



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116669711 A

(43) 申请公布日 2023. 08. 29

(21) 申请号 202180083381.2

(22) 申请日 2021.12.08

(30) 优先权数据

63/123,343 2020.12.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.06.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/062344 2021.12.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/125622 EN 2022.06.16

(71) 申请人 基因泰克公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 Y·范 C-W·寅 K·张

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

A61K 9/51 (2006.01)

权利要求书10页 说明书37页 附图26页

(54) 发明名称

用于制备脂质纳米颗粒的高通量方法及其用途

(57) 摘要

本文提供了用于优化和制造各种脂质纳米颗粒 (LNP) 组合物的高通量方法及其用途。例如, 在一些实施方案中, 本公开提供了一种用于制造 LNP 组合物的高通量筛选方法, 所述方法包括: 获得包含有效载荷和多个能够自组装的分子的至少两种可混合的溶液, 并在一组受控条件下混合所述至少两种溶液, 其中注入顺序、速度、体积、相比率和混合持续时间是不同的。在各种实施方案中, 本公开使得能够确定最优封装效率、粒径分布、纯化和颗粒回收率以及配制物稳定性。本文公开的方法使得能够有效优化用于制备基于 LNP 的治疗剂的制造条件。

1. 一种用于制造脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂的经优化的高通量筛选方法, 所述方法包括:
 - a. 获得包含水相的第一溶液;
 - b. 获得包含有机相和多个能够自组装的分子的第二溶液, 并且其中所述第一溶液和所述第二溶液是可混合的;
 - c. 将至少一种有效载荷分子溶解于所述第一溶液或所述第二溶液中;
 - d. 使用机器人液体处理器制备具有不同组成的所述相并将所述相分配至多个孔中;
 - e. 在适合LNP形成的条件下, 使用所述机器人液体处理器混合所述第一溶液和所述第二溶液以获得封装所述有效载荷的脂质纳米颗粒; 其中不同孔之间, 以下条件中的至少一者是不同的: 自组装分子的类型, 所述自组装分子的组成比率; 所述自组装分子与所述有效载荷的比率和/或浓度、相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、注入速度、混合速度、体积、相比率、注入持续时间和混合持续时间;
 - f. 测量以下中的至少一者: 所述LNP的封装效率、粒径分布、纯化和颗粒回收率以及配制物稳定性;
 - g. 确定用于制造所述LNP制剂的最优参数; 以及
 - h. 基于所述最优参数制造所述LNP制剂。
2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述有效载荷为寡核苷酸。
3. 根据权利要求2所述的方法, 其中所述寡核苷酸为反义分子。
4. 根据权利要求2所述的方法, 其中所述寡核苷酸为siRNA。
5. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述寡核苷酸为shRNA。
6. 根据权利要求2至5所述的方法, 其中所述寡核苷酸的长度在约10至约30个核苷酸之间。
7. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述有效载荷为mRNA。
8. 根据权利要求7所述的方法, 其中mRNA的大小为长度约500至约3000个核苷酸。
9. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述有效载荷为多肽。
10. 根据权利要求9所述的方法, 其中所述多肽在约1,000Da与约10,000Da之间。
11. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述有效载荷为小分子。
12. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述小分子在约100Da与1000Da之间。
13. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述有效载荷溶解于所述第一溶液中。
14. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述有效载荷溶解于所述第二溶液中。
15. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述第一溶液为水性缓冲剂。
16. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述第一溶液包含pH受控缓冲剂和渗透压受控缓冲剂。
17. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述第二溶液的所述有机相包含甲醇。
18. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述第二溶液的所述有机相包含乙醇。
19. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述自组装分子至少包含脂质组分, 所述脂质组分包含至少一种脂质分子。
20. 根据权利要求19所述的方法, 其中所述至少一种脂质分子选自由阳离子脂质种类、可电离脂质种类、非阳离子脂质种类、磷脂质种类和非磷脂质种类组成的组。
21. 根据权利要求19或20所述的方法, 其中所述第二溶液包含多于一种类型的脂质。

22. 根据权利要求1所述的方法,其中脂质的总浓度是变化的。
23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述脂质的总浓度在约0.4mM与约4mM之间变化。
24. 根据权利要求1所述的方法,其中经聚乙二醇化的脂质的百分比是变化的。
25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述经聚乙二醇化的脂质的百分比在总脂质组成的约0.5%至约5%之间变化。
26. 根据权利要求2至8中任一项所述的方法,其中所述有效载荷的N:P比率是变化的。
27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述N:P比率在约0.5至约5之间变化。
28. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述LNP为聚合物脂质纳米颗粒。
29. 根据权利要求1至27所述的方法,其中所述LNP为脂质体。
30. 根据权利要求1至27所述的方法,其中所述LNP为脂蛋白纳米颗粒。
31. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一溶液被注入所述第二溶液中。
32. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第二溶液被注入所述第一溶液中。
33. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述最优参数为产生大于80%的所述有效载荷的封装效率的那些参数。
34. 根据权利要求1至32中任一项所述的方法,其中所述最优参数为产生平均直径为80nm至200nm、具有单峰粒径分布和小于约30%的多分散性的LNP的那些参数。
35. 根据权利要求1至32中任一项所述的方法,其中所述LNP储存于4摄氏度的溶液中时,维持相似的粒径分布和有效载荷封装至少一个月。
36. 一种优化用于制造脂质纳米颗粒(LNP)制剂的制程的高通量方法,所述方法包括:
 - a. 获得包含水相的第一溶液;
 - b. 获得包含有机相和多个能够自组装的分子的第二溶液,并且其中所述第一溶液和所述第二溶液是可混合的;
 - c. 将至少一种有效载荷分子溶解于所述第一溶液或所述第二溶液中;
 - d. 使用机器人液体处理器制备具有不同组成的所述相并将所述相分配至多个孔中;
 - e. 在适合LNP形成的条件下,使用所述机器人液体处理器混合所述第一溶液和所述第二溶液以获得封装所述有效载荷的脂质纳米颗粒;其中不同孔之间,以下条件中的至少一者是不同的:

自组装分子的类型,所述自组装分子的组成比率;所述自组装分子与所述有效载荷的比率和/或浓度、相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、注入速度、混合速度、体积、相比率、注入持续时间和混合持续时间;
 - f. 测量以下中的至少一者:所述LNP的封装效率、粒径分布、纯化和颗粒回收率以及配制物稳定性;
 - g. 确定用于制造所述LNP制剂的最优参数;以及
 - h. 基于所述最优参数制造所述LNP制剂。
37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述有效载荷为寡核苷酸。
38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述寡核苷酸为反义分子。
39. 根据权利要求37所述的方法,其中所述寡核苷酸为siRNA。
40. 根据权利要求38所述的方法,其中所述寡核苷酸为shRNA。
41. 根据权利要求37至42所述的方法,其中所述寡核苷酸的长度在约10至约30个核苷

酸之间。

42. 根据权利要求36所述的方法,其中所述有效载荷为mRNA。
43. 根据权利要求42所述的方法,其中mRNA的大小为约1kb至约2kb。
44. 根据权利要求36所述的方法,其中所述有效载荷为多肽。
45. 根据权利要求45所述的方法,其中所述多肽在约1,000Da与约10,000Da之间。
46. 根据权利要求36所述的方法,其中所述有效载荷为小分子。
47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述小分子在约100Da与1000Da之间。
48. 根据权利要求36所述的方法,其中所述有效载荷溶解于所述第一溶液中。
49. 根据权利要求36所述的方法,其中所述有效载荷溶解于所述第二溶液中。
50. 根据权利要求36所述的方法,其中所述第一溶液为水性缓冲剂。
51. 根据权利要求36所述的方法,其中所述第一溶液包含pH受控缓冲剂和渗透压受控缓冲剂。
52. 根据权利要求36所述的方法,其中所述第二溶液的所述有机相包含甲醇。
53. 根据权利要求36所述的方法,其中所述第二溶液的所述有机相包含乙醇。
54. 根据权利要求36所述的方法,其中所述自组装分子至少包含脂质组分,所述脂质组分包含至少一种脂质分子。
55. 根据权利要求54所述的方法,其中所述至少一种脂质分子选自阳离子脂质种类、非阳离子脂质种类和磷脂质种类。
56. 根据权利要求54或55所述的方法,其中所述第二溶液包含多于一种类型的脂质。
57. 根据权利要求36所述的方法,其中脂质的总浓度是变化的。
58. 根据权利要求57所述的方法,其中所述脂质的总浓度在约0.4mM与约4mM之间变化。
59. 根据权利要求54或55所述的方法,其中经聚乙二醇化的脂质的百分比是变化的。
60. 根据权利要求59所述的方法,其中所述经聚乙二醇化的脂质的百分比在总脂质组成的约0.5%至约5%之间变化。
61. 根据权利要求37至42中任一项所述的方法,其中所述有效载荷的N:P比率是变化的。
62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述N:P比率在约0.5至约5之间变化。
63. 根据权利要求36至62中任一项所述的方法,其中所述LNP为聚合物脂质纳米颗粒。
64. 根据权利要求36至62所述的方法,其中所述LNP为脂质体。
65. 根据权利要求36至62所述的方法,其中所述LNP为脂蛋白纳米颗粒。
66. 根据权利要求36所述的方法,其中所述第一溶液被注入所述第二溶液中。
67. 根据权利要求36所述的方法,其中所述第二溶液被注入所述第一溶液中。
68. 根据权利要求36至67中任一项所述的方法,其中所述最优参数为产生大于80%的所述有效载荷的封装效率的那些参数。
69. 根据权利要求36至67中任一项所述的方法,其中所述最优参数为产生平均直径为80nm至200nm、具有单峰粒径分布和小于约30%的多分散性的LNP的那些参数。
70. 根据权利要求36至67中任一项所述的方法,其中所述LNP储存于4摄氏度的溶液中时,维持相似的粒径分布和有效载荷封装至少一个月。
71. 一种用于将有效载荷封装于液体纳米颗粒(LNP)制剂中的经优化的高通量方法,所

述方法包括：

- a. 获得包含水相的第一溶液；
- b. 获得包含有机相和多个能够自组装的分子的第二溶液，并且其中所述第一溶液和所述第二溶液是可混合的；
- c. 将至少一种有效载荷分子溶解于所述第一溶液或所述第二溶液中；
- d. 使用机器人液体处理器制备具有不同组成的所述相并将所述相分配至多个孔中；
- e. 在适合LNP形成的条件下，使用所述机器人液体处理器混合所述第一溶液和所述第二溶液以获得封装所述有效载荷的脂质纳米颗粒；其中不同孔之间，以下条件中的至少一者是不同的：

自组装分子的类型，所述自组装分子的组成比率；所述自组装分子与所述有效载荷的比率和/或浓度、相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、注入速度、混合速度、体积、相比率、注入持续时间和混合持续时间；

- f. 测量以下中的至少一者：所述LNP的封装效率、粒径分布、纯化和颗粒回收率以及配制物稳定性；

- g. 确定用于制造所述LNP制剂的最优参数；以及

- h. 基于所述最优参数制造所述LNP制剂。

72. 根据权利要求71所述的方法，其中所述有效载荷为寡核苷酸。

73. 根据权利要求72所述的方法，其中所述寡核苷酸为反义分子。

74. 根据权利要求73所述的方法，其中所述寡核苷酸为siRNA。

75. 根据权利要求73所述的方法，其中所述寡核苷酸为shRNA。

76. 根据权利要求72至75所述的方法，其中所述寡核苷酸的长度在约10至约30个核苷酸之间。

77. 根据权利要求71所述的方法，其中所述有效载荷为mRNA。

78. 根据权利要求77所述的方法，其中mRNA的大小为约1kb至约2kb。

79. 根据权利要求71所述的方法，其中所述有效载荷为多肽。

80. 根据权利要求79所述的方法，其中所述多肽在约1,000Da与约10,000Da之间。

81. 根据权利要求71所述的方法，其中所述有效载荷为小分子。

82. 根据权利要求81所述的方法，其中所述小分子在约100Da与1000Da之间。

83. 根据权利要求71所述的方法，其中所述有效载荷溶解于所述第一溶液中。

84. 根据权利要求71所述的方法，其中所述有效载荷溶解于所述第二溶液中。

85. 根据权利要求71所述的方法，其中所述第一溶液为水性缓冲剂。

86. 根据权利要求71所述的方法，其中所述第一溶液包含pH受控缓冲剂和渗透压受控缓冲剂。

87. 根据权利要求71所述的方法，其中所述第二溶液的所述有机相包含甲醇。

88. 根据权利要求71所述的方法，其中所述第二溶液的所述有机相包含乙醇。

89. 根据权利要求71所述的方法，其中所述自组装分子至少包含脂质组分，所述脂质组分包含至少一种脂质分子。

90. 根据权利要求89所述的方法，其中所述至少一种脂质分子选自阳离子脂质种类、非阳离子脂质种类和磷脂质种类。

91. 根据权利要求89或90所述的方法, 其中所述第二溶液包含多于一种类型的脂质。
92. 根据权利要求89或90所述的方法, 其中脂质的总浓度是变化的。
93. 根据权利要求92所述的方法, 其中所述脂质的总浓度在约0.4mM与约4mM之间变化。
94. 根据权利要求89或90所述的方法, 其中经聚乙二醇化的脂质的百分比是变化的。
95. 根据权利要求94所述的方法, 其中所述经聚乙二醇化的脂质的百分比在总脂质组成的约0.5%至约5%之间变化。
96. 根据权利要求72至78中任一项所述的方法, 其中所述有效载荷的N:P比率是变化的。
97. 根据权利要求96所述的方法, 其中所述N:P比率在约0.5至约5之间变化。
98. 根据权利要求71至97中任一项所述的方法, 其中所述LNP为聚合物脂质纳米颗粒。
99. 根据权利要求71至97所述的方法, 其中所述LNP为脂质体。
100. 根据权利要求71至97所述的方法, 其中所述LNP为脂蛋白纳米颗粒。
101. 根据权利要求71所述的方法, 其中所述第一溶液被注入所述第二溶液中。
102. 根据权利要求71所述的方法, 其中所述第二溶液被注入所述第一溶液中。
103. 根据权利要求71至102中任一项所述的方法, 其中所述最优参数为产生大于80%的所述有效载荷的封装效率的那些参数。
104. 根据权利要求71至102中任一项所述的方法, 其中所述最优参数为产生平均直径为80nm至200nm、具有单峰粒径分布和小于约30%的多分散性的LNP的那些参数。
105. 根据权利要求71至102中任一项所述的方法, 其中所述LNP储存于4摄氏度的溶液中时, 维持相似的粒径分布和有效载荷封装至少一个月。
106. 一种向有此需要的患者施用LNP制剂的方法, 其中所述LNP制剂通过以下制造:
- a. 获得包含水相的第一溶液;
 - b. 获得包含有机相和多个能够自组装的分子的第二溶液, 并且其中所述第一溶液和所述第二溶液是可混合的;
 - c. 将至少一种有效载荷分子溶解于所述第一溶液或所述第二溶液中;
 - d. 使用机器人液体处理器制备具有不同组成的所述相并将所述相分配至多个孔中;
 - e. 在适合LNP形成的条件下, 使用所述机器人液体处理器混合所述第一溶液和所述第二溶液以获得封装所述有效载荷的脂质纳米颗粒; 其中不同孔之间, 以下条件中的至少一者是不同的:
 - 自组装分子的类型, 所述自组装分子的组成比率; 所述自组装分子与所述有效载荷的比率和/或浓度、相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、注入速度、混合速度、体积、相比率、注入持续时间和混合持续时间;
 - f. 测量以下中的至少一者: 所述LNP的封装效率、粒径分布、纯化和颗粒回收率以及配制剂物稳定性;
 - g. 确定用于制造所述LNP制剂的最优参数; 以及
 - h. 基于所述最优参数制造所述LNP制剂。
107. 根据权利要求106所述的方法, 其中所述有效载荷为寡核苷酸。
108. 根据权利要求107所述的方法, 其中所述寡核苷酸为反义分子。
109. 根据权利要求108所述的方法, 其中所述寡核苷酸为siRNA。

110. 根据权利要求108所述的方法,其中所述寡核苷酸为shRNA。
111. 根据权利要求107至110所述的方法,其中所述寡核苷酸的长度在约10至约30个核苷酸之间。
112. 根据权利要求106所述的方法,其中所述有效载荷为mRNA。
113. 根据权利要求112所述的方法,其中mRNA的大小为约1kb至约2kb。
114. 根据权利要求106所述的方法,其中所述有效载荷为多肽。
115. 根据权利要求114所述的方法,其中所述多肽在约1,000Da与约10,000Da之间。
116. 根据权利要求106所述的方法,其中所述有效载荷为小分子。
117. 根据权利要求116所述的方法,其中所述小分子在约100Da与1000Da之间。
118. 根据权利要求106所述的方法,其中所述有效载荷溶解于所述第一溶液中。
119. 根据权利要求106所述的方法,其中所述有效载荷溶解于所述第二溶液中。
120. 根据权利要求106所述的方法,其中所述第一溶液为水性缓冲剂。
121. 根据权利要求106所述的方法,其中所述第一溶液包含pH受控缓冲剂和渗透压受控缓冲剂。
122. 根据权利要求106所述的方法,其中所述第二溶液的所述有机相包含甲醇。
123. 根据权利要求106所述的方法,其中所述第二溶液的所述有机相包含乙醇。
124. 根据权利要求106所述的方法,其中所述自组装分子至少包含脂质组分,所述脂质组分包含至少一种脂质分子。
125. 根据权利要求124所述的方法,其中所述至少一种脂质分子选自阳离子脂质种类、非阳离子脂质种类和磷脂质种类。
126. 根据权利要求124或125所述的方法,其中所述第二溶液包含多于一种类型的脂质。
127. 根据权利要求124或125所述的方法,其中脂质的总浓度是变化的。
128. 根据权利要求127所述的方法,其中所述脂质的总浓度在约0.4mM与约4mM之间变化。
129. 根据权利要求124或125所述的方法,其中经聚乙二醇化的脂质的百分比是变化的。
130. 根据权利要求129所述的方法,其中所述经聚乙二醇化的脂质的百分比在总脂质组成的约0.5%至约5%之间变化。
131. 根据权利要求107至113中任一项所述的方法,其中所述有效载荷的N:P比率是变化的。
132. 根据权利要求131所述的方法,其中所述N:P比率在约0.5至约5之间变化。
133. 根据权利要求106至132中任一项所述的方法,其中所述LNP为聚合物脂质纳米颗粒。
134. 根据权利要求106至132所述的方法,其中所述LNP为脂质体。
135. 根据权利要求106至132所述的方法,其中所述LNP为脂蛋白纳米颗粒。
136. 根据权利要求106所述的方法,其中所述第一溶液被注入所述第二溶液中。
137. 根据权利要求106所述的方法,其中所述第二溶液被注入所述第一溶液中。
138. 根据权利要求106至137中任一项所述的方法,其中所述最优参数为产生大于80%

的所述有效载荷的封装效率的那些参数。

139. 根据权利要求106至137中任一项所述的方法, 其中所述最优参数为产生平均直径为80nm至200nm、具有单峰粒径分布和小于约30%的多分散性的LNP的那些参数。

140. 根据权利要求106至137中任一项所述的方法, 其中所述LNP储存于4摄氏度的溶液中时, 维持相似的粒径分布和有效载荷封装至少一个月。

141. 一种用于制造脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂的经优化的高通量筛选方法, 所述方法包括:

- a. 获得包含水相的第一溶液;
- b. 获得包含有机相和多个能够自组装的分子的第二溶液, 并且其中所述第一溶液和所述第二溶液是可混合的;
- c. 将至少一种有效载荷分子溶解于所述第一溶液或所述第二溶液中;
- d. 使用机器人液体处理器制备具有不同组成的所述相并将所述相分配至多个孔中;
- e. 在适合LNP形成的条件下, 使用所述机器人液体处理器混合所述第一溶液和所述第二溶液以获得封装所述有效载荷的脂质纳米颗粒; 其中不同孔之间, 以下条件中的至少一者是不同的:

自组装分子的类型, 所述自组装分子的组成比率; 所述自组装分子与所述有效载荷的比率和/或浓度、相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、注入速度、混合速度、体积、相比率、注入持续时间和混合持续时间;

f. 测量以下中的至少一者: 所述LNP的封装效率、粒径分布、纯化和颗粒回收率以及配制物稳定性;

g. 确定用于制造所述LNP制剂的最优参数; 以及

h. 基于所述最优参数制造所述LNP制剂。

142. 根据权利要求141所述的方法, 其中所述有效载荷为寡核苷酸。

143. 根据权利要求142所述的方法, 其中所述寡核苷酸为反义分子。

144. 根据权利要求142所述的方法, 其中所述寡核苷酸为siRNA。

145. 根据权利要求142所述的方法, 其中所述寡核苷酸为shRNA。

146. 根据权利要求142至145所述的方法, 其中所述寡核苷酸的长度在约10至约30个核苷酸之间。

147. 根据权利要求141所述的方法, 其中所述有效载荷为mRNA。

148. 根据权利要求147所述的方法, 其中mRNA的大小为约1kb至约2kb。

149. 根据权利要求141所述的方法, 其中所述有效载荷为多肽。

150. 根据权利要求149所述的方法, 其中所述多肽在约1,000Da与约10,000Da之间。

151. 根据权利要求141所述的方法, 其中所述有效载荷为小分子。

152. 根据权利要求151所述的方法, 其中所述小分子在约100Da与1000Da之间。

153. 根据权利要求141所述的方法, 其中所述有效载荷溶解于所述第一溶液中。

154. 根据权利要求141所述的方法, 其中所述有效载荷溶解于所述第二溶液中。

155. 根据权利要求141所述的方法, 其中所述第一溶液为水性缓冲剂。

156. 根据权利要求141所述的方法, 其中所述第一溶液包含pH受控缓冲剂和渗透压受控缓冲剂。

157. 根据权利要求141所述的方法, 其中所述第二溶液的所述有机相包含甲醇。
158. 根据权利要求141所述的方法, 其中所述第二溶液的所述有机相包含乙醇。
159. 根据权利要求141所述的方法, 其中所述自组装分子至少包含脂质组分, 所述脂质组分包含至少一种脂质分子。
160. 根据权利要求159所述的方法, 其中所述至少一种脂质分子选自阳离子脂质种类、非阳离子脂质种类和磷脂质种类。
161. 根据权利要求159或160所述的方法, 其中所述第二溶液包含多于一种类型的脂质。
162. 根据权利要求159或160所述的方法, 其中脂质的总浓度是变化的。
163. 根据权利要求162所述的方法, 其中所述脂质的总浓度在约0.4mM与约4mM之间变化。
164. 根据权利要求159或160所述的方法, 其中经聚乙二醇化的脂质的百分比是变化的。
165. 根据权利要求164所述的方法, 其中所述经聚乙二醇化的脂质的百分比在总脂质组成的约0.5%至约5%之间变化。
166. 根据权利要求142至150中任一项所述的方法, 其中所述有效载荷的N:P比率是变化的。
167. 根据权利要求166所述的方法, 其中所述N:P比率在约0.5至约5之间变化。
168. 根据权利要求141至167中任一项所述的方法, 其中所述LNP为聚合物脂质纳米颗粒。
169. 根据权利要求141至167所述的方法, 其中所述LNP为脂质体。
170. 根据权利要求141至167所述的方法, 其中所述LNP为脂蛋白纳米颗粒。
171. 根据权利要求141所述的方法, 其中所述第一溶液被注入所述第二溶液中。
172. 根据权利要求141所述的方法, 其中所述第二溶液被注入所述第一溶液中。
173. 根据权利要求141至172中任一项所述的方法, 其中所述最优参数为产生大于80%的所述有效载荷的封装效率的那些参数。
174. 根据权利要求141至172中任一项所述的方法, 其中所述最优参数为产生平均直径为80nm至200nm、具有单峰粒径分布和小于约30%的多分散性的LNP的那些参数。
175. 根据权利要求141至172中任一项所述的方法, 其中所述LNP储存于4摄氏度的溶液中时, 维持相似的粒径分布和有效载荷封装至少一个月。
176. 一种经优化的脂质纳米颗粒 (LNP), 其通过包括以下步骤的制程制造:
- a. 获得包含水相的第一溶液;
 - b. 获得包含有机相和多个能够自组装的分子的第二溶液, 并且其中所述第一溶液和所述第二溶液是可混合的;
 - c. 将至少一种有效载荷分子溶解于所述第一溶液或所述第二溶液中;
 - d. 使用机器人液体处理器制备具有不同组成的所述相并将所述相分配至多个孔中;
 - e. 在适合LNP形成的条件下, 使用所述机器人液体处理器混合所述第一溶液和所述第二溶液以获得封装所述有效载荷的脂质纳米颗粒; 其中不同孔之间, 以下条件中的至少一者是不同的:

自组装分子的类型,所述自组装分子的组成比率;所述自组装分子与所述有效载荷的比率和/或浓度、相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、注入速度、混合速度、体积、相比率、注入持续时间和混合持续时间;

f. 测量以下中的至少一者:所述LNP的封装效率、粒径分布、纯化和颗粒回收率以及配制物稳定性;

g. 确定用于制造所述LNP制剂的最优参数;以及

h. 基于所述最优参数制造所述LNP制剂。

177. 根据权利要求176所述的方法,其中所述有效载荷为寡核苷酸。

178. 根据权利要求177所述的方法,其中所述寡核苷酸为反义分子。

179. 根据权利要求178所述的方法,其中所述寡核苷酸为siRNA。

180. 根据权利要求178所述的方法,其中所述寡核苷酸为shRNA。

181. 根据权利要求177至180所述的方法,其中所述寡核苷酸的长度在约10至约30个核苷酸之间。

182. 根据权利要求176所述的方法,其中所述有效载荷为mRNA。

183. 根据权利要求182所述的方法,其中mRNA的大小为约1kb至约2kb。

184. 根据权利要求176所述的方法,其中所述有效载荷为多肽。

185. 根据权利要求184所述的方法,其中所述多肽在约1,000Da与约10,000Da之间。

186. 根据权利要求176所述的方法,其中所述有效载荷为小分子。

187. 根据权利要求186所述的方法,其中所述小分子在约100Da与1000Da之间。

188. 根据权利要求176所述的方法,其中所述有效载荷溶解于所述第一溶液中。

189. 根据权利要求176所述的方法,其中所述有效载荷溶解于所述第二溶液中。

190. 根据权利要求176所述的方法,其中所述第一溶液为水性缓冲剂。

191. 根据权利要求176所述的方法,其中所述第一溶液包含pH受控缓冲剂和渗透压受控缓冲剂。

192. 根据权利要求176所述的方法,其中所述第二溶液的所述有机相包含甲醇。

193. 根据权利要求176所述的方法,其中所述第二溶液的所述有机相包含乙醇。

194. 根据权利要求176所述的方法,其中所述自组装分子至少包含脂质组分,所述脂质组分包含至少一种脂质分子。

195. 根据权利要求194所述的方法,其中所述至少一种脂质分子选自阳离子脂质种类、非阳离子脂质种类和磷脂质种类。

196. 根据权利要求194或195所述的方法,其中所述第二溶液包含多于一种类型的脂质。

197. 根据权利要求194或195所述的方法,其中脂质的总浓度是变化的。

198. 根据权利要求197所述的方法,其中所述脂质的总浓度在约0.4mM与约4mM之间变化。

199. 根据权利要求194或195所述的方法,其中经聚乙二醇化的脂质的百分比是变化的。

200. 根据权利要求199所述的方法,其中所述经聚乙二醇化的脂质的百分比在总脂质组成的约0.5%至约5%之间变化。

201. 根据权利要求177至183中任一项所述的方法, 其中所述有效载荷的N:P比率是变化的。

202. 根据权利要求201所述的方法, 其中所述N:P比率在约0.5至约5之间变化。

203. 根据权利要求176至202中任一项所述的方法, 其中所述LNP为聚合物脂质纳米颗粒。

204. 根据权利要求176至202所述的方法, 其中所述LNP为脂质体。

205. 根据权利要求176至202所述的方法, 其中所述LNP为脂蛋白纳米颗粒。

206. 根据权利要求176所述的方法, 其中所述第一溶液被注入所述第二溶液中。

207. 根据权利要求176所述的方法, 其中所述第二溶液被注入所述第一溶液中。

208. 根据权利要求176至207中任一项所述的方法, 其中所述最优参数为产生大于80%的所述有效载荷的封装效率的那些参数。

209. 根据权利要求176至207中任一项所述的方法, 其中所述最优参数为产生平均直径为80nm至200nm、具有单峰粒径分布和小于约30%的多分散性的LNP的那些参数。

210. 根据权利要求176至207中任一项所述的方法, 其中所述LNP储存于4摄氏度的溶液中时, 维持相似的粒径分布和有效载荷封装至少一个月。

211. 一种用于LNP形成的多个参数的HTS筛选的工作流, 其包括:

(i) 机器人液体处理器;

(ii) 至少一台仪器, 其能够测量期望的LNP特性; 以及

(iii) 至少一个微孔板, 其包含多个微孔;

其中所述机器人液体处理器能够将多种溶液注入所述微孔中的每个中;

其中所述参数在微孔之间系统性地变化; 并且

其中能够针对每个微孔测量所述期望的LNP特性。

212. 根据权利要求211所述的方法, 其中所述多个参数选自总脂质含量、自组装分子的类型; 所述自组装分子的组成比率; 所述自组装分子与所述有效载荷的比率和/或浓度; 相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、体积和速度以及混合持续时间。

213. 根据权利要求211所述的方法, 其中所述期望的LNP特性选自由以下项组成的组: 平均粒径、粒径分布、封装效率和颗粒稳定性。

214. 根据权利要求211所述的工作流, 其中所述仪器能够进行动态光散射 (DLS)、紫外光-可见光 (UV-Vis) 或荧光光谱法。

用于制备脂质纳米颗粒的高通量方法及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2020年12月9日递交的美国临时专利申请第63/123,343号的优先权和权益,该美国临时专利申请的全部内容出于所有目的通过援引全部并入本文。

背景技术

[0003] 脂质纳米颗粒(LNP)已被广泛开发为生物相容的且稳定的药物递送平台。用于制备脂质纳米颗粒的脂质通常为低毒性的生理性脂质(具有生物相容性和可生物降解性)。脂质的理化多样性和生物相容性以及其增强药物的口服生物利用度的能力,使脂质纳米颗粒成为非常有吸引力的药物递送载体。此外,基于脂质的配制物可通过多种方式对药物吸收产生积极影响,包括:提高溶解能力、防止药物在肠道稀释时沉淀、增强膜通透性、抑制外流性转运蛋白、减少CYP酶、增强乳糜微粒的产生和淋巴转运。LNP为用于siRNA递送的主要非病毒载体,截至2019年被用于70%的纳米医学临床试验。Anselmo S等人,2019, Bioeng. Transl. Med. 4(3):e10143。

[0004] 由于其复杂的理化性质,基于脂质的纳米载体给药品的质量控制带来了额外的挑战。根据美国FDA最近发布的脂质体药品指南,这些配制物应明确以下质量属性:颗粒结构和粒径分布、颗粒表面理化性质、脂质含量、游离API含量和封装效率以及物理和化学稳定性。不同的制备条件和参数可能影响LNP配制物的质量属性。例如,脂质组合物,特别是掺入不同含量和/或分子量的经聚乙二醇化的脂质,显著影响脂质体的胶体稳定性、细胞吸收和药物动力学(参见例如Allen等人,1991, Biochem Biophys Acta, 1066(1):29-36; Garbuzenko等人,2005, Chem Phys Lipids, 135(2):117-29; Immordino等人, Int J Nanomedicine 1(3)(2006)297-315),而siRNA或ASO载量可通过电荷所介导的与阳离子脂质的相互作用进行控制。Schroeder等人,2010, J Intern Med 267(1):9-21; Cullis等人, 2017, Mol Ther 25(7):1467-1475。LNP的下游性能也受其质量属性高度控制。因此,筛选各种水平的这些参数非常需要一种具有简便程序和多种分析输出的高通量方法。

发明内容

[0005] 为解决筛选并优化基于脂质的纳米医学的需求,本公开提供了一种用于制备该封装各种治疗有效载荷的基于脂质的纳米颗粒的高通量筛选(HTS)工作流程。在各种实施例中,本发明提供了一种使用机器人液体处理器促进LNP的自组装的优化溶剂注入方法。在各种实施例中,阐述了最佳脂质组合物、总脂质浓度和有效载荷的载量。

[0006] 在各种实施例中,本公开涉及一种用于制造脂质纳米颗粒(LNP)制剂的经优化的高通量筛选方法,该方法包括:a.获得包含水相的第一溶液;b.获得包含有机相和多个能够自组装的分子的第二溶液,并且其中该第一溶液和该第二溶液是可混合的;c.将至少一种有效载荷分子溶解于该第一溶液或该第二溶液中;d.使用机器人液体处理器制备具有不同组成的该相并将该相分配至多个孔中;e.在适合LNP形成的条件下,使用该机器人液体处理器混合该第一溶液和该第二溶液以获得封装该有效载荷的脂质纳米颗粒;其中不同孔之

间,以下条件中的至少一者是不同的:自组装分子的类型,该自组装分子的组成比率;该自组装分子与该有效载荷的比率和/或浓度、相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、注入速度、混合速度、体积、相比率、注入持续时间和混合持续时间;f.测量以下中的至少一者:该LNP的封装效率、粒径分布、纯化和颗粒回收率以及配制物稳定性;g.确定用于制造该LNP制剂的最优参数;以及h.基于该最优参数制造该LNP制剂。

[0007] 在各种实施例中,该有效载荷为寡核苷酸。在各种实施例中,该寡核苷酸为反义分子。在各种实施例中,该寡核苷酸为siRNA。在各种实施例中,该寡核苷酸为shRNA。在各种实施例中,该寡核苷酸的长度在约10至约30个核苷酸之间。在各种实施例中,该有效载荷为mRNA。在各种实施例中,mRNA的大小为约500至约3000个核苷酸。在各种实施例中,该有效载荷为多肽。在各种实施例中,该多肽在约1000Da与约10000Da之间。在各种实施例中,该有效载荷为小分子。在各种实施例中,该小分子在约100Da与1000Da之间。

[0008] 在各种实施例中,该有效载荷溶解于第一溶液中。在各种实施例中,该有效载荷溶解于第二溶液中。在各种实施例中,该第一溶液为水性缓冲剂。在各种实施例中,该第一溶液包含pH受控缓冲剂和渗透压受控缓冲剂。在各种实施例中,该第二溶液的有机相包含甲醇。在各种实施例中,该第二溶液的有机相包含乙醇。

[0009] 在各种实施例中,自组装分子至少包含脂质组分,该脂质组分包含至少一种脂质分子。在各种实施例中,该至少一种脂质分子选自阳离子或可电离脂质种类、非阳离子脂质种类和磷脂质种类。在各种实施例中,该第二溶液包含多于一种类型的脂质。在各种实施例中,该脂质的总浓度是变化的。在各种实施例中,该脂质的总浓度在约0.4mM与约4mM之间变化。在各种实施例中,经聚乙二醇化的脂质的百分比是变化的。在各种实施例中,经聚乙二醇化的脂质的百分比在总脂质组成的约0.5%至约5%之间变化。在各种实施例中,该有效载荷的N:P比率是变化的。在各种实施例中,N:P比率在约0.5至约5之间变化。

[0010] 在各种实施例中,该LNP为聚合物脂质纳米颗粒。在各种实施例中,该LNP为脂质体。在各种实施例中,该LNP为脂蛋白纳米颗粒。在各种实施例中,该第一溶液被注入该第二溶液中。在各种实施例中,该第二溶液被注入该第一溶液中。在各种实施例中,最优参数为产生大于80%的有效载荷的封装效率的那些参数。在各种实施例中,最优参数为产生平均直径为80nm至200nm、具有单峰粒径分布和小于约30%的多分散性的LNP的那些参数。在各种实施例中,该LNP储存于4摄氏度的溶液中时,维持相似的粒径分布和有效载荷封装至少一个月。

[0011] 在各种实施例中,本公开涉及一种优化用于制造脂质纳米颗粒(LNP)制剂的制程的高通量方法,其包括:a.获得包含水相的第一溶液;b.获得包含有机相和多个能够自组装的分子的第二溶液,并且其中该第一溶液和该第二溶液是可混合的;c.将至少一种有效载荷分子溶解于该第一溶液或该第二溶液中;d.使用机器人液体处理器制备具有不同组成的该相并将该相分配至多个孔中;e.在适合LNP形成的条件下,使用该机器人液体处理器混合该第一溶液和该第二溶液以获得封装该有效载荷的脂质纳米颗粒;其中不同孔之间,以下条件中的至少一者是不同的:自组装分子的类型,该自组装分子的组成比率;该自组装分子与该有效载荷的比率和/或浓度、相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、注入速度、混合速度、体积、相比率、注入持续时间和混合持续时间;f.测量以下中的至少一者:该LNP的封装效率、粒径分布、纯化和颗粒回收率以及配制物稳定性;g.确定用于制造该LNP制剂的最优

参数;以及h.基于该最优参数制造该LNP制剂。

[0012] 在各种实施例中,该有效载荷为寡核苷酸。在各种实施例中,该寡核苷酸为反义分子。在各种实施例中,该寡核苷酸为siRNA。在各种实施例中,该寡核苷酸为shRNA。在各种实施例中,该寡核苷酸的长度在约10至约30个核苷酸之间。在各种实施例中,该有效载荷为mRNA。在各种实施例中,mRNA的大小为约1kb至约2kb。在各种实施例中,该有效载荷为多肽。在各种实施例中,该多肽在约1000Da与约10000Da之间。在各种实施例中,该有效载荷为小分子。在各种实施例中,该小分子在约100Da与1000Da之间。

[0013] 在各种实施例中,该有效载荷溶解于第一溶液中。在各种实施例中,该有效载荷溶解于第二溶液中。在各种实施例中,该第一溶液为水性缓冲剂。在各种实施例中,该第一溶液包含pH受控缓冲剂和渗透压受控缓冲剂。在各种实施例中,该第二溶液的有机相包含甲醇。在各种实施例中,该第二溶液的有机相包含乙醇。

[0014] 在各种实施例中,自组装分子至少包含脂质组分,该脂质组分包含至少一种脂质分子。在各种实施例中,该至少一种脂质分子选自阳离子脂质种类、非阳离子脂质种类和磷脂种类。在各种实施例中,该第二溶液包含多于一种类型的脂质。在各种实施例中,该脂质的总浓度是变化的。在各种实施例中,该脂质的总浓度在约0.4mM与约4mM之间变化。在各种实施例中,经聚乙二醇化的脂质的百分比是变化的。在各种实施例中,经聚乙二醇化的脂质的百分比在总脂质组成的约0.5%至约5%之间变化。在各种实施例中,该有效载荷的N:P比率是变化的。在各种实施例中,N:P比率在约0.5至约5之间变化。

[0015] 在各种实施例中,该LNP为聚合物脂质纳米颗粒。在各种实施例中,该LNP为脂质体。在各种实施例中,该LNP为脂蛋白纳米颗粒。在各种实施例中,该第一溶液被注入该第二溶液中。在各种实施例中,该第二溶液被注入该第一溶液中。在各种实施例中,最优参数为产生大于80%的有效载荷的封装效率的那些参数。在各种实施例中,最优参数为产生平均直径为80nm至200nm、具有单峰粒径分布和小于约30%的多分散性的LNP的那些参数。在各种实施例中,该LNP储存于4摄氏度的溶液中时,维持相似的粒径分布和有效载荷封装至少一个月。

[0016] 在各种实施例中,本公开涉及一种用于将有效载荷封装于液体纳米颗粒(LNP)制剂中的经优化的高通量方法,该方法包括:a.获得包含水相的第一溶液;b.获得包含有机相和多个能够自组装的分子的第二溶液,并且其中该第一溶液和该第二溶液是可混合的;c.将至少一种有效载荷分子溶解于该第一溶液或该第二溶液中;d.使用机器人液体处理器制备具有不同组成的该相并将该相分配至多个孔中;e.在适合LNP形成的条件下,使用该机器人液体处理器混合该第一溶液和该第二溶液以获得封装该有效载荷的脂质纳米颗粒;其中不同孔之间,以下条件中的至少一者是不同的:自组装分子的类型,该自组装分子的组成比率;该自组装分子与该有效载荷的比率和/或浓度、相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、注入速度、混合速度、体积、相比率、注入持续时间和混合持续时间;f.测量以下中的至少一者:该LNP的封装效率、粒径分布、纯化和颗粒回收率以及配制物稳定性;g.确定用于制造该LNP制剂的最优参数;以及h.基于该最优参数制造该LNP制剂。

[0017] 在各种实施例中,该有效载荷为寡核苷酸。在各种实施例中,该寡核苷酸为反义分子。在各种实施例中,该寡核苷酸为siRNA。在各种实施例中,该寡核苷酸为shRNA。在各种实施例中,该寡核苷酸的长度在约10至约30个核苷酸之间。在各种实施例中,该有效载荷为

mRNA。在各种实施例中，mRNA的大小为约1kb至约2kb。在各种实施例中，该有效载荷为多肽。在各种实施例中，该多肽在约1000Da与约10000Da之间。在各种实施例中，该有效载荷为小分子。在各种实施例中，该小分子在约100Da与1000Da之间。

[0018] 在各种实施例中，该有效载荷溶解于第一溶液中。在各种实施例中，该有效载荷溶解于第二溶液中。在各种实施例中，该第一溶液为水性缓冲剂。在各种实施例中，该第一溶液包含pH受控缓冲剂和渗透压受控缓冲剂。在各种实施例中，该第二溶液的有机相包含甲醇。在各种实施例中，该第二溶液的有机相包含乙醇。

[0019] 在各种实施例中，自组装分子至少包含脂质组分，该脂质组分包含至少一种脂质分子。在各种实施例中，该至少一种脂质分子选自阳离子脂质种类、非阳离子脂质种类和磷脂种类。在各种实施例中，该第二溶液包含多于一种类型的脂质。在各种实施例中，该脂质的总浓度是变化的。在各种实施例中，该脂质的总浓度在约0.4mM与约4mM之间变化。在各种实施例中，经聚乙二醇化的脂质的百分比是变化的。在各种实施例中，经聚乙二醇化的脂质的百分比在总脂质组成的约0.5%至约5%之间变化。在各种实施例中，该有效载荷的N:P比率是变化的。在各种实施例中，N:P比率在约0.5至约5之间变化。

[0020] 在各种实施例中，该LNP为聚合物脂质纳米颗粒。在各种实施例中，该LNP为脂质体。在各种实施例中，该LNP为脂蛋白纳米颗粒。在各种实施例中，该第一溶液被注入该第二溶液中。在各种实施例中，该第二溶液被注入该第一溶液中。在各种实施例中，最优参数为产生大于80%的有效载荷的封装效率的那些参数。在各种实施例中，最优参数为产生平均直径为80nm至200nm、具有单峰粒径分布和小于约30%的多分散性的LNP的那些参数。在各种实施例中，该LNP储存于4摄氏度的溶液中时，维持相似的粒径分布和有效载荷封装至少一个月。

[0021] 在各种实施例中，本公开涉及一种向有此需要的患者施用LNP制剂的方法，其中该LNP制剂通过以下制造：a. 获得包含水相的第一溶液；b. 获得包含有机相和多个能够自组装的分子的第二溶液，并且其中该第一溶液和该第二溶液是可混合的；c. 将至少一种有效载荷分子溶解于该第一溶液或该第二溶液中；d. 使用机器人液体处理器制备具有不同组成的该相并将该相分配至多个孔中；e. 在适合LNP形成的条件下，使用该机器人液体处理器混合该第一溶液和该第二溶液以获得封装该有效载荷的脂质纳米颗粒；其中不同孔之间，以下条件中的至少一者是不同的：自组装分子的类型，该自组装分子的组成比率；该自组装分子与该有效载荷的比率和/或浓度、相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、注入速度、混合速度、体积、相比率、注入持续时间和混合持续时间；f. 测量以下中的至少一者：该LNP的封装效率、粒径分布、纯化和颗粒回收率以及配制物稳定性；g. 确定用于制造该LNP制剂的最优参数；以及h. 基于该最优参数制造该LNP制剂。

[0022] 在各种实施例中，该有效载荷为寡核苷酸。在各种实施例中，该寡核苷酸为反义分子。在各种实施例中，该寡核苷酸为siRNA。在各种实施例中，该寡核苷酸为shRNA。在各种实施例中，该寡核苷酸的长度在约10至约30个核苷酸之间。在各种实施例中，该有效载荷为mRNA。在各种实施例中，mRNA的大小为约1kb至约2kb。在各种实施例中，该有效载荷为多肽。在各种实施例中，该多肽在约1000Da与约10000Da之间。在各种实施例中，该有效载荷为小分子。在各种实施例中，该小分子在约100Da与1000Da之间。

[0023] 在各种实施例中，该有效载荷溶解于第一溶液中。在各种实施例中，该有效载荷溶

解于第二溶液中。在各种实施例中,该第一溶液为水性缓冲剂。在各种实施例中,该第一溶液包含pH受控缓冲剂和渗透压受控缓冲剂。在各种实施例中,该第二溶液的有机相包含甲醇。在各种实施例中,该第二溶液的有机相包含乙醇。

[0024] 在各种实施例中,自组装分子至少包含脂质组分,该脂质组分包含至少一种脂质分子。在各种实施例中,该至少一种脂质分子选自阳离子脂质种类、非阳离子脂质种类和磷脂种类。在各种实施例中,该第二溶液包含多于一种类型的脂质。在各种实施例中,该脂质的总浓度是变化的。在各种实施例中,该脂质的总浓度在约0.4mM与约4mM之间变化。在各种实施例中,经聚乙二醇化的脂质的百分比是变化的。在各种实施例中,经聚乙二醇化的脂质的百分比在总脂质组成的约0.5%至约5%之间变化。在各种实施例中,该有效载荷的N:P比率是变化的。在各种实施例中,N:P比率在约0.5至约5之间变化。

[0025] 在各种实施例中,该LNP为聚合物脂质纳米颗粒。在各种实施例中,该LNP为脂质体。在各种实施例中,该LNP为脂蛋白纳米颗粒。在各种实施例中,该第一溶液被注入该第二溶液中。在各种实施例中,该第二溶液被注入该第一溶液中。在各种实施例中,最优参数为产生大于80%的有效载荷的封装效率的那些参数。在各种实施例中,最优参数为产生平均直径为80nm至200nm、具有单峰粒径分布和小于约30%的多分散性的LNP的那些参数。在各种实施例中,该LNP储存于4摄氏度的溶液中时,维持相似的粒径分布和有效载荷封装至少一个月。

[0026] 在各种实施例中,本公开涉及一种用于将有效载荷封装于液体纳米颗粒(LNP)制剂中的经优化的高通量方法,该方法包括:a.获得包含水相的第一溶液;b.获得包含有机相和多个能够自组装的分子的第二溶液,并且其中该第一溶液和该第二溶液是可混合的;c.将至少一种有效载荷分子溶解于该第一溶液或该第二溶液中;d.使用机器人液体处理器制备具有不同组成的该相并将该相分配至多个孔中;e.在适合LNP形成的条件下,使用该机器人液体处理器混合该第一溶液和该第二溶液以获得封装该有效载荷的脂质纳米颗粒;其中不同孔之间,以下条件中的至少一者是不同的:自组装分子的类型,该自组装分子的组成比率;该自组装分子与该有效载荷的比率和/或浓度、相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、注入速度、混合速度、体积、相比率、注入持续时间和混合持续时间;f.测量以下中的至少一者:该LNP的封装效率、粒径分布、纯化和颗粒回收率以及配制物稳定性;g.确定用于制造该LNP制剂的最优参数;以及h.基于该最优参数制造该LNP制剂。

[0027] 在各种实施例中,该有效载荷为寡核苷酸。在各种实施例中,该寡核苷酸为反义分子。在各种实施例中,该寡核苷酸为siRNA。在各种实施例中,该寡核苷酸为shRNA。在各种实施例中,该寡核苷酸的长度在约10至约30个核苷酸之间。在各种实施例中,该有效载荷为mRNA。在各种实施例中,mRNA的大小为约1kb至约2kb。在各种实施例中,该有效载荷为多肽。在各种实施例中,该多肽在约1000Da与约10000Da之间。在各种实施例中,该有效载荷为小分子。在各种实施例中,该小分子在约100Da与1000Da之间。

[0028] 在各种实施例中,该有效载荷溶解于第一溶液中。在各种实施例中,该有效载荷溶解于第二溶液中。在各种实施例中,该第一溶液为水性缓冲剂。在各种实施例中,该第一溶液包含pH受控缓冲剂和渗透压受控缓冲剂。在各种实施例中,该第二溶液的有机相包含甲醇。在各种实施例中,该第二溶液的有机相包含乙醇。

[0029] 在各种实施例中,自组装分子至少包含脂质组分,该脂质组分包含至少一种脂质

分子。在各种实施例中,该至少一种脂质分子选自阳离子脂质种类、非阳离子脂质种类和磷脂种类。在各种实施例中,该第二溶液包含多于一种类型的脂质。在各种实施例中,该脂质的总浓度是变化的。在各种实施例中,该脂质的总浓度在约0.4mM与约4mM之间变化。在各种实施例中,经聚乙二醇化的脂质的百分比是变化的。在各种实施例中,经聚乙二醇化的脂质的百分比在总脂质组成的约0.5%至约5%之间变化。在各种实施例中,该有效载荷的N:P比率是变化的。在各种实施例中,N:P比率在约0.5至约5之间变化。

[0030] 在各种实施例中,该LNP为聚合物脂质纳米颗粒。在各种实施例中,该LNP为脂质体。在各种实施例中,该LNP为脂蛋白纳米颗粒。在各种实施例中,该第一溶液被注入该第二溶液中。在各种实施例中,该第二溶液被注入该第一溶液中。在各种实施例中,最优参数为产生大于80%的有效载荷的封装效率的那些参数。在各种实施例中,最优参数为产生平均直径为80nm至200nm、具有单峰粒径分布和小于约30%的多分散性的LNP的那些参数。在各种实施例中,该LNP储存于4摄氏度的溶液中时,维持相似的粒径分布和有效载荷封装至少一个月。

[0031] 在各种实施例中,本公开涉及一种用于制造脂质纳米颗粒(LNP)制剂的经优化的高通量筛选方法,该方法包括:a.获得包含水相的第一溶液;b.获得包含有机相和多个能够自组装的分子的第二溶液,并且其中该第一溶液和该第二溶液是可混合的;c.将至少一种有效载荷分子溶解于该第一溶液或该第二溶液中;d.使用机器人液体处理器制备具有不同组成的该相并将该相分配至多个孔中;e.在适合LNP形成的条件下,使用该机器人液体处理器混合该第一溶液和该第二溶液以获得封装该有效载荷的脂质纳米颗粒;其中不同孔之间,以下条件中的至少一者是不同的:自组装分子的类型,该自组装分子的组成比率;该自组装分子与该有效载荷的比率和/或浓度、相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、注入速度、混合速度、体积、相比率、注入持续时间和混合持续时间;f.测量以下中的至少一者:该LNP的封装效率、粒径分布、纯化和颗粒回收率以及配制物稳定性;g.确定用于制造该LNP制剂的最优参数;以及h.基于该最优参数制造该LNP制剂。

[0032] 在各种实施例中,该有效载荷为寡核苷酸。在各种实施例中,该寡核苷酸为反义分子。在各种实施例中,该寡核苷酸为siRNA。在各种实施例中,该寡核苷酸为shRNA。在各种实施例中,该寡核苷酸的长度在约10至约30个核苷酸之间。在各种实施例中,该有效载荷为mRNA。在各种实施例中,mRNA的大小为约1kb至约2kb。在各种实施例中,该有效载荷为多肽。在各种实施例中,该多肽在约1000Da与约10000Da之间。在各种实施例中,该有效载荷为小分子。在各种实施例中,该小分子在约100Da与1000Da之间。

[0033] 在各种实施例中,该有效载荷溶解于第一溶液中。在各种实施例中,该有效载荷溶解于第二溶液中。在各种实施例中,该第一溶液为水性缓冲剂。在各种实施例中,该第一溶液包含pH受控缓冲剂和渗透压受控缓冲剂。在各种实施例中,该第二溶液的有机相包含甲醇。在各种实施例中,该第二溶液的有机相包含乙醇。

[0034] 在各种实施例中,自组装分子至少包含脂质组分,该脂质组分包含至少一种脂质分子。在各种实施例中,该至少一种脂质分子选自阳离子脂质种类、非阳离子脂质种类和磷脂种类。在各种实施例中,该第二溶液包含多于一种类型的脂质。在各种实施例中,该脂质的总浓度是变化的。在各种实施例中,该脂质的总浓度在约0.4mM与约4mM之间变化。在各种实施例中,经聚乙二醇化的脂质的百分比是变化的。在各种实施例中,经聚乙二醇化的脂

质的百分比在总脂质组成的约0.5%至约5%之间变化。在各种实施例中,该有效载荷的N:P比率是变化的。在各种实施例中,N:P比率在约0.5至约5之间变化。

[0035] 在各种实施例中,该LNP为聚合物脂质纳米颗粒。在各种实施例中,该LNP为脂质体。在各种实施例中,该LNP为脂蛋白纳米颗粒。在各种实施例中,该第一溶液被注入该第二溶液中。在各种实施例中,该第二溶液被注入该第一溶液中。在各种实施例中,最优参数为产生大于80%的有效载荷的封装效率的那些参数。在各种实施例中,最优参数为产生平均直径为80nm至200nm、具有单峰粒径分布和小于约30%的多分散性的LNP的那些参数。在各种实施例中,该LNP储存于4摄氏度的溶液中时,维持相似的粒径分布和有效载荷封装至少一个月。

[0036] 在各种实施例中,本公开涉及一种用于将有效载荷封装于液体纳米颗粒(LNP)制剂中的经优化的高通量方法,该方法包括:a.获得包含水相的第一溶液;b.获得包含有机相和多个能够自组装的分子的第二溶液,并且其中该第一溶液和该第二溶液是可混合的;c.将至少一种有效载荷分子溶解于该第一溶液或该第二溶液中;d.使用机器人液体处理器制备具有不同组成的该相并将该相分配至多个孔中;e.在适合LNP形成的条件下,使用该机器人液体处理器混合该第一溶液和该第二溶液以获得封装该有效载荷的脂质纳米颗粒;其中不同孔之间,以下条件中的至少一者是不同的:自组装分子的类型,该自组装分子的组成比率;该自组装分子与该有效载荷的比率和/或浓度、相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、注入速度、混合速度、体积、相比率、注入持续时间和混合持续时间;f.测量以下中的至少一者:该LNP的封装效率、粒径分布、纯化和颗粒回收率以及配制物稳定性;g.确定用于制造该LNP制剂的最优参数;以及h.基于该最优参数制造该LNP制剂。

[0037] 在各种实施例中,该有效载荷为寡核苷酸。在各种实施例中,该寡核苷酸为反义分子。在各种实施例中,该寡核苷酸为siRNA。在各种实施例中,该寡核苷酸为shRNA。在各种实施例中,该寡核苷酸的长度在约10至约30个核苷酸之间。在各种实施例中,该有效载荷为mRNA。在各种实施例中,mRNA的大小为约1kb至约2kb。在各种实施例中,该有效载荷为多肽。在各种实施例中,该多肽在约1000Da与约10000Da之间。在各种实施例中,该有效载荷为小分子。在各种实施例中,该小分子在约100Da与1000Da之间。

[0038] 在各种实施例中,该有效载荷溶解于第一溶液中。在各种实施例中,该有效载荷溶解于第二溶液中。在各种实施例中,该第一溶液为水性缓冲剂。在各种实施例中,该第一溶液包含pH受控缓冲剂和渗透压受控缓冲剂。在各种实施例中,该第二溶液的有机相包含甲醇。在各种实施例中,该第二溶液的有机相包含乙醇。

[0039] 在各种实施例中,自组装分子至少包含脂质组分,该脂质组分包含至少一种脂质分子。在各种实施例中,该至少一种脂质分子选自阳离子脂质种类、非阳离子脂质种类和磷脂种类。在各种实施例中,该第二溶液包含多于一种类型的脂质。在各种实施例中,该脂质的总浓度是变化的。在各种实施例中,该脂质的总浓度在约0.4mM与约4mM之间变化。在各种实施例中,经聚乙二醇化的脂质的百分比是变化的。在各种实施例中,经聚乙二醇化的脂质的百分比在总脂质组成的约0.5%至约5%之间变化。在各种实施例中,该有效载荷的N:P比率是变化的。在各种实施例中,N:P比率在约0.5至约5之间变化。

[0040] 在各种实施例中,该LNP为聚合物脂质纳米颗粒。在各种实施例中,该LNP为脂质体。在各种实施例中,该LNP为脂蛋白纳米颗粒。在各种实施例中,该第一溶液被注入该第二

溶液中。在各种实施例中,该第二溶液被注入该第一溶液中。在各种实施例中,最优参数为产生大于80%的有效载荷的封装效率的那些参数。在各种实施例中,最优参数为产生平均直径为80nm至200nm、具有单峰粒径分布和小于约30%的多分散性的LNP的那些参数。在各种实施例中,该LNP储存于4摄氏度的溶液中时,维持相似的粒径分布和有效载荷封装至少一个月。

[0041] 在各种实施例中,本公开涉及一种经优化的脂质纳米颗粒(LNP),其通过包括以下步骤的制程制造:a.获得包含水相的第一溶液;b.获得包含有机相和多个能够自组装的分子的第二溶液,并且其中该第一溶液和该第二溶液是可混合的;c.将至少一种有效载荷分子溶解于该第一溶液或该第二溶液中;d.使用机器人液体处理器制备具有不同组成的该相并将该相分配至多个孔中;e.在适合LNP形成的条件下,使用该机器人液体处理器混合该第一溶液和该第二溶液以获得封装该有效载荷的脂质纳米颗粒;其中不同孔之间,以下条件中的至少一者是不同的:自组装分子的类型,该自组装分子的组成比率;该自组装分子与该有效载荷的比率和/或浓度、相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、注入速度、混合速度、体积、相比率、注入持续时间和混合持续时间;f.测量以下中的至少一者:该LNP的封装效率、粒径分布、纯化和颗粒回收率以及配制物稳定性;g.确定用于制造该LNP制剂的最优参数;以及h.基于该最优参数制造该LNP制剂。

[0042] 在各种实施例中,该有效载荷为寡核苷酸。在各种实施例中,该寡核苷酸为反义分子。在各种实施例中,该寡核苷酸为siRNA。在各种实施例中,该寡核苷酸为shRNA。在各种实施例中,该寡核苷酸的长度在约10至约30个核苷酸之间。在各种实施例中,该有效载荷为mRNA。在各种实施例中,mRNA的大小为约1kb至约2kb。在各种实施例中,该有效载荷为多肽。在各种实施例中,该多肽在约1000Da与约10000Da之间。在各种实施例中,该有效载荷为小分子。在各种实施例中,该小分子在约100Da与1000Da之间。

[0043] 在各种实施例中,该有效载荷溶解于第一溶液中。在各种实施例中,该有效载荷溶解于第二溶液中。在各种实施例中,该第一溶液为水性缓冲剂。在各种实施例中,该第一溶液包含pH受控缓冲剂和渗透压受控缓冲剂。在各种实施例中,该第二溶液的有机相包含甲醇。在各种实施例中,该第二溶液的有机相包含乙醇。

[0044] 在各种实施例中,自组装分子至少包含脂质组分,该脂质组分包含至少一种脂质分子。在各种实施例中,该至少一种脂质分子选自阳离子脂质种类、非阳离子脂质种类和磷脂种类。在各种实施例中,该第二溶液包含多于一种类型的脂质。在各种实施例中,该脂质的总浓度是变化的。在各种实施例中,该脂质的总浓度在约0.4mM与约4mM之间变化。在各种实施例中,经聚乙二醇化的脂质的百分比是变化的。在各种实施例中,经聚乙二醇化的脂质的百分比在总脂质组成的约0.5%至约5%之间变化。在各种实施例中,该有效载荷的N:P比率是变化的。在各种实施例中,N:P比率在约0.5至约5之间变化。

[0045] 在各种实施例中,该LNP为聚合物脂质纳米颗粒。在各种实施例中,该LNP为脂质体。在各种实施例中,该LNP为脂蛋白纳米颗粒。在各种实施例中,该第一溶液被注入该第二溶液中。在各种实施例中,该第二溶液被注入该第一溶液中。在各种实施例中,最优参数为产生大于80%的有效载荷的封装效率的那些参数。在各种实施例中,最优参数为产生平均直径为80nm至200nm、具有单峰粒径分布和小于约30%的多分散性的LNP的那些参数。在各种实施例中,该LNP储存于4摄氏度的溶液中时,维持相似的粒径分布和有效载荷封装至少

一个月。

[0046] 在各种实施例中,本公开涉及一种用于将有效载荷封装于液体纳米颗粒(LNP)制剂中的经优化的高通量方法,该方法包括:a.获得包含水相的第一溶液;b.获得包含有机相和多个能够自组装的分子的第二溶液,并且其中该第一溶液和该第二溶液是可混合的;c.将至少一种有效载荷分子溶解于该第一溶液或该第二溶液中;d.使用机器人液体处理器制备具有不同组成的该相并将该相分配至多个孔中;e.在适合LNP形成的条件下,使用该机器人液体处理器混合该第一溶液和该第二溶液以获得封装该有效载荷的脂质纳米颗粒;其中不同孔之间,以下条件中的至少一者是不同的:自组装分子的类型,该自组装分子的组成比率;该自组装分子与该有效载荷的比率和/或浓度、相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、注入速度、混合速度、体积、相比率、注入持续时间和混合持续时间;f.测量以下中的至少一者:该LNP的封装效率、粒径分布、纯化和颗粒回收率以及配制物稳定性;g.确定用于制造该LNP制剂的最优参数;以及h.基于该最优参数制造该LNP制剂。

[0047] 在各种实施例中,该有效载荷为寡核苷酸。在各种实施例中,该寡核苷酸为反义分子。在各种实施例中,该寡核苷酸为siRNA。在各种实施例中,该寡核苷酸为shRNA。在各种实施例中,该寡核苷酸的长度在约10至约30个核苷酸之间。在各种实施例中,该有效载荷为mRNA。在各种实施例中,mRNA的大小为约1kb至约2kb。在各种实施例中,该有效载荷为多肽。在各种实施例中,该多肽在约1000Da与约10000Da之间。在各种实施例中,该有效载荷为小分子。在各种实施例中,该小分子在约100Da与1000Da之间。

[0048] 在各种实施例中,该有效载荷溶解于第一溶液中。在各种实施例中,该有效载荷溶解于第二溶液中。在各种实施例中,该第一溶液为水性缓冲剂。在各种实施例中,该第一溶液包含pH受控缓冲剂和渗透压受控缓冲剂。在各种实施例中,该第二溶液的有机相包含甲醇。在各种实施例中,该第二溶液的有机相包含乙醇。

[0049] 在各种实施例中,自组装分子至少包含脂质组分,该脂质组分包含至少一种脂质分子。在各种实施例中,该至少一种脂质分子选自阳离子脂质种类、非阳离子脂质种类和磷脂种类。在各种实施例中,该第二溶液包含多于一种类型的脂质。在各种实施例中,该脂质的总浓度是变化的。在各种实施例中,该脂质的总浓度在约0.4mM与约4mM之间变化。在各种实施例中,经聚乙二醇化的脂质的百分比是变化的。在各种实施例中,经聚乙二醇化的脂质的百分比在总脂质组成的约0.5%至约5%之间变化。在各种实施例中,该有效载荷的N:P比率是变化的。在各种实施例中,N:P比率在约0.5至约5之间变化。

[0050] 在各种实施例中,该LNP为聚合物脂质纳米颗粒。在各种实施例中,该LNP为脂质体。在各种实施例中,该LNP为脂蛋白纳米颗粒。在各种实施例中,该第一溶液被注入该第二溶液中。在各种实施例中,该第二溶液被注入该第一溶液中。在各种实施例中,最优参数为产生大于80%的有效载荷的封装效率的那些参数。在各种实施例中,最优参数为产生平均直径为80nm至200nm、具有单峰粒径分布和小于约30%的多分散性的LNP的那些参数。在各种实施例中,该LNP储存于4摄氏度的溶液中时,维持相似的粒径分布和有效载荷封装至少一个月。

[0051] 在各种实施例中,本公开涉及一种用于LNP形成的多个参数的HTS筛选的工作流,其包括:(i)机器人液体处理器;(ii)至少一台仪器,其能够测量期望的LNP特性;以及(iii)至少一个微孔板,其包含多个微孔;其中该机器人液体处理器能够将多种溶液注入该微孔

中的每个中;其中该参数在微孔之间系统性地变化;并且其中能够针对每个微孔测量该期望的LNP特性。

[0052] 在各种实施例中,该多个参数选自总脂质含量、自组装分子的类型;该自组装分子的组成比率;该自组装分子与该有效载荷的比率和/或浓度;相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、体积和速度以及混合持续时间。在各种实施例中,该期望的LNP特性选自由以下项组成的组:平均粒径、粒径分布、封装效率和颗粒稳定性。在各种实施例中,该仪器能够进行动态光散射(DLS)、紫外光-可见光(UV-Vis)或荧光光谱法。

附图说明

[0053] 图1A至图1F示出了由高速、乙醇到缓冲剂注入且之后经多轮混合产生具有高ASO载量的均匀LNP得到的数据。使用不同的混合条件,将 $0.4\mu\text{mol}$ 总脂质和 $1.5\text{mol}\%$ DSPE-PEG2000所组成的LNP与ASO-1在N/P比率为1的条件下混合。使用TECAN机器人研究以下条件下的反向注入顺序(乙醇到缓冲剂或缓冲剂到乙醇):速度为 0.1 、 0.5 或 0.9ml/s ,然后重复混合10次(图1A至图1C);或研究以下条件下的乙醇到缓冲剂注入:速度为 0.5 或 0.9ml/s ,然后重复混合10次或20次(图1D至图1F)。通过动态光散射(DLS)测量粒径(图1A和图1D)和多分散性(图1B和图1E)。通过OD260测量游离ASO-1并计算封装效率(图1C和图1F)。结果为平均值 $\pm$ SD, $n=3$;ns, 不显著, $****P<0.0001$, 通过(图1A至图1C)双向或单向(图1D至图1F)ANOVA和之后的Tukey多重比较进行分析。

[0054] 图2示出负载ASO的LNP配制物的HTS工作流。96个样品(32种条件, $n=3$)随4个位准的脂质组合物、2个位准的总脂质浓度和4个位准的ASO载量而变化,其通过使用TECAN®液体处理机的自动溶剂注入方法进行制备,然后通过DLS表征粒径分布,并通过260nm下的吸光度表征ASO封装。显示了样品板的代表性LEA(Laboratory Execution and Analysis) Library Studio设计布局。

[0055] 图3A至图3E为负载ASO-1的LNP配制物的HTS分析。图3A为示出筛选设计的影像。在96孔板中筛选总脂质浓度(2个位准)、掺入脂质组合物中的经聚乙二醇化的脂质含量(4个位准)以及ASO载量比(4个位准)等调配参数,每种条件下重复3次。图3B至图3D示出样品在PBS中稀释并通过DLS表征其粒径分布。图3B为示出代表性粒径分布的图片,其中示出了添加至脂质组合物中的经聚乙二醇化的脂质的含量不断增加的小颗粒群。图3C至图3D为热图,示出了当DSPE-PEG2000未掺入脂质组合物中时,具有 45nm 至 145nm 的平均直径和 10% 至 50% 的PD百分比的LNP,但具有多峰粒径分布的大聚集体(直径为 500nm 至 1500nm)除外,如“超出范围”的黑点所示。还示出了总脂质浓度为 2mM 的样品的定量分析。图3E为条形图,示出了通过OD260测量样品等分试样(总脂质浓度为 2mM)中未封装的ASO量以计算封装浓度。结果为平均值 $\pm$ SD, $n=3$;ns, 不显著, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$, 通过双向ANOVA和之后的Tukey多重比较进行分析。此数据得到LC的确认。

[0056] 图4为条形图,示出了在不使用经聚乙二醇化的脂质所制备的LNP,其产生大聚集体。在不使用DSPE-PEG2000的条件下(筛选条件显示在图3C至图3D中的A行和E行中)所制备的负载ASO-1的LNP的平均粒径显示为平均值 $\pm$ SD, $n=3$;ns, 不显著, $*P<0.05$, $***P<0.001$, 通过双向ANOVA和之后的Sidak多重比较进行分析。

[0057] 图5A至图5C为负载ASO-1的阳离子LNP配制物的HTS分析。筛选的阳离子LNP表现出

60nm至120nm的平均直径(图5A)、10%至50%的多分散性(图5B),并且在经聚乙二醇化的脂质的不断增加的含量方面与MC3 LNP具有类似的趋势。不存在DSPE-PEG2000时,产生具有如“超出范围”的黑点所示的多峰粒径分布或白点所示的不完整测量(由于大聚集体)所示的大聚集体。还示出了总脂质浓度为2mM的样品的定量分析。(图5C)通过OD260测量样品中未封装的ASO的量以计算封装效率。结果为平均值 $\pm$ SD, $n=3$; ns, 不显著, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$, 通过双向ANOVA和之后的Tukey(图5A至图5B)或Sidak(图5C)多重比较进行分析。

[0058] 图6A至图6C为用总脂质浓度2mM的可电离脂质、不同含量的DSPE-PEG2000与不同载量的寡核苷酸所调配的负载ASO-2的LNP的HTS分析。结果在粒径(图6A)、多分散性(图6B)和ASO的封装效率(图6C)方面与负载ASO-1的LNP(图3A至图3E)显示出相似的趋势。结果为平均值 $\pm$ SD, $n=3$; ns, 不显著, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$, 通过双向ANOVA和之后的Tukey多重比较进行分析。

[0059] 图7A至图7E是与使用 NanoAssemblr[®] 得到的微流体制剂的结果相关的HTS分析结果。图7A为示出不断减小的粒径、不断增加的多分散性与含量不断增加的经聚乙二醇化的脂质的关系的图。LNP由不同莫耳比的DSPE-PEG2000与固定N/P比率(2)制备。图7B为示出在总脂质浓度下保持稳定的粒径的图。LNP在总脂质浓度为0.4、0.7、1或2mM、DSPE-PEG2000固定含量为1.5mol%且N/P比率为2的条件下制备。图7C至图7D示出了粒径(图7C)保持稳定,而ASO的%EE(图7D)在高和过量的ASO载量下降低。LNP在N/P比率为5、2、1或0.5且DSPE-PEG2000为1.5mol%的条件下制备。图7E. 为通过nanoassemblr或高通量溶剂注入在不同下制备的负载ASO-1的LNP的代表性低温TEM影像。放大影像示出使用两种方法以相同的调配参数制备的代表性LNP(由蓝色箭头指示)的相似结构模式。图(图7A、7C和7D)中的HTS结果由图3所示的相同的筛选实验得到。结果为平均值 $\pm$ SD, $n=3$, 不同的是图7D中的微流体结果 $n=1$ 。

[0060] 图8A至图8B示出了通过高通量溶剂注入法或 NanoAssemblr[®] 制备的负载ASO-1的MC3 LNP在4℃下储存2周的稳定性。图8A示出平均粒径,图8B为示出2周后的多分散性的图。总脂质浓度为2mM, N/P比率为1 (HTS样品) 或0.5 (NanoAssemblr[®] 样品), 且PEG含量在1.5mol%至5mol%之间变化。结果为平均值 $\pm$ SD, $n=3$; 与各组第0天的结果相比, $*P<0.05$ 且 $**P<0.01$, 通过单向ANOVA和之后的Dunnett多重比较进行分析。随后的研究(未示出)证明在4℃下储存1个月后得到了类似的结果。

[0061] 图9为示出图8A至图8B所示的HTS LNP在40℃下储存2周后的稳定性的图。结果为平均值 $\pm$ SD, $n=3$; 与各组第0天的结果相比, $*P<0.05$, 通过单向ANOVA和之后的Dunnett多重比较进行分析。

[0062] 图10为示出40℃下LNP ASO泄漏的图。2周内由LNP释放的ASO-1通过OD260测得。结果为平均值 $\pm$ SD, $n=3$; 与1.5mol% DSPE-PEG2000相比, $*P<0.05$ 且 ns (不显著), 通过双向ANOVA和之后的Dunnett多重比较进行分析。

[0063] 图11表明, 与负载ASO的LNP的微流体制剂相比, HTS方法显著节省了原料并改善了分析输出。计算包含1.5mol% DSPE-PEG2000且N/P比率(基于MC3和ASO-1)为1的2mM总脂质的典型样品所需的材料。

[0064] 图12A至图12B示出了定量分析ASO封装的替代方法。图12A为工作流程的示意图。通过高通量溶剂注入法制备负载ASO的LNP,并与荧光探针Sybr-gold混合,然后使用荧光酶标仪进行定量($E_x/E_m=495/550\text{nm}$)。图12B为示出在不同N/P比率下制备的两种不同LNP配制物的可比的%封装效率的图。结果为平均值 $\pm$ SD, $n=2$; ns, 不显著。

[0065] 图13A示出负载HiBiT肽的脂质体配制物的HTS工作流程。对两种纯化方法(包括高通量凝胶过滤和96孔板规格的透析)进行了比较。LNP通过高通量溶剂注入法合成,然后通过DLS表征粒径分布,通过UV-Vis、发光和荧光表征游离物含量。然后使用高通量凝胶过滤或透析纯化LNP,然后分别使用UV-Vis、荧光和DLS分析纯化效率、颗粒回收率和粒径稳定性。

[0066] 图13B为示出筛选设计的影像。在96孔板中筛选调配参数,包括不含MC3的DPPC LNP、含MC3的DPPC LNP、不含MC3的DSPC LNP和含MC3的DSPC LNP,与均保护经聚乙二醇化的脂质和与叠氮化物结合的经聚乙二醇化的脂质,每种条件下重复3次。

[0067] 图13C为热图,示出了当DSPE-PEG2000未掺入脂质组合物中时,具有50nm至200nm的平均直径的LNP,但具有多峰粒径分布的大聚集体除外,如“超出范围”的黑点所示。

[0068] 图13D至图13F为示出纯化前(图13D)和纯化后游离肽浓度的定量结果表。凝胶过滤和透析分别导致平均纯化效率为约98%(图13E)和约61%(图13F)。使用MWC0为40kD的96小柱板进行凝胶过滤,并用PBS洗脱。使用MWC0为10kD的96孔透析板在3L PBS中透析过夜,其间更换介质3次。透析后数据点的丢失是由于样品回收率低。

[0069] 图13G至图13H为显示通过凝胶过滤纯化后颗粒回收率和粒径的定量结果的数据。图13G回收率一般在80%至120%之间,但不使用经聚乙二醇化的脂质所制备的聚集样品的回收率较低。图13H粒径分布在通过凝胶过滤纯化后保持恒定。

具体实施方式

[0070] 由于其复杂的理化性质受各种调配参数的影响,用于药物递送的脂质纳米颗粒(LNP)制造具有挑战性。颗粒结构和粒径分布、颗粒表面理化性质、脂质含量、游离API量和封装效率以及LNP制造中的物理和化学稳定性的控制困难且复杂。通过常规批次方法筛选LNP调配参数(包括脂质种类、百分比、浓度和药物载量)需要大量时间和原料。因此,优选的是采用具有极少材料输入以及高效制备和分析输出的高通量筛选方法来确定具有最优质量属性的先导候选配制物。机器人液体处理器主要用于液体添加和转移,尚未用作具有微调的仪器参数的LNP调配器。此外,缺乏集成LNP制备与分析两者的简化的高通量工作流程。本文提供了用于基于所需特性优化LNP制造的高通量方法,该方法使用机器人液体处理器进行基于注入的LNP形成。本文进一步提供了优化的LNP颗粒及其制造方法。

[0071] 应理解,本文的描述仅为示例性和说明性的,并不限制本发明要求保护的范围。在本申请中,除非另外具体陈述,否则所用的单数包括复数。

[0072] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,而不应被解释为限制所描述的主题。本申请中所引用的所有文件或文件的部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍和论文,在此明确地出于所有目的通过援引以其全文并入本文。应理解,除非另外指示,否则根据本公开所用的下列术语具有下列含义:

[0073] 在本申请中,除非另外陈述,否则所用的“或”指的是“和/或”。此外,术语“包括

(including)”以及“其他形式诸如所包括(includes)”和“包括在内(included)”的使用并非限制性的。同样,除非另外具体陈述,否则诸如“要素”或“组分”等术语涵盖包含一个单元的要素和组分以及包含多于一个亚单位的要素和组分两种情况。

[0074] 如本文所用,术语“受试者”指的是任何动物(例如哺乳动物),包括但不限于人类、非人类灵长类动物、啮齿动物等,其将作为特定治疗的接受者。通常,术语“受试者”和“患者”在本文中就人类受试者而言可互换使用。

[0075] 术语“多核苷酸”、“核苷酸”或“核酸”包含单股及双股核苷酸聚合物。包含多核苷酸的核苷酸可为核糖核苷酸或去氧核糖核苷酸或任一类型的核苷酸的修饰形式。该修饰包括碱基修饰(诸如溴尿嘧啶核苷和肌苷衍生物)、核糖修饰(诸如2',3'-双去氧核糖),以及核苷酸间键合修饰(诸如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯(phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯(phosphoro-diselenoate)、缩苯胺硫代磷酸酯(phosphoro-anilothioate)、缩苯胺磷酸酯(phosphoraniladate)和酰胺磷酸酯(phosphoroamidate))。

[0076] 术语“寡核苷酸”指的是包含200个或更少核苷酸的多核苷酸。寡核苷酸可为单股或双股,例如,用于构建突变基因。寡核苷酸可为有义或反义寡核苷酸。寡核苷酸可包括标记(包括放射性标记、荧光标记、不完全抗原或抗原标记),其用于检测分析。寡核苷酸可用作例如PCR引物、克隆引物或杂交探针。

[0077] 术语“多肽”或“蛋白质”指的是具有蛋白质的氨基酸序列的大分子,包括天然序列的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代。术语“多肽”和“蛋白质”具体包括抗原结合分子、抗体或具有抗原结合蛋白的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的序列。术语“多肽片段”指的是与全长天然蛋白质相比具有氨基末端缺失、羧基末端缺失和/或内部缺失的多肽。该片段还可包含与天然蛋白质相比经修饰的氨基酸。可用多肽片段包括抗原结合分子的免疫功能片段。

[0078] 术语“经分离”指的是(i)不含至少一些通常与其一起发现的其他蛋白质,(ii)基本上不含来自相同来源(例如来自相同物种)的其他蛋白质,(iii)与至少约50%的多核苷酸、脂质、碳水化合物或与其在自然界中相关的其他材料分离,(iv)与在自然界中与其无关的多肽可操作地相关联(通过共价或非共价相互作用),或(v)不存在于自然界。

[0079] 多肽(例如,抗原结合分子)的“变异体”包含氨基酸序列,其中相对于另一多肽序列,一个或多个氨基酸残基被插入、缺失和/或取代至该氨基酸序列中。变异体包括例如融合蛋白。

[0080] 术语“同一性”指的是通过比对和比较序列所确定的两个或更多个多肽分子或两个或更多个核酸分子的序列之间的关系。“同一性百分比”指的是与所比较的分子中氨基酸或核苷酸相同的残基的百分比,其基于所比较的分子中最小的分子大小来计算。对于这些计算,比对中的差距(如果有的话)优选地是通过特定的数学模型或计算机程序(亦即“算法”)来解决。

[0081] 为计算同一性百分比,所比较的序列通常以提供序列间最大匹配的方式进行比对。可用于确定百分比同一性的计算机程序的一个示例为GCG程序包,其中包括GAP(Devereux等人,Nucl. Acid Res., 1984, 12, 387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)。利用计算机算法GAP比对要确定其百分比序列同一性的两个多肽或多核苷酸。比对序列以获得它们相应的氨基酸或核苷酸的最佳匹配(“匹配范围”,

如通过算法所确定)。在某些实施例中,算法还使用标准比较矩阵(参见例如:Dayhoff等人,1978,Atlas of Protein Sequence and Structure,5:345-352所述的PAM 250比较矩阵;Henikoff等人,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,89,10915-10919所述的BLO-SUM 62比较矩阵)。

[0082] 术语“衍生物”指的是包括除氨基酸(或核酸)插入、缺失或取代之外的化学修饰的分子。在某些实施例中,衍生物包含共价修饰,其包括但不限于与聚合物、脂质或其他有机或无机部分的化学键合。在某些实施例中,经化学修饰的抗原结合分子可具有比未经化学修饰的抗原结合分子更长的循环半衰期。在一些实施例中,衍生抗原结合分子经共价修饰以包括一种或多种水溶性聚合物连接,包括但不限于聚乙二醇、聚氧乙烯醇或聚丙二醇。

[0083] 肽类似物通常作为非肽类药物用于制药工业中,其性质类似于模板肽。这些类型的非肽化合物称为“肽模拟物”或“拟肽物”。Fauchere, J.L., 1986, Adv. Drug Res., 1986, 15, 29; Veber, D.F. 及 Freidinger, R.M., 1985, Trends in Neuroscience, 8, 392-396; 及 Evans, B.E. 等人, 1987, J. Med. Chem., 30, 1229-1239, 其出于所有目的通过援引并入本文。

[0084] 术语“治疗有效量”指的是确定在哺乳动物中产生治疗反应的免疫细胞或其他治疗剂的量。这样的治疗有效量易于由本领域普通技术人员确定。

[0085] 术语“患者”与“受试者”可互换使用,并包括人类及非人类动物受试者以及那些被正式诊断出病症的受试者、那些未正式确诊的受试者、那些接受医疗照顾的受试者、那些有罹患疾病风险的受试者等。

[0086] 术语“治疗”和“治疗方法”包括治疗性治疗、预防性治疗及降低受试者罹患疾病的风险或其他风险因素的应用。治疗无需完全治愈病症并且涵盖减轻症状或潜在风险因素的实施例。术语“预防”不要求100%消除事件发生的可能性。相反,它表示在化合物或方法的存在下,降低了事件发生的可能性。

[0087] 标准技术可用于重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如,电穿孔、脂质转染)。酶促反应和纯化技术可根据制造商的说明书或如本领域中通常实现或如本文所述的方法进行。上述方法和程序通常根据本领域所熟知的常规方法执行,并如本说明书通篇所引用和所讨论的各种一般性和更具体的参考文献中所述。参见例如:Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), 其出于所有目的通过援引并入本文。

[0088] 如本文所用,术语“实质上”或“基本上”指的是数量、含量、值、数值、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度为参考数量、含量、值、数值、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度的约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一个实施例中,术语“基本上相同”或“实质上相同”指的是数量、含量、值、数值、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度与参考数量、含量、值、数值、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度大致相同。

[0089] 如本文所用,术语“实质上不含”与“基本上不含”可互换使用,并且当用于描述组合物诸如细胞群或培养基时,指的是组合物不含指定物质,诸如95%、96%、97%、98%、99%不含指定物质,或通过常规方法测量时无法检出。类似的含义可应用于术语“不存在”,其指的是不存在组合物的特定物质或成分。

[0090] 如本文所用,术语“明显的”指的是通过一种或多种标准方法易于检出的数量、含

量、值、数值、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度的范围或事件。术语“不明显的”和“不明显”及其等同形式指的是通过标准方法不易检出或无法检出的数量、含量、值、数值、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度的范围或事件。在一个实施例中，如果事件发生的时间少于5%、4%、3%、2%、1%、0.1%、0.001%或更少，则其不明显。

[0091] 在整个说明书中，除非上下文另有要求，否则词语“包含 (comprise/comprises/comprising)”将被理解为暗示包括所述步骤或要素或步骤组或要素组，但不排除任何其他步骤或要素或步骤组或要素组。在特定实施例中，术语“包括”、“具有”、“含有”和“包含”同义使用。

[0092] 如本文所用，“由……组成”指的是包括并限于“由……组成”之后的任何内容。因此，短语“由……组成”表示所列要素为必需或强制性的，并且不得存在其他要素。

[0093] “基本上由……组成”指的是包括在该短语之后列出的任何药物，并且限于不干扰或有助于本公开中针对所列要素所规定的活动或作用的其他元素。因此，短语“基本上由……组成”表示所列要素为必需的或强制性的，但没有其他要素是可选的，并且其他要素可能存在或不存在，取决于它们是否影响所列要素的活动或作用。

[0094] 贯穿本说明书，对“一个实施例”、“一实施例”、“实施例”、“相关实施例”、“某个实施例”、“一个附加实施例”或“另一个实施例”或其组合的引用指的是结合该实施例所述的特定特征、结构或特性包括在本发明的至少一个实施例中。因此，在本说明书各处出现的上述短语不一定指同一个实施例。此外，特定特征、结构或特性可在一个或多个实施例中以任何合适的方式组合。

[0095] 如本文所用，术语“约”或“大约”指的是数量、含量、值、数值、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度相对于参考数量、含量、值、数值、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度变化多达30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。在特定实施例中，当在数值之前时，术语“约”或“大约”表示该值加上或减去15%、10%、5%或1%的范围或其任何中间范围。

[0096] 用于优化脂质纳米颗粒的制造的高通量筛选方法

[0097] 为解决基于脂质的纳米药物的筛选及优化的需求，本公开提供了用于制备脂质纳米颗粒的高通量筛选 (HTS) 工作流程以及其粒径分布和有效载荷封装的表征。

[0098] 在各种实施例中，本公开涉及用于优化脂质纳米颗粒 (LNP) 的制造的高通量筛选方法。在各种实施例中，本文所公开的方法利用一种高通量筛选 (HTS) 工作流程，该工作流程包括：(i) 机器人液体处理器；(ii) 至少一台能够测量所需LNP特性的仪器；以及(iii) 至少一个微孔板，其中该微孔板包含多个微孔。在各种实施例中，LNP通过上述HTS过滤工作流程使用溶剂注入法形成。参见例如：Gentine等人，2012, *J Liposome Res.* 22, 18-30；Schubert及Muller-Goymann, 2003, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55, 125-131。

[0099] 在各种实施例中，HTS工作流程包括能够测量所需LNP特性的仪器。此类特性包括封装效率、平均粒径和粒径分布。物理稳定性还可通过测量储存后不同时间点的粒径和有效载荷释放来确定。此类分析技术为本领域已知的，并且包括扫描/透射电子显微镜 (SEM/TEM)、原子力显微镜 (AFM)、分析型超速离心 (AUC)、动态光散射 (DLS)、紫外 (UV) 光谱和流场分级 (FFF)。在各种实施例中，HTS工作流程包括能够实施DLS、UV-Vis或荧光光谱法的仪器。在各种实施例中，本文所公开的方法利用一种高通量筛选 (HTS) 工作流程，该工作流程包

括：(i) 机器人液体处理器；(ii) 能够执行DLS的仪器；(iii) 能够对样品进行UV-Vis或荧光光谱法分析的仪器；以及(iv) 至少一个微孔板，其中该微孔板包含多个微孔。

[0100] 在各种实施例中，HTS工作流程提供了一种使用溶剂注入系统优化LNP制造的方法。如本文所用，“溶剂注入系统”指的是将包含自组装分子（包含脂质）的第一溶液快速注入第二溶液中。在各种实施例中，该溶液为可混合的或可混溶的。在各种实施例中，该第一溶液为水溶性溶剂。在各种实施例中，至少一种溶液为有机相溶剂。丙酮、乙醇、异丙醇和甲醇皆为适用于LNP制剂的溶剂。在各种实施例中，该第一溶液为醇。在各种实施例中，该第一溶液为乙醇。在各种实施例中，该第一溶液为甲醇。

[0101] 在各种实施例中，将LNP所封装的有效载荷溶解于该第二溶液中。在各种实施例中，将LNP所封装的有效载荷溶解于该第一溶液中。在各种实施例中，有效载荷由第三水溶性溶剂封装。

[0102] 在各种实施例中，溶液中的至少两种为不同的相。在各种实施例中，将三种溶液注入彼此之中。在各种实施例中，将至少四种溶液注入彼此之中。在各种实施例中，存在至少一个有机相和至少一个水相。

[0103] 在各种实施例中，溶液中的一种包含水性溶剂。在各种实施例中，该水性溶剂为水性缓冲剂。

[0104] 一种溶液注入另一种溶液的过程由机器人液体处理器控制。如本文所用，术语“机器人液体处理器”指的是能够将液体自动平行移取、转移和混合到多个孔、微孔或其他储液器中的装置。在各种实施例中，该机器人液体处理器能够将不同组成或不同量的液体平行递送至不同的孔、微孔或储液器。在各种实施例中，该机器人液体处理器能够以变化的速度或持续时间将液体平行移取、转移和混合至不同的孔、微孔或储液器。

[0105] 在各种实施例中，将该一种溶液注入该第二溶液后，机器人液体处理器反复吸取并重新注入该溶液，从而将该至少两种溶液混合。在各种实施例中，改变该注入和/或混合的速度及持续时间以确定用于LNP形成的最优参数。在各种实施例中，注入和/或混合的速度在0.1ml/s至0.9ml/s之间变化。在各种实施例中，初始注入速度（即液体的首次注入）以0.1ml/s至0.9ml/s的速度执行。参见图1。在各种实施例中，后续注入/混合在1s至10s的范围内进行（以0.1ml/s至0.9ml/s混合10次）。

[0106] 在各种实施例中，LNP形成在至少一个微孔板中完成。在各种实施例中，微孔板由多个微孔组成，其中各微孔之间的形成条件（例如脂质种类、脂质组合物、总脂质浓度、有效载荷、有效载荷载量比、相种类）是变化的。微孔板可具有任何尺寸，并包含任意数量的微孔。在各种实施例中，微孔板包含4、6、8、12、24、48、96、384、1536个微孔。

[0107] 本文所述的HTS方法的一个优势在于LNP形成能够在少量溶液中迅速发生。本文所公开的方法将材料消耗量减少10倍，并将工艺输出提高了100倍（参见图11）。在微孔中形成LNP所用的材料比例如使用基于微流体的制备方法形成LNP所用的材料少得多。在各种实施例中，微孔的体积为约10 μ L、约20 μ L、约30 μ L、约40 μ L、约50 μ L、约60 μ L、约70 μ L、约80 μ L、约90 μ L、约100 μ L、约125 μ L、约150 μ L、约175 μ L、约200 μ L、约250 μ L、约350 μ L、约360 μ L、约400 μ L、约500 μ L、约1000 μ L、约2000 μ L、约3000 μ L、约4000 μ L。

[0108] 脂质纳米颗粒（LNP）

[0109] 本文提供了优化的脂质纳米颗粒以及优化这些脂质纳米颗粒“LNP”的制造的方法

法。如本文所用,术语“脂质纳米颗粒”或“LNP”指的是包含以下的组合物:(i)多个自组装分子,其中该自组装分子包含脂质组分;以及(ii)有效载荷。其制造使用本发明得到优化的LNP可用于任何目的。在各种实施例中,该优化的LNP可用于递送疫苗。在各种实施例中,该优化的LNP可用于将药物递送至有需要的患者。LNP可携带任何有效载荷,包括但不限于核酸、多肽、蛋白质和小分子。此外,LNP可仅由脂质(例如脂质体)组成,还可包括能够自组装的其他成分诸如聚合物或蛋白质。

[0110] 在各种实施例中,LNP为使用上述技术制造的优化的LNP。在各种实施例中,该经优化的LNP通过包括以下步骤的制程制造:(i)获得包含水相的第一溶液;(ii)获得包含有机相和多个能够自组装的分子的第二溶液,并且其中该第一溶液和该第二溶液是可混合的;(iii)将至少一种有效载荷分子溶解于该第一溶液或该第二溶液中;(iv)使用机器人液体处理器制备具有不同组成的该相并将该相分配至多个孔中;(v)在适合LNP形成的条件下,使用该机器人处理器混合该第一溶液和该第二溶液以获得封装该有效载荷的脂质纳米颗粒;其中不同孔之间,以下条件中的至少一者是不同的:自组装分子的类型,该自组装分子的组成比率;该自组装分子与该有效载荷的比率和/或浓度、相的选择、缓冲剂类型和pH、注入顺序、注入速度、混合速度、体积、相比率、注入持续时间和混合持续时间;(vi)测量以下中的至少一者:该LNP的封装效率、粒径分布、纯化和颗粒回收率以及配制物稳定性;(vii)确定用于制造该LNP制剂的最优参数;以及(viii)基于该最优参数制造该LNP制剂。

[0111] 在各种实施例中,本发明涉及使用包括以下步骤的高通量方法制造LNP的方法:(i)获得包含水相的第一溶液;(ii)获得包含有机相和多个能够自组装的分子的第二溶液,并且其中该第一溶液和该第二溶液是可混合的;(iii)将至少一种有效载荷分子溶解于该第一溶液或该第二溶液中;(iv)使用机器人液体处理器制备具有不同组成的该相并将该相分配至多个孔中;(v)在适合LNP形成的条件下,使用该机器人处理器混合该第一溶液和该第二溶液以获得封装该有效载荷的脂质纳米颗粒。

[0112] 自组装分子

[0113] 如本文所用,术语“自组装分子”指的是任何能够在没有外源引导或管理的情况下实现确定的排列的分子。该优化的LNP可由单一种类的自组装分子组成,或者可由多个种类的自组装分子组成。在各种实施例中,该优化的LNP包括脂质成分与至少一种脂质分子。在各种实施例中,该LNP可包括聚合物分子和/或蛋白质/肽分子。在各种实施例中,该LNP的自组装分子可以仅包括脂质分子。

[0114] 脂质组分可包含单一脂质种类,或者可包括多于一种类型的脂质。在本发明的各种实施例中,LNP制剂中脂质的相对组成将是变化的。在各种实施例中,当考虑用于制造给定LNP配制物的最优参数时,将评估不同种类的脂质或不同的脂质种类组合。在各种实施例中,至少一个脂质分子经聚乙二醇化。在各种实施例中,脂质组分可包含磷脂。

[0115] 在各种实施例中,LNP配制物可包含一种或多种阳离子或可电离脂质。在一些实施例中,该一种或多种阳离子脂质选自由以下项组成的组:cKK-E12、OF-02、C12-200、MC3、DLinDMA、DLinkC2DMA、ICE(基于咪唑)、HGT5000、HGT5001、HGT4003、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA和DMDMA、DODAC、DLenDMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、KLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、3-(4-(双(2-羟基十二烷基)氨基)丁基)-6-(4-((2-羟基十二烷基)(2-羟基十一烷基)氨基)丁基)-1,4-

二恶烷-2,5-二酮(标靶23)、3-(5-(双(2-羟基十二烷基)氨基)戊-2-基)-6-(5-((2-羟基十二烷基)(2-羟基十一烷基)氨基)戊-2-基)-1,4-二恶烷-2,5-二酮(标靶24)、N1GL、N2GL、V1GL以及其组合。

[0116] 在一些实施例中,该一种或多种阳离子或可电离脂质为氨基脂质。在各种实施例中,氨基脂质为一级胺、二级胺、三级胺、四级胺、吡咯啉或哌啉。适用于本发明的氨基脂质包括W02017180917中所述的那些,其通过援引并入本文。W02017180917中的示例性氨基脂质包括段落[0744]中所述的那些,诸如DLin-MC3-DMA(MC3)、(13Z,16Z)-N,N-二甲基-3-壬基二十二碳-13,16-二烯-1-胺(L608)以及化合物18。其他氨基脂质包括化合物2、化合物23、化合物27、化合物10和化合物20。适用于本发明的另外的氨基脂质包括W02017112865中所述的那些,其通过援引并入本文。W02017112865中的示例性氨基脂质包括如式(I)、(Ia1)至(Ia6)、(Ib)、(II)、(IIa)、(III)、(IIia)、(IV)、(17-1)、(19-1)、(19-11)和(20-1)中的一个所述的化合物以及如段落[00185]、[00201]、[0276]中所述的化合物。在一些实施例中,适用于本发明的阳离子脂质包括W02016118725中所述的那些,其通过援引并入本文。W02016118725中的示例性阳离子脂质包括诸如KL22和KL25的那些。在一些实施例中,适用于本发明的阳离子脂质包括W02016118724中所述的那些,其通过援引并入本文。W02016118725中的示例性阳离子脂质包括诸如KL10、1,2-二亚油酰氧基-N,N-二甲氨基丙烷(DLin-DMA)和KL25。

[0117] 在一些实施例中,LNP配制物将包含一种或多种非阳离子脂质。在一些实施例中,该一种或多种非阳离子脂质选自:DSPC(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱)、DPPC(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱)、DOPE(1,2-二油基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DOPC(1,2-二油基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱)、DPPE(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DMPE(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)、DOPG(1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸-(1'-外消旋(rac)-甘油))。

[0118] 在一些实施例中,LNP配制物包含一种或多种经PEG修饰的脂质。在一些实施例中,该一种或多种经PEG修饰的脂质包含长度达5kDa的聚乙二醇链,该聚乙二醇链共价连接至具有长度为C₆-C₂₀的烷基链的脂质。PEG脂质可选自由以下项组成的非限制性组:经PEG修饰的磷脂酰乙醇胺(phosphatidyletanolamines)、经PEG修饰的磷脂酸、经PEG修饰的神经酰胺、经PEG修饰的二烷基胺、经PEG修饰的二酰基甘油以及经PEG修饰的二烷基甘油。例如,PEG脂质可为PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC或PEG-DSPE脂质。

[0119] 在各种实施例中,LNP内经聚乙二醇化的脂质的百分比(亦即PEG密度)是变化的。已发现LNP中的聚乙二醇(PEG)密度影响粒径、表面电荷和稳定性。在各种实施例中,PEG密度在约0.1%与约10%之间变化。在各种实施例中,PEG密度在约0.2%与约9%之间变化。在各种实施例中,PEG密度在约0.3%与约8%之间变化。在各种实施例中,PEG密度在约0.4%与约7%之间变化。在各种实施例中,PEG密度在约0.5%与约6%之间变化。在各种实施例中,PEG密度在约0.5%与约5%之间变化。

[0120] 在各种实施例中,改变存在于LNP制剂溶液中的脂质组分的总浓度以便实现任何给定LNP的最优特性。在各种实施例中,该脂质的总浓度在约0.1mM与约8mM之间变化。在各种实施例中,该脂质的总浓度在约0.2mM与约7mM之间变化。在各种实施例中,该脂质的总浓度在约0.3mM与约6mM之间变化。在各种实施例中,该脂质的总浓度在约0.4mM与约4mM之间

变化。在各种实施例中,该脂质的总浓度在约0.5mM与约3mM之间变化。

[0121] 在各种实施例中,该LNP将包含多于一种类型或种类的脂质。在各种实施例中,该LNP将包含至少2种类型的脂质。在各种实施例中,该LNP将包含至少3种类型的脂质。在各种实施例中,该LNP将包含至少4种类型的脂质。在各种实施例中,该LNP将包含至少5种类型的脂质。在各种实施例中,该LNP将包含至少6种类型的脂质。在各种实施例中,该LNP将包含至少7种类型的脂质。

[0122] 纳米颗粒组合物的脂质组分可包括一种或多种结构脂质。本发明的纳米颗粒组合物可包括结构脂质(例如,胆固醇粪生甾醇(fecosterol)、植物固醇、菜油固醇、豆甾醇、芸苔甾醇、麦角甾醇、番茄次碱、番茄碱、熊果酸或 α -生育酚)。

[0123] 纳米颗粒组合物的脂质组分可包一种或多种磷脂,诸如一种或多种(多)不饱和脂质。一般而言,此类脂质可包括磷脂部分以及一个或多个脂肪酸部分。

[0124] 磷脂部分可选自由以下项组成的非限制性组:磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝胺酸、磷脂酸、2-溶血磷脂酰胆碱和鞘磷脂。脂肪酸部分可选自由以下项组成的非限制性组:月桂酸、肉豆蔻酸、肉豆蔻油酸、棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸、油酸、次亚麻油酸、 α -次亚麻油酸、芥子酸、植烷酸、花生酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十二酸、二十二碳五烯酸及二十二碳六烯酸。还考虑非天然种类,包括具有包括支化、氧化、环化和炔烃在内的修饰和取代的天然种类。

[0125] 在一些实施例中,纳米颗粒组合物可包括1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或DSPC与DOPE两者。可用于本发明的组合物和方法的磷脂可选自由以下项组成的非限制性组: DSPC、DOPE、1,2-二亚油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-双十一烷酰基-sn-甘油基-磷酸胆碱(DUPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二-0-十八碳烯基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(18:0二酰PC)、1-油酰基-2-胆固醇基半琥珀酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(0ChemsPC)、1-十六基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱、1,2-二植烷酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0PE)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸-外消旋-(1-甘油)钠盐(DOPG)以及鞘磷脂。

[0126] LNP组合物可包含一种或多种除上述部分中所述的成分之外的成分。例如,纳米颗粒组合物可包括一种或多种疏水小分子,诸如维生素(例如,维生素A或维生素E)或甾醇。

[0127] LNP组合物还可包括一种或多种通透性增强剂分子、碳水化合物、聚合物、治疗剂、表面改性剂或其他成分。通透性增强剂分子可为例如美国专利申请公开号2005/0222064中所述的分子。碳水化合物可包括单糖(例如,葡萄糖)和多糖(例如,糖原以及其衍生物和类似物)。

[0128] 聚合物可包括在内且/或用于封装或部分封装LNP组合物。聚合物可以是可生物降解的和/或生物相容的。聚合物可选自但不限于聚胺、聚醚、聚酰胺、聚酯、聚氨基甲酸酯、聚

脲、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚酰亚胺、聚砜、聚胺甲酸酯、聚乙炔、聚乙烯、聚乙烯亚胺、聚异氰酸酯、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯腈和聚芳酯。例如,聚合物可包括聚(己内酯)(PCL)、乙烯醋酸乙烯聚合物(EVA)、聚(乳酸)(PLA)、聚(L-乳酸)(PLLA)、聚(乙醇酸)(PGA)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、聚(L-乳酸-共-乙醇酸)(PLLGA)、聚(D,L-丙交酯)(PDLA)、聚(L-丙交酯)(PLLA)、聚(D,L-丙交酯-共-己内酯)、聚(D,L-丙交酯-共-己内酯-共-乙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-PEO-共-D,L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-PP0-共-D,L-丙交酯)、聚氰基丙烯酸烷基酯、聚胺甲酸酯、聚-L-离胺酸(PLL)、甲基丙烯酸羟丙酯(HPMA)、聚乙二醇、聚-L-赖氨酸、聚(羟基酸)、聚酐、聚原酸酯、聚(酯酰胺)、聚酰胺、聚(酯醚)、聚碳酸酯、聚烯炔诸如聚乙烯和聚丙烯、聚亚烷基二醇诸如聚(乙二醇)(PEG)、聚环氧烷(PEO)、聚亚烷基对苯二甲酸酯诸如聚(乙烯对苯二甲酸酯)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯醚、聚乙烯酯诸如聚(醋酸乙烯酯)、聚卤乙烯诸如聚(氯乙烯)(PVC)、聚乙烯吡咯烷酮、聚矽氧烷、聚苯乙烯(PS)、聚胺甲酸酯、衍生纤维素诸如烷基纤维素、羟烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、丙烯酸聚合物诸如聚(甲基)丙烯酸甲酯(PMMA)、聚((甲基)丙烯酸乙酯)、聚((甲基)丙烯酸丁酯)、聚((甲基)丙烯酸异丁酯)、聚((甲基)丙烯酸己酯)、聚((甲基)丙烯酸异癸酯)、聚((甲基)丙烯酸月桂酯)、聚((甲基)丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)、聚(丙烯酸十八酯)及其共聚物和混合物、聚二氧杂环己酮及其共聚物、聚羟基股烷酸酯、丙烯富马酸聚合体、聚甲醛、泊洛沙姆(poloxamer)、聚𪔐胺(polyoxamine)、聚(原)酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)、聚(丙交酯-共-己内酯)以及三亚甲基碳酸酯、聚乙烯吡咯烷酮。

[0129] 治疗剂可包括但不限于细胞毒性剂、化疗剂和其他治疗剂。细胞毒性剂可包括例如紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、二羟基蒽醌(dihydroxyanthracenedione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神霉素(mithramycin)、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因(procaine)、四卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)、嘌呤霉素、美登素(maytansinoid)、雷切霉素(rachelmycin)和其类似物。放射性离子也可用作治疗剂,并可包括例如放射性碘、锶、磷、钋、铯、铊、钍、钷、钆、钷、钆和镨。其他治疗剂可包括例如抗代谢药(例如氨甲蝶呤、6-巯嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷(cytarabine)和5-氟尿嘧啶以及达卡巴仁(decarbazine)、烷化剂(例如,甲氯乙胺、噻替哌(thiotepa)、苯丁酸氮芥、雷切霉素、霉法兰(melphalan)、双氯乙基亚硝脲、洛莫司汀(lomustine)、环磷酰胺、硫酸布他卡因(busulfin)、二溴甘露醇、链佐霉素、丝裂霉素C和顺式二氯二胺铂(II)(DDP)以及顺铂(cisplatin))、蒽环类(例如柔红霉素和阿霉素)、抗生素(例如,放线菌素、博来霉素、光神霉素和蒽霉素)以及抗有丝分裂剂(例如,长春新碱、长春碱、紫杉醇和美登素)。

[0130] 表面修饰剂可包括但不限于阴离子蛋白质(例如牛血清白蛋白)、界面活性剂(例如,阳离子界面活性剂诸如二甲基二十八烷基溴化铵)、糖或糖衍生物(例如,环糊精)、核酸、聚合物(例如,肝素、聚乙二醇和泊洛沙姆)、粘液溶解剂(例如,乙酰半胱氨酸、艾、凤梨酶、木瓜蛋白酶、花环菌素(clerodendrum)、溴己新(carbocysteine)、羧甲司坦(carbocysteine)、依普拉酮(eprazinone)、美司钠(mesna)、氨溴索(ambroxol)、索布罗尔(sobrerol)、多碘醇(domiodol)、莱托司坦(letosteine)、司替罗宁(steproin)、硫普罗宁

(tiopronin)、凝溶胶蛋白(gelsolin)、胸腺素134、阿法链道酶(dornase alfa)、奈替克新(neltenexine)和厄多司坦(erdosteine))以及DNase(例如,rhDNase)。表面修饰剂可布置在LNP内和/或LNP组合物的表面上(例如,通过涂覆、吸附、共价键结或其他方法)。

[0131] 除这些成分之外,本发明的LNP组合物可包括任何可用于药物组合物的物质。例如,LNP组合物可包括一种或多种药用赋形剂或辅助成分,诸如但不限于一种或多种溶剂、分散介质、稀释剂、分散助剂、悬浮助剂、造粒助剂、崩解剂、填充剂、助滑剂、液体载体、粘合剂、界面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、缓冲剂、润滑剂、油、防腐剂以及其他物质。还可包括赋形剂,诸如蜡、黄油、着色剂、包衣剂、调味剂和香化剂。药用赋形剂为本领域中所熟知的(参见例如:Remington's The Science and Practice of Pharmacy,21st Edition,A.R.Gennaro;Lippincott,Williams&Wilkins,Baltimore,Md.,2006)。

[0132] 稀释剂的实例可包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙、磷酸二钙、硫酸钙、磷酸氢钙、磷酸乳糖钠、蔗糖、纤维素、微晶纤维素、高岭土、甘露醇、山梨醇、肌醇、氯化钠、干淀粉、玉米淀粉、糖粉以及/或它们的组合。造粒剂和分散剂可选自由以下各项所组成的非限制性列表:马铃薯淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉、羟基乙酸淀粉钠、粘土、海藻酸、瓜尔胶、柑橘渣、琼脂、膨土、纤维素和木制品、天然海绵、阳离子交换树脂、碳酸钙、硅酸盐、碳酸钠、交联聚(乙烯吡咯烷酮)(交联聚维酮)、羧甲基淀粉钠(羟基乙酸淀粉钠)、羧甲基纤维素、交联羧甲基纤维素钠(交联羧甲基纤维素)、甲基纤维素、预胶化淀粉(淀粉1500)、微晶淀粉、水不溶性淀粉、羧甲基纤维素钙、镁铝硅酸盐(VEEGUM®)、月桂硫酸钠、四级铵化合物以及/或它们的组合。

[0133] 界面活性剂和/或乳化剂可包括但不限于天然乳化剂(例如阿拉伯胶、琼脂、海藻酸、海藻酸钠、黄蓍胶、软骨素、胆固醇、黄原胶、果胶、明胶、蛋黄、酪蛋白、毛脂、胆固醇、蜡和卵磷脂)、胶体粘土(例如膨土[铝]及VEEGUM®[镁铝硅酸盐])、长链氨基酸衍生物、高分子量醇(例如硬脂醇、鲸蜡醇、油醇、单硬脂酸甘油三酸乙酯、二硬脂酸乙二醇酯、单硬脂酸甘油酯和单硬脂酸丙二醇酯、聚乙烯醇)、卡波姆(carbomer)(例如羧基聚亚甲基、聚丙烯酸、丙烯酸聚合物和羧乙烯基聚合物)、鹿角菜胶、纤维素衍生物(例如羧甲基纤维素钠、粉状纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素)、山梨糖醇脂肪酸酯(例如聚氧乙烯山梨糖醇单月桂酸酯[TWEEN®20]、聚氧乙烯山梨糖醇[TWEEN®60]、聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯[TWEEN®80]、山梨糖醇单棕榈酸酯[SPAN®40]、山梨糖醇单硬脂酸酯[SPAN®60]、山梨糖醇三硬脂酸酯[SPAN®65]、单油酸甘油酯、山梨糖醇单油酸酯[SPAN®80])、聚氧乙烯酯(例如聚氧乙烯单硬脂酸酯[MYRJ®45]、聚氧乙烯氢化蓖麻油、聚乙氧基化蓖麻油、聚氧亚甲基硬脂酸酯和SOLUTOL®)、蔗糖脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯(例如CREMOPHOR®)、聚氧乙烯醚(例如聚氧乙烯月桂基醚[BRIJ®30])、聚(乙烷基-吡咯烷酮)、二乙二醇单月桂酸酯、油酸三乙醇胺、油酸钠、油酸钾、油酸乙酯、油酸、月桂酸乙酯、月桂硫酸钠、PLURONIC®F68、POLOXAMER®188、西曲溴铵(cetrimonium bromide)、氯化十六烷基吡啶、杀藻胺、多库酯钠硅酸以及/或它们的组合。

[0134] 粘合剂可为淀粉(例如玉米淀粉和淀粉糊);明胶;糖(例如,蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糊精、糖蜜、乳糖、乳糖醇、甘露醇);天然和合成胶(例如,阿拉伯胶、海藻酸钠、爱尔兰苔萃

取物、panwar胶、甘地胶、车前子粘液(mucilage of isapol husks)、羧甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素、醋酸纤维素、聚(乙烯基吡咯烷酮)、硅酸镁铝(VEEGUM®)和落叶松阿拉伯半乳聚糖(larch arabinogalactan));藻酸盐;聚环氧乙烷;聚乙二醇;无机钙盐;硅酸;聚甲基丙烯酸酯;蜡;水;醇;以及其组合,或任何其他合适的粘合剂。

[0135] 防腐剂包括但不限于抗氧化剂、螯合剂、抗菌防腐剂、抗真菌防腐剂、酒精防腐剂、酸性防腐剂和/或其他防腐剂。抗氧化剂包括但不限于 α -生育酚、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚、丁基羟基甲苯、硫代甘油、偏二亚硫酸钾、丙酸、五倍子酸丙酯、抗坏血酸钠、亚硫酸氢钠、偏二亚硫酸钠和/或亚硫酸钠。螯合剂包括乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸一水合物、依地酸二钠(disodium edetate)、依地酸二钾、依地酸、延胡索酸、苹果酸、磷酸、依地酸钠、酒石酸和/或依地酸三钠。抗菌防腐剂包括但不限于杀藻胺、氯化苯索宁、苯甲醇、溴硝醇、溴化十六基三甲铵、氯化十六烷基吡啶、洛赫西定(chlorhexidine)、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲酚、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶(hexetidine)、咪唑烷基脲(imidurea)、苯酚、苯氧乙醇、苯乙醇、硝酸苯汞、丙二醇和/或乙汞硫柳酸钠。抗真菌防腐剂包括但不限于对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸、羟基苯甲酸、苯甲酸钾、山梨酸钾、苯甲酸钠、丙酸钠和/或山梨酸。醇类防腐剂的实例包括但不限于乙醇、聚乙二醇、苯酚、苯甲醇、酚类化合物、双酚、氯丁醇、羟基苯甲酸酯和/或苯乙醇。酸性防腐剂的实例包括但不限于维生素A、维生素C、维生素E、 β -胡萝卜素、柠檬酸、乙酸、脱氢抗坏血酸、抗坏血酸、山梨酸和/或植酸。其他防腐剂包括但不限于生育酚、生育酚乙酸酯、甲磺酸得立肟(deteroxime mesylate)、溴化十六基三甲铵、丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、乙二胺、月桂硫酸钠(SLS)、月桂醇聚醚硫酸酯钠(SLES)、亚硫酸氢钠、偏二亚硫酸钠、亚硫酸钾、偏二亚硫酸钾、GLYDANT PLUS®、PHENONIP®、对羟基苯甲酸甲酯、GERMALL® 115、GERMABEN® II、NEOLONE™、KATHON™和/或EUXYL®。

[0136] 缓冲剂的实例包括但不限于柠檬酸盐缓冲剂溶液、乙酸盐缓冲剂溶液、磷酸盐缓冲剂溶液、氯化铵、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、葡乳醛酸钙(calcium glubionate)、葡庚糖酸钙、葡萄糖酸钙、d-葡萄糖酸、甘油磷酸钙、乳酸钙、乳糖酸钙、丙酸、乙酰丙酸钙、戊酸、磷酸氢钙、磷酸、磷酸三钙、氢氧化磷酸钙、醋酸钾、氯化钾、葡萄糖酸钾、钾混合物、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸钾混合物、乙酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、柠檬酸钠、乳酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸钠混合物、三木甲胺、氨基磺酸缓冲剂(例如HEPES)、氢氧化镁、氢氧化铝、海藻酸、无热原水、等渗盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、乙醇以及/或其组合。润滑剂可选自由以下项组成的非限制性组:硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、二氧化硅、滑石、麦芽、二十二酸甘油酯、氢化植物油、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、白胺酸、月桂硫酸镁、月桂硫酸钠以及其组合。

[0137] 油的实例包括但不限于杏仁油、杏核油、鳄梨油、巴巴苏油、佛手柑油、黑木耳油、琉璃苣油、杜松油、甘菊油、油菜油、香菜油、巴西棕榈油、蓖麻油、肉桂油、可可脂油、椰子油、鳕鱼肝油、咖啡油、玉米油、棉籽油、鸚鵡油、桉树油、月见油、鱼油、亚麻籽油、香叶醇油、葫芦油、葡萄籽油、榛子油、牛膝草油、肉豆蔻酸异丙酯、荷荷芭油、苦葵果油、熏衣花油、熏

衣草油、柠檬油、山胡椒油、澳洲坚果油、锦葵油、芒果籽油、白芒花籽油、水貂油、肉豆蔻油、橄榄油、橙油、大西洋胸棘鲷油、棕榈油、棕榈仁油、桃仁油、花生油、罂粟籽油、南瓜籽油、油菜籽油、米糠油、迷迭香油、红花油、檀香油、sasquana油、欧洲薄荷油、沙棘油、芝麻油、乳木果油、矽油、大豆油、葵花油、茶树油、蓟油、椿油、香根草油、核桃油和小麦胚芽油以及硬脂酸丁酯、辛酸甘油三酯、癸酸甘油三酯、环甲基矽油、癸二酸二乙酯、二甲基矽油360、甲基矽油、肉豆蔻酸异丙酯、矿物油、辛基十二烷醇、油醇、矽油以及/或其组合。

[0138] 在各种实施例中,该LNP可为脂质体。在各种实施例中,该LNP可为聚合物-脂质纳米颗粒。在各种实施例中,该LNP可包括其他蛋白质或肽分子。

[0139] 有效载荷

[0140] 本发明的LNP被制造成封装有效载荷。术语“有效载荷”指的是与本公开所述的脂质纳米颗粒配制物复合的任何化学实体、医药、药物(这类药物可为但不限于小分子、无机固体、聚合物或生物聚合物)、小分子、核酸(例如,DNA、RNA、siRNA等)、蛋白质、肽等。有效载荷还涵盖用于治疗或预防疾病、病症、病痛或身体机能障碍的候选物(例如,具有未知结构和/或功能的),包括但不限于作为已知与潜在治疗化合物的测试化合物。测试化合物可通过本公开的筛选方法进行筛选以确定其具有治疗作用。

[0141] 在各种实施例中,该有效载荷由一种或多种核苷酸组成。例如,在各种实施例中,该有效载荷为寡核苷酸。在各种实施例中,这样的封装有效载荷的LNP的特征可在于N:P比率。如本文所用,“N/P比率”指的是带正电荷的聚合物胺(N=氮)基团与带负电荷的核酸磷酸酯(P)基团的比率。N/P比率在细胞内有效载荷递送中发挥重要作用。在各种实施例中,该有效载荷的N:P比率是变化的。在各种实施例中,N:P比率在约0.5至约5之间变化。在各种实施例中,N:P比率在约0.25与约10之间变化。在各种实施例中,N:P比率为约0.1、约0.2、约0.25、约.5、约1、约1.5、约2、约2.5、约3、约3.5、约4、约4.5、约5、约6、约7、约8、约9或约10。

[0142] 在各种实施例中,该有效载荷为寡核苷酸。在各种实施例中,该寡核苷酸为反义分子。在各种实施例中,该寡核苷酸为siRNA。在各种实施例中,该寡核苷酸为shRNA。寡核苷酸可具有变化的长度。在各种实施例中,寡核苷酸的长度为约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约31、约32、约33、约34、约35、约36、约37、约38、约39或约40个核苷酸。在各种实施例中,寡核苷酸的长度在约2与约40个核苷酸之间。在各种实施例中,寡核苷酸的长度在约4与约35个核苷酸之间。在各种实施例中,寡核苷酸的长度在约10与约30个核苷酸之间。在各种实施例中,寡核苷酸的长度在约12与约17个核苷酸之间。

[0143] 在各种实施例中,该有效载荷为mRNA。在各种实施例中,该mRNA的长度为约500至3000个核苷酸。在各种实施例中,mRNA的长度为500个核苷酸、1000个核苷酸、1500个核苷酸、2000个核苷酸、2500个核苷酸、3000个核苷酸。在各种实施例中,该mRNA编码抗原肽。在各种实施例中,该mRNA为疫苗的一部分。

[0144] 在各种实施例中,该有效载荷为多肽。在各种实施例中,多肽在约1,000Da与10,000Da之间。在各种实施例中,多肽为约500Da、约600Da、约700Da、约800Da、约900Da、约1,000Da、约1,500Da、约2,000Da、约2,500Da、约3,000Da、约3,500Da、约4,000Da、约4,500Da、约5,000Da、约5,500Da、约6,000Da、约6,500Da、约7,000Da、约7,500Da、约8,000Da、约8,

500Da、约9,000Da、约9,500Da、约10,000Da、约15,000Da或约20,000Da。

[0145] 在各种实施例中,该有效载荷为小分子。在各种实施例中,该小分子在约100Da与1000Da之间。在各种实施例中,小分子为约50Da、约60Da、约70Da、约80Da、约90Da、约100Da、约150Da、约200Da、约250Da、约300Da、约350Da、约400Da、约450Da、约500Da、约550Da、约600Da、约650Da、约700Da、约750Da、约800Da、约850Da、约900Da、约950Da、约1,000Da、约1,500Da或约2,000Da。

[0146] 药物制剂

[0147] 在各种实施例中,该优化的脂质纳米颗粒可整体或部分调配为药物制剂。本发明的药物制剂可包含一种或多种纳米颗粒组合物。例如,药物组合物可包含一种或多种纳米颗粒组合物,该纳米颗粒组合物包含一种或多种有效载荷。本发明的药物组合物可进一步包含一种或多种药用赋形剂或辅助成分(诸如本文所述的那些)。调配及制造药物组合物和药剂的一般指南可参见例如:Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A.R. Gennaro; Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, Md., 2006。常规赋形剂和辅助成分可用于本发明的任何药物组合物中,除非任何常规赋形剂或辅助成分可能与本发明的纳米颗粒组合物的一种或多种成分不相容。如果赋形剂或辅助成分与纳米颗粒组合物的成分结合可能导致任何不良生物效应或其他有害影响,则该赋形剂或辅助成分与纳米颗粒组合物的该成分不相容。

[0148] 在一些实施例中,一种或多种赋形剂或辅助成分可占包括本发明的纳米颗粒组合物的药物组合物的总质量或总体积的50%以上。例如,一种或多种赋形剂或辅助成分可占常规药物的50%、60%、70%、80%、90%或更多。在一些实施例中,药用赋形剂的纯度为至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%。在一些实施例中,赋形剂获批用于人用药品或兽用药品。在一些实施例中,赋形剂获得美国食品暨药物管理局批准。在一些实施例中,赋形剂为医药级。在一些实施例中,赋形剂符合美国药典(USP)、欧洲药典(EP)、英国药典和/或国际药典标准。

[0149] 如本公开中的药物组合物中的一种或多种纳米颗粒组合物、一种或多种药用赋形剂和/或任何其他成分的相对量将是变化的,取决于接受治疗的受试者的身体、体型和/或疾病,并进一步取决于组合物的给药途径。例如,药物组合物可包含0.1%至100%(wt/wt)的一种或多种纳米颗粒组合物。

[0150] 纳米颗粒组合物和/或包含一种或多种纳米颗粒组合物的药物组合物可施用任何患者或受试者,包括可能受益于通过将mRNA递送至一个或多个特定细胞、组织、器官或其系统或组(诸如肾系统)而提供的治疗效果的那些患者或受试者。尽管本文所提供的纳米颗粒组合物和包括纳米颗粒组合物的药物组合物的描述主要涉及适合于施用人类的组合物,但本领域技术人员将理解该组合物通常适合于施用任何其他哺乳动物。为使适于施用各种动物的组合物适于施用人类的组合物的修改为人所熟知,并且普通技术程度的兽医药理学家可仅通过普通实验(如果有的话)来设计和/或执行这样的修改。预期接受组合物施用的受试者包括但不限于人类、其他灵长类动物及其他哺乳动物(包括商业相关的哺乳动物,诸如牛、猪、马、绵羊、猫、狗、小鼠和/或大鼠)。

[0151] 包括一种或多种纳米颗粒组合物的药物组合物可通过药理学领域已知或此后开发的任何方法制备。一般而言,这样的制备方法包括使活性成分与赋形剂和/或一种或多种

其他辅助成分结合,然后,如果需要或必要,将产品分割、成型和/或包装成所需的单一或多剂量单位。

[0152] 如本公开的药物组合物可作为单一单位剂量和/或作为多个单一单位剂量进行制备、包装和/或批量销售。如本文所用,“单位剂量”为包含预定量的活性成分(例如,纳米颗粒组合物)的离散量的药物组合物。活性成分的量通常等于将施用受试者的活性成分的剂量和/或该剂量的方便部分,例如该剂量的二分之一或三分之一。

[0153] 本发明的药物组合物可制备成适合多种施用途径和方法的多种形式。例如,本发明的药物组合物可制备成液体剂型(例如,乳剂、微乳剂、纳米乳剂、溶液、悬液剂、糖浆和酏剂)、注射剂形式、固体剂型(例如,胶囊、片剂、丸剂、粉剂和颗粒剂)、用于局部和/或经皮施用的剂型(例如,软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、粉剂、溶液、喷雾剂、吸入剂和贴剂)、悬液剂、粉剂和其他形式。

[0154] 用于口服和肠胃外施用的液体剂型包括但不限于药用乳剂、微乳剂、纳米乳剂、溶液、悬液剂、糖浆和/或酏剂。除活性成分之外,液体剂型可包括本领域常用的惰性稀释剂,诸如水或其他溶剂;增溶剂和乳化剂,诸如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和山梨糖醇脂肪酸酯以及它们的混合物。除惰性稀释剂外,口服组合物还可包括佐剂,诸如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂和/或香化剂。在肠胃外施用的某些实施例中,将组合物与增溶剂(诸如Cremophor®、醇、油、改性油、二醇、聚山梨醇酯、环糊精、聚合物和/或它们的组合)混合。

[0155] 可根据已知技术使用合适的分散剂、润湿剂和/或悬浮剂调配可注射制剂,例如无菌可注射水性或油质悬浮液。无菌注射制剂可为无毒肠胃外可接受的稀释剂和/或溶剂中的无菌注射溶液、混悬液和/或乳剂,例如1,3-丁二醇中的溶液。可采用的可接受的载体和溶剂包括水、林格氏溶液、USP和等渗氯化钠溶液。通常可采用无菌的不挥发油作为溶剂或悬浮介质。为此目的,可使用任何温和的不挥发性油,包括合成的单甘油酯或双甘油酯。脂肪酸诸如油酸可用于制备注射剂。

[0156] 注射用配制物可经过灭菌,例如,通过细菌截留过滤器过滤,和/或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂,其在使用前可溶解或分散于无菌水或其他无菌可注射介质中。

[0157] 为延长活性成分的作用,通常需要减缓皮下或肌肉注射时对活性成分的吸收。这可以通过使用水溶性差的结晶或无定形材料的液体悬浮液来实现。药物的吸收速率取决于其溶解率,其溶解率继而可能取决于晶体大小和晶型。替代性地,肠胃外给药的药物形式的延迟吸收通过将药物溶解或悬浮在油性载体中来实现。可注射储库型制剂通过在可生物降解的聚合物(如聚丙交酯-聚乙交酯)中形成药物的微囊化基质制成。根据药物与聚合物的比率以及所采用的特定聚合物的性质,可控制药物释放速率。其他生物可降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酐)。可注射储库型配制物通过将药物封装在与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备。

[0158] 用于直肠或阴道施用的组合物通常是栓剂,其可通过将组合物与合适的无刺激性赋形剂诸如可可脂、聚乙二醇或栓剂蜡(其在环境温度下为固体,但在体温下为液体并因此在直肠或阴道腔内融化并释放活性成分)混合来制备。

[0159] 口服固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、膜剂、粉剂和颗粒剂。在这样的固体剂型中,

活性成分与至少一种惰性药用赋形剂诸如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或填充剂或增量剂(例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸)、粘合剂(例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶)、保湿剂(例如甘油)、崩解剂(例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠)、溶液阻滞剂(例如石蜡)、吸收促进剂(例如四级铵化合物)、润湿剂(例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯)、吸收剂(例如高岭土和膨土、硅酸盐)和润滑剂(例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂硫酸钠)以及它们的混合物混合。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型可包括缓冲剂。

[0160] 类似类型的固体组合物可用作软、硬填充明胶胶囊的填充剂,使用赋形剂诸如乳糖或牛奶糖以及高分子量聚乙二醇等。片剂、糖衣锭、胶囊、丸剂和颗粒剂的固体剂型可制备成包含包衣和外壳,诸如肠溶衣和医药调配领域所熟知的其他包衣。它们可视情况包含遮光剂,并且可为仅释放活性成分,或优选地是在肠道的特定部分中释放,且视情况以延迟方式释放。可使用的嵌入组合物的实例包括聚合物和蜡。类似类型的固体组合物可用作软、硬填充明胶胶囊的填充剂,使用赋形剂诸如乳糖或牛奶糖以及高分子量聚乙二醇等。

[0161] 用于外用和/或透皮施用组合物的剂型可包括软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、粉剂、溶液、喷雾剂、吸入剂和/或贴剂。一般而言,活性成分在无菌条件下与药用赋形剂和/或任何所需的防腐剂和/或可能需要的缓冲剂混合。此外,本公开考虑使用透皮贴剂,其通常具有将化合物受控递送至身体的额外优势。这种剂型可例如通过将化合物溶解和/或分散在适当的介质中来制备。替代性地或此外,可通过提供速率控制膜和/或通过将化合物分散在聚合物基质和/或凝胶中来控制速率。

[0162] 用于递送本文所述的皮内药物组合物的合适装置包括短针装置,诸如美国专利第4,886,499、5,190,521、5,328,483、5,527,288、4,270,537、5,015,235、5,141,496和5,417,662号中所述的那些。皮内组合物可通过限制针头进入皮肤的有效穿透长度的装置施用,诸如在PCT公开W099/34850中所述的那些以及其功能等同形式。经由液体喷射注射器和/或经由刺穿角质层并产生到达真皮的射流的针头将液体组分递送至真皮的射流注入装置是合适的。射流注入装置描述于例如美国专利第5,480,381、5,599,302、5,334,144、5,993,412、5,649,912、5,569,189、5,704,911、5,383,851、5,893,397、5,466,220、5,339,163、5,312,335、5,503,627、5,064,413、5,520,639、4,596,556、4,790,824、4,941,880、4,940,460号以及PCT公开W0 97/37705和W0 97/13537中。使用压缩气体加速粉剂形式的疫苗穿过皮肤外层到达真皮的弹道粉末/颗粒递送装置是合适的。替代性地或此外,常规注射器可用于皮内施用的结核菌素皮内试验方法中。

[0163] 适用于局部施用的配制物包括但不限于液体和/或半液体制剂,诸如擦剂、洗剂、水包油和/或油包水乳剂,诸如乳膏、软膏和/或糊剂和/或溶液和/或悬液剂。可局部施用的配制物可例如包含约1%至约10% (wt/wt) 活性成分,尽管活性成分的浓度可与活性成分在溶剂中的溶解度极限一样高。用于局部施用的配制物可进一步包含一种或多种如本文所述的其他成分。

[0164] 药物组合物可制备、包装成适于经由颊腔进行肺部施用的配制物并/或以该形式销售。该配制物可包括干颗粒,其包含活性成分并且其直径在约0.5nm至约7nm或约1nm至约6nm的范围内。这样的组合物方便地为干粉形式,使用包含干粉储存器的装置进行施用,推进剂流可被引导至该储存器以分散粉末,并/或使用自推进溶剂/粉末分配容器(诸如包含

溶解和/或悬浮在密封容器中的低沸点推进剂中的活性成分的装置)进行施用。这样的粉末包含其中按重量计至少98%的颗粒具有大于0.5nm的直径且按数量计至少95%的颗粒具有小于7nm的直径的颗粒。替代性地,按重量计至少95%的颗粒具有大于1nm的直径且按数量计至少90%的颗粒具有小于6nm的直径。干粉组合物可包括固体细粉稀释剂诸如糖,并且方便地以单位剂型提供。

[0165] 低沸点推进剂通常包括在大气压下沸点低于65°F的液体推进剂。一般而言,推进剂可以占组合物的50%至99.9% (wt/wt),且活性成分可以占组合物的0.1%至20% (wt/wt)。推进剂可进一步包含其他成分,诸如液体非离子和/或固体阴离子界面活性剂和/或固体稀释剂(其可具有与包含活性成分的颗粒相同数量级的粒径)。

[0166] 针对肺部递送调配的药物组合物可以溶液和/或悬浮液的液滴形式提供活性成分。这种配制物可制备、包装成水性和/或稀释的醇溶液和/或悬液剂和/或以该形式销售,其可选地为无菌的,包含活性成分,并可方便地使用任何雾化和/或原子化装置施用。这种配制物可进一步包含一种或多种其他成分,此类成分包括但不限于调味剂诸如糖精钠、挥发油、缓冲剂、界面活性剂和/或防腐剂诸如羟基苯甲酸甲酯。通过该施用途径提供的液滴的平均直径可在约1nm至约200nm的范围内。

[0167] 本文所述的可用于肺部递送的配制物可用于鼻内递送医药组合物。另一种适于鼻内施用的配制物为粗粉,其包含活性成分并具有约0.2 μ m至500 μ m的平均粒径。该配制物以吸入鼻烟的方式施用,即通过鼻道从靠近鼻子的粉末容器快速吸入。

[0168] 适于经鼻施用的配制物可例如包含少至约0.1% (wt/wt) 及多至100% (wt/wt) 的活性成分,并可包含一种或多种如本文所述的其他成分。药物组合物可制备、包装成适于口颊施用的配制物并/或以该形式销售。此类配制物可为例如使用常规方法制成的片剂和/或锭剂的形式,并可包含例如0.1%至20% (wt/wt) 的活性成分,余量包括可口服溶解的和/或可降解的组合物及可选地存在的一种或多种本文所述的其他成分。替代性地,适于口颊施用的配制物可包含粉末和/或气雾化和/或雾化溶液和/或悬浮液,其包含活性成分。这种粉状、气雾化和/或雾化配制物在分散时可具有约0.1nm至约200nm范围内的平均颗粒和/或液滴尺寸,并还进一步包含本文所述的任何其他成分中的一种或多种。

[0169] 药物组合物可制备、包装成适于经眼施用的配制物并/或以该形式销售。此类配制物可为例如滴眼剂的形式,其包括例如在水性或油性液体赋形剂中的0.1/1.0% (wt/wt) 的活性成分溶液和/或悬浮液。这样的滴剂可进一步包含缓冲剂、盐和/或本文所述的任何其他成分中的一种或多种。其他可用的经眼施用的配制物包括那些包含微晶形式和/或脂质体制剂中的活性成分的。滴耳剂和/或滴眼剂被视为在本公开的范围內。

[0170] 包括一种或多种有效载荷的纳米颗粒组合物可通过任何途径施用。在一些实施例中,本发明的组合物,包括预防、诊断或成像组合物(包括一种或多种本发明的纳米颗粒组合物)通过多种途径中的一种或多种施用,这些施用途径包括经口、静脉内、肌肉内、动脉内、髓内、鞘内、皮下、心室内、透皮或皮内、皮间、直肠、阴道内、腹膜内、局部(例如通过粉剂、软膏、乳膏、凝胶、洗剂和/或滴剂)、粘膜、鼻腔、口腔、肠内、玻璃体、瘤内、舌下、鼻内;通过气管内滴注、支气管滴注和/或吸入;作为口腔喷雾剂和/或粉剂、鼻腔喷雾剂和/或喷雾剂和/或经由门静脉导管。在一些实施例中,组合物可经静脉内、肌肉内、皮内或皮下施用。然而,本公开涵盖通过任何适当的途径递送本发明的组合物,考虑到药物递送科学的可能的进步。

一般而言,最合适的施用途径将取决于多种因素,包括含有一种或多种mRNA的纳米颗粒组合物的性质(例如,其在各种身体环境诸如血液和胃肠道中的稳定性)、患者的疾病(例如,患者能否耐受特定的施用途径)等。

[0171] 在某些实施例中,如本公开的组合物能够以在给定剂量下递送约0.0001mg/kg至约10mg/kg、约0.001mg/kg至约10mg/kg、约0.005mg/kg至约10mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、约0.1mg/kg至约10mg/kg、约1mg/kg至约10mg/kg、约2mg/kg至约10mg/kg、约5mg/kg至约10mg/kg、约0.0001mg/kg至约5mg/kg、约0.001mg/kg至约5mg/kg、约0.005mg/kg至约5mg/kg、约0.01mg/kg至约5mg/kg、约0.1mg/kg至约10mg/kg、约1mg/kg至约5mg/kg、约2mg/kg至约5mg/kg、约0.0001mg/kg至约1mg/kg、约0.001mg/kg至约1mg/kg、约0.005mg/kg至约1mg/kg、约0.01mg/kg至约1mg/kg或约0.1mg/kg至约1mg/kg的剂量水平施用,其中1mg/kg的剂量为每1kg受试者体重提供1mg组合物。在特定实施例中,可施用剂量约0.005mg/kg至约5mg/kg的本发明的纳米颗粒组合物。可每天以相同或不同的量施用一次或多次剂量,以获得所需的mRNA表达位准和/或治疗、诊断、预防或成像效果。可递送所需的剂量,例如每天三次、每天两次、每天一次、每隔一天一次、每三天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次或每四周一次。在某些实施例中,可使用多次施用(例如,两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次或更多次施用)以递送所需的剂量。在一些实施例中,可例如在外科手术之前或之后或在急性疾病、病症或病状的情况下施用单剂量。

[0172] 包括一种或多种有效载荷的纳米颗粒组合物可与一种或多种其他治疗、预防、诊断或显像剂组合使用。“组合”并非旨在暗示必须同时施用和/或调配成一起递送,尽管这些递送方式在本公开的范围。例如,可组合施用包括一种或多种不同mRNA的一种或多种纳米颗粒组合物。组合物可与一种或多种其他所需的治疗剂或医疗程序同时施用或在之前或之后施用。一般而言,各药剂将以针对该药剂确定的剂量和/或时间表施用。在一些实施例中,本公开涵盖本发明的组合物或其成像、诊断或预防性组合物与提高其生物有效性、减少和/或改变其代谢、抑制其排泄和/或改变其体内的分布的药剂的组合递送。

[0173] 还应当理解的是,组合使用的治疗、预防、诊断或成像活性剂可在单一组合物中一起施用或在不同组合物中分开施用。一般而言,预期组合使用的药剂的使用含量不超过其单独使用时的含量。在一些实施例中,组合使用的含量可低于单独使用时的含量。

[0174] 在组合方案中采用的疗法(治疗剂或程序)的特定组合将考虑所需治疗剂和/或程序的相容性以及要实现的所需治疗效果。还应当理解的是,所采用的疗法可能对相同的病症实现所需的效果(例如,用于治疗癌症的组合物可与化疗剂同时施用),或者它们可能实现不同的效果(例如,控制任何不良反应)。

[0175] 实例

[0176] 以下实例并非旨在限制,其目的在于为本发明提供更多数据和支持。以下实例证明优化LNP形成以获得最优有效载荷载量和粒径分布的HTS方法可直接转化为放大的制造工艺,诸如基于微流体的方法。该HTS方法将材料消耗量减少约10倍,并将工艺输出提高了约100倍。这些结果表明HTS方法在优化LNP制造方面的稳健性及实用性,从而促进了它们的临床转化。

[0177] 材料与amp;方法

[0178] 材料

[0179] 包括1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](DSPE-PEG₂₀₀₀)和阳离子1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)的脂质购自Avanti Polar Lipids(AL,USA)。可电离脂质二亚油基甲基-4-二甲氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA,MC3)购自MCE(NJ,USA),且胆固醇购自Sigma(MO,USA)。在内部合成了两种ASO,即ASO-1(13-mer,钠盐形式)和ASO-2(16-mer,钠盐形式)。所有其他试剂至少为试剂级且不含DNase/RNase。

[0180] 负载ASO的LNP的高通量制备

[0181] 使用LEA Library Studio软件(Unchained Labs,CA,USA),对96孔板基质中设计的包含不同脂质组合物、总脂质浓度和ASO载量的LNP配制物进行筛选。在典型的负载ASO-1的MC3 LNP的筛选中,将ASO溶解于柠檬酸盐缓冲剂(25mM,pH 4)中,其浓度对应于N/P比率为5、2、1和0.5,并使用机器人液体处理器(TECAN®Freedom EVO,NC,USA)将其以150μl/孔的浓度分配至96孔板(Greiner Bio One 655101,NC,USA)中。通过使用TECAN®混合单个脂质储备液(20mg/ml,在乙醇中)并用乙醇稀释,制备包含不同总脂质含量(0.2μmol/孔或0.4μmol/孔)和DSPE-PEG₂₀₀₀含量(0、1.5、3或5mol%的总脂质)的脂质混合物。然后,将50μl脂质以0.5ml/s的速度快速分配至ASO板中,然后使用TECAN机器人通过10轮移液(每次100μl)进行相混合,以促进负载ASO的LNP的自组装。所得板含有96个LNP样品(200μl/孔),其在32个条件下平行变化(4个位准的ASO载量,2个位准的总脂质浓度,4个位准的脂质组合物,n=3)。在其他实验中,将可电离脂质MC3替换为永久阳离子脂质DOTAP,或将13-mer ASO-1替换为16-mer ASO-2,对相似的配制参数进行筛选。还探讨了反向分配顺序(将ASO溶液注入脂质混合物中)和不同的混合速度和轮次,以优化相混合方法。

[0182] 负载ASO的LNP的表征

[0183] 负载ASO的LNP的结构通过低温透射电子显微镜(cryo-TEM)确定。使用DLS测量粒径分布。简言之,使用TECAN®机器人,将负载ASO的LNP在96孔玻璃底微孔板(Greiner Bio One 655892,NC,USA)中用磷酸盐缓冲盐水(PBS,pH 7.4)稀释40倍,并使用DynaPro®酶标仪III(Wyatt Technology,CA,USA)分析平均粒径和粒径分布(以多分散性百分比(%PD)表示)。通过添加15μl 0.5M磷酸盐缓冲剂(pH 7.4),将60μl等分试样调节至中性pH,然后将其转移至滤板(MWCO 100kD;AcroPrep,PALL,NY,USA)并离心(2,000xg,10分钟)得到滤液。然后使用UV酶标仪(TECAN®Spark,NC,USA)通过OD₂₆₀对50μl滤液中未封装的ASO进行定量,并计算ASO的封装效率百分比(%EE):

$$\text{[0184]} \quad \%EE = \frac{\text{总 ASO 含量} - \text{游离 ASO 含量}}{\text{总 ASO 含量}} \times 100\%$$

[0185] ASO标准品采用与LNP样品相同的缓冲剂制备并经过相同的过滤过程。在稳定性实验,将60μl制备的N/P比率为1的LNP用PBS直接稀释10倍,并储存于4℃或40℃下,在2周内分析其粒径和ASO释放。

[0186] 负载ASO的LNP的微流体制备

[0187] 使用微流体方法放大制备按上述高通量方法筛选的ASO负载的LNP。简言之,通过

微流体装置(NanoAssemblr[®], Precision NanoSystems, BC, Canada)在水性缓冲剂/乙醇相比率为3/1且总流速恒定为12ml/min的条件下混合包含不同总脂质浓度和DSPE-PEG₂₀₀₀含量的不同浓度的ASO-1(溶解于柠檬酸盐缓冲剂中)与脂质(溶解于乙醇中)。将收集的LNP通过基于离心机(2,000xg, 30分钟)的超滤(MWCO 10kD; Amicon, MilliporeSigma, MA, USA)纯化,以去除游离ASO和脂质,然后将缓冲剂交换为PBS。通过DLS分析LNP的粒径分布,并通过亲水作用液相层析(HILIC)分析ASO封装。简言之,通过溶解于0.75% Triton溶液中,从纯化后的LNP中提取经封装的ASO。利用HILIC管柱(Waters ACQUITY UPLC BEH Amide, 130Å, 1.7μm, 3mm x 50mm)、流动相A(25mM乙酸铵,溶于乙腈/水(80/20, v/v)中)和移动相B(25mM乙酸铵,溶于乙腈/水(40/60, v/v)中)在10分钟内以0至100%的移动相B进行梯度洗脱,流速为0.8ml/min,柱温为40℃,且检测波长为260nm。

[0188] 统计分析

[0189] 所有结果皆表示为平均值±SD, n=3。使用Prism 8.0(GraphPad Software),通过单向或双向方差分析(ANOVA)对数据进行分析,然后进行Turkey、Sidak或Dunnett后检验以实施多组比较。P值小于0.05被视为具有统计学显著性。

[0190] 实例1

[0191] 通过机器人液体处理器优化相混合过程

[0192] 为开发用于LNP制剂的高通量溶剂注入法,首先研究了相混合对粒径和ASO封装的影响。在N/P比率为1的条件下,通过电荷介导的复合将ASO-1负载到由0.4μmol总脂质和1.5mol%DSPE-PEG₂₀₀₀所组成的LNP中。使用TECAN[®]液体处理器以不同的移液速度(从最小值0.1ml/s到最大值0.9ml/s,取决于仪器设置)分配含有脂质的乙醇相,并与水性ASO相混合,反之亦然。在低、中或高注入速度下将乙醇注入缓冲剂中,然后混合10轮,产生了类似的LNP,其平均直径为约145nm(图1A),%PD为约18%(图1B),且ASO的%EE约为83%(图1C)。相比之下,在低速(0.1ml/s)下将缓冲剂注入乙醇中,产生了更大(平均直径约220nm)、多分散性更高(%PD约41%)且具有更低%EE(约43%)的颗粒(图1A至图1C)。然而,提高注入速度所产生的LNP与将乙醇注入缓冲剂中所得到的LNP相似,表明形成负载ASO的LNP需要在水性缓冲剂中快速消散浓脂质。接下来,将乙醇注入缓冲剂中,之后在不同的移液轮次和速度下进行相混合以制备LNP。中等速度(0.5ml/s)和10轮混合足以产生具有高ASO载量的均质LNP,而进一步增加混合速度或轮次对粒径和%EE无影响(图1D-1F)。因此,选择将乙醇注入缓冲剂中并之后以0.5ml/s混合10轮的条件进行后续研究。

[0193] 实例2

[0194] 负载ASO的LNP配制物的HTS

[0195] 为研究调配参数对LNP的主要质量属性的影响,设计一种HTS工作流程,其能够简化这些配制物的制备和表征(图2)。ASO最初溶解于柠檬酸盐缓冲剂中,该缓冲剂的pH为4.0,低于MC3的pKa(6.4),使得脂质带有正电荷以促进电荷介导的复合。然后在后续分析之前,通过磷酸盐缓冲剂将溶液pH值调节至中性。

[0196] 在典型筛选中,在96孔板中平行筛选32个不同的样品(每个样品重复3次),这些样品具有不同的2个位准的总脂质浓度、4个位准的ASO载量(由N/P比率控制)以及4个位准的经聚乙二醇化的脂质含量(图3A)。在研究的三种调配参数中,经聚乙二醇化之脂质对于LNP

形成必不可少,因为在PEG不掺入脂质组合物的情况下,产生多峰、大的聚集体(图3C至图3D及图4)。增加经聚乙二醇化的脂质含量显著($P<0.0001$)减小了平均粒径,即含有1.5、3和5mol%的DSPE-PEG₂₀₀₀的脂质导致LNP直径分别为约120nm、约80nm及约60nm(图3C至图3D)。然而,多分散性也增加,5mol%的DSPE-PEG₂₀₀₀甚至产生一个亚群,可能是由于形成了小的DSPE-PEG₂₀₀₀胶束(图3C)。参见例如:Johnsson等人,2003,Biophys J 85(6):3839-47;Gill等人,2015,J Drug Target 23(3):222-31。

[0197] 另一方面,ASO的%EE主要由N/P比率决定。N/P比率高于1时,MC3中的复合位点过多,导致%EE>80%;而电荷平衡点以上过量两倍的ASO-1使%EE显著降低至约50%(图3E)。将MC3替换为另一种阳离子脂质DOTAP(图5A至图5C)或将ASO-1替换为ASO-2(图6A至图6C)时也发现类似的结果,证明了HTS结果的稳健性。

[0198] 实例3

[0199] 经由放大LNP制备来验证HTS结果

[0200] 然后通过比较HTS方法所得到的结果与微流体调制器所得到的结果,验证所筛选的调配参数对LNP质量属性的影响。这两种方法表现出相似的结果:(1)随着PEG含量的增加,LNP粒径减小,但多分散性增加(图7A);(2)随着总浓度增加至高达2mM,LNP粒径保持稳定(图7B);(3)当N/P比率<2时,LNP粒径保持稳定(图7C);(4)过量的ASO载量(N/P比率<1)导致%EE显著降低(图7D);以及(5)使用相同的N/P比率与经聚乙二醇化的脂质含量制备的LNP表现出相似的结构(图7E)。此外,HTS方法成功预测了粒径和多分散性对经聚乙二醇化的脂质含量的依赖性,表现为线性回归的强相关性($R^2>0.9$) (图7A)。

[0201] 实例4

[0202] 负载ASO的LNP的稳定性筛选

[0203] 为进一步研究不同粒径对配制物稳定性的影响,将制备的具有不同PEG含量的负载ASO-1的LNP用PBS稀释10倍,在4℃或40℃下孵育,并监测2周内的粒径分布。N/P比率保持为 ≥ 1 且ASO的%EE为约90%,因此可对稳定性研究期间从LNP中泄漏的ASO进行定量。如图8A至图8B所示,通过高通量溶剂注入或 NanoAssemblr[®] 制备的包含1.5mol%或3mol% DSPE-PEG₂₀₀₀的LNP在4℃下孵育期间同样保持其初始平均粒径(图8A)和多分散性(图8B)。在40℃下,含有1.5mol% DSPE-PEG₂₀₀₀的LNP在1周后表现出粒径增加,同时保持恒定的多分散性(图9)。包含1.5mol% DSPE-PEG₂₀₀₀的LNP在前3天内还表现出极小的ASO泄漏,但在2周后,ASO泄漏含量与包含3mol%和5mol% DSPE-PEG₂₀₀₀的LNP相似(图10)。在1个月内,未检测到4℃下的ASO泄漏。

[0204] 选择溶剂注入法进行LNP配制物的高通量制备的原因在于,相混合过程可通过机器人液体处理器执行。与手动移液相比,多通道液体处理器能够以高通量、并行处理96个样品,并实现均匀的液体分配和跨孔混合。关键过程涉及混溶相的快速、充分混合,例如乙醇溶解脂质和水性缓冲剂溶解核酸,以便促进脂质自组装为球形脂质层和纳米颗粒结构。该方法已广泛用于制备脂质体,当乙醇相控制在50vol%以下时,生成均匀的纳米颗粒。提高乙醇相比率和/或脂质浓度将产生大颗粒或聚集体,其可能的原因是相混合不充分,如低速条件下缓冲剂注入乙醇中所得到的结果所示(图1A至图1B)。通过液体处理器实施自动混合过程所得到的结果与通过微流体方法制备的LNP的结果高度相关。流速比(FRR,水相注入有机相的流速)是微流体制备期间的关键调配参数之一,且低FRR产生较大的颗粒。在低速条

件下将缓冲剂注入乙醇中,代表性了低FRR的条件。因此,自动混合条件经优化,并将乙醇注入缓冲剂的流速设定为0.5ml/s,乙醇/水性体积比为1/3 (25vol%乙醇),然后进行10轮移液以实现有效的相混合,产生了具有高封装效率的均匀颗粒。

[0205] 接下来,开发出一种简化的工作流程筛选调配变量,以获得负载ASO的LNP的最优质量属性,这类调配变量包括总脂质浓度、脂质组合物和ASO载量。为此,分别采用高通量DLS和OD₂₆₀测量粒径分布和ASO的%EE,以确定能够产生具有高ASO载量的均匀纳米颗粒的条件。筛选结果表明,经聚乙二醇化的脂质含量显著影响粒径分布(图3B至图3D、图5A至图5B以及图6A至图6B)。以总脂质的1.5mol%掺入的DSPE-PEG₂₀₀₀产生了平均直径为约120nm的单峰纳米颗粒,而更高的PEG导致多分散性增加。由三级胺结构组成的可电离脂质越来越多地用于基于脂质的核苷酸递送系统,其与永久带电荷的阳离子脂质相比,表现出更出色的细胞内递送效率和更低的细胞毒性。参见例如:Cullis及Hope,2017,Mol. Ther. 25 (7) : 1467-1475;Sabnis等人2018,Mol Ther. 26 (6) :1509-1519;Semple等人,2010,Nature Biotechnology,28(2):172-176。与电荷介导的复合的负载机制一致,筛选结果,表明N/P比率决定了ASO封装,当N/P比率=1时,%EE为约90%(图3E、图5C和图6C),对应的载量为0.29mg RTR3833/mg脂质(2mM总脂质,包含1.5mol%DSPE-PEG₂₀₀₀)。

[0206] 重要的是,由HTS方法所得到的结果成功预测了由微流体调制器得到的结果,其已经越来越多地用于制备具有可扩展的生产规模的纳米颗粒配制物。参见例如:Belliveau等人,2012,Mol. Ther. Nucleic Acids,1,e37;van Swaay和deMellow,2013,Lab Chip 13(5):752-67。在两种方法中,LNP粒径表现出对经聚乙二醇化的脂质含量(图7A)、总脂质浓度(图7B)和N/P比率(图7C)相似的依赖性,且ASO的%EE类似地由N/P比率控制(图7D)。这两种方法也在相同的调配参数下产生了结构相似的LNP(图7E)。此外,这些负载ASO的LNP在40℃下储存2周后表现出稳定的粒径分布(图8A至图8B)以及约20%的封装ASO泄漏(图10)。然而,与微流体制备相比,HTS方法表现出以下显著优势:节省原料约10倍,同时将制备和分析输出提高约100倍(与单次微流体运行相比,在微孔板中并行处理96个样品),表明其用于早期调配筛选的巨大潜力(图11)。基于筛选结果,确定1.5mol%DSPE-PEG₂₀₀₀和N/P比率≥1将产生具有均匀和稳定的粒径以及高ASO载量的最优LNP配制物。在HTS系统中引入不同脂质和其他ASO后,同样的表述仍然有效,表明该筛选平台可将其应用扩展到各种类型的载体和物质诸如siRNA和单一导向RNA。

[0207] HTS筛选方法表现为一种可重现的调配平台来制备LNP。从自动注入平台到微流体配制的可转化的结果创建了一种无缝工作流程,其支持筛选和放大制备配制物,并避免了因配制物不一致所引起的桥接研究。下一步是将当前的工作流程与下游体外筛选相结合,以将负载ASO的LNP的理化属性与其治疗功效相关联。此外,可进一步改善工作流程以解决更多的配制物属性诸如ζ电位,并通过液相层析策略同时定量API和赋形剂。Yamamoto等人,2011J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 879(20),3620-5;Li等人,2019,J Chromatogr A 1601:145-154。

[0208] 在本实例中,开发出一种高通量方法以筛选调配参数并解决负载ASO的LNP的质量属性。简化的工作流程从自动液体分配和混合开始,然后进行高通量粒径和ASO封装分析,确定经聚乙二醇化的脂质含量和N/P比率分别是粒径分布和封装效率的主要决定因素。此外,HTS结果成功预测了使用微流体放大制备的结果。稳健的筛选结果以及显著的材料节省

和分析输出的改善表明,该方法在推进基于脂质的纳米颗粒配制物的开发方面具有广阔的前景。

[0209] 实例5

[0210] 定量ASO封装的替代方法

[0211] 使用荧光酶标仪定量测定ASO封装。简言之,通过高通量溶剂注入法制备负载ASO的LNP,然后将其用TE缓冲剂稀释50倍,与等体积5000倍稀释的荧光探针Sybr-gold混合,并使用荧光酶标仪(Ex/Em=495/550nm)定量分析未封装的ASO。然后通过添加等体积的在1vol%Triton TE中稀释10000倍的Sybr-gold来破坏LNP(即,最终探针稀释度保持为10000倍,且Triton浓度为0.5vol%) (图12A)。然后进行荧光测量以定量分析总ASO。封装效率百分比(%EE)计算式如下:

$$[0212] \quad \%EE = \frac{\text{总 ASO 含量} - \text{游离 ASO 含量}}{\text{总 ASO 含量}} \times 100\%$$

[0213] 计算表明,使用荧光和UV-Vis方法得到的以不同N/P比率制备的两种不同配制物的%EE结果相当(图12B)。结果表示为平均值±SD,n=2;ns,不显著,通过双向ANOVA和之后的Sidak多重比较进行分析。

[0214] 实例6

[0215] 负载HiBiT肽的LNP配制物的HTS

[0216] 为研究调配参数对脂质体的主要质量属性的影响,设计一种HTS工作流程,其能够简化这些配制物的制备和表征。将HiBiT最初溶解在补充有150mM NaCl (pH 5.5)的20mM组胺-乙酸盐缓冲剂中,并使用机器人液体处理器将其分配至微孔板中。按照与实例2类似的方法制备脂质混合物(图13A)。

[0217] 在典型筛选中,在96孔板中平行筛选32个不同的样品(每个样品重复3次),这些样品包含4种类型的LNP配制物和8种经聚乙二醇化的脂质的组合,屏蔽经聚乙二醇化的脂质以及经聚乙二醇化的脂质与叠氮化物结合(图13B)。在研究的8种参数中,经聚乙二醇化的脂质是LNP形成所必需的,因为在PEG不掺入脂质组合物的情况下,产生多峰、大的聚集体(图13C)。纯化前和纯化后游离肽浓度的定量结果表明,凝胶过滤和透析的平均纯化效率分别为约98%和约61% (图13D至图13F)。颗粒回收率一般在80%至120%之间,但不使用经聚乙二醇化的脂质所制备的聚集样品的回收率较低(图13G)。此外,通过凝胶过滤后,粒径分布保持恒定(图13H)。

[0218] 参考文献

[0219] K.Sridharan,N.J.Gogtay,Therapeutic nucleic acids:current clinical status,Br J Clin Pharmacol 82(3) (2016)659-72。

[0220] A.Goyon,P.Yehl,K.Zhang,Characterization of therapeutic oligonucleotides by liquid chromatography,J Pharm Biomed Anal 182(2020) 113105。

[0221] C.Chakraborty,A.R.Sharma,G.Sharma,C.G.P.Doss,S.S.Lee,Therapeutic miRNA and siRNA:Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine,Mol Ther Nucleic Acids 8(2017)132-143。

- [0222] C.I.E.Smith,R.Zain,Therapeutic Oligonucleotides:State of the Art,Annu Rev Pharmacol Toxicol 59(2019)605-630。
- [0223] D.Adams,A.Gonzalez-Duarte,W.D.O’Riordan,C.C.Yang,M.Ueda,A.V.Kristen,I.Tournev,H.H.Schmidt,T.Coelho,J.L.Berk,K.P.Lin,G.Vita,S.Attarian,V.Plante-Bordeneuve,M.M.Mezei,J.M.Campistol,J.Buades,T.H.Brannagan,3rd,B.J.Kim,J.Oh,Y.Parman,Y.Sekijima,P.N.Hawkins,S.D.Solomon,M.Polydefkis,P.J.Dyck,P.J.Gandhi,S.Goyal,J.Chen,A.L.Strahs,S.V.Nochur,M.T.Sweetser,P.P.Garg,A.K.Vaishnaw,J.A.Gollob,O.B.Suhr,Patisiran,an RNAi Therapeutic,for Hereditary Transthyretin Amyloidosis,N Engl J Med 379(1) (2018)11-21。
- [0224] U.Sahin,K.Kariko,O.Tureci,mRNA-based therapeutics--developing anew class of drugs,Nat Rev Drug Discov 13(10) (2014)759-80。
- [0225] U.Sahin,E.Derhovanessian,M.Miller,B.P.Kloke,P.Simon,M.Lower,V.Bukur,A.D.Tadmor,U.Luxemburger,B.Schrors,T.Omokoko,M.Vormehr,C.Albrecht,A.Paruzynski,A.N.Kuhn,J.Buck,S.Heesch,K.H.Schreeb,F.Muller,I.Ortseifer,I.Vogler,E.Godehardt,S.Attig,R.Rae,A.Breitkreuz,C.Tolliver,M.Suchan,G.Martic,A.Hohberger,P.Sorn,J.Diekman,J.Ciesla,O.Waksmann,A.K.Bruck,M.Witt,M.Zillgen,A.Rothermel,B.Kasemann,D.Langer,S.Bolte,M.Diken,S.Kreiter,R.Nemecek,C.Gebhardt,S.Grabbe,C.Holler,J.Utikal,C.Huber,C.Loquai,O.Tureci,Personalized RNA mutanomevaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer,Nature547(7662) (2017)222-226。
- [0226] N.Pardi,M.J.Hogan,F.W.Porter,D.Weissman,mRNA vaccines-a newera in vaccinology,Nat Rev Drug Discov 17(4) (2018)261-279。
- [0227] K.A.Dowd,S.Y.Ko,K.M.Morabito,E.S.Yang,R.S.Pelc,C.R.DeMaso,L.R.Castilho,P.Abbink,M.Boyd,R.Nityanandam,D.N.Gordon,J.R.Gallagher,X.Chen,J.P.Todd,Y.Tsybovsky,A.Harris,Y.S.Huang,S.Higgs,D.L.Vanlandingham,H.Andersen,M.G.Lewis,R.De La Barrera,K.H.Eckels,R.G.Jarman,M.C.Nason,D.H.Barouch,M.Roederer,W.P.Kong,J.R.Mascola,T.C.Pierson,B.S.Graham,Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus,Science 354(6309) (2016)237-240。
- [0228] J.M.Richner,S.Himansu,K.A.Dowd,S.L.Butler,V.Salazar,J.M.Fox,J.G.Julander,W.W.Tang,S.Shresta,T.C.Pierson,G.Ciaramella,M.S.Diamond,Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection,Cell 168(6) (2017)1114-1125 e10。
- [0229] A.Patel,E.L.Reuschel,K.A.Kraynyak,T.Racine,D.H.Park,V.L.Scott,J.Audet,D.Amante,M.C.Wise,A.A.Keaton,G.Wong,D.O.Villarreal,J.Walters,K.Muthumani,D.J.Shedlock,M.A.de La Vega,R.Plyler,J.Boyer,K.E.Broderick,J.Yan,A.S.Khan,S.Jones,A.Bello,G.Soule,K.N.Tran,S.He,K.Tierney,X.Qiu,G.P.Kobinger,N.Y.Sardesai,D.B.Weiner,ProtectiveEfficacy and Long-Term Immunogenicity in Cynomolgus Macaques by EbolaVirus Glycoprotein Synthetic DNA Vaccines,J Infect Dis 219(4) (2019)544-555。

- [0230] M.D.Shin,S.Shukla,Y.H.Chung,V.Beiss,S.K.Chan,O.A.Ortega-Rivera,D.M.Wirth,A.Chen,M.Sack,J.K.Pokorski,N.F.Steinmetz,COVID-19 vaccine development and a potential nanomaterial path forward,Nat Nanotechnol (2020)。
- [0231] J.Wang,Z.Lu,M.G.Wientjes,J.L.Au,Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers,The AAPS journal 12(4) (2010)492-503。
- [0232] M.Durymanov,J.Reineke,Non-viral Delivery of Nucleic Acids:Insight Into Mechanisms of Overcoming Intracellular Barriers,Front Pharmacol 9(2018)971。
- [0233] A.Akinc,M.A.Maier,M.Manoharan,K.Fitzgerald,M.Jayaraman,S.Barros,S.Ansell,X.Du,M.J.Hope,T.D.Madden,B.L.Mui,S.C.Semple,Y.K.Tam,M.Ciufolini,D.Witzigmann,J.A.Kulkarni,R.vander Meel,P.R.Cullis,The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs,Nat Nanotechnol 14(12) (2019)1084-1087。
- [0234] A.C.Anselmo,S.Mitragotri,Nanoparticles in the clinic:An update,Bioeng Transl Med 4(3) (2019)e10143。
- [0235] Liposome drug products:chemistry,manufacturing,and controls; human pharmacokinetics and bioavailability;and labeling documentation,U.S.Food and Drug Administration,2018。
- [0236] T.M.Allen,C.Hansen,F.Martin,C.Redemann,A.Yau-Young,Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo,Biochim Biophys Acta 1066(1) (1991)29-36。
- [0237] O.Garbuzenko,Y.Barenholz,A.Priev,Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer,Chem Phys Lipids 135(2) (2005)117-29。
- [0238] M.L.Immordino,F.Dosio,L.Cattel,Stealth liposomes:review of the basic science,rationale,and clinical applications,existing and potential,Int J Nanomedicine 1(3) (2006)297-315。
- [0239] A.Schroeder,C.G.Levens,C.Cortez,R.Langer,D.G.Anderson,Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery,J Intern Med 267(1) (2010)9-21.P.R.Cullis,M.J.Hope,Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies,Mol Ther 25(7) (2017)1467-1475。
- [0240] M.Johnsson,K.Edwards,Liposomes,disks,and spherical micelles:aggregate structure in mixtures of gel phase phosphatidylcholines and poly(ethylene glycol)-phospholipids,Biophys J 85(6) (2003)3839-47。
- [0241] K.K.Gill,A.Kaddoumi,S.Nazzal,PEG-lipid micelles as drug carriers: physiochemical attributes,formulation principles and biological implication,J Drug Target 23(3) (2015)222-31。
- [0242] K.Yang,J.T.Delaney,U.S.Schubert,A.Fahr,Fast high-throughput screening

of temoporfin-loaded liposomal formulations prepared by ethanolinjection method, *J Liposome Res* 22(1) (2012)31-41。

[0243] M.A.Schubert, C.C.Muller-Goymann, Solvent injection as a new approachfor manufacturing lipid nanoparticles--evaluation of the method and processparameters, *Eur J Pharm Biopharm* 55(1) (2003)125-31。

[0244] A.A.Mokhtarieh, J.Lee, S.Kim, M.K.Lee, Preparation of siRNAencapsulated nanoliposomes suitable for siRNA delivery by simply discontinuousmixing, *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860(6) (2018)1318-1325。

[0245] C.Jaafar-Maalej, R.Diab, V.Andrieu, A.Elaissari, H.Fessi, Ethanolinjection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation, *J Liposome Res* 20(3) (2010)228-43。

[0246] I.V.Zhigaltsev, N.Belliveau, I.Hafez, A.K.Leung, J.Huft, C.Hansen, P.R.Cullis, Bottom-up design and synthesis of limit size lipid nanoparticlessystems with aqueous and triglyceride cores using millisecond microfluidicmixing, *Langmuir* 28(7) (2012)3633-40。

[0247] S.Sabnis, E.S.Kumarasinghe, T.Salerno, C.Mihai, T.Ketova, J.J.Senn, A.Lynn, A.Bulychev, I.McFadyen, J.Chan, O.Almarsson, M.G.Stanton, K.E.Benenato, A Novel Amino Lipid Series for mRNA Delivery:ImprovedEndosomal Escape and Sustained Pharmacology and Safety in Non-humanPrimates, *Mol Ther* 26(6) (2018)1509-1519。

[0248] S.C.Semple, A.Akinc, J.Chen, A.P.Sandhu, B.L.Mui, C.K.Cho, D.W.Sah, D.Stebbing, E.J.Crosley, E.Yaworski, I.M.Hafez, J.R.Dorkin, J.Qin, K.Lam, K.G.Rajeev, K.F.Wong, L.B.Jeffs, L.Nechev, M.L.Eisenhardt, M.Jayaraman, M.Kazem, M.A.Maier, M.Srinivasulu, M.J.Weinstein, Q.Chen, R.Alvarez, S.A.Barros, S.De, S.K.Klimuk, T.Borland, V.Kosovrasti, W.L.Cantley, Y.K.Tam, M.Manoharan, M.A.Ciufolini, M.A.Tracy, A.de Fougereolles, I.MacLachlan, P.R.Cullis, T.D.Madden, M.J.Hope, Rational design of cationic lipids for siRNA delivery, *Nature biotechnology* 28(2) (2010)172-6。

[0249] N.M.Belliveau, J.Huft, P.J.Lin, S.Chen, A.K.Leung, T.J.Leaver, A.W.Wild, J.B.Lee, R.J.Taylor, Y.K.Tam, C.L.Hansen, P.R.Cullis, MicrofluidicSynthesis of Highly Potent Limit-size Lipid Nanoparticles for In Vivo Deliveryof siRNA, *Mol Ther Nucleic Acids* 1(2012)e37。

[0250] D.van Swaay, A.deMello, Microfluidic methods for forming liposomes, *Lab Chip* 13(5) (2013)752-67。

[0251] E.Yamamoto, K.Hyodo, N.Ohnishi, T.Suzuki, H.Ishihara, H.Kikuchi, N.Asakawa, Direct, simultaneous measurement of liposome-encapsulated andreleased drugs in plasma by on-line SPE-SPE-HPLC, *J Chromatogr B AnalytTechnol Biomed Life Sci* 879(30) (2011)3620-5。

[0252] L.Li, J.P.Foley, R.Helmy, Simultaneous separation of small interferingRNA and lipids using ion-pair reversed-phase liquid

chromatography, JChromatogr A 1601 (2019) 145-154。

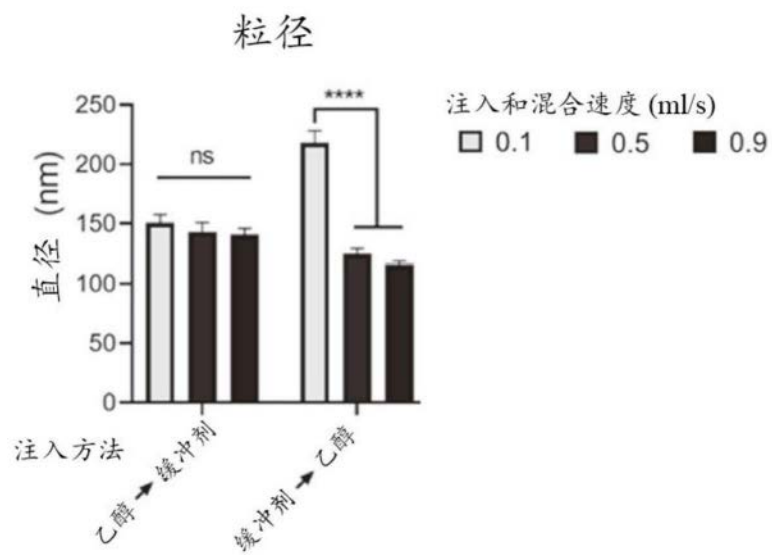


图1A

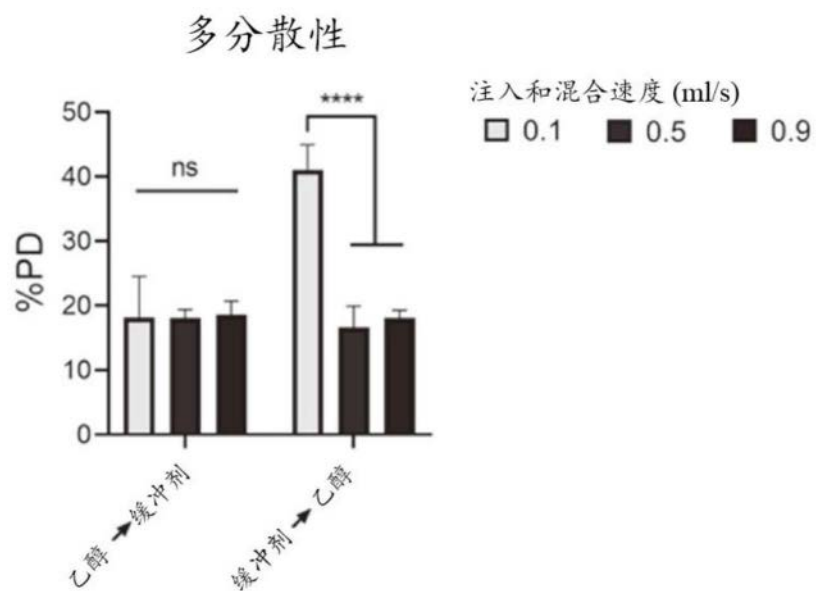


图1B

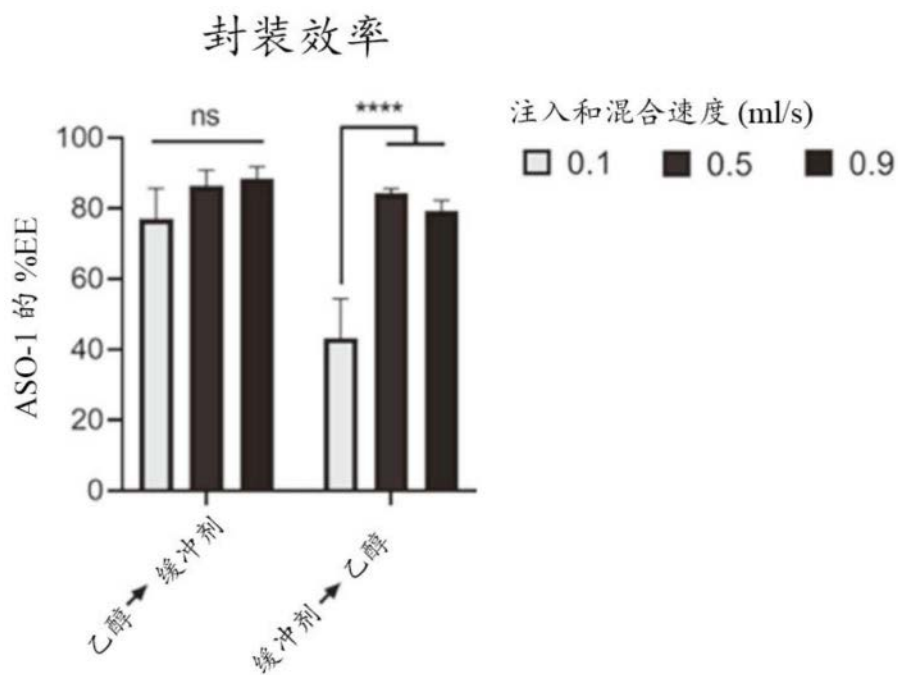


图1C

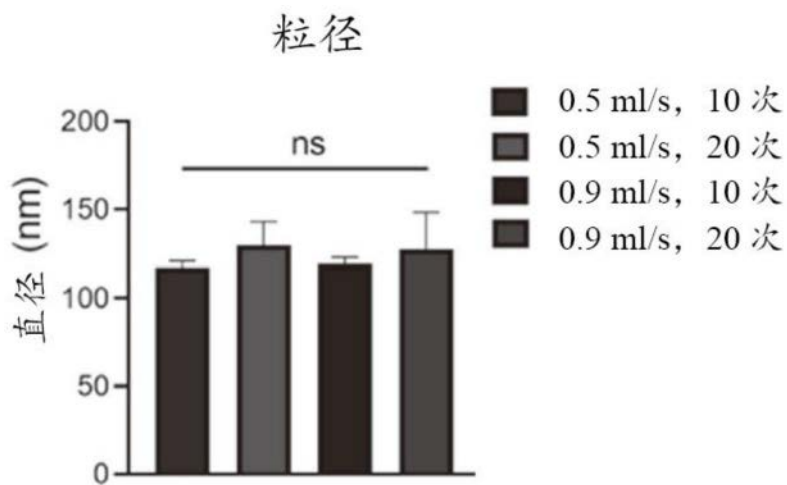


图1D

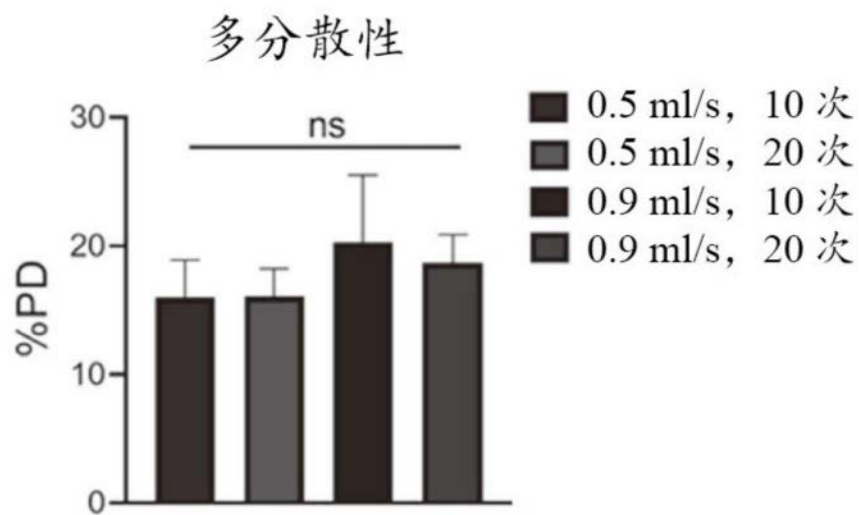


图1E

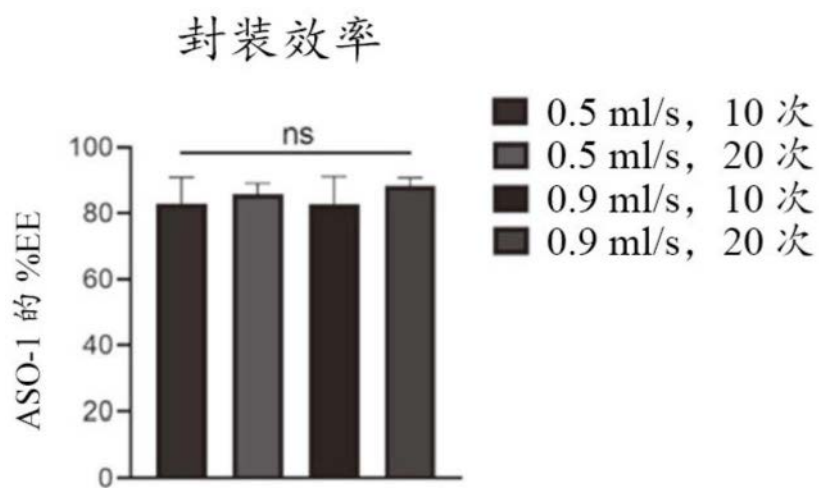


图1F

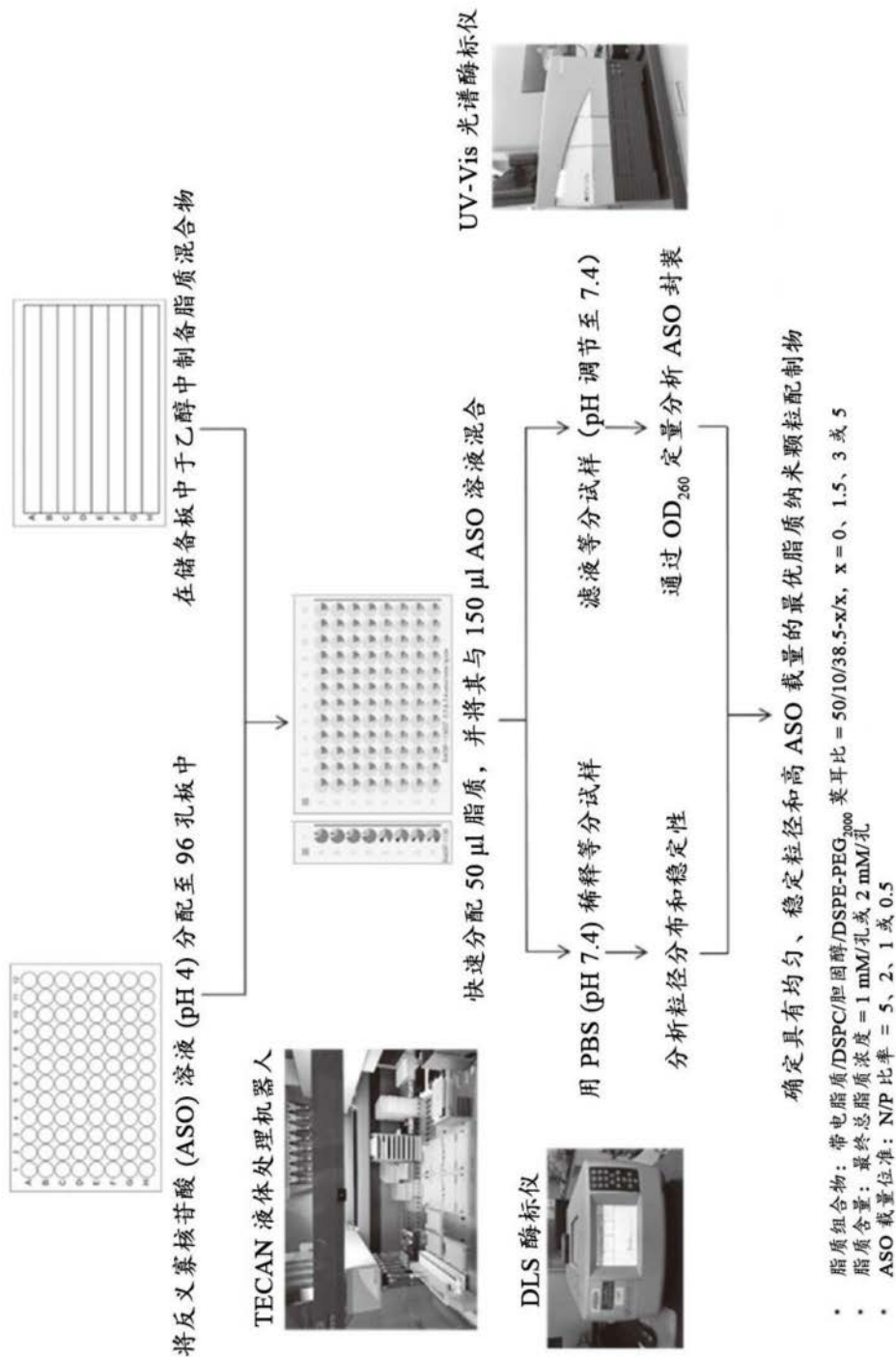


图2

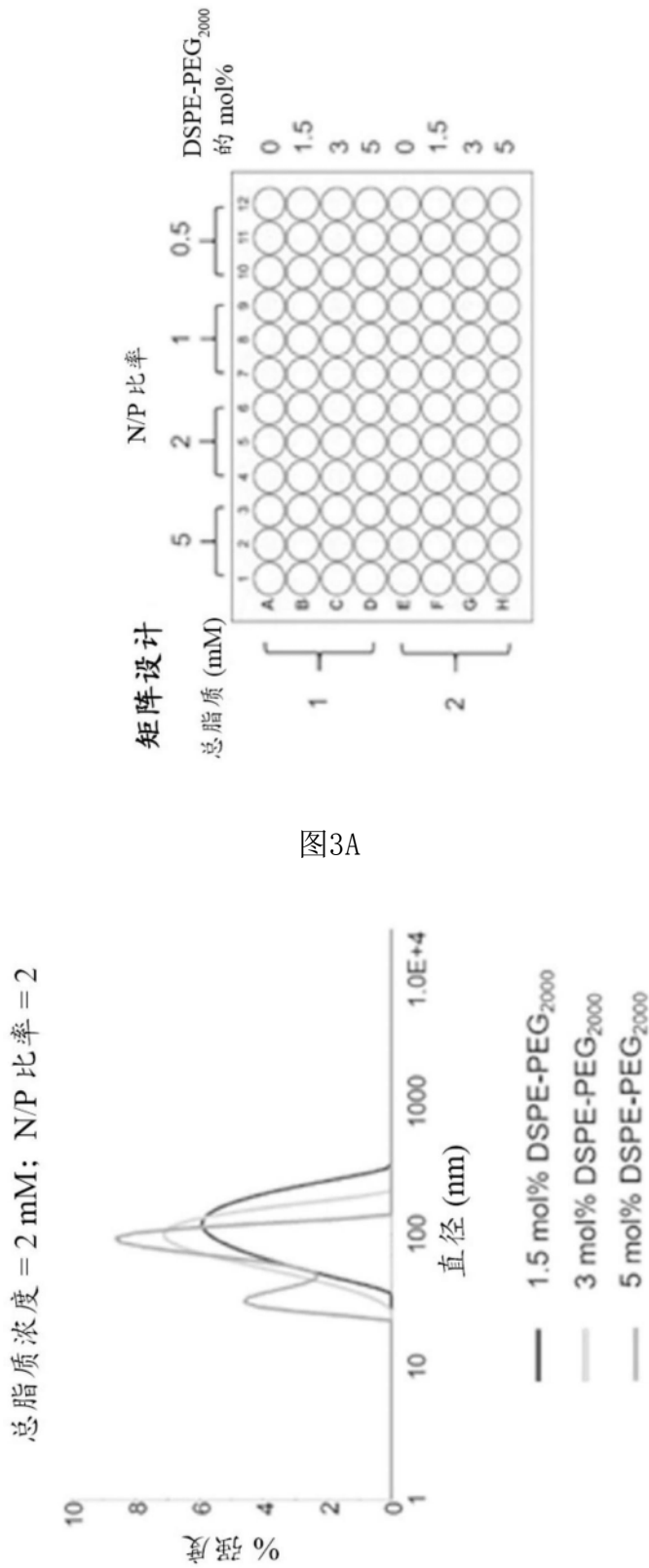


图3A

图3B

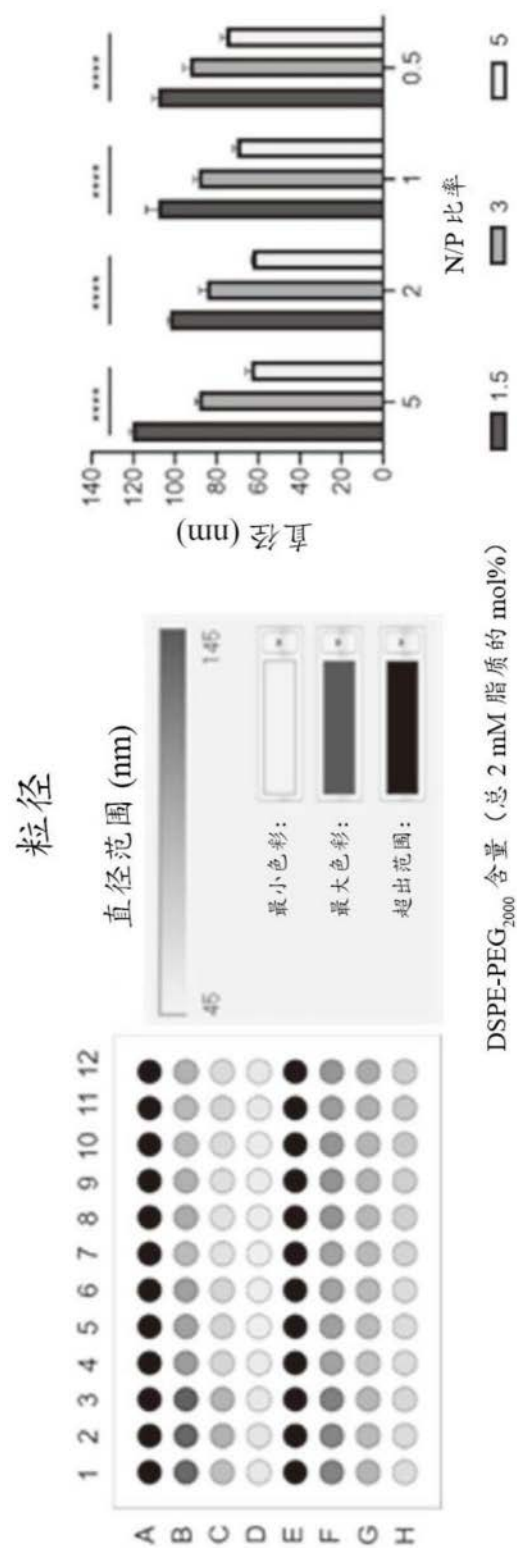


图3C

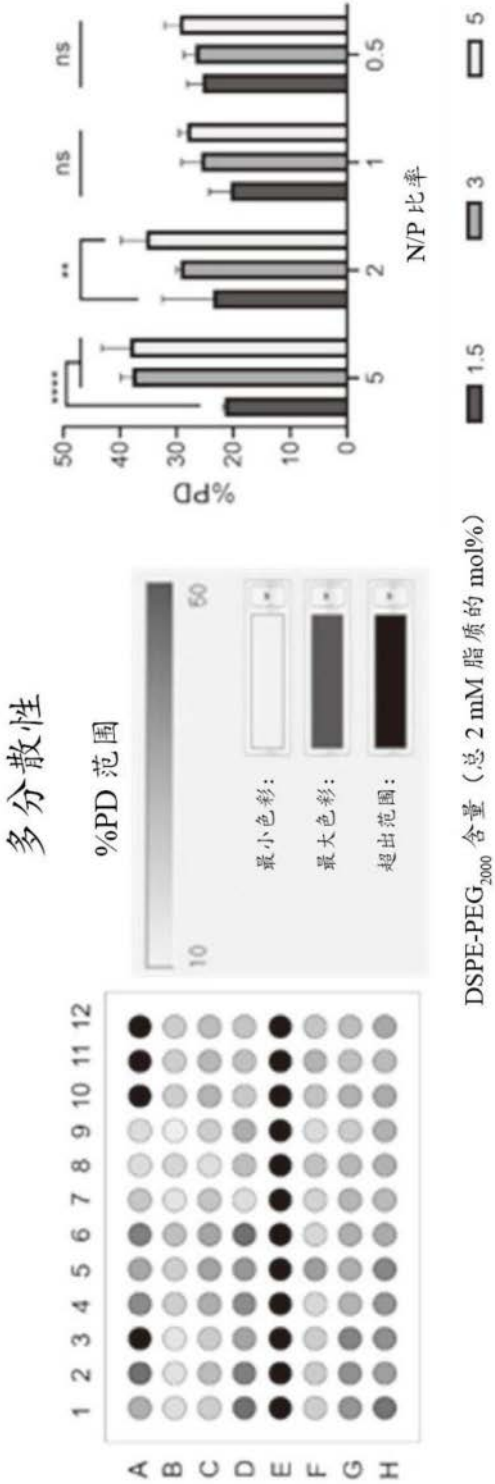


图3D

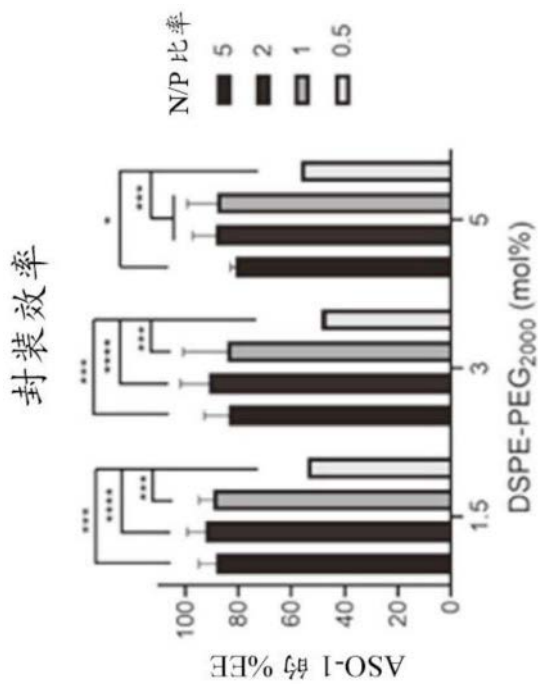


图3E

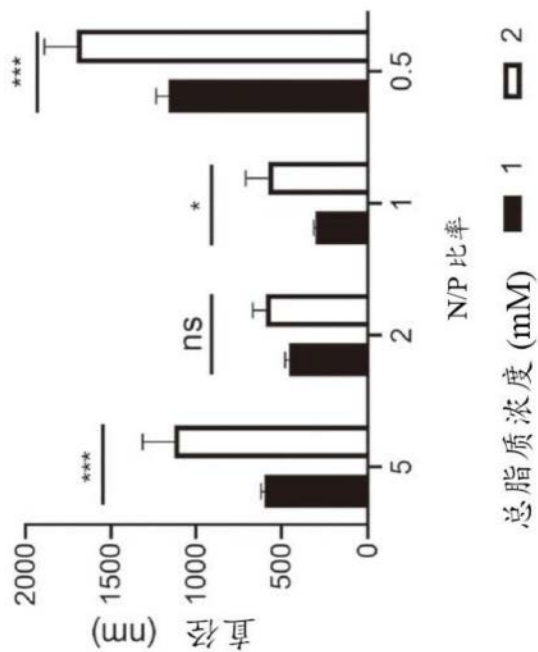


图4

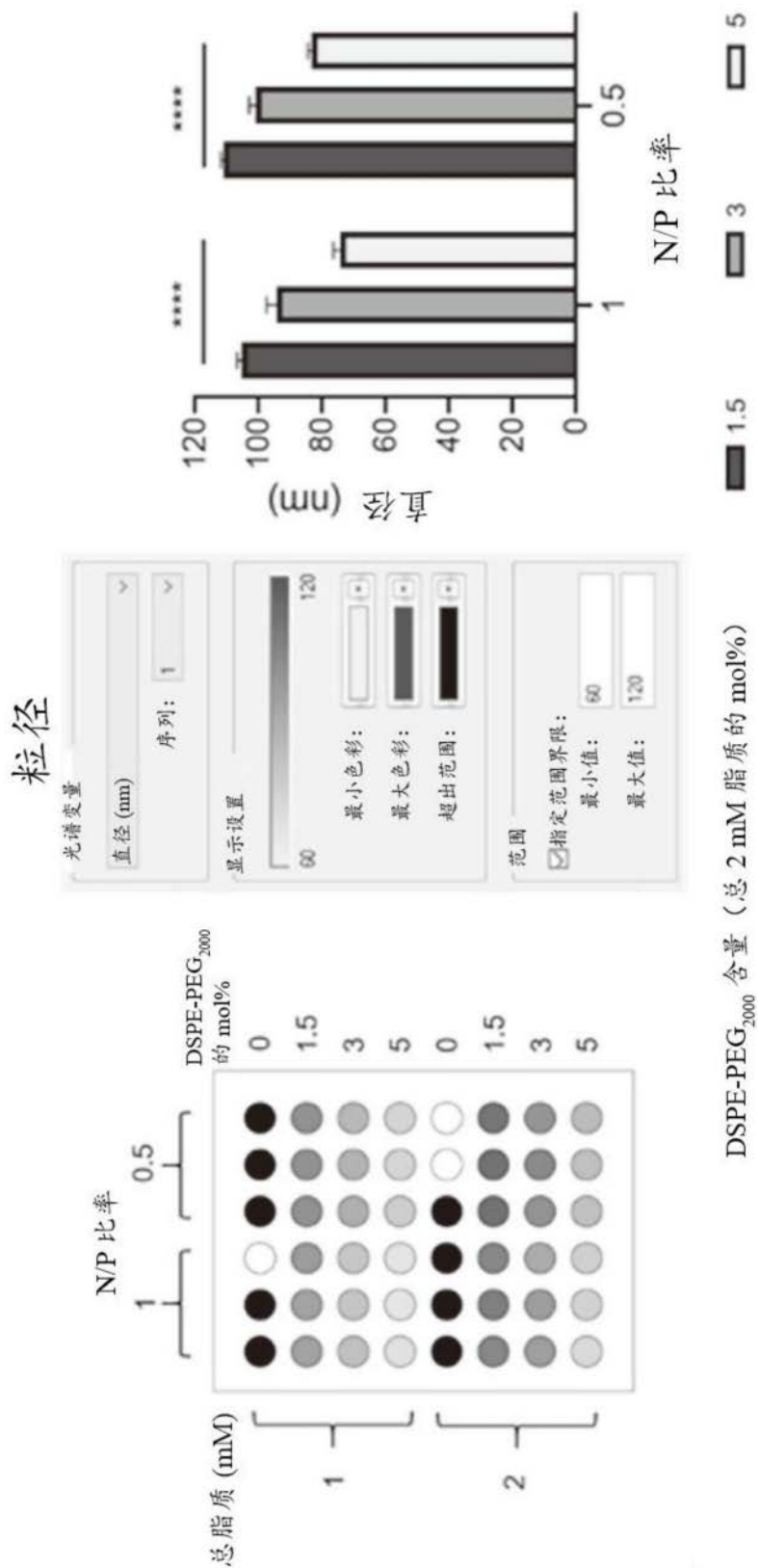


图5A

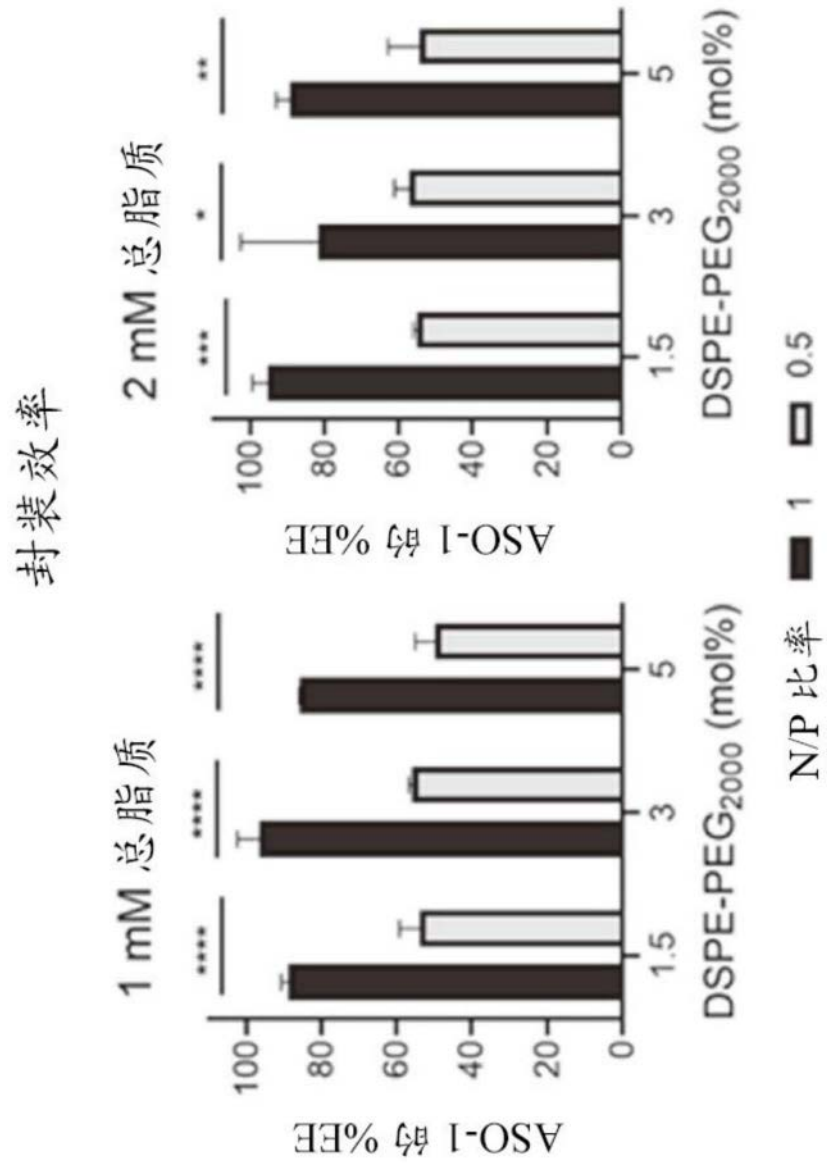


图5C

粒径

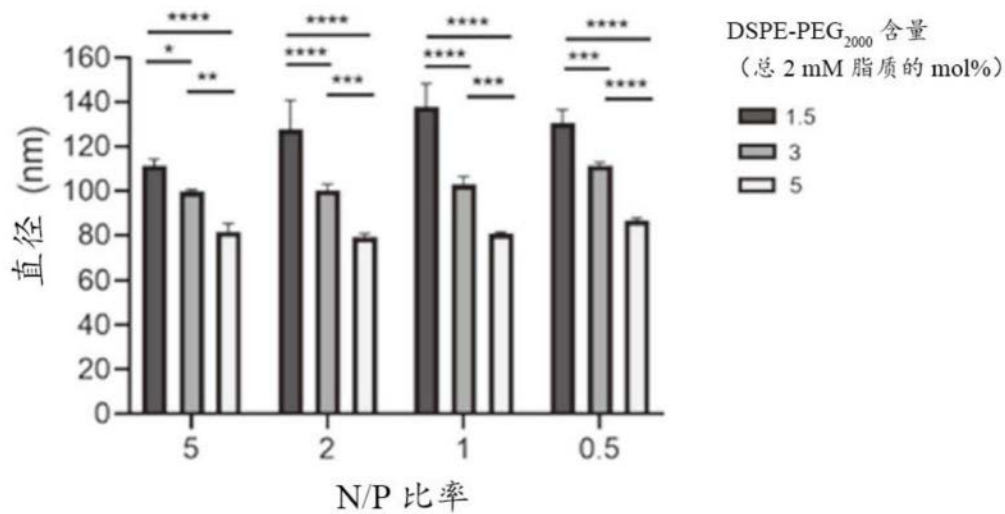


图6A

多分散性

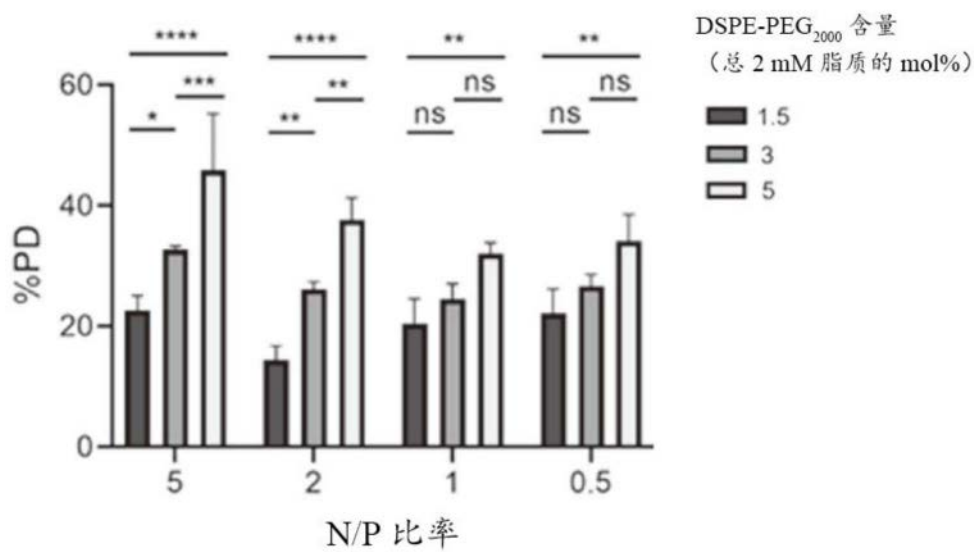


图6B

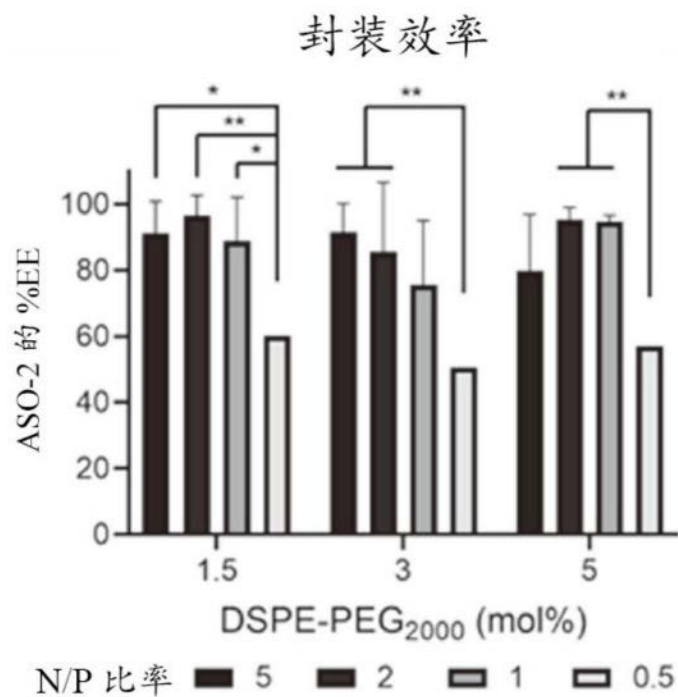


图6C

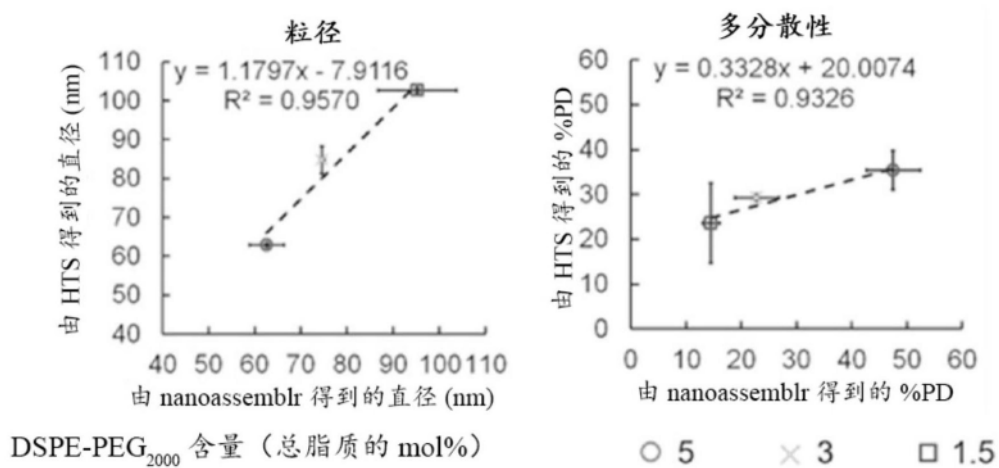


图7A

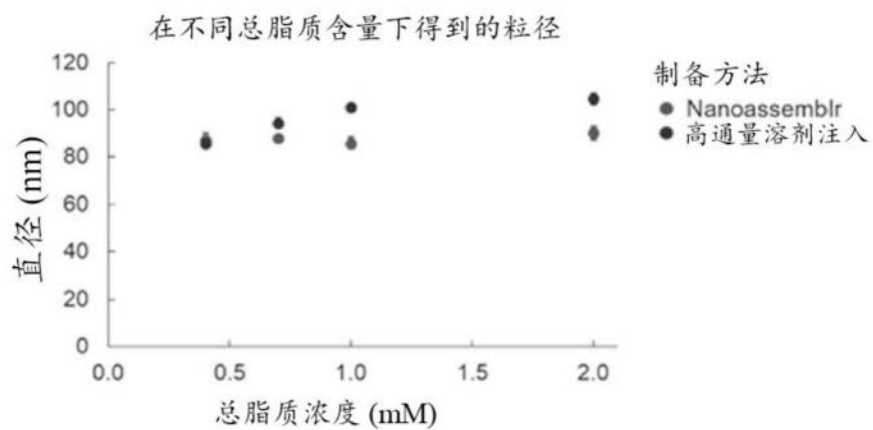


图7B

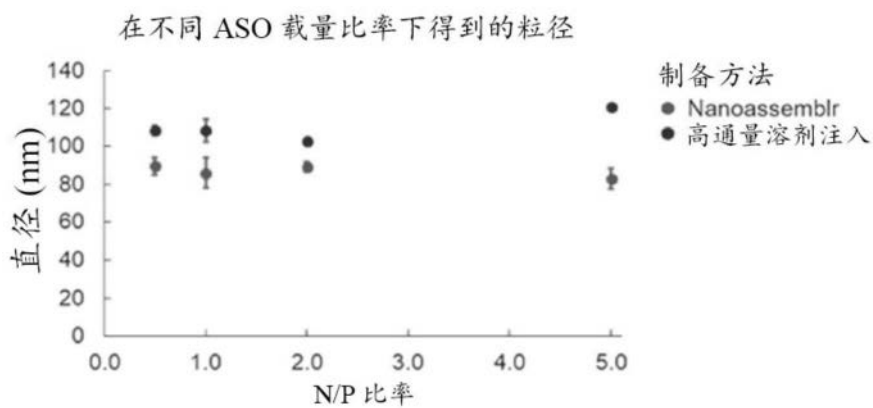


图7C

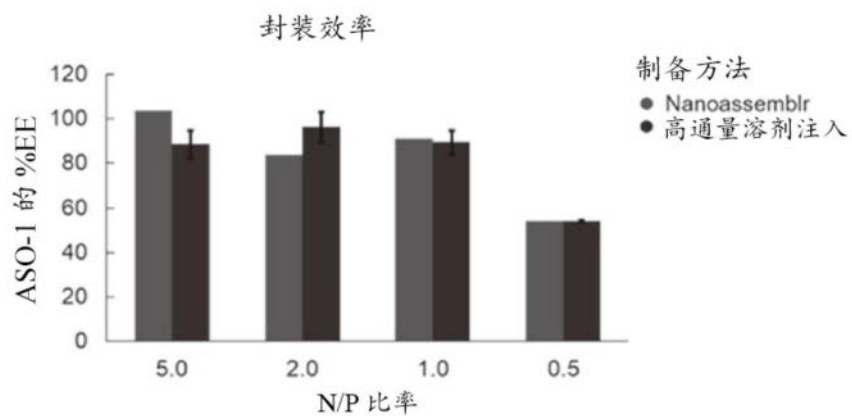


图7D

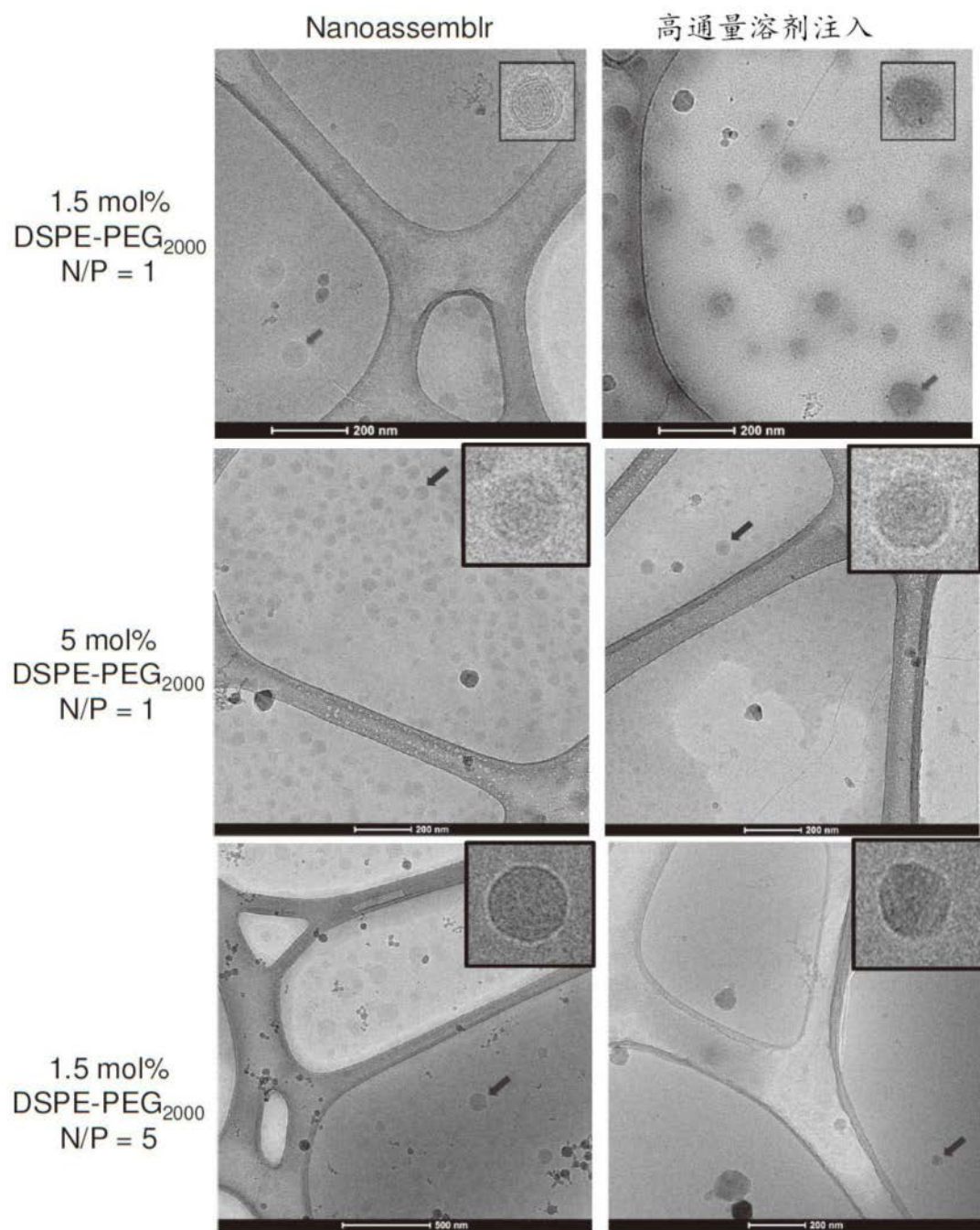


图7E

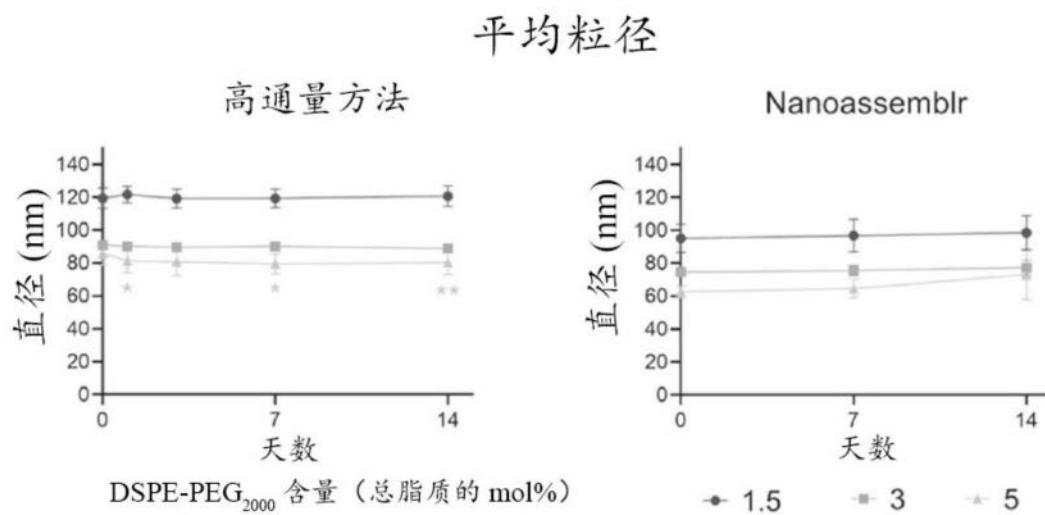


图8A

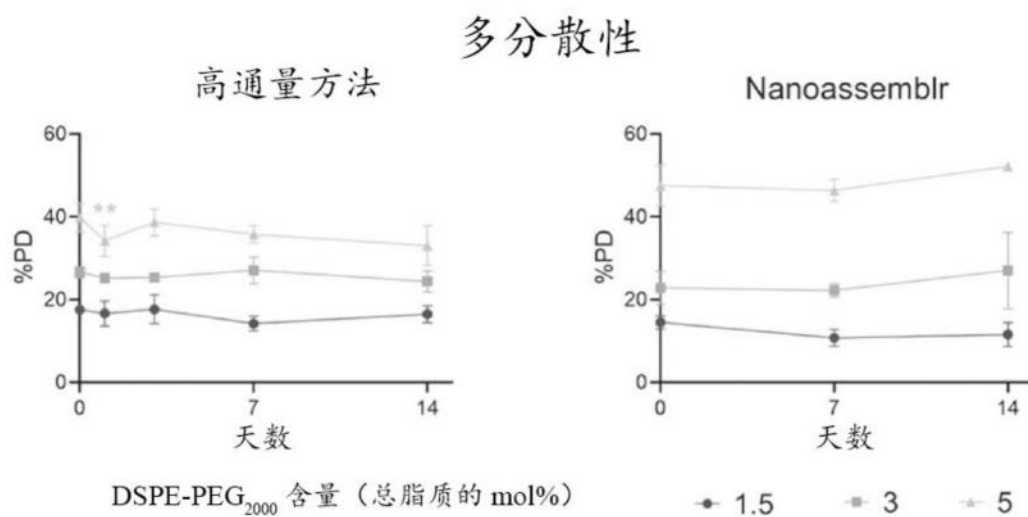


图8B

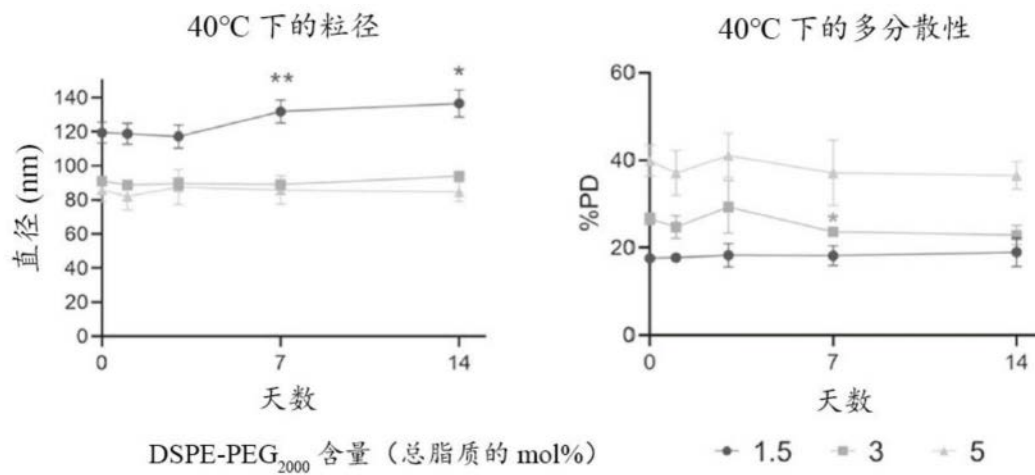


图9

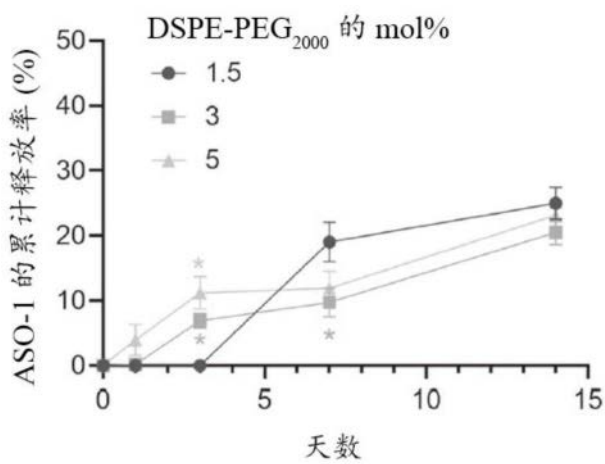


图10

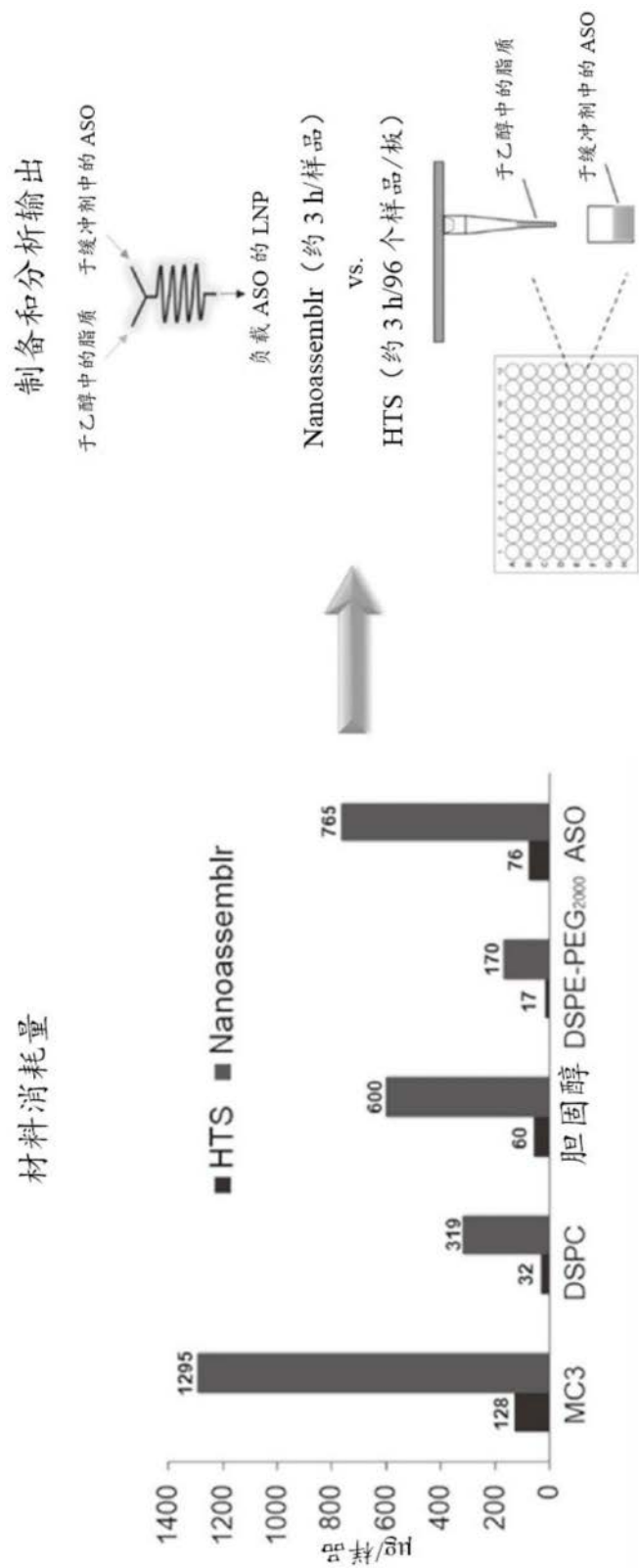


图11

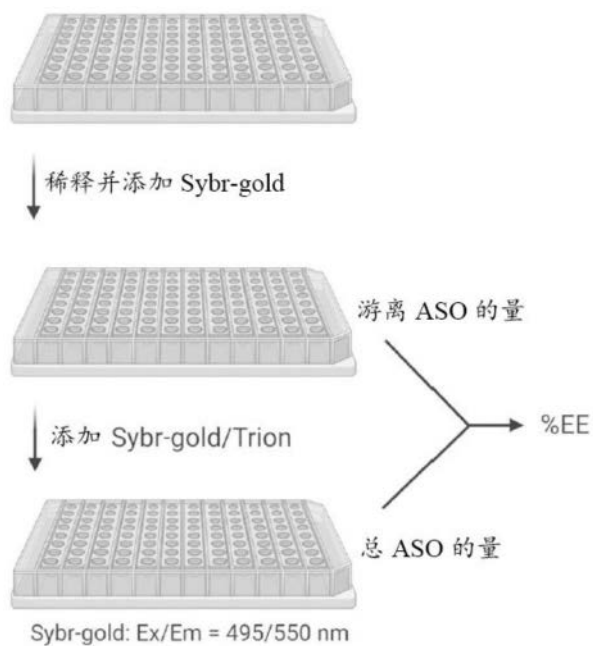


图12A

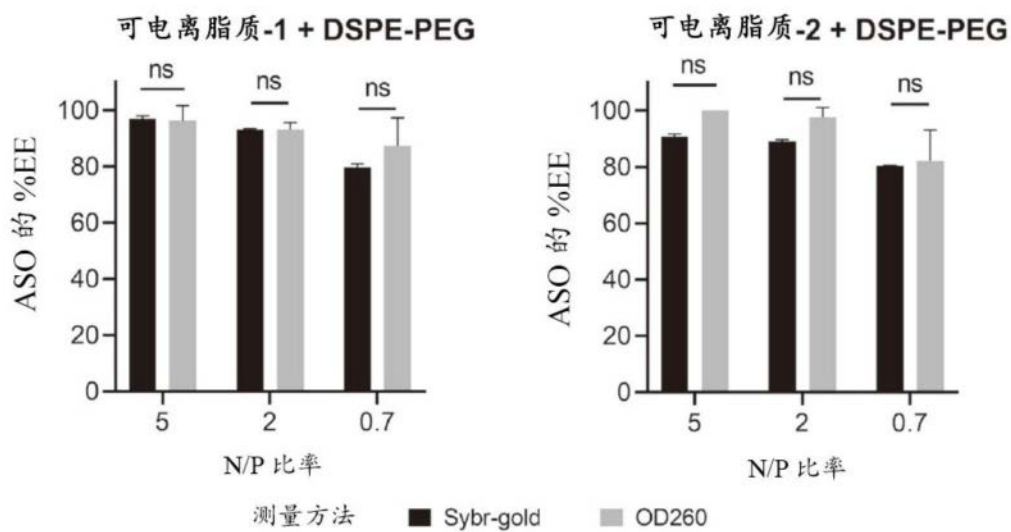


图12B

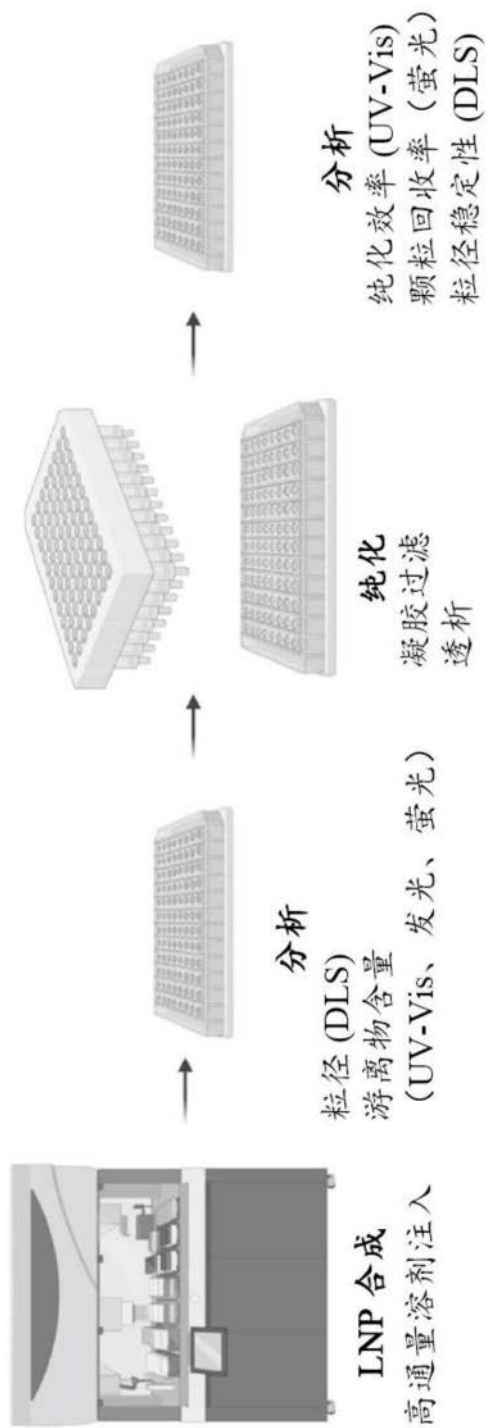


图13A

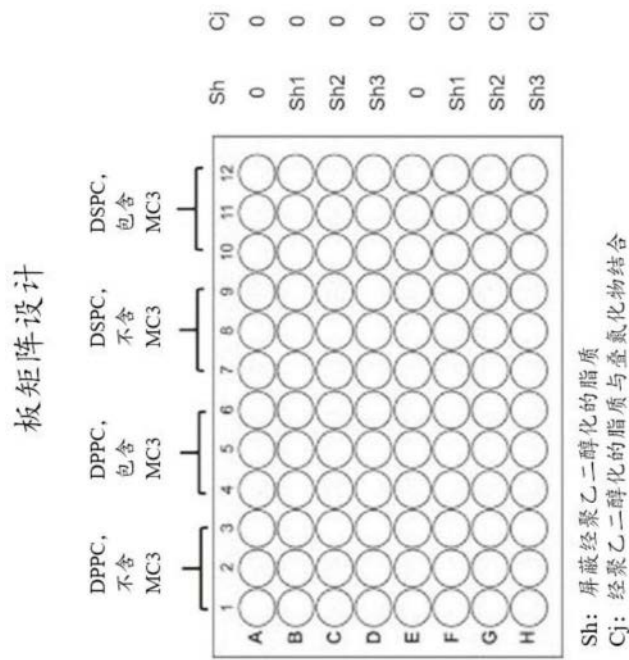


图13B

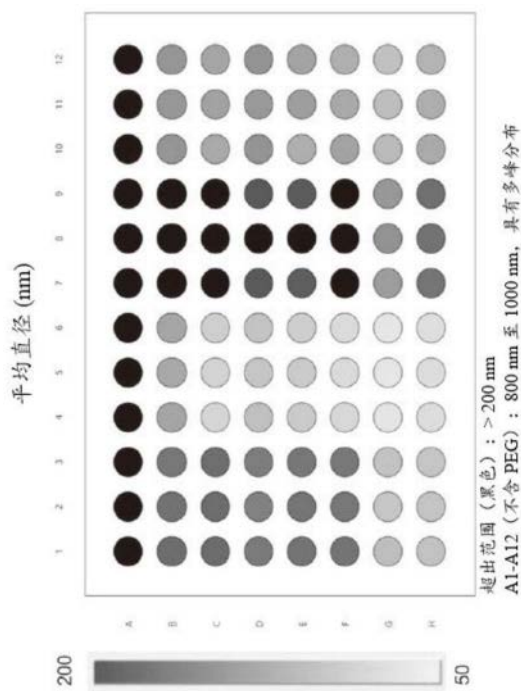


图13C

纯化前的游离肽浓度												
游离 HiBiT 浓度 (mg/ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		1.35	1.42	1.43	1.43	1.41	1.41	1.46	1.42	1.47	1.48	1.48
B		1.07	1.39	1.35	1.36	1.34	1.33	1.31	1.31	1.29	1.34	1.27
C		1.51	1.33	1.36	1.41	1.34	1.30	1.34	1.36	1.23	1.42	1.40
D		1.13	1.31	1.36	1.37	1.32	1.30	1.32	1.30	1.29	1.31	1.28
E		1.60	1.35	1.34	1.38	1.38	1.32	1.30	1.35	1.31	1.33	1.32
F		1.09	1.37	1.36	1.48	1.41	1.39	1.32	1.35	1.34	1.39	1.30
G		1.88	1.38	1.37	1.33	1.39	1.52	1.32	1.32	1.42	1.36	1.39
H		1.40	1.37	1.45	1.40	1.42	1.37	1.40	1.38	1.50	1.45	1.36
												1.67

图13D

凝胶过滤后的游离肽浓度												
SEC 后的 HiBiT 浓度 (mg/ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.027	0.000	0.030	0.027	0.032	0.034	0.026	0.000	0.027	0.032	0.028	0.030
B	0.033	0.031	0.033	0.043	0.030	0.037	0.056	0.036	0.049	0.070	0.028	0.032
C	0.035	0.026	0.029	0.028	0.026	0.029	0.036	0.037	0.033	0.035	0.036	0.036
D	0.028	0.029	0.000	0.000	0.026	0.028	0.032	0.043	0.028	0.030	0.030	0.032
E	0.000	0.037	0.027	0.027	0.064	0.029	0.041	0.062	0.027	0.036	0.048	0.035
F	0.032	0.028	0.032	0.032	0.027	0.036	0.034	0.045	0.039	0.030	0.032	0.135
G	0.034	0.032	0.030	0.027	0.029	0.040	0.033	0.030	0.039	0.029	0.031	0.047
H	0.036	0.037	0.035	0.034	0.032	0.033	0.033	0.031	0.000	0.038	0.034	0.029

图13E

透析后的游离肽浓度												
透析后的 HiBiT 浓度 (mg/ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0.093	0.096	0.140	0.113	0.101	0.115	0.121	0.101	0.121	0.121	0.116
B		0.106	0.104	0.087	0.100	0.117	0.102	0.104	0.094	0.112	0.080	0.100
C		0.099	0.070	0.063	0.108	0.105	0.111		0.102	0.075	0.094	0.105
D		0.096	0.101	0.059	0.102	0.094	0.110	0.108	0.100	0.104	0.113	0.103
E		0.081	0.106	0.098	0.104	0.106	0.110	0.115	0.103	0.103	0.107	0.103
F		0.064	0.083	0.096	0.109	0.100	0.101	0.102	0.091	0.104	0.099	0.104
G				0.118	0.091	0.107	0.118	0.105	0.107	0.111	0.117	0.119
H			0.106	0.100	0.116	0.114	0.124		0.104	0.112	0.116	0.111

图13F

凝胶过滤后的颗粒回收率													
SEC 后的颗粒回收率 (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		72.3	70.9	62.6	47.8	55.2	50.9	41.3	47.4	19.8	42.8	46.1	39.5
B		128.4	106.0	112.2	108.2	112.8	116.1	83.3	93.4	94.1	95.2	92.8	108.2
C		117.3	108.8	97.5	113.4	122.6	111.3	97.1	92.7	98.4	120.4	110.3	109.7
D		107.2	85.8	53.5	89.7	80.7	90.4	81.4	92.9	86.0	106.6	78.7	99.5
E		92.8	108.1	48.7	99.5	108.5	101.2	93.0	83.1	89.7	109.7	132.0	84.3
F		102.3	97.0	104.1	96.6	105.5	109.0	86.6	84.9	87.5	90.5	93.3	108.2
G		115.1	117.8	108.1	120.4	135.1	112.6	125.8	98.3	111.3	99.9	120.5	88.9
H		117.3	93.0	89.4	126.7	82.6	88.6	76.0	93.6	76.7	105.2	99.8	99.8

图13G

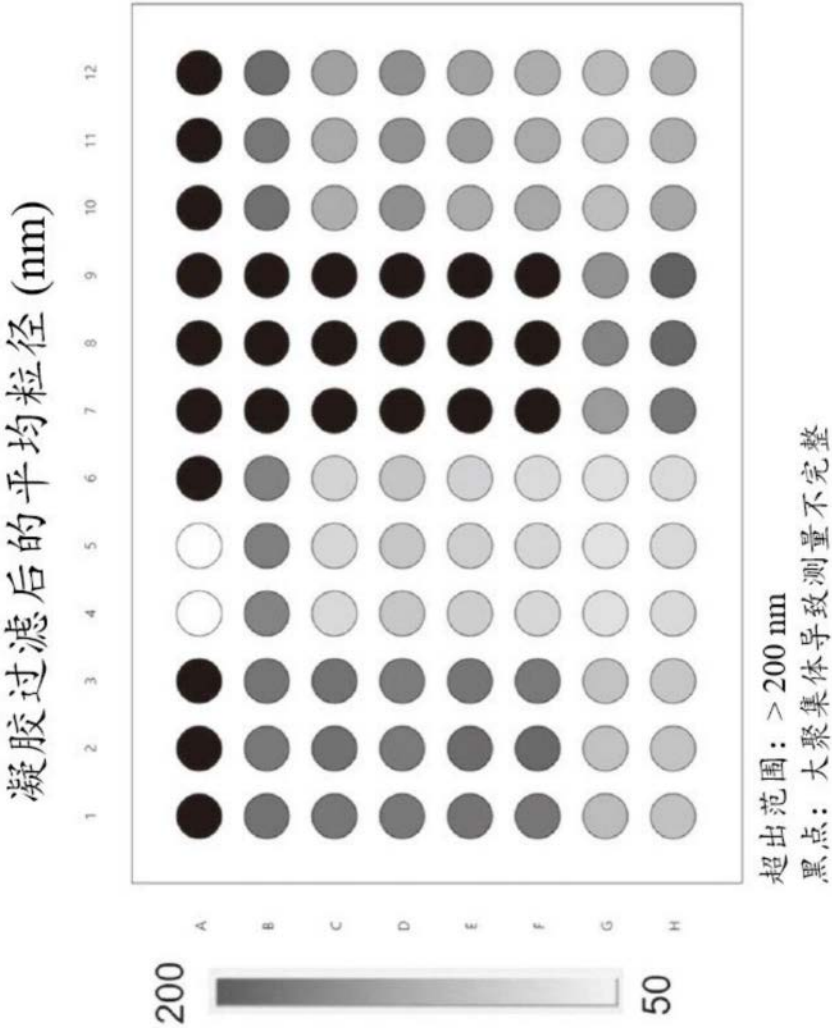


图13H