

一种脂质纳米粒的制备方法和应用

技术领域

本公开属于医药领域，涉及制备一种脂质纳米粒的制备方法和应用。

背景技术

基于核酸类的药物，例如信使 RNA (mRNA)、反义寡核苷酸、小干扰 RNA (siRNA)、质粒等具有广阔的应用前景。目前核酸药物递送载体可分为病毒载体和非病毒载体两大类，其中脂质纳米粒介导的核酸药物递送是属于非病毒递送载体主要方法。

在基因治疗和疫苗应用中，脂质纳米粒已经被证明是核酸的优良递送载体。由阳离子脂质和其他辅助脂质，例如胆固醇、磷脂和 PEG 化的脂质形成的脂质纳米粒包封核酸，保护核酸免于降解并且促进细胞摄取，降低免疫反应。另外，脂质纳米粒进行核酸的胞内递送具有其他优点，如靶向性好、副作用小、稳定性好和转染效率较高等。但目前已上市 mRNA 疫苗需超低温保存，运输储存成本较高，极大的制约了其应用范围。因此探索其他的制剂类型和制备方法，例如冻干，可显著提高脂质纳米粒的保存温度。但制备过程和冻干过程会影响脂质纳米粒的粒径。而脂质纳米粒的平均粒径是决定性质的重要决定因素，粒径的大小影响药物代谢、体内分布、药效和安全性，有报道显示，在 NPHs 动物模型中，150nm 粒径的 LNP 依然可以触发强烈的免疫反应 (Mol Ther. 2022 May 4;30(5):1941-1951)，为此维持冻干复溶后纳米粒粒径是脂质纳米粒重要的质量标准。

发明内容

本公开提供一种冻干组合物，包含脂质纳米粒和氯化钠，其中脂质纳米粒包含至少一种阳离子脂质，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:10~10:1。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物中，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:10~5:1。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物中，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物中，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~5:1。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物中，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:3~5:1。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物中，氯化钠与阳离子脂质重量

的比为 1:2~5:1。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物中，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:2~4:1。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物中，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~3:1。

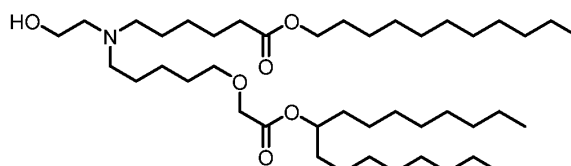
在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物中，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:3~3:1。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物中，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:3~2:1。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物中，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:2~2:1。

在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质可选自 N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、1,2-二油酰基三甲基丙烷氯化铵(DOTAP)(也称为 N-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵和 1,2-二油酰氧基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐)、N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油酰氧基)丙胺(DODMA)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二- γ -亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(γ -DLinDMA)、1,2-二亚油基氨基甲酰氧基-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-吗啉基丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油基硫基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚油氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMA)、1,2-二亚油氧基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油酰基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚油氧基-3-(N-甲基哌嗪基)丙烷(DLin-MPZ)或 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)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)或其类似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯基-5-胺、(6Z,9Z,28Z,31Z)-七碳六烯酸-6,9,28,31-四烯-19-基 4-(二甲基氨基)丁酸酯(MC3)、1,1'-(2-(4-(2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基氮烷二基)双十二烷-2-醇(C12-200)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-C2-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-七碳六烯酸-6,9,28 31-四烯-19-基 4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-M-C3-DMA)、3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-七碳六烯酸-6,9,28,31-四烯-19-

基氧基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(MC3 Ether)、4-((6Z,9Z,28Z,31Z)-七碳六烯酸-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丁烷-1-胺(MC4 Ether)、((4-羟基丁基)氮杂二基)双(己烷-6,1-二基)双(2-己基癸酸酯)(ALC-0315)、8-[(2-羟乙基)[6-氧代-6-(十一烷基氧基)己基]氨基]辛酸 1-辛基壬基酯 (SM-102)、式 I 所示化合物,或上述阳离子脂质任何组合。



I

在一些实施方案中,本公开所述的阳离子脂质选自叔胺脂质。

在一些实施方案中,本公开所述的阳离子脂质包含叔胺、酯连接体和支链尾部。

在一些实施方案中,本公开所述的阳离子脂质包含叔胺、酯连接体和至少三条支链尾部。

在一些实施方案中,本公开所述的阳离子脂质包含叔胺、酯连接体和三条支链尾部。

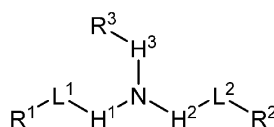
在一些实施方案中,本公开所述的阳离子脂质包含叔胺、酯连接体和至少四条支链尾部。

在一些实施方案中,本公开所述支链尾部可以是包含 6-20 碳原子的饱和或不饱和的疏水性尾部。

在一些实施方案中,本公开所述支链尾部可以是包含 6-20 碳原子的饱和疏水性尾部。

在一些实施方案中,本公开所述的阳离子脂质包含游离的羟基端。

在一些实施方案中,本公开所述的阳离子脂质为式 A 所示化合物,



A

其中, L^1 和 L^2 各自独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-O-$ 、 $-S(O)_x-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-NR^aC(O)-$ 、 $-C(O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(O)O-$ 、 $-OC(O)NR^a$ 或键, R^a 选自氢或 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烯基;

H^1 和 H^2 各自独立地选自 C_{1-12} 亚杂烷基、 C_{1-12} 亚烷基、 C_{2-12} 亚烯基;

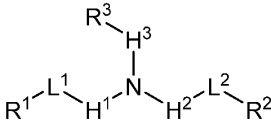
H^3 选自 C_{1-24} 亚烷基、 C_{2-24} 亚烯基、 C_{3-8} 亚环烷基或 C_{3-8} 亚环烯基;

R¹ 和 R² 各自独立地选自 C₁₋₂₄ 烷基或 C₂₋₂₄ 烯基；

R³ 选自氢、-CN、-C(O)OR⁴、-OC(O)R⁴、-OR⁵ 或-NR⁵C(O)R⁴，R⁴ 选自 C₁₋₆ 烷基或 C₂₋₆ 烯基，R⁵ 选自氢、C₁₋₆ 烷基或 C₂₋₆ 烯基；

x 选自 0、1 或 2。

在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质为式 A 所示化合物，



A

其中，L¹ 和 L² 各自独立地选自 -C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)-、-OC(O)O-、-O-；

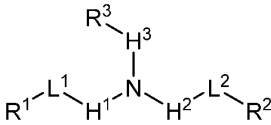
H¹ 和 H² 各自独立地选自 C₁₋₁₂ 亚杂烷基、C₁₋₁₂ 亚烷基、C₂₋₁₂ 亚烯基；

H³ 选自 C₁₋₂₄ 亚烷基、C₁₋₂₄ 亚杂烷基、C₂₋₂₄ 亚烯基；

R¹ 和 R² 各自独立地选自 C₁₋₂₄ 烷基或 C₂₋₂₄ 烯基；

R³ 选自氢、-CN、-C(O)OR⁴、-OC(O)R⁴、-OR⁵ 或-NR⁵C(O)R⁴，R⁴ 选自 C₁₋₆ 烷基或 C₂₋₆ 烯基，R⁵ 选自氢、C₁₋₆ 烷基或 C₂₋₆ 烯基。

在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质为式 A 所示化合物，



A

其中，L¹ 和 L² 各自独立地选自 -C(O)O-、-OC(O)-；

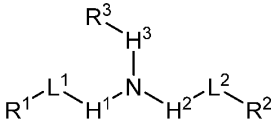
H¹ 和 H² 各自独立地选自 C₁₋₁₂ 亚杂烷基、C₁₋₁₂ 亚烷基、C₂₋₁₂ 亚烯基；

H³ 选自 C₁₋₂₄ 亚烷基、C₁₋₂₄ 亚杂烷基、C₂₋₂₄ 亚烯基；

R¹ 和 R² 各自独立地选自 C₁₋₂₄ 烷基或 C₂₋₂₄ 烯基；

R³ 选自氢、-CN、-C(O)OR⁴、-OC(O)R⁴、-OR⁵ 或-NR⁵C(O)R⁴，R⁴ 选自 C₁₋₆ 烷基或 C₂₋₆ 烯基，R⁵ 选自氢、C₁₋₆ 烷基或 C₂₋₆ 烯基。

在一些实施方案中，本公开所述的阳离子脂质为式 A 所示化合物，



A

其中，L¹ 和 L² 各自独立地选自 -C(O)O-、-OC(O)-；

H¹ 和 H² 各自独立地选自 C₁₋₁₂ 亚杂烷基、C₁₋₁₂ 亚烷基、C₂₋₁₂ 亚烯基；

H³ 选自 C₁₋₂₄ 亚烷基、C₁₋₂₄ 亚杂烷基、C₂₋₂₄ 亚烯基；

R¹ 和 R² 各自独立地选自 C₁₋₂₄ 烷基或 C₂₋₂₄ 烯基；

R³ 选自 -OR⁵，R⁵ 选自氢。

在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 H¹ 和 H² 中至少一个为亚杂烷基，所示亚杂烷基包含至少一个选自 O、N 和 S 的杂原子。

在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 H¹ 选自 C₁₋₁₂ 亚杂烷基，优选 C₂₋₉ 亚杂烷基。在一些实施方案中，亚杂烷基为至少含有一个氧原子的亚杂烷基。在一些实施方案中，亚杂烷基为含有二个氧原子的亚杂烷基。在一些实施方案中，亚杂烷基为至少含有一个氮原子的亚杂烷基。在一些实施方案中，亚杂烷基为至少含有一个氧原子的亚杂烷基。

在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 H¹ 和 H² 中至少一个为 C₁₋₉ 亚烷基、C₂₋₁₀ 亚烯基。

在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 H³ 选自 C₂₋₂₄ 亚烯基；或 H³ 选自 C₁₋₂₄ 亚烷基。在另一些实施方案中，H³ 选自 C₁₋₂₄ 亚杂烷基。

在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 H³ 选自 C₁₋₈ 亚烷基。在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 H³ 选自 C₂₋₆ 亚烷基。

在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 L¹ 和 L² 选自 -C(O)O-。

在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 L¹ 和 L² 选自 -OC(O)-。

在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 和 R² 各自独立地选自 C₂₋₂₄ 烷基（包括但不限于 C₂ 烷基、C₃ 烷基、C₄ 烷基、C₅ 烷基、C₆ 烷基、C₇ 烷基、C₈ 烷基、C₉ 烷基、C₁₀ 烷基、C₁₁ 烷基、C₁₂ 烷基、C₁₃ 烷基、C₁₄ 烷基、C₁₅ 烷基、C₁₆ 烷基、C₁₇ 烷基、C₁₈ 烷基、C₁₉ 烷基、C₂₀ 烷基、C₂₁ 烷基）。在另一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 和 R² 各自独立地选自 C₄₋₁₈ 烷基。

在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 和 R² 各自独立地选自支链 C₄₋₁₈ 烷基。

在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 和 R² 各自独立地选自直链 C₄₋₁₈ 烷基。

在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 选自直链 C₄₋₁₈ 烷基，R² 选自支链 C₄₋₁₈ 烷基。

在一些实施方案中，式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 选自支链 C₄₋₁₈ 烷基，R² 选自支链 C₄₋₁₈ 烷基。

一些实施方案提供的式 A 所示化合物或其盐中 R¹ 和 R² 各自独立地选自 C₂₋₂₄ 烯基（包括但不限于 C₂ 烯基、C₃ 烯基、C₄ 烯基、C₅ 烯基、C₆ 烯基、C₇ 烯基、C₈ 烯基、C₉ 烯基、C₁₀ 烯基、C₁₁ 烯基、C₁₂ 烯基、C₁₃ 烯基、C₁₄ 烯基、C₁₅ 烯基、C₁₆ 烯基、C₁₇ 烯基、C₁₈ 烯基、C₁₉ 烯基、C₂₀ 烯基、C₂₁ 烯基）。另一些实施方案

提供的式 A 所示化合物或其盐中 R^1 和 R^2 各自独立地选自 C_{4-18} 烯基。

在一些实施方案中,式 A 所示化合物或其盐中 R^1 和 R^2 各自独立地选自支链 C_{4-18} 烯基。

在一些实施方案中,式 A 所示化合物或其盐中 R^1 和 R^2 各自独立地选自直链 C_{4-18} 烯基。

在一些实施方案中,式 A 所示化合物或其盐中 R^1 选自直链 C_{4-18} 烯基, R^2 选自支链 C_{4-18} 烯基。

在一些实施方案中,式 A 所示化合物或其盐中 R^1 选自支链 C_{4-18} 烯基, R^2 选自支链 C_{4-18} 烯基。

在一些实施方案中,本公开所述的阳离子脂质为式 I 所示化合物。

在一些实施方案中,本公开所述的阳离子脂质为((4-羟基丁基)氮杂二基)双(己烷-6,1-二基)双(2-己基癸酸酯)(ALC-0315)。

在一些实施方案中,本公开所述的阳离子脂质为 8-[(2-羟乙基)[6-氧代-6-(十一烷基氧基)己基]氨基]辛酸 1-辛基壬基酯 (SM-102)。

在一些实施方案中,冻干组合中阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 10~75%,包括但不限于 15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%或任意两数之间的值。

在一些实施方案中,冻干组合中阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 15~49%,包括但不限于 15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%或任意两数之间的值。

在一些实施方案中,冻干组合中阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~70%。

在一些实施方案中,冻干组合中阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 30~70%。

在一些实施方案中,冻干组合中阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~60%。

在一些实施方案中,冻干组合中阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 30~60%。

在一些实施方案中,冻干组合中阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质

的摩尔量的 42~49%。

在一些实施方案中，冻干组合中阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 45%。

在一些实施方案中，冻干组合中阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 46%。

在一些实施方案中，冻干组合中阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 47%。

在一些实施方案中，冻干组合中阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 48%。

在一些实施方案中，冻干组合中阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 49%。

一些实施方案中提供的冻干组合中阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 5~40%，包括但不限于 5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%或任意两数之间的值。

一些实施方案中提供的冻干组合中阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 40~70%，包括但不限于 40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%或任意两数之间的值。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合中，所述脂质纳米粒包含至少一种非阳离子脂质。

在一些实施方案中，冻干组合中非阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~70%，包括但不限于 20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%或任意两数之间的值。

在一些实施方案中，冻干组合中非阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 50~65%。

在一些实施方案中，冻干组合中非阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 40~55%。

在一些实施方案中，冻干组合中非阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 55~62%。

在一些实施方案中,冻干组合中非阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的30~60%。

在一些实施方案中,冻干组合中非阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的30~50%。

在一些实施方案中,冻干组合中非阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的20~50%。

在一些实施方案中,冻干组合中非阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的20~40%。

在一些实施方案中,本公开所述的非阳离子脂质可选自磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物。

在一些实施方案中,本公开所述的磷脂可选自1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-双十一烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DUPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二-O-十八碳烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0 Diether PC)、1-油酰基-2-胆固醇基半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0 PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-rac-(1-甘油)钠盐(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二硬脂酰基-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(DMPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-硬脂酰乙醇胺(SOPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰胆碱(SOPC)、鞘磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)以及其混合物。

在一些实施方案中,本公开所述的磷脂为1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)。

在一些实施方案中,本公开所述的磷脂为1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

在一些实施方案中,本公开所述磷脂与阳离子脂质的重量的比为1:20~10:1;优选所述磷脂与阳离子脂质的重量的比为1:20~5:1;优选所述磷脂与阳离子脂质

的重量的比为 1:10~5:1；更优选所述磷脂与阳离子脂质的重量的比为 1:10~1:1。

一些实施方案中提供的冻干组合物中磷脂的含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 5~40%，包括但不限于 5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%或任意两数之间的值。

在一些实施方案中，冻干组合物中磷脂的含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 5~20%。

在一些实施方案中，冻干组合物中磷脂的含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 15%。

在一些实施方案中，冻干组合物中磷脂的含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 20%。

在一些实施方案中，冻干组合物中磷脂的含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 10~20%。

在一些实施方案中，冻干组合物中磷脂的含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 10%。

在一些实施方案中，胆固醇衍生物包括但不限于谷固醇、麦角固醇、菜油固醇、豆固醇、菜籽固醇、番茄碱、熊果酸。

另一方面，本公开冻干组合物中胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~60%，包括但不限于 20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%或任意两数之间的值。

在一些实施方案中，冻干组合物中胆固醇或其衍生物含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 30~60%。

在一些实施方案中，冻干组合物中胆固醇或其衍生物含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~45%。

在一些实施方案中，冻干组合物中胆固醇或其衍生物含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 35~45%。

在一些实施方案中，冻干组合物中胆固醇或其衍生物含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~35%。

在一些实施方案中，冻干组合物中胆固醇或其衍生物含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 40.5%。

在一些实施方案中，冻干组合物中胆固醇或其衍生物含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 45%。

在一些实施方案中，本公开所述胆固醇或其衍生物与磷脂的摩尔比为 1.0~5.0，包括但不限于 1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0 或任意两数之间的值。

在一些实施方案中，本公开所述脂质纳米粒中胆固醇或其衍生物与磷脂的摩尔比 2.0~5.0。

另一方面，本公开所述脂质纳米粒中还含有至少一种缀合脂质，所述缀合脂质包括但不限于 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。

在一些实施方案中，所述缀合脂质选自二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺聚乙二醇 2000(DSPE-PEG2000)，二肉豆蔻酰甘油-3-甲氧基聚乙二醇 2000(DMG-PEG2000) 和甲氧基聚乙二醇双十四烷基乙酰胺 (ALC-0159)。

在一些实施方案中，所述缀合脂质选自二肉豆蔻酰甘油-3-甲氧基聚乙二醇 2000。

在一些实施方案中，所述缀合脂质选自二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺聚乙二醇 2000。

在一些实施方案中，缀合脂质起抑制脂质纳米粒（颗粒）聚集。

在一些实施方案中，冻干组合物中缀合脂质的含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 0.5~4%，包括但不限于 0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.2%、1.4%、1.6%、1.8%、2.0%、2.2%、2.4%、2.6%、2.8%、3.0%、3.2%、3.4%、3.6%、3.8%、4.0%或任意两数之间的值。

在一些实施方案中，冻干组合物中缀合脂质的含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 0.5~1.0%。

在一些实施方案中，冻干组合物中缀合脂质的含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 1.5~2.5%。

在一些实施方案中，冻干组合物中缀合脂质的含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 1~2%。

在一些实施方案中，冻干组合物中缀合脂质的含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 1.5%。

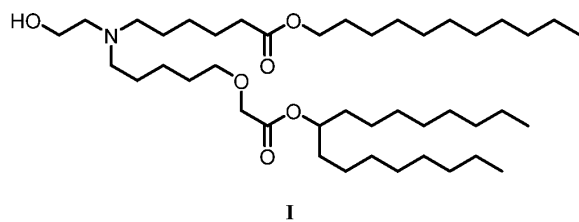
在一些实施方案中，冻干组合物中缀合脂质的含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 2.0%。

在一些实施方案中，所述缀合脂质与阳离子脂质的重量比为 1:100~1:1；优选所述缀合脂质与阳离子脂质的重量比为 1:100~1:2；优选所述缀合脂质与阳离

子脂质的重量比为 1:50~1:1；优选所述缀合脂质与阳离子脂质的重量比为 1:50~1:2；优选所述缀合脂质与阳离子脂质的重量比为 1:25~1:2；优选所述缀合脂质与阳离子脂质的重量比为 1:20~1:2。

在一些实施方案中，本公开所述的脂质纳米粒包含：

阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 10~75%，

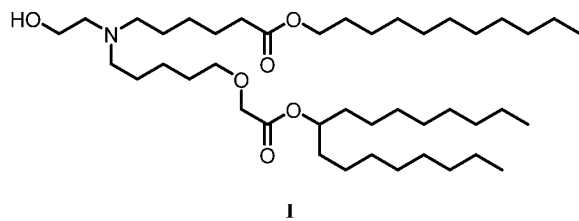


非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%；

和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的脂质纳米粒包含：

阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 20~70%；

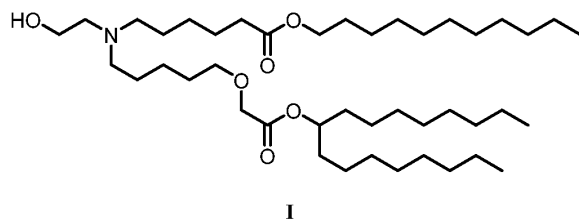


非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%；

和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的脂质纳米粒包含：

阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 10~50%；



非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 30~60%；

和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

另一方面，本公开所述的冻干组合物还包含冻干保护剂。

在一些实施方案中，所述冻干保护剂选自蔗糖、海藻糖、甘露醇、麦芽糖中的一种或几种；优选冻干保护剂选自蔗糖、蔗糖和海藻糖组合。

在一些实施方案中，所述冻干保护剂为蔗糖。

在一些实施方案中，所述冻干保护剂为海藻糖和甘露醇的组合；

在一些实施方案中，所述冻干保护剂与阳离子脂质的重量比为 200:1~1:1；优选冻干保护剂与阳离子脂质的重量比为 150:1~1:1；优选冻干保护剂与阳离子脂质的重量比为 100:1~1:1；优选冻干保护剂与阳离子脂质的重量比为 100:1~20:1；优选冻干保护剂与阳离子脂质的重量比为 800:1~20:1；优选冻干保护剂与阳离子脂质的重量比为 50:1~20:1。

在一些实施方案中，本公开所述冻干组合物中，包含浓度为 5% w/v 至 20% w/v 的冻干保护剂，优选包含 5% w/v 至 15% w/v 的冻干保护剂。

在一些实施方案中，本公开所述冻干组合物中，包含浓度为 5% w/v 至 20% w/v 的蔗糖，优选包含 5% w/v 至 15% w/v 的蔗糖，优选包含浓度为 8% w/v 的蔗糖。

在一些实施方案中，本公开所述冻干组合物中，包含浓度为 5% w/v 至 20% w/v 的海藻糖，优选包含 5% w/v 至 15% w/v 的海藻糖。

在一些实施方案中，本公开所述冻干组合物中，包含浓度为 5% w/v 至 10% w/v 的蔗糖和 1% w/v 至 10% w/v 的海藻糖。

另一方面，本公开所述的冻干组合物还包含缓冲液。

在一些实施方案中，缓冲液选自(N-吗啉基)丙磺酸 (MOPS)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、三羟甲基氨基甲烷 (TRIS)、4-吗啉乙磺酸 (MES)、柠檬酸盐和磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

在一些实施方案中，缓冲液是 TRIS。

在一些实施方案中，缓冲液的浓度为约 10mM 至约 100mM；优选缓冲液的

浓度为约 15mM 至约 75mM；更优选缓冲液的浓度为约 10mM 至约 40mM。

本公开还提供一种冻干组合物的制备方法，所述方法包括以下步骤：

- a. 提供所述脂质纳米粒在液体介质中的悬浮液；以及
- b. 调节所述液体介质从而形成包含 NaCl 的混悬液；
- c. 冷冻干燥。

在一些实施方案中，本公开所述的制备方法，其中所述体介质还包含 5% w/v 至 20% w/v 的冻干保护剂，优选包含 5% w/v 至 15% w/v 的冻干保护剂。

在一些实施方案中，本公开所述的制备方法，其中所述体介质包含 5% w/v 至 20% w/v 的蔗糖，优选包含 5% w/v 至 15% w/v 的蔗糖。

在一些实施方案中，本公开所述的制备方法，其中所述体介质包含 5% w/v 至 10% w/v 的蔗糖和 1% w/v 至 10% w/v 的海藻糖。

在一些实施方案中，本公开所述的制备方法，其中所述体介质包含 10-200mM NaCl；优选包含 10-150mM NaCl；更优选包含 20-150mM NaCl；更优选包含 20-120mM NaCl；更优选包含 50-150mM NaCl；更优选包含 50-120mM NaCl；更优选包含 70-120mM NaCl。

另一方面，本公开所述的冻干组合物不包含泊洛沙姆。

另一方面，本公开所述的冻干组合物不包含山梨酸钾。

在一些实施方案中，本公开所述的脂质纳米粒包含：

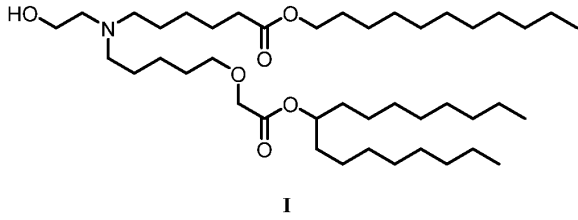
阳离子脂质，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 10~75%；

非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%；

和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的脂质纳米粒包含：

阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 10~75%，



非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占

脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%；

和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的脂质纳米粒包含：

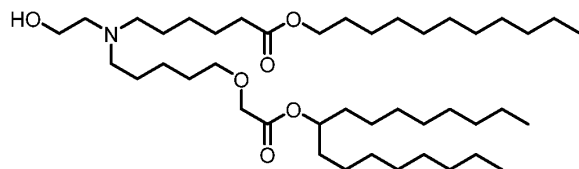
阳离子脂质，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 20~70%；

非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%；

和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的脂质纳米粒包含：

阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 20~70%；



I

；

非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%；

和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的脂质纳米粒包含：

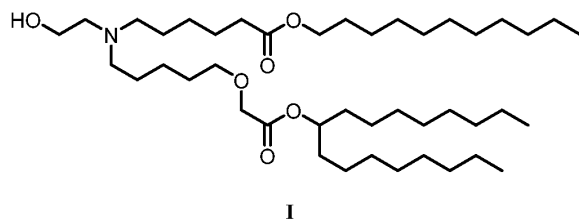
阳离子脂质，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 10~50%；

非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 30~60%；

和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的脂质纳米粒包含：

阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 10~50%；



非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 30~60%；

和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

本公开所述的脂质纳米粒中还含有活性剂，所述活性剂选自核酸，包括核糖核酸或脱氧核糖核酸。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物包含：

活性剂，所述活性剂包含 mRNA；

氯化钠，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；

阳离子脂质，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 10~75%；

非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%；

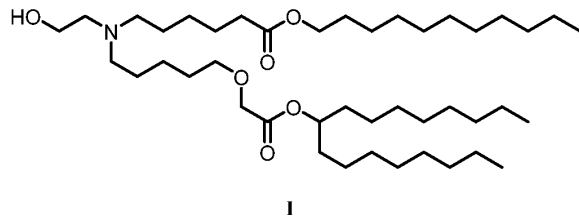
和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物包含：

活性剂，所述活性剂包含 mRNA；

氯化钠，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；

阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 10~75%，



非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占

脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%；

和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物包含：

活性剂，所述活性剂包含 mRNA；

氯化钠，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；

阳离子脂质，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 20~70%；

非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%；

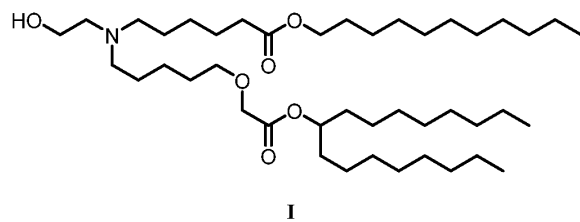
和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物包含：

活性剂，所述活性剂包含 mRNA；

氯化钠，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；

阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 20~70%；



非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%；

和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物包含：

活性剂，所述活性剂包含 mRNA；

氯化钠，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；

阳离子脂质，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 10~50%；

非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 30~60%；

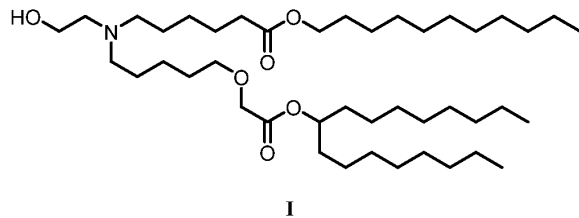
和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物包含：

活性剂，所述活性剂包含 mRNA；

氯化钠，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；

阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 10~50%；



非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 30~60%；

和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物包含：

a) 氯化钠，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；

b) 脂质纳米粒，所述脂质纳米粒包含：

活性剂，所述活性剂包含 mRNA；

阳离子脂质，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 10~75%；

非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%；

和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

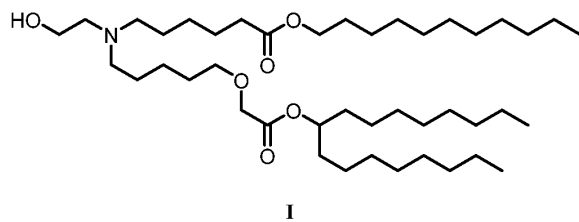
在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物包含：

a) 氯化钠，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；

b) 脂质纳米粒，所述脂质纳米粒包含：

活性剂，所述活性剂包含 mRNA；

阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 10~75%，



非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%；

和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物包含：

- a) 氯化钠，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；
- b) 脂质纳米粒，所述脂质纳米粒包含：

活性剂，所述活性剂包含 mRNA；

阳离子脂质，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 20~70%；

非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%；

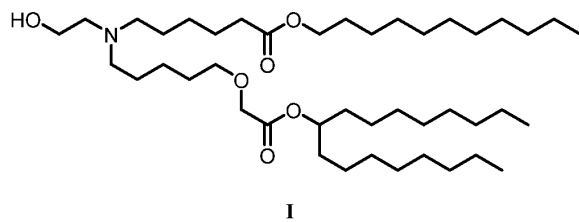
和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物包含：

- a) 氯化钠，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；
- b) 脂质纳米粒，所述脂质纳米粒包含：

活性剂，所述活性剂包含 mRNA；

阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 20~70%；



非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%；

和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物包含：

- a) 氯化钠，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；
- b) 脂质纳米粒，所述脂质纳米粒包含：

活性剂，所述活性剂包含 mRNA；

阳离子脂质，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 10~50%；

非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 30~60%；

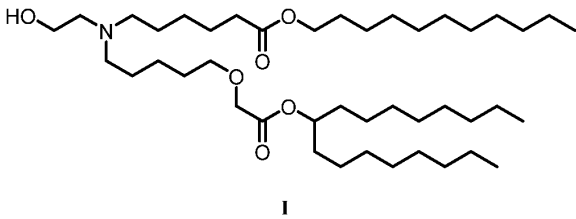
和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，本公开所述的冻干组合物包含：

- a) 氯化钠，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；
- b) 脂质纳米粒，所述脂质纳米粒包含：

活性剂，所述活性剂包含 mRNA；

阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 10~50%；



非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 30~60%；

和缀合脂质，所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

在一些实施方案中，所述冻干组合物包含冻干保护剂，所述冻干保护剂的浓度为 5% w/v 至 20% w/v，优选 5% w/v 至 15% w/v。

在一些实施方案中，所述冻干组合物包含冻干保护剂，所述冻干保护剂选自 5% w/v 至 20% w/v 的蔗糖，优选 5% w/v 至 15% w/v 的蔗糖，更优选 5% w/v 至 10% w/v 的蔗糖。

在一些实施方案中，所述冻干组合物包含冻干保护剂，所述冻干保护剂选自 5% w/v 至 10% w/v 的蔗糖和 1% w/v 至 10% w/v 的海藻糖；优选 5% w/v 至 10% w/v 的蔗糖和 2% w/v 至 8% w/v 的海藻糖。

在一些实施方案中，所述冻干组合物中活性剂的量为约 0.01mg/mL 至约

1mg/mL、约 0.05mg/mL 至约 0.5mg/mL、约 0.1mg/mL 至约 0.5mg/mL、或约 0.2mg/mL、约 0.05mg/mL，或约 0.02mg/mL。

在一些实施方案中，所述活性剂与阳离子脂质的重量比为 1:10~1:60；优选活性剂与阳离子脂质的重量比为 1:10~1:50；优选活性剂与阳离子脂质的重量比为 1:10~1:40。

在一些实施方案中，所述活性剂选自小干扰 RNA(siRNA)、微 RNA(miRNA)、小发夹 RNA(shRNA)、信使 RNA(mRNA)中的任一或其任意组合。

在一些实施方案中，所述活性剂选自 mRNA。

在一些实施方案中，所述 mRNA 包含 ORF，所述 ORF 表达蛋白或多肽。

在一些实施方案中，所述 mRNA 编码蛋白或多肽。

在一些实施方案中，所述 mRNA 编码抗原。

在一些实施方案中，所述 mRNA 编码蛋白或多肽源自传染因子，或为传染因子抗原。

在一些实施方案中，所述蛋白或多肽为病毒抗原和/或细菌抗原。

在一些实施方案中，所述病毒选自腺病毒、疱疹病毒(例如，I 型单纯疱疹病毒、II 型单纯疱疹病毒 8 型人疱疹病毒)、脑炎病毒、乳头瘤病毒、水痘带状疱疹病毒(VZV)、爱泼斯坦-巴尔病毒、人巨细胞病毒、人乳头瘤病毒、BK 病毒、JC 病毒、天花、脊髓灰质炎病毒、肝炎病毒(例如，甲型、乙型、丙型、丁型或戊型肝炎病毒)、人博卡病毒、细小病毒(例如，B19)、人星状病毒、诺沃克病毒、柯萨奇病毒、鼻病毒、严重急性呼吸道综合征病毒、黄热病毒、登革热病毒、西尼罗病毒、风疹病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、甲型或乙型流感病毒、瓜纳里托病毒、胡宁病毒、拉沙病毒、马丘波病毒、萨比亚病毒、克里米亚-刚果出血热病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、人偏肺病毒、亨德拉病毒、尼帕病毒、狂犬病病毒、轮状病毒、环状病毒、科罗拉多壁虱热病毒、汉坦病毒、中东呼吸道冠状病毒、基孔肯亚病毒或版纳病毒。

在一些实施方案中，所述病毒选自流感病毒(例如甲型流感病毒、乙型流感病毒)、冠状病毒或其组合。例如，所述冠状病毒为 SARS-COV-2；所述冠状病毒抗原为刺突蛋白；所述刺突蛋白选自 SARS-COV-2、SARS-COV-2 Alpha、SARS-COV-2 Beta、SARS-COV-2 Gamma、SARS-COV-2 Kappa、SARS-COV-2 Delta 或 SARS-COV-2 Omicron 任一病毒株的刺突蛋白。例如，所述流感病毒选自 A 型流感病毒或 B 型流感病毒；所述流感病毒抗原为血凝素蛋白(HA)和/或神经氨酸酶(NA)；所述流感病毒抗原选自 A 型流感病毒 H1N1、A 型流感病毒 H3N2、B 型流感病毒 Victoria、B 型流感病毒 Yamagata 任一病毒株的血凝素蛋白和/或神经氨酸酶。

在一些实施方案中，所述病毒为 RSV。例如，所述 RSV 抗原为 RSV 附着蛋白(G)或其免疫原性片段、RSV 融合(F)糖蛋白或其免疫原性片段，或其组合；例如，所述 RSV 抗原为融合前糖蛋白 F。此处全文引入 WO2017070622A 中的 RSV 抗原性多肽或其免疫原性片段及其序列，WO2014160463A、WO2012158613A、WO2017109629A、WO2017172890A 中的融合前糖蛋白 F 及其序列。

在一些实施方案中，所述病毒为 VZV。例如，所述 VZV 抗原为 VZV 糖蛋白。例如，VZV 糖蛋白可以是 VZV gE、gI、gB、gH、gK、gL、gC、gN 或 gM 多肽或其免疫原性片段或表位。此处全文引入 WO2017070601A 中的 VZV 抗原性多肽及其序列。

在一些实施方案中，所述蛋白或多肽选自果糖二磷酸醛缩酶 A(ALDOA)、 α -甲基酰基-辅酶 A 消旋酶(AMACR)、血清淀粉样蛋白 P 成分(APCS)、血管生成素 1(ANGPT1)、载脂蛋白 A-I(APOA1)Milano、载脂蛋白 A-I(APOA1)Paris、载脂蛋白 A-I(APOA1)、精氨酸琥珀酸裂解酶(ASL)、artemin(ARTN)、芳基硫酸酯酶 B(ARSB)、杀菌/通透性增加蛋白(rBPI-21)、骨形态发生蛋白 2(BMP2)、骨形态发生蛋白 7(BMP7)、支链酮酸脱氢酶 E1 α 多肽(BCKDHA)、集落刺激因子 2(粒细胞-巨噬细胞)(GM-CSF)、集落刺激因子 3(粒细胞)(GCSF)、脱氧核糖核酸酶 I(DNA 酶 1)、促红细胞生成素(EPO)、IX 因子、VII 因子、XI 因子、纤维蛋白原 A(FGA)、成纤维细胞生长因子 18(FGF18)、成纤维细胞生长因子 23(FGF23)、成纤维细胞生长因子 7(FGF7 或 KGF)、卵泡抑素(FST)、延胡索酰乙酰乙酸水解酶(延胡索酰乙酰乙酸酶)(FAH)、半乳糖激酶 1(GALK1)、半乳糖苷酶 α (GLA)、葡聚糖(1,4- α -)分支酶 1(GBE1)、糖蛋白激素 α 多肽(CGA 或 FSH- α)、血红蛋白 β (HBB)、肝细胞生长因子(HGF)、人生长激素(hGH)、门冬胰岛素、甘精胰岛素、谷赖胰岛素、赖脯胰岛素、干扰素 β (IFNB)、干扰素 α 2(IFNA2)、白细胞介素 10(IL-10)、白细胞介素 15(IL-15)、白细胞介素 7(IL-7)、klotho(KL)、卵磷脂-胆固醇酰基转移酶(LCAT)、溶酶体酸性脂肪酶 A 胆固醇酯酶(LIPA)、脂蛋白脂肪酶(LPL)、低密度脂蛋白受体(LDLR)、甘露糖苷酶 α 2B 类成员 1(MAN2B1)、微粒体甘油三酯转移蛋白(MTTP)、N-乙酰谷氨酸合成酶(NAGS)、神经调节蛋白 1(NRG1)、鸟氨酸氨甲酰基转移酶(OTC)、磷酸化酶激酶 α 2(肝脏)(PHKA2)、纤溶酶原(PLAT)、胞裂蛋白 4(ARTS 或 SEPT4)、serpin 肽酶抑制剂分化体 C(抗凝血酶)成员 1(SERPINC1)、serpin 肽酶抑制剂分化体 F(α -2 抗纤维蛋白溶酶色素上皮衍生因子)成员 2(SERPINF2)、sirtuin 1(SIRT1)、sirtuin 6(SIRT6)、溶质脂质纳米粒家族 16 成员 3(单羧酸转运蛋白 4)(SLC16A3)、溶质脂质纳米粒家族 2(易化葡萄糖转运蛋白)成员 1(SLC2A1 或 GLUT1)、分拣蛋白 1(SORT1)、血小板生成素(THPO)、转化生长因子 β (TGFB1)、釉丛蛋白 1(TUFT1)、肿瘤蛋白 p53(TP53)、酪氨酸酶(TYR)、UDP 葡萄糖苷酰转移酶 1 家族多肽 A1(UGT1A1)、血管内皮生

长因子(VEGF)和 X 连锁细胞凋亡抑制剂(XIAP), 或其任意组合。此处全文引入 WO2013151736A 中 mRNA 编码目标多肽及其序列。在一些实施方案中, 所述蛋白或多肽为肝细胞生长因子(HGF)。在一些实施方案中, 所述 HGF 为人肝细胞生长因子(hHGF)。一些具体实施方案中, 所述 HGF 的氨基酸序列的 Genebank 登录号为 NP_000592.3, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。一些具体实施方案中, 所述表达 HGF 的 ORF 序列为编码如 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的核酸序列或经密码子优化的核酸序列。

HGF 氨基酸序列:

MWVTKLLPALLLQHVLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTL
IKIDPALKIKTKKVNTADQCANRCTRNGKLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFN
SMSSGVKKEFGHEFDLYENKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMI
PHEHSFLPSSYRGKDLQENYCRNPRGEEGGPWCFTSNPEVRYEVCDIPQCSEV
ECMTCNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQTPHRHKFLPERYPDKGFDDNYC
RNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTDVPLETTECIQGQGE
GYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPDGSES
PWCFTTDPNIRVGYSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCS
MWDKNMEDLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPWCYTGNPLIPWDY
CPISRCEGDTTPTIVNLDHPVISCATKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNK
HICGGSLIKESWVLTARQCFPSRDLKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVS
QLVYGPEGSDLVLMKLARPAVLDDFVSTIDLPNYGCTIPEKTSCSVYGWGYT
GLINYDGLLRVAHLIYMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICAGAEEKIGSGPCEGD
YGGPLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIIHKIILTYK
VPQS

SEQ ID NO:1

在一些实施方案中, 所述蛋白或多肽为癌抗原。所述癌抗原包括但不限于: 一种或多种传统癌抗原或受试者特异性癌抗原(包括编码一种或多种已知的为肿瘤所特有的癌抗原或为各受试者所特有的癌抗原的 RNA, 所述癌抗原被称为新表位或受试者特异性表位或抗原)。在一些具体实施方案中, 所述癌抗原是受试者特异性癌抗原。在一些具体实施方案中, 受试者特异性癌抗原可代表受试者的肿瘤样品的外显子组, 或代表受试者的肿瘤样品的转录物组。在一些实施方案中, 受试者特异性癌抗原可代表受试者的外来体。此处全文引入 WO2012159754A 和 WO2017070618A 中所描述的受试者特异性癌抗原及其鉴定方法。在一些具体实施方案中, 所述癌抗原是传统癌抗原。在一些实施方案中, 传统癌抗原是非突变抗原。在一些具体实施方案中, 传统癌抗原是突变抗原。例如, 癌抗原可以是癌胚抗原、 α 1-胎蛋白、异铁蛋白和胎儿磺基糖蛋白(fetal sulphoglycoprotein)、 α 2-H-铁蛋白以及 γ -胎蛋白。

在一些实施方案中, 所述蛋白或多肽为抗体或其抗原结合片段。例如, 抗

PD-1 抗体或其抗原结合片段。一些具体实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段例如为骆驼抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或其抗原结合片段。一些具体实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段例如为重组抗体或其片段。一些具体实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段为线性抗体、单链抗体、纳米抗体、肽抗体 peptibody、结构域抗体和多特异性抗体(双特异性抗体、diabody、triabody 和 tetrabody、串联二- scFv、串联三-scFv)。一些具体实施方案中，所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。一些具体实施方案中，所述表达抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段的 ORF 序列包含选自如下 1)-2)的任一项：

1) 编码如 SEQ ID NO: 2 所示重链氨基酸序列的核酸序列或经密码子优化的核酸序列，和编码如 SEQ ID NO: 3 所示轻链氨基酸序列的核酸序列或经密码子优化的核酸序列；

2) 编码如 SEQ ID NO: 2 所示重链氨基酸序列中 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的核酸序列或经密码子优化的核酸序列，和编码如 SEQ ID NO: 3 所示轻链氨基酸序列中 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的核酸序列或经密码子优化的核酸序列，所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的，例如，是根据 Kabat 编号系统定义的。

PD-1 抗体重链氨基酸序列

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
SYMMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGANTYYPD SVKGRFTISRDN AKNSLYL
QMNSLRAEDTAVYYCARQLYYFDYW GQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPCSR
STSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
L DSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO:2

PD-1 抗体轻链氨基酸序列

MSVPTQVLGLLLLWLT DARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASQTIG
TWL TWYQQKPGKAPKLLIYTATSLADGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDF
ATYYCQQVYSIPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:3

在一些实施方案中，所述 mRNA 包含：

(a) 开放阅读框(ORF)，

(b) 非翻译区元件(UTR),

(c) 多聚腺苷酸(poly-A)尾;

其中, (b) 非翻译区元件(UTR)可包含(b1) 5'UTR 和/或(b2) 3'UTR;

其中, (b) 非翻译区元件(UTR)、(c) 多聚腺苷酸(poly-A)尾可同时存在, 同时不存在, 或则一存在。

在一些实施方案中, 所述 5'UTR 选自 β -珠蛋白 5'UTR、含有强 Kozak 翻译起始信号的 5'UTR、细胞色素 b-245 α 多肽(CYBA)5'UTR、羟基类固醇(17- β)脱氢酶(HSD17B4)5'UTR、烟草蚀纹病毒(TEV)5'UTR、热休克蛋白 70(Hsp70)5'UTR 或 eIF4G 5'UTR。

在一些实施方案中, 所述 3'UTR 选自 α -珠蛋白 3'UTR、 β -珠蛋白 3'UTR、 β -肌动蛋白 3'UTR、CYBA 3'UTR、白蛋白 3'UTR、生长激素(GH)3'UTR、VEEV 3'UTR 或乙型肝炎病毒(HBV)3'UTR。

在一些实施方案中, 所述 poly-A 尾选自 A120、A30L70、HGH polyA、SV40polyA、BGH polyA、rbGlob polyA 或 SV40late polyA。

在一些实施方案中, 所述 mRNA 包含经修饰的核苷酸或核苷。所述经修饰的核苷酸和核苷可为天然存在的经修饰的核苷酸和核苷或非天然存在的经修饰的核苷酸和核苷。所述修饰可包括如本领域中公认的在核苷酸和/或核苷的糖、主链或核碱基部分的那些修饰。在一些具体实施方案中, 所述 mRNA 中经修饰的核碱基包含 1-甲基-假尿苷(m1 ψ)、1-乙基-假尿苷(e1 ψ)、5-甲氧基-尿苷(mo5U)、5-甲基-胞苷(m5C)和/或假尿苷(ψ)。在一些具体实施方案中, 所述 mRNA 中的经修饰的核碱基包含 5-甲氧基甲基尿苷、5-甲硫基尿苷、1-甲氧基甲基假尿苷、5-甲基胞苷和/或 5-甲氧基胞苷。在一些具体实施方案中, 所述 mRNA 包括至少两种(例如, 2、3、4 种或更多种)任何上文所提及的经修饰的核碱基的组合, 包括但不限于化学修饰。

在一些实施方案中, 所述 mRNA 还包含 5'Cap 结构。在一些具体实施方案中, 所述 5'Cap 结构位于 5'UTR 的上游, 例如, 位于 5'UTR 的 5'末端。在一些具体实施方案中, 5'帽结构是本领域技术人员已知的帽结构, 如 Cap0(第一个核碱基的甲基化, 例如 m7GpppN)、Cap1(m7GpppN 的相邻核苷酸的核糖的额外甲基化, 例如 m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG)、Cap2(m7GpppN 下游第 3 个核苷酸的核糖的额外甲基化)、Cap3(m7GpppN 下游第 3 个核苷酸的核糖的额外甲基化)、Cap4(m7GpppN 下游第 4 个核苷酸的核糖的额外甲基化)、ARCA(抗反向帽类似物)、修饰的 ARCA(例如, 硫代磷酸酯修饰的 ARCA)、肌苷、N1-甲基-鸟苷、2'-氟代-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、8-氧代-鸟苷、2-氨基-鸟苷、LNA-鸟苷和 2-叠氮基-鸟苷。

另一方面, 本公开所述脂质纳米粒的平均粒径为 10nm~300nm。

在一些实施方案,所述脂质纳米粒的平均粒径为 10 nm ~250nm。

在一些实施方案,所述脂质纳米粒的平均粒径为 20 nm ~200nm。

在一些实施方案,所述脂质纳米粒的平均粒径为 50 nm ~200nm。

在一些实施方案,所述脂质纳米粒的平均粒径为 50 nm ~150nm。

在一些实施方案,所述脂质纳米粒的平均粒径为 50 nm ~140nm。

在一些实施方案,所述脂质纳米粒的平均粒径为 50 nm ~130nm。

在一些实施方案中,本公开所述的冻干组合物经复溶后,脂质纳米粒的平均粒径增长不超过 100%。在一些实施方案,所述脂质纳米粒的平均粒径增长不超过 80%。在一些实施方案,所述脂质纳米粒的增长不超过 60%。

在一些实施方案中,本公开所述的冻干组合物,在冻干出箱后即刻检测 mRNA 完整性,其中 mRNA 的完整性不低于 75%,或 mRNA 的完整性不低于 80%,或 mRNA 的完整性不低于 85%,或 mRNA 的完整性不低于 86%,或 mRNA 的完整性不低于 87%,或 mRNA 的完整性不低于 88%,或 mRNA 的完整性不低于 89%,或 mRNA 的完整性不低于 90%。所述即刻检验为出箱后 1h 内进行检测。在一些实施方案中,本公开所述的冻干组合物,冻干出箱后在 37℃放置 72h 后检测 mRNA 完整性,其中 mRNA 的完整性不低于 75%,或 mRNA 的完整性不低于 80%,或 mRNA 的完整性不低于 85%,或 mRNA 的完整性不低于 86%,或 mRNA 的完整性不低于 87%,或 mRNA 的完整性不低于 88%,或 mRNA 的完整性不低于 89%,或 mRNA 的完整性不低于 90%。

本公开还提供一种复溶溶液,其由前述冻干组合物或制备方法制备获得的冻干组合物经复溶的步骤获得,其复溶所用溶剂为注射用水。

本公开还提供了前述冻干组合物或复溶溶液在制备用于在脊柱动物体内引起保护性免疫应答的药物中用途。

本公开还提供了冻干组合物或复溶溶液在制备用于在哺乳动物中治疗疾病或功能障碍的药物中用途。在一些实施方案中,所述疾病优选自病毒感染(如冠状病毒、流感病毒、HIV 病毒、或呼吸道合胞病毒引起的疾病)、肝疾病、癌症、疱疹、缺血性疾病、代谢综合征、糖尿病及其并发症、再狭窄、或神经损伤。在一些实施方案中,所述缺血性疾病选自冠状动脉疾病(CAD)、外周动脉疾病(PAD)、心肌梗死、肢体缺血、血栓闭塞性脉管炎(TAO)、糖尿病性动脉硬化闭塞症(DAO)。在一些实施方案中,所述肢体缺血为下肢缺血,例如严重下肢缺血(CLI)。在一些实施方案中,所述糖尿病及其并发症选自糖尿病周围神经病变、糖尿病足(DFU)、糖尿病性动脉硬化闭塞症(DAO)。术语

术语“脂质”是指一类有机化合物,其包括但不限于脂肪酸的酯,并且特征是在水中不溶,但是在许多有机溶剂中是可溶的。通常将它们分成至少三类:(1)“简单脂质”,其包括脂肪和油以及蜡;(2)“化合物脂质”,其包括磷脂和糖脂;

和(3)“衍生的脂质”诸如类固醇。

术语“阳离子脂质”指在选定的 pH 值, 诸如生理 pH 值(例如, pH 为约 7.0)下携带净正电荷的许多脂质物种中的任何一种。

术语“阴离子脂质”指在生理 pH 值下带负电荷的任何脂质。这些脂质包括, 但不限于, 磷脂酰甘油、心磷脂、二酰磷脂酰丝氨酸、二酰磷脂酸、N-十二烷酰磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰磷脂酰乙醇胺、赖氨酰磷脂酰甘油、棕榈酰油酰磷脂酰甘油(POPG), 和其它与中性脂质连接的阴离子修饰基团。

术语“中性脂质”指在选定的 pH 值下以不带电荷或中性两性离子形式存在的许多脂质物种中的任何一种。在生理 pH 值下, 这样的脂质包括, 例如, 二酰磷脂酰胆碱、二酰磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂和二酰甘油。

术语“两亲性脂质”部分地指任何适合的材料, 其中脂质材料的疏水部分定向到疏水相中, 而亲水部分定向到水相。亲水性来自极性基团诸如糖类、磷酸根、羧基、硫酸根、氨基、巯基、硝基、羟基和其它类似基团的存在。疏水性可以通过包含非极性基团而赋予, 所述基团包括但不限于长链饱和和不饱和脂肪族基团和由一个或多个芳族、脂环族或杂环基团取代的这样的基团。两亲性化合物的实例包括但不限于磷脂、氨基脂和鞘脂类。

术语“非阳离子脂质”指任何两亲性脂质以及任何其他中性脂质或阴离子脂质。

术语“缀合脂质”指抑制脂质颗粒聚集的结合脂质。所述缀合脂质包括, 但不限于 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。

术语“哺乳动物”指任何哺乳动物物种诸如人、小鼠、大鼠、狗、猫、仓鼠、豚鼠、兔、家畜等。

术语“核酸”用于本文中时, 指含有处于单链或双链形式的至少两个脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的聚合物, 包括 DNA 和 RNA。DNA 可以采用下列形式: 例如, 反义分子、质粒 DNA、预浓缩 DNA、PCR 产物、脂质纳米粒(P1, PAC, BAC, YAC, 人工染色体)、表达盒、嵌合序列、染色体 DNA、或这些组的衍生物和组合。RNA 可以采用下列形式: 小干扰 RNA(siRNA)、微 RNA(miRNA)、小发夹 RNA(shRNA)、信使 RNA(mRNA)。

术语“抗原”涵盖将引发免疫应答的任何物质。特别是, “抗原”涉及任何物质, 优选为与抗体或 T 淋巴细胞(T 细胞)特异性反应的肽或蛋白质。本公开中, 术语“抗原”包括包含至少一个表位的任何分子。优选地, 本文中抗原是这样的分子, 其(任选地在加工后)诱导优选地对抗原(包括表达该抗原的细胞)特异的免疫反应。

本文中,可使用对于免疫反应而言为候选物的任何合适的抗原,其中所述免疫反应优选地为细胞免疫反应。在一些实施方案的情况下,抗原优选地被细胞、优选被抗原呈递细胞(包括病变细胞、特别是癌症细胞,在 MHC 分子的环境下)呈递,这导致针对该抗原的免疫反应。优选地,抗原是对应于或来源于天然抗原的产物。这种天然抗原包括肿瘤抗原。

术语“癌抗原”与“肿瘤抗原”或“肿瘤相关抗原”通用,其能够刺激免疫应答,优选针对抗原或特征为表达该抗原以及优选地呈递该抗原之细胞(例如病变细胞,尤其是癌症细胞)的细胞应答。一些实施方案中,“癌抗原”在正常条件下在有限数目的组织和/或器官中或者在特定的发育阶段中特异性表达(例如,肿瘤抗原可在正常条件下在胃组织中(优选在胃粘膜中)、在生殖器官中(例如,在睾丸中)、在滋养层组织(例如,在胎盘)或在生殖系细胞中特异性表达),并且在一种或更多种肿瘤或癌组织中表达或异常表达。一些实施方案中,“有限数目”是指不超过 3,例如不超过 2。

术语“疫苗”涉及药物制备物(冻干组合物)或产品,其在施用后诱导识别并攻击病原体(包括病毒或细菌)或病变细胞如癌症细胞的免疫应答,特别是细胞免疫应答。疫苗可用于预防或治疗疾病,例如用于预防病毒感染或治疗癌症。

术语“5'非翻译区元件”(5'UTR)指的是直接位于起始密码子(即,由核糖体转译的 mRNA 转录物的第一密码子)上游(即,5')的不编码多肽的 mRNA 区域。

术语“3'非翻译区元件”(3'UTR)指的是直接位于终止密码子(即,表示转译终止的 mRNA 转录物的密码子)下游(即,3')的不编码多肽的 mRNA 区域。

术语“开放阅读框架”(ORF)是由起始密码子(例如,甲硫氨酸(ATG))开始并以终止密码子(例如,TAA、TAG 或 TGA)结束的 DNA 连续延伸段并且编码蛋白或多肽。

术语“聚腺苷酸(polyA)尾”是位于含有多个连续单磷酸腺苷的 3'UTR 下游,例如直接位于其下游(即 3')的 mRNA 区域。聚腺苷酸尾可含有 10 至 300 个单磷酸腺苷。例如,聚腺苷酸尾可含有 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290 或 300 个单磷酸腺苷。在一些实施方案中,聚腺苷酸尾含有 50 至 250 个单磷酸腺苷。在一种相关生物的情境中(例如,在细胞中、体内),聚(腺苷酸)尾用来保护 mRNA 以免酶促降解,例如在细胞质中,并且有助于转录终止和/或由核输出 mRNA 并转译。

本公开所述“平均粒径”(Z-average Size)例如“平均粒径小于 2000 nm”是光强平均值,由不同种类粒子所贡献的光强计算而得。所述“平均粒径”可通过本领域技术人员熟知的常规粒度测量技术测量颗粒的平均粒径。这样的技术包括例如沉降场流分级,光子相关光谱,光散射等。

本公开多分散系数“PDI”（Polydispersity Index）体现了粒子粒径均一程度，是粒径表征的一个重要指数。

术语“混入”、“混合”表示的意思是 unlimited 组分的加入顺序，例如将 A 混入 B，可以表达 A 加入 B 的意思，也可以表达 B 加入 A 的意思，将 A 和 B 混合，可以表达 A 加入 B 混合的意思，也可以表达 B 加入 A 混合的意思。

本公开中数值为仪器测量值，存在一定程度的误差，一般而言，正负 10% 均属于合理误差范围内。当然需要考虑该数值所用之处的上下文，例如，活性成分的粒径，该数值为测量后误差变化不超过正负 10%，可以为正负 9%、正负 8%、正负 7%、正负 6%、正负 5%、正负 4%、正负 3%、正负 2% 或正负 1%，优选正负 5%。

本公开式 I 化合物参照 WO2023125738A 中方法制备，并将相关内容本申请以示说明。

本公开用于测试的 mRNA 为荧光素酶 mRNA。

本公开提供一种冻干的脂质纳米粒，冻干前和冻干复溶后粒径稳定，平均粒径不高于 150nm，避免了脂质纳米粒产生的免疫反应。

附图说明

- 图 1：处方 1-4 冻干前在不同缓冲液中的粒径。
- 图 2：处方 1-4 冻干复溶后的粒径。
- 图 3：处方 1-4 冻干前后粒径变化率。
- 图 4：处方 1-4 冻干出箱后的 mRNA 完整性。
- 图 5：处方 7-9 冻干出箱后的 mRNA 完整性。
- 图 6：处方 1-4 在 37℃ 高温放置条件下的 mRNA 完整性。
- 图 7：处方 7-9 在 37℃ 高温放置条件下的 mRNA 完整性。
- 图 8：处方 7 和 9 冻干产品的细胞转染表达量荧光值强度。

具体实施方式

以下结合实施例进一步描述本公开中，但这些实施例并非限制本公开中的范围。

本公开中实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例 1：

脂质纳米粒的制备

分别将化合物 1（式 I 化合物 参照 WO2023125738A 制备获得）、DSPC、胆固醇、DMG-PEG 2000 溶液，以一定摩尔百分比混合（mol%），即各组分摩尔量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的百分比，混合配制乙醇脂质溶液。四组分的摩尔比按表 1 中所示进行配制。将编码荧光素酶蛋白的 mRNA 溶于 pH 4 乙酸盐缓冲液，配制 mRNA 水溶液。将乙醇脂质溶液和 mRNA 水溶液通过微流控按 1:3 体积比混合，总脂质与 mRNA 的重量比约为 20:1 制备脂质体。在 20 mM Tris 溶液中透析除去乙醇，得到包封 mRNA 的脂质体纳米粒组合物。

脂质纳米粒组合物表征

表征方法

使用 Malvern Zetasizer Pro，以 173°反向散射检测模式，利用动态光散射检测脂质体纳米粒的纳米粒径和多分散系数 PDI。

使用 Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit RNA 定量检测试剂盒，测定脂质体包封率。

表 1

编号	化合物 1 mol %	DSPC mol %	胆固醇 mol %	PEG-DMG mol %	粒径 nm	PDI	包封率 %
1	48.0	10.0	40.5	1.5	90.8	0.12	97

实施例 2:

评估脂质纳米粒组合物的冻干

按实施例 1 脂质组合物制备脂质纳米粒，并将制备好的脂质纳米粒通过超滤置换到冻干制剂缓冲液中（含有 20 mM Tris, pH 7.5、8%蔗糖、5%海藻糖和对应下表的不同浓度的氯化钠溶液）。将脂质纳米粒的冻干制剂溶液灌装到 2 mL 西林瓶中，0.6 mL/瓶，每瓶中阳离子脂质浓度为 1.78 mg/mL。置于冻干机中。分别经过-45℃预冻 3 小时，一次干燥温度-40℃ 30 小时和二次干燥温度 30℃ 10 小时，真空度为 0.05 mmbar。出箱后即为最终的冻干成品。

取冻干成品，加入 0.6 mL 注射用水复溶后分别按照前述方法检测脂质纳米粒的粒径。分别比较脂质纳米粒冻干前后的粒径大小。检测结果如表 2 和图 1-3 所示。制剂中的氯化钠显著降低了脂质纳米粒的冻干前和冻干后的粒径大小，冻干复溶后粒径的变化率也显著降低。

表 2

编号	NaCl 浓度 (mM)	氯化钠与阳离子 脂质质量比	冻干前粒径 (nm)	冻干复溶后粒 径 (nm)	变化率 (%)
处方 1	0	0	94.3	186.7	98.0
处方 2	25	1:1.2	86.4	128.2	48.4
处方 3	50	1.6:1	85.4	118.3	38.5
处方 4	100	3.3:1	73.7	99.2	34.6

使用冻干制剂缓冲液将以上实验的脂质纳米粒原液分别稀释到 1/2 和 1/3 浓度，得的脂质纳米粒按以上实验操作进行灌装和冻干。分别检测冻干复溶后脂质纳米粒的粒径。检测结果如表 3 所示。

表 3

编号	NaCl 浓度 (mM)	氯化钠与阳离子脂质质量比	冻干前粒径 (nm)	冻干复溶后粒径 (nm)	变化率 (%)
处方 5	100	6.6:1	74.7	101.4	35.7
处方 6	100	9.9:1	73.4	100.4	36.8

将制备好的脂质纳米粒通过超滤换液置换到另一组冻干制剂缓冲液中(含有 20 mM Tris, pH 7.5、8%蔗糖和对应下表的不同浓度的氯化钠溶液)。将脂质纳米粒的冻干制剂溶液灌装到 2 mL 西林瓶中，0.6 mL/瓶，每瓶中阳离子脂质浓度为 2.38 mg/mL。置于冻干机中。分别经过-45℃预冻 3 小时，一次干燥温度-40℃ 30 小时和二次干燥温度 30℃ 10 小时，真空度为 0.05 mmbar。出箱后即为最终的冻干成品。

取冻干成品，加入 0.6 mL 注射用水复溶后分别按照前述方法检测脂质纳米粒的粒径。分别比较脂质纳米粒冻干前后冻干后的粒径大小，检测结果如表 4。

表 4

编号	NaCl 浓度 (mM)	氯化钠与阳离子脂质质量比	冻干前粒径 (nm)	冻干复溶后粒径 (nm)	变化率 (%)
处方 7	0	0	93.5	162.6	73.9
处方 8	25	1:1.6	81.5	121.8	49.4
处方 9	50	1.2:1	82.0	121.7	48.4

。

实施例 3:

评估脂质纳米粒组合物中 mRNA 的完整性

按实施例 2 得到冻干的脂质纳米粒，分别使用毛细管电泳仪器（安捷伦 5200 片段分析仪）检测各组样品中 mRNA 的完整性。

mRNA 易降解，且受温度影响，温度升高，mRNA 稳定性降低。随着放置时间延长，在高温条件下会出现降解，完整性降低。而冻干过程中由一次干燥到二次干燥有温度上升，其二次干燥温度较高，因此评估不同处方中氯化钠在冻干工艺过程和高温放置条件下的 mRNA 完整性。表 5-6 和图 4-7 所示，随着氯化钠浓度的提高冻干出箱后 mRNA 完整性提高。同样在 37℃高温放置条件下，随着氯化钠浓度的提高 mRNA 完整性提高。

表 5

编号	NaCl 浓度 (mM)	mRNA 完整性 (%)	
		冻干出箱后	37℃ 72 小时
处方 1	0	87.7	72.7
处方 2	25	88.1	75.3
处方 3	50	88.3	76.6
处方 4	100	91.8	81.3

表 6

编号	NaCl 浓度 (mM)	mRNA 完整性 (%)	
		冻干出箱后	37℃ 72 小时
处方 7	0	86.9	72.9
处方 8	25	87.2	77.2
处方 9	50	90.2	80.0

实施例 4:

评估脂质纳米粒在细胞上的 mRNA 递送效率

将 HEK 293 细胞接种到 96 孔板培养过夜，待细胞密度达到 80%以上，将封装荧光素酶 mRNA 的脂质纳米颗粒溶液（处方 7 冻干产品和处方 9 冻干产品）加入到细胞板孔培养基中，mRNA 剂量为 100 ng/孔。24 小时后，使用荧光素酶报告基因检测试剂盒（Promega）和酶标仪检测表达荧光素酶蛋白的荧光强度。荧光强度值即酶标仪检测到的荧光数值，代表荧光素酶蛋白的表达量，强光强度越高即蛋白表达量越高。每个化合物对应的脂质纳米颗粒至少 3 组重复计算平均荧光值强度。

表 7

编号	平均荧光强度
处方 7	2.34E+07
处方 9	4.12E+07

结论：如表 7 和图 8 所示荧光强度，处方 9 对应的脂质纳米颗粒冻干产品表达量显著高于处方 7，图 8 中***代表统计学显著差异，P<0.001。

实施例 5:

HGF-mRNA-LNP 喷雾制剂制备工艺：

根据实施例 1 中的方法制备 HGF-mRNA-LNP（0.09mg HGF mRNA，1.07mg 式 I 所示的阳离子脂质；阳离子脂质、DSPC、胆固醇、DMG-PEG 2000 各组分摩尔量占脂质纳米颗粒总摩尔量的百分比分别为 48 mol%、10 mol%、40.5 mol%、1.5 mol%），根据实施例 2 中处方 4 制备得到 HGF-mRNA-LNP 冻干粉（处方 10）。

取冻干成品，加入 0.6 mL 注射用水复溶后分别按照前述方法检测脂质纳米粒的粒径。分别比较脂质纳米粒冻干前后冻干后的粒径大小。

表 8

编号	NaCl 浓度 (mM)	氯化钠与阳离子 脂质质量比	冻干前粒径 (nm)	冻干复溶后粒 径 (nm)	变化率 (%)
处方 10	100	3.3:1	76.8	102.5	33.5

实施例 6:

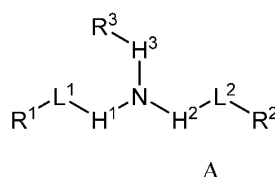
抗 PD-1 抗体-mRNA-LNP 喷雾制剂制备工艺:

根据实施例 1 中的方法制备抗 PD-1 抗体-mRNA-LNP, 根据实施例 2 中处方 4 制备得到抗 PD-1 抗体-mRNA-LNP 冻干粉。取冻干成品，加入 0.6 mL 注射用水复溶后分别按照前述方法检测脂质纳米粒的粒径。分别比较脂质纳米粒冻干前后冻干后的粒径大小。

权利要求书:

1. 一种冻干组合物, 包含脂质纳米粒和氯化钠, 其中脂质纳米粒包含至少一种阳离子脂质, 氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:10~10:1; 优选氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1; 更优选氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:3~5:1; 更优选氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:2~5:1; 更优选氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:2~4:1。

2. 根据权利要求 1 所述的冻干组合物, 其中所述阳离子脂质为式 A 所示化合物,



其中, L^1 和 L^2 各自独立地选自 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$;

H^1 和 H^2 各自独立地选自 C_{1-12} 亚杂烷基、 C_{1-12} 亚烷基、 C_{2-12} 亚烯基;

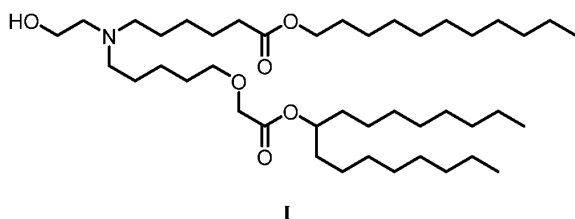
H^3 选自 C_{1-24} 亚烷基、 C_{1-24} 亚杂烷基、 C_{2-24} 亚烯基;

R^1 和 R^2 各自独立地选自 C_{1-24} 烷基或 C_{2-24} 烯基;

R^3 选自 $-\text{OR}^5$, R^5 选自氢。

3. 根据权利要求 1 所述的冻干组合物, 其中所述阳离子脂质选自 N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、1,2-二油酰基三甲基丙烷氯化铵(DOTAP)(也称为 N-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵和 1,2-二油酰氧基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐)、N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油酰氧基)丙胺(DODMA)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二- γ -亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(γ -DLenDMA)、1,2-二亚油基氨基甲酰氧基-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-吗啉基丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油基硫基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚油氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亚油氧基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油酰基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚油氧基-3-(N-甲基哌嗪基)丙烷(DLin-MPZ)或 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)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)或其类似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯基-5-胺、(6Z,9Z,28Z,31Z)-七碳六烯酸-6,9,28,31-四烯-19-基 4-(二甲基氨基)丁酸酯(MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基氮烷二基)双十二烷-2-醇(C12-200)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-C2-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-七碳六烯酸-6,9,28 31-四烯-19-基 4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-M-C3-DMA)、3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-七碳六烯酸-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(MC3 Ether)、4-((6Z,9Z,28Z,31Z)-七碳六烯酸-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丁烷-1-胺(MC4 Ether)、((4-羟基丁基)氮杂二基)双(己烷-6,1-二基)双(2-己基癸酸酯)(ALC-0315)、8-[(2-羟乙基)[6-氧代-6-(十一烷基氧基)己基]氨基]辛酸 1-辛基壬基酯十七烷-9-基-8-((2-羟乙基)(6-氧代-6-((癸氧基)己基)氨基)辛酸酯)(SM-102)、式 I 所示化合物,或上述阳离子脂质任何组合,



4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的冻干组合物,其中阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~70%; 优选阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 30~70%; 更优选阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 40~70%。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的冻干组合物,其中所述脂质纳米粒包含至少一种非阳离子脂质,优选所述的非阳离子脂质选自磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物。

6. 根据权利要求 5 所述的冻干组合物,其中非阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~70%; 优选非阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 30~60%; 更优选非阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质的

摩尔量的 20~50%。

7. 根据权利要求 5 所述的冻干组合物，其中磷脂的含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 5~30%。

8. 根据权利要求 5 所述的冻干组合物，其中胆固醇或其衍生物占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~60%，优选胆固醇或其衍生物含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 30~60%；更优选胆固醇或其衍生物含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 20~45%。

9. 根据权利要求 1 所述的冻干组合物，其中所述脂质纳米粒中还含有至少一种缀合脂质；优选冻干组合物中缀合脂质的含量占脂质纳米粒中存在的总脂质的摩尔量的 0.5~5%。

10. 根据权利要求 1 所述的冻干组合物，其中所述冻干组合物不包含泊洛沙姆或山梨酸钾。

11. 根据权利要求 1 所述的冻干组合物，其中所述脂质纳米粒还包含活性剂，所述活性剂选自核酸；优选核酸选自核糖核酸或脱氧核糖核酸；更优选小干扰 RNA(siRNA)、微 RNA(miRNA)、小发夹 RNA(shRNA)、信使 RNA(mRNA) 中的任一或其任意组合。

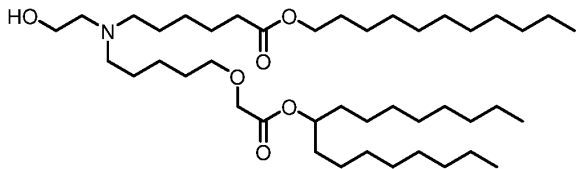
12. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的冻干组合物，其包含

a) 氯化钠，氯化钠与阳离子脂质重量的比为 1:5~10:1；

b) 脂质纳米粒，所述脂质纳米粒包含：

活性剂，所述活性剂包含 mRNA；

阳离子脂质，所述阳离子脂质包含式 I 所示化合物或其可药用盐，所述阳离子脂质占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 10~75%，



I

；

非阳离子脂质，所述非阳离子脂质选自磷脂和胆固醇或其衍生物，其中所述磷脂占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 5~40%，所述胆固醇或其衍生

物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 15~60%;

和缀合脂质,所述缀合物占脂质纳米粒中存在的总脂质摩尔量的 0.5~2%。

13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的冻干组合物,其中还包含冻干保护剂;优选所述冻干保护剂选自蔗糖、海藻糖、甘露醇、麦芽糖中的一种或几种;优选冻干保护剂选自蔗糖、蔗糖和海藻糖组合。

14. 根据权利要求 13 所述的冻干组合物,其中包含浓度为 5% w/v 至 20% w/v 的冻干保护剂,优选包含 5% w/v 至 15% w/v 的冻干保护剂。

15. 根据权利要求 1-14 中任一项所述的冻干组合物,其中包含 5% w/v 至 15% w/v 的蔗糖,或 5% w/v 至 10% w/v 的蔗糖和 1% w/v 至 10% w/v 的海藻糖。

16. 根据权利要求 11-15 中任一项所述的冻干组合物,所述 mRNA 包含开放阅读框(ORF),所述 ORF 编码蛋白或多肽;

优选所述 mRNA 还包含 5'非翻译区元件(5'UTR)、3'非翻译区元件(3'UTR)、多聚腺苷酸(poly-A)尾的任一或其任意组合;

更优选所述 mRNA 还包含 5'帽结构(5'Cap)。

17. 根据权利要求 16 所述的冻干组合物,其中,所述蛋白或多肽为抗原,

优选所述抗原选自病毒抗原、细菌抗原、癌抗原;

更优选地,所述病毒毒株选自流感病毒、冠状病毒、水痘带状疱疹病毒(VZV)、呼吸道合胞病毒(RSV)。

18. 根据权利要求 16 所述的冻干组合物,其中,所述蛋白或多肽为肝细胞生长因子(HGF)、抗体或其抗原结合片段。

19. 根据权利要求 1-18 中任一项所述的冻干组合物,其中所述冻干组合物经复溶后,脂质纳米粒的平均粒径增长不超过 100%;优选所述脂质纳米粒的平均粒径增长不超过 80%;优选所述脂质纳米粒的增长不超过 60%。

20. 根据权利要求 1-19 中任一项所述的冻干组合物,其中所述的冻干组合物,在冻干出箱后即刻检测 mRNA 完整性,其中 mRNA 的完整性不低于 75%,或 mRNA 的完整性不低于 80%,或 mRNA 的完整性不低于 85%,或 mRNA 的完整性不低于 86%,或 mRNA 的完整性不低于 87%,或 mRNA 的完整性不低于 88%,或 mRNA 的完整性不低于 89%,或 mRNA 的完整性不低于 90%。

21 根据权利要求1-20中任一项所述的冻干组合物,其中所述的冻干组合物,在37℃放置72h后检测 mRNA 完整性,其中 mRNA 的完整性不低于75%,或 mRNA 的完整性不低于80%,或 mRNA 的完整性不低于85%,或 mRNA 的完整性不低于86%,或 mRNA 的完整性不低于87%,或 mRNA 的完整性不低于88%,或 mRNA 的完整性不低于89%,或 mRNA 的完整性不低于90%。

22.一种冻干组合物的制备方法,所述方法包括以下步骤:

- a. 提供如权利要求1-21中所述脂质纳米粒在液体介质中的悬浮液;以及
- b. 调节所述液体介质从而形成包含 NaCl 的混悬液;
- c. 冷冻干燥;

其中所述体介质包含 10-200mM NaCl; 优选包含 10-150mM NaCl; 更优选包含 20-150mM NaCl; 更优选包含 20-120mM NaCl; 更优选包含 50-150mM NaCl; 更优选包含 50-120mM NaCl; 更优选包含 70-120mM NaCl。

23. 一种复溶溶液,其由权利要求1-21所述的冻干组合物或权利要求22所述的制备方法制备获得的冻干组合物经复溶的步骤获得,其复溶所用的溶剂优选注射用水。

24. 权利要求1-21任一项所述的冻干组合物、或权利要求23所述的复溶溶液在制备用于在哺乳动物体内引起保护性免疫应答的药物中用途,优选制备疫苗的用途。

25. 权利要求1-21任一项所述的冻干组合物、或权利要求23所述的复溶溶液在制备用于在哺乳动物中治疗疾病或功能障碍的药物中用途,所述疾病优选病毒感染、肝疾病、癌症、缺血性疾病、代谢综合征、糖尿病及其并发症。