



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109563511 A

(43)申请公布日 2019.04.02

(21)申请号 201780049850.2

(22)申请日 2017.06.30

(30)优先权数据

62/357,189 2016.06.30 US

62/375,292 2016.08.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.02.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/040446 2017.06.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/006052 EN 2018.01.04

(71)申请人 阿布特斯生物制药公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72)发明人 迈克尔·J·艾布拉姆斯

詹姆斯·海斯 亚当·贾奇

基尤·蒙格·莱姆

洛恩·拉尔夫·帕尔默

斯蒂芬·P·里德

爱德华·D·亚沃尔斯基

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

代理人 刘明海 周瑞

(51)Int.Cl.

C12N 15/11(2006.01)

A61K 8/14(2006.01)

权利要求书3页 说明书80页

(54)发明名称

用于递送信使RNA的组合物和方法

(57)摘要

本发明提供了包含包封在脂质颗粒内的核酸分子例如mRNA分子的组合物。所述组合物可用于例如将所述mRNA分子引入人类受试者体内,在所述人类受试者体内,所述mRNA分子被翻译以生成用于改善疾病的一种或多种症状的多肽。

1. 一种脂质纳米颗粒,其包含:
 - (a) 阳离子脂质;
 - (b) 非阳离子脂质;
 - (c) 皮质类固醇;以及
 - (d) 核酸,其中所述核酸和所述皮质类固醇包封在所述脂质纳米颗粒内。
2. 一种脂质纳米颗粒群体,其包含如权利要求1所述的脂质纳米颗粒。
3. 一种脂质纳米颗粒群体,其包含至少一个选自以下的脂质纳米颗粒群体:
 - (a) 第一脂质纳米颗粒群体,所述脂质纳米颗粒各自包含阳离子脂质、非阳离子脂质和皮质类固醇;以及
 - (b) 第二脂质纳米颗粒群体,所述脂质纳米颗粒各自包含阳离子脂质、非阳离子脂质和核酸,
其中所述第一脂质纳米颗粒群体不包含核酸,并且其中所述第二脂质纳米颗粒群体不包含皮质类固醇。
4. 一种脂质纳米颗粒群体,其包含如权利要求3所述的第一脂质纳米颗粒群体和第二脂质纳米颗粒群体。
5. 如权利要求1至4中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体,其中所述核酸是mRNA。
6. 如权利要求1至5中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体,其中所述皮质类固醇的logP大于3.0。
7. 如权利要求1至6中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体,其中所述皮质类固醇是糖皮质激素。
8. 如权利要求1至6中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体,其中所述皮质类固醇是盐皮质激素。
9. 如权利要求1至6中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体,其中所述皮质类固醇是氯倍他索。
10. 如权利要求1至9中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体,其中所述非阳离子脂质选自PEG-脂质缀合物和磷脂。
11. 如权利要求1至10中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体,其中所述脂质纳米颗粒还包含胆固醇。
12. 如权利要求10和11中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体,其中所述磷脂包括二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)或它们的混合物。
13. 如权利要求10和11中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体,其中所述PEG-脂质缀合物选自由以下组成的组:PEG-二酰基甘油(PEG-DAG)缀合物、PEG-二烷氧基丙基(PEG-DAA)缀合物、PEG-磷脂缀合物、PEG-神经酰胺(PEG-Cer)缀合物以及它们的混合物。
14. 如权利要求13所述的脂质纳米颗粒或其群体,其中所述PEG-脂质缀合物是PEG-DAA缀合物。
15. 如权利要求14所述的脂质纳米颗粒或其群体,其中所述PEG-DAA缀合物选自由以下组成的组:PEG-二癸氧基丙基(C₁₀)缀合物、PEG-二月桂氧基丙基(C₁₂)缀合物、PEG-二肉豆蔻氧基丙基(C₁₄)缀合物、PEG-二棕榈氧基丙基(C₁₆)缀合物、PEG-二硬脂氧基丙基(C₁₈)缀合物以及它们的混合物。

16. 如权利要求1至15中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体,其中所述脂质纳米颗粒的脂质:核酸质量比为约9:1至约20:1。

17. 如权利要求1至16中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体,其中所述mRNA是经化学修饰的。

18. 如权利要求1至17中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体,其中所述脂质纳米颗粒包含电子致密核。

19. 如权利要求1至17中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体,其中所述脂质纳米颗粒包含电子致密核,并且其中所述mRNA位于所述电子致密核内。

20. 一种脂质颗粒群体,其包含许多如权利要求1所述的脂质纳米颗粒。

21. 如权利要求1至18中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体,所述脂质纳米颗粒或其群体的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水的参考IFIT应答的30倍。

22. 如权利要求1至21中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体,所述脂质纳米颗粒或其群体具有以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物;以及包封在所述脂质颗粒内的mRNA;前提条件是所述脂质颗粒包含小于0.5摩尔%的磷脂。

23. 一种药物组合物,其包含如权利要求1至22中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体,以及药学上可接受的载体。

24. 一种用于将编码蛋白的mRNA引入细胞中的方法,所述方法包括在所述mRNA被引入所述细胞中并在其中表达以产生所述蛋白的条件下,使所述细胞与如权利要求5至23中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体接触。

25. 一种用于治疗 and/或改善人体内与由所述人体内蛋白的表达受损引起的疾病相关的一种或多种症状的方法,所述方法包括向所述人体施用治疗有效量的如权利要求5至23中任一项所述的脂质纳米颗粒或其群体,其中包封在所述脂质纳米颗粒内的所述mRNA编码所述蛋白。

26. 一种包含许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂,其中每个脂质纳米颗粒包含:

- (a) 阳离子脂质;
- (b) 非阳离子脂质;以及
- (c) 包封在所述脂质颗粒内的mRNA,

其中所述脂质纳米颗粒制剂的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水的参考IFIT应答的30倍。

27. 一种制备脂质纳米颗粒的方法,其包括组合:

- (a) 阳离子脂质;
- (b) 非阳离子脂质;以及
- (c) 经纯化的mRNA,以便形成脂质纳米颗粒,其中所述mRNA包封在所述脂质纳米颗粒内,并且其中所述脂质纳米颗粒的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水的参考IFIT应答的30倍。

28. 一种制备包含许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂的方法,所述方法包括组合以下物质的步骤:

- (a) 阳离子脂质;
- (b) 非阳离子脂质;以及

(c) 经纯化的mRNA,以便形成包含许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂,其中所述mRNA包封在所述脂质纳米颗粒制剂中的所述脂质颗粒内,并且其中所述脂质纳米颗粒制剂的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水的参考IFIT应答的30倍。

29. 一种包含许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂,所述脂质纳米颗粒制剂通过包括组合以下物质的步骤的方法制备:

(a) 阳离子脂质;

(b) 非阳离子脂质;以及

(c) 经纯化的mRNA,以便形成包含许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂,其中所述mRNA包封在所述脂质纳米颗粒制剂中的所述脂质颗粒内,并且其中所述脂质纳米颗粒制剂的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水的参考IFIT应答的30倍。

30. 一种脂质纳米颗粒,其包含:

(a) 阳离子脂质;

(b) 以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物;以及

(c) 包封在所述脂质颗粒内的mRNA;

前提条件是所述脂质颗粒包含小于0.5摩尔%的磷脂。

31. 一种脂质纳米颗粒群体,其中所述群体中的每个脂质纳米颗粒包含:

(a) 阳离子脂质;

(b) 以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物;以及

(c) 包封在所述脂质纳米颗粒内的mRNA;

前提条件是所述脂质纳米颗粒包含小于0.5摩尔%的磷脂。

用于递送信使RNA的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求2016年6月30日提交的美国申请序列号62/357,189和2016年8月15日提交的美国申请序列号62/375,292的优先权权益,这些申请以引用方式并入本文。

背景技术

[0003] 人类中的一些疾病是因功能性蛋白通常存在且具有活性的细胞类型中该蛋白的缺失或损伤引起的。例如,由于编码基因的转录失活,或者由于编码基因中存在使蛋白完全或部分无功能的突变,功能性蛋白可以完全或部分缺失。

[0004] 因蛋白完全或部分失活引起的人类疾病的实例包括X连锁重症联合免疫缺陷(X-SCID)和肾上腺脑白质营养不良(X-ALD)。X-SCID由编码共用 γ 链蛋白的基因中的一个或多个突变引起,该共用 γ 链蛋白是若干白介素的受体的组分,这些白介素参与免疫系统内B细胞和T细胞的发育和成熟。X-ALD由称为ABCD1的过氧化物酶体膜转运蛋白基因中的一个或多个突变引起。患有X-ALD的个体的全身组织中具有非常高水平的长链脂肪酸,这会引发多种可能导致精神损伤或死亡的症状。

[0005] 已经尝试使用基因疗法来治疗因功能性蛋白通常存在且具有活性的细胞类型中该蛋白的缺失或损伤引起的一些疾病。基因疗法通常涉及将包含编码受影响蛋白的功能形式的基因的载体引入患者体内,并表达功能性蛋白以治疗疾病。迄今为止,基因疗法仅取得有限成功。

[0006] 因此,一直需要用于在患有因功能性蛋白的完全或部分缺失引起的疾病的人体内表达蛋白的功能形式的组合物和方法,并且需要经由触发较少的对疗法的免疫应答的方法和组合物递送核酸(例如,mRNA)。

发明内容

[0007] 根据前述内容,本发明在某些实施方案中提供了可用于递送核酸的组合物和方法,例如以便在活细胞(例如,人体内的细胞)中表达一种或多种mRNA分子。mRNA分子可以编码在活细胞内表达的一种或多种多肽。在一些实施方案中,多肽在患病生物体(例如,哺乳动物,诸如人类)内表达,并且多肽的表达改善疾病的一种或多种症状。本发明的某些实施方案的组合物和方法尤其适用于治疗因人体内功能性多肽缺失或水平降低引起的人类疾病。

[0008] 在一个方面,本发明提供了一种脂质纳米颗粒(LNP),其包含:(a)阳离子脂质;(b)非阳离子脂质;(c)皮质类固醇;以及(d)核酸,其中核酸和皮质类固醇包封在脂质纳米颗粒内。本发明的某些实施方案提供了一种包含脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒群体。本发明的某些实施方案提供了一种包含许多脂质纳米颗粒的脂质颗粒群体。在某些实施方案中,核酸是经HPLC纯化的mRNA。在某些实施方案中,LNP包含以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物。在某些实施方案中,LNP包含小于0.5摩尔%的磷脂。

[0009] 本发明的某些实施方案提供了一种脂质纳米颗粒群体,其包含至少一个选自以下

的脂质纳米颗粒群体：(a) 第一脂质纳米颗粒群体，所述脂质纳米颗粒各自包含阳离子脂质、非阳离子脂质和皮质类固醇；(b) 第二脂质纳米颗粒群体，所述脂质纳米颗粒各自包含阳离子脂质、非阳离子脂质和核酸，其中第一脂质纳米颗粒群体不包含核酸，并且其中第二脂质纳米颗粒群体不包含皮质类固醇。本发明的某些实施方案提供了一种脂质纳米颗粒群体，其包含第一脂质纳米颗粒群体和第二脂质纳米颗粒群体。在某些实施方案中，核酸是经HPLC纯化的mRNA。

[0010] 本发明的某些实施方案提供了一种脂质纳米颗粒，其包含：(a) 阳离子脂质；(b) 以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物；以及(c) 包封在脂质颗粒内的mRNA；前提条件是脂质颗粒包含小于0.5摩尔%的磷脂。在某些实施方案中，LNP包含皮质类固醇。在某些实施方案中，mRNA是经HPLC纯化的mRNA。

[0011] 某些实施方案提供了一种脂质纳米颗粒群体，其中群体中的每个脂质纳米颗粒包含：(a) 阳离子脂质；(b) 以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物；(c) 包封在脂质纳米颗粒内的mRNA；前提条件是脂质纳米颗粒包含小于0.5摩尔%的磷脂。在某些实施方案中，LNP群体包含含有皮质类固醇的LNP。在某些实施方案中，mRNA是经HPLC纯化的mRNA。

[0012] 本发明的某些实施方案提供了一种包含许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂，其中每个脂质纳米颗粒包含：(a) 阳离子脂质；(b) 非阳离子脂质；(c) 包封在脂质颗粒内的mRNA，其中脂质纳米颗粒制剂的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水的参考IFIT应答的30倍。在某些实施方案中，mRNA是经HPLC纯化的mRNA。在某些实施方案中，LNP包含以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物。在某些实施方案中，LNP包含小于0.5摩尔%的磷脂。在某些实施方案中，LNP包含皮质类固醇。

[0013] 本发明的某些实施方案提供了一种制备脂质纳米颗粒的方法，其包括组合：(a) 阳离子脂质；(b) 非阳离子脂质；以及(c) 经纯化的mRNA，以便形成脂质纳米颗粒，其中mRNA包封在脂质纳米颗粒内，并且其中脂质纳米颗粒的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水的参考IFIT应答的30倍。在某些实施方案中，mRNA是经HPLC纯化的mRNA。在某些实施方案中，LNP包含以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物。在某些实施方案中，LNP包含小于0.5摩尔%的磷脂。在某些实施方案中，LNP包含皮质类固醇。

[0014] 本发明的某些实施方案提供了一种制备包含许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂的方法，其包括组合以下物质的步骤：(a) 阳离子脂质；(b) 非阳离子脂质；以及(c) 经纯化的mRNA，以便形成包含许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂，其中mRNA包封在脂质纳米颗粒制剂中的脂质颗粒内，并且其中脂质纳米颗粒制剂的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水的参考IFIT应答的30倍。在某些实施方案中，LNP包含以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物。在某些实施方案中，LNP包含小于0.5摩尔%的磷脂。在某些实施方案中，LNP包含皮质类固醇。

[0015] 本发明的某些实施方案提供了一种包含许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂，所述脂质纳米颗粒制剂通过包括组合以下物质的步骤的方法制备：(a) 阳离子脂质；(b) 非阳离子脂质；以及(c) 经纯化的mRNA，以便形成包含许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂，其中mRNA包封在脂质纳米颗粒制剂中的脂质颗粒内，并且其中脂质纳米颗粒制剂的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水的参考IFIT应答的30倍。在某些实施方案中，LNP包含以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物。在某些实施方案中，LNP包含小于0.5摩尔%的磷

脂。在某些实施方案中，LNP包含皮质类固醇。

[0016] 因此，在一个方面，本发明提供了一种脂质颗粒，其包含阳离子脂质、非阳离子脂质以及包封在脂质颗粒内的mRNA分子。

[0017] 本发明还提供了核酸-脂质颗粒，其各自包含(a)含有阳离子脂质、PEG-脂质和磷脂的脂质颗粒；(b)mRNA分子，其中mRNA分子包封在脂质颗粒内。脂质颗粒可任选地包含胆固醇。mRNA可以完全或部分包封在脂质颗粒内。在一些实施方案中，核酸-脂质颗粒的脂质:mRNA质量比为约9:1至约20:1。在一个具体实施方案中，核酸-脂质颗粒的脂质:mRNA质量比为约12:1。可对mRNA进行化学修饰，例如通过掺入假尿苷代替尿苷，和/或掺入5-甲基胞苷代替胞苷。本发明还提供了包含本发明的核酸-脂质颗粒的药物组合物。通常，该药物组合物包含赋形剂。

[0018] 另一方面，本发明提供了用于将编码蛋白的mRNA引入细胞中的方法。所述方法各自包括在mRNA被引入细胞中并在其中表达以产生蛋白的条件下使细胞与本发明的核酸-脂质颗粒(通常是本发明的许多核酸-脂质颗粒)接触的步骤。所述方法可以在体内或体外实践。例如，细胞位于活体(例如，哺乳动物体，诸如人体)内，并且核酸-脂质颗粒可通过注射引入活体内。

[0019] 在另一方面，本发明提供了用于治疗 and/或改善人体内与疾病相关的一种或多种症状的方法，所述疾病由人体内蛋白的表达受损引起。本发明的该方面的方法包括向人体施用治疗有效量的本发明的核酸-脂质颗粒(通常是本发明的许多核酸-脂质颗粒)的步骤，其中包封在核酸-脂质颗粒内的mRNA编码蛋白。所编码的蛋白在人体内表达，从而改善疾病的至少一种症状。

[0020] 在一个实施方案中，在本发明的实践中使用的脂质颗粒中脂质与核酸(例如，mRNA)的比率为约13:1。

[0021] 本发明的方法和组合物可用于例如在人体的细胞、组织和/或器官中治疗至少部分地由多肽的缺失、或多肽的水平降低、或多肽的非功能性(或部分功能性或异常功能性)形式的表达引起的任何疾病。

[0022] 通过以下具体实施方式和附图，本发明的其他目的、特征和优点对于本领域的技术人员而言将是显而易见的。

具体实施方式

[0023] 本文所述的核酸-脂质颗粒、方法和药物制剂有利地提供了用于在哺乳动物生物体(例如，人类)中表达蛋白的重要新组合物和方法。本发明的实施方案可以例如每天一次、每周一次、每几周一次(例如，每两周、三周、四周、五周或六周一次)、每月一次或每年一次施用。mRNA在脂质颗粒内的包封赋予一个或多个优点，例如保护mRNA免遭血流中的核酸酶降解、允许mRNA在靶组织中优先积聚以及提供mRNA进入细胞质的手段，在细胞质中mRNA可以表达所编码的蛋白。

[0024] 在一个方面，本发明提供了一种脂质纳米颗粒，其包含：

[0025] (a) 阳离子脂质；(b) 非阳离子脂质；(c) 皮质类固醇；以及(d) 核酸，其中核酸和皮质类固醇包封在脂质纳米颗粒内。本发明的某些实施方案提供了一种包含脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒群体。本发明的某些实施方案提供了一种包含许多脂质纳米颗粒的脂质颗粒

群体。在某些实施方案中,核酸是经HPLC纯化的mRNA。在某些实施方案中,LNP包含以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物。在某些实施方案中,LNP包含小于0.5摩尔%的磷脂。

[0026] 本发明的某些实施方案提供了一种脂质纳米颗粒群体,其包含至少一个选自以下的脂质纳米颗粒群体:(a) 第一脂质纳米颗粒群体,所述脂质纳米颗粒各自包含阳离子脂质、非阳离子脂质和皮质类固醇;(b) 第二脂质纳米颗粒群体,所述脂质纳米颗粒各自包含阳离子脂质、非阳离子脂质和核酸,其中第一脂质纳米颗粒群体不包含核酸,并且其中第二脂质纳米颗粒群体不包含皮质类固醇。本发明的某些实施方案提供了一种脂质纳米颗粒群体,其包含第一脂质纳米颗粒群体和第二脂质纳米颗粒群体。在某些实施方案中,核酸是经HPLC纯化的mRNA。

[0027] 本发明的某些实施方案提供了一种脂质纳米颗粒,其包含:(a) 阳离子脂质;(b) 以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物;以及(c) 包封在脂质颗粒内的mRNA;前提条件是脂质颗粒包含小于0.5摩尔%的磷脂。在某些实施方案中,LNP包含皮质类固醇。在某些实施方案中,mRNA是经HPLC纯化的mRNA。

[0028] 某些实施方案提供了一种脂质纳米颗粒群体,其中群体中的每个脂质纳米颗粒包含:(a) 阳离子脂质;(b) 以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物;(c) 包封在脂质纳米颗粒内的mRNA;前提条件是脂质纳米颗粒包含小于0.5摩尔%的磷脂。在某些实施方案中,LNP群体包含含有皮质类固醇的LNP。在某些实施方案中,mRNA是经HPLC纯化的mRNA。

[0029] 本发明的某些实施方案提供了一种包含许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂,其中每个脂质纳米颗粒包含:(a) 阳离子脂质;(b) 非阳离子脂质;(c) 包封在脂质颗粒内的mRNA,其中脂质纳米颗粒制剂的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水的参考IFIT应答的30倍。在某些实施方案中,mRNA是经纯化的mRNA。在某些实施方案中,mRNA是经HPLC纯化的mRNA。在某些实施方案中,LNP包含以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物。在某些实施方案中,LNP包含以至少3.5摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物。在某些实施方案中,LNP包含小于0.5摩尔%的磷脂。在某些实施方案中,LNP包含小于0.05摩尔%的磷脂。在某些实施方案中,LNP包含皮质类固醇。在某些实施方案中,制剂中的基本上所有脂质纳米颗粒均包含包封在脂质纳米颗粒内的皮质类固醇。例如,在某些实施方案中,制剂中至少约80%的脂质纳米颗粒还包含包封在脂质纳米颗粒内的皮质类固醇。在某些实施方案中,制剂中至少约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的脂质纳米颗粒还包含包封在脂质纳米颗粒内的皮质类固醇。

[0030] 本发明的某些实施方案提供了一种包含许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂,其中每个脂质纳米颗粒包含:(a) 阳离子脂质;(b) 非阳离子脂质;(c) 包封在脂质颗粒内的mRNA,其中脂质纳米颗粒制剂的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水的参考IFIT应答的30倍,其中非阳离子脂质是以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物,前提条件是脂质纳米颗粒包含小于0.5摩尔%的磷脂,并且其中制剂中至少90%的脂质纳米颗粒还包含包封在脂质纳米颗粒内的皮质类固醇。

[0031] 本发明的某些实施方案提供了一种脂质纳米颗粒制剂,其包含:

[0032] (a) 第一脂质纳米颗粒群体,所述脂质纳米颗粒各自包含阳离子脂质、非阳离子脂质以及用脂质纳米颗粒包封的皮质类固醇;以及

[0033] (b) 第二脂质纳米颗粒群体,所述脂质纳米颗粒各自包含阳离子脂质、非阳离子脂质以及包封在脂质纳米颗粒内的mRNA,

[0034] 其中第一脂质纳米颗粒群体不包含mRNA,其中第二脂质纳米颗粒群体不包含皮质类固醇,并且其中脂质纳米颗粒制剂的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水的参考IFIT应答的30倍。

[0035] 本发明的某些实施方案提供了一种制备脂质纳米颗粒的方法,其包括组合:(a) 阳离子脂质;(b) 非阳离子脂质;以及(c) 经纯化的mRNA,以便形成脂质纳米颗粒,其中mRNA包封在脂质纳米颗粒内,并且其中脂质纳米颗粒的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水的参考IFIT应答的30倍。在某些实施方案中,mRNA是经HPLC纯化的mRNA。在某些实施方案中,LNP包含以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物。在某些实施方案中,LNP包含小于0.5摩尔%的磷脂。在某些实施方案中,LNP包含皮质类固醇。在某些实施方案中,该方法还包括纯化mRNA,从而得到经纯化的mRNA。

[0036] 本发明的某些实施方案提供了一种制备包含许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂的方法,其包括组合以下物质的步骤:(a) 阳离子脂质;(b) 非阳离子脂质;以及(c) 经纯化的mRNA,以便形成包含许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂,其中mRNA包封在脂质纳米颗粒制剂中的脂质颗粒内,并且其中脂质纳米颗粒制剂的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水的参考IFIT应答的30倍。在某些实施方案中,LNP包含以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物。在某些实施方案中,LNP包含小于0.5摩尔%的磷脂。在某些实施方案中,LNP包含皮质类固醇。在某些实施方案中,该方法还包括纯化mRNA(例如,经由HPLC),从而得到经纯化的mRNA。

[0037] 本发明的某些实施方案提供了一种包含许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂,所述脂质纳米颗粒制剂通过包括组合以下物质的步骤的方法制备:(a) 阳离子脂质;(b) 非阳离子脂质;以及(c) 经纯化的mRNA,以便形成包含许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂,其中mRNA包封在脂质纳米颗粒制剂中的脂质颗粒内,并且其中脂质纳米颗粒制剂的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水的参考IFIT应答的30倍。在某些实施方案中,LNP包含以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物。在某些实施方案中,LNP包含小于0.5摩尔%的磷脂。在某些实施方案中,LNP包含皮质类固醇。在某些实施方案中,该方法还包括纯化mRNA(例如,经由HPLC),从而得到经纯化的mRNA。

[0038] 在某些实施方案中,核酸是mRNA。

[0039] 在某些实施方案中,核酸是经纯化的mRNA。

[0040] 在某些实施方案中,mRNA是经HPLC纯化的mRNA。

[0041] 在某些实施方案中,皮质类固醇具有大于3.0的logP。

[0042] 在某些实施方案中,制剂/群体中的基本上所有脂质纳米颗粒均包含包封在脂质纳米颗粒内的皮质类固醇。例如,在某些实施方案中,制剂/群体中至少约80%的脂质纳米颗粒还包含包封在脂质纳米颗粒内的皮质类固醇。在某些实施方案中,制剂/群体中至少约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的脂质纳米颗粒还包含包封在脂质纳米颗粒内的皮质类固醇。

[0043] 在某些实施方案中,皮质类固醇是糖皮质激素。

- [0044] 在某些实施方案中,皮质类固醇是盐皮质激素。
- [0045] 在某些实施方案中,皮质类固醇是氯倍他索。
- [0046] 在某些实施方案中,糖皮质激素选自氢化可的松、可的松、皮质酮、脱氧皮质酮、泼尼松、泼尼松龙、甲泼尼龙、地塞米松、倍他米松、莫米松、曲安西龙、倍氯米松、氟氢可的松、醛固酮、氟替卡松、氯倍他松、氯倍他索和氯替泼诺,以及它们的药学上可接受的盐,以及它们的混合物。
- [0047] 在某些实施方案中,非阳离子脂质选自PEG-脂质缀合物和磷脂。
- [0048] 在某些实施方案中,非阳离子脂质选自PEG-脂质缀合物、磷脂或者PEG-脂质缀合物和磷脂的混合物。
- [0049] 在某些实施方案中,非阳离子脂质包含磷脂。
- [0050] 在某些实施方案中,非阳离子脂质包含PEG-脂质缀合物。
- [0051] 在某些实施方案中,非阳离子脂质包含PEG-脂质缀合物和磷脂的混合物。
- [0052] 在某些实施方案中,非阳离子脂质是磷脂。
- [0053] 在某些实施方案中,非阳离子脂质是PEG-脂质缀合物。
- [0054] 在某些实施方案中,非阳离子脂质是PEG-脂质缀合物和磷脂的混合物。
- [0055] 在某些实施方案中,脂质纳米颗粒还包含胆固醇。
- [0056] 在某些实施方案中,磷脂包含二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC) 或它们的混合物。
- [0057] 在某些实施方案中,PEG-脂质缀合物选自PEG-二酰基甘油 (PEG-DAG) 缀合物、PEG-二烷氧基丙基 (PEG-DAA) 缀合物、PEG-磷脂缀合物、PEG-神经酰胺 (PEG-Cer) 缀合物以及它们的混合物。
- [0058] 在某些实施方案中,PEG-脂质缀合物选自PEG-2000-C-DMA、PEG-二酰基甘油 (PEG-DAG) 缀合物、PEG-二烷氧基丙基 (PEG-DAA) 缀合物、PEG-磷脂缀合物、PEG-神经酰胺 (PEG-Cer) 缀合物以及它们的混合物。
- [0059] 在某些实施方案中,PEG-脂质缀合物是PEG-DAA缀合物。
- [0060] 在某些实施方案中,PEG-DAA缀合物选自PEG-二癸氧基丙基 (C₁₀) 缀合物、PEG-二月桂氧基丙基 (C₁₂) 缀合物、PEG-二肉豆蔻氧基丙基 (C₁₄) 缀合物、PEG-二棕榈氧基丙基 (C₁₆) 缀合物、PEG-二硬脂氧基丙基 (C₁₈) 缀合物以及它们的混合物。
- [0061] 在某些实施方案中,脂质纳米颗粒的脂质:核酸质量比为约9:1至约20:1。
- [0062] 在某些实施方案中,脂质纳米颗粒制剂中的许多脂质纳米颗粒的脂质:核酸质量比为约9:1至约20:1。
- [0063] 在某些实施方案中,mRNA是经化学修饰的。
- [0064] 在某些实施方案中,脂质纳米颗粒包含电子致密核。
- [0065] 在某些实施方案中,脂质纳米颗粒包含电子致密核,并且其中mRNA位于电子致密核内。
- [0066] 某些实施方案提供了一种药物组合物,其包含如本文所述的脂质纳米颗粒或其群体,以及药学上可接受的载体。
- [0067] 某些实施方案提供了一种用于将编码蛋白的mRNA引入细胞中的方法,该方法包括在mRNA被引入细胞中并在其中表达以产生蛋白的条件下,使细胞与如本文所述的脂质纳米

颗粒或其群体接触。

[0068] 某些实施方案提供了一种用于治疗 and/或改善人体内与疾病相关的一种或多种症状的方法,所述疾病由人体内蛋白的表达受损引起,该方法包括向人体施用治疗有效量的如本文所述的脂质纳米颗粒或其群体,其中包封在脂质纳米颗粒内的mRNA编码蛋白。

[0069] 在某些实施方案中,磷脂是二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)。

[0070] 在某些实施方案中,PEG-脂质缀合物是PEG-2000-C-DMA。

[0071] 在某些实施方案中,LNP包含至少3.5摩尔%的PEG-脂质缀合物(例如,至少约3.5摩尔%、4摩尔%、4.5摩尔%、5摩尔%、5.5摩尔%或6摩尔%)。

[0072] 在某些实施方案中,PEG-脂质缀合物的量为至少3摩尔%(例如,至少3.1摩尔%、至少3.2摩尔%、至少3.3摩尔%、至少3.4摩尔%、至少3.5摩尔%、至少3.6摩尔%、至少3.7摩尔%、至少3.8摩尔%、至少3.9摩尔%、至少4摩尔%)。就磷脂而言,在某些实施方案中,在本发明的实践中不使用磷脂。在某些实施方案中,脂质颗粒包含小于2摩尔%的磷脂,例如1.9摩尔%的磷脂、1.8摩尔%的磷脂、1.7摩尔%的磷脂、1.6摩尔%的磷脂、1.5摩尔%的磷脂、1.4摩尔%的磷脂、1.3摩尔%的磷脂、1.2摩尔%的磷脂、1.1摩尔%的磷脂、1.0摩尔%的磷脂、0.9摩尔%的磷脂、0.8摩尔%的磷脂、0.7摩尔%的磷脂、0.6摩尔%的磷脂、0.5摩尔%的磷脂、0.4摩尔%的磷脂、0.3摩尔%的磷脂、0.2摩尔%的磷脂、0.1摩尔%的磷脂或0.0%的磷脂,例如小于1.9摩尔%的磷脂、小于1.8摩尔%的磷脂、小于1.7摩尔%的磷脂、小于1.6摩尔%的磷脂、小于1.5摩尔%的磷脂、小于1.4摩尔%的磷脂、小于1.3摩尔%的磷脂、小于1.2摩尔%的磷脂、小于1.1摩尔%的磷脂、小于1.0摩尔%的磷脂、小于0.9摩尔%的磷脂、小于0.8摩尔%的磷脂、小于0.7摩尔%的磷脂、小于0.6摩尔%的磷脂、小于0.5摩尔%的磷脂、小于0.4摩尔%的磷脂、小于0.3摩尔%的磷脂、小于0.2摩尔%的磷脂、小于0.1摩尔%的磷脂。

[0073] 在某些实施方案中,LNP包含以至少3摩尔%的量存在的PEG-脂质缀合物,前提条件是LNP包含小于0.5摩尔%的磷脂。在某些实施方案中,PEG-脂质缀合物以至少3.5摩尔%(例如,至少约3.5摩尔%、4摩尔%、4.5摩尔%、5摩尔%、5.5摩尔%或6摩尔%)的量存在。在某些实施方案中,LNP包含小于0.05摩尔%的磷脂。

[0074] 在某些实施方案中,脂质纳米颗粒的脂质:mRNA质量比为约9:1至约20:1。

[0075] 某些实施方案提供了根据本文所述的方法制备的脂质纳米颗粒。

[0076] 某些实施方案提供了包含如本文所述的许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂。

[0077] 某些实施方案提供了包含如本文所述的许多脂质纳米颗粒的脂质纳米颗粒制剂,其中脂质纳米颗粒制剂的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水对照应答的30倍。在某些实施方案中,脂质纳米颗粒制剂的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水对照应答的约29、28、2、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1倍。

[0078] 如本文所用,除非另外指明,否则以下术语具有归属于它们的含义。

[0079] 治疗性核酸(例如,mRNA)的“有效量”或“治疗有效量”是足以产生所需效果的量,所需效果诸如一定量的蛋白的mRNA导向的表达,其在表达蛋白的生物体内引起期望的生物学效应。例如,在一些实施方案中,所表达的蛋白是通常在体内的某细胞类型中表达的蛋白的活性形式,并且治疗有效量的mRNA是产生一定量的编码蛋白的量,所述编码蛋白的量为通常在健康个体的该细胞类型中表达的蛋白的量的至少50%(例如,至少60%、或至少

70%、或至少80%、或至少90%)。用于测量mRNA或蛋白的表达的合适测定法包括但不限于斑点印迹、Northern印迹、原位杂交、ELISA、免疫沉淀、酶功能,以及本领域的技术人员已知的表型测定法。

[0080] 所谓“降低”、“减少”或“减小”mRNA的免疫应答意指对给定mRNA(例如,经修饰的mRNA)的免疫应答的可检测降低。可相对于在未修饰的mRNA存在下的免疫应答水平确定经修饰的mRNA的免疫应答的降低量。可检测的降低可以是比在未修饰的mRNA存在下检测到的免疫应答低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多。对mRNA的免疫应答的降低通常通过在体外应答细胞产生的细胞因子(例如,IFN γ 、IFN α 、TNF α 、IL-6或IL-12)减少或施用mRNA后哺乳动物受试者血清中产生的细胞因子减少来测量。

[0081] “实质同一性”是指在严格条件下与参考序列杂交的序列,或与参考序列的指定区域具有指定同一性百分比的序列。

[0082] 短语“严格杂交条件”是指核酸通常在核酸的复杂混合物中与其靶序列杂交但不与其他序列杂交的条件。严格条件是序列依赖性的,并且在不同情况下会有所不同。较长的序列在较高温度下特异性杂交。核酸杂交的广泛指南可见于Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes*, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993)。通常,严格条件被选择为在限定的离子强度pH下比特定序列的热熔点(T_m)低约5-10 $^{\circ}\text{C}$ 。 T_m 是(在限定的离子强度、pH和核酸浓度下)平衡时与靶标互补的探针中的50%与靶序列杂交的温度(当靶序列过量存在时,在 T_m 下,50%的探针在平衡时被占据)。通过添加去稳定剂如甲酰胺,也可实现严格条件。对于选择性或特异性杂交,阳性信号是背景的至少两倍,优选是背景杂交的10倍。

[0083] 示例性严格杂交条件可以如下:50%甲酰胺,5x SSC,和1%SDS,在42 $^{\circ}\text{C}$ 下温育,或者5x SSC,1%SDS,在65 $^{\circ}\text{C}$ 下温育,并且在65 $^{\circ}\text{C}$ 下用0.2x SSC和0.1%SDS洗涤。对于PCR,低严格性扩增的典型温度为约36 $^{\circ}\text{C}$,但退火温度可在约32 $^{\circ}\text{C}$ 与48 $^{\circ}\text{C}$ 之间变化,具体取决于引物长度。对于高严格性PCR扩增,典型温度为约62 $^{\circ}\text{C}$,但高严格性退火温度可在约50 $^{\circ}\text{C}$ 至约65 $^{\circ}\text{C}$ 的范围内,具体取决于引物长度和特异性。高严格性和低严格性扩增的典型循环条件包括90 $^{\circ}\text{C}$ -95 $^{\circ}\text{C}$ 持续30秒至2分钟的变性阶段,持续30秒至2分钟的退火阶段,以及约72 $^{\circ}\text{C}$ 持续1至2分钟的延伸阶段。低严格性扩增反应和高严格性扩增反应的方案和指南在例如Innis等人, *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990)中提供。

[0084] 如果在严格条件下彼此不杂交的核酸所编码的多肽实质性相同,则这些核酸仍然是实质性相同的。例如,当使用遗传密码允许的最大密码子简并性产生核酸拷贝时,会发生这种情况。在此类情况下,核酸通常在中等严格杂交条件下杂交。示例性“中等严格杂交条件”包括在37 $^{\circ}\text{C}$ 下在40%甲酰胺、1M NaCl、1%SDS的缓冲液中杂交,以及在45 $^{\circ}\text{C}$ 下在1x SSC中洗涤。阳性杂交是背景的至少两倍。普通技术人员将容易地认识到,可以利用替代性的杂交和洗涤条件来提供类似严格性的条件。用于确定杂交参数的其他指南在诸如Ausubel等人编辑的 *Current Protocols in Molecular Biology* 的许多参考文献中提供。

[0085] 在两种或更多种核酸的上下文中,术语“实质性相同”或“实质同一性”是指如使用

以下序列比较算法之一或通过手动比对和目视检查来测量,当在比较窗口或指定区域上进行比较和比对以获得最大对应性时,两个或更多个相同的或具有指定百分比的相同(即,在指定区域上具有至少约60%,优选至少约65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性)核苷酸的序列或子序列。当上下文指明时,该定义也类似地指代序列的互补序列。优选地,实质同一性存在于长度为至少约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60个核苷酸的区域上。

[0086] 对于序列比较,通常将一个序列作为参考序列,将测试序列与其进行比较。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机中,指定子序列坐标(如果需要),并指定序列算法的程序参数。可使用默认程序参数,也可指定替代性参数。然后,序列比较算法基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0087] 如本文所用,“比较窗口”包括对选自约5至约60、通常约10至约45、更通常约15至约30的多个连续位置中的任一个的区段的参考,在其中可在对两个序列进行最佳比对后将序列与相同数目的连续位置的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法是本领域所熟知的。用于比较的最佳序列比对可例如通过以下方式进行:Smith和Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 (1981) 的局部同源性算法;Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 (1970) 的同源性比对算法;Pearson和Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444 (1988) 的类似性搜索方法;这些算法的计算机化实现方式(Wisconsin Genetics软件包中的GAP、BESALDHIT、FASTA和ALDHASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI);或者手动比对和视觉检查(参见例如Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel等人编辑(1995年增补版))。

[0088] 适用于确定序列同一性百分比和序列相似性的算法的非限制性实例是BLAST和BLAST 2.0算法,这些算法分别在Altschul等人, *Nuc. Acids Res.*, 25:3389-3402 (1977) 和Altschul等人, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990) 中有所描述。使用BLAST和BLAST 2.0以及本文所述的参数确定本发明的核酸的序列同一性百分比。用于进行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 公开获得。另一个实例是用于确定序列同一性百分比的全局比对算法,诸如用于比对蛋白或核苷酸(例如, RNA) 序列的Needleman-Wunsch算法。

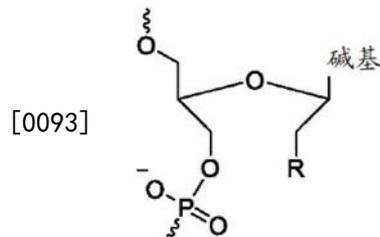
[0089] BLAST算法还对两个序列之间的相似性进行统计分析(参见例如Karlin和Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873-5787 (1993))。BLAST算法提供了一种相似性量度是最小总和概率($P(N)$),其提供了两个核苷酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如,如果测试核酸与参考核酸的比较中的最小总和概率小于约0.2,更优选地小于约0.01,并且最优选地小于约0.001,则认为核酸与参考序列相似。

[0090] 如本文所用的术语“核酸”是指含有至少两个单链形式或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的聚合物,并且包括DNA和RNA。DNA可以呈例如反义分子、质粒DNA、预融合DNA、PCR产物、载体(例如, P1、PAC、BAC、YAC、人工染色体)、表达盒、嵌合序列、染色体DNA,或者这些群组的衍生物和组合的形式。RNA可以呈小干扰RNA (siRNA)、Dicer-底物dsRNA、小发夹RNA (shRNA)、不对称干扰RNA (aiRNA)、微小RNA (miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、tRNA、病毒RNA (vRNA) 以及它们的组合的形式。核酸包括含有已知核苷酸类似物或经修饰的主链残基或键合的核酸,所述核酸是合成的、天然存在的和非天然存在的并且具有与参考核酸相似

的结合特性。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性甲基膦酸酯、2'-O-甲基核糖核苷酸和肽-核酸(PNA)。除非具体限制,否则该术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,所述核酸具有与参考核酸相似的结合特性。在某些实施方案中,核酸序列可包含“解锁核碱基类似物”(缩写为“UNA”)。

[0091] 术语“解锁核碱基类似物”(缩写为“UNA”)是指无环核碱基,其中核糖环的C2'和C3'原子不共价连接。术语“解锁核碱基类似物”包括具有被标识为结构A的下列结构的核碱基类似物:

[0092] 结构A



[0094] 其中R为羟基,并且碱基为任何天然或非天然碱基,例如腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)和胸腺嘧啶(T)。可用于本发明的实践中的UNA包括在美国专利序列号8,314,227中标识为无环2'-3'-seco-核苷酸单体的分子,该专利全文以引用方式并入本文。

[0095] 除非另外指明,否则特定核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子置换)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列,以及明确指出的序列。具体地,简并密码子置换可通过生成其中一个或多个选定(或所有)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基置换的序列来实现(Batzer等人,Nucleic Acid Res.,19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.,260:2605-2608(1985);Rossolini等人,Mol.Cell.Probes,8:91-98(1994))。

[0096] 如本文所用的术语“小干扰RNA”或“siRNA”是指能够在siRNA与靶基因或序列处于同一细胞中时减少或抑制靶基因或序列的表达(例如,通过介导降解或抑制与siRNA序列互补的mRNA的翻译)的双链RNA(即,双链体RNA)。siRNA可以与靶基因或序列具有实质性或完全同一性,或者可包含错配的区域(即,错配基序)。在某些实施方案中,siRNA的长度可为约19-25(双链体)核苷酸,并且长度优选地为约20-24、21-22或21-23(双链体)核苷酸。siRNA双链体可包含约1个至约4个核苷酸或约2个至约3个核苷酸的3'突出端和5'磷酸末端。siRNA的实例包括但不限于由两个分开的链分子组装的双链多核苷酸分子,其中一条链是有义链,而另一条链是互补的反义链。

[0097] 优选地,siRNA是化学合成的。siRNA也可通过用大肠杆菌(E.coli)RNA酶III或Dicer切割较长的dsRNA(例如,长度大于约25个核苷酸的dsRNA)来生成。这些酶将dsRNA加工成生物活性siRNA(参见例如Yang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:9942-9947(2002);Calegari等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:14236(2002);Byrom等人,Ambion TechNotes,10(1):4-6(2003);Kawasaki等人,Nucleic Acids Res.,31:981-987(2003);Knight等人,Science,293:2269-2271(2001);以及Robertson等人,J.Biol.Chem.,243:82(1968))。优选地,dsRNA的长度为至少50个核苷酸至约100、200、300、400或500个核苷酸。dsRNA的长度可长达1000、1500、2000、5000个核苷酸或更长。dsRNA可以编码完整基因转录物或部分基因转录物。在某些情况下,siRNA可以由质粒编码(例如,转录为自动折叠成具有

发夹环的双链体的序列)。

[0098] “核苷酸”包含糖脱氧核糖(DNA)或核糖(RNA)、碱基和磷酸基团。核苷酸通过磷酸基团连接在一起。“碱基”包括嘌呤和嘧啶,进一步包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷和天然类似物,以及嘌呤和嘧啶的合成衍生物,其包括但不限于包含新反应性基团的修饰,所述反应性基团诸如但不限于胺、醇、硫醇、羧酸酯和烷基卤化物。

[0099] 术语“基因”是指包含产生多肽或前体多肽所必需的部分长度或全长编码序列的核酸(例如,DNA或RNA)序列。

[0100] 如本文所用,“基因产物”是指基因的产物,诸如RNA转录物或多肽。

[0101] 术语“脂质”是指一组有机化合物,其包括但不限于脂肪酸酯且特征在于不溶于水,但可溶于许多有机溶剂。它们通常分为至少三类:(1)“简单脂质”,包括脂肪和油以及蜡;(2)“复合脂质”,包括磷脂和糖脂;以及(3)“衍生脂质”,诸如类固醇。

[0102] 术语“脂质颗粒”包括可用于将治疗性核酸(例如,mRNA或siRNA)递送至感兴趣的靶点(例如,细胞、组织、器官等)的脂质制剂。在优选的实施方案中,本发明的脂质颗粒是核酸-脂质颗粒,其通常由阳离子脂质、非阳离子脂质(例如,磷脂)、防止颗粒聚集的缀合脂质(例如,PEG-脂质)以及任选的胆固醇形成。通常,治疗性核酸(例如,mRNA)可以包封在颗粒的脂质部分中,从而保护其免遭酶促降解。

[0103] 当用于描述本发明的脂质颗粒时,术语“电子致密核”是指在使用冷冻透射电镜(“cryoTEM”)观察时脂质颗粒的内部部分的暗色外观。本发明的一些脂质颗粒具有电子致密核而缺乏脂质双层结构。本发明的一些脂质颗粒具有电子致密核,缺乏脂质双层结构,并且具有逆六方相或立方相结构。不希望受理论束缚,据信非双层脂质堆积提供了内部具有水和核酸的脂质圆柱体的三维网络,即基本上是与含有核酸的水性通道相互渗透的脂质液滴。

[0104] 如本文所用,术语“SNALP”是指稳定的核酸-脂质颗粒。SNALP是由脂质(例如,阳离子脂质、非阳离子脂质和防止颗粒聚集的缀合脂质)制成的颗粒,其中核酸(例如,mRNA)完全包封在脂质内。在某些情况下,SNALP对于全身应用非常有用,因为其可在静脉内(i.v.)注射后表现出延长的循环寿命,可在远侧部位(例如,与施用部位物理分开的部位)积聚,并且可以介导这些远侧部位处的mRNA表达。核酸可以与缩合剂复合并如PCT公布号WO 00/03683所述包封在SNALP内,该PCT公布的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0105] 本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)通常具有约30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约80nm至约100nm、约90nm至约100nm、约70至约90nm、约80nm至约90nm、约70nm至约80nm、或约30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm的平均直径,并且基本上无毒。此外,当存在于本发明的脂质颗粒中时,核酸在水溶液中耐核酸酶降解。核酸-脂质颗粒及其制备方法在例如美国专利公布号20040142025和20070042031中有所公开,这些专利的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0106] 如本文所用,“脂质包封的”可以指提供具有完全包封、部分包封或这两者的治疗性核酸(例如,mRNA)的脂质颗粒。在一个优选的实施方案中,核酸(例如,mRNA)完全包封在

脂质颗粒中(例如,以形成SNALP或其他核酸-脂质颗粒)。

[0107] 术语“脂质缀合物”是指抑制脂质颗粒聚集的缀合脂质。此类脂质缀合物包括但不限于PEG-脂质缀合物(诸如偶联至二烷氧基丙基的PEG(例如,PEG-DAA缀合物)、偶联至二酰基甘油的PEG(例如,PEG-DAG缀合物)、偶联至胆固醇的PEG、偶联至磷酸酰乙醇胺的PEG和偶联至神经酰胺的PEG(参见例如美国专利号5,885,613))、阳离子PEG脂质、聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物、聚酰胺低聚物(例如,ATTA-脂质缀合物)以及它们的混合物。POZ-脂质缀合物的其他实例在PCT公布号WO 2010/006282中有所描述。PEG或POZ可以直接与脂质缀合,或者可以经由接头部分与脂质连接。可使用适用于将PEG或POZ偶联至脂质的任何接头部分,包括例如不含酯的接头部分和含酯的接头部分。在某些优选的实施方案中,使用不含酯的接头部分,诸如酰胺或氨基甲酸酯。上述专利文献中每一篇的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0108] 术语“两亲性脂质”部分地指以下任何合适的材料:其中脂质材料的疏水部分定向到疏水相中,而亲水部分朝水相定向。亲水性特征源于极性或带电基团的存在,所述极性或带电基团诸如碳水化合物、磷酸、羧酸、硫酸、氨基、巯基、硝基、羟基和其他类似基团。疏水性可通过包括非极性基团来赋予,所述非极性基团包括但不限于长链饱和脂族烃基和不饱和脂族烃基以及被一个或多个芳族基团、脂环族基团或杂环基团取代的此类基团。两亲性化合物的实例包括但不限于磷脂、氨基脂和鞘脂。

[0109] 磷脂的代表性实例包括但不限于磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱和二亚油酰磷脂酰胆碱。缺乏磷的其他化合物诸如鞘脂、鞘糖脂家族、二酰基甘油和 β -酰氧基酸也在称为两亲性脂质的群组中。另外,上述两亲性脂质可以与包括甘油三酯和甾醇在内的其他脂质混合。

[0110] 术语“中性脂质”是指在选定的pH下以不带电或中性两性离子形式存在的多种脂质物质中的任一种。在生理pH下,此类脂质包括例如二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂和二酰基甘油。

[0111] 术语“非阳离子脂质”是指任何两亲性脂质以及任何其他中性脂质或阴离子脂质。

[0112] 术语“阴离子脂质”是指在生理pH下带负电的任何脂质。这些脂质包括但不限于磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二烷酰基磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰基磷脂酰乙醇胺、赖氨酰磷脂酰甘油、棕榈酰油酰磷脂酰甘油(POPG)以及与中性脂质接合的其他阴离子修饰基团。

[0113] 术语“疏水性脂质”是指具有非极性基团的化合物,所述非极性基团包括但不限于长链饱和脂族烃基和不饱和脂族烃基以及任选地被一个或多个芳族基团、脂环族基团或杂环基团取代的此类基团。合适的实例包括但不限于二酰基甘油、二烷基甘油、N-N-二烷基氨基、1,2-二酰氧基-3-氨基丙烷和1,2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0114] 术语“阳离子脂质”和“氨基脂质”在本文中可互换地用于包括具有一个、两个、三个或更多个脂肪酸或脂肪烷基链和pH可滴定的氨基头部基团(例如,烷基氨基或二烷基氨基头部基团)的那些脂质及其盐。阳离子脂质通常在低于阳离子脂质的pKa的pH下质子化(即,带正电的),并且在高于pKa的pH下基本上是中性的。本发明的阳离子脂质也可称为可滴定的阳离子脂质。在一些实施方案中,阳离子脂质包含:可质子化的叔胺(例如,pH可滴定

的)头部基团;C₁₈烷基链,其中每条烷基链独立地具有0至3个(例如,0、1、2或3个)双键;以及头部基团与烷基链之间的醚、酯或缩酮键合。此类阳离子脂质包括但不限于DSDMA、DODMA、DLinDMA、DLenDMA、 γ -DLenDMA、DLin-K-DMA、DLin-K-C2-DMA(也称为DLin-C2K-DMA、XTC2和C2K)、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLen-C2K-DMA、 γ -DLen-C2K-DMA、DLin-M-C2-DMA(也称为MC2)、DLin-M-C3-DMA(也称为MC3)和(DLin-MP-DMA)(也称为1-B11)。

[0115] 术语“烷基氨基”包括式-N(H)R的基团,其中R为如本文所定义的烷基。

[0116] 术语“二烷基氨基”包括式-NR₂的基团,其中每个R独立地为如本文所定义的烷基。

[0117] 术语“盐”包括任何阴离子和阳离子复合物,例如在阳离子脂质与一种或多种阴离子之间形成的复合物。阴离子的非限制性实例包括无机和有机阴离子,诸如氢化物、氟化物、氯化物、溴化物、碘化物、草酸根(例如,半草酸根)、磷酸根、膦酸根、磷酸氢根、磷酸二氢根、氧化物、碳酸根、碳酸氢根、硝酸根、亚硝酸根、氮化物、亚硫酸氢根、硫化物、亚硫酸根、硫酸氢根、硫酸根、硫代硫酸根、硫酸氢根、硼酸根、甲酸根、乙酸根、苯甲酸根、柠檬酸根、酒石酸根、乳酸根、丙烯酸根、聚丙烯酸根、富马酸根、马来酸根、衣康酸根、乙醇酸根、葡萄糖酸根、苹果酸根、扁桃酸根、惕各酸根、抗坏血酸根、水杨酸根、聚甲基丙烯酸根、高氯酸根、氯酸根、亚氯酸根、次氯酸根、溴酸根、次溴酸根、碘酸根、烷基磺酸根、芳基磺酸根、砷酸根、亚砷酸根、铬酸根、重铬酸根、氰化物、氰酸根、硫氰酸根、氢氧根、过氧化物、高锰酸根以及它们的混合物。在具体实施方案中,本文所公开的阳离子脂质的盐是结晶盐。

[0118] 术语“烷基”包括含有1至24个碳原子的直链或支链、非环状或环状饱和脂族烃。代表性饱和直链烷基包括但不限于甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基等,而饱和支链烷基包括但不限于异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基等。代表性饱和环烷基包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基等,而不饱和环烷基包括但不限于环戊烯基、环己烯基等。

[0119] 术语“烯基”包括在相邻碳原子之间含有至少一个双键的如上定义的烷基。烯基包括顺式和反式异构体。代表性直链和支链烯基包括但不限于乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基等。

[0120] 术语“炔基”包括另外在相邻碳之间含有至少一个三键的如上定义的任何烷基或烯基。代表性直链和支链炔基包括但不限于乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基等。

[0121] 术语“酰基”包括任何烷基、烯基或炔基,其中连接点处的碳被氧基取代,如下所定义。以下是酰基的非限制性实例:-C(=O)烷基、-C(=O)烯基和-C(=O)炔基。

[0122] 术语“杂环”包括5元至7元单环或7元至10元双环杂环,其为饱和的、不饱和的或芳族的并且含有1或2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子,并且其中氮杂原子和硫杂原子可任选地被氧化,氮杂原子可任选地被季铵化,包括任一上述杂环与苯环稠合的双环。杂环可由任何杂原子或碳原子连接。杂环包括但不限于如下文所定义的杂芳基,以及吗啉基、吡咯烷酮基(pyrrolidinonyl)、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、乙内酰脲基、戊内酰胺基、环氧乙烷基、氧杂环丁烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢嘧啶基、四氢噻吩基、四氢噻喃基、四氢噻啶基、四氢噻吩基、四氢噻喃基等。

[0123] 术语“任选取代的烷基”、“任选取代的烯基”、“任选取代的炔基”、“任选取代的酰

基”和“任选取代的杂环”在被取代时意指至少一个氢原子被取代基代替。就氧取代基(=O)而言,两个氢原子被代替。就这一点而言,取代基包括但不限于氧、卤素、杂环、-CN、-OR^x、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x和-SO_nNR^xR^y,其中n为0、1或2,R^x和R^y是相同的或不同的且独立地为氢、烷基或杂环,并且烷基和杂环取代基中的每一者可进一步被氧、卤素、-OH、-CN、烷基、-OR^x、杂环、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x和-SO_nNR^xR^y中的一者或多者取代。当在取代基列表之前使用时,术语“任选取代的”意指该列表中的每个取代基可以如本文所述任选地被取代。

[0124] 术语“卤素”包括氟、氯、溴和碘。

[0125] 术语“促融合”是指脂质颗粒(例如,SNALP)与细胞膜融合的能力。膜可以是质膜或围绕诸如核内体、细胞核等细胞器的膜。

[0126] 如本文所用,术语“水溶液”是指全部地或部分地包含水的组合物。

[0127] 如本文所用,术语“有机脂质溶液”是指全部地或部分地包含具有脂质的有机溶剂的组合物。

[0128] 如本文所用,“远侧部位”是指物理上分开的部位,其不限于相邻的毛细血管床,而是包括广泛分布在整个生物体中的部位。

[0129] 与核酸-脂质颗粒诸如SNALP相关的“血清稳定的”意指在暴露于将会显著降解游离DNA或RNA的血清或核酸酶测定法后,颗粒不会显著降解。合适的测定法包括例如标准血清测定法、DNA酶测定法或RNA酶测定法。

[0130] 如本文所用,“全身递送”是指导致活性剂(例如,mRNA)在生物体内广泛生物分布的脂质颗粒递送。一些施用技术可导致某些药剂而非其他药剂的全身递送。全身递送意指使有用的、优选治疗量的药剂暴露于身体的大多数部位。为了获得广泛的生物分布,通常需要一定的血液寿命,使得药剂在到达施用部位远侧的疾病部位之前不会被快速降解或清除(例如,通过首过器官(肝、肺等)或通过快速非特异性细胞结合)。脂质颗粒的全身递送可通过本领域已知的任何方式进行,包括例如静脉内、皮下和腹膜内。在一个优选的实施方案中,脂质颗粒的全身递送是通过静脉内递送的。

[0131] 如本文所用,“局部递送”是指将活性剂(例如,mRNA)直接递送至生物体内的靶点。例如,可通过直接注射到疾病部位、其他靶点或诸如肝脏、心脏、胰腺、肾等靶器官来局部递送药剂。

[0132] 术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物物种,诸如人、小鼠、大鼠、狗、猫、仓鼠、豚鼠、兔、牲畜等。

[0133] 当在本文中用于描述脂质:mRNA的比率时,术语“脂质”是指颗粒中的总脂质。

[0134] 除非本文另外说明,否则术语“约”在与值或值的范围结合使用时意指所述值或值的范围的±5%。

[0135] 某些实施方案的描述

[0136] 在一个方面,本发明提供了核酸-脂质颗粒,其各自包含(a)含有阳离子脂质的脂质颗粒;以及(b)包封在脂质颗粒内的mRNA分子。通常,mRNA分子群体被包封在脂质颗粒内。脂质颗粒通常包括限定内部部分的外层,其中mRNA分子位于该内部部分内。mRNA分子通常完全包封在脂质颗粒内。脂质颗粒可以是球形或非球形的。当使用冷冻透射电镜观察时,脂

质颗粒可具有电子致密核。通常,电子致密核主要由脂质组成,但含水物质可以按比脂质的量小的量存在。

[0137] 在一个方面,本发明提供了一种脂质颗粒,其包含PEG脂质、非阳离子脂质、选自三烷基阳离子脂质和四烷基阳离子脂质的阳离子脂质、以及mRNA;其中脂质颗粒具有电子致密核,并且mRNA被包封在电子致密核内。

[0138] 在本发明的一些实施方案中,所述脂质颗粒包含(a)含有阳离子脂质、PEG-脂质和磷脂的脂质颗粒;(b)mRNA分子,其中mRNA分子包封在脂质颗粒内。脂质颗粒可任选地包含胆固醇。mRNA可以完全或部分包封在脂质颗粒内。

[0139] 在一个或多个实施方案中,颗粒100的形成包括将脂质置于第一流体(例如,乙醇)中,将mRNA置于第二流体(例如,水性缓冲液)中,并且在受控条件下混合第一流体和第二流体以形成颗粒100。当通过冷冻透射电镜观察时,所得颗粒100在脂质颗粒内包括电子致密核。

[0140] mRNA

[0141] 可用于本发明的实践中的mRNA可包含至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个经修饰的核苷酸,诸如2' OMe核苷酸。优选地,mRNA中的尿苷和/或鸟苷核苷酸用2' OMe核苷酸修饰。在一些实施方案中,mRNA还可包含经修饰的(例如,经2' OMe修饰的)腺苷和/或经修饰的(例如,经2' OMe修饰的)胞嘧啶核苷酸。

[0142] 在一个方面,本发明提供了包含mRNA的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)。核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)通常包含一种或多种(例如,混合物)mRNA、阳离子脂质和非阳离子脂质。在某些情况下,核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)还包含抑制颗粒聚集的缀合脂质。优选地,核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)包含一种或多种(例如,混合物)mRNA、阳离子脂质、非阳离子脂质以及抑制颗粒聚集的缀合脂质。

[0143] 在一些实施方案中,mRNA完全包封在核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)中。关于包含mRNA混合物的制剂,混合物中存在的不同类型的mRNA物质(例如,具有不同序列的mRNA)可以共同包封在相同的颗粒中,或者混合物中存在的每种类型的mRNA物质可以包封在单独的颗粒中。可使用相同、相似或不同浓度或摩尔比的两种或更多种单独mRNA(各自具有独特序列)的混合物将mRNA混合物配制在本文所述的颗粒中。在一个实施方案中,使用相同、相似或不同浓度或摩尔比的每种mRNA物质配制mRNA的混合物(对应于具有不同序列的多种mRNA),并且将不同类型的mRNA共同包封在相同颗粒中。在另一个实施方案中,混合物中存在的每种类型的mRNA物质以相同、相似或不同的mRNA浓度或摩尔比包封在不同颗粒中,并且由此形成的颗粒(各自含有不同的mRNA有效负载)单独施用(例如,根据治疗方案在不同时间),或者(例如,与药学上可接受的载体)组合作为单个单位剂量一起施用。本文所述的颗粒是血清稳定的,耐核酸酶降解,并且对哺乳动物如人类基本上无毒。

[0144] 本发明的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)中的阳离子脂质可包含例如一种或多种本文所述的式I-III的阳离子脂质或任何其他阳离子脂质物质。在一个具体实施方案中,阳离子脂质选自1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二- γ -亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(γ -DLenDMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-C2-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)、二亚油基甲基-3-二甲基氨基丙酸酯

(DLin-M-C2-DMA)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-M-C3-DMA)、它们的盐,以及它们的混合物。

[0145] 本发明的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)中的非阳离子脂质可包含例如一种或多种阴离子脂质和/或中性脂质。在一些实施方案中,非阳离子脂质包含下列中性脂质组分中的一种:(1)磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物;(2)胆固醇或其衍生物;或者(3)磷脂。在某些优选的实施方案中,磷脂包含二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)或它们的混合物。在一个特别优选的实施方案中,非阳离子脂质是DPPC和胆固醇的混合物。

[0146] 本发明的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)中的脂质缀合物抑制颗粒的聚集,并且可包含例如本文所述的脂质缀合物中的一种或多种。在一个具体实施方案中,脂质缀合物包含PEG-脂质缀合物。PEG-脂质缀合物的实例包括但不限于PEG-DAG缀合物、PEG-DAA缀合物以及它们的混合物。在某些实施方案中,脂质颗粒中的PEG-DAA缀合物可包含PEG-二癸氧基丙基(C₁₀)缀合物、PEG-二月桂氧基丙基(C₁₂)缀合物、PEG-二肉豆蔻氧基丙基(C₁₄)缀合物、PEG-二棕榈氧基丙基(C₁₆)缀合物、PEG-二硬脂氧基丙基(C₁₈)缀合物或它们的混合物。在另一个实施方案中,脂质缀合物包含POZ-脂质缀合物,诸如POZ-DAA缀合物。

[0147] 在一些实施方案中,本发明提供了核酸-脂质颗粒(例如,SNALP),其包含:(a)各自编码蛋白的一种或多种(例如,混合物)mRNA分子;(b)一种或多种阳离子脂质或其盐,其占颗粒中存在的总脂质的约50摩尔%至约85摩尔%;(c)一种或多种非阳离子脂质,其占颗粒中存在的总脂质的约13摩尔%至约49.5摩尔%;以及(d)抑制颗粒聚集的一种或多种缀合脂质,其占颗粒中存在的总脂质的约0.5摩尔%至约2摩尔%。

[0148] 在该实施方案的一个方面,核酸-脂质颗粒包含:(a)各自编码蛋白的一种或多种(例如,混合物)mRNA分子;(b)阳离子脂质或其盐,其占颗粒中存在的总脂质的约52摩尔%至约62摩尔%;(c)磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物,其占颗粒中存在的总脂质的约36摩尔%至约47摩尔%;以及(d)PEG-脂质缀合物,其占颗粒中存在的总脂质的约1摩尔%至约2摩尔%。核酸-脂质颗粒的该实施方案在本文中通常称为“1:57”制剂。在一个具体实施方案中,1:57制剂是四组分系统,其包含约1.4摩尔%的PEG-脂质缀合物(例如,PEG2000-C-DMA)、约57.1摩尔%的阳离子脂质(例如,DLin-K-C2-DMA)或其盐、约7.1摩尔%的DPPC(或DSPC)以及约34.3摩尔%的胆固醇(或其衍生物)。

[0149] 在该实施方案的另一方面,核酸-脂质颗粒包含:(a)各自编码蛋白的一种或多种(例如,混合物)mRNA分子;(b)阳离子脂质或其盐,其占颗粒中存在的总脂质的约56.5摩尔%至约66.5摩尔%;(c)胆固醇或其衍生物,其占颗粒中存在的总脂质的约31.5摩尔%至约42.5摩尔%;以及(d)PEG-脂质缀合物,其占颗粒中存在的总脂质的约1摩尔%至约2摩尔%。核酸-脂质颗粒的该实施方案在本文中通常称为“1:62”制剂。在一个具体实施方案中,1:62制剂是三组分系统,其不含磷脂而包含约1.5摩尔%的PEG-脂质缀合物(例如,PEG2000-C-DMA)、约61.5摩尔%的阳离子脂质(例如,DLin-K-C2-DMA)或其盐以及约36.9摩尔%的胆固醇(或其衍生物)。

[0150] 与1:57制剂和1:62制剂相关的另外的实施方案在PCT公布号WO 09/127060和已公布的美国专利申请公布号US 2011/0071208 A1中有所描述,这些公布的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0151] 在其他实施方案中,本发明提供了核酸-脂质颗粒(例如,SNALP),其包含:(a)各自

编码蛋白的一种或多种(例如,混合物)mRNA分子;(b)一种或多种阳离子脂质或其盐,其占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约50摩尔%;(c)一种或多种非阳离子脂质,其占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约90摩尔%;以及(d)抑制颗粒聚集的一种或多种缀合脂质,其占颗粒中存在的总脂质的约0.5摩尔%至约20摩尔%。

[0152] 在该实施方案的一个方面,核酸-脂质颗粒包含:(a)各自编码蛋白的一种或多种(例如,混合物)mRNA分子;(b)阳离子脂质或其盐,其占颗粒中存在的总脂质的约30摩尔%至约50摩尔%;(c)磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物,其占颗粒中存在的总脂质的约47摩尔%至约69摩尔%;以及(d)PEG-脂质缀合物,其占颗粒中存在的总脂质的约1摩尔%至约3摩尔%。核酸-脂质颗粒的该实施方案在本文中通常称为“2:40”制剂。在一个具体实施方案中,2:40制剂是四组分系统,其包含约2摩尔%的PEG-脂质缀合物(例如,PEG2000-C-DMA)、约40摩尔%的阳离子脂质(例如,DLin-K-C2-DMA)或其盐、约10摩尔%的DPPC(或DSPC)以及约48摩尔%的胆固醇(或其衍生物)。

[0153] 在另外的实施方案中,本发明提供了核酸-脂质颗粒(例如,SNALP),其包含:(a)各自编码蛋白的一种或多种(例如,混合物)mRNA分子;(b)一种或多种阳离子脂质或其盐,其占颗粒中存在的总脂质的约50摩尔%至约65摩尔%;(c)一种或多种非阳离子脂质,其占颗粒中存在的总脂质的约25摩尔%至约45摩尔%;以及(d)抑制颗粒聚集的一种或多种缀合脂质,其占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约10摩尔%。

[0154] 在该实施方案的一个方面,核酸-脂质颗粒包含:(a)各自编码蛋白的一种或多种(例如,混合物)mRNA分子;(b)阳离子脂质或其盐,其占颗粒中存在的总脂质的约50摩尔%至约60摩尔%;(c)磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物,其占颗粒中存在的总脂质的约35摩尔%至约45摩尔%;以及(d)PEG-脂质缀合物,其占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约10摩尔%。核酸-脂质颗粒的该实施方案在本文中通常称为“7:54”制剂。在某些情况下,7:54制剂中的非阳离子脂质混合物包含:(i)磷脂,其为颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约10摩尔%;(ii)胆固醇或其衍生物,其为颗粒中存在的总脂质的约25摩尔%至约35摩尔%。在一个具体实施方案中,7:54制剂是四组分系统,其包含约7摩尔%的PEG-脂质缀合物(例如,PEG750-C-DMA)、约54摩尔%的阳离子脂质(例如,DLin-K-C2-DMA)或其盐、约7摩尔%的DPPC(或DSPC)以及约32摩尔%的胆固醇(或其衍生物)。

[0155] 在该实施方案的另一方面,核酸-脂质颗粒包含:(a)各自编码蛋白的一种或多种(例如,混合物)mRNA分子;(b)阳离子脂质或其盐,其占颗粒中存在的总脂质的约55摩尔%至约65摩尔%;(c)胆固醇或其衍生物,其占颗粒中存在的总脂质的约30摩尔%至约40摩尔%;以及(d)PEG-脂质缀合物,其占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约10摩尔%。核酸-脂质颗粒的该实施方案在本文中通常称为“7:58”制剂。在一个具体实施方案中,7:58制剂是三组分系统,其不含磷脂而包含约7摩尔%的PEG-脂质缀合物(例如,PEG750-C-DMA)、约58摩尔%的阳离子脂质(例如,DLin-K-C2-DMA)或其盐以及约35摩尔%的胆固醇(或其衍生物)。

[0156] 与7:54制剂和7:58制剂相关的另外的实施方案在已公布的美国专利申请公布号US 2011/0076335 A1中有所描述,该公布的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0157] 本发明还提供了包含核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)和药学上可接受的载体的药物

组合物。

[0158] 本发明的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)可用于治疗性递送表达一种或多种蛋白(例如,全长蛋白或全长蛋白的生物活性片段)的mRNA。在一些实施方案中,将表达不同蛋白的mRNA的混合物配制到相同或不同的核酸-脂质颗粒中,并将所述颗粒施用于需要这种治疗的哺乳动物(例如,人)。在某些情况下,可将治疗有效量的核酸-脂质颗粒施用于哺乳动物。

[0159] 在某些实施方案中,本发明提供了通过使细胞与本文所述的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP制剂)接触而将一种或多种mRNA分子引入细胞中的方法。在一个具体实施方案中,细胞是网状内皮细胞(例如,单核细胞或巨噬细胞)、成纤维细胞、内皮细胞或血小板细胞。

[0160] 在一些实施方案中,本文所述的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)通过以下施用途径之一施用:经口、鼻内、静脉内、腹膜内、肌内、关节内、病灶内、气管内、皮下和皮内。在具体实施方案中,核酸-脂质颗粒例如经由肠内或胃肠外施用途径全身施用。

[0161] 在具体实施方案中,与其他组织相比,本发明的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)可以将有效负载例如mRNA优先地递送至肝脏。

[0162] 在某些方面,本发明提供了在有需要的哺乳动物(例如,人)中表达蛋白的方法,该方法包括向哺乳动物施用治疗有效量的包含一种或多种mRNA的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP制剂),所述mRNA在能够在哺乳动物中表达蛋白的条件下编码一种或多种蛋白。例如,在mRNA编码通常在健康哺乳动物受试者中表达的蛋白的实施方案中,由包封在SNALP内的mRNA编码的蛋白的表达水平为通常在健康哺乳动物受试者中表达的蛋白水平的至少10%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%、或至少100%、或大于100%。

[0163] 在其他方面,本发明提供了用于治疗有需要的哺乳动物(例如,人)中与疾病相关的一种或多种症状、预防所述症状、降低发展所述症状的风险或可能性(例如,降低其易感性)、延迟所述症状的发作和/或改善所述症状的方法,其中所述疾病(至少部分地)由蛋白的表达降低或表达异常引起。该方法各自包括向哺乳动物施用治疗有效量的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP制剂)的步骤,该核酸-脂质颗粒包含一种或多种mRNA分子,所述mRNA分子编码受治疗的受试者体内不存在的蛋白或以降低的水平存在的蛋白。

[0164] 可用于本发明的mRNA分子可以是化学修饰的或未修饰的。通常,mRNA分子被化学修饰,以降低其诱导引入mRNA的细胞的先天免疫应答的能力。

[0165] 对mRNA的修饰

[0166] 用于本发明的实践中的mRNA可包含一个、两个或多于两个核苷修饰。在一些实施方案中,相对于对应的未修饰的mRNA,经修饰的mRNA在引入mRNA的细胞中表现出减少的降解。

[0167] 在一些实施方案中,经修饰的核苷包括吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮杂-尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代尿苷、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羟基尿苷、3-甲基尿苷、5-羧甲基-尿苷、1-羧甲基-假尿苷、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酰甲基尿苷、1-牛磺酰甲基-假尿苷、5-牛磺酰甲基-2-硫代尿苷、1-牛磺酰甲基-4-硫代尿苷、5-甲基尿苷、1-甲基-1-假尿苷、4-硫代-1-甲基-1-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-假尿苷、1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、二氢尿苷、二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-

硫代-二氢假尿苷、2-甲氧基尿苷、2-甲氧基-4-硫代尿苷、4-甲氧基-假尿苷和4-甲氧基-2-硫代-假尿苷。

[0168] 在一些实施方案中,经修饰的核苷包括5-氮杂-胞苷、假异胞苷、3-甲基-胞苷、N4-乙酰基胞苷、5-甲酰基胞苷、N4-甲基胞苷、5-羟甲基胞苷、1-甲基-假异胞苷、吡咯-胞苷、吡咯-假异胞苷、2-硫代-胞苷、2-硫代-5-甲基-胞苷、4-硫代-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、泽布拉林(zebularine)、5-氮杂-泽布拉林、5-甲基-泽布拉林、5-氮杂-2-硫代-泽布拉林、2-硫代-泽布拉林、2-甲氧基-胞苷、2-甲氧基-5-甲基-胞苷、4-甲氧基-假异胞苷和4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷。

[0169] 在其他实施方案中,经修饰的核苷包括2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤、7-脱氮-2-氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2-氨基嘌呤、7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、1-甲基腺苷、N6-甲基腺苷、N6-异戊烯基腺苷、N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷、2-甲硫基-N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷、N6-甘氨酸氨基甲酰腺苷、N6-苏氨酸氨基甲酰腺苷、2-甲硫基-N6-苏氨酸氨基甲酰腺苷、N6,N6-二甲基腺苷、7-甲基腺嘌呤、2-甲硫基-腺嘌呤和2-甲氧基-腺嘌呤。

[0170] 在具体的实施方案中,经修饰的核苷是5'-0-(1-硫代磷酸)-腺苷、5'-0-(1-硫代磷酸)-胞苷、5'-0-(1-硫代磷酸)-鸟苷、5'-0-(1-硫代磷酸)-尿苷或5'-0-(1-硫代磷酸)-假尿苷。提供 α -硫代取代的磷酸部分以通过非天然硫代磷酸骨架键合为RNA聚合物赋予稳定性。硫代磷酸RNA具有增加的核酸酶抗性,并且随后在细胞环境中具有更长的半衰期。预计硫代磷酸所连接的核酸还通过细胞先天免疫分子的较弱结合/活化来降低先天免疫应答。

[0171] 在某些实施方案中,期望在细胞内降解引入细胞中的经修饰的核酸,例如在需要精确定时的蛋白产生时。因此,本发明提供了含有降解结构域的经修饰的核酸,其能够以定向方式在细胞内起作用。

[0172] 在其他实施方案中,经修饰的核苷包括肌苷、1-甲基-肌苷、怀俄苷、怀丁苷、7-脱氮-鸟苷、7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、6-硫代-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、7-甲基-鸟苷、6-硫代-7-甲基-鸟苷、7-甲基肌苷、6-甲氧基-鸟苷、1-甲基鸟苷、N2-甲基鸟苷、N2,N2-二甲基鸟苷、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷、1-甲基-6-硫代-鸟苷、N2-甲基-6-硫代鸟苷和N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷。

[0173] 经修饰的核酸的任选组分

[0174] 在另外的实施方案中,经修饰的核酸可包含其他任选组分,这些组分在一些实施方案中可能是有益的。这些任选组分包括但不限于非翻译区、kozak序列、内含子核苷酸序列、内部核糖体进入位点(IRES)、帽和polyA尾。例如,可提供5'非翻译区(UTR)和/或3'UTR,其中任一个或两个可以独立地含有一个或多个不同的核苷修饰。在此类实施方案中,核苷修饰也可存在于可翻译区中。还提供了含有Kozak序列的核酸。

[0175] 另外,提供了含有能够从核酸切除的一个或多个内含子核苷酸序列的核酸。

[0176] 非翻译区(UTR)

[0177] 基因的非翻译区(UTR)将被转录但不翻译。5'UTR从转录起始位点开始并持续到起始密码子但不包括起始密码子;然而,3'UTR在终止密码子后立即开始并持续到转录终止信

号。关于UTR在核酸分子的稳定性和翻译方面发挥的调节作用的证据越来越多。UTR的调节特征可以并入本发明所使用的mRNA中以增加分子的稳定性。还可以将特定特征并入以确保转录物的受控下调,以防它们被错误地导向不期望的器官位点。

[0178] 5'加帽

[0179] mRNA的5'帽结构参与核输出从而增加mRNA稳定性,并结合mRNA帽结合蛋白(CBP),CBP负责mRNA在细胞中的稳定性以及通过CBP与poly(A)结合蛋白缔合以形成成熟的环状mRNA物质的翻译能力。该帽进一步有助于在mRNA剪接期间去除5'近端内含子。

[0180] 内源性mRNA分子可以是5'-末端加帽的,从而在mRNA分子的末端鸟苷帽残基与5'-末端转录有义核苷酸之间生成5'-ppp-5'-三磷酸键合。然后该5'-鸟苷酸帽可甲基化以生成N7-甲基-鸟苷酸残基。mRNA的5'端的末端和/或前末端(antiterminal)转录的核苷酸的核糖也可任选地被2'-O-甲基化。通过鸟苷酸帽结构的水解和切割进行的5'-脱帽可以靶向核酸分子(例如,mRNA分子)以进行降解。

[0181] IRES序列

[0182] 含有内部核糖体进入位点(IRES)的mRNA也可用于实践本发明。IRES可以作为唯一的核糖体结合位点,或者可以作为mRNA的多个核糖体结合位点之一。含有多于一个功能性核糖体结合位点的mRNA可以编码由核糖体独立翻译的若干肽或多肽(“多顺反子mRNA”)。当mRNA具有IRES时,还任选地提供第二可翻译区。可根据本发明使用的IRES序列的实例包括但不限于来自小核糖核酸病毒(例如,FMDV)、害虫病毒(CFFV)、脊髓灰质炎病毒(PV)、脑心肌炎病毒(ECMV)、口蹄疫病毒(FMDV)、丙型肝炎病毒(HCV)、经典猪瘟疫病毒(CSFV)、鼠白血病病毒(MLV)、猴免疫缺陷病毒(SIV)或蟋蟀麻痹病毒(CrPV)的那些。

[0183] Poly-A尾

[0184] 在RNA加工期间,可将长链腺嘌呤核苷酸(poly-A尾)添加到多核苷酸如mRNA分子中以增加稳定性。转录后立即切割转录物的3'端以释放3'羟基。然后poly-A聚合酶将一条腺嘌呤核苷酸链添加到RNA中。这种称为聚腺苷酸化的过程添加长度可在100到250个残基之间的poly-A尾。

[0185] 通常,poly-A尾的长度大于30个核苷酸。在另一个实施方案中,poly-A尾的长度大于35个核苷酸(例如,至少为或大于约35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2,000、2,500和3,000个核苷酸)。

[0186] 在该上下文中,poly-A尾的长度可以比经修饰的mRNA长10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。poly-A尾也可以设计为它所属的经修饰的核酸的一部分。在该上下文中,poly-A尾可以是经修饰mRNA的总长度的或者经修饰mRNA的总长度减去poly-A尾后的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%或更多。

[0187] 生成mRNA分子

[0188] 分离RNA、合成RNA、杂交核酸、制备和筛选cDNA文库以及执行PCR的方法是本领域所熟知的(参见例如Gubler和Hoffman, *Gene*, 25:263-269 (1983); Sambrook等人, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (第2版, 1989)); PCR方法也是熟知的(参见美国专利号4,683,195和4,683,202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis等人编辑, 1990))。表达文库也是本领域的技术人员所熟知的。公开本发明的一般使用方法的

其他基础文献包括Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); 以及Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人编辑, 1994)。这些参考文献的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0189] 生成siRNA分子

[0190] siRNA可以若干形式提供, 包括例如作为一种或多种分离的小干扰RNA (siRNA) 双链体, 作为较长的双链RNA (dsRNA), 或作为从DNA质粒中的转录盒转录的siRNA或dsRNA。在一些实施方案中, siRNA可以酶促方法产生或通过部分/全部有机合成产生, 并且经修饰的核糖核苷酸可通过体外酶促或有机合成引入。在某些情况下, 每条链以化学方式制备。合成RNA分子的方法是本领域已知的, 例如, 如Verma和Eckstein (1998) 中所述或如本文所述的化学合成方法。

[0191] 分离RNA、合成RNA、杂交核酸、制备和筛选cDNA文库以及执行PCR的方法是本领域所熟知的(参见例如Gubler和Hoffman, Gene, 25:263-269 (1983); Sambrook等人, 出处同上; Ausubel等人, 出处同上), PCR方法也是熟知的(参见美国专利号4,683,195和4,683,202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis等人编辑, 1990))。表达文库也是本领域的技术人员所熟知的。公开本发明的一般使用方法的其他基础文献包括Sambrook等人, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (第2版, 1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); 以及Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人编辑, 1994)。这些参考文献的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0192] 优选地, siRNA是化学合成的。包含本发明的siRNA分子的寡核苷酸可以使用本领域已知的多种技术中的任一种来合成, 例如Usman等人, J. Am. Chem. Soc., 109:7845 (1987); Scaringe等人, Nucl. Acids Res., 18:5433 (1990); Wincott等人, Nucl. Acids Res., 23:2677-2684 (1995); 以及Wincott等人, Methods Mol. Bio., 74:59 (1997) 中所述的那些技术。寡核苷酸的合成利用共同的核酸保护和偶联基团, 例如5'-端的二甲氧基三苯甲基和3'端的亚磷酰胺。作为非限制性实例, 可使用0.2 μ mol规模方案在Applied Biosystems合成仪上进行小规模合成。替代性地, 可在得自Protogene (Palo Alto, CA) 的96孔板合成仪上进行0.2 μ mol规模的合成。然而, 更大或更小的合成规模也在本发明的范围内。用于寡核苷酸合成的合适试剂、用于RNA去保护的方法和用于RNA纯化的方法是本领域的技术人员已知的。

[0193] siRNA分子可以由两种不同的寡核苷酸组装, 其中一种寡核苷酸构成siRNA的有义链, 另一种寡核苷酸构成siRNA的反义链。例如, 每条链可以单独合成, 并在合成和/或去保护后通过杂交或连接而接合在一起。

[0194] 脂质颗粒

[0195] 在某些方面, 本发明提供了包含包封在脂质颗粒内的一种或多种治疗性mRNA分子的脂质颗粒。

[0196] 在一些实施方案中, mRNA完全包封在脂质颗粒的脂质部分内, 使得脂质颗粒中的mRNA在水溶液中耐核酸酶降解。在其他实施方案中, 本文所述的脂质颗粒对哺乳动物如人类基本上无毒。本发明的脂质颗粒的平均直径通常为约30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm或约70至约90nm。本发明的脂质颗粒通常还具有约1:1至约100:1、约1:1至约50:1、约2:1至约25:1、约3:1至约20:1、约5:1至

约15:1、或约5:1至约10:1、或约10:1至约14:1、或约9:1至约20:1的脂质:mRNA比率(质量/质量比)。在一个实施方案中,本发明的脂质颗粒具有约12:1(例如,12:1)的脂质:mRNA比率(质量/质量比)。在另一个实施方案中,本发明的脂质颗粒具有约13:1(例如,13:1)的脂质:mRNA比率(质量/质量比)。

[0197] 在优选的实施方案中,本发明的脂质颗粒是血清稳定的核酸-脂质颗粒(SNALP),其包含mRNA、阳离子脂质(例如,一种或多种如本文所述的式I-III的阳离子脂质或其盐)、磷脂以及抑制颗粒聚集的缀合脂质(例如,一种或多种PEG-脂质缀合物)。脂质颗粒还可包含胆固醇。SNALP可包含表达一种或多种多肽的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种未修饰和/或经修饰的mRNA。核酸-脂质颗粒及其制备方法在例如美国专利号5,753,613、5,785,992、5,705,385、5,976,567、5,981,501、6,110,745和6,320,017;以及PCT公布号W0 96/40964中有所描述,这些专利的公开内容各自全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0198] 在本发明的核酸-脂质颗粒中,mRNA可以完全包封在颗粒的脂质部分内,从而保护核酸免遭核酸酶降解。在优选的实施方案中,包含mRNA的SNALP完全包封在颗粒的脂质部分内,从而保护核酸免遭核酸酶降解。在某些情况下,在37°C下将颗粒暴露于核酸酶至少约20、30、45或60分钟后,SNALP中的mRNA基本上不降解。在某些其他情况下,在37°C下将颗粒在血清中温育至少约30、45或60分钟或至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34或36小时后,SNALP中的mRNA基本上不降解。在其他实施方案中,mRNA与颗粒的脂质部分复合。本发明的制剂的益处之一是核酸-脂质颗粒组合物对哺乳动物如人类基本上无毒。

[0199] 术语“完全包封”表示核酸-脂质颗粒中的核酸(mRNA)在暴露于血清后或会显著降解游离RNA的核酸酶测定法后未显著降解。在完全包封的系统中,在通常会降解100%游离核酸的处理中,颗粒中优选小于约25%、更优选小于约10%并且最优选小于约5%的核酸被降解。“完全包封”还表示核酸-脂质颗粒是血清稳定的,即,核酸-脂质颗粒在体内施用不会快速分解成其组成部分。

[0200] 在核酸的上下文中,可通过执行膜不可渗透的荧光染料排除测定法来确定完全包封,所述测定法采用当与核酸缔合时具有增强的荧光的染料。诸如 OliGreen[®] 和 RiboGreen[®] (Invitrogen Corp.;Carlsbad,CA)的特定染料可用于定量测定质粒DNA、单链脱氧核糖核苷酸和/或单链或双链核糖核苷酸。通过将染料添加到脂质体制剂中,测量所得荧光,并将其与添加少量非离子洗涤剂时观察到的荧光进行比较来确定包封。洗涤剂介导的脂质体双层破坏释放包封的核酸,使其与膜不可渗透的染料相互作用。核酸包封可以计算为 $E = (I_0 - I) / I_0$,其中I和I₀是指添加洗涤剂之前和之后的荧光强度(参见Wheeler等人, Gene Ther., 6:271-281(1999))。

[0201] 在其他实施方案中,本发明提供了包含多个核酸-脂质颗粒的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)组合物。

[0202] 在一些情况下,SNALP组合物包含完全包封在颗粒的脂质部分内的mRNA,使得约30%至约100%、约40%至约100%、约50%至约100%、约60%至约100%、约70%至约100%、约80%至约100%、约90%至约100%、约30%至约95%、约40%至约95%、约50%至约95%、约60%至约95%、约70%至约95%、约80%至约95%、约85%至约95%、约90%至约95%、约30%至约90%、约40%至约90%、约50%至约90%、约60%至约90%、约70%至约

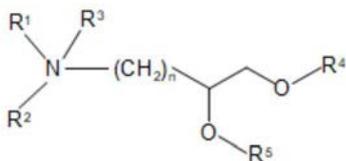
90%、约80%至约90%、或至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99% (或其任何分数或其中的范围) 的颗粒具有包封在其中的mRNA。

[0203] 根据本发明的脂质颗粒的预期用途,可改变组分的比例,并且可使用例如胞内体释放参数(ERP)测定法来测量特定制剂的递送效率。

[0204] 阳离子脂质

[0205] 多种阳离子脂质或其盐中的任一种可以单独地或与一种或多种其他阳离子脂质物质或非阳离子脂质物质组合地用在本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)中。阳离子脂质包括其(R)和/或(S)对映体。通常,阳离子脂质包含含有不饱和烃链和/或饱和烃链的部分(即,疏水部分)。

[0206] 在一个方面,具有以下结构的式I的阳离子脂质可用在本发明中:



[0207]

(I),

[0208] 或其盐,其中:

[0209] R^1 和 R^2 是相同的或不同的且独立地为氢(H)或任选取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基或 C_2 - C_6 炔基,或者 R^1 和 R^2 可以接合以形成4至6个碳原子和1或2个选自氮(N)、氧(O)及其混合物的杂原子的任选取代的杂环;

[0210] R^3 不存在或者为氢(H)或 C_1 - C_6 烷基,从而得到季胺; R^4 和 R^5 是相同的或不同的且独立地为任选取代的 C_{10} - C_{24} 烷基、 C_{10} - C_{24} 烯基、 C_{10} - C_{24} 炔基或 C_{10} - C_{24} 酰基,其中 R^4 和 R^5 中的至少一者包含至少两个不饱和位点;以及

[0211] n 为0、1、2、3或4。

[0212] 在一些实施方案中, R^1 和 R^2 独立地为任选取代的 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或 C_2 - C_4 炔基。在一个优选的实施方案中, R^1 和 R^2 均为甲基。在其他优选的实施方案中, n 为1或2。在其他实施方案中,当pH高于阳离子脂质的 pK_a 时, R^3 不存在,并且当pH低于阳离子脂质的 pK_a 时, R^3 为氢,使得氨基头部基团被质子化。在一个替代性实施方案中, R^3 为任选取代的 C_1 - C_4 烷基,从而得到季胺。在另外的实施方案中, R^4 和 R^5 独立地为任选取代的 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 烷基、 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 烯基、 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 炔基、或者 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 酰基,其中 R^4 和 R^5 中的至少一者包含至少两个不饱和位点。

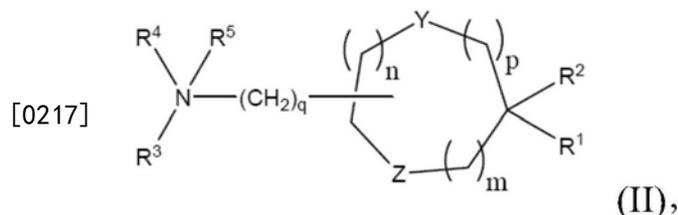
[0213] 在某些实施方案中, R^4 和 R^5 独立地选自十二碳二烯基部分、十四碳二烯基部分、十六碳二烯基部分、十八碳二烯基部分、二十碳二烯基部分、十二碳三烯基部分、十四碳三烯基部分、十六碳三烯基部分、十八碳三烯基部分、二十碳三烯基部分、花生四烯基部分和二十二碳六烯基部分,以及其酰基衍生物(例如,亚油酰基、亚麻酰基、 γ -亚麻酰基等)。在一些情况下, R^4 和 R^5 中的一者包含支化烷基(例如,植烷基部分)或其酰基衍生物(例如,植酰基部分)。在某些情况下,十八碳二烯基部分是亚油基部分。在某些其他情况下,十八碳三烯基部分是亚麻基部分或 γ -亚麻基部分。在某些实施方案中, R^4 和 R^5 均为亚油基部分、亚麻

基部分或 γ -亚麻基部分。在具体实施方案中,式I的阳离子脂质是1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二亚油基氧基-(N,N-二甲基)-丁基-4-胺(C2-DLinDMA)、1,2-二亚油酰氧基-(N,N-二甲基)-丁基-4-胺(C2-DLinDAP)或它们的混合物。

[0214] 在一些实施方案中,式I的阳离子脂质与一种或多种阴离子形成盐(优选结晶盐)。在一个具体实施方案中,式I的阳离子脂质是其草酸盐(例如,半草酸盐),其优选地为结晶盐。

[0215] 阳离子脂质如DLinDMA和DLenDMA以及另外的阳离子脂质的合成在美国专利公布号20060083780中有所描述,该专利公布的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。阳离子脂质如C2-DLinDMA和C2-DLinDAP以及另外的阳离子脂质的合成在国际专利申请号W02011/000106中有所描述,该专利申请的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0216] 在另一方面,具有以下结构的式II的阳离子脂质(或其盐)可用在本发明中:



[0218] 其中 R^1 和 R^2 是相同的或不同的且独立地为任选取代的 C_{12} - C_{24} 烷基、 C_{12} - C_{24} 烯基、 C_{12} - C_{24} 炔基或 C_{12} - C_{24} 酰基; R^3 和 R^4 可以相同或不同且独立地为任选取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基或 C_2 - C_6 炔基,或者 R^3 和 R^4 可以接合以形成4至6个碳原子和1或2个选自氮和氧的杂原子的任选取代的杂环; R^5 不存在或者为氢(H)或 C_1 - C_6 烷基,从而得到季胺; m 、 n 和 p 是相同的或不同的且独立地为0、1或2,前提条件是 m 、 n 和 p 不同时为0; q 为0、1、2、3或4;并且 Y 和 Z 是相同的或不同的且独立地为O、S或NH。在一个优选的实施方案中, q 为2。

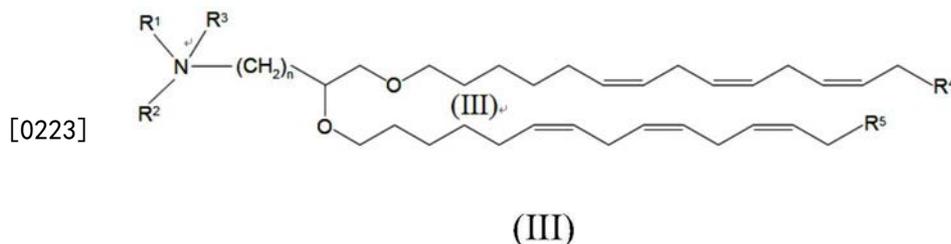
[0219] 在一些实施方案中,式II的阳离子脂质是2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环、2,2-二亚油基-4-(3-二甲基氨基丙基)-[1,3]-二氧戊环、2,2-二亚油基-4-(4-二甲基氨基丁基)-[1,3]-二氧戊环、2,2-二亚油基-5-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧己环、2,2-二亚油基-4-N-甲基哌嗪并-[1,3]-二氧戊环、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环、2,2-二油酰基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环、2,2-二硬脂酰基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环、2,2-二亚油基-4-N-吗啉代-[1,3]-二氧戊环、2,2-二亚油基-4-三甲基氨基-[1,3]-二氧戊环氯化物、2,2-二亚油基-4,5-双(二甲基氨基甲基)-[1,3]-二氧戊环、2,2-二亚油基-4-甲基哌嗪-[1,3]-二氧戊环或它们的混合物。在优选的实施方案中,式II的阳离子脂质是2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环。

[0220] 在一些实施方案中,式II的阳离子脂质与一种或多种阴离子形成盐(优选结晶盐)。在一个具体实施方案中,式II的阳离子脂质是其草酸盐(例如,半草酸盐),其优选地为结晶盐。

[0221] 阳离子脂质如2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环以及另外的阳离子脂质的合成在PCT公布号W0 09/086558中有所描述,该公布的公开内容全文以引用方

式并入本文以用于所有目的,并且在名称为“Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids”的PCT申请号PCT/US2009/060251中有所描述,该申请的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0222] 在另一方面,具有以下结构的式III的阳离子脂质可用在本发明中:



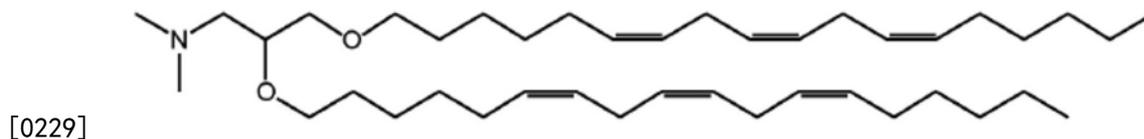
[0224] 或其盐,其中: R^1 和 R^2 是相同的或不同的且独立地为任选取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基或 C_2 - C_6 炔基,或者 R^1 和 R^2 可以接合以形成4至6个碳原子和1或2个选自氮(N)、氧(O)及其混合物的杂原子的任选取代的杂环; R^3 不存在或者为氢(H)或 C_1 - C_6 烷基,从而得到季胺; R^4 和 R^5 不存在或存在,并且当存在时是相同的或不同的且独立地为任选取代的 C_1 - C_{10} 烷基或 C_2 - C_{10} 烯基;并且n为0、1、2、3或4。

[0225] 在一些实施方案中, R^1 和 R^2 独立地为任选取代的 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或 C_2 - C_4 炔基。在一个优选的实施方案中, R^1 和 R^2 均为甲基。在另一个优选的实施方案中, R^4 和 R^5 均为丁基。在又一个优选的实施方案中,n为1。在其他实施方案中,当pH高于阳离子脂质的 pK_a 时, R^3 不存在,并且当pH低于阳离子脂质的 pK_a 时, R^3 为氢,使得氨基头部基团被质子化。在一个替代性实施方案中, R^3 为任选取代的 C_1 - C_4 烷基,从而得到季胺。在另外的实施方案中, R^4 和 R^5 独立地为任选取代的 C_2 - C_6 或 C_2 - C_4 烷基或者 C_2 - C_6 或 C_2 - C_4 烯基。

[0226] 在一个替代性实施方案中,式III的阳离子脂质包含氨基头部基团与一条或两条烷基链之间的酯键。在一些实施方案中,式III的阳离子脂质与一种或多种阴离子形成盐(优选结晶盐)。在一个具体实施方案中,式III的阳离子脂质是其草酸盐(例如,半草酸盐),其优选地为结晶盐。

[0227] 虽然式III中的每条烷基链在6位、9位和12位含有顺式双键(即,顺,顺,顺- Δ^6 , Δ^9 , Δ^{12}),但在一个替代性实施方案中,一条或两条烷基链中的这些双键中的一个、两个或三个可以呈反式构型。

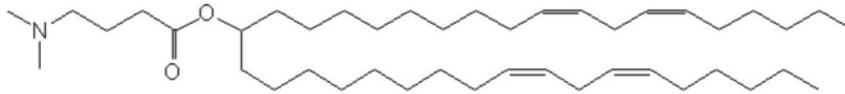
[0228] 在一个实施方案中,式III的阳离子脂质具有以下结构:



γ -DLenDMA (15)

[0230] 阳离子脂质如 γ -DLenDMA以及另外的阳离子脂质的合成在国际专利申请W02011/000106中有所描述,该专利申请的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0231] 在具体实施方案中,具有以下结构的阳离子脂质可用在本发明中:



[0232]

7

[0233] 阳离子脂质如化合物7以及另外的阳离子脂质的合成在美国专利序列号8,158,601和国际专利申请序列号PCT/GB2011/000723中有所描述,这些专利的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0234] 可包含在本发明的脂质颗粒中的其他阳离子脂质或其盐的实例包括但不限于诸如WO2011/000106中描述的那些阳离子脂质,其公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的),以及诸如以下阳离子脂质:N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、1,2-二油烯氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DODMA)、1,2-二硬脂基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DSDMA)、N-(1-(2,3-二油烯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1-(2,3-二油烯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、3-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基)胆固醇(DC-Chol)、N-(1,2-二肉豆蔻氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)、2,3-二油烯氧基-N-[2(精胺-甲酰胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙胺三氟乙酸盐(DOSPA)、二十八烷基氨基甘氨酸基精胺(DOGS)、3-二甲氨基-2-(胆甾-5-烯-3-β-氧基丁烷-4-氧基)-1-(顺,顺-9,12-十八碳二烯氧基)丙烷(CLindMA)、2-[5'-(胆甾-5-烯)-3-β-氧基]-3'-氧杂戊氧基)-3-二甲氨基-1-(顺,顺-9',12'-十八碳二烯氧基)丙烷(CpLindMA)、N,N-二甲基-3,4-二油烯氧基苄胺(DMOBA)、1,2-N,N'-二油烯基氨基甲酰基-3-二甲氨基丙烷(DOcarbDAP)、1,2-N,N'-二亚油基氨基甲酰基-3-二甲氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油基氧基-3-(二甲氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚油基氧基-3-吗啉代丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油基硫基-3-二甲氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚油基氧基-3-二甲氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亚油基氧基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油酰基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚油基氧基-3-(N-甲基哌嗪基)丙烷(DLin-MPZ)、3-(N,N-二亚油基氨基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油烯基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亚油基氧代-3-(2-N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、1,2-二油烯基氨基甲酰氧基-3-二甲氨基丙烷(DO-C-DAP)、1,2-二肉豆蔻油酰基-3-二甲氨基丙烷(DMDAP)、1,2-二油酰基-3-三甲基氨基丙烷氯化物(DOTAP.Cl)、二亚油基甲基-3-二甲氨基丙酸盐(DLin-M-C2-DMA;也称为DLin-M-K-DMA或DLin-M-DMA),以及它们的混合物。可包含在本发明的脂质颗粒中的另外的阳离子脂质或其盐在美国专利公布号20090023673中有所描述,该专利公布的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0235] 在另一个实施方案中,三烷基阳离子脂质可用于制备本文所述的脂质颗粒。此类三烷基阳离子脂质通常包含三条饱和或不饱和烃链,每条链中具有六个或更多个碳。可掺入本文所述的组合物中的三烷基阳离子脂质可如国际专利申请公布号WO 2013/126803中所述制备。

[0236] 例如,下式B的三烷基阳离子脂质可用于制备本发明的脂质颗粒:

[0237] X-A-Y-Z;

[0238] (式B)

[0239] 或其盐,其中:

[0240] X为-N(H)R或-NR₂;

[0241] A不存在、为C₁至C₆烷基、C₂至C₆烯基或C₂至C₆炔基,所述C₁至C₆烷基、C₂至C₆烯基和C₂至C₆炔基任选地被一个或多个独立地选自氧、卤素、杂环、-CN、-OR^x、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x和-SO_nNR^xR^y的一个或多个基团取代,其中n为0、1或2,并且R^x和R^y各自独立地为氢、烷基或杂环,其中R^x和R^y的每个烷基和杂环可以进一步被独立地选自氧、卤素、-OH、-CN、烷基、-OR^{x'}、杂环、-NR^{x'}R^{y'}、-NR^{x'}C(=O)R^{y'}、-NR^{x'}SO₂R^{y'}、-C(=O)R^{x'}、-C(=O)OR^{x'}、-C(=O)NR^{x'}R^{y'}、-SO_{n'}R^{x'}和-SO_{n'}NR^{x'}R^{y'}的一个或多个基团取代,其中n'为0、1或2,并且R^{x'}和R^{y'}各自独立地为氢、烷基或杂环;

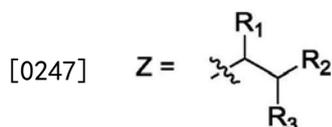
[0242] Y选自不存在、-C(=O)-、-O-、-OC(=O)-、-C(=O)O-、-N(R^b)C(=O)-、-C(=O)N(R^b)-、-N(R^b)C(=O)O-和-OC(=O)N(R^b)-;

[0243] Z为含有三条链的疏水部分,其中每条链独立地选自C₈至C₁₁烷基、C₈至C₁₁烯基和C₈至C₁₁炔基,所述C₈至C₁₁烷基、C₈至C₁₁烯基和C₈至C₁₁炔基任选地被独立地选自氧、卤素、杂环、-CN、-OR^x、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x和-SO_nNR^xR^y的一个或多个基团取代,其中n为0、1或2,并且R^x和R^y各自独立地为氢、烷基或杂环,其中R^x和R^y的任何烷基和杂环可以进一步被独立地选自氧、卤素、-OH、-CN、烷基、-OR^{x'}、杂环、-NR^{x'}R^{y'}、-NR^{x'}C(=O)R^{y'}、-NR^{x'}SO₂R^{y'}、-C(=O)R^{x'}、-C(=O)OR^{x'}、-C(=O)NR^{x'}R^{y'}、-SO_{n'}R^{x'}和-SO_{n'}NR^{x'}R^{y'}的一个或多个基团取代,其中n'为0、1或2,并且R^{x'}和R^{y'}各自独立地为氢、烷基或杂环;

[0244] 每个R独立地为烷基、烯基或炔基,其任选地被独立地选自氧、卤素、杂环、-CN、-OR^x、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x和-SO_nNR^xR^y的一个或多个基团取代,其中n为0、1或2,并且R^x和R^y各自独立地为氢、烷基或杂环,其中R^x和R^y的任何烷基和杂环可以进一步被独立地选自氧、卤素、-OH、-CN、烷基、-OR^{x'}、杂环、-NR^{x'}R^{y'}、-NR^{x'}C(=O)R^{y'}、-NR^{x'}SO₂R^{y'}、-C(=O)R^{x'}、-C(=O)OR^{x'}、-C(=O)NR^{x'}R^{y'}、-SO_{n'}R^{x'}和-SO_{n'}NR^{x'}R^{y'}的一个或多个基团取代,其中n'为0、1或2,并且R^{x'}和R^{y'}各自独立地为氢、烷基或杂环;以及

[0245] 每个R^b为H或C₁至C₆烷基。

[0246] 在一些实施方案中,式B中的Z具有以下结构:



[0248] 其中,R₁、R₂和R₃各自独立地为C₈至C₁₁烷基、C₈至C₁₁烯基或C₈至C₁₁炔基,所述C₈至C₁₁烷基、C₈至C₁₁烯基和C₈至C₁₁炔基任选地被独立地选自氧、卤素、杂环、-CN、-OR^x、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x和-SO_nNR^xR^y的一个或多个基团取代,其中n为0、1或2,并且R^x和R^y各自独立地为氢、烷基或杂环,其中R^x和R^y的任何烷基和杂环可以进一步被独立地选自氧、卤素、-OH、-CN、烷基、-OR^{x'}、杂环、-NR^{x'}R^{y'}、-NR^{x'}C(=O)R^{y'}、-NR^{x'}SO₂R^{y'}、-C(=O)R^{x'}、-C(=O)OR^{x'}、-C(=O)NR^{x'}R^{y'}、-SO_{n'}R^{x'}和-SO_{n'}NR^{x'}R^{y'}的

一个或多个基团取代,其中n'为0、1或2,并且R^x和R^y各自独立地为氢、烷基或杂环。

[0249] 在另一个实施方案中,下式C的阳离子脂质用于制备本发明的脂质颗粒:

[0250] X-A-Y-Z¹;

[0251] (式C)

[0252] 或其盐,其中:

[0253] X为-N(H)R或-NR₂;

[0254] A不存在、为C₁至C₆烷基、C₂至C₆烯基或C₂至C₆炔基,所述C₁至C₆烷基、C₂至C₆烯基和C₂至C₆炔基任选地被一个或多个独立地选自氧、卤素、杂环、-CN、-OR^x、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x和-SO_nNR^xR^y的一个或多个基团取代,其中n为0、1或2,并且R^x和R^y各自独立地为氢、烷基或杂环,其中R^x和R^y的每个烷基和杂环可以进一步被独立地选自氧、卤素、-OH、-CN、烷基、-OR^x、杂环、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x和-SO_nNR^xR^y的一个或多个基团取代,其中n'为0、1或2,并且R^x和R^y各自独立地为氢、烷基或杂环;

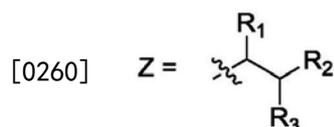
[0255] Y选自不存在、-C(=O)-、-O-、-OC(=O)-、-C(=O)O-、-N(R^b)C(=O)-、-C(=O)N(R^b)-、-N(R^b)C(=O)O-和-OC(=O)N(R^b)-;

[0256] Z¹为被三个或四个R^x基团取代的C₁至C₆烷基,其中每个R^x独立地选自C₆至C₁₁烷基、C₆至C₁₁烯基和C₆至C₁₁炔基,所述C₆至C₁₁烷基、C₆至C₁₁烯基和C₆至C₁₁炔基任选地被独立地选自氧、卤素、杂环、-CN、-OR^x、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x和-SO_nNR^xR^y的一个或多个基团取代,其中n为0、1或2,并且R^x和R^y各自独立地为氢、烷基或杂环,其中R^x和R^y的任何烷基和杂环可以进一步被独立地选自氧、卤素、-OH、-CN、烷基、-OR^x、杂环、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x和-SO_nNR^xR^y的一个或多个基团取代,其中n'为0、1或2,并且R^x和R^y各自独立地为氢、烷基或杂环;

[0257] 每个R独立地为烷基、烯基或炔基,其任选地被独立地选自氧、卤素、杂环、-CN、-OR^x、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x和-SO_nNR^xR^y的一个或多个基团取代,其中n为0、1或2,并且R^x和R^y各自独立地为氢、烷基或杂环,其中R^x和R^y的任何烷基和杂环可以进一步被独立地选自氧、卤素、-OH、-CN、烷基、-OR^x、杂环、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x和-SO_nNR^xR^y的一个或多个基团取代,其中n'为0、1或2,并且R^x和R^y各自独立地为氢、烷基或杂环;以及

[0258] 每个R^b为H或C₁至C₆烷基。

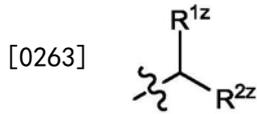
[0259] 在一些实施方案中,式C中的Z¹具有以下结构:



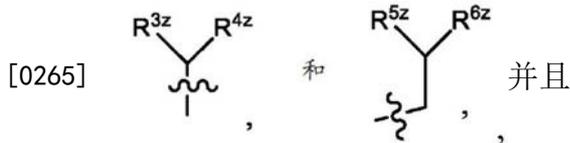
[0261] 其中,R₁、R₂和R₃各自独立地为C₈至C₁₁烷基、C₈至C₁₁烯基或C₈至C₁₁炔基,所述C₈至C₁₁烷基、C₈至C₁₁烯基和C₈至C₁₁炔基任选地被独立地选自氧、卤素、杂环、-CN、-OR^x、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x和-SO_nNR^xR^y的一个或多个基团取代,其中n为0、1或2,并且R^x和R^y各自独立地为氢、烷基或杂环,其中R^x和R^y的任

何烷基和杂环可以进一步被独立地选自氧、卤素、-OH、-CN、烷基、-OR^{x'}、杂环、-NR^{x'}R^{y'}、-NR^{x'}C(=O)R^{y'}、-NR^{x'}SO₂R^{y'}、-C(=O)R^{x'}、-C(=O)OR^{x'}、-C(=O)NR^{x'}R^{y'}、-SO_{n'}R^{x'}和-SO_{n'}NR^{x'}R^{y'}的一个或多个基团取代,其中n'为0、1或2,并且R^{x'}和R^{y'}各自独立地为氢、烷基或杂环。

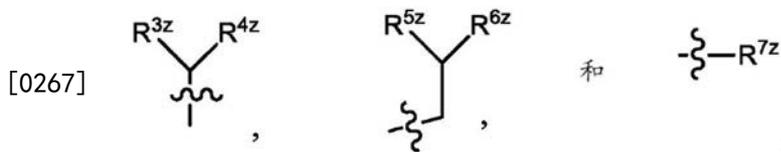
[0262] 在一些实施方案中,式C中的Z¹具有以下结构:



[0264] 其中R^{1z}和R^{2z}中的一者选自:

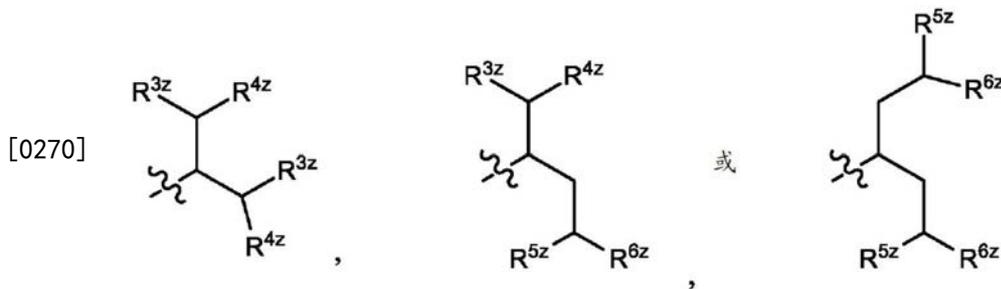


[0266] R^{1z}和R^{2z}中的另一者选自:



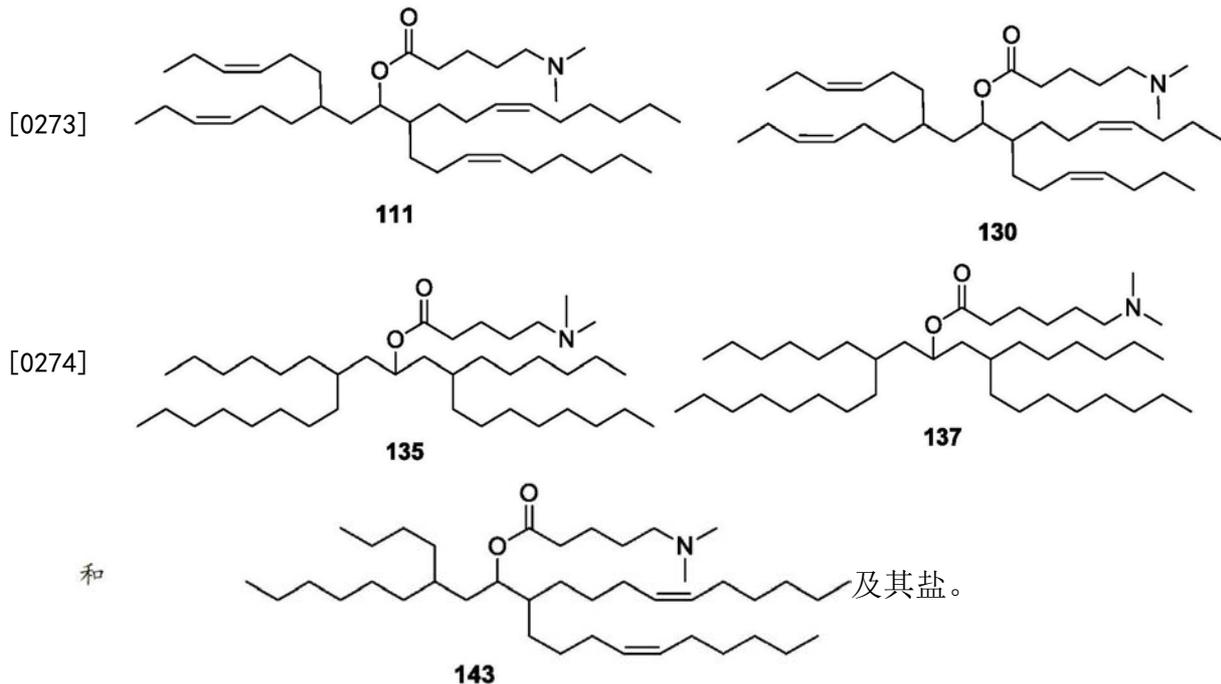
[0268] 其中每个R^{3z}、R^{4z}、R^{5z}、R^{6z}和R^{7z}独立地选自C₆至C₁₁烷基、C₆至C₁₁烯基和C₆至C₁₁炔基,所述C₆至C₁₁烷基、C₆至C₁₁烯基和C₆至C₁₁炔基任选地被独立地选自氧、卤素、杂环、-CN、-OR^x、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x和-SO_nNR^xR^y的一个或多个基团取代,其中n为0、1或2,并且R^x和R^y各自独立地为氢、烷基或杂环,其中R^x和R^y的任何烷基和杂环可以进一步被独立地选自氧、卤素、-OH、-CN、烷基、-OR^{x'}、杂环、-NR^{x'}R^{y'}、-NR^{x'}C(=O)R^{y'}、-NR^{x'}SO₂R^{y'}、-C(=O)R^{x'}、-C(=O)OR^{x'}、-C(=O)NR^{x'}R^{y'}、-SO_{n'}R^{x'}和-SO_{n'}NR^{x'}R^{y'}的一个或多个基团取代,其中n'为0、1或2,并且R^{x'}和R^{y'}各自独立地为氢、烷基或杂环。

[0269] 在一些实施方案中,式C中的Z¹具有以下结构:



[0271] 其中每个R^{3z}、R^{4z}、R^{5z}和R^{6z}独立地选自C₆至C₁₁烷基、C₆至C₁₁烯基和C₆至C₁₁炔基,所述C₆至C₁₁烷基、C₆至C₁₁烯基和C₆至C₁₁炔基任选地被独立地选自氧、卤素、杂环、-CN、-OR^x、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x和-SO_nNR^xR^y的一个或多个基团取代,其中n为0、1或2,并且R^x和R^y各自独立地为氢、烷基或杂环,其中R^x和R^y的任何烷基和杂环可以进一步被独立地选自氧、卤素、-OH、-CN、烷基、-OR^{x'}、杂环、-NR^{x'}R^{y'}、-NR^{x'}C(=O)R^{y'}、-NR^{x'}SO₂R^{y'}、-C(=O)R^{x'}、-C(=O)OR^{x'}、-C(=O)NR^{x'}R^{y'}、-SO_{n'}R^{x'}和-SO_{n'}NR^{x'}R^{y'}的一个或多个基团取代,其中n'为0、1或2,并且R^{x'}和R^{y'}各自独立地为氢、烷基或杂环。

[0272] 在一些实施方案中,阳离子脂质选自:



[0275] 阳离子脂质如CLinDMA以及另外的阳离子脂质的合成在美国专利公布号20060240554中有所描述,该专利公布的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。阳离子脂质如DLin-C-DAP、DLinDAC、DLinMA、DLinDAP、DLin-S-DMA、DLin-2-DMAP、DLinTMA.Cl、DLinTAP.Cl、DLinMPZ、DLinAP、DOAP和DLin-EG-DMA以及另外的阳离子脂质的合成在PCT公布号W009/086558中有所描述,该公布的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。阳离子脂质如DO-C-DAP、DMDAP、DOTAP.Cl、DLin-M-C2-DMA以及另外的阳离子脂质的合成在2009年10月9日提交的名称为“Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids”的PCT申请号PCT/US2009/060251中有所描述,该申请的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。多种其他阳离子脂质和相关类似物的合成已在美国专利号5,208,036、5,264,618、5,279,833、5,283,185、5,753,613和5,785,992;以及PCT公布号W0 96/10390中有所描述,这些专利的公开内容各自全文以引用方式并入本文以用于所有目的。另外,可使用多种商业阳离子脂质制备物,例如LIPOFECTIN[®](包括DOTMA和DOPE,可得自Invitrogen);LIPOFECTAMINE[®](包括DOSPA和DOPE,可得自Invitrogen);以及TRANSFECTAM[®](包括DOGS,可得自Promega Corp.)。

[0276] 在一些实施方案中,阳离子脂质占颗粒中存在的总脂质的约50摩尔%至约90摩尔%、约50摩尔%至约85摩尔%、约50摩尔%至约80摩尔%、约50摩尔%至约75摩尔%、约50摩尔%至约70摩尔%、约50摩尔%至约65摩尔%、约50摩尔%至约60摩尔%、约55摩尔%至约65摩尔%或约55摩尔%至约70摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。在具体实施方案中,阳离子脂质占颗粒中存在的总脂质的约50摩尔%、51摩尔%、52摩尔%、53摩尔%、54摩尔%、55摩尔%、56摩尔%、57摩尔%、58摩尔%、59摩尔%、60摩尔%、61摩尔%、62摩尔%、63摩尔%、64摩尔%或65摩尔%(或其任何分数)。

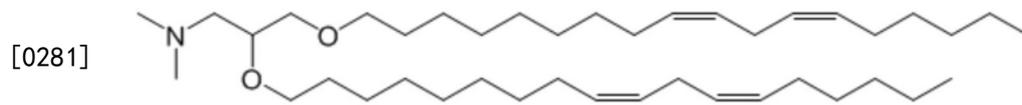
[0277] 在其他实施方案中,阳离子脂质占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约60摩尔%、约5摩尔%至约50摩尔%、约10摩尔%至约50摩尔%、约20摩尔%至约50摩尔%、约20

摩尔%至约40摩尔%、约30摩尔%至约40摩尔%、或约40摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。

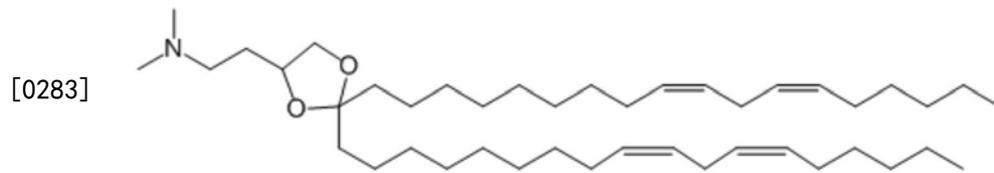
[0278] 适用于本发明的脂质颗粒中的阳离子脂质的其他百分比和范围在PCT公布号W0 09/127060、美国已公布的申请号US 2011/0071208、PCT公布号W02011/000106和美国已公布的申请号US2011/0076335中有所描述,这些专利的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0279] 应当理解,本发明的脂质颗粒中存在的阳离子脂质的百分比是目标量,并且制剂中存在的阳离子脂质的实际量可以变化例如 ± 5 摩尔%。例如,在1:57脂质颗粒(例如,SNALP)制剂中,阳离子脂质的目标量为57.1摩尔%,但阳离子脂质的实际量可为该目标量的 ± 5 摩尔%、 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%,其中制剂的余量由其他脂质组分构成(合计达颗粒中存在的总脂质的100摩尔%)。

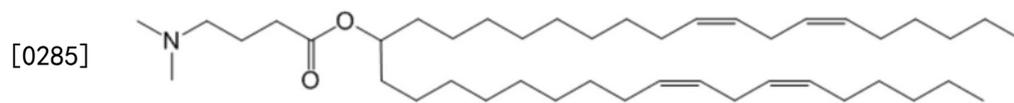
[0280] 作为非限制性实例,阳离子脂质包括以下化合物:



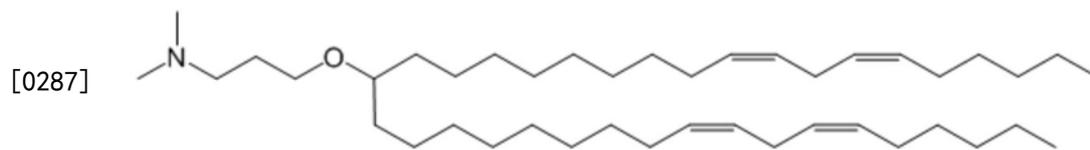
[0282] N,N-二甲基-2,3-双((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基氧基)丙-1-胺(5)



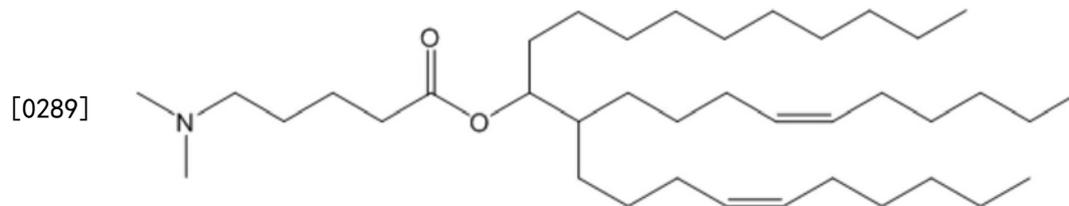
[0284] 2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基乙胺(6)



[0286] (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯(7)

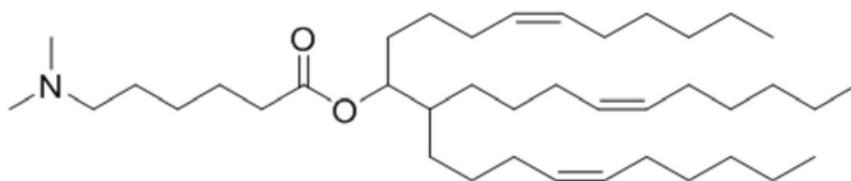


[0288] 3-(((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(8)



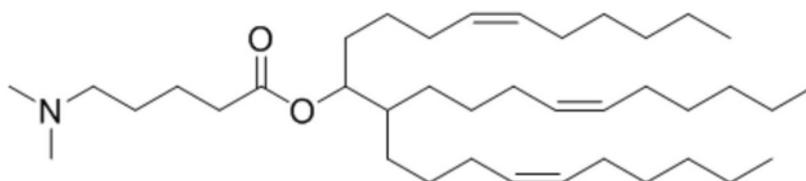
[0290] (Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二-16-烯-11-基5-(二甲基氨基)戊酸酯(53)

[0291]



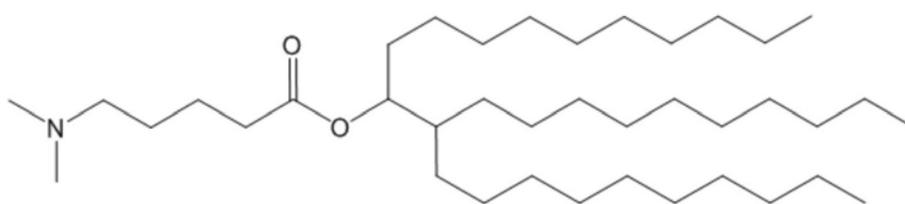
[0292] (6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基6-(二甲基氨基)己酸酯(11)

[0293]

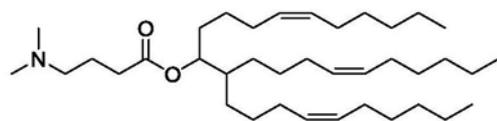


[0294] (6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基5-(二甲基氨基)戊酸酯(13)

[0295]

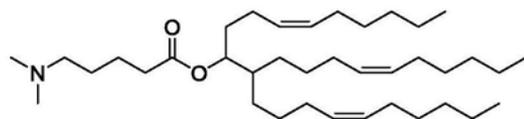


[0296] 12-癸基二十二烷-11-基5-(二甲基氨基)戊酸酯(14)

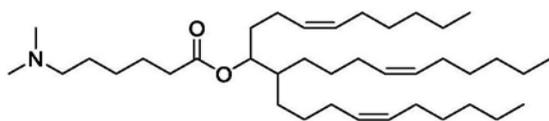


化合物 9、

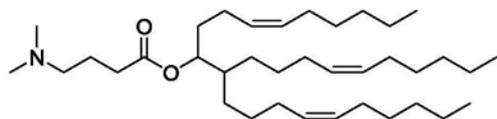
[0297]



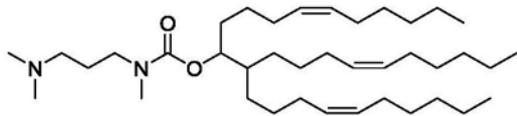
化合物 19、



化合物 21、

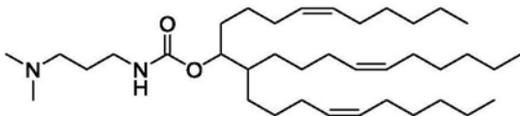


化合物 22、

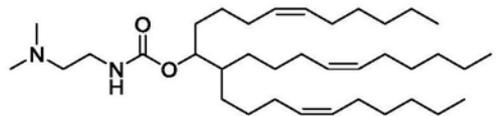


化合物 23、

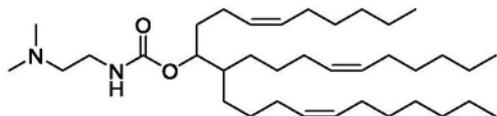
[0298]



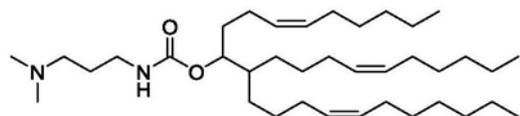
化合物 24、



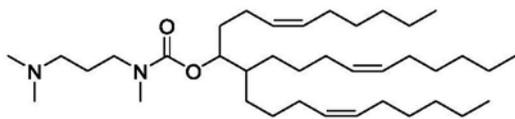
化合物 25、



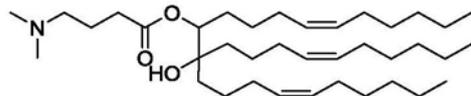
化合物 26、



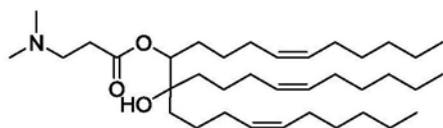
化合物 27、



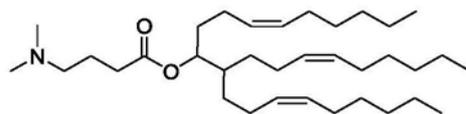
化合物 28、



化合物 30、

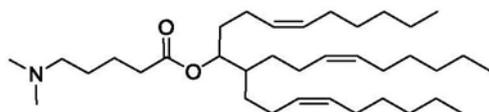


化合物 31、

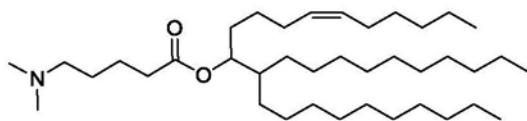


[0299]

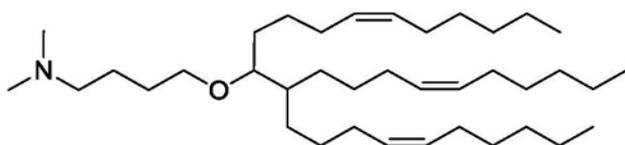
化合物 40、



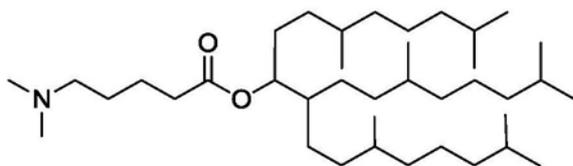
化合物 42、



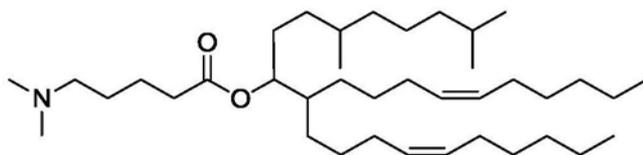
化合物 50、



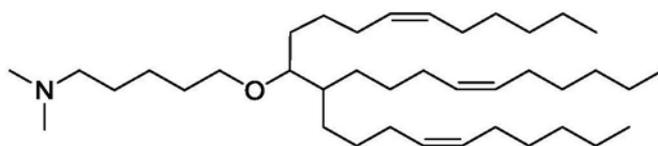
化合物 62、



化合物 71、

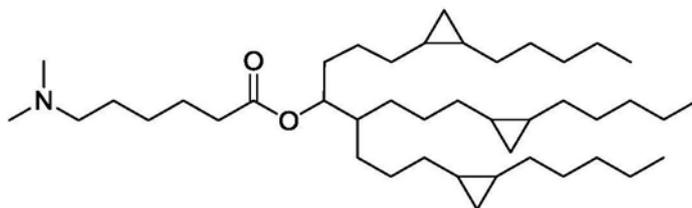


化合物 74、

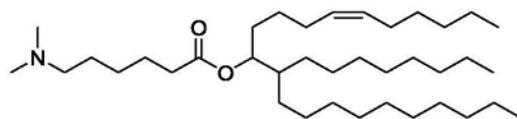


化合物 76、

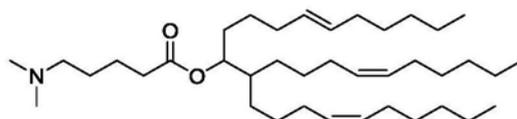
[0300]



化合物 79、

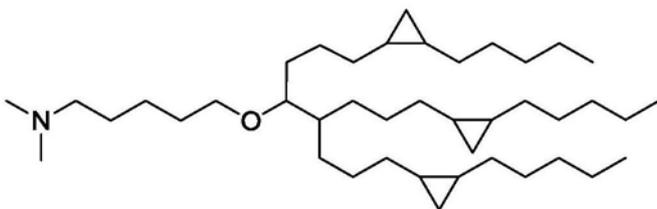


化合物 83、



化合物 89 和

[0301]



化合物 90

[0302] 非阳离子脂质

[0303] 用于本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)中的非阳离子脂质可以是能够产生稳定复合物的各种中性不带电脂质、两性离子脂质或阴离子脂质中的任一种。

[0304] 非阳离子脂质的非限制性实例包括磷脂,例如卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、双十六烷基磷酸酯、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰基-磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰基-磷脂酰乙醇胺(POPE)、棕榈酰油酰基-磷脂酰甘油(POPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸酯(DOPE-ma1)、二棕榈酰基-磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基-磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺、二甲基-磷脂酰乙醇胺、二反油酰基-磷脂酰乙醇胺(DEPE)、硬脂酰油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰磷脂酰胆碱以及它们的混合物。也可使用其他二酰基磷脂酰胆碱磷脂和二酰基磷脂酰乙醇胺磷脂。这些脂质中的酰基优选地为衍生自具有C₁₀-C₂₄碳链的脂肪酸的酰基,例如月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基或油酰基。

[0305] 非阳离子脂质的其他实例包括甾醇,例如胆固醇及其衍生物。胆固醇衍生物的非限制性实例包括极性类似物,例如5 α -胆甾烷醇、5 β -粪甾醇、胆甾醇基-(2'-羟基)-乙基醚、胆甾醇基-(4'-羟基)-丁基醚和6-酮胆甾烷醇;非极性类似物,例如5 α -胆甾烷、胆甾烯酮、5 α -胆甾烷酮、5 β -胆甾烷酮和胆甾醇癸酸酯;以及它们的混合物。在优选的实施方案中,胆固醇衍生物是极性类似物,例如胆甾醇基-(4'-羟基)-丁基醚。胆甾醇基-(2'-羟基)-乙基醚的合成在PCT公布号WO 09/127060中有所描述,该专利的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0306] 在一些实施方案中,脂质颗粒(例如,SNALP)中存在的非阳离子脂质包含一种或多种磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物或由该混合物组成。在其他实施方案中,脂质颗粒(例如,SNALP)中存在的非阳离子脂质包含一种或多种磷脂或由所述磷脂组成,例如不含胆固醇的脂质颗粒制剂。在另外其他实施方案中,脂质颗粒中存在的非阳离子脂质(例如,SNALP)包含胆固醇或其衍生物或者由胆固醇或其衍生物组成,例如不含磷脂的脂质颗粒制剂。

[0307] 适用于本发明的非阳离子脂质的其他实例包括不含磷的脂质,例如硬脂胺、十二烷胺、十六烷胺、乙酰基棕榈酸酯、甘油蓖麻醇酸酯、十六烷基硬脂酸酯、肉豆蔻酸异丙酯、两性丙烯酸聚合物、三乙醇胺-月桂基硫酸酯、烷基-芳基硫酸酯聚乙氧基化脂肪酸酰胺、双十八烷基二甲基溴化铵、神经酰胺、鞘磷脂等。

[0308] 在一些实施方案中,非阳离子脂质占颗粒中存在的总脂质的约10摩尔%至约60摩尔%、约20摩尔%至约55摩尔%、约20摩尔%至约45摩尔%、约20摩尔%至约40摩尔%、约25摩尔%至约50摩尔%、约25摩尔%至约45摩尔%、约30摩尔%至约50摩尔%、约30摩尔%至约45摩尔%、约30摩尔%至约40摩尔%、约35摩尔%至约45摩尔%、约37摩尔%至约42摩尔%、或约35摩尔%、36摩尔%、37摩尔%、38摩尔%、39摩尔%、40摩尔%、41摩尔%、42摩尔%、43摩尔%、44摩尔%或45摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。

[0309] 在脂质颗粒包含磷脂和胆固醇或胆固醇衍生物的混合物的实施方案中,该混合物可占颗粒中存在的总脂质的至多约40摩尔%、45摩尔%、50摩尔%、55摩尔%或60摩尔%。

[0310] 在一些实施方案中,混合物中的磷脂组分可占颗粒中存在的总脂质的约2摩尔%至约20摩尔%、约2摩尔%至约15摩尔%、约2摩尔%至约12摩尔%、约4摩尔%至约15摩尔%或约4摩尔%至约10摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。在某些优选的实施方案中,混合物中的磷脂组分占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约10摩尔%、约5摩尔%至约9摩尔%、约5摩尔%至约8摩尔%、约6摩尔%至约9摩尔%、约6摩尔%至约8摩尔%、或约5摩尔%、6摩尔%、7摩尔%、8摩尔%、9摩尔%或10摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。作为非限制性实例,包含磷脂和胆固醇的混合物的1:57脂质颗粒制剂可包含约7摩尔%(或其任何分数)的磷脂如DPPC或DSPC,例如,所述磷脂与占颗粒中存在的总脂质的约34摩尔%(或其任何分数)的胆固醇或胆固醇衍生物呈混合物的形式。作为另一个非限制性实例,包含磷脂和胆固醇的混合物的7:54脂质颗粒制剂可包含约7摩尔%(或其任何分数)的磷脂如DPPC或DSPC,例如,所述磷脂与占颗粒中存在的总脂质的约32摩尔%(或其任何分数)的胆固醇或胆固醇衍生物呈混合物的形式。

[0311] 在其他实施方案中,混合物中的胆固醇组分可占颗粒中存在的总脂质的约25摩尔%至约45摩尔%、约25摩尔%至约40摩尔%、约30摩尔%至约45摩尔%、约30摩尔%至约40摩尔%、约27摩尔%至约37摩尔%、约25摩尔%至约30摩尔%、或约35摩尔%至约40摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。在某些优选的实施方案中,混合物中的胆固醇组分占颗粒中存在的总脂质的约25摩尔%至约35摩尔%、约27摩尔%至约35摩尔%、约29摩尔%至约35摩尔%、约30摩尔%至约35摩尔%、约30摩尔%至约34摩尔%、约31摩尔%至约33摩尔%、或约30摩尔%、31摩尔%、32摩尔%、33摩尔%、34摩尔%或35摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。通常,包含磷脂和胆固醇的混合物的1:57脂质颗粒制剂可包含约34摩尔%(或其任何分数)的胆固醇或胆固醇衍生物,例如,所述胆固醇或胆固醇衍生物与占颗粒中存在的总脂质的约7摩尔%(或其任何分数)的磷脂如DPPC或DSPC呈混合物的形式。通常,包含磷脂和胆固醇的混合物的7:54脂质颗粒制剂可包含约32摩尔%(或其任何分数)的胆固醇或胆固醇衍生物,例如,所述胆固醇或胆固醇衍生物与占颗粒中存在的总脂质的约7摩尔%(或其任何分数)的磷脂如DPPC或DSPC呈混合物的形式。

[0312] 在脂质颗粒不含磷脂的实施方案中,胆固醇或其衍生物可占颗粒中存在的总脂质的至多约25摩尔%、30摩尔%、35摩尔%、40摩尔%、45摩尔%、50摩尔%、55摩尔%或60摩尔%。

[0313] 在一些实施方案中,不含磷脂的脂质颗粒制剂中的胆固醇或其衍生物可占颗粒中存在的总脂质的约25摩尔%至约45摩尔%、约25摩尔%至约40摩尔%、约30摩尔%至约45摩尔%、约30摩尔%至约40摩尔%、约31摩尔%至约39摩尔%、约32摩尔%至约38摩尔%、

约33摩尔%至约37摩尔%、约35摩尔%至约45摩尔%、约30摩尔%至约35摩尔%、约35摩尔%至约40摩尔%、或约30摩尔%、31摩尔%、32摩尔%、33摩尔%、34摩尔%、35摩尔%、36摩尔%、37摩尔%、38摩尔%、39摩尔%或40摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。作为非限制性实例,1:62脂质颗粒制剂可包含占颗粒中存在的总脂质的约37摩尔%(或其任何分数)的胆固醇。作为另一个非限制性实例,7:58脂质颗粒制剂可包含占颗粒中存在的总脂质的约35摩尔%(或其任何分数)的胆固醇。

[0314] 在其他实施方案中,非阳离子脂质占颗粒中存在的总脂质的约5摩尔%至约90摩尔%、约10摩尔%至约85摩尔%、约20摩尔%至约80摩尔%、约10摩尔%(例如,仅磷脂)或约60摩尔%(例如,磷脂和胆固醇或其衍生物)(或其任何分数或其中的范围)。

[0315] 适用于本发明的脂质颗粒中的非阳离子脂质的其他百分比和范围在PCT公布号W0 09/127060、美国已公布的申请号US 2011/0071208、PCT公布号W02011/000106和美国已公布的申请号US2011/0076335中有所描述,这些专利的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0316] 应当理解,本发明的脂质颗粒中存在的非阳离子脂质的百分比是目标量,并且制剂中存在的非阳离子脂质的实际量可以变化例如 ± 5 摩尔%。例如,在1:57脂质颗粒(例如,SNALP)制剂中,磷脂的目标量为7.1摩尔%,胆固醇的目标量为34.3摩尔%,但磷脂的实际量可为该目标量的 $\pm 2\text{mol}$ 、 ± 1.5 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%,胆固醇的实际量可为该目标量的 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%,其中制剂的余量由其他脂质组分构成(合计达颗粒中存在的总脂质的100摩尔%)。类似地,在7:54脂质颗粒(例如,SNALP)制剂中,磷脂的目标量为6.75摩尔%,胆固醇的目标量为32.43摩尔%,但磷脂的实际量可为该目标量的 $\pm 2\text{mol}$ 、 ± 1.5 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%,胆固醇的实际量可为该目标量的 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%,其中制剂的余量由其他脂质组分构成(合计达颗粒中存在的总脂质的100摩尔%)。

[0317] 脂质缀合物

[0318] 除阳离子和非阳离子脂质外,本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)还可包含脂质缀合物。缀合的脂质是有用的,因为它会防止颗粒的聚集。合适的缀合脂质包括但不限于PEG-脂质缀合物、POZ-脂质缀合物、ATTA-脂质缀合物、阳离子聚合物-脂质缀合物(CPL)以及它们的混合物。在某些实施方案中,颗粒包含PEG-脂质缀合物或ATTA-脂质缀合物以及CPL。

[0319] 在一个优选的实施方案中,脂质缀合物是PEG-脂质。PEG-脂质的实例包括但不限于如例如PCT公布号W0 05/026372中所述的偶联至二烷氧基丙基的PEG(PEG-DAA)、如例如美国专利公布号20030077829和2005008689中所述的偶联至二酰基甘油的PEG(PEG-DAG)、偶联至磷脂如磷脂酰乙醇胺的PEG(PEG-PE)、如例如美国专利号5,885,613中所述的缀合至神经酰胺的PEG、缀合至胆固醇或其衍生物的PEG以及它们的混合物。这些专利文献的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。适用于本发明的另外的PEG-脂质包括但不限于mPEG2000-1,2-二-O-烷基-sn3-氨基甲酰甘油酯(PEG-C-DOMG)。PEG-C-DOMG的合成在PCT公布号W0 09/086558中有所描述,该专利的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。另外的合适的PEG-脂质缀合物包括但不限于1-[8'-(1,2-二肉豆蔻酰基-3-丙氧

基)-甲酰胺基-3',6'-二氧杂辛基]氨基甲酰基- ω -甲基-聚(乙二醇)(2KPEG-DMG)。2KPEG-DMG的合成在美国专利号7,404,969中有所描述,该专利的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0320] PEG是具有两个末端羟基的乙烯PEG重复单元的直链水溶性聚合物。PEG按其分子量分类;例如,PEG 2000的平均分子量为约2,000道尔顿,并且PEG 5000的平均分子量为约5,000道尔顿。PEG可从Sigma Chemical Co.和其他公司商购获得,并且包括但不限于以下这些:单甲氧基聚乙二醇(MePEG-OH)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯(MePEG-S)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯(MePEG-S-NHS)、单甲氧基聚乙二醇-胺(MePEG-NH₂)、单甲氧基聚乙二醇-三氟乙基磺酸酯(MePEG-TRES)、单甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基(MePEG-IM),以及含有末端羟基而不是末端甲氧基的此类化合物(例如,HO-PEG-S、HO-PEG-S-NHS、HO-PEG-NH₂等)。其他PEG诸如美国专利号6,774,180和7,053,150中所述的那些(例如,mPEG(20KDa)胺)也可用于制备本发明的PEG-脂质缀合物。这些专利的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。此外,单甲氧基聚乙二醇-乙酸(MePEG-CH₂COOH)特别适用于制备PEG-脂质缀合物,包括例如PEG-DAA缀合物。

[0321] 本文所述的PEG-脂质缀合物的PEG部分的平均分子量可在约550道尔顿至约10,000道尔顿的范围内。在某些情况下,PEG部分的平均分子量为约750道尔顿至约5,000道尔顿(例如,约1,000道尔顿至约5,000道尔顿、约1,500道尔顿至约3,000道尔顿、约750道尔顿至约3,000道尔顿、约750道尔顿至约2,000道尔顿等)。在优选的实施方案中,PEG部分的平均分子量为约2,000道尔顿或约750道尔顿。

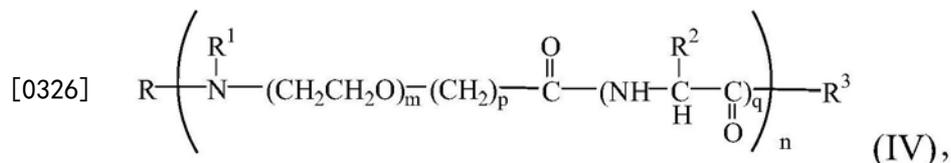
[0322] 在某些情况下,PEG可任选地被烷基、烷氧基、酰基或芳基取代。PEG可以直接与脂质缀合,或者可以经由接头部分与脂质连接。可使用适于将PEG偶联至脂质的任何接头部分,包括例如不含酯的接头部分和含酯的接头部分。在一个优选的实施方案中,接头部分是不含酯的接头部分。如本文所用,术语“不含酯的接头部分”是指不包含羧酸酯键(-OC(O)-)的接头部分。合适的不含酯的接头部分包括但不限于酰胺基(-C(O)NH-)、氨基(-NR-)、羰基(-C(O)-)、氨基甲酸根(-NHC(O)O-)、脲(-NHC(O)NH-)、二硫化物(-S-S-)、醚(-O-)、琥珀酰基(-O)CCH₂CH₂C(O)-、琥珀酰氨基(-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-)、醚、二硫化物以及它们的组合(例如,含有氨基甲酸根接头部分和酰胺基接头部分两者的接头)。在一个优选的实施方案中,氨基甲酸根接头用于将PEG偶联至脂质。

[0323] 在其他实施方案中,含酯的接头部分用于将PEG偶联至脂质。合适的含酯接头部分包括例如碳酸酯(-OC(O)O-)、琥珀酰基、磷酸酯(-O-(O)POH-O-)、磺酸酯以及它们的组合。

[0324] 具有各种链长和饱和度的各种酰基链基团的磷脂酰乙醇胺可以缀合至PEG以形成脂质缀合物。此类磷脂酰乙醇胺可商购获得,或者可以使用本领域的技术人员已知的常规技术分离或合成。含有碳链长度在C₁₀至C₂₀范围内的饱和或不饱和脂肪酸的磷脂酰乙醇胺是优选的。也可使用具有单不饱和脂肪酸或二不饱和脂肪酸以及饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸的混合物的磷脂酰乙醇胺。合适的磷脂酰乙醇胺包括但不限于二肉豆蔻酰基-磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二棕榈酰基-磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)和二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(DSPE)。

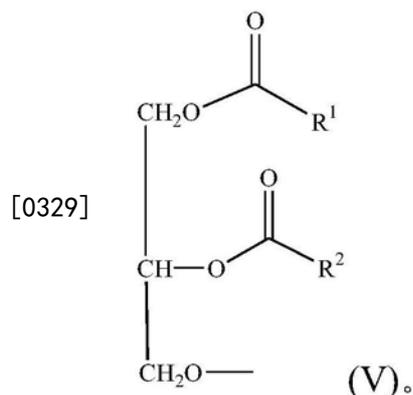
[0325] 术语“ATTA”或“聚酰胺”包括但不限于美国专利号6,320,017和6,586,559中描述的化合物,这些专利的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。这些化合物包

括具有下式的化合物：

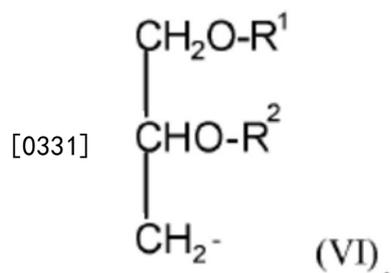


[0327] 其中R是选自氢、烷基和酰基的成员；R¹是选自氢和烷基的成员；或者任选地，R和R¹与它们所结合的氮形成叠氨基部分；R²是选自氢、任选取代的烷基、任选取代的芳基和氨基酸侧链的成员；R³是选自氢、卤素、羟基、烷氧基、巯基、胍基、氨基和NR⁴R⁵的成员，其中R⁴和R⁵独立地为氢或烷基；n为4至80；m为2至6；p为1至4；并且q为0或1。对于本领域技术人员将显而易见的是，其他聚酰胺可用在本发明的化合物中。

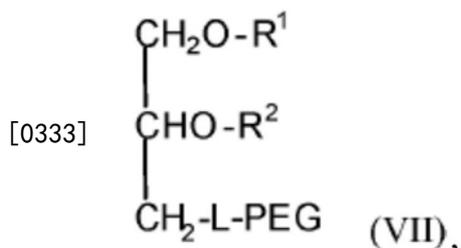
[0328] 术语“二酰基甘油”或“DAG”包括具有2条脂肪酰基链即R¹和R²（两者均独立地具有通过酯键结合至甘油的1位和2位的2至30个碳）的化合物。酰基可以是饱和的或具有不同的不饱和度。合适的酰基包括但不限于月桂酰基（C₁₂）、肉豆蔻酰基（C₁₄）、棕榈酰基（C₁₆）、硬脂酰基（C₁₈）和二十碳酰基（C₂₀）。在优选的实施方案中，R¹和R²是相同的，即R¹和R²均为肉豆蔻酰基（即，二肉豆蔻酰基），R¹和R²均为硬脂酰基（即，二硬脂酰基）等。二酰基甘油具有以下通式：



[0330] 术语“二烷氧基丙基”或“DAA”包括具有2条烷基链即R¹和R²（两者均独立地具有2至30个碳）的化合物。烷基可以是饱和的或具有不同的不饱和度。二烷氧基丙基具有以下通式：



[0332] 在一个优选的实施方案中，PEG-脂质是具有下式的PEG-DAA缀合物：

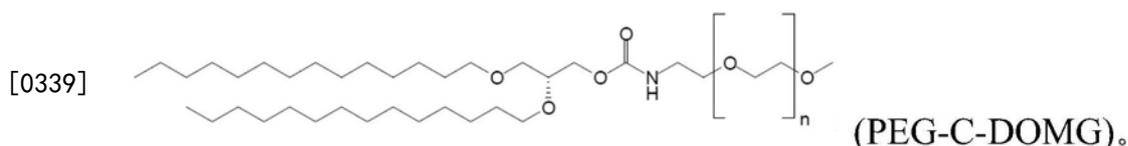
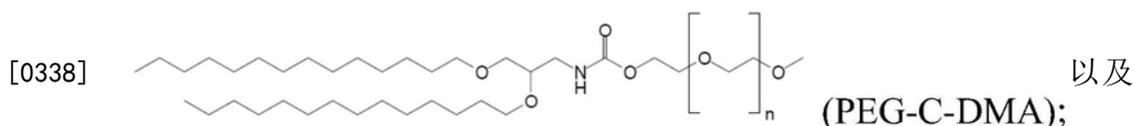


[0334] 其中 R^1 和 R^2 是独立选择的,并且是具有约10至约22个碳原子的长链烷基;PEG为聚乙二醇;并且L为如上所述的不含酯的接头部分或含酯的接头部分。长链烷基可以是饱和的或不饱和的。合适的烷基包括但不限于癸基(C_{10})、月桂基(C_{12})、肉豆蔻基(C_{14})、棕榈基(C_{16})、硬脂酰(C_{18})和二十烷基(C_{20})。在优选的实施方案中, R^1 和 R^2 是相同的,即, R^1 和 R^2 均为肉豆蔻基(即,二肉豆蔻基), R^1 和 R^2 均为硬脂基(即,二硬脂基)等。

[0335] 在上面的式VII中,PEG的平均分子量在约550道尔顿至约10,000道尔顿的范围内。在某些情况下,PEG的平均分子量为约750道尔顿至约5,000道尔顿(例如,约1,000道尔顿至约5,000道尔顿、约1,500道尔顿至约3,000道尔顿、约750道尔顿至约3,000道尔顿、约750道尔顿至约2,000道尔顿等)。在优选的实施方案中,PEG的平均分子量为约2,000道尔顿或约750道尔顿。PEG可任选地被烷基、烷氧基、酰基或芳基取代。在某些实施方案中,末端羟基被甲氧基或甲基取代。

[0336] 在一个优选的实施方案中,“L”是不含酯的接头部分。合适的不含酯的接头包括但不限于酰胺基接头部分、氨基接头部分、羰基接头部分、氨基甲酸根接头部分、脲接头部分、醚接头部分、二硫化物接头部分、琥珀酰胺基接头部分以及它们的组合。在一个优选的实施方案中,不含酯的接头部分是氨基甲酸根接头部分(即,PEG-C-DAA缀合物)。在另一个优选的实施方案中,不含酯的接头部分是酰胺基接头部分(即,PEG-A-DAA缀合物)。在又一个优选的实施方案中,不含酯的接头部分是琥珀酰胺基接头部分(即,PEG-S-DAA缀合物)。

[0337] 在具体实施方案中,PEG-脂质缀合物选自:



[0340] 使用本领域技术人员已知的标准技术和试剂合成PEG-DAA缀合物。应认识到,PEG-DAA缀合物将含有各种酰胺键、胺键、醚键、硫代键、氨基甲酸根键和脲键。本领域技术人员将认识到,用于形成这些键的方法和试剂是众所周知的并且容易获得。参见例如March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY (Wiley 1992); Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS (VCH 1989); 以及Furniss, VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY, 第5版 (Longman 1989)。还应当理解,存在的任何官能团可能需要在合成PEG-DAA缀合物中的不同时间点进行保护和去保护。本领域技术人员将认识到此类技术是众所周知的。参见例如Green和Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991)。

[0341] 优选地,PEG-DAA缀合物是PEG-二癸氧基丙基(C₁₀)缀合物、PEG-二月桂氧基丙基(C₁₂)缀合物、PEG-二肉豆蔻氧基丙基(C₁₄)缀合物、PEG-二棕榈氧基丙基(C₁₆)缀合物或PEG-二硬脂氧基丙基(C₁₈)缀合物。在这些实施方案中,PEG的平均分子量优选地为约750或约2,000道尔顿。在一个特别优选的实施方案中,PEG-脂质缀合物包含PEG2000-C-DMA,其中“2000”表示PEG的平均分子量,“C”表示氨基甲酸根接头部分,并且“DMA”表示二肉豆蔻氧基丙基。在另一个特别优选的实施方案中,PEG-脂质缀合物包含PEG750-C-DMA,其中“750”表示PEG的平均分子量,“C”表示氨基甲酸根接头部分,并且“DMA”表示二肉豆蔻氧基丙基。在具体实施方案中,PEG的末端羟基被甲基取代。本领域技术人员将容易理解,其他二烷氧基丙基可用在本发明的PEG-DAA缀合物中。

[0342] 除了前述内容之外,对于本领域技术人员将显而易见的是,可使用其他亲水性聚合物代替PEG。可用于代替PEG的合适聚合物的实例包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羟丙基甲基丙烯酸酰胺、聚甲基丙烯酸酰胺和聚二甲基丙烯酸酰胺、聚乳酸、聚乙醇酸以及衍生的纤维素如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素。

[0343] 除了前述组分之外,本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)还可包含阳离子聚(乙二醇)(PEG)脂质或CPL(参见例如Chen等人,Bioconj.Chem.,11:433-437(2000);美国专利号6,852,334;PCT公布号W0 00/62813,这些文献的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的)。

[0344] 合适的CPL包括式VIII的化合物:

[0345] A-W-Y(VIII),

[0346] 其中A、W和Y如下所述。

[0347] 相对于式VIII,“A”为脂质部分,诸如两亲性脂质、中性脂质或充当脂质锚的疏水性脂质。合适的脂质实例包括但不限于二酰基甘油基、二烷基甘油基、N-N-二烷基氨基、1,2-二酰氧基-3-氨基丙烷和1,2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0348] “W”为聚合物或低聚物,例如亲水性聚合物或低聚物。优选地,亲水性聚合物是生物相容性聚合物,其是非免疫原性的或具有低固有免疫原性。替代性地,如果与适当的佐剂一起使用,则亲水性聚合物可为弱抗原性的。合适的非免疫原性聚合物包括但不限于PEG、聚酰胺、聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸/聚乙醇酸共聚物,以及它们的组合。在一个优选的实施方案中,聚合物的分子量为约250至约7,000道尔顿。

[0349] “Y”为多阳离子部分。术语多阳离子部分是指在选定的pH、优选生理pH下具有正电荷、优选至少2个正电荷的化合物、衍生物或官能团。合适的多阳离子部分包括碱性氨基酸及其衍生物,例如精氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸和组氨酸;精胺;亚精胺;阳离子树枝状体;聚胺;聚胺糖;以及氨基多糖。多阳离子部分的结构可为直链的(例如,直链四赖氨酸)、支链的或树枝状的。在选定的pH值下,多阳离子部分具有约2个至约15个正电荷,优选约2个至约12个正电荷,更优选约2个至约8个正电荷。选择使用哪种多阳离子部分可通过所需的颗粒应用类型来确定。

[0350] 多阳离子部分上的电荷可以分布在整个颗粒部分周围,或者替代性地,在颗粒部分的一个特定区域中具有离散浓度的电荷密度,例如电荷尖峰。如果电荷密度分布在颗粒上,则电荷密度可以均匀分布或不均匀分布。多阳离子部分的电荷分布的所有变化都涵盖在本发明中。

[0351] 脂质“A”和非免疫原性聚合物“W”可通过各种方法并优选通过共价连接来连接。本领域技术人员已知的方法可用于“A”和“W”的共价连接。合适的键合包括但不限于酰胺键、胺键、羧基键、碳酸根键、氨基甲酸根键、酯键和腙键。对于本领域技术人员将显而易见的是，“A”和“W”必须具有互补的官能团以实现键合。这两个基团（一个在脂质上，另一个在聚合物上）的反应将提供所需的键合。例如，当脂质是二酰基甘油并且末端羟基例如用NHS和DCC活化形成活性酯，然后与含有氨基的聚合物例如聚酰胺反应时（参见例如美国专利号6,320,017和6,586,559，这些专利的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的），酰胺键将在两个基团之间形成。

[0352] 在某些情况下，多阳离子部分可具有连接的配体，例如靶向配体或用于与钙复合的螯合部分。优选地，在连接配体之后，阳离子部分保持正电荷。在某些情况下，连接的配体具有正电荷。合适的配体包括但不限于具有反应性官能团的化合物或装置，并且包括脂质、两亲性脂质、载体化合物、生物亲和性化合物、生物材料、生物聚合物、生物学装置、可分析检测的化合物、治疗活性化合物、酶、肽、蛋白、抗体、免疫刺激物、放射性标记、荧光素、生物素、药物、半抗原、DNA、RNA、多糖、脂质体、病毒体、胶束、免疫球蛋白、官能团、其他靶向部分或毒素。

[0353] 在一些实施方案中，脂质缀合物（例如，PEG-脂质）占颗粒中存在的总脂质的约0.1摩尔%至约2摩尔%、约0.5摩尔%至约2摩尔%、约1摩尔%至约2摩尔%、约0.6摩尔%至约1.9摩尔%、约0.7摩尔%至约1.8摩尔%、约0.8摩尔%至约1.7摩尔%、约0.9摩尔%至约1.6摩尔%、约0.9摩尔%至约1.8摩尔%、约1摩尔%至约1.8摩尔%、约1摩尔%至约1.7摩尔%、约1.2摩尔%至约1.8摩尔%、约1.2摩尔%至约1.7摩尔%、约1.3摩尔%至约1.6摩尔%、或约1.4摩尔%至约1.5摩尔%（或其任何分数或其中的范围）。

[0354] 在其他实施方案中，脂质缀合物（例如，PEG-脂质）占颗粒中存在的总脂质的约0摩尔%至约20摩尔%、约0.5摩尔%至约20摩尔%、约2摩尔%至约20摩尔%、约1.5摩尔%至约18摩尔%、约2摩尔%至约15摩尔%、约4摩尔%至约15摩尔%、约2摩尔%至约12摩尔%、约5摩尔%至约12摩尔%、或约2摩尔%（或其任何分数或其中的范围）。

[0355] 在另外的实施方案中，脂质缀合物（例如，PEG-脂质）占颗粒中存在的总脂质的约4摩尔%至约10摩尔%、约5摩尔%至约10摩尔%、约5摩尔%至约9摩尔%、约5摩尔%至约8摩尔%、约6摩尔%至约9摩尔%、约6摩尔%至约8摩尔%、或约5摩尔%、6摩尔%、7摩尔%、8摩尔%、9摩尔%或10摩尔%（或其任何分数或其中的范围）。

[0356] 适用于本发明的脂质颗粒中的脂质缀合物的其他百分比和范围在PCT公布号W009/127060、美国已公布的申请号US 2011/0071208、PCT公布号W02011/000106和美国已公布的申请号US2011/0076335中有所描述，这些专利的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0357] 应当理解，本发明的脂质颗粒中存在的脂质缀合物（例如，PEG-脂质）的百分比是目标量，并且制剂中存在的脂质缀合物的实际量可以变化例如 ± 2 摩尔%。例如，在1:57脂质颗粒（例如，SNALP）制剂中，脂质缀合物的目标量为1.4摩尔%，但脂质缀合物的实际量可为该目标量的 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.4 摩尔%、 ± 0.3 摩尔%、 ± 0.2 摩尔%、 ± 0.1 摩尔%或 ± 0.05 摩尔%，其中制剂的余量由其他脂质组分构成（合计达颗粒中存在的总脂质的100摩尔%）。类似地，在7:54脂质颗粒（例如，SNALP）制剂中，脂质缀合物的目标量为6.76摩尔%，

但脂质缀合物的实际量可为该目标量的 ± 2 摩尔%、 ± 1.5 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%，其中制剂的余量由其他脂质组分构成（合计达颗粒中存在的总脂质的100摩尔%）。

[0358] 本领域的普通技术人员将理解，脂质缀合物的浓度可以根据所用的脂质缀合物和脂质颗粒的促融合速率而变化。

[0359] 通过控制脂质缀合物的组成和浓度，可以控制脂质缀合物从脂质颗粒中交换出的速率，进而控制脂质颗粒的促融合速率。例如，当PEG-DAA缀合物用作脂质缀合物时，脂质颗粒的促融合速率可以变化，例如通过改变脂质缀合物的浓度，通过改变PEG的分子量，或者通过改变PEG-DAA缀合物上的烷基的链长和饱和度。此外，包括例如pH、温度、离子强度等的其他变量可用于改变和/或控制脂质颗粒的促融合速率。在阅读本公开后，可用于控制脂质颗粒的促融合速率的其他方法对于本领域技术人员而言将变得显而易见。而且，通过控制脂质缀合物的组成和浓度，可以控制脂质颗粒（例如，SNALP）的大小。

[0360] 脂质颗粒的制备

[0361] 本发明的脂质颗粒例如SNALP（其中mRNA被包埋在颗粒的脂质部分内并且被保护免遭降解）可通过本领域已知的任何方法形成，包括但不限于连续混合方法、直接稀释方法和在线稀释方法。

[0362] 在某些实施方案中，本发明提供了经由连续混合方法制备的核酸-脂质颗粒（例如，SNALP），例如，包括以下步骤的方法：在第一贮存器中提供包含核酸（例如，mRNA）的水溶液，在第二贮存器中提供有机脂质溶液（其中有机脂质溶液中存在的脂质溶解于有机溶剂诸如低级烷醇如乙醇中），以及将水溶液与有机脂质溶液混合，使得有机脂质溶液与水溶液混合，从而基本上瞬时产生脂质囊泡（例如，脂质体），该脂质囊泡将核酸包封在其中。该方法和用于执行该方法的设备在美国专利公布号20040142025中有详细描述，该专利公布的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0363] 将脂质和缓冲溶液连续引入混合环境（例如在混合室中）的动作导致用缓冲溶液连续稀释脂质溶液，从而在混合时基本上瞬时产生脂质囊泡。如本文所用，短语“用缓冲溶液连续稀释脂质溶液”（及变型）通常意指脂质溶液在水合过程中以足够的力足够快地稀释以实现囊泡的生成。通过将包含核酸的水溶液与有机脂质溶液混合，有机脂质溶液在缓冲溶液（即，水溶液）存在下经历连续逐步稀释，从而产生核酸-脂质颗粒。

[0364] 使用连续混合方法形成的核酸-脂质颗粒的大小通常为约30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约80nm至约100nm、约90nm至约100nm、约70至约90nm、约80nm至约90nm、约70nm至约80nm，小于约120nm、110nm、100nm、90nm或80nm，或者为约30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm（或其任何分数或其中的范围）。如此形成的颗粒不聚集，并且任选地定尺寸以实现均匀的颗粒大小。

[0365] 在另一个实施方案中，本发明提供了经由直接稀释方法制备的核酸-脂质颗粒（例如，SNALP），该方法包括形成脂质囊泡（例如，脂质体）溶液，并立即直接将脂质囊泡溶液引入含有受控量的稀释缓冲液的收集容器中。在优选的方面，收集容器包括一个或多个元件，所述元件被构造成搅拌收集容器的内容物以促进稀释。在一个方面，收集容器中存在的稀

释缓冲液的量基本上等于引入其中的脂质囊泡溶液的体积。作为非限制性实例,45%乙醇中的脂质囊泡溶液当引入含有等体积的稀释缓冲液的收集容器中时将有利地产生更小的颗粒。

[0366] 在又一个实施方案中,本发明提供了经由在线稀释方法制备的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP),其中含有稀释缓冲液的第三贮存器流体联接到第二混合区。在该实施方案中,在第一混合区域中形成的脂质囊泡(例如,脂质体)溶液立即直接与稀释缓冲液在第二混合区中混合。在优选的方面,第二混合区包括T形连接器,该T形连接器被布置成使得脂质囊泡溶液和稀释缓冲液流以相反的180°流动会合;然而,可使用提供较浅角度诸如约27°至约180°(例如,约90°)的连接器。泵机构将可控制的缓冲液流递送到第二混合区。在一个方面,提供给第二混合区的稀释缓冲液的流速被控制为基本上等于从第一混合区引入其中的脂质囊泡溶液的流速。该实施方案有利地允许更多地控制在第二混合区中与脂质囊泡溶液混合的稀释缓冲液的流动,并因此还允许更多地控制缓冲液中的脂质囊泡溶液在整个第二混合过程中的浓度。对稀释缓冲液流速的这种控制有利地允许在降低的浓度下形成小粒度。

[0367] 用于执行这些直接稀释和在线稀释过程的这些方法和设备在美国专利公布号20070042031中详细描述,该专利公布的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0368] 使用直接稀释和在线稀释方法形成的核酸-脂质颗粒的大小通常为约30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约80nm至约100nm、约90nm至约100nm、约70至约90nm、约80nm至约90nm、约70nm至约80nm,小于约120nm、110nm、100nm、90nm或80nm,或者为约30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm(或其任何分数或其中的范围)。如此形成的颗粒不聚集,并且任选地定尺寸以实现均匀的颗粒大小。

[0369] 如果需要,本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)可通过可用于确定脂质体大小的任何方法来定大小。可进行定大小以实现所需的大小范围和相对窄的粒度分布。

[0370] 多种技术可用于将颗粒调整到所需的大小。一种用于脂质体并且同样适用于本发明颗粒的定大小方法在美国专利号4,737,323中有所描述,该专利的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。通过浴或探头超声处理对颗粒悬浮液进行超声处理产生渐进的大小减缩,直至颗粒大小小于约50nm。均化是另一种依靠剪切能量使较大颗粒破碎成较小颗粒的方法。在典型的均化工序中,颗粒通过标准乳液均化器再循环,直到观察到通常在约60与约80nm之间的选定粒度。在两种方法中,可通过常规激光束粒度鉴别或QELS来监测粒度分布。

[0371] 通过小孔聚碳酸酯膜或不对称陶瓷膜挤出颗粒也是将粒度减小到相对明确定义的粒度分布的有效方法。通常,将悬浮液通过膜循环一次或多次,直至实现所需的粒度分布。颗粒可通过连续的小孔膜挤出,以实现大小的逐渐减缩。

[0372] 在其他实施方案中,所述方法还可包括添加非脂质多阳离子,这些非脂质多阳离子可用于使用本发明的组合物实现细胞的脂质转染。合适的非脂质多阳离子的实例包括溴化己二甲胺(Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USA以商品名POLYBRENE[®]出售)或其他己二甲胺盐。其他合适的多阳离子包括例如聚-L-鸟氨酸、

聚-L-精氨酸、聚-L-赖氨酸、聚-D-赖氨酸、聚烯丙基胺和聚乙烯亚胺的盐。优选在形成颗粒之后添加这些盐。

[0373] 在一些实施方案中,所形成的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)中的核酸与脂质比率(质量/质量比)将在约0.01至约0.2、约0.05至约0.2、约0.02至约0.1、约0.03至约0.1、或约0.01至约0.08的范围内。起始物质(输入)的比率也在该范围内。在其他实施方案中,颗粒制剂使用每10mg总脂质约400 μ g核酸或者约0.01至约0.08、更优选约0.04(对应于每50 μ g核酸1.25mg总脂质)的核酸与脂质质量比。在其他优选的实施方案中,颗粒的核酸:脂质质量比为约0.08。

[0374] 在其他实施方案中,所形成的核酸-脂质颗粒(例如,SNALP)中的脂质与核酸比率(质量/质量比)将在约1(1:1)至约100(100:1)、约5(5:1)至约100(100:1)、约1(1:1)至约50(50:1)、约2(2:1)至约50(50:1)、约3(3:1)至约50(50:1)、约4(4:1)至约50(50:1)、约5(5:1)至约50(50:1)、约1(1:1)至约25(25:1)、约2(2:1)至约25(25:1)、约3(3:1)至约25(25:1)、约4(4:1)至约25(25:1)、约5(5:1)至约25(25:1)、约5(5:1)至约20(20:1)、约5(5:1)至约15(15:1)、约5(5:1)至约10(10:1)的范围内,或为约5(5:1)、6(6:1)、7(7:1)、8(8:1)、9(9:1)、10(10:1)、11(11:1)、12(12:1)、13(13:1)、14(14:1)、15(15:1)、16(16:1)、17(17:1)、18(18:1)、19(19:1)、20(20:1)、21(21:1)、22(22:1)、23(23:1)、24(24:1)或25(25:1),或其任何分数或其中的范围。起始物质(输入)的比率也在该范围内。

[0375] 如前所述,缀合的脂质还可包含CPL。本文讨论了制备SNALP-CPL(含CPL的SNALP)的多种通用方法。两种通用技术包括“后插入”技术,即将CPL插入例如预先形成的SNALP;以及“标准”技术,其中在例如SNALP形成步骤期间将CPL包含在脂质混合物中。后插入技术导致SNALP主要在SNALP双层膜的外表面中具有CPL,而标准技术提供在内表面和外表面上均具有CPL的SNALP。该方法尤其适用于由磷脂(可含有胆固醇)制成的囊泡,也适用于含有PEG-脂质(如PEG-DAA和PEG-DAG)的囊泡。制备SNALP-CPL的方法例如在美国专利号5,705,385、6,586,410、5,981,501、6,534,484和6,852,334;美国专利公布号20020072121;以及PCT公布号WO 00/62813中有所教导,这些专利的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0376] 脂质颗粒的施用

[0377] 一旦形成后,本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)特别可用于将核酸(例如,mRNA)引入细胞中。因此,本发明还提供了用于将核酸(例如,mRNA)引入细胞中的方法。在具体实施方案中,将核酸(例如,mRNA)引入受感染的细胞,诸如网状内皮细胞(例如,巨噬细胞、单核细胞等)以及其他细胞类型,包括成纤维细胞、内皮细胞(例如,衬在血管内表面的那些)和/或血小板细胞。可通过首先形成如本文所述的颗粒,然后使颗粒与细胞接触足以将mRNA递送至细胞的一段时间,从而在体外或体内进行该方法。

[0378] 本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)可以吸附到与其混合或接触的几乎任何细胞类型。一旦被吸附后,颗粒可以被一部分细胞内吞,与细胞膜交换脂质,或者与细胞融合。颗粒的核酸(例如,mRNA)部分的转移或掺入可经由这些途径中的任一种进行。具体地讲,当发生融合时,颗粒膜整合到细胞膜中,并且颗粒的内容物与细胞内液混合。

[0379] 本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)可以单独地施用或以与根据施用途径和标准药理学实践选择的药学上可接受的载体(例如,生理盐水或磷酸盐缓冲液)的混合物形式施用。

通常,缓冲生理盐水(例如,135-150mM NaCl)将用作药学上可接受的载体。其他合适的载体包括例如水、缓冲水、0.4%盐水、0.3%甘氨酸等,包括用于增强稳定性的糖蛋白,诸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。另外的合适载体在例如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版(1985)中有所描述。如本文所用,“载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、媒介物、包衣、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶体等。短语“药学上可接受的”是指当施用给人时,不会产生变应性的或类似的不利反应的分子实体和组合物。

[0380] 通常在脂质颗粒形成后添加药学上可接受的载体。因此,在形成脂质颗粒(例如,SNALP)后,可将颗粒稀释到药学上可接受的载体,例如缓冲生理盐水中。

[0381] 药物制剂中颗粒的浓度可以广泛变化,即,从小于约0.05重量%,通常为或至少约2重量%至5重量%,最多至约10至90重量%,并且主要根据所选的具体施用方式按照流体体积、粘度等进行选择。例如,可以增加浓度以降低与治疗相关的流体负荷。这对于患有动脉粥样硬化相关的充血性心力衰竭或严重高血压的患者可能是特别理想的。替代性地,可将由刺激性脂质组成的颗粒稀释至低浓度以减轻施用部位的炎症。

[0382] 本发明的药物组合物可通过常规的、众所周知的灭菌技术进行灭菌。水溶液可直接包装使用或在无菌条件下过滤并冻干,该冻干制剂在施用前与无菌水溶液组合。该组合物可含有接近生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,例如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾和氯化钙。另外,颗粒悬浮液可包含脂质保护剂,这些脂质保护剂保护脂质在储存时免遭自由基和脂质过氧化损害。亲脂性自由基淬灭剂诸如 α -生育酚和水溶性铁特异性螯合剂诸如铁草胺(ferrioxamine)是合适的。

[0383] 在一些实施方案中,本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)特别可用于治疗性递送一种或多种mRNA的方法。

[0384] 体内施用

[0385] 用于体内治疗的全身递送(例如,经由诸如循环的身体系统将治疗性核酸递送至远侧靶细胞)已使用核酸-脂质颗粒实现,诸如PCT公布号WO 05/007196、WO 05/121348、WO 05/120152和WO 04/002453中所述的那些核酸-脂质颗粒,这些公布的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。本发明还提供了完全包封的脂质颗粒,所述脂质颗粒保护核酸免遭血清中的核酸酶降解,是非免疫原性的,尺寸小,并且适合于重复给药。

[0386] 对于体内施用,施用可采用本领域已知的任何方式,例如通过注射、经口施用、吸入(例如,鼻内或气管内)、透皮应用或经直肠施用。施用可经由单剂量或分剂量完成。药物组合物可以胃肠外(即,关节内、静脉内、腹膜内、皮下或肌内)方式施用。在一些实施方案中,药物组合物通过推注进行静脉内或腹膜内施用(参见例如美国专利号5,286,634)。细胞内核酸递送也已在Straubinger等人,Methods Enzymol.,101:512(1983);Mannino等人,Biotechniques,6:682(1988);Nicolau等人,Crit.Rev.Ther Drug Carrier Syst.,6:239(1989);以及Behr,Acc.Chem.Res.,26:274(1993)中进行了论述。施用基于脂质的治疗剂的另外其他方法在例如美国专利号3,993,754、4,145,410、4,235,871、4,224,179、4,522,803和4,588,578中有所描述。脂质颗粒可通过在疾病部位直接注射或通过向疾病部位远侧的部位注射来施用(参见例如Culver,HUMAN GENE THERAPY,MaryAnn Liebert,Inc.,Publishers,New York.,第70-71页(1994))。上述参考文献的公开内容全文以引用方式并

入本文以用于所有目的。

[0387] 在静脉内施用本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)的实施方案中,在注射后约8、12、24、36或48小时,颗粒的总注射剂量的至少约5%、10%、15%、20%或25%存在于血浆中。在其他实施方案中,在注射后约8、12、24、36或48小时,脂质颗粒的总注射剂量的高于约20%、30%、40%且多达约60%、70%或80%存在于血浆中。在某些情况下,在施用后约1小时,多个颗粒中的多于约10%存在于哺乳动物的血浆中。在某些其他情况下,在施用颗粒后至少约1小时可检测到脂质颗粒的存在。在一些实施方案中,在施用后约8、12、24、36、48、60、72或96小时,可在细胞中检测到治疗性核酸如mRNA分子的存在。在其他实施方案中,在施用后约8、12、24、36、48、60、72或96小时,可检测到由根据本发明的引入活体中的mRNA编码的多肽的表达。在另外的实施方案中,在施用后约12、24、48、72或96小时或者约6、8、10、12、14、16、18、19、20、22、24、26或28天,可检测到在施用部位近侧或远侧的部位的细胞中mRNA的存在或效应。在另外的实施方案中,本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)以胃肠外或腹膜内方式施用。

[0388] 单独的或与其他合适组分组合的本发明组合物可制成气溶胶制剂(即,其可“雾化”),以经由吸入施用(例如,鼻内或气管内)(参见Brigham等人,Am.J.Sci.,298:278(1989))。气溶胶制剂可置于加压可接受推进剂中,诸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等。

[0389] 在某些实施方案中,药物组合物可通过鼻内喷雾、吸入和/或其他气溶胶递送媒介物递送。用于经由鼻气溶胶喷雾将核酸组合物直接递送至肺部的方法已例如在美国专利号5,756,353和5,804,212中进行了描述。同样,使用鼻内微粒树脂和溶血磷脂酰甘油化合物的药物递送(美国专利5,725,871)也是药学领域已知的。类似地,以聚四氟乙烯支撑基质形式的经粘膜药物递送在美国专利号5,780,045中有所描述。上述专利的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0390] 适合于胃肠外施用(诸如通过关节内(在关节中)、静脉内、肌内、皮内、腹膜内和皮下途径)的制剂包括水性和非水性的等渗无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质;以及水性和非水性无菌悬浮液,其可包含助悬剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。在本发明的实践中,组合物优选地例如通过静脉内输注、经口、局部、腹膜内、膀胱内或鞘内施用。

[0391] 通常,当静脉内施用时,脂质颗粒制剂用合适的药物载体配制。许多药学上可接受的载体可用于本发明的组合物和方法中。用于本发明的合适制剂可见于例如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,Mack Publishing Company,Philadelphia,PA,第17版(1985)中。可使用多种含水载体,例如水、缓冲水、0.4%盐水、0.3%甘氨酸等,并且可包括用于增强稳定性的糖蛋白诸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。通常,缓冲生理盐水(135-150mM NaCl)将用作药学上可接受的载体,但其他合适的载体也可使用。这些组合物可通过常规的脂质体灭菌技术诸如过滤进行灭菌。组合物可包含接近生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,诸如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、油酸三乙醇胺等。这些组合物可以使用上述技术灭菌,或者替代性地,可以在无菌条件下生产。所得水溶液可直接包装使用或在无菌条件下过滤并冻干,该冻干制剂在施用前与无菌水溶液组合。

[0392] 在某些应用中,本文所公开的脂质颗粒可经由经口施用递送给个体。颗粒可与赋

形剂结合并以可摄取的片剂、颊含片、糖锭、胶囊、丸剂、锭剂、酏剂、漱口水、悬浮液、口腔喷雾剂、糖浆、糯米纸囊剂等形式使用(参见例如美国专利号5,641,515、5,580,579和5,792,451,这些专利的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的)。这些口服剂型还可包含以下物质:粘合剂、明胶;赋形剂、润滑剂和/或矫味剂。当单位剂型为胶囊时,除上述材料之外,它还可含有液体载体。各种其他材料可以作为包衣存在或以其他方式改变剂量单位的物理形式。当然,用于制备任何单位剂型的任何材料应当是药学纯的,并且在所用量下基本上无毒。

[0393] 通常,这些口服制剂可包含至少约0.1%或更多的脂质颗粒,但颗粒的百分比当然可以变化,并且可以便利地介于总制剂的重量或体积的约1%或2%至约60%或70%或更多之间。当然,每种治疗学上有用的组合中的颗粒量的制备方式可以使得在化合物的任何给定单位剂量中将获得合适的剂量。此类药物制剂的制备领域中的技术人员将考虑到诸如溶解度、生物利用率、生物半衰期、施用途径、产品储存寿命以及其他药理学考量等因素,并且因此而言,多种剂量和治疗方案可能是可取的。

[0394] 适合于经口施用的制剂可包括:(a) 液体溶液,例如悬浮在稀释剂如水、盐水或PEG 400中的有效量的包封治疗性核酸(例如,mRNA);(b) 胶囊、小袋或片剂,各自以液体、固体、颗粒或明胶形式含有预定量的治疗性核酸(例如,mRNA);(c) 适当液体中的悬浮液;以及(d) 合适的乳液。片剂形式可包含乳糖、蔗糖、甘露醇、山梨糖醇、磷酸钙、玉米淀粉、马铃薯淀粉、微晶纤维素、明胶、胶体二氧化硅、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸和其他赋形剂、着色剂、填充剂、粘合剂、稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂、矫味剂、染料、崩解剂和药学上相容的载体中的一种或多种。锭剂形式可包含在风味剂例如蔗糖中的治疗性核酸(例如,mRNA),以及在惰性基料(例如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯树胶乳液、凝胶等)中除治疗性核酸外还含有本领域已知的载体的糖锭。

[0395] 在其用途的另一个实例中,脂质颗粒可以掺入宽泛范围的局部剂型中。例如,含有核酸-脂质颗粒诸如SNALP的悬浮液可以作为凝胶、油、乳液、局部乳膏、糊剂、软膏、洗剂、泡沫、摩丝等配制和施用。

[0396] 当制备本发明的脂质颗粒的药物制剂时,优选使用一定量的颗粒,所述颗粒已纯化以减少或消除空颗粒或具有与外表面相关的治疗剂如核酸的颗粒。

[0397] 本发明的方法可在多种宿主中实践。优选的宿主包括哺乳动物物种,诸如灵长类(例如,人类和黑猩猩以及其他非人类灵长类)、犬科、猫科、马科、牛科、绵羊、山羊、啮齿类(例如,大鼠和小鼠)、兔类和猪。

[0398] 施用的颗粒的量将取决于治疗性核酸(例如,mRNA)与脂质的比率,所用的具体治疗性核酸,所治疗的疾病或病症,患者的年龄、体重和症状,以及临床医生的判断,但通常将为约0.01至约50mg/kg体重,优选地为约0.1至约5mg/kg体重,或每次施用(例如,注射)约 10^8 - 10^{10} 个颗粒。

[0399] 体外施用

[0400] 对于体外应用,治疗性核酸(例如,mRNA)的递送可以是在培养基中生长的任何细胞,无论是植物还是动物来源、脊椎动物还是无脊椎动物以及任何组织或类型的细胞。在优选的实施方案中,细胞为动物细胞,更优选地为哺乳动物细胞,最优选地为人细胞。

[0401] 当在体外进行时,细胞与脂质颗粒之间的接触在生物相容的培养基中发生。颗粒

的浓度根据具体应用而广泛变化,但通常在约 $1\mu\text{mol}$ 与约 10mmol 之间。用脂质颗粒处理细胞通常在生理温度(约 37°C)下进行约1至48小时、优选约2至4小时的时间段。

[0402] 在一组优选的实施方案中,将脂质颗粒悬浮液加到60%–80%汇合度的铺板细胞中,所述铺板细胞的细胞密度为约 10^3 至约 10^5 个细胞/mL,更优选地为约 2×10^4 个细胞/mL。添加到细胞中的悬浮液的浓度优选地为约 0.01 至 $0.2\mu\text{g/mL}$,更优选地为约 $0.1\mu\text{g/mL}$ 。

[0403] 在可能需要细胞的组织培养方面来说,这是本领域众所周知的。例如,Freshney, *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 第3版, Wiley-Liss, New York (1994); Kuchler等人, *Biochemical Methods in Cell Culture and Virology*, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. (1977) 以及其中引用的参考文献提供了细胞培养的一般指导。培养的细胞系统通常将是细胞单层的形式,但也可使用细胞悬浮液。

[0404] 使用胞内体释放参数(ERP)测定法,可以优化本发明的SNALP或其他脂质颗粒的递送效率。ERP测定法在美国专利公布号20030077829中进行了详细描述,该专利公布的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。更具体地,ERP测定法的目的是基于SNALP或其他脂质颗粒的各种阳离子脂质和辅助脂质组分对胞内体膜的结合/摄取或融合/去稳定化的相对影响来区分它们的作用。该测定法允许定量地确定SNALP或其他脂质颗粒的每种组分如何影响递送效率,从而优化SNALP或其他脂质颗粒。通常,ERP测定法测量报告蛋白(例如,荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、绿荧光蛋白(GFP)等)的表达,并且在一些情况下,针对表达质粒优化的SNALP制剂也将适于包封mRNA。通过比较各种SNALP或其他脂质颗粒中的每一种的ERP,可以容易地确定优化的系统,例如在细胞中具有最大摄取的SNALP或其他脂质颗粒。

[0405] 用于递送脂质颗粒的细胞

[0406] 本发明可以在来自任何脊椎动物物种的多种细胞类型上实践,包括哺乳动物,例如犬科、猫科、马科、牛科、绵羊、山羊、啮齿类(例如,小鼠、大鼠和豚鼠)、兔类、猪和灵长类(例如猴子、黑猩猩和人类)。

[0407] 脂质颗粒的检测

[0408] 在一些实施方案中,在约1、2、3、4、5、6、7、8或更多小时,可在受试者中检测到本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)。在其他实施方案中,在施用颗粒后约8、12、24、48、60、72或96小时或者约6、8、10、12、14、16、18、19、22、24、25或28天,可在受试者中检测到本发明的脂质颗粒(例如,SNALP)。可在来自受试者的细胞、组织或其他生物样品中检测颗粒的存在。颗粒可例如通过直接检测颗粒和/或检测包封在脂质颗粒内的mRNA序列和/或检测由mRNA表达的多肽来检测。

[0409] 颗粒的检测

[0410] 可使用本领域已知的任何方法检测本发明的脂质颗粒诸如SNALP。例如,可使用本领域熟知的方法将标记直接或间接偶联至脂质颗粒的组分。可使用多种标记,其中标记的选择取决于所需的灵敏度、与脂质颗粒组分缀合的容易性、稳定性需求以及可用的仪器和处置规定。合适的标记包括但不限于光谱标记,诸如荧光染料(例如,荧光素和衍生物,如异硫氰酸荧光素(FITC)和Oregon GreenTM;罗丹明和衍生物诸如德州红、异硫氰酸四氢嘧啶(TRITC)等、地高辛、生物素、藻红蛋白、AMCA、CyDyesTM等;放射性标记,诸如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 等;酶,诸如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等;光谱比色标记,诸如胶体金或彩色玻

璃或塑料珠,如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等。标记可使用本领域已知的任何方式进行检测。

[0411] 核酸的检测

[0412] 核酸(例如,mRNA)在本文中通过本领域技术人员熟知的多种方法中的任一种进行检测和定量。核酸的检测可通过众所周知的方法进行,诸如Southern分析、Northern分析、凝胶电泳、PCR、放射性标记、闪烁计数和亲和色谱法。还可使用其他生物化学分析方法,诸如分光光度法、放射线照相术、电泳、毛细管电泳、高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)和超扩散色谱法。

[0413] 核酸杂交形式的选择并不是关键性的。多种核酸杂交形式是本领域技术人员已知的。例如,常见的形式包括夹心测定法和竞争或置换测定法。杂交技术在例如“Nucleic Acid Hybridization,A Practical Approach,”Hames和Higgins编,IRL Press(1985)进行了一般描述。

[0414] 通过使用使被检测的靶核酸倍增的核酸扩增系统可增强杂交测定法的灵敏度。适合于扩增用作分子探针的序列或适合于生成核酸片段以进行后续亚克隆的体外扩增技术是已知的。足以通过此类体外扩增方法指导技术人员的技术的实例(包括聚合酶链式反应(PCR)、连接酶链式反应(LCR)、 $\text{Q}\beta$ -复制酶扩增和其他RNA聚合酶介导的技术(例如,NASBATM))可见于Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press(2000);和Ausubel等人,SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY编,Current Protocols,Green Publishing Associates,Inc.和John Wiley&Sons,Inc.(2002);以及美国专利号4,683,202;PCR Protocols,A Guide to Methods and Applications(Innis等人编辑)Academic Press Inc.San Diego,CA(1990);Arnheim和Levinson(1990年10月1日),C&EN 36;The Journal Of NIH Research,3:81(1991);Kwoh等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:1173(1989);Guatelli等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:1874(1990);Lomell等人,J.Clin.Chem.,35:1826(1989);Landegren等人,Science,241:1077(1988);Van Brunt,Biotechnology,8:291(1990);Wu和Wallace,Gene,4:560(1989);Barringer等人,Gene,89:117(1990);以及Sooknanan和Malek,Biotechnology,13:563(1995)。克隆体外扩增的核酸的改进方法在美国专利号5,426,039中有所描述。本领域描述的其他方法是基于核酸序列的扩增(NASBATM,Cangene,Mississauga,Ontario)和 $\text{Q}\beta$ -复制酶系统。这些系统可用于直接识别突变体,其中PCR或LCR引物被设计为仅在存在所选序列时才延伸或连接。替代性地,通常可使用例如非特异性PCR引物来扩增所选序列,随后探测扩增的靶区域中指示突变的特定序列。上述参考文献的公开内容全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0415] 用作例如体外扩增方法中的探针、用作基因探针或用作抑制剂组分的核酸通常根据Beaucage等人,Tetrahedron Letts.,22:1859-1862(1981)描述的固相亚磷酰胺三酯方法,例如使用如Needham VanDevanter等人,Nucleic Acids Res.,12:6159(1984)中所述的自动合成仪进行化学合成。必要时,多核苷酸的纯化通常通过天然丙烯酰胺凝胶电泳或通过阴离子交换HPLC进行,如Pearson等人,J.Chrom.,255:137-149(1983)中所述。合成多核苷酸的序列可使用Maxam和Gilbert(1980)在Grossman和Moldave(编辑)Academic Press,New York,Methods in Enzymology,65:499中的化学降解方法进行验证。

[0416] 确定转录水平的替代性方式是原位杂交。原位杂交测定法是众所周知的,并且在

Angerer等人, *Methods Enzymol.*, 152:649 (1987) 中进行了一般描述。在原位杂交测定法中, 将细胞固定到固体支持物通常是载玻片上。如果要探测DNA, 则利用热或碱使细胞变性。然后使细胞在中等温度下与杂交溶液接触, 以使标记的特异性探针退火。探针优选用放射性同位素或荧光报告子标记。

[0417] 实施例

[0418] 将通过具体实施例更详细地描述本发明。以下实施例用于说明性目的, 而无意以任何方式限制本发明。本领域的技术人员将容易地认识到可改变或修改以产生基本相同的结果的各种非关键参数。技术人员也将理解, 虽然“表1”可包括在多于一个实施例中, 但实施例1中对“表1”的提及是指实施例1中存在的表1。

[0419] 实施例1-13在脂质纳米颗粒中共同递送核酸有效负载与类固醇

[0420] 皮质类固醇是一类在脊椎动物的肾上腺皮质中产生的类固醇激素, 以及这些激素的合成类似物。皮质类固醇参与广泛的生理过程, 包括应激反应、免疫应答、炎症调节、碳水化合物代谢、蛋白分解代谢、血液电解质水平和行为。

[0421] 皮质类固醇有两类。糖皮质激素如皮质醇控制碳水化合物、脂肪和蛋白代谢, 并且通过阻止磷脂释放、减少嗜酸性粒细胞作用和许多其他机制来抗炎。盐皮质激素如醛固酮控制电解质和水的水平, 这主要通过促进肾脏中的钠潴留来进行。

[0422] 术语“糖皮质激素”是指控制碳水化合物、蛋白和脂肪代谢并具有抗炎和/或免疫抑制特性的一组天然或合成类固醇激素中的任一种。适用于本发明的某些实施方案中的糖皮质激素包括但不限于氢化可的松、可的松、皮质酮、脱氧皮质酮、泼尼松、泼尼松龙、甲泼尼龙、地塞米松、倍他米松、莫米松、曲安西龙、倍氯米松、氟氢可的松、醛固酮、氟替卡松、氯倍他松、氯倍他索和氯替泼诺, 以及它们的药学上可接受的盐, 以及它们的混合物。

[0423] 类固醇通常用于治疗各种疾病, 因为它们可通过多种方式帮助治疗。例如, 在癌症治疗中, 类固醇可以减少与化疗和辐射相关的恶心, 减少炎症, 减少过敏反应(例如, 在输注之前), 或者简单地通过使患者能够睡眠、进食和感觉更好来帮助改善生活质量。

[0424] 虽然脂质纳米颗粒的使用是一种得到证实的递送平台, 但有必要通过解决许多安全性和耐受性问题来进一步扩展LNP的治疗效用和患者便利性。在临床中, 并且在没有术前用药的情况下, 大多数LNP治疗相关的不良事件与可代表剂量限制毒性的某些炎性生物标志物的增加相关的输注型反应一致。(参见例如Judge等人, *Review: Overcoming the Innate Immune Response to Small Interfering RNA, Human Gene Therapy*, 19, 2008)

[0425] 已经研究了将糖皮质激素共同配制到LNP中的作用, 以观察静脉内施用后的炎症反应是否可以减弱, 并且平台的治疗指数是否变宽。在鼠模型中生成的临床前数据表明, 类固醇与LNP的共制剂是实现减少的免疫刺激, 同时保持相同水平的基因沉默能力的可行策略。此外, NHP和猪模型中的早期临床前数据与鼠类数据密切相关, 从而为这种新策略提供了额外的保证。

[0426] 一般程序

[0427] 脂质纳米颗粒配制

[0428] 通过Jeffs等人(参见美国专利9,005,654)描述的直接稀释方法或在线稀释方法制备脂质纳米颗粒。除非另有说明, 否则脂质组合物通常包含相应摩尔比的下列脂质: PEG-脂质(PEG2000-C-DMA, 1.1摩尔%); 阳离子脂质(化合物13, 54.9摩尔%); 胆固醇(33.0摩

尔%) ;和1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC,11.0摩尔%)。将核酸溶解于pH 4.5的20mM EDTA中。将溶液以400mL/min的流速在T形连接器中合并,用pH7.4的PBS稀释(在线稀释或直接稀释)。然后去除乙醇,并通过使用Midgee hoop滤柱(分子量截止值为500K,GE Healthcare)进行的切向流超滤将载体缓冲液替换为pH 7.4的PBS。对LNP进行无菌过滤(0.2 μ m注射过滤器),并通过DENAX-HPLC或RiboGreen测定法测定样品浓度。使用Malvern Nano Series Zetasizer测定粒度和多分散性。通过UPLC测定最终脂质和类固醇浓度。

[0429] 动物模型

[0430] LPS激发的细胞因子小鼠模型

[0431] 在时间=0时,用0.05mg/kg脂多糖(LPS)预处理雌性ICR小鼠(每组n=5,5-6周龄)以激发免疫系统。在t=2h时,它们通过静脉内施用以1mg/kg剂量接受LNP。在LNP处理后4h将血液样品收集到EDTA钠微量采集管中(末梢血),并通过在16 $^{\circ}$ C下以16000xg离心5min而处理成血浆。通过ELISA分析血浆样品的白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)和单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)细胞因子水平。

[0432] 急性细胞因子小鼠模型

[0433] 通过静脉内施用,用10mg/kg的LNP处理雌性ICR小鼠(每组n=5,5-6周龄)。在处理2h,经由尾部切口将血液收集到含有50mM EDTA的管中,并通过在16 $^{\circ}$ C下以16000xg离心5分钟而处理成血浆。在处理6h,将末梢血样品收集到EDTA钠微量采集管中,并使用与上述相同的工序处理成血浆。通过ELISA分析血浆样品的白介素-6(IL-6)和单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)细胞因子水平。

[0434] 活性小鼠模型

[0435] 将用靶向载脂蛋白B(ApoB)的siRNA配制的LNP进行静脉内施用,以在雌性Ba1b/C小鼠(每组n=3,5-6周龄)中生成剂量响应曲线(典型剂量:0.01mg/kg至0.05mg/kg总siRNA)。终止时间点是静脉内施用LNP后48小时。将肝左叶收集到RNAlater中,并通过QuantiGene2.0分析法测定ApoB水平。结果归一化至管家基因GAPDH。

[0436] 实施例1:LPS激发的细胞因子小鼠模型中含有地塞米松21-棕榈酸酯的LNP

[0437] 地塞米松21-棕榈酸酯(Dex-P)实际上是地塞米松的前药,需要酶促作用来释放类固醇(地塞米松)。与游离形式的类固醇相比,这不太有利(因为它需要在体内转化为活性形式);然而,地塞米松21-棕榈酸酯具有比游离地塞米松更高的log P,从而促进更好地掺入LNP中。

[0438] 使用一般程序中描述的基础组合物,制备滴定系列的组合物,所述滴定系列具有稳定增加的Dex-P含量(0.5摩尔%、2摩尔%或5摩尔%Dex-P)。仅将Dex-P作为额外脂质组分包含在90%乙醇脂质储液中。颗粒特征与基础组合物基本上相同(表1)。

[0439] 表1.基础制剂对比Dex-P LNP的制剂特征

	制剂	Z 平均值 (nm)	PDI	包封%
[0440]	基础制剂	77	0.04	98
	基础+5% DexP	77	0.03	98
	基础+2% DexP	77	0.02	99
	基础+0.5% DexP	74	0.03	98

[0441] 在一般程序中描述的LPS激发的小鼠细胞因子模型中测试上述制剂。作为另外的对照,将基础制剂与游离地塞米松共同施用。以0.3mg/kg的剂量(临床相关剂量)静脉内施用游离类固醇。

[0442] 与用PBS预处理的动物相比,用0.05mg/kg的脂多糖(LPS)预处理的ICR小鼠诱导了细胞因子应答。在静脉内施用LNP后,所有3种细胞因子进一步增加。代表性细胞因子数据(MCP-1)示于表2中。在不存在类固醇的情况下,用基础制剂处理的组的细胞因子水平最高。将Dex-P与LNP共同配制显著降低了细胞因子水平。此外,当在LNP中共同配制时,低类固醇剂量(0.5摩尔%)与高类固醇剂量(5摩尔%)之间的细胞因子水平是相似的,表明潜在的饱和效应。将5摩尔%Dex-P掺入LNP中,在单次静脉内注射中施用的游离地塞米松的等价剂量为0.3mg/kg。在该剂量下用Dex-P LNP实现的细胞因子水平类似于在两次单独的连续注射中共同施用对照LNP与0.3mg/kg的游离地塞米松。

[0443] 表2.LPS激发的细胞因子小鼠模型中基础组合物对比Dex-P LNP的MCP-1 ELISA结果

	预处理	处理	平均 MCP-1 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)	
[0444]	PBS	PBS	95	35	
	LPS	PBS	4170	2345	
	LPS	1.1:55 (“基础”)	39403	12135	
	LPS	基础+5% DexP	8978	5817	
	LPS	基础+2% DexP	13039	4824	
	LPS	基础+0.5% DexP	12899	4705	
	LPS	1.1:55 (“基础”)	0.3mg/kg 游离地 塞米松	8801	4327

[0445] 实施例2:急性细胞因子小鼠模型中含有地塞米松21-棕榈酸酯的LNP

[0446] 皮质类固醇共制剂的概念得到来自急性细胞因子模型的数据的进一步支持。测试了相同的制剂组(在该模型中以10mg/kg给药),数据再次表明共同配制的Dex-P LNP是减少免疫刺激、在相同或更低剂量下实现与共同施用LNP和游离地塞米松类似的细胞因子水平的有效方式(表3)。

[0447] 表3.急性细胞因子小鼠模型中基础组合物对比Dex-P LNP的MCP-1 ELISA结果

处理	2h		6h	
	平均 MCP-1 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)	平均 MCP-1 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)
PBS	88	14	104	18
1.1:55 (“基础”)	3804	1145	1377	553
基础+5% DexP	104	24	118	43
基础+2% DexP	148	66	139	84
基础+0.5% DexP	193	62	203	61
1.1:55 (“基础”) 0.3mg/kg 游离地塞米松	190	132	252	155

[0449] 实施例3:LPS激发的模型中含有减少的地塞米松21-棕榈酸酯的LNP

[0450] 进一步向下滴定Dex-P的浓度(至0.5摩尔%、0.1摩尔%和0.01摩尔%)。通过UPLC进行的配制后分析表明,Dex-P易于掺入颗粒中。LNP制剂之间的颗粒特征相当(表4)。

[0451] 表4. 基础制剂对比Dex-P LNP的制剂特征

制剂	Z-平均值 (nm)	PDI	包封%
基础制剂	75	0.10	99
基础+0.5% DexP	74	0.03	99
基础+0.1% DexP	75	0.07	98
基础+0.01% DexP	74	0.01	98

[0453] 代表性细胞因子读数(MCP-1)的结果示于表5中。观察到Dex-P浓度与细胞因子水平之间的相关性(更多的Dex-P使细胞因子更好地减少)。0.5%Dex-P LNP相当于约0.03mg/kg剂量的游离地塞米松。对这两组进行比较的数据显示,当将皮质类固醇掺入LNP中时,细胞因子的减少明显更好。实际上,这种LNP(0.5%Dex-P)与0.3mg/kg剂量的游离地塞米松(皮质类固醇的10倍剂量)效果一样。据推测,这种令人惊讶的结果可能是由于皮质类固醇的有效得多的“靶向递送”。摄取LNP并且可能另外触发免疫应答的免疫细胞同时接受免疫抑制性皮质类固醇。

[0454] 表5.LPS激发的细胞因子小鼠模型中基础组合物对比Dex-P LNP的MCP-1 ELISA结果

预处理	处理		平均 MCP-1 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)
PBS	PBS		135	21
LPS	PBS		3821	432
LPS	1.1:55 (“基础”)		28020	6224
LPS	基础+0.5% DexP		12304	7171
[0455] LPS	基础+0.1% DexP		24119	9935
LPS	基础+0.01% DexP		29276	5392
LPS	1.1:55 (“基础”)	0.3mg/kg 游离 地塞米松	13982	4350
LPS	1.1:55 (“基础”)	0.03 mg/kg 游离 地塞米松	27893	7566
LPS	1.1:55 (“基础”)	0.006 mg/kg 游 离地塞米松	23901	4254

[0456] 实施例4:与Dex-P共同配制的LNP的活性

[0457] 为了验证Dex-P掺入LNP不影响效力,在一般程序中描述的活性小鼠模型中评估制剂。将含有不同量Dex-P的样品以2种剂量进行测试:0.025mg/kg和0.05mg/kg。在每种剂量下均观察到所有制剂的类似沉默活性。将含有0.5%Dex-P和非靶向对照siRNA (siLuc-2) 的基础制剂作为阴性对照包括在内。预期此有效负载没有或不会观察到任何沉默。结果示于表6中。

[0458] 表6. 小鼠模型中1.1:55基础对比与Dex-P共同配制的LNP的ApoB沉默活性

处理	剂量(mg/kg)	PBS%	误差%
PBS	n/a ¹	100	21
1.1:55 (“基础”)	0.025	55	6
	0.05	47	7
基础+5% Dex-P	0.025	81	12
	0.05	46	5
基础+2.5% Dex-P	0.025	57	19
	0.05	34	6
基础+0.5% Dex-P	0.025	54	8
	0.05	35	10
基础+0.1% Dex-P	0.025	67	8
	0.05	36	14
基础+游离地塞米松	0.025	64	15
	0.05	29	6
基础+0.5% Dex-P (siLuc-2)	0.025	86	8
	0.05	92	20

[0460] ¹PBS以10mL/kg静脉内施用。

[0461] 实施例5:LPS激发的小鼠模型中含有氯倍他索的LNP

[0462] 然后尝试将皮质类固醇氯倍他索-17-丙酸酯(氯倍他索)共同配制到LNP中,再次研究其抑制对颗粒的炎症反应的能力。使用40mM乙酸盐(pH 4.5)缓冲液来溶解核酸。最终的脂质组成示于表7中。具有较低log P(约3.5)的氯倍他索不像Dex-P(log P为约9)那样容易地掺入LNP。因此,将最终产品中实际所需的氯倍他索浓度的8倍浓度输入到该过程中。通过UPLC进行的分析证实了氯倍他索的掺入。

[0463] 表7.1.1:55基础对比含有氯倍他索的LNP的脂质组成

	脂质组成(摩尔%)				
	PEG2000-C-DMA	化合物 13	胆固醇	磷脂 ¹	氯倍他索
1.1:55 (“基础”)	1.1	55	33	11	-
基础+1%氯倍他索	1.1	55	33	11	1

[0466] ¹在含有氯倍他索的LNP中使用1,2-二-0-十八烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱代替DSPC

[0467] 如表8所概述,两种组合物之间的制剂特征相当。粒度、多分散性和有效负载包封表明均匀的颗粒群体。

[0468] 表8. 1.1:55基础对比含有氯倍他索的LNP的表征

	制剂	Z 平均值 (nm)	PDI	包封%
[0469]	基础制剂	79	0.04	96
	基础+1%氯倍他索	65	0.04	98

[0470] 在LPS激发的小鼠模型中评估了两种组合物。代表性细胞因子读数(MCP-1)示于表9中。使用氯倍他索LNP时,对LNP的炎症反应显著降低。MCP-1水平与含有Dex-P的LNP相似;然而,氯倍他索不是前药,并且不依赖于酶促作用来活化。这是优于Dex-P的显著优势,因为这种皮质类固醇在将LNP递送至其靶向作用位点时将自发起作用。

[0471] 表9.LPS激发的细胞因子小鼠模型中基础组合物对比含有氯倍他索的LNP的MCP-1 ELISA结果

	预处理	处理	平均 MCP-1 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)
	PBS	PBS	201	13
[0472]	LPS	PBS	3877	2138
	LPS	1.1:55 (“基础”)	49069	9784
	LPS	基础+1%氯倍他索	11550	7598

[0473] 实施例6:急性细胞因子小鼠模型中含有氯倍他索的LNP

[0474] 在急性细胞因子模型中测试了相同的LNP组合物(基础和基础+氯倍他索)。在2h和6h的时间点测量了MCP-1和IL-6细胞因子水平。对于共同配制的氯倍他索LNP,所报告的两种细胞因子的水平显著降低。后一种制剂仅在两个时间点报告了基线IL-6水平(表10)。

[0475] 表10.急性细胞因子小鼠模型中基础组合物对比含有氯倍他索的LNP的IL-6 ELISA结果

	处理	2h		6h	
		平均 IL-6 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)	平均 IL-6 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)
[0476]	PBS	17	4	10	7
	1.1:55 (“基础”)	2232	493	152	137
	基础+1%氯倍他索	27	13	5	2

[0477] 以更多的时间点进行了扩展急性细胞因子研究,以确保在使用氯倍他索LNP时峰值细胞因子应答不会简单地偏移得更早或更晚的时间点。在该模型中,通常在LNP处理后2h观察到峰值细胞因子反应。结果证实,该类固醇在研究的整个时间过程中有效抑制免疫应答(表11)。

[0478] 表11.扩展时间过程研究的急性细胞因子小鼠模型中的基础组合物对比含有氯倍他索的LNP的MCP-1 ELISA结果

	PBS		1.1:55 (“基础”)		基础+1%氯倍他索		
时间点 (h)	平均 MCP-1 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)	平均 MCP-1 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)	平均 MCP-1 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)	
[0479]	0.25	74	10	83	13	68	5
	0.5	150	52	314	196	75	9
	1	91	7	356	202	99	7
	2	100	12	1447	602	248	198
	3	98	21	946	815	186	156
[0480]	4	113	22	646	411	191	99
	6	84	16	735	561	106	24

[0481] 实施例7:小鼠剂量响应研究中含有氯倍他索的LNP的活性

[0482] 为了验证在LNP中掺入氯倍他索以及对该过程的略微修改不影响效力,在一般程序中描述的活性模型中评估制剂。在每种剂量下均观察到两种制剂的类似沉默活性(表12)。这强调了氯倍他索LNP具有显著改善的治疗指数;它们具有相同的效力,但具有好得多的耐受性。

[0483] 表12. 1.1:55基础组合物对比含有氯倍他索的LNP的ApoB沉默活性

	处理	剂量(mg/kg)	PBS%	误差%
	PBS	n/a ¹	100	20
[0484]	1.1:55 (“基础”)	0.01	45	7
		0.025	21	1
		0.05	12	1
	基础+1%氯倍他索	0.01	44	11
		0.025	18	5
		0.05	9	1

[0485] ¹PBS以10mL/kg静脉内施用。

[0486] 实施例8:含有环索奈德的LNP的免疫抑制

[0487] 接下来测试了皮质类固醇环索奈德。最终的脂质组成示于表13中。通过UPLC进行的分析证实了环索奈德的掺入。环索奈德具有约5.3的log P,并且易于掺入颗粒中。

[0488] 表13. 1.1:55基础对比含有氯倍他索的LNP的脂质组成

	脂质组成(摩尔%)					
	PEG2000-C-DMA	化合物 13	胆固醇	DSPC	环索奈德	
[0489]	基础制剂	1.1	55	33	11	-
[0490]	基础+2%环索奈德	1.1	55	33	11	2

[0491] 如表14所概述,两种组合物之间的制剂特征相当。粒度、多分散性和有效负载包封表明均匀的颗粒群体。

[0492] 表14. 1.1:55基础对比含有氯倍他索的LNP的表征

	制剂	Z-平均值 (nm)	PDI	包封%
[0493]	基础制剂	78	0.06	96
	基础+2%环索奈德	77	0.04	97

[0494] 在LPS激发的小鼠模型中测试了环索奈德LNP,并与基础制剂以及Dex-P LNP进行比较。与基础制剂相比,环索奈德LNP还显示出显著降低的炎性细胞因子应答。代表性细胞因子(MCP-1)的数据示于表15中。

[0495] 表15.LPS激发的细胞因子小鼠模型中基础组合物对比含有类固醇的LNP的MCP-1 ELISA结果

	预处理	处理	平均 MCP-1 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)
	PBS	PBS	170	9
[0496]	LPS	PBS	6012	2774
	LPS	1.1:55 (“基础”)	54909	18542
	LPS	基础+2% Dex-P	26468	4561
	LPS	基础+2%环索奈德	17913	4352

[0497] 实施例9:含有环索奈德的LNP的活性

[0498] 也在一般程序中描述的活性模型中评估了环索奈德LNP。与Dex-P LNP一样,环索奈德LNP表现出与基础制剂相似的效力(表16)。

[0499] 表16. 1.1:55基础组合物对比含有环索奈德和Dex-P的LNP的ApoB沉默活性

处理	剂量(mg/kg)	PBS%	误差%
PBS	n/a ¹	100	17
1.1:55 (“基础”)	0.01	31	3
	0.025	16	2
	0.05	12	2
基础+2% Dex-P	0.01	43	11
	0.025	17	9
	0.05	17	3
基础+2%环索奈德	0.01	48	16
	0.025	27	2
	0.05	13	4

[0501] ¹PBS以10mL/kg静脉内施用。

[0502] 实施例10:含有氯倍他索的LNP降低了非人灵长类动物的免疫刺激

[0503] 在食蟹猴中进行了静脉内药理学研究以评估氯倍他索LNP制剂,并且与对照制剂(先前使用的“基础制剂”)进行比较。与实施例5类似,将8倍浓度的氯倍他索输入该过程中以在最终组合中得到所需的1摩尔%(表17)。使用40mM乙酸盐(pH 4.5)缓冲液来溶解核酸。

[0504] 表17. 1.1:55基础对比含有氯倍他索的LNP的脂质组成

	脂质组成(摩尔%)				
	PEG-2000-C-DMA	化合物 13	胆固醇	DSPC	氯倍他索
1.1:55 (“基础”)	1.1	55	33	11	-
基础+1%氯倍他索	1.0	61	18.5	18.5	1

[0506] 将LNP制剂经由60分钟静脉输注以2.0mg/kg总siRNA的剂量施用给一组共四只食蟹猴(柬埔寨来源;2只雄性,2只雌性,2-5岁)。对给药前和给药后2、6和24h抽取的血样测试一组炎症标志物。氯倍他索LNP显示出多种炎症标志物的显著减少,进一步证实了该策略的有效性。表18比较了输注后6小时两种组合物之间的MCP-1、IL-6和IL-1ra(白介素-1受体拮抗剂)水平。

[0507] 表18. 食蟹猴中基础组合物对比含有氯倍他索的LNP的炎症反应(输注后6小时)比较

处理	平均 MCP-1(pg/mL)	标准偏 差 (pg/mL)	平均 IL-6 (pg/mL)	标准偏 差 (pg/mL)	平均 IL-1ra (pg/mL)	标准偏 差 (pg/mL)
[0508] 盐水	660	334	26	31	420	344
1.1:55 (“基础”)	5548	7280	703	1164	2571	3114
基础+1% 氯倍他索	214	28	7	3	204	160

[0509] 实施例11:经麻醉的雌性哥廷根小型猪中单次输注LNP制剂的心血管效应的检查

[0510] 在经麻醉的雌性哥廷根小型猪中评估单次1小时输注LNP制剂对血液动力学参数和炎性生物标志物的供试品相关效应。用表19中的组合物配制LNP。与实施例5类似,将8倍浓度的氯倍他索输入该过程中以在最终组合物中得到所需的1摩尔%。使用40mM乙酸盐(pH4.5)缓冲液来溶解核酸。

[0511] 表19. 1.1:55基础对比含有氯倍他索的LNP的脂质组成

	脂质组成(摩尔%)				
	PEG-2000-C-DMA	化合物 13	胆固醇	DSPC	氯倍他索
[0512] 1.1:55 (“基础”)	1.1	55	33	11	-
基础+1%氯倍他索	1.0	61	18.5	18.5	1

[0513] 对三(3)只首次接受试验的小型猪进行手术,并在经由60分钟静脉内输注而单次施用媒介物(盐水)、基础LNP或氯倍他索LNP之前收集基线数据。LNP制剂以0.3mg/kg总核酸的剂量施用。在第一次输注之前,并在输注开始后约5、60、90、120、180和240分钟,获取血液样品,处理成血浆和血清,并分析细胞因子和血栓素(11-脱氢血栓素B2)。在整个实验中连续收集血液动力学数据,总时间为4小时。在输注后4小时,在麻醉下利用过量巴比妥酸盐使猪安乐死。

[0514] 用基础制剂处理导致血栓素(表20)和细胞因子(表21)的显著、可测量的增加。此外,观察到血液动力学变化,例如肺动脉压的增加(表22)。这些参数都表明对基础LNP的炎症反应通过将氯倍他索掺入LNP制剂中而被抑制。当用共同配制的类固醇LNP处理动物时,则可能是糖皮质激素介导的磷脂酶A2抑制和炎性细胞因子转录的转录抑制。

[0515] 表20. 麻醉小型猪中1.1:55基础和含氯倍他索的LNP的血栓素水平比较

TXB2 相比基线的变化(pg/mL)								
		相对于输注开始的时间(分钟)						
		-15	5	60	90	120	180	240
[0516] 盐水	平均值	0.0	-9.2	1.5	-13.0	-13.0	-7.0	-9.0
	平均值的标准误差	0.0	3.5	3.6	2.3	2.3	1.5	2.2
1.1:55 (“基础”)	平均值	0.0	4.8	21.5	24.4	19.4	14.0	4.8
	平均值的标准误差	0.0	2.0	1.4	8.1	7.2	6.6	2.7
基础+1% 氯倍他索	平均值	0.0	-7.3	9.9	-0.9	-0.1	-7.3	-7.3
	平均值的标准误差	0.0	7.3	8.5	0.9	7.3	7.3	7.3

[0517] 表21. 麻醉小型猪中1.1:55基础和含氯倍他索的LNP的IL-6细胞因子水平比较

IL-6 相比基线的倍数变化								
		相对于输注开始的时间(分钟)						
		-15	5	60	90	120	180	240
[0518] 盐水	平均值	1.0	0.9	3.3	5.4	8.0	16.6	40.3
	平均值的标准误差	0.0	0.1	1.5	2.3	1.6	1.4	20.0
[0519] 1.1:55 (“基础”)	平均值	1.0	1.0	4.2	9.0	21.4	76.5	210.5
	平均值的标准误差	0.0	0.0	3.2	8.0	15.9	39.9	58.9
基础+1%氯 倍他索	平均值	1.0	0.9	3.9	10.0	15.8	1.0	0.4
	平均值的标准误差	0.0	0.5	2.9	9.0	14.7	0.6	0.3

[0520] 表22. 麻醉小型猪中1.1:55基础和含氯倍他索的LNP的平均肺动脉压 (PAP) 比较

平均 PAP 相比基线的变化(mmHg)											
		相对于输注开始的时间(分钟)									
		-15	0	15	30	60	90	120	150	180	240
[0521] 盐水	平均值	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	平均值的标准误差	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
1.1:55 (“基础”)	平均值	0	0	4	1	4	6	4	3	2	1
	平均值的标准误差	0	0	2	0	2	3	2	2	1	1
基础+1% 氯倍他索	平均值	0	0	4	1	1	1	1	1	0	1
	平均值的标准误差	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1

[0522] 实施例12共同配制的氯倍他索有效降低对携带mRNA有效负载的LNP的免疫应答

[0523] 在携带mRNA有效负载的情况下进一步测试了类固醇与LNP的共制剂的概念。该实施例展示了如何通过掺入皮质类固醇氯倍他索实现mRNA-LNP免疫刺激的减少。

[0524] 通过Jeffs等人描述的直接稀释方法制备LNP(含PL和不含PL)。简而言之,在100%乙醇中制备了脂质储液,总脂质浓度为6-7mg/mL。将编码荧光素酶(TriLink BioTechnologies)(报告基因)的mRNA转录物以0.366mg/mL溶解于pH 4.5的40mM EDTA中。将等体积的这些溶液在T形连接器中以250mL/min的流速组合,立即稀释到pH 7.4的PBS(脂质储液的4倍体积)中。然后去除乙醇,并通过透析(Slide-A-Lyzer装置,MWCO 10k)将载体缓冲液替换为PBS,其中用100倍体积的PBS透析过夜。透析后,使用VivaSpin浓缩器单元(MWCO 100,000)将制剂浓缩为约0.3mg/mL。与siRNA制剂一样,氯倍他索的低log P需要以最终组合物中所需量的约8倍输入,因为在LNP颗粒中仅掺入约15%。在透析期间其余部分丢失。将LNP样品进行无菌过滤(0.2 μ m注射过滤器),并通过RiboGreen测定法测定样品浓度。使用Malvern Nano Series Zetasizer测定粒度和多分散性。通过UPLC测定了最终组合物中的氯倍他索和其他脂质的量,并示于表23中。

[0525] 表23. 基础制剂对比含有氯倍他索的LNP的制剂特征

	脂质组成(摩尔%)					表征		
	PEG2000-C -DMA	化合物 13	胆固醇	磷脂 ¹	氯倍 他索	大小 (nm)	PDI	包封 %
[0526] 1.6:55 基础	1.6	55	33	11	0	73	0.07	97
基础 +1.0% 氯倍他 索	1.6	55	33	11	1	67	0.04	96

[0527] ¹ 1,2-二-0-十八烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱

[0528] 在注射之前,将制剂稀释至0.05mg/mL。经由静脉途径通过侧尾对Balb/c小鼠(n=5)以0.5mg/kg(mRNA)进行注射。注射后四小时,用致死剂量的氯胺酮/甲苯噻嗪对动物实施安乐死。取少量(20 μ L)末梢血收集到含有5 μ L 50mg/L的肝素的管中,而将剩余的血液收集到EDTA钠微量采集管中。将所有这些管在16000xg和16 $^{\circ}$ C下离心5分钟以分离血浆。收集肝的左侧叶的一小部分(约200mg),并在4 $^{\circ}$ C下在RNALater中储存过夜。

[0529] 将肝素血浆(用ELISA稀释剂以1:4000稀释)用于标准鼠EPO ELISA分析(得自R&D Systems的试剂盒)。如表24所示,在mRNA-LNP内掺入氯倍他索可能导致效力略微降低,但可能在实验波动的边界内。在这些小鼠的血浆中观察到的常规EPO水平为0.1-0.2ng/mL。因此,在mRNA-LNP内掺入氯倍他索并不会真正影响制剂的功效。

[0530] 表24. 基础组合物对比含有氯倍他索的LNP静脉内施用后4h肝脏中鼠mEPO-LNP的功效

[0531]

处理	mEPO (ng/mL)	标准偏差 (ng/mL)
1.6:55 (“基础”)	6041	1305
基础+氯倍他索	4438	781

[0532] 为了评估对免疫刺激的影响, 稀释EDTA血浆样品(1:8)并通过ELISA(得自BD Biosciences的ELISA测定以及捕获和检测抗体)分析细胞因子(MCP-1和IL-6)。表25表明, 当将氯倍他索掺入制剂中时, 细胞因子的产生显著减少。

[0533] 表25. 基础组合物对比含有氯倍他索的LNP的MCP-1和IL-6ELISA结果

处理	MCP-1		IL-6	
	平均值 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)	平均值 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)
PBS	57	4	15	3
1.6:55 (“基础”)	5911	3592	353	194
基础+氯倍他索	479	146	78	24

[0535] 还测量了肝脏IFIT(三角形四肽重复干扰素诱导蛋白)对两种制剂的应答。IFIT生物标志物指示I型干扰素对有效负载的应答。将肝脏样品(20-25mg)均化并使用QuantiGene 2.0测定法(Affymetrix)评估肝脏中的IFIT水平(归一化至管家基因GAPDH)。将结果作为相较于PBS对照组的倍数增加作图, 并证明氯倍他索共制剂也能有效抑制IFIT对mRNA有效负载的应答(表26)。

[0536] 表26. 基础组合物对比含有氯倍他索的LNP的肝脏IFIT诱导

处理	相较于 PBS 的倍数增加	标准偏差
1.6:55 (“基础”)	591	116
基础+氯倍他索	334	31

[0538] 总之, 这些结果表明在LNP颗粒中掺入氯倍他索显著地消除了对mRNA-LNP的免疫刺激, 并且观察到治疗指数的增加。

[0539] 实施例13共同配制的地塞米松棕榈酸酯有效降低对携带mRNA有效负载的LNP的免疫应答

[0540] 该实施例展示了类固醇前药地塞米松21-棕榈酸酯(Dex-P)如何也可用于减少对携带LNP和mRNA有效负载的炎症反应。如实施例12所述配制了含有Dex-P的mRNA-LNP, 其具有表27中所述的组成。将鼠EPO mRNA转录物(TriLink BioTechnologies)用于有效负载。

[0541] 表27. 基础制剂对比含有Dex-P的LNP的制剂特征

	脂质组成(摩尔%)					表征		
	PEG2000-C-DMA	化合物13	胆固醇	DSPC	DEX-P	大小(nm)	PDI	包封%
1.1:55 基础	1.1	55	33	11	0	85	0.06	97
基础 +2% Dex-P	1.1	55	33	11	2	81	0.05	97

[0543] 将制剂以0.5mg/kg(总mRNA)的剂量静脉内注射到Balb/C小鼠(n=5)中。注射后六小时,用致死剂量的氯胺酮/甲苯噻嗪对动物实施安乐死。取少量(75 μ L)末梢血收集到含有5 μ L 50mg/L的肝素的管中,而将剩余的血液收集到EDTA钠微量采集管中。将血液样品在16000xg和16 $^{\circ}$ C下离心5分钟以分离血浆。

[0544] 通过ELISA分析肝素血浆(用ELISA稀释剂以1:4000稀释)的EPO水平(得自R&D Systems的试剂盒)。如表28所示,在mRNA-LNP内掺入Dex-P可能导致效力增加,但可能在实验波动的范围内。

[0545] 表28.基础组合物对比含有Dex-P的LNP静脉内施用后4小时肝脏中鼠mEPO-LNP的功效

[0546]

处理	mEPO (ng/mL)	标准偏差 (ng/mL)
1.1:55 (“基础”)	2009	1179
基础+2%Dex-P	3659	1313

[0547] 通过ELISA(BD Biosciences)分析EDTA血浆的细胞因子水平(MCP-1和IL-6)。表29表明,在mRNA-LNP中掺入Dex-P引起细胞因子水平的显著降低。

[0548] 表29.基础组合物对比含有Dex-P的LNP的MCP-1和IL-6 ELISA结果

处理	MCP-1		IL-6	
	平均值 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)	平均值 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)
PBS	36	15	27	13
1.1:55 (“基础”)	4471	1279	515	194
基础+2% Dex-P	1281	737	83	16

[0550] 该数据表明,掺入地塞米松-棕榈酸酯降低了对mRNA-LNP的炎症反应,并且结果显著改善了mRNA-LNP的治疗指数。

[0551] 实施例14-20.LNP中减少或不存在的磷脂和高PEG。

[0552] 磷脂的存在会缩短脂质纳米颗粒(LNP)的贮藏寿命,因为磷酸酯键被认为是非常不稳定的。从LNP中去除大部分或全部磷脂以测试对包含mRNA的LNP的贮藏寿命的影响。在这些实验中,发现制剂的免疫原性大大降低而不影响效力。如本文所述,本发明的某些实施方案涉及具有低水平的磷脂或无磷脂和高于一般水平的PEG的组合物。有趣的是,低磷脂和高摩尔百分比PEG的组合比siRNA更有效地减少了mRNA的免疫刺激。

[0553] 在某些实施方案中,PEG的量为至少3摩尔%(例如,至少3.1摩尔%、至少3.2摩尔%、至少3.3摩尔%、至少3.4摩尔%、至少3.5摩尔%、至少3.6摩尔%、至少3.7摩尔%、至少3.8摩尔%、至少3.9摩尔%、至少4摩尔%)。就磷脂而言,在某些实施方案中,在本发明的实践中不使用磷脂。在某些实施方案中,脂质颗粒包含小于2摩尔%的磷脂,例如1.9摩尔%的磷脂、1.8摩尔%的磷脂、1.7摩尔%的磷脂、1.6摩尔%的磷脂、1.5摩尔%的磷脂、1.4摩尔%的磷脂、1.3摩尔%的磷脂、1.2摩尔%的磷脂、1.1摩尔%的磷脂、1.0摩尔%的磷脂、0.9摩尔%的磷脂、0.8摩尔%的磷脂、0.7摩尔%的磷脂、0.6摩尔%的磷脂、0.5摩尔%的磷脂、0.4摩尔%的磷脂、0.3摩尔%的磷脂、0.2摩尔%的磷脂、0.1摩尔%的磷脂或0.0%的磷

脂,例如小于1.9摩尔%的磷脂、小于1.8摩尔%的磷脂、小于1.7摩尔%的磷脂、小于1.6摩尔%的磷脂、小于1.5摩尔%的磷脂、小于1.4摩尔%的磷脂、小于1.3摩尔%的磷脂、小于1.2摩尔%的磷脂、小于1.1摩尔%的磷脂、小于1.0摩尔%的磷脂、小于0.9摩尔%的磷脂、小于0.8摩尔%的磷脂、小于0.7摩尔%的磷脂、小于0.6摩尔%的磷脂、小于0.5摩尔%的磷脂、小于0.4摩尔%的磷脂、小于0.3摩尔%的磷脂、小于0.2摩尔%的磷脂、小于0.1摩尔%的磷脂。

[0554] 一般程序

[0555] 脂质纳米颗粒配制

[0556] 通过Jeffs等人描述的LipoMixer方法,使用直接稀释或在线稀释来制备LNP制剂。脂质组合物如前所述,通常包含所述摩尔比的3或4种脂质。以约12mg/mL的总脂质浓度将脂质溶于100%乙醇中。当磷脂存在于LNP中时,将核酸溶解于pH 4.5的20mM EDTA中,并且在不存在磷脂的情况下,将核酸溶解于pH 4.5的40mM EDTA中。将等体积的这些溶液在T形连接器中以400mL/min的流速组合,立即稀释(在线稀释或直接稀释)到pH 7.4的PBS(脂质储液的4倍体积)中。然后去除乙醇,并通过透析(Slide-A-Lyzer装置,MWCO 10k)或使用Midgee hoop滤柱(MWCO 500k,GE Healthcare)进行的切向流超滤将载体缓冲液替换为PBS。对LNP样品进行无菌过滤(0.2 μ m注射过滤器),并通过DENAX-HPLC或RiboGreen测定法测定样品浓度。使用Malvern Nano Series Zetasizer测定粒度和多分散性。通过UPLC测定最终脂质。

[0557] 动物模型

[0558] 使用3种动物模型评估制剂;两种免疫刺激模型,一种效力模型。说明如下:

[0559] LPS激发的细胞因子小鼠模型

[0560] 在时间=0时,用0.05mg/kg脂多糖(LPS)预处理雌性ICR小鼠(n=5,5-6周龄)以激发免疫系统。在t=2h时,它们通过静脉内施用以1mg/kg剂量接受LNP。在LNP处理后4小时将血液样品收集到EDTA钠微量采集管中(末梢血),并通过在16 $^{\circ}$ C下以16000xg离心5min而处理成血浆。通过ELISA分析血浆样品的IL-1 β 、IL-6和MCP-1细胞因子水平。

[0561] 急性细胞因子小鼠模型

[0562] 通过静脉内施用,用10mg/kg的LNP处理雌性ICR小鼠(n=5,5-6周龄)。在处理2h,经由尾部切口将血液收集到含有50mM EDTA的管中,并通过在16 $^{\circ}$ C下以16000xg离心5分钟而处理成血浆。在处理6h,将末梢血样品收集到EDTA钠微量采集管中,并使用与上述相同的工序处理成血浆。通过ELISA分析血浆样品的IL-6和MCP-1细胞因子水平。

[0563] 活性小鼠模型

[0564] 将用靶向载脂蛋白B的siRNA配制的LNP进行静脉内施用,以在雌性Balb/C小鼠(n=3,5-6周龄)中生成剂量响应曲线(典型剂量:0.01mg/kg至0.05mg/kg包封在LNP中的总siRNA)。终止时间点是静脉内施用LNP后48小时。将肝左叶收集到RNAlater中,并通过QuantiGene 2.0分析法测定ApoB水平。将结果归一化为管家基因GAPDH,并表示为PBS对照的%。具有“PBS的20%”的ApoB读数的组比具有“PBS的80%”的ApoB读数的组经历了更显著的基因沉默活性。

[0565] 实施例14:从LNP制剂中去除磷脂减少了免疫刺激而不影响效力

[0566] 用靶向载脂蛋白B(ApoB)的寡核苷酸siRNA有效负载制备了两种LNP制剂。“基础”

组合物,以及省略了磷脂(“不含磷脂”或“不含PL”)的另一种组合物。组成细节列于表30中。

[0567] 表30. 1.6:55(“基础”)和1.8:61(“不含PL”)制剂的脂质组成

	脂质组成(摩尔%)			
	PEG-2000-C -DMA	阳离子化合物 13	胆固醇	DSPC
[0568] 1.6:55 (“基础”)	1.6	55	33	11
1.8:61 (“不含 PL”)	1.8	61	37	0

[0569] 在LPS激发的小鼠细胞因子模型中,结果清楚地表明,不含PL的LNP比其含有磷脂的母体组合物的刺激性更小(表31)。

[0570] 表31.LPS激发的细胞因子小鼠模型中基础组合物对比不含PL的组合物的MCP-1 ELISA结果

预处理	处理	平均 MCP-1 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)
[0571] PBS	PBS	160	11
LPS	PBS	3237	782
LPS	1.6:55 (“基础”)	35691	17620
LPS	1.8:61 (“不含 PL”)	10485	3545

[0572] 虽然减少炎症反应是一个重要目标,但同样重要的是效力不会同时受损。因此,在ApoB沉默活性模型(如一般程序下所述)中评估了相同的LNP组。基因沉默数据(表32)揭示了去除磷脂不会影响效力。

[0573] 表32.活性小鼠模型中基础组合物对比不含PL的组合物的ApoB沉默活性

处理	剂量(mg/kg)	PBS%	误差%
PBS	n/a ¹	100	9.2
[0574] 1.6:55 (“基础”)	0.01	45	8.6
	0.025	17	2.1
	0.05	11	1.3
1.8:61 (“不含 PL”)	0.01	43	8.6
	0.025	29	1.5
	0.05	20	5.2

[0575] ¹PBS以10mL/kg静脉内施用。

[0576] 实施例15:在不含磷脂的LNP中增加PEG脂质含量导致细胞因子水平进一步降低,而不显著影响效力

[0577] 使用ApoB siRNA有效负载配制了以下LNP。从“基础”组合物开始,首先去除磷脂,然后使PEG含量翻倍或增至三倍(表33):

[0578] 表33. 1.1:55基础和具有增加的PEG含量的不含PL的制剂的脂质组成

	脂质组成(摩尔%)			
	PEG-2000-C-DMA	阳离子化合物 13	胆固醇	DSPC
[0579] 1.1:55 (“基础”)	1.1	55	33	11
1.1:57 (“不含 PL”)	1.1	57	42	0
2.2:56 (“不含 PL”)	2.2	56	42	0
3.3:55 (“不含 PL”)	3.3	55	41	0

[0580] 在急性小鼠细胞因子模型中评估了该组LNP,时间点为2h和6h。当从组合物中去除磷脂时,再次观察到细胞因子的减少。代表性细胞因子数据(MCP-1)示于表34中。随后,随着PEG含量的增加,观察到细胞因子的甚至更显著的减少。

[0581] 表34. 急性细胞因子小鼠模型中1.1:55基础组合物对比具有增加的PEG脂质含量的不含PL的组合物的MCP-1 ELISA结果

处理	2h		6h	
	平均 MCP-1 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)	平均 MCP-1 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)
PBS	29	4	36	6
[0582] 1.1:55 (“基础”)	1967	916	973	801
1.1:57 (“不含 PL”)	1072	317	745	342
2.2:56 (“不含 PL”)	704	147	183	73
3.3:55 (“不含 PL”)	157	72	45	7

[0583] 有趣的是,这些高PEG、不含PL的组合物的效力未受到显著影响(表35)。据以往的经验,常常发现具有较高PEG含量的制剂的活性受损。例如,评估了类似PEG滴定系列中但具有标准磷脂含量的三(3)个相关LNP(表36),代表性活性数据示于表37中。随着PEG含量增加,观察到活性显著减弱。因此,令人惊讶地发现,对于上述高PEG、无PL系统,细胞因子的显著减少不伴随更显著的相称的效力损失。

[0584] 表35. 活性小鼠模型中1.1:55基础组合物对比具有增加的PEG脂质含量的不含PL的组合物的ApoB沉默活性

处理	剂量(mg/kg)	PBS%	误差%
PBS	n/a ¹	100	13
1.1:55 (“基础”)	0.01	37	2
	0.025	15	2
	0.05	9	3
1.1:57 (“不含 PL”)	0.01	37	7
	0.025	21	5
	0.05	12	2
2.2:56 (“不含 PL”)	0.01	45	7
	0.025	20	5
	0.05	11	2
3.3:55 (“不含 PL”)	0.01	48	7
	0.025	31	8
	0.05	22	6

[0586] ¹PBS以10mL/kg静脉内施用。

[0587] 表36. 1.1:55基础和具有增加的PEG含量的含PL的LNP的脂质组成

	脂质组成(摩尔%)			
	PEG-2000-C-DMA	阳离子化合物 13	胆固醇	DSPC
1.1:55 (“基础”)	1.1	55	33	11
2.2:54	2.2	54	33	11
4.3:53	4.3	53	32	11

[0589] 表37. 活性小鼠模型中1.1:55基础和具有增加的PEG含量的含PL的LNP的ApoB沉默活性

[0590]

处理	剂量 (mg/kg)	PBS%	误差%
PBS	n/a ¹	100	30
1.1:55 (“基础”)	0.05	16	5
2.2:55	0.05	33	3
4.4:55	0.05	100	38

[0591] 实施例16:磷脂含量的降低也有效减少炎症反应

[0592] 假设可能不需要从LNP制剂中完全去除磷脂即可消除免疫刺激,并且可通过简单地降低PL含量来实现这种效果。使用降低的PL含量(3摩尔%或8摩尔%)对比母体组合物(11摩尔%)制备了一组组合物(表38):

[0593] 表38. 1.1:55基础和具有降低的PL含量的含PL的LNP的脂质组成

		脂质组成(摩尔%)			
		PEG-2000-C-DMA	阳离子化合物 13	胆固醇	DSPC
[0594]	1.1:55 (“基础”)	1.1	55	33	11
	1.1:57	1.1	57	34	8
	1.1:55	1.1	55	41	3
	1.6:52	1.6	52	39	8
	1.6:55	1.6	55	41	3

[0595] 评估了这些组合物在急性细胞因子模型中的免疫刺激。如表39所见,具有减少的磷脂的组合物具有降低的刺激细胞因子产生的倾向。另外,磷脂含量的降低对效力没有显著影响(表40)。

[0596] 表39.急性细胞因子小鼠模型中1.1:55基础对比具有降低的PL含量的含PL的LNP的MCP-1 ELISA结果

		2h		6h	
[0597]	处理	平均 MCP-1 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)	平均 MCP-1 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)
	[0598]	PBS	721	487	85
1.1:55 (“基础”)		3644	3250	894	759
1.1:57		831	786	388	295
1.1:55		335	213	117	39
1.6:52		447	174	76	14
1.6:55		221	159	91	35

[0599] 表40.小鼠模型中1.1:55基础组合物对比具有降低的PL含量的含PL的LNP的ApoB沉默活性

处理	剂量(mg/kg)	PBS%	误差%
PBS	n/a ¹	100	6
1.1:55 (“基础”)	0.01	47	4
	0.025	18	2
1.1:57	0.01	37	4
	0.025	15	2
1.1:55	0.01	60	13
	0.025	20	5
1.6:52	0.01	66	14
	0.025	27	3
1.6:55	0.01	46	10
	0.025	28	2

[0601] ¹PBS以10mL/kg静脉内施用。

[0602] 实施例17去除磷脂减少了含有mRNA的LNP的免疫刺激而不影响效力

[0603] 该实施例展示了可如何通过从LNP组合中去除磷脂(即,产生不含PL的mRNA-LNP)来实现mRNA-LNP免疫刺激的减少。用表41中所示的脂质组合物制备了mRNA-LNP制剂。两种不同的基础制剂(1.1:55和1.6:55)去除了其磷脂含量(“不含PL”的组合物),同时保持或略微增加胆固醇含量。

[0604] 表41:基础制剂对比不含PL的mLuc-LNP的制剂特征

	脂质组成(摩尔%)				表征		
	PEG-2000-C-DMA	化合物 13	胆固醇	DSPC	大小 (nm)	PDI	包封 %
1.1:55 (“基础”)	1.1	55	33	11	104	0.01	96
1.6:55 (“基础”)	1.6	55	33	11	80	0.11	99
1.1:57 (“不含 PL”)	1.1	57	42	0	106	0.08	96
1.7:57 (“不含 PL”)	1.7	57	42	0	94	0.08	98
1.8:61 (“不含 PL”)	1.8	61	37	0	99	0.09	95

[0606] 通过Jeffs等人描述的直接稀释方法制备LNP(含PL和不含PL)。简而言之,在100%乙醇中制备了脂质储液,总脂质浓度为6-7mg/mL。将编码荧光素酶(报告基因)的mRNA转录物以0.366mg/mL溶解于pH 4.5的40mM EDTA中。将等体积的这些溶液在T形连接器中以250mL/min的流速组合,立即稀释到pH 7.4的PBS(脂质储液的4倍体积)中。然后去除乙醇,并通过透析(Slide-A-Lyzer装置,MWCO 10k)将载体缓冲液替换为PBS,其中用100倍体积的PBS透析过夜。透析后,使用VivaSpin浓缩器单元(MWCO 100,000)将制剂浓缩为约0.6mg/

mL。将LNP样品进行无菌过滤(0.2 μ m注射过滤器),并通过RiboGreen测定法测定样品浓度。使用Malvern Nano Series Zetasizer测定粒度和多分散性。

[0607] 在注射之前,将LNP稀释至0.05mg/mL。经由侧尾静脉对Balb/c小鼠(n=4)施用0.5mg/kg(总mRNA)的剂量(使用10mL/kg的体积剂量)。在处理4小时后,用氯胺酮/甲苯噻嗪对动物实施安乐死。将末梢血收集到EDTA钠微量采集管中,并在16000xg和16°C下离心5分钟以分离血浆。将肝脏切片收集到FastPrep管中并储存于-80°C下直至分析。

[0608] 为了评估效力,将肝脏在1x细胞培养裂解试剂(CCLR)缓冲液中均化,然后使用荧光素酶测定法(Promega)分析荧光素酶活性。如表42所见,当从组合物中去除磷脂时,对效力没有不利影响。

[0609] 表42. 基础组合物对比不含PL的mLuc-LNP静脉内施用后6h肝脏中的荧光素酶基因表达

处理	荧光素酶活性 (ng/g 肝脏)	标准偏差 (ng/g)
1.1:55 (“基础”)	849	33
1.6:55 (“基础”)	1092	42
1.1:57 (“不含 PL”)	991	27
1.7:57 (“不含 PL”)	846	22
1.8:61 (“不含 PL”)	1156	65

[0611] 为了评估对免疫刺激的影响,稀释血浆样品(1:8)并通过ELISA(得自BD Biosciences的ELISA测定以及捕获和检测抗体)分析细胞因子(MCP-1和IL-6)。表43表明,当去除磷脂时,两种“基础”制剂的细胞因子产生显著减少。对1.1:55基础的影响尤其明显。

[0612] 表43. 基础组合物对比不含PL的mLuc-LNP的MCP-1和IL-6ELISA结果

处理	MCP-1		IL-6	
	平均值 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)	平均值 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)
PBS	28	7	14	5
1.1:55 (“基础”)	8022	3166	566	177
1.6:55 (“基础”)	2293	293	136	23
1.1:57 (“不含 PL”)	1434	657	41	29
1.7:57 (“不含 PL”)	705	144	28	6
1.8:61 (“不含 PL”)	540	82	23	6

[0614] 总之,这些结果表明,与含PL的制剂相比,使用不含PL的制剂导致制剂的免疫刺激减少。鉴于功效似乎没有受到影响,这应当导致mRNA-LNP的治疗指数的增加。

[0615] 实施例18去除磷脂减少了含有mRNA的LNP的免疫刺激而不影响效力

[0616] 用两种不同mRNA转录物mLuc(表44a)和mEPO(表44b)配制的组合物的子集进一步证实了实施例17中的结果。所用的转录物编码荧光素酶(报告基因)或促红细胞生成素(控制红血球生成或红细胞产生的激素)。

[0617] 表44a. 1.6:55基础制剂对比不含PL的mLuc-LNP的制剂特征

	脂质组成(摩尔%)				表征		
	PEG-2000-C-DMA	化合物 13	胆固醇	DSPC	大小 (nm)	PDI	包封 %
[0618] 1.6:55 (“基础”)	1.6	55	33	11	77	0.10	95
1.7:57 (“不含 PL”)	1.7	57	42	0	80	0.06	93
1.8:61 (“不含 PL”)	1.8	61	37	0	90	0.06	91

[0619] 表44b. 1.6:55基础制剂对比不含PL的mEPO-LNP的制剂特征

	脂质组成(摩尔%)				表征		
	PEG-2000-C-DMA	化合物 13	胆固醇	DSPC	大小 (nm)	PDI	包封 %
[0620] 1.6:55 (“基础”)	1.6	55	33	11	76	0.10	95
1.7:57 (“不含 PL”)	1.7	57	42	0	78	0.09	95
1.8:61 (“不含 PL”)	1.8	61	37	0	82	0.02	93

[0621] 如实施例17中所述制备了mRNA-LNP。雌性Ba1b/C (n=4) 接受了0.5mg/kg (mRNA) 静脉内剂量的LNP。六小时后,用氯胺酮/甲苯噻嗪对动物实施安乐死。取少量(75 μ L)末梢血收集到含有18.8 μ L50mg/L的肝素的管中,而将剩余的血液收集到EDTA钠微量采集管中。将所有这些管在16000xg和16 $^{\circ}$ C下离心5分钟并分离血浆。另外,将部分肝脏收集到FastPrep管中,将该管置于-80 $^{\circ}$ C下直至分析。

[0622] 将肝脏在1xCLLR缓冲液中均化,并使用荧光素酶测定法(Promega)分析荧光素酶活性。如从表45中可以看出,不含PL的mRNA-LNP制剂的功效类似于基础(含PL)制剂的功效。

[0623] 表45. 基础组合物对比不含PL的mLuc-LNP静脉内施用后6h肝脏中的荧光素酶基因表达

处理	荧光素酶活性 (ng/g 肝脏)	标准偏差 (ng/g 肝脏)
[0624] 1.6:55 (“基础”)	1708	73
1.7:57 (“不含 PL”)	1651	70
1.8:61 (“不含 PL”)	1867	62

[0625] 将肝素血浆(用ELISA稀释剂以1:4000稀释)用于标准鼠EPO ELISA分析(R&D Systems)。如表46所见,mEPO-LNP的功效趋势类似于用mLuc-LNP观察到的功效趋势,其中不含PL的Luc mRNA-LNP的功效类似于基础(含PL)制剂的功效。

[0626] 表46. 基础组合物对比不含PL的mEPO-LNP静脉内施用后6小时肝脏中鼠mEPO-LNP的功效

[0627]

处理	mEPO (ng/mL)	标准偏差 (ng/mL)
PBS	0.124	0.009
1.6:55 (“基础”)	2839	313
1.7:57 (“不含PL”)	2460	611
1.8:61 (“不含PL”)	3986	426

[0628] 为了评估免疫刺激,通过ELISA分析血浆样品中的细胞因子MCP-1和IL-6(得自BD Biosciences的ELISA测定以及捕获/检测抗体)。表47a(mEPO)和表47b(mLuc)中的结果再次显示了,与基础组合物相比,对不含PL的LNP组合物的炎症反应如何显著降低。对于两组LNP(荧光素酶和EPO)都是如此。鉴于这些不含PL的组合物的功效未受影响,其降低的细胞因子诱导将提供显著改善的治疗指数。

[0629] 表47a. 基础组合物对比不含PL的mEPO-LNP的MCP-1和IL-6 ELISA结果

处理	MCP-1		IL-6	
	平均值 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)	平均值 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)
[0630] PBS	47	3	15	3
1.6:55 (“基础”)	3947	440	236	29
1.7:57 (“不含PL”)	873	431	39	14
1.8:61 (“不含PL”)	851	110	43	17

[0631] 表47b. 基础组合物对比不含PL的mLuc-LNP的MCP-1和IL-6 ELISA结果

处理	MCP-1		IL-6	
	平均值 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)	平均值 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)
[0632] PBS	47	5	14	3
1.6:55 (“基础”)	2474	446	208	31
1.7:57 (“不含PL”)	1231	687	27	6
1.8:61 (“不含PL”)	856	745	30	8

[0633] 实施例19具有增加的PEG含量的不含PL的LNP刺激性较小该实施例展示了可如何通过增加不含PL的mRNA-LNP的PEG组分来实现mRNA-LNP免疫刺激的进一步减小,同样不影响活性。如实施例17中所述制备了以下具有EPO mRNA有效负载的mRNA-LNP组合物(表48):

[0634] 表48. 1.6:55基础制剂对比不含PL的mRNA-LNP的制剂特征

[0635]	脂质组成(摩尔%)				表征		
	PEG-2000-C-DMA	化合物 13	胆固	DSPC	大小 (nm)	PDI	封装

			醇				%	
[0636]	1.6:55 (“基础”)	1.6	55	33	11	73	0.07	97
	1.8:61 (“不含PL”)	1.8	61	37	0	86	0.06	96
	3.3:55 (“不含PL”)	3.3	55	41	0	59	0.06	96

[0637] 然后雌性Ba1b/C (n=4) 接受了0.5mg/kg (mRNA) 静脉内施用的LNP。六小时后,用氯胺酮/甲苯噻嗪对动物实施安乐死。将血液收集到EDTA钠微量采集管中。将所有这些管在16000xg和16°C下离心5分钟并分离血浆。通过ELISA分析血浆样品中的细胞因子MCP-1和IL-6(得自BD Biosciences的ELISA测定以及捕获/检测抗体)。表49中的结果再次显示了,与基础组合物相比,对不含PL的LNP组合物的炎症反应如何显著降低。鉴于这些不含PL的组合物的功效未受影响,其降低的细胞因子诱导将提供显著改善的治疗指数。

[0638] 表49. 基础组合物对比高PEG、不含PL的mEPO-LNP的MCP-1和IL-6 ELISA结果

处理	MCP-1		IL-6	
	平均值 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)	平均值 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)
[0639] PBS	57	4	15	3
1.6:55 (“基础”)	2875	2317	244	112
1.8:61 (“不含PL”)	1204	460	77	22
3.3:55 (“不含PL”)	712	186	37	11

[0640] 这些结果表明,通过在不含PL的制剂(3.3:55化合物13,不含PL的mRNA-LNP)内将PEG脂质的量增加至3.3摩尔%,可进一步减小mRNA-LNP的免疫刺激。接下来检查了3.3:55组合物的效力。

[0641] 实施例20高PEG、不含PL的mRNA-LNP保持惊人的效力,并且表现出较大的治疗指数

[0642] 该实施例展示了高PEG、不含PL的3.3:55 mRNA-LNP组合物与含有PL的基础组合物一样有效。其再次显示3.3:55组合物的免疫刺激减小,因此实现改善的治疗指数。使用实施例17(表50)中描述的方法制备了以下具有EPO有效负载的LNP:

[0643] 表50. 1.6:55基础制剂对比高PEG、不含PL的mEPO-LNP的制剂特征

	脂质组成(摩尔%)				表征		
	PEG-2000-C -DMA	化合物 13	胆固醇	DSPC	大小 (nm)	PDI	包封 %
[0644] 1.6:55 (“基础”)	1.6	55	33	11	74	0.07	97
3.3:55 (“不含PL”)	3.3	55	41	0	63	0.06	96

[0645] 然后雌性Ba1b/C (n=4) 接受了0.5mg/kg (mRNA) 静脉内施用的LNP。六小时后,用氯胺酮/甲苯噻嗪对动物实施安乐死。在2h、3h、4h和5h的时间点抽血,并取20μL血液收集到含有5μL 50mg/L的肝素的管中。然后在6小时时间点,用致死剂量的氯胺酮/甲苯噻嗪对动物

实施安乐死。取少量 (20 μ L) 末梢血收集到含有5 μ L 50mg/L的肝素的管中,而将剩余的血液收集到EDTA钠微量采集管中。将管在16000xg和16 $^{\circ}$ C下离心5分钟以分离血浆。

[0646] 通过ELISA (得自R&D Systems的试剂盒) 分析肝素血浆的EPO浓度。如表51所见,在所有时间点,含有PL的mRNA-LNP和3.3:55不含PL的制剂的功效是等同的。

[0647] 表51. 基础组合物对比高PEG、不含PL的mEPO-LNP静脉内施用后6h肝脏中鼠mEPO-LNP的功效

[0648]	时间点 (h)	1.6:55 (“基础”)		3.3:55 (“不含 PL”)	
		EPO (ng/mL)	标准偏差 (ng/mL)	EPO (ng/mL)	标准偏差 (ng/mL)
	2	5065	773	4832	843
	3	6174	514	6412	1188
	4	5194	485	5902	1093
	5	3961	643	4313	768
[0649]	6	2936	528	3055	521

[0650] 通过ELISA分析血浆样品中的细胞因子MCP-1和IL-6 (得自BD Biosciences的ELISA测定以及捕获/检测抗体)。表52中的结果证实了实施例19中的数据,并且再次显示了,与基础组合物相比,对高PEG、不含PL的LNP组合物的炎症反应如何显著降低。

[0651] 表52. 基础组合物对比高PEG、不含PL的mEPO-LNP的MCP-1和IL-6 ELISA结果

[0652]	处理	MCP-1		IL-6	
		平均值 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)	平均值 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)
	PBS	67	3	22	4
	1.6:55 (“基础”)	2402	1317	163	74
	3.3:55 (“不含 PL”)	485	210	36	12

[0653] 总之,这些结果表明,通过使用不含PL的制剂,可以增加mRNA-LNP制剂的治疗指数,并且进一步通过改变制剂以包含更高的PEG量 (例如,3.3摩尔%),治疗指数可进一步提高。

[0654] 实施例21经HPLC纯化的mRNA用于消除mRNA-LNP的免疫刺激的用途

[0655] 该实施例展示了如何通过LNP中用经反相 (RP) HPLC纯化的mRNA替换经常规二氧化硅膜纯化的mRNA来实现mRNA-LNP免疫刺激的减小。将通过任一方法纯化的鼠促红细胞生成素 (EPO) mRNA配制在LNP中,并经由静脉内途径注射到Ba1b/C小鼠中。注射四小时后,处死动物并分析血浆和肝脏组织的功效和免疫刺激。

[0656] LNP通过常规LipoMixer技术制备。简而言之,制备了包含以下摩尔比 (摩尔%) 的脂质DSPC:Chol:PEG₂₀₀₀-C-DMA:化合物13的溶于100%乙醇中的7.36mg/mL脂质溶液:10.9:32.8:1.64:54.6。将mRNA有效负载以0.366mg/mL的浓度溶解于40mM EDTA (pH 4.5) 中。使用Jeffs等人描述的直接稀释法,通过T形连接器以250mL/min共混等体积的各种溶液 (1.6mL)。随后将所得混合物直接收集到含有约4倍体积 (5.9mL) 的PBS (pH 7.4) 的管中。将

这些制剂置于Slide-A-Lyzer透析单元(MWCO 10,000)中,并用100倍体积的PBS(pH 7.4)透析过夜。透析后,使用VivaSpin浓缩器单元(MWCO 100,000)将制剂浓缩为约0.6mg/mL。

[0657] 雌性Balb/C小鼠(n=5)接受静脉内(尾静脉)施用PBS或者携带经常规方式纯化的(二氧化硅膜)或经HPLC纯化的mRNA有效负载的LNP.mRNA转录物编码小鼠促红细胞生成素(EPO)。每只动物接受对应于0.5mg/kg mRNA的剂量。注射后四小时,用致死剂量的氯胺酮/甲苯噻嗪对动物实施安乐死。取少量(20 μ L)末梢血收集到含有5 μ L50mg/L的肝素的管中,而将剩余的血液收集到EDTA钠微量采集管中。将所有管在16000xg和16 $^{\circ}$ C下离心5分钟以分离血浆。将左侧叶的一半收集到1.5mL RNALater中并在4 $^{\circ}$ C下储存至少16h。

[0658] 将肝素血浆(用ELISA稀释剂以1:4000稀释)用于标准鼠EPO ELISA分析(得自R&D Systems的试剂盒)。从表53中可以看出,含有高度(HPLC)纯化的EPO mRNA的LNP的功效与经常规方式(二氧化硅膜)纯化的EPO mRNA非常相似。在用PBS处理的小鼠血浆中观察到的EPO的常规水平为100–200pg/mL。因此,无论掺入的EPO mRNA的纯度如何,来自包封的mEPO的EPO的肝脏基因表达水平都非常高。

[0659] 为了确定由mRNA-LNP引起的免疫刺激水平,测定经LNP处理的动物(相较于经PBS处理的动物)的肝脏内IFIT mRNA的倍数增加。这是本领域工作人员可用于评估由mRNA-LNP引起的免疫刺激水平的测定法的一个实例。在某些实施方案中,经HPLC纯化的mRNA-LNP比对照诱导显著更少的免疫刺激,在某些实施方案中,这通过IFIT应答来表征。IFN诱导型IFIT1 mRNA(响应于I型IFN的最强诱导的mRNA)被用作免疫刺激的更灵敏的量度。即使在不存在可检测的血浆IFN蛋白的情况下,在用携带核酸的LNP处理过的小鼠中也可观察到肝脏和脾脏中的强IFIT1 mRNA诱导。这可能反映了局部IFN诱导,其不表现为全身性细胞因子应答。在IFIT1测定中,对肝细胞中IFIT1 mRNA的量定量并将其归一化为管家基因(通常为GAPD)的mRNA水平,该mRNA水平通常保持恒定。使用得自Affymetrix的QuantiGene 2.0试剂盒(基于分支DNA的测定法)测定两种基因的mRNA水平。

[0660] 将约20–25mg的肝脏的左侧叶(储存在RNALater中)均化。使用QuantiGene 2.0测定法测定IFIT和管家基因GAPD的相对mRNA水平。对于每组动物,将IFIT读数归一化为GAPD,并表示为相较于PBS对照组的倍数增加。表54中的结果表明,与PBS组相比,携带通过二氧化硅膜纯化的mRNA有效负载的LNP产生了627倍的IFIT增加。用携带经HPLC纯化的有效负载的LNP处理过的小鼠相对于PBS仅显示出21倍的增加。因此其刺激性比携带经二氧化硅膜纯化的mRNA的颗粒约小30倍。在某些实施方案中,具有经HPLC纯化的mRNA的脂质纳米颗粒制剂的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水的参考IFIT应答的30倍。在某些实施方案中,具有经HPLC纯化的mRNA的脂质纳米颗粒制剂的IFIT应答不超过磷酸盐缓冲盐水的参考IFIT应答的10倍或20倍或30倍或40倍或50倍或60倍或70倍或80倍或90倍或100倍。

[0661] 通过在细胞因子(MCP-1和IL-6)ELISA测定法中分析EDTA血浆提供了对免疫刺激能力的进一步比较。将血浆稀释(1:8或1:80)在ELISA稀释剂中,并使用得自BD Biosciences的ELISA测定法以及捕获和检测抗体分析了MCP-1和IL-6的存在水平。通过掺入经HPLC纯化的mRNA,MCP-1的水平显著降低(37106pg/mL降至105pg/mL)。类似地,当使用经HPLC纯化的mRNA时,另一种细胞因子(IL-6)也显著降低(4805pg/mL降至22pg/mL)。结果示于表55中。

[0662] 总之,这些结果表明,携带经HPLC纯化的mRNA有效负载的LNP颗粒的刺激性比具有

不够精制的(例如,经常规二氧化硅膜纯化的)mRNA有效负载的LNP颗粒显著更小。鉴于功效未受到不利影响,这代表mRNA-LNP的治疗指数的显著增加。

[0663] 表53.含有经常规二氧化硅膜纯化或经HPLC纯化的鼠mEPO的0.5mg/kg 1.6:55化合物13在Ba1b/C小鼠(n=5)中静脉内给药后4小时的EPO功效

处理	EPO (ng/mL)	标准偏差(ng/mL)
[0664] 具有经常规方式纯化的鼠mEPO的1.6:55 (“基础”)	4050	450
具有经HPLC纯化的鼠mEPO的1.6:55 (“基础”)	4525	385

[0665] 表54.含有经常规二氧化硅膜纯化或经HPLC纯化的鼠mEPO的0.5mg/kg 1.6:55化合物13在Ba1b/C小鼠(n=5)中静脉内给药后4小时的IFIT诱导

处理	IFIT (相较于 PBS 的倍数增加)	
	平均值	标准偏差
[0666] PBS	1.0	0.3
具有经常规方式纯化的鼠mEPO的1.6:55 (“基础”)	627	52
具有经HPLC纯化的鼠mEPO的1.6:55 (“基础”)	21	12

[0667] 表55.含有经常规二氧化硅膜纯化或经HPLC纯化的鼠mEPO的0.5mg/kg 1.6:55化合物13在Ba1b/C小鼠(n=5)中静脉内给药后4小时MCP-1和IL-6 ELISA结果

处理	MCP-1		IL-6	
	平均值 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)	平均值 (pg/mL)	标准偏差 (pg/mL)
[0668] PBS	56	3	17	2
[0669] 具有经常规方式纯化的鼠mEPO的1.6:55 (“基础”)	37106	12621	4805	1075
具有经HPLC纯化的鼠mEPO的1.6:55 (“基础”)	105	18	22	6

[0670] 本文引用的所有文献均以引用方式并入。虽然描述了本发明的某些实施方案,并且已出于说明的目的阐述了许多细节,但在不脱离本发明的基本原理的情况下可改变某些细节。

[0671] 除非本文另外指明或明显与上下文矛盾,否则在描述本发明的实施方案的上下文中使用的术语“一个”、“一种”、“该”和“所述”以及类似的术语应理解为涵盖单数和复数形式两者。除非另有说明,否则术语“包括”、“具有”、“包含”和“含有”应被理解为开放式术语(即,意味着“包括但不限于”)。除非本文另外指明,否则本文对值的范围的列举仅旨在充当单独指出落在该范围内的每个独立值的一种简便方法,并且每个独立值就像在本文中单独

列举那样包括在说明书中。除非本文另外指明或者明显与上下文矛盾,否则除了本文详述的顺序之外,本文所述方法都可以按照任何合适的顺序进行。除非权利要求中另外明确列举,否则本文提供的任何和全部实例或示例性语言(如,“例如”)的使用只是为了更好地阐明本发明的实施方案,而不一定对本发明的范围施加限制。说明书中的语言都不应被解释为表示任何未要求保护的要素是实施本发明所必需的。