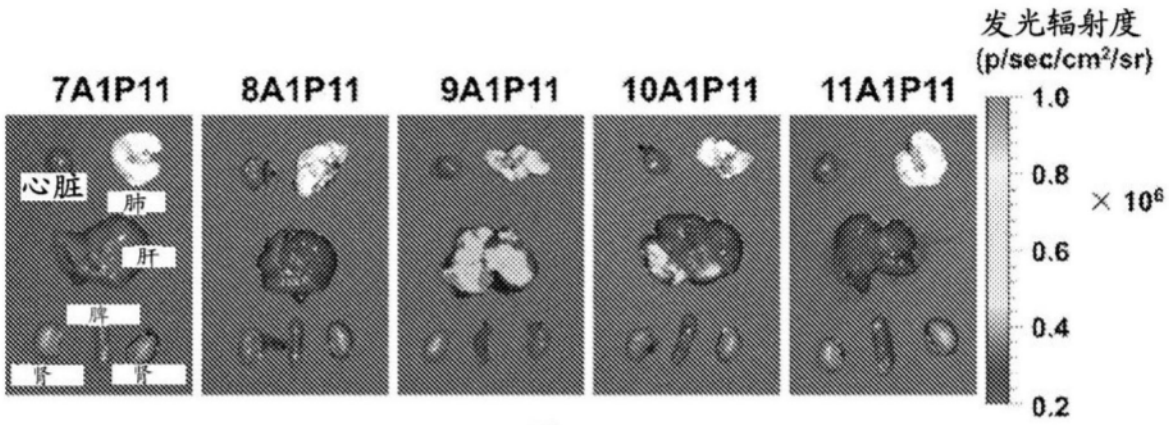

发光辐射度
(p/sec/cm²/sr)
7A1P11
8A1P11
9A1P11
10A1P11
11A1P11
心脏
肺
肝
脾
肾
肾
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
× 10⁶

图17A

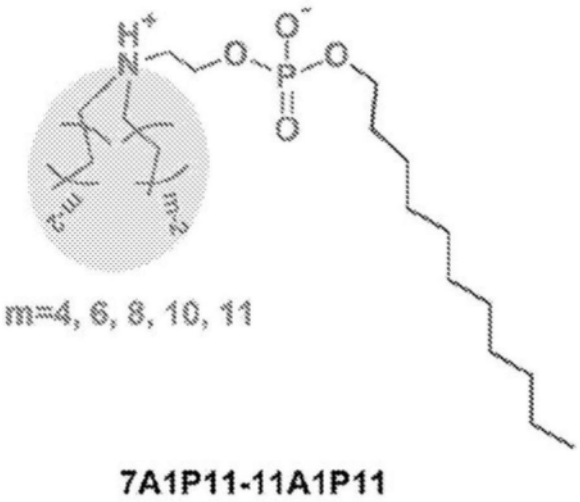

m=4, 6, 8, 10, 11
7A1P11-11A1P11

图17B

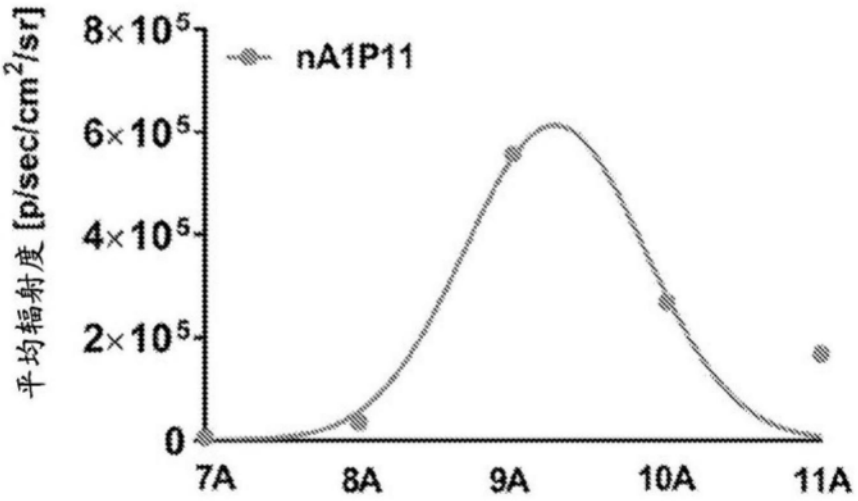

平均輻射度 [p/sec/cm²/sr]
8×10⁵
6×10⁵
4×10⁵
2×10⁵
0
nA1P11
7A
8A
9A
10A
11A

图17C

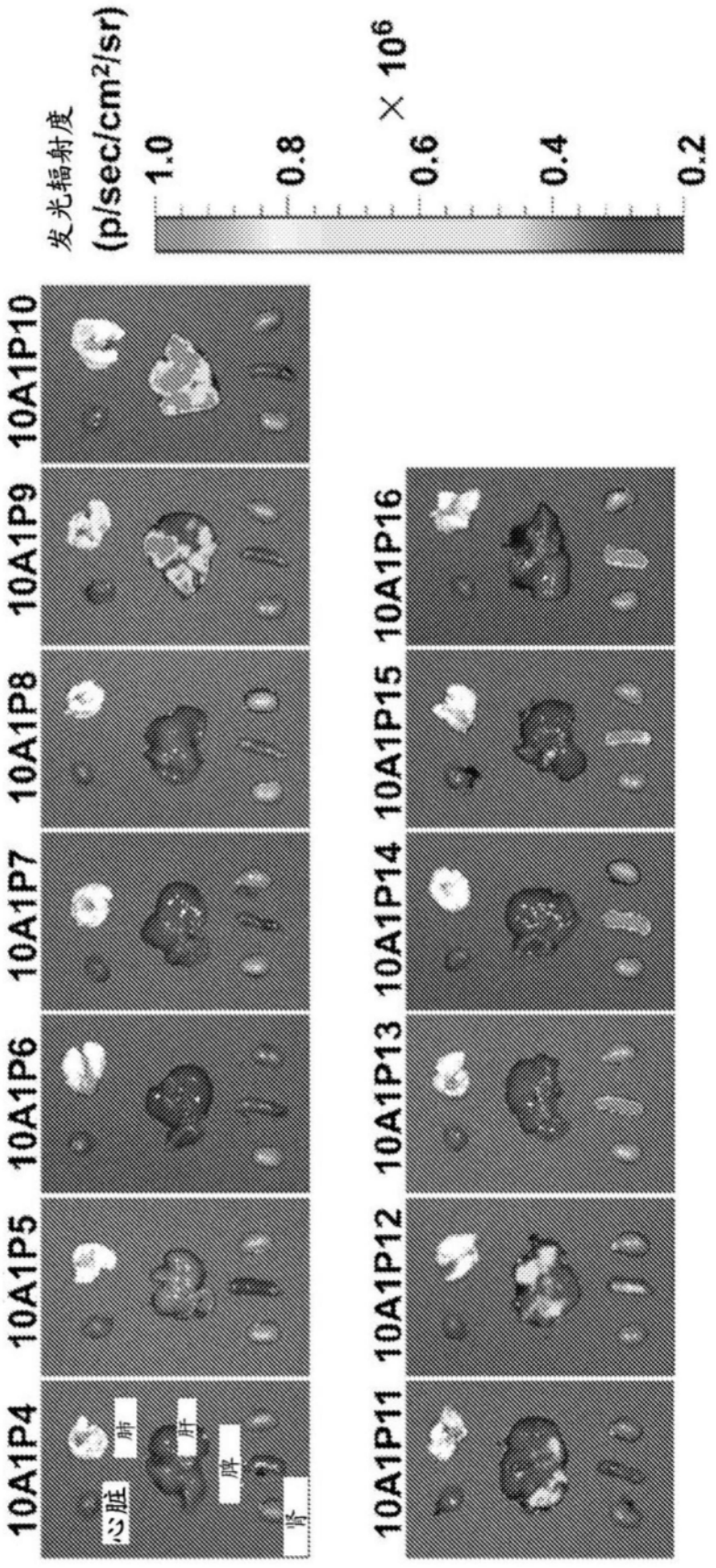
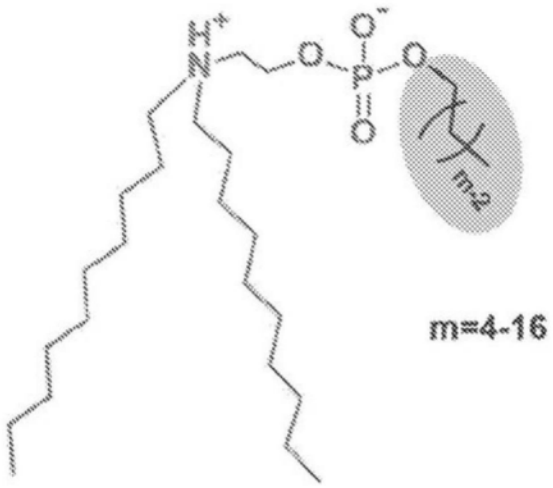

发光辐射度
(p/sec/cm²/sr)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
× 10⁶
10A1P4
10A1P5
10A1P6
10A1P7
10A1P8
10A1P9
10A1P10
心脏
肺
肝
脾
肾
10A1P11
10A1P12
10A1P13
10A1P14
10A1P15
10A1P16

图18A



10A1P4-10A1P16

图18B

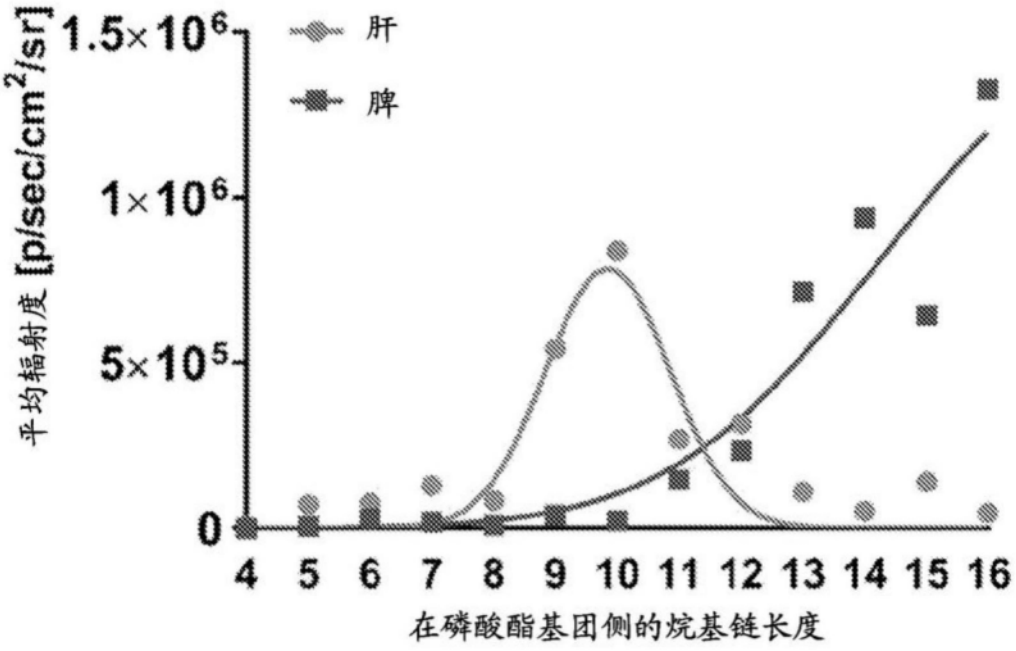


图18C

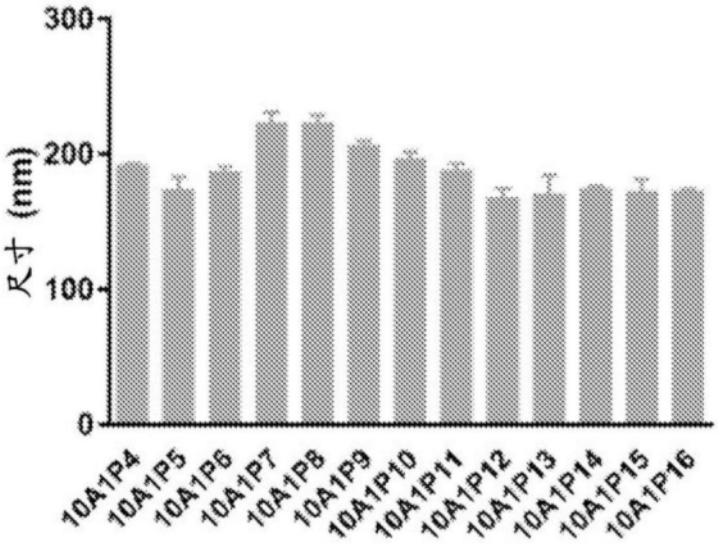

300
200
100
0
尺寸 (nm)
10A1P4
10A1P5
10A1P6
10A1P7
10A1P8
10A1P9
10A1P10
10A1P11
10A1P12
10A1P13
10A1P14
10A1P15
10A1P16

图19A

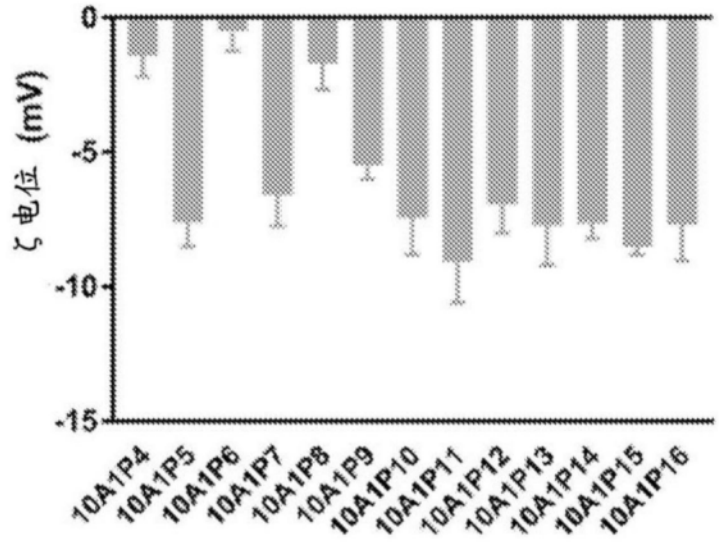

0
-5
-10
-15
ζ电位 (mV)
10A1P4
10A1P5
10A1P6
10A1P7
10A1P8
10A1P9
10A1P10
10A1P11
10A1P12
10A1P13
10A1P14
10A1P15
10A1P16

图 19B

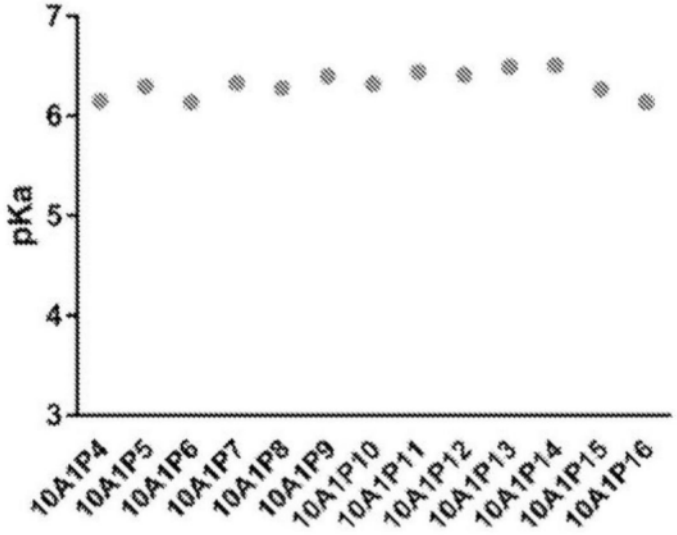

7
6
5
4
3
pKa
10A1P4
10A1P5
10A1P6
10A1P7
10A1P8
10A1P9
10A1P10
10A1P11
10A1P12
10A1P13
10A1P14
10A1P15
10A1P16

图 19C

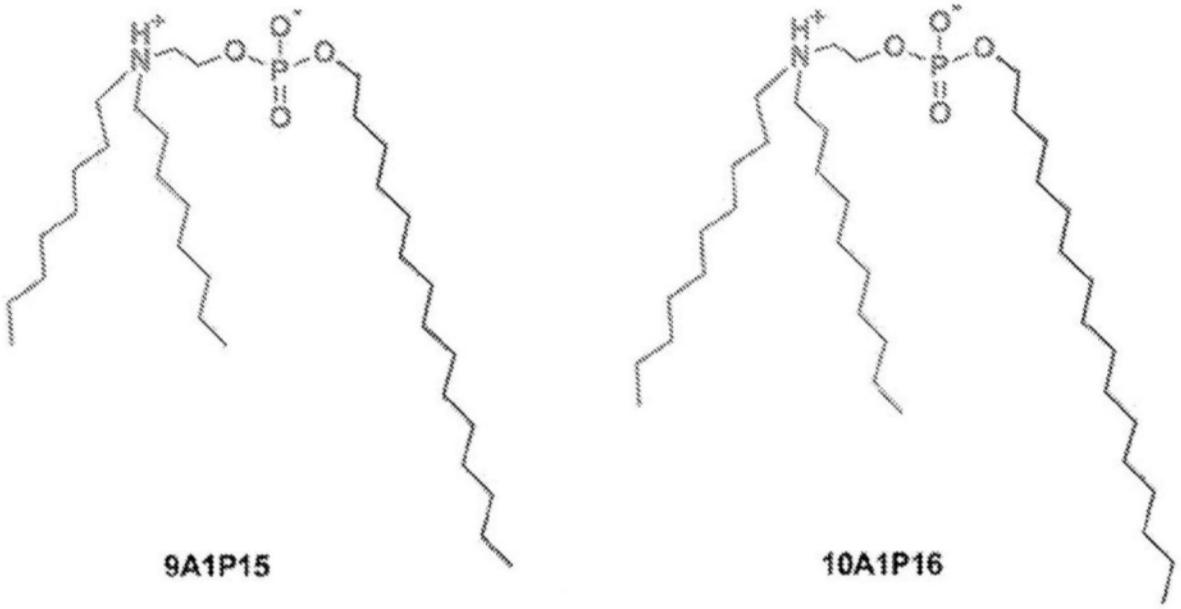

9A1P15
10A1P16

图20A

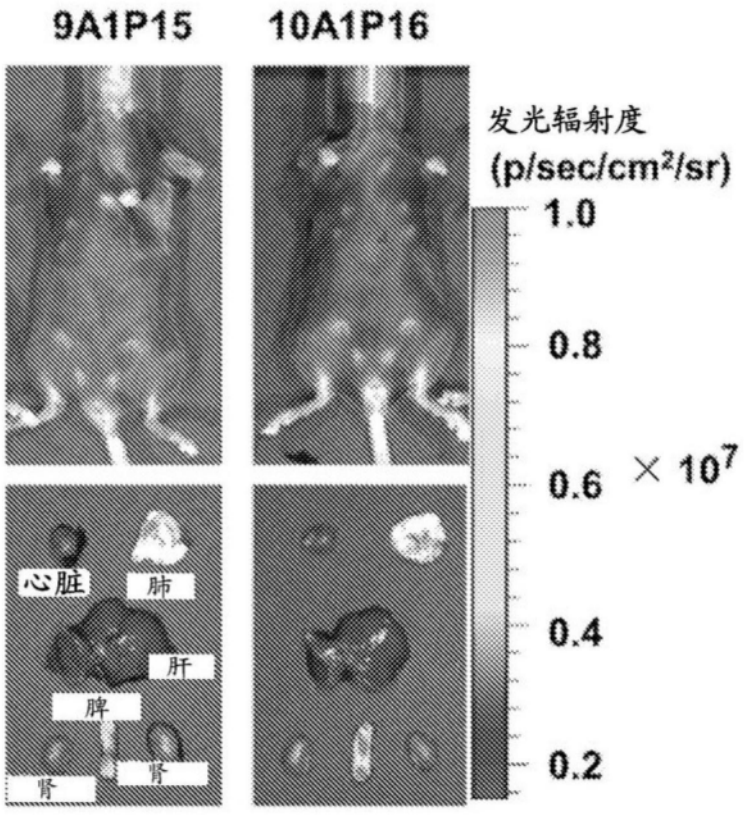

9A1P15
10A1P16
发光辐射度
(p/sec/cm²/sr)
1.0
0.8
0.6
× 10⁷
0.4
0.2
心脏
肺
肝
脾
肾
肾

图20B

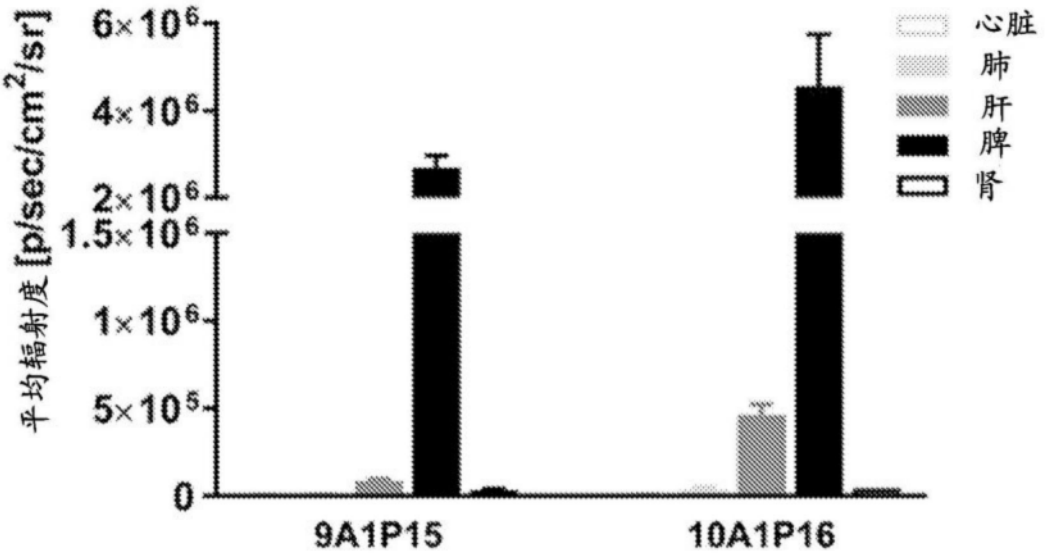

平均辐射度 [p/sec/cm²/sr]
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
1.5×10⁶
1×10⁶
5×10⁵
0
心脏
肺
肝
脾
肾
9A1P15
10A1P16

图20C

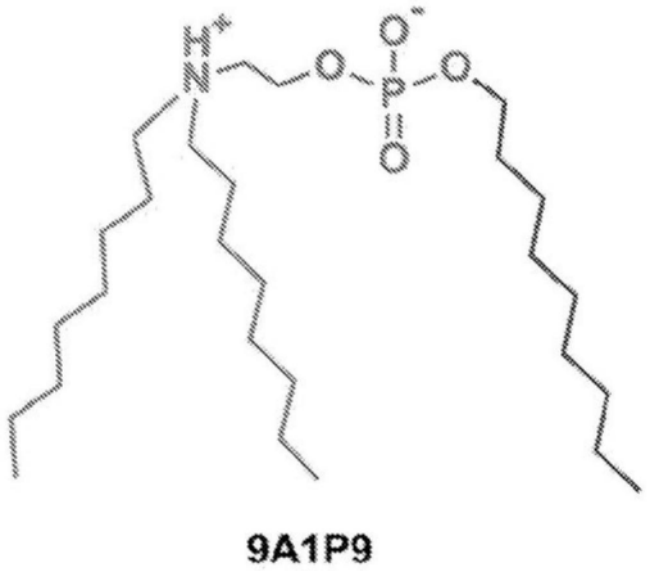

9A1P9

图21A

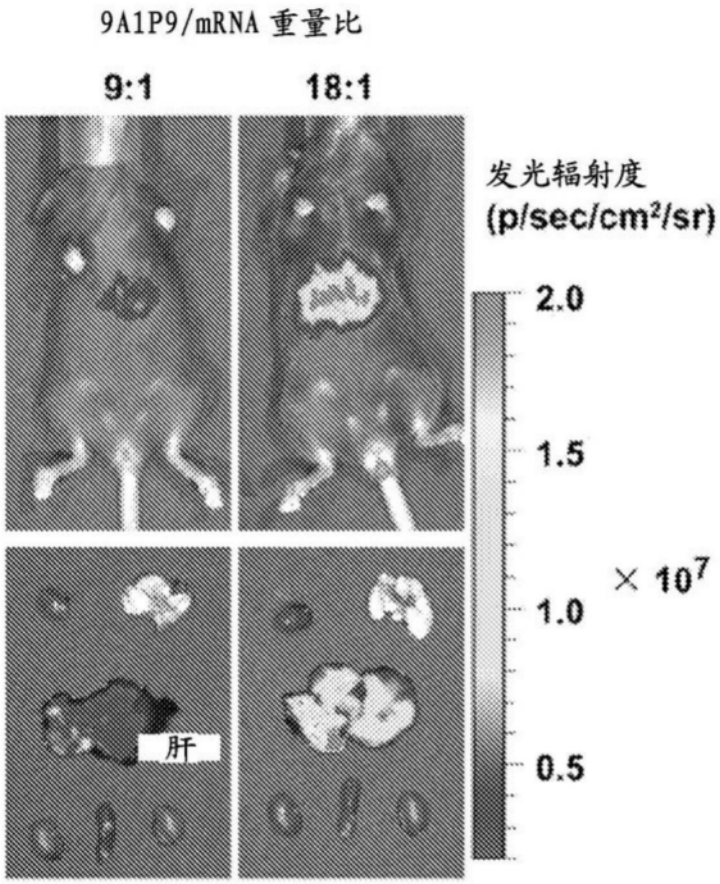

9A1P9/mRNA 重量比
9:1
18:1
发光辐射度
(p/sec/cm²/sr)
2.0
1.5
1.0
0.5
× 10⁷
肝

图21B

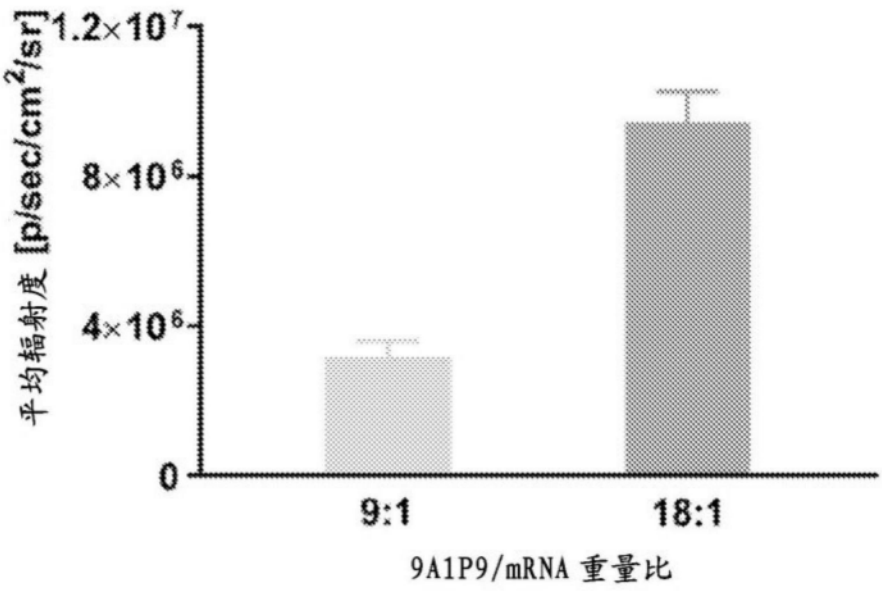

平均辐射度 [p/sec/cm²/sr]
1.2×10⁷
8×10⁶
4×10⁶
0
9:1
18:1
9A1P9/mRNA 重量比

图21C

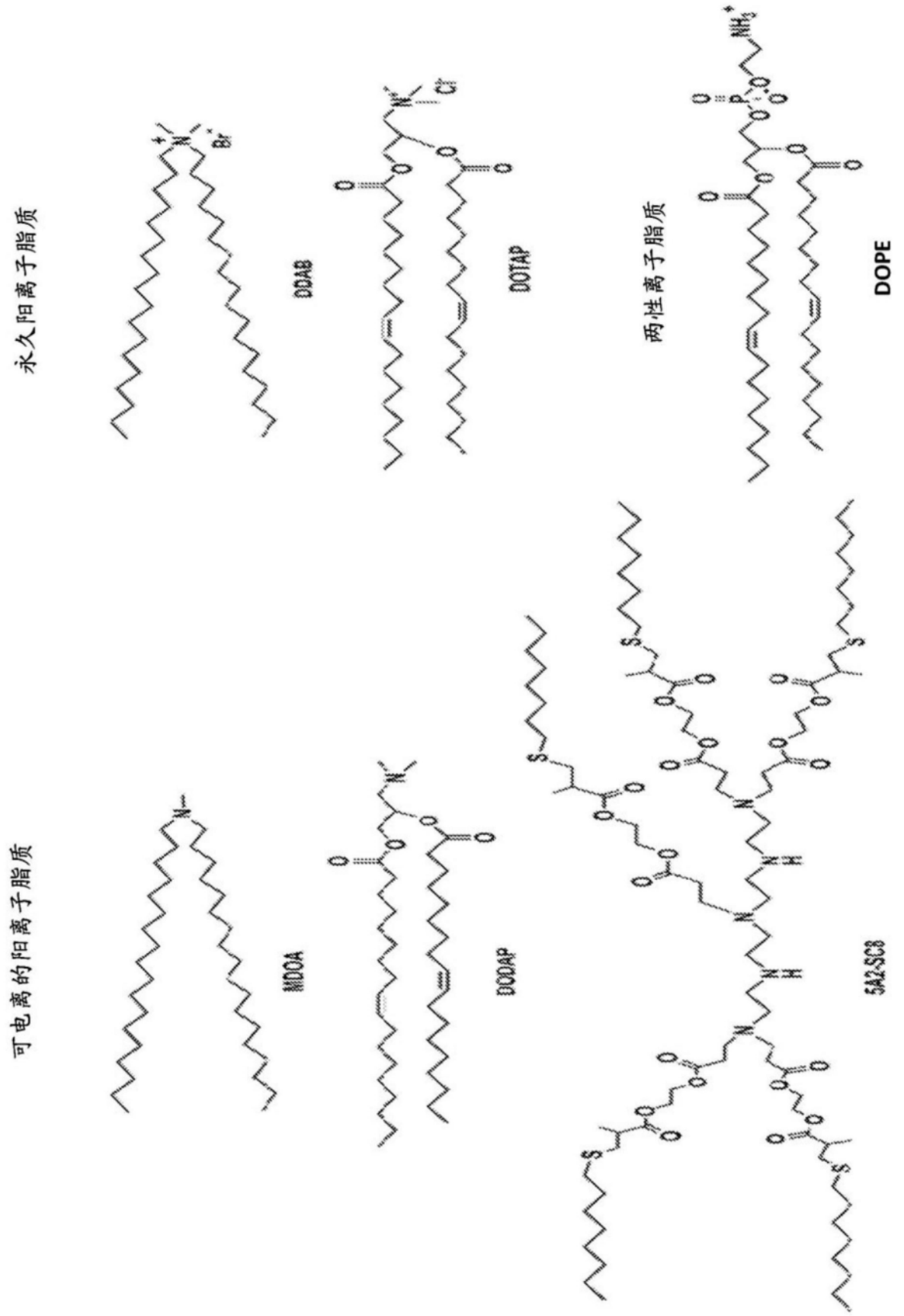

永久阳离子脂质
DDAB
DOTAP
两性离子脂质
DOPE
可电离的阳离子脂质
MDOA
DODAP
5A2-SC8

图22

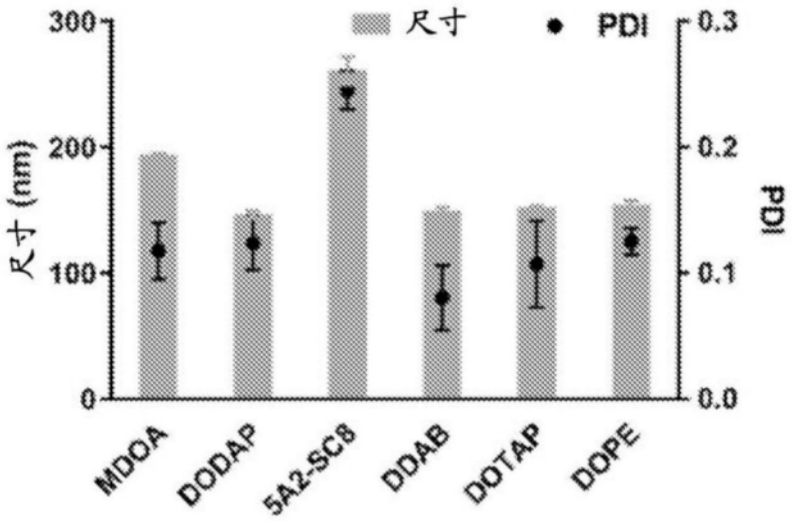

尺寸
PDI
300
200
100
0
0.3
0.2
0.1
0.0
尺寸 (nm)
PDI
MDOA
DODAP
5A2-SC8
DDAB
DOTAP
DOPE

图23A

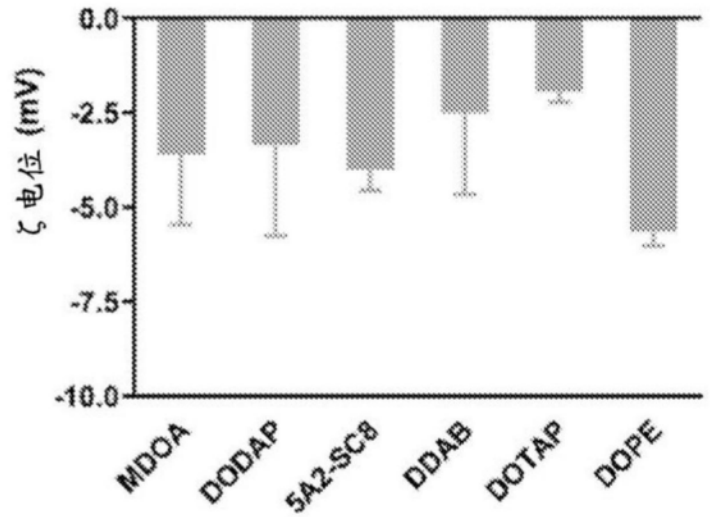

0.0
-2.5
-5.0
-7.5
-10.0
ζ电位 (mV)
MDOA
DODAP
5A2-SC8
DDAB
DOTAP
DOPE

图 23B

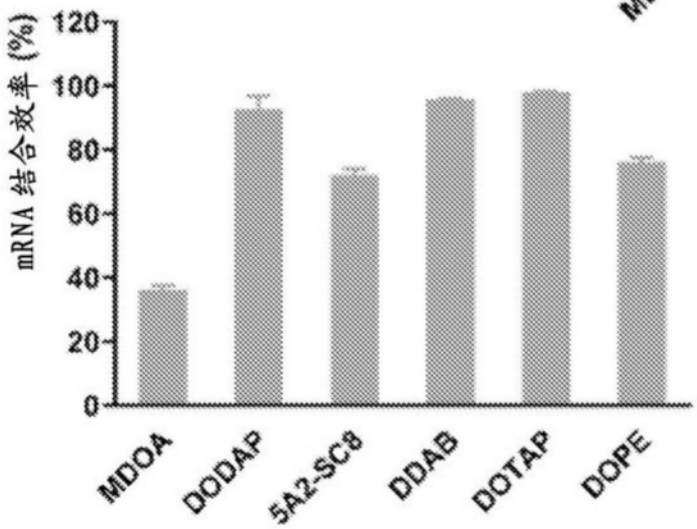

120
100
80
60
40
20
0
mRNA 结合效率 (%)
MDOA
DODAP
5A2-SC8
DDAB
DOTAP
DOPE

图 23C

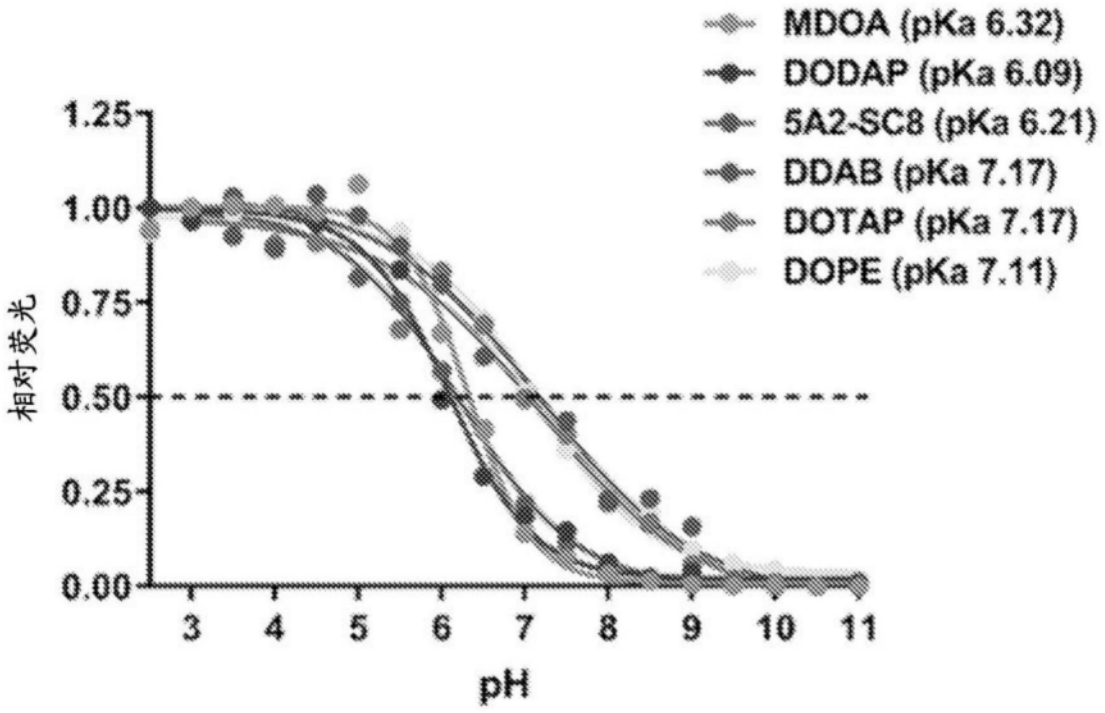

MDOA (pKa 6.32)
DODAP (pKa 6.09)
5A2-SC8 (pKa 6.21)
DDAB (pKa 7.17)
DOTAP (pKa 7.17)
DOPE (pKa 7.11)
相对荧光
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
3
4
5
6
7
8
9
10
11
pH

图23D

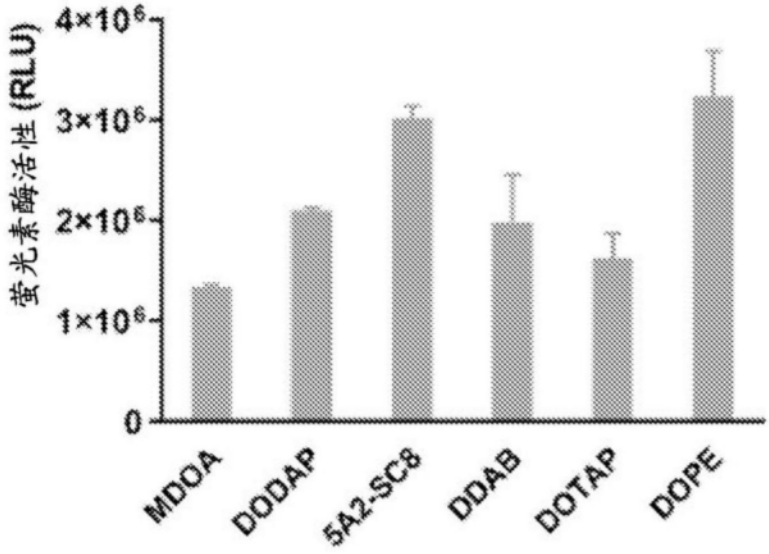

萤光素酶活性 (RLU)
4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
MDOA
DODAP
5A2-SC8
DDAB
DOTAP
DOPE

图23E

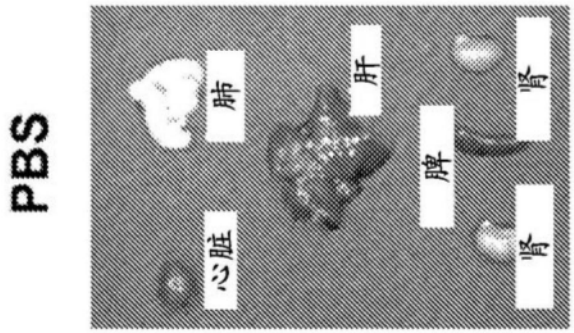


图24A

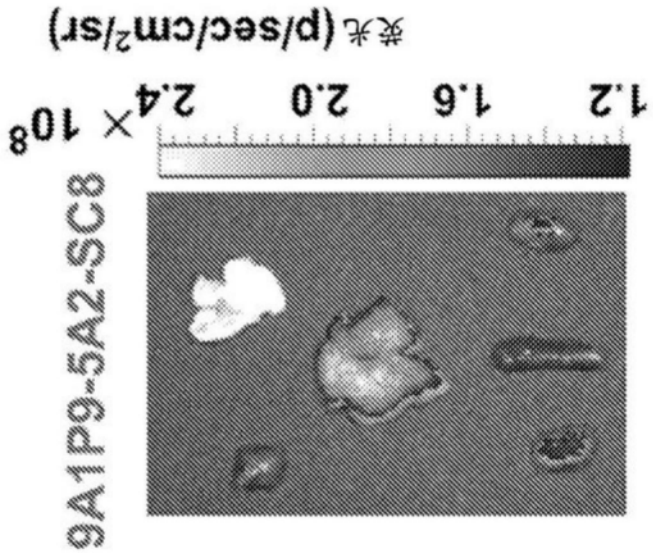


图24B

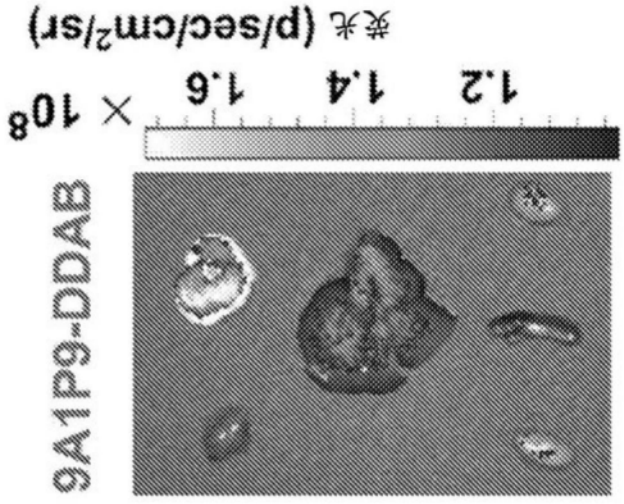


图24C

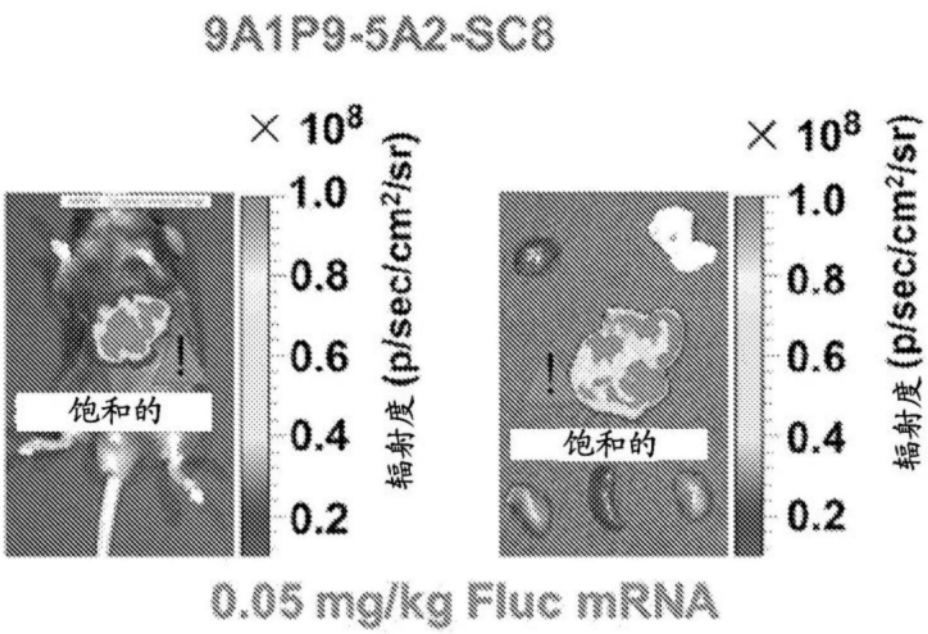

9A1P9-5A2-SC8
× 10^8
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
辐射度 (p/sec/cm²/sr)
饱和的
饱和的
0.05 mg/kg Fluc mRNA

图25A

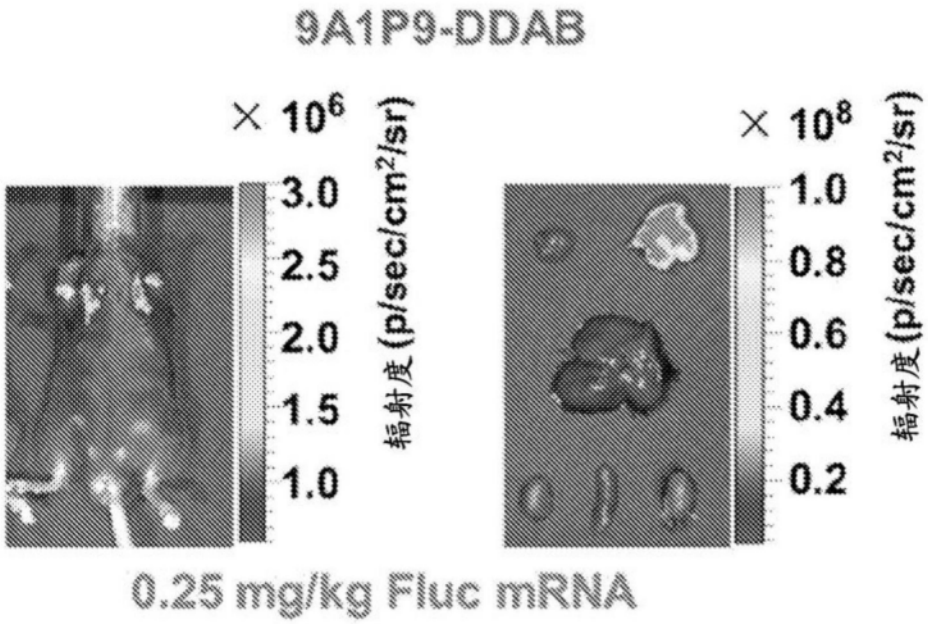

9A1P9-DDAB
× 10^6
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
× 10^8
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
辐射度 (p/sec/cm²/sr)
0.25 mg/kg Fluc mRNA

图25B

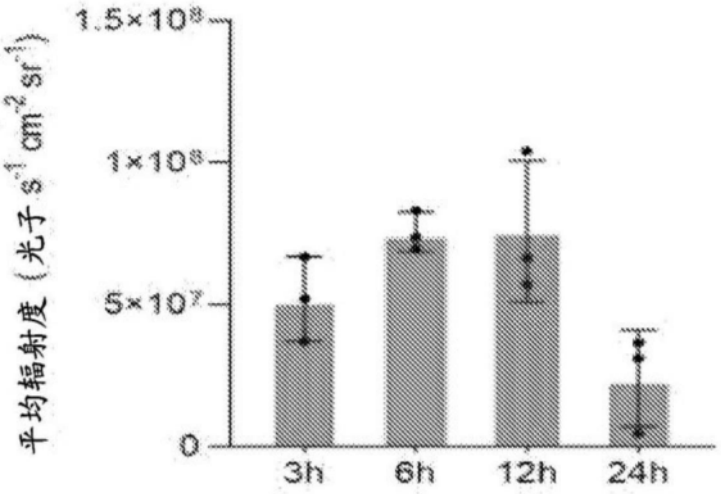

平均辐射度（光子 s^{-1} cm^{-2} sr^{-1}）
1.5×10^{8}
1×10^{8}
5×10^{7}
0
3h
6h
12h
24h

图26A

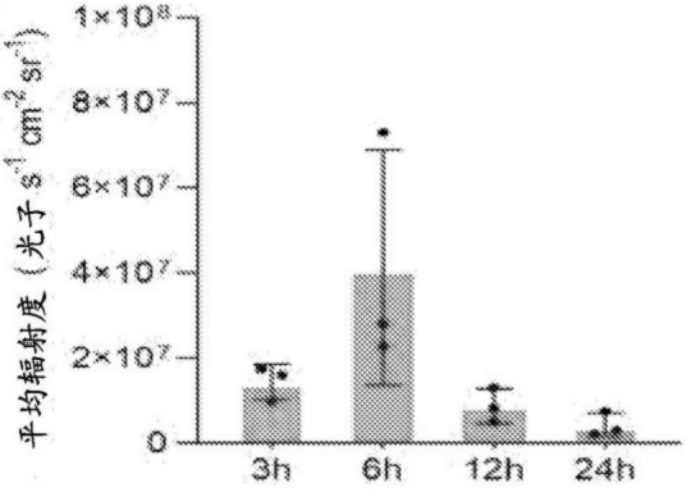

平均辐射度（光子 s^{-1} cm^{-2} sr^{-1}）
1×10^{8}
8×10^{7}
6×10^{7}
4×10^{7}
2×10^{7}
0
3h
6h
12h
24h

图26B

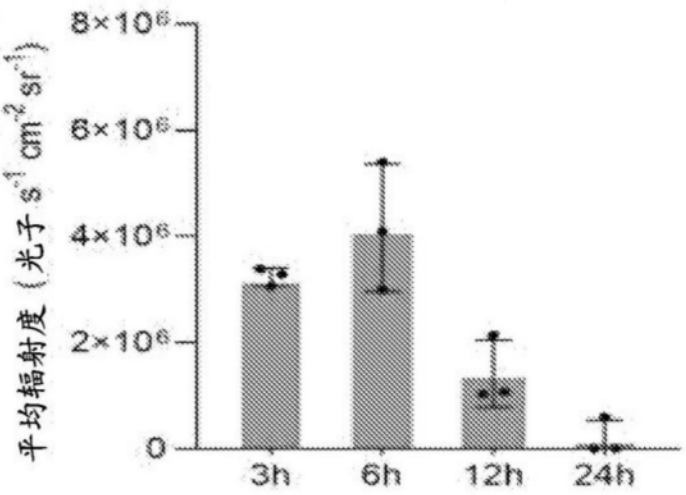

平均辐射度（光子 s^{-1} cm^{-2} sr^{-1}）
8×10⁶
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
3h
6h
12h
24h

图26C

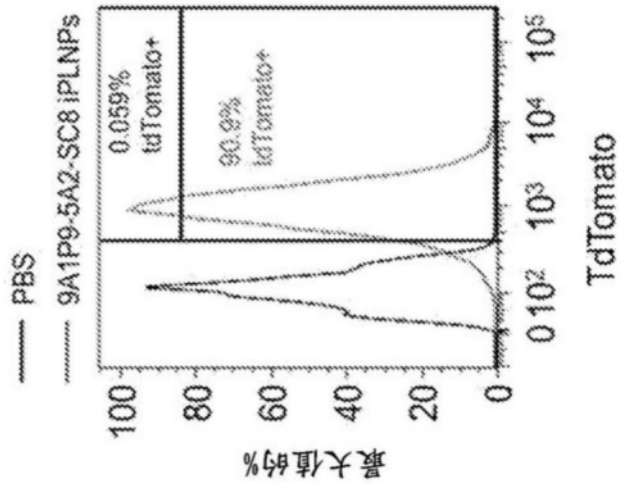

PBS
9A1P9-5A2-SC8 iPLNPs
0.059%
tdTomato+
90.9%
tdTomato+
最大值的%
100
80
60
40
20
0
0 10² 10³ 10⁴ 10⁵
TdTomato

图27A

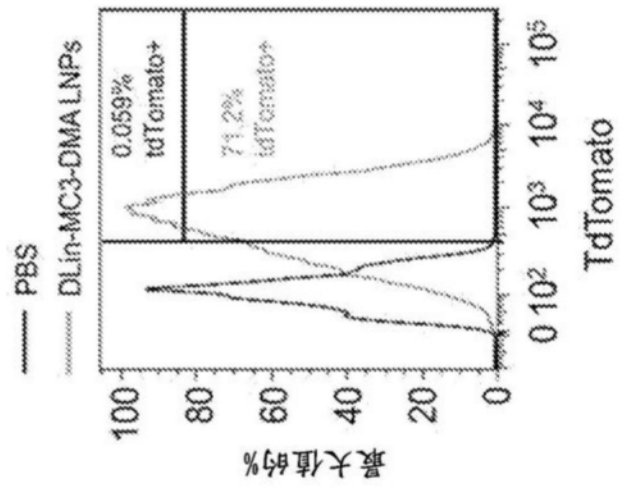

PBS
DLin-MC3-DMA LNPs
0.059%
tdTomato+
71.2%
tdTomato+
TdTomato
最大值的%

图27B

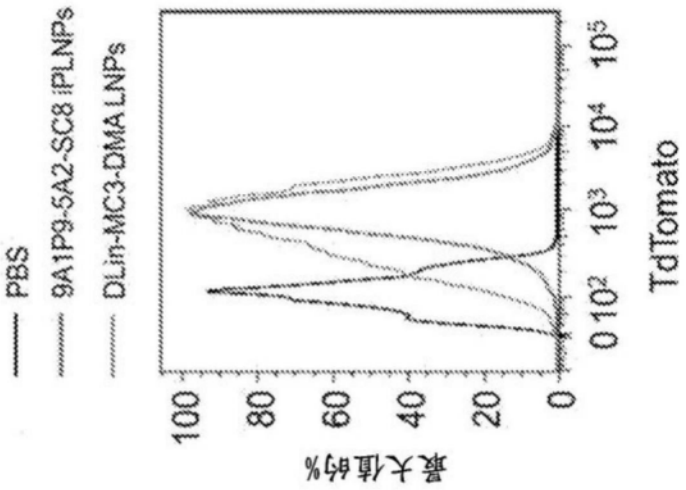

PBS
9A1P9-5A2-SC8 iPLNPs
DLin-MC3-DMA LNPs
TdTomato
最大值的%

图27C

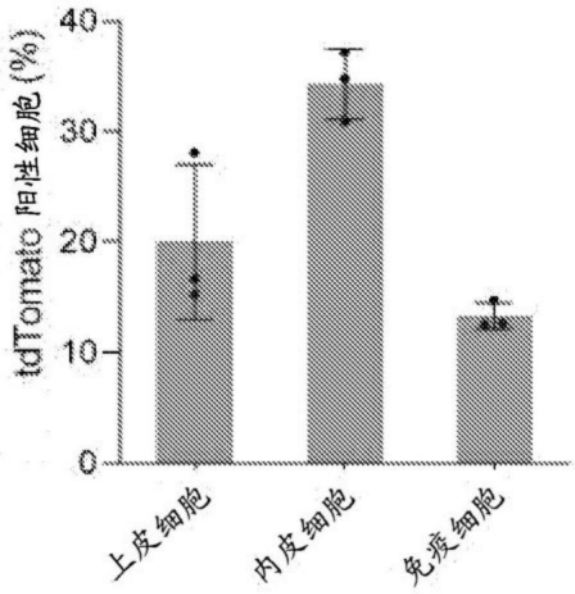

tdTomato 阳性细胞 (%)
40
30
20
10
0
上皮细胞
内皮细胞
免疫细胞

图28

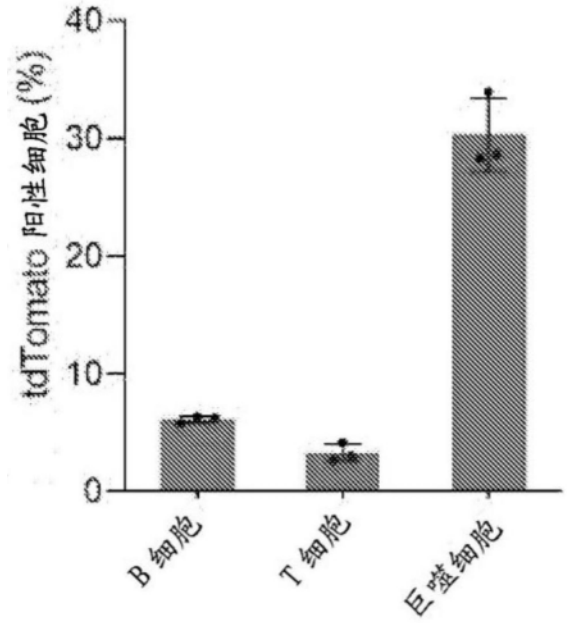

tdTomato 阳性细胞 (%)
40
30
20
10
0
B 细胞
T 细胞
巨噬细胞

图29

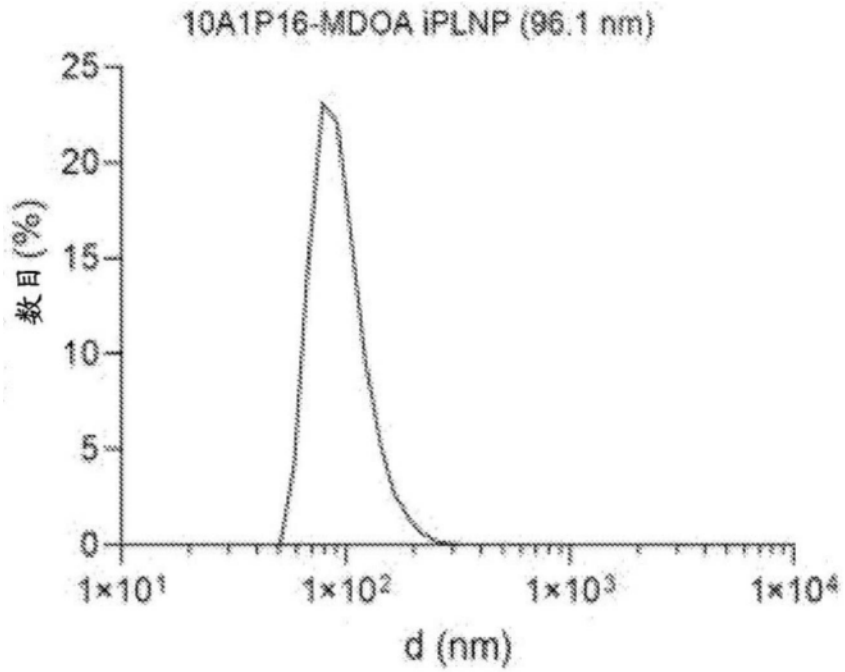

10A1P16-MDOA iPLNP (96.1 nm)
数目(%)
25
20
15
10
5
0
1×10¹
1×10²
1×10³
1×10⁴
d (nm)

图30A

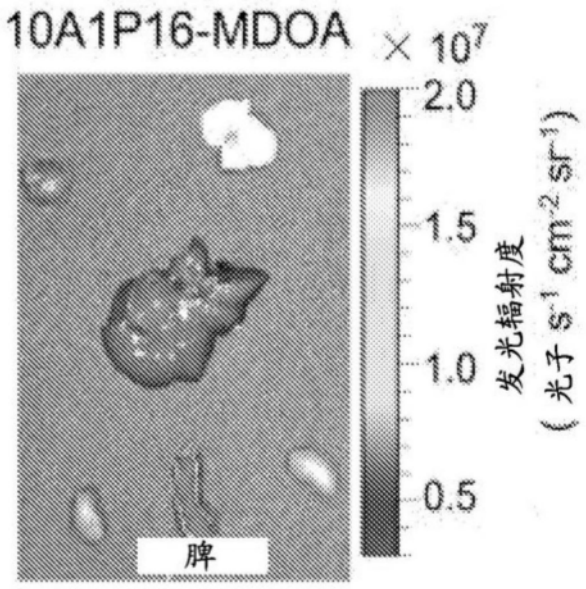

10A1P16-MDOA
× 10⁷
2.0
1.5
1.0
0.5
发光辐射度
(光子 s⁻¹ cm⁻² sr⁻¹)
脾

图30B

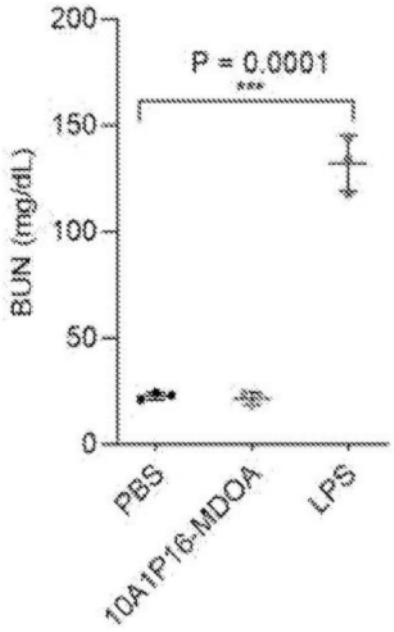

200
150
100
50
0
BUN (mg/dL)
P = 0.0001
***
PBS
10A1P16-MDOA
LPS

图31A

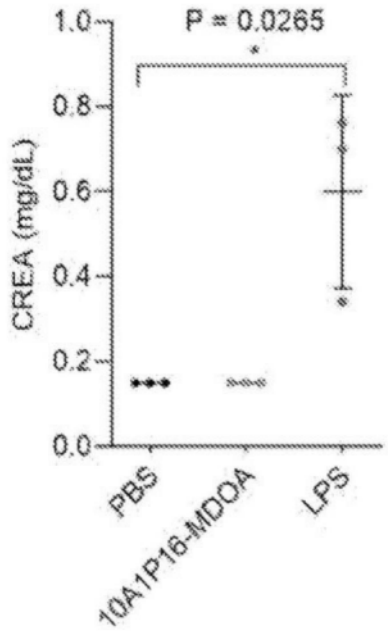

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
CREA (mg/dL)
P = 0.0265
*
PBS
10A1P16-MDOA
LPS

图31B

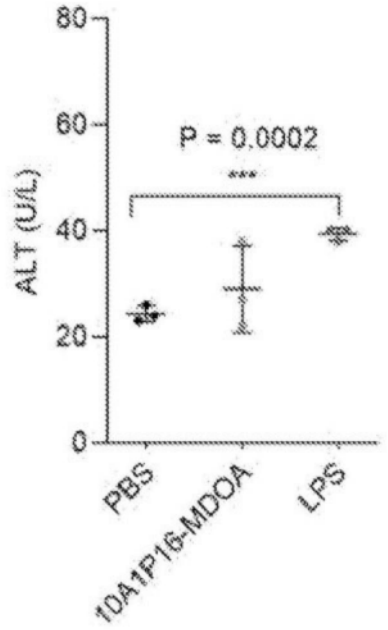

80
60
40
20
0
ALT (U/L)
P = 0.0002
***
PBS
10A1P16-MDOA
LPS

图31C

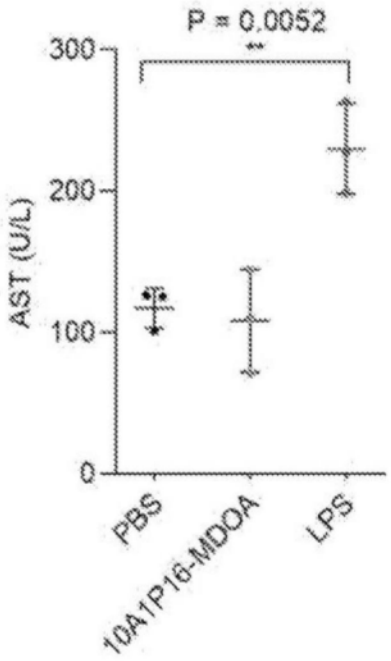

300
200
100
0
AST (U/L)
P = 0.0052
**
PBS
10A1P16-MDOA
LPS

图31D

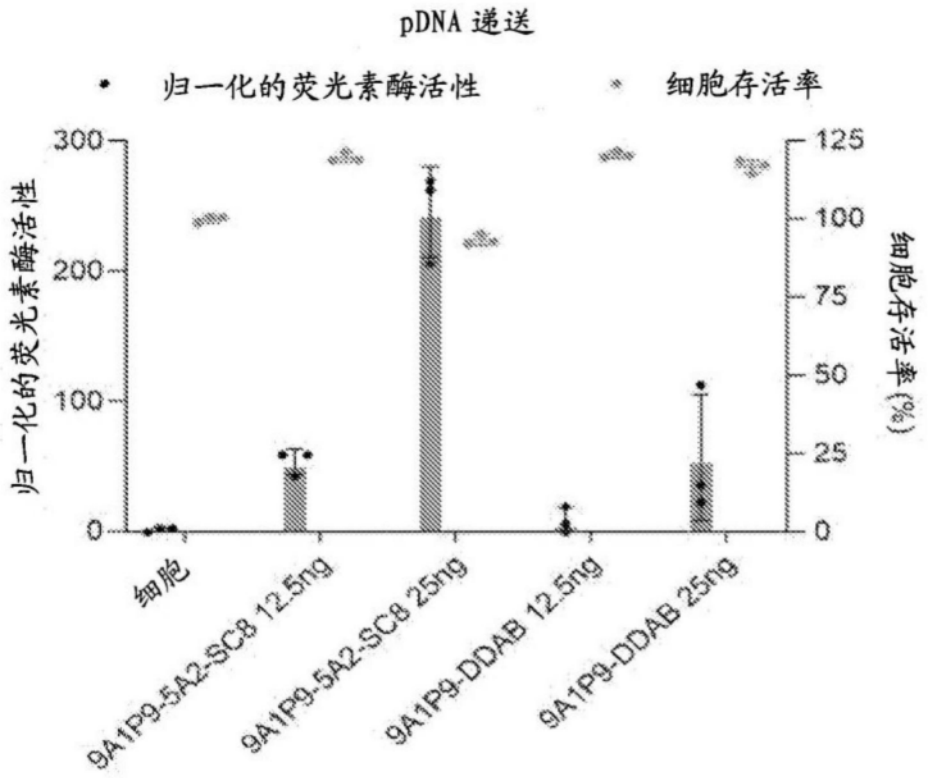

pDNA 递送
归一化的荧光素酶活性
细胞存活率
归一化的荧光素酶活性
细胞存活率(%)
300
200
100
0
125
100
75
50
25
0
细胞
9A1P9-5A2-SC8 12.5ng
9A1P9-5A2-SC8 25ng
9A1P9-DDAB 12.5ng
9A1P9-DDAB 25ng

图32A

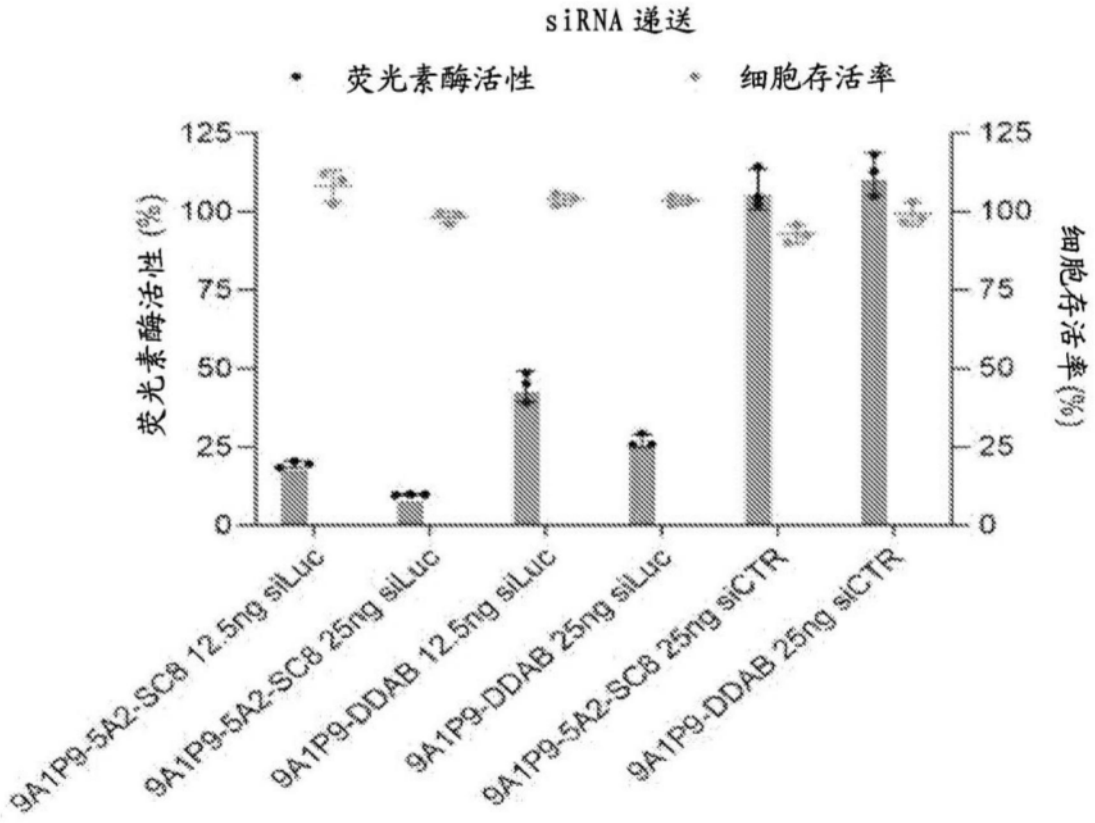

siRNA 递送
荧光素酶活性
细胞存活率
荧光素酶活性 (%)
细胞存活率 (%)
125
100
75
50
25
0
9A1P9-5A2-SC8 12.5ng siLuc
9A1P9-5A2-SC8 25ng siLuc
9A1P9-DDAB 12.5ng siLuc
9A1P9-DDAB 25ng siLuc
9A1P9-5A2-SC8 25ng siCTR
9A1P9-DDAB 25ng siCTR

图32B

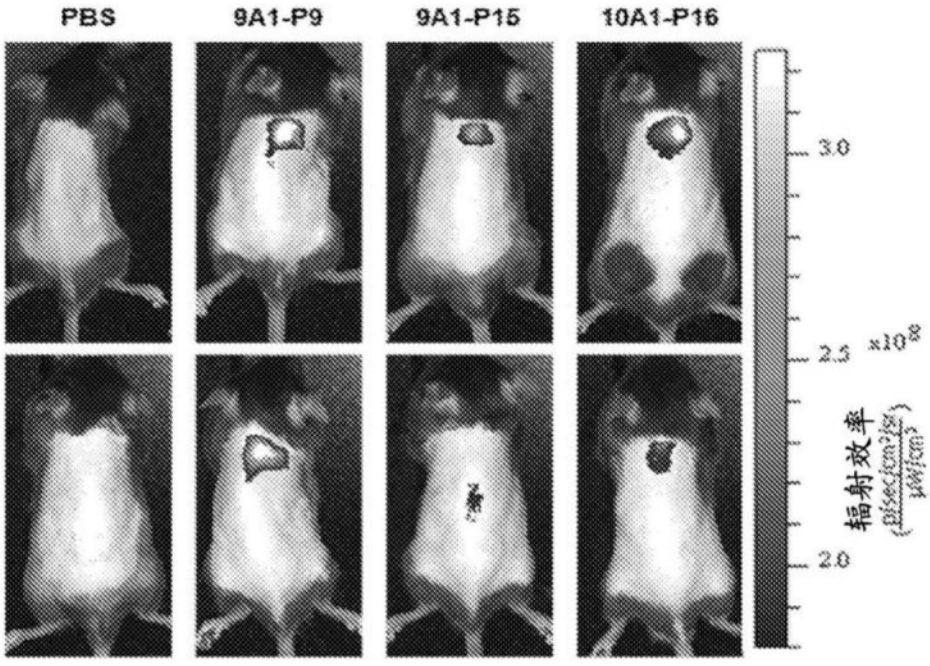

PBS
9A1-P9
9A1-P15
10A1-P16
3.0
2.5
2.0
×10⁸
辐射效率

图33A

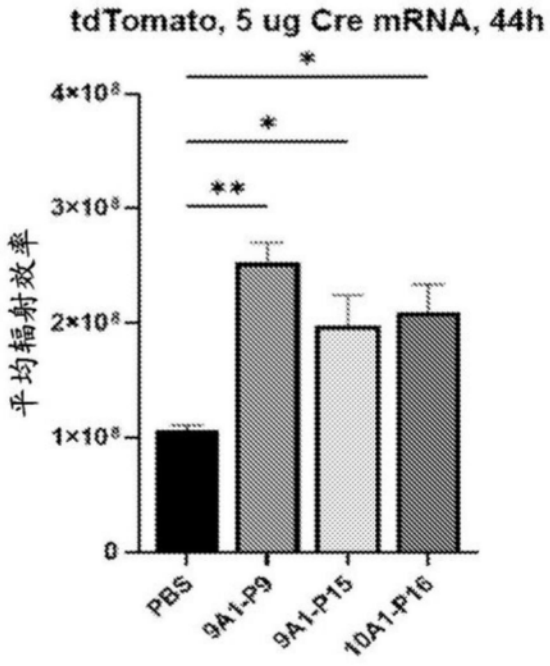

tdTomato, 5 ug Cre mRNA, 44h
平均辐射效率
4×10⁸
3×10⁸
2×10⁸
1×10⁸
0
*
*
**
PBS
9A1-P9
9A1-P15
10A1-P16

图33B