

说明书

核酸-脂质纳米颗粒组合物、及其冻干制剂、制备方法和应用

技术领域

本公开属于生物医药技术领域，涉及一种核酸-脂质纳米颗粒组合物，该组合物的冻干制剂，及其制备方法和应用。

背景技术

新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 疫情中，mRNA 疫苗具有安全、免疫应答高和生产成本低的优势，同时获得美国和欧盟紧急获批上市。近年来，研究发现由 mRNA 诱导的瞬时蛋白表达在其他传染病疫苗、癌症疫苗、心血管疾病、蛋白质替代疗法和遗传病等多领域均具有巨大的应用价值，甚至能够通过体内注射实现自主产生 CAR-T 效应。然而，与绝大多数疫苗的储存条件 (2-8°C) 不同，已上市 mRNA 疫苗长期稳定性差，需超低温保存 (-20°C，甚至 -70°C)，且有效期低于 6 个月。在面临数亿剂 mRNA 疫苗需要储存，运输和分发到世界各地的情况下，稳定性成为其应用的瓶颈问题。

mRNA 链长为 1000 至 5000 个碱基长度，早期研究中已发现裸 mRNA 会被核糖核酸酶 (RNase) 迅速水解，而 RNase 无处不在，体内外均有大量附着，需要特殊处理才能去除。除此之外，mRNA 长链上仅一个变化 (键断裂或碱基的氧化) 即会终止翻译，故 mRNA 疫苗中 mRNA 分子的完整性至关重要。

mRNA 在体内表达成目标蛋白需要完整的 mRNA 分子，mRNA 长链上仅一个变化 (键断裂或碱基的氧化) 即会导致无法翻译，故 mRNA 制剂中 mRNA 分子的完整性至关重要。同时 Fabre 等人的研究表明，在相同条件下，mRNA 分子的完整性降低速率与 mRNA 分子链长呈正相关，mRNA 分子链长越长，越容易在储存中发生完整性降低。目前已上市的两款 mRNA 新冠疫苗 mRNA 分子链长约为 4000 个碱基长度，而临床在研的自复制型 mRNA 分子链长甚至可达 10000 个碱基以上，减缓此类 mRNA 分子的完整性降低速率显得更为迫切。

将 mRNA 制剂制成冻干制剂，是改善 mRNA 制剂稳定性的一种有效手段，目前已经有一些研究将 mRNA 制剂进行冻干。在 2009 年 Curevac 公司 MUTZKE, TM 等人发明了标题为《LYOPHILIZATION OF NUCLEIC ACIDS IN LACTATE-CONTAINING SOLUTIONS》的 mRNA 冻干专利，该专利中实施了将 CureVac 公司专有的鱼精蛋白-mRNA 复合物制成冻干制剂的过程。在该专利中，优选了 80% 的乳酸林格氏液作为配置 mRNA 溶液的溶剂，将配置后的 mRNA 溶液与鱼精蛋白按照 4:1 (w/w) 的比例进行混合，将混合后的 mRNA-鱼精蛋白复合物进行冻干，冻干后的 mRNA 制剂在室温放置后具有更好的完整性，其原理为 80% 乳酸林格氏液的存在下可影响鱼精蛋白与 mRNA 的复合状态，形成了更加稳定的结构，从而在冻干后依然在室温有较好的稳定性。

由于乳酸林格氏液作为一种富含盐类的溶媒，现有技术通常认为不适用于脂质纳米颗粒冻干，原因在于含高盐浓度的核酸-脂质纳米颗粒冻干后会遭到破坏，CureVac 公司以乳酸林格氏液作为溶媒进行良好冻干无法在核酸-脂质纳米颗粒制剂上复制。

2022 年 Muramatsu 等人 (BioNTech 公司合作) 也发表文章公布了其 mRNA 冻干制剂长期储存的稳定性, mRNA-LNP 冻干制剂在 4°C 放置 24 周后各项质量指标变化均较小, 体内生物活性也未发生明显下降, 较液体冷冻制剂的稳定性显著改善。而冻干制剂 25°C 或 42°C 放置后, 完整性和体内活性均呈现一定的下降趋势, 文章中两种较短的 mRNA 序列 Luc mRNA 和 PR8 HA mRNA 序列冻干制剂在 42°C 放置一个月后, 完整性急剧由初始的 100% 左右降低到 30-40% 之间, 与之对应的是小鼠免疫抗体滴度较初始低 1-2 个数量级。这反映即使是冻干制剂, 在室温或更高温度储存时, 短期内完整性便会发生显著降低, 而完整性的降低与体内活性减弱密切相关

为了提高 mRNA 制剂的稳定性, 现有技术将其制备成冻干制剂以降低水解的发生, 但即使制成冻干制剂后, 最终制剂内也至少含有 1-2% 的水分难以完全去除, 这部分水分依然会导致 mRNA 水解的发生。

因此, 亟需新型冻干制剂, 相比现有技术而言能够更好地避免 mRNA 水解, 从而获得稳定性更高的 mRNA 制剂。

发明内容

本公开的第一目的在于提高核酸-脂质纳米颗粒的储存稳定性, 一方面将储存条件降低为冷藏 (2-8°C) 或室温存放 (10-30°C) 即可, 另一方面可延长有效期。同时复水迅速。冷藏能达到 18 个月以上, 室温状态能维持 12 个月以上。

本公开的第二目的在于可显著缩短冻干程序总时长, 提高效率, 降低生产的能源和时间成本。

本公开的第三目的在于针对核酸-脂质纳米颗粒筛选出特定种类及用量的冻干保护剂, 充分保持其冻干复水制剂的核酸总量、包封率和完整性, 并具有无损的体内外生物活性。

本公开的第四目的在于本公开突破冷冻干燥工艺“经验式”的开发模式, 建立了对关键理化性质评价方法。

本公开基于发明人令人惊讶地发现尽管现有技术中普遍认为盐的引入会对脂质纳米制剂的冷冻干燥不利, 但将乳酸盐, 例如乳酸钠加入核酸-脂质纳米颗粒制剂后, 能改善核酸-脂质纳米颗粒冻干后的稳定性, 从而完成了本发明。

在一方面, 本公开提供了一种核酸-脂质纳米颗粒组合物, 其包括以下组分: 核酸、脂质和乳酸盐, 其中所述乳酸盐选自乳酸钠或乳酸钾, 含量为 5-100mM, 例如 5-75mM、5-50mM 或 10-100mM, 优选为 5-50mM。

在一些实施方案中, 该核酸-脂质纳米颗粒组合物还包括缓冲液, 其中所述缓冲液与乳酸盐的含量比为 0.25-1:1。

在一些实施方案中, 所述缓冲液是选自由乙酸盐缓冲液、PBS 缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液和 tris 缓冲液组成的组的一种或多种的复配。缓冲液的含量为 1.25-100mM, 例如 2.5-100mM、5-100mM、5-75mM 或 5-50mM, 优选地, 所述缓冲液的含量为 1.25-50mM, 或 5-50nM。

在一些实施方案中, 所述核酸-脂质纳米颗粒组合物还包括冻干保护剂。

在一些实施方案中，所述冻干保护剂选自由蔗糖、海藻糖、乳糖、环糊精和甘露醇组成的组中的一种或多种的组合。

在一些实施方案中，所述核酸-脂质纳米颗粒组合物的 pH 为 1.0-14.0，优选为 5.0-9.0，更优选为 7.0-8.0。

在一些实施方案中，所述核酸选自由 ssDNA、dsDNA、mRNA、lncRNA、siRNA、saRNA、shRNA、ASO、质粒、circRNA、circDNA、miRNA、CRISPR-Cas、pI:C、SamRNA 和 5'-pppRNA 组成的组。

在一些实施方案中，所述的核酸被包裹在脂质纳米颗粒 (LNP) 中。

在一些实施方案中，所述脂质包括阳离子脂质、中性磷脂、PEG-脂质和任选的甾族脂质。

在一些实施方案中，所述组合物进一步被制备为冻干制剂。

在一些实施方案中，以冻干制剂总重量计，所述乳酸盐固含量为 0.5-10.0wt%，例如 0.5-7.5wt%、0.5-5.0wt% 或 1.0-10wt%，优选为 0.5-5.0wt%。

在一些实施方案中，以冻干制剂总重量计，所述缓冲剂固含量为 0.35-10.0wt%，例如 0.35-7.5wt%、0.35-5.0wt% 或 1.0-10wt%，优选为 0.5-5.0wt%。

在另一方面，本公开提供了一种核酸-脂质纳米颗粒组合物的制备方法，其中，所述组合物被制备为冻干制剂，所述制备方法包括以下步骤：

(1) 将乳酸盐溶液与核酸-脂质纳米颗粒母液相混合，或者

在核酸包封前将乳酸盐加入到核酸溶液中，再加入脂质，或者

在核酸-脂质纳米颗粒超滤换液阶段采用含乳酸盐的溶液进行超滤，

其中，所述乳酸盐选自乳酸钠或乳酸钾，含量为 5-100mM，例如 5-75mM、5-50mM 或 10-100mM，优选为 5-50mM；

(2) 加入冻干保护剂；和

(3) 进行冷冻干燥，从而得到核酸-脂质纳米颗粒组合物的冻干制剂。

在一些实施方案中，所述冻干保护剂选自由蔗糖、海藻糖、乳糖、环糊精和甘露醇组成的组中的一种或多种的组合。

在一些实施方案中，以冻干制剂总重量计，所述冻干保护剂固含量为 50-99.9wt%。

在一些实施方案中，步骤 (1) 还包括加入缓冲剂，其中所述缓冲液与乳酸盐的含量比为 0.25-1:1。

在一些实施方案中，所述缓冲液是选自由乙酸盐缓冲液、PBS 缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液和 tris 缓冲液组成的组的一种或多种的复配。缓冲液的含量为 1.25-100mM，例如 2.5-100mM、5-100mM、5-75mM 或 5-50mM，优选地，所述缓冲液的含量为 1.25-50mM，或 5-50nM。

在一些实施方案中，步骤 (1) 制得的溶液的 pH 为 1.0-14.0，例如 2.0-13.0，优选为 5.0-9.0，优选为 7.0-8.0。

在一些实施方案中，所述核酸选自由 ssDNA、dsDNA、mRNA、lncRNA、siRNA、saRNA、shRNA、ASO、质粒、circRNA、circDNA、miRNA、CRISPR-Cas、pI:C、SamRNA 和 5'-pppRNA 组成的组。

在一些实施方案中，在步骤 (1) 中，所述核酸包裹于脂质纳米颗粒中。

在一些实施方案中，所述脂质包括阳离子脂质、中性磷脂、PEG-脂质和任选的甾族脂质。

在再一方面，本公开提供了本公开的核酸-脂质纳米颗粒组合在制备药物中的用途。

在一些实施方案中，所述药物是疫苗。

在一些实施方案中，所述疫苗是用于预防癌症、治疗性肿瘤疫苗、病毒感染、细菌感染或真菌感染的疫苗。

在一些实施方案中，所述病毒选自由诺如病毒、埃博拉病毒、冠状病毒、巨细胞病毒、登革热病毒、寨卡病毒、肠病毒、肝炎病毒、单纯疱疹病毒、人乳头瘤病毒、流感病毒、马尔堡病毒、麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒和轮状病毒组成的组。

在一些实施方案中，所述药物为口服制剂、肌肉注射制剂、皮下注射制剂、静脉注射制剂或吸入制剂。

在一些实施方案中，所述吸入制剂为雾化吸入剂或干粉吸入剂。

与现有技术相比，本公开具有如下有益效果：

为解决现有冻干制剂中这残余水分带来的 mRNA 水解问题，考虑引入可以降低水分子活度的添加剂来降低冻干制剂中 mRNA 分子水解的发生，而乳酸盐，例如乳酸钠作为一种天然存在且安全无毒的物质，利用其降低水活性的作用，进一步改善冻干制剂中 mRNA 分子的稳定性。

本公开克服了现有技术对盐的引入会使脂质纳米制剂冷冻干燥不利的认识。本公开将乳酸盐，例如乳酸钠单独添加，用于核酸-脂质纳米颗粒的冻干以改善核酸-脂质纳米颗粒冻干后的稳定性。本公开将乳酸盐与缓冲液进行复配，对核酸-脂质纳米颗粒冻干后的稳定性进一步加强。

本公开制备的核酸-脂质纳米颗粒冻干后较现有报道的冻干制剂稳定性显著改善，可在 42°C 高温放置后完整性依然处于较高水平，体内活性依然保持良好，这可提高核酸-脂质纳米颗粒冻干制剂的保存温度和延长有效期，同时显著降低储存和运输成本。

本公开核酸-脂质纳米颗粒具有较好的冻干特性，冻干后的制剂外观、复溶时间、残余水分、粒径、电位、包封率、mRNA 含量、完整性等质量指标较冻干前均未显著改变，冻干复溶后制剂的细胞转染效率、体内活性与冻干前相当。

本公开发现核酸-脂质纳米颗粒冻干稳定性与冻干前核酸-脂质纳米颗粒的 pH 有较大关联，本公开发现核酸-脂质纳米颗粒冻干前 pH 应当保持在 2-13，优选地，7-8 之间较为合适。

将乳酸盐添加到 mRNA-LNP 制剂冻干后较现有报道的 mRNA-LNP 冻干制剂稳定性显著改善，可在 42°C 高温放置后完整性依然处于较高水平，体内活性依然保持良好，这可提高 mRNA-LNP 冻干制剂的保存温度和延长有效期，同时显著降低储存和运输成本。

本公开将乳酸盐添加到 mRNA-LNP 冻干制剂中，虽然现有技术认为盐的引入对 LNP 这种纳米制剂冻干十分不利，但本公开经过筛选合适的用量和加入方式，使添加乳酸盐后的 mRNA-LNP 依然能得到较好的冻干，冻干后的制剂外观、复溶时间、残余水

分、粒径、电位、包封率、mRNA 含量、完整性等质量指标较冻干前均未显著改变，冻干复溶后制剂的细胞转染效率、体内活性与冻干前相当。

本公开可将核酸-脂质纳米颗粒冷冻干燥工艺总时长缩短至 8~18 小时，显著降低能源消耗和产品放大生产的时间成本。且本公开冷冻干燥工艺制备的冻干核酸-脂质纳米颗粒，复水迅速 (10s 以内)，核酸总量、包封率及核酸完整性高，除此之外，冻干复水后制剂的细胞转染效率与未冻干核酸-脂质纳米颗粒体原液无显著性差异，且体内免疫应答高，甚至超过未冻干核酸-脂质纳米颗粒体原液。除此之外，通过冷冻干燥降低甚至去除体系内的含水微环境，可以抑制核酸酶催化的核酸水解反应，显著提高核酸-脂质纳米颗粒的长期稳定性，延长有效期，提高保存温度为 2~8℃，显著降低储存和运输的成本和效率。除此之外，将核酸-脂质纳米颗粒的制剂相态由液态转变为固态，为其新型固体制剂的开发提供可能，具有重要意义。

附图说明

为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案，下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图是本发明的一些实施方式，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

图 1 示出了实施例 1-1 mRNA-LNP 制剂冻干复溶后的冷冻电镜结果。

图 2a 示出了实施例 2-1 冻干复溶后的完整性测定图谱。

图 2b 示出了实施例 2-2 冻干复溶后的完整性测定图谱。

图 2c 示出了实施例 2-3 冻干复溶后的完整性测定图谱。

图 3 示出了实施例 2-1、实施例 2-2、实施例 2-3 三组冻干制剂 42℃放置的完整性变化情况。

图 4a 示出了实施例 2-4 冻干复溶后的完整性测定图谱。

图 4b 示出了实施例 2-5 冻干复溶后的完整性测定图谱。

图 4c 示出了实施例 2-6 冻干复溶后的完整性测定图谱。

图 5 示出了 mRNA-LNP 转染细胞后 gE 蛋白的表达情况。

图 6 示出了小鼠两次免疫后的细胞免疫水平情况 (Elispot)。

图 7 示出了小鼠初次免疫 14 天后及二次免疫 14 天后的体液免疫应答水平情况。

图 8 示出了不同类型 eGFP 序列 mRNA 冻干前后的细胞表达情况。

图 9 示出了实施例 6-1 mRNA-LNP 制剂冻干复溶后的冷冻电镜结果。

图 10 示出了实施例 6-2 mRNA-LNP 制剂冻干复溶后的冷冻电镜结果。

图 11 示出了不同可质子化阳离子脂质包裹 eGFP mRNA 序列冻干前后的细胞表达情况。

图 12 示出了实施例 7-1 mRNA-LNP 制剂冻干复溶后的冷冻电镜结果。

图 13 示出了实施例 7-2 mRNA-LNP 制剂冻干复溶后的冷冻电镜结果。

图 14 示出了实施例 7-3 mRNA-LNP 制剂冻干复溶后的冷冻电镜结果。

具体实施方式

如附图中所阐释和举例的，从以下对具体实施方案的更详细描述，上述和其他目的、组件和优点将变得明显，其中相同的参照数字、标识等表示具体实施方案的相同部件、组件或特征。需指出的是，以下若有未特别详细说明之过程，均是本领域技术人员可参照现有技术实现或理解的。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，视为可以通过市售购买得到的常规产品。

就其所使用范围而言，如在本文的权利要求书和说明书中所使用的术语“包括”、“包含”和“具有”或其任何变型均将被视为指示可以包括未指定的其它要素的开放的组。术语“至少一个”和“一个或多个”可以互换使用。术语“单个”应用于指示意指某物的一个且仅一个。类似地，当需要特定数量的事物时，将使用其他特定的整数值，例如“二”。术语“优选地”、“优选的”、“优选”、“任选地”、“可以”以及类似的术语用于指示所引述的项目、条件或步骤是实施方案中的可选的(即，不是必需的)的特征。除非另有说明，否则描述为“在 a 与 b 之间”的范围包括“a”和“b”的值。

尽管已经参照本发明的特定的实施方案在本文中描述各种改进，应当理解，这种描述仅仅是说明的方式，而不应被解释为限制任何要求保护的发明的范围。因此，任何要求保护的本发明的范围和内容将仅由所附权利要求书的条款以当前形式或如在审查期间修改的形式或在任何继续申请中实行的形式限定。此外，应理解，除非另有说明，否则本文中讨论的任何具体实施方案的特征可以与本文中以其他方式讨论或考虑的任何一个或多个实施方案的一个或多个特征组合。

定义

如本文所用，术语“核酸”是指呈单链或双链形式的含有至少两种脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的聚合物，并且包括 DNA、RNA 及其杂交物或衍生物，例如双链 RNA、单链 RNA、经分离的 RNA (如部分纯化的 RNA)、基本上纯的 RNA、合成 RNA、重组产生的 RNA 以及通过添加、缺失、取代和/或改变一个或多个核苷酸而与天然存在的 RNA 不同的经改变的 RNA。这类改变可包括如向干扰 RNA 的端部或内部 (例如在 RNA 的一个或多个核苷酸处) 添加非核苷酸物质。本发明的 RNA 分子中的核苷酸还可包含非标准核苷酸，如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些经改变的 RNA 可称为类似物或天然存在的 RNA 的类似物。如本文所用，术语“核糖核酸”和“RNA”是指含有至少一个核糖核苷酸残基的分子，包括 siRNA、反义 RNA、单链 RNA、微 RNA、mRNA、非编码 RNA 和多价 RNA。核糖核苷酸是在 β -D-呋喃核糖部分的 2' 位置具有羟基的核苷酸。这些术语包括双链 RNA (dsRNA)、单链 RNA (ssRNA)、经分离的 RNA (如部分纯化的 RNA)、基本上纯的 RNA、合成 RNA、重组产生的 RNA 以及通过添加、缺失、取代、修饰和/或改变一个或多个核苷酸而与天然存在的 RNA 不同的经修饰和改变的 RNA。RNA 的改变可包括如向干扰 RNA 的端部或内部 (例如在 RNA 的一个或多个核苷酸处) 添加非核苷酸物质，RNA 分子中的核苷酸包括非标准核苷酸，如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些经改变的 RNA 可称为 RNA 类似物。

如本文所用，术语“脂质纳米颗粒”是指包含至少一种脂质的具有至少一个纳米量级尺寸的颗粒，其是可用于递送治疗性核酸 (例如，mRNA) 至所关注的目标位点 (例如，细胞、组织、器官等等) 的脂质配制品。在一些实施方案中，脂质纳米颗粒是核酸-脂质粒子，其通常由核酸、阳离子脂质、非阳离子脂质 (例如，磷脂)、防止粒子聚集的结合

聚合物脂质 (例如, PEG-脂质) 和任选的结构脂质 (例如胆固醇)。通常, 治疗性核酸 (例如, mRNA) 可囊封于脂质纳米颗粒的脂质部分中, 从而保护其免于酶降解, 此时也可以称为“核酸-脂质纳米颗粒”。

如本文所用, 术语“脂质”是指一类有机化合物, 它们是脂肪酸的衍生物 (例如酯) 并且特征通常在于不溶于水但可溶于许多有机溶剂。脂质通常分为至少三类: (1) 包括脂肪和油以及蜡的“简单脂质”; (2) 包括磷脂和糖脂的“复合脂质”; (3) 诸如类固醇的“衍生脂质”。

如本文所用, 术语“阳离子脂质”和“可离子化脂质”在本文中可互换用于包括那些具有一个、两个、三个或更多个脂肪酸或脂肪烷基链和 pH 可滴定的氨基头部基团 (例如, 烷基氨基或二烷基氨基头部基团) 的脂质和其盐。阳离子脂质通常在低于阳离子脂质 pKa 的 pH 下质子化 (即, 带正电荷) 并且在高于 pKa 的 pH 下基本上是中性的。本发明的阳离子脂质也可称为可滴定的阳离子脂质。

如本文所用, 术语“磷脂”是指由两个疏水性脂肪酸“尾部”和由磷酸基团构成的亲水性“头部”组成的脂质分子。这两种组分最常通过甘油分子结合在一起, 因此, 在本公开中, 磷脂优选为中性磷脂。此外, 磷酸基团经常被简单的有机分子例如胆碱 (即产生磷酸胆碱) 或乙醇胺 (即产生磷酸乙醇胺) 修饰。在一些实施方案中, 磷脂可以选自以下组, 该组包括但不限于: 1,2-二亚油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DMPC)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DOPC)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DPPC)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DSPC)、1,2-二-十一烷酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DUPC)、1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (POPC)、1,2-二-O-十八烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (18:0 二醚 PC)、1-油酰-2-胆固醇基半琥珀酰-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-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-双二十二碳六烯酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DOPE)、1,2-二植烷酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (ME 16.0PE)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚麻酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-双二十二碳六烯酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸-rac-(1-甘油) 钠盐 (DOPG)、鞘磷脂及其混合物。

如本文所用, 术语“聚合物脂质”主要包括 PEG 脂质, 或可替代地称为 PEG 化脂质、PEG-脂质 (聚乙二醇脂质), 是指用 PEG (聚乙二醇) 基团修饰的任何合适的脂质。在一些实施方案中, PEG 脂质可以选自以下组, 该组包括但不限于 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 修饰的二烷基甘油及其混合物。在一些实施方案中, PEG 脂质的具体实例包括但不限于 C14-PEG2000 (1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油、甲氧基聚乙二醇-2000 (DMG-PEG2000)) 和 C18-PEG5000 (1,2-二硬脂酰基-rac-甘油、甲氧基聚乙二醇-5000 (DSG-PEG5000))。

如本文所用, 术语“甾族脂质”, 又可以称为“结构脂质”, 是指甾族化合物 (在一些情况下也称为甾醇、类固醇) 或含有甾族部分的脂质。

如本文所用, 术语“冻干保护剂”用于在脂质化合物或组合物例如脂质纳米颗粒的冻干、储存或复溶期间增加脂质化合物或组合物的化学和/或物理稳定性的一种或

多种化合物。在一些实施方案中，冻干保护剂选自糖、多元醇，或其衍生物。在一些实施方案中，冻干保护剂选自单糖、二糖，或其混合物。例如，冻干保护剂可以是蔗糖、乳酮糖、海藻糖、乳糖、葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、纤维二糖、环糊精，或其混合物。需要说明的是，在本公开中使用的冻干保护剂可以是本领域技术人员熟知且常用的冻干保护剂，在本公开中不做特殊限定。

本公开术语“疫苗”是指适合于应用于动物 (包括人) 的组合物，在施用后诱导免疫应答，其强度足以最低限度地帮助预防、改善或治愈起因于由微生物感染的临床疾病。

本公开术语“递送系统”是指调控生物活性成分在空间、时间及剂量在生物体内分布的制剂或组合物。

核酸-脂质纳米颗粒

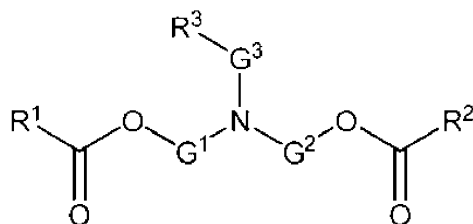
将核酸封装于脂质纳米颗粒的脂质部分中从而得到核酸-脂质纳米颗粒。

在一些实施方案中，核酸包括但不限于 ssDNA、dsDNA、mRNA、lncRNA、siRNA、saRNA、shRNA、ASO、质粒、circRNA、circDNA、miRNA、CRISPR-Cas、polyI:C、SamRNA 或 5'-pppRNA。在一些具体实施方案中，核酸为 mRNA。

在一些实施方案中，脂质包括阳离子脂质、中性磷脂、PEG-脂质和任选的甾族脂质。例如，在一些实施方案中，脂质包括阳离子脂质、中性磷脂和 PEG-脂质。在一些实施方案中，脂质包括阳离子脂质、中性磷脂、PEG-脂质和甾族脂质。

在一些实施方案中，阳离子脂质包括可离子化叔胺 (例如，pH 可滴定) 头部基团；C18 烷基链，其中每一烷基链独立地具有 0 至 3 (例如，0、1、2 或 3) 个双键；和头部基团与烷基链之间的醚、酯或缩酮键。这类阳离子脂质包括 (但不限于) DSDMA、DODMA、DLinDMA、DLenDMA、 γ -DLenDMA、DLin-K-DMA、DLin-K-C2-DMA (也称为 DLin-C2K-DMA、XTC2 和 C2K)、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLen-C2K-DMA、 γ -DLen-C2K-DMA、DLin-MC2-DMA (也称为 MC2)、DLin-MC3-DMA (也称为 MC3)、DLin-MP-DMA (也称为 1-B11) 和 ALC-0315。

在一些实施方案中，阳离子脂质具有以下结构：



或其药物可接受的盐或立体异构体，其中：

G¹ 和 G² 各自独立地为未取代的 C₆-C₁₀ 亚烷基；

G³ 为未取代的 C₁-C₁₂ 亚烷基；

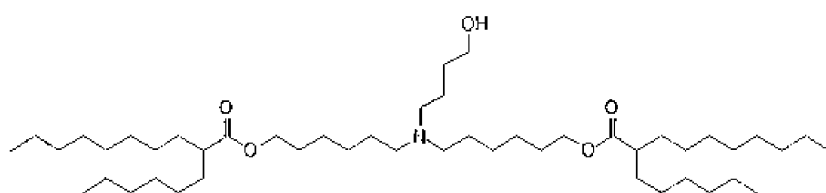
R¹ 和 R² 各自独立地为 C₆-C₂₄ 烷基或 C₆-C₂₄ 烯基；

R³ 为 OR⁵、CN、-C(=O)OR⁴、-OC(=O)R⁴ 或 -NR⁵C(=O)R⁴；

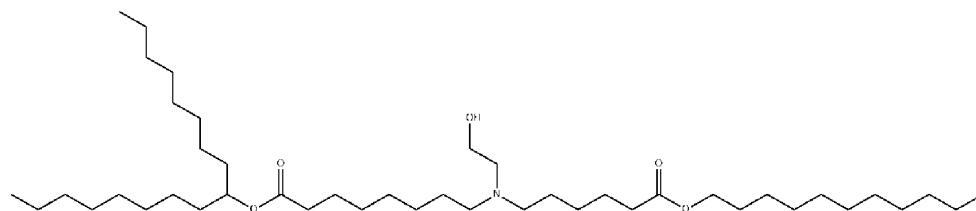
R⁴ 为 C₁-C₁₂ 烃基；并且

R⁵ 为 H 或 C₁-C₆ 烃基。

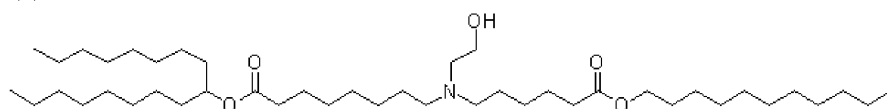
在一些具体实施方案中，阳离子脂质是具有以下结构的化合物：



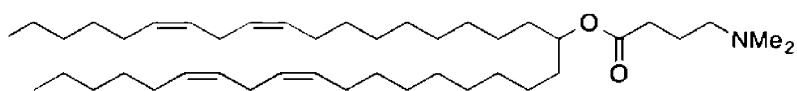
或,



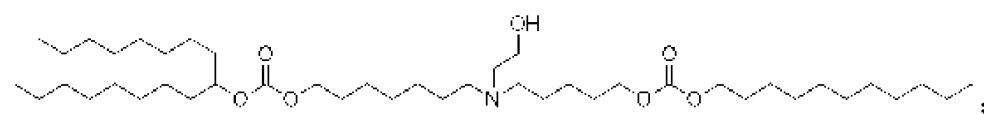
或,



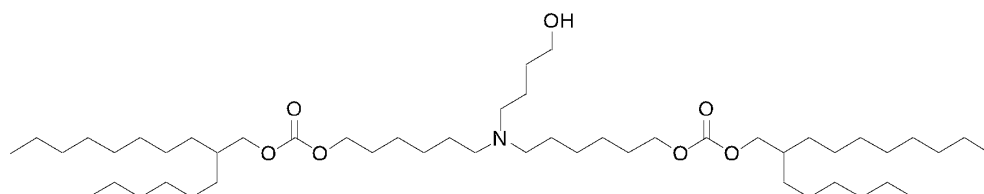
或,



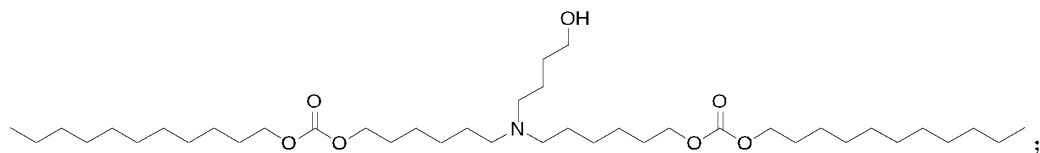
或,



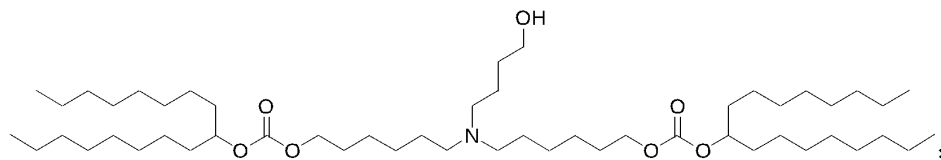
或,



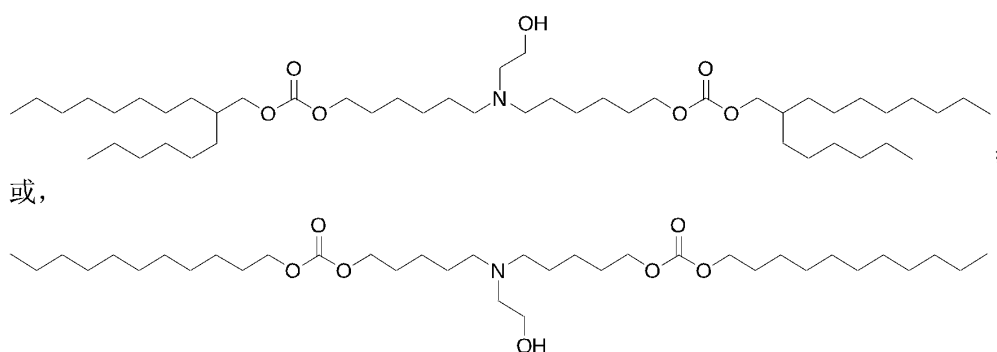
或,



或,

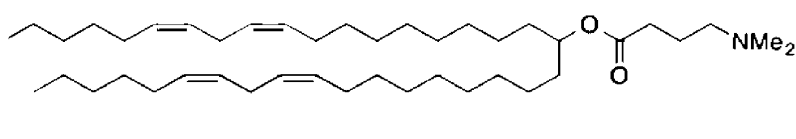


或,

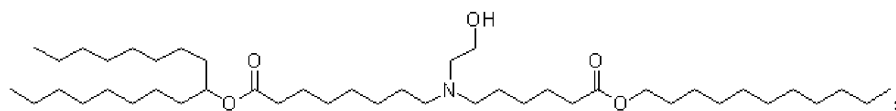


在一些具体实施方案中, 阳离子脂质是具有以下结构的化合物:

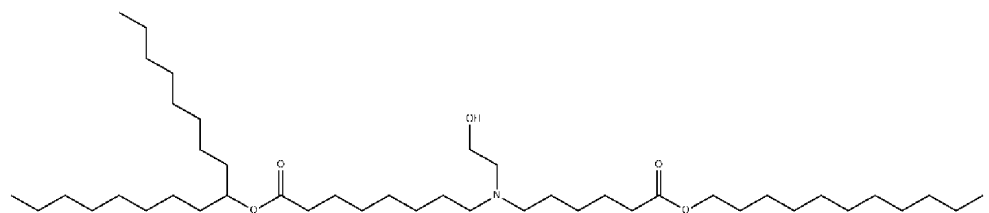
DLin-MC3-DMA



ALC-0315



SM-102



在一些实施方案中, 中性磷脂 (在本公开中也可以成为中性脂质, 二者可互换使用) 是选自由 1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DSPC)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DPPC)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DOPE)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DPPE)、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DMPE)、2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-(1'-rac-甘油) (DOPG)、油酰磷脂酰胆碱 (POPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基磷脂酰乙醇胺 (POPE) 组成的组中的一种或多种的组合。在一些具体实施方案中, 中性磷脂是 DSPC。

在一些实施方案中, PEG-脂质是选自由 2-[(聚乙二醇)-2000]-N,N-二十四烷基乙酰胺 (ALC-0159)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油甲氧基聚乙二醇 (PEG-DMG)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)] (PEG-DSPE)、PEG-二甾醇基甘油 (PEG-DSG)、PEG-二棕榈油基、PEG-二油基、PEG-二硬脂基、PEG-二酰基甘油酰胺 (PEG-DAG)、PEG-二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺 (PEG-DPPE)、PEG-1,2-二肉豆蔻酰基氧基丙基-3-胺 (PEG-c-DMA) 或 DMG-PEG2000 组成的组中的一种或多种的组合。在一些具体实施方案中, PEG-脂质是 DMG-PEG2000。

在一些实施方案中，甾族脂质是选自燕麦甾醇、 β -谷甾醇、菜子甾醇、麦角骨化醇、菜油甾醇、胆甾烷醇、胆固醇、粪甾醇、脱氢胆固醇、链甾醇、二氢麦角骨化醇、二氢胆固醇、二氢麦角甾醇、黑海甾醇、表胆甾醇、麦角甾醇、岩藻甾醇、六氢光甾醇、羟基胆固醇以及经多肽修饰后的胆固醇；羊毛甾醇、光甾醇、海藻甾醇、谷甾烷醇、谷甾醇、豆甾烷醇、豆甾醇、胆酸、甘氨酸胆酸、牛磺胆酸、脱氧胆酸和石胆酸组成的一种或多种的组合。在一些具体实施方案中，甾族脂质是胆固醇。

在一些具体实施方案中，所述脂质包括阳离子脂质例如 DLin-MC3-DMA、ALC-0315 或 SM-102，PEG-脂质例如 DMG-PEG2000，中性磷脂例如 DSPC，和任选的甾族脂质例如胆固醇。

在一些实施方案中，在脂质纳米颗粒中，以摩尔百分比含量计，阳离子脂质占 25-75%、中性磷脂占 5-20%、PEG-脂质占 1-5%，以及甾族脂质 0-50%。

在一些实施方案中，在脂质纳米颗粒中，以摩尔百分比含量计，所述的阳离子脂质在脂质组分中的摩尔百分含量为 20-60%、中性磷脂在脂质组分中的摩尔百分含量为 5%-25%、甾族脂质在脂质组分中的摩尔百分含量为 25%-55%；PEG-脂质在脂质组分中的摩尔百分含量为 0.1%-15%。

在一些实施方案中，在脂质纳米颗粒中，阳离子脂质:中性磷脂:PEG-脂质:甾族脂质的摩尔比为 30-60:1-20:0.1-10:20-50。在一些实施方案中，在脂质纳米颗粒中，阳离子脂质:中性磷脂:PEG-脂质:甾族脂质的摩尔比为 40-60:10-20:1-5:30-50。在一些实施方案中，在脂质纳米颗粒中，阳离子脂质:中性磷脂:PEG-脂质:甾族脂质的摩尔比为 45:10:2:43 或 40:10:2:48。

在核酸-脂质纳米颗粒中，所述核酸被包裹在由脂质形成的脂质纳米颗粒中。在一些实施方案中，核酸与脂质纳米颗粒中总脂质的质量比 (w/w) 在 1:10-30 的范围内。

在一些实施方案中，核酸-脂质纳米颗粒的平均粒径为 50-200nm。在一些实施方案中，核酸-脂质纳米颗粒在中性 pH 下具有净中性电荷。在一些实施方案中，核酸-脂质纳米颗粒具有小于 0.4 的多分散性。

本公开的核酸-脂质纳米颗粒的制备方法包括将核酸包裹于脂质纳米颗粒中，具体地，将阳离子脂质、中性磷脂、PEG-脂质和任选的甾族脂质溶解至溶剂，然后与核酸相混合。

在一些实施方案中，核酸-脂质纳米颗粒的制备方法包括将阳离子脂质、中性磷脂、PEG-脂质，以及任选的甾族脂质溶解至乙醇，然后与经稀释后的 mRNA 稀释液混合，经超滤、稀释、过滤后制得；优选的，将阳离子脂质、中性磷脂、PEG-脂质，以及任选的甾族脂质溶解至乙醇，然后与经稀释后的 mRNA 稀释液按一定流速比混合后经超滤、稀释、过滤后制得；优选的，所述的超滤方式为切向流过滤；更优选的，所述的混合方式可为湍流混合、层流混合或微流体混合。

核酸-脂质纳米颗粒组合物

本公开提供了一种核酸-脂质纳米颗粒组合物，其包括以下组分：核酸、脂质和乳酸盐，其中所述乳酸盐选自乳酸钠或乳酸钾，含量为 5-100mM，例如 5-75mM、5-50mM 或 10-100mM，优选为 5-50mM。核酸、脂质以及核酸-脂质纳米颗粒如本文中所限定。

在一些实施方案中，该核酸-脂质纳米颗粒组合物还包括缓冲液，其中所述缓冲液与乳酸盐的含量比为 0.25-1:1。

在一些实施方案中，所述缓冲液是选自由乙酸盐缓冲液、PBS 缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液和 tris 缓冲液组成的组的一种或多种的复配。缓冲液的含量为 1.25-100mM，例如 2.5-100mM、5-100mM、5-75mM 或 5-50mM，优选地，所述缓冲液的含量为 1.25-50mM，或 5-50mM。

在一些实施方案中，所述核酸-脂质纳米颗粒组合物还包含其他辅料，所述辅料是选自由醋酸钠、氨丁三醇、磷酸二氢钾、氯化钠、磷酸氢二钠、蔗糖组成的组中的一种或多种的组合。

在一些实施方案中，所述核酸-脂质纳米颗粒组合物的 pH 为 1.0-14.0，例如 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0、14.0，以及由上述中任意两个数值为端点的数值范围以及该数值范围内的数值，例如 2.0-13.0、3.0-12.0、4.0-11.0、5.0-10.0、5.0-9.0、6.0-9.0、6.0-8.0、6.0-7.0、7.0-8.0。在一些实施方案中，所述核酸-脂质纳米颗粒组合物的 pH 为 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0，或由上述中任意两个数值为端点的数值范围以及该数值范围内的数值。

在一些实施方案中，所述核酸选自由 ssDNA、dsDNA、mRNA、lncRNA、siRNA、saRNA、shRNA、ASO、质粒、circRNA、circDNA、miRNA、CRISPR-Cas、poyl:C、SamRNA 和 5'-pppRNA 组成的组。

在一些实施方案中，所述脂质包括阳离子脂质、中性磷脂、PEG-脂质和任选的甾族脂质。

在一些实施方案中，所述的核酸被包裹在脂质纳米颗粒 (LNP) 中。

在一些实施方案中，所述核酸-脂质纳米颗粒组合物还包括冻干保护剂，其将进一步被制备为冻干制剂。冻干保护剂的非限制性实例选自由蔗糖、海藻糖、乳糖、环糊精和甘露醇组成的组中的一种或多种的组合。

在非限制性实施方案中，冻干保护剂包括以下组分：蔗糖和海藻糖，所述蔗糖与海藻糖的质量比为 5-15:5-11。在非限制性实施方案中，冻干保护剂包括以下组分：蔗糖、海藻糖、甘露醇、葡萄糖或乳糖中的一种或多种。在非限制性实施方案中，冻干保护剂包括以下组分：蔗糖、海藻糖、以及甘露醇或葡萄糖或乳糖中的一种，其中蔗糖:海藻糖:甘露醇或葡萄糖或乳糖中的一种的质量比为 5-15:5-11:1-5。在非限制性实施方案中，将冻干保护剂按照其中所包括的组分的相应配比溶解在无核酸酶水中，以备用。

核酸-脂质纳米颗粒组合物冻干制剂

本公开提供了一种核酸-脂质纳米颗粒组合物的冻干制剂。核酸-脂质纳米颗粒组合物如本文中所限定。

在一些实施方案中，所述核酸-脂质纳米颗粒组合物还包括冻干保护剂。关于冻干保护剂如本公开中所述。

在一些实施方案中，所述组合物进一步被制备为冻干制剂。

在一些实施方案中，以冻干制剂总重量计，所述乳酸盐固含量为 0.5-10.0wt%，例如 0.5-7.5wt%、0.5-5.0wt%或 1.0-10wt%，优选为 0.5-5.0wt%，又例如 0.5wt%、1.0wt%、

1.5wt%、2.0wt%、2.5wt%、3.0wt%、3.5wt%、4.0wt%、4.5wt%、5.0wt%、5.5wt%、6.5wt%、7.0wt%、7.5wt%、8.0wt%、8.5wt%、9.0wt%、9.5wt%、10.0wt%，或由上述范围内的任何两个数值为端值所限定的数值范围。

在一些实施方案中，以冻干制剂总重量计，所述缓冲剂固含量为 0.35-10wt%，例如 0.35-7.5wt%、0.35-5.0wt%或 1.0-10wt%，优选为 0.5-5.0wt%，又例如 0.35wt%、0.5wt%、0.75wt%、1.0wt%、1.5wt%、2.0wt%、2.5wt%、3.0wt%、3.5wt%、4.0wt%、4.5wt%、5.0wt%、5.5wt%、6.5wt%、7.0wt%、7.5wt%、8.0wt%、8.5wt%、9.0wt%、9.5wt%、10.0wt%，或由上述范围内的任何两个数值为端值所限定的数值范围。

在一些实施方案中，以冻干制剂总重量计，所述冻干保护剂固含量为 50-99.9wt%，例如 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%，或 95%，例如由上述范围内的任何两个数值为端值所限定的数值范围。

核酸-脂质纳米颗粒组合物的制备方法

本公开提供了一种核酸-脂质纳米颗粒组合物的制备方法，其中，所述组合物被制备为冻干制剂，所述制备方法包括以下步骤：

(1) 将乳酸盐溶液与核酸-脂质纳米颗粒母液相混合，或者

在核酸包封前将乳酸盐加入到核酸溶液中，再加入脂质，或者

在核酸-脂质纳米颗粒超滤换液阶段采用含乳酸盐的溶液进行超滤，

其中，所述乳酸盐选自乳酸钠或乳酸钾，含量为 5-100mM，例如 5-75mM、5-50mM 或 10-100mM，优选为 5-50mM；

(2) 加入冻干保护剂；和

(3) 进行冷冻干燥，从而得到核酸-脂质纳米颗粒组合物的冻干制剂。

核酸、脂质、核酸-脂质纳米颗粒、核酸-脂质纳米颗粒组合物、冻干制剂如本文中 so 限定。

在一些实施方案中，所述冻干保护剂选自由蔗糖、海藻糖、乳糖、环糊精和甘露醇组成的组中的一种或多种。

在一些实施方案中，以冻干制剂总重量计，所述冻干保护剂固含量为 50-99.9wt%，例如 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%，或 95%，例如由上述范围内的任何两个数值为端点的数值范围以及该数值范围内的数值。

在一些实施方案中，步骤 (1) 还包括加入缓冲剂，其中所述缓冲液与乳酸盐的含量比为 0.25-1:1。

在一些实施方案中，所述缓冲液是选自由乙酸盐缓冲液、PBS 缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液和 tris 缓冲液组成的组的一种或多种的复配。缓冲液的含量为 1.25-100mM，例如 2.5-100mM、5-100mM、5-75mM 或 5-50mM，优选地，所述缓冲液的含量为 1.25-50mM，或 5-50nM。

在一些实施方案中，步骤 (1) 制得的溶液的 pH 为 1.0-14.0，例如 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0、14.0，以及由上述中任意两个数值为端点的数值范围以及该数值范围内的数值，例如 2.0-13.0、3.0-12.0、4.0-11.0、5.0-10.0、5.0-9.0、6.0-9.0、6.0-8.0、6.0-7.0、7.0-8.0。在一些实施方案中，所述核酸-脂

质纳米颗粒组合物的 pH 为 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0，或由上述中任意两个数值为端点的数值范围以及该数值范围内的数值。

在一些实施方案中，核酸-脂质纳米颗粒组合物的制备方法还包括：配制完成后，进行无菌过滤，将过滤后的样品灌装西林瓶进行冻干。在一些实施方案中，西林瓶冻干胶塞半加塞后，置于冻干机按预定程序冻干。在一些实施方案中，滤膜为 0.22 μ m。

在一些实施方案中，冷冻干燥包括以下步骤：预冻阶段、一次干燥阶段，和解吸干燥阶段。

所述预冻阶段：温度为-80 $^{\circ}$ C~-30 $^{\circ}$ C，例如-80 $^{\circ}$ C、-70 $^{\circ}$ C、-60 $^{\circ}$ C、-50 $^{\circ}$ C、-40 $^{\circ}$ C、-30 $^{\circ}$ C，或由上述中任意两个数值为端点的数值范围以及该数值范围内的数值，预冻时间为 1~6 小时，例如 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时，或由上述中任意两个数值为端点的数值范围以及该数值范围内的数值。

所述一次干燥阶段 (又可以称为升华干燥阶段)：温度为-60 $^{\circ}$ C~0 $^{\circ}$ C，例如-60 $^{\circ}$ C、-50 $^{\circ}$ C、-40 $^{\circ}$ C、-30 $^{\circ}$ C、-20 $^{\circ}$ C、-10 $^{\circ}$ C、0 $^{\circ}$ C，或由上述中任意两个数值为端点的数值范围以及该数值范围内的数值，终点温度为-5 $^{\circ}$ C~0 $^{\circ}$ C，例如-5 $^{\circ}$ C、-4 $^{\circ}$ C、-3 $^{\circ}$ C、-2 $^{\circ}$ C、-1 $^{\circ}$ C、0 $^{\circ}$ C，或由上述中任意两个数值为端点的数值范围以及该数值范围内的数值，真空压力控制 $\leq$ 10Pa，一次干燥阶段持续时间为 5~100 小时，例如 5 小时、10 小时、20 小时、30 小时、40 小时、50 小时、60 小时、70 小时、80 小时、90 小时、100 小时，或由上述中任意两个数值为端点的数值范围以及该数值范围内的数值。在一些实施方案中，一次干燥阶段分 2~8 段呈梯度升温，每段升温 5~30 $^{\circ}$ C，每段维持时间 0.5~10 小时，真空压力控制 $\leq$ 10Pa。

所述解吸干燥阶段：温度为 0 $^{\circ}$ C~35 $^{\circ}$ C，例如 0 $^{\circ}$ C、5 $^{\circ}$ C、10 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C，或由上述中任意两个数值为端点的数值范围以及该数值范围内的数值，终点温度为 30 $^{\circ}$ C~35 $^{\circ}$ C，例如 30 $^{\circ}$ C、31 $^{\circ}$ C、32 $^{\circ}$ C、33 $^{\circ}$ C、34 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C，或由上述中任意两个数值为端点的数值范围以及该数值范围内的数值，真空压力控制 $\leq$ 10Pa，解吸干燥阶段持续时间 2~15 小时，例如 2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时、13 小时、14 小时、15 小时，或由上述中任意两个数值为端点的数值范围以及该数值范围内的数值。

使用和施用

本公开提供了本公开的核酸-脂质纳米颗粒组合物在制备药物中的用途。

在一些实施方案中，所述药物是疫苗。

在一些实施方案中，所述疫苗是用于预防癌症、治疗性肿瘤疫苗、病毒感染、细菌感染或真菌感染的疫苗。

在一些实施方案中，所述病毒选自由诺如病毒、埃博拉病毒、冠状病毒、巨细胞病毒、登革热病毒、寨卡病毒、肠病毒、肝炎病毒、单纯疱疹病毒、人乳头瘤病毒、流感病毒、马尔堡病毒、麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒和轮状病毒组成的组。

在一些实施方案中，所述药物为口服制剂、肌肉注射制剂、皮下注射制剂、静脉注射制剂或吸入制剂。

在一些实施方案中，所述吸入制剂为雾化吸入剂或干粉吸入剂。

实施例

下面将结合实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

下面结合优选实施例进一步说明本发明的技术方案和有益效果。

实施例 1 不同类型乳酸盐考察

模型样品：

以编码带状疱疹病毒 gE 蛋白的 mRNA (gE-mRNA，约 2300bp) 为模型 mRNA，以未加入乳酸钠、未冷冻干燥的 mRNA 脂质纳米颗粒 (即 mRNA-LNP) 为模型样品。

制备过程如下：醋酸钠缓冲液稀释 mRNA 原液至浓度为 135 μ g/ml，按照阳离子脂质 ALC-0315 : DSPC : 胆固醇 : DMG-PEG 2000 摩尔比为 49 : 10 : 39.5 : 1.5 配制脂质混合溶液；在纳米药物制造设备上完成包封后，超滤换液，浓缩后以 0.22 μ m 无菌过滤，收集得到 mRNA-LNP 母液。

为进一步研究乳酸盐类 mRNA-LNP 的冻干效果，除乳酸钠外，向 mRNA-LNP 中添加不同乳酸盐母液，考察对比了乳酸钾、乳酸铵、乳酸、乳酸锂、乳酸镁、乳酸钙的冻干效果。实施例 1-1 到 1-7 中不同种类乳酸盐的用量均为 20mM，实施例 1-8 为添加乳酸钠的 mRNA-鱼精蛋白复合物 (制备 mRNA-鱼精蛋白复合物，将 mRNA 配置成 0.4 g/L 的水溶液，以 mRNA/鱼精蛋白 (4:1 w/w) 的比例与鱼精蛋白混合，后加入乳酸钠母液及冻干保护剂母液并稀释至 mRNA 浓度约 100 μ g/mL、乳酸钠浓度为 20mM、冻干保护剂至少为 5% (w/v)，冻干保护剂选自蔗糖、海藻糖、甘露醇、葡萄糖、麦芽糖、乳糖中的一种或几种组合，将 mRNA-LNP、mRNA-鱼精蛋白复合物分别进行冻干及评价。

向 mRNA-LNP 母液中添加冻干保护剂母液。将样品配置完成后，进行 0.22 μ m 无菌过滤，将过滤后的样品以 0.6mL/瓶的体积灌装到 2R 西林瓶，冻干胶塞半加塞后，置于冻干机 (SP Scientific VirTis Genesis 25L Pilot Lyophilizer) 按预定程序 (-55 $^{\circ}$ C预冻 3 小时，50min 升温至-20 $^{\circ}$ C进行一次干燥，一次干燥持续 10 小时，后以最大升温速率升温至 30 $^{\circ}$ C进行解吸干燥，解吸干燥持续 10 小时，一次干燥及二次干燥阶段压力均控制为 50mTorr) 进行冻干。

表 1 不同乳酸盐冻干效果

样品名称	用量	盐种类	冻干后外观	粒径 (nm)	mRNA 含量 (μ g/mL)	包封率 (%)	完整性 (%)
冻干前 mRNA-LNP 母液	/	/	/	87.6	97	95.6	93.1
实施例 1-1	20mM	乳酸钠	外观良好	94.5	95	90.9	93.7
实施例 1-2	20mM	乳酸钾	外观良好	95.8	96	90.1	92.6
实施例 1-3	20mM	乳酸铵	外观良好	96.3	94	76.6	69.2
实施例 1-4	20mM	乳酸	外观良好	98.7	88	95.5	60.0
实施例 1-5	20mM	乳酸锂	外观良好	96.8	98	88.4	50.2
实施例 1-6	20mM	乳酸钙	外观良好	103.9	90	83.9	45.8
实施例 1-7	20mM	乳酸镁	外观良好	108.4	87	85.0	42.7
实施例 1-8 (鱼精蛋白-mRNA 复合物)	20mM	乳酸钠	完全塌陷	225.4	85	40.4	82.5

以 RiboGreen RNA 试剂与游离 mRNA 结合荧光显色，利用荧光分析仪测定游离 mRNA 量；同时，以 Triton X-100 破膜，测得 mRNA 总量，则：

包封率 (EE%) = (mRNA 总量 - mRNA 游离量) / mRNA 总量 * 100%

mRNA 完整性测定：先将 mRNA-LNP 样品稀释后 70℃变性，制备 Dye-Gel 胶，注入压胶器中，接着，分别加入 mRNA marker, ladder 和 sample。利用 Agilent 5200 生物分析系统以凝胶电泳原理高效测定样品 mRNA 完整性谱图。

通过表 1 可见，实施例 1-1 到 1-7 结果显示乳酸钾与乳酸钠均有较好的冻干效果，但考虑到在某些特别剂型的情况下，例如 mRNA-LNP 主流剂型为注射剂，较高的钾离子浓度注射给药后将会影响心肌细胞电生理，存在一定的安全性风险几率，因此，在乳酸钾和乳酸钠均能实现较好的冻干效果的情况下，可以优选乳酸钠。同时实施例 1-8 结果显示，乳酸钠用于鱼精蛋白-mRNA 复合物，冻干后完全塌陷，包封率和完整性均较低。

现有技术对盐的引入会使脂质纳米制剂冷冻干燥不利的认识，本发明突破传统研究限制，选择加入乳酸盐，为进一步证明乳酸盐在冷冻干燥中的性质，对实施例 1-1 号样品进行电镜观察。

取石墨烯载网，正面朝上于表面皿中，在辉光仪中辉光 2 秒 (到时间后手动停止)；进行冷冻制样，1) 提前半小时打开冷冻制样机，更换滤纸，向冷冻制样机中加入双蒸水，输入 Blot Time (2.5s)、Blot Force (3s)、Wait Time (3s)、Blot Total (1s) 的冷冻制样参数制样。

向模具中准备好液氮及液态乙烷；将载网按照卡槽方向夹在夹具上，然后将夹具与载网一起安装于冷冻制样机上；移取 3μl 复溶后的实施例 1-1 样品，小心吹打至载网表面 (注意防止枪尖戳破载网)，运行仪器，仪器将按照制样条件运行；取下夹具，将载网从乙烷中快速转移至液氮中 (勿撞弯载网)，将载网安装于电镜检测转轮模具中。保管好样品，结束冻样。

将冷冻好的载网上机 (FEI 200KV Talos Arctica G2 场发射透射电子显微镜) 冷却并上载样品，进行电镜观察及拍摄。

从实施例 1-1 号样品冷冻电镜结果可以看到，即使使用了盐浓度较高的 20mM 乳酸钠进行冻干，冻干复溶后的制剂依然呈现均匀球状，添加乳酸钠冻干并未显著改变 mRNA-LNP 的微观形貌 (图 1)。

实施例 2 乳酸钠单独及复配考察

表 2 冻干 buffer 组成

样品名称	Buffer 组成
实施例 2-1	pH8.0 (5mM Tris)
实施例 2-2	pH7.5 (20mM 乳酸钠)
实施例 2-3	pH7.5 (20mM Tris +5mM 乳酸钠)

按照实施例 1 模型样品的制备方式，制备得到 mRNA 浓度约 200μg/mL 的 mRNA-LNP 母液，mRNA-LNP 母液中不含 buffer。取适当体积的 mRNA-LNP 母液加入适当体积的 100mM pH7.5 Tris 母液、pH8.0 Tris 母液、pH7.5 乳酸钠母液，再加入适当体积超纯

水和冻干保护剂母液稀释至 mRNA 浓度约为 100µg/mL，最终 buffer 组成与表 2 相对应。将序号 1-3 的样品配置完成后，进行 0.22µm 无菌过滤，将过滤后的样品以 0.6mL/瓶的体积灌装到 2R 西林瓶，冻干胶塞半加塞后，置于冻干机按预定程序进行冻干。

冻干完成后进行充氮压塞出箱并轧盖，向冻干后的样品中加入 0.54mL 无酶水进行复溶，记录复溶所需时间。取复溶后的样品适量，稀释 50 倍于马尔文粒径仪进行粒径、多分散系数检测，平行检测三次取平均值，同时取复溶后的样品检测 pH、mRNA 含量、包封率、完整性，结果见表 3。

表 3 不同冻干 buffer 组成样品检测结果

样品名称	平均粒径 (nm)	PDI	mRNA 含量 (µg/mL)	包封率%	完整性%	复溶后 pH	复溶时间 (s)
实施例 2-1	98.28	0.113	91	88	80.9	7.98	15
实施例 2-2	98.40	0.146	86	87	96.0	7.31	12
实施例 2-3	97.53	0.108	100	88	97.8	7.48	11

实施例 2 样品 1-3 的完整性测定图谱如图 2 所示。

取 100uL 冻干复溶后的 mRNA-LNP 样品，加入到 0.6mL 的离心管中进行 pH 测定，pH 计为梅特勒-托利多 FE28 型，采用微量 pH 探头测定。

由上述实验结果可知，冷冻干燥后的制剂可快速复溶，复溶后的 mRNA-LNP 制剂，粒径大小依然处于合理区间，PDI 较小粒径分布集中，mRNA 包封率和完整性处于较高水平，样品均冻干成功。

为短时间内区分出实施例 2 中样品 1-3 的稳定性差异，将样品 1-3 的冻干制剂置于 42℃放置一个月，分别于第一、二、三、四周取样品复溶后进行粒径、多分散系数检测、pH、mRNA 含量、包封率、完整性检测，结果见表 4。

表 4 42℃高温影响因素不同时间点检测结果

样品名称	时间点	平均粒径 (nm)	PDI	mRNA 含量 (µg/mL)	包封率%	完整性%
实施例 2-1	1 周	110.50	0.129	91.0	88.7	68.4
	2 周	124.80	0.122	87.4	86.8	44.1
	3 周	121.23	0.081	93.5	85.6	49.8
	4 周	145.21	0.102	86.7	82.1	30.6
实施例 2-2	1 周	144.80	0.064	96.8	90.2	94.8
	2 周	154.80	0.094	95.2	86.4	79.5
	3 周	158.10	0.091	94.5	86.0	78.4
	4 周	163.80	0.095	91.2	81.9	71.7
实施例 2-3	1 周	136.80	0.063	95.0	86.6	62.1
	2 周	136.00	0.079	98.1	84.5	39.4
	3 周	146.60	0.091	88.6	81.8	31.6
	4 周	141.34	0.105	93.6	80.4	23.3

通过表 4 我们可以看到，在 42℃放置后，样品 1-3 的粒径均发生一定程度增大，包封率发生较小幅度降低，mRNA 含量保持稳定，完整性出现较大分化，如图 3 所示，在 42℃放置一个月后，5mM Tris 组和 20mM Tris+5mM 乳酸钠组完整性降低至 30%左右，变化趋势与 Muramatsu 等人报道接近。但出乎意料的是，20mM 乳酸钠组样品即使在 42℃

放置一个月后，完整性依然高达 71.7%，显著高于其他两组，反映使用 20mM 乳酸钠能显著改善冻干制剂的完整性降低。

实验过程显示，实施例 2-2 显示出乳酸钠加入核酸-脂质纳米颗粒制剂后实现了改善核酸-脂质纳米颗粒冻干制剂的完整性和长期保存稳定性的技术效果，但也显示 pH 仅有 7.31，pH 检测过程中波动较大且低于目标 pH7.5，这与乳酸钠在 pH7-8 之间缓冲能力弱相关。因此，为了获得更好的技术效果，进一步尝试加入少量 Tris 与不同用量乳酸钠复配来改善制剂的 pH 缓冲能力从而达到保护 mRNA 免受 pH 波动降解，进而改善冻干制剂的完整性和稳定性。

表 5 Tris 与乳酸钠复配处方设置

样品名称	复配 Buffer 组成
实施例 2-4	pH7.5 5mM Tris & 5mM 乳酸钠
实施例 2-5	pH7.5 5mM Tris & 10mM 乳酸钠
实施例 2-6	pH7.5 5mM Tris & 20mM 乳酸钠

按照模型样品的制备方式，制备得到 mRNA 浓度约 200μg/mL 的 mRNA-LNP 母液，mRNA-LNP 母液中 buffer 为 5mM Tris。取适当体积的 mRNA-LNP 母液加入适当体积的 100mM 乳酸钠母液，再加入适当体积 5mM Tris 溶液和冻干保护剂母液稀释至 mRNA 浓度约为 100μg/mL，最终 buffer 组成与表 5 相对应。将序号 4-6 的样品配置完成后，进行 0.22μm 无菌过滤，将过滤后的样品以 0.6mL/瓶的体积灌装到 2R 西林瓶，冻干胶塞半加塞后，置于冻干机按预定程序进行冻干。

冻干完成后进行充氮压塞出箱并轧盖，向冻干后的样品中加入 0.54mL 无酶水进行复溶，记录复溶所需时间。取复溶后的样品适量，稀释 50 倍于马尔文粒径仪进行粒径、多分散系数检测，平行检测三次取平均值，同时取复溶后的样品检测 mRNA 含量、包封率、完整性，结果见表 6。

表 6 冻干后关键质量指标及复溶时间

样品名称	平均粒径 (nm)	PDI	mRNA 含量 (μg/mL)	包封率%	完整性%	冻干前 pH	复溶后 pH	42℃放置四周复溶后完整性%	42℃放置四周复溶后 pH	复溶时间 (s)
实施例 2-4	106.6	0.15	89	90.8	94	7.54	7.42	82	7.45	15
实施例 2-5	99.88	0.0966	92	89.4	89.8	7.39	7.48	79	7.44	14
实施例 2-6	99.52	0.111	90	87.3	92	7.4	7.47	81	7.42	16

分别取 100uL 冻干复溶后的 mRNA-LNP 样品与冻干前样品, 加入到 0.6mL 的离心管中进行 pH 测定, pH 计为梅特勒-托利多 FE28 型, 采用微量 pH 探头测定。

以 RiboGreen RNA 试剂与游离 mRNA 结合荧光显色, 利用荧光分析仪测定游离 mRNA 量; 同时, 以 Triton X-100 破膜, 测得 mRNA 总量, 则:

$$\text{包封率 (EE\%)} = (\text{mRNA 总量} - \text{mRNA 游离量}) / \text{mRNA 总量} * 100\%$$

mRNA 完整性测定: 先将 mRNA-LNP 样品稀释后 70°C 变性, 制备 Dye-Gel 胶, 注入压胶器中, 接着, 分别加入 mRNA marker, ladder 和 sample。利用 Agilent 5200 生物分析系统以凝胶电泳原理高效测定样品 mRNA 完整性谱图。实施例 2-4、实施例 2-5、实施例 2-6 的完整性测定图谱如附图 4 所示。

由上述实验结果可知, Tris 与乳酸钠进行复配后的冷冻干燥制剂可以快速复溶, 复溶后的 mRNA-LNP 制剂, 粒径大小依然处于合理区间, PDI 较小粒径分布集中, mRNA 包封率和完整性处于较高水平, 样品均冻干成功。从冻干前后的 pH 来看, 引入 Tris 与乳酸钠复配后, 使 mRNA-LNP 样品的 pH 在冻干前后都较为稳定, 非常接近所设定的 pH7.5 的水平, 稳定的 pH 可以使 mRNA 免受 pH 波动而降解。

细胞表达 Western-blot

以 HEK293 细胞作为体外蛋白表达模型细胞。以 1×10^6 细胞/mL 细胞密度于 6 孔板中铺板, 并培养 24 小时, 接着, 将实施例 2-1 到实施例 2-6 样品以无核酸酶水复溶, 再取模型样品, 依次加入孔中, 加入量为 20uL, 混匀后转染 4 小时, 换液 (含血清)。

于培养箱中培养 24 小时后采用 PBS 消化细胞, 并将其转移到离心管后离心 (2500 r/min, 5min), 将细胞收集, 加入 1mL PBS 吹匀, 转移到 1.5mL 的 EP 管中, 离心后取下层细胞。每个样品加入 200uL 的蛋白裂解液 (每 100uL CHAPS 加入 1uL Protease inhibitor), 于冰上裂解 1 小时。置于 4°C 的离心机中离心 (13500 r/min, 20 分钟) 后取上清, 将样品进行 western-blot 实验测定蛋白表达量。

首先将电泳装置检漏 (水检漏, 加满, 5min 内液面不降, 则代表装置可以用), 检漏完成, 清干净水分; 将置好的 12% 分离胶 (体积分数) 加入到电泳装置中, 再加入无水乙醇 (用于压气泡), 将其静置 30 分钟后, 分离胶凝固后, 将无水乙醇倒掉, 采用滤纸吸掉多余的液体; 加入浓缩胶并迅速插入梳子, 放置 30 分钟后, 浓缩胶凝固; 将此装置放到电泳槽中, 加入电泳液 (1×SDS-PAGE 缓冲液) 没过铂丝, 拔出梳子, 分别依次加入实施例 1 中的样品 1-3 和实施例 3 中的样品 4-6、模型样品的蛋白表达样品; 电泳 (100 V, 300 mA), 在电泳的过程中观察溴酚蓝以及 marker 的位置, 待其到达凝胶底部后停止; 取出电泳后的凝胶, 按照浓缩胶和分离胶的分界线处分开, 去掉浓缩胶, 保留分离胶, 将分离胶和滤纸在 1×blotting buffer 中浸泡, PVDF 膜在无水甲醇中浸泡使其活化; 按照 3 层滤纸、1 层 PVDF 膜、分离胶、3 层滤纸的顺序放在转膜仪上并将气泡赶出, 打开电源, 15 V (5 V 到 15 V 梯度升压), 300 mA, 转印 1 小时 40 分钟; 将 PVDF 膜 (转有蛋白) 浸于含有 5% 脱脂奶粉的 1×PBST 中, 在室温下封闭 2 小时, 2h 后使采用 1×PBST 洗去过量的脱脂奶粉; 将膜放入含有一抗 (按照说明书采用 5% 脱脂奶粉稀释) 的 15mL 离心管中, 于 4°C 孵育过夜, 1×PBST 洗去过量的一抗; 将已经封闭完一抗的 PVDF 膜放入含有二抗 (按照说明书采用 5% 脱脂奶粉稀释) 的 15mL 离心管中, 在室温条件下孵育 1 小时 (注意避光), 洗去过量的二抗后, 采用 Odyssey 红外激光成像系统检测并分析。

实验结果见图 5，可见实施例 2 中的样品实施例 2-1 到实施例 2-6 样品的 gE 蛋白表达量无显著差异，甚至较未冻干的模型样品表达水平更高。各组样品的细胞转染效率无显著差异，说明冷冻干燥工艺并未降低 mRNA-LNP 的细胞水平生物活性，同时乳酸钠单独使用或不同用量与 Tris 复配使用未显著影响 mRNA-LNP 的细胞水平生物活性。

小鼠体内免疫

取 BALB/c 小鼠，以实施例 2-1 到实施例 2-3 三组制剂、实施例 2-1 到实施例 2-3 三组制剂 42℃高温加速四周后三组制剂、实施例 2-4 到实施例 2-6 中三组制剂，共计 9 组制剂复溶后与未冻干模型样品作对比研究，将小鼠随机分为 10 组，在第 0 和 14 天各肌肉注射 100uL (5μg)，在第 14 天和第 28 天采血样，用于针对 VZV gE 蛋白的 IgG 检测和替代性中和抗体检测；取脾细胞，进行 gE 蛋白抗原特异性 ICS 检测；合管取 PBMC 细胞，进行 gE 蛋白抗原特异性 ELISPOT 检测。

由图 6 和 7 的细胞免疫及体液免疫水平可见，制剂冻干后的体液免疫及细胞免疫水平与冻干前的模型样品接近，冻干并未导致制剂的小鼠体内免疫水平发生明显降低，甚至部分冻干制剂出现体内免疫活性显著优于冻干前模型制剂的情况。此外可以发现，冻干制剂 42℃放置 4 周后，不同处方样品小鼠体内免疫活性发生了明显分化，含乳酸钠制剂 42℃放置 4 周后小鼠体内免疫活性较冻干零点未发生明显降低，另外两组 42℃放置 4 周的冻干样品小鼠体内免疫活性则出现了明显的降低，这与 42℃放置 4 周后完整性水平相对应。

表 7 小鼠免疫样品信息

序号	处方信息	样品
Gr1	pH8.0 (5mM Tris)	实施例 2-1
Gr2	pH7.5 (20mM 乳酸钠)	实施例 2-2
Gr3	pH7.5 (20mM Tris + 5mM 乳酸钠)	实施例 2-3
Gr4	pH8.0 (5mM Tris)	实施例 2-1 高温 42℃四周
Gr5	pH7.5 (20mM 乳酸钠)	实施例 2-2 高温 42℃四周
Gr6	pH7.5 (20mM Tris + 5mM 乳酸钠)	实施例 2-3 高温 42℃四周
Gr7	pH7.5 5mM Tris & 5mM 乳酸钠	实施例 2-4
Gr8	pH7.5 5mM Tris & 10mM 乳酸钠	实施例 2-5
Gr9	pH7.5 5mM Tris & 20mM 乳酸钠	实施例 2-6
Gr10	冻干前液体冷冻制剂 (pH7.5 20mM Tris)	冻干前模型样品

实施例 3 乳酸钠用量考察实验

为考察不同乳酸钠用量对 LNP 制剂冻干的影响，配置了不同乳酸钠浓度的 LNP 制剂并根据实施例 1 中的配置方法及冻干程序进行冻干，具体冻干结果见表 8。

表 8 不同乳酸钠用量考察

样品名称	乳酸钠用量 (mM)	冻干后外观	粒径 (nm)	mRNA 含量 (μg/mL)	包封率 (%)	完整性 (%)	pH	乳酸钠占冻干后固体理论质量分数 (%) ²
冻干前 mRNA-LNP 母液	/	/	84.7	84	96.2	92.7	/	/
对比例 3-1 ¹	0	外观良好	95.6	85	90	93.1	7.54	0
实施例 3-1	5	外观良好	96.8	86	92.1	95.6	7.33	0.37

实施例 3-2	10	外观良好	96.2	84	92.6	89.2	7.23	0.74
实施例 3-3	20	外观良好	98.4	81	90.5	90.0	7.33	1.47
实施例 3-4	30	外观良好	117.2	88	88.4	90.2	7.27	2.19
实施例 3-5	40	外观良好	101.7	86	88.7	90.0	7.27	2.90
实施例 3-6	50	外观良好	98.4	80	86.0	92.7	7.27	3.60
实施例 3-7	75	外观良好	105.4	85	80.4	92.5	6.92	5.30
实施例 3-8	100	稍有皱缩	121.3	83	75.2	81.3	7.03	6.95
实施例 3-9	125	完全塌陷	143.8	83	71.3	75.3	7.11	8.54
实施例 3-10	150	完全塌陷	167.5	80	68.7	77.5	7.09	10.07

¹ 对比例 3-1 作为未添加乳酸钠对照，添加 20mM pH7.5 Tris buffer (Moderna 公司已上市新冠疫苗 mRNA-1273 buffer 处方) 进行冻干。

² 按冻干后水分被完全除去进行理论计算，冻干后固体物质为冻干保护剂、mRNA-LNP、乳酸钠，用乳酸钠冻干后理论质量比上冻干保护剂、mRNA-LNP、乳酸钠质量之和即为乳酸钠占冻干后固体理论质量分数 (%)。

从实施例 3-1 至 10 冻干结果可以看出，当乳酸钠用量在 100mM 及以上时，冻干后的粉饼外观有一定缺陷，尤其是用量为 125mM 及以上时出现完全塌陷。对于冻干后制剂的包封率，当乳酸钠用量在 50mM 以上时，冻干后的包封率随乳酸钠用量增加出现明显的降低，尤其当乳酸钠用量在 100mM 及以上时，冻干后的包封率低于 80%。从完整性来看，由于检测方法本身存在一定的误差，可以认为当乳酸钠用量在 5-75mM 时，冻干后制剂的完整性均处于较高水平且未发生明显降低，而乳酸钠用量达到 100mM 及以上浓度时，冻干后的完整性出现较为明显的降低，这与冻干后的包封率降低相对应。同时注意到冻干复溶后的 pH 与冻干前设定的 pH7.5 存在一定差距，尤其是当乳酸钠用量为 75mM 及以上时，冻干复溶后的 pH 降低至 7 左右，这与乳酸钠本身缓冲能力较弱且溶液近中性有关。

在制备了含不同乳酸钠用量冻干制剂的基础上，为进一步确认不同乳酸钠用量冻干制剂的热稳定性，进一步进行了 42°C 高温影响因素实验，分别对 42°C 高温放置两周和四周的样品进行完整性检测，具体实验结果见表 9。42°C 高温放置 4 周后对比例 3-1 及实施例 3-1 样品完整性降低到 30% 左右，而其余样品 42°C 放置四周后完整性依然处于 73-83% 之间且与实施例 2-2 的结果较为接近。

结合实施例 2-2/2-3 样品 42°C 放置四周完整性结果，反映乳酸钠用量在 5mM 时，在 42°C 高温放置时保护 mRNA 的效果有限，仅使用 5mM 乳酸钠的冻干制剂 42°C 放置四周的完整性降低程度与未添加乳酸钠制剂基本一致，且远低于添加 10mM 及以上用量乳酸钠的制剂，这可能与乳酸钠在高温条件下保护 mRNA 免受降解的机理有关，乳酸钠通过降低冻干制剂中少量残余水分活度的方式对 mRNA 进行保护，当乳酸钠用量较低时可能无法完全降低冻干制剂中残余水分的活度。

表 9 不同乳酸钠用量 42°C 高温影响因素实验考察

样品名称	乳酸钠用量 (mM)	零点完整性 (%)	42°C 放置 2 周后完整性 (%)	42°C 放置 4 周后完整性 (%)
对比例 3-1	0	93.1	37.2	30.3
实施例 3-1	5	95.6	39.7	28.4
实施例 3-2	10	89.2	81.3	77.9
实施例 3-3	20	90	87.5	79.9

实施例 3-4	30	90.2	83.4	79.7
实施例 3-6	50	92.7	81.8	73
实施例 3-7	75	92.5	91.8	83
实施例 3-8	100	81.3	69.8	79.6

这些实验表明，乳酸钠用量在 5-100mM 时，mRNA-LNP 制剂均能得到可接受的冻干；当乳酸钠用量为 5-75mM 范围内时，能够得到冻干后完整性最优的冻干制剂；当乳酸钠用量为 5-50mM 时，能得到冻干后各项关键质量指标均较优的冻干制剂；当乳酸钠用量在 10-100mM 的范围时，冻干制剂具有优异的热稳定性。综上，最优选地，在乳酸钠浓度为 10-50mM 范围时，可以得到冻干后各项关键质量指标均较优且高温热稳定性优异的冻干制剂。

实施例 4 不同种类 buffer 与乳酸钠复配用量考察

在实施例 2 和实施例 3 的实验中发现，单用乳酸钠时由于乳酸钠缓冲能力较弱，pH 容易发生较大的波动，可能潜在地影响乳酸钠增加 mRNA 制剂在冻干过程中的稳定行的技术效果。为了获得更好的技术效果，采取向 mRNA-LNP 母液中添加目标量乳酸钠及各种缓冲对母液，进一步考察了乳酸钠与不同浓度及种类缓冲对复配后进行冻干，具体实施方法同实施例 1，具体考察内容见表 10。

从表 11 考察结果可以看到，加入缓冲对与乳酸钠复配冻干复溶后，所测得 pH 值与目标设定 pH 十分接近，对比实施例 2 和实施例 3，加入缓冲对复配后能够显著稳定制剂 pH。乳酸钠用量为 20mM 时，分别与不同用量的乙酸、磷酸、Tris、柠檬酸、组氨酸缓冲对进行复配冻干，当缓冲对用量为 30mM 及 50mM 时 (既缓冲盐与乳酸钠摩尔比为 1.5 及 2.5)，冻干后的包封率明显更低且对应的完整性也较低 (包封率低于 80%或完整性低于 85%)，这反映高缓冲盐与乳酸钠摩尔比不利于 mRNA-LNP 的冻干。当乙酸、磷酸、Tris、柠檬酸、组氨酸缓冲对与乳酸钠摩尔比范围内在 0.25-1 时，均能与乳酸复配得到较好的冻干，优选乙酸、磷酸、Tris、柠檬酸、组氨酸缓冲对与乳酸钠摩尔比 0.25-1 的范围进行复配冻干。

表 10 不同种类 buffer 与乳酸钠复配用量考察

样品名称	乳酸钠用量 (mM)	乙酸缓冲对 (mM)	磷酸缓冲对 (mM)	Tris 缓冲对 (mM)	柠檬酸缓冲对 (mM)	组氨酸缓冲对 (mM)	设定 pH 值	缓冲盐占冻干后固体理论质量分数 (%) ¹	乳酸钠占冻干后固体理论质量分数 (%) ²	冻干制剂中缓冲盐与乳酸钠摩尔比 ³
实施例 4-1	20	5	/	/	/	/	7.5	0.45	1.47	0.25
实施例 4-2	20	10	/	/	/	/	7.5	0.9	1.46	0.5
实施例 4-3	20	15	/	/	/	/	7.5	1.34	1.46	0.75
实施例 4-4	20	20	/	/	/	/	7.5	1.78	1.45	1
实施例 4-5	20	30	/	/	/	/	7.5	2.65	1.45	1.5
实施例 4-6	20	50	/	/	/	/	7.5	4.34	1.43	2.5
实施例 4-7	20	/	5	/	/	/	7.5	1.18	1.46	0.25
实施例 4-8	20	/	10	/	/	/	7.5	2.33	1.45	0.5

实施例 4-9	20	/	15	/	/	/	7.5	3.46	1.44	0.75
实施例 4-10	20	/	20	/	/	/	7.5	4.56	1.43	1
实施例 4-11	20	/	30	/	/	/	7.5	6.68	1.41	1.5
实施例 4-12	20	/	50	/	/	/	7.5	10.66	1.38	2.5
实施例 4-13	20	/	/	5	/	/	7.5	0.52	1.47	0.25
实施例 4-14	20	/	/	10	/	/	7.5	1.03	1.46	0.5
实施例 4-15	20	/	/	15	/	/	7.5	1.54	1.46	0.75
实施例 4-16	20	/	/	20	/	/	7.5	2.04	1.45	1
实施例 4-17	20	/	/	30	/	/	7.5	3.03	1.44	1.5
实施例 4-18	20	/	/	50	/	/	7.5	4.94	1.43	2.5
实施例 4-19	20	/	/	/	5	/	7.5	0.97	1.46	0.25
实施例 4-20	20	/	/	/	10	/	7.5	1.92	1.45	0.5
实施例 4-21	20	/	/	/	15	/	7.5	2.86	1.44	0.75
实施例 4-22	20	/	/	/	20	/	7.5	3.77	1.44	1
实施例 4-23	20	/	/	/	30	/	7.5	5.55	1.42	1.5
实施例 4-24	20	/	/	/	50	/	7.5	8.93	1.39	2.5
实施例 4-25	20	/	/	/	/	5	7.5	0.52	1.47	0.25
实施例 4-26	20	/	/	/	/	10	7.5	1.03	1.47	0.5
实施例 4-27	20	/	/	/	/	15	7.5	1.52	1.46	0.75
实施例 4-28	20	/	/	/	/	20	7.5	2.04	1.46	1
实施例 4-29	20	/	/	/	/	30	7.5	3.05	1.46	1.5
实施例 4-30	20	/	/	/	/	50	7.5	5.03	1.45	2.5

¹ 按冻干后水分被完全除去进行理论计算，冻干后固体物质为冻干保护剂、mRNA-LNP、乳酸钠、缓冲对，用缓冲盐冻干后理论质量比上冻干保护剂、mRNA-LNP、乳酸钠、缓冲对质量之和既为缓冲盐占冻干后固体理论质量分数 (%)。

² 按冻干后水分被完全除去进行理论计算，冻干后固体物质为冻干保护剂、mRNA-LNP、乳酸钠、缓冲对，用乳酸钠冻干后理论质量比上冻干保护剂、mRNA-LNP、乳酸钠、缓冲对质量之和既为乳酸钠占冻干后固体理论质量分数 (%)。

³ 冻干制剂中缓冲盐摩尔浓度比上乳酸钠摩尔浓度既为两者摩尔比。

表 11 不同种类 buffer 与乳酸钠复配用量考察结果

样品名称	包封率 (%)	完整性 (%)	粒径 (nm)	实测 pH
冻干前 mRNA-LNP 母液	96.4	92.1	85.3	/
实施例 4-1	93.3	89.3	95.4	7.47

实施例 4-2	89.5	92.0	99.2	7.55
实施例 4-3	88.4	93.0	92.3	7.52
实施例 4-4	91.2	91.7	97.5	7.50
实施例 4-5	83.1	83.3	93.1	7.44
实施例 4-6	79.0	84.0	98.9	7.49
实施例 4-7	92.1	93.3	99.2	7.51
实施例 4-8	90.7	89.7	98.7	7.55
实施例 4-9	92.3	92.5	96.3	7.46
实施例 4-10	91.8	95.6	95.5	7.49
实施例 4-11	82.3	83.3	93.4	7.42
实施例 4-12	78.7	81.2	98.2	7.58
实施例 4-13	91.4	88.9	90.7	7.47
实施例 4-14	90.3	93.7	91.2	7.63
实施例 4-15	89.2	91.6	93.5	7.42
实施例 4-16	91.0	94.2	94.2	7.49
实施例 4-17	84.2	84.5	89.7	7.51
实施例 4-18	81.3	83.2	93.3	7.48
实施例 4-19	90.3	89.1	94.4	7.50
实施例 4-20	91.0	90.1	92.4	7.58
实施例 4-21	88.6	90.3	88.2	7.45
实施例 4-22	89.4	87.9	90.8	7.49
实施例 4-23	86.4	81.3	95.5	7.50
实施例 4-24	85.3	80.6	98.0	7.47
实施例 4-25	91.5	92.1	96.1	7.55
实施例 4-26	90.7	88.2	95.6	7.51
实施例 4-27	89.7	90.6	94.3	7.43
实施例 4-28	88.9	90.1	90.3	7.61
实施例 4-29	86.3	75.4	95.6	7.41
实施例 4-30	84.2	78.9	92.7	7.37

在表 11 乳酸钠用量为 20mM 与 5-50mM 不同缓冲盐复配考察实验结果中, 确认缓冲盐与乳酸钠摩尔比在 0.25-1 更优, 为进一步验证缓冲盐与乳酸钠摩尔比为 0.25-1 范围内复配冻干可行, 进一步考察乳酸钠浓度分别为 30/40/50mM 时与不同摩尔比缓冲盐复配冻干效果, 具体考察内容见表 12。

乳酸钠浓度分别为 30/40/50mM 时与不同摩尔比的 Tris buffer 或组氨酸 buffer 复配冻干, 具体考察结果见表 13。在缓冲盐与乳酸钠摩尔比为 0.2 时, 冻干复溶后 pH 偏离目标 pH7.5, 当缓冲盐与乳酸钠摩尔比为 0.25 及以上时, 冻干复溶后 pH 值与目标 pH7.5 十分接近, 这反映当缓冲盐与乳酸钠摩尔比过低时无法起到有效的缓冲作用来稳定制剂 pH。在缓冲盐与乳酸钠摩尔比为 1.5 时, 即使乳酸钠用量分别为 30/40/50mM 有所不同, 但冻干复溶后的包封率及完整性均较低, 这可能是缓冲盐用量过高影响冻干效果。在缓冲盐与乳酸钠摩尔比为 0.25-1 时, 冻干效果与表 11 类似, 冻干前后制剂各项质量指标均与冻干前较为接近。

综上，在乳酸钠用量不同的情况下与不同缓冲液进行复配冻干，当缓冲盐与乳酸钠摩尔比保持在 0.25-1 之间时稳定 pH 及冻干效果均较佳，优选缓冲盐与乳酸钠摩尔比 0.25-1 进行冻干。

表 12 不同种类 buffer 与不同用量乳酸钠复配考察

样品名称	乳酸钠用量 (mM)	Tris 缓冲对 (mM)	组氨酸缓冲对 (mM)	设定 pH 值	缓冲盐占冻干后固体理论质量分数 (%) ¹	乳酸钠占冻干后固体理论质量分数 (%) ²	冻干制剂中缓冲盐与乳酸钠摩尔比 ³
实施例 4-31	30	6	/	7.5	0.61	2.18	0.2
实施例 4-32	30	7.5	/	7.5	0.77	2.17	0.25
实施例 4-33	30	15	/	7.5	1.52	2.16	0.5
实施例 4-34	30	22.5	/	7.5	2.27	2.14	0.75
实施例 4-35	30	30	/	7.5	3.00	2.13	1
实施例 4-36	30	45	/	7.5	4.43	2.09	1.5
实施例 4-37	40	8	/	7.5	0.81	2.88	0.2
实施例 4-38	40	10	/	7.5	1.01	2.87	0.25
实施例 4-39	40	20	/	7.5	2.00	2.84	0.5
实施例 4-40	40	30	/	7.5	2.98	2.81	0.75
实施例 4-41	40	40	/	7.5	3.93	2.79	1
实施例 4-42	40	60	/	7.5	5.78	2.73	1.5
实施例 4-43	50	10	/	7.5	1.01	3.56	0.2
实施例 4-44	50	12.5	/	7.5	1.25	3.55	0.25
实施例 4-45	50	25	/	7.5	2.48	3.51	0.5
实施例 4-46	50	37.5	/	7.5	3.67	3.47	0.75
实施例 4-47	50	50	/	7.5	4.83	3.43	1
实施例 4-48	50	75	/	7.5	7.08	3.34	1.5
实施例 4-49	30	/	6	7.5	0.60	2.18	0.2
实施例 4-50	30	/	7.5	7.5	0.76	2.18	0.25
实施例 4-51	30	/	15	7.5	1.50	2.17	0.5
实施例 4-52	30	/	22.5	7.5	2.25	2.17	0.75
实施例 4-53	30	/	30	7.5	2.99	2.16	1
实施例 4-54	30	/	45	7.5	4.43	2.14	1.5
实施例 4-55	40	/	8	7.5	0.80	2.89	0.2
实施例 4-56	40	/	10	7.5	0.99	2.89	0.25
实施例 4-57	40	/	20	7.5	1.98	2.87	0.5

实施例 4-58	40	/	30	7.5	2.97	2.86	0.75
实施例 4-59	40	/	40	7.5	3.93	2.84	1
实施例 4-60	40	/	60	7.5	5.83	2.82	1.5
实施例 4-61	50	/	10	7.5	0.99	3.58	0.2
实施例 4-62	50	/	12.5	7.5	1.24	3.58	0.25
实施例 4-63	50	/	25	7.5	2.45	3.56	0.5
实施例 4-64	50	/	37.5	7.5	3.67	3.54	0.75
实施例 4-65	50	/	50	7.5	4.84	3.51	1
实施例 4-66	50	/	75	7.5	7.19	3.47	1.5

¹ 按冻干后水分被完全除去进行理论计算，冻干后固体物质为冻干保护剂、mRNA-LNP、乳酸钠、缓冲对，用缓冲盐冻干后理论质量比上冻干保护剂、mRNA-LNP、乳酸钠、缓冲对质量之和既为缓冲盐占冻干后固体理论质量分数(%)。

² 按冻干后水分被完全除去进行理论计算，冻干后固体物质为冻干保护剂、mRNA-LNP、乳酸钠、缓冲对，用乳酸钠冻干后理论质量比上冻干保护剂、mRNA-LNP、乳酸钠、缓冲对质量之和既为乳酸钠占冻干后固体理论质量分数(%)。

³ 冻干制剂中缓冲盐摩尔浓度比上乳酸钠摩尔浓度既为两者摩尔比。

表 13 不同种类 buffer 与不同用量乳酸钠复配考察结果

样品名称	包封率 (%)	完整性 (%)	粒径 (nm)	实测 pH
冻干前 mRNA-LNP 母液	97.0	91.7	80.7	/
实施例 4-31	91.3	89.7	90.5	7.23
实施例 4-32	90.5	91.0	94.4	7.51
实施例 4-33	91.0	91.3	90.6	7.55
实施例 4-34	88.9	90.5	89.7	7.49
实施例 4-35	89.4	93.2	87.2	7.52
实施例 4-36	81.8	83.6	89.3	7.51
实施例 4-37	89.1	90.7	88.9	7.26
实施例 4-38	89.0	89.0	93.5	7.47
实施例 4-39	90.2	89.3	93.2	7.55
实施例 4-40	90.8	91.5	90.8	7.52
实施例 4-41	91.4	88.3	94.1	7.56
实施例 4-42	79.4	81.9	89.7	7.50
实施例 4-43	87.3	92.4	90.3	7.24
实施例 4-44	86.8	93.6	91.2	7.47
实施例 4-45	88.7	89.2	94.1	7.52
实施例 4-46	89.4	90.3	92.6	7.53
实施例 4-47	88.3	90.7	88.3	7.49
实施例 4-48	75.6	79.8	87.5	7.52
实施例 4-49	91.7	88.9	86.5	7.25

实施例 4-50	90.2	88.7	85.2	7.57
实施例 4-51	90.2	90.8	89.7	7.51
实施例 4-52	88.4	93.2	91.3	7.54
实施例 4-53	89.8	91.4	88.5	7.58
实施例 4-54	84.2	83.5	91.5	7.50
实施例 4-55	89.2	89.5	89.2	7.19
实施例 4-56	89.7	89.2	90.3	7.42
实施例 4-57	90.0	90.1	90.3	7.50
实施例 4-58	91.3	92.4	89.7	7.52
实施例 4-59	90.7	89.1	89.4	7.51
实施例 4-60	80.1	78.4	88.6	7.48
实施例 4-61	88.5	89.3	88.2	7.14
实施例 4-62	87.7	88.9	90.2	7.47
实施例 4-63	87.3	90.6	92.0	7.43
实施例 4-64	89.5	91.2	89.6	7.48
实施例 4-65	86.4	89.1	90.5	7.56
实施例 4-66	72.4	75.6	87.4	7.51

实施例 5 不同 pH 值冻干效果考察

在实施例 1-4 的基础上，进一步考察了含乳酸钠冻干制剂冻干前最适的 pH 范围，在乳酸钠用量为 20mM 的基础上，分别考察单独使用乳酸钠、与浓度为 10mM 的不同种类及 pH 缓冲对复配的冻干效果，不同缓冲对与乳酸钠复配后加入合适的 pH 调节剂调节至目标 pH，具体冻干结果见表 14。

表 14 同 pH 值冻干效果

样品名称	乳酸钠用量 (mM)	缓冲对 (10mM)	设定 pH	包封率 (%)	完整性 (%)	粒径 (nm)	冻干后 pH
冻干前 mRNA-LNP 母液	/	/	/	95.9	93.5	84.2	/
实施例 5-1	20	乙酸缓冲对	6.5	83.3	89.3	115.4	6.47
实施例 5-2	20	磷酸缓冲对	6.5	79.5	92.0	119.2	6.55
实施例 5-3	20	Tris 缓冲对	6.5	78.4	93.0	112.3	6.52
实施例 5-4	20	柠檬酸缓冲对	6.5	81.2	91.7	117.5	6.50
实施例 5-5	20	组氨酸缓冲对	6.5	83.1	90.3	123.1	6.44
实施例 5-6	20	乙酸缓冲对	7.0	90.1	93.3	99.2	7.01
实施例 5-7	20	磷酸缓冲对	7.0	90.7	89.7	98.7	7.05
实施例 5-8	20	Tris 缓冲对	7.0	91.3	92.5	96.3	6.96
实施例 5-9	20	柠檬酸缓冲对	7.0	91.2	95.6	95.5	6.99
实施例 5-10	20	组氨酸缓冲对	7.0	88.3	93.3	93.4	6.92
实施例 5-11	20	乙酸缓冲对	7.5	93.4	88.9	90.7	7.47
实施例 5-12	20	磷酸缓冲对	7.5	92.3	93.7	91.2	7.63
实施例 5-13	20	Tris 缓冲对	7.5	89.2	91.6	93.5	7.42
实施例 5-14	20	柠檬酸缓冲对	7.5	93.0	94.2	94.2	7.49
实施例 5-15	20	组氨酸缓冲对	7.5	92.2	87.5	89.7	7.51
实施例 5-16	20	乙酸缓冲对	8.0	91.3	84.1	94.4	8.00
实施例 5-17	20	磷酸缓冲对	8.0	90.0	85.1	92.4	8.08
实施例 5-18	20	Tris 缓冲对	8.0	89.6	85.3	88.2	7.95
实施例 5-19	20	柠檬酸缓冲对	8.0	89.5	82.9	90.8	7.99

实施例 5-20	20	组氨酸缓冲对	8.0	88.4	81.3	95.5	8.00
实施例 5-21	20	乙酸缓冲对	8.5	91.5	77.1	96.0	8.55
实施例 5-22	20	磷酸缓冲对	8.5	92.7	73.2	94.2	8.51
实施例 5-23	20	Tris 缓冲对	8.5	90.7	75.6	93.5	8.43
实施例 5-24	20	柠檬酸缓冲对	8.5	88.7	70.1	90.3	8.61
实施例 5-25	20	组氨酸缓冲对	8.5	89.3	65.4	95.6	8.41

由表 14 可见，在 pH6.5 时，乳酸钠与不同缓冲对进行复配冻干后粒径增长显著大于其他 pH 值，冻干复溶后粒径均大于 110nm，同时冻干复溶后的包封率较其他 pH 值更低；在 pH 为 8.5 时，冻干后完整性较冻干前显著降低；在 pH7.0-8.0 之间时乳酸钠与不同缓冲对复配均能得到较好的冻干，冻干后的各项质量指标与冻干前较为接近，单独使用 20mM 乳酸钠进行冻干时，pH 为 7.27 (介于 7-8 之间) 也可以得到较好的冻干。

综上，含乳酸 mRNA-LNP 样品进行冻干时，无论是乳酸钠单独使用或乳酸钠与不同缓冲对复配，在 pH7-8 的范围内均能得到较好的冻干，优选的冻干 pH 范围为 7-8。

实施例 6 不同类型 mRNA 的冻干效果

在对传统线性 mRNA 的考察基础上，进一步确认了在传统线性 mRNA 上可行的冻干条件是否适用于自复制 mRNA (samRNA) 及环状 mRNA (circRNA)，以 eGFP 的 samRNA 和 circRNA 为例，按上述实施例相同的包封方式分别对 eGFP 的 samRNA 和 circRNA 进行了包封，包封后置换缓冲液为 50mM 乳酸钠&10mM PB 缓冲液内含冻干保护剂，按每瓶 0.6mL 灌装到 2R 西林瓶后以实施例 1 冻干程序进行冻干，冻干结果如表 15。

将表 15 中的样品冻干加无酶水复溶后，取样品进行细胞表达实验。具体实验为取 6.5×10^5 细胞/mL 细胞密度的 Hep3B 细胞，1mL/孔接种到 6 细胞培养板中，24 小时后每孔转染 2.5 μ g mRNA-LNP 后将细胞培养板置于 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 细胞培养箱中培养，阴性对照组转染等体积生理盐水。24 小时后，显微镜拍照成像，结果如图 8 所示。

表 15 不同类型 mRNA 冻干结果

样品名称		mRNA 类型	粒径 (nm)	PDI	包封率%	完整性%
实施例 6-1	冻干前	SamRNA (eGFP)	78.9	0.06	99.2	83.5
	冻干后		85.2	0.05	95.6	81.2
实施例 6-2	冻干前	circRNA (eGFP)	83.5	0.09	97	92.3
	冻干后		88.2	0.11	92.4	93.1
对比例 6-1	冻干前	传统线性 mRNA (eGFP)	81.5	0.07	95.7	95.4
	冻干后		90.3	0.07	91.2	94.2

从表 15 可以看到，三种不同类型 mRNA 分子均能得到良好的包封及冻干，冻干后的多项指标与冻干前十分接近。从图 8 可以看到，三种类型 mRNA 冻干前后的细胞表达水平均十分接近，冻干并未导致 3 种类型的 mRNA 制剂生物活性发生降低。反映冻干处方和冻干工艺对不同类型核酸具有高度兼容性，不同类型核酸均能得到良好的冻干。

实施例 6-1 号和 6-2 样品涉及 SamRNA 和 circRNA，为进一步证明本发明所述乳酸盐的在冷冻干燥中的性质，对实施例 6-1 号和 6-2 样品进行电镜观察。

取石墨烯载网，正面朝上于表面皿中，在辉光仪中辉光 2 秒 (到时间后手动停止)；进行冷冻制样，1) 提前半小时打开冷冻制样机，更换滤纸，向冷冻制样机中加入双蒸水，输入 Blot Time (2.5s)、Blot Force (3s)、Wait Time (3s)、Blot Total (1s) 的冷冻制样参数制样。

向模具中准备好液氮及液态乙烷；将载网按照卡槽方向夹在夹具上，然后将夹具与载网一起安装于冷冻制样机上；移取 3μl 复溶后的实施 6-1 样品、实施例 6-2 样品，小心吹打至载网表面 (注意防止枪尖戳破载网)，运行仪器，仪器将按照制样条件运行；取下夹具，将载网从乙烷中快速转移至液氮中 (勿撞弯载网)，将载网安装于电镜检测转轮模具中。保管好样品，结束冻样。

将冷冻好的载网上机 (FEI 200KV Talos Arctica G2 场发射透射电子显微镜) 冷却并上载样品，进行电镜观察及拍摄。

从实施例 6-1 样品 (图 9)、实施例 6-2 样品 (图 10) 电镜图片可见，即使是 50mM 乳酸钠&10mM PB 缓冲液这种盐浓度相对较高的条件下，包封 SamRNA 和 circRNA 的 LNP 冻干复溶后制剂依然呈现均匀球状，冻干并未导致制剂的微观形貌遭到破坏。

实施例 7 不同脂质纳米颗粒的冻干研究

以 eGFP mRNA 为例，进行不同阳离子脂质的 LNP-mRNA 包封，分别将三种阳离子脂质按表 16 的摩尔比溶解在乙醇溶液中，mRNA 溶解在 pH 4.0 醋酸缓冲液中，以脂质混合物：mRNA 流速比 1:3，通过微流控设备 Precision Nanosystems 的纳米颗粒制备仪器 Ignite 制备 mRNA-LNP 组合物 (具体配方见表 16)。将包封好的 mRNA-LNP 换液到表 16 对应的 buffer 中，添加乳酸钠母液至目标浓度，添加冻干保护剂母液使最终冻干保护剂组成与实施例 1 相同，无菌过滤后按每瓶 0.6mL 灌装到 2R 西林瓶进行冻干。冻干前后取样检测包封率、平均粒径、PDI、完整性，并取样进行细胞表达实验。

LNP 包封冻干前后的各项指标如表 17，三种不同脂质纳米颗粒各自在不同氮磷比条件下均能较好包封 mRNA，制得 LNP 的各项指标均较优。在不同乳酸钠用量及与不同 buffer 复配后进行冻干，冻干后的各项理化指标均与冻干前十分接近，反映样品均得到良好的冻干。冻干前后的细胞表达结果如图 11，三种 LNP 制剂冻干后的细胞表达均较高，甚至较各自冻干前有所提高。

表 16 不同三组分 LNP 处方信息

样品名称	乳酸钠用量 (mM)	Buffer 组成	脂质配方 (摩尔百分比)	氮磷比
实施例 7-1	20	10mM PB	ALC-0315 : 胆固醇 : DSPC : DMG-PEG2000 = 49 : 10 : 39.5 : 1.5	6
实施例 7-2	30	15mM 组氨酸	MC3 : 胆固醇 : DSPC : DMG- PEG2000 = 49 : 10 : 39.5 : 1.5	4
实施例 7-3	50	25mM 柠檬酸	SM-102 : 胆固醇 : DSPC : DMG-PEG2000 = 49 : 10 : 39.5 : 1.5	8

表 17 不同三组分 LNP 冻干结果

样品名称	阳离子脂质	粒径 (nm)	PDI	包封率%	完整性%
------	-------	---------	-----	------	------

实施例 7-1	冻干前	ALC-0315	75.4	0.08	98.2	93.2
	冻干后		82.6	0.09	95.0	89.5
实施例 7-2	冻干前	MC3	81.7	0.10	97	94.3
	冻干后		87.6	0.08	93.4	92.3
实施例 7-3	冻干前	SM-102	80.2	0.11	99.7	94.4
	冻干后		90.2	0.10	95.2	96.2

取石墨烯载网，正面朝上于表面皿中，在辉光仪中辉光 2 秒 (到时间后手动停止)；进行冷冻制样，1) 提前半小时打开冷冻制样机，更换滤纸，向冷冻制样机中加入双蒸水，输入 Blot Time (2.5s)、Blot Force (3s)、Wait Time (3s)、Blot Total (1s) 的冷冻制样参数制样。

向模具中准备好液氮及液态乙烷；将载网按照卡槽方向夹在夹具上，然后将夹具与载网一起安装于冷冻制样机上；移取 3μl 复溶后的实施例 7-1 样品、实施例 7-2 样品、实施例 7-3 样品，小心吹打至载网表面 (注意防止枪尖戳破载网)，运行仪器，仪器将按照制样条件运行；取下夹具，将载网从乙烷中快速转移至液氮中 (勿撞弯载网)，将载网安装于电镜检测转轮模具中。保管好样品，结束冻样。

将冷冻好的载网上机 (FEI 200KV Talos Arctica G2 场发射透射电子显微镜) 冷却并上载样品，进行电镜观察及拍摄。

从实施例 7-1 样品 (图 12)、实施例 7-2 样品 (图 13)、实施例 7-3 样品 (图 14) 电镜图片可见，三种 LNP 冻干后微观形貌较好。

最后应说明的是：以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案，而非对其限制；尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

权 利 要 求 书

1. 一种核酸-脂质纳米颗粒组合物，其包括以下组分：核酸、脂质和乳酸盐，其中所述乳酸盐选自乳酸钠或乳酸钾，含量为 5-100mM，例如 5-75mM、5-50mM 或 10-100mM，优选为 5-50mM。
2. 根据权利要求 1 所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物，其还包括缓冲液，其中所述缓冲液与乳酸盐的含量比为 0.25-1:1。
3. 根据权利要求 2 所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物，其中，所述缓冲液是选自由乙酸盐缓冲液、PBS 缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液和 tris 缓冲液组成的组的一种或多种的复配，优选地，缓冲液含量为 1.25-50 mM。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物，其还包括冻干保护剂，优选地所述冻干保护剂选自由蔗糖、海藻糖、乳糖、环糊精和甘露醇组成的组中的一种或多种的组合。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物，其中，所述核酸-脂质纳米颗粒组合物的 pH 为 1.0-14.0，例如 2.0-13.0，优选为 5.0-9.0，更优选为 7.0-8.0。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物，其中，所述核酸选自由 ssDNA、dsDNA、mRNA、lncRNA、siRNA、saRNA、shRNA、ASO、质粒、circRNA、circDNA、miRNA、CRISPR-Cas、ployI:C、SamRNA 和 5'-pppRNA 组成的组。
7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物，其中，所述的核酸被包裹在脂质纳米颗粒 (LNP) 中。
8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物，其中，所述脂质包括阳离子脂质、中性磷脂、PEG-脂质和任选的甾族脂质。
9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物，其中，所述组合物被制备为冻干制剂。
10. 根据权利要求 9 所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物，其中，以冻干制剂总重量计，所述乳酸盐固含量为 0.5-10.0wt%，例如 0.5-7.5wt%、0.5-5.0wt%或 1.0-10wt%，优选为 0.5-5.0wt%。
11. 根据权利要求 9 或 10 所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物，其中，以冻干制剂总重量计，所述缓冲剂固含量为 0.35-10.0wt%，例如 0.35-7.5wt%、0.35-5.0wt%或 1.0-10wt%，优选为 0.5-5.0wt%。

12. 一种核酸-脂质纳米颗粒组合物的制备方法, 其中, 所述组合物被制备为冻干制剂, 所述制备方法包括以下步骤:

- (1) 将乳酸盐溶液与核酸-脂质纳米颗粒母液相混合, 或者在核酸封装前将乳酸盐加入到核酸溶液中, 再加入脂质, 或者在核酸-脂质纳米颗粒超滤换液阶段采用含乳酸盐的溶液进行超滤, 其中, 所述乳酸盐选自乳酸钠或乳酸钾, 含量为 5-100mM, 例如 5-75mM、5-50mM 或 10-100mM, 优选为 5-50mM;
- (2) 加入冻干保护剂; 和
- (3) 进行冷冻干燥, 从而得到核酸-脂质纳米颗粒组合物的冻干制剂。

13. 根据权利要求 12 所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物的制备方法, 其中, 所述冻干保护剂选自蔗糖、海藻糖、乳糖、环糊精和甘露醇组成的组中的一种或多种的组合。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物的制备方法, 其中, 以冻干制剂总重量计, 所述冻干保护剂固含量为 50-99.9wt%。

15. 根据权利要求 14 所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物的制备方法, 其中, 步骤 (1) 还包括加入缓冲剂, 其中所述缓冲液与乳酸盐的含量比为 0.25-1:1。

16. 根据权利要求 15 所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物的制备方法, 其中, 所述缓冲液是选自由乙酸盐缓冲液、PBS 缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液和 tris 缓冲液组成的组的一种或多种的复配, 优选地, 缓冲液含量为 1.25-50 mM。

17. 根据权利要求 12-16 中任一项所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物的制备方法, 其中, 步骤 (1) 制得的溶液的 pH 为 1.0-14.0, 例如 2.0-13.0, 优选为 5.0-9.0, 优选为 7.0-8.0。

18. 根据权利要求 12-17 中任一项所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物的制备方法, 其中, 所述核酸选自 ssDNA、dsDNA、mRNA、lncRNA、siRNA、saRNA、shRNA、ASO、质粒、circRNA、circDNA、miRNA、CRISPR-Cas、polyI:C、SamRNA 和 5'-pppRNA 组成的组。

19. 根据权利要求 12-18 中任一项所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物的制备方法, 其中, 在步骤 (1) 中, 所述核酸包裹于脂质纳米颗粒中。

20. 根据权利要求 12-19 中任一项所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物的制备方法, 其中, 所述脂质包括阳离子脂质、中性磷脂、PEG-脂质和任选的甾族脂质。

21. 权利要求 1-11 中任一项所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物在制备药物中的用途。

22. 根据权利要求 21 所述的用途，所述药物是疫苗。

23. 根据权利要求 22 所述的用途，其中，所述疫苗是用于预防癌症、治疗性肿瘤疫苗、病毒感染、细菌感染或真菌感染的疫苗。

24. 根据权利要求 23 所述的用途，其中，所述病毒选自由诺如病毒、埃博拉病毒、冠状病毒、巨细胞病毒、登革热病毒、寨卡病毒、肠病毒、肝炎病毒、单纯疱疹病毒、人乳头瘤病毒、流感病毒、马尔堡病毒、麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒和轮状病毒组成的组。

25. 根据权利要求 21-24 中任一项所述的用途，其中，所述药物为口服制剂、肌肉注射制剂、皮下注射制剂、静脉注射制剂或吸入制剂。

26. 根据权利要求 25 所述的用途，其中，所述吸入制剂为雾化吸入剂或干粉吸入剂。