(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119562806 A
(43)申请公布日 2025.03.04

(21)申请号 202380049309.7
(22)申请日 2023.05.25
(30)优先权数据
63/345,823 2022.05.25 US
63/346,197 2022.05.26 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.12.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/067517 2023.05.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/230587 EN 2023.11.30
(71)申请人 阿卡格拉医药公司
地址 美国
(72)发明人 达赖尔·C·德拉蒙德
德米特里·B·基尔波京
马克·E·海斯
亚历山大·科什卡里耶夫
罗斯·B·富尔顿
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张福誉 陈九洲
(51)Int.Cl.
A61K 9/51(2006.01)
A61K 9/14(2006.01)
A61K 9/16(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)

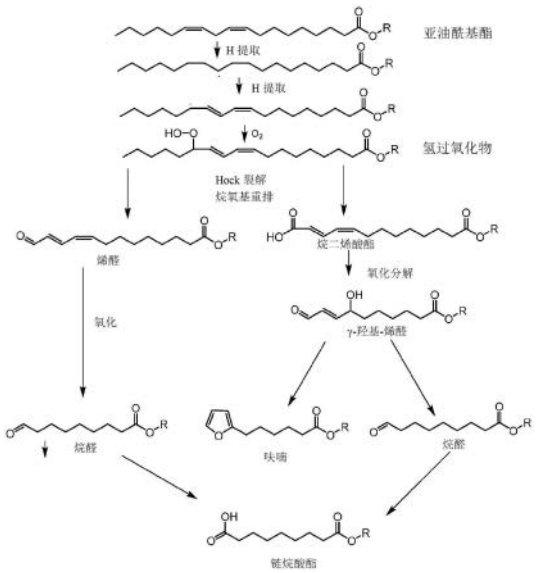
权利要求书5页 说明书169页
序列表（电子公布） 附图42页

(54)发明名称

用于递送核酸的脂质纳米粒及其使用方法

(57)摘要

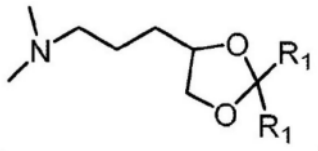
本公开内容提供了用于将治疗性核酸递送至细胞的改进的可电离脂质纳米粒的组合物。阴离子磷脂(包括磷脂酰丝氨酸和磷脂酰甘油)包含在所述脂质纳米粒中以提高在人树突细胞中的转染效率。与同一家族中的其他可电离脂质相比,在制剂中二甲基氨基丙基-二氧戊环或杂环缩酮可电离脂质中单不饱和烷基链类似物的进一步并入显示出在人树突细胞中高水平的转染,并且显示出对氧化损伤的良好稳定性。最后,使用磷脂酰丝氨酸的铵盐允许有效产生PS靶向的LNP。



CN 119562806 A

1.脂质纳米粒(LNP)疫苗组合物,其包含:

a.核酸;

b.相对于所述核酸的N/P比为3至8的可电离阳离子脂质,其中该可电离脂质具有化学结构:  其中R_1是包含一个或两个烯烃的C_{15}-C_{19}的烷基,并且,

其中所述可电离阳离子脂质以总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%存在于所述LNP疫苗组合物中,并且所述可电离阳离子脂质任选地选自组:DLin-KC3-DMA,KC3-01,KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(8:1),KC3-C15(C8:1)化合物3(表1A)、化合物8(表1A);

c.甾醇,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的25至45mol%;

d.一种或更多种磷脂,其磷脂总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%;以及

e.缀合的脂质,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%。

2.权利要求1所述的组合物,其中所述一种或更多种磷脂包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的磷脂酰丝氨酸(PS)脂质。

3.权利要求2所述的组合物,其中所述PS-脂质是DSPS或DPPS。

4.权利要求1所述的组合物,其中第二磷脂选自:DSPC、HSPC、DPPC和鞘磷脂。

5.权利要求1所述的LNP疫苗组合物,其中所述可电离阳离子脂质包含单不饱和烷基链或双不饱和烷基链,其中所述烯烃被至少两个亚甲基隔开。

6.权利要求1所述的组合物,其中所述可电离阳离子脂质选自:KC3-01,KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(8:1),KC3-C15(C8:1)和化合物8(表1A)。

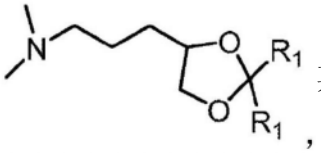
7.权利要求1至6中任一项所述的组合物,其相对于所述核酸的N/P比为5至6。

8.权利要求7所述的组合物,其中所述核酸是RNA。

9.权利要求8所述的组合物,其中所述核酸是mRNA,任选地是经化学修饰的RNA,并且还任选地是用N-甲基假尿苷修饰的。

10.脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:

a.核酸;

b.相对于所述核酸的N/P比为3至8的可电离阳离子脂质,其中该可电离脂质具有化学结构:  其中R_1是包含一个或两个烯烃的C_{15}-C_{19}的烷基,并且,

其中所述可电离阳离子脂质以总量为所述LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%存在于所述LNP组合物中,并且所述可电离阳离子脂质任选地选自组:化合物3(表1A)、化合物8(表1A)、DLin-KC3-DMA,KC3-01,KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(8:1),和KC3-C15(C8:1);

c.甾醇,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的25至45mol%;

d.一种或更多种磷脂,其磷脂总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%;并且包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸(DPPS)脂质;以及

e.缀合的脂质,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%。

11.权利要求10所述的组合物,其中第二磷脂选自:DSPC、HSPC和鞘磷脂。

12.权利要求10至11中任一项所述的组合物,其中所述可电离阳离子脂质相对于所述核酸的N/P比为5至6。

13.权利要求12所述的LNP组合物,其中所述可电离阳离子脂质包含两个单不饱和烷基链或两个双不饱和烷基链,并且其中所述烯烃被至少两个亚甲基隔开。

14.权利要求13所述的LNP组合物,其中所述可电离阳离子脂质选自组:KC3-01,KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(8:1),KC3-C15(C8:1)和化合物8(表1A)。

15.权利要求14所述的组合物,其中所述可电离阳离子脂质是3-((S)-2,2-二((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(KC3-OA)。

16.权利要求10至15中任一项所述的组合物,其中所述核酸是mRNA。

17.权利要求16所述的组合物,其中所述mRNA用N-甲基假尿苷化学修饰。

18.核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:

a.核酸;

b.相对于所述核酸的N/P比为3至8的可电离阳离子脂质,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%;

c.甾醇,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的25至45mol%;

d.一种或更多种磷脂,其磷脂总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%;以及

e.缀合的脂质,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%,所述缀合的脂质包含PEG-脂质,所述PEG-脂质具有末端连接至接头部分的聚(乙二醇)链和末端连接至同一接头部分的两个烃链,其中所述烃链是独立地选自正十二烷基(月桂基)和正十二烷酰基(月桂酰基)的饱和C_{12}链。

19.权利要求18所述的组合物,其中所述接头部分是甘油基、N-氧基羰基甘油磷酰基乙醇氨基羰基、氧基羰基酰胺基或氧基乙酰胺基。

20.权利要求19所述的组合物,其中所述聚(乙二醇)链是平均分子量为2000的甲氧基-聚(乙二醇)。

21.权利要求20所述的组合物,其中所述PEG-脂质是mPEG-1,2-二月桂酰基甘油(PEG-DLG)、mPEG-1,2-二月桂基甘油(PEG-DLG)、PEG-1,2-二月桂基甘油、PEG-DLPE、PEG-氧基羰基-N,N-双十二烷基酰胺或mPEG-N,N-双十二烷基乙酰胺。

22.权利要求18至21中任一项所述的组合物,其中所述LNP的z-平均颗粒尺寸为60至150nm,并且是冻融稳定的。

23.权利要求18至22中任一项所述的组合物,其中一种或更多种磷脂包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的磷脂酰丝氨酸(PS)脂质,并且其中所述LNP组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的磷脂酰丝氨酸(PS)脂质。

24.核酸脂质纳米粒(LNP)人疫苗组合物,其包含:

a.核酸;

b.以相对于所述核酸的N/P比为3至8的可电离阳离子脂质,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%;

c.甾醇,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的25至45mol%;

d.一种或更多种磷脂,其磷脂总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%,并且

包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的1.0至10mol％的磷脂酰甘油(PG);以及

e.缀合的脂质,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol％。

25.权利要求24所述的组合物,其中所述可电离阳离子脂质选自:KC3-01,KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(8:1),KC3-C15(C8:1)和化合物8(表1A)。

26.权利要求24所述的组合物,其中:

a.所述甾醇是胆固醇;并且

b.所述磷脂酰甘油(PG)是选自二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)和二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)的阴离子磷脂。

27.权利要求24所述的组合物,其中所述核酸是mRNA,并且所述可电离阳离子脂质以相对于所述核酸的N/P比为4至7存在。

28.权利要求24所述的组合物,其中所述缀合的脂质选自PEG-DMG、PEG-DLG和PEG-DLPE。

29.权利要求26所述的组合物,其中所述一种或更多种磷脂包含选自二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)和氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)的磷脂。

30.制备包含脂质的核酸递送组合物的方法,其中所述脂质包含磷脂酰丝氨酸,所述方法包括将所述磷脂酰丝氨酸溶解在乙醇中的步骤,其中所述磷脂酰丝氨酸为所述磷脂酰丝氨酸的铵盐的形式。

31.权利要求30所述的方法,其中所述磷脂酰丝氨酸是DPPS。

32.权利要求30至31中任一项所述的方法,其中将所述磷脂酰丝氨酸溶解在乙醇中至浓度超过0.2mM。

33.权利要求30至32中任一项所述的方法,其中所述铵盐是包含选自以下的铵的盐:铵、烷基铵、二烷基铵、三烷基铵和四烷基铵。

34.权利要求30至32中任一项所述的方法,其中所述铵选自铵形式,所述铵形式选自:氨、二甲胺、二乙胺、三乙胺、三甲胺、2-(二甲基氨基)乙醇、二乙醇胺、2-(二乙基氨基)乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-甲基-葡糖胺、咪唑、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、4-(2-羟乙基)-吗啉、哌嗪、1-(2-羟乙基)-吡咯烷、三乙醇胺或氨丁三醇(三(羟甲基)氨基甲烷)。

35.权利要求30至32中任一项所述的方法,其中所述核酸递送组合物是权利要求1至29中任一项所述的组合物。

36.用于将核酸递送至细胞中的方法,其包括以下步骤:使所述脂质纳米粒(LNP)与所述细胞接触,其中所述细胞是人树突细胞,其中所述LNP组合物通过包括一个或更多个权利要求30至34中任一项所述步骤的方法获得。

37.权利要求36所述的方法,其中所述LNP包含权利要求1至29中任一项所述的可电离阳离子脂质。

38.权利要求36或37中任一项所述的方法,其中所述细胞处于人或动物对象中。

39.权利要求38所述的方法,其中所述LNP肌内、皮下、皮内或表面施用于所述对象。

40.LNP组合物,其包含:

a.核酸,其中所述核酸是mRNA;

b.胆固醇甾醇,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的25至40mol％;

c.相对于所述核酸的N/P比为3至8的可电离阳离子脂质,其总量为所述LNP组合物中总

脂质含量的40至65mol％；

d.一种或更多种磷脂,其磷脂总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol％,所述一种或更多种磷脂选自：

i.二棕榈酰基磷脂酰-L-丝氨酸((L-丝氨酸)DPPS)脂质的铵盐,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol％;以及

ii.二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)磷脂,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol％;以及

e.含PEG的缀合的脂质,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol％。

41.用于向有此需要的对象施用核酸的方法,其包括向人对象施用核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,所述核酸LNP组合物包含：

a.核酸；

b.相对于所述核酸的N/P比为3至8的可电离阳离子脂质,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的40至65mol％；

c.甾醇,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的25至45mol％；

d.一种或更多种磷脂,其磷脂总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol％,并且包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的1.0至10mol％的磷脂酰甘油(PG);以及

e.缀合的脂质,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol％。

42.核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含：

a.核酸；

b.相对于所述核酸的N/P比为3至8的可电离阳离子脂质,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的40至65mol％；

c.甾醇,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的25至45mol％；

d.一种或更多种磷脂,其磷脂总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol％,并且包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol％的磷脂酰丝氨酸(PS)脂质;以及

e.缀合的脂质,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol％。

43.权利要求42所述的组合物,其中：

a.所述核酸是mRNA

b.所述可电离阳离子脂质以相对于所述核酸的N/P比为4至7存在于所述LNP组合物中；

c.所述甾醇是胆固醇;并且

d.所述缀合的脂质是含PEG的缀合的脂质。

44.权利要求43所述的组合物,其中所述一种或更多种磷脂包含至少两种具有错配的酰基链长度的磷脂。

45.权利要求44所述的组合物,其中所述磷脂酰丝氨酸(PS)脂质是二棕榈酰基磷脂酰-L-丝氨酸((L-丝氨酸)DPPS)。

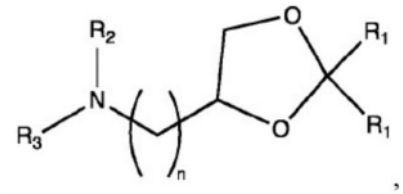
46.权利要求45所述的组合物,其中所述一种或更多种磷脂包含选自二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)和氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)的磷脂。

47.权利要求46所述的组合物,其中所述一种或更多种磷脂由二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)和二棕榈酰基磷脂酰-L-丝氨酸((L-丝氨酸)DPPS)组成。

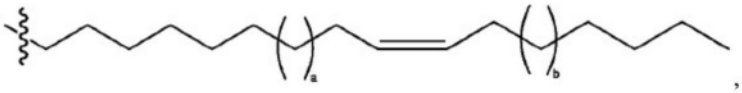
48.权利要求47所述的组合物,其中所述含PEG的缀合的脂质是PEG(2000)-二肉豆蔻酰

基甘油(PEG-DMG)。

49.LNP组合物,其中可电离脂质具有以下化学结构:



其中R_1是



其中a是0或1;b是1、2、3或4,前提是a+b之和是1、2、3或4;

R_2和R_3各自独立地是任选地经羟基取代的(C_1-C_4)烷基;并且

n是等于2、3或4的整数。

50.权利要求49所述的组合物,其中:

a.R_2和R_3各自是甲基;并且

b.n是3或4。

51.权利要求49中任一项所述的组合物,其中该可电离阳离子脂质是一种或更多种选自以下的化合物:KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(8:1),和KC3-C15(C8:1)。

52.权利要求49至51中任一项所述的组合物,其中该可电离阳离子脂质是KC3-PA。

53.权利要求49至51中任一项所述的组合物,其中该可电离阳离子脂质是KC3-OA。

54.权利要求49至51中任一项所述的组合物,其中该可电离阳离子脂质是KC3-C17(C8:1)。

55.可电离阳离子脂质,其选自KC3-PA,KC3-C17(8:1),和KC3-C15(C8:1)。

用于递送核酸的脂质纳米粒及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本专利申请要求于2022年5月25日提交的美国临时专利申请No.63/345,823、于2022年5月26日提交的美国临时专利申请No.63/346,197和于2023年5月25日提交的美国实用新型专利申请No.18/324,097的权益和优先权,其各自的全部内容在此通过引用以其整体并入本文。

[0003] 序列表的引用

[0004] 本说明书包括随同提交的序列表,其包括创建于2023年5月24日的标题为191016-010503.xml的具有以下大小的文件:17,585字节,其内容通过引用并入本文。

技术领域

[0005] 本公开内容涉及阳离子可电离脂质和脂质纳米粒(lipid nanoparticle,LNP)。在一些实施方案中,包含一种或更多种阳离子可电离脂质的LNP可用于核酸化合物的递送、用于树突细胞靶向或使用这些LNP组合物作为疫苗的方法。在一些实施方案中,LNP可包含生物可还原的可电离阳离子脂质或未缀合的聚烯烃可电离阳离子脂质。

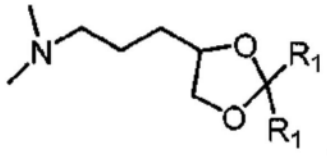
背景技术

[0006] 脂质纳米粒(LNP)用于将治疗性核酸递送至细胞。例如,LNP药物组合物被用于疫苗中以递送mRNA治疗剂。LNP制剂通常包含可电离阳离子脂质(ionizable cationic lipid,ICL)。然而,本领域中已知某些ICL化合物在储存期间对氧化不期望地敏感。因此,需要改善的ICL化合物,其在储存时对氧化降解具有改善的稳定性,同时当与治疗剂例如核酸一起并入LNP中时还在细胞中提供期望的转染活性或效力。

[0007] LNP组合物,包括稳定的核酸脂质颗粒(stable nucleic acid lipid particle,SNALP)组合物,可用于递送用于多种感染性疾病的核酸治疗剂。感染性疾病例如结核病、HIV/AIDS、疟疾和COVID-19表现出对人健康的重大挑战。例如,分枝杆菌(Mycobacteria)是引起结核病(tuberculosis,TB)的细菌属。根据世界卫生组织(World Health Organization),在全世界,TB是前10死亡原因之一和由于单一感染原死亡的主要原因。尽管目前尽了最大努力,但在开发用于预防许多感染性疾病的有效疫苗方面仍存在重大挑战。鉴定单独抗原肽或抗原肽组合的新的努力有助于改善疫苗的效率。尽管如此,在改造佐剂以帮助有效地将这些抗原序列递送和呈递至专业抗原呈递细胞如树突细胞方面仍然有重要机会。与可电离阳离子脂质纳米粒组合的编码抗原肽或抗原蛋白的mRNA代表了疫苗开发中特别有前景的策略。需要安全且有效的治疗剂,其包含用于递送用于治疗和预防多种疾病的mRNA的LNP药物组合物,包括疫苗组合物。

发明内容

[0008] 本公开内容的一些方面涉及脂质纳米粒(LNP)疫苗组合物,其包含:(a)核酸;(b)相对于核酸的N/P比为3至8的可电离阳离子脂质,其中该可电离脂质具有以下化学结构:

[0009] 

[0010] 其中R_1是包含一个或两个烯烃的C_{15}-C_{19}的烷基,并且其中可电离阳离子脂质以LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%的总量存在于LNP疫苗组合物中,并且可电离阳离子脂质任选地选自以下组:DLin-KC3-DMA,KC3-01,KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(8:1),KC3-C15(C8:1)化合物3(表1A)、化合物8(表1A);(c)甾醇,其总量为LNP组合物中总脂质含量的25至45mol%;(d)一种或更多种磷脂,其磷脂总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%;以及(e)缀合的脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%。

[0011] 在一些实施方案中,一种或更多种磷脂包含总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的磷脂酰丝氨酸(PS)脂质。在一些实施方案中,PS-脂质是DSPS或DPPS。

[0012] 在一些实施方案中,第二磷脂选自:DSPC、HSPC、DPPC和鞘磷脂。

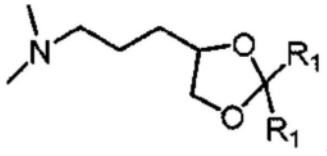
[0013] 在一些实施方案中,可电离阳离子脂质包含单不饱和烷基链或双不饱和烷基链,其中烯烃被至少两个亚甲基隔开。

[0014] 在一些实施方案中,可电离阳离子脂质选自:KC3-01,KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(8:1),KC3-C15(C8:1)和化合物8(表1A)。

[0015] 在一些实施方案中,组合物其相对于核酸的N/P比为5至6。

[0016] 在一些实施方案中,核酸是RNA。在一些实施方案中,核酸是mRNA。在一些实施方案中,核酸是经化学修饰的RNA。在一些实施方案中,核酸用N-甲基假尿苷修饰。

[0017] 本公开内容的另一些方面涉及脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:(a)核酸;(b)相对于核酸的N/P比为3至8的可电离阳离子脂质,其中可电离脂质具有以下化学结构:

[0018] 

[0019] 其中R_1是包含一个或两个烯烃的C_{15}-C_{19}的烷基,并且其中可电离阳离子脂质以LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%的总量存在于LNP组合物中,并且可电离阳离子脂质任选地选自以下组:化合物3(表1A)、化合物8(表1A)、DLin-KC3-DMA,KC3-01,KC33--OA,KC3-PA,KC3-C17(8:1),和KC3-C15(C8:1);(c)甾醇,其总量为LNP组合物中总脂质含量的25至45mol%;(d)一种或更多种磷脂,其磷脂总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%,并且包含总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸(DPPS)脂质;以及(e)缀合的脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%。

[0020] 在一些实施方案中,第二磷脂选自:DSPC、HSPC和鞘磷脂。

[0021] 在一些实施方案中,可电离阳离子脂质相对于核酸的N/P比为5至6。

[0022] 在一些实施方案中,可电离阳离子脂质包含两个单不饱和烷基链或两个双不饱和烷基链,并且其中烯烃被至少两个亚甲基隔开。

[0023] 在一些实施方案中,可电离阳离子脂质选自以下组:KC3-01,KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(8:1),KC3-C15(C8:1)和化合物8(表1A)。

[0024] 在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是3-((S)-2,2-二((Z)-十八碳-9-烯-1-

基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(KC3-OA)。

[0025] 在一些实施方案中,核酸是mRNA。在一些实施方案中,mRNA用N-甲基假尿苷化学修饰。

[0026] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:(a)核酸;(b)相对于核酸的N/P比为3至8的可电离阳离子脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%;(c)甾醇,其总量为LNP组合物中总脂质含量的25至45mol%;(d)一种或更多种磷脂,其磷脂总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%;以及(e)缀合的脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%,所述缀合的脂质包含PEG-脂质,所述PEG-脂质具有末端连接至接头部分的聚(乙二醇)链和末端连接至同一接头部分的两个烃链,其中所述烃链是独立地选自正十二烷基(月桂基)和正十二烷酰基(月桂酰基)的饱和C_{12}链。

[0027] 在一些实施方案中,接头部分是甘油基、N-氧基羰基甘油磷酰基乙醇氨基羰基、氧基羰基酰胺基或氧基乙酰胺基。在一些实施方案中,聚(乙二醇)链是平均分子量为2000的甲氧基-聚(乙二醇)。在一些实施方案中,PEG-脂质是mPEG-1,2-二月桂酰基甘油(PEG-DLG)、mPEG-1,2-二月桂基甘油(PEG-DLG)、PEG-1,2-二月桂基甘油、PEG-DLPE、PEG-氧基羰基-N,N-双十二烷基酰胺或mPEG-N,N-双十二烷基乙酰胺。

[0028] 在一些实施方案中,LNP的z-平均颗粒尺寸为60至150nm,并且是冻融稳定的。

[0029] 在一些实施方案中,一种或更多种磷脂包含总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的磷脂酰丝氨酸(PS)脂质,并且其中LNP组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的磷脂酰丝氨酸(PS)脂质。

[0030] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)人疫苗组合物,其包含:(a)核酸;(b)相对于核酸的N/P比为3至8的可电离阳离子脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%;(c)甾醇,其总量为LNP组合物中总脂质含量的25至45mol%;(d)一种或更多种磷脂,其磷脂总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%,并且包含总量为LNP组合物中总脂质含量的1.0至10mol%的磷脂酰甘油(PG);以及(e)缀合的脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%。

[0031] 在一些实施方案中,可电离阳离子脂质选自:KC3-01,KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(8:1),KC3-C15(C8:1)和化合物8(表1A)。

[0032] 在一些实施方案中,甾醇是胆固醇;并且磷脂酰甘油(PG)是选自二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)和二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)的阴离子磷脂。

[0033] 在一些实施方案中,核酸是mRNA,并且可电离阳离子脂质相对于核酸以4至7的N/P比存在。

[0034] 在一些实施方案中,缀合的脂质选自PEG-DMG、PEG-DLG和PEG-DLPE。

[0035] 在一些实施方案中,一种或更多种磷脂包含选自二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)和氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)的磷脂。

[0036] 本公开内容的一些方面涉及制备包含脂质的核酸递送组合物的方法,其中脂质包含磷脂酰丝氨酸,该方法包括将磷脂酰丝氨酸溶解在乙醇中的步骤,其中磷脂酰丝氨酸为磷脂酰丝氨酸的铵盐的形式。

[0037] 在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸是DPPS。在一些实施方案中,将磷脂酰丝氨酸溶解在乙醇中至浓度超过0.2mM。在一些实施方案中,铵盐是包含选自以下的铵的盐:铵、烷基

铵、二烷基铵、三烷基铵和四烷基铵。在一些实施方案中,铵形式选自:氨、二甲胺、二乙胺、三乙胺、三甲胺、2-(二甲基氨基)乙醇、二乙醇胺、2-(二乙基氨基)乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-甲基-葡糖胺、咪唑、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、4-(2-羟乙基)-吗啉、哌嗪、1-(2-羟乙基)-吡咯烷、三乙醇胺或氨丁三醇(三(羟甲基)氨基甲烷)。

[0038] 本公开内容的一些方面涉及用于将核酸递送至细胞中的方法,其包括以下步骤:使脂质纳米粒(LNP)与细胞接触,其中细胞是人树突细胞,其中LNP组合物通过本公开内容的一些方面的方法获得。

[0039] 在一些实施方案中,LNP包含本公开内容的可电离阳离子脂质。

[0040] 在一些实施方案中,细胞处于人或动物对象中。在一些实施方案中,LNP肌内、皮下、皮内或表面施用于对象。

[0041] 本公开内容的一些方面涉及LNP组合物,其包含:(a)核酸,其中核酸是mRNA;(b)胆固醇甾醇,其总量为LNP组合物中总脂质含量的25至40mol%;(c)相对于核酸的N/P比为3至8的可电离阳离子脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%;(d)一种或更多种磷脂,其磷脂总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%,一种或更多种磷脂选自(i)二棕榈酰基磷脂酰-L-丝氨酸((L-丝氨酸)DPPS)脂质的铵盐,其总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%;以及(ii)二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)磷脂,其总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%;以及(e)含PEG的缀合的脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%。

[0042] 本公开内容的一些方面涉及用于向有此需要的对象施用核酸的方法,其包括向人对象施用核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,该核酸LNP组合物包含:(a)核酸;(b)相对于核酸的N/P比为3至8的可电离阳离子脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%;(c)甾醇,其总量为LNP组合物中总脂质含量的25至45mol%;(d)一种或更多种磷脂,其磷脂总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%,并且所述一种或更多种磷脂包含总量为LNP组合物中总脂质含量的1.0至10mol%的磷脂酰甘油(PG);以及(e)缀合的脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%。

[0043] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:(a)核酸;(b)相对于核酸的N/P比为3至8的可电离阳离子脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%;(c)甾醇,其总量为LNP组合物中总脂质含量的25至45mol%;(d)一种或更多种磷脂,其磷脂总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%,并且包含总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的磷脂酰丝氨酸(PS)脂质;以及(e)缀合的脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%。在一些实施方案中,核酸是mRNA;可电离阳离子脂质相对于核酸以4至7的N/P比存在于LNP组合物中;甾醇是胆固醇;以及缀合的脂质是含PEG的缀合的脂质。

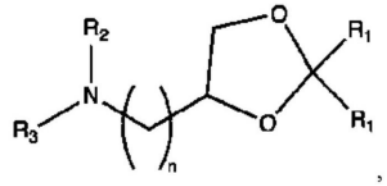
[0044] 在一些实施方案中,一种或更多种磷脂包含至少两种具有错配的酰基链长度的磷脂。

[0045] 在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸(PS)脂质是二棕榈酰基磷脂酰-L-丝氨酸((L-丝氨酸)DPPS)。

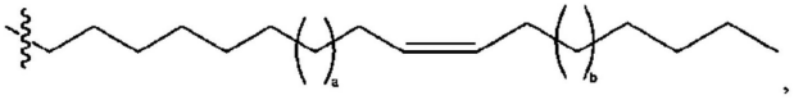
[0046] 在一些实施方案中,一种或更多种磷脂包含选自二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)和氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)的磷脂。在一些实施方案中,一种或更多种磷脂由二硬脂酰基

磷脂酰胆碱(DSPC)和二棕榈酰基磷脂酰-L-丝氨酸((L-丝氨酸)DPPS)组成。在一些实施方案中,含PEG的缀合的脂质是PEG(2000)-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG)。

[0047] 本公开内容的一些方面涉及LNP组合物,其中可电离脂质具有以下化学结构:

[0048] 

[0049] 其中R_1是

[0050] 

[0051] 其中a是0或1;b是1、2、3或4,前提是a+b之和为1、2、3或4;

[0052] R_2和R_3各自独立地是任选地被羟基取代的(C_1-C_4)烷基;并且

[0053] n是等于2、3或4的整数。

[0054] 在一些实施方案中,R_2和R_3各自是甲基;并且n是3或4。

[0055] 在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是一种或更多种选自以下的化合物:KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(8:1),和KC3-C15(C8:1)。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-PA。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-OA。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-C17(C8:1)。

[0056] 本公开内容的一些方面涉及选自KC3-PA,KC3-C17(8:1),和KC3-C15(C8:1)的可电离阳离子脂质。

[0057] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:(a)核酸;(b)相对于核酸的N/P比为3至8的可电离阳离子脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%;(c)甾醇,其总量为LNP组合物中总脂质含量的25至45mol%;(d)一种或更多种磷脂,其磷脂总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%,并且包含总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的磷脂酰丝氨酸(PS)脂质;以及(d)缀合的脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%。

[0058] 在一些实施方案中,甾醇是胆固醇。在一些实施方案中,一种或更多种磷脂包含具有错配的酰基链长度的磷脂。在一些实施方案中,PS脂质是二棕榈酰基磷脂酰-L-丝氨酸((L-丝氨酸)DPPS)。在一些实施方案中,一种或更多种磷脂包含选自二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)和氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)的磷脂。在一些实施方案中,一种或更多种磷脂包含二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)和磷脂酰丝氨酸(PS)。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是3-((S)-2,2-二((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(KC3-OA)。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是3-((S)-2,2-二((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(KC3-OA)。在一些实施方案中,一种或更多种磷脂由二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)和二棕榈酰基磷脂酰-L-丝氨酸((L-丝氨酸)DPPS)组成,并且磷脂酰丝氨酸(PS)是(L-丝氨酸)DPPS。

[0059] 在一些实施方案中,缀合的脂质是含PEG的缀合的脂质,并且其中含PEG的缀合的脂质选自:PEG(2000)-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸

乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](PEG-DLPE)和PEG(2000)-二月桂酰基甘油(PEG-DLG)。

[0060] 在一些实施方案中,核酸是mRNA;一种或更多种磷脂包括磷脂酰丝氨酸(PS)和一种或更多种选自以下的磷脂:二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)和二棕榈酰基磷脂酰-L-丝氨酸((L-丝氨酸)DPPS);并且缀合的脂质包含聚乙二醇(PEG)。在一些实施方案中,缀合的脂质是PEG(2000)-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG)。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是3-((S)-2,2-二((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(KC3-OA)。在一些实施方案中,一种或更多种磷脂由二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)和二棕榈酰基磷脂酰-L-丝氨酸((L-丝氨酸)DPPS)组成。

[0061] 在一些实施方案中,二棕榈酰基磷脂酰-L-丝氨酸((L-丝氨酸)DPPS)是(L-丝氨酸)DPPS的铵盐。

[0062] 在一些实施方案中,(a)核酸是mRNA;(b)甾醇是胆固醇甾醇,其总量为LNP组合物中总脂质含量的25至45mol%;(c)可电离阳离子脂质相对于核酸的N/P比为3至8,其总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%;(d)一种或更多种磷脂的磷脂总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%,一种或更多种磷脂由以下组成:(i)二棕榈酰基磷脂酰-L-丝氨酸((L-丝氨酸)DPPS)脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%;以及(ii)二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)磷脂,其总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%;(e)缀合的脂质是含PEG的缀合的脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%。

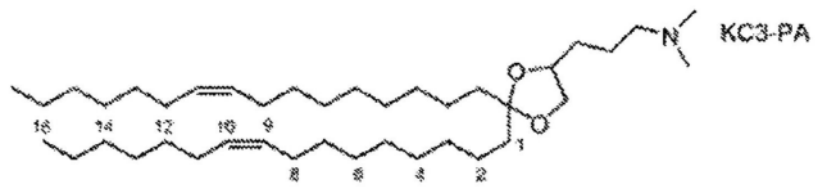
[0063] 在一些实施方案中,含PEG的缀合的脂质选自:PEG(2000)-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](PEG-DLPE)和PEG(2000)-二月桂酰基甘油(PEG-DLG)。

[0064] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)人疫苗组合物,其包含:(a)核酸;(b)相对于核酸的N/P比为3至8的可电离阳离子脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%;(c)甾醇,其总量为LNP组合物中总脂质含量的25至45mol%;(d)一种或更多种磷脂,其磷脂总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%,并且包含总量为LNP组合物中总脂质含量的1.0至10$_{mo}$l%的磷脂酰甘油(PG);以及(e)缀合的脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%。

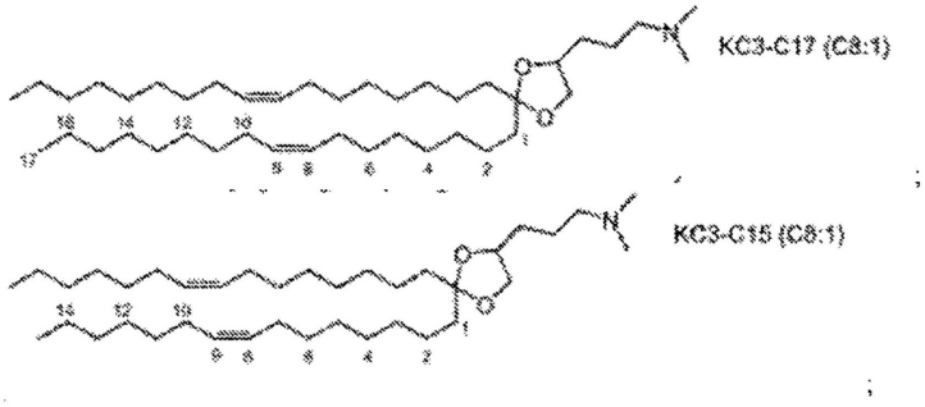
[0065] 在一些实施方案中,甾醇是胆固醇;并且磷脂酰甘油(PG)是选自二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)和二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)的阴离子磷脂。

[0066] 在一些实施方案中,核酸是mRNA,并且可电离阳离子脂质相对于核酸以4至7的N/P比存在。

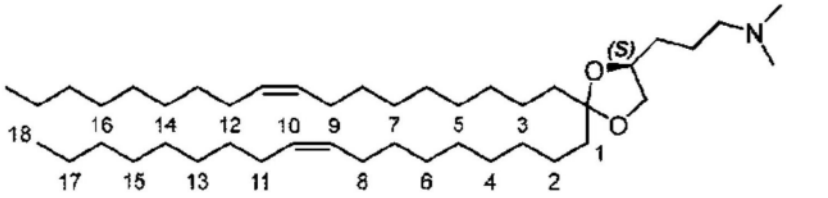
[0067] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%的可电离阳离子脂质,其中可电离阳离子脂质选自:KC3-PA,KC3-C17(8:1),和KC3-C15(C8:1),KC3-OA,和KC3-01:

[0068] 

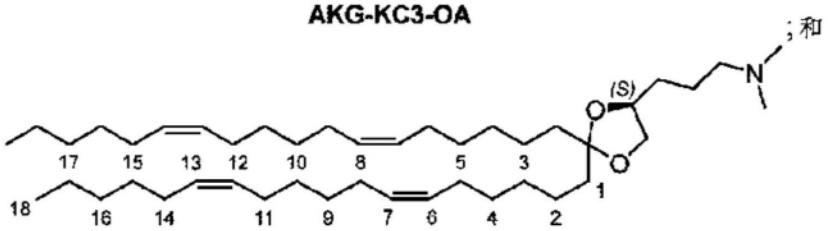
;



[0069]



AKG-KC3-OA



AKG-KC3-01

[0070] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:(a)核酸;(b)相对于核酸的N/P比为3至8的可电离阳离子脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%;(c)甾醇,其总量为LNP组合物中总脂质含量的25至45mol%;(d)一种或更多种磷脂,其磷脂总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%;以及(d)缀合的脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%,其中缀合的脂质是PEG-脂质,所述PEG-脂质具有末端连接至接头部分的聚(乙二醇)链和末端连接至同一接头部分的两个烃链,其中两个烃链是独立地选自正十二烷基(月桂基)和正十二烷酰基(月桂酰基)的饱和C_{12}链。

[0071] 在一些实施方案中,接头部分是甘油基、N-氧基羰基甘油磷酰基乙醇氨基羰基、氧基羰基酰胺基或氧基乙酰胺基。在一些实施方案中,聚(乙二醇)链是具有平均分子量为2000的甲氧基-聚(乙二醇)。在一些实施方案中,PEG-脂质是mPEG-1,2-二月桂酰基甘油(PEG-DLG)、mPEG-1,2-二月桂基甘油(PEG-DLG)、PEG-1,2-二月桂基甘油、PEG-DLPE、PEG-氧基羰基-N,N-双十二烷基酰胺或mPEG-N,N-双十二烷基乙酰胺。

附图说明

[0072] 图1描绘了包含对氧化特别敏感的缀合的多不饱和物的亚油酸脂质酯的氧化降解机制。

[0073] 图2示出了Fab'抗体片段的经还原c末端半胱氨酸与马来酰亚胺封端的聚(乙二醇)2000衍生的二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺的反应。R1和R2是硬脂酸。最终的抗体脂质聚合物

缀合物是中间体,其随后被插入到脂质纳米粒的外脂质层中以使其主动靶向。

[0074] 图3A使用用DLin-KC2-DMA作为可电离阳离子脂质配制的mCherry mRNALNP,0至2.5mol％的DSPS包含物对树突细胞(MutuDC1940)的转染效率的影响。ICL保持在50mol％,胆固醇保持在38.5mol％,PEG-DMG保持在1.5mol％,并且DSPS含量变化。通过将DSPC含量降低与所添加DSPS相同的mol％来包含DSPS。将细胞用浓度为1μg mRNA/mL的各制剂孵育24小时。UT样品对应于未添加LNP的细胞。脂质体转染(Lipofect)是指经Lipofectamine处理的样品。

[0075] 图3B使用用DLin-KC2-DMA作为可电离阳离子脂质配制的mCherry mRNA LNP,0至7.5mol％的DSPS包含物对树突细胞(MutuDC1940)的转染效率的影响。ICL保持在50mol％,胆固醇保持在38.5mol％,PEG-DMG保持在1.5mol％,并且DSPS含量变化。通过将DSPC含量降低与所添加DSPS相同的mol％来包含DSPS。将细胞用浓度为1μg mRNA/mL的各制剂孵育24小时。UT样品对应于未添加LNP的细胞。脂质体转染是指经Lipofectamine处理的样品。

[0076] 图3C使用用DLin-KC2-DMA作为可电离阳离子脂质配制的mCherry mRNA LNP,0至7.5mol％的DSPS包含物对树突细胞(MutuDC1940)的转染效率的影响。ICL保持在50mol％,胆固醇保持在38.5mol％,PEG-DMG保持在1.5mol％,并且DSPS含量变化。通过将DSPC含量降低与所添加DSPS相同的mol％来包含DSPS。将细胞用浓度为0.3μg mRNA/mL的各制剂孵育24小时。UT样品对应于未添加LNP的细胞。

[0077] 图3D使用用DLin-KC2-DMA作为可电离阳离子脂质配制的mCherry mRNA LNP,0至7.5mol％的DSPS包含物对树突细胞(MutuDC1940)的转染效率的影响。ICL保持在50mol％,胆固醇保持在38.5mol％,PEG-DMG保持在1.5mol％,并且DSPS含量变化。通过将DSPC含量降低与所添加DSPS相同的mol％来包含DSPS。将细胞用浓度为0.1μg mRNA/mL的各制剂孵育24小时。UT样品对应于未添加LNP的细胞。

[0078] 图4使用包含多种ICL(KC2、KC2-OA、KC3-OA和SM-102)和5mol％DSPS的LNP转染鼠树突细胞(MutuDC1940),并与使用Glu-DSPE或Suc-DSPE而不是DSPS的LNP进行比较。UT样品对应于未添加LNP的细胞。

[0079] 图5DSPS或DPPS提高了具有包含KC2、KC2-01、KC2-PA、KC3-01和KC3-OA的ICL的mCherry LNP的转染。UT样品对应于未添加LNP的细胞。

[0080] 图6A在转染鼠树突细胞方面,将多种化学形式的磷脂酰丝氨酸与包含AKG-UO-1的LNP进行的比较。UT样品对应于未添加LNP的细胞。Lipo是指根据制造商的说明以与LNP相同的剂量水平使用的Lipofectamine MessengerMax(ThermoFisher)。

[0081] 图6B在使用包含AKG-UO1的LNP转染鼠树突细胞的情况下,将DSPS与其他带负电荷的磷脂进行的比较。UT样品对应于未添加LNP的细胞。Lipo是指根据制造商的说明以与LNP相同的剂量水平使用的Lipofectamine MessengerMax(ThermoFisher)。

[0082] 图7包含AUG-UO-1的LNP中的DSPS浓度对转染树突细胞的影响。UT样品对应于未添加LNP的细胞。

[0083] 图8在含和不含5mol％DSPS的情况下包含AUG-UO-1的LNP中的PEG-DMG浓度对转染树突细胞的影响。Y轴显示组合物中使用的％PEG,之后是添加至细胞的mRNA的浓度(0.11、0.33或1μg/mL)。UT样品对应于未添加LNP的细胞。

[0084] 图9A在两个烯烃之间具有单个亚甲基的ICL(KC2、KC3和O-11769)和在两个烯烃之

间具有四个亚甲基的ICL(KC2-01、KC3-01和UO-1)的脂质混悬液的氧化降解。

[0085] 图9B包含O-11769的脂质体的氧化降解,所述O-11769为在两个烯烃之间具有单个亚甲基的ICL;包含UO-1的脂质体的氧化降解,所述UO-1为在两个烯烃之间具有四个亚甲基的ICL。

[0086] 图10A在鼠树突细胞中,N/P对1μg/ml的包含KC2-01的LNP的mCherry表达的作用。UT样品对应于未添加LNP的细胞。

[0087] 图10B在鼠树突细胞中,N/P对0.33μg/ml的包含KC2-01的LNP的mCherry表达的作用。UT样品对应于未添加LNP的细胞。

[0088] 图11含和不含DSPS(7.5mol%)并且包含不同可电离阳离子脂质的LNP的转染效率。UT样品对应于未添加LNP的细胞。

[0089] 图12包含多种浓度的DOPS(0、10和25mol%,作为总脂质的%)和mCherry mRNA的LNP制剂在鼠树突细胞中的转染效率。

[0090] 图13A VRN-029的mRNA序列,其为SARS-COV2刺突蛋白产生序列。

[0091] 图13B PEG-DMG(C14)浓度(mol%)对LNP疫苗免疫原性的作用。来自经使用7.5%DSPS和可电离脂质UO1以及递增mol%的PEG-DMG的mRNA-LNP免疫接种的小鼠的总抗刺突抗体效价和CD4应答。中间图显示了第34天的终点抗体效价。右图显示了相应的CD4 T细胞应答。

[0092] 图13C PEG-DPPE(C16)浓度(mol%)对LNP疫苗免疫原性的作用。来自经使用7.5%DSPS和可电离脂质UO1以及递增mol%的PEG-DPPE的mRNA-LNP免疫接种的小鼠的总抗刺突抗体效价。中间图显示了第34天的终点抗体效价。PEG-DPPE的mol%成反比地影响抗体水平。右图显示了相应的CD4 T细胞应答。

[0093] 图13D来自经使用7.5%DSPS和可电离脂质KC20A以及1.5mol%PEG-DMG(14C)或PEG-DSG(18C)的mRNA-LNP免疫接种的小鼠的总抗刺突抗体效价和CD4应答。左图显示了第34天的终点抗体效价。右图显示了相应的CD4 T细胞应答。

[0094] 图13E来自经使用7.5%DSPS和可电离脂质UO1以及1.5mol%PEG-DMG(14C)或PEG-DSG(18C)的mRNA-LNP免疫接种的小鼠的总抗刺突抗体效价和CD4应答。左图显示了第34天的终点抗体效价。右图显示了相应的CD4 T细胞应答。

[0095] 图13F磷脂酰丝氨酸并入对mRNA-LNP免疫原性的作用。来自经使用多种可电离脂质和PEG-脂质加/减7.5mol%DSPS的mRNA-LNP免疫接种的小鼠的总抗刺突抗体效价(A)和刺突特异性CD4 T细胞应答。对抗体数据进行对数转换,并使用双因素ANOVA和Sidak多重比较检验进行分析。使用REML混合效应模型和Sidak多重比较检验来分析CD4 T细胞数据。

[0096] 图13G磷脂酰丝氨酸脂质尾(DPPS vs DSPS)组成对mRNA-LNP初免的B细胞应答(图A)和T细胞应答(图B)的作用。对抗体数据进行对数转换,随后进行分析。使用单因素ANOVA和Tukey多重比较检验分析数据。

[0097] 图14A对KC2-01 LNP、7.5mol%DSPS(D异构体)和DSPS(L异构体)在1μg/mL mRNA下持续24小时的mCherry表达进行的比较。

[0098] 图14B对KC2-01 LNP、7.5mol%DSPS(D异构体)和DSPS(L异构体)在0.33μg/mL mRNA下持续24小时的mCherry表达进行的比较。

[0099] 图15对含5和7.5mol%DSPS(L-异构体)的KC2 LNP与用SM-102或ALC-0315制备的

LNP在1μg/mL mRNA下持续24小时的mCherry表达进行的比较。Y轴是平均荧光强度(mean fluorescence intensity,MFI)。UT样品对应于未添加LNP的细胞。

[0100] 图16对单独的UO1、UO6和UO7制剂或添加了7.5mol％DSPS的D-异构体的UO1、UO6和UO7制剂在1μg/mL mRNA下持续24小时的mCherry表达进行的比较。UT样品对应于未添加LNP的细胞。

[0101] 图17对单独的UO1、SM102、ALC-0315制剂或添加了DSPS的UO1、SM102、ALC-0315制剂在1μg/mL mRNA下持续24小时的mCherry表达进行的比较。Lipo是指根据制造商的说明以与LNP相同的剂量水平使用的Lipofectamine MessengerMax(ThermoFisher)。UT样品对应于未添加LNP的细胞。

[0102] 图18包含KC3(DLin-KC3-DMA)的脂质体与包含具有单不饱和烷基链的ICL(KC3-OA、KC3-PA或KC3-C17(C8:1))以及完全饱和的ICL(KC3-C17)的脂质体的氧化降解,所述KC3(DLin-KC3-DMA)是在两个烯烃之间具有单个亚甲基的多不饱和ICL。通过CAD-HPLC测量的过氧化氢对单个可电离阳离子脂质稳定性的影响。

[0103] 图19在人树突细胞中,对单独的UO1、UO1A和KC3-OALNP制剂或者添加了DSPS的UO1、UO1A和KC3-OA制剂在0.1和1μg/mL mRNA下持续24小时的mCherry表达进行的比较。未经处理的DC样品对应于未添加LNP的人树突细胞。

[0104] 图20在鼠树突细胞中,对包含多不饱和KC3、单不饱和KC3-OA、KC3-PA或KC3C17(C8:1)以及完全饱和KC3C17的LNP在全部有或没有DPPS(NH_4^+盐)的情况下在0.3或1μg/mL mRNA下持续24小时的mCherry表达进行的比较。UT样品对应于未添加LNP的细胞。

[0105] 图21在人树突细胞中,对包含在两个烯烃之间具有单个亚甲基的多不饱和KC2或KC3,在两个烯烃之间具有四个亚甲基的多不饱和KC3-01、单不饱和KC3-OA、KC3-PA或KC3C17(C8:1)以及ALC-0315的LNP(除含ALC-0315外的所有LNP都具有DPPS($NH4^+$盐))在0.1或1μg/mL mRNA下持续24小时的mCherry表达进行的比较。未经处理的样品对应于未添加LNP的细胞。

[0106] 图22在人树突细胞中,对具有5mol％DSPS和46至54mol％KC3-OA的LNP制剂与ALC-0315和SM-102LNP对照在0.1和1μg/mL mRNA下持续24小时的mCherry表达进行的比较。未经处理的DC样品对应于未添加LNP的人树突细胞。

[0107] 图23在人树突细胞中,对N/P比为4至7的具有0或5mol％DSPS和50mol％KC2-01的LNP制剂在0.1μg/mLmRNA下持续24小时的mCherry表达进行的比较。还将这些与N/P比为5的包含KC3-OA和5mol％DSPS的LNP进行比较。未经处理的DC样品对应于未添加LNP的人树突细胞。

[0108] 图24A对包含多不饱和KC3与单不饱和KC3-OA和KC3-PA的LNP制剂在疫苗免疫原性方面进行的比较。来自经使用5mol％DSPS或DPPS靶向的包含KC3、KC3-OA或KC3-PA的LNP的mRNA-LNP免疫接种的小鼠的总抗刺突抗体效价。对于KC3-OA和KC3-PALNP,每种制剂也用C16 DPPC或C18 DSPC中性磷脂酰胆碱组分进行评价。所有LNP都包含1.5mol％PEG-DMG。该图示出了在1μg mRNA/小鼠的初始初免注射之后的第21天的终点抗体效价。

[0109] 图24B对包含多不饱和KC3与单不饱和KC3-OA和KC3-PA的LNP制剂在疫苗免疫原性方面进行的比较。来自经使用5mol％DSPS或DPPS靶向的包含KC3、KC3-OA或KC3-PA的LNP的mRNA-LNP免疫接种的小鼠的总抗刺突抗体效价。对于KC3-OA和KC3-PALNP,每种制剂也用

C16 DPPC或C18 DSPC中性磷脂酰胆碱组分进行评价。所有LNP都包含1.5mol％PEG-DMG。该图示出了在1μg mRNA/小鼠的初免,然后在第21天加强之后,在第34天的终点抗体效价。

[0110] 图25A在人树突细胞中,对具有5mol％DSPS和43至48mol％KC3-OA的LNP制剂与ALC-0315和SM-102LNP对照在1μg/mL mRNA下持续24小时的mCherry表达进行的比较。还在5、5.5、6.0和6.5的N/P比下对以总脂质的45mol％KC3-OA和5mol％DSPS制备的KC3-OA LNP进行比较。最后,用1或3mol％的PEG-SA代替1.5mol％的PEG-DMG来评价N/P为5和6的具有45mol％KC3-OA的LNP。未经处理的DC样品对应于未添加LNP的人树突细胞。

[0111] 图25B在人树突细胞中,对具有5mol％DSPS和43至48mol％KC3-OA的LNP制剂与ALC-0315和SM-102LNP对照在0.1μg/mL mRNA下持续24小时的mCherry表达进行的比较。还在5、5.5、6.0和6.5的N/P比下对以总脂质的45mol％KC3-OA和5mol％DSPS制备的KC3-OA LNP进行比较。最后,用1或3mol％的PEG-SA代替1.5mol％的PEG-DMG来评价N/P为5和6的具有45mol％KC3-OA的LNP。未经处理的DC样品对应于未添加LNP的人树突细胞。

[0112] 图26A在1μg/mL mRNA下孵育24小时之后,在人树突细胞中对包含50mol％UO-1的具有7.5mol％多种阴离子磷脂的LNP制剂的mCherry表达进行的比较。所有LNP包含2.5mol％DSPC、50mol％UO-1和1.5mol％PEG-DMG。阴离子磷脂包括磷脂酰丝氨酸、DOPS、DSPS、DPPS和DMPS、二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)以及N-戊二酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(Glu-DSPE)和N-琥珀酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(Suc-DSPE),并且其以7.5mol％被包含,除DSPG以5和7.5mol％二者进行比较之外。

[0113] 图26B在0.1μg/mL mRNA下孵育24小时之后,在人树突细胞中对包含50mol％UO-1的具有7.5mol％多种阴离子磷脂的LNP制剂的mCherry表达进行的比较。所有LNP包含2.5mol％DSPC、50mol％UO-1和1.5mol％PEG-DMG。阴离子磷脂包括磷脂酰丝氨酸、DOPS、DSPS、DPPS和DMPS、二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)以及N-戊二酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(Glu-DSPE)和N-琥珀酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(Suc-DSPE),并且其以7.5mol％被包含,除DSPG以5和7.5mol％二者进行比较之外。

[0114] 图27A在1μg/mL mRNA下孵育24小时之后,在人树突细胞中对包含UO-1或KC3-01的具有0至10mol％DSPG的LNP制剂的mCherry表达进行的比较。还包括在1μg/mL mRNA下的ALC-0315和SM-102LNP对照,并且未经处理的DC样品对应于未添加LNP的人树突细胞。

[0115] 图27B在0.1μg/mL mRNA下孵育24小时之后,在人树突细胞中对包含UO-1或KC3-01的具有0至10mol％DSPG的LNP制剂的mCherry表达进行的比较。还包括在0.1μg/mL mRNA下的ALC-0315和SM-102LNP对照,并且经未处理的DC样品对应于未添加LNP的人树突细胞。

[0116] 图28在1μg/mL mRNA下孵育24小时之后,在鼠树突细胞中对包含UO1、UO6或UO7以及7.5mol％DSPS的LNP的mCherry表达进行的比较。UT样品对应于未添加LNP的细胞。

[0117] 图29对包含二亚油基KC2、单不饱和KC3-OA和四种亚甲基间插的多不饱和ICL(KC3-01、AKG-UO1和AKG-UO9)的LNP制剂在疫苗免疫原性方面进行的比较。包括含ALC-0315的LNP作为对照。所有LNP都包含1.5mol％的PEG-DMG。在第1天的1μg mRNA/小鼠的初始初免注射之后在第21天确定来自用mRNA-LNP免疫接种的小鼠的总抗刺突抗体效价。

[0118] 图30A在1μg/mL mRNA下孵育24小时之后,在人树突细胞中对包含48mol％KC3-OA的具有5mol％多种阴离子磷脂的LNP制剂的mCherry表达进行的比较。所有LNP均包含2.5mol％DSPC、50mol％UO-1和1.5mol％PEG-DMG。阴离子磷脂包括磷脂酰甘油、DOPG、DSPG、

DPPG和DMPG以及DSPS。在一些LNP中,DSPG和DSPS单独组合,或者与DSPC一起组合。在本研究中,使用两个供体以产生人树突细胞,并且未经处理的DC样品对应于未添加LNP的人树突细胞。

[0119] 图30B在0.1μg/mL mRNA下孵育24小时之后,在人树突细胞中对包含48mol%KC3-OA的具有5mol%多种阴离子磷脂的LNP制剂的mCherry表达进行的比较。所有LNP均包含2.5mol%DSPC、50mol%UO-1和1.5mol%PEG-DMG。阴离子磷脂包括磷脂酰甘油、DOPG、DSPG、DPPG和DMPG以及DSPS。在一些LNP中,DSPG和DSPS单独组合,或者与DSPC一起组合。在本研究中,使用两个供体以产生人树突细胞,并且未经处理的DC样品对应于未添加LNP的人树突细胞。

[0120] 图31在1μg/mL mRNA下孵育24小时之后,在鼠树突细胞中对包含KC3-OA LNP与5mol%DSPS(Na^+盐)或5mol%DPPS(NH_4^+盐)的LNP的mCherry表达进行的比较。还包括在1μg/mL mRNA下的ALC-0315和SM-102LNP对照。UT样品对应于未添加LNP的细胞。

[0121] 图32.在与用荧光脂质标记DiIC18(5)-DS(DiI5-DS)标记的mCherry mRNA(0.2μg/mL)的多种LNP制剂一起孵育的MutDC1940细胞中,LNP摄取随时间的图(实施例47)。在指定的时间,通过标记(RL-1荧光通道)的流式细胞术对LNP摄取进行定量,并绘制为中值细胞荧光强度。数据是一式三份运行的平均值。误差棒为标准偏差。制剂:AKG+PS,KC3OA+PS;AKG-PS,KC3OA-PS;SM102;ALC-0315。未经处理的是指未经LNP处理的细胞。

[0122] 图33.在与用荧光脂质标记DiIC18(5)-DS(DiI5-DS)标记的mCherry mRNA(0.2μg/mL)的多种LNP制剂一起孵育的MutuDC1940细胞中,LNP mRNA表达随时间的图(实施例47)。在指定的时间,通过以蛋白荧光(YL-2荧光通道)的流式细胞术对mCherry蛋白表达进行定量,并绘制为中值细胞荧光强度。数据是一式三份运行的平均值。误差棒为标准偏差。制剂:AKG+PS,KC3OA+PS;AKG-PS,KC3OA-PS;SM102;ALC-0315。未经处理的是指未经LNP处理的细胞。

[0123] 图34.用以10×LNP脂质浓度的“阻断脂质体”预处理细胞对MutuDC1940细胞摄取DiI5-DS标记的LNP的作用(实施例48)。在LNP之前15分钟添加脂质体。在LNP暴露1小时之后,通过流式细胞术(RL1-A通道)以DiI5-DS荧光测量LNP的摄取,并绘制为中值细胞荧光强度。数据是一式四份运行的平均值。误差棒为标准偏差。LNP类型在水平轴处示出。图例表示“阻断脂质体”中PS组分的量和性质。“%”表示阻断脂质体制剂中PS相对于总脂质的mol%。

[0124] 图35.在与用多种ICL制备的mCherry mRNA-LNP构建体(0.3μg/mL mRNA)一起孵育3小时之后,PS靶向剂对MutuDC1940细胞中的mCherry表达的作用(实施例49)。通过以mCherry蛋白荧光(YL2-A荧光通道)的流式细胞术对表达进行定量,并绘制为中值细胞荧光强度。数据是一式四份运行的平均值。误差棒为标准偏差。ICL:UO1、KC2、KC3OA。靶向PS:DPPS、DSPS、D-DSPS,无靶向(NT)。UT是指未经LNP处理的细胞。

[0125] 图36.在与用多种ICL制备的mCherry mRNA-LNP构建体(0.3μg/mL mRNA)一起孵育24小时之后,PS靶向剂对MutuDC1940细胞中的mCherry表达的作用(实施例49)。通过以mCherry蛋白荧光(YL2-A荧光通道)的流式细胞术对表达进行定量,并绘制为中值细胞荧光强度。数据是一式四份运行的平均值。误差棒为标准偏差。ICL:UO1、KC2、KC3OA。靶向PS:DPPS、DSPS、D-DSPS,无靶向(NT)。UT是指未经LNP处理的细胞。

[0126] 图37.在与用多种ICL制备的mCherry mRNA-LNP构建体(0.3μg/mL mRNA)一起孵育

3小时之后,PS靶向剂对MutuDC1940细胞中的LNP摄取的作用(实施例49)。通过以DiI5-DS(DiI)脂质标记荧光(RL1A荧光通道)的流式细胞术对表达进行定量,并绘制为中值细胞荧光强度。数据是一式四份运行的平均值。误差棒为标准偏差。ICL:UO1、KC2、KC3OA。靶向PS:DPPS、DSPS、D-DSPS,无靶向(NT)。UT是指未经LNP处理的细胞。

[0127] 图38.在与用多种ICL制备的mCherry mRNA-LNP构建体(0.3μg/mL mRNA)一起孵育24小时之后,PS靶向剂对MutuDC1940细胞中的LNP摄取的作用(实施例49)。通过以DiI5-DS(DiI)脂质标记荧光(RL1A荧光通道)的流式细胞术对表达进行定量,并绘制为中值细胞荧光强度。数据是一式四份运行的平均值。误差棒为标准偏差。ICL:UO1、KC2、KC3OA。靶向PS:DPPS、DSPS、D-DSPS,无靶向(NT)。UT是指未经LNP处理的细胞。

[0128] 图39.通过在KC3OA/DPPS LNP中配制的mCherry mRNA(0.3μg/mL)的LNP制剂递送至MutuDC1940细胞的mCherry mRNA的表达,所述KC3OA/DPPS LNP用PEG-DMG和多种量的PEG-DLG制备(实施例50)。在1.0和0.1μg/mL mRNA下用LNP转染之后24小时,通过mCherry荧光的流式细胞术对表达进行定量。PBMC取自两个供体,并且每个供体以一式三份运行。条是合并的供体重复数据的平均值。LNP组合物在X轴处示出。“%”是指PEG-脂质组分相对于总LNP脂质的mol%。

[0129] 图40.用在KC3-PA/DSPC/DPPS-NH_4/Chol/PEG-脂质LNP中配制的VRN029刺突mRNA免疫接种的Balb/C小鼠血清中的抗SARS-COV-2刺突蛋白抗体效价,所述KC3-PA/DSPC/DPPS-NH_4/Chol/PEG-脂质LNP包含PRG-DMG或PEG-DLG(N=5)(实施例51)。在1μg mRNA/小鼠的加强剂量之后2周(初免剂量之后第35天)收集血清。使用4×背景作为ELISA测试的终点来确定效价。棒表示各组中的几何平均效价,误差区间是经对数转换数据的标准偏差,标记(marker)示出了单个动物效价。PEG-脂质名称处的数字是PEG-脂质相对于LNP总脂质的mol%。虚线示出了效价测定中的检测上限。

[0130] 图41A.用在KC3-OA/DSPC/DPPS-NH_4/Chol/PEG-脂质LNP中配制的VRN029刺突mRNA免疫接种的Balb/C小鼠血清中的抗SARS-COV-2刺突蛋白抗体效价,所述KC3-OA/DSPC/DPPS-NH_4/Chol/PEG-脂质LNP包含PEG-DMG或PEG-DLG(N=5)(实施例52)。在1μg mRNA/小鼠的初免mRNA-LNP剂量之后3周收集血清。使用4×背景作为ELISA测试的终点来确定效价。棒表示各组中的几何平均效价,误差区间是经对数转换数据的标准偏差,标记示出了单个动物效价。组间差异具有统计学显著性。虚线示出了效价测定中的检测下限。

[0131] 图41B.用在KC3-OA/DSPC/DPPS-NH_4/Chol/PEG-脂质LNP中配制的VRN029刺突mRNA免疫接种的Balb/C小鼠血清中的抗SARS-COV-2刺突蛋白抗体效价,所述KC3-OA/DSPC/DPPS-NH_4/Chol/PEG-脂质LNP包含多种量的DPPS以及PEG-DMG或PEG-DLG(N=5)(实施例52)。在初免之后3周施用1μg mRNA/小鼠的加强mRNA-LNP剂量之后2周收集血清。使用4×背景作为ELISA测试的终点来确定效价。棒表示各组中的几何平均效价,误差区间是经对数转换数据的标准偏差,标记示出了单个动物效价。虚线示出了效价测定中的检测下限。“%”表示脂质组分相对于总LNP脂质的mol%。

[0132] 图42.通过KC3OA/DSPC/DPPS-NH_4/Chol/PEG-脂质LNP递送至人PBMC来源树突细胞的mCherry mRNA的表达,所述KC3OA/DSPC/DPPS-NH4/Chol/PEG-脂质LNP用多种量的PEG-DMG或PEG-DLPE制备(实施例53)。在0.3μg/mL mRNA下用LNP转染之后24小时,通过mCherry荧光的流式细胞术对表达进行定量。条示出了重复的平均中值细胞荧光强度。误差区间是

标准偏差。PEG-脂质的mol％是指相对于总LNP脂质的mol％。

[0133] 图43A.用在KC3-OA/DSPC/DPPS-NH_4/Chol/PEG-DMG LNP中配制的VRN029刺突mRNA免疫接种的Balb/C小鼠血清中的抗SARS-COV-2刺突蛋白抗体效价,所述KC3-OA/DSPC/DPPS-NH_4/Chol/PEG-DMG LNP包含多种量的DPPS(N＝5)(实施例54)。在0.3μg mRNA/小鼠的初免mRNA剂量之后的第20天收集血清。使用4×背景作为ELISA测试的终点来确定效价。棒表示各组中的几何平均效价,误差区间是经对数转换数据的标准偏差,标记示出了单个动物效价。星号表示p＝0.05时组间差异的统计学显著性。还示出了p值为0.059的组。虚线示出了效价测定中的检测下限。LNP脂质组合物标记处的数字是各组分相对于总LNP脂质的mol％。

[0134] 图43B.用在KC3-OA/DSPC/DPPS-NH_4/Chol/PEG-脂质LNP中配制的VRN029刺突mRNA免疫接种的Balb/C小鼠血清中的抗SARS-COV-2刺突蛋白抗体效价,以及用基于ALC-0315的非靶向LNP制剂的VRN029刺突mRNA免疫接种的Balb/C小鼠血清中的抗SARS-COV-2刺突蛋白抗体效价,所述KC3-OA/DSPC/DPPS-NH_4/Chol/PEG-脂质LNP包含多种量的PEG-DMG或PEG-DLG(N＝5)(实施例54)。在0.3μg mRNA/小鼠的初免mRNA-LNP剂量之后3周进行加强注射之后2周收集血清。使用4×背景作为ELISA测试的终点来确定效价。棒表示各组中的几何平均效价,误差区间是经对数转换数据的标准偏差,标记示出了单个动物效价。虚线示出了效价测定中的检测下限。LNP脂质组合物标记处的数字是各组分相对于总LNP脂质的mol％。

[0135] 图43C.用在KC3-OA/DSPC/PS/Chol/PEG-脂质LNP中配制的VRN029刺突mRNA免疫接种的Balb/C小鼠血清中的抗SARS-COV-2刺突蛋白抗体效价,所述KC3-OA//PS/Chol/PEG-脂质LNP包含相对于总LNP脂质的5mol％的DSPS-Na或DPPS-NH_4作为PS组分,以及相对于总LNP脂质的1.5mol％的PEG-DMG或PEG-DLG作为PEG-脂质组分(N＝5)(实施例54)。在0.3μg mRNA/小鼠的初免mRNA-LNP剂量之后3周进行加强注射之后2周(初免之后35天)收集血清。使用4×背景作为ELISA测试的终点来确定效价。棒表示各组中的几何平均效价,误差区间是经对数转换数据的标准偏差,标记示出了单个动物效价。虚线示出了效价测定中的检测下限。LNP脂质组合物标记处的数字是PEG-脂质相对于总LNP脂质的mol％。

[0136] 图44.用在KC3-OA/DSPC/DPPS-NH_4/Chol/PEG-DMG LNP或ALC-0315LNP中配制的多种SARS-COV-2刺突mRNA(VRN029、VRN118、VRN119)免疫接种的Balb/C小鼠血清中的抗SARS-COV-2刺突蛋白抗体效价(N＝5)(实施例55)。在0.3μg mRNA/小鼠的初免mRNA-LNP剂量之后第20天收集血清。使用4×背景作为ELISA测试的终点来确定效价。棒表示各组中的几何平均效价,误差区间是经对数转换数据的标准偏差,标记示出了单个动物效价。虚线示出了效价测定中的检测下限。

[0137] 图45A.用在基于ALC-0315的LNP、基于SM-102的LNP或KC3-OA/DSPC/DPPS-NH_4/Chol/PEG-DMG LNP中配制的VRN029刺突mRNA免疫接种的Balb/C小鼠血清中的抗SARS-COV-2刺突蛋白抗体效价(N＝5)(实施例56)。在0.1、0.3或1.0μg mRNA/小鼠的初免mRNA-LNP剂量之后3周进行加强注射之后2周(初免之后第35天)收集血清。使用4×背景作为ELISA测试的终点来确定效价。棒表示各组中的几何平均效价,误差区间是经对数转换数据的标准偏差,标记示出了单个动物效价。虚线示出了效价测定中的检测下限。LNP脂质组合物标记处的数字是PEG-脂质相对于总LNP脂质的mol％。

[0138] 图45B.用在KC3-OA/DSPC/DPPS-NH_4/Chol/PEG-DMG LNP中配制的VRN029刺突mRNA

免疫接种的Balb/C小鼠血清中的抗SARS-COV-2刺突蛋白抗体效价,所述KC3-OA/DSPC/DPPS-NH_4/Chol/PEG-DMG LNP具有不同量的PEG-DMG,并且以不同的剂量施用(N=5)(实施例56)。在0.1、0.3或1.0μg mRNA/小鼠的初免mRNA-LNP剂量之后3周进行加强注射之后2周(初免之后35天)收集血清。使用4×背景作为ELISA测试的终点来确定效价。棒表示各组中的几何平均效价,误差区间是经对数转换数据的标准偏差,标记示出了单个动物效价。虚线示出了效价测定中的检测下限。LNP脂质组合物标记处的数字是相应脂质组分相对于总LNP脂质的mol%。

[0139] 图46A.用在KC3-OA/DSPC/DPPS-NH_4/Chol/PEG-DMG(靶向KC3-OA)LNP、KC3-OA/DSPC/Chol/PEG-DMG(非靶向,KC3-OA)LNP或ALC-0315LNP中配制的VRN029刺突mRNA免疫接种的Balb/C小鼠血清中的抗SARS-COV-2刺突蛋白抗体效价(实施例57)。在0.1μg mRNA/小鼠的初免mRNA-LNP剂量之后第20天收集血清。使用4×背景作为ELISA测试的终点来确定效价。棒表示各组中的几何平均效价,误差区间是经对数转换数据的标准偏差,标记示出了单个动物效价。虚线示出了效价测定中的检测下限。

[0140] 图46B.用在KC3-OA/DSPC/DPPS-NH_4/Chol/PEG-DMG(靶向KC3-OA)LNP、KC3-OA/DSPC/Chol/PEG-DMG(非靶向,KC3-OA)LNP或ALC-0315LNP中配制的VRN029刺突mRNA免疫接种的Balb/C小鼠血清中的抗SARS-COV-2刺突蛋白抗体效价(实施例57)。在0.1μg mRNA/小鼠的初免mRNA-LNP剂量之后3周进行加强注射之后2周(初免之后第35天)收集血清。使用4×背景作为ELISA测试的终点来确定效价。棒表示各组中的几何平均效价,误差区间是经对数转换数据的标准偏差,标记示出了单个动物效价。虚线示出了效价测定中的检测下限。

[0141] 图47A和图47B.UO-1系列的可电离阳离子脂质的合成方案。

[0142] 图48KC2-01和KC3-01可电离阳离子脂质的合成方案。

[0143] 图49.单不饱和KC2-OA、KC2-PA和KC3-OA可电离阳离子脂质的合成方案。

[0144] 图50.单不饱和KC3-C17(C8:1)和完全不饱和KC3-C17可电离阳离子脂质的合成方案。

[0145] 图51二硬脂酰基磷脂酰-D-丝氨酸的合成方案。

具体实施方式

[0146] 应当理解,前述一般性说明和以下详细说明二者仅是示例性和说明性的,并且并不限制本公开内容的组合物和方法。

[0147] 脂质体纳米粒(LNP)组合物可包含可电离脂质、甾醇和一种或更多种磷脂。在一些实施方案中,LNP组合物还包含用于在药物组合物例如疫苗中施用的核酸,例如mRNA。在一些实施方案中,LNP组合物任选地还包含缀合的脂质。

[0148] 包含mRNA的脂质纳米粒(LNP)组合物包括被用作载剂以用于全身递送mRNA或其他核酸治疗剂的稳定的核酸脂质颗粒(SNALP)。SNALP组合物包含阳离子脂质例如MC3或KC2,其包含与一对直链18碳脂族链连接的可质子化叔胺头基,所述直链18碳脂族链包含被单个亚甲基隔开的一对碳-碳双键(例如亚油酸)。然而,尽管各自包含被单个亚甲基隔开的一对双键的这些烃链的结构赋予对于SNALP组合物期望的生物特性,但这种化学亚结构也导致了这样的不期望的问题:化合物对氧化降解的敏感性提高。例如,图1描绘了包含对氧化特别敏感的缀合的多不饱和物的亚油酸的脂质酯的氧化降解机制。需要的是适用于SNALP组

合物但具有增强的对氧化降解的抗性的新的阳离子脂质。

[0149] 本文中公开了与治疗细菌感染相关的化合物、组合物和方法。本文中使用的术语“化合物”、“药物”和“活性剂”可互换使用。本公开内容的一些方面涉及新的可电离脂质或生物可还原的可电离脂质。这些脂质在酸性pH下是阳离子型的(即带正电荷),例如在通过细胞的内吞作用或吞噬作用之后在细胞内遇到的。相同的脂质和包含其的组合物在存在于pH 7.4时,电荷接近中性。这些脂质也可具有存在于它们的烷基或酰基中的单个烯烃基团。

[0150] 本公开内容的一些方面涉及用于合成新的可电离脂质的方法。

[0151] 另一些方面涉及包含含有可电离阳离子脂质的脂质纳米粒的组合物,所述脂质纳米粒包含核酸。在一些实施方案中,核酸被包封到脂质纳米粒中。

[0152] 本公开内容的一些方面提供了用于将治疗性核酸递送至细胞的可电离脂质纳米粒的改进组合物。脂质纳米粒中包含阴离子磷脂(包括磷脂酰丝氨酸和磷脂酰甘油)以提高树突细胞中的转染效率。与同一家族中的其他可电离脂质相比,在LNP制剂中在1,3-二氧戊环或缩酮的第2位上具有单不饱和烷基链(单烯烃)的偕二取代的可电离脂质的进一步并入显示出在人树突细胞中的高水平的转染,并且显示出对氧化损伤的良好稳定性。

[0153] 定义

[0154] 为方便起见,在此收集了说明书、实施例和所附权利要求书中使用的某些术语。除非另有定义,否则本文中使用的所有技术术语和科学术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。

[0155] 本文中使用的以下术语和短语旨在具有以下含义:

[0156] 本文中使用的没有数量词修饰的名词用于指一个/种或多于一个/种(即至少一个/种)语法对象。举例来说,“要素”意指一个/种要素或多于一个/种要素。

[0157] 本文中使用的术语“包含”或“包括”用于指在给定实施方案中存在的组合物、方法及其相应组分,但是也是开放式的,包含未指定的要素。

[0158] 本文中使用的术语“基本上由.....组成”是指对于给定实施方案所需的那些要素。该术语允许存在不会实质上影响本公开内容的该实施方案的基本和新的或功能特征的另外的要素。

[0159] 术语“由.....组成”是指如本文中所述的组合物、方法及其相应组分,其不包括未在实施方案的描述中列举的任何要素。

[0160] 术语“包含”在本说明书中使用时包含“由.....组成”和“基本上由.....组成”。

[0161] 如果在本说明书中提及“如上所述”或“以上所述”、“上文”,则是指在本说明书中前面页数的任一页中的任何本公开内容。

[0162] 如果在本说明书中提及“如本文中所述”、“本文中所述”、“本文中所提供”或“如本文本中所述”或“本文中所说明”,则是指在本说明书中前面或后面页数的任一页中的任何本公开内容。

[0163] 本文中使用的术语“约”意指所述值的20%以内、10%以内和5%以内的可接受变化。在某些实施方案中,“约”可意指+/-1%、2%、3%、4%、5%、10%或20%的变化。

[0164] 本文中使用的关于化合物或组合物的术语“有效量”意指足以产生杀菌或抑菌作用的活性化合物(本文中也称为活性剂或药物)的量。在一些实施方案中,有效量是“治疗有效量”,其意指足以减轻被治疗的细菌感染症状的活性化合物的量。

[0165] 本文中使用的术语“对象”(或者作为替代地,“患者”)是指接受预防性或治疗性治疗的动物,优选哺乳动物,最优选人。

[0166] 本文中使用的术语“施用”或其变化形式包括将化合物或药物组合物引入至有此需要的对象的所有手段,包括但不限于经口、静脉内、肌内、腹膜内、皮下、经皮、吸入、经颊、经眼、舌下、经阴道、经直肠等。化合物或组合物的施用是合适地肠胃外的。例如,化合物或组合物可优选地静脉内施用,但也可腹膜内或通过吸入施用,类似目前在临床上针对鸟分枝杆菌(mycobacterium avium)治疗中的脂质体阿米卡星(amikacin)而使用的(参见Shirley et al.,Amikacin Liposome Inhalation Suspension:A Review in Mycobacterium avium Complex Lung Disease.Drugs.2019Apr;79(5):555-562)。

[0167] 本文中使用的术语“治疗”和“处理”是指治疗性或预防性措施,例如本文中所述的那些。

[0168] 术语“可药用盐”是指本公开内容的化合物的相对无毒的无机或有机酸加成盐,该盐具有期望的药理活性。

[0169] 术语“烷基”意指具有一至二十个碳原子的饱和碳链,除非碳链另有定义,否则其可以是直链的或支链的或其组合。烷基的一些实例包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基和叔丁基、戊基、己基、庚基、辛基等。除非在说明书中另有具体说明,否则烷基是任选经取代的。

[0170] 术语“磷脂酰丝氨酸”及其酰基链组成中任一者是指头基中丝氨酸的L-异构体,除非在特定实例中说明。

[0171] 术语“脂质缀合物”是指抑制脂质颗粒聚集的缀合的脂质。这样的脂质缀合物包括但不限于:聚肌氨酸(参见例如WO2021191265A1,其出于所有目的通过引用整体并入本文);聚酰胺低聚物(例如ATTA-脂质缀合物);PEG-脂质缀合物,例如与二烷氧基丙基偶联的PEG、与二酰基甘油偶联的PEG、与胆固醇偶联的PEG、与磷脂酰乙醇胺偶联的PEG、与神经酰胺缀合的PEG(参见例如,美国专利No.5,885,613,其公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文);阳离子PEG脂质;及其混合物。PEG可与脂质直接缀合,或者可通过接头部分与脂质连接。可使用任何适合于将PEG与脂质偶联的接头部分,包括例如,非含酯接头部分和含酯接头部分。在一些优选实施方案中,使用非含酯接头部分。

[0172] 在实施例中,可电离阳离子脂质的缩写可从表中使用的缩写中截取,例如,AKG-UO-1或AKG-KC2-01可称为UO1或KC2-01。

[0173] 多种研究中使用的缩写UT是指未经处理的样品。

[0174] 术语“脂质纳米粒”或“LNP”是指直径为约5至500nm的颗粒。在一些实施方案中,脂质纳米粒包含一种或更多种活性剂。在一些实施方案中,脂质纳米粒包含核酸。在一些实施方案中,核酸缩合在纳米粒的内部,所述纳米粒具有阳离子脂质、聚合物或多价小分子以及与生物环境相互作用的外部脂质包衣。由于磷酸基团之间的排斥力,核酸是天然的刚性聚合物并且优选为伸长的构型。在细胞中,为了应对体积限制,DNA可在离子和其他分子的帮助下在适当的溶液条件下堆积自身。通常,DNA缩合被定义为延长的DNA链塌缩成仅包含一个或数个分子的紧凑、有序的颗粒。通过与磷酸基团结合,阳离子脂质可通过中和磷酸电荷来缩合DNA,并允许紧密堆积。

[0175] 在一些实施方案中,活性剂被包封在LNP中。在一些实施方案中,活性剂可以是阴

离子化合物,例如但不限于:DNA;RNA;天然和合成寡核苷酸(包括反义寡核苷酸、干扰RNA和小干扰RNA);核蛋白;肽;核酸;核酶;含DNA的核蛋白,例如完整的或部分脱蛋白的病毒颗粒(病毒体);除DNA之外的低聚和多聚阴离子化合物(例如,酸性多糖和糖蛋白)。在一些实施方案中,活性剂可与辅料混合。

[0176] 在LNP疫苗产品中,活性剂通常包含在LNP的内部。在一些实施方案中,活性剂包含核酸。通常,水溶性核酸在颗粒内部中与阳离子脂质或聚阳离子聚合物缩合,并且颗粒表面富含中性脂质或PEG-脂质衍生物。另外的可电离阳离子脂质也可位于表面,并通过变得带正电荷而对环境中的酸化有响应,促进内体逃逸。

[0177] 关于LNP,可电离脂质可具有不同的特性或功能。由于氨基的pKa,脂质分子在酸性条件下可变得带正电荷。在这些条件下,脂质分子可与核酸的磷酸基团静电结合,这允许LNP的形成和核酸的包载(entrapment)。在一些实施方案中,pKa可足够低,使得LNP在生理pH值下的生物流体例如血液中的表面电荷基本上是中性的。高LNP表面电荷与毒性、通过固定和游离巨噬细胞从循环中的快速清除、溶血性毒性(包括免疫活化)相关(Filion et al Biochim Biophys Acta.19970ct 23;1329(2):345-56)。

[0178] 在一些实施方案中,pKa可足够高,使得可电离阳离子脂质在酸性内体pH值下可采用带正电荷的形式。以这种方式,阳离子脂质可与内源性内体阴离子脂质组合,以促进膜裂解非双层结构例如六角HII相(hexagonal HII phase),从而导致更有效的胞内递送。在一些实施方案中,pKa的范围为6.2至6.5。例如,pKa可为约6.2、约6.3、约6.4、约6.5。不饱和尾也有助于脂质的采用非双层结构的能力。(Jayaraman et al.,Angew Chem Int Ed Engl.2012Aug 20;51(34):8529-33)。

[0179] 核酸从LNP制剂中的释放,以及特征例如脂质体清除和循环半衰期可通过以下来改进:在LNP中存在聚乙二醇和/或甾醇(例如胆固醇)或其他潜在添加剂,以及整体化学结构,包括作为制剂一部分而被包含的任何可电离阳离子脂质的pKa。

[0180] 术语“生物可还原”是指在还原环境中由于二硫键的裂解而经历加速降解的化合物。与另一些核酸治疗剂例如siRNA不同,基于mRNA的治疗的成功取决于包封mRNA的安全且有效的递送载剂的可用性。mRNA是脆弱的,并且需要针对其的保护性包衣来保持活性,直至其到达其靶位点。包含mRNA的LNP是用于Covid-19免疫的有前景的疫苗选择(Jackson et al.,Preliminary Report.N Engl J Med.2020Nov 12;383(20):1920-1931)。LNP的效率和耐受性归因于氨基脂质并且与许多可具有所需要的数周或数月使用寿命的生物材料应用不同,功能性LNP介导的mRNA递送在数小时内发生,避免了对持久性脂质的需要。实际上,在需要长期给药的应用中,这将尤其重要。已表明,LNP通过内吞作用进入细胞,并在内溶酶体区室中积累。可电离阳离子脂质(ICL)能够在内吞作用之后有效地将mRNA递送至胞质溶胶,同时易受晚期内体/溶酶体中通过脂肪酶的酶促水解或由溶酶体的还原性环境引发的水解的影响而允许完全的生物降解。胞外空间是相对的氧化性环境,而胞内空间是还原性环境,这允许二硫化物连接的分子在胞外空间中保持完整,但一旦内化则迅速还原(Huang etal.,Mol Ther.2005Mar;11(3):409-17,2005)。一些实施方案提供了生物可还原的二硫化物连接的ICL分子(参见化合物29至36,表2),其在LNP制剂中是稳定的并且在循环中是稳定的,但在溶酶体的还原环境中经历裂解。这样的化合物和组合物可促进对脂质的快速生物破坏,并可阻止ICL脂质的潜在毒性积累(如在使用DLin-MC3-DMA的大鼠中观察到的

(Sabins et al.,Mol Ther.2018Jun 6;26(6):1509-1519)。

[0181] 本文中使用的术语“包封”和“包载”是指将mRNA、DNA、siRNA或其他核酸药剂并入到脂质纳米粒中或者与脂质纳米粒缔合。本文中使用的术语“包封”是指完全包封或部分包封。siRNA可能够选择性地敲低或下调目的基因的表达。例如,可选择siRNA以在向有此需要的对象施用包含所述siRNA的纳米粒组合物之后,使与特定疾病、障碍或病症相关的基因沉默。siRNA可包含与编码目的基因或蛋白质的mRNA序列互补的序列。

[0182] 关于胆固醇的术语“mol%”是指以百分点表示的相对于胆固醇和非聚乙二醇化磷脂的摩尔量之总和的胆固醇的摩尔量。例如,在包含胆固醇和HSPC的脂质体中“55mol.%胆固醇”是指55mol.份胆固醇/45mol.份HSPC的组合物。

[0183] 关于PEG-脂质的术语“mol%”是指以百分点表示的PEG-脂质和非聚乙二醇化磷脂的摩尔量的比率。例如,在包含HSPC和PEG-DSPE的LNP中“5mol.%PEG-DSPE”是指具有5mol.份PEG-DSPE/100mol.份HSPC的组合物。

[0184] 在一些实施方案中,关于胆固醇的“mol%”是指以百分点表示的相对于总脂质的摩尔量之总和的胆固醇的摩尔量。例如,在包含胆固醇、ICL、DSPC、PS、胆固醇和PEG-DMG的LNP组合物中“40.5mol%胆固醇”是指40.5mol.份胆固醇/59.5mol.份ICL、DSPC、PS和PEG-DMG组合的组分的组合物。

[0185] 在一些实施方案中,关于缀合的脂质的“mol%”是指以百分点表示的缀合的脂质的摩尔量的比率。例如,在包含胆固醇、ICL、DSPC、PS、胆固醇和PEG-DMG的LNP中“1.5mol%PEG-DMG”是指1.5mol.份PEG-DMG/98.5mol.份组合的ICL、DSPC、PS和胆固醇组分的组合物。

[0186] 在一些实施方案中,关于PS脂质的“mol%”是指以百分点表示的PS脂质的摩尔量的比率。例如,在包含胆固醇、ICL、DSPC、DPPS、胆固醇和PEG-DMG的LNP中“5mol%DPPS”是指5mol.份PEG-DMG/95mol.份组合的ICL、DSPC、PEG-DMG和胆固醇组分的组合物。

[0187] 在一些实施方案中,关于ICL的“mol%”是指以百分点表示的ICL的摩尔量的比率。例如,在包含胆固醇、KC3-OA(例如ICL的一个实例)、DSPC、PS、胆固醇和PEG-DMG的LNP中“48mol%PEG-DMG”是指48mol.份ICL/52mol.份组合的PEG-DMG、DSPC、PS和胆固醇组分的组合物。

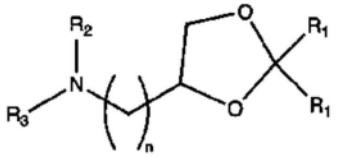
[0188] 本文中使用的术语“可药用载体、稀释剂或赋形剂”包括但不限于任何辅料、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、助悬剂、稳定剂、等张剂、溶剂或乳化剂,其已被美国食品和药物管理局(United States Food and Drug Administration)批准为可用于人或家养动物。

[0189] 多个方面和实施方案在以下小节中进一步详细描述。

[0190] 可电离阳离子脂质

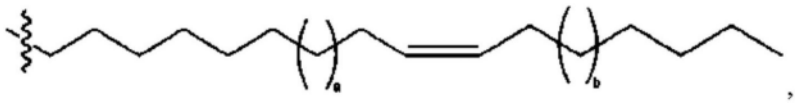
[0191] 本文中提供了可用于制备脂质纳米粒(LNP)组合物的化合物。

[0192] 在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质:

[0193] 

(I),

[0194] 其中R_1是

[0195] 

[0196] 其中a是0或1;b是1、2、3或4,前提是a+b之和是1、2、3或4;

[0197] R_2和R_3各自独立地是任选地被羟基取代的(C_1-C_4)烷基;并且

[0198] n是等于2、3或4的整数。

[0199] 在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中R_1烃链的总长度为C_{15}-C_{18}。在一些实施方案中,R_1烃链的总长度为C_{16}-C_{18}。在一些实施方案中,R_1烃链的总长度为C_{16}或C_{18}。

[0200] 在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中a是0并且b是1、2、3或4。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中a是0并且b是1或3。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中a是0并且b是1。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中a是0并且b是3。

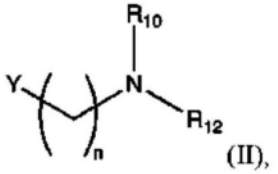
[0201] 在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中a是1并且b是1、2、3或4。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中a是1并且b是1或3。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中a是1并且b是1。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中a是1并且b是3。

[0202] 在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中R_{10}和R_{12}相同。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中R_{10}和R_{12}各自是任选地被羟基取代的(C_1-C_4)烷基。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中R_{10}和R_{12}各自是(C_1-C_4)烷基。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中R_{10}和R_{12}各自是甲基。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中R_{10}和R_{12}各自是乙基。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中R_{10}和R_{12}各自独立地选自甲基或乙基。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中R_{10}和R_{12}各自独立地选自甲基、乙基、-(CH_2)(CH_2)OH和-(CH_2)$_2$(CH_2)OH。

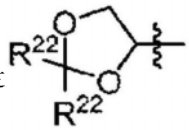
[0203] 在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中a是0或1;b是1、2、3或4,前提是a+b之和是1、2、3或4;R_2和R_3各自是甲基;并且

n是等于2、3或4的整数。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中a是0或1;b是1、2、3或4,前提是a+b之和是1、2、3或4;R_2和R_3各自是甲基;并且n是等于2或3的整数。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中a是0或1;b是1、2、3或4,前提是a+b之和是1、2、3或4;R_2和R_3各自是甲基;并且n是等于2的整数。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中a是0或1;b是1、2、3或4,前提是a+b之和是1、2、3或4;R_2和R_3各自是甲基;并且n是等于3的整数。

[0204] 在一些实施方案中,可电离阳离子脂质包含式(II)的化学结构:

[0205] 
(II),

[0206] 或其可药用盐,其中:

[0207] Y是 
,

[0208] n是整数2、3或4;

[0209] R^{22}是具有单一烯烃并且总长度为C_{15}-C_{18}的烃链,并且

[0210] R_{10}和R_{12}各自独立地是任选地被羟基取代的(C_1-C_4)烷基。

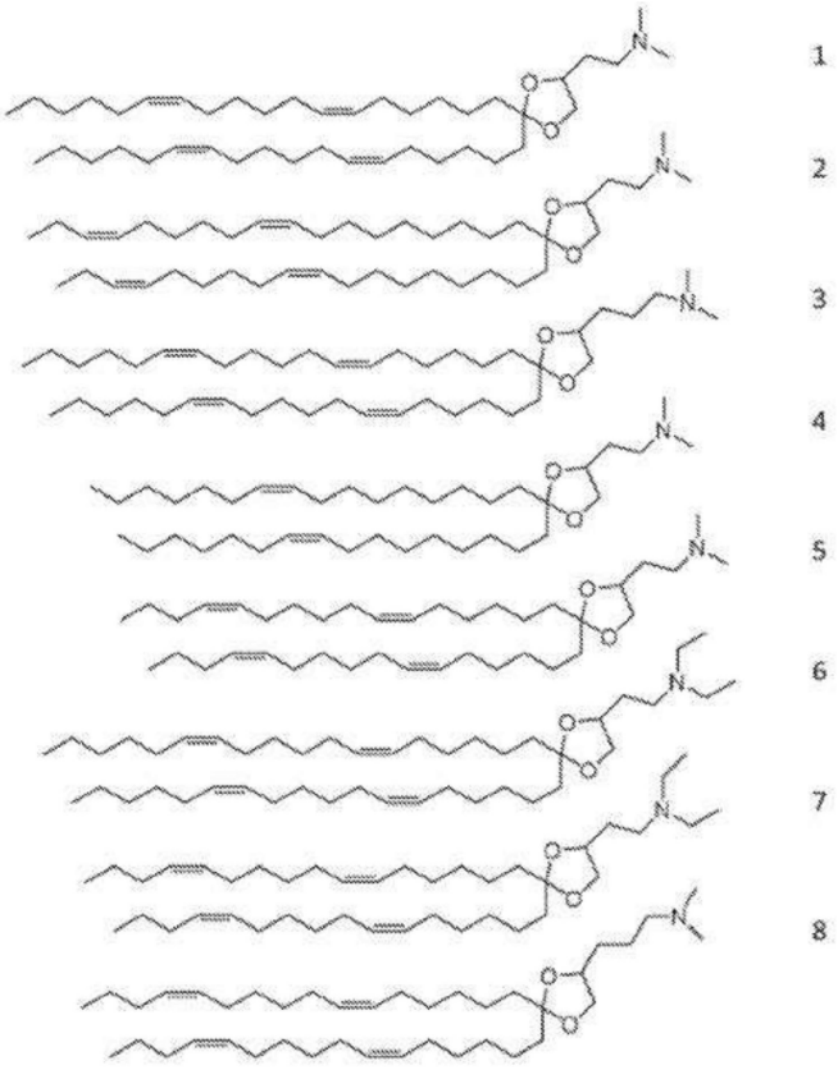
[0211] 在一些方面中,式(II)中的R^{22}是式A的多烯烃链。

[0212] 在一些方面中,式(II)中的R_{10}和R_{12}各自独立地选自甲基、乙基、丙基、-(CH_2)(CH_2)OH和-(CH_2)$_2$(CH_2)OH。在一些方面中,在式(II)中R_{10}和R_{12}各自独立地是甲基。在一些方面中,在式(II)中R_{10}和R_{12}各自独立地是乙基。在一些方面中,在式(II)中R_{10}和R_{12}中的至少一个是任选地被羟基取代的正丙基。在一些方面中,在式(II)中R_{10}是甲基,并且R_{12}选自甲基、乙基、-(CH_2)(CH_2)OH和-(CH_2)$_2$(CH_2)OH。在一些方面中,在式(II)中R_{10}是甲基,并且R_{12}选自-(CH_2)(CH_2)OH和-(CH_2)$_2$(CH_2)OH。在一些方面中,在包含式(II)化学结构的化合物中,R_{10}是甲基,并且R_{12}选自-(CH_2)(CH_2)OH和-(CH_2)$_2$(CH_2)OH。在一些方面中,在式(II)中R_{10}和R_{12}独立地选自任选地被一个或更多个羟基取代的甲基或乙基。在一些方面中,在式(II)中,式(II)中的R_{10}和R_{12}中的一者或二者是-(CH_2)(CH_2)OH或-(CH_2)$_2$(CH_2)OH。在一些方面中,在式(II)中R_{10}是甲基,并且R_{12}是被羟基取代的甲基或乙基。在一些方面中,式(II)中的R_{10}中的一个或两个是甲基,并且在式(II)中R_{12}是-(CH_2)(CH_2)OH。在一些方面中,式(II)中的R_{10}中的一个或两个是甲基,并且在式(II)中R_{12}是-(CH_2)$_2$(CH_2)OH。

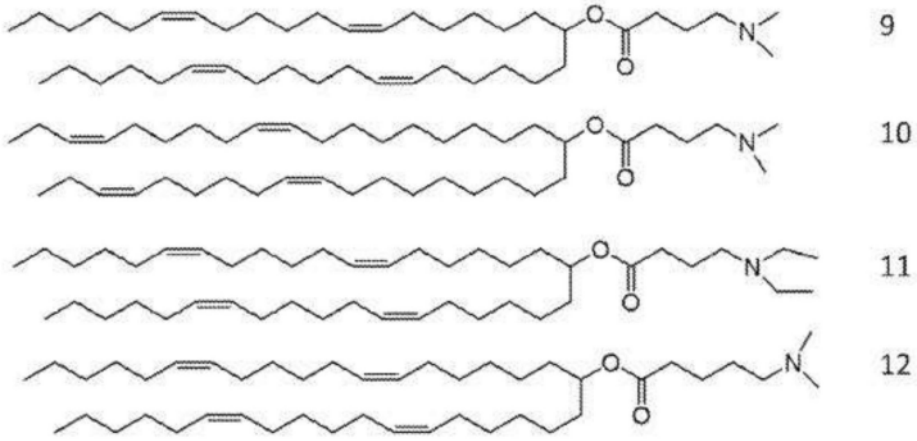
[0213] 在一些实施方案中,化合物具有下表中列出的化合物的结构。表1A和表1B示出了阳离子脂质的一些实例。表2示出了生物可还原的阳离子脂质的一些实例。

[0214] 表1A.示例性阳离子脂质

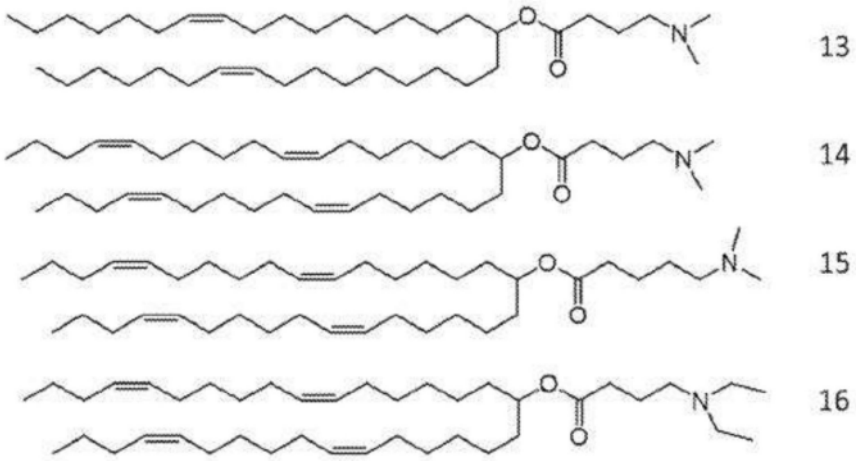
[0215]



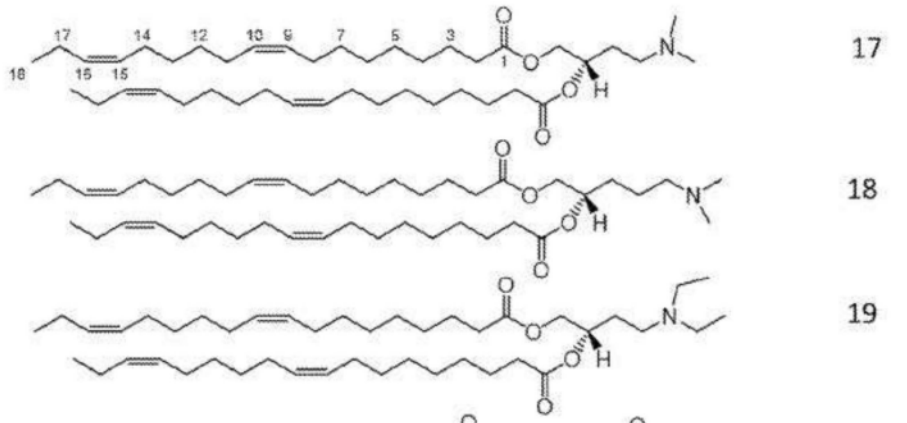
[0216] 表1A.示例性阳离子脂质(续)



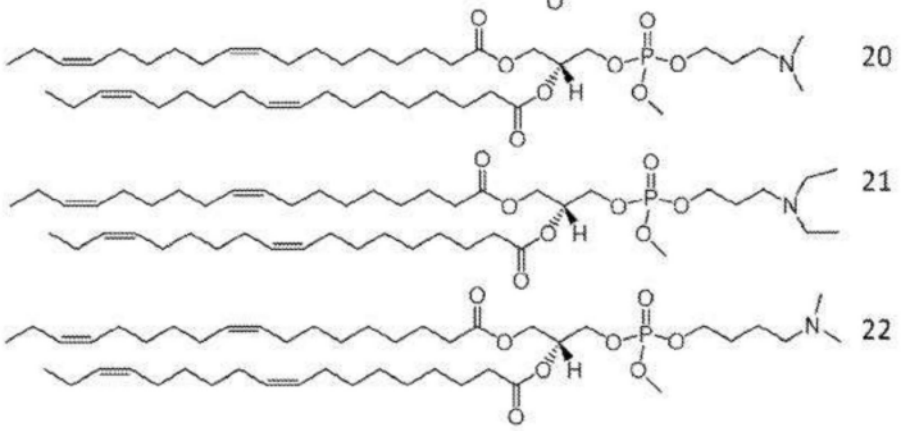
[0217]



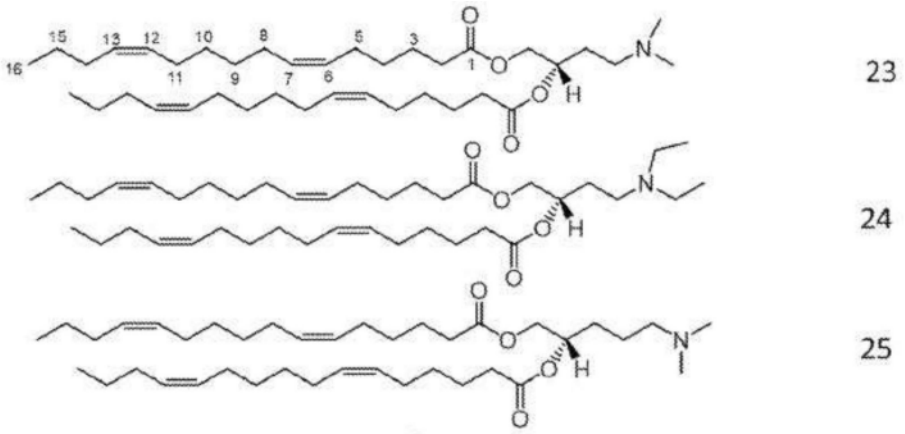
[0218] 表1A.示例性阳离子脂质(续)



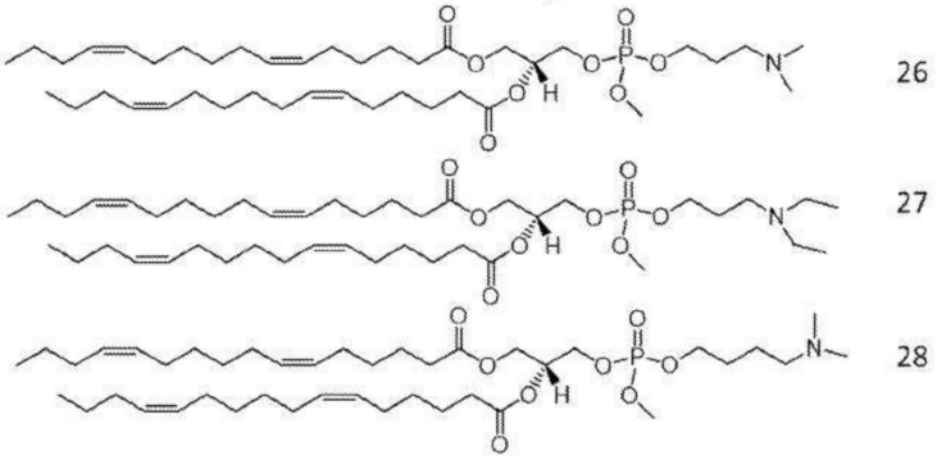
[0219]



[0220] 表1A.示例性阳离子脂质(续)

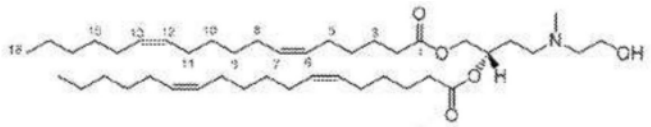


[0221]

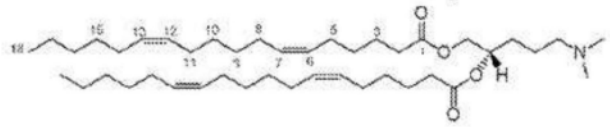


[0222] 表1B另外的示例性阳离子脂质

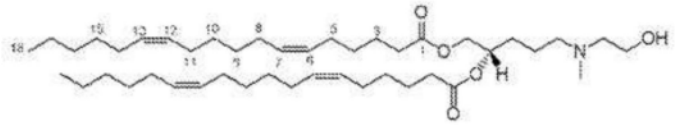
[0223]



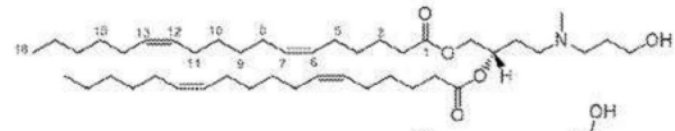
AKG-UO-6



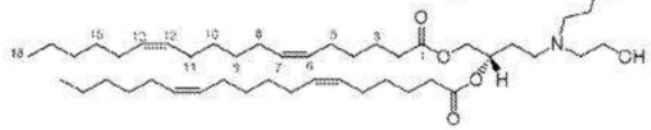
AKG-UO-7



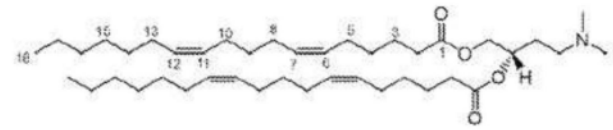
AKG-UO-8



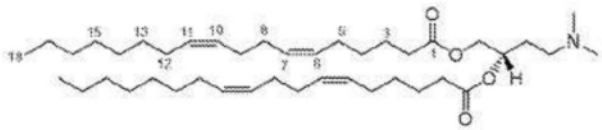
AKG-UO-9



AKG-UO-10



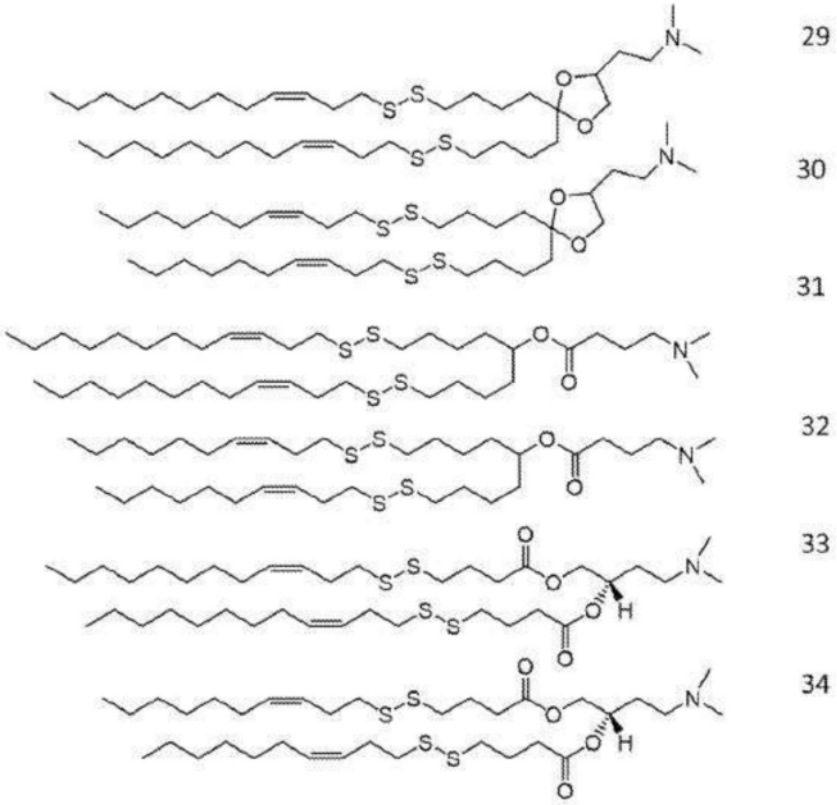
AKG-UO-1A



AKG-UO-1B

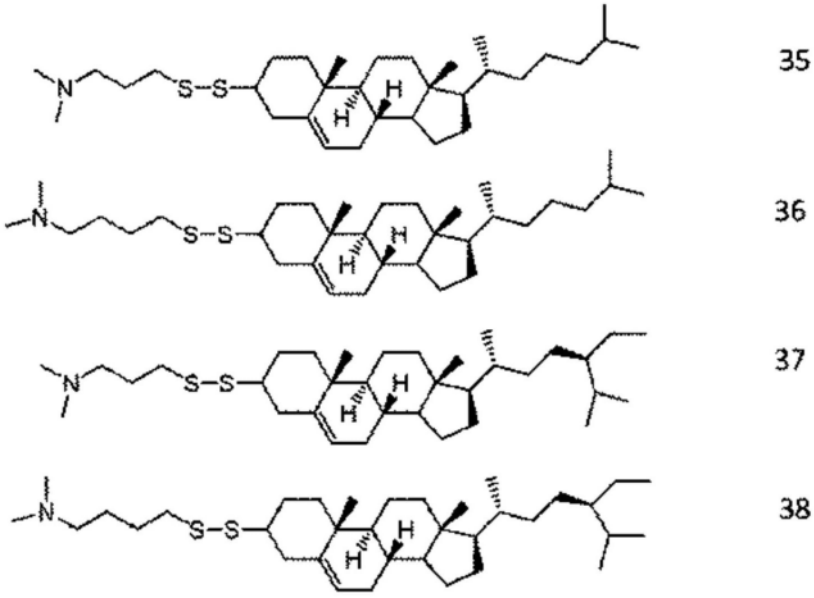
[0224] 表2.示例性生物可还原的阳离子脂质

[0225]



[0226] 表2.示例性生物可还原的阳离子脂质(续)

[0227]



[0228] 在一些实施方案中,可电离脂质包封核酸。在一些实施方案中,可电离脂质将核酸包封在LNP制剂中。在一些实施方案中,核酸是siRNA分子。在一些实施方案中,核酸是mRNA分子。在一些实施方案中,核酸是DNA分子。

[0229] 在一些实施方案中,提供了组合物,所述组合物还包含配体,例如抗体缀合物,其针对细胞表面受体以高度特异性方式将脂质纳米粒靶向至树突细胞。在一些实施方案中,组合物还包含靶向配体,其中所述靶向配体朝向纳米粒的外部。在一些实施方案中,靶向配体是抗体。

[0230] 在一些实施方案中,脂质纳米粒是在水性介质中。

[0231] 在一些实施方案中,核酸包载在具有本文中公开的化合物的脂质纳米粒中,所述化合物包括式I、II、III、IV-B、V-A-1化合物或其组合,其中核酸是RNA或DNA。在一些实施方案中,核酸包载在具有本文中公开的化合物的脂质纳米粒中,所述化合物包括本文中公开的化合物或其组合,其中核酸是RNA或DNA。在一些实施方案中,核酸是mRNA。在一些实施方案中,核酸是siRNA。在一些实施方案中,核酸是DNA。

[0232] 在一些实施方案中,脂质纳米粒包含含有磷脂酰胆碱和甾醇的膜。在一些实施方案中,甾醇是胆固醇。在一些实施方案中,脂质纳米粒包含含有磷脂酰胆碱、可电离阳离子脂质(ICL)的膜。在一些实施方案中,ICL具有式I、II、III、IV-B、V-A-1的结构,以及胆固醇,其中膜将脂质纳米粒的内部与水性介质隔开。在一些实施方案中,ICL具有如表1A和表2中所示的结构。在一些实施方案中,ICL具有表1B中所示的结构。在一些实施方案中,磷脂酰胆碱是二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)或氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质与胆固醇的摩尔比为约65:35至40:60。在一些实施方案中,ICL与胆固醇的摩尔比为约60:40至约45:55。

[0233] 在一些实施方案中,磷脂酰胆碱与胆固醇的摩尔比为约1:5至约1:2。

[0234] 在一些实施方案中,膜还包含聚合物缀合的脂质。

[0235] 在一些实施方案中,脂质纳米粒包含摩尔比为约49.5:10.3:39.6:2.5的ICL、DSPC、胆固醇和聚合物缀合的脂质。

[0236] 在一些实施方案中,聚合物缀合的脂质为PEG(2000)-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG)或PEG(分子量2,000)-二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(PEG-DMPE)。

[0237] 在一些实施方案中,可电离脂质的氧化降解产物的百分比小于DLin-KC2-DMA或DLin-MC3-DMA对照制剂的氧化降解产物的百分比的50%。

[0238] 在一些实施方案中,组合物是用于肠胃外施用的液体药物制剂。

[0239] 在一些实施方案中,组合物是用于皮下、肌内或皮内施用的液体药物制剂。

[0240] 在一些实施方案中,组合物为冻干粉的形式,其随后在施用之前用水性介质重构。

[0241] 本公开内容的另一些方面涉及预防细菌或病毒感染的方法,所述方法包括向有此需要的对象施用有效量的本文中提供的组合物以引发免疫应答。一些实施方案提供了对有此需要的对象进行疫苗接种的方法,所述方法包括施用包含编码抗原蛋白的核酸的组合物。

[0242] 在一些实施方案中,组合物是皮下、肌内或皮内施用的。

[0243] 在一些实施方案中,细菌感染是结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)感染。在一些实施方案中,细菌感染是非结核分枝杆菌的形式。

[0244] 在一些实施方案中,病毒感染是冠状病毒。在一些实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV、MERS-CoV或SARS-CoV-2。

[0245] 在一些实施方案中,病毒感染是HIV/AID。

[0246] 在一些实施方案中,脂质纳米粒是肠胃外施用的。

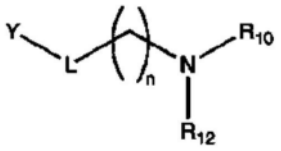
[0247] 在一些实施方案中,脂质纳米粒组合物作为单次注射的一部分施用。

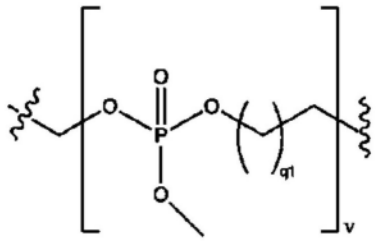
[0248] 本公开内容的特征在于脂质纳米粒,其包含:核酸例如DNA、mRNA、siRNA、反义寡核苷酸、CRISPR组分例如指导RNA(gRNA或sgRNA)和CRISPR相关核酸内切酶(Cas蛋白),以及脂质。一些示例性脂质包括可电离阳离子脂质(ICL)、磷脂、甾醇脂质、亚烷基二醇脂质(例如,

聚乙二醇脂质)、鞘脂、甘油脂质、甘油磷脂、孕烯醇酮(prenol)脂质、糖脂质、脂肪酸和聚酮化合物。在一些实施方案中,LNP包含单一类型的脂质。在一些实施方案中,LNP包含多种(例如,两种或更多种)脂质。LNP可包含可电离阳离子脂质、磷脂、甾醇或亚烷基二醇脂质(例如,聚乙二醇脂质)中的一种或更多种。

[0249] 在一个实施方案中,LNP包含可电离阳离子脂质。本文中使用的"可电离阳离子脂质"、"可电离脂质"和"ICL"可互换使用。ICL是这样的脂质,其包含能够在特定条件下(例如,在特定pH范围内,例如,在生理条件下)携带电荷(例如,正电荷,例如阳离子脂质)的可电离部分。可电离部分可包含胺,并且优选经取代的胺。可电离脂质可以是阳离子脂质或阴离子脂质。除可电离部分之外,可电离脂质可包含烷基或烯基,例如长度大于6个碳原子(例如,长度大于约8个碳、10个碳、12个碳、14个碳、16个碳、18个碳、20个碳或更多)的烷基或烯基。本文中所述的LNP中可包含的另外的可电离脂质在以下中公开:Jayaraman et al.(Angew.Chem.Int.Ed.51:8529-8533(2012)),Semple et al.Nature Biotechnol.28:172-176(2010)),以及美国专利No.8,710,200和8,754,062,其各自通过引用整体并入本文。

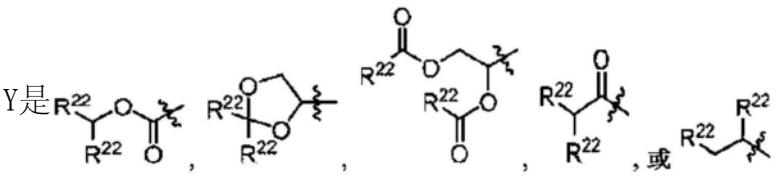
[0250] 在一些实施方案中,LNP还包含具有式(IV-A)结构的可电离脂质,或其可药用盐,

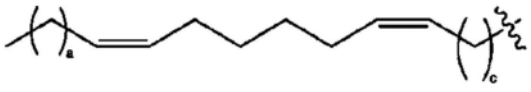
[0251] 

[0252] L= 

(III)

[0253] 其中R_{10}和R_{12}各自独立地是任选地被羟基取代的(C_1-C_4)烷基;v是0或1;q1是1或2;

Y是  ;



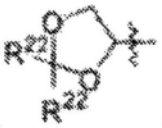
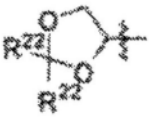
a是1、2、3、4或5;并且c是4、5、6、7或8。

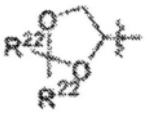
[0254] 在一些实施方案中,对于式(III)化合物,v等于0。在一些实施方案中,对于式(III)化合物,v等于1。在一些实施方案中,对于式(III)化合物,v等于1并且q1等于1。在一些实施方案中,对于式(III)化合物,v等于1并且q1等于2。

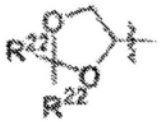
[0255] 在一些实施方案中,对于式(III)化合物,R^{22}中a和c的总和是6、7、8或9。在一些实施方案中,对于式(III)化合物,R^{22}中a和c的总和是6。在一些实施方案中,对于式(III)化合物,R^{22}中a和c的总和是7。在一些实施方案中,对于式(III)化合物,R^{22}中a和c的总和是9。

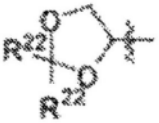
[0256] 在一些实施方案中,对于式(III)化合物,v等于0,并且R^{22}中a和c的总和是6、7、8或9。在一些实施方案中,对于式(IV-B)化合物,v等于0,并且R^{22}中a和c的总和是6。在一些实施方案中,对于式(III)化合物,v等于0,并且R^{22}中a和c的总和是7。在一些实施方案中,对于式(III)化合物,v等于0,并且R^{22}中a和c的总和是9。

[0257] 在一些实施方案中,对于式(III)化合物,R_{10}和R_{12}独立地选自甲基、乙基、-$(CH_2)$$(CH_2)$OH和-$(CH_2)_2(CH_2)$OH。在一些实施方案中,对于式(III)化合物,$R_{10}$和$R_{12}$各自是甲基,并且$R^{22}$中a和c的总和是6、7、8或9。在一些实施方案中,对于式(III)化合物,R_{10}和R_{12}各自是甲基,v是0,并且R^{22}中a和c的总和是6、7、8或9。

[0258] 在一些实施方案中,对于式(IV-B)化合物,v等于0,并且R^{22}是  。在一些实施方案中,对于式(III)化合物,v等于0,并且R^{22}是  并且a和c的总和是7或9。

在一些实施方案中,对于式(III)化合物,v等于0,并且R^{22}是  并且a是4且c是5。

在一些实施方案中,对于式(III)化合物,v等于0,并且R^{22}是  并且a是1且c是8。

在一些实施方案中,对于式(III)化合物,v等于0,并且R^{22}是  并且a是2且c是5。

[0259] LNP可包含浓度大于例如LNP的总脂质含量的约0.1mol%的可电离脂质。在一个实施方案中,LNP包含浓度大于例如LNP的总脂质含量的约1mol%、约2mol%、约4mol%、约8mol%、约20mol%、约40mol%、约50mol%、约60mol%、约80mol%的可电离脂质。在一个实施方案中,LNP包含浓度大于约20mol%、约40mol%或约50mol%的可电离脂质。在一个实施方案中,LNP包含浓度为例如LNP的总脂质含量的约1mol%至约95mol%的可电离脂质。在一个实施方案中,LNP包含浓度为例如LNP的总脂质含量的约2mol%至约90mol%、约4mol%至约80mol%、约10mol%至约70mol%、约20mol%至约60mol%、约40mol%至约55mol%的可电离脂质。在一个实施方案中,LNP包含浓度为约20mol%至约60mol%的可电离脂质。在一个实施方案中,LNP包含浓度为约40mol%至约55mol%的可电离脂质。

[0260] 在一个实施方案中,LNP包含磷脂。磷脂是包含磷酸基团和至少一个烷基、烯基或杂烷基链的脂质。磷脂可以是天然存在的或非天然存在的(例如,合成的磷脂)。磷脂可包含胺、酰胺、酯、羧基、胆碱、羟基、缩醛、醚、碳水化合物、甾醇或甘油。在一些实施方案中,磷脂可包含磷酸胆碱、鞘磷酸脂或缩醛磷脂。一些示例性磷脂包括1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘

油基-3-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DSPE)、1-肉豆蔻酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(MOPC)、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DAPC)、1-棕榈酰基-2-亚油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(PLPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-甘油基-3-磷酸胆碱(POPC)、1-硬脂酰基-2-肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(SMPC)、1-棕榈酰基-2-肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(PMPC)、双(单酰基甘油基)磷酸酯(BMP)、L-α-磷脂酰胆碱、1,2-双十七烷酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DHDPC)和1-硬脂酰基-2-花生四烯酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(SAPC)。本文中所述的LNP中可包含的另外的磷脂在Li,J.et al.(Asian J.Pharm.Sci.10:81-98(2015))中公开,其通过引用整体并入本文。

[0261] 在一些实施方案中,磷脂为1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)。在一些实施方案中,磷脂是1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC)。在一些实施方案中,磷脂是1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPPC)。在一些实施方案中,磷脂是1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

[0262] 磷脂酰丝氨酸的并入

[0263] LNP(例如,如本文中所述)可包含以下组分中的一种或更多种:(i)可电离阳离子脂质(ICL),其包含浓度为约1mol%至约95mol%(或其之间的任何值,例如约20mol%至约80mol%)的C16烷基或C16烯基或C18烷基或C18烯基;(ii)磷脂,其浓度为0.1mol%至约20mol%(或其之间的任何值,例如约2.5mol%至约10mol%),其中所述磷脂还包含C16或C18烷基或烯基;(iii)胆固醇,其浓度为约1mol%至约95mol%(或其之间的任何值,例如约20mol%至约80mol%);(iv)以以下浓度添加至LNP脂质制剂的磷脂酰丝氨酸(PS)或磷脂酰甘油(PG):LNP的总脂质含量的约0.5mol%至约20mol%、约2.5mol%至约10mol%、约4mol%至约8mol%、或其之间的任何值,以及(v)含聚乙二醇(PEG)-2000的脂质(例如,DPG-PEG2000、DPPE-PEG2000、DMPE-PEG2000、DMG-PEG2000),其浓度为约0.1mol%至约5mol%(或其之间的任何值,例如,约1mol%至约2.5mol%)。在一些实施方案中,LNP包含(i)至(v)中的两种。在一些实施方案中,LNP包含(i)至(v)中的三种。在一些实施方案中,LNP包含(i)至(v)中的四种。在一些实施方案中,LNP包含(i)至(v)中的每一种。在一些实施方案中,LNP包含(i)和(ii)。在一些实施方案中,LNP包含(i)和(iii)。在一些实施方案中,LNP包含(i)和(v)。在一些实施方案中,LNP包含(ii)和(iii)。在一些实施方案中,LNP包含(ii)和(v)。在一些实施方案中,LNP包含(iii)和(iv)。在一些实施方案中,LNP包含(iii)和(v)。在一些实施方案中,LNP包含(i)、(ii)和(iii)。在一些实施方案中,LNP包含(i)、(ii)和(v)。在一些实施方案中,LNP包含(ii)、(iii)和(v)。在一些实施方案中,LNP包含(ii)、(iii)、(iv)和(v)。在一个实施方案中,LNP由(i)至(v)中的四种组成或基本上由(i)至(v)中的四种组成。在一个实施方案中,LNP由(i)至(v)中的每一种组成或基本上由(i)至(v)中的每一种组成。在一些实施方案中,LNP由(i)和(ii)组成或基本上由(i)和(ii)组成。在一些实施方案中,LNP由(i)和(iii)组成或基本上由(i)和(iii)组成。在一些实施方案中,LNP由(i)和(v)组成或基本上由(i)和(v)组成。在一些实施方案中,LNP由(ii)和(iii)组成或基本上由(ii)和(iii)组成。在一些实施方案中,LNP包含(ii)和(v)。在一些实施方案中,LNP由(iii)和(iv)组成或基本上由(iii)和(iv)组成。在一些实施方案中,LNP由(iii)和(v)组成或基本上由(iii)和(v)组成。在一些实施方案中,LNP由(i)、(ii)和(iii)组成或基本上由(i)、

(ii)和(iii)组成。在一些实施方案中,LNP由(i)、(ii)和(v)组成或基本上由(i)、(ii)和(v)组成。在一些实施方案中,LNP包含(ii)、(iii)和(v)。在一些实施方案中,LNP由(ii)、(iii)、(iv)和(v)组成或基本上由(ii)、(iii)、(iv)和(v)组成。

[0264] LNP可包含浓度大于例如LNP的总脂质含量的约0.1mol%的磷脂。在一个实施方案中,LNP包含浓度大于例如LNP的总脂质含量的约0.5mol%、约1mol%、约1.5mol%、约2mol%、约3mol%、约4mol%、约5mol%、约6mol%、约8mol%、约10mol%、约12mol%、约15mol%、约20mol%、约50mol%的磷脂。在一个实施方案中,LNP包含浓度大于约1mol%、约5mol%、或约10mol%的磷脂。在一个实施方案中,LNP包含浓度为例如LNP的总脂质含量的约0.1mol%至约50mol%的磷脂。在一个实施方案中,LNP包含浓度为例如LNP的总脂质含量的约0.5mol%至约40mol%、约1mol%至约30mol%、约5mol%至约25mol%、约10mol%至约20mol%、约10mol%至约15mol%、或约15mol%至约20mol%的磷脂。在一个实施方案中,LNP包含浓度为约5mol%至约25mol%的磷脂。在一个实施方案中,LNP包含浓度为约10mol%至20mol%的磷脂。

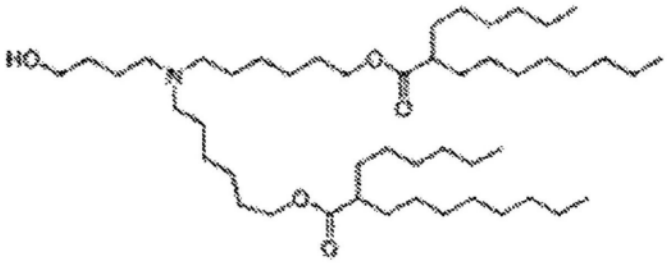
[0265] 在一个实施方案中,LNP包含甾醇或可电离甾醇分子。甾醇是包含多环结构和任选的羟基或醚取代基的脂质,并且可以是天然存在的或非天然存在的(例如,合成的甾醇)。甾醇可不包含双键,包含单个双键或多个双键。甾醇还可包含烷基、烯基、卤素、酯、酮、羟基、胺、聚醚、碳水化合物或环部分。甾醇的示例性列表包含胆固醇、去氢麦角甾醇、麦角甾醇、菜油甾醇、β-谷甾醇、豆甾醇、羊毛甾醇、二氢羊毛甾醇、链甾醇(desmosterol)、菜子甾醇(brassicasterol)、7-胆甾烯醇(lathosterol)、酵母甾醇(zymosterol)、7-去氢链甾醇(7-dehydrodesmosterol)、燕麦甾醇、菜油甾烷醇、羽扇豆醇和环阿屯醇。在一些实施方案中,甾醇包括胆固醇、去氢麦角甾醇、麦角甾醇、菜油甾醇、β-谷甾醇或豆甾醇。本文中所述的LNP中可包含的另外的甾醇在Fahy,E.et al.(J.Lipid.Res.46:839-862(2005)中公开。

[0266] 可电离甾醇

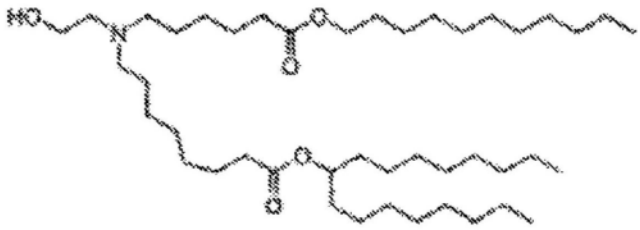
[0267] 在一些实施方案中,LNP包含甾醇。在一些实施方案中,甾醇是胆固醇。在一些实施方案中,甾醇是去氢麦角甾醇。在一些实施方案中,甾醇是麦角甾醇。在一些实施方案中,甾醇是菜油甾醇。在一些实施方案中,甾醇是β-谷甾醇。在一些实施方案中,甾醇是豆甾醇。在一些实施方案中,甾醇是皮质类固醇(例如,皮质酮、氢化可的松、可的松或醛固酮)。

[0268] 在一些实施方案中,可电离脂质可以是选自ALC-0315和SM-102的支链可电离脂质:

[0269]



ALC-0315



SM-102

[0270] LNP可包含浓度大于例如LNP的总脂质含量的约0.1mol％的甾醇。在一个实施方案中,LNP包含浓度大于例如LNP的总脂质含量的约0.5mol％、约1mol％、约5mol％、约10mol％、约15mol％、约20mol％、约25mol％、约35mol％、约40mol％、约45mol％、约50mol％、约55mol％、约60mol％、约65mol％或约70mol％的甾醇。在一个实施方案中,LNP包含浓度大于约10mol％、约15mol％、约20mol％或约25mol％的甾醇。在一个实施方案中,LNP包含浓度为例如LNP的总脂质含量的约1mol％至约95mol％的甾醇。在一个实施方案中,LNP包含浓度为例如LNP的总脂质含量的约5mol％至约90mol％、约10mol％至约85mol％、约20mol％至约80mol％、约20mol％至约60mol％、约20mol％至约50mol％、或约20mol％至40mol％的甾醇。在一个实施方案中,LNP包含浓度为约20mol％至约50mol％的甾醇。在一个实施方案中,LNP包含浓度为约30mol％至约60mol％的甾醇。

[0271] 在一些实施方案中,LNP包含含亚烷基二醇的脂质。含亚烷基二醇的脂质是包含至少一个亚烷基二醇部分,例如亚甲基二醇或乙二醇部分的脂质。在一些实施方案中,含亚烷基二醇的脂质包含聚乙二醇(PEG)。含亚烷基二醇的脂质可以是含PEG的脂质。聚合物缀合的脂质可包括聚(乙二醇)缀合的(聚乙二醇化)磷脂(PEG-脂质),例如PEG(分子量2,000)甲氧基-聚(乙二醇)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油(PEG-DSG)、PEG(分子量2,000)甲氧基-聚(乙二醇)-1,2-棕榈酰基-sn-甘油(PEG-DPG)、PEG(分子量2,000)1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](PEG-DSPE)或N-棕榈酰基-鞘氨醇-1-{琥珀酰基[甲氧基(聚乙二醇)2000]}(PEG-神经酰胺)。PEG-脂质组分中PEG部分的分子量也可从500至10,000g/mol、1,500至6000g/mol变化,但优选约2,000MW。用于与脂质锚缀合的另一些聚合物可包括聚(2-甲基-2-噁唑啉)(PMOZ)、聚(2-乙基-2-噁唑啉)(PEOZ)、聚-N-乙烯基吡咯烷酮(PVP)、聚甘油、聚(羟乙基L-天冬酰胺)(PHEA)和聚(羟乙基L-谷氨酰胺)(PHEG)。

[0272] 含PEG的脂质还可包含胺、酰胺、酯、羧基、磷酸酯、胆碱、羟基、缩醛、醚、杂环或碳水化合物。含PEG的脂质可包含至少一个烷基或烯基,例如长度大于6个碳原子(例如,长度大于约8个碳、10个碳、12个碳、14个碳、16个碳、18个碳、20个碳或更多)的烷基或烯基,例如除PEG部分之外。在一个实施方案中,含PEG的脂质包含含有以下的PEG部分:至少20个PEG单体,例如,至少30个PEG单体、40个PEG单体、45个PEG单体、50个PEG单体、100个PEG单体、200个PEG单体、300个PEG单体、500个PEG单体、1000个PEG单体或2000个PEG单体。示例性的含

PEG的脂质包括PEG-DMG(例如,DMG-PEG2k)、PEG-c-DMG、PEG-DSG、PEG-DPG、PEG-DSPE、PEG-DMPE、PEG-DPPE、PEG-DOPE和PEG-DLPE。在一些实施方案中,PEG-脂质包括PEG-DMG(例如,DMG-PEG2k)、PEG-c-DMG、PEG-DSG和PEG-DPG。本文中所述的LNP中可包含的另外的PEG-脂质在Fahy,E.et al.(J.Lipid.Res.46:839-862(2005)中公开,其通过引用整体并入本文。

[0273] 在一些实施方案中,PEG-脂质是PEG-DMG(例如,DMG-PEG2k)。在一些实施方案中,PEG-脂质是α-(3'-{[1,2-二(肉豆蔻氧基)丙氧基]羰基氨基}丙基)-ω-甲氧基、聚氧乙烯(PEG-c-DMG)。在一些实施方案中,PEG-脂质是PEG-DSG。在一些实施方案中,PEG-脂质是PEG-DPG。

[0274] LNP可包含浓度大于例如LNP的总脂质含量的约0.1mol%的含亚烷基二醇的脂质。在一个实施方案中,LNP包含浓度大于例如LNP的总脂质含量的约0.5mol%、约1mol%、约1.5mol%、约2mol%、约3mol%、约4mol%、约5mol%、约6mol%、约8mol%、约10mol%、约12mol%、约15mol%、约20mol%、约50mol%的含亚烷基二醇的脂质。在一个实施方案中,LNP包含浓度大于约1mol%、约4mol%或约6mol%的含亚烷基二醇的脂质。在一个实施方案中,LNP包含浓度为例如LNP的总脂质含量的约0.1mol%至约50mol%的含亚烷基二醇的脂质。在一个实施方案中,LNP包含浓度为例如LNP的总脂质含量的约0.5mol%至约40mol%、约1mol%至约35mol%、约1.5mol%至约30mol%、约2mol%至约25mol%、约2.5mol%至约20%、约3mol%至约15mol%、约3.5mol%至约10mol%、或约4mol%至9mol%的含亚烷基二醇的脂质。在一个实施方案中,LNP包含浓度为约3.5mol%至约10mol%的含亚烷基二醇的脂质。在一个实施方案中,LNP包含浓度为约4mol%至9mol%的含亚烷基二醇的脂质。

[0275] 在一些实施方案中,LNP包含至少两种类型的脂质。在一个实施方案中,LNP包含可电离脂质、磷脂、甾醇和含亚烷基二醇的脂质中的两种。在一些实施方案中,LNP包含至少三种类型的脂质。在一个实施方案中,LNP包含可电离脂质、磷脂、甾醇和含亚烷基二醇的脂质中的三种。在一些实施方案中,LNP包含至少四种类型的脂质。在一个实施方案中,LNP包含可电离脂质、磷脂、甾醇和含亚烷基二醇的脂质中的每一种。

[0276] LNP(例如,如本文中所述)可包含以下组分中的一种或更多种:(i)可电离阳离子脂质,其浓度为约1mol%至约95mol%(例如,约20mol%至约80mol%);(ii)磷脂,其浓度为0.1mol%至约50mol%(例如,约2.5mol%至约20mol%);(iii)甾醇,其浓度为约1mol%至约95mol%(例如,约20mol%至约80mol%);以及(iv)含PEG的脂质,其浓度为约0.1mol%至约50mol%(例如,约2.5mol%至约20mol%)。在一些实施方案中,LNP包含(i)至(iv)中的一种。在一些实施方案中,LNP包含(i)至(iv)中的两种。在一些实施方案中,LNP包含(i)至(iv)中的三种。在一些实施方案中,LNP包含(i)至(iv)中的每一种。在一些实施方案中,LNP包含(i)和(ii)。在一些实施方案中,LNP包含(i)和(iii)。在一些实施方案中,LNP包含(i)和(iv)。在一些实施方案中,LNP包含(ii)和(iii)。在一些实施方案中,LNP包含(ii)和(iv)。在一些实施方案中,LNP包含(iii)和(iv)。在一些实施方案中,LNP包含(i)、(ii)和(iii)。在一些实施方案中,LNP包含(i)、(ii)和(iv)。在一些实施方案中,LNP包含(ii)、(iii)和(iv)。

[0277] LNP(例如,如本文中所述)可包含以下组分中的一种或更多种:(i)可电离阳离子脂质(ICL),其浓度为约1mol%至约95mol%(例如,约20mol%至约80mol%);(ii)DSPC,其浓度为0.1mol%至约50mol%(例如,约2.5mol%至约20mol%);(iii)胆固醇,其浓度为约

1mol％至约95mol％(例如,约20mol％至约80mol％);以及(iv)DMG-PEG2k,其浓度为约0.1mol％至约50mol％(例如,约2.5mol％至约20mol％)。在一些实施方案中,LNP包含(i)至(iv)中的两种。在一些实施方案中,LNP包含(i)至(iv)中的三种。在一些实施方案中,LNP包含(i)至(iv)中的每一种。在一些实施方案中,LNP包含(i)和(ii)。在一些实施方案中,LNP包含(i)和(iii)。在一些实施方案中,LNP包含(i)和(iv)。在一些实施方案中,LNP包含(ii)和(iii)。在一些实施方案中,LNP包含(ii)和(iv)。在一些实施方案中,LNP包含(iii)和(iv)。在一些实施方案中,LNP包含(iii)和(iv)。在一些实施方案中,LNP包含(i)、(ii)和(iii)。在一些实施方案中,LNP包含(i)、(ii)和(iv)。在一些实施方案中,LNP包含(ii)、(iii)和(iv)。

[0278] 在一个实施方案中,LNP包含的可电离脂质与磷脂的比率为约50:1至约1:1(例如,40:1,32:3,6:1,7:1,5:1,24:5,26:5,10:3,15:2,16:7,18:1,3:1,3:2,或1:1)。在一个实施方案中,LNP包含的可电离脂质与磷脂的比率为约15:2。在一个实施方案中,LNP包含的可电离脂质与磷脂的比率为约5:1。在一个实施方案中,LNP包含的可电离脂质与甾醇的比率为约10:1至约1:10(例如,9:1,8:1,8:7,7:1,7:5,7:3,6:1,6:5,5:1,5:3,4:1,4:3,3:1,2:1,1:1,1:2,1:3,3:4,1:4,3:5,1:5,4:5,1:6,5:6,7:6,7:8或8:9)。在一个实施方案中,LNP包含的可电离脂质与含亚烷基的脂质的比率为约1:10至约10:1(例如,1:9,1:8,7:8,7:1,7:5,7:3,6:1,6:5,5:1,5:3,4:1,4:3,3:1,2:1,1:1,1:2,1:3,3:4,1:4,3:5,1:5,4:5,1:6,5:6,7:6,7:8或8:9)。在一个实施方案中,LNP包含的磷脂与含亚烷基的脂质的比率为约10:1至约1:10(例如,9:1,8:1,8:7,7:1,7:5,7:3,6:1,6:5,5:1,5:3,4:1,4:3,3:1,2:1,1:1,1:2,1:3,3:4,1:4,3:5,1:5,4:5,1:6,5:6,7:6,7:8或8:9)。在一个实施方案中,LNP包含的甾醇与含亚烷基的脂质的比率为约50:1至约1:1(例如,40:1,32:3,6:1,7:1,5:1,24:1,22:1,20:1,22:5,24:5,26:5,10:3,15:2,16:7,18:1,3:1,3:2或1:1)。

[0279] 在一些实施方案中,LNP(例如,本文中所述)包含可电离脂质、磷脂、甾醇和含亚烷基二醇的脂质(例如,含PEG的脂质)中的两种。在另一个实施方案中,LNP(例如,本文中所述)包含可电离脂质、磷脂、甾醇和含亚烷基二醇的脂质(例如,含PEG的脂质)中的三种。在一些实施方案中,LNP(例如,本文中所述)包含可电离脂质、磷脂、甾醇和含亚烷基二醇的脂质(例如,含PEG的脂质)中的每一种。

[0280] 在一些实施方案中,本文中所述的LNP的直径为5至500nm,例如,10至400nm、20至350nm、25至325nm、30至300nm、50至250nm、60至200nm、75至190nm、80至180nm、100至200nm、200至300nm、和150至250nm。LNP的直径可通过本领域已知的任何方法,例如动态光散射、透射电子显微术(transmission electron microscopy,TEM)或扫描电子显微术(scanning electron microscopy,SEM)来确定。在一些实施方案中,LNP的直径为50至100nm、70至100nm、和80至100nm。在一个实施方案中,LNP的直径为约90nm。在一些实施方案中,本文中所述的LNP的直径大于约30nm。在一些实施方案中,LNP的直径大于约35nm、约40nm、约45nm、约50nm、约60nm、约70nm、约80nm、约90nm、约100nm、约120nm、约140nm、约160nm、约180nm、约200nm、约225nm、约250nm、约275nm或约300nm。在一个实施方案中,LNP的直径大于约70nm。在一个实施方案中,LNP的直径大于约90nm。在一个实施方案中,LNP的直径大于约180nm。

[0281] 在一些实施方案中,本文中所述的多种LNP的平均直径为约40nm至约180nm。在一些实施方案中,本文中所述的多种LNP的平均直径为约50nm至约150nm。在一些实施方案中,

本文中所述的多种LNP的平均直径为约50nm至约120nm。在一些实施方案中,本文中所述的多种LNP的平均直径为约60nm至约120nm。在一些实施方案中,多种LNP的平均直径为约40nm、约45nm、约50nm、约60nm、约70nm、约80nm、约90nm、约100nm、约120nm、约140nm、约160nm、约180nm。

[0282] 在一些实施方案中,本文中所述的纳米粒或多种纳米粒的平均中性至负表面电荷小于-100mv,例如,小于-90mv、-80mv、-70mv、-60mv、-50mv、-40mv、-30mv和-20mv。在一些实施方案中,纳米粒或多种纳米粒的中性至负表面电荷为-100mv至100mv、-75mv至0、或-50mv至-10mv。

[0283] 在一些实施方案中,纳米粒或多种纳米粒中的至少5%(例如,至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%)的平均中性至负表面电荷小于-100mv。在一些实施方案中,纳米粒或多种纳米粒在pH 7.4下的平均表面电荷为-20mv至+20、-10mv至+10mv、或-5mv至+5mv。与阳离子LNP相比,带中性电荷的LNP具有改善的药代动力学和生物学性能。

[0284] 制备脂质纳米粒(LNP)

[0285] 制备LNP的方法可包括将第一溶液与第二溶液混合。可使用标准液体混合技术,例如螺旋桨(propellor)混合、涡旋溶液或优选地通过微流体混合或高效T混合来实现混合。在一些实施方案中,第一溶液包含脂质或多种脂质,以及核酸,其中所有组分均溶解在水/溶剂体系中。溶剂可以是任何水混溶性溶剂(例如,乙醇、甲醇、异丙醇、乙腈、二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、二氧六环或四氢呋喃)。在一些实施方案中,第一溶液包含小百分比的水或pH缓冲水。第一溶液可包含高至至少60体积%的水,例如,高至至少约0.05体积%、0.1体积%、0.5体积%、1体积%、2体积%、3体积%、4体积%、5体积%、10体积%、15体积%、20体积%、25体积%、30体积%、35体积%、40体积%、45体积%、50体积%、55体积%或60体积%的水。在一个实施方案中,第一溶液包含约0.05体积%至60体积%的水,例如,约0.05体积%至50体积%、约0.05体积%至40体积%、或约5体积%至20体积%的水。

[0286] 在一些实施方案中,第一溶液包含单一类型的脂质,例如,可电离脂质、磷脂、甾醇或含PEG的脂质。在一些实施方案中,第一溶液包含多种脂质。在一些实施方案中,多种包含可电离脂质、磷脂、甾醇或含PEG的脂质。在一些实施方案中,多种脂质包含胆固醇、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯2000(DMG-PEG2k)或α-(3'-{[1,2-二(肉豆蔻氧基)丙氧基]羰基氨基}丙基)-ω-甲氧基、聚氧乙烯(PEG2000-C-DMG)和可电离脂质。多种脂质可以以任何比率存在。在一个实施方案中,多种脂质包含上述脂质中的可电离脂质或甾醇、磷脂、甾醇、含PEG的脂质或者其特定比率(例如,本文中所述的比率)的组合。

[0287] 在一些实施方案中,第二溶液是水。在一些实施方案中,第二溶液是pH为3至6(例如,pH为约3、约4、约5或约6)的水性缓冲液。第二溶液可包含负载组分,例如核酸(例如mRNA)。第二溶液可包含小百分比的水混溶性有机溶剂。第二溶液可包含高至至少60体积%的至少一种水混溶性有机溶剂,例如,高至至少约0.05体积%、0.1体积%、0.5体积%、1体积%、2体积%、3体积%、4体积%、5体积%、6体积%、7体积%、8体积%、9体积%、10体积%、15体积%、20体积%、25体积%、30体积%、35体积%、40体积%、45体积%、50体积%、55体积%、60体积%或其之间任何体积百分比的至少一种有机溶剂(例如,水混溶性有机溶

剂)。在一个实施方案中,第二溶液包含约0.05体积%至60体积%的有机溶剂,例如,约0.05体积%至50体积%、约0.05体积%至40体积%、或约5体积%至20体积%的有机溶剂(例如,水混溶性有机溶剂)。水性缓冲溶液可以是柠檬酸盐缓冲水溶液。在一些实施方案中,水性缓冲溶液是pH为4至6(例如,pH为约4、约5或约6)的柠檬酸盐缓冲溶液。在一个实施方案中,水性缓冲溶液是pH为约6的柠檬酸盐缓冲溶液。

[0288] 在一些实施方案中,可稀释包含第一和第二溶液的混合物的溶液,所述混合物包含LNP混悬液。在一些实施方案中,可调节包含第一和第二溶液的混合物的溶液的pH,所述混合物包含LNP混悬液。LNP混悬液的稀释或LNP混悬液pH的调节可通过添加水、酸、碱或水性缓冲液来实现。在一些实施方案中,不进行LNP混悬液的稀释或LNP混悬液pH的调节。在一些实施方案中,进行LNP混悬液的稀释和LNP混悬液pH的调节二者。

[0289] 在一些实施方案中,可通过切向流过滤(tangential flow filtration,TFF)(例如,渗滤)从LNP混悬液中除去过量的试剂、溶剂、未包封的核酸。也可用TFF从LNP混悬液中除去有机溶剂(例如乙醇)和缓冲液。在一些实施方案中,对LNP混悬液进行透析而不是TFF。在一些实施方案中,对LNP混悬液进行TFF而不是透析。在一些实施方案中,对LNP混悬液进行透析和TFF二者。

[0290] 在一个方面中,本公开内容的特征在于这样的方法:其包括将包含核酸的LNP样品用包含洗涤剂(例如,Triton X-100,或阴离子洗涤剂(例如但不限于十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,SDS),或非离子洗涤剂,例如但不限于β-辛基葡糖苷,或两性洗涤剂(Zwittergent)3-14)的流体处理适合于降解脂质层并从而释放包封和/或包载的核酸的一段时间。在一个实施方案中,所述方法还包括分析样品中所释放核酸的存在、不存在和/或量。

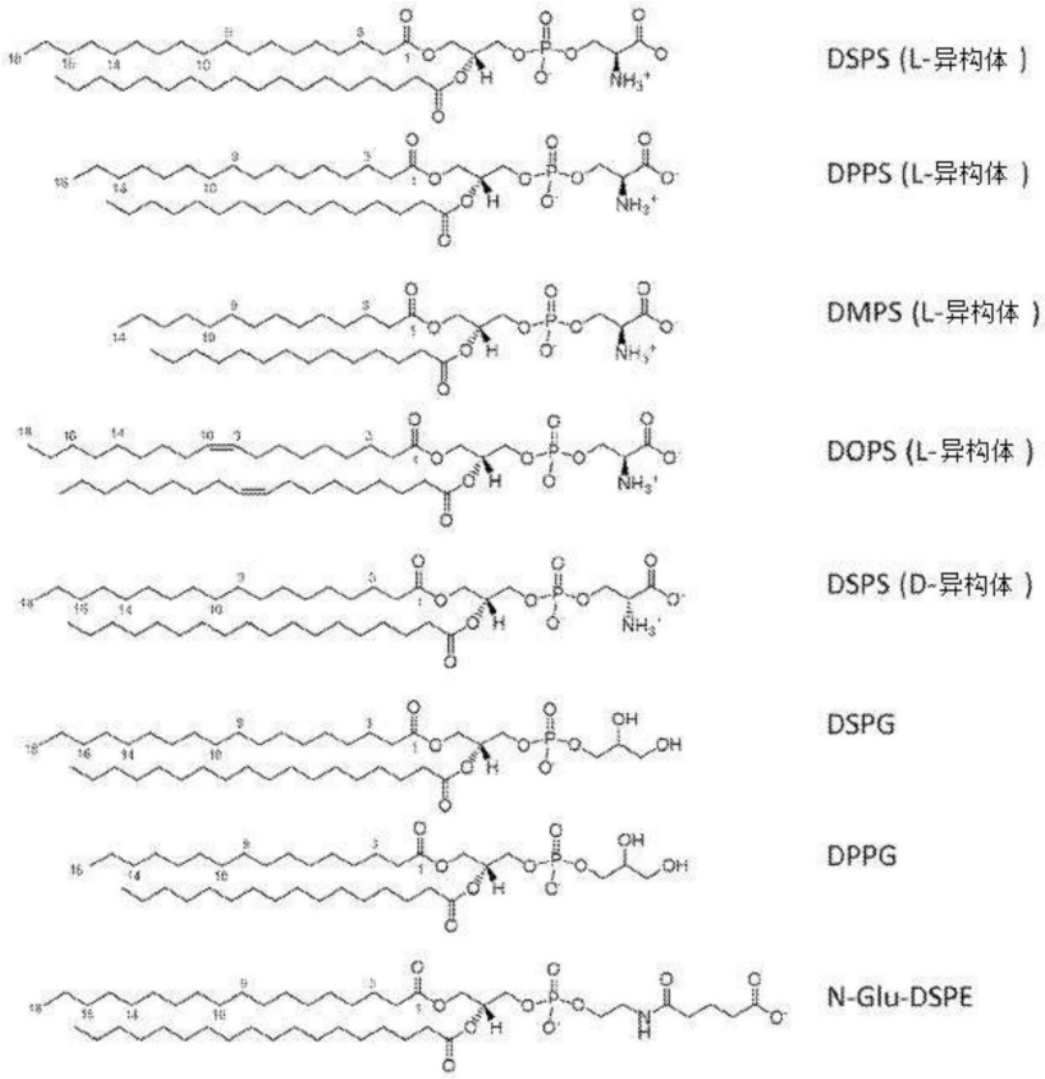
[0291] 包含配体的LNP

[0292] 本公开内容的一些方面涉及包含对细胞表面抗原具有结合特异性的配体(本文中也称为靶向配体)的LNP,其中配体与抗原的结合诱导配体的内化。一些实施方案涉及包含含有如本文中所述的配体的LNP的组合物。

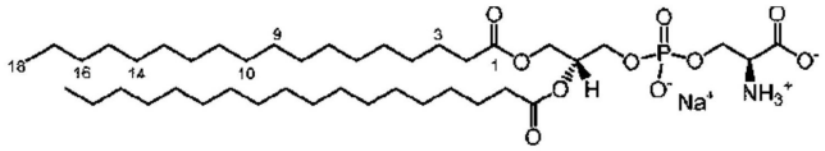
[0293] LNP靶向也可通过向制剂中添加脂质来实现。例如,已知磷脂酰丝氨酸在凋亡期间重新分布至质膜的外表面,并且是用于吞噬细胞吸引的分子信号(cue)(Fadok et al.Curr Biol.2003Aug 19;13(16):R655-7)。磷脂酰丝氨酸(PS)和磷脂酰甘油(PG)被树突细胞识别,并可诱导树突细胞的摄取和活化。LNP靶向也可通过向制剂中添加某些阴离子磷脂来实现(表3A)。例如,已知磷脂酰丝氨酸在凋亡期间重新分布至质膜的外表面,并且是用于吞噬细胞吸引的分子信号(Fadok et al.Curr Biol.2003Aug19;13(16):R655-7)。磷脂酰丝氨酸(PS)和磷脂酰甘油(PG)被树突细胞识别,并可诱导树突细胞的摄取和活化(Caronni et al.,Nat Comm.2021April 14;12:2237-2253;Ischihashi et al.,PLOS One 2013)。尽管阴离子磷脂先前已在脂质体的背景下使用,但它们包含在包含缩合核酸的脂质纳米粒中是出乎意料的,因为阴离子头基可与mRNA的磷酸骨架竞争可电离阳离子脂质的结合位点、可通过改变表面电荷来抑制胞内逃逸、或可导致LNP在形成或储存期间聚集。

[0294] 表3A.阴离子磷脂靶向部分

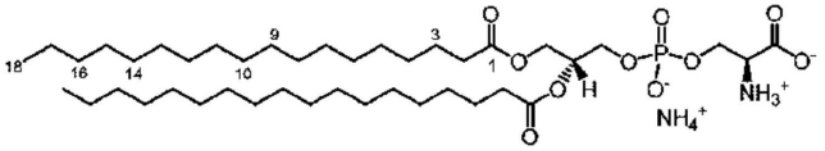
[0295]



[0296] 表3B.磷脂酰丝氨酸靶向部分

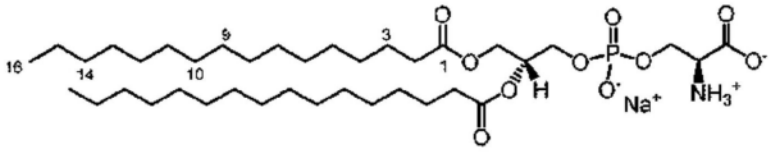


DSPS (L-异构体) – 钠盐

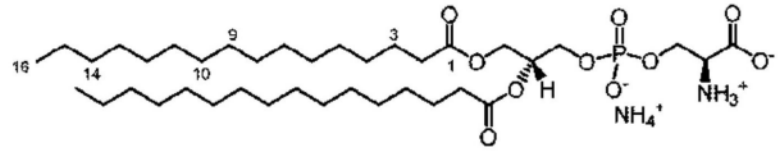


DSPS (L-异构体) – 铵盐

[0297]



DPPS (L-异构体) – 钠盐



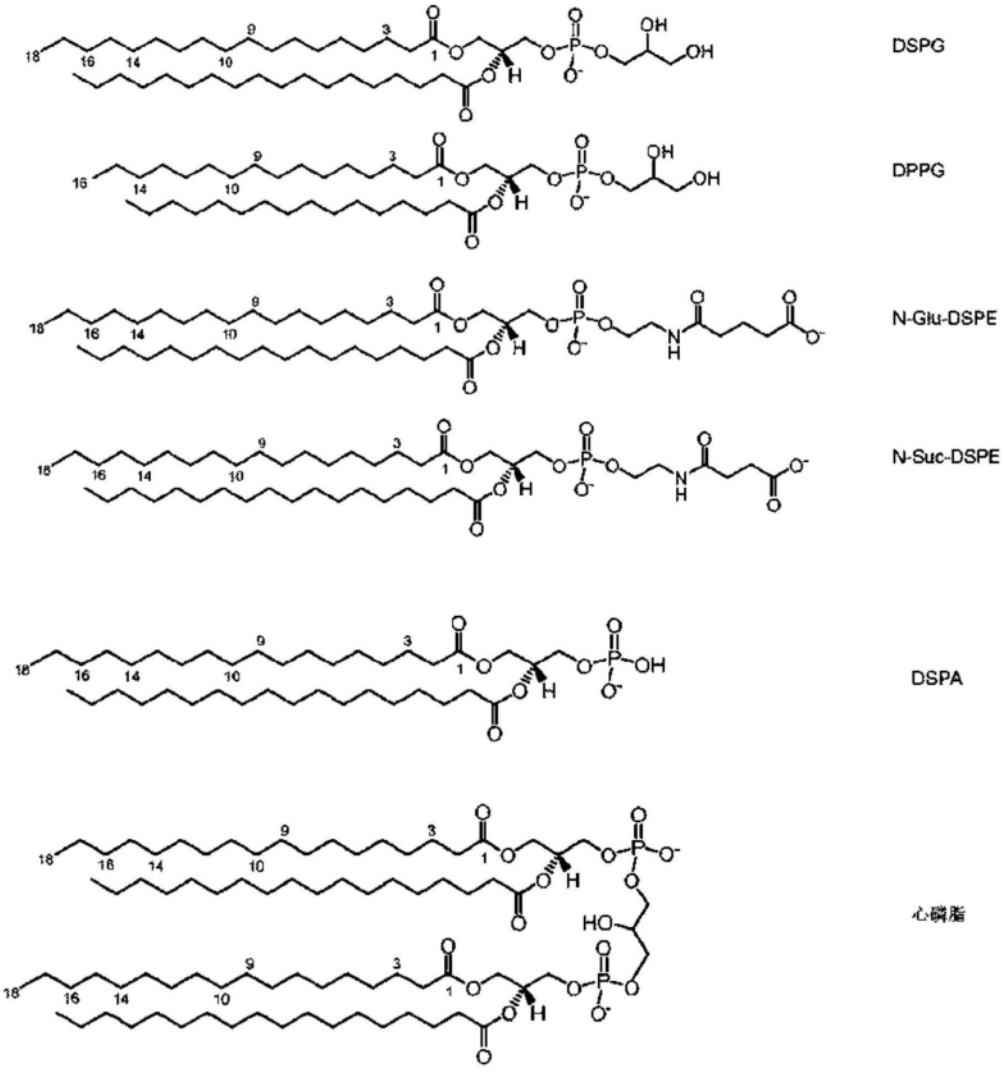
DPPS (L-异构体) – 铵盐

[0298] 在一些实施方案中,阴离子靶向配体选自以下组:磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰甘油(PG)、N-戊二酰基-磷脂酰乙醇胺(N-glu-PE)或N-琥珀酰基-磷脂酰乙醇胺(N-Suc-PE)。在一个实施方案中,所使用的阴离子磷脂是磷脂酰丝氨酸。在另一个实施方案中,磷脂酰丝氨酸包含丝氨酸的L-异构体。在另一个实施方案中,磷脂酰丝氨酸的酰基链是完全饱和的,例如二肉豆蔻酰基磷脂酰-L-丝氨酸(DMPS)、二棕榈酰基磷脂酰-L-丝氨酸(DPPS)或二硬脂酰基磷脂酰-L-丝氨酸(DSPS)的情况。在一个优选的实施方案中,所使用的PS是DPPS的L-异构体或DSPS的L-异构体。磷脂酰丝氨酸也可包含非对称的酰基链组成,例如其中一个酰基链是硬脂酸并且另一个是棕榈酸。

[0299] 在一些实施方案中,阴离子磷脂选自除磷脂酰丝氨酸以外的组。在一些实施方案中,这些非PS阴离子磷脂包括磷脂酰甘油(PG)、磷脂酸(PA)、N-戊二酰基-磷脂酰乙醇胺(N-Glu-PE)、N-琥珀酰基-磷脂酰乙醇胺(N-Suc-PE)和心磷脂。在一个实施方案中,这些阴离子磷脂包括16或18个碳的饱和酰基链,例如二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、N-琥珀酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(N-Suc-DSPE)、N-戊二酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(N-Glu-DSPE)、二硬脂酰基磷脂酸(DSPA)和心磷脂。

[0300] 表3C.非磷脂酰丝氨酸阴离子磷脂

[0301]

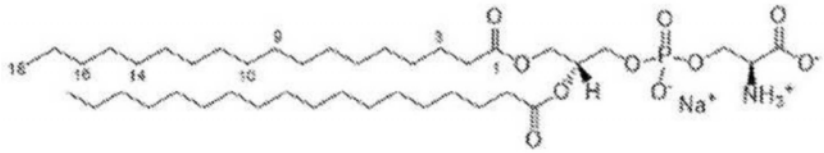


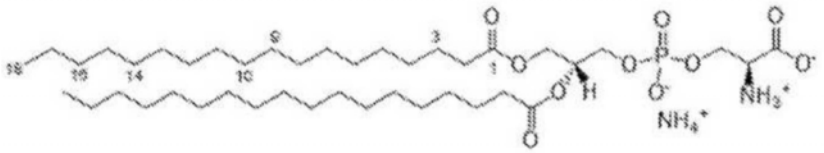
[0302] 在一些实施方案中,使用的阴离子磷脂是磷脂酰甘油。在另一个实施方案中,磷脂酰甘油的酰基链是完全饱和的,例如二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油(DMPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)或二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)的情况。在一个优选实施方案中,使用的PG是DPPS或DSPS。磷脂酰甘油也可包含非对称酰基链组合物,例如其中一个酰基链是硬脂酸,而另一个是棕榈酸。

[0303] 在一些实施方案中,磷脂酰甘油或磷脂酰丝氨酸的盐形式在乙醇中是高度可溶的。在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸的盐形式在乙醇中是高度可溶的。在一些实施方案中,其在大于0.5mg/ml、大于1mg/mL、大于5mg/mL、大于10mg/mL或大于20mg/mL时是可溶的。在一些实施方案中,在22℃或更低的温度下,如通过烧瓶振荡法在200标准乙醇(200proof ethanol)中测定,磷脂酰甘油或磷脂酰丝氨酸的盐形式在至少0.3mM、至少0.4mM、至少0.5mM、至少0.6mM或至少0.8mM时是可溶的。在一些实施方案中,盐是铵盐。在一个实施方案中,磷脂酰丝氨酸以铵盐或经取代铵盐的形式添加至LNP脂质。经取代铵盐可以是具有烷基的单烷基铵、二烷基铵、三烷基铵、或四烷基铵,所述烷基各具有一至六个、一至四个、一至三个、一个、两个或三个碳原子。一个或更多个烷基可以是正烷基、或支链烷基(例如,如异丙基),或形成环(例如,如环己基)。烷基和氮铵原子可形成杂环。经取代铵盐也可由亚烷基二胺形成。三(羟甲基)氨基甲烷和三乙醇胺也可以用作胺碱以形成PS盐。在一些实施方案

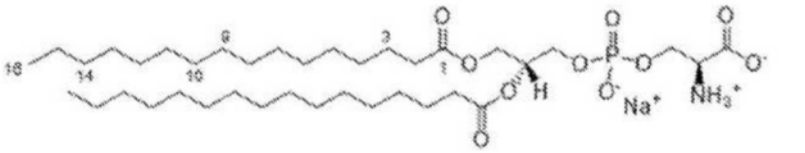
中,胺选自氨、二甲胺、二乙胺、三乙胺、三甲胺、2-(二甲基氨基)乙醇、二乙醇胺、2-(二乙基氨基)乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-甲基-葡糖胺、咪唑、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、4-(2-羟乙基)-吗啉、哌嗪、1-(2-羟乙基)-吡咯烷、三乙醇胺和氨丁三醇(三(羟甲基)氨基甲烷)。在一些实施方案中,该靶向脂质是DPPS的铵盐。

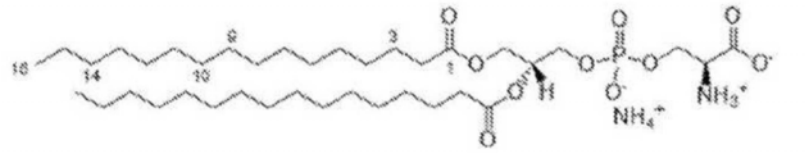
[0304] 表3D.二棕榈酰基-磷脂酰丝氨酸或二硬脂酰基-磷脂酰丝氨酸的铵盐和钠盐形式。





[0305]





[0306] 为了获得以铵盐或经取代铵盐形式的磷脂酰丝氨酸,可使用本领域已知的任何方法。在一个实施方案中,将磷脂酰丝氨酸(PS)的钠盐溶解在含有铵或经取代铵的氯化物盐的氯仿、甲醇和水的单相体系中(Bligh-Dyer单相),并且通过添加额外的含有铵或经取代铵氯化物的水和/或甲醇使该体系达到两相状态。将含有PS的富含氯仿的相分离,并重复该过程。最后,将富含氯仿的相用水洗涤以除去过量的氯化物,并且通过蒸发富含氯仿的相获得PS的铵盐(经取代铵盐)。任选地,将获得的PS的铵盐或经取代铵盐真空干燥或溶解在环己烷中并冻干。在另一个实施方案中,将作为钠盐或钾盐的PS溶解在与水不混溶的有机溶剂,例如氯仿或氯仿-甲醇混合物中,并用酸(例如HCl)的经稀释水溶液洗涤,以获得PS的游离酸形式,然后用以游离碱形式的经取代胺或氢氧化铵中和。在又一个实施方案中,用以经取代铵形式的铵的阳离子交换树脂处理作为钠盐或钾盐的PS的有机溶液。在又一个实施方案中,PS以钙盐或镁盐的形式制备,并在有机溶剂的存在下,用螯合剂(例如EDTA)的铵盐或经取代铵盐,或者用磷酸铵或经取代磷酸铵处理,导致钙或镁离子以螯合物或较难溶解的磷酸盐的形式置换,将其例如通过过滤分离,而PS的铵盐或经取代铵盐留在有机(例如,乙醇)溶液中。

[0307] 在一个实施方案中,将PS或PG以LNP的总脂质含量的约0.1mol%至约20mol%、约

0.1mol％至约10mol％、约0.1mol％至约5mol％、约0.5mol％至约20mol％、约0.5mol％至约10mol％、约0.5mol％至约5mol％、约1mol％至约20mol％、约1mol％至约10mol％、或约1mol％至约5mol％的浓度添加至LNP脂质制剂。在一个实施方案中,将PS以LNP的总脂质含量的约1mol％至约20mol％、约2.5mol％至约10mol％、约3mol％至约9mol％、或约4mol％至约8mol％的浓度添加至LNP脂质制剂。

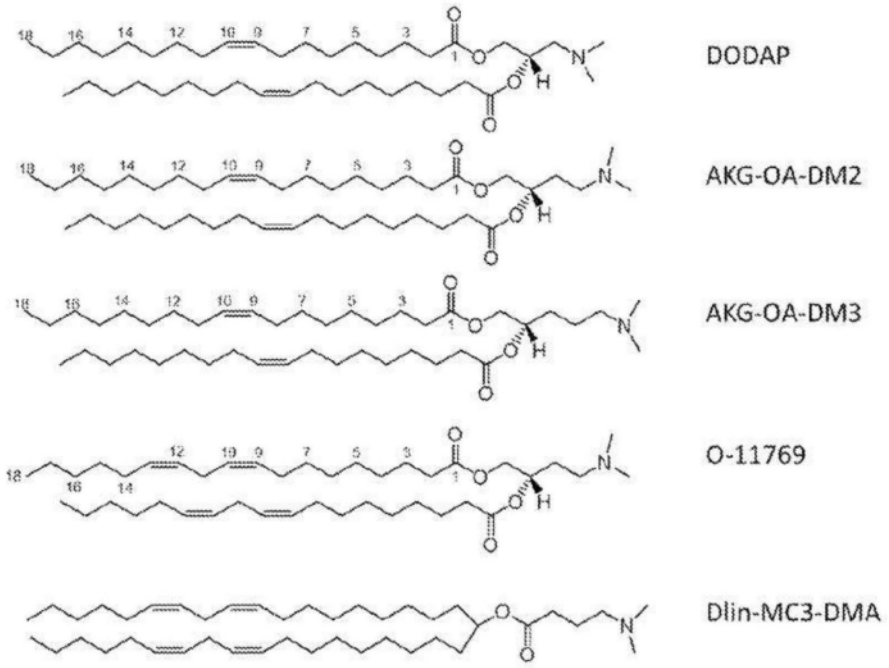
[0308] 在一个实施方案中,PS或PG脂质被包含在包含本领域已知的可电离阳离子脂质的LNP组合物中,所述可电离阳离子脂质包括DODAP、AKG-OA-DM2、O-11769、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DLin-KC3-DMA、ALC-0315和SM-102。

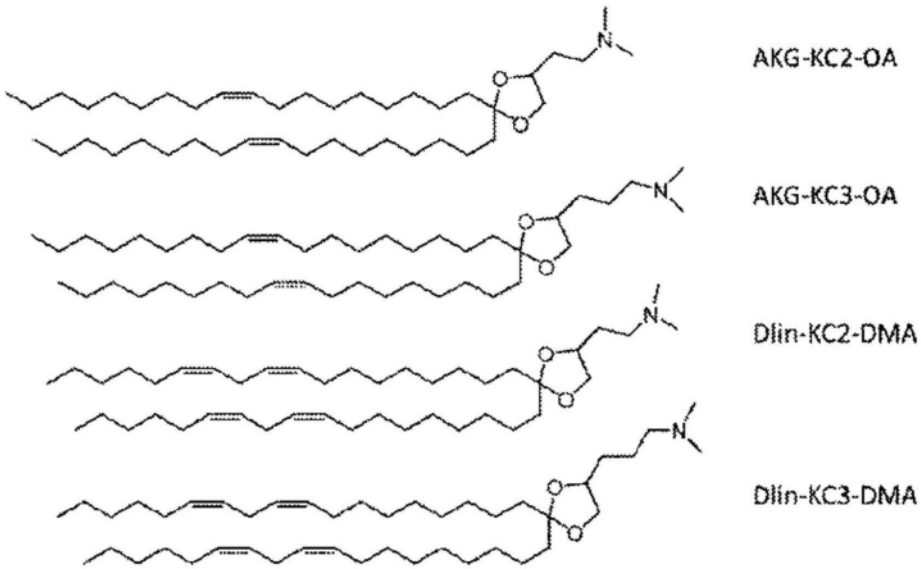
[0309] 在另一个实施方案中,PS脂质被包含在包含式I、II、III、IV-B、V-A-1的ICL、其组合或其药学盐的LNP组合物中。在另一个实施方案中,PS脂质使用3至8、4至7、或5至6的N/P比被包含在LNP组合物中。

[0310] 在一些方面中,提供了将核酸递送至细胞的方法,所述方法包括:使细胞与包含含有对细胞表面抗原具有结合特异性的配体(本文中也称为靶向配体)的LNP的组合物接触,其中配体与抗原的结合诱导配体的内化。在一些实施方案中,靶向配体可以是但不限于内化抗体或其片段、小分子缀合物或糖缀合物。在一些实施方案中,当在内化条件下与表达至少100,000或至少1,000,000分子抗原的细胞接触并孵育时,在靶向配体被该细胞附着的情况下靶向配体与特定细胞表面抗原的结合诱导LNP的内化。

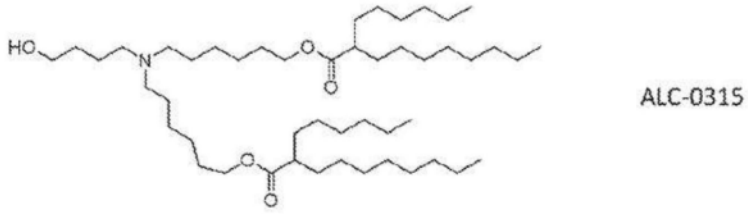
[0311] 表4A.示例性的二烷基和支链可电离阳离子脂质

[0312]

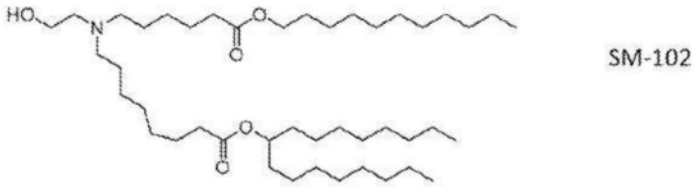




[0313] 表4B.示例性的二烷基和支链可电离阳离子脂质(续)



[0314]



[0315] 组合物

[0316] 在一些实施方案中,脂质纳米粒组合物包含脂质和核酸,所述脂质纳米粒包含式I、II、III、IV-B、V-A-1化合物、其组合或其可药用盐。

[0317] 本公开内容的另一些方面涉及这些可电离脂质或包含可电离脂质的脂质纳米粒组合物在用于预防感染性疾病或癌症的疫苗中的用途。在一些实施方案中,感染性疾病可以是细菌或病毒感染。在一些实施方案中,本文中所述的组合物可用于预防与结核病、HIV/AIDS、疟疾或冠状病毒相关感染(例如COVID-19)相关的感染。在另一些实施方案中,感染是流感、乙型肝炎、丙型肝炎、登革热、人乳头瘤病毒(human papillomavirus,HPV)、诺如病毒、腮腺炎、麻疹、脑膜炎球菌疾病(Meningococcal disease)、肺炎球菌疾病(pneuomococcal disease)、脊髓灰质炎、轮状病毒(rotovirus)、呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus,RSV)、风疹、带状疱疹病毒(shingles/herpes zoster virus)、破伤风或百日咳。

[0318] 在一些实施方案中,本文中所述的化合物和组合物可促进靶细胞(包括组织巨噬细胞和树突细胞)的有效摄取和转染。结果是有效递送编码感染性病毒或细菌所特有的抗原的核酸,并随后呈递该抗原以引发所期望的免疫应答,以防止相应的感染。在一些实施方案中,核酸可以是编码冠状病毒例如SARS-CoV、MERS-CoV或SARS-CoV-2的表位的合成核酸(例如,经改造的密码子优化的mRNA)。在一些实施方案中,核酸可以是编码冠状病毒例如SARS-CoV、MERS-CoV或SARS-CoV-2的S蛋白(刺突蛋白)或其片段的合成核酸(例如,经改造的密码子优化的mRNA)。

[0319] 在一些实施方案中,疫苗用于预防分枝杆菌感染。在一些实施方案中,疫苗可用于预防结核病、非结核分枝杆菌(nontuberculous mycobacteria,NTM)、非结核肺病、麻风、胞内鸟分枝杆菌(mycobacterium avium-intracellulare)、堪萨斯分枝杆菌(mycobacterium kansasii)、海分枝杆菌(mycobacterium marinum)、溃疡分枝杆菌(mycobacterium ulcerans)、龟分枝杆菌(mycobacterium chelonae)、偶发分枝杆菌(mycobacterium fortuitum)、脓肿分枝杆菌(mycobacterium abscessus)和其他感染性疾病,例如由以下引起的疾病:冠状病毒SARS-CoV-2,Covid-19;SARS-CoV,SARS;MERS-CoV;HCoV-229E;HCoV-NL63;HCoV-OC43;HCoV-HKU1),基孔肯雅病(chikungunya)、登革热、白喉、埃博拉(Ebola)、EV-D68、流感(influenza,flu)、肝炎病毒(包括HAV、HBV、HCV、HDV、HEV和GB病毒C)、B型流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae type B,Hib)、亨德拉病毒(Hendra virus)、HIV/AIDS、人偏肺病毒(human metapneumovirus,hMPV)、人乳头瘤病毒(HPV)、拉沙(Lassa)、莱姆(Lyme)、疟疾、马尔堡(Marburg)、麻疹、脑膜炎球菌疾病、腮腺炎、尼帕病毒(Nipah virus)、诺如病毒、副流感病毒(parainfluenza virus,PIV)、鼠疫、肺炎球菌疾病、脊髓灰质炎、呼吸道合胞病毒(RSV)、落基山斑疹热(Rocky Mountain spotted fever)、轮状病毒、风疹(德国麻疹)、水痘-带状疱疹病毒(水痘(chickenpox)、带状疱疹(shingles))、天花、破伤风(口噤(Lockjaw))、西尼罗(West Nile)、百日咳(whooping cough)(百日咳(Pertussis))和寨卡(zika)。

[0320] 在一些实施方案中,组合物还包含药物赋形剂。

[0321] 在一些实施方案中,脂质纳米粒是在水性介质中。

[0322] 在一些实施方案中,核酸被本文中提供的可电离阳离子脂质化合物或其组合包载在脂质纳米粒中,其中核酸是RNA或DNA。在一些实施方案中,核酸是mRNA。在一些实施方案

中,核酸是siRNA。在一些实施方案中,核酸是DNA。

[0323] 在一些实施方案中,脂质纳米粒包含含有磷脂酰胆碱和甾醇的膜。在一些实施方案中,甾醇是胆固醇。在一些实施方案中,脂质纳米粒包含含有磷脂酰胆碱、可电离阳离子脂质(ICL)的膜。在一些实施方案中,ICL具有式I结构和胆固醇,其中膜将脂质纳米粒的内部与水性介质隔开。在一些实施方案中,ICL具有表1A和表2中所示的结构。在一些实施方案中,ICL具有表1B中所示的结构。在一些实施方案中,磷脂酰胆碱是二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)或氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质与胆固醇的摩尔比为约65:35至40:60。在一些实施方案中,ICL与胆固醇的摩尔比为约60:40至约45:55。

[0324] 在一些实施方案中,磷脂酰胆碱与胆固醇的摩尔比为约1:5至约1:2。

[0325] 在一些实施方案中,膜还包含聚合物缀合的脂质。

[0326] 在一些实施方案中,脂质纳米粒包含摩尔比为约49.5:10.3:39.6:2.5的ICL、DSPC、胆固醇和聚合物缀合的脂质。

[0327] 在一些实施方案中,聚合物缀合的脂质为PEG(2000)-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG)或PEG(分子量2,000)-二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(PEG-DMPE)。

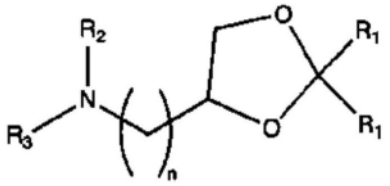
[0328] 本公开内容的组合物可通过多种途径施用,例如,通过静脉内、肠胃外、腹膜内或表面途径以实现全身递送。组合物可静脉内、皮下或腹膜内施用于对象。在一些实施方案中,本公开内容提供了用于将核酸体内递送至对象的方法。

[0329] 在一些实施方案中,组合物是用于肠胃外施用的液体药物制剂。

[0330] 在一些实施方案中,组合物是用于皮下、肌内或皮内施用的液体药物制剂。

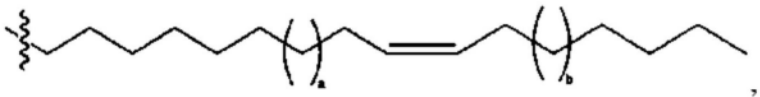
[0331] 在一些实施方案中,组合物为冻干粉的形式,其随后在施用之前用水性介质重构。

[0332] 在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质:

[0333] 

(I),

[0334] 其中R_1是

[0335] 

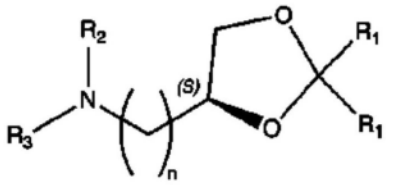
其中a是0或1;b是1、2、3或4,前提是a+b之和是1、2、3或4;

[0336] R_2和R_3各自独立地是任选地被羟基取代的(C_1-C_4)烷基;并且

[0337] n是等于2、3或4的整数。

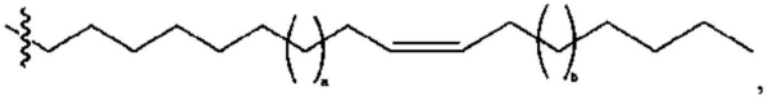
[0338] 其中两个R_1烃链中的a和b是相同的或者不同的,或者两个R_1烃链中的一个是饱和的C_{12}-C_{18}烷基。

[0339] 在一些实施方案中,提供了可电离阳离子脂质组合物。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I-A)化学结构的可电离阳离子脂质:

[0340] 

(I-A),

[0341] 其中R_1是

[0342] 

[0343] 其中a是0或1;b是1、2、3或4,前提是a+b之和是1、2、3或4;

[0344] R_2和R_3各自独立地是任选地被羟基取代的(C_1-C_4)烷基;并且

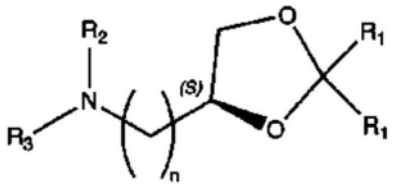
[0345] n是等于2、3或4的整数。

[0346] 在一些实施方案中,两个R_1烃链的a和b是相同的。

[0347] 在一些实施方案中,两个R_1烃链的a和b是不同的。

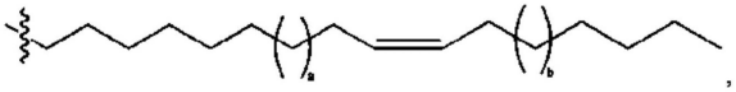
[0348] 在一些实施方案中,两个R_1烃链中的一个是饱和的C_{12}-C_{18}烷基。

[0349] 在一些实施方案中,提供了可电离阳离子脂质组合物。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I-A)化学结构的可电离阳离子脂质:

[0350] 

(I-A),

[0351] 其中R_1是

[0352] 

[0353] 其中a是0或1;b是1、2、3或4,前提是a+b之和是1、2、3或4;

[0354] R_2和R_3各自是甲基;并且

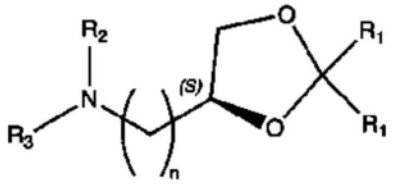
[0355] n是等于3的整数。

[0356] 在一些实施方案中,两个R_1烃链的a和b是相同的。

[0357] 在一些实施方案中,两个R_1烃链的a和b是不同的。

[0358] 在一些实施方案中,两个R_1烃链中的一个是饱和的C_{12}-C_{18}烷基。

[0359] 在一些实施方案中,提供了可电离阳离子脂质组合物。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I-A)化学结构的可电离阳离子脂质:

[0360] 

(I-A),

[0361] 其中:

[0362] R_1是饱和的C15-C18烃链,

[0363] R_2和R_3各自是甲基;并且

[0364] n是等于3的整数。

[0365] 在一些实施方案中,两个R_1烃链的a和b是相同的。

[0366] 在一些实施方案中,两个R_1烃链的a和b是不同的。

[0367] 在一些实施方案中,两个R_1烃链中的一个是饱和的C_{12}-C_{18}烷基。

[0368] 使用方法

[0369] 靶向树突细胞

[0370] 树突细胞(DC)是特化的抗原呈递细胞,其在启动和调节适应性免疫中发挥核心作用。由于其有效的抗原(Ag)呈递能力和产生不同的T细胞应答的能力,将Ag有效且特异性地递送至DC是产生针对肿瘤或病原体的Ag特异性效应细胞和记忆细胞的基石。

[0371] 通过添加粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor,GM-CSF)、IL-4和IFN-γ以在体外分化单核细胞来源的DC,可从人血液单核细胞产生树突细胞。培养中的细胞表现出树枝状和网状(veiled)形态二者,前者是贴壁的并且后者是悬浮的。在表型上,它们是

[0372] CD1a-/dim,CD11a+,CD11b++,CD11c+,CD14dim/-,CD16a-/dim,CD18+,CD32dim/-,CD33+,CD40+,CD45RO+,CD50+,CD54+,CD64-/dim,CD68+,CD71+,CD80dim,CD86+/++,MHCI类++/,HLA-DR++/,HLA-DP+,和HLA-DQ(Geiseler et al.Dev Immunol.1998;6(1-2):25-39)。

[0373] 作为替代,已开发了人原代血液树突细胞系,并且其可从Creative Biolabs商购获得。

[0374] CD8+ T细胞可产生IL2、IFN-γ和TNF,已知这些细胞因子在结核分枝杆菌感染期间发挥关键作用。重要的是,CD8+ T细胞具有细胞裂解功能以通过颗粒介导的功能(通过穿孔素、颗粒酶和颗粒溶素)杀伤结核分枝杆菌感染的细胞、或Fas-Fas配体相互作用以诱导凋亡。在人中,CD8+T细胞可产生颗粒溶素,其可直接杀伤结核分枝杆菌。因此,预期递送至DC的产生抗原的mRNALNP将刺激CD8+ T细胞应答以对抗结核分枝杆菌感染。

[0375] CD8+ T细胞能够识别由经典和非经典MHC分子呈递的结核分枝杆菌(M.tuberculosis)特异性抗原(作为肽)。已鉴定了经典限制性CD8+ T细胞,其在经典MHC Ia(HLA-A,HLA-B,HLA-C)分子的背景下识别由抗原呈递细胞呈递的抗原。非经典限制性CD8+ T细胞包括能够在HLA-E分子(非MHC 1a)、与1类CD1分子相关的糖脂、和MHC I相关分子(MR1)例如黏膜相关不变T细胞(mucosal associated invariant T cell,MAIT)的背景下识别Mg抗原的那些CD8+ T细胞。最后,γδT细胞代表了CD8(和CD4)T细胞的单独群体,其在对结核分枝杆菌感染的应答方面具有固有和适应性功能二者。CD8+ T细胞已显示出在对结核分枝杆菌感染的应答方面发挥直接功能,但它们也在总体宿主免疫应答中协调许多不同功能方面发挥重要作用(例如,相互作用以提供最佳CD4 T细胞功能)。

[0376] 在一个实施方案中,可将LNP以适当的浓度(例如,1至5μg/mL mRNA)添加至培养的人树突细胞。在允许细胞摄取和抗原表达的一段时间之后,可添加人T细胞(HemaCare),并在不同时间对细胞培养基进行取样以用于通过Elisa(R&D Systems,DIF50C)的INF-γ。作为替代,可通过流式细胞术分析细胞的CD8+标志物或胞内INFγ产生(PE抗人IFN-γ抗体,

Biolegend)。

[0377] 在一个实施方案中,可将LNP通过以上概述的任何施用途径以0.01至5mg/kg的mRNA的剂量施用到对象中。根据一些实施方案,LNP中的一部分被DC细胞吸收,而大部分将在肝和脾中积聚。DC细胞可表达抗原肽,对其进行加工以用于MHC I呈递并行进至淋巴结以用于呈递至初始T细胞,这诱导记忆T细胞针对所述抗原的教育。

[0378] 在一个实施方案中,可将已用靶向配体例如抗DEC205-PEG-DSPE修饰的LNP以0.01至5mg/kg的mRNA的剂量施用到对象中。根据一些实施方案,较高比例的LNP可被DC细胞吸收,这允许提高抗原肽的产生(与非靶向LNP相比)以及针对病原体的更有效的疫苗接种。树突细胞的另外的靶向配体包括但不限于CLEC9A、CLEC4A、XCR1、CD141和HLD-DR。例如,评估CD8+对体内产生的抗原的反应性可通过由来自R&D Systems的物种特异性IFN-γ Quantikine ELISA试剂盒测量INFγ血浆水平来完成。

[0379] 在一些实施方案中,LNP组合物提供了期望的药代动力学特性,例如延长的血浆半衰期和稳定的mRNA包封。血浆半衰期可以以在免疫活性(immunocompetent)小鼠中静脉内注射之后6或24小时之后血液中保留的注射剂量(injected dose,ID)的百分比来衡量。血浆中经过24小时mRNA的包封稳定性可通过在小鼠中iv施用之后mRNA与脂质比例(mRNA/L比例)的变化来确定。在一些实施方案中,在6小时时,血液中保留的包封mRNA的百分比大于注射剂量的20%,优选大于30%,并且最优选大于40%。在24小时之后血液中保留的百分比优选大于注射剂量的10%,并且更优选大于20%。

[0380] 本文中公开了用于预防分枝杆菌感染(例如结核分枝杆菌)或革兰氏阳性菌(例如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant Staphylococcus aureus,MRSA))的方法。另外的分枝杆菌和革兰氏阳性菌包括但不限于鸟分枝杆菌复合群(Mycobacterium avium complex)、麻风分枝杆菌(Mycobacterium leprae)、戈登分枝杆菌(Mycobacterium gordonae)、脓肿分枝杆菌(Mycobacterium abscessus)、脓肿分枝杆菌、产黏液分枝杆菌(Mycobacterium mucogenicum)、链球菌(streptococci)、耐万古霉素肠球菌(vancomycin-resistant enterococci,VRE)、肺炎葡萄球菌(Staphylococcus pneumoniae)、屎肠球菌(Enterococcus faecium)、无乳链球菌(Streptococcus agalactiae)、肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)、化脓性链球菌(Streptococcus pyogenes)、草绿色链球菌(viridans group streptococci)、单核细胞增生李斯特菌(Listeria monocytogenes)、诺卡氏菌(Nocardia)和棒状杆菌(Corynebacterium)。

[0381] 施用用于诱导第二免疫应答的疫苗可提供II类MHC呈递的表位,其能够引发针对表达抗原的细胞的CD4+辅助T细胞应答,MHC呈递的表位来源于所述抗原。作为替代或补充,施用用于诱导第二免疫应答的疫苗可提供I类MHC呈递的表位,其能够引发针对表达抗原的细胞的CD8+ T细胞应答,MHC呈递的表位来源于所述抗原。此外,施用用于诱导第二免疫应答的疫苗可提供一种或更多种新表位(包括已知的新表位)以及一种或更多种不含癌症特异性体细胞突变但由癌细胞表达并优选诱导针对癌细胞的免疫应答,优选癌症特异性免疫应答的表位。在一个实施方案中,施用用于诱导第二免疫应答的疫苗提供了新表位,其为II类MHC呈递的表位和/或能够引发针对表达抗原的细胞的CD4+辅助T细胞应答,MHC呈递的表位来源于所述抗原;以及提供了不含癌症特异性体细胞突变的表位,其为I类MHC呈递的表位和/或能够引发针对表达抗原的细胞的CD8+T细胞应答,MHC呈递的表位来源于所述抗原。

在一个实施方案中,表位不含癌症特异性体细胞突变。

[0382] “细胞免疫应答”、“细胞应答”、“针对抗原的细胞应答”或类似术语意指包括针对细胞的细胞应答,其特征在于用I类或II类MHC呈递抗原。细胞应答与称为T细胞或T淋巴细胞的细胞有关,这些细胞充当“辅助细胞”或“杀伤细胞”。辅助T细胞(也称为CD4+ T细胞)通过调节免疫应答发挥核心作用,并且杀伤细胞(也称为细胞毒性T细胞、细胞裂解T细胞、CD8+ T细胞或CTL)杀伤病变细胞,例如癌细胞,从而阻止更多病变细胞的产生。在一些优选的实施方案中,本公开内容涉及刺激针对表达一种或更多种表达抗原的分枝杆菌的抗结核分枝杆菌CTL应答,并且优选用I类MHC呈递这样的表达抗原。

[0383] 根据本公开内容的“抗原”涵盖将引发免疫应答的任何物质。特别地,“抗原”涉及与抗体或T淋巴细胞(T细胞)特异性反应的任何物质,优选肽或蛋白质。本文中使用的术语“抗原”包含含有至少一个表位的任何分子。优选地,在本公开内容的上下文中,抗原是这样的分子:其任选地在加工之后诱导优选地对所述抗原(包括表达所述抗原的细胞)具有特异性的免疫反应。根据本公开内容,可使用作为免疫反应候选物的任何合适的抗原,其中所述免疫反应优选是细胞免疫反应。在本公开内容的实施方案的上下文中,在MHC分子的背景中,抗原优选地由细胞,优选由抗原呈递细胞(其包括病变细胞),特别是癌细胞呈递,这导致针对抗原的免疫反应。抗原优选是对应于或来源于天然存在的抗原的产物。这样的天然存在的抗原可包括肿瘤抗原。

[0384] 本文中使用的“抗原肽”涉及抗原的一部分或片段,其能够刺激针对该抗原或者针对以表达该抗原为特征且优选地以呈递该抗原为特征的细胞(例如,病变细胞,特别是癌细胞)的免疫应答,优选细胞应答。优选地,抗原肽能够刺激针对以用I类MHC呈递抗原为特征的细胞的细胞应答,并且优选地能够刺激抗原反应性细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T-lymphocyte,CTL)。优选地,根据本公开内容的抗原肽是I类MHC和/或II类MHC呈递的肽,或者可被加工以产生I类MHC和/或II类MHC呈递的肽。优选地,抗原肽包含基本上对应于抗原片段的氨基酸序列的氨基酸序列。优选地,所述抗原片段是I类MHC和/或II类MHC呈递的肽。优选地,根据本公开内容的抗原肽包含基本上对应于这样的片段的氨基酸序列的氨基酸序列,并且被加工以产生这样的片段,即来源于抗原的I类MHC和/或II类MHC呈递的肽。如果肽被直接呈递,即不经加工,特别是不经切割,则其长度适合于与MHC分子,特别是I类MHC分子结合,并且优选长度为7至20个氨基酸,更优选长度为7至12个氨基酸,更优选长度为8至11个氨基酸,特别地长度为9或10个氨基酸。

[0385] 专职抗原呈递细胞的主要类型是具有最广泛的抗原呈递范围的树突细胞,并且可能是最重要的抗原呈递细胞、巨噬细胞、B细胞和某些活化的上皮细胞。树突细胞(DC)是通过II类MHC和I类MHC抗原呈递途径二者将在外周组织中捕获的抗原呈递至T细胞的白细胞群。公知树突细胞是免疫应答的有效诱导剂,并且这些细胞的活化是诱导抗肿瘤免疫的关键步骤。树突细胞被方便地分类为“未成熟”和“成熟”细胞,这可用作在两种良好表征的表型之间进行区分的简单方法。

[0386] 然而,该命名不应被解释为排除所有可能的分化中间阶段。未成熟树突细胞的特征为具有高抗原摄取和加工能力(这与Fcγ受体和甘露糖受体的高表达相关)的抗原呈递细胞。通常,成熟表型的特征在于这些标志物的较低表达,但负责T细胞活化的细胞表面分子例如I类和II类MHC、黏附分子(例如CD54和CD11)和共刺激分子(例如CD40、CD80、CD86和

4-1BB)的高表达。树突细胞成熟被认为是树突细胞活化的状态,在该状态下这样的抗原呈递树突细胞引起T细胞初免,而未成熟树突细胞的呈递导致耐受。树突细胞成熟主要由以下引起:具有通过固有受体检出的微生物特征的生物分子(细菌DNA、病毒RNA、内毒素等)、促炎细胞因子(TNF、IL-1、IFN)、树突细胞表面上CD40与CD40L的连接以及从经历应激性细胞死亡的细胞中释放的物质。树突细胞可通过在体外用细胞因子例如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM CSF)和肿瘤坏死因子α培养骨髓细胞来获得。非专职抗原呈递细胞不组成型地表达与初始T细胞相互作用所需的II类MHC蛋白;这些仅在某些细胞因子例如IFNγ刺激非专职抗原呈递细胞时表达。"抗原呈递细胞"可通过用编码肽或包含待呈递肽的多肽的核酸、优选mRNA(例如编码抗原的核酸)转导细胞而负载有I类MHC呈递的肽。

[0387] 在一些实施方案中,可向患者施用包含靶向树突细胞或其他抗原呈递细胞的基因递送载剂的药物组合物,从而导致在体内发生转染。本文中使用的"核酸"是脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid,DNA)或核糖核酸(ribonucleic acid,RNA),更优选RNA,最优选体外转录的RNA(in vitro transcribed RNA,IVT RNA)或合成RNA。根据本公开内容,核酸包括基因组DNA、cDNA、mRNA、重组产生的分子和化学合成的分子。根据本公开内容,核酸可作为单链或双链以及直链或共价环状闭合的分子存在。根据本公开内容,核酸可以是分离的。根据本公开内容,术语"分离的核酸"意指核酸(i)在体外扩增,例如通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR),(ii)通过克隆重组产生,(iii)是纯化的,例如通过切割和通过凝胶电泳分离,或(iv)是合成的,例如通过化学合成。核酸可用于引入到细胞中,即转染细胞,特别是以可通过从DNA模板体外转录来制备的RNA的形式。此外,可在应用之前通过稳定序列、加帽和多腺苷酸化来修饰RNA。

[0388] 本文中使用的术语"RNA"涉及包含核糖核苷酸残基并且优选完全或基本上由核糖核苷酸残基构成的分子。"核糖核苷酸"涉及在B-D-呋喃核糖基的2'-位具有羟基的核苷酸。术语"RNA"包括双链RNA、单链RNA、分离的RNA例如部分或完全纯化的RNA、基本上纯的RNA、合成的RNA、和重组产生的RNA,例如通过一个或更多个核苷酸的添加、缺失、替换和/或改变而不同于天然存在的RNA的经修饰的RNA。这样的改变可包括将非核苷酸物质添加至例如RNA的末端或添加至内部,例如在RNA的一个或更多个核苷酸处。RNA分子中的核苷酸还可包含非标准核苷酸,例如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些改变的RNA可被称为类似物或天然存在的RNA的类似物。

[0389] 本文中使用的术语"RNA"包括并优选地涉及"mRNA"。术语"mRNA"意指"信使-RNA"并涉及通过使用DNA模板产生并编码肽或多肽的"转录物"。通常,mRNA包含5'-UTR、蛋白质编码区和3'-UTR。mRNA在细胞中和在体外仅具有有限的半衰期。在本公开内容的上下文中,mRNA可从DNA模板通过体外转录而产生。在本公开内容中使用的RNA的上下文中,术语"修饰"包括对所述RNA中非天然存在的RNA的任何修饰。在本公开内容的一个实施方案中,根据本公开内容使用的RNA不具有未加帽的5'-三磷酸。这样的未加帽的5'-三磷酸的去除可通过用磷酸酶处理RNA来实现。根据本公开内容的RNA可具有经修饰的核糖核苷酸,以提高其稳定性和/或降低细胞毒性。例如,在一个实施方案中,在根据本公开内容使用的RNA中,5-甲基胞苷部分地或完全地,优选完全地替换为胞苷。作为替代或补充,在一个实施方案中,在根据本公开内容使用的RNA中,假尿苷部分地或完全地,优选完全地替换为尿苷。

[0390] 在一个实施方案中,术语"修饰"涉及提供具有5-帽或5'-帽类似物的RNA。术语"5-

帽”是指存在于mRNA分子的5’端的帽结构,并且通常由通过不寻常的5’至5三磷酸酯键联与mRNA连接的鸟苷核苷酸组成。在一个实施方案中,该鸟苷在7-位被甲基化。术语“常规5’-帽”是指天然存在的RNA 5’-帽,优选7-甲基鸟苷帽(m’G)。本文中使用的术语“5’-帽”包括5’-帽类似物,其类似于RNA帽结构并且被修饰以具有稳定RNA和/或增强RNA翻译的能力(如果与其连接的话),优选在体内和/或细胞中。

[0391] 根据本公开内容,可根据需要修饰RNA的稳定性和翻译效率。例如,通过一种或更多种具有稳定作用和/或提高RNA翻译效率的修饰,可稳定RNA并提高其翻译。例如,在PCT/EP2006/009448中描述了这样的修饰,其通过引用并入本文。为了提高根据本公开内容使用的RNA的表达,可在编码区(即编码所表达肽或蛋白质的序列)内对其进行修饰,优选不改变所表达肽或蛋白质的序列,以便提高GC含量以提高mRNA稳定性并进行密码子优化,并因此增强细胞中的翻译。

[0392] 本公开内容的一些方面涉及预防细菌或病毒感染的方法,所述方法包括向有此需要的对象施用有效量的本文中提供的组合物以引发免疫应答。

[0393] 本公开内容的一些方面提供了对对象进行疫苗接种的方法,其包括向对象施用单剂量的本文中所述的组合物,所述组合物包含对对象进行疫苗接种的有效量的编码多肽的核酸(例如mRNA)。在一些实施方案中,核酸被配制成在阳离子脂质纳米粒内。在一些实施方案中,脂质纳米粒组合物作为单次注射施用。

[0394] 在一些实施方案中,细菌感染是结核分枝杆菌感染。

[0395] 在一些实施方案中,病毒感染是冠状病毒。在一些实施方案中,冠状病毒是SARS-CoV、MERS-CoV或SARS-CoV-2。

[0396] 在一些实施方案中,病毒感染是HIV/AIDS。

[0397] 在一些实施方案中,脂质纳米粒为肠胃外施用。

[0398] 一般而言,可通过皮内注射对患者进行施用。然而,注射也可节内地实施到淋巴结中(Maloy et al.(2001),Proc Natl Acad Sci USA98:3299-3033)。产生的细胞呈递目的复合物,并被随后增殖的自体细胞毒性T淋巴细胞识别。

[0399] 在一些实施方案中,组合物通过吸入施用。在一些实施方案中,组合物被配制成鼻喷剂和/或气雾剂。

[0400] 在对患者无毒的情况下,可改变本文中公开的药物组合物中活性剂的实际剂量水平,以便获得有效实现针对特定患者、组合物和施用方式的期望的治疗响应的活性剂的量。

[0401] 本文中使用的在施用背景下的“肠胃外”意指除了肠内和表面施用之外的施用方式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、椎管内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0402] 本文中使用的短语“肠胃外施用”和“肠胃外地施用”是指除了肠内(即通过消化道)和表面施用之外的施用方式,通常通过注射或输注,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、吸入、囊下、蛛网膜下、呼吸道黏膜、椎管内、硬膜外和胸骨内注射和输注。静脉内注射和输注经常(但不完全)用于脂质体药物施用。

[0403] 可调整给药方案以提供最佳的期望响应(例如,治疗响应)。例如,可随时间施用一

个或更多个剂量,或者可通过治疗情况的紧急程度的指示按比例降低或提高剂量。

[0404] 在一些实施方案中,剂量包含0.01至5mg/kg的核酸。在一些实施方案中,剂量包含0.01至5mg/kg的mRNA。在一些实施方案中,剂量包含0.01至3mg/kg的核酸。在一些实施方案中,剂量包含0.01至3mg/kg的mRNA。在一些实施方案中,剂量包含0.01至1mg/kg的核酸。在一些实施方案中,剂量包含0.01至1mg/kg的mRNA。在一些实施方案中,剂量包含0.01至0.5mg/kg的核酸。在一些实施方案中,剂量包含0.01至0.5mg/kg的mRNA。在一些实施方案中,剂量包含0.01至1mg/kg的mRNA。在一些实施方案中,剂量包含0.01至0.1mg/kg的核酸。在一些实施方案中,剂量包含0.01至0.05mg/kg的mRNA。在一些实施方案中,剂量包含0.01至0.1mg/kg的核酸。在一些实施方案中,剂量包含0.01至0.05mg/kg的mRNA。

[0405] 化合物和/或其可药用盐或者包含化合物和/或其可药用盐的LNP的剂量可在宽范围限制内变化,并且在每种特定情况下,应根据个体条件和待控制的病原体自然地调整。

[0406] 在一些实施方案中,提供了可电离阳离子脂质(ICL)。阳离子脂质被改造成在储存时对氧化降解具有改善的稳定性,同时在细胞中保持高转染活性或效力。本公开内容的一些方面部分地基于以下发现:包含mRNA和某些可电离阳离子脂质(ICL)的LNP组合物增强了mRNA在人树突细胞中的表达。

[0407] 在一些实施方案中,LNP组合物包含针对细胞表面受体的靶向配体,用于以高度特异性的方式将脂质纳米粒靶向至包括树突细胞。在一些实施方案中,LNP组合物包含作为靶向配体的磷脂酰-L-丝氨酸化合物,例如二棕榈酰基磷脂酰-L-丝氨酸(DPPS)或二硬脂酰基磷脂酰-L-丝氨酸(DSPS)。在一些实施方案中,LNP组合物包含作为靶向配体的磷脂酰-L-丝氨酸化合物和阴离子磷脂。在一些实施方案中,LNP组合物包含作为靶向配体的含磷脂酰甘油的化合物,例如二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)或二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG),用于增强在人树突细胞中的表达。在一些实施方案中,LNP组合物包含作为靶向配体的磷脂酰-L-丝氨酸化合物和作为第二磷脂的二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)二者。在一些实施方案中,LNP组合物包含作为靶向配体的磷脂酰-L-丝氨酸化合物和作为第二磷脂的二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)二者,而不包含二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)。

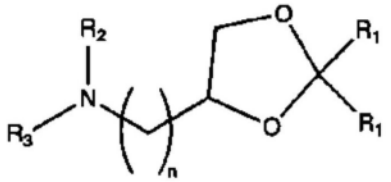
[0408] 本公开内容的一些方面部分地基于以下发现:某些阳离子可电离脂质的选择可增强人树突细胞的转染。例如,在LNP组合物中,KC3阳离子离子脂质比KC2或二酰基可电离脂质(UO系列)在转染人树突细胞中更有活性。在包含KC3可电离阳离子脂质的LNP组合物中,含有具有单不饱和烷基链的可电离阳离子脂质的那些LNP组合物出乎意料地比包含含有二亚油基烷基链的可电离阳离子脂质的那些LNP组合物更有活性并且对氧化降解更稳定。另外,在包含单不饱和脂质的LNP组合物中观察到人树突细胞中的转染活性降低,例如对于二酰基可电离脂质(UO系列)。

[0409] 在一些实施方案中,提供了磷脂酰丝氨酸靶向脂质的某些盐。例如,在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸靶向脂质可以作为DPPS的铵盐提供,其在乙醇(用于制备LNP的优选溶剂)存在下具有改善的生物物理特性和较高的溶解度。DSPS或DSPS的钠盐不溶于乙醇,并且需要存在甲醇和加热二者以允许其形成,DSPS的铵盐也是如此。预期磷脂酰丝氨酸的其他铵盐将在溶解度和生物物理特性方面产生相同的优点。

[0410] 在一些实施方案中,提供了可用于制备脂质体纳米粒(LNP)组合物的可电离阳离子脂质组合物。在一些实施方案中,提供了包含可电离阳离子脂质的脂质体组合物,所述可

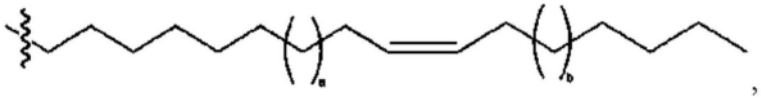
电离阳离子脂质具有(a)直链C_{16}或C_{18}烃链对,每个链在每个多烯烃链中包含单个不饱和烯基双键,与包含二烷基氨基烷基的头基共价结合。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质的头基具有pKa为约6.3至7.5的二烷基氨基。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质的头基包含与二烷基氨基共价结合的杂环基或烷基部分。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质的头基任选地还包含磷酸基团。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质化合物的每个脂质尾是相同的,并且每个脂质尾具有总共一个烯烃,其总长度为15、16、17或18个碳。

[0411] 在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质:

[0412] 

(I),

[0413] 其中R_1是

[0414] 

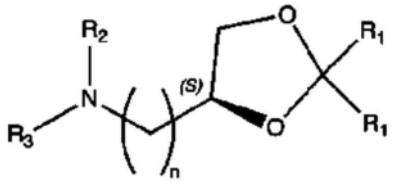
[0415] 其中a是0或1;b是1、2、3或4,前提是a+b之和是1、2、3或4;

[0416] R_2和R_3各自独立地是任选地被羟基取代的(C_1-C_4)烷基;并且

[0417] n是等于2、3或4的整数。

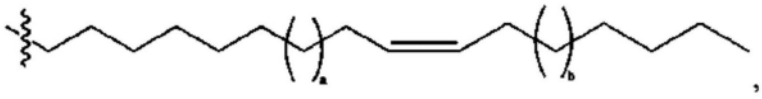
[0418] 在一些实施方案中,提供了可电离阳离子脂质组合物。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I)化学结构的可电离阳离子脂质,其中a是0或1;b是1、2、3或4,前提是a+b之和是1、2、3或4;R_2和R_3各自是甲基;并且n是等于3的整数。

[0419] 在一些实施方案中,提供了可电离阳离子脂质组合物。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含具有式(I-A)化学结构的可电离阳离子脂质:

[0420] 

(I-A),

[0421] 其中R_1是

[0422] 

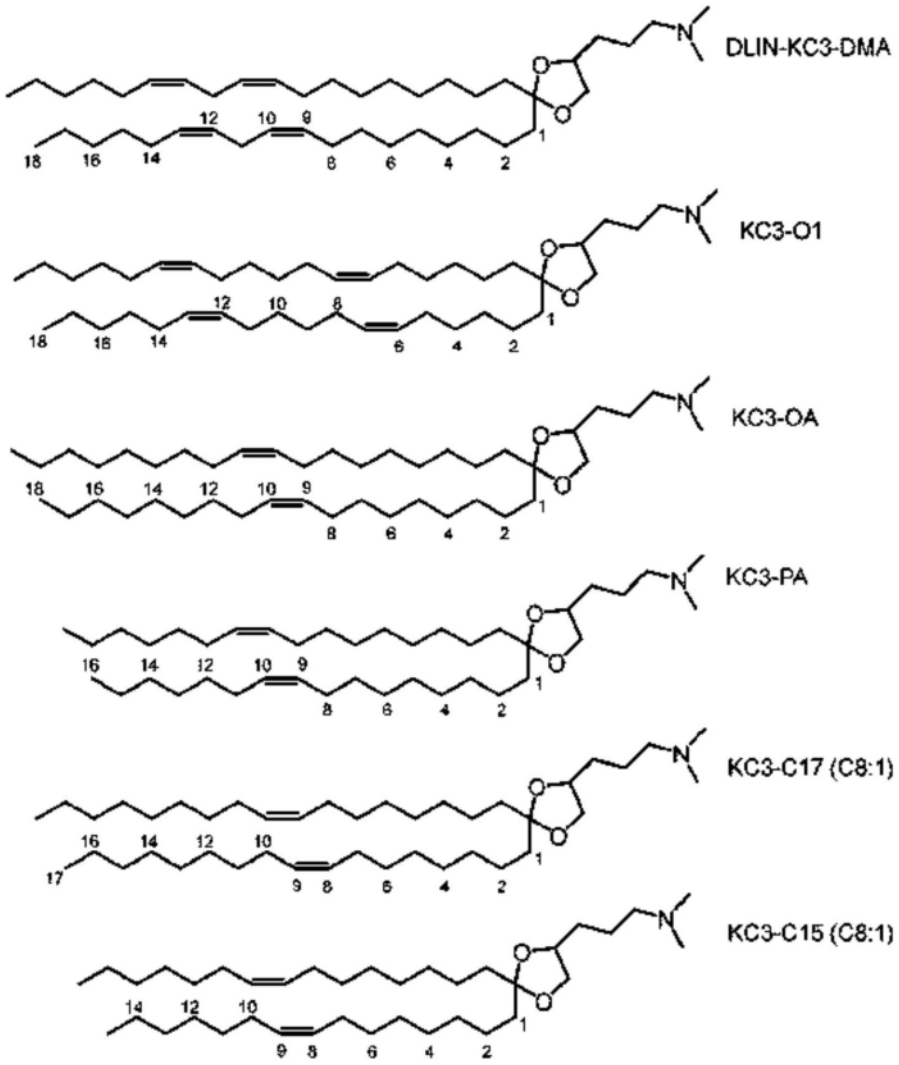
[0423] 其中a是0或1;b是1、2、3或4,前提是a+b之和是1、2、3或4;

[0424] R_2和R_3各自是甲基;并且

[0425] n是等于3的整数。

[0426] 在一些实施方案中,LNP组合物包含可电离阳离子脂质,所述可电离阳离子脂质包含相同的脂质烃尾对,所述脂质烃尾具有总共15、16、17或18个碳,并且包含单个烯烃基团或烯烃基团对。在一些实施方案中,LNP组合物包含选自以下的可电离阳离子脂质:

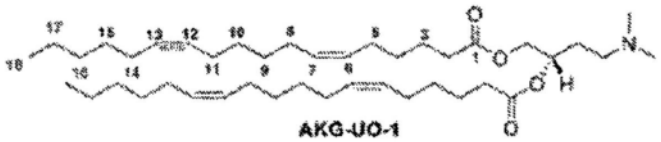
[0427]



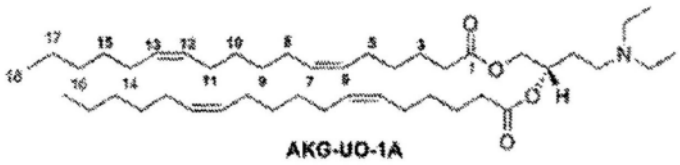
[0428] 在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-PA。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-C15(C8:1)。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-C16(C8:1)。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-C17(C8:1)。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-C18(C8:1)。

[0429] 在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-15。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-16。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-17。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-18。

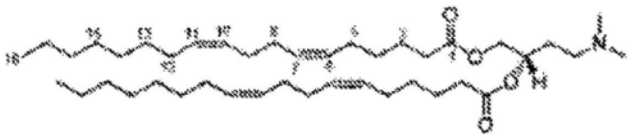
[0430] 靶向脂质的盐形式可以影响其在制备脂质纳米粒中使用的含醇溶剂中的溶解度。在一些实施方案中,提供了可电离阳离子脂质组合物。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含核酸;本文中公开的可电离脂质;甾醇;包含磷脂酰丝氨酸(PS)脂质的一种或更多种磷脂;并且任选地还包含缀合的脂质。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含mRNA核酸;本文中公开的可电离脂质;胆固醇;选自DSPC、DPPC和DOPC的一种或更多种磷脂;以及选自DPPS、DSPS和DOPS的PS脂质;并且任选地还包含含有PEG的缀合的脂质。

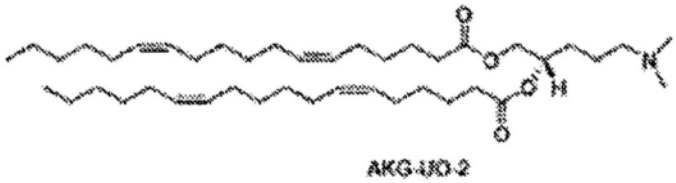
[0431] 

在一些实施方案中,可电离脂质是AKG-UO-1A:

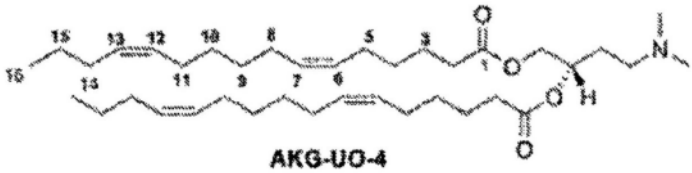
[0432] 

在一些实施方案中,可电离脂质是AKG-UO-1B:

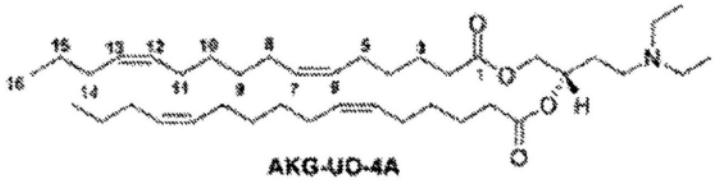
[0433] 
AKG-UO-1B 在一些实施方案中,可电离脂质是AKG-UO-2

[0434] 

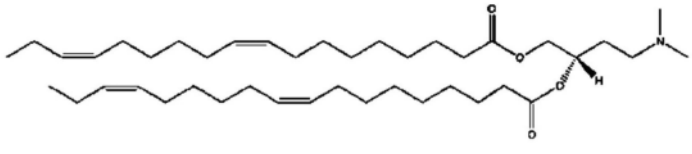
在一些实施方案中,可电离脂质是AKG-UO-4:

[0435] 

在一些实施方案中,可电离脂质是AKG-UO-4A:

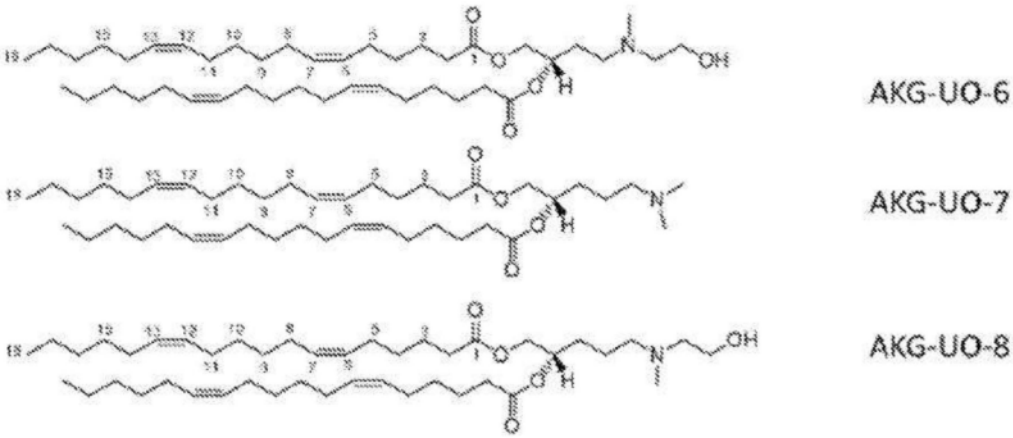
[0436] 

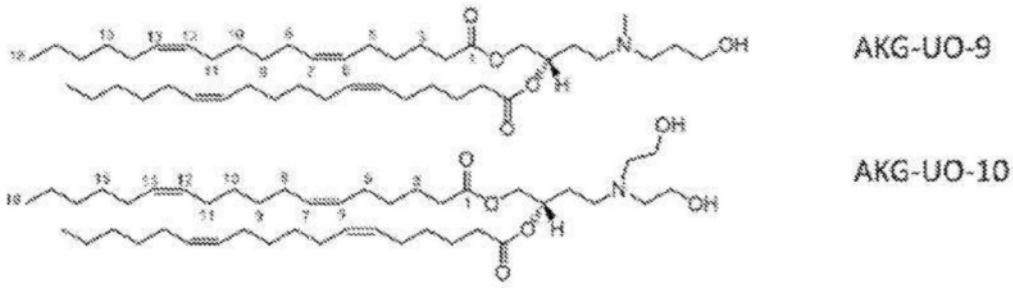
在一些实施方案中,可电离脂质是AKG-UO-5:

[0437] 

[0438] 在一些实施方案中,可电离脂质是AKG-UO-6、AKG-UO-7、AKG-UO-7、AKG-UO-8、AKG-UO-9或AKG-UO-10:

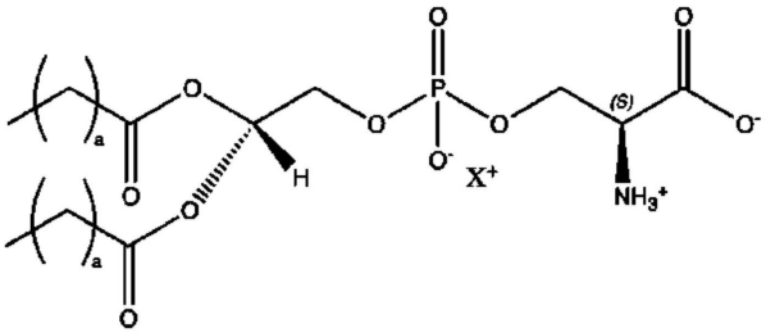
[0439]





[0440] 在一些实施方案中,LNP组合物可包含阴离子磷脂。在一些实施方案中,使用阴离子磷脂的钠盐或铵盐制备LNP组合物。在一些实施方案中,阴离子磷脂盐是式(V-A-1)化合物,其具有以下化学结构:

[0441]



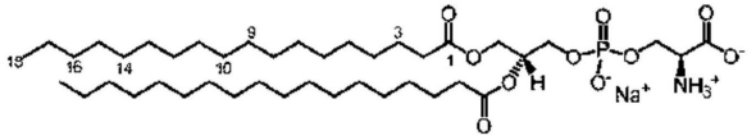
式 (V-A-1),

[0442] 其中:

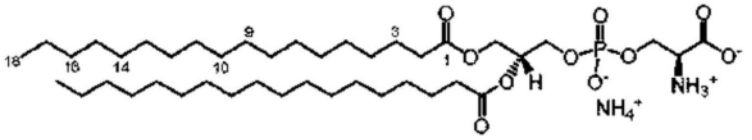
[0443] X^+是铵(NH_4^+)或钠(Na^+)阳离子;并且

[0444] a是14,15或16。

[0445] 在一些实施方案中,阴离子磷脂盐选自:

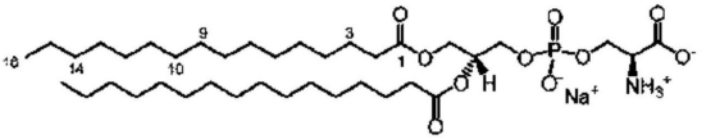


DSPS(L-异构体)-钠盐

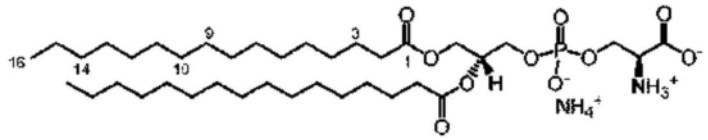


DSPS(L-异构体)-铵盐

[0446]



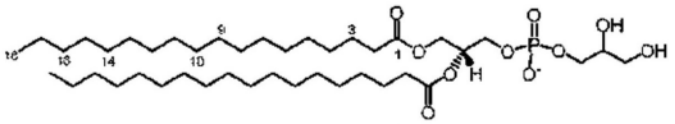
DPPS(L-异构体)-钠盐



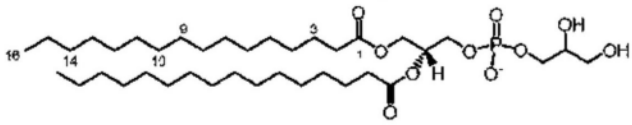
DPPS(L-异构体)-铵盐。

[0447] 在一些实施方案中,阴离子磷脂盐是DSPS(L-异构体)钠盐。在一些实施方案中,阴离子磷脂盐是DSPS(L-异构体)铵盐。在一些实施方案中,阴离子磷脂盐是DPPS(L-异构体)钠盐。在一些实施方案中,阴离子磷脂盐是DPPS(L-异构体)铵盐。在一些实施方案中,靶向脂质是二棕榈酰基磷脂酰-L-丝氨酸(DPPS)或二硬脂酰基磷脂酰-L-丝氨酸(DSPS)的钠盐或铵盐。在一些实施方案中,靶向脂质是二棕榈酰基磷脂酰-L-丝氨酸(DPPS)或二硬脂酰基磷脂酰-L-丝氨酸(DSPS)的钠盐或铵盐。

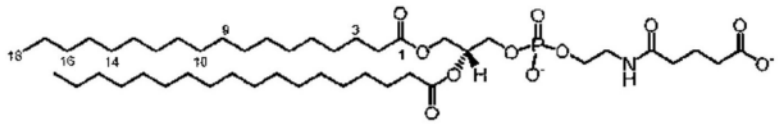
[0448] 在一些实施方案中,LNP组合物可包含选自以下的阴离子磷脂或其铵盐或钠盐:



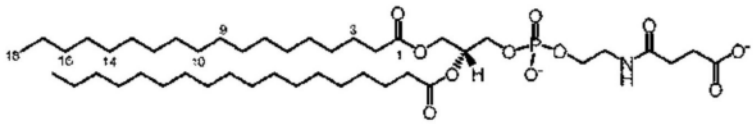
DSPG



DPPG

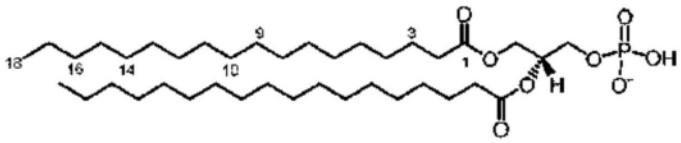


N-Glu-DSPE

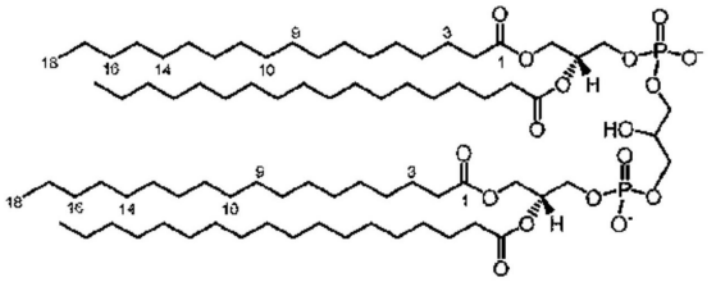


N-Suc-DSPE

[0449]



DSPA



心磷脂

[0450] 在一些实施方案中,磷脂酰丝氨酸的盐形式在乙醇中是高度可溶的。在一些实施方案中,其在大于0.5mg/ml、大于1mg/mL、大于5mg/mL、大于10mg/mL或大于20mg/mL时是可溶的。在一些实施方案中,盐是铵盐。在一些实施方案中,盐是铵本身、烷基铵、二烷基铵或三烷基铵盐。在一些实施方案中,胺选自氨、二甲胺、二乙胺、三乙胺、三甲胺、2-(二甲基氨基)乙醇、二乙醇胺、2-(二乙基氨基)乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-甲基-葡糖胺、咪唑、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、4-(2-羟乙基)-吗啉、哌嗪、1-(2-羟乙基)-吡咯烷、三乙醇胺和氨丁三醇(三(羟甲基)氨基甲烷)。在一些实施方案中,该靶向脂质是DPPS的铵盐。

[0451] 与磷脂酰-L-丝氨酸分离的阴离子磷脂也被认为是LNP的靶向脂质。这些包括磷脂酰甘油(PG)、磷脂酸(PA)、N-戊二酰基-磷脂酰乙醇胺(N-Glu-PE)、N-琥珀酰基-磷脂酰乙醇胺(N-Suc-PE)和心磷脂。在一些实施方案中,LNP包含与磷脂酰-L-丝氨酸分离的阴离子磷脂,其可用作LNP的靶向脂质。在一些实施方案中,LNP包含选自以下的阴离子磷脂:磷脂酰甘油(PG)、磷脂酸(PA)、N-戊二酰基-磷脂酰乙醇胺(N-Glu-PE)、N-琥珀酰基-磷脂酰乙醇胺(N-Suc-PE)和心磷脂。二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、N-琥珀酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(N-Suc-DSPE)、N-戊二酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(N-glu-DSPE)、二硬脂酰基磷脂酸(DSPA)和心磷脂也作为阴离子磷脂提供。

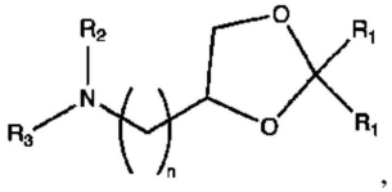
[0452] 在一些实施方案中,提供了包含可电离阳离子脂质组合物的脂质纳米粒(LNP)组

合物。在一些实施方案中,提供了包含可电离阳离子脂质的脂质纳米粒(LNP)组合物。在一些实施方案中,LNP组合物包含mRNA核酸。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物还包含总量为LNP组合物中总脂质的2.5至10mol%的PS脂质。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物还包含选自DSPS(L-异构体)和DPPS的PS脂质。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.0mol%的缀合的脂质。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含缀合的脂质,其总量小于LNP组合物中总脂质含量的2mol%,并且缀合的脂质是PEG-DMG。

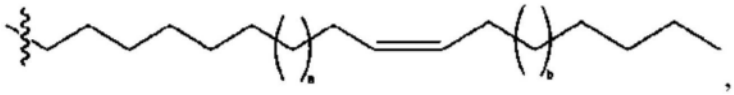
[0453] 在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含核酸;本文中公开的可电离脂质;甾醇;包含磷脂酰丝氨酸(PS)脂质的一种或更多种磷脂;并且任选地还包含缀合的脂质。在一些实施方案中,脂质纳米粒(LNP)组合物包含mRNA核酸;本文中公开的可电离脂质;胆固醇;选自SM、DSPC、HSPC、DPPC和DOPC的一种或更多种磷脂;以及选自DPPS和DSPS的PS脂质;并且任选地还包含含有PEG的缀合的脂质。在一些实施方案中,核酸脂质纳米粒(LNP)组合物包含:核酸;可电离阳离子脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%;甾醇,其总量为LNP组合物中总脂质含量的25至45mol%;以及一种或更多种磷脂,其磷脂总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%,并且包含总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的磷脂酰丝氨酸(PS);以及任选地还包含缀合的脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%。

[0454] 在一些实施方案中,LNP组合物还包含选自以下的阴离子脂质:DSPS(L-异构体)、DPPS(L-异构体)、DMPS(L-异构体)、DOPS(L-异构体)和DSPS(D-异构体)。

[0455] 本公开内容的一些方面涉及脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含具有以下化学结构的可电离脂质:

[0456] 

[0457] 其中R_1是

[0458] 

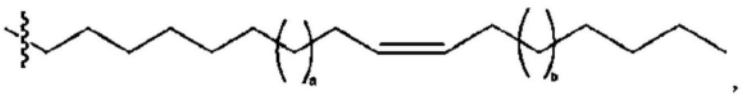
[0459] 其中a是0或1;b是1、2、3或4,前提是a+b之和是1、2、3或4;

[0460] R_2和R_3各自独立地是任选地被羟基取代的(C_1-C_4)烷基;并且

[0461] n是等于2、3或4的整数。

[0462] 在一些实施方案中,n是2或3。在一些实施方案中,a是0。在一些实施方案中,b是1、2或3。在一些实施方案中,a是1。在一些实施方案中,b是1、2或3。在一些实施方案中,R_2和R_3各自是甲基。

[0463] 在一些实施方案中,R_1是

[0464] 

[0465] a是0或1,并且b是1或3;R_2和R_3各自是甲基;并且n是2或3。在一些实施方案中,n是

3。

[0466] 在一些实施方案中,包含核酸;本文中所述的可电离脂质,甾醇;包含磷脂酰丝氨酸(PS)脂质的一种或更多种磷脂;以及任选的缀合的脂质。

[0467] 在一些实施方案中,核酸是mRNA。

[0468] 在一些实施方案中,甾醇是胆固醇。

[0469] 在一些实施方案中,一种或更多种磷脂由以下组成:选自SM、DSPC、HSPC、DPPC和DOPC的一种或更多种磷脂;以及选自DPPS和DSPS的PS脂质。

[0470] 在一些实施方案中,一种或更多种磷脂由DSPC组成;并且一种或更多种PS脂质选自(L-丝氨酸)DPPS和(L-丝氨酸)DSPS。

[0471] 在一些实施方案中,组合物包含总量为组合物中总脂质的2.5至10mol%的PS脂质。

[0472] 在一些实施方案中,缀合的脂质包含PEG。

[0473] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:核酸;可电离阳离子脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%;甾醇,其总量为LNP组合物中总脂质含量的25至45mol%;以及一种或更多种磷脂,其磷脂总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%,并且包含磷脂酰丝氨酸(PS),其总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%;以及任选的缀合的脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%。

[0474] 在一些实施方案中,核酸是mRNA。

[0475] 在一些实施方案中,甾醇是胆固醇。

[0476] 在一些实施方案中,一种或更多种磷脂由DSPC和L-丝氨酸PS组成。

[0477] 在一些实施方案中,组合物包含总量为组合物中总脂质的2.5至7.5mol%的PS。

[0478] 在一些实施方案中,缀合的脂质包含PEG。在一些实施方案中,缀合的脂质是PEG-DMG。

[0479] 在一些实施方案中,LNP包含总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.0mol%的缀合的脂质。在一些实施方案中,缀合的脂质的总量小于LNP组合物中总脂质含量的2mol%。

[0480] 在一些实施方案中,核酸是mRNA,可电离阳离子脂质的总量为LNP组合物中总脂质含量的45至55mol%;甾醇是总量为LNP组合物中总脂质含量的35至45mol%的胆固醇;磷脂总量为LNP组合物中总脂质含量的7至15mol%;一种或更多种磷脂由DSPC和PS脂质组成,所述PS脂质是选自L-丝氨酸构型的DPPS和DSPS的一种或更多种脂质;并且PS脂质的总量为LNP组合物中总脂质含量的约5mol%。

[0481] 在一些实施方案中,组合物包含总量选自LNP组合物中总脂质含量的1.25mol%、2.5mol%、5mol%、7.5mol%和10mol%的PS脂质。

[0482] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:核酸,其中该核酸是mRNA;可电离阳离子脂质,该可电离阳离子脂质的总量为LNP组合物中总脂质含量的45至55mol%;甾醇,其中该甾醇是总量为LNP组合物中总脂质含量的35至45mol%的胆固醇;一种或更多种磷脂,其中该一种或更多种磷脂的磷脂总量为LNP组合物中总脂质含量的10mol%,并且包含总量为LNP组合物中总脂质含量的3至9mol%的磷脂酰丝氨酸(PS);以及缀合的脂质,该缀合的脂质的总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.0mol%。

[0483] 在一些实施方案中,一种或更多种磷脂选自:DSPS(L-异构体)、DPPS(L-异构体)、DMPS(L-异构体)、DOPS(L-异构体)和DSPS(D-异构体)。

[0484] 在一些实施方案中,缀合的脂质是PEG-DMG;并且PS脂质选自DSPS(L-异构体)和DPPS。

[0485] 在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是一种或更多种选自以下的化合物:KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(8:1),和KC3-C15(C8:1)。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-PA。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-OA。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-C17(C8:1)。

[0486] 在一些实施方案中,LNP包含核酸;可电离阳离子脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的50mol%;胆固醇,其总量为LNP组合物中总脂质含量的38.5mol%;一种或更多种磷脂,其总量为LNP组合物中总脂质含量的7至15mol%,并且包含总量为LNP组合物中总脂质含量的3至9mol%的磷脂酰丝氨酸(PS)脂质;以及含PEG的脂质,其总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.0mol%。

[0487] 在一些实施方案中,磷脂由选自DSPC、DOPC、DPPC、HSPC和SM的一种或更多种磷脂组成。

[0488] 在一些实施方案中,PS脂质是选自DPPS和DSPS的一种或更多种L-丝氨酸脂质。

[0489] 在一些实施方案中,一种或更多种磷脂包含至少两种具有错配的酰基链长度的(L-丝氨酸)PS脂质。

[0490] 在一些实施方案中,磷脂是DSPC和DPPS。在一些实施方案中,DSPC和DPPS各自以各自基于LNP组合物中总脂质含量的5mol%的总量存在于LNP中。

[0491] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:核酸、可电离阳离子脂质KC3-PA或KC3-OA以及总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质。

[0492] 在一些实施方案中,核酸是mRNA,PS脂质是(L-丝氨酸)DSPS、(L-丝氨酸)DPPS或其混合物,并且LNP组合物还包含胆固醇和选自DSPC、DPPC、HSPC和SM的第二磷脂。

[0493] 在一些实施方案中,LNP组合物还包含基于LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.0mol%的PEG-DMG或PEG-DSG。

[0494] 在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-PA。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-OA。

[0495] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:核酸、KC3-C17(C8:1)可电离阳离子脂质;以及总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质。

[0496] 在一些实施方案中,LNP组合物的N/P比为4至7。在一些实施方案中,组合物的N/P比为5至6。在一些实施方案中,组合物的N/P比为5.3。

[0497] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:核酸、可电离阳离子脂质KC3-PA以及总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质。

[0498] 在一些实施方案中,核酸是mRNA,PS脂质是(L-丝氨酸)DSPS、(L-丝氨酸)DPPS或其混合物,并且LNP组合物还包含胆固醇和选自DSPC、DOPC、DPPC、HSPC和SM的第二磷脂。

[0499] 在一些实施方案中,LNP组合物还包含基于LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.0mol%的PEG-DMG或PEG-DSG。

[0500] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:核酸、选自KC3-C17(C8:1)的可电离阳离子脂质;以及总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质。

[0501] 在一些实施方案中,N/P比为4至7。在一些实施方案中,N/P比为5至6。在一些实施方案中,N/P比为3。在一些实施方案中,N/P比为7。

[0502] 在一些实施方案中,核酸是编码SARS-CoV-2刺突蛋白的mRNA。

[0503] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)疫苗组合物,其包含:N/P比为4至7的mRNA核酸;总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%的KC3-PA可电离阳离子脂质;总量为LNP组合物中总脂质含量的25至40mol%的胆固醇;总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质;总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%的DSPC磷脂;以及总量为LNP组合物中总脂质含量的0至2.5mol%的PEG-DMG。

[0504] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)疫苗组合物,其包含:N/P比为3至8的mRNA核酸;总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%的KC3-C17(C8:1)可电离阳离子脂质;总量为LNP组合物中总脂质含量的25至40mol%的胆固醇;总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质;总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%的DSPC磷脂;以及总量为LNP组合物中总脂质含量的0至2.5mol%的PEG-DMG。

[0505] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)疫苗组合物,其包含:N/P比为4至7的mRNA核酸;总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%的KC3-C15(C8:1)可电离阳离子脂质;总量为LNP组合物中总脂质含量的25至40mol%的胆固醇;总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质;总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%的DSPC磷脂;以及总量为LNP组合物中总脂质含量的0至2.5mol%的PEG-DMG。

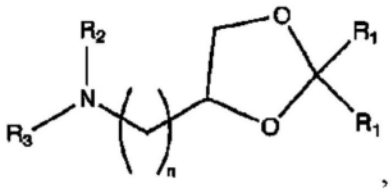
[0506] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)疫苗组合物,其包含:N/P比为3至8的mRNA核酸;总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%的KC3-C18可电离阳离子脂质;总量为LNP组合物中总脂质含量的25至40mol%的胆固醇;总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质;总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%的DSPC磷脂;以及总量为LNP组合物中总脂质含量的0至2.5mol%的PEG-DMG。

[0507] 在一些实施方案中,核酸是SEQ ID NO:2的mRNA。

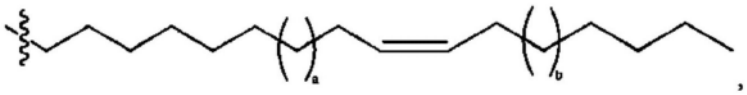
[0508] 本公开的一些方面涉及在LNP中将(L-丝氨酸)PS脂质与本文中所述的可电离阳离子脂质组合用于将LNP靶向至树突细胞的用途。在一些实施方案中,LNP包含mRNA。在一些实施方案中,LNP还包含胆固醇。在一些实施方案中,LNP中的(L-丝氨酸)PS脂质的总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%。在一些实施方案中,LNP还包含一种或更多种另外的磷脂,所述另外的磷脂包括DSPC。在一些实施方案中,LNP还包含缀合的脂质。在一些实施方案中,LNP包含:N/P比为3至8的mRNA核酸;总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%的KC3-PA或KC3-C17(C8:1)可电离阳离子脂质(ICL);总量为LNP组合物中总脂质含量的25至40mol%的胆固醇;总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质;总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%的DSPC磷脂;以及总量为LNP组合物中总脂质含量的0至2.5mol%的缀合的脂质。在一些实施方案中,ICL是KC3-PA。在一些实施方案中,

ICL是KC3-C17(C8:1)。

[0509] 本公开内容的一些方面涉及脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含具有以下化学结构的可电离脂质:

[0510] 

[0511] 其中R_1是

[0512] 

[0513] 其中a是0或1;b是1、2、3或4,前提是a+b之和是1、2、3或4;

[0514] R_2和R_3各自独立地是甲基;并且

[0515] n是等于2或3的整数。

[0516] 在一些实施方案中,a是0。在一些实施方案中,b是1。在一些实施方案中,b是3。

[0517] 在一些实施方案中,a是1。在一些实施方案中,b是1。在一些实施方案中,b是3。

[0518] 在一些实施方案中,n是2。在一些实施方案中,n是3。

[0519] 在一些实施方案中,组合物包含选自以下的阴离子脂质:磷脂酰甘油(PG)、磷脂酸(PA)、N-戊二酰基-磷脂酰乙醇胺(N-Glu-PE)、N-琥珀酰基-磷脂酰乙醇胺(N-Suc-PE)和心磷脂。二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、N-琥珀酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(N-Suc-DSPE)、N-戊二酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(N-glu-DSPE)、二硬脂酰基磷脂酸(DSPA)和心磷脂。

[0520] 在一些实施方案中,组合物包含除磷脂酰-L-丝氨酸以外的阴离子靶向磷脂。

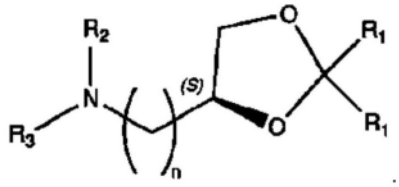
[0521] 在一些实施方案中,组合物包含选自DSPG和DPPG的阴离子磷脂。

[0522] 在一些实施方案中,组合物包含选自N-Glu-DSPE和N-Suc-DSPE的阴离子磷脂。

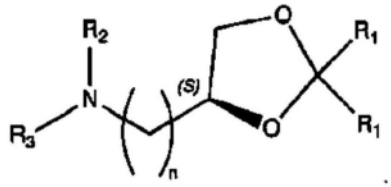
[0523] 在一些实施方案中,组合物包含DSPA阴离子磷脂。

[0524] 在一些实施方案中,组合物包含心磷脂阴离子磷脂。

[0525] 在一些实施方案中,可电离脂质具有以下化学结构:

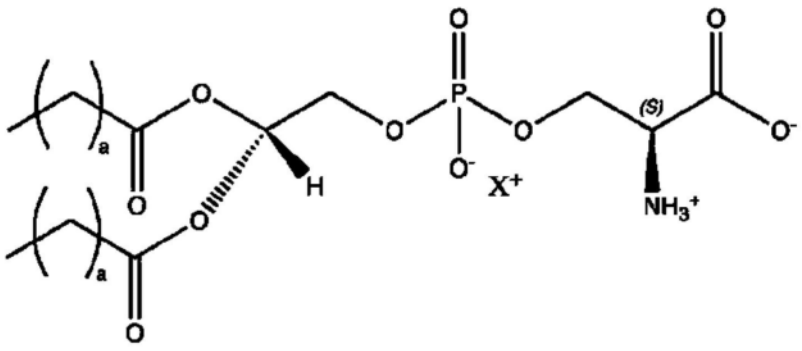
[0526] 

[0527] 在一些实施方案中,可电离脂质具有以下化学结构:

[0528] 

[0529] 本公开内容的一些方面涉及式(V-A-1)的阴离子磷脂的组合物的钠盐或铵盐,所

述式(V-A-1)具有以下化学结构:

[0530] 

式 (V-A-1),

[0531] 其中X^+是铵阳离子或钠(Na^+)阳离子;并且a是14,15或16。

[0532] 在一些实施方案中,a是14或16。在一些实施方案中,X^+是铵阳离子(NH_4^+)。

[0533] 在一些实施方案中,X^+是钠阳离子(Na^+)

[0534] 在一些实施方案中,X是选自以下的铵阳离子:铵(NH_4^+)、烷基铵、二烷基铵和三烷基铵盐。在一些实施方案中,X是选自以下的铵阳离子:铵、二甲胺、二乙胺、三乙胺、三甲胺、2-(二甲基氨基)乙醇、二乙醇胺、2-(二乙基氨基)乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-甲基-葡糖胺、咪唑、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、4-(2-羟乙基)-吗啉、哌嗪、1-(2-羟乙基)-吡咯烷、三乙醇胺和氨丁三醇(三(羟甲基)氨基甲烷)。

[0535] 在一些实施方案中,式(V-A-1)的阴离子磷脂是二硬脂酰基磷脂酰-L-丝氨酸(DSPS L-异构体)的钠盐。在一些实施方案中,式(V-A-1)的阴离子磷脂是二硬脂酰基磷脂酰-L-丝氨酸(DSPS L-异构体)的铵盐。在一些实施方案中,式(V-A-1)的阴离子磷脂是DPPS(L-异构体)的钠盐。在一些实施方案中,式(V-A-1)的阴离子磷脂是DPPS(L-异构体)的铵盐。一些实施方案涉及盐形式组合物在制备脂质体纳米粒(LNP)组合物中的用途。在一些实施方案中,该用途在制备LNP组合物期间与以下LNP组分中的一种或更多种组合:mRNA核酸;可电离阳离子脂质(ICL);胆固醇;(L-丝氨酸)PS脂质;一种或更多种磷脂;以及缀合的脂质。在一些实施方案中,该用途包括在制备LNP组合物期间将式(V-A-1)化合物的铵或盐形式与以下LNP组分中的一种或更多种组合的步骤:mRNA核酸;可电离阳离子脂质(ICL);胆固醇;(L-丝氨酸)PS脂质;一种或更多种磷脂;以及缀合的脂质。

[0536] 在一些实施方案中,LNP是核酸脂质纳米粒疫苗组合物,其包含:N/P比为4至7的mRNA核酸;总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%的可电离阳离子脂质;总量为LNP组合物中总脂质含量的25至40mol%的胆固醇;总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质;总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%的DSPC磷脂;以及总量为LNP组合物中总脂质含量的0至2.5mol%的PEG-DMG。

[0537] 在一些实施方案中,核酸是SEQ ID NO:2的mRNA。

[0538] 在一些实施方案中,LNP组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的46至65mol%的可电离阳离子脂质。在一些实施方案中,LNP组合物包含总量为组合物中总脂质的约5mol%的PS。在一些实施方案中,LNP组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的约1.5mol%的缀合的脂质。

[0539] 在一些实施方案中,缀合的脂质是PEG-DMG;并且PS脂质选自DSPS(L-异构体)和

DPPS。

[0540] 在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是一种或更多种选自以下的化合物:KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(C8:1),和KC3-C15(C8:1)在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-PA。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-OA。在一些实施方案中,可电离阳离子脂质是KC3-C17(C8:1)。

[0541] 一些实施方案涉及在LNP中将(L-丝氨酸)PS脂质与本文中所述的可电离阳离子脂质组合用于将LNP靶向至树突细胞的用途。

[0542] 在一些实施方案中,LNP包含mRNA。在一些实施方案中,LNP还包含胆固醇。在一些实施方案中,LNP中的(L-丝氨酸)PS脂质的总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%。在一些实施方案中,LNP还包含一种或更多种另外的磷脂,所述另外的磷脂包括DSPC。在一些实施方案中,LNP还包含缀合的脂质。

[0543] 在一些实施方案中,LNP包含:N/P比为3至8的mRNA核酸;总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%的KC3-PA或KC3-C17(C8:1)可电离阳离子脂质(ICL);总量为LNP组合物中总脂质含量的25至40mol%的胆固醇;总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质;总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%的DSPC磷脂;以及总量为LNP组合物中总脂质含量的0至2.5mol%的缀合的脂质。

[0544] 在一些实施方案中,ICL是KC3-PA。在一些实施方案中,ICL是KC3-C17(C8:1)。

[0545] 在一些实施方案中,组合物包含选自DSPG和DPPG的阴离子磷脂,其总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5%至7.5%。在一些实施方案中,组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5%至7.5%的DSPG阴离子磷脂。在一些实施方案中,组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5%至7.5%的DPPG阴离子磷脂。

[0546] 在一些实施方案中,LNP还包含一种或更多种另外的磷脂,所述另外的磷脂包括DSPC。

[0547] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:核酸;总量为LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%的KC3可电离阳离子脂质;总量为LNP组合物中总脂质含量的23.5至43.5mol%的胆固醇;总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质;总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%的DSPC或HSPC磷脂;以及总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5mol%至2.5mol%的含PEG的缀合的脂质。

[0548] 在一些实施方案中,核酸是mRNA。在一些实施方案中,N/P比为3至8。

[0549] 在一些实施方案中,KC3可电离阳离子脂质选自:KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(8:1),和KC3-C15(C8:1)。在一些实施方案中,KC3可电离阳离子脂质是KC3-OA。在一些实施方案中,KC3可电离阳离子脂质是KC3-PA。在一些实施方案中,KC3可电离阳离子脂质是KC3-C17(C8:1)。在一些实施方案中,KC3可电离阳离子脂质是KC3-C15(C8:1)。

[0550] 在一些实施方案中,缀合的脂质是PEG-DMG或PEG-DSG。

[0551] 在一些实施方案中,组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.0mol%的含PEG的缀合的脂质。

[0552] 在一些实施方案中,组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的48mol%的KC3可电离阳离子脂质。

[0553] 在一些实施方案中,组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的10mol%的DSPC

和DSPS。

[0554] 在一些实施方案中,组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的5mol%的5%DSPC或HSPC。

[0555] 在一些实施方案中,组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的1.5mol%的PEG-DMG。

[0556] 在一些实施方案中,组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的40.5mol%胆固醇的胆固醇。

[0557] 在一些实施方案中,组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的10mol%的DSPC磷脂。

[0558] 在一些实施方案中,含PEG的缀合的脂质是PEG_{2000}-DMG。

[0559] 在一些实施方案中,组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的23.5mol%的胆固醇。在一些实施方案中,组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的33.5mol%的胆固醇。在一些实施方案中,组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的38.5mol%的胆固醇。在一些实施方案中,组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的40.5mol%的胆固醇。在一些实施方案中,组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的42.7mol%的胆固醇。在一些实施方案中,组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的43.5mol%的胆固醇。在一些实施方案中,组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的33.5至43.5mol%的胆固醇。在一些实施方案中,组合物包含总量为LNP组合物中总脂质含量的45至55mol%的KC3可电离阳离子脂质。

[0560] 本公开内容的一些方面涉及核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:mRNA核酸;选自以下的KC3可电离阳离子脂质:KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(8:1),和KC3-C15(C8:1),其总量为LNP组合物中总脂质含量的45至55mol%;总量为LNP组合物中总脂质含量的33.5至43.5mol%的胆固醇;总量为LNP组合物中总脂质含量的5mol%的(L-丝氨酸)DPPS脂质;总量为LNP组合物中总脂质含量的5mol%的DSPC或HSPC磷脂;以及总量为LNP组合物中总脂质含量的1.5mol%的PEG-DMG缀合的脂质。

[0561] 本公开内容的一些方面涉及脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含KC3可电离阳离子脂质、(L-丝氨酸)PS脂质、胆固醇、包含至少一种阴离子磷脂的一种或更多种磷脂、以及缀合的脂质,其中LNP通过包括溶解阴离子磷脂的钠盐或铵盐的步骤的方法获得。

[0562] 在一些实施方案中,组合物包含核酸。在一些实施方案中,核酸是mRNA。

[0563] 在一些实施方案中,组合物是疫苗。

[0564] 在一些实施方案中,组合物中磷脂的总量为LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%,并且磷脂酰丝氨酸(PS)的总量为LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%;以及组合物中缀合的脂质的总量为LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%。

[0565] 在一些实施方案中,组合物包含48mol%的KC3可电离阳离子脂质、40.5mol%胆固醇和5mol%(L-丝氨酸)DPPS脂质,其中每个mol%是指LNP组合物中总脂质含量的mol%。

[0566] 在一些实施方案中,组合物包含48mol%的KC3可电离阳离子脂质、38.5mol%胆固醇和5mol%(L-丝氨酸)DPPS脂质,其中每个mol%是指LNP组合物中总脂质含量的mol%。

[0567] 在一些实施方案中,组合物包含46至54mol%的KC3可电离阳离子脂质和5mol%(L-丝氨酸)DPPS脂质,其中每个mol%是指LNP组合物中总脂质含量的mol%。

[0568] 在一些实施方案中,组合物包含45mol%的KC3可电离阳离子脂质、42.7mol%胆固醇和5mol%(L-丝氨酸)DPPS脂质,其中每个mol%是指LNP组合物中总脂质含量的mol%。

[0569] 在一些实施方案中,组合物包含50mol%的KC3可电离阳离子脂质、38.5mol%胆固醇、5mol%(L-丝氨酸)DPPS脂质和总共10mol%磷脂浓度;其中每个mol%是指LNP组合物中总脂质含量的mol%。

[0570] 在一些实施方案中,组合物包含48mol%的KC3可电离阳离子脂质、40.5mol%胆固醇、5mol%(L-丝氨酸)DPPS脂质和总共10mol%磷脂浓度;其中每个mol%是指LNP组合物中总脂质含量的mol%。

[0571] 在一些实施方案中,组合物包含48mol%的KC3可电离阳离子脂质、40.5mol%胆固醇、5mol%(L-丝氨酸)DPPS脂质、5mol%DSPC或DPPC;以及总共10mol%磷脂浓度;其中每个mol%是指LNP组合物中总脂质含量的mol%。

[0572] 在一些实施方案中,组合物包含46.5mol%的KC3可电离阳离子脂质、42mol%胆固醇、5mol%(L-丝氨酸)DPPS脂质,其中每个mol%是指LNP组合物中总脂质含量的mol%。

[0573] 在一些实施方案中,组合物还包含总共的LNP组合物中总脂质含量的5mol%DSPC或HSPC。

[0574] 在一些实施方案中,组合物还包含总共的LNP组合物中总脂质含量的1.5mol%PEG-DMG。

[0575] 在一些实施方案中,组合物包含总共的LNP组合物中总脂质含量的10mol%的DSPC/DPPC磷脂。

[0576] 本公开内容的一些方面涉及选自以下的磷脂酰丝氨酸盐:DSPS钠、DPPS钠、DSPS铵和DPPS铵。

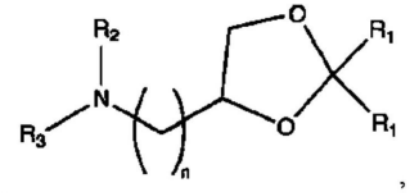
[0577] 本公开内容的一些方面涉及DSPS-Na盐或DPPS-NH_4^+盐在制备LNP中的用途,所述LNP包含(L-丝氨酸)PS脂质、甾醇、缀合的脂质、磷脂,用于将LNP靶向至树突细胞。

[0578] 本公开内容的一些方面涉及包含乙醇和DSPS或DPPS的溶液,该溶液通过包括将磷脂酰丝氨酸盐溶解在乙醇中的步骤的方法获得,其中磷脂酰丝氨酸盐选自DSPS钠、DPPS钠、DSPS铵和DPPS铵。

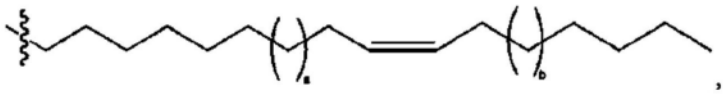
[0579] 实施方案:

[0580] 下面描述了一些非限制性实施方案,每个实施方案都被认为在本公开内容的范围内。

[0581] 实施方案1:脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含具有以下化学结构的可电离脂质:

[0582] 

[0583] 其中R_1是

[0584] 

[0585] 其中a是0或1;b是1、2、3或4,前提是a+b之和是1、2、3或4;

[0586] R_2和R_3各自独立地是任选地被羟基取代的(C_1-C_4)烷基;并且

[0587] n是等于2、3或4的整数。

[0588] 实施方案2:实施方案1所述的组合物,其中n是2或3。

[0589] 实施方案3:实施方案1至2中任一项所述的组合物,其中a是0。

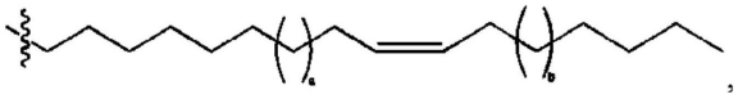
[0590] 实施方案4:实施方案1至3中任一项所述的组合物,其中b是1、2或3。

[0591] 实施方案5:实施方案1至2中任一项所述的组合物,其中a是1。

[0592] 实施方案6:实施方案1至3中任一项所述的组合物,其中b是1、2或3。

[0593] 实施方案7:实施方案1至6中任一项所述的组合物,其中R_2和R_3各自是甲基。

[0594] 实施方案8:权利要求1所述的组合物,其中R_1是

[0595] 

[0596] a是0或1且b是1或3;

[0597] R_2和R_3各自是甲基;并且

[0598] n是2或3。

[0599] 实施方案9:实施方案1至8中任一项所述的组合物,其中n是3。

[0600] 实施方案10:实施方案1至9中任一项所述的组合物,其包含:

[0601] a.核酸;

[0602] b.实施方案1至9中任一项所述的可电离脂质;

[0603] c.甾醇;

[0604] d.包含磷脂酰丝氨酸(PS)脂质的一种或更多种磷脂;以及

[0605] e.任选地还包含缀合的脂质。

[0606] 实施方案11:实施方案10所述的组合物,其中所述核酸是mRNA。

[0607] 实施方案12:实施方案11所述的组合物,其中所述甾醇是胆固醇。

[0608] 实施方案13:实施方案12所述的组合物,其中所述一种或更多种磷脂由以下组成:

[0609] a.选自SM、DSPC、HSPC、DPPC和DOPC的一种或更多种磷脂;以及

[0610] b.选自DPPS和DSPS的PS脂质。

[0611] 实施方案14:实施方案13所述的组合物,其中所述一种或更多种磷脂由以下组成:

[0612] a.DSPC;以及

[0613] b.选自(L-丝氨酸)DPPS和(L-丝氨酸)DSPS的一种或更多种PS脂质。

[0614] 实施方案15:实施方案13所述的组合物,其中所述组合物包含总量为所述组合物中总脂质的2.5至10mol%的所述PS脂质。

[0615] 实施方案16:实施方案10至15中任一项所述的组合物,其中所述缀合的脂质包含PEG。

[0616] 实施方案17:核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:

[0617] a.核酸;

[0618] b.可电离阳离子脂质,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%;

[0619] c.甾醇,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的25至45mol%;以及

[0620] d.一种或更多种磷脂,其磷脂总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%,并且包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的磷脂酰丝氨酸(PS);以及

[0621] e.任选地还包含缀合的脂质,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol%。

[0622] 实施方案18:实施方案17所述的组合物,其中所述核酸是mRNA。

[0623] 实施方案19:实施方案18所述的组合物,其中所述甾醇是胆固醇。

[0624] 实施方案20:实施方案19所述的组合物,其中所述一种或更多种磷脂由DSPC和L-丝氨酸PS组成。

[0625] 实施方案21:实施方案20所述的组合物,其中所述组合物包含总量为所述组合物中总脂质的2.5至7.5mol%的所述PS。

[0626] 实施方案22:实施方案17至21中任一项所述的组合物,其中所述缀合的脂质包含PEG。

[0627] 实施方案23:实施方案22所述的组合物,其中所述缀合的脂质是PEG-DMG。

[0628] 实施方案24:实施方案23所述的组合物,其中所述LNP包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.0mol%的所述缀合的脂质。

[0629] 实施方案25:实施方案24所述的组合物,其中所述LNP包含总量小于所述LNP组合物中总脂质含量的2mol%的所述缀合的脂质。

[0630] 实施方案26:权利要求17所述的组合物,其中:

[0631] a.所述核酸是mRNA,

[0632] b.所述可电离阳离子脂质的总量为所述LNP组合物中总脂质含量的45至55mol%;

[0633] c.甾醇是总量为所述LNP组合物中总脂质含量的35至45mol%的胆固醇;

[0634] d.磷脂的总量为所述LNP组合物中总脂质含量的7至15mol%;

[0635] e.所述一种或更多种磷脂由DSPC和PS脂质组成,所述PS脂质是选自L-丝氨酸构型的DPPS和DSPS的一种或更多种脂质;并且

[0636] f.所述PS脂质的总量为所述LNP组合物中总脂质含量的约5mol%。

[0637] 实施方案27:实施方案26所述的组合物,其中所述组合物包含总量选自所述LNP组合物中总脂质含量的1.25mol%、2.5mol%、5mol%、7.5mol%和10mol%的所述PS脂质。

[0638] 实施方案28:核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:

[0639] a.核酸,其中所述核酸是mRNA;

[0640] b.可电离阳离子脂质,所述可电离阳离子脂质的总量为所述LNP组合物中总脂质含量的45至55mol%;

[0641] c.甾醇,其中所述甾醇是总量为所述LNP组合物中总脂质含量的35至45mol%的胆固醇;

[0642] d.一种或更多种磷脂,其中所述一种或更多种磷脂的磷脂总量为所述LNP组合物中总脂质含量的10mol%,并且包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的3至9mol%的磷脂酰丝氨酸(PS);以及

[0643] e.缀合的脂质,所述缀合的脂质的总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.0mol%。

[0644] 实施方案29:实施方案17至28中任一项所述的组合物,其中所述一种或更多种磷脂选自:DSPS(L-异构体)、DPPS(L-异构体)、DMPS(L-异构体)、DOPS(L-异构体)和DSPS(D-异构体)。

[0645] 实施方案30:权利要求29所述的组合物,其中:

[0646] a.所述缀合的脂质是PEG-DMG;并且

[0647] b.所述PS脂质选自DSPS(L-异构体)和DPPS。

[0648] 实施方案31:实施方案17至28中任一项所述的组合物,其中所述可电离阳离子脂质是一种或更多种选自以下的化合物:KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(8:1),和KC3-C15(C8:1)。

[0649] 实施方案32:实施方案17至28中任一项所述的组合物,其中所述可电离阳离子脂质是KC3-PA。

[0650] 实施方案33:实施方案17至28中任一项所述的组合物,其中所述可电离阳离子脂质是KC3-OA。

[0651] 实施方案34:实施方案17至28中任一项所述的组合物,其中所述可电离阳离子脂质是KC3-C17(C8:1)。

[0652] 实施方案35:权利要求17所述的核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:

[0653] a.核酸;

[0654] b.可电离阳离子脂质,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的50mol%;

[0655] c.胆固醇,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的38.5mol%;

[0656] d.一种或更多种磷脂,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的7至15mol%,并且包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的3至9mol%的磷脂酰丝氨酸(PS)脂质;以及

[0657] e.含PEG的脂质,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.0mol%。

[0658] 实施方案36:实施方案34所述的组合物,其中所述磷脂由一种或更多种选自DSPC、DOPC、DPPC、HSPC和SM的磷脂组成。

[0659] 实施方案37:实施方案36所述的组合物,其中所述PS脂质是一种或更多种选自DPPS和DSPS的L-丝氨酸脂质。

[0660] 实施方案38:实施方案17至28中任一项所述的组合物,其中所述一种或更多种磷脂包含至少两种具有错配的酰基链长度的(L-丝氨酸)PS脂质。

[0661] 实施方案39:实施方案38所述的组合物,其中所述磷脂是DSPC和DPPS。

[0662] 实施方案40:实施方案39所述的组合物,其中所述DSPC和DPPS各自以各自基于所述LNP组合物中总脂质含量的5mol%的总量存在于所述LNP中。

[0663] 实施方案41:核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:核酸、可电离阳离子脂质KC3-PA或KC3-OA、和总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质。

[0664] 实施方案42:实施方案41所述的组合物,其中所述核酸是mRNA,所述PS脂质是(L-丝氨酸)DSPS、(L-丝氨酸)DPPS或其混合物,并且所述LNP组合物还包含胆固醇和选自DSPC、DPPC、HSPC和SM的第二磷脂。

[0665] 实施方案43:实施方案42所述的组合物,其中所述LNP组合物还包含基于所述LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.0mol%的PEG-DMG或PEG-DSG。

[0666] 实施方案44:实施方案41至43中任一项所述的组合物,其中所述可电离阳离子脂质是KC3-PA。

[0667] 实施方案45:实施方案41至43中任一项所述的组合物,其中所述可电离阳离子脂质是KC3-OA。

[0668] 实施方案46:核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:核酸,KC3-C17(C8:1)可电离

阳离子脂质;以及总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol％的(L-丝氨酸)PS脂质。

[0669] 实施方案47:实施方案41至46中任一项所述的组合物,其中所述LNP组合物的N/P比为4至7。

[0670] 实施方案48:实施方案47所述的组合物,其中所述LNP组合物的N/P比为5至6。

[0671] 实施方案49:实施方案48所述的组合物,其中所述LNP组合物的N/P比为5.3。

[0672] 实施方案50:核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:核酸,可电离阳离子脂质KC3-PA,以及总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol％的(L-丝氨酸)PS脂质。

[0673] 实施方案51:实施方案50所述的组合物,其中所述核酸是mRNA,所述PS脂质是(L-丝氨酸)DSPS、(L-丝氨酸)DPPS或其混合物,并且所述LNP组合物还包含胆固醇和选自DSPC、DOPC、DPPC、HSPC和SM的第二磷脂。

[0674] 实施方案52:实施方案51所述的组合物,其中所述LNP组合物还包含基于所述LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.0mol％的PEG-DMG或PEG-DSG。

[0675] 实施方案53:核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:核酸,选自KC3-C17(C8:1)的可电离阳离子脂质;以及总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol％的(L-丝氨酸)PS脂质。

[0676] 实施方案54:实施方案17至21、26至28、35至44或53中任一项所述的组合物,其中N/P比为4至7。

[0677] 实施方案55:实施方案54所述的组合物,其中所述N/P比为5至6。

[0678] 实施方案56:实施方案55所述的组合物,其中所述N/P比为3。

[0679] 实施方案57:实施方案55所述的组合物,其中所述N/P比为7。

[0680] 实施方案58:权利要求17至21、26至28、35至47或53中任一项所述的组合物,其中所述核酸是编码SARS-CoV-2刺突蛋白的mRNA。

[0681] 实施方案59:核酸脂质纳米粒(LNP)疫苗组合物,其包含:

[0682] a.N/P比为4至7的mRNA核酸;

[0683] b.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的40至65mol％的KC3-PA可电离阳离子脂质;

[0684] c.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的25至40mol％的胆固醇;

[0685] d.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol％的(L-丝氨酸)PS脂质;

[0686] e.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol％的DSPC磷脂;以及

[0687] f.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0至2.5mol％的PEG-DMG。

[0688] 实施方案60:核酸脂质纳米粒(LNP)疫苗组合物,其包含:

[0689] a.N/P比为3至8的mRNA核酸;

[0690] b.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的40至65mol％的KC3-C17(C8:1)可电离阳离子脂质;

[0691] c.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的25至40mol％的胆固醇;

[0692] d.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol％的(L-丝氨酸)PS脂质;

[0693] e.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol％的DSPC磷脂;以及

[0694] f.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0至2.5mol％的PEG-DMG。

[0695] 实施方案61:核酸脂质纳米粒(LNP)疫苗组合物,其包含:

[0696] a.N/P比为4至7的mRNA核酸;

[0697] b.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%的KC3-C15(C8:1)可电离阳离子脂质;

[0698] c.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的25至40mol%的胆固醇;

[0699] d.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质;

[0700] e.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%的DSPC磷脂;以及

[0701] f.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0至2.5mol%的PEG-DMG。

[0702] 实施方案62:核酸脂质纳米粒(LNP)疫苗组合物,其包含:

[0703] a.N/P比为3至8的mRNA核酸;

[0704] b.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%的KC3-C18可电离阳离子脂质;

[0705] c.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的25至40mol%的胆固醇;

[0706] d.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质;

[0707] e.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%的DSPC磷脂;以及

[0708] f.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0至2.5mol%的PEG-DMG。

[0709] 实施方案63:实施方案59至62中任一项所述的组合物,其中所述核酸是SEQ ID NO:2的mRNA。

[0710] 实施方案64:在所述LNP中将(L-丝氨酸)PS脂质与实施方案1至9中任一项所述的可电离阳离子脂质组合用于将所述LNP靶向至树突细胞的用途。

[0711] 实施方案65:实施方案64所述的用途,其中所述LNP包含mRNA。

[0712] 实施方案66:实施方案64至65中任一项所述的用途,其中所述LNP还包含胆固醇。

[0713] 实施方案67:实施方案66所述的用途,其中所述LNP中(L-丝氨酸)PS脂质的总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%。

[0714] 实施方案68:实施方案67所述的用途,其中所述LNP还包含一种或更多种另外的磷脂,所述另外的磷脂包括DSPC。

[0715] 实施方案69:实施方案68所述的用途,其中所述LNP还包含缀合的脂质。

[0716] 实施方案70:实施方案64所述的用途,其中所述LNP包含:

[0717] a.N/P比为3至8的mRNA核酸;

[0718] b.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%的KC3-PA或KC3-C17(C8:1)可电离阳离子脂质(ICL);

[0719] c.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的25至40mol%的胆固醇;

[0720] d.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质;

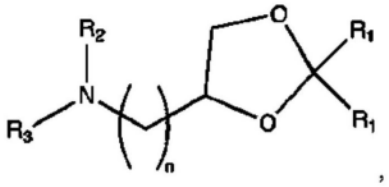
[0721] e.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%的DSPC磷脂;以及

[0722] f.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0至2.5mol%的缀合的脂质。

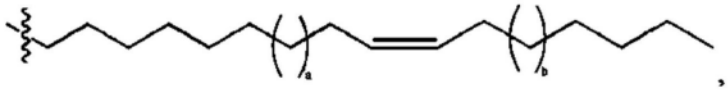
[0723] 实施方案71:实施方案70所述的用途,其中所述ICL是KC3-PA。

[0724] 实施方案72:实施方案70所述的用途,其中所述ICL是KC3-C17(C8:1)。

[0725] 实施方案73:脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含具有以下化学结构的可电离脂质:

[0726] 

[0727] 其中R_1是

[0728] 

[0729] 其中a是0或1;b是1、2、3或4,前提是a+b之和是1、2、3或4;

[0730] R_2和R_3各自独立地是甲基;并且

[0731] n是等于2或3的整数。

[0732] 实施方案74:实施方案73所述的组合物,其中a是0。

[0733] 实施方案75:实施方案74所述的组合物,其中b是1。

[0734] 实施方案76:实施方案74所述的组合物,其中b是3。

[0735] 实施方案77:实施方案73所述的组合物,其中a是1。

[0736] 实施方案78:实施方案77所述的组合物,其中b是1。

[0737] 实施方案79:实施方案77所述的组合物,其中b是3。

[0738] 实施方案80:实施方案73至79中任一项所述的组合物,其中n是2。

[0739] 实施方案81:实施方案73至79中任一项所述的组合物,其中n是3。

[0740] 实施方案82:实施方案17至28中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含选自以下的阴离子脂质:磷脂酰甘油(PG)、磷脂酸(PA)、N-戊二酰基-磷脂酰乙醇胺(N-Glu-PE)、N-琥珀酰基-磷脂酰乙醇胺(N-Suc-PE)和心磷脂。二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、N-琥珀酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(N-Suc-DSPE)、N-戊二酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(N-glu-DSPE)、二硬脂酰基磷脂酸(DSPA)和心磷脂。

[0741] 实施方案83:实施方案17至28或82中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含除磷脂酰-L-丝氨酸以外的阴离子靶向磷脂。

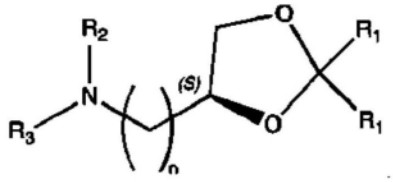
[0742] 实施方案84:实施方案17至28或82至83中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含选自DSPG和DPPG的阴离子磷脂。

[0743] 实施方案85:实施方案17至28或82至83中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含选自N-Glu-DSPE和N-Suc-DSPE的阴离子磷脂。

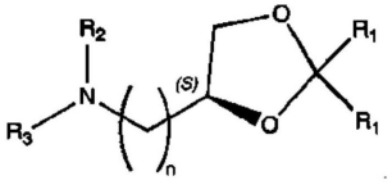
[0744] 实施方案86:实施方案17至28或82至83中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含DSPA阴离子磷脂。

[0745] 实施方案87:实施方案17至28或82至83中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含心磷脂阴离子磷脂。

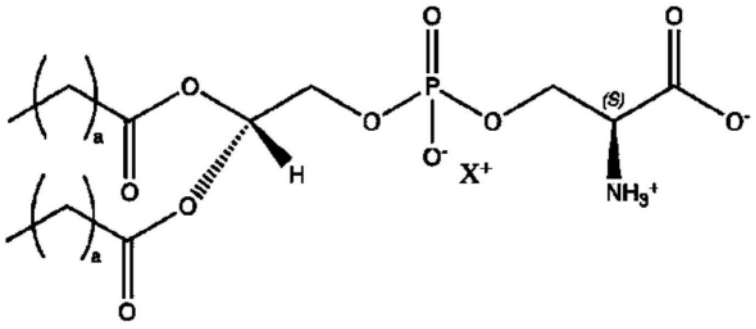
[0746] 实施方案88:实施方案1至63或73至87中任一项所述的组合物,其中所述可电离脂质具有以下化学结构:

[0747] 

[0748] 实施方案89:实施方案64至72中任一项所述的用途,其中所述可电离脂质具有以下化学结构:

[0749] 

[0750] 实施方案90:式(V-A-1)的阴离子磷脂组合物的钠盐或铵盐,所述式(V-A-1)具有以下化学结构:

[0751] 

式 (V-A-1),

[0752] 其中:

[0753] X^+是铵阳离子或钠(Na^+)阳离子;并且

[0754] a是14,15或16。

[0755] 实施方案91:实施方案90所述的组合物,其中a是14或16。

[0756] 实施方案92:实施方案90或91中任一项所述的组合物,其中X^+是铵阳离子(NH_4^+)。

[0757] 实施方案93:实施方案90或91中任一项所述的组合物,其中X^+是钠阳离子(Na^+)。

[0758] 实施方案94:实施方案90至93中任一项所述的组合物,其中式(V-A-1)的阴离子磷脂是二硬脂酰基磷脂酰-L-丝氨酸(DSPS L-异构体)的钠盐。

[0759] 实施方案95:实施方案90至93中任一项所述的组合物,其中式(V-A-1)的阴离子磷脂是二硬脂酰基磷脂酰-L-丝氨酸(DSPS L-异构体)的铵盐。

[0760] 实施方案96:实施方案90至93中任一项所述的组合物,其中式(V-A-1)的阴离子磷脂是DPPS(L-异构体)的钠盐。

[0761] 实施方案97:实施方案90至93中任一项所述的组合物,其中式(V-A-1)的阴离子磷脂是DPPS(L-异构体)的铵盐。

[0762] 实施方案98:实施方案90至97中任一项所述的盐形式组合物在制备脂质体纳米粒(LNP)组合物中的用途。

[0763] 实施方案99:实施方案98所述的用途,其在制备所述LNP组合物期间与以下LNP组分中的一种或更多种组合:

[0764] mRNA核酸;

[0765] 可电离阳离子脂质(ICL);

[0766] 胆固醇;

[0767] (L-丝氨酸)PS脂质;

[0768] 一种或更多种磷脂;以及

[0769] 缀合的脂质。

[0770] 实施方案100:实施方案98所述的用途,其包括在制备LNP组合物期间将式(V-A-1)化合物的铵或盐形式与以下LNP组分中的一种或更多种组合的步骤:

[0771] mRNA核酸;

[0772] 权利要求1至9或73至88中任一项所述的可电离阳离子脂质(ICL);

[0773] 胆固醇;

[0774] (L-丝氨酸)PS脂质;

[0775] 一种或更多种磷脂;以及

[0776] 缀合的脂质。

[0777] 实施方案101:实施方案98至100中任一项所述的用途,其中所述LNP是核酸脂质纳米粒疫苗组合物,其包含:

[0778] a.N/P比为4至7的mRNA核酸;

[0779] b.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%的实施方案1至9或73至88中任一项所述的可电离阳离子脂质;

[0780] c.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的25至40mol%的胆固醇;

[0781] d.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质;

[0782] e.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%的DSPC磷脂;以及

[0783] f.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0至2.5mol%的PEG-DMG。

[0784] 实施方案102:实施方案101所述的用途,其中所述核酸是SEQ ID NO:2的mRNA。

[0785] 实施方案103:实施方案17至63或73至89中任一项所述的组合物,其中LNP组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的46至65mol%的所述可电离阳离子脂质。

[0786] 实施方案104:实施方案17至63、73至89或103中任一项所述的组合物,其中所述LNP组合物包含总量为所述组合物中总脂质的约5mol%的所述PS。

[0787] 实施方案105:实施方案17至63、73至89或103至104中任一项所述的组合物,其中所述LNP组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的约1.5mol%的所述缀合的脂质。

[0788] 实施方案106:实施方案82至87中任一项所述的组合物,其中:

[0789] 所述缀合的脂质是PEG-DMG;并且

[0790] 所述PS脂质选自DSPS(L-异构体)和DPPS。

[0791] 实施方案107:实施方案82至87中任一项所述的组合物,其中所述可电离阳离子脂质是一种或更多种选自以下的化合物:KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(C8:1),和KC3-C15(C8:1)。

[0792] 实施方案108:实施方案82至87中任一项所述的组合物,其中所述可电离阳离子脂质是KC3-PA。

[0793] 实施方案109:实施方案82至87中任一项所述的组合物,其中所述可电离阳离子脂质是KC3-OA。

[0794] 实施方案110:实施方案82至87中任一项所述的组合物,其中所述可电离阳离子脂质是KC3-C17(C8:1)。

[0795] 实施方案111:在所述LNP中将(L-丝氨酸)PS脂质与实施方案73至87中任一项所述的可电离阳离子脂质组合用于将所述LNP靶向至树突细胞的用途。

[0796] 实施方案112:实施方案111所述的用途,其中所述LNP包含mRNA。

[0797] 实施方案113:实施方案111至112中任一项所述的用途,其中所述LNP还包含胆固醇。

[0798] 实施方案114:实施方案113所述的用途,其中所述LNP中(L-丝氨酸)PS脂质的总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%。

[0799] 实施方案115:实施方案114所述的用途,其中所述LNP还包含一种或更多种另外的磷脂,所述另外的磷脂包括DSPC。

[0800] 实施方案116:实施方案115所述的用途,其中所述LNP还包含缀合的脂质。

[0801] 实施方案117:实施方案111所述的用途,其中所述LNP包含:

[0802] a.N/P比为3至8的mRNA核酸;

[0803] b.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的40至65mol%的KC3-PA或KC3-C17(C8:1)可电离阳离子脂质(ICL);

[0804] c.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的25至40mol%的胆固醇;

[0805] d.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol%的(L-丝氨酸)PS脂质;

[0806] e.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol%的DSPC磷脂;以及

[0807] f.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0至2.5mol%的缀合的脂质。

[0808] 实施方案118:实施方案117所述的用途,其中所述ICL是KC3-PA。

[0809] 实施方案119:实施方案117所述的用途,其中所述ICL是KC3-C17(C8:1)。

[0810] 实施方案120:实施方案90至97中任一项所述的组合物,其中X是选自以下的铵阳离子:铵(NH_4^+)、烷基铵、二烷基铵和三烷基铵盐。

[0811] 实施方案121:实施方案120所述的组合物,其中X是选自以下的铵阳离子:铵、二甲胺、二乙胺、三乙胺、三甲胺、2-(二甲基氨基)乙醇、二乙醇胺、2-(二乙基氨基)乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-甲基-葡糖胺、咪唑、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、4-(2-羟乙基)-吗啉、哌嗪、1-(2-羟乙基)-吡咯烷、三乙醇胺和氨丁三醇(三(羟甲基)氨基甲烷)。

[0812] 实施方案122:实施方案17至28或82至83中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含选自DSPG和DPPG的阴离子磷脂,其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5%至7.5%。

[0813] 实施方案123:实施方案122所述的组合物,其中所述组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5%至7.5%的DSPG阴离子磷脂。

[0814] 实施方案124:实施方案122所述的组合物,其中所述组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5%至7.5%的DPPG阴离子磷脂。

[0815] 实施方案125:实施方案114所述的用途,其中所述LNP还包含一种或更多种另外的磷脂,所述另外的磷脂包括DSPC。

[0816] 实施方案126:核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:

[0817] a.核酸;

[0818] b.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的40至65mol％的KC3可电离阳离子脂质；

[0819] c.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的23.5至43.5mol％的胆固醇；

[0820] d.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol％的(L-丝氨酸)PS脂质；

[0821] e.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol％的DSPC或HSPC磷脂；以及

[0822] f.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0.5mol％至2.5mol％的含PEG的缀合的脂质。

[0823] 实施方案127：实施方案126所述的组合物，其中所述核酸是mRNA。

[0824] 实施方案128：实施方案126至127中任一项所述的组合物，其中所述N/P比为3至8。

[0825] 实施方案129：实施方案126至127中任一项所述的组合物，其中所述KC3可电离阳离子脂质选自：KC3-OA，KC3-PA，KC3-C17(8:1)，和KC3-C15(C8:1)。

[0826] 实施方案130：实施方案129所述的组合物，其中所述KC3可电离阳离子脂质是KC3-OA。

[0827] 实施方案131：实施方案129所述的组合物，其中所述KC3可电离阳离子脂质是KC3-PA。

[0828] 实施方案132：实施方案129所述的组合物，其中所述KC3可电离阳离子脂质是KC3-C17(C8:1)。

[0829] 实施方案133：实施方案129所述的组合物，其中所述KC3可电离阳离子脂质是KC3-C15(C8:1)。

[0830] 实施方案134：实施方案126至133中任一项所述的组合物，其中所述缀合的脂质是PEG-DMG或PEG-DSG。

[0831] 实施方案135：实施方案134所述的组合物，其中所述组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.0mol％的所述含PEG的缀合的脂质。

[0832] 实施方案136：实施方案126至135中任一项所述的组合物，其中所述组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的48mol％的所述KC3可电离阳离子脂质。

[0833] 实施方案137：实施方案126至136中任一项所述的组合物，其中所述组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的10mol％的DSPC和DSPS。

[0834] 实施方案138：实施方案126至137中任一项所述的组合物，其中所述组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5mol％的5％DSPC或HSPC。

[0835] 实施方案139：实施方案126至137中任一项所述的组合物，其中所述组合物包含总共为所述LNP组合物中总脂质含量的1.5mol％的PEG-DMG。

[0836] 实施方案140：实施方案126至137中任一项所述的组合物，其中所述组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的40.5mol％胆固醇的胆固醇。

[0837] 实施方案141：实施方案126至137中任一项所述的组合物，其中所述组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的10mol％的所述DSPC磷脂。

[0838] 实施方案142：实施方案126至141中任一项所述的组合物，其中所述含PEG的缀合的脂质是PEG_{2000}-DMG。

[0839] 实施方案143：实施方案126至139中任一项所述的组合物，其中所述组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的23.5mol％的所述胆固醇。

[0840] 实施方案144：实施方案126至139中任一项所述的组合物，其中所述组合物包含总

量为所述LNP组合物中总脂质含量的33.5mol％的所述胆固醇。

[0841] 实施方案145:实施方案126至139中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的38.5mol％的所述胆固醇。

[0842] 实施方案146:实施方案126至139中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的40.5mol％的所述胆固醇。

[0843] 实施方案147:实施方案126至139中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的42.7mol％的所述胆固醇。

[0844] 实施方案148:实施方案126至139中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的43.5mol％的所述胆固醇。

[0845] 实施方案149:实施方案126至139中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的33.5至43.5mol％的所述胆固醇。

[0846] 实施方案150:实施方案126至149中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含总量为所述LNP组合物中总脂质含量的45至55mol％的所述KC3可电离阳离子脂质。

[0847] 实施方案151:核酸脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含:

[0848] a.mRNA核酸;

[0849] b.选自以下的KC3可电离阳离子脂质:KC3-OA,KC3-PA,KC3-C17(8:1),和KC3-C15(C8:1),其总量为所述LNP组合物中总脂质含量的45至55mol％;

[0850] c.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的33.5至43.5mol％的胆固醇;

[0851] d.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5mol％的(L-丝氨酸)DPPS脂质;

[0852] e.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5mol％的DSPC或HSPC磷脂;以及

[0853] f.总量为所述LNP组合物中总脂质含量的1.5mol％的PEG-DMG缀合的脂质。

[0854] 实施方案152:脂质纳米粒(LNP)组合物,其包含KC3可电离阳离子脂质、(L-丝氨酸)PS脂质、胆固醇、包含至少一种阴离子磷脂的一种或更多种磷脂、以及缀合的脂质,其中所述LNP通过包括溶解所述阴离子磷脂的钠盐或铵盐的步骤的方法获得。

[0855] 实施方案153:实施方案152所述的组合物,其中所述阴离子磷脂是权利要求90至97中任一项所述的盐。

[0856] 实施方案154:实施方案152至153中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含核酸。

[0857] 实施方案155:实施方案154所述的组合物,其中所述核酸是mRNA。

[0858] 实施方案156:实施方案155所述的组合物,其中所述组合物是疫苗。

[0859] 实施方案157:实施方案152至156中任一项所述的组合物,其中所述组合物中磷脂的总量为所述LNP组合物中总脂质含量的5至25mol％,并且磷脂酰丝氨酸(PS)的总量为所述LNP组合物中总脂质含量的2.5至10mol％;并且所述组合物中所述缀合的脂质的总量为所述LNP组合物中总脂质含量的0.5至2.5mol％。

[0860] 实施方案158:实施方案152至156中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含

[0861] 48mol％的所述KC3可电离阳离子脂质,

[0862] 40.5mol％胆固醇,以及

[0863] 5mol％(L-丝氨酸)DPPS脂质,

[0864] 其中每个mol％是指所述LNP组合物中总脂质含量的mol％。

[0865] 实施方案159:实施方案152至156中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含

[0866] 48mol%的所述KC3可电离阳离子脂质,

[0867] 38.5mol%胆固醇,以及

[0868] 5mol%(L-丝氨酸)DPPS脂质,

[0869] 其中每个mol%是指所述LNP组合物中总脂质含量的mol%。

[0870] 实施方案160:实施方案152至156中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含

[0871] 46至54mol%的所述KC3可电离阳离子脂质,以及

[0872] 5mol%(L-丝氨酸)DPPS脂质,

[0873] 其中每个mol%是指所述LNP组合物中总脂质含量的mol%。

[0874] 实施方案161:实施方案152至156中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含

[0875] 45mol%的所述KC3可电离阳离子脂质,

[0876] 42.7mol%的胆固醇,以及

[0877] 5mol%(L-丝氨酸)DPPS脂质,

[0878] 其中每个mol%是指所述LNP组合物中总脂质含量的mol%。

[0879] 实施方案162:实施方案152至156中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含

[0880] 50mol%的所述KC3可电离阳离子脂质,

[0881] 38.5mol%胆固醇,

[0882] 5mol%(L-丝氨酸)DPPS脂质,以及

[0883] 总共10mol%磷脂浓度;

[0884] 其中每个mol%是指LNP组合物中总脂质含量的mol%。

[0885] 实施方案163:实施方案152至156中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含

[0886] 48mol%的所述KC3可电离阳离子脂质,

[0887] 40.5mol%胆固醇,

[0888] 5mol%(L-丝氨酸)DPPS脂质,以及

[0889] 总共10mol%磷脂浓度;

[0890] 其中每个mol%是指所述LNP组合物中总脂质含量的mol%。

[0891] 实施方案164:实施方案152至156中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含

[0892] 48mol%的所述KC3可电离阳离子脂质,

[0893] 40.5mol%胆固醇,

[0894] 5mol%(L-丝氨酸)DPPS脂质,

[0895] 5mol%DSPC或DPPC;以及

[0896] 总共10mol%磷脂浓度;

[0897] 其中每个mol%是指所述LNP组合物中总脂质含量的mol%。

[0898] 实施方案165:实施方案152至156中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含

[0899] 46.5mol%的所述KC3可电离阳离子脂质,

[0900] 42mol%胆固醇,

[0901] 5mol%(L-丝氨酸)DPPS脂质,

[0902] 其中每个mol%是指所述LNP组合物中总脂质含量的mol%。

[0903] 实施方案166:实施方案158至165中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含

总共的所述LNP组合物中总脂质含量的5mol％DSPC或HSPC。

[0904] 实施方案167:实施方案158至166中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含总共的所述LNP组合物中总脂质含量的1.5mol％PEG-DMG。

[0905] 实施方案168:实施方案158至163中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含总共的所述LNP组合物中总脂质含量的10mol％DSPC/DPPC磷脂。

[0906] 实施方案169:磷脂酰丝氨酸盐,其选自DSPS钠、DPPS钠、DSPS铵和DPPS铵。

[0907] 实施方案170:DSPS-Na盐或DPPS-NH_4^+盐在制备LNP中的用途,所述LNP包含(L-丝氨酸)PS脂质、甾醇、缀合的脂质、磷脂,用于将所述LNP靶向至树突细胞。

[0908] 实施方案171:包含乙醇和DSPS或DPPS的溶液,所述溶液通过包括将磷脂酰丝氨酸盐溶解在乙醇中的步骤的方法获得,其中所述磷脂酰丝氨酸盐选自DSPS钠、DPPS钠、DSPS铵和DPPS铵。

[0909] 实施例

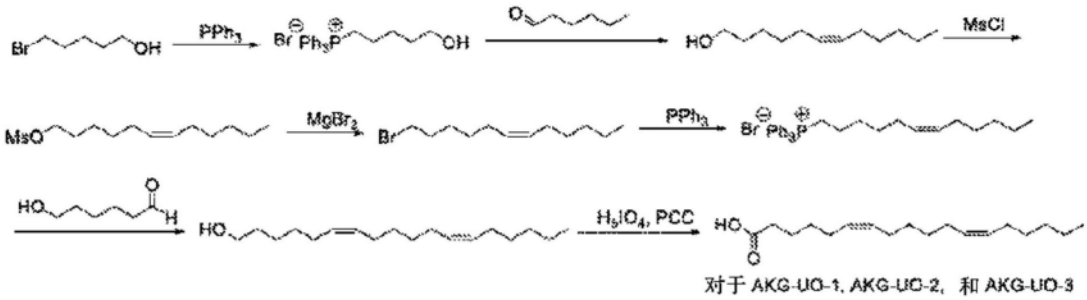
[0910] 虽然已经结合某些实施方案对本公开内容进行了描述,并且出于举例说明的目的已经阐述了许多细节,但是对于本领域技术人员将明显的是,本公开内容包括另外的实施方案,并且在不脱离本公开内容的情况下,本文中描述的一些细节可以有相当大的变化。本公开内容包括这样的另外的实施方案、修改和等同方案。特别地,本公开内容包括多种举例说明性组分和实例的特征、术语或要素的任何组合。

[0911] 除非另有明确说明,否则实施例中使用的磷脂酰丝氨酸脂质的异构体形式是磷脂酰-L-丝氨酸。

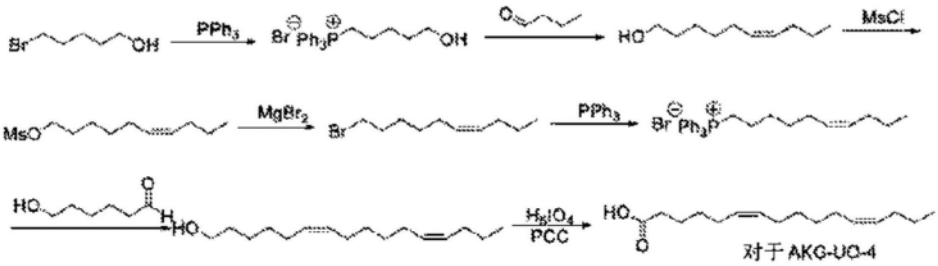
[0912] 下面提供了某些实施例来举例说明本文中所公开的实施方案中的多种实施方案。本领域普通技术人员将认识到,多种本文中所公开的实施方案不限于这些具体的举例说明性实施例。

[0913] 实施例1A:可电离脂质的合成

[0914] 方案1AKG-UO-1至AKG-UO-3的酸中间体的合成。参见图47A至47B。



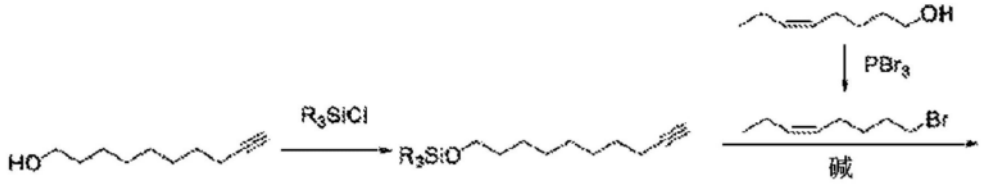
[0915]



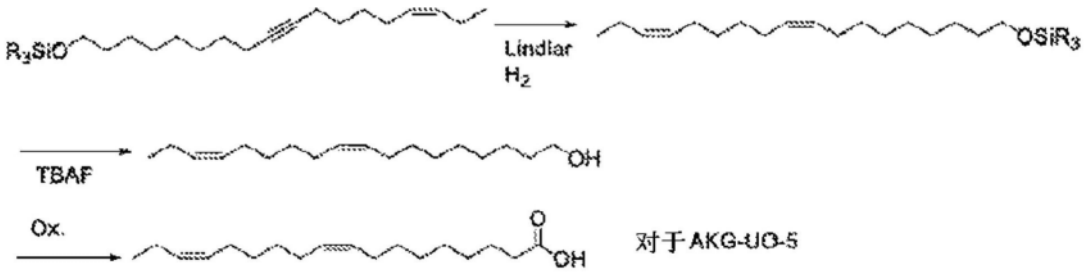
[0916] 酸中间体(6Z,12Z)-6,12-十八碳二烯酸和(6Z,12Z)-6,12-十六碳二烯酸通过一般合成来制备,在错误!未找到引用源中示出,涉及i)由5-溴戊醇和相应的醛制备的三苯基

镅叶立德的初始Witting反应,ii)通过甲磺酰化和取代将末端醇转化为溴化物,iii)重复叶立德合成和Witting反应的顺序,以及最终iv)末端醇的高碘酸氧化。所得的酸中间体用于合成AKG-UO-1至AKG-UO-4,参见下文。

[0917] 方案2AKG-UO-5的酸中间体的合成



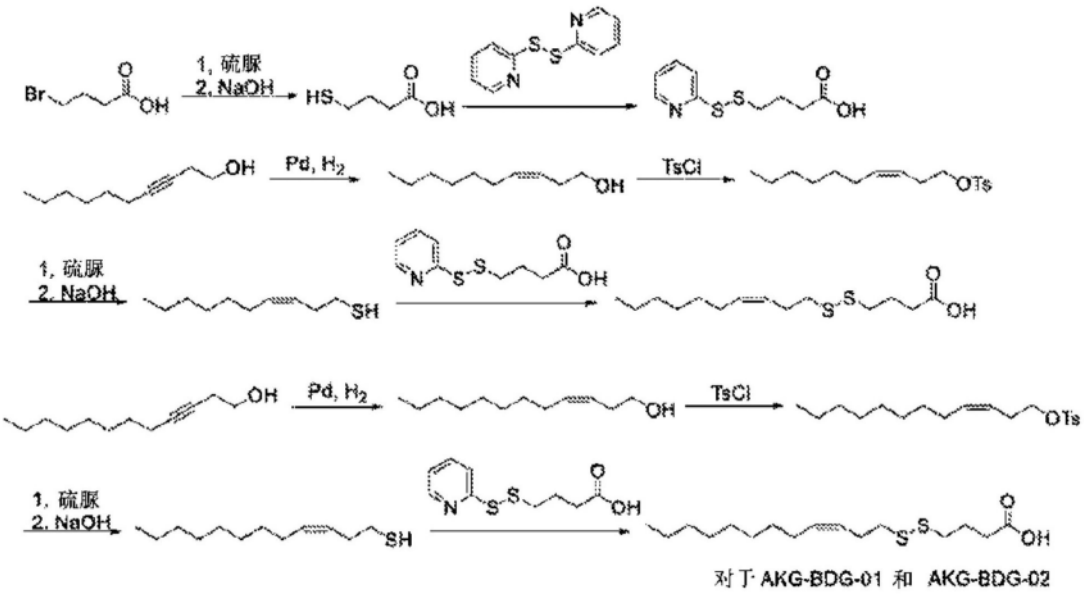
[0918]



[0919] 用于合成AKG-UO-5的酸中间体(9Z,15Z)-9,15-十八碳二烯酸是通过方案2中示出的一般合成来制备的,涉及i)用(5Z)-1-溴-5-辛烯对甲硅烷基保护的10-羟基-1-癸炔进行烷基化,ii)将炔烃催化氢化成顺式烯烃,iii)除去醇上的甲硅烷基保护,以及最终iv)将末端醇氧化成所期望的酸。

[0920] 方案3AKG-BDG-01和AKG-BDG-02的酸中间体的合成

[0921]

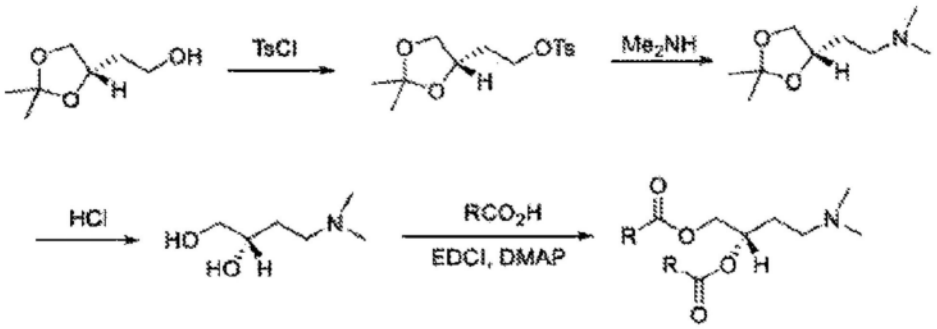


[0922] 用于合成AKG-BDG-1和AKG-BDG-2的两种二硫化物酸中间体的合成在方案4中示出。

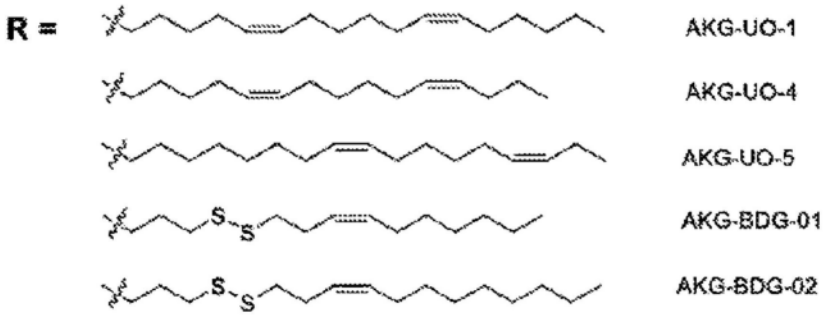
[0923] AKG-BDG-1的酸中间体的一般合成涉及i)由4-溴丁酸合成4-巯基丁酸,ii)4-巯基丁酸与DPS反应得到4-(2-吡啶基二硫烷基)丁酸,iii)将3-癸炔-1-醇催化氢化为顺式烯烃,iv)伯醇的甲苯磺酰化,v)使用硫脲置换甲苯磺酰基得到末端硫醇,以及最终vi)将末端硫醇与以上步骤ii中制备的4-(2-吡啶基二硫烷基)丁酸偶联,从而得到含有二硫化物的酸

中间体。按照类似的合成顺序从3-十二炔-1-醇开始产生用于合成AKG-BDG-2的第二酸中间体。

[0924] 方案4AKG-UO-1、AKG-UO-4、AKG-UO-5、AKG-BDG-1和AKG-BDG-2的合成

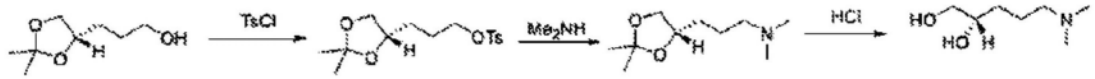


[0925]

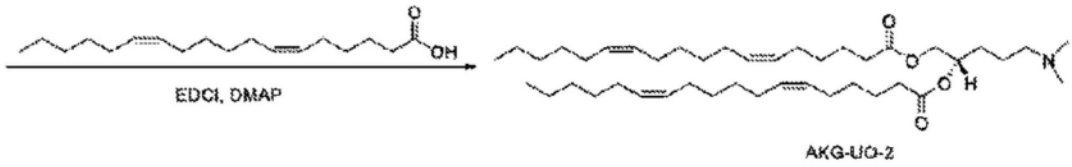


[0926] 方案4中示出的脂质AKG-UO-1、AKG-UO-4、AKG-UO-5、AKG-BDG-1和AKG-BDG-2的一般合成涉及以下步骤:i)可商购的手性二氧戊环的伯醇的甲苯磺酰化;ii)使用二甲基胺基置换甲苯磺酰基,得到叔胺;iii)二醇的酸催化脱保护;以及最终iv)用根据方案1至3合成的相应酸中间体来使二醇酯化。按照类似的合成顺序从不同的二氧戊环和相应酸中间体开始来制备AKG-UO-2,如以下方案5中所示。

[0927] 方案5AKG-UO-2的合成

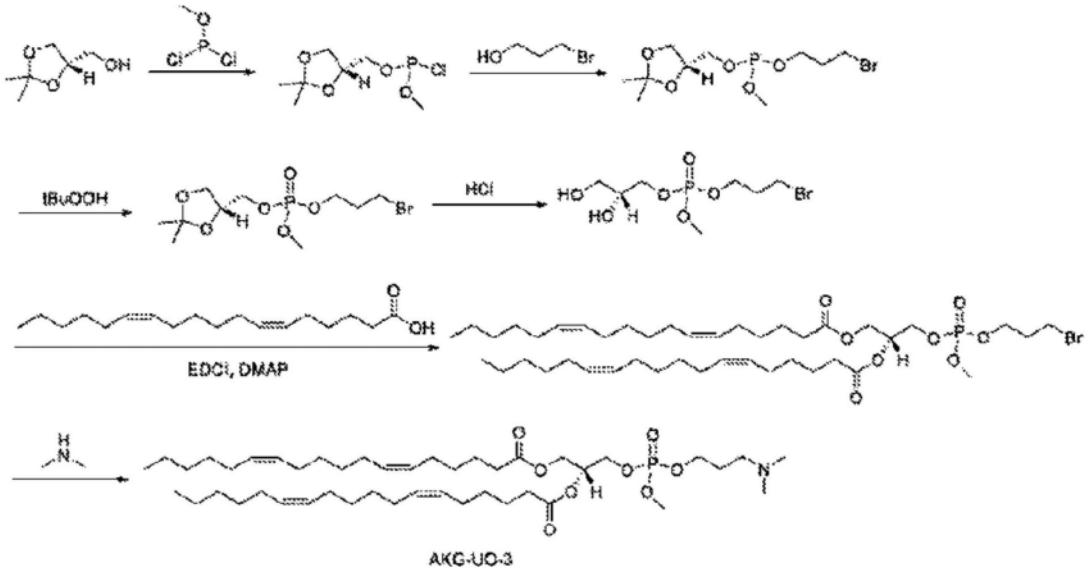


[0928]



[0929] 包含方案6中示出的脂质AKG-UO-3的磷酸三烷基酯的一般合成涉及以下步骤:i)可商购的手性二氧戊环的伯醇与甲基二氯代亚磷酸酯反应,得到相应的二烷基氯代亚磷酸酯;ii)通过用3-溴丙醇处理二烷基氯代亚磷酸酯中的氯化物来置换其,得到相应的三烷基亚磷酸酯;iii)二醇的酸催化脱保护;iv)用根据方案1合成的相应酸中间体来使二醇酯化;以及最终v)使用二甲基胺基置换溴基,得到叔胺。

[0930] 方案6AKG-UO-3的合成

[0931] 

[0932] 作为替代地,如在Caballeira et al.,Chem.Phys.Lipids,第100卷,第33至40页,1999中所述的,或者如由D'yakonov et al.(D'yakonov et al.,Med.Chem.Res.,2016,第25卷,第30至39页;D'yakonov et al.,Chem.Commun.2013,第49卷,第8401至8403页;D'yakonov et al.,2020,Phytochem.Rev.)所述的,合成了在烃链中的双键位置之间具有两个亚甲基的酸中间体。

[0933] 实施例1B:可电离脂质的合成-参见图48

[0934] 1.2-((S)-2,2-二((6Z,12Z)-十八碳-6,12-二烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基乙烷-1-胺(AKG-KC2-01,O-12095)

[0935] 2.3-((S)-2,2-二((6Z,12Z)-十八碳-6,12-二烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(AKG-KC3-01,O-12096)

[0936] 3.2-((S)-2,2-二((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基乙烷-1-胺(AKG-KC2-OA,O-11880)

[0937] 4.2-((S)-2,2-二((Z)-十六碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基乙烷-1-胺(AKG-KC2-PA,O-11879)

[0938] 5.3-((S)-2,2-二((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(AKG-KC3-OA,O-11957)

[0939] 6.3-((S)-2,2-二((Z)-十六碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(AKG-KC3-PA,O-12418)

[0940] 7.3-((S)-2,2-二((Z)-十七碳-8-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(AKG-KC3-C17(C8:1))

[0941] 8.(S)-3-(2,2-双十七烷基-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(AKG-KC3-C17)

[0942] 以下的合成:2-((S)-2,2-二((6Z,12Z)-十八碳-6,12-二烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基乙烷-1-胺(AKG-KC2-01,O-12095)

[0943] 3-((S)-2,2-二((6Z,12Z)-十八碳-6,12-二烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(AKG-KC3-01,O-12096)

[0944] 参见图48。

[0945] 实验程序

[0946] (6Z,12Z)-1-溴十八碳-6,12-二烯,2的合成

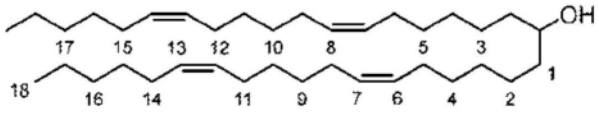
[0947] 

2

[0948] 在0℃下,向(6Z,12Z)-十八碳-6,12-二烯-1-醇,1(3.6g,13.7mmol)在二氯甲烷(50mL)中的溶液中添加甲烷磺酰氯(1.26mL,16.4mmol)和三乙胺(3.6mL,20.5mmol)。将所得溶液温热至室温并搅拌2小时。将混合物用水猝灭,并用二氯甲烷(2×100mL)萃取。将合并的有机物用盐水洗涤,然后经硫酸镁干燥,然后过滤。将滤液在真空下浓缩以得到粗油状物。将所得油状物溶解在二乙醚(50mL)中,在0℃下添加至搅拌的溴化镁乙醚(7g,27.4mmol)在二乙醚(50mL)中的浆料。将混合物温热至室温并搅拌2小时。将反应混合物用水猝灭并用乙酸乙酯(2×100mL)萃取。将合并的有机物用盐水洗涤,然后经硫酸镁干燥,然后过滤。将滤液在真空下浓缩以得到粗油状物。将粗油状物通过色谱在二氧化硅上使用在正己烷中的5%至10%乙酸乙酯作为洗脱剂进行纯化,以得到作为黄色油状物的(6Z,12Z)-1-溴十八碳-6,12-二烯,3(2.9g,8.89mmol,65%)。

[0949] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.36-5.33(m,4H),3.42-3.37(t,J=7.5Hz,2H),2.04-1.97(m,8H),1.83-1.83(m,2H),1.37-1.28(m,14H),0.90-0.86(t,J=6.6Hz,3H)。

[0950] (6Z,12Z,25Z,31Z)-三十七碳-6,12,25,31-四烯-19-醇,3的合成

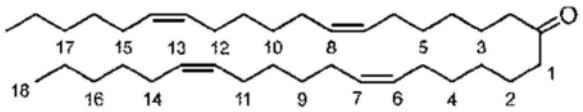
[0951] 

3

[0952] 在室温下在氩下,将(6Z,12Z)-1-溴十八碳-6,12-二烯,2(2g,6.08mmol)在醚(10mL)中的溶液添加至镁屑(162mg,6.69mmol)和碘在醚(2mL)中的混合物。将混合物在室温下搅拌90分钟(消耗镁屑),接着添加甲酸乙酯(0.24mL,3.04mmol)。在室温下搅拌一小时之后,将反应用1N HCl溶液猝灭。将混合物用乙酸乙酯(2×100mL)萃取,并将合并的有机物用水洗涤,然后用盐水洗涤。将有机物在硫酸镁下干燥,过滤,并将滤液在真空下浓缩以得到粗油状物。将所得油状物溶解在乙醇(10mL)中,并添加至氢氧化钾(260mg)在水(3mL)中的溶液。在搅拌12小时之后,用2N HCl将混合物的pH调节为4。将水溶液用二氯甲烷(2×)萃取并合并。将有机物用盐水洗涤,然后在硫酸镁下干燥并过滤。将滤液在真空下浓缩以得到粗油状物。将粗油状物在二氧化硅上使用在正己烷中的10%至30%乙酸乙酯作为洗脱剂进行纯化,以得到作为澄清油状物的(6Z,12Z,25Z,31Z)-三十七碳-6,12,25,31-四烯-19-醇,3(0.29g,0.55mmol,18%)。

[0953] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.36-5.32(m,8H),3.57(bs,1H),3.33-3.32,(m,2H),2.13-1.97(m,16H),1.36-1.29(m,34H),0.90-0.86(t,J=6.6Hz,6H)。

[0954] (6Z,12Z,25Z,31Z)-三十七碳-6,12,25,31-四烯-19-酮,4的合成

[0955] 

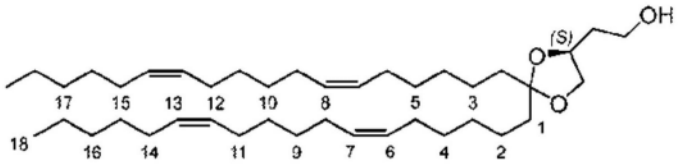
4

[0956] 在0℃下,向(6Z,12Z,25Z,31Z)-三十七碳-6,12,25,31-四烯-19-醇,3(0.29g,

0.55mmol)和碳酸钠(3mg,0.03mmol)在二氯甲烷中的混合物中添加氯铬酸吡啶鎓(236mg,1.1mmol)。将混合物温热至室温并搅拌一小时。在一小时之后,向反应物中添加硅胶(1g)并过滤混合物。将滤液浓缩,并将所得油状物在二氧化硅上使用在正己烷中的10%至20%乙酸乙酯作为洗脱剂进行纯化,以得到作为澄清油状物的(6Z,12Z,25Z,31Z)-三十七碳-6,12,25,31-四烯-19-酮,4(0.12g,0.23mmol,42%)。

[0957] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.36-5.32(m,8H),3.36-3.32,(m,1H),2.40-2.35(t,J=6.6Hz,3H),2.14-2.00(m,16H),1.58-1.54(m,4H),1.34-1.29(m,28H),0.90-0.86(t,J=6.6Hz,6H)。

[0958] 2-((S)-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)乙烷-1-醇,7的合成

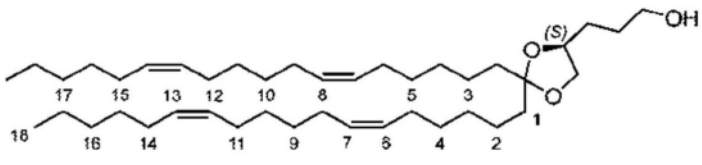
[0959] 

7

[0960] 将(6Z,12Z,25Z,31Z)-三十七碳-6,12,25,31-四烯-19-酮,4(0.12g,0.23mmol)、(4S)-(+)-4-(2-羟乙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊环5(0.20g,1.38mmol)和对甲苯磺酸吡啶鎓(9mg)在甲苯(10mL)中的混合物在氮正压下在回流下加热。在12小时之后,将混合物在真空下浓缩以得到粗油状物。将所得粗油状物通过色谱在二氧化硅上使用在正己烷中的20%至40%乙酸乙酯作为洗脱剂进行纯化,以得到作为澄清油状物的2-((S)-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)乙烷-1-醇,7(0.11g,0.17mmol,77%)。

[0961] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.36-5.32(m,8H),4.25-4.20(m,1H),4.10-4.06(m,1H),3.82-3.77(m,1H),3.54-3.49(m,1H),2.23-2.19(t,J=6.6Hz,3H),2.14-2.00(m,16H),1.84-1.78(m,2H),1.62-1.51(m,6H),1.34-1.29(m,28H),0.90-0.86(t,J=6.6Hz,6H)。

[0962] 3-((S)-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)丙烷-1-醇,8的合成

[0963] 

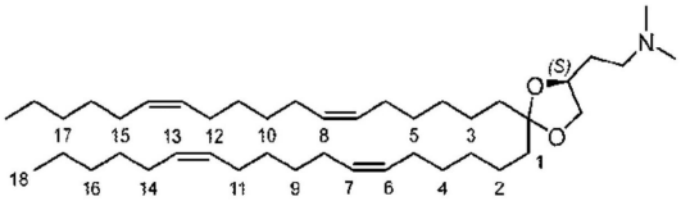
8

[0964] 将(6Z,12Z,25Z,31Z)-三十七碳-6,12,25,31-四烯-19-酮,4(0.50g,0.95mmol)、(S)-(3)-(2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-基)丙醇6(0.76g,4.75mmol)和对甲苯磺酸吡啶鎓(36mg)在甲苯(10mL)中的混合物在氮正压下在回流下加热。在12小时之后,将混合物在真空下浓缩以得到粗油状物。将所得粗油状物通过色谱在二氧化硅上使用在正己烷中的20%至40%乙酸乙酯作为洗脱剂进行纯化,以得到作为澄清油状物的3-((S)-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)丙烷-1-醇,8(0.48g,0.76mmol,80%)。

[0965] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.34-5.29(m,8H),4.06-4.02(m,2H),3.67-3.47(m,2H),

3.45-3.43(m,1H),2.12-2.01(m,16H),1.65-1.62(m,8H),1.34-1.29(m,32H),0.89-0.85(t,J＝6.6Hz,6H)。

[0966] 2-((S)-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基乙烷-1-胺(AKG-KC2-01,O-12095)的合成

[0967] 

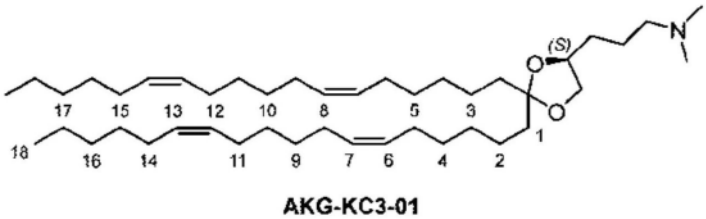
AKG-KC2-01

[0968] 在0℃下,向2-((S)-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)乙烷-1-醇,7(0.49g,0.79mmol)在二氯甲烷(10mL)中的溶液中添加甲磺酰氯(73μL,0.95mmol)和三乙胺(0.26mL,1.2mmol)。将溶液温热至室温并搅拌另外的1小时。将反应用水猝灭并用二氯甲烷(2×100mL)萃取。将有机物用盐水洗涤,然后经硫酸镁干燥并过滤。将滤液在真空下浓缩以得到粗油状物。将2M二甲基胺溶液(10mL)添加至所得粗油状物,并允许搅拌24小时。然后将混合物用水猝灭并用二氯甲烷(2×100mL)萃取。将合并的有机物用盐水洗涤,然后经硫酸镁干燥,然后过滤。将滤液在真空下浓缩以得到粗油状物。将粗油状物通过色谱在二氧化硅上使用在正己烷中的5%至100%乙酸乙酯作为洗脱剂进行纯化,以得到作为澄清油状物的2-((S)-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基乙烷-1-胺,(AKG-KC2-01,O-12095),(206mg,0.32mmol,41%)。

[0969] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.35-5.32(m,8H),4.08-4.03(m,2H),3.47(t,J＝68Hz,1H),2.36-2.27(m,2H),2.21(s,6H),2.01-1.99(m,16H),1.88-1.77(m,2H),1.68-1.53(m,6H),1.42-1.19(m,34H),0.96-0.86(t,J＝3.7Hz,6H)。

[0970] $C_{43}H_{79}NO_2$的MS(APCI):642.6

[0971] 3-((S)-2,2-二((6Z,12Z)-十八碳-6-12-二烯-4-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺,AKG-KC3-01,O-12096)的合成

[0972] 

AKG-KC3-01

[0973] 程序已在先前描述。

[0974] 作为澄清油状物的3-((S)-2,2-二((6Z,12Z)-十八碳-6-12-二烯-4-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺,(AKG-KC3-01,O-12096),(255mg,0.39mmol,51%)。

[0975] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.39-5.32(m,8H),4.06-4.02(m,2H),3.48-3.44(m,1H),2.35-2.30(m,2H),2.25(s,6H),2.01-1.98(m,16H),1.70-1.51(m,12H),1.35-1.25(m,32H),0.90-0.85(t,J＝6.6Hz,6H)。$C_{44}H_{81}NO_2$的MS(APCI):656.6

[0976] 以下的合成:2-((S)-2,2-二((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基乙烷-1-胺(AKG-KC2-OA,O-11880)

[0977] 2-((S)-2,2-二((Z)-十六碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基乙

烷-1-胺(AKG-KC2-PA,O-11879)

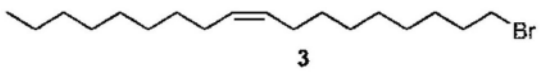
[0978] 3-((S)-2,2-二((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(AKG-KC3-OA,O-11957)

[0979] 3-((S)-2,2-二((Z)-十六碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(AKG-KC3-PA,O-12418)

[0980] 参见图49。

[0981] 实验程序(参考先前描述的AKG-KC2-01的合成)

[0982] (Z)-1-溴十八碳-9-烯3的合成

[0983] 

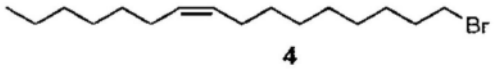
3

[0984] 程序已在先前描述。

[0985] 作为澄清油状物的(Z)-1-溴十八碳-9-烯(6.4g,19.33mmol)。

[0986] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.36-5.32(m,2H),3.41(t,J=7.5Hz,2H),2.01-1.99(m,4H),1.87-1.82(m,2H),1.44-1.26(m,22H),0.87(t,J=6.6Hz,3H)。

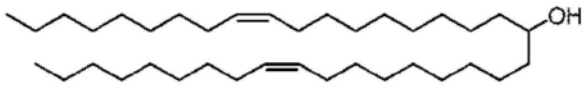
[0987] (Z)-16-溴十六碳-7-烯4

[0988] 

4

[0989] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.36-5.32(m,2H),3.42(t,J=7.5Hz,2H),2.01-1.99(m,4H),1.87-1.82(m,2H),1.44-1.26(m,18H),0.89(t,J=6.6Hz,3H)。

[0990] (9Z,28Z)-三十七碳-9,28-二烯-19-醇5的合成

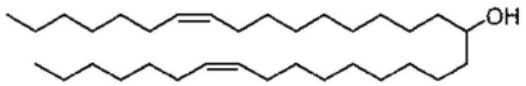
[0991] 

5

[0992] 程序已在先前描述。

[0993] 作为固体的(9Z,28Z)-三十七碳-9,28-二烯-19-醇(1.2g,2.25mmol,47%)。HNMR(300MHz,CDCl3):5.36-5.29(m,4H),357(bs,1H),2.01-1.97(m,8H),1.42-1.26(m,53H),0.89(t,J=6.6Hz,6H)。

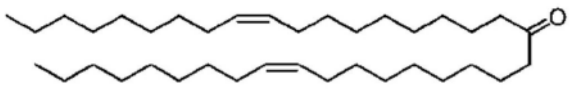
[0994] (7Z,26Z)-三十三碳-7,26-二烯-17-醇6

[0995] 

6

[0996] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.36-5.29(m,4H),3.57(bs,1H),2.01-1.97(m,8H),1.42-1.26(m,45H),0.89(t,J=6.6Hz,6H)。

[0997] (9Z,28Z)-三十七碳-9,28-二烯-19-酮7的合成

[0998] 

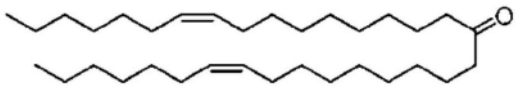
7

[0999] 程序已在先前描述。

[1000] 作为澄清油状物的(9Z,28Z)-三十七碳-9,28-二烯-19-酮(0.89g,1.67mmol,74%)。

[1001] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.36-5.29(m,4H),2.03-1.98(m,8H),1.42-1.26(m,52H),0.90-0.89(t,J=6.6Hz,6H)。

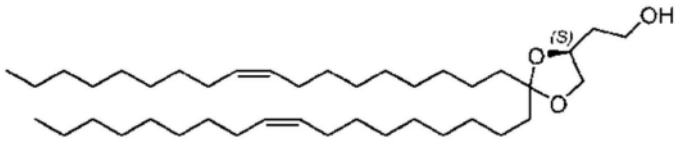
[1002] (7Z,26Z)-三十三碳-7,26-二烯-17-酮8

[1003] 

8

[1004] HNMR(300MHz,CDCl3):5.36-5.29(m,4H),2.03-1.98(m,8H),1.42-1.26(m,44H),0.90-0.89(t,J=6.6Hz,6H)

[1005] 2-((S)-2,2-二((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)乙烷-1-醇9的合成

[1006] 

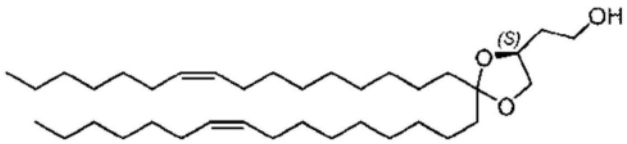
9

[1007] 程序已在先前描述。

[1008] 作为澄清油状物的2-((S)-2,2-二((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)乙烷-1-醇(0.39g,0.63mmol,74%)。

[1009] H NMR(300MHz,CDCl3):5.36-5.28(m,4H),4.22-4.10(m,1H),4.08-4.05(m,1H),3.82-3.79(m,2H),3.48(t,J=6.8Hz,1H),2.24-2.21(m,1H),2.01-1.99(m,8H),1.81-1.80(m,2H),1.59-1.54(m,6H),1.34-1.26(m,45H),0.87(t,J=6.3Hz,6H)。

[1010] 2-((S)-2,2-二((Z)-十六碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)乙烷-1-醇,10的合成

[1011] 

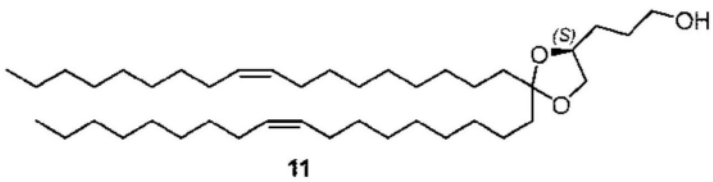
10

[1012] 程序已在先前描述。

[1013] 作为澄清油状物的2-((S)-2,2-二((Z)-十六碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)乙烷-1-醇(1.02g,1.65mmol,51%)。

[1014] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.36-5.29(m,4H),4.23-4.10(m,1H),4.07-4.05(m,1H),3.82-3.79(m,2H),3.48(t,J-6.6Hz,1H),2.24-2.12(m,1H),2.01-1.97(m,8H),1.84-1.78(m,2H),1.57-1.55(m,8H),1.34-1.29(m,35H),0.87(t,J=6.3Hz,6H)。

[1015] 3-((S)-2,2-二((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)丙烷-1-醇,11的合成

[1016] 

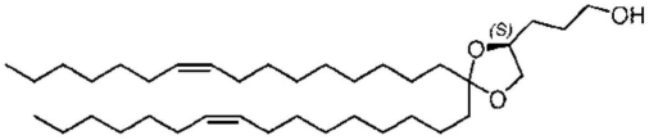
11

[1017] 程序已在先前描述。

[1018] 作为澄清油状物的3-((S)-2,2-二((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)丙烷-1-醇(0.41g,0.65mmol,76%)

[1019] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.39-5.32(m,4H),4.06-4.03(m,2H),3.71-3.67(m,2H),3.47-3.46(m,1H),2.01-1.99(m,10H),1.66-1.59(m,4H),1.56-1.54(m,6H),1.34-1.26(m,44H),0.87(t,J=6.3Hz,6H)。

[1020] 3-((S)-2,2-二((Z)-十六碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)丙烷-1-醇的合成

[1021] 

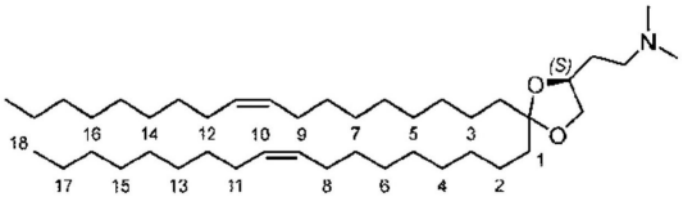
12

[1022] 程序已在先前描述。

[1023] 作为澄清油状物的3-((S)-2,2-二((Z)-十六碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)丙烷-1-醇(0.9g,1.56mmol,80%)。

[1024] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.39-5.28(m,4H),4.06-4.01(m,2H),3.71-3.67(m,2H),3.47-3.46(m,1H),2.01-1.99(m,10H),1.66-1.59(m,4H),1.56-1.54(m,6H),1.34-1.26(m,37H),0.87(t,J=6.3Hz,6H)。

[1025] 2-((S)-2,2-二((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基乙烷-1-胺(AKG-KC2-OA,O-11880)的合成

[1026] 

AKG-KC2-OA

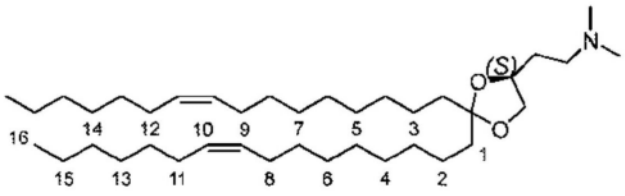
[1027] 程序已在先前描述。

[1028] 作为澄清油状物的2-((S)-2,2-二((Z)-十六碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基乙烷-1-胺,(AKG-KC2-OA,O-11880)(200mg,0.31mmol,49%)。

[1029] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.38-5.28(m,4H),4.08-4.01(m,2H),3.48(t,J=6.8Hz,1H),2.39-2.24(m,2H),2.21(s,6H),2.01-1.97(m,8H),1.82-1.77(m,2H),1.68-1.52(m,6H),1.34-1.26(m,46H),0.87(t,=6.3Hz,6H)。

[1030] $C_{43}H_{83}NO_2$的MS(APCI):646.7

[1031] 2-((S)-2,2-二((Z)-十六碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基乙烷-1-胺(AKG-KC2-PA,O-11879)的合成

[1032] 

AKG-KC2-PA

[1033] 程序已在先前描述。

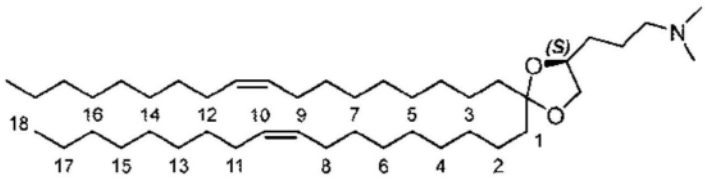
[1034] 作为澄清油状物的2-((S)-2,2-二((Z)-十六碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-

基)-N,N-二甲基乙烷-1-胺,(AKG-KC2-PA,O-11879),(195mg,0.33mmol,18%)。

[1035] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.35-5.28(m,4H),4.08-4.02(m,2H),3.48(t,J=6.6Hz,1H),2.38-2.27(m,2H),2.20(s,6H),2.01-1.99(m,8H),1.97-1.80(m,2H),1.77-1.52(m,6H),1.34-1.29(m,38H),0.87(t,J=6.3Hz,6H)。

[1036] $C_{39}H_{75}NO_2$的MS(APCI):590.6

[1037] 3-((S)-2,2-二((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺,(AKG-KC3-OA,O-11957)的合成

[1038] 

AKG-KC3-OA

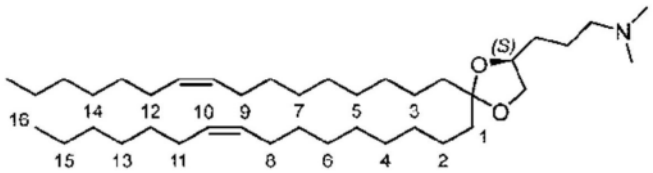
[1039] 程序已在先前描述。

[1040] 作为澄清油状物的3-((S)-2,2-二((Z)-十八碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺,(AKG-KC3-OA,O-11957),(160mg,0.24mmol,37%)。

[1041] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.39-5.28(m,4H),4.06-4.01(m,2H),3.44(t,J=6.8Hz,1H),2.26(t,J=6.8Hz,2H),2.20(s,6H),2.01-1.97(m,8H),1.82-1.77(m,2H),1.60-1.43(m,8H),1.34-1.26(m,46H),0.87(t,J=6.3Hz,6H)。

[1042] $C_{44}H_{85}NO_2$的MS(APCI):660.6

[1043] 3-((S)-2,2-二((Z)-十六碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(AKG-KC3-PA,O-12418)的合成

[1044] 

AKG-KC3-PA

[1045] 程序已在先前描述。

[1046] 作为澄清油状物的3-((S)-2,2-二((Z)-十六碳-9-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺,(AKG-KC3-PA,O-12418),(300mg,0.49mmol,32%)。

[1047] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):5.39-5.28(m,4H),4.06-4.01(m,2H),3.47-3.42(m,1H),2.43-2.41(m,2H),2.31(s,6H),2.01-1.97(m,8H),1.70-1.52(m,6H),1.27-1.18(m,42H),0.87(t,J=6.6Hz,6H)。

[1048] $C_{44}H_{85}NO_2$的MS(APCI):604.6

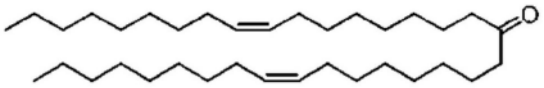
[1049] 3-((S)-2,2-二((Z)-十七碳-8-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺,AKG-KC3-C17(C8:1)的合成

[1050] (S)-3-(2,2-双十七烷基-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺,AKG-KC3-C17的合成

[1051] 参见图50。

[1052] 实验程序

[1053] (9Z,26Z)-三十五碳-9,26-二烯-18-酮,2的合成

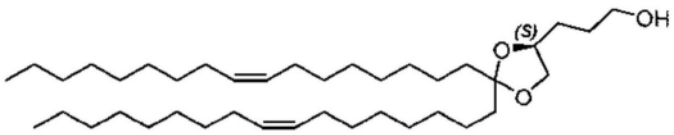
[1054] 

2

[1055] 在0℃下,向油酰氯(10g,33.3mmol)在甲苯(50mL)中的搅拌溶液中添加三乙胺(5.8mL,33.3mmol)。形成大量沉淀物,并允许将混合物在室温下搅拌8小时。将混合物用2%硫酸溶液猝灭,并随后用乙酸乙酯萃取。将有机物用盐水洗涤,然后经硫酸镁干燥并过滤。将滤液在真空下浓缩以得到粗油状物。将所得油状物用乙醇(20mL)稀释,并添加[2N NaOH](30mL)。将混合物在100℃下加热12小时,然后冷却。将混合物用2N HCl溶液稀释,直至获得pH为4。将混合物用乙酸乙酯萃取。将合并的有机物用盐水洗涤,然后经硫酸镁干燥并过滤。将滤液在真空下浓缩以得到粗油状物。将该油状物在二氧化硅上使用在正己烷中的10%至20%乙酸乙酯作为洗脱剂进行纯化,得到作为黄色油状物的(9Z,26Z)-三十五碳-9,26-二烯-18-酮,2(3.8g,44%)。

[1056] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):δppm5.35-5.31(m,4H),2.39-2.34(m,4H),2.0-1.85(m,8H),1.57-1.52(m,4H),1.27-1.25(m,40H),0.88(t,J=6.6Hz,3H)。

[1057] 3-((S)-2,2-二((Z)-十七碳-8-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)丙烷-1-醇,3的合成

[1058] 

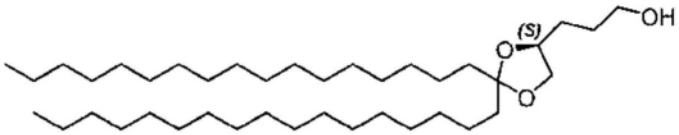
3

[1059] 先前描述的合成AKG-KC2-01的程序

[1060] 作为澄清油状物的3-((S)-2,2-二((Z)-十七碳-8-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)丙烷-1-醇,3(0.7g,1.15mmol,65%)。

[1061] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):δppm5.38-5.31(m,4H),4.08-4.02(m,2H),3.67-3.66(m,2H),3.48-3.43(m,1H),215-2.13(m,1H),2.00-1.98(m,8H),1.65-1.56(m,8H),1.27-1.25(m,44H),0.88(t,J=6.6Hz,6H)。

[1062] (S)-3-(2,2-双十七烷基-1,3-二氧戊环-4-基)丙烷-1-醇,4的合成

[1063] 

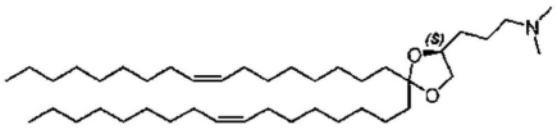
4

[1064] 将3-((S)-2,2-二((Z)-十七碳-8-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)丙烷-1-醇(1.3g,2.15mmol)在甲醇/乙酸乙酯(20mL,1:1/v:v)中的溶液在1atm(氢气球)下经10%钯碳(100mg)氢化2小时。将混合物抽空氢并用氮流动。将混合物经硅藻土过滤,并将滤液在真空下浓缩以得到作为澄清油状物的(S)-3-(2,2-双十七烷基-1,3-二氧戊环-4-基)丙烷-1-醇,4(1.3g,定量)。

[1065] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):δppm 4.10-4.01(m,2H),3.71-3.64(m,1H),3.47-3.43(m,

2H),2.05-2.01(m,1H),1.63-1.51(m,8H),1.42-1.22(m,58H),0.87(t,J=6.6Hz,6H)。

[1066] 3-((S)-2,2-二((Z)-十七碳-8-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺,AKG-KC3-C17(C8:1)(O-12620)的合成

[1067] 

AKG-KC3-C17(C8:1)

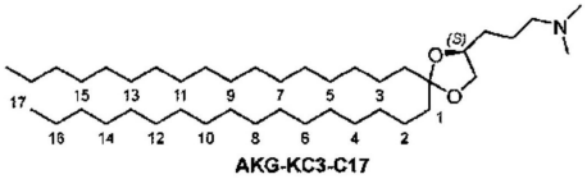
[1068] 先前描述的合成AKG-KC2-01的程序

[1069] 作为澄清油状物的3-((S)-2,2-二((Z)-十七碳-8-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺,(AKG-KC3-C17(C8:1),O-12620),(290mg,0.46mmol,40%)。

[1070] $C_{42}H_{81}NO_2$的MS(APCI$^+$):632.6

[1071] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):δppm5.38-5.28(m,4H),4.09-3.99(m,2H),3.48-3.41(m,1H),2.77-2.71(m,1H),2.55(s,6H),2.01-1.95(m,8H),1.88-1.78(m,2H),1.62-1.50(m,6H),1.27-1.24(m,44H),0.88(t,J=6.8Hz,6H)。

[1072] (S)-3-(2,2-双十七烷基-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺,AKG-KC3-C17(O-12637)的合成

[1073] 

AKG-KC3-C17

[1074] 先前描述的合成AKG-KC2-01的程序

[1075] 作为固体的(S)-3-(2,2-双十七烷基-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺,(AKG-KC3-C17,O-12637),(275mg,0.43mmol,22%)。

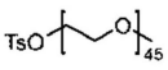
[1076] $C_{42}H_{85}NO_2$的MS(APCI$^+$):636.6

[1077] ^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):δppm4.06-4.00(m,2H),3.47-3.43(m,1H),2.29-2.25(m,2H),2.21(s,6H),1.60-1.48(m,8H),1.29-1.24(m,60H),0.87(t,J=6.6Hz,6H)。

[1078] 实施例1C.二月桂酰基-(S)-甘油-mPEG2000(PEG(2000)-DL)的合成

[1079] 实验程序

[1080] mPEG2000甲苯磺酸酯2的合成

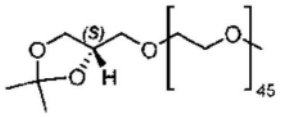
[1081] 

2

[1082] 在0℃下,向聚(乙二醇)甲基醚1(7g,3.5mmol)在二氯甲烷(30mL)中的溶液中添加对甲苯磺酰氯(0.9g,7mmol)和三乙胺(1.8mL,10.5mmol)。将所得混合物在室温下搅拌12小时,然后用水猝灭。将混合物用二氯甲烷萃取,并将有机物用盐水洗涤,然后经硫酸镁干燥并过滤。将滤液在真空下浓缩以得到粗油状物。将该油状物在二氧化硅上使用在二氯甲烷中的10%甲醇作为洗脱剂进行纯化,得到作为白色固体的mPEG2000甲苯磺酸酯(5.2g,70%)。

[1083] 1H NMR(300MHz,$CDCl_3$):δppm7.79-7.76(d,2H),7.34-7.25(d,2H),5.28(s,6H),4.15-4.12(,2H),3.87-3.81(m,1H),3.71-3.43(m,188H).3.47-3.36(m,5H)。

[1084] (S)-(+)-1,2-亚异丙基甘油mPEG2000 4的合成

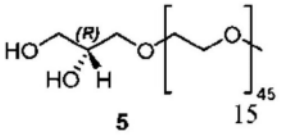
[1085] 

4

[1086] 在0℃下,将氢化钠(133mg,3.33mmol)添加至(S)-(+)-1,2-亚异丙基甘油(440mg,3.33mmol)在四氢呋喃(20mL)中的溶液。在搅拌30分钟之后,添加聚(乙二醇)甲苯磺酸甲酯(5.2g,2.41mmol)。将混合物在70℃下加热18小时,然后冷却。将反应用水猝灭,并用二氯甲烷萃取。将有机物用水洗涤,经硫酸镁干燥,然后过滤。将滤液在真空下浓缩以得到粗油状物。将该油状物在二氧化硅上使用在二氯甲烷中的1%甲醇作为洗脱剂进行纯化,得到作为澄清油状物的(S)-(+)-1,2-亚异丙基甘油mPEG 2000(3.3g,56%)。

[1087] 1H NMR(300MHz,CDCl3):δppm4.32(dd,J=11.8,6.3Hz,1H),3.99(dd,J=8.2,6.3Hz,1H),3.85-3.74(m,1H),3.68-3.51(m,190H),3.39-3.36(m,5H),1.35(s,3H),1.28(s,3H)。

[1088] (R)-3-(mPEG2000)-丙烷-1,2-二醇5的合成

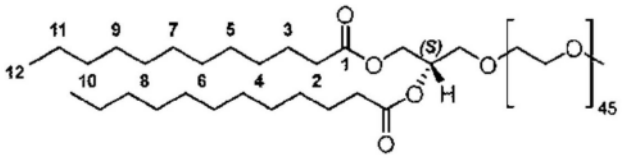
[1089] 

5

[1090] 将(S)-(+)-1,2-亚异丙基甘油mPEG 2000(3.3g,1.56mmol)和15mL[1N HCl]在THF(10mL)中的混合物在室温下搅拌一小时。在一小时之后,将混合物在真空下浓缩,以得到作为白色固体的(R)-3-(mPEG2000)-丙烷-1,2-二醇(3.4g,定量)。在没有进一步纯化的情况下进行。

[1091] 1H NMR(300MHz,CDCl3):8ppm4.1-4.12(m,1H),3.68-3.51(m,180H),3.39-3.36(m,4H)。

[1092] 二月桂酰基-(S)-甘油-mPEG2000的合成

[1093] 

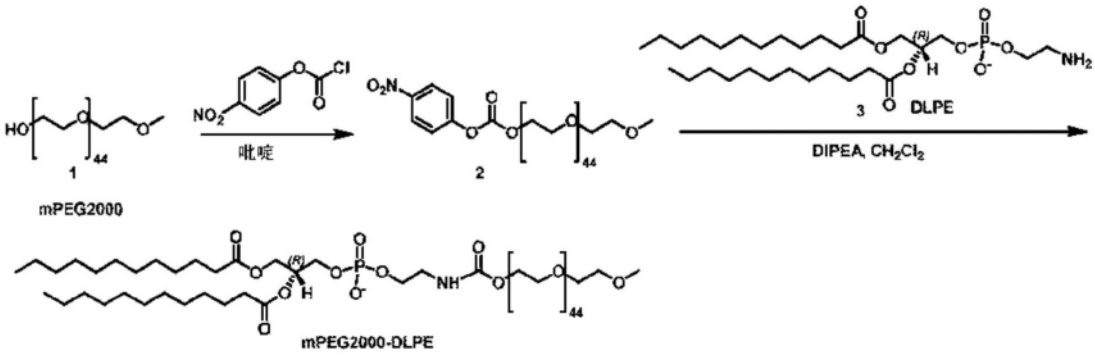
mPEG$_{2000}$-DLG (C12:0)

[1094] 在0℃下,向(R)-3-(mPEG2000)-丙烷-1,2-二醇(1.56mmol)在二氯甲烷(10mL)中的溶液中添加月桂酰氯(0.75g,3.43mmol)、N,N-二异丙基乙胺(1.2mL,6.8mmol)和4-二甲基氨基吡啶(0.42g,3.43mmol)。将所得混合物在室温下搅拌12小时,然后用水猝灭。将混合物用二氯甲烷萃取,并将有机物用盐水洗涤,然后经硫酸镁干燥并过滤。将滤液在真空下浓缩以得到粗油状物。将该油状物在二氧化硅上使用在己烷中的5%至100%的二乙醚作为洗脱剂进行纯化,得到作为白色固体的二月桂酰基-(S)-甘油-mPEG2000(0.66g,18%)。

[1095] MS(MALDI):CHCA基质:2431.57

[1096] 1H NMR(300MHz,CDCl3):δppm 5.23-5.18(m,1H),4.32(dd,J=11.8,3.6Hz,1H),4.13(dd,J=11.8,6.3Hz,1H),3.85-3.74(m,1H),3.68-3.51(m,190H),3.39-3.36(m,4H),2.32-2.25(m,4H),1.66-1.51(m,4H),1.47-1.46(m,32H),0.88-0.85(m,6H)。

[1097] 实施例1D.mPEG2000-DLPE的合成

[1098] 

[1099] 4-硝基苯基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77,80,83,86,89,92,95,98,101,104,107,110,113,116,119,122,125,128,131-四十四碳氧杂三十三碳-烷(hectan)-133-基)碳酸酯,2

[1100] 在0℃下,向聚(乙二醇)甲基醚(4g,2mmol)在二氯甲烷(20mL)中的溶液中添加4-硝基苯基氯甲酸酯(603mg,3mmol)和吡啶(0.5mL,6mmol)。将所得混合物在室温下搅拌3小时,然后用水猝灭。将混合物用二氯甲烷萃取,并将有机物用盐水洗涤,然后经硫酸镁干燥并过滤。将滤液在真空下浓缩以得到粗油状物。将该油状物在二氧化硅上使用在二氯甲烷中的5%至10%甲醇作为洗脱剂进行纯化,以得到作为白色固体的4-硝基苯基

[1101] (2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77,80,83,86,89,92,95,98,101,104,107,110,113,116,119,122,125,128,131

[1102] 四十四碳氧杂三十三碳-烷-133-基)碳酸酯(3.4g,82%)。

[1103] 1H NMR(300MHz,CDCl3):δppm8.28-8.25(d,2H),7.39-7.38(m,2H),4.43-4.41(m,1H),4.00-3.90(m,2H),4.00-3.80(m,5H),3.68-3.36(m,188H),2.03(s,3H)。

[1104] (2R)-3-((羟基((135-氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77,80,83,86,89,92,95,98,101,104,107,110,113,116,119,122,125,128,131,134-四十五碳氧杂-136-氮杂三十八碳烷-138-基)氧基)磷酰基)氧基)丙烷-1,2-二基双十二烷酸酯,mPEG2000-DLPE

[1105] 将4-硝基苯基

[1106] (2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77,80,83,86,89,92,95,98,101,104,107,110,113,116,119,122,125,128,131-四十四碳氧杂三十三碳-烷-133-基)碳酸酯2(3.4g,1.65mmol)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(1g,1.72mmol)和三乙胺(0.32mL,2.28mmol)在二氯甲烷(30mL)中的混合物在室温下搅拌12小时。在12小时之后,将混合物用水猝灭,并用二氯甲烷萃取。将合并的有机物用盐水洗涤,然后经硫酸镁干燥并过滤。将滤液在真空下浓缩以得到粗油状物。将该油状物在二氧化硅上使用在二氯甲烷中的1%至5%甲醇作为洗脱剂进行纯化,得到作为半固体的(2R)-3-((羟基((135-氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77,80,83,86,89,92,95,98,101,104,107,110,113,116,119,122,125,128,131,134-四十五碳氧杂-136-氮杂三十八碳烷-138-基)氧基)磷酰基)氧基)丙烷-1,2-二基双十二烷酸酯mPEG2000-DLPE(2g,46%)。

[1110] 1H NMR(300MHz,CDCl3):δppm5.17-5.15(m,1H),4.35-4.31(m,1H),4.16-4.10(m,

3H),4.00-3.80(m,5H),3.65-3.37(m,188H),3.34(s,3H),3.05-3.01(m,1H),2.26-2.23(m,6H),1.54-1.52(m,4H),1.32-1.17(m,33H),0.86-0.82(t,J＝1.3Hz,6H)。

[1111] 实施例1E.二硬脂酰基磷脂酰基-D-丝氨酸(O-12153)的合成-参见图51((苄氧基)羰基)-D-丝氨酸苄酯,2

[1112] 向Z-(D)-丝氨酸-OH(2.4g,10mmol)在DMF(10mL)中的溶液中添加苄基溴(1.2mL,10mmol)和碳酸铯(3.2g,10mmol)。将所得混合物在室温下搅拌12小时,然后用水猝灭。将混合物用二氯甲烷萃取,并将有机物用盐水洗涤,然后经硫酸镁干燥并过滤。将滤液在真空下浓缩以得到粗油状物。将该油状物在二氧化硅上使用在己烷中的20％至40％乙酸乙酯作为洗脱剂进行纯化,以得到作为白色固体的((苄氧基)羰基)-D-丝氨酸苄酯(2.5g,76％)。

[1113] O-((苄氧基)(二异丙基氨基)膦基)-N-((苄氧基)羰基)-D-丝氨酸苄酯,4

[1114] 将1-(苄氧基)-N,N,N',N'-四异丙基磷酸二胺,3(2.8g,8.4mmol)、((苄氧基)羰基)-D-丝氨酸酯4(2.5g,7.6mmol)和四唑(16.8mL,8.4mmol)在THF(20mL)中的混合物在室温下搅拌12小时。在12小时之后,将反应物在真空下浓缩,并将所得油状物在二氧化硅上(用0.1％Et3N/正己烷溶液预处理)使用在正己烷中的10％乙酸乙酯作为洗脱剂进行纯化,以得到作为澄清油状物的O-((苄氧基)(二异丙基氨基)膦基)-N-((苄氧基)羰基)-D-丝氨酸苄酯4(2.0g,47％)。

[1115] MS(APCI+):567.2(M+1);1H NMR(300MHz,CDCl3):δppm7.33-7.30(m,15H),5.81-5.61(dd,J＝11.8,3.6Hz,1H),5.12-5.09(m,3H),4.61-4.58(m,2H),4.13-4.11(m,2H),3.58-3.55(m,2H),1.16-1.12(m,12H)。

[1116] (2R)-3-(((苄氧基)((R)-3-(苄氧基)-2-(((苄氧基)羰基)氨基)-3-氧代丙氧基)磷酰基)氧基)丙烷-1,2-二基二硬脂酸酯,6

[1117] 将1.2二硬脂酰基-sn-甘油,5(1.0g,1.6mmol)、O-((苄氧基)(二异丙基氨基)膦基)-N-((苄氧基)羰基)-D-丝氨酸苄酯4(0.94g,1.6mmol)和四唑(4.3mL,1.9mmol)在THF(25mL)中的混合物在室温下搅拌6小时。在6小时之后,添加叔丁基过氧化氢[70％水溶液]在THF(3mL)中的溶液。将所得混合物在室温下搅拌1小时,然后用饱和硫代硫酸钠猝灭。将混合物用乙酸乙酯萃取,并将有机物用盐水洗涤,然后经硫酸镁干燥并过滤。将滤液在真空下浓缩以得到粗油状物。将该油状物在二氧化硅上使用在己烷中的10％至20％乙酸乙酯作为洗脱剂进行纯化,以得到作为白色固体的(2R)-3-(((苄氧基)((R)-3-(苄氧基)-2-(((苄氧基)羰基)氨基)-3-氧代丙氧基)磷酰基)氧基)丙烷-1,2-二基二硬脂酸酯6(1.4g,80％)。

[1118] 1H NMR(300MHz,CDCl3):δppm 7.33-7.25(m,15H),5.91-5.79(dd,J＝11.8,3.6Hz,1H),5.21-5.11(m,6H),5.06-4.95(m,3H),4.60-4.57(m,1H),4.48-4.43(m,2H),4.29-4.20(m,2H),4.05-4.01(m,3H),2.26-2.04(m,4H),1.58-1.48(m,8H),1.29-1.26(m,45H),0.89-0.85,(t,J＝1.3,Hz,6H)。。

[1119] O-(((R)-2,3-双(硬脂酰基氧基)丙氧基)(羟基)磷酰基)-D-丝氨酸双三乙胺盐,

[1120] 将(2R)-3-(((苄氧基)((R)-3-(苄氧基)-2-(((苄氧基)羰基)氨基)-3-氧代丙氧基)磷酰基)氧基)丙烷-1,2-二基二硬脂酸酯6(800mg,0.72mmol)在甲醇、乙酸、THF的混合物(10:2:4,v:v:v,10mL)中的溶液在1大气压下在室温下经10％钯碳(40mg)氢化。在3小时之后,将混合物脱气,用氮充满,并经硅藻土过滤。将三乙胺(0.5mL)添加至滤液,并随后在真空下浓缩以得到油状物。将该油状物在C18柱上使用甲醇(0.5％三乙胺)作为洗脱剂进行

纯化,以得到作为白色固体的O-(((R)-2,3-双(硬脂酰基氧基)丙氧基)(羟基)磷酰基)-D-丝氨酸双三乙胺盐(360mg,50%)。

[1121] MS,(APCI+):567.2(M+1),1H NMR(300MHz,CDCl3):δppm5.30-5.20(m,1H),4.38-4.17(m,4H),3.94-3.84(m,4H),3.12-3.07(m,4H),2.32-2.02(m,14H),1.58-1.57(m,4H),1.24-0.89(m,66H),0.87-0.85(m,(dd,J=0.6Hz,6H)。

[1122] 实施例2.在人肝细胞或癌细胞中对体外细胞毒性的测定

[1123] 可在一系列10个稀释中对LNP进行体外测试以确定在人肝细胞/肝(HepG2;ATCC#HB8065)细胞中的IC50。由于通常预期这些制剂是无毒的,因此所有研究中都包括了阳性对照Lipofectamine™3000(ThermoFisher#L3000015)复合mRNA(2μl试剂/1μg mRNA)。所使用的mRNA是CleanCap FLuc、EGFP或MCherry报道基因mRNA(5moU;Trilink#L-7202、#L-7201或#L-7203)。数据以完整的细胞生存力曲线以及每种化合物的实际IC50值的计算结果进行报道。

[1124] 贴壁细胞生长至约80%汇合。通过添加0.25%胰蛋白酶-EDTA(Gibco#25200-072)将细胞胰蛋白酶化,并随后将细胞离心,并添加5ml生长培养基(MEM培养基;Corning#10010CM)以分散细胞。使用血细胞计数器确定细胞密度。将生长培养基(包含10%FBS的MEM培养基;Corning#35015CV)添加至细胞以调节至合适的细胞浓度。然后,将200μl细胞(5,000个细胞/孔)添加至96孔透明平底板(Costar#9804),并在37℃下在有5%CO_2的湿润培养箱中孵育24小时。

[1125] 使用生长培养基作为溶剂来制备LNP制剂的系列稀释液。这些化合物以浓度为1mg/ml mRNA的无菌水溶液提供。为了进行稀释,将各LNP储备液温热至室温。将这些在生长培养基中进一步稀释至4×以使所测试的最高mRNA浓度为250μg/ml。

[1126] 通过吸出旧培养基并用200μl含LNP的培养基替换旧培养基,将LNP从各LNP的初始250μg/ml浓度开始以一系列1:3稀释添加至孔。将板在37℃下在有5%CO_2的湿润培养箱中孵育72小时。在LNP孵育期结束时,用100μl 1×PrestoBlue细胞生存力试剂(ThermoFisher目录号A13261)替换每个孔中的培养基。将板在37℃下在有5%CO_2的湿润培养箱中孵育30分钟至2小时。在30、60和120分钟时读取读数。使用SpectraMax M5板阅读器(Molecular Devices)读取560nm激发和590nm发射下的荧光。通过从所有样品读数中减去仅包含培养基的对照(背景对照孔)的RFU来校正背景。使用下式计算细胞毒性百分比:

[1127] %细胞毒性=[($RFU._{培养基}$-$RFU_{处理}$)/$RFU._{培养基}$]×100%

[1128] 使用GraphPad Prism使用下式来确定IC50:

[1129] Y=100/(1+10^((LogIC50-X)*Hill斜率)))

[1130] 在一些实施方案中,Lipofectamine™3000(ThermoFisher#L3000015)复合mRNA(2μl试剂/1μg mRNA)阳性对照的细胞毒性可以是在此公开的化合物的5至100倍更有毒性。这表明在体外肝细胞毒性测定中,所公开的化合物与商业转染试剂相比毒性更低。在一些实施方案中,本文中所述的化合物与可商购的转染试剂相比在体内形成毒性更低的LNP。

[1131] 实施例3.可电离脂质pKa的确定

[1132] 可电离阳离子脂质的pKa可以用数种方式计算。对于脂质,这有时是困难的,因为膜结构和膜中邻近的脂质可以影响氨基的解离特性,从而可能给出不准确的值。原位测量是理想的,其中可电离脂质的表观pKa在脂质处于其预期环境中时进行测量,所述脂质在这

种情况下作为LNP的一部分(Jayaraman 2012,Sabins 2018)。

[1133] 对于每种LNP制剂,氨基脂质pKa值是通过在从pH 3至12的滴定期间测量2-(对甲苯胺基)-6-萘磺酸(TNS)的荧光来确定的。TNS是阴离子分子,其在溶液中不发荧光,但当与阳性脂质膜缔合时会提高荧光,并且这种特性在过去已被用于探测膜表面电荷。制备了主缓冲储备液(10mM磷酸钠、10mM硼酸钠、10mM柠檬酸钠、150mM氯化钠),所述主缓冲储备液用于制备在多种pH值下的缓冲液以用于确定表观pKa。使用1M氢氧化钠和1M盐酸,制备来自主缓冲储备液的约20种在约3至12的不同pH值下的独特的缓冲液。溶解在二甲基亚砜(DMSO)中的300mM6-(对甲苯胺基)-2-萘磺酸钠盐(TNS试剂)用作储备液。制备LNP并将其纯化到最终mRNA浓度为0.04mg/mL的所期望的pH缓冲液中。使用预加载有所期望缓冲液的96孔板,添加含mRNA的LNP,使得mRNA的最终浓度为0.7μg/mL。向每个孔中添加TNS使得DMSO浓度为1%(v/v)。在进行混合之后,测量每个孔中TNS的荧光(Ex/Em 331nm/445nm),并对荧光数据应用S形最佳拟合分析。pKa被确定为引起半最大荧光强度的pH。针对化合物1至36测量的表观pKa在6.0至7.0的pH范围内。

[1134] 实施例4.LNP细胞摄取的测量。

[1135] LNP细胞摄取的测量通过荧光成像和/或荧光定量来实现。有许多合适的荧光示踪剂是可用的,例如1,1'-双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吲哚羰花青高氯酸盐(DiI)、3,3'-二亚油基氧杂羰花青高氯酸盐(3,3'-Dilinoleyloxacarbocyanine Perchlorate,DiO)、1,1'-双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吲哚双羰花青高氯酸盐(DiD)和1,1'-双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吲哚三羰花青碘化物(DiR)(Thermo)。这些脂质在水中荧光较弱,但当并入到脂质膜(例如存在于LNP中的脂质膜)时则显示出高荧光。重要的是所选择的脂质是光稳定的并且具有高消光系数。

[1136] 在荧光显微镜下使包含这些类型脂质的LNP显现。在一种方法中,LNP脂质制剂包含0.1至0.5mol%总脂质的荧光脂质示踪剂,例如1,1'-双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吲哚双羰花青-5,5'-二磺酸(DiI5-DS)。在合适的细胞培养皿,例如24孔板(Corning)中培养目的细胞。在摄取研究的前一天,以50%汇合度接种细胞并将其在合适的条件(例如37℃、5%CO2、90%至100%湿度)下培养过夜。将LNP以0.1至100μg/mL mRNA添加至细胞培养基,允许其与细胞相互作用一段时间(4至24小时),然后将细胞用培养基洗涤三次以除去未内化的LNP,随后进行观察。用具有荧光检测能力的显微镜观察细胞。使用未经处理的细胞作为背景对照,根据来自细胞的荧光强度信号确定LNP细胞摄取的相对程度。或者,细胞荧光脂质的定量测量可通过以下实现:使细胞沉淀,用洗涤剂例如Triton-X100溶解它们,并通过荧光分光光度计来对荧光进行定量或通过HPLC来对荧光脂质示踪剂进行定量。

[1137] 以类似的方式,实现了荧光标记mRNA的定量。例如,染料标记的增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein,EGFP)和萤火虫萤光素酶(Firefly luciferase,FLuc)mRNA(两者均用1:3比例的花青5-UTP:5-甲氧基-UTP来转录)目前可从Trilink Biotechnologies获得。花青5的激发最大值为650nm以及发射最大值为670nm。在这种比例下的替换导致mRNA容易被显现,并且仍然可以在细胞培养中被翻译。通过捕获荧光标记mRNA,可通过上述方法来使mRNA的胞内递送显现。

[1138] 细胞中的LNP摄取可通过内源性方法(例如ApoE介导的),或通过外源性方法(例如主动靶向)来实现。发现包含可电离阳离子脂质的LNP系统利用了“天然”的靶向过程,其中

它们吸附血液中的载脂蛋白E(apolipoprotein E,ApoE)(Cullis et al 2017),并随后在肝细胞中被许多含有ApoE结合配体的受体主动摄取(Williams et al.2010)。通过使用不重叠的荧光团,可独立地追踪mRNA和LNP胞内分布和细胞器累积动力学。

[1139] mRNA细胞表达水平可通过使用报道系统例如EGFP、FLuc或mCherry(可从Trilink Biotechnologies获得)来定量。在一个实施方案中,EGFP mRNA被包封在LNP中,并以0.1至100μg/mL mRNA添加至目的细胞。通过在4至24小时之后替换培养基,可以洗涤细胞使无未内化的LNP。在24小时时,通过荧光显微术或流式细胞术对GFP信号进行定量。以这种方式,可基于报道蛋白表达水平而在LNP制剂组之间进行区分。

[1140] 实施例5.转染选择性指数

[1141] 计算转染选择性指数(Transfection selectivity Index,TSI)以确定在哺乳动物细胞中的相对转染效率,与在那些相同细胞中的相对毒性进行比较。使用下式计算选择性指数:

[1142] $TSI = EF_{哺乳动物} / IC_{50,哺乳动物}$

[1143] 其中$EF_{哺乳动物}$是以ng蛋白质/百万细胞表示的转染效率,并且$IC_{50,哺乳动物}$与相同制剂的细胞生存力相关,以半最大抑制浓度表示。

[1144] 使用在此描述的化合物(1至36)的LNP与使用以对照分子DLin-MC3-DMA作为ICL制备的另外的相同LNP而制备的LNP相比具有50%更高的TSI。

[1145] 实施例6.脂质过氧化的测定。

[1146] 氧化程度可以使用强制降解测定来确定,其中将LNP样品在25℃下用3%H_2O_2处理,并在第0、1、3和5天针对脂质氧化产物进行取样(Blessy et al.(2014)Journal of Pharmaceutical Analysis 4,159-165)。氧化反应物可通过添加在乙醇中的0.1M丁基化羟基甲苯(BHT)来猝灭,并在-80℃下冷冻储存直至测量。脂质氧化产物可以使用用于检测脂质过氧化终产物丙二醛(malondialdehyde,MDA)的2-硫代巴比妥酸(2-thiobarbituric acid,TBA)反应性测定(Gutteridge(1982)FEBS Letters 150,454-458),或者通过使用具有蒸发光散射检测(evaporative light scattering detection,ELSD)或带电荷气溶胶检测(charged aerosol detection,CAD)的HPLC测定的检测来测量。脂质氧化和异构化杂质结构可以基于已知的文献先例来指定,并且预期是异构体的混合物。

[1147] 通常,本领域中已知在酰基链中具有多个不饱和的脂质对氧化更敏感(参见Reis and Spickett(2012)Biochim Biophys Acta 1818,2374-2387)。

[1148] 预期当与包含DLin-KC2-DMA脂质的对照LNP相比时或当与包含DLin-MC3-DMA的对照LNP相比时,本文中所述的化合物1至36对氧化损伤或降解具有较低的易感性。在一些实施方案中,当与对照LNP相比时,本文中提供的化合物在氧化副产物方面具有大于30%、大于50%、大于75%、大于90%和大于95%的降低。

[1149] 实施例7.制备配体靶向LNP

[1150] 以抗体Fab'片段或单链Fv片段形式的抗体配体通过本领域中已知的任何方法来制备(例如,如在Drummond et al.的美国专利申请20180271998;Zhou et al.的美国专利10,406,225;Marks et al.的美国专利8,974,792中所述的,其通过引用整体并入本文),所述抗体配体被提供以用于将LNP特异性摄取到目的细胞(例如免疫细胞)中。为了提供配体与LNP的缀合物,配体是用具有半胱氨酸残基的C端序列,例如CAA或GGSGGC构建的,并随后

按照图2与马来酰亚胺封端的PEG-DSPE锚缀合。配体在细菌或真核细胞中表达,并使用标准方法例如蛋白质亲和色谱或金属螯合色谱从细胞团或生长培养基中分离。为了活化末端半胱氨酸残基的硫醇基,将配体在存在15mM半胱氨酸的情况下在含140mM NaCl的pH 6.0至6.2的10mM柠檬酸盐缓冲液中孵育1小时,并通过凝胶色谱在Sephadex G-25或类似柱上纯化,洗脱液为含140mM NaCl的pH 6.0至6.2的10mM柠檬酸盐缓冲液。使用UV分光光度法在280nm下确定在经纯化的半胱氨酸活化的配体溶液中的蛋白质浓度。将上述缓冲液中1至10mg/ml的抗体配体与马来酰亚胺封端的PEG-DSPE衍生物(mal-PEG(2000)-DSPE,目录号880126,Avanti Polar Lipids,AL,USA,或Sunbright®DSPE-020MA,NOF corporation,Japan)的水溶液以4:1的蛋白质/脂质摩尔比混合。在期望LNP表面与配体部分之间的距离更长的情况下,可以使用分子量为3,400(Sunbright®DSPE-034MA)或5,000(可从NOF Corporation获得)(Sunbright®DSPE-050MA)的具有PEG间隔基的Mal-PEG脂质。将溶液在环境温度下孵育2小时,调节至0.5mM半胱氨酸以封闭未反应的马来酰亚胺基团,并且将胶束配体-PEG-DSPE缀合物通过凝胶色谱在Ultrogel AcA 34(如果配体是Fab)或Ultrogel AcA44(如果配体是scFv)上纯化,洗脱液为用10mM HEPES缓冲的144mM NaCl,pH 7.0至7.4。缀合蛋白质通过UV分光光度法来定量,并且纯度通过SDS凝胶电泳来确定。

[1151] 通过以下方法之一将配体附加至LNP的表面。

[1152] 方法1.将预形成的LNP(如Hope et al.的US10,653,780中所述获得,其通过引用整体并入本文)与配体-PEG-DSPE缀合物在HEPES缓冲盐水(10mM HEPES,140mM NaCl,pH 7.0至7.2)中的胶束溶液混合,以实现在5至100(通常15至30)个配体/LNP颗粒范围内的所需配体/脂质比。将混合物在缓慢搅拌的情况下在37℃至40℃下孵育2小时,或在2℃至8℃下过夜,在此时间期间缀合物被并入到LNP的外脂质层。将配体缀合的LNP通过凝胶色谱在Sepharose CL-2B或CL-4B(也可以使用具有相同分子量截止值的亲水性尺寸排阻介质)上从未并入的配体-PEG-DSPE中纯化出;收集出现在空隙体积附近的LNP级分。通过SDS凝胶电泳与考马斯蓝(Coomassie Blue)或荧光染色并同时运行配体标准物来确定与颗粒缀合的配体的量。

[1153] 方法2.将还包含LNP的核酸组分的配体-PEG-DSPE缀合物在10mM柠檬酸钠缓冲液pH 4.0中的溶液与LNP脂质的乙醇溶液混合至按体积计40%的最终乙醇浓度,如由Semple et al.的美国专利8,021,686所述,其通过引用整体并入本文。或者,使用Hope et al.的美国专利10,653,780(通过引用整体并入本文)的LNP制备方案。配体-PEG-DSPE的量为脂质的0.1至1mol%。将混合物针对HEPES缓冲盐水(10mM HEPES,140mM NaCl,pH 7.0)进行透析以除去乙醇。将配体-PEG-DSPE并入到所得的LNP中。任何剩余的配体-PEG-DSPE通过凝胶色谱使用Sepharose CL-4B或CL-2B、洗脱液HEPES缓冲盐水来除去,或者通过在具有500KD分子量截止值的聚砜膜(平的或中空纤维筒)上通过切向流过滤进行的HEPES缓冲盐水的缓冲液交换来除去。

[1154] 方法3.将Mal-PEG-DSPE与预形成的LNP在柠檬酸缓冲盐水(10mM柠檬酸钠缓冲液,pH 6.0至6.2,140mM NaCl)中以相对于LNP脂质0.1至1mol%的量以与方法1的配体-PEG-DSPE相同的方式组合。将并入了mal-PE-DSPE的LNP通过凝胶色谱在Sepharose CL-4B上在相同缓冲液中从未并入的mal-PEG-DSPE中纯化出,并与硫醇活化的抗体配体(5至100个配体/LNP颗粒)一起孵育2至24小时。将如此获得的配体缀合的LNP通过Sepharose CL-4B凝胶

色谱使用HEPES缓冲盐水pH 7.0作为洗脱剂从未缀合的配体中纯化出。

[1155] 方法4.将Mal-PEG-DSPE以LNP脂质的0.1至1mol％以与根据方法2的配体-PEG-DSPE相同的方式并入到LNP中。如方法3中所述,将所得Mal-PEG-缀合的LNP与硫醇活化的配体一起孵育并纯化。

[1156] 方法5.进行方法4的方案,其中不同之处在于用没有PEG间隔基的马来酰亚胺缀合的脂质(mal-DSPE,Coatsome®FE-808MA3,NOF corporation,Japan)代替mal-PEG-DSPE添加至脂质溶液。按照方法3,将所得马来酰亚胺-LNP与硫醇活化的配体缀合。

[1157] 方法6.通过方法1或2将低分子配体(例如甘露糖)与LNP缀合,其中用甘露糖-PEG-DSPE(Biochempeg Scientific,MA,USA,目录号12169)替换抗体配体-PEG-DSPE。

[1158] 实施例8.确定配体靶向LNP的最佳配体密度

[1159] 使用实施例7中的方法中的任一种来制备配体密度在给定范围(2至200个配体/LNP颗粒,或5至100个配体/LNP颗粒)内递增的LNP组。如实施例4中所述,通过并入荧光标记的脂质或荧光标记的核酸来对LNP进行荧光标记。根据实施例4测试经标记的配体缀合的LNP的细胞摄取,并确定对应于LNP的配体特异性细胞摄取最大值的配体含量。核酸胞内功能(例如mRNA表达)可用作测定输出(实施例4),在这种情况下,脂质或核酸可检测标记的存在不是必需的。

[1160] 实施例9.脂质纳米粒(LNP)的制备。

[1161] 经5-甲氧基尿苷(5moU)修饰并编码mCherry(目录号L-7203)的mRNA从Trilink Biotechnologies(San Diego,CA)获得。所有尿苷核苷都用N1-甲基-假尿苷替换。为了产生mRNA,将编码mRNA序列的合成基因克隆到DNA质粒中。合成基因由RNA启动子、5’非翻译区、mCherry蛋白编码序列、3’非翻译区和约120A的poly(A)尾区构成。来自TriLink(目录号L-7203)的mCherry mRNA的开放阅读框序列对应于SEQ ID NO:1:

[1162]
AUGGUGAGCAAGGGCGAGGAGGACAACAUGGCCAUCAUCAAGGAGUUCAUGCGG
UUCAAGGUGCACAUGGAGGGCAGCGUGAACGGCCACGAGUUCGAGAUCGAGGGC
GAGGGCGAGGGCCGGCCCUACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCUGAAGGUGACCA
AGGGCGGCCCCCUGCCCUUCGCCUGGGACAUCCUGAGCCCCCAGUUCAUGUACGG
CAGCAAGGCCUACGUGAAGCACCCCGCCGACAUCCCCGACUACCUGAAGCUGAGC
UUCCCCGAGGGCUUCAAGUGGGAGCGGGUGAUGAACUUCGAGGACGGCGGCGUG
GUGACCGUGACCCAGGACAGCAGCCUGCAGGACGGCGAGUUCAUCUACAAGGUGA
AGCUGCGGGGCACCAACUUCCCCAGCGACGGCCCCGUGAUGCAGAAGAAGACCAU
GGGCUGGGAGGCCAGCAGCGAGCGGAUGUACCCCGAGGACGGCGCCCUGAAGGGC
GAGAUCAAGCAGCGGCUGAAGCUGAAGGACGGCGGCCACUACGACGCCGAGGUGA
AGACCACCUACAAGGCCAAGAAGCCCGUGCAGCUGCCCGGCGCCUACAACGUGAA
CAUCAAGCUGGACAUCACCAGCCACAACGAGGACUACACCAUCGUGGAGCAGUAC
GAGCGGGCCGAGGGCCGGCACAGCACCGGCGGCAUGGACGAGCUGUACAAGAGCG
GCAACUGA

[1163] 制备每种脂质的储备溶液。在4mL玻璃小瓶(Thermo B7999-2)中称出可电离脂质,并将其溶解在乙醇(Sigma-Aldrich 200proof,不含RNA酶)中至最终浓度为10mM。将其他脂质例如DSPC、DPPC-NH_4、胆固醇和PEG-DMG称出,并溶解在乙醇中至浓度为1mM。将DSPS-Na以1mM的浓度溶解在甲醇(Sulpelco,Omnisolve)中,并短暂加热至70℃以完成其溶解。

[1164] 通过以下制备每种单独LNP的脂质混合物:将所期望体积的每种脂质储备溶液添加至新的小瓶,如果需要的话则添加乙醇,以达到1.2mL的最终体积。例如,AKG-UO-1/DSPC/DSPS/Chol/PEG-DMG(50/2.5/7.5/38.5/1.5mol％)的LNP制剂,其在N/P为5的情况下针对使

用的每100μg mRNA包含1500nmol AKG-UO-1、75nmol DSPC、225nmol DSPS、1155nmol Chol和45nmol PEG-DMG。

[1165] 通过解冻经冷冻的mRNA(mCherry mRNA,Trilink)小瓶并在6.25mM乙酸钠(pH 5.0)中将mRNA稀释至0.033mg/mL的最终浓度来制备mRNA溶液。

[1166] 为了制备LNP,使用了NanoAssemblr台式微流体装置(来自Precision Nanosystems)。如果LNP包含DSPS的钠盐或铵盐,或者DPPS的钠盐,则使用设置为70℃的加热块附件,否则在室温下混合LNP。将3mL mRNA溶液装载到3mL一次性注射器(BD 309656)中,并将1ml脂质混合物装载到1ml注射器(BD309659)中,并置于NanoAssemblr加热块中持续4分钟,随后进行混合。通过将液体流以6mL/分钟的混合速度以3:1的水:醇体积比泵送经过一次性微流体盒来实现LNP形成。在混合之后,收集3.6mL LNP混合物,同时丢弃0.35mL初始混合体积和最终的0.05mL混合物。通过使用SpectraPor透析管(12至14k MWCO)在PBS(Cytivia,SH30256.01)中进行缓冲液交换,或者通过使用Amicon Ultra-4离心浓缩器(10k MWCO,在500g下)进行连续浓缩和稀释来除去乙醇。

[1167] 通常将LNP交换到PBS,pH 7.4中,并随后到15mM Tris,pH 7.4,20%蔗糖中,使用Amicon-Ultra 4(100,000MWCO)旋转柱浓缩至20至50μg/mL mRNA,无菌过滤(Thermo Nalgene 0.2um#720-1320),然后通过浸入液氮中冷冻5分钟,并在-80℃下长期储存。

[1168] 实施例10.LNP表征

[1169] A.通过荧光结合染料来确定mRNA浓度和相对包封效率材料:Ribogreen试剂(Thermo#11491)、带盖的3×96孔板、PBS、解离缓冲液(含10%DMSO和1%(wt/wt)两性洗涤剂3-14(Sigma-Aldrich#693017)的PBS)、mRNA、一般移液器尖端&重复移液器尖端。

[1170] 1.在DPBS或PBS中制备5mL的2μg/mL mRNA储备液

[1171] 2.如下在96孔板(板A)的单个孔中制备稀释的标准物;

[1172]

最终[mRNA]ng/mL	2μg/mL储备液的体积(μL)	PBS的体积(μL)
2000	400	0
1500	300	100
1000	200	200
500	100	300
0	0	400

[1173] 3.使用板A中的不同孔,估计样品mRNA浓度并将其稀释至在标准曲线内。例如,如果样品中大概mRNA浓度应为约30μg/mL,则进行20×稀释(稀释因子)。(将20μL样品添加至孔中的380μL PBS)。板A上没有使用盖。通过轻轻地上下移液来混合样品。

[1174] 板A的实例

[1175]

A	0	500	1000	1500	2000							
B												
C	S1	S2	S3	S4	S5	S6	7	S8	等			
D												
E												
F												
G												

H												

[1176] 4.使用了另外两个板:板B和C。使用多通道移液器,将60μL各标准物2各自移液到孔中(一式两份),并将样品各自移液到3个孔中(一式三份)

[1177] 板B和C的实例

[1178]

A	0	500	1000	1500	2000							
B	0	500	1000	1500	2000							
C	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	等			
D	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	等			
E	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	等			
F												
G												
H												

[1179] 5.计算每个板上使用的孔的数目,并在该数目上加4。对于板B,用1:100稀释的Ribogreen制备PBS。例如,对于40个孔,使用44作为数目。需要44×60μL=2.64mL Ribogreen溶液,因此是2.61mL含26.4μL Ribogreen的PBS。

[1180] 6.对于板C,吸取2.61mL解离缓冲液和26.4μL Ribogreen。

[1181] 7.使用设定为60μL的重复移液器,将PBS+Ribogreen添加至板B上的每个孔,并将60μL解离缓冲液+Ribogreen添加至板C。将板B和板C二者在轨道混合器(120rpm)上混合1分钟。将板B置于黑暗中15分钟。将板C在黑暗中在37℃下孵育10分钟,然后在室温下孵育5分钟。

[1182] 8.使用Ex.465、Em.530nm一个接一个地读取两个板。

[1183] 9.使用标准曲线,计算斜率和截距,并通过外推法计算板B和C上样品的mRNA浓度(平均值和标准偏差)

[1184] 10.通过[mRNA]板B/[mRNA]板C×100来计算包封效率百分比(%EE)11.通过取[mRNA]板C×稀释因子来计算总[mRNA]。

[1185] B.LNP颗粒尺寸

[1186] 1.将30μL的LNP与1.5mL PBS在聚苯乙烯比色皿(Sarstedt,#67.754)中混合,并使用ZetaSizer Pro(Malvern)使用版本号1.4.0.105的ZS Xplorer软件来分析尺寸。记录Z平均尺寸和多分散性指数值。通常,LNP的尺寸测量在LNP混合之后、在缓冲液交换之后和在无菌过滤之后进行。

[1187] C.LNPζ电位

[1188] 1.将30μL LNP与1.5mL PBS混合,并注射到一次性折叠的毛细管单元(Malvern Nanoseries DTS1070)中,并在ZetaSizer Pro上在25℃下测量ζ电位。

[1189] 实施例11.使用mCherry mRNA确定LNP在鼠树突细胞中的转染效率。A.细胞繁殖、转染、收获和染色方案

[1190] 1.将MutuDC1940细胞(Applied Biological Materials,T0528)根据供应商的说明培养在T75瓶中。在转染之前一天将它们以180,000个细胞/孔平板接种到24孔板中。

[1191] 2.将LNP以1mL培养基中的期望mRNA浓度(例如1μg/mL)一式三份地添加至每个孔,并在24小时之后将细胞用DPBS(VWR 02-0119-1000)洗涤一次。

[1192] 3.然后添加0.2mL DPBS(加5mM EDTA,pH 7.4)以促进分离。

[1193] 4.将细胞在37℃下放置3分钟直至分离。

[1194] 5.向每个孔中添加0.5ml DPBS,并将液体转移至流式细胞术管(Falcon 5mL# 352054)。

[1195] 6.将管在1100rpm下离心3至5分钟,并倒出液体。

[1196] 7.向每个管中添加100μL Zombie Violet(Biolegend)(在PBS中以1:500稀释)。

[1197] 8.轻拍管以重悬细胞,并将其在室温下在黑暗中放置15分钟。

[1198] 9.向细胞中添加0.5mL(1:1的在PBS中的4％多聚甲醛:DPBS),并轻弹细胞以重悬并将其置于冰上30分钟。添加另外2ml PBS。

[1199] 10.如上沉淀细胞并将其重悬于含5％BSA的0.5mL DPBS中,并置于冰箱中直至需要。

[1200] B.细胞分析

[1201] 通过Attune NxT流式细胞仪使用VL1和YL2分别分析细胞悬液的活/死和mCherry荧光信号。在FloJo软件上进行设门分析。

[1202] 实施例12.DSPS对使用具有KC2作为可电离阳离子脂质的LNP转染树突细胞的效率的影响。

[1203] 本研究的目的是在鼠树突细胞中探索使用DSPS的磷脂酰丝氨酸靶向对转染效率的作用。如实施例9中所述制备LNP,如实施例10中所述表征颗粒尺寸和ζ电位,并且如实施例11中所述在鼠树突细胞中评价转染效率。所有LNP的DLin-KC2-DMA恒定在N/P比为5和总脂质的50mol％,PS脂质最初从0至2.5mol％变化,并且DSPC磷脂从0至7.5mol％变化(DSPC和DSPS的总mol％恒定在10mol％),并且胆固醇恒定在38.5mol％(全部为总脂质的mol％)。所有制剂的颗粒尺寸、多分散性指数(Polydispersity Index,PDI)和包封效率在下表5和6中示出。

[1204] 表5.实施例12和图3A中使用的从0至2.5mol％变化的在实施例12中所使用的包含KC2的LNP的物理化学特性。

[1205]

Mol％DSPS	颗粒尺寸(nm)	PDI	％包封±SD
0	77.6	0.075	86.4±2.8
0.1	82.0	0.171	87.0±4.7
0.5	89.2	0.285	86.3±3.2
2.5	72.2	0.263	87.1±6.8

[1206] 表6.实施例12和图3B、图3C和图3D中使用的从0至7.5mol％变化的包含KC2的LNP的物理化学特性。

[1207]

Mol％DSPS	颗粒尺寸(nm)	PDI	％包封±SD
0	73.9	0.14	92.6±6.2
1.25	80.3	0.13	90.9±5.6
2.5	70.7	0.25	89.0±7.4
5	78.7	0.12	85.1±6.8
7.5	76.4	0.14	85.4±3.6

[1208] 初始一组包含DLin-KC2-DMA和从0至2.5mol％变化的DSPS形式的磷脂酰丝氨酸的

LNP显示出在0或0.5mol％DSPS下极少的转染,但当DSPS以2.5mol％并入时提高了18倍(图3A)。在0.1、0.3和1μg/mL mRNA浓度下评价了用0至7.5mol％的DSPS制备的第二系列LNP(图3B、图3C和图3D)。随着DSPS的mol％提高高于2.5mol％,转染效率提高,其中在1μg/mL mRNA下在7.5mol％下最大,以及在0.1和0.3μg/mL mRNA二者下在5mol％下最大。这些数据表明磷脂酰-L-丝氨酸的包含可以显著提高含mRNA的LNP的转染效率,并且最大摄取发生在5至7.5mol％的DSPS(作为总脂质的％)之间。

[1209] 实施例13.ICL和阴离子磷脂靶向配体对mRNA转染树突细胞的影响。

[1210] 本研究的目的是观察其他阴离子磷脂是否也可以增强LNP的转染效率,以及用不同ICL和PS靶向制备的LNP如何转染树突细胞。如实施例9中所述制备LNP,如实施例10中所述表征颗粒尺寸和ζ电位,并且如实施例11中所述在鼠树突细胞中评价转染效率。LNP的多种ICL(DLin-KC2-DMA、KC2-OA、KC3-OA或SM-102)恒定在N/P比为5和总脂质的50mol％,PS脂质保持恒定在5mol％以及DSPC在5mol％,以及胆固醇恒定在38.5mol％(全部为总脂质的mol％)。所有制剂的颗粒尺寸、PDI和包封效率在下表7中示出。

[1211] 表7.所使用的ICL不同并且具有5mol％的阴离子磷脂的LNP的物理化学特性。

[1212]

可电离阳离子脂质 (ICL)	阴离子脂质	颗粒尺寸 (nm)	PDI	% 包封 ± SD
KC2	5％DSPS	90.9	0.13	91.0 ± 5.8
KC2-OA	5％DSPS	74.8	0.13	92.8 ± 8.0

[1213]

KC3-OA	5％DSPS	95.5	0.09	96.6 ± 18.3
SM-102	无	77.5	0.05	92.6 ± 5.0
SM-102	5％DSPS	65.9	0.13	84.5 ± 7.7
KC2	5％Glu-DSPE	52.1	0.23	87.9 ± 6.8
KC2	5％Suc-DSPE	64.6	0.19	86.6 ± 3.6

[1214] 转染结果在图4中示出,图4示出了在三种不同的KC系列ICL(KC2、KC2-OA和KC3-OA)的情况下以及在用支链ICL(SM-102)制备的LNP的情况下的高转染率。所有制剂,包括用替代阴离子磷脂(Suc-DSPE或Glu-DSPE)制备的制剂的包封效率均是高的,并且颗粒尺寸均低于100nm。数据表明,DSPS(L-丝氨酸)不能被N-戊二酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(Glu-DSPE)或N-琥珀酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(Suc-DSPE)替换,并且提供相同高水平的mRNA转染,尽管两种磷脂也包含两个负电荷并且都包含相同的二硬脂酰基(C18:0)完全饱和的酰基链。这些研究还清楚地表明,DSPS的添加可导致其他可电离阳离子脂质的高转染效率,所述其他可电离阳离子脂质包括具有单一不饱和酰基增益的那些(KC2-OA或KC3-OA)和包括支链ICL(如SM-102)的那些。例如,将DSPS添加至包含SM-102的LNP导致mCherry表达提高22倍。

[1215] 实施例14.PS靶向对ICL和PS结构的依赖性。

[1216] 本研究的目的是比较PS靶向LNP与具有不同酰基链组成的KC2和KC3系列可电离阳离子脂质。将具有二甲基氨基乙基头基结构的结构的KC2系列脂质与包含二甲基氨基丙基来源的头基的KC3系列进行比较。LNP包含N/P比为5且50mol％ICL的多种ICL(KC2、KC2-01、KC2-OA、KC2-PA、KC3-OA和KC3-01)作为ICL,以及恒定的1.5mol％PEG-DMG。胆固醇含量保持恒定在38.5mol％,并且DSPC含量与0或5mol％的DSPS的mol％成反比变化(所有脂质浓度均以总脂质的mol％使用)。如实施例11中所述,在鼠树突细胞中评价转染效率。

[1217] 表8.所使用的ICL不同并且具有5mol％的阴离子磷脂的LNP的物理化学特性。

[1218]

可电离阳离子脂质 (ICL)	PS 含量	颗粒尺寸 (nm)	PDI	% 包封 ± SD
KC2	无	95.6	0.08	91.7 ± 2.0
KC2	5 % DSPS	82.5	0.09	87.1 ± 3.8
KC2-01	无	82.4	0.08	91.6 ± 3.9
KC2-01	5 % DSPS	76.0	0.10	90.5 ± 3.5
KC2-OA	无	89.5	0.08	88.6 ± 4.2
KC2-OA	5 % DSPS	85.9	0.10	92.4 ± 4.5
KC2-PA	无 / 10 % DPPC	92.3	0.11	92.4 ± 4.4
KC2-PA	5 % DSPS/5 %DPPC	85.2	0.10	95.5 ± 3.4
KC3-01	无	88.2	0.10	94.3 ± 7.1
KC3-01	5 % DSPS	101.2	0.16	95.2 ± 4.4
KC3-OA	无	105.9	0.08	86.6 ± 1.6
KC3-OA	5 % DSPS	103.0	0.13	93.8 ± 3.2
KC2-PA	5 % DPPS/5 % DPPC	77.1	0.06	93.8 ± 3.7

[1219] 图5中示出了转染结果,并且清楚地示出了PS靶向对多种KC系列ICL的积极影响。在此,数据示出了包含不饱和C16和C18 ICL二者的ICL可以被磷脂酰-L-丝氨酸靶向,并导致针对树突细胞的高转染率。当PS和PC包含错配的酰基链组成、以及5mol％DPPC和5mol％DSPS,并与C16 ICL(KC2-PA)组合时出现最高转染率。

[1220] 实施例15.磷脂酰丝氨酸结构对LNP转染效率的影响

[1221] 本研究的目的是在树突细胞中探索不同阴离子磷脂结构对转染效率的作用。如实施例9中所述制备LNP,如实施例10中所述表征其颗粒尺寸和ζ电位,并且如实施例11中所述评价其在鼠树突细胞中的转染效率。所有LNP的AKG-UO-1恒定在N/P比为5和总脂质的50mol％,阴离子脂质根据制剂而变化并且与DSPC磷脂相反,并且除了20mol％的DSPS LNP之外,胆固醇恒定在38.5mol％(全部为总脂质的mol％)。对于包含高至10％磷脂酰丝氨酸组分的样品,磷脂酰胆碱组成相应地从10mol％降低。例如,具有5mol％DSPS的LNP包含5mol％DSPS和5mol％DSPC,并且包含10mol％DSPS的那些没有DSPC。然而,对于包含20mol％DSPS的样品,制剂中没有DSPC,并且胆固醇的mol％降低了10mol％至28.5mol％。

[1222] 所有制剂的包封效率为84％至90％,表明LNP中高效的mRNA包封。表9.用AKG-UO-1作为ICL和不同阴离子磷脂制备的LNP的物理化学特性及包封。

[1223]

LNP 制剂（阴离子脂质）	颗粒尺寸 (nm)	PDI	在PH 5下的ζ电位 (mV)	在PH 7下的ζ电位 (mV)	% 包封
无阴离子脂质	98.1	0.03	13.01	-0.2	84.2 ± 4.2
2.5% L-DSPS	96.8	0.03	3.4	-1.7	86.1 ± 5.0
5% L-DSPS	95.7	0.05	14.9	-2.9	88.3 ± 3.2
7.5% L-DSPS	95.1	0.10	17.0	-4.2	89.1 ± 3.6
10% L-DSPS	100.5	0.08	15.2	-5.1	89.6 ± 3.1
7.5% L-DPPS	96.3	0.07	17.8	-7.6	88.1 ± 2.7
7.5% D-DSPS	100.1	0.14	19.5	-9.6	87.4 ± 4.4
7.5% L-DOPS	110.4	0.07	15.1	-3.5	89.5 ± 3.5
7.5% L-DMPS	97.6	0.08	12.7	-3.8	88.4 ± 1.3
20% L-DSPS	97.7	0.07	7.0	-7.0	88.5 ± 1.9
5% DSPG	86.6	0.04	17.5	-4.7	87.1 ± 3.1
7.5% DSPG	85.0	0.08	16.6	-4.1	90.1 ± 0.9
7.5% Glu-DSPE	94.0	0.07	16.9	-6.4	89.6 ± 9.1
7.5% Suc-DSPE	96.9	0.05	14.3	-5.6	88.4 ± 9.0

[1224] 图6A中评价了不同磷脂酰丝氨酸化学形式的作用,显示出饱和度、酰基链长度和丝氨酸立体化学对LNP在鼠树突细胞中的转染活性的重要性。具有油酸酰基链(DOPS)或其中立体化学为(D-丝氨酸)而不是L-丝氨酸的PS类似物产生这样的LNP:具有与在没有任何磷脂酰丝氨酸的情况下制备的LNP的转染活性类似的转染活性。然而,与不含任何PS的LNP相比,用包含丝氨酸L-异构体和饱和酰基链的PS制备的LNP在转染树突细胞方面显著更好。在饱和系列中,具有C16(DPPS)或C18(DSPS)的那些显示出最高的活性,而具有C14(DMPS)的那些活性较低但是与用不含任何PS的LNP处理的树突细胞相比仍有改善。在图6B中,用包含DSPG的制剂(5或7.5mol%)评价了其他阴离子磷脂的影响,所述包含DSPG的制剂显示出与背景类似的活性,并且N-戊二酰基-或N-琥珀酰基-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(Glu-DSPE或Suc-DSPE)当包含在这些含AKG-UO1的LNP中时显示出更适度的3至5倍的活性增强。该实施例显示,用饱和磷脂酰-L-丝氨酸制备的LNP与包含不饱和二油酰基磷脂酰-L-丝氨酸(DOPS)或者DSPS的D-异构体的LNP相比显著更好地转染树突细胞。与其他形式的PS、阴离子N-戊二酰基或N-琥珀酰基DSPE类似物、或者5或7.5mol%的二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)相比,包含DSPS的L-异构体和DPPS的LNP显示出最高水平的转染。

[1225] 实施例16.对包含AKG-UO-1的LNP上DSPS密度的优化

[1226] 本研究的目的是探索DSPS密度对LNP转染效率的影响。如实施例9中所述制备LNP。LNP包含N/P比为5的AKG-UO-1作为ICL、以及0至20mol%的DSPS、以及恒定为1.5mol%的PEG-DMG。胆固醇含量保持恒定在38.5mol%,并且DSPC含量与0至10mol%的DSPS的mol%成反比变化(所有脂质浓度均作为总脂质的mol%使用)。在20mol%DSPS制剂中,没有DSPC,并且胆固醇含量总共降低了10mol%(从38.5mol%至28.5mol%)。如实施例11中所述,在鼠树突细胞中评价转染效率。

[1227] 表10.用AKG-UO-1作为ICL和不同阴离子磷脂制备的LNP的物理化学特性及包封。

[1228]

LNP 制剂	颗粒尺寸 (nm)	PDI	在PH 5下的ζ电位(mV)	在PH 7下的ζ电位 (mV)	% 包封
UO1 + 0 % DSPS	98.1	0.03	13.0	-0.2	84.2 ± 4.2
UO1+2.5% DSPS	96.8	0.03	3.4	-1.7	86.1 ± 5.0
UO1 + 5% DSPS	95.7	0.05	14.9	-2.9	88.3 ± 3.2
UO1+7.5% DSPS	95.1	0.10	17.0	-4.2	89.1 ± 3.6
UO1 +10% DSPS	100.5	0.08	15.2	-5.1	89.6 ± 3.1
UO1 +20% DSPS	97.7	0.07	7.0	-7.0	88.5 ± 1.9

[1229] 对于包含AKG-UO1的LNP,LNP组合物对DSPS浓度的依赖性在图7中示出。该研究表明,制剂中DSPS的存在允许2.5至10mol％DSPS高水平转染树突细胞,并且对于包含AKG-UO-1的LNP,约5至7.5mol％DSPS有明显的峰。

[1230] 实施例17.PEG对包含AKG-UO-1的LNP的转染效率的影响。

[1231] 本研究的目的是探索PEG-脂质密度对非靶向和磷脂酰-L-丝氨酸靶向的LNP的转染效率的影响。如实施例9中所述制备LNP。LNP包含N/P比为5的AKG-UO-1作为ICL、以及0或5mol％的DSPS和0.5至4.5mol％的PEG-DMG。胆固醇含量保持恒定在38.5mol％,并且不含DSPS的制剂的DSPC含量为10mol％而含5mol％DSPS的制剂的DSPC含量为5mol％。在PEG-DMG含量高于1.5mol％时,总胆固醇含量因添加的PEG-DMG的量而降低,例如在PEG-DMG含量为3.5mol％的情况下,胆固醇含量从38.5mol％降低至36.5mol％。具有0.5％PEG-DMG的颗粒在pH 7.4下显示出负ζ电位,并且在pH 5下显著转变为正ζ电位。具有1.5至3.5mol％PEG-DMG的LNP在pH 7下基本上是中性的。

[1232] 表11.实施例17中使用的并且包含AKG-UO-1、0或5mol％DSPS的LNP的物理化学特性

[1233]

% DSPS	% PEG-DMG	颗粒尺寸 (nm)	在PH 7下的ζ电位 (mV)	在PH 5下的ζ电位 (mV)
0	0.5	98.9	0.27	25.92
0	1.5	75.0	-0.87	12.07
0	2.5	73.8	-0.51	11.86
0	3.5	81.0	-0.30	6.34
0	4.5	143	-1.47	14.51
5	0.5	106.1	-1.35	9.30
5	1.5	73.7	-0.21	3.23
5	2.5	70.7	-0.20	4.75
5	3.5	65.6	-0.10	7.54
5	4.5	63.1	-1.12	3.73

[1234] 图8中示出了PEG-DMG对由包含AKG-UO-1ICL的DSPS靶向的LNP转染树突细胞的影响。含0.5％PEG-DMG的制剂显示出在存在5％DSPS的情况下转染效率是在1.5至2.5％PEG-DMG下观察到的转染效率的6至7倍高。转染在1.5和2.5％PEG-DMG下是相似的,但是在3.5和4.5mol％PEG-DMG下显著降低。在每种PEG密度下,靶向转染与非靶向转染的比率不同,并且在0.5％PEG下为12倍、在1.5％PEG下为7倍,在2.5％PEG下为37倍,以及在3.5％和4.5％PEG下低于5倍,这可能是因为PS靶向部分的高PEG屏蔽。这些数据的组合显示,PEG密度的最佳

范围为0.5至2.5％PEG-DMG,其中该范围的较低端对于总转染效率是最佳的,而2.5％对于靶特异性是最佳的。

[1235] 实施例18.ICL的氧化稳定性

[1236] 本研究的目的是在加速氧化下比较具有缀合烯烃的可电离阳离子脂质(例如KC2、KC3和O-11769)与具有缀合烯烃的可电离阳离子脂质(例如KC2-01、KC3-01和UO-1)的稳定性。

[1237] 在乙醇中制备单独的脂质储备液(10mM)并储存在-20℃下。在实验之前,通过将45μl在乙醇中的10mM脂质储备液(Sigma-Aldrich,目录号459836)与45μl超纯水(Rx Biosciences,目录号P01-UPW02-1000)混合来制备5mM混悬液(KC2、KC2-01、KC3、KC3-01、O-11769和UO-1)。基于AKG-UO-1和O-11769可电离阳离子脂质的脂质体制剂(表12)通过在NanoAssemblr(Precision Nanosystems)上以6mL/分钟将1mL乙醇中的期望组合物的脂质混合物与pH 5.0的3mL 6.25mM乙酸钠组合来制备。保留3.6mL混合物,同时丢弃初始的0.35mL混合物和最终的0.05mL。通过以下除去乙醇:通过使用Aminon-Ultra 4离心浓缩器将每种脂质体制剂在4℃下在500g下浓缩10分钟,并用PBS稀释回至原始体积而将缓冲液交换成pH 7.4的PBS。该循环重复多次直至乙醇浓度<1％。最后,将脂质体通过0.2μm PES(Nalgene)注射器过滤器进行无菌过滤,并通过ZetaSizer(Malvern)测量尺寸。包含AKG-UO-1的制剂(批号102021-6)的平均尺寸为81.8nm并且PDI为0.09,而包含O-11769的制剂的平均尺寸为86.6nm并且PDI为0.10。

[1238] 表12.加速氧化研究中使用的LNP制剂。

[1239]

批号	组合物	MW	mol%	估算的总脂质 [mM]
102021-6	AKG-UO-1	658.1	50	1.5
	DSPC	790	10	
	胆固醇	387	38.5	
	PEG_{2000}-DMG	2500	1.5	
102021-7	O-11769	658.1	50	1.5
	DSPC	790	10	
	胆固醇	387	38.5	
	PEG_{2000}-DMG	2500	1.5	

[1240] 将脂质体制剂的等分试样储存在-80℃并在实验之前解冻。在处理之前,新鲜制备10％H_2O_2(Sigma-Aldrich,目录号H1009)和1mM Fe(III)Cl(Sigma-Aldrich,目录号372870)在水中的组合储备液。为了使H_2O_2和100μM Fe(III)Cl的最终浓度为1％,将10μl的10％H_2O_2/1mM Fe(III)Cl储备液添加至90μl的脂质体制剂和单独脂质二者。将脂质体和单独脂质与H_2O_2/Fe(III)Cl在37℃下孵育,并随后在不同时间点(0、3、24、48和72小时)从各样品中取出5μl,并将其溶解在90μl MeOH中用于HPLC分析。使用配有带电荷气溶胶检测器(Charged Aerosol Detector,CAD)和Thermo Scientific Accucore™C18+UHPLC柱(L＝50mm,D＝2.1mm,颗粒尺寸＝1.5μm)的Thermo Scientific Vanquish Flex UHPLC来分析主

要脂质峰的降解。表13中列出了UHPLC的操作条件。

[1241] 表13.色谱条件

HPLC 仪器	Thermo Scientific Vanquish Flex UHPLC
HPLC 柱	Accucore™ Vanquish™ C18+ UHPLC 柱
柱温	55℃
流量	0.5 mL/分钟
注射体积	5 μL
吸光度检测	210 nm
CAD	10 Hz
运行时间	15 分钟
样品温度	21℃
样品溶剂	MeOH
流动相	流动相 A：在水中的 5 mM 乙酸铵（pH 4）
	流动相 B：甲醇

[1242]

流动相程序：

时间，分钟	流动相 A，%	流动相 B，%
-0.5	15	85
0	15	85
2	10	90
4	2	98
8	2	98
12	0	100
14	15	85
15	15	85

[1243] 数据表示为在不同时间点测量的主要脂质峰相对于在时间零测量的脂质峰的百分比。

[1244] 表14.具有被一个(KC2,KC3或O-11769)或更多个(KC2-01、KC3-01、UO-1、UO-6和UO-7)亚甲基隔开的两个烯烃的ICL的降解。

[1245]

脂质 / 制剂	在时间0时母体脂质峰值的%		
	24 小时	48 小时	72 小时
ICL 脂质混悬液			
KC2	35 ± 0.7	6 ± 1.9	0 ± 0.0
KC2-01	91 ± 0.3	87 ± 0.9	83 ± 0.3
KC3	46 ± 1.8	1 ± 0.2	0 ± 0.0
KC3-01	83 ± 4.3	80 ± 0.4	74 ± 2.2
O-11769	31 ± 0.9	1 ± 0.2	0.3 ± 0.1
UO-1	78 ± 0.6	74 ± 0.1	65 ± 2.5
UO-6	58 ± 0.8	32 ± 1.3	22 ± 1.8
UO-7	80 ± 1.7	71 ± 0.8	62 ± 1.0
脂质体制剂			
UO-1 (102021-6)	86 ± 6.2	85 ± 4.2	73 ± 0.1
O-11769 (102021-7)	27 ± 2.2	8 ± 1.4	4 ± 0.1

[1246] 如图9A和图9B中所示,所有具有在两个烯烃之间有四个亚甲基的烯烃的ICL(KC2-01、KC3-01和UO-1)与它们的具有隔开两个烯烃的单个亚甲基的对应物(分别为KC2、KC3和O-11769)相比,表现出在用过氧化氢加速氧化下显著优异的稳定性。即使在用过氧化氢处理72小时之后,KC2-01、KC3-01和UO-1的主峰相对于处理开始时仍保持高于70%,而KC2、KC3和O-11769在用过氧化氢孵育48小时之后完全降解。另外两种多不饱和ICL(UO-6和UO-7)类似地显示出良好的对氧化的稳定性,但是在头基中具有羟乙基取代基的UO-7比随后的二甲基氨基ICL降解得更快(表14)。

[1247] 使用结构上相关的UO-1和O-11769ICL,研究了作为无mRNA脂质体制剂的一部分具有被多于一个亚甲基隔开的烯烃的ICL的稳定性。其他可电离阳离子脂质(KC2、KC2-01、KC3和KC3-01)被排除在本研究之外,因为它们的色谱峰与DSPC的峰重叠,这影响了数据解释。图9A中示出了基于UO-1和O-11769的脂质体制剂的稳定性数据。在存在1%过氧化氢的情况下孵育72小时之后,配制在脂质体中的UO-1的主UO-1峰为73±0.05%。相比之下,基于O-11769的脂质体在处理72小时之后仅显示出O-11769峰为3.9±0.06%。

[1248] 所有这些数据表明,除了在实施例14和20或在其烯烃之间具有多于一个亚甲基的ICL中表明的转染效率改善之外,这些脂质还显示出对氧化降解的稳定性显著改善。

[1249] 实施例19.N/P比对包含mCherry mRNA的LNP的转染效率的影响。

[1250] 本研究的目的是在树突细胞中探索不同N/P比对转染效率的作用。如实施例9中所述制备LNP,如实施例10中所述表征颗粒尺寸和ζ电位,并且如实施例11中所述在鼠树突细胞中评价转染效率。LNP全部使用KC2-01作为ICL,但是阳离子脂质与mRNA磷酸(N/P)的比从4至7变化,PS脂质恒定在5mol%以及DSPC磷脂恒定在5mol%,并且胆固醇恒定在38.5mol%。所有制剂的包封效率为84%至90%,表明在LNP中高效的mRNA包封。如实施例11中所述,在鼠树突细胞中评价转染效率。

[1251] 表15.实施例19中使用的LNP的物理化学特性

[1252]

% DSPS	N/P	颗粒尺寸 (nm)	在PH 7下的ζ电位 (mV)	在PH 5下的ζ电位 (mV)
0	4	85.4	-10.8	16.3
0	5	84.9	-6.9	20.9
0	6	81.1	-7.0	21.6
0	7	75.7	-6.1	21.5
5	4	84.1	-17.5	13.8
5	5	80.9	-17.2	20.4
5	6	82.2	-15.5	15.8
5	7	79.5	-13.9	16.6

[1253] 对DSPS靶向的和非靶向的KC-01LNP制剂二者在1μg/ml(图10A)和0.33μg/ml(图10B)二者下的转染活性进行了评价。这些数据显示,在宽的N/P比范围内的包含KC2-01的LNP具有高的DSPS介导的转染效率,其中在N/P为7时观察到最大的转染效率。

[1254] 实施例20.可电离脂质结构对含LNP转染效率的影响。

[1255] 本研究的目的是为了在树突细胞中探索不同ICL对转染效率的作用。如实施例9中所述制备LNP,如实施例10中所述表征颗粒尺寸和ζ电位,并且如实施例11中所述在鼠树突细胞中评价转染效率。LNP在ICL中使用表16中的可电离脂质(恒定N/P比为5),PS脂质为0或7.5mol%,并且DSPC磷脂恒定在10或2.5mol%(DSPC和DSPC总共为10mol%),并且胆固醇恒定在38.5mol%。

[1256] 表16.实施例20中使用的LNP的物理化学特性。

[1257]

ICL	% DSPS	颗粒尺寸 (nm)	冷冻/解冻后的颗粒尺寸（nm）	包封效率 (%)
AKG-UO1	0	98.0	122.6	75.4 ± 2.2
AKG-UO1	7.5	93.9	94.2	91.6 ± 2.9
AKG-UO1A	0	84.4	103.2	77.5 ± 0.9
AKG-UO1A	7.5	89.2	91.1	88.7 ± 4.1
O-11769	0	83.0	89.6	87.5 ± 2.7
O-11769	7.5	130.8	126.4	91.5 ± 6.2
AKG-UO4	0	102.3	169.4	46.5 ± 1.8
AKG-UO4	7.5	89.9	91.3	89.0 ± 7.6
AKG-UO4A	0	112.1	123.4	73.1 ± 4.1
AKG-UO4A	7.5	92.4	91.81	85.8 ± 4.3
AKG-DM2-OA	0	77.6	111.5	64.9 ± 3.4
AKG-DM2-OA	7.5	106.5	123.0	86.2 ± 5.5
DODAP	0	69.8	68.2	83.4 ± 7.7
DODAP	7.5	90.1	88.0	84.1 ± 2.3

[1258] 使用非靶向和7.5mol%DSPS靶向的LNP二者评价靶向和ICL选择对转染活性的作

用(图11)。本研究中使用的所有ICL都具有相关的二酰基结构,这种结构在酰基链中不饱和的程度和位置或使用的特定可电离胺方面有所不同,并因此其有明显的pKa。该数据显示,具有被四个亚甲基(C18总长度)隔开的两个烯烃的AKG-UO1脂质在并入到LNP中时显示出最高的活性。O-11769脂质(二亚油酸)显示的活性为包含AKG-UO-1的LNP的约一半,后者具有与具有C16酰基链的AKG-UO4脂质和具有相同头基但在两个酰基链上都是油酸(单个烯烃)的ICL(AKG-OA-DM2)类似的活性。然而,活性的最大降低来自于将AKG-UO-1中的二甲基胺基取代基改变为UO-1A中的二乙基胺基,或者降低两个酯与二甲基胺基(DODAP)之间的亚甲基的数目。这两种变化导致转染活性的大的降低,后者甚至在存在DSPS靶向的情况下也是如此。

[1259] 还值得注意的是,在该系列中,与那些不包含DSPS的LNP相比,那些包含7.5mol%DSPS的LNP在其经历冻融过程之后更不易受到颗粒尺寸的不利变化的影响。平均来说,那些不包含DSPS的LNP的直径改变了28.4nm,而那些包含DSPS的LNP改变了3.9nm。由于储存稳定性是mRNA疫苗的主要问题,因此DSPS的添加为这些LNP提供了重要的稳定作用。

[1260] 实施例21.在MutuDC1940树突细胞系中测量添加10和25mol%DOPS对LNP颗粒形成和活性的作用。

[1261] 本研究的目的是探索将DOPS以等于或低于先前在文献(Gaitonde et al.(2011) Clin Immunol 138,135-145;Rodriquez-Fernandez(2018)Front Immunol 9,253)中示出的mol%的组成包含到mRNA LNP制剂中对增强将脂质体(存在的情况下)摄取到树突细胞中的影响。如实施例9中所述在25℃下制备LNP,并如实施例10中所述进行分析。LNP包含N/P比为5的KC2作为ICL、以及0、10至25mol%的DOPS、以及恒定1.5mol%的PEG-DMG。对于0%和10%DOPS制剂,胆固醇含量保持恒定在38.5mol%,并且DSPC含量与0至10mol%的DOPS的mol%成反比变化(所有脂质浓度均作为总脂质的mol%使用)。在25mol%DOPS制剂中,没有DSPC并且胆固醇含量总共降低了15mol%(从38.5mol%降低至23.5mol%)。如实施例11中所述,在鼠树突细胞中评价转染效率。

[1262] 表17.包含DOPS的LNP制剂的物理化学特性

[1263]

LNP 制剂	颗粒尺寸 (nm)	PDI	包封效率 (%)
KC2/DSPC/DOPS/Chol/PEG-DMG (50/10/0/38.5/1.5)	68.8	0.136	90.0 ± 3.5
KC2/DSPC/DOPS/Chol/PEG-DMG (50/0/10/38.5/1.5)	80.8	0.163	90.9 ± 3.5
KC2/DSPC/DOPS/Chol/PEG-DMG (50/0/25/23.5/1.5)	峰 1 = 62.6, 峰 2 = 416.3	0.398	77.3 ± 3.5

[1264] 图12中评价了10至25mol%DOPS对LNP靶向树突细胞的影响。该研究显示,在基于KC2的LNP制剂中包含10mol%的DOPS对MutuDC1940细胞中的mCherry表达水平具有积极作用,同时对颗粒尺寸或mRNA的包封没有不利影响。然而,当DOPS含量提高至25mol%时,mCherry的表达比不含DOPS的制剂更低,并且尺寸分布变宽(如PDI提高所表明的)并产生包含>400nm颗粒的分布。总之,在文献中25mol%可能已显示出对将脂质体摄取到树突细胞中

的增强,而在含有mRNA的LNP制剂中其对颗粒尺寸和转染活性二者均具有有害作用。重要的是,在此和在文献中使用的DOPS包含不饱和酰基链,在这种情况下是油酸。这类似于许多细胞中的典型情况,其中磷脂酰丝氨酸酰基链通常在第sn-2位是不饱和的,在许多情况下具有多个烯烃(2至4)。虽然在较低浓度的DOPS下有小的增强,但是实施例15中显示,当PS由饱和酰基链,最优选二棕榈酰基(C16)或二硬脂酰基(C18)构成时,这种增强显著更高。

[1265] 实施例22.聚乙二醇化和磷脂酰丝氨酸靶向对SARS-CoV-2刺突蛋白mRNA疫苗构建体的免疫原性的影响。

[1266] 小鼠和研究设计。进行了体内研究。雌性BALB/c小鼠购自Jackson Labs,使其在动物饲养所中适应至少7天,并在研究开始时为6至8周。在研究的第0天,对小鼠的右四头肌肌内注射50μL体积中的1μg疫苗候选物(量是指mRNA)。研究组由5只小鼠组成,并包括载剂对照、比较物疫苗和实验疫苗候选物。21天之后,向小鼠给予相同疫苗候选物的第二次注射。在研究开始时从5只随机选择的对照小鼠中以及在研究第21天和第34天从所有小鼠中收集血液并分离血清。将血清储存在-80℃直至分析抗体效价。在研究的第34天,对小鼠实施安乐死并收获脾。

[1267] mRNA的设计和制备。编码SARS-CoV-2全长刺突蛋白并且侧翼是BNT162b2(Comirnaty)疫苗中使用的相同UTR的mRNA购自Vernal Biosciences。所有尿苷核苷都用N1-甲基-假尿苷替换。为了产生mRNA,将编码mRNA序列的合成基因(VRN029;SEQ ID NO:2,图13A)克隆到DNA质粒中。合成基因由RNA启动子、5'非翻译区、SARS-COV2刺突蛋白受体结合结构域、3'非翻译区和约120A的poly(A)尾区构成。质粒在大肠杆菌(E.coli)培养物中繁殖和扩增,并随后经由阴离子交换色谱从澄清的大肠杆菌裂解物中分离。使用在poly(A)尾编码区末端处的位点进行切割的II型限制性内切酶将纯化的质粒线性化。然后将该质粒在具有核苷酸三磷酸、RNA聚合酶和RNA酶抑制剂的缓冲液中孵育。为了停止反应,添加DNA酶I来消化线性质粒模板。然后将未加帽的RNA使用色谱进行纯化,并随后在另外的具有GTP、S-腺苷甲硫氨酸、鸟苷酸转移酶(guanalyltransferase)、2'-O-甲基转移酶和RNA酶抑制剂的缓冲液中孵育。然后将加帽的mRNA使用色谱进行纯化,将缓冲液换成水,并装入到小瓶中。

[1268] 包含mRNA的脂质纳米粒(LNP)的产生。制备每种脂质的储备溶液。在4mL玻璃小瓶(Thermo B7999-2)中称出可电离脂质,并将其溶解在乙醇(Sigma-Aldrich 200proof,不含RNA酶)中至最终浓度为10mM。称出其他脂质例如DSPC(Avanti Polar Lipids)、胆固醇(Dishman)和PEG-DMG(NOF),并将其溶解在乙醇中至浓度为1mM。将DSPS-Na(NOF)以1mM的浓度溶解在甲醇(Sulpelco,Omnisolve)中并短暂加热至70℃以完成其溶解。

[1269] 通过以下制备每种单独LNP的脂质混合物:将所期望体积的每种脂质储备溶液添加至新的小瓶,如果需要的话则添加乙醇,以达到1.2mL的最终体积。例如,AKG-UO-1/DSPC/DSPS/Chol/PEG-DMG(50/2.5/7.5/38.5/1.5mol%)的LNP制剂,其在N/P为5的情况下针对使用的每100μg mRNA包含1500nmol AKG-UO-1、75nmol DSPC、225nmol DSPS、1155nmol Chol和45nmol PEG-DMG。通过解冻经冷冻的mRNA(SARS-CoV-2刺突mRNA,Vernal)小瓶并将mRNA在6.25mM乙酸钠(pH 5.0)中稀释至0.033mg/mL的最终浓度来制备mRNA溶液,其中浓度通过Nanodrop上的吸光度来确定。

[1270] 为了制备LNP,使用了NanoAssemblr台式微流体装置(来自Precision Nanosystems)。如果LNP包含DSPS,则使用设置为70℃的加热块附件,否则在室温下混合

LNP。将3mL mRNA溶液装载到3mL一次性注射器(BD 309656)中,并将1ml脂质混合物装载到1ml注射器(BD309659)中,并置于NanoAssemblr加热块中持续4分钟,随后进行混合。通过将液体流以6mL/分钟的混合速度以3:1的水:醇体积比泵送经过一次性微流体盒来实现LNP形成。在混合之后,收集3.6mL LNP混合物,同时丢弃0.35mL初始混合体积和最终的0.05mL混合物。通过使用SpectraPor透析管(12至14k MWCO)在PBS(Cytivia,SH30256.01)中进行缓冲液交换来除去乙醇。通常将LNP交换到PBS,pH 7.4中,并随后到15mM Tris,pH 7.4,20%蔗糖中,浓缩至20至50μg/mL mRNA,无菌过滤(Thermo Nalgene 0.2um#720-1320),然后通过浸入液氮中冷冻5分钟,并在-20℃下长期储存。对于该研究,将样品浓缩至>40μg/mL mRNA,并用不同体积的15mM Tris、20%蔗糖、pH 7.4稀释至40μg mRNA的靶浓度,并随后在LN2上冷冻。LNP的表征是在将LNP的等分试样解冻并用pH 7.4的15mM Tris以1:1(体积:体积)稀释使得最终浓度为在15mM Tris,10%蔗糖,pH 7.4中的20μg/mL mRNA之后进行的。这模拟了通过IM注射将50μL体积中的1μg mRNA注射到后肢来向动物给药之前进行的样品制备的条件。

[1271] LNP表征。LNP内的mRNA包封和mRNA浓度使用Ribogreen测定来测量。纳米粒尺寸和ζ电位通过zetasizer(Malvern)来测量。

[1272] SARS-CoV-2抗刺突抗体效价。进行标准间接ELISA来分析血清样品中针对SARS-CoV-2刺突蛋白的总IgG结合抗体。对于该测定,用在pH 7.4的1×PBS中稀释至2μg/mL的100μL SARS-CoV-2刺突蛋白(Sino Biological,目录号40589-V08B1)包被Nunc MaxiSorp 96孔板。将板在37℃下静态孵育12小时。通过用100μL PBS+0.05%吐温20将板洗涤3×来除去未结合的包被抗原。然后将板在PBS+5%脱脂乳中在37℃下封闭1小时。将测试和阳性对照样品在测定稀释液(PBS、吐温-20、1%脱脂乳)中稀释至1:20的起点稀释度,随后使用U型底稀释板进行四倍系列稀释。一旦封闭完成,则通过倒置除去封闭缓冲液,并将各样品一式两份地进行平板接种。将板在37℃下静态孵育2小时,随后用100μL的PBS+0.05%吐温20洗涤3×以除去未结合的血清。将100μL的第二检测抗体(山羊抗小鼠-HRP IgG,Abcam)以1:10,000的稀释度添加至每个孔。将板在室温下静态孵育30分钟,并随后除去未结合的抗体,并将板如上所述进行洗涤。为了显影,将100μL一步超TMB底物添加至每个孔,并在约10分钟之后用50μL TMB终止液(SeraCare,目录号5150-0019)终止反应。将板用Thermo LabSystems Multiskan分光光度计在450nm下在30分钟内进行读取。效价被定义为在效价曲线的线性部分产生OD 450的特定截止值的稀释度的倒数。

[1273] 离体T细胞应答。在研究的第34天,脾被机械分离成单细胞悬液。将细胞重悬于细胞刺激培养基(含有L-谷氨酰胺和HEPES缓冲液、热灭活的胎牛血清和Pen/Strep的RPMI)中,并将2×10^6个细胞以100μL的体积等分到96孔板中。将来自每只小鼠的脾细胞在37℃下用100μL培养基单独刺激约18小时,用包含PMA和离子霉素的阳性对照细胞刺激混合物(Cell Stimulation Cocktail)(ThermoFisher,目录号00-4970-93),或1μg/mL涵盖SARS-CoV-2刺突蛋白的肽合并物(JPT,目录号PM-WCPV-S-2)处理。在刺激1小时之后,将Golgi Stop(BD Biosciences,目录号554724)添加至每个孔。

[1274] 流式细胞术。在刺激之后,将细胞用PBS洗涤并转移至96孔深孔板。将细胞用在PBS中稀释的活/死近IR生存力染料(LIVE/DEAD near IR viability dye)(ThermoFisher,目录号L10119)在4℃下染色20分钟。将细胞用FBS染色缓冲液(BD Biosciences,目录号

554656)洗涤,并用Fc Block(BD Biosciences,目录号553142)在4℃下孵育10分钟。然后将细胞用由CD3 BV605(BD,目录号564009)、CD4 BV421(BD,目录号562891)和CD8 APC(BD,目录号553035)组成的细胞表面抗体混合物在4℃下染色40分钟。BD Brilliant染色缓冲液(目录号563794)包含在染色缓冲液中。将细胞用FBS染色缓冲液洗涤,并随后在室温下用Fix/Perm缓冲液(ThermoFisher,目录号00-5523-00)固定20分钟。将细胞用1×Perm缓冲液洗涤,用Fc Block孵育,并随后用胞内细胞因子抗体混合物在4℃下染色40分钟,所述混合物由IFN-g PE/Cy7(BD,目录号557649)、IL-2PE(BioLegend,目录号503808)和TNF-a FITC(BD,目录号554418)组成。然后将细胞洗涤,重悬于FBS染色缓冲液中,并在MACSQuant 16流式细胞仪(Miltenyi Biotec)上进行捕获。使用FlowJo v10.8.1(BD Biosciences)分析流式数据。

[1275] 表18.用于评价SARS-CoV-2刺突蛋白mRNA疫苗构建体的免疫原性的LNP的物理化学特性

[1276]

LNP 制剂	颗粒尺寸 (nm)	ζ电位 (mV) pH 5	ζ电位 (mV) pH 7	包封效率(%)
7.5% DSPS_UO1_PEG-DMG 1.5%	80.3	5.3	-2.6	90.7 ± 7.1
7.5% DSPS_UO1_PEG-DMG 2.5%	71.0	5.5	-1.0	89.1 ± 9.3
7.5% DSPS_UO1_PEG-DMG 3.5%	61.9	6.6	-3.6	89.3 ± 10.0
7.5% DSPS_UO1_PEG-DPPE 1.5%	80.7	7.9	-5.1	90.7 ± 14.2
7.5% DSPS_UO1_PEG-DPPE 2.5%	68.4	2.7	-2.4	91.0 ± 6.9
7.5% DSPS_UO1_PEG-DSG 1.5%	100.7	9.6	-6.7	88.8 ± 5.1
7.5% DPPS_UO1_PEG-DMG 1.5%	89.8	14.4	-1.4	93.8 ± 9.2
UO1_PEG-DMG 1.5%	116.0	20.2	2.5	86.5 ± 9.3
7.5% DSPS_KC2OA_PEG-DMG 1.5%	80.0	11.7	-3.5	90.9 ± 5.5
7.5% DSPS_KC2OA_PEG-DSG 1.5%	88.5	9.0	-3.9	92.2 ± 9.7
ALC0315_1.5% PEG-DMG	79.5	2.0	-2.4	86.7 ± 9.3
SM102_1.5% PEG-DMG	92.6	11.8	-0.1	92.0 ± 7.1

[1277] 为了评价PEG-脂质浓度对疫苗免疫原性的影响,用包含递增量的PEG-脂质(PEG-DMG或PEG-DPPE)的mRNA-LNP免疫接种BALB/c小鼠。在初免之后第21天和加强之后第13天(研究的第34天)收集血清用于抗体分析。用刺突肽合并物刺激脾细胞,并使用流式细胞术量化产生IL-2的CD4 T细胞的百分比(图13B和图13C)。PEG的两种形式,PEG-DMG(图13B)或PEG-DPPE(图13C)都反向影响mRNA-LNPA疫苗免疫原性,其中较低浓度的PEG-脂质显示出较高水平的B细胞和T细胞应答二者。

[1278] 为了评价PEG-脂质酰基链组成对mRNA-LNP免疫原性的影响,用包含不同PEG形式(PEG-DMG或PEG-DSG)的mRNA-LNP免疫接种BALB/c小鼠。在初免之后第21天和加强之后第13天(研究的第34天)收集血清。用刺突肽合并物刺激脾细胞,并使用流式细胞术量化产生IL-2的CD4 T细胞的百分比。对抗体效价数据进行对数转换,随后进行统计学分析。使用未配对t检验对组进行比较。对于用可电离脂质KC2OA制备的LNP,任一PEG形式表现相似(图13D)。相比之下,使用可电离脂质UO1和PEG-DMG的LNP与包含PEG-DSG的LNP相比诱导了更好的抗体应答(图13E)。

[1279] 为了评估磷脂酰丝氨酸的并入如何影响mRNA-LNP的免疫原性,用含或不含DSPS的包含多种可电离脂质的mRNA-LNP免疫接种BALB/c小鼠。在第34天(加强之后13天),收集血清用于通过ELISA量化总IgG抗刺突抗体。用肽刺激脾细胞并使用流式细胞术量化产生IL-2的CD4 T细胞的百分比。

[1280] 包含DSPS与比较物可电离脂质ALC-0315对总IgG抗刺突抗体水平产生负影响(图13F)。DSPS对包含可电离脂质UO1和KC2OA的LNP具有相反的作用,并将几何平均抗体水平分别显著提高36倍和46倍。DSPS也对CD4 T细胞应答有作用,其中针对包含UO1和KC2OA的LNP的应答趋势较高,并且针对SM-102显著较高。总之,脂质纳米粒中包含DSPS可基本上影响mRNA疫苗的免疫原性,并且DSPS的影响受到可电离阳离子脂质类型的影响。

[1281] 评价了不同磷脂酰丝氨酸酰基链组成对血清抗体效价(图13G,图A)和脾中刺突特异性CD4 T细胞应答的量值(magnitude)(图13G,图B)的作用。用使用可电离脂质UO1以及DSPS或DPPS形式的磷脂酰丝氨酸的LNP免疫接种小鼠。在第34天(加强之后13天)收集血清用于通过ELISA量化总IgG抗刺突抗体。用肽刺激脾细胞并使用流式细胞术量化产生IL-2的CD4 T细胞的百分比。

[1282] 关于PS酰基链组成的影响,两种形式的PS相对于缺乏PS的基础制剂相当地提高了抗体水平(图13G,图A)。两种形式的PS也对CD4 T细胞应答具有积极作用(图13G,图B),但是仅包含DPPS的制剂显著高于不含PS的基础制剂。总之,LNP中包含的两种形式的PS:DPPS或DSPS,对提高mRNA-LNP疫苗的免疫原性具有相似的积极作用。

[1283] 实施例23.在MutuDC1940树突细胞系中通过颗粒特征和活性来测量在基于KC2-01的LNP中添加7.5mol%的DSPSD-异构体或L-异构体的作用。

[1284] 本研究的目的是比较将DSPS的D-异构体和L-异构体以7.5mol%包含到mRNA LNP制剂中的影响。如实施例9中所述在25℃下制备LNP,并如实施例10中所述进行分析。LNP包含N/P比为5的KC2-01作为ICL,以及2.5mol%DSPC、7.5mol%DSPS(D或L)和恒定1.5mol%的PEG-DMG。如实施例11中所述,在鼠树突细胞中评价转染效率。

[1285] 表19.含有mCherry mRNA和二硬脂酰基磷脂酰-L-丝氨酸或二硬脂酰基磷脂酰-D-丝氨酸的KC2-01 LNP的物理化学特性。

[1286]

LNP 制剂	DSPS（丝氨酸异构体）	颗粒尺寸 (nm)	PDI	ζ电位 mV, pH 5	ζ电位 mV, pH 7	包封效率 (%)
KC2-01/DSPC/Chol/PEG-DMG (50/10/38.5/1.5)	N/A	83.92	0.03	7.7	-0.47	89.2 ± 5.7
KC2-01/DSPC/DSPS/ Chol/PEG-DMG (50/2.5/7.5/38.5/1.5)	D	85.4	0.09	7.8	-4.8	88.7 ± 3.5
KC2-01/DSPC/DSPS/ Chol/PEG-DMG (50/2.5/7.5/38.5/1.5)	L	87.4	0.04	7.7	-2.7	90.9 ± 6.0

[1287] 该研究显示,在基于KC2-01的LNP制剂中包含7.5mol％DSPS(任一异构体)对颗粒尺寸或mRNA包封没有影响。ζ电位值在pH 5下相似,但是包含DSPS的制剂在pH 7下与不含DSPS的制剂相比具有更大的负值,这可能是由于DSPS添加了另外的负电荷。图14A和图14B中评价了立体化学对转染的影响。在1μg/mL mRNA下与DSPS的L异构体相比,当使用DSPS的D异构体时观察到mCherry表达的8倍提高(以及在0.33μg/mL mRNA下为4.7倍),表明包含DSPS的LNP的摄取或表达机制可能是立体特异性的。

[1288] 实施例24.在MutuDC1940树突细胞系中测量在25℃和65℃下在基于KC2的LNP中包含DSPS对颗粒特征和活性的作用。

[1289] 本研究的目的是比较在两种不同温度下产生的基于KC2的LNP中包含DSPS的D-异构体的影响。如实施例9中所述制备LNP,其中在65℃下制备包含DSPS的LNP,在25℃下制备不包含DSPS的LNP,并且如实施例10中所述对所有LNP进行分析。

[1290] 所有LNP均包含N/P比为5的ICL、以及恒定1.5mol％的PEG-DMG。胆固醇含量保持恒定在38.5mol％,并且DSPC含量与5和7.5mol％的DSPS的mol％成反比变化(所有脂质浓度均作为总脂质的mol％使用)。包含以下的所有这些mRNA LNP取自它们各自的处方信息:mCherry mRNA以及使用基于SM-102的脂质制剂的比较物制剂的组成(与mRNA-1273中使用的相同的脂质组成)和使用ALC-0315的比较物制剂的组成(与BNT162b2中使用的相似)。值得注意的是,与本研究中的其他制剂一致,使用ALC-0315的BNT162b2比较物是在N/P为5.0的情况下制备的,这与批准的Covid疫苗Comirnaty相比是不同的。

[1291] 表20.与用SM102或ALC-0315可电离阳离子脂质制备的类似LNP相比,含5％或7.5％DSPS的包含KC2的LNP的物理化学特性。

[1292]

LNP 制剂	混合温度 °C	颗粒尺寸 (nm)	PDI	ζ电位 mV, pH 5	ζ电位 mV, pH 7	包封效率 (%)
KC2	25	70.4	0.21	4.5	-1.1	87.3 ± 3.2
KC2以及5% DSPS	25	78.3	0.12	2.5	-2.2	87.0 ± 2.2
KC2以及5% DSPS	65	88.2	0.11	7.4	-4.2	87.0 ± 3.8
KC2以及7.5% DSPS	25	73.5	0.11	1.0	-2.3	86.9 ± 3.8
KC2以及7.5% DSPS	65	74.3	0.07	0.5	-8.2	87.8 ± 2.2
SM102	25	84.0	0.17	6.3	-0.7	81.9 ± 3.9
ALC-0315	25	72.1	0.08	3.3	-3.0	80.7 ± 2.2

[1293] 该研究显示,在设定为65℃的加热块中加热脂质溶液和mRNA溶液,在5或7.5mol％DSPS含量下对颗粒直径或ζ电位或mRNA包封读取没有有害作用。图15中示出了温度对DSPS靶向的KC2 LNP的转染的影响,以及与包含SM102和ALC-0315的LNP的比较。5mol％DSPS制剂的mCherry表达是在25℃下制备的完全相同的制剂的2倍高($p<0.05$,T-检验)。在任一温度下制备的具有7.5mol％DSPS的制剂的比较显示没有显著差异。相对于SM102制剂,在65℃下制备的包含5mol％DSPS的LNP在mCherry表达方面产生6.5倍的提高。可能较高的温度提高了DSPS在醇中的溶解度并允许脂质更好地并入到颗粒中,在该体外研究中这允许增强摄取,同时不会不利地影响许多LNP关键颗粒特征,例如尺寸、包封或mRNA表达。

[1294] 实施例25.对含和不含DSPS的LNP中的UO1、UO6和7进行比较

[1295] 本研究的目的是评价在含和不含7.5mol％DSPS的LNP中的AKG-UO-6(“UO-6”)和AKG-UO-7(“UO-7”)。先前,发现从UO-1系列中7.5mol％DSPS产生最佳的LNP。在此选择7.5mol％DSPS作为所包含DSPS的初始量,以比较结构上相似的如实施例9中所述进行制备并如实施例10中所述进行分析的UO-6和UO-7LNP。

[1296] LNP包含50mol％的UO-1、UO-6或UO-7作为ICL。该制剂还包含38.5mol％胆固醇和1.5mol％PEG-DMG。不含DSPS的样品具有10mol％DSPC,并且向包含7.5mol％DSPS的LNP中添加7.5mol％的DSPS并包含2.5mol％的DSPC。所有制剂中的N/P为5。如实施例11中所述,在鼠树突细胞中评价转染效率。

[1297] 表21.有和没有DSPS靶向的UO-1、UO-6和UO-7LNP的物理化学特性和包封效率。

[1298]

LNP 制剂	颗粒尺寸 (nm)	PDI	ζ电位 mV, pH 5	ζ电位 mV, pH 7	包封效率 (%)
UO1	72.8	0.11	14.5	5.6	89.6 ± 4.8
UO1_7.5%_DSPS	80.5	0.03	13.9	-2.4	91.4 ± 4.2
UO6	72.0	0.22	14.9	4.2	90.5 ± 11.1
UOUO6_7.5%_DSPS	86.1	0.13	14.3	1.7	92.8 ± 11.1
UO7	79.3	0.16	18.2	-2.6	91.4 ± 2.5
UO7_7.5%_DSPS	94.3	0.13	16.9	-5.3	92.3 ± 5.0

[1299] 该研究显示,在基于UO1、UO6和UO7的LNP中包含DSPS引起mCherry表达提高,而颗

粒尺寸或mRNA包封没有不利变化。对于用三种不同ICL(UO-1、UO-6和UO-7)制备的制剂,示出了并入到LNP中的7.5%DSPS对树突细胞转染活性的影响(图16)。对于具有7.5mol%DSPS的UO-1,mCherry表达是具有7.5mol%DSPS的UO6的11倍高,并且是具有7.5mol%DSPS的UO7的7倍高。具有DSPS的UO-7的mCherry表达是具有DSPS的UO6的1.5倍高。在不含DSPS的制剂中,UO7的活性是UO1的2.2倍高并且活性是UO6的1.9倍高。然而,用所有三种ICL制备的LNP维持了良好的包封效率、颗粒尺寸和ζ电位,同时受益于包含在制剂中的DSPS的靶向性。

[1300] 实施例26.在MutuDC1940树突细胞系中通过比较颗粒特征和活性来评价向基于UO1、SM102和ALC-0315的LNP中添加DSPS的作用。

[1301] 本研究的目的是评价将DSPC的L-异构体以0、5%和7.5mol%包含到mRNA LNP制剂中的作用。如实施例9中所述在25℃下制备LNP,并如实施例10中所述进行分析。

[1302] LNP包含50mol%的AKG-UO-1("UO-1")或SM102作为ICL。对于UO1和SM102,制剂包含38.5mol%的胆固醇和1.5mol%的PEG-DMG。不含DSPS的样品具有10mol%的DSPC,并向含DSPS的LNP中添加5或7.5mol%的DSPS,并且同时将DSPC降低相同的mol%。对于ALC-0315制剂,ICL为46.3mol%,DSPC为9.4mol%,胆固醇为42.7mol%,并且PEG-DMG为1.5mol%。如上添加DSPS,并且同时降低DSPC mol%。所有制剂中的N/P为5。如实施例11中所述,在鼠树突细胞中评价转染效率。

[1303] 表22.包含UO1、SM102和ALC-0315的LNP的PS靶向制剂的物理化学特性和包封效率

[1304]

LNP 制剂	颗粒尺寸 (nm)	PDI	ζ电位 mV, pH 5	ζ电位 mV, pH 7	包封效率 (%)
UO1	72.8	0.11	10.2	3.6	89.6 ± 4.8
UO1_5%_DSPS	83.0	0.11	9.9	-2.7	91.4 ± 4.2
UO1_7.5%_DSPS	80.5	0.03	11.0	1.4	91.1 ± 6.3
SM102	80.7	0.04	13.0	1.6	90.1 ± 5.6
SM102_5%_DSPS	81.0	0.02	13.1	-6.1	90.5 ± 1.4
SM102_7.5%_DSPS	80.1	0.05	13.0	-4.0	90.1 ± 2.7
ALC0315	74.6	0.06	6.2	-0.9	72.3 ± 0.9
ALC0315_5%_DSPS	68.1	0.10	8.0	-8.8	84.2 ± 1.3
ALC0315_7.5%_DSPS	75.0	0.02	7.9	-11.8	84.9 ± 3.8

[1305] 该研究显示,在基于UO1、SM102和ALC-0315的LNP中包含DSPS引起mCherry表达的提高(图17),而颗粒尺寸或mRNA包封没有不利变化。对于UO-1和SM102,5mol%DSPS看起来最大,而对于ALC-0315制剂,7.5mol%DSPS最大。对于UO-1和SM102,5mol%DSPS样品的表达分别提高18.1和58.7倍。对于基于ALC-0315的7.5mol%DSPS的样品提高80.9倍。

[1306] 实施例27.另外的示例性磷脂酰-L-丝氨酸靶向LNP制剂。

[1307] 使用上述实施例中描述的方法也可以制备以下示出的另外的制剂。所有脂质浓度均以LNP中总脂质的百分比mol%表示。以下组成这样变化:缀合的脂质含量为0.5至2.5mol%,甾醇含量为25至45mol%,ICL含量为40至65mol%,饱和磷脂酰-L-丝氨酸含量为2至10mol%,以及总非阳离子磷脂含量为5至20mol%。大多数组合物包含两种磷脂,通常是

磷脂酰-L-丝氨酸(DSPS或DPPS是优选的)和磷脂酰胆碱,但是一些示例性制剂可包含超过两种磷脂,包括磷脂酰乙醇胺,如二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

[1308] 表23.示例性的包含磷脂酰-L-丝氨酸的LNP制剂

制剂 (#)	可电离阳离子脂质 (mol %)	PS (mol %)	另外的磷脂 (mol %)	甾醇 (mol %)	缀合的脂质 (mol %)
1	AKG-UO-1 (47.5)	DSPS (7.5)	DSPC (3.5)	Chol (40)	PEG-DMG (1.5)
2	AKG-UO-1 (45)	DSPS (8)	DSPC (4)	Chol (42)	PEG-DMG (1)
3	AKG-KC2-01 (40)	DSPS (5)	DSPC (5) DOPE (5)	Chol (44)	PEG-DMG (1)
4	AKG-KC2-01 (42.5)	DSPS (7.5)	DSPC (6.5)	Chol (42)	PEG-DMG (1.5)
5	AKG-KC2-01 (65)	DSPS (7.5)	DSPC (2.5)	Chol (24.5)	PEG-DMG (0.5)
6	AKG-KC2-01 (60)	DSPS (6)	DSPC (4)	Chol (29)	PEG-DMG (1)
7	AKG-KC2-01 (55)	DSPS (7)	DSPC (3)	Chol (34)	PEG-DMG (1)
8	AKG-KC2-01 (57)	DSPS (6.5)	DSPC (3.5)	Chol (28)	PEG-DMG (1)
9	AKG-KC2-01 (60)	DSPS (7.5)	DSPC (2.5) DOPE (4)	Chol (28.5)	PEG-DMG (1.5)
10	AKG-KC2-01 (48)	DSPS (6)	DSPC (4)	Chol (41.5)	PEG-DMG (0.5)
11	AKG-KC2-01 (48)	DPPS (6)	DSPC (4)	Chol (41.5)	PEG-DMG (0.5)
12	AKG-KC2-01 (48)	DSPS (6)	DPPC (4)	Chol (41.5)	PEG-DMG (0.5)
13	AKG-KC2-PA (47.5)	DSPS (6)	DSPC (4)	Chol (41.5)	PEG-DMG (1)
14	AKG-KC2-PA(47.5)	DPPS (6)	DSPC (4)	Chol (41.5)	PEG-DMG (1)
15	AKG-KC2-PA(47.5)	DSPS (6)	DPPC (4)	Chol (41.5)	PEG-DMG (1)
16	AKG-UO-04 (48)	DSPS (7.5)	DSPC (2.5)	Chol (41.5)	PEG-DMG (0.5)
17	AKG-UO-04 (48)	DPPS (7.5)	DSPC (2.5)	Chol (41.5)	PEG-DMG (0.5)
18	AKG-UO-04 (48)	DSPS (7.5)	DPPC (2.5)	Chol (41.5)	PEG-DMG (0.5)
19	AKG-UO-1 (47.5)	DSPS (7.5)	DSPC (4.5)	Chol (39)	PEG-DMG (1.5)
20	AKG-UO-1 (47.5)	DPPS (7.5)	DSPC (4.5)	Chol (39)	PEG-DMG (1.5)
21	AKG-UO-1 (47.5)	DSPS (7.5)	DSPC (2.5)	β-谷甾醇 (42)	PEG-DMG (0.5)
22	AKG-UO-1 (50)	DSPS (7.5)	DSPC (2.5)	β-谷甾醇 (39)	PEG-DMG (1)
23	AKG-UO-1 (52.5)	DSPS (7.5)	DSPC (2.5)	β-谷甾醇 (39)	PEG-DMG (1)
24	AKG-UO-1 (55)	DSPS (7.5)	DSPC (2.5)	β-谷甾醇 (39)	PEG-DMG (1)
25	AKG-UO-1 (55)	DSPS (7.5)	DSPC (2.5)	Chol (34)	PEG-DMG (1)
26	AKG-UO-1 (57)	DSPS (6.5)	DSPC (3.5) DOPE (4)	Chol (28)	PEG-DMG (1)
27	AKG-UO-1 (52.5)	DSPS (7.5)	DSPC (6.5) DOPE (4)	Chol (28)	PEG-DMG (1.5)
28	AKG-UO-1a (48)	DSPS (8)	DSPC (2)	Chol (41.5)	PEG-DMG (0.5)
29	AKG-UO-7 (48)	DSPS (7)	DSPC (3)	Chol (41)	PEG-DMG (1)
30	AKG-KC3-01 (45)	DSPS (6)	DSPC (4)	Chol (44)	PEG-DMG (1)
31	AKG-KC2-01 (42.5)	DSPS (7.5)	DSPC (6.5)	Chol (42)	PEG-DMG (1.5)
32	AKG-UO-2 (48)	DPPS (8)	DSPC (2)	Chol (41.5)	PEG-DMG (0.5)
33	化合物 29 (48)	DSPS (5)	DSPC (5)	Chol (41.5)	PEG-DMG (0.5)
34	化合物 33 (48)	DSPS (7.5)	DSPC (2.5)	Chol (41)	PEG-DMG (1)

[1309]

[1310] 表23.示例性的包含磷脂酰-L-丝氨酸的LNP制剂(续)

[1311]

制剂 (#)	可电离阳离子脂质 (mol %)	PS (mol %)	另外的磷脂 (mol %)	甾醇 (mol %)	缀合的脂质 (mol %)
35	化合物 29 (50)	DSPS (5)	DSPC (5)	Chol (39)	PEG-DMG (1)
36	化合物 33 (50)	DSPS (7.5)	DSPC (2.5)	Chol (39)	PEG-DMG (1)
37	KC3-OA (48)	DSPS (5)	DSPC (5)	Chol (41.5)	PEG-DMG (0.5)
38	ALC-0315 (46)	DSPS (5)	DSPC (5)	Chol (43)	PEG-DMG (1)
39	ALC-0315 (48)	DSPS (5)	DSPC (5)	Chol (41)	PEG-DMG (1)
40	SM-102 (50)	DSPS (5)	DSPC (5)	Chol (39.5)	PEG-DMG (0.5)
41	SM-102 (50)	DSPS (7.5)	DSPC (2.5)	Chol (39)	PEG-DMG (1)
42	SM-102 (48)	DSPS (5)	DSPC (5)	Chol (41)	PEG-DMG (1)
43	AKG-UO-1 (48)	DSPS (7.5)	-	Chol (43.5)	PEG-DMG (1)
44	AKG-UO-1 (48)	DSPS (7.5)	-	Chol (43.5)	PEG-DMG (1)
45	AKG-KC3-01 (48)	DSPS (5)	DSPC (5)	Chol (26)	PEG-DMG (1)
46	AKG-KC3-01 (48)	DSPS (5)	DOPE (15) DSPC (5) DOPE (10)	Chol (31)	PEG-DMG (1)
47	AKG-KC3-01 (48)	DSPS (6)	DSPC (4)	Chol (40)	PEG-DMG (2)
48	AKG-KC3-01 (48)	DSPS (6)	DSPC (4)	Chol (39.5)	PEG-DMG (2.5)
49	AKG-UO-1 (46)	DSPS (7)	DSPE (5)	Chol (41.5)	PEG-DMG (0.5)
50	AKG-UO-1 (48)	DSPS (7.5)	eggSM (2.5)	Chol (41.5)	PEG-DMG (0.5)
51	AKG-KC3-01 (48)	DSPS (5)	HSPC (5)	Chol (41.5)	PEG-DMG (0.5)
52	AKG-UO-1 (47.5)	DSPS (7.5)	DSPC (2.5)	Chol (42)	PEG-DPG (0.5)
53	AKG-UO-1 (47)	DSPS (7.5)	DSPC (2.5)	Chol (42)	PEG-DPG (1)

[1312] 实施例28.使用mCherry mRNA确定LNP在人树突细胞中的转染效率。

[1313] 在转染之前4天,使用CD14分离试剂盒(StemCell)将单核细胞从健康供体的PMBC中分离。CD14纯度＝90.3%,生存力＝93.2%。将单核细胞与IL-4(R&D 1000IU/mL)和GM-CSF(R&D,800IU/mL)在6孔培养皿中以1×10^6个细胞/mL在37℃、5%CO2下一起培养。在4天之后,将未成熟的DC收获,并以50,000个细胞/孔接种于96孔圆底板中。通过将小瓶置于37℃水浴中30秒或直至样品几乎完全融化来解冻LNP。将小瓶立即置于冰上直至使用。将LNP添加至最终浓度为1μg/ml和0.1μg/ml mRNA。对于1μg/mL处理,将LNP直接添加至每个孔,然后将孔通过移液混合。对于0.1μg/mL处理,将LNP在完全培养基中以1:10稀释,然后添加至每个孔,并通过移液混合。在4小时之后,将成熟细胞因子混合物直接添加至由TNF-a(R&D,10ng/mL)、IL-1b(R&D,2ng/mL)、IL-6(R&D,1000IU/mL)和PGE1(R&D,1μg/mL)组成的每个孔。在24小时之后,将细胞离心,在PBS中洗涤,并通过流式细胞术分析mCherry荧光。使用CytExpert软件进行设门分析。

[1314] 实施例29.在加速氧化条件下可电离阳离子脂质的稳定性

[1315] 本研究的目的是在加速氧化下比较可电离阳离子脂质的稳定性。

[1316] 制备1mM阳离子脂质(KC3、KC3-OA、KC3-PA、KC3-C17和KC3-C17(C8:1))的乙醇(Sigma-Aldrich,目录号459836)储备液,并将其储存在-20℃下。在实验之前,将75μl脂质储备液与75μl超纯水(Rx Biosciences,目录号P01-UPW02-1000)混合,以分别制备0.5mM阳离子脂质和5mM亚油酸。在实验之前,新鲜制备10%H_2O_2(Sigma-Aldrich,目录号H1009)和1mM Fe(III)Cl(Sigma-Aldrich,目录号372870)在水中的合并储备液。为了使H_2O_2和100μM Fe(III)Cl的最终浓度为1%,将15μl的10%H_2O_2/1mM Fe(III)Cl储备液添加至135μl的单独脂质。将脂质体和单独脂质与H_2O_2/Fe(III)Cl在37℃下孵育,并随后在不同时间点(0、24、48、72和96小时)从各样品中取出5μl,并将其溶解在90μl MeOH中用于HPLC分析。使用配有带电荷气溶胶检测器(CAD)和Phenomenex™ Kinetex C8柱(L＝150mm,D＝2.1mm,颗粒尺寸

=1.7μm,100A)的Thermo Scientific Vanquish Flex UHPLC来分析主要脂质峰的降解。表24中列出了UHPLC的操作条件。

[1317] 表24.色谱条件

	HPLC 仪器	Thermo Scientific Vanquish Flex UHPLC
	HPLC 柱	Phenomenex™ Kinetex C8 柱（L= 150 mm，D= 2.1 mm，颗粒尺寸= 1.7 μm，100 A）
	柱温	50℃
	流量	0.5 mL/分钟
	注射体积	5 μL
[1318]	CAD	10 Hz
	运行时间	11 分钟
	样品温度	21℃
	样品溶剂	MeOH
	流动相	流动相 A：在水中的 100 mM 乙酸铵（pH 4）
		流动相 B：甲醇
	流动相程序：	

[1319]

时间，分钟	流动相 A，%	流动相 B，%
-0.5	18	82
0	18	82
1	16	84
4	10	90
6	0	100
9	0	100
10	18	82
11	18	82

[1320] 数据表示为在不同时间点测量的主要脂质峰相对于在时间零测量的脂质峰的百分比。

[1321] 如图18和表25中所示,在用H_2O_2强制氧化下,相对于其他阳离子脂质,KC3显示出最快的降解。

[1322] 表25.过氧化氢对单独可电离阳离子脂质稳定性的作用

[1323]

脂质	主要脂质峰相对于T_0的 %		
	24 小时	48 小时	72 小时
KC3	11.2 ± 1.0	10.5 ± 0.5	0 ± 0
KC3-OA	88.9 ± 0.5	84.6 ± 0.9	79.0 ± 0.1
KC3-PA	62.7 ± 0.1	59.2 ± 0.8	60.2 ± 0.6
KC3-17	92.9 ± 0.3	91.8 ± 1.2	90.2 ± 1.2
KC3-17 (C8:1)	66.1 ± 0.6	58.4 ± 1.5	45.9 ± 4.7

[1324] 实施例30.使用KC3-OA、UO-1或UO-1A脂质制备的LNP在人树突细胞中的转染效率的比较

[1325] 本研究的目的是探索不同ICL在人树突细胞中对转染效率的作用。如实施例9中所述制备LNP,如实施例10中所述表征其颗粒尺寸和ζ电位,并且如实施例28中所述评价其在人树突细胞中的转染效率。LNP使用表26至28中的可电离脂质,并将ICL保持在恒定N/P比为5,PS脂质为0或7.5mol%,并且DSPC磷脂为10或2.5mol%(DSPS和DSPC总共为10mol%),并且胆固醇保持恒定在38.5mol%。

[1326] 表26.实施例30中使用的LNP的物理化学特性。

[1327]

ICL	% DSPS	颗粒尺寸 (nm)	冷冻/解冻后的颗粒尺寸 (nm)	包封效率 (%)
AKG-UO1	0	97.97	122.6	75.4 ± 2.2
AKG-UO1	7.5	93.86	94.16	91.6 ± 2.9
AKG-UO1A	0	84.41	103.2	77.5 ± 0.9
AKG-UO1A	7.5	89.19	91.05	88.7 ± 4.1
KC3-OA	5	93.3	90.0	91.7 ± 3.6

[1328] 表27.对于1μg/mL的靶向UO-1或KC3-OA LNP,人树突细胞中的mCherry表达

[1329]

ICL	% DSPS	MFI	T/NT	Vs KC3-OA LNP (倍)
未处理		1,456 ± 27		
AKG-UO1	0	2,073 ± 180		
AKG-UO1	7.5	22,310 ± 3,915	33.8	16.4
AKG-UO1A	0	1,595 ± 37		
AKG-UO1A	7.5	16,381 ± 899	107.5	22.8
KC3-OA	5	342,442 ± 106,704		

[1330] 表28.对于0.1μg/mL的靶向UO-1或KC3-OA LNP,人树突细胞中的mCherry表达

[1331]

ICL	% DSPS	MFI	T/NT	Vs KC3-OA LNP（倍）
未处理		1,245 ± 3		
AKG-UO1	0	1,385 ± 4		
AKG-UO1	7.5	2,716 ± 233	10.6	25.3
AKG-UO1A	0	1,346 ± 14		
AKG-UO1A	7.5	1,805 ± 79	5.6	66.4
KC3-OA	5	38,385 ± 1,705		

[1332] 使用非靶向LNP和7.5mol％DSPS靶向LNP二者来评价靶向和ICL选择对转染活性的作用(图19)。本研究中使用的三种ICL还具有在使用的特定可电离胺(二甲基氨基乙基或二乙基氨基乙基)方面不同的二酰基结构(UO-1或UO-1A),并因此其有明显的pKa。最终ICL与具有二氧戊环结构和单烯烃的KC3-OA一起使用。对于包含UO-1的LNP或包含UO-1A的LNP二者,当制剂中包含阴离子磷脂DSPS时,其在人树突细胞的转染活性方面有显著改善,在1μg/mL mRNA下为33.8至107.5倍,在0.1μg/mL mRNA下为5.6至10.6倍。这表明了磷脂酰丝氨酸正向影响转染活性的能力。另外,当将DSPS靶向KC3-OA LNP与DSPS靶向UO-1或UO-1ALNP进行比较时,包含KC3-OA的制剂具有多于一个数量级的更大的活性。在1μg/mL下,该差异是16.4至22.8倍,并且在0.1μg/mL下,该转染活性的提高为25.3至66.4倍,这表明包含KC3-OA的制剂在转染人树突细胞方面具有显著更大的活性。

[1333] 实施例31.针对鼠树突细胞中的表达,比较PS靶向LNP中的KC2和KC3家族脂质

[1334] 本研究的目的是探索不同KC2和KC3 ICL在鼠树突细胞中对转染效率的作用。KC2(DLin-KC2-DMA)和KC3(DLin-KC3-DMA)脂质二者均具有亚油酸链,其中每个链具有两个烯烃,但不同之处在于在二氧戊环处的可电离胺基,其中KC2在该位置处具有二甲基氨基乙基,并且KC3在该位置处具有二甲基氨基丙基。所评价的两种另外的变体具有单不饱和烷基链,其中KC3-OA的长度为18个碳并且KC3C17(8:1)具有17个碳。如实施例9中所述制备LNP,如实施例10中所述表征其颗粒尺寸和ζ电位,并且如实施例11中所述评价其在鼠树突细胞中的转染效率。LNP使用表29至30中的可电离脂质,ICL的恒定N/P比为5.25,DPPS(NH4+盐)脂质为0或5mol％,并且DSPC磷脂恒定在10或5mol％(DPPS和DSPC总共为10mol％),并且胆固醇恒定在38.5mol％。

[1335] 表29.实施例31中使用的LNP的物理化学特性。

LNP 制剂	颗粒尺寸 (nm)	冷冻/解冻后的颗粒尺寸（nm）	包封效率 (%)
KC2/DSPC/DSPS	87.8		85.6 ± 4.6
KC3/DSPC	91.2	90.1	95.1 + 5.6
KC3/DSPC/DPPS	90.5	90.2	95.0 ± 9.8
KC3-OA/DSPC	88.4	84.7	96.0 ± 13.1
KC3-OA/DSPC/DPPS	97.7	97.7	96.5 ± 7.3
KC3C17(8:1)/DSPC	85.3	83.0	94.4 ± 6.2
KC3C17(8:1)/DSPC/DPPS	100.2	96.8	94.7 ± 8.4
KC3C17/DSPC	73.9	77.5	95.6 ± 5.5
KC3C17/DSPC/DPPS	85.2	81.4	97.0 ± 8.4

[1336]

[1337] 表30.在鼠树突细胞中的mCherry表达

LNP 制剂	[mRNA] (μg/mL)	MFI	T/NT	vs KC3 LNP (%)
未处理 (UT)		234 ± 6		
KC2/DSPC/DSPS	1	13,570 ± 2,324		17.3 %
KC3/DSPC	1	14,962 ± 711		
	0.3	6,656 ± 125		
KC3/DSPC/DPPS	1	78,539 ± 15,239	5.32	
	0.3	30,525 ± 2,946	4.72	
KC3-OA/DSPC	1	27,513 = 10,579		185 %
	0.3	12,719 ± 1,316		194 %
KC3-OA/DSPC/DPPS	1	163,844 ± 24,614	6.00	209 %
	0.3	85,584 ± 10,863	6.84	282 %
KC3C17(8:1)/DSPC	1	16,075 ± 1,956		108 %
	0.3	6,701 ± 440		101 %
KC3C17(8:1)/DSPC/DPPS	1	145,159 ± 35,387	9.15	185 %
	0.3	61,788 ± 7,404	9.52	203 %
KC3C17DSPC	1	344 ± 15		0.8 %
	0.3	270 ± 8		0.6 %
KC3C17/DSPC/DPPS	1	428 ± 30	1.77	0.3 %
	0.3	330 ± 5	2.64	0.3 %

[1338]

[1339] 使用非靶向LNP和5mol％DSPS靶向LNP二者来评价靶向和ICL选择对转染活性的作用(图20)。本研究中使用的五种ICL还具有在使用的特定可电离胺方面不同的二酰基结构，

并因此其有明显的pKa。该数据显示,具有单个烯烃的两种KC3脂质(KC3OA和KC3C17(8:1))在并入到LNP中时显示出最高的活性。这两种脂质在并入到5mol％DPPS靶向LNP中时显示出:活性是包含KC3脂质的LNP制剂的185％至282％并且转染活性是包含KC2脂质的LNP的1,087％至1,227％。先前,Semple及其同事(Semple et al.,(2010)Nature Biotech.28(2)172-176)已表明,相较于KC3,KC2的活性是6倍高,并且所有脂质是根据这样的理解来设计的:基于对DLinDMA的先前工作(Heyes et al.,(2005)J Control Release 107,276-287),具有两个顺式双键的亚油基脂质的活性显著较低,并因此从未对单不饱和脂质进行评价。在此,使用两种不同的单不饱和ICL(KC3-OA和KC3C17(8:1))的数据清楚地显示出,单不饱和脂质相对于包含二亚油基链的脂质明显更优,并且与包含完全饱和烷基链的那些(KC3C17)(其完全无活性)相比明显更优,甚至在存在DPPS靶向脂质的情况下也是如此。数据还显示出,这些新的脂质显著比先导和从早期工作产生的最具活性的脂质KC2(DLin-KC2-DMA)更有活性。最后,与不含DPPS的类似LNP相比,由这两种单不饱和ICL之一和DPPS二者构成的LNP显示出6至10倍的靶向作用。

[1340] 实施例32.针对人树突细胞中的表达,比较PS靶向LNP中的KC2和KC3家族脂质

[1341] 本研究的目的是探索不同KC2和KC3 ICL在人树突细胞中对转染效率的作用。KC2(DLin-KC2-DMA)和KC3(DLin-KC3-DMA)脂质二者均具有亚油酸链,其中每个链具有两个烯烃,但不同之处在于二氧戊环处的可电离胺基,其中KC2在该位置处具有二甲基氨基乙基,并且KC3在该位置处具有二甲基氨基丙基。所评价的三种另外的变体具有单不饱和烷基链,其中KC3-OA的长度为18个碳、KC3-PA具有16个碳并且KC3C17(8:1)具有17个碳。本研究的目的还是通过使用包含KC3-OA的LNP和包含KC3C17(8:1)的LNP二者对完全饱和的C16 DPPC和完全饱和的DSPC进行比较,来评价PC组分对转染的影响。如实施例9中所述制备LNP,如实施例10中所述表征其颗粒尺寸和ζ电位,并且如实施例11中所述评价其在鼠树突细胞中的转染效率。LNP使用表31至33中的可电离脂质,其中ICL保持恒定在N/P比为5.25和48mol％,包含5mol％的DPPS(NH4+盐)脂质,并且DSPC磷脂恒定在5mol％(DPPS和DSPC/DPPC总共为10mol％),并且胆固醇恒定在38.5mol％。最终的ALC-0315/DSPC制剂由46.3mol％ALC-0315、9.4mol％DSPC、42.7mol％胆固醇和1.56mol％PEG-DMG构成,其N/P为6.2。最终的SM-102/DSPC制剂由50mol％SM-102、10mol％DSPC、38.5mol％胆固醇和1.5mol％PEG-DMG构成,其N/P为5。

[1342] 表31.实施例32中使用的LNP的物理化学特性。

[1343]

LNP 制剂	颗粒尺寸 (nm)	冷冻/解冻后的颗粒尺寸（nm）	包封效率 (%)
KC2/DSPC/DSPS	71.8	69.6	85.4 ± 1.5
KC3-01/DSPC/DPPS	67.9	71.7	84.3 ± 3.6
KC3/DSPC/DPPS	103.4	100.3	91.5 ± 6.2
KC3-OA/DSPC/DPPS	87.9	87.7	92.2 ± 8.6
KC3-OA/DPPC/DPPS	89.8	98.2	91.7 ± 6.3
KC3-PA/DSPC/DPPS	104.7	98.0	90.1 ± 10.3
KC3C17(8:1)/DSPC/DPPS	91.6	92.7	91.7 ± 5.3
KC3C17(8:1)/DPPC/DPPS	86.6	88.7	92.9 ± 2.6
ALC-0315/DSPC	69.8	71.5	88.0 ± 4.1
SM-102/DSPC	82.1	83.4	92.4

[1344] 表32.在1μg/ml下孵育之后,人树突细胞中的mCherry表达

LNP 制剂	MFI	vs KC3 LNP (倍)	vs DPPC LNP (倍)
未处理 (UT)	2,279 ± 129		
KC2/DSPC/DSPS	11,150 ± 1,556	0.08	
KC3-01/DSPC/DPPS	1,149,875 ± 111,037	10.08	2.35

[1345]

KC3-OA/DSPC/DPPS	963,929 ± 95,910	8.44	
KC3-OA/DPPC/DPPS	412,204 ± 37,299	3.60	
KC3-PA/DSPC/DPPS	757,849 ± 95,345	6.64	
KC3C17(8:1)/DSPC/DPPS	534,708 ± 80,921	4.68	3.60
KC3C17(8:1)/DPPC/DPPS	149,980 ± 34,195	1.30	
KC3/DSPC/DPPS	116,155 ± 30,093	1.00	
ALC-0315/DSPC	10,327 ± 1,916	0.07	
SM-102/DSPC	258,967 ± 16,828	2.25	

[1346] 表33.在0.1μg/ml下孵育之后,人树突细胞中的mCherry表达

[1347]

LNP 制剂	MFI	vs KC3 LNP（倍）	vs DPPC LNP（倍）
未处理 (UT)	2,502 ± 293		
KC2/DSPC/DSPS	3,048 ± 193	0.09	
KC3-01/DSPC/DPPS	46,489 ± 4,173	7.45	
KC3-OA/DSPC/DPPS	44,197 ± 4,407	7.06	2.61
KC3-OA/DPPC/DPPS	18,485 ± 1,488	2.71	
KC3-PA/DSPC/DPPS	35,177 ± 3,396	5.53	
KC3C17(8:1)/DSPC/DPPS	25,044 ± 2,144	3.82	2.82
KC3C17(8:1)/DPPC/DPPS	10,499 ± 979	1.35	
KC3/DSPC/DPPS	8,409 ± 660	1.00	
ALC-0315/DSPC	3,783 ± 1,090	0.22	
SM-102/DSPC	9,177 ± 1,494	1.13	

[1348] 使用非靶向LNP和5mol％DPPS靶向LNP二者来评价靶向和ICL选择对转染活性的作用(图21)。本研究中使用的五种ICL具有在使用的特定可电离胺方面不同的二酰基结构。该数据显示,具有单一烯烃的三种KC3脂质(KC3OA、KC3-PA和KC3C17(8:1))、或在两个烯烃之间具有四个亚甲基的多不饱和KC3-01脂质在并入到LNP中时显示出最高的活性(表32和33)。在人树突细胞中,这四种脂质与包含KC3的LNP相比显示出在1μg/ml下在转染活性方面的4.7至10.8倍提高,以及在0.1μg/ml下的3.8至7.5倍提高。当与包含KC2的靶向LNP相比时,所述提高进一步为10至12倍高。KC2和KC3二者均含有亚油酰基烷基链(被一个亚甲基隔开的两个烯烃)。先前,Semple及其同事(Semple et al.,(2010)Nature Biotech.28(2)172-176)已表明,相较于KC3,KC2的活性是6倍高,并且所有脂质是根据这样的理解来设计的:基于对DLinDMA的先前工作(Heyes et al.,(2005)J Control Release 107,276-287),具有两个顺式双键的亚油基脂质的活性显著较低,并因此从未对单不饱和脂质进行评价。在此,使用3种不同的单不饱和ICL(KC3-OA、KC3-PA和KC3C17(8:1))的数据清楚地显示出,单不饱和脂质明显优于包含二亚油基链的脂质。然而,当使用在两个烯烃之间具有4个亚甲基的KC3-01 ICL时,在两种浓度下都有最大的改善。数据还显示出,这些新的脂质显著比先导和从该早期工作产生的最具活性的脂质KC2(DLin-KC2-DMA)更有活性,并且显著比包含ALC-0315或SM-102的LNP更有活性。最后,用C16 DPPC或C18 DSPC作为磷脂酰胆碱组分,对由DPPS和KC3-OA或KC3-C17(8:1)ICL二者构成的DPPS靶向LNP中的两者进行评价。对于两组制剂,与DPPC制剂相比,包含DSPC的制剂在人树突细胞中显示出更高的转染活性,在0.1μg/mL下为2.61至2.82倍高,在1μg/mL下为2.35至3.60倍高。这表明,当与较低相变脂质如DPPC相比时,包含DSPC的LNP提供了更高的转染活性。

[1349] 实施例33.PS靶向LNP中的ICL浓度对人树突细胞中的表达的影响

[1350] 本研究的目的是探索DSPS靶向LNP中的KC3-OA浓度对人树突细胞中的转染效率的作用。KC3-OA的浓度从46至54mol％变化,同时保持DSPS和DSPC浓度各自恒定在5mol％,并且PEG-DMG在1.5mol％。KC3OA％的提高与胆固醇％的成比例降低是相称的。还评价了ALC-0315和SM-102比较物制剂。最终的ALC-0315/DSPC制剂由46.3mol％ALC-0315、9.4mol％

DSPC、42.7mol％胆固醇和1.56mol％PEG-DMG构成,其N/P为6.2。最终的SM-102/DSPC制剂由50mol％SM-102、10mol％DSPC、38.5mol％胆固醇和1.5mol％PEG-DMG构成,其N/P为5。

[1351] 如实施例9中所述制备LNP,如实施例10中所述表征其颗粒尺寸和ζ电位,并且如实施例28中所述评价其在鼠树突细胞中转染效率。

[1352] 表34.包含多种浓度的KC3-OA的DSPS靶向KC3-OALNP的物理化学特性和表征

[1353]

LNP 制剂	颗粒尺寸 (nm)	冷冻/解冻后的颗粒尺寸（nm）	包封效率 (%)
SM-102/DSPC	71.0	74.1	84.1 ± 10.7
ALC-0315/DSPC	63.0	62.3	89.0 ± 5.9
KC3-OA (46)/DSPC/DSPS	101.9	110.0	94.1 ±10.0
KC3-OA(48)/DSPC/DSPS	96.9	110.6	93.8 ± 16.8
KC3-OA(50/DSPC/DSPS	109.0	108.0	93.1 ± 14.4
KC3-OA(52)/DSPC/DSPS	108.6	110.9	93.8 ± 10.0
KC3-OA(54)/DSPC/DSPS	121.2	122.8	93.8 ± 17.0

[1354] 所有DSPS靶向KC3-OA制剂都显示出约100至120nm的颗粒尺寸和大于90％的包封效率。-80℃下的所有颗粒对于冷冻和解冻是稳定的。使用的在46至54mol％范围内的KC3-OA浓度对这些特性没有明显影响。表35.在包含多种浓度的KC3-OA的DSPS靶向KC3-OA LNP在1μg/ml下孵育之后,人树突细胞中的mCherry表达

[1355]

LNP 制剂	MFI	vs SM-102（倍）	vs ALC-0315（倍）
未处理 (UT)	1,343 ± 104		
SM-102/DSPC	4,242 ± 1,942		
ALC-0315/DSPC	3,760 ± 1,625		
KC3-OA (46)/DSPC/DSPS	100,521 ± 44,930	34	41
KC3-OA(48)/DSPC/DSPS	116,994 ± 52,141	40	48
KC3-OA(50/DSPC/DSPS	107,911 ± 46,614	37	44
KC3-OA(52)/DSPC/DSPS	67,845 ± 37,779	23	28
KC3-OA(54/DSPC/DSPS	101,338 ± 46,945	34	41

[1356] 表36.在包含多种浓度的KC3-OA的DSPS靶向KC3-OALNP在0.1μg/ml下孵育之后,人树突细胞中的mCherry表达

[1357]

LNP 制剂	MFI	vs SM-102（倍）	vs ALC-0315（倍）
未处理 (UT)	1,295 ± 116		
SM-102/DSPC	1,492 ± 26		
ALC-0315/DSPC	1,405 ± 28		
KC3-OA (46)/DSPC/DSPS	6,915 ± 1,659	29	51
KC3-OA(48)/DSPC/DSPS	10,491 ± 3,164	47	84
KC3-OA(50/DSPC/DSPS	11,033 ± 3,043	49	89
KC3-OA(52)/DSPC/DSPS	8,393 ± 2,447	36	65
KC3-OA(54)/DSPC/DSPS	7,496 ± 1,855	31	57

[1358] 使用由浓度为46至54mol％的KC3-OA构成的5mol％DSPS靶向LNP来评价靶向和ICL选择对转染活性的作用(图22)。在0.1和1μg/mL二者下,该靶向组合物在所有KC3-OA浓度下均具有高活性,并且仅在48至50mol％的KC3-OA下显示出轻微的峰。然而,该DSPS靶向KC3-OA LNP制剂的所有变体显著比SM-102/DSPC或ALC-0315/DSPC对照更有活性(表34至36)。

[1359] 实施例34.PS靶向LNP的N/P比对人树突细胞中的表达的影响

[1360] 本研究的目的是探索DSPS靶向KC2-01 LNP的不同N/P比对人树突细胞中转染效率的作用。N/P比从4至7变化,同时保持DSPS和DSPC的浓度各自恒定在5mol％,KC2-01的浓度恒定在50mol％,并且PEG-DMG在1.5mol％。还评价了ALC-0315和SM-102比较物制剂。最终的ALC-0315/DSPC制剂由46.3mol％ALC-0315、9.4mol％DSPC、42.7mol％胆固醇和1.56mol％PEG-DMG构成,其N/P为6.2。最终的SM-102/DSPC制剂由50mol％SM-102、10mol％DSPC、38.5mol％胆固醇和1.5mol％PEG-DMG构成,其N/P为5。

[1361] 如实施例9中所述制备LNP,如实施例10中所述表征其颗粒尺寸和ζ电位,并且如实施例28中所述评价其在鼠树突细胞中的转染效率。

[1362] 表37.不同N/P比下的包含KC2-01的DSPS靶向KC2-01 LNP的物理化学特性和表征

[1363]

LNP 制剂	颗粒尺寸	冷冻/解冻后的颗粒尺寸（nm）	包封效率 (%)
KC2-O1 (N/P=4)	85.4	91.3	83.2 ± 4.7
KC2-O1/DSPS (N/P=4)	84.1	90.2	85.5 ± 3.9
KC2-O1 (N/P=5)	84.9	87.0	88.0 ± 4.7
KC2-O1/DSPS (N/P=5)	80.91	88.0	88.3 ± 4.0
KC2-O1 (N/P=6)	81.1	84.0	88.0 ± 1.3
KC2-O1/DSPS (N/P=6)	82.2	88.0	89.6 ± 2.7
KC2-O1 (N/P=7)	75.7	84.0	89.0 ± 3.1
KC2-O1/DSPS (N/P=7)	79.5	81.5	88.8 ± 4.1

[1364] 所有DSPS靶向KC2-01制剂都显示出约76至85nm的颗粒尺寸和大于80％的包封效率。-80℃下的所有颗粒对于冷冻和解冻是稳定的。使用的在4至7范围内的N/P对这些特性

没有明显影响。

[1365] 表38.在多种N/P比下包含KC2-01的DSPS靶向KC2-01 LNP在0.1μg/ml下孵育之后，人树突细胞中的mCherry表达

[1366]

LNP 制剂	MFI	T/NT	vs N/P=4
未处理 (UT)	1,245 ± 3		
KC2-O1 (N/P=4)	2,077 ± 40		
KC2-O1/DSPS (N/P=4)	12,466 ± 2,359	13.5	1
KC2-O1 (N/P=5)	1,966 ± 163		
KC2-O1/DSPS (N/P=5)	35,574 ± 13,780	47.6	3.1
KC2-O1 (N/P=6)	3,389 ± 1,157		
KC2-O1/DSPS (N/P=6)	29,617 ± 3,345	13.2	2.5
KC2-O1 (N/P=7)	5,852 ± 1,961		
KC2-O1/DSPS (N/P=7)	39,097 ± 6,398	8.2	3.4

[1367] 使用比率为4至7的由KC2-01构成的5mol％DSPS靶向LNP来评价靶向和N/P比对转染活性的作用(图23)。该靶向组合物在所有N/P比下均具有高活性，但从N/P为5至N/P为4确实显示出约3倍的降低。靶向与非靶向(T/NT)比在N/P＝5时显示出清晰的峰(表38)。

[1368] 实施例35.可电离脂质对SARS-CoV-2刺突蛋白mRNA疫苗构建体的免疫原性的影响。

[1369] 小鼠和研究设计。雌性BALB/c小鼠购自Charles River Laboratories，使其在动物饲养所中适应至少4天，并在研究开始时为6至8周龄。在研究的第(study day，SD)0天，对小鼠的左后方大腿中肌内注射在50μL体积中的1μg疫苗候选物(量是指mRNA)。研究组由5只小鼠组成，并包括载剂对照、比较物疫苗和实验疫苗候选物。21天之后，给予小鼠相同疫苗候选物的第二次注射。通过下颌下穿刺或末端地通过心脏穿刺收集血液，并在SD 21和34(加强之后+13天)从小鼠中分离血清或血浆。将样品储存在-80℃下直至进行抗体效价分析。

[1370] mRNA的设计和制备。编码SARS-CoV-2全长刺突蛋白并且侧翼是BNT162b2(Comirnaty)疫苗中使用的相同UTR的mRNA购自Vernal Biosciences。所有尿苷核苷都用N1-甲基-假尿苷替换。为了产生mRNA，将编码mRNA序列的合成基因(VRN029;SEQ ID NO:2，图13A)克隆到DNA质粒中。合成基因由RNA启动子、5’非翻译区、SARS-COV2刺突蛋白受体结合结构域、3’非翻译区和约120A的poly(A)尾区构成。质粒在大肠杆菌(E.coli)的培养物中繁殖并扩增，并随后经由阴离子交换色谱从澄清的大肠杆菌裂解物中分离。使用在poly(A)尾编码区末端处的位点处进行切割的II型限制酶使所纯化的质粒线性化。然后将该质粒在具有核苷酸三磷酸、RNA聚合酶和RNA酶抑制剂的缓冲液中孵育。为了停止反应，添加DNA酶I来消化线性质粒模板。然后将未加帽的RNA使用色谱进行纯化，并随后在另外的具有GTP、S-腺苷甲硫氨酸、鸟苷酸转移酶(guanalyltransferase)、2’-O-甲基转移酶和RNA酶抑制剂的缓冲液中孵育。然后将加帽的mRNA使用色谱进行纯化，将缓冲液交换成水，并填充到小瓶中。

[1371] 包含mRNA的脂质纳米粒(LNP)的产生。制备每种脂质的储备溶液。在4mL玻璃小瓶(Thermo B7999-2)中称出可电离脂质,并将其溶解在乙醇(Sigma-Aldrich 200proof,不含RNA酶)中至最终浓度为10mM。称出其他脂质例如DSPC(Avanti Polar Lipids)、胆固醇(Dishman)和PEG-DMG(NOF),并将其溶解在乙醇中至浓度为1mM。将DSPS-Na(NOF)以1mM的浓度溶解在甲醇(Sulpelco,Omnisolve)中并短暂加热至70℃以完成其溶解。将DPPS-NH4(Avanti Polar Lipids)直接溶解在乙醇中,并在室温下与其他脂质组分一起并入。

[1372] 通过以下制备每种单独LNP的脂质混合物:将所期望体积的每种脂质储备溶液添加至新的小瓶,如果需要的话则添加乙醇,以达到1.2mL的最终体积。所有制剂具有5mol%的PC和PS组分、40.5mol%的胆固醇、1.5mol%的PEG-DMG、48mol%的ICL,并且恒定N/P比为5.25。例如,KC3-PA/DPPC/DPPS/Chol/PEG-DMG(48/5/5/40.5/1.5mol%)的LNP制剂,其在N/P为5.25的情况下针对使用的每100μg mRNA包含1575nmol KC3-PA、164.1nmol DPPC、164.1nmol DPPS、1296.1nmol Chol和82nmol PEG-DMG。通过解冻经冷冻的mRNA(SARS-CoV-2刺突mRNA,Vernal)小瓶并将mRNA在6.25mM乙酸钠(pH 5.0)中稀释至0.033mg/mL的最终浓度来制备mRNA溶液,其中浓度通过Nanodrop上的吸光度来确定。

[1373] 为了制备LNP,使用了NanoAssemblr台式微流体装置(来自Precision Nanosystems)。如果LNP包含DSPS,则使用设置为70℃的加热块附件,否则在室温下混合LNP。将3mL mRNA溶液装载到3mL一次性注射器(BD 309656)中,并将1ml脂质混合物装载到1ml注射器(BD309659)中,并置于NanoAssemblr加热块中持续4分钟,随后进行混合。通过将液体流以6mL/分钟的混合速度以3:1的水:醇体积比泵送经过一次性微流体盒来实现LNP形成。在混合之后,收集3.6mL LNP混合物,同时丢弃0.35mL初始混合体积和最终的0.05mL混合物。通过使用SpectraPor透析管(12至14k MWCO)在PBS(Cytivia,SH30256.01)中进行缓冲液交换来除去乙醇。通常将LNP交换到PBS,pH 7.4中,并随后到15mM Tris,pH 7.4,20%蔗糖中,浓缩至20至50μg/mL mRNA,无菌过滤(Thermo Nalgene 0.2um#720-1320),然后通过浸入液氮中冷冻5分钟,并在-20℃下长期储存。对于该研究,将样品浓缩至>40μg/mL mRNA,并用不同体积的15mM Tris、20%蔗糖、pH 7.4稀释至40μg mRNA的靶浓度,并随后在LN2上冷冻。LNP的表征是在将LNP的等分试样解冻并用pH 7.4的15mM Tris以1:1(体积:体积)稀释使得最终浓度为在15mM Tris,10%蔗糖,pH 7.4中的20μg/mL mRNA之后进行的。这模拟了通过IM注射将50μL体积中的1μg mRNA注射到后肢来向动物给药之前进行的样品制备的条件。

[1374] LNP表征。LNP内的mRNA包封和mRNA浓度使用Ribogreen测定来测量。纳米粒尺寸和ζ电位通过zetasizer(Malvern)来测量。

[1375] SARS-CoV-2抗刺突抗体效价。进行标准间接ELISA来分析血清样品中针对SARS-CoV-2刺突蛋白的总IgG结合抗体。用在pH 7.4的1×PBS中稀释至5nM的75μL SARS-CoV-2(Wuhan-Hu-1)刺突蛋白(Sino Biological,目录号40589-V08B1)包被Nunc MaxiSorp 96孔板,覆盖并在4℃下静态孵育16至18小时。通过使用BioTek 405TS洗板机,用300μL PBS+0.05%吐温20将板洗涤3×来除去未结合的包被抗原。然后将板在PBS+5%w/v脱脂乳(Research Products International,目录号M17200-1000.0)中在37℃下封闭1小时。将测试和阳性对照样品在测定稀释液(PBS、0.05%吐温-20、1%w/v脱脂乳)中稀释至1:20或1:40的起点稀释度,随后使用U型底稀释板进行四倍系列稀释。一旦封闭完成,则通过倒置除

去封闭缓冲液,将板用纸巾吸干,并将各样品一式两份地进行平板接种。将板在37℃下静态孵育2小时,随后用300μL洗涤3×。将在测定稀释液中的100μL的第二检测抗体(山羊抗小鼠-HRP IgG,Abcam,目录号ab6789)以1:10,000的稀释度(1.33nM浓度)添加至每个孔。将板在室温下静态孵育30分钟,并随后通过平板倒置然后用300μL洗涤3×除去未结合的抗体。为了显影,将100μL的室温一步超TMB底物(ThermoFisher,目录号34028)添加至每个孔,并在10分钟之后用50μL TMB终止液(ThermoFisher,目录号SS04)终止反应。将板用BioTek Synergy Neo 2分光光度计在450nm下在30分钟内进行读取。效价被定义为在效价曲线的线性部分产生吸光度信号的稀释度的倒数。

[1376] 表39.用于评价SARS-CoV-2刺突蛋白mRNA疫苗构建体的免疫原性的LNP的物理化学特性

[1377]

LNP 制剂	颗粒尺寸 (nm)	ζ电位 (mV) pH 5	ζ电位 (mV) pH 7	包封效率(%)
KC3/DPPS-NH4/DPPC/ PEG-DMG	98.2	5.2	-3.2	87.4 ± 7.4
KC3-OA/DPPS-NH4/DPPC/ PEG-DMG	73.7	11.8	-2.6	91.2 ± 5.5
KC3-OA/DSPS/DSPC/ PEG-DMG	97.3	7.4	-3.7	87.7 ± 5.9
KC3-PA/DPPS-NH4/DPPC/ PEG-DMG	89.7	8.4	-1.0	88.0 ± 4.3
KC3-PA/DSPS/DSPC/ PEG-DMG	87.8	9.0	-2.9	91.8 ± 8.2

[1378] 为了评价可电离脂质组成对mRNA-LNP免疫原性的影响,用包含不同可电离脂质(KC3、KC3-OA和KC3-PA)的mRNA-LNP免疫接种BALB/c小鼠。在初免之后第21天和加强之后第13天(研究的第34天)收集血清。通过ELISA确定抗刺突结合IgG抗体总效价。将抗体效价倒数数据进行对数转换,随后进行统计学分析。使用单因素ANOVA和Dunnett多重比较事后检验对组进行比较。在初免之后第21天(图24A)和加强之后第13天(研究的第34天)(图24B)二者,使用可电离脂质KC3-OA或KC3-PA制备的LNP与包含二亚油基KC3(DLin-KC3-DMA或仅KC3)的LNP相比诱导了更好的抗体应答。

[1379] 实施例36.DPPS和DSPS的铵盐的制备

[1380] 将1.5g PS钠盐(DPPS-Na或DSPS-Na)溶解在500ml按体积计1:3:1的$CHCl_3$:甲醇:水(CMW)中。用在水中的1M NH_4Cl来在分液漏斗中制备单相溶液。搅拌3至5分钟,如果PS没有完全溶解则施加最小的热量。添加CHC13和蒸馏水(各约200mL),并将漏斗摇动2至3分钟,直至实现清晰的两相分配。将底层收集,并用CMW 1:1:1(按体积计)和在水中的1M NH_4Cl重新分配。将底层收集,并用新鲜的甲醇-水(甲醇体积为$CHCl_3$体积的50%,并且水体积为氯仿和甲醇总体积的20%)将其洗涤2×,直至实现清晰的两相分配。在真空下除去溶剂,并由环己烷冷冻干燥。产量1.2g。

[1381] 实施例37.磷脂酰丝氨酸盐在乙醇中的表观溶解度

[1382] 通过摇瓶技术来确定磷脂酰丝氨酸盐在乙醇中的表观溶解度。从Avanti Polar Lipids(Alabama,USA)获得呈粉末形式的磷脂酰丝氨酸的钠盐和铵盐。将磷脂酰丝氨酸盐粉末的等分试样一式三份地置于12×75硼硅酸盐玻璃管中。添加3ml 200标准乙醇(目录号E-7023,MilliporeSigma,USA),将管用聚乙烯扣帽封闭,使用涡旋混合器搅拌10至15秒以获得均匀的混悬液,并在室温(20℃至22℃)下置于振动平台上水平位置过夜。在孵育结束时的环境温度为20.4℃至20.9℃。在孵育24小时之后,目视检查混悬液中固相的存在,使其在重力下沉降,并使上清溶液通过0.2-μm PTFE注射器膜过滤器。将初始的0.5ml滤液丢弃,收集接下来的1ml滤液,并通过磷脂磷酸测定如下来对滤液中的磷脂酰丝氨酸进行定量:取滤液的20μL等分试样一式三份地放入玻璃管中,在70℃下在氩气流中蒸发乙醇,并将剩余物在60μL浓硫酸和20μL 30%过氧化氢的混合物中在180℃至190℃下消化10分钟。将经消化的样品用1mL去离子水稀释,添加20μL 10%亚硫酸钠以破坏任何剩余的过氧化物,并将样品在沸水浴中孵育15分钟,以水解任何缩合的磷酸盐种类。将样品冷却至室温,与0.2mL 2%(w/w)钼酸铵溶液和20μL 10%(w/w)抗坏血酸溶液混合,在沸水浴中孵育10分钟,并在室温下在水浴中冷却。使用五点标准曲线根据形成的蓝色磷钼酸在825nm下的光密度来确定磷酸盐的浓度,该五点标准曲线来自由NIST可追踪的商业磷酸盐标准溶液制备的同时运行标准,所述商业磷酸盐标准溶液被稀释至覆盖0至2mM磷酸盐的范围(决定系数R^2>0.9999)。磷脂酰丝氨酸盐的溶解度以磷脂酰丝氨酸的摩尔浓度单位表示(表40)。数据为平均值±SD(N=3)。

[1383] 表40.在室温下磷脂酰丝氨酸盐在100%乙醇中的溶解度。

[1384]

磷脂酰丝氨酸盐	溶解度 , mM 磷脂酰丝氨酸
DSPS 钠	0.111 ± 0.009
DPPS 钠	0.201 ± 0.004
DSPS 铵	0.034 ± 0.004
DPPS 铵	0.865 ± 0.060

[1385] 二棕榈酰磷脂酰丝氨酸(DPPS)铵盐出乎意料地显示出是二硬脂酰磷脂酰丝氨酸(DSPS)铵盐或这些化合物中任一者的钠盐的数倍高的乙醇溶解度。

[1386] 实施例38.PEG-硬脂酸、N/P和ICL在人树突细胞中对转染效率的影响

[1387] 本研究的目的是在人树突细胞中探索DSPS靶向LNP中的不同KC3-OA浓度和N/P比对转染效率的作用。另外,比较了用1和3mol%总脂质下的PEG-硬脂酸(PEG-SA)(BroadPharm,BP-26262)替代PEG-DMG的作用。

[1388] KC3-OA的浓度从45至48mol%变化,同时保持DSPS和DSPC浓度各自恒定在5mol%,并且PEG-DMG在1.5mol。KC3OA%的提高与胆固醇的%的成比例降低是相称的。N/P以0.5的增量从5至6.5变化,同时保持45mol%KC3OA恒定。在某些情况下,将PEG-DMG用PEG-硬脂酸替代。还评价了ALC-0315和SM-102比较物制剂。最终的ALC-0315/DSPC制剂由46.3mol%ALC-0315、9.4mol%DSPC、42.7mol%胆固醇和1.56mol%PEG-DMG构成,其N/P为6.2。最终的SM-102/DSPC制剂由50mol%SM-102、10mol%DSPC、38.5mol%胆固醇和1.5mol%PEG-DMG构

成,其N/P为5。

[1389] 如实施例9中所述制备LNP,如实施例10中所述表征其颗粒尺寸和ζ电位,并且如实施例28中所述评价其在人树突细胞中的转染效率。

[1390] 表41.实施例38中使用的多种N/P比、多种ICL浓度和PEG-SA浓度下的DSPS靶向KC3-OA LNP的物理化学特性和表征

[1391]

LNP 制剂	颗粒尺寸 (nm)	ζ电位 (mV) pH 5	ζ电位 (mV) pH 7	包封效率 (%)
KC3-OA, 5 % DSPS	85.2	13.9	-1.9	90.3 ± 6.4
SM102	71.0	6.0	-3.5	84.1 ± 10.7
ALC-0315	63.0	5.2	-5.2	89.0 ± 5.9
45 mol% KC3-OA, 5 % DSPS (N/P=5)	90.9	15.4	-2.0	93.9 ± 2.4
45 mol% KC3-OA, 5 % DSPS (N/P=5.5)	91.1	14.4	-0.48	92.9 ± 1.7
45 mol % KC3-OA, 5 % DSPS (N/P=6)	81.2	12.5	-1.9	92.8 ± 6.3
45 mol % KC3-OA, 5 % DSPS (N/P=6.5)	73.0	16.9	-1.6	92.8 ± 7.6
43 % KC3-OA, 5 % DSPS (N/P=5)	84.3	20.8	-0.2	93.0 ± 4.2
48 % KC3-OA, 5 % DSPS (N/P=5)	102.6	19.6	-2.1	94.4 ± 4.5
45 % KC3-OA, 5 % DSPS, 1% PEG-SA (N/P=5)	141.7	19.6	-1.6	93.8 ± 2.9
45 % KC3-OA, 5 % DSPS, 3% PEG-SA (N/P=5)	123.1	17.0	-3.3	91.7 ± 4.8
45 % KC3-OA, 5 % DSPS, 1% PEG-SA (N/P=6)	163	23.3	-1.5	92.9 ± 1.7
45 % KC3-OA, 5 % DSPS, 3% PEG-SA (N/P=6)	142.2	17.2	-2.3	92.6 ± 3.6

[1392] 当用1.5mol%PEG-DMG配制时,所有DSPS靶向KC3-OA制剂显示出约90nm的颗粒尺寸和大于90%的包封效率。然而,当用1或3mol%的PEG200-硬脂酸(PEG-SA)替换1.5mol%

PEG-DMG时,尺寸显著增加至约140nm。所有颗粒显示出在pH 7.4下为轻微的负ζ电位,并且在pH 5下ζ电位为12.5至23mV。

[1393] 表42.在1μg/ml下孵育之后,人树突细胞中的mCherry表达

[1394]

LNP制剂	MFI
UI	1,343±263
KC3-OA,5%DSPS	74,561±8,663
SM102	4,242±1,942
ALC-0315	3,760±1,625
45mol%KC3-OA,5%DSPS(N/P=5)	70,437±26,182
45mol%KC3-OA,5%DSPS(N/P=5.5)	71,757±25,238
45mol%KC3-OA,5%DSPS(N/P=6)	29,810±11,956
45mol%KC3-OA,5%DSPS(N/P=6.5)	17,921±8,100
43%KC3-OA,5%DSPS(N/P=5)	39,229±13,743
48%KC3-OA,5%DSPS(N/P=5)	117,973±42,550
45%KC3-OA,5%DSPS,1%PEG-SA(N/P=5)	76,331±26,839
45%KC3-OA,5%DSPS,3%PEG-SA(N/P=5)	38,667±21,077
45%KC3-OA,5%DSPS,1%PEG-SA(N/P=6)	74,019±46,480
45%KC3-OA,5%DSPS,3%PEG-SA(N/P=6)	49,934±24,738

[1395] 表43.在0.1μg/ml下孵育之后,人树突细胞中的mCherry表达

[1396]

LNP制剂	MFI
UT	1,295±116
KC3-OA,5%DSPS	5,670±886
SM102	1,492±26
ALC-0315	1,405±28
45mol%KC3-OA,5%DSPS(N/P=5)	10,035±2,773
45mol%KC3-OA,5%DSPS(N/P=5.5)	11,461±3,826
45mol%KC3-OA,5%DSPS(N/P=6)	9,014±1,673
45mol%KC3-OA,5%DSPS(N/P=6.5)	5,214±1,678
43%KC3-OA,5%DSPS(N/P=5)	8,403±2,185
48%KC3-OA,5%DSPS(N/P=5)	13,434±5,292
45%KC3-OA,5%DSPS,1%PEG-SA(N/P=5)	7,943±2,848
45%KC3-OA,5%DSPS,3%PEG-SA(N/P=5)	6,362±1,502
45%KC3-OA,5%DSPS,1%PEG-SA(N/P-6)	7,197±1,495
45%KC3-OA,5%DSPS,3%PEG-SA(N/P=6)	6,601±1,756

[1397] 使用由浓度为43至48mol%(图25A至25B)和N/P为5至6.5的KC3-OA构成的5mol%DSPS靶向LNP,来评价靶向和ICL选择对转染活性的作用。还制备了具有在1和3mol%二者下的PEG-SA的N/P为5和6且45mol%KC3-OA的LNP制剂,并与具有1.5mol%PEG-DMG的类似制剂进行了比较。所有制剂都具有高活性,但是具有PEG-DMG的制剂确实显示出比具有PEG-SA的那些高约30至40%的转染率。制剂确实趋向于在43至48mol%KC3-OA的范围内具有较高转

染率。在所评价的两种浓度下,该DSPS靶向KC3-OA LNP制剂的所有LNP变体比SM-102/DSPC或ALC-0315/DSPC对照显著更有活性(表42和43)。

[1398] 实施例39.用阴离子磷脂靶向人树突细胞

[1399] 本研究的目的是探索具有增加量的DSPS的基于AKG-UO-1的靶向LNP的作用,以确定是否可以限定最佳组成。另外,在保持磷脂酰丝氨酸组成恒定的同时,进行了L-DSPS、L-DPPS、L-DOPS、L-DMPG的钠盐与DSPS的D异构体之间的比较。另外,通过制备包含DSPG(Avanti Polar lipids#840465)、DSPE-谷氨酸(BroadPharm,BP-26158)和DSPE-琥珀酰基(Avanti Polarlipids)的钠盐的AKG-UO-1LNP,并确定其在人树突细胞中的转染效率,对磷脂酰丝氨酸的靶向作用与其他阴离子脂质的潜在靶向作用进行了比较。

[1400] KC3-OA的浓度保持恒定在50mol%,总磷脂浓度保持恒定在10mol%,胆固醇组成保持恒定在38.5mol%,并且PEG-DMG浓度保持恒定在1.5mol%。所有样品的N/P比为5。DSPS含量的增加与DSPS%的成比例降低是相称的,并且阴离子脂质的包含与DSPC的成比例降低是相关联的。

[1401] 如实施例9中所述制备LNP,如实施例10中所述表征其颗粒尺寸和ζ电位,并且如实施例28中所述评价其在人树突细胞中的转染效率。

[1402] 表44.实施例39中使用的LNP的物理化学特性和表征

[1403]

LNP 制剂	颗粒尺寸 (nm)	ζ电位 (mV) pH 5	ζ电位 (mV) pH 7	包封效率 (%)
KC3OA/ 5 mol% DSPS-Na	73.4	13.8	-1.8	90.3 ± 6.4
AKG-UO1	108	13.1	-0.2	84.2 ± 4.2
AKG-UO1/ 2.5 mol% DSPS-Na	120.6	3.4	-1.7	86.1 ± 5.0
AKG-UO1/ 5 mol% DSPS-Na	101.3	14.9	-2.9	88.3 ± 3.2
AKG-UO1/ 7.5 mol% DSPS-Na	107	17.0	-4.2	89.1 ± 3.6
AKG-UO1/ 10 mol% DSPS-Na	110.1	15.2	-5.1	88.1 ± 2.7
AKG-UO1/ 7.5 mol% DPPS-Na	99.37	17.8	-7.6	87.4 ± 4.4

[1404]

AKG-UO1/ 7.5 mol% DOPS-Na	120.6	15.1	-3.5	89.5 ± 3.5
AKG-UO1/ 7.5 mol% DMPS-Na	101.8	12.7	-3.8	88.4 ± 1.3
AKG-UO1/ 20 mol% DSPS-Na	130.7	7.0	-7.0	88.5 ± 1.9
AKG-UO1/ 5 mol% DSPG-Na	101.1	17.5	-4.7	87.1 ± 0.9
AKG-UO1/ 10 mol% DSPG-Na	86.23	16.5	-4.1	90.1 ± 3.1
AKG-UO1/ 7.5 mol% DSPE-Glut	98.31	16.9	-6.5	89.6 ± 9.1
AKG-UO1/ 7.5 mol% DSPE-SA	98.6	14.3	-5.6	88.4 ± 9.0

[1405] 这些用多种阴离子磷脂靶向的包含UO-1的LNP在人树突细胞中的针对1μg/ml mRNA浓度的表达数据在图26A中示出,并且针对0.1μg/ml浓度的表达数据在图26B中示出。这些研究显示出,与不含任何磷脂酰丝氨酸的LNP相比,并入了DPPS或DSPS的LNP表现出显著更高的表达,并且这两种饱和PS类似物优于包含C14饱和DMPS的LNP和包含C18单不饱和DOPS的LNP。出乎意料地,在LNP中并入DSPG在0.1μg/mL和1μg/mL二者下的表达的提高与DSPS或DPPS等同,而Glu-DSPE和Suc-DSPE均未表现出在表达方面的任何改善。出乎意料地,虽然显示出在LNP中使用磷脂酰甘油(PG)在鼠树突细胞中没有优势(实施例15),但本实施例中提供的结果显示出,PG当被并入到LNP中时可以显著改善人树突细胞的转染,并因此成为人LNP疫苗的可用的组分。

[1406] 实施例40.用磷脂酰甘油靶向人树突细胞

[1407] 本研究的目的是探索具有多种密度的二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)的包含UO-1或KC3-01 ICL的靶向LNP在人树突细胞中对转染效率的作用。将DSPG以总脂质含量的0至10mol%的密度并入到LNP中。对照LNP包括具有先前建立的5mol%的DSPS作为靶向脂质的KC3-OA LNP、以及非靶向的包含SM-102或ALC-0315的LNP。如实施例9中所述制备LNP,如实施例10中所述表征其颗粒尺寸和ζ电位,并且如实施例28中所述评价其在人树突细胞中的转染效率。LNP在ICL中使用表45中具有恒定N/P比为5.25和48mol%的可电离脂质,包含0至10mol%的DSPG(Na^+盐)脂质,并且并入DSPG的DSPC磷脂恒定在10mol%至mol%(DSPG和DSPC总共为10mol%),并且胆固醇恒定在40.5mol%。PEG-DMG在所有制剂中保持恒定在1.5mol%。最终的ALC-0315/DSPC制剂由46.3mol%ALC-0315、10mol%DSPC、42.7mol%胆固醇和1.5mol%PEG-DMG构成。SM-102/DSPC制剂由50mol%SM102、10mol%DSPC、38.5mol%胆固醇和1.5mol%PEG-DMG构成。

[1408] 表45.实施例40中使用的LNP的物理化学特性和表征

[1409]

LNP 制剂	颗粒尺寸 (nm)	ζ电位 (mV) pH 5	ζ电位 (mV) pH 7	包封效率 (%)
KC3-OA, 5 % DSPS	85.2	13.9	-1.9	90.3 ± 6.4
SM102	71.0	6.0	-3.5	84.1 ± 10.7
ALC-0315	63.0	5.2	-5.2	89.0 ± 5.9
UO1	99.2	25.4	2.9	86.9 ± 2.5
UO1, 1.25 % DSPG	101.2	17.7	0.4	85.3 ± 2.4
UO1, 2.5 % DSPG	89.7	13.5	-2.3	83.8 ± 8.4
UO1, 5.0 % DSPG	81.2	17.3	-0.7	90.9 ± 2.7
UO1, 7.5 % DSPG	65.9	15.9	-1.8	91.0 ± 8.1
UO1, 10 % DSPG	67.7	16.7	-2.9	90.5 ± 6.6
KC3-01	95.0	26.4	1.5	90.3 ± 11.5
KC3-01, 1.25 % DSPG	98.4	27.4	0.0	90.7 ± 3.1
KC3-01, 2.5 % DSPG	82.1	18.5	-0.8	90.6 ± 3.2
KC3-01, 5.0 % DSPG	72.4	18.1	-2.1	89.9 ± 3.8
KC3-01, 7.5 % DSPG	71.0	14.8	-2.2	89.4 ± 3.6
KC3-01, 10 % DSPG	74.6	13.0	-2.3	89.5 ± 13.5

[1410] 表46.在1μg/ml下孵育之后,人树突细胞中的mCherry表达

[1411]

LNP 制剂	MFI	T/NT	vs ALC-0315 LNP (倍)	vs SM-102 LNP (倍)
未处理 (UT)	1,453 ± 263			
KC3-OA, 5 % DSPS	89,815 ± 16,603		76.8	8.4
SM102	11,924 ± 1,089			
ALC-0315	2,604 ± 376			
UO1	2,049 ± 297		0.5	0.1
UO1, 1.25 % DSPG	2,728 ± 950	2.1	1.1	0.1
UO1, 2.5 % DSPG	8,134 ± 3,763	11.2	5.8	0.6
UO1, 5.0 % DSPG	22,206 ± 3,488	34.8	18.0	2.0
UO1, 7.5 % DSPG	12,424 ± 1,939	18.4	9.5	1.0
UO1, 10 % DSPG	5,561 ± 639	6.9	3.6	0.4
KC3-01	49,931 ± 14,344		42.1	4.6
KC3-01, 1.25 % DSPG	119,467 ± 21,513	2.4	102.6	11.3
KC3-01, 2.5 % DSPG	112,191 ± 12,156	2.3	96.2	10.6
KC3-01, 5.0 % DSPG	86,696 ± 10,231	1.8	74.1	8.1
KC3-01, 7.5 % DSPG	25,230 ± 2,061	0.5	20.7	2.3
KC3-01, 10 % DSPG	8,250 ± 2,442	0.1	5.9	0.6

[1412] 表47.在0.1μg/ml下孵育之后,人树突细胞中的mCherry表达

[1413]

LNP 制剂	MFI	T/NT (倍)	vs ALC-0315 LNP (倍)	vs SM-102 LNP (倍)
未处理 (UT)	1,403 ± 190			

[1414]

KC3-OA, 5 % DSPS	10,347 ± 3,118		308.6	48.0
SM102	1,590 ± 243			
ALC-0315	1,432 ± 198			
UO1	1,393 ± 237			
UO1, 1.25 % DSPG	1,409 ± 262	0.5	0.2	0
UO1, 2.5 % DSPG	1,474 ± 280	6.7	2.4	0.4
UO1, 5.0 % DSPG	2,253 ± 1,089	81.0	29.3	4.6
UO1, 7.5 % DSPG	1,887 ± 400	46.2	16.7	2.6
UO1, 10 % DSPG	1,515 ± 252	10.7	3.9	0.6
KC3-01	1,976 ± 112		19.8	3.1
KC3-01, 1.25 % DSPG	2,377 ± 329	1.7	33.6	5.2
KC3-01, 2.5 % DSPG	3,801 ± 485	4.2	82.7	12.9
KC3-01, 5.0 % DSPG	8,580 ± 786	12.5	247.6	38.5
KC3-01, 7.5 % DSPG	3,075 ± 279	2.9	57.7	9.0
KC3-01, 10 % DSPG	1,619 ± 146	0.4	7.4	1.2

[1415] 使用0至10mol％DSPG靶向LNP来评价DSPG靶向的两种不同LNP对转染活性的作用(图27A至27B)。对于包含UO-1的LNP,在1和0.1μg/ml二者下,DSPG的最佳浓度为5mol％,导致在1μg/ml下有34.8倍的靶向作用,并且在0.1μg/ml下比非靶向LNP具有81倍的改善。对于包含KC3-01的LNP,对于0.1μg/mL,DSPG的最佳浓度也为5mol％,但在1μg/mL的更高浓度下显示出1.25至5mol％的更宽的峰,其中在1μg/mL下靶向作用为2.4倍并且在0.1μg/mL的更低浓度下为12.5倍。与非靶向ALC-0315和SM-102LNP相比,两种靶向LNP的峰显示出提高的转染活性(表46和47),以及与ALC-0315相比,DSPG靶向KC3-01 LNP在1μg/mL下有高至102.6％的提高,并且在0.1μg/mL下有高至247.6倍的提高。与SM-102LNP相比,5mol％DSPG靶向KC3-01 LNP的改善高至38.50倍,并且DSPS靶向KC3-OALNP对照的改善高至48倍。该数据表明,DSPG可作为有效的靶向阴离子脂质来提高人树突细胞中的转染效率,并因此包含在基于人脂质纳米粒的疫苗中。数据表明,LNP的PG靶向当与ICL的KC3家族组合时是高度有效的。鉴于LNP中使用带高度负电荷的阴离子磷脂,LNP还并入了带负电荷的核酸与之竞争,这些结果是意想不到的。鉴于在LNP中包含DSPG对鼠树突细胞中的摄取缺乏影响,这些结果也是出乎意料的(实施例15)。

[1416] 实施例41.在基于KC3-PA的LNP制剂中DSPC和DPPC作为辅助脂质的比较

[1417] 本研究的目的是探索对KC3-PADPPS靶向和非靶向LNP中DSPC和DPPC的比较。KC3-OA浓度为48mol％,胆固醇40.5mol％,PEG-DMG1.5mol％。磷脂组成保持恒定在10mol％,但对于用DPPS靶向的那些,DPPS浓度为5mol％,并且DSPC或DPPC为5mol％。所有制剂的N/P为5.25。

[1418] 如实施例9中所述制备LNP,并且如实施例10中所述在通过透析除去乙醇之后和在无菌过滤之后表征其颗粒尺寸、mRNA浓度和mRNA包封％。

[1419] 表48.KC3-PA靶向和非靶向LNP的物理化学特性和表征

[1420]

LNP 制剂	过滤之后的颗粒尺寸（nm）	包封效率 (%)	过滤之后的mRNA损失%
KC3-PA/DPPC	108.5	82.2 ± 2.4	35.5
KC3-PA/DPPC/DPPS-NH^4	107.7	90.6 ± 6.1	10.6
KC3-PA/DSPC	114.0	86.4 ± 5.7	12.5
KC3-PA/DSPC/DPPS-NH^4	91.6	91.3 ± 6.7	4.4

[1421] 一旦已经制备了LNP并且通过透析除去了乙醇,则在过滤之前和之后对mRNA浓度的测量提供了另外的指标以评价制剂。如果LNP具有高效的无菌过滤则是有利的,其中mRNA损失最小化并且消除了膜污染和差的产物产量。在非靶向组中,我们发现与DPPC相比,DSPC样品中mRNA回收的2.8倍提高,并且在靶向组中,我们发现mRNA回收的2.4倍提高。这表明,在具有KC3-PA的制剂中,在有和没有5mol％DPPS的情况下,DSPC与DPPC相比是更相容的辅助脂质。

[1422] 实施例42.针对鼠树突细胞中的表达,比较PS靶向LNP中的UO-1、UO-6、UO-7

[1423] 本研究的目的是比较一系列可电离脂质类似物当配制成有和没有DSPS靶向的LNP时在鼠树突细胞中的转染活性。使用编码mCherry的mRNA,将AKG-UO-1、AKG-UO-6和AKG-UO-7配制成N/P为5的以50mol％包含10％磷脂、38.5mol％胆固醇、1.5mol％PEG-DMG的LNP。如果添加DSPS,则制剂中包含的DSPC的mol％成比例降低。

[1424] 如实施例9中所述制备LNP,如实施例10中所述表征其颗粒尺寸和ζ电位,并且如实施例11中所述评价其在鼠树突细胞中的转染效率。

[1425] 表49.包含UO_1、UO-6或UO-7的DSPS靶向LNP的物理化学特性和表征

[1426]

LNP 制剂	颗粒尺寸 (nm)	ζ电位 (mV) pH 5	ζ电位 (mV) pH 7	包封效率 (%)
UO-1	72.8	10.2	3.6	89.6 ± 4.8
UO-1/ 7.5 %DSPS	80.5	9.2	-2.7	91.1 ± 4.2
UO-6	80.0	14.5	5.6	90.5 ± 11.1
UO-6/ 7.5 %DSPS	86.1	13.9	-2.4	92.8 ± 11.3
UO-7	79.3	14.9	4.3	91.4 ± 2.5
UO-7/ 7.5 %DSPS	94.3	14.3	-2.6	92.3 ± 5.0

[1427] 用或不用7.5％DSPS以及三种不同的ICL(UO-1、UO-6和UO-7)制备的LNP全部显示出72至95nm的小尺寸和大于约90％的包封效率。所有LNP在pH 5下具有正ζ电位,而包含DSPS的制剂在中性pH下显示出轻微阴离子ζ电位。

[1428] 表50.包含UO-1、UO-6或UO-7的DSPS靶向LNP在1μg/ml下孵育之后,鼠树突细胞中的mCherry表达

[1429]

LNP制剂	MFI	T/NT	vs UO-1(倍)
未处理(UT)	233±9		
UO-1	$^{2,234}\pm^{204}$		
UO-1/7.5％DSPS	31,928±3,992	15.8	

UO-^{6}	^{433}±70		
UO-6/7.5%DSPS	2,894±255	13.3	0.08
UO-7	510±18		
UO-7/7.5%DSPS	4,486±1,042	15.4	0.13

[1430] 与那些不包含7.5mol%DSPS的LNP相比,由三种不同ICL各自构成的LNP的表达数据显示出13.3至15.4倍的靶向作用(T/NT)(图28)。然而,与UO-6和UO-7二者相比,包含UO-1的LNP在转染鼠树突细胞方面明显更优。这被出乎意料地给出,我们先前已经表明在二氧戊环系列脂质的情况下,二甲基氨基丙基头基(例如KC3-01)明显优于用其中头基是二甲基氨基乙基并因此在可滴定胺基与二氧戊环主链之间包含乙基(两个碳)的KC2-01制备的LNP。然而,在UO系列脂质的情况下,包含KC3中使用的相同二甲基氨基丙基的UO-7脂质明显劣于具有在胺与目前的甘油主链之间包含两个碳乙基的二甲基氨基乙基的UO-1脂质。实际上,包含UO-7的LNP显示出在包含UO-1的LNP的情况下看到的活性的仅13%。

[1431] 实施例43.可电离脂质和ICL密度对SARS-CoV-2刺突蛋白mRNALNP的免疫原性的影响

[1432] 如实施例9中所述制备LNP,如实施例10中所述表征其颗粒尺寸和ζ电位,并且如实施例28中所述评价其在人树突细胞中的转染效率。LNP在ICL中使用表51中的可电离脂质,其恒定N/P比为5.25。图表中示出了特定制剂中使用的ICL的浓度。例如,46.5%KC3-OA%/5%DSPC/5%DSPS制剂包含46.5mol%KC3-OA、5mol%DSPC、5mol%DSPS、42mol%胆固醇和1.5mol%PEG-DMG,或每100μg mRNA包含1575nmol KC3-OA、169.4nmol DSPC、169.4nmol DSPS、1422.6nmol胆固醇和50.8nmol PEG-DMG。对于所有样品,PEG-DMG浓度保持恒定在1.5mol%。如果提高ICL浓度,则胆固醇浓度成比例降低。对于具有KC样ICL的制剂,将其用5mol%DSPS靶向,并且对于具有UO样ICL的制剂,将其用7.5mol%DSPS靶向。

[1433] ALC-0315制剂由46.3mol%ALC-0315、10mol%DSPC、42.7mol%胆固醇和1.56mol%PEG-DMG构成。

[1434] 表51.包含SARS-CoV-2刺突蛋白mRNA的包含ALC-0315、KC2、KC3-OA、UO-1和UO-9的LNP的物理化学特性和表征

[1435]

LNP 制剂	颗粒尺寸 (nm)	ζ电位 (mV) pH 5	ζ电位 (mV) pH 7	包封效率 (%)
ALC-0315	99.2	25.4	2.9	81.1 ± 3.7
46.5% KC2/5% DSPC/5% DSPS	89.7	13.5	-2.3	92.1 ± 3.8
46.5% KC3-01/5% DSPC/5% DSPS	81.2	17.3	-0.7	92.3 ± 6.4
46.5% KC3-OA/5% DSPC/5% DSPS	65.9	15.9	-1.8	91.3 ± 7.7
48% KC3-OA/5% DSPC/5% DSPS	67.8	16.7	-2.9	89.9 ± 7.2
46.5 KC3-OA/5% DPPC/5% DSPS	95.0	26.4	1.5	91.5 ± 3.8
48% UO-1/5% DSPC/7.5% DSPS	82.1	18.5	-0.8	91.9 ± 7.8
48% UO-9/5% DSPC/7.5% DSPS	72.4	18.1	-2.1	92.8 ± 6.5

[1436] 然而,尚不清楚降低可电离脂质的mol％是否会对体内免疫原性产生负面影响。使用实施例35中概述的相同方法,将BALB/c小鼠用1μg疫苗候选物进行肌内免疫接种,并在21天之后收集血液。

[1437] 通过ELISA测定血清中的总抗刺突IgG抗体。用包含46.5或48mol％KC3-OA的LNP免疫接种的小鼠之间的几何平均效价相似。包含46.5mol％可电离脂质KC3-01的LNP具有相似的免疫原性(图29)。当与ALC-0315或KC2 LNP对照相比时,所有的KC3-01或KC3-OA LNP均显示出显著更高的效价。

[1438] 还将小鼠用包含可电离脂质AKG-UO1和AKG-UO9的疫苗候选物进行免疫接种。AKG-UO1诱导的抗体效价与KC3-OA相似,但包含AKG-UO9的LNP的免疫原性差。

[1439] 实施例44.PG和PS靶向的包含KC3-OA的LNP在人树突细胞中对mRNA表达的影响。

[1440] 本研究的目的是探索具有多种形式的磷脂酰甘油(PG)(包括二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油基磷脂酰甘油(DOPG)和二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG))的包含KC3-OA ICL的靶向LNP对人树突细胞中的转染效率的作用。第二目的是将这些靶向LNP与包含DSPS的那些进行比较,并最后比较并入了两种阴离子磷脂(DSPG和DSPS)的制剂。

[1441] 将多种形式的PG以总脂质含量的0至5mol％的密度并入到LNP中。对照LNP包括具有先前确定的5mol％的DSPS作为靶向脂质的KC3-OA LNP。如实施例9中所述制备LNP,如实施例10中所述表征其颗粒尺寸和ζ电位,并且如实施例28中所述评价其在人树突细胞中的转染效率。LNP在具有恒定N/P比为5.25和48mol％的ICL中使用表52中的可电离脂质,包含0至10mol％的DSPG(Na^+盐)脂质,并且DSPC磷脂也从0至10mol％变化,并且胆固醇恒定在40.5mol％。一些制剂在有或没有DSPC的情况下包含DSPS和DSPG。PEG-DMG在所有制剂中保持恒定在1.5mol％。

[1442] 表52.实施例44中使用的LNP的物理化学特性和表征

LNP 制剂	颗粒尺寸 (nm)	ζ电位 (mV) pH 5	ζ电位 (mV) pH 7	包封效率 (%)
10 % DSPC	91.9	22.19	1.712	92.7 ± 3.1
5% DSPG/5 % DSPC	94.0	15.01	-6.99	90.3 ± 2.1
5% DOPG/5 % DSPC	77.0	15.64	2.303	92.0 ± 7.5
5% DPPG/5 % DSPC	93.6	14.7	-0.2016	90.6 ± 2.7
5% DMPG/5 % DSPC	66.0	19.29	0.8961	92.8 ± 8.0
5% DSPS/5 % DSPC	87.9	23.18	-1.219	92.7 ± 4.5
5% DSPG/5 % DSPS	69.9	25.61	-1.651	93.3 ± 6.1
2.5% DSPG/5 % DSPS/2.5 % DSPC	72.2	19.36	-1.596	92.7 ± 6.0
5% DSPG/5 % DSPS/2.5 % DSPC	66.6	16.72	-5.128	92.6 ± 2.0
5% DSPG/5 % DSPS/5 % DSPC	69.1	17.75	-4.506	93.5 ± 3.3
5% DSPG/5 % DSPS/7.5 % DSPC	66.9	11.11	-5.389	93.4 ± 9.0
5% DSPG/5 % DSPS/10 % DSPC	64.6	15.43	-6.708	93.2 ± 4.2

[1443]

[1444] 所有制剂均显示出65至100nm的颗粒尺寸,其在pH 7.4下带轻微负电荷,并且在pH 5下有10至25mV的明显正ζ电位。尽管存在可与mRNA上带负电荷的磷酸脂竞争结合的阴离子磷脂,但所有颗粒的包封效率均大于90%。

[1445] 表53.在1μg/ml下孵育之后,人树突细胞中的mCherry表达

LNP 制剂	MFI (供体1)	T/NT (供体1)	MFI (供体2)	T/NT (供体2)
未处理 (UT)	2,735 ± 56		1,354 ± 19	
10 % DSPC	14,152 ± 661		14,034 ± 5,257	
5% DSPG/5 % DSPC	43,413 ± 5,029	3.56	53,670 ± 1,974	4.13
5% DOPG/5 % DSPC	16,783 ± 1,375	1.23	62,404 ± 2,841	4.81
5% DPPG/5 % DSPC	39,042 ± 6,957	3.18	58,557± 3,456	4.51
5% DMPG/5 % DSPC	70,516 ± 1,584	1.79	51,862 ± 5,953	3.98
5% DSPS/5 % DSPC	70,516 ± 1,584	5.94	225,546 ± 11,751	17.68
5% DSPG/5 % DSPS	10,148 ± 313	0.65	15,158 ± 289	1.09
2.5% DSPG/5 % DSPS/2.5 % DSPC	35,797 ± 2,364	2.90	85,066 ± 8,576	6.60
5% DSPG/5 % DSPS/2.5 % DSPC	27,349 ± 4,520	2.16	59,403 ± 4,237	4.58
5% DSPG/5 % DSPS/5 % DSPC	52,500 ± 1,351	4.36	98,242 ± 1,421	7.64
5% DSPG/5 % DSPS/7.5 % DSPC	49,439 ± 3,660	4.09	80,055 ± 7,036	6.21
5% DSPG/5 % DSPS/10 % DSPC	32,566 ± 4,525	2.61	47,190 ± 9,456	3.61

[1446]

[1447] 表54.在0.1μg/ml下孵育之后,人树突细胞中的mCherry表达

[1448]

LNP 制剂	MFI（供体1）	T/NT（供体1）	MFI（供体2）	T/NT（供体2）
未处理 (UT)	2,687 ± 27		1,390 ± 11	
10 % DSPC	3,330 ± 216		1,721 ± 36	
5% DSPG/5 % DSPC	6,292 ± 155	5.61	4,289 ± 19	8.76
5% DOPG/5 % DSPC	4,288 ± 52	2.49	5,951 ± 370	13.78
5% DPPG/5 % DSPC	6,754 ± 312	6.32	5,243 ± 535	11.64
5% DMPG/5 % DSPC	4,912 ± 647	3.46	4,202 ± 199	8.49
5% DSPS/5 % DSPC	10,776 ± 161	12.58	21,283 ± 1,303	60.10
5% DSPG/5 % DSPS	3,379 ± 112	1.08	3,574 ± 178	6.60
2.5% DSPG/5 % DSPS/2.5 % DSPC	6,190 ± 184	5.45	11,379 ± 133	30.18
5% DSPG/5 % DSPS/2.5 % DSPC	4,967 ± 291	3.55	6,028 ± 65	14.01
5% DSPG/5 % DSPS/5 % DSPC	8,353 ± 153	8.81	9,758 ± 214	25.28
5% DSPG/5 % DSPS/7.5 % DSPC	10,604 ± 126	12.31	10,602 ± 1,620	27.83
5% DSPG/5 % DSPS/10 % DSPC	11,761 ± 502	14.11	10,139 ± 339	26.43

[1449] 使用多种组成的PG靶向LNP来评价DSPG靶向的两种不同LNP对转染活性的作用(图30A至30B)。对于包含KC3-OA的LNP,相对于10％DSPC对照,所有形式的PG均显示出一定水平的表达提高,并且尽管在一个供体中饱和DPPG或DSPG形式的PG有小的偏好,但在单独的供体中DOPG和DMPG表现出相似的活性。与DSPC对照相比,5％DSPS靶向LNP有最高的提高,并且将DSPS与DSPG组合没有进一步改善转染活性,并且在大多数情况下,当与包含DSPS作为唯一阴离子磷脂的那些制剂相比时,其是拮抗性的。实际上,其中所有磷脂是DSPG或DSPS(例如,无DSPC)的那些LNP制剂显示出靶向LNP制剂的最低转染活性。该数据表明,PG和DSPS二者可以有效地靶向阴离子脂质,以提高在人树突细胞中的转染效率,但是二者组合似乎没有进一步改善活性。

[1450] 实施例45.乙醇可溶的DPPS-NH4而不是更不可溶的DSPS-Na的使用允许在室温下制备磷脂酰丝氨酸靶向的基于KC3OA的LNP

[1451] 本研究的目的是通过测量在LNP中作为靶向配体的DSPS-Na和DPPS-NH_4在鼠DC细胞中的转染效率来对其进行比较。如实施例10制备LNP。在LNP制备之前,在使用之前在乙醇中制备各脂质的储备溶液,除了DSPS-Na由于其在乙醇中的低溶解度(参见实施例37)而在升高的温度(70℃)下溶解在甲醇中以确保完全溶解。一旦冷却至室温,甲醇溶液将在短时间段内(<1小时)维持DSPS-Na的溶解度。因此,将KC3OA、DSPC、Chol和PEG-DMG以及DSPS-Na

从其各自脂质储备液中添加之后,所得的混合物包含在乙醇中按体积计约16%的甲醇。为了制备DSPS靶向LNP并确保DSPS-Na的完全溶解度,将乙醇/甲醇溶液在70℃下在注射器保持器加热块中孵育,然后与预温热的mRNA混合。在LNP形成之前必须注意保持升高的温度控制,否则可发生DSPS聚集或LNP聚集。一旦形成LNP,就使混悬液自然冷却至室温,然后通过透析除去溶剂。KC3OA保持恒定在48mol%,DSPC浓度为5mol%,并具有5mol%DSPS-Na或DPPS-NH_4,38.5mol%胆固醇和1.5mol%PEG-DMG。N/P为5.25。KC3OA/DSPS样品为每100μg mRNA包含1575nmol KC3OA、164.1nmol DSPC、164.1nmol DSPS-Na、1328.9nmol胆固醇和49.2nmol PEG-DMG。相比之下,由于DPPS-NH_4的较高溶解度,LNP可以从所有乙醇储备溶液中制备,从而消除在混合之前高温孵育并从该过程中消除甲醇的需要,这从放大和残留溶剂的角度二者来看都是有利的。KC3OA/DPPS样品为每100μg mRNA包含1575nmol KC3OA、164.1nmol DSPC、164.1nmol DPPS-NH_4、1328.9nmol胆固醇和49.2nmol PEG-DMG,并在室温下混合。最终的ALC-0315/DSPC制剂由46.3mol%ALC-0315、10mol%DSPC、42.7mol%胆固醇和1.5mol%PEG-DMG构成。SM-102/DSPC制剂由50mol%SM102、10mol%DSPC、38.5mol%胆固醇和1.5mol%PEG-DMG构成,两种对照均在室温下制备。

[1452] 将LNP交换到PBS,pH 7.4中,并随后到15mM Tris,pH 7.4、20%蔗糖中,使用Amicon-Ultra 4(100,000MWCO)旋转柱浓缩至20至50μg/mL mRNA,无菌过滤(Thermo Nalgene 0.2um#720-1320),然后通过浸入液氮中冷冻5分钟,并在-80℃下长期储存。如实施例10中所述分析LNP,并且如实施例11中所述在鼠DC细胞中测试LNP。

[1453] 表55A

[1454]

LNP 制剂	颗粒尺寸 (nm)	ζ电位 (mV) pH 5	ζ电位 (mV) pH 7	包封效率 (%)
ALC-0315	71.0	6.0	-3.5	84.1 ± 10.7
SM102	63.0	5.2	-5.2	89.0 ± 5.9
KC3-OA/DSPS-Na	83.9	19.04	-0.8	92.6 ± 8.7
KC3-OA/DSPS-NH_4	78.3	11.91	-0.1	93.3 ± 1.2

[1455] 表55B

[1456]

LNP制剂	mCherryMFI	vs ALC-0315 LNP(倍)	vs SM-102 LNP(倍)
未处理(UT)	282.7±3.8		
ALC-0315	1336.3±91.6		
SM-102	6978.3±1388		
KC3-OA/DSPS-Na	16039.3±4046.4	12.0	23
KC3-OA/DSPS-Na	32326.3±735.9	24.2	4.6

[1457] 从生物物理学的角度来看,KC3-OA/DPPS-NH_4 LNP与DSPS靶向LNP相当,所有测量的特征均非常相似。另外,发现包含DPPS诱导了mCherry表达的约2倍提高(图31)。相当的LNP生物物理学特征与相当且轻微改善的mRNA表达的组合,表明了DPPS-NH_4是有吸引力的靶向KC3-OA LNP的PS靶向配体。

[1458] 实施例46.具有不对称链的阳离子脂质的合成,并且其中一条链为饱和烷基且另

一条链是单不饱和的,C15或C17

[1459] (7Z,24Z)-三十三碳-7,24-二烯-16-酮(不对称C_{15}(8:1)-C_{17}(8:1)酮)的合成。

[1460] 将油酰氯和棕榈酰氯的等摩尔混合物基本上如上针对(9Z,26Z)-三十五碳-9,26-二烯-18-酮(2)的合成所述进行处理。使用柱色谱将产物(C_{15}(8:1)-C_{15}(8:1)、C_{17}(8:1)-C_{17}(8:1)和C_{15}(8:1)-C_{17}(8:1)酮)分离,以分离不对称C_{15}(8:1)-C_{17}(8:1)酮。通过NMR确定结构。

[1461] 3-(S)-2-(8Z)-十五碳-8-烯-1-基-2'-(8Z)-十七碳-8-烯-1-基-1,3-二氧戊环-4-基)-N.N-二甲基丙烷-1-胺的合成。使用(7Z,24Z)-三十三碳-7,24-二烯-16-酮作为起始物质,基本上按照上述用于合成3-((S)-2,2-二((Z)-十七碳-8-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺,AKG-KC3-C17(C8:1))的程序。获得了有具有一个C_{17}单不饱和的和一个C_{15}单不饱和的R_1烃链的通式结构I-A的阳离子脂质。

[1462] (9Z)-三十五碳-9-烯-18-酮(不对称C_{17}(8:1)-C_{17}酮)的合成。将油酰氯和硬脂酰氯的等摩尔混合物基本上如上针对(9Z,26Z)-三十五碳-9,26-二烯-18-酮(2)的合成所述进行处理。使用柱色谱将产物(C_{17}(8:1)-C_{17}(8:1)、C_{17}(8:1)-C_{17}和C_{17}-C_{17}酮)分离,以分离不对称C_{17}(8:1)-C_{17}酮。通过NMR确定结构。

[1463] 3-(S)-2-(8Z)-十七碳-8-烯-1-基-2'-十七碳-1-基-1,3-二氧戊环-4-基)-N.N-二甲基丙烷-1-胺的合成

[1464] 使用(9Z)-三十五碳-9-烯-18-酮作为起始物质,基本上按照上述用于合成3-((S)-2,2-二((Z)-十七碳-8-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺,AKG-KC3-C17(C8:1))的程序。获得了有具有一个C_{17}单不饱和的和一个C_{17}饱和的(烷基)R_1烃链的通式结构I-A的阳离子脂质。

[1465] (24Z)-三十三碳-24-烯-16-酮(不对称C_{15}-C_{17}(8:1)酮)的合成。将油酰氯和棕榈酰氯的等摩尔混合物基本上如上针对(9Z,26Z)-三十五碳-9,26-二烯-18-酮(2)的合成所述进行处理。使用柱色谱将产物(C_{17}(8:1)-C_{17}(8:1)、C_{15}-C_{15}和C_{15}-C_{17}(8:1)酮)分离,以分离不对称C_{15}-C_{17}(8:1)酮。通过NMR确定结构。

[1466] 3-(S)-2-(8Z)-十五碳-8-烯-1-基-2'-十七碳-1-基-1,3-二氧戊环-4-基)-N.N-二甲基丙烷-1-胺的合成

[1467] 使用(24Z)-三十三碳-24-烯-16-酮作为起始物质,基本上按照上述用于合成3-((S)-2,2-二((Z)-十七碳-8-烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺,AKG-KC3-C17(C8:1))的程序。获得了有具有一个C_{17}单不饱和的和一个C_{15}饱和的(烷基)R_1烃链的通式结构I-A的阳离子脂质。

[1468] 实施例47.使用磷脂酰丝氨酸的基于KC3OA的靶向LNP对体外鼠DC细胞的影响以及与ALC-0315和SM-102LNP制剂的比较

[1469] 如实施例9和10中所述制备和表征LNP脂质制剂,所述LNP脂质制剂与包含报道子mRNA mCherry(Trilink Biotechnologies,San Diego,CA,#7203)的Comirnaty®("ALC-0315")和Spikevax®("SM102")相对应,并将其与KC3OA(KC3OA-PS)和KC3OA/5mol%DPPS(KC3OA+PS)制剂进行比较。特别地,制剂由ALC-0315/DSPC/Chol/ALC-0159(46.3/9.4/42.7/1.56mol%,"ALC0315")、SM102/DSPC/CHol/PEG-DMG(50/10/38.5/1.5mol%,"SM102")、KC3OA/DSPC/Chol/PEG-DMG(48/10/40.5/1.5mol%,"KC3OA-PS")和KC3OA/DSPC/DPPS/Chol/PEG-DMG(48/5/5/40.5/1.5mol%,"KC3OA+PS")组成。将荧光脂质标志物1,1'-

双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吲哚双羰花青-5,5'-二磺酸(DiIC18(5)-DS,ATT Bioquest,目录号22054)以0.025mol%添加至每一个。SM-102购自Organix,Inc(O-11182),并且ALC-0315(BP-25498)和ALC-0159(BP-25711)购自BroadPharm,Inc。表56中示出了对这些制剂的分析。(缩写:F/T,冷冻/解冻循环。%EE,mRNA包封效率%。Stdev-EE标准偏差。ζ,ζ电位(mV)。C/F,浓缩和0.2μm无菌过滤步骤。Z-Ave,通过DLS的Z-平均颗粒尺寸,nm。PDI,通过DLS的多分散性指数)

[1470] 表56.对实施例47中所述的LNP制剂的分析。F/T,冷冻/解冻循环。EE,包封效率。

[1471]

	C/F后		F/T后		ζ		C/F后		F/T后	
LNP	**Z-Ave**	**PDI**	**Z-Ave**	**PDI**	**pH 5**	**pH 7**	**% EE**	**stdev**	**%EE**	**stdev**
ALC-0315	78.88	0.12	80.11	0.13	3.7	-6.77	77.7	3.5	77.6	4.8
SM102	90.00	0.00	90.67	0.04	10.8	-3.48	88.4	5.1	88.8	2.7
KC3OA-PS	113.00	0.06	110.7	0.07	17.8	-4.44	92.4	7.8	91.9	3.8
KC3OA+PS	98.70	0.07	97.74	0.12	15.4	-1.61	92.3	9.5	91.6	8.1

[1472] LNP经冷冻和解冻表现出在mRNA包封方面的小的变化(<1%),并且在尺寸方面的变化小于2%。当LNP混悬在pH 5.0或pH 7.0的缓冲液中时,其表现出预期的ζ电位变化(它们从阳离子表面电荷变为中性表面电荷)。将制剂以0.2μg mRNA/ml的浓度添加至MutuDC1940细胞,并在37℃下孵育。在多种孵育时间下,如实施例11中所述将细胞洗涤、收获、用活/死染料染色、固定并通过流式细胞术分析DiIC18(5)-DS含量或mCherry蛋白含量。结果在图32和图33以及表57中示出。

[1473] 与基础制剂KC3OA-PS相比,观察到PS靶向KC3OA LNP的快速细胞累积,如通过DiIC18(5)-DS信号随时间的提高所观察到的,该信号在约24小时时达到平稳并在72小时之后下降。KC3OA+PS的DiIC18(5)-DS信号在24小时时是KC3OA-PS的15.1倍高。与ALC-0135或SM102制剂相比,靶向制剂的DiIC18(5)-DS信号在24小时时也更高(分别是4.1倍和9.7倍高)。实际上,细胞累积的提高导致mCherry表达的增强;PS靶向KC3OA制剂的mCherry信号是非靶向KC3OA制剂的22倍高,并且分别是ALC—0315和SM102 LNP的38.5和6.8倍高。在72小时之后,DiIC18(5)-DS和mCherry二者的细胞信号的降低可能是由于来自MutuDC1940细胞分裂的信号稀释。

[1474] 表57.在存在mCherry mRNA-LNP制剂的情况下在多种孵育时间下,

[1475] MutuDC1940细胞中DiIC18(5)-DS脂质标记和mCherry蛋白的中位荧光强度(Median fluorescence intensity,MedFI)。

[1476] DiIC18(5)-DS

[1477] 摄取

[1478]

时间,小时	ALC-0315	SM102	AKG-PS	AKG+PS
0.08	227.3±6.8	382.7±23.2	677.3±75.2	726±118.9
0.25	257.7±10.1	443.7±45.5	775±208.1	3848±320
0.5	383.7±28.6	571=65.9	1,573.7±123.7	15,579.3±3,688.8
1	803.3±23.1	863.7±26	3,546=156.5	38,914.3±2,170.4
3	7,861.7±575.7	1,1493±1030.2	19,864.7±622.9	247,097.3±6,530.3

6	20,506.7±2381.1	21,278.7±1787.7	26,716＝1094.6	352,339±21,625.6
24	97,906±6553	41,135.3±585	26,575.7±2772.5	400,445±476,77.6
48	134,970.3±12277.7	55,837.7±3247.6	32,861＝3080.6	416,549±42829
72	128,059±5843.2	63,535±9808	34,736＝4999.8	402,600±14,855.3
96	102,199.3±3865.9	50,093.3±8009.1	25,992＝5200.1	218,035±10,560

[1479] mCherry表达

[1480]

时间,小时	ALC-0315	SMI02	AKG-PS	AKG+PS
0.08	220.7±1.2	214±3.5	218.3±7.2	176.1±75.2
0.25	218.7±5.1	218.3±3.5	216.3±4.5	218.7±1.5
0.5	233.7±4.9	234±3.6	233±5	239.3±4.7
1	246±4.4	228.7±2.5	240.7±2.9	273.7±2.9
3	335.7±21.7	665±11.5	425.3±24.2	5,422±489.5
6	628±34	4,415.3±601.3	1,154.3±87.5	30,103.7±4,000.4
24	1,062±82.9	6,014.3±676.4	1,848.7±93.9	40,977.7±2,040.9
48	1,171.3+159.9	6,230+444.9	1,606+115.5	47,934.7+4,430.3
72	840±35	2,072.7±190.4	1,016.7±86.1	25,137.3±1,973.9
96	1,019±99.7	1,446.7±75.4	803±47.1	11,256.3±794.6

[1481] 实施例48.包含磷脂酰丝氨酸的脂质体与LNP的共孵育对mRNA.LNP的DC摄取的影响

[1482] 本实验的目的是确定包含PS变体的磷脂酰胆碱/胆固醇/PEG-DMG脂质体是否在体外竞争不同LNP制剂的细胞摄取。我们假设,如果包含PS的脂质体和LNP通过Tim4/Tim1和另一些PS特异性树突细胞表面受体内化,则包含PS的类似尺寸的非LNP的中性脂质体(“阻断脂质体”)将特异性阻断PS靶向LNP的摄取,并且缺乏PS的脂质体将具有较低的阻断效率,因此表明包含PS的LNP的增强的摄取机制是PS特异性的。本研究中使用的LNP为ALC-0315/DSPC/Chol/ALC-0159(46.3/9.4/42.7/1.56mol%,“ALC-0315”)、SM102/DSPC/Chol/PEG-DMG(50/10/38.5/1.5mol%,“SM102”)、KC30A/DSPC/Chol/PEG-DMG(48/10/40.5/1.5mol%,“KC30A-PS”)、和KC30A/DSPC/DPPS/Chol/PEG-DMG(48/5/5/40.5/1.5mol%,“KC30A+PS”)。将荧光标志物DiIC18(5)-DS以0.025mol％添加至每一个。如实施例9和10中所述制备和表征LNP。

[1483] 脂质体的制备。在制备阻断脂质体中考虑了数个设计要素。首先,大多数脂质应与KC30A在其双层形成特性方面相似。因此,选择了与KC30A具有相同烷基链的1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC),并且以与KC30A-LNP相同的比例在48mol％下使用其。其次,胆固醇和PEG-DMG含量保持在40.5和1.5mol％,与典型的基于KC30A的LNP一致。对于不含PS的脂质体,使用10mol％的DSPC。对于包含PS的脂质体,用以下PS变体代替DSPC:L-DPPS、L-DOPS、L-DSPC(Avanti Polar Lipids)或D-DSPC(如实施例1E中所述)。

[1484] 如下制备脂质体:

[1485] 1.脂质储备溶液在乙醇(无RNA酶,DNA酶,Sigma E7023)中制备(除了DPPS是在乙醇-甲醇混合物中),在25ml玻璃梨形烧瓶中组合(基于72μmol DOPC)。

[1486] 2.将脂质溶液在50℃下旋转蒸发至可见干燥,并在65℃下重新溶解在0.5ml乙醇中。

[1487] 3.向脂质乙醇溶液中添加4.5ml 25mM Tris,145mM NaCl,pH 7.5(TBS-25-7.5),并在65℃下涡旋2分钟,以形成多层囊泡(multilamellar vesicle,MLV)。

[1488] 4.使用10ml thermobarrel挤出机(Lipex,Northern Lipids),在65℃,34至350psi下,使MLV通过孔径(从顶部至低部)为200nm(1)、100nm(1)和50nm(1)的聚碳酸酯径迹蚀刻膜(PCTE,Whatman Nuclepore)堆穿过五次,并在冰箱中冷藏过夜。

[1489] 5.使用SpectraPor 12-14MWCO 25mm管,在室温下对脂质体进行2次150ml TBS-25-7.5的透析,每次持续2小时。

[1490] 6.将脂质体通过0.2μm 13mm无菌PES过滤器(Nalgene)进行无菌过滤,并通过磷脂含量(如实施例37中所述,除了经稀释脂质体或标准品的等分试样为5μl,并且标准品的磷酸脂范围为2.5至10 mM)和通过使用DLS的颗粒尺寸进行表征。结果在下表58中示出。

[1491] 表58.对用于LNP共孵育研究的脂质体批次的表征

[1492]

批次	Ls-391	Ls-388	Ls-394	Ls-392	Ls-393
磷脂,	DSPC	DPPS	DOPS	D-DSPS	L-DSPS
PhL,mM,	14.2	13.70	12.8	14.2	14.2
Z-Ave,nm,	81.0	83.0	80.3	82.0	82.0
PDI,SD	0.0149	0.0409	0.0502	0.0454	0.0653

[1493] 如实施例11中所述将MutuDC1940细胞进行平板接种,除了使用96孔板并且将细胞以35,000个细胞/孔进行平板接种。在添加LNP(n=4)之前15分钟以约32μM的总脂质浓度添加脂质体。将LNP以0.1μg/ml mRNA或3.2μM总脂质添加,并且在37℃下孵育1小时之后,将细胞洗涤,并通过流式细胞术分析DiIC18(5)-DS信号。结果在图34和表59中示出。“仅细胞”样品的MedFI为319±56.6个荧光单位。

[1494] 表59.用LNP和脂质体阻断剂处理的细胞的DiIC18(5)-DS中位荧光强度(medFI,平均值±标准差(SD))。

[1495]

脂质体 \LNP	ALC-0135	SM102	KC3OA-PS	KC3OA+PS
无预处理	1105 ± 33	783 ± 92.5	2999.3 ± 224.5	25932.7 ± 3529.4
Ls-388 (DPPS)	579.3 ± 30.3	543.5 ± 81.4	1917.3 ± 104.6	2098.5 ± 137.5
Ls-391 (DSPC, 无PS)	791.5 ± 92.2	595.3 ± 77.8	1448.5 ± 74	26752.5 ± 1798.9
Ls-392 (D-DSPS)	837.8 ± 187.1	583.8 ± 67	1775 ± 380.4	28463.5 ± 1829.5
Ls-393 (L-DSPS)	638.8 ± 76.2	592.5 ± 84.4	2109 ± 96.1	2147.3 ± 142.5
Ls-394 (DOPS)	814 ± 138.1	915 ± 101.4	1342.3 ± 191.5	1744 ± 205.1

[1496] 我们观察到,没有脂质体对ALC-0315或SM102制剂的摄取有任何显著作用。然而,用某些脂质体的预处理对PS靶向KC3OA LNP的摄取有显著作用。例如,包含L-DPPS、L-DOPS或L-DSPS的脂质体广泛阻断靶向KC3OA+PS LNP的摄取,将其降低至与非靶向制剂KC3OA-PS相似的水平。相比之下,不含PS的脂质体对LNP摄取没有作用。重要的是,包含D-DSPS的脂质体没有作用,这表明摄取的特异性与PS的L-异构体有关。这些数据支持了这样的假设:PS靶向LNP通过L-异构体特异性PS依赖机制被DC内化。

[1497] 实施例49.D-或L-异构体对包含磷脂酰丝氨酸的LNP制剂在体外对鼠DC细胞的靶向能力的影响。

[1498] 本研究的目的是评价丝氨酸基团手性对包含磷脂酰丝氨酸的LNP的摄取和功能性

mRNA递送的影响。用N/P＝5.25的UO-1、KC2或KC3OA ICL制备包含mCherry mRNA(Trilink,目录号L-7203)的LNP并将其配制到15mM Tris,20％蔗糖,pH 7.4的缓冲液中以用于在-80℃下储存。磷脂酰丝氨酸(PS)脂质L-DSPS-Na、D-DSPS-Na或L-DPPS-NH_4以7.5mol％包含在包含UO-1的LNP的制剂中,并且以5.0mol％包含在KC系列ICL的制剂中,我们发现在之前的实验中其是每种ICL的最佳mol％。还制备了不含PS的LNP。将PS脂质滴定到制剂中,其中DSPC的mol％成比例降低。所有制剂中PS+DSPC组成为10mol％,并且对于不含PS的那些,DSPC为10mol％。相对于总LNP脂质,ICL含量为48mol％,胆固醇含量为38.5mol％,并且PEG-DMG含量为1.5mol％。DSPS-Na和DPPS-NH_4从Avanti Polar Lipids获得,并且如实施例9和10中所述合成和纯化D-DSPS。荧光非可交换脂质标志物DiIC18(5)-DS也以0.025mol％总脂质被包含。将制剂冷冻-解冻以模拟如实施例51中所述的在转染之前进行的样品制备的条件。LNP表征数据在表60中示出(缩写参见实施例47,表56)。

[1499] 表60.对实施例47中所述的LNP制剂的分析。

[1500]

	在C/F之后		在F/T之后		ζ		在C/F之后		在F/T之后	
LNP	Z-Ave	PDI	Z-Ave	PDI	pH 5	pH 7	%E.E	stdev	%E.E	stdev
UO-1/DPPS	91.80	0.09	91.62	0.10	16.77	-4.63	87.48	5.45	88.77	5.76
UO-1/DSPS	101.20	0.04	100.40	0.04	16.68	-2.47	89.60	5.85	89.86	8.07
UO-1/D-DSPS	104.30	0.08	102.70	0.08	18.40	-3.51	90.33	5.24	87.27	4.61
KC2/DPPS	81.44	0.04	79.25	0.04	12.74	-1.32	85.93	2.09	87.27	8.34
KC2/DSPS	85.32	0.02	83.28	0.03	9.78	-4.57	87.36	4.52	88.75	7.68
KC2/D-DSPS	84.88	0.07	85.35	0.03	10.70	-4.85	89.33	5.32	88.75	7.68
KC3OA/DPPS	104.60	0.12	103.90	0.12	15.69	-1.31	91.65	3.70	92.42	2.75
KC3OA/DSPS	111.80	0.08	110.50	0.12	16.31	-2.36	92.26	6.51	92.40	3.99
KC3OA/D-DSPS	115.10	0.12	114.20	0.10	14.47	-1.65	90.55	7.00	91.19	9.45
UO-1	96.92	0.09	124.80	0.13	11.04	1.32	88.33	8.65	82.35	5.97
KC2	106.00	0.09	106.60	0.12	17.17	-0.63	87.26	7.13	86.60	8.14
KC3OA	104.30	0.15	105.80	0.13	15.54	3.10	91.84	9.12	91.83	3.62

[1501] 我们发现在F/T之后LNP尺寸的变化小于2.8％,其LNP从97nm增加至125nm的UO-1(无PS)除外。LNP经冷冻和解冻后表现出在mRNA包封方面的极小变化(<3.5％),其中观察到从88％至82％的降低(降低6％)的UO-1(无PS)除外。当将LNP混悬在pH 5.0或pH 7.0的缓冲液中时,其表现出预期的ζ电位变化(它们从阳离子表面电荷变为中性表面电荷)。将LNP以0.3μg mRNA/ml(n＝4)添加至如实施例11中所述的MutuDC1940细胞中,并将细胞在3小时和24小时时洗涤,进行活/死染色,固定并使用AttuneNxT细胞仪通过流式细胞术分析mCherry和DiIC18(5)-DS信号。与非靶向样品和包含非天然D-异构体形式的DSPS的那些相比,用DSPS的L-异构体的靶向改善了MutuDC1940细胞的摄取。LNP摄取和mCherry表达是时间依赖性的(图35至38),并且数据在表61A中示出。

[1502] 表61A.在用实施例49的LNP处理3小时或24小时之后,MutuDC1940细胞中的mCherry中位荧光强度值。

[1503]

LNP 制剂	mCherry表达（3小时）		mCherry表达（24小时）	
	medFI	stdev	medFI	stdev
UT	169	3	149	4
UO1	283	28	1,514	70
UO1/DPPS	2,366	949	14,823	1,435
UO1/DSPS	1,972	873	14,809	3,717
UO1/D-DSPS	264	29	7,664	938
KC2	301	27	1,283	90
KC2/DPPS	1,678	432	10,883	2,185
KC2/DSPS	898	383	5,381	923
KC2/D-DSPS	233	25	3,114	378
KC3OA	525	59	4,999	386
KC3OA/DPPS	1,965	357	30,996	8,747
KC3OA/DSPS	1,484	215	22,768	6,034
KC3OA/D-DSPS	274	10	8,158	1,577

[1504] 表61B.用LNP(0.3μg mRNA剂量)处理3小时或24小时的MutuDC1940细胞的DiIC18(5)-DS中位荧光强度值

[1505]

LNP 制剂	细胞摄取 (DiIC18(5)-DS) –3 小时		细胞摄取 (DiIC18(5)-DS) -24小时	
	medFI	stdev	medFI	stdev
UT	247.8	38.0	279.0	227.4
UO1	21,032.5	803.6	14,119.5	1,701.2
UO1/DPPS	206,581.8	24,173.8	250,388.8	14,557.6
UO1/DSPS	138,715.8	17,472.5	166,328.3	36,956.2
UO1/D-DSPS	26,353.3	1,421.6	79,878.0	10,846.4
KC2	20,716.8	762.0	16,844.0	763.6
KC2/DPPS	117,301.5	7,956.7	144,347.8	6,911.8
KC2/DSPS	12,3615.0	6,040.3	130,389.8	12,992.5
KC2/D-DSPS	26,675.3	1,282.8	58,229.5	2,232.9

[1506]

KC3OA	56,610.0	2,856.1	18,451.8	630.3
KC3OA/DPPS	175,661.0	16,507.1	220,166.8	30,492.5
KC3OA/DSPS	145,807.8	16,163.0	186,204.0	23,922.1
KC3OA/D-DSPS	45,704.3	922.4	96,361.5	14,802.3

[1507] 表62.L-DPPS、L-DSPS或D-DSPS靶向LNP在MutuDC1940细胞中在3和24小时时的mCherry表达或DiIC18(5)-DS摄取的比较比率。比率表示为用包含L-DPPS的LNP处理的细胞相对于用非靶向LNP(DPPS/NT)、包含L-DSPS(DPPS/DSPS)或DSPS的D异构体(DPPS/D-DSPS)

的LNP处理的细胞在medFI mCherry或DiIC18(5)-DS信号方面的倍数差异。

[1508]

	24小时mCherry表达 (MedFI)			24小时DiIC18(5)-DS 摄取 (MedFI)		
ICL	DPPS/NT	DPPS/DSPS	DPPS/D-DSPS	DPPS/NT	DPPS/DSPS	DPPS/D-DSPS
UO-1	9.8	1.0	1.9	17.7	1.5	3.1
KC2	8.5	2.0	3.5	8.6	1.1	2.5
KC3OA	6.2	1.4	3.8	11.9	1.2	2.3
	3小时mCherry表达 (MedFI)			3小时DiI摄取 (MedFI)		
ICL	DPPS/NT	DPPS/DSPS	DPPS/D-DSPS	DPPS/NT	DPPS/DSPS	DPPS/D-DSPS
UO-1	8.4	1.2	9.0	9.8	1.5	1.5
KC2	5.6	1.9	7.2	5.7	2.4	5.8
KC3OA	3.7	1.3	7.2	3.1	1.4	5.5

[1509] 观察到在L-DPPS靶向LNP下在24小时时mutuDC1940 mCherry表达的6.2至9.8倍提高,表62中示出了最大的倍数提高来自包含UO-1ICL的LNP制剂。观察到相对于非靶向LNP,通过包含DPPS在24小时时LNP摄取(DiIC18(5)-DS信号)的相应11.9至17.7倍提高。一般而言,DPPS相对于DSPS在靶向能力方面有轻微优势,但DSPS的L-异构体是D-异构体脂质的7.2至9倍好,这表明PS的L异构体形式对于靶向DC的最佳LNP是重要的。我们认为,该实施例中的PS靶向LNP利用了天然PS/受体内化和细胞摄取机制来改善mRNA的胞内递送和翻译。

[1510] 实施例50.PEG-DLG对LNP生物物理特性和对人单核细胞来源树突细胞的转染效率的影响。

[1511] 由于脂质双分子层解离的增加,通常认为具有少于14个碳原子的双烃链的缀合脂质不能产生具有其核酸载荷的有效细胞递送的尺寸稳定的LNP。尽管如此,我们仍探索了我们的LNP制剂是否允许使用二-C12-PEG-缀合脂质(PEG-二月桂酰甘油,PEG-PLG)作为LNP稳定剂,提高LNP中PEG-DLG的mol%如何影响生物物理特性和转染效率。为此,将多种量的PEG-DLG并入到KC3OA+PS LNP中。还制备了包含1.5mol%的二-C14-PEG缀合脂质PEG DMG的KC3OA+PS LNP以用于比较。使用实施例9和10的方案用于制备和表征LNP,并且这些LNP的基础脂质组成为KC3OA/DSPC/DPPS-NH4/Chol/PEG-脂质,其摩尔比为48/5/5(42-X)/X,其中X=0.5、1.0、1.5、2.0或2.5,在5.25的N/P下的mRNA。LNP颗粒尺寸和mRNA包封效率在表63中示出。

[1512] 表63.实施例50中使用的KC3OA+PS LNP的物理化学特性

[1513]

批号	PEG-脂质	PEG脂质mol%	颗粒尺寸(nm)	PDI	%E.E±SD
032922-1	PEG-DMG	1.5	98.7	0.14	92.0±8.6
032922-2	PEG-DLG	0.5	94.4	0.13	92.5±7.6
032922-3	PEG-DLG	1.0	90.3	0.19	92.6±3.0
032922-4	PEG-DLG	1.5	93.3	0.14	91.9±4.4
032922-5	PEG-DLG	2.0	85.2	0.12	92.1±3.9
032922-6	PEG-DLG	2.5	81.5	0.13	91.6±3.6

[1514] 在具有增加量的PEG-DLG的LNP系列内,观察到了LNP尺寸与PEG-DLG含量之间(批号032922-2至032922-6)的反比关系,而包封效率保持在相似的约92%,也与1.5mol%PEG-DMG样品(92%)相似。批号032922-1和032922-4的相似尺寸和mRNA包封特征表明了包含PEG-DLG的LNP与包含PEG-DMG的那些LNP紧密相似。

[1515] 如实施例28中所述,在转染之前4天,使用CD14分离试剂盒(StemCell)将单核细胞从健康供体的PBMC中分离。供体1和供体2单核细胞的CD14纯度分别为95%和98%;总体生存力>92%。将单核细胞与IL-4(R&D,1000IU/mL)和GM-CSF(R&D,800IU/mL)在6孔培养皿中以1×10^6个细胞/mL在37℃、5%CO2下一起培养。在4天之后,将未成熟的DC收获,并以50,000个细胞/孔接种在96孔圆底板中。通过将小瓶置于37℃水浴中30秒或直至样品几乎完全融化来解冻LNP。将小瓶立即置于冰上直至使用。将LNP添加至最终浓度为1μg/ml和0.1μg/mL mRNA。对于1μg/mL处理,将LNP直接添加至每个孔,然后通过移液来混合孔。对于0.1μg/mL处理,将LNP在完全培养基中以1:10稀释,然后添加至每个孔并通过移液混合。在4小时之后,将成熟细胞因子混合物直接添加至由TNF-a(R&D,10ng/mL)、IL-1b(R&D,2ng/mL)、IL-6(R&D,1000IU/mL)和PGE1(R&D,1μg/mL)组成的每个孔。在24小时之后,将细胞离心,在PBS中洗涤,并通过流式细胞术分析mCherry荧光。使用CytExpert软件进行设门分析。

[1516] mCherry表达(图39)表明了mCherry表达与PEG-DLG含量之间的反比关系。LNP 032911-1至6包含以0.5mol%增量从0.5至2.5mol%变化的PEG-DLG的量。在该系列内,PEG-DLG含量的增加与mCherry表达的降低相关。如果在用PEG-DMG或PEG-DLG(批号032922-1v 032922-4)以各1.5mol%制备的LNP之间进行直接比较,则PEG-DMG LNP的mCherry表达是PEG-DLG LNP的约5.2倍(1μg/ml)或4.5倍(0.1μg/ml)高,而二者的LNP尺寸和mRNA包封效率是相似的。

[1517] 实施例51.对基于KC3-PA的LNP制剂中的PEG-DMG和PEG-DLG针对Covid刺突mRNA在体内产生抗刺突抗体的能力的比较。

[1518] 本研究的目的是比较包含编码SARS-COV2刺突蛋白的mRNA的LNP制剂中的PEG-DMG和PEG-DLG在小鼠中诱导抗SARS-COV2刺突蛋白抗体效价的能力。

[1519] mRNA的设计和制备。如实施例35中所述,编码SARS-CoV-2全长刺突蛋白并且侧翼是BNT162b2(Comirnaty®)疫苗中使用的相同UTR的mRNA由Vernal Biosciences制备。

[1520] LNP的制备

[1521] 使用48mol％的KC3-PA作为可电离脂质、5mol％DPPC作为磷脂、5mol％DPPS-NH_4、和1.5mol％至2.5mol％不同量的PEG-DLG,使用mRNA VRN029,其N/P比为5.25,如实施例9中所述制备LNP。类似于实施例50,增加PEG-脂质含量是以胆固醇含量为代价的。还使用了实施例35中由KC3-PA/DSPC/DPPS/Chol/PEG-DMG(48/5/5/40.5/1.5mol%)构成的比较物制剂031822-9。

[1522] 冷冻/解冻方案

[1523] 冷冻LNP是通过将样品小瓶部分浸入液氮(LN2)中5分钟完成的,随后在-80℃下储存。在给药之前,将各LNP的小瓶置于漂浮物中,并放置于37℃水浴中约30秒,直至小瓶内的冰几乎完全融化。

[1524] 对于本研究,将样品浓缩至>40μg/mL mRNA,并用不同体积的15mM Tris、20％蔗糖、pH 7.4稀释至40μg mRNA的靶浓度,并随后在LN2上冷冻。LNP的表征是在将LNP的等分试样解冻并用pH 7.4的15mM Tris以1:1(体积:体积)稀释使得最终浓度为在15mM Tris、10％蔗糖、pH 7.4中的20μg/mL mRNA之后进行的。这模拟了在用i.m.注射将50μL体积中的配制成LNP的1μg mRNA注射到后肢大腿区域来向动物给药之前使用的样品制备条件。通过颗粒尺寸和mRNA包封效率对LNP进行表征(表64)。

[1525] 表64.实施例51的Covid刺突mRNA免疫原性研究中使用的LNP的组成和表征

[1526]

批号	ICL	PEG-脂质	Mol %	% Chol	颗粒尺寸 (nm)	PDI	% E.E ± SD
031822-9	KC3-PA	PEG-DMG	1.5	40.5	89.7	0.26	87.4 ± 10.3
031822-10	KC3-PA	PEG-DLG	1.5	40.5	114.7	0.020	84.2 ± 5.7
031822-11	KC3-PA	PEG-DLG	2.0	40.0	101.2	0.020	88.8 ± 5.6
031822-12	KC3-PA	PEG-DLG	2.5	39.5	105.5	0.09	84.9 ± 3.9

[1527] 免疫接种和SARS-CoV-2抗刺突抗体效价。如实施例35中所述,用LNP对小鼠进行免疫接种,并进行标准间接ELISA来分析血清样品中针对SARS-CoV-2刺突蛋白的总IgG结合抗体。

[1528] 图40示出了在用基于KC3-PA的LNP加强给药之后2周(SD35)时小鼠血液中的抗刺突抗体的效价。出乎意料地,尽管体外mRNA表达存在差异(参见实施例50),但这些含有PEG-DMG和PEG-DLG的LNP在体内的表现非常相似。当PEG-DLG的mol％从总脂质的1.5mol％以上增加至2.0和2.5mol％时,使用单因素ANOVA和Dunnett多重比较事后检验,用相应的LNP所获得的平均抗体效价无统计学差异。这表明PEG-DLG可用作PEG-DMG的替代物。在一些实施方案中,PEG-DLG浓度的范围为约0.5至2.5mol％。

[1529] 实施例52.比较KC3-OA的包含PEG-DMG和PEG-DLG的SARS-COV-2刺突mRNA LNP制剂的免疫原性,DPPS含量(3.5至6.5mol％)的作用

[1530] 本研究的目的是比较包含编码SARS-COV2刺突蛋白的mRNA的包含PEG-DMG和PEG-DLG的基于KC3-OA的LNP制剂诱导针对SARS-COV2刺突蛋白的抗体的能力。使用编码SARS-CoV-2全长刺突蛋白的mRNA制备LNP,其使用KC3-OA作为可电离脂质、5mol％DPPS作为靶向配体,并且不同之处在于用于稳定LNP的PEG-脂质的类型。如实施例9中所述制备具有摩尔比为48/(10-X)/X/40.5/1.5,X＝3.5、5.0或6.5的KC3OA、DSPC、DPPS-NH_4、胆固醇和PEG-脂

质的LNP。其组成和表征在表65中示出。

[1531] 表65.实施例52中使用的包含KC3-OA的LNP的组成和表征。ZP,ζ电位(mV)。%EE,包封效率,%(平均值±标准偏差)。

批号	PEG-脂质	DPPS, mol%	Z-平均尺寸 (nm)	PDI	%E.E	ZP pH 7	ZP pH 5
051722-8	PEG-DMG	5.0	114.3	0.13	93.8 ± 5.6	7.12	-0.22
051722-11	PEG-DLG	5.0	107.6	0.15	94.7 ± 5.4	7.33	-0.47

[1532]

批号	PEG-脂质	DPPS, mol%	Z-平均尺寸 (nm)	PDI	%E.E	ZP pH 7	ZP pH 5
051722-9	PEG-DMG	3.5	103.8	0.13	94.3 ± 5.0	5.00	-0.03
051722-10	PEG-DMG	6.5	105.9	0.19	94.6 ± 5.4	11.82	-0.56

[1533] 通过IM注射将在50μL体积中的1μg配制成LNP的mRNA注射到后肢中来向Balb/C小鼠(n=5)给药。在给药之后3周,如实施例35中所述,收集血清并通过ELISA分析抗刺突抗体,数据在图41A中示出。

[1534] 同样,与体外结果相比,包含PEG-DLG而不是PEG-DMG显示出在免疫原性方面甚至轻微的改善,而其他颗粒特征是类似的。这表明PEG-DLG有潜力被用于产生类似的生物物理特征并且在体内具有类似或更好的活性的LNP制剂。当在加强之后2周时测量效价时,观察到包含PEG-DLG或PEG-DMG的5mol%DPPS靶向的KC3-OALNP之间有类似的效价(图41B),其是初免给药之后3周的效价(图41A)的至少两个数量级高。图41B还示出了含3.5至6.5mol%DPPS并且还包含1.5mol%PEG-DMG的制剂。在3.5至6.5mol%DPPS范围内的三种1.5mol%PEG-DMG LNP制剂在体内引发对mRNA编码抗原的免疫应答的能力方面彼此类似,并且与含1.5mol%PEG-DLG的5mol%DPPS制剂类似(图41B)。这些制剂的制剂尺寸和mRNA包封效率类似,表明可以将该范围的DPPS浓度包含在LNP中而其生物物理特征和/或免疫原性没有显著变化。

[1535] 实施例53.包含多种mol%的PEG-DMG和PEG-DLPE的LNP的生物物理特征和体外比较。

[1536] 本研究的目的是比较用多种浓度(0.5至2.5mol%)的不同二-C12-PEG脂质(磷脂酰乙醇胺脂质衍生物1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](PEG-DLPE))代替PEG-DMG对LNP颗粒尺寸、mRNA包封%和冷冻-解冻稳定性之生物物理特征的作用。如以上实施例9和10所述,制备、分析和冷冻LNP,所述LNP包含摩尔比为48/5/5/(42-X)/X,其中X=0.5、1.0、1.5、2.0或2.5的KC3OA/DSPC/DPPS-NH_4/胆固醇/PEG-脂质和mRNA,其N/P=5.25。LNP的分析数据在表66和表67中(缩写:%EE,mRNA包封效率,%;stdev,%EE标准偏差;混合之后,在脂质与mRNA溶液混合之后;离心+过滤之后,在通过离心

浓缩器交换缓冲液和0.2μm过滤之后;F/T之后,在冷冻-解冻循环之后;Z-Ave,通过DLS的z-平均颗粒尺寸,nm;PDI,尺寸多分散性指数)。

[1537] 表66.如由以上实施例10中所述的荧光Ribogreen®测定测量的包含KC3-OA的LNP的mRNA浓度和包封效率。

[1538]

批号	过程阶段	PEG-脂质	PEG-脂质 mol%(X)	mRNA μg/mL	%E.E	stdev
082322-1	冷冻/解冻前	PEG-DMG	0.5	45.7	92.0	1.8
082322-1	冷冻/解冻后	PEG-DMG	0.5	46.2	86.1	8.8
082322-2	冷冻/解冻前	PEG-DMG	1.0	60.3	92.2	8.7
082322-2	冷冻/解冻后	PEG-DMG	1.0	59.0	93.5	7.8
082322-3	冷冻/解冻前	PEG-DMG	1.5	59.8	90.9	2.6
082322-3	冷冻/解冻后	PEG-DMG	1.5	58.0	92.4	9.2
082322-4	冷冻/解冻前	PEG-DMG	2.0	52.3	90.3	7.9
082322-4	冷冻/解冻后	PEG-DMG	2.0	51.9	89.9	6.7
082322-5	冷冻/解冻前	PEG-DMG	2.5	56.6	89.5	7.8
082322-5	冷冻/解冻后	PEG-DMG	2.5	56.6	90.9	4.0
082322-11	冷冻/解冻前	PEG-DLPE	0.5	30.2	87.7	4.0
082322-11	冷冻/解冻后	PEG-DLPE	0.5	28.7	77.5	5.5
082322-12	冷冻/解冻前	PEG-DLPE	1.0	60.4	89.4	9.1
082322-12	冷冻/解冻后	PEG-DLPE	1.0	58.5	93.2	8.4
082322-13	冷冻/解冻前	PEG-DLPE	1.5	50.3	90.7	10.0
082322-13	冷冻/解冻后	PEG-DLPE	1.5	51.0	90.3	7.0
082322-14	冷冻/解冻前	PEG-DLPE	2.0	65.4	90.0	6.2
082322-14	冷冻/解冻后	PEG-DLPE	2.0	63.3	89.9	7.9
082322-15	冷冻/解冻前	PEG-DLPE	2.5	63.7	90.0	5.6
082322-15	冷冻/解冻后	PEG-DLPE	2.5	64.2	89.6	6.0

[1539] 一般而言,观察到冷冻/解冻之前和之后mRNA包封效率之间的差异很小(对于含1mol%或更多PEG-脂质的LNP,小于1.2%)。然而,在0.5mol%PEG-DLPE的情况下,在解冻之后的包封分别降低11.7%,这表明PEG-脂质浓度对该PEG-脂质变体的冷冻/解冻稳定性的重要性。

[1540] 表67.实施例53的包含KC3-OA的LNP在多种制备过程步骤下的颗粒尺寸特性。

[1541]

		混合之后		离心+过滤之后		F/T之后	
批号	PEG-脂质	Z-Ave	PDI	Z-Ave	PDI	Z-Ave	PDI
082322-1	0.5 PEG-DMG	78.34	0.10	123.10	0.05	124.30	0.07
082322-2	1.0 PEG-DMG	67.84	0.16	107.80	0.06	106.10	0.04
082322-3	1.5 PEG-DMG	59.43	0.14	89.48	0.07	92.96	0.07
082322-4	2.0 PEG-DMG	55.14	0.09	85.39	0.10	83.35	0.13
082322-5	2.5 PEG-DMG	53.24	0.15	74.84	0.11	74.43	0.15
082322-11	0.5 PEG-DLPE	102.90	0.10	154.10	0.12	156.80	0.13
082322-12	1.0 PEG-DLPE	91.21	0.28	129.10	0.19	129.20	0.17
082322-13	1.5 PEG-DLPE	82.43	0.34	122.40	0.22	120.90	0.25
082322-14	2.0 PEG-DLPE	81.70	0.28	114.90	0.22	112.70	0.20
082322-15	2.5 PEG-DLPE	92.6	0.32	101.0	0.20	102.5	0.21

[1542] 观察到对于PEG-DMG和PEG-DLPE二者,制剂内PEG-脂质浓度越低,则LNP尺寸越大。这很可能是公知的LNP制剂中PEG-脂质的浓度依赖性稳定作用的结果(Mui BL,et al.Mol Ther Nucleic Acids.2013Dec17;2(12):e139.doi:10.1038/mtna.2013.66.PMID:24345865;PMCID:PMC3894582)。一般而言,含PEG-DMG的LNP的尺寸比含相应含量的PEG-DLPE的那些更小(直径低19.8至27.0%)。然而,与原始样品相比,冷冻和解冻后的尺寸变化在所有情况下均小于1.5%。

[1543] 在用0.3μg/mL配制成LNP的mCherry mRNA孵育24小时之后,在鼠DC细胞系MutuDC1940中研究了实施例53的LNP中的mCherry蛋白mRNA的体外表达(表68,图42),其通过流式细胞术用实施例11中所述的实验细节和细胞样品制备进行测量。

[1544] 表68.用实施例53的LNP处理的MutuDC1940细胞中的mCherry中位荧光强度(MedFI)值。

[1545]

批号	PEG-脂质	X	MedFI	stdev
未处理			281.7	5.7
082322-1	PEG-DMG	0.5	183,442.3	27,278.5
082322-2	PEG-DMG	1.0	145,519.0	4,167.8
082322-3	PEG-DMG	1.5	81,032.7	4,320.6
082322-4	PEG-DMG	2.0	30,000.0	1,817.3
082322-5	PEG-DMG	2.5	12,835.0	564.3
082322-11	PEG-DLPE	0.5	61,306.7	2,682.7
082322-12	PEG-DLPE	1.0	48,264.7	5,298.1
082322-13	PEG-DLPE	1.5	31,809.3	2,376.0
082322-14	PEG-DLPE	2.0	34,627.0	2,546.0
082322-15	PEG-DLPE	2.5	27,116.7	2,789.8

[1546] 发现在各组内,较低的PEG-脂质浓度导致较高的转染率。包含PEG-DMG的LNP在较低PEG-脂质含量(1.5 mol%或更低)时表现最佳,而PEG-DLPE在PEG-脂质大于2 mol%时表现优于PEG-DMG。在选定的范围内,对于含PEG-DMG(0.5至2 mol%)的LNP(r^2=0.99)和包含0.5至1.5 mol%的PEG-DLPE的LNP(r^2=0.99),mCherry表达以线性方式降低。数据表明,另外的二-C12-PEG-脂质缀合物PEG-DLPE在LNP制剂中与PEG-DMG同样有效。其提供了具有高

mRNA捕获效率的LNP,对LNP尺寸具有浓度依赖作用,阻止LNP结构在冷冻和解冻后的不稳定性,提供了具有与PEG-DMG类似的mRNA转染活性的LNP,并且在较高的PEG密度下可比PEG-DMG更有效。

[1547] 实施例54.含一系列PS浓度的LNP的体内免疫原性比较,在单一PS浓度下在PEG-DMG与PEG-DLG之间的比较,以及DSPS和DPPS作为靶向配体的比较。

[1548] 本研究的第一目的是确定是否存在特定量的可被并入到基于KC3OA的LNP中从而在小鼠中实现最高抗体效价的PS靶向脂质。这是通过以下进行测试的:产生包含PEG-DMG的含0、2、3.5、5、6.5或9 mol%DPPS

[1549] (余量为DSPC,DPPS+DSPC之和等于总脂质的10 mol%)的包封mRNA VRN029(N/P=5.25)的LNP,以0.3μg配制成LNP的mRNA向小鼠给药(n=5),并在第20天收集血清并用于抗刺突抗体效价分析。如实施例9中所述制备和表征LNP,如实施例35对小鼠进行免疫接种并确定抗刺突抗体效价。第20天的效价数据在图43A中示出。对于活性在发现为最佳的2.0至5.0mol%范围内观察到对DPPS-NH_4含量的显著依赖性。表69中示出了每种制剂相对于不含DPPS(非靶向)的LNP的几何平均效价的比率。在表70和71中分别描述了实施例54中使用的LNP的脂质组成和生物物理特征。

[1550] 表69.在第20天,给定制剂与非靶向变体(不含DPPS靶向脂质的KC3OA)的血清抗刺突抗体效价之间的倍数差异。

[1551]

制剂	相对于非靶向KC3-OA的几何平均值倍数差异
KC3-OA, 9 DPPS, 1.5 PEG-DMG	0.66
KC3-OA, 6.5 DPPS, 1.5 PEG-DMG	1.78
KC3-OA, 5 DPPS, 1.5 PEG-DMG	6.48
KC3-OA, 3.5 DPPS, 1.5 PEG-DMG	5.96
KC3-OA, 2 DPPS, 1.5 PEG-DMG	4.63

[1552] 根据以上数据,发现最佳的DPPS mol%在2至5mol%内。制备、表征了一组包含3.5mol%DPPS但不同之处在于PEG-DLG或PEG-DMG的量的LNP,并且以0.3μg配制成LNP的mRNA对小鼠进行免疫接种。制备ALC-0315LNP作为对照。通过降低Chol含量的成比例mol%,在KC3-OALNP(KC3OA/DSPC/DPPS/Chol/PEG脂质为48/6.5/3.5/42-X/X摩尔部分,X=0.5、1.0、1.5、2.0)中包含不同量的PEG-DMG或PEG-DLG。在初始初免给药之后2周,在第35天测量抗刺突效价(图43B)。在PEG-DMG的情况下(制剂16、15和5分别为0.5、1.0和1.5mol%PEG-DMG,表70),没有观察到在抗体效价方面的显著变化。平均LNP尺寸分别为145、125和103nm,其中发现尺寸与PEG-脂质含量成反比(表71)。另外,对于检测的含1.0、1.5或2.0mol%PEG-DLG的制剂,没有观察到在效价方面的显著变化,并且根据免疫原性读出,这些制剂是不可区分的。这些制剂的LNP Z-平均颗粒尺寸与PEG-DLG含量以113、94和88nm分别相对于1.0、1.5和2.0mol%也呈负相关。在多种不同浓度的PEG-DMG和PEG-DLG中,来源于3.5mol%DPPS靶向的KC3-OA LNP的数据的相似性表明PEG-DLG可用作LNP制剂中PEG-DMG的替代物。所有DPPS靶向KC3-OA制剂,无论其PEG-脂质特性或浓度如何,都比ALC-0315对照制剂或非靶向KC3-OALNP显著更有活性。

[1553] 另外,完成了对使用DSPS-Na作为靶向组分(5mol%)的含1.5mol%PEG-DMG或PEG-DLG的基于KC3-OA的LNP制剂的比较,并且图43C中示出了SD35效价数据。还测试了含5mol%DPPS和1.5mol%PEG-DMG的KC3OA的比较物制剂。数据显示,所述制剂具有类似的免疫原性,这表明DSPS和DPPS对于树突细胞靶向目的是等同的,并且PEG-DLG可用作LNP制剂中PEG-DMG的有效替代物,可能不易于引发不期望的抗PEG抗体应答。

[1554] 表70中示出了实施例54中使用的制剂的所有脂质组成,而表71中示出了生物物理特征(例如尺寸、ζ电位和mRNA包封)。所有LNP中总磷脂为10mol%,其在包含不同量的磷脂酰丝氨酸之后用DSPC补足差异。

[1555] 表70.实施例54中使用的LNP制剂细节

[1556]

LNP#	ICL	mol%	PtdSer	mol%	Chol, mol%	PEG	mol%
1	ALC-0315	46.3	无	0	42.7	ALC-0159	1.5
2	KC3-OA	48	DPPS-NH4	9	40.5	PEG-DMG	1.5
3	KC3-OA	48	DPPS-NH4	6.5	40.5	PEG-DMG	1.5
4	KC3-OA	48	DPPS-NH4	5	40.5	PEG-DMG	1.5
5	KC3-OA	48	DPPS-NH4	3.5	40.5	PEG-DMG	1.5
6	KC3-OA	48	DPPS-NH4	2	40.5	PEG-DMG	1.5
7	KC3-OA	48	无	0	40.5	PEG-DMG	1.5
8	KC3-OA	48	DPPS-NH4	3.5	40.5	PEG-DLG	1.5
9	KC3-OA	48	无	0	40.5	PEG-DLG	1.5
10	KC3-OA	48	DSPS-Na	5	40.5	PEG-DMG	1.5
11	KC3-OA	48	DSPS-Na	5	40.5	PEG-DLG	1.5
12	KC3-OA	48	DPPS-NH4	3.5	41	PEG-DMG	1
13	KC3-OA	48	DPPS-NH4	3.5	41.5	PEG-DMG	0.5
14	KC3-OA	48	DPPS-NH4	3.5	40	PEG-DLG	2
15	KC3-OA	48	DPPS-NH4	3.5	41	PEG-DLG	1

[1557] 表71.%E.E是指mRNA包封效率。F/T是指冷冻/解冻。

[1558]

	C/F		F/T之后		C/F		F/T之后	
LNP#	尺寸	PDI	尺寸	PDI	% E.E	stdev	% E.E	stdev
1	84.21	0.12	80.88	0.10	79.2	2.5	79.8	2.1
2	94.88	0.08	95.44	0.12	89.9	5.7	91.0	1.2
3	97.22	0.09	96.31	0.09	90.0	6.1	91.0	1.2
4	99.84	0.06	98.44	0.09	89.8	5.6	90.6	4.9
5	103.90	0.08	103.40	0.08	89.1	5.4	89.1	4.0
6	109.30	0.07	106.20	0.10	90.1	5.6	90.0	7.7
7	103.50	0.03	102.70	0.07	90.0	3.4	89.8	4.2
8	93.51	0.11	93.98	0.11	89.9	4.5	90.8	6.4
9	100.70	0.10	98.92	0.10	89.8	6.1	89.3	4.6
10	101.60	0.04	99.64	0.05	90.2	4.2	91.3	5.9
11	101.00	0.04	104.40	0.01	89.7	3.6	90.9	5.3
12	122.70	0.04	124.80	0.07	91.6	5.8	92.2	5.1
13	143.60	0.04	145.30	0.02	91.2	4.6	91.7	5.0
4	88.72	0.11	89.88	0.09	89.7	6.3	90.2	8.9
15	112.90	0.06	107.60	0.07	90.1	2.6	90.2	8.9

[1559] 表69和表70中分别示出了LNP制剂和表征数据。各制剂中LNP的%E.E为79.2至91.6%,并且作为冷冻-解冻的结果%E.E变化至低于2.5%。在缓冲液交换和无菌过滤之后,不同制剂之间的LNP颗粒尺寸为80.9至145.3nm,并且冷冻和解冻后的尺寸变化小于5%。

[1560] 表72.在第0天和第21天:出血时间第35天(加强)时,在用LNP中的0.3μg mRNA处理的小鼠中的抗SARS-COV-2刺突蛋白抗体的Log转换的倒数血清效价。Log效价表示为平均值±标准偏差(中位数)。

[1561]

制剂	组成	第35天Log效价
1	ALC-0315,ALC-0159	5.16±0.15(5.15)
2	KC3-OA,9DPPS,1.5PEG-DMG	5.28±0.49(5.55)
3	KC3-OA,6.5DPPS,1.5PEG-DMG	5.85±0.20(5.75)
4	KC3-OA,5DPPS,1.5PEG-DMG	5.88±0.33(5.70)
5	KC3-OA,3.5DPPS,1.5PEG-DMG	5.84±0.17(5.78)
6	KC3-OA,2DPPS,1.5PEG-DMG	5.73±0.20(5.73)
7	KC3-OA,0DPPS,1.5PEG-DMG	5.53±0.25(5.64)
8	KC3-OA,3.5DPpS,1.5PEG-DLG	5.66±0.07(5.64)
9	KC3-OA,0DPPS,1.5PEG-DLG	5.17±0.05(5.16)
10	KC3-OA,5DSPS,1.5PEG-DMG	6.07±0.51(6.03)
11	KC3-OA,5DSPS,1.5PEG-DLG	5.77±0.09(5.76)
12	KC3-OA,3.5DPPS,1PEG-DMG	5.84±0.27(5.79)
13	KC3-OA,3.5DPPS,0.5PEG-DMG	5.67±0.07(5.65)
14	KC3-OA,3.5DPPS,2PEG-DLG	5.72±0.23(5.75)
15	KC3-OA,3.5DPPS,1PEG-DLG	5.67±0.24(5.70)

[1562] 该研究表明,潜在免疫原性较低的包含二月桂酰基烷基链的缀合脂质可以成功地用于为局部施用(例如在肌内递送的LNP疫苗的情况下)开发的LNP组合物中。

[1563] 实施例55.包封不同的SARS-CoV-2全长刺突蛋白编码mRNA的LNP的比较。

[1564] 本研究的目的是比较编码SARS-CoV-2全长刺突蛋白、侧翼是BNT162b2(Comirnaty)疫苗(VRN029)中使用的相同UTR的mRNA,与两种另外的包含相同内源性5'信号序列和polyA尾但其ORF密码子优化和UTR优化和序列不同的mRNA。两种mRNA变体是VRN118(Akagera(AKG)优化的,HBB UTR,SEQ ID:NO 3)和VRN119(AKG优化的,Vernal UTR,SEQ ID:NO 4)。我们假设,Comirnaty®疫苗药物产品中包含的mRNA的序列优化可导致免疫原性增强。

[1565] 以下列出了VRN 118(SEQ ID NO:3)的序列。

[1566]

ACATTTGCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGCCACCATGTTCGTGTTCCTGGTGCTGCTGCCC
CTGGTGAGCAGCCAGTGCGTGAACCTGACCACCAGGACCCAGCTGCCCCCCGCCTACACCAACAGCTTCACCAGGGG
CGTGTACTACCCCGACAAGGTGTTCAGGAGCAGCGTGCTGCACAGCACCCAGGACCTGTTCCTGCCCTTCTTCAGCA
ACGTGACCTGGTTCCACGCCATCCACGTGAGCGGCACCAACGGCACCAAGAGGTTCGACAACCCCGTGCTGCCCTTC
AACGACGGCGTGTACTTCGCCAGCACCGAGAAGAGCAACATCATCAGGGGCTGGATCTTCGGCACCACCCTGGACAG
CAAGACCCAGAGCCTGCTGATCGTGAACAACGCCACCAACGTGGTGATCAAGGTGTGCGAGTTCCAGTTCTGCAACG
ACCCCTTCCTGGGCGTGTACTACCACAAGAACAACAAGAGCTGGATGGAGAGCGAGTTCAGGGTGTACAGCAGCGCC
AACAACTGCACCTTCGAGTACGTGAGCCAGCCCTTCCTGATGGACCTGGAGGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAACCT
GAGGGAGTTCGTGTTCAAGAACATCGACGGCTACTTCAAGATCTACAGCAAGCACACCCCCATCAACCTGGTGAGGG
ACCTGCCCCAGGGCTTCAGCGCCCTGGAGCCCCTGGTGGACCTGCCCATCGGCATCAACATCACCAGGTTCCAGACC
CTGCTGGCCCTGCACAGGAGCTACCTGACCCCCGGCGACAGCAGCAGCGGCTGGACCGCCGGCGCCGCCGCCTACTA
CGTGGGCTACCTGCAGCCCAGGACCTTCCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGCACCATCACCGACGCCGTGGACTGCG
CCCTGGACCCCCTGAGCGAGACCAAGTGCACCCTGAAGAGCTTCACCGTGGAGAAGGGCATCTACCAGACCAGCAAC
TTCAGGGTGCAGCCCACCGAGAGCATCGTGAGGTTCCCCAACATCACCAACCTGTGCCCCTTCGGCGAGGTGTTCAA
CGCCACCAGGTTCGCCAGCGTGTACGCCTGGAACAGGAAGAGGATCAGCAACTGCGTGGCCGACTACAGCGTGCTGT
ACAACAGCGCCAGCTTCAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGAGCCCCACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACCAAC
GTGTACGCCGACAGCTTCGTGATCAGGGGCGACGAGGTGAGGCAGATCGCCCCCGGCCAGACCGGCAAGATCGCCGA
CTACAACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGCGTGATCGCCTGGAACAGCAACAACCTGGACAGCAAGGTGG
GCGGCAACTACAACTACCTGTACAGGCTGTTCAGGAAGAGCAACCTGAAGCCCTTCGAGAGGGACATCAGCACCGAG
ATCTACCAGGCCGGCAGCACCCCCTGCAACGGCGTGGAGGGCTTCAACTGCTACTTCCCCCTGCAGAGCTACGGCTT
CCAGCCCACCAACGGCGTGGGCTACCAGCCCTACAGGGTGGTGGTGCTGAGCTTCGAGCTGCTGCACGCCCCCGCCA
CCGTGTGCGGCCCCAAGAAGAGCACCAACCTGGTGAAGAACAAGTGCGTGAACTTCAACTTCAACGGCCTGACCGGC
ACCGGCGTGCTGACCGAGAGCAACAAGAAGTTCCTGCCCTTCCAGCAGTTCGGCAGGGACATCGCCGACACCACCGA
CGCCGTGAGGGACCCCCAGACCCTGGAGATCCTGGACATCACCCCCTGCAGCTTCGGCGGCGTGAGCGTGATCACCC
CCGGCACCAACACCAGCAACCAGGTGGCCGTGCTGTACCAGGACGTGAACTGCACCGAGGTGCCCGTGGCCATCCAC
GCCGACCAGCTGACCCCCACCTGGAGGGTGTACAGCACCGGCAGCAACGTGTTCCAGACCAGGGCCGGCTGCCTGAT
CGGCGCCGAGCACGTGAACAACAGCTACGAGTGCGACATCCCCATCGGCGCCGGCATCTGCGCCAGCTACCAGACCC
AGACCAACAGCCCCAGGAGGGCCAGGAGCGTGGCCAGCCAGAGCATCATCGCCTACACCATGAGCCTGGGCGCCGAG
AACAGCGTGGCCTACAGCAACAACAGCATCGCCATCCCCACCAACTTCACCATCAGCGTGACCACCGAGATCCTGCC
CGTGAGCATGACCAAGACCAGCGTGGACTGCACCATGTACATCTGCGGCGACAGCACCGAGTGCAGCAACCTGCTGC
TGCAGTACGGCAGCTTCTGCACCCAGCTGAACAGGGCCCTGACCGGCATCGCCGTGGAGCAGGACAAGAACACCCAG
GAGGTGTTCGCCCAGGTGAAGCAGATCTACAAGACCCCCCCCATCAAGGACTTCGGCGGCTTCAACTTCAGCCAGAT
CCTGCCCGACCCCAGCAAGCCCAGCAAGAGGAGCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAGGTGACCCTGGCCGACG
CCGGCTTCATCAAGCAGTACGGCGACTGCCTGGGCGACATCGCCGCCAGGGACCTGATCTGCGCCCAGAAGTTCAAC
GGCCTGACCGTGCTGCCCCCCCTGCTGACCGACGAGATGATCGCCCAGTACACCAGCGCCCTGCTGGCCGGCACCAT
CACCAGCGGCTGGACCTTCGGCGCCGGCGCCGCCCTGCAGATCCCCTTCGCCATGCAGATGGCCTACAGGTTCAACG
GCATCGGCGTGACCCAGAACGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCAACCAGTTCAACAGCGCCATCGGCAAG
ATCCAGGACAGCCTGAGCAGCACCGCCAGCGCCCTGGGCAAGCTGCAGGACGTGGTGAACCAGAACGCCCAGGCCCT
GAACACCCTGGTGAAGCAGCTGAGCAGCAACTTCGGCGCCATCAGCAGCGTGCTGAACGACATCCTGAGCAGGCTGG
ACCCCCCCGAGGCCGAGGTGCAGATCGACAGGCTGATCACCGGCAGGCTGCAGAGCCTGCAGACCTACGTGACCCAG
CAGCTGATCAGGGCCGCCGAGATCAGGGCCAGCGCCAACCTGGCCGCCACCAAGATGAGCGAGTGCGTGCTGGGCCA
GAGCAAGAGGGTGGACTTCTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCCCAGAGCGCCCCCCACGGCGTGGTGT
TCCTGCACGTGACCTACGTGCCCGCCCAGGAGAAGAACTTCACCACCGCCCCCGCCATCTGCCACGACGGCAAGGCC
CACTTCCCCAGGGAGGGCGTGTTCGTGAGCAACGGCACCCACTGGTTCGTGACCCAGAGGAACTTCTACGAGCCCCA
GATCATCACCACCGACAACACCTTCGTGAGCGGCAACTGCGACGTGGTGATCGGCATCGTGAACAACACCGTGTACG

ACCCCCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAGGAGGAGCTGGACAAGTACTTCAAGAACCACACCAGCCCCGACGTG
GACCTGGGCGACATCAGCGGCATCAACGCCAGCGTGGTGAACATCCAGAAGGAGATCGACAGGCTGAACGAGGTGGC
CAAGAACCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAGGAGCTGGGCAAGTACGAGCAGTACATCAAGTGGCCCTGGTACA
TCTGGCTGGGCTTCATCGCCGGCCTGATCGCCATCGTGATGGTGACCATCATGCTGTGCTGCATGACCAGCTGCTGC
AGCTGCCTGAAGGGCTGCTGCAGCTGCGGCAGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGACAGCGAGCCCGTGCTGAAGGG
CGTGAAGCTGCACTACACCTGATAATAGGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCCTTTGTTCCCTA
AGTCCAACTACTAAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTT
CATTGCAA

[1567] 以下列出了VRN 119(SEQ ID NO:4)的序列。

[1568]

GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCCCGGCGCCACCATGTTCGTGTTCCTGGTGCTGCT
GCCCCTGGTGAGCAGCCAGTGCGTGAACCTGACCACCAGGACCCAGCTGCCCCCCGCCTACACCAACAGCTTCACCA
GGGGCGTGTACTACCCCGACAAGGTGTTCAGGAGCAGCGTGCTGCACAGCACCCAGGACCTGTTCCTGCCCTTCTTC
AGCAACGTGACCTGGTTCCACGCCATCCACGTGAGCGGCACCAACGGCACCAAGAGGTTCGACAACCCCGTGCTGCC
CTTCAACGACGGCGTGTACTTCGCCAGCACCGAGAAGAGCAACATCATCAGGGGCTGGATCTTCGGCACCACCCTGG
ACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTGATCGTGAACAACGCCACCAACGTGGTGATCAAGGTGTGCGAGTTCCAGTTCTGC
AACGACCCCTTCCTGGGCGTGTACTACCACAAGAACAACAAGAGCTGGATGGAGAGCGAGTTCAGGGTGTACAGCAG
CGCCAACAACTGCACCTTCGAGTACGTGAGCCAGCCCTTCCTGATGGACCTGGAGGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGA
ACCTGAGGGAGTTCGTGTTCAAGAACATCGACGGCTACTTCAAGATCTACAGCAAGCACACCCCCATCAACCTGGTG
AGGGACCTGCCCCAGGGCTTCAGCGCCCTGGAGCCCCTGGTGGACCTGCCCATCGGCATCAACATCACCAGGTTCCA
GACCCTGCTGGCCCTGCACAGGAGCTACCTGACCCCCGGCGACAGCAGCAGCGGCTGGACCGCCGGCGCCGCCGCCT
ACTACGTGGGCTACCTGCAGCCCAGGACCTTCCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGCACCATCACCGACGCCGTGGAC
TGCGCCCTGGACCCCCTGAGCGAGACCAAGTGCACCCTGAAGAGCTTCACCGTGGAGAAGGGCATCTACCAGACCAG
CAACTTCAGGGTGCAGCCCACCGAGAGCATCGTGAGGTTCCCCAACATCACCAACCTGTGCCCCTTCGGCGAGGTGT
TCAACGCCACCAGGTTCGCCAGCGTGTACGCCTGGAACAGGAAGAGGATCAGCAACTGCGTGGCCGACTACAGCGTG
CTGTACAACAGCGCCAGCTTCAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGAGCCCCACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCAC
CAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGATCAGGGGCGACGAGGTGAGGCAGATCGCCCCCGGCCAGACCGGCAAGATCG
CCGACTACAACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGCGTGATCGCCTGGAACAGCAACAACCTGGACAGCAAG
GTGGGCGGCAACTACAACTACCTGTACAGGCTGTTCAGGAAGAGCAACCTGAAGCCCTTCGAGAGGGACATCAGCAC
CGAGATCTACCAGGCCGGCAGCACCCCCTGCAACGGCGTGGAGGGCTTCAACTGCTACTTCCCCCTGCAGAGCTACG
GCTTCCAGCCCACCAACGGCGTGGGCTACCAGCCCTACAGGGTGGTGGTGCTGAGCTTCGAGCTGCTGCACGCCCCC
GCCACCGTGTGCGGCCCCAAGAAGAGCACCAACCTGGTGAAGAACAAGTGCGTGAACTTCAACTTCAACGGCCTGAC
CGGCACCGGCGTGCTGACCGAGAGCAACAAGAAGTTCCTGCCCTTCCAGCAGTTCGGCAGGGACATCGCCGACACCA
CCGACGCCGTGAGGGACCCCCAGACCCTGGAGATCCTGGACATCACCCCCTGCAGCTTCGGCGGCGTGAGCGTGATC
ACCCCCGGCACCAACACCAGCAACCAGGTGGCCGTGCTGTACCAGGACGTGAACTGCACCGAGGTGCCCGTGGCCAT
CCACGCCGACCAGCTGACCCCCACCTGGAGGGTGTACAGCACCGGCAGCAACGTGTTCCAGACCAGGGCCGGCTGCC
TGATCGGCGCCGAGCACGTGAACAACAGCTACGAGTGCGACATCCCCATCGGCGCCGGCATCTGCGCCAGCTACCAG
ACCCAGACCAACAGCCCCAGGAGGGCCAGGAGCGTGGCCAGCCAGAGCATCATCGCCTACACCATGAGCCTGGGCGC
CGAGAACAGCGTGGCCTACAGCAACAACAGCATCGCCATCCCCACCAACTTCACCATCAGCGTGACCACCGAGATCC
TGCCCGTGAGCATGACCAAGACCAGCGTGGACTGCACCATGTACATCTGCGGCGACAGCACCGAGTGCAGCAACCTG
CTGCTGCAGTACGGCAGCTTCTGCACCCAGCTGAACAGGGCCCTGACCGGCATCGCCGTGGAGCAGGACAAGAACAC
CCAGGAGGTGTTCGCCCAGGTGAAGCAGATCTACAAGACCCCCCCCATCAAGGACTTCGGCGGCTTCAACTTCAGCC
AGATCCTGCCCGACCCCAGCAAGCCCAGCAAGAGGAGCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAGGTGACCCTGGCC
GACGCCGGCTTCATCAAGCAGTACGGCGACTGCCTGGGCGACATCGCCGCCAGGGACCTGATCTGCGCCCAGAAGTT
CAACGGCCTGACCGTGCTGCCCCCCCTGCTGACCGACGAGATGATCGCCCAGTACACCAGCGCCCTGCTGGCCGGCA
CCATCACCAGCGGCTGGACCTTCGGCGCCGGCGCCGCCCTGCAGATCCCCTTCGCCATGCAGATGGCCTACAGGTTC
AACGGCATCGGCGTGACCCAGAACGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCAACCAGTTCAACAGCGCCATCGG
CAAGATCCAGGACAGCCTGAGCAGCACCGCCAGCGCCCTGGGCAAGCTGCAGGACGTGGTGAACCAGAACGCCCAGG
CCCTGAACACCCTGGTGAAGCAGCTGAGCAGCAACTTCGGCGCCATCAGCAGCGTGCTGAACGACATCCTGAGCAGG
CTGGACCCCCCCGAGGCCGAGGTGCAGATCGACAGGCTGATCACCGGCAGGCTGCAGAGCCTGCAGACCTACGTGAC
CCAGCAGCTGATCAGGGCCGCCGAGATCAGGGCCAGCGCCAACCTGGCCGCCACCAAGATGAGCGAGTGCGTGCTGG
GCCAGAGCAAGAGGGTGGACTTCTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCCCAGAGCGCCCCCCACGGCGTG
GTGTTCCTGCACGTGACCTACGTGCCCGCCCAGGAGAAGAACTTCACCACCGCCCCCGCCATCTGCCACGACGGCAA
GGCCCACTTCCCCAGGGAGGGCGTGTTCGTGAGCAACGGCACCCACTGGTTCGTGACCCAGAGGAACTTCTACGAGC
CCCAGATCATCACCACCGACAACACCTTCGTGAGCGGCAACTGCGACGTGGTGATCGGCATCGTGAACAACACCGTG

TACGACCCCCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAGGAGGAGCTGGACAAGTACTTCAAGAACCACACCAGCCCCGA
CGTGGACCTGGGCGACATCAGCGGCATCAACGCCAGCGTGGTGAACATCCAGAAGGAGATCGACAGGCTGAACGAGG
TGGCCAAGAACCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAGGAGCTGGGCAAGTACGAGCAGTACATCAAGTGGCCCTGG
TACATCTGGCTGGGCTTCATCGCCGGCCTGATCGCCATCGTGATGGTGACCATCATGCTGTGCTGCATGACCAGCTG
CTGCAGCTGCCTGAAGGGCTGCTGCAGCTGCGGCAGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGACAGCGAGCCCGTGCTGA
AGGGCGTGAAGCTGCACTACACCTGATAATAGCTAGTGACTGACTAGGATCTGGTTACCACTAAACCAGCCTCAAGA
ACACCCGAATGGAGTCTCTAAGCTACATAATACCAACTTACACTTACAAAATGTTGTCCCCCAAAATGTAGCCATTC
GTATCTGCTCCTAATAAAAAGAAAGTTTCTTCACAT

[1569] 按照实施例9和10的程序制备和分析LNP,其脂质组成为摩尔比为48/6.5/3.5/40.5/1.5的KC3OA/DSPC/DPPS/Chol/PEG-DMG,mRNA N/P＝5.25(KC3OA),和摩尔比为46.3/9.4/42.7/1.5的ALC-0315/DSPC/Chol/ALC-0159,mRNA N/P＝6.2(ALC-0315)。分析数据在表73中(对于缩写,参见实施例47、表56)。

[1570] 表73.实施例55的LNP制剂的分析,KC3OA制剂

[1571]

		C/F之后		F/T 之后		C/F之后		FT之后	
ICL	mRNA	Z-Ave	PDI	Z-Ave	PDI	%EE	stdev	%EE	stdev
ALC-0315	VRN029	84.21	0.12	80.88	0.10	79.2	2.5	79.8	2.1
KC3-OA	VRN029	99.84	0.06	98.44	0.09	89.8	5.6	90.6	4.9
KC3-OA	VRN118	95.48	0.09	97.38	0.09	90.5	7.0	91.5	3.6
KC3-OA	VRN119	93.94	0.08	95.73	0.10	90.8	7.8	91.9	5.6

[1572] 本研究中使用的LNP的直径<100nm,并且表现出80至91％的良好mRNA包封,并且显示出这些特征在冷冻-解冻循环之后的极小变化。如实施例35在Balb/C小鼠中研究这些LNP的免疫原性,除了剂量为0.3μg mRNA之外。在注射之后第20天(初免)和第35天(加强),收集血清并评价抗刺突效价,并且数据在图44中示出。

[1573] 表74.在用包含多种编码刺突的mRNA的LNP处理的小鼠中,抗SARS-COV_2刺突蛋白抗体的Log转换的倒数血清效价。Log效价表示为平均值±标准偏差(中位数)。

[1574]

组成	第20天	第35天
ALC-0315,ALC-0159,VRN029mRNA	2.39±0.12(2.44)	5.16±0.15(5.15)
KC3-OA,5DPPS,1.5PEG-DMG,VRN029mRNA	3.85±0.33(3.79)	5.88±0.33(5.70)
KC3-OA,5DPPS,1.5PEG-DMG,VRN118mRNA	4.13±0.13(4.15)	5.82±0.05(5.81)
KC3-OA,5DPPS,1.5PEG-DMG,VRN119mRNA	4.10±0.28(4.07)	5.74±0.13(5.80)

[1575] 我们发现,在相同N/P=5.25比率下,在相同LNP制剂(KC3OA/DSPC/DPPS/Chol/PEG-DMG为48.5/5/5/40.5/1.5mol％)中配制的mRNA,mRNAVRN118和VRN119二者均导致优于VRN029的效价(平均为约1.5倍高),而VRN029的KC3OA/5％PS制剂是ALC-0315制剂的约35倍高。

[1576] 实施例32显示,在体外人单核细胞来源树突细胞中,KC3-OA PS靶向LNP与ALC-0315制剂相比具有更大的mCherry信号,其中两种制剂均包含相同的mRNA。在实施例45中,与使用相同mRNA的ALC-0315制剂相比,在体外MutuDC1940鼠DC细胞中观察到了类似地较优mCherry信号。实施例54和55显示,PS靶向LNP与基于ALC-0315的LNP相比具有优势,二者均使用SARS-CoV2 mRNA序列(VRN029)用于在小鼠中产生抗刺突效价。在该实施例中,使用另外两种不同的SARS-CoV2mRNA序列(VRN118和VRN119),确定了在SD20(在初次免疫接种之后3周),DPPS靶向KC3-OA LNP与基于ALC-0315的制剂相比也具有更优的免疫原性。总之,这些数据表明,从基于KC3-OA/PS的LNP观察到的与基于ALC-0315的制剂相比增强的免疫原性是由于脂质载体,而不是mRNA。

[1577] 实施例56.LNP制剂和剂量在小鼠中对SARS-COV-2刺突mRNA的免疫原性的影响

[1578] 本研究的目的是在小鼠中比较Comirnaty®和Spikevax®已知mRNA-LNP疫苗中存在的LNP脂质制剂与KC3OA/5％DPPS在1、0.3和0.1μg mRNA VRN029剂量下的免疫原性。制备了对应于Comirnaty®、Spikevax®公开信息的制剂的组合物,并且在表75中示出了其脂质组成。还显示了KC3OA/5％DPPS的组成。所有制剂使用如前(实施例35)所述的NanoAssemblr制备,N/P分别=6.25、5.0和5.25,并且纯化到15mM Tris,20％蔗糖,pH 7.4,用于在-80℃下储存。

[1579] 表75.实施例56和图45A中使用的制剂的脂质组成

[1580]

	ICL		靶向					PEG-脂质	
LNP #	ICL	mol%	PtdSer	mol%	PC	mol%	Chol, mol%	PEG-脂质	mol%
1	ALC-0315	46.3	无	0	DSPC	9.4	42.7	ALC-0159	1.5
2	SM-102	50	无	0	DSPC	10	38.5	PEG-DMG	1.5
3	KC3-OA	48	DPPS-NH4	5	DSPC	5	40.5	PEG-DMG	1.5

[1581] 制剂生物物理特征在下表76中示出。对于缩写,参见实施例47、表56)

[1582] 表76.实施例56和图45A中使用的ALC-0315、SM102和KC3OA/5%DPPS LNP制剂的表征。

[1583]

	C/F 之后		F/T 之后		ζ电位		C/F 之后		F/T 之后	
LNP	Z-Ave	PDI	Z-Ave	PDI	pH 5	pH 7	%EE	stdev	% EE	stdev
ALC-0135	84.34	0.09	83.75	0.11	7.98	-3.63	87.5	3.7	87.1	3.1
SM102	91.92	0.04	92.20	0.07	14.64	-0.41	90.9	7.7	90.3	4.6
KC3OA/5 % DPPS	100.60	0.13	98.22	0.12	13.92	-1.74	93.2	9.2	93.6	2.3

[1584] 将制剂冷冻-解冻,以模拟在向动物给药之前进行的样品制备的条件。在冷冻和解冻之后,%E.E尺寸变化小于1%并且尺寸小于2.5%。当LNP混悬在pH 5.0(10mM MES,15mM NaCl)或pH 7.0(10mM HEPES,15mM NaCl)缓冲液中时,其表现出预期的ζ电位变化(其从阳离子表面电荷变为中性表面电荷)。通过IM注射将在50μL体积中的1μg、0.3μg或0.1μg配制成LNP的mRNA注射到后肢来向Balb/C小鼠给药,并在第3周时再次注射,并且如实施例35中所述,在第20天和第35天测量血清抗体效价(图45A,表77)。

[1585] 观察到所有制剂的抗体效价剂量依赖性。虽然ALC-0315和SM-102在较高剂量下具有类似的效价,但发现ALC-0315制剂具有非线性依赖性,其与SM-102相比在0.1μg剂量下的产量更低。相比之下,发现KC3OA/5%DPPS制剂与比较物ALC-0135和SM-102相比在所有测试剂量下均产生更高的效价(在1μg剂量下分别为2.7倍和3.7倍,并且在0.3μg剂量下分别为4.1倍和3.1倍),并且在较低剂量下差异显著增加(0.1μg,分别为80倍和6.1倍高,通过Mann-Whitney U检验P=0.009)。不受理论束缚,我们假设该免疫原性的强烈提高最有可能是通过包含DPPS而赋予该制剂的LNP被摄取到树突细胞中的特异性提高的结果。

[1586] 表77.在第0天(初免)和第21天(加强);出血时间第20天(初免)和第35天(初免-加强)时,用ALC-0315、SM-102和KC3OA/5%DPPS LNP在三个刺突mRNA剂量水平下处理的小鼠中的抗SARS-COV-2刺突蛋白抗体的Log转换的倒数血清效价。Log效价表示为平均值±标准偏差(中位数)。

[1587]

制剂	剂量 (μg/ 鼠)	第20天	第35天
ALC-0315	1	4.14 ± 0.20 (4.18)	5.99 ± 0.21 (5.93)
ALC-0315	0.3	3.13 ± 0.64 (3.32)	5.40 ± 0.30 (5.30)
ALC-0315	0.1	1.72 ± 0.46 (1.72)	3.85 ± 0.44 (3.98)
SM102	1	3.98 ± 0.54 (4.16)	5.85 ± 0.20 (5.78)
SM102	0.3	3.62 ± 0.58 (3.85)	5.52 ± 0.57 (5.61)
SM102	0.1	2.45 ± 0.82 (2.43)	4.96 ± 0.40 (5.15)
KC3OA/5 DPPS	1	4.30 ± 0.22 (4.25)	6.42 ± 0.11 (6.41)
KC3OA/5 DPPS	0.3	3.90 ± 0.36 (3.78)	6.01 ± 0.23 (6.03)
KC3OA/5 DPPS	0.1	2.96 ± 0.61 (3.03)	5.75 ± 0.10 (5.73)

[1588] 另外,确定了由配制在包含不同量的PEG-DMG的KC3-OA LNP中的SARS-COV-2刺突mRNA引发的抗刺突抗体应答的剂量依赖性。根据实施例9制备包含摩尔比为48/5/5/(42-X)/X,X＝0.5、1.0、1.5的KC3-OA/DPPS/DSPC/Chol/PEG-DMG的制剂。表78中为LNP分析数据,并且表79和图45B中为免疫原性结果。

[1589] 表78.实施例56、图45B中使用的KC3-OA制剂的生物物理特征。

[1590]

ICL	DPPS, mol%	PEG-DMG, mol%	过滤之后		ζ电位		%E.E	
			Z-Ave	PDI	ph 5	ph 7	过滤之后	stdev
KC3OA	5	1.5	98.2	0.12	7.98	-3.63	93.2	9.2
KC3OA	5	1.0	107.7	0.09	14.64	-0.41	93.6	11.6
KC3OA	5	0.5	130.6	0.08	13.92	-1.74	94.7	11.2

[1591] 表79.在第0天(初免)和第21天(加强);出血时间第20天(初免)和第35天(初免-加强)时,用含不同量的PEG-DMG的KC3OA/5％DPPS LNP在三个刺突mRNA剂量水平下处理的小鼠中的抗SARS-COV-2刺突蛋白抗体的Log转换的倒数血清效价。Log效价表示为平均值±标准偏差(中位数)。

[1592]

制剂	剂量 (μg/ 鼠)	第20天 Log效价	第35天 Log效价
KC3-OA, 1.5 mol% PEG-DMG	1	4.30 ± 0.22 (4.25)	6.42 ± 0.11 (6.41)
KC3-OA, 1.5 mol% PEG-DMG	0.3	3.90 ± 0.36 (3.78)	6.01 ± 0.23 (6.03)
KC3-OA, 1.5 mol% PEG-DMG	0.1	2.96 ± 0.61 (3.03)	5.75 ± 0.10 (5.73)
KC3-OA, 1.0 mol% PEG-DMG	1	4.28 ± 0.24 (4.36)	6.57 ± 0.24 (6.50)
KC3-OA, 1.0 mol% PEG-DMG	0.3	3.91 ± 0.48 (4.15)	6.14 ± 0.41 (6.04)
KC3-OA, 1.0 mol% PEG-DMG	0.1	2.63 ± 0.98 (3.06)	5.31 ± 0.46 (5.40)
KC3-OA, 0.5 mol% PEG-DMG	1	4.25 ± 0.32 (4.19)	6.35 ± 0.17 (6.26)
KC3-OA, 0.5 mol% PEG-DMG	0.3	3.74 ± 0.30 (3.59)	6.01 ± 0.23 (6.02)
KC3-OA, 0.5 mol% PEG-DMG	0.1	3.20 ± 0.69 (3.41)	5.72 ± 0.04 (5.73)

[1593] 在0.5至1.5mol％PEG-DMG的范围内,各剂量组中的抗体效价类似。

[1594] 实施例57.在小鼠中在低剂量下,PS靶向LNP制剂对SARS-CoV2刺突mRNA的免疫原性的影响。

[1595] 实施例56的数据(图45A)表明,在配制成LNP的mRNA的较低施用剂量下,KC3-OA制剂的免疫原性优势更显著。检查了通过包含PS而赋予的对DC的主动靶向是否在较低剂量下可更具特异性,因为体内负责LNP摄取的靶受体的量有限,并且在较高剂量下靶受体可以已饱和。这导致较大比例的剂量进入脱靶组织并且变得无效。对于使用ALS-0135ICL、KC3-OA ICL以及含5mol％DPPS作为靶向剂的KC3-OA ICL制备的包封SARS-COV-2刺突mRNA VRN029的LNP,是根据实施例9用以下脂质组成制备的:摩尔比为46.3/9.4/42.7/1.5的ALC-0315/DSPC/Chol/ALC-0159(ALC-0315),摩尔比为48/5/5/40.5/1.5的KC3-OA/DPPS-NH_4/DSPC/Chol/PEG-DMG(靶向KC3-OA),以及摩尔比为48/10/40.5/1.5的KC3-OA/DSPC/Chol/PEG-DMG(KC3-OA)。在N/P 5.25下添加mRNA。制剂的特征在于颗粒尺寸和包封效率(表80),并如实施例56中所述在第0天和第21天以0.1μg的mRNA剂量施用于小鼠。在第20天和第35天对血液取样,并如实施例35确定抗刺突抗体效价。结果(图46A,图46B)表明,在0.1μg mRNA的低剂量下,PS靶向的作用最高,与没有PS靶向的匹配制剂相比,导致抗体效价的12.7倍(第20天,通过Mann-Whitney U检验P＝0.028)和7倍(第35天,通过Mann-Whitney U检验P＝0.009)提高。已公开的比较物LNP制剂(ALC-0315)仅在该组5只小鼠中的一只中产生可检测的效价信号。

[1596] 表80.实施例57中使用的ALC-0315、KC3OA/5％DPPS和非靶向LNP制剂的表征。

[1597]

	过滤之后		F/T之后		ζ电位		%E.E		%E.E	
LNP	Z-Ave	PDI	Z-Ave	PDI	ph 5	ph 7	0.2 um	stdev	F/T之后	stdev
ALC-0135	84.34	0.09	83.75	0.11	7.98	-3.63	87.5	3.7	87.1	3.1
KC3OA/5 % DPPS	100.60	0.13	98.22	0.12	13.92	-1.74	93.2	9.2	93.6	2.3
KC3-OA	97.74	0.06	97.12	0.07	18.4	0.11	93.1	7.0	93.9	6.5

[1598] 实施例58.比较由可电离脂质ALC-0315、SM-102和AKG UO-1构成的LNP制剂中的较短烷基链PEG-DLG和PEG-DLPE。

[1599] 实施例52和53表明,在基于KC3-OA的LNP制剂中,二-C12-PEG-脂质PEG-DLG和PEG-

DLPE是用于稳定PEG-脂质PEG-DMG的可行选择。本研究的目的是制备和表征一系列基于其他可电离阳离子脂质的包含PEG-DLG或PEG-DLPE的LNP。其他可电离脂质。使用包含支链酯的ICL家族(ALC-0315和SM-102)以及在脂质尾部包含被两个亚甲基隔开的烯烃的二烷基可电离阳离子脂质(AKG-UO-1)。如实施例9中所述制备ALC-0315、SM-102和KC3-OA/PS LNP,其N/P比分别为6.2、5.0和5.25,使用编码mCherry的mRNA并将最终缓冲液交换到pH 7.4的PBS中。如实施例10中所述表征LNP的颗粒尺寸、mRNA包封和表面电荷。表81中示出了LNP脂质制剂和表征数据。(对于缩写,参见实施例47,表56)。

[1600] 表81.利用PEG-DLG或PEG-DLPE的LNP的脂质组成和表征。

[1601]

	C/F 之后		ζ		
制剂，脂质（摩尔比）	Z-Ave	PDI	pH 5	pH 7	% E.E ± stdev
ALC-0315/DSPC/Chol/PEG-DLG (46.5/9.4/42.7/1.5)	69.11	0.10	6.24	-1.93	86.4 ± 11.1
ALC-0315/DSPC/Chol/PEG-DLPE (46.5/9.4/42.7/1.5)	70.12	0.13	4.17	-4.78	83.9 ± 8.2
SM-102/DSPC/Chol/PEG-DLG (50/10/38.5/1.5)	69.80	0.02	9.28	0	89.3 ± 7.4
SM-102/DSPC/Chol/PEG-DLPE (50/10/38.5/1.5)	82.97	0.18	8.92	-2.18	89.4 + 5.6
AKG-UO-1/DSPC/DPPS/Chol/PEG-DLG (48/5/5/40.5/1.5)	80.08	0.08	8.52	-1.19	91.3 ± 2.8
AKG-UO-1/DSPC/DPPS/Chol/PEG-DLPE (48/5/5/40.5/1.5)	100.70	0.13	7.28	-2.03	90.9 ± 7.9

[1602] 表81中示出的LNP制剂显示出具有良好尺寸均质性(PDI<0.2)的小尺寸和mRNA捕获效率。表81中所述的ALC-0315、SM-102和AKG UO-1制剂与在其他实施例中所示的使用相同mol%的PEG-DMG代替的类似制剂(对于ALC-0315和SM-102的比较,参见实施例24、表20;并且对于UO-1的比较,参见实施例15、表9)具有类似的生物物理特征。因此,PEG-DLG和PEG-DLPE是作为稳定PEG-脂质用于基于多种ICL结构的LNP制剂的PEG-DMG的可行替代物。

[1603] 本公开内容的多个方面可以单独、组合或者以在前面描述的实施方案中未具体讨论的多种布置来使用,并因此其应用不限于前面描述中所阐述或在附图中所示出的组件的细节和布置。例如,一个实施方案中描述的方面可以与其他实施方案中描述的方面以任何方式组合。

[1604] 虽然已经讨论了主题公开内容的具体实施方案,但是上述说明是举例说明性的而非限制性的。本公开内容的许多变化对于本领域技术人员在阅读本说明书之后将变得明显。本公开内容的全部范围应当通过参考权利要求书及其等同物的全部范围、以及说明书以及这样的变化来确定。

[1605] 本说明书中引用的所有出版物、专利和专利申请出于所有目的通过引入整体并入本文,其程度如同具体地指示每个单独的出版物、专利或专利申请均如此通过引用并入一样。

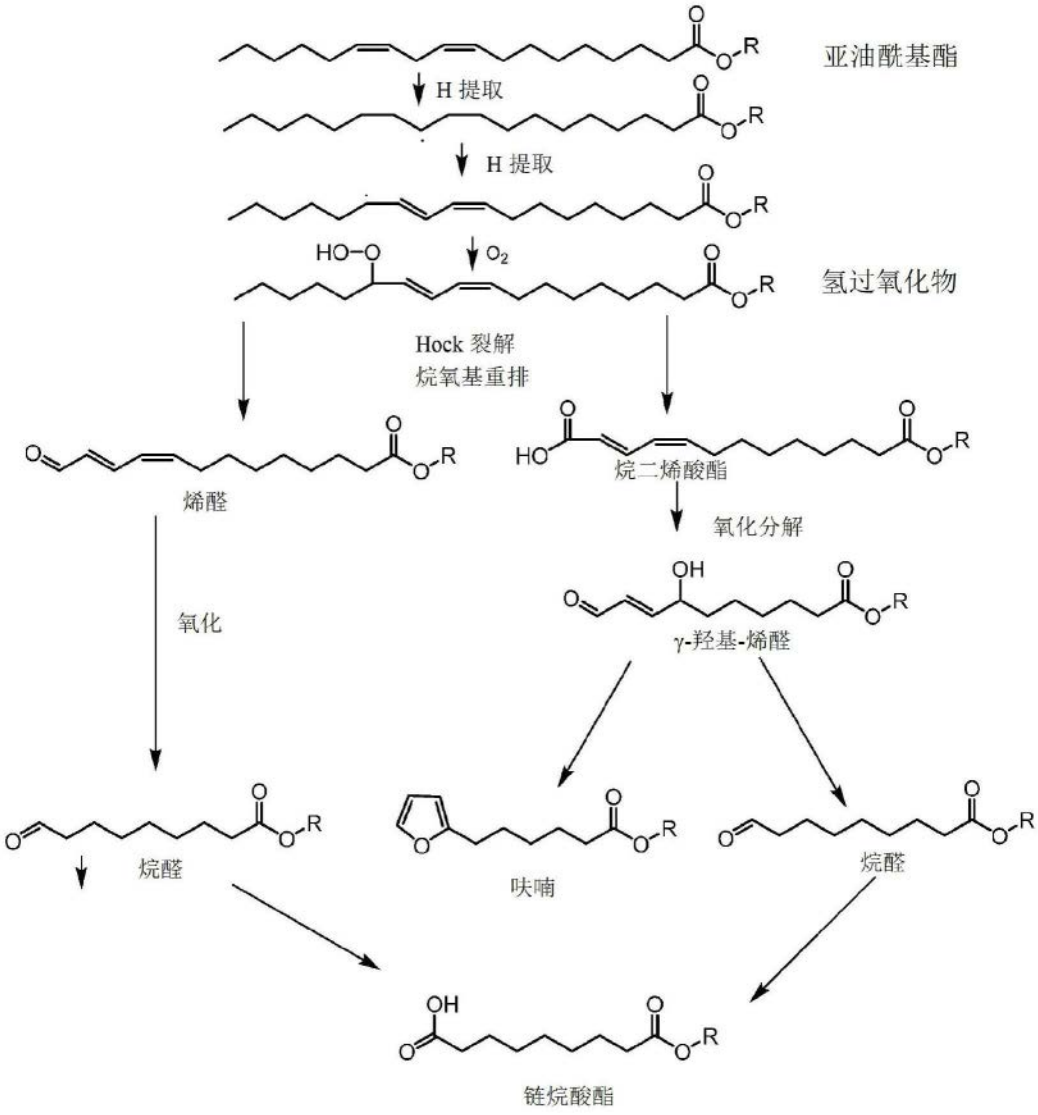

亚油酰基酯
H 提取
H 提取
HO—O
O_2
氢过氧化物
Hock 裂解
烷氧基重排
烯醛
烷二烯酸酯
氧化分解
γ-羟基-烯醛
氧化
烷醛
呋喃
烷醛
链烷酸酯

图1

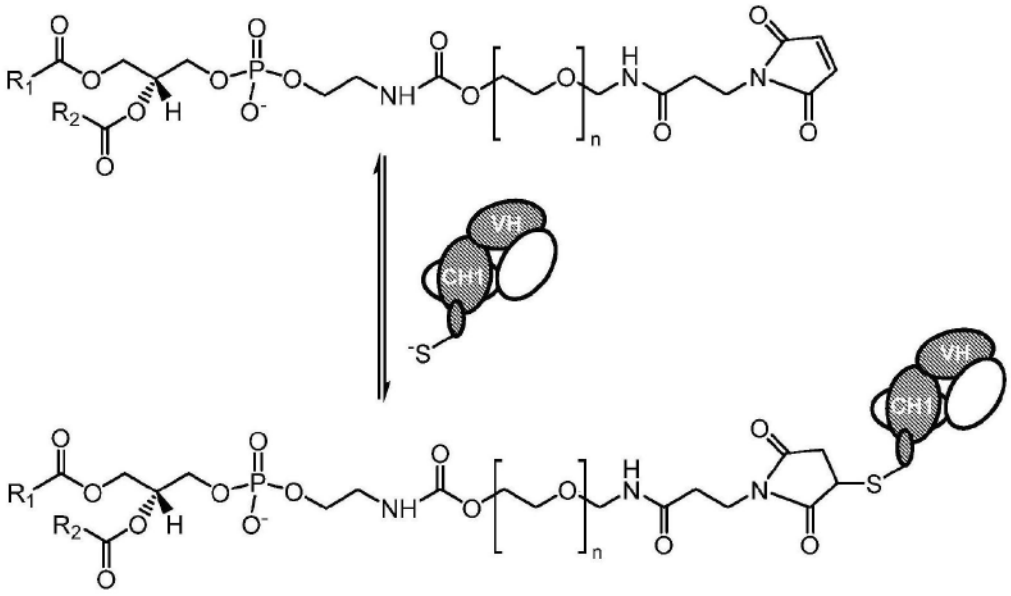

R1
R2
O
H
O-
NH
n
VH
CH1
-S
S

图2

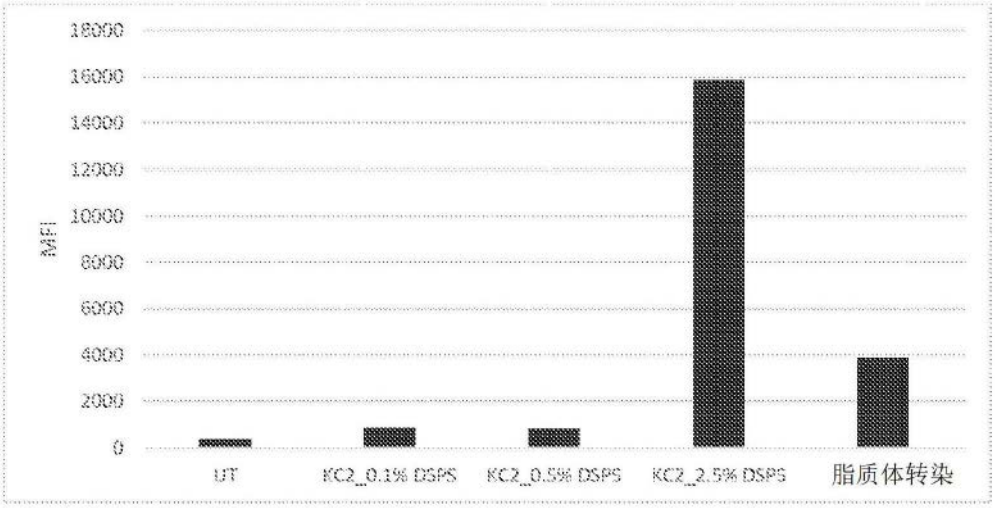

18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
MFI
UT
KC2_0.1% DSPS
KC2_0.5% DSPS
KC2_2.5% DSPS
脂质体转染

图3A(实施例12)

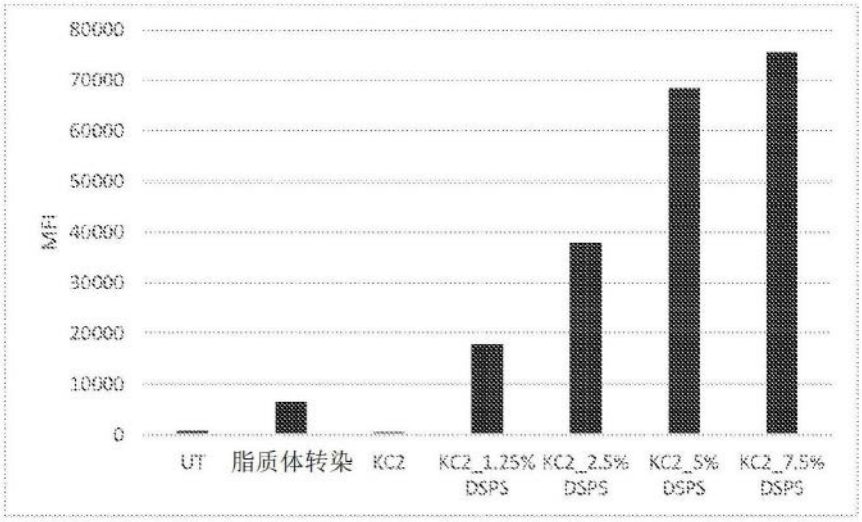


图3B(实施例12)

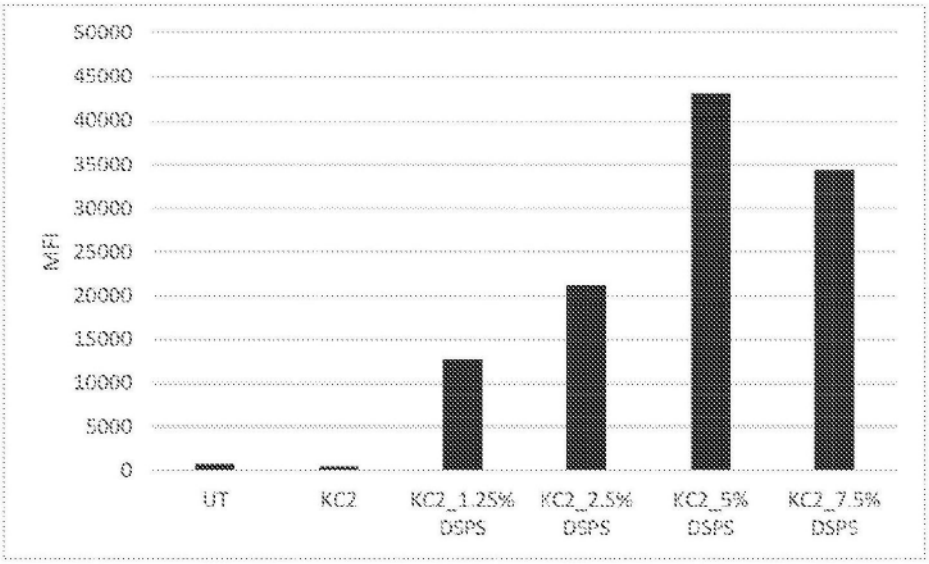


图3C(实施例12)

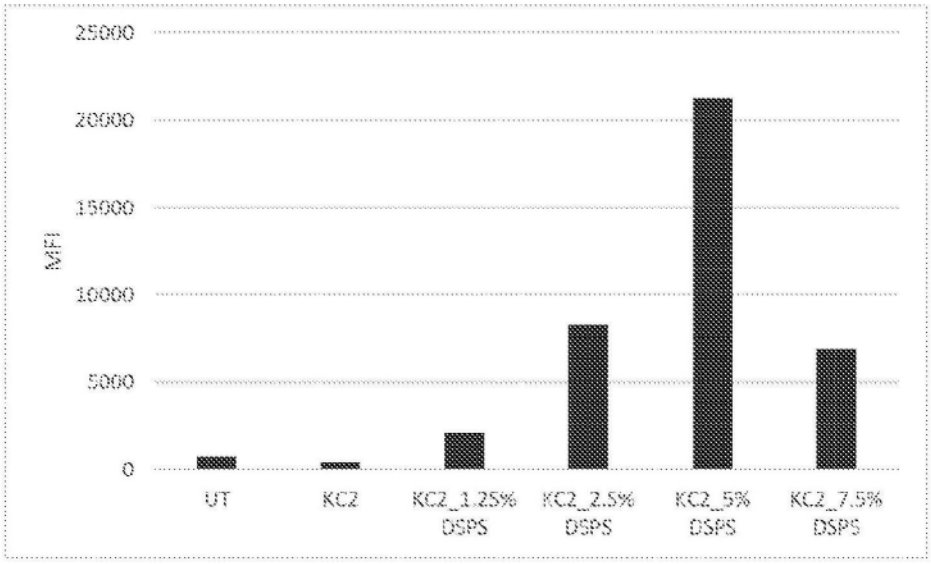


图3D(实施例12)

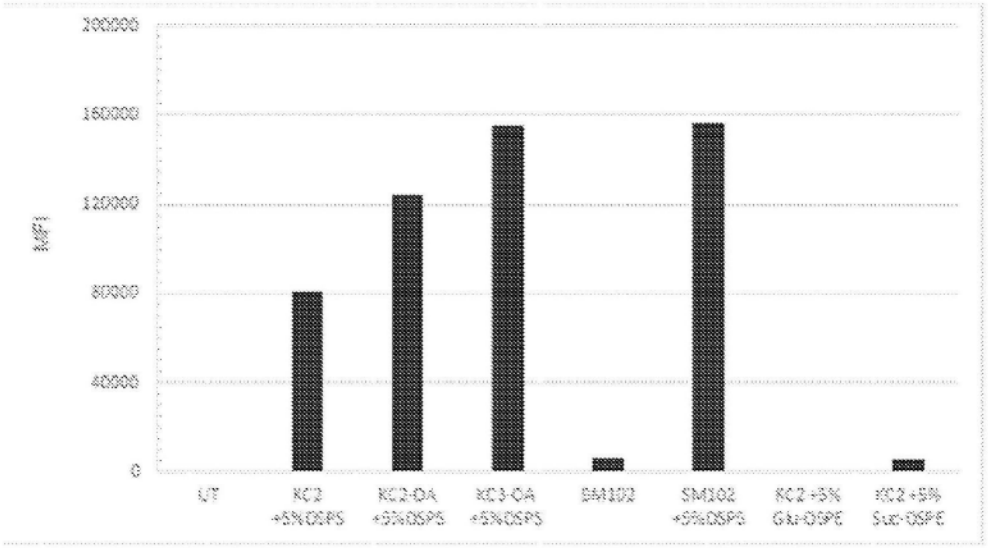


图4(实施例13)-SM102与KC系列的比较

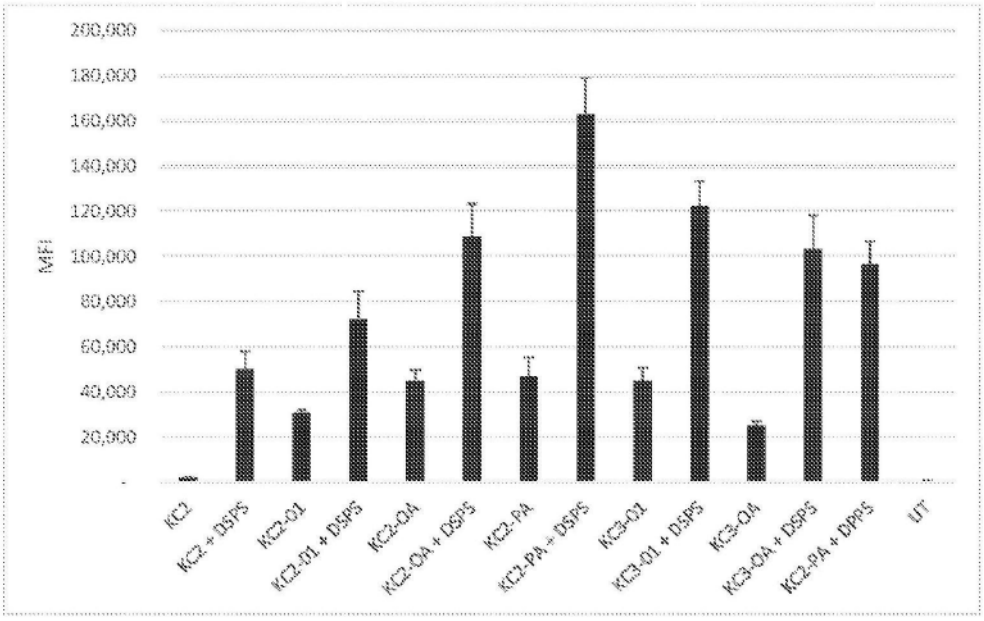


图5(实施例14)-PS靶向KC系列

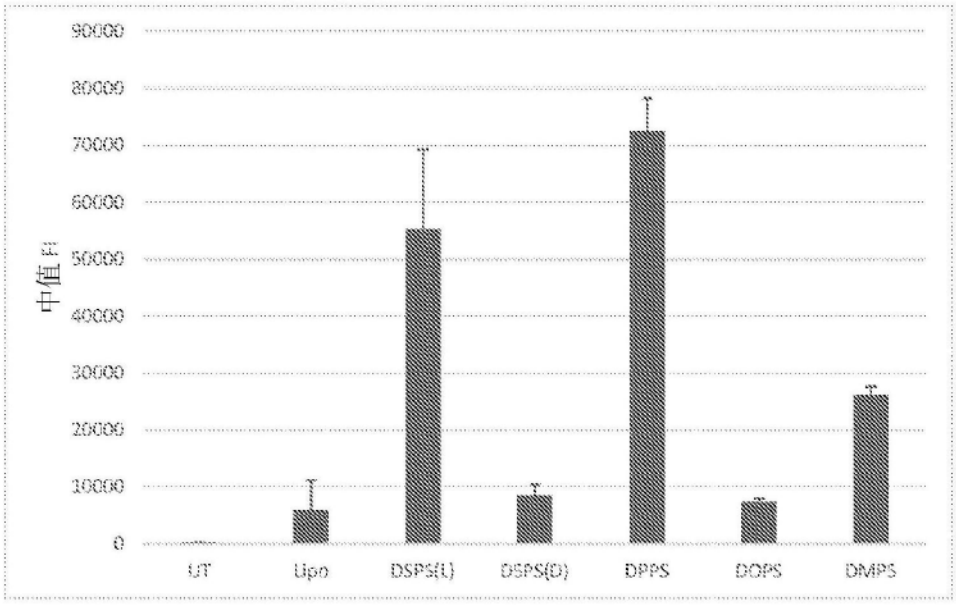


图6A(实施例15)

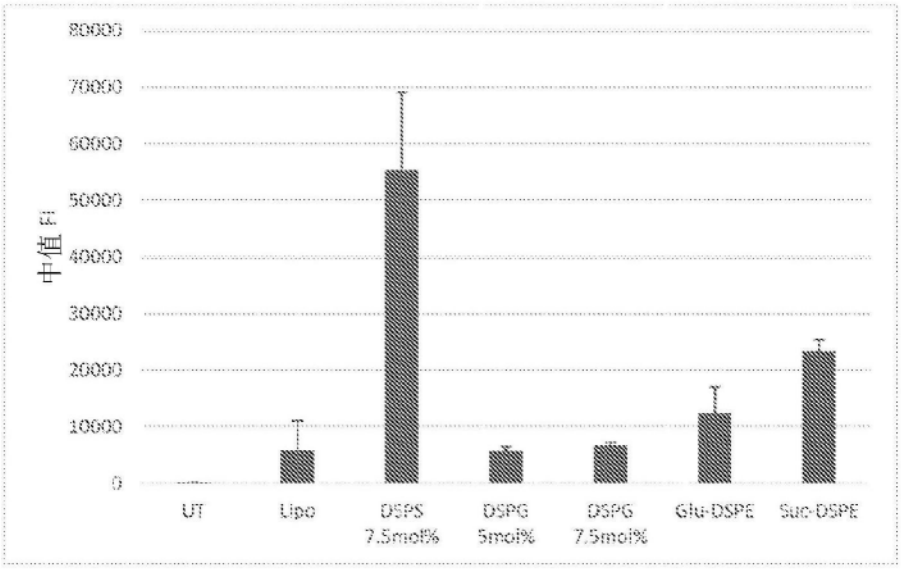


图6B(实施例15)

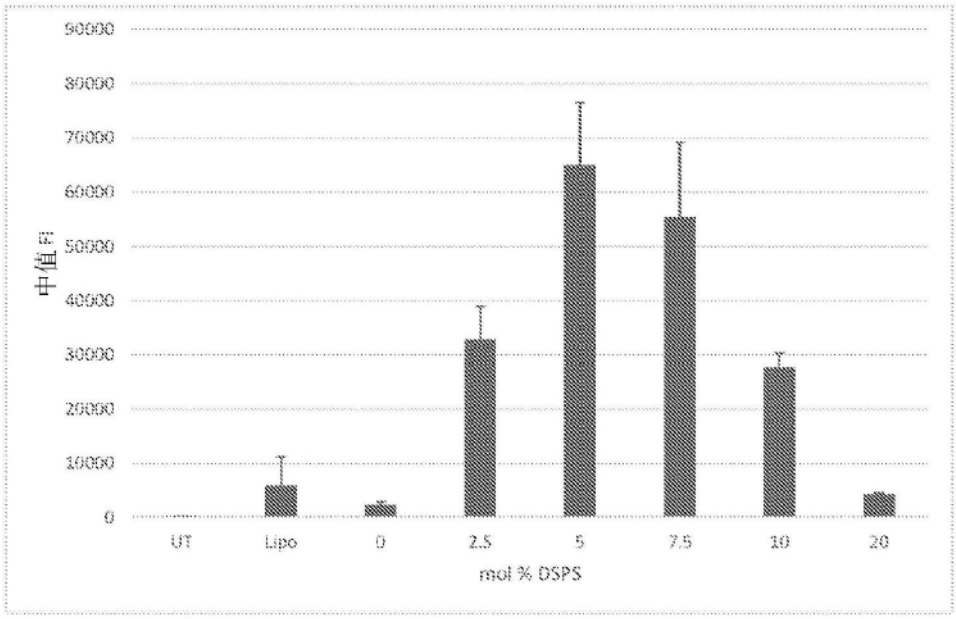


图7(实施例16)

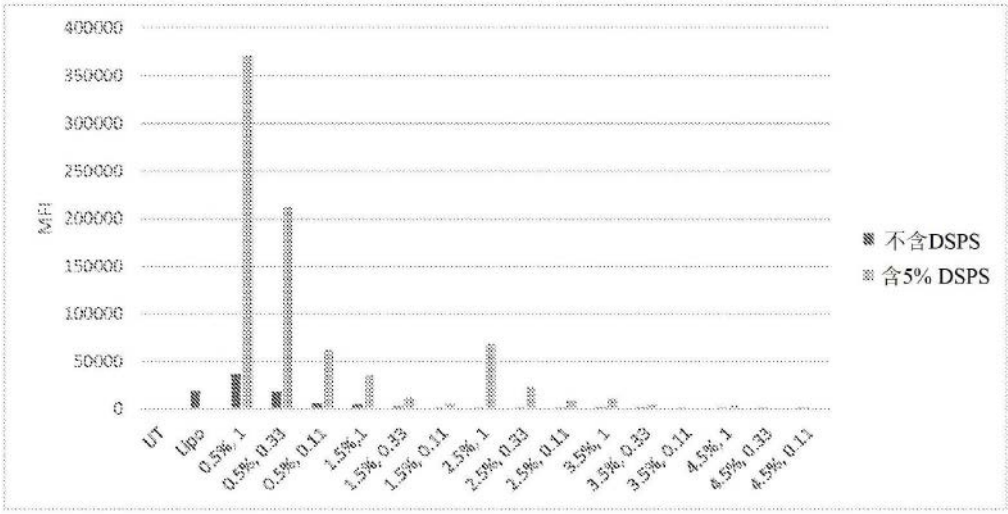


图8(实施例17)

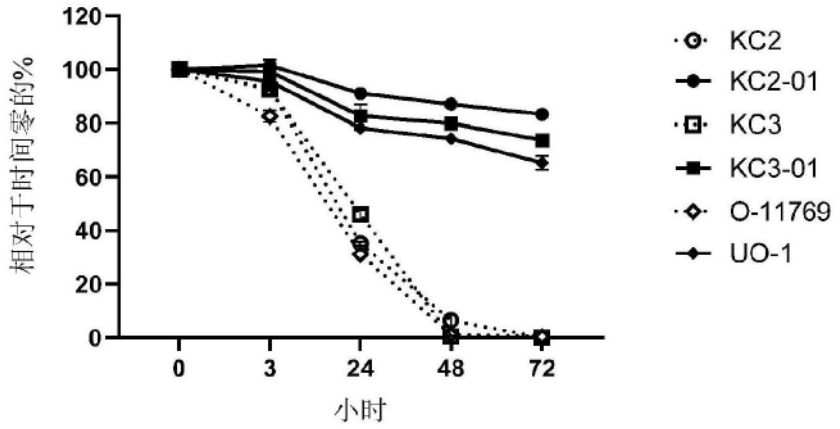


图9A(实施例18)

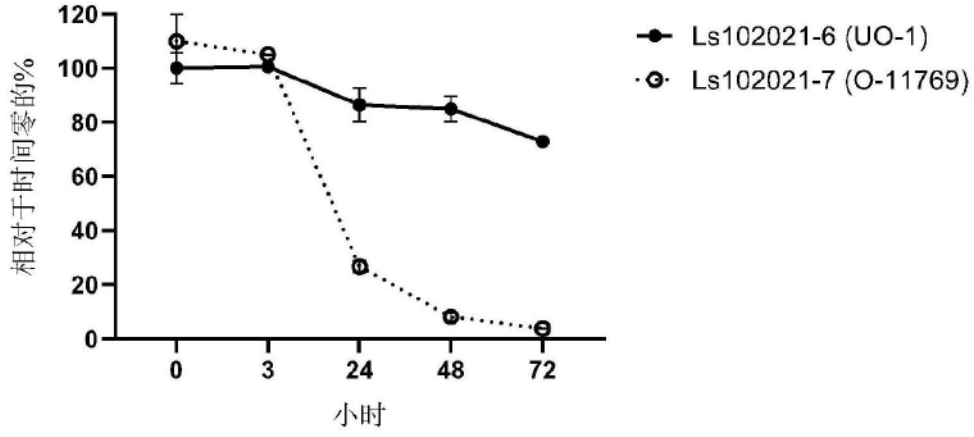


图9B(实施例18)

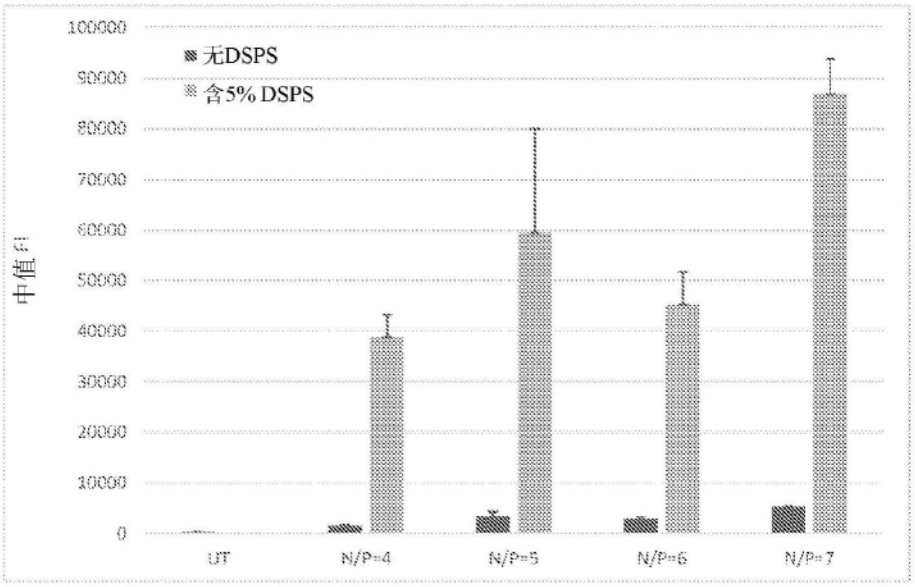


图10A(实施例19)

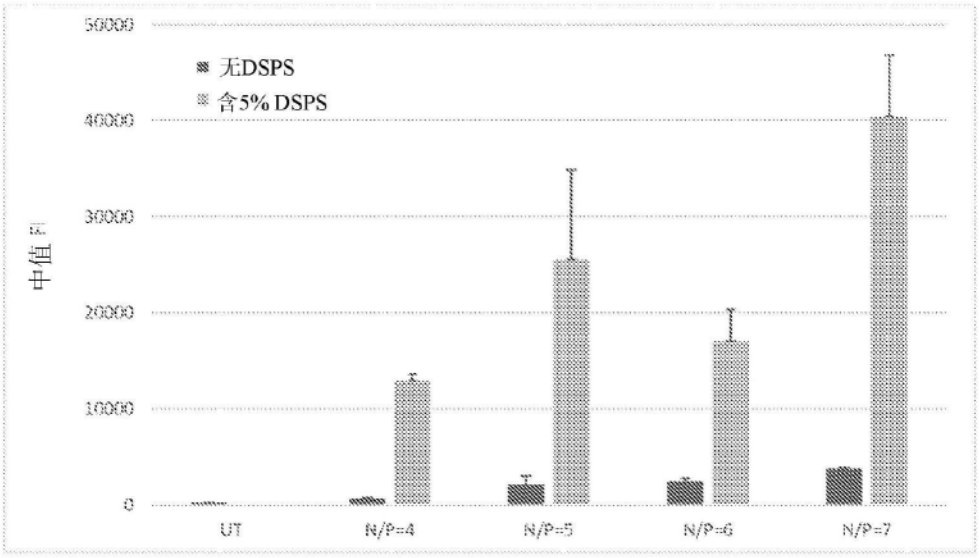


图10B(实施例19)

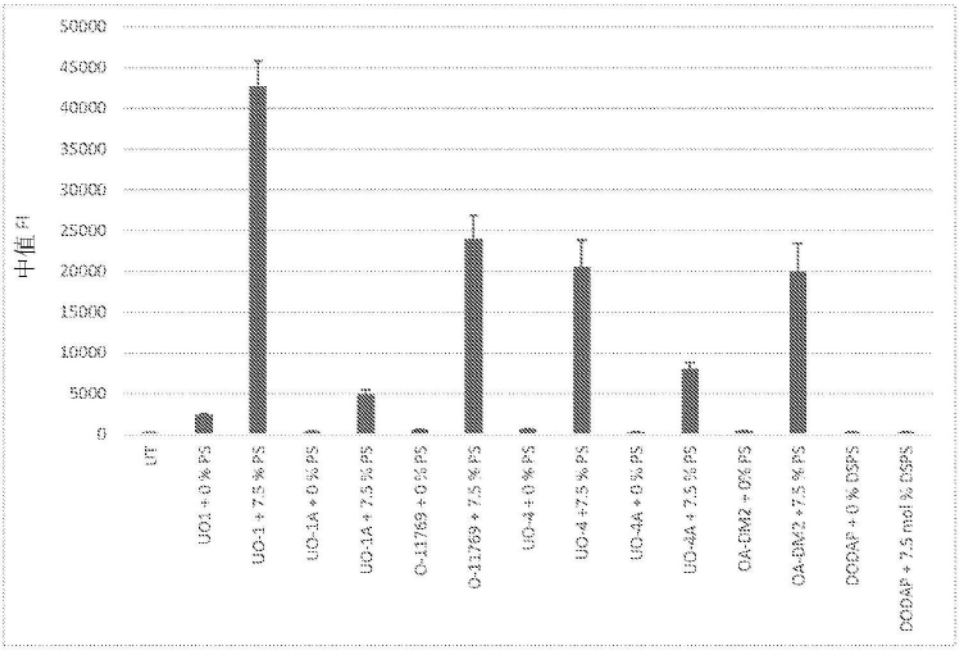


图11(实施例20)

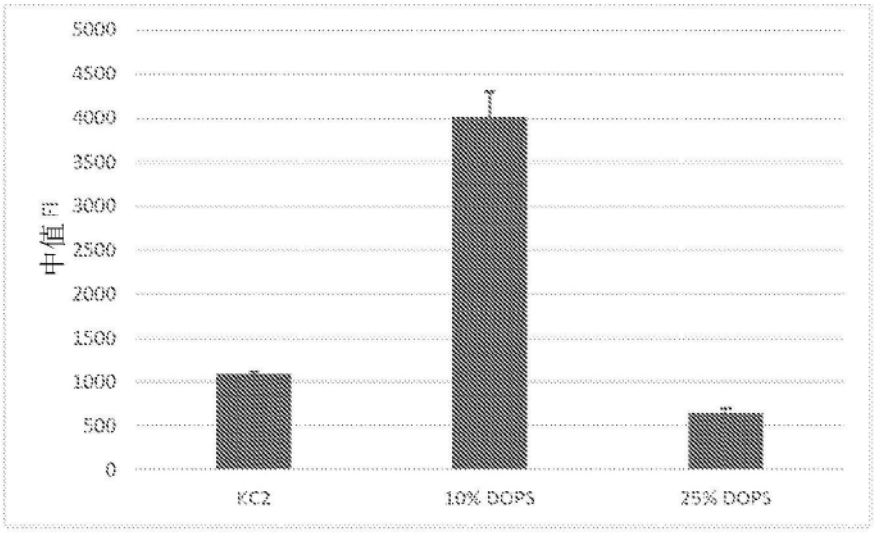


图12(实施例21)

mVRN029 (SEQ ID NO: 2)

GGGAATAAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACCATGTTCGTGTTCCTGG
TGCTGCTGCCTCTGGTGTCCAGCCAGTGTGTGAACCTGACCACCAGAACACAGCTGCCTCCAGCCTACAC
CAACAGCTTTACCAGAGGCGTGTACTACCCCGACAAGGTGTTCAGATCCAGCGTGCTGCACTCTACCCAG
GACCTGTTCCTGCCTTTCTTCAGCAACGTGACCTGGTTCCACGCCATCCACGTGTCCGGCACCAATGGCA
CCAAGAGATTCGACAACCCCGTGCTGCCCTTCAACGACGGGGTGTACTTTGCCAGCACCGAGAAGTCCAA
CATCATCAGAGGCTGGATCTTCGGCACCACACTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTGATCGTGAACAAC
GCCACCAACGTGGTCATCAAAGTGTGCGAGTTCCAGTTCTGCAACGACCCCTTCCTGGGCGTCTACTACC
ACAAGAACAACAAGAGCTGGATGGAAAGCGAGTTCCGGGTGTACAGCAGCGCCAACAACTGCACCTTCGA
GTACGTGTCCCAGCCTTTCCTGATGGACCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAACCTGCGCGAGTTC
GTGTTTAAGAACATCGACGGCTACTTCAAGATCTACAGCAAGCACACCCCTATCAACCTCGTGCGGGATC
TGCCTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAACCCCTGGTGGATCTGCCCATCGGCATCAACATCACCCGGTTTCA
GACACTGCTGGCCCTGCACAGAAGCTACCTGACACCTGGCGATAGCAGCAGCGGATGGACAGCTGGTGCC
GCCGCTTACTATGTGGGCTACCTGCAGCCTAGAACCTTCCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGCACCATCA
CCGACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATCCTCTGAGCGAGACAAAGTGCACCCTGAAGTCCTTCACCGTGGA
AAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTTCCGGGTGCAGCCCACCGAATCCATCGTGCGGTTCCCCAATATC
ACCAATCTGTGCCCCTTCGGCGAGGTGTTCAATGCCACCAGATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGGA
AGCGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACTACTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTTCAGCACCTTCAAGTG
CTACGGCGTGTCCCCTACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACAAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGATC
CGGGGAGATGAAGTGCGGCAGATTGCCCCTGGACAGACAGGCAAGATCGCCGACTACAACTACAAGCTGC
CCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGCCTGGAACAGCAACAACCTGGACTCCAAAGTCGGCGGCAACTA
CAATTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCTGAAGCCCTTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATC
TATCAGGCCGGCAGCACCCCTTGTAACGGCGTGGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACTGCAGTCCTACG
GCTTTCAGCCCACAAATGGCGTGGGCTATCAGCCCTACAGAGTGGTGGTGCTGAGCTTCGAACTGCTGCA
TGCCCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACCAATCTCGTGAAGAACAAATGCGTGAACTTCAAC
TTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTGCTGACAGAGAGCAACAAGAAGTTCCTGCCATTCCAGCAGTTTG
GCCGGGATATCGCCGATACCACAGACGCCGTTAGAGATCCCCAGACACTGGAAATCCTGGACATCACCCC
TTGCAGCTTCGGCGGAGTGTCTGTGATCACCCCTGGCACCAACACCAGCAATCAGGTGGCAGTGCTGTAC
CAGGACGTGAACTGTACCGAAGTGCCCGTGGCCATTCACGCCGATCAGCTGACACCTACATGGCGGGTGT
ACTCCACCGGCAGCAATGTGTTTCAGACCAGAGCCGGCTGTCTGATCGGAGCCGAGCACGTGAACAATAG
CTACGAGTGCGACATCCCCATCGGCGCTGGAATCTGCGCCAGCTACCAGACACAGACAAACAGCCCTCGG
AGAGCCAGAAGCGTGGCCAGCCAGAGCATCATTGCCTACACAATGTCTCTGGGCGCCGAGAACAGCGTGG
CCTACTCCAACAACTCTATCGCTATCCCCACCAACTTCACCATCAGCGTGACCACAGAGATCCTGCCTGT
GTCCATGACCAAGACCAGCGTGGACTGCACCATGTACATCTGCGGCGATTCCACCGAGTGCTCCAACCTG
CTGCTGCAGTACGGCAGCTTCTGCACCCAGCTGAATAGAGCCCTGACAGGGATCGCCGTGGAACAGGACA
AGAACACCCAAGAGGTGTTCGCCCAAGTGAAGCAGATCTACAAGACCCCTCCTATCAAGGACTTCGGCGG
CTTCAATTTCAGCCAGATTCTGCCCGATCCTAGCAAGCCCAGCAAGCGGAGCTTCATCGAGGACCTGCTG
TTCAACAAAGTGACACTGGCCGACGCCGGCTTCATCAAGCAGTATGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCG
CCAGGGATCTGATTTGCGCCCAGAAGTTTAACGGACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGACCGATGAGAT
GATCGCCCAGTACACATCTGCCCTGCTGGCCGGCACAATCACAAGCGGCTGGACATTTGGAGCAGGCGCC
GCTCTGCAGATCCCCTTTGCTATGCAGATGGCCTACCGGTTCAACGGCATCGGAGTGACCCAGAATGTGC
TGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCAACCAGTTCAACAGCGCCATCGGCAAGATCCAGGACAGCCTGAG
CAGCACAGCAAGCGCCCTGGGAAAGCTGCAGGACGTGGTCAACCAGAATGCCCAGGCACTGAACACCCTG
GTCAAGCAGCTGTCCTCCAACTTCGGCGCCATCAGCTCTGTGCTGAACGATATCCTGAGCAGACTGGACC
CTCCTGAGGCCGAGGTGCAGATCGACAGACTGATCACAGGCAGACTGCAGAGCCTCCAGACATACGTGAC
CCAGCAGCTGATCAGAGCCGCCGAGATTAGAGCCTCTGCCAATCTGGCCGCCACCAAGATGTCTGAGTGT
GTGCTGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGACTTTTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCTCAGTCTG
CCCCTCACGGCGTGGTGTTTCTGCACGTGACATATGTGCCCGCTCAAGAGAAGAATTTCACCACCGCTCC

图13A(实施例22)

AGCCATCTGCCACGACGGCAAAGCCCACTTTCCTAGAGAAGGCGTGTTCGTGTCCAACGGCACCCATTGG
TTCGTGACACAGCGGAACTTCTACGAGCCCCAGATCATCACCACCGACAACACCTTCGTGTCTGGCAACT
GCGACGTCGTGATCGGCATTGTGAACAATACCGTGTACGACCCTCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAA
AGAGGAACTGGACAAGTACTTTAAGAACCACACAAGCCCCGACGTGGACCTGGGCGATATCAGCGGAATC
AATGCCAGCGTCGTGAACATCCAGAAAGAGATCGACCGGCTGAACGAGGTGGCCAAGAATCTGAACGAGA
GCCTGATCGACCTGCAAGAACTGGGGAAGTACGAGCAGTACATCAAGTGGCCCTGGTACATCTGGCTGGG
CTTTATCGCCGGACTGATTGCCATCGTGATGGTCACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGCTGTAGC
TGCCTGAAGGGCTGTTGTAGCTGTGGCAGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCCGTGCTGA
AGGGCGTGAAACTGCACTACACATGATGACTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTT
TCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCA
CTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGC
CACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAAC
CCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCCTGGAGCTAGCAGCGGCCGCGGCCGCAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图13A(实施例22)续

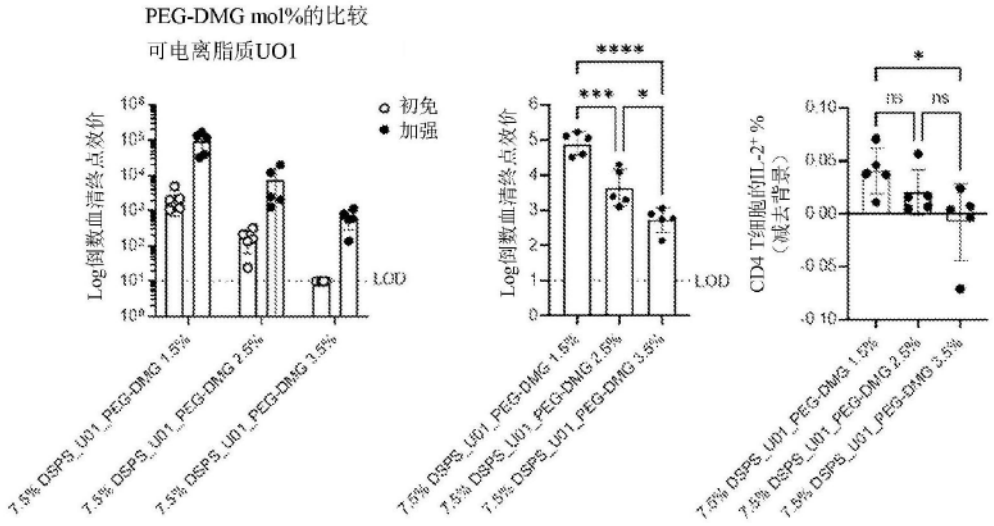


图13B(实施例22)

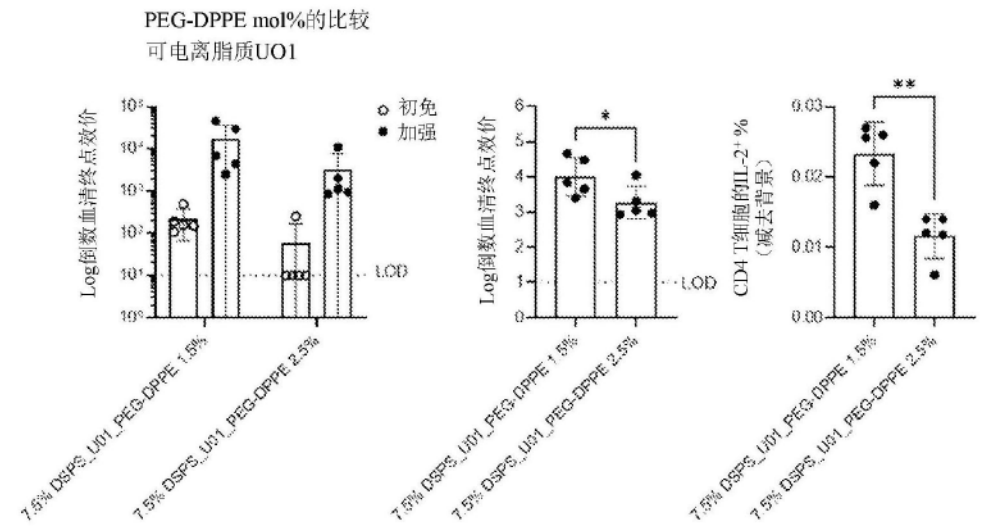


图13C(实施例22)

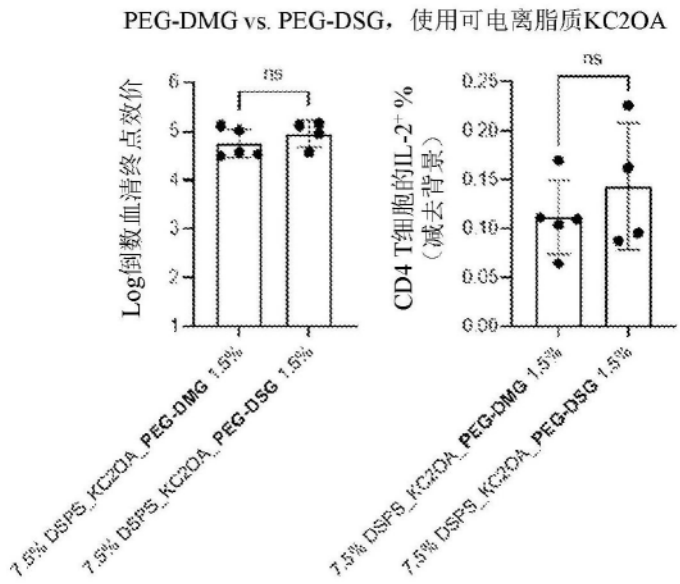


图13D(实施例22)

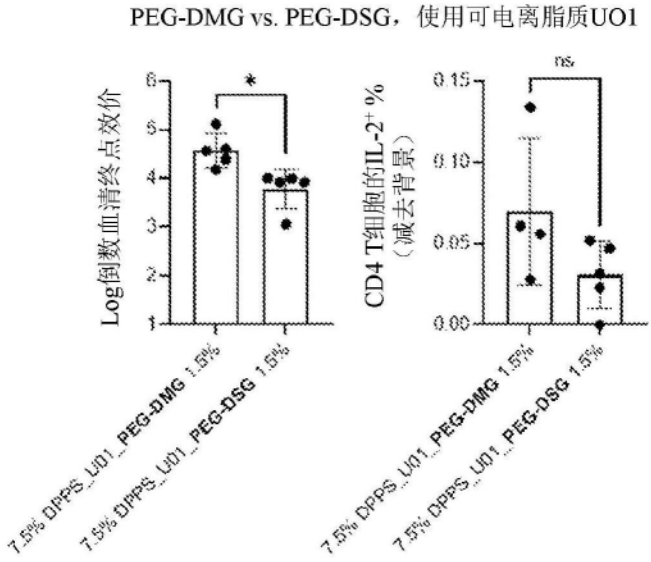


图13E(实施例22)

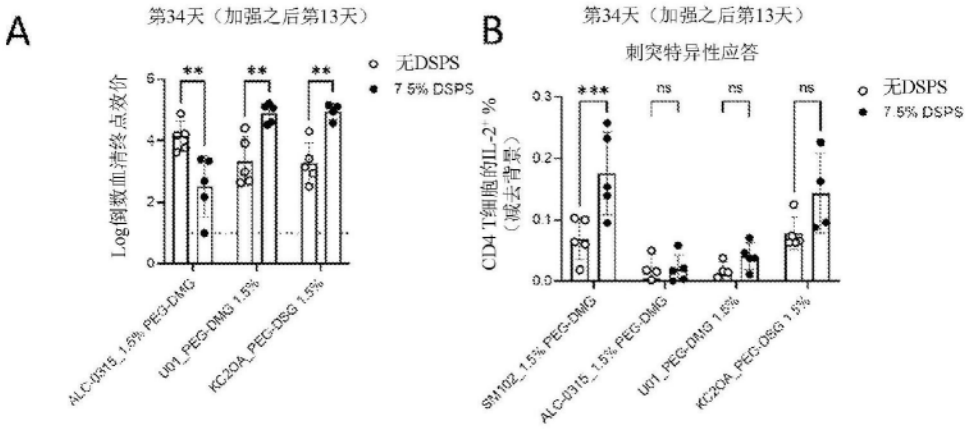


图13F(实施例22)

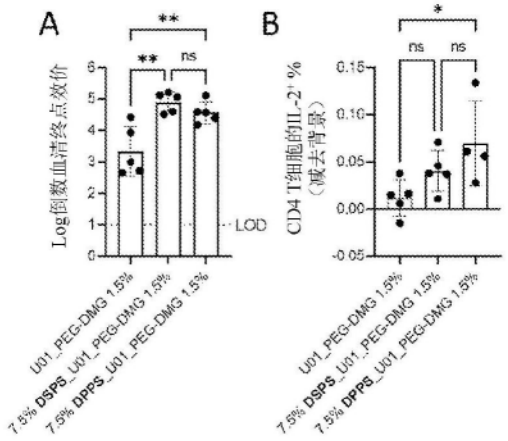


图13G(实施例22)

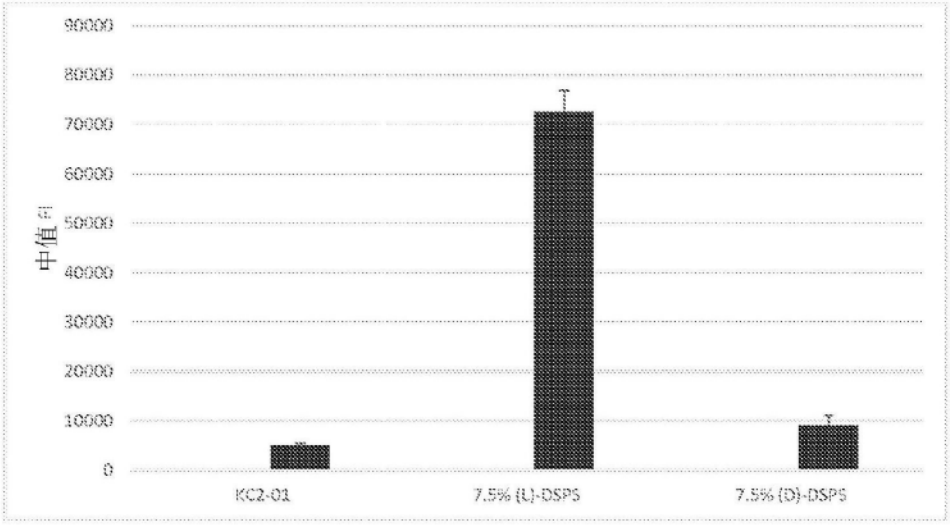


图14A(实施例23)

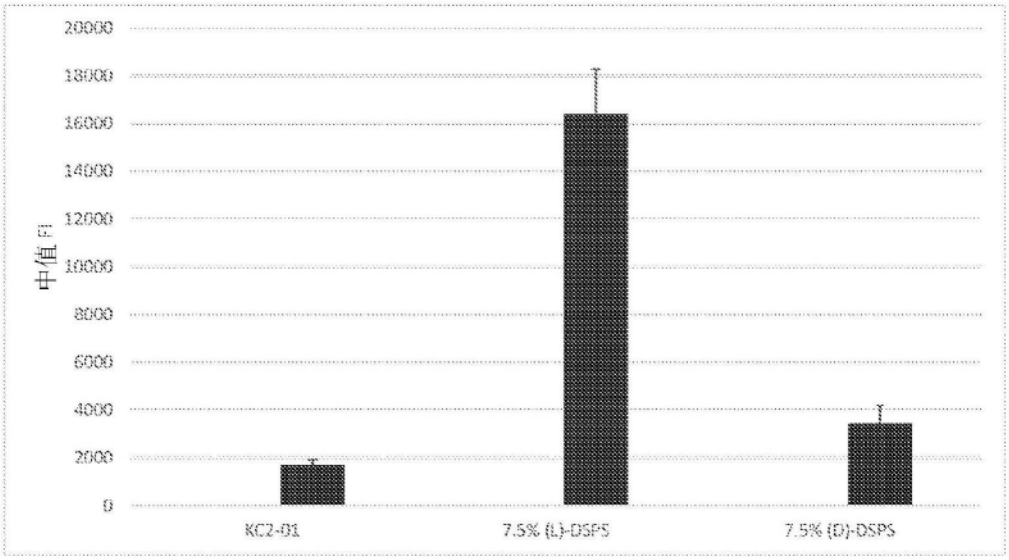


图14B(实施例23)

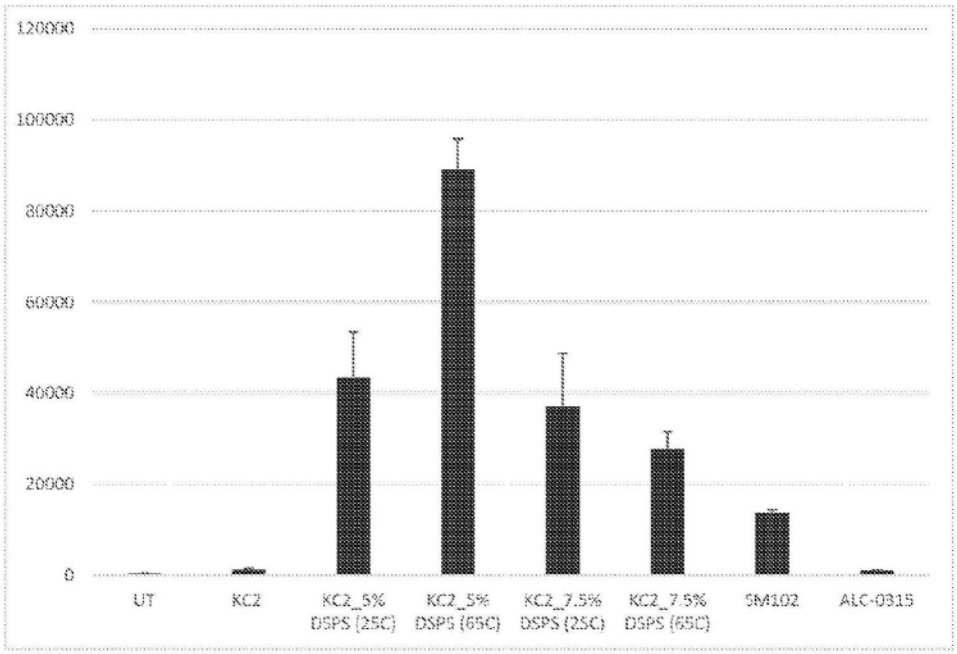


图15(实施例24)

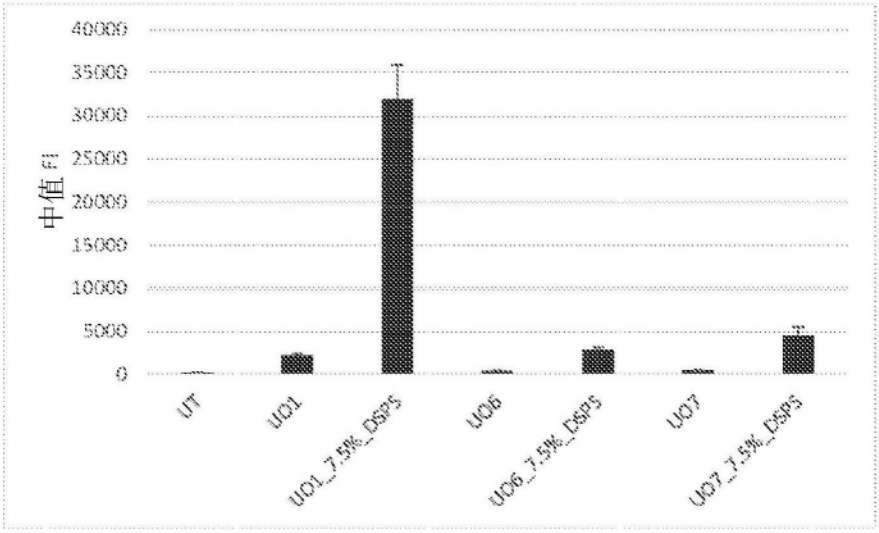


图16(实施例25)

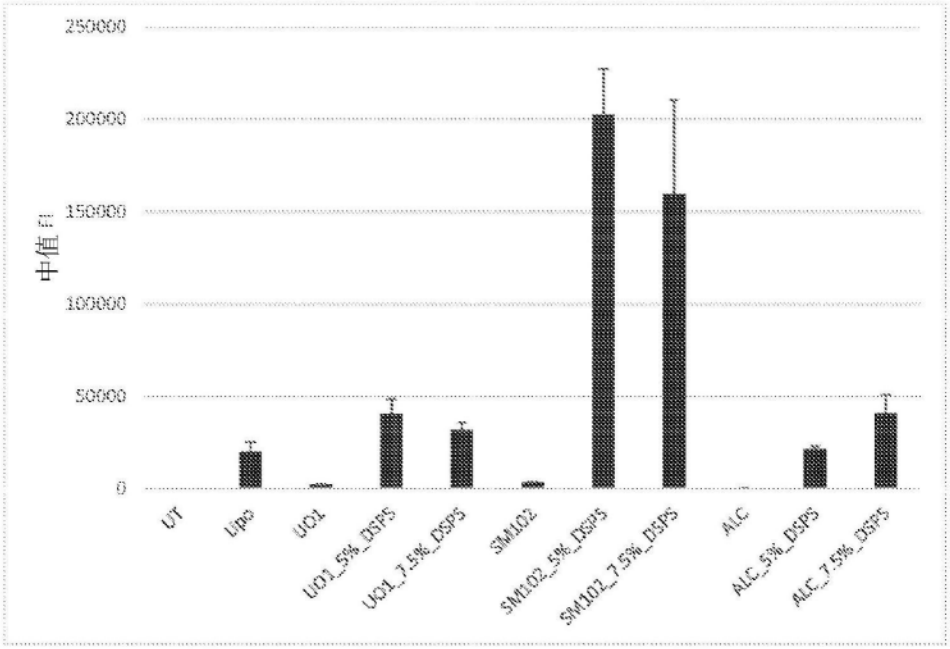


图17(实施例26)

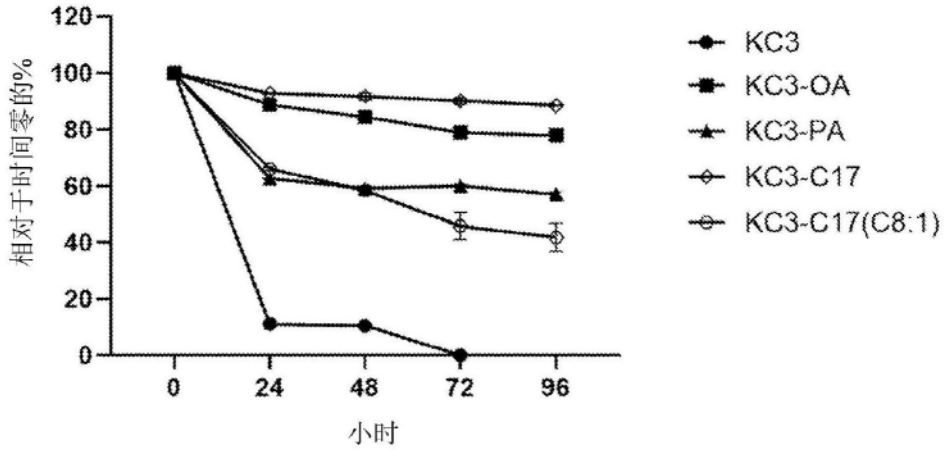


图18(实施例29)

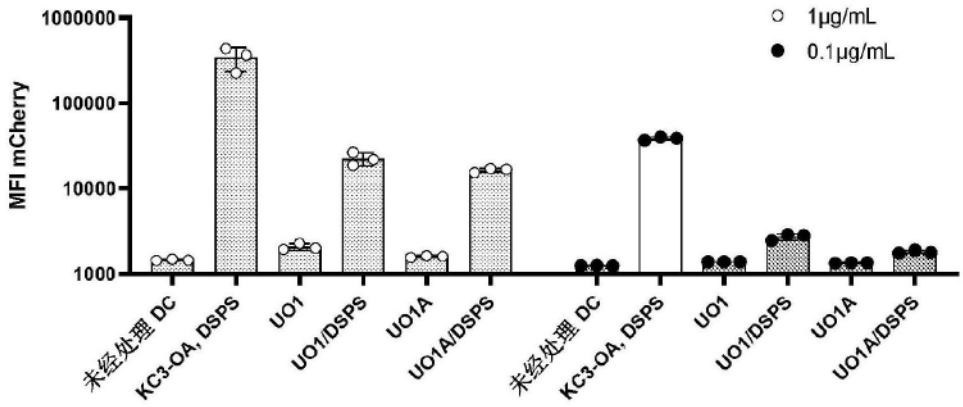


图19(实施例30)

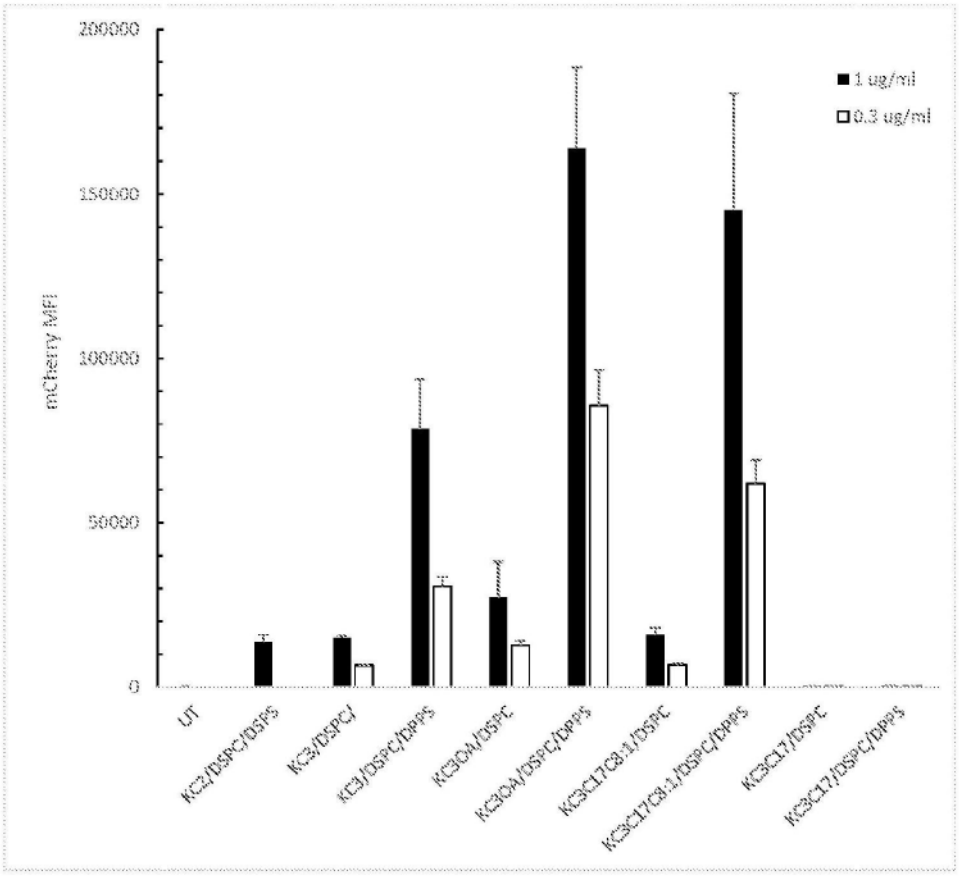


图20(实施例31)

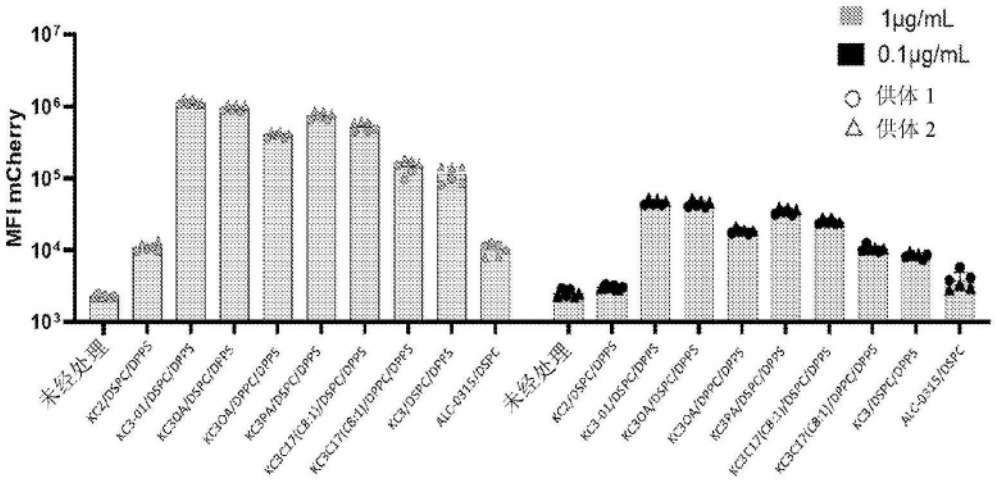


图21(实施例32)

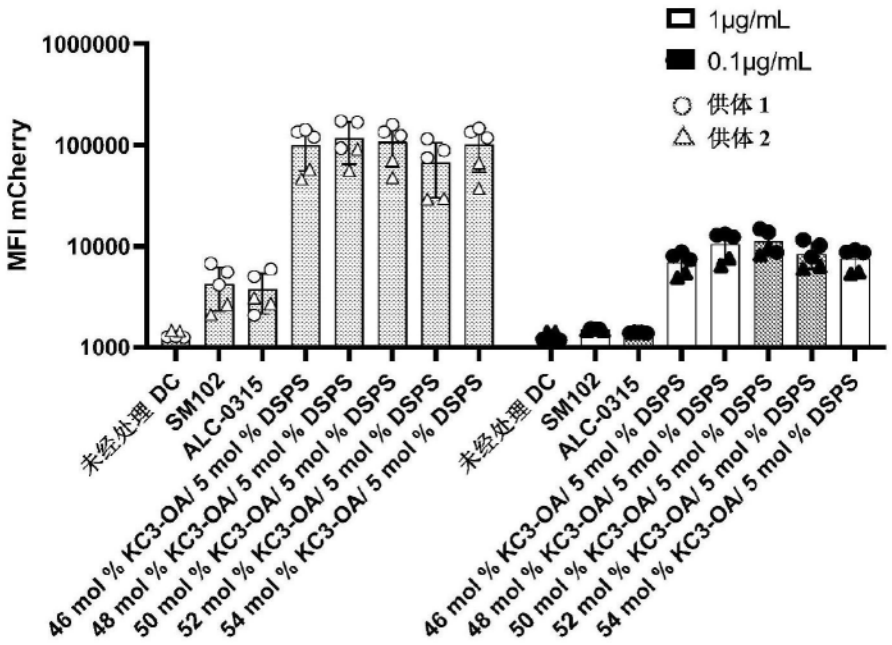


图22(实施例33)

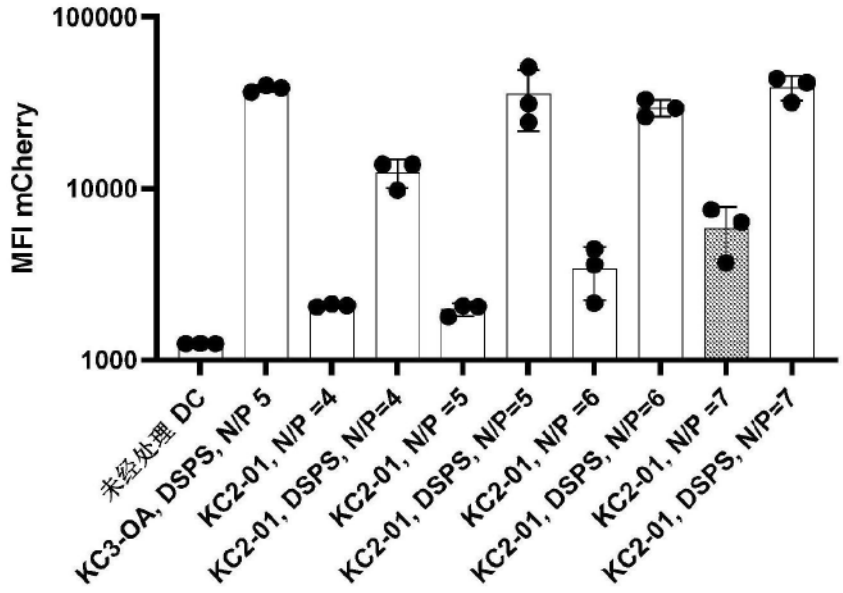


图23(实施例34)

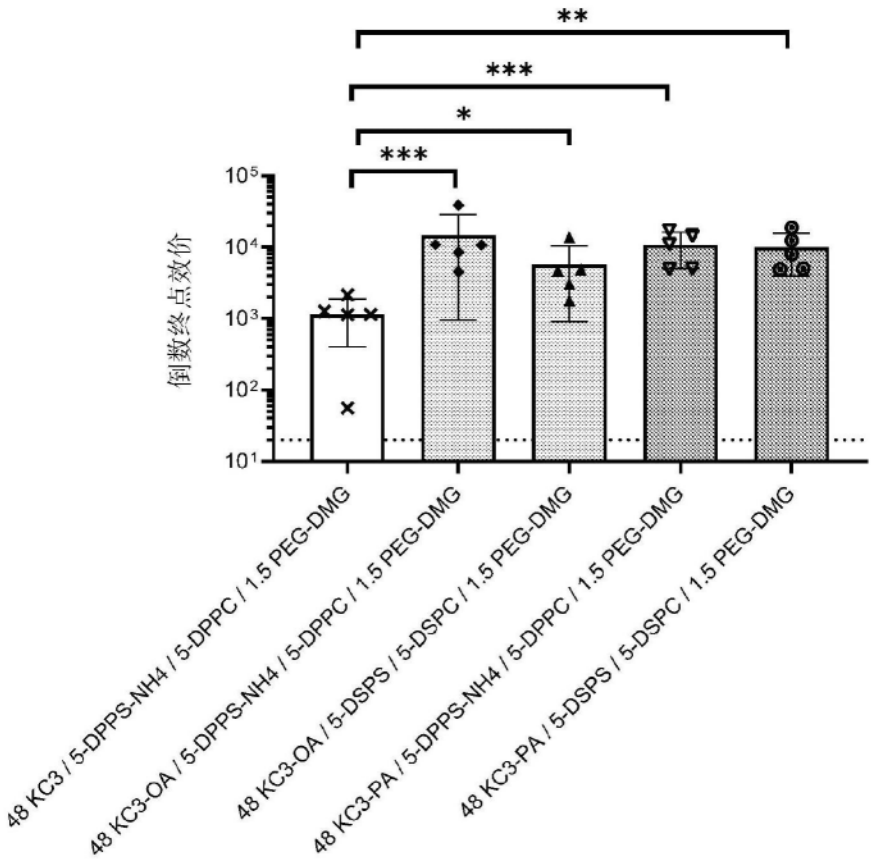

**
***
*
***
倒数终点效价
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
48 KC3 / 5-DPPS-NH4 / 5-DPPC / 1.5 PEG-DMG
48 KC3-OA / 5-DPPS-NH4 / 5-DPPC / 1.5 PEG-DMG
48 KC3-OA / 5-DSPS / 5-DSPC / 1.5 PEG-DMG
48 KC3-PA / 5-DPPS-NH4 / 5-DPPC / 1.5 PEG-DMG
48 KC3-PA / 5-DSPS / 5-DSPC / 1.5 PEG-DMG

图24A(实施例35)

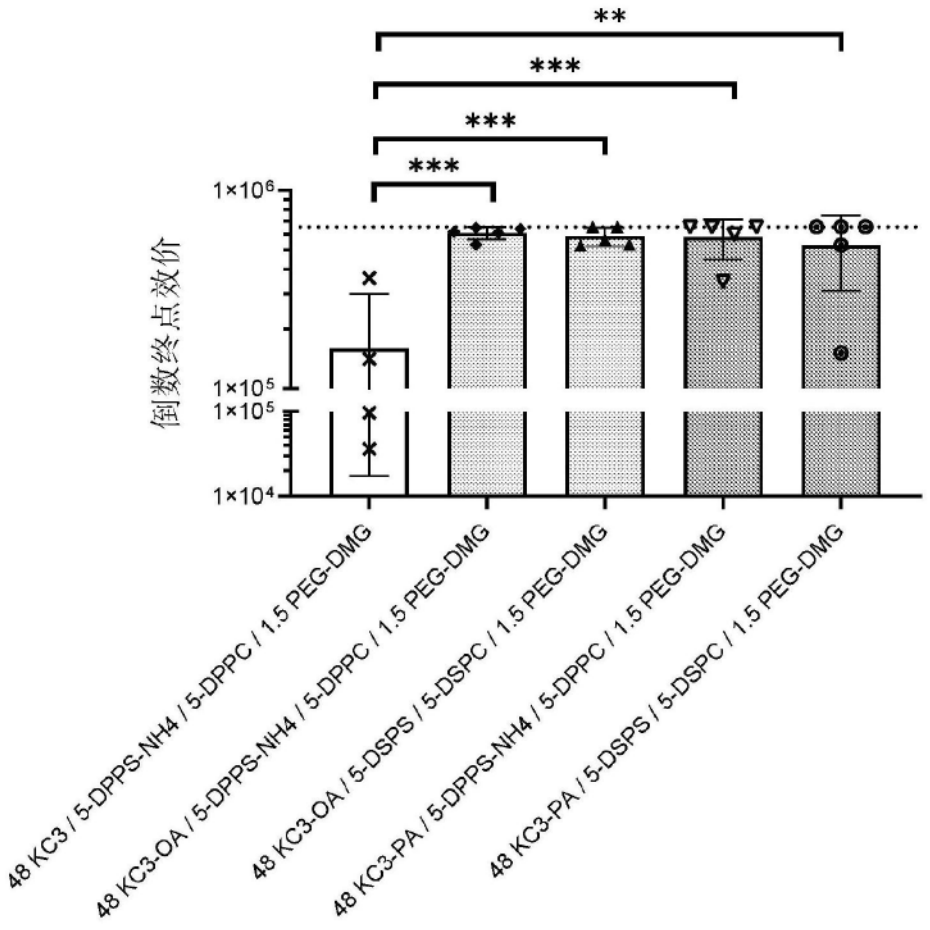


图24B(实施例35)

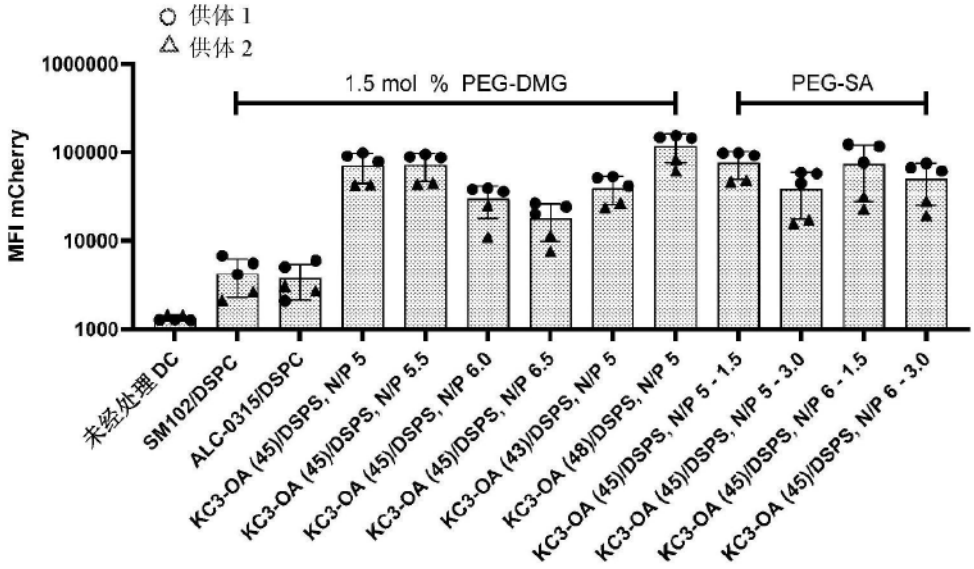


图25A(实施例38)

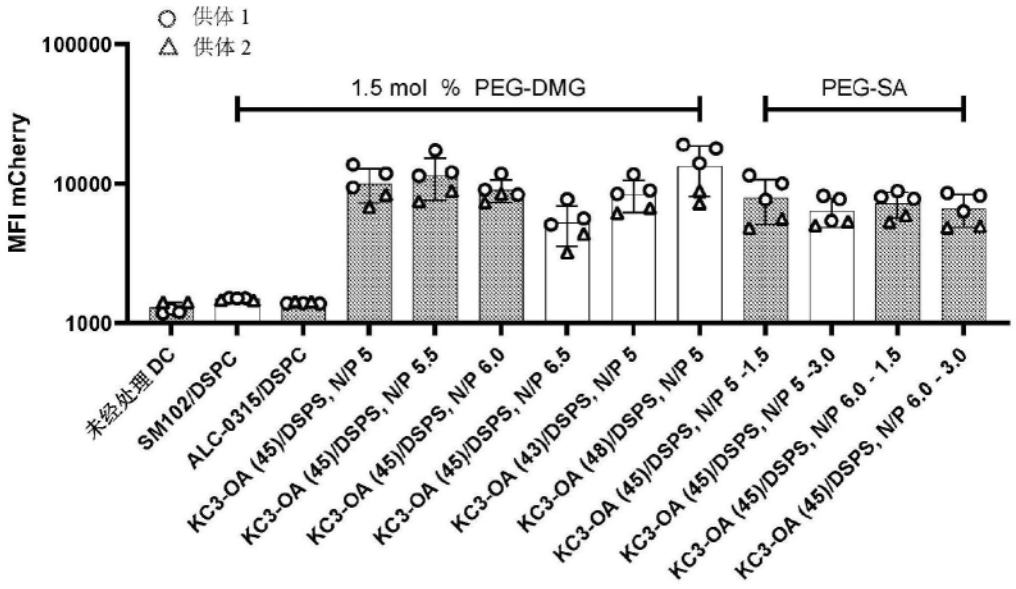


图25B(实施例38)-MS 148-152

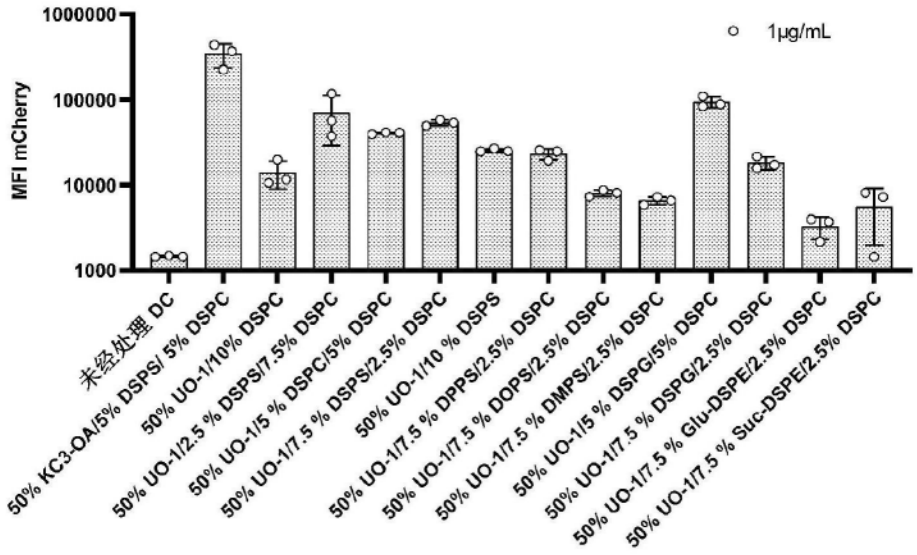


图26A(实施例39)

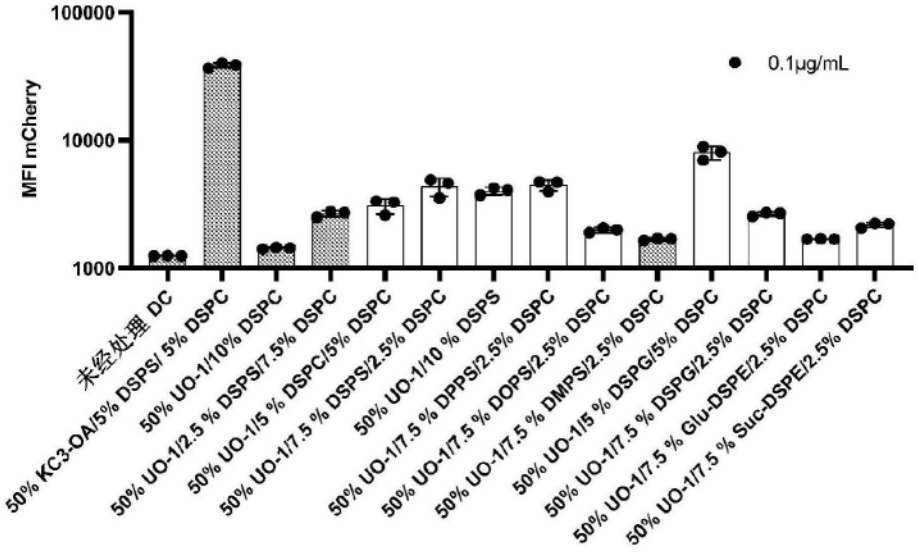


图26B(实施例39)

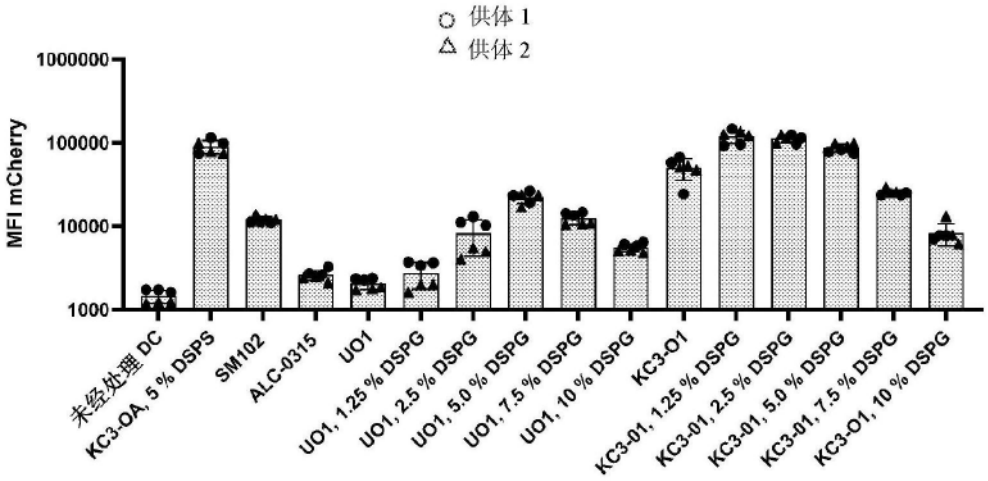


图27A(实施例40)

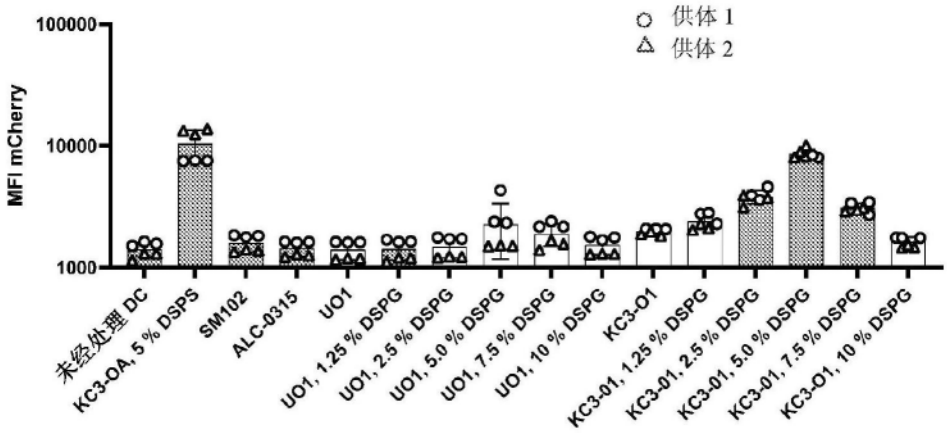


图27B(实施例40)

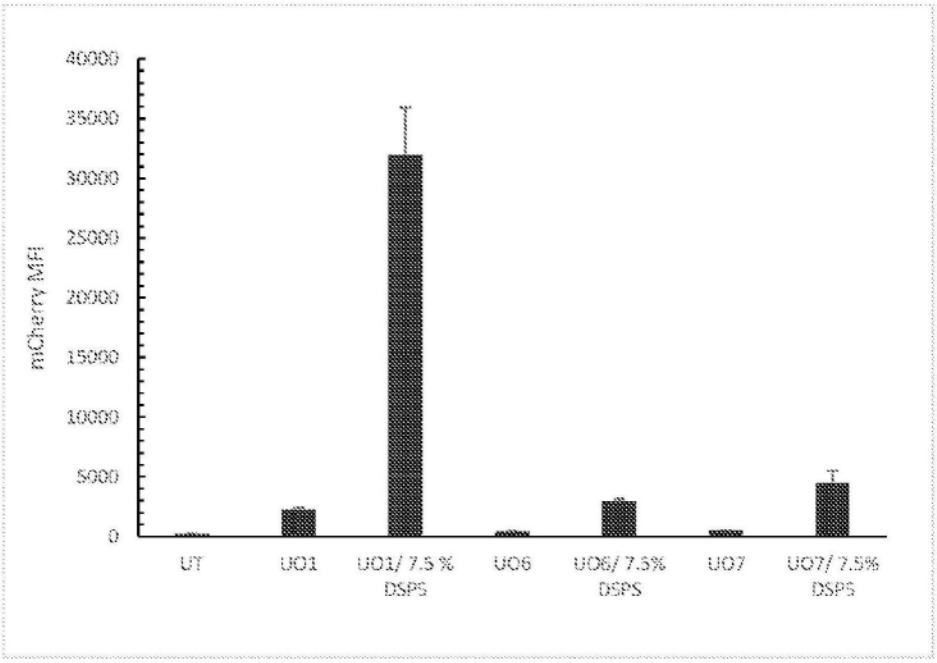


图28(实施例42)

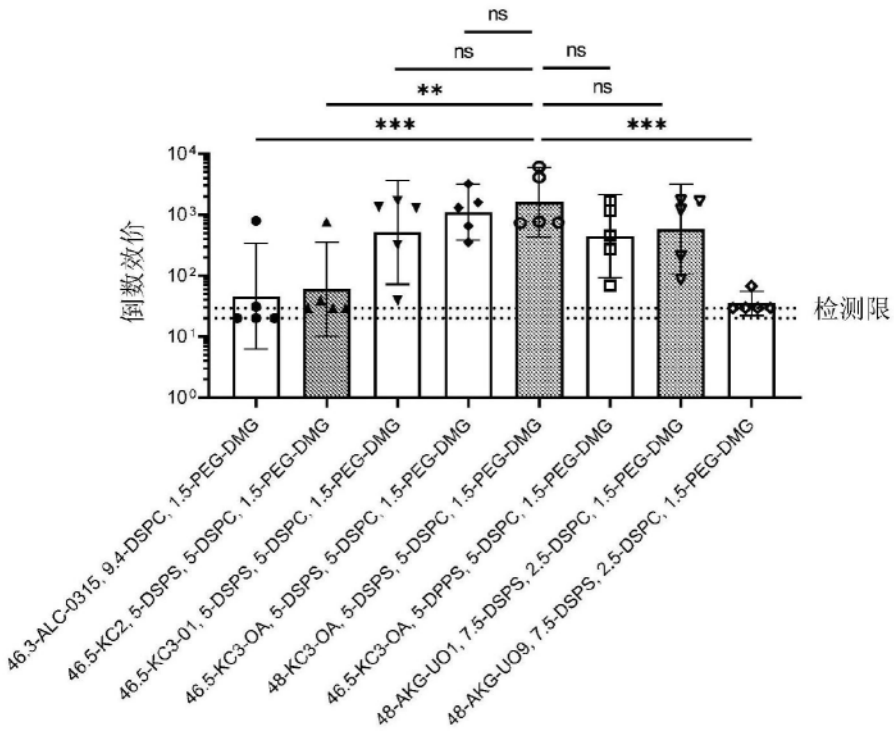


图29(实施例43)

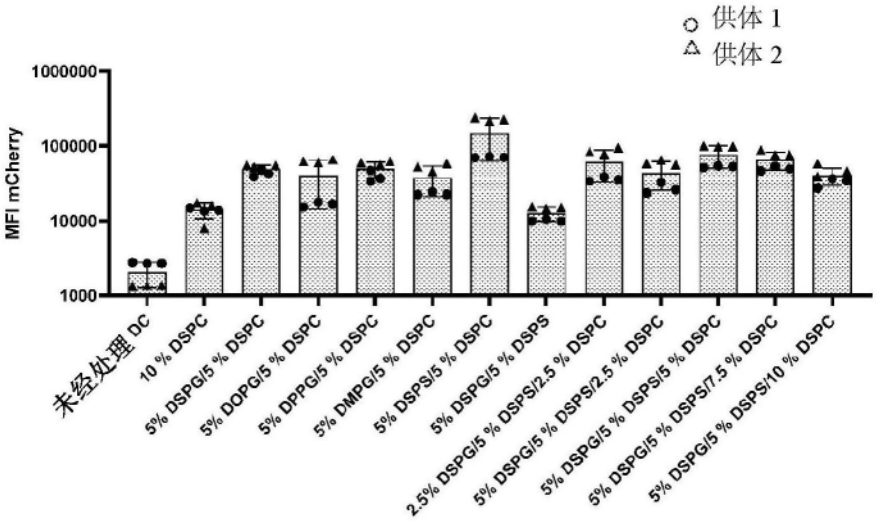


图30A(实施例44)

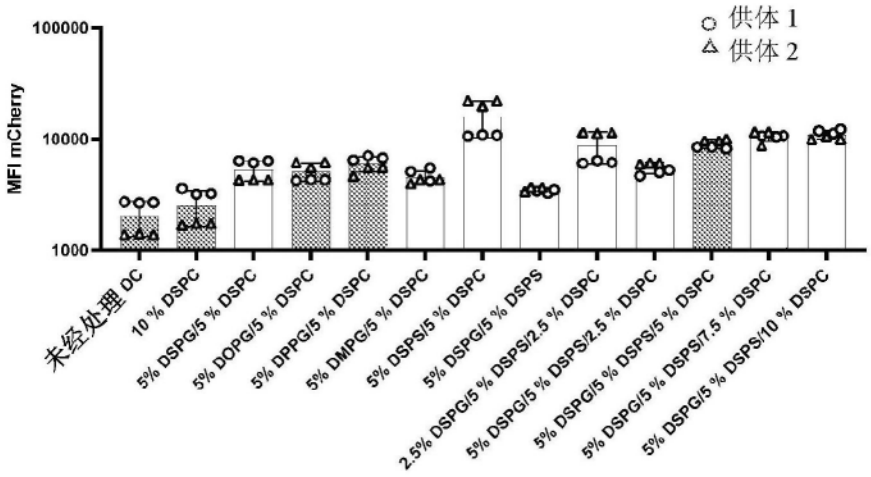


图30B(实施例44)

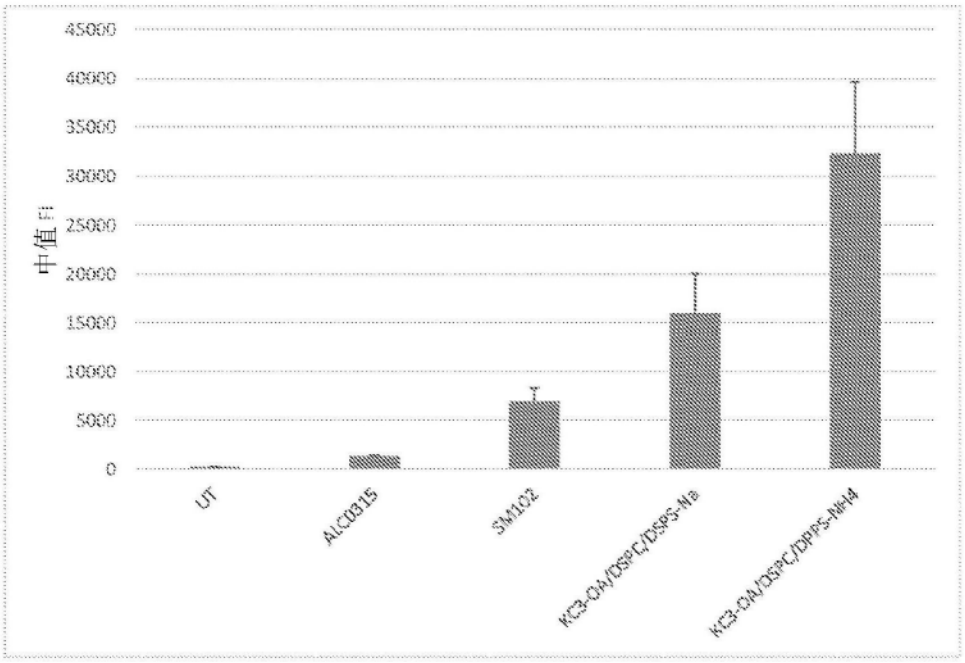


图31(实施例45)

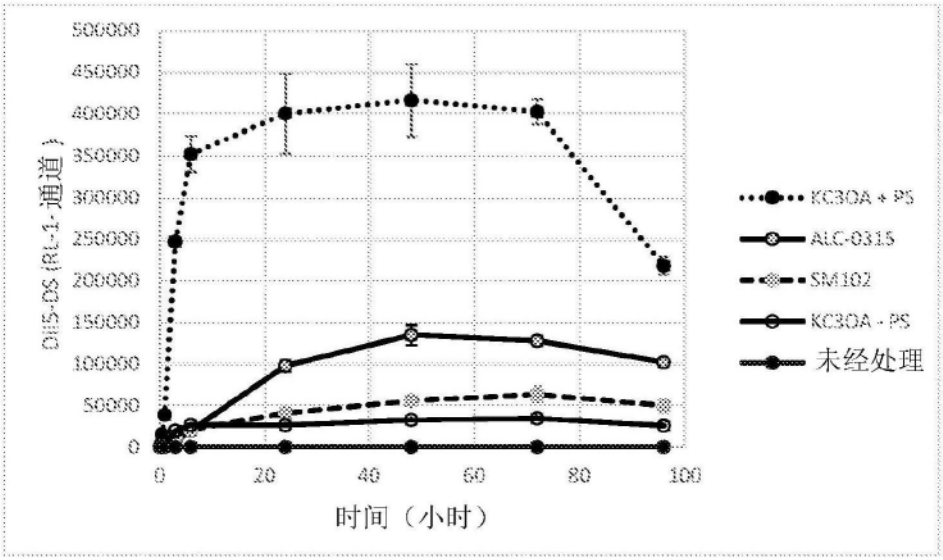

DiS-DS (RL-1-通道)
500000
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
0
20
40
60
80
100
时间（小时）
KC3OA + PS
ALC-0315
SM102
KC3OA - PS
未经处理

图32

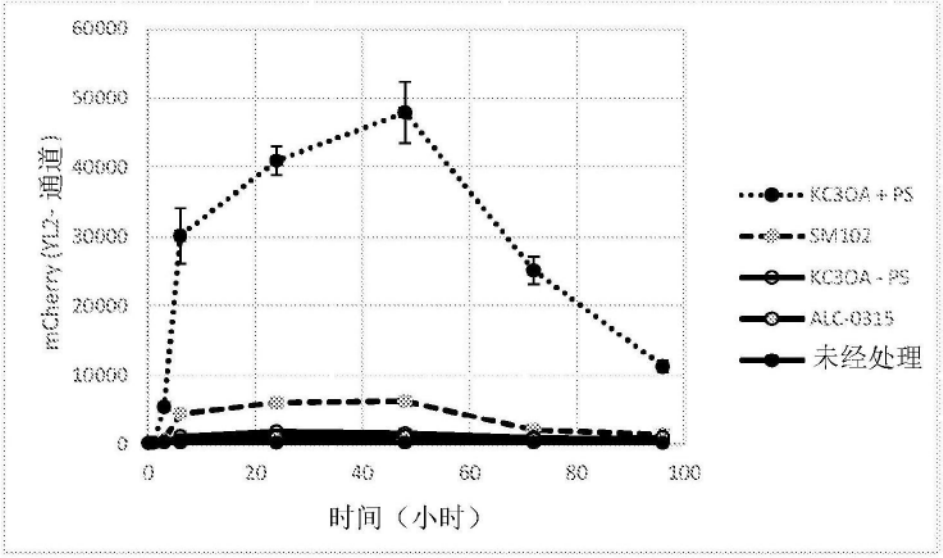

mCherry (YL2-通道)
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
20
40
60
80
100
时间（小时）
KC3OA + PS
SM102
KC3OA - PS
ALC-0315
未经处理

图33

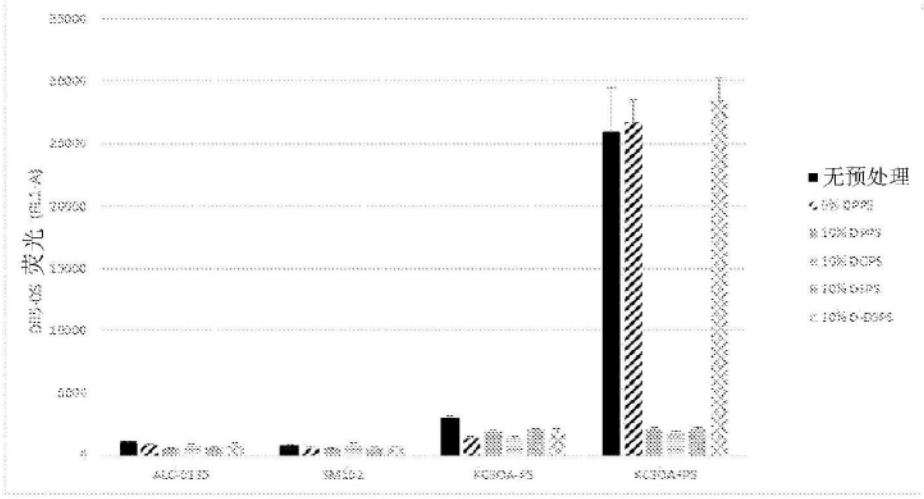

荧光
无预处理

图34

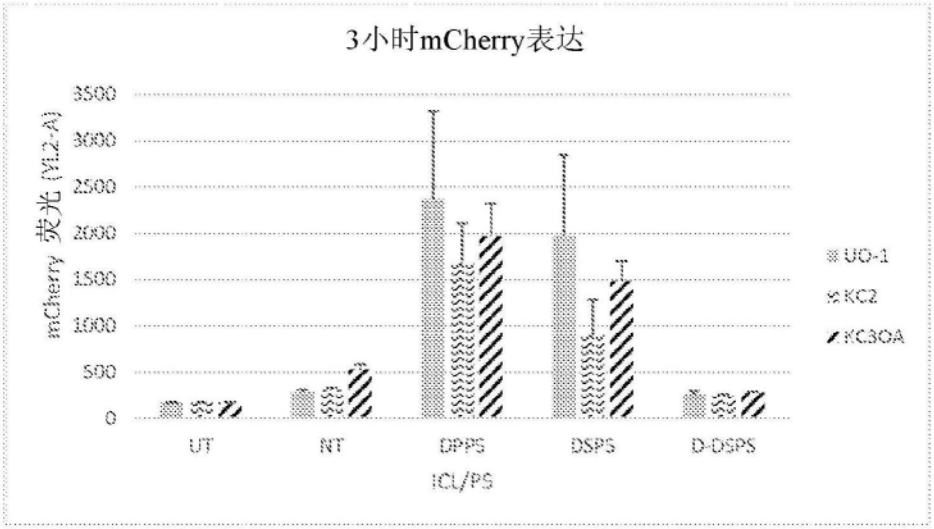

3小时mCherry表达
mCherry 荧光 (Y1.2-A)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
UT
NT
DPPS
DSPS
D-DSPS
ICL/PS
UO-1
KC2
KC3OA

图35

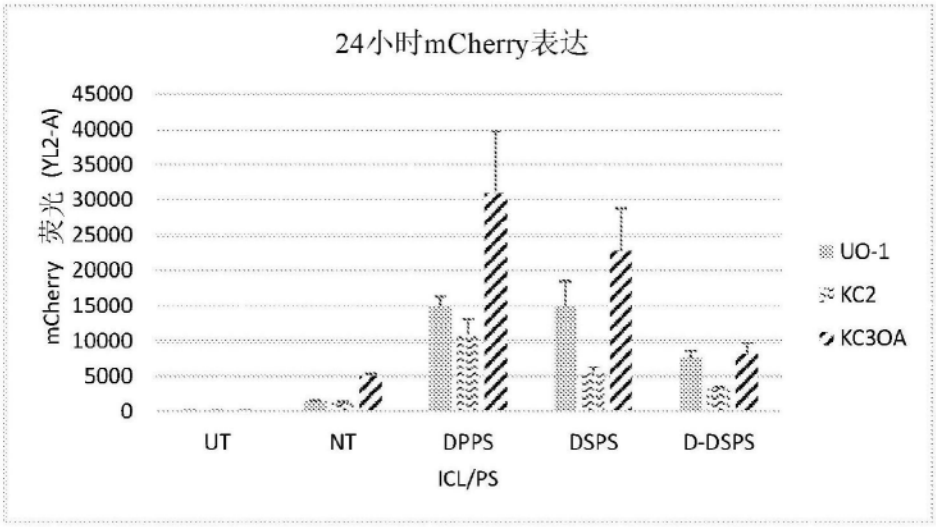

24小时mCherry表达
mCherry 荧光 (YL2-A)
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
UT
NT
DPPS
DSPS
D-DSPS
ICL/PS
UO-1
KC2
KC3OA

图36

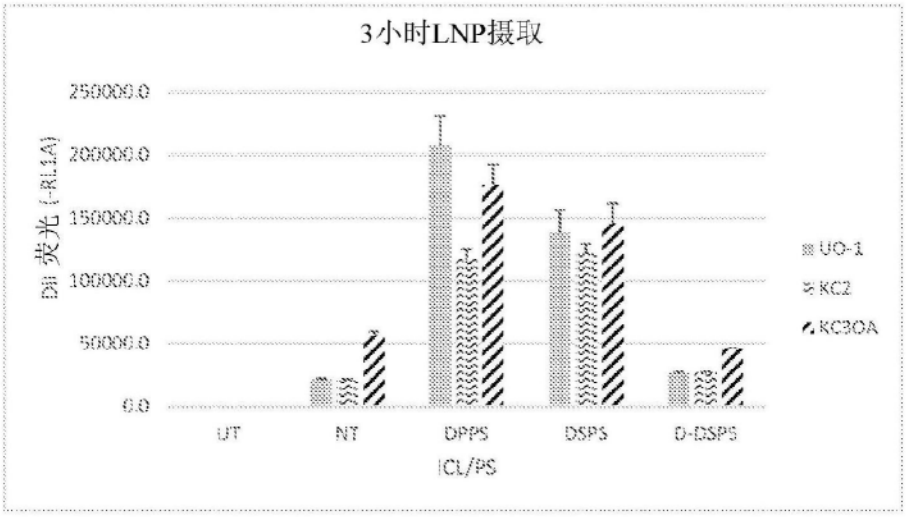

3小时LNP摄取
Dil 荧光 (-RL1A)
250000.0
200000.0
150000.0
100000.0
50000.0
0.0
UT
NT
DPPS
DSPS
D-DSPS
ICL/PS
UO-1
KC2
KC3OA

图37

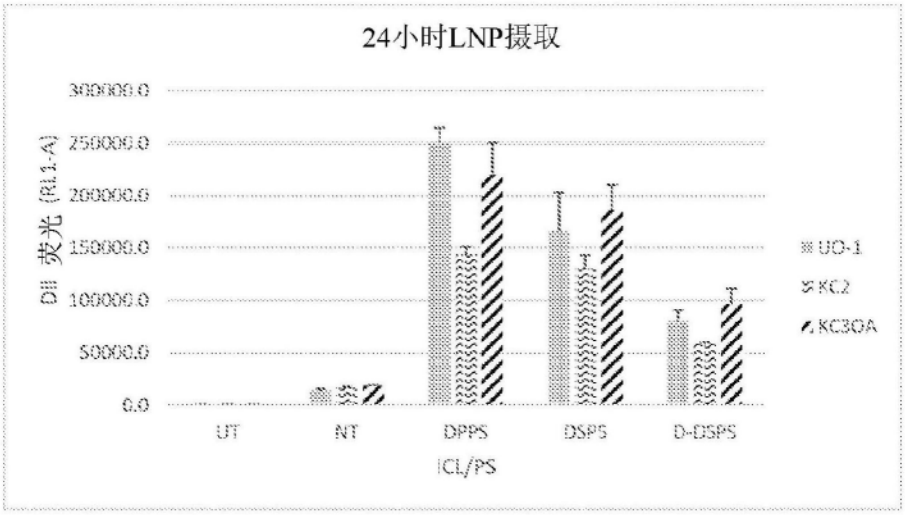

24小时LNP摄取
300000.0
250000.0
200000.0
150000.0
100000.0
50000.0
0.0
Dil 荧光 (RL1-A)
UT
NT
DPPS
DSPS
D-DSPS
ICL/PS
UO-1
KC2
KC3OA

图38

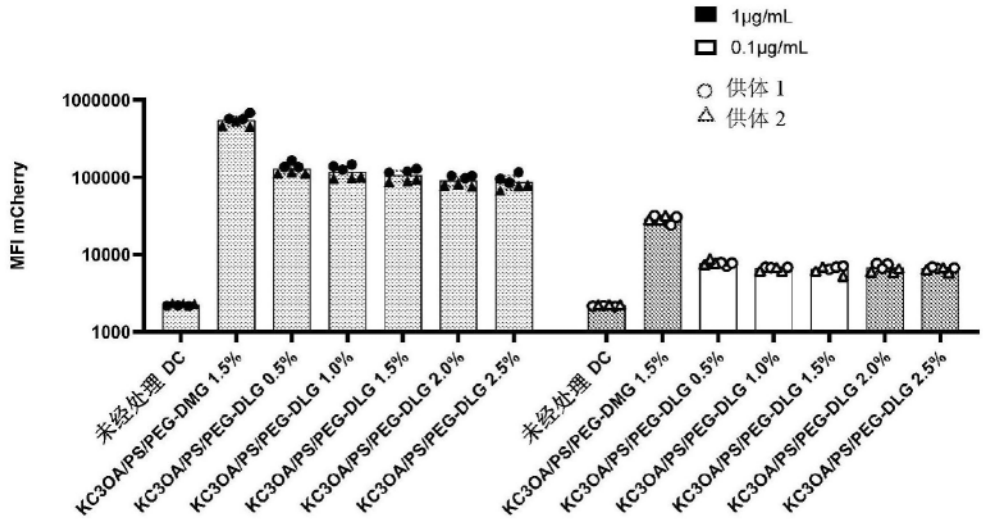

1μg/mL
0.1μg/mL
供体 1
供体 2
MFI mCherry
1000000
100000
10000
1000
未经处理 DC
KC3OA/PS/PEG-DMG 1.5%
KC3OA/PS/PEG-DLG 0.5%
KC3OA/PS/PEG-DLG 1.0%
KC3OA/PS/PEG-DLG 1.5%
KC3OA/PS/PEG-DLG 2.0%
KC3OA/PS/PEG-DLG 2.5%

图39

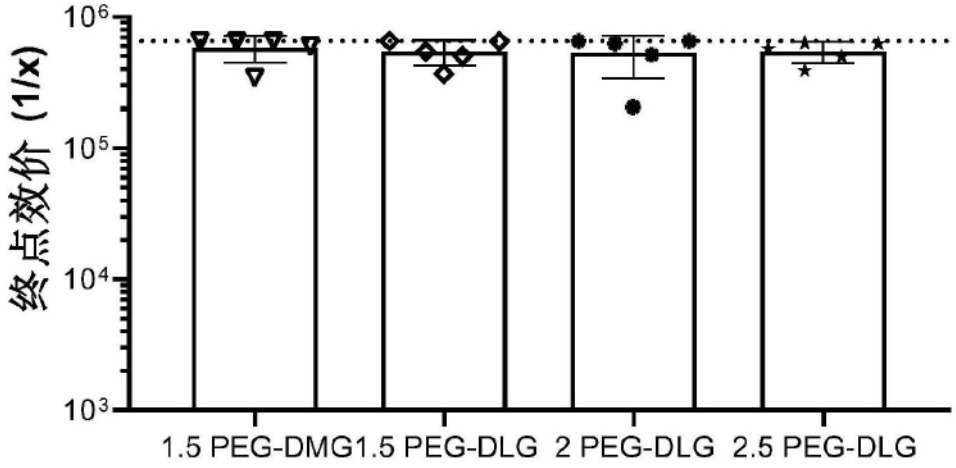


图40(在加强之后)

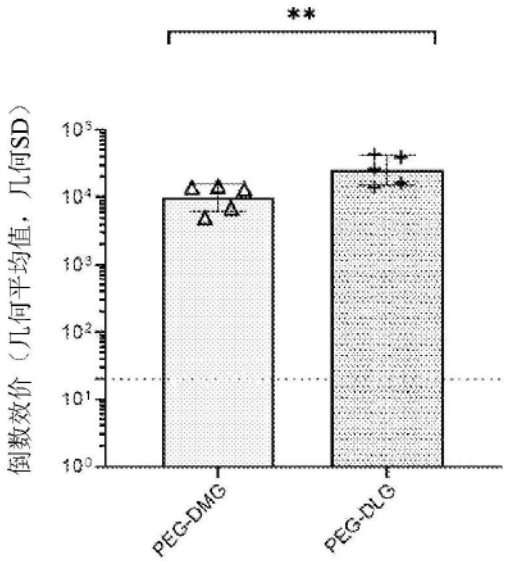


图41A(所有KC3-OA/5%DPPS和1μg剂量)

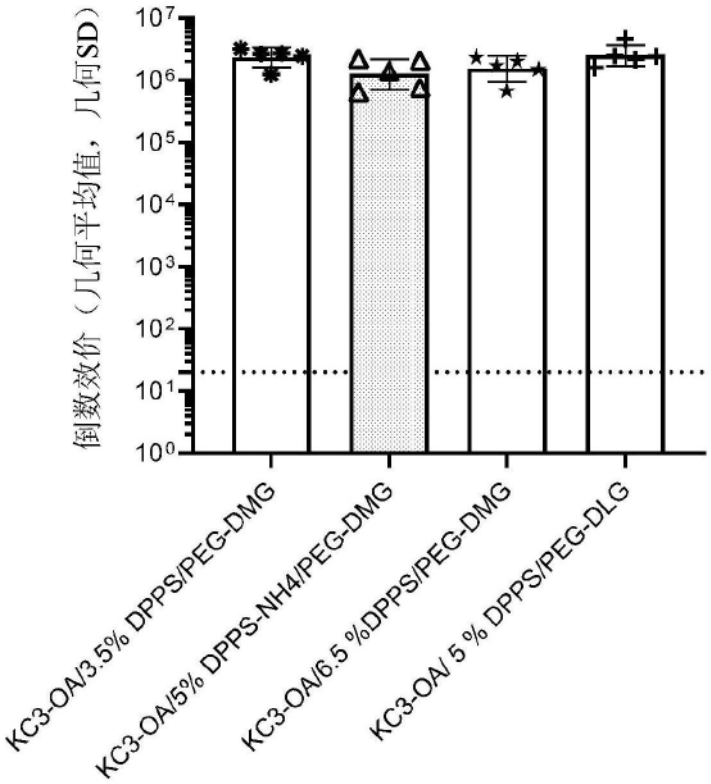


图41B(加强之后2周)

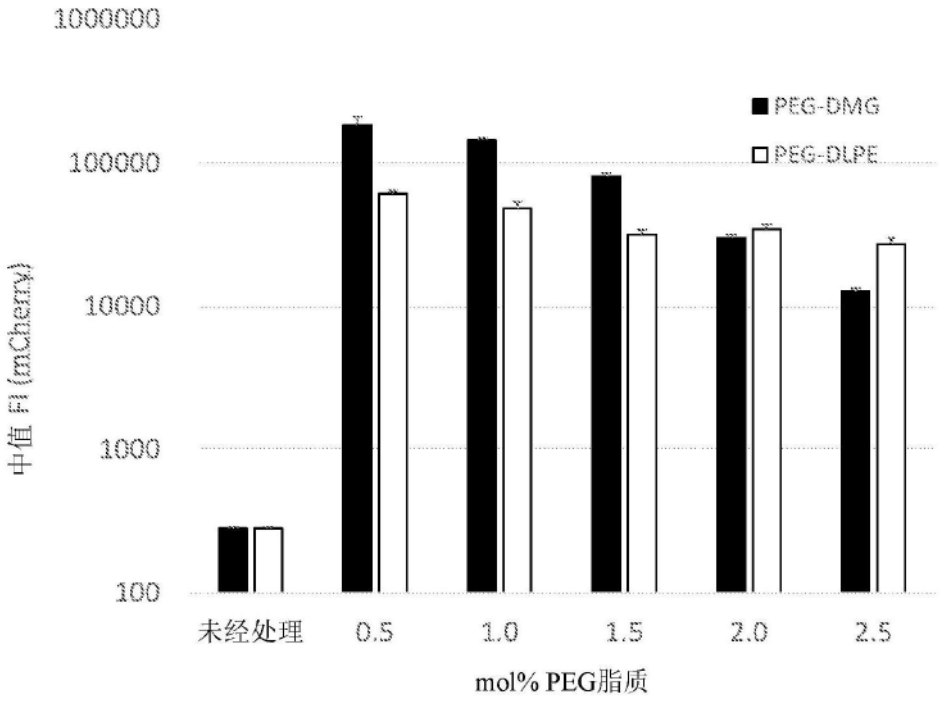


图42

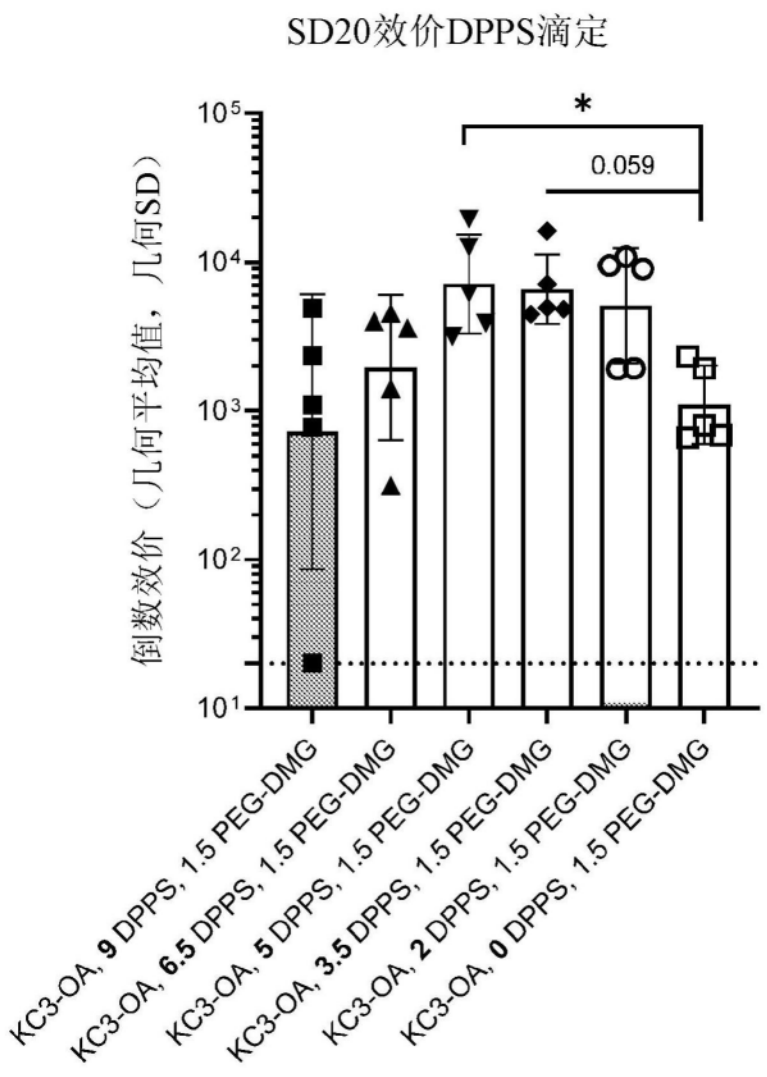

SD20效价DPPS滴定
倒数效价（几何平均值，几何SD）
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
*
0.059
KC3-OA, 9 DPPS, 1.5 PEG-DMG
KC3-OA, 6.5 DPPS, 1.5 PEG-DMG
KC3-OA, 5 DPPS, 1.5 PEG-DMG
KC3-OA, 3.5 DPPS, 1.5 PEG-DMG
KC3-OA, 2 DPPS, 1.5 PEG-DMG
KC3-OA, 0 DPPS, 1.5 PEG-DMG

图43A

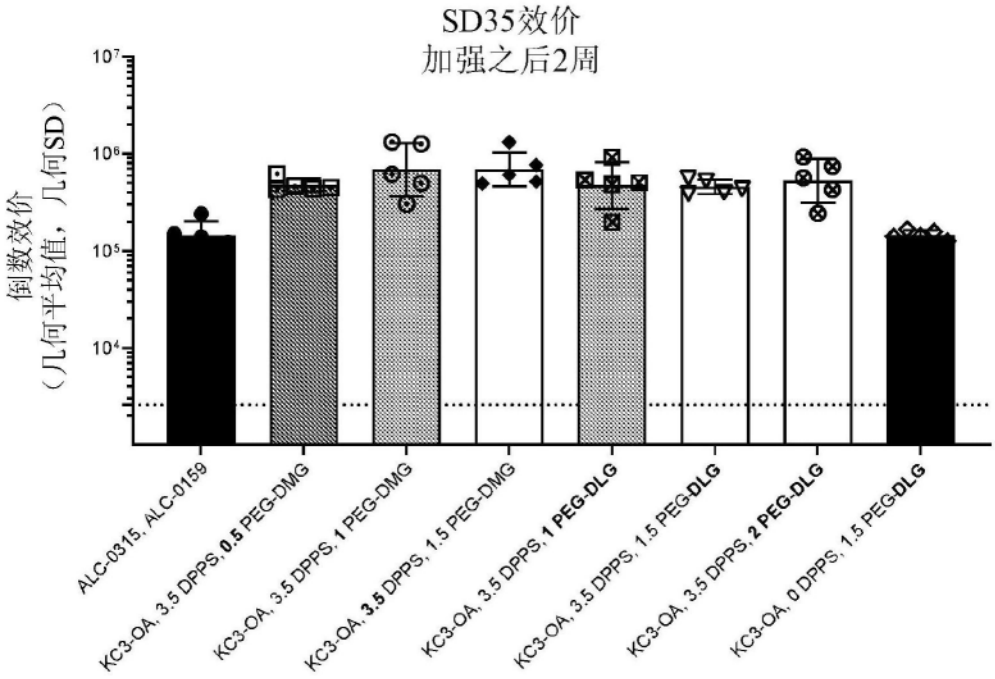

SD35效价
加强之后2周
倒数效价
（几何平均值，几何SD）
10^7
10^6
10^5
10^4
ALC-0315, ALC-0159
KC3-OA, 3.5 DPPS, 0.5 PEG-DMG
KC3-OA, 3.5 DPPS, 1 PEG-DMG
KC3-OA, 3.5 DPPS, 1.5 PEG-DMG
KC3-OA, 3.5 DPPS, 1 PEG-DLG
KC3-OA, 3.5 DPPS, 1.5 PEG-DLG
KC3-OA, 3.5 DPPS, 2 PEG-DLG
KC3-OA, 0 DPPS, 1.5 PEG-DLG

图43B

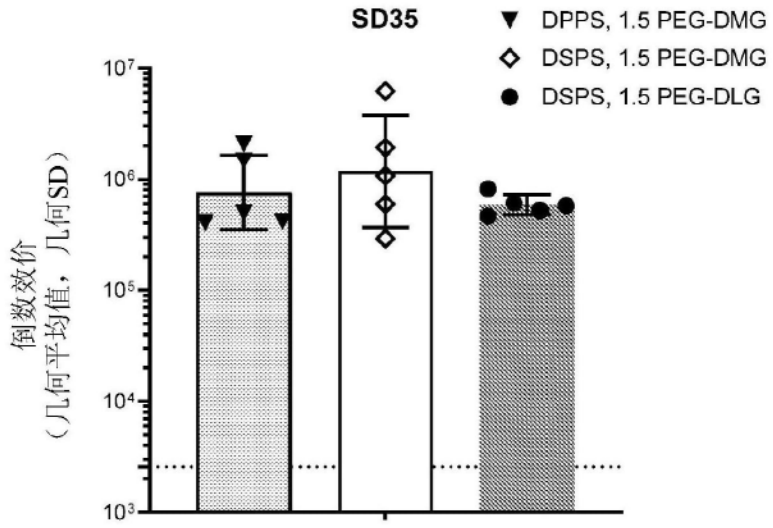
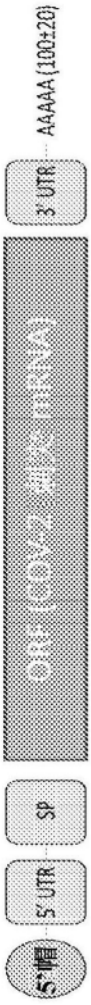

SD35
DPPS, 1.5 PEG-DMG
DSPS, 1.5 PEG-DMG
DSPS, 1.5 PEG-DLG
倒数效价
（几何平均值，几何SD）
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3

图43C


5'帽
5' UTR
SP
ORF (COV-2 刺突 mRNA)
3' UTR
AAAAA (100±20)

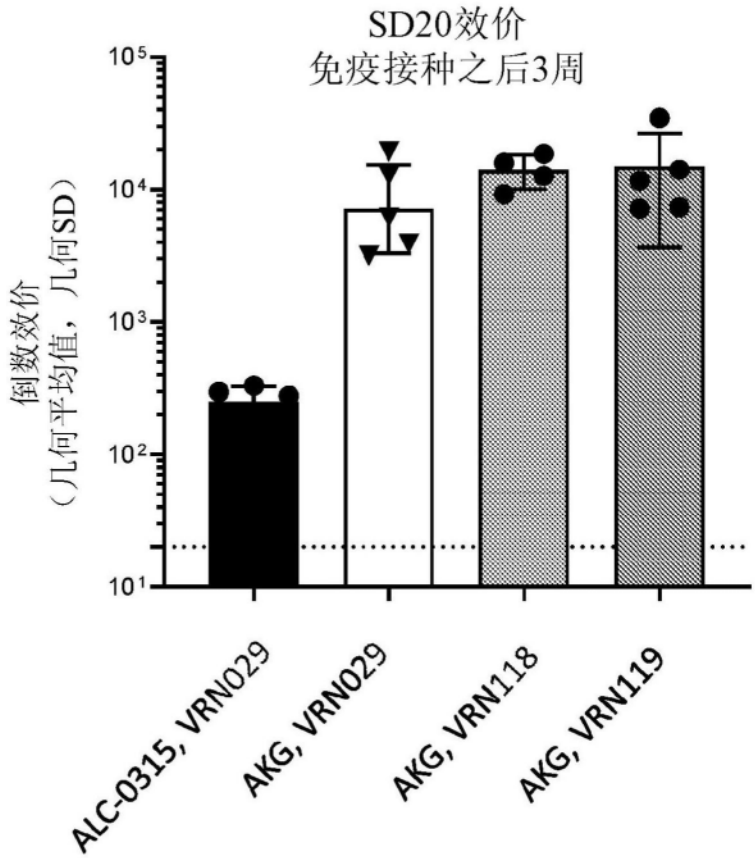

SD20效价
免疫接种之后3周
倒数效价
（几何平均值，几何SD）
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
ALC-0315, VRN029
AKG, VRN029
AKG, VRN118
AKG, VRN119

图44

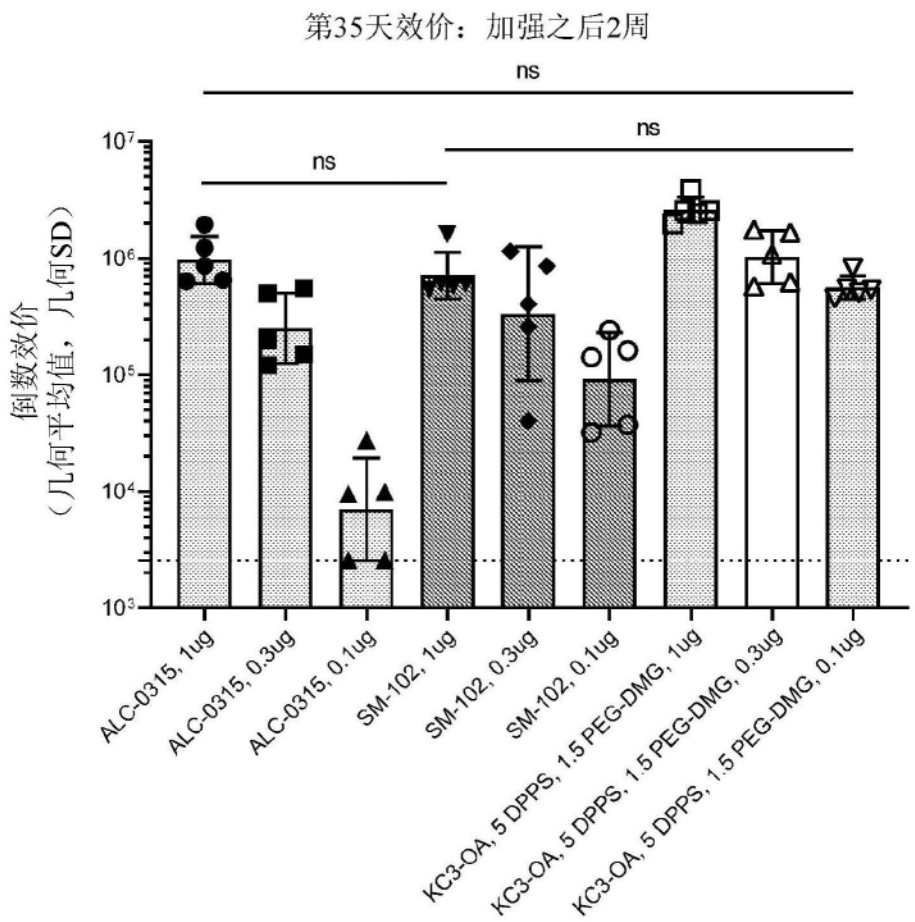

第35天效价：加强之后2周
ns
ns
ns
倒数效价
（几何平均值，几何SD）
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
ALC-0315, 1ug
ALC-0315, 0.3ug
ALC-0315, 0.1ug
SM-102, 1ug
SM-102, 0.3ug
SM-102, 0.1ug
KC3-OA, 5 DPPS, 1.5 PEG-DMG, 1ug
KC3-OA, 5 DPPS, 1.5 PEG-DMG, 0.3ug
KC3-OA, 5 DPPS, 1.5 PEG-DMG, 0.1ug

图45A

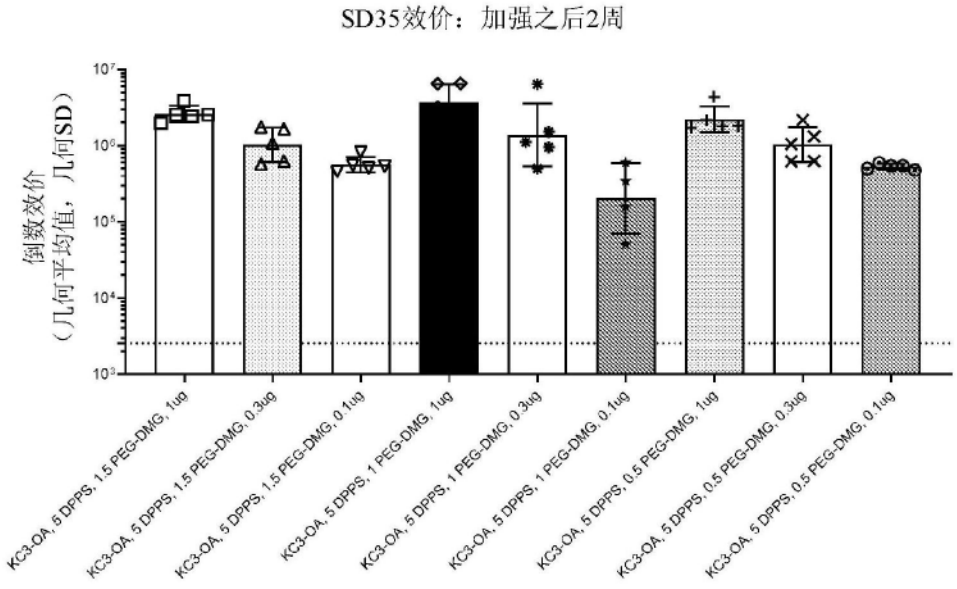

SD35效价：加强之后2周
倒数效价
（几何平均值，几何SD）
KC3-OA, 5 DPPS, 1.5 PEG-DMG, 1ug
KC3-OA, 5 DPPS, 1.5 PEG-DMG, 0.3ug
KC3-OA, 5 DPPS, 1.5 PEG-DMG, 0.1ug
KC3-OA, 5 DPPS, 1 PEG-DMG, 1ug
KC3-OA, 5 DPPS, 1 PEG-DMG, 0.3ug
KC3-OA, 5 DPPS, 1 PEG-DMG, 0.1ug
KC3-OA, 5 DPPS, 0.5 PEG-DMG, 1ug
KC3-OA, 5 DPPS, 0.5 PEG-DMG, 0.3ug
KC3-OA, 5 DPPS, 0.5 PEG-DMG, 0.1ug

图45B

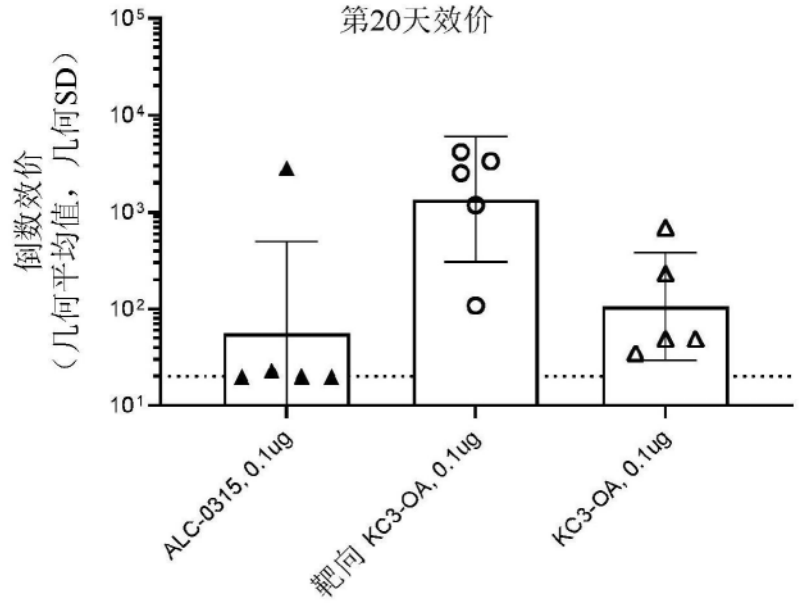

第20天效价
倒数效价
（几何平均值，几何SD）
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
ALC-0315, 0.1ug
靶向 KC3-OA, 0.1ug
KC3-OA, 0.1ug

图46A

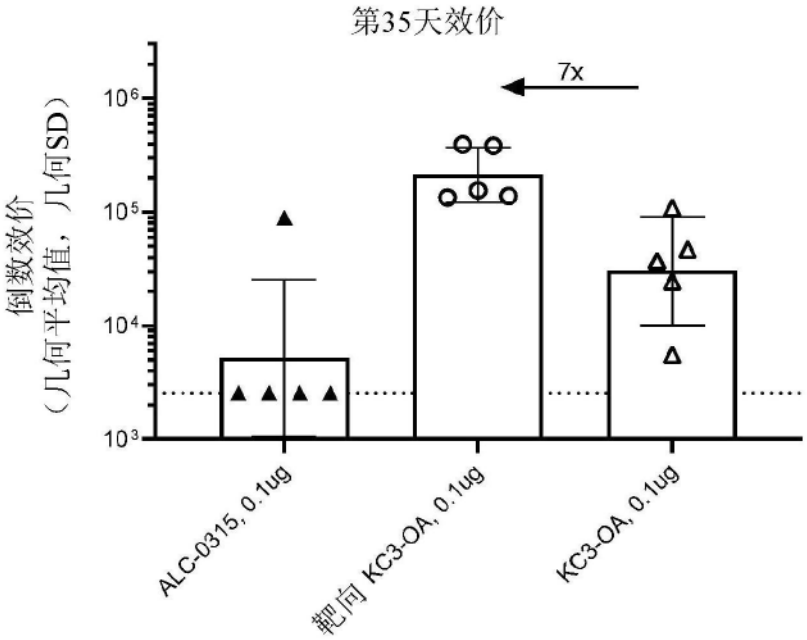

第35天效价
7x
倒数效价
（几何平均值，几何SD）
10^6
10^5
10^4
10^3
ALC-0315, 0.1ug
靶向 KC3-OA, 0.1ug
KC3-OA, 0.1ug

图46B

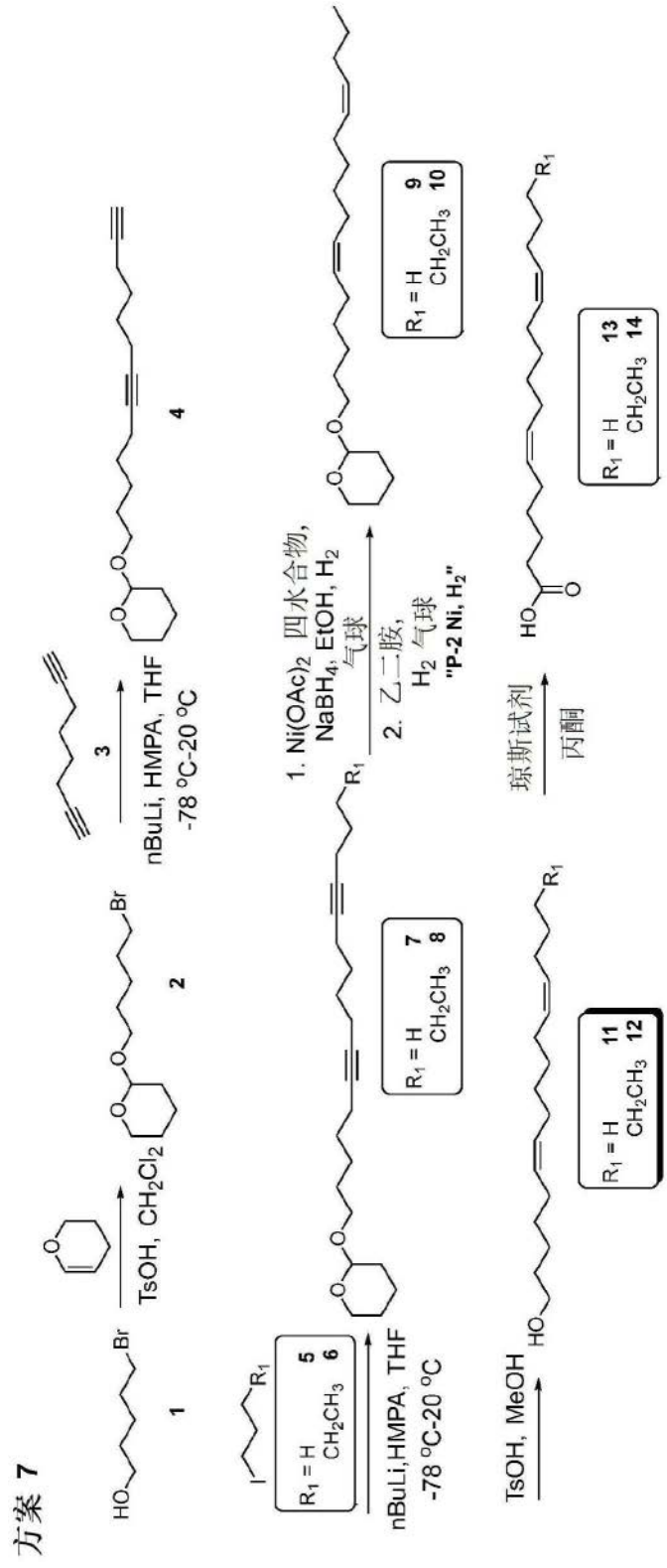

方案 7
HO
Br
1
TsOH, CH2Cl2
2
nBuLi, HMPA, THF
-78 °C-20 °C
3
4
I
R1
R1 = H
CH2CH3
5
6
nBuLi,HMPA, THF
-78 °C-20 °C
7
8
1. Ni(OAc)2 四水合物,
NaBH4, EtOH, H2
气球
2. 乙二胺,
H2 气球
"P-2 Ni, H2"
9
10
TsOH, MeOH
琼斯试剂
丙酮
11
12
13
14

图47A

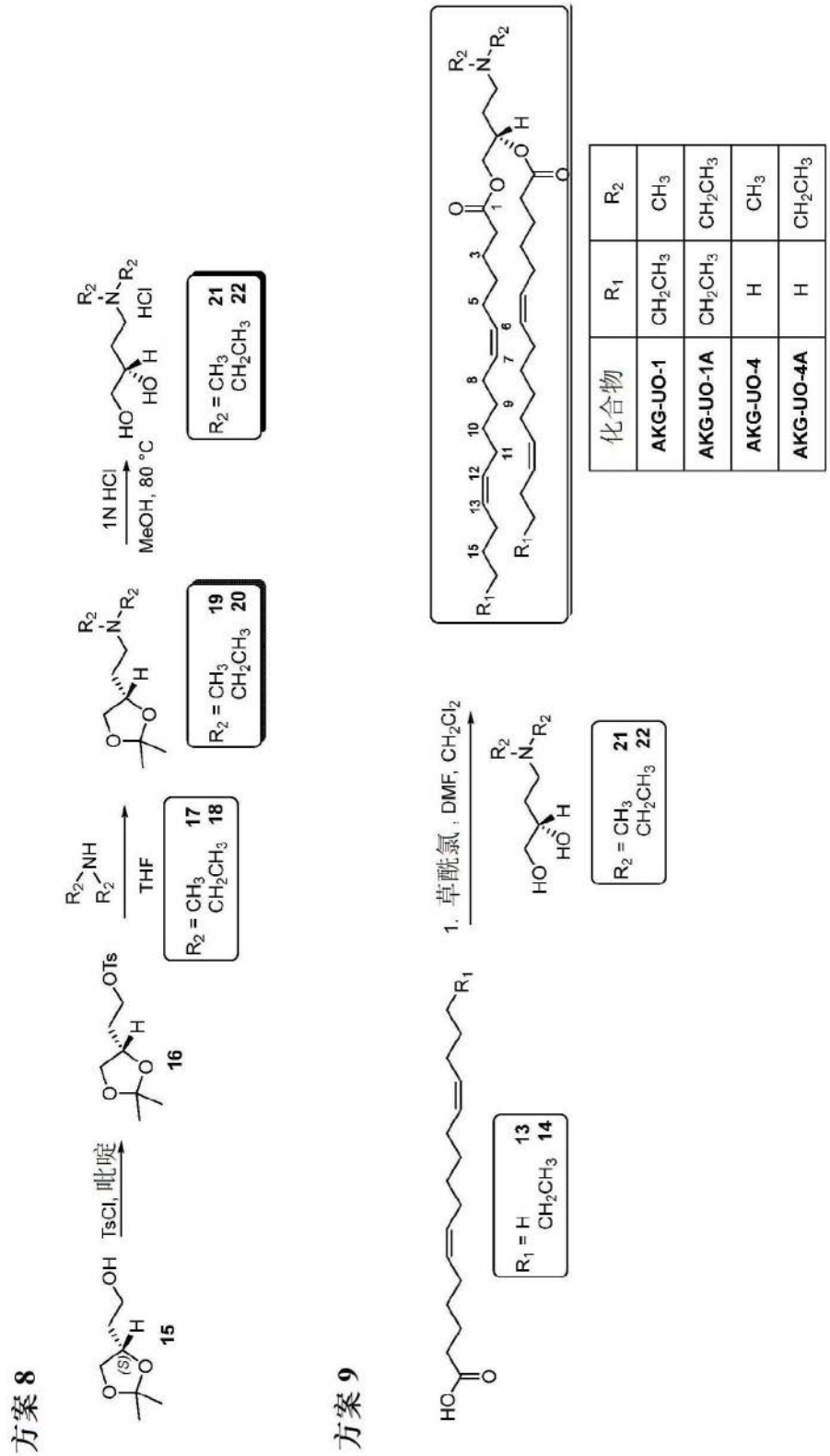

方案 8
TsCl, 吡啶
THF
1N HCl
MeOH, 80 °C
方案 9
1. 草酰氯, DMF, CH_2Cl_2
化合物 | R_1 | R_2
AKG-UO-1 | CH_2CH_3 | CH_3
AKG-UO-1A | CH_2CH_3 | CH_2CH_3
AKG-UO-4 | H | CH_3
AKG-UO-4A | H | CH_2CH_3

图47B

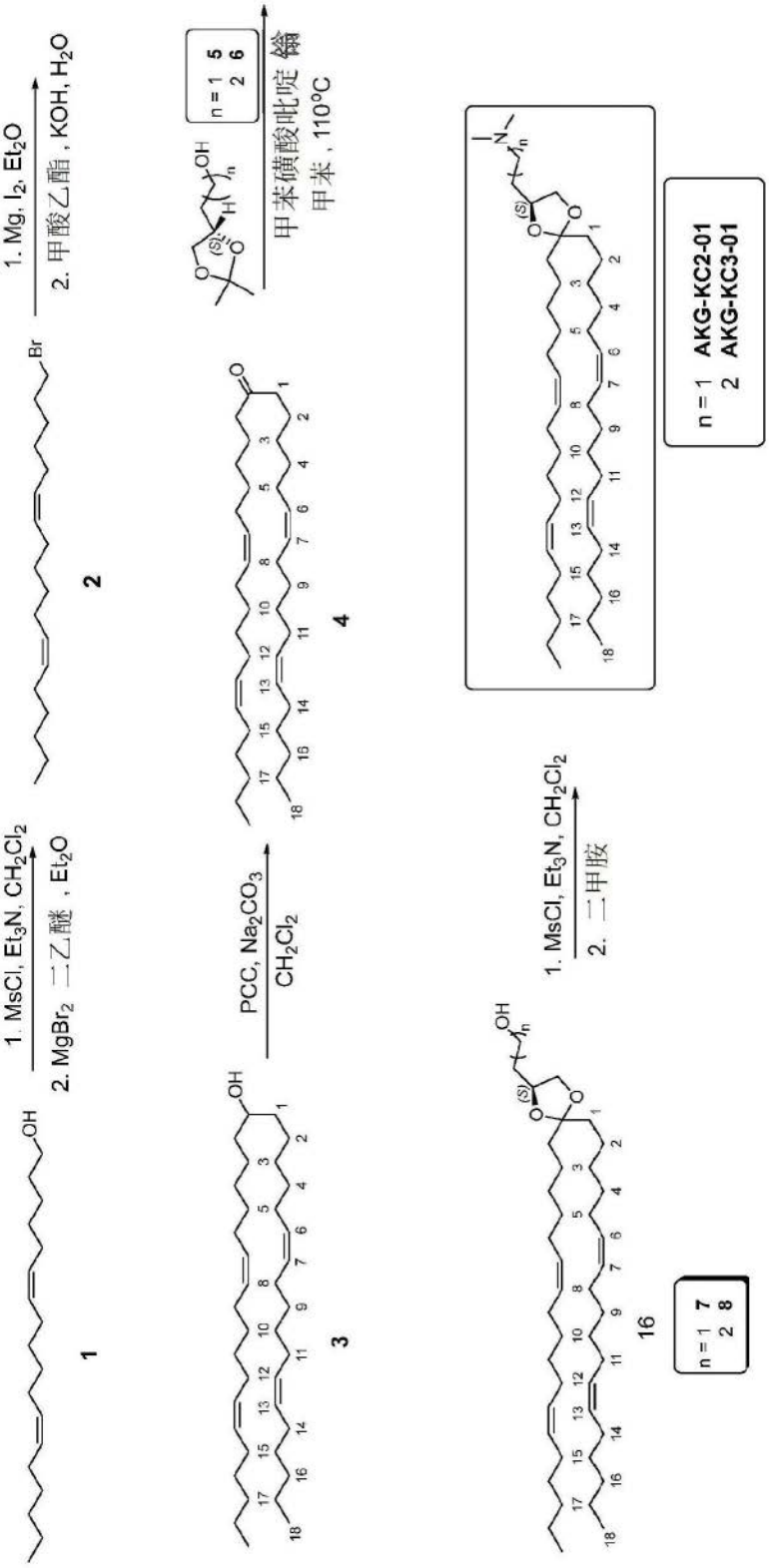

1. Mg, I2, Et2O
2. 甲酸乙酯 , KOH, H2O
1. MsCl, Et3N, CH2Cl2
2. MgBr2 二乙醚 , Et2O
PCC, Na2CO3
CH2Cl2
甲苯磺酸吡啶鎓
甲苯 , 110°C
n = 1 5
2 6
1. MsCl, Et3N, CH2Cl2
2. 二甲胺
n = 1 AKG-KC2-01
2 AKG-KC3-01
n = 1 7
2 8
1
2
3
4
16

图48

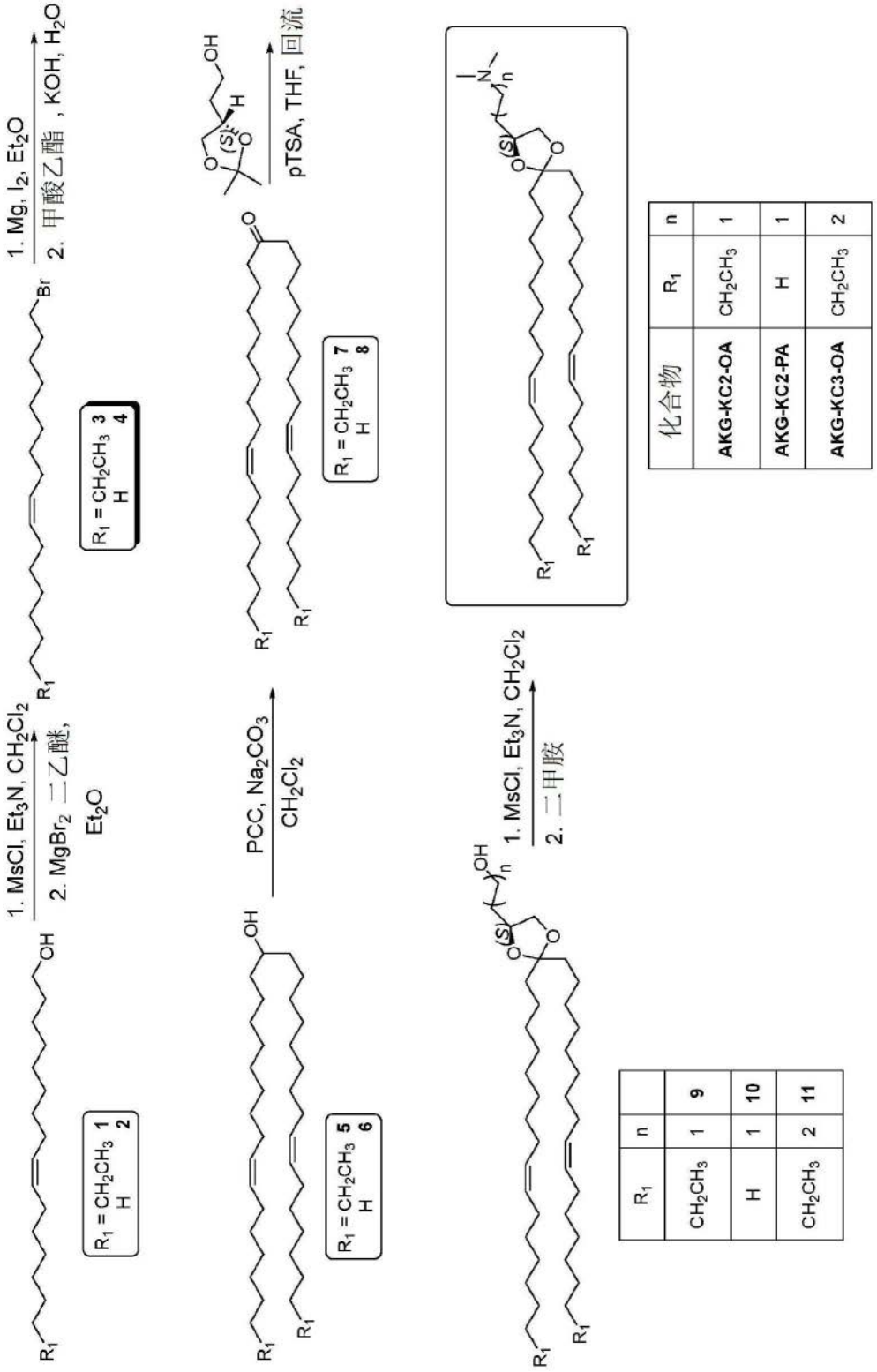

1. Mg, I2, Et2O
2. 甲酸乙酯 , KOH, H2O
1. MsCl, Et3N, CH2Cl2
2. MgBr2 二乙醚, Et2O
PCC, Na2CO3
CH2Cl2
pTSA, THF, 回流
1. MsCl, Et3N, CH2Cl2
2. 二甲胺
R1 = CH2CH3 1 2
H
R1 = CH2CH3 3 4
H
R1 = CH2CH3 5 6
H
R1 = CH2CH3 7 8
H
R1 n
CH2CH3 1 9
H 1 10
CH2CH3 2 11
化合物 R1 n
AKG-KC2-OA CH2CH3 1
AKG-KC2-PA H 1
AKG-KC3-OA CH2CH3 2

图49

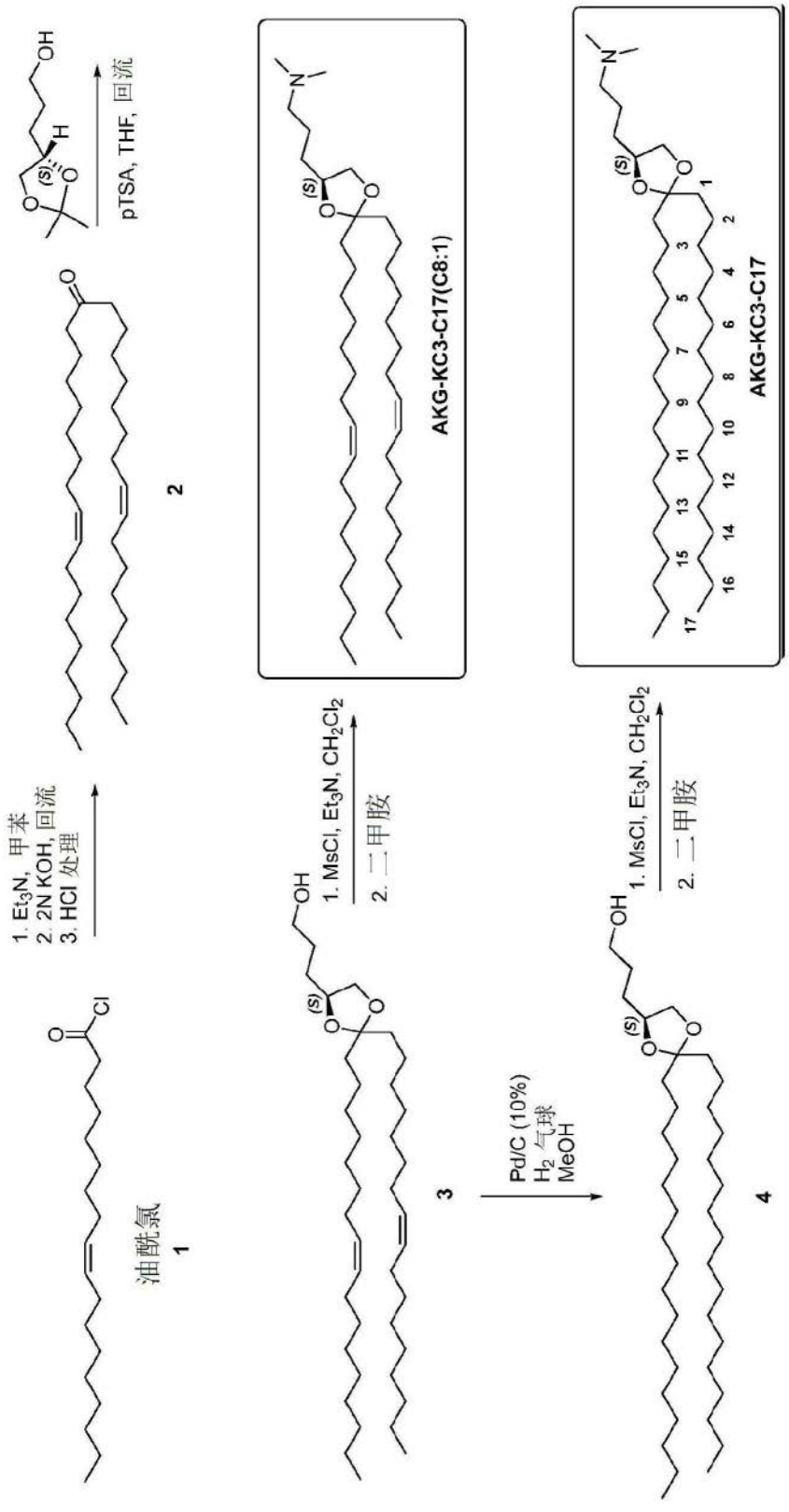

油酰氯
1
1. Et3N, 甲苯
2. 2N KOH, 回流
3. HCl 处理
2
pTSA, THF, 回流
3
1. MsCl, Et3N, CH2Cl2
2. 二甲胺
AKG-KC3-C17(C8:1)
Pd/C (10%)
H2 气球
MeOH
4
1. MsCl, Et3N, CH2Cl2
2. 二甲胺
AKG-KC3-C17

图50

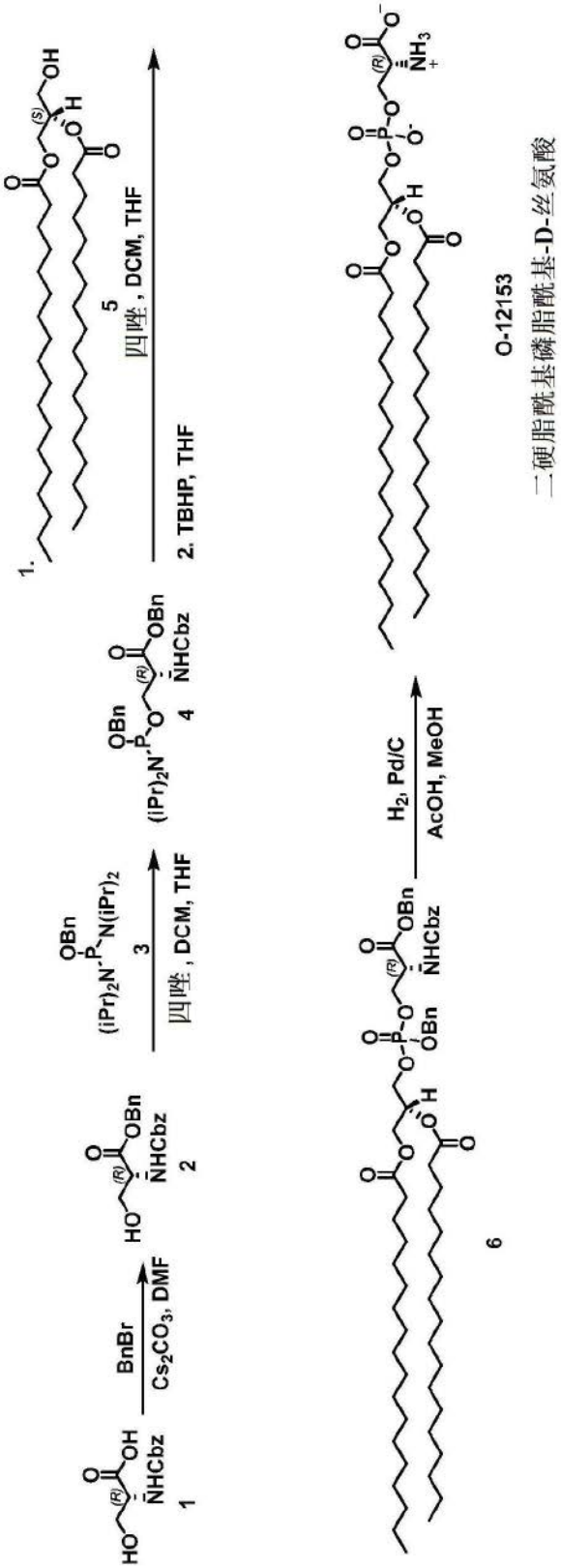

BnBr
Cs2CO3, DMF
四唑, DCM, THF
四唑, DCM, THF
2. TBHP, THF
H2, Pd/C
AcOH, MeOH
O-12153
二硬脂酰基磷脂酰基-D-丝氨酸

图51