脂质纳米颗粒及脂质纳米颗粒组合物

技术领域

本申请属于生物技术领域，具体地，涉及一种脂质纳米颗粒及脂质纳米颗粒组合物。

背景技术

生物活性物质如小分子药物、蛋白质和核酸的有效定向递送是一项持续的医学挑战。基因治疗成功的关键在于是否在体内能够安全有效的通过载体将治疗药物传递进入目标细胞中。由于核酸的相对不稳定性和此类物质的低细胞渗透性，使核酸向细胞的递送变得困难。因此，需要开发方法和组合物以促进治疗和/或预防药物如核酸向细胞的传递。基因治疗载体分为病毒载体和非病毒载体。尽管病毒载体作为高效的传递系统以达到目的基因转染及治疗目的，但是病毒载体因其含有免疫原性的病毒蛋白、目的基因装载量有限及价格高昂等问题，使得作为非病毒载体的脂质纳米颗粒(lipidnanoparticles，LNPs)由于其体外稳定性好、体内可被降解、安全可靠等优点而得到广泛关注，并且大量应用于的先天性和后天性遗传缺陷的基因治疗研究中。

含脂质的纳米颗粒或脂质纳米颗粒、脂质体和脂质复合物已被证明是进入细胞和/或细胞内的生物活性物质如小分子药物、蛋白质和核酸的有效运输载体。LNPs 是指由一种或多种脂质组分形成的小囊泡，可以有效压缩和传递各种核酸分子，从 DNA、RNA 到染色体、甚至是细胞；LNPs 因其确定的构建方案以及易于靶向配体的修饰等特点而利于规模化生产。

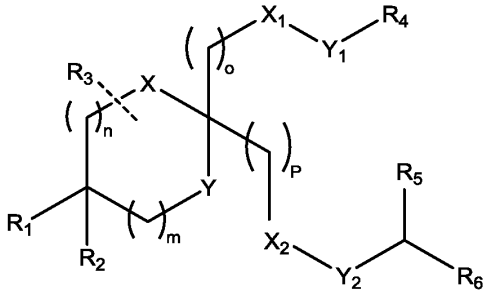
发明内容

本申请的目的在于提供一种脂质纳米颗粒及脂质纳米颗粒组合物。

具体来说，本申请涉及如下方面：

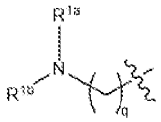
1. 一种脂质纳米颗粒，其包含可电离脂质、磷脂、结构脂质、以及 PEG 脂质，所述可电离脂质、所述磷脂和所述结构脂质之和、以及 PEG 脂质的摩尔比

为(35-65)：(35-65)：(0.5-5)，其中所述可电离脂质为式(I)的化合物，或其盐或其异构体，



(I)

其中，

R_1 为 ，其中，R^{1a}、R^{1b} 独立地选自 H，C1-C6 烷基，R_2、R_3 独立地选自 H 或 C1-C6 烷基；

R_4、R_5、R_6 独立地选自 C1-C14 烷基；

X、Y 独立地选自 O 或 S；

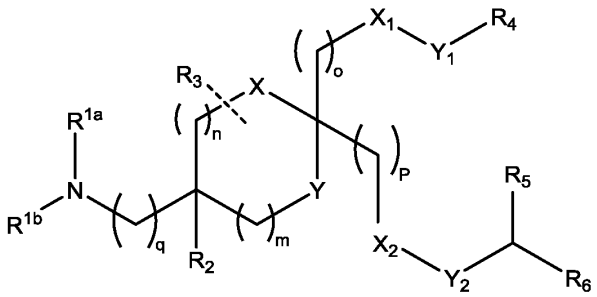
X_1、X_2 独立地选自 C=O 或 O，Y_1、Y_2 独立地选自 C=O 或 O，前提是 X_1 和 Y_1、X_2 和 Y_2 不同时为 C=O 或 O；

m、n 独立地选自 0，1，2，前提是 m、n 不同时为 0；

o、p 独立地选自 1，2，3，4，5，6，7，8，9，10；

q 选自 0，1，2，3，4，5，6。

2. 根据项 1 所述的脂质纳米颗粒，所述式(I)的化合物为式(IA)，



(IA)

其中，q选自0，1，2，3，4。

3. 根据项1或2所述的脂质纳米颗粒，其中R_4为C10-C11烷基。

4. 根据项3所述的脂质纳米颗粒，其中R_4为C10-C11直链烷基。

5. 根据项1-4中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中R_5、R_6为C8烷基。

6. 根据项5所述的脂质纳米颗粒，其中R_5、R_6为C8直链烷基。

7. 根据项1-6中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中o为5或6。

8. 根据项1-7中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中p为7或8。

9. 根据项1-8中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中，

o为5，R_4为C11直链烷基，p为7且R_5、R_6为C8直链烷基或

o为6，R_4为C10直链烷基，p为7且R_5、R_6为C8直链烷基。

10. 根据项1-9中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中X_1、X_2为C=O，Y_1、Y_2为O。

11. 根据项1-9中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中X_1为O，Y_1为C=O，X_2为C=O，Y_2为O。

12. 根据项1-9中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中X_1为C=O，Y_1为O、X_2为O，Y_2为C=O。

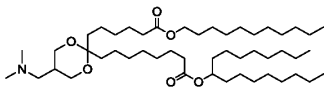
13. 根据项1-9中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中X_1，X_2为O，Y_1、Y_2为C=O。

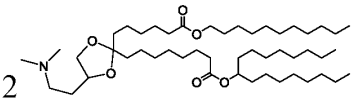
14. 根据项1-9中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中X、Y均为O。

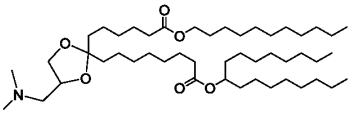
15. 根据项1-9中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中，n为0，m为1，或n为1，m为0，或n为1，m为1。

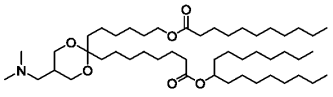
16. 根据项1-9中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中C1-C6烷基选自-CH_3、-CH_2CH_3或-$CH(CH_3)_2$。

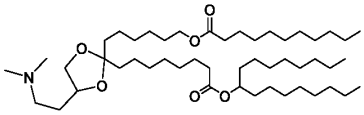
17. 根据项1所述的脂质纳米颗粒，其中，所述式(I)的化合物及其立体异构体选自：

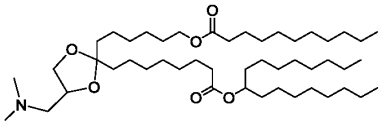
化合物1 ，

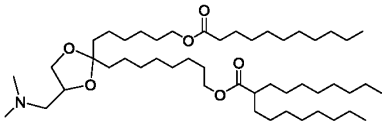
化合物2 ，

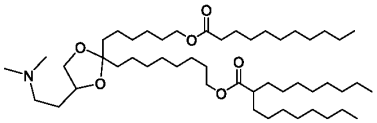
化合物 3 ,

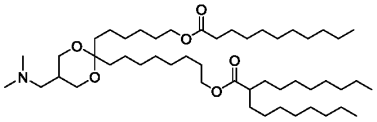
化合物 4 ,

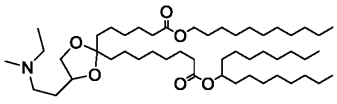
化合物 5 ,

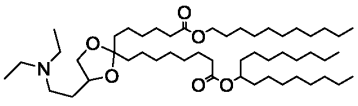
化合物 6 ,

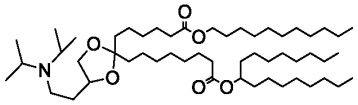
化合物 7 ,

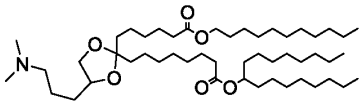
化合物 8 ,

化合物 9 ,

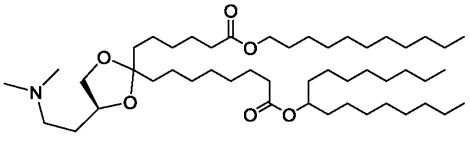
化合物 10 ,

化合物 11 ,

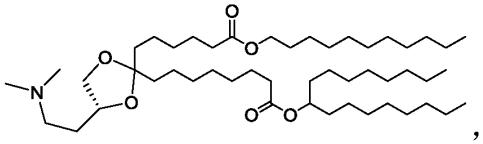
化合物 12 ,

化合物 13 ,

化合物 2A

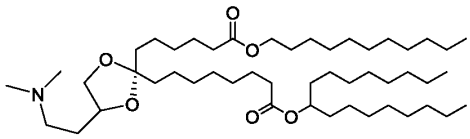
,

化合物 2B

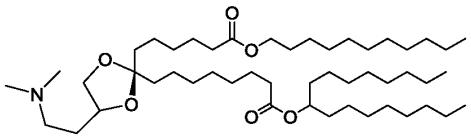
,

化合物 2C

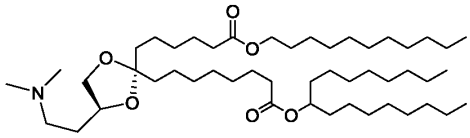
化合物 2D



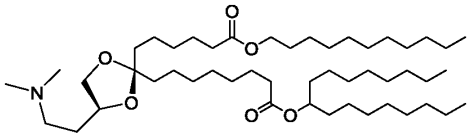
化合物 2E



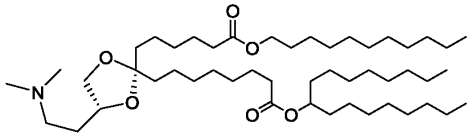
化合物 2F



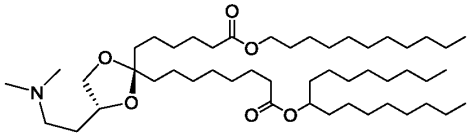
化合物 2G



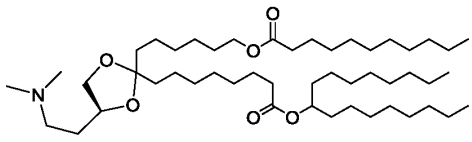
化合物 2H



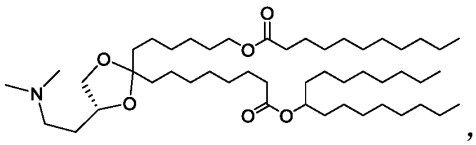
化合物 5A



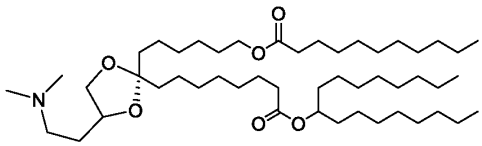
化合物 5B



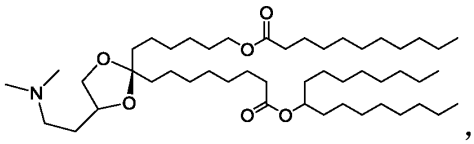
化合物 5C



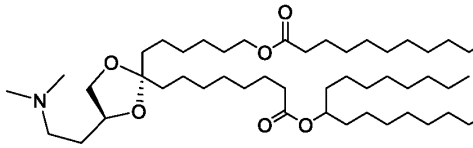
化合物 5D



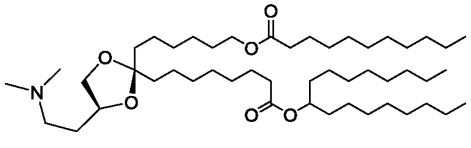
化合物 5E



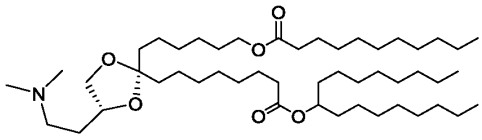
化合物 5F



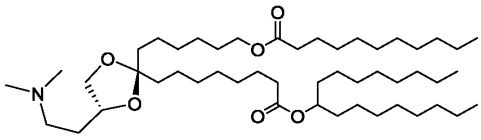
化合物 5G



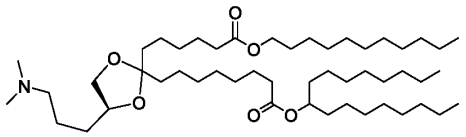
化合物 5H



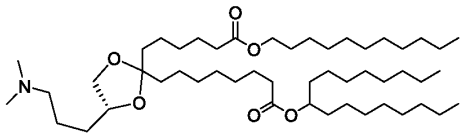
化合物 13A



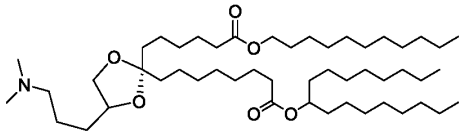
化合物 13B



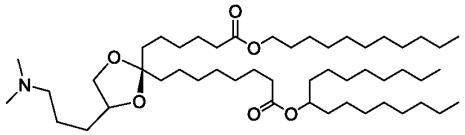
化合物 13C



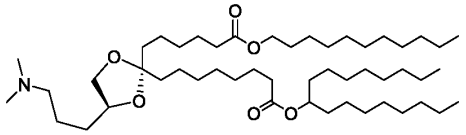
化合物 13D



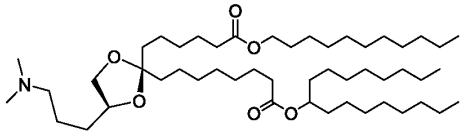
化合物 13E



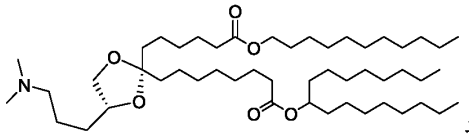
化合物 13F



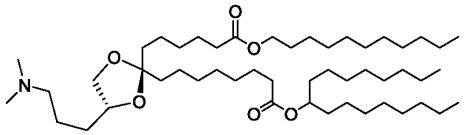
化合物 13G



化合物 13H



或



。

18. 根据项 1-17 中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中所述磷脂选自下述化合物中的一种或两种以上：

二月桂酰基卵磷脂(DLPC)、

二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、

二油酰基卵磷脂(DOPC)、

二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、

二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、

二油酰基磷脂酰胆碱(DUPC)、

棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、

1,2-二-O-十八烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (18:0 Diether PC)、

1-油酰基-2-胆甾醇二甲基琥珀酸-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemsPC)、

l-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、

1,2-二乙烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、

1,2-二芳基酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、

1,2-二油酰-SN-甘油-3-磷酰乙醇胺(DOPE)、

1,2-二氢氧化锡-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0 PE)、

1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二乙烯醇基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二乙烯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二芳基基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二硫代六烯酸-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二醇基-sn-甘油-3-磷酸-(1-甘油)钠盐(DOPG)或鞘磷脂。

19. 根据项 18 所述的脂质纳米颗粒，其中所述磷脂是 DSPC。

20. 根据项 1-19 所述的脂质纳米颗粒，其中所述结构脂质选自胆固醇、粪甾醇、谷甾醇、麦角甾醇、豆甾醇的一种或两种以上。

21. 根据项 20 所述的脂质纳米颗粒，其中所述结构脂质是胆固醇。

22. 根据项 1-21 中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中所述 PEG 脂质选自 PEG 修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG 修饰的磷脂酸、PEG 修饰的神经酰胺、PEG 修饰的二烷基胺、PEG 修饰的二酰基甘油或 PEG 修饰的二烷基甘油中的一种或两种以上。

23. 根据项 22 所述的脂质纳米颗粒，其中所述 PEG 脂质为 DMG-PEG2000。

24. 根据项 1-23 中任一项所述的脂质纳米颗粒，所述可电离脂质、所述磷脂和所述结构脂质之和、以及 PEG 脂质的摩尔比为(40-50)：(35-65)：(1-3)。

25. 根据项 1-23 中任一项所述的脂质纳米颗粒，所述可电离脂质、所述磷脂和所述结构脂质之和、以及 PEG 脂质的摩尔比为(50-65)：(35-65)：(1-3)。

26. 根据项 24 所述的脂质纳米颗粒，所述可电离脂质、所述磷脂、所述结构脂质、以及 PEG 脂质的摩尔比为(40-50)：(5-15)：(30-50)：(1-3)。

27. 根据项 26 所述的脂质纳米颗粒，所述可电离脂质、所述磷脂、所述结构脂质、以及 PEG 脂质的摩尔比为(40-50)：(10-15)：(35-45)：(1.5-2.5)。

28. 根据项 25 所述的脂质纳米颗粒，所述可电离脂质、所述磷脂、所述结构脂质、以及 PEG 脂质的摩尔比为(50-65)：(5-15)：(30-50)：(1-3)。

29. 根据项 28 所述的脂质纳米颗粒，所述可电离脂质、所述磷脂、所述结构脂质、以及 PEG 脂质的摩尔比为(50-65)：(10-15)：(35-45)：(1.5-2.5)。

30. 根据项 1-29 所述的脂质纳米颗粒，其中

可电离脂质的含量为 35mol%-65mol%,

磷脂和所述结构脂质之和的含量为 35mol%-65mol%,

PEG 脂质的含量为 0.5mol%-5mol%，

其中 mol%是基于脂质纳米颗粒组合物中总脂质摩尔数计算。

31. 根据项 1-30 中任一项所述的脂质纳米颗粒，

可电离脂质的含量为 40mol%-50mol%，优选 45 mol%-49 mol%，进一步优选 48 mol%-49 mol%。

32. 根据项 1-30 中任一项所述的脂质纳米颗粒，

可电离脂质的含量为 50mol%-65mol%，优选 51 mol%-55 mol%，进一步优选 52 mol%-53 mol%。

33．根据项 1-32 中任一项所述的脂质纳米颗粒，

磷脂和所述结构脂质之和的含量为 35mol%-65mol%，优选 35mol%-55mol%, 进一步优选 45mol%-50mol%。

34. 根据项 1-33 中任一项所述的脂质纳米颗粒，

磷脂的含量为 5mol%-15mol%，优选 10mol%-15mol%。

35. 根据项 1-34 中任一项所述的脂质纳米颗粒，

结构脂质含量为 30 mol%-50 mol%，优选 35 mol%-45 mol%。

36. 一种脂质纳米颗粒组合物，其包含项 1-35 中任一项所述的脂质纳米颗粒和治疗剂和/或预防剂，其中所述治疗剂和/或预防剂选自疫苗或能够引发免疫反应的化合物、核酸。

37. 根据项 36 所述的脂质纳米颗粒组合物，其中所述核酸为 RNA，所述 RNA 选自 siRNA、aiRNA、miRNA、dsRNA、shRNA 或 mRNA 中的一种或两种以上。

38. 根据项 37 所述的脂质纳米颗粒组合物，其中所述核酸为 mRNA。

39. 根据项 37 所述的脂质纳米颗粒组合物，其中所述 mRNA 的编码序列如 SEQ ID NO：12 所示。

40. 根据项 36-39 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物，其中所述治疗剂和/或预防剂为 mRNA, 所述可电离脂与 mRNA 的 N/P 比为 3.5-5.5。

41. 根据项 36-40 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物，其中所述治疗剂和/或预防剂的包封率≥50%；或者≥80%；或者≥90%。

42. 根据项 36-41 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物，其中所述纳米颗粒的平均粒径为 50nm-150nm,优选 50nm-80nm。

43. 根据项 36-42 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物，其中所述纳米颗粒的分散性指数为 0.001-0.16。

44. 一种药物组合物，其包含项 36-43 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物和药学上可接受的赋形剂或辅助成分。

45. 一种将治疗剂和/或预防剂递送至哺乳动物细胞的方法，所述方法包括向受试者施用项 36-43 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物或项 44 所述的药物组合物，所述施用包括使细胞与所述纳米颗粒组合物或所述药物组合物接触，以将治疗剂和/或预防剂递送至细胞。

46. 根据项 45 所述的方法，其中所述哺乳动物细胞在哺乳动物中。

47. 根据项 45 或 46 所述的方法，其中所述哺乳动物是人类。

48. 根据项 45-47 中任一项所述的方法，其中所述脂质纳米颗粒通过静脉内、肌肉内、皮内、皮下、鼻内或通过吸入给药。

49. 一种在哺乳动物细胞中产生目的多肽的方法，所述方法包括使细胞与项 36-43 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物或项 44 所述的药物组合物接触，以将治疗剂和/或预防剂递送至细胞，其中所述治疗剂和/或预防剂是 mRNA，所述 mRNA 编码目的多肽，由此 mRNA 能够在细胞中翻译以产生目的多肽。

50. 根据项 49 所述的方法，其中所述哺乳动物细胞在哺乳动物中。

51. 根据项 49 或 50 所述的方法，其中所述哺乳动物是人类。

52. 根据项 49-51 中任一项所述的方法，其中所述脂质纳米颗粒组合物或药物组合物通过静脉内、肌肉内、皮内、皮下、鼻内或通过吸入给药。

53. 一种治疗哺乳动物的疾病或病症的方法，所述方法包括向哺乳动物施用治疗有效量的项 36-43 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物或项 44 所述的药物组合物。

54. 根据项 53 所述的方法，其中所述疾病或病症的特征在于功能失调或异常的蛋白质或多肽活性。

55. 根据项 53 或 54 所述的方法，其中所述疾病或病症选自传染病、癌症和增殖性疾病、遗传疾病、自身免疫疾病、糖尿病、神经退行性疾病、心血管疾病、肾血管疾病或代谢疾病。

56. 根据项 53-55 中任一项所述的方法，其中所述哺乳动物是人类。

57. 根据项 53-56 中任一项所述的方法，其中所述脂质纳米颗粒组合物或药

物组合物通过静脉内、肌肉内、皮内、皮下、鼻内或通过吸入给药。

58. 一种将治疗剂和/或预防剂特异性递送至哺乳动物器官的方法，所述方法包括向哺乳动物施用项 36-43 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物或项 44 所述的药物组合物，所述施用包括使哺乳动物器官与纳米颗粒接触，由此将治疗剂和/或预防剂递送至器官。

59. 根据项 58 所述的方法，其中所述哺乳动物是人类。

60. 根据项 58 或 59 所述的方法，其中所述脂质纳米颗粒组合物或药物组合物通过静脉内、肌肉内、皮内、皮下、鼻内或通过吸入给药。

61. 根据项 58-60 中任一项所述的方法，其中所述哺乳动物在接触或给药步骤前 24 小时或更少小时进行预处理。

62. 根据项 58-61 中任一项所述的方法，其中所述哺乳动物在接触或给药步骤前约一小时进行预处理。

63. 根据项 1-35 中任一项所述的脂质纳米颗粒或项 36-43 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物或项 44 所述的药物组合物，其进一步包括二价金属阳离子，二价金属阳离子优选 Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}或 Mn^{2+}。

64. 根据项 63 所述的脂质纳米颗粒或脂质纳米颗粒组合物或药物组合物，所述二价金属阳离子与脂质纳米颗粒组合物中的总脂质的摩尔比为 0.5-400：100，优选 10-50：100 或 30-60：100 或 100-200：100 或 300-400：100。

65. 根据项 63-64 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物，其制备方法包括：

用酸性缓冲液配置一定浓度的二价金属阳离子溶液，再用于稀释 mRNA 得到 mRNA 工作液，mRNA 工作液中 mRNA 终浓度为 100-300 μg/ml，二价金属阳离子溶液终浓度为 0.8-20 mM；mRNA 工作液与混合总脂质乙醇相按照体积比 1-5：1 混合制备 LNP，混合后样品经稀释、浓缩、置换，除去乙醇，再定容并调节 pH 值至 7-8。

66. 根据项 65 所述的方法，所述酸性缓冲液为醋酸缓冲液。

67. 根据项 65-66 所述的方法，所述酸性缓冲液的 pH 约 4.0~6.0，优选约 5.0-5.5。

68. 根据项 65-67 所述的方法，mRNA 工作液中 mRNA 终浓度为 200 μg/ml。

69. 根据项 65-68 所述的方法，mRNA 工作液与混合总脂质乙醇相的体积比为 2.5：1-4：1。

70. 根据项 65-69 所述的方法，mRNA 工作液与混合总脂质乙醇相的混合方式为 T 混流装置混合。

71. 根据项 65-70 所述的方法，mRNA 工作液中二价金属阳离子溶液浓度可选自 0.8mM、1.6mM、3.2mM、6.4mM、8mM、12.8mM、16mM、20mM。

72.根据项 65-71 所述的脂质纳米颗粒组合物的制备方法。

本申请的脂质纳米颗粒组合物可以实现治疗剂/预防剂的包封、递送，将治疗剂/预防剂安全送达靶向位置，实现高表达，发挥治疗剂/预防剂的效果。本申请的脂质纳米颗粒具有平均粒径小、分散性好、包封率高、毒性低等优势。

附图说明

图 1 为实施例 2 中的流式细胞术的分析结果。

图 2-3 为实施例 3 中的 Elispot 分析结果。

具体实施方式

下面结合实施例进一步说明本申请，应当理解，实施例仅用于进一步说明和阐释本申请，并非用于限制本申请。

除非另外定义，本说明书中有关技术的和科学的术语与本领域内的技术人员所通常理解的意思相同。虽然在实验或实际应用中可以应用与此间所述相似或相同的方法和材料，本文还是在下文中对材料和方法做了描述。在相冲突的情况下，以本说明书包括其中定义为准，另外，材料、方法和例子仅供说明，而不具限制性。以下结合具体实施例对本申请作进一步的说明，但不用来限制本申请的范围。

术语和定义

如本文所用，术语“烷基”是指包含一个或多个碳原子(例如，一个，两个，三个，四个，五个，六个，七个，八个，九，十，十一，十二，十三，十四，十五，十六，十七，十八，十九，二十或更多个碳原子)，其任选地被取代。术语“C1-C14 烷基”是指任选取代的包括 1-14 个碳原子的直链或支链的饱和烃。除非另有说明，否则本文描述的烷基是指未取代的和取代的烷基。

除非另有说明，否则烷基可任选地被取代。任选的取代基可以选自但不限于卤素原子(例如，氯，溴，氟或碘基)，羧酸(例如-C(O)OH)，醇(例如羟基，-

OH)，酯(例如-C(O)OR 或-OC(O)R)，醛(例如-C(O)H)，羰基(例如-C(O)R，或由 C=O 表示)，酰基卤(例如-C(O)X，其中 X 是选自溴化物，氟化物，氯化物和碘化物的卤化物)，碳酸盐(例如，-OC(O)OR)，烷氧基(例如，-OR)，乙缩醛，磷酸盐，硫醇(例如-SH)，亚砜(例如-S(O)R)，亚硫酸(例如-S(O)OH)，磺酸(例如-$S(O)_2OH$)，硫醇(例如-C(S)H)，硫酸盐，磺酰基(例如-$S(O)_2$-)，酰胺(例如-$C(O)NR_2$ 或-N(R)C(O)R)，叠氮基(例如-N_3)，硝基(例如-NO_2)，氰基(例如-CN)，异氰基(例如-NC)，酰氧基(例如-OC(O)R)，氨基(例如-NR_2，-NRH 或-NH_2)，氨基甲酰基(例如-$OC(O)NR_2$，-OC(O)NRH 或-$OC(O)NH_2$)，磺酰胺，烷基，烯基和环基(例如碳环基或杂环基)。在前述任一项中，R 是如本文所定义的烷基或烯基。在一些实施方案中，取代基本身可以进一步被例如本文所定义的一个，两个，三个，四个，五个或六个取代基取代。例如，C_{1-6} 烷基可以进一步被本文所述的 1、2、3、4、5 或 6 个取代基取代。

如本文所用，术语“化合物”是指包括所描述的结构的所有异构体和同位素。“同位素”是指具有相同原子序数的原子，但由于原子核中的中子数不同而导致质量数不同。例如，氢的同位素包括氚和氘。此外，本申请的化合物、盐或复合物可通过常规方法与溶剂或水分子结合制备，形成溶胶和水合物。

如本文所用，术语“接触”是指在两个或更多实体之间建立物理连接。例如，使哺乳动物细胞与纳米颗粒组合物接触意味着使哺乳动物细胞和纳米颗粒共享物理连接。在体内和离体中使细胞与外部实体接触的方法在生物学领域是众所周知的。例如，可以通过多种给药途径(例如，静脉内，肌内，皮内和皮下)来使纳米颗粒组合物与置于哺乳动物内的哺乳动物细胞接触，并且可以涉及多种量的纳米颗粒组合物。此外，纳米颗粒组合物可以接触不止一个哺乳动物细胞。

如本文所使用的，术语“特异性递送”或“特异性输送”是指，相比于非靶组织，通过纳米颗粒将更多(例如，至少 1.5 倍、至少 2 倍、至少 3 倍、至少 4 倍、至少 5 倍、至少 6 倍、至少 7 倍、至少 8 倍、至少 9 倍、至少 10 倍)的治疗性和/或预防性药物递送到目标靶组织(如哺乳动物肝脏)。可以通过比较组织中产生的蛋白重量与所述组织的重量，比较组织中的治疗和/或预防量与组织的重量，比较组织中产生的蛋白重量与所述组织中的总蛋白重量，或比较组织中的治疗和/或预防量与所述组织中的总治疗和/或预防量来衡量纳米粒子向特定组织的输送水平。

如本文所用，“包封率”是指成为纳米颗粒组合物一部分的治疗剂和/或预防剂的量，相对于制备纳米颗粒组合物中使用的治疗剂或预防剂总量。例如，如果在最初提供给组合物的总共 100mg 治疗和/或预防剂中，将 97mg 治疗和/或者预防剂包封在纳米颗粒组合物中，则包封率可以为 97%。如本文所用，“包封”可以指完全，实质或部分的包封，封闭，包围或包封。

如本文所用，核酸序列的“表达”是指 mRNA 翻译成多肽或蛋白质和/或多肽或蛋白质的翻译后修饰。

如本文所用，术语“体外”是指在人工环境中发生的事件，例如在试管或反应容器中，在细胞培养物中，在培养皿中等，而不是在生物体内发生的事件。(例如，动物，植物或微生物)。

如本文所用，术语“体内”是指在生物体(例如动物，植物或微生物或其细胞或组织)内发生的事件。

如本文所用，术语“离体”是指在生物体(例如动物，植物或微生物或其细胞或组织)外部发生的事件。离体事件可以在与自然(例如，体内)环境最小程度改变的环境中发生。

如本文所用，术语“异构体”是指化合物的任何几何异构体，互变异构体，两性离子，立体异构体，对映异构体或非对映异构体。化合物可包含一个或多个手性中心和/或双键，因此可以立体异构体的形式存在，例如双键异构体(即几何 E/Z 异构体)或非对映异构体(例如对映异构体(即(+)或(-))或顺反异构体)。本申请涵盖本文所述化合物的任何和所有异构体。化合物的对映异构体和立体异构体混合物以及将其拆分成其组分对映异构体或立体异构体的方法是众所周知的。

如本文所用，“脂质组分”是包含一种或多种脂质的纳米颗粒组合物的组分。例如，脂质组分可以包括一种或多种阳离子/可电离的脂质，PEG 化的脂质，结构脂质或其他脂质，例如磷脂。

如本文所用，“可电离脂质”或“阳离子脂质”指在选定的 pH 值，诸如生理 pH 值下携带净正电荷的许多脂质物种中的任何一种。

如本文所用，“PEG 脂质”或“PEG 化脂质”是指包含聚乙二醇成分的脂质，例如可以是 PEG 缀合的脂质或 PEG 修饰的脂质或 PEG 改性的脂质。

如本文所用，“磷脂”是包括磷酸酯部分和一个或多个碳链，例如不饱和

脂肪酸链的脂质。磷脂可包含一个或多个多个(例如双或三键)键(例如一个或多个不饱和键)。特定的磷脂可以促进与膜的融合。例如，阳离子磷脂可以与膜(例如细胞膜或细胞内膜)的一种或多种带负电荷的磷脂相互作用。磷脂与膜的融合可允许含脂质组合物的一种或多种元素穿过膜，从而允许例如将一种或多种元素递送至细胞。

如本文所用，“脂质纳米颗粒”是包含一种或多种脂质的组合物，包括可电离脂质、磷脂、结构脂质、以及 PEG 脂质。脂质纳米颗粒的粒径通常在微米、纳米或更小的数量级。

如本文所用，“脂质纳米颗粒组合物”包括脂质纳米颗粒(LNP)和治疗剂和/或预防剂，治疗剂和/或预防剂被脂质纳米颗粒(LNP)包封，其中所述治疗剂和/或预防剂选自疫苗或能够引发免疫反应的化合物、核酸或蛋白。

如本文所用，“施用方法”可包括静脉内，肌内，皮内，皮下或将组合物递送至受试者的其他方法。可以选择任何一种施用方法以靶向递送(例如特异性递送)到身体的特定区域或系统。

如本文所用，“患者”是指可能寻求或需要治疗，需要治疗，正在接受治疗，将要接受治疗的受试者，或受过训练的专业人员针对特定疾病进行护理的受试者。术语“药学上可接受的”在本文中用于指在合理的医学判断范围内适用于与人和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症的那些化合物、材料、组合物和/或剂型，与合理的收益/风险比率相称。

如本文所用，短语“药学上可接受的赋形剂”是指除本文所述的化合物以外的任何成分(例如，能够悬浮，络合或溶解活性化合物的媒介物)，并且具有基本上对患者无毒无炎。赋形剂可包括，例如：抗粘剂，抗氧化剂，粘合剂，涂料，抗压助剂，崩解剂，染料(着色剂)，润肤剂，乳化剂，填充剂(稀释剂)，成膜剂或涂料，调味剂，香料，助流剂(流动增强剂)，润滑剂，防腐剂，印刷油墨，吸附剂，悬浮剂或分散剂，甜味剂和水合水。示例性的赋形剂包括但不限于：丁基羟基甲苯(BHT)，碳酸钙，磷酸钙(二元酸)，硬脂酸钙，交联羧甲基纤维素，交联的聚乙烯吡咯烷酮，柠檬酸，交聚维酮，半胱氨酸，乙基纤维素，明胶，羟丙基纤维素，羟丙基 甲基纤维素，乳糖，硬脂酸镁，麦芽糖醇，甘露醇，蛋氨酸，甲基纤维素，对羟基苯甲酸甲酯，微晶纤维素，聚乙二醇，聚乙烯吡咯烷酮，聚维酮，预胶化淀粉，对羟基苯甲酸丙酯，棕榈酸视黄酯，

虫胶，二氧化硅，羧甲基纤维素钠，柠檬酸钠，淀粉羟乙酸钠，山梨糖醇，淀粉(玉米)，硬脂酸，蔗糖，滑石粉，二氧化钛，维生素 A，维生素 E(α-生育酚)，维生素 C，木糖醇和本文公开的其他物质。

在本申请中，为了方便起见，所述化合物的结构式表示某些异构体，但是本申请包括所有异构体，例如几何异构体，基于不对称碳的旋光异构体，立体异构体，互变异构体等等。另外，本申请所述化合物的结构式表示的化合物可能存在晶体多态性。注意，任何晶型，晶型混合物或其酸酐或水合物都包括在本申请的范围内。

术语“晶体多晶型物”,“多晶型物”或“晶型”是指其中化合物(或其盐或溶剂化物)可以以不同的晶体堆积排列结晶的晶体结构，所有这些晶体具有相同的元素组成。不同的晶体形式通常具有不同的 X 射线衍射图，红外光谱，熔点，密度硬度，晶体形状，光学和电学性质，稳定性和溶解性。重结晶溶剂，结晶速率，储存温度和其他因素可能导致一种晶型占主导地位。化合物的晶体多晶型物可以通过在不同条件下结晶来制备。

本申请的纳米颗粒组合物还可包含一种或多种化合物的盐。盐可以是药学上可接受的盐。如本文所用，“药学上可接受的盐”是指所公开化合物的衍生物，其中通过将现有的酸或碱部分转化为其盐形式(例如，通过使游离碱基与合适的有机酸反应)来改变母体化合物。药学上可接受的盐的实例包括但不限于碱性残基如胺的无机或有机酸盐；酸性残基如羧酸的碱或有机盐等等。代表性的酸加成盐包括乙酸盐，己二酸盐，藻酸盐，抗坏血酸盐，天冬氨酸盐，苯磺酸盐，苯甲酸盐，硫酸氢盐，硼酸盐，丁酸盐，樟脑酸盐，樟脑磺酸盐，柠檬酸盐，环戊烷丙酸盐，二葡糖酸盐，十二烷基硫酸盐，乙磺酸盐，富马酸盐，葡庚糖酸盐，葡糖庚糖酸盐 ，氢溴酸盐，盐酸盐，氢碘酸盐，2-羟基-乙磺酸盐，乳酸盐，乳酸盐，月桂酸盐，月桂基硫酸盐，苹果酸盐，马来酸盐，丙二酸盐，甲磺酸盐，2-萘磺酸盐，烟酸盐，硝酸盐，油酸盐，草酸盐，棕榈酸盐，棕榈酸盐，果胶酸盐， 3-苯基丙酸酯，磷酸盐，苦味酸酯，新戊酸酯，丙酸酯，硬脂酸酯，琥珀酸酯，硫酸酯，酒石酸酯，硫氰酸酯，甲苯磺酸酯，十一酸酯，戊酸酯盐等。

代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠，锂，钾，钙，镁等，以及无毒铵，季铵和胺阳离子，包括但不限于铵，四甲基铵，四乙基铵，甲胺，二甲胺，三

甲胺，三乙胺，乙胺等。本申请的药学上可接受的盐包括例如由无毒的无机或有机酸形成的母体化合物的常规无毒的盐。本申请的药学上可接受的盐可以通过常规化学方法从含有碱性或酸性部分的母体化合物合成。通常，这些盐可以通过将这些化合物的游离酸或碱形式与化学计算量的合适的碱或酸在水中或在有机溶剂中或在两者的混合物中反应来制备。通常，非水介质如醚，乙酸乙酯，乙醇，异丙醇或乙腈是优选的。

如本文所用，“多分散指数”是描述系统粒度分布均匀性的比率。较小的值，例如小于 0.3，表示窄的粒度分布。

如本文所用，术语“多肽”或“目的多肽”是指通常通过肽键连接的氨基酸残基的聚合物，其可以天然(例如，分离或纯化)或合成产生。

如本文所用，“RNA”是指可以天然或非天然存在的核糖核酸。例如，RNA 可以包括修饰的和/或非天然存在的组分，例如一个或多个核碱基，核苷，核苷酸或接头。RNA 可以包括帽结构，链终止核苷，茎环，polyA 序列和/或聚腺苷酸化信号。RNA 可以具有编码目的多肽的核苷酸序列。例如，RNA 可以是信使 RNA(mRNA)。编码特定多肽的 mRNA 的翻译，例如，哺乳动物细胞内部的 mRNA 的体内翻译，可以产生编码的多肽。RNA 可以选自非限制组，包括小干扰 RNA(siRNA)，不对称干扰 RNA(aiRNA)，微 RNA(miRNA)，双链 RNA(dsRNA)，小发夹 RNA(shRNA)，mRNA 和其混合物。

如本文所用，“单一单位剂量”是以一剂/一次/单途径/单接触点即单次施用的任何治疗剂的剂量。

如本文所用，“分割剂量”是将单一单位剂量或每日总剂量分成两个或多个剂量。

如本文所用，“每日总剂量”是 24 小时内给定或规定的量。它可以单一单位剂量给药。

如本文所用，在纳米颗粒组合物的上下文中，“粒径”或“平均粒径”是指纳米颗粒组合物的平均直径。

如本文所用，术语“受试者”或“患者”是指可以向其施用根据本申请的组合物的任何生物，例如用于实验，诊断，预防和/或治疗目的。典型的受试者包括动物(例如哺乳动物，例如小鼠，大鼠，兔子，非人灵长类动物和人)和/或植物。

如本文所用，“靶向细胞”是指任何一个或多个目的细胞。可以在体外，体内，原位或生物体的组织或器官中发现细胞。该生物可以是动物，优选为哺乳动物，更优选为人，最优选为患者。

如本文所用，“靶组织”是指任何一种或多种目标组织类型，其中治疗性和/或预防性的递送将导致期望的生物学和/或药理作用。目标组织的实例包括特定的组织，器官及其系统或组。在特定应用中，靶组织可以是肾脏(例如，冠状内或股骨内)或血管(例如，通过肿瘤内注射)中的肾脏，肺，脾，血管内皮。“非靶组织”是指任何一种或多种组织类型，其中编码的蛋白质的表达不导致期望的生物学和/或药理作用。在特定的应用中，非靶组织可以包括肝脏和脾脏。

术语“治疗剂”或“预防剂”是指给受试者服用时具有治疗、诊断和/或预防作用和/或引起所需的生物和/或药理作用的任何药剂。治疗剂也称为“活性剂”或“活性组分”。此类物质包括但不限于细胞毒素、放射性离子、化疗剂、小分子药物、蛋白质和核酸。

如本文所用，术语“治疗有效量”是指当以下情况时足够的待递送试剂(例如，核酸，药物，组合物，治疗剂，诊断剂，预防剂等)的量：给予患有或易受感染，疾病，病症和/或病状的受试者，以治疗，改善其症状，诊断，预防和/或延迟感染，疾病，病症和/或病状的发作。

如本文所用，“转染”是指将物种(例如，RNA)引入细胞。转染可以例如在体外，离体或体内进行。

如本文所用，术语“治疗”是指部分或完全缓解，缓解，改善，缓解，延迟其发作，抑制其进展，降低其严重程度和/或降低其一种或多种症状或特征的发生率。特定的感染，疾病，病症和/或状况。例如，“治疗”癌症可以指抑制肿瘤的存活，生长和/或扩散。为了降低风险，可以对不表现出疾病，病症和/或病状的受试者和/或对仅表现出疾病，病症和/或病状的早期迹象的受试者进行治疗。与疾病，病症和/或病状相关的病理发展状况。

如本文所用，“mol%”是基于脂质纳米颗粒中总脂质摩尔数计算，即脂质纳米颗粒中的脂质成分占所述脂质纳米颗粒中存在的总脂质的摩尔百分比。

如本文所用，总脂质是指脂质纳米颗粒中所有的脂质，具体地，总脂质可以由可电离脂质、磷脂、结构脂质、以及 PEG 脂质组成。

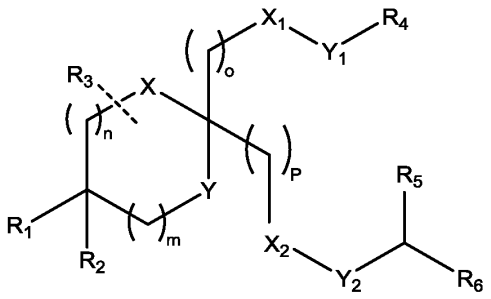
如本文所用，“编码序列”可用以指代成熟 mRNA 中可以被翻译为蛋白质

的核糖核苷酸序列，亦可以指代作为模板用以转录所述核糖核苷酸(RNA)序列的脱氧核糖核苷酸(DNA)序列的互补序列。此外，本申请的“编码序列”还可以进一步包含编码功能性核酸，例如 miRNA，shRNA，dsRNA 等的多核苷酸序列。

如本文所使用，“N:P 比率”或“N/P 比”是脂质中可离子化氮原子与 RNA 中磷酸酯基的摩尔比。

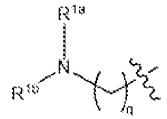
本发明提供一种脂质纳米颗粒，其包含可电离脂质、磷脂、结构脂质、以及 PEG 脂质。

本文中可电离脂质可以为式(I)的化合物，或其盐或其异构体，



(I)

其中，

R_1 为 ，其中，R^{1a}、R^{1b} 独立地选自 H，C1-C6 烷基，R_2、R_3 独立地选自 H 或 C1-C6 烷基；

R_4、R_5、R_6 独立地选自 C1-C14 烷基；

X、Y 独立地选自 O 或 S；

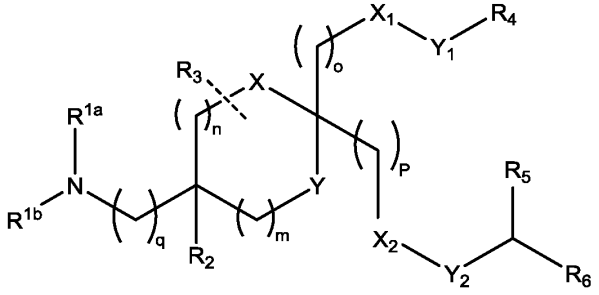
X_1、X_2 独立地选自 C=O 或 O，Y_1、Y_2 独立地选自 C=O 或 O，前提是 X_1 和 Y_1、X_2 和 Y_2 不同时为 C=O 或 O；

m、n 独立地选自 0，1，2，前提是 m、n 不同时为 0；

o、p 独立地选自 1，2，3，4，5，6，7，8，9，10；

q 选自 0，1，2，3，4，5，6。

在一个具体的实施方式中，所述式(I)的化合物为式(IA)，



(IA)

其中，q选自0，1，2，3，4。

在一个具体的实施方式中，上述式(I)或(IA)中，R_4为C10-C11烷基，例如，R_4为C10烷基或C11烷基。在一个具体的实施方式中，上述式(I)或(IA)中，R4为C10-C11直链烷基，例如，R4为C10直链烷基或C11直链烷基。

在一个具体的实施方式中，上述式(I)或(IA)中，R_5、R_6为C8烷基。在一个具体的实施方式中，上述式(I)或(IA)中，R_5、R_6为C8直链烷基。

在一个具体的实施方式中，上述式(I)或(IA)中，o为5或6。

在一个具体的实施方式中，上述式(I)或(IA)中，p为7或8。

在一个具体的实施方式中，上述式(I)或(IA)中，o为5，R_4为C11直链烷基，p为7且R_5、R_6为C8直链烷基。

在一个具体的实施方式中，上述式(I)或(IA)中，o为6，R_4为C10直链烷基，p为7且R_5、R_6为C8直链烷基。

在一个具体的实施方式中，上述式(I)或(IA)中，X_1、X_2为C=O，Y_1、Y_2为O。

在一个具体的实施方式中，上述式(I)或(IA)中，X_1为O，Y_1为C=O，X_2为C=O，Y_2为O。

在一个具体的实施方式中，上述式(I)或(IA)中，X_1为C=O，Y_1为O、X_2为O，Y_2为C=O。

在一个具体的实施方式中，上述式(I)或(IA)中，X_1，X_2为O，Y_1、Y_2为C=O。

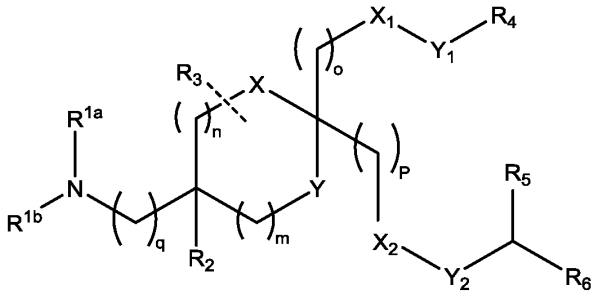
在一个具体的实施方式中，上述式(I)或(IA)中，X、Y均为O。

在一个具体的实施方式中，上述式(I)或(IA)中，n为0，m为1。在一个具

体的实施方式中，上述式(I)或(IA)中，n 为 1，m 为 0。在一个具体的实施方式中，上述式(I)或(IA)中，n 为 1，m 为 1。

在一个具体的实施方式中，R^{1a}、R^{1b}选自-CH_3、-CH_2CH_3或-$CH(CH_3)_2$。

在一个具体的实施方式中，所述式(I)的化合物为式(IA)，



(IA)

其中，q 选自 2，3，R^{1a}、R^{1b}选自-CH_3，

R_2为 H，R_3为 H，

n 为 1，m 为 0，

X、Y 均为 O，

o 为 5 或 6，

p 为 7，

X_1、X_2为 C=O，Y_1、Y_2为 O 或 X_1为 O，Y_1为 C=O，X_2为 C=O，Y_2为 O，

R_4为 C10 直链烷基或 C11 直链烷基，

R_5、R_6为 C8 直链烷基。

在一个具体的实施方式中，C1-C6 烷基选自-CH_3、-CH_2CH_3或-$CH(CH_3)_2$。

在本申请的脂质纳米颗粒及脂质纳米颗粒组合物中，可电离脂质还可以包括，例如，以下的一种或多种：1，2-二亚油基氧基-N，N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1，2-二亚麻基氧基-N，N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、2，2-二亚油基-4-(2-二甲基氨乙基)-[1，3]-二氧环戊烷(DLin-K-C2-DMA；“XTC2”)、2，2-二亚油基-4-(3-二甲基氨基丙基)-[1，3]-二氧环戊烷(DLin-K-C3-DMA)、2，2-二亚油基-4-(4-二甲基氨基丁基)-[1，3]-二氧环戊烷(DLin-K-C4-DMA)、2，2-二亚油基-5-二甲基氨基甲基-[1，3]-二噁烷(DLin-K6-DMA)、2，2-二亚油基-4-N-甲基 pepiazino-[1，3]-二氧环戊烷(DLin-K-MPZ)、2，2-二亚油基-4-二甲基氨基

甲基-[1，3]-二氧环戊烷(DLin-K-DMA)、1，2-二亚油基氨甲酰氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1，2-二亚油氧基-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1，2-二亚油氧基-3-吗啉代丙烷(DLin-MA)、1，2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1，2-二亚油基硫代-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚油基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、氯化 1，2-二亚油基氧基-3-三甲基氨基丙烷盐(DLin-TMA.Cl)、氯化 1，2-二亚油酰基-3-三甲基氨基丙烷盐(DLin-TAP.Cl)、1，2-二亚油基氧基-3-(N-甲基哌嗪并)丙烷(DLin-MPZ)、3-(N，N-二亚油基氨基)-1，2-丙二醇(DLinAP)、3-(N，N-二油基氨基)-1，2-丙二醇(DOAP)、1，2-二亚油基氧代-3-(2-N，N-二甲基氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、N，N-二油基-N，N-二甲基氯化铵(DODAC)、1，2-二油基氧基-N，N-二甲基氨基丙烷(DODMA)、1，2-二硬脂基氧基-N，N-二甲基氨基丙烷(DSDMA)、N-(1-(2，3-二油基氧基)丙基)-N，N，N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N，N-二硬脂基-N，N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1-(2，3-二油酰氧基)丙基)-N，N，N-三甲基氯化铵(DOTAP)、3-(N-(N’，N’-二甲基氨基乙烷)-氨甲酰基)胆固醇(DC-Chol)、N-(1，2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N，N-二甲基-N-羧乙基溴化铵(DMRIE)、2，3-二油基氧基-N-[2(精胺-甲酰氨基)乙基]-N，N-二甲基-1-丙铵三氟乙酸酯(DOSPA)、双十八基氨基甘氨酰基精胺(DOGS)、3-二甲基氨基-2-(胆甾-5-烯-3-β-氧基丁-4-氧基)-1-(顺，顺式-9，12-十八二烯氧基)丙烷(CLinDMA)、2-[5’-(胆甾-5-烯-3-β-氧基)-3’-氧杂戊氧基)-3-二甲基-1-(顺，顺式-9’，1-2’-十八二烯氧基)丙烷(CpLinDMA)、N，N-二甲基-3，4-二油基氧基苄胺(DMOBA)、1，2-N，N’-二油基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(DOcarbDAP)、1，2-N，N’-二亚油基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLincarbDAP)、MC3、SM-102、ALC-0315。

在本申请中，所述磷脂可以选自下述化合物中的一种或两种以上：

二月桂酰基卵磷脂(DLPC)、

二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、

二油酰基卵磷脂(DOPC)、

二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、

二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、

二油酰基磷脂酰胆碱(DUPC)、

棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、

1,2-二-O-十八烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (18:0 Diether PC)、

1-油酰基-2-胆甾醇二甲基琥珀酸-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemsPC)、

l-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、

1,2-二乙烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、

1,2-二芳基酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、

1,2-二油酰-SN-甘油-3-磷酰乙醇胺(DOPE)、

1,2-二氢氧化锡-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0 PE)、

1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二乙烯醇基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二乙烯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二芳基基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二硫代六烯酸-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二醇基-sn-甘油-3-磷酸-(1-甘油)钠盐(DOPG)或鞘磷脂。

在一个具体的实施方式中，所述磷脂是 DSPC。

在一个具体的实施方式中，所述磷脂是 DOPE。

在一个具体的实施方式中，所述磷脂是 DSPC 和 DOPE 的组合。

在本申请中，结构脂质可以选自由但不限于以下组成的组：胆固醇、粪固醇、谷固醇、麦角固醇、菜油固醇、豆固醇、菜籽固醇、番茄碱(tomatidine)、番茄素(tomatine)、熊果酸、α-生育酚以及其混合物。在一些实施方案中，结构性脂质是胆固醇。在一些实施方案中，结构性脂质包括胆固醇和皮质类固醇(如泼尼松龙(prednisolone)、地塞米松、泼尼松(prednisone)和氢化可的松(hydrocortisone))或其组合。

在本申请中，所述 PEG 脂质可替代地称为聚乙二醇化脂质。PEG 脂质是用聚乙二醇修饰的脂质。PEG 脂质可以选自由 PEG-修饰的磷脂酰乙醇胺，PEG-修饰的磷脂酸，PEG-修饰的神经酰胺，PEG-修饰的二烷基胺，PEG-修饰的二酰基甘油，PEG-修饰的二烷基甘油及其混合物组成的非限制性组。例如，PEG 脂质可以是 PEG-c-DOMG，PEG-DMG，PEG-DLPE，PEG-DMPE，PEG-DPPC 或 PEG-DSPE 脂质。

在一个具体的实施方式中，所述 PEG 脂质为 DMG-PEG2000。

在本申请的一些实施方案中，脂质纳米颗粒中，所述可电离脂质的含量为35mol%-65mol%，例如可以为 35mol%、35.5mol%、36mol%、36.5mol%、37mol%、37.5mol%、38mol%、38.5mol%、39mol%、39.5mol%、40mol%、40.5mol%、41mol%、41.5mol%、42mol%、42.5mol%、43mol%、43.5mol%、44mol%、44.5mol%、45mol%、45.5mol%、46mol%、46.5mol%、47mol%、47.5mol%、48mol%、48.1mol%、48.2mol%、48.3mol%、48.4mol%、48.5mol%、48.6mol%、48.7mol%、48.8mol%、48.9mol%、49mol%、49.1mol%、49.2mol%、49.3mol%、49.4mol%、49.5mol%、49.6mol%、49.7mol%、49.8mol%、49.9mol%、50mol%、50.5mol%、51mol%、51.5mol%、52mol%、52.5mol%、53mol%、53.5mol%、54mol%、54.5mol%、55mol%、55.5mol%、56 mol%、56.5mol%、57 mol%、57.5mol%、58mol%、58.5mol%、59 mol%、59.5mol%、60mol%、60.5mol%、61mol%、61.5mol%、62mol%、62.5mol%、63mol%、63.5mol%、64mol%、64.5mol%、65mol%。

在本申请的一些实施方案中，脂质纳米颗粒中，所述磷脂和所述结构脂质之和的含量可以为 35mol%-65mol%，例如可以为 35mol%、35.5mol%、36mol%、36.5mol%、37mol%、37.5mol%、38mol%、38.5mol%、39mol%、39.5mol%、40mol%、40.5mol%、41mol%、41.5mol%、42mol%、42.5mol%、43mol%、43.5mol%、44mol%、44.5mol%、45mol%、45.5mol%、46mol%、46.5mol%、47mol%、47.5mol%、48mol%、48.1mol%、48.2mol%、48.3mol%、48.4mol%、48.5mol%、48.6mol%、48.7mol%、48.8mol%、48.9mol%、49mol%、49.1mol%、49.2mol%、49.3mol%、49.4mol%、49.5mol%、49.6mol%、49.7mol%、49.8mol%、49.9mol%、50mol%、50.5mol%、51mol%、51.5mol%、52mol%、52.5mol%、53mol%、53.5mol%、54mol%、54.5mol%、55mol%、55.5mol%、56 mol%、56.5mol%、57 mol%、57.5mol%、58mol%、58.5mol%、59 mol%、59.5mol%、60mol%、60.5mol%、61mol%、61.5mol%、62mol%、62.5mol%、63mol%、63.5mol%、64mol%、64.5mol%、65mol%。

在本申请的一些实施方案中，脂质纳米颗粒中，所述磷脂含量可以为5mol%-15mol%，例如可以为 5mol%、5.5mol%、6mol%、6.5mol%、7mol%、7.5mol%、8mol%、8.5mol%、9mol%、9.5mol%、10mol%、10.5mol%、11mol%、11.5mol%、12mol%、12.5mol%、13mol%、13.5mol%、14mol%、14.5mol%、

15mol%；例如可以为 10mol%-15mol%。

在本申请的一些实施方案中，脂质纳米颗粒中，所述结构脂质含量可以为 30mol%-50mol%，例如可以为 30mol%、30.5mol%、31mol%、31.5mol%、32mol%、32.5mol%、33mol%、33.5mol%、34mol%、34.5mol%、35mol%、35.5mol%、36mol%、36.5mol%、37mol%、37.5mol%、38mol%、38.5mol%、39mol%、39.5mol%、40mol%、40.5mol%、41mol%、41.5mol%、42mol%、42.5mol%、43mol%、43.5mol%、44mol%、44.5mol%、45mol%、45.5mol%、46mol%、46.5mol%、47mol%、47.5mol%、48mol%、48.1mol%、48.2mol%、48.3mol%、48.4mol%、48.5mol%、48.6mol%、48.7mol%、48.8mol%、48.9mol%、49mol%、49.1mol%、49.2mol%、49.3mol%、49.4mol%、49.5mol%、49.6mol%、49.7mol%、49.8mol%、49.9mol%、50mol%；例如可以为 35mol%-45mol%。

在本申请的一些实施方案中，脂质纳米颗粒中，所述 PEG 脂质的含量为 0.5mol%-5mol%，例如可以为 0.5mol%、0.6mol%、0.7mol%、0.8mol%、0.9mol%、1mol%、1.1mol%、1.2mol%、1.3mol%、1.4mol%、1.5mol%、1.6mol%、1.7mol%、1.8mol%、1.9mol%、2mol%、2.1mol%、2.2mol%、2.3mol%、2.4mol%、2.5mol%、2.6mol%、2.7mol%、2.8mol%、2.9mol%、3mol%、3.1mol%、3.2mol%、3.3mol%、3.4mol%、3.5mol%、3.6mol%、3.7mol%、3.8mol%、3.9mol%、4mol%、4.1mol%、4.2mol%、4.3mol%、4.4mol%、4.5mol%、4.6mol%、4.7mol%、4.8mol%、4.9mol%、5 mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，可电离脂的含量为 35mol%-65mol%，磷脂和胆固醇之和的含量为 35mol%-65mol%，PEG 脂质的含量为 0.5mol%-5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，所述组分配比不为：可电离脂的含量为 50 mol%，磷脂和胆固醇之和的含量为 48.5 mol%，PEG 脂质的含量为 1.5 mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 40mol%-50mol%，磷脂含量为 10mol%-15mol%，胆固醇含量为 35mol%-45mol%，PEG 脂质的含量为 1.5mol%-2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 48mol%-49mol%，磷脂含量为 10mol%-15mol%,胆固醇含量为 35mol%-45mol%，PEG 脂质的含量为 1.5mol%-2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 40mol%，磷脂含量为 15mol%,胆固醇含量为 42.5mol%，PEG 脂质的含量为 2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 40mol%，磷脂含量为 15mol%, 胆固醇含量为 43.5 mol%，PEG 脂质的含量为 1.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 48.5%，磷脂含量为 5mol%, 胆固醇含量为 45mol%，PEG 脂质的含量为 1.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 44.3mol%，磷脂含量为 9.3mol%，胆固醇含量为 45mol%，PEG 脂质的含量为 1.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 50mol%，磷脂含量为 5mol%，胆固醇含量为 43mol%，PEG 脂质的含量为 2.1mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 40mol%，磷脂含量为 12.5mol%，胆固醇含量为 45mol%，PEG 脂质的含量为 2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 46mol%，磷脂含量为 11mol%，胆固醇含量为 41mol%，PEG 脂质的含量为 2mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 47.5mol%，磷脂含量为 5mol%，胆固醇含量为 45mol%，PEG 脂质的含量为 2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 40mol%，磷

脂含量为 13mol%，胆固醇含量为 45mol%，PEG 脂质的含量为 2mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 50mol%，磷脂含量为 12.5mol%，胆固醇含量为 35mol%，PEG 脂质的含量为 2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 50mol%，磷脂含量为 8mol%，胆固醇含量为 39.5mol%，PEG 脂质的含量为 2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 42.3mol%，磷脂含量为 15mol%，胆固醇含量为 40.3mol%，PEG 脂质的含量为 2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 46mol%，磷脂含量为 11mol%，胆固醇含量为 41mol%，PEG 脂质的含量为 2mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 47.5mol%，磷脂含量为 15mol%，胆固醇含量为 35mol%，PEG 脂质的含量为 2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 48.5mol%，磷脂含量为 15mol%，胆固醇含量为 35mol%，PEG 脂质的含量为 1.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 50mol%，磷脂含量为 5mol%，胆固醇含量为 43.5mol%，PEG 脂质的含量为 1.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 40mol%，磷脂含量为 15mol%，胆固醇含量为 43.5mol%，PEG 脂质的含量为 1.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 48mol%，磷脂含量为 10.3mol%，胆固醇含量为 39.6mol%，PEG 脂质的含量为 2.1mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，所述组分配比不为：可电离脂的

含量为 50mol%，磷脂含量为 10 mol%，胆固醇含量为 38.5mol%，PEG 脂质的含量为 1.5 mol%。

在本申请的一些实施方案中，在所述脂质纳米颗粒中，所述可电离脂质、所述磷脂和所述结构脂质之和、以及 PEG 脂质的摩尔比为 35-65：35-65：0.5-5。

在本申请的脂质纳米颗粒中，对于所述可电离脂质、所述磷脂和所述结构脂质之和、以及 PEG 脂质的摩尔比(35-65)：(35-65)：(0.5-5)，35-65 可以取 35-65 之间的任意数值，例如可以为 35、35.5、36、36.5、37、37.5、38、38.5、39、39.5、40、40.5、41、41.5、42、42.5、43、43.5、44、44.5、45、45.5、46、46.5、47、47.5、48、48.5、49、49.5、50、50.5、51、51.5、52、52.5、53、53.5、54、54.5、55、55.5、56、56.5、57、57.5、58、58.5、59、59.5、60、60.5、61、61.5、62、62.5、63、63.5、64、64.5、65；0.5-5 可以取 0.5-5 之间的任意数值，例如可以为 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5。

在一个具体的实施方式中，在所述脂质纳米颗粒中，所述可电离脂质、所述磷脂和所述结构脂质之和、以及 PEG 脂质的摩尔比为(40-50)：(35-65)：(1-3)。

在一个具体的实施方式中，在所述脂质纳米颗粒中，所述可电离脂质、所述磷脂和所述结构脂质之和、以及 PEG 脂质的摩尔比为(50-65)：(35-65)：(1-3)。

在一个具体的实施方式中，所述可电离脂质、所述磷脂和所述结构脂质之和、以及 PEG 脂质的摩尔比不为 50: 48.5: 1.5。

在一个具体的实施方式中，在所述脂质纳米颗粒中，所述可电离脂质、所述磷脂、所述结构脂质、以及 PEG 脂质的摩尔比为(40-65)：(5-15)：(30-50)：(1-3)。

在一个具体的实施方式中，在所述脂质纳米颗粒中，所述可电离脂质、所述磷脂、所述结构脂质、以及 PEG 脂质的摩尔比为(40-65)：(10-15)：(35-45)：(1.5-2.5)。

在一个具体的实施方式中，在所述脂质纳米颗粒中，所述可电离脂质、所述磷脂、所述结构脂质、以及 PEG 脂质的摩尔比为(40-50)：(5-15)：(30-50)：(1-3)。其中，对于摩尔比(40-50)：(5-15)：(30-50)：(1-3)，40-50 可以取 40-50

之间的任意数值，例如可以为 40、40.5、41、41.5、42、42.5、43、43.5、44、44.5、45、45.5、46、46.5、47、47.5、48、48.5、49、49.5、50；5-15 可以取 5-15 之间的任意数值，例如可以为 5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15；30-50 可以取 30-50 之间的任意数值，例如可以为 30、30.5、31、31.5、32、32.5、33、33.5、34、34.5、35、35.5、36、36.5、37、37.5、38、38.5、39、39.5、40、40.5、41、41.5、42、42.5、43、43.5、44、44.5、45、45.5、46、46.5、47、47.5、48、48.5、49、49.5、50；1-3 可以是 1-3 之间的任意数值，例如可以为 1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3。

在一个具体的实施方式中，在所述脂质纳米颗粒中，所述可电离脂质、所述磷脂、所述结构脂质、以及 PEG 脂质的摩尔比为(40-50)：(5-15)：(35-45)：(1.5-2.5)。其中，对于摩尔比(40-50)：(5-15)：(35-45)：(1.5-2.5)，40-50 可以取 40-50 之间的任意数值，例如可以为 40、40.5、41、41.5、42、42.5、43、43.5、44、44.5、45、45.5、46、46.5、47、47.5、48、48.5、49、49.5、50；5-15 可以取 5-15 之间的任意数值，例如可以为 5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15；35-45 可以取 35-45 之间的任意数值，例如可以为 35、35.5、36、36.5、37、37.5、38、38.5、39、39.5、40、40.5、41、41.5、42、42.5、43、43.5、44、44.5、45；1.5-2.5 可以是 1.5-2.5 之间的任意数值，例如可以为 1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5。

在一个具体的实施方式中，在所述脂质纳米颗粒中，所述可电离脂质、所述磷脂、所述结构脂质、以及 PEG 脂质的摩尔比为(50-65)：(5-15)：(30-50)：(1-3)。其中，对于摩尔比(50-65)：(5-15)：(30-50)：(1-3)，50-65 可以取 50-65 之间的任意数值，例如可以为 51、51.5、52、52.5、53、53.5、54、54.5、55、55.5、56、56.5、57、57.5、58、58.5、59、59.5、60、60.5、61、61.5、62、62.5、63、63.5、64、64.5、65；5-15 可以取 5-15 之间的任意数值，例如可以为 5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15；30-50 可以取 30-50 之间的任意数值，例如可以为 30、30.5、31、31.5、32、32.5、33、33.5、34、34.5、35、35.5、36、36.5、37、37.5、38、38.5、39、39.5、40、40.5、41、41.5、42、42.5、43、43.5、44、

44.5、45、45.5、46、46.5、47、47.5、48、48.5、49、49.5、50；1-3 可以是 1-3 之间的任意数值，例如可以为 1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3。

在一个具体的实施方式中，所述可电离脂质、所述磷脂、所述结构脂质、以及 PEG 脂质的摩尔比不为 50:10:38.5:1.5。

在一个具体的实施方式中，在所述脂质纳米颗粒中，所述可电离脂质、所述磷脂、所述结构脂质、以及 PEG 脂质的摩尔比为(50-65)：(5-15)：(35-45)：(1.5-2.5)。其中，对于摩尔比(50-65)：(5-15)：(35-45)：(1.5-2.5)，50-65 可以取 50-65 之间的任意数值，例如可以为 51、51.5、52、52.5、53、53.5、54、54.5、55、55.5、56、56.5、57、57.5、58、58.5、59、59.5、60、60.5、61、61.5、62、62.5、63、63.5、64、64.5、65；5-15 可以取 5-15 之间的任意数值，例如可以为 5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15；35-45 可以取 35-45 之间的任意数值，例如可以为 35、35.5、36、36.5、37、37.5、38、38.5、39、39.5、40、40.5、41、41.5、42、42.5、43、43.5、44、44.5、45；1.5-2.5 可以是 1.5-2.5 之间的任意数值，例如可以为 1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 2、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 2、DSPC 和胆固醇之和、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(35-65)：(35-65)：(0.5-5)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 2、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 2、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(40-49)：(5-15)：(30-50)：(1-3)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 2、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 2、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(40-49)：(10-15)：(35-45)：(1.5-2.5)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 2、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 2、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(51-60)：(5-15)：(30-50)：(1-3)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 2、DSPC、胆固

醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 2、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(51-60)：(10-15)：(35-45)：(1.5-2.5)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 2、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，化合物 2 的含量为 35mol%-65mol%，DSPC 和胆固醇之和的含量为 35mol%-65mol%，DMG-PEG2000 的含量为 0.5mol%-5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 2、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，在所述脂质纳米颗粒中，化合物 2 的含量为 40mol%-50mol%，DSPC 含量为 10mol%-15mol%，胆固醇含量为 35mol%-45mol%，DMG-PEG2000 的含量为 1.5mol%-2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 2、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，在所述脂质纳米颗粒中，化合物 2 的含量为 48mol%-49mol%，DSPC 含量为 10mol%-15mol%，胆固醇含量为 35mol%-45mol%，DMG-PEG2000 的含量为 1.5mol%-2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 4、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 4、DSPC 和胆固醇之和、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(35-65)：(35-65)：(0.5-5)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 4、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 4、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(40-49)：(5-15)：(30-50)：(1-3)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 4、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 4、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(40-49)：(10-15)：(35-45)：(1.5-2.5)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 4、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 4、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(51-60)：(5-15)：(30-50)：(1-3)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 4、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 4、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(51-60)：(10-15)：(35-45)：(1.5-2.5)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 4、DSPC、胆固

醇、以及 DMG-PEG2000，在所述脂质纳米颗粒组合物中，化合物 4 的含量为35mol%-65mol%，DSPC 和胆固醇之和的含量为 35mol%-65mol%，DMG-PEG2000 的含量为 0.5mol%-5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 4、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，在所述脂质纳米颗粒组合物中，化合物 4 的含量为40mol%-50mol%，DSPC 含量为 10mol%-15mol%, 胆固醇含量为 35mol%-45mol%，DMG-PEG2000 的含量为 1.5mol%-2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 4、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，在所述脂质纳米颗粒组合物中，化合物 4 的含量为48mol%-49mol%，DSPC 含量为 10mol%-15mol%, 胆固醇含量为 35mol%-45mol%，DMG-PEG2000 的含量为 1.5mol%-2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 5、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 5、DSPC 和胆固醇之和、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(35-65)：(35-65)：(0.5-5)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 5、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 5、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(40-49)：(5-15)：(30-50)：(1-3)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 5、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 5、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(40-49)：(10-15)：(35-45)：(1.5-2.5)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 5、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 5、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(51-60)：(5-15)：(30-50)：(1-3)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 5、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 5、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(51-60)：(10-15)：(35-45)：(1.5-2.5)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 5、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，在所述脂质纳米颗粒中，化合物 5 的含量为 35mol%-65mol%，DSPC 和胆固醇之和的含量为 35mol%-65mol%，DMG-PEG2000 的含

量为 0.5mol%-5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 5、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，在所述脂质纳米颗粒中，化合物 5 的含量为 40mol%-50mol%，DSPC 含量为 10mol%-15mol%，胆固醇含量为 35mol%-45mol%，DMG-PEG2000 的含量为 1.5mol%-2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 5、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，在所述脂质纳米颗粒中，化合物 5 的含量为 48mol%-49mol%，DSPC 含量为 10mol%-15mol%，胆固醇含量为 35mol%-45mol%，DMG-PEG2000 的含量为 1.5mol%-2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 5A、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 5A、DSPC 和胆固醇之和、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(35-65)：(35-65)：(0.5-5)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 5A、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 5A、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(40-49)：(5-15)：(30-50)：(1-3)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 5A、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 5A、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(40-49)：(10-15)：(35-45)：(1.5-2.5)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 5A、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 5A、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(51-60)：(5-15)：(30-50)：(1-3)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 5A、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 5A、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(51-60)：(10-15)：(35-45)：(1.5-2.5)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 5A、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，在所述脂质纳米颗粒中，化合物 5A 的含量为 35mol%-65mol%，DSPC 和胆固醇之和的含量为 35mol%-65mol%，DMG-PEG2000 的含量为 0.5mol%-5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 5A、DSPC、胆

固醇、以及 DMG-PEG2000，在所述脂质纳米颗粒中，化合物 5A 的含量为 40mol%-50mol%，DSPC 含量为 10mol%-15mol%，胆固醇含量为 35mol%-45mol%，DMG-PEG2000 的含量为 1.5mol%-2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 5A、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，在所述脂质纳米颗粒中，化合物 5A 的含量为 48mol%-49mol%，DSPC 含量为 10mol%-15mol%，胆固醇含量为 35mol%-45mol%，DMG-PEG2000 的含量为 1.5mol%-2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 8、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 8、DSPC 和胆固醇之和、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(35-65)：(35-65)：(0.5-5)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 8、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 8、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(40-49)：(5-15)：(30-50)：(1-3)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 8、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 8、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(40-49)：(10-15)：(35-45)：(1.5-2.5)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 8、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 8、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(51-60)：(5-15)：(30-50)：(1-3)。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 8、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 8、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000 的摩尔比为(51-60)：(10-15)：(35-45)：(1.5-2.5)。

在一个具体的实施方式中，在所述脂质纳米颗粒中，所述脂质纳米颗粒组合物包含化合物 8、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 8 的含量为 35mol%-65mol%，DSPC 和胆固醇之和的含量为 35mol%-65mol%，DMG-PEG2000 的含量为 0.5mol%-5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 8、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，在所述脂质纳米颗粒中，化合物 8 的含量为 40mol%-50mol%，DSPC 含量为 10mol%-15mol%，胆固醇含量

为 35mol%-45mol%，DMG-PEG2000 的含量为 1.5mol%-2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 8、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，在所述脂质纳米颗粒中，化合物 8 的含量为 48mol%-49mol%，DSPC 含量为 10mol%-15mol%, 胆固醇含量为 35mol%-45mol%，DMG-PEG2000 的含量为 1.5mol%-2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，在所述脂质纳米颗粒中，所述脂质纳米颗粒组合物包含化合物 13、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，所述化合物 13 的含量为 35mol%-65mol%，DSPC 和胆固醇之和的含量为 35mol%-65mol%，DMG-PEG2000 的含量为 0.5mol%-5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 13、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，在所述脂质纳米颗粒中，化合物 13 的含量为 40mol%-50mol%，DSPC 含量为 10mol%-15mol%, 胆固醇含量为 35mol%-45mol%，DMG-PEG2000 的含量为 1.5mol%-2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 13、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，在所述脂质纳米颗粒中，化合物 13 的含量为 48mol%-49mol%，DSPC 含量为 10mol%-15mol%, 胆固醇含量为 35mol%-45mol%，DMG-PEG2000 的含量为 1.5mol%-2.5mol%。

除了前述部分中所述的那些之外，本申请的脂质纳米颗粒或脂质纳米颗粒组合物还可包含一种或多种组分。例如，所述脂质纳米颗粒或脂质纳米颗粒组合物可包含一种或多种小的疏水分子，例如维生素(例如，维生素 A 或维生素 E)或固醇。

所述脂质纳米颗粒或脂质纳米颗粒组合物还可包含一种或多种渗透性增强剂分子，碳水化合物，聚合物，表面改变剂或其他组分。所述渗透性增强剂分子可以是美国专利申请 2005/0222064 中描述的分子。所述碳水化合物可包括单糖(例如葡萄糖)和多糖(例如糖原及其衍生物和类似物)。

所述脂质纳米颗粒或脂质纳米颗粒组合物还可包含一种或多种聚合物，所述聚合物可以是生物可降解的和/或生物相容的。所述聚合物可以选自但不限于聚胺，聚醚，聚酰胺，聚酯，聚氨基甲酸酯，聚脲，聚碳酸酯，聚苯乙烯，聚

酰亚胺，聚砜，聚氨酯，聚乙炔，聚乙烯，聚乙烯亚胺，聚异氰酸酯，聚丙烯酸酯，聚甲基丙烯酸酯，聚丙烯腈和聚芳酯。例如，聚合物可以包括聚己内酯(PCL)，乙烯乙酸乙烯酯聚合物(EVA)，聚乳酸(PLA)，聚 L-乳酸(PLLA)，聚乙二醇酸(PGA)，聚(乳酸-甘油乙酸)(PLGA)，聚(L-乳酸-乙二醇乙酸)(PLLGA)，聚(D，L-丙交酯)(PDLA)，聚(L -丙交酯(PLLA)，聚(D，L-丙交酯-共己内酯)，聚(D，L-丙交酯-己内酯-乙交酯)，聚(D，L-丙交酯-PEO-co -D，L-丙交酯)，聚(D，L-丙交酯-co-PPO-co-D，L-丙交酯)，聚氰基丙烯酸烷基酯，聚氨酯，聚-L-赖氨酸(PLL)，甲基丙烯酸羟丙酯(HPMA)，聚乙二醇 ，聚 L-谷氨酸，聚羟基酸，聚酐，聚原酸酯，聚(酯酰胺)，聚酰胺，聚(酯醚)，聚碳酸酯，聚亚烷基，例如聚乙烯和聚丙烯；聚亚烷基二醇，例如聚(乙二醇)(PEG)；聚环氧烷(PEO)；聚对苯二甲酸亚烷基酯，例如聚对苯二甲酸乙二醇酯；聚乙烯醇(PVA)；聚乙烯基醚，聚乙烯基酯，例如聚 (醋酸乙烯酯)，聚卤乙烯，例如聚氯乙烯(PVC)，聚乙烯吡咯烷酮(PVP)，聚硅氧烷，聚苯乙烯(PS)，聚氨酯，衍生化纤维素，例如烷基纤维素，羟烷基纤维素，纤维素醚，纤维素酯，硝基纤维素，羟丙基纤维素，羧甲基纤维素，丙烯酸类聚合物，例如聚(甲基(甲基)) 丙烯酸酯)(PMMA)，聚(甲基)丙烯酸乙酯，聚(甲基)丙烯酸丁酯，聚(甲基)丙烯酸异丁酯，聚(甲基)丙烯酸己酯，聚(甲基)丙烯酸异癸酯，聚(甲基)丙烯酸月桂酯，聚(甲基)丙烯酸苯酯，聚(丙烯酸甲酯)，聚(丙烯酸异丙酯)，聚(丙烯酸异丁酯)，聚(丙烯酸十八烷基酯)以及它们的共聚物和混合物，聚二恶烷酮及其共聚物，聚羟基链烷酸酯，富马酸聚丙烯酯，聚甲醛，泊洛沙姆，聚乙二胺，聚(原酸酯)，聚(丁酸)，聚(戊酸)，聚(丙交酯-己内酯)，碳酸三亚甲基酯，聚(N-丙烯酰基吗啉)(PAcM)，聚(2-甲基-2- 恶唑啉(PMOX)，聚(2-乙基-2-恶唑啉)(PEOZ)和聚甘油。

所述脂质纳米颗粒或脂质纳米颗粒组合物还可包含一种或多种表面改变剂，所述表面改变剂可以包括但不限于阴离子蛋白(例如牛血清白蛋白)，表面活性剂(例如阳离子表面活性剂例如二甲基二十八烷基-溴化铵)，糖或糖衍生物(例如环糊精)，核酸，聚合物(例如肝素，聚乙二醇和泊洛沙姆)，粘液溶解剂(例如乙酰半胱氨酸，艾蒿，菠萝蛋白酶，木瓜蛋白酶，硬皮草，溴化己内酯，卡波西汀，依普嗪酮 ，mesna， 氨溴索 ，sobrerol，domiodol，letosteine，stepronin，tiopronin，凝溶胶蛋白，胸腺素 β4，dornase alfa，neltenexine 和 erdosteine)和DNase(例如 rhDNase)。 可以将表面改变剂设置在纳米颗粒内和/或纳米颗粒组合

物的表面上(例如，通过涂覆，吸附，共价键合或其他方法)。

除上述组分外，所述脂质纳米颗粒或脂质纳米颗粒组合物可包括在药物组合物中有用的任何物质。例如，纳米颗粒组合物可以包含一种或多种药学上可接受的赋形剂或辅助成分，例如但不限于一种或多种溶剂，分散介质，稀释剂，分散助剂，助悬剂，制粒助剂，崩解剂，填充剂，助流剂，液体载体，粘合剂，表面活性剂，等渗剂，增稠剂或乳化剂，缓冲剂，润滑剂，油，防腐剂和其他物质。也可以包括赋形剂，例如蜡，黄油，着色剂，涂料，调味剂和加香剂。药学上可接受的赋形剂是本领域众所周知的。

缓冲剂的实例包括但不限于柠檬酸盐缓冲溶液，乙酸盐缓冲溶液，磷酸盐缓冲溶液，氯化铵，碳酸钙，氯化钙，柠檬酸钙，葡萄糖酸钙，葡萄糖酸钙，葡萄糖酸钙，d-葡萄糖酸，甘油磷酸钙，乳酸钙，乳糖酸钙，丙酸，乙酰丙酸钙，戊酸，磷酸氢二钙，磷酸，磷酸三钙，磷酸氢钙，乙酸钾，氯化钾，钾葡萄糖酸，钾混合物，磷酸氢二钾，磷酸二氢钾，磷酸钾混合物，乙酸钠，碳酸氢钠，氯化钠，柠檬酸钠，乳酸钠，磷酸氢二钠，磷酸二氢钠，磷酸钠混合物，氨丁三醇，氨基磺酸盐缓冲液，氢氧化镁，氢氧化铝，藻酸，无热原水，等渗盐水，林格氏溶液，乙醇和/或其组合。润滑剂可以选自硬脂酸镁，硬脂酸钙，硬脂酸，二氧化硅，滑石粉，麦芽，氢化植物油，聚乙二醇，苯甲酸钠，乙酸钠，氯化钠，亮氨酸，月桂酸镁，硫酸盐，十二烷基硫酸钠及其组合。

本申请还提供一种脂质纳米颗粒，其包含上述的任意一种脂质纳米颗粒组合物和治疗剂和/或预防剂，其中所述治疗剂和/或预防剂选自疫苗或能够引发免疫反应的化合物、核酸或蛋白。

所述治疗和/或预防剂包括生物活性物质，并且可替代地称为“活性剂”。治疗剂和/或预防剂可以是一种物质，一旦被递送至细胞或器官，就会在细胞，器官或其他身体组织或系统中产生所需的变化。这样的物质可用于治疗一种或多种疾病，病症或病状。在一些实施方式中，治疗剂和/或预防剂是可用于治疗特定疾病，病症或病状的小分子药物。可用于纳米颗粒组合物中的药物的实例包括但不限于抗肿瘤药(例如长春新碱，阿霉素，米托蒽醌，喜树碱，顺铂，博来霉素，环磷酰胺，甲氨蝶呤和链脲霉素)，抗肿瘤药(例如放线菌素 D，长春新碱)，长春碱，胱氨酸阿拉伯糖苷，蒽环类药物，烷基化剂，铂化合物，抗代谢物和核苷类似物(例如甲氨蝶呤，嘌呤和嘧啶类似物)，抗感染剂，局部麻醉药

(例如地布卡因和氯丙嗪)，β-肾上腺素能阻滞剂(例如普萘洛尔，噻吗洛尔和拉贝洛尔)，降压药(例如可乐定和肼苯哒嗪)，抗抑郁药(例如丙咪嗪，阿米替林和多西平)，抗转化剂(例如苯妥英)，抗组胺药(例如，苯海拉明，氯苯那明和异丙嗪)，抗生素/抗菌剂(例如庆大霉素，环丙沙星和头孢西丁)，抗真菌剂(例如咪康唑，特康唑，益康唑，异康唑，丁康唑，克霉唑，伊曲康唑，制霉菌素和萘替芬)，抗寄生虫剂，激素，激素拮抗剂，免疫调节剂，神经递质拮抗剂，抗青光眼剂，维生素，麻醉剂和显像剂。

在一些实施方式中，治疗和/或预防剂是蛋白质。可用于本申请所述的纳米颗粒组合物中的治疗性蛋白质包括但不限于庆大霉素，丁胺卡那霉素，胰岛素，促红细胞生成素(EPO)，粒细胞集落刺激因子(G-CSF)，粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)，因子 VIR，促黄体生成激素释放激素(LHRH)类似物，干扰素，肝素，乙型肝炎表面抗原，伤寒疫苗和霍乱疫苗。

在一些实施方式中，治疗剂是多核苷酸或核酸(例如，核糖核酸或脱氧核糖核酸)。术语“多核苷酸”，在其最广义上，包括任何结合或可结合到寡核苷酸链中的化合物和/或物质。根据本申请使用的示例性多核苷酸包括但不限于脱氧核糖核酸(DNA)、包括信使 mRNA(mRNA)的核糖核酸(RNA)、其杂交物、RNAi 诱导剂、RN-Ai 试剂、siRNA、shRNA、miRNA、反义 RNA、核酶、催化 DNA、诱导三螺旋形成的 RNA、适配体、载体等中的一种或多种。在一些实施方式中，治疗性和/或预防性的是 RNA。可用于本文所述的组合物和方法的 RNA 可选自但不限于短聚体、抗配子体、反义、核酶、小干扰 RNA(siRNA)、不对称干扰 RNA(aiRNA)、microRNA(miRNA)、双链 RNA(dsRNA)、小发夹 RNA(shRNA)、转移 RNA(tRNA)、信使 RNA(mRNA)及其混合物。在某些实施方式中，RNA 是 mRNA。

在某些实施方式中，治疗和/或预防剂是 mRNA。mRNA 可以编码任何目的多肽，包括任何天然或非天然存在的或另外修饰的多肽。由 mRNA 编码的多肽可以具有任何大小，并且可以具有任何二级结构或活性。在一些实施方式中，当在细胞中表达时，由 mRNA 编码的多肽可以具有治疗作用。

在一些实施方案中，所述 mRNA 分子的部分或全部尿苷为 1□甲基□假尿苷。在一些实施方案中，所述 mRNA 进一步包含 5’帽子结构。在一些实施方案中，所述 5’帽子结构为 O 型、I 型和 II 型。在一些实施方案中，所述 5’帽子结构为

m7G(5')ppp(5')(2'□OMeA)pG。在一些实施方案中，所述 mRNA 进一步包含 polyA 尾。在一些实施方案中，所述 polyA 尾序列包含至少 20、至少 30、至少 40、至少 50、至少 60、至少 70、至少 80、至少 90、至少 100 个腺苷酸。在一些实施方案中，所述 polyA 尾序包含至多 500、至多 400、至多 300、至多 200、至多 150、至多 140、至多 130、至多 120、至多 110、至多 100、至多 90、至多 80、至多 70、至多 60 个腺苷酸(A)组成，特别是约 120 个 A。

在一个具体的实施方式中，本发明 mRNA 的编码序列如 SEQ ID NO：12 所示或与 SEQ ID NO：12 具有至少 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%或 80%相似度的序列。

在一个具体的实施方式中，本发明 mRNA 的编码序列包含 SEQ ID NO：10 所示序列或包含与 SEQ ID NO：10 具有至少 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%或 80%相似度的序列。

在一个具体的实施方式中，本发明 mRNA 的编码序列为 SEQ ID NO：10 所示序列或为与 SEQ ID NO：10 具有至少 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%或 80%相似度的序列。

在一个具体的实施方式中，本发明 mRNA 的编码序列包含 SEQ ID NO：11 所示序列或包含与 SEQ ID NO：11 具有至少 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%或 80%相似度的序列。

在一个具体的实施方式中，本发明 mRNA 的编码序列为 SEQ ID NO：11 所示序列或为与 SEQ ID NO：11 具有至少 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%或 80%相似度的序列。

在一个具体的实施方式中，本发明 mRNA 编码包含 SEQ ID NO：3 所示序列的蛋白或编码包含与 SEQ ID NO：3 具有至少 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%或 80%相似度的序列的蛋白。

在一个具体的实施方式中，本发明 mRNA 编码 SEQ ID NO：3 所示序列的蛋白或与 SEQ ID NO：3 具有至少 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%或 80%相似度的序列的蛋白。

在一个具体的实施方式中，本发明 mRNA 编码包含 SEQ ID NO：4 所示序列的蛋白或编码包含与 SEQ ID NO：4 具有至少 99%, 98%, 97%, 96%, 95%,

90%, 85%或 80%相似度的序列的蛋白。

在一个具体的实施方式中，本发明 mRNA 编码 SEQ ID NO：4 所示序列的蛋白或与 SEQ ID NO：4 具有至少 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%或 80%相似度的序列的蛋白。

本发明进一步提供了一种治疗和/或预防 HPV 病毒感染相关疾病的 mRNA 疫苗，其包括编码 HPV 抗原的 mRNA，所述 mRNA 被包封于本发明脂质纳米颗粒(LNP)中。

在一个具体的实施方式中，所述编码的 HPV 抗原序列包含或为如 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 所示的序列。

在一种具体的实施方式中，所述 mRNA 分子全部尿苷为 1□甲基□假尿苷。

在一种具体的实施方式中，所述 mRNA 包含 5’帽子结构，所述 5’帽子结构为 m7G(5’)ppp(5’)(2’□OMeA)pG，

所述 mRNA 分子序列从 5’端到 3’端依次为 5’帽、5’UTR、ORF、3’UTR、poly A 尾，其中 5’帽、5’UTR、ORF、3’UTR、poly A 尾彼此可操作的连接，

在一个具体的实施方式中，所述编码 HPV 抗原的 mRNA ORF 序列如 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 11 所示。

在一个具体的实施方式中，所述编码的 HPV 抗原序列如 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 所示。

在一个具体的实施方式中，所述 5’UTR 序列为 SEQ ID NO：5，

在一个具体的实施方式中，所述 3’UTR 序列为 SEQ ID NO：6，

在一个具体的实施方式中，所述 poly A 尾序列为 SEQ ID NO：7。

在一个具体的实施方式中，所述编码 HPV 抗原的 mRNA 全长序列为 SEQ ID NO: 12。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含化合物 5A、DSPC、胆固醇、以及 DMG-PEG2000，在所述脂质纳米颗粒中，化合物 5A 的含量为 48mol%-49mol%，DSPC 含量为 10mol%-15mol%，胆固醇含量为 35mol%-45mol%，DMG-PEG2000 的含量为 1.5mol%-2.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂 5A、磷脂、胆

固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 48.5%，磷脂含量为 5mol%,胆固醇含量为 45mol%，PEG 脂质的含量为 1.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂 5A、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 40mol%，磷脂含量为 15mol%，胆固醇含量为 43.5mol%，PEG 脂质的含量为 1.5mol%。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含可电离脂 5A、磷脂、胆固醇、以及 PEG 脂质，在所述脂质纳米颗粒中，可电离脂的含量为 48mol%，磷脂含量为 10.3mol%，胆固醇含量为 39.6mol%，PEG 脂质的含量为 2.1mol%。

在其他实施方式中，治疗和/或预防剂是 siRNA。siRNA 可能能够选择性敲低或下调目的基因的表达。例如，可以选择 siRNA 以在向需要其的受试者施用包括 siRNA 的纳米颗粒组合物时沉默与特定疾病、病症或病症相关的基因。siRNA 可包含与编码感兴趣基因或蛋白质的 mRNA 序列互补的序列。在一些实施方式中，siRNA 可以是免疫调节 siRNA。

在一些实施方式中，治疗和/或预防剂是 shRNA 或编码该 shRNA 的载体或质粒。在将合适的构建体递送至细胞核后，可以在靶细胞内部产生 shRNA。与 shRNA 有关的构建体和机制在相关领域中是众所周知的。

纳米颗粒中治疗剂和/或预防剂的量可取决于纳米颗粒的大小，组成，所需靶标和/或应用或其他性质以及治疗剂和/或预防剂的性质。例如，可用于纳米颗粒中的 RNA 的量可取决于 RNA 的大小，序列和其他特征。

本申请脂质纳米颗粒或脂质纳米颗粒组合物或本申请药物组合物还可进一步包括二价金属阳离子，具体的，二价金属阳离子可以为 Ca^{2+} 、Mg^{2+} 、Zn^{2+}、Mn^{2+}。

在本申请一些实施方式中，二价金属阳离子与脂质纳米颗粒组合物、脂质纳米颗粒或药物组合物中的总脂质的摩尔比为 0.1-400：100，可以为 1-30：100 或 10-50：100 或 30-60：100 或 30-35：100 或 100-200：100 或 150-180：100 或 300-320：100 或 300-400：100。

在本申请一些实施方式中，用酸性缓冲液配置一定浓度的二价金属阳离子溶液，再用于稀释 mRNA 得到 mRNA 工作液，mRNA 工作液中 mRNA 终浓度为 100-300 μg/ml，优选地 200 μg/ml，二价金属阳离子溶液终浓度为 0.8-20 mM。mRNA 工作液与混合总脂质乙醇相按照体积比 1-5：1，优选 2.5：1-4：1 混合制

备 LNP，混合方式优选 T 混流装置混合，混合后样品经稀释、浓缩、置换，除去乙醇，再定容并调节 pH 值至 7-8。

优选地，mRNA 工作液中二价金属阳离子溶液浓度可以为 0.8mM、1.6mM、3.2mM、6.4mM、8mM、12.8mM、16mM、20mM。

优选地，所述酸性缓冲液为醋酸缓冲液。

在本申请一些实施方式中，所述酸性缓冲液的 pH 为 5.0-6.0，优选 5.0-5.5;

在本申请一些实施方式中，所述 mRNA 工作液的 pH 为 5.0-6.0，优选 5.0-5.5。

在本申请一些实施方式中，用酸性缓冲液配置 0.8-20mM 浓度的二价金属阳离子溶液，再用于稀释 mRNA 得到 mRNA 水相，mRNA 水相终浓度为 100-300μg/ml，优选地 200μg/ml； mRNA 水相与混合总脂质乙醇相按照体积比 1-5：1 混合，优选 2.5：1-4：1，混合方式优选 T 混流装置混合，混合后样品经稀释、浓缩、置换，除去乙醇，再定容并调节 pH 值至 7-8。

酸性缓冲液配置的二价金属阳离子溶液浓度可以为 0.8mM、1.6mM、3.2mM、6.4mM、8mM、12.8mM、16mM、20mM。

优选地，所述酸性缓冲液为醋酸缓冲液。

在本申请一些实施方式中，所述酸性缓冲液的 pH 为 5.0-6.0，优选 5.0-5.5;

在本申请一些实施方式中，所述 mRNA 水相的 pH 为 5.0-6.0，优选 5.0-5.5。

在一个具体的实施方式中，所述治疗剂和/或预防剂为 mRNA，所述可电离脂与所述脂质纳米颗粒中的 mRNA 的 N/P 比为 3.5-5.5，例如可以为 3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5。

治疗剂和/或预防剂的包封率描述了相对于所提供的初始量，在制备后被包封或以其他方式与纳米颗粒组合物缔合的治疗剂和/或预防剂的量。包封率期望越高越好(例如，接近 100%)。包封率可以例如通过比较含有纳米颗粒组合物的溶液在用一种或多种有机溶剂或去污剂分解纳米颗粒组合物之前和之后的治疗和/或预防剂的量来测量。荧光可用于测量溶液中游离的治疗性和/或预防性(例如，RNA)的量。对于本文所述的纳米颗粒组合物，治疗剂和/或预防剂的包封率可以为至少 50%，例如 50%，55%，60%，65%，70%，75%，80%，85%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%或 100%。在

一些实施方案中，包封率可以是至少 80%。在某些实施方案中，包封率可以是至少 90%。

所述脂质纳米颗粒可以通过多种方法表征。例如，显微镜(例如，透射电子显微镜或扫描电子显微镜)，可以用于检查纳米颗粒的形态和尺寸分布。动态光散射或电位测定法(例如电位滴定法)可用于测量 ζ 电位。动态光散射也可以用于确定粒径。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒的平均粒径为 50nm-150nm。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒的平均粒径为 50nm-100nm。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒的平均粒径为 50nm-80nm。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒的平均粒径为 50nm-60nm。

所述脂质纳米颗粒可以是相对均匀的。多分散指数可用于表示所述纳米颗粒的均匀性。小的(例如小于 0.3)多分散性指数通常指示窄的粒度分布。

在一个具体的实施方式中，所述脂质纳米颗粒的多分散指数为 0.001-0.16。例如可以为 0.001、0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16。

本申请还提供一种药物组合物，其包含一种或多种药学上可接受的赋形剂或辅助成分，例如本文所述的那些，除非任何常规的赋形剂或辅助成分可能与纳米颗粒的一种或多种组分不相容。如果赋形剂或辅助成分与纳米颗粒的组分不相容，则其与该组分的组合可能导致任何不希望的生物学作用或其他有害作用。

根据本申请的药物组合物中的一种或多种脂质纳米颗粒，一种或多种药学上可接受的赋形剂和/或辅助成分的相对量将变化，取决于身份，大小和/或所治疗对象的疾病状况，并且进一步取决于组合物的施用途径。举例来说，药物组合物可包含 0.1%至 100%(wt/wt)的一种或多种脂质纳米颗粒。

所述脂质纳米颗粒和/或药物组合物可以施用给任何患者或受试者，包括可受益于通过向一个或多个特定细胞、组织、器官或其系统或组织(例如肾系统)递送治疗和/或预防剂而提供的治疗效果的那些患者或受试者。尽管本文提供的脂质纳米颗粒和药物组合物的描述主要针对适合于给药给人，但本领域技术人员将理解，这种脂质纳米颗粒和药物组合物通常适合给药给任何其他哺乳动物。为了使脂质纳米颗粒和药物组合物适合于各种动物给药，对适合于人类给药的

脂质纳米颗粒和药物组合物进行修改是众所周知的，通常熟练的兽医药理学家可以仅通过普通的(如果有的话)实验设计和/或进行这种修改，包括但不限于人类、其他灵长类动物和其他人造动物，包括商业上相关的哺乳动物，如牛、猪、软管、羊、猫、狗、老鼠和/或大鼠。

本申请的药物组合物可以通过药理学领域已知或今后开发的任何方法制备。通常，这种制备方法包括使活性成分与赋形剂和/或一种或多种其他辅助成分结合，然后，如果需要或必要，将产品分割、成形和/或包装成所需的单剂量或多剂量单位。

本申请的药物组合物可以以单一单位剂量和/或多个单一单位剂量批量制备、包装和/或销售。如本文所用，“单位剂量”为小包含预定量的活性成分(例如，纳米颗粒组合物)的药物组合物的精确量。活性成分的量通常等于将给予受试者的活性成分的剂量和/或该剂量的方便部分，例如该剂量的一半或三分之一。

药物组合物可以适合于多种给药途径和方法的多种形式制备。例如，药物组合物可以液体剂型(例如，乳剂、微乳剂、纳米乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和药剂)、可注射形式、固体剂型(例如胶囊、片剂、片剂等)制备液体、粉末和颗粒)、局部和/或经皮给药的剂型(例如软膏、膏剂、乳膏、洗剂、凝胶、粉末、溶液、喷雾、吸入剂和贴剂)、悬浮液、粉末和其他形式。口服和非肠道给药的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳剂、微乳剂、纳米乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和/或药物。

除了活性成分之外，液体剂型可以包括本领域中常用的惰性稀释剂，例如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂，例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1，3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和山梨醇脂肪酸酯及其混合物。除了惰性稀释剂外，口服组合物还可以包括其他治疗剂和/或预防剂、其他试剂，如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂和/或者香料。在用于肠胃外给药的某些实施方案中，将组合物与增溶剂(例如醇、油、改性油、二醇、聚山梨醇酯、环糊精、聚合物和/或其组合)混合。

可根据已知技术使用合适的分散剂，湿润剂和/或助悬剂配制可注射制剂，例如无菌可注射水性或油性悬浮液。无菌注射制剂可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂和/或溶剂中的无菌注射溶液，悬浮液和/或乳剂，例如在 1，3-丁二

醇中的溶液。可以使用的可接受的媒介物和溶剂包括水。无菌的不挥发性油通常用作溶剂或悬浮介质。为此，可以使用任何温和的不挥发性油，包括合成的甘油单酯或甘油二酯。脂肪酸如油酸可用于注射剂的制备中。

可以通过例如通过细菌保留过滤器过滤和/或通过以无菌固体组合物的形式掺入灭菌剂来对可注射制剂进行灭菌，所述无菌固体组合物可以在溶解或分散在无菌水或其他无菌可注射介质之前使用。

为了延长活性成分的作用，通常期望减慢来自皮下或肌肉内注射的活性成分的吸收。这可以通过使用水溶性差的结晶或无定形物质的液体悬浮液来实现。然后，药物的吸收速率取决于其溶解速率，而溶解速率又取决于晶体尺寸和晶体形式。或者，通过将药物溶解或悬浮在油载体中来实现肠胃外施用的药物形式的延迟吸收。可注射的药库形式是通过在生物可降解聚合物(如聚乳酸-聚乙二醇)中形成药物的微胶囊基质而制成的。根据药物与聚合物的比例和所使用的特定聚合物的性质，可以控制药物释放速率。其他生物可降解聚合物的实例包括聚(邻酯)和聚(酸酐)。通过将药物包埋在与身体组织相容的脂质体或微乳中来制备储备注射制剂。

用于直肠或阴道给药的组合物通常是栓剂，其可以通过将组合物与合适的非刺激性赋形剂如可可脂，聚乙二醇或栓剂蜡混合而制备，所述赋形剂在环境温度下为固体，但是在体温下呈液态，因此在直肠或阴道腔内融化并释放出活性成分。

用于口服的固体剂型包括胶囊剂，片剂，丸剂，薄膜，散剂和颗粒剂。在这样的固体剂型中，将活性成分与至少一种惰性的药学上可接受的赋形剂例如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或填充剂或增量剂(例如淀粉，乳糖，蔗糖，葡萄糖，甘露醇和硅酸)混合，粘合剂(例如羧甲基纤维素，藻酸盐，明胶，聚乙烯吡咯烷酮，蔗糖和阿拉伯胶)，保湿剂(例如甘油)，崩解剂(例如琼脂，碳酸钙，马铃薯或木薯淀粉，藻酸，某些硅酸盐和碳酸钠)，缓溶剂(例如石蜡)，吸收促进剂(例如季铵化合物)，润湿剂(例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯)，吸收剂(例如高岭土和膨润土，硅酸盐)和润滑剂(例如滑石粉)，硬脂酸钙，硬脂酸镁，固体聚乙二醇，月桂基硫酸钠)及其混合物。就胶囊，片剂和丸剂而言，剂型可包含缓冲剂。

相似类型的固体组合物可以用作软和硬填充明胶胶囊中的填充剂，其使用诸如乳糖或乳糖和高分子量聚乙二醇等赋形剂。片剂，糖衣丸，胶囊，丸剂和

颗粒剂的固体剂型可以用包衣和衣壳例如肠溶衣和药物配制领域众所周知的其他包衣制备。它们可以任选地包含遮光剂，并且可以具有仅释放活性成分的组成，或者优选地，在肠道的某个部分中，任选地，以延迟的方式。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物质和蜡。相似类型的固体组合物可用作乳糖和乳糖以及高分子量聚乙二醇等赋形剂在软和硬填充明胶胶囊中用作填充剂。

用于组合物的局部和/或透皮给药的剂型可以包括软膏剂，糊剂，乳膏剂，洗剂，凝胶，粉剂，溶液剂，喷雾剂，吸入剂和/或贴剂。通常，将活性成分在无菌条件下与药学上可接受的赋形剂和/或任何可能需要的防腐剂和/或缓冲剂。另外，本申请考虑了透皮贴剂的使用，透皮贴剂通常具有提供化合物向身体的受控递送的附加优点。这样的剂型可以例如通过将化合物溶解和/或分配在适当的介质中来制备。替代地或附加地，速率可以由以下任一者控制提供速率控制膜和/或通过将化合物分散在聚合物基质和/或凝胶中。

适用于局部给药的制剂包括但不限于液体和/或半液体制剂，如搽剂、洗剂、水包油和/或油包水乳液，如乳膏、软膏和/或糊剂和/或溶液和/或悬浮液，尽管活性成分的浓度可以与活性成分在溶剂中的溶解度极限一样高。用于局部给药的制剂可进一步包含本文所述的一种或多种其他成分。

药物组合物可以以适于经由口腔进行肺部给药的制剂制备、包装和/或出售。这样的制剂可包含活性成分的干颗粒。这种组合物方便地为干粉形式，用于使用包括干粉储存器的装置和/或使用自推进溶剂/粉末分配容器(例如包含溶解和/或悬浮在密封容器中的低沸点推进剂中的活性成分的装置)进行给药粉末组合物可包括固体细粉末稀释剂，如糖，并方便地以单位剂量形式提供。

低沸点推进剂通常包括在大气压下沸点低于 65°F 的液体推进剂。通常，推进剂可占组合物的 50%至 99.9%(wt/wt)，而活性成分可占组合物的 0.1%至 20%(wt/wt)。推进剂可进一步包含其他成分，例如液体非离子和/或固体阴离子表面活性剂和/或固体稀释剂(其粒径可与包含活性成分的颗粒相同数量级)。

配制用于肺递送的药物组合物可以提供溶液和/或悬浮液的液滴形式的活性成分。此类制剂可制备、包装和/或作为含水和/或稀释酒精溶液和/或悬浮液出售，任选无菌，包含活性成分，并可方便地使用任何雾化和/或雾化装置给药。此类制剂可进一步包含一种或多种其它成分，包括但不限于调味剂如糖精钠、挥发油、缓冲剂、表面活性剂和/或防腐剂如羟基苯甲酸甲酯。通过该给药途径

提供的液滴的平均直径可以在 1nm 至 200nm 的范围内。

本文描述的可用于肺部递送的制剂可用于鼻内递送药物组合物。适用于鼻内给药的另一种制剂是包含活性成分并具有 0.2μm 至 500μm 的平均颗粒的粗粉。这样的制剂以服用鼻烟的方式施用，即通过从保持在鼻子附近的粉末容器通过鼻道快速吸入。

适用于鼻腔给药的制剂可以例如包含 0.1%(wt/wt)至 100%(wt/wt)的活性成分，并且可以包含一种或多种其他活性成分 本文所述的成分。 药物组合物可以适合于频给药的制剂来制备，包装和/或出售。这样的制剂可以例如为使用常规方法制备的片剂和/或锭剂的形式，并且可以例如为 0.1%至 20%(wt/wt)的活性成分，余量包含口腔可溶解的和/或 可降解的组合物，以及任选地，本文所述的一种或多种其他成分。或者，适用于口腔给药的制剂可以包括含有活性成分的粉末和/或雾化和/或喷雾溶液和/或悬浮液。这种粉末状、气雾化和/或气雾化制剂在分散时可具有 0.1nm 至 200nm 范围内的平均颗粒和/或液滴尺寸，并且可进一步包含本文所述的一种或多种其它成分。

药物组合物可以适合眼科给药的制剂的形式制备，包装和/或出售。这样的制剂可以例如是滴剂的形式，包括例如 0.1/1.0%(wt/wt)的溶液和/或活性成分在水性或油性液体赋形剂中的悬浮液。这样的滴剂可进一步包含缓冲剂、盐和/或本文所述的一种或多种其他任何添加剂成分。其他可用于眼科给药的制剂包括包含微晶形式和/或脂质体制剂中的活性成分的制剂。滴耳液和/或眼药水被认为在本公开的范围内在细胞中产生多肽的方法。

本申请进一步提供了在哺乳动物细胞中产生目的多肽的方法。产生多肽的方法包括使细胞与包含编码目的多肽的 mRNA 的脂质纳米颗粒接触。使细胞与脂质纳米颗粒接触后，mRNA 可被吸收并在细胞中翻译以产生目的多肽。

通常，使哺乳动物细胞与包含编码目的多肽的 mRNA 的纳米颗粒接触的步骤可以在体内，离体，在培养物中或在体外进行。与细胞接触的纳米颗粒的量和/或其中的 mRNA 的量可以取决于被接触的细胞或组织的类型，给药方式，纳米颗粒组合物的理化特性和 mRNA(例如，大小，电荷和化学成分)以及其他因素。通常，有效量的纳米颗粒将允许在细胞中有效产生多肽。效率的度量标准可能包括多肽翻译(由多肽表达表示)，mRNA 降解水平和免疫反应指标。

使包括 mRNA 的纳米颗粒与细胞接触的步骤可能涉及或引起转染。纳米颗

粒的脂质组分中包含的磷脂可以例如通过与细胞或细胞内膜相互作用和/或融合而促进转染和/或提高转染效率。转染可允许细胞内 mRNA 的翻译。

在某些实施方案中，纳米颗粒中包括的 mRNA 可以编码重组多肽，该重组多肽可以替代与纳米颗粒接触的细胞中可能基本上不存在的一种或多种多肽。由于编码基因的遗传突变或其调节途径，可能缺少一种或多种基本上不存在的多肽。或者，通过 mRNA 翻译产生的重组多肽可以拮抗存在于细胞中，细胞表面上或从细胞分泌的内源蛋白质的活性。对抗性重组多肽可能是理想的，以对抗由内源蛋白质的活性引起的有害作用，例如活性改变或突变引起的定位。在另一个替代方案中，通过 mRNA 翻译产生的重组多肽可以间接或直接拮抗存在于细胞中，细胞表面上或从细胞分泌的生物部分的活性。拮抗的生物部分可包括但不限于脂质(例如胆固醇)，脂蛋白(例如低密度脂蛋白)，核酸，碳水化合物和小分子毒素。通过 mRNA 翻译产生的重组多肽可以被工程化以定位在细胞内，例如在特定的区室例如核内，或者可以被工程化以从细胞分泌或转运至细胞的质膜。

在一些实施方案中，使细胞与包含 mRNA 的纳米颗粒接触可以减少细胞对外源核酸的先天免疫应答。可以使细胞与包含第一量的第一外源 mRNA 的第一纳米颗粒组合物接触，所述第一外源 mRNA 包括可翻译的区域，并且可以确定细胞对第一外源 mRNA 的先天免疫应答的水平。随后，可以使细胞与包含第二量的第一外源 mRNA 的第二组合物接触，第二量是与第一量相比较少量的第一外源 mRNA。或者，第二组合物可以包含不同于第一外源 mRNA 的第一量的第二外源 mRNA。使细胞与第一和第二组合物接触的步骤可以重复一次或多次。此外，可以任选地测定细胞中多肽生产(例如翻译)的效率，并且可以重复地使细胞与第一和/或第二组合物重新接触，直到达到目标蛋白质生产效率。

本申请进一步提供了一种治疗哺乳动物的疾病或病症的方法，所述方法包括向哺乳动物施用治疗有效量的本申请的任意一种脂质纳米颗粒或药物组合物，特别地，所述脂质纳米颗粒或药物组合物可用于治疗以蛋白质或多肽活性缺失或异常为特征的疾病，病症或病状。例如，可以将包含编码缺失的或异常的多肽的 mRNA 的脂质纳米颗粒或药物组合物施用或递送至细胞。mRNA 的后续翻译可以产生多肽，从而减少或消除了由于缺乏或由多肽引起的异常活性引起的问题。因为翻译可能迅速发生，所以这些方法和组合物可用于治疗急性疾病，

病症或诸如败血症，中风和心肌梗塞的病症。所述纳米颗粒组合物中包括的治疗剂和/或预防剂也可能能够改变给定物种的转录速率，从而影响基因表达。

以功能失常或异常的蛋白质或多肽活性为特征的疾病，病症和/或状况包括但不限于罕见疾病，传染性疾病(如疫苗和治疗剂)，癌症和 增生性疾病，遗传性疾病(例如，囊性纤维化)，自身免疫性疾病，糖尿病，神经退行性疾病，心血管和肾血管疾病以及代谢性疾病。

本领域技术人员可以理解，特定受试者的具体给药量可能因受试者种类、年龄和一般情况而异；管理目的；特定成分；管理模式；等等。本申请的脂质纳米颗粒或药物组合物可以以单位剂量形式配制，以便于给药和剂量均匀。然而，应当理解，本申请的脂质纳米颗粒或药物组合物的每日总用量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。任何特定患者的特定治疗有效、预防有效或其他适当剂量水平(例如，用于成像)将取决于多种因素，包括所治疗疾病的严重程度和识别(如果有)；所用的一种或多种治疗剂和/或预防剂；所用的具体成分；患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食；所用特定药物成分的给药时间、给药途径和排泄率；治疗持续时间；与所使用的特定药物成分组合或同时使用的药物；以及医学界众所周知的因素。

本申请进一步提供了一种将治疗剂和/或预防剂特异性递送至哺乳动物器官的方法，所述方法包括向哺乳动物施用本申请的任意一种脂质纳米颗粒或药物组合物，所述施用包括使哺乳动物器官与脂质纳米颗粒或药物组合物接触，由此将治疗剂和/或预防剂递送至器官。治疗剂和/或预防剂，例如，蛋白质、细胞毒性剂、放射性离子、化疗剂或核酸(例如 RNA，例如 mRNA)可被递送至细胞或器官。在治疗性和/或预防性是 mRNA 的情况下，当细胞与脂质纳米颗粒或药物组合物接触时，可翻译的 mRNA 可在细胞中翻译以产生目标多肽。然而，基本上不可翻译的 mRNAs 也可被递送至细胞。基本上不可翻译的 mRNA 可用作疫苗和/或可隔离细胞的翻译成分以减少细胞中其他物种的表达。

在一些实施方案中，所述脂质纳米颗粒可以靶向特定类型或类别的细胞(例如其特定器官或系统的细胞)。例如，可以将包含目标治疗和/或预防的脂质纳米颗粒特异性地递送至哺乳动物的肝，肾，脾，股骨或肺。对特定类别的细胞，器官或其系统或组的特定递送意味着相对于其他目的地，包括治疗和/或预防在内的更高比例的包括治疗和/或预防剂的脂质纳米颗粒被递送至目标目的地(例如

组织)，例如，在向哺乳动物施用纳米颗粒时。在一些实施方案中，目标组织选自肝，肾，肺，脾，股骨，眼组织(例如，通过眼内，视网膜下或玻璃体内注射)，血管中的血管内皮(例如，冠状动脉内或股骨内)或肾脏，以及肿瘤组织(例如，通过肿瘤内注射)。

本申请的脂质纳米颗粒或药物组合物可以通过任何途径施用。在一些实施方案中，通过多种途径中的一种或多种施用包括、口服，静脉内，肌肉内，动脉内，髓内，鞘内，皮下，心室内，经皮或皮内，真皮内，直肠，阴道内，腹膜内，眼内，视网膜下，玻璃体内，局部(例如通过散剂，软膏剂，乳膏，凝胶，洗剂和/或滴剂)，粘膜，鼻，颊，肠，玻璃体，肿瘤内，舌下，鼻内;通过气管内滴注，支气管滴注和/或吸入；作为口服喷雾剂和/或散剂，鼻喷雾剂和/或气雾剂，和/或通过门静脉导管。在一些实施方案中，脂质纳米颗粒或药物组合物可以静脉内，肌内，真皮内，动脉内，肿瘤内，皮下，眼内，视网膜下，玻璃体内或通过吸入给药。然而，考虑到药物递送科学中的可能进展，本申请涵盖通过任何合适的途径递送或描述本申请所述的脂质纳米颗粒或药物组合物。通常，最合适的给药途径取决于多种因素，包括脂质纳米颗粒组合物的性质，包括一种或多种治疗和/或预防措施(例如，其在各种身体环境(例如血液和胃肠道)中的稳定性)，患者的状况(例如，患者是否能够耐受特定的途径)管理)等等。

在某些实施方案中，向哺乳动物施用 0.0001mg/kg 至 10mg/kg 剂量的治疗剂和/或预防剂。例如可以为 0.0001mg/kg 至 10mg/kg，0.001mg/kg 至 10mg/kg，0.005 mg/kg 至 10 mg/kg，0.01 mg/kg 至 10 mg/kg，0.05 mg/kg 至 10 mg/kg，0.1 mg/kg 至 10 mg/kg 1 mg/kg 至 10 mg/kg，2 mg/kg 至 10 mg/kg，5 mg/kg 至 10 mg/kg，0.0001 mg/kg 至 5 mg/kg，0.001 mg/kg 至 5 mg/kg，0.005 mg/kg 至 5 mg/kg，0.01 mg/kg 至 5 mg/kg，0.05 mg/kg 至 5 mg/kg，0.1 mg/kg 至 5 mg/kg，1 mg/kg 至 5 mg/kg，2 mg/kg 至 5 mg/kg，0.0001 mg/kg 至 2.5 mg/kg，0.001 mg/kg 至 2.5 mg/kg，0.005 mg/kg 至 2.5 mg/kg，0.01 mg/kg 至 2.5 mg/kg 0.05mg/kg 至 2.5mg/kg，0.1mg/kg 至 2.5mg/kg，1mg/kg 至 2.5mg/kg，2mg/kg 至 2.5mg/kg，0.0001 mg/kg 至 1 mg/kg，0.001 mg/kg 至 1 mg/kg，0.005 mg/kg 至 1 mg/kg，0.01 mg/kg 至 1 mg/kg，0.05 mg/kg 至 1 mg/kg，0.1 mg/kg 至 1 mg/kg，0.0001 mg/kg 至 0.25 mg/kg，0.001 mg/kg 至 0.25 mg/kg，0.005 mg/kg 至 0.25 mg/kg，0.01 mg/kg 至 0.25 mg/kg，0.05 mg/kg 至 0.25 mg/kg 或 0.1 mg/kg 至 0.25 mg/kg。

剂量可以以相同或不同的量每天给药一次或多次，以获得所需水平的mRNA 表达和/或治疗、诊断、预防或成像效果。所需剂量可以例如每天三次、每天两次、每天一次、每隔一天、每三天、每周、每两周、每三周或每四周递送。在某些实施例中，可以使用多次给药(例如，两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次或更多次给药)来递送所需剂量。在一些实施方案中，例如，在外科手术之前或之后，或者在急性疾病、病症或病症的情况下，可以施用单一剂量。

本申请的脂质纳米颗粒可以与一种或多种其他治疗，预防，诊断或成像剂组合使用。“与……结合”并不意味着必须同时施用和/或配制试剂以一起递送，尽管这些递送方法在本申请的范围内。例如，可以组合施用包含一种或多种不同的治疗和/或预防剂的一种或多种纳米颗粒。纳米颗粒可以与一种或多种其他所需的治疗或医学程序同时，之前或之后施用。通常，每种药剂将以针对该药剂确定的剂量和/或时间表来施用。在一些实施方案中，本申请包括将本申请的脂质纳米颗粒与提高其生物利用度、减少和/或改变其代谢、抑制其排泄和/或调节体内收缩的药剂组合递送。

在联合方案中使用的治疗(治疗或程序)的特定组合将考虑期望的治疗和/或程序的兼容性以及要实现的期望的治疗效果。还将认识到，所采用的治疗可以实现对相同病症的期望效果(例如，用于治疗癌症的组合物可以与化疗剂同时施用)，或者它们可以实现不同的效果(例如控制任何副作用，例如输注相关反应)。

在一些实施方案中，治疗有需要的受试者或向受试者(例如哺乳动物)递送治疗性和/或预防性药物的方法可包括在施用纳米颗粒之前用一种或多种药剂预处理受试者。例如，可以用有效量的(例如，10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg 或任何其他有效量)的地塞米松、甲氨蝶呤、对乙酰氨基酚、Hl 受体阻断剂或 H2 受体阻断剂对受试者进行预处理。预处理可以在施用纳米颗粒之前 24 小时或更少小时(例如，24 小时、20 小时、16 小时、12 小时、8 小时、4 小时、2 小时、1 小时、50 分钟、40 分钟、30 分钟、20 分钟或 10 分钟)发生，并且可以在例如增加剂量的情况下发生一次、两次或更多次。

本申请另一方面，提供了一种疫苗制剂，其包括本发明mRNA疫苗和药学上可接受的载体。

在一个具体的实施方式中，药学上可接受的载体包括冷冻保护剂、pH缓冲剂、pH调节剂、注射用水。

在一个具体的实施方式中，所述冷冻保护剂为蔗糖。

在一个具体的实施方式中，所述pH缓冲剂为冰醋酸和/或氨丁三醇。

在一个具体的实施方式中，所述pH调节剂为氢氧化钠和/或盐酸。

在一个具体的实施方式中，所述制剂的pH为7.2~8。

本申请的另一方面，提供了治疗或预防由HPV感染相关疾病的方法，包含向个体施用本发明脂质纳米颗粒组合物或药物组合物或mRNA疫苗或疫苗制剂。

在一些实施方案中，所述HPV感染相关疾病为宫颈癌。

在一些实施方案中，所述HPV感染相关疾病为宫颈癌前病变。

在一些实施方案中，所述HPV感染相关疾病为子宫颈高级别上皮内病变。在一些实施方案中，所述HPV感染相关疾病为高级别鳞状上皮内病变(HSIL)。

在一些实施方案中，所述HPV感染相关疾病为宫颈鳞状上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)2 级或 3 级(CIN2/3)。

在一些实施方案中，所述HPV感染相关疾病为低级别LSIL上皮内瘤变(CIN 1)。

在一些实施方案中，所述HPV感染相关疾病为宫颈原位腺癌(AIS)。

在一些实施方案中，所述HPV感染相关疾病为头颈部鳞癌(HNSCC)。在一些实施方案中，所述HPV感染相关疾病为宫颈癌(CC)。

在一些实施方案中，所述HPV感染相关疾病为口咽部鳞癌。

在一些实施方案中，所述HPV感染相关疾病为肛门癌、阴道癌、外阴癌、阴茎癌中的一种。

在上述方案中，HPV感染相关疾病是与人乳头瘤病毒(HPV)16型和/或18型相关的疾病。

优选的，HPV感染相关疾病是人乳头瘤病毒(HPV)16型和/或18型相关的2级或3级宫颈上皮内瘤变(CIN2/3)。

优选的，HPV感染相关疾病是人乳头瘤病毒(HPV)16和/或HPV18相关的宫颈癌。

优选的，HPV感染相关疾病是人乳头瘤病毒(HPV)16型和/或18型相关的人乳头瘤病毒(HPV)16和/或HPV18相关的头颈部鳞癌。

优选的，HPV感染相关疾病是人乳头瘤病毒(HPV)16和/或HPV18相关的肛门癌。

优选的，HPV感染相关疾病是人乳头瘤病毒(HPV)16和/或HPV18相关的阴道癌。

优选的，HPV感染相关疾病是人乳头瘤病毒(HPV)16和/或HPV18相关的外阴癌。

优选的，HPV感染相关疾病是人乳头瘤病毒(HPV)16和/或HPV18相关的阴茎癌。

在一些实施方案中，所述施用为瘤内或淋巴周围注射或肌肉注射。在一些实施方案中，所述方法还进一步包含向个体施用免疫刺激因子、化学疗法、放射性疗法和/或靶向疗法。在一些实施方案中，所述靶向疗法是针对宫颈癌特异性肿瘤靶点的抗体或其功能结构域。

在一些实施方案中，所述方法还进一步包含向个体施用免疫检查点抑制剂。在一些实施方案中，免疫检查点抑制剂为PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂。

在一些实施方案中，PD-1或PD-L1抑制剂为帕博利珠单抗、纳武利尤单抗、替雷利珠单抗、特瑞普利单抗、信迪利单抗、卡瑞利珠单抗、派安普利单抗、赛帕丽单抗、恩沃利单抗、舒格利单抗、斯鲁利单抗、普特利单抗、阿得贝利单抗中一种或多种。在一些优选的实施方案中，PD-1抑制剂为帕博利珠单抗。

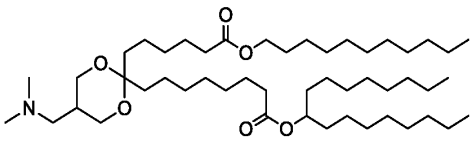
应当理解，本文描述的本申请的方面和实施方案包括“包含”，“组成”和“基本上由……组成”的方面和实施方案。以上详细描述了本申请的优选实施方案，但是，本申请并不限于此。在本申请的技术构思范围内，可以对本申请的技术方案进行多种简单变型，包括各个技术特征以任何其它的合适方式进行组合，这些简单变型和组合同样应当视为本申请所公开的内容，均属于本申请的保护范围。

实施例 1 可电离脂化合物的合成

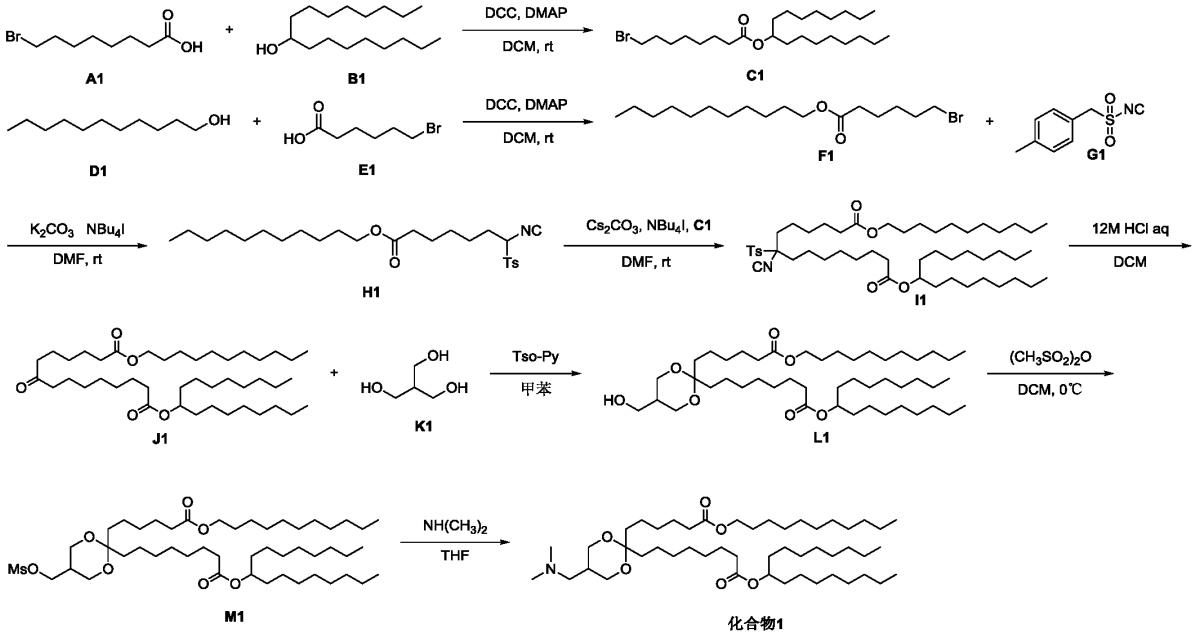
下述实施例是对本申请的举例说明，不以任何方式限制本申请。除非另外

说明，所有温度均为摄氏度，压力为大气压或接近大气压。除了合成的中间体或特别指明外，本申请所用的所有试剂和原料均为商业渠道获得。

化合物1的合成

化合物1 

合成路线如下所示，



具体的，向化合物A1(2.0g, 8.96mmol)的二氯甲烷(30ml)溶液中加入化合物B1(1.9g, 7.47mmol)，DCC(1.8g, 8.96mmol)和DMAP(437mg, 3.58mmol)，室温下搅拌7小时，TLC监测反应。反应完全后，向反应液中加入等体积的饱和碳酸氢钠溶液稀释，分液，有机层加入无水硫酸镁干燥，过滤，滤液浓缩，硅胶柱层析(石油醚：乙酸乙酯=30：1)得到化合物C1(2.9g, 85.00%)。

向化合物E1(5.0g, 25.63mmol)的二氯甲烷(60ml)溶液中加入化合物D1(3.7g, 21.36mmol)，DCC(5.29g, 25.63mmol)和DMAP(1.2g, 10.25mmol)，室温下搅拌7小时，TLC监测反应。反应完全后，向反应液中加入等体积的饱和碳酸氢钠溶液稀释，分液，有机层加入无水硫酸镁干燥，过滤，滤液浓缩，硅胶柱层析(石油醚：乙酸乙酯=30：1)得到化合物F1(6.5g, 88.00%)。

向化合物F1(500mg, 1.44mmol)的DMF(15ml)溶液中加入化合物G(562mg, 2.88mmol),NBu4I(795mg, 2.15mmol)和K2CO3(597mg, 4.32mmol),室温下搅拌12小时，TLC监测反应。反应完全后，向反应液中加入等体积的水稀释，乙酸乙酯萃取(10ml × 3)，浓缩，硅胶柱层析(石油醚：乙酸乙酯=10：1)得到化合物H1(580mg，收率87%)。

向化合物H1(500mg, 1.08mmol)的DMF(15ml)溶液中加入化合物C1(745mg, 1.62mmol), NBu4I(598mg, 1.62mmol)和Cs2CO3(1.4g, 4.32mmol),室温下搅拌15小时，TLC监测反应。反应完全后，向反应液中加入等体积的水稀释，乙酸乙酯萃取(10ml × 3)，浓缩，硅胶柱层析(石油醚：乙酸乙酯=10：1)得到化合物I1(811mg，收率89%)。

向化合物I1(10g, 11.85mmol)的二氯甲烷(100ml)溶液中加入浓盐酸(60ml)，室温下搅拌3小时，TLC监测反应。反应完全后，分液，有机层用饱和碳酸氢钠溶液洗涤，无水硫酸镁干燥，浓缩，硅胶柱层析(石油醚：乙酸乙酯=30：1)得到化合物J1(6.5g, 81.00%)。

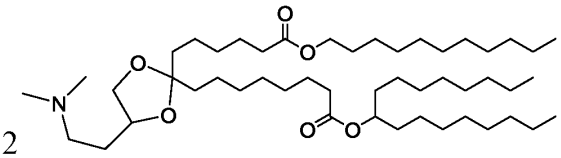
向化合物J1(1g, 1.48mmol)的甲苯(25ml)溶液中加入化合物K1(470mg, 4.44mmol)和4-甲基苯磺酸吡啶鎓(744mg, 2.96mmol),Dean-Stark装置，加热回流20小时，TLC监测反应。反应完全后，冷却至室温，向反应液中加入等体积的水稀释，乙酸乙酯萃取(10ml × 3)，浓缩，硅胶柱层析(石油醚：乙酸乙酯=5：1)得到化合物L1(648mg，收率57%)。

在0℃下，向化合物L1(750mg, 0.98mmol)的超干二氯甲烷(10ml)溶液中加入甲基磺酸酐(340mg，1.96mmol)和无水三乙胺(0.45ml)，搅拌12小时，TLC监测反应。反应完全后，放至室温，向反应液中加入等体积的水稀释，分液，有机层加入无水硫酸镁干燥，过滤，滤液浓缩，硅胶柱层析(石油醚：乙酸乙酯=5：1)得到化合物M1(800mg，收率97%)。

向化合物M1(750mg, 0.89mmol)加入二甲胺(2M in THF)溶液30ml，密封，室温下搅拌6天，TLC监测反应。反应完全后，浓缩，硅胶柱层析(二氯甲烷：甲醇=30：1)得到油状化合物1(212mg，收率30%)。1H NMR (600 MHz, CDCl3) δ 4.87 – 4.82 (m, 1H), 4.05 – 4.02 (m, 2H), 3.90 – 3.85 (m, 2H), 3.59 – 3.56 (m, 2H), 2.31 – 2.23 (m, 4H), 2.21 – 2.19 (m, 8H), 1.94 – 1.87 (brs, 1H), 1.68 – 1.56 (m, 10H), 1.52 – 1.42 (m, 4H), 1.36 – 1.21 (m, 52H), 0.87 – 0.84 (m, 9H); 13C NMR (151 MHz,

CDCl3) δ 173.98, 173.77, 100.76, 74.22, 64.55, 62.87, 62.81, 59.34, 59.31, 45.97, 35.37, 35.28, 34.86, 34.49, 34.46, 34.28, 32.47, 32.39, 32.03, 31.99, 29.99 29.72, 29.65, 29.46, 29.36, 28.80, 26.06, 25.44, 25.29, 25.16, 23.49, 23.26, 23.16, 22.92, 22.79, 14.22; MS-ESI (m/z): 794.6 (M+H)+。

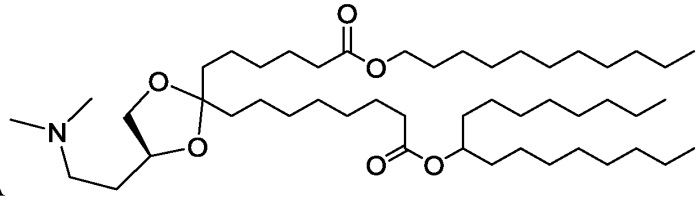
化合物2的合成



化合物2

制备方法同化合物1，使用1,2,4-丁三醇代替化合物K1为原料可制得油状化合物2，1H NMR (600 MHz, CDCl3) δ 4.82 – 4.78 (m, 1H), 4.04 – 3.96 (m, 4H), 3.42 – 3.39 (m, 1H), 2.39 – 2.34 (brs, 1H), 2.29 – 2.25 (brs, 1H), 2.23 – 2.18 (m, 10H), 1.77 – 1.71 (brs, 1H), 1.66 – 1.65 (brs, 1H), 1.58 – 1.39 (m, 13H), 1.33 – 1.16 (m, 53H), 0.82 – 0.80 (m, 9H); 13C NMR (151 MHz, CDCl3) δ 173.62, 173.41, 111.82, 74.63, 74.61, 73.88, 69.89, 64.25, 56.18, 45.28, 37.73, 37.48, 37.40, 37.20, 34.59, 34.19, 34.18, 34.09, 31.83, 31.78, 31.60, 29.70, 29.68, 29.52, 29.50, 29.45, 29.34, 29.32, 29.25, 29.20, 29.15, 29.09, 29.07, 28.59, 25.86, 25.23, 25.07, 24.89, 23.88, 23.58, 23.56, 23.24, 22.60, 22.58, 14.01; MS-ESI (m/z): 794.6 (M+H)+。

化合物2A的合成

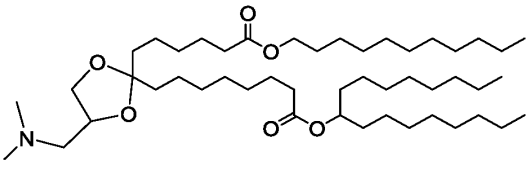


化合物2A

制备方法同化合物1，使用(S)-1,2,4-丁三醇代替化合物K1为原料可制得油状化合物2A，1H NMR (400 MHz, CDCl3) δ 4.97 - 4.83 (m, 1H), 4.17 – 4.05 (m, 4H), 3.52 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 2.58 – 2.37 (m, 2H), 2.35 – 2.23 (m, 10H), 1.91 – 1.70 (m, 2H), 1.69 – 1.50 (m, 14H), 1.48 – 1.24 (m, 52H), 0.92 (t, J = 8.0 Hz, 9H); 13C NMR (100 MHz, CDCl3) δ 174.04, 173.69, 112.10, 74.59, 74.12, 69.94, 64.34, 56.22, 45.21, 37.79, 37.70, 37.44, 37.38, 34.74, 34.42, 34.16, 31.91, 31.88, 31.43, 31.41, 29.80,

29.57, 29.55, 29.52，29.49, 29.32, 29.28, 29.25, 29.19, 28.63, 28.61, 25.95, 25.33, 25.17, 25.00, 23.89, 23.71, 23.59, 22.68, 14.12; MS-ESI (m/z): 795.0 (M+H)+。

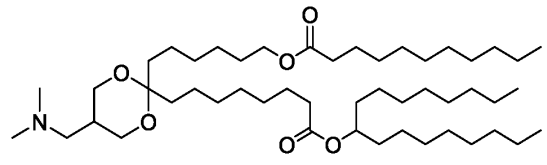
化合物3的合成



化合物3

制备方法同化合物1，使用3-二甲胺基-1,2-丙二醇和对甲苯磺酸一水合物代替化合物K1和4-甲基苯磺酸吡啶鎓为原料可制得油状化合物3，1H NMR (600 MHz, CDCl3) δ 4.85 – 4.81 (m, 1H), 4.20 – 4.16 (m, 1H), 4.06 – 4.01 (m, 3H), 3.49 – 3.46 (m, 1H), 2.48 – 2.44 (m, 1H), 2.35 – 2.32 (m, 1H), 2.27 – 2.22 (m, 10H), 1.60 – 1.54 (m, 8H), 1.48 – 1.47 (m, 4H), 1.31 – 1.20 (m, 54H), 0.86 – 0.83 (m, 9H); 13C NMR (151 MHz, CDCl3) δ 173.90, 173.69, 112.58, 74.40, 74.36, 74.13, 69.06, 64.48, 62.62, 62.59, 46.22, 37.80, 37.55, 37.51, 37.30, 34.79, 34.40, 34.38, 34.24, 31.99, 31.94, 29.88, 29.83, 29.68, 29.66, 29.61, 29.58, 29.52, 29.47, 29.41, 29.38, 29.33, 29.31, 29.27, 29.25, 28.74, 26.01, 25.39, 25.24, 25.06, 25.06, 24.03, 23.70, 23.35, 22.74, 14.17; MS-ESI (m/z): 780.6 (M+H)+。

化合物4的合成

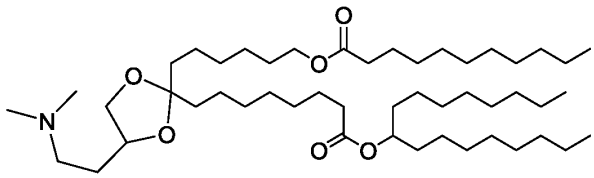


化合物4

制备方法同化合物1，使用十一酸和6-溴-1-己醇代替化合物D1和化合物E1为原料可制得油状化合物4，1H NMR (600 MHz, CDCl3) δ 4.86 – 4.81 (m, 1H), 4.04 – 4.01 (m, 2H), 3.90 – 3.84 (m, 2H), 3.59 – 3.55 (m, 2H), 2.27 – 2.22 (m, 4H), 2.20 – 2.17 (m, 8H), 1.94 – 1.85 (brs, 1H), 1.67 – 1.55 (m, 10H), 1.48 – 1.45 (m, 4H), 1.36 – 1.22 (m, 52H), 0.86 – 0.83 (m, 9H); 13C NMR (151 MHz, CDCl3) δ 174.01, 173.70, 100.73, 74.14, 64.40, 64.36, 62.83, 62.75, 59.31, 59.28, 45.98, 35.50, 35.25, 34.79, 34.47, 34.24, 32.45, 32.43, 32.22, 31.98, 31.95, 29.94, 29.70, 29.64, 29.61,

29.59, 29.55, 29.42, 29.39, 29.35, 29.32, 29.29, 29.25, 28.73, 26.05, 25.40, 25.24, 25.10, 23.45, 23.32, 23.21, 23.08, 22.75, 14.18; MS-ESI (m/z): 794.6 (M+H)+。

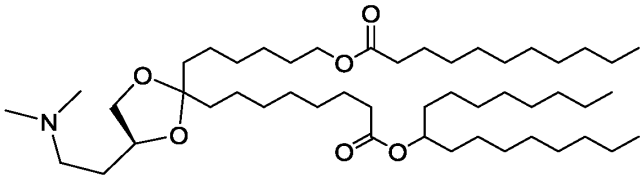
化合物5的合成



化合物5

制备方法同化合物1，使用十一酸，6-溴-1-己醇和1，2，4-丁三醇代替化合物D1，化合物E1和化合物K1为原料可制得油状化合物5，1H NMR (600 MHz, CDCl3) δ 4.81 (p, J = 6.2 Hz, 1H), 4.03 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 3.99 (t, J = 6.6 Hz, 3H), 3.42 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 2.41 – 2.36 (brs, 1H), 2.31 – 2.26 (brs, 1H), 2.23 – 2.20 (m, 10H), 1.78 – 1.73 (brs, 1H), 1.66 – 1.60 (brs, 1H), 1.58 – 1.43 (m, 12H), 1.31 – 1.20 (m, 54H), 0.82 (t, J = 7.0 Hz, 9H); 13C NMR (151 MHz, CDCl3) δ 173.92, 173.60, 112.00, 74.75, 74.73, 74.05, 70.00, 64.31, 56.29, 45.41, 37.83, 37.73, 37.50, 37.42, 34.73, 34.40, 34.20, 31.93, 31.90, 31.73, 31.71, 29.82, 29.80, 29.58, 29.56, 29.53, 29.50, 29.33, 29.30, 29.26, 29.20, 28.67, 28.65, 25.96, 25.35, 25.19, 25.05, 23.90, 23.71, 23.59, 22.69, 14.13; MS-ESI (m/z): 794.6 (M+H)+。

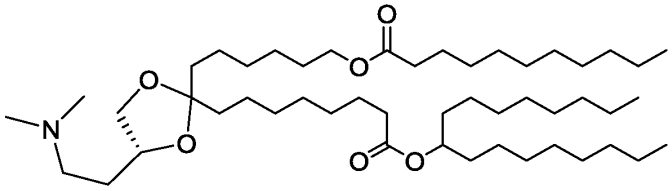
化合物5A的合成



制备方法同化合物1，使用十一酸，6-溴-1-己醇和(S)-1，2，4-丁三醇代替化合物D1，化合物E1和化合物K1为原料可制得油状化合物5A，1H NMR (400 MHz, CDCl3) δ 4.97 - 4.83 (m, 1H), 4.17 – 4.06 (m, 4H), 3.51 (t, J = 4.0 Hz, 1H), 2.51 – 2.45 (m, 1H), 2.44 – 2.32 (m, 1H), 2.31 – 2.23 (m, 10H), 1.87 – 1.80 (m, 1H), 1.74 – 1.67 (m, 1H), 1.66 – 1.50 (m, 14H), 1.48 – 1.24 (m, 52H), 0.92 (t, J = 8.0 Hz, 9H); 13C NMR (100 Hz, CDCl3) δ 173.96, 173.62, 111.98, 74.71, 74.08, 69.96, 64.30, 56.24, 45.36, 37.60, 37.53, 37.50, 37.43, 34.71, 34.39, 34.13, 31.87, 31.84,

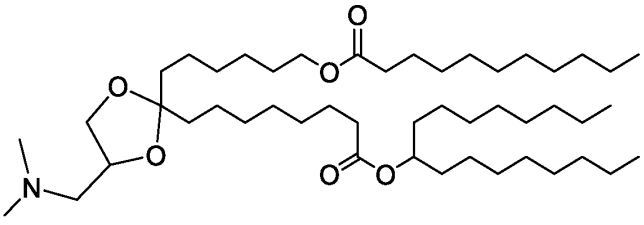
31.67, 31.61, 29.78, 29.70, 29.51, 29.48, 29.30, 29.28, 29.24, 29.18, 28.64, 28.61, 25.94, 25.32, 25.17, 25.03, 23.89, 23.70, 23.59, 22.67, 14.11; MS-ESI (m/z): 795.0 (M+H)+。

化合物5B的合成



制备方法同化合物1，使用十一酸，6-溴-1-己醇和(R)-1，2，4-丁三醇代替化合物D1，化合物E1和化合物K1为原料可制得油状化合物5B，1H NMR (400 MHz, CDCl3) δ 4.97 - 4.83 (m, 1H), 4.17 – 4.05 (m, 4H), 3.51 (t, J = 4.0 Hz, 1H), 2.51 – 2.45 (m, 1H), 2.44 – 2.32 (m, 1H), 2.31 – 2.23 (m, 10H), 1.86 – 1.80 (m, 1H), 1.74 – 1.67 (m, 1H), 1.66 – 1.51 (m, 14H), 1.48 – 1.24 (m, 52H), 0.92 (t, J = 8.0 Hz, 9H); 13C NMR (100 MHz, CDCl3) δ 173.97, 173.62, 111.98, 74.71, 74.08, 69.96, 64.30, 56.24, 45.36, 37.60, 37.43, 37.50, 37.44, 34.71, 34.39, 34.13, 31.87, 31.84, 31.67, 31.61, 29.79, 29.70, 29.51, 29.48, 29.30, 29.28, 29.24, 29.18, 28.64, 28.61, 25.94, 25.32, 25.18, 25.03, 23.89, 23.70, 23.59, 22.67, 14.11; MS-ESI (m/z): 795.0 (M+H)+。

化合物6的合成

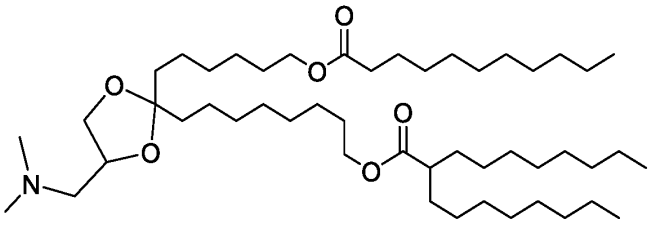


化合物6

制备方法同化合物1，使用十一酸，6-溴-1-己醇和3-二甲胺基-1,2-丙二醇代替化合物D1，化合物E1和化合物K1为原料可制得油状化合物6，1H NMR (500 MHz, CDCl3) δ 4.84 (p, J = 6.2 Hz, 1H), 4.19 (p, J = 6.5 Hz, 1H), 4.06 – 4.01 (m, 3H), 3.49 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 2.48 (dd, J = 12.6, 6.8 Hz, 1H), 2.35 (dd, J = 12.6, 5.0 Hz, 1H), 2.27 – 2.23 (m, 10H), 1.62 – 1.53 (m, 10H), 1.49 – 1.46 (m, 4H), 1.33 – 1.24

(m, 52H), 0.85 (t, J = 6.8 Hz, 9H); 13C NMR (126 MHz, CDCl3) δ 174.05, 173.72, 112.66, 74.44, 74.18, 69.08, 64.40, 62.65, 46.25, 37.82, 37.71, 37.49, 37.44, 34.83, 34.50, 34.26, 32.00, 31.97, 29.91, 29.86, 29.63, 29.61, 29.40, 29.37, 29.33, 29.27, 28.73, 26.04, 25.42, 25.26, 25.12, 24.06, 23.95, 23.73, 23.61, 22.77, 14.19; MS-ESI (m/z): 780.6 (M+H)+。

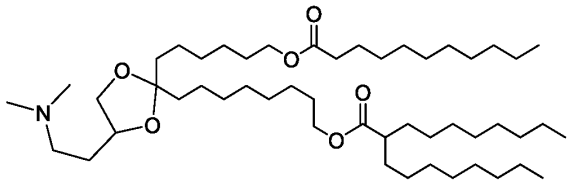
化合物7的合成



化合物7

制备方法同化合物1，使用8-溴-1-辛醇，2-辛基-癸酸和3-二甲胺基-1,2-丙二醇代替化合物A1，化合物B1和化合物K1为原料可制得油状化合物7，1H NMR (500 MHz, CDCl3) δ 4.22 – 4.17 (m, 1H), 4.06 – 4.01 (m, 5H), 3.48 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 2.50 – 2.46 (m, 1H), 2.39 – 2.36 (m, 1H), 2.28 – 2.24 (m, 9H), 1.60 – 1.53 (m, 13H), 1.42 – 1.37 (m, 2H), 1.30 – 1.22 (m, 53H), 0.85 (t, J = 6.8 Hz, 9H); 13C NMR (126 MHz, CDCl3) δ 176.64, 173.92, 112.62, 74.26, 74.21, 68.96, 64.29, 64.10, 62.48, 46.07, 45.85, 37.75, 37.60, 37.42, 37.32, 34.40, 32.56, 31.90, 31.87, 29.91, 29.86, 29.57, 29.46, 29.31, 29.25, 29.18, 28.75, 28.64, 27.47, 25.99, 25.94, 25.03, 23.98, 23.85, 23.64, 23.51, 22.67, 14.10; MS-ESI (m/z): 794.6 (M+H)+。

化合物8的制备

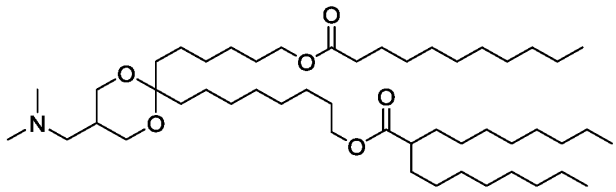


化合物8

制备方法同化合物1，使用8-溴-1-辛醇,2-辛基-癸酸和1，2，4-丁三醇代替化合物A1，化合物B1和化合物K1为原料可制得油状化合物8，1H NMR (500 MHz, CDCl3) δ 4.07 – 4.00 (m, 6H), 3.44 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 2.42 – 2.36 (brs 1H), 2.32 – 2.21 (m, 10H), 1.81 – 1.74 (brs, 1H), 1.68 – 1.51 (m, 14H), 1.42 – 1.34 (brs, 2H), 1.26

– 1.22 (m, 53H), 0.84 (t, J = 6.9 Hz, 9H); 13C NMR (126 MHz, CDCl3) δ 176.69, 173.97, 112.05, 74.81, 70.06, 64.36, 64.16, 56.36, 45.92, 45.50, 37.93, 37.78, 37.59, 37.48, 34.46, 32.63, 31.97, 31.94, 31.82, 29.63, 29.53, 29.37, 29.32, 29.24, 28.81, 28.71, 27.54, 26.06, 26.02, 25.09, 24.07, 23.94, 23.77, 23.64, 22.73, 14.16; MS-ESI (m/z): 808.6 (M+H)+。

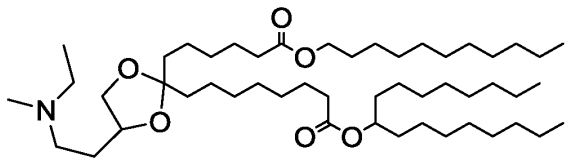
化合物9的制备



化合物9

制备方法同化合物1，使用8-溴-1-辛醇，2-辛基-癸酸，十一酸和6-溴-1-己醇代替化合物A1，化合物B1，化合物D1和化合物E1为原料可制得油状化合物9，1H NMR (500 MHz, CDCl3) δ 4.04 – 4.01 (m, 4H), 3.89 – 3.85 (m, 2H), 3.59 – 3.56 (m, 2H), 2.31 – 2.18 (m, 11H), 1.93 – 1.86 (brs, 1H), 1.67 – 1.52 (m, 12H), 1.43 – 1.23 (m, 56H), 0.85 (t, J = 6.9 Hz, 9H); 13C NMR (126 MHz, CDCl3) δ 176.71, 174.00, 100.75, 64.40, 64.36, 64.18, 62.83, 62.76, 59.34, 59.31F, 45.98, 45.94, 35.46, 35.25, 34.48, 32.64, 32.54, 32.46, 32.34, 31.98, 31.96, 30.06, 29.71, 29.65, 29.55, 29.39, 29.34, 29.26, 28.83, 28.74, 27.56, 26.08, 25.11, 23.46, 23.32, 23.23, 23.09, 22.75, 14.18; MS-ESI (m/z): 808.5 (M+H)+。

化合物10的制备

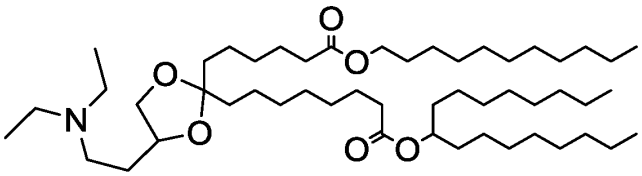


化合物10

制备方法同化合物1，使用1，2，4-丁三醇和N-乙基甲基胺代替化合物K1和二甲胺为原料可制得油状化合物10，1H NMR (600 MHz, CDCl3) δ 4.83 – 4.75 (m, 1H), 4.05 – 3.93 (m, 4H), 3.42 – 3.35 (m, 1H), 2.46-2.30 (m, 4H), 2.23 – 2.15 (m, 7H), 1.79 – 1.70 (m, 1H), 1.67 – 1.59 (m, 1H), 1.56 – 1.51 (m, 6H), 1.43 (d, J = 7.2 Hz, 4H), 1.29 – 1.14 (m, 56H), 0.99 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.80 (t, J = 7.0 Hz, 9H)；13C

NMR (151 MHz, CDCl3) δ 173.72, 173.51, 111.83, 74.85, 74.81, 73.96, 69.99, 64.33, 53.70, 51.43, 41.49, 37.80, 37.56, 37.48, 37.28, 34.66, 34.26, 34.25, 34.15, 31.90, 31.85, 31.30, 29.77, 29.59, 29.57, 29.51, 29.49, 29.41, 29.38, 29.32, 29.29, 29.24, 29.22, 29.16, 29.13, 28.65, 25.92, 25.30, 25.13, 24.97, 23.96, 23.66, 23.31, 22.65, 14.08, 12.09；MS-ESI (m/z): 808.7 (M+H)+。

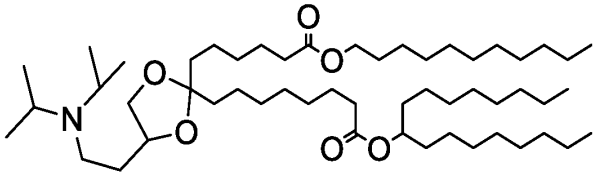
化合物11的制备



化合物11

制备方法同化合物1，使用1，2，4-丁三醇和二乙胺代替化合物K1和二甲胺为原料可制得油状化合物11，1H NMR (600 MHz, CDCl3) δ 4.86 – 4.80 (m, 1H), 4.08 – 4.00 (m, 4H), 3.49 – 3.43 (m, 1H), 2.77 – 2.62 (m, 7H), 2.25 (dt, J = 10.5, 7.5 Hz, 4H), 1.85 – 1.75 (m, 2H), 1.63 – 1.56 (m, 6H), 1.50 – 1.44 (m, 4H), 1.37 – 1.19 (m, 56H), 1.12 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 0.85 (td, J = 7.1, 2.4 Hz, 9H)；13C NMR (151 MHz, CDCl3) δ 173.95, 173.73, 112.22, 74.59, 74.55, 74.17, 69.94, 64.52, 49.36, 46.95, 37.84, 37.59, 37.42, 37.21, 34.80, 34.39, 34.24, 31.99, 31.95, 30.30, 29.87, 29.69, 29.67, 29.62, 29.59, 29.50, 29.47, 29.42, 29.35, 29.32, 29.29, 29.26, 28.74, 26.02, 25.40, 25.24, 25.07, 24.09, 23.82, 23.76, 23.47, 22.75, 14.20, 10.74；MS-ESI (m/z): 822.9(M+H)+。

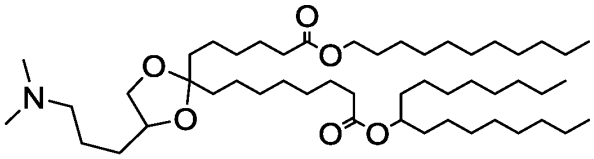
化合物12的制备



化合物12

化合物12的制备参考化合物2的制备。

化合物13的制备

化合物13 

制备方法同化合物1，使用1，2，5-戊三醇代替化合物K1为原料可制得油状化合物13，1H NMR (600 MHz, CDCl3) δ 4.81 – 4.74 (m, 1H), 4.00 – 3.92 (m, 4H), 3.38 – 3.33 (m, 1H), 2.25 – 2.17 (m, 6H), 2.15 (s, 6H), 1.59 – 1.46 (m, 15H), 1.46 – 1.37 (m, 5H), 1.29 – 1.12 (m, 50H), 0.79 (td, J = 7.1, 2.3 Hz, 9H)；13C NMR (151 MHz, CDCl3) δ 173.69, 173.47, 111.86, 76.08, 76.05, 73.92, 69.93, 69.91, F64.29, 59.48, 53.38, 45.24, 37.80, 37.56, 37.47, 37.25, 34.64, 34.24, 34.22, 34.13, 31.88, 31.83, 31.20, 29.76, 29.57, 29.55, 29.49, 29.47, 29.39, 29.37, 29.30, 29.27, 29.22, 29.20, 29.14, 29.11, 28.63, 25.90, 25.28, 25.12, 24.95, 23.95, 23.89, 23.64, 23.62, 23.29, 22.64, 22.62, 14.05; MS-ESI (m/z): 808.8(M+H)+。

实施例2 mRNA的合成

2.1 HPV疫苗序列的合成及重组载体构建

本实施例中HPV mRNA疫苗的抗原序列为16和18型HPV的E6和E7蛋白，将其编码片段串联获得多核苷酸序列。自5’端依次包含：5’端带有XbaI的T7启动子、5’UTR、tPA-SP、Flt3L、HPV E2、E6/E7蛋白或其变体、3’UTR 和/或poly A尾的编码核苷酸序列进行XbaI和NotI双酶切，与经过XbaI和NotI酶切的pUC57-GW-Kan(金维智)载体骨架片段进行连接反应，构建重组质粒。

2.2 mRNA制备

2.2.1 质粒线性化

步骤1构建的重组质粒，在polyA尾序列最后一个A后面有一个Sap Ⅰ酶切位点。用限制性内切酶Sap Ⅰ线性化含有目的基因的质粒，反应体系如表1所示，37℃酶切3 h。

表1. 质粒线性化酶切体系

10×Cutsmart缓冲液	5 μL
SapI酶(10000U/mL)	1 μL
质粒	10 μg

ddH2O	补齐至50 μL

取2 μL酶切产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，检测质粒的线性化情况。利用PCR产物回收试剂盒(康维世纪)纯化线性化质粒。

(2)体外转录及纯化

以步骤(1)获得的线性化重组质粒为模板进行体外转录，利用高产量T7 RNA转录试剂盒进行体外转录。高产量T7 RNA转录试剂盒，产品名称为High Yield T7 RNA Synthesis Kit，上海兆维科技发展有限公司，产品目录号为ON-040；5× Reaction Buffer、100mM ATP Solution、100mM CTP Solution、100mM GTP Solution、Enzyme mix、DNase I、Ammonium Acetate Stop Solution、Lithium Chloride (LiCl) Precipitation Solution均为高产量T7 RNA转录试剂盒中的组件。100mM ΨUTP Solution (假尿苷三磷酸)，全称为N1-Me-pUTP，100mM，上海兆维科技发展有限公司，产品目录号为R5-027。按如下体系(表2)加入各组分(以20μL反应体系为例)，混匀后37℃反应3h。

表2. 体外转录体系

5×Reaction Buffer	4μL
ATP(100mM)	2μL
ΨTP(100mM)	2μL
CTP(100mM)	2μL
GTP(100mM)	2μL
Enzyme mix	1μL
线性化DNA模板	500ng-1μg
CleanCap AG (100 mM)	1μL
无核酸酶H2O	补齐至20μL

其中，CleanCap AG为m7G(5')ppp(5')(2'□OMeA)pG，货号为ON-134，上海兆维。

转录反应结束后，加入1 μL DNase I，37℃反应15 min，加入15 μL Ammonium Acetate Stop Solution，混匀。之后加入1/3体积的7.5 M Lithium Chloride (LiCl) Precipitation Solution(使其终浓度为2.5M)，-20℃放置30 min。12000 g离心15 min，RNA沉淀在底部，弃掉上清。加入1 mL 70%乙醇清洗RNA，12000 g离心5 min，弃掉上清。晾干后加入50 μL无RNA酶的水溶解沉淀，并使

用紫外分光光度计进行mRNA定量，得到加帽的体外转录mRNA。

实施例 3 脂质纳米颗粒(LNP)包载与测定

用 pH4.0~6.0 的醋酸将 HPV mRNA(SEQ ID NO：12 所示)配制成浓度为 200 μg/ml 的溶液，根据处方量用无水乙醇将四个脂配制成混脂溶液。采用柱塞泵或注射泵将油相、水相按照 1:3 的流速经过 T 混流装置进行混合，形成 LNP 后，用 2~10 倍的蔗糖或水溶液稀释。采用超滤方式除去样品中的乙醇，用醋酸溶液进行置换，置换倍数不低于 3 倍。置换后用 Tris 调节产品的 pH 值为 7.0~8.0，用蔗糖调节渗透压接近生理值。除菌过滤，密封，于-20℃保存。最后用 Ribogreen 试剂盒和 10%OTG 作为破乳剂检测 LNP 中 mRNA 总含量和游离含量，并计算 LNP 的包封率。在用稀释液将 LNP 最终产品稀释，加入到粒径池中 1ml，放到马尔文 ZetaSizer 仪器上，检测 LNP 的粒径，结果见表 3。

表 3.化合物 5A 的不同比例 LNP 配方对 HPV mRNA 的包封率测定实验结果

样品编号	N/P	化合物 5A (×100 mol%)	DSPC (×100 mol%)	胆固醇 (×100 mol%)	DMG-PEG2K (×100 mol%)	0 天		
						包封率/%	粒径/nm	PDI
1	4.50	0.443	0.093	0.450	0.015	97.68	72.3	0.05706
2	4.50	0.400	0.150	0.425	0.025	98.76	60.19	0.0751
3	4.50	0.500	0.050	0.430	0.021	98.53	72.95	0.01876
4	3.50	0.400	0.125	0.450	0.025	98.80	59.65	0.07077
5	3.50	0.460	0.110	0.410	0.020	98.75	67.24	0.03711
6	5.50	0.475	0.050	0.450	0.025	98.51	64.56	0.06519
7	3.50	0.475	0.050	0.450	0.025	98.06	67.57	0.03252
8	5.50	0.400	0.150	0.435	0.015	95.17	66.27	0.1762
9	3.50	0.485	0.050	0.450	0.015	97.79	83.23	0.006533
10	5.50	0.400	0.130	0.450	0.020	97.17	61.13	0.1007
11	5.50	0.500	0.125	0.350	0.025	99.14	66.89	0.03853
12	3.50	0.500	0.080	0.395	0.025	97.81	69.05	0.03225
13	5.50	0.423	0.150	0.403	0.025	97.50	61.27	0.06134
14	4.50	0.460	0.110	0.410	0.020	98.49	66.52	0.04339
15	3.50	0.500	0.135	0.350	0.015	97.89	79.23	0.03701

16	5.50	0.460	0.110	0.410	0.020	98.66	69.06	0.06607
17	3.50	0.475	0.150	0.350	0.025	100.00	63.25	0.06019
18	5.50	0.485	0.150	0.350	0.015	97.67	68.54	0.0823
19	5.50	0.500	0.050	0.435	0.015	96.46	76.89	0.01484
20	3.50	0.400	0.150	0.435	0.015	97.88	70.05	0.07959
21	5.2	0.480	0.103	0.396	0.021	95	72.9	0.08
对照组 (SM-102)	5.2	0.5	0.1	0.385	0.015	98.39	68.76	0.04722

由表 3 可知，结果显示实施例化合物 5A 所形成的 LNP 的粒径均一性、包封率等性能出色，与目前已知的 SM-102 标准配方相比，性能相当或更优。

流式分析

利用流式细胞术分析试验动物体内细胞免疫水平，为候选疫苗的有效性评价提供科学依据。细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL 细胞)通常称为 CD8+T 细胞，在免疫系统抵御病原体(如病毒、细菌和肿瘤)中发挥重要作用。IFN-γ 作为免疫活性细胞分泌的细胞因子在诱导细胞免疫中起着重要的免疫调理作用，包括激活细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte,CTL)、自然杀伤细胞(natural killer cell，NK)细胞和吞噬细胞等，目前，检测 IFN-γ 的水平已经逐渐代替各种传统的细胞免疫检测手段，成为检测细胞免疫效果的一种重要方法。

实验步骤

C57BL/6 小鼠免疫步骤：通过小鼠后肢肌肉注射表 3 配方包载的 HPV mRNA 序列，免疫剂量：12.5 μg，免疫体积：50 μL, 免疫 7 天后试验终点。

试验终点时，C57BL/57 小鼠牺牲后，在无菌环境下取出脾脏，放入含有 2 mL RPMI 1640 完全培养基的 6 孔细胞培养板中。研磨脾脏，制备单细胞悬液，利用细胞筛网过滤；转移单细胞滤液至 50 mL 无菌离心管中；室温 300 g 离心 5 min。弃上清，加入 3 mL 红细胞裂解液，充分重悬细胞，放入 37℃ 5% CO2 细胞培养箱，孵育 3 min；孵育结束后，加入同等体积的 RPMI 1640 完全培养基，充分混匀，终止反应；然后，利用细胞筛网再次过滤单细胞悬液。获得单细胞过滤液，300 g 离心 5 min，弃去上清，加入 2 mL RPMI 1640 完全培养基，充分重悬细胞后计数； 并将细胞浓度调整至 1 x 10^7 cells/mL。取 96 孔 U 底细胞培养

板，每孔接种 1 x 10^6 细胞量；HPV 疫苗肽库作为刺激物，BFA+莫能霉素作为阻断剂：肽库工作浓度：2 μg/ml/ Peptide；BFA 稀释倍数： 0.1 μL/test(1000 倍稀释)；莫能霉素稀释倍数： 0.1 μL/test(1000 倍稀释)。

将 96 孔 U 底细胞板放入 37℃、5% CO2 培养箱中，过夜培养。取出刺激后的 96 孔 U 底细胞板，300 g 离心 5 min，弃掉上清；

胞外流式抗体染色

胞外染色抗体的配制(1 x PBS 配制)

Anti-CD3-cy5.5 染色浓度分别是：1 μL/test

Anti-CD4-APC (Biolegend)染色浓度分别是：0.5 μL/test

Anti-CD8 -FITC (MBL)染色浓度分别是：5 μL/test

每孔加入 100 μL 胞外抗体染色混合液，4℃避光孵育 30 min ；加入 100 μL PBS，300 g 离心 5 min，弃上清；每孔加入 200 μL 固定液，充分重悬细胞，4℃避光孵育 30 min。300 g 离心 5 min，弃上清；每孔加入 100 μL 1x 破膜液，充分重悬细胞；300g 离心 5 min，弃上清。

胞内流式抗体染色

胞内染色抗体配置(1x 破膜液配制)

Anti-IFN-γ-PE (Biolegend)染色浓度分别是：0.5 μL/test 每孔加入 100 μL 胞内抗体染色混合液，室温避光振荡孵育 1h 以上。

孵育结束后，300 g 离心 5 min，弃上清；每孔加入 200 μL PBS，充分重悬细胞，300 g 离心 5 min，弃上清；4.9.4每孔加入 200 μL PBS，充分重悬细胞，上机分析。

以对照组 SM-102 标准配方样品的 CD8+IFN-γ+双阳性细胞检测结果为 1，化合物 5A 不同配方样品的表达量与之进行比较。结果如图 1 所示，化合物 5A 的不同配方比例在 CD8+ IFN-γ+阳性表达细胞数均显著优于对照组 SM-102 标准配方样品，CD8+ IFN-γ+阳性细胞比例提高了 1.2-1.7 倍。表明基于化合物 5A 的配方相较于 SM-102 标准配方递送 mRNA 序列能够诱导更强烈的细胞免疫反应。

实施例 4

用醋酸缓冲液溶解氯化钙，得到一定浓度的 Ca^{2+}溶液，再用于稀释 HPV

mRNA 得到 mRNA 工作液, mRNA 终浓度 200 μg/ml，Ca^{2+}溶液终浓度(如表 4 所示)。mRNA 水相与混合脂质乙醇相按照体积比 3：1 混合，混合后样品经稀释、浓缩、置换，除去乙醇，再定容并调节 pH 值至 7-8(具体步骤可参见实施例 2)。用蔗糖调节渗透压接近生理值。除菌过滤，密封，于-20℃保存。

取 HPV mRNA 注射液 0.5ml，加 10%曲拉通溶液 0.5ml 破乳，再用 2%硝酸水溶液稀释至 10ml，摇匀。依照中国药典(2020 版)0411 电感耦合等离子体原子发射光谱法进行检测。

表 4: 配方组成

样品编号	N/P	化合物 5A (×100 mol%)	DSPC (×100 mol%)	胆固醇 (×100 mol%)	DMG-PEG2K (×100 mol%)	Ca^{2+}浓度 mM
21	5.2	0.480	0.103	0.396	0.021	0
21-1	5.2	0.480	0.103	0.396	0.021	0.8
21-2	5.2	0.480	0.103	0.396	0.021	3.2
21-3	5.2	0.480	0.103	0.396	0.021	8
13	5.5	0.423	0.150	0.403	0.025	0
13-1	5.5	0.423	0.150	0.403	0.025	1.6

Elispot 分析

利用 Elispot 分析试验动物体内细胞免疫水平，为候选疫苗的有效性评价提供科学依据。细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL 细胞)通常称为 $CD8^+$T 细胞，在免疫系统抵御病原体(如病毒、细菌和肿瘤)中发挥重要作用。IFN-γ 作为免疫活性细胞分泌的细胞因子在诱导细胞免疫中起着重要的免疫调理作用，包括激活细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte,CTL)、自然杀伤细胞(natural killer cell，NK)细胞和吞噬细胞等，目前，检测 IFN-γ 的水平已经逐渐代替各种传统的细胞免疫检测手段，成为检测细胞免疫效果的一种重要方法。

给小鼠肌肉注射 HPV mRNA 注射液，以 mRNA 计 25μg/只，5 只/样品。给药 7 天后，处死小鼠并获取脾脏单细胞悬液，浓度 1.5 x 10^6 cells/ml，采用 IFN-γ Elispot KIT 试剂盒检测 $CD8^+$ IFN-γ 阳性分泌表达细胞数。Elispot KIT 试剂盒通过显色反应使分泌细胞因子 IFN-γ 的阳性细胞显现清晰可辨的斑点，再通过 ELISPOT 分析系统对斑点进行计数，1 个斑点代表 1 个活性细胞，依此计算出分泌该细胞因子的细胞的频率，通常以 10^6 cells 中活性细胞数表示。

采用 IFN-γ Elispot KIT 试剂盒对各样品的小鼠脾脏 IFN-γ 分泌表达效果进行检测，以 10^6 cells 中阳性细胞数表示。以未加 Ca^{2+}的样品的 IFN-γ 阳性细胞检测结果为 1，其他样品与之进行比较。如图 2(配方 21-1、21-2、21-3)、图 3(配方 13-1)所示，与未加 Ca^{2+}样品的表达效果相比，考察范围内，不同浓度 Ca^{2+}的样品表达效果提高了 1~5 倍。

本申请以上实施例中使用的序列示于如下序列表中。应当理解，以下序列仅为本申请实施方案的示例性序列，而非对本申请方案的任何限制。以下序列表中的核酸序列可表示 DNA 序列或 RNA 序列，当其表示 RNA 序列时，其中的“T”代表尿苷。

序列表:

SEQ ID NO.	名称	序列
氨基酸序列		
1	Flt3L	ITQDCSFQHSPISSDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLQDEELCGGLWRLVLAQRW MERLKTVAGSKMQGLLERVNTEIHFVTKCAFQPPPSCLRFVQTNISRLLQETSEQLV ALKPWITRQNFSRCLELQCQPDSSTLPPPWSPRPLEATAPTAPGGGSGD
2	tPA-SP	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPS
3	HPV 抗原序列	MNVCQDKILEHYENDSKDILEHYENDSKDLCDHICDHIDYWKHIRLECAIMYKARIR LECAIMYKAREMGFHQFDGDICNTMHYTNWIYICEDAQCTVVEGQVDKKWEVHA GGQVILCPESGQRRIKRPRSENCHPNKLLILKCLRYRFKKHCKLSSTWHWTCHDGKH KWHWTCHDGKHKNAIVTLTYDHIDYWKAIRQENAIFFAARHQVVPALNICKAKAC KAIEWNTEPKHCFKKGGQHIEVWFDYVAWDSVYYCGDDGWCKTEAEKYGCKGT WEVHFGNSIDCNDSMCSTFDDNVSATELVKMARFEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQ DIEITCVYCKTVLELTEVFEFAFKDLFVVYRDSIPHAACHKCIDFYSRIRELRYYSDSV MYGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQLSDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQ RHTMLCMCFYSRIRELRYYSDSVYGDTLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLR HLNEKRRFHKIAGHYRGQCHSCCNRARQERLQRRRETQVARRAEPQRHTMLCMCC KCEARIELVVESSADDLRAFQQLFLSTLSFVCPWCASQQMHQKRTAMFQDPQERPR KLPHLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCL KFYSKISEYRYMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAE PDRAHYNIVTFCCKCDSTLDKCLKFYSKISEYRYYCYSVYGTTLEQQYNKPLCDLLI RCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCCRSSRTRRETQLHYNIVTF CCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKP
4	tPA-SP+Flt3L+ HPV- 抗原序列	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSITQDCSFQHSPISSDFAVKIRELSDYLLQDYPVT VASNLQDEELCGGLWRLVLAQRWMERLKTVAGSKMQGLLERVNTEIHFVTKCAFQ PPPSCLRFVQTNISRLLQETSEQLVALKPWITRQNFSRCLELQCQPDSSTLPPPWSPRP LEATAPTAPGGGSGDMNVCQDKILEHYENDSKDILEHYENDSKDLCDHICDHIDYW KHIRLECAIMYKARIRLECAIMYKAREMGFHQFDGDICNTMHYTNWIYICEDAQCT VVEGQVDKKWEVHAGGQVILCPESGQRRIKRPRSENCHPNKLLILKCLRYRFKKHC KLSSTWHWTCHDGKHKWHWTCHDGKHKNAIVTLTYDHIDYWKAIRQENAIFFAA RHQVVPALNICKAKACKAIEWNTEPKHCFKKGGQHIEVWFDYVAWDSVYYCGDD GWCKTEAEKYGCKGTWEVHFGNSIDCNDSMCSTFDDNVSATELVKMARFEDPTRR PYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFEFAFKDLFVVYRDSIPHAACHKCI

		DFYSRIRELRYYSDSVMYGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQLSDSEEENDEID GVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCFYSRIRELRYYSDSVYGDTLEKLTNTGLYNLLI RCLRCQKPLNPAEKLRHLNEKRRFHKIAGHYRGQCHSCCNRARQERLQRRRETQVA RRAEPQRHTMLCMCCKCEARIELVVESSADDLRAFQQLFLSTLSFVCPWCASQQMH QKRTAMFQDPQERPRKLPHLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCIV YRDGNPYAVCDKCLKFYSKISEYRYMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDS SEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCKCDSTLDKCLKFYSKISEYRYYCYSVYGT TLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCCRSS RTRRETQLHYNIVTFCCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKP
核酸序列组件		
5	5’UTR	ACTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCACC
6	3’UTR	GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCCAGCCCCTCC TCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC
7	polyA 尾	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAGATATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAA AAGAAAAAAAAAAAAAAAAA
ORF 序列		
8	tPA-SP 多核苷酸序列	ATGGACGCCATGAAGCGCGGTCTTTGCTGCGTCCTGCTGTTATGCGGCGCTGTGT TCGTCAGCCCTAGC
9	Flt3L 多核苷酸序列	ATAACGCAGGACTGCAGCTTCCAGCACAGCCCTATATCTTCGGACTTCGCGGTCA AGATTCGGGAGCTCTCCGACTATCTGCTCCAGGACTATCCCGTCACGGTCGCCAG CAACCTTCAGGACGAAGAGTTGTGTGGCGGCCTGTGGCGGTTAGTCCTGGCGCA GCGTTGGATGGAGCGCCTGAAGACCGTGGCTGGTTCGAAGATGCAGGGCTTGCT GGAGCGGGTGAACACGGAGATTCACTTCGTGACCAAGTGCGCGTTTCAGCCTCC GCCGAGCTGTCTGAGGTTCGTGCAGACGAACATCAGTCGGCTCTTGCAGGAGAC TAGCGAGCAGTTGGTCGCGTTGAAGCCGTGGATCACCCGCCAGAACTTCTCACG TTGCCTTGAGCTGCAGTGCCAGCCGGATTCCTCGACCCTCCCTCCGCCGTGGTCG CCGCGGCCGCTGGAGGCCACGGCGCCCACGGCGCCTGGCGGCGGGAGCGGAGA T
10	编码 HPV 抗原的多核苷酸序列	ATGAACGTGTGCCAGGATAAGATCTTGGAGCATTACGAGAATGACTCCAAGGAT ATCCTGGAGCACTATGAGAACGACTCCAAGGATCTATGTGATCACATCTGTGAT CACATAGATTATTGGAAGCACATCCGGCTGGAGTGCGCCATTATGTATAAGGCT CGGATACGGCTGGAATGTGCTATAATGTATAAAGCCCGTGAGATGGGCTTTCAC CAGTTCGATGGTGACATTTGTAACACAATGCACTATACGAACTGGATATACATCT GCGAGGACGCGCAGTGTACGGTAGTTGAGGGTCAGGTAGACAAGAAGTGGGAG GTTCACGCGGGTGGGCAGGTCATCCTCTGCCCGGAGTCCGGGCAGAGGAGGATC AAGCGTCCGCGGAGTGAAAACTGCCACCCTAACAAGCTACTGATCCTCAAGTGC CTTCGCTATCGCTTCAAGAAGCATTGCAAGTTGTCGTCCACGTGGCACTGGACTT GCCACGACGGCAAGCACAAGTGGCACTGGACGTGCCACGACGGCAAGCACAAG AACGCGATAGTGACGCTTACCTATGATCACATAGATTATTGGAAAGCGATCCGG CAGGAGAATGCGATATTCTTCGCTGCTAGACACCAGGTGGTGCCCGCGTTGAAT ATCTGCAAGGCGAAGGCCTGCAAGGCCATAGAGTGGAACACAGAGCCGAAGCA CTGCTTTAAGAAAGGCGGTCAGCACATCGAGGTCTGGTTCGACTATGTGGCCTG GGACTCGGTCTACTATTGCGGCGACGACGGTTGGTGCAAGACCGAGGCCGAGAA ATACGGCTGCAAAGGGACGTGGGAAGTTCACTTCGGGAACTCCATCGATTGCAA CGACTCCATGTGCAGCACGTTTGACGATAACGTGTCTGCCACGGAGTTGGTAAA GATGGCCCGATTCGAAGATCCCACAAGAAGACCCTACAAGCTGCCCGACCTGTG CACCGAGCTGAACACAAGCCTCCAAGACATCGAGATTACCTGCGTGTACTGCAA GACCGTGCTGGAGCTGACCGAGGTGTTCGAGTTCGCCTTCAAGGACCTGTTCGTG GTGTACAGAGACAGCATCCCACACGCCGCCTGCCACAAGTGCATCGACTTCTAC AGCCGGATTCGGGAACTGCGGTACTACAGCGACAGCGTGATGTATGGGCCCAAG GCCACCCTGCAAGACATCGTGCTGCACCTGGAGCCTCAGAACGAAATACCCGTG GACCTGCTGTGCCATGAGCAACTGAGCGACAGCGAGGAAGAGAATGATGAGAT CGACGGCGTGAATCATCAGCACCTGCCCGCTAGAAGGGCCGAGCCACAACGGCA CACCATGCTGTGCATGTGCTTCTACAGCAGAATCAGAGAACTCCGGTATTACAG

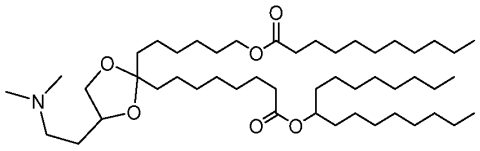
		CGACTCCGTGTACGGAGATACCCTCGAGAAGCTGACCAACACCGGCCTGTACAA TCTGCTGATCAGATGTCTGAGATGTCAGAAACCCTTAAATCCCGCCGAGAAGCT GAGACACCTGAACGAGAAGAGAAGATTCCACAAGATCGCCGGCCACTACAGAG GGCAGTGCCACAGCTGCTGCAACAGAGCTAGACAAGAGAGACTGCAGAGAAGA CGGGAGACCCAAGTGGCTAGAAGGGCTGAGCCGCAAAGACATACCATGCTGTGT ATGTGCTGCAAATGCGAGGCTAGAATCGAGCTGGTGGTGGAGAGCAGCGCCGAC GACCTGAGAGCCTTTCAGCAGCTGTTCCTGAGCACCCTGAGCTTCGTGTGTCCCT GGTGCGCTAGCCAACAGATGCATCAGAAGAGAACCGCCATGTTCCAAGATCCGC AAGAGAGACCTAGAAAACTCCCTCATCTGTGCACCGAACTGCAGACCACCATCC ACGACATCATCCTGGAGTGCGTGTATTGCAAACAACAGCTGCTGAGAAGAGAGG TGTACGACTTCGCCTTCAGAGACCTGTGCATCGTGTACCGGGACGGCAATCCCTA CGCCGTGTGCGACAAGTGCCTCAAGTTCTATAGCAAGATCAGCGAGTATAGATA CATGCACGGAGATACGCCGACCCTGCACGAGTACATGCTGGACCTGCAGCCCGA GACCACCGACCTGTACTGCTACGAGCAGCTGAACGACAGCAGCGAAGAGGAGG ACGAGATTGACGGCCCGGCCGGCCAAGCCGAGCCCGACAGAGCCCACTACAAC ATCGTGACCTTCTGCTGTAAATGCGATAGCACACTGGACAAGTGCCTGAAGTTCT ACAGCAAGATTAGCGAGTACAGATATTACTGCTACTCCGTGTACGGGACAACCC TGGAGCAGCAGTACAACAAGCCTCTGTGCGACCTGCTGATCCGGTGTATTAACT GTCAGAAGCCCTTGTGTCCCGAGGAGAAGCAGAGACACCTGGACAAGAAGCAG AGATTCCACAACATCAGAGGCAGATGGACCGGCAGATGCATGAGCTGCTGCAGA AGCAGCAGAACAAGAAGAGAGACACAACTGCACTACAATATCGTCACCTTCTGC TGCAAGTGCGACTCCACACTGCGGCTCTGCGTGCAGAGCACCCACGTGGACATC AGAACCCTGGAGGACCTGCTGATGGGCACCCTGGGCATCGTGTGTCCCATCTGC AGCCAAAAGCCCTGATGA
11	ORF 多核苷酸序列	ATGGACGCCATGAAGCGCGGTCTTTGCTGCGTCCTGCTGTTATGCGGCGCTGTGT TCGTCAGCCCTAGCATAACGCAGGACTGCAGCTTCCAGCACAGCCCTATATCTTC GGACTTCGCGGTCAAGATTCGGGAGCTCTCCGACTATCTGCTCCAGGACTATCCC GTCACGGTCGCCAGCAACCTTCAGGACGAAGAGTTGTGTGGCGGCCTGTGGCGG TTAGTCCTGGCGCAGCGTTGGATGGAGCGCCTGAAGACCGTGGCTGGTTCGAAG ATGCAGGGCTTGCTGGAGCGGGTGAACACGGAGATTCACTTCGTGACCAAGTGC GCGTTTCAGCCTCCGCCGAGCTGTCTGAGGTTCGTGCAGACGAACATCAGTCGG CTCTTGCAGGAGACTAGCGAGCAGTTGGTCGCGTTGAAGCCGTGGATCACCCGC CAGAACTTCTCACGTTGCCTTGAGCTGCAGTGCCAGCCGGATTCCTCGACCCTCC CTCCGCCGTGGTCGCCGCGGCCGCTGGAGGCCACGGCGCCCACGGCGCCTGGCG GCGGGAGCGGAGATATGAACGTGTGCCAGGATAAGATCTTGGAGCATTACGAGA ATGACTCCAAGGATATCCTGGAGCACTATGAGAACGACTCCAAGGATCTATGTG ATCACATCTGTGATCACATAGATTATTGGAAGCACATCCGGCTGGAGTGCGCCA TTATGTATAAGGCTCGGATACGGCTGGAATGTGCTATAATGTATAAAGCCCGTG AGATGGGCTTTCACCAGTTCGATGGTGACATTTGTAACACAATGCACTATACGAA CTGGATATACATCTGCGAGGACGCGCAGTGTACGGTAGTTGAGGGTCAGGTAGA CAAGAAGTGGGAGGTTCACGCGGGTGGGCAGGTCATCCTCTGCCCGGAGTCCGG GCAGAGGAGGATCAAGCGTCCGCGGAGTGAAAACTGCCACCCTAACAAGCTACT GATCCTCAAGTGCCTTCGCTATCGCTTCAAGAAGCATTGCAAGTTGTCGTCCACG TGGCACTGGACTTGCCACGACGGCAAGCACAAGTGGCACTGGACGTGCCACGAC GGCAAGCACAAGAACGCGATAGTGACGCTTACCTATGATCACATAGATTATTGG AAAGCGATCCGGCAGGAGAATGCGATATTCTTCGCTGCTAGACACCAGGTGGTG CCCGCGTTGAATATCTGCAAGGCGAAGGCCTGCAAGGCCATAGAGTGGAACACA GAGCCGAAGCACTGCTTTAAGAAAGGCGGTCAGCACATCGAGGTCTGGTTCGAC TATGTGGCCTGGGACTCGGTCTACTATTGCGGCGACGACGGTTGGTGCAAGACC GAGGCCGAGAAATACGGCTGCAAAGGGACGTGGGAAGTTCACTTCGGGAACTC CATCGATTGCAACGACTCCATGTGCAGCACGTTTGACGATAACGTGTCTGCCACG GAGTTGGTAAAGATGGCCCGATTCGAAGATCCCACAAGAAGACCCTACAAGCTG CCCGACCTGTGCACCGAGCTGAACACAAGCCTCCAAGACATCGAGATTACCTGC GTGTACTGCAAGACCGTGCTGGAGCTGACCGAGGTGTTCGAGTTCGCCTTCAAG GACCTGTTCGTGGTGTACAGAGACAGCATCCCACACGCCGCCTGCCACAAGTGC ATCGACTTCTACAGCCGGATTCGGGAACTGCGGTACTACAGCGACAGCGTGATG TATGGGCCCAAGGCCACCCTGCAAGACATCGTGCTGCACCTGGAGCCTCAGAAC

		GAAATACCCGTGGACCTGCTGTGCCATGAGCAACTGAGCGACAGCGAGGAAGA GAATGATGAGATCGACGGCGTGAATCATCAGCACCTGCCCGCTAGAAGGGCCGA GCCACAACGGCACACCATGCTGTGCATGTGCTTCTACAGCAGAATCAGAGAACT CCGGTATTACAGCGACTCCGTGTACGGAGATACCCTCGAGAAGCTGACCAACAC CGGCCTGTACAATCTGCTGATCAGATGTCTGAGATGTCAGAAACCCTTAAATCCC GCCGAGAAGCTGAGACACCTGAACGAGAAGAGAAGATTCCACAAGATCGCCGG CCACTACAGAGGGCAGTGCCACAGCTGCTGCAACAGAGCTAGACAAGAGAGAC TGCAGAGAAGACGGGAGACCCAAGTGGCTAGAAGGGCTGAGCCGCAAAGACAT ACCATGCTGTGTATGTGCTGCAAATGCGAGGCTAGAATCGAGCTGGTGGTGGAG AGCAGCGCCGACGACCTGAGAGCCTTTCAGCAGCTGTTCCTGAGCACCCTGAGC TTCGTGTGTCCCTGGTGCGCTAGCCAACAGATGCATCAGAAGAGAACCGCCATG TTCCAAGATCCGCAAGAGAGACCTAGAAAACTCCCTCATCTGTGCACCGAACTG CAGACCACCATCCACGACATCATCCTGGAGTGCGTGTATTGCAAACAACAGCTG CTGAGAAGAGAGGTGTACGACTTCGCCTTCAGAGACCTGTGCATCGTGTACCGG GACGGCAATCCCTACGCCGTGTGCGACAAGTGCCTCAAGTTCTATAGCAAGATC AGCGAGTATAGATACATGCACGGAGATACGCCGACCCTGCACGAGTACATGCTG GACCTGCAGCCCGAGACCACCGACCTGTACTGCTACGAGCAGCTGAACGACAGC AGCGAAGAGGAGGACGAGATTGACGGCCCGGCCGGCCAAGCCGAGCCCGACAG AGCCCACTACAACATCGTGACCTTCTGCTGTAAATGCGATAGCACACTGGACAA GTGCCTGAAGTTCTACAGCAAGATTAGCGAGTACAGATATTACTGCTACTCCGTG TACGGGACAACCCTGGAGCAGCAGTACAACAAGCCTCTGTGCGACCTGCTGATC CGGTGTATTAACTGTCAGAAGCCCTTGTGTCCCGAGGAGAAGCAGAGACACCTG GACAAGAAGCAGAGATTCCACAACATCAGAGGCAGATGGACCGGCAGATGCAT GAGCTGCTGCAGAAGCAGCAGAACAAGAAGAGAGACACAACTGCACTACAATA TCGTCACCTTCTGCTGCAAGTGCGACTCCACACTGCGGCTCTGCGTGCAGAGCAC CCACGTGGACATCAGAACCCTGGAGGACCTGCTGATGGGCACCCTGGGCATCGT GTGTCCCATCTGCAGCCAAAAGCCCTGATGA
12	HPV mRNA 全长序列	AGGACTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCACCggatccgccaccATGGAC GCCATGAAGCGCGGTCTTTGCTGCGTCCTGCTGTTATGCGGCGCTGTGTTCGTCA GCCCTAGCATAACGCAGGACTGCAGCTTCCAGCACAGCCCTATATCTTCGGACTT CGCGGTCAAGATTCGGGAGCTCTCCGACTATCTGCTCCAGGACTATCCCGTCACG GTCGCCAGCAACCTTCAGGACGAAGAGTTGTGTGGCGGCCTGTGGCGGTTAGTC CTGGCGCAGCGTTGGATGGAGCGCCTGAAGACCGTGGCTGGTTCGAAGATGCAG GGCTTGCTGGAGCGGGTGAACACGGAGATTCACTTCGTGACCAAGTGCGCGTTT CAGCCTCCGCCGAGCTGTCTGAGGTTCGTGCAGACGAACATCAGTCGGCTCTTGC AGGAGACTAGCGAGCAGTTGGTCGCGTTGAAGCCGTGGATCACCCGCCAGAACT TCTCACGTTGCCTTGAGCTGCAGTGCCAGCCGGATTCCTCGACCCTCCCTCCGCC GTGGTCGCCGCGGCCGCTGGAGGCCACGGCGCCCACGGCGCCTGGCGGCGGGA GCGGAGATATGAACGTGTGCCAGGATAAGATCTTGGAGCATTACGAGAATGACT CCAAGGATATCCTGGAGCACTATGAGAACGACTCCAAGGATCTATGTGATCACA TCTGTGATCACATAGATTATTGGAAGCACATCCGGCTGGAGTGCGCCATTATGTA TAAGGCTCGGATACGGCTGGAATGTGCTATAATGTATAAAGCCCGTGAGATGGG CTTTCACCAGTTCGATGGTGACATTTGTAACACAATGCACTATACGAACTGGATA TACATCTGCGAGGACGCGCAGTGTACGGTAGTTGAGGGTCAGGTAGACAAGAAG TGGGAGGTTCACGCGGGTGGGCAGGTCATCCTCTGCCCGGAGTCCGGGCAGAGG AGGATCAAGCGTCCGCGGAGTGAAAACTGCCACCCTAACAAGCTACTGATCCTC AAGTGCCTTCGCTATCGCTTCAAGAAGCATTGCAAGTTGTCGTCCACGTGGCACT GGACTTGCCACGACGGCAAGCACAAGTGGCACTGGACGTGCCACGACGGCAAG CACAAGAACGCGATAGTGACGCTTACCTATGATCACATAGATTATTGGAAAGCG ATCCGGCAGGAGAATGCGATATTCTTCGCTGCTAGACACCAGGTGGTGCCCGCG TTGAATATCTGCAAGGCGAAGGCCTGCAAGGCCATAGAGTGGAACACAGAGCC GAAGCACTGCTTTAAGAAAGGCGGTCAGCACATCGAGGTCTGGTTCGACTATGT GGCCTGGGACTCGGTCTACTATTGCGGCGACGACGGTTGGTGCAAGACCGAGGC CGAGAAATACGGCTGCAAAGGGACGTGGGAAGTTCACTTCGGGAACTCCATCGA TTGCAACGACTCCATGTGCAGCACGTTTGACGATAACGTGTCTGCCACGGAGTTG GTAAAGATGGCCCGATTCGAAGATCCCACAAGAAGACCCTACAAGCTGCCCGAC CTGTGCACCGAGCTGAACACAAGCCTCCAAGACATCGAGATTACCTGCGTGTAC

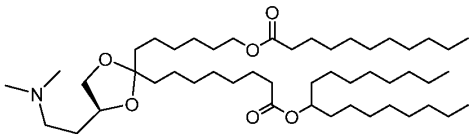
		TGCAAGACCGTGCTGGAGCTGACCGAGGTGTTCGAGTTCGCCTTCAAGGACCTG TTCGTGGTGTACAGAGACAGCATCCCACACGCCGCCTGCCACAAGTGCATCGAC TTCTACAGCCGGATTCGGGAACTGCGGTACTACAGCGACAGCGTGATGTATGGG CCCAAGGCCACCCTGCAAGACATCGTGCTGCACCTGGAGCCTCAGAACGAAATA CCCGTGGACCTGCTGTGCCATGAGCAACTGAGCGACAGCGAGGAAGAGAATGAT GAGATCGACGGCGTGAATCATCAGCACCTGCCCGCTAGAAGGGCCGAGCCACAA CGGCACACCATGCTGTGCATGTGCTTCTACAGCAGAATCAGAGAACTCCGGTAT TACAGCGACTCCGTGTACGGAGATACCCTCGAGAAGCTGACCAACACCGGCCTG TACAATCTGCTGATCAGATGTCTGAGATGTCAGAAACCCTTAAATCCCGCCGAG AAGCTGAGACACCTGAACGAGAAGAGAAGATTCCACAAGATCGCCGGCCACTA CAGAGGGCAGTGCCACAGCTGCTGCAACAGAGCTAGACAAGAGAGACTGCAGA GAAGACGGGAGACCCAAGTGGCTAGAAGGGCTGAGCCGCAAAGACATACCATG CTGTGTATGTGCTGCAAATGCGAGGCTAGAATCGAGCTGGTGGTGGAGAGCAGC GCCGACGACCTGAGAGCCTTTCAGCAGCTGTTCCTGAGCACCCTGAGCTTCGTGT GTCCCTGGTGCGCTAGCCAACAGATGCATCAGAAGAGAACCGCCATGTTCCAAG ATCCGCAAGAGAGACCTAGAAAACTCCCTCATCTGTGCACCGAACTGCAGACCA CCATCCACGACATCATCCTGGAGTGCGTGTATTGCAAACAACAGCTGCTGAGAA GAGAGGTGTACGACTTCGCCTTCAGAGACCTGTGCATCGTGTACCGGGACGGCA ATCCCTACGCCGTGTGCGACAAGTGCCTCAAGTTCTATAGCAAGATCAGCGAGT ATAGATACATGCACGGAGATACGCCGACCCTGCACGAGTACATGCTGGACCTGC AGCCCGAGACCACCGACCTGTACTGCTACGAGCAGCTGAACGACAGCAGCGAA GAGGAGGACGAGATTGACGGCCCGGCCGGCCAAGCCGAGCCCGACAGAGCCCA CTACAACATCGTGACCTTCTGCTGTAAATGCGATAGCACACTGGACAAGTGCCT GAAGTTCTACAGCAAGATTAGCGAGTACAGATATTACTGCTACTCCGTGTACGG GACAACCCTGGAGCAGCAGTACAACAAGCCTCTGTGCGACCTGCTGATCCGGTG TATTAACTGTCAGAAGCCCTTGTGTCCCGAGGAGAAGCAGAGACACCTGGACAA GAAGCAGAGATTCCACAACATCAGAGGCAGATGGACCGGCAGATGCATGAGCT GCTGCAGAAGCAGCAGAACAAGAAGAGAGACACAACTGCACTACAATATCGTC ACCTTCTGCTGCAAGTGCGACTCCACACTGCGGCTCTGCGTGCAGAGCACCCAC GTGGACATCAGAACCCTGGAGGACCTGCTGATGGGCACCCTGGGCATCGTGTGT CCCATCTGCAGCCAAAAGCCCTGATGAggcgcgccGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGC TTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCCAGCCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCC CGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCgaattcAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGATATCAAAA AAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAA AA

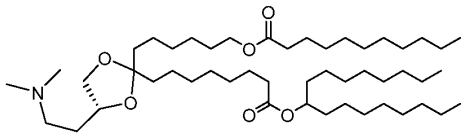
权 利 要 求 书

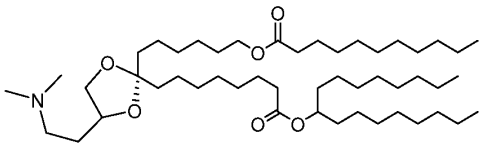
1. 一种脂质纳米颗粒，其包含可电离脂质、磷脂、结构脂质、以及 PEG 脂质，所述可电离脂质、所述磷脂、所述结构脂质以及 PEG 脂质的摩尔比为(40-50)：(5-15)：(30-50)：(1-3)，其中所述可电离脂质为化合物 5，或其盐或其立体异构体，

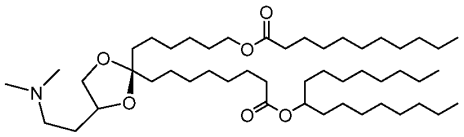
化合物 5 。

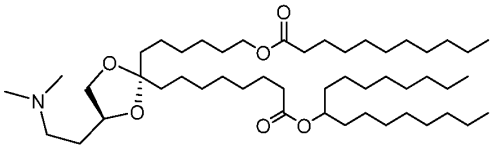
2. 根据权利要求 1 所述的脂质纳米颗粒，其中所述可电离脂的立体异构体的结构选自

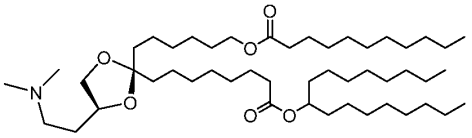
化合物 5A 

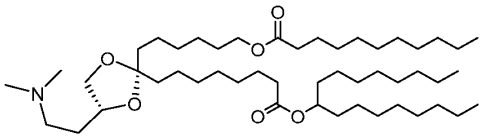
化合物 5B 

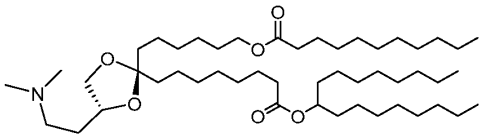
化合物 5C 

化合物 5D 

化合物 5E 

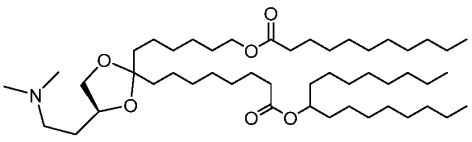
化合物 5F 

化合物 5G 

化合物 5H 

中的一种或多种。

3. 根据权利要求 1 所述的脂质纳米颗粒，其中所述可电离脂结构选自


化合物 5A。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中所述磷脂选自下述化合物中的一种或两种以上：

二月桂酰基卵磷脂(DLPC)、

二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、

二油酰基卵磷脂(DOPC)、

二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、

二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、

二油酰基磷脂酰胆碱(DUPC)、

棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、

1,2-二-O-十八烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (18:0 Diether PC)、

1-油酰基-2-胆甾醇二甲基琥珀酸-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemsPC)、

l-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、

1,2-二乙烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、

1,2-二芳基酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、

1,2-二油酰-SN-甘油-3-磷酰乙醇胺(DOPE)、

1,2-二氢氧化锡-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0 PE)、

1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二乙烯醇基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二乙烯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二芳基基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二硫代六烯酸-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、

1,2-二醇基-sn-甘油-3-磷酸-(1-甘油)钠盐(DOPG)或鞘磷脂。

5. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中所述磷脂是 DSPC。

6. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中所述结构脂质选自胆固醇、粪甾醇、谷甾醇、麦角甾醇、豆甾醇的一种或两种以上。

7. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中所述结构脂质是胆

固醇。

8. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中所述 PEG 脂质选自 PEG 修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG 修饰的磷脂酸、PEG 修饰的神经酰胺、PEG 修饰的二烷基胺、PEG 修饰的二酰基甘油或 PEG 修饰的二烷基甘油中的一种或两种以上。

9. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中所述 PEG 脂质为 DMG-PEG2000。

10. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的脂质纳米颗粒，所述可电离脂质、所述磷脂、所述结构脂质、以及 PEG 脂质的摩尔比为(40-50)：(10-15)：(35-45)：(1.5-2.5)或(45-49)：(10-15)：(35-45)：(1.5-2.5)或(48-49)：(10-15)：(35-45)：(1.5-2.5)。

11. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中

可电离脂质的含量为 40mol%-50mol%，优选 45 mol%-49 mol%，进一步优选 48 mol%-49 mol%，

磷脂的含量为 5mol%-15mol%，优选 10mol%-15mol%，

结构脂质含量为 30 mol%-50 mol%，优选 35 mol%-45 mol%，

PEG 脂质的含量为 1mol%-3mol%，优选 1.5mol%-2.5 mol%；

其中 mol%是基于脂质纳米颗粒组合物中总脂质摩尔数计算。

12. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的脂质纳米颗粒，其中所述可电离脂质、所述磷脂、所述结构脂质、以及 PEG 脂质的摩尔比不为 50:10:38.5:1.5。

13. 一种脂质纳米颗粒组合物，其包含权利要求 1-12 中任一项所述的脂质纳米颗粒和治疗剂和/或预防剂，其中所述治疗剂和/或预防剂选自疫苗或能够引发免疫反应的化合物、核酸或蛋白，所述治疗剂和/或预防剂被脂质纳米颗粒包封 。

14. 根据权利要求 13 所述的脂质纳米颗粒组合物，其中所述核酸为 RNA，所述 RNA 选自 siRNA、aiRNA、miRNA、dsRNA、shRNA 或 mRNA 中的一种或两种以上。

15. 根据权利要求 14 所述的脂质纳米颗粒组合物，其中所述核酸为 mRNA。

16. 根据权利要求 15 所述的脂质纳米颗粒组合物，其中所述 mRNA 编码包括 SEQ ID NO：3 或 SEQ ID NO：4 所示序列的蛋白或其中所述 mRNA 编码如 SEQ ID NO：3 或 SEQ ID NO：4 所示序列的蛋白。

17. 根据权利要求 15 所述的脂质纳米颗粒组合物，其中所述 mRNA 的编码序列包括如 SEQ ID NO：10 或 SEQ ID NO：11 所示序列或其中所述 mRNA 的编码序列如 SEQ ID NO：10 或 SEQ ID NO：11 所示。

18. 根据权利要求 15 所述的脂质纳米颗粒组合物，其中所述 mRNA 的编码序列包括 SEQ ID NO：12 所示序列或其中所述 mRNA 的编码序列如 SEQ ID NO：12 所示。

19. 根据权利要求 15-18 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物，其中所述 mRNA 的编码序列包括 5’UTR 编码序列，优选地，5’UTR 编码序列如 SEQ ID NO：5 所示。

20. 根据权利要求 15-18 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物，其中所述 mRNA 的编码序列包括 3’UTR 编码序列，优选地，3’UTR 编码序列如 SEQ ID NO：6 所示。

21. 根据权利要求 15-18 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物，其中所述 mRNA 的编码序列包括 poly A 尾编码序列，优选地，poly A 尾编码序列如 SEQ ID NO：7 所示。

22. 根据权利要求 15-18 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物，其中所述 mRNA 的编码序列包括 5’帽，优选地，5’帽结构为 m7G(5’)ppp(5’)(2’□OMeA)pG。

23. 根据权利要求 15-18 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物，其中所述 mRNA 分子的部分或全部尿苷为 1□甲基□假尿苷 。

24. 根据权利要求 15-18 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物，所述可电离脂与 mRNA 的 N/P 比为 3.5-5.5，优选 5.2。

25. 根据权利要求 15-18 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物，其进一步包括二价金属阳离子，二价金属阳离子优选 Ca^{2+} 、Mg^{2+} 、Zn^{2+}或 Mn^{2+}。

26. 一种药物组合物，其包含权利要求 1-12 中任一项所述的脂质纳米颗粒或权利要求 13-25 中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物和药学上可接受的赋形剂或辅助成分。

27. 根据权利要求 26 所述的药物组合物，其进一步包括二价金属阳离子，二价金属阳离子优选 Ca^{2+} 、Mg^{2+} 、Zn^{2+}或 Mn^{2+}。