(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117897143 A
(43)申请公布日 2024.04.16

(21)申请号 202280053409.2

(22)申请日 2022.06.07

(30)优先权数据
63/197,881 2021.06.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.01.30

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/032510 2022.06.07

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/261101 EN 2022.12.15

(71)申请人 世代生物公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 M·勒布朗 G·范斯坦
R·N·托伊 B·诺尔廷
N·西尔弗 P·萨马约亚
J·E·查特顿 M·曼加涅罗
D·A·罗斯 R·M·德莱尼

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平

(51)Int.Cl.
A61K 9/51(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
C12N 15/66(2006.01)

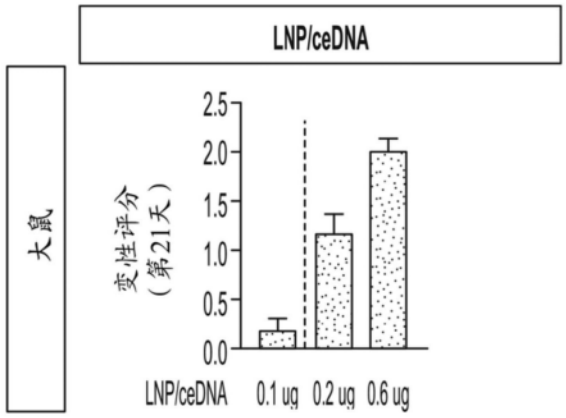
权利要求书15页 说明书126页 附图60页

(54)发明名称

APOE和APOB修饰的脂质纳米颗粒组合物及其用途

(57)摘要

本文提供了包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA)以及至少一种药学上可接受的赋形剂的药物组合物,其中该LNP包含与该LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段。该ApoE多肽或其片段和/或该ApoB多肽或其片段能够结合低密度脂蛋白(LDL)受体或LDL受体家族成员,有利地提供可针对表达LDL受体的任何细胞或组织的LNP组合物。



CN 117897143 A

1.一种药物组合物,所述药物组合物包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA),其中所述LNP包含与所述LNP连接的载脂蛋白E(ApoE)多肽或其片段和/或载脂蛋白B(ApoB)多肽或其片段,以及至少一种药学上可接受的赋形剂。

2.根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽或其片段和/或所述ApoB多肽或其片段能够结合低密度脂蛋白(LDL)受体或LDL受体家族成员。

3.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述LNP包含ApoE多肽或其片段。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的药物组合物,其中所述LNP包含ApoB多肽或其片段。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽包含EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGGC(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1中所示的所述氨基酸序列具有至少80%的序列相似性。

6.根据权利要求5所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽与SEQ ID NO:1所示的所述氨基酸序列具有至少85%的序列相似性。

7.根据权利要求5所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽与SEQ ID NO:1所示的所述氨基酸序列具有至少90%的序列相似性。

8.根据权利要求5所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽与SEQ ID NO:1所示的所述氨基酸序列具有至少95%的序列相似性。

9.根据权利要求5所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽与SEQ ID NO:1所示的所述氨基酸序列具有至少99%的序列相似性。

10.根据权利要求5所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽由SEQ ID NO:1组成。

11.根据权利要求1至4中任一项所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽与SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列具有至少80%的序列相似性。

12.根据权利要求11所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽与SEQ ID NO:3所示的所述氨基酸序列具有至少85%的序列相似性。

13.根据权利要求12所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽与SEQ ID NO:3所示的所述氨基酸序列具有至少90%的序列相似性。

14.根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽与SEQ ID NO:3所示的所述氨基酸序列具有至少95%的序列相似性。

15.根据权利要求14所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽与SEQ ID NO:3所示的所述氨基酸序列具有至少99%的序列相似性。

16.根据权利要求15所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽包含SEQID NO:3。

17.根据权利要求12所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽由SEQ ID NO:3组成。

18.根据权利要求1至3中任一项所述的药物组合物,其中与所述LNP连接的所述ApoE多肽是如SEQ ID NO:1中所示的EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGGC的片段,其中所述片段能够结合到LDL受体。

19.根据权利要求1至3中任一项所述的药物组合物,其中与所述LNP连接的所述ApoE多肽是如SEQ ID NO:3中所示的EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGGC的片段,其中所述片段能够结合到LDL受体。

20.根据权利要求18或权利要求19所述的药物组合物,其中所述LNP被内化到细胞中。

21.根据权利要求1、2或4中任一项所述的药物组合物,其中所述ApoB多肽包含SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC

(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2具有至少80％的序列相似性。

22.根据权利要求21所述的药物组合物,其中所述ApoB多肽与SEQ ID NO:2中所示的所述氨基酸序列具有至少85％的序列相似性。

23.根据权利要求21所述的药物组合物,其中所述ApoB多肽与SEQ ID NO:2中所示的所述氨基酸序列具有至少90％的序列相似性。

24.根据权利要求21所述的药物组合物,其中所述ApoB多肽与SEQ ID NO:2中所示的所述氨基酸序列具有至少95％的序列相似性。

25.根据权利要求21所述的药物组合物,其中所述ApoB多肽与SEQ ID NO:2中所示的所述氨基酸序列具有至少99％的序列相似性。

26.根据权利要求21所述的药物组合物,其中所述ApoB多肽具有由SEQ ID NO:2组成的氨基酸序列。

27.根据权利要求21所述的药物组合物,其中所述ApoB多肽由SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC

(SEQ ID NO:4)组成。

28.根据权利要求1、2或4中任一项所述的药物组合物,其中所述ApoB多肽包含SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC

(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4中所示的所述氨基酸序列具有至少80％的序列相似性。

29.根据权利要求28所述的药物组合物,其中所述ApoB多肽与SEQ ID NO:4所示的所述氨基酸序列具有至少85％的序列相似性。

30.根据权利要求28所述的药物组合物,其中所述ApoB多肽与SEQ ID NO:4所示的所述氨基酸序列具有至少90％的序列相似性。

31.根据权利要求28所述的药物组合物,其中所述ApoB多肽与SEQ ID NO:4所示的所述氨基酸序列具有至少95％的序列相似性。

32.根据权利要求28所述的药物组合物,其中所述ApoB多肽与SEQ ID NO:4所示的所述氨基酸序列具有至少99％的序列相似性。

33.根据权利要求28所述的药物组合物,其中所述ApoB多肽由SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC

(SEQ ID NO:4)组成。

34.根据权利要求1、2和4中任一项所述的药物组合物,其中与所述LNP连接的所述ApoB多肽是SEQ ID NO:2中所示的EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGGC的片段,其中所述片段能够结合到LDL受体。

35.根据权利要求1、2和4中任一项所述的药物组合物,其中与所述LNP连接的所述ApoB多肽是SEQ ID NO:4中所示的EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGG的片段,其中所述片段能够结合到LDL受体。

36.根据权利要求34或权利要求35所述的药物组合物,其中所述LNP被内化到细胞中。

37.根据权利要求1至36中任一项所述的药物组合物,其中所述LNP包含选自由以下组

成的组的脂质:阳离子脂质、甾醇或其衍生物、非阳离子脂质和至少一种PEG化脂质。

38.根据权利要求1至37中任一项所述的药物组合物,其中所述TNA被包封在所述LNP中。

39.根据权利要求1至38中任一项所述的药物组合物,其中所述TNA选自由以下组成的组:小基因、质粒、小环、小干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)、反义寡核苷酸(ASO)、核酶、末端封闭的(ceDNA)、迷你串、doggybone、末端经前端粒封闭的DNA或哑铃线性DNA、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、非对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、DNA病毒载体、病毒RNA载体、非病毒载体及其任何组合。

40.根据权利要求39所述的药物组合物,其中所述TNA为ceDNA。

41.根据权利要求39所述的药物组合物,其中所述ceDNA为线性双链体DNA。

42.根据权利要求39所述的药物组合物,其中所述TNA为mRNA。

43.根据权利要求39所述的药物组合物,其中所述TNA为siRNA。

44.根据权利要求39所述的药物组合物,其中所述TNA为质粒。

45.根据权利要求1至44中任一项所述的药物组合物,其中所述LNP包含PEG化脂质,其中所述PEG化脂质与所述ApoE多肽或其片段连接,或者所述PEG化脂质与所述ApoB多肽或其片段连接。

46.根据权利要求45所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽或其片段或所述ApoB多肽或其片段与所述PEG化脂质化学缀合。

47.根据权利要求1至46中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物施用于受试者。

48.根据权利要求47所述的药物组合物,其中所述受试者是需要用TNA包封的LNP治疗的人类患者。

49.根据权利要求1至48中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物经由存在于所述LNP中的所述ApoE多肽和/或所述ApoB多肽与LDLR受体的结合而被递送至表达LDLR的组织。

50.根据权利要求1至49中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被递送至眼中的视网膜细胞。

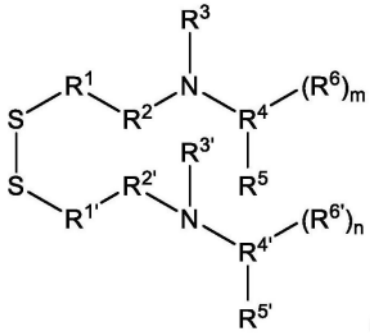
51.根据权利要求1至50中任一项所述的组合物,其中所述组合物被递送至光感受器(PR)细胞。

52.根据权利要求1至50中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被递送至视网膜色素上皮(RPE)细胞。

53.根据权利要求1至50中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被递送至光感受器(PR)细胞和视网膜色素上皮(RPE)细胞,其中所述TNA在所述PR细胞中的表达和所述TNA在所述RPE细胞中的表达是均匀分布的。

54.根据权利要求1至49中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被递送至肝脏中的肝细胞。

55.根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述阳离子脂质由式(I)表示:



(I),

或其药学上可接受的盐,其中:

R^1和$R^{1'}$各自独立地为任选取代的直链或支链C_{1-3}亚烷基;

R^2和$R^{2'}$各自独立地为任选取代的直链或支链C_{1-6}亚烷基;

R^3和$R^{3'}$各自独立地为任选取代的直链或支链C_{1-6}烷基;

或可替代地,当R^2是任选取代的支链C_{1-6}亚烷基时,R^2和R^3与它们的居间N原子一起形成4元至8元杂环基;

或可替代地,当$R^{2'}$是任选取代的支链C_{1-6}亚烷基时,$R^{2'}$和$R^{3'}$与它们的居间N原子一起形成4元至8元杂环基;

R^4和$R^{4'}$各自独立地为$-CR^a$、$-C(R^a)_2CR^a$或$-[C(R^a)_2]_2CR^a$;

R^a每次出现时独立地为H或C_{1-3}烷基;

或可替代地,当R^4为$-C(R^a)_2CR^a$或$-[C(R^a)_2]_2CR^a$并且当R^a是C_{1-3}烷基时,R^3和R^4与它们的居间N原子形成4元至8元杂环基;

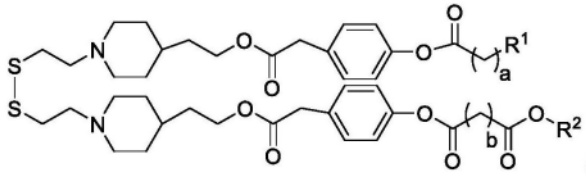
或可替代地,当$R^{4'}$为$-C(R^a)_2CR^a$或$-C(R^a)_2]_2CR^a$并且当R^a是C_{1-3}烷基时,$R^{3'}$和$R^{4'}$与它们的居间N原子一起形成4元至8元杂环基;

R^5和$R^{5'}$各自独立地为氢气、C_{1-20}亚烷基或C_{2-20}亚烯基;

R^6和$R^{6'}$每次出现时独立地为C_{1-20}亚烷基、C_{3-20}亚环烷基或C_{2-20}亚烯基;并且

M和n各自独立地是选自1、2、3、4和5的整数。

56.根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述阳离子脂质由式(II)表示:



(II);

或其药学上可接受的盐,其中:

a为1-20的整数;

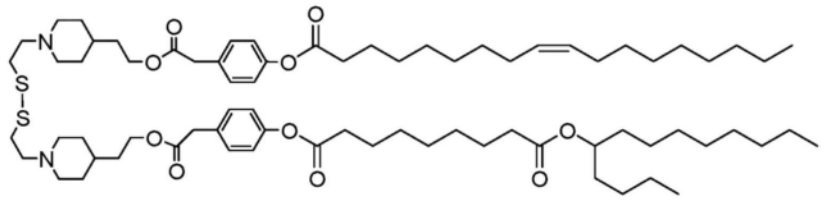
b为2-10的整数;

R^1不存在或选自(C_2-C_{20})烯基、$-C(O)O(C_2-C_{20})$烷基和被(C_2-C_{20})烷基取代的环丙基;并且

R^2为(C_2-C_{20})烷基。

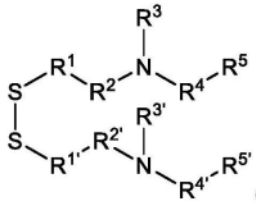
57.根据权利要求56所述的药物组合物,其中所述阳离子脂质是1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-(十三烷-5-基)壬二酸酯(脂质58),由以下结构式

表示：



脂质58

58.根据权利要求37所述的药物组合物，其中所述脂质由式(V)表示：



(V)；

或其药学上可接受的盐，其中：

R^1和$R^{1'}$各自独立地为任选被一个或多个选自R^a的组取代的(C_1-C_6)亚烷基；

R^2和$R^{2'}$各自独立地为(C_1-C_2)亚烷基；

R^3和$R^{3'}$各自独立地为任选被一个或多个选自R^b的组取代的(C_1-C_6)烷基；

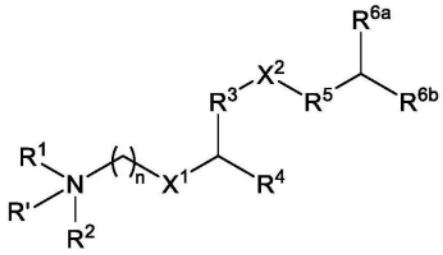
或可替代地，R^2和R^3和/或$R^{2'}$和$R^{3'}$与它们的居间N原子一起形成4元至7元杂环基；

R^4和$R^{4'}$各自为被-C(O)O-中断的(C_2-C_6)亚烷基；

R^5和$R^{5'}$各自独立地为(C_2-C_{30})烷基或(C_2-C_{30})烯基，它们各自任选地被-C(O)O-或(C_3-C_6)环烷基中断；并且

R^a和R^b各自为卤素或氰基。

59.根据权利要求37所述的药物组合物，其中所述阳离子脂质由式(XV)表示：



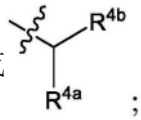
(XV)

或其药学上可接受的盐，其中：

R'不存在，为氢或C_1-C_6烷基；前提条件是当R'为氢或C_1-C_6烷基时，R'、R^1和R^2所附接到的氮原子均被质子化；

R^1和R^2各自独立地为氢、C_1-C_6烷基或C_2-C_6烯基；

R^3为C_1-C_{12}亚烷基或C_2-C_{12}亚烯基；

R^4为C_1-C_{16}非支链烷基、C_2-C_{16}非支链烯基，或  其中：

R^{4a}和R^{4b}各自独立地为C_1-C_{16}非支链烷基或C_2-C_{16}非支链烯基；

R^5不存在，为C_1-C_8亚烷基或C_2-C_8亚烯基；

R^{6a}和R^{6b}各自独立地为C_7-C_{16}烷基或C_7-C_{16}烯基;前提条件是

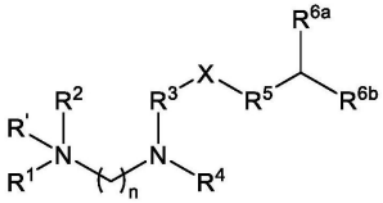
R^{6a}和R^{6b}组合中的碳原子总数大于15;

X^1和X^2各自独立地为-OC(=O)-、-SC(=O)-、-OC(=S)-、-C(=O)O-、-C(=O)S-、-S-S-、-C(R^a)=N-、-N=C(R^a)-、-C(R^a)=NO-、-O-N=C(R^a)-、-C(=O)NR^a-、-NR^aC(=O)-、-NR^aC(=O)NR^a-、-OC(=O)O-、-OSi(R^a)$_2$O-、-C(=O)(CR^a_2)C(=O)O-或OC(=O)(CR^a_2)C(=O)-;其中:

R^a每次出现时独立地为氢或C_{1-6}烷基;并且

n是选自1、2、3、4、5和6的整数。

60.根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述阳离子脂质由式(XX)表示:



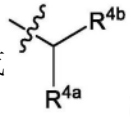
(XX)

或其药学上可接受的盐,其中:

R'不存在,为氢或C_1-C_3烷基;前提条件是当R'为氢或C_1-C_3烷基时,R'、R^1和R^2所附接到的氮原子均被质子化;

R^1和R^2各自独立地为氢或C_1-C_3烷基;

R^3为C_3-C_{10}亚烷基或C_3-C_{10}亚烯基;

R^4为C_1-C_{16}非支链烷基、C_2-C_{16}非支链烯基,或其中:

;

R^{4a}和R^{4b}各自独立地为C1-C16非支链烷基或C2-C16非支链烯基;

R^5不存在,为C_1-C_6亚烷基或C_2-C_6亚烯基;

R^{6a}和R^{6b}各自独立地为C_7-C_{14}烷基或C_7-C_{14}烯基;

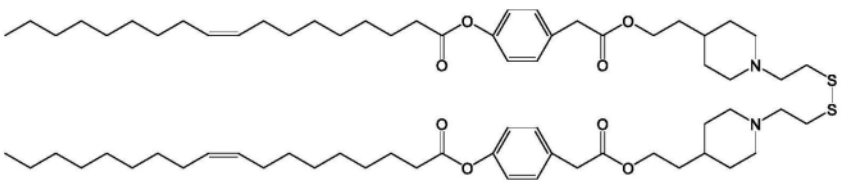
X为-OC(=O)-、-SC(=O)-、-OC(=S)-、-C(=O)O-、-C(=O)S-、-S-S-、-C(R^a)=N-、-N=C(R^a)-、-C(R^a)=NO-、-O-N=C(R^a)-、-C(=O)NR^a-、-NR^aC(=O)-、-NR^aC(=O)NR^a-、-OC(=O)O-、-OSi(R^a)$_2$O-、-C(=O)(CR^a_2)C(=O)O-或OC(=O)(CR^a_2)C(=O)-;其中:

R^a每次出现时独立地为氢或C_{1-6}烷基;并且

n是选自1、2、3、4、5和6的整数。

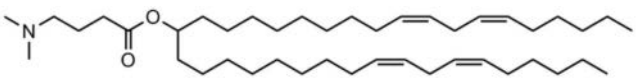
61.根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述阳离子脂质选自表2、表5、表6、表7或表8中的任一种脂质。

62.根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述阳离子脂质是由以下结构表示的脂质A:



或其药学上可接受的盐。

63.根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述阳离子脂质为具有以下结构的MC3(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA或MC3):



DLin-M-C3-DMA ("MC3")

或其药学上可接受的盐。

64.根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述甾醇或其衍生物是胆固醇。

65.根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述甾醇或其衍生物是β-谷甾醇。

66.根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述非阳离子脂质选自由以下组成的组:二硬脂酰基-sn-甘油-磷酸乙醇胺(DSPE)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-甲酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆酰基磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基磷脂酰基-乙醇胺(DSPE)、单甲基磷脂酰乙醇胺(诸如16-O-单甲基PE)、二甲基磷脂酰乙醇胺(诸如16-O-二甲基PE)、18-1-反式PE、1-硬脂酰基-2-油酰基磷脂酰乙醇胺(SOPE)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、卵磷脂酰胆碱(EPC)、二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)、鞘磷脂(SM)、二肉豆酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆酰基磷脂酰甘油(DMPG)、二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、二芥酰基磷脂酰胆碱(DEPC)、棕榈酰基油酰磷脂酰甘油(POPG)、二反式油酰基磷脂酰乙醇胺(DEPE)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DLPE);1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPHyPE);卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷、磷酸二鲸蜡酯、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰胆碱以及它们的混合物。

67.根据权利要求66所述的药物组合物,其中所述非阳离子脂质选自由以下组成的组:二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)和二油酰-磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

68.根据权利要求45所述的组合物,其中所述PEG化脂质选自由以下组成的组:PEG-二月桂基氧基丙基;PEG-二肉豆蔻基氧基丙基;PEG-二棕榈基氧基丙基、PEG-二硬脂基氧基丙基;1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰甘油(DMG-PEG);1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[叠氮基(聚乙二醇)]和二硬脂酰基-rac-甘油-聚(乙二醇)(DSG-PEG);PEG-二月桂基甘油;PEG-二棕榈酰甘油;PEG-二硬脂酰甘油;PEG-二月桂酰糖酰胺;PEG-二肉豆蔻酰糖酰胺;PEG-二棕榈酰糖酰胺;PEG-二硬脂酰糖酰胺;(1-[8'-(胆甾-5-烯-3[β]-氧基)甲酰胺基-3',6'-二氧辛酰基]氨基甲酰基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)(PEG-胆固醇);3,4-双十四烷氧基苄基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)醚(PEG-DMB),以及1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N[甲氧基(聚乙二醇)(DSPE-PEG)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-聚(乙二醇)-羟基(DSPE-PEG-OH);以及1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N[甲氧基(聚乙二醇)-叠氮化物(DSPE-PEG-叠氮化物)。

69.根据权利要求68所述的药物组合物,其中所述PEG化脂质是DMG-PEG、DSPE-PEG、

DSPE-PEG-OH、DSPE-PEG-叠氮化物、DSG-PEG或其组合。

70.根据权利要求68或69所述的药物组合物,其中所述至少一种PEG化脂质是DMG-PEG2000、DSPE-PEG2000、DSPE-PEG2000-OH、DSPE-PEG2000-叠氮化物、DSG-PEG2000或其组合。

71.根据权利要求45、46、69或70中任一项所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽或其片段和/或所述ApoB多肽或其片段与所述LNP的PEG化脂质共价连接以形成PEG化脂质缀合物。

72.根据权利要求71所述的药物组合物,其中与所述ApoE多肽或其片段和/或所述ApoB多肽或其片段共价连接的所述PEG化脂质是DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

73.根据权利要求1至45中任一项所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽或其片段和/或所述ApoB多肽或其片段经由不可切割的接头与所述LNP共价连接。

74.根据权利要求73所述的药物组合物,其中所述不可切割的接头是含马来酰亚胺的接头。

75.根据权利要求1至45中任一项所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽或其片段和/或所述ApoB多肽或其片段经由可切割的接头与所述LNP共价连接。

76.根据权利要求1至45中任一项所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽或其片段和/或所述ApoB多肽或其片段经由含吡啶基二硫化物(PDS)的接头与所述LNP共价连接。

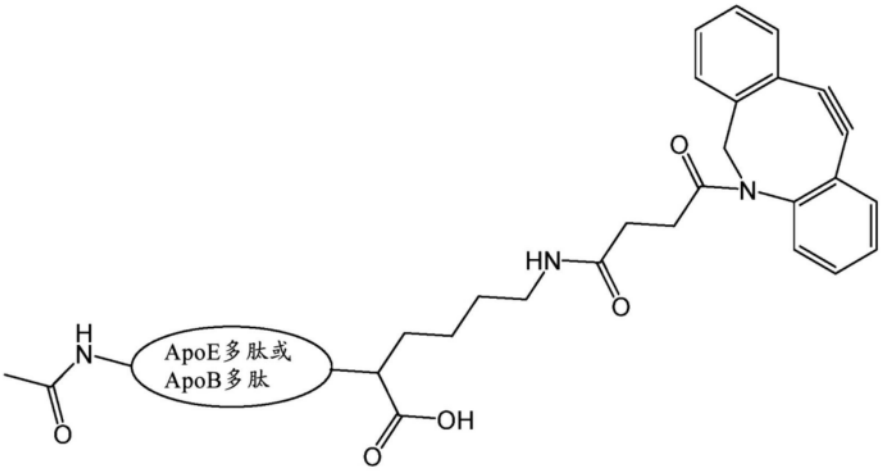
77.根据权利要求1至45中任一项的药物组合物,其中所述ApoE多肽或其片段和/或所述ApoB多肽或其片段经由菌株促进的炔-叠氮化物环加成(SPAAC)化学作用与所述LNP共价连接。

78.根据权利要求77所述的药物组合物,其中所述SPAAC化学作用包括环辛炔或其衍生物与叠氮化合物之间的反应。

79.根据权利要求78所述的药物组合物,其中,所述环辛炔或其衍生物为二苯并环辛炔(DBCO)或其衍生物。

80.根据权利要求79的药物组合物,其中所述DBCO或其衍生物是DBCO官能化的ApoE多肽或DBCO官能化的ApoB多肽。

81.根据权利要求80的药物组合物,其中DBCO官能化的ApoE多肽或其中DBCO官能化的ApoB多肽由以下结构表示:



82.根据权利要求78至81中任一项所述的药物组合物,其中所述叠氮化合物是DSPE-

PEG2000-叠氮化物或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[叠氮基(聚乙二醇)-2000]或其盐。

83.根据权利要求1至45中任一项所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽或其片段和/或所述ApoB多肽或其片段经由选自氢键、范德华键、离子键和疏水键的一种或多种非共价相互作用与所述LNP连接。

84.根据权利要求55至63中任一项所述的药物组合物,其中所述阳离子脂质以约30%到约80%的摩尔百分比存在。

85.根据权利要求64至65中任一项所述的药物组合物,其中所述甾醇以约20%至约50%的摩尔百分比存在。

86.根据权利要求66至67中任一项所述的药物组合物,其中所述非阳离子脂质以约2%到约20%的摩尔百分比存在。

87.根据权利要求68至70中任一项所述的药物组合物,其中所述至少一种PEG化脂质以约2.1%至约10%的摩尔百分比存在,或其中所述至少一种PEG化脂质以约1%至约2%的摩尔百分比存在。

88.根据权利要求1至87中任一项所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽和/或所述ApoB多肽以约0.02μg/μg的TNA至约0.1μg/μg的TNA的总量存在。

89.根据权利要求1至88中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物还包括地塞米松棕榈酸酯。

90.根据权利要求62所述的药物组合物,其中所述LNP包含脂质A、DOPC、胆固醇和DMG-PEG。

91.根据权利要求62所述的药物组合物,其中所述LNP包含脂质A、DOPC、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

92.根据权利要求62所述的药物组合物,其中所述LNP包含脂质A、DOPE、胆固醇和DMG-PEG。

93.根据权利要求62所述的药物组合物,其中所述LNP包含脂质A、DOPE、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

94.根据权利要求62所述的药物组合物,其中所述LNP包含脂质A、DSPC、胆固醇和DMG-PEG。

95.根据权利要求62所述的药物组合物,其中所述LNP包含脂质A、DSPC、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

96.根据权利要求62所述的药物组合物,其中所述LNP包含脂质A、DOPC、β-谷甾醇和DMG-PEG。

97.根据权利要求62所述的药物组合物,其中所述LNP包含脂质A、DOPC、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

98.根据权利要求62所述的药物组合物,其中所述LNP包含脂质A、DOPE、β-谷甾醇和DMG-PEG。

99.根据权利要求62所述的药物组合物,其中所述LNP包含脂质A、DOPE、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

100.根据权利要求62所述的药物组合物,其中所述LNP包含脂质A、DSPC、β-谷甾醇和

DMG-PEG。

101.根据权利要求62所述的药物组合物,其中所述LNP包含脂质A、DSPC、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

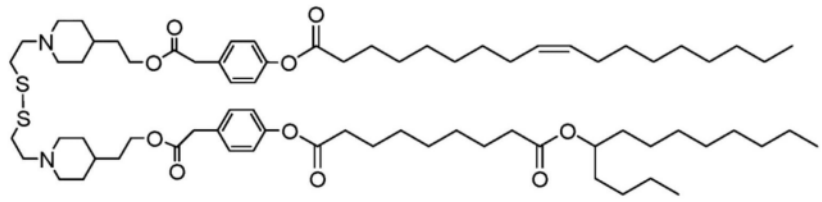
102.根据权利要求90至101中任一项所述的药物组合物,其中所述DMG-PEG为DMG-PEG2000。

103.根据权利要求90至102中任一项所述的药物组合物,其中所述DSPE-PEG为DSPE-PEG2000或DSPE-PEG5000。

104.根据权利要求90至102中任一项的药物组合物,其中所述DSPE-PEG-叠氮化物是DSPE-PEG2000-叠氮化物或DSPE-PEG5000-叠氮化物。

105.根据权利要求104所述的药物组合物,其中所述LNP包含摩尔比为约51:7.3:38.3:2.9:0.5的脂质A、DOPC、甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

106.根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述LNP包含1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-(十三烷-5-基)壬二酸酯(脂质58),由以下结构式表示:



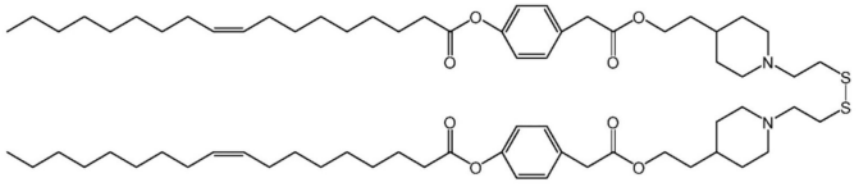
脂质58

107.根据权利要求1至106中任一项所述的药物组合物,其中所述LNP的总脂质与TNA的比率为约10:1至约40:1。

108.一种药物组合物,所述组合物包含脂质纳米颗粒(LNP)、治疗性信使RNA(mRNA)和至少一种药学上可接受的赋形剂;其中所述LNP包含:

与所述LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段;

具有以下结构式的阳离子脂质:



((((((二硫烷二基二(乙烷-2,1-二基))双(哌啶-1,4-二基))双(乙烷-2,1-二基))双(氧))双(2-氧代乙烷-2,1-二基))双(4,1-亚苯基)二油酸酯)

(脂质A)

并且其中所述LNP能够将所述mRNA递送至视网膜细胞。

109.根据权利要求108所述的药物组合物,其中所述LNP能够将所述mRNA递送至光感受器(PR)细胞。

110.根据权利要求108或权利要求109所述的药物组合物,其中所述LNP能够将所述mRNA递送至视网膜色素上皮(RPE)细胞。

111.根据权利要求109或权利要求110中任一项所述的药物组合物,其中所述LNP能够

被内化到所述PR细胞和/或所述RPE细胞中。

112.根据权利要求110或权利要求111所述的药物组合物,其中mRNA表达均匀地分布在所述PR细胞和所述RPE细胞中。

113.根据权利要求108至112中任一项所述的药物组合物,其中所述LNP能够将所述mRNA递送至视网膜细胞而不导致视网膜降解或外核层(ONL)变薄。

114.根据权利要求108至113中任一项所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽或其片段和/或所述ApoB多肽或其片段能够结合低密度脂蛋白(LDL)受体或LDL受体家族成员。

115.根据权利要求108至114中任一项所述的药物组合物,其中所述LNP包含ApoE多肽或其片段。

116.根据权利要求108至114中任一项所述的药物组合物,其中所述LNP包含ApoB多肽或其片段。

117.根据权利要求108至116中任一项所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽包含EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGG(SEQID NO:3)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:3所示的所述氨基酸序列具有至少80%的序列相似性。

118.根据权利要求117所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽与SEQID NO:3中所示的所述氨基酸序列具有至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的序列相似性。

119.根据权利要求117或权利要求118所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽由EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGG(SEQ ID NO:3)组成。

120.根据权利要求108至119中任一项所述的药物组合物,其中与所述LNP连接的ApoE多肽是SEQ ID NO:3中所示的EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGGC的片段,其中所述片段能够结合到LDL受体。

121.根据权利要求108至114和116中任一项所述的药物组合物,其中所述ApoB多肽包含SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC

(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4中所示的所述氨基酸序列具有至少80%的序列相似性。

122.根据权利要求121所述的药物组合物,其中所述ApoB多肽与SEQ ID NO:4中所示的所述氨基酸序列具有至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的序列相似性。

123.根据权利要求121或权利要求122所述的药物组合物,其中所述ApoB多肽由SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC(SEQ ID NO:4)组成。

124.根据权利要求108至114和116中任一项所述的药物组合物,其中与所述LNP连接的所述ApoB多肽是SEQ ID NO:4中所示的EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGG的片段,其中所述片段能够结合到LDL受体。

125.根据权利要求108至124中任一项所述的药物组合物,其中所述mRNA被包封在所述LNP中。

126.根据权利要求108至125中任一项所述的药物组合物,其中所述LNP包含选自由以下组成的组的脂质:甾醇或其衍生物、非阳离子脂质和至少一种PEG化脂质。

127.根据权利要求126所述的药物组合物,其中所述甾醇或其衍生物是胆固醇。

128.根据权利要求126所述的药物组合物,其中所述甾醇或其衍生物是β-谷甾醇。

129.根据权利要求126至128中任一项所述的药物组合物,其中所述非阳离子脂质选自

由以下组成的组:二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)和二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

130.根据权利要求126至129中任一项所述的药物组合物,其中所述PEG化脂质是DMG-PEG、DSPE-PEG、DSPE-PEG-OH、DSPE-PEG-叠氮化物、DSG-PEG或其组合。

131.根据权利要求130所述的药物组合物,其中所述至少一种PEG化脂质是DMG-PEG2000、DSPE-PEG2000、DSPE-PEG2000-OH、DSPE-PEG-叠氮化物、DSG-PEG或其组合。

132.根据权利要求108所述的药物组合物,其中所述LNP包含:

脂质A、DOPC、胆固醇和DMG-PEG;或

脂质A、DOPC、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物;或

脂质A、DOPE、胆固醇和DMG-PEG;

脂质A、DOPE、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物;或

脂质A、DSPC、胆固醇和DMG-PEG;或

脂质A、DSPC、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物;

脂质A、DOPC、β-谷甾醇和DMG-PEG;或

脂质A、DOPC、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物;或

脂质A、DOPE、β-谷甾醇和DMG-PEG;或

脂质A、DOPE、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物;或

脂质A、DSPC、β-谷甾醇和DMG-PEG;或

脂质A、DSPC、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

133.根据权利要求132所述的药物组合物,其中所述DMG-PEG是DMG-PEG2000。

134.根据权利要求132或权利要求133所述的药物组合物,其中所述DSPE-PEG为DSPE-PEG2000或DSPE-PEG5000。

135.根据权利要求132或权利要求133所述的药物组合物,其中所述DSPE-PEG-叠氮化物是DSPE-PEG2000-叠氮化物或DSPE-PEG5000-叠氮化物。

136.根据权利要求132所述的药物组合物,其中所述LNP包含摩尔比为约51:7.3:38.3:2.9:0.5的脂质A、DOPC、甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

137.根据权利要求108至135中任一项所述的药物组合物,其中所述LNP包含PEG化脂质,其中所述PEG化脂质与所述ApoE多肽或其片段连接;所述PEG化脂质与所述ApoB多肽或其片段连接。

138.根据权利要求137所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽或其片段,或所述ApoB多肽或其片段与所述LNP的PEG化脂质共价连接以形成PEG化脂质缀合物。

139.根据权利要求138所述的药物组合物,其中与所述ApoE多肽或其片段和/或所述ApoB多肽或其片段共价连接的所述PEG化脂质是DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

140.根据权利要求108至139中任一项所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽或其片段和/或所述ApoB多肽或其片段经由不可切割的接头与所述LNP共价连接。

141.根据权利要求140所述的药物组合物,其中所述不可切割的接头是含马来酰亚胺的接头。

142.根据权利要求108至139中任一项所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽或其片段和/或所述ApoB多肽或其片段经由可切割的接头与所述LNP共价连接。

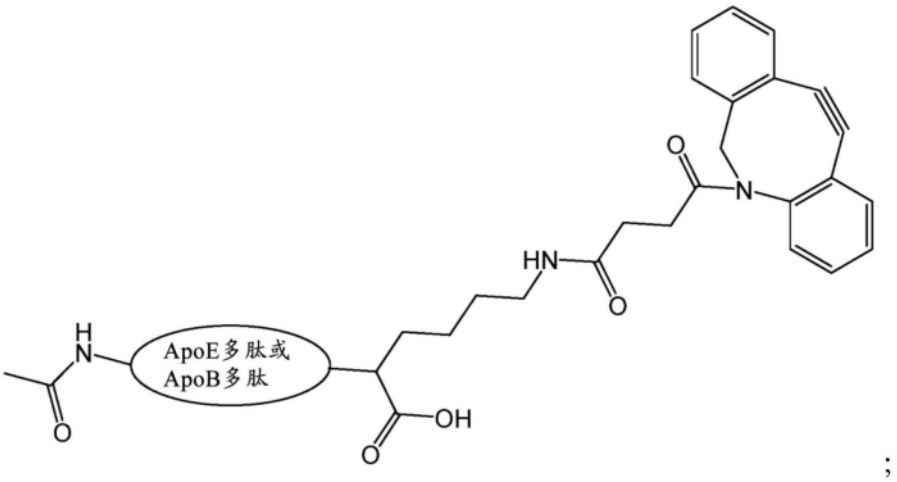
143.根据权利要求108至139中任一项所述的药物组合物,其中所述ApoE多肽或其片段和/或所述ApoB多肽或其片段经由含吡啶基二硫化物(PDS)的接头与所述LNP共价连接。

144.根据权利要求108至139中任一项的药物组合物,其中所述ApoE多肽或其片段和/或所述ApoB多肽或其片段经由菌株促进的炔-叠氮化物环加成(SPAAC)化学作用与所述LNP共价连接。

145.根据权利要求108至144中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物经由视网膜下注射、脉络膜上注射或玻璃体内注射施用于受试者。

146.根据权利要求145所述的药物组合物,其中所述药物组合物经由视网膜下注射施用于受试者。

147.一种二苯并环辛炔(DBCO)官能化的ApoE多肽或ApoB多肽,所述多肽由以下结构表示:



;

其中:

ApoE多肽包含EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGG(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:3中所示的所述氨基酸序列具有至少80%的序列相似;并且

ApoB多肽包含SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC

(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4中所示的所述氨基酸序列具有至少80%的序列相似性。

148.一种使用权利要求147所述的DBCO官能化的ApoE多肽或ApoB多肽作为试剂与叠氮化合物组合制备的药物组合物。

149.一种使用权利要求147所述的DBCO官能化的ApoE多肽或ApoB多肽与叠氮化合物的组合制备的脂质纳米颗粒组合物。

150.根据权利要求148或权利要求149所述的药物组合物或脂质纳米颗粒组合物,其中所述叠氮化合物是DSPE-PEG2000-叠氮化物或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[叠氮基(聚乙二醇)-2000]或其盐。

151.根据权利要求1至148中任一项所述的药物组合物,其中所述LNP的直径范围为约40nm至约120nm。

152.根据权利要求1至151中任一项所述的药物组合物,其中所述纳米颗粒的直径小于约100nm。

153.根据权利要求1至152中任一项所述的药物组合物,其中所述纳米颗粒的直径为约

60nm至约80nm。

154.一种治疗受试者的基因病患的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至148或150至153中任一项所述的药物组合物或根据权利要求149所述的脂质纳米颗粒组合物。

155.根据权利要求154所述的方法,其中所述受试者是人类。

156.根据权利要求154或155所述的方法,其中所述病患是眼部病患。

157.根据权利要求154或权利要求155所述的方法,其中所述基因病患选自由以下组成的组:镰状细胞性贫血、黑色素瘤、血友病A(凝血因子VIII(FVIII)缺乏症)和血友病B(凝血因子IX(FIX)缺乏症)、囊性纤维化((CFTR)、家族性高胆固醇血症(LDL受体缺陷)、肝母细胞瘤、威尔逊病、苯丙酮尿症(PKU)、先天性肝卟啉症、遗传性肝代谢疾病、Lesch Nyhan综合征、镰状细胞性贫血、地中海贫血、色素性干皮病、范可尼贫血、色素性视网膜炎、共济失调毛细血管扩张症、布鲁姆综合征、视网膜母细胞瘤、粘多糖贮积病(例如,Hurler综合征(MPS I型)、Scheie综合征(MPSI S型)、Hurler-Scheie综合征(MPS I H-S型)、亨特综合征(MPSII型)、Sanfilippo A、B、C和D型(MPS III A、B、C和D型)、Morquio A和B型(MPS IVA和MPS IVB)、Maroteaux-Lamy综合征(MPS VI型)、Sly综合征(MPS VII型),透明质酸酶缺乏症(MPS IX型))、Niemann-Pick病A/B、C1和C2型、法布里病、Schindler病、GM2-神经节苷脂沉积症II型(Sandhoff病)、Tay-Sachs病,异染性脑白质营养不良、Krabbe病、粘脂沉积症I、II/III和IV型,唾液酸贮积症I和II型、糖原贮积病I和II型(庞贝病)、戈谢病I、II和III型,胱氨酸病、巴顿病、天冬氨酰氨基葡萄糖尿症、Salla病、达农病(LAMP-2缺乏症)、溶酶体酸性脂肪酶(LAL)缺乏症、神经元蜡样脂褐质沉积症(CLN1-8、INCL和LINCL)、鞘脂症、半乳糖唾液酸中毒、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、帕金森病、阿尔茨海默病、亨廷顿病、脊髓小脑共济失调、脊髓性肌萎缩症、弗里德赖希共济失调、杜氏肌营养不良症(DMD)、贝克尔肌营养不良症(BMD)、营养不良性大疱性表皮松解症(DEB)、外核苷酸焦磷酸酶1缺乏症,婴儿全身性动脉钙化(GACI)、利伯先天性黑矇(Leber Congenital Amaurosis)、Stargardt黄斑营养不良(ABCA4)、鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)缺乏症、Usher综合征、年龄相关性黄斑变性(AMD)、α-1抗胰蛋白酶缺乏症,进行性家族性肝内胆汁淤积症(PFIC)I型(ATP8B1缺乏症)、II型(ABCB11)、III型(ABCB4)或IV型(TJP2)和组织蛋白酶A缺乏症。

158.根据权利要求157所述的方法,其中所述基因病患是血友病A。

159.根据权利要求157所述的方法,其中所述基因病患是血友病B。

160.根据权利要求157所述的方法,其中所述基因病患是苯丙酮尿症(PKU)。

161.根据权利要求157所述的方法,其中所述基因病患是威尔逊病。

162.根据权利要求157所述的方法,其中所述基因病患是戈谢病I、II或III型。

163.根据权利要求157所述的方法,其中所述基因病患是Stargardt黄斑营养不良。

164.根据权利要求157所述的方法,其中所述基因病患是LCA10。

165.根据权利要求157所述的方法,其中所述基因病患是Usher综合征。

166.根据权利要求86所述的方法,其中所述基因病患是湿性AMD。

167.一种向受试者的视网膜递送治疗性核酸(TNA)或增加TNA浓度的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至148或150至153中任一项所述的药物组合物或根据权利要求149所述的脂质纳米颗粒组合物。

168.一种将治疗性核酸(TNA)递送至受试者的肝脏或增加TNA浓度的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至148或150至153中任一项所述的药物组合物或跟根据权利要求149所述的脂质纳米颗粒组合物。

APOE和APOB修饰的脂质纳米颗粒组合物及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2021年6月7日提交的美国临时申请63/197,881的优先权。前述申请的全部内容通过引用明确地并入本文。

背景技术

[0003] 可离子化脂质纳米颗粒(LNP)已广泛用于基因治疗剂(例如,RNA治疗剂)的全身递送。先前已经报道了用于LNP配制物的各种类型的可离子化脂质材料,诸如C12-200、cKK-E12和DLin-MC3-DMA,并且已经证明了在0.002mg siRNA/kg的剂量水平下在肝中的有效基因沉默(Dong等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.111,3955-3960(2014))。尽管已经显示包含某些配体增强mRNA LNP的递送和治疗效率,但是已经认识到,附接部分以增强递送和治疗效率可能增加制造LNP系统的过程的复杂性、成本和调节难度(Cheng等人,Science.2012年11月16日;338(6109):903-10)。另外,已经证明,当脂质纳米颗粒暴露于生物流体时(其中发生与介质中的蛋白质相互作用并因此形成蛋白质冠),一些配体的特异性可能消失(Salvati等人,Nat Nanotechnol.2013年2月;8(2):137-43)。因此,在可能的临床益处与靶向RNA-LNP制造的复杂性和成本之间存在权衡。

[0004] 已经检查了细胞摄取的机制,并且已经显示了血清ApoE(载脂蛋白E)在LNP表面上的吸附是促进将LNP通过低密度脂蛋白(LDL)受体细胞内递送进入肝细胞的主要效应物(Akinc等人,Mol.Ther.18,1357-1364(2010))。然而,尽管已经显示LNP对于体内递送是有利的,但是将基因治疗剂系统递送至肝细胞和其它细胞类型仍然是具有高度挑战性的。

[0005] 关于基因治疗剂向肝细胞的递送,这些LNP的相对大的尺寸通过几种机制降低了肝脏适应症的治疗指数:(1)较大的LNP不能有效地绕过衬在肝窦状隙中的内皮细胞的窗孔,从而阻止进入靶细胞(肝细胞);(2)较大的LNP不能经由网格蛋白介导的与几种不同受体(例如,脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)、低密度脂蛋白(LDL)受体)的胞吞作用被肝细胞有效地内化;以及(3)高于某一阈值大小的LNP倾向于被网状内皮系统系统的细胞优先摄取,这可以激发剂量限制性免疫应答。此外,LNP介导的较大刚性多核苷酸货物(例如,双链线性DNA、质粒DNA、末端封闭的的双链DNA(ceDNA)的递送相对于较小和/或柔性货物(例如,siRNA)存在另外的挑战。此类挑战涉及当包封大的刚性货物时所得LNP的尺寸。

[0006] 关于将基因治疗剂递送至其他类型的细胞(例如,视网膜细胞),将这些治疗递送至视网膜色素上皮(RPE)细胞和/或感光细胞的最佳方法仍有待改进,以增加转导功效并减少与视网膜下注射病毒载体悬浮液所需的高侵入性手术相关的并发症。迄今为止,当LNP被用于视网膜基因转导时,已经在眼杯(eyecup)中的视网膜色素上皮(RPE)中观察到大部分表达(Patel等人,Journal of Controlled Release,303卷,2019年6月10日,第91-100页),并且将基因治疗递送到视网膜中的实际光感受器中仍然具有重大挑战。

[0007] 因此,为了充分实现对肝细胞以及其它细胞类型(诸如视网膜细胞)的核酸治疗的可能,需要有效的核酸体内递送系统。

发明内容

[0008] 本公开首次描述了用于视网膜递送的脂质纳米颗粒(例如,具有如本文所述的脂质A作为可离子化或阳离子脂质的脂质纳米颗粒)与基因治疗货物(诸如,mRNA或末端封闭的DNA)的组合。使用小鼠、大鼠和非人灵长类动物(NHP)体内系统,本公开证明了使用LNP递送的mRNA货物,可在眼杯(RPE)和神经视网膜中实现稳健的转基因表达,其中光感受器位于神经视网膜中。重要的是,本文提供的数据显示在低剂量LNP递送的mRNA下实现饱和,从而成功地实现优异的治疗指数和潜在治疗的耐受性。以前,当LNP被用于视网膜基因转导时,已经在眼杯中的视网膜色素上皮(RPE)中观察到大部分表达(Patel等人,Journal of Controlled Release,303卷,2019年6月10日,第91-100页),而将基因治疗递送到视网膜中的实际光感受器中仍然具有重大挑战。在本公开中呈现的结果令人惊讶地证明不仅LNP能够以与RPE的表达相等的表达进入眼杯,而且在低剂量下也是如此。

[0009] 在一个方面,本公开提供了药物组合物,该药物组合物包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA),其中LNP包含与LNP连接的载脂蛋白E(ApoE)多肽或其片段和/或载脂蛋白B(ApoB)多肽或其片段,以及至少一种药学上可接受的赋形剂。根据一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段能够结合低密度脂蛋白(LDL)受体或LDL受体家族成员。根据进一步的实施方案,LNP包含ApoE多肽或其片段。根据本文的任何实施方案中的一些实施方案,LNP包含ApoB多肽或其片段。根据本文的任何实施方案中的一些实施方案,ApoE多肽包含EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGGC(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少80％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少85％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少90％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少95％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少99％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽由SEQ ID NO:1组成。根据本文的任何实施方案中的一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少80％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少85％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少90％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少95％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少99％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽包含SEQ ID NO:3。根据一些实施方案,ApoE多肽由SEQ ID NO:3组成。根据本文任何实施方案中的一些实施方案,与LNP连接的ApoE多肽是SEQ ID NO:1中所示的EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGGC的片段,其中该片段能够结合到LDL受体。根据本文任何实施方案中的一些实施方案,与LNP连接的ApoE多肽是SEQ ID NO:3中所示的EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGGC的片段,其中该片段能够结合到LDL受体。根据一些实施

方案,LNP被内化到细胞中。根据本文的任何实施方案中的一些实施方案,ApoB多肽包含SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2具有至少80%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列具有至少85%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列具有至少90%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列具有至少95%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列具有至少99%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽具有由SEQ ID NO:2组成的氨基酸序列。根据一些实施方案,ApoB多肽由SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC(SEQ ID NO:4)组成。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,ApoB多肽包含SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列具有至少80%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列具有至少85%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列具有至少90%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列具有至少95%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列具有至少99%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽由SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC(SEQ ID NO:4)组成。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,与LNP连接的ApoB多肽是SEQ ID NO:2中所示的EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGGC的片段,其中该片段能够结合到LDL受体。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,与LNP连接的ApoB多肽是SEQ ID NO:4中所示的EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGG的片段,其中该片段能够结合到LDL受体。根据一些实施方案,LNP被内化到细胞中。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含选自由以下组成的组的脂质:阳离子脂质、甾醇或其衍生物、非阳离子脂质和至少一种PEG化脂质。

[0010] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,TNA被包封在LNP中。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,该TNA选自由以下组成的组:小基因、质粒、小环、小干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)、反义寡核苷酸(ASO)、核酶、末端封闭的(ceDNA)、迷你串(ministring)、doggybone™、末端经前端粒封闭的DNA或哑铃线性DNA、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、非对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、gRNA、DNA病毒载体、病毒RNA载体、非病毒载体及其任何组合。根据一些实施方案,该TNA为ceDNA。根据一些实施方案,该ceDNA为线性双链体DNA。根据一些实施方案,该TNA为mRNA。根据一些实施方案,该TNA为siRNA。根据一些实施方案,该TNA为质粒。

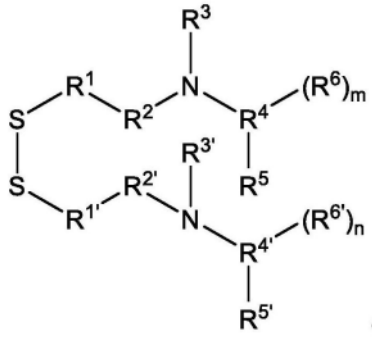
[0011] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含PEG化脂质,其中PEG化脂质与ApoE多肽或其片段连接,或者PEG化脂质与ApoB多肽或其片段连接。根据一些实施方案,ApoE多肽或其片段或ApoB多肽或其片段与PEG化脂质化学缀合。

[0012] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,将药物组合物施用于受试者。根

据一些实施方案,受试者是需要用包封有TNA的LNP治疗的人类患者。

[0013] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,经由存在于LNP中的ApoE多肽和/或ApoB多肽与LDLR受体的结合,将组合物递送至表达LDLR的组织。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,将组合物递送至眼中的视网膜细胞。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,将组合物递送至光感受器(PR)细胞。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,将组合物递送至视网膜色素上皮(RPE)细胞。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,将所述组合物递送至光感受器(PR)细胞和视网膜色素上皮(RPE)细胞,其中TNA在PR细胞中的表达和TNA在RPE细胞中的表达均匀分布。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,将组合物递送至肝中的肝细胞。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,将该组合物内化在光感受器(PR)细胞中。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,将该组合物内化在视网膜色素上皮(RPE)细胞中。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,将该组合物内化在肝细胞中。

[0014] 根据一些实施方案,阳离子脂质由式(I)表示:

[0015] 

(I),

[0016] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0017] R^1和$R^{1'}$各自独立地为任选取代的直链或支链C_{1-3}亚烷基;

[0018] R^2和$R^{2'}$各自独立地为任选取代的直链或支链C_{1-6}亚烷基;

[0019] R^3和$R^{3'}$各自独立地为任选取代的直链或支链C_{1-6}烷基;

[0020] 或可替代地,当R^2是任选取代的支链C_{1-6}亚烷基时,R^2和R^3与它们的居间N原子一起形成4元至8元杂环基;

[0021] 或可替代地,当$R^{2'}$是任选取代的支链C_{1-6}亚烷基时,$R^{2'}$和$R^{3'}$与它们的居间N原子一起形成4元至8元杂环基;

[0022] R^4和$R^{4'}$各自独立地为$-CR^a$、$-C(R^a)_2CR^a$或$-[C(R^a)_2]_2CR^a$;

[0023] R^a每次出现时独立地为H或C_{1-3}烷基;

[0024] 或可替代地,当R^4为$-C(R^a)_2CR^a$或$-[C(R^a)_2]_2CR^a$并且当R^a是C_{1-3}烷基时,R^3和R^4与它们的居间N原子形成4元至8元杂环基;

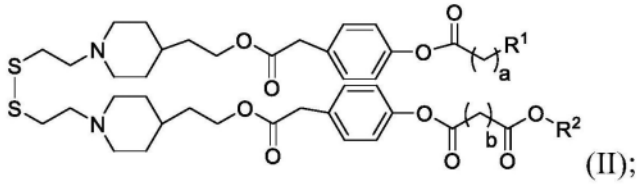
[0025] 或可替代地,当$R^{4'}$为$-C(R^a)_2CR^a$或$-C(R^a)_2]_2CR^a$并且当R^a是C_{1-3}烷基时,$R^{3'}$和$R^{4'}$与它们的居间N原子一起形成4元至8元杂环基;

[0026] R^5和$R^{5'}$各自独立地为氢气、C_{1-20}亚烷基或C_{2-20}亚烯基;

[0027] R^6和$R^{6'}$每次出现时独立地为C_{1-20}亚烷基、C_{3-20}亚环烷基或C_{2-20}亚烯基;并且

[0028] M和n各自独立地是选自1、2、3、4和5的整数。

[0029] 根据一些实施方案,阳离子脂质由式(II)表示:

[0030] 

(II);

[0031] 或其药学上可接受的盐,其中:

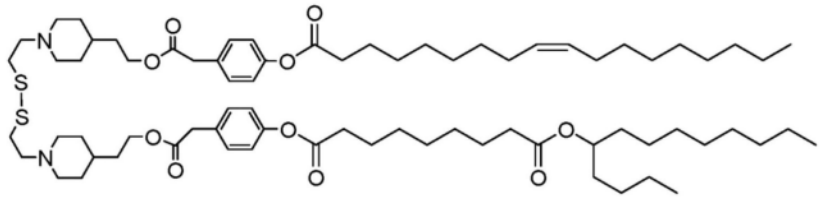
[0032] a为1-20的整数;

[0033] b为2-10的整数;

[0034] R^1不存在或选自(C_2-C_{20})烯基、-C(O)O(C_2-C_{20})烷基和被(C_2-C_{20})烷基取代的环丙基;并且

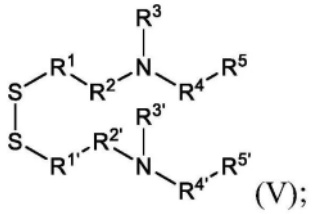
[0035] R^2为(C_2-C_{20})烷基。

[0036] 根据一些实施方案,阳离子脂质为1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-(十三烷-5-基)壬二酸酯(脂质58),由以下结构式表示:

[0037] 

脂质58

[0038] 根据一些实施方案,脂质由式(V)表示:

[0039] 

(V);

[0040] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0041] R^1和$R^{1'}$各自独立地为任选被一个或多个选自R^a的组取代的(C_1-C_6)亚烷基;

[0042] R^2和$R^{2'}$各自独立地为(C_1-C_2)亚烷基;

[0043] R^3和$R^{3'}$各自独立地为任选被一个或多个选自R^b的组取代的(C_1-C_6)烷基;

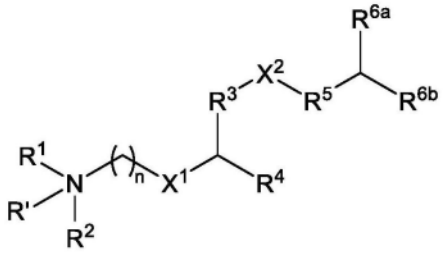
[0044] 或可替代地,R^2和R^3和/或$R^{2'}$和$R^{3'}$与它们的居间N原子一起形成4元至7元杂环基;

[0045] R^4和$R^{4'}$各自为被-C(O)O-中断的(C_2-C_6)亚烷基;

[0046] R^5和$R^{5'}$各自独立地为(C_2-C_{30})烷基或(C_2-C_{30})烯基,它们各自任选地被-C(O)O-或(C_3-C_6)环烷基中断;并且

[0047] R^a和R^b各自为卤素或氰基。

[0048] 根据一些实施方案,阳离子脂质由式(XV)表示:

[0049] 

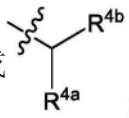
(XV)

[0050] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0051] R'不存在,为氢或C_1-C_6烷基;前提条件是当R'为氢或C_1-C_6烷基时,R'、R^1和R^2所附接到的氮原子均被质子化;

[0052] R^1和R^2各自独立地为氢、C_1-C_6烷基或C_2-C_6烯基;

[0053] R^3为C_1-C_{12}亚烷基或C_2-C_{12}亚烯基;

[0054] R^4为C_1-C_{16}非支链烷基、C_2-C_{16}非支链烯基,或  其中:;

[0055] R^{4a}和R^{4b}各自独立地为C_1-C_{16}非支链烷基或C_2-C_{16}非支链烯基;

[0056] R^5不存在,为C_1-C_8亚烷基或C_2-C_8亚烯基;

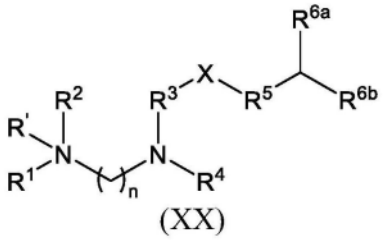
[0057] R^{6a}和R^{6b}各自独立地为C_7-C_{16}烷基或C_7-C_{16}烯基;前提条件是R^{6a}和R^{6b}组合中的碳原子总数大于15;

[0058] X^1和X^2各自独立地为-OC(=O)-、-SC(=O)-、-OC(=S)-、-C(=O)O-、-C(=O)S-、-S-S-、-C(R^a)=N-、-N=C(R^a)-、-C(R^a)=NO-、-O-N=C(R^a)-、-C(=O)NR^a-、-NR^aC(=O)-、-NR^aC(=O)NR^a-、-OC(=O)O-、-OSi(R^a)$_2$O-、-C(=O)(CR^a_2)C(=O)O-或OC(=O)(CR^a_2)C(=O)-;其中:

[0059] R^a每次出现时独立地为氢或C_{1-6}烷基;并且

[0060] n是选自1、2、3、4、5和6的整数。

[0061] 根据一些实施方案,阳离子脂质由式(XX)表示:

[0062] 

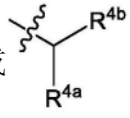
(XX)

[0063] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0064] R'不存在,为氢或C_1-C_3烷基;前提条件是当R'为氢或C_1-C_3烷基时,R'、R^1和R^2所附接到的氮原子均被质子化;

[0065] ^{R}R^{1}和R2各自独立地为氢或C_1-C_3烷基;

[0066] R^3为C_3-C_{10}亚烷基或C_3-C_{10}亚烯基;

[0067] R^4为C_1-C_{16}非支链烷基、C_2-C_{16}非支链烯基,或  其中:;

[0068] R^{4a}和R^{4b}各自独立地为C_1-C_{16}非支链烷基或C_2-C_{16}非支链烯基;

[0069] R^5不存在,为C_1-C_6亚烷基或C_2-C_6亚烯基;

[0070] R^{6a}和R^{6b}各自独立地为C_7-C_{14}烷基或C_7-C_{14}烯基;

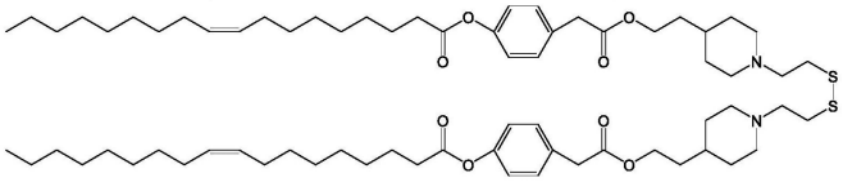
[0071] X为-OC(=O)-、-SC(=O)-、-OC(=S)-、-C(=O)O-、-C(=O)S-、-S-S-、-C(R^a)=N-、-N=C(R^a)-、-C(R^a)=NO-、-O-N=C(R^a)-、-C(=O)NR^a-、-NR^aC(=O)-、-NR^aC(=O)NR^a-、-OC(=O)O-、-OSi(R^a)$_2$O-、-C(=O)(CR^a_2)C(=O)O-或OC(=O)(CR^a_2)C(=O)-;其中:

[0072] R^a每次出现时独立地为氢或C_{1-6}烷基;并且

[0073] n是选自1、2、3、4、5和6的整数。

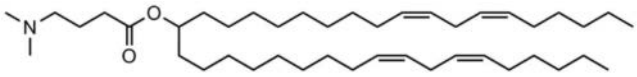
[0074] 根据一些实施方案,阳离子脂质选自表2、表5、表6、表7或表8中的任何脂质。

[0075] 根据一些实施方案,阳离子脂质是由以下结构表示的脂质A:

[0076] 

[0077] 或其药学上可接受的盐。

[0078] 根据一些实施方案,阳离子脂质为具有以下结构的MC3(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA或MC3):

[0079] 

DLin-M-C3-DMA ("MC3")

[0080] 或其药学上可接受的盐。

[0081] 根据一些实施方案,甾醇或其衍生物为胆固醇。

[0082] 根据一些实施方案,甾醇或其衍生物为β-谷甾醇。

[0083] 根据一些实施方案,非阳离子脂质选自由以下组成的组:二硬脂酰基-sn-甘油-磷酸乙醇胺(DSPE)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环已烷-1-甲酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆酰基磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基磷脂酰基-乙醇胺(DSPE)、单甲基磷脂酰乙醇胺(诸如16-O-单甲基PE)、二甲基磷脂酰乙醇胺(诸如16-O-二甲基PE)、18-1-反式PE、1-硬脂酰基-2-油酰基磷脂酰乙醇胺(SOPE)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、卵磷脂酰胆碱(EPC)、二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)、鞘磷脂(SM)、二肉豆酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆酰基磷脂酰甘油(DMPG)、二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、二芥酰基磷脂酰胆碱(DEPC)、棕榈酰基油酰磷脂酰甘油(POPG)、二反式油酰基磷脂酰乙醇胺(DEPE)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DLPE);1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPHyPE);卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷、磷酸二鲸蜡酯、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰胆碱以及它们的混合物。根据一些实施方案,非阳离子脂质选自由以

下组成的组:二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)和二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

[0084] 根据一些实施方案,PEG化脂质选自由以下组成的组:PEG-二月桂基氧基丙基;PEG-二肉豆蔻基氧基丙基;PEG-二棕榈基氧基丙基、PEG-二硬脂基氧基丙基;1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰甘油(DMG-PEG);1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[叠氮基(聚乙二醇)]和二硬脂酰基-rac-甘油-聚(乙二醇)(DSG-PEG);PEG-二月桂基甘油;PEG-二棕榈酰甘油;PEG-二硬脂酰甘油;PEG-二月桂酰糖酰胺;PEG-二肉豆蔻酰糖酰胺;PEG-二棕榈酰糖酰胺;PEG-二硬脂酰糖酰胺;(1-[8'-(胆甾-5-烯-3[β]-氧基)甲酰胺基-3',6'-二氧辛酰基]氨基甲酰基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)(PEG-胆固醇);3,4-双十四烷氧基苄基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)醚(PEG-DMB),以及1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N[甲氧基(聚乙二醇)(DSPE-PEG)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-聚(乙二醇)-羟基(DSPE-PEG-OH);以及1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N[甲氧基(聚乙二醇)-叠氮化物(DSPE-PEG-叠氮化物)。根据一些实施方案,PEG化脂质为DMG-PEG、DSPE-PEG、DSPE-PEG-OH、DSPE-PEG-叠氮化物、DSG-PEG或其组合。根据一些实施方案,至少一种PEG化脂质是DMG-PEG2000、DSPE-PEG2000、DSPE-PEG2000-OH、DSPE-PEG2000-叠氮化物、DSG-PEG2000或其组合。

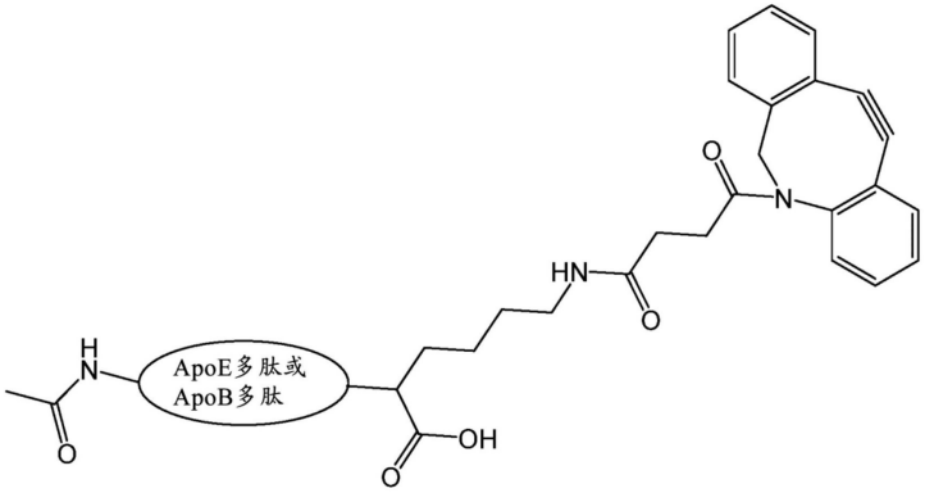
[0085] 根据本文方面和实施方案中的一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段与LNP的PEG化脂质共价连接以形成PEG化脂质缀合物。根据一些实施方案,与ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段共价连接的PEG化脂质是DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

[0086] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段经由不可切割的接头与LNP共价连接。根据一些实施方案,不可切割的接头是含马来酰亚胺的接头。

[0087] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段经由可切割的接头与LNP共价连接。

[0088] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段经由含吡啶基二硫化物(PDS)的接头与LNP共价连接。

[0089] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段经由菌株促进的炔-叠氮化物环加成(SPAAC)化学作用与LNP共价连接。根据一些实施方案,SPAAC化学作用包括环辛炔或其衍生物与叠氮化合物之间的反应。根据一些实施方案,环辛炔或其衍生物是二苯并环辛炔(DBCO)或其衍生物。根据一些实施方案,DBCO或其衍生物是DBCO官能化的ApoE多肽或DBCO官能化的ApoB多肽。根据一些实施方案,DBCO官能化的ApoE多肽或其中DBCO官能化的ApoB多肽由以下结构表示:

[0090] 

[0091] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,叠氮化合物是DSPE-PEG2000-叠氮化物或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[叠氮基(聚乙二醇)-2000]或其盐。

[0092] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段经由选自氢键、范德瓦尔键、离子键和疏水键的一种或多种非共价相互作用与LNP连接。

[0093] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,阳离子脂质以约30%至约80%的摩尔百分比存在。

[0094] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,甾醇以约20%至约50%的摩尔百分比存在。

[0095] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,非阳离子脂质以约2%至约20%的摩尔百分比存在。

[0096] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,至少一种PEG化脂质以约2.1%至约10%的摩尔百分比存在,或其中至少一种PEG化脂质以约1%至约2%的摩尔百分比存在。

[0097] 根据本文的方面和实施方案的一些实施方案,ApoE多肽和/或ApoB多肽以约0.02μg/μg的TNA至约0.1μg/μg的TNA的总量存在。

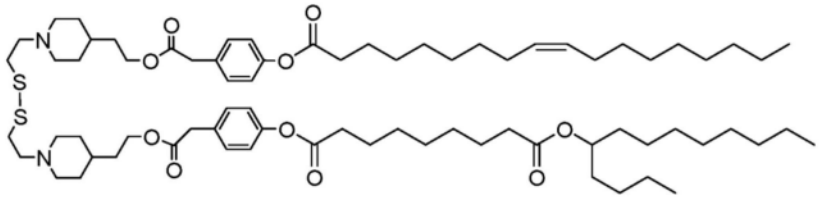
[0098] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,该药物组合物还包括地塞米松棕榈酸酯。

[0099] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPC、胆固醇和DMG-PEG。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPC、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPE、胆固醇和DMG-PEG。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPE、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含脂质A、DSPC、胆固醇和DMG-PEG。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含脂质A、DSPC、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPC、β-谷甾醇和DMG-PEG。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPC、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPE、β-谷甾醇和DMG-PEG。根据本文的方面和实施方案中的一些实

施方案,LNP包含脂质A、DOPE、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含脂质A、DSPC、β-谷甾醇和DMG-PEG。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含脂质A、DSPC、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

[0100] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,DMG-PEG为DMG-PEG2000。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,DSPE-PEG为DSPE-PEG2000或DSPE-PEG5000。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,e DSPE-PEG-叠氮化物为DSPE-PEG2000-叠氮化物或DSPE-PEG5000-叠氮化物。根据一些实施方案,LNP包含摩尔比为约51:7.3:38.3:2.9:0.5的脂质A、DOPC、甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

[0101] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-(十三烷-5-基)壬二酸酯(脂质58),由以下结构式表示:

[0102] 

脂质58

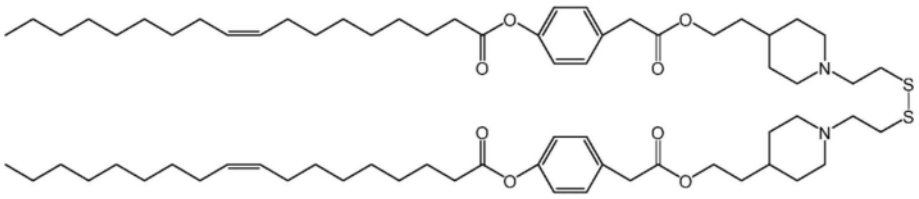
。

[0103] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP的总脂质与TNA的比率为约10:1至约40:1。

[0104] 在另一个方面,本公开提供了一种药物组合物,该组合物包含脂质纳米颗粒(LNP)、治疗性信使RNA(mRNA)和至少一种药学上可接受的赋形剂;其中LNP包含:

[0105] 与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段;

[0106] 具有以下结构式的阳离子脂质:

[0107] 

((((((二硫烷二基二(乙烷-2,1-二基))双(哌啶-1,4-二基))双(乙烷-2,1-二基))双(氧))双(2-氧代乙烷-2,1-二基))双(4,1-亚苯基)二油酸酯)

(脂质 A)

[0108] 并且其中LNP能够将mRNA递送至视网膜细胞。

[0109] 根据一些实施方案,LNP能够将mRNA递送至光感受器(PR)细胞。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP能够将mRNA递送至视网膜色素上皮(RPE)细胞。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP能够被内化到PR细胞和/或RPE细胞中。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,mRNA表达均匀分布在PR细胞和RPE细胞中。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP能够将mRNA递送至视网膜细胞而不导致视网膜降解或外核层(ONL)变薄。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段能够结合低密度脂蛋白(LDL)受体或LDL受体家族成员。根据本

文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含ApoE多肽或其片段。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含ApoB多肽或其片段。根据一些实施方案,ApoE多肽包含EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGG(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少80％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少85％、至少90％、至少95％或至少99％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽由EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGG(SEQ ID NO:3)组成。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,与LNP连接的ApoE多肽是SEQ ID NO:3中所示的EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGGC的片段,其中该片段能够结合到LDL受体。根据一些实施方案,ApoB多肽包含SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列具有至少80％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列具有至少85％、至少90％、至少95％或至少99％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽由SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC(SEQ ID NO:4)组成。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,与LNP连接的ApoB多肽是SEQ ID NO:4中所示的EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGG的片段,其中该片段能够结合到LDL受体。

[0110] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,mRNA被包封在LNP中。

[0111] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP还包含选自由以下组成的组的脂质:甾醇或其衍生物、非阳离子脂质和至少一种PEG化脂质。根据一些实施方案,甾醇或其衍生物为胆固醇。根据一些实施方案,甾醇或其衍生物为β-谷甾醇。

[0112] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,非阳离子脂质选自由以下组成的组:二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)和二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

[0113] 根据本文的方面和实施方案的一些实施方案,PEG化脂质为DMG-PEG、DSPE-PEG、DSPE-PEG-OH、DSPE-PEG-叠氮化物、DSG-PEG或其组合。根据一些实施方案,至少一种PEG化脂质为DMG-PEG2000、DSPE-PEG2000、DSPE-PEG2000-OH、DSPE-PEG-叠氮化物、DSG-PEG或其组合。根据一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPC、胆固醇和DMG-PEG;或脂质A、DOPC、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物;或脂质A、DOPE、胆固醇和DMG-PEG;脂质A、DOPE、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物;或

[0114] 脂质A、DSPC、胆固醇和DMG-PEG;或脂质A、DSPC、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物;或脂质A、DOPC、β-谷甾醇和DMG-PEG;或脂质A、DOPC、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物;或脂质A、DOPE、β-谷甾醇和DMG-PEG;或脂质A、DOPE、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物;或

[0115] 脂质A、DSPC、β-谷甾醇和DMG-PEG;或脂质A、DSPC、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。根据一些实施方案,DMG-PEG为DMG-PEG2000。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,DSPE-PEG为DSPE-PEG2000或DSPE-PEG5000。根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,DSPE-PEG-叠氮化物为DSPE-PEG2000-叠氮化物或DSPE-PEG5000-叠氮化物。根据一些实施方案,LNP包含摩尔比为约51:7.3:38.3:2.9:0.5的脂质A、DOPC、甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

[0116] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含PEG化脂质,其中该PEG化

脂质与ApoE多肽或其片段连接;PEG化脂质与ApoB多肽或其片段连接。根据一些实施方案,ApoE多肽或其片段、或ApoB多肽或其片段与LNP的PEG化脂质共价连接以形成PEG化脂质缀合物。根据一些实施方案,与ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段共价连接的PEG化脂质是DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

[0117] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段经由不可切割的接头与LNP共价连接。根据一些实施方案,不可切割的接头是含马来酰亚胺的接头。

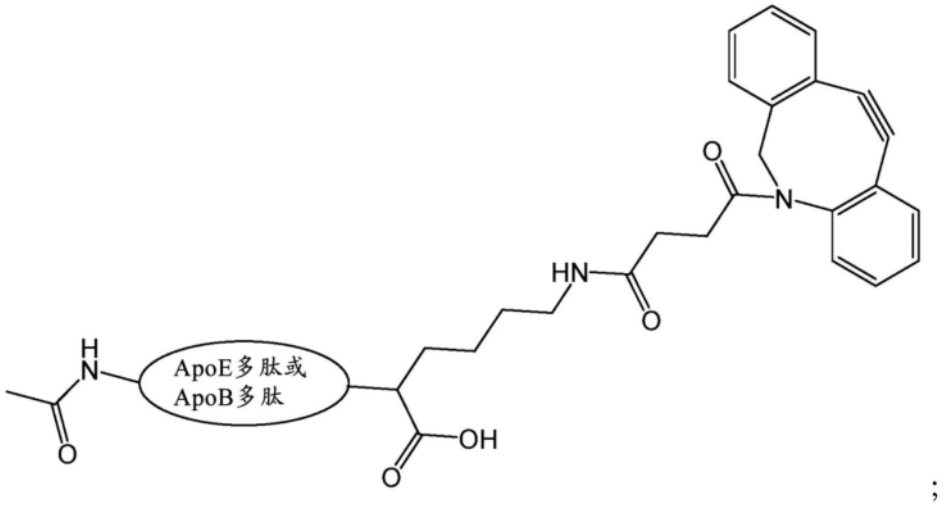
[0118] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段经由可切割的接头共价连接至LNP。

[0119] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段经由含吡啶基二硫化物(PDS)的接头与LNP共价连接。

[0120] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段经由菌株促进的炔-叠氮化物环加成(SPAAC)化学与LNP共价连接。

[0121] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,药物组合物通过视网膜下注射、脉络膜上注射或玻璃体内注射施用于受试者。根据一些实施方案,药物组合物通过视网膜下注射施用于受试者。

[0122] 根据另一个方面,本公开提供由以下结构表示的二苯并环辛炔(DBCO)官能化的ApoE多肽或ApoB多肽:

[0123] 

;

[0124] 其中:

[0125] ApoE多肽包含EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGG(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少80%的序列相似;并且

[0126] ApoB多肽包含SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列具有至少80%的序列相似性。

[0127] 根据一些实施方案,使用DBCO官能化的ApoE多肽或ApoB多肽作为试剂与叠氮化合物组合来制备药物组合物。

[0128] 根据其它方面,本公开提供使用本文的方面和实施方案的DBCO官能化的ApoE多肽或ApoB多肽与叠氮化合物组合制备的脂质纳米颗粒组合物。根据一些实施方案,叠氮化合物是DSPE-PEG2000-叠氮化物或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[叠氮基(聚乙

二醇)-2000]或其盐。

[0129] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,LNP的直径为约40nm至约120nm。

[0130] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,纳米颗粒的直径为于约100nm。

[0131] 根据本文的方面和实施方案中的一些实施方案,纳米颗粒的直径为约60nm至约80nm。

[0132] 根据另一方面,本公开提供了一种治疗受试者的基因病症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文的方面或实施方案中的任一项的药物组合物或脂质组合物。根据一些实施方案,受试者是人类。根据本文的方法及其实施方案中的一些实施方案,病症是眼部病患。根据本文的方法及其实施方案中的一些实施方案,基因病症选自由以下组成的组:镰状细胞性贫血、黑色素瘤血友病A(凝血因子VIII(FVIII)缺乏症)和血友病B(凝血因子IX(FIX)缺乏症)、囊性纤维化(CFTR)、家族性高胆固醇血症(LDL受体缺陷)、肝母细胞瘤、威尔逊病、苯丙酮尿症(PKU)、先天性肝卟啉症、遗传性肝代谢疾病、Lesch Nyhan综合征、镰状细胞性贫血、地中海贫血、色素性干皮病、范可尼贫血、色素性视网膜炎、共济失调毛细血管扩张症、布鲁姆综合征、视网膜母细胞瘤、粘多糖贮积病(例如,Hurler综合征(MPS I型)、Scheie综合征(MPS I S型)、Hurler-Scheie综合征(MPS I H-S型)、亨特综合征(MPS II型)、Sanfilippo A、B、C和D型(MPS III A、B、C和D型)、Morquio A和B型(MPS IVA和MPS IVB)、Maroteaux-Lamy综合征(MPS VI型)、Sly综合征(MPS VII型)、透明质酸酶缺乏症(MPS IX型))、Niemann-Pick病A/B、C1和C2型、法布里病、Schindler病、GM2-神经节苷脂沉积症II型(Sandhoff病)、Tay-Sachs病、异染性脑白质营养不良、Krabbe病、粘脂沉积症I、II/III和IV型、唾液酸贮积症I和II型、糖原贮积病I和II型(庞贝病)、戈谢病I、II和III型、胱氨酸病、巴顿病、天冬氨酰氨基葡萄糖尿症、Salla病、达农病(LAMP-2缺乏症)、溶酶体酸性脂肪酶(LAL)缺乏症、神经元蜡样脂褐质沉积症(CLN1-8、INCL和LINCL)、鞘脂症、半乳糖唾液酸中毒、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、帕金森病、阿尔茨海默病、亨廷顿病、脊髓小脑共济失调、脊髓性肌萎缩症、弗里德赖希共济失调、杜氏肌营养不良症(DMD)、贝克尔肌营养不良症(BMD)、营养不良性大疱性表皮松解症(DEB)、外核苷酸焦磷酸酶1缺乏症、婴儿全身性动脉钙化(GACI)、利伯先天性黑矇(Leber Congenital Amaurosis)、Stargardt黄斑营养不良(ABCA4)、鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)缺乏症、Usher综合征、年龄相关性黄斑变性(AMD)、α-1抗胰蛋白酶缺乏症、进行性家族性肝内胆汁淤积症(PFIC)I型(ATP8B1缺乏症)、II型(ABCB11)、III型(ABCB4)或IV型(TJP2)和组织蛋白酶A缺乏症。

[0133] 根据一些实施方案,遗传性病患是血友病A。根据一些实施方案,遗传性病患是血友病B。根据一些实施方案,遗传性病患是苯丙酮尿症(PKU)。根据一些实施方案,基因病症是威尔逊病。根据一些实施方案,基因病症是戈谢病I、II或III型。根据一些实施方案,基因病症是Stargardt黄斑营养不良。根据一些实施方案,基因病症是LCA10。根据一些实施方案,基因病症是Usher综合征。根据一些实施方案,基因病症是湿性AMD。

[0134] 根据另一个方面,本公开提供了向受试者的视网膜递送治疗性核酸(TNA)或增加TNA的浓度的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文的方面或实施方案中的任一项的药物组合物或脂质纳米颗粒组合物。

[0135] 根据另一个方面,本公开提供了向受试者的肝递送治疗性核酸(TNA)或增加TNA的浓度的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文的方面或实施方案中的任一项的药物

组合物或脂质纳米颗粒组合物。

附图说明

[0136] 通过参考在附图中描绘的本公开的说明性实施方案,可以理解上面简要概述并且在下面更详细论述的本公开的实施方案。但是,附图仅示出了本公开的典型实施方案,因此不应视为对范围的限制,因为本公开可以允许其他等效的实施方案。

[0137] 图1A至图1D呈现了显示LNP递送的mRNA和LNP递送的ceDNA在小鼠(下图,图1B和图1D)和大鼠(上图,图1A和图1C)中都是耐受的的图表。在第21天显示变性评分。

[0138] 图2A至图2I显示了如实施例2所述的24小时时大鼠和小鼠中GFP表达的眼底成像结果。图2A至图2I显示了与未处理的对照小鼠(如表9中所述的第1组,图2F至图2I)相比,脂质A LNP/GFP mRNA处理的小鼠(0.4μg)(如表9中所述的第2组,图2A至图2E)的眼底成像。

[0139] 图3是显示在处理后12小时和24小时时向野生型小鼠给药脂质A LNP/GFP mRNA(0.4μg)(如表9中所述的第2组)后,通过ELISA测定的神经视网膜和RPE/眼杯中的GFP量的图表。

[0140] 图4A和图4B显示了脂质A LNP/GFP mRNA(0.4μg)(图4B)与GFP转基因小鼠(图4A)中GFP表达模式的比较。

[0141] 图5A和图5B显示了脂质A LNP/GFP mRNA(0.4μg)(图5B)与未处理媒介物对照小鼠(图5A)中GFP表达模式的比较。

[0142] 图6是定量GFP表达的图表。图6显示了在小鼠中递送脂质A LNP/GFP mRNA导致GFP表达在神经视网膜和眼杯中的均匀分布。

[0143] 图7A至图7E显示了如实施例2所述的用脂质A LNP/GFP mRNA(0.4μg)和AAV.GFP(AAV5-CAG-GFP)处理的小鼠的神经视网膜和RPE中的GFP表达。图7A至图7D是显示了来自免疫组织化学(IHC)的结果的图像。图7E是量化结果的图表。

[0144] 图8A和8B是在12小时和24小时时以递增剂量(0.2μg、0.4μg、1.0μg)通过ELISA定量神经视网膜(具有光感受器或PR)和眼杯(具有视网膜色素上皮或RPE细胞)中的GFP表达的图表,其中GFP浓度表示为ng/眼睛(图8A)和ng/μg货物(图8B)。

[0145] 图9A至图9F显示了如实施例4所述的小鼠和大鼠模型中眼底成像的结果。当LNP递送的mRNA(诸如脂质A LNP/GFP mRNA)在小鼠和大鼠模型中剂量匹配时,发现大鼠中眼底的GFP表达与小鼠中的GFP表达相当。如图9E和图9F所示,以中等剂量和高剂量给予大鼠的脂质A LNP/GFP mRNA(分别为0.3μg和1.2μg)在大鼠中获得与以中等剂量和高剂量给予小鼠的脂质A LNP/GFP mRNA(分别为0.1μg和0.4μg,见图9B和图9C)的表达水平相当的表达水平。

[0146] 图10A至图10D是显示了如实施例4所述处理的小鼠中的视网膜变性的图像。图10A显示用于参照的媒介物处理。图10B-图10D中的图像显示了在给小鼠施用0.03μg、0.1μg和0.4μg的增加的脂质A LNP/GFP mRNA剂量后第1天没有发生视网膜变性,从而表明LNP递送的mRNA的大耐受性窗口。

[0147] 图11A至图11E显示了用表12中所述的用GFP mRNA和用不同可离子化脂质配制的各种LNP组合物(均为0.2μg量)经由视网膜下注射处理后第2天小鼠眼睛的彩色眼底成像,而图11F至图11J显示了相同小鼠眼睛样品的对应钴蓝眼底成像(对于GFP表达)。

[0148] 图12是定量来自实施例5中进行的实验的神经视网膜和眼杯中的GFP表达的图表。

[0149] 图13A和图13B是分别显示了本实施例中所述的用GFP mRNA和用不同可离子化脂质配制的各种LNP组合物(全部0.2μg剂量)经由视网膜下注射处理后小鼠眼睛的第1天炎性评分和变性评分的图表。图13C和图13D是分别显示了相同样品的第1天炎症评分和变性评分的图表。

[0150] 图14A至图14F是显示如实施例5所述的在第1天的OCT成像结果的图。图14A示出了媒介物参照。图14B显示了脂质A LNP/GFP mRNA,图14C显示了MC3 LNP/GFP mRNA,图14D和图14E显示了对照(CTRL)脂质Z LNP 1/GFP mRNA和对照(CTRL)脂质Z LNP 2/GFP mRNA,并且图14F分别显示了脂质58LNP/GFP mRNA。

[0151] 图15A至图15F是显示如实施例5中所述在第28天的OCT成像结果的图。图15A示出了媒介物参照。在第28天,在用MC3或对照(CTRL)脂质Z配制的LNP组合物中观察到高达约2.0的变性评分;并且通过在第28天拍摄的OCT图像中观察到的外核层(ONL)的变薄或视网膜变性证实了这样的高变性评分(见图15C至图15E)。相反,在第28天,脂质A LNP/GFP mRNA和脂质58LNP/GFP mRNA分别记录了<0.5和约1.0的变性评分,并且在图15B和图15F中它们对应的OCT图像(使用图15A媒介物作为参照)表明了ONL层保持健康的层厚。在第1天,使用图14A媒介物作为参照,没有一个样品显示任何视网膜降解(见图14A至图14F)。

[0152] 图16A至图16D显示了媒介物参照和低剂量6μg的OCT(在第22天拍摄)与苏木精和伊红(H和E)定性分析(在第28天拍摄)的图像。

[0153] 图17A至图17C是作为阴性对照的未经处理区域(图17A)、6μg低剂量处理区域(图17B)和30μg高剂量区域(图17C)在处理后24小时拍摄的IHC图像。

[0154] 图18是显示了LDL受体肽与本文所述的基于多肽的LNP缔合的示意图。

[0155] 图19A是显示了用于通过在ARPE-19人视网膜色素上皮(RPE)细胞系中成像经由LDLR介导的胞吞作用确定LDL摄取的实验的第1天-6天的时间线的示意图。图19B是证实LDLR敲低的蛋白质印迹。GAPDH用作加载对照。

[0156] 图20显示了ApoE和EpoB配体通过ARPE-19细胞中的细胞表面受体增强LNP的细胞摄取。使用免疫荧光显示DiD标记的LNP或LDL的摄取。左图显示了具有(+)LDL受体表达的细胞,右图显示了其中LDL受体已被敲低的细胞。

[0157] 图21显示了ApoE和ApoB配体在ARPE-19细胞中通过细胞表面受体增强LNP的细胞表达。使用免疫荧光显示ApoE/DiD标记的LNP mRNA表达。左图显示了具有(+)LDL受体表达的细胞,右图显示了其中LDL受体已被敲低的细胞。

[0158] 图22A和图22B显示了ApoE和ApoB多肽,而不是它们相应的完整蛋白,经由细胞表面受体增强LNP表达。图22A显示了用于确认配体缔合的亲和层析的结果。图22B显示了亲和层析和体外摄取测定的结果,该亲和层析和体外摄取测定用于确认与ApoB和ApoE多肽,而不是它们相应的完整蛋白的缔合。

[0159] 图23A和图23B显示了与基础水平相比,ApoE和ApoB配体体内增加了在光感受器和RPE中的GFP mRNA表达。图23A显示了活的成像结果,其证明了ApoE和ApoB配体的总GFP mRNA表达的增加。图23B是显示了确认ApoE和ApoB配体促进PR和RPE细胞中GFP表达(ng GFP/眼睛)的ELISA测定的结果的图表。

[0160] 图24显示了ApoE(SEQ ID NO:3)和ApoB(SEQ ID NO:4)肽序列和生理化学性质。

[0161] 图25显示了用于确定ApoE和ApoB多肽在溶液中的稳定性的SDS-PAGE结果。

[0162] 图26A和图26B显示了图26A中显示的使用基于硫醇的交联的缀合的主要途径。马来酰亚胺(不可切割的)连接显示在图26A中。PDS(可切割的)连接显示在图26B中。

[0163] 图27显示了马来酰亚胺化学物质的缀合方案的示意图。

[0164] 图28显示了脂质A/mCherry mRNA的摄取,无论是经由非共价相互作用(即,脂质A LNP与ApoE一起孵育)还是共价相互作用(即,脂质A LNP与0.5%DSPE-PEG2000-马来酰亚胺一起孵育并与ApoE反应)与ApoE缔合,均由LDLR介导并通过用25-羟基胆固醇处理阻断(参见,图28中的A1和A2)。此外,图28显示,当经由0.5%的DSPE-PEG2k-马来酰亚胺直接缀合至ApoE时,脂质A/mCherry mRNA的摄取也由LDLR介导(参见,图28中的A4)。

[0165] 图29A至图29C显示了AKTA结合测定的结果,其证实了在以下各项中ApoE与LNP的缔合:与ApoE一起孵育的脂质A LNP(图29A,即,非特异性缔合);具有0.1%DSPE-PEG5000并与ApoE一起孵育的脂质A(图29B,即,也是非特异性缔合);以及具有0.1%DSPE-PEG5k-OPDS+ApoE的脂质A(图29C,即,直接缀合)。

[0166] 图30显示了各种CTRL脂质Z LNP配制物的SDS-PAGE凝胶分析。

[0167] 图31显示了各种CTRL脂质Z LNP配制物的SDS-PAGE凝胶分析。

[0168] 图32显示了用SPAAC化学作用进行ApoE/ApoB多肽与LNP缀合的示意图。

[0169] 图33A至图33C是实施例11的实验的结果。图33B证实了48小时时所有样品中细胞的生存力。图33A和图33C中所示的结果均表明,当与脂质A LNP(用DSPE-PEG2k-N_3配制的)反应的DBCO-ApoE的摩尔比从0.2mol%增加到1.0mol%时,GFP表达也逐渐增加,从而表明了LDLR介导的脂质A/GFP mRNA的摄取。

具体实施方式

[0170] AAV载体是目前选择用于视网膜基因转移的病毒载体。然而,将这些治疗递送至视网膜色素上皮(RPE)细胞和/或感光细胞的最佳方法仍有待改进,以增加转导效率并减少与视网膜下注射病毒载体悬浮液所需的高度侵入性手术相关的并发症。本公开首次描述了脂质纳米颗粒(诸如,具有如本文所述的脂质A作为可离子化或阳离子脂质的脂质纳米颗粒)与用于视网膜递送的mRNA货物的组合。使用小鼠、大鼠和非人灵长类动物(NHP)体内系统,本公开证明了使用LNP递送的mRNA货物,可在眼杯(RPE)和神经视网膜中实现稳健的转基因表达,其中光感受器位于神经视网膜中。重要的是,本文提供的数据显示在低剂量LNP递送的mRNA下实现饱和,从而成功地实现优异的治疗指数和潜在治疗的耐受性。以前,当LNP被用于视网膜基因转导时,已经在眼杯中的视网膜色素上皮(RPE)中观察到大部分表达(Patel等人,Journal of Controlled Release,303卷,2019年6月10日,第91-100页),而将基因治疗递送到视网膜中的实际光感受器中仍然具有重大挑战。在本公开中呈现的结果令人惊讶地证明不仅LNP能够以与RPE的表达相等的表达进入眼杯,而且在低剂量下也是如此。

[0171] 在一些实施方案中,本公开提供了包含治疗性核酸(TNA)的脂质纳米颗粒(LNP)组合物(例如,药物组合物),其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽和/或ApoB多肽。本发明的有利特征在于,如本文所述的ApoE连接的LNP或ApoB连接的LNP可用于将TNA递送至表达LDL受体(LDLR)的任何细胞或组织,并且不限于特定的细胞或组织类型。本发明令人惊讶地发现,

本文所述的LNP组合物的生理化学性质部分地依赖于包含治疗性核酸(TNA)的LNP组合物中使用的脂质,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽和/或ApoB多肽。例如,通过本公开发现脂质2LNP大小随着ApoB加载/LNP增加而增加,并且脂质2LNP产率随着ApoB加载/LNP增加而降低。还发现脂质1LNP大小在ApoB加载后更稳定,并且脂质1LNP产率随着ApoB加载/LNP增加而降低。

[0172] 作为另一个优点,包含与本文所述的与LNP连接的ApoE多肽和/或ApoB多肽的LNP提供更有效的治疗性核酸递送、更好的耐受性和改善的安全特性。因为目前描述的治疗性核酸脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)没有病毒衣壳内的空间所施加的包装约束,所以理论上,治疗性核酸脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的唯一大小限制在于宿主细胞的DNA复制效率。如本文所述和示例的,根据一些实施方案,治疗性核苷酸是治疗性核苷酸(TNA)样双链DNA(例如,ceDNA)。如本文所述和例示的,根据一些实施方案,治疗性核酸为ceDNA。也如本文所述,根据一些实施方案,治疗性核酸为mRNA。

[0173] 特别在罕见疾病中,治疗剂开发中的最困难的障碍之一是大量的个体病症。地球上约3.5亿人带罕见疾患生活,该罕见疾患由美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)定义为不到200,000人被诊断患有的疾患或病症。这些罕见疾患中约有80%是基因起源的,其中约95%没有经过由FDA批准的治疗(rarediseases.info.nih.gov/diseases/pages/31/faqs-about-rare-diseases)。本文所述的ceDNA脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的优点中在于提供一种可以快速适应多种疾病,并且尤其适应罕见单基因疾病的方法,该方法可以有意义地改变针对基因病患或疾病中的一些病患或疾病的当前治疗状态。

[0174] I.定义

[0175] 除非本文另有定义,否则结合本申请使用的科学和技术术语应具有本公开所属领域的普通技术人员通常所了解的含义。应理解,本发明不限于本文所描述的特定方法、方案和试剂等,并且因此可以变化。本文中所用的术语仅仅是为了描述具体实施方案,而无意于限制本发明的范围,本发明的范围仅仅由权利要求书限定。免疫学和分子生物学中常用术语的定义可以在以下文献中找到:The Merck Manual of Diagnosis and Therapy,第19版,由Merck Sharp&Dohme Corp.出版(2011)(ISBN 978-0-911910-19-3);Robert S.Porter等人,(编辑),Fields Virology,第6版,由Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA,USA出版(2013);Knipe,D.M.和Howley,P.M.(编辑),The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine,由Blackwell Science Ltd.出版(1999-2012)(ISBN 9783527600908);以及Robert A.Meyers(编辑),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,由VCH Publishers,Inc.出版(1995)(ISBN 1-56081-569-8);Immunology by Werner Luttmann,由Elsevier出版(2006);Janeway's Immunobiology,Kenneth Murphy,Allan Mowat,Casey Weaver(编辑),Taylor&Francis Limited,2014(ISBN 0815345305、9780815345305);Lewin's Genes XI,由Jones&Bartlett Publishers出版(2014)(ISBN-1449659055);Michael Richard Green and Joseph Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,USA(2012)(ISBN 1936113414);Davis等人,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier Science Publishing,

Inc.,New York,USA(2012)(ISBN 044460149X);Laboratory Methods in Enzymology: DNA,Jon Lorsch(编辑),Elsevier,2013(ISBN 0124199542);Current Protocols in Molecular Biology(CPMB),Frederick M.Ausubel(编辑),John Wiley and Sons,2014(ISBN047150338X、9780471503385),Current Protocols in Protein Science(CPPS),John E.Coligan(编辑),John Wiley and Sons,Inc.,2005;以及Current Protocols in Immunology(CPI)(John E.Coligan,ADA M Kruisbeek,David H Margulies,Ethan M Shevach,Warren Strobe(编辑)John Wiley and Sons,Inc.,2003(ISBN 0471142735、9780471142737),这些文献的内容均以全文引用的方式并入本文。

[0176] 如在本说明书和所附权利要求书中所使用的,除非上下文另外明确指明,否则单数形式“一个/种(a/an)”和“所述(the)”包含复数指示物。

[0177] 缩写“例如(e.g.)”源自于拉丁文exempli gratia,并且在本文中用于指示非限制性示例。因此,缩写“例如(e.g.)”与术语“例如(for example)”同义。

[0178] 替代方案(例如,“或”)的使用应理解为意指替代方案中的一个、两个或其任何组合。

[0179] 如本文所使用的,当提及如量、持续时间等可测量的值时,术语“约”旨在涵盖与指定值的±20%或±10%(更优选地±5%,甚至更优选地±1%,以及还更优选地±0.1%)的偏差,因为此类偏差适合于执行所公开的方法。

[0180] 如本文所使用的,除非另外说明,否则任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应被理解为包含所述范围内的任何整数的值,以及在适当时包含其分数(诸如,整数的十分之一和百分之一)。

[0181] 如本文所用,“包括(comprise)”、“包括(comprising)”和“包括(comprises)”和“由……组成(comprisedof)”意在与“包括(include)”、“包括(including)”、“包括(includes)”或“含有(contain)”、“含有(containing)”、“含有(contains)”同义,并且是包括性或开放式术语,其指定以下内容的存在,例如,组分,并且不排除或排除本领域已知或其中公开的附加的、未列举的组分、特征、元件、成员、步骤的存在。

[0182] 术语“由……组成”是指如本文所述的组合物、方法、过程和其相应组分,其排除在实施方案的描述中未叙述的任何元件。

[0183] 如本文所使用的,术语“基本上由……组成”是指给定实施方案所需要的那些要素。该术语允许存在不实质影响本发明的那个实施方案的一种或多种基本和新颖或功能特征的另外要素。

[0184] 如本文所使用的,术语“诸如”、“例如”等意图指代示例性实施方案,而不限制本公开的范围。

[0185] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有与本公开本领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。尽管与本文所描述的任何方法和材料相似或等效的那些方法和材料可以用于实施以测试本公开,但在本文中描述优选的材料和方法。

[0186] 如本文所用,术语“施用(administration/administering)”和其变化形式是指将组合物或药剂(例如,核酸,尤其ceDNA)引入受试者中并且包括同时和依序引入一种或多种组合物或药剂。“施用”可以指例如治疗、药代动力学、诊断、研究、安慰剂和实验方法。“施用”还涵盖体外和离体治疗。将组合物或药剂引入受试者中是通过任何适合的途径,包括经

口、经肺、经鼻、肠胃外(静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下)、经直肠、淋巴内、瘤内或局部。施用包括自我施用和由另一个人施用。可以通过任何适合的途径进行施用。适合的施用途径使得组合物或药剂执行其预期功能。例如,如果合适的途径是静脉内,则通过将组合物或药剂引入受试者的静脉中来施用组合物。

[0187] 如本文所用,短语“抗治疗性核酸免疫应答”、“抗转移载体免疫应答”、“针对治疗性核酸的免疫应答”、“针对转移载体的免疫应答”等意指针对其来源的治疗性核酸、病毒或非病毒的任何非所要免疫应答。在一些实施方案中,不期望的免疫应答是针对病毒转移载体本身的抗原特异性免疫应答。在一些实施方案中,免疫应答对可以是双链DNA、单链RNA或双链RNA的转移载体是特异性的。在其它实施方案中,免疫应答对转移载体的序列是特异性的。在其它实施方案中,免疫应答对转移载体的CpG含量是特异性的。

[0188] 如本文所使用的,术语“水溶液”意指包括全部或部分水的组合物。

[0189] 如本文所用,术语“叠氮化合物”意指具有叠氮(N3)部分的任何合成的或天然的化合物。

[0190] 如本文所使用的,术语“碱基”包含嘌呤和嘧啶,其进一步包含天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷和天然类似物,以及嘌呤和嘧啶的合成衍生物,包含但不限于,放置新反应性基团(诸如但不限于胺、醇、硫醇、羧酸盐和卤代烷)的修饰。

[0191] 如本文所用,术语“载体”和“赋形剂”旨在包括任何和所有溶剂、分散介质、媒介物、涂层、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬液、胶体等。此类介质和药剂用于药学上活性物质的用途是所属领域熟知的。补充性活性成分也可以并入组合物中。短语“药学上可接受的”是指当施用于宿主时不会产生毒性、过敏性或类似的不良反应的分子实体和组合物。

[0192] 如本文所用,术语“ceDNA”意指用于非病毒基因转移、合成或其它形式的无衣壳末端封闭的的线性双链体(ds)双链体DNA。根据一些实施方案,该ceDNA为末端封闭的的线性双链体(CELiD)CELiD DNA。根据一些实施方案,该ceDNA为基于DNA的小环。根据一些实施方案,该ceDNA为简约的免疫学定义的基因表达(MIDGE)-载体。根据一些实施方案,该ceDNA为辅助DNA。根据一些实施方案,该ceDNA为哑铃形线性双链体末端封闭的DNA,包括表达盒的5’和3’端中ITR的两个发夹结构。根据一些实施方案,该ceDNA为狗骨^{TM}DNA。ceDNA的详细描述描述于2017年3月3日提交的PCT/US2017/020828的国际申请中,所述申请的全部内容以引用方式明确地并入本文。使用基于细胞的方法产生包括各种反向末端重复(ITR)序列和构型的ceDNA的某些方法描述于2018年9月7日提交的国际专利申请PCT/US18/49996和2018年12月6日提交的PCT/US2018/064242的实施例1中,该申请中的每一个全文以引用方式并入本文。用于产生包括各种ITR序列和构型的合成ceDNA载体的某些方法描述于例如2019年1月18日提交的国际申请PCT/US2019/14122中,该申请的全部内容以引用的方式并入本文中。

[0193] 如本文所用,术语“末端封闭的DNA载体”是指具有至少一个共价封闭的末端的无衣壳DNA载体,其中该载体的至少一部分具有分子内双链体结构。

[0194] 如本文所使用的,术语“ceDNA载体”与“ceDNA”可互换地使用并且指包括至少一个末端回文结构的末端封闭的DNA载体。在一些实施方案中,ceDNA包含两个共价封闭端。

[0195] 如本文所用,术语“ceDNA-杆粒”意指一种包括作为分子间双链体的ceDNA基因组

的感染性杆状病毒基因组,其能够作为质粒在大肠杆菌(E.coli)中增殖,因此可以作为杆状病毒的穿梭载体操作。

[0196] 如本文所用,术语“ceDNA-杆状病毒”意指一种在杆状病毒基因组内包括作为分子间双链体的ceDNA基因组的杆状病毒。

[0197] 如本文所用,术语“ceDNA-杆状病毒感染的昆虫细胞”和“ceDNA-BIIC”可互换使用,意指被ceDNA-杆状病毒感染的无脊椎动物宿主细胞(包括但不限于昆虫细胞(例如,Sf9细胞))。

[0198] 如本文所使用的,术语“ceDNA基因组”意指还并入了至少一个反向末端重复(ITR)区的表达盒。ceDNA基因组还可以包括一个或多个间隔区。在一些实施方案中,该ceDNA基因组作为DNA的分子间双链体多核苷酸并入质粒或病毒基因组中。

[0199] 如本文所用,术语“环辛炔或其衍生物”意指具有环辛炔部分的任何合成的或天然的化合物。根据一些实施方案,环辛炔是具有至少一个C≡C三键的C_8炔。

[0200] 如本文所用,术语“DNA调节序列”、“控制元件”和“调节元件”在本文可互换使用,并且意指提供和/或调节非编码序列(例如,靶向DNA的RNA)或编码序列(例如,定点修饰多肽或Cas9/Csn1多肽)的转录和/或调节所编码多肽的翻译的转录和翻译控制序列,诸如,启动子、增强子、多聚腺苷酸化信号、终止子、蛋白质降解信号等。

[0201] “ITR”可以使用包括一个或多个所需功能序列(例如回文序列,RBS)的一组寡核苷酸人工合成。ITR序列可以是AAV ITR、人工非AAV ITR或从病毒AAV ITR物理衍生的ITR(例如,从病毒基因组中去除的ITR片段)。例如,ITR可以源自细小病毒科,其涵盖细小病毒和依赖病毒(例如犬细小病毒、牛细小病毒、小鼠细小病毒、猪细小病毒、人细小病毒B-19),或者可以将充当SV40复制起点的SV40发夹用作ITR,其可以通过截断、取代、缺失、插入和/或添加而被进一步修饰。细小病毒科病毒由两个亚科组成:感染脊椎动物的细小病毒亚科(Parvovirinae)以及感染无脊椎动物的浓病毒亚科(Densovirinae)。依赖病毒属包含腺相关病毒(AAV)的病毒家族,其能够在脊椎动物宿主中复制,该宿主包含但不限于人、灵长类、牛、犬、马和羊物种。一般而言,ITR序列不仅可以源自AAV,还可以源自细小病毒、慢病毒、鹅病毒、B19,呈野生型、“狗骨”和“哑铃形”、对称或甚至非对称ITR取向的构型。虽然ITR通常存在于AAV载体的5’端和3’端,但ITR只能存在于线性载体的一端。例如,ITR只能出现在5’端。在一些其它情况下,ITR只能出现在合成AAV载体的3’端。本文中为方便起见,将位于合成AAV载体中的表达盒的5’(“上游”)的ITR称为“5’ITR”或“左ITR”,并将位于载体或合成AAV中的表达盒的3’(“下游”)的ITR称为“3’ITR”或“右ITR”。

[0202] 如本文所使用的,“野生型ITR”或“WT-ITR”是指AAV基因组或其它依赖病毒中天然存在的ITR序列的序列,其保留例如Rep结合活性和Rep切口产生能力。由于遗传密码的简并性或漂移,来自任何AAV血清型的WT-ITR的核苷酸序列可能与典型的天然存在的序列略有不同,并且因此,本文涵盖使用的WT-ITR序列包含由于天然存在的变化(例如复制错误)而产生的WT-ITR序列。

[0203] 如本文所使用的,术语“基本上对称的WT-ITR”或“基本上对称的WT-ITR对”是指合成AAV载体内的一对WT-ITR,它们都是野生型ITR,在其整个长度上具有反向互补序列。例如,即使ITR具有一个或多个偏离规范的天然存在的规范序列的核苷酸,只要这些变化不影响所述序列的物理和功能性质以及整体三维结构(二级和三级结构),该ITR也可以被认为

是野生型序列。在一些方面,偏离的核苷酸代表保守的序列变化。作为一个非限制性示例,序列与典型序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性(如使用默认设置下的BLAST测量),并且还与另一WT-ITR具有对称的三维空间组构,使得其3D结构在几何空间中具有相同的形状。基本上对称的WT-ITR在3D空间中具有相同的A、C-C'和B-B'环。通过确定基本上对称的WT-ITR具有与适当的Rep蛋白配对的可操作的Rep结合位点(RBE或RBE')和末端解链位点(trs),可以在功能上将其确认为WT。可以选择测试其它功能,包括在许可条件下的转基因表达。

[0204] 如本文所使用的,短语"经修饰的ITR"或"mod-ITR"或"突变ITR"可互换使用,并且是指与来自相同血清型的WT-ITR相比在至少一个或多个核苷酸中具有突变的ITR。该突变可以引起ITR中的A、C、C'、B、B'区中的一个或多个发生变化,并且可以使得三维空间组构(即,其几何空间中的3D结构)相较于相同血清型的WT-ITR的3D空间组构发生变化。

[0205] 如本文所使用的,术语"非对称ITR",也被称为"非对称ITR对",是指单个合成AAV基因组内的一对ITR,它们在其全长上不是反向互补的。作为一个非限制性示例,不对称的ITR与其同源ITR不具有对称的三维空间组织,使得其3D结构在几何空间中具有不同的形状。换句话说,非对称ITR对具有不同的整体几何结构,即它们在3D空间中具有不同的A、C-C'和B-B'环组构(例如,一个ITR与同源ITR相比可能具有短的C-C'臂和/或短的B-B'臂)。两个ITR之间的序列差异可能是由于一个或多个核苷酸添加、缺失、截断或点突变引起的。在一个实施方案中,非对称ITR对中的一个ITR可以是野生型AAV ITR序列,并且另一个ITR是如本文定义的经修饰的ITR(例如,非野生型或合成ITR序列)。在另一个实施方案中,非对称ITR对中的ITR皆不是野生型AAV序列,并且两个ITR是在几何空间中具有不同形状的经修饰的ITR(即,不同的整体几何结构)。在一些实施方案中,非对称ITR对中的一个mod-ITR可以具有短C-C'臂,并且另一个ITR可以具有不同修饰(例如,单臂或短B-B'臂等),使得它们具有不同于同源非对称mod-ITR的三维空间组构。

[0206] 如本文所使用的,术语"对称ITR"是指单链AAV基因组内的一对ITR,它们是野生型或突变的(例如,相对于野生型修饰的)依赖病毒ITR序列并且在其全长上是反向互补的。在一个非限制性示例中,两个ITR都是来自AAV2的野生型ITR序列。在另一个示例中,这两个ITR都不是野生型ITR AAV2序列(即,它们是经修饰的ITR,也被称为突变ITR),并且由于核苷酸的添加、缺失、取代、截断或点突变而在序列上与野生型ITR不同。本文中为方便起见,将位于合成AAV载体中表达盒的5'(上游)的ITR称为"5'ITR"或"左ITR",并将位于合成AAV载体中表达盒的3'(下游)的ITR称为"3'ITR"或"右ITR"。

[0207] 如本文所使用的,术语"基本上对称的经修饰的ITR"或"基本上对称的mod-ITR对"是指合成AAV内的一对经修饰的ITR,它们在其整个长度上都具有反向互补序列。例如,经修饰的ITR即使具有一些偏离反向互补序列的核苷酸序列,但只要变化不影响性质和整体形状,也可以认为其是基本上对称的。作为一个非限制性示例,序列与典型序列具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性(如使用默认设置下的BLAST测量),并且还与其同源经修饰的ITR具有对称的三维空间组织,使得其3D结构在几何空间中具有相同的形状。换句话说,基本上对称的经修饰的ITR对具有在3D空间中组织的相同的A、C-C'和B-B'环。在一些实施方案中,来自经修饰的ITR对的ITR可具有不同的反向互补核苷酸序列,但仍具有相同的对称三维空间组织,即两个ITR都具有产生相同的整体3D形状的突变。

例如,mod-ITR对中的一个ITR(例如5'ITR)可以来自一种血清型,而另一个ITR(例如3'ITR)可以来自不同的血清型,但是,两种都可以具有相同的对应突变(例如,如果5'ITR在C区中具有缺失,那么来自不同血清型的同源经修饰的3'ITR在C'区的对应位置处也具有缺失),以使得经修饰的ITR对具有相同的对称三维空间组构。在此类实施方案中,经修饰的ITR对中的每个ITR可以来自不同血清型(例如,AAV1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12),诸如AAV2与AAV6的组合,其中一个ITR中的修饰反映在来自不同血清型的同源ITR中的对应位置中。在一个实施方案中,基本上对称的经修饰的ITR对是指一对经修饰ITR(mod-ITR),只要ITR之间的核苷酸序列的差异不影响性质或整体形状并且其在3D空间中具有基本上相同的形状即可。作为非限制性示例,诸如通过本领域中公知的标准方法,如默认设置下的BLAST(基本局部比对搜索工具)或BLASTN测定,mod-ITR与典型mod-ITR具有至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性,并且还具有对称的三维空间组织,以使其3D结构在几何空间中的形状相同。基本上对称的mod-ITR对在3D空间中具有相同的A、C-C'和B-B'环,例如,如果基本上对称的mod-ITR对中的经修饰的ITR缺失C-C'臂,那么同源mod-ITR对应缺失C-C'环,并且还具有在其同源mod-ITR的几何空间中呈相同形状的剩余A和B-B'环的类似3D结构。

[0208] 如本文所用,短语活性剂或治疗剂(诸如治疗性核酸)的"有效量"或"治疗有效量"是足以产生所需效应(例如,相比于在不存在治疗性核酸的情况下检测到的表达水平抑制目标序列的表达)的量。用于测量目标基因或目标序列的表达的适合测定包括例如,使用所属领域的技术人员已知的技术检查蛋白质或RNA水平,该技术如斑点印迹、北方印迹法、原位杂合、ELISA、免疫沉淀、酶功能以及所属领域的技术人员已知的表型测定。

[0209] 如本文所用,术语"表达"意指涉及产生RNA和蛋白质以及适当时分泌蛋白质的细胞过程,在适用时包括但不限于例如,转录、转录物加工、翻译和蛋白质折叠、修饰和处理。如本文所用,短语"表达产物"包括从基因(例如,转基因)转录的RNA和通过翻译从基因转录的mRNA所获得的多肽。

[0210] 如本文所用,术语"表达载体"意指指导RNA或多肽从与载体上的转录调节序列连接的序列的表达的载体。表达的序列通常但不一定与宿主细胞异源。表达载体可以包括其它元件,例如,表达载体可以具有两个复制系统,从而使其可以在两种生物体中维持,例如,在人类细胞中进行表达,以及在原核宿主中进行克隆和扩增。表达载体可以是重组载体。

[0211] 如本文所用,术语"侧接"是指一个核酸序列相对于另一核酸序列的相对位置。通常,在序列ABC中,B的两侧是A和C。这同样适用于布置AxBxC。因此,侧接序列在所侧接的序列之前或之后,但不必与所侧接的序列相邻或紧邻。

[0212] 如本文所用,术语"间隔区"意指分离载体或基因组中的功能元件的居间序列。在一些实施方案中,间隔区将两个功能元件保持在对于最优功能性来说所期望的距离处。在一些实施方案中,间隔区提供或增加了载体或基因组的基因稳定性。在一些实施方案中,间隔区通过提供克隆位点的适宜位置和设计数目的碱基对的间隙而促进基因组的就绪基因操作。

[0213] 如本文所用,术语"表达盒"和"表达单元"可互换使用,意指与启动子或足以指导DNA载体(例如,合成AAV载体)的转基因转录的其他DNA调节序列可操作连接的异源DNA序列。合适的启动子包括例如,组织特异性启动子。启动子也可以是AAV起源的。

[0214] 如本文所用,短语"基因疾病"或"基因病患"是指部分或完全、直接或间接地由基

因组中的一种或多种异常引起的疾病,包括并且尤其是从出生起出现的病症。异常可以是基因中的突变、插入或缺失。异常可能影响基因的编码序列或其调节序列。

[0215] 如本文所用,术语“多肽”意指氨基酸的重复序列。根据一些实施方案,本公开的多肽是ApoE或ApoB多肽。根据一些实施方案,ApoE多肽是全长ApoE多肽的功能性片段(或功能性部分)。根据一些实施方案,ApoE多肽是全长ApoB多肽的功能性片段(或功能性部分)。根据一些实施方案,ApoE多肽的长度为30个氨基酸或更少。根据一些实施方案,ApoB多肽的长度为30个氨基酸或更少。

[0216] 如本文所用,术语“LDL”是指低密度脂蛋白颗粒。

[0217] 如本文所用,术语“LDL-R”和“LDL受体”可互换使用,并且指低密度脂蛋白颗粒受体。根据一些实施方案,LDL-R表达可通过例如mRNA或蛋白质测定来确定。LDLR家族成员的非限制性示例包括LDLR、极低密度脂蛋白(VLDL)受体、ApoE受体、LDL受体相关蛋白1(LRP-1)、LRP-1b和LRP-2/megalin(参见,Strickland等人,2002,TRENDS in Endocrinol.& Metab.13:66-74)。在一些情况下,LDLR或LDLR家族成员的配体可结合LDLR家族的多个成员。

[0218] 如本文所用,术语“LDLR配体”意指可结合LDLR和/或LDLR受体家族的一个或多个成员的配体。

[0219] 如本文所用,术语“脂质”意指一组有机化合物,包括但不限于脂肪酸的酯,并且其特征在于不溶于水,但是可溶于许多有机溶剂中。它们通常被分成至少三类:(1)“简单脂质”,其包括脂肪和油以及蜡;(2)“复合脂质”,其包括磷脂和糖脂;以及(3)“衍生脂质”诸如类固醇。

[0220] 磷脂的代表性示例包括但不限于磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰基磷脂酰胆碱、二油酰基磷脂酰胆碱、二硬脂酰基磷脂酰胆碱和二亚油酰基磷脂酰胆碱。缺少磷的其他化合物,诸如,鞘脂、鞘糖脂家族、二酰基甘油和β-酰氧基酸,也在被称为两亲性脂质的组内。此外,上述两亲性脂质可与其他脂质(包括甘油三酸酯和甾醇)混合。

[0221] 在一个实施方案中,脂质组合物包括一个或多个叔氨基、一个或多个苯基酯键和二硫键。

[0222] 如本文所用,术语“脂质缀合物”意指抑制脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)聚集的缀合脂质。此类脂质缀合物包括但不限于聚乙二醇化脂质,诸如,与二烷氧基丙基偶联的PEG(例如,PEG-DAA缀合物)、与二酰基甘油偶联的PEG(例如,PEG-DAG缀合物)、与胆固醇偶联的PEG、与磷脂酰乙醇胺偶联的PEG和与神经酰胺偶联的PEG(参见,例如,美国专利号5,885,613)、阳离子的PEG脂质、聚恶唑啉(POZ)-脂质缀合物(例如,POZ-DAA缀合物;参见,例如,2010年1月13日提交的美国临时申请号61/294828和2010年1月14日提交的美国临时申请号61/295140)、聚酰胺低聚物(例如,ATTA-脂质缀合物)以及它们的混合物。POZ-脂质缀合物的其他示例描述于国际专利申请公开号WO 2010/006282中。PEG或POZ可以直接与脂质缀合,或者可以经由接头部分与脂质连接。可以使用适合将PEG或POZ与脂质偶联的任何接头部分,包括例如,不含酯的接头部分和含酯的接头部分。在某些优选的实施方案中,使用不含酯的接头部分,诸如,酰胺或氨基甲酸酯。出于所有目的,将每个上述专利文件的公开内容全文以引用方式并入本文。

[0223] 如本文所使用的,术语“脂质包封”意指提供具有完全包封、部分包封或两者的活性剂或治疗剂,诸如核酸(例如,ceDNA)的脂质颗粒。在优选的实施方案中,核酸被完全包封在脂质颗粒中(例如,以形成含有核酸的脂质颗粒)。

[0224] 如本文所使用的,术语“脂质颗粒”或“脂质纳米颗粒”意指可用于将治疗剂(诸如核酸治疗剂)递送至感兴趣位点(例如,细胞、组织、器官等)的脂质调配物。在一个实施方案中,本发明的脂质颗粒是含有核酸的脂质颗粒,其通常由阳离子脂质、非阳离子脂质和任选的防止颗粒聚集的缀合脂质形成。在其他优选的实施方案中,可以将治疗剂(诸如,治疗性核酸)包封于颗粒的脂质部分中,从而保护其免于酶促降解。在一个实施方案中,脂质颗粒包括核酸(例如,ceDNA)和脂质,该脂质包括一个或多个叔氨基、一个或多个苯基酯键和二硫键。

[0225] 根据一些实施方案,本发明脂质颗粒的平均直径尺寸通常为约20nm至约75nm、约20nm至约70nm、约25nm至约75nm、约25nm至约70nm、约30nm至约75nm、约30nm至约70nm、约35nm至约75nm、约35nm至约70nm、约40nm至约75nm、约40nm至约70nm、约45nm至约75nm、约50nm至约75nm、约50nm至约70nm、约60nm至约75nm、约60nm至约70nm、约65nm至约75nm、约65nm至约70nm或约20nm、约25nm、约30nm、约35nm、约40nm、约45nm、约50nm、约51nm、约52nm、约53nm、约54nm、约55nm、约56nm、约57nm、约58nm、约59nm、约60nm、约61nm、约62nm、约63nm、约64nm、约65nm、约66nm、约67nm、约68nm、约69nm、约70nm、约71nm、约72nm、约73nm、约74nm或约75nm(±3nm)。

[0226] 通常,选择本发明的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的平均直径以实现预期的治疗效果。

[0227] 根据一些实施方案,本公开的脂质颗粒的平均直径尺寸通常为小于约75nm、小于约70nm、小于约65nm、小于约60nm、小于约55nm、小于约50nm、小于约45nm、小于约40nm、小于约35nm、小于约30nm、小于约25nm,或小于约20nm。

[0228] 如本文所使用的,术语“阳离子脂质”是指在生理pH下带正电荷的任何脂质。脂质颗粒中的阳离子脂质可以包括例如一种或多种阳离子脂质,诸如1,2-二亚油酰氧基-N,N-二甲氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚油酰氧基-N,N-二甲氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二-γ-亚麻氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(γ-DLenDMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-C2-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)、“SS-可切割脂质”或其混合物。在一些实施方案中,阳离子脂质也是可离子化脂质,即,可离子化阳离子脂质。本文所述的所有阳离子脂质的对应四价脂质(quaternary lipid)(即,其中阳离子部分中的氮原子被质子化并且具有四个取代基)预期在本公开的范围内。例如,通过氯甲烷(CH_3Cl)的乙腈(CH_3CN)和氯仿($CHCl_3$)溶液的处理,本文所述的任何阳离子脂质可转换成对应四价脂质。

[0229] 如本文所用,术语“阴离子脂质”是指在生理pH下带负电荷的任何脂质。这些脂质包括但不限于磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二烷酰基磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰基磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰基磷脂酰乙醇胺、赖氨酰基磷脂酰甘油、棕榈酰基油酰基磷脂酰甘油(POPG)、和加入其他阴离子改性基团的中性脂质。

[0230] 如本文所用,术语“疏水性脂质”是指具有非极性基团的化合物,该非极性基团包括但不限于长链饱和和不饱和脂族烃基、以及任选地被一个或多个芳族、环脂族或杂环基

团取代的此类基团。合适的示例包括但不限于二酰基甘油、二烷基甘油、N-N-二烷基氨基、1,2-二酰氧基-3-氨基丙烷和1,2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0231] 如本文所用,术语“可离子化脂质”意指具有至少一个可质子化或可去质子化基团的脂质,例如阳离子脂质,使得该脂质在等于或低于生理pH(例如,pH 7.4)的pH下带正电荷,并且在第二pH(优选地等于生理pH或高于生理pH)为中性。本领域普通技术人员将理解,根据pH添加或去除质子是一种平衡过程,并且提到带电脂质或中性脂质是指主要物质的性质,并不要求所有脂质都以带电或中性形式存在。通常,可离子化脂质的可质子化基团的pKa在约4至约7的范围内。在一些实施方案中,可离子化脂质可以包括“可切割脂质”或“SS-可切割脂质”。

[0232] 如本文所用,术语“中性脂质”意指在所选pH下以不带电或中性两性离子形式存在的多种脂质种类中的任一种。在生理pH下,此类脂质包括例如,二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂和二酰基甘油。

[0233] 如本文所用,术语“非阳离子脂质”意指任何两亲性脂质以及任何其他中性脂质或阴离子脂质。

[0234] 如本文所用,术语“可切割脂质”或“SS-可切割脂质”是指包括二硫键可切割单元的脂质。可切割脂质可以包含可切割的二硫键(“ss”),其含有脂质样材料,该脂质样材料包括pH敏感性叔胺和可自降解的苯基酯。例如,SS-可切割脂质可以是ss-OP脂质(COATSOME®SS-OP)、ss-M脂质(COATSOME®SS-M)、ss-E脂质(COATSOME®SS-E)、ss-EC脂质(COATSOME®SS-EC)、ss-LC脂质(COATSOME®SS-LC)、ss-OC脂质(COATSOME®SS-OC)和ss-PalmE脂质(参见例如,式I-式IV),或以下文献中描述的脂质:Togashi等人,(2018),(Journal of Controlled Release),A hepatic pDNA delivery system based on an intracellular environment sensitive vitamin E-scaffold lipid-like material with the aid of an anti-inflammatory drug”,279:262-270。可切割脂质的附加示例描述于美国专利号9,708,628和美国专利号10,385,030中,该美国专利的全部内容通过引用并入本文。在一个实施方案中,可切割脂质包括响应于酸性区室(例如,用于膜去稳定化的内体或溶酶体)的叔胺以及可在还原环境(例如,细胞质)中切割的二硫键。在一个实施方案中,可切割脂质是阳离子脂质。在一个实施方案中,可切割脂质是可离子化阳离子脂质。本文更详细地描述了可切割脂质。

[0235] 如本文所用,术语“有机脂质溶液”意在是指全部或部分包括具有脂质的有机溶剂的组合物。

[0236] 如本文所用,术语“脂质体”意指组装成球形构型的脂质分子,该球形构型包封与水性外部隔离的内部水性体积。脂质体是具有至少一个脂质双层的囊泡。在医药研发的背景下,脂质体通常用作药物/治疗剂递送的载剂。其通过与细胞膜融合并重新定位其脂质结构以递送药物或活性药物成分来起作用。用于此类递送的脂质体组合物通常由磷脂,尤其具有磷脂酰胆碱基团的化合物构成,然而这些组合物还可以包括其它脂质。

[0237] 如本文所用,术语“局部递送”意指将诸如干扰RNA(例如,siRNA)的活性剂直接递送到生物体内的感兴趣位点。例如,药剂可以通过直接注射到疾病部位(诸如肿瘤或其他部位,诸如发炎部位或目标器官,诸如肝脏、心脏、胰腺、肾脏等)中来局部递送。

[0238] 如本文所用,术语“核酸”意指含有呈单链或双链形式的至少两种核苷酸(即,脱氧

核糖核苷酸或核糖核苷酸)并且包括DNA、RNA和其杂合物的聚合物。DNA可以呈例如反义分子、质粒DNA、DNA-DNA双链体、预缩合DNA、PCR产物、载体(P1、PAC、BAC、YAC、人工染色体)、表达盒、嵌合序列、染色体DNA或这些组的衍生物和组合的形式。DNA可以呈小环、质粒、杆粒、小基因、辅助DNA(线性共价闭合DNA载体)、末端封闭的的线性双链体DNA(CELiD或ceDNA)、doggybone™DNA、哑铃形DNA、简约的免疫学定义的基因表达(MIDGE)-载体、病毒载体或非病毒载体的形式。RNA可以呈小干扰RNA(siRNA)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、mRNA、rRNA、tRNA、gRNA、病毒RNA(vRNA)以及它们的组合的形式。核酸包括含有已知核苷酸类似物或经修饰主链残基或键的核酸,它们是合成的、天然存在的和非天然存在的,并且具有与参考核酸相似的结合性质。此类类似物和/或经修饰残基的示例包含(但不限于):硫代磷酸酯、磷酰二胺吗啉代寡聚体(吗啉代)、氨基磷酸酯、膦酸甲酯、手性膦酸甲酯、2'-O-甲基核糖核苷酸、锁核酸(LNA™)和肽核酸(PNA)。除非特别限定,否则该术语涵盖含有天然核苷酸已知类似物的核酸,其具有与参考核酸相似的结合性质。除非另有说明,否则特定核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指出的序列。

[0239] 如本文所用,短语"核酸治疗性"、"治疗性核酸"和"TNA"可互换地使用,并且是指使用核酸作为治疗疾病或病患的治疗剂的活性组分的治疗的任何模态。如本文所用,这些短语是指基于RNA的治疗剂和基于DNA的治疗剂。基于RNA的治疗剂的非限制性示例包含mRNA、反义RNA和寡核苷酸、核酶、适体、干扰RNA(RNAi)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、非对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)。基于DNA的治疗剂的非限制性示例包含小环DNA、小基因、病毒DNA(例如,慢病毒或AAV基因组)或非病毒合成DNA载体、末端封闭的的线性双链体DNA(ceDNA/CELiD)、质粒、杆粒、DOGGYBONE™DNA载体、简约的免疫学定义的基因表达(MIDGE)-载体、非病毒迷你串DNA载体(线性-共价封闭的DNA载体)或哑铃形DNA最小载体("哑铃DNA")。

[0240] 如本文所用,"核苷酸"含有糖脱氧核苷(DNA)或核糖(RNA)、碱基和磷酸酯基。核苷酸通过磷酸酯基连接在一起。

[0241] 如本文所使用的,术语"药学上可接受的载体"包含任何标准药学载体,诸如磷酸盐缓冲盐溶液、水、乳液(如油/水或水/油)以及各种类型的润湿剂。该术语还涵盖美国联邦政府监管机构批准的或美国药典中列出的用于动物(包含人类)的任何药剂,以及不会对受试者造成显著刺激并且不会消除所施用化合物的生物活性和性质的任何载体或稀释剂。

[0242] 如本文所使用的,术语"间隙"意指本发明的合成DNA载体的中断部分,其在另外的双链ceDNA中产生单链DNA部分的一段。在双链体DNA的一个链中,间隙的长度可以是1个碱基对到100个碱基对。由本文所描述的方法以及由所述方法产生的合成载体设计和产生的典型间隙的长度可以是例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60bp。本公开中的示例性间隙的长度可以是1bp到10bp、1bp到20bp、1bp到30bp。

[0243] 如本文所使用的,术语"切口"是指双链DNA分子中的不连续性,其中通常通过损伤或酶作用在一条链的相邻核苷酸之间不存在磷酸二酯键。应当理解,一个或多个切口允许在DNA复制期间释放链中的扭转,并且切口也被认为在促进转录机制结合方面发挥作用。

[0244] 本文所用的术语"受体"意在包括整个受体或其配体结合部分。受体的这些部分特

别包括足以发生配体特异性结合的那些区。

[0245] 如本文所用,术语“眼部病患”意在包括与眼部血管生成相关的病症、干眼、炎性病症、高眼压症和与眼内压(IOP)升高相关的眼病,诸如青光眼。

[0246] 如本文所用,术语“受试者”是指向其提供根据本公开的治疗性核酸的治疗(包括预防性治疗)的人或动物。通常,动物为脊椎动物,诸如但不限于灵长类动物、啮齿动物、家养动物或猎获的动物。灵长类动物包括但不限于:黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴和猕猴,例如,恒河猴。啮齿动物包括小鼠、大鼠、旱獭、雪貂、兔和仓鼠。家养动物和猎获的动物包括但不限于:牛、马、猪、鹿、野牛、水牛、猫科物种(例如,家猫)、犬科物种(例如,狗、狐狸、狼)、禽类物种(例如,鸡、鸸鹋、鸵鸟),以及鱼(例如,鳟鱼、鲶鱼和鲑鱼)。在本文所描述方面的某些实施方案中,受试者是哺乳动物,例如,灵长类动物或人。受试者可以是雄性或雌性。另外,受试者可以是婴儿或儿童。在一些实施方案中,受试者可以是新生儿或未出生的受试者,例如,受试者还在子宫内。优选地,受试者是哺乳动物。哺乳动物可以是人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛,但不限于这些示例。人以外的哺乳动物可以有利地用作代表疾病和病患的动物模型的受试者。另外,本文所描述的方法和组合物可以用于家养动物和/或宠物。人类受试者可以是任何年龄、性别、种族或人种群组,例如,高加索人(白人)、亚洲人、非洲人、黑人、非裔美国人、非裔欧洲人、西班牙人、中东人等。在一些实施方案中,受试者可以是临床环境中的患者或其它受试者。在一些实施方案中,受试者已进行治疗。在一些实施方案中,受试者是胚胎、胎儿、新生儿、婴儿、儿童、青少年或成人。在一些实施方案中,受试者是人类胎儿、人类新生儿、人类婴儿、人类儿童、人类青少年或人类成人。在一些实施方案中,受试者是动物胚胎,或非人类胚胎或非人类灵长类动物胚胎。在一些实施方案中,受试者是人胚胎。

[0247] 如本文所用,短语“有需要的受试者”是指(i)将施用根据所述公开的ceDNA脂质颗粒(或包含ceDNA脂质颗粒的药物组合物),(ii)正在接受根据所述公开的ceDNA脂质颗粒(或包含ceDNA脂质颗粒的药物组合物);或(iii)已接受根据所述公开的ceDNA脂质颗粒(或包含ceDNA脂质颗粒的药物组合物)的受试者,除非该短语的上下文和用法另有说明。

[0248] 如本文所用,术语“遏制”、“减少”、“干扰”、“抑制”和/或“降低”(以及类似术语)通常是指直接或间接地降低相对于自然条件、预期条件或平均条件,或相对控制条件的浓度、水平、功能、活动或行为的行为。

[0249] 如本文所用,术语“全身递送”意指脂质颗粒的递送,使得活性剂诸如,干扰RNA(例如,siRNA)在生物体内的广泛生物分布。一些施用技术可导致某些药剂而非其他药剂的全身递送。全身递送意指使有用量(优选治疗量)的药剂暴露于身体的大部分部位。为了获得广泛的生物分布,通常需要血液寿命,以使药剂在到达施用位点远端的疾病位点之前不会迅速地降解或清除(例如,通过首过器官(肝脏、肺等)或通过快速、非特异性细胞结合)。脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的全身递送可以通过本领域已知的任何手段进行,包括例如,静脉内、皮下和腹膜内。在优选的实施方案中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的全身递送是通过静脉内递送进行的。

[0250] 如本文所使用的,术语“末端重复”或“TR”包含任何包括至少一个最低需要的复制起点和包括回文发夹结构的区域的病毒或非病毒末端重复或合成序列。Rep结合序列(“RBS”或也被称为Rep结合元件(RBE))和末端解链位点(“TRS”)共同构成AAV的“最低需要的复制起点”,并且因此TR包括至少一个RBS和至少一个TRS。在给定的一段多核苷酸序列内

彼此是反向互补序列的TR通常各自被称为“反向末端重复”或“ITR”。在病毒的背景下,ITR在介导复制、病毒颗粒和DNA包装、DNA整合以及基因组和前病毒拯救方面发挥着关键作用。在全长上并非反向互补(回文)的TR仍然可以执行ITR的传统功能,因此术语ITR用于指病毒或非病毒AAV载体中能够介导宿主细胞中的复制的TR。本领域普通技术人员将理解,在复杂的AAV载体构型中,可能存在两个以上ITR或非对称ITR对。

[0251] 如本文所用,术语活性剂(例如,如本文所描述的ceDNA脂质颗粒)的“治疗量”、“治疗有效量”、“有效量”或“药学上有效量”可互换地使用以指代足以提供治疗的预期益处的量。然而,剂量水平是基于多种因素,包括损伤类型、年龄、体重、性别、患者的医学病症、病症的严重程度、施用途径和所采用的特定活性剂。因此,剂量方案可以在很大范围内变化,但可以由医师使用标准方法常规地确定。另外,术语“治疗量”、“治疗有效量”和“药学上有效量”包括所描述的公开内容的组合物的防治或预防量。在所描述的公开内容的防治或预防应用中,以足以消除或降低疾病、病患或病症(包括疾病、病患或病症的生物化学、组织学和/或行为症状、其并发症和在疾病、病患或病症的发展期间呈现的中间病理学表型)的风险、减轻它们的严重程度或者延迟它们的发作的量向易患有疾病、病患或病症或者以其他方式处于它们的风险中的患者施用药物组合物或药剂。通常优选使用最大剂量,即,根据一些医学判断的最高安全剂量。术语“剂量(dose/dosage)”在本文中可互换地使用。

[0252] 如本文所用,术语“治疗效果”是指治疗的结果,其结果被判定为合乎需要并且有益的。治疗效果可以直接或间接地包括疾病表现的遏制、减少或消除。治疗效果还可以直接或间接地包括疾病表现的进展的遏制减少或消除。

[0253] 对于本文所描述的任何治疗剂,治疗有效量可以初始地根据初步的体外研究和/或动物模型来确定。治疗有效剂量也可以根据人数据来确定。可以基于相对生物利用度和施用的化合物的效力调节施用剂量。基于上述方法和其他熟知的方法调整剂量以实现最大功效在普通技术人员的能力内。下文总结了用于测定治疗有效性的一般原理,其可以在Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,第10版,McGraw-Hill(纽约)(2001)的第1章中找到,该文献以引用的方式并入本文中。

[0254] 药代动力学原理为修改剂量方案以获得期望程度的治疗功效并且具有最小的不可接受的副作用提供了基础。在可以测量药物的血浆浓度并且与治疗窗口有关的情况下,可以获得针对剂量修改的另外的指导。

[0255] 如本文所用,术语“治疗”包括减轻、基本上抑制、减缓或逆转病症的进展,基本上改善病症的临床症状,或者基本上预防病症的临床症状的出现、获得有益或期望的临床结果。治疗还指完成以下一项或多项:(a)降低病患的严重程度;(b)限制被治疗病患的特征性症状的发展;(c)限制被治疗病患的特征性症状的恶化;(d)限制病患在先前患有该病患的患者中的复发;以及(e)限制先前对病患无症状的患者的症状复发。

[0256] 有益或所需的临床结果,诸如药理学和/或生理学效应,包括(但不限于):预防可能易患有疾病、病患或病症但尚未经历或展现疾病的症状的受试者出现该疾病、病患或病症(防治性治疗);缓解该疾病、病患或病症的症状;减轻该疾病、病患或病症的程度;稳定该疾病、病患或病症(即,不恶化);预防该疾病、病患或病症的扩散;延迟或减缓该疾病、病患或病症进展;改善或缓和该疾病、病患或病症;以及其组合,以及与如果不接受治疗所预期的存活期相比,延长存活期。

[0257] 有益或所需的临床结果,诸如药理学和/或生理学效应,包括(但不限于):预防可能易患有疾病、病患或病症但尚未经历或展现疾病的症状的受试者出现该疾病、病患或病症(防治性治疗);缓解该疾病、病患或病症的症状;减轻该疾病、病患或病症的程度;稳定该疾病、病患或病症(即,不恶化);预防该疾病、病患或病症的扩散;延迟或减缓该疾病、病患或病症进展;改善或缓和该疾病、病患或病症;以及其组合,以及与如果不接受治疗所预期的存活期相比,延长存活期。

[0258] 如本文所用,术语"烷基"是指1-20个碳原子的饱和一价烃基(即,C_{1-20}烷基)。"一价"是指烷基与分子其余部分有一个附接点。在一个实施方案中,烷基具有1至12个碳原子(即C_{1-12}烷基)或1至10个碳原子(即C_{1-10}烷基)。在一个实施方案中,烷基具有1至8个碳原子(即C_{1-8}烷基)、1至7个碳原子(即C_{1-7}烷基)、1至6个碳原子(即C_{1-6}烷基)、1至4个碳原子(即C_{1-4}烷基),或1至3个碳原子(即C_{1-3}烷基)。示例包括但不限于甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、2-甲基-1-丙基、2-丁基、2-甲基-2-丙基、1-戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-2-丁基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基、3,3-二甲基-2-丁基、1-庚基、1-辛基等。直链或支链烷基,诸如"直链或支链C_{1-6}烷基"、"直链或支链C_{1-4}烷基",或"直链或支链C_{1-3}烷基"是指饱和一价烃基是直链或支链的。如本文所用,涉及脂族烃链的术语"直链"是指该链是无支链的。

[0259] 如本文所用,术语"亚烷基"是指1至20个碳原子的饱和二价烃基(即C_{1-20}亚烷基),其示例包括但不限于与上述示例烷基核心结构相同的饱和二价烃基。"二价"是指亚烷基与分子其余部分有两个附接点。在一个实施方案中,亚烷基具有1至12个碳原子(即C_{1-12}亚烷基),或1至10个碳原子(即(即C_{1-10}亚烷基)。在一个实施方案中,亚烷基具有1至8个碳原子(即C_{1-8}亚烷基)、1至7个碳原子(即C_{1-7}亚烷基)、1至6个碳原子(即C即C_{1-6}亚烷基)、1至4个碳原子(即C_{1-4}亚烷基)、1至3个碳原子(即C_{1-3}亚烷基)、亚乙基或亚甲基。直链或支链亚烷基,诸如"直链或支链C_{1-6}亚烷基"、"直链或支链C_{1-4}亚烷基",或"直链或支链C_{1-3}亚烷基"是指饱和二价烃基是直链或支链的。

[0260] 术语"烯基"是指具有一个或多个(例如,一个或两个)碳-碳双键的直链或支链脂族烃基,其中烯基包括具有"顺式"和"反式"取向,或按照替代命名法"E"和"Z"取向的基团。

[0261] 如本文所用,"亚烯基"是指具有一个或两个碳-碳双键的2至20个碳原子的脂肪族二价烃基(即C_{2-20}亚烯基),其中亚烯基包括具有"顺式"和"反式"取向,或按照替代命名法,"E"和"Z"取向的基团。"二价"是指亚烯基与分子其余部分有两个附接点。在一个实施方案中,亚烯基具有2至12个碳原子(即C_{2-16}亚烯基)、2至10个碳原子(即C_{2-10}亚烯基)。在一个实施方案中,亚烯基具有2至4个碳原子(C_{2-4})。示例包括但不限于亚乙烯基(ethylenylene)或亚乙烯基(vinylene)(-CH=CH-)、烯丙基(-CH_2CH=CH-)等。直链或支链亚烯基,诸如"直链或支链C_{2-6}亚烯基"、"直链或支链C_{2-4}亚烯基"或"直链或支链C_{2-3}亚烯基"是指不饱和二价烃基是直链或支链的。

[0262] 如本文所用的"亚环烷基"是指具有3至12个碳原子作为单环或7至12个碳原子作为双环的二价饱和碳环基团。"二价"是指亚环烷基与分子其余部分具有两个附接点。在一个实施方案中,亚环烷基是3至7元单环或3至6元单环。单环环烷基的示例包括但不限于亚环丙基、亚环丁基、亚环戊基、亚环己基、亚环庚基、亚环辛基、亚环壬基、亚环癸基、亚环十

一烷基、亚环十二烷基等。在一个实施方案中,亚环烷基是亚环丙基。

[0263] 术语“杂环(heterocycle)”、“杂环基”、杂环的和“杂环(heterocyclic ring)”在本文中可互换使用,并且是指包含至少一个N原子、具有杂原子和任选1-3个选自N和S的额外杂原子的环状基团,并且是非芳香族的(即,部分或完全饱和)。它可以是单环或双环的(桥接的或稠合的)。杂环的示例包括但不限于氮丙啶基、二氮丙啶基、噻氮丙啶基、氮杂环丁烷基、二氮杂环丁烷基、三氮杂环丁烷基、噻二氮杂环丁烷基、噻氮杂环丁烷基、吡咯烷基、吡唑烷基、咪唑啉基、异噻唑烷基、噻唑烷基、哌啶基、哌嗪基、六氢嘧啶基、氮杂环庚烷基、氮杂环辛烷基等。杂环含有1至4个选自N和S的可相同或不同的杂原子。在一个实施方案中,杂环含有1至3个N原子。在另一个实施方案中,杂环含有1或2个N原子。在另一个实施方案中,杂环含有1个N原子。“4至8元杂环基”意指具有以单环排列的4至8个原子(包括1至4个选自N和S的杂原子,或1至3个N原子,或1或2个N原子,或1个N原子)的基团。“5或6元杂环基”是指具有以单环排列的5或6个原子(包括1至4个选自N和S的杂原子,或1至3个N原子,或1或2个N原子,或1个N原子)的基团。术语“杂环”旨在包括所有可能的异构形式。杂环描述于Paquette,Leo A.,Principles of Modern Heterocyclic Chemistry(W.A.Benjamin,纽约,1968),特别是第1、3、4、6、7和9章;The Chemistry of Heterocyclic Compounds,A Series of Monographs(John Wiley&Sons,纽约,1950-至今),特别是第13、14、16、19和28卷;和J.Am.Chem.Soc.(1960)82:5566。在可能的情况下,杂环基可以是附接到分子其余部分的碳(碳连接)或氮(氮连接)。

[0264] 如果基团被描述为“任选取代的”,则该基团可以是(1)未取代的,或(2)取代的。如果基团的碳被描述为被一系列取代基中的一个或多个任选取代,则该碳上的一个或多个氢原子(在有的情况下)可以单独和/或一起被独立选择的任选取代基取代。

[0265] 烷基、亚烷基、亚烯基、亚环烷基和杂环基的合适取代基是不会明显不利地影响双官能团化合物的生物活性的取代基。除非另有说明,否则这些基团的示例性取代基包括具有1个至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、芳基、杂芳基、杂环基、卤素、胍[-NH(C=NH)NH_2]、-OR_{100}、$NR_{101}R_{102}$、-NO_2、-$NR_{101}COR_{102}$、-SR_{100}、由-SOR_{101}表示的亚砜、由-SO_2R_{101}表示的砜、磺酸酯-SO_3M,硫酸根-OSO_3M、由-$SO_2NR_{101}R_{102}$表示的磺酰胺、氰基、叠氮基、-COR_{101}、-$OCOR_{101}$、-$OCONR_{101}R_{102}$、聚乙二醇单元$(-OCH)_2CH_2)_nR_{101}$,其中M为H或阳离子(诸如Na^+或K^+);R_{101}、R_{102}和R_{103}各自独立地选自H、具有1个至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、聚乙二醇单元$(-OCH_2CH_2)_n-R_{104}$(其中n是1至24的整数)、具有6至10个碳原子的芳基、具有3至10个碳原子的杂环和具有5至10个碳原子的杂芳基;R_{104}为H或具有1个至4个碳原子的直链或支链烷基,其中由R_{100}、R_{101}、R_{102}、R_{103}和R_{104}表示的基团中的烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和杂环基任选地被一个或多个(例如2、3、4、5、6或更多个)独立地选自卤素、-OH、-CN、-NO_2和具有1个至4个碳原子的未取代的直链或支链烷基的取代基取代。优选地,任选取代的烷基、亚烷基、亚烯基、亚环烷基和杂环基的取代基选自由以下组成的组:卤素、-CN、-$NR_{101}R_{102}$、-CF_3、-OR_{100}、芳基、杂芳基、杂环基、-SR_{101}、-SOR_{101}、-SO_2R_{101}和-SO_3M。可替代地,合适的取代基选自由以下组成的组:卤素、-OH、-NO_2、-CN、C_{1-4}烷基、-OR_{100}、$NR_{101}R_{102}$、-$NR_{101}COR_{102}$、-SR_{100}、-SO_2R_{101}、-$SO_2NR_{101}R_{102}$、-COR_{101}、-$OCOR_{101}$和-$OCONR_{101}R_{102}$,其中R_{100}、R_{101}和R_{102}各自独立地为-H或C_{1-4}烷基。

[0266] 如本文所用,“卤素”是指F、Cl、Br或I。“氰基”为-CN。

[0267] 如本文所用,“胺”或“氨基”可互换地指包含具有孤对的碱性氮原子的官能团。

[0268] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指本公开可离子化脂质的药学上可接受的有机盐或无机盐。示例性盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸性磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸性柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、鞣酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡糖醛酸盐、蔗糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲基磺酸盐“甲磺酸盐”、乙基磺酸盐、苯基磺酸盐、对甲苯磺酸盐、双羟萘酸盐(即1,1’-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸盐))盐、碱金属(例如,钠和钾)盐、碱土金属(例如,镁)盐和铵盐。药学上可接受的盐可涉及包括另一种分子,诸如,乙酸根离子、琥珀酸根离子或其他抗衡离子。该抗衡离子可以是稳定母体化合物电荷的任何有机部分或无机部分。此外,药学上可接受的盐在其结构中可以具有多于一个的带电原子。多个带电原子是药学上可接受的盐一部分的情况可以具有多个抗衡离子。因此,药学上可接受的盐可以具有一个或多个带电原子和/或一个或多个抗衡离子。

[0269] 本文公开的本发明的替代要素或实施方案的分组不应解释为限制。每个组成员可以单独提及和要求,或呈与该组的其它成员或此处找到的其它要素的任何组合提及和要求。出于方便和/或可专利性的原因,一个组中的一个或多个成员可以包括在一个组中或从中删除。当发生任何这样的包括或删除时,在本文中认为说明书含有修改的组,从而满足所附权利要求书中使用的所有马库什组(Markush group)的书面描述。

[0270] 在任何方面的一些实施方案中,本文描述的公开内容不涉及克隆人的方法、用于修饰人的种系遗传身份的方法、用于工业或商业目的的人胚胎的使用、或用于修饰动物的基因身份,可能导致其遭受痛苦而对人或动物没有任何实质性医学益处的方法,以及由这类方法产生的动物。

[0271] 本文在本发明的各个方面的描述内定义了其它术语。

[0272] 本申请全文中引用的所有专利和其他出版物(包括参考文献、授权的专利、公开的专利申请和共同未决的专利申请)以引用的方式明确地并入本文,以描述和公开例如在此类出版物中描述的可以与本文所述的技术结合使用的方法。提供这些出版物仅仅是出于其在本申请的提交日期之前的公开内容而提供。关于这一点,任何内容都不应被解释为承认发明者由于在先发明或任何其他原因而无权早于这种公开内容。关于这些文件的日期的所有声明或关于内容的陈述都是基于申请人可获得的信息,并且不等同于承认这些文件的日期或内容的正确性。

[0273] 本公开的实施方案的描述并非旨在穷举或将本公开限制于所公开的精确形式。尽管本文出于说明性目的描述了本公开的特定实施方案和实施例,但是如相关领域的技术人员将认识到的,在本公开的范围内可以进行各种等效修改。例如,虽然方法步骤或功能以给定的次序呈现,但是另选的实施方案可以以不同的次序执行功能,或者功能可以基本上同时执行。本文提供的本公开的教导可以适当地应用于其他程序或方法。本文描述的各种实施方案可以进行组合以提供其他实施方案。如果需要,可以修改本公开的各方面以采用上述参考文献和申请的组合物、功能和概念来提供本公开的又一实施方案。而且,由于生物学功能等效性的考虑,可以在不影响生物学或化学作用的种类或数量的情况下对蛋白结构进行一些改变。可以根据详细描述对本公开进行这些和其他改变。意图所有这些修改包括在

所附权利要求书的范围内。

[0274] 任何前述实施方案的特定要素都可以进行组合或替代其他实施方案中的要素。此外,尽管已经在这些实施方案的上下文中描述了与本公开的某些实施方案相关联的优点,但是其他实施方案也可以表现出这样的优点,并且并非所有实施方案都需要为了落入本公开的范围内而表现出这样的优点。

[0275] 通过以下实施例进一步说明本文所述的技术,这些实施例决不应解释为进一步限制。应当理解,本发明不以任何方式限制于本文所述的特定方法、方案和试剂等,因此可以变化。本文中所用的术语仅是出于描述特定实施方案的目的,而无意于限制本发明的范围,本发明的范围仅仅由权利要求限定。

[0276] II.脂质纳米颗粒组合物

[0277] 本文提供了包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA)的药物组合物,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段。术语“连接”包括化学缀合、吸附(物理吸附和/或化学吸附)。术语“连接”所涵盖的键的类型是共价相互作用和非共价相互作用(例如,氢键、范德华键、离子键和疏水键)。本文还提供了包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA)的药物组合物,其中LNP包含与LNP连接的ApoB多肽或其片段。根据一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段能够结合低密度脂蛋白(LDL)受体或LDL受体家族成员。例如,许多与LDLR受体家族成员结合的配体提供于Strickland等人,2002,TRENDS in Endocrinol.&Metab.13:66-74,其全部内容通过引用并入本文。根据一些实施方案,特别优选的配体家族包括肽,该肽包含载脂蛋白B(ApoB,Spencer和Verma,2007,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 104:7594-7599)或载脂蛋白E(ApoE,Lalazar等人,1988,J.Biol.Chem.263:3542-3545)的LDLR结合结构域,它们是名义上的LDL受体配体。已经鉴定了ApoE的三种主要同种型,包括apoE2、apoE3和apoE4,并且已经描述了许多ApoE变体(参见,例如,de Knijff等人,1994,Hum.Mutat.4:178-194)。

[0278] 根据一些实施方案,LNP包含ApoE多肽或其片段。根据一些实施方案,ApoE多肽的长度为30个氨基酸。根据一些实施方案,ApoE多肽包含如以下SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列:

[0279] EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGGC(SEQ ID NO:1)

[0280] EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGG(SEQ ID NO:3)

[0281] 根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少80%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少80%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少81%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少82%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少83%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少84%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少85%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少86%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少87%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少88%的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID

NO:1或SEQ ID NO:3具有至少89％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少90％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少91％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少92％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少93％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少94％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少95％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少96％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少97％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少98％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少99％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoE多肽由SEQ ID NO:1或由SEQ ID NO:3组成。根据一些实施方案,ApoE多肽包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3,其中ApoE多肽能够结合LDL受体。根据一些实施方案,ApoE多肽包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3,其中ApoE多肽能够结合LDL受体并将LNP内化到细胞中。根据一些实施方案,与LNP连接的ApoE多肽是SEQ ID NO:1中所示的EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGGC片段或SEQ ID NO:3中所示的EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGG片段,其中该片段能够结合到LDL受体。根据一些实施方案,与LNP连接的ApoE多肽是SEQ ID NO:1中所示的EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGGC片段或SEQ ID NO:3中所示的EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGG片段,其中该片段能够结合到LDL受体并将LNP内化到细胞中。

[0282] 根据一些实施方案,LNP包含ApoB多肽或其片段。根据一些实施方案,ApoB多肽的长度为30个氨基酸。根据一些实施方案,ApoB多肽包含如以下SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列:

[0283] SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC(SEQ ID NO:2)

[0284] SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGG(SEQ ID NO:4)

[0285] 根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列具有至少80％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列具有至少80％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少81％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少82％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少83％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少84％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少85％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少86％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少87％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少88％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少89％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少90％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少91％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少92％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID

NO:2或SEQ ID NO:4具有至少93％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少94％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少95％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少96％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少97％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少98％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少99％的序列相似性。根据一些实施方案,ApoB多肽由SEQ ID NO:2或由SEQ ID NO:4组成。根据一些实施方案,ApoB多肽包含SEQ ID NO:2,其中ApoB多肽能够结合LDL受体。根据一些实施方案,ApoB多肽包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4,其中ApoB多肽能够结合LDL受体并将LNP内化到细胞中。根据一些实施方案,与LNP连接的ApoB多肽是SEQ ID NO:2中所示的SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC片段或SEQ ID NO:4中所示的SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGG片段,其中该片段能够结合到LDL受体。根据一些实施方案,与LNP连接的ApoB多肽是SEQ ID NO:2中所示的SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC片段或SEQ ID NO:4中所示的SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGGC片段,其中该片段能够结合到LDL受体并将LNP内化到细胞内。

[0286] 本文所述的LNP提供了许多治疗优点,包括可以包封大的治疗性核酸分子的较小尺寸。本发明的有利特征在于,如本文所述的ApoE连接的LNP或ApoB连接的LNP可用于将LNP递送至主动表达LDLR的任何细胞或组织。

[0287] 根据一些实施方案,LNP包含阳离子脂质、甾醇或其衍生物、非阳离子脂质或PEG化脂质。

[0288] A.阳离子脂质

[0289] 在一些实施方案中,平均直径为20nm-74nm的脂质纳米颗粒包含阳离子脂质。在一些实施方案中,阳离子脂质是例如非融合阳离子脂质。“非融合阳离子脂质”是指可以缩合和/或包封核酸货物(诸如ceDNA)但不具有融合活性或具有非常小的融合活性的阳离子脂质。

[0290] 在一些实施方案中,阳离子脂质描述于下表1中列出的国际专利申请公开和美国专利申请公开中,并且确定为非融合的,如例如通过不可渗透膜的荧光染料排斥测定法(例如,本文实施例部分中描述的测定法)所测量。以下表1中列出的所有这些国际专利申请公开和美国专利申请公开的内容通过引用以其全文并入本文。

[0291] 表1.描述阳离子或可离子化脂质的示例性专利文献

[0292]

国际专利申请公开号	美国专利申请公开号
WO2015/095340	US2016/0311759
WO2015/199952	US2015/0376115
WO2018/011633	US2016/0151284
WO2017/049245	US2017/0210697
WO2015/061467	US2015/0140070
WO2012/040184	US2013/0178541
WO2012/000104	US2013/0303587
WO2015/074085	US2015/0141678
WO2016/081029	US2015/0239926
WO2017/004143	US2016/0376224
WO2017/075531	US2017/0119904
WO2017/117528	
WO2011/022460	US2012/0149894
WO2013/148541	US2015/0057373
WO2013/116126	

[0293]

WO2011/153120	US2013/0090372
WO2012/044638	US2013/0274523
WO2012/054365	US2013/0274504
WO2011/090965	US2013/0274504
WO2013/016058	
WO2012/162210	
WO2008/042973	US2009/0023673
WO2010/129709	US2012/0128760
WO2010/144740	US201/003241240
WO2012/099755	US2014/0200257
WO2013/049328	US2015/0203446
WO2013/086322	US2018/0005363
WO2013/086373	US2014/0308304
WO2011/071860	US2013/0338210
WO2009/132131	
WO2010/048536	
WO2010/088537	US2012/0101148
WO2010/054401 WO2010/054406 WO2010/054405	US2012/0027796
WO2010/054384	US2012/0058144
WO2012/016184	US2013/0323269
WO2009/086558	US2011/0117125
WO2010/042877	US2011/0256175
WO2011/000106	US2012/0202871
WO2011/000107	US2011/0076335
WO2005/120152	US2006/0083780
WO2011/141705	US2013/0123338
WO2013/126803	US2015/0064242
WO2006/07712	US2006/0051405
WO2011/038160	US2013/0065939
WO2005/121348	US2006/0008910
WO2011/066651	US2003/0022649
WO2009/127060	US2010/0130588
WO2011/141704	US2013/0116307
WO2006/069782	US2010/0062967
WO2012/031043	US2013/0202684
WO2013/006825	US2014/0141070
WO2013/033563	US2014/0255472
WO2013/089151	US2014/0039032
WO2017/099823	US2018/0028664
WO2015/095346	US2016/0317458
WO2013/086354	US2013/0195920

[0294] 在一些实施方案中,阳离子脂质选自由以下组成的组:N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA);N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP);1,2-二油酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DOCPC);1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DLEPC);1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DMEPC);1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(14:1),N1-[2-((1S)-1-[(3-氨基丙基)氨基]-4-[二(3-氨基丙基)氨基丁基甲酰氨基乙酯]-1,3,4-二[油烯基氧基]-苯甲酰胺(MVL5);双十八烷基胺基甘氨酰精胺(DOGS);3b-[N-(N',N'-二甲基氨基乙基)氨基甲酰基]胆固醇(Dc-Chol);双十八烷基二甲基溴化铵(DDAB);圣脂质(例如,SAINT-2,N-甲基1-4-(二油基)甲基吡啶鎓);1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-二甲基羟乙基溴化铵(DMRIE);1,2-二油基1,3-二甲基-羟乙基溴化铵(DORIE);1,2二油基氧基丙基-3-二甲基羟乙基氯化铵(DORI);二烷基化氨基酸

(DILA2)(例如,C18:1-norArg-C16);二油基二甲基氯化铵(DODAC);1-棕榈酰-2-油酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(POEPC);以及1,2-二肉豆蔻酰油酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(MOEPC)。在一些变型中,缩合剂(例如阳离子脂质)是脂质,诸如双十八烷基二甲基溴化铵(DDAB)、1,2-二亚油基氧基-3-二甲氨基丙烷(DLinDMA)、2,2-二亚油基1-4-(2二甲氨基乙基)-[1,31-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、三十七-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA)、1,2-二油酰氧基-3-二甲氨基丙烷(DODAP)、1,2-二油酰氧基-3-二甲氨基丙烷(DODMA)、吗啉胆固醇(Mo-CHOL)、(R)-5-(二甲基氨基)戊烷-1,2-二油酸二酯盐酸盐(DODAPen-C1)、(R)-5-胍基戊烷-1,2-二油酸二酯盐酸盐(DOPen-G)、(R)-N,N,N-三甲基-4,5-双(油酰氧基)戊-1-氯化铵(DOTAPen)。

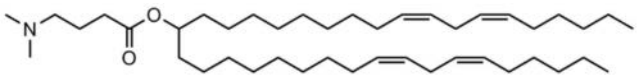
[0295] 在一些实施方案中,缩合脂质是DOTAP。

[0296] 可离子化脂质

[0297] 根据一些实施方案,本文还提供了含有LNP的药物组合物,该LNP包含可离子化脂质和治疗性核苷酸如非病毒载体(例如,ceDNA)。如本文所述,此类LNP可用于将例如包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA)的药物组合物递送至感兴趣位点(例如,细胞、组织、器官等),其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段。

[0298] 示例性可离子化脂质描述于国际PCT专利公开WO2015/095340、WO2015/199952、WO2018/011633、WO2017/049245、WO2015/061467、WO2012/040184、WO2012/000104、WO2015/074085、WO2016/081029、WO2017/004143、WO2017/075531、WO2017/117528、WO2011/022460、WO2013/148541、WO2013/116126、WO2011/153120、WO2012/044638、WO2012/054365、WO2011/090965、WO2013/016058、WO2012/162210、WO2008/042973、WO2010/129709、WO2010/144740、WO2012/099755、WO2013/049328、WO2013/086322、WO2013/086373、WO2011/071860、WO2009/132131、WO2010/048536、WO2010/088537、WO2010/054401、WO2010/054406、WO2010/054405、WO2010/054384、WO2012/016184、WO2009/086558、WO2010/042877、WO2011/000106、WO2011/000107、WO2005/120152、WO2011/141705、WO2013/126803、WO2006/007712、WO2011/038160、WO2005/121348、WO2011/066651、WO2009/127060、WO2011/141704、WO2006/069782、WO2012/031043、WO2013/006825、WO2013/033563、WO2013/089151、WO2017/099823、WO2015/095346和WO2013/086354;以及美国专利公开US2016/0311759、US2015/0376115、US2016/0151284、US2017/0210697、US2015/0140070、US2013/0178541、US2013/0303587、US2015/0141678、US2015/0239926、US2016/0376224、US2017/0119904、US2012/0149894、US2015/0057373、US2013/0090372、US2013/0274523、US2013/0274504、US2013/0274504、US2009/0023673、US2012/0128760、US2010/0324120、US2014/0200257、US2015/0203446、US2018/0005363、US2014/0308304、US2013/0338210、US2012/0101148、US2012/0027796、US2012/0058144、US2013/0323269、US2011/0117125、US2011/0256175、US2012/0202871、US2011/0076335、US2006/0083780、US2013/0123338、US2015/0064242、US2006/0051405、US2013/0065939、US2006/0008910、US2003/0022649、US2010/0130588、US2013/0116307、US2010/0062967、US2013/0202684、US2014/0141070、US2014/0255472、US2014/0039032、US2018/0028664、US2016/0317458和US2013/0195920,这些文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0299] 在一些实施方案中,可离子化脂质为具有以下结构的MC3(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA或MC3):

[0300] 

DLin-M-C3-DMA ("MC3")

[0301] 脂质DLin-MC3-DMA描述于Jayaraman等人,Angew.Chem.Int.Ed Engl.(2012),51(34):8529-8533,其内容以全文引用的方式并入本文。

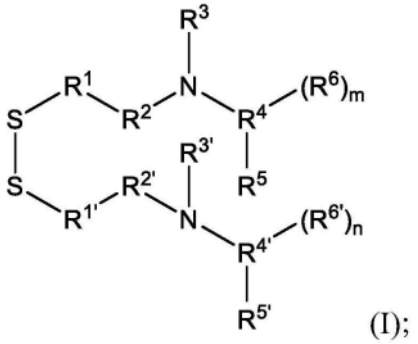
[0302] 在一些实施方案中,可离子化脂质是如WO2015/074085(其内容以全文引用的方式并入本文)中所述的脂质ATX-002。

[0303] 在一些实施方案中,可离子化脂质是如WO2012/040184(其内容以全文引用的方式并入本文)中所述的(13Z,16Z)-N,N-二甲基-3-壬基二十二碳-13,16-二烯-1-胺(化合物32)。

[0304] 在一些实施方案中,可离子化脂质是如WO2015/199952(其内容以全文引用的方式并入本文)中所述的化合物6或化合物22。

[0305] 式(I)

[0306] 根据一些实施方案,可离子化脂质由式(I)表示:

[0307] 

(I);

[0308] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0309] R^1和$R^{1'}$各自独立地为C_{1-3}亚烷基;

[0310] R^2和$R^{2'}$各自独立地为直链或支链的C_{1-6}亚烷基,或C_{3-6}亚环烷基;

[0311] R^3和$R^{3'}$各自独立地为任选取代的C_{1-6}烷基或任选取代的C_{3-6}环烷基;

[0312] 或可替代地,当R^2是支链C_{1-6}亚烷基并且当R^3是C_{1-6}烷基时,R^2和R^3与它们的居间N原子一起形成4元至8元杂环基;

[0313] 或可替代地,当$R^{2'}$是支链C_{1-6}亚烷基并且当$R^{3'}$是C_{1-6}烷基时,$R^{2'}$和$R^{3'}$与它们的居间N原子一起形成4元至8元杂环基;

[0314] R^4和$R^{4'}$各自独立地为-CH、$-CH_2CH$或$-(CH_2)_2CH$;

[0315] R^5和$R^{5'}$各自独立地为氢气、C_{1-20}亚烷基或C_{2-20}亚烯基;

[0316] R^6和$R^{6'}$每次出现时独立地为C_{1-20}亚烷基、C_{3-20}亚环烷基或C_{2-20}亚烯基;并且

[0317] M和n各自独立地是选自1、2、3、4和5的整数。

[0318] 根据本文的任何方面或实施方案中的一些实施方案,R^2和$R^{2'}$各自独立地为C_{1-3}亚烷基。

[0319] 根据本文的任何方面或实施方案中的一些实施方案,由R^1或$R^{1'}$表示的该直链或支链C_{1-3}亚烷基、由R^2或$R^{2'}$表示的该直链或支链C_{1-6}亚烷基和任选取代的直链或支链C_{1-6}烷基各自为任选地被一个或多个卤代基和氰基取代。

[0320] 根据本文的任何方面或实施方案中的一些实施方案，R^1和R^2合在一起是C_{1-3}亚烷基，并且$R^{1'}$和$R^{2'}$合在一起是C_{1-3}亚烷基，例如亚乙基。

[0321] 根据本文的任何方面或实施方案中的一些实施方案，R^3和$R^{3'}$各自独立地为任选取代的C_{1-3}烷基，例如甲基。

[0322] 根据本文的任何方面或实施方案中的一些实施方案，R^4和$R^{4'}$各自为-CH。

[0323] 根据本文的任何方面或实施方案中的一些实施方案，R^2为任选取代的支链C_{1-6}亚烷基。并且R^2和R^3与它们的居间N原子一起形成5元或6元杂环基。根据本文的任何方面或实施方案的一些实施方案，R^2为任选取代的支链C_{1-6}亚烷基；并且R^2和R^3与它们的居间N原子一起形成5元或6元杂环基，诸如吡咯烷基或哌啶基。

[0324] 根据本文的任何方面或实施方案中的一些实施方案，R^4为$-C(R^a)_2CR^a$或$-[C(R^a)_2]_2CR^a$且R^a为C_{1-3}烷基；并且R^3和R^4与它们的居间N原子一起形成5元或6元杂环基。根据本文的任何方面或实施方案中的一些实施方案，R^4为$-C(R^a)_2CR^a$或$-[C(R^a)_2]_2CR^a$且R^a是C_{1-3}烷基；R^3和R^4与它们插入的N原子一起形成5元或6元杂环基，诸如吡咯烷基或哌啶基。

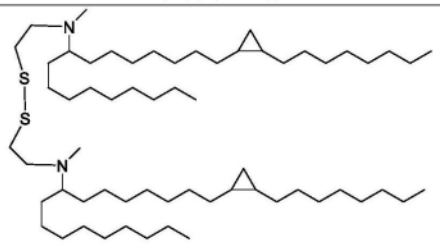
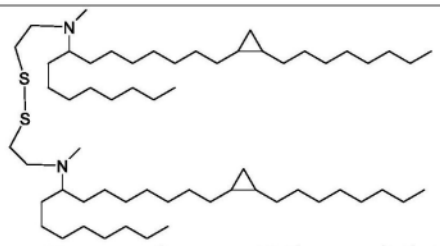
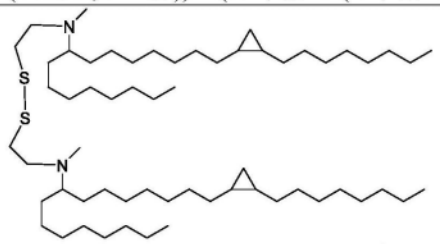
[0325] 根据本文的任何方面或实施方案中的一些实施方案，R^5和$R^{5'}$各自独立地为C_{1-10}亚烷基或C_{2-10}亚烯基。在一个实施方案中，R^5和$R^{5'}$各自独立地为C_{1-8}亚烷基或C_{1-6}亚烷基。

[0326] 根据本文的任何方面或实施方案中的一些实施方案，R^6和$R^{6'}$在每次出现时独立地为C_{1-10}亚烷基、C_{3-10}亚环烷基或C_{2-10}亚烯基。在一个实施方案中，C_{1-6}亚烷基、C_{3-6}亚环烷基或C_{2-6}亚烯基。在一个实施方案中，该C_{3-10}、亚环烷基或该C_{3-6}亚环烷基是亚环丙基。根据本文的任何方面或实施方案中的一些实施方案，m和n各为3。

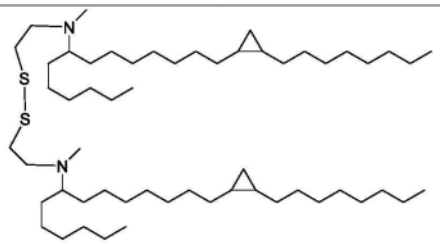
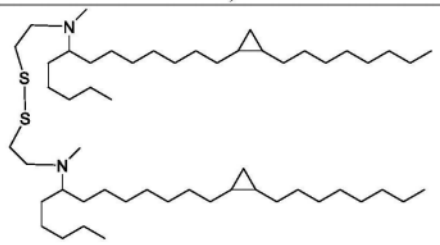
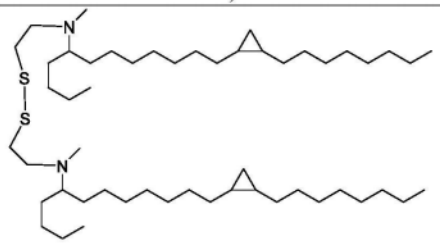
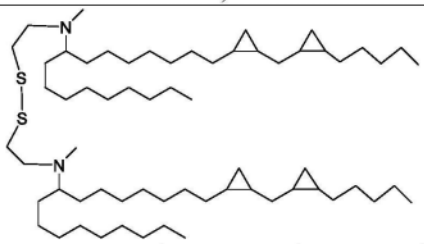
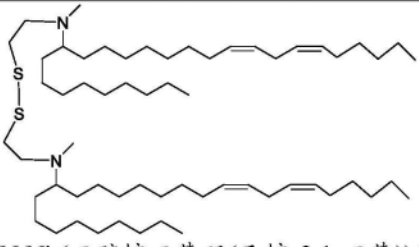
[0327] 根据本文的任何方面或实施方案中的一些实施方案，可离子化脂质选自表2中的任一种脂质或其药学上可接受的盐。

[0328] 表2.式(I)的示例性可离子化脂质

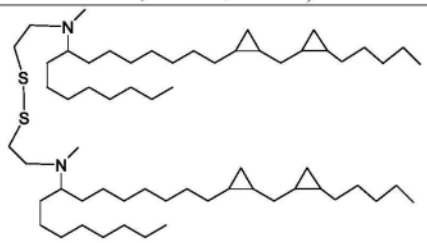
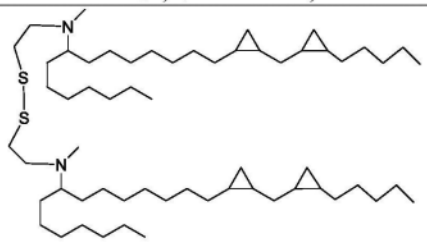
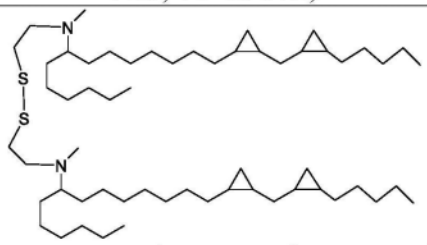
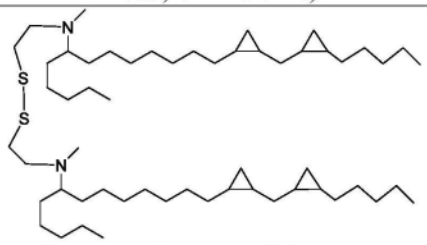
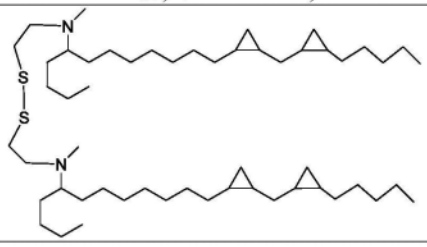
[0329]

脂质编号	结构和名称
1	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-1-(2-辛基环丙基)十七烷-8-胺)
2	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-1-(2-辛基环丙基)十六烷-8-胺)
3	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-1-(2-辛基环丙基)十六烷-8-胺)

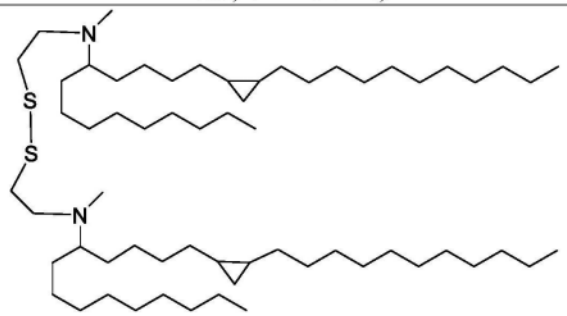
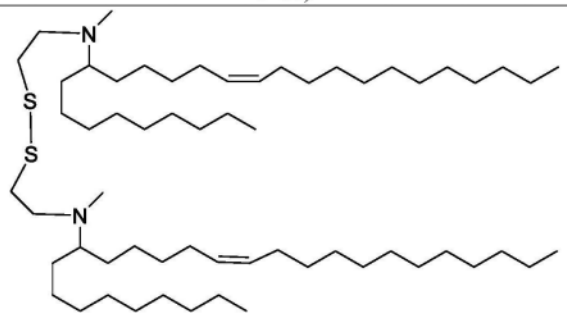
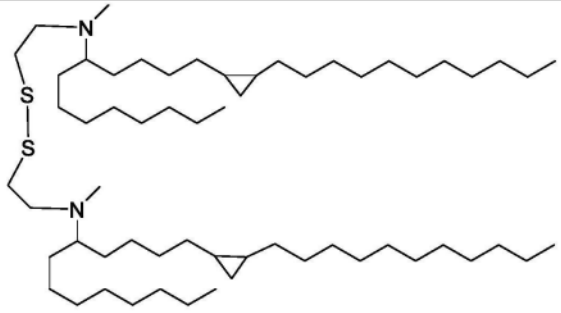
[0330]

4	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-14-(2-辛基环丙基)十四烷-7-胺)
5	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-13-(2-辛基环丙基)十三烷-6-胺)
6	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-12-(2-辛基环丙基)十二烷-5-胺)
7	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-1-(2-((2-戊基环丙基)甲基)环丙基)十七烷-8-胺)
8	 (18Z,18'Z,21Z,21'Z)-N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基二十七碳-

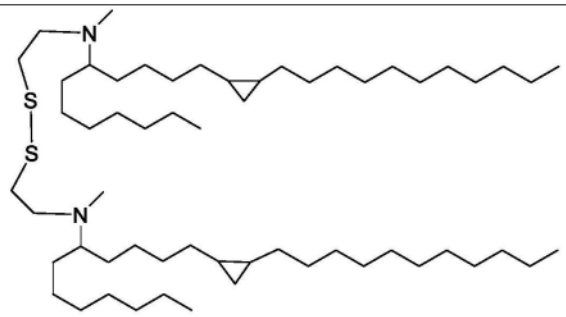
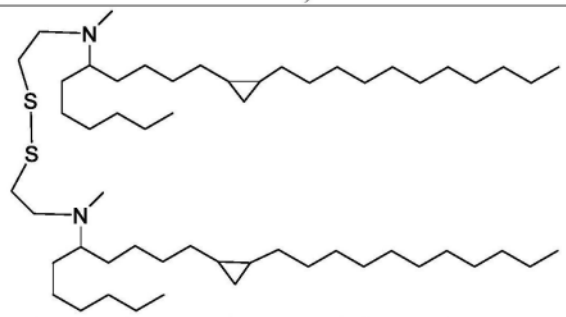
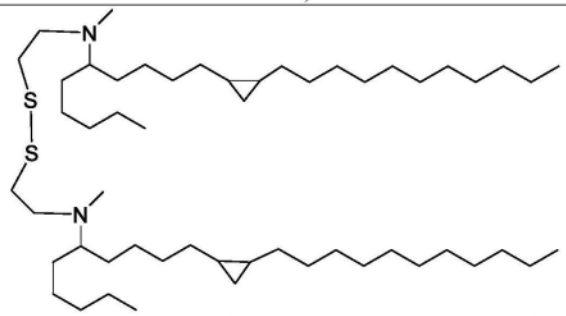
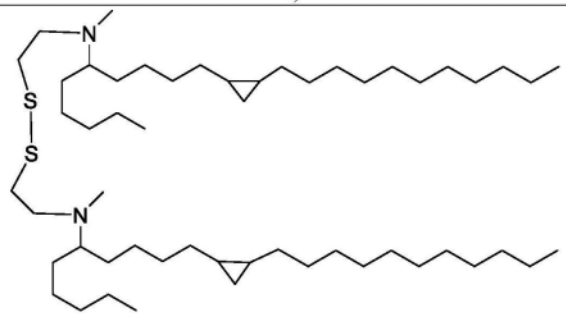
[0331]

	18,21-二烯-10-胺)
9	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-1-(2-((2-戊基环丙基)甲基)环丙基)十六烷-8-胺)
10	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-1-(2-((2-戊基环丙基)甲基)环丙基)十五烷-8-胺)
11	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-14-(2-((2-戊基环丙基)甲基)环丙基)十四烷-7-胺)
12	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-13-(2-((2-戊基环丙基)甲基)环丙基)十三烷-6-胺)
13	

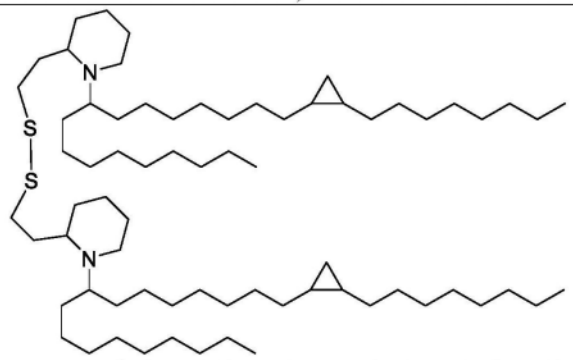
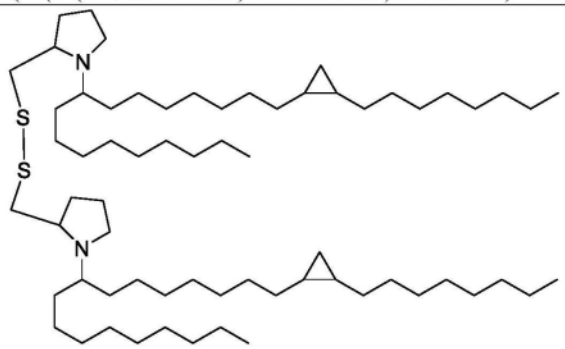
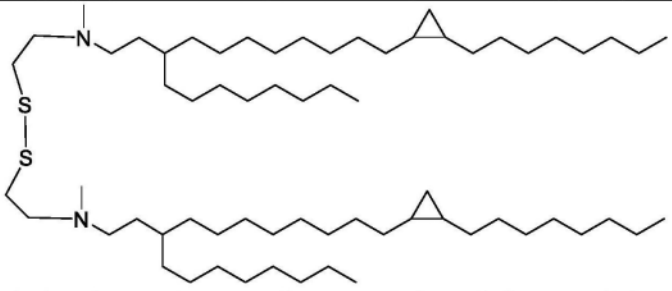
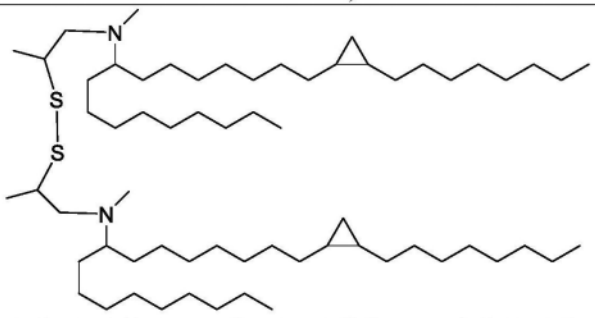
[0332]

	N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-12-(2-((2-戊基环丙基)甲基)环丙基)十二烷-5-胺)
14	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-1-(2-十一烷基环丙基)十四烷-5-胺)
15	 (15Z,15'Z)-N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基二十七碳-15-烯-10-胺)
16	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-1-(2-十一烷基环丙基)十三烷-5-胺)

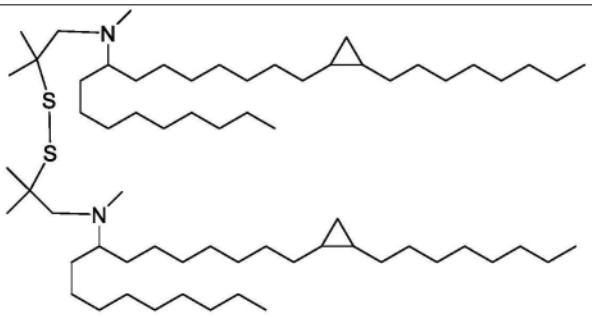
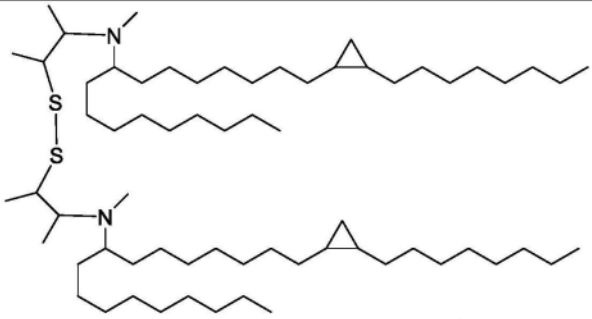
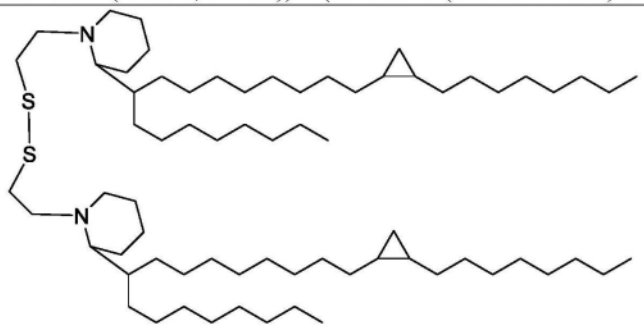
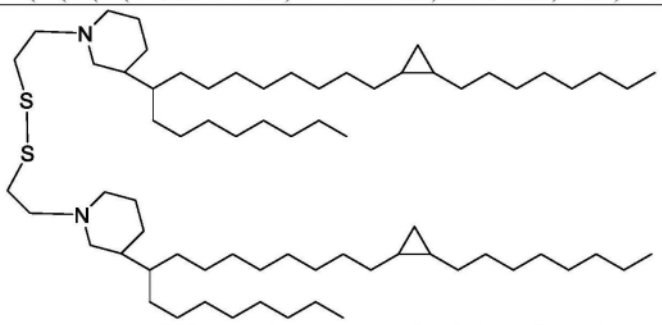
[0333]

17	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-1-(2-十一烷基环丙基)十二烷-5-胺)
18	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-1-(2-十一烷基环丙基)十一烷-5-胺)
19	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-1-(2-十一烷基环丙基)癸烷-5-胺)
20	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-1-(2-十一烷基环丙基)癸烷-5-

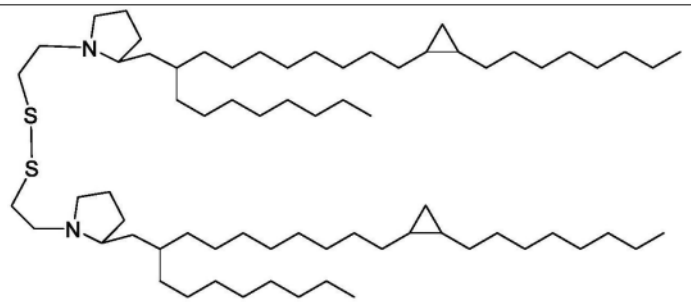
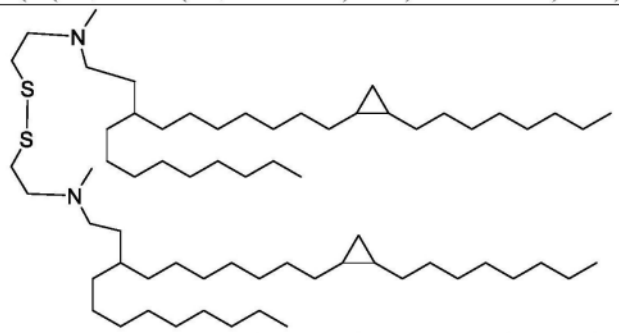
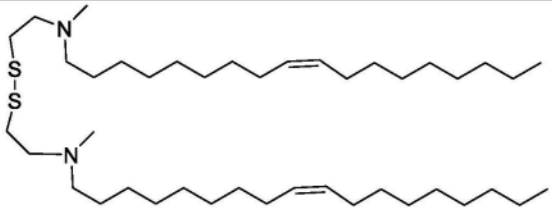
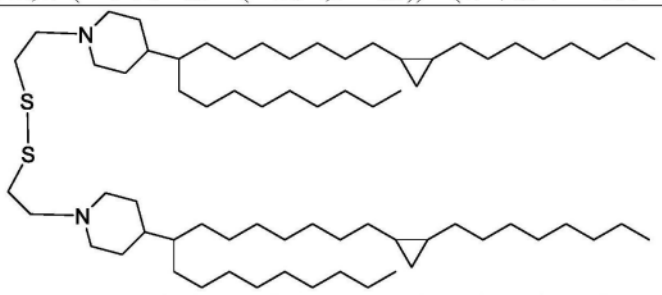
[0334]

	胺)
21	 1,2-双(2-(1-(1-(2-辛基环丙基)十七烷-8-基)哌啶-2-基)乙基)二硫烷
22	 1,2-双((1-(1-(2-辛基环丙基)十七烷-8-基)吡咯烷-2-基)甲基)二硫烷
23	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-3-辛基-11-(2-辛基环丙基)十一烷-1-胺)
24	 N,N'-(二硫烷二基双(丙烷-2,1-二基))双(N-甲基-1-(2-辛基环丙基)十七烷-9-胺)

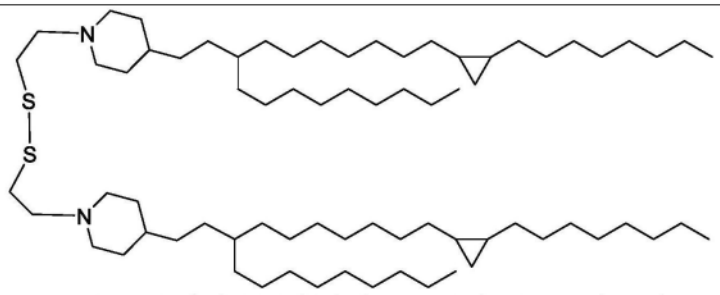
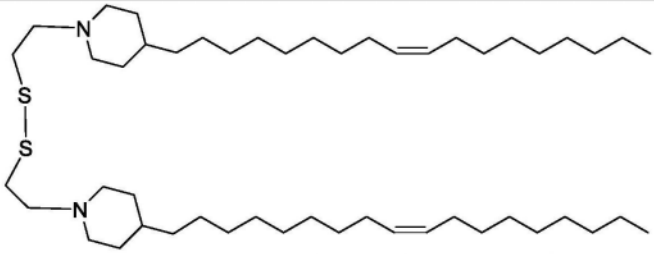
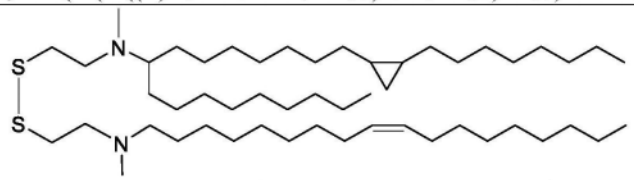
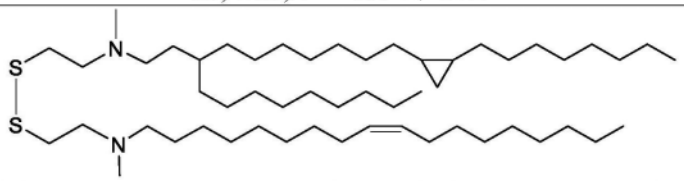
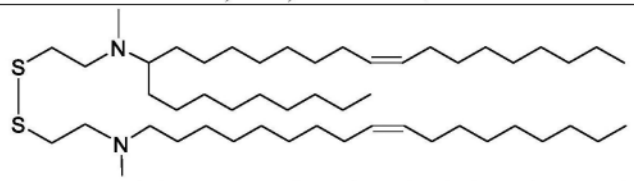
[0335]

25	 N,N'-(二硫烷二基双(2-甲基丙烷-2,1-二基))双(N-甲基-1-(2-辛基环丙基)十七烷-8-胺)
26	 N,N'-(二硫烷二基双(丁烷-3,2-二基))双(N-甲基-1-(2-辛基环丙基)十七烷-8-胺)
27	 1,2-双(2-(2-(1-(2-辛基环丙基)十七烷-9-基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷
28	 1,2-双(2-(3-(1-(2-辛基环丙基)十七烷-9-基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷

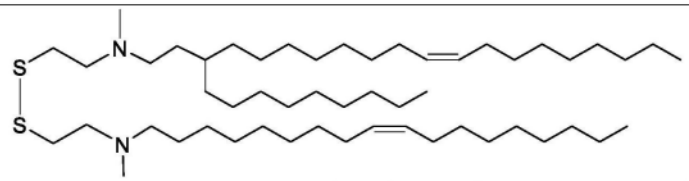
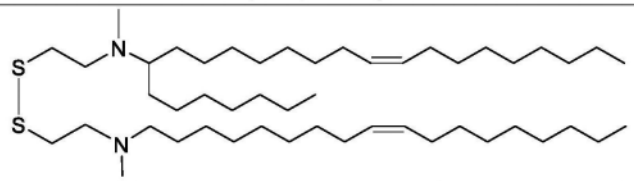
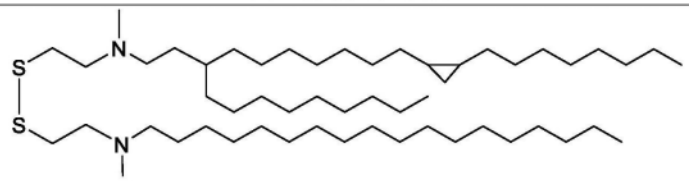
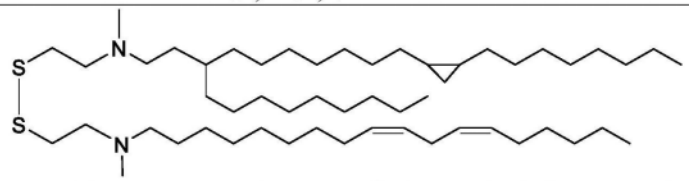
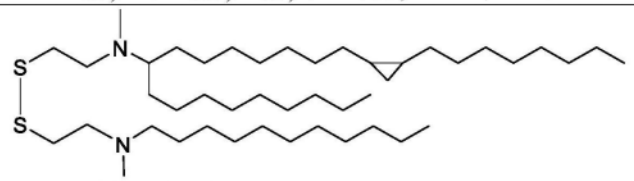
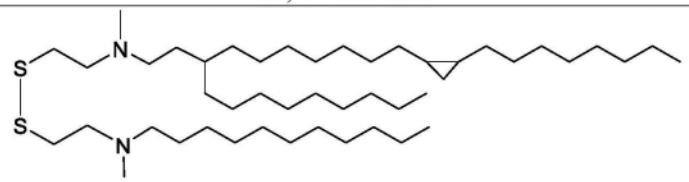
[0336]

29	 1,2-双(2-(2-(2-辛基-10-(2-辛基环丙基)癸基)吡咯烷-1-基)乙基)二硫烷
30	 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基-3-(7-(2-辛基环丙基)庚基)十二烷-1-胺)
31	 (9Z,9'Z)-N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(N-甲基十八碳-9-烯-1-胺)
32	 1,2-双(2-(4-(1-(2-辛基环丙基)十七烷-8-基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷

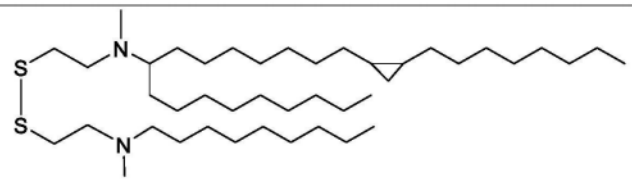
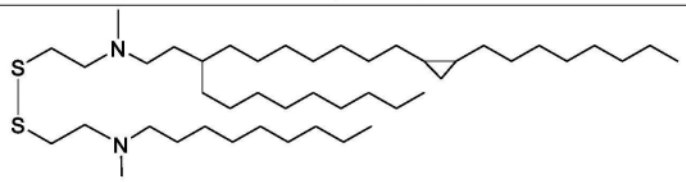
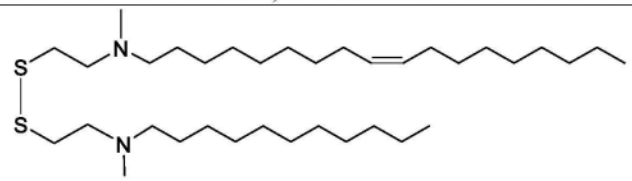
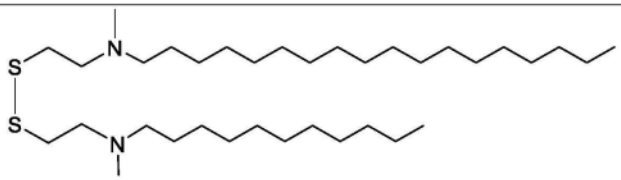
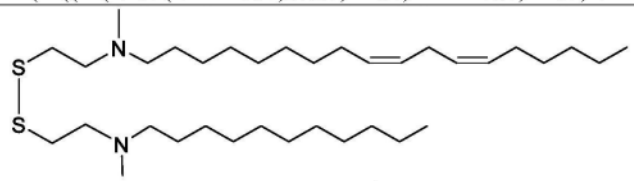
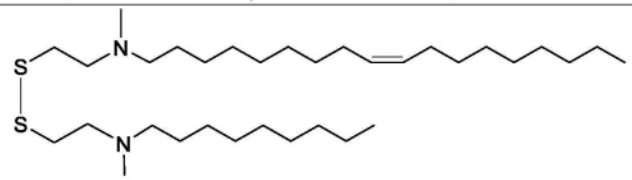
[0337]

33	 1,2-双(2-(4-(3-(7-(2-辛基环丙基)庚基)十二烷基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷
34	 1,2-双(2-(4-((Z)-十八碳-9-烯-1-基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷
35	 (Z)-N-甲基-N-(2-((2-(甲基(1-(2-辛基环丙基)十七烷-8-基)氨基)乙基)二硫烷基)乙基)十八碳-9-烯-1-胺
36	 (Z)-N-甲基-N-(2-((2-(甲基(3-(7-(2-辛基环丙基)庚基)十二烷基)氨基)乙基)二硫烷基)乙基)十八碳-9-烯-1-胺
37	 (Z)-N-甲基-N-(2-((2-(甲基((Z)-十八碳-9-烯-1-基)氨基)乙基)二硫烷基)乙基)二十七碳-18-烯-10-胺

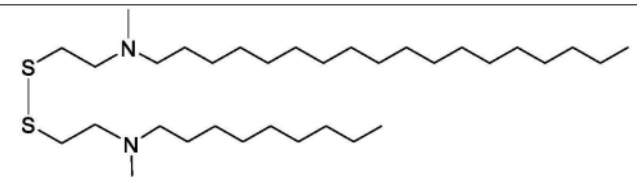
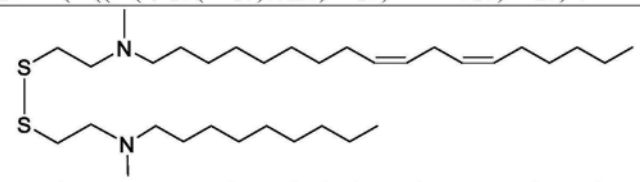
[0338]

38	 (Z)-N-甲基-N-(2-((2-(甲基((Z)-十八碳-9-烯-1-基)氨基)乙基)二硫烷基)乙基)-3-二十九碳-11-烯-1-胺
39	 (Z)-N-甲基-N-(2-((2-(甲基((Z)-十八碳-9-烯-1-基)氨基)乙基)二硫烷基)乙基)二十五碳-16-烯-8-胺
40	 N-甲基-N-(2-((2-(甲基(3-(7-(2-辛基环丙基)庚基)十二烷基)氨基)乙基)二硫烷基)乙基)十八烷-1-胺
41	 (9Z,12Z)-N-甲基-N-(2-((2-(甲基(3-(7-(2-辛基环丙基)庚基)十二烷基)氨基)乙基)二硫烷基)乙基)十八碳-9,12-二烯-1-胺
42	 N-甲基-N-(2-((2-(甲基(十一烷基)氨基)乙基)二硫烷基)乙基)-1-(2-辛基环丙基)十七烷-8-胺
43	 N-甲基-N-(2-((2-(甲基(十一烷基)氨基)乙基)二硫烷基)乙基)-3-(7-(2-辛基环丙基)庚基)十二烷-1-胺

[0339]

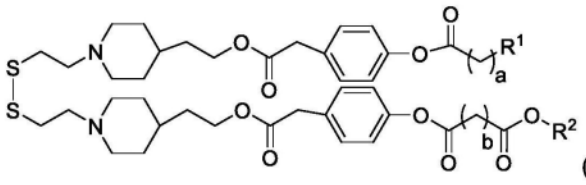
44	 N-甲基-N-(2-((2-(甲基(壬基)氨基)乙基)二硫烷基)乙基)-1-(2-辛基环丙基)十七烷-8-胺
45	 N-甲基-N-(2-((2-(甲基(壬基)氨基)乙基)二硫烷基)乙基)-3-(7-(2-辛基环丙基)庚基)十二烷-1-胺
46	 (Z)-N-甲基-N-(2-((2-(甲基(十一烷基)氨基)乙基)二硫烷基)乙基)十八碳-9-烯-1-胺
47	 N-甲基-N-(2-((2-(甲基(十一烷基)氨基)乙基)二硫烷基)乙基)十八烷-1-胺
48	 (9Z,12Z)-N-甲基-N-(2-((2-(甲基(十一烷基)氨基)乙基)二硫烷基)乙基)十八碳-9,12-二烯-1-胺
49	 (Z)-N-甲基-N-(2-((2-(甲基(壬基)氨基)乙基)二硫烷基)乙基)十八碳-9-烯-1-胺

[0340]

50	 N-甲基-N-(2-((2-(甲基(壬基)氨基)乙基)二硫烷基)乙基)十八烷-1-胺
51	 (9Z,12Z)-N-甲基-N-(2-((2-(甲基(壬基)氨基)乙基)二硫烷基)乙基)十八碳-9,12-二烯-1-胺

[0341] 式(II)

[0342] 在一些方面,可离子化脂质具有式(II):

[0343]  (XII);

[0344] 或其药学上可接受的盐,其中:

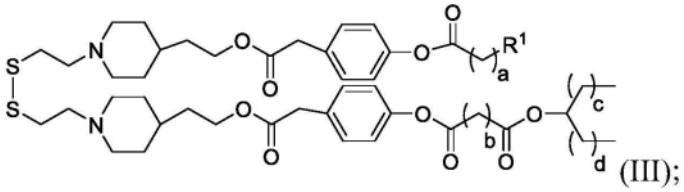
[0345] a为1至20的整数(例如,a为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20);

[0346] b为2至10的整数(例如,b是2、3、4、5、6、7、8、9或10);

[0347] R^1不存在或选自(C_2-C_{20})烯基、-C(O)O(C_2-C_{20})烷基和被(C_2-C_{20})烷基取代的环丙基;并且

[0348] R^2为(C_2-C_{20})烷基。

[0349] 在第二化学实施方案中,式(II)的可离子化脂质具有式(XIII):

[0350]  (III);

[0351] 或其药学上可接受的盐,其中c和d各自独立地为1至8范围内的整数(例如,1、2、3、4、5、6、7或8),并且其中其余变量如针对式(XII)所述。

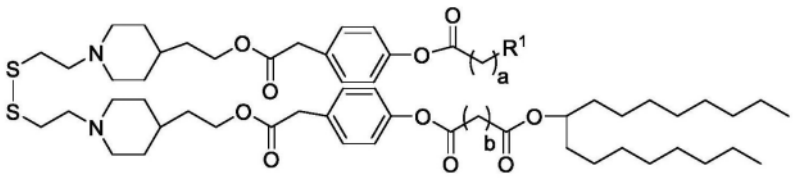
[0352] 在第三化学实施方案中,式(II)或式(III)的可离子化脂质中的c和d各自独立地为2至8、3至8、3至7、3至6、3至5、4至8、4至7、4至6、5至8、5至7或6至8范围内的整数,其中其余变量如针对式(XII)所述。

[0353] 在第四化学实施方案中,式(II)或式(III)的可离子化脂质中的c为2、3、4、5、6、7或8,其中其余变量如针对式(XII)或第二或第三化学实施方案所述。可替代地,作为第四化学实施方案的一部分,式(XII)或式(XIII)的可离子化脂质或其药学上可接受的盐中的c和d各自独立地为1、3、5或7,其中其余变量如针对式(XII)或第二或第三化学实施方案所述。

[0354] 在第五化学实施方案中,式(II)或式(III)的可离子化脂质中的d为2、3、4、5、6、7

或8,其中其余变量如针对式(II)或第二或第三或第四化学实施方案所述。可替代地,作为第四化学实施方案的一部分,式(II)或式(III)的可离子化脂质或其药学上可接受的盐中的c和d中的至少一者为7,其中其余变量如针对式(II)或第二或第三或第四化学实施方案所述。

[0355] 在第六化学实施方案中,式(II)或式(III)的可离子化脂质具有式(IV):

[0356] 

(IV);

[0357] 或其药学上可接受的盐,其中其余变量如针对式(I)所述。

[0358] 在第七化学实施方案中,式(II)、式(III)或式(IV)的可离子化脂质中的b为3至9的整数,其中其余变量如针对式(II)或第二、第三、第四或第五化学实施方案所述。可替代地,作为第七化学实施方案的一部分,式(II)、式(III)或式(IV)的可离子化脂质中的b为3至8、3至7、3至6、3至5、4至9、4至8、4至7、4至6、5至9、5至8、5至7、6至9、6至8或7至9范围内的整数,其中其余变量如针对式(II)或第二、第三、第四或第五化学实施方案所述。在另一个替代方案中,作为第七化学实施方案的一部分,式(II)、式(III)或式(IV)的可离子化脂质中的b为3、4、5、6、7、8或9,其中其余变量如针对式(XII)或第二、第三、第四或第五化学实施方案所述。

[0359] 在第八化学实施方案中,式(II)、式(III)或式(IV)的可离子化脂质中的a为2至18范围内的整数,其中其余变量如针对式(II)或第二、第三、第四、第五或第七化学实施方案所述。可替代地,作为第八实施方案的一部分,式(II)、式(III)或式(IV)的可离子化脂质中的a为2至18、2至17、2至16、2至15、2至14、2至13、2至12、2至11、2至10、2至9、2至8、2至7、2至6、2至5、2至4、3至18、3至17、3至16、3至15、3至14、3至13、3至12、3至11、3至10、3至9、3至8、3至7、3至6、3至5、4至18、4至17、4至16、4至15、4至14、4至13、4至12、4至11、4至10、4至9、4至8、4至7、4至6、5至18、5至17、5至16、5至15、5至14、5至13、5至12、5至11、5至10、5至9、25至8、5至7、6至18、6至17、6至16、6至15、6至14、6至13、6至12、6至11、6至10、6至9、6至8、7至18、7至17、7至16、7至15、7至14、7至13、7至12、7至11、7至10、7至9、8至18、8至17、8至16、8至15、8至14、8至13、8至12、8至11、8至10、9至18、9至17、9至16、9至15、9至14、9至13、9至12、9至11、10至18、10至17、10至16、10至15、10至14、10至13、11至18、11至17、11至16、11至15、11至14、11至13、12至18、12至17、12至16、12至15、12至14、13至18、13至17、13至16、13至15、14至18、14至17、14至16、15至18、15至17或16至18范围内的整数,其中其余变量如针对式(II)或第二、第三、第四、第五或第七化学实施方案所述。在另一个替代方案中,作为第八实施方案的一部分,式(II)、式(III)或式(IV)的可离子化脂质中的a为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18,其中其余变量如针对式(II)或第二、第三、第四、第五或第七化学实施方案所述。

[0360] 在第九化学实施方案中,式(II)、式(III)或式(IV)的可离子化脂质或其药学上可接受的盐中的R^1不存在或选自(C_5-C_{15})烯基、-C(O)O(C_4-C_{18})烷基和被(C_4-C_{16})烷基取代的环丙基,其中其余变量如针对式(II)、式(III)或式(IV)或第二、第三、第四、第五、第七或第

八化学实施方案所述。可替代地,作为第九化学实施方案的一部分,式(II)、式(III)或式(IV)的可离子化脂质或其药学上可接受的盐中的R^1不存在或选自(C_5-C_{15})烯基、-C(O)O(C_4-C_{16})烷基和被(C_4-C_{16})烷基取代的环丙基,其中其余变量如针对式(II)、式(III)或式(IV)或第二、第三、第四、第五、第七或第八化学实施方案所述。可替代地,作为第九化学实施方案的一部分,式(II)、式(III)或式(IV)的可离子化脂质或其药学上可接受的盐中的R^1不存在或选自(C_5-C_{12})烯基、-C(O)O(C_4-C_{12})烷基和被(C_4-C_{12})烷基取代的环丙基,其中其余变量如针对式(II)、式(III)或式(IV)或第二、第三、第四、第五、第七或第八化学实施方案所述。在另一个替代方案中,作为第九化学实施方案的一部分,式(II)、式(III)或式(IV)的可离子化脂质或其药学上可接受的盐中的R^1不存在或选自(C_5-C_{10})烯基、-C(O)O(C_4-C_{10})烷基和经(C_4-C_{10})烷基取代的环丙基,其中其余变量如针对式(II)、式(III)或式(IV)或第二、第三、第四、第五、第七或第八化学实施方案所述。

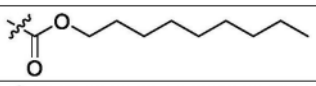
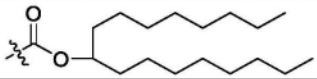
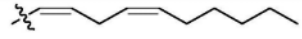
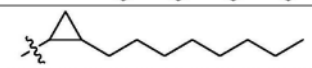
[0361] 在第十化学实施方案中,R^1是C_{10}烯基,其中其余变量如前述实施方案中任一项中所述。

[0362] 在第十一化学实施方案中,式(II)、式(III)或式(IV)的可离子化脂质或其药学上可接受的盐中R^1的C(O)O(C_2-C_{20})烷基、-C(O)O(C_4-C_{18})烷基、-C(O)O(C_4-C_{12})烷基或-C(O)O(C_4-C_{10})烷基中的烷基为无支链烷基,其中其余变量如前述实施方案中任一项中所述。在一个化学实施方案中,R^1为-C(O)O(C_9烷基)。可替代地,在第十一化学实施方案中,式(II)、式(III)或式(IV)的可离子化脂质或其药学上可接受的盐中的R^1的-C(O)O(C_4-C_{18})烷基、-C(O)O(C_4-C_{12})烷基或-C(O)O(C_4-C_{10})烷基中的烷基为支链烷基,其中其余变量如前述化学实施方案中任一项中所述。在一个化学实施方案中,R^1为-C(O)O(C_{17}烷基),其中其余变量如前述化学实施方案中任一项中所述。

[0363] 在第十二化学实施方案中,式(II)、式(III)或式(IV)的可离子化脂质或其药学上可接受的盐中的R^1选自以下表3中所列的任何基团,其中每个基团中的波浪键表示该基团与脂质分子的剩余部分的附接点,并且其中其余变量如针对式(II)、式(III)或式(IV)或第二、第三、第四、第五、第七或第八化学实施方案所述。本公开还考虑表4中的R^1基团中的任一个与表5中的R^2基团中的任一个的组合,其中其余变量如针对式(II)、式(III)或式(IV)或第二、第三、第四、第五、第七或第八化学实施方案所述。

[0364] 表3.式(II)、式(III)或式(IV)中的示例性R^1基团

[0365]

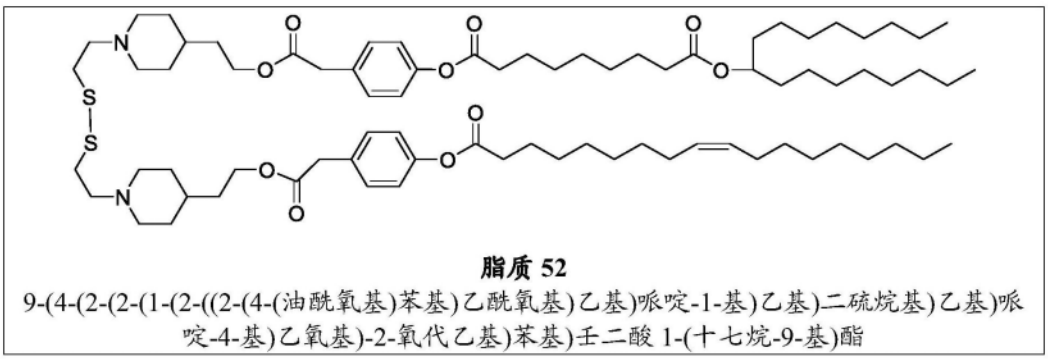
[0366] 在第十三化学实施方案中,式(II)的可离子化脂质或其药学上可接受的盐中的R^2选自以下表4中列出的任何基团,其中每个基团中的波浪键表示该基团与脂质分子的剩余部分的附接点,并且其中其余变量如针对式(II)或第七、第八、第九、第十或第十一化学实施方案所述。

[0367] 表4.式(II)中的示例性R^2基团

[0368] 

[0369] 具体实施例在表5和下文的范例部分中提供,并且作为式(II)的可离子化脂质的第十四化学实施方案的一部分被包括在本文中。还包括药学上可接受的盐以及离子化的和中性形式。

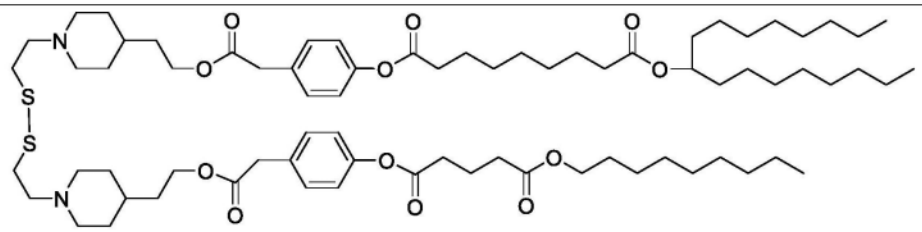
[0370] 表5.式(II)、式(III)或式(IV)的示例性可离子化脂质

[0371] 

脂质 52

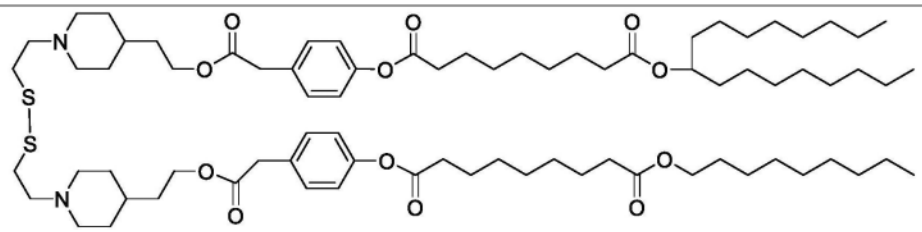
9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸 1-(十七烷-9-基)酯

[0372]



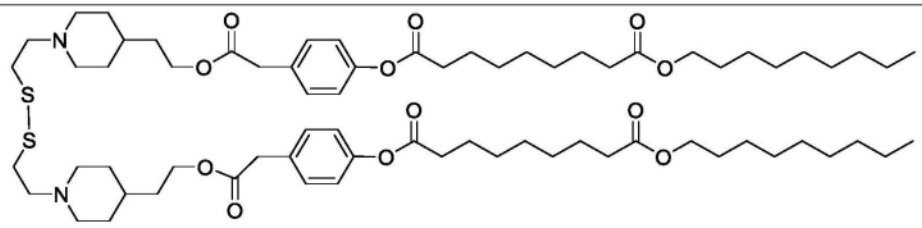
脂质 53

9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((5-(壬氧基)-5-氧代戊酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸 1-(十七烷-9-基)酯



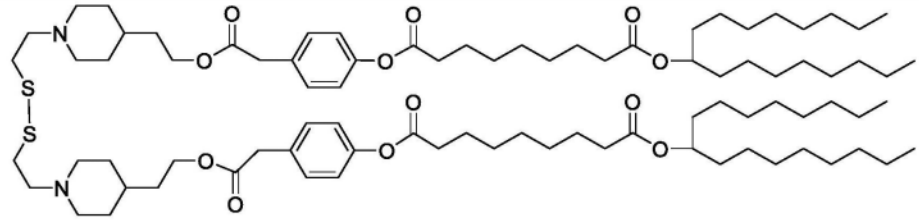
脂质 54

9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((9-(壬氧基)-9-氧代壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸 1-(十七烷-9-基)酯



脂质 55

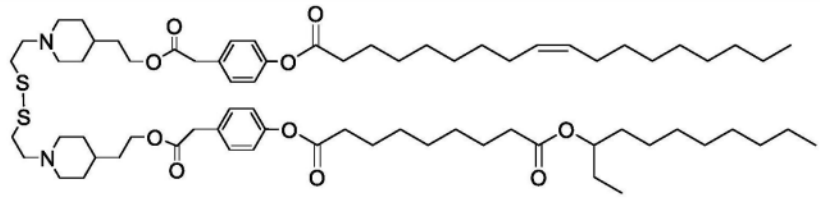
9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((5-(壬氧基)-5-氧代戊酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)(哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸 1-(十七烷-9-基)酯



脂质 56

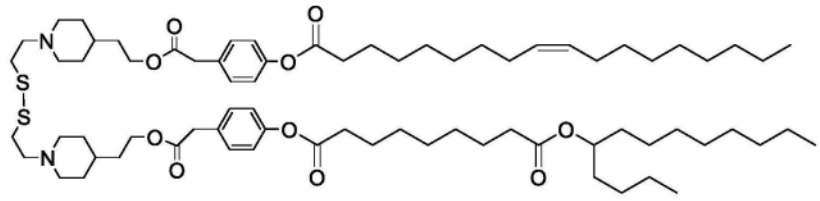
O'1,O1-((((((二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(哌啶-1,4-二基))双(乙烷-2,1-二基))双(氧))双(2-氧代乙烷-2,1-二基))双(4,1-亚苯基))双(壬二酸酯)9,9'-二(十七烷-9-基)二(壬二酸酯)

[0373]



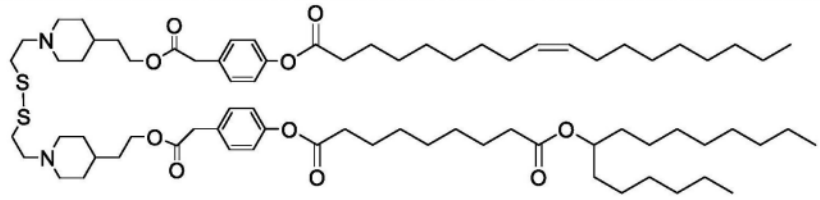
脂质 57

1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-(十一烷-3-基)壬二酸酯



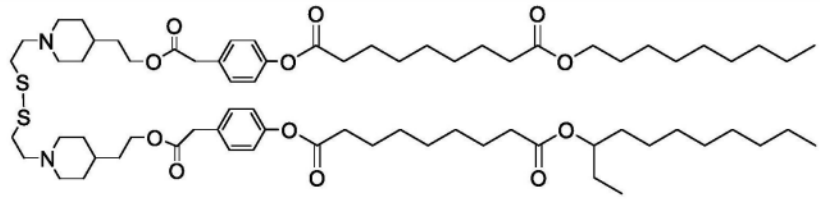
脂质 58

1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-(十三烷-5-基)壬二酸酯



脂质 59

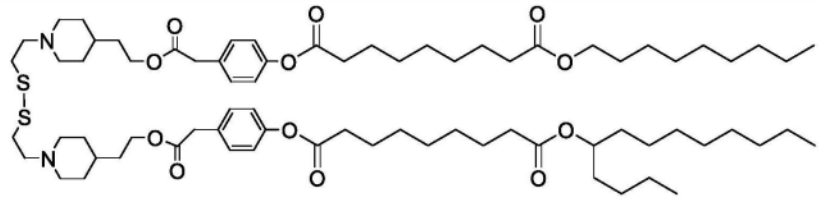
1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-(十五烷-7-基)壬二酸酯



脂质 60

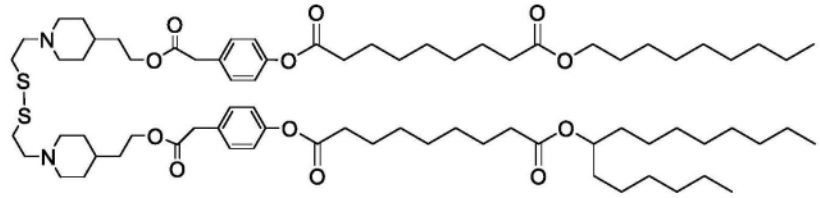
9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(4-((9-氧代-9-(十一烷-3-基氧基)壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)乙基)苯基)壬二酸 1-壬基酯

[0374]



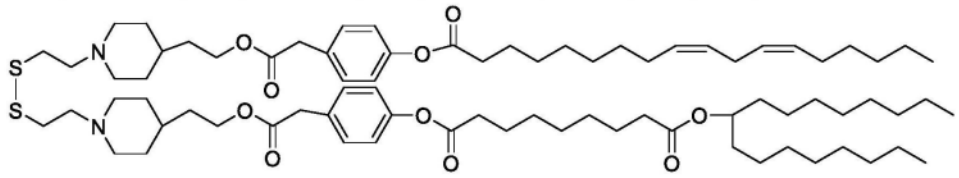
脂质 61

9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-((9-氧代-9-(十三烷-5-基氧基)壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)乙基)苯基)壬二酸 1-壬基酯



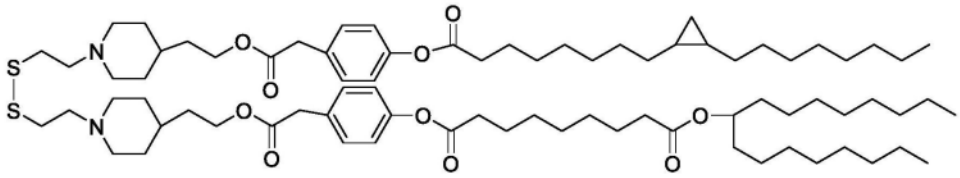
脂质 62

9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-((9-氧代-9-(十五烷-7-基氧基)壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)乙基)苯基)壬二酸 1-壬基酯



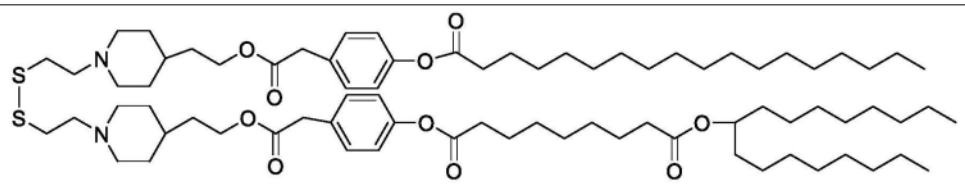
脂质 63

9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(((9Z,12Z)-十八烷基-9,12-二烯酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸 1-(十七烷基-9-基)酯



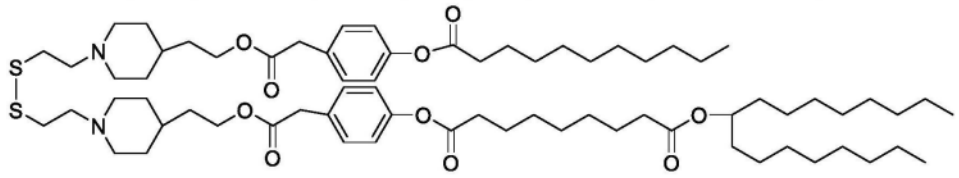
脂质 64

9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-((8-(2-辛基环丙基)辛酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸 1-(十七烷基-9-基)酯



脂质 65

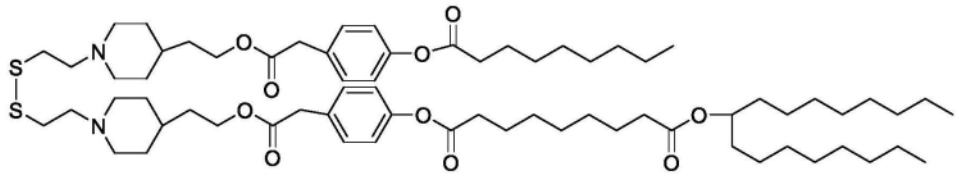
9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-(硬脂酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)乙基)苯基)壬二酸 1-(十七烷基-9-基)酯



脂质 66

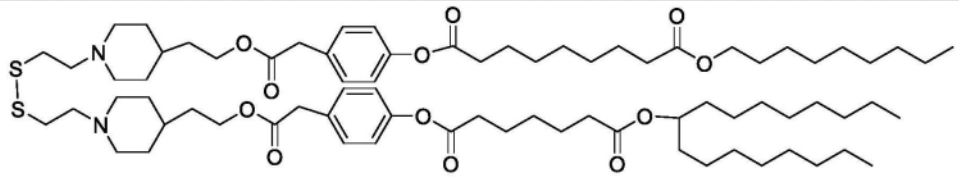
9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-(十一烷酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)乙基)苯基)壬二酸 1-(十七烷-9-基)酯

[0375]



脂质 67

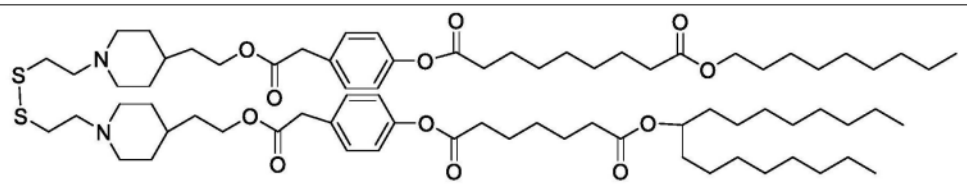
9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(壬酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸 1-(十七烷-9-基)酯



脂质 68

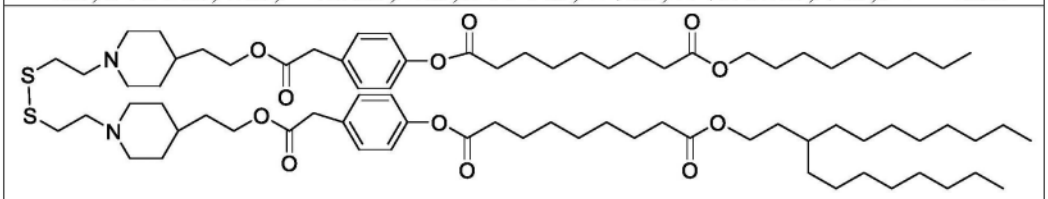
9-(4-(2-(2-(1-(2-(2-(4-(2-(4-((9-((3-辛基十一烷基)氧基)-9-氧代壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸 1-壬基酯

[0376]



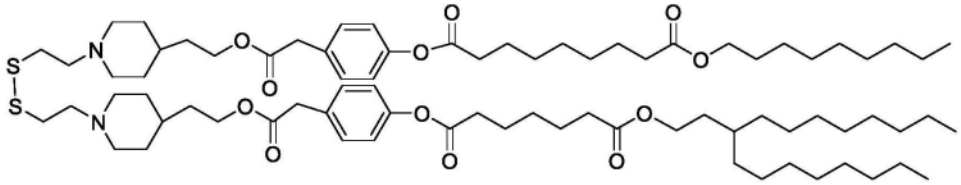
脂质 69

1-(4-(2-(2-(1-(2-(2-(-(2-(4-(2-(4-((7-(十七烷-9-基氧基)-7-氧代壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-壬二酸酯



脂质 70

9-(4-(2-(2-(1-(2-(2-(4-(2-(4-((9-((3-辛基十一烷基)氧基)-9-氧代壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸 1-壬基酯

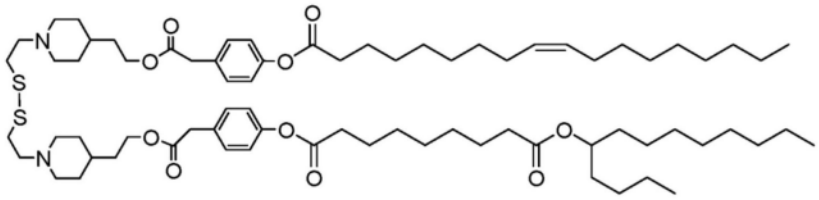


脂质 71

9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(4-((7-((3-辛基十一烷基)氧基)-7-氧代庚酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸 1-壬基酯

[0377] 在一些实施方案中,本公开的脂质纳米颗粒包含1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-(十三烷-5-基)壬二酸酯,以上作为脂质58列出:

[0378]

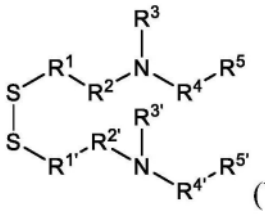


脂质58

[0379] 式(V)

[0380] 在一些方面,可离子化脂质具有式(V):

[0381]



(V);

[0382] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0383] R^1和$R^{1'}$各自独立地为任选被一个或多个选自R^a的组取代的(C_1-C_6)亚烷基；

[0384] R^2和$R^{2'}$各自独立地为(C_1-C_2)亚烷基；

[0385] R^3和$R^{3'}$各自独立地为任选被一个或多个选自R^b的组取代的(C_1-C_6)烷基；

[0386] 或可替代地，R^2和R^3和/或$R^{2'}$和$R^{3'}$与它们的居间N原子一起形成4元至7元杂环基；

[0387] R^4和$R^{4'}$各自为被-C(O)O-中断的(C_2-C_6)亚烷基；

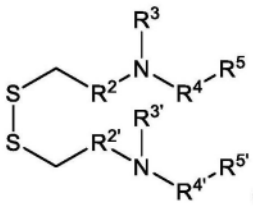
[0388] R^5和$R^{5'}$各自独立地为(C_2-C_{30})烷基或(C_2-C_{30})烯基，它们各自任选地被-C(O)O-或(C_3-C_6)环烷基中断；并且

[0389] R^a和R^b各自为卤素或氰基。

[0390] 在第二个化学方面，式(V)的可离子化脂质中的R^1和$R^{1'}$各自独立地为(C_1-C_6)亚烷基，其中其余变量如上针对式(V)所述。可替代地，作为第二个化学方面的一部分，式(V)的可离子化脂质中的R^1和$R^{1'}$各自独立地为(C_1-C_3)亚烷基，其中其余变量如上文针对式(V)所述。

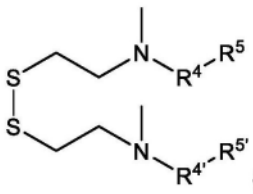
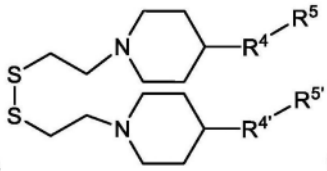
[0391] 在第三个化学方面，式(V)的可离子化脂质具有

[0392] 式(VI)：

[0393] 
(VI);

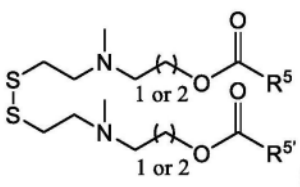
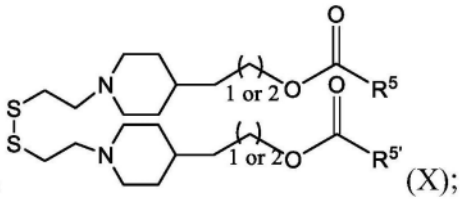
[0394] 或其药学上可接受的盐，其中其余变量如上文针对式(V)所述。

[0395] 在第四个化学方面，式(V)的可离子化脂质具有式(VII)或式(VIII)：

[0396] 
(VII); 或 
(VIII);

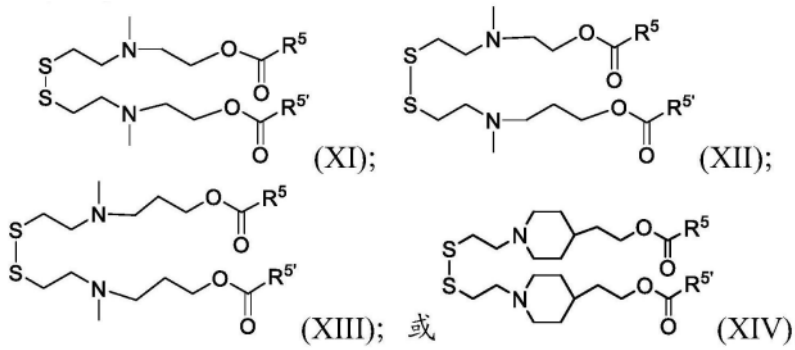
[0397] 或其药学上可接受的盐，其中其余变量如上文针对式(V)所述。

[0398] 在第五个化学方面，式(V)的可离子化脂质具有式(IX)或式(VI)：

[0399] 
(IX); 或 
(X);

[0400] 或其药学上可接受的盐，其中其余变量如上文针对式(V)所述。

[0401] 在第六个化学方面，式(V)的可离子化脂质具有式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)：

[0402] 
(XI); (XII); (XIII); 或 (XIV);

[0403] 或其药学上可接受的盐,其中其余变量如上文针对式(XV)所述。

[0404] 在第七个化学方面中,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的R^5和R^5中的至少一者是支链烷基或支链烯基(如上文针对式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)所述的碳原子数)。在另一个替代方面,作为第七个化学方面的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的R^5和$R^{5'}$中的一者是支链烷基或支链烯基。在另一个替代方面,作为第七个化学方面的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的R^5为支链烷基或支链烯基。在另一个替代方面,作为第七个化学方面的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的$R^{5'}$为支链烷基或支链烯基。

[0405] 在第八个化学方面中,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的R^5是(C_6-C_{26})烷基或(C_6-C_{26})烯基,其各自任选被-C(O)O-或(C_3-C_6)环烷基中断,其中其余变量如上文针对式(I)所述。可替代地,作为第七个化学方面的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的R^5是(C_6-C_{26})烷基或(C_6-C_{26})烯基,其各自任选地被-C(O)O-或(C_3-C_5)环烷基中断,其中其余变量如上文针对式(V)所述。在另一个替代方面,作为第八个化学方面的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的R^5是(C_7-C_{26})烷基或(C_7-C_{26})烯基,其各自任选地被-C(O)O-或(C_3-C_5)环烷基中断,其中其余变量如上文针对式(V)所述。在另一个替代方面,作为第八个化学方面的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的R^5是(C_8-C_{26})烷基或(C_8-C_{26})烯基,其各自任选地被-C(O)O-或(C_3-C_5)环烷基中断,其中其余变量如上文针对式(V)所述。在另一个替代方面,作为第八个化学方面的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的R^5是(C_6-C_{24})烷基或(C_6-C_{24})烯基,其各自任选地被-C(O)O-或环丙基中断,其中其余变量如上文针对式(V)所述。在另一个替代方面,作为第八个化学方面的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的R^5是(C_8-C_{24})烷基或(C_8-C_{24})烯基,其中(C_8-C_{24})烷基任选地被-C(O)O-或环丙基中断,其中其余变量如上文针对式(V)所述。在另一个替代方面,作为第八个化学方面的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质

中的R^5是(C_8-C_{10})烷基,其中其余变量如上文针对式(V)所述。在另一个替代方面,作为第八个化学方面的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的R^5是被环丙基中断的(C_{14}-C_{16})烷基,其中其余变量如上文针对式(V)所述。在另一个替代方面,作为第八个化学方面的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的R^5是被-C(O)O-中断的(C_{10}-C_{24})烷基,其中其余变量如上文针对式(V)所述。在另一个替代方面,作为第八个化学方面的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的R^5是(C_{16}-C_{18})烯基,其中其余变量如上文针对式(V)所述。在另一个替代方面,作为第八个化学方面的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的R^5为-$(CH_2)_3$C(O)O$(CH_2)_8CH_3$、

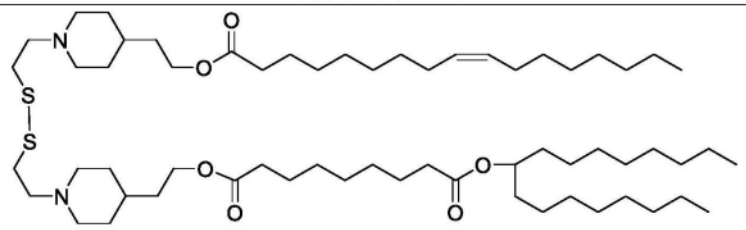
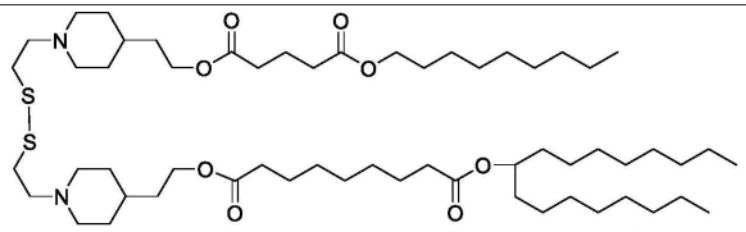
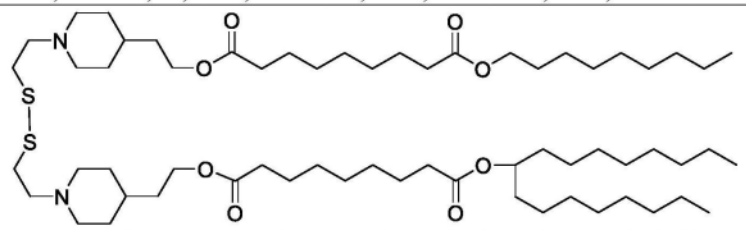
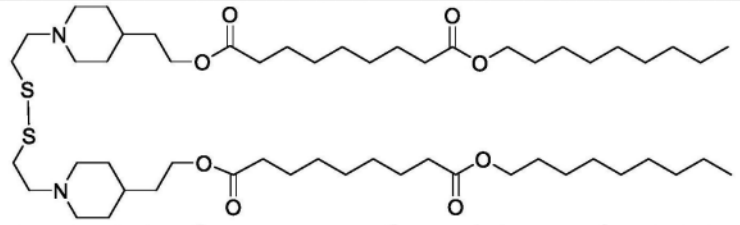
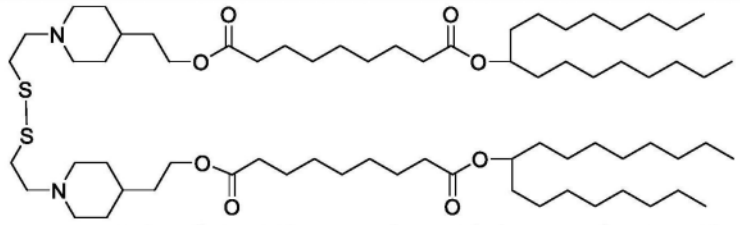
[0406] -$(CH_2)_5$C(O)O$(CH_2)_8CH_3$、-$(CH_2)_7$C(O)O$(CH_2)_8CH_3$、-$(CH_2)_7$C(O)OCH[$(CH_2)_7CH_3$]$_2$、-$(CH_2)_7$-C_3H_6-$(CH_2)_7CH_3$、-$(CH_2)_7CH_3$、-$(CH_2)_9CH_3$、-$(CH_2)_{16}CH_3$、-$(CH_2)_7$CH=CH$(CH_2)_7CH_3$或-$(CH_2)_7$CH=CHCH_2CH=CH$(CH_2)_4CH_3$,其中其余变量如上文针对式(XV)所述。

[0407] 在第九个化学方面,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的$R^{5'}$是被-C(O)O-中断的(C_{15}-C_{28})烷基,其中其余变量如上文针对式(V)或第八个化学方面所述。可替代地,作为第九个化学方面的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的$R^{5'}$是被-C(O)O-中断的(C_{17}-C_{28})烷基,其中其余变量如上文针对式(V)或第八个化学方面所述。在另一个替代方案中,作为第九实施方案的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的$R^{5'}$是被-C(O)O-中断的(C_{19}-C_{28})烷基,其中其余变量如上文针对式(V)或第八个化学方面所述。在另一个替代方面,作为第九个化学方面的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的$R^{5'}$是被-C(O)O-中断的(C_{17}-C_{26})烷基,其中其余变量如上文针对式(I)或第八个化学方面所述。在另一个替代方案中,作为第九实施方案的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的$R^{5'}$是被-C(O)O-中断的(C_{19}-C_{26})烷基,其中其余变量如上文针对式(V)或第八个化学方面所述。在另一个替代方面,作为第九个化学方面的一部分,式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质中的$R^{5'}$是被-C(O)O-中断的(C_{20}-C_{26})烷基,其中其余变量如上文针对式(V)或第八个化学方面所述。在另一个替代方案中,作为第九实施方案的一部分,$R^{5'}$是被-C(O)O-中断的(C_{22}-C_{24})烷基,其中其余变量如上文针对式(V)或第八个化学方面所述。在另一个替代方案中,作为第九实施方案的一部分,$R^{5'}$是-$(CH_2)_5$C(O)OCH[$(CH_2)_7CH_3$]$_2$、-$(CH_2)_7$C(O)OCH[$(CH_2)_7CH_3$]$_2$、-$(CH_2)_5$C(O)OCH$(CH_2)_2$[$(CH_2)_7CH_3$]$_2$或-$(CH_2)_7$C(O)OCH$(CH_2)_2$[$(CH_2)_7CH_3$]$_2$,其中其余变量如上文针对式(V)或第八个化学方面所述。

[0408] 在另一个方面,式(V)、式(VI)、式(VIII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的可离子化脂质可选自表6中的以下脂质中的任一种或其药学上可接受的盐。

[0409] 表6.式(V)、式(VI)、式(VIII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XII)、式(XIII)或式(XIV)的示例性可离子化脂质

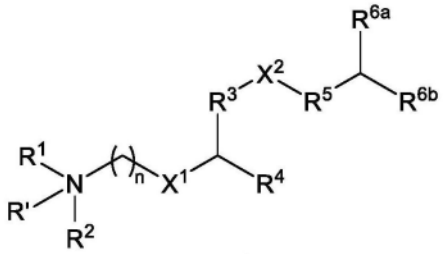
[0410]

脂质编号	脂质结构和名称
72	 (Z)-1-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(十七-9-烯酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙基)9-(十七烷-9-基)壬二酸酯
73	 1-(十七烷-9-基)9-(2-(1-(2-((2-(4-(2-((5-(壬氧基)-5-氧代戊酰基)氧基)乙基)哌啶-1-)基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙基)壬二酸酯
74	 1-(十七烷-9-基)9-(2-(1-(2-((2-(4-(2-((9-(壬氧基)-9-氧壬酰基)氧基)乙基)哌啶-1-)基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙基)壬二酸酯
75	 O'1,O1-(((二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(哌啶-1,4-二基))双(乙烷-2,1-二基))9,9'-二壬基二(壬二酸)
76	 O'1,O1-(((二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(哌啶-1,4-二基))双(乙烷-2,1-二基))9,9'-二(十七烷)-9-基)二(壬二酸酯)

[0411]

[0412] 式(XV)

[0413] 在一些方面,可离子化脂质具有式(XV):

[0414] 

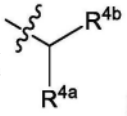
(XV)

[0415] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0416] R'不存在,为氢或C_1-C_6烷基;前提条件是当R'为氢或C_1-C_6烷基时,R'、R^1和R^2所附接到的氮原子均被质子化;

[0417] R^1和R^2各自独立地为氢、C_1-C_6烷基或C_2-C_6烯基;

[0418] R^3为C_1-C_{12}亚烷基或C_2-C_{12}亚烯基;

[0419] R^4为C_1-C_{16}非支链烷基、C_2-C_{16}非支链烯基,或  其中:

[0420] R^{4a}和R^{4b}各自独立地为C1-C16非支链烷基或C2-C16非支链烯基;

[0422] R^5不存在,为C_1-C_8亚烷基或C_2-C_8亚烯基;

[0423] R^{6a}和R^{6b}各自独立地为C_7-C_{16}烷基或C_7-C_{16}烯基;前提条件是R^{6a}和R^{6b}组合中的碳原子总数大于15;

[0424] X^1和X^2各自独立地为-OC(=O)-、-SC(=O)-、-OC(=S)-、-C(=O)O-、-C(=O)S-、-S-S-、-C(R^a)=N-、-N=C(R^a)-、-C(R^a)=NO-、-O-N=C(R^a)-、-C(=O)NR^a-、-NR^aC(=O)-、-NR^aC(=O)NR^a-、-OC(=O)O-、-OSi(R^a)$_2$O-、-C(=O)(CR^a_2)C(=O)O-或OC(=O)(CR^a_2)C(=O)-;其中:

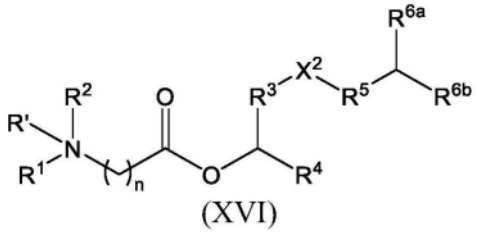
[0425] R^a每次出现时独立地为氢或C_{1-6}烷基;并且

[0426] n是选自1、2、3、4、5和6的整数。

[0427] 在第二实施方案中,在根据第一实施方案的可离子化脂质或其药学上可接受的盐中,X^1和X^2是相同的;并且所有其他其余变量如针对式(V)或第一实施方案所述。

[0428] 在第三实施方案中,在根据第一实施方案或第二实施方案的可离子化脂质或其药学上可接受的盐中,X^1和X^2各自独立地为-OC(=O)-、-SC(=O)-、-OC(=S)-、-C(=O)O-、-C(=O)S-或-S-S-;或X^1和X^2各自独立地为C(=O)O-、-C(=O)S-或-S-S-;或X^1和X^2各自独立地为-C(=O)O-或-S-S-;并且所有其他其余变量如针对式V或前述实施方案中任一项所述。

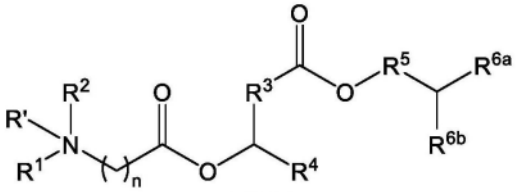
[0429] 在第四实施方案中,本公开的可离子化脂质由式(XVI)表示:

[0430] 

(XVI)

[0431] 或其药学上可接受的盐,其中n是选自1、2、3和4的整数;并且所有其他其余变量如针对式(XV)或前述实施方案中任一项所述。

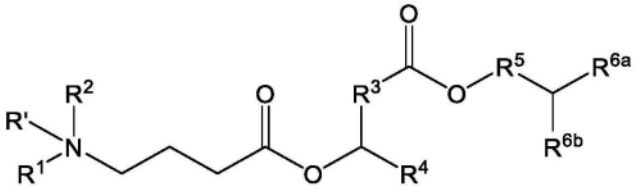
[0432] 在第五实施方案中,本公开的可离子化脂质由式(XVII)表示:

[0433] 

(XVII)

[0434] 或其药学上可接受的盐,其中n是选自1、2和3的整数;并且所有其他其余变量如针对式(XV)、式(XVI)或前述实施方案中任一项所述。

[0435] 在第六实施方案中,本公开的可离子化脂质由式(XVIII)表示:

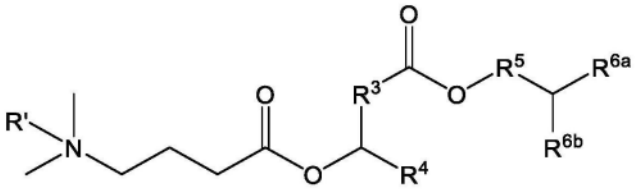
[0436] 

(XVIII)

[0437] 或其药学上可接受的盐;并且所有其他其余变量如针对式(XV)、式(XVI)、式(XVII)或前述实施方案中任一项所述。

[0438] 在第七实施方案中,在根据式(XV)、式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)或前述实施方案中任一项的可离子化脂质或其药学上可接受的盐中,R^1和R^2各自独立地为氢、C_1-C_6烷基或C_2-C_6烯基或C_1-C_5烷基或C_2-C_5烯基或C_1-C_4烷基或C_2-C_4烯基或C_6烷基、或C_5烷基、或C_4烷基、或C_3烷基、或C_2烷基、或C_1烷基、或C_6烯基或C_5烯基或C_4烯基或C_3烯基或C_2烯基;并且所有其他其余变量如针对式(XV)、式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)或前述实施方案中任一项所述。

[0439] 在第八实施方案中,本公开的可离子化脂质由式(XIX)表示:

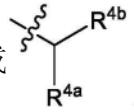
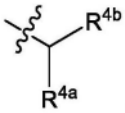
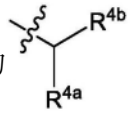
[0440] 

(XIX)

[0441] 或其药学上可接受的盐;并且所有其他其余变量如针对式(XV)、式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)或前述实施方案中任一项所述。

[0442] 在第九实施方案中,在根据式(XV)、式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)、式(XIX)或前述实施方案中任一项所述的可离子化脂质或其药学上可接受的盐中,R^3为C_1-C_9亚烷基或C_2-C_9亚烯基、C_1-C_7亚烷基或C_2-C_7亚烯基、C_1-C_5亚烷基或C_2-C_5亚烯基、或C_2-C_8亚烷基或C_2-C_8亚烯基、或C_3-C_7亚烷基或C_3-C_7亚烯基、或C_5-C_7亚烷基或C_5-C_7亚烯基;或R^3为C_{12}亚烷基、C_{11}亚烷基、C_{10}亚烷基、C_9亚烷基、或C_8亚烷基、或C_7亚烷基、或C_6亚烷基、或C_5亚烷基、或C_4亚烷基、或C_3亚烷基、或C_2亚烷基、或C_1亚烷基、或C_{12}亚烯基、C_{11}亚烯基、C_{10}亚烯基、C_9亚烯基、或C_8亚烯基、或C_7亚烯基、或C_6亚烯基、或C_5亚烯基、或C_4亚烯基、或C_3亚烯基、或C_2亚烯基;并且所有其他其余变量如针对式(XV)、式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)、式(XIX)或前述实施方案中任一项所述。

[0443] 在第十实施方案中,在根据式(XV)、式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)、式(XIX)或前述实施方案中任一项所述的阳离子脂质或其药学上可接受的盐中,R^5不存在,为C_1-C_6亚烷基或C_2-C_6亚烯基;或R^5不存在,为C_1-C_4亚烷基或C_2-C_4亚烯基;或R^5不存在;或R^5为C_8亚烷基、C_7亚烷基、C_6亚烷基、C_5亚烷基、C_4亚烷基、C_3亚烷基、C_2亚烷基、C_1亚烷基、C_8亚烯基、C_7亚烯基、C_6亚烯基、C_5亚烯基、C_4亚烯基、C_3亚烯基、或C_2亚烯基;并且所有其他其余变量如针对式(XV)、式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)、式(XIX)或前述实施方案中任一项所述。

[0444] 在第十一实施方案中,在根据式(XV)、式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)、式(XIX)或前述实施方案中任一项所述的阳离子脂质或其药学上可接受的盐中,R^4为C_1-C_{14}非支链烷基、C_2-C_{14}非支链烯基或,其中R^{4a}和R^{4b}各自独立地为C_1-C_{12}非支链烷基或C_2-C_{12}非支链烯基;或R^4为C_2-C_{12}非支链烷基或C_2-C_{12}非支链烯基;或R^4为C_5-C_7非支链烷基或C_5-C_7非支链烯基;或R^4为C_{16}非支链烷基、C_{15}非支链烷基、C_{14}非支链烷基、C_{13}非支链烷基、C_{12}非支链烷基、C_{11}非支链烷基、C_{10}非支链烷基、C_9非支链烷基、C_8非支链烷基、C_7非支链烷基、C_6非支链烷基、C_5非支链烷基、C_4非支链烷基、C_3非支链烷基、C_2非支链烷基、C_1非支链烷基、C_{16}非支链烯基、C_{15}非支链烯基、C_{14}非支链烯基、C_{13}非支链烯基、C_{12}非支链烯基、C_{11}非支链烯基、C_{10}非支链烯基、C_9非支链烯基、C_8非支链烯基、C_7非支链烯基、C_6非支链烯基、C_5非支链烯基、C_4非支链烯基、C_3非支链烯基或C_2烯基;或R^4为,其中R^{4a}和R^{4b}各自独立地为C_2-C_{10}非支链烷基或C_2-C_{10}非支链烯基;或R^4为,其中R^{4a}和R^{4b}各自独立地为C_{16}非支链烷基、C_{15}非支链烷基、C_{14}非支链烷基、C_{13}非支链烷基、C_{12}非支链烷基、C_{11}非支链烷基、C_{10}非支链烷基、C_9非支链烷基、C_8非支链烷基、C_7非支链烷基、C_6非支链烷基、C_5非支链烷基、C_4非支链烷基、C_3非支链烷基、C_2烷基、C_1烷基、C_{16}非支链烯基、C_{15}非支链烯基、C_{14}非支链烯基、C_{13}非支链烯基、C_{12}非支链烯基、C_{11}非支链烯基、C_{10}非支链烯基、C_9非支链烯基、C_8非支链烯基、C_7非支链烯基、C_6非支链烯基、C_5非支链烯基、C_4非支链烯基、C_3非支链烯基或C_2烯基;并且所有其他其余变量如针对式(XV)、式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)、式(XIX)或前述实施方案中任一项所述。

[0445] 在第十二实施方案中,在根据式(XV)、式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)、式(XIX)或前述实施方案中任一项所述的阳离子脂质或其药学上可接受的盐中,R^{6a}和R^{6b}各自独立地为C_6-C_{14}烷基或C_6-C_{14}烯基;或R^{6a}和R^{6b}各自独立地为C_8-C_{12}烷基或C_8-C_{12}烯基;或R^{6a}和R^{6b}各自独立地为C_{16}烷基、C_{15}烷基、C_{14}烷基、C_{13}烷基、C_{12}烷基、C_{11}烷基、C_{10}烷基、C_9烷基、C_8烷基、C_7烷基、C_{16}烯基、C_{15}烯基、C_{14}烯基、C_{13}烯基、C_{12}烯基、C_{11}烯基、C_{10}烯基、C_9烯基、C_8烯基或C_7烯基;前提条件是R^{6a}和R^{6b}组合中的碳原子总数大于15;并且所有其他其余变量如针对式(XV)、式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)、式(XIX)或前述实施方案中任一项所述。

[0446] 在第十三实施方案中,在根据式(XV)、式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)、式(XIX)或前述实施方案中任一项的阳离子脂质或其药学上可接受的盐中,R^{6a}和R^{6b}含有彼此相等数目的碳原子;或R^{6a}和R^{6b}相同;或R^{6a}和R^{6b}均为C_{16}烷基、C_{15}烷基、C_{14}烷基、C_{13}烷基、C_{12}烷基、C_{11}

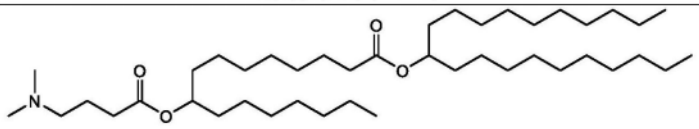
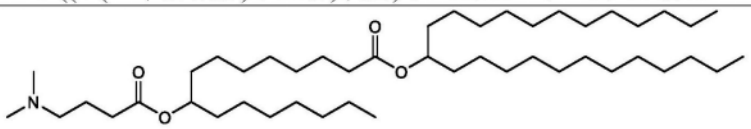
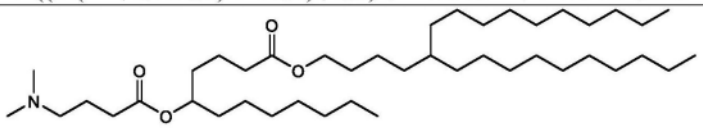
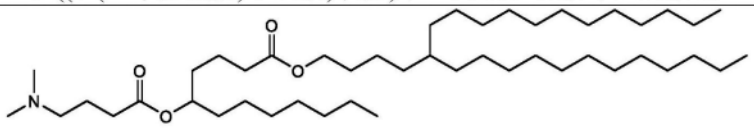
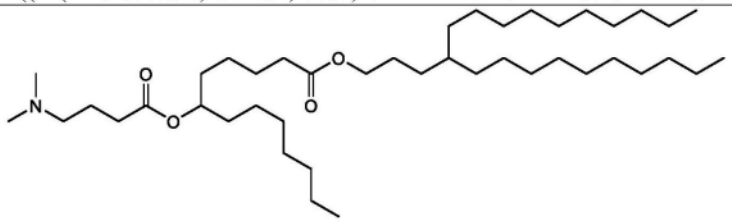
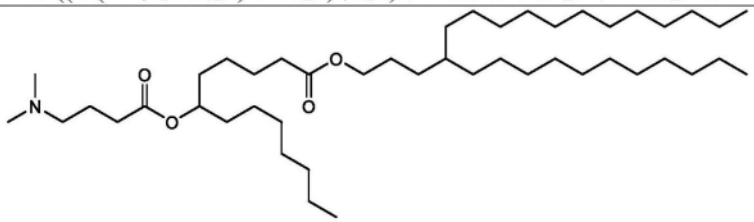
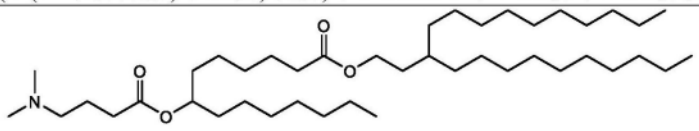
烷基、C_{10}烷基、C_9烷基、C_8烷基、C_7烷基、C_{16}烯基、C_{15}烯基、C_{14}烯基、C_{13}烯基、C_{12}烯基、C_{11}烯基、C_{10}烯基、C_9烯基、C_8烯基或C_7烯基;前提条件是R^{6a}和R^{6b}组合中的碳原子总数大于15;并且所有其他其余变量如针对式(XV)、式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)、式(XIX)或前述实施方案中任一项所述。

[0447] 在第十四实施方案中,在根据式(XV)、式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)、式(XIX)或前述实施方案中任一项所述的阳离子脂质或其药学上可接受的盐中,如前述实施方案中任一项所定义的,R^{6a}和R^{6b}各自含有彼此不同数量的碳原子;或碳原子R^{6a}和R^{6b}的数量相差一个或两个碳原子;或碳原子R^{6a}和R^{6b}的数量相差一个碳原子;或R^{6a}是C_7烷基和R^{6a}是C_8烷基,R^{6a}是C_8烷基和R^{6a}是C_7烷基,R^{6a}是C_8烷基和R^{6a}是C_9烷基,R^{6a}是C_9烷基和R^{6a}是C_8烷基,R^{6a}是C_9烷基和R^{6a}是C_{10}烷基,R^{6a}是C_{10}烷基和R^{6a}是C_9烷基,R^{6a}是C_{10}烷基和R^{6a}是C_{11}烷基,R^{6a}是C_{11}烷基和R^{6a}是C_{10}烷基,R^{6a}是C_{11}烷基和R^{6a}是C_{12}烷基,R^{6a}是C_{12}烷基和R^{6a}是C_{11}烷基,R^{6a}是C_7烷基和R^{6a}是C_9烷基,R^{6a}是C_9烷基和R^{6a}是C_7烷基,R^{6a}是C_8烷基和R^{6a}是C_{10}烷基,R^{6a}是C_{10}烷基和R^{6a}是C_8烷基,R^{6a}是C_9烷基和R^{6a}是C_{11}烷基,R^{6a}是C_{11}烷基和R^{6a}是C_9烷基,R^{6a}是C_{10}烷基和R^{6a}是C_{12}烷基,R^{6a}是C_{12}烷基和R^{6a}是C_{10}烷基,R^{6a}是C_{11}烷基和R^{6a}是C_{13}烷基或R^{6a}是C_{13}烷基和R^{6a}是C_{11}烷基等;并且所有其他其余变量如针对式I、式II、式III、式IV、式V或前述实施方案中任一项所述。

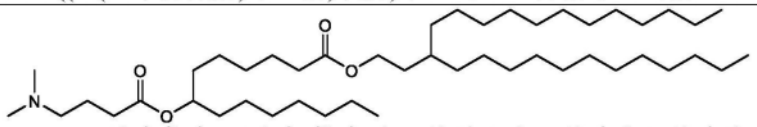
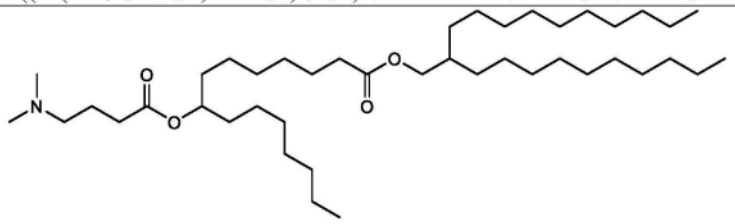
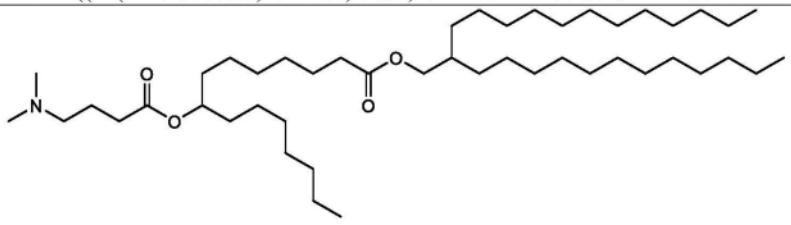
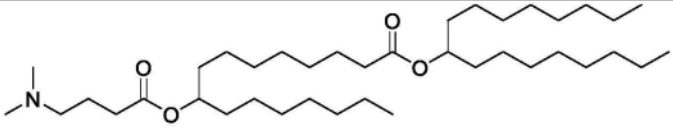
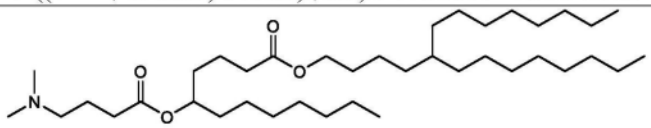
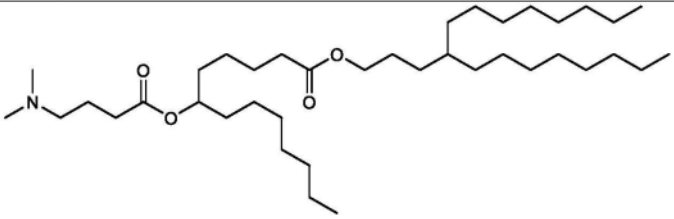
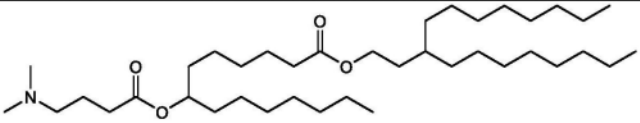
[0448] 在一个实施方案中,本公开的阳离子脂质或式(XV)、式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)或式(XIX)的阳离子脂质是选自表7中的脂质或其药学上可接受的盐的任一种脂质:

[0449] 表7.本公开的示例性脂质,包括式(XV)、式(XVI)、式(XVII)、式(XVIII)、式(XIX)的示例性脂质

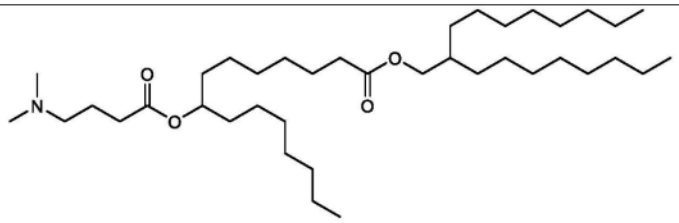
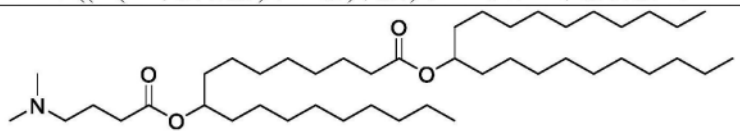
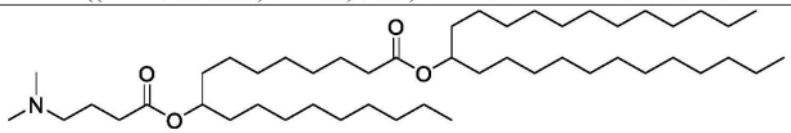
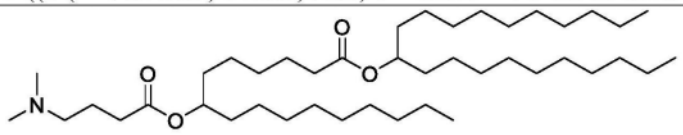
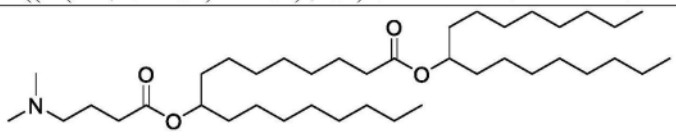
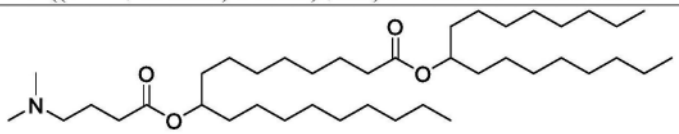
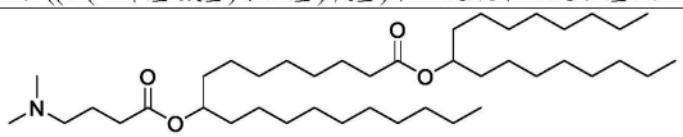
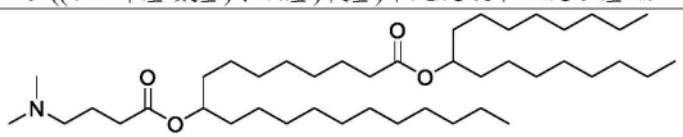
[0450]

脂质编号	脂质结构和名称
77	 9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十六烷酸二十一烷-11-基酯
78	 9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十六烷酸二十五烷-13-基酯
79	 5-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十二烷酸 5-癸基十五烷基酯
80	 5-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十二烷酸 5-十二烷基十七烷基酯
81	 6-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十三烷酸 4-癸基十四烷基酯
82	 6-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十三烷酸 4-十二烷基十六烷基基酯
83	

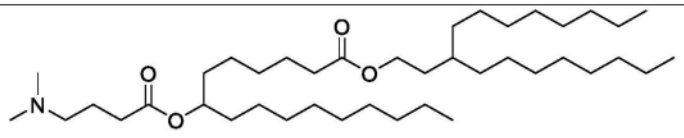
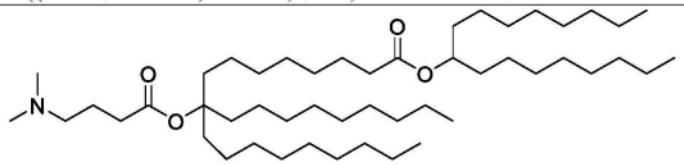
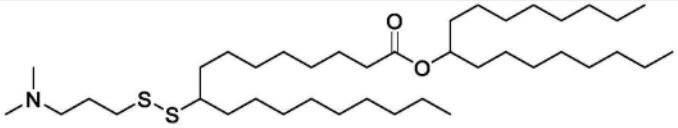
[0451]

	7-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十四烷酸 3-癸基十三烷基酯
84	 7-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十四烷酸 3-十二烷基十五烷基酯
85	 8-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十五烷酸 2-癸基十二烷基酯
86	 8-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十五烷酸 2-十二烷基十四烷基酯
87	 9-((4-二甲基氨基)丁酰基)氧基)十六烷酸十七烷-9-基酯
88	 5-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十二烷酸 5-辛基十三烷基酯
89	 6-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十三烷酸 4-辛基十二烷基酯
90	 7-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十四烷酸 3-辛基十一烷基酯

[0452]

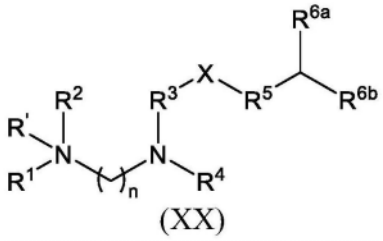
91	 8-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十五烷酸 2-辛基癸基酯
92	 9-((4-二甲基氨基)丁酰基)氧基)十八烷酸二十一烷-11-基酯
93	 9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十八烷酸二十五烷-13-基酯
94	 7-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十六烷酸二十一烷-11-基酯
95	 9-((4-二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷酸十七烷-9-基酯
96	 9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十八烷酸十七烷-9-基酯
97	 9-((4-二甲基氨基)丁酰基)氧基)十九烷酸十七烷-9-基酯
98	 9-((4-二甲基氨基)丁酰基)氧基)二十烷酸十七烷-9-基酯

[0453]

99	 7-((4-二甲基氨基)丁酰基)氧基)十六烷酸 3-辛基十一烷基酯
100	 9-((4-二甲基氨基)丁酰基)氧基)-9-壬基十八烷酸十七烷-9-基酯
101	 9-((3-(二甲基氨基)丙基)二硫烷基)十八烷酸十七烷-9-基酯

[0454] 式(XX)

[0455] 在一些方面中,阳离子脂质具有式(XX):

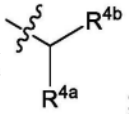
[0456] 

[0457] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0458] R'不存在,为氢或C_1-C_3烷基;前提条件是当R'为氢或C_1-C_3烷基时,R'、R^1和R^2所附接到的氮原子均被质子化;

[0459] R^1和R^2各自独立地为氢或C_1-C_3烷基;

[0460] R^3为C_3-C_{10}亚烷基或C_3-C_{10}亚烯基;

[0461] R^4为C_1-C_{16}非支链烷基、C_2-C_{16}非支链烯基,或  其中:;

[0462] R^{4a}和R^{4b}各自独立地为C1-C16非支链烷基或C2-C16非支链烯基;

[0463] R^5不存在,为C_1-C_6亚烷基或C_2-C_6亚烯基;

[0464] R^{6a}和R^{6b}各自独立地为C_7-C_{14}烷基或C_7-C_{14}烯基;

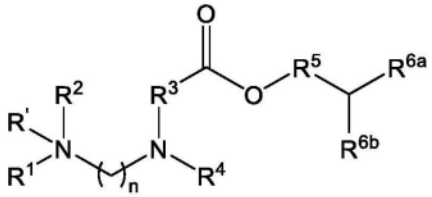
[0465] X为-OC(=O)-、-SC(=O)-、-OC(=S)-、-C(=O)O-、-C(=O)S-、-S-S-、-C(R^a)=N-、-N=C(R^a)-、-C(R^a)=NO-、-O-N=C(R^a)-、-C(=O)NR^a-、-NR^aC(=O)-、-NR^aC(=O)NR^a-、-OC(=O)O-、-OSi(R^a)$_2$O-、-C(=O)(CR^a_2)C(=O)O-或OC(=O)(CR^a_2)C(=O)-;其中:

[0466] R^a每次出现时独立地为氢或C_{1-6}烷基;并且

[0467] n是选自1、2、3、4、5和6的整数。

[0468] 在第二实施方案中,在根据第一实施方案的阳离子脂质或其药学上可接受的盐中,X为-OC(=O)-、-SC(=O)-、-OC(=S)-、-C(=O)O-、-C(=O)S-或-S-S-;并且所有其他其余变量如针对式(XX)或第一实施方案所述。

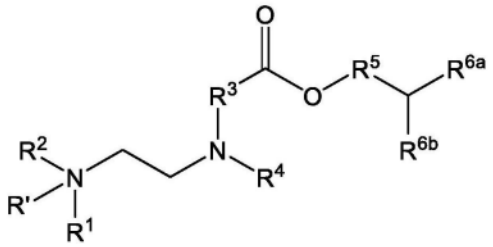
[0469] 在第三实施方案中,本公开的阳离子脂质由式(XXI)表示:

[0470] 

(XXI)

[0471] 或其药学上可接受的盐,其中n是选自1、2、3和4的整数;并且所有其他其余变量如针对式(XX)或前述实施方案中任一项所述。在替代的第三实施方案中,n为选自1、2和3的整数;并且所有其他其余变量如针对式(XX)或前述实施方案中任一项所述。

[0472] 在第四实施方案中,本公开的阳离子脂质由式(XXII)表示:

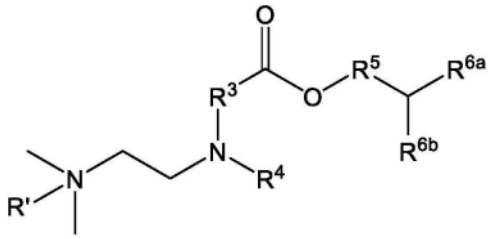
[0473] 

(XXII)

[0474] 或其药学上可接受的盐;并且所有其他其余变量如针对式(XX)、式(XXI)或前述实施方案中任一项所述。

[0475] 在第五实施方案中,在根据第一实施方案的阳离子脂质或其药学上可接受的盐中,R^1和R^2各自独立地为氢或C_1-C_2烷基或C_2-C_3烯基;或者R'、R^1和$R^{2'}$各自独立地是氢或C_1-C_2烷基;并且所有其他其余变量如针对式(XX)、式(XXI)或前述实施方案中任一项所述。

[0476] 在第六实施方案中,本公开的阳离子脂质由式(XXIII)表示:

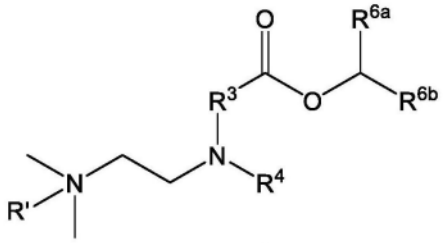
[0477] 

(XXIII)

[0478] 或其药学上可接受的盐;并且所有其他其余变量如针对式(XX)、式(XXI)、式(XXII)或前述实施方案中任一项所述。

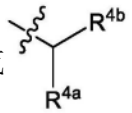
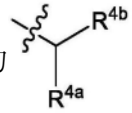
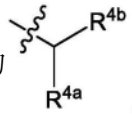
[0479] 在第七实施方案中,在根据式(XX)、式(XXI)、式(XXII)、式(XXIII)或前述实施方案中任一项所述的阳离子脂质,或其药学上可接受的盐中,R^5不存在,或为C_1-C_8亚烷基;或R^5不存在,为C_1-C_6亚烷基或C_2-C_6亚烯基;或R^5不存在,为C_1-C_4亚烷基或C_2-C_4亚烯基;或R^5不存在;或R^5是C_6亚烷基、C_5亚烷基、C_4亚烷基、C_3亚烷基、C_2亚烷基、C_1亚烷基、C_6亚烯基、C_5亚烯基、C_4亚烯基、C_3亚烯基或C_2亚烯基;并且所有其他其余变量如针对式(XX)、式(XXI)、式(XXII)、式(XXIII)或前述实施方案中任一项所述。

[0480] 在第八实施方案中,本公开的阳离子脂质由式(XXIV)表示:

[0481] 

(XXIV)

[0482] 或其药学上可接受的盐;并且所有其他其余变量如针对式(XX)、式(XXI)、式(XXII)、式(XXIII)或前述实施方案中任一项所述。

[0483] 在第十一实施方案中,在根据式(XX)、式(XXI)、式(XXII)、式(XXIII)、式(XXIV)或前述实施方案中任一项所述的阳离子脂质或其药学上可接受的盐中,R^4为C_1-C_{14}非支链烷基、C_2-C_{14}非支链烯基或  其中R^{4a}和R^{4b}各自独立地为C_1-C_{12}非支链烷基或C_2-C_{12}非支链烯基;或R^4为C_2-C_{12}非支链烷基或C_2-C_{12}非支链烯基;或R^4为C_5-C_{12}非支链烷基或C_5-C_{12}非支链烯基;或R^4为C_{16}非支链烷基、C_{15}非支链烷基、C_{14}非支链烷基、C_{13}非支链烷基、C_{12}非支链烷基、C_{11}非支链烷基、C_{10}非支链烷基、C_9非支链烷基、C_8非支链烷基、C_7非支链烷基、C_6非支链烷基、C_5非支链烷基、C_4非支链烷基、C_3非支链烷基、C_2非支链烷基、C_1非支链烷基、C_{16}非支链烯基、C_{15}非支链烯基、C_{14}非支链烯基、C_{13}非支链烯基、C_{12}非支链烯基、C_{11}非支链烯基、C_{10}非支链烯基、C_9非支链烯基、C_8非支链烯基、C_7非支链烯基、C_6非支链烯基、C_5非支链烯基、C_4非支链烯基、C_3非支链烯基或C_2烯基;或R^4为  其中R^{4a}和R^{4b}各自独立地为C_2-C_{10}非支链烷基或C_2-C_{10}非支链烯基;或R^4为  其中R4a和R4b各自独立地为C_{16}非支链烷基、C_{15}非支链烷基、C_{14}非支链烷基、C_{13}非支链烷基、C_{12}非支链烷基、C_{11}非支链烷基、C_{10}非支链烷基、C_9非支链烷基、C_8非支链烷基、C_7非支链烷基、C_6非支链烷基、C_5非支链烷基、C_4非支链烷基、C_3非支链烷基、C_2烷基、C_1烷基、C_{16}非支链烯基、C_{15}非支链烯基、C_{14}非支链烯基、C_{13}非支链烯基、C_{12}非支链烯基、C_{11}非支链烯基、C_{10}非支链烯基、C_9非支链烯基、C_8非支链烯基、C_7非支链烯基、C_6非支链烯基、C_5非支链烯基、C_4非支链烯基、C_3非支链烯基或C_2烯基;并且所有其他其余变量如针对式(XX)、式(XXI)、式(XXII)、式(XXIII)、式(XXIV)或前述实施方案中任一项所述。

[0484] 在第十实施方案中,在根据式(XX)、式(XXI)、式(XXII)、式(XXIII)、式(XXIV)或前述实施方案中任一项的阳离子脂质或其药学上可接受的盐中,R^3是C_3-C_8亚烷基或C_3-C_8亚烯基、C_3-C_7亚烷基或C_3-C_7亚烯基、或$_3$-C_5亚烷基或C_3-C_5亚烯基;或R^3为C_8亚烷基、或C_7亚烷基、或C_6亚烷基、或C_5亚烷基、或C_4亚烷基、或C_3亚烷基、或C_1亚烷基、或C_8亚烯基、或C_7亚烯基、或C_6亚烯基、或C_5亚烯基、或C_4亚烯基、或C_3亚烯基;并且所有其他其余变量如针对式(XX)、式(XXI)、式(XXII)、式(XXIII)、式(XXIV)或前述实施方案中任一项所述。

[0485] 在第十一实施方案中,在根据式(XX)、式(XXI)、式(XXII)、式(XXIII)、式(XXIV)或

前述实施方案中任一项所述的阳离子脂质或其药学上可接受的盐中,R^{6a}和R^{6b}各自独立地为C_7-C_{12}烷基或C_7-C_{12}烯基;或R^{6a}和R^{6b}各自独立地为C_8-C_{10}烷基或C_8-C_{10}烯基;或R^{6a}和R^{6b}各自独立地为C_{12}烷基、C_{11}烷基、C_{10}烷基、C_9烷基、C_8烷基、C_7烷基、C_{12}烯基、C_{11}烯基、C_{10}烯基、C_9烯基、C_8烯基或C_7烯基;并且所有其他其余变量如针对式(XX)、式(XXI)、式(XXII)、式(XXIII)、式(XXIV)或前述实施方案中任一项所述。

[0486] 在第十二实施方案中,在根据式(XX)、式(XXI)、式(XXII)、式(XXIII)、式(XXIV)或前述实施方案中任一项的阳离子脂质或其药学上可接受的盐中,R^{6a}和R^{6b}含有彼此相等数目的碳原子;或R6a和R6b相同;或R^{6a}和R^{6b}均为C_{12}烷基、C_{11}烷基、C_{10}烷基、C_9烷基、C_8烷基、C_7烷基、C_{12}烯基、C_{11}烯基、C_{10}烯基、C_9烯基、C_8烯基或C_7烯基;并且所有其他其余变量如针对式(XX)、式(XXI)、式(XXII)、式(XXIII)、式(XXIV)或前述实施方案中任一项所述。

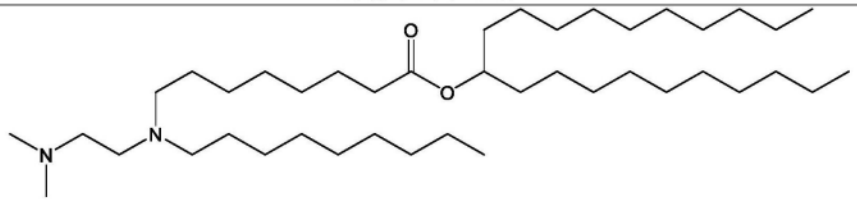
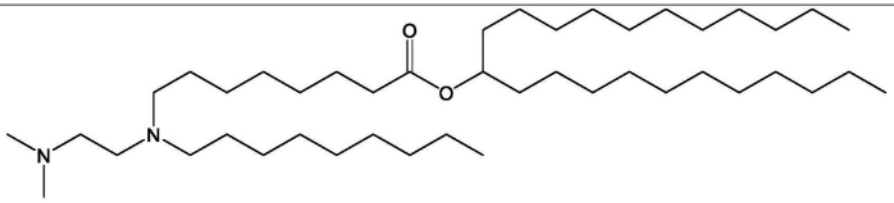
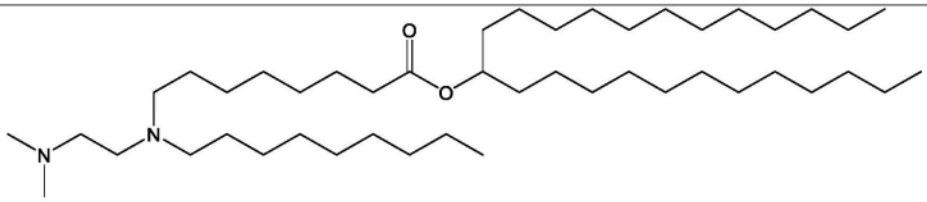
[0487] 在第十三实施方案中,在根据式(XX)、式(XXI)、式(XXII)、式(XXIII)、式(XXIV)或前述实施方案中任一项所述的阳离子脂质或其药学上可接受的盐中,如前述实施方案中任一项所定义的,R^{6a}和R^{6b}各自含有彼此不同数量的碳原子;或碳原子R^{6a}和R^{6b}的数量相差一个或两个碳原子;或碳原子R^{6a}和R^{6b}的数量相差一个碳原子;或R^{6a}是C_7烷基和R^{6a}是C_8烷基,R^{6a}是C_8烷基和R^{6a}是C_7烷基,R^{6a}是C_8烷基和R^{6a}是C_9烷基,R^{6a}是C_9烷基和R^{6a}是C_8烷基,R^{6a}是C_9烷基和R^{6a}是C_{10}烷基,R^{6a}是C_{10}烷基和R^{6a}是C_9烷基,R^{6a}是C_{10}烷基和R^{6a}是C_{11}烷基,R^{6a}是C_{11}烷基和R^{6a}是C_{10}烷基,R^{6a}是C_{11}烷基和R^{6a}是C_{12}烷基,R^{6a}是C_{12}烷基和R^{6a}是C_{11}烷基,R^{6a}是C_7烷基和R^{6a}是C_9烷基,R^{6a}是C_9烷基和R^{6a}是C_7烷基,R^{6a}是C_8烷基和R^{6a}是C_{10}烷基,R^{6a}是C_{10}烷基和R^{6a}是C_8烷基,R^{6a}是C_9烷基和R^{6a}是C_{11}烷基,R^{6a}是C_{11}烷基和R^{6a}是C_9烷基,R^{6a}是C_{10}烷基和R^{6a}是C_{12}烷基,R^{6a}是C_{12}烷基和R^{6a}是C_{10}烷基,等等;并且所有其他其余变量如针对式(XX)、式(XXI)、式(XXII)、式(XXIII)、式(XXIV)或前述实施方案中任一项所述。

[0488] 在第十四实施方案中,在根据式(XX)、式(XXI)、式(XXII)、式(XXIII)、式(XXIV)或前述实施方案中任一项所述的阳离子脂质或其药学上可接受的盐中,R'不存在。并且所有其他其余变量如针对式(XX)、式(XXI)、式(XXII)、式(XXIII)、式(XXIV)或前述实施方案中任一项所述。

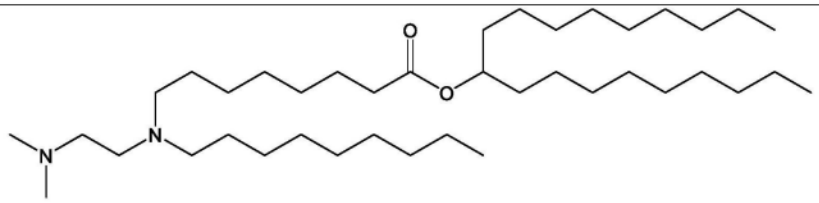
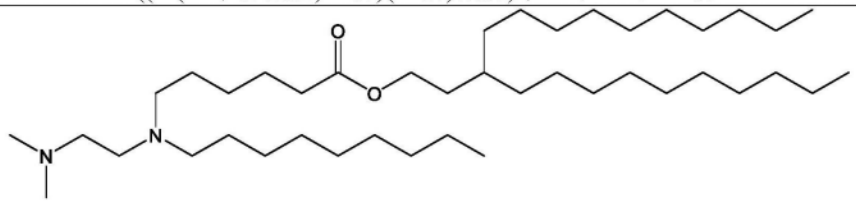
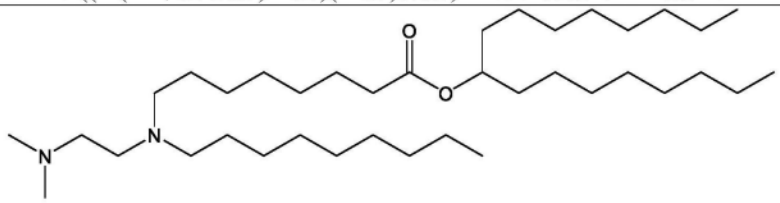
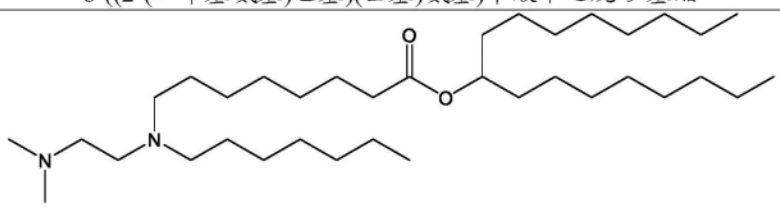
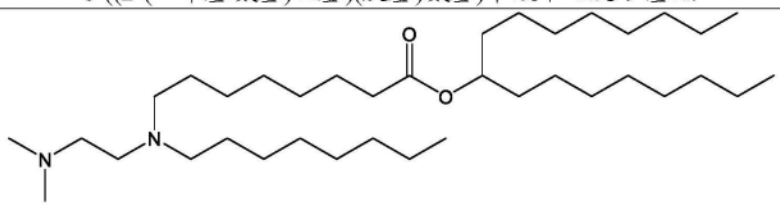
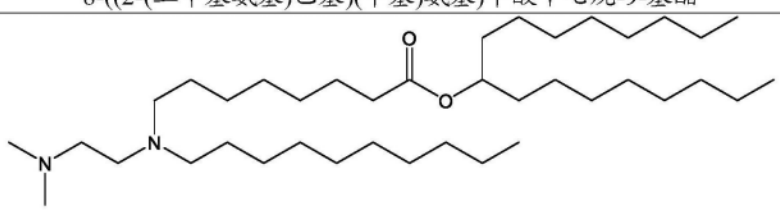
[0489] 在一个实施方案中,本公开的阳离子脂质或式(XX)、式(XXI)、式(XXII)、式(XXIII)、式(XXIV)的阳离子脂质是选自表8中的脂质或其药学上可接受的盐的任一种脂质:

[0490] 表8.式(XX)、式(XXI)、式(XXII)、式(XXIII)、式(XXIV)的示例性脂质

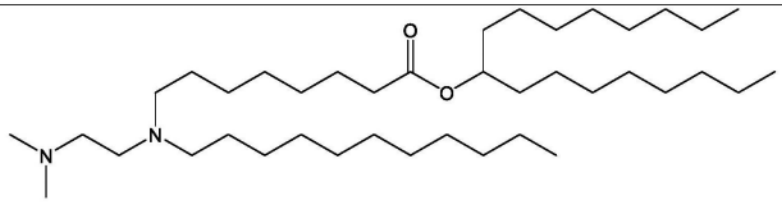
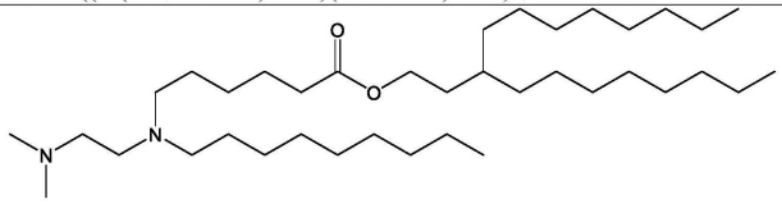
[0491]

脂质编号	脂质结构和名称
102	 8-((2-(二甲基氨基)乙基)(壬基)氨基)辛酸二十一烷-11-基酯
103	 8-((2-(二甲基氨基)乙基)(壬基)氨基)辛酸二十三-12-基酯
104	 8-((2-(二甲基氨基)乙基)(壬基)氨基)辛酸戊酯-13-基酯

[0492]

105	 8-((2-(二甲基氨基)乙基)(壬基)氨基)辛酸十九烷-10-基酯
106	 6-((2-(二甲基氨基)乙基)(壬基)氨基)己酸 3-癸基十三烷基酯
107	 8-((2-(二甲基氨基)乙基)(壬基)氨基)辛酸十七烷-9-基酯
108	 8-((2-(二甲基氨基)乙基)(庚基)氨基)辛酸十七烷-9-基酯
109	 8-((2-(二甲基氨基)乙基)(辛基)氨基)辛酸十七烷-9-基酯
110	 8-(癸基(2-(二甲基氨基)乙基)氨基)辛酸十七烷-9-基酯

[0493]

111	 8-((2-(二甲基氨基)乙基)(十一烷基)氨基)辛酸十七烷-9-基酯
112	 6-((2-(二甲基氨基)乙基)(壬基)氨基)己酸 3-辛基十一烷基酯

[0494] 具体示例在下面的示例部分中提供并且被包括作为本文描述的可离子化脂质的一部分。还包括药学上可接受的盐以及中性形式。

[0495] 可切割脂质

[0496] 根据一些实施方案,本文提供了包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA)的药物组合物,其中LNP包含经由可切割脂质与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段,该可切割脂质可用于将无衣壳非病毒DNA载体递送至感兴趣位点(例如,细胞、组织、器官等)。如本文所使用的,术语“可切割脂质”是指包括二硫键(“SS”)可切割单元的阳离子脂质。在一个实施方案中,SS-可切割脂质包括叔胺,其响应用于膜去稳定化的酸性区室(例如,内体或溶酶体)和可在还原环境(例如,细胞质)中切割的二硫键。SS-可切割的脂质可包括SS-可切割的和pH-活化的脂质样材料,诸如ss-OP脂质、ssPalm脂质、ss-M脂质、ss-E脂质、ss-EC脂质、ss-LC脂质和ss-OC脂质等。

[0497] 根据一些实施方案,SS-可切割的脂质描述于国际专利申请公开号WO2019188867中,其全部内容通过引用并入本文。

[0498] 根据一些实施方案,本文所述的LNP的平均直径尺寸范围为约20nm至约70nm,例如,平均直径为约20nm至约70nm、约25nm至约70nm、约30nm至约70nm、约35nm至约70nm、约40nm至约70nm、约45nm至约80nm、约50nm至约70nm、约60nm至约70nm、约65nm至约70nm、或约20nm、约25nm、约30nm、约35nm、约40nm、约45nm、约50nm、约55nm、约60nm、约65nm、约70nm。根据一些实施方案,LNP的平均直径为约50nm至约70nm。其明显更小,因此有利于靶向和防止免疫反应。此外,本文所述的LNP可以包封大于约60%至约90%的双链DNA,如ceDNA。根据一些实施方案,本文所述的LNP可包封大于约60%的双链DNA(如ceDNA)、大于约65%的双链DNA(如ceDNA)、大于约70%的双链DNA(如ceDNA)、大于约75%的双链DNA(如ceDNA)、大于约80%的双链DNA(如ceDNA)、大于约85%的双链DNA(如ceDNA)或大于约90%的双链DNA(如ceDNA)。

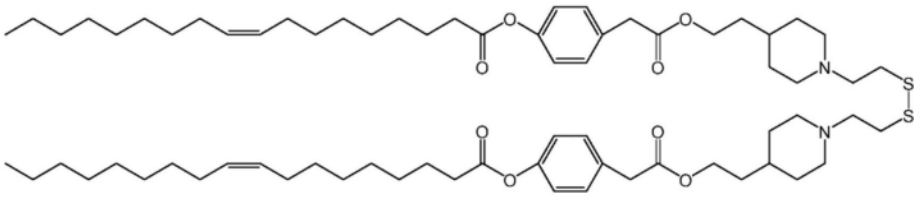
[0499] 与通过其他方法产生的LNP相比,并且与其他脂质例如可离子化阳离子脂质相比,本文所述的脂质颗粒(例如,包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段的LNP)可有利地用于增加核酸(例如,ceDNA、mRNA)向细胞/组织的递送。因此,与通过本领域已知的工艺和方法制备的脂质颗粒相比,本文描述的脂质颗粒(例如,包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段的LNP)提供最大核酸递送。尽管机制尚未确定,

并且不受理论束缚,但认为与肝细胞连接的脂质颗粒(例如,包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段的LNP)逃脱了来自细胞核的吞噬作用并且更有效地运输至细胞核。本文所述的脂质颗粒(例如,包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段的LNP)的另一个优点是与其他脂质(例如,可离子化阳离子脂质,例如,MC3)相比具有更好的耐受性。

[0500] 在一个实施方案中,可切割脂质可以包括三种组分:胺端基、接头基团和疏水尾。在一个实施方案中,可切割脂质包括一个或多个苯基酯键、多个叔氨基中的一个叔氨基,和二硫键。叔胺基提供pH响应性并诱导内体逃逸,苯基酯键增强结构的可降解性(自降解性),并且二硫键在还原环境中切割。

[0501] 在一个实施方案中,可切割脂质是SS-可切割脂质。在一个实施方案中,SS-可切割脂质包括以下所示的结构:

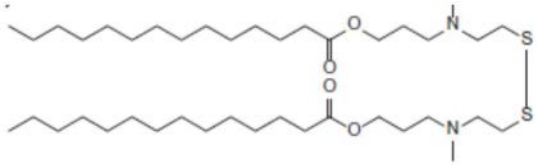
[0502] 脂质A

[0503] 

((((((二硫烷二基二(乙烷-2,1-二基))双(哌啶-1,4-二基))双(乙烷-2,1-二基))双(氧))双(2-氧代乙烷-2,1-二基))双(4,1-亚苯基)二油酸酯)

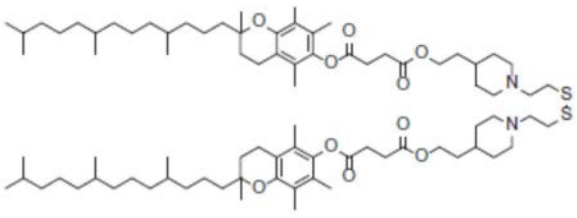
[0504] 在一个实施方案中,SS-可切割脂质是SS-可切割的和pH活化的脂质样材料(ssPalm)。ssPalm脂质在本领域中是公知的。例如,参见Togashi等人,Journal of Controlled Release,279(2018)262-270,其全部内容通过引用并入本文。在一个实施方案中,ssPalm是包括脂质B结构的ssPalmM脂质。

[0505] 脂质B

[0506] 

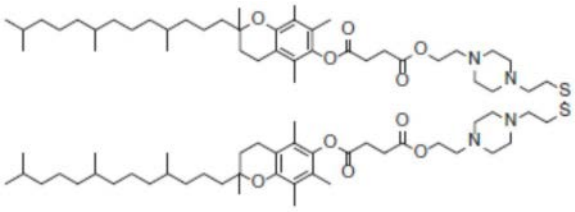
[0507] 在一个实施方案中,ssPalmE脂质是包括脂质C结构的ssPalmE-P4-C2脂质。

[0508] 脂质C

[0509] 

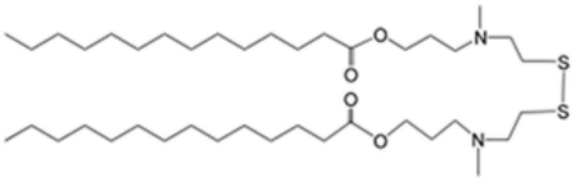
[0510] 在一个实施方案中,ssPalmE脂质是包括脂质D结构的ssPalmE-Paz4-C2脂质。

[0511] 脂质D

[0512] 

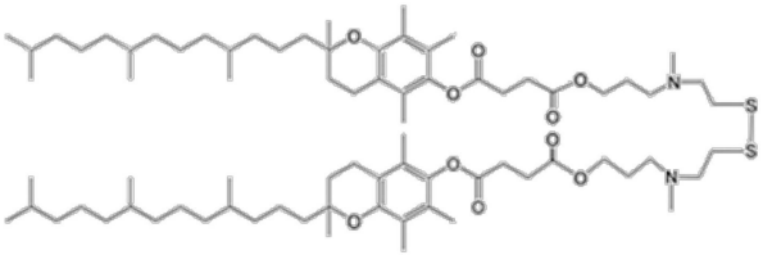
[0513] 在一个实施方案中,可切割脂质是ss-M脂质。在一个实施方案中,ss-M脂质包含以下脂质E中所示的结构:

[0514] 脂质E

[0515] 

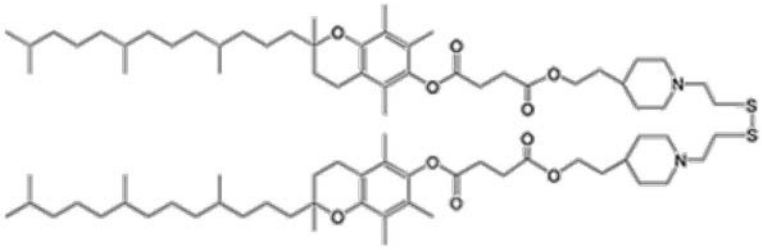
[0516] 在一个实施方案中,可切割脂质是ss-E脂质。在一个实施方案中,ss-E脂质包含以下脂质F中所示的结构:

[0517] 脂质F

[0518] 

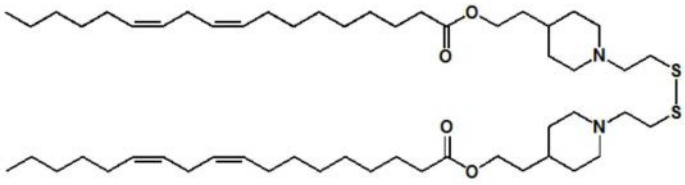
[0519] 在一个实施方案中,可切割脂质是ss-EC脂质。在一个实施方案中,ss-EC脂质包含以下脂质G中所示的结构:

[0520] 脂质G

[0521] 

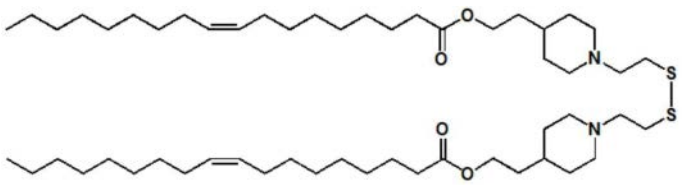
[0522] 在一个实施方案中,可切割脂质是ss-LC脂质。在一个实施方案中,ss-LC脂质包含以下脂质H中所示的结构:

[0523] 脂质H

[0524] 

[0525] 在一个实施方案中,可切割脂质是ss-OC脂质。在一个实施方案中,ss-OC脂质包含以下脂质J中所示的结构:

[0526] 脂质J

[0527] 

[0528] 在一些实施方案中,本公开的脂质纳米颗粒包含如上文所列的脂质A。

[0529] 在一些实施方案中,本公开的脂质纳米颗粒可以包含脂质A、DOPC、胆固醇和PEG-DMG。在一些实施方案中,本公开的脂质纳米颗粒可以包含脂质A、DOPC、胆固醇和PEG2000-DMG。

[0530] 在一些实施方案中,本公开的脂质纳米颗粒可以包含脂质A、DOPC、胆固醇、PEG_{2000}-DMG和GalNAc。在又一实施方案中,脂质纳米颗粒可包含摩尔比分别为50%:10%:38%:1.5%:0.5%的脂质A、DOPC、胆固醇、PEG_{2000}-DMG和GalNAc。

[0531] 在一个实施方案中,制备脂质微粒(例如,包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段的LNP)配制物并加载ceDNA,该ceDNA是通过如在2018年9月7日提交的国际专利申请号PCT/US2018/050042中公开的方法获得,该国际专利申请以引用方式整体并入本文。这可以通过在低pH下将乙醇脂质与水性ceDNA进行高能混合来实现,这使脂质质子化并为ceDNA/脂质缔合和颗粒的成核提供有利的能量。通过水稀释和去除有机溶剂可以进一步稳定粒子。能够将颗粒浓缩至所需水平。在一个实施方案中,本公开提供了一种包含式I的脂质的ceDNA脂质颗粒,该脂质是通过如美国临时申请号63/194,620中的实施例2中所述的方法制备。

[0532] 通常,以约10:1至60:1的总脂质与ceDNA(质量或重量)比制备脂质颗粒(例如,包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段的LNP)。在一些实施方案中,脂质与ceDNA比率(质量/质量比率;w/w比率)的范围可以是约1:1至约60:1、约1:1至约55:1、约1:1至约50:1、约1:1至约45:1、约1:1至约40:1、约1:1至约35:1、约1:1至约30:1、约1:1至约25:1、约10:1至约14:1、约3:1至约15:1、约4:1至约10:1、约5:1至约9:1、约6:1至约9:1、约30:1至约60:1。根据一些实施方案,以约60:1的ceDNA(质量或重量)与总脂质比率制备脂质颗粒(例如,包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段的LNP)。根据一些实施方案,以约30:1的ceDNA(质量或重量)与总脂质比率制备脂质颗粒(例如,包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段的LNP)。能够调节脂质和ceDNA的量以提供所需的N/P比,例如N/P比为3、4、5、6、7、8、9、10或更高。通常,脂质颗粒配制物的总脂质含量能够在约5mg/mL至约30mg/mL的范围内。

[0533] 在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包括用于缩合和/或包封核酸货物(例如,ceDNA)的试剂。这种试剂在本文中也称为缩合剂或包封剂。不受限制地,可以使用本领域已知的用于缩合和/或包封核酸的任何化合物,只要它是非融合的。换言之,能够缩合和/或包封核酸货物(诸如,ceDNA)的试剂,但几乎没有或没有融合活性。不希望受理论束缚,缩合剂在不缩合/包封核酸(例如,ceDNA)时可能具有一些融合活性,但是用该缩合剂形成的包封核酸的脂质纳米颗粒可以是非融合的。

[0534] 根据一些实施方案,包含与本文所述的LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段的LNP可包封大于约60%的刚性双链DNA(如ceDNA)、大于约65%的刚性双链DNA(如ceDNA)、大于约70%的刚性双链DNA(如ceDNA)、大于约75%的刚性双链DNA(如ceDNA)、

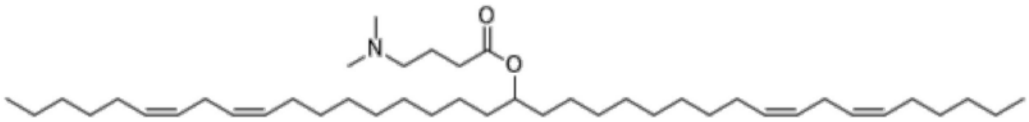
大于约80％的刚性双链DNA(如ceDNA)、大于约85％的刚性双链DNA(如ceDNA)或大于约90％的刚性双链DNA(如ceDNA)。

[0535] 阳离子脂质通常用于在低pH下缩合核酸货物(例如,ceDNA)并驱动膜缔合和融合。一般而言,阳离子脂质是包括至少一个氨基的脂质,该氨基带正电或在酸性条件下(例如在6.5或更低的pH下)质子化。阳离子脂质还可以是可离子化脂质(例如,可离子化阳离子脂质)。“非融合阳离子脂质”是指可以缩合和/或包封核酸货物(诸如ceDNA)但不具有融合活性或具有非常小的融合活性的阳离子脂质。

[0536] 在一个实施方案中,阳离子脂质可以占存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的20％-90％(mol)。例如,阳离子脂质摩尔含量可以是存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的20％-70％(mol)、30％-60％(mol)、40％-60％(mol)、40％-55％(mol)或45％-55％(mol)。在一些实施方案中,阳离子脂质占脂质颗粒(例如,包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段的LNP)中存在的总脂质的约50mol％至约90mol％。

[0537] 在一个实施方案中,SS-可切割脂质不是MC3(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烯-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA或MC3)。DLin-MC3-DMA描述于以下文献中:Jayaraman等人,Angew.Chem.Int.Ed Engl.(2012),51(34):8529-8533,其内容通过引用整体并入本文。D-Lin-MC3-DMA(MC3)的结构如下脂质K所示:

[0538] 脂质K

[0539] 

[0540] 在一个实施方案中,可切割脂质不是脂质ATX-002。脂质ATX-002描述于WO2015/074085中,其内容通过引用整体并入本文。在一个实施方案中,可切割脂质不是(13Z.16Z)-/V,/V-二甲基-3-壬基二十二碳-13,16-二烯-1-胺(化合物32)。化合物32描述于WO2012/040184中,其内容通过引用整体并入本文。在一个实施方案中,可切割脂质不是化合物6或化合物22。化合物6和22描述于WO2015/199952中,其内容通过引用整体并入本文。

[0541] 阳离子脂质的非限制性示例包括SS-可切割的且pH-活化的脂质样材料-OP(ss-OP;式I)、SS-可切割的且pH-活化的脂质样材料-M(SS-M;式V)、SS-可切割的且pH-活化的脂质样材料-E(SS-E;式VI)、SS-可切割的且pH-活化的脂质样材料式VII)、SS-可切割的且pH-活化的脂质样材料-LC(SS-LC;式VIII)、SS-可切割的且pH-活化的脂质样材料-OC(SS-OC;式IX)、聚乙烯亚胺、聚酰胺基胺(PAMAM)星爆式树枝状聚合物、脂质体(DOTMA与DOPE的组合)、Lipofectase、LIPOFECTAMINE™(例如,LIPOFECTAMINE™2000)、DOPE、Cytofectin(加利福尼亚州斯特城的吉利德科学公司(Gilead Sciences,Foster City,Calif.))和Eufectins(加利福尼亚州圣路易斯•奥比斯波(San Luis Obispo,Calif.)的JBL)。示例性阳离子脂质体可以由以下制成:N-[1-(2,3-二油醇氧基)-丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N-[1-(2,3-二油醇氧基)-丙基]-N,N,N-三甲基甲基硫酸铵(DOTAP)、3b-[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨基甲酰基]胆固醇(DC-Chol)、2,3,-二油酰氧基-N-[2(精胺甲酰胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-三氟乙酸丙胺(DOSPA)、1,2-二肉豆蔻氧基丙基-3-二甲基-羟乙

基溴化铵;以及溴化二甲基双十八烷基铵(DDAB)。核酸(例如,ceDNA或CELiD)也可以与例如聚(L-赖氨酸)或亲和素形成复合物,并且脂质可以或可以不包含在这一混合物中,例如甾基-聚(L-赖氨酸)。

[0542] 在一个实施方案中,阳离子脂质是式I的ss-OP。在另一个实施方案中,阳离子脂质是式II的SS-PAZ。

[0543] 在一个实施方案中,如本文公开的ceDNA载体使用美国专利号8,158,601中所描述的阳离子脂质或如美国专利号8,034,376中所描述的多元胺化合物或脂质进行递送。

[0544] B.非阳离子脂质

[0545] 在一个实施方案中,脂质颗粒(例如,包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段的LNP)还可包含非阳离子脂质。该非阳离子脂质可以用于增强融合性并且还可以增强LNP在形成过程中的稳定性。非阳离子脂质包括两亲性脂质、中性脂质和阴离子脂质。因此,非阳离子脂质可以是中性不带电的、两性离子型或阴离子脂质。非阳离子脂质通常用于增强融合性。

[0546] 示例性非阳离子脂质包括但不限于二硬脂酰基-sn-甘油-磷酸乙醇胺、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环已烷-1-甲酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆酰基磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基磷脂酰基-乙醇胺(DSPE)、单甲基磷脂酰乙醇胺(诸如16-0-单甲基PE)、二甲基磷脂酰乙醇胺(诸如16-0-二甲基PE)、18-1-反式PE、1-硬脂酰基-2-油酰基磷脂酰乙醇胺(SOPE)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、卵磷脂酰胆碱(EPC)、二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)、鞘磷脂(SM)、二肉豆酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆酰基磷脂酰甘油(DMPG)、二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、二芥酰基磷脂酰胆碱(DEPC)、棕榈酰基油酰磷脂酰甘油(POPG)、二反式油酰基磷脂酰乙醇胺(DEPE)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DLPE);1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPHyPE);卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷、磷酸二鲸蜡酯、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰胆碱或它们的混合物。应当理解,也可以使用其他二酰基磷脂酰胆碱和二酰基磷脂酰乙醇胺磷脂。这些脂质中的酰基优选为衍生自具有C_{10}-C_{24}碳链的脂肪酸的酰基,例如,月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基或油酰基。

[0547] 适用于脂质颗粒(例如,包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段的所有LNP)的非阳离子脂质的其他示例包括非磷脂质,诸如硬脂胺、十二烷基胺、十六烷基胺、乙酰基棕榈酸酯、甘油蓖麻酸酯、硬脂酸十六烷基酯、肉豆蔻酸异丙酯、两性丙烯酸聚合物、三乙醇胺-月桂基硫酸酯、烷基-芳基硫酸酯聚乙氧基化脂肪酸酰胺、双十八烷基二甲基溴化铵、神经酰胺、鞘磷脂等。

[0548] 在一些实施方案中,非阳离子脂质是磷脂。在一些实施方案中,非阳离子脂质选自由以下组成的组:DSPC、DPPC、DMPC、DOPC、POPC、DOPE和SM。在一些实施方案中,非阳离子脂质是DSPC。在其他实施方案中,非阳离子脂质是DOPC。在其他实施方案中,非阳离子脂质是DOPE。

[0549] 在一些实施方案中,非阳离子脂质可以占存在于脂质纳米颗粒中总脂质的0%-20%(mol)。在一些实施方案中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的0.5%-15%(mol)。在一些实施方案中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的5%-12%(mol)。在一些实施方案中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的5%-10%(mol)。在一个实施方案中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的约6%(mol)。在一个实施方案中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的约7.0%(mol)。在一个实施方案中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的约7.5%(mol)。在一个实施方案中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的约8.0%(mol)。在一个实施方案中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的约9.0%(mol)。在一些实施方案中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的约10%(mol)。在一个实施方案中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的约11%(mol)。

[0550] 示例性非阳离子脂质描述于国际申请公开号WO2017/099823和美国专利公开号US2018/0028664中,两者的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0551] 在一个实施方案中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以还包含一种组分(诸如,甾醇)以提供脂质颗粒的膜完整性和稳定性。在一个实施方案中,可用于脂质颗粒的示例性甾醇是胆固醇或其衍生物。胆固醇衍生物的非限制性示例包括极性类似物,诸如5α-胆固醇、5β-粪固醇、胆固醇基-(2'-羟基)-乙醚、胆固醇基-(4'-羟基)-丁醚和6-酮胆固醇;非极性类似物诸如5α-胆甾烷、胆甾烯酮、5α-胆甾烷酮、5β-胆甾烷酮、胆固醇癸酸酯等;以及它们的混合物。在一些实施方案中,该胆固醇衍生物是极性类似物,诸如胆固醇基-(4'-羟基)-丁基醚。在一些实施方案中,胆固醇衍生物是半琥珀酸胆甾醇酯(CHEMS)。

[0552] 示例性胆固醇衍生物描述于国际专利申请号WO2009/127060和美国专利公布号U.S.2010/0130588中,该两篇文献全文以引用方式并入本文。

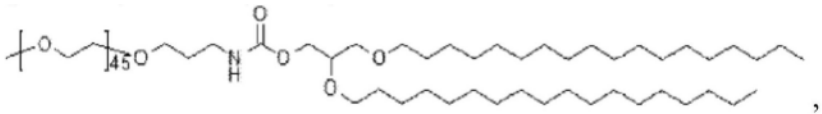
[0553] 在一个实施方案中,提供膜完整性的组分(诸如,甾醇)可以占存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的0%-50%(mol)。在一些实施方案中,此类组分是脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)总脂质含量的20%-50%(mol)。在一些实施方案中,此类组分是脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)总脂质含量的30%-40%(mol)。在一些实施方案中,此类组分是脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)总脂质含量的35%-45%(mol)。在一些实施方案中,此类组分是脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)总脂质含量的38%-42%(mol)。

[0554] 在一个实施方案中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)还可包含聚乙二醇(PEG)或缀合的脂质分子。通常,这些物质用于抑制脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的聚集和/或提供空间稳定化。示例性缀合脂质包含但不限于PEG-脂质缀合物、聚唔唑啉(POZ)-脂质缀合物、聚酰胺-脂质缀合物(诸如ATTA-脂质缀合物)、阳离子聚合物脂质(CPL)缀合物及其混合物。在一些实施方案中,缀合脂质分子是PEG化脂质,例如,(甲氧基聚乙二醇)-缀合脂质。在一些其他实施方案中,PEG化脂质是PEG_{2000}-DMG(二肉豆蔻酰甘油)。

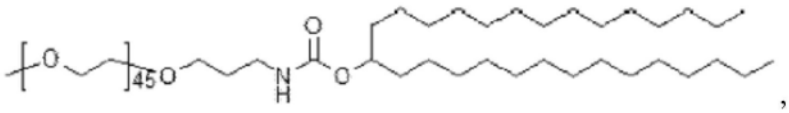
[0555] 示例性聚乙二醇化脂质包括(但不限于):PEG-二酰基甘油(DAG)(诸如1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰甘油(PEG-DMG)、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-

神经酰胺(Cer)、聚乙二醇化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)、PEG丁二酸酯二酰基甘油(PEGS-DAG)(诸如4-O-(2',3'-二(十四烷酰氧基)丙基-1-O-(w-甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯(PEG-S-DMG)、PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺钠盐,或它们的混合物。另外的示例性PEG-脂质缀合物描述于例如US5,885,613、US6,287,591、US2003/0077829、US2003/0077829、US2005/0175682、US2008/0020058、US2011/0117125、US2010/0130588、US2016/0376224和US2017/0119904中,所有这些文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

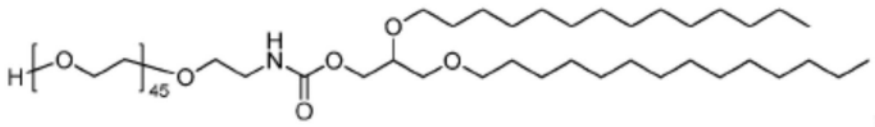
[0556] 在一个实施方案中,PEG-DAA PEG化脂质可以是例如,PEG-二月桂酰氧基丙基、PEG-二肉豆蔻酰氧基丙基、PEG-二棕榈酰氧基丙基或PEG-二硬脂酰基氧基丙基。PEG-脂质可以是以下中的一种或多种:PEG-DMG、PEG-二月桂基甘油、PEG-二棕榈酰基甘油、PEG-二硬脂基甘油、PEG-二月桂基甘油酰胺、PEG-二肉豆蔻基甘油酰胺、PEG-二棕榈酰基甘油酰胺、PEG-二硬脂基甘油酰胺、PEG-胆固醇(1-[8'-(胆甾-5-烯-3[β]-氧基)甲酰胺基-3',6'-二氧杂辛基]氨甲酰基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)、PEG-DMB(3,4-二(十四烷氧基)苯甲基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)醚),以及1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。在一个实施方案中,PEG-脂质可以选自由以下组成的组:PEG-DMG、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。

[0557] 

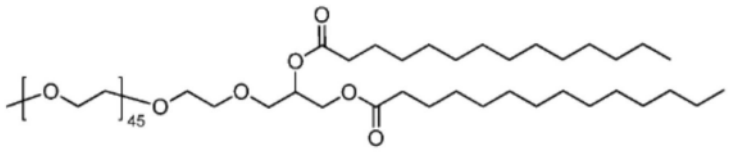
,



,

[0558] 

,和



。

[0559] 在一些实施方案中,PEG化脂质选自由以下组成的组:N-(羰基-甲氧基聚乙二醇$_n$)-1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DMPE-PEG$_n$,其中n(代表PEG平均分子量)是350、500、750、1000或2000);N-(羰基-甲氧基聚乙二醇$_n$)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DSPE-PEG$_n$,其中n是350、500、750、1000或2000);DSPE-聚乙二醇-环己基-羧酸;DSPE-聚乙二醇-2-甲基戊二酸-羧酸;1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DSPE)缀合的聚乙二醇(DSPE-PEG-OH);聚乙二醇-二肉豆蔻甘油(PEG-DMG);聚乙二醇-二硬脂酰基甘油(PEG-DSG);或N-辛酰基-鞘氨醇-1-{琥珀酰基-[甲氧基(聚乙二醇)200011(C8 PEG2000神经酰胺)。在DMPE-PEG$_n$的一些示例中,其中n是350、500、750、1000或2000,PEG-脂质是N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DMPE-PEG 2000)。在DSPE-PEG$_n$的一些示例中。其中n(表示PEG平均分子量)是350、500、750、1000 2000或5000,PEG-脂质是N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE-PEG 2,000)。在一些其他实施方案中,PEG化脂质是DSPE-PEG-

OH。在一些实施方案中,PEG化脂质是DSPE-PEG-叠氮化物。在一些实施方案中,PEG化脂质是PEG-DMG。在一些其他实施方案中,PEG化脂质是PEG-DSG。

[0560] 在一些实施方案中,缀合脂质(例如,PEG化脂质)包括组织特异性配体(例如,第一配体或第二配体)。例如,DSPE-PEG与GalNAc配体缀合,DSG-PEG与GalNAc配体缀合。

[0561] 在一个实施方案中,还能够使用与除PEG之外的分子缀合的脂质替代PEG-脂质。例如,聚唑啉(POZ)-脂质缀合物、聚酰胺-脂质缀合物(诸如ATTA-脂质缀合物)和阳离子-聚合物脂质(CPL)缀合物可用于代替或补充PEG-脂质。示例性缀合脂质(即PEG-脂质、(POZ)-脂质缀合物、ATTA-脂质缀合物和阳离子聚合物-脂质)描述于以下文献中:国际专利申请公开号WO1996/010392、WO1998/051278、WO2002/087541、WO2005/026372、WO2008/147438、WO2009/086558、WO2012/000104、WO2017/117528、WO2017/099823、WO2015/199952、WO2017/004143、WO2015/095346、WO2012/000104、WO2012/000104和WO2010/006282;美国专利申请公开号US2003/0077829、US2005/0175682、US2008/0020058、US2011/0117125、US2013/0303587、US2018/0028664、US2015/0376115、US2016/0376224、US2016/0317458、US2013/0303587、US2013/0303587和US20110123453;以及美国专利US5,885,613、US6,287,591、US6,320,017和US6,586,559,所有文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0562] 在一些实施方案中,PEG化脂质可以占存在于脂质纳米颗粒中总脂质的0%-20%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约0.5%-10%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约1%-5%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为2%-4%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约2%-3%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约1%-3%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约0.75%-2.5%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约0.75%-2.0%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约0.75%-1.8%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约1%-2%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约0.75%-1.5%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约1%-1.8%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约1%-1.5%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约1%-1.3%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约1%-1.2%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约0.75%-1.5%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约0.75%-1.25%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约1.5%-1.8%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约1.2%-1.5%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约2%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约2.5%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约3%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约3.5%(mol)。在一些实施方案中,PEG化脂质含量为约4%(mol)。

[0563] 应当理解,阳离子脂质(例如,可离子化阳离子脂质)与非阳离子脂质、甾醇和PEG化脂质的摩尔比可以根据需要而变化。例如,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可包含按摩尔或按组合物的总重量计30%-70%的阳离子脂质、按摩尔或按组合物的总重量计0%-60%的胆固醇、按摩尔或按组合物的总重量计0%-30%的非阳离子脂质和按摩尔或按组合物的总重量计2%-5%的PEG化脂质。在一个实施方案中,组合物包含按摩尔或按组合物的总重量计40%-60%的阳离子脂质、按摩尔或按组合物的总重量计30%-50%的胆固醇、按摩尔或按组合物的总重量计5%-15%的非阳离子脂质和按摩尔或按组合物的总重量计2%-5%的PEG或缀合的脂质。在一个实施方案中,组合物为按摩尔或按组合物的总重量计40%-

60％的阳离子脂质、按摩尔或按组合物的总重量计30％-40％的胆固醇和按摩尔或按组合物的总重量计5％-10％的非阳离子脂质以及按摩尔或按组合物的总重量计2％-5％的PEG化脂质。组合物可包含按摩尔或按组合物的总重量计60％-70％的阳离子脂质、按摩尔或按组合物的总重量计25％-35％的胆固醇、按摩尔或按组合物的总重量计5％-10％的非阳离子脂质和按摩尔或按组合物的总重量计2％-5％的PEG化脂质。组合物还可包含按摩尔或按组合物的总重量计至多45％-55％的阳离子脂质、按摩尔或按组合物的总重量计35％-45％的胆固醇、按摩尔或按组合物的总重量计2％-15％的非阳离子脂质和按摩尔或按组合物的总重量计2％-5％的PEG化脂质。该配制物也可以是脂质纳米颗粒配制物,例如包含按摩尔或按组合物的总重量计8％-30％的阳离子脂质、按摩尔或按组合物的总重量计5％-15％的非阳离子脂质、和按摩尔或按组合物的总重量计0％-40％的胆固醇;按摩尔或按组合物的总重量计4％-25％的阳离子脂质、按摩尔或按组合物的总重量计4％-25％的非阳离子脂质、按摩尔或按组合物的总重量计2％-25％的胆固醇、按摩尔或按组合物总重量计10％-35％的缀合脂质、和按摩尔或按组合物的总重量计5％的胆固醇;或按摩尔或按组合物的总重量计2％-30％的阳离子脂质、按摩尔或按组合物的总重量计2-30％的非阳离子脂质、按摩尔或按组合物的总重量计1％-15％的胆固醇、按摩尔或按组合物的总重量计2％-35％的PEG化脂质、和按摩尔或按组合物的总重量计1％-20％的胆固醇;或甚至按摩尔或按组合物的总重量计至多90％的阳离子脂质和按摩尔或按组合物的总重量计2％-10％的非阳离子脂质,或甚至按摩尔或按组合物的总重量计100％的阳离子脂质。在一些实施方案中,脂质颗粒配制物包含摩尔比为约50:9:38.5:2.5的阳离子脂质、非阳离子磷脂、胆固醇和PEG化脂质(缀合脂质)。

[0564] 在一个实施方案中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)配制物包含摩尔比为约50:7:40:3的阳离子脂质、非阳离子磷脂、胆固醇和PEG化脂质(缀合脂质)。

[0565] 在其它方面,本公开提供了一种包含磷脂、卵磷脂、磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺的脂质纳米颗粒配制物。

[0566] 在一个实施方案中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)包含阳离子脂质、非阳离子脂质(例如,磷脂)、甾醇(例如,胆固醇)和聚乙二醇化脂质(缀合脂质),其中阳离子脂质的脂质摩尔比在20摩尔％至70％摩尔范围内,目标为30摩尔％至60摩尔％,非阳离子脂质的摩尔百分比在0摩尔％至30摩尔％范围内,目标为0摩尔％至15摩尔％,甾醇的摩尔百分比在20摩尔％至70摩尔％范围内,目标为30摩尔％至50摩尔％,并且PEG化脂质(缀合脂质)的摩尔百分比在1摩尔％至6摩尔％范围内,目标为2摩尔％至5摩尔％。

[0567] 包含ceDNA的脂质纳米颗粒(LNP)在2018年9月7日提交的国际申请号PCT/US2018/050042中公开,其以全文引用的方式并入本文中并设想用于本文所公开的方法和组合物中。

[0568] 脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的尺寸可以使用Malvern Zetasizer Nano ZS(英国莫尔文)通过准弹性光散射来确定。根据一些实施方案,通过光散射测定的LNP平均直径小于约75nm或小于约70nm。根据一些实施方案,通过光散射测定的LNP平均直径为约50nm至约75nm或约50nm至约70nm。

[0569] 配制的阳离子脂质的pKa可以与LNP递送核酸的有效性相关(参见Jayaraman等人,Angewandte Chemie,国际版(2012),51(34),8529-8533;Semple等人,Nature

Biotechnology,第28卷,172-176(2010),这两篇文献全文以引用方式并入)。在一个实施方案中,使用基于2-(对甲苯胺)-6-萘磺酸(TNS)的荧光的测定法在脂质纳米颗粒中测定每种阳离子脂质的pKa。可以使用如本文和别处所述的在线过程制备在PBS中包括浓度为0.4mM总脂质的阳离子脂质/DSPC/胆固醇/PEG-脂质(50/10/38.5/1.5mol%)的脂质纳米颗粒。TNS可以在蒸馏水中制成100mM的储备溶液。可以在2mL缓冲溶液中将囊泡稀释到24mM脂质,该缓冲溶液含有10mM HEPES、10mM MES、10mM乙酸铵、130mM NaCl,其中pH在2.5到11范围内。可以添加等分试样的TNS溶液,使最终浓度为1mM,并在涡旋混合后,在室温下,使用321nm和445nm的激发和发射波长,在SLM Aminco系列2发光分光光度计中测量荧光强度。可以将S型最佳拟合分析应用于荧光数据,并测量pKa,其为达到半最大荧光强度的pH值。

[0570] 在一个实施方案中,相对活性可以通过在经由尾静脉注射施用后4小时测量肝脏中的荧光素酶表达来确定。在0.3mg和1.0mg ceDNA/kg的剂量下比较活性,并以施用后4小时测得的ng荧光素酶/g肝脏表示。

[0571] 不受限制地,本公开的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)包括可以用于递送无衣壳非病毒的DNA载体到感兴趣位点(例如,细胞、组织、器官等)的脂质配制物。一般而言,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)包括无衣壳非病毒DNA载体和阳离子脂质或其盐。

[0572] 在一个实施方案中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)包括摩尔比为50:10:38.5:1.5的阳离子脂质/非阳离子脂质/甾醇/缀合脂质。在一个实施方案中,本公开提供了一种包含磷脂、卵磷脂、磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)配制物。

[0573] III.末端封闭的DNA(ceDNA)载体

[0574] 本公开的实施方案基于包括可表达转基因(例如,治疗性核酸)的末端封闭的的线性双链(ceDNA)载体的方法和组合物。如本文所述的ceDNA载体没有由病毒衣壳内的有限空间所强加的包装约束。与包封的AAV基因组相反,ceDNA载体代表了一种可行的真核生物生产的替代原核生物生产的质粒DNA载体。这允许插入控制元件,例如,如本文所公开的调控开关、大的转基因、多个转基因等。

[0575] ceDNA载体优选地具有线性和连续结构而不是非连续结构。相信线性和连续结构在受到细胞核酸内切酶攻击时更稳定,并且不太可能重组并引起诱变。因此,线性和连续结构的ceDNA载体是优选的实施方案。连续、线性、单链的分子内双链体ceDNA载体可以具有共价结合的末端,而不具有编码AAV衣壳蛋白的序列。这些ceDNA载体在结构上不同于质粒(包括本文所描述的ceDNA质粒),该质粒是细菌来源的环状双链体核酸分子。质粒的互补链在变性后可以分离以产生两个核酸分子,而相比之下,ceDNA载体虽具有互补链,却是单个DNA分子,并且因此即使变性,可能也仍保持是单个分子。在一些实施方案中,与质粒不同,ceDNA载体的产生可以没有原核类型的DNA碱基甲基化。因此,在结构方面(特别是线性对比环形)以及还根据用于产生和提纯这些不同物体的方法方面,以及还根据它们的DNA甲基化方面,即ceDNA-质粒属于原核类型而ceDNA载体属于真核类型,ceDNA载体和ceDNA质粒是不同的。

[0576] 本文提供了具有共价封闭端的非病毒无衣壳ceDNA分子(ceDNA)。这些非病毒无衣壳ceDNA分子可以在许可宿主细胞中由含有定位在两个不同的反向末端重复(ITR)序列之间的异源基因(例如,转基因,尤其是治疗性转基因)的表达构建体(例如,ceDNA质粒、ceDNA-杆粒、ceDNA-杆状病毒或整合细胞系)产生,其中该ITR彼此不同。在一些实施方案

中,相较于野生型ITR序列(例如,AAV ITR),ITR其中中的一个ITR通过缺失、插入和/或取代进行修饰。并且ITR中的至少一个ITR包含功能末端解链位点(trs)和Rep结合位点。ceDNA载体优选地是双链体,例如,相对于分子的至少一部分是自互补的,诸如,表达盒(例如,ceDNA不是双链环状分子)。ceDNA载体具有共价末端封闭的,并且因此抵抗核酸外切酶消化(例如,核酸外切酶I或核酸外切酶III),例如在37℃下维持超过一小时。

[0577] 在一个方面,ceDNA载体在5'到3'方向上包括:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、感兴趣核苷酸序列(例如,如本文所描述的表达盒)和第二AAV ITR。在一个实施方案中,第一ITR(5'ITR)和第二ITR(3'ITR)相对于彼此不对称,也就是说,其彼此具有不同的3D空间构型。作为示例性实施方案,第一ITR可以是野生型ITR,并且第二ITR可以是经突变或修饰的ITR,或反过来,其中第一ITR可以是经突变或修饰的ITR,并且第二ITR可以是野生型ITR。在一个实施方案中,第一ITR和第二ITR都经修饰但为不同的序列,或具有不同的修饰,或不是相同的经修饰的ITR并且具有不同的3D空间构型。换句话说,具有不对称ITR的ceDNA载体具有这样的ITR:其中一个ITR相对于WT-ITR的任何变化不反映在另一个ITR中;或可替代地,其中具有经修饰的不对称ITR对的不对称ITR可以具有相对于彼此不同的序列和不同的三维形状。

[0578] 在一个实施方案中,ceDNA载体在5'到3'方向包括:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、感兴趣核苷酸序列(例如,如本文所述的表达盒)和第二AAV ITR,其中第一ITR(5'ITR)和第二ITR(3'ITR)相对于彼此是对称的或基本对称的,也就是说,ceDNA载体能够包括具有对称三维空间组构的ITR序列,使得其结构在几何空间中具有相同形状,或在3D空间中具有相同的A、C-C'和B-B'环。在这样的实施方案中,对称的ITR对或基本上对称的ITR对可以是修饰的ITR(例如,mod-ITR),它不是野生型ITR。一个mod-ITR对可以具有相同的相对于野生型ITR具有一个或多个修饰的序列,并且彼此反向互补(反向)。在一个实施方案中,经修饰的ITR对如本文所定义是大体上对称的,也就是说,经修饰的ITR对可以具有不同的序列,但具有对应或相同的对称三维形状。在一些实施方案中,对称的ITR或基本上对称的ITR可以是如本文所述的野生型(WT-ITR)。也就是说,两个ITR都具有野生型序列,但不一定必须是来自同一AAV血清型的WT-ITR。在一个实施方案中,一个WT-ITR可以来自一种AAV血清型,而另一个WT-ITR可以来自不同的AAV血清型。在这样的实施方案中,WT-ITR对如本文所定义是基本上对称的,即,它们可以具有一个或多个保守核苷酸修饰,同时仍然保留对称的三维空间组织。

[0579] 本文提供的野生型或突变的或以其它方式修饰的ITR序列代表了用于产生ceDNA载体的表达构建体(例如,ceDNA-质粒、ce-DNA杆粒、ceDNA-杆状病毒)中包括的DNA序列。因此,从ceDNA-质粒或其它表达构建体产生的ceDNA载体中实际含有的ITR序列与由于在产生过程期间发生天然发生的变化(例如,复制误差)而产生的本文中提供的ITR序列可能相同或可能不同。

[0580] 在一个实施方案中,本文所述的包括具有作为治疗性核酸序列的转基因的表达盒ceDNA载体可以可操作地连接到允许或控制转基因的表达的一或多个调节序列。在一个实施方案中,多核苷酸包括第一ITR序列和第二ITR序列,其中感兴趣核苷酸序列侧接第一和第二ITR序列,并且第一和第二ITR序列彼此不对称,或彼此对称。

[0581] 在一个实施方案中,表达盒位于两个ITR之间,该ITR按以下次序包括以下中的一

者或多者:可操作地连接到转基因的启动子、转录后调节元件以及聚腺苷酸化和终止信号。在一个实施方案中,启动子是可调节的-可诱导的或可抑制的。启动子可以是促进转基因转录的任何序列。在一个实施方案中,启动子是CAG启动子,或其变体。转录后调节元件是调节转基因表达的序列,作为非限制性示例,是产生增强作为治疗性核酸序列的转基因的表达的三级结构的任何序列。

[0582] 在一个实施方案中,转录后调节元件包括WPRE。在一个实施方案中,多聚腺苷酸化和终止信号包括BGH多聚腺苷酸。可以另外使用本领域已知的任何顺式调节元件或其组合,例如,SV40晚期多聚腺苷酸化信号上游增强子序列(USE)或其它转录后处理元件,包括但不限于单纯疱疹病毒或乙型肝炎病毒(HBV)的胸苷激酶基因。在一个实施方案中,表达盒在5'到3'方向上的长度大于已知在AAV病毒粒子中被衣壳化的最大长度。在一个实施方案中,长度大于4.6kb,或大于5kb,或大于6kb,或大于7kb。本文中举例说明了各种表达盒。

[0583] 在一个实施方案中,该表达盒能够包括超过4000个核苷酸、5000个核苷酸、10,000个核苷酸或20,000个核苷酸,或30,000个核苷酸,或40,000个核苷酸,或50,000个核苷酸,或在约4000-10,000个核苷酸或10,000-50,000个核苷酸之间的任何范围,或超过50,000个核苷酸。在一些实施方案中,表达盒可以包括转基因,该转基因是长度在500到50,000个核苷酸范围内的治疗性核酸序列。在一些实施方案中,表达盒可以包括转基因,该转基因是长度在500到75,000个核苷酸范围内的治疗性核酸序列。在一些实施方案中,表达盒可以包括转基因,该转基因是长度在500到10,000个核苷酸范围内的治疗性核酸序列。在一些实施方案中,表达盒可以包括转基因,该转基因是长度在1000到10,000个核苷酸范围内的治疗性核酸序列。在一些实施方案中,表达盒可以包括转基因,该转基因是长度在500到5,000个核苷酸范围内的治疗性核酸序列。ceDNA载体不具有衣壳化AAV载体的大小限制,因此能够将大尺寸的表达盒递送给宿主。在一个实施方案中,ceDNA载体缺乏原核生物特异性甲基化。

[0584] 在一个实施方案中,治疗性核酸可以是质粒。

[0585] 在一个实施方案中,本文所公开的ceDNA载体用于治疗目的(例如,用于医学、诊断或兽医学用途)或免疫原性多肽。

[0586] 表达盒可以包括作为治疗性核酸序列的任何转基因。在某些实施方案中,ceDNA载体包括受试者中感兴趣任何基因,包括一种或多种多肽、肽、核酶、肽核酸、siRNA、RNAi、反义寡核苷酸、反义多核苷酸、抗体、抗原结合片段、或其任何组合。

[0587] 在一个实施方案中,ceDNA表达盒可以包含例如可表达的外源序列(例如,开放阅读框)(其编码在接受者受试者中不存在、无活性或活性不足的蛋白质)或编码具有期望的生物学或治疗效果的蛋白质的基因。在一个实施方案中,诸如供体序列等外源序列可以编码一种基因产物,该基因产物可以起到校正缺陷基因或转录物表达的作用。在一个实施方案中,表达盒还可以编码正确的DNA链、多肽、有义或反义寡核苷酸或RNA(编码或非编码;例如,siRNA、shRNA、微小RNA和它们的反义对应物(例如,inisteriR))。在一个实施方案中,表达盒可以包含编码用于实验或诊断目的的报告蛋白的外源序列,诸如b-内酰胺酶、b-半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶、胸苷激酶、绿色荧光蛋白(GFP、氯霉素乙酰转移酶(CAT))、荧光素酶和本领域中公知的其它报告蛋白。

[0588] 因此,表达盒可以包含编码蛋白质、多肽或RNA的任何基因,该蛋白质、多肽或RNA由于突变而减少或缺失,或者当过表达时传递治疗益处被认为在本公开的范围内。ceDNA载

体可以包括模板或供体核苷酸序列,其用作在核酸酶提供的双链断裂(或切口)后插入的矫正DNA链。ceDNA载体可以包含模板核苷酸序列,其用作在由指导RNA核酸酶、大范围核酸酶或锌指核酸酶提供的双链断裂(或切口)后插入的矫正DNA链。

[0589] IV.治疗性核酸

[0590] 本公开的方面总体上提供了包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA)的组合物(例如,药物组合物),其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段。

[0591] 本公开的示例性治疗性核酸可包括但不限于小基因、质粒、小环分子、小干扰RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)、反义寡核苷酸(ASO)、核酶、末端封闭的双链DNA(例如,ceDNA、CELiD、线性共价封闭DNA(

[0592] “inisteringg”)、doggybone™、末端经前端粒封闭的DNA或哑铃线性DNA)、切丁酶底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、gRNA、DNA病毒载体、病毒RNA载体及其任意组合。

[0593] 本公开还预期可以通过称作RNA干扰(RNAi)的过程下调特定蛋白质的细胞内水平的siRNA或miRNA为核酸治疗剂。在将siRNA或miRNA引入宿主细胞的胞质中之后,这些双链RNA构建体可以结合到称为RISC的蛋白质。siRNA或miRNA的有义链通过RISC复合物去除。RISC复合物当与互补mRNA组合时,切割mRNA并且释放切割的链。RNAi是通过诱导mRNA的特异性破坏而导致相应蛋白质的下调。

[0594] 抑制mRNA翻译到蛋白质中的反义寡核苷酸(ASO)和核酶可以是核酸治疗剂。对于反义构建体,这些单链脱氧核酸具有与目标蛋白mRNA序列互补的序列,并且沃森-能够通过克里克碱基配对与mRNA结合。这一结合阻止目标mRNA的翻译,和/或触发mRNA转录物的RNaseH降解。因此,反义寡核苷酸具有增加的作用特异性(即,特定疾病相关蛋白的下调)。

[0595] 在本文所提供的任何方面和实施方案中,治疗性核酸可以是治疗性RNA。该治疗性RNA可以是mRNA翻译的抑配制物、RNA干扰的药剂(RNAi)、催化活性RNA分子(核酶)、转移RNA(tRNA)或结合mRNA转录物(ASO)的RNA、蛋白质或其它分子配体(适体)。在本文提供的任何方法中,RNAi的药剂可以是双链RNA、单链RNA、微RNA、短干扰RNA、短发夹RNA或三链体形成寡核苷酸。

[0596] 变性治疗性核酸

[0597] 本公开内容的方面还提供了包含脂质颗粒的药物组合物(例如,组合物如药物组合物),该药物组合物包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA),其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段)和变性治疗性核酸(TNA),其中TNA如上文所定义。

[0598] 在一个实施方案中,变性TNA是末端封闭的DNA(ceDNA)。术语“变性治疗性核酸”是指部分或完全的TNA,其中构象已经从标准B型结构改变。构象变化可以包括二级结构的变化(即,单个核酸分子内的碱基对相互作用)和/或三级结构的变化(即,双螺旋结构)。不受理论束缚,认为用醇/水溶液或纯醇溶剂处理的TNA导致核酸变性成构象,该构象增强LNP的包封效率,并产生具有较小直径尺寸(即,小于75nm,例如,平均直径尺寸为约68nm-74nm)的LNP配制物。本文所述的所有LNP平均直径尺寸和尺寸范围适用于含有变性TNA的LNP。

[0599] 当DNA处于水性环境中时,它具有B型结构,每个完整的螺旋圈中有10.4个碱基对。

如通过圆二色性(CD)光谱所观察到的,如果通过添加适度低极性的醇诸如甲醇来逐渐改变该水性环境,则螺旋的扭转松弛,由此DNA平稳地变成每个螺旋圈仅有10.2个碱基对的形式。在一个实施方案中,本文提供的药物组合物中的变性TNA具有10.2型结构。

[0600] 与这种行为相反,如果水被极性稍低的醇诸如乙醇替代,将仅发生相同类型的构象变化直至约65%的水被乙醇替代。如通过CD观察到的,此时,DNA突然变为A型结构,其具有更紧密扭转的螺旋,每个螺旋圈含有11个碱基对。在一个实施方案中,本文提供的药物组合物中的变性TNA具有A型结构。

[0601] 根据一些实施方案,当在透射电子显微镜(TEM)下观察时,本文提供的药物组合物中的变性TNA具有棒状结构。根据一些实施方案,当在透射电子显微镜(TEM)下观察时,本文提供的药物组合物中的变性TNA具有环状结构。比较而言,未变性的TNA具有链状结构。

[0602] V.ceDNA载体的产生

[0603] 本发明的实施方案基于包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA)的组合物。如本文所述的ceDNA载体没有由病毒衣壳内的有限空间所强加的包装约束。与包封的AAV基因组相反,ceDNA载体代表了一种可行的真核生物生产的替代原核生物生产的质粒DNA载体。这允许插入控制元件,例如,如本文所公开的调控开关、大的转基因、多个转基因等。

[0604] 用于产生如本文所述的包含如本文定义的不对称ITR对或对称ITR对的ceDNA载体的方法描述于2018年9月7日提交的PCT/US18/49996的第IV部分中,该专利通过引用整体并入本文。如本文所述,ceDNA载体可以例如通过包括以下步骤的方法获得:a)在能有效诱导在宿主细胞内产生ceDNA载体的条件下并持续足以诱导在宿主细胞内产生ceDNA载体的时间,在Rep蛋白的存在下孵育具有不含病毒衣壳编码序列的多核苷酸表达构建体模板(例如,ceDNA质粒、ceDNA杆粒和/或ceDNA杆状病毒)的宿主细胞(例如,昆虫细胞)群体,并且其中宿主细胞不包含病毒衣壳编码序列;以及b)从宿主细胞中收获并分离ceDNA载体。Rep蛋白的存在诱导具有经修饰的ITR的载体多核苷酸复制,从而在宿主细胞中产生ceDNA载体。

[0605] 提供以下作为非限制性示例。

[0606] 根据一些实施方案,合成ceDNA经由从双链DNA分子切除而产生。ceDNA载体的合成产生描述于2019年1月18日提交的国际申请PCT/US19/14122的实施例2-实施例6中,该国际申请通过引用整体并入本文。使用合成方法产生ceDNA载体的一种示例性方法涉及切除双链DNA分子。简而言之,可以使用双链DNA构建体产生ceDNA载体,例如,参见PCT/US19/14122的图7A至图8E。在一些实施方案中,双链DNA构建体是ceDNA质粒,例如参见例如2018年12月6日提交的国际专利申请PCT/US2018/064242的图6)。

[0607] 在一些实施方案中,制备ceDNA载体的构建体包括调控转基因表达的另外的组分,例如调控转基因表达的调控开关,或可以杀灭包括载体的细胞的杀灭开关。

[0608] 分子调节开关是一种响应信号而生成可测量的状态变化的开关。此类调控开关可以与本文所述的ceDNA载体有用地组合以控制转基因表达的输出。在一些实施方案中,ceDNA载体包括用以微调转基因的表达的调控开关。例如,其可以发挥ceDNA载体的生物封存功能。在一些实施方案中,开关是“ON/OFF”型开关,其被设计成以可控和可调控方式来启动或终止(即,关闭)感兴趣基因在ceDNA载体中的表达。在一些实施方案中,开关可以包含“杀灭开关”,一旦该开关被活化,其就可以指示包括合成ceDNA载体的细胞经历细胞程序性死亡。涵盖在ceDNA载体中使用的示例性调控开关可用于调控转基因的表达,并且在国际申

请PCT/US18/49996中更充分地讨论,该国际申请通过引用整体并入本文并在本文中描述。

[0609] 使用涉及组装不同寡核苷酸的合成方法产生ceDNA载体的另一种示例性方法提供于PCT/US19/14122的实施例3中,其中ceDNA载体是通过合成5'寡核苷酸和3'ITR寡核苷酸并且将ITR寡核苷酸与包含表达盒的双链多核苷酸接合来产生。PCT/US19/14122(通过引用整体并入本文)的图11B示出了将5'ITR寡核苷酸和3'ITR寡核苷酸与包括表达盒的双链多核苷酸接合的示例性方法。

[0610] PCT/US19/14122(通过引用整体并入本文)的实施例4中提供了使用合成方法产生ceDNA载体的示例性方法,该方法使用包括两个有义ITR的单链线性DNA,该有义ITR侧接于有义表达盒序列并共价附接到两个反义ITR,该反义ITR位于反义表达盒的两侧,然后将其单链线性DNA的末端接合,以形成末端封闭的的单链分子。一个非限制性示例包含合成和/或产生单链DNA分子、使该分子的各部分退火以形成具有二级结构的一个或多个碱基对区域的单一线性DNA分子,然后使自由的5'与3'端彼此接合以形成封闭的单链分子。

[0611] 在又一方面,本发明提供了宿主细胞系,该宿主细胞系已将本文所述的DNA载体多核苷酸表达模板(ceDNA模板)稳定整合到其自身的基因组中,用于生产非病毒DNA载体。产生这种细胞系的方法描述于Lee,L.等人,(2013)Plos One 8(8):e69879,其全部内容通过引用并入本文。例如,将Rep蛋白以3的MOI加入宿主细胞中。在一个实施方案中,宿主细胞系是无脊椎动物细胞系,优选地,昆虫Sf9细胞。当宿主细胞系是哺乳动物细胞系(优选地,293细胞)时,该细胞系可以具有稳定整合的多核苷酸载体模板,并且可以使用第二载体(诸如疱疹病毒)将Rep蛋白引入细胞中,从而允许在存在Rep的情况下切除和扩增ceDNA。

[0612] 任何启动子都可以与载体多核苷酸的异源核酸(例如报告核酸或治疗性转基因)可操作地连接。表达盒可以含有合成调控元件,诸如CAG启动子。CAG启动子包括(i)巨细胞病毒(CMV)早期增强子元件,(ii)鸡β-肌动蛋白基因的启动子、第一外显子和第一内含子,以及(ii)兔β珠蛋白基因的剪接受体。可替代地,表达盒可以含有α-1-抗胰蛋白酶(AAT)启动子、肝脏特异性(LP1)启动子或人延长因子-1α(EF1-α)启动子。在一些实施方案中,表达盒包含一种或多种组成型启动子,例如,逆转录病毒劳氏肉瘤病毒(RSV)LTR启动子(任选地带有RSV增强子)、巨细胞病毒(CMV)即刻早期启动子(任选地带有CMV增强子)。可替代地,可以使用诱导型或抑制型启动子、转基因的天然启动子、组织特异性启动子或本领域已知的各种启动子。用于基因疗法的合适转基因对于本领域技术人员是公知的。

[0613] 无衣壳ceDNA载体也可以由载体多核苷酸表达构建体产生,该载体多核苷酸表达构建体进一步包括顺式调控元件或顺式调控元件的组合,非限制性示例包含土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)和BGH polyA,或者例如β-珠蛋白polyA。其它转录后处理元件包含例如单纯疱疹病毒或乙型肝炎病毒(HBV)的胸苷激酶基因。表达盒可以包含本领域已知的任何聚腺苷酸化序列或其变体,诸如从牛BGHpA或病毒SV40pA分离的天然存在的,或合成的。一些表达盒还可以包括SV40晚期聚A信号上游增强子(USE)序列。USE可以与SV40pA或异源聚A信号组合使用。

[0614] 可以选择和优化从细胞中收获和收集本文所述的DNA载体的时间,以实现ceDNA载体的高产率生产。例如,可以根据细胞活力、细胞形态、细胞生长等选择收获时间。在一个实施方案中,细胞在足够的条件下生长,并在杆状病毒感染后足以产生DNA载体但在大多数细胞因病毒毒性而开始死亡之前的时间进行收获。可以使用质粒纯化试剂盒(诸如Qiagen

Endo-Free Plasmid试剂盒)分离DNA载体。为分离质粒而开发的其它方法也可适用于DNA载体。通常,可以采用任何核酸纯化方法。

[0615] DNA载体可以通过所属领域的技术人员已知用于纯化DNA的任何手段来纯化。在一个实施方案中,ceDNA载体被纯化为DNA分子。在另一个实施方案中,将ceDNA载体作为外泌体或微粒进行纯化。

[0616] 在一个实施方案中,无衣壳非病毒DNA载体包括含有多核苷酸模板的质粒或从包括多核苷酸模板的质粒获得,该多核苷酸模板按顺序包括:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、感兴趣核苷酸序列(例如,外源DNA的表达盒)和经修饰的AAV ITR,其中所述模板核酸分子缺乏AAV衣壳蛋白编码。在另一个实施方案中,本发明的核酸模板缺乏病毒衣壳蛋白编码序列(即,其缺乏AAV衣壳基因,也缺乏其他病毒的衣壳基因)。另外,在特定的实施方案中,核酸分子还缺乏AAV Rep蛋白编码序列。因此,在优选的实施方案中,本发明的核酸分子缺乏功能性AAV cap和AAV rep基因。

[0617] 在一个实施方案中,ceDNA可以包含这样一种ITR结构,其相对于本文公开的野生型AAV2 ITR发生突变,但仍保留可操作的RBE、TRS和RBE'部分。

[0618] ceDNA质粒

[0619] ceDNA-质粒是用于后来产生的ceDNA载体的质粒。在一个实施方案中,ceDNA质粒可以使用已知的技术来构建,以在转录方向上提供至少以下项作为操作性地连接的组分:(1)经修饰5'ITR序列;(2)含有顺式调节元件(例如,启动子、诱导型启动子、调节开关、增强子等)的表达盒;以及(3)经修饰的3'ITR序列,其中3'ITR序列相对于5'ITR序列对称。在一些实施方案中,侧接ITR的表达盒包含用于引入外源序列的克隆位点。表达盒替换了AAV基因组的rep和cap编码区。

[0620] 在一个实施方案中,ceDNA载体是从质粒获得,该质粒在本文中被称为"ceDNA-质粒",其按顺序编码:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、包括转基因的表达盒、以及突变的或经修饰的AAV ITR,其中该ceDNA-质粒缺乏AAV衣壳蛋白编码序列。在另选的实施方案中,ceDNA-质粒按次序编码:第一(或5')经修饰或经突变AAV ITR、包括转基因的表达盒、以及第二(或3')经修饰AAV ITR,其中该ceDNA-质粒缺乏AAV衣壳蛋白编码序列,并且其中5'和3'ITR彼此对称。在替代性实施方案中,ceDNA-质粒按顺序编码:第一(或5')经修饰的或突变AAV ITR、包括转基因的表达盒、以及第二(或3')突变的或经修饰的AAV ITR,其中该ceDNA-质粒缺乏AAV衣壳蛋白编码序列,并且其中5'和3'经修饰的ITR具有相同的修饰(即,它们是反向互补或相对于彼此对称)。

[0621] 在一个实施方案中,ceDNA-质粒系统缺乏病毒衣壳蛋白编码序列(即,其缺乏AAV衣壳基因,也缺乏其它病毒的衣壳基因)。在一个实施方案中,ceDNA-质粒还不含AAV Rep蛋白编码序列。在一个实施方案中,ceDNA质粒缺乏AAV2的功能性AAV cap和AAV rep基因GG-3'加上允许发夹形成的可变回文序列。在一个实施方案中,可以使用本领域公知的任何AAV血清型的基因组的天然核苷酸序列来产生本公开的ceDNA-质粒。在一个实施方案中,ceDNA-质粒主链衍生自AAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV 5、AAV7、AAV8、AAV9、AAV 10、AAV11、AAV 12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ和AAV-DJ8基因组(例如,NCBI:NC 002077);NC 001401;NC001729;NC001829;NC006152;NC 006260;NC 006261;Kotin和Smith,The Springer Index of Viruses,可在Springer维护的URL处获得。在一个实施方案中,ceDNA-

质粒主链源自AAV2基因组。在一个实施方案中,ceDNA-质粒主链是合成的主链,其被基因工程化为在其5'和3'ITR处包含源自于这些AAV基因组之一。

[0622] 在一个实施方案中,ceDNA-质粒可以任选地包含用于建立产生ceDNA载体的细胞系的选择性或选择标志物。在一个实施方案中,选择标志物可以插入3'ITR序列的下游(即,3')。在另一个实施方案中,选择标志物可以插入5'ITR序列的上游(即,5')。适当的选择标志物包含例如赋予耐药性的那些标志物。选择标志物可以是例如杀稻瘟菌素S抗性基因、卡那霉素(kanamycin)、遗传霉素(geneticin)等。

[0623] VI.脂质颗粒的制备

[0624] 脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以在将ceDNA与脂质混合时自发形成。取决于期望的粒度分布,可以使用例如热桶挤出机,诸如Lipex挤出机(Northern Lipids,Inc),膜(例如,100nrn截止值)挤出所得的纳米颗粒混合物。在某些情况下,可以省略挤出步骤。可以通过例如,透析或切向流过滤来实现乙醇去除和同时进行缓冲液交换。在一个实施方案中,如美国临时申请号63/194620中所述的实施例3所述形成脂质纳米颗粒。

[0625] 通常,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以通过本领域已知的任何方法形成。例如,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以通过例如US2013/0037977、US2010/0015218、US2013/0156845、US2013/0164400、US2012/0225129和US2010/0130588中描述的方法制备,其中每个专利的全部内容通过引用并入本文。在一些实施方案中,可以使用连续混合方法、直接稀释法或在线稀释法来制备脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)。用于使用直接稀释法和在线稀释法制备脂质纳米颗粒的装置的方法和装置描述于US2007/0042031中,其内容通过引用整体并入本文。使用逐步稀释法制备脂质纳米颗粒的方法和装置描述于US2004/0142025中,其内容通过引用整体并入本文。

[0626] 根据一些实施方案,本公开提供了包含DNA载体(包括如本文所述的ceDNA载体)和可离子化脂质的LNP。例如,一种脂质纳米颗粒配制物,其被制备并加载有通过2018年9月7日提交的国际专利申请号PCT/US2018/050042中公开的方法获得的治疗性核酸如ceDNA,该国际专利申请通过引用整体并入本文。

[0627] 在一个实施方案中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以通过冲击喷射方法制备。通常,颗粒是通过将溶解在醇(例如,乙醇)中的脂质与溶解在缓冲液(例如柠檬酸盐缓冲液、乙酸钠缓冲液、乙酸钠和氯化镁缓冲液、苹果酸缓冲液、苹果酸和氯化钠缓冲液或柠檬酸钠和氯化钠缓冲液)中的ceDNA混合形成的。脂质与ceDNA的混合比率可以是约45%-55%的脂质和约65%-45%的ceDNA。

[0628] 脂质溶液可以含有阳离子脂质(例如,可离子化阳离子脂质)、非阳离子脂质(例如,磷脂,如DSPC、DOPE和DOPC)、PEG或PEG缀合分子(例如,PEG-脂质)以及甾醇(例如,胆固醇),其在醇(例如,乙醇)中的总脂质浓度为5mg/mL-30mg/mL、更可能为5mg/mL-15mg/mL、最可能为9mg/mL-12mg/mL。在脂质溶液中,脂质的摩尔比对于阳离子脂质可为约25%-98%,优选约35%-65%;对于非离子脂质为约0%-15%,优选约0%-12%;对于PEG或PEG缀合的脂质分子为约0%-15%,优选约1%-6%;以及对于甾醇为约0%-75%,优选约30%-50%。

[0629] ceDNA溶液可以包括浓度范围为0.3mg/mL-1.0mg/mL,优选0.3mg/mL-0.9mg/mL的ceDNA缓冲溶液,pH范围为3.5-5。

[0630] 为了形成LNP,在一个示例性但非限制性实施方案中,将两种液体加热到约15℃-

40℃,优选约30℃-40℃的温度,然后例如,在冲击射流混合器中混合,立即形成LNP。混合流速可在10mL/min-600mL/min的范围内。管ID可具有0.25mm至1.0mm的范围和10mL/min-600mL/min的总流速。流速和管ID的组合可具有将LNP的粒径控制在30nm和200nm之间的效果。然后可以将溶液与较高pH的缓冲溶液混合,混合比在1:1至1:3vol:vol范围内,优选约1:2vol:vol。如果需要,这种缓冲溶液的温度可以在15℃-40℃或30℃-40℃范围内。然后混合的LNP可以进行阴离子交换过滤步骤。在阴离子交换之前,可以将混合的LNP孵育一段时间,例如,30分钟至2小时。孵育期间的温度可以在15℃-40℃或30℃-40℃的范围内。孵育后,溶液通过过滤器过滤,例如,0.8μm过滤器,包括阴离子交换分离步骤。该过程可以使用1mm ID到5mm ID的管内径和10mL/min到2000mL/min的流速。

[0631] 在形成之后,可以经由超滤过程浓缩和渗滤LNP,其中除去醇并将缓冲液更换为最终缓冲溶液,例如约pH 7(例如,约pH 6.9、约pH 7.0、约pH 7.1、约pH 7.2、约pH 7.3或约pH 7.4)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0632] 超滤过程可以使用切向流过滤形式(TFF),使用30kD-500kD的膜标称分子量截留范围。膜形式是中空纤维或平板盒。具有适当截留分子量的TFF过程可以将LNP保留在渗余液中,并且滤液或渗透液含有醇;柠檬酸盐缓冲液废液和最终缓冲液废液。TFF过程是多步骤过程,初始浓度为1mg/mL-3mg/mL的ceDNA浓度。浓缩后,将LNP溶液对最终缓冲液进行10-20体积的渗滤,以去除醇并进行缓冲液交换。然后可以将材料再浓缩1-3倍。浓缩的LNP溶液可以无菌过滤。

[0633] VII.药物组合物和配制物

[0634] 本文提供了包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA)的药物组合物,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段,以及至少一种药学上可接受的赋形剂。根据一些实施方案,经由LNP中存在的ApoE多肽和/或ApoB多肽与LDLR受体的结合,将药物组合物递送至表达LDLR的组织。根据一些实施方案,将组合物递送到眼中的视网膜细胞。根据一些实施方案,将组合物递送到肝中的肝细胞。根据一些实施方案,组合物被内化到眼中的视网膜细胞中。根据一些实施方案,组合物被内化到肝中的肝细胞中。

[0635] 在一个实施方案中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)对受试者,例如,对哺乳动物(诸如人类)基本上是无毒的。

[0636] 在一些实施方案中,如本文所述,LNP包含选自由以下组成的组:阳离子脂质、甾醇或其衍生物、非阳离子脂质和至少一种PEG化脂质的脂质。在一些实施方案中,LNP包含阳离子脂质。在一些实施方案中,LNP包含甾醇或其衍生物。在一些实施方案中,LNP包含非阳离子脂质。在一些实施方案中,LNP包含至少一种PEG化脂质。

[0637] 在一个实施方案中,可以将脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)与其他部分缀合以防止聚集。此类脂质缀合物包括但不限于PEG-脂质缀合物,例如与二烷氧基丙基偶联的PEG(例如,PEG-DAA缀合物)、与二酰基甘油偶联的PEG(例如,PEG-DAG缀合物)、与胆固醇偶联的PEG、与磷脂酰乙醇胺偶联的PEG、以及与神经酰胺缀合的PEG(参见,例如美国专利号5,885,613)、阳离子PEG脂质、聚恶唑啉(POZ)-脂质缀合物(例如,POZ-DAA缀合物;参见,例如,2010年1月13日提交的美国临时申请号61/294828和2010年1月14日提交的美国临时申请号61/295140)、聚酰胺低聚物(例如,ATTA-脂质缀合物)以及它们的混合物。POZ-脂质缀合物的其他示例在PCT公开号WO 2010/006282中有描述。PEG或POZ可以直接与脂质缀合,或者可以经

由接头部分与脂质连接。可以使用适合将PEG或POZ与脂质偶联的任何接头部分,包括例如,不含酯的接头部分和含酯的接头部分。在某些优选的实施方案中,使用不含酯的接头部分,诸如,酰胺或氨基甲酸酯。出于所有目的,将每个上述专利文件的公开内容全文以引用方式并入本文。

[0638] 根据一些实施方案,TNA(例如,ceDNA)被包封在脂质中。在一个实施方案中,TNA可以完全包封在脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的脂质位置,从而保护它免于(例如,在水溶液中)被核酸酶降解。在一个实施方案中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的TNA在脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)于37℃暴露于核酸酶至少约20分钟、30分钟、45分钟或60分钟后基本上没有被降解。在一些实施方案中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的TNA在该颗粒于血清中在37℃下孵育至少约30分钟、45分钟或60分钟或至少约2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、14小时、16小时、18小时、20小时、22小时、24小时、26小时、28小时、30小时、32小时、34小时或36小时后基本上不降解。

[0639] 在一个实施方案中,TNA(例如,ceDNA)在脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的包封可以通过进行不可渗透膜的荧光染料排除测定法来确定,例如OLIGREEN®测定法或ICOGREEN®测定法,该测定法使用与核酸缔合时增强荧光的染料。通常,通过将染料添加到脂质颗粒配制物中,测量所得的荧光,并与添加少量非离子洗涤剂后观察到的荧光进行比较来确定包封。洗涤剂介导的对脂质双层的破坏释放了包封的TNA(例如,ceDNA),使其与不可渗透膜的染料相互作用。ceDNA的包封可以计算为E=(Io-I)/Io,其中I和Io是指添加洗涤剂之前和之后的荧光强度。

[0640] 根据一些实施方案,TNA选自由以下组成的组:微基因、质粒、小环、小干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)、反义寡核苷酸(ASO)、核酶、末端封闭的(ceDNA)、迷你串、doggybone™、末端经前端粒封闭的的DNA或哑铃线性DNA、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、非对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、DNA病毒载体、病毒RNA载体、非病毒载体及其任何组合。

[0641] 根据一些实施方案,该TNA为ceDNA。根据一些实施方案,该ceDNA为线性双链体DNA。根据一些实施方案,该TNA为mRNA。根据一些实施方案,该TNA为siRNA。根据一些实施方案,该TNA为质粒。

[0642] 根据一些实施方案,ApoE多肽和/或ApoB多肽以约0.02μg/μg的TNA至约0.1μg/μg的TNA的总量存在。根据一些实施方案,ApoE多肽和/或ApoB多肽以约0.05μg/μg的TNA至约0.1μg/μg的TNA的总量存在。根据一些实施方案,ApoE多肽和/或ApoB多肽以约0.02μg/μg的TNA至约0.05μg/μg的TNA的总量存在。根据一些实施方案,ApoE多肽和/或ApoB多肽以0.08μg/μg的TNA至约0.1μg/μg的TNA的总量存在。

[0643] 根据一些实施方案,LNP的总脂质与TNA的比率为约10:1至约40:1,例如10:1至30:1或10:1至20:1或10:1至15:1。

[0644] 根据一些实施方案,LNP包含PEG化脂质,其中PEG化脂质与ApoE多肽或其片段连接,或者PEG化脂质与ApoB多肽或其片段连接。根据进一步的实施方案,ApoE多肽或其片段或ApoB多肽或其片段与PEG化脂质化学缀合。根据一些实施方案,ApoB多肽或其片段与LNP的PEG化脂质共价连接以形成PEG化脂质缀合物。根据一些实施方案,与ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段共价连接的PEG化脂质是DSPE-PEG(例如,DSPE-PEG2000)。根据一

些实施方案,与ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段共价连接的PEG化脂质是DSPE-PEG-OH。根据一些实施方案,与ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段共价连接的PEG化脂质是DSG-PEG(例如,DSG-PEG2000)。根据一些实施方案,与ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段共价连接的PEG化脂质是DSG-PEG(例如,DSG-PEG2000)。根据一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段经由不可切割的接头与LNP共价连接。根据一些实施方案,不可切割的接头是含马来酰亚胺的接头。根据一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段经由可切割的接头与LNP共价连接。根据一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段经由含吡啶基二硫化物(PDS)的接头与LNP共价连接。根据一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段经由菌株促进的炔-叠氮化物环加成(SPAAC)化学作用与LNP共价连接。

[0645] 根据一些实施方案,LNP包含阳离子脂质,其中该阳离子脂质以约30%至约80%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含阳离子脂质,其中该阳离子脂质以约30%至约70%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含阳离子脂质,其中该阳离子脂质以约30%至约60%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含阳离子脂质,其中该阳离子脂质以约30%至约50%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含阳离子脂质,其中该阳离子脂质以约30%至约40%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含阳离子脂质,其中该阳离子脂质以约40%至约80%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含阳离子脂质,其中该阳离子脂质以约30%至约70%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含阳离子脂质,其中该阳离子脂质以约40%至约60%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含阳离子脂质,其中该阳离子脂质以约40%至约50%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含阳离子脂质,其中该阳离子脂质以约50%至约80%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含阳离子脂质,其中该阳离子脂质以约50%至约70%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含阳离子脂质,其中该阳离子脂质以约50%至约60%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含阳离子脂质,其中该阳离子脂质以约60%至约80%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含阳离子脂质,其中该阳离子脂质以约70%至约80%的摩尔百分比存在。

[0646] 根据一些实施方案,LNP包含甾醇,其中该甾醇以约20%至约50%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含甾醇,其中该甾醇以约30%至约50%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含甾醇,其中该甾醇以约40%至约50%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含甾醇,其中该甾醇以约20%至约40%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含甾醇,其中该甾醇以约30%至约40%的摩尔百分比存在。

[0647] 根据一些实施方案,LNP包含非阳离子脂质,其中该非阳离子脂质以约2%至约20%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含非阳离子脂质,其中该非阳离子脂质以约5%至约20%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含非阳离子脂质,其中该非阳离子脂质以约10%至约20%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含非阳离子脂质,其中该非阳离子脂质以约15%至约20%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含非阳离子脂质,其中该非阳离子脂质以约10%至约20%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含非阳离子脂质,其中该非阳离子脂质以约10%至约15%的摩尔百分比存在。

[0648] 根据一些实施方案,LNP包含至少一种PEG化脂质,其中该PEG化脂质以约2.1%至约10%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含至少一种PEG化脂质,其中该PEG化脂质以约5%至约10%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含至少一种PEG化脂质,其中该PEG化脂质以约7%至约10%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含至少一种PEG化脂质,其中该PEG化脂质以约2.1%至约8%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含至少一种PEG化脂质,其中该PEG化脂质以约2.1%至约5%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含至少一种PEG化脂质,其中该PEG化脂质以约5%至约8%的摩尔百分比存在。

[0649] 根据一些实施方案,LNP包含至少一种PEG化脂质,其中该PEG化脂质以约1%至约2%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含至少一种PEG化脂质,其中该PEG化脂质以约1.2%至约2%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含至少一种PEG化脂质,其中该PEG化脂质以约1.5%至约2%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含至少一种PEG化脂质,其中该PEG化脂质以约1.75%至约2%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含至少一种PEG化脂质,其中该PEG化脂质以约1%至约1.5%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含至少一种PEG化脂质,其中该PEG化脂质以约1.25%至约1.5%的摩尔百分比存在。根据一些实施方案,LNP包含至少一种PEG化脂质,其中该PEG化脂质以约1.5%至约1.75%的摩尔百分比存在。

[0650] 取决于该脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的预期用途,可以改变组分的比例,并且可以使用例如内体释放参数(ERP)测定法来测量特定配制物的递送效率。

[0651] 根据一些实施方案,药物组合物还可包含地塞米松棕榈酸酯。

[0652] 根据本文所述的药物组合物的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPC、胆固醇和DMG-PEG。根据本文所述的药物组合物的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPC、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG。根据本文所述的药物组合物的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPC、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG-叠氮化物。根据本文所述的药物组合物的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPC、胆固醇和DMG-PEG。根据本文所述的药物组合物的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPE、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG。根据本文所述的药物组合物的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPE、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG-叠氮化物。根据本文所述的药物组合物的一些实施方案,LNP包含脂质A、DSPC、胆固醇和DMG-PEG。根据本文所述的药物组合物的一些实施方案,LNP包含脂质A、DSPC、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG。根据本文所述的药物组合物的一些实施方案,e LNP包含脂质A、DSPC、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG-叠氮化物。根据本文所述的药物组合物的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPC、β-谷甾醇和DMG-PEG。根据本文所述的药物组合物的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPC、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG。根据本文所述的药物组合物的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPC、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG-叠氮化物。根据本文所述的药物组合物的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPE、β-谷甾醇和DMG-PEG。根据本文所述的药物组合物的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPE、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG。根据本文所述的药物组合物的一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPE、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG-叠氮化物。根据本文所述的药物组合物的一些实施方案,LNP包含脂质A、DSPC、β-谷甾醇和DMG-PEG。根据本文所述的药物组合物的一些实施方案,LNP包含脂质A、DSPC、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG。根据本文所述的药物组合物的一些实施方

案,LNP包含脂质A、DSPC、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG-叠氮化物。

[0653] 根据本文的任何方面和实施方案中的一些实施方案中,DMG-PEG是DMG-PEG2000。

[0654] 根据本文的任何方面和实施方案中的一些实施方案中,DSPE-PEG是DSPE-PEG2000。

[0655] 根据本文的任何方面和实施方案中的一些实施方案中,DSPE-PEG是DSPE-PEG5000。

[0656] 根据本文的任何方面或实施方案中的一些实施方案,DSPE-PEG-叠氮化物是DSPE-PEG2000-叠氮化物。

[0657] 根据本文的任何方面或实施方案中的一些实施方案,DSPE-PEG-叠氮化物是DSPE-PEG5000-叠氮化物。

[0658] 根据本文的任何方面和实施方案中的一些实施方案,LNP包含摩尔比为约51:7.3:38.3:2.9:0.5的脂质A、DOPC、甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

[0659] 根据一些方面,本公开提供了一种药物组合物,该组合物包含LNP、治疗性信使RNA(mRNA)和至少一种药学上可接受的赋形剂;其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段,和/或ApoB多肽或其片段;阳离子脂质,该阳离子脂质具有如本文所述的脂质A的结构式,并且其中LNP能够将mRNA递送至视网膜细胞。根据一些实施方案,LNP能够将mRNA递送至光感受器(PR)细胞。根据一些实施方案,LNP能够将mRNA递送至视网膜色素上皮(RPE)细胞。根据一些实施方案,LNP能够被内化到PR细胞和/或RPE细胞中。根据一些实施方案,mRNA表达均匀地分布在PR细胞和RPE细胞中。

[0660] 根据一些实施方案,与合适的对照相比,LNP能够将mRNA递送至视网膜细胞而不导致视网膜降解或外核层(ONL)变薄。

[0661] 根据一些实施方案,ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段能够结合低密度脂蛋白(LDL)受体或LDL受体家族成员。

[0662] 根据一些实施方案,mRNA被包封在LNP中。

[0663] 根据一些实施方案,LNP还包含选自由以下组成的组的脂质:甾醇或其衍生物、非阳离子脂质和至少一种PEG化脂质。根据一些实施方案,甾醇或其衍生物是胆固醇。根据其它实施方案,甾醇或其衍生物是β-谷甾醇。根据一些实施方案,非阳离子脂质选自由以下组成的组:二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)和二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)。根据一些实施方案,PEG化脂质为DMG-PEG、DSPE-PEG、DSPE-PEG-OH、DSPE-PEG-叠氮化物、DSG-PEG或其组合。根据一些实施方案,至少一种PEG化脂质为DMG-PEG2000、DSPE-PEG2000、DSPE-PEG2000-OH、DSPE-PEG-叠氮化物、DSG-PEG或其组合。根据一些实施方案,LNP包含脂质A、DOPC、胆固醇和DMG-PEG;或脂质A、DOPC、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG;或脂质A、DOPC、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG-叠氮化物;或脂质A、DOPE、胆固醇和DMG-PEG;脂质A、DOPE、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG;或脂质A、DOPE、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG-叠氮化物;或

[0664] 脂质A、DSPC、胆固醇和DMG-PEG;或脂质A、DSPC、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG;或脂质A、DSPC、胆固醇、DMG-PEG和DSPE-PEG-叠氮化物;脂质A、DOPC、β-谷甾醇和DMG-PEG;或脂质A、DOPC、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG;或脂质A、DOPC、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG-叠氮化物;或脂质A、DOPE、β-谷甾醇和DMG-PEG;或脂质A、DOPE、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-

PEG;或脂质A、DOPE、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG-叠氮化物;或脂质A、DSPC、β-谷甾醇和DMG-PEG;或脂质A、DSPC、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG;或脂质A、DSPC、β-谷甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG-叠氮化物。

[0665] 根据一些实施方案,DMG-PEG为DMG-PEG2000。

[0666] 根据一些实施方案,DSPE-PEG为DSPE-PEG2000。

[0667] 根据一些实施方案,DSPE-PEG为DSPE-PEG5000。

[0668] 根据一些实施方案,DSPE-PEG-叠氮化物为DSPE-PEG2000-叠氮化物。

[0669] 根据一些实施方案,DSPE-PEG-叠氮化物为DSPE-PEG 5000-叠氮化物。

[0670] 根据一些实施方案,LNP包含摩尔比为约51:7.3:383:2.9:0.5的脂质A、DOPC、甾醇、DMG-PEG和DSPE-PEG或DSPE-PEG-叠氮化物。

[0671] 根据其它方面,本公开提供了一种使用如本文所述的DBCO官能化的ApoE多肽或ApoB多肽作为试剂与叠氮化合物组合制备的药物组合物。根据一些实施方案,叠氮化合物为DSPE-PEG2000-叠氮化物或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[叠氮基(聚乙二醇)-2000]或其盐。

[0672] 在一个实施方案中,脂质颗粒配制物是水溶液。在一个实施方案中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)配制物是冻干粉末。

[0673] 根据一些方面,本公开提供了一种还包括一种或多种药物赋形剂的脂质颗粒配制物。在一个实施方案中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)配制物还包括蔗糖、tris、海藻糖和/或甘氨酸。

[0674] 用于治疗目的的药物组合物能够配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或其它适合高TNA(例如,ceDNA)载体浓度的有序结构。无菌注射溶液可通过将所需量的TNA(例如,ceDNA)载体化合物根据需要与上文列举的成分中的一种或组合一起掺入适当缓冲液(例如,药学上可接受的赋形剂)中,接着进行过滤灭菌来制备。

[0675] 用于治疗目的的药物组合物通常必须在制造和存储条件下是无菌的和稳定的。组合物可以配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或其它适合于高TNA(例如,ceDNA)载体浓度的有序结构。无菌注射溶液可以通过将所需量的ceDNA载体化合物根据需要与上文列举的成分中的一种或组合一起掺入适当的缓冲液中,接着进行过滤灭菌来制备。

[0676] 在一个实施方案中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)是具有至少一个脂质双层的实心颗粒。在一个实施方案中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)具有非双层结构,即非层状(即非双层)形态。不受限制地,非双层形态可以包括例如三维管、棒、立方对称等。脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的非层状形态(即,非双层结构)可以使用本领域的技术人员已知并使用的分析技术来确定。此类技术包括(但不限于):低温透射电子显微镜(“Cryo-TEM”)、差示扫描量热法(“DSC”)、X射线衍射等。例如,脂质颗粒的形态(层状与非层状)可以很容易地进行评估,并使用例如如US2010/0130588中所描述的Cryo-TEM分析来表征,该文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0677] 在一个实施方案中,具有非片层形态的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)是电子致密的。

[0678] 在一个实施方案中,本公开提供了一种结构上为单层或多层的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)。在一些方面,本公开提供了一种包括多囊泡颗粒和/或基于泡沫的颗粒的脂

质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)配制物。通过控制脂质组分的组成和浓度,可以控制脂质缀合物从脂质颗粒中交换出来的速率,进而可以控制脂质颗粒(例如脂质纳米颗粒)融合的速率。此外,包括例如pH、温度或离子强度的其他变量可用于改变和/或控制脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)融合的速率。基于本公开,本领域普通技术人员将清楚可以用于控制脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)融合速率的其他方法。同样显而易见,通过控制该脂质缀合物的组合物和浓度,可以控制脂质颗粒的大小。

[0679] 在一个实施方案中,配制的阳离子脂质的pKa可以与LNP递送核酸的效力相关(参见,Jayaraman等人,Angewandte Chemie,International Edition(2012),51(34),8529-8533;Semple等人,Nature Biotechnology,第28卷,172-176(2010),这两篇文献全文以引用方式并入)。在一个实施方案中,pKa的优选范围是约5至约7。在一个实施方案中,可以使用基于2-(p-甲苯胺)-6-萘磺酸(TNS)的荧光的测定法在脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中测定阳离子脂质的pKa。

[0680] 根据一些实施方案,对于眼用递送,干扰RNA-配体缀合物和纳米颗粒-配体缀合物可与眼科可接受的防腐剂、共溶剂、表面活性剂、粘度增强剂、渗透增强剂、缓冲剂、氯化钠或水组合以形成水性无菌眼用混悬液或溶液。

[0681] 单位剂量

[0682] 在一个实施方案中,药物组合物可以单位剂量呈现。单位剂量通常将适于药物组合物的一种或多种特定施用途径。

[0683] 在一些实施方案中,单位剂量适合于静脉内、肌肉内或皮下施用。在一些实施方案中,单位剂量适合于鞘内或脑室内施用。在一些实施方案中,单位剂量适合于通过吸入施用。在一些实施方案中,单位剂量适合于通过汽化器施用。在一些实施方案中,单位剂量适合于通过喷雾器施用。在一些实施方案中,单位剂量适合于通过气雾器施用。在一些实施方案中,单位剂量适合于口服施用、经颊施用或舌下施用。在一些实施方案中,配制药物组合物以供局部施用。

[0684] 可以与载剂材料组合以产生单个剂量的活性成分的量将通常是化合物产生治疗效果的量。

[0685] 根据一些实施方案,LNP/TNA的施用剂量如下:约0.03μg至约2.0μg、或约0.05μg至约2.0μg、约0.1μg至约2.0μg、约0.5μg至约2.0μg、约1.0μg至约2.0μg、约1.5μg至约2.0μg、约0.03μg至约1.5μg、约0.05μg至约1.5μg、约0.1μg至约1.5μg、约0.5μg至约1.5μg、约1.0μg至约1.5μg、约0.03μg至约1.0μg、约0.05μg至约1.0μg、约0.1μg至约1.0μg、约0.5μg至约1.0μg、约0.03μg至约0.5μg、约0.05μg至约0.5μg、约0.1μg至约0.5μg、约0.03μg至约0.1μg、约0.05μg至约0.1μg、或约0.03μg至约0.05μg。

[0686] 根据一些实施方案,LNP/TNA的施用剂量如下:约0.1μg至约1.0μg、或约0.1μg至约0.9μg、或约0.1μg至约0.8μg、或约0.1μg至约0.7μg、或约0.1μg至约0.6μg、或约0.1μg至约0.5μg、或约0.1μg至约0.4μg、或约0.1μg至约0.3μg、或约0.1μg至约0.2μg。

[0687] 根据一些实施方案,LNP/TNA的施用剂量如下:约0.1μg至约0.2μg,例如约0.1μg、0.11μg、0.12μg、0.13μg、0.14μg、0.15μg、0.16μg、0.17μg、0.18μg、0.19μg或约0.2μg的剂量。

[0688] VIII.治疗方法

[0689] 如本文所述,包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA)的药物组合物可用于在宿主细胞中引入核酸序列(例如,TNA),其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段。在一个实施方案中,宿主细胞在体外。在一个实施方案中,宿主细胞在体内。

[0690] 根据一个方面,本公开提供了治疗受试者中的遗传性疾患的方法,包括向受试者施用有效量的本文所述的药物组合物(例如,包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA)的药物组合物)。根据一些实施方案,受试者是人类。

[0691] 在一个实施方案中,使用如本文所述的包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA)的药物组合物将核酸序列引入宿主细胞可用来自治疗患者的合适生物标志物监测以评估基因表达。

[0692] 本文提供的药物组合物可用于递送转基因(核酸序列)以用于各种目的。在一个实施方案中,ceDNA载体(例如,ceDNA载体脂质颗粒)可以以多种方式使用,包括,例如,异位、体外和体内应用、方法、诊断程序和/或基因疗法方案。

[0693] 本文提供了治疗受试者的疾病或病患的方法,该方法包括将治疗有效量的包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA)的药物组合物引入受试者的有需要的细胞(例如,肌细胞或组织,或其他受影响的细胞类型)中,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段。虽然TNA脂质纳米颗粒可以在载剂存在下引入,但此类载剂不是必需的。

[0694] 如本文所述,本文提供了用于向有需要的受试者提供诊断或治疗有效量的包含LNP和TNA的药物组合物的方法,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段;如本文所述,该方法包括向有需要的受试者的细胞、组织或器官提供一定量的包含LNP和TNA的药物组合物,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段;并且如本文所述,持续一段时间以使得能够从ceDNA载体表达转基因,从而为受试者提供诊断或治疗有效量的包含LNP和TNA的药物组合物,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段。在一个实施方案中,受试者是人类。

[0695] 本文提供了包括使用如本文所述的包含LNP和TNA的药物组合物治疗或减轻疾病或疾病状态的一种或多种症状的方法,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段。有许多遗传疾病中的缺陷基因是已知的,并且通常分为两类:缺陷状态,通常是酶,一般以隐性方式遗传;和不平衡状态,其可以涉及调节蛋白或结构蛋白,并且通常但不总是以显性方式遗传。对于缺陷状态疾病,如本文所述的包含LNP和TNA的药物组合物(其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段)可用于递送转基因以将正常基因带入受影响的组织中用于替代疗法,以及在一些实施方案中,使用反义突变产生用于疾病的动物模型。如本文所使用的,通过部分或完全拯救导致疾病或使其更严重的缺陷或不平衡,可以治疗疾病状态。

[0696] 根据一些实施方案,如本文所述的包含LNP和TNA的药物组合物靶向与眼部病症相关的基因,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段。如本文所述,RPE和PR上的LDLR表达为使用包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA)的药物组合物(其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段)的靶向治疗提供机会。靶基因的示例包括与影响视网膜的疾患相关的基因、与青光眼相关的基因和与眼部

炎症相关的基因。如本文实施例中所示,本公开的发现是,包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA)的药物组合物(其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段)具有导致在视网膜中稳健递送和耐受性的独特性质。如本文实施例中所示,与对照相比,ApoE和ApoB配体体内增加GFP mRNA在光感受器和RPE两者中的表达。

[0697] 与视网膜疾患相关的靶基因的示例包括酪氨酸激酶、内皮细胞(TEK);补体因子B(CFB);低氧诱导因子1,α亚基(HIF1A);HtrA丝氨酸肽酶1(HTRA1);血小板衍生的生长因子受体β(PDGFRB);趋化因子,CXC基序,受体4(CXCR4);胰岛素样生长因子I受体(IGF1R);血管生成素2(ANGPT2);v-fos FBJ鼠骨肉瘤病毒致癌基因同系物(FOS);组织蛋白酶L1,转录物变体1(CTSL1);组织蛋白酶L1,转录物变体2(CTSL2);胞内粘附分子1(ICAM1);胰岛素样生长因子I(IGF1);整联蛋白α5(ITGA5);整联蛋白β1(ITGB1);核因子κ-B,亚基1(NFKB1);核因子κ-B,亚基2(NFKB2);趋化因子,CXC基序,配体12(CXCL12);肿瘤坏死因子-α-转化酶(TACE);肿瘤坏死因子受体1(TNFR1);血管内皮生长因子(VEGF);血管内皮生长因子受体1(VEGFR1);和激酶插入结构域受体(KDR)。

[0698] 与青光眼相关的靶基因的示例包括碳酸酐酶II(CA2);碳酸酐酶IV(CA4);碳酸酐酶XII(CA12);β1肾上腺素受体(ADBR1);β2肾上腺素受体(ADBR2);乙酰胆碱酯酶(ACHE);Na+/K+-ATP酶;溶质载体家族12(钠/钾/氯化物转运蛋白),成员1(SLC12A1);溶质载体家族12(钠/钾/氯化物转运蛋白),成员2(SLC12A2);结缔组织生长因子(CTGF);血清淀粉状蛋白A(SAA);分泌的卷曲相关蛋白1(sFRP1);gremlin(GREM1);赖氨酰氧化酶(LOX);c-Maf;rho相关卷曲螺旋的蛋白激酶1(ROCK1);rho相关卷曲螺旋的蛋白激酶2(ROCK2);纤溶酶原激活物抑配制物1(PAI-1);内皮分化、鞘脂G蛋白偶联受体3(Edg3 R);肌纤蛋白(MYOC);NADPH氧化酶4(NOX4);蛋白激酶Cδ(PKCδ);水通道蛋白1(AQP1);水通道蛋白4(AQP4);补体级联成员;ATP酶,H+转运,溶酶体V1亚基A(ATP6V1A);间隙连接蛋白α-1(GJA1);甲酰基肽受体1(FPR1);甲酰基肽受体样1(FPRL1);白介素8(IL8);核因子κ-B,亚基1(NFKB1);核因子κ-B,亚基2(NFKB2);早老素1(PSEN1);肿瘤坏死因子-α-转化酶(TACE);转化生长因子β2(TGFB2);瞬时受体电位阳离子通道,亚家族V,成员1(TRPV1);氯化物通道3(CLCN3);间隙连接蛋白α5(GJA5);肿瘤坏死因子受体1(TNFR1);和几丁质酶3样2(CHI3L2)。

[0699] 与眼部炎症相关的靶基因的示例包括肿瘤坏死因子受体超家族成员1A(TNFRSF1A);磷酸二酯酶4D,cAMP-特异性(PDE4D);组胺受体H1(HRH1);脾酪氨酸激酶(SYK);白介素1β(IL1B);核因子κ-B,亚基1(NFKB1);核因子κ-B,亚基2(NFKB2);和肿瘤坏死因子-α-转化酶(TACE)。

[0700] 此类靶基因描述于例如公开号为20060166919、20060172961、20060172963、20060172965、20060223773、20070149473和20070155690的美国专利申请中,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0701] 一般而言,如本文所述的包含LNP和TNA(其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段)的药物组合物可用于递送根据上文描述的任何转基因,以治疗、预防或改善与基因表达相关的任何病患相关的症状。说明性疾病状态包括但不限于:囊性纤维化(和肺的其它疾病)、A型血友病、B型血友病、地中海贫血、贫血和其它血液病症、AIDS、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿氏病、肌萎缩性侧索硬化、癫痫症和其它神经病症、癌症、糖尿病、肌营养不良症(例如,杜兴氏、贝克尔)、赫尔勒氏病、腺苷脱氨酶缺陷、代

谢障碍、视网膜变性疾病(和眼部的其它疾病)、线粒体病(例如,莱博氏遗传性视神经病变(LHON)、雷氏综合征和亚急性硬化性脑病变)、肌病(例如,面肩胛肱骨型肌病(FSHD)和心肌病)、实质器官(例如,脑、肝脏、肾脏、心脏)的疾病等等。在一些实施方案中,如本文公开的ceDNA载体可以有利地用于治疗患有代谢病患(例如,鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺乏症)的个体。

[0702] 在一个实施方案中,如本文所述的包含LNP和TNA的药物组合物(其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段)可用于治疗、改善和/或预防由基因或基因产物中的突变引起的病症或病患(即,遗传性疾患)。可用ceDNA载体(例如,包含LNP和TNA的药物组合物其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段,如本文所述)治疗的示例性疾病或病患包括但不限于代谢疾病或病患(例如,法布瑞氏症、戈谢病、苯丙酮尿症(PKU)、糖原贮积病);尿素循环疾病或病患(例如,鸟氨酸氨甲酰基转移酶(OTC)缺乏症);溶酶体贮积疾病或病患(例如,异染性脑白质营养不良(MLD)、黏多糖贮积症II型(MPSII;亨特综合征));肝脏疾病或病患(例如,进行性家族性肝内胆汁淤积症(PFIC));血液疾病或病患(例如,血友病A和B、地中海贫血和贫血);癌症和肿瘤,以及遗传疾病或病患(例如,囊性纤维化)。

[0703] 根据一些实施方案,遗传性疾患是血友病A。根据一些实施方案,遗传性疾患是血友病B。根据一些实施方案,遗传性疾患是苯丙酮尿症(PKU)。根据一些实施方案,基因病患是威尔逊病。根据一些实施方案,基因病患是戈谢病I、II或III型。根据一些实施方案,基因病患是Stargardt黄斑营养不良。根据一些实施方案,基因病患是LCA10。根据一些实施方案,基因病患是Usher综合征。根据一些实施方案,基因病患是湿性AMD。

[0704] 在一个实施方案中,如本文所述,包含LNP和TNA的药物组合物(其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段)可用于在需要调节转基因表达水平的情况下递送异源核苷酸序列(例如编码激素或生长因子的转基因,如本文所述)。

[0705] 在一个实施方案中,如本文所述,包含LNP和TNA的药物组合物(其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段)可用于校正导致疾病或病患的基因产物的异常水平和/或功能(例如,蛋白质缺乏或缺陷)。如本文所述的ceDNA载体可以产生功能性蛋白质和/或调控蛋白质的水平,以减轻或减少由蛋白质的缺乏或缺陷引起的特定疾病或病患所产生的症状或为该疾病或病患带来益处。例如,OTC缺乏症的治疗可以通过产生功能性OTC酶来实现;血友病A和B的治疗可以通过改变因子VIII、因子IX和因子X的水平来实现;PKU的治疗可以通过改变苯丙氨酸羟化酶的水平来实现;法布里病或戈谢病的治疗可以通过分别产生功能性α半乳糖苷酶或β葡萄糖脑苷脂酶来实现;MFD或MPSII的治疗可以通过分别产生功能性芳基硫酸酯酶A或艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶来实现;囊性纤维化的治疗可以通过产生功能性囊性纤维化跨膜传导调节剂来实现;糖原贮积病的治疗可通过恢复功能性G6Pase酶功能来实现;并且PFIC的治疗可通过产生功能性ATP8B1、ABCB11、ABCB4或TJP2基因来实现。

[0706] 在一个实施方案中,由TNA诸如ceDNA载体编码的示例性转基因包含但不限于:溶酶体酶(例如,与泰-萨氏病(Tay-Sachs disease)相关的己糖胺酶A或与亨特综合征/MPS II相关的艾杜糖醛酸硫酸酯酶)、促红细胞生成素、血管抑素、内皮抑素、超氧化物歧化酶、球蛋白、瘦蛋白、过氧化氢酶、酪氨酸羟化酶以及细胞因子(例如,干扰素、b-干扰素、干扰

素-g、白介素-2、白介素-4、白介素12、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、淋巴毒素等)、肽生长因子和激素(例如,生长激素、胰岛素、胰岛素样生长因子1和2、血小板衍生生长因子(PDGF)、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、神经生长因子(NGF)、神经营养因子-3和4、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经胶质衍生生长因子(GDNF)、转化生长因子-a和-b等)、受体(例如,肿瘤坏死因子受体)。在一些示例性实施方案中,转基因编码对一个或多个期望的目标具有特异性的单克隆抗体。在一些示例性实施方案中,ceDNA载体编码超过一种转基因。在一些示例性实施方案中,转基因编码包括两种不同的感兴趣多肽的融合蛋白。在一些实施方案中,转基因编码如本文定义的抗体,包括全长抗体或抗体片段。在一些实施方案中,抗体是如本文所定义的抗原结合结构域或免疫球蛋白可变结构域序列。其它说明性转基因序列编码自杀基因产物(胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、白喉毒素、细胞色素P450、脱氧胞苷激酶和肿瘤坏死因子)、将抗性赋予癌症疗法中所用的药物的蛋白质,以及肿瘤抑制基因产物。

[0707] 施用

[0708] 在一个实施方案中,可将如本文所述的包含脂质纳米颗粒(LNP)和治疗性核酸(TNA)的药物组合物施用于生物体以在体内转导细胞。在一个实施方案中,可以将TNA施用于生物体以在体外转导细胞。

[0709] 一般地,通过通常用于使分子最终与血液或组织细胞接触的任何途径施用。合适的施用此类核酸的方法是可获得的并且是本领域的技术人员公知的,并且虽然可以使用超过一种途径来施用特定的组合物,但特定的途径通常可以提供比另一途径更直接和更有效的反应。本文所述的包含LNP和TNA的药物组合物的示例性施用模式包括口服、直肠、透粘膜、鼻内、吸入(例如,经由气雾剂)、含服(例如,舌下)、阴道、鞘内、眼内、透皮、内皮内、子宫内(或卵内)、肠胃外(例如,静脉内、皮下、皮内、颅内、肌内[包括向骨骼肌、膈肌和/或心肌施用]、胸膜内、脑内和关节内)、局部(例如,向皮肤和粘膜表面,包括气道表面,和透皮施用)、淋巴内等,以及直接组织或器官注射(例如,向肝、眼、骨骼肌、心肌、膈肌或脑施用)。

[0710] 可以将如本文所述的包含LNP和TNA的药物组合物(其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段)施用于受试者中的任何部位,包括但不限于选自由以下组成的组的部位:脑、骨骼肌、平滑肌、心脏、膈膜、气道上皮、肝、肾、脾、胰腺、皮肤和眼。在一个实施方案中,也可以将如本文所述的包含LNP和TNA的药物组合物(其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段)施用于肿瘤(例如,在肿瘤或淋巴结中或附近)。在任何给定情况下,最合适的途径将取决于所治疗、改善和/或预防的病症的性质和严重程度,以及所使用的如本文所述的特定ceDNA(例如,ceDNA脂质颗粒)的性质。另外,ceDNA允许通过单个载体或多个ceDNA载体(例如,ceDNA混合物)施用超过一种转基因。

[0711] 在一个实施方案中,将ceDNA载体(例如,包含LNP和TNA的药物组合物,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段,如本文所述)施用于骨骼肌包括但不限于施用于四肢(例如,上臂、下臂、大腿和/或小腿)、背部、颈部、头部(例如,舌)、胸部、腹部、骨盆/会阴和/或手指/脚趾(digit)中的骨骼肌。ceDNA载体(例如,包含LNP和TNA的药物组合物,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段,如本文所述)可通过静脉内施用、动脉内施用、腹膜内施用、肢体灌流、(任选地,腿部和/或臂部的分离的肢体灌流;参见例如Arruda等人,(2005)Blood,105:3458-3464)和/或直接肌肉内

注射而递送到骨骼肌。在特定实施方案中,通过肢体灌流,任选分离的肢体灌流(例如,通过静脉内或关节内施用),将ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)施用至受试者(例如,患有肌营养不良症如DMD的受试者)的肢体(手臂和/或腿)。在一个实施方案中,ceDNA载体(例如,包含LNP和TNA的药物组合物,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段,如本文所述)可以在不采用"流体动力学"技术的情况下施用。

[0712] 将ceDNA载体(例如,包含LNP和TNA的药物组合物,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段,如本文所述)施用于心肌包括施用于左心房、右心房、左心室、右心室和/或中隔。ceDNA载体(例如,包含LNP和TNA的药物组合物,其中LNP包含连接至LNP的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段,如本文所述)可通过静脉内施用、动脉内施用诸如主动脉内施用、直接心脏注射(例如,至左心房、右心房、左心室、右心室中)和/或冠状动脉灌流递送至心肌。施用至隔膜肌可以通过任何适合的方法,包括静脉内施用、动脉内施用和/或腹膜内施用。施用至平滑肌可以通过任何适合的方法,包括静脉内施用、动脉内施用和/或腹膜内施用。在一个实施方案中,可以施用于存在于平滑肌内、附近和/或平滑肌上的内皮细胞。

[0713] 在一个实施方案中,将ceDNA载体(例如,包含LNP和TNA的药物组合物,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段,如本文所述)施用于骨骼肌、膈肌和/或心肌(例如,以治疗、改善和/或预防肌营养不良或心脏病(例如,PAD或充血性心衰)。

[0714] 可将ceDNA载体(例如,包含LNP和TNA的药物组合物,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段,如本文所述)施用于CNS(例如,至脑或至眼)。可将ceDNA载体(例如,包含LNP和TNA的药物组合物,其中LNP包含连接至LNP的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段,如本文所述)引入脊髓、脑干(延髓、脑桥)、中脑(下丘脑、丘脑、上丘脑、下垂体、黑质、松果体)、小脑、端脑(纹状体、大脑,包括枕叶、颞叶、顶叶和额叶、皮质、基底节、海马和杏仁核)、边缘系统、新皮质、纹状体、大脑和下丘。

[0715] 如本文所述的包含LNP和TNA的药物组合物(其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段)也可以施用于眼的不同区域,诸如视网膜、角膜和/或视神经。

[0716] 根据一些实施方案,药物组合物经由视网膜下注射、脉络膜上注射或玻璃体内注射施用于受试者。

[0717] ceDNA载体(例如,包含LNP和TNA的药物组合物,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段,如本文所述)可(例如,通过腰椎穿刺)递送至脑脊髓液中。在血脑屏障受到干扰的情况下(例如,脑肿瘤或脑梗塞),ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))可以进一步被血管内施用至CNS。

[0718] 在一个实施方案中,ceDNA载体(例如,包含LNP和TNA的药物组合物,其中LNP包含与LNP连接的的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段,如本文所述)可以通过本领域已知的任何途径施用至CNS的期望区域,该途径包括但不限于鞘内、眼内、脑内、心室内、静脉内(例如,在糖诸如甘露醇的存在下)、鼻内、耳内、眼内(例如,玻璃体内、视网膜下、前房)和眼周(例如,眼球下区域)递送以及逆向递送至运动神经元的肌内递送。

[0719] 根据一些实施方案,ceDNA载体(例如,包含LNP和TNA的药物组合物,其中LNP包含

与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段,如本文所述)在液体配制物中通过直接注射(例如,立体定向注射)至CNS中的期望区域或隔室来施用。根据其它实施方案,可通过局部施用于期望区域或通过鼻内施用气溶胶配制物来提供ceDNA载体(例如,ceDNA载体脂颗粒(例如,包含LNP和TNA的药物组合物,其中LNP包含连接至LNP的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段,如本文所述))。可以通过局部施加液滴来施用于眼睛。作为另一替代方案,ceDNA载体能够作为固体、缓释型配制物施用(参见例如美国专利号7,201,898,其全文以引用方式并入本文)。在一个实施方案中,ceDNA载体(例如,包含LNP和TNA的药物组合物,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段,如本文所述)可用于逆行转运以治疗、改善和/或预防涉及运动神经元(例如,肌萎缩性侧索硬化(ALS)的疾病和病患;脊髓性肌萎缩(SMA)等)。例如,ceDNA载体(例如,包含LNP和TNA的药物组合物,其中LNP包含与LNP连接的ApoE多肽或其片段和/或ApoB多肽或其片段,如本文所述)可被递送至肌肉组织,其可从肌肉组织迁移至神经元中。

[0720] 在一个实施方案中,可以重复施用治疗产品,直到达到适当的表达水平。因此,在一个实施方案中,可以多次施用和重复施用治疗性核酸。例如,治疗性核酸可以在第0天施用。在第0天进行初始治疗后,可以在用治疗性核酸进行初始治疗之后约1周、约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、约8周、或约3月、约4月、约5月、约6月、约7月、约8月、约9月、约10月、约11月、或约1年、约2年、约3年、约4年、约5年、约6年、约7年、约8年、约9年、约10年、约11年、约12年、约13年、约14年、约15年、约16年、约17年、约18年、约19年、约20年、约21年、约22年、约23年、约24年、约25年、约26年、约27年、约28年、约29年、约30年、约31年、约32年、约33年、约34年、约35年、约36年、约37年、约38年、约39年、约40年、约41年、约42年、约43年、约44年、约45年、约46年、约47年、约48年、约49年或约50年内进行第二次施用(重复剂量)。

[0721] 在一个实施方案中,还可以包括一种或多种另外的化合物。可以单独施用那些化合物,或另外的化合物可以包括在本公开的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)。换言之,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以含有除了ceDNA或至少第二ceDNA之外的其它化合物,其不同于第一种化合物。不受限制地,其它另外的化合物可以选自由以下组成的组:有机或无机的小分子或大分子、单糖、二糖、三糖、寡糖、多糖、肽、蛋白质、肽类似物和其衍生物、拟肽、核酸、核酸类似物和衍生物、由生物材料制成的提取物或其任何组合。

[0722] 在一个实施方案中,一种或多种另外的化合物可以是治疗剂。治疗剂可以选自适合于治疗目的的任何类别。因此,可以从适合于治疗目的的任何类别中选择治疗剂。治疗剂可以根据治疗目的和所需的生物作用进行选择。例如,在一个实施方案中,如果LNP内的ceDNA可用于治疗癌症,则另外的化合物可以是抗癌剂(例如,化疗剂、靶向癌症疗法(包含但不限于小分子、抗体或抗体-药物缀合物)。在一个实施方案中,如果含有ceDNA的LNP可用于治疗感染,则另外的化合物可以是抗微生物剂(例如,抗生素或抗病毒化合物)。在一个实施方案中,如果含有ceDNA的LNP可用于治疗免疫疾病或病患,则另外的化合物可以是调控免疫反应的化合物(例如,免疫抑制剂、免疫刺激化合物或调控一种或多种特异性免疫通路的化合物)。在一个实施方案中,含有不同化合物的不同脂质颗粒的不同混合物,诸如编码不同蛋白质或不同化合物的ceDNA,诸如治疗剂,可用于本公开的组合物和方法。在一个实施方案中,另外的化合物是免疫调节剂。例如,另外的化合物是免疫抑制剂。在一些实施方案中,另外的化合物是免疫刺激剂。

[0723] 参考文献

[0724] 本申请全文中引用的所有专利和其他出版物(包括参考文献、授权的专利、公开的专利申请和共同未决的专利申请)以引用的方式明确地并入本文,以描述和公开例如在此类出版物中描述的可以与本文所述的技术结合使用的方法。提供这些出版物仅仅是出于其在本申请的提交日期之前的公开内容而提供。关于这一点,任何内容都不应被解释为承认发明者无权借助先前公开或出于任何其它原因而提前所述公开。关于这些文件的日期的所有声明或关于内容的陈述都是基于申请人可获得的信息,并且不等同于承认这些文件的日期或内容的正确性。

[0725] 本公开的实施方案的描述并非旨在穷举或将本公开限制于所公开的精确形式。尽管本文出于说明性目的描述了本公开的特定实施方案和实施例,但是如相关领域的技术人员将认识到的,在本公开的范围内可以进行各种等效修改。例如,虽然方法步骤或功能以给定的次序呈现,但是另选的实施方案可以以不同的次序执行功能,或者功能可以基本上同时执行。本文提供的本公开的教导可以适当地应用于其他程序或方法。本文描述的各种实施方案可以进行组合以提供其他实施方案。如果需要,可以修改本公开的各方面以采用上述参考文献和申请的组合物、功能和概念来提供本公开的又一实施方案。而且,由于生物学功能等效性的考虑,可以在不影响生物学或化学作用的种类或数量的情况下对蛋白结构进行一些改变。可以根据详细描述对本公开进行这些和其他改变。意图所有这些修改包括在所附权利要求书的范围内。

[0726] 任何前述实施方案的特定要素都可以进行组合或替代其他实施方案中的要素。此外,尽管已经在这些实施方案的上下文中描述了与本公开的某些实施方案相关联的优点,但是其他实施方案也可以表现出这样的优点,并且并非所有实施方案都需要为了落入本公开的范围内而表现出这样的优点。

[0727] 通过以下实施例进一步说明本文所述的技术,这些实施例决不应解释为进一步限制。应当理解,本公开不以任何方式限制于本文所述的特定方法、方案和试剂等,因此可以变化。本文所使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并且不打算限制仅由权利要求书定义的本公开的范围。

[0728] 实施例

[0729] 通过说明而非限制的方式提供了以下实施例。

[0730] 实施例1:将ceDNA LNP递送至视网膜

[0731] 哺乳动物视网膜是眼后部的光敏组织薄层。视网膜由各种细胞类型组成,包括光感受器(PR)细胞和视网膜色素上皮(RPE)细胞,它们是细胞的极化单层,其顶端侧面向神经视网膜。RPE形成血-视网膜屏障(BRB)的一部分。BRB由内屏障和外屏障两者组成。外BRB是指在RPE细胞层处形成的屏障,并且部分地起到调节溶质和营养物从脉络膜到视网膜下腔的移动的作用。相反,内BRB,类似于血脑屏障(BBB),位于内视网膜微脉管系统中,并包括排列这些血管的微血管内皮。RPE对来自体循环的LDL和HDL是可渗透的,并且是胆固醇和脂质转运进出视网膜的调节中枢。RPE和PR细胞上的低密度脂蛋白受体(LDLR)表达为基于肽的LNP(ApoE和ApoB)提供了机会。由于目标细胞类型,基于多肽的LNP经由视网膜下注射递送,该注射将药物置于PR和RPE细胞层之间(小鼠最终注射量为1μg)。给小鼠视网膜下注射载体、不含ApoE或ApoB配体的空载LNP、含ApoE的LNP、含ApoB的LNP。除载体外,所有LNP组合物

均用eGFP mRNA货物配制。在24小时,使用眼底自发荧光使小鼠成像以显现GFP表达。然后处死小鼠(在24小时),摘除眼睛,并进行GFP ELISA或使用抗GFP的免疫组织化学处理。

[0732] 应当理解,如实施例中所用,术语“ApoE”和“ApoB”(单独或除非另有明确说明)默认指ApoE和ApoB多肽而不是它们各自的完整蛋白质。还应当理解,如在实施例和附图中使用的,术语“GFP”(单独的或除非另外明确指出)默认是指增强的绿色荧光蛋白。此外,应当理解,如在实施例和附图中使用的术语“OS”和“OD”分别是指左眼(ocular sinister)和右眼(ocular dexter)。

[0733] 作为概述,图1A至图1D呈现了显示LNP递送的mRNA和LNP递送的ceDNA在小鼠和大鼠中均被耐受的图表。LNP/ceDNA和LNP/mRNA组合物以各种剂量施用。在第21天测定变性评分(视网膜变性)。

[0734] 实施例2.视网膜下注射后小鼠中LNP递送的mRNA和AAV表达模式的比较

[0735] 本研究的目的是比较在C57BL/6J小鼠中视网膜下注射后不同测试材料的表达,包括LNP递送的GFP mRNA和AAV载体中携带的gfp基因。向所有动物视网膜下(SR)给药表9A中所述的测试制品。小鼠用单次剂量的皮下0.5mg/kg甲泼尼龙进行预处理。此外,还将转基因小鼠的GFP表达与上述测试材料的GFP表达水平进行比较。

[0736] 表9A.C57BL/6J小鼠的实验设计

[0737]

小鼠: C57BL/6J									
组号	N	左眼			右眼			研究终点	安乐死/组织收集
		处理(浓缩)	剂量(μg或vg)	体积(μl)/ROA	处理(浓缩)	剂量(μg或vg)	体积(μl)/ROA		
1*	8	未经处理	N/A	N/A	媒介物	0	1μL SR	• 全面眼科检查(OE):基线,第7天和第21天 • 颜色和钴蓝眼底:第1天和第27天后注射 • OCT:基线(注射后)和注射后第1天和第27天	第2天:n=2只眼用于IHC,n=2只眼用于平装分析,并且n=6只眼用于ELISA测定 第28天:n=6只眼用于赞助商的平装分析
2*	8	脂质A LPN/GFP mRNA (0.4μg/ul)	0.4	1μL SR	脂质A LPN/GFP mRNA (0.4μg/ul)	0.4			
3*	6	AAV5-CAG-GFP (1E9 vg/μL)	1E9		AAV5-CAG-GFP (1E9 vg/μL)	1E9			第28天:n=2只眼用于IHC,n=2只眼用于平装测定,并且n=2只眼用于ELISA测定

[0738] • 脂质A LPN/GFP mRNA是使用脂质A作为可离子化或阳离子脂质配制的任何脂质纳米颗粒,并且脂质纳米颗粒含有翻译成GFP的mRNA。使用脂质A与任何其他脂质组分(例如,甾醇、非阳离子脂质、PEG化脂质)的组合并且以脂质A和其他脂质组分的任何摩尔比来配制脂质纳米颗粒。

[0739] • AAV5-CAG-GFP是在CAG启动子控制下表达GFP的AAV血清型5病毒(来自AAV5的衣壳和来自AAV2的ITR)。

[0740] 动物健康和驯化:使动物在麻醉前至少适应研究环境3天。在适应期结束时,对每只动物进行身体检查以确定是否适合参与研究。检查包括皮肤和外耳、眼睛、腹部、神经、行为和全身状况。将确定健康状况良好的动物放到研究中。

[0741] 随机化和研究识别:根据动力研究标准操作程序(SOP),将所有动物分配到研究组。动物通过对应的笼卡编码进行唯一识别。

[0742] 检查:每天进行死亡率和发病率检查。

[0743] 体重:基线(给药前),然后尸体剖检。

[0744] 外科手术-小鼠:在外科手术当天,给小鼠皮下注射丁丙诺啡0.01mg/kg-0.05mg/kg。还给动物局部给予托吡卡胺(1.0%)和去氧肾上腺素(2.5%)的混合物以使眼睛扩张和前突。然后用氯胺酮/甲苯噻嗪混合物使动物镇静以进行外科手术,并将一滴0.5%盐酸丙美卡因施用到双眼。使眼睛准备好进行无菌外科手术。可替代地,通过吸入异氟醚让小鼠镇静。使用局部洗眼液保持角膜湿润,并根据需要使用热垫保持体温。使用30号针尖端在后巩膜上开一个小导向孔,用于使用34号针和10μl注射器进行视网膜下注射。在任一注射程序之后,依次将1滴氧氟沙星滴眼液和眼部润滑剂局部施加于眼表,并使得动物从手术中恢复。如果在外科手术期间的任何时候,外科医生确定注射不佳或不成功,则将动物安乐死并更换。给小鼠服用阿替美唑以逆转甲苯噻嗪效应(0.1mg/kg-1.0mg/kg)。

[0745] 视网膜下注射:通过结膜和眼球筋膜囊切开一个2毫米长的切口,以暴露巩膜。使用30号针尖端在后巩膜上开一个小导向孔,用于使用33号针和Hamilton注射器进行视网膜下注射。在任一注射程序之后,依次将1滴氧氟沙星滴眼液和眼部润滑剂局部施加于眼表,并使得动物从手术中恢复。如果在外科手术期间的任何时候,外科医生确定注射不佳或不成功,则将动物安乐死并更换。向大鼠给予阿替美唑以逆转甲苯噻嗪的效应(0.1mg/kg-1.0mg/kg)。

[0746] 眼部检查:使用裂隙灯生物显微镜进行眼部检查,以在上表所示的时间点评估眼表形态。下面的评分表用于评估眼前节炎症。

[0747] 表9B.炎症评分表

[0748]

眼前节炎症的临床分级	
等级[a]	标准
0	无疾病;眼睛是半透明的并且反射光(红色反射)
0.5(微量)	虹膜血管扩张
1	虹膜血管充血异常瞳孔收缩
2	前房混浊;红色回流减少
3	前房适度不透明,但瞳孔仍可见;红光反射迟钝暗红反射
4	前房不透明和瞳孔模糊;红色反射缺失;眼球突出
[a]每个更高的级别都包含前一个级别的标准。	
Agarwal,RJ等人,Rodent Models of Experimental Autoimmune Uveitis. Methods in Molecular Medicine2004:102卷,第395-419页。	

[0749] 眼底成像:在实验设计表中的时间点对所有登记的眼睛进行彩色和钴蓝(eGFP表达)眼底成像。局部给予动物托品酰胺(1.0%)和和苯肾上腺素(2.5%)的混合物以使眼睛扩张和突出,并且向眼睛施用局部眼睛麻醉剂(丙美卡因0.5%或类似物)。彩色眼底照相后进行钴蓝照相。

[0750] 光学相干断层扫描(OCT):在如实验设计表中所示的日期里,所有动物都接受了眼睛后部的OCT成像程序,以确定视网膜下注射的成功和随时间的变化。在检查前15分钟,使用1%托吡卡胺HCL和2.5%盐酸去氧肾上腺素的混合物对眼睛进行OCT扩张。通过两次OCT扫描在三个位置(左、右和中心)测量外核层(ONL)厚度:一次穿过注射位点(泡),一次不穿过穿过注射位点(泡)。在单独的数据报告(电子表格)中提供所有数值厚度值,以及所有相关/注释的OCT图像。

[0751] 安乐死/组织收集:在实验设计表中所示的时间点,经由二氧化碳窒息对动物进行

安乐死,并通过颈椎脱位或开胸手术确认死亡。

[0752] 平装(Flatmount):安乐死后,立即摘除指定的眼睛并在4℃下在4%PFA中固定过夜。将眼睛在1×PBS中洗涤一次,转移到新鲜的PBS中。

[0753] 免疫组织化学:将指定用于IHC的所有眼睛摘除,标记注射的大致位点,然后置于1×PBS中。在角膜缘处切开2mm-3mm深的切口,并在室温下将眼睛固定在分别标记的小瓶中的4%低聚甲醛中1小时。然后将眼睛转移到0.1M磷酸缓冲液(PB)中,通过连续的蔗糖梯度(10%-30%,每次1小时),随后包埋在OCT培养基中并在干冰上冷冻。将眼冷冻切片(141.1m切片)并用以下抗体染色:1/250鸡抗-GFP、1/100兔抗-RPE65(在图中标记为"RPE"或"RPE65"),以及1250小鼠抗视紫红质(在图中标记为"Rho"),随后是1/200抗鸡Cy2,1/200抗兔Cy3、1/200抗小鼠Cy5和1/1,000DAPI(在图中标记为"DAPI")。

[0754] ELISA:安乐死后,立即将所有指定用于ELISA的眼睛摘除并快速冷冻在单独的管中,随后在80℃下储存。

[0755] 结果:

[0756] 眼底是内、后表面。它由视网膜、黄斑、视神经盘、中央凹和血管组成。图2A至图2I显示了与未处理的对照小鼠(如表9中所述的第1组,图2F至图2I)相比,脂质A LNP/GFP mRNA处理的小鼠(0.4μg)(如表9中所述的第2组,图2A至图2E)的眼底成像。图3是显示了在用脂质A LNP/GFP mRNA处理的小鼠(0.4μg)(如表9所述的第2组)对野生型小鼠给药后12小时和24小时通过ELISA测定的神经视网膜和RPE/眼杯中的GFP量的图表。总之,图2A至图2I和图3证明了脂质A/LNP/GFP mRNA转导光感受器(PR)穿过内段的外段/视网膜(OS/IS)连接,以及小鼠眼杯中的视网膜色素上皮(RPE)。

[0757] 图4A和图4B显示了脂质A LNP/GFP mRNA(0.4μg)(图4B)与GFP转基因小鼠(图4A)中GFP表达模式相比的比较。即使在GFP转基因小鼠中,已知对视网膜中的光感受器的转导功效也是具有挑战性的(图4A)。如图4B所示,在视网膜(OS/IS)的外段和内段以及在眼杯中的RPE中可以看到强烈的GFP荧光。此外,在含有视杆感光细胞的核的视网膜外核层(ONL)中,甚至可以在内节段(IS)之后看到蜂窝状GFP荧光图案,从而证明成功转导至光感受器。

[0758] 图5A和图5B显示了脂质A LNP/GFP mRNA(0.4μg)(图5B)与未处理媒介物对照小鼠(图5A)中GFP表达模式的比较。在图5A和图5B中,Rho被用作光感受器(PR)外部片段的标记。如在图5B中可见,在RPE中和在PR外区段中存在GFP的强烈表达。

[0759] 图6是定量GFP表达的图表。重要的是,图6证明在小鼠中递送脂质A、LNP/GFP mRNA导致GFP表达在神经视网膜以及眼杯中均匀分布。

[0760] 图7A至图7E比较了用脂质A LNP/GFP mRNA(0.4μg)和AAV5-CAG-GFP处理的小鼠的神经视网膜和RPE中的GFP表达。如在IHC图像中可以看到的,与在24小时的脂质A LPNP/GFP mRNA处理的小鼠(图7A、图7B)相比,在第28天AAV 5-CAG-GFP处理的小鼠在RPE中具有较少的具有GFP表达的细胞(图7C、图7D)。如图7E中量化结果的图表所示,在24小时来自脂质A/LNP/GFP mRNA构建体的mRNA表达与第28天的峰值AAV5-CAG-GFP表达的水平(其用作基准)相匹配。

[0761] 上述结果表明,脂质A LNP/GFP mRNA被成功地转导到神经视网膜(光感受器)和RPE中,此外,表达的定量化(图7E)表明,在处理后24小时,在神经视网膜和眼杯中,脂质A LNP/GFP mRNA的GFP表达水平均高于第28天的AAV5-CAG-GFP的GFP表达水平。最后,上述实

验表明,经由LNP递送至视网膜的核酸货物(包括DNA和mRNA)在转导方面优于AAV载体平台,因为RPE中较少的细胞在AAV处理的小鼠中显示GFP表达。

[0762] 实施例3.视网膜下注射后小鼠中不同剂量的LNP递送的mRNA的表达的评价

[0763] 本研究的目的是评价在视网膜下(SR)注射不同剂量的LNP递送的GFP mRNA后野生型小鼠中的GFP表达,并鉴定峰值表达的时期。向16只(+8只备用)雄性C57BL/6J小鼠视网膜下(SR)给药下述测试制品。

[0764] 表10.C57BL6J小鼠的实验设计

[0765]

组号	#	品系	左眼			右眼			研究终点	安乐死/组织收集
			SR治疗	剂量(μg)	体积(μl)	SR治疗	剂量(μg)	体积(μl)		
1*	4	C57Bl/6J	未经处理	N/A	N/A	媒介物	0	1	• 全眼检查(OE):基线 • OCT:基线(注射后)和注射后24小时 • 颜色和钴蓝眼底:注射后12小时(n=4只眼/组)和24小时	将n=4只眼在注射后12小时和24小时时摘除并快速冷冻。
2*	4		脂质A LPN/GFP mRNA (0.2μg/μL)	0.2	1	脂质A LPN/GFP mRNA (0.2μg/μL)	0.2	1		
3*	4		脂质A LPN/GFP mRNA (0.4μg/μL)	0.4	1	脂质A LPN/GFP mRNA (0.4μg/μL)	0.4	1		
4*	4		脂质A LPN/GFP mRNA (1μg/μL)	1	1	脂质A LPN/GFP mRNA (1μg/μL)	1	1		

[0766] • 脂质A LPN/GFP mRNA是使用脂质A作为可离子化或阳离子脂质配制的任何脂质纳米颗粒,并且脂质纳米颗粒含有翻译成GFP的mRNA。使用脂质A与任何其他脂质组分(例如,甾醇、非阳离子脂质、PEG化脂质)的组合并且以脂质A和其他脂质组分的任何摩尔比来配制脂质纳米颗粒

[0767] 用于该实施例3研究的涉及动物健康检查和驯化、随机分组和研究鉴定、死亡率和发病率检查、体重检查、手术、眼部检查、光学相干断层扫描、眼底成像和安乐死/组织收集的程序如实施例2中所述,稍作修改。

[0768] 结果:

[0769] 图8A和8B是在12小时和24小时时以递增剂量(0.2μg、0.4μg、1.0μg)通过ELISA定量神经视网膜(具有光感受器或PR)和眼杯(具有视网膜色素上皮或RPE细胞)中的GFP表达的图表,其中GFP浓度表示为ng/眼睛(图8A)和ng/μg货物(图8B)。两组图表都表明,在神经视网膜和眼杯中,在治疗后12小时时可以检测到GFP表达,并且在治疗后24小时时表达水平进一步增加。值得注意的是,在0.2μg的最低剂量下,神经视网膜和眼杯都被GFP饱和。

[0770] 实施例4.视网膜下注射后小鼠和大鼠中脂质递送的mRNA和AAV载体表达模式的比较

[0771] 本研究的目的是比较在Sprague Dawley(SD)大鼠和C57BL/6J小鼠中视网膜下注射后不同测试剂量的LNP递送的mRNA的表达(剂量匹配)。设计该研究以进一步开发治疗患有退行性视网膜疾病的人的递送平台。对20只(+8只备用)雄性C57BL/6J小鼠和20只(+8只备用)雄性SD大鼠视网膜下(SR)给药下述测试制品。根据实施例2中观察到的结果,其中证实0.2μg的剂量足以使GFP在神经视网膜和眼杯中的表达饱和,与上述实施例2中施用的0.4μg的剂量相比,本研究中的小鼠被施用较低的剂量,诸如0.03μg和0.1μg。对于大鼠,脂质A

LNP/GFP mRNA在较高剂量诸如0.3μg和1.2μg(即,高于实施例2研究中给药的0.1μg)下是剂量匹配的。研究的小鼠(第1组-第4组)用单次剂量的皮下0.5mg/kg甲泼尼龙进行预处理。从第1天开始,到第28天结束,每天对研究的大鼠(第5组-第8组)进行0.5mg/kg甲泼尼龙(皮下,SC)处理。

[0772] 表11A.C57BL/6J小鼠的实验设计

[0773]

小鼠: C57Bl/6J									
组号	N	左眼			右眼			研究终点	安乐死/组织收集
		处理(浓度)	剂量(μg或vg)	体积(μl)/ROA	处理(浓度)	剂量(μg或vg)	体积(μl)/ROA		
1*	5	未经处理	N/A	N/A	媒介物	0	1μL SR	• 全眼检查(OE):基线 • 颜色和钴蓝眼底:第1天 • OCT:基线(注射后)24小时,(n=3终末期)和注射后21天(剩余n=2)	第1天:IHC:n=2只眼/组 赞助商开发的测定:n=4只眼/组 第28天:IHC/TUNEL:n=4只眼/组
2*	5	脂质A/GFP mRNA (0.03μg/μL)	0.03	1μL SR	脂质A/GFP mRNA (0.03μg/μL)	0.03			
3*	5	脂质A/GFP mRNA (0.1μg/μL)	0.1		脂质A/GFP mRNA (0.1μg/μL)	0.1			
4*	5	脂质A/GFP mRNA (0.4μg/μL)	0.4		脂质A/GFP mRNA (0.4μg/μL)	0.4			

[0774] • 脂质A LPN/GFP mRNA是使用脂质A作为可离子化或阳离子脂质配制的任何脂质纳米颗粒,并且脂质纳米颗粒含有翻译成GFP的mRNA。使用脂质A与任何其他脂质组分(例如,甾醇、非阳离子脂质、PEG化脂质)的组合并且以脂质A和其他脂质组分的任何摩尔比来配制脂质纳米颗粒。

[0775] 表11B.Sprague-Dawley大鼠的实验设计

[0776]

大鼠: Sprague-Dawley									
组号	N	左眼			右眼			研究终点	安乐死/组织收集
		处理(浓度)	剂量(μg或vg)	体积(μl)/ROA	处理(浓度)	剂量(μg或vg)	体积(μl)/ROA		
5§	5	未经处理	N/A	N/A	媒介物	0	2.5μL SR	• 全眼检查(OE):基线 • 颜色和钴蓝眼底:第1天 • OCT:基线(注射后)24小时,(n=3终末期)和注射后21天(剩余n=2)	第1天:IHC:n=2只眼/组 ELISA测定:n=4只眼/组 第28天:IHC/TUNEL:n=4只眼/组
6§	5	脂质A LPN/GFP mRNA (0.04μg/μL)	0.1	2.5μL SR	脂质A LPN/GFP mRNA (0.04μg/μL)	0.1			
7§	5	脂质A LPN/GFP mRNA (0.12μg/μL)	0.3		脂质A LPN/GFP mRNA (0.12μg/μL)	0.3			
8§	5	脂质A LPN/GFP mRNA (0.48μg/μL)	1.2		脂质A LPN/GFP mRNA (0.48μg/μL)	1.2			

[0777] • 脂质A LPN/GFP mRNA是使用脂质A作为可离子化或阳离子脂质配制的任何脂质纳米颗粒,并且脂质纳米颗粒含有翻译成GFP的mRNA。使用脂质A与任何其他脂质组分(例如,甾醇、非阳离子脂质、PEG化脂质)的组合并且以脂质A和其他脂质组分的任何摩尔比来配制脂质纳米颗粒。

[0778] 用于该实施例4研究的涉及动物健康检查和驯化、随机分组和研究鉴定、死亡率和发病率检查、体重检查、手术、眼部检查、光学相干断层扫描、眼底成像和安乐死/组织收集、IHC和ELISA的程序如实施例2中所述,稍作修改。

[0779] PopTag Red TUNEL(Powered Research;仅第28天的眼睛):将所有指定用于TUNEL的眼睛摘除,用荧光组织标记物标记大致的注射位点,然后置于1×PBS中。在角膜缘处切开2mm-3mm深的切口,并在室温下将眼睛固定在分别标记的小瓶中的4%低聚甲醛中1小时。然后将眼睛转移到0.1M磷酸缓冲液(PB)中,通过连续的蔗糖梯度(10%-30%,每次1小时),随后包埋在OCT培养基中并在干冰上冷冻。将眼睛冷冻切片(14μm切片)。在荧光组织标记(标记大致的注射位点)的中心区域内选择每只眼睛两(2)个载玻片(32只眼睛/64个载玻片)用于TUNEL。在室温下将载玻片在1%PFA的PBS溶液中后固定10分钟,然后在PBS中洗涤2×5分钟。在室温下施加七十五(75)微升平衡缓冲液10分钟;来自试剂盒的柔性塑料盖玻片可用于保存所需的试剂体积。除去过量的液体,并将工作强度TdT酶在37℃下在潮湿的室中施加60分钟。施加工作强度STOP/WASH缓冲液10分钟。将载玻片用PBS洗涤3×1分钟,并且将Cy3缀合的抗地高辛抗体(Jackson Immuno)在黑暗、潮湿的室中施加30分钟;或者,载玻片可以放置在Sequenza载玻片架中。在PBS中洗涤3×10分钟。TUNEL标记的细胞将呈现红色。然后将载玻片用以下抗体复染:1/250兔抗-RPE 65和1/1000DAPI,如上述免疫荧光部分所述。

[0780] 结果:

[0781] 当LNP递送的mRNA(诸如脂质A LNP/GFP mRNA)在小鼠和大鼠模型中剂量匹配时,发现大鼠中眼底的GFP表达与小鼠中的相当。如图9E和图9F所示,以中等剂量和高剂量给予的脂质A LNP/GFP mRNA(分别为0.3μg和1.2μg)在大鼠中达到与以中等剂量和高剂量给予小鼠的脂质A LNP/GFP mRNA(分别为0.1μg和0.4μg,见图9B和图9C)的表达水平相当的表达水平。

[0782] 除了在用低剂量的0.2μg脂质A LNP/GFP mRNA处理的小鼠的神经视网膜和眼窝中证实的GFP表达饱和之外(参见上述实施例2,特别是图8A和图8B),图10B至图10D中的图像显示了在给小鼠施用增加剂量的0.03μg、0.1μg和0.4μg的脂质A LNP/GFP mRNA后第1天没有发生视网膜变性(参见图10A中的媒介物以供参考),从而示出了LNP递送的mRNA如脂质A LNP/GFP mRNA的大耐受窗口。

[0783] 实施例5.在野生型小鼠中视网膜下注射后治疗剂的安全性和测试制品表达的评价

[0784] 本研究的目的是比较在视网膜下注射到野生型C57BL/6J小鼠中后,用不同可离子化脂质(各自携带GFP/mRNA货物)配制的不同LNP组合物的表达。设计该研究以进一步开发治疗患有退行性视网膜疾病的人的递送平台。向36只(+12只备用)雄性C57BL/6J小鼠视网膜下(SR)给药以下实验设计中所述的测试制品。研究中的小鼠用单次剂量的皮下0.5mg/kg甲泼尼龙进行预处理。

[0785] 表12.C57BL/6J小鼠的实验设计

[0786]

小鼠：C57Bl/6J									
组号	N	OS			OD			研究终点	安乐死/组织收集
		Tx [最终浓度]	剂量（μg或vg）	体积（μl）/ROA	Tx [最终浓度]	剂量（μg或vg）	体积（μl）/ROA		
1*	6	未经处理	N/A	N/A	媒介物	0	1μL SR	• 全面眼科检查（OE）：基线，第7天和第21天 • 颜色和钴蓝眼底：注射后24小时 • OCT：基线（注射后），注射后24小时、第14天和第28天	第2天▽：固定n=2只眼/组以用于GFP IHC，并且快速冷冻n=6只眼/组以用于ELISA测定 第29天：快速冷冻n=4只眼/组以用于ELISA测定
2*	6	脂质A LPN/GFP mRNA（0.2μg/μL）	0.2	1μL SR	脂质A LPN/GFP mRNA（0.2μg/μL）	0.2			
3*	6	MC3 LNP/GFP mRNA（0.2μg/μL）	0.2		MC3 LNP/GFP mRNA（0.2μg/μL）	0.2			
4*	6	CTRL脂质Z LNP 1/GFP mRNA（0.2μg/μL）	0.2		CTRL脂质Z LNP 1/GFP mRNA（0.2μg/μL）	0.2			
5*	6	CTRL脂质Z LNP 2/GFP mRNA（0.2μg/μL）	0.2		CTRL脂质Z LNP 2/GFP mRNA（0.2μg/μL）	0.2			
6*	6	脂质58 LNP/GFP mRNA（0.2μg/μL）	0.2		脂质58 LNP/GFP mRNA（0.2μg/μL）	0.2			

[0787] • 脂质A LPN/GFP mRNA是使用脂质A作为可离子化或阳离子脂质配制的任何脂质纳米颗粒，并且脂质纳米颗粒含有翻译成GFP的mRNA。使用脂质A与任何其他脂质组分(例如，甾醇、非阳离子脂质、PEG化脂质)的组合并且以脂质A和其他脂质组分的任何摩尔比来配制脂质纳米颗粒。

[0788] • CTRL脂质Z LNP 1/GFP mRNA和CTRL脂质Z LNP 2/GFP mRNA各自为使用CTRL脂质Z配制的脂质纳米颗粒组合物，CTRL脂质Z为不同类别的可离子化脂质，该可离子化脂质在脂质A中存在的头基中缺乏二硫键。CTRL脂质Z LNP 1/GFP mRNA和CTRL脂质Z LNP 2/GFP mRNA使用不同的方法制备，并且在其它脂质组分例如PEG化脂质、甾醇和/或非阳离子脂质中也不同。(CTRL＝对照)。

[0789] 用于该实施例5研究的涉及动物健康检查和驯化、随机分组和研究鉴定、死亡率和发病率检查、体重检查、手术、眼部检查、光学相干断层扫描、眼底成像和安乐死/组织收集、IHC和ELISA的程序如实施例2中所述，稍作修改。

[0790] 结果：

[0791] 图11A至图11E显示了用表12中所述的用GFP mRNA和用不同可离子化脂质配制的各种LNP组合物(均为0.2μg量)在经由视网膜下注射治疗后第2天小鼠眼睛的彩色眼底成像，而图11F至图11J显示了相同小鼠眼睛样品的对应钴蓝眼底成像(对于GFP表达)。具体地，图11A和图11F是用0.2μg的脂质A LNP/GFP mRNA处理的小鼠眼睛的图像；图11A和图11G是用0.2μg的脂质A LNP/GFP mRNA处理的小鼠眼睛的图像；图11B和图11F是用0.2μg的MC3 LNP/GFP mRNA处理的小鼠眼睛的图像；图11C和图11G是用0.2μg的CTRL脂质Z LNP 1/GFP mRNA处理的小鼠眼睛的图像；图11D和图11H是用0.2μg的CTRL脂质Z LNP 2/GFP mRNA处理的小鼠眼睛的图像；图11E和图11J是用0.2μg的脂质58LNP/GFP mRNA处理的小鼠眼睛的图像。

[0792] 图11B至图11D的眼底彩色图像表明，用MC3或CTRL脂质Z配制的LNP组合物具有严

重毒性,该毒性会导致脉络膜局部缺血(血管或循环流的中断),从而导致失明。图11B至图11D中看到的主要为白色和半透明的区域指示死亡的视网膜细胞。图11G至图11I的对应钴蓝眼底图像显示出最小的GFP表达,这并不令人惊讶。

[0793] 相反,图11A和11E的眼底图像显示,用与脂质A或脂质58配制的LNP组合物处理的小鼠眼睛的视网膜细胞维持健康的微粉红色,从而表明这些组合物是良好耐受的并且不导致脉络膜局部缺血;并且图11F和图11J中也观察到良好的GFP表达。图12是定量神经视网膜和眼杯中的GFP表达的图表。定量数据与图11F至图11J中注意到的观察结果一致,即用脂质A或脂质58配制的LNP组合物具有良好的GFP表达,而用MC3或CTRL脂质Z配制的LNP组合物则没有。

[0794] 图13A至图13B是分别显示本实施例所述的用GFP mRNA和用不同可离子化脂质配制的各种LNP组合物(全部0.2μg剂量)经由视网膜下注射处理后小鼠眼睛的第1天炎性评分和变性评分的图表;而图13C至图13D是分别显示相同样品的第1天炎症评分和变性评分的图表。与上述眼底成像中观察到的毒性一致,用MC3或CTRL脂质Z配制的LNP组合物在第1天记录了高达约2.0的炎症评分;而相比之下,脂质A、LNP/GFP mRNA和脂质58、LNP/GFP mRNA分别记录了<0.5和<1.0的炎症评分。

[0795] 此外,在第28天,在用MC3或CTRL脂质Z配制的LNP组合物中观察到高达约2.0的变性评分。并且通过在第28天拍摄的OCT图像中看到的ONL层的变薄或视网膜变性证实了这种高度变性评分(参见,图15C至图15E并且使用图15A媒介物作为参照)。相反,在第28天,脂质A LNP/GFP mRNA和脂质58LNP/GFP mRNA分别记录了<0.5和约1.0的变性评分,并且在图15B和图15F中它们对应的OCT图像(使用图15A媒介物作为参照)确证了ONL层保持健康的层厚。在第1天,使用图14A媒介物作为参照,没有一个样品显示任何视网膜降解(参见,图14A至图14F)。

[0796] 实施例6.在雌性食蟹猴中视网膜下施用后4周的耐受性和表达研究

[0797] 本研究的目的是利用0.6μg的低剂量或3.0μg的高剂量的脂质A LNP/GFP mRNA,经由视网膜下注射以单一剂量施用于雌性食蟹猴时,评价LNP递送的核苷酸货物(例如,LNP递送的mRNA)的耐受性和表达。还通过第1给药阶段每天一次将免疫抑制剂施用于动物,并持续至第2给药阶段的第1天(第2组和第3组中的中期处死动物)、第7天(第4组)或第28天(第1组、第2组和第3组中的终末期处死动物)。在第2天,在给药后24小时(±2小时)处死第2组和第3组中的中期处死动物。给药后,在给药后观察第1、第2组和第3组中的终末期处死组动物28天(第29天终末期处死)以评估任何效应的可逆性或持久性。

[0798] 选择视网膜下施用途径是因为它是预期的人类治疗途径。在该物种中,高剂量旨在基于视网膜下滤过泡施用限制的最大可行剂量(150μL/滤过泡)。低剂量旨在理解测试制品的剂量-响应性。

[0799] 由于猴与人在视网膜的解剖学和生理学方面的相似性,选择食蟹猴作为相关物种。

[0800] 表13A.第1给药阶段(免疫抑制剂)

[0801]

组[a]	给药方案	给药天数	剂量体积（mL/kg）	剂量水平（mg/kg/天）	剂量浓度（mg/mL）	雌性数量
1（对照）	泼尼松龙	1至14	0.33	1	3	1
2（低）	泼尼松龙	1至14	0.33	1	3	2
3（高）	泼尼松龙	1至14	0.33	1	3	2
4（额外）	泼尼松龙	1至14	0.33	1	3	1

[0802] 表13B.第2给药阶段(免疫抑制剂)

[0803]

组[a]	给药方案	给药天数	剂量体积(mL/kg)	剂量水平(mg/kg/天)	剂量浓度(mg/mL)	雌性数量
1（对照）	泼尼松龙	1至28	0.33	1	3	1
2（低）	泼尼松龙	1或1至28	0.33	1	3	2
3（高）	泼尼松龙	1或1至28	0.33	1	3	2
4（额外）	泼尼松龙	1至7；9、11、13和15	0.33	1	3	1
		17、19和21	0.167	0.5	3	

[0804] 表13C.第3给药阶段(媒介物对照和测试制品)

[0805]

组[b]	给药方案 左眼和右眼		给药天数	剂量体积（μL/眼睛） 左眼和右眼		剂量水平[c]（μg/眼睛） 左眼和右眼		剂量浓度（mg/mL） 左眼和右眼		雌性数量
1（对照）[d]	未给药	媒介物	1	NA	150	NA	0	NA	0	1
2（低）	测试制品	测试制品	1	150	150	6	6	0.04	0.04	2
3（高）	测试制品	测试制品	1	150	150	30	30	0.2	0.2	2
4（额外）	未给药的	未给药的	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1

[0806] NA＝不适用;TA＝测试制品

[0807] 第1组、第2组和第3组中被指定为终末期处死的动物被施用

[0808] 眼底自发荧光成像:手术前将动物禁食(至少10小时)。用氯胺酮麻醉动物,并用七氟烷维持。麻醉方案可由主治兽医和/或研究主任酌情根据需要调整。用扩瞳剂使瞳孔扩张。用Phoenix Micron X®仪器拍摄图像。眼底自发荧光图像包括后极、滤过泡(尽可能多)和任何高荧光区域(如果可能的话)。

[0809] 眼底照相:手术前将动物禁食(至少10小时)。用氯胺酮和右美托咪定(用于给药)麻醉动物。根据需要调整麻醉方案。用数字眼底照相机拍摄两只眼睛的照片。使用彩色照片来记录给药后视网膜下滤过泡的位置和外观。对于第1组的左眼,拍摄代表性的对照图像。这些图像可用作参照,以在随后的OCT间隔识别处理区域。

[0810] 光学相干断层扫描(OCT):手术前将动物禁食(至少10小时)。用氯胺酮麻醉动物,并用七氟烷维持。麻醉方案由主治兽医和/或研究主任酌情根据需要调整。用扩瞳剂使瞳孔扩张。

[0811] 以获得后眼底中的视网膜表面的轴向视图的方式进行谱域光学相干断层扫描(OCT或sdOCT)和成像。设定仪器以进行标准视网膜扫描(黄斑体积扫描和/或线扫描和/或圆形扫描)。

[0812] 在给药阶段期间,尝试收集处理区域(视网膜下滤过泡)内以及距视神经乳头(ONH)大致相同距离的未处理区域(视网膜下滤过泡外)内的扫描结果。这些扫描的可行性将取决于视网膜下滤过泡的大小、位置和可见度。

[0813] 根据需要,将在第2天给药后收集的彩色图像用作参照,以在给药阶段OCT间隔识别处理区域。

[0814] 组织学:所有终末期处死动物的两只眼睛,除非注明缺失,均通过沿视神经任一侧、垂直于后睫状动脉截取横截面在垂直平面上进行修剪,并包埋在石蜡中(即中央部分)。

另外,剩余的颞眼球帽状切块被包埋在石蜡中。

[0815] 将包埋的组织以标称5μm切片,并用苏木精和伊红(H和E)染色。从每只眼睛中,将中心部分切片以便于检查视神经盘和视神经。通过中央凹将颞眼球帽状切块切片以便于视情况检查视网膜下滤过泡。

[0816] 结果:

[0817] 图16A至图16D显示了媒介物对照和低剂量6μg的OCT(在第22天拍摄)和H&E定性分析(在第28天拍摄)的图像。在6μg剂量下,脂质A LNP/GFP mRNA在猴中表现出良好的耐受性,因为没有观察到有意义的ONL变薄或视网膜降解。

[0818] 图17A至图17C是作为阴性对照的未经处理区域(图17A)、6μg低剂量处理区域(图17B)和30μg高剂量区域(图17C)在处理后24小时拍摄的IHC图像。在低和高剂量下均观察到GFP表达,在高剂量下表达水平更高或更稳健,从而表明猴中的剂量响应性。

[0819] 总之,在该实施例中获得的结果表明LNP递送的核酸货物,诸如脂质A LNP递送的mRNA,是良好耐受的并且在猴中实现了良好表达。

[0820] 实施例7.ApoE和ApoB配体增强LNP的递送和摄取

[0821] 图18是显示了LDL受体肽与本文所述的基于多肽的LNP缔合的示意图。

[0822] 图19A显示了通过在ARPE-19人视网膜色素上皮(RPE)细胞系中成像经由LDLR介导的胞吞作用确定LDL摄取的实验的第1天-第6天的时间线。使用免疫荧光来定位LDL受体并检查在25-羟基胆固醇存在(+)或不存在(-)的情况下的LDL摄取。如图19A所示,LDLR的下调导致降低的LDL摄取和绿色核内体定位的缺失。图19B是显示了确认LDLR敲低的蛋白质印迹。GAPDH用作加载对照。

[0823] 图20显示了ApoE和ApoB配体在ARPE-19细胞中通过细胞表面受体增强LNP的细胞摄取。使用免疫荧光显示DiD标记的LNP或LDL的摄取。左图显示了具有(+)LDL受体表达的细胞,右图显示了其中LDL受体已被敲低的细胞。

[0824] 图21显示了ApoE和ApoB配体在ARPE-19细胞中通过细胞表面受体增强LNP的细胞表达。使用免疫荧光显示ApoE/DiD标记的LNP mRNA表达。左图显示了具有(+)LDL受体表达的细胞,右图显示了其中LDL受体已被敲低的细胞。

[0825] 图22A和图22B显示了ApoE和ApoB多肽(但不是它们各自的完整蛋白)经由细胞表面受体增强LNP表达。左图(图27A)显示了使用亲和层析证实了配体缔合。右图图27B)显示了ApoB和ApoE多肽,但不是它们相应的完整蛋白(,使用亲和层析和体外摄取测定证实了缔合。

[0826] 图23A和图23B显示了与空载水平相比,ApoE和ApoB配体体内增加了在光感受器和RPE中的GFP mRNA表达。图23A中所示的实时成像证实了ApoE和ApoB配体的总GFP mRNA表达的增加。图23B显示了确认ApoE和ApoB配体促进PR和RPE细胞中的GFP表达(ng GFP/眼睛)的ELISA测定结果。

[0827] 视网膜LNP具有在视网膜中的稳健递送和耐受性的独特的性质。RPE和PR上的LDLR表达为基于多肽的LNP(ApoE和ApoB)提供了机会。这些结果表明,ApoE和ApoB配体不仅可以在视网膜中,而且可以在表达LDLR的任何细胞或组织中通过细胞表面受体增强LNP的细胞摄取和表达。

[0828] 实施例8:LNP与ApoE/ApoB多肽的配制

[0829] 本实施例描述了LNP的制备,该LNP在其表面上呈递ApoE和ApoB多肽。多肽可溶于水溶液中并且在中性pH下带正电荷。ApoE(SEQ ID NO:3)和ApoB(SEQ ID NO:4)肽序列和生理化学性质显示在图24中。通过SDS-PAGE测定ApoE和ApoB多肽在溶液中的稳定性。结果显示在图25中。如可在图25中看到的,在4℃下在溶液中储存多达14天后观察到ApoB多肽条带。ApoE条带的强度在新鲜溶液和4℃下储存14天的溶液之间是相当的,ApoE和ApoB多肽在溶液中的稳定性是相当的。

[0830] 实施例9:对掺入ApoE或ApoB配体的LNP的马来酰亚胺化学物质的评价

[0831] 使用基于硫醇的交联的缀合的主要途径显示在图26A中。马来酰亚胺(不可切割的)连接显示在左侧。PDS(可切割的)连接显示在右侧。

[0832] 马来酰亚胺化学物质的缀合方案如下进行。该方案的示意图显示在图27中。

[0833] 1.合成LNP。

[0834] 0.5%PEG2k(PEG匹配的对照)

[0835] 0.5%PEG2k-MAL(用于缀合)

[0836] 2.在缀合当天制备新鲜的多肽溶液。

[0837] 3.与多肽在4℃下反应过夜。

[0838] 4.与半胱氨酸在4℃下反应3小时以对未反应的马来酰亚胺加帽。

[0839] 5.用50kD Amicon过滤器洗涤3次(2000g 20分钟,每次旋转前加入500μl的PBS)。

[0840] 6.向最终产物中加入100μL的PBS并通过无菌注射过滤器(0.2μm)。

[0841] 7.进行分析。

[0842] LNP尺寸

[0843] LNP包封效率

[0844] RNA浓度(LLE)

[0845] 配制物组成显示在下表14中,并且配制物分析显示在表15中。ApoE/μg mRNA的货物浓度为0.37μg,并且ApoB/μg mRNA的货物浓度为0.23μg。

[0846] 表14.配制物组合物

[0847]

描述	脂质 A	DOPC	胆固醇	DMG-PEG2k	DSPE-PEG2k-MAL	DSPE-PEG2k-OMe
脂质 A LNP（对照）	51	7.3	38.3	2.9		0.5
与 ApoE 一起孵育的脂质 A LNP（无缀合）	51	7.3	38.3	2.9		0.5
具有 0.5%DSPE-PEG2k-马来酰亚胺的脂质 A LNP	51	7.3	38.3	2.9	0.5	
与 ApoE 反应的（缀合的）具有 0.5%DSPE-PEG2k-马来酰亚胺的脂质 A LNP	51	7.3	38.3	2.9	0.5	
脂质 A LNP（对照）	51	7.3	38.3	2.9		0.5
与 ApoB 一起孵育的脂质 A LPN（无缀合）	51	7.3	38.3	2.9		0.5
具有 0.5%DSPE-PEG2k-马来酰亚胺的脂质 A LNP	51	7.3	38.3	2.9	0.5	
与 ApoB 反应的（缀合的）具有 0.5%DSPE-PEG2k-马来酰亚胺的脂质 A LNP	51	7.3	38.3	2.9	0.5	

[0848] 缩写:DOPC＝1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱;DMG-PEG2k＝1,2-二肉豆蔻酰基-外消旋-甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000;DSPE-PEG2k-MAL＝1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-2000]-马来酰亚胺;DSPE-PEG2k-OMe＝1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-聚乙二醇-2000-O-甲基

[0849] 表15.配制物分析

[0850]

描述	平均直径（nm）	多分散性指数（PDI）	包封效率（EE%）
脂质 A LNP（对照）	78.0	0.134	59.1
与 ApoE 一起孵育的脂质 A LNP（无缀合）	79.4	0.017	72.3

[0851]

具有 0.5%DSPE-PEG2k-马来酰亚胺的脂质 A LNP	80.0	0.028	56.5
与 ApoE 反应的（缀合的）具有 0.5%DSPE-PEG2k-马来酰亚胺的脂质 A LNP	89.1	0.041	59.9
脂质 A LNP（对照）	75.0	0.053	70.8
与 ApoB 一起孵育的脂质 A LPN（无缀合）	80.7	0.071	73.3
具有 0.5%DSPE-PEG2k-马来酰亚胺的脂质 A LNP	82.5	0.047	66.6
与 ApoB 反应的（缀合的）具有 0.5%DSPE-PEG2k-马来酰亚胺的脂质 A LNP	96.9	0.083	50.9

[0852] 缩写:DOPC＝1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱;DMG-PEG2k＝1,2-二肉豆蔻酰基-外消旋-甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000;DSPE-PEG2k-MAL＝1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-2000]-马来酰亚胺;DSPE-PEG2k-OMe＝1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-聚乙二醇-2000-O-甲基

[0853] DSPE-PEG脂质上存在反应性基团,因此对照包括不含反应性基团的PEG匹配的LNP。PEG的量可以驱动不同量的基线摄取和非特异性蛋白质吸附至LNP。

[0854] 多肽与PEG匹配的LNP的孵育证明了缀合的多肽与非特异性吸附的多肽之间的差异。

[0855] 表15中的分析结果表明,经由吸附或非特异性缔合或经由马来酰亚胺缀合化学均质性(表示为PDI)或包封效率,用ApoE或ApoB来官能化脂质A LNP组合物。由于使用标准含水方法制备LNP,所以在所有配制物中观察到<80%的包封效率。

[0856] 图28显示了脂质A/mCherry mRNA的摄取,无论是否通过非共价相互作用(即,脂质A LNP与ApoE一起孵育)或共价相互作用(即,脂质A LNP与0.5%DSPE-PEG2k-马来酰亚胺一起孵育并与ApoE反应)与ApoE相关,均由LDLR介导并通过用25-羟基胆固醇处理阻断(参见,图28中的A1和A2)。此外,图28显示,当通过0.5%的DSPE-PEG2k-马来酰亚胺直接缀合至ApoE时,脂质A/mCherry mRNA的摄取也由LDLR介导(参见,图28中的A4)。通过免疫细胞化学(ICC)和蛋白质印迹(未示出)验证了25-羟基胆固醇对LDLR蛋白的敲低。图28中所示的配制物代码系统:

[0857] B1=脂质A LNP(对照)

[0858] A1=与ApoE一起孵育的脂质A LNP(无缀合)

[0859] B2=具有0.5%DSPE-PEG2k-马来酰亚胺的脂质A LNP

[0860] A2=与ApoE反应的(缀合的)具有0.5%DSPE-PEG2k-马来酰亚胺的脂质A LNP

[0861] B3=脂质A LNP(对照)

[0862] A3=与ApoB一起孵育的脂质A LNP(无缀合)

[0863] B4=具有0.5%DSPE-PEG2k-马来酰亚胺的脂质A LNP

[0864] A4=与ApoB反应的(缀合的)具有0.5%DSPE-PEG2k-马来酰亚胺的脂质A LNP

[0865] 实施例10.合成掺入ApoE或ApoB配体的LNP的PDS化学物质的评价

[0866] 马来酰亚胺对水解敏感,这样影响了多肽与LNP的缀合效率。因此,作为合成ApoE-LNP和ApoB-LNP的方法,研究了PDS化学物质(参见,图26B)。用PDS化学物质将ApoE/ApoB多肽缀合至LNP的方案如下进行:

[0867] 1.合成下列LNP:

[0868] 具有DSPE-PEG5k-PDS的LNP

[0869] 具有DSPE-PEG5k的LNP(PEG匹配的对照)

[0870] 空载(没有锚定的PEG)

[0871] 2.在室温下与肽反应2小时。

[0872] 3.在Float-a-lyzer透析管(100kD或300kD MWCO)中对1xdPBS进行透析。

[0873] 4.用0.2μm注射过滤器灭菌。

[0874] 5.进行分析。

[0875] LNP尺寸

[0876] LNP包封效率

[0877] 核酸浓度(LLE)

[0878] AKTA

[0879] SDS-PAGE

[0880] 脂质A LNP

[0881] 表16列出了在分析与ApoE或ApoB一起孵育或经由PDS化学物质与ApoE或ApoB缀合

的脂质A LNP的研究中包括的配制物组成。

[0882] 表16.配制物组合物(全部用mCherry配制作为mRNA)

[0883]

描述	脂质 A	DOPC	胆固醇	DMG-PEG2k	DSPE-PEG5k-OMe	DSPE-PEG5k-OPDS
脂质 A LNP（对照）	51	7.3	38.8	2.9		
与 ApoE 一起孵育的脂质 A LNP（无缀合）	51	7.3	38.8	2.9		
与 ApoB 一起孵育的脂质 A LPN（无缀合）	51	7.3	38.8	2.9		
脂质 A LNP+0.1%DSPE-PEG5k-OMe	51	7.3	38.7	2.9	0.1	
脂质 A LNP+0.1%DSPE-PEG5k-OMe+ApoE（无缀合）	51	7.3	38.7	2.9	0.1	
脂质 A LNP+0.1%DSPE-PEG5k-OMe+ApoB（无缀合）	51	7.3	38.7	2.9	0.1	
脂质 A LNP + 0.1%DSPE-PEG5k-OPDS	51	7.3	38.7	2.9		0.1
脂质 A LNP + 0.1%DSPE-PEG5k-OPDS + ApoE（缀合的）	51	7.3	38.7	2.9		0.1
脂质 A LNP+0.1%DSPE-PEG5k-OPDS ApoB（缀合的）	51	7.3	38.7	2.9		0.1

[0884] 缩写:DOPC＝1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱;DMG-PEG2k＝1,2-二肉豆蔻酰基-外消旋-甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000;DSPE-PEG5k-OMe＝1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-聚乙二醇-5000-0-甲基;DSPE-PEG5k-OPDS1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-聚(乙二醇)-5000-邻吡啶基二硫化物

[0885] 表17列出了缀合前和缀合后表16中列出的配制物的分析学。

[0886] 表17.配制物分析(全部用mCherry配制作为mRNA)

[0887]

描述	直径（nm）	PDI	包封效率（EE%）
脂质 A LNP	94.1	0.023	66.2
与 ApoE 一起孵育的脂质 A LNP（无缀合）	90.9	0.018	51.5
与 ApoB 一起孵育的脂质 A LPN（无缀合）	104.3	0.064	56.2

[0888]

脂质 A LNP+0.1%DSPE-PEG5k-OMe	102.4	0.100	73.3
脂质 A LNP+0.1%DSPE-PEG5k-OMe+ApoE（无缀合）	100.4	0.040	48.6
脂质 A LNP+0.1%DSPE-PEG5k-OMe+ApoB（无缀合）	78.7	0.040	63.1
脂质 A LNP + 0.1%DSPE-PEG5k-OPDS	107.6	0.197	75.6
脂质 A LNP + 0.1%DSPE-PEG5k-OPDS + ApoE（缀合的）	89.4	0.012	50.3
脂质 A LNP + 0.1%DSPE-PEG5k-OPDS+ApoB（缀合的）	109.6	0.069	62.3

[0889] 缩写:PDI＝多分散性指数;DOPC＝1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱;DMG-PEG2k＝1,2-二肉豆蔻酰基-外消旋-甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000;DSPE-PEG5k-OMe＝1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-聚乙二醇-5000-0-甲基;DSPE-PEG5k-OPDS1,2-二

硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-聚(乙二醇)-5000-邻吡啶基二硫化物

[0890] 在AKTA FPLC上分析LNP样品以检查结合。将与ApoE/ApoB在PBS中一起孵育或单独在PBS中孵育的LNP样品注射到系统上。将样品以1mL/min的PBS速率通过肝素HP HiTrap柱(Cytivia Life Sciences),以将未结合的材料与结合的材料分离。逐渐添加具有附加1M NaCl的PBS,直至整个流中包含1M NaCl,以洗脱任何结合的材料。通过与硫酸肝素的亲和力或通过非特异性阳离子相互作用,与柱结合的LNP材料沿着该梯度洗脱,随后洗脱的材料具有与柱更紧密的结合。与不存在多肽的材料相比,结合ApoE或ApoB多肽的LNP在梯度中更晚洗脱。这些颗粒和多肽的检测使用在214nm、260nm和280nm处的UV吸光度以及通过用于运行内比对的电导率来进行。

[0891] 表17中的分析结果表明,经由吸附或非特异性缔合或通过PDS缀合化学均质性(表示为PDI)或包封效率,用ApoE或ApoB来官能化脂质A/NP组合物。由于使用标准含水方法制备LNP,所以在所有配制物中观察到<80%的包封效率。

[0892] 图29A至图29C显示了AKTA结合测定的结果,其证实了在以下各项中ApoE与LNP的结合:与ApoE一起孵育的脂质A LNP(图29A,即,非特异性缔合);具有0.1%DSPE-PEG5k并与ApoE一起孵育的脂质A(图29B,即,也是非特异性缔合);以及具有0.1%DSPE-PEG5k-OPDS+ApoE的脂质A(图29C,即,直接缀合)。层析图的右移表明,在逐渐升高的NaCl梯度存在的情况下,肝素柱上的LNP滞留时间更长。

[0893] CTRL脂质Z LNP

[0894] 表18列出了分析与ApoE或ApoB一起孵育或经由PDS化学物质与其缀合的CTRL脂质Z LNP的研究中包括的配制物组合物。

[0895] 表18.配制物组合物(所有配制的mCherrymRNA作为货物)

[0896]

描述	CTRL 脂质 Z	DOPC	胆固醇	DMG-PEG2k	DSPE-PEG5k-OMe	DSPE-PEG5k-OPDS
CTRL 脂质 Z LNP（对照）	51	7.3	38.8	2.9		
具有 0.5%DSPE-PEG5k-OMe 的 CTRL 脂质 Z（对照）	51	7.3	38.8	2.9	0.5	
具有 0.5%DSPE-PEG5k-OPDS 的 CTRL 脂质 Z（对照）	51	7.3	38.8	2.9		0.5
CTRL 脂质 Z LNP + ApoE（无缀合）	51	7.3	38.8	2.9		
具有 0.5%DSPE-PEG5k-OMe 的 CTRL 脂质 Z + ApoE（无缀合）	51	7.3	38.8	2.9	0.5	
具有 0.5%DSPE-PEG5k-OPDS 的 CTRL 脂质 Z + ApoE（缀合的）	51	7.3	38.8	2.9		0.5
CTRL 脂质 Z LNP + ApoB（无缀合）	51	7.3	38.8	2.9		
具有 0.5%DSPE-PEG5k-OMe 的 CTRL 脂质 Z + ApoB（无缀合）	51	7.3	38.8	2.9	0.5	
具有 0.5%DSPE-PEG5k-OPDS 的 CTRL 脂质 Z + ApoB（缀合的）	51	7.3	38.8	2.9		0.5

[0897] 表19列出了缀合前和缀合后表18中列出的配制物的分析学。

[0898] 表19.配制物分析(所有配制的mCherrymRNA作为货物)

[0899]

描述	直径	多分散性	包封效率

[0900]

	（nm）	指数（PDI）	（EE%）
CTRL 脂质 Z LNP（对照）	79.0	0.128	96.8
具有 0.5%DSPE-PEG5k-OMe 的 CTRL 脂质 Z（对照）	72.7	0.092	95.5
具有 0.5%DSPE-PEG5k-OPDS 的 CTRL 脂质 Z（对照）	77.6	0.117	94.3
CTRL 脂质 Z LNP + ApoE（无缀合）	77.6	0.081	92.7
具有 0.5%DSPE-PEG5k-OMe 的 CTRL 脂质 Z + ApoE（无缀合）	72.9	0.065	88.7
具有 0.5%DSPE-PEG5k-OPDS 的 CTRL 脂质 Z + ApoE（缀合的）	88.7	0.117	82.6
CTRL 脂质 Z LNP + ApoB（无缀合）	148.4	多峰	89.4
具有 0.5%DSPE-PEG5k-OMe 的 CTRL 脂质 Z + ApoB（无缀合）	90.5	0.164	87.2
具有 0.5%DSPE-PEG5k-OPDS 的 CTRL 脂质 Z + ApoB（缀合的）	102.7	0.189	80.4

[0901] 表19中的分析结果表明,经由吸附或非特异性缔合或经由PDS缀合化学物质均质性(表示为PDI)或包封效率,用ApoE或ApoB来官能化CTRL脂质Z LNP组合物。尽管使用标准含水方法来制备LNP,但在这些CTRL脂质Z LNP配制物中观察到包封率>80％并且甚至>

90％。上述表15和17都表明,该方法导致脂质A LNP的包封效率<80％。

[0902] 图30显示了各种CTRL脂质Z LNP配制物的SDS-PAGE凝胶分析。样品如下:CTRL脂质Z+ApoE(泳道1)及其对照CTRL脂质Z(泳道4);具有0.5％DSPE-PEG-5k-OMe的CTRL脂质Z+ApoE(泳道2)及其具有0.5％DSPE-PEG-5k-OMe的对照CTRL脂质Z(泳道5);具有0.5％DSPE-PEG-5k-OPDS的CTRL脂质Z+ApoE(泳道3)及其具有0.5％DSPE-PEG-5k-OPDS的对照CTRL脂质Z(泳道6);ApoE标准显示对应于ApoE单体和ApoE二聚体的两个不同的条带(泳道8);以及梯(泳道10)。条带大小<14kb且位于泳道3中的人工条带的正下方,表明ApoE经由PDS缀合与CTRL脂质Z LNP缔合。与DSPE-PEG5k(约5kb)缀合的ApoE单体(约3kb)预期产生大小为约8kb的缀合物。

[0903] 图31显示了各种CTRL脂质Z LNP配制物的SDS-PAGE凝胶分析。样品如下:CTRL脂质Z+ApoB(泳道1)及其对照CTRL脂质Z(泳道4);具有0.5％DSPE-PEG-5k-OMe的CTRL脂质Z+ApoB(泳道2)及其含有0.5％DSPE-PEG-5k-OMe的对照CTRL脂质Z(泳道5);具有0.5％DSPE-PEG-5k-OPDS的CTRL脂质Z+ApoB(泳道3)及其含有0.5％DSPE-PEG-5k-OPDS的对照CTRL脂质Z(泳道6);ApoB标准显示对应于ApoB单体和ApoB二聚体的两个不同的条带(泳道8);以及梯(泳道10)。条带≤14kb且位于泳道3中的人工条带正下方,表明ApoB通过PDS缀合与CTRL脂质Z LNP缔合。与DSPE-PEG5k(约5kb)缀合的ApoB单体(约3kb)预期产生大小为约8kb的缀合物。

[0904] 实施例11.合成掺入ApoE或ApoB作为配体的LNP的菌株促进的叠氮化合物-炔环加成(SPAAC)化学作用的评价

[0905] 菌株促进的炔-叠氮化物环加成(SPAAC),也称为无Cu点击反应,是利用一对试剂环辛炔和叠氮化物的生物正交反应,该试剂环辛炔和叠氮化物专门且有效地彼此反应,同时对天然存在的官能团诸如胺保持惰性。通过形成稳定的三唑,SPAAC使得能够在水性和其它复杂化学环境中标记多种生物分子而无需任何辅助试剂。

[0906] 如实施例10中所讨论的,马来酰亚胺对水解敏感,这影响了多肽与LNP的缀合效率。此外,PDS中存在的二硫化物可与血清中存在的硫醇经历二硫化物交换,这可能会导致配体(例如,ApoE或ApoB)随时间而丢失。在大量已知的环辛炔中,二苯并环辛炔(DBCO)包括一类在水性缓冲液中具有相当快的动态和良好稳定的试剂。在生理温度和pH范围内,DBCO基团将不与许多生物分子中天然存在的胺或羟基反应。另外,DBCO基团与叠氮基团的反应明显快于与巯基(-SH、巯基)的反应。因此,将叠氮化物-DBCO缀合化学作用作为合成ApoE-LNP和ApoB-LNP的方法进行了研究。

[0907] 用SPAAC化学作用将ApoE/ApoB多肽缀合至LNP的示意图在图32中进行了描述,并且如下所述。

[0908] 经由标准Fmoc固相肽合成条件合成DBCO官能化的ApoE肽。从2-氯三苯甲基氯树脂开始制备肽,在任何修饰之前,先将其在DCM中溶胀60分钟。使用1.5当量的Fmoc-赖氨酸(Dde)和过量当量的DIPEA的DCM溶液进行最初的赖氨酸偶联。之后,使用氨基酸、HOBt、DIC、DIPEA在DMF中的混合物加载各氨基酸残基30分钟。偶联后,在20％的4甲基哌啶(DMF溶液)中脱保护20分钟。在将最终的谷氨酸残基偶联和脱保护后,使用乙酸酐和DIPEA在DMF中的混合物乙酰化N-末端。通过在6.25％水合肼的DMF溶液中孵育20分钟,从赖氨酸中除去Dde保护基。然后用HOBt、DIC、DIPEA和DMF将该赖氨酸与DBCO-丁酸偶联。使用95％的TFA、2.5％

的TIPS和2.5％的H2O切割混合物从树脂上切割最终的肽。将所得溶液过滤,真空浓缩并沉淀到乙醚中,得到ApoE-DBCO。

[0909] 接下来,为了经由DBCO-叠氮化物缀合化学作用将ApoE肽缀合至LNP,进行以下方案:

[0910] 1.合成LNP。

[0911] 0.5％PEG2k(PEG匹配的对照)

[0912] 0.5％DSPE-PEG2k-N_3(用于缀合)(可商购)

[0913] 2.在缀合当天制备新鲜的多肽溶液。

[0914] 3.与多肽在4℃下反应过夜。

[0915] 4.在Float-a-lyzer透析管(100kD或300kD MWCO)中对1xdPBS进行透析。

[0916] 4.用50kD Amicon过滤器浓缩3次(2000g,20分钟)。

[0917] 5.向最终产物中加入100μL的PBS并通过无菌注射过滤器(0.2μm)。

[0918] 6.进行分析。

[0919] LNP尺寸

[0920] LNP包封效率

[0921] RNA浓度(LLE)

[0922] 表20列出了在分析经由DBCO-叠氮化物化学作用与ApoE缀合的脂质A LNP的研究中包括的配制物组合物和分析。

[0923] 表20.配制物组合物和分析(全部用GFP mRNA配制作为货物)

[0924]

LNP	在与LNP反应期间添加的DBCO-ApoE(摩尔％)	直径(nm)	多分散性指数(PDI)	包封效率(EE％)
脂质A LNP(对照) 脂质A:DOPC:Chol:DMG-PEG2k 51:7.3:38.8:2.9	0	75.6	0.088	91.4
脂质A LNP 1	0.2	77.4	0.054	90.9

[0925]

脂质A:DOPC:Chol:DMG-PEG2k:DSPE-PEG2k-N_3 51:7.3:38.3:2.9:0.5				
脂质A LNP2 脂质A:DOPC:Chol:DMG-PEG2k:DSPE-PEG2k-N_3 51:7.3:38.3:2.9:0.5	0.6	85.7	0.21	90.2
脂质A LNP3 脂质A:DOPC:Chol:DMG-PEG2k:DSPE-PEG2k-N_3 51:7.3:38.3:2.9:0.5	1.0	82.5	0.12	88.0
脂质A LNP4 脂质A:DOPC:Chol:DMG-PEG2k:DSPE-PEG5k-N_3 51:7.3:38.3:2.9:0.5	0.6	88.3	0.078	89.7

[0926] 缩写:DOPC＝1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱;Chol＝胆固醇;DMG-PEG2k＝1,2-二肉豆蔻酰基-外消旋-甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000;DSPE-PEG2k-N_3＝1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-2000]-叠氮化物;DSPE-PEG5k-N_3＝1,2-

二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-5000]-叠氮化物

[0927] 然后用ARPE-19细胞(即,人视网膜色素上皮细胞的无限增殖化细胞系)进行体外测定以通过成像经由LDLR介导的胞吞作用确定LDL摄取。简言之,将ARPE-19细胞以60000k细胞/孔铺板在96孔板中的完全培养基(DMEM/F12+10％FBS)中。24小时后,用饥饿培养基(DMEM/F12+0.3％BSA)代替完全培养基,静置48小时,不时地检查细胞健康状况。48小时后,将阳性对照(LDL-pHRodo)和脂质A LNP 1-4以所需浓度(通常为0.2μg/孔或0.1μg/孔)加入到细胞中。阳性对照的培养基在阳性对照的2小时时更换以减轻对细胞的毒性。在4小时、6小时、24小时和48小时拍摄图像。使用免疫荧光来定位LDL受体并检查LDL摄取。

[0928] 表20中的分析结果表明,经由DBCO-叠氮环加成缀合化学作用ApoE官能化LNP组合物对平均直径尺寸、均质性(表示为PDI)或包封效率没有任何有意义的影响。由于使用利用含有乙醇和甲醇的混合物的溶剂体系的不同制备方法,所以在所有这些脂质A LNP配制物中观察到>80％的改善的包封效率。图33B证实了48小时时所有样品中细胞的生存力。图33A和图33C均表明,当与脂质A LNP(用DSPE-PEG2k-N_3配制)反应的DBCO-ApoE的摩尔比从0.2mol％增加到1.0mol％时,GFP表达也逐渐增加,从而表明了LDLR介导的脂质A/GFP mRNA的摄取。

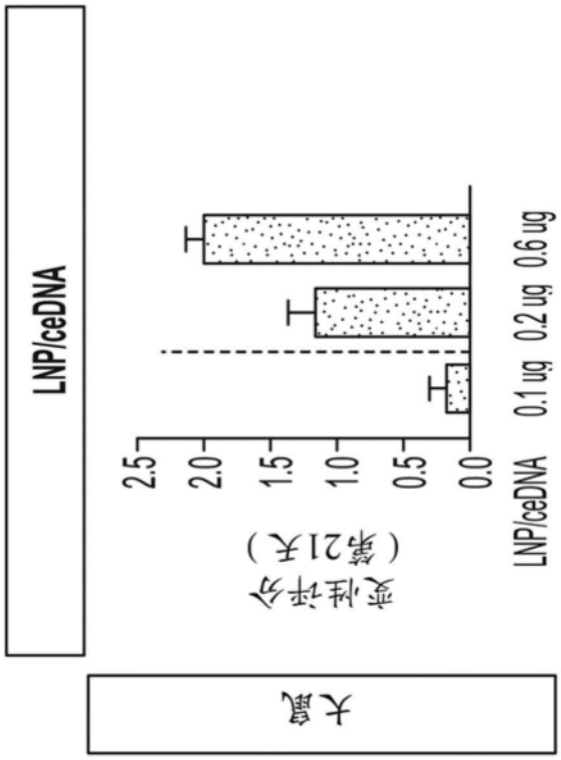

大鼠
LNP/ceDNA
变化评分
（第21天）
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
LNP/ceDNA 0.1 ug 0.2 ug 0.6 ug

图1A

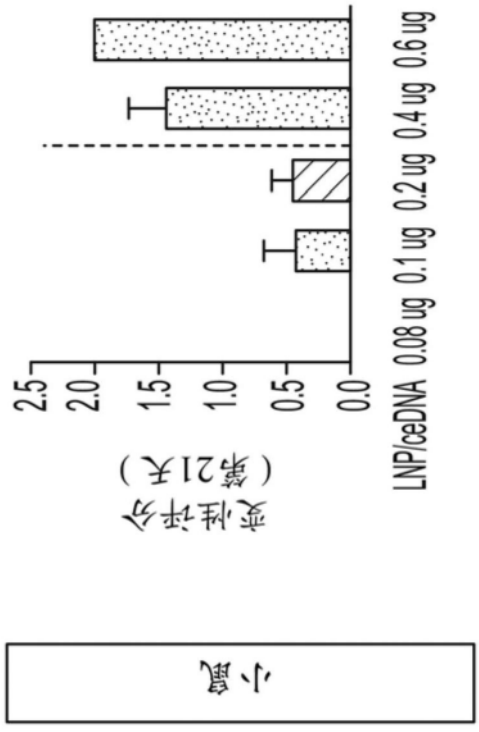

小鼠
变化评分
（第21天）
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
LNP/ceDNA 0.08 ug 0.1 ug 0.2 ug 0.4 ug 0.6 ug

图1B

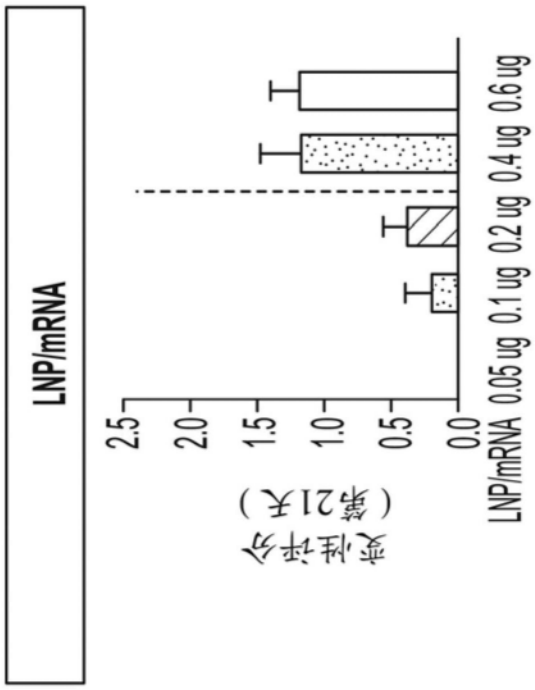

LNP/mRNA
变性评分
（第21天）
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
LNP/mRNA 0.05 ug 0.1 ug 0.2 ug 0.4 ug 0.6 ug

图1C

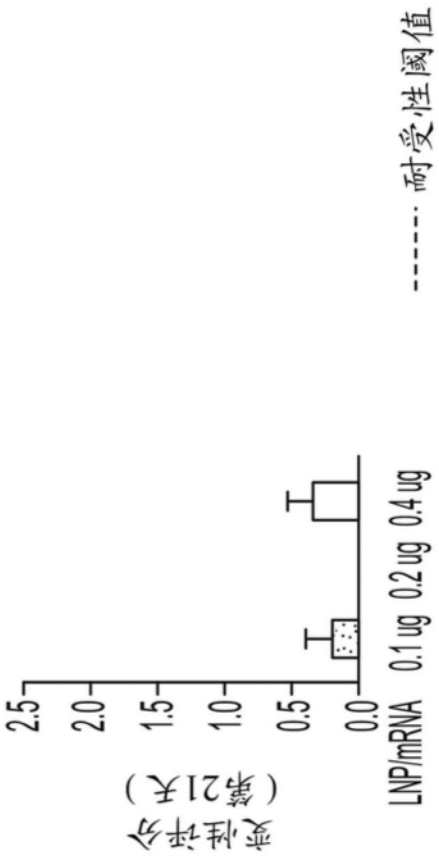
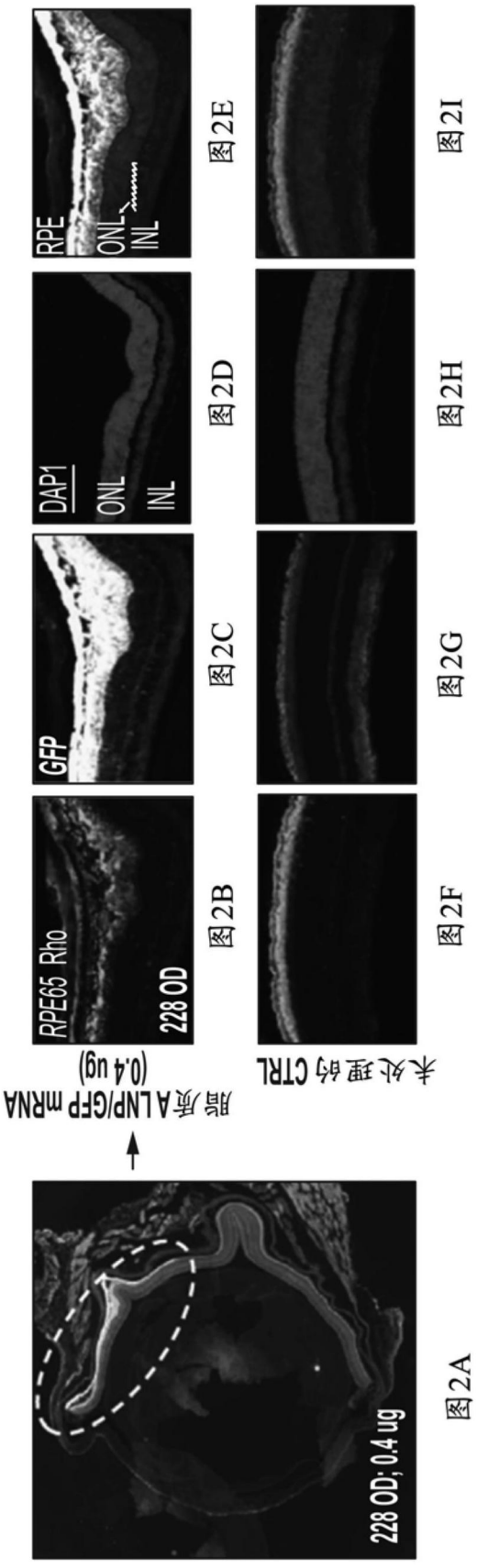

耐受性阈值
变性评分
（第21天）
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
LNP/mRNA 0.1 ug 0.2 ug 0.4 ug

图1D


228 OD; 0.4 ug
RPE65 Rho
228 OD
GFP
DAP1
ONL
INL
RPE
ONL
INL
玻璃体 ALNP/GFP mRNA (0.4 ug)
未处理的 CTRL
图2A
图2B
图2C
图2D
图2E
图2F
图2G
图2H
图2I

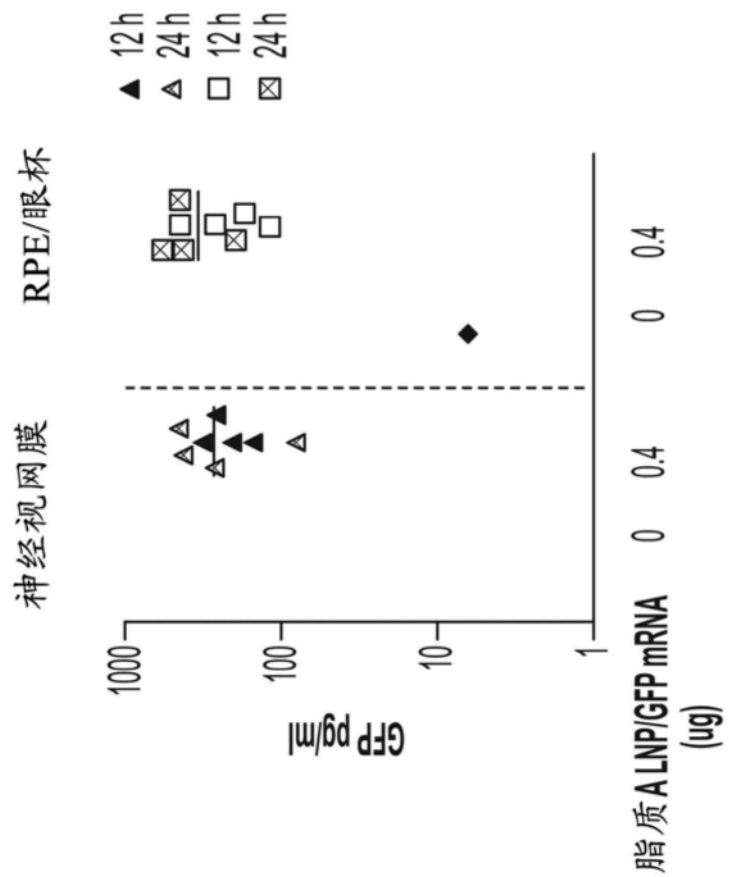

12 h
24 h
12 h
24 h
RPE/眼杯
神经视网膜
1000
100
10
1
GFP pg/ml
0
0.4
0
0.4
脂质A LNP/GFP mRNA
(ug)

图3

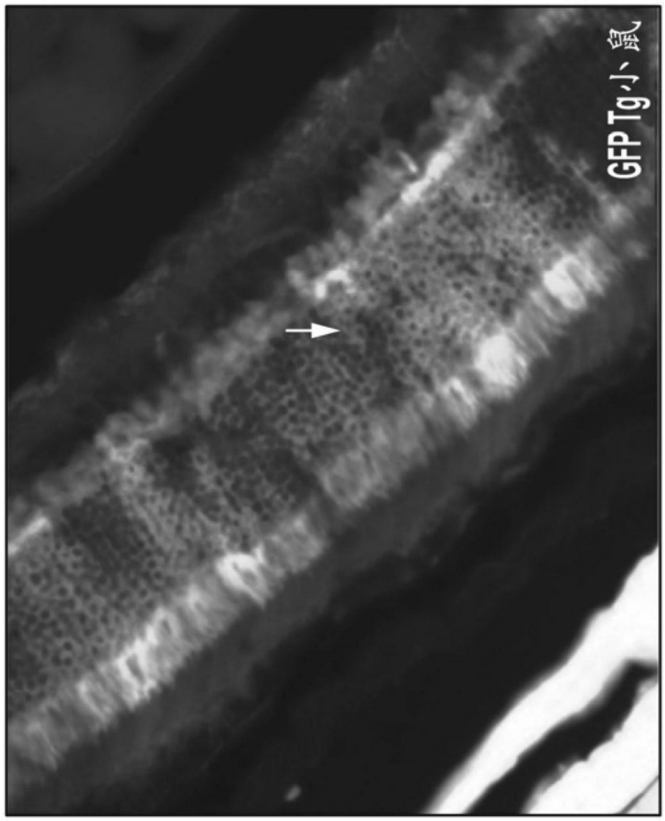


图4A

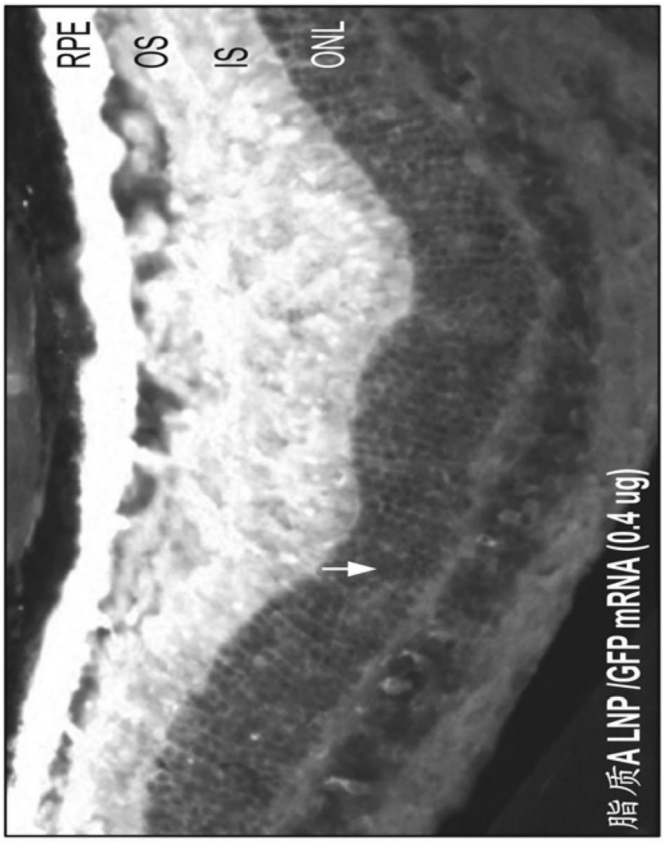


图4B

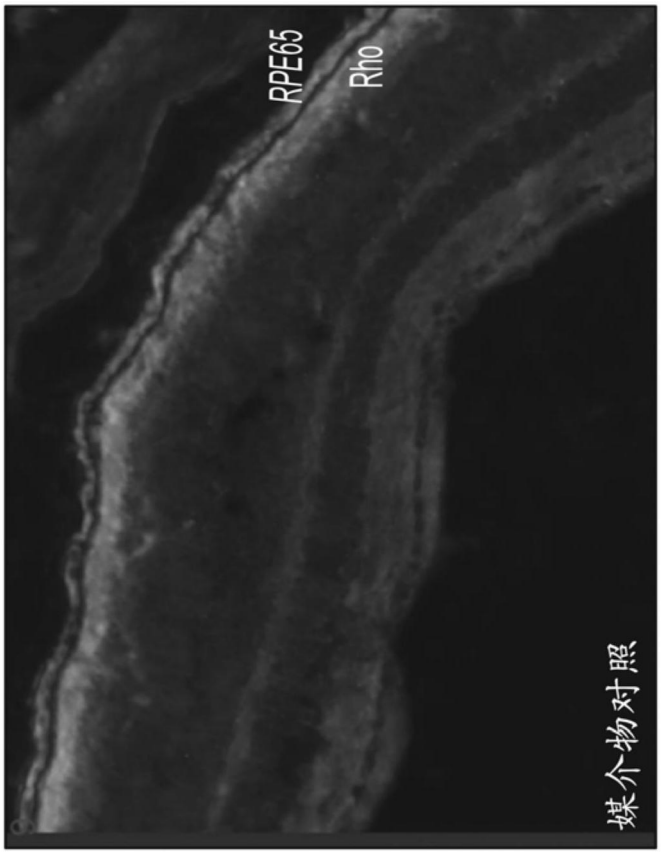


图5A

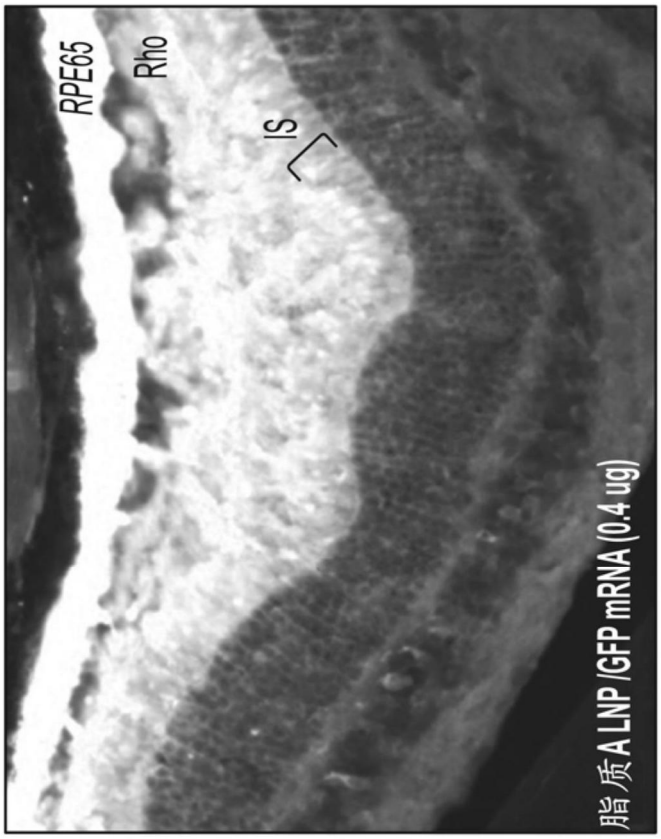


图5B

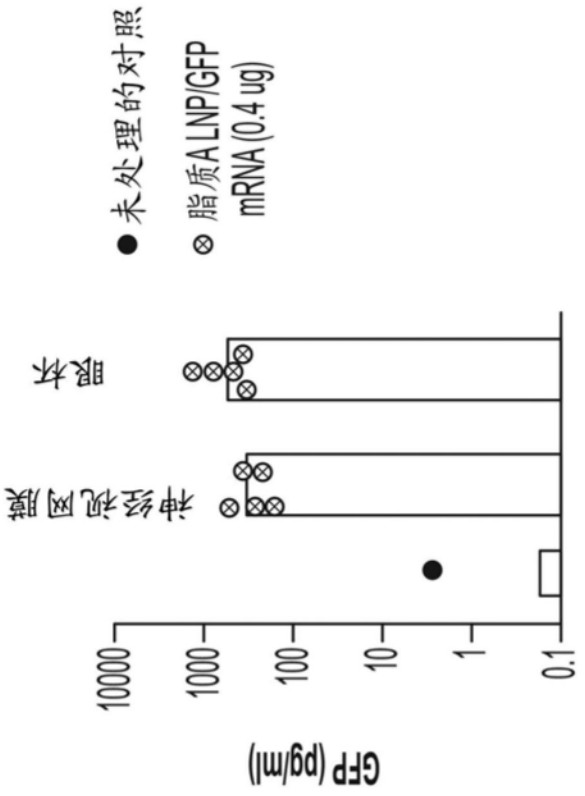

● 未处理的对照
⊗ 脂质A LNP/GFP mRNA (0.4 ug)
眼水
神经视网膜
GFP (pg/ml)
10000
1000
100
10
1
0.1

图6

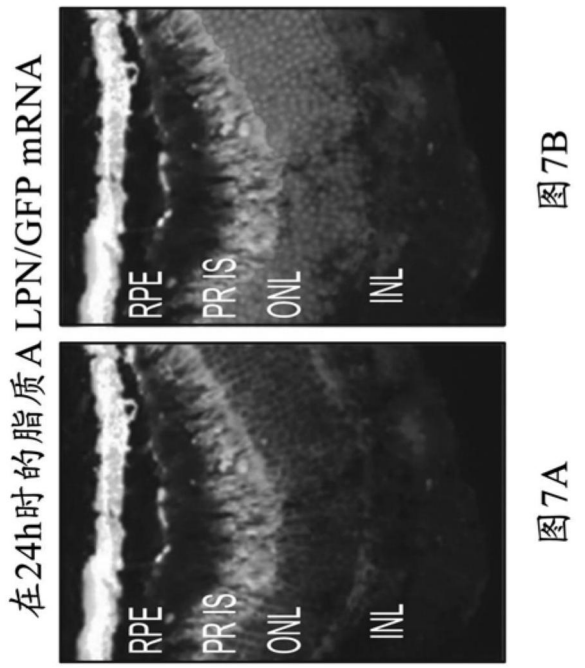

在24h时的脂质A LPN/GFP mRNA
RPE
PR IS
ONL
INL
RPE
PR IS
ONL
INL

图7A 图7B

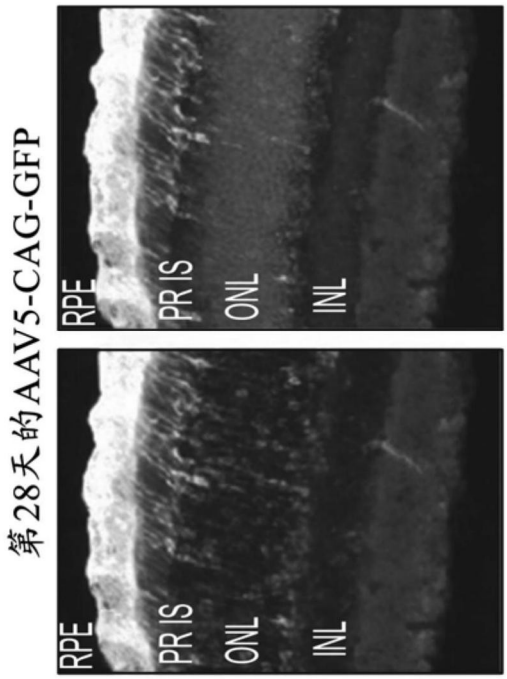

第28天的AAV5-CAG-GFP
RPE
PR IS
ONL
INL
RPE
PR IS
ONL
INL

图7C 图7D

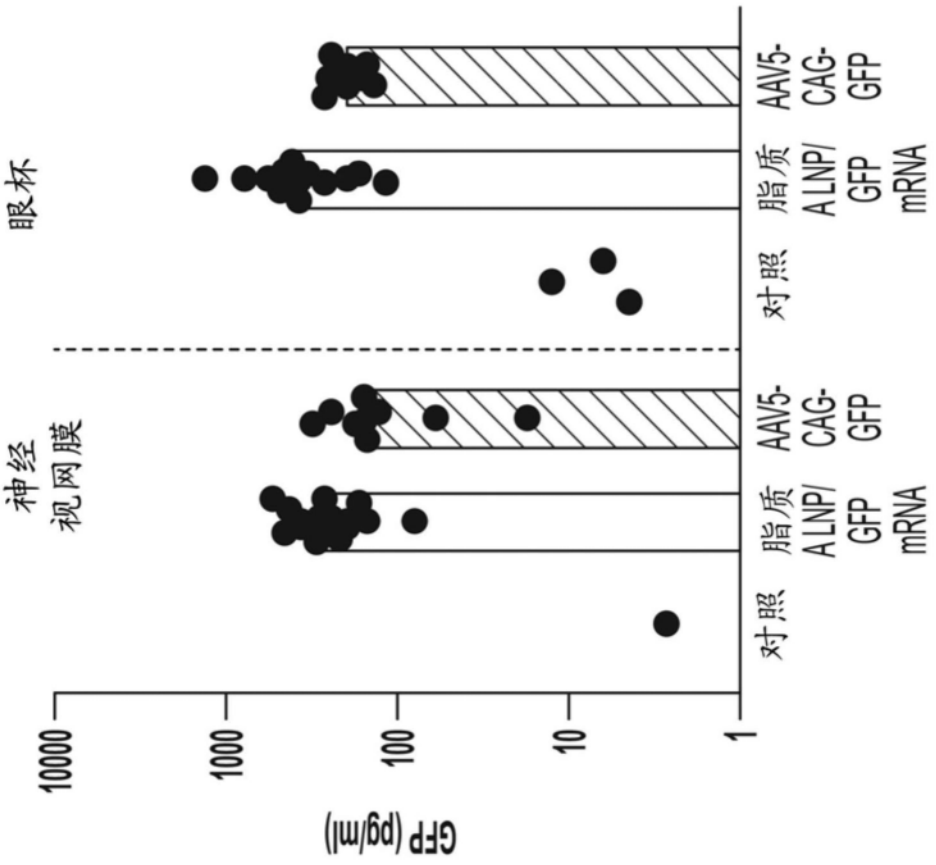

眼杯
神经视网膜
GFP (pg/ml)
10000
1000
100
10
1
对照
脂质ALNP/GFP mRNA
AAV5-CAG-GFP
对照
脂质ALNP/GFP mRNA
AAV5-CAG-GFP

图7E

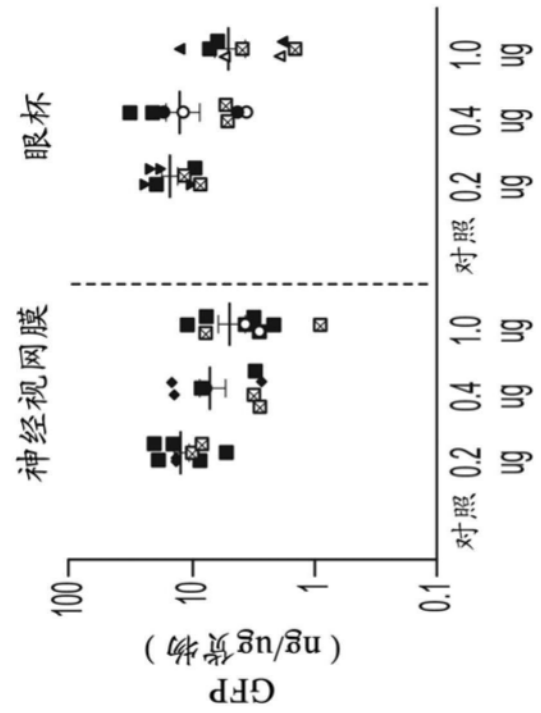

GFP
(ng/ug蛋白)
100
10
1
0.1
神经视网膜
眼杯
对照 0.2 0.4 1.0 对照 0.2 0.4 1.0
ug ug ug ug ug ug ug ug

图8B

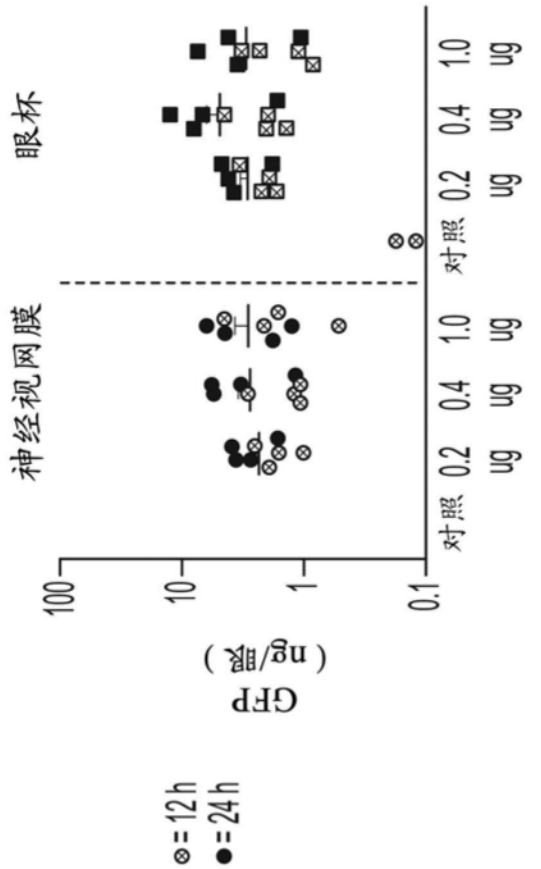

GFP
(ng/眼)
100
10
1
0.1
神经视网膜
眼杯
对照 0.2 0.4 1.0 对照 0.2 0.4 1.0
ug ug ug ug ug ug ug ug
⊗ = 12 h
● = 24 h

图8A

低

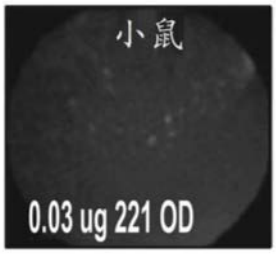


图9A

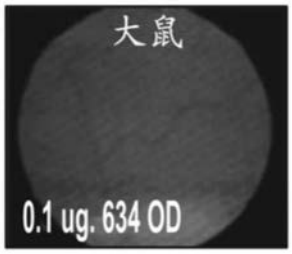


图9D

中等

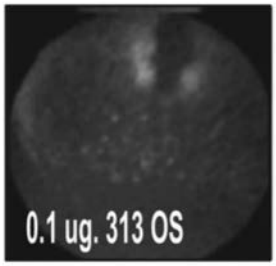


图9B

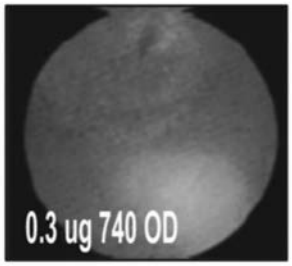


图9E

高

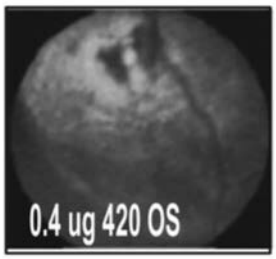


图9C

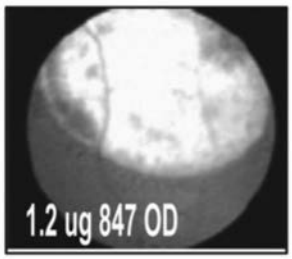
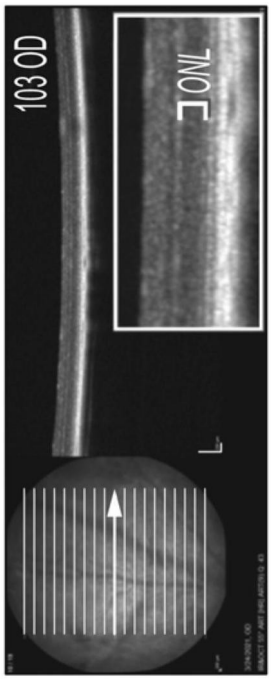


图9F

	小鼠(ug)	大鼠(ug)
低	0.03	0.1
中等	0.1	0.3
高	0.4	1.2



媒介物

图10A

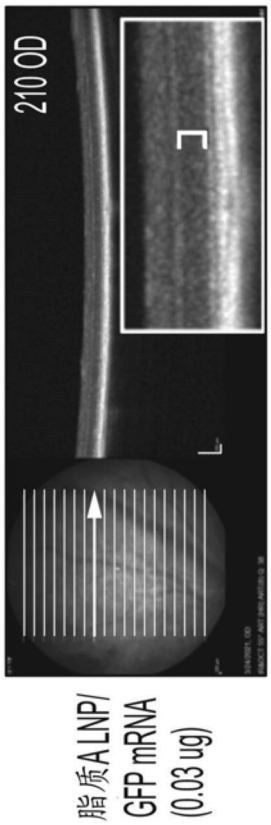


图10B

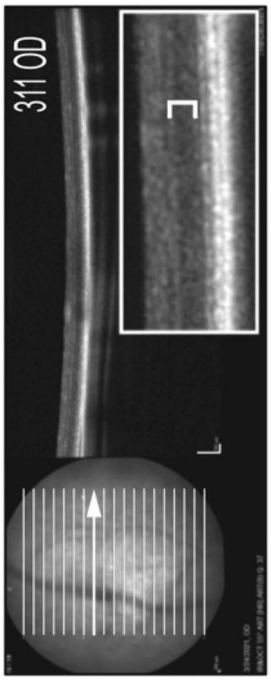


图10C

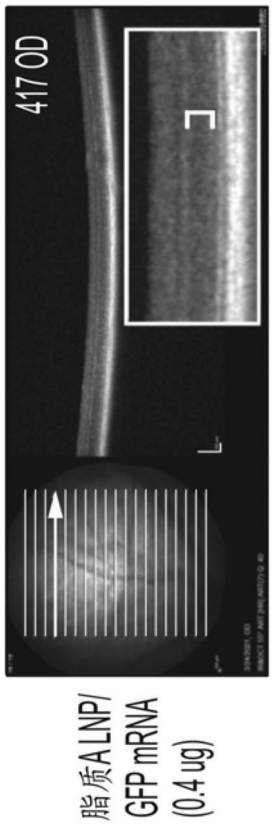


图10D

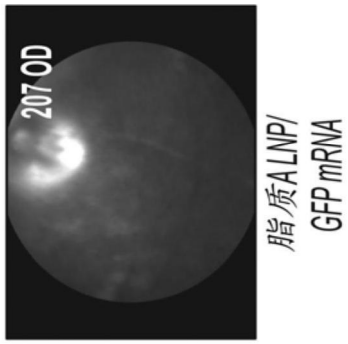


图11A

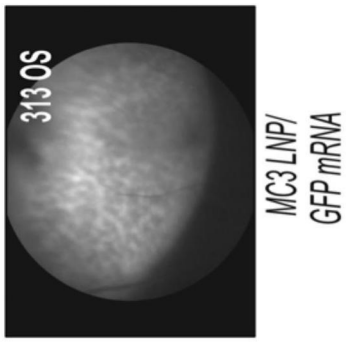


图11B

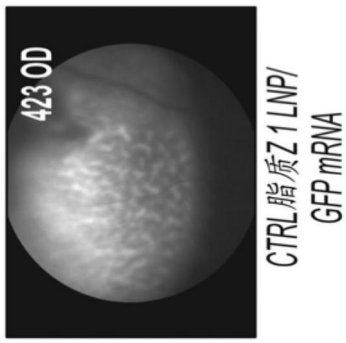


图11C

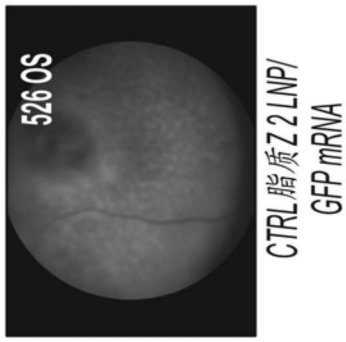


图11D

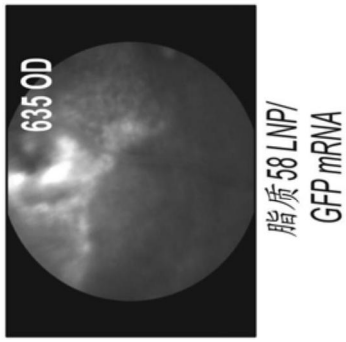


图11E

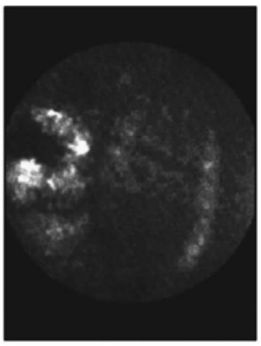


图11F

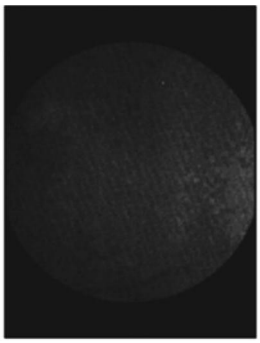


图11G

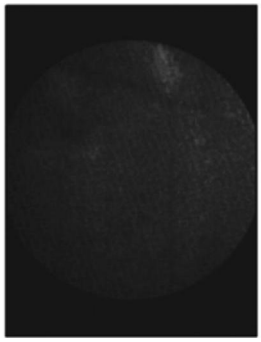


图11H

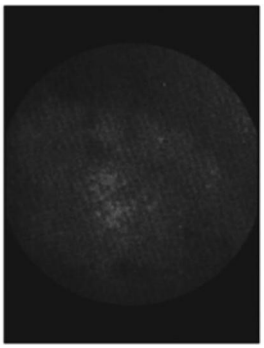


图11I

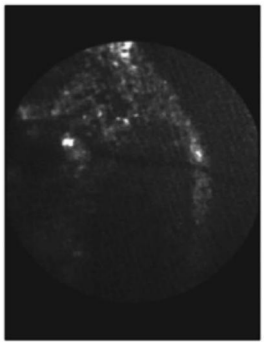


图11J

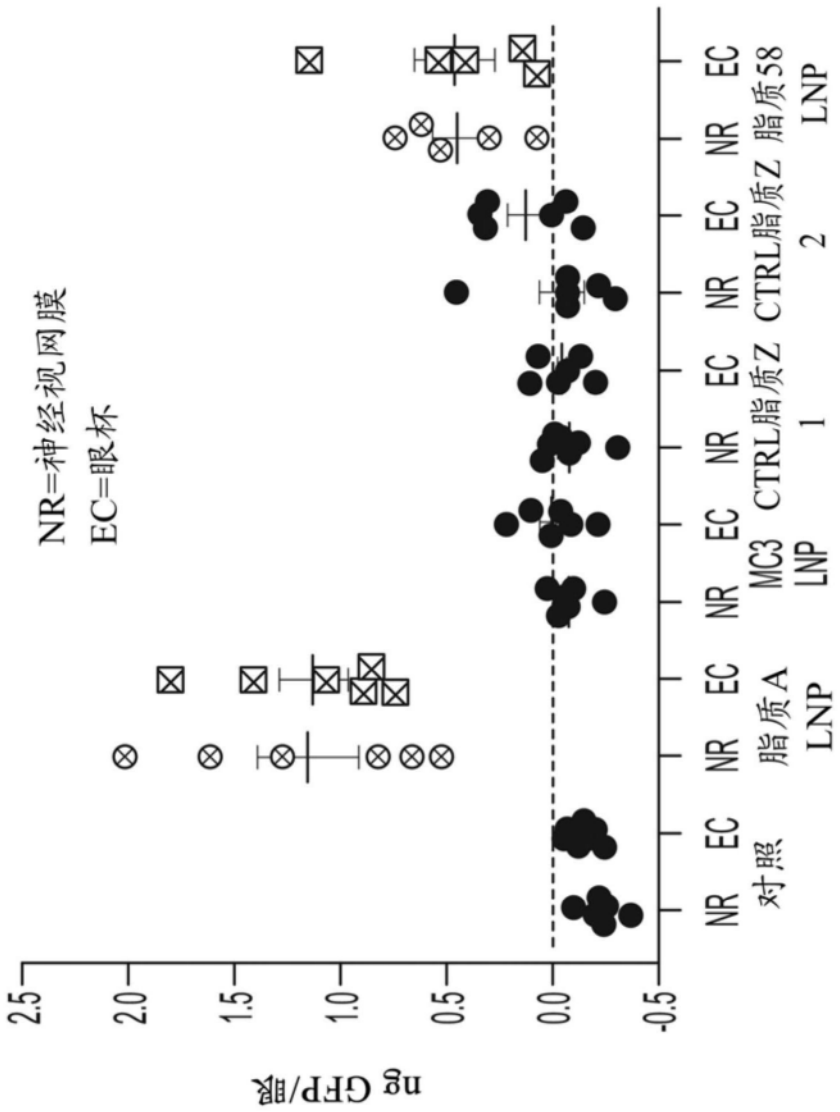

NR=神经视网膜
EC=眼杯
ng GFP/眼
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
NR EC NR EC NR EC NR EC NR EC NR EC NR EC
对照
脂质A
LNP
MC3
LNP
CTRL脂质Z
1
CTRL脂质Z
2
脂质58
LNP

图12

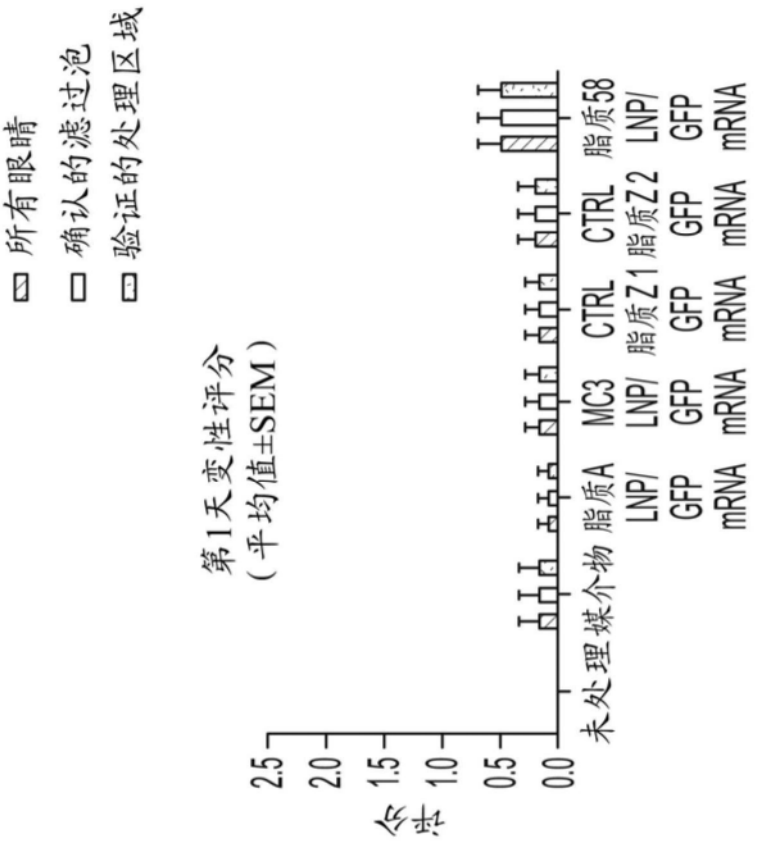

所有眼睛
确认的滤过泡
验证的处理区域
第1天变性评分
（平均值±SEM）
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
分
未处理 媒介物 脂质A MC3 CTRL CTRL 脂质58
LNP/ LNP/ 脂质Z1 脂质Z2 LNP/
GFP GFP GFP GFP GFP
mRNA mRNA mRNA mRNA mRNA

图13B

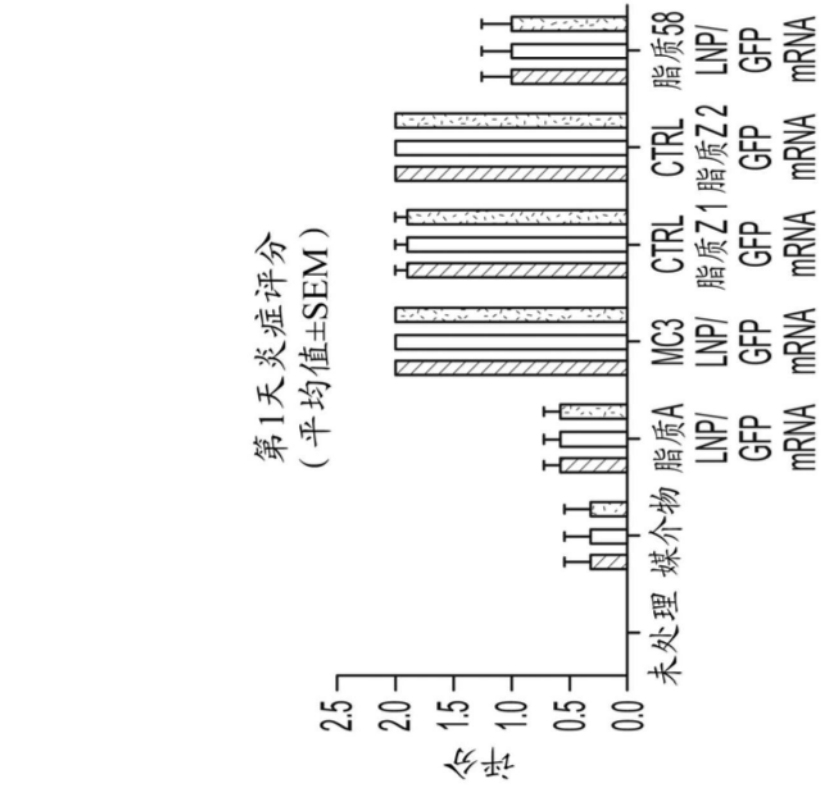

第1天炎症评分
（平均值±SEM）
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
分
未处理 媒介物 脂质A MC3 CTRL CTRL 脂质58
LNP/ LNP/ 脂质Z1 脂质Z2 LNP/
GFP GFP GFP GFP GFP
mRNA mRNA mRNA mRNA mRNA

图13A

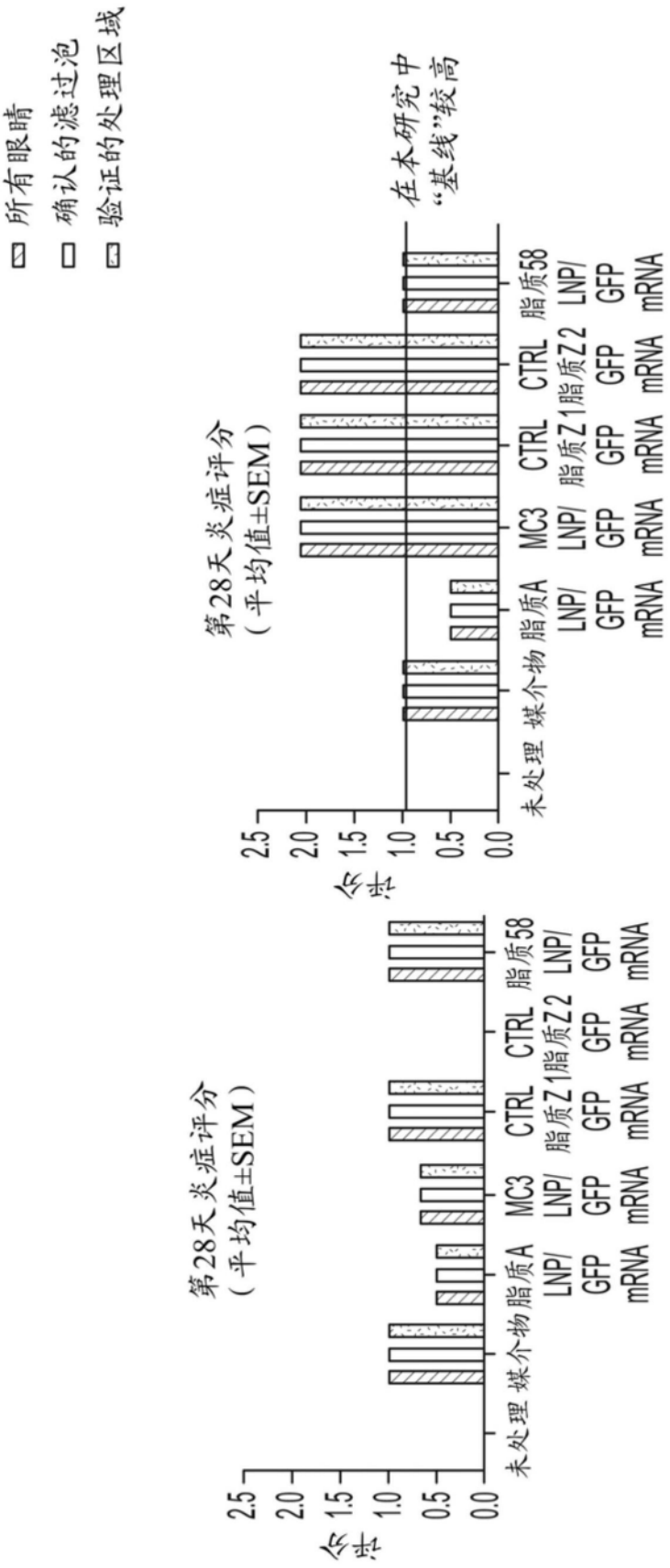

所有眼睛
确认的滤过泡
验证的处理区域
第28天炎症评分
（平均值±SEM）
分
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
未处理
媒介物
脂质A
MC3
LNP/ GFP mRNA
LNP/ 脂质Z1 GFP mRNA
CTRL GFP mRNA
CTRL 脂质Z2 GFP
CTRL 脂质58
LNP/ GFP mRNA
在本研究中
“基线”较高

图13C

图13D

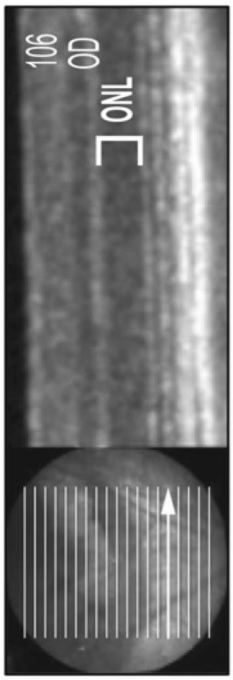


图14A

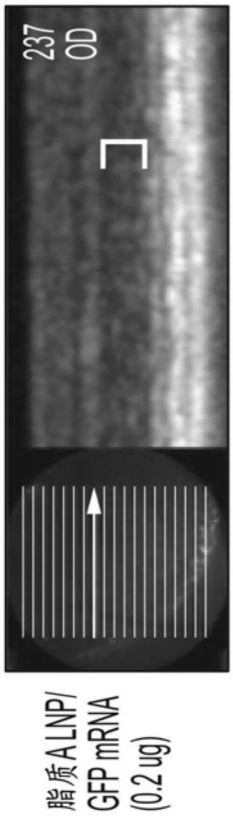


图14B

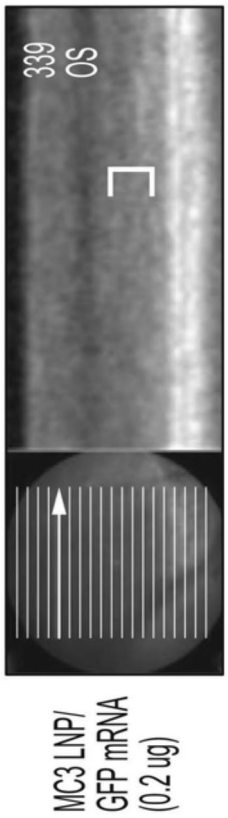


图14C

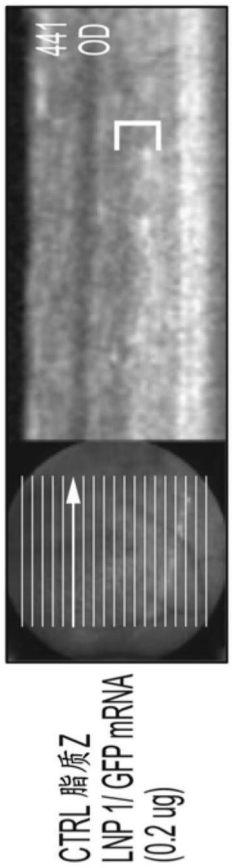


图14D

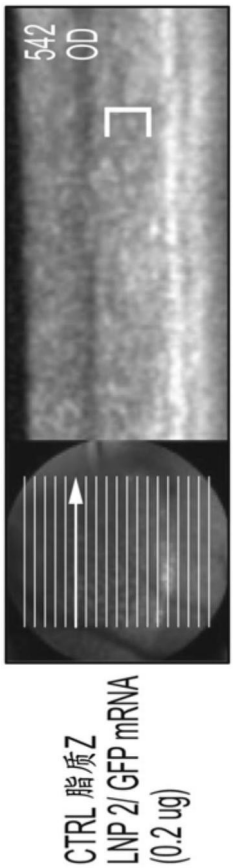


图14E

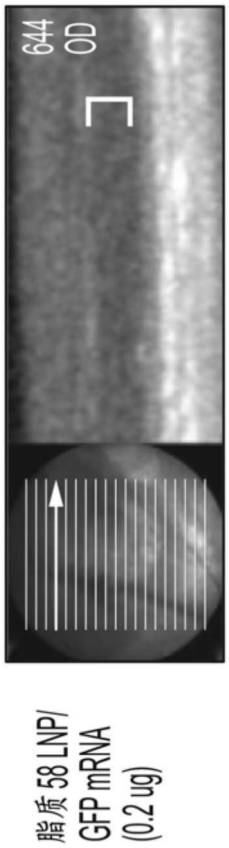


图14F

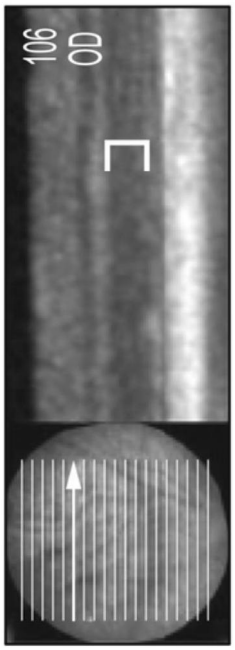


图15A

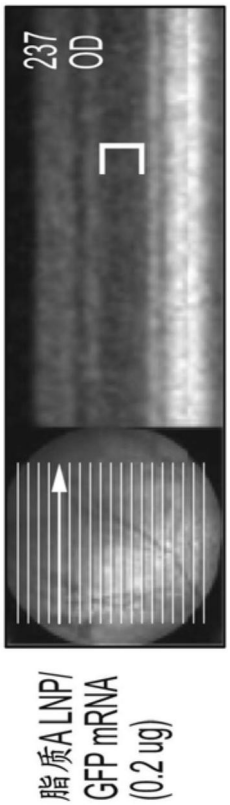


图15B

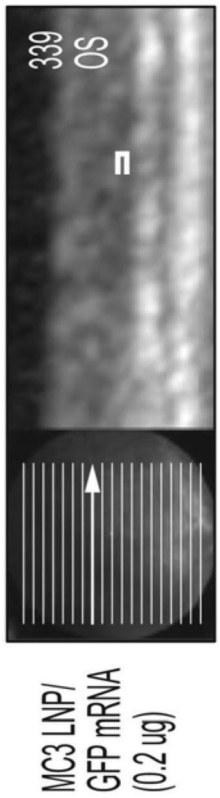


图15C

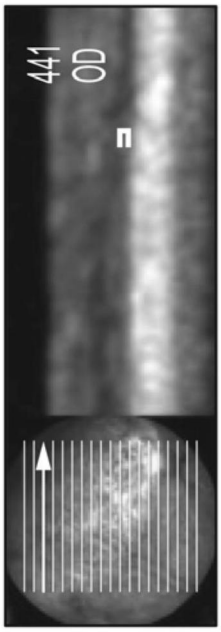


图15D

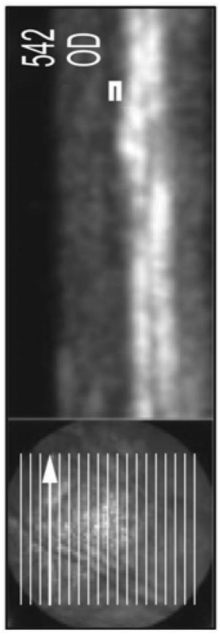


图15E

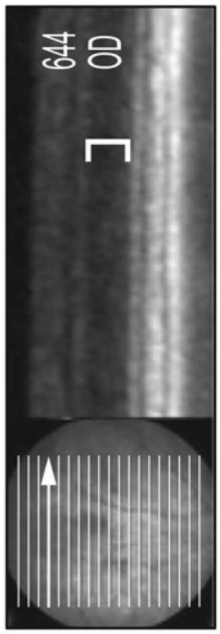


图15F

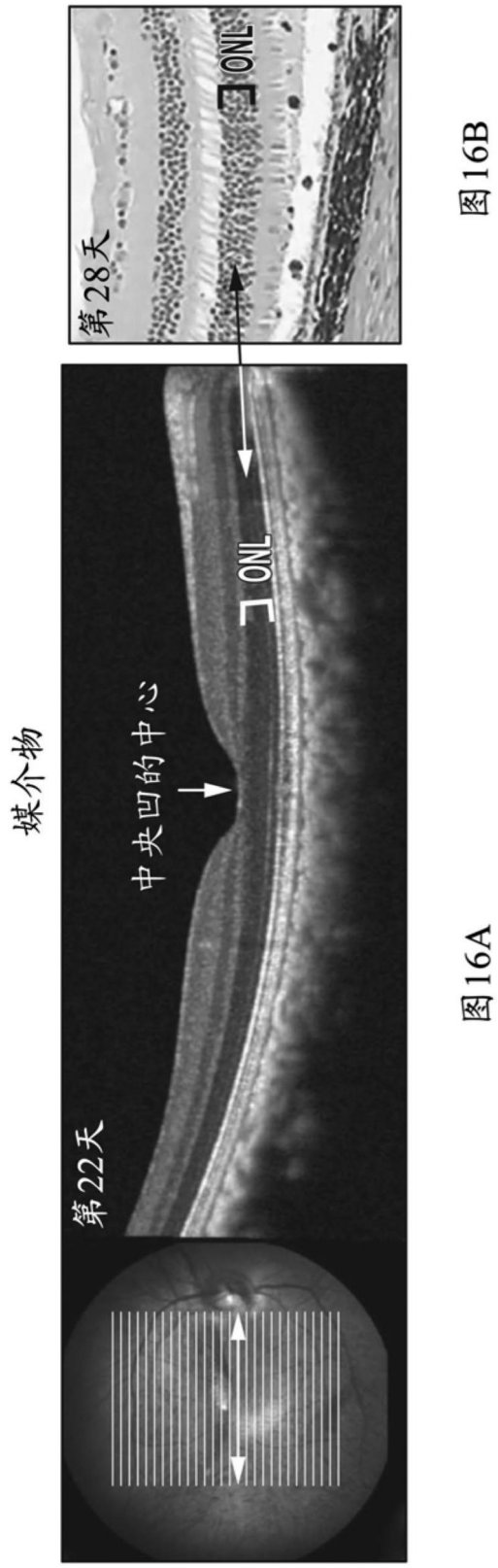


图16A

图16B

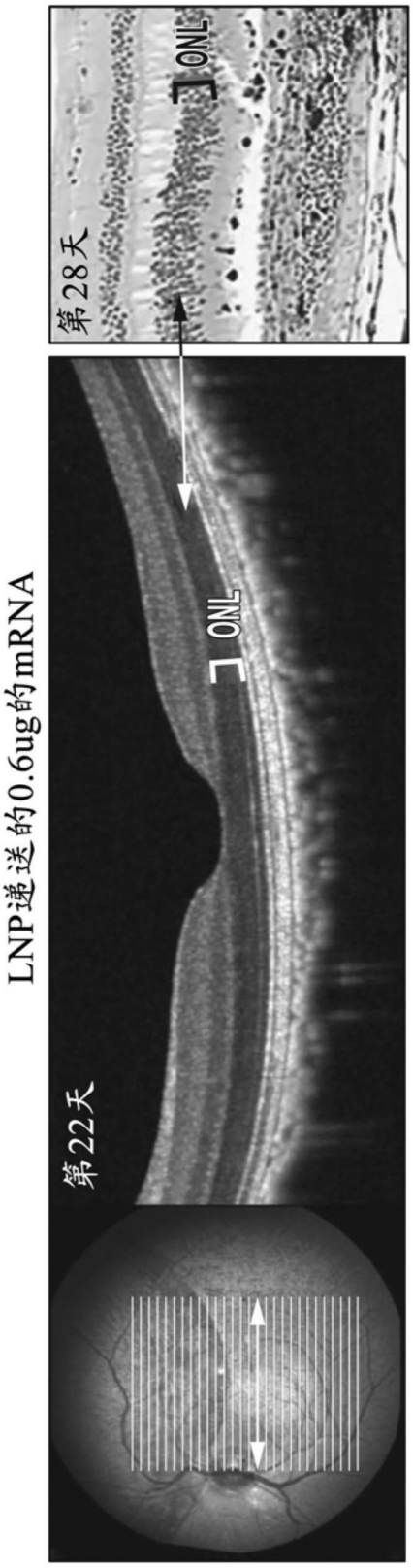


图16C

图16D

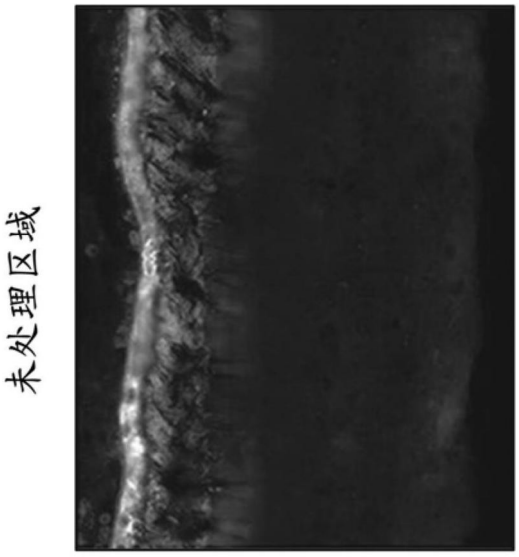


图17A

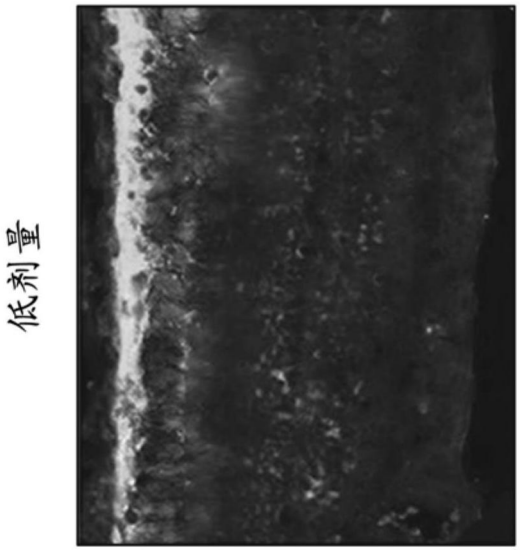


图17B

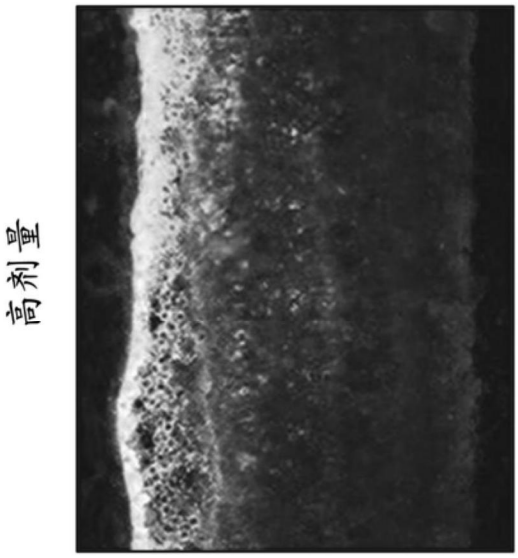


图17C

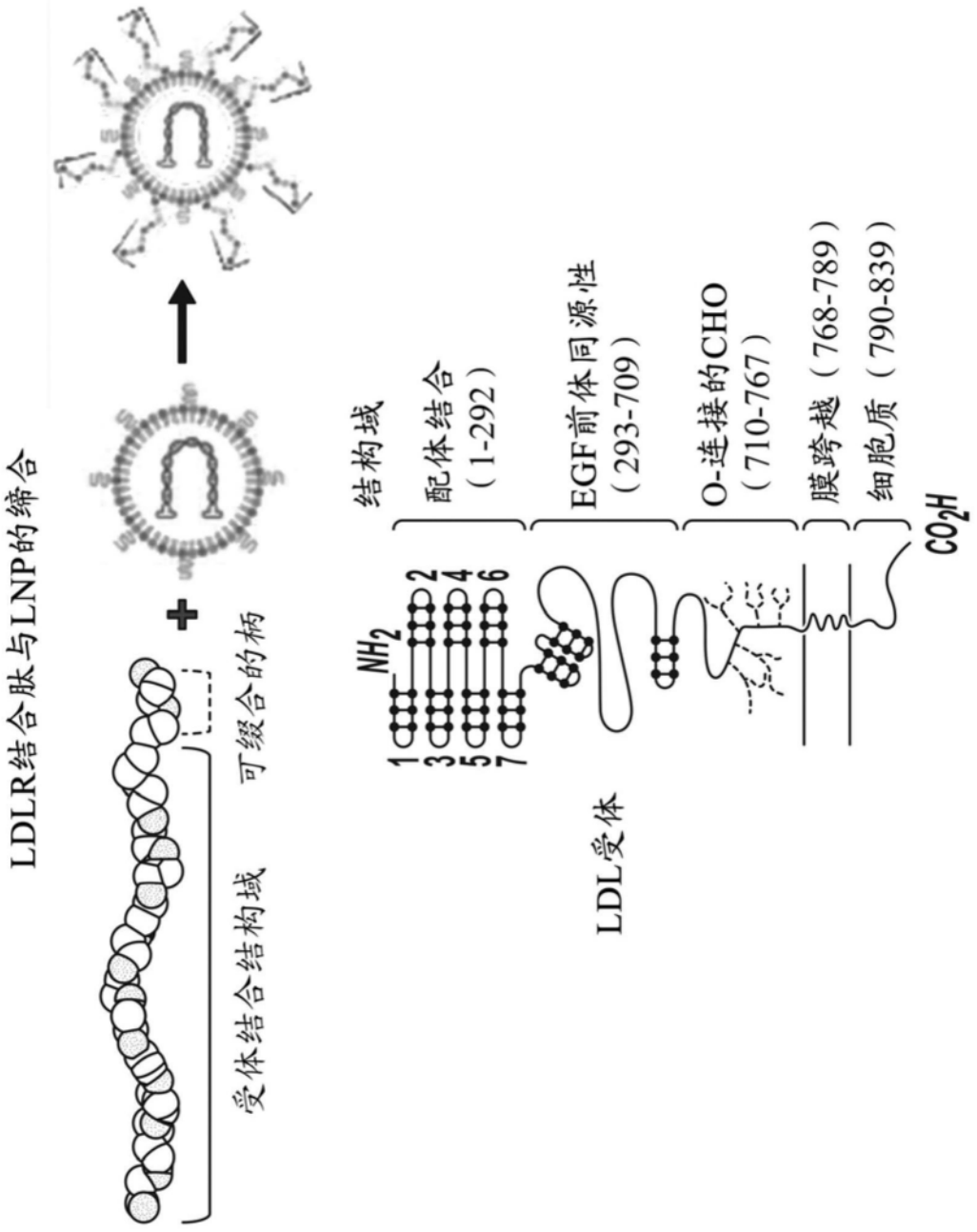

LDLR结合肽与LNP的缔合
受体结合结构域
可缀合的柄
结构域
配体结合
(1-292)
EGF前体同源性
(293-709)
O-连接的CHO
(710-767)
膜跨越 (768-789)
细胞质 (790-839)
NH2
CO2H
LDL受体

图18

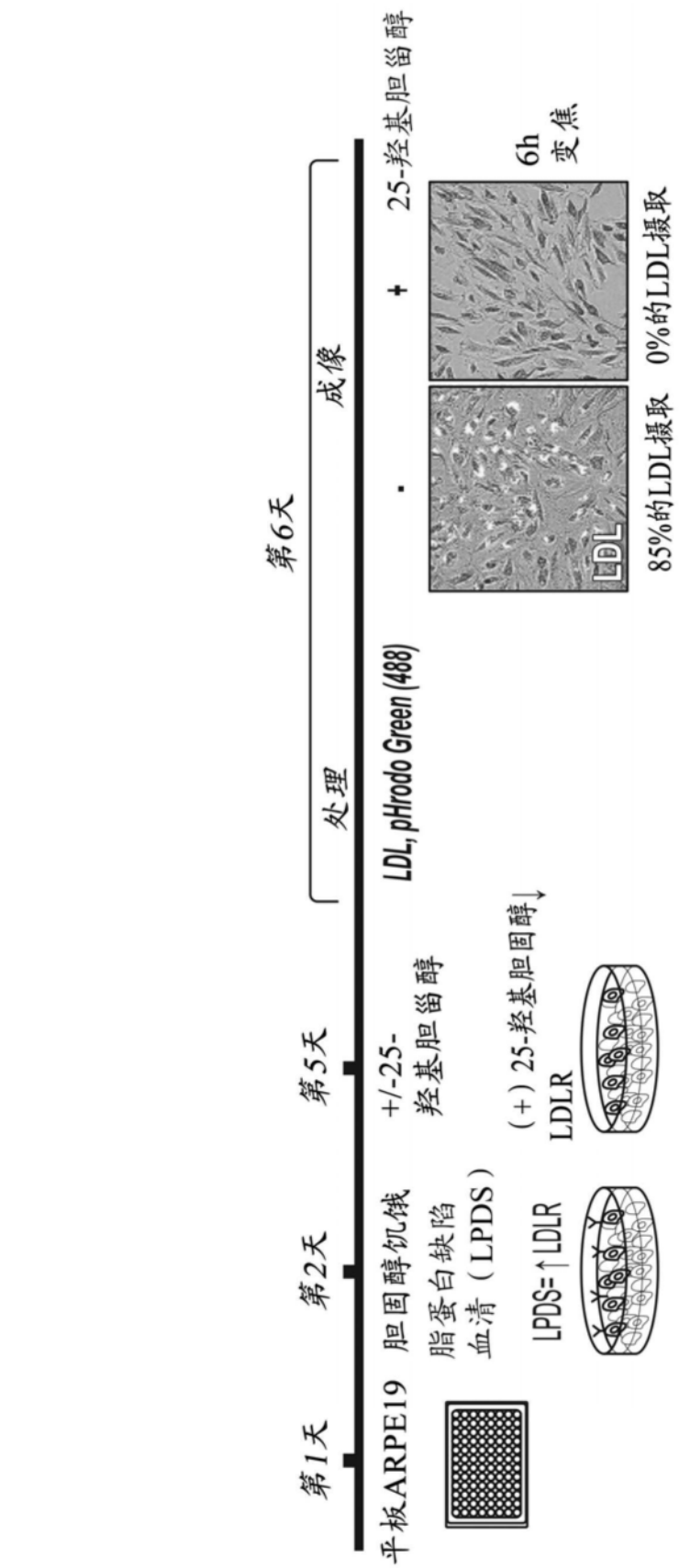

第1天
第2天
第5天
第6天
处理
成像
平板ARPE19
胆固醇饥饿
脂蛋白缺陷
血清（LPDS）
+/-25-
羟基胆甾醇
LDL, pHrodo Green (488)
+
25-羟基胆甾醇
6h
变焦
LDL
85%的LDL摄取
0%的LDL摄取
（+）25-羟基胆固醇
LPDS=↑LDLR
LDLR

图19A

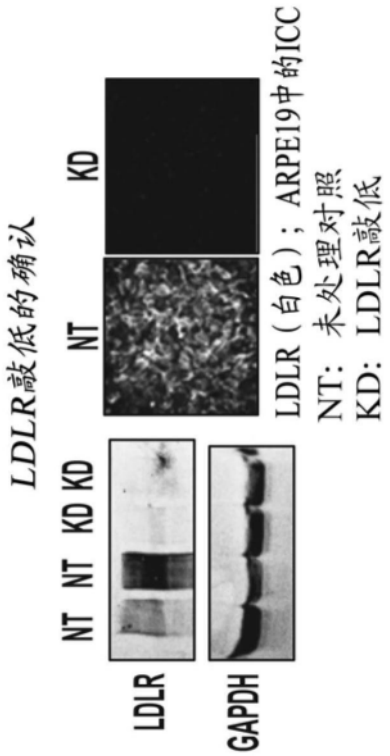

LDLR敲低的确认
NT NT KD KD
LDLR
GAPDH
NT
KD
LDLR（白色）；ARPE19中的ICC
NT：未处理对照
KD：LDLR敲低

图19B

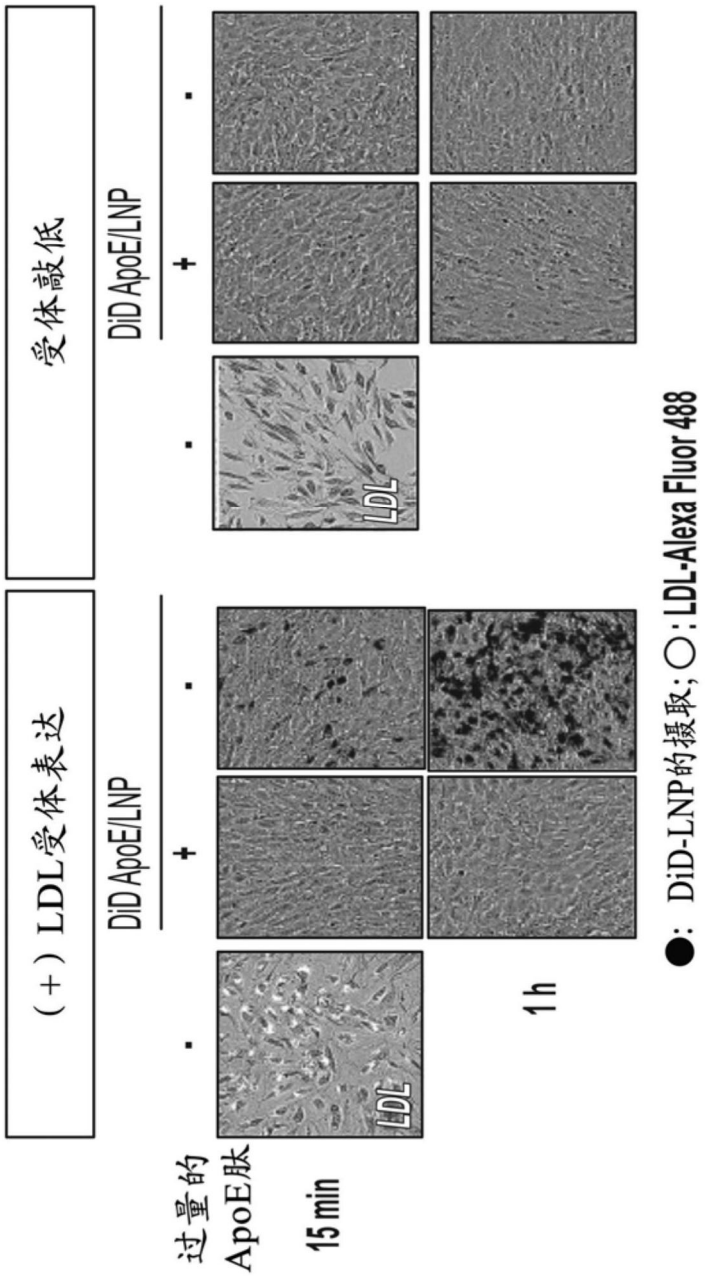

(+) LDL受体表达
受体敲低
DiD ApoE/LNP
DiD ApoE/LNP
过量的ApoE肽
15 min
1 h
LDL
LDL
●: DiD-LNP的摄取; ○: LDL-Alexa Fluor 488

图20

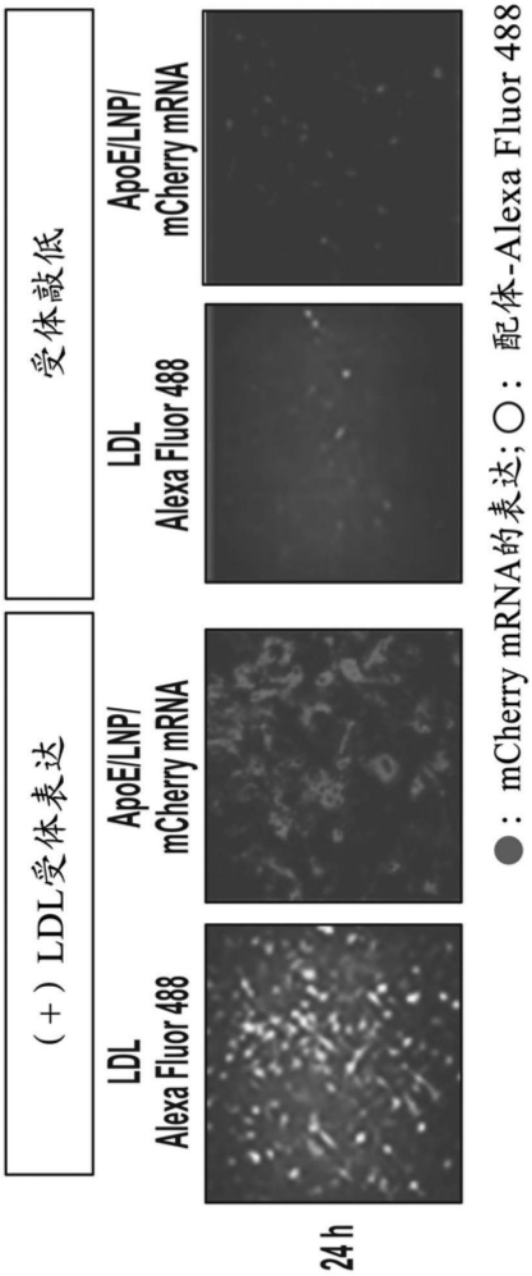

（+）LDL受体表达
受体敲低
LDL
Alexa Fluor 488
ApoE/LNP/
mCherry mRNA
LDL
Alexa Fluor 488
ApoE/LNP/
mCherry mRNA
24 h
●：mCherry mRNA的表达；○：配体-Alexa Fluor 488

图21

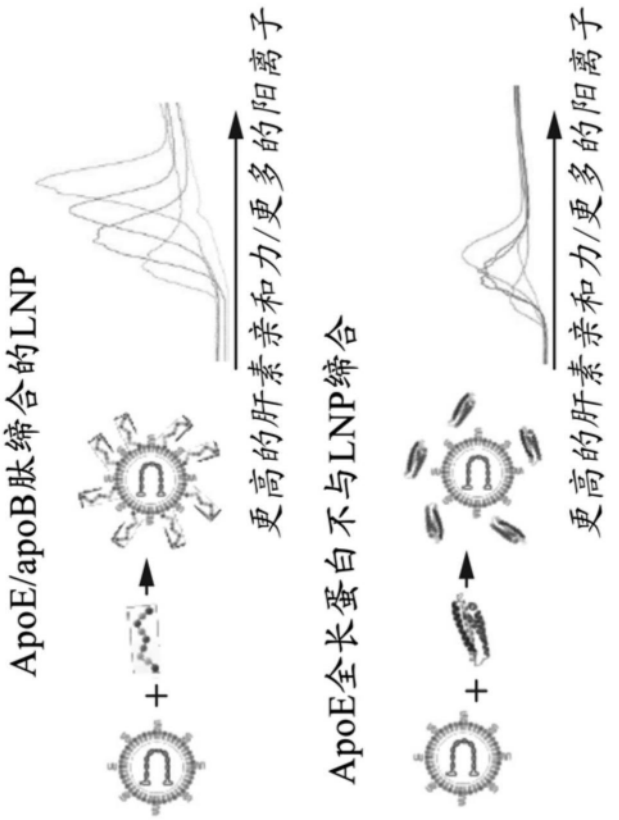

ApoE/apoB肽缔合的LNP
更高的肝素亲和力/更多的阳离子
ApoE全长蛋白不与LNP缔合
更高的肝素亲和力/更多的阳离子

图22A

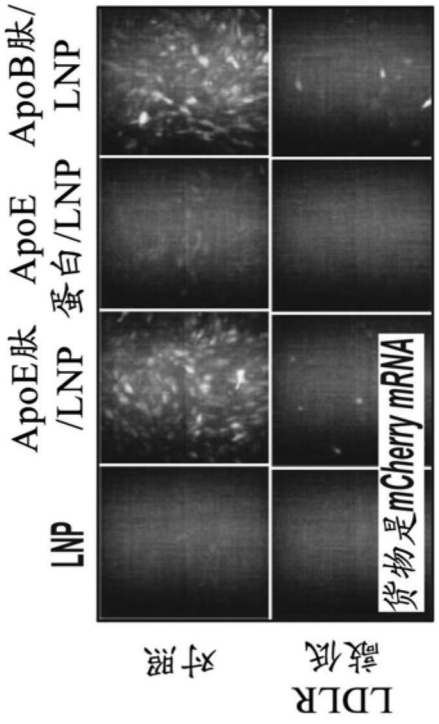

LNP
ApoE肽/LNP
ApoE蛋白/LNP
ApoB肽/LNP
货物是mCherry mRNA
敲除
LDLR
对照

图22B

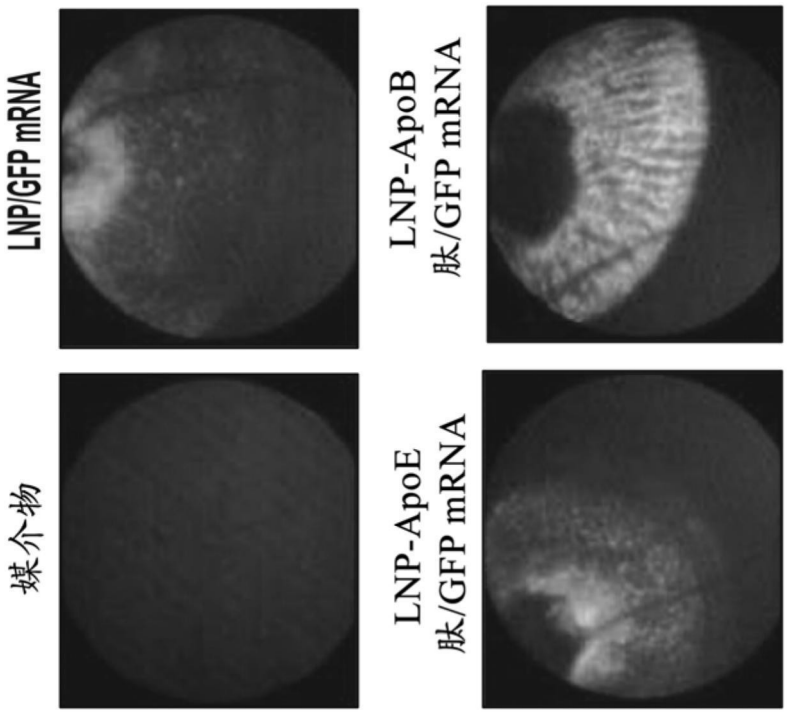

LNP/GFP mRNA
媒介物
LNP-ApoB
肽/GFP mRNA
LNP-ApoE
肽/GFP mRNA

图23A

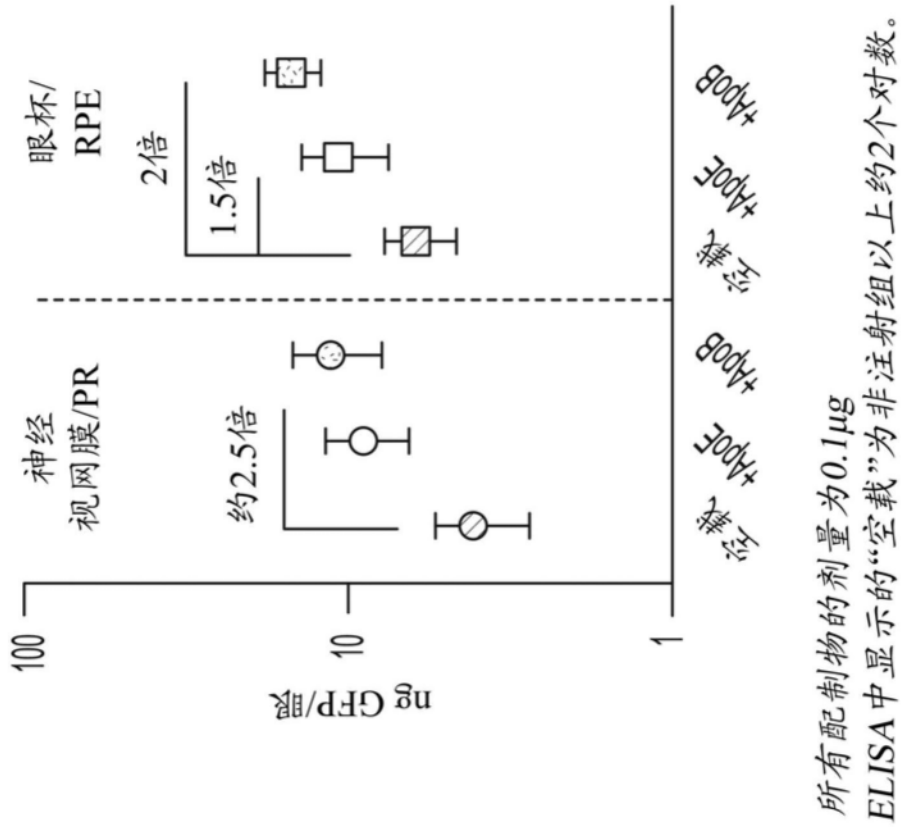

眼杯/
RPE
神经
视网膜/PR
2倍
1.5倍
约2.5倍
100
10
1
ng GFP/照
没有
+ApoE
+ApoB
没有
+ApoE
+ApoB
所有配制物的剂量为0.1μg
ELISA中显示的"空载"为非注射组以上约2个对数。

图23B

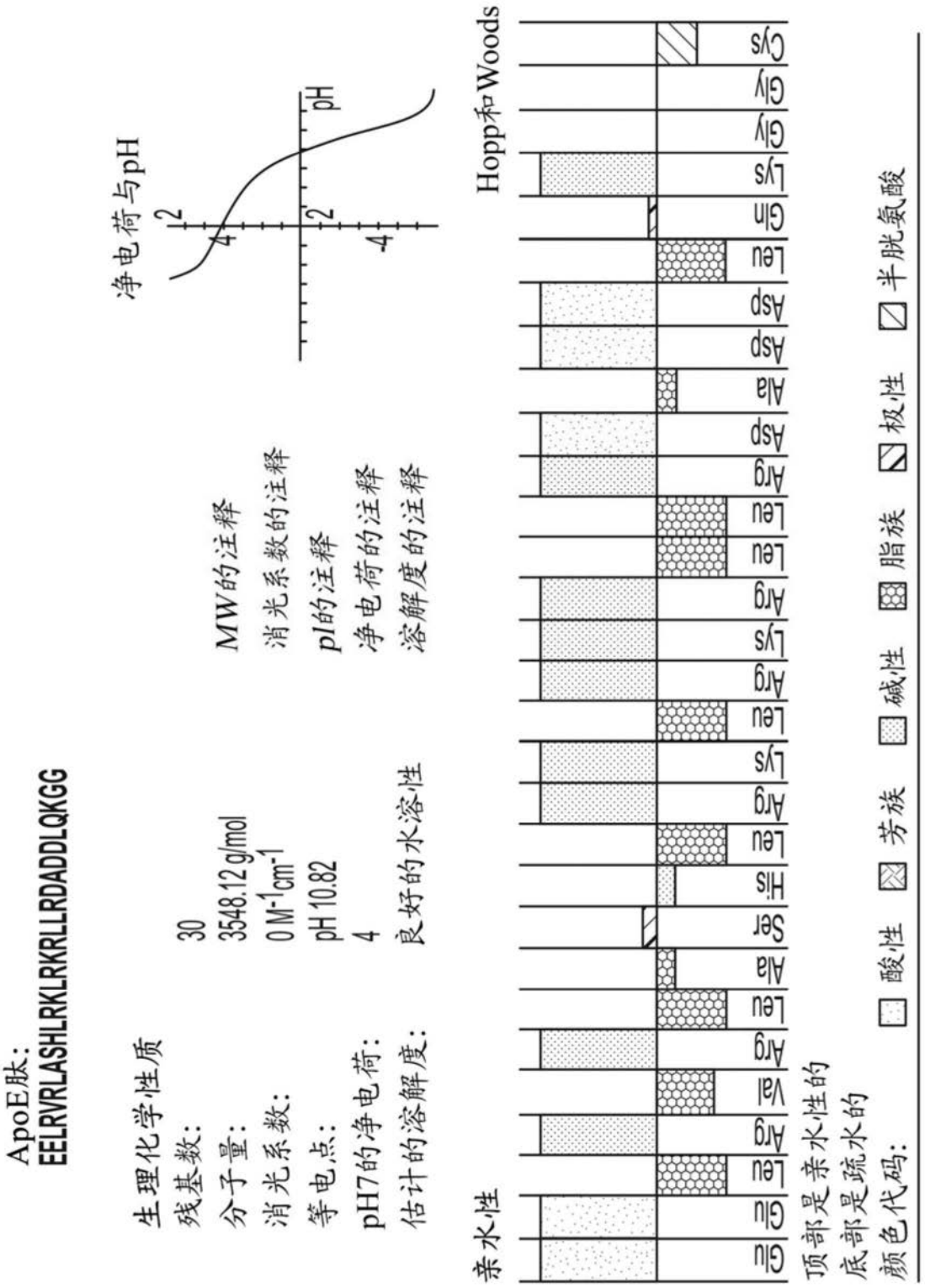

ApoE肽:
EELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKGG
生理化学性质
残基数: 30
分子量: 3548.12 g/mol
消光系数: 0 M-1cm-1
等电点: pH 10.82
pH7的净电荷: 4
估计的溶解度: 良好的水溶性
净电荷与pH
MW的注释
消光系数的注释
pI的注释
净电荷的注释
溶解度的注释
Hopp和Woods
亲水性
顶部是亲水性的
底部是疏水的
颜色代码:
酸性
芳族
碱性
脂族
极性
半胱氨酸

图24

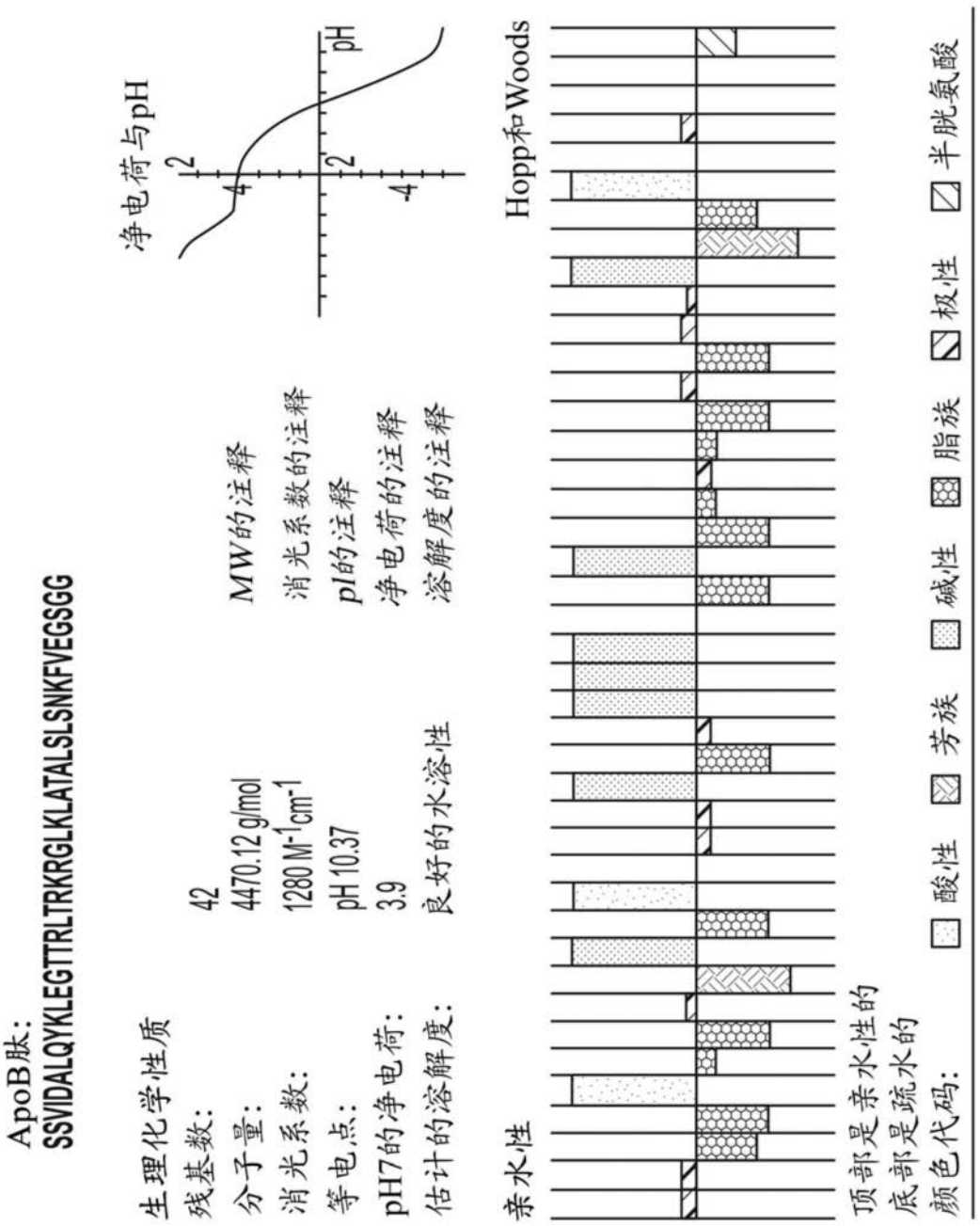

ApoB肽：
SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSGG
生理化学性质
残基数：
42
分子量：
4470.12 g/mol
消光系数：
1280 M-1cm-1
等电点：
pH 10.37
pH7的净电荷：
3.9
估计的溶解度：
良好的水溶性
MW的注释
消光系数的注释
pI的注释
净电荷的注释
溶解度的注释
净电荷与pH
pH
Hopp和Woods
亲水性
顶部是亲水性的
底部是疏水的
颜色代码：
酸性
芳族
碱性
脂族
极性
半胱氨酸

图24续图

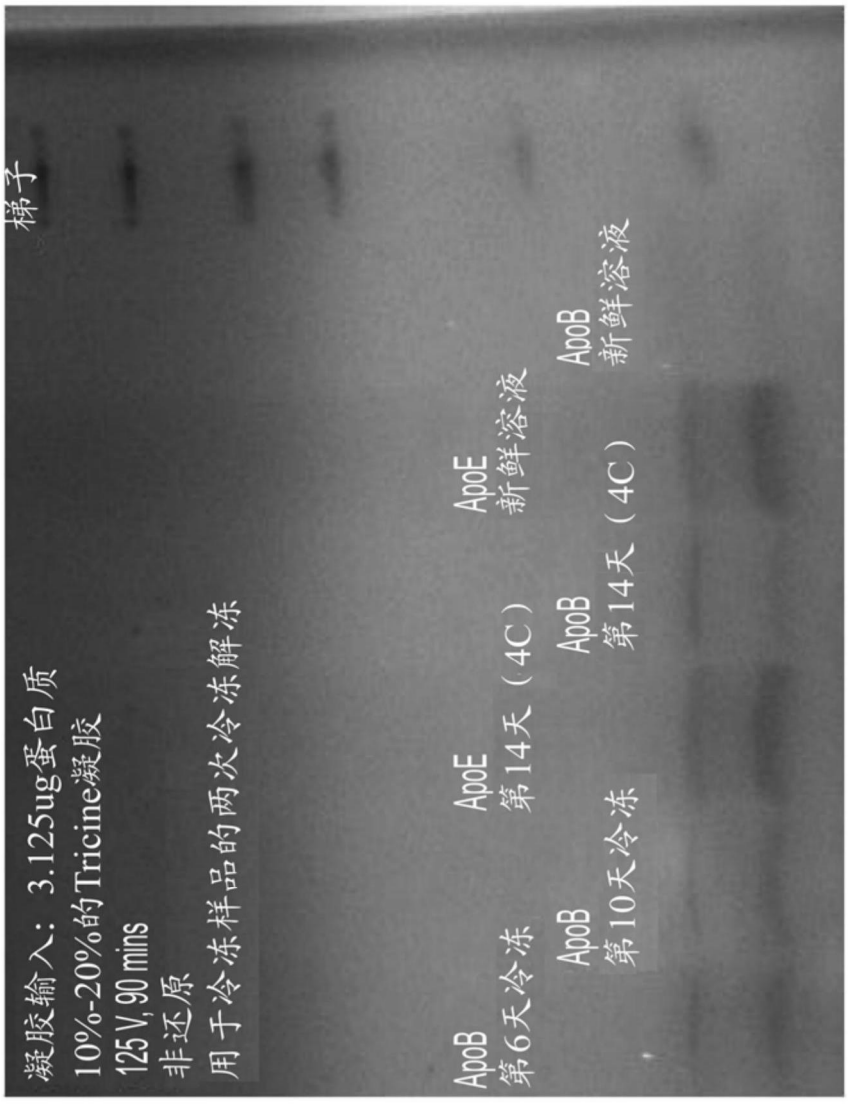

梯子
凝胶输入：3.125ug蛋白质
10%-20%的Tricine凝胶
125 V, 90 mins
非还原
用于冷冻样品的两次冷冻解冻
ApoB
第6天冷冻
ApoE
第14天（4C）
ApoE
新鲜溶液
ApoB
第10天冷冻
ApoB
第14天（4C）
ApoB
新鲜溶液
肽二聚体
肽单体

图25

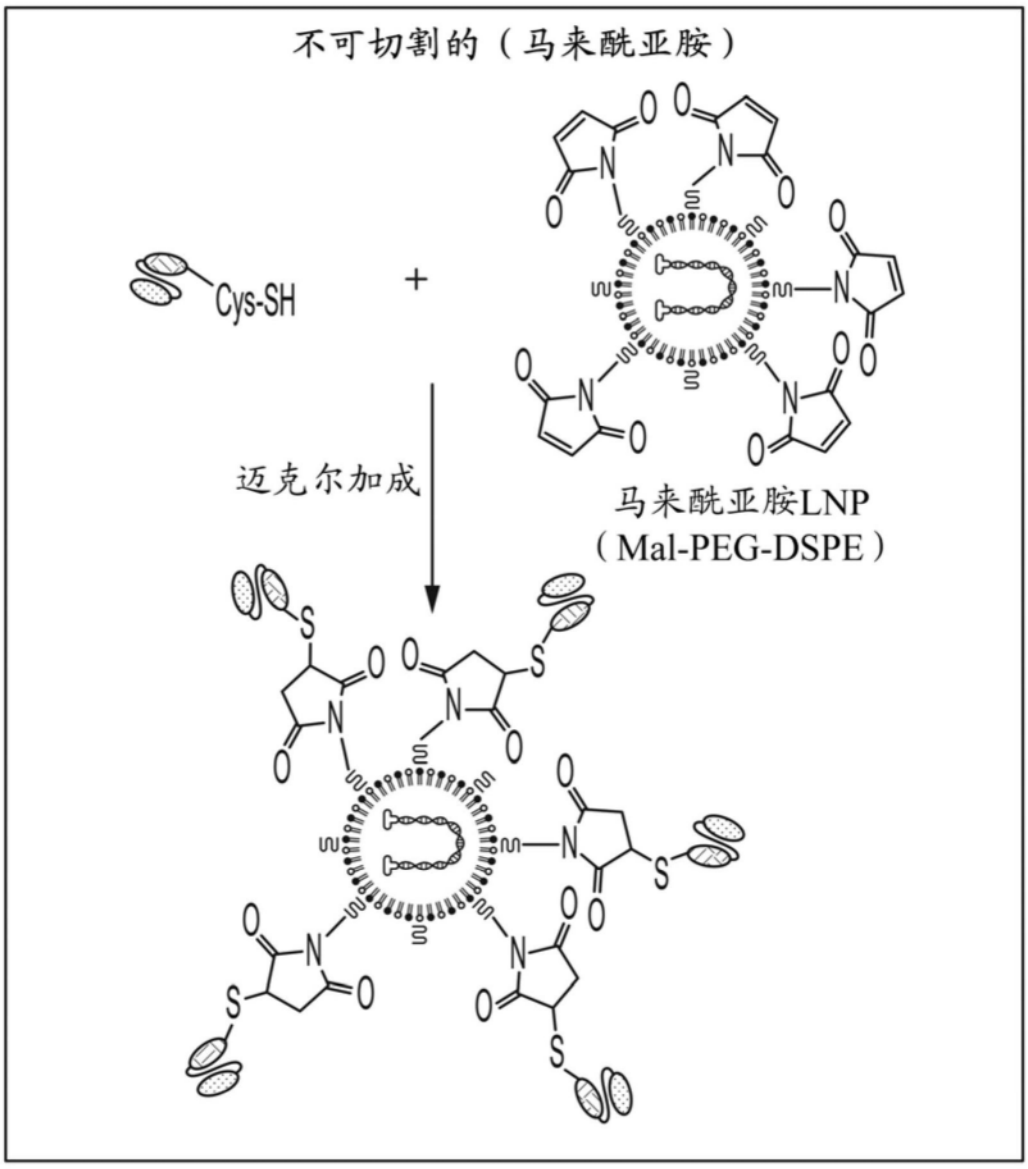


图26A

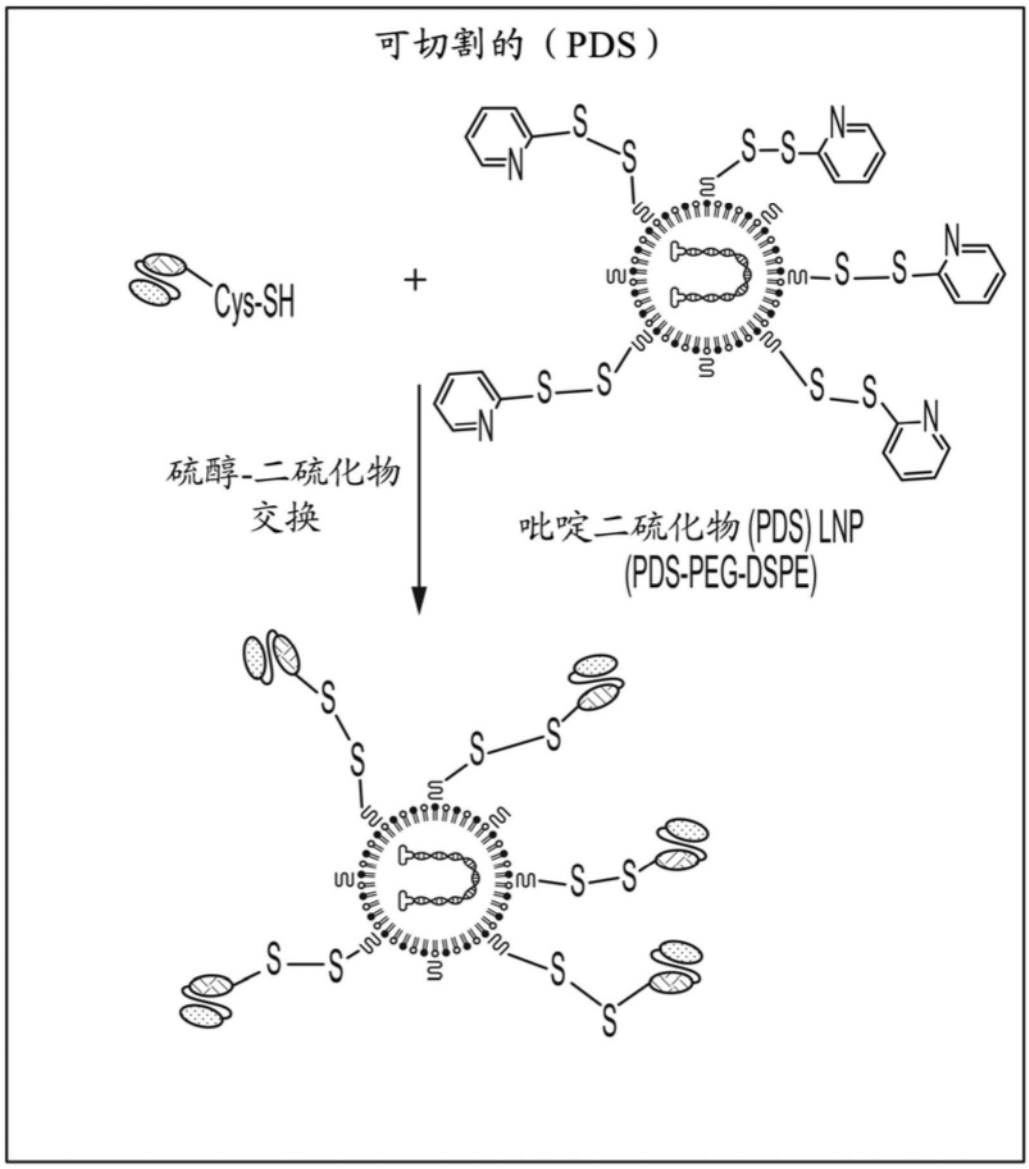
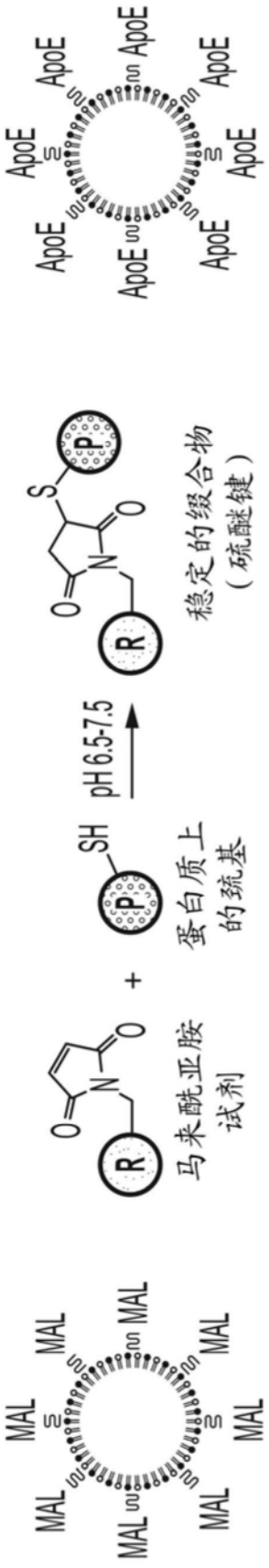


图26B



相对于马来酰亚胺#的过量的肽反应

肽	反应过量
ApoE	2x
ApoB	0.5x

图27

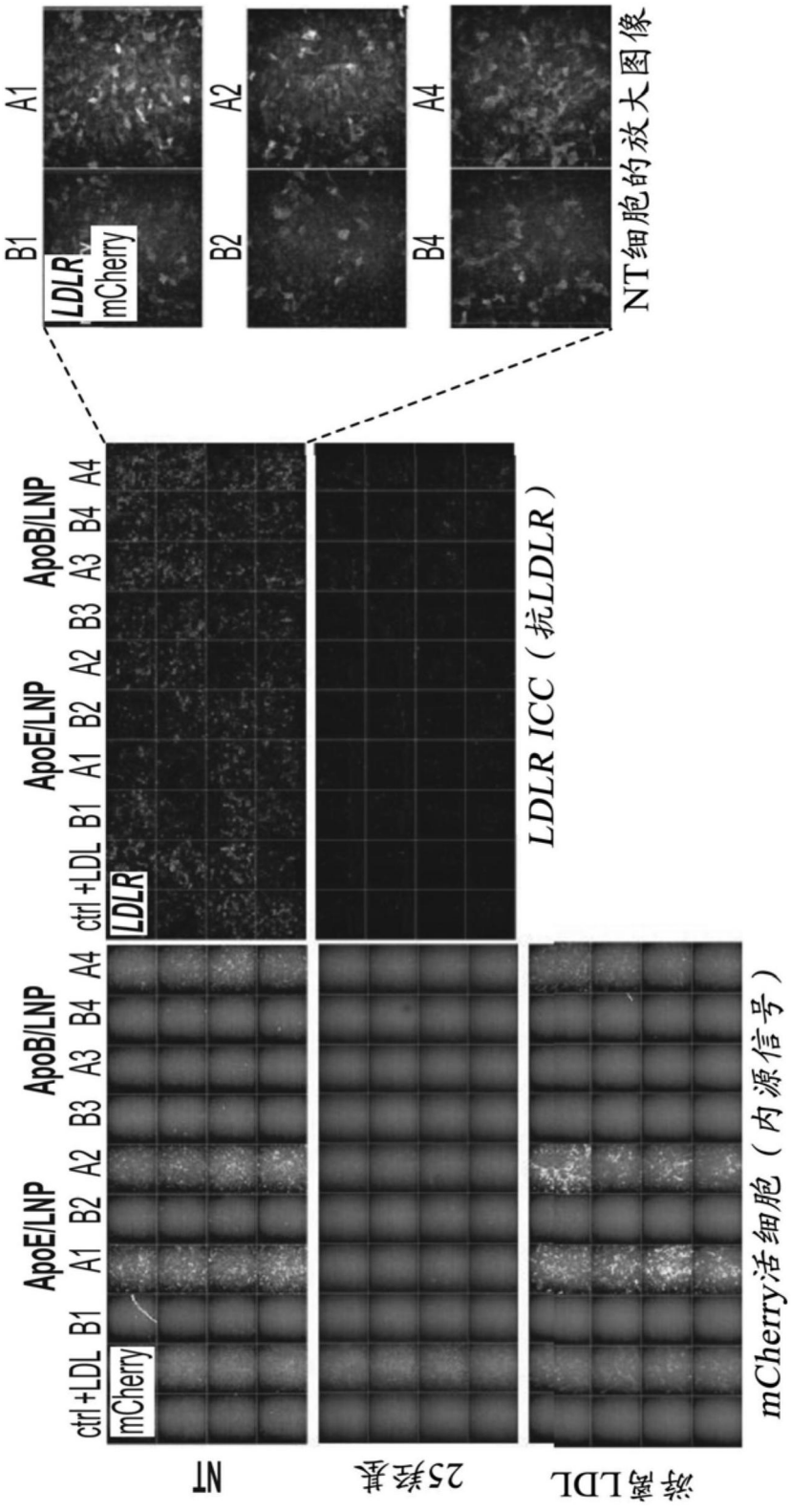

游离LDL
25羟基
NT
mCherry活细胞（内源信号）
LDLR ICC（抗LDLR）
NT细胞的放大图像
ctrl +LDL
ApoE/LNP
ApoB/LNP
A1
A2
A3
A4
B1
B2
B3
B4
mCherry
LDLR

图28

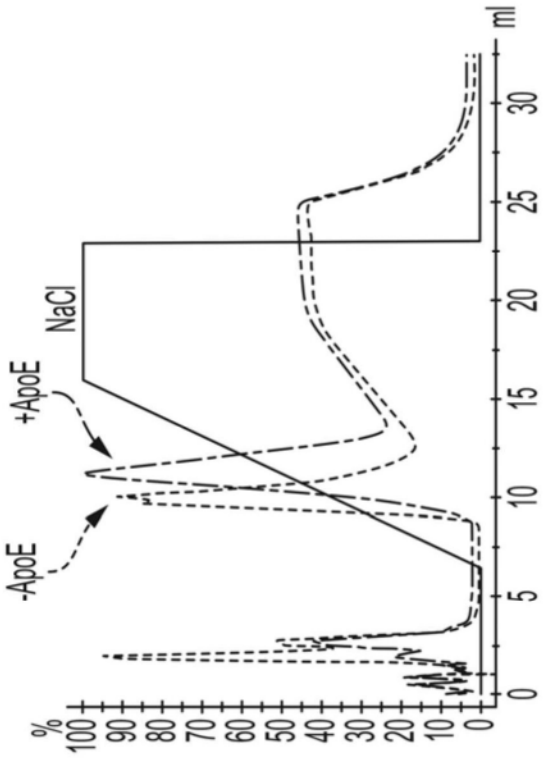

ml
NaCl
+ApoE
-ApoE
%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30

图29A

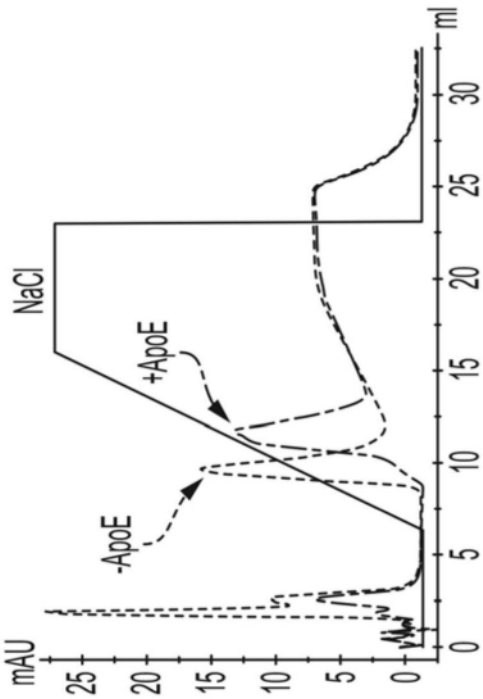

ml
NaCl
+ApoE
-ApoE
mAU
25
20
15
10
5
0
0
5
10
15
20
25
30

图29B

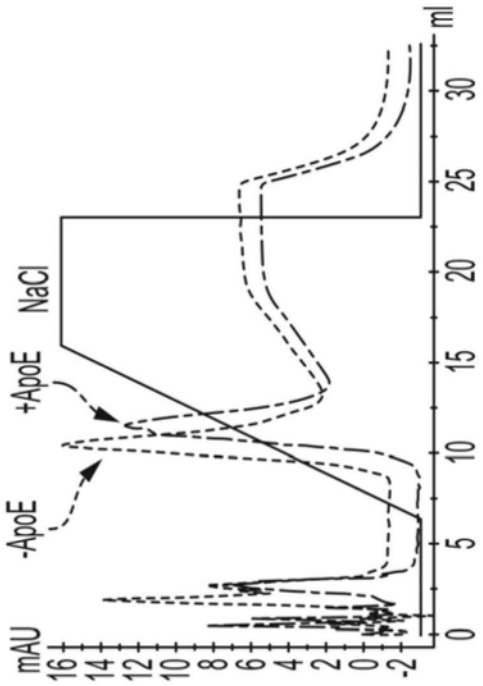


图29C

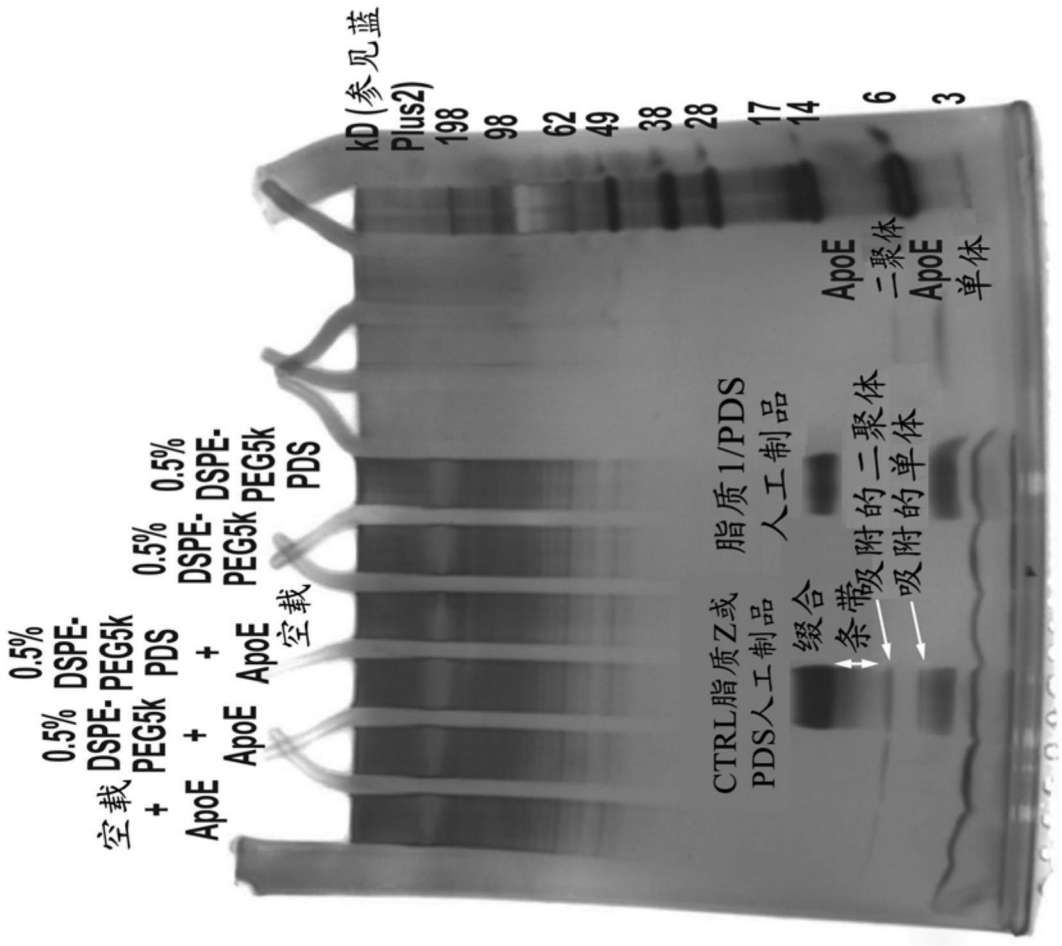

kD(参见蓝Plus2)
198
98
62
49
38
28
17
14
6
3
ApoE二聚体
ApoE单体
CTRL脂质Z或PDS人工制品
脂质1/PDS人工制品
缀合条带
吸附的二聚体
吸附的单体
空载 + ApoE
0.5% DSPE-PEG5k + ApoE
0.5% DSPE-PEG5k PDS + ApoE
空载
0.5% DSPE-PEG5k
0.5% DSPE-PEG5k PDS

图30

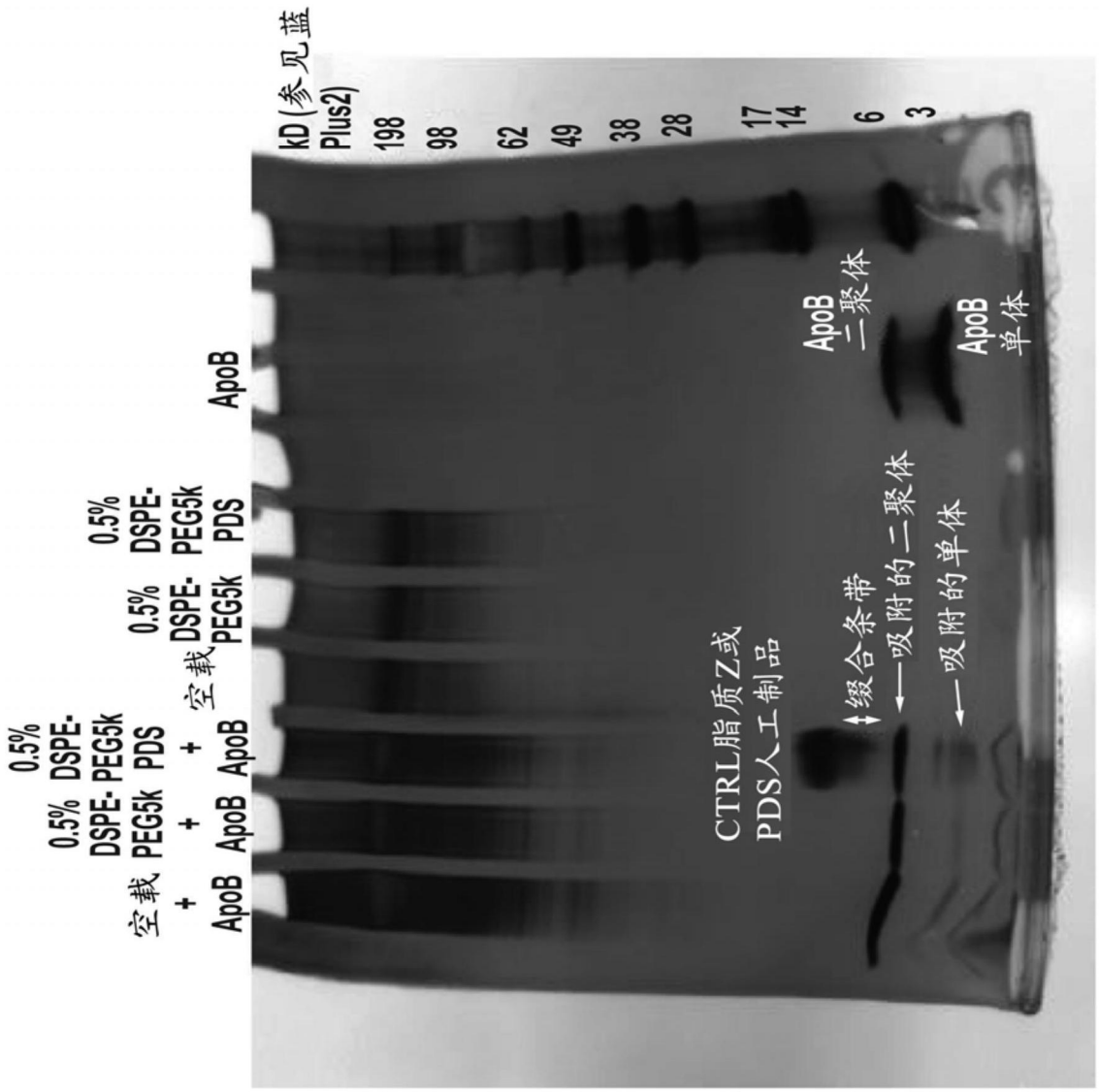

kD(参见蓝Plus2)
198
98
62
49
38
28
17
14
6
3
ApoB
空载 + ApoB
0.5% DSPE-PEG5k + ApoB
0.5% DSPE-PEG5k PDS + ApoB
空载 + ApoB
0.5% DSPE-PEG5k + ApoB
0.5% DSPE-PEG5k PDS + ApoB
CTRL脂质Z或
PDS人工制品
缀合条带
吸附的二聚体
吸附的单体
ApoB
二聚体
ApoB
单体

图31

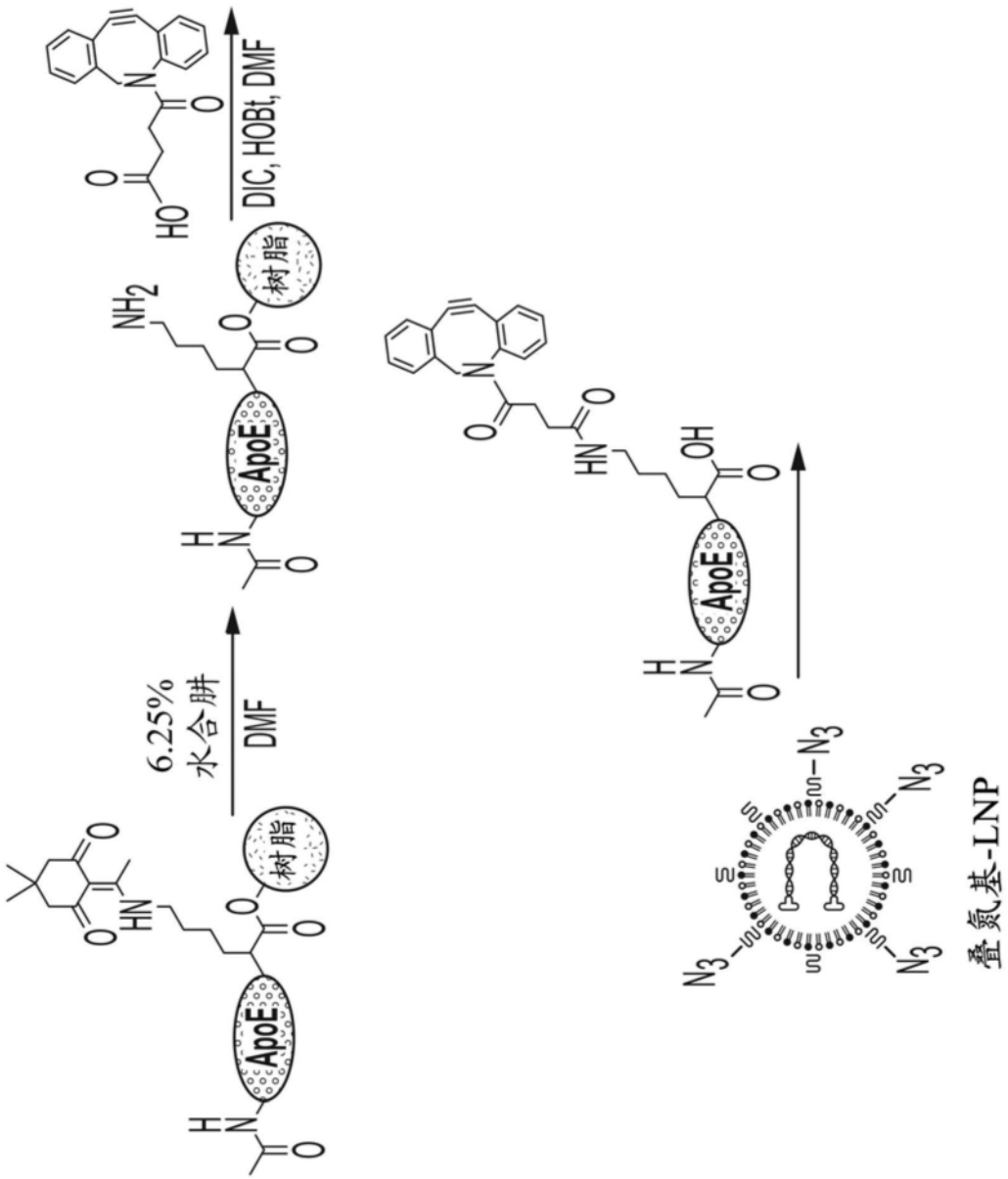

DIC, HOBt, DMF
树脂
NH2
ApoE
6.25%
水合肼
DMF
树脂
HN
ApoE
HN
OH
ApoE
N3
N3
N3
N3
叠氮基-LNP

图32

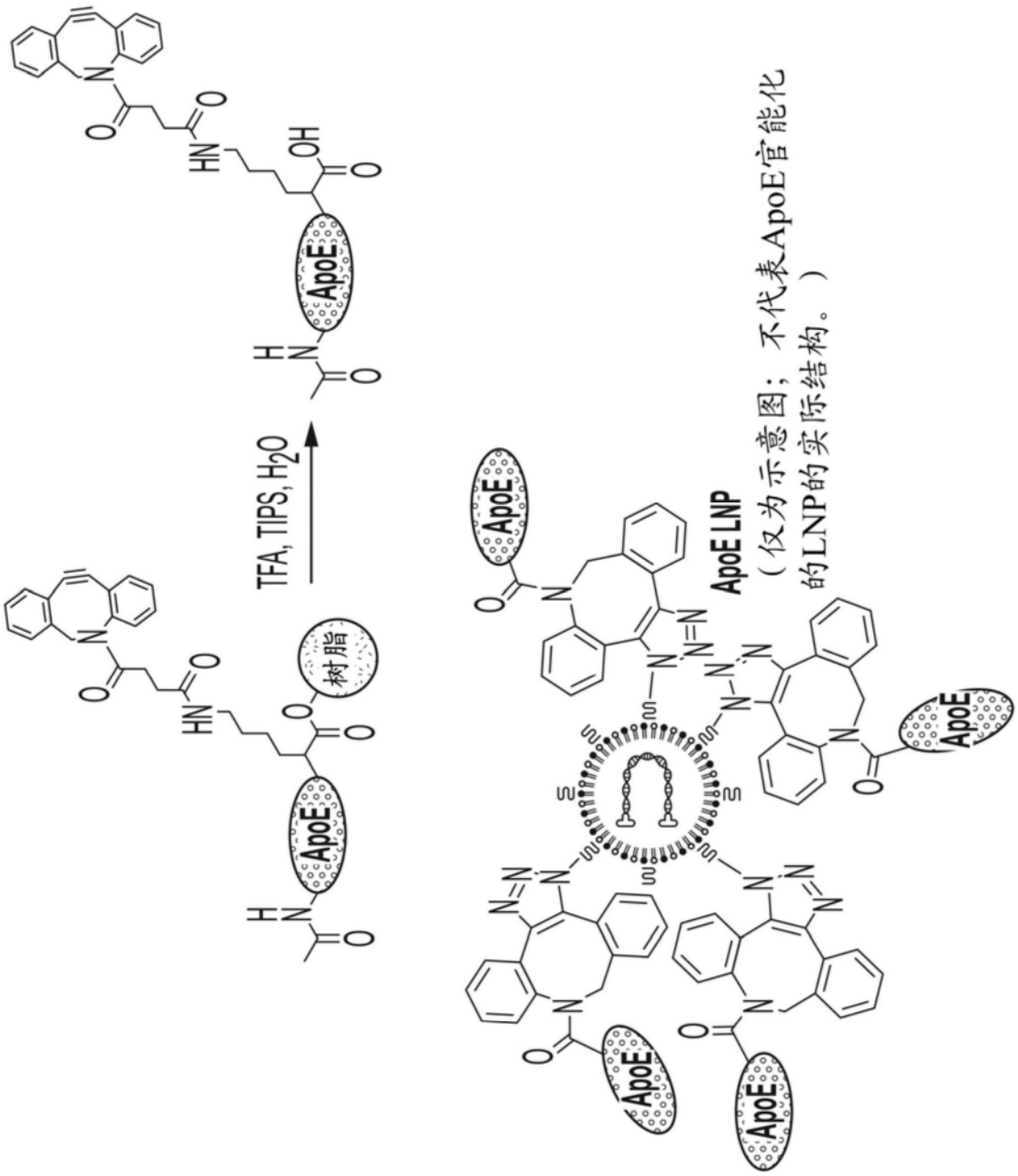


图32续图

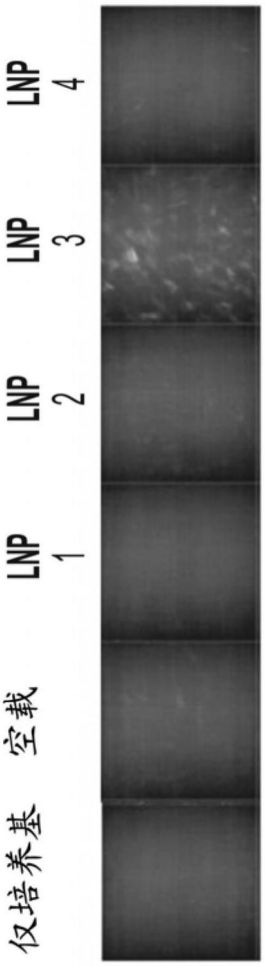

仅培养基
空载
LNP 1
LNP 2
LNP 3
LNP 4

图33A

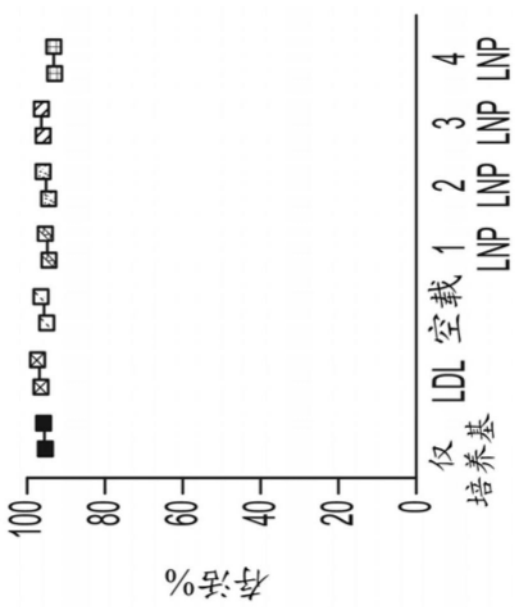

存活%
100
80
60
40
20
0
仅培养基
LDL
空载
LNP 1
LNP 2
LNP 3
LNP 4

图33B

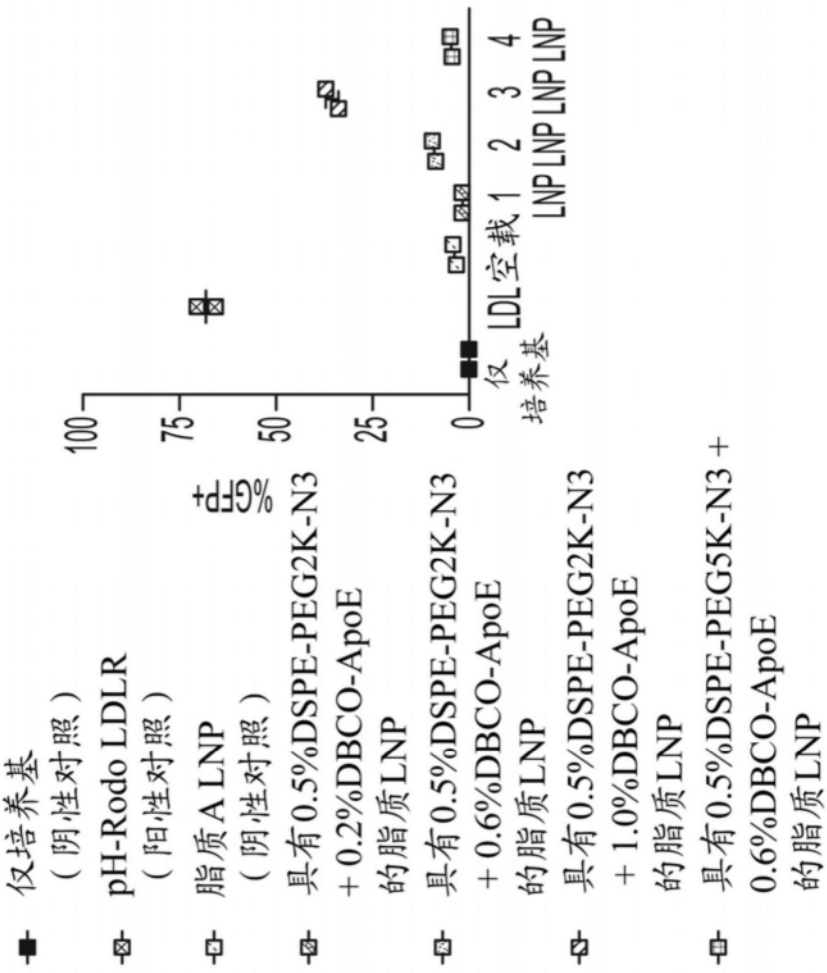

仅培养基
（阴性对照）
pH-Rodo LDLR
（阳性对照）
脂质A LNP
（阴性对照）
具有0.5%DSPE-PEG2K-N3
+0.2%DBCO-ApoE
的脂质LNP
具有0.5%DSPE-PEG2K-N3
+0.6%DBCO-ApoE
的脂质LNP
具有0.5%DSPE-PEG2K-N3
+1.0%DBCO-ApoE
的脂质LNP
具有0.5%DSPE-PEG5K-N3+
0.6%DBCO-ApoE
的脂质LNP
%
100
75
50
25
0
仅培养基
LDL
空载LNP
1
2
3
4
LNP
LNP

图33C