(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114146063 A
(43)申请公布日 2022.03.08

(21)申请号 202111247720.4
(22)申请日 2015.07.02
(30)优先权数据
62/020,163 2014.07.02 US
(62)分案原申请数据
201580033224.5 2015.07.02
(71)申请人 川斯勒佰尔公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 F·德罗莎 S·卡夫 M·哈特莱因
(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
代理人 吴瑜 顾云峰
(51)Int.Cl.
A61K 9/51(2006.01)
A61K 31/713(2006.01)
A61K 47/60(2017.01)
A61K 47/69(2017.01)

权利要求书3页 说明书26页
序列表9页 附图3页

(54)发明名称

信使RNA的包封

(57)摘要

本发明提供了一种用于脂质纳米颗粒配制和mRNA包封的改良方法。在一些实施方案中，本发明提供了一种将信使RNA(mRNA)包封在脂质纳米颗粒中的方法，其包括混合mRNA溶液和脂质溶液的步骤，其中所述mRNA溶液和/或所述脂质溶液处于大于环境温度的预定温度下。

CN 114146063 A

1.一种将信使RNA(mRNA)包封在脂质纳米颗粒中的方法,其包括混合mRNA溶液和脂质溶液的步骤,其中所述mRNA溶液和/或所述脂质溶液处于大于环境温度的预定温度下。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述预定温度为等于或大于约30℃、37℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃或70℃。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中所述预定温度介于约25-70℃、约30-70℃、约35-70℃、约40-70℃、约45-70℃、约50-70℃或约60-70℃的范围内。

4.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述预定温度为约65℃。

5.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述mRNA溶液和所述脂质溶液在混合前分别被加热至所述预定温度。

6.根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中在混合之前,所述mRNA溶液被加热至所述预定温度且所述脂质溶液处于环境温度下。

7.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中通过将环境温度下的mRNA储备溶液添加到加热的缓冲溶液中达到所述预定温度而将所述mRNA溶液加热至所述预定温度。

8.根据权利要求7所述的方法,其中所述缓冲溶液具有不大于约4.5的pH。

9.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中通过无脉流泵混合所述mRNA溶液和所述脂质溶液。

10.根据权利要求9所述的方法,其中所述泵是齿轮泵。

11.根据权利要求9所述的方法,其中所述泵是离心泵。

12.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在介于约150-250ml/分钟、250-500ml/分钟、500-1000ml/分钟、1000-2000ml/分钟、2000-3000ml/分钟、3000-4000ml/分钟或4000-5000ml/分钟的范围内的流速下混合所述mRNA溶液。

13.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在约200ml/分钟、约500ml/分钟、约1000ml/分钟、约2000ml/分钟、约3000ml/分钟、约4000ml/分钟或约5000ml/分钟的流速下混合所述mRNA溶液。

14.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在介于约25-75ml/分钟、约75-200ml/分钟、约200-350ml/分钟、约350-500ml/分钟、约500-650ml/分钟、约650-850ml/分钟或约850-1000ml/分钟的范围内的流速下混合所述脂质溶液。

15.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在约50ml/分钟、约100ml/分钟、约150ml/分钟、约200ml/分钟、约250ml/分钟、约300ml/分钟、约350ml/分钟、约400ml/分钟、约450ml/分钟、约500ml/分钟、约550ml/分钟、约600ml/分钟、约650ml/分钟、约700ml/分钟、约750ml/分钟、约800ml/分钟、约850ml/分钟、约900ml/分钟、约950ml/分钟或约1000ml/分钟的流速下混合所述脂质溶液。

16.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法包括首先通过混合柠檬酸盐缓冲液与mRNA储备溶液产生所述mRNA溶液的步骤。

17.根据权利要求16所述的方法,其中所述柠檬酸盐缓冲液包含约10mM柠檬酸盐、约150mM NaCl、约4.5的pH。

18.根据权利要求16或17所述的方法,其中所述mRNA储备溶液包含浓度等于或大于约1mg/ml、约10mg/ml、约50mg/ml、约100mg/ml的mRNA。

19.根据权利要求16至18中任一项所述的方法,其中在介于约100-300ml/分钟、300-

600ml/分钟、600-1200ml/分钟、1200-2400ml/分钟、2400-3600ml/分钟、3600-4800ml/分钟或4800-6000ml/分钟的范围内的流速下混合所述柠檬酸盐缓冲液。

20.根据权利要求16至19中任一项所述的方法，其中在约220ml/分钟、约600ml/分钟、约1200ml/分钟、约2400ml/分钟、约3600ml/分钟、约4800ml/分钟或约6000ml/分钟的流速下混合所述柠檬酸盐缓冲液。

21.根据权利要求16至20中任一项所述的方法，其中在介于约10-30ml/分钟、约30-60ml/分钟、约60-120ml/分钟、约120-240ml/分钟、约240-360ml/分钟、约360-480ml/分钟或约480-600ml/分钟的范围内的流速下混合所述mRNA储备溶液。

22.根据权利要求16至21中任一项所述的方法，其中在约20ml/分钟、约40ml/分钟、约60ml/分钟、约80ml/分钟、约100ml/分钟、约200ml/分钟、约300ml/分钟、约400ml/分钟、约500ml/分钟或约600ml/分钟的流速下混合所述mRNA储备溶液。

23.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述脂质溶液在乙醇中包含一种或多种阳离子脂质、一种或多种辅助脂质、一种或多种基于胆固醇的脂质和PEG脂质。

24.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中将所述mRNA溶液和所述脂质溶液混合于20％乙醇中，得到脂质纳米颗粒的悬浮液。

25.根据权利要求24所述的方法，其中所述脂质纳米颗粒通过切向流过滤进一步纯化。

26.根据权利要求25所述的方法，其中大于约50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％的所述纯化纳米颗粒具有小于100nm的大小。

27.根据权利要求26所述的方法，其中大体上所有的所述纯化纳米颗粒具有小于100nm的大小。

28.根据权利要求25至27中任一项所述的方法，其中大于约70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％的所述纯化纳米颗粒具有介于50-80nm范围内的大小。

29.根据权利要求25至28中任一项所述的方法，其中大体上所有的所述纯化纳米颗粒具有介于50-80nm范围内的大小。

30.根据权利要求25至29中任一项所述的方法，其中所述纯化纳米颗粒具有大于约80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％的包封率。

31.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述方法产生大于约60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％的mRNA回收率。

32.一种将信使RNA(mRNA)包封在脂质纳米颗粒中的方法，其包括：

a.将mRNA溶液和/或脂质溶液分别加热至大于环境温度的预定温度；

b.将加热的mRNA溶液和/或加热的脂质溶液混合以产生脂质纳米颗粒的悬浮液；以及

c.使所述脂质纳米颗粒纯化。

33.一种脂质纳米颗粒的组合物，所述组合物由根据前述权利要求中任一项所述的方法产生。

34.一种包含纯化脂质纳米颗粒的组合物，其中大于约90％的所述纯化脂质纳米颗粒具有小于约100nm的单个粒度且大于约70％的所述纯化脂质纳米颗粒将mRNA包封在每个单独颗粒内。

35.根据权利要求34所述的组合物，其中大于约95％、96％、97％、98％或99％的所述纯化脂质纳米颗粒具有小于约100nm的单个粒度。

36.根据权利要求34或35中任一项所述的组合物，其中大体上所有的所述纯化脂质纳米颗粒具有小于约100nm的单个粒度。

37.根据权利要求34至36中任一项所述的组合物，其中大于约75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％的所述纯化脂质纳米颗粒将mRNA包封在每个单独颗粒内。

38.根据权利要求34至37中任一项所述的组合物，其中大体上所有的所述纯化脂质纳米颗粒将mRNA包封在每个单独颗粒内。

39.根据权利要求34至38中任一项所述的组合物，其中所述组合物包含至少1mg、5mg、10mg、100mg、500mg或1000mg包封的mRNA。

40.根据权利要求34至39中任一项所述的组合物，其中每个单独的脂质纳米颗粒包含一种或多种阳离子脂质、一种或多种辅助脂质、一种或多种基于胆固醇的脂质和PEG脂质。

41.根据权利要求24所述的方法或根据权利要求40所述的组合物，其中所述一种或多种阳离子脂质选自由以下所组成的组：C12-200、MC3、DLinDMA、DLinkC2DMA、cKK-E12、ICE(基于咪唑)、HGT5000、HGT5001、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA和DMDMA、DODAC、DLenDMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、KLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、HGT4003及其组合。

42.根据权利要求24所述的方法或根据权利要求40所述的组合物，其中所述一种或多种非阳离子脂质选自DSPC(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)、DPPC(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)、DOPE(1,2-二油基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、DOPC(1,2-二油基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱)、DPPE(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、DMPE(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、DOPG(,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸(1'-外消旋-甘油))。

43.根据权利要求24所述的方法或根据权利要求40所述的组合物，其中所述一种或多种基于胆固醇的脂质是胆固醇或聚乙二醇化胆固醇。

44.根据权利要求24所述的方法或根据权利要求40所述的组合物，其中所述一种或多种经PEG修饰的脂质包含共价连接至具有C_6-C_{20}长度的烷基链的脂质的长度最高达5kDa的聚乙二醇链。

45.根据前述权利要求中任一项所述的方法或组合物，其中所述mRNA含有一个或多个修饰的核苷酸。

46.根据前述权利要求中任一项所述的方法或组合物，其中所述mRNA是未修饰的。

信使RNA的包封

[0001] 本申请是申请号为201580033224.5、申请日为2015年7月2日、发明名称为“信使RNA的包封”的中国发明专利申请的分案申请，原申请为国际申请号为PCT/US2015/039004的PCT国际申请的中国国家阶段申请，该国际申请要求申请日为2014年7月2日，申请号为62/020,163的美国临时申请的优先权。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2014年7月2日提交的美国临时专利申请第62/020,163号的优先权，所述申请的公开内容通过引用整体并入本文中。

[0004] 发明背景

[0005] 信使RNA治疗(MRT)正在成为治疗各种疾病的越来越重要的方法。MRT涉及将信使RNA(mRNA)施用到需要用于产生由患者体内的mRNA编码的蛋白质的治疗的患者中。脂质纳米粒常用于包封mRNA以用于mRNA的有效体内递送。然而，用于产生负载mRNA的脂质纳米颗粒的当前方法遭受不良的包封效率，低mRNA回收率和/或不均匀的粒度。

发明概要

[0006] 本发明尤其提供了一种用于脂质纳米颗粒配制和mRNA包封的改良方法。具体地说，本发明基于以下出乎意料的发现：在混合之前预加热mRNA溶液和/或脂质溶液产生显着改善的包封效率、mRNA回收率以及更均匀和更小的粒度(例如，小于100nm)。

[0007] 因此，在一些实施方案中，本发明提供了一种将信使RNA(mRNA)包封在脂质纳米颗粒中的方法，其包括混合mRNA溶液和脂质溶液的步骤，其中mRNA溶液和/或脂质溶液处于大于环境温度的预定温度下。在一些实施方案中，适用于本发明的预定温度为等于或大于约30℃、37℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃或70℃。在一些实施方案中，适用于本发明的预定温度介于约25-70℃、约30-70℃、约35-70℃、约40-70℃、约45-70℃、约50-70℃或约60-70℃的范围内。在特定实施方案中，适用于本发明的预定温度为约65℃。

[0008] 在一些实施方案中，mRNA溶液和脂质溶液在混合前分别被加热至预定温度。在一些实施方案中，在混合之前，mRNA溶液被加热至预定温度且脂质溶液处于环境温度下。在一些实施方案中，通过将环境温度下的mRNA储备溶液添加到加热的缓冲溶液中达到预定温度而将mRNA溶液加热至预定温度。在一些实施方案中，缓冲溶液具有不大于约4.5(例如，不大于约4.4、4.2、4.0或3.8)的pH。

[0009] 在一些实施方案中，通过无脉流泵混合mRNA溶液和脂质溶液。在一些实施方案中，合适的泵是齿轮泵。在一些实施方案中，合适的泵是蠕动泵。在一些实施方案中，合适的泵是离心泵。

[0010] 在一些实施方案中，在介于约150-250ml/分钟、250-500ml/分钟、500-1000ml/分钟、1000-2000ml/分钟、2000-3000ml/分钟、3000-4000ml/分钟或4000-5000ml/分钟的范围内的流速下混合mRNA溶液。在一些实施方案中，在约200ml/分钟、约500ml/分钟、约1000ml/分钟、约2000ml/分钟、约3000ml/分钟、约4000ml/分钟或约5000ml/分钟的流速下混合mRNA溶液。

[0011] 在一些实施方案中，在介于约25-75ml/分钟、约75-200ml/分钟、约200-350ml/分钟、约350-500ml/分钟、约500-650ml/分钟、约650-850ml/分钟或约850-1000ml/分钟的范围内的流速下混合脂质溶液。在一些实施方案中，在约50ml/分钟、约100ml/分钟、约150ml/分钟、约200ml/分钟、约250ml/分钟、约300ml/分钟、约350ml/分钟、约400ml/分钟、约450ml/分钟、约500ml/分钟、约550ml/分钟、约600ml/分钟、约650ml/分钟、约700ml/分钟、约750ml/分钟、约800ml/分钟、约850ml/分钟、约900ml/分钟、约950ml/分钟或约1000ml/分钟的流速下混合脂质溶液。

[0012] 在一些实施方案中，根据本发明的方法包括首先通过混合柠檬酸盐缓冲液与mRNA储备溶液产生mRNA溶液的步骤。在某些实施方案中，合适的柠檬酸盐缓冲液包含约10mM柠檬酸盐、约150mM NaCl、约4.5的pH。在一些实施方案中，合适的mRNA储备溶液含有浓度等于或大于约0.10mg/mL、1mg/ml、约10mg/ml、约50mg/ml或约100mg/ml的mRNA。

[0013] 在一些实施方案中，在介于约100-300ml/分钟、300-600ml/分钟、600-1200ml/分钟、1200-2400ml/分钟、2400-3600ml/分钟、3600-4800ml/分钟或4800-6000ml/分钟的范围内的流速下混合柠檬酸盐缓冲液。在一些实施方案中，在约220ml/分钟、约600ml/分钟、约1200ml/分钟、约2400ml/分钟、约3600ml/分钟、约4800ml/分钟或约6000ml/分钟的流速下混合柠檬酸盐缓冲液。

[0014] 在一些实施方案中，在介于约10-30ml/分钟、约30-60ml/分钟、约60-120ml/分钟、约120-240ml/分钟、约240-360ml/分钟、约360-480ml/分钟或约480-600ml/分钟的范围内的流速下混合mRNA储备溶液。在一些实施方案中，在约20ml/分钟、约40ml/分钟、约60ml/分钟、约80ml/分钟、约100ml/分钟、约200ml/分钟、约300ml/分钟、约400ml/分钟、约500ml/分钟或约600ml/分钟的流速下混合mRNA储备溶液。

[0015] 在一些实施方案中，所述脂质溶液在乙醇中含有一种或多种阳离子脂质、一种或多种辅助脂质、一种或多种基于胆固醇的脂质和PEG脂质。在一些实施方案中，将mRNA溶液和脂质溶液混合于20％乙醇中，得到脂质纳米颗粒的悬浮液。在一些实施方案中，脂质纳米颗粒通过切向流过滤进一步纯化。

[0016] 在一些实施方案中，大于约50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％的纯化纳米颗粒具有小于约100nm(例如，小于约95nm、约90nm、约85nm、约80nm、约75nm、约70nm、约65nm、约60nm、约55nm或约50nm)的大小。在一些实施方案中，大体上所有的纯化纳米颗粒具有小于100nm(例如，小于约95nm、约90nm、约85nm、约80nm、约75nm、约70nm、约65nm、约60nm、约55nm或约50nm)的大小。

[0017] 在一些实施方案中，大于约70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％的纯化纳米颗粒具有介于约40-90nm(例如，约40-85nm、约40-80nm、约40-75nm、约40-70nm、约40-65nm或约40-60nm)的范围内的大小。在一些实施方案中，大体上所有的纯化纳米颗粒具有介于约40-90nm(例如，约40-85nm、约40-80nm、约40-75nm、约40-70nm、约40-65nm或约40-60nm)的范围内的大小。

[0018] 在一些实施方案中，纯化的纳米颗粒具有大于约80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％的包封效率。在一些实施方案中，根据本发明的方法产生大于约60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％的mRNA回收率。

[0019] 在一些实施方案中，本发明提供了一种将信使RNA(mRNA)包封在脂质纳米颗粒中

的方法,其包括(a)将mRNA溶液和/或脂质溶液分别加热至大于环境温度的预定温度;(b)将加热的mRNA溶液和/或加热的脂质溶液混合以产生脂质纳米颗粒的悬浮液;和(c)使脂质纳米颗粒纯化。

[0020] 在另一方面,本发明提供了一种通过本文所述的方法产生的脂质纳米颗粒的组合物。在一些实施方案中,本发明提供了一种包含纯化脂质纳米颗粒的组合物,其中大于约90%的纯化脂质纳米颗粒具有小于约100nm(例如,小于约95nm、约90nm、约85nm、约80nm、约75nm、约70nm、约65nm、约60nm、约55nm或约50nm)的单个粒度且大于约70%的纯化脂质纳米颗粒将mRNA包封在每个单独颗粒内。在一些实施方案中,大于约95%、96%、97%、98%或99%的纯化脂质纳米颗粒具有小于约100nm(例如,小于约95nm、约90nm、约85nm、约80nm、约75nm、约70nm、约65nm、约60nm、约55nm或约50nm)的单个粒度。在一些实施方案中,大体上所有的纯化脂质纳米颗粒具有小于约100nm(例如,小于约95nm、约90nm、约85nm、约80nm、约75nm、约70nm、约65nm、约60nm、约55nm或约50nm)的单个粒度。在一些实施方案中,大于约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的纯化脂质纳米颗粒将mRNA包封在每个单独颗粒内。在一些实施方案中,大体上所有的纯化脂质纳米颗粒将mRNA包封在每个单独颗粒内。在一些实施方案中,根据本发明的组合物含有至少约1mg、5mg、10mg、100mg、500mg或1000mg包封的mRNA。

[0021] 在一些实施方案中,每个单独的脂质纳米颗粒包含一种或多种阳离子脂质、一种或多种辅助脂质、一种或多种基于胆固醇的脂质和PEG脂质。在一些实施方案中,所述一种或多种阳离子脂质选自由以下所组成的组:C12-200、MC3、DLinDMA、DLinkC2DMA、cKK-E12、ICE(基于咪唑)、HGT5000、HGT5001、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA和DMDMA、DODAC、DLenDMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、KLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、HGT4003及其组合。

[0022] 在一些实施方案中,一种或多种非阳离子脂质选自DSPC(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)、DPPC(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)、DOPE(1,2-二油基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、DOPC(1,2-二油基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱)、DPPE(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、DMPE(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、DOPG(,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸(1'-外消旋-甘油))。

[0023] 在一些实施方案中,一种或多种基于胆固醇的脂质是胆固醇或聚乙二醇化胆固醇。在一些实施方案中,一种或多种经PEG修饰的脂质包含共价连接至具有C_6-C_{20}长度的烷基链的脂质的长度最高达5kDa的聚乙二醇链。

[0024] 在一些实施方案中,本发明用于包封含有一个或多个修饰的核苷酸的mRNA。在一些实施方案中,本发明用于包封未修饰的mRNA。

[0025] 在下面的详细描述、附图和权利要求中,本发明的其它特征、目的和优点是显而易见的。然而,应当理解,详细描述、附图和权利要求在指示本发明的实施方案时仅以说明而非限制的方式给出。在本发明的范围内的各种改变和修改对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0026] 附图简述

[0027] 附图仅用于说明的目的而不是为了限制。

[0028] 图1:示出了利用均质流泵进行的示例性大规模脂质纳米颗粒包封mRNA的配制过

程的示意图。

[0029] 图2:描绘了用于脂质纳米颗粒的示例性纯化和缓冲液交换系统。

[0030] 图3:描绘了利用蠕动泵进行的示例性大规模脂质纳米颗粒包封mRNA的配制过程的示意图。

[0031] 图4:描绘了用于纯化和缓冲液交换的替代性的示例性切向流过滤系统。

[0032] 图5:描绘了利用蠕动泵进行的示例性大规模脂质纳米颗粒包封mRNA的配制过程的替代性示意图。

[0033] 定义

[0034] 为了更容易地理解本发明,首先在下文中定义某些术语。在整个说明书中阐述了以下术语和其它术语的附加定义。

[0035] 大约或约:如本文中所用,术语“大约”或“约”在应用于感兴趣的一个或多个值时是指类似于规定的参考值的值。在某些实施方案中,除非另有说明或另外从上下文中明显看出,否则术语“大约”或“约”是指落在规定参考值的任一方向(大于或小于)的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小范围内的一系列值(除了这样的数值将超过可能值的100%以外)。

[0036] 包封:如本文中所用,术语“包封”或语法等价物是指将单个mRNA分子限制在纳米颗粒内的过程。

[0037] 提高、增加或减少:如本文中所用,术语“提高”、“增加”或“减少”或语法等价物指示相对于基线测量(诸如在开始本文所述的治疗前在同一个体中的测量,或在不存在本文所述的治疗的情况下在对照受试者(或多个对照受试者)中的测量)的值。“对照受试者”是患有与所治疗的受试者相同形式的疾病的受试者,其与所治疗的受试者具有大约相同的年龄。

[0038] 杂质:如本文中所用,术语“杂质”是指在有限量的液体、气体或固体内的物质,其不同于目标材料或化合物的化学组成。杂质也被称为污染物。

[0039] 体外:如本文中所用,术语“体外”是指发生在人工环境中(例如,在试管或反应容器中、在细胞培养物中等),而非多细胞生物体内的事件。

[0040] 体内:如本文中所用,术语“体内”是指发生在多细胞生物体(如人类和非人类动物)中的事件。在基于细胞的系统的情况下,该术语可以用于指发生在活细胞中的事件(而不是例如体外系统)。

[0041] 分离的:如本文中所用,术语“分离的”是指这样的物质和/或实体,它们已经(1)与在最初产生时(无论在自然界中和/或在实验环境中)与其结合的组分的至少一些分离,和/或(2)由人工生产、制备和/或制造。分离的物质和/或实体可以与约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或大于约99%的最初与它们结合的其它组分分离。在一些实施方案中,分离的试剂的纯度为约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或大于约99%。如本文中所用,如果物质大体上不含其它组分,则该物质是“纯的”。如本文中所用,分离的物质和/或实体的百分比纯度的计算不应包括赋形剂(例如,缓冲剂、溶剂、水等)。

[0042] 信使RNA(mRNA):如本文中所用,术语“信使RNA(mRNA)”是指编码至少一种多肽的

多核苷酸。本文所用的mRNA包括修饰的和未修饰的RNA。mRNA可以含有一个或多个编码区和非编码区。

[0043] 核酸:如本文中所用,术语“核酸”在其最广泛的意义上是指并入或可以并入多核苷酸链中的任何化合物和/或物质。在一些实施方案中,核酸是经由磷酸二酯键并入或可以并入多核苷酸链中的化合物和/或物质。在一些实施方案中,“核酸”是指个别核酸残基(例如,核苷酸和/或核苷)。在一些实施方案中,“核酸”是指包含个别核酸残基的多核苷酸链。在一些实施方案中,“核酸”包括RNA以及单链和/或双链DNA和/或cDNA。此外,术语“核酸”、“DNA”、“RNA”和/或类似术语包括核酸类似物,即不具有磷酸二酯主链的类似物。例如,本领域中已知的且在主链中具有肽键而不是磷酸二酯键的所谓“肽核酸”被认为在本发明的范围内。术语“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括互为彼此的简并形式和/或编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质和/或RNA的核苷酸序列可以包括内含子。核酸可以从天然来源纯化,使用重组表达系统产生并任选地纯化,化学合成等。在合适的情况下,例如在化学合成分子的情况下,核酸可以包含核苷类似物,例如具有化学修饰的碱基或糖、主链修饰等的类似物。除非另有说明,否则核酸序列是以5’至3’方向呈现。在一些实施方案中,核酸是或包含天然核苷(例如,腺苷,胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷);核苷类似物(例如,2-氨基腺苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯并嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C-5丙炔基-胞苷、C-5丙炔基-尿苷、2-氨基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、2-氨基腺苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-氧代腺苷、8-氧代鸟苷、O(6)-甲基鸟嘌呤和2-硫代胞苷);化学修饰的碱基;生物修饰的碱基(例如,甲基化碱基);插入的碱基;修饰的糖(例如,2’-氟核糖、核糖、2’-脱氧核糖、阿拉伯糖和己糖);和/或修饰的磷酸基团(例如,硫代磷酸酯键和5’-N-亚磷酰胺键)。在一些实施方案中,本发明明确地涉及“未修饰的核酸”,意思是未经化学修饰以促进或实现递送的核酸(例如,多核苷酸和残基,包括核苷酸和/或核苷)。

[0044] 盐:如本文中所用,术语“盐”是指源自或可能源自酸和碱之间的中和反应的离子性化合物。

[0045] 大体上:如本文中所用,术语“大体上”是指表现出全部或接近全部范围或程度的感兴趣的特性或性质的定性条件。生物领域的普通技术人员将理解的是,生物和化学现象几乎从不完全发生和/或进行到完全或实现或避免绝对的结果。因此,本文中使用术语“大体上”来体现许多生物和化学现象中固有的潜在完全性缺乏。

[0046] 产率:如本文中所用,术语“产率”是指在包封后回收的mRNA相对于作为起始材料的总mRNA的百分比。在一些实施方案中,术语“回收率”可与术语“产率”互换使用。

具体实施方式

[0047] 本发明提供了一种用于脂质纳米颗粒配制和mRNA包封的改良方法。在一些实施方案中,本发明提供了一种将信使RNA(mRNA)包封在脂质纳米颗粒中的方法,其包括混合mRNA溶液和脂质溶液的步骤,其中mRNA溶液和/或脂质溶液处于大于环境温度的预定温度下。

[0048] 在以下章节中详细描述了本发明的各个方面。章节的使用无意限制本发明。每个章节可以应用于本发明的任何方面。在本申请中,除非另外说明,否则使用“或”意指“和/或”。

[0049] mRNA

[0050] 本发明可以用于包封任何mRNA。mRNA通常被认为是将来自DNA的信息携带至核糖体中的RNA类型。mRNA的存在通常非常短暂，并且包括加工和翻译，随后降解。通常，在真核生物中，mRNA加工包括在N末端(5'端)添加“帽”，以及在C末端(3'端)添加“尾部”。典型的帽是7-甲基鸟苷帽，它是通过5'-5'-三磷酸酯键连接到第一个转录核苷酸的鸟苷。帽的存在对于提供对大多数真核细胞中发现的核酸酶的抗性是重要的。所述尾部通常是聚腺苷酸化事件，通过该事件将聚腺苷酰基部分添加到mRNA分子的3'端。这种“尾部”的存在用于保护mRNA免受核酸外切酶降解。信使RNA由核糖体翻译成构成蛋白质的一系列氨基酸。

[0051] mRNA可以根据多种已知方法中的任一种来合成。例如，根据本发明的mRNA可以经由体外转录(IVT)来合成。简言之，通常利用含有启动子的线性或环状DNA模板、三磷酸核糖核苷酸池、可以包括DTT和镁离子的缓冲系统以及合适的RNA聚合酶(例如，T3、T7或SP6 RNA聚合酶)、DNA酶I、焦磷酸酶和/或RNA酶抑制剂来进行IVT。确切的条件将根据具体应用而变化。

[0052] 在一些实施方案中，体外合成的mRNA可以在配制和包封之前进行纯化以除去非所需的杂质，包括在mRNA合成期间使用的各种酶和其它试剂。

[0053] 本发明可以用于配制和包封各种长度的mRNA。在一些实施方案中，本发明可以用于配制和包封体外合成的长度为等于或大于约1kb、1.5kb、2kb、2.5kb、3kb、3.5kb、4kb、4.5kb、5kb 6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、11kb、12kb、13kb、14kb、15kb或20kb的mRNA。在一些实施方案中，本发明可以用于配制和包封体外合成的长度介于约1-20kb、约1-15kb、约1-10kb、约5-20kb、约5-15kb、约5-12kb、约5-10kb、约8-20kb或约8-15kb的范围内的mRNA。

[0054] 本发明可以用于配制和包封未修饰的mRNA或含有通常增强稳定性的一种或多种修饰的mRNA。在一些实施方案中，修饰选自修饰的核苷酸、修饰的糖磷酸主链、5'和/或3'非翻译区。

[0055] 在一些实施方案中，mRNA的修饰可以包括RNA的核苷酸的修饰。根据本发明的修饰的mRNA可以包括例如主链修饰、糖修饰或碱基修饰。在一些实施方案中，mRNA可以由以下合成：天然存在的核苷酸和/或核苷酸类似物(修饰的核苷酸)，包括但不限于嘌呤(腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G))或嘧啶(胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶C)、尿嘧啶(U))；以及嘌呤和嘧啶的修饰的核苷酸类似物或衍生物，如(例如)1-甲基腺嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲硫基-N-6-异戊烯基腺嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、N6-异戊烯腺嘌呤、2-硫代胞嘧啶、3-甲基胞嘧啶、4-乙酰胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、2,2-二甲基鸟嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、肌苷、1-甲基肌苷、假尿嘧啶(5-尿嘧啶)、二氢尿嘧啶、2-硫代尿嘧啶、4-硫代尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶、5-(羧基羟甲基)-尿嘧啶、5-氟-尿嘧啶、5-溴-尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-尿嘧啶、5-甲基-2-硫代尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶、5'-甲氧羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、1-甲基假尿嘧啶、辫苷、.β.-D-甘露糖基辫苷、怀丁苷(wybutoxosine)和氨基磷酸酯、硫代磷酸酯、肽核苷酸、甲基膦酸酯、7-脱氮鸟苷、5-甲基胞嘧啶和肌苷。本领域技术人员从例如美国专利第4,373,071号、美国专利第4,401,796号、美国专利第4,415,732号、美国专利第4,458,066号、美国专利第4,500,707号、美国专利第4,668,777号、美国专利第4,973,679号、美国专利第5,

047,524号、美国专利第5,132,418号、美国专利第5,153,319号、美国专利第5,262,530号和第5,700,642号了解此类类似物的制备，这些专利的公开内容通过引用全部包括在本文中。

[0056] 通常，mRNA合成包括在N末端(5’端)添加“帽”，以及在C末端(3’端)添加“尾部”。帽的存在对于提供对大多数真核细胞中发现的核酸酶的抗性是重要的。“尾部”的存在用于保护mRNA免受核酸外切酶降解。

[0057] 因此，在一些实施方案中，mRNA包括5’帽结构。5’帽的添加通常如下：首先，RNA末端磷酸酶从5’核苷酸去除一个末端磷酸基团，留下两个末端磷酸酯；然后通过鸟苷酰转移酶将三磷酸鸟苷(GTP)添加到末端磷酸酯上，产生5’5’5三磷酸酯键；然后通过甲基转移酶使鸟嘌呤的7-氮甲基化。2’-O-甲基化也可以发生在7-甲基鸟苷三磷酸残基之后的第一碱基和/或第二碱基上。帽结构的实例包括但不限于m7GpppNp-RNA、m7GpppNmp-RNA和m7GpppNmpNmp-RNA(其中m指示2’-O甲基残基)。

[0058] 在一些实施方案中，mRNA包括5’和/或3’非翻译区。在一些实施方案中，5’非翻译区包括影响mRNA的稳定性或翻译的一个或多个元件，例如铁反应元件。在一些实施方案中，5’非翻译区的长度可以介于约50个核苷酸和500个核苷酸之间。

[0059] 在一些实施方案中，3’非翻译区包括下列中的一个或多个：聚腺苷酸化信号、影响mRNA在细胞中的位置稳定性的蛋白质的结合位点或miRNA的一个或多个结合位点。在一些实施方案中，3’非翻译区的长度可以介于约50个核苷酸和500个核苷酸之间或更长。

[0060] 虽然由体外转录反应提供的mRNA在一些实施方案中可以是理想的，但预期了在本发明的范围内的其它来源的mRNA，包括由细菌、真菌、植物和/或动物产生的mRNA。

[0061] 本发明可以用于配制和包封编码各种蛋白质的mRNA。适用于本发明的mRNA的非限制性实例包括编码脊髓运动神经元1(SMN)、α-半乳糖苷酶(GLA)、精氨基琥珀酸合成酶(ASS1)、萤火虫荧光素酶、因子IX(FIX)、苯丙氨酸羟化酶(PAH)和囊性纤维化跨膜传导受体(CFTR)的mRNA。在实施例部分中详细描述了示例性mRNA序列。

[0062] mRNA溶液

[0063] mRNA可以在待与脂质溶液混合的溶液中提供，这样使得mRNA可以包封在脂质纳米颗粒中。合适的mRNA溶液可以是含有将以各种浓度包封的mRNA的任何水溶液。例如，合适的mRNA溶液可以含有浓度大于约0.01mg/ml、0.05mg/ml、0.06mg/ml、0.07mg/ml、0.08mg/ml、0.09mg/ml、0.1mg/ml、0.15mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml或1.0mg/ml的mRNA。在一些实施方案中，合适的mRNA溶液可以含有浓度介于约0.01-1.0mg/ml、0.01-0.9mg/ml、0.01-0.8mg/ml、0.01-0.7mg/ml、0.01-0.6mg/ml、0.01-0.5mg/ml、0.01-0.4mg/ml、0.01-0.3mg/ml、0.01-0.2mg/ml、0.01-0.1mg/ml、0.05-1.0mg/ml、0.05-0.9mg/ml、0.05-0.8mg/ml、0.05-0.7mg/ml、0.05-0.6mg/ml、0.05-0.5mg/ml、0.05-0.4mg/ml、0.05-0.3mg/ml、0.05-0.2mg/ml、0.05-0.1mg/ml、0.1-1.0mg/ml、0.2-0.9mg/ml、0.3-0.8mg/ml、0.4-0.7mg/ml或0.5-0.6mg/ml的范围内的mRNA。在一些实施方案中，合适的mRNA溶液可以含有浓度为至多约5.0mg/ml、4.0mg/ml、3.0mg/ml、2.0mg/ml、1.0mg/ml、.09mg/ml、0.08mg/ml、0.07mg/ml、0.06mg/ml或0.05mg/ml的mRNA。

[0064] 通常，合适的mRNA溶液还可以含有缓冲剂和/或盐。通常，缓冲剂可以包括HEPES、硫酸铵、碳酸氢钠、柠檬酸钠、乙酸钠、磷酸钾和磷酸钠。在一些实施方案中，缓冲剂的合适浓度可以介于约0.1mM至100mM、0.5mM至90mM、1.0mM至80mM、2mM至70mM、3mM至60mM、4mM至

50mM、5mM至40mM、6mM至30mM、7mM至20mM、8mM至15mM或9至12mM的范围内。在一些实施方案中，缓冲剂的合适浓度等于或大于0.1mM、0.5mM、1mM、2mM、4mM、6mM、8mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM或50mM。

[0065] 示例性盐可以包括氯化钠、氯化镁和氯化钾。在一些实施方案中，mRNA溶液中的合适的盐浓度可以介于约1mM至500mM、5mM至400mM、10mM至350mM、15mM至300mM、20mM至250mM、30mM至200mM、40mM至190mM、50mM至180mM、50mM至170mM、50mM至160mM、50mM至150mM或50mM至100mM的范围内。合适的mRNA溶液中的盐浓度为等于或大于约1mM、5mM、10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM或100mM。

[0066] 在一些实施方案中，合适的mRNA溶液可以具有在约3.5-6.5、3.5-6.0、3.5-5.5.、3.5-5.0、3.5-4.5、4.0-5.5、4.0-5.0、4.0-4.9、4.0-4.8、4.0-4.7、4.0-4.6或4.0-4.5的范围内的pH。在一些实施方案中，合适的mRNA溶液可以具有不大于约3.5、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.1、6.3和6.5的pH。

[0067] 可以使用各种方法来制备适用于本发明的mRNA溶液。在一些实施方案中，mRNA可以直接溶解于本文所述的缓冲溶液中。在一些实施方案中，mRNA溶液可以通过在与用于包封的脂质溶液混合之前混合mRNA储备溶液和缓冲溶液来产生。在一些实施方案中，mRNA溶液可以通过在与用于包封的脂质溶液混合前即刻混合mRNA储备溶液和缓冲溶液来产生。在一些实施方案中，合适的mRNA储备溶液可以含有在水中的浓度为等于或大于约0.2mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.8mg/ml、1.0mg/ml、1.2mg/ml、1.4mg/ml、1.5mg/ml或1.6mg/ml、2.0mg/ml、2.5mg/ml、3.0mg/ml、3.5mg/ml、4.0mg/ml、4.5mg/ml或5.0mg/ml的mRNA。

[0068] 在一些实施方案中，使用泵混合mRNA储备溶液与缓冲溶液。示例性泵包括但不限于齿轮泵、蠕动泵和离心泵。

[0069] 通常，缓冲溶液的混合速率大于mRNA储备溶液的混合速率。例如，缓冲溶液可以在比mRNA储备溶液的速率高至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍或20倍的速率下混合。在一些实施方案中，在介于约100-6000ml/分钟(例如，约100-300ml/分钟、300-600ml/分钟、600-1200ml/分钟、1200-2400ml/分钟、2400-3600ml/分钟、3600-4800ml/分钟、4800-6000ml/分钟或60-420ml/分钟)的范围内的流速下混合缓冲溶液。在一些实施方案中，在等于或大于约60ml/分钟、100ml/分钟、140ml/分钟、180ml/分钟、220ml/分钟、260ml/分钟、300ml/分钟、340ml/分钟、380ml/分钟、420ml/分钟、480ml/分钟、540ml/分钟、600ml/分钟、1200ml/分钟、2400ml/分钟、3600ml/分钟、4800ml/分钟或6000ml/分钟的流速下混合缓冲溶液。

[0070] 在一些实施方案中，在介于约10-600ml/分钟(例如，约5-50ml/分钟、约10-30ml/分钟、约30-60ml/分钟、约60-120ml/分钟、约120-240ml/分钟、约240-360ml/分钟、约360-480ml/分钟或约480-600ml/分钟)的范围内的流速下混合mRNA储备溶液。在一些实施方案中，在等于或大于约5ml/分钟、10ml/分钟、15ml/分钟、20ml/分钟、25ml/分钟、30ml/分钟、35ml/分钟、40ml/分钟、45ml/分钟、50ml/分钟、60ml/分钟、80ml/分钟、100ml/分钟、200ml/分钟、300ml/分钟、400ml/分钟、500ml/分钟或600ml/分钟的流速下混合mRNA储备溶液。

[0071] 脂质溶液

[0072] 根据本发明，脂质溶液含有适于形成用于包封mRNA的脂质纳米颗粒的脂质的混合

物。在一些实施方案中，合适的脂质溶液是基于乙醇的。例如，合适的脂质溶液可以含有溶解在无水乙醇(即，100％乙醇)中的所需脂质的混合物。在另一个实施方案中，合适的脂质溶液是基于异丙醇的。在另一个实施方案中，合适的脂质溶液是基于二甲亚砜的。在另一个实施方案中，合适的脂质溶液是合适的溶剂(包括但不限于乙醇、异丙醇和二甲亚砜)的混合物。

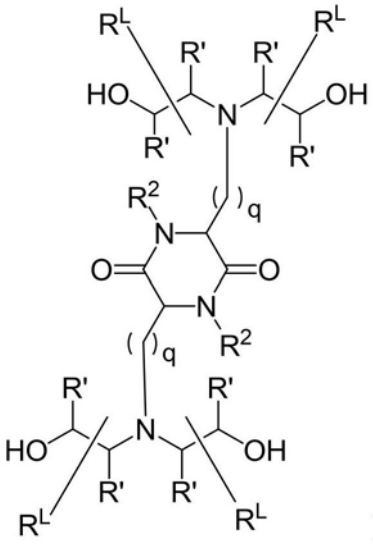
[0073] 合适的脂质溶液可以含有不同浓度的所需脂质的混合物。例如，合适的脂质溶液可以含有总浓度等于或大于约0.1mg/ml、0.5mg/ml、1.0mg/ml、2.0mg/ml、3.0mg/ml、4.0mg/ml、5.0mg/ml、6.0mg/ml、7.0mg/ml、8.0mg/ml、9.0mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml、30mg/ml、40mg/ml、50mg/ml或100mg/ml的所需脂质的混合物。在一些实施方案中，合适的脂质溶液可以含有总浓度介于约0.1-100mg/ml、0.5-90mg/ml、1.0-80mg/ml、1.0-70mg/ml、1.0-60mg/ml、1.0-50mg/ml、1.0-40mg/ml、1.0-30mg/ml、1.0-20mg/ml、1.0-15mg/ml、1.0-10mg/ml、1.0-9mg/ml、1.0-8mg/ml、1.0-7mg/ml、1.0-6mg/ml或1.0-5mg/ml的范围内的所需脂质的混合物。在一些实施方案中，合适的脂质溶液可以含有总浓度为至多约100mg/ml、90mg/ml、80mg/ml、70mg/ml、60mg/ml、50mg/ml、40mg/ml、30mg/ml、20mg/ml或10mg/ml的所需脂质的混合物。

[0074] 任何所需脂质可以以适于包封mRNA的任何比率混合。在一些实施方案中，合适的脂质溶液含有包括阳离子脂质、辅助脂质(例如，非阳离子脂质和/或胆固醇脂质)和/或聚乙二醇化脂质的所需脂质的混合物。在一些实施方案中，合适的脂质溶液含有包括一种或多种阳离子脂质、一种或多种辅助脂质(例如，非阳离子脂质和/或胆固醇脂质)和一种或多种聚乙二醇化脂质的所需脂质的混合物。

[0075] 阳离子脂质

[0076] 如本文中所使用，短语“阳离子脂质”是指在选定的pH(如生理pH)下具有净正电荷的多个脂质物种中的任一个。在文献中已经描述了几种阳离子脂质，其中许多是市售的。特别合适在本发明的组合物和方法中使用的阳离子脂质包括在国际专利公开WO 2010/053572(并且具体地说，在段落[00225]处描述的C12-200)和WO 2012/170930中描述的阳离子脂质，这两个文献均通过引用并入本文中。在某些实施方案中，适用于本发明的组合物和方法的阳离子脂质包括描述于2012年3月29日提交的美国临时专利申请61/617,468(通过引用并入本文)中的可电离阳离子脂质，如例如(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-15,18-二烯-1-胺(HGT5000)、(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-4,15,18-三烯-1-胺(HGT5001)和(15Z,18Z)-N,N-二甲基-6-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)二十四碳-5,15,18-三烯-1-胺(HGT5002)。

[0077] 在一些实施方案中，适用于本发明的组合物和方法的阳离子脂质包括描述于WO 2013063468和标题为“LipidFormulations for Delivery of Messenger RNA”的美国临时申请中的阳离子脂质，这两个文献均通过引用并入本文中。在一些实施方案中，阳离子脂质包含式I-c1-a的化合物：

[0078] 

I-c1-a，

[0079] 或其药学上可接受的盐，其中：

[0080] 每个R^2独立地为氢或C_{1-3}烷基；

[0081] 每个q独立地为2至6；

[0082] 每个R’独立地为氢或C_{1-3}烷基；

[0083] 且每个R^L独立地为C_{8-12}烷基。

[0084] 在一些实施方案中，每个R^2独立地为氢、甲基或乙基。在一些实施方案中，每个R^2独立地为氢或甲基。在一些实施方案中，每个R^2为氢。

[0085] 在一些实施方案中，每个q独立地为3至6。在一些实施方案中，每个q独立地为3至5。在一些实施方案中，每个q为4。

[0086] 在一些实施方案中，每个R’独立地为氢、甲基或乙基。在一些实施方案中，每个R’独立地为氢或甲基。在一些实施方案中，每个R’独立地为氢。

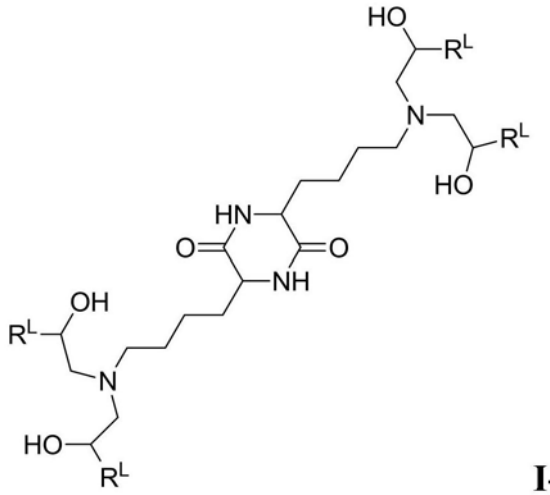
[0087] 在一些实施方案中，每个R^L独立地为C_{8-12}烷基。在一些实施方案中，每个R^L独立地为正C_{8-12}烷基。在一些实施方案中，每个R^L独立地为C_{9-11}烷基。在一些实施方案中，每个R^L独立地为正C_{9-11}烷基。在一些实施方案中，每个R^L独立地为C_{10}烷基。在一些实施方案中，每个R^L独立地为正C_{10}烷基。

[0088] 在一些实施方案中，每个R^2独立地为氢或甲基；每个q独立地为3至5；每个R’独立地为氢或甲基；且每个R^L独立地为C_{8-12}烷基。

[0089] 在一些实施方案中，每个R^2为氢；每个q独立地为3至5；每个R’为氢；且每个R^L独立地为C_{8-12}烷基。

[0090] 在一些实施方案中，每个R^2为氢；每个q为4；每个R’为氢；且每个R^L独立地为C_{8-12}烷基。

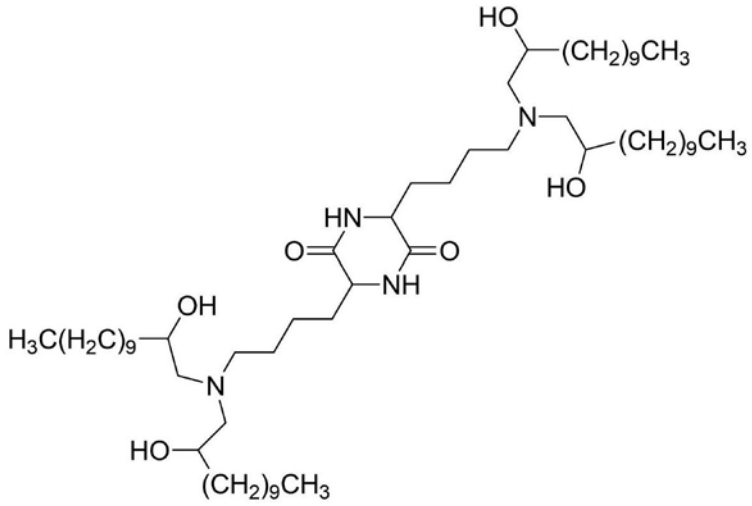
[0091] 在一些实施方案中，阳离子脂质包含式I-g的化合物：

[0092] 

I-g,

[0093] 或其药学上可接受的盐,其中每个R^L独立地为C_{8-12}烷基。在一些实施方案中,每个R^L独立地为正C_{8-12}烷基。在一些实施方案中,每个R^L独立地为C_{9-11}烷基。在一些实施方案中,每个R^L独立地为正C_{9-11}烷基。在一些实施方案中,每个R^L独立地为C_{10}烷基。在一些实施方案中,每个R^L为正C_{10}烷基。

[0094] 在具体实施方案中,合适的阳离子脂质是cKK-E12,或(3,6-双(4-(双(2-羟基十二烷基)氨基)丁基)哌嗪-2,5-二酮)。cKK-E12的结构如下所示:

[0095] 

。

[0096] 在一些实施方案中,适用于本发明的一种或多种阳离子脂质可以是N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵或"DOTMA"。(Feigner等人(Proc.Nat'l Acad.Sci.84,7413(1987);美国专利第4,897,355号)。其它合适的阳离子脂质包括例如5-羧基精胺基甘氨酸-二-十八烷基酰胺或"DOGS"、2,3-二油基氧基-N-[2(精胺-羧酰胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙铵或"DOSPA"(Behr等人Proc.Nat.'l Acad.Sci.86,6982(1989);美国专利第5,171,678号;美国专利第5,334,761号)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵丙烷或"DODAP"、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷或"DOTAP"。

[0097] 其它示例性阳离子脂质还包括1,2-硬脂酰氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷或"DSDMA"、1,2-二油基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷或"DODMA"、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷或"DLinDMA"、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷或"DLenDMA"、N-二油基-N,N-二甲基氯化铵或"DODAC"、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵或"DDAB"、N-

(1,2-二肉豆蔻基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵或"DMRIE"、3-二甲氨基-2-(胆甾-5-烯基-3-β-氧基丁-4-氧基)-1-(顺式,顺式-9,12-十八碳二烯氧基)丙烷或"CLinDMA"、2-[5'-(胆甾-5-烯基-3-β-氧基)-3'-氧杂戊氧基)-3-二甲基-1-(顺式,顺式-9',1-2'-十八碳二烯氧基)丙烷或"CpLinDMA"、N,N-二甲基-3,4-二油基氧基苄胺或"DMOBA"、1,2-N,N'-二油基氨甲酰基-3-二甲基氨基丙烷或"DOcarbDAP"、2,3-二亚油酰基氧基-N,N-二甲基丙胺或"DLinDAP"、1,2-N,N'-二亚油基氨甲酰基-3-二甲基氨基丙烷或"DLincarbDAP"、1,2-二亚油酰基氨甲酰基-3-二甲基氨基丙烷或"DLinCDAP"、2,2-二亚油基-4-二甲氨基甲基-[1,3]-二氧戊环或"DLin--DMA"、2,2-二亚油基-4-二甲氨基乙基-[1,3]-二氧戊环或"DLin-K-XTC2-DMA"以及2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基乙胺(DLin-KC2-DMA))(参见WO2010/042877;Semple等人,Nature Biotech.28:172-176(2010)),或其混合物(Heyes,J.等人,J Controlled Release 107:276-287(2005);Morrissey,DV.等人,Nat.Biotechnol.23(8):1003-1007(2005);PCT公开WO2005/121348A1)。在一些实施方案中,所述阳离子脂质中的一种或多种包含咪唑、二烷基氨基或胍鎓部分中的至少一个。

[0098] 在一些实施方案中,一种或多种阳离子脂质可以选自XTC(2,2-二亚油基-4-二甲氨基乙基-[1,3]-二氧戊环)、MC3(((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲氨基)丁酸酯)、ALNY-100((3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊烷并[d][1,3]二氧戊环-5-胺))、NC98-5(4,7,13-三(3-氧代-3-(十一烷基氨基)丙基)-N1,N16-二-十一烷基-4,7,10,13-四氮杂十六烷-1,16-二酰胺)、DODAP(1,2-二油基-3-二甲基铵丙烷)、HGT4003(WO 2012/170889,其教导内容通过引用全部并入本文中)、ICE(WO2011/068810,其教导内容通过引用全部并入本文中)、HGT5000(美国临时专利申请第61/617,468号,其教导内容通过引用全部并入本文中)或HGT5001(顺式或反式)(临时专利申请第61/617,468号)、氨基醇类脂如WO2010/053572中公开的那些、DOTAP(1,2-二油基-3-三甲基铵丙烷)、DOTMA(1,2-二-O-十八碳烯基-3-三甲基铵丙烷)、DLinDMA(Heyes,J.;Palmer,L.;Bremner,K.;MacLachlan,I."Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids" J.Contr.Rel.2005,107,276-287)、DLin-KC2-DMA(Semple,S.C.等人"Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery"Nature Biotech.2010,28,172-176)、C12-200(Love,K.T.等人"Lipid-like materials for low-dose in vivo gene silencing"PNAS 2010,107,1864-1869)。

[0099] 在一些实施方案中,阳离子脂质按重量计或按摩尔计在合适的脂质溶液中构成总脂质的至少约5%、10%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%。在一些实施方案中,阳离子脂质按重量计或按摩尔计构成总脂质混合物的约30-70%(例如,约30-65%、约30-60%、约30-55%、约30-50%、约30-45%、约30-40%、约35-50%、约35-45%或约35-40%)。

[0100] 非阳离子/辅助脂质

[0101] 如本文中所使用,短语"非阳离子脂质"是指任何中性、两性离子或阴离子脂质。如本文中所使用,短语"阴离子脂质"是指在选定的H(如生理pH)下携带净负电荷的多个脂质物种中的任一个。非阳离子脂质包括但不限于:二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂

酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰基-磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰基-乙醇胺(DSPE)、16-O-单甲基PE、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)或其混合物。

[0102] 在一些实施方案中,非阳离子脂质按重量计或按摩尔计在合适的脂质溶液中可以构成总脂质的至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%。在一些实施方案中,非阳离子脂质按重量计或按摩尔计在合适的脂质溶液中构成总脂质的约30-50%(例如,约30-45%、约30-40%、约35-50%、约35-45%或约35-40%)。

[0103] 基于胆固醇的脂质

[0104] 在一些实施方案中,合适的脂质溶液包括一种或多种基于胆固醇的脂质。例如,合适的基于胆固醇的阳离子脂质包括例如DC-Choi(N,N-二甲基-N-乙基甲酰胺胆固醇)、1,4-双(3-N-油基氨基-丙基)哌嗪(Gao等人Biochem.Biophys.Res.Comm.179,280(1991);Wolf等人BioTechniques 23,139(1997);美国专利第5,744,335号)或ICE。在一些实施方案中,基于胆固醇的脂质按重量计或按摩尔计在合适的脂质溶液中构成总脂质的至少约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%或70%。在一些实施方案中,基于胆固醇的脂质按重量计或按摩尔计在合适的脂质溶液中构成总脂质的约30-50%(例如,约30-45%、约30-40%、约35-50%、约35-45%或约35-40%)。

[0105] 聚乙二醇化脂质

[0106] 在一些实施方案中,合适的脂质溶液包括一种或多种聚乙二醇化脂质。例如,本发明还预期了使用经聚乙二醇(PEG)修饰的磷脂和衍生的脂质,如衍生的神经酰胺(PEG-CER),包括N-辛酰基-鞘氨醇-1-[琥珀酰(甲氧基聚乙二醇)-2000](C8 PEG-2000神经酰胺)。预期的经PEG修饰的脂质包括但不限于共价连接至具有C_6-C_{20}长度的烷基链的脂质的长度最高达5kDa的聚乙二醇链。在一些实施方案中,经PEG修饰的或聚乙二醇化脂质是聚乙二醇化胆固醇或PEG-2K。在一些实施方案中,特别有用的可交换脂质是具有较短酰基链(例如,C_{14}或C_{18})的PEG-神经酰胺。

[0107] 经PEG修饰的磷脂和衍生的脂质按重量计或按摩尔计在合适的脂质溶液中可以构成总脂质的至少约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%或70%。在一些实施方案中,聚乙二醇化脂质脂质按重量计或按摩尔计在合适的脂质溶液中构成总脂质的约30-50%(例如,约30-45%、约30-40%、约35-50%、约35-45%或约35-40%)。

[0108] 阳离子脂质、非阳离子脂质、基于胆固醇的脂质和经PEG修饰的脂质的示例性组合描述于实施例部分中。例如,合适的脂质溶液可以含有cKK-E12、DOPE、chol和DMG-PEG2K;C12-200、DOPE、胆固醇和DMG-PEG2K;HGT5000、DOPE、chol和DMG-PEG2K;HGT5001、DOPE、chol和DMG-PEG2K;cKK-E12、DPPC、chol和DMG-PEG2K;C12-200、DPPC、胆固醇和DMG-PEG2K;HGT5000、DPPC、chol和DMG-PEG2K;或HGT5001、DPPC、chol和DMG-PEG2K。组成脂质混合物的阳离子脂质、非阳离子脂质和/或经PEG修饰的脂质的选择以及此类脂质相对于彼此的摩尔比是基于所选脂质的特性及待包封的mRNA的性质和特性。额外的考虑因素包括例如烷基链

的饱和度,以及所选脂质的大小、电荷、pH、pKa、融合性和毒性。因此,可以相应地调整摩尔比。

[0109] 混合过程

[0110] 本发明是基于温度对mRNA包封效率和回收率的出乎意料的影响的发现。因此,在一些实施方案中,本发明提供了一种通过混合本文所述的mRNA溶液和脂质溶液将信使RNA(mRNA)包封在脂质纳米颗粒中的方法,其中将mRNA溶液和/或脂质溶液加热至大于环境温度的预定温度。如本文中所用,术语"环境温度"是指室内的温度或在没有加热或冷却的情况下包围感兴趣的物体(例如,mRNA溶液或脂质溶液)的温度。在一些实施方案中,环境温度是指介于约20-25℃的范围内的温度。

[0111] 因此,大于环境温度的预定温度通常大于约25℃。在一些实施方案中,适用于本发明的预定温度为等于或大于约30℃、37℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃或70℃。在一些实施方案中,适用于本发明的预定温度介于约25-70℃、约30-70℃、约35-70℃、约40-70℃、约45-70℃、约50-70℃或约60-70℃的范围内。在特定实施方案中,适用于本发明的预定温度为约65℃。

[0112] 可以在混合之前将mRNA溶液或脂质溶液或二者加热至高于环境温度的预定温度。在一些实施方案中,mRNA溶液和脂质溶液在混合前分别被加热至预定温度。在一些实施方案中,mRNA溶液和脂质溶液在环境温度下混合,但在混合后被加热至预定温度。在一些实施方案中,将脂质溶液加热至预定温度,并与环境温度下的mRNA溶液混合。在一些实施方案中,将mRNA溶液加热至预定温度,并与环境温度下的脂质溶液混合。

[0113] 在一些实施方案中,通过将环境温度下的mRNA储备溶液添加到加热的缓冲溶液中以实现所需的预定温度而将mRNA溶液加热至预定温度。

[0114] 可以使用泵混合mRNA溶液和脂质溶液。因为包封程序能够在广泛的规模下进行,所以可以使用不同类型的泵以适应所需的规模。然而,通常希望使用无脉流泵。如本文中所用,无脉流泵是指可以建立具有稳定流速的连续流的任何泵。合适的泵的类型可以包括但不限于齿轮泵和离心泵。示例性齿轮泵包括但不限于Cole-Parmer或Diener齿轮泵。示例性离心泵包括但不限于由Grainger或Cole-Parmer制造的离心泵。

[0115] 可以在各种流速下混合mRNA溶液和脂质溶液。通常,mRNA溶液的混合速率可以大于脂质溶液的混合速率。例如,mRNA溶液可以在比脂质溶液的速率高至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍或20倍的速率下混合。

[0116] 用于混合的合适流速可以根据规模来确定。在一些实施方案中,在介于约40-400ml/分钟、60-500ml/分钟、70-600ml/分钟、80-700ml/分钟、90-800ml/分钟、100-900ml/分钟、110-1000ml/分钟、120-1100ml/分钟、130-1200ml/分钟、140-1300ml/分钟、150-1400ml/分钟、160-1500ml/分钟、170-1600ml/分钟、180-1700ml/分钟、150-250ml/分钟、250-500ml/分钟、500-1000ml/分钟、1000-2000ml/分钟、2000-3000ml/分钟、3000-4000ml/分钟或4000-5000ml/分钟的范围内的流速下混合mRNA溶液。在一些实施方案中,在约200ml/分钟、约500ml/分钟、约1000ml/分钟、约2000ml/分钟、约3000ml/分钟、约4000ml/分钟或约5000ml/分钟的流速下混合mRNA溶液。

[0117] 在一些实施方案中,在介于约25-75ml/分钟、20-50ml/分钟、25-75ml/分钟、30-90ml/分钟、40-100ml/分钟、50-110ml/分钟、75-200ml/分钟、200-350ml/分钟、350-500ml/

分钟、500-650ml/分钟、650-850ml/分钟或850-1000ml/分钟的范围内的流速下混合脂质溶液。在一些实施方案中，在约50ml/分钟、约100ml/分钟、约150ml/分钟、约200ml/分钟、约250ml/分钟、约300ml/分钟、约350ml/分钟、约400ml/分钟、约450ml/分钟、约500ml/分钟、约550ml/分钟、约600ml/分钟、约650ml/分钟、约700ml/分钟、约750ml/分钟、约800ml/分钟、约850ml/分钟、约900ml/分钟、约950ml/分钟或约1000ml/分钟的流速下混合脂质溶液。

[0118] 通常，将mRNA溶液和脂质溶液混合成溶液，以使得所述脂质可以形成包封mRNA的纳米颗粒。这种溶液也被称为配制或包封溶液。合适的配制或包封溶液可以基于溶剂如乙醇。例如，合适的配制或包封溶液可以基于约10％乙醇、约15％乙醇、约20％乙醇、约25％乙醇、约30％乙醇、约35％乙醇或约40％乙醇。

[0119] 合适的配制或包封溶液可以基于溶剂如异丙醇。例如，合适的配制或包封溶液可以基于约10％异丙醇、约15％异丙醇、约20％异丙醇、约25％异丙醇、约30％异丙醇、约35％异丙醇或约40％异丙醇。

[0120] 合适的配制或包封溶液可以基于溶剂如二甲亚砜。例如，合适的配制或包封溶液可以基于约10％二甲亚砜、约15％二甲亚砜、约20％二甲亚砜、约25％二甲亚砜、约30％二甲亚砜、约35％二甲亚砜或约40％二甲亚砜。

[0121] 合适的配制或包封溶液还可以含有缓冲剂或盐。示例性缓冲剂可以包括HEPES、硫酸铵、碳酸氢钠、柠檬酸钠、乙酸钠、磷酸钾和磷酸钠。示例性盐可以包括氯化钠、氯化镁和氯化钾。

[0122] 纯化

[0123] 通常，在配制和包封后，将脂质纳米颗粒纯化和/或浓缩。可以使用各种纯化方法。在一些实施方案中，使用切向流过滤纯化脂质纳米颗粒。切向流过滤(TFF)，也称为交叉流过滤，是其中待过滤的材料切向地穿过过滤器，而不是通过该过滤器的过滤类型。在TFF中，非所需的渗透物通过过滤器，而所需的滞留物沿过滤器前行并在下游被收集。重要的是要注意，所需的材料通常包含在TFF的滞留物中，这与通常在传统死端过滤种遇到的情况相反。

[0124] 根据待过滤的材料，TFF通常用于微滤或超滤。微滤通常被定义为其中过滤器具有0.05μm和1.0μm之间(包括0.05μm和1.0μm)的孔径的情况，而超滤通常涉及具有小于0.05μm的孔径的过滤器。孔径还确定了特定过滤器的标称分子量限值(NMWL)，也被称为截留分子量(MWCO)，其中微滤膜通常具有大于1,000千道尔顿(kDa)的NMWL且超滤过滤器具有1kDa和1,000kDa之间的NMWL。

[0125] 切向流过滤的主要优点在于：在传统的“死端”过滤期间可能聚集在过滤器中并堵塞过滤器的非渗透性颗粒(有时称为“滤饼”)相反沿着所述过滤器的表面前行。这个优点允许切向流过滤被广泛地用于需要连续操作的工业过程中，因为过滤器一般不需要被移除和清洗，所以停工时间显著减少。

[0126] 切向流过滤可以用于几种目的，包括浓缩和渗滤等。浓缩是从溶液中除去溶剂而保留溶质分子的过程。为了有效地浓缩样品，使用具有大大低于待保留的溶质分子的分子量的NMWL或MWCO的膜。通常，技术人员可以选择具有比目标分子的分子量低三至六倍的NMWL或MWCO的过滤器。

[0127] 渗滤是一个分馏过程，由此非所需的小颗粒通过过滤器，而较大的所需纳米颗粒

保持在滞留物中而不改变那些纳米颗粒在溶液中的浓度。渗滤经常被用来从溶液中去除盐或反应缓冲剂。渗滤可以是连续的或不连续的。在连续渗滤中，渗滤溶液以与生成滤液相同的速率加入到样品进料中。在不连续渗滤中，首先稀释溶液，然后将其再浓缩至起始浓度。可以重复不连续渗滤，直到达到纳米颗粒的所需浓度。

[0128] 可以在所需的缓冲液如(例如)PBS中配制纯化和/或浓缩的脂质纳米颗粒。

[0129] 提供包封mRNA的纳米颗粒

[0130] 相比于现有技术方法，根据本发明的方法产生更均匀和更小的粒度(例如，小于100nm)，以及显著提高的包封效率和/或mRNA回收率。

[0131] 因此，本发明提供包含本文所述的纯化纳米颗粒的组合物。在一些实施方案中，组合物中的大多数纯化纳米颗粒，即大于约50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％的纯化纳米颗粒，具有小于约100nm(例如，小于约95nm、约90nm、约85nm、约80nm、约75nm、约70nm、约65nm、约60nm、约55nm或约50nm)的大小。在一些实施方案中，大体上所有的纯化纳米颗粒具有小于100nm(例如，小于约95nm、约90nm、约85nm、约80nm、约75nm、约70nm、约65nm、约60nm、约55nm或约50nm)的大小。

[0132] 另外，通过本发明的方法实现了具有窄粒度范围的更均匀的纳米颗粒。例如，由本发明提供的组合物中的大于约70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％的纯化纳米颗粒具有介于约40-90nm(例如，约40-85nm、约40-80nm、约40-75nm、约40-70nm、约40-65nm或约40-60nm)的范围内的大小。在一些实施方案中，大体上所有的纯化纳米颗粒具有介于约40-90nm(例如，约40-85nm、约40-80nm、约40-75nm、约40-70nm、约40-65nm或约40-60nm)的范围内的大小。

[0133] 在一些实施方案中，由本发明提供的组合物中的纳米颗粒的分散度或分子大小的非均质性的量度(PDI)为小于约0.16(例如，小于约0.15、0.14、0.13、0.12、0.11、0.10、0.09或0.08)。

[0134] 在一些实施方案中，由本发明提供的组合物中的大于约75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％的纯化脂质纳米颗粒将mRNA包封在每个单独颗粒内。在一些实施方案中，组合物中的大体上所有的纯化脂质纳米颗粒将mRNA包封在每个单独颗粒内。

[0135] 在一些实施方案中，根据本发明的组合物含有至少约1mg、5mg、10mg、100mg、500mg或1000mg包封的mRNA。在一些实施方案中，根据本发明的方法产生大于约60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％的mRNA回收率。

[0136] 实施例

[0137] 虽然已经根据某些实施方案具体地描述了本发明的某些化合物、组合物和方法，但以下实施例仅用于说明本发明的化合物，并且无意限制所述化合物。

[0138] 实施例1.温度对纳米颗粒包封过程的影响

[0139] 此实施例证明，在纳米颗粒包封过程中的温度升高增加产率和/或包封效率。

[0140] 脂质材料

[0141] 除非另有说明，否则在以下实施例中描述的制剂包含使用不同比率的一种或多种阳离子脂质、辅助脂质(例如，非阳离子脂质和/或胆固醇脂质)和PEG化脂质的多组分脂质混合物，其旨在包封各种核酸材料。用于所述过程的阳离子脂质可以包括但不限于DOTAP(1,2-二油基-3-三甲基铵丙烷)、DODAP(1,2-二油基-3-二甲基铵丙烷)、DOTMA(1,2-二-O-

十八碳烯基-3-三甲基铵丙烷)、DLinDMA(Heyes,J.、Palmer,L.、Bremner,K.、MacLachlan,I.“Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids”J.Contr.Rel.2005,107,276-287)、DLin-KC2-DMA(Semple,S.C.等人“Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery”Nature Biotech.2010,28,172-176)、C12-200(Love,K.T.等人“Lipid-like materials for low-dose in vivo gene silencing”PNAS 2010,107,1864-1869)、cKK-E12(3,6-双(4-(双(2-羟基十二烷基)氨基)丁基)哌嗪-2,5-二酮)、HGT5000、HGT5001、HGT4003、ICE、二烷基氨基型、咪唑型、胍鎓型等。辅助脂质可以包括但不限于DSPC(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)、DPPC(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)、DOPE(1,2-二油基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、DOPC(1,2-二油基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱)、DPPE(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、DMPE(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、DOPG(,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸(1’-外消旋-甘油))、胆固醇等。聚乙二醇化脂质可以包括但不限于共价连接至具有C6-C20长度的烷基链的脂质的长度最高达5kDa的聚乙二醇链。

[0142] 信使RNA材料

[0143] 密码子优化的人类脊髓运动神经元1(SMN)信使RNA、精氨基琥珀酸合成酶(ASS1)信使RNA、修饰的囊性纤维化跨膜传导调节子(SNIM®CFTR,25%假尿苷,25%5-甲基胞苷)信使RNA、萤火虫荧光素酶(FFL)信使RNA、因子IX(FIX)信使RNA、苯丙氨酸羟化酶(PAH)信使RNA和α-半乳糖苷酶(GLA)信使RNA是通过从编码所述基因的质粒DNA模板进行体外转录,随后添加5’帽结构(帽1)(Fechter,P.;Brownlee,G.G.“Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins”J.Gen.Virology 2005,86,1239-1249)和长度为约250个核苷酸(如通过凝胶电泳法所测定)的3’聚(A)尾部而合成。存在于每种mRNA产物中的5’和3’非翻译区分别表示为X和Y,并且定义如下所规定(参见下文)。

[0144] 密码子优化的人类脊髓运动神经元1(SMN)mRNA:

[0145]
XAUGGCCAUGAGCAGCGGAGGCAGCGGCGGAGGAGUGCCCGAGCAGGAGGACAG
CGUGCUGUUCAGGAGAGGCACCGGCCAGAGCGAUGACAGCGAUAUCUGGGACGA
UACCGCUCUGAUCAAGGCCUACGACAAGGCCGUGGCCAGCUUCAAGCACGCCCUG
AAAAACGGCGACAUCUGCGAGACCAGCGGCAAGCCCAAGACAACCCCCAAGAGAA
AGCCCGCCAAGAAGAAUAAGAGCCAGAAAAAGAACACCGCCGCCAGCCUGCAGCA
GUGGAAGGUGGGCGACAAGUGCAGCGCCAUCUGGAGCGAGGACGGCUGCAUCUA
CCCCGCCACCAUCGCCAGCAUCGACUUCAAGAGAGAGACCUGCGUGGUCGUGUAC
ACCGGCUACGGCAACAGAGAGGAGCAGAACCUGAGCGACCUGCUGAGCCCCAUUU
GUGAGGUGGCCAAUAACAUCGAACAGAACGCCCAGGAGAACGAGAAUGAAAGCC
AGGUGAGCACCGACGAGAGCGAGAACAGCAGAUCUCCUGGCAACAAGAGCGACAA
CAUCAAGCCUAAGUCUGCCCCUUGGAACAGCUUCCUGCCCCCUCCUCCACCCAUG
CCCGGACCCAGACUGGGACCCGGAAAACCUGGCCUGAAGUUCAACGGACCACCUC
CCCCUCCACCUCCUCCCCCACCUCAUCUCCUGAGCUGCUGGCUGCCACCCUUCCCC
AGCGGACCCCCUAUCAUCCCACCACCCCCUCCCAUCUGCCCCGACAGCCUGGACGA
CGCCGAUGCCCUGGGCAGCAUGCUGAUCAGCUGGUACAUGAGCGGCUACCACACA
GGAUACUACAUGGGCUUCAGACAGAACCAGAAGGAGGGCAGAUGCUCCCACUCCC
UGAACUGAY

[0146] 人类α-半乳糖苷酶(GLA)mRNA:

[0147] XAUGCAGCUGAGGAACCCAGAACUACAUCUGGGCUGCGCGCUUGCGCUUCGCUUC
CUGGCCCUCGUUUCCUGGGACAUCCCUGGGGCUAGAGCACUGGACAAUGGAUUGG
CAAGGACGCCUACCAUGGGCUGGCUGCACUGGGAGCGCUUCAUGUGCAACCUUGA
CUGCCAGGAAGAGCCAGAUUCCUGCAUCAGUGAGAAGCUCUUCAUGGAGAUGGC
AGAGCUCAUGGUCUCAGAAGGCUGGAAGGAUGCAGGUUAUGAGUACCUCUGCAU
UGAUGACUGUUGGAUGGCUCCCCAAAGAGAUUCAGAAGGCAGACUUCAGGCAGA
CCCUCAGCGCUUUCCUCAUGGGAUUCGCCAGCUAGCUAAUUAUGUUCACAGCAAA
GGACUGAAGCUAGGGAUUUAUGCAGAUGUUGGAAAUAAAACCUGCGCAGGCUUC
CCUGGGAGUUUUGGAUACUACGACAUUGAUGCCCAGACCUUUGCUGACUGGGGA
GUAGAUCUGCUAAAAUUUGAUGGUUGUUACUGUGACAGUUUGGAAAAUUUGGCA
GAUGGUUAUAAGCACAUGUCCUUGGCCCUGAAUAGGACUGGCAGAAGCAUUGUG
UACUCCUGUGAGUGGCCUCUUUAUAUGUGGCCCUUUCAAAAGCCCAAUUAUACAG
AAAUCCGACAGUACUGCAAUCACUGGCGAAAUUUUGCUGACAUUGAUGAUUCCU
GGAAAAGUAUAAAGAGUAUCUUGGACUGGACAUCUUUUAACCAGGAGAGAAUUG
UUGAUGUUGCUGGACCAGGGGGUUGGAAUGACCCAGAUAUGUUAGUGAUUGGCA
ACUUUGGCCUCAGCUGGAAUCAGCAAGUAACUCAGAUGGCCCUCUGGGCUAUCAU
GGCUGCUCCUUUAUUCAUGUCUAAUGACCUCCGACACAUCAGCCCUCAAGCCAAA
GCUCUCCUUCAGGAUAAGGACGUAAUUGCCAUCAAUCAGGACCCCUUGGGCAAGC
AAGGGUACCAGCUUAGACAGGGAGACAACUUUGAAGUGUGGGAACGACCUCUCU
CAGGCUUAGCCUGGGCUGUAGCUAUGAUAAACCGGCAGGAGAUUGGUGGACCUC
GCUCUUAUACCAUCGCAGUUGCUUCCCUGGGUAAAGGAGUGGCCUGUAAUCCUGC
CUGCUUCAUCACACAGCUCCUCCCUGUGAAAAGGAAGCUAGGGUUCUAUGAAUGG
ACUUCAAGGUUAAGAAGUCACAUAAAUCCCACAGGCACUGUUUUGCUUCAGCUA
GAAAAUACAAUGCAGAUGUCAUUAAAAGACUUACUUUAAY

[0148] 密码子优化的人类精氨基琥珀酸合成酶(ASS1)mRNA：

[0149] XAUGAGCAGCAAGGGCAGCGUGGUGCUGGCCUACAGCGGCGGCCUGGACACCAGC
UGCAUCCUGGUGUGGCUGAAGGAGCAGGGCUACGACGUGAUCGCCUACCUGGCCA
ACAUCGGCCAGAAGGAGGACUUCGAGGAGGCCCGCAAGAAGGCCCUGAAGCUGGG
CGCCAAGAAGGUGUUCAUCGAGGACGUGAGCCGCGAGUUCGUGGAGGAGUUCAU
CUGGCCCGCCAUCCAGAGCAGCGCCCUGUACGAGGACCGCUACCUGCUGGGCACC
AGCCUGGCCCGCCCCUGCAUCGCCCGCAAGCAGGUGGAGAUCGCCCAGCGCGAGG
GCGCCAAGUACGUGAGCCACGGCGCCACCGGCAAGGGCAACGACCAGGUGCGCUU
CGAGCUGAGCUGCUACAGCCUGGCCCCCCAGAUCAAGGUGAUCGCCCCCUGGCGC
AUGCCCGAGUUCUACAACCGCUUCAAGGGCCGCAACGACCUGAUGGAGUACGCCA
AGCAGCACGGCAUCCCCAUCCCCGUGACCCCCAAGAACCCCUGGAGCAUGGACGA
GAACCUGAUGCACAUCAGCUACGAGGCCGGCAUCCUGGAGAACCCCAAGAACCAG
GCCCCCCCCCGGCCUGUACACCAAGACCCAGGACCCCGCCAAGGCCCCCAACACCCC
CGACAUCCUGGAGAUCGAGUUCAAGAAGGGCGUGCCCGUGAAGGUGACCAACGU
GAAGGACGGCACCACCCACCAGACCAGCCUGGAGCUGUUCAUGUACCUGAACGAG
GUGGCCGGCAAGCACGGCGUGGGCCGCAUCGACAUCGUGGAGAACCGCUUCAUCG
GCAUGAAGAGCCGCGGCAUCUACGAGACCCCCGCCGGCACCAUCCUGUACCACGC
CCACCUGGACAUCGAGGCCUUCACCAUGGACCGCGAGGUGCGCAAGAUCAAGCAG

GGCCUGGGCCUGAAGUUCGCCGAGCUGGUGUACACCGGCUUCUGGCACAGCCCCG
AGUGCGAGUUCGUGCGCCACUGCAUCGCCAAGAGCCAGGAGCGCGUGGAGGGCAA
GGUGCAGGUGAGCGUGCUGAAGGGCCAGGUGUACAUCCUGGGCCGCGAGAGCCCC
CUGAGCCUGUACAACGAGGAGCUGGUGAGCAUGAACGUGCAGGGCGACUACGAG
CCCACCGACGCCACCGGCUUCAUCAACAUCAACAGCCUGCGCCUGAAGGAGUACC
ACCGCCUGCAGAGCAAGGUGACCGCCAAGUGAY

[0150] 密码子优化的萤火虫荧光素酶mRNA：

[0151] **X**AUGGAAGAUGCCAAAAACAUUAAGAAGGGCCCAGCGCCAUUCUACCCACUCGAA
GACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUGCACAAAGCCAUGAAGCGCUACGCCCUGGUGC
CCGGCACCAUCGCCUUUACCGACGCACAUAUCGAGGUGGACAUUACCUACGCCGA
GUACUUCGAGAUGAGCGUUCGGCUGGCAGAAGCUAUGAAGCGCUAUGGGCUGAA
UACAAACCAUCGGAUCGUGGUGUGCAGCGAGAAUAGCUUGCAGUUCUUCAUGCCC
GUGUUGGGUGCCCUGUUCAUCGGUGUGGCUGUGGCCCCAGCUAACGACAUCUACA
ACGAGCGCGAGCUGCUGAACAGCAUGGGCAUCAGCCAGCCCACCGUCGUAUUCGU
GAGCAAGAAAGGGCUGCAAAAGAUCCUCAACGUGCAAAAGAAGCUACCGAUCAU
ACAAAAGAUCAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAAAGCAUG
UACACCUUCGUGACUUCCCAUUUGCCACCCGGCUUCAACGAGUACGACUUCGUGC
CCGAGAGCUUCGACCGGGACAAAACCAUCGCCCUGAUCAUGAACAGUAGUGGCAG
UACCGGAUUGCCCAAGGGCGUAGCCCUACCGCACCGCACCGCUUGUGUCCGAUUC
AGUCAUGCCCGCGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCCGACACCGCUAUCC
UCAGCGUGGUGCCAUUUCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACCACGCUGGGCUACUU
GAUCUGCGGCUUUCGGGUCGUGCUCAUGUACCGCUUCGAGGAGGAGCUAUUCUU
GCGCAGCUUGCAAGACUAUAAGAUUCAAUCUGCCCUGCUGGUGCCCACACUAUUU
AGCUUCUUCGCUAAGAGCACUCUCAUCGACAAGUACGACCUAAGCAACUUGCACG
AGAUCGCCAGCGGCGGGGCGCCGCUCAGCAAGGAGGUAGGUGAGGCCGUGGCCAA
ACGCUUCCACCUACCAGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACAGAAACAACCAGC
GCCAUUCUGAUCACCCCCGAAGGGGACGACAAGCCUGGCGCAGUAGGCAAGGUGG
UGCCCUUCUUCGAGGCUAAGGUGGUGGACUUGGACACCGGUAAGACACUGGGUG
UGAACCAGCGCGGCGAGCUGUGCGUCCGUGGCCCCAUGAUCAUGAGCGGCUACGU
UAACAACCCCGAGGCUACAAACGCUCUCAUCGACAAGGACGGCUGGCUGCACAGC
GGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCAUCGUGGACCGGCUGA
AGAGCCUGAUCAAAUACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGAACUGGAGAGCAU
CCUGCUGCAACACCCCAACAUCUUCGACGCCGGGGUCGCCGGCCUGCCCGACGAC
GAUGCCGGCGAGCUGCCCGCCGCAGUCGUCGUGCUGGAACACGGUAAAACCAUGA
CCGAGAAGGAGAUCGUGGACUAUGUGGCCAGCCAGGUUACAACCGCCAAGAAGCU
GCGCGGUGGUGUUGUGUUCGUGGACGAGGUGCCUAAAGGACUGACCGGCAAGUU
GGACGCCCGCAAGAUCCGCGAGAUUCUCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUC
GCCGUGUAA**Y**

[0152] 人类因子IX(FIX)mRNA：

[0153] XAUGCAGCGCGUGAACAUGAUCAUGGCAGAAUCACCAGGCCUCAUCACCAUCUGC
CUUUUAGGAUAUCUACUCAGUGCUGAAUGUACAGUUUUUCUUGAUCAUGAAAAC
GCCAACAAAAUUCUGAGGCGGAGAAGGAGGUAUAAUUCAGGUAAAUUGGAAGAG
UUUGUUCAAGGGAACCUUGAGAGAGAAUGUAUGGAAGAAAAGUGUAGUUUUGAA
GAAGCACGAGAAGUUUUUGAAAACACUGAAAGAACAACUGAAUUUUGGAAGCAG
UAUGUUGAUGGAGAUCAGUGUGAGUCCAAUCCAUGUUUAAAUGGCGGCAGUUGC
AAGGAUGACAUUAAUUCCUAUGAAUGUUGGUGUCCCUUUGGAUUUGAAGGAAAG
AACUGUGAAUUAGAUGUAACAUGUAACAUUAAGAAUGGCAGAUGCGAGCAGUUU
UGUAAAAAUAGUGCUGAUAACAAGGUGGUUUGCUCCUGUACUGAGGGAUAUCGA
CUUGCAGAAAACCAGAAGUCCUGUGAACCAGCAGUGCCAUUUCCAUGUGGAAGA
GUUUCUGUUUCACAAACUUCUAAGCUCACCCGUGCUGAGGCUGUUUUUCCUGAUG
UGGACUAUGUAAAUUCUACUGAAGCUGAAACCAUUUUGGAUAACAUCACUCAAA
GCACCCAAUCAUUUAAUGACUUCACUCGGGUUGUUGGUGGAGAAGAUGCCAAAC
CAGGUCAAUUCCCUUGGCAGGUUGUUUUGAAUGGUAAAGUUGAUGCAUUCUGUG
GAGGCUCUAUCGUUAAUGAAAAAUGGAUUGUAACUGCUGCCCACUGUGUUGAAA
CUGGUGUUAAAAUUACAGUUGUCGCAGGUGAACAUAAUAUUGAGGAGACAGAAC
AUACAGAGCAAAAGCGAAAUGUGAUUCGAAUUAUUCCUCACCACAACUACAAUG
CAGCUAUUAAUAAGUACAACCAUGACAUUGCCCUUCUGGAACUGGACGAACCCUU
AGUGCUAAACAGCUACGUUACACCUAUUUGCAUUGCUGACAAGGAAUACACGAA
CAUCUUCCUCAAAUUUGGAUCUGGCUAUGUAAGUGGCUGGGGAAGAGUCUUCCA
CAAAGGGAGAUCAGCUUUAGUUCUUCAGUACCUUAGAGUUCCACUUGUUGACCG
AGCCACAUGUCUUCGAUCUACAAAGUUCACCAUCUAUAACAACAUGUUCUGUGCU
GGCUUCCAUGAAGGAGGUAGAGAUUCAUGUCAAGGAGAUAGUGGGGGACCCCAU
GUUACUGAAGUGGAAGGGACCAGUUUCUUAACUGGAAUUAUUAGCUGGGGUGAA
GAGUGUGCAAUGAAAGGCAAAUAUGGAAUAUAUACCAAGGUAUCCCGGUAUGUC
AACUGGAUUAAGGAAAAAACAAAGCUCACUUAAY

[0154] 密码子优化的人类苯丙氨酸羟化酶(PAH)mRNA：

[0155] XAUGAGCACCGCCGUGCUGGAGAACCCCGGCCUGGGCCGCAAGCUGAGCGACUUC
GGCCAGGAGACCAGCUACAUCGAGGACAACUGCAACCAGAACGGCGCCAUCAGCC
UGAUCUUCAGCCUGAAGGAGGAGGUGGGCGCCCUGGCCAAGGUGCUGCGCCUGUU
CGAGGAGAACGACGUGAACCUGACCCACAUCGAGAGCCGCCCCAGCCGCCUGAAG
AAGGACGAGUACGAGUUCUUCACCCACCUGGACAAGCGCAGCCUGCCCGCCCUGA
CCAACAUCAUCAAGAUCCUGCGCCACGACAUCGGCGCCACCGUGCACGAGCUGAG
CCGCGACAAGAAGAAGGACACCGUGCCCUGGUUCCCCCGCACCAUCCAGGAGCUG
GACCGCUUCGCCAACCAGAUCCUGAGCUACGGCGCCGAGCUGGACGCCGACCACC
CCGGCUUCAAGGACCCCGUGUACCGCGCCCGCCGCAAGCAGUUCGCCGACAUCGC
CUACAACUACCGCCACGGCCAGCCCAUCCCCCGCGUGGAGUACAUGGAGGAGGAG
AAGAAGACCUGGGGCACCGUGUUCAAGACCCUGAAGAGCCUGUACAAGACCCACG
CCUGCUACGAGUACAACCACAUCUUCCCCCUGCUGGAGAAGUACUGCGGCUUCCA
CGAGGACAACAUCCCCCAGCUGGAGGACGUGAGCCAGUUCCUGCAGACCUGCACC
GGCUUCCGCCUGCGCCCCGUGGCCGGCCUGCUGAGCAGCCGCGACUUCCUGGGCG
GCCUGGCCUUCCGCGUGUUCCACUGCACCCAGUACAUCCGCCACGGCAGCAAGCC

CAUGUACACCCCCGAGCCCGACAUCUGCCACGAGCUGCUGGGCCACGUGCCCCUG
UUCAGCGACCGCAGCUUCGCCCAGUUCAGCCAGGAGAUCGGCCUGGCCAGCCUGG
GCGCCCCCGACGAGUACAUCGAGAAGCUGGCCACCAUCUACUGGUUCACCGUGGA
GUUCGGCCUGUGCAAGCAGGGCGACAGCAUCAAGGCCUACGGCGCCGGCCUGCUG
AGCAGCUUCGGCGAGCUGCAGUACUGCCUGAGCGAGAAGCCCAAGCUGCUGCCCC
UGGAGCUGGAGAAGACCGCCAUCCAGAACUACACCGUGACCGAGUUCCAGCCCCU
GUACUACGUGGCCGAGAGCUUCAACGACGCCAAGGAGAAGGUGCGCAACUUCGCC
GCCACCAUCCCCCCGCCCCUUCAGCGUGCGCUACGACCCCUACACCCAGCGCAUCGA
GGUGCUGGACAACACCCAGCAGCUGAAGAUCCUGGCCGACAGCAUCAACAGCGAG
AUCGGCAUCCUGUGCAGCGCCCUGCAGAAGAUCAAGUAAY

[0156] 密码子优化的囊性纤维化跨膜传导调节子(CFTR)mRNA：

[0157]

AUGCAGCGGUCCCCGCUCGAAAAGGCCAGUGUCGUGUCCAAACUCUUCUUCUCAU
GGACUCGGCCUAUCCUUAGAAAGGGGUAUCGGCAGAGGCUUGAGUUGUCUGACA
UCUACCAGAUCCCCUCGGUAGAUUCGGCGGAUAACCUCUCGGAGAAGCUCGAACG
GGAAUGGGACCGCGAACUCGCGUCUAAGAAAAACCCGAAGCUCAUCAACGCACUG
AGAAGGUGCUUCUUCUGGCGGUUCAUGUUCUACGGUAUCUUCUUGUAUCUCGGG
GAGGUCACAAAAGCAGUCCAACCCCUGUUGUUGGGUCGCAUUAUCGCCUCGUACG
ACCCCGAUAACAAAGAAGAACGGAGCAUCGCGAUCUACCUCGGGAUCGGACUGUG
UUUGCUUUUCAUCGUCAGAACACUUUUGUUGCAUCCAGCAAUCUUCGGCCUCCAU
CACAUCGGUAUGCAGAUGCGAAUCGCUAUGUUUAGCUUGAUCUACAAAAAGACA
CUGAAACUCUCGUCGCGGGUGUUGGAUAAGAUUUCCAUCGGUCAGUUGGUGUCC
CUGCUUAGUAAUAACCUCAACAAAUUCGAUGAGGGACUGGCGCUGGCACAUUUC
GUGUGGAUUGCCCCGUUGCAAGUCGCCCUUUUGAUGGGCCUUAUUUGGGAGCUG
UUGCAGGCAUCUGCCUUUUGUGGCCUGGGAUUUCUGAUUGUGUUGGCAUUGUUU
CAGGCUGGGCUUGGGCGGAUGAUGAUGAAGUAUCGCGACCAGAGAGCGGGUAAA
AUCUCGGAAAGACUCGUCAUCACUUCGGAAAUGAUCGAAAACAUCCAGUCGGUCA
AAGCCUAUUGCUGGGAAGAAGCUAUGGAGAAGAUGAUUGAAAACCUCCGCCAAA
CUGAGCUGAAACUGACCCGCAAGGCGGCGUAUGUCCGGUAUUUCAAUUCGUCAGC
GUUCUUCUUUUCCGGGUUCUUCGUUGUCUUUCUCUCGGUUUUGCCUUAUGCCUUG
AUUAAGGGGAUUAUCCUCCGCAAGAUUUUCACCACGAUUUCGUUCUGCAUUGUA
UUGCGCAUGGCAGUGACACGGCAAUUUCCGUGGGCCGUGCAGACAUGGUAUGAC
UCGCUUGGAGCGAUCAACAAAAUCCAAGACUUCUUGCAAAAGCAAGAGUACAAG
ACCCUGGAGUACAAUCUUACUACUACGGAGGUAGUAAUGGAGAAUGUGACGGCU
UUUUGGGAAGAGGGUUUUGGAGAACUGUUUGAGAAAGCAAAGCAGAAUAACAAC
AACCGCAAGACCUCAAAUGGGGACGAUUCCCUGUUUUUCUCGAACUUCUCCCUGC
UCGGAACACCCGUGUUGAAGGACAUCAAUUUCAAGAUUGAGAGGGGACAGCUUC
UCGCGGUAGCGGGAAGCACUGGUGCGGGAAAAACUAGCCUCUUGAUGGUGAUUA
UGGGGGAGCUUGAGCCCAGCGAGGGGAAGAUUAAACACUCCGGGCGUAUCUCAU
UCUGUAGCCAGUUUUCAUGGAUCAUGCCCGGAACCAUUAAAGAGAACAUCAUUU
UCGGAGUAUCCUAUGAUGAGUACCGAUACAGAUCGGUCAUUAAGGCGUGCCAGU
UGGAAGAGGACAUUUCUAAGUUCGCCGAGAAGGAUAACAUCGUCUUGGGAGAAG
GGGGUAUUACAUUGUCGGGAGGGCAGCGAGCGCGGAUCAGCCUCGCGAGAGCGG

[0158]

UAUACAAAGAUGCAGAUUUGUAUCUGCUUGAUUCACCGUUUGGAUACCUCGACG
UAUUGACAGAAAAAGAAAUCUUCGAGUCGUGCGUGUGUAAACUUAUGGCUAAUA
AGACGAGAAUCCUGGUGACAUCAAAAAUGGAACACCUUAAGAAGGCGGACAAGA
UCCUGAUCCUCCACGAAGGAUCGUCCUACUUUUACGGCACUUUCUCAGAGUUGCA
AAACUUGCAGCCGGACUUCUCAAGCAAACUCAUGGGGUGUGACUCAUUCGACCAG
UUCAGCGCGGAACGGCGGAACUCGAUCUUGACGGAAACGCUGCACCGAUUCUCGC
UUGAGGGUGAUGCCCCGGUAUCGUGGACCGAGACAAAGAAGCAGUCGUUUAAGC
AGACAGGAGAAUUUGGUGAGAAAAGAAAGAACAGUAUCUUGAAUCCUAUUAACU
CAAUUCGCAAGUUCUCAAUCGUCCAGAAAACUCCACUGCAGAUGAAUGGAAUUG
AAGAGGAUUCGGACGAACCCCUGGAGCGCAGGCUUAGCCUCGUGCCGGAUUCAGA
GCAAGGGGAGGCCAUUCUUCCCCGGAUUUCGGUGAUUUCAACCGGACCUACACUU
CAGGCGAGGCGAAGGCAAUCCGUGCUCAACCUCAUGACGCAUUCGGUAAACCAGG
GGCAAAACAUUCACCGCAAAACGACGGCCUCAACGAGAAAAGUGUCACUUGCACC
CCAGGCGAAUUUGACUGAACUCGACAUCUACAGCCGUAGGCUUUCGCAAGAAACC
GGACUUGAGAUCAGCGAAGAAAUCAAUGAAGAAGAUUUGAAAGAGUGUUUCUUU
GAUGACAUGGAAUCAAUCCCAGCGGUGACAACGUGGAACACAUACUUGCGUUAC
AUCACGGUGCACAAGUCCUUGAUUUUCGUCCUCAUCUGGUGUCUCGUGAUCUUUC
UCGCUGAGGUCGCAGCGUCACUUGUGGUCCUCUGGCUGCUUGGUAAUACGCCCUU
GCAAGACAAAGGCAAUUCUACACACUCAAGAAACAAUUCCUAUGCCGUGAUUAUC
ACUUCUACAAGCUCGUAUUACGUGUUUUACAUCUACGUAGGAGUGGCCGACACUC
UGCUCGCGAUGGGUUUCUUCCGAGGACUCCCACUCGUUCACACGCUUAUCACUGU
CUCCAAGAUUCUCCACCAUAAGAUGCUUCAUAGCGUACUGCAGGCUCCCAUGUCC
ACCUUGAAUACGCUCAAGGCGGGAGGUAUUUUGAAUCGCUUCUCAAAAGAUAUU
GCAAUUUUGGAUGACCUUCUGCCCCUGACGAUCUUCGACUUCAUCCAGUUGUUGC
UGAUCGUGAUUGGGGCUAUUGCAGUAGUCGCUGUCCUCCAGCCUUACAUUUUUG
UCGCGACCGUUCCGGUGAUCGUGGCGUUUAUCAUGCUGCGGGCCUAUUUCUUGCA
GACGUCACAGCAGCUUAAGCAACUGGAGUCUGAAGGGAGGUCGCCUAUCUUUAC
GCAUCUUGUGACCAGUUUGAAGGGAUUGUGGACGUUGCGCGCCUUUGGCAGGCA
GCCCUACUUUGAAACACUGUUCCACAAAGCGCUGAAUCUCCAUACGGCAAAUUGG
UUUUUGUAUUUGAGUACCCUCCGAUGGUUUCAGAUGCGCAUUGAGAUGAUUUUU
GUGAUCUUCUUUAUCGCGGUGACUUUUAUCUCCAUCUUGACCACGGGAGAGGGC
GAGGGACGGGUCGGUAUUAUCCUGACACUCGCCAUGAACAUUAUGAGCACUUUG
CAGUGGGCAGUGAACAGCUCGAUUGAUGUGGAUAGCCUGAUGAGGUCCGUUUCG
AGGGUCUUUAAGUUCAUCGACAUGCCGACGGAGGGAAAGCCCACAAAAAGUACG
AAACCCUAUAAGAAUGGGCAAUUGAGUAAGGUAAUGAUCAUCGAGAACAGUCAC
GUGAAGAAGGAUGACAUCUGGCCUAGCGGGGGUCAGAUGACCGUGAAGGACCUG
ACGGCAAAAUACACCGAGGGAGGGAACGCAAUCCUUGAAAACAUCUCGUUCAGCA
UUAGCCCCGGUCAGCGUGUGGGGUUGCUCGGGAGGACCGGGUCAGGAAAAUCGA
CGUUGCUGUCGGCCUUCUUGAGACUUCUGAAUACAGAGGGUGAGAUCCAGAUCG
ACGGCGUUUCGUGGGAUAGCAUCACCUUGCAGCAGUGGCGGAAAGCGUUUGGAG
UAAUCCCCCAAAAGGUCUUUAUCUUUAGCGGAACCUUCCGAAAGAAUCUCGAUCC
UUAUGAACAGUGGUCAGAUCAAGAGAUUUGGAAAGUCGCGGACGAGGUUGGCCU
UCGGAGUGUAAUCGAGCAGUUUCCGGGAAAACUCGACUUUGUCCUUGUAGAUGG
GGGAUGCGUCCUGUCGCAUGGGCACAAGCAGCUCAUGUGCCUGGCGCGAUCCGUC
CUCUCUAAAGCGAAAAUUCUUCUCUUGGAUGAACCUUCGGCCCAUCUGGACCCGG

UAACGUAUCAGAUCAUCAGAAGGACACUUAAGCAGGCGUUUGCCGACUGCACGG
UGAUUCUCUGUGAGCAUCGUAUCGAGGCCAUGCUCGAAUGCCAGCAAUUUCUUG
UCAUCGAAGAGAAUAAGGUCCGCCAGUACGACUCCAUCCAGAAGCUGCUUAAUGA
GAGAUCAUUGUUCCGGCAGGCGAUUUCACCAUCCGAUAGGGUGAAACUUUUUCC
ACACAGAAAUUCGUCGAAGUGCAAGUCCAAACCGCAGAUCGCGGCCUUGAAAGAA
GAGACUGAAGAAGAAGUUCAAGACACGCGUCUUUAA

[0159] 5’和3’UTR序列

X =

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACC
GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCCCG
UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG

Y =

CGGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUGGAAGUUGCC
ACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAGCU

[0160] 脂质纳米颗粒制剂

[0161] 制备报告体积的脂质(阳离子脂质、辅助脂质、两性离子脂质、PEG脂质等)的混合物的乙醇溶液,并加热到选定温度。另外,从1mg/mL储备溶液制备mRNA的水性缓冲溶液(10mM柠檬酸盐/150mMNaCl,pH 4.5),并加热到选定温度5-10分钟。

[0162] 对于小规模制剂来说,使用注射泵(3.71mL/秒)将脂质溶液迅速注入到水性mRNA溶液中,并振荡所得悬浮液以得到脂质纳米颗粒的20%乙醇溶液。用1×PBS(pH 7.4)渗滤所得纳米颗粒悬浮液,浓缩,并储存于2-8℃下

[0163] 25℃下的代表性实施例

[0164] 混合cKK-E12、DOPE、Chol和DMG-PEG2K的50mg/mL乙醇溶液的等分试样并用乙醇稀释到3mL最终体积。另外,从1mg/mL储备溶液制备FFL mRNA的水性缓冲溶液(10mM柠檬酸盐/150mM NaCl,pH 4.5)。将脂质溶液迅速注入到水性mRNA溶液中,并振荡以得到最终的20%乙醇悬浮液。过滤所得纳米颗粒悬浮液,用1×PBS(pH 7.4)渗滤,浓缩,并储存于2-8℃下。最终浓度=0.20mg/mL FFL mRNA(包封)。Z_{ave}=91nm PDI(0.16)。

[0165] 37℃下的配制

[0166] 混合cKK-E12、DOPE、Chol和DMG-PEG2K的50mg/mL乙醇溶液的等分试样并用乙醇稀释到3mL最终体积。另外,从1mg/mL储备溶液制备FIX mRNA的水性缓冲溶液(10mM柠檬酸盐/150mM NaCl,pH 4.5)。将脂质溶液迅速注入到水性mRNA溶液中,并振荡以得到最终的20%乙醇悬浮液。过滤所得纳米颗粒悬浮液,用1×PBS(pH 7.4)渗滤,浓缩,并储存于2-8℃下。最终浓度=0.20mg/mL FIX mRNA(包封)。Z_{ave}=64nm;PDI(0.12)。

[0167] 65℃下的配制

[0168] 混合cKK-E12、DOPE、Chol和DMG-PEG2K的50mg/mL乙醇溶液的等分试样并用乙醇稀释到3mL最终体积。另外,从1mg/mL储备溶液制备FIX mRNA的水性缓冲溶液(10mM柠檬酸盐/150mM NaCl,pH 4.5)。将脂质溶液迅速注入到水性mRNA溶液中,并振荡以得到最终的20%乙醇悬浮液。过滤所得纳米颗粒悬浮液,用1×PBS(pH 7.4)渗滤,浓缩,并储存于2-8℃下。最终浓度=0.20mg/mL FIX mRNA(包封)。Z_{ave}=73nm;PDI(0.13)。

[0169] 温度对纳米颗粒包封过程的影响

[0170] 乙醇脂质溶液和mRNA的水性缓冲溶液(10mM柠檬酸盐/150mM NaCl,pH4.5)在配制过程前均在不同的选定温度下加热,以确定温度对制剂的最终产率和包封效率的影响。

[0171] 针对大小、大小分散度、包封效率和产率(或回收率)评价温度对纳米颗粒包封过程的影响。示例性数据显示在表1中。可以看到,温度升高(例如,高于环境温度)的结果是增加的包封效率和/或产率/回收率,以及减小的粒度和/或大小分散度。

[0172] 表1.温度对纳米颗粒形成和mRNA包封的影响

[0173]

环境温度(25℃)下的配制过程:						
制剂编号	**mRNA**	**温度**	**大小**	**PDI**	**包封**	**回收率**
1	FFL	25	91	0.16	71%	30%
2	FFL	25	88	0.14	76%	33%
37℃下的配制过程:						
制剂编号	mRNA	温度	大小	PDI	包封	回收率
3	FIX	37	77	0.13	57%	29%
4	FIX	37	80	0.12	68%	36%
5	FIX	37	64	0.12	69%	37%
6	FIX	37	63	0.12	65%	51%
65℃下的配制过程:						
制剂编号	mRNA	温度	大小	PDI	包封	回收率
7	ASS1	65	86	0.12	85%	64%
8	ASS1	65	84	0.11	96%	98%
9	ASS1	65	81	0.16	86%	64%
10	ASS1	65	84	0.11	96%	98%
11	PAH	65	79	0.12	82%	77%
12	FIX	65	73	0.13	81%	77%
13	FIX	65	79	0.14	92%	82%
14	FIX	65	85	0.13	95%	70%
15	FFL	65	68	0.10	92%	78%
16	FFL	65	83	0.12	91%	77%
17	FFL	65	80	0.11	91%	75%
18	FFL	65	83	0.11	88%	72%
19	FFL	65	80	0.16	90%	75%
20	FFL	65	78	0.11	81%	77%
21	FFL	65	86	0.12	82%	75%

[0174]

[0175] 实施例2.大规模配制过程

[0176] 此实施例说明用于在升高的温度下包封mRNA的示例性大规模配制过程。

[0177] 示例性的大规模配制过程示于图1中。使用Ismatec可编程数字驱动泵(Cole Parmer Model#CP 78008-10)。使用Micropump A卡口吸入靴泵头316SS主体/石墨齿轮/PTFE密封件,0.084mL/转(无内部旁路)(Cole Parmer型号07002-27)和Pharma Pure管路尺寸14,0.06″ID,1/16″(Spectrum labs零件号ACTU-P14-25N)。

[0178] mRNA的纳米颗粒配制和包封是通过使用‘T’接头(或“Y”接头)在柠檬酸盐缓冲液(10mM柠檬酸盐缓冲液,150mM NaCl,pH 4.5)中混合乙醇脂质溶液和mRNA来准备。在柠檬酸盐缓冲液中的mRNA和在乙醇溶液中的脂质的示例性流速分别为200mL/分钟和50mL/分钟。在此过程中,同时启动两个泵。制剂的起始和末尾部分均被丢弃,只有中间制剂被收集。精确的流速和无脉流是这个过程的两个重要参数。

[0179] 纯化和缓冲液交换

[0180] 从上述步骤得到的制剂的纯化和缓冲液交换是利用来自Spectrum labs的KrosFlo ®Research IIi切向流过滤系统，使用改性聚醚砜中空纤维过滤器模块进行。用6倍体积的无菌PBS(pH 7.4)以连续渗滤形式进行缓冲液交换。参见图2。分析制剂的大小(PDI)和包封(产率)。示例性数据呈现在表2中。

[0181] 表2.大规模配制的实例

[0182]

制剂	批量大小 (mg)	N/P	mRNA	大小 (nm)	PDI	包封
22	5	4	ASS1	59	0.09	88%
23	5	4	ASS1	60	0.12	81%
24	5	4	ASS1	59	0.11	92%
25	5	4	ASS1	62	0.12	91%
26	5	4	ASS1	59	0.11	89%
27	5	4	ASS1	62	0.07	97%
28	5	4	ASS1	57	0.12	91%
29	5	4	ASS1	62	0.07	97%
30	5	4	ASS1	67	0.12	88%
31	5	4	ASS1	60	0.15	82%
32	5	4	ASS1	75	0.09	92%
33	5	4	ASS1	67	0.12	91%
34	5	4	ASS1	71	0.13	92%
35	5	4	ASS1	69	0.11	92%
36	5	4	ASS1	66	0.13	94%
37	5	4	ASS1	72	0.11	94%
38	5	4	ASS1	82	0.13	96%
39	5	4	ASS1	62	0.12	90%
40	5	4	ASS1	60	0.11	86%
41	5	4	ASS1	67	0.15	91%
42	5	4	ASS1	69	0.14	94%
43	5	4	ASS1	65	0.16	90%
44	5	4	ASS1	63	0.12	89%

[0183]

45	5	4	ASS1	65	0.08	86%
46	5	4	GLA	62	0.11	95%
47	5	4	GLA	57	0.16	89%
48	5	4	GLA	54	0.08	95%
49	5	4	GLA	62	0.12	88%
50	5	2	SMN	61	0.14	81%
51	5	4	25%s2U, 25%5mC CFTR	60	0.13	96%
52	20	2	ASS1	72	0.10	90%
53	20	4	ASS1	75	0.12	92%
54	20	4	ASS1	81	0.11	82%
55	20	6	FFluc	82	0.11	94%
56	20	4	FFLuc	78	0.11	94%
57	20	4	CFTR	80	0.12	98%
58	30	4	CFTR	75	0.12	85%
59	50	4	CFTR	69	0.17	92%
60	50	2	ASS1	73	0.15	82%
61	60	4	ASS1	71	0.13	95%
62	300	2	ASS1	59	0.18	95%
63	300	4	ASS1	64	0.11	96%
64	1000	2	ASS1	51	0.18	89%
65	1000	4	ASS1	61	0.19	91%
66	1000	2	ASS1	56	0.18	81%
67	1000	4	ASS1	71	0.08	92%
68	1000	2	ASS1	51	0.12	90%
69	1000	4	ASS1	73	0.13	89%
平均值				**65.8**	**0.12**	**91%**

[0184] 使用这种方法,实现了极窄的粒度范围以及高包封效率(例如,>90%的平均值)。

[0185] 为了测试无脉均质流的重要性,将具有一定程度的脉动流的蠕动泵用于所述配制过程。参见图3。在柠檬酸盐缓冲液中的mRNA和在无水乙醇中的脂质分别在200mL/分钟和50mL/分钟的流速下混合。示例性结果显示在表3中。可以看到,在此过程中使用蠕动泵产生具有较大尺寸的纳米颗粒的制剂。这可能是由于由脉动流所引起的非均匀混合。

[0186] 表3.使用蠕动泵配制的实例

[0187]

制剂编号	mRNA	大小(nm)	PDI
70	CFTR	112	0.19

[0188]

71	CFTR	116	0.17
72	FFL	128	0.14
73	FFL	134	0.16

[0189] 等效物和范围

[0190] 本领域技术人员仅利用常规实验就将认识到或能够确定本文所描述的本发明的具体实施方案的许多等效物。本发明的范围无意受以上描述的限制,而是如以下权利要求中所阐述。

序列表

<110> 川斯勒佰尔公司

<120> 信使RNA的包封

<130> 2006685-1079

<140> PCT/US15/39004

<141> 2015-07-02

<150> 62/020,163

<151> 2014-07-02

<160> 10

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 250

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述:合成的多核苷酸

<220>

<223> 参见提交的说明书对取代和优选的实施方式的详细描述

<400> 1

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 240

aaaaaaaaaa 250

<210> 2

<211> 1130

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述:合成的多核苷酸

<400> 2

ggacagaucg ccuggagacg ccauccacgc uguuuugacc uccauagaag acaccgggac 60

cgauccagcc uccgcggccg ggaacggugc auuggaacgc ggauuccccg ugccaagagu 120

gacucaccgu ccuugacacg auggccauga gcagcggagg cagcggcgga ggagugcccg 180

agcaggagga cagcgugcug uucaggagag gcaccggcca gagcgaugac agcgauaucu 240

gggacgauac cgcucugauc aaggccuacg acaaggccgu ggccagcuuc aagcacgccc 300

ugaaaaacgg cgacaucugc gagaccagcg gcaagcccaa gacaaccccc aagagaaagc 360

ccgccaagaa gaauaagagc cagaaaaaga acaccgccgc cagccugcag caguggaagg 420

ugggcgacaa gugcagcgcc aucuggagcg aggacggcug caucuacccc gccaccaucg 480
ccagcaucga cuucaagaga gagaccugcg uggucgugua caccggcuac ggcaacagag 540
aggagcagaa ccugagcgac cugcugagcc ccauuuguga gguggccaau aacaucgaac 600
agaacgccca ggagaacgag aaugaaagcc aggugagcac cgacgagagc gagaacagca 660
gaucuccugg caacaagagc gacaacauca agccuaaguc ugccccuugg aacagcuucc 720
ugccccucc uccacccaug cccggaccca gacugggacc cggaaaaccu ggccugaagu 780
ucaacggacc accucccccu ccaccuccuc ccccaccuca ucuccugagc ugcuggcugc 840
cacccuuccc cagcggaccc ccuaucaucc caccaccccc ucccaucugc cccgacagcc 900
uggacgacgc cgaugcccug ggcagcaugc ugaucagcug guacaugagc ggcuaccaca 960
caggauacua caugggcuuc agacagaacc agaaggaggg cagaugcucc cacucccuga 1020
acugacgggu ggcaucccug ugaccccucc ccagugccuc uccuggcccu ggaaguugcc 1080
acuccagugc ccaccagccu uguccuaaua aaauuaaguu gcaucaagcu 1130

<210> 3
<211> 1535
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 对人工序列的描述:合成的多核苷酸
<400> 3

ggacagaucg ccuggagacg ccauccacgc uguuuugacc uccauagaag acaccgggac 60
cgauccagcc uccgcggccg ggaacggugc auuggaacgc ggauuccccg ugccaagagu 120
gacucaccgu ccuugacacg augcagcuga ggaacccaga acuacaucug ggcugcgcgc 180
uugcgcuucg cuuccuggcc cucguuuccu gggacauccc uggggcuaga gcacuggaca 240
auggauuggc aaggacgccu accaugggcu ggcugcacug ggagcgcuuc augugcaacc 300
uugacugcca ggaagagcca gauuccugca ucagugagaa gcucuucaug gagauggcag 360
agcucauggu cucagaaggc uggaaggaug cagguuauga guaccucugc auugaugacu 420
guuggauggc uccccaaaga gauucagaag gcagacuuca ggcagacccu cagcgcuuuc 480
cucaugggau ucgccagcua gcuaauuaug uucacagcaa aggacugaag cuagggauuu 540
augcagaugu uggaaauaaa accugcgcag gcuucccugg gaguuuugga uacuacgaca 600
uugaugccca gaccuuugcu gacuggggag uagaucugcu aaaauuugau gguuguuacu 660
gugacaguuu ggaaaauuug gcagaugguu auaagcacau guccuuggcc cugaauagga 720
cuggcagaag cauuguguac uccugugagu ggccucuuua uauguggccc uuucaaaagc 780
ccaauuauac agaaauccga caguacugca aucacuggcg aaauuuugcu gacauugaug 840
auuccuggaa aaguauaaag aguaucuugg acuggacauc uuuuaaccag gagagaauug 900
uugauguugc uggaccaggg gguuggaaug acccagauau guuagugauu ggcaacuuug 960
gccucagcug gaaucagcaa guaacucaga uggcccucug ggcuaucaug gcugcuccuu 1020
uauucauguc uaaugaccuc cgacacauca gcccucaagc caaagcucuc cuucaggaua 1080
aggacguaau ugccaucaau caggaccccu ugggcaagca aggguaccag cuuagacagg 1140
gagacaacuu ugaaagugugg gaacgaccuc ucucaggcuu agccugggcu guagcuauga 1200

uaaaccggca ggagauuggu ggaccucgcu cuuauaccau cgcaguugcu ucccugggua 1260
aaggaguggc cuguaauccu gccugcuuca ucacacagcu ccucccugug aaaaggaagc 1320
uaggguucua ugaauggacu ucaagguuaa gaagucacau aaaucccaca ggcacuguuu 1380
ugcuucagcu agaaaauaca augcagaugu cauuaaaaga cuuacuuuaa cggguggcau 1440
cccugugacc ccucccccagu gccucuccug gcccuggaag uugccacucc agugcccacc 1500
agccuugucc uaauaaaauu aaguugcauc aagcu 1535

<210> 4
<211> 1484
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 对人工序列的描述:合成的多核苷酸
<400> 4

ggacagaucg ccuggagacg ccauccacgc uguuuugacc uccauagaag acaccgggac 60
cgauccagcc uccgcggccg ggaacggugc auuggaacgc ggauuccccg ugccaagagu 120
gacucaccgu ccuugacacg augagcagca agggcagcgu ggugcuggcc uacagcggcg 180
gccuggacac cagcugcauc cuggugguggc ugaaggagca gggcuacgac gugaucgccu 240
accuggccaa caucggccag aaggaggacu ucgaggaggc ccgcaagaag gcccugaagc 300
ugggcgccaa gaagguguuc aucgaggacg ugagccgcga guucguggag gaguucaucu 360
ggcccgccau ccagagcagc gcccuguacg aggaccgcua ccugcugggc accagccugg 420
cccgccccug caucgcccgc aagcaggugg agaucgccca gcgcgagggc gccaaguacg 480
ugagccacgg cgccaccggc aagggcaacg accaggugcg cuucgagcug agcugcuaca 540
gccuggcccc ccagaucaag gugaucgccc ccuggcgcau gcccgaguuc uacaaccgcu 600
ucaagggccg caacgaccug auggaguacg ccaagcagca cggcaucccc aucccccguga 660
cccccaagaa ccccuggagc auggacgaga accugaugca caucagcuac gaggccggca 720
uccuggagaa ccccaagaac caggcccccc ccggccugua caccaagacc caggaccccg 780
ccaaggcccc caacaccccc gacauccugg agaucgaguu caagaagggc gugcccguga 840
aggugaccaa cgugaaggac ggcaccaccc accagaccag ccuggagcug uucauguacc 900
ugaacgaggu ggccggcaag cacggcgugg gccgcaucga caucguggag aaccgcuuca 960
ucggcaugaa gagccgcggc aucuacgaga cccccgccgg caccauccug uaccacgccc 1020
accuggacau cgaggccuuc accauggacc gcgaggugcg caagaucaag cagggccugg 1080
gccugaaguu cgccgagcug guguacaccg gcuucuggca cagccccgag ugcgaguucg 1140
ugcgccacug caucgccaag agccaggagc gcguggaggg caaggugcag gugagcgugc 1200
ugaagggcca gguguacauc cugggccgcg agagcccccu gagccuguac aacgaggagc 1260
uggugagcau gaacgugcag ggcgacuacg agcccaccga cgccaccggc uucaucaaca 1320
ucaacagccu gcgccugaag gaguaccacc gccugcagag caaggugacc gccaagugac 1380
ggguggcauc ccugugaccc cucccccagug ccucuccugg cccuggaagu ugccacucca 1440
gugcccacca gccuuguccu aauaaaauua aguugcauca agcu 1484

<210> 5

<211> 1898
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 对人工序列的描述:合成的多核苷酸
<400> 5

ggacagaucg ccuggagacg ccauccacgc uguuuugacc uccauagaag acaccgggac 60
cgauccagcc uccgcggccg ggaacggugc auuggaacgc ggauuccccg ugccaagagu 120
gacucaccgu ccuugacacg auggaagaug ccaaaaacau uaagaagggc ccagcgccau 180
ucuacccacu cgaagacggg accgccggcg agcagcugca caaagccaug aagcgcuacg 240
cccuggugcc cggcaccauc gccuuuaccg acgcacauau cgagguggac auuaccuacg 300
ccgaguacuu cgagaugagc guucggcugg cagaagcuau gaagcgcuau gggcugaaua 360
caaaccaucg gaucguggug ugcagcgaga auagcuugca guucuucaug cccguguugg 420
gugcccuguu caucggugug gcuguggccc cagcuaacga caucuacaac gagcgcgagc 480
ugcugaacag caugggcauc agccagccca ccgucguauu cgugagcaag aaagggcugc 540
aaaagauccu caacgugcaa aagaagcuac cgaucauaca aaagaucauc aucauggaua 600
gcaagaccga cuaccagggc uuccaaagca uguacaccuu cgugacuucc cauuugccac 660
ccggcuucaa cgaguacgac uucgugcccg agagcuucga ccgggacaaa accaucgccc 720
ugaucaugaa caguaguggc aguaccggau ugcccaaggg cguagcccua ccgcaccgca 780
ccgcuugugu ccgauucagu caugcccgcg accccaucuu cggcaaccag aucaucccg 840
acaccgcuau ccucagcgug gugccauuuc accacggcuu cggcauguuc accacgcugg 900
gcuacuugau cugcggcuuu cgggucgugc ucauguaccg cuucgaggag gagcuauucu 960
ugcgcagcuu gcaagacuau aagauucaau cugcccugcu ggugcccaca cuauuuagcu 1020
ucuucgcuaa gagcacucuc aucgacaagu acgaccuaag caacuugcac gagaucgcca 1080
gcggcggggc gccgcucagc aaggagguag gugaggccgu ggccaaacgc uuccaccuac 1140
caggcauccg ccagggcuac ggccugacag aaacaaccag cgccauucug aucacccccg 1200
aaggggacga caagccuggc gcaguaggca agguggugcc cuucuucgag gcuaaggugg 1260
uggacuugga caccgguaag acacugggug ugaaccagcg cggcgagcug ugcguccgug 1320
gccccaugau caugagcggc uacguuaaca accccgaggc uacaaacgcu cucaucgaca 1380
aggacggcug gcugcacagc ggcgacaucg ccuacuggga cgaggacgag cacuucuuca 1440
ucguggaccg gcugaagagc cugaucaaau acaagggcua ccagguagcc ccagccgaac 1500
uggagagcau ccugcugcaa caccccaaca ucuucgacgc cggggucgcc ggccugcccg 1560
acgacgaugc cggcgagcug cccgccgcag ucgucgugcu ggaacacggu aaaaccauga 1620
ccgagaagga gaucguggac uauguggcca gccagguuac aaccgccaag aagcugcgcg 1680
gugguguugu guucguggac gaggugccua aaggacugac cggcaaguug gacgcccgca 1740
agauccgcga gauucucauu aaggccaaga agggcggcaa gaucgccgug uaacgggugg 1800
caucccugug accccucccc agugccucuc cuggcccugg aaguugccac uccagugccc 1860
accagccuug uccuaauaaa auuaaguugc aucaagcu 1898

<210> 6

<211> 1631
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 对人工序列的描述:合成的多核苷酸
<400> 6

ggacagaucg ccuggagacg ccauccacgc uguuuugacc uccauagaag acaccgggac 60
cgauccagcc uccgcggccg ggaacggugc auuggaacgc ggauuccccg ugccaagagu 120
gacucaccgu ccuugacacg augcagcgcg ugaacaugau cauggcagaa ucaccaggcc 180
ucaucaccau cugccuuuua ggauaucuac ucagugcuga auguacaguu uuucuugauc 240
augaaaacgc caacaaaauu cugaggcgga gaaggaggua uaauucaggu aaauuggaag 300
aguuuguuca agggaaccuu gagagagaau guauggaaga aaaguguagu uuugaagaag 360
cacgagaagu uuuugaaaac acugaaagaa caacugaauu uuggaagcag uauguugaug 420
gagaucagug ugaguccaau ccauguuuaa auggcggcag uugcaaggau gacauuaauu 480
ccuaugaaug uugguguccc uuuggauuug aaggaaagaa cugugaauua gauguaacau 540
guaacauuaa gaauggcaga ugcgagcagu uuuguaaaaa uagugcugau aacaaggugg 600
uuugcuccug uacugaggga uaucgacuug cagaaaacca gaaguccugu gaaccagcag 660
ugccauuucc auguggaaga guuucuguuu cacaaacuuc uaagcucacc cgugcugagg 720
cuguuuuucc ugauguggac uauguaaauu cuacugaagc ugaaaccauu uuggauaaca 780
ucacucaaag cacccaauca uuuaaugacu ucacucgggu uguuggugga gaagaugcca 840
aaccagguca auucccuugg cagguuguuu ugaaugguaa aguugaugca uucuguggag 900
gcucuaucgu uaaugaaaaa uggauuguaa cugcugccca cuguguugaa acugguguua 960
aaauuacagu ugucgcaggu gaacauaaua uugaggagac agaacauaca gagcaaaagc 1020
gaaaugugau ucgaauuauu ccucaccaca acuacaaugc agcuauuaau aaguacaacc 1080
augacauugc ccuucuggaa cuggacgaac ccuuagugcu aaacagcuac guuacaccua 1140
uuugcauugc ugacaaggaa uacacgaaca ucuuccucaa auuuggaucu ggcuauguaa 1200
guggcugggg aagagucuuc cacaaaggga gaucagcuuu aguucuucag uaccuuagag 1260
uuccacuugu ugaccgagcc acaugucuuc gaucuacaaa guucaccauc uauaacaaca 1320
uguucugugc uggcuuccau gaaggaggua gagauucaug ucaaggagau agugggggac 1380
cccauguuac ugaaguggaa gggaccaguu ucuuaacugg aauuauuagc uggggugaag 1440
agugugcaau gaaaggcaaa uauggaauau auaccaaggu aucccgguau gucaacugga 1500
uuaaggaaaa aacaaagcuc acuuaacggg uggcaucccu gugaccccuc cccagugccu 1560
cuccuggccc uggaaguugc cacuccagug cccaccagcc uuguccuaau aaaauuaagu 1620
ugcaucaagc u 1631

<210> 7
<211> 1604
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 对人工序列的描述:合成的多核苷酸

<400> 7

ggacagaucg ccuggagacg ccauccacgc uguuuugacc uccauagaag acaccgggac 60
cgauccagcc uccgcggccg ggaacggugc auuggaacgc ggauuccccg ugccaagagu 120
gacucaccgu ccuugacacg augagcaccg ccgugcugga gaaccccggc cugggccgca 180
agcugagcga cuucggccag gagaccagcu acaucgagga caacugcaac cagaacggcg 240
ccaucagccu gaucuucagc cugaaggagg agguggggcgc ccuggccaag gugcugcgcc 300
uguucgagga gaacgacgug aaccugaccc acaucgagag ccgccccagc cgccugaaga 360
aggacgagua cgaguucuuc acccaccugg acaagcgcag ccugcccgcc cugaccaaca 420
ucaucaagau ccugcgccac gacaucggcg ccaccgugca cgagcugagc cgcgacaaga 480
agaaggacac cgugcccugg uuccccccgca ccauccagga gcuggaccgc uucgccaacc 540
agauccugag cuacggcgcc gagcuggacg ccgaccaccc cggcuucaag gaccccgugu 600
accgcgcccg ccgcaagcag uucgccgaca ucgccuacaa cuaccgccac ggccagccca 660
ucccccgcgu ggaguacaug gaggaggaga agaagaccug gggcaccgug uucaagaccc 720
ugaagagccu guacaagacc cacgccugcu acgaguacaa ccacaucuuc ccccugcugg 780
agaaguacug cggcuuccac gaggacaaca ucccccagcu ggaggacgug agccaguucc 840
ugcagaccug caccggcuuc cgccugcgcc ccguggccgg ccugcugagc agccgcgacu 900
uccugggcgg ccuggccuuc cgcguguucc acugcaccca guacauccgc cacggcagca 960
agcccaugua caccccgag cccgacaucu gccacgagcu gcugggccac gugccccugu 1020
ucagcgaccg cagcuucgcc caguucagcc aggagaucgg ccuggccagc cugggcgccc 1080
ccgacgagua caucgagaag cuggccacca ucuacugguu caccguggag uucggccugu 1140
gcaagcaggg cgacagcauc aaggccuacg gcgccggccu gcugagcagc uucggcgagc 1200
ugcaguacug ccugagcgag aagcccaagc ugcugccccu ggagcuggag aagaccgcca 1260
uccagaacua caccgugacc gaguuccagc cccuguacua cguggccgag agcuucaacg 1320
acgccaagga gaaggugcgc aacuucgccg ccaccauccc ccgccccuuc agcgugcgcu 1380
acgaccccua cacccagcgc aucgaggugc uggacaacac ccagcagcug aagauccugg 1440
ccgacagcau caacagcgag aucggcaucc ugugcagcgc ccugcagaag aucaaguaac 1500
ggguggcauc ccugugaccc cucccccagug ccucuccugg cccuggaagu ugccacucca 1560
gugcccacca gccuuguccu aauaaaauua aguugcauca agcu 1604

<210> 8

<211> 4443

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述:合成的多核苷酸

<400> 8

augcagcggu ccccgcucga aaaggccagu gucgugucca aacucuucuu cucauggacu 60
cggccuaucc uuagaaaggg guaucggcag aggcuugagu ugucugacau cuaccagauc 120
cccucgguag auucggcgga uaaccucucg gagaagcucg aacgggaaug ggaccgcgaa 180

cucgcgucua agaaaaaccc gaagcucauc aacgcacuga gaaggugcuu cuucuggcgg 240
uucauguucu acgguaucuu cuuguaucuc ggggagguca caaaagcagu ccaaccccug 300
uuguuggguc gcauuaucgc cucguacgac cccgauaaca aagaagaacg gagcaucgcg 360
aucuaccucg ggaucggacu guguuugcuu uucaucguca gaacacuuuu guugcaucca 420
gcaaucuucg gccuccauca caucgguaug cagaugcgaa ucgcuauguu uagcuugauc 480
uacaaaaaga cacugaaacu cucgucgcgg guguuggaua agauuuccau cggucaguug 540
gugucccugc uuaguaauaa ccucaacaaa uucgaugagg gacuggcgcu ggcacauuuc 600
guguggauug ccccguugca agucgcccuu uugaugggcc uuauuuggga gcuguugcag 660
gcaucugccu uuuguggccu gggauuucug auuguguugg cauuguuuca ggcugggcuu 720
gggcggauga ugaugaagua ucgcgaccag agagcgggua aaaucucgga aagacucguc 780
aucacuucgg aaaugaucga aaacauccag ucggucaaag ccuauugcug ggaagaagcu 840
auggagaaga ugauugaaaa ccuccgccaa acugagcuga aacugacccg caaggcggcg 900
uauguccggu auuucaauuc gucagcguuc uucuuuuccg gguucuucgu ugucuuucuc 960
ucgguuuugc cuuaugccuu gauuaagggg auuauccucc gcaagauuuu caccacgauu 1020
ucguucugca uuguauugcg cauggcagug acacggcaau uuccgugggc cgugcagaca 1080
ugguaugacu cgcuuggagc gaucaacaaa auccaagacu ucuugcaaaa gcaagaguac 1140
aagacccugg aguacaaucu uacuacuacg gagguaguaa uggagaaugu gacggcuuuu 1200
ugggaagagg guuuuggaga acuguuugag aaagcaaagc agaauaacaa caaccgcaag 1260
accucaaaug gggacgauuc ccuguuuuuc ucgaacuucu cccugcucgg aacacccgug 1320
uugaaggaca ucaauuucaa gauugagagg ggacagcuuc ucgcgguagc gggaagcacu 1380
ggugcgggaa aaacuagccu cuugauggug auuaugggggg agcuugagcc cagcgagggg 1440
aagauuaaac acuccgggcg uaucucauuc uguagccagu uuucauggau caugcccgga 1500
accauuaaag agaacaucau uuucggagua uccuaugaug aguaccgaua cagaucgguc 1560
auuaaggcgu gccaguugga agaggacauu ucuaaguucg ccgagaagga uaacaucguc 1620
uugggagaag gggguauuac auugucggga gggcagcgag cgcggaucag ccucgcgaga 1680
gcgguauaca aagaugcaga uuuguaucug cuugauucac cguuuggaua ccucgacgua 1740
uugacagaaa aagaaaucuu cgagucgugc guguguaaac uuauggcuaa uaagacgaga 1800
auccugguga caucaaaaau ggaacaccuu aagaaggcgg acaagauccu gauccuccac 1860
gaaggaucgu ccuacuuuua cggcacuuuc ucagaguugc aaaacuugca gccggacuuc 1920
ucaagcaaac ucauggggug ugacucauuc gaccaguuca gcgcggaacg gcggaacucg 1980
aucuugacgg aaacgcugca ccgauucucg cuugagggug augccccggu aucguggacc 2040
gagacaaaga agcagucguu uaagcagaca ggagaauuug gugagaaaag aaagaacagu 2100
aucuugaauc cuauuaacuc aauucgcaag uucucaaucg uccagaaaac uccacugcag 2160
augaauggaa uugaagagga uucggacgaa ccccuggagc gcaggcuuag ccucgugccg 2220
gauucagagc aaggggaggc cauucuuccc cggauuucgg ugauuucaac cggaccuaca 2280
cuucaggcga ggcgaaggca auccgugcuc aaccucauga cgcauucggu aaaccagggg 2340
caaaacauuc accgcaaaac gacggccuca acgagaaaag ugucacuugc accccaggcg 2400
aauuugacug aacucgacau cuacagccgu aggcuuucgc aagaaaccgg acuugagauc 2460
agcgaagaaa ucaaugaaga agauuugaaa gaguguuucu uugaugacau ggaaucaauc 2520

ccagcgguga caacguggaa cacauacuug cguuacauca cggugcacaa guccuugauu 2580
uucguccuca ucuggugucu cgugaucuuu cucgcugagg ucgcagcguc acuuguggguc 2640
cucuggcugc uugguaauac gcccuugcaa gacaaaggca auucuacaca cucaagaaac 2700
aauuccuaug ccgugauuau cacuucuaca agcucguauu acguguuuua caucuacgua 2760
ggaguggccg acacucugcu cgcgaugggu uucuuccgag gacucccacu cguucacacg 2820
cuuaucacug ucuccaagau ucuccaccau aagaugcuuc auagcguacu gcaggcuccc 2880
auguccaccu ugaauacgcu caaggcggga gguauuuuga aucgcuucuc aaaagauauu 2940
gcaauuuugg augaccuucu gccccugacg aucuucgacu ucauccaguu guugcugauc 3000
gugauugggg cuauugcagu agucgcuguc cuccagccuu acauuuuugu cgcgaccguu 3060
ccggugaucg uggcguuuau caugcugcgg gccuauuucu ugcagacguc acagcagcuu 3120
aagcaacugg agucugaagg gaggucgccu aucuuuacgc aucuugugac caguuugaag 3180
ggauugugga cguugcgcgc cuuuggcagg cagcccuacu uugaaacacu guuccacaaa 3240
gcgcugaauc uccauacggc aaauugguuu uuguauuuga guacccuccg augguuucag 3300
augcgcauug agaugauuuu ugugaucuuc uuuaucgcgg ugacuuuuau cuccaucuug 3360
accacgggag agggcgaggg acgggucggu auuauccuga cacucgccau gaacauuaug 3420
agcacuuugc agugggcagu gaacagcucg auugaugugg auagccugau gaggcccguu 3480
ucgagggucu uuaaguucau cgacaugccg acggagggaa agcccacaaa aaguacgaaa 3540
cccuauaaga augggcaauu gaguaaggua augaucaucg agaacaguca cgugaagaag 3600
gaugacaucu ggccuagcgg gggucagaug accgugaagg accugacggc aaaauacacc 3660
gagggaggga acgcaauccu ugaaaacauc ucguucagca uuagccccgg ucagcgugug 3720
ggguugcucg ggaggaccgg gucaggaaaa ucgacguugc ugucggccuu cuugagacuu 3780
cugaauacag agggugagau ccagaucgac ggcguuucgu gggauagcau caccuugcag 3840
caguggcgga aagcguuugg aguaaucccc caaaaggucu uuaucuuuag cggaaccuuc 3900
cgaaagaauc ucgauccuua ugaacagugg ucagaucaag agauuuggaa agucgcggac 3960
gagguuggcc uucggagugu aaucgagcag uuuccgggaa aacucgacuu uguccuugua 4020
gaugggggau gcguccuguc gcaugggcac aagcagcuca ugugccuggc gcgauccguc 4080
cucucuaaag cgaaaauucu ucucuuggau gaaccuucgg cccaucugga cccgguaacg 4140
uaucagauca ucagaaggac acuuaagcag gcguuugccg acugcacggu gauucucugu 4200
gagcaucgua ucgaggccau gcucgaaugc cagcaauuuc uugucaucga agagaauaag 4260
guccgccagu acgacuccau ccagaagcug cuuaaugaga gaucauuguu ccggcaggcg 4320
auuucaccau ccgauagggu gaaacuuuuu ccacacagaa auucgucgaa gugcaagucc 4380
aaaccgcaga ucgcggccuu gaaagaagag acugaagaag aaguucaaga cacgcgucuu 4440
uaa 4443

<210> 9
<211> 140
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 对人工序列的描述:合成的多核苷酸

<400> 9

ggacagaucg ccuggagacg ccauccacgc uguuuugacc uccauagaag acaccgggac 60

cgauccagcc uccgcggccg ggaacggugc auuggaacgc ggauuccccg ugccaagagu 120

gacucaccgu ccuugacacg 140

<210> 10

<211> 105

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述:合成的多核苷酸

<400> 10

cggguggcau cccugugacc ccuccccagu gccucuccug gcccuggaag uugccacucc 60

agugcccacc agccuugucc uaauaaaauu aaguugcauc aagcu 105

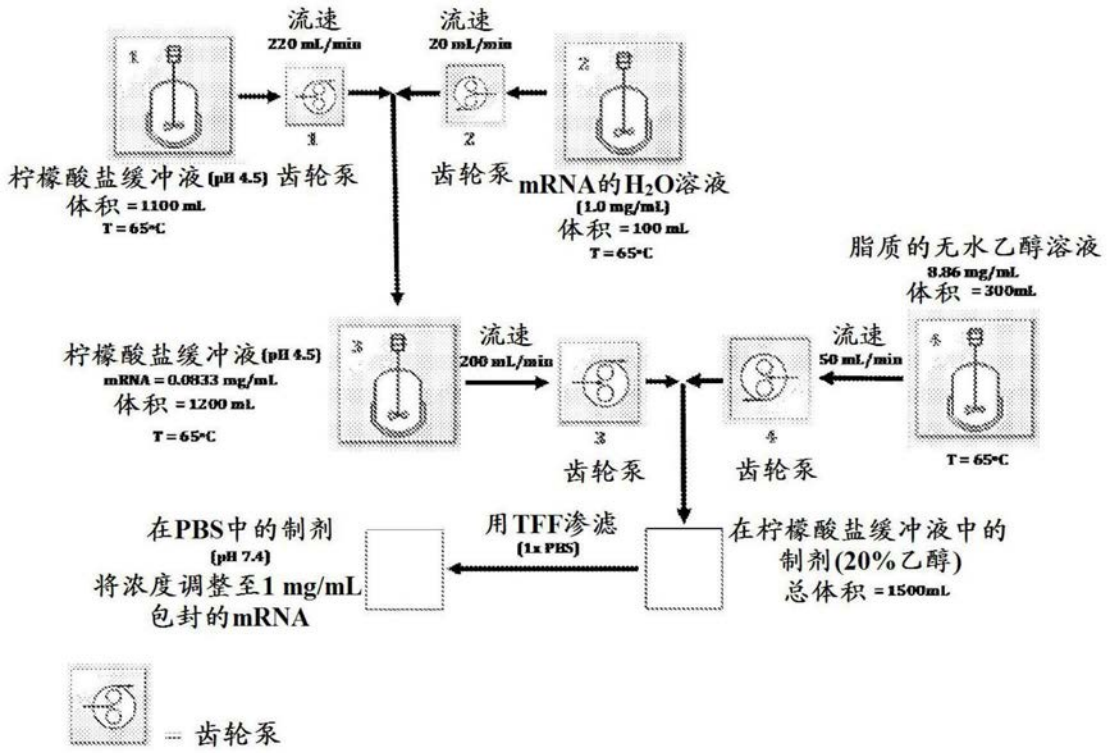

流速
220 mL/min
流速
20 mL/min
柠檬酸盐缓冲液(pH 4.5)
体积 = 1100 mL
T = 65°C
齿轮泵
齿轮泵
mRNA的H2O溶液
(1.0 mg/mL)
体积 = 100 mL
T = 65°C
脂质的无水乙醇溶液
8.86 mg/mL
体积 = 300mL
柠檬酸盐缓冲液(pH 4.5)
mRNA = 0.0833 mg/mL
体积 = 1200 mL
T = 65°C
流速
200 mL/min
流速
50 mL/min
齿轮泵
齿轮泵
T = 65°C
在PBS中的制剂
(pH 7.4)
将浓度调整至1 mg/mL
包封的mRNA
用TFF渗滤
(1x PBS)
在柠檬酸盐缓冲液中的
制剂(20%乙醇)
总体积 = 1500mL
齿轮泵

图1

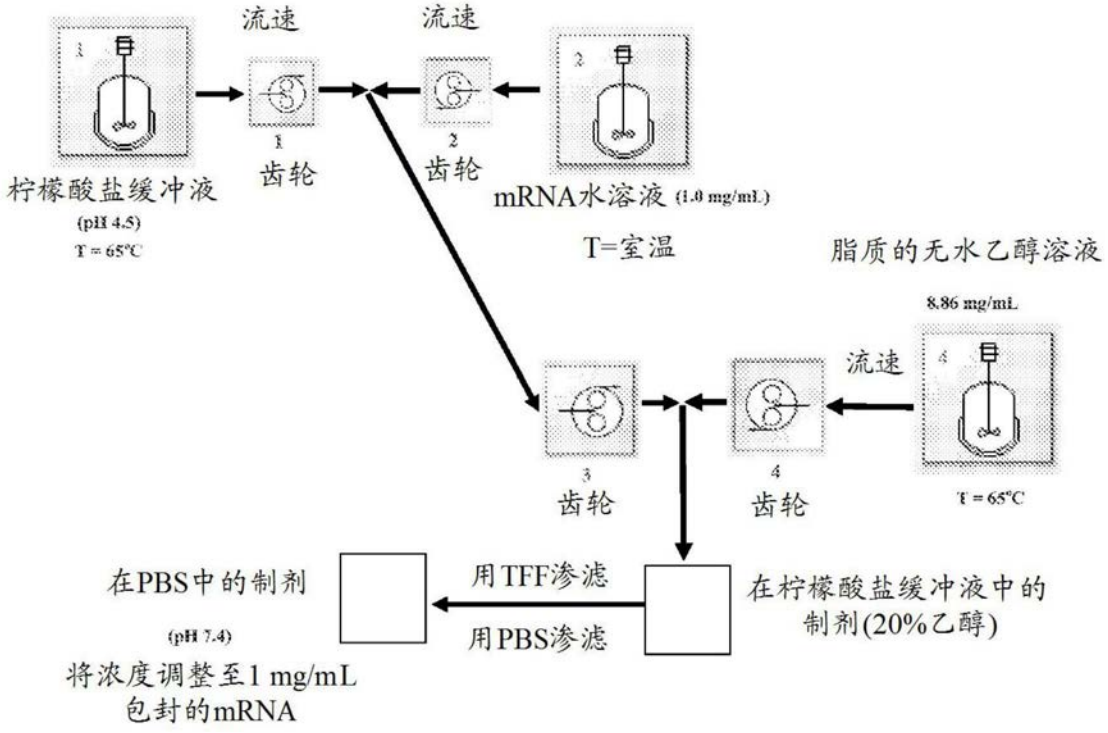

流速
流速
柠檬酸盐缓冲液
(pH 4.5)
T = 65°C
齿轮
齿轮
mRNA水溶液 (1.0 mg/mL)
T=室温
脂质的无水乙醇溶液
8.86 mg/mL
流速
齿轮
齿轮
T = 65°C
在PBS中的制剂
(pH 7.4)
将浓度调整至1 mg/mL
包封的mRNA
用TFF渗滤
用PBS渗滤
在柠檬酸盐缓冲液中的
制剂(20%乙醇)

图2

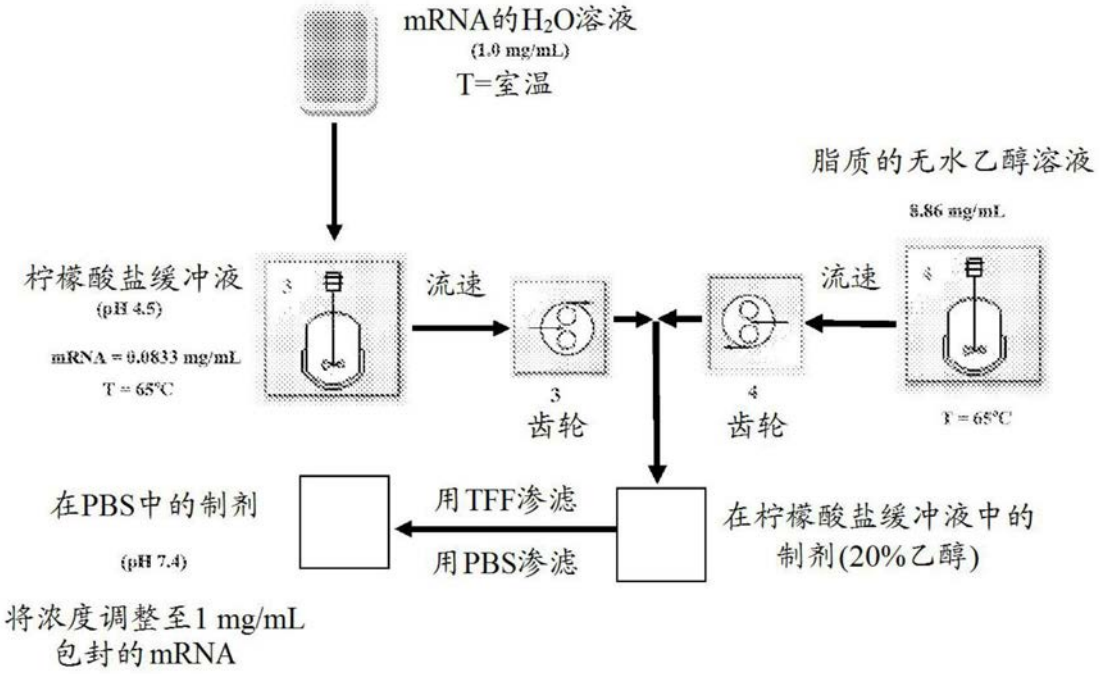

mRNA的H2O溶液
(1.0 mg/mL)
T=室温
脂质的无水乙醇溶液
8.86 mg/mL
柠檬酸盐缓冲液
(pH 4.5)
mRNA = 0.0833 mg/mL
T = 65°C
流速
流速
3
齿轮
4
齿轮
T = 65°C
在PBS中的制剂
(pH 7.4)
用TFF渗滤
用PBS渗滤
在柠檬酸盐缓冲液中的
制剂(20%乙醇)
将浓度调整至1 mg/mL
包封的mRNA

图3

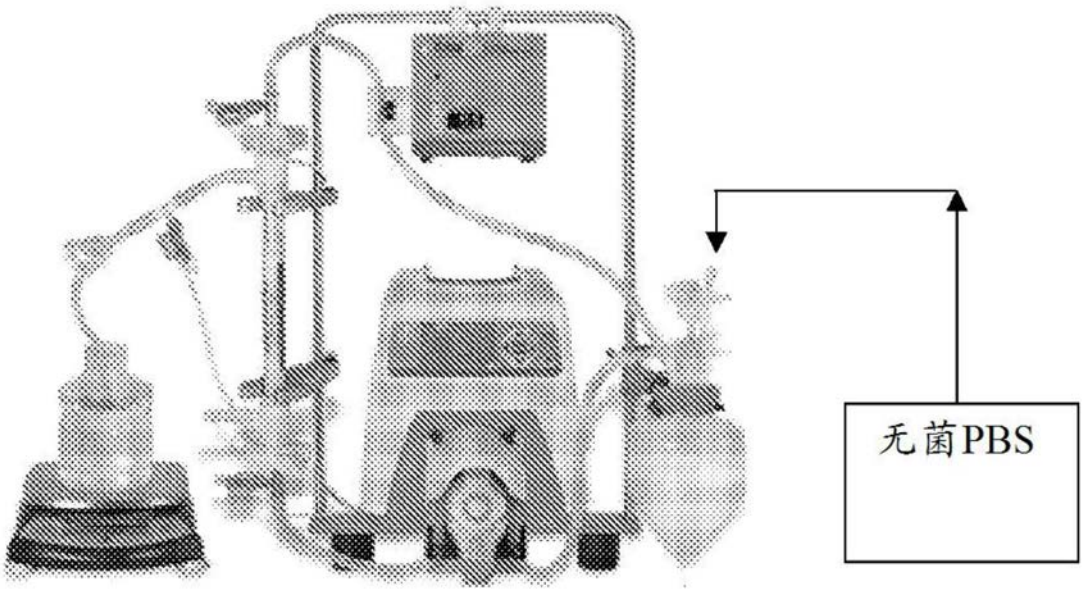

无菌PBS

图4

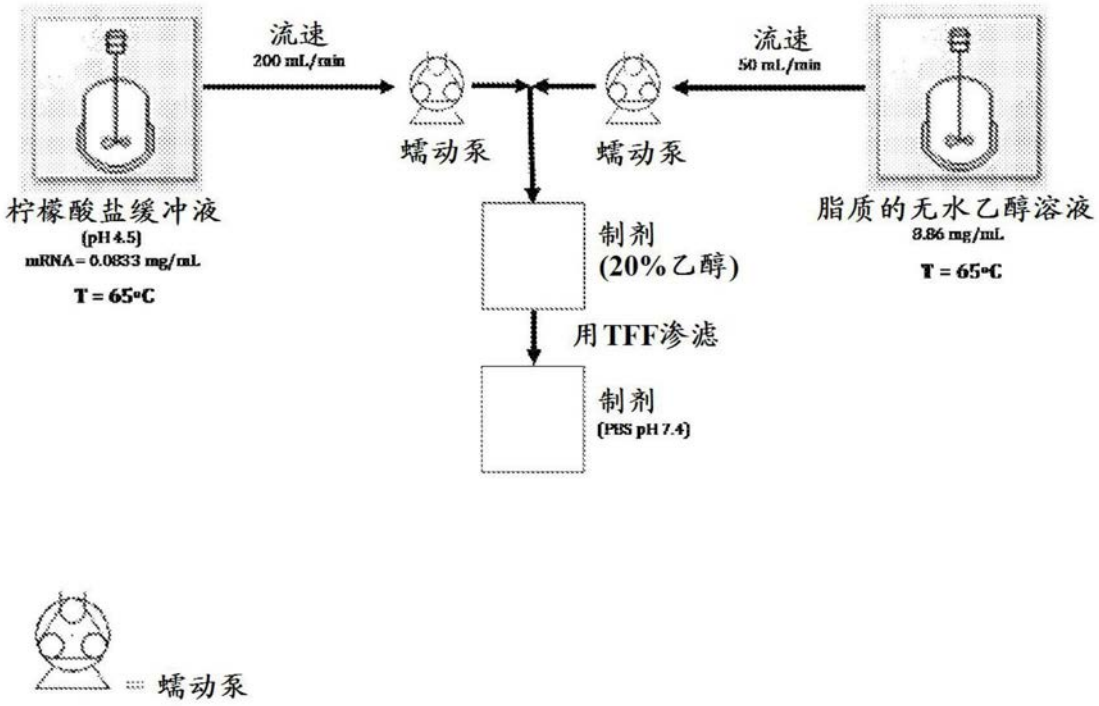

流速
200 mL/min
流速
50 mL/min
蠕动泵
蠕动泵
柠檬酸盐缓冲液
(pH 4.5)
mRNA = 0.0833 mg/mL
T = 65°C
脂质的无水乙醇溶液
8.86 mg/mL
T = 65°C
制剂
(20%乙醇)
用TFF渗滤
制剂
(PBS pH 7.4)
蠕动泵

图5