



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0049205

(51)^{2020.01} C12N 15/113; A61K 47/10; A61K 9/51 (13) B

(21) 1-2021-06487

(22) 18/03/2020

(86) PCT/US2020/023442 18/03/2020

(87) WO2020/191103 24/09/2020

(30) 62/820,496 19/03/2019 US

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/01/2022 406A

(73) ARCTURUS THERAPEUTICS, INC. (US)

10628 Science Center Drive, Suite 250, San Diego, CA 92121, United States of America

(72) KARMALI, Priya (US); CHIVUKULA, Padmanabh (US); PAYNE, Joseph, E. (US); BAO, Yanjie (CN).

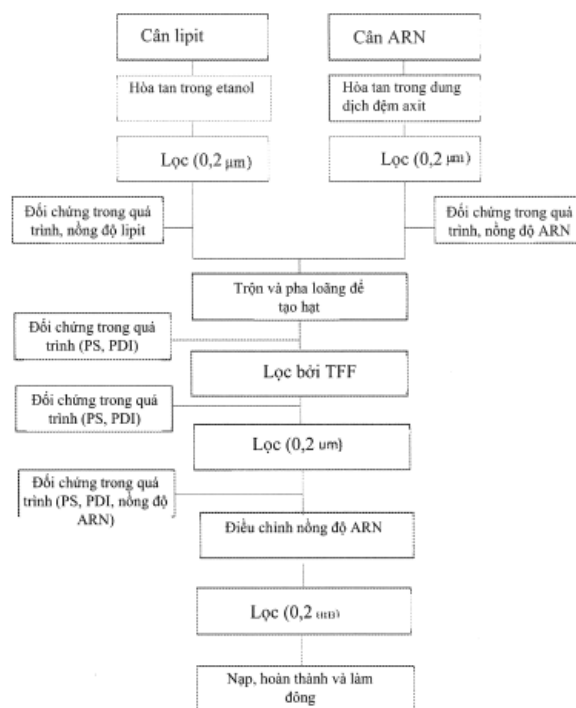
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT HẠT NANO ARN ĐƯỢC BAO NANG LIPIT

(21) 1-2021-06487

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất hạt nano ARN được bao nang lipid, bao gồm các bước a) cho dung dịch nước bao gồm ARN chảy qua ống thứ nhất có đường kính trong (ID) khoảng từ 0,1" (0,254 cm) đến 0,132" (0,33528 cm); b) cho dung dịch etanol bao gồm lipid chảy qua ống thứ hai có ID nằm trong khoảng từ 0,005" (0,0127 cm) đến 0,02" (0,0508 cm) với tốc độ chảy bằng một phần ba tốc độ chảy của dung dịch nước qua ống thứ nhất, trong đó lipid bao gồm lipid cation; và c) trộn dung dịch etanol với dung dịch nước bằng cách cho dung dịch etanol và dung dịch nước chảy vào môđun trộn cầu thành bởi ống thứ hai được nối vuông góc với ống thứ nhất; trong đó quá trình trộn tạo ra dòng dung dịch ra trong ống thứ nhất bao gồm dòng chảy rời của ARN và lipid với lượng từ khoảng 10% đến 75% thể tích/thể tích etanol, và trong đó các hạt nano ARN được bao nang lipid có cấu trúc hai lớp.

FIG. 1



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất hạt nano ARN được bao nang lipid.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lipid được sử dụng làm nguyên liệu để phân phối axit ribonucleic (ARN) do chúng có khả năng tạo các hạt nano lipid bao nang ARN để phân phối tới các tế bào đích khi dùng ngoài ruột. (Zimmermann, 2006, Nature, doi:10.1038/nature04688).

Các phương pháp khác nhau để sản xuất các hạt nano ARN được bao nang lipid là đã biết. Ví dụ, WO 2001/005373 bộc lộ các kỹ thuật để điều chế các hạt nano ARN được bao nang lipid sử dụng quy trình loại tiêm etanol bằng thiết bị trộn tĩnh để tạo ra môi trường chảy rồi, mà sau khi tạo túi nhỏ được kết với với phân tử điều trị. US 2004/0142025 bộc lộ các kỹ thuật để tạo ra các hạt nano ARN được bao nang lipid sử dụng quá trình trộn không chảy rồi và dãy pha loãng từng bước theo trình tự. US 6,843,942 bộc lộ phương pháp trộn không chảy rồi để tạo ra các hạt bằng cách phun lipid trong ống dung dịch hữu cơ qua vòi phun vào axit nucleic trong dòng dung dịch nước đi qua vòi phun. US 9,005,654 bộc lộ siARN bao nang trong hạt nano lipid (lipid nanoparticle - LNP) sử dụng quá trình trộn chảy rồi, tại đó lipid và ARN là các dòng đối nhau đi vào khoang trộn hình chữ T từ các nhánh đối nhau với tốc độ gần như bằng nhau để tạo ra dung dịch etanol 45-60% bao gồm các túi, mà được thu gom và sau đó được pha loãng tiếp (phương pháp pha loãng trực tiếp). US 9,404,127 bộc lộ phần lớn LNP được sản xuất bằng phương pháp pha loãng trực tiếp có hình thái không phải dạng tấm, tức là, cấu trúc không phải hai lớp.

Cần phải cải tiến quy trình và thiết bị để tạo ra các hạt nano ARN được bao nang lipid, gồm cả việc sản xuất với quy mô lớn đáng tin cậy đồng thời tối ưu hóa được cỡ hạt và tính đồng nhất.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hạt nano ARN được bao nang lipid, bao gồm các bước a) cho dung dịch nước bao gồm ARN chảy qua ống thứ nhất có đường

kính trong (inner diameter - ID) nằm trong khoảng từ 0,1" (0,254 cm) đến 0,132" (0,33528 cm); b) cho dung dịch etanol bao gồm lipid chảy qua ống thứ hai có ID nằm trong khoảng từ 0,005" (0,0127 cm) đến 0,02" (0,0508 cm) với tốc độ chảy bằng một phần ba tốc độ chảy của dung dịch nước qua ống thứ nhất, trong đó lipid bao gồm lipid cation; và c) trộn dung dịch etanol với dung dịch nước bằng cách cho dung dịch etanol và dung dịch nước chảy vào môđun trộn cấu thành bởi ống thứ hai được nối vuông góc với ống thứ nhất; trong đó quá trình trộn tạo ra dòng dung dịch ra trong ống thứ nhất bao gồm dòng chảy rồi chứa ARN và lipid trong khoảng từ 10% đến 75% thể tích/thể tích etanol, và trong đó các hạt nano ARN được bao nang lipid có cấu trúc hai lớp.

Theo một số phương án, tốc độ chảy ra ít nhất là 200 ml/phút. Theo phương án khác, dòng được gom có số Reynolds ít nhất bằng 2.000.

Theo một số phương án, dung dịch nước được bơm qua ống thứ nhất bằng bơm HPLC thứ nhất, tốt hơn là với áp suất ngược ít nhất bằng 10 psi, 25 psi, 50 psi, 75 psi, hoặc 100 psi. Tốt hơn là, ống thứ nhất có ID bằng 0,132" (0,335 cm), và dung dịch nước được bơm với tốc độ chảy ít nhất bằng 30 ml/phút, 45 ml/phút, 60 ml/phút, 75 ml/phút, 90 ml/phút, 105 ml/phút, 120 ml/phút, 150 ml/phút, 225 ml/phút, 262,5 ml/phút, 300 ml/phút, hoặc 450 ml/phút.

Theo một số phương án, dung dịch etanol được bơm qua ống thứ hai bằng bơm HPLC thứ hai, tốt hơn là với áp suất ngược ít nhất bằng 40 psi, 80 psi, 150 psi, 300 psi, hoặc 400 psi. Tốt hơn là, ống thứ hai có ID bằng 0,007" (0,018 cm), 0,01" (0,0254 cm), hoặc 0,02" (0,0508 cm); và dung dịch etanol được bơm với tốc độ chảy ít nhất bằng 10 ml/phút, 15 ml/phút, 20 ml/phút, 25 ml/phút, 30 ml/phút, 35 ml/phút, 40 ml/phút, 50 ml/phút, 60 ml/phút, hoặc 75 ml/phút, 87,5 ml/phút, 100 ml/phút, hoặc 150 ml/phút.

Tốt hơn là, dung dịch dạng nước và etanol được duy trì ở 15-20 °C.

Theo một số phương án, môđun trộn cấu thành bởi ống thứ hai được gắn vuông góc trên ống thứ nhất, trong đó ống thứ nhất có phần hở qua thành, trong đó phần hở có kích cỡ đường kính bên ngoài của ống thứ hai, và trong đó ống thứ hai được làm vừa khít qua phần hở để cho phép di chuyển liên tục dung dịch thứ hai trong ống thứ hai trong dung dịch thứ nhất trong ống thứ nhất. Môđun trộn tốt hơn là được cấu thành bởi ống thép không gỉ.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp còn bao gồm bơm dung dịch đậm pha loãng qua ống thứ ba, và trộn dung dịch đậm pha loãng với dung dịch ra bằng cách đưa dung dịch đậm pha loãng vào dung dịch ra ở vùng nối Y để tạo ra dung dịch ra đã được pha loãng. Tốt hơn là, dung dịch đậm pha loãng bao gồm 15 mM Tris, 50 mM NaCl, 9% sucroza, độ pH = 7,5; 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 9% sucroza, độ pH = 7,5; 50 mM phosphat, độ pH = 6,0; 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 9% sucroza, độ pH = 7,4; hoặc 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 9% sucroza, độ pH = 7,4. Tốt hơn là, dung dịch ra đã được pha loãng bao gồm 6,25% etanol; 8,25% etanol; hoặc 12,5% etanol.

Theo một số phương án, chi tiết nối Y nằm ở góc khoảng 45°. Tốt hơn là, chi tiết nối Y cấu thành bởi polyete ete keton (PEEK).

Theo một số phương án, dung dịch đậm pha loãng được bơm qua ống thứ ba với tốc độ chảy 400-900 mL/phút, và ống thứ ba có ID bằng 0,25" (0,635 cm).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các hạt nano ARN được bao nang lipid được sản xuất bởi phương pháp được bộc lộ ở đây.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm ARN, được sản xuất bởi quy trình bao gồm các bước a) cho dung dịch nước bao gồm ARN chảy qua ống thứ nhất có đường kính trong (ID) nằm trong khoảng từ 0,1" (0,254 cm) đến 0,132" (0,33528 cm); b) cho dung dịch etanol bao gồm lipid chảy qua ống thứ hai có ID nằm trong khoảng từ 0,005" (0,0127 cm) đến 0,02" (0,0508 cm) với tốc độ chảy bằng một phần ba tốc độ chảy của dung dịch nước qua ống thứ nhất, trong đó lipid bao gồm lipid cation; và c) trộn dung dịch etanol với dung dịch nước bằng cách cho dung dịch etanol và dung dịch nước chảy vào môđun trộn cấu thành bởi ống thứ hai được nối vuông góc với ống thứ nhất; trong đó quá trình trộn tạo ra dòng dung dịch ra trong ống thứ nhất bao gồm dòng chảy rồi chứa ARN và lipid trong khoảng từ 10% đến 75% thể tích/thể tích etanol trong dòng chảy rồi. Các hạt nano ARN được bao nang lipid được sản xuất bởi quy trình được bộc lộ ở đây có cấu trúc hai lớp, tức là, hình thái dạng tấm. Tốt hơn là, các hạt nano ARN được bao nang lipid có cỡ hạt trung bình nhỏ hơn 70 nm, 80 nm, 90 nm, hoặc 100 nm; chỉ số đa phân tán (PDI) nhỏ hơn 0,09, 0,07, hoặc 0,05; và mức bao nang lớn hơn 94%, 96%, hoặc 98% ARN. Tốt hơn là, cỡ mẻ là 0,05 đến ít nhất 30 g ARN, và sự biến thiên về cỡ hạt trung bình giữa các mẻ nhỏ hơn 10%.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất thiết bị sản xuất các hạt nano lipid bao gồm ARN, bao gồm ống thứ nhất có ID nằm trong khoảng từ 0,1" (0,254 cm) đến 0,132" (0,33528 cm); được nối một đầu với bơm HPLC thứ nhất và ở đầu còn lại với môđun trộn, trong đó bơm HPLC thứ nhất được tạo cấu hình để bơm dung dịch nước bao gồm ARN qua ống thứ nhất với tốc độ chảy ít nhất bằng 150 ml/phút; bể chứa thứ nhất được nối với bơm HPLC thứ nhất, trong đó bể chứa thứ nhất chứa dung dịch nước; ống thứ hai có ID nằm trong khoảng từ 0,005" (0,0127 cm) đến 0,02" (0,0508 cm) được nối một đầu với bơm HPLC thứ hai và ở đầu còn lại với môđun trộn, trong đó bơm HPLC thứ hai được tạo cấu hình để bơm dung dịch etanol bao gồm lipid qua ống thứ hai với tốc độ chảy lớn hơn 50 ml/phút, và trong đó ống thứ hai được nối vuông góc với ống thứ nhất ở môđun trộn; bể chứa thứ hai được nối với bơm HPLC thứ hai, trong đó bể chứa thứ hai chứa dung dịch etanol, trong đó thiết bị được tạo cấu hình để trộn dung dịch etanol với dung dịch nước bằng cách đưa dung dịch etanol vào dung dịch nước ở vùng nằm trong môđun trộn để tạo ra dung dịch ra; và trong đó dòng dung dịch ra tạo ra dòng chảy rời.

Theo một số phương án, thiết bị được bộc lộ ở đây tốt hơn là có môđun trộn trong đó ống thứ hai kéo dài qua thành của ống thứ nhất và một phần vào phía trong của ống thứ nhất; hoặc ống thứ hai kéo dài tới thành của ống thứ nhất và kết nối ống thứ nhất.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện lưu đồ đối với một phương án của quy trình sản xuất các hạt nano lipid. Các lipid được hòa tan trong etanol, ARN được hòa tan trong dung dịch đệm nước axit (ví dụ, dung dịch đệm xitrat), cả hai được lọc vô trùng. Các dung dịch được trộn bởi quy trình được mô tả ở đây để tạo ra các hạt, mà được phân tích về PDI và cỡ hạt (particle size - PS). Các hạt được cô và tinh chế bằng cách lọc dòng tiếp tuyến (tangential flow filtration - TFF) để loại etanol và ARN không gắn kết, và PDI và PS được kiểm tra tiếp. Nồng độ của các hạt sau đó được điều chỉnh theo tổng nồng độ ARN đo được. Các hạt được lọc vô trùng, được nạp, hoàn thành và đông lạnh.

Fig. 2 thể hiện bảng chế phẩm ARN lipid làm ví dụ, gồm cỡ hạt.

Fig. 3 thể hiện bảng chế phẩm ARN lipid làm ví dụ, gồm cỡ hạt và cỡ mẻ.

Fig. 4 thể hiện thiết bị sản xuất các hạt nano ARN được bao nang lipid. Dung dịch nước bao gồm ARN được vận chuyển bởi bơm HPLC qua ống bao gồm các vùng ống PEEK có ID 0,03'' (0,0762 cm), chi tiết nối PEEL có ID 0,05'', ống silicon 0,0625'', và ống silicon có ID 0,122'' (0,30988 cm), và thép không gỉ có ID 0,132'' (0,335 cm). Dung dịch hữu cơ bao gồm các lipid được vận chuyển bởi bơm HPLC qua ống, ví dụ, bao gồm các vùng ống PEEK có ID 0,03'' (0,0762 cm), chi tiết nối PEEK có ID 0,02'' (0,0508 cm), thép không gỉ có ID 0,01'' (0,0254 cm). Dung dịch hữu cơ được bơm vào dung dịch nước ở góc 90 độ ở vùng trộn. Ống silicon có ID 0,122'' (0,30988 cm) vận chuyển đầu ra lipid-ARN đã được trộn với ống polypropylen có ID 0,25'' (0,635 cm) mà hợp nhất ở góc 45 độ với dung dịch đệm pha loãng trong vùng pha loãng. Ống mà hợp nhất ở góc 45 độ với dung dịch đệm pha loãng trong vùng pha loãng có thể được pha loãng theo dãy để gồm 1, 2, 3 hoặc 4 vùng pha loãng của ống ở góc 45 độ đối với quy trình pha loãng. Sau quy trình pha loãng, các hạt đã được pha loãng được gom trong bình bọc thép không gỉ được duy trì ở 15-20 °C. Các hạt còn được xử lý bằng cách lọc dòng tiếp tuyến sử dụng bơm nhu động, màng ngăn hoặc ly tâm.

Fig. 5 thể hiện môđun trộn chi tiết hơn. Axit nucleic trong dung dịch đệm được vận chuyển qua nhánh vào gồm ống thép không gỉ thứ nhất (ví dụ, ID 0,100-0,132'' (0,254-0,335 cm)). Các lipid trong etanol được vận chuyển qua ống thép không gỉ thứ hai (ví dụ, ID 0,005-0,010'' (0,0127-0,0254 cm)) mà được gắn vuông góc với ống thứ nhất. Lỗ trên thành của ống thứ nhất cho phép vận chuyển chất lỏng từ ống thứ hai đến phần bên trong của ống thứ nhất. Các hạt nano ARN được bao nang lipid thu được từ việc trộn đi ra qua nhánh ra của ống thứ nhất.

Fig. 6A thể hiện khả năng mở rộng quy mô của quy trình được mô tả trong Ví dụ 1. Cỡ hạt duy trì không quá 80 nm đối với các mẻ 0,05 g, 0,5 g, 1 g, 3 g, 15 g, và 30 g ARN.

Fig. 6B thể hiện khả năng tái sản xuất của các hạt nano lipid được sản xuất bởi quy trình được mô tả trong Ví dụ 1. Cỡ hạt được duy trì nhỏ hơn 80 nm đối với mẻ 15 g và ba mẻ 30 g.

Fig. 7 thể hiện các hình ảnh cryo-TEM của các hạt nano ARN được bao nang lipid. Hình ảnh bên trái thể hiện các hạt nano mang ARN, phần lớn trong số chúng là

cấu trúc dạng tâm đơn nhất hình cầu. Độ phóng đại 52000 lần, khung tỉ lệ 200 nm. Hình ảnh bên phải thể hiện độ phóng đại lớn 110.000 lần, khung tỉ lệ 100 nm.

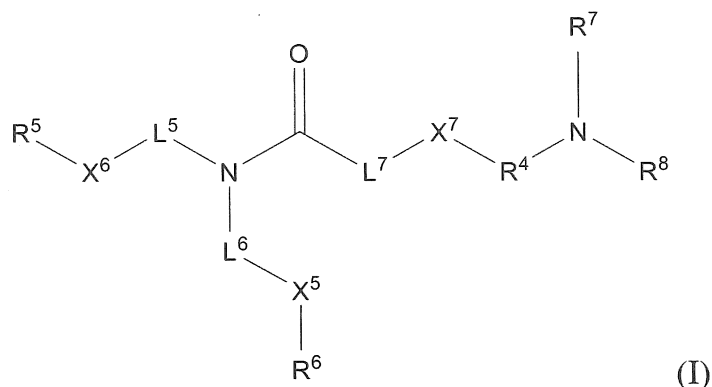
Mô tả chi tiết sáng chế

Cần hiểu rằng các dạng khác nhau của kỹ thuật theo sáng chế sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật từ phần bộc lộ này, trong đó các dạng khác nhau của kỹ thuật theo sáng chế được thể hiện và được mô tả bằng cách minh họa. Nhận thấy rằng kỹ thuật theo sáng chế có thể có các dạng khác và các dạng khác nhau và một vài chi tiết của nó có thể biến đổi theo các khía cạnh khác khác nhau, tất cả chúng đều không nằm ngoài phạm vi của kỹ thuật theo sáng chế. Theo đó, bản chất kỹ thuật của sáng chế, các hình vẽ và phần mô tả chi tiết sáng chế được đề cập tới như là có bản chất minh họa và không giới hạn phạm vi sáng chế.

Chủ đơn đã phát hiện ra quy trình trộn lipit và axit ribonucleic sợi đơn hoặc sợi kép (single stranded ribonucleic acid - ssARN hoặc double stranded ribonucleic acid - dsARN) sử dụng dòng chảy rối để tạo ra các hạt nano ARN được bao nang lipit mà tạo ra các hạt đơn phân tán gần nhỏ hơn 100 nm có hình thái dạng tấm, tức là, gồm cấu trúc hai lớp. Quy trình này có thể mở rộng tới hơn 30 g ARN. Các hạt nano ARN được bao nang lipit bao gồm ARN được sản xuất bởi các quy trình được mô tả ở đây là hữu ích để phân phối ARN *in vivo* và có độ an toàn và hiệu quả cải thiện khi dùng đường tĩnh mạch ở các mô hình động vật.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hạt nano ARN được bao nang lipit, bao gồm các bước a) cho dung dịch nước bao gồm ARN chảy qua ống thứ nhất có đường kính trong (ID) nằm trong khoảng từ 0,1” (0,254 cm) đến 0,132” (0,335 cm); b) cho dung dịch etanol bao gồm lipit chảy qua ống thứ hai có ID nằm trong khoảng từ 0,005” (0,0127 cm) đến 0,02” (0,0508 cm) với tốc độ chảy bằng một phần ba tốc độ chảy của dung dịch nước qua ống thứ nhất, trong đó lipit bao gồm lipit cation; và c) trộn dung dịch etanol với dung dịch nước bằng cách cho dung dịch etanol và dung dịch nước chảy vào môđun trộn cấu thành bởi ống thứ hai được nối vuông góc với ống thứ nhất; trong đó quá trình trộn tạo ra dòng dung dịch ra trong ống thứ nhất bao gồm dòng chảy rối chứa ARN và lipit trong khoảng từ 10% đến 75% thể tích/thể tích etanol,

và trong đó các hạt nano ARN được bao nang lipid có cấu trúc hai lớp và lipid bao gồm lipid cation có Công thức I:



hoặc muối được dung hoặc solvat của chúng, trong đó mỗi R^5 và R^6 được chọn độc lập từ nhóm cấu thành bởi C_1 - C_{31} alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, C_2 - C_{31} alkenyl hoặc C_2 - C_{31} alkynyl và cholesteryl; mỗi L^5 và L^6 được chọn độc lập từ nhóm cấu thành bởi C_1 - C_{20} alkyl mạch thẳng và C_2 - C_{20} alkenyl; X^5 là $-C(O)O-$ hoặc $-OC(O)-$; X^6 là $-C(O)O-$ hoặc $-OC(O)-$; X^7 là S hoặc O; L^7 không có mặt hoặc là alkyl bậc thấp; R^4 là C_1 - C_6 alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh; và mỗi R^7 và R^8 được chọn độc lập từ nhóm cấu thành bởi hydro và C_1 - C_6 alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hạt nano ARN được bao nang lipid được sản xuất bởi phương pháp như được thể hiện ở đây.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất hạt nano ARN được bao nang lipid được sản xuất bởi quy trình, trong đó quy trình bao gồm các bước a) cho dung dịch nước bao gồm ARN chảy qua ống thứ nhất có đường kính trong (ID) nằm trong khoảng từ 0,1" (0,254 cm) (0,254cm) đến 0,132" (0,335 cm); b) cho dung dịch etanol bao gồm lipid chảy qua ống thứ hai có ID nằm trong khoảng từ 0,005" (0,0127 cm) đến 0,02" (0,0508 cm) với tốc độ chảy bằng một phần ba tốc độ chảy của dung dịch nước qua ống thứ nhất, trong đó lipid bao gồm lipid cation; và c) trộn dung dịch etanol với dung dịch nước bằng cách cho dung dịch etanol và dung dịch nước chảy vào môđun trộn cấu thành bởi ống thứ hai được nối vuông góc với ống thứ nhất; trong đó quá trình trộn tạo ra dòng dung dịch ra trong ống thứ nhất bao gồm dòng chảy rời chứa ARN và lipid trong khoảng từ 10% đến 75% thể tích/thể tích etanol, và trong đó các hạt nano ARN được bao nang lipid có cấu trúc hai lớp, và trong đó các hạt nano ARN được bao nang lipid có cấu trúc hai lớp và lipid bao gồm lipid cation có Công thức I.

Theo một số phương án, dòng dung dịch ra trong ống thứ nhất bao gồm dòng chảy rồi chứa ARN và lipit trong khoảng 10% đến khoảng 50% thể tích/thể tích etanol.

Theo một số phương án, dòng dung dịch ra trong ống thứ nhất bao gồm dòng chảy rồi chứa ARN và lipit trong khoảng 16% đến khoảng 50% thể tích/thể tích etanol.

Theo một số phương án, dòng dung dịch ra trong ống thứ nhất bao gồm dòng chảy rồi chứa ARN và lipit trong khoảng 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 44%, 50%, 55%, 60%, 70% hoặc 75% thể tích/thể tích etanol.

Theo một số phương án, đầu ra có tốc độ chảy ít nhất bằng 200 ml/phút.

Theo một số phương án, tốc độ chảy của đầu ra có số Reynolds ít nhất bằng 2.000.

Theo một số phương án, dung dịch nước được bơm qua ống thứ nhất bằng bơm HPLC thứ nhất.

Theo một số phương án, dung dịch nước được bơm với áp suất ngược ít nhất bằng 10 psi, 25 psi, 50 psi, 75 psi, hoặc 100 psi.

Theo một số phương án, ống thứ nhất có ID bằng 0,132" (0,335 cm).

Theo một số phương án, dung dịch nước được bơm với tốc độ chảy ít nhất bằng 30 ml/phút, 45 ml/phút, 60 ml/phút, 75 ml/phút, 90 ml/phút, 105 ml/phút, 120 ml/phút, 150 ml/phút, 225 ml/phút, 262,5 ml/phút, 300 ml/phút, hoặc 450 ml/phút.

Theo một số phương án, dung dịch nước bao gồm ARN bao gồm từ khoảng 2 mM đến 50 mM dung dịch đệm xitrat, ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 4,5.

Theo một số phương án, dung dịch nước bao gồm ARN còn bao gồm từ khoảng 10 mM đến 200 mM NaCl.

Theo một số phương án, dung dịch etanol được bơm qua ống thứ hai bằng bơm HPLC thứ hai.

Theo một số phương án, dung dịch etanol được bơm với áp suất ngược ít nhất bằng 40 psi, 80 psi, 150 psi, 300 psi, hoặc 400 psi.

Theo một số phương án, ống thứ hai có ID bằng 0,007" (0,018 cm), 0,01" (0,0254 cm), hoặc 0,02" (0,0508 cm).

Theo một số phương án, dung dịch etanol được bơm với tốc độ chảy ít nhất bằng 10 ml/phút, 15 ml/phút, 20 ml/phút, 25 ml/phút, 30 ml/phút, 35 ml/phút, 40 ml/phút, 50 ml/phút, 60 ml/phút, hoặc 75 ml/phút, 87,5 ml/phút, 100 ml/phút, hoặc 150 ml/phút.

Theo một số phương án, hỗn hợp thứ nhất và thứ hai được duy trì ở 15-20 °C.

Theo một số phương án, mô đun trộn cấu thành bởi ống thứ hai được gắn vuông góc trên ống thứ nhất, trong đó ống thứ nhất có phần hở qua thành, trong đó phần hở có cỡ bằng khoảng đường kính ngoài của ống thứ hai, và trong đó ống thứ hai được làm vừa khít qua phần hở để cho phép di chuyển liên tục dung dịch thứ hai trong ống thứ hai vào dung dịch thứ nhất trong ống thứ nhất.

Theo một số phương án, mô đun trộn cấu thành bởi ống thép không gỉ.

Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước bơm dung dịch đệm pha loãng qua ống thứ ba, và trộn dung dịch đệm pha loãng với dung dịch ra bằng cách đưa dung dịch đệm pha loãng vào dung dịch ra ở vùng nối Y để tạo ra dung dịch ra đã được pha loãng.

Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước bơm dung dịch đệm pha loãng thứ nhất qua ống thứ ba và trộn dung dịch đệm pha loãng thứ nhất với dung dịch ra bằng cách đưa dung dịch đệm pha loãng thứ nhất vào dung dịch ra ở vùng nối hình chữ Y thứ nhất để tạo ra dung dịch ra đã được pha loãng thứ nhất.

Theo một số phương án, dung dịch đệm pha loãng thứ nhất bao gồm từ khoảng 10 mM đến 20 mM dung dịch đệm Tris, từ khoảng 45 mM đến 55 mM NaCl, và từ khoảng 8% đến 10% sucroza, ở độ pH từ khoảng 7,4 đến 8,5.

Theo một số phương án, dung dịch đệm pha loãng thứ nhất bao gồm từ khoảng 10 mM đến 20 mM dung dịch đệm Tris, đến khoảng 45 mM đến 55 mM NaCl, và từ khoảng 8% và 10% sucroza, ở độ pH từ khoảng 7,4 đến 8,5 và ARN là siARN.

Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước bơm dung dịch đệm pha loãng thứ hai qua ống thứ tư, và trộn dung dịch đệm pha loãng thứ hai với dung dịch ra đã được pha loãng thứ nhất bằng cách đưa dung dịch đệm pha loãng thứ hai vào dung dịch ra đã được pha loãng thứ nhất ở vùng nối hình chữ Y thứ hai để tạo ra dung dịch ra đã được pha loãng thứ hai.

Theo một số phương án, dung dịch đệm pha loãng thứ nhất bao gồm từ khoảng 40 mM đến 90 mM dung dịch đệm phosphat, ở độ pH từ khoảng 6,0 đến 6,5; và dung dịch đệm pha loãng thứ hai bao gồm từ khoảng 20 mM đến 50 mM dung dịch đệm HEPES, từ khoảng 50 mM đến 300 mM NaCl, từ khoảng 0% đến 15% sucroza, ở độ pH từ khoảng 7,4 đến 8,5.

Theo một số phương án, dung dịch đệm pha loãng thứ hai bao gồm từ khoảng 20 mM đến 50 mM dung dịch đệm HEPES, từ khoảng 50 mM đến 300 mM NaCl, từ khoảng 0% đến 15% sucroza, ở độ pH từ khoảng 7,4 đến 8,5.

Theo một số phương án, dung dịch đệm pha loãng thứ hai còn bao gồm từ khoảng 25 mM đến 100 mM NaCl.

Theo một số phương án, dung dịch đệm pha loãng thứ nhất bao gồm từ khoảng 40 mM đến 90 mM dung dịch đệm phosphat, ở độ pH từ khoảng 6,0 đến 6,5 và ARN là mARN.

Theo một số phương án, dung dịch đệm pha loãng thứ nhất bao gồm từ khoảng 40 mM đến 90 mM dung dịch đệm phosphat, ở độ pH từ khoảng 6,0 đến 6,5; và dung dịch đệm pha loãng thứ hai bao gồm từ khoảng 20 mM đến 50 mM dung dịch đệm HEPES, từ khoảng 50 mM đến 300 mM NaCl, từ khoảng 0% đến 15% sucroza, ở độ pH từ khoảng 7,4 đến 8,5 và ARN là mARN.

Theo một số phương án, dung dịch đệm pha loãng bao gồm từ khoảng 5 đến 25 mM Tris, từ 15 đến 75 mM NaCl, từ khoảng 3 đến 12% sucroza ở độ pH từ khoảng 7,0 đến 8,5; từ khoảng 5 đến 20 mM Tris, từ khoảng 20 đến 70 mM NaCl, từ khoảng 3 đến 12% sucroza ở độ pH từ khoảng 7,0 đến 8,5; từ khoảng 20 đến 65 mM phosphat ở độ pH từ khoảng 5,5 đến 8,0; từ khoảng 10 đến 30 mM HEPES, từ khoảng 25 đến 75 mM NaCl, từ khoảng 5 đến 12% sucroza ở độ pH từ khoảng 7,0 đến 8,5; hoặc từ khoảng 25 đến 65 mM HEPES, từ khoảng 25 đến 65 mM NaCl, từ khoảng 3 đến 12% sucroza ở độ pH từ khoảng 7,0 đến 8,5. Theo một số phương án, dung dịch đệm pha loãng bao gồm 15 mM Tris, 50 mM NaCl, 9% sucroza, độ pH = 7,5; 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 9% sucroza ở độ pH = 7,5; 45 mM phosphat, độ pH = 6,0; 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 9% sucroza ở độ pH từ khoảng 7,4 đến 8,0; hoặc 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 9% sucroza ở độ pH từ khoảng 7,4 đến 8,0. Theo một số phương án, dung dịch đệm pha loãng bao gồm 15 mM Tris, 50 mM NaCl, 9% sucroza, độ pH = 7,5; 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 9% sucroza ở độ pH = 7,5; 45 mM phosphat, độ pH = 6,0; 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 9% sucroza ở độ pH từ 7,4 đến 8,0; hoặc 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 9% sucroza ở độ pH từ 7,4 đến 8,0.

Theo một số phương án, dung dịch ra đã được pha loãng bao gồm 6,25% etanol; 8,25% etanol; 8,3% etanol; hoặc 12,5% etanol.

Theo một số phương án, chi tiết nối Y được nối ở góc khoảng 45° .

Theo một số phương án, chi tiết nối Y cấu thành bởi polyete ete keton.

Theo một số phương án, dung dịch đệm pha loãng được bơm qua ống thứ ba với tốc độ chảy 400-900 mL/phút.

Theo một số phương án, ống thứ ba có ID bằng 0,25" (0,635 cm).

Theo một số phương án, ARN được bao nang bởi hạt nano lipid ít nhất là 70%, 75%, 80%, hoặc 85% ARN được trộn với lipid.

Theo một số phương án, lipid trong hạt nano ARN được bao nang lipid ít nhất là 70%, 75%, 80%, hoặc 85% lipid được trộn với ARN.

Theo một số phương án, X^7 là S.

Theo một số phương án, mỗi R^7 và R^8 được chọn độc lập từ nhóm cấu thành bởi methyl, ethyl và isopropyl.

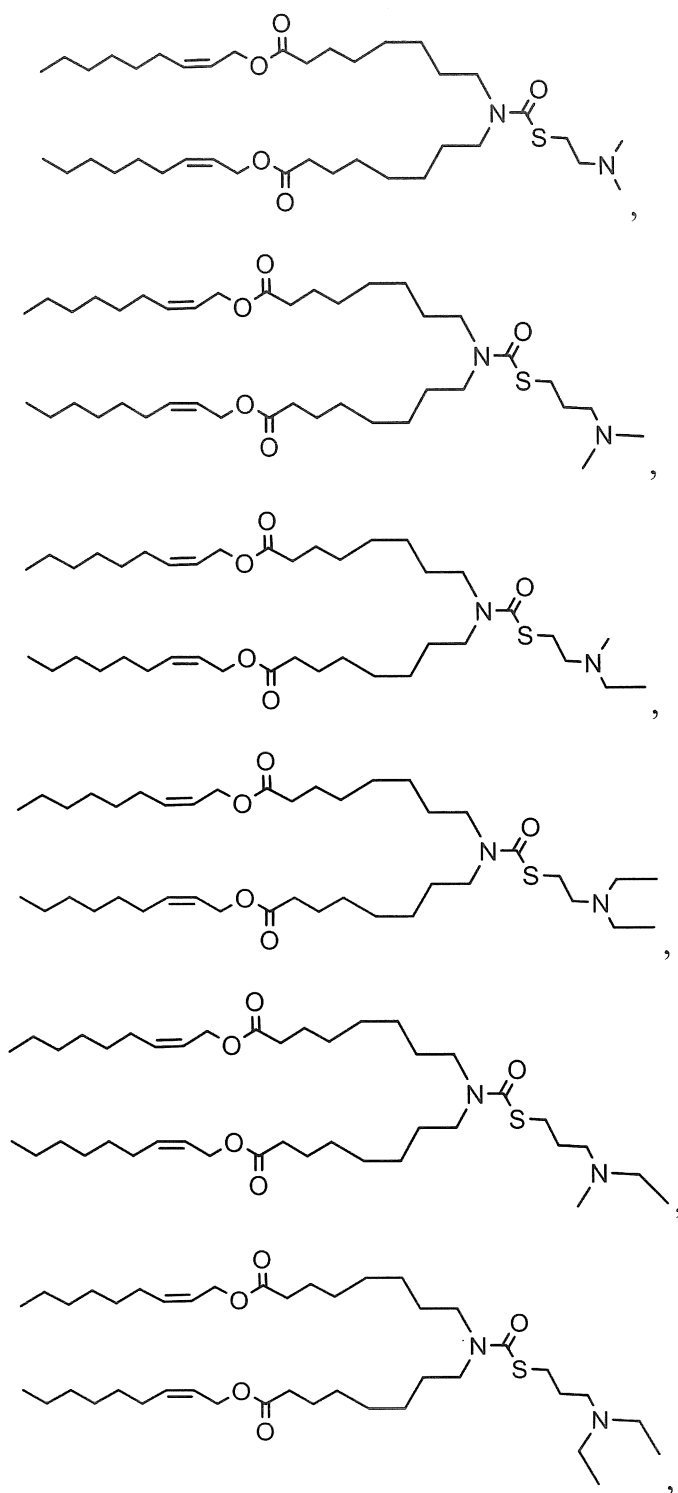
Theo một số phương án, mỗi L^5 và L^6 độc lập là C_1 - C_{10} alkyl. Theo một số phương án, L^5 là C_1 - C_3 alkyl, và L^6 là C_1 - C_5 alkyl. Theo một số phương án, L^6 là C_1 - C_2 alkyl. Theo một số phương án, L^5 và L^6 mỗi là mạch thẳng C_7 alkyl. Theo một số phương án, mỗi L^5 và L^6 là C_9 alkyl mạch thẳng.

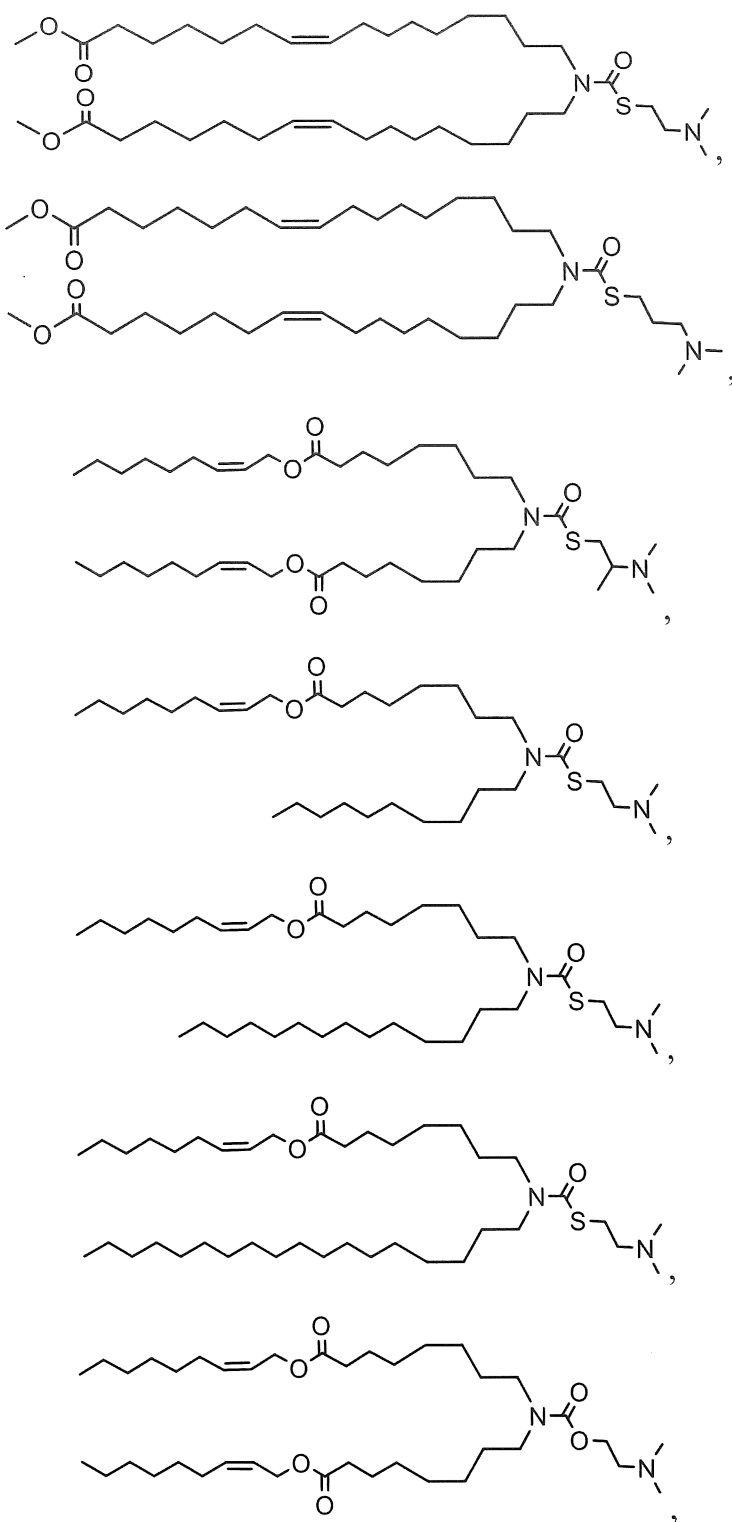
Theo một số phương án, mỗi R^5 và R^6 độc lập là alkenyl. Theo một số phương án, R^6 là alkenyl. Theo một số phương án, R^6 là C_2 - C_9 alkenyl. Theo một số phương án, alkenyl của mỗi R^5 và R^6 độc lập bao gồm một liên kết đôi. Theo một số phương án, mỗi R^5 và R^6 là alkyl. Theo một số phương án, R^5 là alkan mạch nhánh. Theo một số phương án, mỗi R^5 và R^6 được chọn độc lập từ nhóm cấu thành bởi C_9 alkyl, C_9 alkenyl và C_9 alkynyl. Theo một số phương án, mỗi R^5 và R^6 được chọn độc lập từ nhóm cấu thành bởi C_{11} alkyl, C_{11} alkenyl, và C_{11} alkynyl. Theo một số phương án, mỗi R^5 và R^6 được chọn độc lập từ nhóm cấu thành bởi C_7 alkyl, C_7 alkenyl, và C_7 alkynyl. Theo một số phương án, R^5 là $-\text{CH}((\text{CH}_2)_p\text{CH}_3)_2$ hoặc $-\text{CH}((\text{CH}_2)_p\text{CH}_3)((\text{CH}_2)_{p-1}\text{CH}_3)$, trong đó p bằng 4-8. Theo một số phương án, p bằng 5 và L^5 là C_1 - C_3 alkyl. Theo một số phương án, p bằng 6 và L^5 là C_3 alkyl. Theo một số phương án, p bằng 7. Theo một số phương án, p bằng 8 và L^5 là C_1 - C_3 alkyl. Theo một số phương án, R^5 cấu thành bởi $-\text{CH}((\text{CH}_2)_p\text{CH}_3)((\text{CH}_2)_{p-1}\text{CH}_3)$, trong đó p bằng 7 hoặc 8.

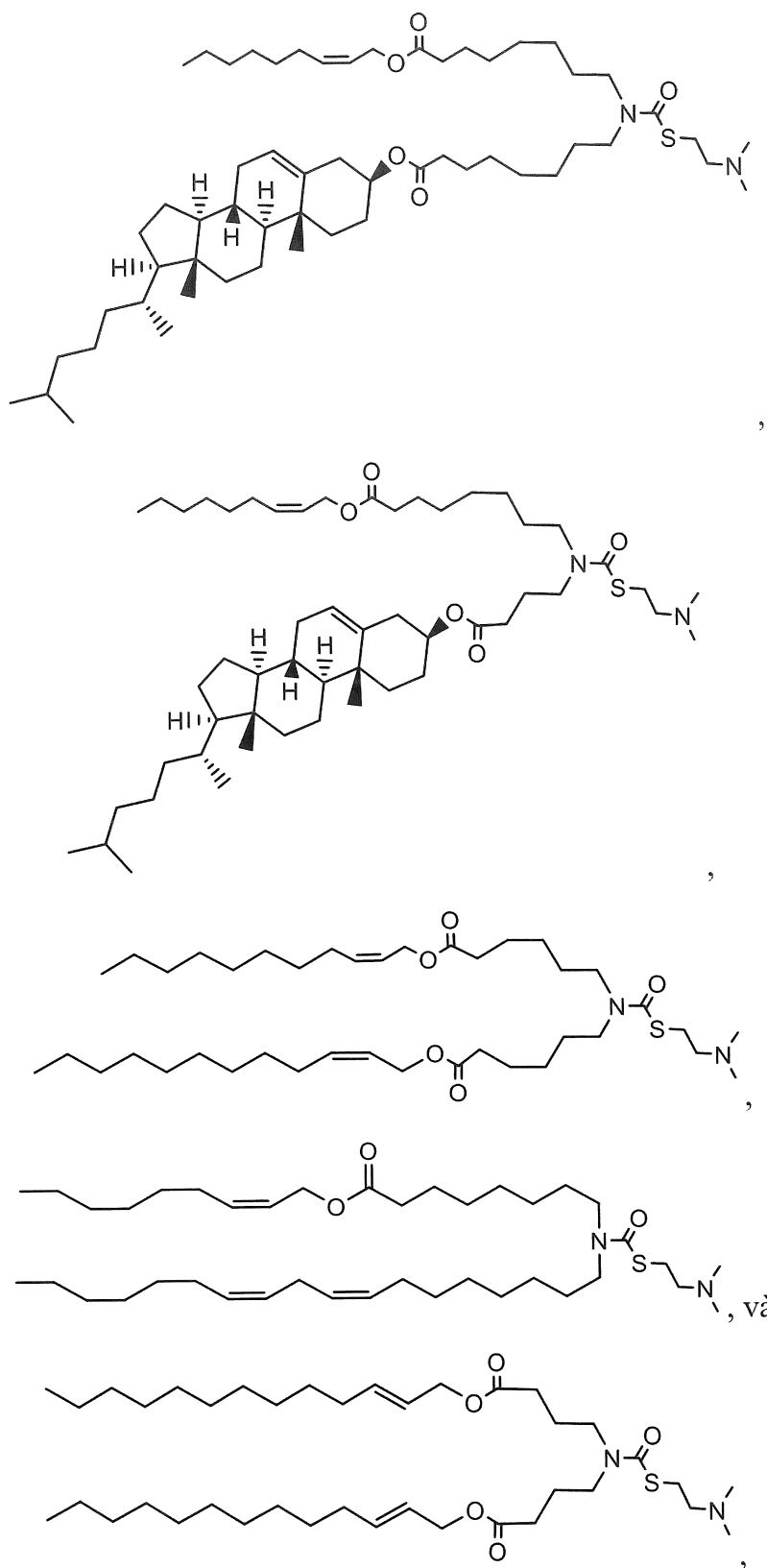
Theo một số phương án, R^4 là etylen hoặc propylen. Theo một số phương án, R^4 là n-propylen hoặc isobutylen.

Theo một số phương án, L^7 không có mặt, R^4 là etylen, X^7 là S và mỗi R^7 và R^8 là metyl. Theo một số phương án, L^7 không có mặt, R^4 là n-propylen, X^7 là S và mỗi R^7 và R^8 là metyl. Theo một số phương án, L^7 không có mặt, R^4 là etylen, X^7 là S và mỗi R^7 và R^8 là etyl.

Theo một số phương án, lipid cation được chọn từ nhóm cấu thành bởi

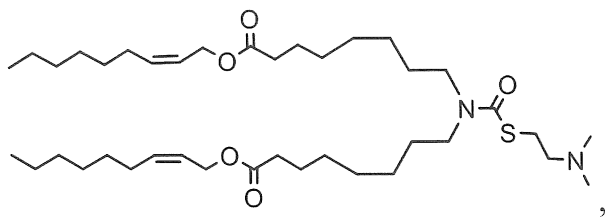






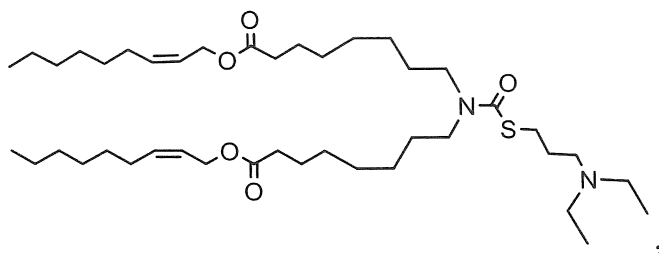
hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó.

Theo một số phương án, lipid cation là



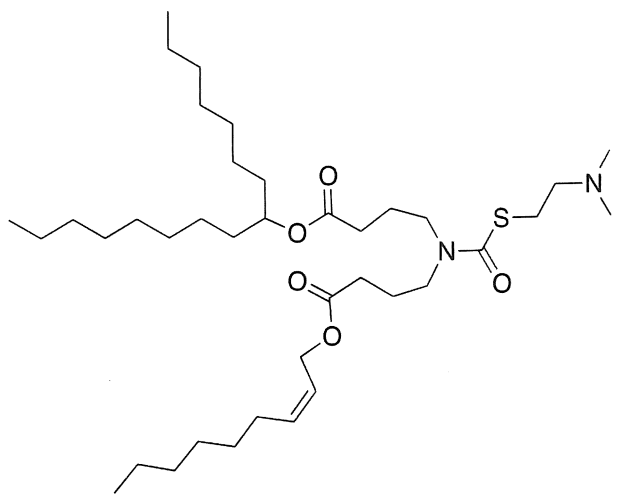
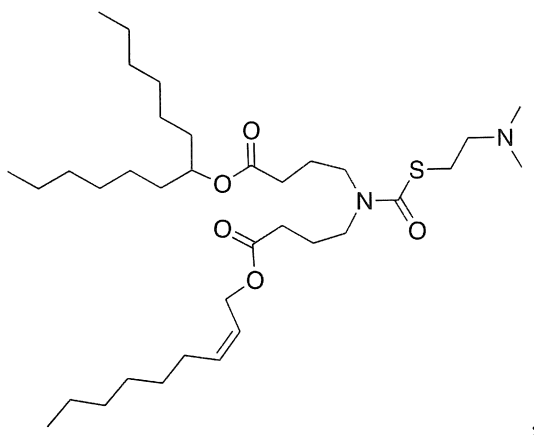
hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó.

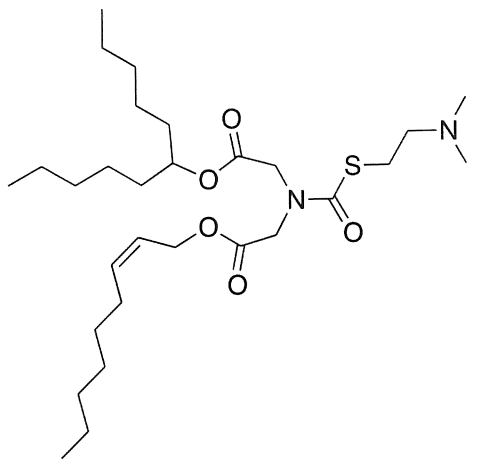
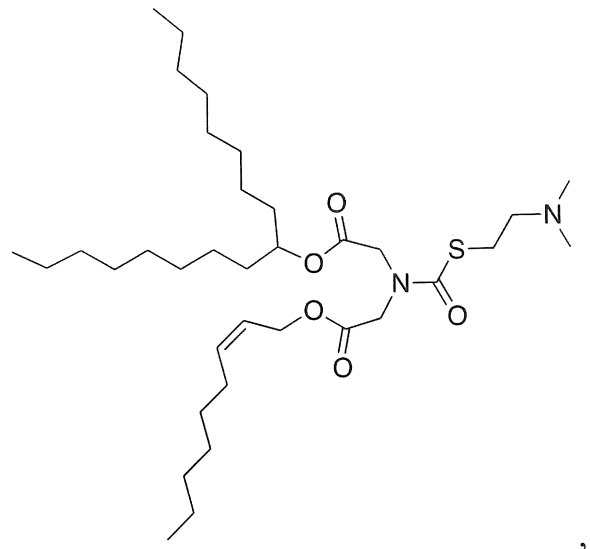
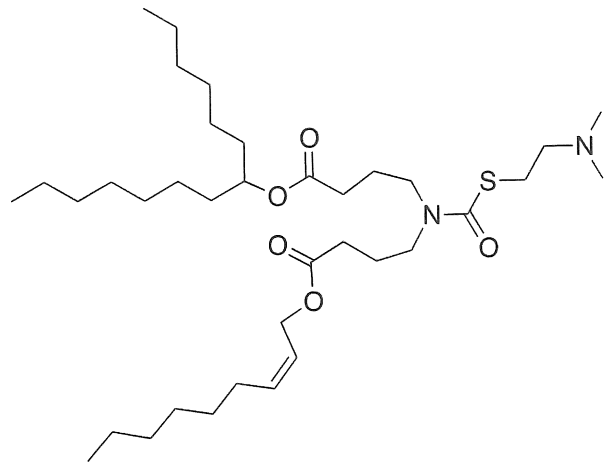
Theo một số phương án, lipid cation là

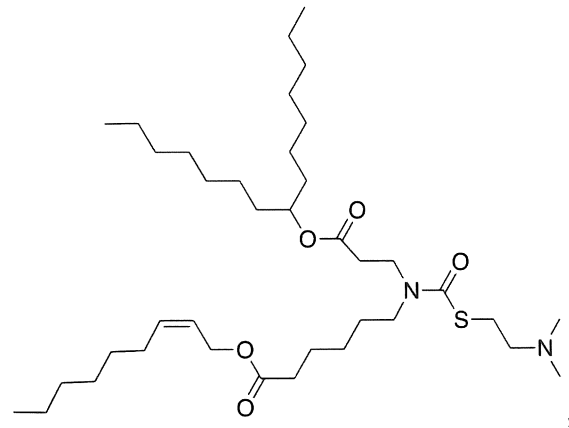
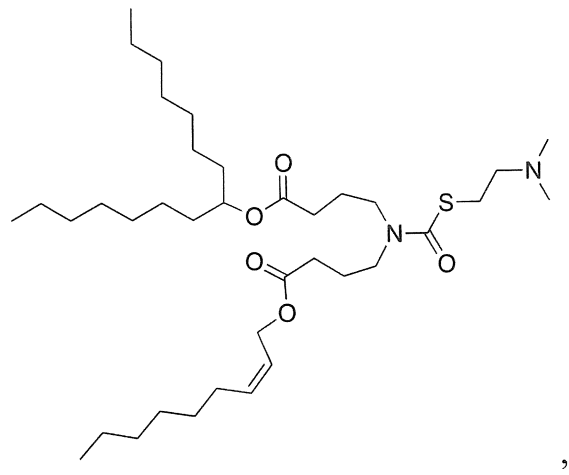
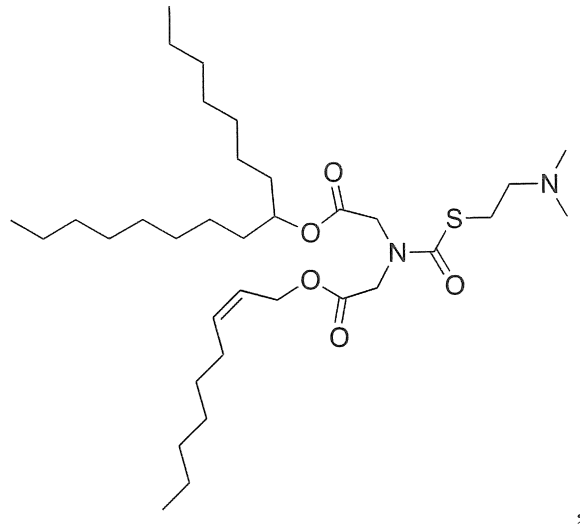


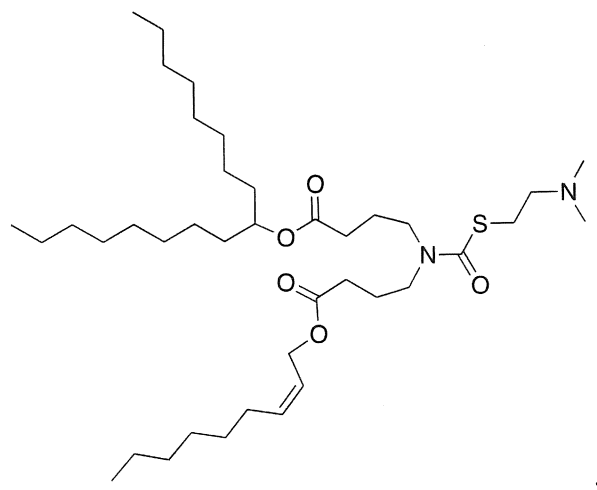
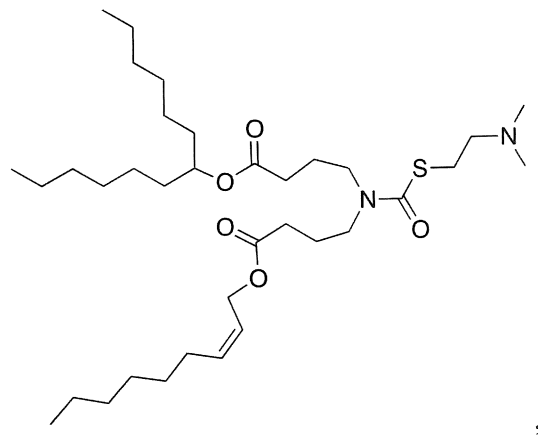
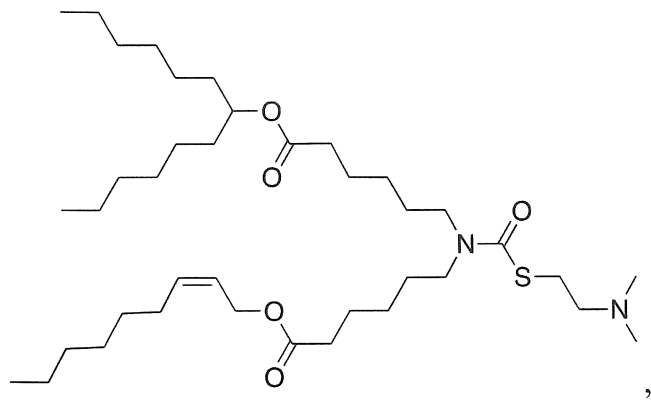
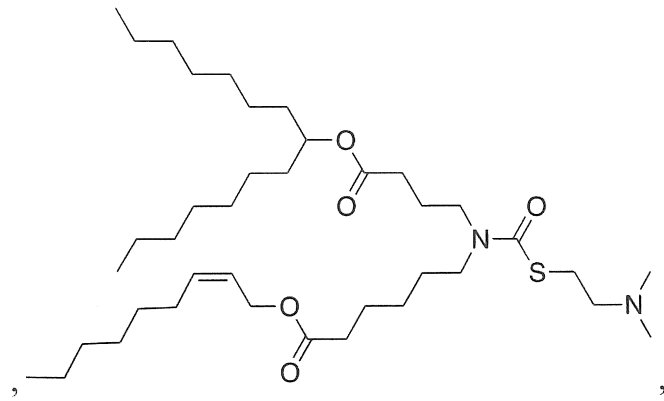
hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó.

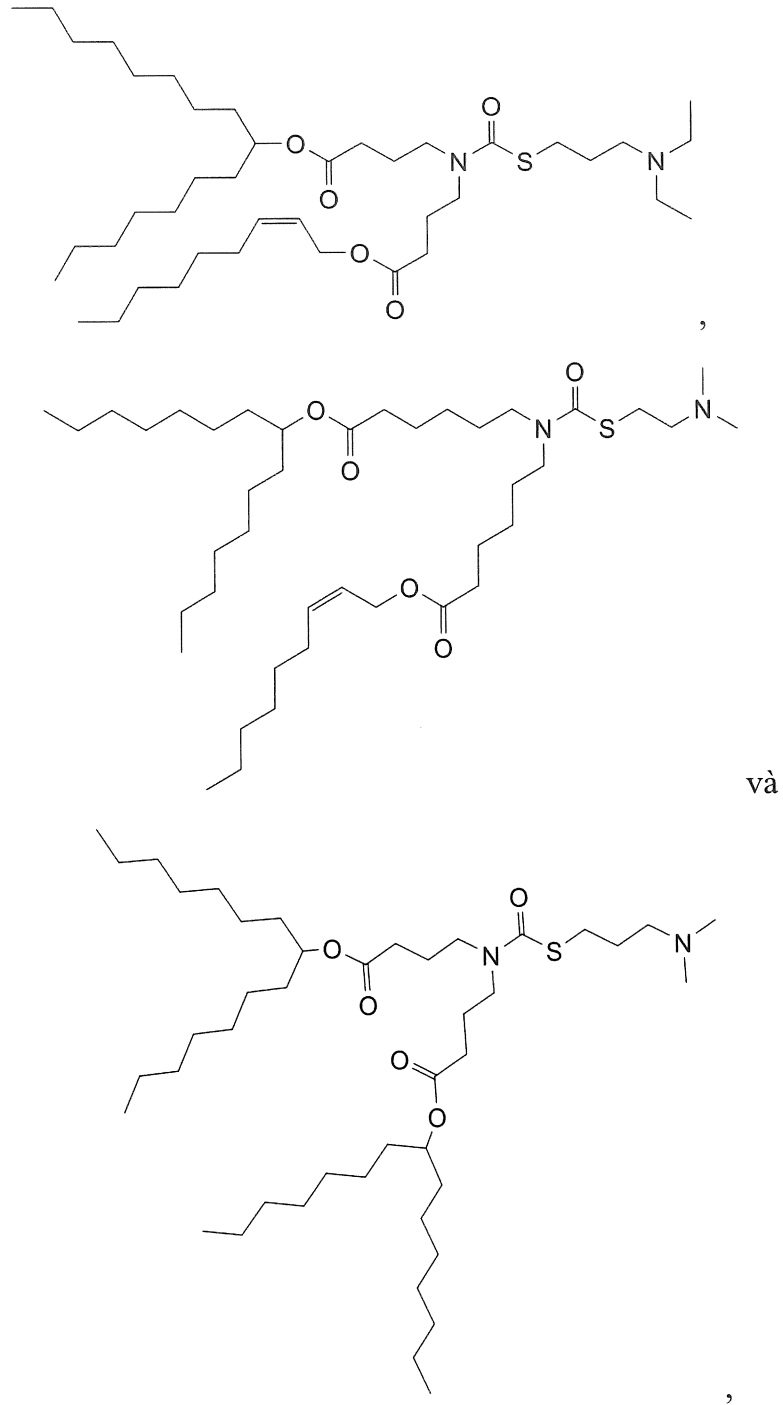
Theo một số phương án, lipid được chọn từ nhóm cấu thành bởi





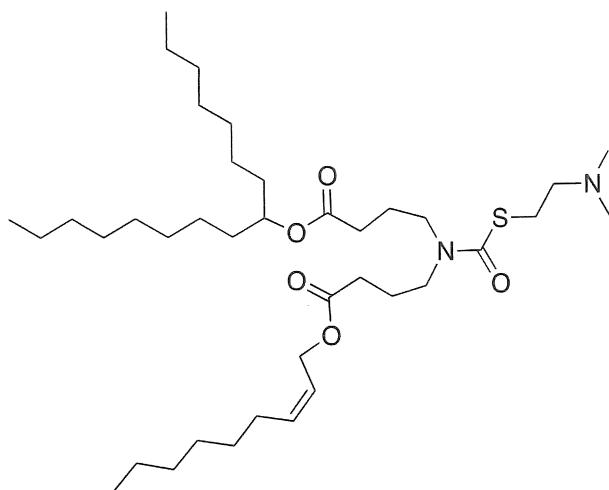






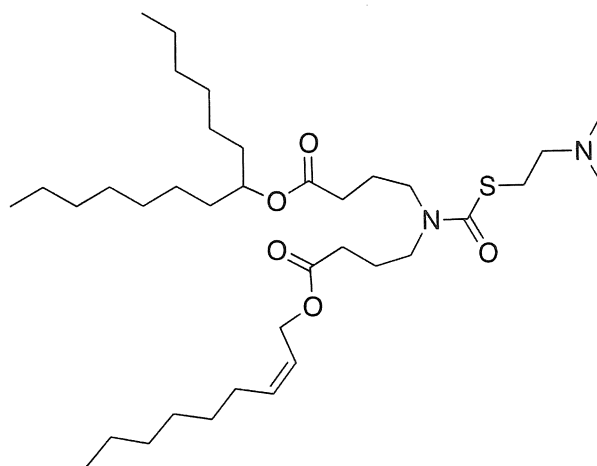
hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó.

Theo một số phương án, lipid cation là



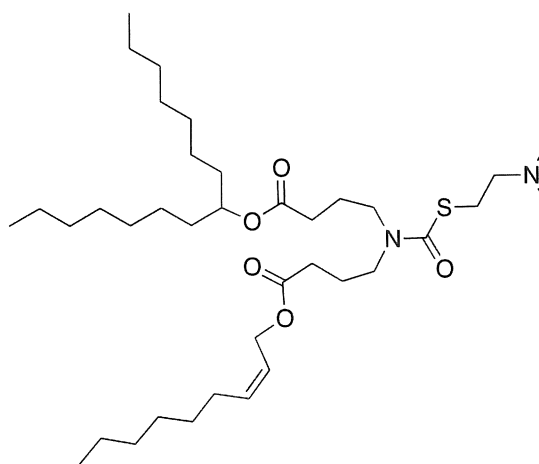
hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó.

Theo một số phương án, lipid cation là



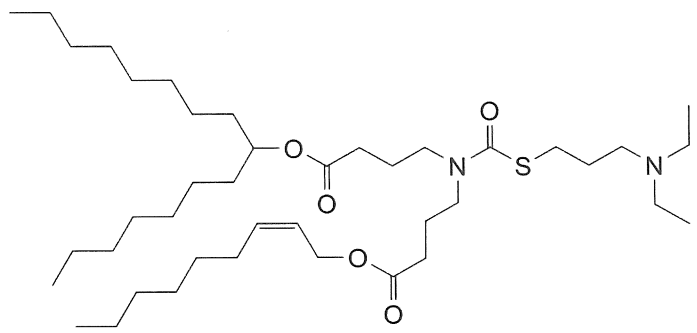
hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó.

Theo một số phương án, lipid cation là



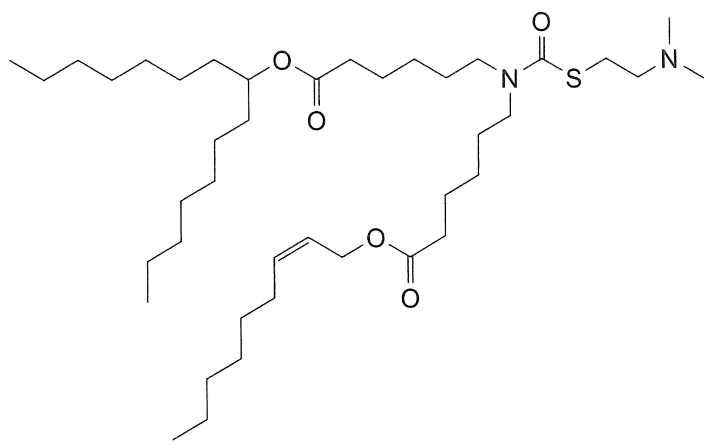
hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó.

Theo một số phương án, lipid cation là



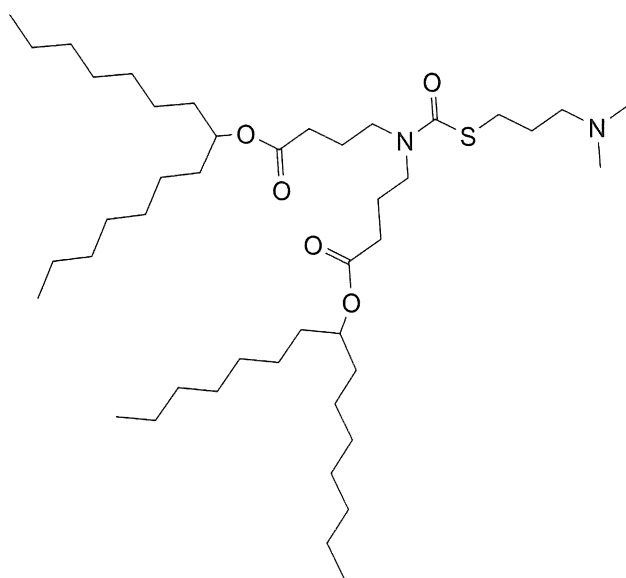
hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó.

Theo một số phương án, lipid cation là



hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó.

Theo một số phương án, lipid cation là



hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó.

Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid có cỡ hạt trung bình nhỏ hơn khoảng 100 nm. Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid có cỡ hạt trung bình khoảng 55 nm đến khoảng 85 nm.

Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao nang ít nhất khoảng 50% ARN. Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao nang ít nhất khoảng 85% ARN.

Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid còn bao gồm lipid trợ giúp được chọn từ nhóm cấu thành bởi dioleoylphosphatidyl etanolamin (DOPE), dimyristoylphosphatidyl cholin (DMPC), distearoylphosphatidyl cholin (DSPC), dimyristoylphosphatidyl glyxerol (DMPG), dipalmitoyl phosphatidylcholin (DPPC), và phosphatidylcholin (PC). Theo một số phương án, lipid trợ giúp là distearoylphosphatidylcholin (DSPC).

Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid còn bao gồm cholesterol.

Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid còn bao gồm thể tiếp hợp polyetylen glycol (PEG)-lipid. Theo một số phương án, thể tiếp hợp PEG-lipid là PEG-DMG. Theo một số phương án, PEG-DMG là PEG2000-DMG (Dimyristoyl glyxerol).

Theo một số phương án, phần lipid của hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm khoảng 48 % mol đến khoảng 66 % mol lipid cation có thể ion hóa, khoảng 2 % mol đến khoảng 12 % mol DSPC, khoảng 25 % mol đến khoảng 42 % mol cholesterol, và khoảng 0,5 % mol đến khoảng 3 % mol PEG2000-DMG. Theo một số phương án, phần lipid của hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm khoảng 50 % mol đến khoảng 61 % mol lipid cation có thể ion hóa, khoảng 5 % mol đến khoảng 9 % mol DSPC, khoảng 29 % mol đến khoảng 38 % mol cholesterol, và khoảng 1 % mol đến khoảng 2 % mol PEG2000-DMG. Theo một số phương án, phần lipid của hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm khoảng 56 % mol đến khoảng 58 % mol lipid cation có thể ion hóa, khoảng 6 % mol đến khoảng 8 % mol DSPC, khoảng 31 % mol đến khoảng 34 % mol cholesterol, và khoảng 1,25 % mol đến khoảng 1,75 % mol PEG2000-DMG.

Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid có tổng tỷ lệ khối lượng lipid:ARN khoảng 50:1 đến khoảng 3:1. Theo một số phương án, hạt nano ARN

được bao nang lipid có tổng tỷ lệ khối lượng lipid:ARN khoảng 50:1 đến khoảng 5:1. Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid có tổng tỷ lệ khối lượng lipid:ARN khoảng 50:1 đến khoảng 10:1. Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid có tổng tỷ lệ khối lượng lipid:ARN khoảng 40:1 đến khoảng 20:1. Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid có tổng tỷ lệ khối lượng lipid:ARN khoảng 35:1 đến khoảng 25:1. Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid có tổng tỷ lệ khối lượng lipid:ARN khoảng 28:1 đến khoảng 32:1. Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid có tổng tỷ lệ khối lượng lipid:ARN khoảng 29:1 đến khoảng 31:1.

Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm lipid cation:DOTAP:DSPC:Cholesterol:PEG với tỷ lệ phần trăm mol là 25:25:10:38,5:1,5, 25:25:10:37:3, 25:25:10:35:5, 20:20:7:51,5:1,5, 25:20:10:42:3, 20:30:13:32:5, 25:20:10:40:5, 25:25:13:35,5:1,5, 25:30:7:35:3, 30:20:13:34:3, 30:25:7:33:3, 30:30:10:25,8:1,5, 15:20:13:49:3, 20:20:13:44:3, 20:25:13:39:3, 15:25:13:44:3, 20:25:13:39:3, 25:25:13:34:3, 30:20:13:34:3, hoặc 30:30:13:29:3.

Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm từ khoảng 20% khối lượng/khối lượng và 60% khối lượng/khối lượng lipid cation. Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm nhỏ hơn khoảng 90% khối lượng/khối lượng lipid cation.

Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm từ khoảng 5% khối lượng/khối lượng và 30% khối lượng/khối lượng lipid trợ giúp.

Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm từ khoảng 0% khối lượng/khối lượng và 60% khối lượng/khối lượng cholesterol.

Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm từ khoảng 0,5% khối lượng/khối lượng và 15% khối lượng/khối lượng polyetylen glycol (PEG).

Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm từ khoảng 5% khối lượng/khối lượng và 25% khối lượng/khối lượng lipid trung hòa.

Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm từ khoảng 0% khối lượng/khối lượng và 30% khối lượng/khối lượng phospholipit.

Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1,5:1 đến 9:1 cholesterol:ARN.

Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 0,5:1 đến 5:1 PEG:mARN.

Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 0,25:1 đến 4:1 lipid trợ giúp:ARN.

Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1 đến 7:1 lipid cation:ARN. Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm từ khoảng 10% khối lượng/khối lượng và 98% khối lượng/khối lượng lipid cation có Công thức I. Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 5,4:1 đến 15,4:1 lipid cation:ARN. Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm lipid cation % mol và/hoặc tỷ lệ lipid cation:ARN như được thể hiện trên FIG. 2. Theo một số phương án, hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm chế phẩm lipid cation và/hoặc % mol lipid như được thể hiện trên FIG. 3.

Theo một số phương án, ARN được chọn từ nhóm cấu thành bởi tARN (ARN chuyển), snARN (ARN nhân nhỏ), rARN (ARN ribosom), mARN (ARN thông tin), ARN đối nghĩa, siARN (ARN cản trở nhỏ) và ARN tự sao chép.

Theo một số phương án, cỡ hạt trung bình nhỏ hơn 70 nm, 80 nm, 90 nm, hoặc 100 nm.

Theo một số phương án, chỉ số đa phân tán nhỏ hơn 0,05, 0,07, hoặc 0,09.

Theo một số phương án, tỷ lệ phần trăm của ARN bao nang lớn hơn 90%, 94%, 96%, hoặc 98%.

Theo một số phương án, cỡ mẻ là 0,05 đến 100 g ARN. Theo một số phương án, cỡ mẻ là 0,05 đến 30 g ARN.

Theo một số phương án, sự biến thiên của cỡ hạt trung bình giữa các mẻ nhỏ hơn 10%.

Nucleotit tự nhiên và được cải biến

Tốt hơn là mARN được mô tả ở đây bao gồm một hoặc nhiều nucleotit được cải biến hóa học. Các ví dụ về các monome axit nucleic gồm các nucleotit được cải biến hóa học, được cải biến và không có trong tự nhiên, gồm các nucleotit bất kỳ như vậy được biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Các nucleotit có thể được cải biến nhân tạo ở phần

bazơ hoặc phân đường. Trong tự nhiên, hầu hết các nucleotit bao gồm các nucleotit “không được cải biến” hoặc “tự nhiên”, mà gồm các bazơ purin adenin (A) và guanin (G), và các bazơ pyrimidin thymin (T), xytosin (C) và uraxin (U). Các bazơ này thường được cố định với roboza hoặc deoxy roboza ở vị trí 1'. Việc sử dụng các polynucleotit mARN bao gồm nucleotit được cải biến hóa học được thể hiện là để cải thiện sự biểu hiện mARN, tốc độ biểu hiện, thời gian bán thải và/hoặc nồng độ protein được biểu hiện. Các polynucleotit mARN bao gồm nucleotit được cải biến hóa học cũng là hữu ích trong việc tối ưu hóa sự định vị protein từ đó tránh được các đáp ứng sinh học có hại như các đáp ứng miễn dịch và/hoặc các con đường thoái biến.

Các ví dụ về các nucleotit được cải biến hoặc được cải biến hóa học gồm 5-hydroxyxytidin, 5-alkylxytidin, 5-hydroxyalkylxytidin, 5-carboxyxytidin, 5-formylxytidin, 5-alkoxyxytidin, 5-alkynylxytidin, 5-haloxytidin, 2-thioxytidin, N⁴-alkylxytidin, N⁴-aminoxytidin, N⁴-axetylxytidin, và N⁴,N⁴-dialkylxytidin.

Các ví dụ về các nucleotit được cải biến hoặc được cải biến hóa học gồm 5-hydroxyxytidin, 5-metylxytidin, 5-hydroxymetylxytidin, 5-carboxyxytidin, 5-formylxytidin, 5-metoxxytydin, 5-propynylxytidin, 5-bromoxytydin, 5-iodoxytydin, 2-thioxytydin; N⁴-metylxytidin, N⁴-aminoxytidin, N⁴-axetylxytidin, và N⁴,N⁴-dimetylxytidin.

Các ví dụ về các nucleotit được cải biến hoặc được cải biến hóa học gồm 5-hydroxyuridin, 5-alkyluridin, 5-hydroxyalkyluridin, 5-carboxyuridin, 5-carboxyalkylesteruridin, 5-formyluridin, 5-alkoxyuridin, 5-alkynyluridin, 5-halouridin, 2-thiouridin, và 6-alkyluridin.

Các ví dụ về các nucleotit được cải biến hoặc được cải biến hóa học gồm 5-hydroxyuridin, 5-metyluridin, 5-hydroxymetyluridin, 5-carboxyuridin, 5-carboxymetylesteruridin, 5-formyluridin, 5-metoxxyuridin (cũng được đề cập ở đây là “5MeOU”), 5-propynyluridin, 5-bromouridin, 5-florouridin, 5-iodouridin, 2-thiouridin, và 6-metyluridin.

Các ví dụ về các nucleotit được cải biến hoặc được cải biến hóa học gồm 5-metoxycarbonylmetyl-2-thiouridin, 5-metylaminometyl-2-thiouridin, 5-carbamoylmetyluridin, 5-carbamoylmetyl-2'-O-metyluridin, 1-metyl-3-(3-amino-3-carboxypropy)pseudouridin, 5-metylaminometyl-2-selenouridin, 5-

carboxymethyluridin, 5-metyldihydrouridin, 5-taurinometyluridin, 5-taurinometyl-2-thiouridin, 5-(isopentenylaminometyl)uridin, 2'-O-metylpsedouridin, 2-thio-2'O-metyluridin, và 3,2'-O-dimetyluridin.

Các ví dụ về các nucleotit được cải biến hoặc được cải biến hóa học gồm N⁶-metyladenosin, 2-aminoadenosin, 3-metyladenosin, 8-azaadenosin, 7-deazaadenosin, 8-oxoadenosin, 8-bromoadenosin, 2-metylthio-N⁶-metyladenosin, N⁶-isopentenyladenosin, 2-metylthio-N⁶-isopentenyladenosin, N⁶-(cis-hydroxyisopentenyl)adenosin, 2-metylthio-N⁶-(cis-hydroxyisopentenyl)adenosin, N⁶-glyxinylcarbamoyladenosin, N⁶-threonylcarbamoyl-adenosin, N⁶-metyl-N⁶-threonylcarbamoyl-adenosin, 2-metylthio-N⁶-threonylcarbamoyl-adenosin, N⁶,N⁶-dimetyladenosin, N⁶-hydroxynorvalylcarbamoyladenosin, 2-metylthio-N⁶-hydroxynorvalylcarbamoyl-adenosin, N⁶-axetyl-adenosin, 7-metyl-adenin, 2-metylthio-adenin, 2-metoxi-adenin, alpha-thio-adenosin, 2'-O-metyl-adenosin, N⁶,2'-O-dimetyl-adenosin, N⁶,N⁶,2'-O-trimetyl-adenosin, 1,2'-O-dimetyl-adenosin, 2'-O-ribosyladenosin, 2-amino-N⁶-metyl-purin, 1-thio-adenosin, 2'-F-ara-adenosin, 2'-F-adenosin, 2'-OH-ara-adenosin, và N⁶-(19-amino-pentaoxanonadexyl)-adenosin.

Các ví dụ về các nucleotit được cải biến hoặc được cải biến hóa học gồm N¹-alkylguanosin, N²-alkylguanosin, thienoguanosin, 7-deazaguanosin, 8-oxoguanosin, 8-bromoguanosin, O6-alkylguanosin, xanthosin, inosin, và N¹-alkylinosin.

Các ví dụ về các nucleotit được cải biến hoặc được cải biến hóa học gồm N¹-metylguanosin, N²-metylguanosin, thienoguanosin, 7-deazaguanosin, 8-oxoguanosin, 8-bromoguanosin, O6-metylguanosin, xanthosin, inosin, và N¹-metylinosin.

Các ví dụ về các nucleotit được cải biến hoặc được cải biến hóa học gồm pseudouridin. Các ví dụ về pseudouridin gồm N¹-alkylpseudouridin, N¹-xycloalkylpseudouridin, N¹-hydroxypseudouridin, N¹-hydroxyalkylpseudouridin, N¹-phenylpseudouridin, N¹-phenylalkylpseudouridin, N¹-aminoalkylpseudouridin, N³-alkylpseudouridin, N⁶-alkylpseudouridin, N⁶-alkoxypseudouridin, N⁶-hydroxypseudouridin, N⁶-hydroxyalkylpseudouridin, N⁶-morpholinopseudouridin, N⁶-phenylpseudouridin, và N⁶-halopseudouridin. Các ví dụ về pseudouridin gồm N¹-alkyl-N⁶-alkylpseudouridin, N¹-alkyl-N⁶-alkoxypseudouridin, N¹-alkyl-N⁶-hydroxypseudouridin, N¹-alkyl-N⁶-hydroxyalkylpseudouridin, N¹-alkyl-N⁶-

morpholinopseudouridin, N¹-alkyl-N⁶-phenylpseudouridin, và N¹-alkyl-N⁶-halopseudouridin. Trong các ví dụ này, các phần tử thế alkyl, xycloalkyl, và phenyl có thể không được thế, hoặc còn được thế bằng các phần tử thế alkyl, halo, haloalkyl, amino, hoặc nitro.

Các ví dụ về pseudouridin gồm N¹-metylpseudouridin (cũng được đề cập ở đây là “N1MPU”), N¹-etylpsudouridin, N¹-propylpseudouridin, N¹-xyclopropylpseudouridin, N¹-phenylpseudouridin, N¹-aminometylpseudouridin, N³-metylpseudouridin, N¹-hydroxypseudouridin, và N¹-hydroxymetylpseudouridin.

Các ví dụ về các monome axit nucleic gồm các nucleotit được cải biến và được cải biến hóa học, gồm các nucleotit bất kỳ như vậy được biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Các ví dụ về monome nucleotit được cải biến và được cải biến hóa học gồm các nucleotit bất kỳ như vậy được biết trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, 2'-O-metyl ribonucleotit, 2'-O-metyl purin nucleotit, 2'-deoxy-2'-flo ribonucleotit, 2'-deoxy-2'-flo pyrimidin nucleotit, 2'-deoxy ribonucleotit, 2'-deoxy purin nucleotit, nucleotit bazơ chính tắc, 5-C-metyl-nucleotit, và gốc monome deoxyabazơ nghịch đảo.

Các ví dụ về monome nucleotit được cải biến và được cải biến hóa học gồm nucleotit được ổn định đầu 3', 3'-glyxeryl nucleotit, nucleotit abazơ nghịch đảo 3', và thymidin nghịch đảo 3'.

Các ví dụ về monome nucleotit được cải biến và được cải biến hóa học gồm nucleotit của axit nucleic được khóa (locked nucleic acid nucleotide - LNA), nucleotit 2'-O,4'-C-metylen-(D-ribofuranosyl), nucleotit 2'-metoxyetoxi (MOE), 2'-metyl-thio-etyl, 2'-deoxy-2'-flo nucleotit, và 2'-O-metyl nucleotit. Theo một phương án làm ví dụ, monome được cải biến là nucleotit của axit nucleic được khóa (LNA).

Các ví dụ về monome nucleotit được cải biến và được cải biến hóa học gồm 2',4'-bị giới hạn 2'-O-metoxietyl (cMOE) và ADN được cải biến 2'-O-Etyl (cEt).

Các ví dụ về monome nucleotit được cải biến và được cải biến hóa học gồm 2'-amino nucleotit, 2'-O-amino nucleotit, 2'-C-allyl nucleotit, và 2'-O-allyl nucleotit.

Các ví dụ về monome nucleotit được cải biến và được cải biến hóa học gồm N⁶-metyladenosin nucleotit.

Các ví dụ về monome nucleotit được cải biến và được cải biến hóa học gồm các monome nucleotit với các bazơ được cải biến 5-(3-amino)propyluridin, 5-(2-mercapto)ethyluridin, 5-bromouridin; 8-bromoguanosin, hoặc 7-deazaadenosin.

Các ví dụ về monome nucleotit được cải biến và được cải biến hóa học gồm nucleotit được thế 2'-O-aminopropyl.

Các ví dụ về monome nucleotit được cải biến và được cải biến hóa học gồm việc thay thế nhóm 2'-OH của nucleotit với 2'-R, 2'-OR, 2'-halogen, 2'-SR, hoặc 2'-amino, trong đó R có thể là H, alkyl, alkenyl, hoặc alkynyl.

Ví dụ về các cải biến bazơ được mô tả trên đây có thể được kết hợp với các cải biến bổ sung của nucleosit hoặc cấu trúc nucleotit, gồm các cải biến đường và các cải biến liên kết. Các monome nucleotit được cải biến hoặc được cải biến hóa học nhất định có thể được tìm thấy trong tự nhiên.

Các cải biến nucleotit được ưu tiên gồm N¹-methylpseudouridin và 5-metoxymuridin.

5' Cap

Cấu trúc Cap trên đầu 5' của mARN (hoặc ARN tự sao chép), được thể hiện trong tất cả các vi sinh vật có nhân điển hình (và một số virus) là quan trọng để ổn định mARN *in vivo*. Các cấu trúc Cap xuất hiện trong tự nhiên bao gồm gốc ribo-guanosin mà được methyl hóa ở vị trí N7 của bazơ guanin. 7-methylguanosin (m⁷G) này được liên kết qua đầu 5' - đến 5' -triphosphat ở đầu 5' của phân tử mARN. Sự có mặt của đoạn m⁷Gppp trên đầu 5' là cần thiết để đột biến mARN vì nó bảo vệ mARN khỏi sự thoái biến bởi exonucleaza, thuận tiện cho việc vận chuyển mARN từ nhân đến tế bào chất và đóng vai trò quan trọng trong việc lắp ráp phức hợp khởi đầu dịch mã (Cell 9:645-653, (1976); Nature 266:235, (1977); Federation of Experimental Biologists Society Letter 96:1-11, (1978); Cell 40:223-24, (1985); Prog. Nuc. Acid Res. 35:173-207, (1988); Ann. Rev. Biochem. 68:913-963, (1999); và J Biol. Chem. 274:30337-3040, (1999)).

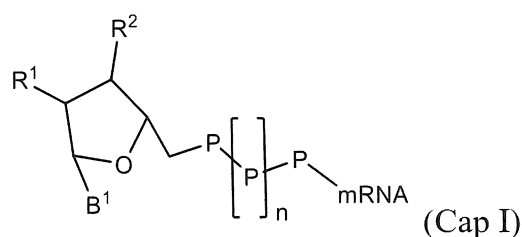
Chỉ các mARN này mới có cấu trúc Cap được hoạt động trong quá trình dịch mã phụ thuộc Cap; “sự cắt ngọn” mARN làm mất hầu như toàn toàn hoạt tính khuôn mẫu của chúng đối với sự tổng hợp protein (Nature, 255:33-37, (1975); J. Biol.

Chem., vol. 253:5228-5231, (1978); và Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:1189-1193 (1975)).

Yếu tố khác của mARN của sinh vật có nhân điển hình là sự có mặt của các gốc 2'-O-metyl nucleosit ở vị trí phiên mã 1 (Cap 1), và trong một số trường hợp, ở các vị trí phiên mã 1 và 2 (Cap 2). Quá trình 2'-O-metyl hóa mARN tạo ra hiệu quả dịch mã mARN cao hơn *in vivo* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:3952-3956 (1980)) và còn cải thiện tính ổn định nucleaza của mARN được gắn mũ ở đầu 5'. mARN với Cap 1 (và Cap 2) là dấu phân biệt cho phép tế bào nhận diện đầu 5' của mARN thiện ý, và trong một số trường hợp, để phân biệt đối với các phiên mã có nguồn gốc từ yếu tố di truyền lây nhiễm (Nucleic Acid Research 43: 482-492 (2015)).

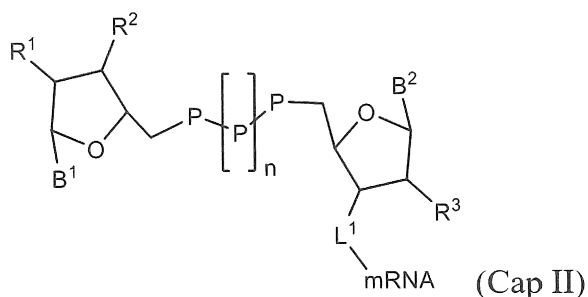
Một số ví dụ về cấu trúc 5' cap và các phương pháp điều chế mARN bao gồm cấu trúc này được đưa ra trong WO 2015/051169A2, WO 2015/061491, US 2018/0273576, và các US Patent số 8,093,367, 8,304,529, và U.S. số 10,487,105. Theo một số phương án, 5' cap là m⁷GpppAmpG, mà được biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Theo một số phương án, 5' cap là m⁷GpppG hoặc m⁷GpppGm, mà là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Các công thức cấu trúc đối với các phương án của cấu trúc 5' cap được đưa ra dưới đây.

Theo một số phương án, mARN được mô tả ở đây bao gồm 5' cap có cấu trúc có Công thức (Cap I).



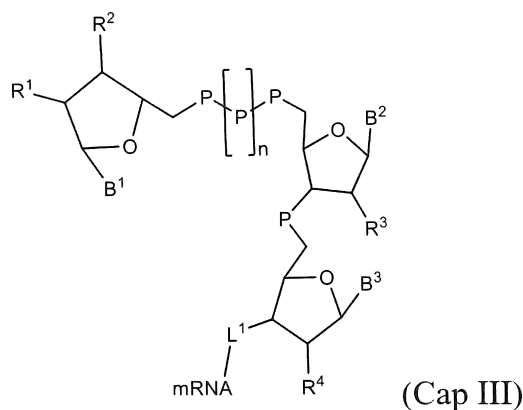
trong đó B¹ là nucleobazơ tự nhiên hoặc được cải biến; mỗi R¹ và R² độc lập được chọn từ halogen, OH, và OCH₃; mỗi P độc lập được chọn từ nhóm cấu thành bởi phosphat, phosphorothioat, và boranophosphat; n bằng 0, 1, 2 hoặc 3; mARN thể hiện mARN theo sáng chế được liên kết ở đầu 5' của nó. Theo một số phương án B¹ là G, m⁷G, hoặc A. Theo một số phương án, n bằng 0. Theo một số phương án, B¹ là A hoặc m⁶A và R¹ là OCH₃; trong đó G là guanin, m⁷G là 7-methylguanin, A là adenin, và m⁶A là N⁶-methyladenin.

Theo một số phương án, mARN được mô tả ở đây bao gồm 5' cap có cấu trúc có Công thức (Cap II).



trong đó mỗi B¹ và B² độc lập là nucleobazơ tự nhiên hoặc được cải biến; mỗi R¹, R², và R³ độc lập được chọn từ halogen, OH, và OCH₃; mỗi P độc lập được chọn từ nhóm cấu thành bởi phosphat, phosphorothioat, và boranophosphat; mARN thể hiện mARN theo sáng chế được liên kết ở đầu 5' của nó; n bằng 0, 1, 2 hoặc 3; và L¹ là phosphat, phosphorothioat, hoặc boranophosphat, trong đó ít nhất một trong số R¹, R², và R³ là OH. Theo một số phương án B¹ là G, m⁷G, hoặc A. Theo một số phương án, n bằng 0. Theo một số phương án, B¹ là A hoặc m⁶A và R¹ là OCH₃; trong đó G là guanin, m⁷G là 7-methylguanin, A là adenin, và m⁶A là N⁶-methyladenin.

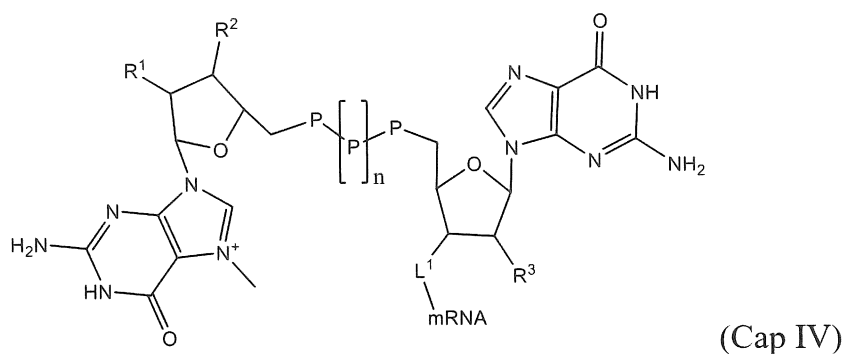
Theo một số phương án, mARN được mô tả ở đây bao gồm 5' cap có cấu trúc có Công thức (Cap III).



trong đó mỗi B¹, B², và B³ độc lập là nucleobazơ tự nhiên hoặc được cải biến; mỗi R¹, R², R³, và R⁴ độc lập được chọn từ halogen, OH, và OCH₃; mỗi P độc lập được chọn từ nhóm cấu thành bởi phosphat, phosphorothioat, và boranophosphat; mARN thể hiện mARN theo sáng chế được liên kết ở đầu 5' của nó; n bằng 0, 1, 2 hoặc 3; và L¹ là phosphat, phosphorothioat, hoặc boranophosphat, trong đó ít nhất một trong số R¹, R²,

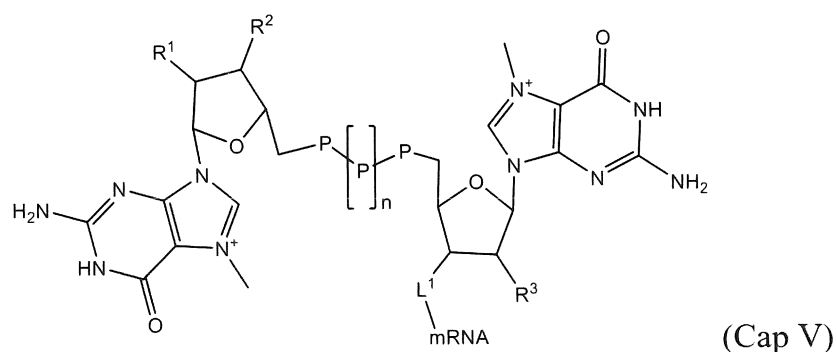
R^3 , và R^4 là OH. Theo một số phương án B^1 là G, m^7G , hoặc A. Theo một số phương án, B^1 là A hoặc m^6A và R^1 là OCH_3 ; trong đó G là guanin, m^7G là 7-methylguanin, A là adenin, và m^6A là N^6 -methyladenin. Theo một số phương án, n bằng 1.

Theo một số phương án, mARN được mô tả ở đây bao gồm chất tương đồng m^7GpppG 5' cap có cấu trúc có Công thức (Cap IV).



trong đó, mỗi R^1 , R^2 , và R^3 độc lập được chọn từ halogen, OH, và OCH_3 ; mỗi P độc lập được chọn từ nhóm cấu thành bởi phosphat, phosphorothioat, và boranophosphat; mARN thể hiện mARN theo sáng chế được liên kết ở đầu 5' của nó; n bằng 0, 1, 2 hoặc 3; và L^1 là phosphat, phosphorothioat, hoặc boranophosphat, trong đó ít nhất một trong số R^1 , R^2 , và R^3 là OH. Theo một số phương án, 5' cap là m^7GpppG trong đó mỗi R^1 , R^2 , và R^3 là OH, n bằng 1, và L^1 là phosphat. Theo một số phương án, n bằng 1. Theo một số phương án, mỗi R^1 và R^2 là OH, R^3 là OCH_3 , mỗi P là phosphat tại đó các liên kết phosphodiester được tạo ra, mARN là mARN theo sáng chế được liên kết ở đầu 5' của nó, n bằng 1, và L^1 là phosphat.

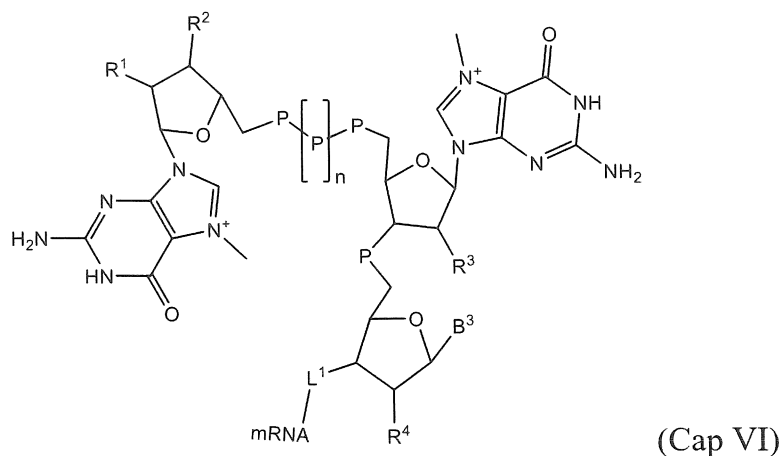
Theo một số phương án, mARN được mô tả ở đây bao gồm chất tương đồng m^7Gpppm^7G 5' cap có cấu trúc có Công thức (Cap V).



trong đó, mỗi R^1 , R^2 , và R^3 độc lập được chọn từ halogen, OH, và OCH_3 ; mỗi P độc lập được chọn từ nhóm cấu thành bởi phosphat, phosphorothioat, và boranophosphat; mARN thể hiện mARN theo sáng chế được liên kết ở đầu 5' của nó; n bằng 0, 1, 2 hoặc

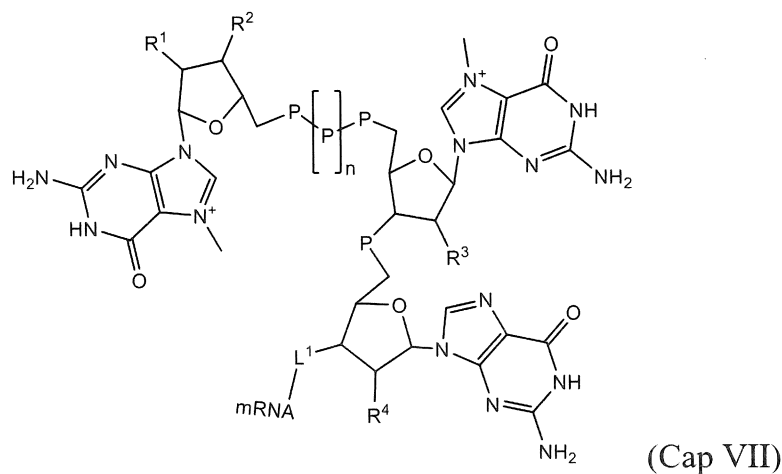
3; và L^1 là phosphat, phosphorothioat, hoặc boranophospat, trong đó ít nhất một trong số R^1 , R^2 , và R^3 là OH. Theo một số phương án, n bằng 0.

Theo một số phương án, mARN được mô tả ở đây bao gồm m^7Gpppm^7GpN , chất tương đồng 5', trong đó N là nucleotit tự nhiên hoặc được cải biến, chất tương đồng 5' có cấu trúc có Công thức (Cap VI).



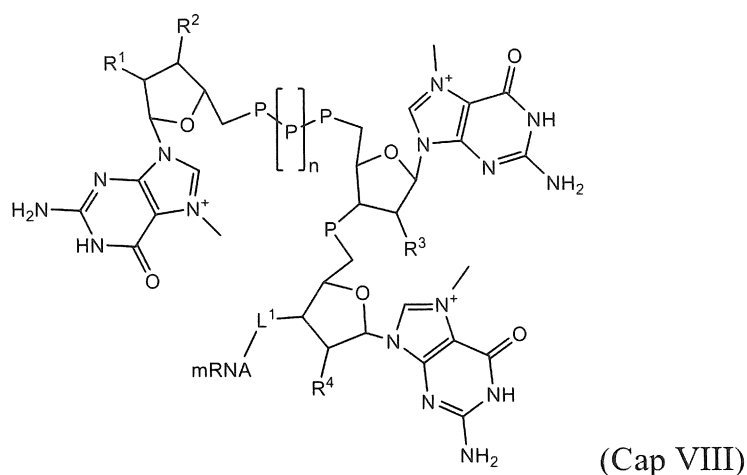
trong đó B^3 là nucleobazơ tự nhiên hoặc được cải biến; mỗi R^1 , R^2 , R^3 , và R^4 độc lập được chọn từ halogen, OH, và OCH_3 ; mỗi P độc lập được chọn từ nhóm cấu thành bởi phosphat, phosphorothioat, và boranophospat; mARN thể hiện mARN theo sáng chế được liên kết ở đầu 5' của nó; n bằng 0, 1, 2 hoặc 3; và L^1 là phosphat, phosphorothioat, hoặc boranophospat, trong đó ít nhất một trong số R^1 , R^2 , R^3 , và R^4 là OH. Theo một số phương án B^1 là G, m^7G , hoặc A. Theo một số phương án, B^1 là A hoặc m^6A và R^1 là OCH_3 ; trong đó G là guanin, m^7G là 7-methylguanin, A là adenin, và m^6A là N^6 -methyladenin. Theo một số phương án, n bằng 1.

Theo một số phương án, mARN được mô tả ở đây bao gồm m^7Gpppm^7GpG chất tương đồng 5' có cấu trúc có Công thức (Cap VII).



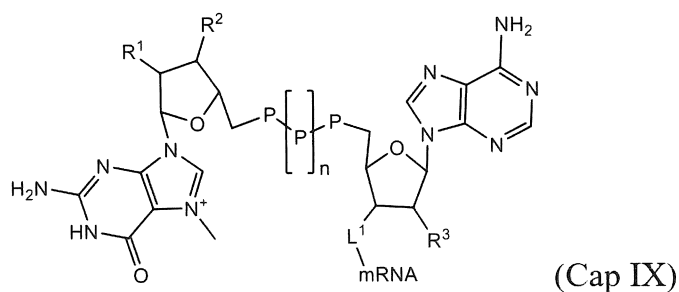
trong đó, mỗi R^1 , R^2 , R^3 , và R^4 độc lập được chọn từ halogen, OH, và OCH_3 ; mỗi P độc lập được chọn từ nhóm cấu thành bởi phosphat, phosphorothioat, và boranophosphat; mARN thể hiện mARN theo sáng chế được liên kết ở đầu 5' của nó; n bằng 0, 1, 2 hoặc 3; và L^1 là phosphat, phosphorothioat, hoặc boranophosphat, trong đó ít nhất một trong số R^1 , R^2 , R^3 , và R^4 là OH. Theo một số phương án, n bằng 1.

Theo một số phương án, mARN được mô tả ở đây bao gồm $m^7Gpppm^7Gpm^7G$ chất tương đồng 5' có cấu trúc có Công thức (Cap VIII).



trong đó, mỗi R^1 , R^2 , R^3 , và R^4 độc lập được chọn từ halogen, OH, và OCH_3 ; mỗi P độc lập được chọn từ nhóm cấu thành bởi phosphat, phosphorothioat, và boranophosphat; mARN thể hiện mARN theo sáng chế được liên kết ở đầu 5' của nó; n bằng 0, 1, 2 hoặc 3; và L^1 là phosphat, phosphorothioat, hoặc boranophosphat, trong đó ít nhất một trong số R^1 , R^2 , R^3 , và R^4 là OH. Theo một số phương án, n bằng 1.

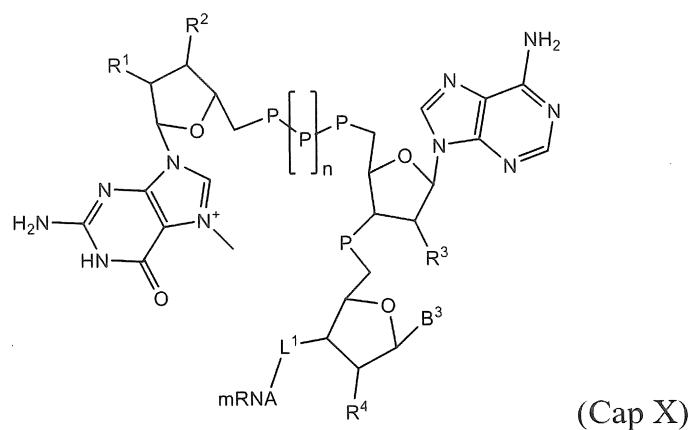
Theo một số phương án, mARN được mô tả ở đây bao gồm m^7GpppA chất tương đồng 5' cap có cấu trúc có Công thức (Cap IX).



trong đó, mỗi R^1 , R^2 , và R^3 độc lập được chọn từ halogen, OH, và OCH_3 ; mỗi P độc lập được chọn từ nhóm cấu thành bởi phosphat, phosphorothioat, và boranophosphat; mARN thể hiện mARN theo sáng chế được liên kết ở đầu 5' của nó; n bằng 0, 1, 2 hoặc

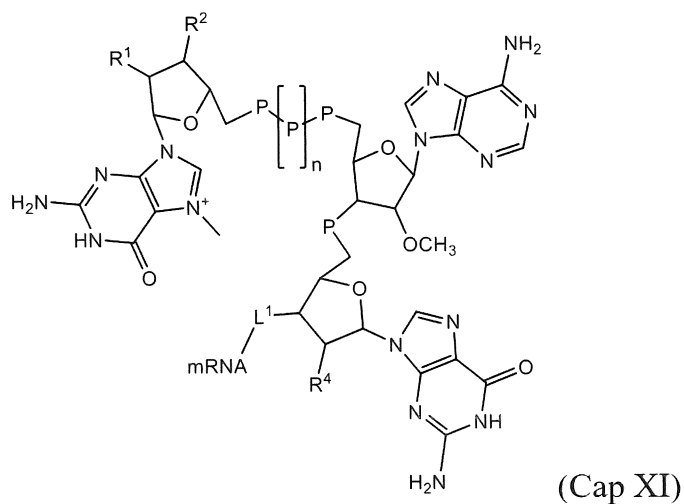
3; và L^1 là phosphat, phosphorothioat, hoặc boranophospat, trong đó ít nhất một trong số R^1 , R^2 , và R^3 là OH. Theo một số phương án, n bằng 1.

Theo một số phương án, mARN được mô tả ở đây bao gồm $m^7GpppApN$ chất tương đồng 5' cap, trong đó N là nucleotit tự nhiên hoặc được cải biến, và 5' cap có cấu trúc có Công thức (Cap X).



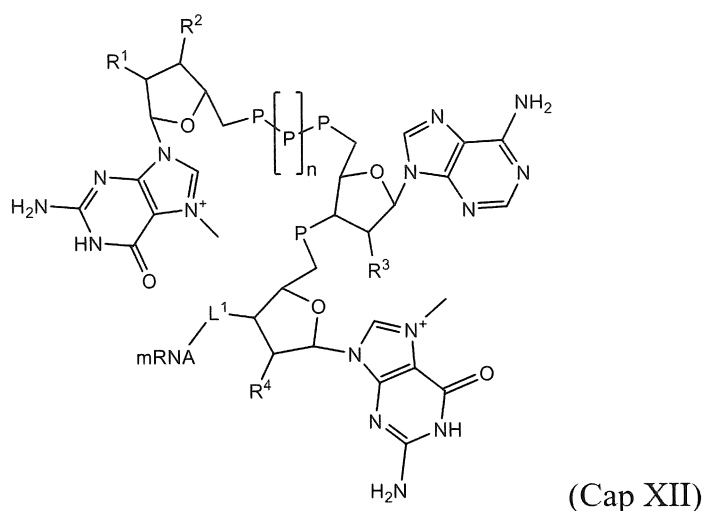
trong đó B^3 là nucleobazơ tự nhiên hoặc được cải biến; mỗi R^1 , R^2 , R^3 , và R^4 độc lập được chọn từ halogen, OH, và OCH_3 ; mỗi P độc lập được chọn từ nhóm cấu thành bởi phosphat, phosphorothioat, và boranophospat; mARN thể hiện mARN theo sáng chế được liên kết ở đầu 5' của nó; n bằng 0, 1, 2 hoặc 3; và L^1 là phosphat, phosphorothioat, hoặc boranophospat, trong đó ít nhất một trong số R^1 , R^2 , R^3 , và R^4 là OH. Theo một số phương án B^3 là G, m^7G , A hoặc m^6A ; trong đó G là guanin, m^7G là 7-metylguanin, A là adenin, và m^6A là N^6 -metyladenin. Theo một số phương án, n bằng 1.

Theo một số phương án, mARN được mô tả ở đây bao gồm $m^7GpppAmpG$ chất tương đồng 5' cap có cấu trúc có Công thức (Cap XI).



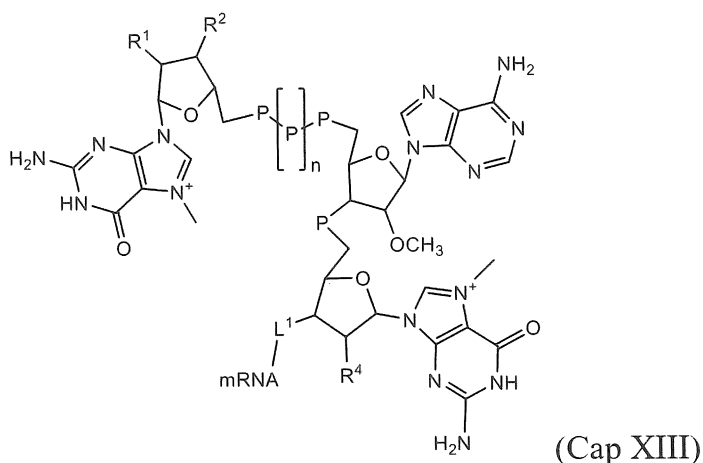
trong đó, mỗi R^1 , R^2 , và R^4 độc lập được chọn từ halogen, OH, và OCH_3 ; mỗi P độc lập được chọn từ nhóm cấu thành bởi phosphat, phosphorothioat, và boranophosphat; mARN thể hiện mARN theo sáng chế được liên kết ở đầu 5' của nó; n bằng 0, 1, 2 hoặc 3; và L^1 là phosphat, phosphorothioat, hoặc boranophosphat, trong đó ít nhất một trong số R^1 , R^2 , và R^4 là OH. Theo một số phương án, hợp chất có Công thức Cap XI là $m^7GpppAmpG$, trong đó mỗi R^1 , R^2 , và R^4 là OH, n bằng 1, và L^1 là liên kết phosphat. Theo một số phương án, n bằng 1.

Theo một số phương án, mARN được mô tả ở đây bao gồm $m^7GpppApm^7G$ chất tương đồng 5' có cấu trúc có Công thức (Cap XII).



trong đó, mỗi R^1 , R^2 , R^3 , và R^4 độc lập được chọn từ halogen, OH, và OCH_3 ; mỗi P độc lập được chọn từ nhóm cấu thành bởi phosphat, phosphorothioat, và boranophosphat; mARN thể hiện mARN theo sáng chế được liên kết ở đầu 5' của nó; n bằng 0, 1, 2 hoặc 3; và L^1 là phosphat, phosphorothioat, hoặc boranophosphat, trong đó ít nhất một trong số R^1 , R^2 , R^3 , và R^4 là OH. Theo một số phương án, n bằng 1.

Theo một số phương án, mARN được mô tả ở đây bao gồm $m^7GpppAmpm^7G$ chất tương đồng 5' cap có cấu trúc có Công thức (Cap XIII).



trong đó, mỗi R^1 , R^2 , và R^4 độc lập được chọn từ halogen, OH, và OCH_3 ; mỗi P độc lập được chọn từ nhóm cấu thành bởi phosphat, phosphorothioat, và boranophosphat; mRNA thể hiện mRNA theo sáng chế được liên kết ở đầu 5' của nó; n bằng 0, 1, 2 hoặc 3; và L^1 là phosphat, phosphorothioat, hoặc boranophosphat, trong đó ít nhất một trong số R^1 , R^2 , và R^4 là OH. Theo một số phương án, n bằng 1.

ARN có thể chứa cấu trúc 5' trinucleotit cap như được mô tả bởi US 2018/0105551A1, toàn bộ nội dung của nó được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

ARN tự nhiên có thể có khung chính phosphat. ARN như được mô tả ở đây có thể chứa các loại khung chính khác và các bazơ gồm axit nucleic peptit, phosphothionat, phosphoramidat, phosphorothioat, và/hoặc các liên kết metylphosphonat.

Lipit cation

Chế phẩm lipit tốt hơn là gồm lipit cation thích hợp để tạo ra liposom cation hoặc hạt nano lipit. Các lipit cation được nghiên cứu rộng rãi để phân phối axit nucleic do chúng có thể gắn kết với các màng tích điện âm và tạo ra quá trình hấp thu. Nhìn chung, các lipit cation là lưỡng tính chứa nhóm đầu ưa nước dương, hai (hoặc nhiều hơn) đuôi ưa lipid, hoặc phần steroid và phần nối giữa hai miền này. Tốt hơn là, lipit cation mang điện tích dương thực ở khoảng pH sinh lý. Các liposom cation về mặt truyền thống hệ thống phân phối không phải virus được sử dụng phổ biến nhất đối với oligonucleotit, gồm ADN plasmit, oligo đối nghĩa, và siARN/ARN kẹp tóc nhỏ-shRNA). Các lipit cation, như DOTAP, (1,2-dioleoyl-3- trimetylamonium-propan) và DOTMA (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetyl- amoni metyl sulfat) có thể

tạo ra các phức hợp hoặc các lipoplex với axit nucleic tích điện âm bằng cách tương tác tĩnh điện, tạo ra hiệu quả chuyển nhiễm *in vitro* cao.

Trong chế phẩm lipit và phương pháp sản xuất chế phẩm theo sáng chế, lipit cation có thể là, ví dụ, N,N-dioleoyl-N,N-dimethylamoni clorua (DODAC), N,N-distearyl-N,N-dimethylamoni bromua (DDAB), 1,2-dioleoyltrimethylamonipropion clorua (DOTAP) (cũng đã biết là N-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylamoni clorua và muối 1,2-Dioleoyloxy-3-trimethylaminopropion clorua), N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylamoni clorua (DOTMA), N,N-dimethyl-2,3-dioleoyloxy)propylamin (DODMA), 1,2-DiLinoleoyloxy-N,N-dimethylaminopropion (DLinDMA), 1,2-Dilinolenyloxy-N,N-dimethylaminopropion (DLenDMA), 1,2-di-γ-linolenyloxy-N,N-dimethylaminopropion (γ-DLenDMA), 1,2-Dilinoleylcarbamoxyloxy-3-dimethylaminopropion (DLin-C-DAP), 1,2-Dilinoleoyloxy-3-(dimethylamino)axetoxypion (DLin-DAC), 1,2-Dilinoleoyloxy-3-morpholinopropion (DLin-MA), 1,2-Dilinoleoyl-3-dimethylaminopropion (DLinDAP), 1,2-Dilinoleylthio-3-dimethylaminopropion (DLin-S-DMA), 1-Linoleoyl-2-linoleoyloxy-3-dimethylaminopropion (DLin-2-DMA), muối 1,2-Dilinoleoyloxy-3-trimethylaminopropion clorua (DLin-TMA.Cl), muối 1,2-Dilinoleoyl-3-trimethylaminopropion clorua (DLin-TAP.Cl), 1,2-Dilinoleoyloxy-3-(N-methylpiperazino)propion (DLin-MPZ), hoặc 3-(N,N-Dilinoleylamino)-1,2-propandiol (DLinAP), 3-(N,N-Dioleylamino)-1,2-propandiol (DOAP), 1,2-Dilinoleoyloxy-3-(2-N,N-dimethylamino)etoxypion (DLin-EG-DMA), 2,2-Dilinoleyl-4-dimethylaminomethyl-[1,3]-dioxolan (DLin-K-DMA) hoặc chất tương đồng của chúng, (3aR,5s,6aS)-N,N-dimethyl-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienyl)tetrahydro-3aH-xyclopenta[d][1,3]dioxol-5-amin, (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl-4-(dimethylamino)butanoat (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hydroxydodecyl)amino)ethyl)(2-hydroxydodecyl)amino)ethyl)piperazin-1-yl)ethylazanediyldidodecan-2-ol (C12-200), 2,2-dilinoleyl-4-(2-dimethylaminoethyl)-[1,3]-dioxolan (DLin-K-C2-DMA), 2,2-dilinoleyl-4-dimethylaminomethyl-[1,3]-dioxolan (DLin-K-DMA), (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28 31-tetraen-19-yl 4-(dimethylamino) butanoat (DLin-M-C3-DMA), 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yloxy)-N,N-dimethylpropan-1-amin (MC3 ete), 4-((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yloxy)-N,N-dimethylbutan-1-amin (MC4 ete),

hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Các lipid cation khác gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, N,N-distearyl-N,N-dimethylamoni bromua (DDAB), 3P-(N-(N',N'-dimethylaminoetan)- carbamoyl)cholesterol (DC-Choi), N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N-2-(sperminecarboxamido)etyl)-N,N-dimethylamoni trifluoraxetat (DOSPA), dioctadexylamidoglycyl carboxyspermin (DOGS), 1,2-dioleoyl-sn-3-phosphoetanolamin (DOPE), 1,2-dioleoyl-3-dimethylamoni propan (DODAP), N-(1,2-dimyristyloxyprop-3-yl)-N,N-dimetyl-N-hydroxyetyl amoni bromua (DMRIE), và 2,2-Dilinoleyl-4-dimethylaminoetyl-[1,3]-dioxolan (XTC). Ngoài ra, các chế phẩm thương mại của các lipid cation có thể được sử dụng, như, ví dụ, LIPOFECTIN (gồm DOTMA và DOPE, có sẵn từ GIBCO/BRL), và Lipofectamin (bao gồm DOSPA và DOPE, có sẵn từ GIBCO/BRL).

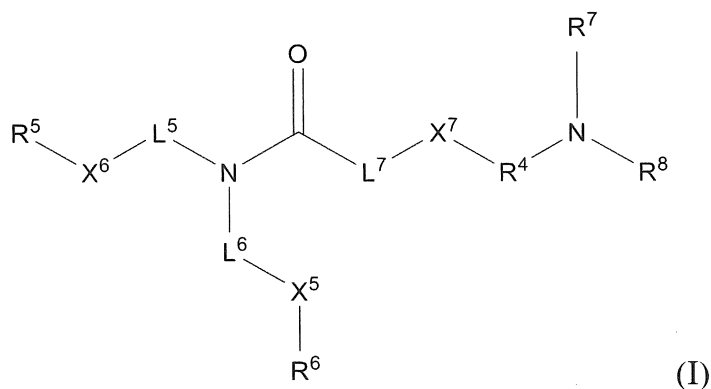
Các lipid cation thích hợp khác được bộc lộ trong Công bố đơn quốc tế số WO 09/086558, WO 09/127060, WO 10/048536, WO 10/054406, WO 10/088537, WO 10/129709, và WO 2011/153493; Công bố sáng chế Mỹ số 2011/0256175, 2012/0128760, và 2012/0027803; Patent Mỹ số 8,158,601; và Love *et al.*, PNAS, 107(5), 1864-69, 2010, nội dung của chúng được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Các lipid cation thích hợp khác gồm các lipid có các nhóm axit béo khác và các nhóm dialkylamino khác, gồm các lipid, trong đó các phần tử alkyl là khác nhau (ví dụ, N-etyl- N-metylamino-, và N-propyl-N-etylamino-). Các lipid này là một phần của nhóm phụ của các lipid cation được gọi là các lipid amino. Theo một số phương án của chế phẩm lipid được mô tả ở đây, lipid cation là lipid amino. Nhìn chung, lipid amino có mạch axyl kém bão hòa hơn được tạo cơ đơn giản hơn, cụ thể là khi các phức hợp phải có cơ nhỏ hơn khoảng 0,3 micron, nhằm mục đích lọc vô trùng. Các lipid amino chứa các axit béo không bão hòa với chiều dài mạch cacbon nằm trong khoảng từ C14 đến C22 có thể được sử dụng. Các khung khác cũng có thể được sử dụng để tách nhóm amino và axit béo hoặc phần alkyl béo của lipid amino.

Theo một số phương án, chế phẩm lipid và phương pháp sản xuất chế phẩm này bao gồm lipid cation có Công thức I theo đơn sáng chế PCT/EP2017/064066. Trong bản mô tả này, phần bộc lộ của PCT/EP2017/064066 cũng được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án, amino hoặc các lipid cation theo sáng chế có thể được ion hóa và có ít nhất một nhóm có thể proton hóa hoặc khử proton (“lipid cation có thể ion hóa”), sao cho lipid được tích điện dương ở độ pH ở hoặc dưới độ pH sinh lý (ví dụ, độ pH = 7,4), và trung hòa ở độ pH thứ hai, tốt hơn là ở hoặc trên độ pH sinh lý. Đương nhiên, sẽ hiểu rằng việc bổ sung hoặc loại proton là hàm của độ pH là quy trình cân bằng, và việc dẫn tới lipid mang điện tích hoặc trung hòa để chỉ bản chất của các loài chiếm ưu thế và không đòi hỏi tất cả lipid có mặt ở dạng mang điện tích hoặc trung hòa. Các lipid có nhiều hơn một nhóm có thể proton hóa hoặc khử proton, hoặc là lưỡng tính, không được loại trừ khỏi việc sử dụng trong sáng chế. Theo các phương án nhất định, các lipid có thể proton hóa có pKa của nhóm có thể proton hóa nằm trong khoảng từ khoảng 4 đến khoảng 11. Theo một số phương án, lipid cation có thể ion hóa có pKa khoảng từ 5 đến khoảng 7, Theo một số phương án, pKa của lipid cation có thể ion hóa khoảng từ 6 đến khoảng 7.

Theo một số phương án, chế phẩm lipid và phương pháp sản xuất chế phẩm này bao gồm lipid cation có thể ion hóa có Công thức I:



hoặc muối được dụng hoặc solvat của chúng, trong đó mỗi R⁵ và R⁶ được chọn độc lập từ nhóm cấu thành bởi C₁-C₃₁ alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, C₂-C₃₁ alkenyl hoặc C₂-C₃₁ alkynyl và cholesteryl; mỗi L⁵ và L⁶ được chọn độc lập từ nhóm cấu thành bởi C₁-C₂₀ alkyl và C₂-C₂₀ alkenyl mạch thẳng; X⁵ là -C(O)O-, tại đó -C(O)O-R⁶ được tạo ra hoặc -OC(O)- tại đó -OC(O)-R⁶ được tạo ra; X⁶ là -C(O)O- tại đó -C(O)O-R⁵ được tạo ra hoặc -OC(O)- tại đó -OC(O)-R⁵ được tạo ra; X⁷ là S hoặc O; L⁷ không có mặt hoặc

alkyl bậc thấp; R^4 là C_1 - C_6 alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh; và mỗi R^7 và R^8 được chọn độc lập từ nhóm cấu thành bởi hydro và C_1 - C_6 alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh.

Theo một số phương án, X^7 là S.

Theo một số phương án, X^5 là $-C(O)O-$, tại đó $-C(O)O-R^6$ được tạo ra và X^6 là $-C(O)O-$ tại đó $-C(O)O-R^5$ được tạo ra.

Theo một số phương án, mỗi R^7 và R^8 được chọn độc lập từ nhóm cấu thành bởi methyl, ethyl và isopropyl.

Theo một số phương án, mỗi L^5 và L^6 độc lập là C_1 - C_{10} alkyl. Theo một số phương án, L^5 là C_1 - C_3 alkyl, và L^6 là C_1 - C_5 alkyl. Theo một số phương án, L^6 là C_1 - C_2 alkyl. Theo một số phương án, mỗi L^5 và L^6 là C_7 alkyl mạch thẳng. Theo một số phương án, mỗi L^5 và L^6 là C_9 alkyl mạch thẳng.

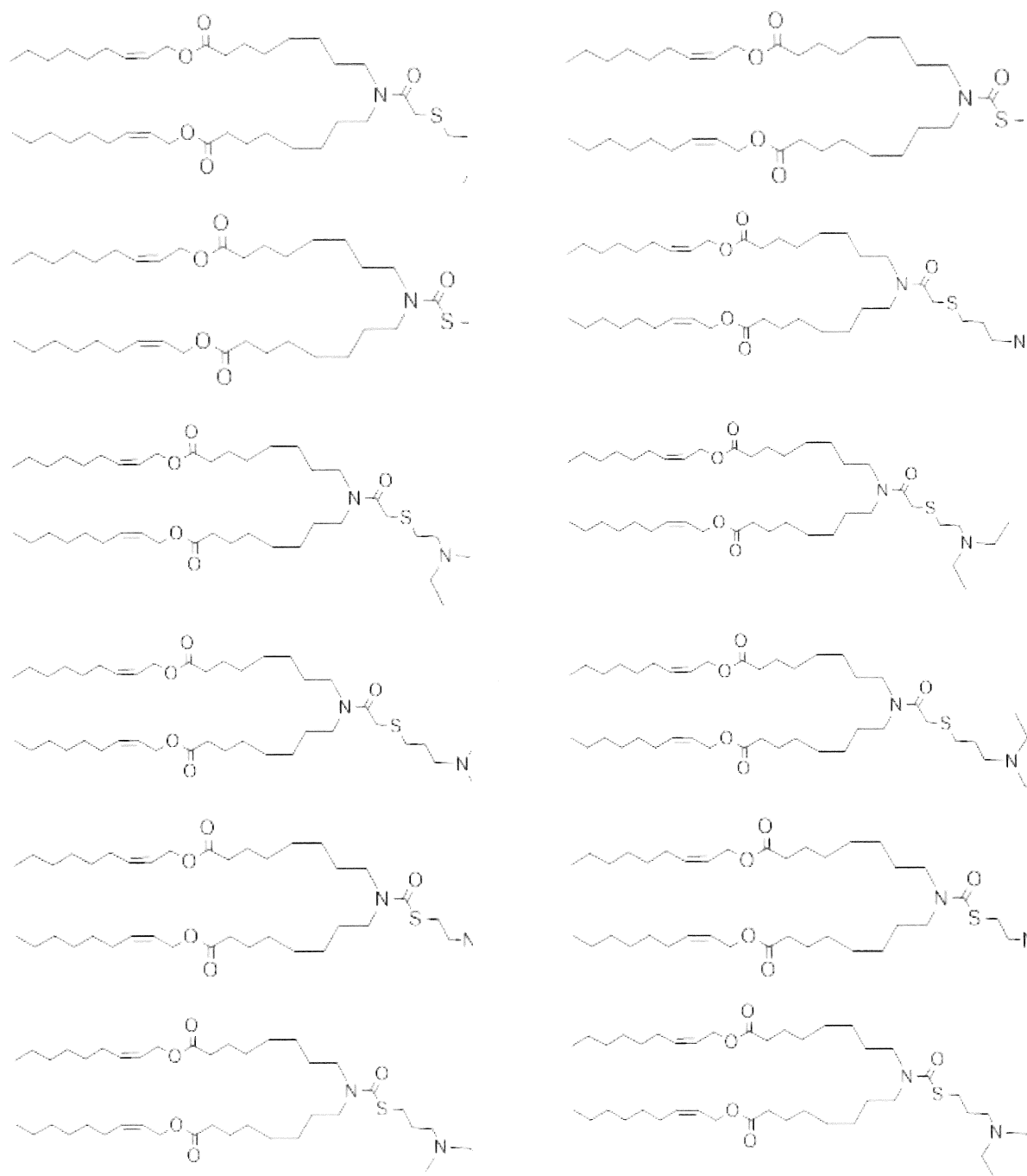
Theo một số phương án, mỗi R^5 và R^6 độc lập là alkenyl. Theo một số phương án, R^6 là alkenyl. Theo một số phương án, R^6 là C_2 - C_9 alkenyl. Theo một số phương án, alkenyl bao gồm một liên kết đôi. Theo một số phương án, mỗi R^5 và R^6 là alkyl. Theo một số phương án, R^5 là alkyl mạch nhánh. Theo một số phương án, mỗi R^5 và R^6 được chọn độc lập từ nhóm cấu thành bởi C_9 alkyl, C_9 alkenyl và C_9 alkynyl. Theo một số phương án, mỗi R^5 và R^6 được chọn độc lập từ nhóm cấu thành bởi C_{11} alkyl, C_{11} alkenyl và C_{11} alkynyl. Theo một số phương án, mỗi R^5 và R^6 được chọn độc lập từ nhóm cấu thành bởi C_7 alkyl, C_7 alkenyl và C_7 alkynyl. Theo một số phương án, R^5 là $-\text{CH}((\text{CH}_2)_p\text{CH}_3)_2$ hoặc $-\text{CH}((\text{CH}_2)_p\text{CH}_3)((\text{CH}_2)_{p-1}\text{CH}_3)$, trong đó p bằng 4-8. Theo một số phương án, p bằng 5 và L^5 là C_1 - C_3 alkyl. Theo một số phương án, p bằng 6 và L^5 là C_3 alkyl. Theo một số phương án, p bằng 7. Theo một số phương án, p bằng 8 và L^5 là C_1 - C_3 alkyl. Theo một số phương án, R^5 cấu thành bởi $-\text{CH}((\text{CH}_2)_p\text{CH}_3)((\text{CH}_2)_{p-1}\text{CH}_3)$, trong đó p bằng 7 hoặc 8.

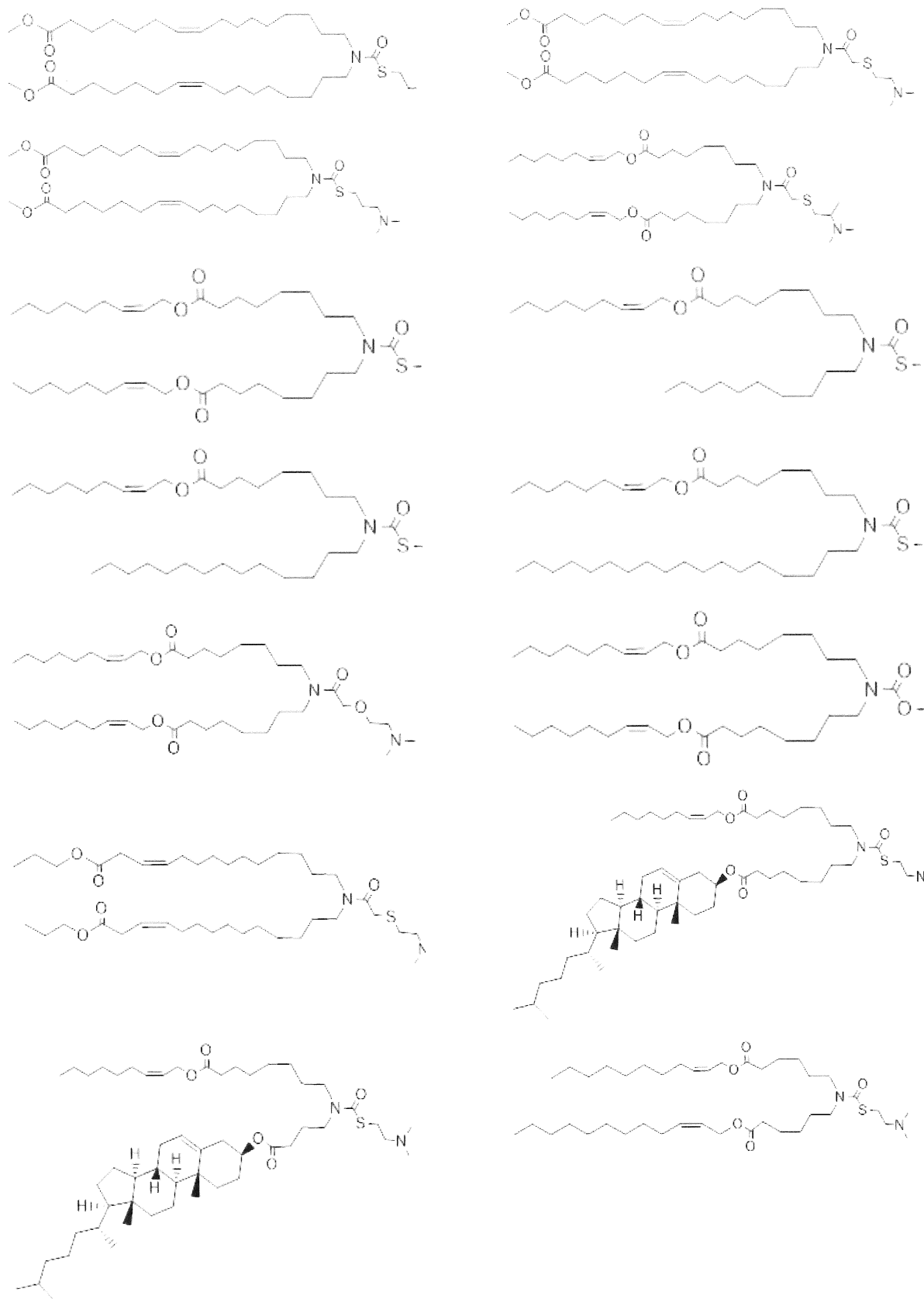
Theo một số phương án, R^4 là etylen hoặc propylen. Theo một số phương án, R^4 là n-propylen hoặc isobutylen.

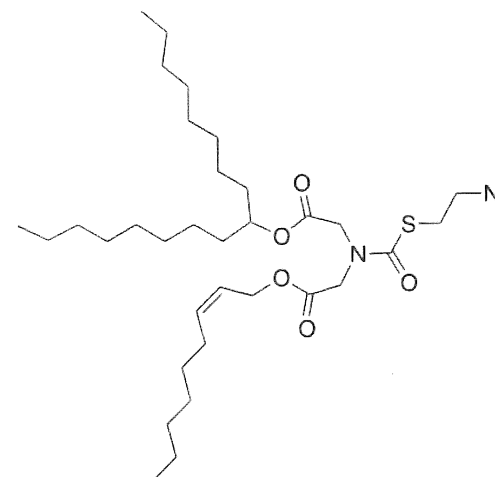
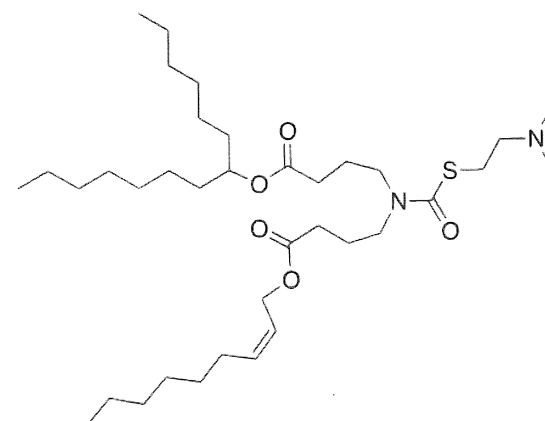
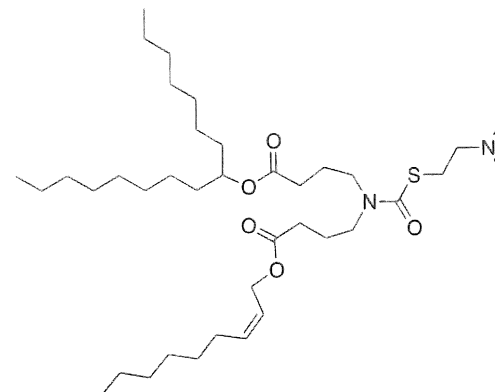
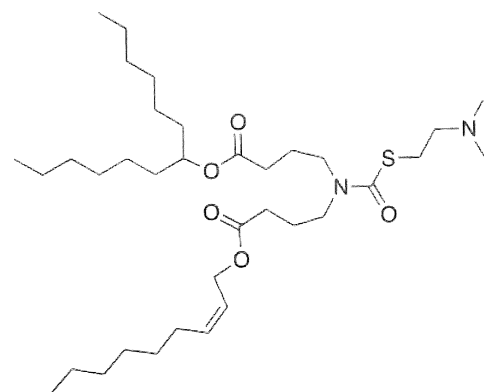
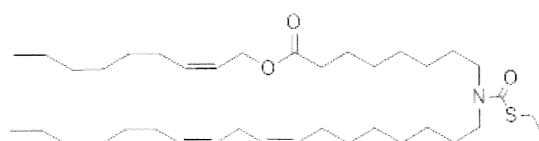
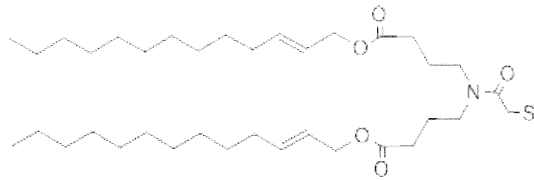
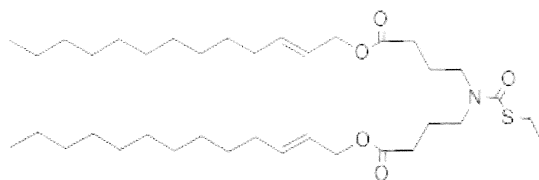
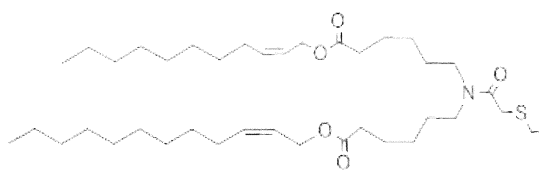
Theo một số phương án, L^7 không có mặt, R^4 là etylen, X^7 là S và mỗi R^7 và R^8 là methyl. Theo một số phương án, L^7 không có mặt, R^4 là n-propylen, X^7 là S và mỗi R^7 và R^8 là methyl. Theo một số phương án, L^7 không có mặt, R^4 là etylen, X^7 là S và mỗi R^7 và R^8 là etyl.

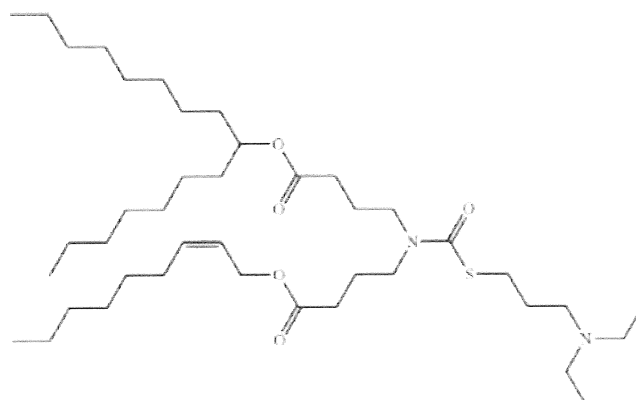
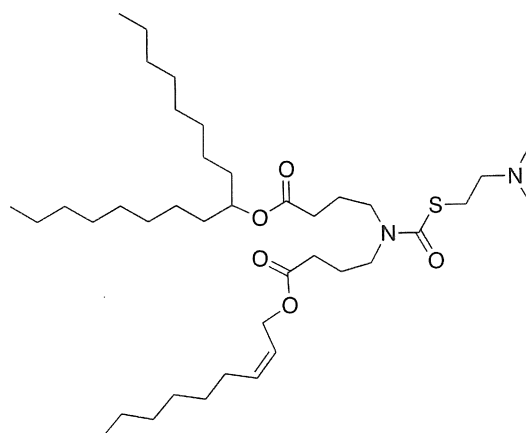
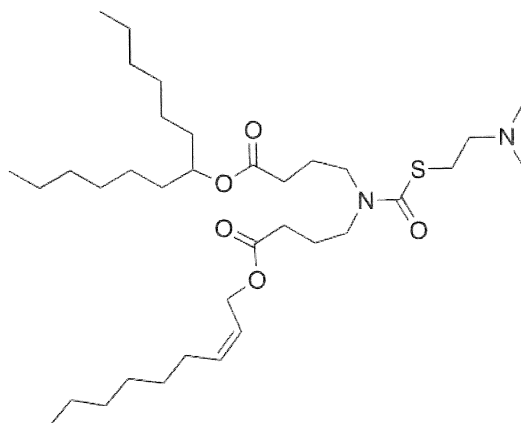
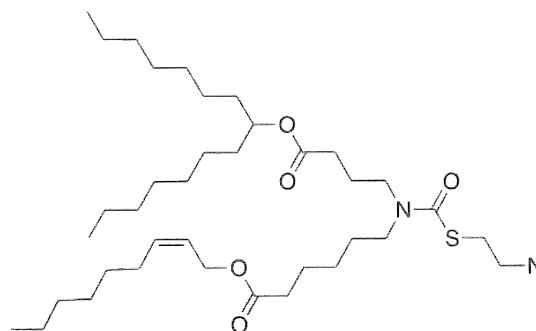
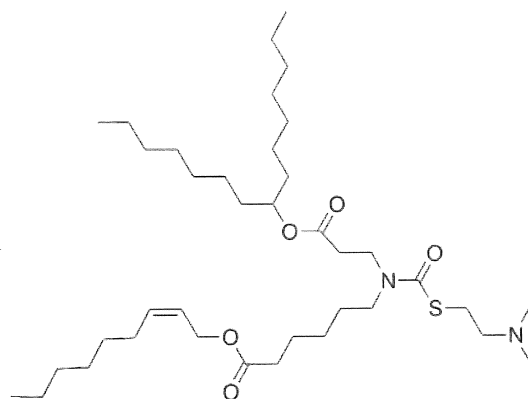
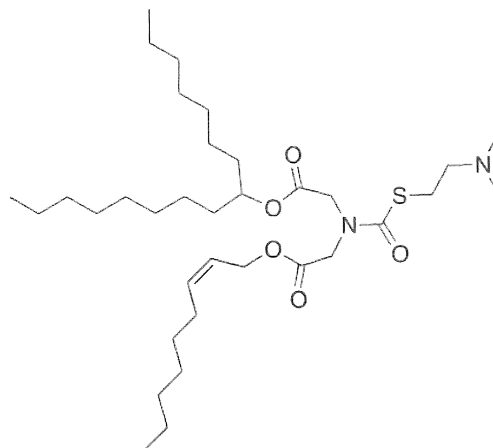
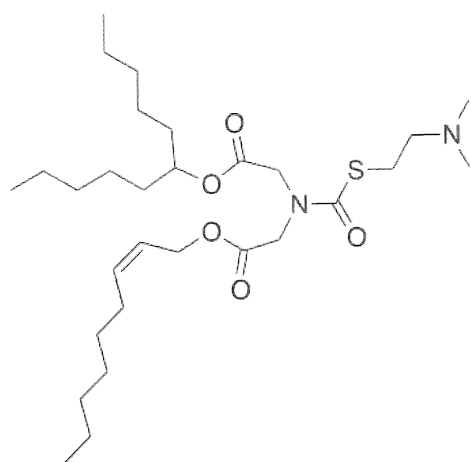
Theo một số phương án, X^7 là S, X^5 là $-C(O)O-$, tại đó $-C(O)O-R^6$ được tạo ra, X^6 là $-C(O)O-$ tại đó $-C(O)O-R^5$ được tạo ra, mỗi L^5 và L^6 độc lập là C_3-C_7 alkyl mạch thẳng, L^7 không có mặt, R^5 là $-\text{CH}((\text{CH}_2)_p\text{CH}_3)_2$, và R^6 là C_7-C_{12} alkenyl. Theo một số phương án khác, p bằng 6 và R^6 là C_9 alkenyl.

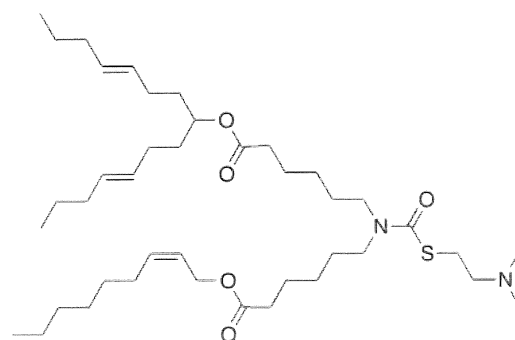
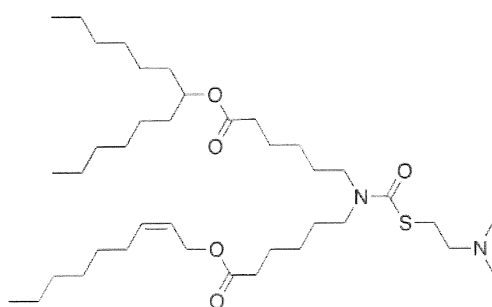
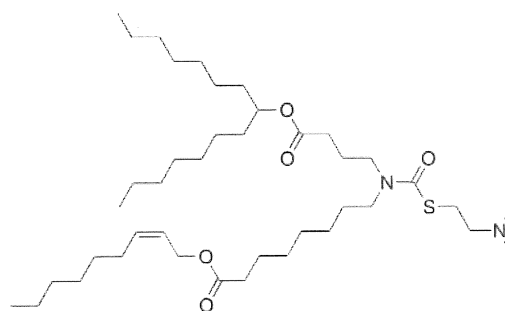
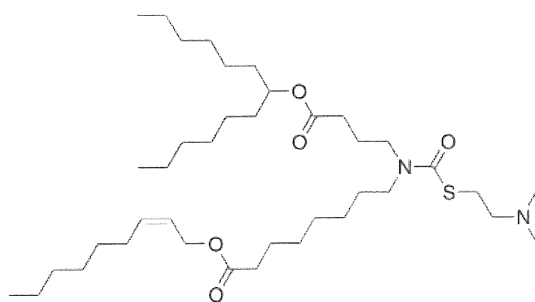
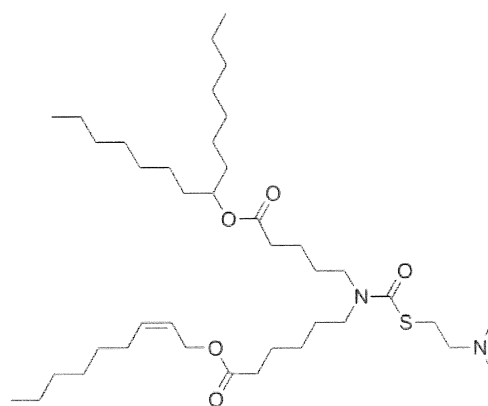
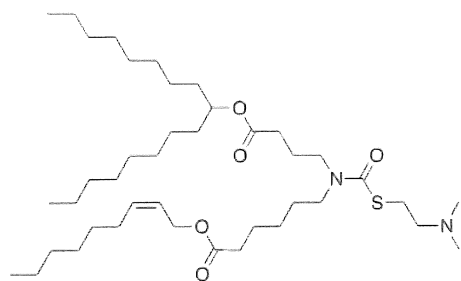
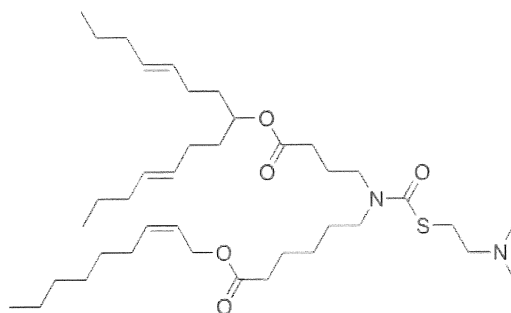
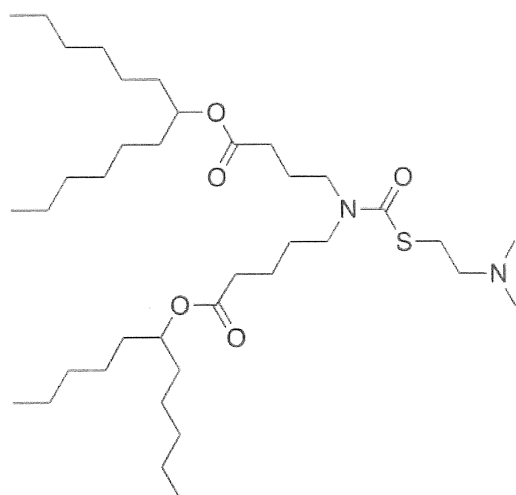
Theo một số phương án, chế phẩm lipid và phương pháp sản xuất chế phẩm này bao gồm lipid cation có thể ion hóa được chọn từ nhóm cấu thành bởi

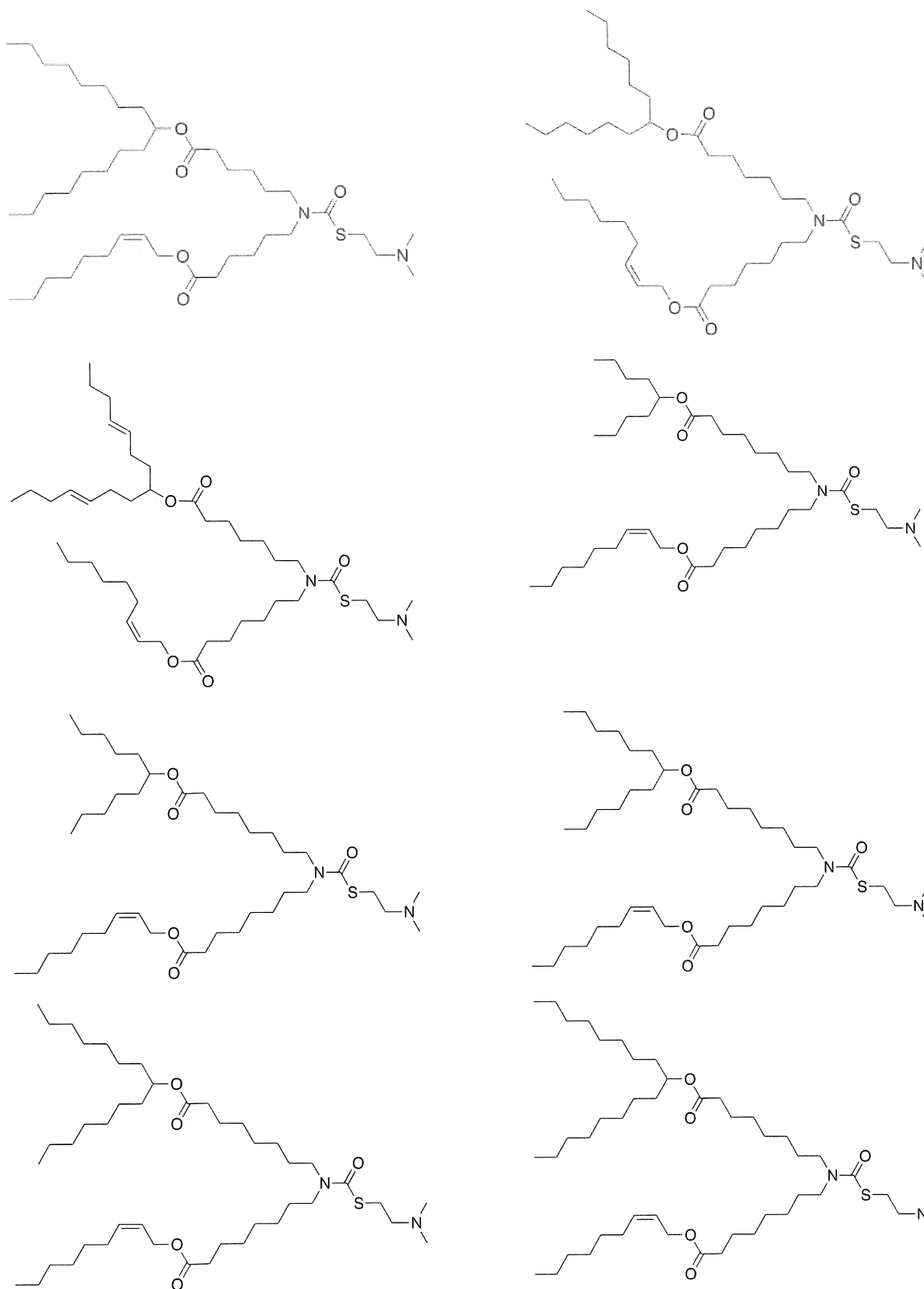


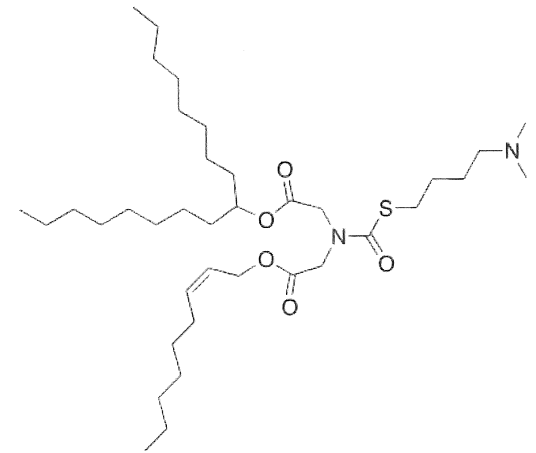
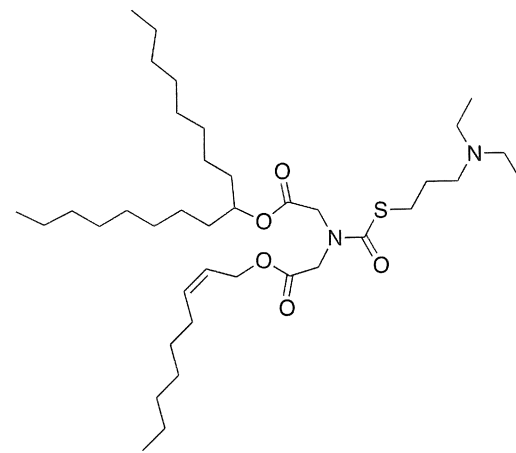
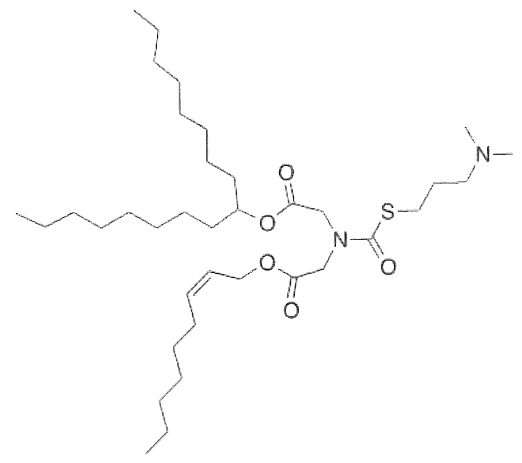
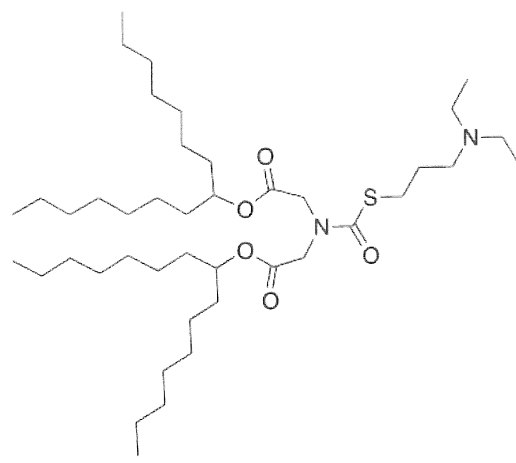
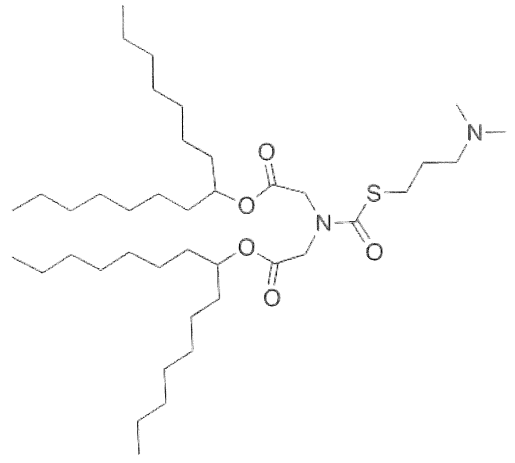
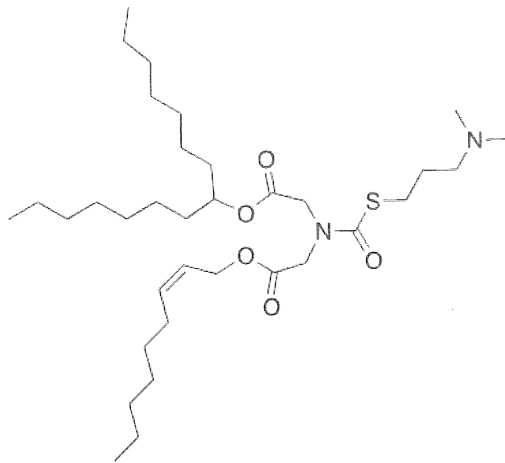


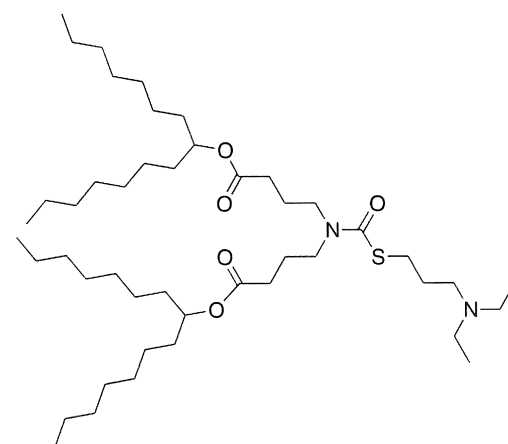
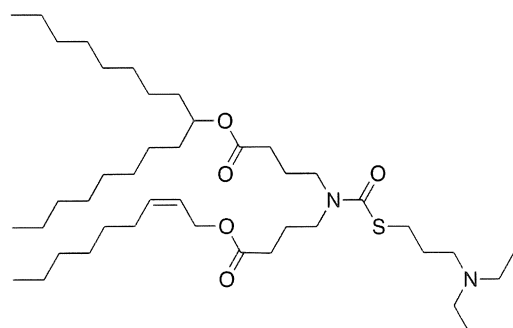
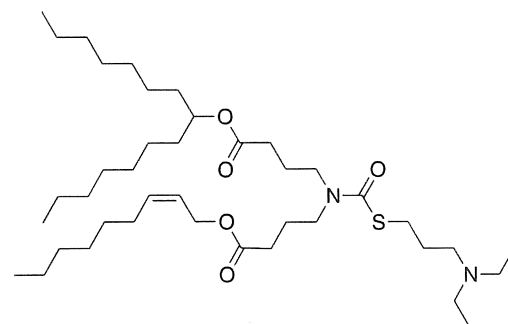
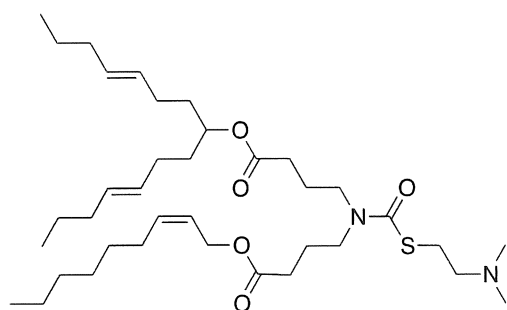
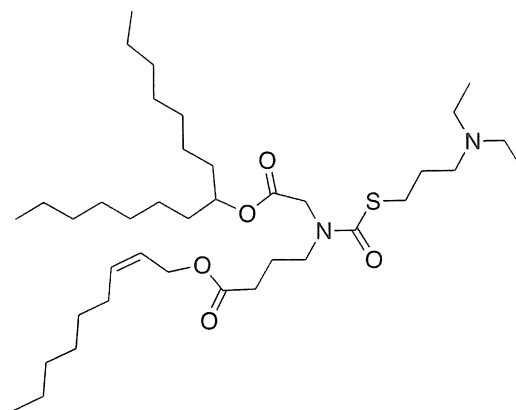
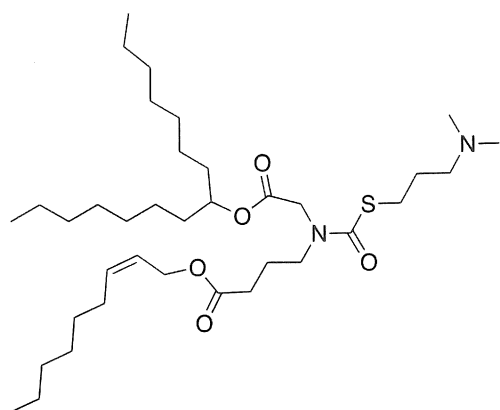
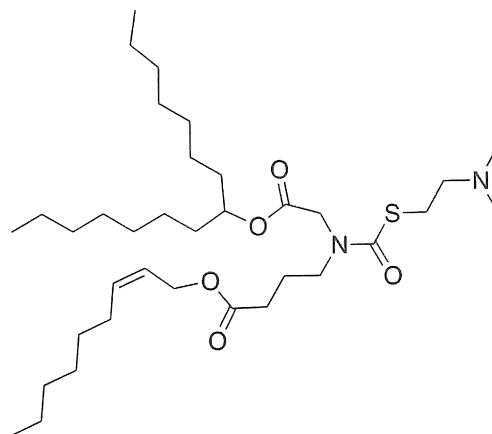
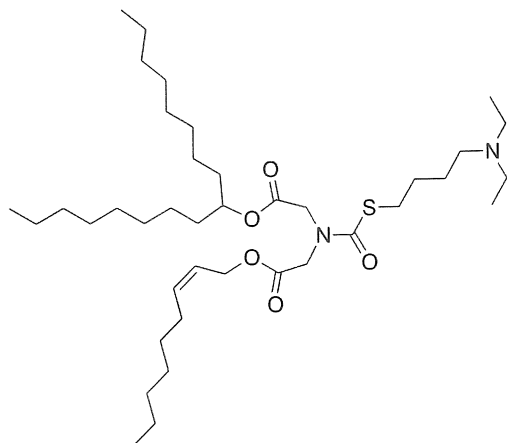


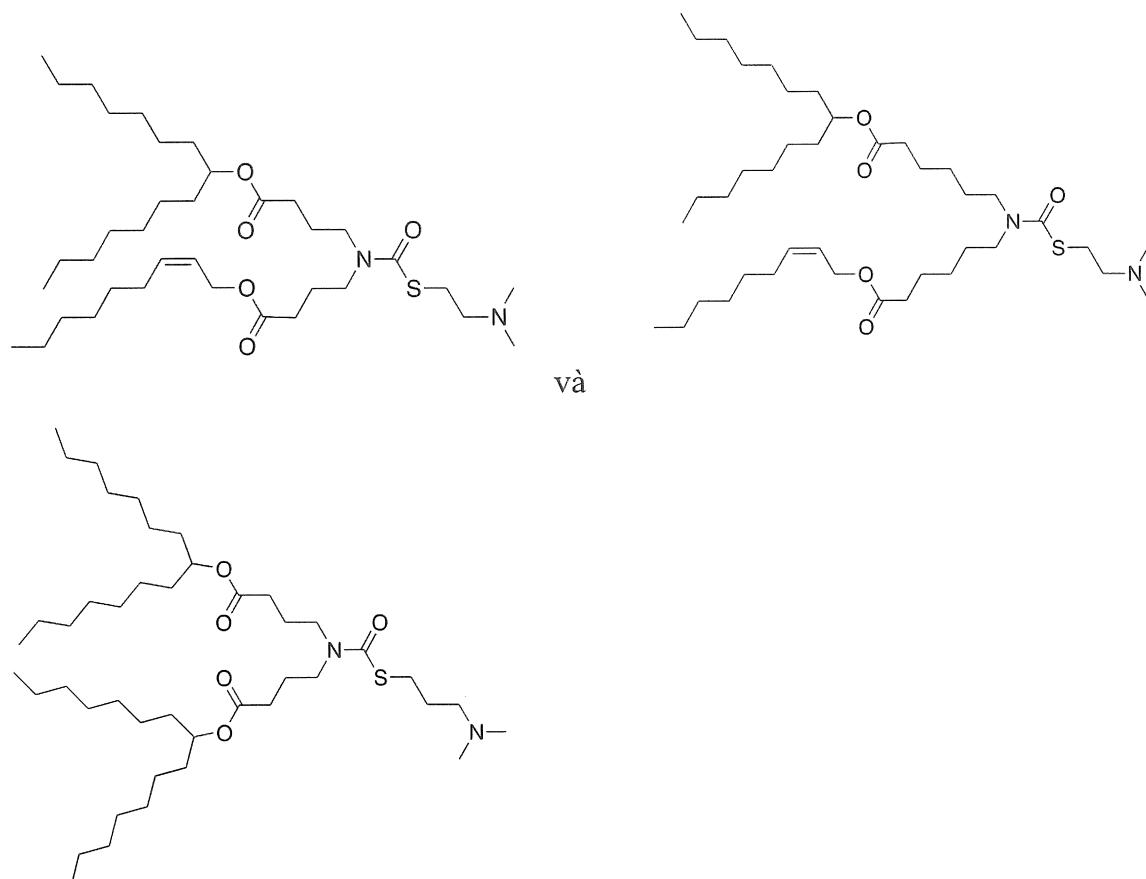








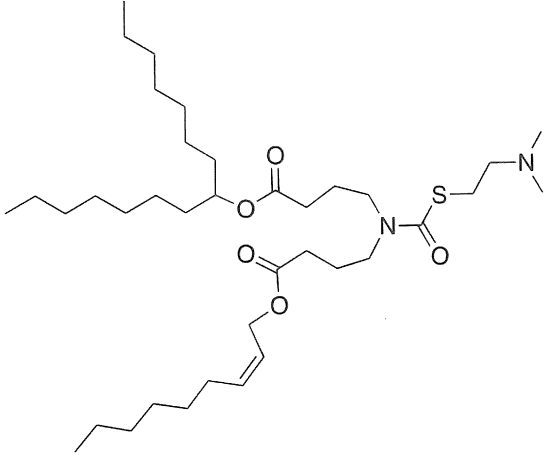
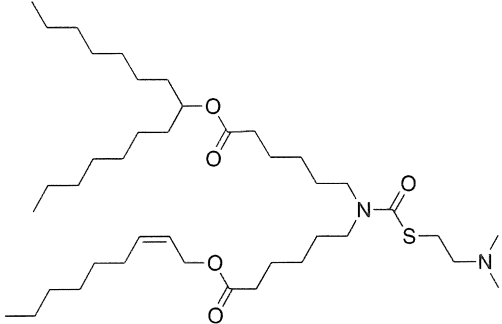
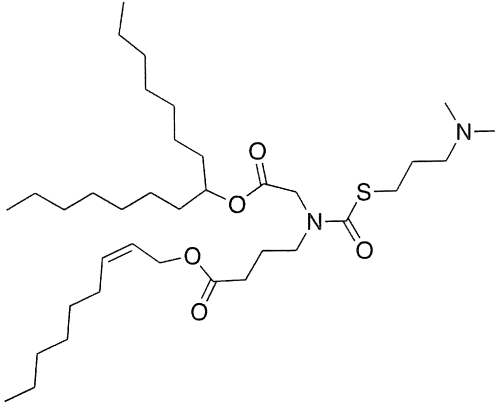
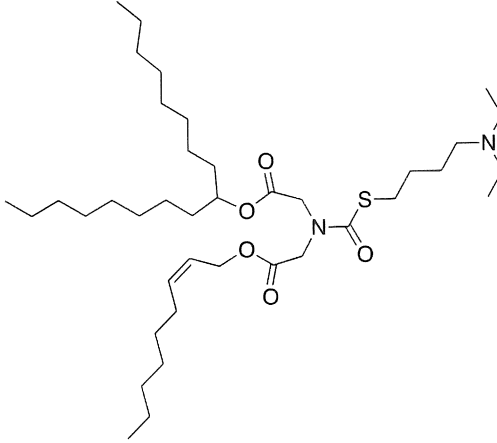


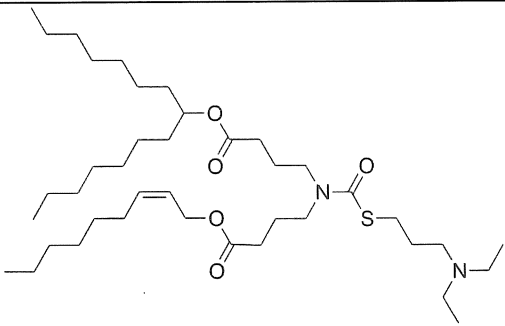
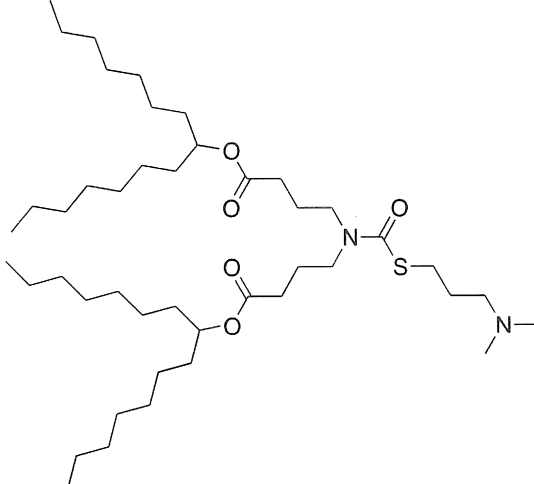
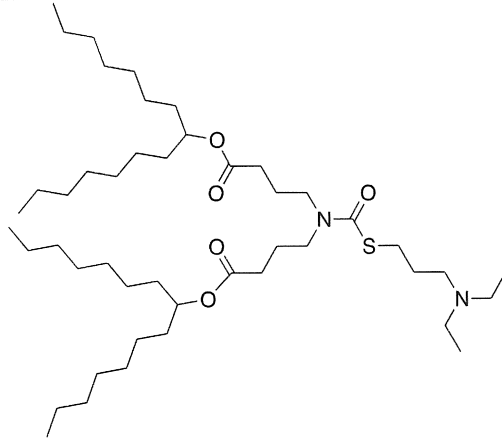
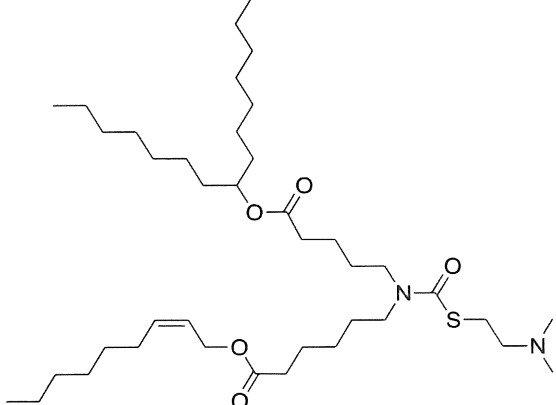


Theo một số phương án, chế phẩm lipid can bao gồm lipid cation có thể ion hóa được chọn từ nhóm cấu thành bởi lipid # 1 đến lipid # 9 như được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây:

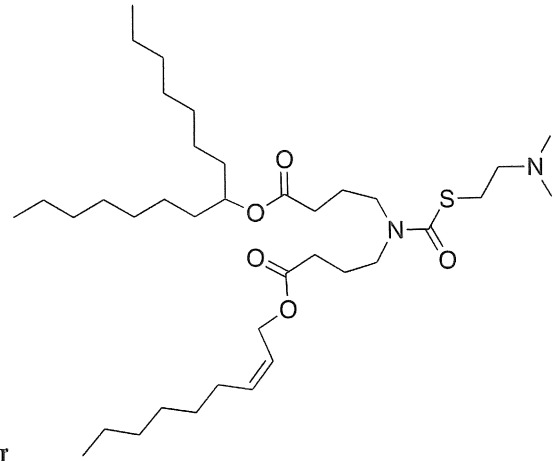
Bảng 1

Lipid #	Cấu trúc
1	

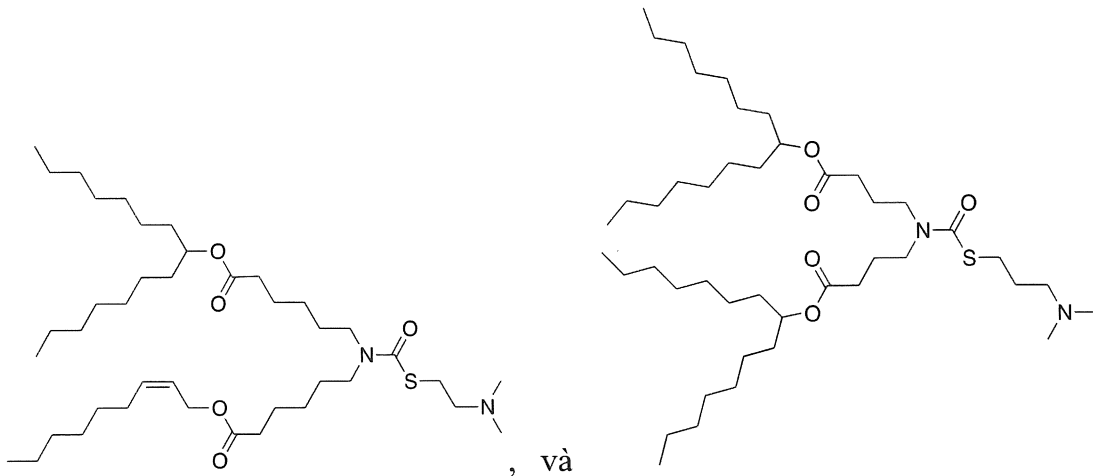
Lipit #	Cấu trúc
2	
3	
4	
5	

Lipit #	Cấu trúc
6	
7	
8	
9	

Theo một số phương án, chế phẩm lipit bao gồm lipit cation có thể ion hóa

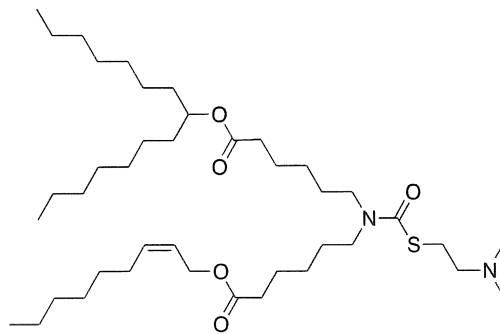


có cấu trúc được chọn từ



muối được dụng của chúng.

Theo một số phương án được ưu tiên, chế phẩm lipit bao gồm



lipit cation có thể ion hóa có cấu trúc , hoặc muối được dụng của chúng.

Theo các phương án, một hoặc nhiều lipid bất kỳ được đề cập ở đây có thể được loại trừ một cách rõ ràng.

Lipid trợ giúp và sterol

Chế phẩm mRNA-lipid theo sáng chế và phương pháp sản xuất chế phẩm này can bao gồm lipid trợ giúp, mà có thể được dùng để chỉ là lipid trung hòa trợ giúp, lipid không cation, lipid trợ giúp không cation, lipid anion, lipid trợ giúp anion, hoặc lipid trung hòa. Nhận thấy rằng các chế phẩm lipid, cụ thể là các liposom cation và các hạt nano lipid có khả năng hấp thu tế bào tăng nếu các lipid trợ giúp có mặt trong chế phẩm. (Curr. Drug Metab. 2014; 15(9):882-92). Ví dụ, một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng các lipid trung hòa và lưỡng tính như 1,2-dioleoylsn-glycero-3-phosphatidylcholin (DOPC), Di-Oleoyl-Phosphatidyl-Etanoalamin (DOPE) và 1,2-DiStearoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin (DSPC), có tính kích thích dung hợp (tức là, thuận tiện cho việc dung hợp) lớn hơn so với các lipid cation, có thể ảnh hưởng đến các đặc điểm đa hình của các phức hợp axit lipid-nucleic, thúc đẩy quá trình dịch chuyển từ pha dạng tấm sang pha lục giác, và từ đó cảm ứng quá trình dung hợp và phá vỡ màng tế bào. (Nanomedicine (Lond). 2014 Jan;9(1):105-20]. Ngoài ra, việc sử dụng lipid trợ giúp có thể giúp làm giảm các tác dụng bất lợi có thể bất kỳ từ việc sử dụng nhiều lipid cation phổ biến như tính gây độc và tính sinh miễn dịch.

Các ví dụ không giới hạn về các lipid không cation thích hợp cho chế phẩm lipid theo sáng chế và phương pháp sản xuất chế phẩm này gồm các phospholipid như lecithin, phosphatidyletanolamin, lysolecithin, lysophosphatidyletanolamin, phosphatidylserin, phosphatidylinositol, sphingomyelin, sphingomyelin của quả trứng (egg sphingomyelin - ESM), cephalin, cardiolipin, axit phosphatidic, cerebrosit, dicetylphosphat, distearoylphosphatidylcholin (DSPC), dioleoylphosphatidylcholin (DOPC), dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), dioleoylphosphatidylglyxerol (DOPG), dipalmitoylphosphatidylglyxerol (DPPG), dioleoylphosphatidyletanolamin (DOPE), palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholin (POPC), palmitoyl-oleoyl-phosphatidyletanolamin (POPE), palmitoyl-oleoyl-phosphatidylglyxerol (POPG), dioleoylphosphatidyletanolamin 4-(N-maleimidometyl)-xyclohexan-1-carboxylat (DOPE-mal), dipalmitoyl-phosphatidyletanolamin (DPPE), dimyristoyl-phosphatidyletanolamin (DMPE), distearoyl-phosphatidyletanolamin (DSPE),

monometyl-phosphatidyletanolamin, dimetyl-phosphatidyletanolamin, dielaidoyl-phosphatidyletanolamin (DEPE), stearyl-oleoyl-phosphatidyletanolamin (SOPE), lysophosphatidylcholin, dilinoleoylphosphatidylcholin, và các hỗn hợp của chúng. Các diaxylphosphatidylcholin và diaxylphosphatidyletanolamin phospholipit khác cũng có thể được sử dụng. Các nhóm axyl trong các lipit này tốt hơn là các nhóm axyl có nguồn gốc từ các axit béo có mạch C_{10} - C_{24} cacbon, ví dụ, lauroyl, myristoyl, palmitoyl, stearyl, hoặc oleoyl.

Các ví dụ bổ sung về các lipit không cation gồm sterol như cholesterol và các dẫn xuất của chúng. Một nghiên cứu đã kết luận rằng đối với lipit trợ giúp, cholesterol làm tăng không gian của các điện tích của lớp lipit phân cách với axit nucleic tạo nên sự phân bố điện tích phù hợp với điện tích của nucleic nằm gần hơn. (J. R. Soc. Interface. 2012 Mar 7; 9(68): 548–561). Các ví dụ không giới hạn về các dẫn xuất cholesterol gồm các chất tương đồng phân cực như 5α -cholestanol, 5α -coprostanol, cholesteryl-(2'-hydroxy)-etyl ete, cholesteryl-(4'-hydroxy)-butyl ete, và 6-ketcholestanol; các chất tương đồng không phân cực như 5α -cholestan, cholestenon, 5α -cholestanon, 5α -cholestanon, và cholesteryl decanoat; và các hỗn hợp của chúng. Theo các phương án được ưu tiên, dẫn xuất cholesterol là chất tương đồng phân cực như cholesteryl-(4'-hydroxy)-butyl ete.

Theo một số phương án, lipit trợ giúp có mặt trong chế phẩm lipit bao gồm hoặc cấu thành bởi hỗn hợp của một hoặc nhiều phospholipit và cholesterol hoặc dẫn xuất của chúng. Theo các phương án khác, lipit trung hòa có mặt trong chế phẩm lipit bao gồm hoặc cấu thành bởi một hoặc nhiều phospholipits, ví dụ, chế phẩm lipit không chứa cholesterol. Theo các phương án khác nữa, lipit trung hòa có mặt trong chế phẩm lipit bao gồm hoặc cấu thành bởi cholesterol hoặc dẫn xuất của chúng, ví dụ, chế phẩm lipit không chứa phospholipit.

Các ví dụ khác về lipit trợ giúp gồm các lipit không chứa phospho như, ví dụ, stearylamin, dodexylamin, hexadexylamin, axetyl palmitat, glyxerol rixinoleat, hexadexyl stearat, isopropyl myristat, polyme acrylic lưỡng tính, trietanolamin-lauryl sulfat, amit của axit béo được polyetyloxyl hóa bằng alky-aryl sulfat, dioctadexyldimetyl amoni bromua, xeramit, và sphingomyelin.

Theo một số phương án, lipid trợ giúp bao gồm từ khoảng 2 % mol đến khoảng 20 % mol, từ khoảng 3 % mol đến khoảng 18 % mol, từ khoảng 4 % mol đến khoảng 16 % mol, khoảng 5 % mol đến khoảng 14 % mol, từ khoảng 6 % mol đến khoảng 12 % mol, từ khoảng 5 % mol đến khoảng 10 % mol, từ khoảng 5 % mol đến khoảng 9 % mol, hoặc khoảng 2 % mol, khoảng 3 % mol, khoảng 4 % mol, khoảng 5 % mol, khoảng 6 % mol, khoảng 7 % mol, khoảng 8 % mol, khoảng 9 % mol, khoảng 10 % mol, khoảng 11 % mol, hoặc khoảng 12 % mol (hoặc phân đoạn bất kỳ của chúng hoặc khoảng nằm trong đó) của lipid toàn phần có mặt trong chế phẩm lipid.

Cholesterol hoặc dẫn xuất cholesterol trong chế phẩm lipid và phương pháp sản xuất chế phẩm này có thể bao gồm lên đến khoảng 40 % mol, khoảng 45 % mol, khoảng 50 % mol, khoảng 55 % mol, hoặc khoảng 60 % mol lipid toàn phần có mặt trong chế phẩm lipid. Theo một số phương án, cholesterol hoặc dẫn xuất cholesterol bao gồm khoảng 15 % mol đến khoảng 45 % mol, khoảng 20 % mol đến khoảng 40 % mol, khoảng 25 % mol đến khoảng 35 % mol, hoặc khoảng 28 % mol đến khoảng 35 % mol; hoặc khoảng 25 % mol, khoảng 26 % mol, khoảng 27 % mol, khoảng 28 % mol, khoảng 29 % mol, khoảng 30 % mol, khoảng 31 % mol, khoảng 32 % mol, khoảng 33 % mol, khoảng 34 % mol, khoảng 35 % mol, khoảng 36 % mol, hoặc khoảng 37 % mol lipid toàn phần có mặt trong chế phẩm lipid.

Theo một số phương án, thành phần phospholipid trong hỗn hợp có thể bao gồm từ khoảng 2 % mol đến khoảng 20 % mol, từ khoảng 3 % mol đến khoảng 18 % mol, từ khoảng 4 mol % đến khoảng 16 mol %, khoảng 5 mol % đến khoảng 14 mol %, từ khoảng 6 mol % đến khoảng 12 % mol, từ khoảng 5 % mol đến khoảng 10 % mol, từ khoảng 5 % mol đến khoảng 9 % mol, hoặc khoảng 2 % mol, khoảng 3 % mol, khoảng 4 % mol, khoảng 5 % mol, khoảng 6 % mol, khoảng 7 % mol, khoảng 8 % mol, khoảng 9 % mol, khoảng 10 % mol, khoảng 11 % mol, hoặc khoảng 12 % mol (hoặc phân đoạn bất kỳ của chúng hoặc khoảng nằm trong đó) của lipid toàn phần có mặt trong chế phẩm lipid.

Tỷ lệ phần trăm của lipid trợ giúp có mặt trong chế phẩm lipid và phương pháp sản xuất chế phẩm này là lượng đích, và lượng thực tế của lipid trợ giúp có mặt trong chế phẩm có thể thay đổi, ví dụ, bởi ± 5 % mol.

Chế phẩm lipit chứa hợp chất lipit cation hoặc hợp chất lipit cation có thể ion hóa có thể được tính theo mol khoảng 30-70% hợp chất lipit cation, khoảng 25-40 % cholesterol, khoảng 2-15% lipit trợ giúp, và khoảng 0,5-5% lipit polyetylen glycol (PEG), trong đó tỷ lệ phần trăm là của lipit toàn phần có mặt trong chế phẩm. Theo một số phương án, chế phẩm là khoảng 40-65% hợp chất lipit cation, khoảng 25- 35% cholesterol, khoảng 3-9% lipit trợ giúp, và khoảng 0,5-3% PEG-lipit, trong đó tỷ lệ phần trăm là của lipit toàn phần có mặt trong chế phẩm.

Chế phẩm có thể là chế phẩm hạt lipit, ví dụ chứa 8-30% hợp chất axit nucleic, 5-30% lipit trợ giúp, và 0-20% cholesterol; 4-25% lipit cation, 4-25% lipit trợ giúp, 2-25% cholesterol, 10- 35% cholesterol-PEG, và 5% cholesterol-amin; hoặc 2-30% lipit cation, 2-30% lipit trợ giúp, 1- 15% cholesterol, 2- 35% cholesterol-PEG, và 1-20% cholesterol-amin; hoặc lên đến 90% lipit cation và 2-10% lipit trợ giúp, hoặc thậm chí là 100% lipit cation.

Thể tiếp hợp lipit

Các hạt nano ARN được bao nang lipit được mô tả ở đây có thể còn bao gồm thể tiếp hợp lipit. Lipit được tiếp hợp là hữu ích trong đó nó ngăn cản sự tích tụ của các hạt. Các lipit được tiếp hợp thích hợp gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thể tiếp hợp PEG-lipit, thể tiếp hợp cationic-polyme-lipit, và các hỗn hợp của chúng. Hơn nữa, các túi phân phối lipit có thể được sử dụng để hướng đích đặc hiệu bằng cách gắn với các phối tử (ví dụ, kháng thể, peptit, và cacbohydrat) với bề mặt của chúng hoặc với đầu tận cùng của mạch PEG đã được gắn kết (Front Pharmacol. 2015 Dec 1; 6:286).

Theo phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp lipit là PEG-lipit. Thể vùi của polyetylen glycol (PEG) trong chế phẩm lipit là lớp bao hoặc phối tử bề mặt, kỹ thuật được dùng để chỉ quá trình PEG hóa, giúp bảo vệ các hạt nano khỏi hệ miễn dịch và chúng thoát khỏi sự hấp thu hệ lưới nội mô (reticuloendothelial system - RES) (Nanomedicine (Lond). 2011 Jun;6(4):715-28]. Quá trình PEG hóa được sử dụng rộng rãi để ổn định chế phẩm lipit và tải trọng của chúng thông qua các cơ chế vật lý, hóa học và sinh học. Các lipit PEG tương tự chất tẩy rửa (ví dụ, PEG-DSPE) có thể đi vào chế phẩm lipit để tạo ra lớp được hydrat và hàng rào không gian trên bề mặt. Dựa vào mức độ PEG hóa, nhìn chung lớp bề mặt có thể được chia thành hai loại, lớp tương tự dạng bàn chải và lớp tương tự cây nấm. Đối với hợp chất được ổn định PEG-DSPE,

PEG sẽ tạo cấu hình cây nấm với mức PEG hóa thấp (thường nhỏ hơn 5 % mol) và sẽ chuyển sang cấu hình dạng bàn chải khi hàm lượng của PEG-DSPE tăng hơn mức nhất định (Journal of Nanomaterials. 2011;2011:12). Nhận thấy rằng quá trình PEG hóa tăng dẫn tới việc tăng đáng kể thời gian bán thải tuần hoàn của các chế phẩm lipit (Annu. Rev. Biomed. Eng. 2011 Aug 15; 13():507-30; J. Control Release. 2010 Aug 3;145(3):178-81].

Các ví dụ thích hợp về PEG-lipit gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, PEG được liên hợp với dialkyloxypropyl (PEG-DAA), PEG được liên hợp với diacylglycerol (PEG-DAG), PEG được liên hợp với phospholipit như phosphatidyletanolamin (PEG-PE), PEG được tiếp hợp với xeromit, PEG được tiếp hợp với cholesterol hoặc dẫn xuất của chúng, và các hỗn hợp của chúng.

PEG là mạch thẳng, polyme hòa tan trong nước của các đơn vị lặp etylen PEG với hai nhóm hydroxyl tận cùng. PEG được phân loại bởi khối lượng phân tử của chúng và gồm các chất sau: monometoxypolyetylen glycol (MePEG-OH), monometoxypolyetylen glycol- succinat (MePEG-S), monometoxypolyetylen glycol-succinimidyl succinat (MePEG-S-NHS), monometoxypolyetylen glycol-amin (MePEG-NH₂), monometoxypolyetylen glycol-tresylat (MePEG-TRES), monometoxypolyetylen glycol-imidazolyl-carbonyl (MePEG-IM), cũng như các hợp chất như vậy chứa nhóm hydroxyl tận cùng thay cho nhóm metoxy tận cùng (ví dụ, HO-PEG-S, HO-PEG-S-NHS, HO-PEG-NH₂).

Gốc PEG của thể tiếp hợp PEG-lipit được mô tả ở đây có thể bao gồm khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ khoảng 550 dalton đến khoảng 10.000 dalton. Trong các trường hợp nhất định, gốc PEG có khối lượng phân tử trung bình từ khoảng 750 dalton đến khoảng 5.000 dalton (ví dụ, từ khoảng 1.000 dalton đến khoảng 5.000 dalton, từ khoảng 1.500 dalton đến khoảng 3.000 dalton, từ khoảng 750 dalton đến khoảng 3.000 dalton, từ khoảng 750 dalton đến khoảng 2.000 dalton). Theo các phương án được ưu tiên, gốc PEG có khối lượng phân tử trung bình khoảng 2.000 dalton hoặc khoảng 750 dalton. Khối lượng phân tử trung bình có thể là giá trị bất kỳ hoặc cận giá trị trong các khoảng đã nêu, gồm các đầu mút.

Trong các trường hợp nhất định, PEG có thể được thế tùy ý bằng nhóm alkyl, alkoxy, axyl, hoặc aryl. PEG có thể được tiếp hợp trực tiếp với lipit hoặc có thể được

liên kết với lipid qua gốc liên kết. Gốc liên kết thích hợp để liên hợp PEG với lipid có thể được sử dụng gồm, ví dụ, các gốc liên kết không chứa este và các gốc liên kết chứa este. Theo phương án được ưu tiên, gốc liên kết là các gốc liên kết không chứa este. Các gốc liên kết không chứa este thích hợp gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, amido (-C(O)NH-), amino (-NR-), carbonyl (-C(O)-), carbamat (-NHC(O)O-), urea (-NHC(O)NH-), disulfua (-S-S-), ete (-O-), succinyl (-C(O)CH₂CH₂C(O)-), succinamidyl (-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-), ete, cũng như dạng kết hợp của chúng (như liên kết chứa cả gốc liên kết carbamat và gốc liên kết amido). Theo phương án được ưu tiên, liên kết carbamat được sử dụng để liên hợp PEG với lipid.

Theo các phương án khác, gốc liên kết chứa este được sử dụng để liên hợp PEG với lipid. Các gốc liên kết chứa este thích hợp gồm, ví dụ, cacbonat (-OC(O)O-), succinoyl, phosphat este (-O-(O)POH-O-), sulfonat este, và dạng kết hợp của chúng.

Phosphatidyletanolamin có nhiều nhóm mạch axyl cps chiều dài mạch và mức độ bão hòa thay đổi có thể được tiếp hợp với PEG để tạo ra thể tiếp hợp lipid. Các phosphatidyletanolamin như vậy là có sẵn thương mại hoặc có thể được phân lập hoặc tổng hợp sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Phosphatidyletanolamin chứa các axit béo bão hòa hoặc không bão hòa với chiều dài mạch cacbon nằm trong khoảng từ C10 đến C20 được ưu tiên. Phosphatidyletanolamin với các axit béo không bão hòa một hoặc hai lần và hỗn hợp của các axit béo bão hòa và không bão hòa cũng có thể được sử dụng. Các phosphatidyletanolamin thích hợp gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dimyristoyl-phosphatidyletanolamin (DMPE), dipalmitoyl-phosphatidyletanolamin (DPPE), dioleoyl-phosphatidyletanolamin (DOPE), và distearoyl-phosphatidyletanolamin (DSPE).

Theo một số phương án, thể tiếp hợp PEG-DAA là thể tiếp hợp PEG-didexyloxypropyl (C₁₀), thể tiếp hợp PEG-dilauryloxypropyl (C₁₂), thể tiếp hợp PEG-dimyristyloxypropyl (C₁₄), thể tiếp hợp PEG-dipalmitoyloxypropyl (C₁₆), hoặc thể tiếp hợp PEG-distearoyloxypropyl (C₁₈). Theo các phương án này, PEG tốt hơn là có khối lượng phân tử trung bình khoảng 750 hoặc khoảng 2.000 dalton. Theo các phương án cụ thể, nhóm hydroxyl tận cùng của PEG được thế bằng nhóm methyl.

Ngoài ra các dạng nêu trên, các polyme ưa nước khác có thể được sử dụng thay cho PEG. Các ví dụ về các polyme thích hợp có thể được sử dụng thay cho PEG gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyvinylpyrrolidon, polymetyloxazolin, polyetyloxazolin, polyhydroxypropyl, metacrylamit, polymetacrylamit, và polydimetylacrylamit, axit polylactic, axit polyglycolic, và xenluloza được tạo dẫn xuất như hydroxymetylxenluloza hoặc hydroxyetylxenluloza.

Theo một số phương án, thể tiếp hợp lipit (ví dụ, PEG-lipit) bao gồm từ khoảng 0,1 % mol đến khoảng 2 % mol, từ khoảng 0,5 % mol đến khoảng 2 % mol, từ khoảng 1 % mol đến khoảng 2 % mol, từ khoảng 0,6 % mol đến khoảng 1,9 % mol, từ khoảng 0,7 % mol đến khoảng 1,8 % mol, từ khoảng 0,8 % mol đến khoảng 1,7 % mol, từ khoảng 0,9 % mol đến khoảng 1,6 % mol, từ khoảng 0,9 % mol đến khoảng 1,8 % mol, từ khoảng 1 % mol đến khoảng 1,8 % mol, từ khoảng 1 % mol đến khoảng 1,7 % mol, từ khoảng 1,2 % mol đến khoảng 1,8 % mol, từ khoảng 1,2 % mol đến khoảng 1,7 % mol, từ khoảng 1,3 % mol đến khoảng 1,6 % mol, hoặc từ khoảng 1,4 % mol đến khoảng 1,6 % mol (hoặc phân đoạn bất kỳ của chúng hoặc khoảng trong đó) của lipit toàn phần có mặt trong chế phẩm lipit. Theo các phương án khác, thể tiếp hợp lipit (ví dụ, PEG-lipit) bao gồm khoảng 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, hoặc 5%, (hoặc phân đoạn bất kỳ của chúng hoặc khoảng trong đó) của lipit toàn phần có mặt trong chế phẩm lipit và phương pháp sản xuất chế phẩm này. Lượng có thể là giá trị bất kỳ hoặc cận giá trị nằm trong các khoảng đã nêu, gồm các đầu mút.

Tỷ lệ phần trăm của thể tiếp hợp lipit (ví dụ, PEG-lipit) có mặt trong chế phẩm lipit theo sáng chế và phương pháp sản xuất chế phẩm này là lượng đích, và lượng thực tế của thể tiếp hợp lipit có mặt trong chế phẩm có thể thay đổi, ví dụ, $\pm 0,5$ % mol. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể nhận thấy rằng nồng độ của thể tiếp hợp lipit có thể thay đổi phụ thuộc vào thể tiếp hợp lipit đã dùng và tốc độ tại đó chế phẩm lipit trở nên có tính kích thích dung hợp.

Chế phẩm hạt nano ARN được bao nang lipit

Fig. 1 là ví dụ về giản đồ thể hiện phương pháp sản xuất các hạt nano ARN được bao nang lipit được mô tả ở đây.

Hình thái của lớp trộn cấu thành bởi ống thứ nhất để vận chuyển dung dịch nước có đường kính trong (ID) lớn hơn 0,1" (0,254 cm), tốt hơn là ID lớn hơn 0,132" (0,33528 cm); và ống thứ hai để vận chuyển dung dịch etanol cấu thành bởi ID lớn hơn 0,005" (0,0127 cm), tốt hơn là lớn hơn 0,01" (0,0254 cm); trong đó ống thứ hai (hữu cơ) giao với ống thứ nhất (nước) ở góc vuông hoặc gần góc vuông. Tốc độ chảy ra trong quá trình trộn ít nhất là 200 ml/phút, tốt hơn là ít nhất là 300 ml/phút.

Phương pháp được mô tả ở đây tạo ra dung dịch ARN trong nước bao gồm ARN điều trị, ví dụ, được điều chế theo quy trình thực hành sản xuất thuốc tốt (Good Manufacturing Practice - GMP), được hòa tan trong dung dịch nước bao gồm dung dịch đệm, ví dụ, xitrat. Phương pháp theo sáng chế cùng đề xuất dung dịch hữu cơ bao gồm một hoặc nhiều lipid, ví dụ, lipid loại lâm sàng được tổng hợp theo GMP, được sản xuất bằng cách hòa tan lipid trong dung môi hữu cơ có thể trộn với nước. Trong phương pháp được mô tả ở đây, dung môi hữu cơ có thể trộn với nước, tốt hơn là là alkanol bậc thấp, ví dụ, etanol. Tốt hơn là, cả hai dung dịch này được lọc vô trùng và nồng độ của chúng được điều chỉnh.

Dung dịch lipid hữu cơ được trộn với dung dịch nước bao gồm axit nucleic để tạo ra hạt nano ARN được bao nang lipid có hình thái dạng tấm, tức là, gồm hai lớp lipid. Theo một khía cạnh, axit nucleic được bao nang trong các hạt nano ARN được bao nang lipid với việc tạo thành cấu trúc dạng tấm.

Phương pháp được mô tả ở đây được đề cập tới bước đưa liên tiếp dung dịch lipid vào dung dịch nước trong môi trường trộn, tốt hơn là trực giao trong mô đun trộn. Hỗn hợp trộn pha loãng dung dịch lipid với dung dịch nước với 20%, 22,5%, 25%, 27,5%, hoặc 30% etanol, tốt hơn là 25% etanol, và tạo ra các hạt nano ARN được bao nang lipid trong dòng chảy rời.

Sau khi tạo ra các hạt nano ARN được bao nang lipid, hỗn hợp được pha loãng liên tục bởi dung dịch đệm đến 7,5%, 10%, 12,5%, hoặc 15%, tốt hơn là đến nhỏ hơn 12,5% etanol, mà còn làm ổn định các hạt nano ARN được bao nang lipid và tăng khả năng bao nang của axit nucleic.

Các hạt nano ARN được bao nang lipid được cô bằng cách lọc dòng tiếp tuyến, tốt hơn là bằng thiết bị lọc sợi lỗ. Các hạt nano ARN được bao nang lipid đã được cô được đưa vào siêu lọc step để loại alkanol và thay thế dung dịch đệm. Nồng độ axit

nucleic được điều chỉnh bằng cách pha loãng. Chế phẩm thu được được lọc vô trùng và được nạp vào các lọ. Quy trình hiện sẽ được thảo luận chi tiết hơn trong phần mô tả dưới đây sử dụng các bước như được đưa ra trên FIG. 1.

Hòa tan lipid và hòa tan ARN

Theo một phương án, các hạt nano ARN được bao nang lipid được sản xuất bởi phương pháp được mô tả ở đây ở dạng lắp ráp đa phân tử chứa ARN và lipid, trong đó ARN được bao nang ít nhất một phần bằng cách bắt cặp ion với các lipid cation.

Cỡ được ưu tiên đối với các hạt nano được bao nang lipid bao gồm ARN tạo ra bởi phương pháp được mô tả ở đây có đường kính khoảng 50-200 nm, tốt hơn là, với sự phân bố kích cỡ trong đó kích cỡ trung bình (ví dụ, đường kính) là khoảng 70 nm đến khoảng 150 nm, và tốt hơn nữa là kích cỡ trung bình nhỏ hơn khoảng 100 nm.

Theo các khía cạnh nhất định, các hạt nano lipid của phần mô tả ở đây gồm bốn thành phần lipid: lipid trợ giúp; cholesterol; PEG-lipid; và lipid cation có thể ion hóa. Tốt hơn là, lipid trợ giúp là DSPC, PEG-lipid là PEG-DMG và lipid cation có thể ion hóa là lipid cation có thể ion hóa. Theo các phương án nhất định, nồng độ dung môi hữu cơ trong đó lipid được hòa tan là khoảng 45% thể tích/thể tích đến khoảng 90% thể tích/thể tích. Theo các khía cạnh được ưu tiên nhất định, dung môi hữu cơ là alkanol bậc thấp. Các alkanol bậc thấp thích hợp gồm, ví dụ, metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol, các chất đồng phân của chúng và dạng kết hợp của chúng. Dung môi tốt hơn là etanol với nồng độ khoảng 50-90% thể tích/thể tích. Tốt hơn là, lipid chiếm thể tích khoảng 1 mL/g đến khoảng 5 mL/g.

Các lipid được hòa tan sử dụng, ví dụ, máy khuấy ở trên ở nhiệt độ thích hợp. Theo một khía cạnh, nồng độ lipid toàn phần của dung dịch khoảng 49,4 mg/mL. Theo các khía cạnh được ưu tiên nhất định, ARN bao gồm trong dung dịch nước (ví dụ, dung dịch đệm) và được pha loãng tới nồng độ cuối. Tốt hơn là, nồng độ cuối khoảng 0,55 mg/mL trong dung dịch đệm xitrat, với độ pH khoảng 3,5.

ARN tốt hơn là ARN sợi kép (double-stranded RNA - dsARN), mARN, hoặc ARN tự sao chép. Kích cỡ của dsARN là từ 10 cặp bazơ đến một vài trăm bazơ, tốt hơn là nhỏ hơn 30 cặp bazơ, tốt nhất là nhỏ hơn 25 cặp bazơ. Kích cỡ của mARN là từ 10 và một vài nghìn bazơ trong một sợi.

Bước tạo hạt nano ARN được bao nang lipit

Sau khi dung dịch hữu cơ và dung dịch nước được điều chế, chúng được trộn với nhau sử dụng thiết bị được mô tả chi tiết dưới đây. Tóm lại, thiết bị cấu thành bởi ống thứ nhất để vận chuyển dung dịch ARN trong nước và ống thứ hai để vận chuyển dung dịch lipit hữu cơ, trong đó ống thứ hai giao với ống thứ nhất góc theo cách vuông góc trong môđun trộn. Hai dung dịch này được bơm qua các ống tương ứng bằng cách tách các bơm HPLC và được trộn trong vùng của ống thứ nhất vuông góc trong môđun trộn. Tốt hơn là, dung dịch ARN trong nước được bơm với tốc độ lớn hơn gấp 2,0, 2,5, 3,0, 3,25, hoặc 3,5 lần, tốt hơn là gấp 3,0 lần, so với dung dịch lipit hữu cơ. Khi trộn hai dung dịch này ở vùng trộn, các hạt nano ARN đã được bao nang lipit được tạo ra.

Tốc độ bơm và kích cỡ của ống thứ nhất trong vùng của môđun trộn cung cấp cho quy trình trộn bao gồm dòng chảy rối. Trong động học chất lưu, sự chảy rối hoặc dòng chảy rối là sự vận chuyển chất lưu được đặc trưng bởi sự thay đổi hỗn loạn về áp suất và vận tốc chảy. Đối lập với dòng phân tầng, dòng chảy rối xuất hiện khi chất lưu chảy trong các lớp song song, mà không làm phá vỡ giữa các lớp đó. Dòng chảy rối thường rất không đều, và việc cấp năng lượng sẵn có trong dòng chảy rối có xu hướng thúc đẩy sự đồng nhất hóa (trộn) của hỗn hợp chất lưu. Đặc trưng này phù hợp với tốc độ trộn tăng cường và tăng cao về khối lượng, mômen và năng lượng vận chuyển trong dòng được gọi là “tính khuếch tán”. Các đặc trưng khác của dòng chảy rối gồm “tính luân chuyển” vì các dòng chảy rối có cơ chế tạo xoáy ba chiều mạnh được biết là sự kéo xoáy và “tiêu tán” vì sự chảy rối làm tiêu tán nhanh do năng lượng động học được chuyển hóa thành năng lượng nội tại bởi ứng suất trượt nhớt. Quá trình trộn chảy rối được vượt trội bởi sự di chuyển ngẫu nhiên ở quy mô nhỏ (được so sánh với dòng ban đầu) của các bọt trong chất lưu mà mang chúng vào mối quan hệ gần hơn hoặc khoảng cách gần hơn và có thể chia mịn và trộn lẫn chúng vào nhau hơn. Các quy trình được mô tả ở đây để trộn dung dịch lipit và dung dịch nước để bao nang ARN trong các hạt nano lipit tạo ra trùng khớp với việc tạo ra chúng với hiệu quả bao nang lớn hơn 95%.

Các hạt nano lipit thường được tạo ra ở nhiệt độ phòng, nhưng các hạt nano lipit có thể được tạo ra ở nhiệt độ cao hơn theo sáng chế. Không có yêu cầu chung đối với

chế phẩm đậm. Trên thực tế, các quy trình và thiết bị theo sáng chế có thể tạo ra túi lipid bằng cách trộn lipid trong etanol với ARN trong dung dịch nước.

Theo một phương án, các hạt nano lipid tạo ra khi các lipid được hòa tan trong dung môi hữu cơ, ví dụ, etanol, được pha loãng từng bước by trộn với dung dịch đậm nước, trước tiên bằng cách trộn các dòng nước và lipid với nhau trong môđun trộn tới nồng độ cuối của dung môi hữu cơ tốt hơn là giữa 25-40%. Nồng độ lipid, dung môi và chất tan thu được có thể được giữ ổn định thông qua quy trình tạo túi nhỏ. Sau khi tạo ban đầu, hỗn hợp lipid-ARN ban đầu còn được hòa tan bằng cách bổ sung dung dịch đậm, tốt hơn là đến khoảng 6,0%, 6,25%, 7,0% 7,5%, 10%, 12,5%, hoặc 15% dung môi hữu cơ, tốt nhất là 6,25% 6,25%, 7,0% 7,5%, 10%, hoặc 12,5%.

Quy trình liên tục được mô tả ở đây hoàn toàn có thể được mở rộng. Theo một khía cạnh, các hạt nano ARN được bao nang lipid được tạo ra có đường kính trung bình nhỏ hơn khoảng 80 nm, không có quy trình cơ học-năng lượng như đèn màng, sonication hoặc vi hóa lỏng.

Các hạt nano ARN được bao nang lipid

Các hạt nano ARN được bao nang lipid được bộc lộ ở đây bao gồm hạt nano hoặc hai lớp phân tử lipid. Ngoài lipid cation, ví dụ, lipid cation có thể ion hóa), hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm lipid trung hòa hoặc polyme.

Theo một số phương án, ARN được bao nang hoàn toàn trong phần lipid của hạt nano lipid sao cho ARN trong các hạt nano ARN được bao nang lipid bền trong dung dịch nước đối với sự thoái biến nucleaza. Theo các phương án khác, các hạt nano ARN được bao nang lipid được mô tả ở đây về cơ bản là không độc đối với động vật có vú như người. Các hạt nano ARN được bao nang lipid thường có đường kính trung bình là từ 30 nm đến 150 nm, từ 40 nm đến 150 nm, từ 50 nm đến 150 nm, từ 60 nm đến 130 nm, từ 70 nm đến 110 nm, hoặc từ 70 đến 90 nm. Các hạt nano ARN được bao nang lipid được mô tả ở đây cũng thường có tỷ lệ lipid:ARN (tỷ lệ khối lượng/khối lượng) là từ 1:1 đến 100:1, từ 1:1 đến 50:1, từ 2:1 đến 25:1, từ 3:1 đến 20:1, từ 5:1 đến 15:1, hoặc từ 5:1 đến 10:1, hoặc từ 10:1 đến 14:1, hoặc từ 9:1 đến 20:1. Theo một số phương án, chế phẩm có tổng tỷ lệ khối lượng lipid:ARN nằm trong khoảng từ 50:1 đến 10:1. Theo một số phương án, chế phẩm có tổng tỷ lệ khối lượng lipid:ARN nằm trong khoảng từ

40:1 đến 20:1. Theo một số phương án, chế phẩm có tổng tỷ lệ khối lượng lipid:ARN nằm trong khoảng từ 35:1 đến 25:1. Theo một số phương án, chế phẩm có tổng tỷ lệ khối lượng lipid:ARN nằm trong khoảng từ 28:1 đến 32:1.

Theo các phương án được ưu tiên, các hạt lipid bao gồm ARN, lipid cation (ví dụ, một hoặc nhiều lipid cation hoặc các muối của chúng được mô tả ở đây), phospholipit, và lipid được tạo tiếp hợp ức chế sự tích tụ của các hạt (ví dụ, một hoặc nhiều thể tiếp hợp PEG-lipit). Các hạt nano ARN được bao nang lipid có thể cũng gồm cholesterol. Các hạt nano ARN được bao nang lipid có thể bao gồm ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, hoặc nhiều ARN khác nhau biểu hiện một hoặc nhiều polypeptit.

Trong các hạt nano ARN được bao nang lipid ARN có thể được bao nang hoàn toàn trong phần lipid của hạt, từ đó bảo vệ ARN từ sự thoái biến nucleaza. Theo các phương án được ưu tiên, các hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm ARN được bao nang hoàn toàn trong phần lipid của hạt, từ đó bảo vệ ARN khỏi sự thoái biến nucleaza. Trong các trường hợp nhất định, ARN trong hạt lipid về cơ bản không bị thoái hóa sau khi phơi nhiễm hạt với nucleaza ở 37 °C trong ít nhất 20, 30, 45, hoặc 60 phút. Theo các trường hợp nhất định khác, ARN trong hạt lipid về cơ bản không bị thoái hóa sau khi ủ hạt trong huyết thanh ở 37 °C trong ít nhất 30, 45, hoặc 60 phút hoặc ít nhất 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, hoặc 36 giờ. Theo các phương án khác, ARN được tạo phức hợp với lipid cation của các hạt nano ARN được bao nang lipid. Một trong số các lợi ích của chế phẩm theo sáng chế đó là các hạt nano ARN được bao nang lipid về cơ bản là không độc đối với động vật có vú như người.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm hạt axit nucleic-lipid bao gồm rất nhiều hạt axit nucleic-lipid.

Hạt lipid bao gồm ARN mà được bao nang hoàn toàn trong phần lipid của các hạt, sao cho từ 30% đến 100%, từ 40% đến 100%, từ 50% đến 100%, từ 60% đến 100%, từ 70% đến 100%, từ 80% đến 100%, từ 90% đến 100%, từ 30% đến 95%, từ 40% đến 95%, từ 50% đến 95%, từ 60% đến 95%, từ 70% đến 95%, từ 80% đến 95%, từ 85% đến 95%, từ 90% đến 95%, từ 30% đến 90%, từ 40% đến 90%, từ 50% đến 90%, từ 60% đến 90%, từ 70% đến 90%, từ 80% đến 90%, hoặc ít nhất 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, hoặc 99% (hoặc phân đoạn bất kỳ của chúng hoặc khoảng trong đó) các hạt có ARN được bao nang trong đó.

Phụ thuộc vào việc sử dụng đã định của các hạt nano ARN được bao nang lipid, các tỷ lệ của các thành phần có thể thay đổi và hiệu quả phân phối của chế phẩm cụ thể có thể được đo sử dụng các thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Pha loãng các hạt nano ARN được bao nang lipid

Sau khi trộn dung dịch lipid hữu cơ vào dung dịch ARN trong nước, mức độ bao nang ARN có thể được tăng cường nếu huyền phù của các hạt nano ARN được bao nang lipid còn được pha loãng trước khi loại ARN tự do. Theo một phương án dung dịch đệm có thể có hai lượng là 15 mM Tris, 50 mM NaCl, 9% sucroza, độ pH = 7,5 để làm giảm nồng độ etanol xuống 8,25%. Theo phương án khác dung dịch đệm có thể có ba lượng là 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 9% sucroza, độ pH = 7,5 để làm giảm nồng độ etanol xuống 6,25%. Theo phương án khác dung dịch đệm có thể có một lượng là 50 mM dung dịch đệm phosphat, độ pH = 6,0 để làm giảm nồng độ etanol đến 12,5%. Theo phương án khác dung dịch đệm có thể có hai lượng là 50 mM dung dịch đệm phosphat, độ pH = 6,0 để làm giảm nồng độ etanol xuống 8,3%. Theo phương án khác dung dịch đệm có thể có ba lượng là 50 mM dung dịch đệm phosphat, độ pH = 6,0 để làm giảm nồng độ etanol xuống 6,25%. Theo phương án khác dung dịch đệm có thể có ba lượng là 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 9% sucroza, độ pH = 7,4 để làm giảm nồng độ etanol xuống 6,25%. Theo phương án khác dung dịch đệm có thể có 1-3 lượng 50 mM dung dịch đệm phosphat, độ pH = 6,0, ba lượng là 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 9% sucroza, độ pH = 7,5 để làm giảm nồng độ etanol xuống 6,25%.

Các hạt nano ARN được bao nang lipid đã được pha loãng sau đó được tùy ý thu gom trong bình được duy trì ở 15-20°C và cho phép ủ từ vài phút đến hai giờ trước bước pha loãng thứ hai với 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 9% sucroza, độ pH = 7,5 hoặc bước cô.

Cô mẫu

Các hạt nano ARN được bao nang lipid đã được pha loãng có thể được cô, ví dụ, bằng cách lọc dòng tiếp tuyến (TFF) sử dụng màng lọc rỗng (màng mPES Kros,

Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, California), tùy ý qua bơm nhu động hoặc bơm màng ngăn 4 pittông hoặc bơm ly tâm (dựa trên nguyên lý đệm từ trường). Phương pháp cô là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể rõ ràng là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Loại ARN tự do và thay thế dung dịch đệm

Việc cô có thể được tiến hành sau đó bằng cách lọc thẩm tách đối với 7-10 thể tích của 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 9% sucroza, độ pH = 7,5 để loại dung môi hữu cơ và ARN không gắn kết. Tốt hơn là, dung dịch lọc thẩm tách được bổ sung thông qua thiết bị trao đổi nhiệt sao cho nhiệt độ sản xuất được duy trì ở 15-20 °C. Chế phẩm còn có thể được cô để hướng đích dạng cô ARN được bào chế toàn phần > 3 mg/mL.

Lọc vô trùng

Nồng độ ARN trong chế phẩm của các hạt nano ARN được bao nang lipid can sau đó được đo bởi IPRP-HPLC (Sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo cặp ion) và được điều chỉnh tới ~2 mg/mL (1,85 đến 2,3 mg/mL) bằng cách pha loãng với 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 9% sucroza, độ pH = 7,5 chứa glyxerol sao cho nồng độ cuối của glyxerol trong chế phẩm bằng 5%. Các hạt nano ARN được bao nang lipid đã được lọc thẩm tách được lọc vô trùng qua thiết bị lọc loại vô trùng 0,2 µm (PES) ở nồng độ lipid 56-69 mg/mL.

Lọc vô trùng

Sau đó, chế phẩm được lọc có thể được lọc vô trùng vào các ống thủy tinh, được đậy bằng nút, đậy nút và được đặt ở -20 hoặc -70 ± 5 °C.

Thiết bị

Bản mô tả ở đây đưa ra thiết bị tiến hành các quy trình được mô tả trên đây. Fig. 4 là ví dụ về sơ đồ của thiết bị theo một phương án của bản mô tả ở đây.

Dung dịch nước bao gồm ARN được vận chuyển bởi bơm HPLC qua ống, ví dụ, bao gồm các vùng ống PEEK có ID 0,03'' (0,0762 cm), chi tiết nối PEEL CÓ ID 0,05'', ống silicon 0,0625'', và ống silicon có ID 0,122'' (0,30988 cm), và thép không

gỉ có ID 0,132'' (0,335 cm). Dung dịch hữu cơ bao gồm lipid được vận chuyển bởi bơm HPLC qua ống bao gồm, ví dụ, các vùng ống PEEK có ID 0,03'' (0,0762 cm), chi tiết nối PEEK CÓ ID 0,02'' (0,0508 cm), thép không gỉ có ID 0,01'' (0,0254 cm). Dung dịch hữu cơ được bơm vào dung dịch nước ở góc 90 độ trong môđun trộn. Do đó, dung dịch hữu cơ bao gồm lipid được đưa vào dung dịch nước với dòng vuông góc với dòng dung dịch nước. Việc đưa vào ở các góc bên phải của hướng dòng xuất hiện trong môđun trộn như được minh họa trên FIG. 5, và các kết quả trong quá trình trộn chảy rối, trong các điều kiện được bỏ vào một cách cẩn thận trong các điều kiện để đảm bảo rằng quá trình bao nang hạt nano lipid của ARN được tạo ra theo cách có thể chấp nhận liên quan đến cỡ hạt, dạng huyền phù, và hiệu quả bao nang. Ống chứa lipid-ARN đã được trộn sau đó vận chuyển các hạt nano ARN được bao nang lipid vào vùng trộn thứ hai, ví dụ, qua ống polypropylen 0,25'' (0,635 cm) ID mà hợp nhất ở góc 45 độ với dung dịch đệm pha loãng trong vùng pha loãng, và các hạt nano ARN được bao nang lipid đã được pha loãng được gom trong bình bọc thép không gỉ được duy trì ở 15-20 °C. Các hạt còn được xử lý, ví dụ, bằng cách lọc dòng tiếp tuyến sử dụng màng ngăn hoặc bơm ly tâm.

Theo một phương án, khu vực trộn là môđun trộn trong đó dung dịch lipid hữu cơ được phân phối vào dòng dung dịch ARN trong nước, tốt hơn là ở góc khoảng 90°. Ống thép không gỉ có ID 0,132'' (0,335 cm) (3,35 mm) thứ nhất vận chuyển dung dịch ARN trong nước có một lỗ trên thành của nó nằm giữa các đầu của nó. Ống thứ hai có ID 0,01'' (0,0254 cm), OD 0,0625'' được gắn vuông góc bằng cách lọc qua lỗ nằm trên thành của ống thứ nhất cho phép vận chuyển chất lỏng từ ống thứ hai vào bên trong của ống thứ nhất (Xem FIG. 5). Theo các khía cạnh được ưu tiên, các hình dạng được xác định rõ ràng và kích cỡ có thể tái sản xuất của các hạt nano ARN được bao nang lipid được điều chế sử dụng tốc độ chảy của dung dịch ARN trong nước tốt hơn là gấp ba lần tốc độ chảy của dung dịch lipid hữu cơ. Các túi có hình dạng được xác định rõ ràng và kích cỡ có thể tái sản xuất cũng được điều chế bằng cách thay đổi tốc độ chảy của các đường chất lưu, ví dụ, để đảm bảo quá trình trộn hiệu quả trong một số trường hợp.

Fig. 5 thể hiện môđun trộn và động lực dòng liên quan theo một phương án. So với các hệ thống đã biết trước, sáng chế đề xuất dòng chảy rối và tốc độ trượt gia tăng. Ví dụ, sáng chế đưa ra một cách có lợi dòng chảy rối ($N_{re} > 2000$) trong môi trường trộn

với tốc độ trượt từ khoảng 500/giây đến khoảng 3300/giây với tốc độ chảy (cả hai đường dòng) nằm trong khoảng từ 0,1 L/phút đến khoảng 0,3 L/phút.

Bản mô tả ở đây đưa ra thiết bị có lọc dòng tiếp tuyến sử dụng màng lọc rỗng (màng mPES Kros, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, California) và bơm màng ngăn 4 pittông hoặc bơm ly tâm.

Dược phẩm

Các hạt nano ARN được bao nang lipit được mô tả ở đây là hữu ích làm các thành phần trong dược phẩm. Các dược phẩm này thường gồm chất mang dược dụng ngoài các hạt nano ARN được bao nang lipit. Phần thảo luận xuyên suốt về chất mang dược dụng là có sẵn trong Available in Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472, được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Dược phẩm được mô tả ở đây có thể gồm các hạt nano lipit in nước tinh khiết (ví dụ nước để tiêm) hoặc trong dung dịch đệm, ví dụ, dung dịch đệm phosphat, dung dịch đệm Tris, dung dịch đệm borat, dung dịch đệm succinat, dung dịch đệm histidin, hoặc dung dịch đệm xitrat. Các muối đệm sẽ thường được gồm trong khoảng 5-20 mM.

Dược phẩm như được mô tả ở đây có thể có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 9,5, ví dụ, nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0.

Dược phẩm như được mô tả ở đây có thể gồm muối natri (ví dụ natri clorua) để tạo ra tính trung. Muối natri có thể là NaCl ở nồng độ 10 ± 2 mg/ml, ví dụ, khoảng 9 mg/ml.

Dược phẩm như được mô tả ở đây có thể gồm chất càn hóa ion kim loại. Các dược phẩm này có thể kéo dài độ ổn định ARN bằng cách loại ion có thể thúc đẩy quá trình thủy phân phosphodiester, ví dụ, một hoặc nhiều EDTA, EGTA, BAPTA, hoặc axit pentetic. Các chất càn hóa này tốt hơn là ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10-500 μ M, ví dụ, 0,1 mM. Muối xitrat, như natri xitrat, có thể cũng tác động như chất càn hóa, đồng thời cũng tạo ra hoạt tính đệm theo cách có lợi.

Dược phẩm như được mô tả ở đây tốt hơn là có độ thẩm thấu nằm trong khoảng từ 200 mOsm/kg đến 400 mOsm/kg, ví dụ, nằm trong khoảng 240-360 mOsm/kg, hoặc nằm trong khoảng 290-310 mOsm/kg.

Dược phẩm như được mô tả ở đây tốt hơn là gồm một hoặc nhiều chất bảo quản, như thiomersal hoặc 2-phenoxyetanol. Chế phẩm không chứa thủy ngân được ưu tiên nhất.

Dược phẩm như được mô tả ở đây tốt hơn là được vô trùng.

Dược phẩm như được mô tả ở đây tốt hơn là không tỏa nhiệt ví dụ chứa <1 EU (đơn vị ngoại độc tố, thước đo tiêu chuẩn) trên một liều, và tốt hơn là $<0,1$ EU trên một liều.

Dược phẩm như được mô tả ở đây tốt hơn là không chứa gluten.

Dược phẩm như được mô tả ở đây có thể được bào chế ở dạng liều đơn vị. Theo một số phương án liều đơn vị có thể có thể tích nằm trong khoảng từ 0,1-1,0 mL, ví dụ, khoảng 0,5 mL.

Dược phẩm có thể được bào chế ở dạng có thể tiêm, như dung dịch hoặc huyền phù. Dược phẩm có thể được bào chế để dùng cho phổi, ví dụ bằng cách máy xông, sử dụng dạng phun mịn. Dược phẩm có thể được bào chế để dùng cho mũi, tai hoặc mắt, ví dụ ở dạng phun hoặc giọt.

Dược phẩm bao gồm lượng hữu hiệu miễn dịch của các hạt nano lipid, cũng như các thành phần khác bất kỳ, nếu cần.

Dược phẩm như được mô tả ở đây cũng là thích hợp để dùng qua thiết bị phân phối, ví dụ, xi lanh, ống phun, máy phun, máy xông, hoặc miếng dán trên da, mà có thể được sử dụng để dùng dược phẩm cho đối tượng có xương sống.

Các hạt nano ARN được bao nang lipid như được mô tả ở đây không chứa ribosom.

Các định nghĩa

Các thuật ngữ “xấp xỉ” hoặc “khoảng” như được áp dụng với một hoặc nhiều giá trị quan tâm, để chỉ giá trị tương tự với giá trị tham chiếu được đề cập. Theo các phương án nhất định, thuật ngữ “xấp xỉ” hoặc “khoảng” để chỉ khoảng giá trị nằm trong $\pm 10\%$ giá trị được đề cập nếu không có chỉ dẫn khác hoặc chỉ dẫn hiển nhiên khác từ ngữ cảnh (ngoại trừ trong đó số này có thể vượt quá 100% giá trị khả dụng).

Các thuật ngữ “được liên kết với”, “được tạo tiếp hợp”, “được gắn kết”, “được gắn” và “được nối”, khi được sử dụng đối với hai hoặc nhiều gốc, có nghĩa là các gốc

được liên kết hoặc nối với nhau theo cách sinh lý, trực tiếp hoặc qua một hoặc nhiều gốc bổ sung mà đóng vai trò là tác nhân liên kết, để tạo ra cấu trúc là đủ ổn định sao cho các gốc được liên kết sinh lý trong các điều kiện trong đó cấu trúc này được sử dụng, ví dụ, các điều kiện sinh lý. “Sự liên kết” cần thiết không theo cách nghiêm ngặt qua gắn kết hóa học cộng hóa trị trực tiếp. Có thể cũng gợi ý gắn kết ion hoặc hydro hoặc tính kết nối trên cơ sở lai hóa đủ ổn định sao cho các thực thể “được liên kết” giữa được sự liên kết sinh lý.

Trong phần yêu cầu bảo hộ, các vật phẩm như “một” có thể có nghĩa một hoặc nhiều hơn nếu không chỉ ra theo cách đối lập hoặc chỉ dẫn hiển nhiên khác từ ngữ cảnh. Phần yêu cầu bảo hộ hoặc phần mô tả gồm “hoặc” nằm trong khoảng từ một hoặc nhiều thành phần của nhóm được coi là thỏa mãn nếu một, nhiều hơn một, hoặc tất cả các thành phần của nhóm có mặt trong, được dùng trong, hoặc theo cách khác liên quan tới sản phẩm hoặc quy trình nhất định nếu không được chỉ ra theo cách đối lập hoặc chỉ dẫn hiển nhiên khác từ ngữ cảnh. Phần bộc lộ gồm các phương án trong đó một cách chính xác một thành phần của nhóm có mặt trong, được dùng trong, hoặc theo cách khác liên quan tới sản phẩm hoặc quy trình nhất định. Phần bộc lộ gồm các phương án trong đó nhiều hơn một, hoặc tất cả các thành phần của nhóm có mặt trong, được dùng trong, hoặc theo cách khác liên quan tới sản phẩm hoặc quy trình nhất định.

Thuật ngữ “axyl”, như được sử dụng ở đây, là nhóm hydro hoặc alkyl (ví dụ, nhóm haloalkyl), như được định nghĩa ở đây, tức là được gắn với nhóm phân tử ban đầu thông qua nhóm carbonyl, như được định nghĩa ở đây, và được minh họa bởi formyl (tức là, nhóm carboxyaldehyt), axetyl, trifluoroaxetyl, propionyl, butanoyl và tương tự. Các nhóm axyl không được thể làm ví dụ gồm từ 1 đến 7, từ 1 đến 11, hoặc từ 1 đến 21 cacbon. Theo một số phương án, nhóm alkyl còn được thể bằng 1, 2, 3, hoặc 4 phân tử thể như được mô tả ở đây.

Thuật ngữ “alkenyl”, như được sử dụng ở đây, là nhóm mạch thẳng hoặc mạch nhánh hóa trị một, nếu không được chỉ ra theo cách khác, từ 2 đến 20 cacbon (ví dụ, từ 2 đến 6 hoặc từ 2 đến 10 cacbon) chứa một hoặc nhiều liên kết đôi cacbon-cacbon và được minh họa bởi etenyl, 1-propenyl, 2-propenyl, 2-metyl-1-propenyl, 1-butenyl, 2-butenyl, và tương tự. Alkenyl gồm cả chất đồng phân cis và trans. Các nhóm alkenyl có thể tùy ý được thể bằng 1, 2, 3, hoặc 4 nhóm thể được lựa chọn, một cách độc lập, từ

amino, aryl, xycloalkyl, hoặc heteroxyclyl (ví dụ, heteroaryl), như được định nghĩa ở đây, hoặc nhóm bất kỳ trong số các nhóm thế alkyl làm ví dụ được mô tả ở đây.

Thuật ngữ “alkoxy” là phân tử thế hóa học có Công thức —hoặc, trong đó R là nhóm C₁₋₂₀ alkyl (ví dụ, C₁₋₆ hoặc C₁₋₁₀ alkyl), nếu không được chỉ ra theo cách khác. Các nhóm alkoxy làm ví dụ gồm metoxy, etoxy, propoxy (ví dụ, n-propoxy và isopropoxy), t-butoxy, và tương tự. Theo một số phương án, nhóm alkyl có thể còn được thế bằng 1, 2, 3, hoặc 4 nhóm thế như được định nghĩa ở đây (ví dụ, hydroxy hoặc alkoxy).

Thuật ngữ “alkyl”, như được sử dụng ở đây, gồm cả hai nhóm bão hòa mạch thẳng và mạch nhánh từ 1 đến 20 cacbon (ví dụ, từ 1 đến 10 hoặc từ 1 đến 6), nếu không được chỉ ra theo cách khác. Các nhóm alkyl được lấy làm ví dụ là metyl, etyl, n- và isopropyl, n-, sec-, iso- và tert-butyl, neopentyl, và tương tự. Thuật ngữ “alkyl bậc thấp” có nghĩa là nhóm có một đến sáu cacbon trong mạch mà mạch này có thể mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Các ví dụ không giới hạn về các nhóm alkyl thích hợp gồm metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, t-butyl, n-pentyl, và hexyl.

Thuật ngữ “alkynyl” như được sử dụng ở đây, là nhóm mạch thẳng hoặc mạch nhánh hóa trị một từ 2 đến 20 nguyên tử cacbon (ví dụ, từ 2 đến 4, từ 2 đến 6, hoặc từ 2 đến 10 cacbon) chứa liên kết ba cacbon-cacbon và được minh họa bởi etynyl, 1-propynyl, và tương tự. Các nhóm alkynyl có thể tùy ý được thế bằng 1, 2, 3, hoặc 4 nhóm thế được chọn, một cách độc lập, từ aryl, xycloalkyl, hoặc heteroxyclyl (ví dụ, heteroaryl), như được định nghĩa ở đây, hoặc nhóm bất kỳ trong số các nhóm thế alkyl làm ví dụ được mô tả ở đây.

Thuật ngữ “lipit lưỡng tính” hoặc “lipit lưỡng ái” có nghĩa là nguyên liệu trong đó phân kị nước của nguyên liệu lipit hướng vào pha kị nước, đồng thời phần ưa nước định hướng ra ngoài pha nước. Các đặc tính ưa nước xuất phát từ sự có mặt của các nhóm phân cực hoặc mang điện tích như cacbohydrat, phosphat, carboxylic, sulfato, amino, sulfhydryl, nitro, hydroxyl, và các nhóm tương tự khác. Tính kị nước có thể được đem lại bởi thể vùi của các nhóm không phân cực gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm hydrocacbon béo không bão hòa và bão hòa mạch dài và các nhóm này được thế bởi một hoặc nhiều (các) nhóm thơm, béo vòng, hoặc dị vòng. Các ví dụ về các hợp

chất lưỡng tính gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phospholipit, aminolipit, và sphingolipit.

Thuật ngữ “lipit anion” có nghĩa là lipit được tích điện âm ở độ pH sinh lý. Các lipit này gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phosphatidylglycerol, cardiolipin, diaxylphosphatidylserins, axit diaxylphosphatidic, N-dodecanoyl phosphatidyletanolamin, N-succinyl phosphatidyletanolamin, N-glutarylphosphatidyletanolamin, lysylphosphatidylglycerol, palmitoyloleyolphosphatidylglycerol (POPG), và các nhóm cải biến anion khác được nối với các lipit trung hòa.

“Đôi nghĩa” là polynucleotit gây cản trở chức năng của ADN và/hoặc ARN. Điều này dẫn tới việc kìm hãm sự biểu hiện.

“Dung dịch nước” để chỉ chế phẩm bao gồm toàn bộ, hoặc một phần, nước.

Thuật ngữ “áp suất ngược” để chỉ tính kháng hoặc lực đối ngược với dòng chất lưu mong muốn thông qua ống dẫn, làm giảm ma sát và sụt áp lực. Chất lưu được hướng tới, có xu hướng chảy ra từ vùng áp suất cao và vào vùng áp suất thấp.

Thuật ngữ “bao gồm” được dự định theo nghĩa mở và cho phép nhưng không yêu cầu gồm cả các yếu tố hoặc bước bổ sung. Khi thuật ngữ “bao gồm” được sử dụng ở đây, thuật ngữ “cấu thành bởi” do đó cũng được bao hàm và bộc lộ.

Thuật ngữ “chế phẩm” có nghĩa là sản phẩm bao gồm các thành phần cụ thể với lượng cụ thể, cũng như sản phẩm bất kỳ mà tạo ra, một cách trực tiếp hoặc gián tiếp, từ việc kết hợp các thành phần cụ thể với lượng cụ thể.

Thuật ngữ “hóa chất có sẵn thương mại” và các hóa chất sử dụng trong các ví dụ được nêu ở đây có thể thu được từ các nguồn thương mại tiêu chuẩn, trong đó các nguồn này gồm, Ví dụ, Acros Organics (Pittsburgh, Pa.), Sigma-Adrich Chemical (Milwaukee, Wis.), Avocado Research (Lancashire, U.K.), Bionet (Cornwall, U.K.), Boron Molecular (Research Triangle Park, N.C.), Combi-Blocks (San Diego, Calif.), Eastman Organic Chemicals, Eastman Kodak Company (Rochester, N.Y.), Fisher Scientific Co. (Pittsburgh, Pa.), Frontier Scientific (Logan, Utah), ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa, Calif.), Lancaster Synthesis (Windham, N.H.), Maybridge Chemical Co. (Cornwall, U.K.), Pierce Chemical Co. (Rockford, Ill.), Riedel de Haen (Hannover,

Germany), Spectrum Quality Product, Inc. (New Brunswick, N.J.), TCI America (Portland, Oreg.), and Wako Chemicals USA, Inc. (Richmond, Va.).

Thuật ngữ “biểu hiện” của trình tự axit nucleic để chỉ một hoặc nhiều sự kiện sau: (1) tạo ra khuôn mẫu ARN từ trình tự ADN (ví dụ, by phiên mã); (2) xử lý sản phẩm phiên mã ARN (ví dụ, bằng cách ghép nối, thêm bớt, tạo 5' cap, và/hoặc xử lý đầu 3'); (3) dịch mã ARN thành polypeptit hoặc protein; và (4) cải biến sau dịch mã polypeptit hoặc protein.

“Được bao nang hoàn toàn” có nghĩa là ARN trong hạt axit nucleic-lipit không bị thoái biến đáng kể sau khi phơi nhiễm với huyết thanh hoặc thử nghiệm nucleaza có thể thoái biến đáng kể ARN tự do. Khi được bao nang hoàn toàn, tốt hơn là nhỏ hơn 25% axit nucleic trong hạt được thoái biến trong khi xử lý có thể thường làm thoái biến 100% axit nucleic tự do, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 10%, và tốt nhất là nhỏ hơn 5% axit nucleic trong hạt được thoái biến. “Được bao nang hoàn toàn” cũng có nghĩa là hạt axit nucleic-lipit không bị phân hủy nhanh chóng thành các thành phần của chúng khi dùng *in vivo*.

Trong ngữ cảnh của axit nucleic, quá trình bao nang hoàn toàn có thể được xác định bằng cách tiến hành thử nghiệm loại trừ nhuộm huỳnh quang không thấm màng, sử dụng thuốc nhuộm có tính phát huỳnh quang tăng cường khi được liên kết với axit nucleic. Bao nang được xác định bằng cách bổ sung thuốc nhuộm vào chế phẩm liposom, đo khả năng phát huỳnh quang thu được, và so sánh nó với khả năng phát huỳnh quang được quan sát khi bổ sung lượng nhỏ chất tẩy không ion. Việc phá vỡ qua trung gian chất tẩy của hai lớp liposom giải phóng axit nucleic được bao nang, cho phép nó tương tác với thuốc nhuộm không thể thấm màng. Quá trình bao nang axit nucleic có thể được tính toán là $E = (I_0 - I)/I_0$, trong đó I và I_0 để chỉ cường độ phát huỳnh quang trước và sau khi bổ sung chất tẩy.

“Gen” để chỉ trình tự axit nucleic (ví dụ, ADN) bao gồm trình tự mã hóa cần để tạo ra polypeptit hoặc tiền chất (ví dụ, virus hecpet đơn giản). Polypeptit có thể được mã hóa bởi trình tự mã hóa có chiều dài đầy đủ hoặc bởi phần bất kỳ của trình tự mã hóa với điều kiện hoạt tính mong muốn hoặc đặc tính chức năng (ví dụ, hoạt tính enzym, gắn kết phối tử, dẫn truyền tín hiệu, và tương tự) của polypeptit có chiều dài đầy đủ hoặc đoạn của chúng được giữ lại.

Thuật ngữ “lipit kỵ nước” có nghĩa là hợp chất có các nhóm không phân cực gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm hydrocacbon béo không bão hòa và bão hòa mạch dài và các nhóm này tùy ý được thế bởi một hoặc nhiều /(các) nhóm thơm, béo vòng, hoặc dị vòng. Các ví dụ thích hợp gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, diacylglycerol, dialkylglycerol, N,N-dialkylamino, 1,2-diacyloxy-3-aminopropan, và 1,2-dialkyl-3-aminopropan.

Lượng hoặc liều “hữu hiệu miễn dịch” là lượng hoặc liều đủ để tạo ra phản ứng miễn dịch ở đối tượng tại đó tính miễn dịch được thiết lập ở đối tượng. Tính miễn dịch có thể được đánh giá, ví dụ, bằng thử nghiệm chuẩn độ kháng thể để xác định xem có đủ kháng thể chống lại các bệnh lây nhiễm nhất định được phát hiện ở đối tượng hay không.

“Hình thái dạng tấm” đề chỉ cấu trúc hai lớp. Hình thái dạng tấm, cấu trúc hai lớp của các hạt lipit được bộc lộ ở đây có thể được xác định sử dụng các kỹ thuật phân tích, ví dụ, bằng các hình ảnh cryo-TEM.

Thuật ngữ “lipit” có nghĩa là hợp chất hữu cơ bao gồm este của axit béo và được đặc trưng bởi tính không hòa tan trong nước, mà hòa tan trong nhiều dung môi hữu cơ. Các lipit thường được chia thành ít nhất ba nhóm: (1) “lipit đơn giản”, gồm các chất béo và dầu cũng như sáp; (2) “lipit hợp phần”, gồm các phospholipit và glycolipit; và (3) “lipit được tạo dẫn xuất” như steroid.

Thuật ngữ “thể tiếp hợp lipit” có nghĩa là lipit được tạo tiếp hợp ức chế sự tích tụ của các hạt lipit. Các thể tiếp hợp lipit gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thể tiếp hợp PEG-lipit như, ví dụ, PEG được liên hợp với dialkyloxypropyl (ví dụ, thể tiếp hợp PEG-DAA), PEG được liên hợp với diacylglycerol (ví dụ, thể tiếp hợp PEG-DAG), PEG được liên hợp với cholesterol, PEG được liên hợp với phosphatidyletanolamin, và PEG được tiếp hợp với xeromit, lipit PEG cation, thể tiếp hợp polyoxazolin (POZ)-lipit, oligome polyamit, và các hỗn hợp của chúng. PEG hoặc POZ có thể được tiếp hợp trực tiếp với lipit hoặc có thể được liên kết với lipit qua gốc liên kết. Gốc liên kết bất kỳ thích hợp để liên hợp PEG hoặc POZ với lipit có thể được sử dụng gồm, ví dụ, các gốc liên kết không chứa este và các gốc liên kết chứa este. Theo các phương án được ưu tiên nhất định, các gốc liên kết không chứa este, như amit hoặc carbamat, được sử dụng.

Thuật ngữ “tá được phân phối lipit” có nghĩa là chế phẩm lipit có thể được sử dụng để phân phối axit nucleic điều trị (ví dụ, mARN) tới vị trí đích quan tâm (ví dụ, tế bào, mô, cơ quan, và tương tự). Tá được phân phối lipit có thể là hạt axit nucleic-lipit, mà có thể được tạo ra từ lipit cation, lipit không cation (ví dụ, phospholipit), lipit được tạo tiếp hợp mà ngăn cản sự tích tụ của hạt (ví dụ, PEG-lipit), và tùy ý cholesterol. Thông thường, axit nucleic điều trị (ví dụ, mARN) có thể được bao nang trong phần lipit của hạt, từ đó bảo vệ nó khỏi sự thoái biến enzym.

“Hạt nano lipit” là chế phẩm lipit bất kỳ mà có thể được sử dụng để phân phối hợp chất gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, liposom, mà bao gồm hai lớp lipit, như cấu trúc dạng đơn tấm hoặc đa tấm, trong đó ARN được bao nang ít nhất một phần bằng cách cặp đôi ion với các lipit cation. Khi hạt nano lipit là liposom, thì nó được xem là có phần nước bên trong. Các hạt nano lipit khác có phần bên trong rắn trong đó lớp lipit (mà có thể là hai lớp hoặc một lớp) được liên kết trực tiếp với nguyên liệu được bao nang (ví dụ, axit nucleic).

“Được bao nang lipit” có thể dùng để chỉ chế phẩm lipit tạo ra hợp chất bao nang hoàn toàn, bao nang một phần, hoặc cả hai, trong đó ARN (hoặc axit nucleic khác) không tham gia vào quá trình thủy phân qua trung gian RNaza hoặc xen vào thuốc nhuộm.

Thuật ngữ “ARN thông tin” (mARN) để chỉ polynucleotit bất kỳ mã hóa protein hoặc polypeptit quan tâm và which có khả năng được dịch mã để tạo ra protein hoặc polypeptit được mã hóa quan tâm in vitro, in vivo, tại chỗ (in situ) hoặc ex vivo.

Thuật ngữ “lipit trung hòa” có nghĩa là các loại lipit tồn tại ở dạng lưỡng tính không tích điện hoặc trung hòa lưỡng tính ở độ pH được chọn. Ở độ pH sinh lý, các lipit này gồm, ví dụ, diacylphosphatidylcholin, diacylphosphatidyletanolamin, xeromit, sphingomyelin, cephalin, cholesterol, cerebrosit, và diacylglycerol.

Thuật ngữ “lipit không cation” có nghĩa là lipit lưỡng tính, lipit trung hòa hoặc lipit anion như được mô tả ở đây.

Thuật ngữ “axit nucleic” có nghĩa là deoxyribonucleotit hoặc ribonucleotit và polyme của chúng ở dạng sợi đơn hoặc sợi kép. Thuật ngữ này bao hàm các axit nucleic chứa các chất tương tự nucleotit đã biết hoặc các gốc hoặc các liên kết thuộc bộ khung đã được cải biến, mà được tổng hợp, xuất hiện trong tự nhiên, và không xuất hiện trong

tự nhiên, có các đặc tính gắn kết tương tự như axit nucleic tham chiếu, và được chuyển hóa theo cách tương tự nucleotit tham chiếu. Ví dụ về các chất tương tự như vậy bao gồm, mà không giới hạn ở, phosphorothioat, phosphoramidat, metyl phosphonat, metyl phosphorat không đối xứng, 2-O-metyl ribonucleotit, axit peptit-nucleic (PNA).

Thuật ngữ “nucleotit” có nghĩa để gồm các nucleotit có các bazơ tự nhiên (tiêu chuẩn) hoặc các bazơ được cải biến được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Nhìn chung, các bazơ này được nằm ở vị trí 1' của gốc đường nucleotit. Nhìn chung, các nucleotit bao gồm bazơ, đường, và nhóm phosphat. Các nucleotit có thể không được cải biến hoặc được cải biến ở gốc đường, phosphat, và/hoặc bazơ, (cũng để chỉ sự thay thế cho nhau như các chất tương đồng nucleotit, các nucleotit được cải biến, các nucleotit không có trong tự nhiên, các nucleotit không tiêu chuẩn và các nucleotit khác; Xem, Ví dụ, Usman and McSwiggen, *supra*; Eckstein, et al., Công bố đơn quốc tế số WO 92/07065; Usman, et al., Công bố đơn quốc tế số WO 93/15187; Uhlman & Peyman, *supra*, tất cả chúng được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn). Có một số ví dụ về bazơ axit nucleic được cải biến được biết trong lĩnh vực kỹ thuật như được tóm tắt bởi Limbach, et al, *Nucleic Acids Res.* 22:2183, 1994. Một vài ví dụ không giới hạn về các cải biến bazơ mà có thể được đưa vào các phân tử axit nucleic gồm: inosin, purin, pyridin-4-on, pyridin-2-on, phenyl, pseudouraxin, 2,4,6-trimethoxy benzen, 3-metyl uraxin, dihydrouridin, naphthyl, aminophenyl, 5-alkylxytidin (ví dụ, 5-metylxytidin), 5-alkyluridin (ví dụ, ribothymidin), 5-halouridin (ví dụ, 5-bromouridin) hoặc 6-azapyrimidin hoặc 6-alkylpyrimidin (ví dụ, 6-metyluridin), propyn, và các cải biến khác (Burgin, et al., *Biochemistry* 35:14090, 1996; Uhlman & Peyman, *supra*). “Các bazơ được cải biến” theo khía cạnh này có nghĩa là bazơ nucleotit không phải adenin, guanin, xytosin, và uraxin ở vị trí 1' hoặc các dạng tương đương của chúng.

“Dung dịch lipid hữu cơ” để chỉ chế phẩm bao gồm toàn bộ, hoặc một phần, dung môi hữu cơ có lipid. Dung dịch lipid hữu cơ tốt hơn là bao gồm alkanol, tốt nhất là etanol.

Thuật ngữ “dược dụng” được dùng ở đây để chỉ các hợp chất, nguyên liệu, chế phẩm, và/hoặc các dạng liều mà, trong phạm vi của quy định y tế hợp lý, là thích hợp để dùng tiếp xúc với mô người và động vật mà không gây độc hại, kích ứng, phản ứng

dị ứng quá mức hoặc không gây ra vấn đề hoặc biến chứng khác, và tương xứng với tỷ lệ lợi ích/nguy cơ hợp lý.

Cụm từ “tá dược được dụng” như được sử dụng ở đây, để chỉ thành phần bất kỳ không phải là các hợp chất được mô tả ở đây (ví dụ, tá dược có thể tạo huyền phù hoặc hòa tan hoạt chất) và có các đặc tính không gây độc và không gây viêm đáng kể ở bệnh nhân. các tá dược có thể gồm, Ví dụ: chất chống bám dính, chất chống oxy hóa, chất gắn kết, chất bao, chất trợ nén, chất rã, thuốc nhuộm (chất màu), chất làm dịu, chất nhũ hóa, chất độn (chất pha loãng), chất tạo màng hoặc chất bao, chất tạo hương, chất tạo hương thơm, chất chảy (chất làm tăng độ chảy), chất trơn, chất bảo quản, mực in, chất hấp thụ, tác nhân tạo huyền phù hoặc phân tán, chất tạo ngọt, và nước của quá trình hydrat hóa. Các tá dược làm ví dụ gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: hydroxytoluen được butyl hóa (butylated hydroxytoluene - BHT), canxi cacbonat, canxi phosphat (dibazơ), canxi stearat, croscarmelloza, polyvinyl pyrrolidon được liên kết ngang, axit xitric, crospovidon, xystein, etylxenluloza, gelatin, hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza, lactoza, magie stearat, maltitol, mannitol, methionine, metylxenluloza, metyl paraben, xenluloza vi tinh thể, polyetylen glycol, polyvinyl pyrrolidon, povidon, tinh bột được gelatin hóa sơ bộ, propyl paraben, retinyl palmitat, sen-lắc, silic dioxit, natri carboxymetyl xenluloza, natri xitrat, tinh bột natri glycolat, sorbitol, tinh bột (ngô), axit stearic, sucroza, talc, titan dioxit, vitamin A, vitamin E, vitamin C, và xylitol.

Cụm từ “muối được dụng” để chỉ các dẫn xuất của các hợp chất được bộc lộ trong đó hợp chất gốc được cải biến bằng cách chuyển hóa gốc axit hoặc bazơ có sẵn thành dạng muối của nó (ví dụ, bằng cách cho nhóm bazơ tự do với axit hữu cơ thích hợp). Ví dụ về các muối được dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các muối axit vô cơ hoặc hữu cơ của các gốc bazơ như các amin; các muối kiềm hoặc hữu cơ của các gốc axit như các axit carboxylic; và muối tương tự. Các muối cộng axit đại diện gồm các muối axetat, adipat, alginat, ascorbat, aspartat, benzensulfonat, benzoat, bisulfat, borat, butyrat, camphorat, camphorsulfonat, xitrat, xyclopentanepropionat, digluconat, dodexylsulfat, etansulfonat, fumarat, glucoheptonat, glyxerophosphat, hemisulfat, heptonat, hexanoat, hydrobromua, hydroclorua, hydroiodua, 2-hydroxy-etansulfonat, lactobionat, lactat, laurat, lauryl sulfat, malat, maleat, malonat,

metansulfonat, 2-naphthalenesulfonat, nicotinat, nitrate, oleat, oxalat, palmitat, pamoat, pectinat, persulfat, 3-phenylpropionat, phosphat, picrat, pivalat, propionat, stearat, succinat, sulfat, tartrat, thioxyanat, toluensulfonat, undecanoat, valerat, và các muối tương tự. Các muối kim loại kiềm hoặc kiềm thổ đại diện natri, lithi, kali, canxi, magie, và tương tự, cũng như amoni không độc, amoni bậc bốn, và cation amin, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở amoni, tetrametylamoni, tetraetylamoni, metylamin, dimetylamini, trimetylamini, trietylamini, etylamin, và tương tự. Các muối được dùng theo sáng chế gồm các muối không độc thông thường của hợp chất gốc được tạo ra, ví dụ, từ axit vô cơ hoặc hữu cơ không độc. Các muối được dùng theo sáng chế có thể được tổng hợp từ hợp chất gốc mà nó chứa phần bazơ hoặc axit bằng các phương pháp hóa học thông thường. Nhìn chung, các muối như vậy có thể được điều chế bằng cách cho các dạng axit hoặc bazơ tự do của các hợp chất này phản ứng với lượng tỷ lệ của bazơ hoặc axit thích hợp trong nước hoặc trong dung môi hữu cơ, hoặc trong hỗn hợp chứa hai chất này; nhìn chung, môi trường không trong nước như ete, etyl axetat, etanol, isopropanol, hoặc axetonitril được ưu tiên. Danh sách các muối thích hợp được tìm thấy trong Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, và Use, P. H. Stahl và C. G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, và Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977), mỗi tài liệu này được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

“Axit ribonucleic” hoặc “ARN” để chỉ polyme chứa ít nhất hai ribonucleotit. “Ribonucleotit” chứa riboza đường, bazơ, và nhóm phosphat. Các nucleotit được liên kết với nhau qua các nhóm phosphat. “Các bazơ” gồm purin và pyrimidin, mà còn gồm các hợp chất tự nhiên adenin, thymine, guanin, xytosin, uraxin, inosin, và chất tương đồng tự nhiên, và các dẫn xuất tổng hợp của purin và pyrimidin, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các cải biến nằm ở các nhóm hoạt tính mới như, nhưng không chỉ giới hạn ở, amin, rượu, thiol, carboxylat, và alkyl halua.

ARN có thể ở dạng ARN oligonucleotit, tARN (ARN chuyên), snARN (ARN nhân nhỏ), rARN (ARN ribosom), mARN (ARN thông tin), ARN đối nghĩa, siARN (ARN cản trở nhỏ), ARN tự sao chép, ribozym, trình tự khảm, hoặc các dẫn xuất của các nhóm này. ARN có thể gồm (ngoài cấu trúc 5' cap bất kỳ) một hoặc nhiều nucleotit

có nucleobazơ được cải biến, gồm m5C (5-metylxytidin), m5U (5-metyluridin), m6A (N6-metyladenosin), s2U (2-thiouridin), Um (2' -O-metyluridin), m1A (1-metyladenosin); m2A (2-metyladenosin); Am (2' -O-metyladenosin); ms2m6A (2-metylthio-N6-metyladenosin); i6A (N6-isopentenyladenosin); ms2i6A (2-metylthio-N6isopentenyladenosin); io6A (N6-(cis-hydroxyisopentenyl)adenosin); ms2io6A (2-metylthio-N6-(cis-hydroxyisopentenyl) adenosin); g6A (N6-glyxinylcarbamoyladenosin); t6A (N6-threonyl carbamoyladenosin); ms2t6A (2-metylthio-N6-threonyl carbamoyladenosin); m6t6A (N6-metyl-N6-threonylcarbamoyladenosin); hn6A(N6.-hydroxynorvalylcarbamoyl adenosin); ms2hn6A (2-metylthio-N6-hydroxynorvalyl carbamoyladenosin); Ar(p) (2' -O-ribosyladenosin (phosphat)); I (inosin); m1I (1-metylinosin); m' Im (1,2' -O-dimetylinosin); m3C (3-metylxytidin); Cm (2T-O-metylxytidin); s2C (2-thioxytidin); ac4C (N4-axetylxytidin); f5C (5-fonnylxytidin); m5Cm (5,2-O-dimetylxytidin); ac4Cm (N4axetyl2TOMetylxytidin); k2C (lysidin); m1G (1-metylguanosin); m2G (N2-metylguanosin); m7G (7-metylguanosin); Gm (2' -O-metylguanosin); m22G (N2,N2-dimetylguanosin); m2Gm (N2,2' -O-dimetylguanosin); m22Gm (N2,N2,2' -O-trimetylguanosin); Gr(p) (2' -O-ribosylguanosin (phosphat)); yW (wybutosin); o2yW (peroxywybutosin); OHyW (hydroxywybutosin); OHyW* (undermodified hydroxywybutosin); imG (wyosine); mimG (metylguanosin); Q (queuosin); oQ (epoxyqueuosin); galQ (galtactosyl-queuosin); manQ (mannosyl-queuosin); preQo (7-xyano-7-deazaguanosin); preQi (7-aminometyl-7-deazaguanosin); G* (archaeosin); D (dihydrouridin); m5Um (5,2' -O-dimetyluridin); s4U (4-thiouridin); m5s2U (5-metyl-2-thiouridin); s2Um (2-thio-2' -O-metyluridin); acp3U (3-(3-amino-3-carboxypropyl)uridin); ho5U (5-hydroxyuridin); mo5U (5-metoxxyuridin); cmo5U (axit uridin 5-oxyaxetic); mcmo5U (metyl este của axit uridin 5-oxyaxetic); chm5U (5-(carboxyhydroxymetyl)uridin); mchm5U (5-(carboxyhydroxymetyl)uridin metyl este); mcm5U (5-metoxycarbonyl metyluridin); mcm5Um (S-metoxycarbonylmetyl-2-O-metyluridin); mcm5s2U (5-metoxycarbonylmetyl-2-thiouridin); nm5s2U (5-aminometyl-2-thiouridin); mnm5U (5-metylaminometyluridin); mnm5s2U (5-metylaminometyl-2-thiouridin); mnm5se2U (5-metylaminometyl-2-selenouridin);

ncm5U (5-carbamoylmethyl uridin); ncm5Um (5-carbamoylmethyl-2' -O-methyluridin); cmnm5U (5-carboxymethylaminomethyluridin); cnmm5Um (5-carboxymethylaminomethyl-2-L-O-methyluridin); cmnm5s2U (5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin); m62A (N6,N6-dimethyladenosin); Tm (2' -O-metylinosin); m4C (N4-metylxytidin); m4Cm (N4,2-O-dimetylxytidin); hm5C (5-hydroxymetylxytidin); m3U (3-metyluridin); cm5U (5-carboxymetyluridin); m6Am (N6,T-O-dimethyladenosin); rn62Am (N6,N6,O-2-trimethyladenosin); m2' 7G (N2,7-dimethylguanosin); m2' 2' 7G (N2,N2,7-trimethylguanosin); m3Um (3,2T-O-dimetyluridin); m5D (5-metyldihydrouridin); f5Cm (5-formyl-2' -O-metylxytidin); m1Gm (1,2' -O-dimethylguanosin); m' Am (1,2-O-dimethyl adenosin) irinometyluridin); tm5s2U (S-taurinometyl-2-thiouridin)); imG-14 (4-demetyl guanosin); imG2 (isoguanosin); hoặc ac6A (N6-axetyladenosin), hypoxanthin, inosin, 8-oxo-adenin, các dẫn xuất được thế vị trí 7 của chúng, dihydrouraxin, pseudouraxin, 2-thiouraxin, 4-thiouraxin, 5-aminouraxin, 5-(C1-C6)-alkyluraxin, 5-metyluraxin, 5-(C2-C6)-alkenyluraxin, 5-(C2-C6)-alkynyluraxin, 5-(hydroxymetyl)uraxin, 5-clouraxin, 5-flouraxin, 5-bromouraxin, 5-hydroxyxytosin, 5-(C1-C6)-alkylxytosin, 5-metylxytosin, 5-(C2-C6)-alkenylxytosin, 5-(C2-C6)-alkynylxytosin, 5-chloroxytosin, 5-floxytosin, 5-bromoxytosin, N2-dimethylguanin, 7-deazaguanin, 8-azaguanin, guanin được thế ở 7-deaza-7, 7-deaza-7-(C2-C6)alkynylguanin, guanin được thế ở 7-deaza-8, 8-hydroxyguanin, 6-thioguanin, 8-oxoguanin, 2-aminopurin, 2-amino-6-chloropurin, 2,4-diaminopurin, 2,6-diaminopurin, 8-azapurin, 7-deazapurin được thế, purin được thế ở 7-deaza-7, purin được thế ở 7-deaza-8, hoặc nucleotit mất một bazơ.

ARN có thể bao gồm một hoặc nhiều phân tử UNA, ví dụ, như được bộc lộ trong Patent Mỹ số 8,314,227, 9,051,570, 9,303,260, 9,297,009, và 9,340,789, và Công bố Sáng chế Mỹ số 2016/0168567, được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

ARN hoặc ARN tự sao chép can gồm một hoặc nhiều pyrimidin nucleobazơ được cải biến, như các gốc pseudouridin và/hoặc 5-metylxytosin.

“ARN tự sao chép” để chỉ các ARN mà có thể, khi được giải phóng vào tế bào từ động vật có vú ngay cả khi không có protein bất kỳ, sẽ làm sản sinh nhiều ARN con bằng cách tự phiên mã (bằng bản sao đối nghĩa tự tạo ra). Phân tử ARN tự sao chép

thường là phân tử sợi dương có thể được dịch mã trực tiếp khi giải phóng vào tế bào, và sự dịch mã này tạo ra ARN polymeaza phụ thuộc ARN mà sau đó tạo ra cả các sản phẩm phiên mã đối nghĩa và có nghĩa của ARN được giải phóng. Các ARN con, cũng như các sản phẩm phiên mã cận bộ gen cộng tuyến, có thể được tự dịch mã để biểu hiện tại chỗ protein đã mã hóa (ví dụ, và kháng nguyên hoặc chất kháng nguyên), hoặc chúng có thể được phiên mã để tạo ra các sản phẩm phiên mã bổ sung với nghĩa tương tự khi ARN được giải phóng mà được dịch mã để tạo ra sự biểu hiện protein tại vị trí. Toàn bộ kết quả của trình tự phiên mã này là sự khuếch đại lớn về số lượng các đơn vị sao chép ARN đã được đưa vào và theo cách này protein đã mã hóa trở thành sản phẩm chính của các tế bào được chuyển nhiễm. Các ví dụ về ARN tự sao chép được mô tả trong WO 2012/006369 và US 2018/0104359, nội dung của chúng được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

“Sự chảy rối” được định nghĩa ở đây về mặt hình thái của khu vực trộn, và tốc độ chảy của dung dịch nước bao gồm ARN và dung dịch etanol bao gồm hỗn hợp lipid. Trong khi trộn số Reynolds ít nhất là 2000, trong đó số Reynolds Re được xác định là

$$Re = DV\rho/\mu$$

trong đó: ρ là mật độ dung dịch bao gồm 0 đến 25% etanol trong nước (g/cm^3), V là vận tốc của dung dịch liên quan đến ống ($\text{cm}/\text{giây}$), D là ID của ống (cm), μ là vận tốc động học của dung dịch ($\text{g}/(\text{cm}\cdot\text{giây})$). Tilton, *Fluid and Particle Dynamics*, PERRY'S CHEMICAL ENGINEERS' HANDBOOK (Green ed., 8th ed. 2008) (được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn) ở trang 6-51. Việc dịch chuyển dòng chảy rối xuất hiện với số Reynolds Re nằm trong khoảng từ 2000 đến 2500 (Tilton ở 6-14). Ví dụ, ở 300 ml/phút tốc độ chảy trong ống có ID=0,132" (0,335 cm), Re là 2.100 ($D=0,30$ cm, $V=70$ cm/giây, $\rho=96$ g/cm^3 , và $\mu=0,01$ gm/ (cm giây) (Poling, *Physical and Chemical Data*, in PERRY'S, ở 2-117 và 2-448, tương ứng). Xem xét profin vận tốc của ống quan tâm, vận tốc đường trung tâm v là hàm của vị trí bán kính r trong đường ống tròn có bán kính R ($D/2$) được xác định là

$$v=2V(1-r^2/R^2)$$

trong đó vận tốc tối đa gấp hai lần vận tốc hữu hiệu đối với profin parabol (Tilton, ở 6-11). Ví dụ, với tốc độ chảy 300 ml/phút, số Reynolds ở tâm của ống là 4.200. Đối với

lý do này, có thể xác định tốc độ chảy trong đó sự chảy rôi được tạo ra ít nhất ở tâm của ống, và tới mức đáng kể hướng tới các thành.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Hiệu quả của tốc độ chảy đối với cỡ hạt

Bể chứa chứa siARN ở nồng độ 0,55 mg/mL và bể chứa khác với lipit toàn phần ở nồng độ 49,4 mg/mL được điều chế, như được thể hiện trên FIG. 1.

Chế phẩm lipit được chế hóa trong khoảng lipit cation:DSPC:Cholesterol:PEG-DMG, 48-60:5-10:28-38:0,5-3,0 % mol. Tỷ lệ của lipit toàn phần và ARN là 25:1 đến 30:1, khối lượng:khối lượng.

Dung dịch lipit được bơm từ bể chứa qua mô đun trộn bằng cách bơm HPLC qua ống có đầu vào lipit 0,01" (0,0254 cm) ở tốc độ chảy từ 25 đến 87,5 ml/phút. Dung dịch siARN được bơm từ bể chứa qua mô đun bằng bơm HPLC qua ống có đầu ra siARN 0,132" (0,335 cm). Tốc độ chảy của siARN lớn hơn gấp ba lần tốc độ chảy của lipit, và đầu ra của trộn là dung dịch 25% EtOH. Dung dịch ra còn được pha loãng trong dung dịch đệm, và ARN tự do và etanol được loại bỏ bằng cách lọc dòng tiếp tuyến (TFF). Các hình từ Fig. 1, 4, và 5 được thể hiện bằng sơ đồ toàn bộ quy trình với FIG. 1 thể hiện các bước tạo ra, FIG. 4 thể hiện sơ đồ thiết bị, và FIG. 5 đưa ra các minh họa mô đun trộn theo sáng chế.

Các đặc tính khác nhau của các hạt nano ARN được bao nang lipit được đo, gồm cỡ hạt trung bình (nm), chỉ số đa phân tán (PDI), và tỷ lệ bao nang. Hiệu suất tạo thành là >80% đối với tất cả các điều kiện được thử nghiệm. Các kết quả này được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2: Thay đổi tốc độ chảy trong quá trình trộn

Tốc độ chảy, ml//phút			Cỡ hạt trung bình (nm)	PDI	% được bao nang	Hiệu suất (%)	Tỷ lệ ARN và lipit (khối lượng/khối lượng)
Lipit	siARN	Tổng cộng					

25	75	100	106,9	0,09	99,1	76	0,03
50	150	200	75,7	0,08	99,4	82	0,03
75	225	300	71,2	0,07	99,3	85	0,03
87,5	262,5	350	66,4	0,08	98,7	80	0,03

Các kết quả đã chỉ ra rằng việc tăng tốc độ chảy của lipit và ARN sẽ làm giảm cỡ hạt trung bình đồng thời duy trì PDI ở $<0,1$, và tỷ lệ bao nang ở khoảng 99%.

Ví dụ 2: Quy mô xử lý và khả năng tái sản xuất

Các điều kiện của Ví dụ 1 được dùng bằng cách sử dụng tốc độ chảy kết hợp 300 ml/phút đối với thể tích mẻ từ 1 lít đến 220 lít. Các kết quả này được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3: Quy mô và khả năng tái sản xuất của các đặc tính hóa sinh lý

Thể tích mẻ (L)	Cỡ hạt trung bình (nm)	PDI	% siARN được bao nang	Tỷ lệ ARN/lipit (khối lượng/khối lượng)
1,8	75,4	0,07	96,9	0,03
3,5	73,6	0,04	98,7	0,03
7,3	73,7	0,04	99,1	0,03
22	76,1	0,04	99,1	0,03
110	76,0	0,06	99,0	0,03
220	76,0	0,06	99,0	0,03
220	75,3	0,05	99,0	0,03
220	75,0	0,04	99,0	0,03

Các kết quả chứng tỏ rằng quy trình được bộc lộ ở đây sử dụng sự chảy rôi có thể được mở rộng quy mô từ 1,8 lít đến 220 lít. Các đặc tính hóa sinh lý và sinh học quan trọng không thay đổi trong quá trình mở rộng quy mô. Fig. 7 đưa ra ảnh chụp kính hiển vi cryo-TEM (kính hiển vi điện tử truyền qua) mà chỉ ra rằng các hạt đã được tạo ra có kích cỡ đồng nhất ở mẻ 220 L, với hình thái học dạng đơn tấm.

Khả năng mở rộng của quy trình được bộc lộ ở đây được đo sử dụng các điều kiện được bộc lộ trong Ví dụ 1 bằng cách thay đổi lượng ARN được xử lý từ 0,05 đến 30 gam với tốc độ chảy 300 ml/phút, và đo cỡ hạt, PDI và % bao nang. Kết quả được thể hiện trên các FIG. 6A. Các kết quả chứng tỏ rằng kích cỡ của các hạt giữ trong khoảng từ 70 đến 80 nm với quy mô tăng từ 0,5 gam đến 30 gam.

Khả năng tái sản xuất của quy trình được đo bằng cách điều chế một số mẻ 30 g hạt nano lipid ARN một cách độc lập. Kết quả được thể hiện trên các FIG. 6B. Các kết quả chứng minh khả năng tái sản xuất bên trong mẻ, trong đó cỡ hạt 70-80 nm thu được.

Hiệu suất tạo thành cuối là >80% qua tất cả các quy mô từ 1,8-220 L.

Hiệu quả của các hạt tạo ra ở các mẻ 220 L bởi quy trình được bộc lộ ở đây bằng cách tiêm tĩnh mạch vào tĩnh mạch đuôi chuột Balb/c. Các kết quả này được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4

Quy trình	Liều 15 mg/kg	Liều 20 mg/kg
sự chảy rôi	dung nạp tốt	dung nạp tốt

Các kết quả chỉ ra rằng các hạt nano ARN được bao nang lipid được sản xuất bằng cách dòng chảy rôi được dung nạp với liều lên đến ít nhất 20 mg/kg.

Ví dụ 3: Hiệu quả của việc thay đổi nồng độ siARN

Phương pháp của Ví dụ 1 được sử dụng với tốc độ chảy lipid 75 ml/phút, siARN tốc độ chảy 225 ml/phút và tổng tốc độ chảy, 300 ml/phút. Nồng độ trong quá trình xử lý của siARN trước khi pha loãng được thay đổi từ 0,083 mg/ml đến 0,41 mg/ml, và

nồng độ của lipid được tăng theo tỷ lệ để duy trì tỷ lệ ARN:lipid. Các kết quả này được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5: Thay đổi nồng độ trong quá trình xử lý khi trộn

Số mẻ	Nồng độ siARN (mg/ml)	Nồng độ lipid toàn phần (ug/ml)	Cỡ hạt trung bình (nm)	PDI	% được bao nang	Tỷ lệ ARN/lipid (khối lượng/khối lượng)
5	0,41	12,22	70,3	0,08	96,8	0,03
6	0,33	9,84	67,9	0,08	98,3	0,03
7	0,25	7,46	67,1	0,09	97,8	0,03
8	0,17	5,07	68,1	0,10	97,0	0,03
9	0,083	2,48	68,2	0,10	97,3	0,03

Các kết quả đã chỉ ra rằng nồng độ trong quá trình xử lý ARN có thể thay đổi mà không làm thay đổi cỡ hạt hoặc tỷ lệ của ARN được bao nang.

Ví dụ 4: Hiệu quả của cỡ môđun

Các điều kiện của Ví dụ 1 được tiến hành sử dụng tỷ lệ ARN:lipid là 0,03, khối lượng:khối lượng. Hiệu quả của việc thay đổi đường kính đầu ra môđun được đo bằng cách thay đổi tốc độ chảy từ 40 đến 600 ml/phút, tổng số, như được thể hiện bằng các kết quả trong Bảng 6. Áp suất vào được kiểm soát, và kích cỡ PDI và tỷ lệ bao nang của các hạt ARN đã được bao nang thu được được đo.

Bảng 6: Thay đổi đường kính vào môđun

Số mẻ	ID vào (inch)		Áp suất vào (psi)		Tốc độ chảy (ml/phút)			Cỡ hạt trung bình (nm)	PDI	% được bao nang	Tỷ lệ ARN/lipid (khối lượng/khối lượng)
	Lipit	siARN	Lipit	siARN	Lipit	siARN	Tổng cộng				
10	0,005	0,132	209	0	10	30	40	131	0,09	98,1	0,03
11			386	0	15	45	60	94,07	0,14	98,5	0,03

12			622	0	20	60	80	70,83	0,10	98,2	0,03
13			172	0	25	75	100	97,74	0,12	98,6	0,03
14	0,007		244	3	30	90	120	84,88	0,14	98,6	0,03
15			439	8	35	105	140	72,62	0,12	98,5	0,03
16			617	14	40	120	160	64,28	0,09	97,7	0,03
17			5	0	25	75	100	106,9	0,09	99,1	0,03
18	0,01		96	27	50	150	200	75,7	0,08	99,4	0,03
19			343	75	75	225	300	69,06	0,11	98,0	0,03
20			477	101	87,5	262,5	350	66,38	0,08	98,7	0,03
21			0	100	75	225	300	135,6	0,08	98,8	0,03
22	0,02		2	170	100	300	400	119,6	0,12	98,2	0,03
23			56	345	150	450	600	100,4	0,16	98,6	0,03
24		0,1	186	0	10	30	40	136,8	0,11	98,0	0,03
25	0,005		350	0	15	45	60	104,6	0,16	98,1	0,03
26			566	0	20	60	80	81,24	0,13	97,5	0,03

Các kết quả chỉ ra rằng khi không thay đổi chế phẩm, mà chỉ thay đổi ID của đầu vào lipid và/hoặc siARN của môđun trộn có thể tạo ra các kích cỡ hạt nano khác nhau với $\geq 99\%$ hiệu quả bao nang và $\geq 80\%$ hiệu suất.

Ví dụ 5: Tạo ra các hạt nano ARN được bao nang lipid chứa mARN hoặc ARN tự sao chép

Các điều kiện của Ví dụ 1 được tiến hành sử dụng môđun với đầu ra lipid 0,01" (0,0254 cm) và đầu ra siARN 0,132" (0,33528 cm), tốc độ chảy lipid 75 ml/phút, tốc độ chảy mARN 225 ml/phút, tổng tốc độ chảy, 300 ml/phút. mARN sợi đơn được sử dụng có kích cỡ thay đổi từ 265 kDa đến 3.858 kDa ARN, giữ được tỷ lệ ARN/lipid toàn phần (khối lượng/khối lượng) từ 0,025 đến 0,035. ARN đã được sử dụng là mARN hoặc ARN tự sao chép, chứa vùng đơn vị sao chép.

Bảng 7: Thay đổi kích cỡ axit nucleic (mARN)

Số mê	mARN MW Da	Chiều dài mARN (số lượng các nucleotit)	Cỡ hạt trung bình (nm)	PDI	% được bao nang	Tỷ lệ ARN/lipit (khối lượng/khối lượng)
27	265.213	827	73,3	0,09	95,2	0,03
28	677.000	2.082	73,0	0,08	94,2	0,03
29	1.389.000	4.269	73,0	0,06	95,0	0,03
30	1.782.362	5.489	82,1	0,08	96,1	0,03
31	3.857.750	11.870	93,4	0,20	96,5	0,03

Các kết quả được chỉ ra trong Bảng 7 thể hiện rằng mARN lên đến khoảng 0,8 đến 12 kilobazơ (kb) có thể được đóng gói với khoảng 95-97% bao nang sử dụng quy trình được mô tả ở đây. Kích cỡ của các hạt thu được chỉ tăng ở chiều dài mARN lớn hơn 5,5 kb.

Ví dụ 6: Tạo ra các hạt nano ARN được bao nang lipid chứa mARN hoặc ARN tự sao chép

Các điều kiện của Ví dụ 1 được tiến hành sử dụng mô đun với đầu ra lipid 0,01" (0,0254 cm) và đầu ra siARN 0,132" (0,33528 cm), tốc độ dòng lipid 75 ml/phút, tốc độ dòng mARN 225 ml/phút, tổng tốc độ dòng, 300 ml/phút. mARN sợi đơn được sử dụng có kích cỡ thay đổi từ 265 kDa đến 3.858 kDa ARN, giữ được tỷ lệ ARN/lipit toàn phần (khối lượng/khối lượng) từ 0,025 đến 0,035. ARN đã được sử dụng là mARN hoặc ARN tự sao chép, chứa vùng đơn vị sao chép.

Ví dụ 6: Hoạt tính sinh học của các hạt nano được bao nang lipid *in vivo*

Các hạt nano ARN được bao nang lipid chứa EPO mARN hoặc FVII siARN được chế hóa sử dụng quy trình được mô tả ở đây, sau đó tiêm lần lượt vào chuột Balb/c (6-8 tuần tuổi). Nồng độ của protein Erythropoietin (EPO) protein và protein FVII trong huyết thanh hoặc huyết tương chuột được đánh giá sau khi xác định hoạt tính sinh học của các hạt nano này.

Bằng cách sử dụng quá trình sàng lọc thư viện lipid *in vivo* hướng tới gan, đây các hợp chất được thử nghiệm về nồng độ cao có lợi của siARN qua trung gian gen không có trong tế bào gan, các tế bào này bao gồm nhu mô gan. Yếu tố VII, yếu tố đông

máu, là gen đích thích hợp để thử nghiệm sự phân phối siARN tới gan. Do yếu tố này được sản sinh đặc hiệu trong tế bào gan, nên sự không có mặt gen đã chỉ ra sự phân phối thành công tới nhu mô, đối lập với sự phân phối tới các tế bào của hệ thống tế bào lưới-màng trong (ví dụ, tế bào Kupffer). Hơn nữa, Yếu tố VII là protein tiết có thể được đo dễ dàng trong huyết thanh, ngăn cản nhu cầu chết nhẹ nhàng của động vật. Sự không có mặt ở mức mARN có thể được xác định dễ dàng bằng cách đo nồng độ của protein. Điều này là do thời gian bán thải của protein ngắn (2–5 giờ). Các chế phẩm với siARN hướng tới Yếu tố VII được chế hóa. Chuột C57BL/6 cái (6-8 tuần tuổi) được sử dụng cho các thử nghiệm phá vỡ (knockdown - KD) FVII siARN.

Quy trình của Ví dụ 1 được tiến hành. Hoạt tính sinh học *in vivo* ở chuột được đo như được mô tả trên đây. Các kết quả này được thể hiện trong bảng 8.

Bảng 8: Kết quả *in vivo* đối với các hạt nano ARN được bao nang lipid

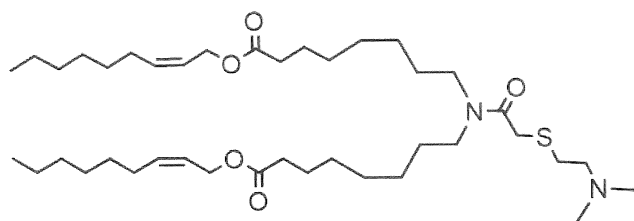
Loại ARN	% mol lipid	API/lipid toàn phần đích (khối lượng/khối lượng)	Tốc độ chảy (ml/phút)			Cỡ hạt trung bình (nm)	PDI	% được bao nang	Hoạt tính sinh học <i>in vivo</i> ở chuột
			Lipid	ARN	Tổng cộng				
epo mARN	50:7:40:3	0,028	75	225	300	81,6	0,11	96,1	47 ng/ml EPO protein @ 0,3 mg/kg mARN
FVII siARN	58:7:33,5:1,5	0,034	50	150	200	68,9	0,08	93,7	92,5% phá vỡ FVII mARN @ 0,2 mg/kg siARN

Các kết quả đã chỉ ra rằng cả sự biểu hiện qua trung gian EPO mARN và phá vỡ (KD) qua trung gian FVII siARN của sự biểu hiện FVII là tiềm năng trong các hạt nano ARN có khả năng có lipid chứa EPO mARN hoặc FVII siARN được chế hóa sử dụng quy trình được mô tả ở đây.

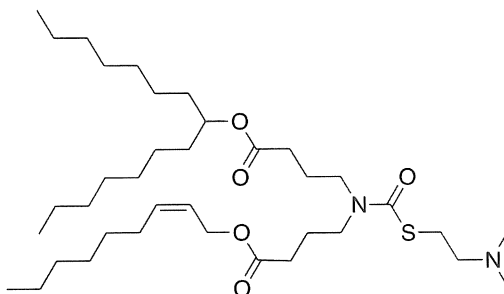
Ví dụ 7: Hoạt tính sinh học *in vivo* của các hạt mARN được bao nang lipid sử dụng các thành phần lipid khác nhau

Các hạt nano ARN có khả năng có lipid với thành phần lipid chứa EPO mARN thay đổi lần lượt được chế hóa sử dụng quy trình được mô tả ở đây. Lipid cation có thể ion hóa được thay đổi: Lipit 1 từ Bảng 1 như được so sánh với lipit 2, lipit 3 và lipit 9. Cấu trúc của lipid cation có thể ion hóa được chỉ ra dưới đây. Các thành phần của chế phẩm được chỉ ra trong Bảng 9.

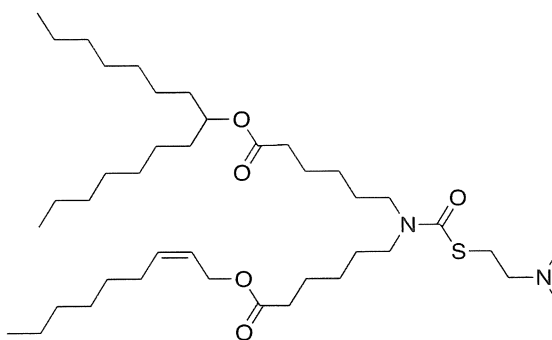
Lipit 1



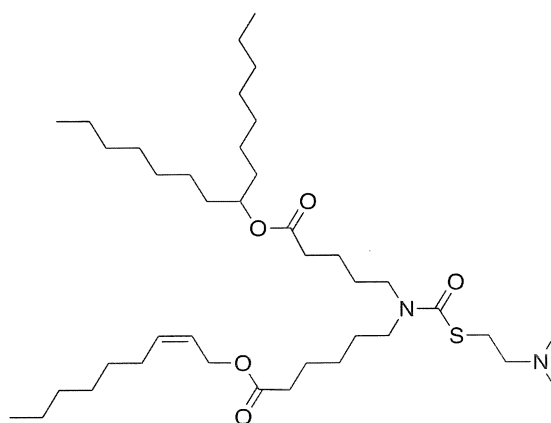
Lipit 2



Lipit 3



Lipit 9



Sự biểu hiện protein EPO (ng/ml) trong huyết thanh được đo sau khi dùng đơn liều 0,3 mg/kg mARN cho chuột Balb/c cái (6-8 tuần tuổi). Đối chứng âm PBS có mức biểu hiện EPO là 2 ng/ml. Các kết quả so sánh được chỉ ra trong Bảng 9.

Bảng 9: Kết quả *in vivo* đối với các hạt nano ARN được bao nang lipid

Thành phần lipid bất kỳ	% mol lipid	ARN/lipid (khối lượng/khối lượng)	ARN (mg/ml)	Cỡ hạt trung bình (nm)	PDI	% được bao nang	Mức biểu hiện protein EPO (ng/ml)
lipit 1: DSPC:PEG_DMG	48-60:5-10:35-45:1-4	0,03	0,14	81,4	0,07	92,1	95
lipit 2: DSPC:PEG_DMG	48-60:5-10:28-38:0,5-3,0	0,03	0,17	68,1	0,16	93,4	92
lipit 3: DSPC:PEG_DMG		0,03		73,7	0,08	94,9	146
lipit 9: DSPC:PEG_DMG		0,03		71,1	0,10	94,9	154

Các kết quả đã chỉ ra rằng mặc dù cỡ hạt là tương đương, nhưng mức biểu hiện protein EPO về cơ bản là thay đổi giữa các hạt nano EPO mARN có khả năng có lipid với các lipid cation có thể ion hóa và thành phần khác nhau. Sử dụng quy trình được mô tả ở đây, tất cả các hạt nano EPO mARN có khả năng có lipid đã được tạo ra là có hiệu lực. Hiệu suất >85% được quan sát đối với các thành phần được thử nghiệm.

Xem xét khác

Phần mô tả nêu trên được đưa ra để người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này tiến hành các dạng cấu hình khác nhau được mô tả ở đây. Có thể có nhiều cách thực hiện kỹ thuật theo sáng chế. Các chức năng và yếu tố khác nhau được mô tả ở đây có thể được phân chia khác nhau từ các chức năng và yếu tố được thể hiện mà không nằm ngoài phạm vi của các kỹ thuật theo sáng chế. Các cải biến khác nhau đối với các dạng cấu hình này là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, và các nguyên lý chung được định nghĩa ở đây có thể được áp dụng cho các dạng cấu hình khác. Do đó, nhiều thay đổi và cải biến có thể được tạo ra đối với kỹ

thuật theo sáng chế, bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, mà không nằm ngoài phạm vi của kỹ thuật theo sáng chế.

Mặc dù phần mô tả chi tiết chứa nhiều đặc điểm cụ thể, nhưng các đặc điểm này không nên hiểu là được xây dựng nhằm giới hạn phạm vi của kỹ thuật theo sáng chế mà chỉ nhằm minh họa các ví dụ và khía cạnh khác nhau của kỹ thuật theo sáng chế. Cần hiểu rằng phạm vi của kỹ thuật theo sáng chế gồm các phương án khác không được thảo luận chi tiết ở trên. Các cải biến, thay đổi và biến đổi khác nhau có thể được tiến hành theo cách bố trí, vận hành và chi tiết của phương pháp và thiết bị của kỹ thuật theo sáng chế được bộc lộ ở đây mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, đối với thiết bị hoặc phương pháp hướng tới mỗi vấn đề không nhất thiết phải được giải quyết (hoặc thu được mỗi ưu điểm) bằng các phương án khác nhau theo sáng chế để được bao hàm trong phạm vi của sáng chế. Việc sử dụng ở đây thuật ngữ “có thể” và các dạng của chúng cần được hiểu theo nghĩa là “có khả năng” hoặc “tùy ý” đối lập với khả năng khẳng định.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất hạt nano ARN được bao nang lipid, bao gồm các bước

a) cho dung dịch nước bao gồm ARN chảy qua ống thứ nhất có đường kính trong (inner diameter - ID) nằm trong khoảng từ 0,1" (0,254 cm) đến 0,132" (0,33528 cm);

b) cho dung dịch etanol bao gồm lipid chảy qua ống thứ hai có ID nằm trong khoảng từ 0,005" (0,0127 cm) đến 0,02" (0,0508 cm) với tốc độ chảy bằng một phần ba tốc độ chảy của dung dịch nước qua ống thứ nhất, trong đó lipid bao gồm lipid cation; và

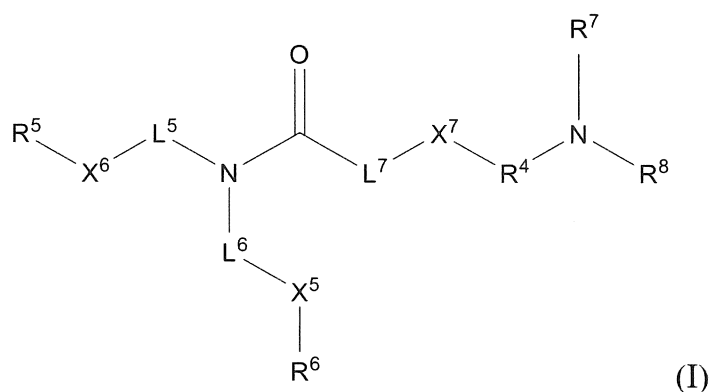
c) trộn dung dịch etanol với dung dịch nước bằng cách cho dung dịch etanol và dung dịch nước chảy vào môđun trộn cấu thành bởi ống thứ hai được nối vuông góc với ống thứ nhất;

trong đó quá trình trộn tạo ra dòng dung dịch ra chảy trong ống thứ nhất bao gồm dòng chảy rồi chứa ARN và lipid trong khoảng từ 10% đến 75% thể tích/thể tích etanol, và trong đó các hạt nano ARN được bao nang lipid có cấu trúc hai lớp;

trong đó ARN được bao nang lớn hơn 98%;

trong đó chỉ số đa phân tán nhỏ hơn 0,09; và,

trong đó lipid cation có pKa trong khoảng 6 đến khoảng 7 và cấu trúc có công thức I:



hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó:

mỗi R⁵ và R⁶ được chọn độc lập từ nhóm cấu thành bởi C₁-C₃₁ alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, C₂-C₃₁ alkenyl hoặc C₂-C₃₁ alkynyl và cholesteryl;

mỗi L⁵ và L⁶ được chọn độc lập từ nhóm cấu thành bởi C₁-C₂₀ alkyl mạch thẳng và C₂-C₂₀ alkenyl;

X⁵ là -C(O)O- hoặc -OC(O)-;

X^6 là $-C(O)O-$ hoặc $-OC(O)-$;

X^7 là S hoặc O;

L^7 không có mặt hoặc là alkyl bậc thấp;

R^4 là C_1 - C_6 alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh; và

mỗi R^7 và R^8 được chọn độc lập từ nhóm cấu thành bởi hydro và C_1 - C_6 alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó đầu ra có tốc độ chảy ít nhất bằng 200 ml/phút.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tốc độ chảy của đầu ra có số Reynolds ít nhất bằng 2.000.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch nước được bơm qua ống thứ nhất bằng bơm HPLC thứ nhất với áp suất ngược ít nhất bằng 10 psi, 25 psi, 50 psi, 75 psi, hoặc 100 psi và dung dịch etanol được bơm qua ống thứ hai bằng bơm HPLC thứ hai với áp suất ngược ít nhất bằng 40 psi, 80 psi, 150 psi, 300 psi, hoặc 400 psi.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ống thứ nhất có ID bằng 0,132" (0,335 cm) và ống thứ hai có ID bằng 0,007" (0,018 cm), 0,01" (0,0254 cm), hoặc 0,02" (0,0508 cm).
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch nước được bơm với tốc độ chảy ít nhất bằng 30 ml/phút, 45 ml/phút, 60 ml/phút, 75 ml/phút, 90 ml/phút, 105 ml/phút, 120 ml/phút, 150 ml/phút, 225 ml/phút, 262,5 ml/phút, 300 ml/phút, hoặc 450 ml/phút; và dung dịch etanol được bơm với tốc độ chảy ít nhất bằng 10 ml/phút, 15 ml/phút, 20 ml/phút, 25 ml/phút, 30 ml/phút, 35 ml/phút, 40 ml/phút, 50 ml/phút, 60 ml/phút, hoặc 75 ml/phút, 87,5 ml/phút, 100 ml/phút, hoặc 150 ml/phút.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch ra, etanol trong nước được duy trì ở 15-20 °C.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môđun trộn được làm bằng thép không gỉ và cấu thành bởi ống thứ hai được gắn vuông góc trên ống thứ nhất, trong đó ống thứ nhất có phần hở qua thành, trong đó phần hở có kích cỡ bằng đường kính bên ngoài của ống thứ hai, và trong đó ống thứ hai được làm vừa khít qua phần hở để cho phép di chuyển liên tục dung dịch etanol trong ống thứ hai vào dung dịch nước trong ống thứ nhất.

9. Phương pháp theo điểm 1, còn bao gồm bơm dung dịch đệm pha loãng qua ống thứ ba, và trộn dung dịch đệm pha loãng với dung dịch ra bằng cách đưa dung dịch đệm pha loãng vào dung dịch ra ở vùng nối Y nối ống thứ ba với ống thứ nhất để tạo ra dung dịch ra đã được pha loãng.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó dung dịch đệm pha loãng bao gồm

a) từ khoảng 10 mM đến 20 mM dung dịch đệm Tris, từ khoảng 45 mM đến 55 mM NaCl, và từ khoảng 8% đến 10% sucroza, ở độ pH từ khoảng 7,4 đến 8,5; hoặc

b) từ 40 mM đến 90 mM dung dịch đệm phosphat, ở độ pH từ khoảng 6,0 đến 6,5; và (i) dung dịch đệm pha loãng thứ ba bao gồm từ khoảng 20 mM đến 50mM dung dịch đệm HEPES; hoặc

(ii) dung dịch đệm pha loãng thứ ba bao gồm từ khoảng 20 mM đến 50 mM dung dịch đệm HEPES, từ khoảng 50 mM đến 300 mM NaCl, từ khoảng 0% đến 15% sucroza, ở độ pH từ khoảng 7,4 đến 8,5.

11. Phương pháp theo điểm 9, trong đó dung dịch ra đã được pha loãng bao gồm 6,25% etanol; 8,25% etanol; 8,3% etanol; hoặc 12,5% etanol.

12. Phương pháp theo điểm 9, trong đó dung dịch đệm pha loãng được bơm qua ống thứ ba với tốc độ chảy 400-900 mL/phút.

13. Phương pháp theo điểm 9, trong đó ống thứ ba có ID bằng 0,25" (0,635 cm).

14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hạt nano ARN được bao nang lipit có cỡ hạt trung bình nhỏ hơn khoảng 100 nm.

15. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phần lipid của hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm khoảng 48 % mol đến khoảng 66 % mol lipid cation, khoảng 2 % mol đến khoảng 12 % mol DSPC, khoảng 25 % mol đến khoảng 42 % mol cholesterol, và khoảng 0,5 % mol đến khoảng 3 % mol PEG2000-DMG.

16. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hạt nano ARN được bao nang lipid có tổng tỷ lệ khối lượng lipid:ARN khoảng 50:1 đến khoảng 3:1.

17. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm lipid cation:DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylamoni-propan):DSPC:cholesterol:PEG với tỷ lệ mol được chọn từ 25:25:10:38,5:1,5, 25:25:10:37:3, 25:25:10:35:5, 20:20:7:51,5:1,5, 25:20:10:42:3, 20:30:13:32:5, 25:20:10:40:5, 25:25:13:35,5:1,5, 25:30:7:35:3, 30:20:13:34:3, 30:25:7:33:3, 30:30:10:25,8:1,5, 15:20:13:49:3, 20:20:13:44:3, 20:25:13:39:3, 15:25:13:44:3, 20:25:13:39:3, 25:25:13:34:3, 30:20:13:34:3, hoặc 30:30:13:29:3.

18. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hạt nano ARN được bao nang lipid bao gồm từ khoảng 20% khối lượng/khối lượng đến 60% khối lượng/khối lượng lipid cation, từ khoảng 5% khối lượng/khối lượng đến 30% khối lượng/khối lượng lipid trợ giúp, từ khoảng 0% khối lượng/khối lượng đến 60% khối lượng/khối lượng cholesterol, và từ khoảng 0,5% khối lượng/khối lượng đến 15% khối lượng/khối lượng thể tiếp hợp polyetylen glycol-lipid (PEG).

19. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ARN được chọn từ nhóm cấu thành bởi ARN chuyên, ARN nhân nhỏ, ARN ribosom, ARN thông tin, ARN đối nghĩa, ARN cản trở nhỏ và ARN tự sao chép.

FIG. 1

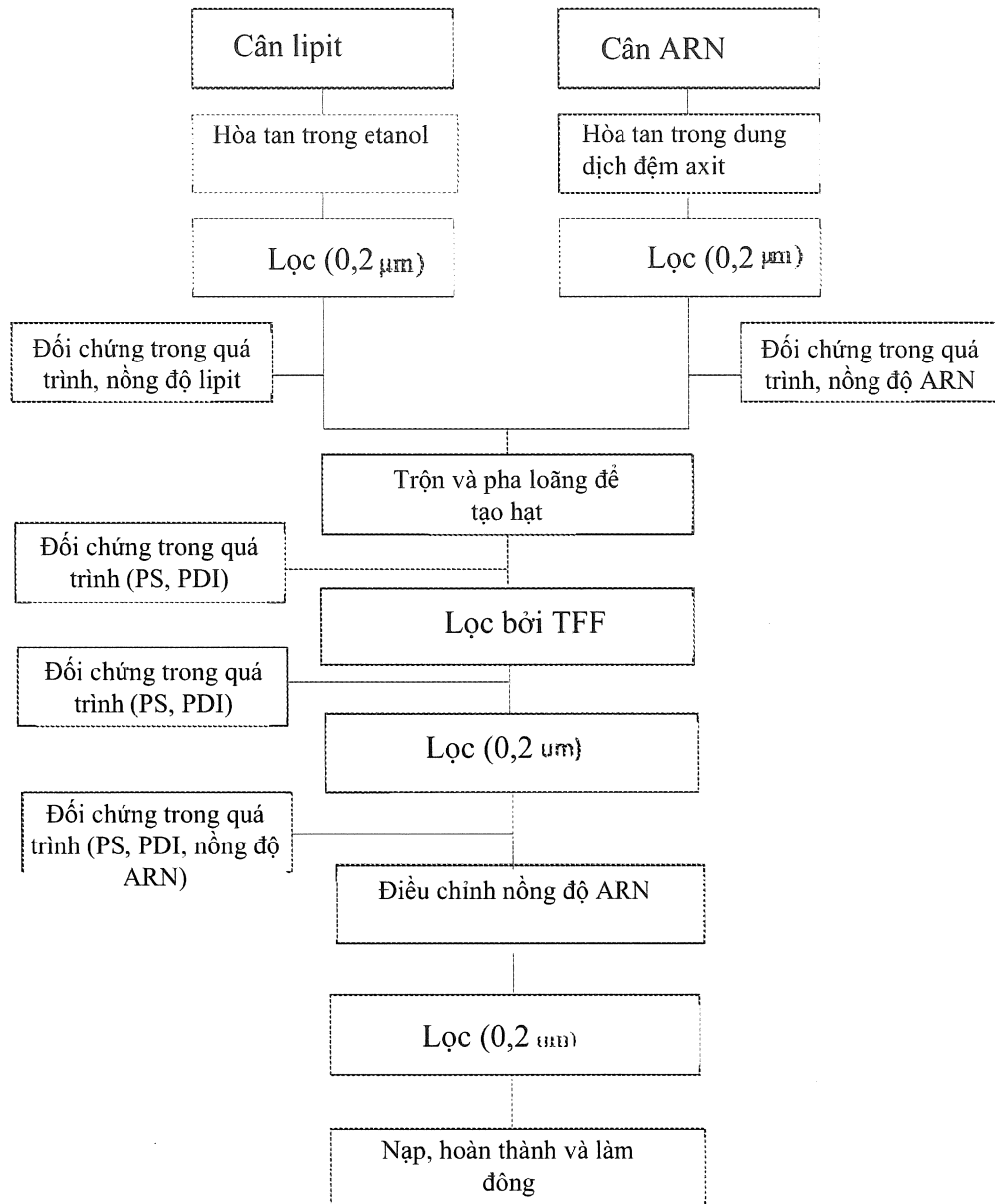


FIG. 2

Ví dụ số	Chiều dài mARN (số nucleotit)	mRNA MW	% Mol lipid					mARN/Lipit (khối lượng/khối lượng)	N/P	Cỡ hạt (nm)	PDI	% bao nang	Độ tinh khiết mARN (%)
			DOTAP	Lipit	DSPC	CHOL	PEG						
1	4867	1582818	25	25	10	38,5	1,5	0,09	3	99,7	0,1	97,6	75,0
2	4867	1582818	25	25	10	38,5	1,5	0,07	4	87,7	0,1	99,3	79,0
3	4867	1582818	25	25	10	38,5	1,5	0,05	5	85,9	0,1	99,7	80,0
4	4867	1582818	25	25	10	38,5	1,5	0,04	6	81,2	0,2	99,8	76,0
5	4867	1582818	25	25	10	37	3	0,06	4	72,9	0,2	99,5	82,0
6	4867	1582818	25	25	10	35	5	0,06	4	72,0	0,1	99,5	77,0
7	4867	1582818	25	25	10	38,5	1,5	0,06	4	82,4	0,1	99,2	78,0
8	4867	1582818	25	25	10	38,5	1,5	0,05	5	81,8	0,1	99,4	80,0
9	4867	1582818	20	20	7	51,5	1,5	0,06	4	80,3	0,1	99,5	77,0
10	4867	1582818	20	25	10	42	3	0,06	4	84,4	0,2	97,2	74,0
11	4867	1582818	20	30	13	32	5	0,06	4	80,8	0,1	94,7	64,0
12	4867	1582818	25	20	10	40	5	0,05	4	70,2	0,1	99,7	74,0
13	4867	1582818	25	25	13	35,5	1,5	0,06	4	87,7	0,1	98,8	78,0
14	4867	1582818	25	30	7	35	3	0,07	4	81,2	0,1	95,8	72,0
15	4867	1582818	30	20	13	34	3	0,06	4	70,2	0,2	99,5	76,0
16	4867	1582818	30	25	7	33	3	0,06	4	71,7	0,2	97,9	72,0
17	4867	1582818	30	30	10	25,8	1,5	0,07	4	85,9	0,1	99,2	76,0
18	4867	1582818	20	15	13	49	3	0,05	4	68,8	0,2	98,6	76,9
19	4867	1582818	20	20	13	44	3	0,05	4	73,5	0,1	99,4	78,9
20	4867	1582818	20	25	13	39	3	0,06	4	78,6	0,1	98,9	76,2
21	4867	1582818	25	15	13	44	3	0,05	4	67,2	0,1	98,5	73,5
22	4867	1582818	25	20	13	39	3	0,06	4	71,2	0,2	99,5	78,8
23	4867	1582818	25	25	13	34	3	0,06	4	75,2	0,1	99,3	79,1
24	4867	1582818	30	20	13	34	3	0,06	4	72,7	0,2	99,4	78,0
25	4867	1582818	30	30	13	29	3	0,07	4	78,2	0,2	99,4	79,0

FIG. 3

Cỡ mề (mARN theo g)	Cỡ mARN (số nucleotit)	mRNA MW	Thành phần lipit	% mol lipit	Cỡ hạt (nm)	PDI	% bao nang	% hiệu suất
0,10	1331	435111	Lipit: DSPC: Cholesterol: PEG2000- DMG	50:7:41,5:1,5	64,9	0,16	97,3	78%
0,25	1331	435111	Lipit: DSPC: Cholesterol: PEG2000- DMG	50:7:41,5:1,5	67,5	0,11	97,8	84%
1,00	1331	435111	Lipit: DSPC: Cholesterol: PEG2000- DMG	50:7:41,5:1,5	64	0,07	95,5	88%
3,00	1331	435111	Lipit: DSPC: Cholesterol: PEG2000- DMG	50:7:41,5:1,5	64,4	0,08	97,5	82%
10,00	1331	435111	Lipit: DSPC: Cholesterol: PEG2000- DMG	50:7:41,5:1,5	85,9	0,10	96,4	88%

FIG. 4

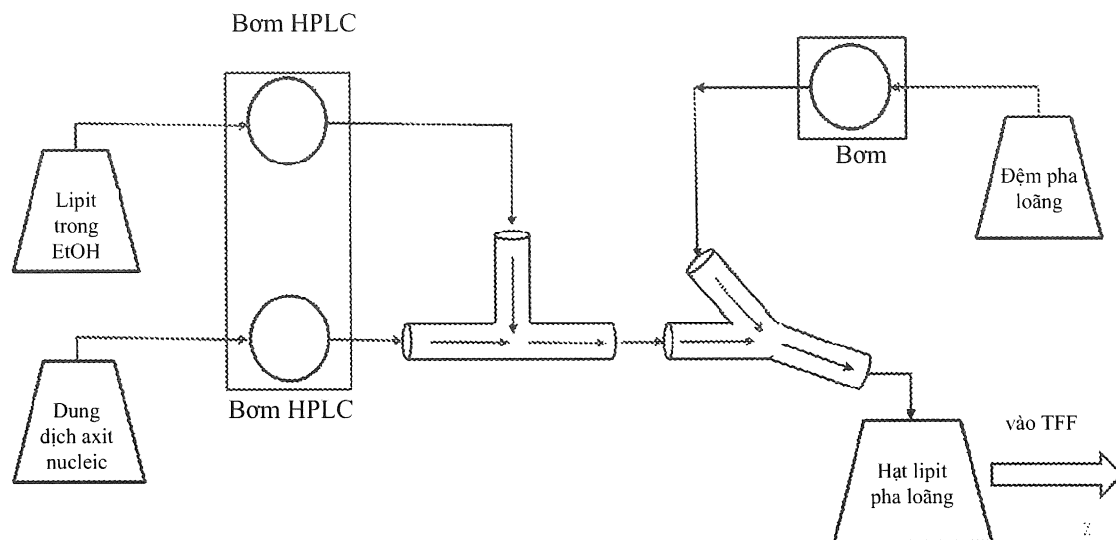


FIG. 5

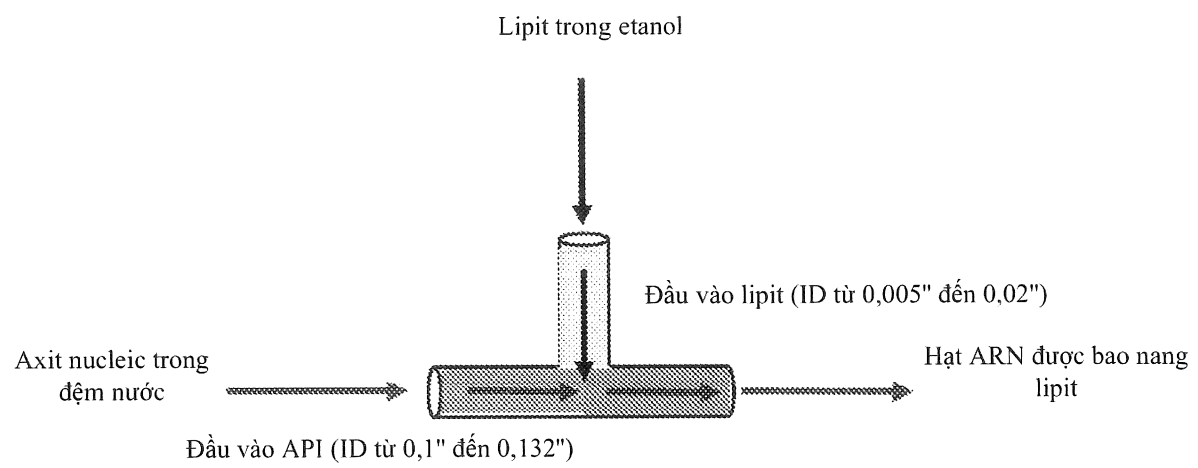


FIG. 6A

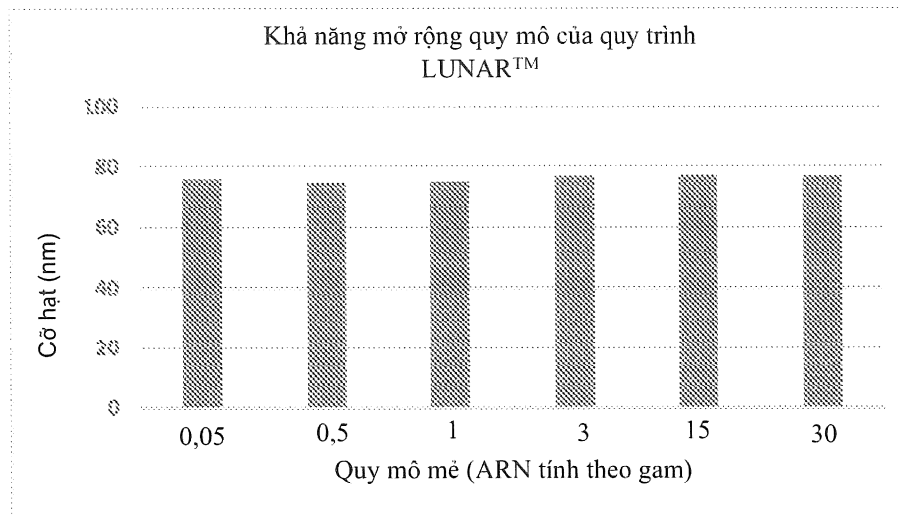


FIG. 6B

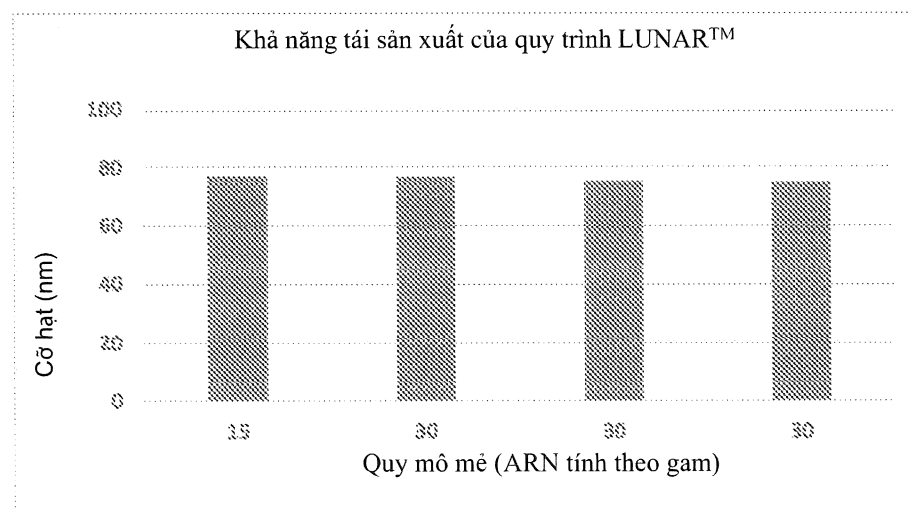


FIG. 7

