



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0051961

(51)<sup>2022.01</sup> C12N 15/113; A61K 9/51; C12N 15/11; (13) B  
A61K 47/10; B82Y 5/00

(21) 1-2023-02224

(22) 13/09/2021

(86) PCT/US2021/050120 13/09/2021

(87) WO2022/056413 17/03/2022

(30) 63/077,648 13/09/2020 US

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/10/2023 427A

(73) ARCTURUS THERAPEUTICS, INC. (US)

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

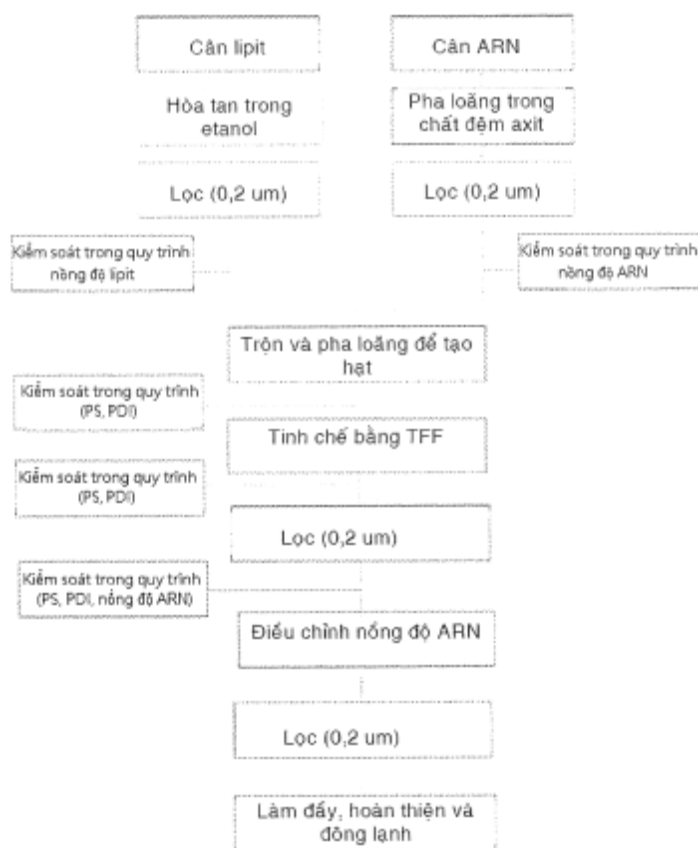
(72) BAO, Yanjie (CN); CLEMENTE, Brenda (US); KARMALI, Priya Prakash (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

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

(21) 1-2023-02224

(57) Phương pháp sản xuất hạt nano ARN được bao nang bằng lipid bao gồm việc cho dung dịch nước chứa ARN chảy qua ống thứ 1 có đường kính trong (inner diameter - ID) thứ nhất; ARN này chứa từ khoảng 6.000 đến khoảng 13.000 nucleotit; cho dung dịch ethanol chứa các lipid chảy qua ống thứ 2 có đường kính trong (inner diameter - ID) thứ hai, ở tốc độ dòng chảy là khoảng 0,2 đến khoảng 1 lần so với dung dịch nước qua ống thứ 1, các lipid này bao gồm lipid cation; và trộn dung dịch ethanol với dung dịch nước; ID thứ nhất và ID thứ hai và tốc độ dòng chảy qua ống thứ 1 và ống thứ 2 được chọn lựa để tạo ra lực cọ xát đủ thấp để giữ nguyên tính nguyên vẹn của ARN; phương pháp trộn tạo ra dung dịch đầu ra chảy trong ống thứ 1 bao gồm dòng chảy nhiễu loạn của ARN và các lipid ở giữa khoảng ethanol, hạt nano ARN được bao nang bằng lipid có cấu trúc hai lớp.



HÌNH 1

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất hạt nano axit ribonucleic (ARN) được bao nang bằng lipid.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Các lipid được sử dụng làm chất liệu cho việc phân phối axit ribonucleic (ARN) do khả năng của chúng trong việc tạo thành hạt nano lipid mà bao nang ARN dùng cho việc phân phối đến các tế bào đích sau khi cho dùng ngoài đường tiêu hóa. (Zimmermann, 2006, Nature, doi:10.1038/nature04688).

Các phương pháp khác nhau của việc sản xuất hạt nano ARN được bao nang bằng lipid là đã biết. Ví dụ, WO 2001/005373 bộc lộ các kỹ thuật dùng để điều chế hạt nano ARN được bao nang bằng lipid bằng cách sử dụng quy trình loại tiêm ethanol bằng thiết bị trộn tĩnh mà đem lại môi trường nhiễu loạn, phần này, sau khi tạo thành bọt, được kết hợp với phân tử trị liệu. US 2004/0142025 bộc lộ các kỹ thuật dùng để tạo thành hạt nano ARN được bao nang bằng lipid bằng cách sử dụng phương pháp trộn không nhiễu loạn và một loạt lần pha loãng từng bước liên tiếp. US 6,843,942 bộc lộ phương pháp trộn không nhiễu loạn của việc tạo thành các hạt bằng cách phun các lipid trong ống dẫn dung dịch hữu cơ qua lỗ vào các axit nucleic trong dung dịch nước chảy qua lỗ này. US 9,005,654 bộc lộ việc bao nang siARN trong hạt nano lipid (lipid nanoparticle - LNP) bằng cách sử dụng phương pháp trộn nhiễu loạn, nhờ đó các lipid và ARN trong vai trò là dòng chảy đối nghịch xâm nhập buồng trộn có hình dạng chữ T từ các nhánh đối bên ở khoảng các tốc độ ngang bằng để tạo ra dung dịch ethanol 45-60% chứa các bọt, phần này được thu gom và sau đó, được pha loãng thêm (phương pháp pha loãng trực tiếp). US 9,404,127 bộc lộ rằng đa số LNP được tạo ra bằng phương pháp pha loãng trực tiếp có hình thái học không dạng lớp, tức là, cấu trúc không phải hai lớp.

Các thử thách phát sinh trong việc cố gắng áp dụng các phương pháp thông thường để tạo thành hạt nano ARN được bao nang bằng lipid từ các ARN lớn. Ví dụ, một vấn đề như vậy phát sinh từ các lực tác dụng lên ARN trong suốt quá trình tạo thành LNP gây ra tính nguyên vẹn cấu trúc bị phương hại của ARN. Do vậy, có nhu cầu cải thiện quy trình và thiết bị dùng để tạo dạng chế phẩm hạt nano ARN được bao nang bằng lipid trong bối

cảnh về các trình tự ARN lớn. Các phương pháp như vậy cũng cần phải thuận lợi cho việc tăng quy mô trong khi hướng đích kích cỡ hạt và độ đa phân tán mong muốn. Các phương án trong bản mô tả này giải quyết một hoặc nhiều vấn đề trong số các vấn đề này và các thử thách khác do chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này nhận biết.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Theo một số khía cạnh, các phương án trong bản mô tả này đem lại các phương pháp sản xuất hạt nano ARN được bao nang bằng lipid, bao gồm các bước a) cho dung dịch nước chứa ARN chảy qua ống thứ 1 có đường kính trong (inner diameter - ID) là từ khoảng 0,01 inơ đến khoảng 0,08 inơ; trong đó độ pH của dung dịch nước này nằm trong khoảng từ khoảng 3,0 đến khoảng 4,5 với nồng độ NaCl tùy ý là lên đến khoảng 300 mM; trong đó ARN này chứa từ khoảng 6.000 đến khoảng 13.000 nucleotit; b) cho dung dịch etanol chứa các lipid chảy qua ống thứ 2 có ID là từ khoảng 0,01 inơ đến khoảng 0,04 inơ ở tốc độ dòng chảy là khoảng 0,2 đến khoảng 1 lần tốc độ dòng chảy của dung dịch nước qua ống thứ 1, trong đó các lipid này bao gồm lipid cation; và c) trộn dung dịch etanol với dung dịch nước; trong đó phương pháp trộn này tạo ra dung dịch đầu ra chảy trong ống thứ 1 bao gồm dòng chảy nhiễu loạn của ARN và các lipid trong etanol khoảng 10% đến 75% thể tích/thể tích; và trong đó hạt nano ARN được bao nang bằng lipid này có cấu trúc hai lớp.

Theo một số khía cạnh, các phương án trong bản mô tả này đem lại các phương pháp sản xuất hạt nano ARN được bao nang bằng lipid, bao gồm các bước a) cho dung dịch nước chứa ARN chảy qua ống thứ 1 có đường kính trong (inner diameter - ID) thứ nhất; trong đó ARN này chứa từ khoảng 6.000 đến khoảng 13.000 nucleotit; b) cho dung dịch etanol chứa các lipid chảy qua ống thứ 2 có đường kính trong (inner diameter - ID) thứ hai, ở tốc độ dòng chảy là khoảng 0,2 đến khoảng 1 lần tốc độ dòng chảy của dung dịch nước qua ống thứ 1, trong đó các lipid này bao gồm lipid cation; và c) trộn dung dịch etanol với dung dịch nước; trong đó ID thứ nhất và ID thứ hai và tốc độ dòng chảy qua ống thứ 1 và ống thứ 2 được chọn lựa để tạo ra lực cọ xát đủ thấp để giữ nguyên tính nguyên vẹn của ARN; trong đó phương pháp trộn này tạo ra dung dịch đầu ra chảy trong ống thứ 1 bao gồm dòng chảy nhiễu loạn của ARN và các lipid trong etanol từ khoảng 10% đến 75% thể tích/thể tích; và trong đó hạt nano ARN được bao nang bằng lipid này có cấu trúc hai lớp.

### Mô tả các hình vẽ

Hình 1 thể hiện sơ đồ dạng lưu đồ của một phương án về quy trình sản xuất hạt nano lipit. Các lipit được hòa tan trong etanol, ARN được hòa tan trong chất đệm dạng nước có tính axit (ví dụ, chất đệm xitrat), cả hai được tiệt trùng bằng bộ lọc. Các dung dịch này được trộn bằng quy trình được mô tả trong bản mô tả này để tạo thành các hạt, phần này được phân tích về PDI và kích cỡ hạt (particle size - PS). Các hạt được cô và tinh chế bằng phương pháp lọc theo dòng chảy tiếp tuyến (tangential flow filtration - TFF) để loại bỏ etanol và ARN không liên kết, và PDI và PS được theo dõi lần nữa. Sau đó, nồng độ của các hạt được điều chỉnh theo tổng nồng độ ARN đã được đo. Các hạt được tiệt trùng bằng bộ lọc, được làm đầy, hoàn thiện, và làm đông lạnh.

Hình 2 thể hiện thiết bị dùng để sản xuất hạt nano ARN được bao nang bằng lipit. Dung dịch nước chứa ARN được vận chuyển bằng bơm HPLC qua hệ thống ống, và dung dịch hữu cơ chứa các lipit được vận chuyển bằng bơm HPLC qua hệ thống ống tách biệt. Dung dịch hữu cơ có thể được bơm vào dung dịch nước ở góc 90 độ trong vùng trộn. Hệ thống ống đầu ra vận chuyển đầu ra lipit-ARN đã được trộn đến hệ thống ống polypropylen, phần này hòa nhập ở góc 45 độ với chất đệm pha loãng trong vùng pha loãng. Hệ thống ống mà hòa nhập ở góc 45 độ với chất đệm pha loãng trong vùng pha loãng có thể được pha loãng nối tiếp để bao gồm 1, 2, 3 hoặc 4 vùng pha loãng của hệ thống ống mà mỗi vùng ở góc 45 độ của quy trình pha loãng. Sau quy trình pha loãng, có thể thu gom các hạt đã được pha loãng trong bình có vỏ bọc bằng thép không gỉ được duy trì ở 15-20 °C. Các hạt được chế biến thêm bằng phương pháp lọc theo dòng chảy tiếp tuyến bằng cách sử dụng bơm ly tâm, màng hoặc nhu động.

Hình 3 thể hiện cấu kiện trộn chi tiết hơn. Các axit nucleic trong chất đệm được vận chuyển qua nhánh đầu vào của ống thép không gỉ thứ 1. Các lipit trong etanol (hoặc hỗn hợp dung môi/dung môi hữu cơ thích hợp khác) được vận chuyển qua ống thép không gỉ thứ 2 mà được gắn kết theo kiểu vuông góc vào ống thứ 1. Lỗ trên thành của ống thứ nhất cho phép vận chuyển chất lỏng từ ống thứ 2 đến phần trong của ống thứ 1. Hạt nano ARN được bao nang bằng lipit hình thành từ phương pháp trộn thoát qua nhánh đầu ra của ống thứ 1.

Hình 4 thể hiện cường độ huỳnh quang trung bình (mean fluorescent intensity - MFI) được điều chỉnh của các mức liều lượng khác nhau của các dạng chế phẩm hạt nano lipit được mô tả trong Ví dụ 13, tương ứng với các mức kháng thể Protein Gai kháng

COVID19 được phát triển khi đáp ứng với việc cho dùng hạt nano lipid đối với chuột nhắt.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Cần phải hiểu rằng các kiểu sắp đặt khác nhau của công nghệ đối tượng sẽ trở nên sáng tỏ một cách dễ dàng đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này nhờ phần bộc lộ, trong đó các kiểu sắp đặt khác nhau của công nghệ đối tượng được thể hiện và mô tả thông qua cách minh họa. Như sẽ được nhận ra, công nghệ đối tượng có khả năng về các kiểu sắp đặt khác và các kiểu sắp đặt khác nhau và một vài chi tiết của nó có khả năng về sự cải biến theo các khía cạnh khác nhau khác, đều không đi trệch khỏi phạm vi của công nghệ đối tượng. Do vậy, phần bản chất kỹ thuật của sáng chế, hình vẽ và mô tả chi tiết sáng chế cần được xem là có tính minh họa về bản chất và không được xem là có tính giới hạn. Các phương án trong bản mô tả này đem lại các quy trình dùng để bao nang các ARN lớn (ví dụ, ARN tự sao chép) trong hạt nano lipid. Ví dụ, các mARN lớn có thể có kích cỡ khoảng 6.000 đến khoảng 15.000 nucleotit. Như được bộc lộ trong bản mô tả này, đã phát hiện ra rằng các nucleotit lớn này là không tương hợp với các quy trình tạo thành LNP điển hình. Quy trình LNP mà thường được sử dụng cho việc sản xuất các chế phẩm mARN-LNP được sử dụng để thử và sản xuất ARN được bao nang bằng LNP tự sao chép. Quy trình sau đây là điển hình đối với ARN chứa khoảng 1.000 đến khoảng 5.000 nucleotit. Dạng chế phẩm chất đông được sản xuất bằng cách trộn dung dịch etanol của các lipid với dung dịch nước của được chất ARN hoặc mARN nhỏ hơn khác như được tóm lược dưới đây:

- Các tá được lipid (lipid cation, phospholipid, cholesterol (Chol) và thể tiếp hợp lipid-PEG được hòa tan trong etanol và được lọc qua bộ lọc polyetesulfon (PES) 0,2  $\mu\text{m}$ .
- Dung dịch nước của mARN được điều chế trong chất đệm xitrat độ pH 4,0, sau đó là lọc qua bộ lọc PES 0,2  $\mu\text{m}$ .
- Sau đó, dung dịch mARN được trộn với dung dịch etanol của các lipid thông qua cấu kiện trộn bằng thép không gỉ. Hạt nano được tạo thành như vậy được làm ổn định bằng phương pháp pha loãng liên tiếp với chất đệm phosphat độ pH 6,0, sau đó là chất đệm HEPES độ pH 8,0.

- Sau đó, thực hiện phương pháp siêu lọc và phương pháp lọc pha loãng qua màng (UF/DF) đối với dạng chế phẩm hạt nano bằng phương pháp lọc theo dòng chảy tiếp tuyến (tangential flow filtration - TFF) bằng cách sử dụng các màng sợi rỗng PES được cải biến (MWCO (ngưỡng trọng lượng phân tử) 100 kDa) và chất đệm HEPES độ pH 8,0. Sau UF/DF, dạng chế phẩm này được lọc qua bộ lọc PES 0,2  $\mu\text{m}$  và được lưu trữ ở 2 đến 8°C cho đến khi làm đầy.
- Sau đó, phép phân tích nồng độ mARN trong quy trình được thực hiện. Nồng độ của dạng chế phẩm được điều chỉnh đến nồng độ mARN đích cuối cùng (0,2 mg/mL), sau đó là lọc qua bộ lọc hạng tiết trùng PES 0,2  $\mu\text{m}$ .
- Sau khi lọc vô trùng, sản phẩm chất đông được làm đầy một cách vô khuẩn vào các lọ thủy tinh, được đóng nút chặn, được bịt nắp, và làm đông lạnh ở  $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ .

Bằng cách sử dụng quy trình này, các LNP thu được có các ARN lớn hơn (nhiều hơn khoảng 6.000 nucleotit) có kích cỡ, dạng phân tán, và hiệu quả bao nang kém. Hơn nữa, đã khám phá ra rằng phần cơ bản của các cấu trúc ARN lớn hơn này đang bị suy biến trong quy trình tạo dạng chế phẩm, hiện tượng này đặt giả thuyết là do các lực cọ xát hình thành từ các áp suất quy trình và tốc độ dòng chảy nhất định được sử dụng trong phương pháp này. Đã đặt thành định đề rằng các lực cọ xát như vậy có thể được điều biến bằng cách thay đổi tốc độ dòng chảy và định kích cỡ ống. Tuy nhiên, các điều kiện trộn và chỉ một mình áp suất vận hành không được xem là các biến số duy nhất mà nhất thiết sẽ đem lại các ARN được bọc bằng LNP cần thiết. Bằng cách làm giảm các lực cọ xát và điều chỉnh các điều kiện trộn, có thể rằng các điều kiện có thể là không đủ cho quá trình tạo thành LNP. Do vậy, vấn đề do các ARN lớn gây ra được xem là phức tạp khi mà các thông số khác được xem xét để tính vào dạng tạo thành thành công của các ARN lớn được bọc bằng LNP bao gồm, mà không chỉ giới hạn ở, nồng độ chất đệm và muối, nồng độ ARN và lipid, độ pH và áp suất ngược tổng thể trong hệ thống.

Các phương án trong bản mô tả này đem lại dung dịch làm việc cho việc tạo thành các ARN lớn được bao nang bằng LNP. Trong số các ưu điểm của các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này, là (1) độ biến đổi lớn của chế phẩm mà được dung nạp với các hợp phần lipid khác nhau, như một loạt nồng độ lipid trợ giúp/phospholipit, nồng độ lipid cation và cholesterol, và kích cỡ ARN; (2) khả năng chuyển giữa các cấu kiện có thể

tăng quy mô được khác nhau dùng để sản xuất trên quy mô nhỏ, vừa, và lớn; và (3) khả năng tăng quy mô sản xuất trong khi duy trì thể tích mẻ giảm.

Theo các phương án, có đề xuất các phương pháp sản xuất hạt nano ARN được bao nang bằng lipid, bao gồm các bước: a) cho dung dịch nước chứa ARN chảy qua ống thứ 1 có đường kính trong (inner diameter - ID) là từ khoảng 0,01 inso đến khoảng 0,08 inso; trong đó độ pH của dung dịch nước này nằm trong khoảng từ khoảng 3,0 đến khoảng 4,5 với nồng độ NaCl tùy ý lên đến khoảng 300 mM; trong đó ARN này chứa từ khoảng 6.000 đến khoảng 13.000 nucleotit; b) cho dung dịch etanol chứa các lipid chảy qua ống thứ 2 có ID là từ khoảng 0,01 inso đến khoảng 0,04 inso ở tốc độ dòng chảy là khoảng 0,2 đến khoảng 1 lần tốc độ dòng chảy dung dịch nước qua ống thứ 1, trong đó các lipid này bao gồm lipid cation; và c) trộn dung dịch etanol với dung dịch nước; trong đó phương pháp trộn này tạo ra dung dịch đầu ra chảy trong ống thứ 1 bao gồm dòng chảy nhiễu loạn của ARN và các lipid trong etanol khoảng 10% đến 75% thể tích/thể tích; và trong đó hạt nano ARN được bao nang bằng lipid này có cấu trúc hai lớp.

Theo các phương án, có đề xuất các phương pháp sản xuất hạt nano ARN được bao nang bằng lipid, bao gồm các bước: a) cho dung dịch nước chứa ARN chảy qua ống thứ 1 có đường kính trong (inner diameter - ID) thứ nhất; trong đó ARN này chứa từ khoảng 6.000 đến khoảng 13.000 nucleotit; b) cho dung dịch etanol chứa các lipid chảy qua ống thứ 2 có đường kính trong (inner diameter - ID) thứ hai, ở tốc độ dòng chảy là khoảng 0,2 đến khoảng 1 lần tốc độ dòng chảy dung dịch nước qua ống thứ 1, trong đó các lipid này bao gồm lipid cation; và c) trộn dung dịch etanol với dung dịch nước; trong đó ID thứ nhất và ID thứ hai và tốc độ dòng chảy qua ống thứ 1 và ống thứ 2 được chọn lựa để tạo ra lực cọ xát đủ thấp để giữ nguyên tính nguyên vẹn của ARN; trong đó phương pháp trộn này tạo ra dung dịch đầu ra chảy trong ống thứ 1 bao gồm dòng chảy nhiễu loạn của ARN và các lipid trong etanol từ khoảng 10% đến 75% thể tích/thể tích; và trong đó hạt nano ARN được bao nang bằng lipid này có cấu trúc hai lớp.

Theo các phương án, phương pháp trộn này bao gồm việc cho dung dịch etanol và dung dịch nước chảy vào cấu kiện trộn gồm ống thứ 2 được nối liền theo kiểu vuông góc với ống thứ 1.

Theo các phương án, phương pháp trộn này bao gồm việc cho dung dịch etanol và dung dịch nước chảy vào thiết bị lắc trộn đa đầu vào.

Theo các phương án, nồng độ của ARN trong dung dịch nước này nằm trong khoảng từ khoảng 85 microgam/mL đến khoảng 2100 microgam/mL. Theo các phương án, khoảng này là từ khoảng 85 đến khoảng 200 microgam/mL, hoặc khoảng 200 đến khoảng 500, hoặc khoảng 500 đến khoảng 800, hoặc khoảng 800 đến khoảng 1000, hoặc khoảng 1000 đến khoảng 1500, hoặc khoảng 1500 đến khoảng 2100 microgam/mL, bao gồm cả các khoảng nhỏ bất kỳ giữa chúng và các phân số của chúng.

Theo các phương án, nồng độ của lipit trong dung dịch etanol nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 mg/mL đến khoảng 125 mg/mL. Theo các phương án, khoảng này là từ khoảng 5,0 đến khoảng 30 mg/mL, hoặc khoảng 30 đến khoảng 60, hoặc khoảng 60 đến khoảng 90, hoặc khoảng 90 đến khoảng 125 mg/mL, bao gồm cả các khoảng nhỏ bất kỳ giữa chúng và các phân số của chúng.

Theo các phương án, dung dịch nước được bơm qua ống thứ 1 bằng bơm thứ 1 có áp suất ngược là không nhiều hơn khoảng 200 psi, và dung dịch etanol được bơm qua ống thứ 2 bằng bơm thứ 2. Theo một số phương án, các áp suất ngược này là không nhiều hơn khoảng 195 psi, hoặc không nhiều hơn khoảng 190 psi, hoặc không nhiều hơn khoảng 180 psi.

Theo các phương án, ống thứ 1 có ID nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 inso đến khoảng 0,08 inso và ống thứ 2 có ID nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 inso đến khoảng 0,04 inso. Theo các phương án, ống thứ 1 có ID nằm trong khoảng từ khoảng 0,02 inso đến khoảng 0,03 inso và ống thứ 2 có ID nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 inso đến khoảng 0,02 inso. Theo các phương án, ống thứ 1 có ID là khoảng 0,02 inso và ống thứ 2 có ID là khoảng 0,01 inso. Theo các phương án, ống thứ 1 có ID là khoảng 0,03 inso và ống thứ 2 có ID là khoảng 0,01 inso. Các lần đo như vậy bao gồm các khoảng nhỏ bất kỳ giữa chúng và các phân số của chúng.

Theo các phương án, dung dịch nước được bơm ở tốc độ dòng chảy nằm trong khoảng từ khoảng 40 mL/phút đến khoảng 375 mL/phút. Theo các phương án, tốc độ dòng chảy này nằm trong khoảng từ khoảng 40 đến khoảng 80 mL/phút., hoặc khoảng 80 đến khoảng 120, hoặc khoảng 120 đến khoảng 160, hoặc khoảng 160 đến khoảng 200, hoặc khoảng 200 đến khoảng 240, hoặc khoảng 240 đến khoảng 280, hoặc khoảng 280 đến khoảng 320, hoặc khoảng 320 đến khoảng 375 mL/phút, bao gồm cả các khoảng nhỏ bất kỳ giữa chúng và các phân số của chúng.

Theo các phương án, dung dịch etanol được bơm ở tốc độ dòng chảy nằm trong khoảng từ khoảng 10 mL/phút đến khoảng 75 mL/phút. Theo một số phương án, tốc độ dòng chảy này nằm trong khoảng từ khoảng 10 đến khoảng 30 mL/phút., hoặc khoảng 30 đến khoảng 50, hoặc khoảng 50 đến khoảng 75 mL/phút, bao gồm cả các khoảng nhỏ bất kỳ giữa chúng và các phân số của chúng.

Theo các phương án, các dung dịch nước, etanol, và dầu ra được duy trì trong khoảng nhiệt độ từ khoảng 10 °C đến khoảng 25 °C.

Theo các phương án, các phương pháp có thể còn bao gồm việc bơm chất đệm pha loãng thứ nhất và trộn chất đệm pha loãng với dung dịch dầu ra bằng cách đưa chất đệm pha loãng vào dung dịch dầu ra để tạo ra dung dịch dầu ra được pha loãng thứ nhất.

Theo các phương án, các phương pháp có thể còn bao gồm việc bơm chất đệm pha loãng thứ hai vào dung dịch dầu ra được pha loãng thứ nhất, nhờ đó tạo thành dung dịch dầu ra được pha loãng cuối cùng, trong đó có thời gian trì hoãn giữa lần bơm chất đệm pha loãng thứ nhất và chất đệm pha loãng thứ hai.

Theo các phương án, thời gian trì hoãn này là từ khoảng 0,1 đến khoảng 30 giây, trong đó thời gian trì hoãn này được tạo ra theo độ dài của hệ thống ống. Theo một số phương án, không có thời gian trì hoãn nào. Theo một số phương án, thời gian trì hoãn này là từ 0,1 đến khoảng 5 giây, hoặc khoảng 5 đến khoảng 10 giây, hoặc khoảng 10 đến khoảng 15 giây, hoặc khoảng 15 đến khoảng 20 giây, hoặc khoảng 20 đến khoảng 30 giây, bao gồm cả khoảng nhỏ bất kỳ giữa chúng và các phân số của chúng.

Theo các phương án, chất đệm pha loãng thứ nhất bao gồm: chất đệm có độ pH từ khoảng 5,5 đến khoảng 7,0; và tùy ý, nồng độ natri clorua lên đến khoảng 100 mM. Ví dụ, chất đệm pha loãng thứ nhất có thể bao gồm chất đệm Tris lên đến khoảng 20 mM, hoặc chất đệm phosphat 40 mM đến 90 mM, hoặc chất đệm HEPES 20 mM đến 50 mM, hoặc chất đệm phosphat 45 mM độ pH 6,5.

Theo các phương án, chất đệm pha loãng thứ nhất này có thể tùy ý chứa nồng độ natri clorua lên đến khoảng 50 mM.

Theo các phương án, chất đệm pha loãng thứ hai này có thể bao gồm chất đệm có độ pH từ khoảng 7,4 đến 8,0; và tùy ý, nồng độ natri clorua lên đến khoảng 100 mM.

Theo các phương án, chất đệm pha loãng thứ hai này có thể tùy ý bao gồm dung dịch natri clorua lên đến khoảng 50 mM.

Theo các phương án, chất đệm thứ hai này bao gồm sucroza lên đến khoảng 15% trọng lượng/thể tích. Theo một số phương án, sucroza có mặt lên đến khoảng 12% trọng lượng/thể tích, hoặc lên đến khoảng 10% hoặc lên đến khoảng 8%, hoặc lên đến khoảng 5%, hoặc lên đến khoảng 1%. Theo một số phương án, sucroza thì vắng mặt.

Theo các phương án, chất đệm thứ hai này bao gồm chất chống oxy hóa lên đến khoảng 0,5% trọng lượng/thể tích. Theo một số phương án, chất chống oxy hóa thì vắng mặt. Theo một số phương án, chất chống oxy hóa này có mặt lên đến khoảng 0,4% trọng lượng/thể tích, hoặc khoảng 0,3%, hoặc khoảng 0,2%, hoặc khoảng 0,1% trọng lượng/thể tích.

Theo các phương án, chất đệm thứ hai này chứa lên đến 20 mM của chất tạo chelat.

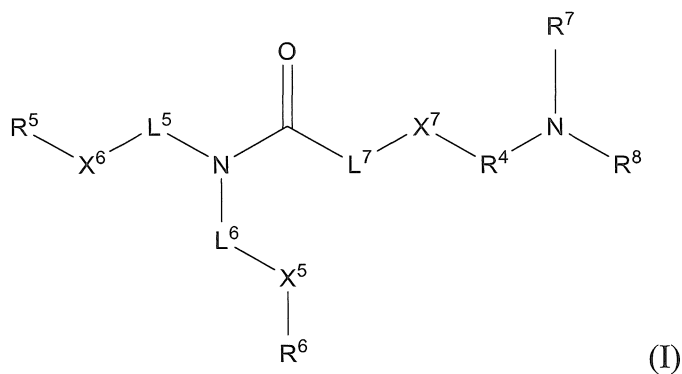
Theo các phương án, dung dịch đầu ra được pha loãng thứ nhất này chứa khoảng 1,0% đến khoảng 10,0% etanol. Theo một số phương án, dung dịch đầu ra được pha loãng thứ nhất này chứa từ khoảng 2% đến khoảng 8% etanol, hoặc từ khoảng 3 đến khoảng 7% etanol, bao gồm cả khoảng nhỏ bất kỳ giữa chúng và các phân số của chúng.

Theo các phương án, chất đệm pha loãng thứ nhất được bơm ở tốc độ dòng chảy từ khoảng 80 mL/phút đến khoảng 900 mL/phút. Theo một số phương án, tốc độ dòng chảy này là từ khoảng 80 mL/phút đến khoảng 150 mL/phút, hoặc khoảng 150 đến khoảng 200, hoặc khoảng 200 đến khoảng 250, hoặc khoảng 250 đến khoảng 300, hoặc khoảng 300 đến khoảng 400, hoặc khoảng 400 đến khoảng 500, hoặc khoảng 500 đến khoảng 600, hoặc khoảng 600 đến khoảng 700, hoặc khoảng 700 đến khoảng 900 mL/phút., bao gồm cả khoảng nhỏ bất kỳ giữa chúng và các phân số của chúng.

Theo các phương án, chất đệm pha loãng thứ hai được bơm ở tốc độ dòng chảy từ khoảng 240 mL/phút đến khoảng 5400 mL/phút. Theo một số phương án, tốc độ dòng chảy này là từ khoảng 240 đến khoảng 500 mL/phút., hoặc khoảng 500 đến khoảng 1000, hoặc khoảng 1000 đến khoảng 1500, hoặc khoảng 1500 đến khoảng 2000, hoặc khoảng 2000 đến khoảng 2500, hoặc khoảng 2500 đến khoảng 3000, hoặc khoảng 3000 đến khoảng 3500, hoặc khoảng 3500 đến khoảng 4000, hoặc khoảng 4000 đến khoảng 4500, hoặc khoảng 4500 đến khoảng 5000, hoặc khoảng 5000 đến khoảng 5500 mL/phút., bao gồm cả khoảng nhỏ bất kỳ giữa chúng và các phân số của chúng.

Theo các phương án, dung dịch đầu ra có tổng tốc độ dòng chảy nằm trong khoảng từ khoảng 120 mL/phút đến khoảng 300 mL/phút.

Theo các phương án, lipid cation này có cấu trúc có Công thức I:



hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, trong đó

mỗi  $R^5$  và  $R^6$  được độc lập chọn lựa từ nhóm gồm  $C_1$ - $C_{31}$  alkyl,  $C_2$ - $C_{31}$  alkenyl hoặc  $C_2$ - $C_{31}$  alkynyl tuyến tính hoặc phân nhánh và cholesteryl;

mỗi  $L^5$  và  $L^6$  được độc lập chọn lựa từ nhóm gồm  $C_1$ - $C_{20}$  alkyl và  $C_2$ - $C_{20}$  alkenyl tuyến tính;

$X^5$  là -C(O)O- hoặc -OC(O)-;

$X^6$  là -C(O)O- hoặc -OC(O)-;

$X^7$  là S hoặc O;

$L^7$  là vắng mặt hoặc alkyl thấp hơn;

$R^4$  là  $C_1$ - $C_6$  alkyl tuyến tính hoặc phân nhánh; và

mỗi  $R^7$  và  $R^8$  được độc lập chọn lựa từ nhóm gồm hydro và  $C_1$ - $C_6$  alkyl tuyến tính hoặc phân nhánh.

Theo các phương án, hạt nano ARN được bao nang bằng lipid có kích cỡ hạt trung bình nằm trong khoảng từ khoảng 50 nm đến khoảng 120 nm. Theo một số phương án, kích cỡ hạt trung bình này là từ khoảng 60 đến khoảng 120 nm, khoảng 70 đến khoảng 120 nm, hoặc khoảng 70 đến 90 nm, bao gồm cả khoảng nhỏ bất kỳ giữa chúng và các phân số của chúng.

Theo các phương án, độ đa phân tán của hạt nano ARN được bao nang bằng lipid không vượt quá khoảng 0,2.

Theo các phương án, phần lipid của hạt nano ARN được bao nang bằng lipid còn bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn lựa từ nhóm gồm lipid trợ giúp, cholesterol, và thể tiếp hợp lipid PEG.

Theo các phương án, ARN này là ARN tự sao chép.

Theo các phương án, các phương pháp có thể còn bao gồm việc làm đông khô dung dịch đầu ra được pha loãng cuối cùng.

Các phương án được đề cập trên đây đã kết hợp trong dạng kết hợp bất kỳ và biểu diễn các phương án làm ví dụ. Một sự hiểu đầy đủ hơn về các phương án này được đưa ra thêm dưới đây trong bản mô tả này và trong phần các Ví dụ Thực hiện Sáng chế dưới đây.

### **Các dạng chế phẩm trên cơ sở lipit**

Các liệu pháp dựa trên sự phân phối nội bào của các axit nucleic đến các tế bào đích đối mặt với cả hàng rào ngoại bào và hàng rào nội bào. Thực sự, không thể cho dùng chất liệu axit nucleic trần một cách dễ dàng theo kiểu toàn thân do độc tính, tính ổn định thấp trong huyết thanh, mức thanh thải nhanh chóng ở thận, mức hấp thụ giảm bởi các tế bào đích, mức hấp thụ thể thực bào của chúng và khả năng của chúng trong việc hoạt hóa đáp ứng miễn dịch, tất cả các đặc tính mà ngăn cản sự phát triển lâm sàng của chúng. Khi chất liệu axit nucleic ngoại sinh (ví dụ, mRNA) xâm nhập hệ thống sinh học của người, thì chất liệu này được nhận biết bởi hệ thống lưới nội mạc (reticuloendothelial system - RES) là mầm bệnh ngoại lai và được thanh thải khỏi dòng lưu thông máu trước khi có cơ hội gặp các tế bào đích trong hoặc ngoài hệ thống mạch máu. Đã có ghi nhận rằng thời gian bán hủy của axit nucleic trần trong dòng máu là khoảng một vài phút (Kawabata K, Takakura Y, Hashida M *Pharm Res.* 1995 Jun; 12(6):825-30). Dạng cải biến hóa học và phương pháp phân phối đúng đắn có thể làm giảm mức hấp thụ bởi RES và bảo vệ các axit nucleic khỏi sự suy biến bởi các nucleaza rộng khắp, điều này làm tăng tính ổn định và độ hiệu nghiệm của các liệu pháp trên cơ sở axit nucleic. Ngoài ra, các ARN hoặc ADN là các polyme ưa nước anion mà không thuận lợi cho sự hấp thụ bởi các tế bào, phần này cũng có tính anion ở bề mặt. Vì vậy, sự thành công của các liệu pháp trên cơ sở axit nucleic hầu như phụ thuộc vào sự phát triển của các chất dẫn hoặc vector mà có thể phân phối một cách có hiệu quả và hữu hiệu vật liệu gen đến các tế bào đích và thu được các mức biểu hiện *in vivo* đủ với độc tính tối thiểu.

Hơn nữa, sau khi nội bào hóa vào tế bào đích, vector phân phối axit nucleic được thử thách bằng các hàng rào nội bào, bao gồm cả sự kìm giữ thể nội bào, sự suy biến thể tiêu bào, sự giải nén axit nucleic khỏi vector, sự chuyển vị băng qua màng nhân (đối với ADN), và giải phóng ở bào tương (đối với ARN). Vì vậy, liệu pháp trên cơ sở axit nucleic thành công phụ thuộc vào khả năng của vector trong việc phân phối các axit nucleic đến các vị trí đích bên trong các tế bào để thu được đủ mức hoạt tính mong muốn như mức biểu hiện của gen.

Trong khi một vài liệu pháp gen đã có thể sử dụng một cách thành công vector phân phối virus (ví dụ, AAV), thì các dạng chế phẩm trên cơ sở lipid ngày càng được công nhận là một hệ thống trong số các hệ thống phân phối đầy hứa hẹn nhất đối với ARN và các hợp chất axit nucleic khác do độ tương hợp sinh học của chúng và sự dễ dàng của việc sản xuất quy mô lớn của chúng. Một trong các bước tiến đáng kể nhất trong các liệu pháp axit nucleic trên cơ sở lipid xảy ra vào tháng 8 năm 2018 khi Patisiran (ALN-TTR02) là chất trị liệu siARN đầu tiên được cả Cục Quản lý Dược phẩm và Thực phẩm (Food and Drug Administration - FDA) Hoa Kỳ và Ủy ban Châu Âu (European Commission - EC) phê duyệt. ALN-TTR02 là dạng chế phẩm siARN dựa trên cái gọi là công nghệ chuyển nhiễm Hạt Lipid Axit nucleic Ổn định (Stable Nucleic Acid Lipid Particle - SNALP). Mặc cho sự thành công của Patisiran, sự phân phối của chất axit nucleic trị liệu, bao gồm cả mARN, thông qua các dạng chế phẩm lipid vẫn đang trải qua quá trình phát triển.

Một số chất dẫn phân phối được tạo dạng chế phẩm bằng lipid được công nhận trong lĩnh vực kỹ thuật này dùng cho chất axit nucleic trị liệu bao gồm, theo các phương án khác nhau, các chất mang trên cơ sở polyme, như polyetylenimin (PEI), dạng chế phẩm chứa dạng lipid, hạt nano lipid và liposom, nanoliposom, nanoliposom chứa xeromit, liposom đa bong, proteoliposom, cả bong tiết ngoại bào tự nhiên và bong tiết ngoại bào được lấy bằng cách tổng hợp, các thể dạng lớp tự nhiên, tổng hợp và bán tổng hợp, dạng hạt nano, mixen, và nhũ tương.

Các dạng chế phẩm lipid này thay đổi về cấu trúc và chế phẩm của chúng, và như có thể được kỳ vọng trong lĩnh vực phát triển một cách nhanh chóng, một vài thuật ngữ khác nhau đã được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này để mô tả một loại chất dẫn phân phối đơn lẻ. Cùng lúc, các thuật ngữ dùng cho các dạng chế phẩm lipid đã được đúc kết một cách thường xuyên xuyên suốt tài liệu chuyên ngành khoa học, và cách sử dụng không nhất quán này đã gây ra sự lẫn lộn về ý nghĩa chính xác của một vài thuật ngữ dùng cho các dạng chế phẩm lipid. Trong số một vài dạng chế phẩm lipid tiềm năng, thì các liposom, liposom cation, và hạt nano lipid được mô tả chi tiết và định nghĩa một cách cụ thể trong bản mô tả này vì các mục đích của sáng chế này.

### **Các liposom**

Các liposom thông thường là các bong mà gồm ít nhất một cấu trúc hai lớp và ngăn dạng nước bên trong. Các màng cấu trúc hai lớp của các liposom thường được tạo thành bởi

các phân tử lưỡng ái, như các lipit có nguồn gốc tổng hợp hoặc tự nhiên mà bao gồm các miền ưa nước và kỵ nước được phân cách về không gian (Lasic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998). Các màng cấu trúc hai lớp của các liposom cũng có thể được tạo thành bởi các polyme và các chất hoạt động bề mặt lưỡng ái (ví dụ, polymeosom, niosom, v.v.). Nhìn chung, chúng có mặt ở dạng bọt có dạng hình cầu và về kích cỡ, có thể nằm trong khoảng từ 20 nm đến một vài micromét. Có thể điều chế các dạng chế phẩm liposom ở dạng phân tán chất keo hoặc có thể làm đông khô chúng để làm giảm các nguy cơ về tính ổn định và để cải thiện thời hạn sử dụng của các thuốc trên cơ sở liposom. Các phương pháp điều chế các chế phẩm liposom là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và nằm trong phạm vi kỹ năng của chuyên gia có hiểu biết trung bình.

Các liposom mà chỉ có một cấu trúc hai lớp được gọi là dạng đơn lớp, và những loại có nhiều hơn một cấu trúc hai lớp được gọi là dạng đa lớp. Các loại liposom thông thường nhất là các bọt dạng đơn lớp nhỏ (small unilamellar vesicle - SUV), các bọt dạng đơn lớp lớn (large unilamellar vesicle - LUV), và các bọt dạng đa lớp (multilamellar vesicle - MLV). Trái ngược với các liposom, các thể tiêu bào, mixen, và mixen được đảo ngược được hợp thành từ các cấu trúc đơn lớp của các lipit. Nhìn chung, liposom được nghĩ đến ở dạng có một ngăn bên trong đơn lẻ, tuy nhiên, một số dạng chế phẩm có thể là liposom đa bọt (multivesicular liposome - MVL), phần này gồm nhiều ngăn dạng nước bên trong không liên tục khác nhau được phân cách bằng một vài cấu trúc hai lớp lipit không đồng tâm.

Các liposom từ lâu đã được cảm nhận là các chất dẫn phân phối thuốc bởi vì độ tương hợp sinh học ưu việt của chúng, cho dù rằng các liposom về cơ bản là các chất đồng đẳng của các màng sinh học và có thể được điều chế từ cả phospholipit tự nhiên và phospholipit tổng hợp (Int. J. Nanomedicine. 2014; 9:1833-1843). Trong cách sử dụng chúng làm các chất dẫn phân phối thuốc, các chất tan ưa nước được hòa tan trong lõi liposom không thể di chuyển qua màng kỵ nước của cấu trúc hai lớp một cách dễ dàng, và các hợp chất kỵ nước sẽ gắn liền với cấu trúc hai lớp. Vì vậy, liposom có thể được nạp các phân tử kỵ nước và/hoặc ưa nước. Khi liposom được sử dụng để mang axit nucleic như ARN, axit nucleic này được chứa trong ngăn liposom trong pha nước.

### **Liposom cation**

Các liposom có thể được hợp thành từ các lipit cation, anion, và/hoặc trung tính. Trong vai trò là một phân nhóm quan trọng của các liposom, các liposom cation là liposom mà được tạo ra toàn bộ hoặc một phần từ các lipit mang điện tích dương, hoặc cụ thể hơn là lipit mà bao gồm cả nhóm cation và phần ưa chất béo. Ngoài các đặc điểm tổng quát được xác định trên đây đối với các liposom, các gốc mang điện tích dương của các lipit cation được sử dụng trong liposom cation đem lại một vài ưu điểm và một số đặc tính cấu trúc đặc thù. Ví dụ, phần ưa chất béo của lipit cation là kỵ nước và vì vậy, sẽ dẫn dắt chính nó cách xa với phần bên trong dạng nước của liposom và gắn liền với các loại không phân cực và kỵ nước khác. Ngược lại, gốc cation sẽ gắn liền với môi trường dạng nước và quan trọng hơn là, với các loại và phân tử phân cực mà nó có thể tạo phức chất trong phần bên trong dạng nước của liposom cation. Vì các lý do này, liposom cation ngày càng được nghiên cứu để sử dụng trong liệu pháp gen do tính thuận lợi của chúng hướng về các axit nucleic mang điện tích âm thông qua các tương tác tĩnh điện, đem lại các phức chất mà đem lại độ tương hợp sinh học, độc tính thấp, và khả năng thực hiện việc sản xuất quy mô lớn cần thiết cho các ứng dụng lâm sàng *in vivo*. Các lipit cation thích hợp để sử dụng trong liposom cation được liệt kê dưới đây trong bản mô tả này.

### **Hạt nano lipit**

Trái ngược với các liposom và liposom cation, hạt nano lipit (lipid nanoparticle - LNP) có cấu trúc mà bao gồm một cấu trúc đơn lớp hoặc cấu trúc hai lớp đơn lẻ của các lipit mà bao nang hợp chất trong pha rắn. Vì vậy, không giống với các liposom, hạt nano lipit không có pha nước hoặc pha lỏng khác trong phần bên trong của nó, nhưng hơn thế, các lipit từ vỏ cấu trúc hai lớp hoặc cấu trúc đơn lớp được tạo phức chất một cách trực tiếp vào hợp chất bên trong, nhờ đó bao nang nó trong lõi rắn. Hạt nano lipit thường là các bong có dạng hình cầu có sự phân tán tương đối đồng đều về hình dạng và kích cỡ. Trong khi tài liệu chuyên ngành khoa học thay đổi về kích cỡ nào làm cho hạt lipit đủ tư cách là dạng hạt nano, thì có một số điểm chòng lún trong việc đồng ý rằng hạt nano lipit có thể có đường kính nằm trong khoảng từ 10 nm đến 1000 nm. Tuy nhiên, thông thường hơn là, chúng được xem là nhỏ hơn 120 nm hoặc thậm chí 100 nm.

Đối với các hệ thống phân phối axit nucleic hạt nano lipit, vỏ lipit có thể được tạo dạng chế phẩm để bao gồm lipit cation có thể ion hóa được mà có thể tạo phức chất vào và gắn

liền với xương sống mang điện tích âm của lõi axit nucleic. Các lipid cation có thể ion hóa được có trị số pKa biểu kiến dưới khoảng 7 có lợi ích là đem lại lipid cation để tạo phức chất với xương sống mang điện tích âm của axit nucleic và nạp vào hạt nano lipid ở trị số độ pH dưới pKa của lipid có thể ion hóa được mà ở đó, nó mang điện tích dương. Sau đó, ở trị số độ pH sinh lý, hạt nano lipid có thể vận dụng phần bên ngoài tương đối trung tính cho phép có được mức tăng đáng kể về thời gian bán hủy lưu thông của các hạt sau khi cho dùng trong tĩnh mạch. Trong bối cảnh về cách phân phối axit nucleic, hạt nano lipid đem lại nhiều ưu điểm so với các hệ thống phân phối axit nucleic trên cơ sở lipid khác bao gồm cả hiệu quả bao nang axit nucleic cao, sự chuyển nhiễm công hiệu, mức thâm nhập vào mô để phân phối chất trị liệu được cải thiện, và mức của tính gây độc tế bào và tính sinh miễn dịch thấp.

Trước khi phát triển các hệ thống phân phối hạt nano lipid dùng cho các axit nucleic, các lipid cation được nghiên cứu một cách rộng khắp trong vai trò là chất liệu tổng hợp dùng cho việc phân phối các thuốc axit nucleic. Trong các nỗ lực sớm này, sau khi trộn cùng nhau ở độ pH sinh lý, các axit nucleic được làm ngưng tụ bằng các lipid cation để tạo thành các phức chất lipid-axit nucleic được biết đến với tên gọi là các phức chất lipid. Tuy nhiên, các phức chất lipid đã chứng tỏ là không ổn định và đặc trưng bởi các mức phân bố kích cỡ rộng nằm trong khoảng từ thang đo dưới micromét đến một vài micromét. Các phức chất lipid, như chất phản ứng Lipofectamine®, đã tìm được tính hữu dụng đáng kể cho phương pháp chuyển nhiễm *in vitro*. Tuy nhiên, các phức chất lipid thế hệ thứ nhất này chưa chứng tỏ là hữu ích *in vivo*. Kích cỡ hạt lớn và điện tích dương (được truyền bằng lipid cation) đem lại mức thanh thải nhanh chóng trong huyết tương, tán huyết và các độc tính khác, cũng như sự hoạt hóa hệ miễn dịch.

### **Các dạng chế phẩm lipid-mARN**

Chất mARN như được bộc lộ trong bản mô tả này hoặc muối được dụng của nó có thể được sáp nhập vào dạng chế phẩm lipid (tức là, chất dẫn phân phối trên cơ sở lipid).

Trong ngữ cảnh của sáng chế này, chất dẫn phân phối trên cơ sở lipid thường giúp vận chuyển mARN mong muốn vào tế bào hoặc mô đích. Chất dẫn phân phối trên cơ sở lipid có thể là chất dẫn phân phối trên cơ sở lipid thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, chất dẫn phân phối trên cơ sở lipid này là liposom, liposom cation, hoặc hạt nano lipid chứa mARN theo sáng chế này. Theo một số phương

án, chất dẫn phân phối trên cơ sở lipit này bao gồm hạt nano hoặc cấu trúc hai lớp của các phân tử lipit và mARN theo sáng chế này. Theo một số phương án, tốt hơn, nếu cấu trúc hai lớp lipit còn bao gồm lipit trung tính hoặc polyme. Theo một số phương án, tốt hơn, nếu dạng chế phẩm lipit bao gồm môi trường lỏng. Theo một số phương án, tốt hơn, nếu dạng chế phẩm này bao nang thêm axit nucleic. Theo một số phương án, tốt hơn, nếu dạng chế phẩm lipit này còn bao gồm axit nucleic và lipit trung tính hoặc polyme. Theo một số phương án, tốt hơn, nếu dạng chế phẩm lipit này bao nang axit nucleic.

Bản mô tả này đưa ra các dạng chế phẩm lipit bao gồm một hoặc nhiều phân tử mARN trị liệu được bao nang trong dạng chế phẩm lipit. Theo một số phương án, dạng chế phẩm lipit này chứa các liposom. Theo một số phương án, dạng chế phẩm lipit này chứa liposom cation. Theo một số phương án, dạng chế phẩm lipit này chứa hạt nano lipit.

Theo một số phương án, mARN này được bao nang hoàn toàn trong phần lipit của dạng chế phẩm lipit sao cho mARN trong dạng chế phẩm lipit này có tính đề kháng trong dung dịch nước đối với hiện tượng suy biến nucleaza. Theo các phương án khác, các dạng chế phẩm lipit được mô tả trong bản mô tả này về cơ bản không độc đối với các động vật có vú như con người.

Các dạng chế phẩm lipit theo sáng chế cũng thường có tổng tỷ số lipit:ARN (tỷ số khối lượng/khối lượng) là từ khoảng 1:1 đến khoảng 100:1, từ khoảng 1:1 đến khoảng 50:1, từ khoảng 2:1 đến khoảng 45:1, từ khoảng 3:1 đến khoảng 40:1, từ khoảng 5:1 đến khoảng 38:1, hoặc từ khoảng 6:1 đến khoảng 40:1, hoặc từ khoảng 7:1 đến khoảng 35:1, hoặc từ khoảng 8:1 đến khoảng 30:1; hoặc từ khoảng 10:1 đến khoảng 25:1; hoặc từ khoảng 8:1 đến khoảng 12:1; hoặc từ khoảng 13:1 đến khoảng 17:1; hoặc từ khoảng 18:1 đến khoảng 24:1; hoặc từ khoảng 20:1 đến khoảng 30:1. Theo một số phương án được ưu tiên, tổng tỷ số lipit:ARN (tỷ số khối lượng/khối lượng) là từ khoảng 10:1 đến khoảng 25:1. Tỷ số này có thể là trị số hoặc trị số con bất kỳ trong phạm vi các khoảng được liệt kê, bao gồm cả các điểm đầu mút.

Các dạng chế phẩm lipit theo sáng chế này thường có đường kính trung bình là từ khoảng 30 nm đến khoảng 150 nm, từ khoảng 40 nm đến khoảng 150 nm, từ khoảng 50 nm đến khoảng 150 nm, từ khoảng 60 nm đến khoảng 130 nm, từ khoảng 70 nm đến khoảng 110 nm, từ khoảng 70 nm đến khoảng 100 nm, từ khoảng 80 nm đến khoảng 100 nm, từ khoảng 90 nm đến khoảng 100 nm, từ khoảng 70 đến khoảng 90 nm, từ khoảng 80 nm đến khoảng 90 nm, từ khoảng 70 nm đến khoảng 80 nm, hoặc khoảng 30 nm, khoảng 35

nm, khoảng 40 nm, khoảng 45 nm, khoảng 50 nm, khoảng 55 nm, khoảng 60 nm, khoảng 65 nm, khoảng 70 nm, khoảng 75 nm, khoảng 80 nm, khoảng 85 nm, khoảng 90 nm, khoảng 95 nm, khoảng 100 nm, khoảng 105 nm, khoảng 110 nm, khoảng 115 nm, khoảng 120 nm, khoảng 125 nm, khoảng 130 nm, khoảng 135 nm, khoảng 140 nm, khoảng 145 nm, hoặc khoảng 150 nm, và về cơ bản là không độc. Đường kính này có thể là trị số hoặc trị số con bất kỳ trong phạm vi các khoảng được liệt kê, bao gồm cả các điểm đầu mút. Ngoài ra, các axit nucleic, khi có mặt trong hạt nano lipid theo sáng chế này, là có tính đề kháng trong dung dịch nước đối với hiện tượng suy biến do nucleaza.

Theo các phương án được ưu tiên, các dạng chế phẩm lipid này chứa mARN, lipid cation (ví dụ, một hoặc nhiều lipid cation hoặc các muối của chúng được mô tả trong bản mô tả này), phospholipid, và lipid được tiếp hợp mà ức chế mức kết tụ của các hạt (ví dụ, một hoặc nhiều thể tiếp hợp lipid-PEG). Các dạng chế phẩm lipid này cũng có thể bao gồm cholesterol.

Trong các dạng chế phẩm axit nucleic-lipid, mARN này có thể được bao nang hoàn toàn trong phần lipid của dạng chế phẩm, nhờ đó bảo vệ axit nucleic khỏi hiện tượng suy biến nucleaza. Theo các phương án được ưu tiên, dạng chế phẩm lipid chứa mARN được bao nang hoàn toàn trong phần lipid của dạng chế phẩm lipid, nhờ đó bảo vệ axit nucleic khỏi hiện tượng suy biến nucleaza. Trong các trường hợp nhất định, mARN trong dạng chế phẩm lipid này về cơ bản không bị suy biến sau khi cho hạt tiếp xúc với nucleaza ở 37 °C trong ít nhất 20, 30, 45, hoặc 60 phút. Trong các trường hợp khác nhất định, mARN trong dạng chế phẩm lipid này về cơ bản không bị suy biến sau khi ủ dạng chế phẩm 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, mARN này được tạo phức chất với phần lipid của dạng chế phẩm.

Trong bối cảnh về các axit nucleic, có thể xác định mức bao nang hoàn toàn bằng cách thực hiện thử nghiệm loại trừ thuốc nhuộm huỳnh quang không thể thấm được qua màng, thử nghiệm này sử dụng thuốc nhuộm mà có mức huỳnh quang được tăng cường khi gắn liền với axit nucleic. Mức bao nang được xác định bằng cách bổ sung thuốc nhuộm vào dạng chế phẩm lipid, đo mức huỳnh quang thu được, và so sánh mức huỳnh quang này với mức huỳnh quang được quan sát thấy sau khi bổ sung một lượng nhỏ của chất tẩy không ion. Sự phá vỡ lớp lipid do chất tẩy làm trung gian giải phóng axit nucleic được bao nang, cho phép chất này tương tác với thuốc nhuộm không thể thấm được qua màng.

Mức bao nang Axit nucleic có thể được tính toán là  $E = (I_0 - I)/I_0$ , trong đó  $I$  và  $I_0$  được dùng để chỉ các mức cường độ huỳnh quang trước và sau khi bổ sung chất tẩy.

Theo các phương án khác, sáng chế này đề xuất chế phẩm axit nucleic-lipit bao gồm nhiều liposom-axit nucleic, liposom cation-axit nucleic, hoặc hạt nano lipit-axit nucleic. Theo một số phương án, chế phẩm axit nucleic-lipit này chứa nhiều liposom-mARN. Theo một số phương án, chế phẩm axit nucleic-lipit này chứa nhiều liposom cation-mARN. Theo một số phương án, chế phẩm axit nucleic-lipit này chứa nhiều hạt nano lipit-mARN.

Theo một số phương án, các dạng chế phẩm lipit này chứa mARN mà được bao nang hoàn toàn trong phần lipit của dạng chế phẩm, sao cho từ khoảng 30% đến khoảng 100%, từ khoảng 40% đến khoảng 100%, từ khoảng 50% đến khoảng 100%, từ khoảng 60% đến khoảng 100%, từ khoảng 70% đến khoảng 100%, từ khoảng 80% đến khoảng 100%, từ khoảng 90% đến khoảng 100%, từ khoảng 30% đến khoảng 95%, từ khoảng 40% đến khoảng 95%, từ khoảng 50% đến khoảng 95%, từ khoảng 60% đến khoảng 95%, từ khoảng 70% đến khoảng 95%, từ khoảng 80% đến khoảng 95%, từ khoảng 85% đến khoảng 95%, từ khoảng 90% đến khoảng 95%, từ khoảng 30% đến khoảng 90%, từ khoảng 40% đến khoảng 90%, từ khoảng 50% đến khoảng 90%, từ khoảng 60% đến khoảng 90%, từ khoảng 70% đến khoảng 90%, từ khoảng 80% đến khoảng 90%, hoặc ít nhất khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 91%, khoảng 92%, khoảng 93%, khoảng 94%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, hoặc khoảng 99% (hoặc phân số bất kỳ của chúng hoặc khoảng trong đó) của các hạt có mARN được bao nang trong đó. Lượng này có thể là trị số hoặc trị số con bất kỳ trong phạm vi các khoảng được liệt kê, bao gồm cả các điểm đầu mút.

Tùy thuộc vào cách sử dụng được dự định của dạng chế phẩm lipit, các tỷ lệ của các hợp phần có thể được thay đổi, và hiệu quả phân phối của một dạng chế phẩm cụ thể có thể được đo bằng cách sử dụng các thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một số phương án, polynucleotit có thể biểu hiện được và cấu trúc mARN được mô tả trong bản mô tả này được tạo dạng chế phẩm lipit. Tốt hơn, nếu dạng chế phẩm lipit được chọn lựa từ, nhưng không chỉ giới hạn ở, các liposom, liposom cation, và hạt nano

lipit. Theo một phương án được ưu tiên, dạng chế phẩm lipit là liposom cation hoặc hạt nano lipit (lipid nanoparticle - LNP) bao gồm:

- (a) mRNA theo sáng chế này,
- (b) lipit cation,
- (c) chất làm giảm mức kết tụ (như lipit polyetylen glycol (PEG) hoặc lipit được cải biến bằng PEG),
- (d) tùy ý, lipit không cation (như lipit trung tính), và
- (e) tùy ý, sterol.

Theo một số phương án, lipit cation này là lipit cation có thể ion hóa được. Theo một phương án, dạng chế phẩm hạt nano lipit này gồm (i) ít nhất một lipit cation; (ii) lipit trợ giúp; (iii) sterol (ví dụ, cholesterol); và (iv) lipit-PEG, theo tỷ số mol là khoảng 20% đến khoảng 40% lipit cation có thể ion hóa được: khoảng 25% đến khoảng 45% lipit trợ giúp: khoảng 25% đến khoảng 45% sterol; khoảng 0,5-5% lipit-PEG. Các lipit cation làm ví dụ (bao gồm cả các lipit cation có thể ion hóa được), các lipit trợ giúp (ví dụ, các lipit trung tính), sterol, và các lipit chứa phối tử (ví dụ, lipit-PEG) được mô tả dưới đây trong bản mô tả này.

Việc chọn lựa các lipit cụ thể và các chế phẩm tính theo % tương đối của chúng phụ thuộc vào một vài yếu tố bao gồm cả tác dụng trị liệu mong muốn, đích phân phối được dự định *in vivo*, và chế độ liều dùng và tần suất được lên kế hoạch. Nhìn chung, các lipit mà tương ứng với cả độ công hiệu cao (tức là, tác dụng trị liệu như hoạt tính hạ giảm mức biểu hiện hoặc hiệu quả dịch mã) và khả năng phân hủy sinh học đem lại mức thanh thải nhanh chóng ở mô thì được ưu tiên nhất. Tuy nhiên, khả năng phân hủy sinh học có thể là ít quan trọng hơn đối với các dạng chế phẩm mà được dự định cho chỉ một lần cho dùng hoặc hai lần cho dùng nơi đối tượng. Ngoài ra, chế phẩm lipit có thể đòi hỏi phương pháp xử lý công nghệ cẩn thận sao cho dạng chế phẩm lipit giữ nguyên hình thái học của nó trong suốt quá trình cho dùng *in vivo* và hành trình của nó đến đích được dự định, nhưng, sau đó, sẽ có thể giải phóng chất có hoạt tính sau khi hấp thụ vào các tế bào đích. Vì vậy, một vài dạng chế phẩm thường cần được đánh giá để tìm được dạng kết hợp khả dĩ tốt nhất của các lipit theo tỷ số mol khả dĩ tốt nhất của các lipit cũng như tỷ số giữa tổng lipit và thành phần có hoạt tính.

Các hợp phần lipit thích hợp và các phương pháp sản xuất hạt nano lipit là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả, ví dụ, trong PCT/US2020/023442, U.S.

8,058,069, U.S. 8,822,668, U.S. 9,738,593, U.S. 9,139,554, PCT/US2014/066242, PCT/US2015/030218, PCT/2017/015886, và PCT/US2017/067756, nội dung của tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

### **Các lipid cation**

Tốt hơn, nếu dạng chế phẩm lipid bao gồm lipid cation thích hợp cho việc tạo thành liposom cation hoặc hạt nano lipid. Các lipid cation được nghiên cứu một cách rộng khắp cho cách phân phối axit nucleic bởi vì chúng có thể liên kết với các màng mang điện tích âm và kích thích mức hấp thụ. Nhìn chung, các lipid cation là các chất lưỡng ái chứa nhóm đầu ưa nước dương tính, hai (hoặc nhiều hơn) đuôi ưa chất béo, hoặc phần steroid và phần kết nối giữa hai miền này. Tốt hơn, nếu lipid cation mang điện tích dương toàn phần ở khoảng độ pH sinh lý. Theo truyền thống, liposom cation là các hệ thống phân phối không virus thường được sử dụng nhất cho oligonucleotit, bao gồm cả plasmid ADN, oligo đối nghĩa, và siARN/ARN dạng kẹp tóc nhỏ-shARN. Các lipid cation, như DOTAP, (1,2-dioleoyl-3-trimethylamoni-propan) và DOTMA (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetyl-amoni metyl sulfat) có thể tạo thành các phức chất hoặc các phức chất lipid với các axit nucleic mang điện tích âm bằng sự tương tác tĩnh điện, đem lại hiệu quả chuyển nhiễm *in vitro* cao.

Trong các dạng chế phẩm lipid hiện bộc lộ, lipid cation có thể là, ví dụ, N,N-dioleoyl-N,N-dimethylamoni clorua (DODAC), N,N-distearyl-N,N-dimethylamoni bromua (DDAB), 1,2-dioleoyltrimethylamonipropan clorua (DOTAP) (còn được biết đến với tên gọi là muối N-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylamoni clorua và 1,2-Dioleoyloxy-3-trimethylaminopropan clorua), N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylamoni clorua (DOTMA), N,N-dimetyl-2,3-dioleoyloxypropylamin (DODMA), 1,2-DiLinoleoyloxy-N,N-dimethylaminopropan (DLinDMA), 1,2-Dilinolenyloxy-N,N-dimethylaminopropan (DLinDMA), 1,2-di-γ-linolenyloxy-N,N-dimethylaminopropan (γ-DLinDMA), 1,2-Dilinoleylcarbamoxyloxy-3-dimethylaminopropan (DLin-C-DAP), 1,2-Dilinoleoyloxy-3-(dimethylamino)axetoxipropan (DLin-DAC), 1,2-Dilinoleoyloxy-3-morpholinopropan (DLin-MA), 1,2-Dilinoleoyl-3-dimethylaminopropan (DLinDAP), 1,2-Dilinoleylthio-3-dimethylaminopropan (DLin-S-DMA), 1-Linoleoyl-2-linoleoyloxy-3-dimethylaminopropan (DLin-2-DMA), muối 1,2-Dilinoleoyloxy-3-trimethylaminopropan clorua (DLin-TMA.Cl), muối 1,2-Dilinoleoyl-3-trimethylaminopropan clorua (DLin-TAP.Cl), 1,2-Dilinoleoyloxy-3-

(N-metylpiperazino)propan (DLin-MPZ), hoặc 3-(N,N-Dilinoleylamino)-1,2-propandiol (DLinAP), 3-(N,N-Dioleoylamino)-1,2-propandiol (DOAP), 1,2-Dilinoleyl-3-(2-N,N-dimetylamino)etoxipropan (DLin-EG-DMA), 2,2-Dilinoleyl-4-dimetylaminmetyl-[1,3]-dioxolan (DLin-K-DMA) hoặc các chất đồng đẳng của chúng, (3aR,5s,6aS)-N,N-dimetyl-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-(dimetylamin)butanoat (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hydroxydodexyl)amin)etyl)(2-hydroxydodexyl)amin)etyl)piperazin-1-yl)etylazanediy)didodecan-2-ol (C12-200), 2,2-dilinoleyl-4-(2-dimetylamin)etyl-[1,3]-dioxolan (DLin-K-C2-DMA), 2,2-dilinoleyl-4-dimetylaminmetyl-[1,3]-dioxolan (DLin-K-DMA), (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl-4-(dimetylamin)butanoat (DLin-M-C3-DMA), 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yloxy)-N,N-dimetylpropan-1-amin (MC3 Ether), 4-((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yloxy)-N,N-dimetylbutan-1-amin (MC4 Ether), hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Các lipid cation khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, N,N-distearyl-N,N-dimetylamonium bromua (DDAB), 3P-(N-(N',N'-dimetylamin)etan)-carbamoyl)cholesterol (DC-Choi), N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N-2-(spermincarboxamido)etyl)-N,N-dimetylamonium trifluoraxetat (DOSPA), dioctadexylamidoglyxyl carboxyspermin (DOGS), 1,2-dioleoyl-sn-3-phosphoetanolamin (DOPE), 1,2-dioleoyl-3-dimetylamonium propan (DODAP), N-(1,2-dimyristyloxyprop-3-yl)-N,N-dimetyl-N-hydroxyetylamonium bromua (DMRIE), và 2,2-Dilinoleyl-4-dimetylamin)etyl-[1,3]-dioxolan (XTC). Ngoài ra, các chế phẩm thương mại của các lipid cation có thể được sử dụng, như, ví dụ, LIPOFECTIN (bao gồm cả DOTMA và DOPE, sẵn có từ GIBCO/BRL), và Lipofectamine (bao gồm DOSPA và DOPE, sẵn có từ GIBCO/BRL).

Các lipid cation thích hợp khác được bộc lộ trong tài liệu: các 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; các Công bố Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 2011/0256175, 2012/0128760, và 2012/0027803; Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 8,158,601; và Love và đồng tác giả, PNAS, 107(5), 1864-69, 2010, nội dung của tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

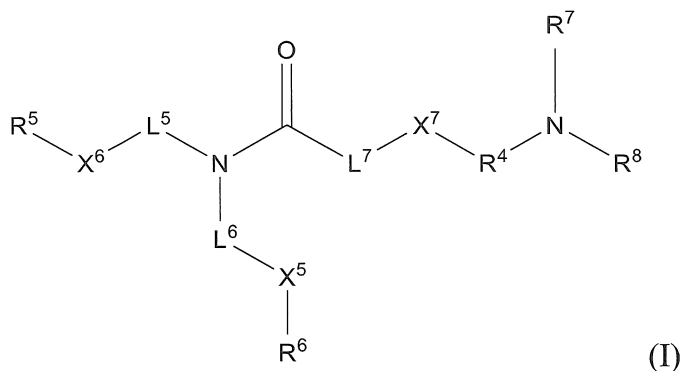
Các lipid cation thích hợp khác bao gồm những loại có các nhóm axit béo thay thế khác và các nhóm dialkylamino khác, bao gồm cả những loại, mà trong đó các phân tử thể

alkyl là khác nhau (ví dụ, N-etyl- N-metyl-amino-, và N-propyl-N-etyl-amino-). Các lipit này là một phần của chủng loại con của các lipit cation được gọi là các lipit amino. Theo một số phương án về các dạng chế phẩm lipit được mô tả trong bản mô tả này, lipit cation là lipit amino. Nhìn chung, các lipit amino có ít chuỗi axyl bão hòa hơn được định kích cỡ một cách dễ dàng hơn, cụ thể là khi các phức chất này phải được định kích cỡ dưới khoảng 0,3 micromét, vì các mục đích của việc tiết trùng bằng bộ lọc. Có thể sử dụng các lipit amino chứa các axit béo không bão hòa có độ dài chuỗi carbon nằm trong khoảng từ C<sub>14</sub> đến C<sub>22</sub>. Các khung khác cũng có thể được sử dụng để tách nhóm amino và axit béo hoặc phần alkyl béo của lipit amino.

Theo một số phương án, dạng chế phẩm lipit này chứa lipit cation có Công thức I theo đơn đăng ký bằng sáng chế PCT/EP2017/064066. Trong ngữ cảnh này, phần bộc lộ của PCT/EP2017/064066 cũng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án, các lipit cation hoặc amino theo sáng chế này là có thể ion hóa được và có ít nhất một nhóm có thể proton hóa được hoặc nhóm có thể khử proton được, sao cho lipit này mang điện tích dương ở độ pH ở hoặc dưới độ pH sinh lý (ví dụ, độ pH 7,4), và trung tính ở độ pH thứ hai, tốt hơn, nếu ở hoặc trên độ pH sinh lý. Tất nhiên, cần phải hiểu rằng việc bổ sung hoặc loại bỏ các proton trong vai trò là chức năng của độ pH là quy trình trạng thái cân bằng, và rằng việc đề cập đến lipit mang điện tích hoặc trung tính được dùng để chỉ bản chất của các loại nổi trội và không đòi hỏi rằng tất cả lipit này phải có mặt dưới dạng mang điện tích hoặc trung tính. Các lipit mà có nhiều hơn một nhóm có thể proton hóa được hoặc nhóm có thể khử proton được, hoặc lipit là ion lưỡng cực, không bị loại trừ khỏi cách sử dụng theo sáng chế. Theo các phương án nhất định, các lipit có thể proton hóa được có pKa của nhóm có thể proton hóa được nằm trong khoảng từ khoảng 4 đến khoảng 11. Theo một số phương án, lipit cation có thể ion hóa được có pKa là khoảng 5 đến khoảng 7. Theo một số phương án, pKa của lipit cation có thể ion hóa được là khoảng 6 đến khoảng 7.

Theo một số phương án, dạng chế phẩm lipit này chứa lipit cation có thể ion hóa được có Công thức I:



hoặc muối được dung hoặc solvat của nó, trong đó mỗi  $R^5$  và  $R^6$  được độc lập chọn lựa từ nhóm gồm  $C_1$ - $C_{31}$  alkyl,  $C_2$ - $C_{31}$  alkenyl hoặc  $C_2$ - $C_{31}$  alkynyl tuyến tính hoặc phân nhánh và cholesteryl; mỗi  $L^5$  và  $L^6$  được độc lập chọn lựa từ nhóm gồm  $C_1$ - $C_{20}$  alkyl và  $C_2$ - $C_{20}$  alkenyl tuyến tính;  $X^5$  là  $-C(O)O-$ , nhờ đó  $-C(O)O-R^6$  được tạo thành hoặc  $-OC(O)-$  nhờ đó  $-OC(O)-R^6$  được tạo thành;  $X^6$  là  $-C(O)O-$  nhờ đó  $-C(O)O-R^5$  được tạo thành hoặc  $-OC(O)-$  nhờ đó  $-OC(O)-R^5$  được tạo thành;  $X^7$  là S hoặc O;  $L^7$  là vắng mặt hoặc alkyl thấp hơn;  $R^4$  là  $C_1$ - $C_6$  alkyl tuyến tính hoặc phân nhánh; và mỗi  $R^7$  và  $R^8$  được độc lập chọn lựa từ nhóm gồm hydro và  $C_1$ - $C_6$  alkyl tuyến tính hoặc phân nhánh.

Theo một số phương án,  $X^7$  là S.

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

Theo một số phương án, mỗi  $R^7$  và  $R^8$  được độc lập chọn lựa từ nhóm gồm metyl, etyl 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 tuyến tính. Theo một số phương án, mỗi  $L^5$  và  $L^6$  là  $C_9$  alkyl tuyến tính.

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 này chứa một mối liên kết kép đơn lẻ. Theo một số phương án, mỗi  $R^5$  và  $R^6$  là alkyl. Theo một số phương án,  $R^5$  là alkyl phân nhánh. Theo một số phương án, mỗi  $R^5$  và  $R^6$  được độc lập chọn lựa từ nhóm gồm  $C_9$  alkyl,  $C_9$  alkenyl và  $C_9$  alkynyl. Theo một số phương án, mỗi  $R^5$  và  $R^6$  được độc lập chọn lựa từ nhóm gồm  $C_{11}$  alkyl,  $C_{11}$  alkenyl và  $C_{11}$  alkynyl. Theo một số phương án, mỗi  $R^5$  và  $R^6$  được độc lập chọn lựa từ nhóm gồm  $C_7$  alkyl,  $C_7$  alkenyl và  $C_7$  alkynyl. Theo một số phương án,  $R^5$  là  $-CH((CH_2)_pCH_3)_2$  hoặc

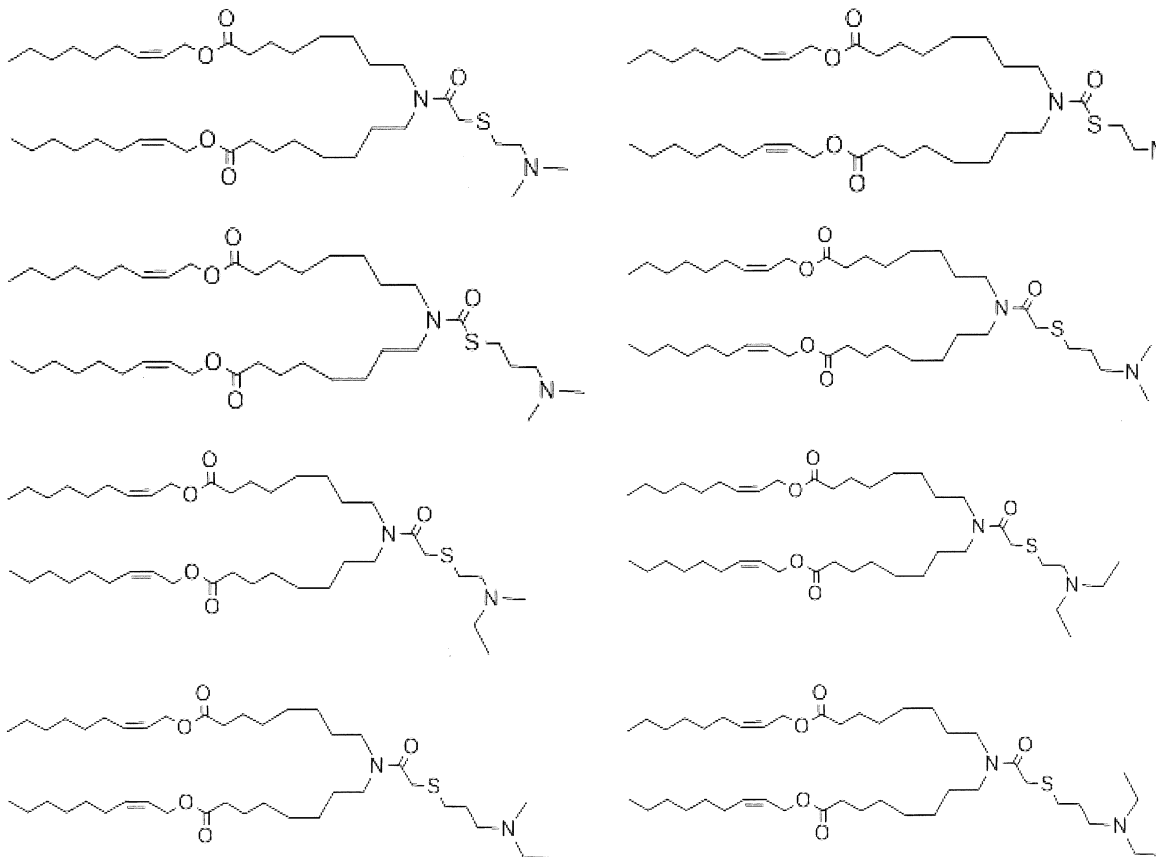
$-\text{CH}((\text{CH}_2)_p\text{CH}_3)((\text{CH}_2)_{p-1}\text{CH}_3)$ , trong đó  $p$  là 4-8. Theo một số phương án,  $p$  là 5 và  $L^5$  là  $\text{C}_1\text{-C}_3$  alkyl. Theo một số phương án,  $p$  là 6 và  $L^5$  là  $\text{C}_3$  alkyl. Theo một số phương án,  $p$  là 7. Theo một số phương án,  $p$  là 8 và  $L^5$  là  $\text{C}_1\text{-C}_3$  alkyl. Theo một số phương án,  $R^5$  gồm  $-\text{CH}((\text{CH}_2)_p\text{CH}_3)((\text{CH}_2)_{p-1}\text{CH}_3)$ , trong đó  $p$  là 7 hoặc 8.

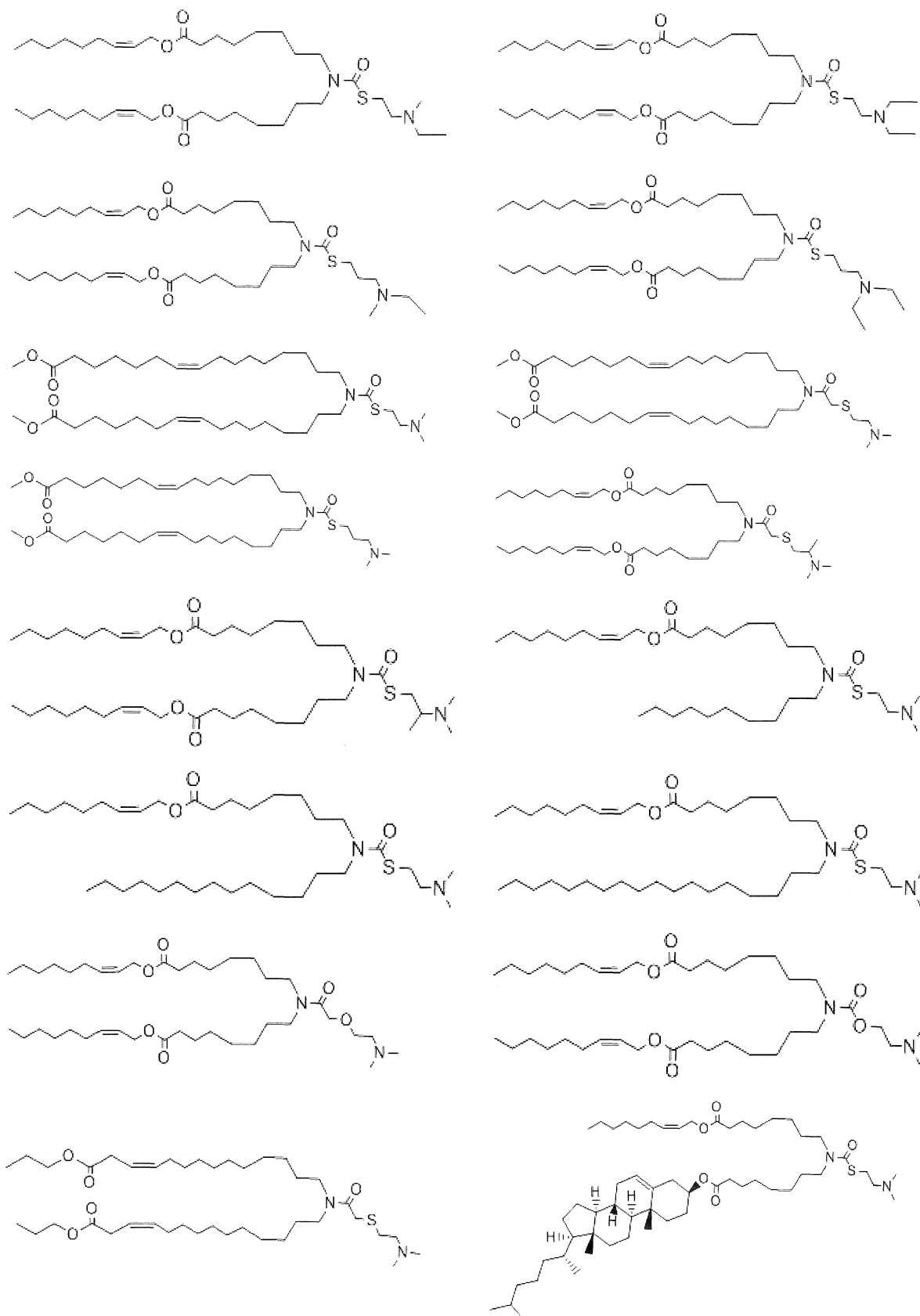
Theo một số phương án,  $R^4$  là etylen hoặc propylen. Theo một số phương án,  $R^4$  là  $n$ -propylen hoặc isobutylen.

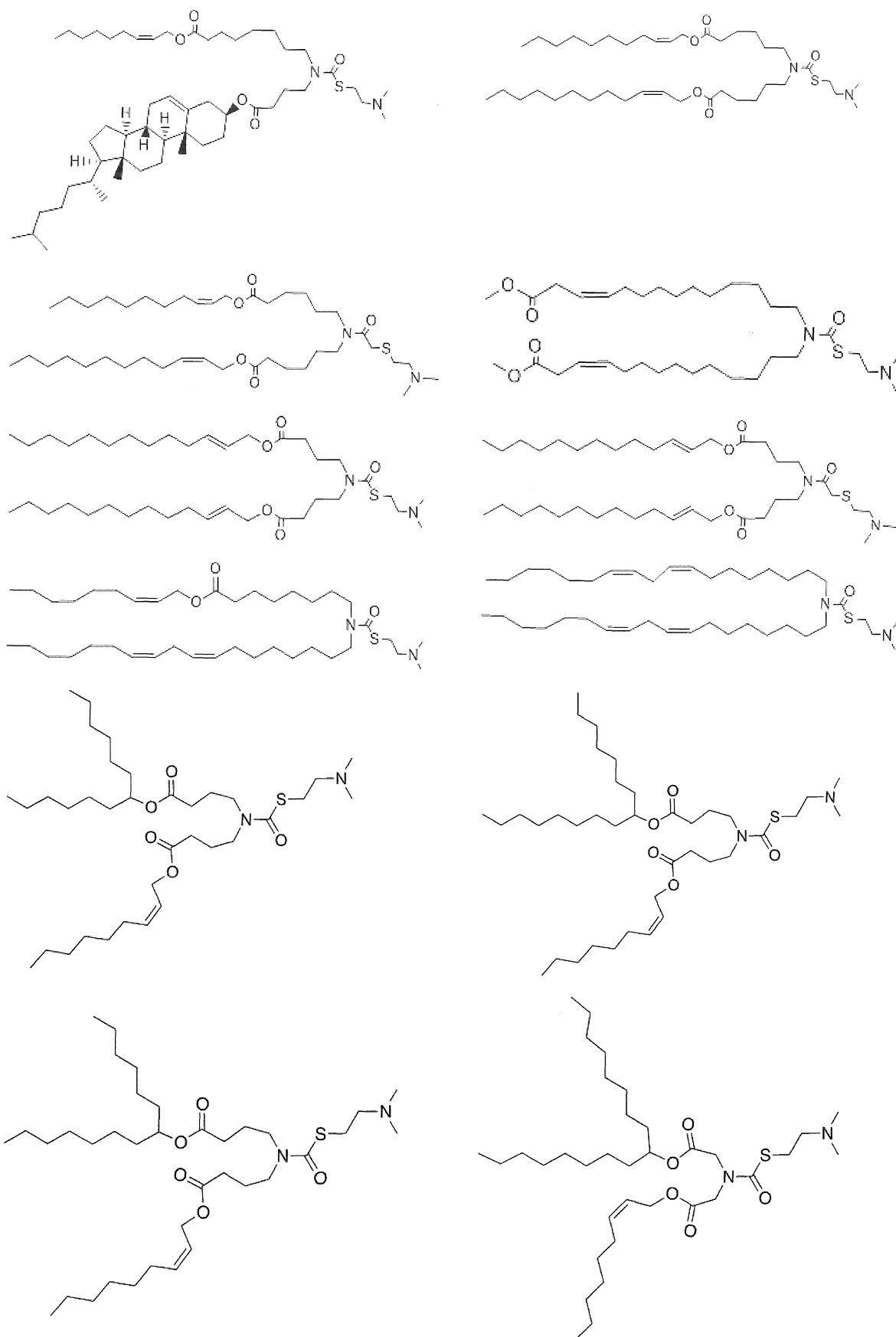
Theo một số phương án,  $L^7$  là vắng mặt,  $R^4$  là etylen,  $X^7$  là S và mỗi  $R^7$  và  $R^8$  là methyl. Theo một số phương án,  $L^7$  là vắng mặt,  $R^4$  là  $n$ -propylen,  $X^7$  là S và mỗi  $R^7$  và  $R^8$  là methyl. Theo một số phương án,  $L^7$  là vắng mặt,  $R^4$  là etylen,  $X^7$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

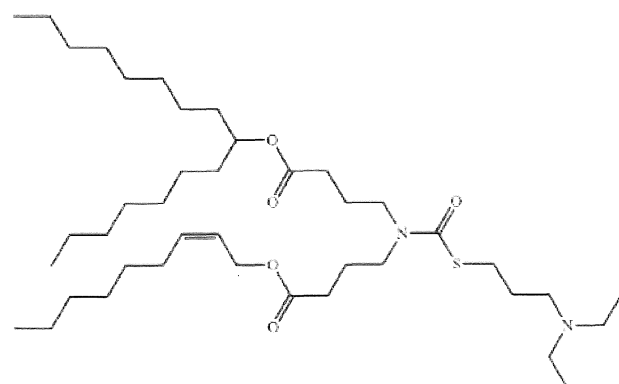
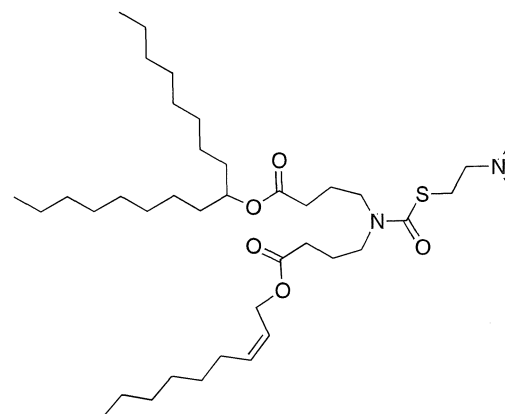
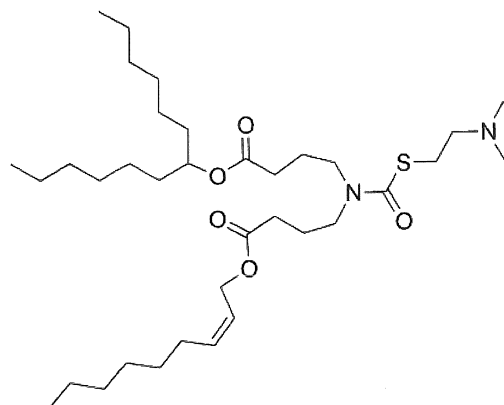
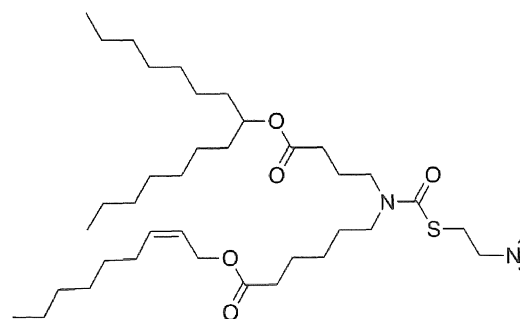
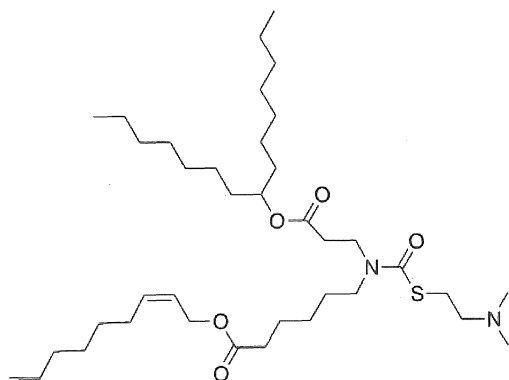
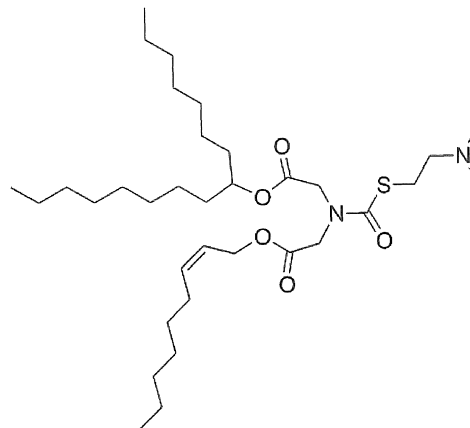
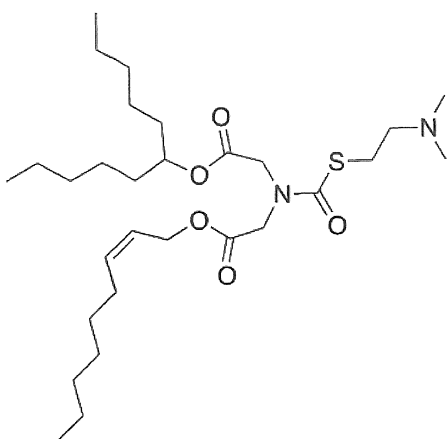
Theo một số phương án,  $X^7$  là S,  $X^5$  là  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ , nhờ đó  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-R^6$  được tạo thành,  $X^6$  là  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$  nhờ đó  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-R^5$  được tạo thành, mỗi  $L^5$  và  $L^6$  độc lập là  $\text{C}_3\text{-C}_7$  alkyl tuyến tính,  $L^7$  là vắng mặt,  $R^5$  là  $-\text{CH}((\text{CH}_2)_p\text{CH}_3)_2$ , và  $R^6$  là  $\text{C}_7\text{-C}_{12}$  alkenyl. Theo một số phương án khác nữa,  $p$  là 6 và  $R^6$  là  $\text{C}_9$  alkenyl.

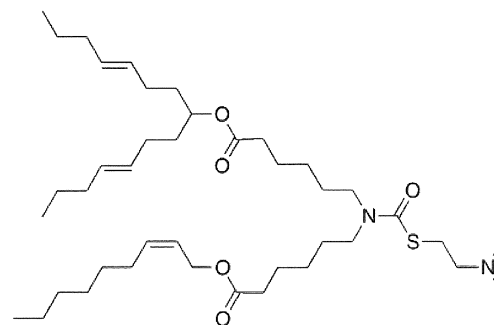
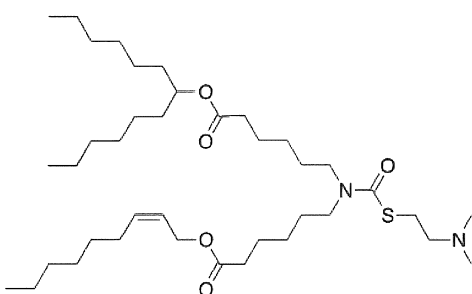
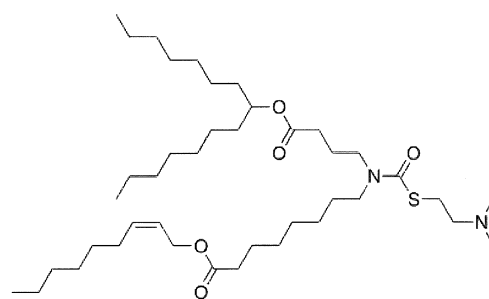
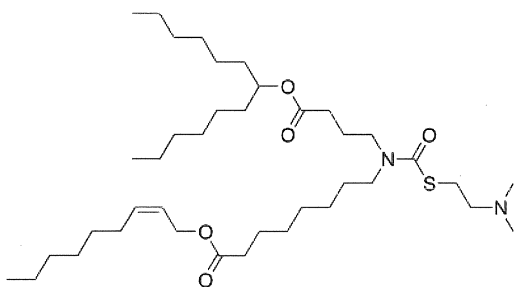
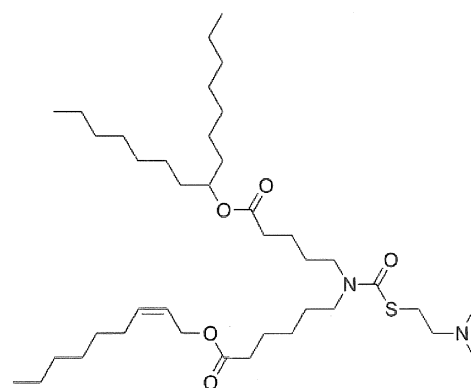
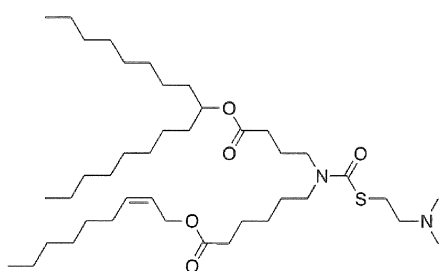
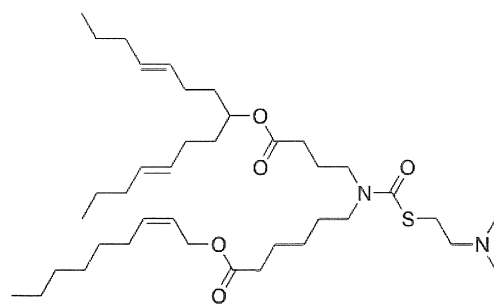
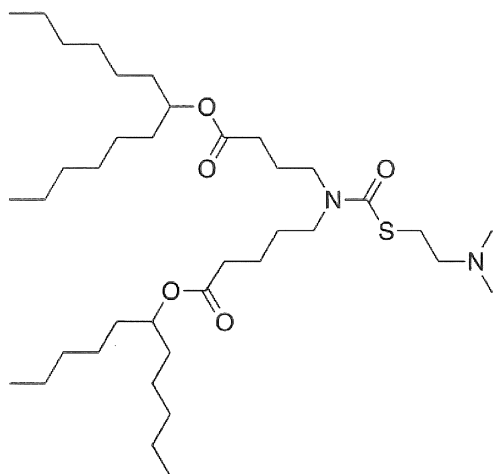
Theo một số phương án, dạng chế phẩm lipid này chứa lipid cation có thể ion hóa được được chọn lựa từ nhóm gồm

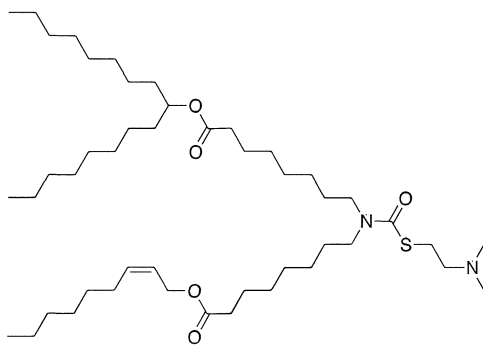
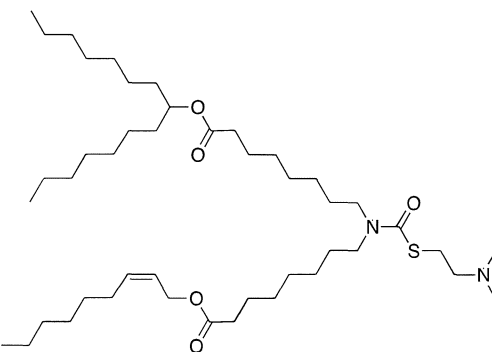
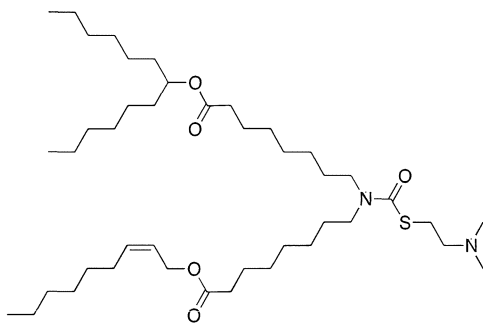
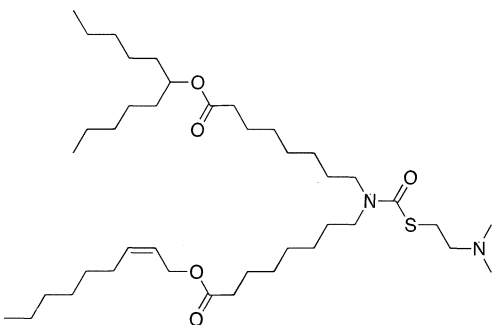
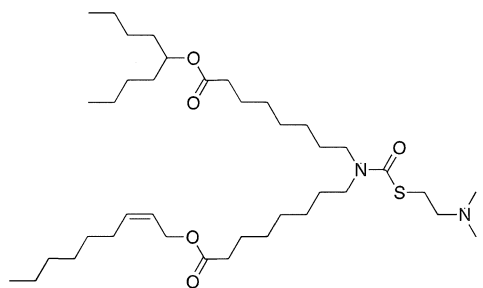
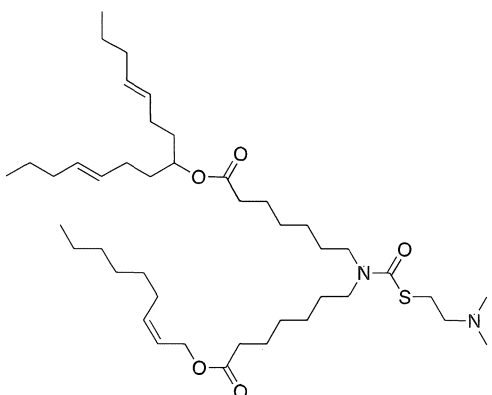
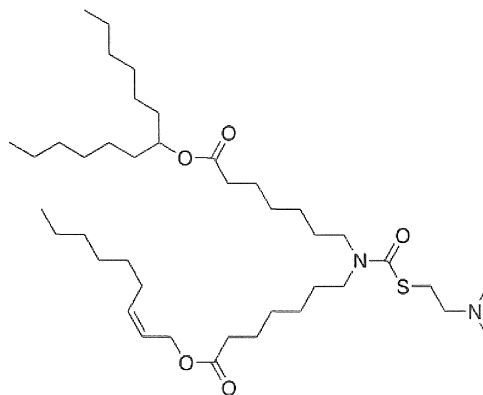
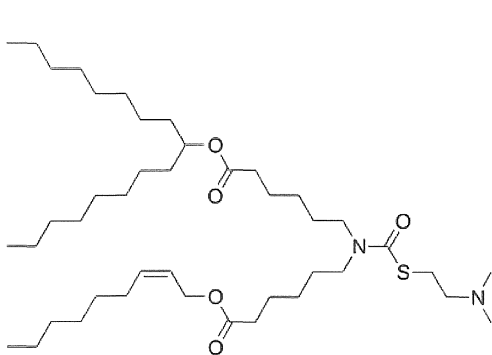


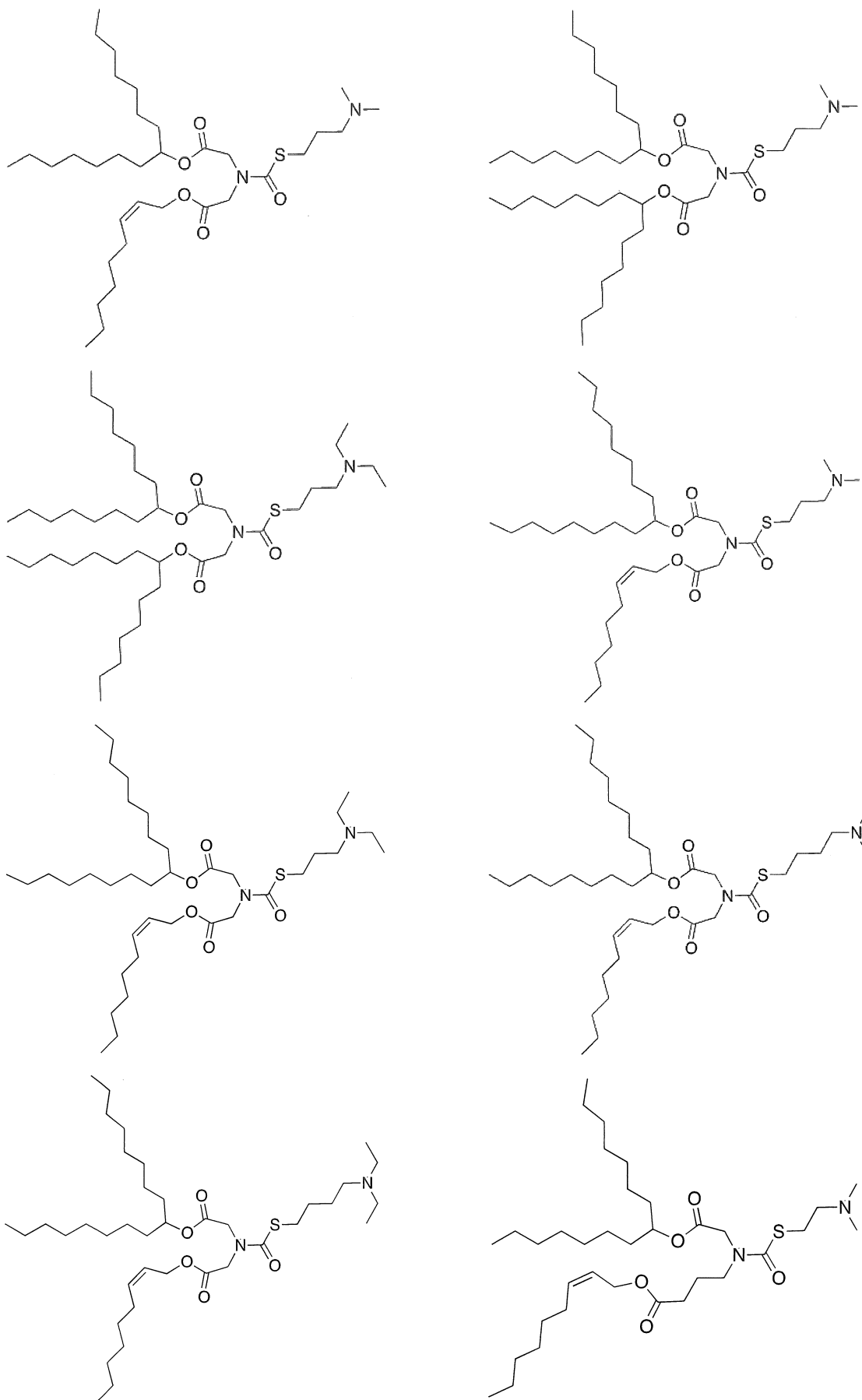


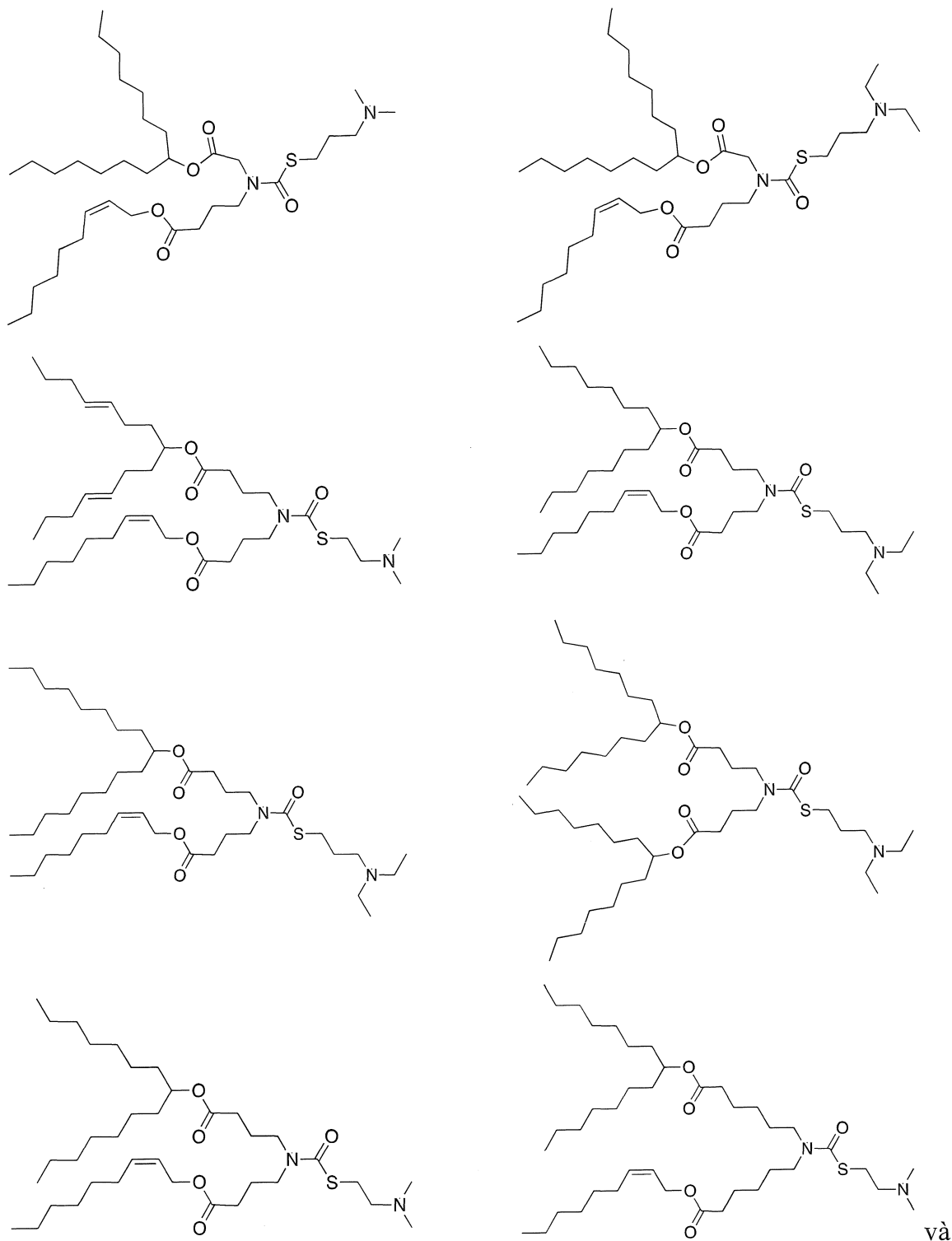




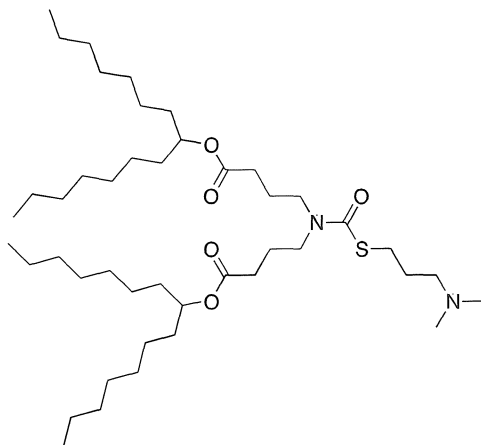








và



Theo một số phương án, một hoặc nhiều lipid bất kỳ được liệt kê trong bản mô tả này rõ ràng có thể bị loại trừ.

### **Các lipid trợ giúp và sterol**

Các dạng chế phẩm mARN-lipid theo sáng chế này có thể bao gồm lipid trợ giúp, chất này có thể được gọi là lipid trung tính, lipid trợ giúp trung tính, lipid không cation, lipid trợ giúp cation, lipid anion, lipid trợ giúp anion, hoặc lipid ion lưỡng cực. Đã phát hiện ra rằng các dạng chế phẩm lipid, cụ thể là liposom cation và hạt nano lipid đã làm tăng mức hấp thụ tế bào nếu các lipid trợ giúp có mặt trong dạng chế phẩm. (Curr. Drug Metab. 2014; 15(9):882-92). Ví dụ, một số nghiên cứu đã biểu lộ rằng các lipid trung tính và ion lưỡng cực như 1,2-dioleoyl-sn-glyxero-3-phosphatidylcholin (DOPC), Di-Oleoyl-Phosphatidyl-Etanoalamin (DOPE) và 1,2-DiStearoyl-sn-glyxero-3-PhosphoCholin (DSPC), là có tính tạo sự dung hợp hơn (tức là, tạo thuận lợi cho quá trình dung hợp) so với các lipid cation, có thể ảnh hưởng đến các đặc tính đa hình của các phức chất lipid-axit nucleic, thúc đẩy sự chuyển tiếp từ pha dạng lớp đến pha lục giác, và vì vậy, kích thích mức dung hợp và mức phá vỡ của màng tế bào. (Nanomedicine (Lond). 2014 Jan; 9(1):105-20). Ngoài ra, cách sử dụng các lipid trợ giúp có thể giúp làm giảm các tác dụng có hại tiềm năng bất kỳ từ việc sử dụng nhiều lipid cation tràn lan như độc tính và tính sinh miễn dịch.

Các ví dụ không giới hạn về các lipid không cation thích hợp cho các dạng chế phẩm lipid theo sáng chế này bao gồm các phospholipid như lexitin, phosphatidyletanolamin, lysolexitin, lysophosphatidyletanolamin, phosphatidylserin, phosphatidylinositol, sphingomyelin, sphingomyelin trứng (egg sphingomyelin - ESM), xephalin, cardiolipin, axit phosphatidic, xerebrosit, dixetylphosphat, 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-maleimide-methyl)-xyclohexan-1-carboxylat (DOPE-mal), dipalmitoyl-phosphatidyletanolamin (DPPE), dimyristoyl-phosphatidyletanolamin (DMPE), distearoyl-phosphatidyletanolamin (DSPE), monomethyl-phosphatidyletanolamin, dimethyl-phosphatidyletanolamin, dielaidoyl-phosphatidyletanolamin (DEPE), stearyl-oleoyl-phosphatidyletanolamin (SOPE), lysophosphatidylcholin, dilinoleoylphosphatidylcholin, và các hỗn hợp của chúng. Cũng có thể sử dụng các phospholipit diacylphosphatidylcholin và diacylphosphatidyletanolamin khác. Tốt hơn, nếu các nhóm axyl trong các lipid này là các nhóm axyl được lấy từ các axit béo có các chuỗi carbon C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>, ví dụ, lauroyl, myristoyl, palmitoyl, stearyl, hoặc oleoyl.

Các ví dụ phụ thêm về các lipid không cation bao gồm các sterol như cholesterol và các dẫn xuất của chúng. Một nghiên cứu đã kết luận rằng trong vai trò là lipid trợ giúp, cholesterol làm tăng khoảng cách không gian của các điện tích của lớp lipid có mặt phân giới với axit nucleic làm cho sự phân bố điện tích trùng khớp sự phân bố điện tích của axit nucleic một cách gần gũi hơn. (J. R. Soc. Interface. 2012 Mar 7; 9(68): 548–561). Các ví dụ không giới hạn về các dẫn xuất cholesterol bao gồm các chất tương tự phân cực như 5 $\alpha$ -cholestanol, 5 $\alpha$ -coprostanol, ete của cholesteryl-(2'-hydroxy)-etyl, ete của cholesteryl-(4'-hydroxy)-butyl, và 6-ketcholestanol; các chất tương tự không phân cực như 5 $\alpha$ -cholestan, cholestenon, 5 $\alpha$ -cholestanon, 5 $\alpha$ -cholestanon, và cholesteryl decanoat; và các hỗn hợp của chúng. Theo các phương án được ưu tiên, dẫn xuất cholesterol là chất tương tự phân cực như ete của cholesteryl-(4'-hydroxy)-butyl.

Theo một số phương án, lipid trợ giúp có mặt trong dạng chế phẩm lipid bao gồm hoặc gồm hỗn hợp của một hoặc nhiều phospholipit và cholesterol hoặc dẫn xuất của nó. Theo các phương án khác, lipid trợ giúp có mặt trong dạng chế phẩm lipid bao gồm hoặc gồm một hoặc nhiều phospholipit, ví dụ, dạng chế phẩm lipid không có cholesterol. Theo các phương án khác nữa, lipid trợ giúp có mặt trong dạng chế phẩm lipid bao gồm hoặc gồm cholesterol hoặc dẫn xuất của nó, ví dụ, dạng chế phẩm lipid không có phospholipit.

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

Theo một số phương án, lipid trợ giúp bao gồm từ khoảng 20 % mol đến khoảng 50 % mol, từ khoảng 22 % mol đến khoảng 48 % mol, từ khoảng 24 % mol đến khoảng 46 % mol, khoảng 25 % mol đến khoảng 44 % mol, từ khoảng 26 % mol đến khoảng 42 % mol, từ khoảng 27 % mol đến khoảng 41 % mol, từ khoảng 28 % mol đến khoảng 40 % mol, hoặc khoảng 29 % mol, khoảng 30 % mol, khoảng 31 % mol, khoảng 32 % mol, khoảng 33 % mol, khoảng 34 % mol, khoảng 35 % mol, khoảng 36 % mol, khoảng 37 % mol, khoảng 38 % mol, hoặc khoảng 39 % mol (hoặc phân số bất kỳ của chúng hoặc khoảng trong đó) của tổng lipid có mặt trong dạng chế phẩm lipid.

Theo một số phương án, tổng của lipid trợ giúp trong dạng chế phẩm bao gồm hai lipid trợ giúp hoặc nhiều hơn và tổng lượng của lipid trợ giúp bao gồm từ khoảng 20 % mol đến khoảng 50 % mol, từ khoảng 22 % mol đến khoảng 48 % mol, từ khoảng 24 % mol đến khoảng 46 % mol, khoảng 25 % mol đến khoảng 44 % mol, từ khoảng 26 % mol đến khoảng 42 % mol, từ khoảng 27 % mol đến khoảng 41 % mol, từ khoảng 28 % mol đến khoảng 40 % mol, hoặc khoảng 29 % mol, khoảng 30 % mol, khoảng 31 % mol, khoảng 32 % mol, khoảng 33 % mol, khoảng 34 % mol, khoảng 35 % mol, khoảng 36 % mol, khoảng 37 % mol, khoảng 38 % mol, hoặc khoảng 39 % mol (hoặc phân số bất kỳ của chúng hoặc khoảng trong đó) của tổng lipid có mặt trong dạng chế phẩm lipid. Theo một số phương án, các lipid trợ giúp này là dạng kết hợp của DSPC và DOTAP. Theo một số phương án, các lipid trợ giúp này là dạng kết hợp của DSPC và DOTMA.

Cholesterol hoặc dẫn xuất cholesterol trong dạng chế phẩm lipid này có thể chứa lên đến khoảng 40 % mol, khoảng 45 % mol, khoảng 50 % mol, khoảng 55 % mol, hoặc khoảng 60 % mol của tổng lipid có mặt trong dạng chế phẩm lipid. Theo một số phương án, cholesterol hoặc dẫn xuất cholesterol này chứa khoảng 15 % mol đến khoảng 45 % mol, khoảng 20 % mol đến khoảng 40 % mol, khoảng 30 % mol đến khoảng 40 % mol, hoặc khoảng 35 % mol, khoảng 36 % mol, khoảng 37 % mol, khoảng 38 % mol, khoảng 39 % mol, hoặc khoảng 40 % mol của tổng lipid có mặt trong dạng chế phẩm lipid.

Tỷ lệ phần trăm của lipit trợ giúp có mặt trong dạng chế phẩm lipit là lượng đích, và lượng thực sự của lipit trợ giúp có mặt trong dạng chế phẩm có thể thay đổi, ví dụ, là  $\pm 5$  % mol.

Dạng chế phẩm lipit chứa hợp chất lipit cation hoặc hợp chất lipit cation có thể ion hóa được có thể là trên cơ sở mol khoảng 20-40% hợp chất lipit cation, khoảng 25-40 % cholesterol, khoảng 25-50% lipit trợ giúp, và khoảng 0,5-5% của lipit polyetylen glycol (PEG), trong đó phần trăm này là so với tổng lipit có mặt trong dạng chế phẩm. Theo một số phương án, chế phẩm này là khoảng 22-30% hợp chất lipit cation, khoảng 30- 40% cholesterol, khoảng 30-40% lipit trợ giúp, và khoảng 0,5-3% của lipit-PEG, trong đó phần trăm này là so với tổng lipit có mặt trong dạng chế phẩm.

### **Thế tiếp hợp lipit**

Các dạng chế phẩm lipit được mô tả trong bản mô tả này có thể còn bao gồm thế tiếp hợp lipit. Lipit được tiếp hợp này là hữu ích cho việc phòng ngừa hiện tượng kết tụ của các hạt. Các lipit được tiếp hợp thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thế tiếp hợp lipit-PEG, các thế tiếp hợp lipit-polyme-cation, và các hỗn hợp của chúng. Hơn nữa, có thể sử dụng các chất dẫn phân phối lipit cho việc hướng đích đặc hiệu bằng cách gắn kết các phối tử (ví dụ, các kháng thể, peptit, và carbohydrat) với bề mặt của nó hoặc vào đầu mút tận cùng của các chuỗi PEG được gắn kết (Front. Pharmacol. 2015 Dec 1; 6:286).

Theo một phương án được ưu tiên, thế tiếp hợp lipit này là lipit-PEG. Việc lấy polyetylen glycol (PEG) vào dạng chế phẩm lipit làm màng phủ hoặc phối tử bề mặt, một kỹ thuật được gọi là kỹ thuật PEG hóa, giúp bảo vệ hạt nano khỏi hệ miễn dịch và hiện tượng tảo thoát của chúng khỏi quá trình hấp thụ RES (Nanomedicine (Lond). 2011 Jun; 6(4):715-28). Kỹ thuật PEG hóa đã được sử dụng một cách rộng rãi để làm các dạng chế phẩm lipit ổn định và các tải lượng của chúng thông qua các cơ chế vật lý, hóa học, và sinh học. Các lipit PEG giống chất tẩy (ví dụ, PEG-DSPE) có thể xâm nhập dạng chế phẩm lipit để tạo thành lớp được hydrat hóa và hàng rào không gian trên bề mặt. Dựa trên mức độ PEG hóa, lớp bề mặt nhìn chung có thể được chia thành hai loại, lớp giống chổi và lớp giống nấm. Đối với các dạng chế phẩm được làm ổn định bằng PEG-DSPE, PEG sẽ có hình thể nấm ở mức độ PEG hóa thấp (thường nhỏ hơn 5 % mol) và sẽ chuyển thành hình thể chổi khi mà hàm lượng của PEG-DSPE được làm tăng quá một mức nhất định (J.

Nanomaterials. 2011;2011:12). Đã được thể hiện rằng mức PEG hóa tăng dần đến mức tăng đáng kể về thời gian bán hủy lưu thông của các dạng 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 các lipit-PEG bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, PEG được liên hợp với dialkyloxypropyl (PEG-DAA), PEG được liên hợp với diaxylglyxerol (PEG-DAG), PEG được liên hợp với các phospholipit như phosphatidyletanolamin (PEG-PE), PEG được tiếp hợp với xeromit, PEG được tiếp hợp với cholesterol hoặc dẫn xuất của nó, và các hỗn hợp của chúng.

PEG là polyme tuyến tính tan được trong nước của các đơn vị lặp đi lặp lại PEG etylen có hai nhóm hydroxyl đầu tận cùng. Các PEG được phân loại bằng trọng lượng phân tử của chúng và bao gồm các loại sau đây: monometoxypolyetylen glycol (MePEG-OH), monometoxypolyetylen glycol- suxinat (MePEG-S), monometoxypolyetylen glycol-suxinimidyl suxinat (MePEG-S-NHS), monometoxypolyetylen glycol-amin (MePEG-NH<sub>2</sub>), monometoxypolyetylen glycol-tresylat (MePEG-TRES), monometoxypolyetylen glycol-imidazolyl-carbonyl (MePEG-IM), cũng như các hợp chất như vậy chứa nhóm hydroxyl đầu tận cùng thay vì nhóm metoxy đầu tận cùng (ví dụ, HO-PEG-S, HO-PEG-S-NHS, HO-PEG-NH<sub>2</sub>).

Gốc PEG của các thể tiếp hợp lipit-PEG được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm trọng 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 trọng lượng phân tử trung bình là 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 trọng lượng phân tử trung bình là khoảng 2.000 dalton hoặc khoảng 750 dalton. Trọng lượng phân tử trung bình này có thể là trị số hoặc trị số con bất kỳ trong phạm vi các khoảng được liệt kê, bao gồm cả các điểm đầu mút.

Trong các trường hợp nhất định, các monome PEG có thể được thể tùy ý bằng nhóm alkyl, alkoxy, axyl, hoặc aryl. PEG này có thể được tiếp hợp một cách trực tiếp vào lipit hoặc có thể được liên kết vào lipit thông qua gốc liên kết. Có thể sử dụng gốc liên kết bất kỳ thích hợp cho việc liên hợp PEG với lipit bao gồm, ví dụ, gốc liên kết không chứa este và gốc liên kết chứa este. Theo một phương án được ưu tiên, gốc liên kết này là gốc liên

kết không chứa este. Các gốc liên kết không chứa este thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, amido ( $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ), amino ( $-\text{NR}-$ ), carbonyl ( $-\text{C}(\text{O})-$ ), carbamat ( $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ ), ure ( $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}-$ ), disulfua ( $-\text{S}-\text{S}-$ ), ete ( $-\text{O}-$ ), suxinyl ( $-(\text{O})\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ ), suxinamidyl ( $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ), ete, cũng như các dạng kết hợp của chúng (như gốc liên kết chứa cả gốc liên kết carbamat và gốc liên kết amido). Theo một phương án được ưu tiên, gốc liên kết carbamat được sử dụng để liên hợp PEG với lipit.

Theo các phương án khác, gốc liên kết chứa este được sử dụng để liên hợp PEG với lipit. Các gốc liên kết chứa este thích hợp bao gồm, ví dụ, carbonat ( $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$ ), suxinoyl, este của phosphat ( $-\text{O}-(\text{O})\text{POH}-\text{O}-$ ), este của sulfonat, và các dạng kết hợp của chúng.

Phosphatidyletanolamin có một loạt nhóm chuỗi axyl có các độ dài chuỗi và mức độ bão hòa khác nhau có thể được tiếp hợp với PEG để tạo thành thể tiếp hợp lipit. Phosphatidyletanolamin như vậy là sẵn có trên thị trường hoặc có thể được phân lập hoặc được tổng hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phosphatidyletanolamin chứa các axit béo bão hòa hoặc không bão hòa có độ dài chuỗi carbon nằm trong khoảng từ  $\text{C}_{10}$  đến  $\text{C}_{20}$  là được ưu tiên. Cũng có thể sử dụng phosphatidyletanolamin có axit béo không bão hòa một liên kết bội hoặc axit béo không bão hòa hai liên kết bội và các hỗn hợp của axit béo bão hòa và axit béo không bão hòa. Phosphatidyletanolamin thích hợp bao 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 này là thể tiếp hợp PEG-didexyloxypropyl ( $\text{C}_{10}$ ), thể tiếp hợp PEG-dilauryloxypropyl ( $\text{C}_{12}$ ), thể tiếp hợp PEG-dimyristyloxypropyl ( $\text{C}_{14}$ ), thể tiếp hợp PEG-dipalmitoyloxypropyl ( $\text{C}_{16}$ ), hoặc thể tiếp hợp PEG-distearoyloxypropyl ( $\text{C}_{18}$ ). Theo các phương án này, tốt hơn, nếu PEG có trọng lượng phân tử trung bình là khoảng 750 đến khoảng 2.000 dalton. Theo các phương án cụ thể, nhóm hydroxyl đầu tận cùng của PEG này được thế bằng nhóm methyl.

Ngoài những điều trên đây, các polyme ưa nước khác có thể được sử dụng thay cho PEG. Các ví dụ về các polyme thích hợp mà có thể được sử dụng thay cho PEG bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyvinylpyrrolidon, polymetyloxazolin, polyetyloxazolin,

polyhydroxypropyl, metacrylamit, polymetacrylamit, và polydimetylacrylamit, axit polylactic, axit polyglycolic, và các xenluloza được tạo dẫn xuất như hydroxymetylxenluloza hoặc hydroxyetylxenluloza.

Theo một số phương án, thể tiếp hợp lipit này (ví dụ, lipit-PEG) chứa 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 1,7 % 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 số bất kỳ của chúng hoặc khoảng trong đó) của tổng lipit có mặt trong dạng chế phẩm lipit. Theo các phương án khác, thể tiếp hợp lipit này (ví dụ, lipit-PEG) chứa 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 số bất kỳ của chúng hoặc khoảng trong đó) của tổng lipit có mặt trong dạng chế phẩm lipit. Lượng này có thể là trị số hoặc trị số con bất kỳ trong phạm vi các khoảng được liệt kê, bao gồm cả các điểm đầu mút.

Theo một số phương án được ưu tiên, lipit-PEG này là PEG550-PE. Theo một số phương án được ưu tiên, lipit-PEG này là PEG750-PE. Theo một số phương án được ưu tiên, lipit-PEG này là PEG2000-DMG

Tỷ lệ phần trăm của thể tiếp hợp lipit (ví dụ, lipit-PEG) có mặt trong các dạng chế phẩm lipit theo sáng chế là lượng đích, và lượng thực sự của thể tiếp hợp lipit có mặt trong dạng chế phẩm có thể thay đổi, ví dụ, là  $\pm 0,5$  % mol. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận thấy rằng có thể thay đổi nồng độ của thể tiếp hợp lipit tùy thuộc vào thể tiếp hợp lipit được sử dụng và tốc độ mà ở đó dạng chế phẩm lipit sẽ trở nên có tính tạo sự dung hợp.

#### **Cơ chế tác động của quá trình hấp thụ tế bào của các dạng chế phẩm lipit**

Các dạng chế phẩm lipit dùng cho việc phân phối nội bào của các axit nucleic, cụ thể là các liposom, liposom cation, và hạt nano lipit, được thiết kế cho quá trình hấp thụ tế bào bằng cách thâm nhập các tế bào đích thông qua việc khai thác các cơ chế nhập bào của

các tế bào đích trong đó các lượng chứa của chất dẫn phân phối lipit được phân phối đến chất dịch bào tương của tế bào đích. (Nucleic Acid Therapeutics, 28(3):146-157, 2018). Cụ thể là, trong trường hợp dạng chế phẩm mARN-lipit hướng đích các tế bào gan được mô tả trong bản mô tả này, dạng chế phẩm mARN-lipit này xâm nhập các tế bào gan thông qua hiện tượng nhập bào do thụ thể làm trung gian. Trước khi nhập bào, các phối tử được tạo nhóm chức như lipit-PEG ở bề mặt của chất dẫn phân phối lipit được lột bỏ khỏi bề mặt, quá trình này khởi động hiện tượng nội bào hóa vào tế bào đích. Trong suốt hiện tượng nhập bào, một số phần của màng sinh chất của tế bào bao quanh vector và bao trùm nó vào bong bóng mà sau đó, ngắt ra khỏi màng tế bào, xâm nhập chất dịch bào tương và cuối cùng, trải qua con đường thể nội-tiêu bào. Đối với các chất dẫn phân phối chứa lipit cation có thể ion hóa được, độ axit tăng khi mà thể nội bào lão hóa đem lại chất dẫn có điện tích dương mạnh trên bề mặt. Sau đó, các tương tác giữa chất dẫn phân phối và màng thể nội bào đem lại sự kiện dung hợp màng mà dẫn đến hiện tượng phân phối chất dịch bào tương của tải lượng. Sau đó, đối với các tải lượng mARN, chính quá trình dịch mã bên trong của tế bào sẽ dịch mã mARN thành protein được mã hóa. Protein được mã hóa có thể còn trải qua quá trình chế biến sau dịch mã, bao gồm cả sự vận chuyển đến bào quan được hướng đích hoặc vị trí trong tế bào.

Bằng cách kiểm soát chế phẩm và nồng độ của thể tiếp hợp lipit, ta có thể kiểm soát tốc độ mà ở đó thể tiếp hợp lipit trao đổi ra ngoài dạng chế phẩm lipit và, bởi đó, tốc độ mà ở đó dạng chế phẩm lipit trở nên có tính tạo sự dung hợp. Ngoài ra, các biến số khác bao gồm, ví dụ, độ pH, nhiệt độ, hoặc độ mạnh ion, có thể được sử dụng để thay đổi và/hoặc kiểm soát tốc độ mà ở đó dạng chế phẩm lipit trở nên có tính tạo sự dung hợp. Các phương pháp khác mà có thể được sử dụng để kiểm soát tốc độ mà ở đó dạng chế phẩm lipit trở nên có tính tạo sự dung hợp sẽ trở nên sáng tỏ đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sau khi đọc sáng chế này. Đồng thời, bằng cách kiểm soát chế phẩm và nồng độ của thể tiếp hợp lipit, ta có thể kiểm soát kích cỡ hạt lipit hoặc liposom.

### **Sản xuất dạng chế phẩm lipit**

Có nhiều phương pháp khác nhau dùng cho việc điều chế các dạng chế phẩm lipit chứa axit nucleic. (Curr. Drug Metabol. 2014, 15, 882–892; Chem. Phys. Lipids 2014, 177, 8–18; Int. J. Pharm. Stud. Res. 2012, 3, 14–20). Các kỹ thuật về phương pháp thủy hợp màng mỏng, nhũ tương kép, làm bay hơi pha đảo, điều chế kênh dẫn vi lưu, ly tâm kép

không đối xứng, tiêm etanol, thẩm tách chất tẩy, tạo thành bong tự phát bằng phương pháp pha loãng etanol, và bao nang trong các liposom được tạo thành trước được mô tả một cách vắn tắt trong bản mô tả này.

### **Thủy hợp màng mỏng**

Trong phương pháp thủy hợp màng mỏng (thin film hydration - TFH) hoặc phương pháp Bangham, các lipid được hòa tan trong dung môi hữu cơ, sau đó, được làm bay hơi thông qua việc sử dụng thiết bị làm bay hơi quay dẫn đến hiện tượng tạo thành lớp lipid mỏng. Sau khi thủy hợp lớp bằng dung dịch đệm nước chứa hợp chất cần được nạp, các bong dạng đa lớp (multilamellar vesicle - MLV) được tạo thành, dạng này có thể được làm giảm về kích cỡ để tạo ra các bong dạng đơn lớp nhỏ hoặc lớn (LUV và SUV) bằng phương pháp ép đùn qua màng hoặc bằng phương pháp chiếu sóng siêu âm đối với MLV bắt đầu.

### **Nhũ tương kép**

Cũng có thể điều chế các dạng chế phẩm lipid thông qua kỹ thuật nhũ tương kép, kỹ thuật này bao gồm quá trình hòa tan các lipid trong hỗn hợp nước/dung môi hữu cơ. Dung dịch hữu cơ, chứa các giọt li ti của nước, được trộn với lượng dư của môi trường nước, dẫn đến hiện tượng tạo thành nhũ tương kép nước-trong-dầu-trong-nước (W/O/W). Sau khi lắc mạnh bằng cơ học, một phần của các giọt li ti của nước xẹp xuống, thu được các bong dạng đơn lớp lớn (large unilamellar vesicle - LUV).

### **Làm bay hơi pha đảo**

Phương pháp làm bay hơi pha đảo (reverse phase evaporation - REV) cũng cho phép ta đạt được các LUV được nạp bằng axit nucleic. Trong kỹ thuật này, hệ thống hai pha được tạo thành bằng quá trình hòa tan phospholipid trong dung môi hữu cơ và chất đệm nước. Sau đó, huyền phù thu được được chiếu sóng siêu âm một cách nhanh gọn cho đến khi hỗn hợp trở thành dạng phân tán một pha trong suốt. Dạng chế phẩm lipid là đạt được sau khi làm bay hơi dung môi hữu cơ trong áp suất giảm. Kỹ thuật này đã được sử dụng để bao nang các phân tử ưa nước lớn và nhỏ khác nhau bao gồm cả các axit nucleic.

### **Điều chế kênh dẫn vi lưu**

Phương pháp Kênh dẫn vi lưu, không giống với các kỹ thuật chất lỏng khác, đem lại khả năng kiểm soát quy trình thủy hợp lipid. Phương pháp này có thể được phân loại thành kênh dẫn vi lưu dòng chảy-liên tục và kênh dẫn vi lưu trên cơ sở giọt li ti, theo cách mà trong đó dòng chảy này được thao tác. Trong phương pháp tập trung thủy động kênh dẫn vi lưu (microfluidic hydrodynamic focusing - MHF), phương pháp này hoạt động ở chế độ dòng chảy liên tục, các lipid được hòa tan trong rượu isopropyl mà được tập trung bằng thủy động trong vi kênh bằng qua khớp nối giữa hai dòng chất đệm nước. Có thể kiểm soát kích cỡ bong bóng bằng cách điều biến tốc độ dòng chảy, vì vậy mà kiểm soát được quy trình pha loãng chất đệm/dung dịch lipid. Phương pháp này có thể được sử dụng cho việc sản xuất các dạng chế phẩm lipid oligonucleotit (ON) bằng cách sử dụng thiết bị vi kênh dẫn gồm các cổng ba đầu vào và một đầu ra.

### **Ly tâm kép không đối xứng**

Ly tâm kép không đối xứng (reverse phase evaporation - DAC) khác biệt với dạng ly tâm phổ biến hơn khi mà nó sử dụng sự quay phụ thêm quanh chính trục thẳng đứng của nó. Quá trình làm thuần nhất có hiệu quả là đạt được do hai chuyển động chồng lên được tạo ra: mẫu được đẩy ra ngoài, như trong máy ly tâm bình thường, và sau đó, nó được đẩy về phía trung tâm của lọ do sự quay phụ thêm. Bằng cách trộn các lipid và dung dịch NaCl, đạt được gel phospholipid bong (vesicular phospholipid gel - VPC) nhớt, sau đó, dạng này được pha loãng để thu được dạng phân tán của dạng chế phẩm lipid. Có thể điều tiết kích cỡ dạng chế phẩm lipid bằng cách tối ưu hóa vận tốc DAC, nồng độ lipid và thời gian làm thuần nhất.

### **Tiêm etanol**

Có thể sử dụng phương pháp tiêm etanol (ethanol injection - EI) cho việc bao nang axit nucleic. Phương pháp này đem lại sự tiêm nhanh chóng dung dịch etanol, mà trong đó các lipid được hòa tan, vào môi trường nước chứa các axit nucleic cần được bao nang, thông qua việc sử dụng kim. Các bong bóng được tạo thành một cách tự phát khi các phospholipid được phân tán xuyên suốt môi trường này.

### **Thẩm tách chất tẩy**

Có thể sử dụng phương pháp thẩm tách chất tẩy để bao nang các axit nucleic. Một cách nhanh gọn, lipid và plasmit được làm tan trong dung dịch chất tẩy có độ mạnh ion thích hợp, sau khi loại bỏ chất tẩy bằng phương pháp thẩm tách, dạng chế phẩm lipid đã được làm ổn định được tạo thành. Sau đó, axit nucleic chưa được bao nang được loại bỏ bằng sắc ký trao đổi ion và các bọt trống không bằng phương pháp ly tâm gradien mật độ sucroza. Kỹ thuật này là nhạy cảm ở mức cao với hàm lượng lipid cation và với nồng độ muối của chất đệm thẩm tách, và phương pháp này cũng khó thay đổi quy mô.

### **Tạo thành bọt tự phát bằng phương pháp pha loãng etanol**

Cũng có thể sản xuất các dạng chế phẩm lipid ổn định thông qua phương pháp Tạo thành Bọt Tự phát bằng cách Pha loãng Etanol mà trong đó cách pha loãng etanol từng bước hoặc từng giọt đem lại sự tạo thành tức thời của các bọt được nạp bằng axit nucleic bằng phương pháp bổ sung có kiểm soát lipid được hòa tan trong etanol vào chất đệm nước trộn một cách nhanh chóng chứa axit nucleic.

### **Bao nang trong các liposom được tạo thành trước**

Cũng có thể thu được sự kìm giữ các axit nucleic bắt đầu bằng các liposom được tạo thành trước thông qua hai phương pháp khác nhau: (1) phương pháp trộn đơn giản liposom cation với các axit nucleic, phương pháp này đem lại các phức chất tĩnh điện được gọi là “các phức chất lipid”, trong đó chúng có thể được sử dụng một cách thành công để chuyển nhiễm sản phẩm nuôi cấy tế bào, nhưng đặc trưng bởi hiệu quả bao nang thấp và hiệu suất kém *in vivo* của chúng; và (2) làm mất ổn định liposom, bổ sung một cách chậm rãi etanol tuyệt đối vào huyền phù của các bọt cation lên đến nồng độ là 40% thể tích/thể tích, sau đó là bổ sung từng giọt các axit nucleic đạt được các bọt được nạp; tuy nhiên, hai bước chính xác định đặc điểm quy trình bao nang là quá nhạy cảm, và các hạt phải được giảm kích cỡ.

### **Tạo thành hạt nano ARN được bao nang bằng lipid**

Hình 1 đem lại một ví dụ về một lưu đồ tiêu biểu về phương pháp tổng quát được mô tả trong bản mô tả này về việc sản xuất hạt nano ARN được bao nang bằng lipid.

Dạng hình học của lớp trộn gồm ống thứ nhất dùng để vận chuyển dung dịch nước có đường kính trong như được mô tả trong bản mô tả này; và ống thứ hai dùng để vận chuyển dung dịch etanol (hữu cơ) gồm ID như được mô tả trong bản mô tả này; khi cấu kiện trộn như được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng, ống thứ hai (hữu cơ) phân cắt ống thứ nhất (dạng nước) ở tại hoặc gần góc vuông góc.

Phương pháp được mô tả trong bản mô tả này đem lại dung dịch ARN dạng nước bao gồm ARN lớn trị liệu, ví dụ, được điều chế theo Thực hành Sản xuất Tốt (good manufacturing practice - GMP), được làm tan trong dung dịch nước chứa chất đệm, ví dụ, xitrat. Phương pháp này còn đem lại dung dịch hữu cơ chứa một hoặc nhiều lipid, ví dụ, các lipid hạng lâm sàng được tổng hợp theo GMP, được tạo ra bằng cách làm tan lipid trong dung môi hữu cơ có thể trộn lẫn được với nước. Trong phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, tốt hơn, nếu dung môi hữu cơ có thể trộn lẫn được với nước này là alkanol thấp hơn, ví dụ, etanol. Tốt hơn, nếu cả hai dung dịch được tiết trùng bằng bộ lọc và nồng độ của chúng được điều chỉnh.

Dung dịch lipid hữu cơ được trộn với dung dịch nước chứa axit nucleic để tạo thành hạt nano ARN được bao nang bằng lipid có hình thái học dạng lớp, tức là, bao gồm cả cấu trúc hai lớp lipid. Theo một khía cạnh, axit nucleic này được bao nang trong hạt nano ARN được bao nang bằng lipid có sự tạo thành cấu trúc dạng lớp.

Phương pháp được mô tả trong bản mô tả này hướng đến việc đưa một cách liên tục dung dịch lipid vào dung dịch nước trong môi trường trộn, tốt hơn, nếu theo kiểu vuông góc trong cấu kiện trộn. Phương pháp trộn này pha loãng dung dịch lipid bằng dung dịch nước đến 10% đến 75% thể tích/thể tích etanol, 12% đến 70% thể tích/thể tích etanol, 14% đến 65% thể tích/thể tích etanol, 16% đến 60% thể tích/thể tích etanol, 18% đến 50% thể tích/thể tích etanol, 20% đến 45% thể tích/thể tích etanol, hoặc 22% đến 30% thể tích/thể tích etanol, và gây ra hiện tượng tạo thành hạt nano ARN được bao nang bằng lipid trong dòng chảy nhiễu loạn.

Sau khi tạo thành hạt nano ARN được bao nang bằng lipid, hỗn hợp này được pha loãng một cách liên tục bằng chất đệm đến khoảng 1 đến khoảng 10% thể tích/thể tích etanol, hoặc 7,5%, 10%, 12,5%, hoặc 15%, tốt hơn, nếu đến mức nhỏ hơn 12,5% etanol, điều này làm ổn định thêm hạt nano ARN được bao nang bằng lipid và làm tăng mức bao nang của axit nucleic.

Hạt nano ARN được bao nang bằng lipid được cô bằng phương pháp lọc theo dòng chảy tiếp tuyến, tốt hơn, nếu bằng bộ lọc sợi rỗng. Các hạt nano ARN được bao nang bằng lipid đã được cô được đưa đến bước siêu lọc để loại bỏ alkanol và thay thế chất đệm. Nồng độ axit nucleic được điều chỉnh bằng cách pha loãng. Dạng chế phẩm thu được được tiệt trùng bằng bộ lọc và được làm đầy vào các lọ. Bây giờ, quy trình này sẽ được bàn luận chi tiết hơn dưới đây trong bản mô tả này bằng cách sử dụng các bước như được nêu ra trên Hình 1.

### **Làm tan lipid và hòa tan ARN**

Theo một phương án, hạt nano ARN được bao nang bằng lipid được tạo ra bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này là dưới dạng cụm lắp ráp đa phân tử của ARN và các lipid, mà trong đó ARN này được bao nang ít nhất một phần bằng phương pháp ghép cặp ion với các lipid cation.

Theo các khía cạnh nhất định, hạt nano lipid theo phần mô tả trong bản mô tả này bao gồm bốn hợp phần lipid: lipid trợ giúp; cholesterol; lipid-PEG; và lipid cation. Tốt hơn, nếu lipid trợ giúp này là DSPC, lipid-PEG này là PEG-DMG, và lipid cation này là lipid cation có thể ion hóa được. Theo các phương án nhất định, nồng độ dung môi hữu cơ mà trong đó các lipid được làm 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 này là alkanol thấp hơn. Các alkanol thấp hơn thích hợp bao gồm, ví dụ, metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol, các chất đồng phân của chúng và các dạng kết hợp của chúng. Tốt hơn, nếu dung môi này là etanol có nồng độ là khoảng 50-90% thể tích/thể tích. Các lipid này có thể chiếm thể tích là khoảng 1 mL/g đến khoảng 5 mL/g hoặc cách khác là, như được mô tả trong phần các ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Các lipid được làm tan bằng cách sử dụng, ví dụ, thiết bị khuấy từ trên đầu ở nhiệt độ thích hợp. Theo các khía cạnh được ưu tiên nhất định, ARN này được lấy vào trong dung dịch nước (ví dụ, chất đệm) và được pha loãng đến nồng độ cuối.

### **Bước tạo thành hạt nano ARN được bao nang bằng lipid**

Sau khi dung dịch hữu cơ và dung dịch nước được điều chế, chúng có thể được trộn cùng nhau bằng cách sử dụng thiết bị được mô tả chi tiết dưới đây. Nói một cách vắn tắt, thiết bị này gồm ống thứ nhất dùng để vận chuyển dung dịch ARN dạng nước và ống thứ hai

dùng để vận chuyển dung dịch lipid hữu cơ, mà trong đó ống thứ hai phân cắt ống thứ nhất theo kiểu vuông góc trong cấu kiện trộn. Hai dung dịch này được bơm qua các ống tương ứng bằng các bơm HPLC tách biệt và được trộn trong vùng của ống thứ nhất theo kiểu vuông góc trong cấu kiện trộn. Dung dịch ARN dạng nước được bơm ở tốc độ mà lớn hơn dung dịch lipid hữu cơ 0,2 đến 1 lần. Sau khi trộn hai dung dịch trong vùng trộn, hạt nano ARN được bao nang bằng lipid được tạo thành.

Vận tốc bơm và kích cỡ của ống thứ nhất trong vùng của cấu kiện trộn giúp có được quy trình trộn mà bao gồm dòng chảy nhiễu loạn. Trong động lực học chất lưu, sự nhiễu loạn hoặc dòng chảy nhiễu loạn là chuyển động chất lưu đặc trưng bởi các thay đổi hỗn loạn về áp suất và vận tốc dòng chảy. Trái ngược với dòng chảy theo lớp, hiện tượng này xảy ra khi chất lưu chảy thành các lớp song song, không có sự phá vỡ nào giữa các lớp đó. Các dòng chảy nhiễu loạn luôn luôn không đều ở mức cao, và nguồn cung cấp năng lượng dễ tìm trong các dòng chảy nhiễu loạn có xu hướng tăng tốc mức làm thuần nhất (trộn) của các hỗn hợp chất lưu. Đặc điểm mà chịu trách nhiệm về mức trộn được tăng cường và tỷ suất khối lượng tăng, vận chuyển động lượng và năng lượng trong dòng chảy được gọi là “độ khuếch tán”. Các đặc điểm khác của dòng chảy nhiễu loạn bao gồm “độ quay” khi mà các dòng chảy nhiễu loạn có cơ chế tạo cuộn xoáy không gian ba chiều mạnh được biết đến với tên gọi là làm căng cuộn xoáy và “sự tan biến” khi mà sự nhiễu loạn tan biến một cách nhanh chóng khi mà động năng được chuyển hóa thành nội năng bằng ứng suất cọ xát nhớt. Phương pháp trộn nhiễu loạn bị áp đảo bởi các chuyển động ngẫu nhiên quy mô nhỏ (so với dòng chảy mẹ) của các bọc trong chất lưu mà đem chúng vào mối quan hệ gần hơn hoặc xa hơn và có thể được nghiền vụn hơn và pha trộn qua lại chúng. Các quy trình được mô tả trong bản mô tả này dùng cho việc trộn dung dịch lipid và dung dịch nước giúp có được sự bao nang của ARN trong hạt nano lipid được tạo thành trùng khớp với sự tạo thành của chúng có hiệu quả bao nang là lớn hơn 95%.

Quy trình liên tục được mô tả trong bản mô tả này là có thể tăng quy mô được một cách đầy đủ. Theo một khía cạnh, hạt nano ARN được bao nang bằng lipid được tạo thành có đường kính trung bình là nhỏ hơn khoảng 90 nm, mà không có các quy trình cơ năng như phương pháp ép đùn màng, phương pháp chiếu sóng siêu âm hoặc phương pháp vi lưu hóa.

### **Hạt nano ARN được bao nang bằng lipid**

Hạt nano ARN được bao nang bằng lipid được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm hạt nano hoặc cấu trúc hai lớp của các phân tử lipid. Ngoài lipid cation (ví dụ, lipid cation có thể ion hóa được), hạt nano ARN được bao nang bằng lipid bao gồm lipid trung tính hoặc polyme.

Theo một số phương án, ARN được bao nang hoàn toàn trong phần lipid của hạt nano lipid sao cho ARN trong hạt nano ARN được bao nang bằng lipid này có tính đề kháng trong dung dịch nước đối với hiện tượng suy biến nucleaza. Theo các phương án khác, hạt nano ARN được bao nang bằng lipid được mô tả trong bản mô tả này về cơ bản không độc đối với các động vật có vú như con người. Hạt nano ARN được bao nang bằng 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. Hạt nano ARN được bao nang bằng lipid được mô tả trong bản mô tả này cũng thường có tỷ số lipid:ARN (tỷ số khối lượng/khối lượng) là từ 1:1 đến 100:1, từ 1:1 đến 50:1, từ 5:1 đến 45:1, từ 10:1 đến 40:1, từ 12:1 đến 38:1, hoặc từ 15:1 đến 45:1, hoặc từ 25:1 đến 40:1, hoặc từ 30:1 đến 40:1. Theo một số phương án, chế phẩm này có tỷ số trọng lượng tổng lipid:ARN là từ khoảng 50:1 đến 10:1. Theo một số phương án, chế phẩm này có tỷ số trọng lượng tổng lipid:ARN là từ khoảng 40:1 đến 20:1. Theo một số phương án, chế phẩm này có tỷ số trọng lượng tổng lipid:ARN là từ khoảng 45:1 đến 30:1. Theo một số phương án, chế phẩm này có tỷ số trọng lượng tổng lipid:ARN là từ khoảng 38:1 đến 30:1.

Theo các phương án được ưu tiên, các hạt lipid này chứa ARN, lipid cation (ví dụ, một hoặc nhiều lipid cation hoặc các muối của chúng được mô tả trong bản mô tả này), phospholipid, và lipid được tiếp hợp mà ức chế mức kết tụ của các hạt (ví dụ, một hoặc nhiều thể tiếp hợp lipid-PEG). Hạt nano ARN được bao nang bằng lipid cũng có thể bao gồm cholesterol. Hạt nano ARN được bao nang bằng lipid có thể bao gồm ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, hoặc nhiều ARN khác nhau hơn mà biểu hiện một hoặc nhiều polypeptit.

Trong hạt nano ARN được bao nang bằng lipid, ARN có thể được bao nang hoàn toàn trong phần lipid của hạt, nhờ đó bảo vệ ARN khỏi hiện tượng suy biến nucleaza. Theo các phương án được ưu tiên, hạt nano ARN được bao nang bằng lipid này chứa ARN mà được bao nang hoàn toàn trong phần lipid của hạt, nhờ đó bảo vệ ARN khỏi hiện tượng suy biến nucleaza. Trong các trường hợp nhất định, ARN trong hạt lipid này về cơ bản

không bị suy biến sau khi cho hạt tiếp xúc với nucleaza ở 37 °C trong ít nhất 20, 30, 45, hoặc 60 phút. Trong các trường hợp khác nhất định, ARN trong hạt lipid này về cơ bản không bị suy biến 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 này được tạo phức chất với lipid cation của hạt nano ARN được bao nang bằng lipid. Một trong các lợi ích của các dạng chế phẩm theo sáng chế này là hạt nano ARN được bao nang bằng lipid về cơ bản không độc đối với các động vật có vú như con người.

Hạt lipid này chứa 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 số bất kỳ của chúng hoặc khoảng trong đó) của các hạt có ARN được bao nang trong đó.

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

### **Pha loãng hạt nano ARN được bao nang bằng lipid**

Sau khi trộn dung dịch lipid hữu cơ vào dung dịch ARN dạng nước, có thể tăng cường mức độ bao nang ARN nếu huyền phù của hạt nano ARN được bao nang bằng lipid được pha loãng thêm trước khi loại bỏ ARN tự do. Có thể thực hiện việc này thông qua một hoặc nhiều lần pha loãng chất đậm, ví dụ, thông qua một hoặc nhiều phần kết nổi chữ Y mà chảy vào đường đầu ra. Các chất đậm chảy vào một hoặc nhiều phần kết nổi chữ Y không cần phải là giống nhau.

Sau đó, có thể tùy ý thu gom hạt nano ARN được bao nang bằng lipid đã được pha loãng trong bình được duy trì ở 15-20°C và cho phén ủ từ vài phút đến hai giờ trước bước pha loãng thêm hoặc bước cô.

### **Cô mẫu**

Có thể cô hạt nano ARN được bao nang bằng lipid đã được pha loãng, ví dụ, bằng phương pháp lọc theo dòng chảy tiếp tuyến (tangential flow filtration - TFF) bằng cách sử dụng các màng sợi rỗng (màng mPES Kros, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, California), tùy ý thông qua bơm nhu động hoặc bơm màng 4 pít tông hoặc bơm ly tâm (dựa trên nguyên lý của sự nâng nổi từ tính). Các phương pháp của các kỹ thuật cô như vậy là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và sẽ sáng tỏ đối với người có hiểu biết trung bình một cách dễ dàng.

### **Loại bỏ ARN tự do và thay thế chất đệm**

Sau khi cô, có thể thực hiện phương pháp lọc pha loãng qua màng chống lại 7-10 thể tích của Tris 10 mM, NaCl 50 mM, sucroza 9%, độ pH 7,5 để loại bỏ dung môi hữu cơ và ARN không liên kết. Tốt hơn, nếu chất đệm lọc pha loãng qua màng được bổ sung thông qua thiết bị trao đổi nhiệt sao cho nhiệt độ sản phẩm được duy trì ở 15-20 °C. Dạng chế phẩm này có thể được cô thêm để hướng đích tổng nồng độ ARN được tạo dạng chế phẩm là > 3 mg/mL.

### **Lọc vô trùng và làm đầy**

Sau đó, có thể đo nồng độ ARN trong dạng chế phẩm của hạt nano ARN được bao nang bằng lipid bằng IPRP-HPLC (Sắc ký Lỏng Hiệu suất Cao-Pha đảo Cặp Ion) và được điều chỉnh đến ~2 mg/mL (1,85 đến 2,3 mg/mL) bằng cách pha loãng với chất đệm như được mô tả dưới đây trong bản mô tả này tùy ý chứa glyxerol sao cho nồng độ cuối của glyxerol trong dạng chế phẩm là 5%. Hạt nano ARN được bao nang bằng lipid đã được lọc pha loãng qua màng được lọc vô trùng qua bộ lọc hạng tiệt trùng 0,2 µm (PES). Sau đó, dạng chế phẩm đã được lọc có thể được làm đầy một cách vô khuẩn vào các lọ thủy tinh, được đóng nút chặn, được bịt nắp và được đặt ở -20 hoặc  $-70 \pm 5$  °C.

### **Thiết bị**

Phần mô tả trong bản mô tả này đem lại thiết bị dùng để thực hiện các quy trình được mô tả trên đây. Hình 2 đem lại một ví dụ về dạng giản đồ tiêu biểu về thiết bị theo một phương án của phần mô tả trong bản mô tả này.

Dung dịch nước chứa ARN được vận chuyển bằng bơm HPLC qua hệ thống ống. Dung dịch hữu cơ chứa các lipid được vận chuyển bằng bơm HPLC qua hệ thống ống tách biệt. Dung dịch hữu cơ được bơm vào dung dịch nước ở góc 90 độ trong cấu kiện trộn. Vì vậy, dung dịch hữu cơ chứa các lipid này được đưa vào dung dịch nước có dòng chảy mà vuông góc với dòng chảy của dung dịch nước. Việc đưa vào ở góc vuông của chiều dòng chảy này xảy ra trong cấu kiện trộn như loại được minh họa trên Hình 3, và đem lại phương pháp trộn nhiễu loạn, trong các điều kiện mà được tinh chỉnh một cách cẩn thận để đảm bảo rằng dạng bao nang hạt nano lipid của ARN được tạo thành theo một phương thức có thể chấp nhận được liên quan đến kích cỡ hạt, dạng phân tán, và hiệu quả bao nang. Sau đó, hệ thống ống chứa lipid-ARN đã được trộn vận chuyển hạt nano ARN được bao nang bằng lipid đến vùng trộn thứ hai, ví dụ, thông qua hệ thống ống polypropylen mà hòa nhập ở góc 45 độ với chất đệm pha loãng trong vùng pha loãng, và hạt nano ARN được bao nang bằng lipid đã được pha loãng được thu gom trong bình có vỏ bọc bằng thép không gỉ được duy trì ở 15-20 °C. Các hạt được chế biến thêm, ví dụ, bằng phương pháp lọc theo dòng chảy tiếp tuyến bằng cách sử dụng bơm ly tâm hoặc màng.

Vùng trộn, theo một phương án, là cấu kiện trộn mà trong đó dung dịch lipid hữu cơ được phân phối vào dòng của dung dịch ARN dạng nước, tốt hơn, nếu ở một góc khoảng 90°. Ống thép không gỉ thứ nhất vận chuyển dung dịch ARN dạng nước có lỗ trên thành của nó nửa chừng giữa các đầu mút của nó. Ống thứ hai được gắn theo kiểu vuông góc bằng dạng lọc qua lỗ trên thành của ống thứ nhất mà cho phép vận chuyển chất lỏng từ ống thứ hai đến phần trong của ống thứ nhất (xem Hình 3). Theo các khía cạnh được ưu tiên, hình dạng được xác định rõ và kích cỡ có thể tái lập được của hạt nano ARN được bao nang bằng lipid được điều chế bằng cách sử dụng tốc độ dòng chảy của dung dịch ARN dạng nước mà làm giảm các lực cọ xát và cho phép giữ nguyên tính nguyên vẹn của ARN lớn. Các bong có hình dạng được xác định rõ và kích cỡ có thể tái lập được cũng được điều chế bằng cách thay đổi tốc độ dòng chảy của các đường chất lưu, ví dụ, để đảm bảo mức trộn đủ trong một số trường hợp.

Hình 3 thể hiện cấu kiện trộn và động lực học dòng chảy đi kèm theo một phương án.

Phần mô tả trong bản mô tả này đem lại thiết bị có phương pháp lọc theo dòng chảy tiếp tuyến bằng cách sử dụng các màng sợi rỗng (màng mPES Kros, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, California) và bơm màng 4 pít tông hoặc bơm ly tâm.

### **Định nghĩa**

Thuật ngữ “lipit anion” có nghĩa là lipit mà mang điện tích âm ở độ pH sinh lý. Các lipit này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phosphatidylglycerol, cardiolipin, diacylphosphatidylserin, axit diacylphosphatidic, N-dodecanoyl phosphatidyletanolamin, N-suxinyl phosphatidyletanolamin, N-glutarylphosphatidyletanolamin, lysylphosphatidylglycerol, palmitoyloleoylphosphatidylglycerol (POPG), và các nhóm cải biến anion khác được nối liền với các lipit trung tính.

Thuật ngữ “lipit cation” có nghĩa là các lipit lưỡng ái và các muối của chúng có nhóm đầu ưa nước, dương tính; một, hai, ba, hoặc nhiều chuỗi alkyl béo hoặc axit béo kỵ nước hơn; và phần kết nối giữa hai miền này. Lipit cation có thể ion hóa được hoặc có thể proton hóa được thường được proton hóa (*tức là*, mang điện tích dương) ở độ pH dưới  $pK_a$  của nó và về cơ bản là trung tính ở độ pH trên  $pK_a$ . Các lipit cation có thể ion hóa được được ưu tiên là những loại có  $pK_a$  mà nhỏ hơn độ pH sinh lý, mức này thường là khoảng 7,4. Các lipit cation theo sáng chế cũng có thể được đặt tên là các lipit cation có thể chuẩn độ được. Các lipit cation có thể là “lipit amino” có nhóm đầu amin bậc ba có thể proton hóa được (ví dụ, có thể chuẩn độ được về độ pH). Một số lipit amino làm ví dụ có thể bao gồm các chuỗi  $C_{18}$  alkyl, trong đó mỗi chuỗi alkyl độc lập có mối liên kết kép 0 đến 3 (ví dụ, 0, 1, 2, hoặc 3); và các dạng liên kết ete, este, hoặc ketal giữa nhóm đầu và các chuỗi alkyl. Các lipit cation như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA,  $\gamma$ -DLenDMA, DLin-K-DMA, DLin-K-C2-DMA (còn được biết đến với tên gọi là DLin-C2K-DMA, XTC2, và C2K), DLin-K-C3 -DMA, DLin-K-C4-DMA, DLen-C2K-DMA,  $\gamma$ -DLen-C2K-DMA, DLin-M-C2-DMA (còn được biết đến với tên gọi là MC2), DLin-M-C3 -DMA (còn được biết đến với tên gọi là MC3) và (DLin-MP- DMA)(còn được biết đến với tên gọi là 1-BI 1).

Thuật ngữ “các bazơ nucleotit bổ sung” có nghĩa là cặp gồm các bazơ nucleotit mà tạo thành các mối liên kết hydro với nhau. Adenin (A) ghép cặp với thymin (T) hoặc với uraxil (U) trong ARN, và guanin (G) ghép cặp với xytosin (C). Các đoạn hoặc dải bổ sung của axit nucleic mà lai tạo (*tức là* nối liền bằng mối liên kết hydro) với nhau. Nói là “bổ sung” có nghĩa là axit nucleic có thể tạo thành (các) mối liên kết hydro với một trình tự axit nucleic khác bằng phương thức liên kết Watson-Crick truyền thống hoặc bằng các phương thức liên kết phi truyền thống khác.

Thuật ngữ “được bao nang hoàn toàn” có nghĩa là axit nucleic (ví dụ, mARN) trong hạt axit nucleic-lipit không bị suy biến một cách đáng kể sau khi tiếp xúc với huyết thanh hoặc thử nghiệm nucleaza mà sẽ làm suy biến một cách đáng kể ARN tự do. Khi được bao nang hoàn toàn, tốt hơn, nếu ít hơn 25% axit nucleic trong hạt này bị suy biến trong điều trị mà bình thường sẽ làm suy biến 100% axit nucleic tự do, tốt hơn nữa, nếu ít hơn 10%, và tốt hơn cả, nếu ít hơn 5% axit nucleic trong hạt này bị suy biến. “Được bao nang hoàn toàn” còn có nghĩa là các hạt axit nucleic-lipit không phân hủy một cách nhanh chóng thành các phần của hợp phần của chúng sau khi cho dùng *in vivo*.

Thuật ngữ “axit nucleic” có nghĩa là deoxyribonucleotit hoặc ribonucleotit và các polyme của chúng dưới dạng có dải đơn hoặc có dải kép. Thuật ngữ này bao quát các axit nucleic chứa các chất đồng đẳng nucleotit hoặc các gốc xương sống hoặc các dạng liên kết được cải biến đã biết, dạng này là tổng hợp, có trong tự nhiên, và không có trong tự nhiên, dạng này có các thuộc tính liên kết tương tự với axit nucleic tham chiếu, và dạng này được biến dưỡng theo một phương thức tương tự với nucleotit tham chiếu. Các ví dụ về các chất đồng đẳng như vậy bao gồm, mà không chỉ giới hạn ở, phosphorothioat, phosphoramidat, metyl phosphonat, metyl phosphonat-không đối xứng, 2'-O-metyl ribonucleotit, peptit-axit nucleic (peptide-nucleic acid - PNA).

Thuật ngữ “sự phân phối” được dùng để chỉ hành động hoặc phương thức phân phối hợp chất, chất, thực thể, gốc, hàng hóa vận chuyển hoặc tải lượng.

Thuật ngữ “chất phân phối” được dùng để chỉ chất bất kỳ mà tạo thuận lợi cho, ít nhất là một phần, sự phân phối *in vivo* của polynucleotit đến các tế bào được hướng đích.

Thuật ngữ “được xử lý công nghệ” được dùng để chỉ phân tử được thiết kế để có đặc tính hoặc thuộc tính, dù là về cấu trúc hay hóa học, mà thay đổi so với phân tử điểm bắt đầu, kiểu hoang hoặc nguyên thể.

Thuật ngữ “quá trình biểu hiện” của trình tự axit nucleic được dùng để chỉ một hoặc nhiều sự kiện trong số các sự kiện sau đây: (1) sản xuất khuôn mẫu ARN từ trình tự ADN (ví dụ, bằng quá trình phiên mã); (2) chế biến sản phẩm phiên mã ARN (ví dụ, bằng cách cắt nối, biên tập, tạo thành mũ chụp 5', và/hoặc chế biến đầu mút 3'); (3) dịch mã ARN thành polypeptit hoặc protein; và (4) dạng cải biến sau dịch mã polypeptit hoặc protein.

Thuật ngữ “các lipid kỵ nước” có nghĩa là các hợp chất có các nhóm không cực mà bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm hydrocarbon béo bão hòa và không bão hòa chuỗi dài và các nhóm như vậy tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều (các) nhóm thơm,

vòng béo, hoặc dị vòng. Các ví dụ thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, diacylglycerol, dialkylglycerol, N-N-dialkylamino, 1,2-diaxyloxy-3-aminopropan, và 1,2-dialkyl-3-aminopropan.

Thuật ngữ “lipit” có nghĩa là hợp chất hữu cơ mà bao gồm este của axit béo và được xác định đặc điểm là không tan trong nước, nhưng tan được trong nhiều dung môi hữu cơ. Các lipit thường được chia thành ít nhất ba nhóm: (1) “các lipit đơn giản”, dạng này bao gồm mỡ và dầu cũng như sáp; (2) “các lipit hợp chất”, dạng này bao gồm các phospholipit và các glycolipit; và (3) “các lipit phái sinh” như steroid.

Thuật ngữ “chất dẫn phân phối lipit” có nghĩa là dạng chế phẩm lipit mà có thể được sử dụng để phân phối axit nucleic trị liệu (ví dụ, mRNA) đến vị trí đích đang được quan tâm (ví dụ, tế bào, mô, cơ quan, và các vị trí tương tự). Chất dẫn phân phối lipit có thể là hạt axit nucleic-lipit, dạng này có thể được tạo thành từ lipit cation, lipit không cation (ví dụ, phospholipit), lipit được tiếp hợp mà phòng ngừa hiện tượng kết tụ của hạt (ví dụ, lipit-PEG), và tùy ý là, cholesterol. Thông thường, axit nucleic trị liệu (ví dụ, mRNA) có thể được bao nang trong phần lipit của hạt, nhờ đó bảo vệ nó khỏi hiện tượng suy biến do enzym.

Thuật ngữ “được bao nang bằng lipit” có nghĩa là hạt lipit mà cung cấp cho axit nucleic trị liệu như mRNA mức bao nang hoàn toàn, mức bao nang một phần, hoặc cả hai. Theo một phương án được ưu tiên, axit nucleic (ví dụ, mRNA) được bao nang hoàn toàn trong hạt lipit.

Thuật ngữ “thể tiếp hợp lipit” có nghĩa là lipit được tiếp hợp mà ức chế mức kết tụ của các hạt lipit. Các thể tiếp hợp lipit như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thể tiếp hợp lipit-PEG như, ví dụ, PEG được liên hợp với dialkyloxypropyl (ví dụ, thể tiếp hợp PEG-DAA), PEG được liên hợp với diacylglycerols (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, các 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 một cách trực tiếp vào lipit hoặc có thể được liên kết vào lipit thông qua gốc liên kết. Gốc liên kết bất kỳ thích hợp cho việc liên hợp PEG hoặc POZ với lipit có thể được sử dụng bao gồm, ví dụ, gốc liên kết không chứa este và gốc liên kết chứa este. Theo các phương án được ưu tiên nhất định, gốc liên kết không chứa este, như amit hoặc carbamat, được sử dụng.

Thuật ngữ “lipit lưỡng tính phân cực” hoặc “lipit lưỡng ái” có nghĩa là chất liệu mà trong đó phần kỵ nước của chất liệu lipit định hướng thành pha kỵ nước, trong khi phần ưa nước định hướng về phía pha nước. Các đặc điểm ưa nước lấy từ sự có mặt của các nhóm phân cực hoặc mang điện tích như carbohydrat, phosphat, carboxylic, sulfato, amino, sulfhydryl, nitro, hydroxyl, và các nhóm tương tự khác. Có thể đem lại tính kỵ nước bằng cách lấy vào các nhóm không cực mà bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm hydrocarbon béo bão hòa và không bão hòa chuỗi dài và các nhóm như vậy được thể bằng một hoặc nhiều (các) nhóm thơm, vòng béo, hoặc dị vòng. Các ví dụ về các hợp chất lưỡng tính phân cực bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phospholipit, aminolipit, và sphingolipit.

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

Thuật ngữ “được cải biến” được dùng để chỉ trạng thái hoặc cấu trúc được thay đổi của phân tử theo sáng chế. Các phân tử có thể được cải biến theo nhiều cách bao gồm cả về mặt hóa học, về mặt cấu trúc, và về mặt chức năng. Theo một phương án, phân tử mARN theo sáng chế này được cải biến bằng cách đưa vào các nucleosit và/hoặc nucleotit phi tự nhiên, ví dụ, khi mà nó liên quan đến các ribonucleotit tự nhiên A, U, G, và C. Các nucleotit không chính tắc như các cấu trúc mũ chụp không được xem là “được cải biến” mặc dù chúng có thể khác biệt với cấu trúc hóa học của các ribonucleotit A, C, G, U.

Thuật ngữ “nucleotit” có nghĩa là các bazơ tự nhiên (tiêu chuẩn) và các bazơ được cải biến đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các bazơ như vậy thường nằm ở vị trí 1' của gốc đường nucleotit. Các nucleotit thường bao gồm bazơ, đường, và nhóm phosphat. Các nucleotit này có thể là không được cải biến hoặc được cải biến ở gốc đường, phosphat, và/hoặc bazơ, (còn được gọi theo cách thay thế là các chất đồng đẳng nucleotit, nucleotit được cải biến, nucleotit phi tự nhiên, nucleotit phi tiêu chuẩn và tên gọi khác; xem, ví dụ, Usman và McSwiggen, trên đây; Eckstein, và đồng tác giả, Công bố Đơn PCT Quốc tế số WO 92/07065; Usman, và đồng tác giả, Công bố Đơn PCT Quốc tế số WO 93/15187; Uhlman & Peyman, trên đây, tất cả được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Có một vài ví dụ về các bazơ axit nucleic được cải biến đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như được tổng kết bởi Limbach, và đồng tác giả, Nucleic Acids Res. 22:2183, 1994. Một số ví dụ

trong số các ví dụ không giới hạn về các dạng cải biến bazơ mà có thể được đưa vào các phân tử axit nucleic bao gồm: inosin, purin, pyridin-4-on, pyridin-2-on, phenyl, pseudouraxil, 2,4,6-trimethoxy benzen, 3-metyl uraxil, dihydrouridin, naphetyl, aminophenyl, 5-alkylxytidin (ví dụ, 5-metylxytidin), 5-alkyluridin (ví dụ, ribothymidin), 5-halouridin (ví dụ, 5-bromuridin) hoặc 6-azapyrimidin hoặc 6-alkylpyrimidin (ví dụ, 6-metyluridin), propyn, và các chất khác (Burgin, và đồng tác giả, Biochemistry 35:14090, 1996; Uhlman & Peyman, trên đây). Nói là “các bazơ được cải biến” theo khía cạnh này có nghĩa là các bazơ nucleotit không phải là adenin, guanin, xytosin, thymine và uraxil ở vị trí 1' hoặc các dạng tương đương của chúng.

Thuật ngữ “khung đọc mở” hay “ORF” của trình tự axit nucleic (ADN hoặc ARN) mà có khả năng mã hóa polypeptit đang được quan tâm. Các ORF thường bắt đầu bằng codon bắt đầu ATG, và kết thúc bằng tín hiệu hoặc codon vô nghĩa hoặc kết thúc.

Thuật ngữ “ARN” có nghĩa là phân tử bao gồm ít nhất một gốc ribonucleotit. Nói là “ribonucleotit” có nghĩa là nucleotit có nhóm hydroxyl ở vị trí 2' của gốc  $\beta$ -D-ribofuranosa. Các thuật ngữ này bao gồm ARN có dải kép, ARN có dải đơn, ARN được phân lập như ARN được tinh chế một phần, ARN về cơ bản tinh khiết, ARN tổng hợp, ARN được sản xuất theo kiểu tái tổ hợp, cũng như ARN được thay đổi mà khác biệt với ARN có trong tự nhiên bởi dạng bổ sung, xóa bỏ, dạng thay thế, và/hoặc thay đổi một hoặc nhiều nucleotit. Các dạng thay đổi như vậy có thể bao gồm dạng bổ sung chất liệu không nucleotit, như vào (các) đầu mút của ARN cản trở hoặc theo kiểu bên trong, ví dụ, ở một hoặc nhiều nucleotit của ARN. Nucleotit trong các phân tử ARN theo sáng chế cũng có thể bao gồm nucleotit phi tiêu chuẩn, như nucleotit không có trong tự nhiên hoặc nucleotit được tổng hợp về mặt hóa học hoặc deoxynucleotit. Các ARN được thay đổi này có thể được gọi là chất đồng đẳng hoặc chất đồng đẳng của ARN có trong tự nhiên. Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “axit ribonucleic” và “ARN” được dùng để chỉ phân tử chứa ít nhất một gốc ribonucleotit, bao gồm cả siARN, ARN đối nghĩa, ARN có dải đơn, microARN, mARN, ARN không mã hóa, và ARN đa hóa trị.

Thuật ngữ “các tế bào được hướng đích” được dùng để chỉ một hoặc nhiều tế bào đang được quan tâm bất kỳ. Có thể tìm thấy các tế bào này *in vitro*, *in vivo*, *in situ* hoặc ở mô hoặc cơ quan của sinh vật. Sinh vật này có thể là động vật, tốt hơn, nếu là động vật có vú, tốt hơn nữa, nếu là người và tốt hơn cả, nếu là đối tượng bệnh.

Thuật ngữ “tác nhân trị liệu” được dùng để chỉ chất bất kỳ mà, khi cho đối tượng dùng, có tác dụng trị liệu, chẩn đoán, và/hoặc phòng bệnh và/hoặc khơi dậy tác dụng sinh học và/hoặc được lý học mong muốn.

Thuật ngữ “monome” được dùng để chỉ một đơn vị đơn lẻ, ví dụ, một axit nucleic đơn lẻ, phần này có thể được nối liền với một phân tử khác thuộc loại giống nhau hoặc khác nhau để tạo thành oligome. Theo một số phương án, monome có thể là axit nucleic không được khóa, tức là, monome UNA.

Thuật ngữ “lipit trung tính” có nghĩa là loại lipit mà tồn tại dưới dạng không mang điện tích hoặc dạng ion lưỡng cực trung tính ở độ pH được chọn lựa. Ở độ pH sinh lý, các lipit như vậy bao gồm, ví dụ, diacylphosphatidylcholin, diacylphosphatidyletanolamin, xeromit, sphingomyelin, xephalin, cholesterol, xerebrosit, và diacylglycerol.

Thuật ngữ “lipit không cation” có nghĩa là lipit lưỡng tính phân cực hoặc lipit trung tính hoặc lipit anion và được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “oligome” có thể được sử dụng thay thế cho “polynucleotit” và được dùng để chỉ phân tử chứa ít nhất hai monome và bao gồm các oligonucleotit như ADN và ARN. Trong trường hợp oligome chứa các monome ARN và/hoặc các monome axit nucleic không được khóa (unlocked nucleic acid - UNA), các oligome theo sáng chế này có thể chứa các trình tự ngoài trình tự mã hóa (coding sequence - CDS). Các trình tự phụ thêm này có thể là trình tự không được dịch mã, tức là, trình tự mà không được chuyển hóa thành protein bởi tế bào chủ. Các trình tự không được dịch mã này có thể bao gồm mũ chụp 5', vùng không được dịch mã 5' (UTR 5'), vùng không được dịch mã 3' (UTR 3'), và vùng đuôi, ví dụ, vùng đuôi poly-A. Như được mô tả chi tiết hơn trong bản mô tả này, trình tự bất kỳ trong số các trình tự không được dịch mã này có thể chứa một hoặc nhiều monome UNA - các monome UNA này không có khả năng được dịch mã bởi bộ máy của tế bào chủ. Trong ngữ cảnh của sáng chế này, “trình tự mARN”, “trình tự mARN”, “polynucleotit có thể dịch mã được”, hoặc “hợp chất có thể dịch mã được” được dùng để chỉ trình tự mà bao gồm vùng, ví dụ, vùng mã hóa của ARN, phần này có khả năng được chuyển hóa thành protein hoặc mảnh của nó.

Thuật ngữ “có thể dịch mã được” có thể được sử dụng thay thế cho thuật ngữ “có thể biểu hiện được” và được dùng để chỉ khả năng của polynucleotit, hoặc phần của nó, sẽ được chuyển hóa thành polypeptit bởi tế bào chủ. Như được hiểu trong lĩnh vực kỹ thuật này, quá trình dịch mã là quá trình mà trong đó các ribosom trong bào tương của tế bào

tạo ra polypeptit. Trong quá trình dịch mã, ARN thông tin (messenger RNA - mRNA) được giải mã bởi tARN trong phức chất ribosom để tạo ra một chuỗi axit amin hoặc polypeptit cụ thể. Hơn nữa, thuật ngữ “có thể dịch mã được” khi được sử dụng trong bản mô tả này liên quan đến oligome, có nghĩa là ít nhất một phần của oligome, ví dụ, vùng mã hóa của trình tự oligome (còn được biết đến với tên gọi là trình tự mã hóa hay CDS), có khả năng được chuyển hóa thành protein hoặc mảnh của nó.

Thuật ngữ “hiệu quả dịch mã” được dùng để chỉ số đo về mức sản xuất protein hoặc polypeptit bằng phương pháp dịch mã trình tự mRNA *in vitro* hoặc *in vivo*. Sáng chế này đề xuất một loạt phân tử trình tự mRNA, phân tử này có thể chứa một hoặc nhiều monome UNA, và một số monome axit nucleic, trong đó trình tự mRNA này có thể là có thể biểu hiện được để đem lại polypeptit hoặc protein.

Kết cục hữu hiệu về mặt trị liệu: Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kết cục hữu hiệu về mặt trị liệu” có nghĩa là kết cục mà đủ ở đối tượng hứng chịu hoặc dễ bị ảnh hưởng bởi tình trạng lây nhiễm, bệnh, rối loạn, và/hoặc tình trạng, để điều trị, cải thiện các triệu chứng của tình trạng lây nhiễm, bệnh, rối loạn, và/hoặc tình trạng này, chẩn đoán, phòng ngừa, và/hoặc trì hoãn sự khởi phát của tình trạng lây nhiễm, bệnh, rối loạn, và/hoặc tình trạng này.

### **Các ví dụ thực hiện sáng chế**

Các phương án phụ thêm của sáng chế này được minh họa chi tiết thêm trong các ví dụ dưới đây, các ví dụ này không được dự định để làm giới hạn phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ theo cách bất kỳ.

#### **Ví dụ 1: Sản xuất ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid**

##### **Hòa tan ARN và các tá dược lipid**

Ví dụ này tóm lược một số điều kiện tổng quát được sử dụng cho việc sản xuất ARN lớn được bao nang bằng LNP. Các tá dược lipid (Lipid cation/lipid cation có thể ion hóa được: lipid phosphat: cholesterol: lipid-PEG) được cân và được hòa tan trong etanol 100% (ở tỷ số mol là 50:X:48,5-X:1,5, X=7, 10 hoặc 13) ở 40°C cho đến khi quá trình hòa tan hoàn thành, có thời gian hòa tan không vượt quá bốn giờ. Sau hiện tượng hòa tan có thể nhìn thấy được, nhiệt độ của dung dịch được làm cân bằng đến nhiệt độ trong phòng, sau đó là

lọc dung dịch qua bộ lọc polyetesulfon (PES) 0,2  $\mu\text{m}$  vào bình bằng thép không gỉ hoặc thủy tinh có vỏ bọc. Nồng độ lipid danh định ở giai đoạn này là 5-125 mg/mL.

ARN này được pha loãng trong chất đệm xitrat 5 mM độ pH 4,0 chứa NaCl 0-300mM. Sau đó, dung dịch này được lọc qua PES 0,2  $\mu\text{m}$ . Nồng độ của ARN lớn ở giai đoạn này là khoảng 0,096-0,765 mg/mL.

#### Tạo thành hạt nano bằng cấu kiện trộn bằng thép không gỉ có hình dạng chữ T

ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid được tạo thành bằng cách trộn dung dịch etanol của các lipid với dung dịch nước của ARN ở một tốc độ được kiểm soát thông qua cấu kiện trộn bằng thép không gỉ có hình dạng chữ T (“Cấu kiện T”). Phương pháp trộn này bao gồm việc cho dung dịch etanol và dung dịch nước chảy vào cấu kiện trộn gồm ống thứ 2 được nối liền theo kiểu vuông góc với ống thứ 1. Dung dịch đầu ra bao gồm hỗn hợp của hai dung dịch được sản xuất chảy theo chiều của dòng ARN ban đầu.

Tỷ số trọng lượng giữa tổng lipid và mARN được thiết lập là khoảng 35,88:1, tuy nhiên tỷ số trọng lượng này có thể thay đổi tùy thuộc vào kích cỡ chính xác của ARN lớn đang được sử dụng và chế phẩm lipid mong muốn. Người có kỹ năng chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận thấy rằng các quy trình được mô tả trong bản mô tả này là có thể áp dụng được cho các chế phẩm lipid chứa dạng kết hợp thích hợp bất kỳ của các lipid theo tỷ số mol và tỷ số trọng lượng thích hợp bất kỳ với ARN. Tốc độ bổ sung của mỗi dung dịch được kiểm soát bằng cách sử dụng bơm pít tông áp suất cao (Knauer) với việc các dung dịch lipid và mARN được bổ sung ở tốc độ dòng chảy lần lượt là 30-75 và 90-225 mL/phút. Hai dòng này hội tụ trong cấu kiện trộn bằng thép không gỉ ở tổng tốc độ dòng chảy là 120-300 mL/phút. Hệ thống ống Peek được sử dụng cho bơm pít tông áp suất cao có ID 0,03-0,08 inso đối với dòng ARN và ID 0,01-0,03 inso đối với dòng lipid.

#### Tạo thành hạt nano bằng thiết bị lắc trộn đa đầu vào

ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid được tạo thành bằng cách trộn dung dịch etanol của các lipid với dung dịch nước của ARN ở một tốc độ được kiểm soát thông qua thiết bị lắc trộn đa đầu vào (MIVM, Hà Lan).

Tỷ số trọng lượng giữa tổng lipid và mARN là 35,88:1. Tốc độ bổ sung của mỗi dung dịch được kiểm soát bằng cách sử dụng bơm HPLC với việc các dung dịch lipid và mARN được bổ sung ở tốc độ dòng chảy lần lượt là 20-50 mL/phút cho mỗi dòng. Bốn

dòng này hội tụ trong cấu kiện trộn bằng thép không gỉ ở tổng tốc độ dòng chảy là 80-200 mL/phút. Hệ thống ống Peek được sử dụng cho bơm pít tông áp suất cao có ID 0,02-0,8 inso đối với dòng ARN và 0,01-0,03 inso đối với dòng lipid.

#### Làm ổn định hạt nano bằng các lần pha loãng từng bước

Hạt nano được tạo thành như vậy được làm ổn định bằng các lần pha loãng trong dòng liên tiếp bằng các chất đệm: trước tiên bằng chất đệm phosphat 45 mM độ pH 6,5 được nạp ở tốc độ dòng chảy là 80-600 mL/phút, sau đó là Tris hoặc HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, chất đệm sucroza 9% (trọng lượng/thể tích) độ pH 8,0 được nạp ở tốc độ dòng chảy là 240-2700 mL/phút.

#### Cô và trao đổi chất đệm

Dạng chế phẩm hạt nano đã được pha loãng thu được như được mô tả trên đây được cô và được lọc pha loãng qua màng chống lại HEPES 50 mM/Tris 20mM, NaCl 50 mM, chất đệm sucroza 9% (trọng lượng/thể tích) độ pH 8,0 bằng phương pháp lọc theo dòng chảy tiếp tuyến bằng cách sử dụng các màng sợi rỗng PES được cải biến có MWCO 100 kDa. Bước quy trình này đảm bảo sự loại bỏ etanol và trao đổi chất đệm. Nhiệt độ của dạng chế phẩm trong suốt quá trình cô và lọc pha loãng qua màng được duy trì ở 16 đến 25°C. Một khi sự loại bỏ etanol được xác nhận bằng phép phân tích Alco-Screen Alcohol Test Strips, sau đó, dung dịch đã được cô này được lọc qua bộ lọc PES 0,2 µm vào chai thủy tinh để loại bỏ các dạng hạt lớn hơn và các chất tạp nhiễm vi sinh vật học tiềm năng. Mẫu của sản phẩm chất đông được lọc này được thu gom cho phép phân tích nồng độ ARN trong quy trình. Sản phẩm chất đông này được lưu trữ ở 2 đến 8°C cho đến khi điều chỉnh nồng độ.

#### Điều chỉnh nồng độ, làm đầy và làm đông lạnh

Nồng độ của ARN trong dạng chế phẩm được điều chỉnh đến nồng độ đích là 0,2 mg/mL bằng cách bổ sung HEPES 50 mM/Tris 20mM, NaCl 50 mM, chất đệm sucroza 9% (trọng lượng/thể tích) độ pH 8,0 chứa glyxerol sao cho nồng độ cuối của glyxerol trong chất đệm là 6,3% (trọng lượng/thể tích).

Sau khi điều chỉnh nồng độ, sản phẩm chất đông đã được điều chỉnh được lọc qua bộ lọc hạng tiệt trùng PES 0,2 µm vào bình thu gom vô trùng.

Sản phẩm được làm đầy một cách vô khuẩn để làm đầy thể tích là 1 mL (có mức làm đầy quá 0,2 mL) trong các lọ thủy tinh borosilicat loại I 2 mL, được đóng nút chặn và được bịt nắp. Tất cả các lọ được làm đông lạnh ở tốc độ có kiểm soát là 0,5°C trong mỗi phút đến  $\leq -55^{\circ}\text{C}$  bằng cách sử dụng máy đông khô hoặc làm đông lạnh một cách trực tiếp ở  $-70^{\circ}\text{C}$ . Các lọ này được lưu trữ trong máy đông lạnh được duy trì ở  $-70 \pm 10^{\circ}\text{C}$ .

#### Điều chỉnh nồng độ, bổ sung tá dược LYO, làm đầy và làm đông khô

Nồng độ của ARN trong dạng chế phẩm được điều chỉnh đến nồng độ đích là 0,1-0,2 mg/mL bằng cách bổ sung HEPES 50 mM/Tris 20mM, NaCl 50 mM, chất đệm sucroza 9% (trọng lượng/thể tích) độ pH 8,0 chứa các tá dược LYO đúng đắn, và sau đó, có thể được lưu trữ ở  $2-8^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  hoặc  $-70 \pm 10^{\circ}\text{C}$  trước quy trình làm đông khô hoặc được làm đông khô một cách trực tiếp.

#### Tán xạ ánh sáng động học

Kích cỡ hạt trung bình (z) và chỉ số độ đa phân tán (polydispersity index - PDI) của các dạng chế phẩm hạt nano lipid được sử dụng ở các Ví dụ thực hiện sáng chế được đo bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động học trên Malvern Zetasizer Nano ZS (Vương quốc Anh).

#### Thử nghiệm RiboGreen

Hiệu quả bao nang của các dạng chế phẩm hạt nano lipid được xác định đặc điểm bằng cách sử dụng thử nghiệm đo huỳnh quang RiboGreen. RiboGreen là thuốc nhuộm huỳnh quang độc quyền sở hữu (Molecular Probes/Invitrogen, một bộ phận của Life Technologies, nay là một phần của Thermo Fisher Scientific của Eugene, Oregon, Mỹ) mà được sử dụng trong việc phát hiện và định lượng các axit nucleic, bao gồm cả ARN và ADN. Dưới dạng tự do của nó, RiboGreen biểu hiện mức huỳnh quang ít và sở hữu chỉ dấu về độ hấp thụ không đáng kể. Khi được liên kết vào các axit nucleic, thuốc nhuộm phát huỳnh quang có cường độ mà lớn hơn dạng không được liên kết một vài bậc độ lớn. Sau đó, có thể phát hiện mức huỳnh quang bằng thiết bị cảm biến (huỳnh quang kế) và có thể định lượng axit nucleic.

#### Các đặc điểm lý hóa của LNP có thể chấp nhận được

Các thí nghiệm khác nữa được thực hiện như được mô tả trong các ví dụ dưới đây để đánh giá tác dụng của các chất phản ứng, các thông số quy trình và các kiểu sắp đặt thiết bị khác nhau đối với chất lượng của các dạng chế phẩm ARN lớn được bao nang bằng LNP. Chất lượng của các dạng chế phẩm này được đánh giá bằng cách phân tích các dạng chế phẩm để có được kích cỡ hạt (Z hoặc Z-trung bình), độ đa phân tán (PDI) và hiệu quả bao nang (%Encap) có thể chấp nhận được. Các chế phẩm khác nhau được kiểm nghiệm được sàng lọc về ngưỡng của các thuộc tính có được đáp ứng hay không bao gồm cả kích cỡ hạt có thể chấp nhận được (nhỏ hơn 150 nm, nhưng được ưu tiên nhất là nhỏ hơn 120 nm), PDI ( $< 0,2$ ), và hiệu quả bao nang cao ( $> 85\%$ ).

### Ví dụ 2: LNP chứa ARN lớn-Nghiên cứu ban đầu

Trong lần chạy ban đầu, Precision Nano Assembler (Một hệ thống tạo dạng chế phẩm để bàn, Precision Nanosystems, Inc., Vancouver, BC, Canada) được sử dụng để tạo ra LNP. Chế phẩm này bao gồm lipit cation: DSPC: cholesterol: lipit-PEG ở tỷ số mol là 50:7:41,5:1,5. Dạng mARN này được pha loãng trong chất đệm xitrat 5 mM độ pH 4,0. Tỷ số trọng lượng tổng lipit: ARN là 35,2, và tổng tốc độ dòng chảy của cả hai dòng là 12 mL/phút với tỷ số giữa EtOH và nước là 1:3. Các bước pha loãng, tinh chế và cô là như được mô tả trong ví dụ 1, tỷ số pha loãng thứ 1 là 1:2 và tỷ số pha loãng thứ 2 là 1:3. Các kết quả ban đầu so sánh trình tự nucleotit nhỏ và lớn điển hình được thể hiện dưới đây trong Bảng 1.

Bảng 1

| ARN                                                     | Trong quy trình |       |        |
|---------------------------------------------------------|-----------------|-------|--------|
|                                                         | Đường kính (nm) | PDI   | %Encap |
| Dạng mARN nhỏ<br>(cấu trúc mARM2016, 1328 nt)           | 74,8            | 0,053 | 94,9   |
| ARN tự sao chép luxiferaza (cấu trúc pARM2807, 9693 nt) | 93,99           | 0,358 | 88     |

Như được nhìn thấy trong Bảng 1, bằng cách sử dụng cùng một quy trình, sự bao nang của ARN lớn hơn đem lại kích cỡ hạt lớn hơn, với độ đa phân tán (PDI) cao hơn và tỷ lệ phần trăm của hiệu quả bao nang (%encap) thấp hơn.

### Ví dụ 3: Tác dụng của việc bổ sung muối

Trong ví dụ này, đã quan sát thấy chất lượng được cải thiện đối với ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid với cách sử dụng NaCl trong chất đệm xitrat. Chế phẩm, cấu kiện tạo dạng chế phẩm và mARN là tương tự như được mô tả trong Ví dụ 2. Các kết quả này được tổng kết trong Bảng 2 dưới đây.

Trong bảng dưới đây, “[Lipit IP] mM” là nồng độ tổng lipid trong quy trình sau khi trộn hai dòng mà không pha loãng.

Bảng 2

| [Lipit IP]<br>mM | Chất đệm xitrat |          |              | Chất đông            |      |        |
|------------------|-----------------|----------|--------------|----------------------|------|--------|
|                  | [Xitrat]<br>mM  | Độ<br>pH | NaCl<br>(mM) | Z-trung<br>bình (nm) | PDI  | %Encap |
| 4                | 5               | 3,5      | 10           | 75                   | 0,2  | 87     |
| 4                | 5               | 3,5      | 20           | 61                   | 0,11 | 86     |
| 4                | 5               | 3,5      | 30           | 61                   | 0,13 | 82     |
| 4                | 5               | 3,5      | 50           | 61                   | 0,1  | 78     |
| 4                | 5               | 3,5      | 100          | 65                   | 0,1  | 72     |
| 4                | 5               | 4        | 0            | 95                   | 0,25 | 91     |
| 4                | 5               | 4        | 10           | 82                   | 0,23 | 89     |
| 4                | 5               | 4        | 20           | 66                   | 0,14 | 82     |

Với các cải thiện quy trình này, chất đệm xitrat độ pH 4,0 có NaCl 10 mM được chọn để phát triển thêm bởi vì chất đệm độ pH 4,0 cũng đã duy trì độ tinh khiết và tính nguyên vẹn của mARN tốt hơn.

Tác dụng của việc bổ sung muối trong chất đệm xitrat đã phát huy tác dụng khắp các chế phẩm của dạng chế phẩm và các ARN tự sao chép lớn khác nhau. Cũng đã phát hiện ra rằng chế phẩm chất đệm này thì dễ chuyển sang hệ thống tạo dạng chế phẩm quy mô vừa bao gồm cả với cách sử dụng thiết bị lắc trộn đa đầu vào. Tuy nhiên, chế phẩm chất đệm

thì chưa thuận lợi cho hệ thống tạo dạng chế phẩm quy mô lớn, như những loại có sử dụng cấu kiện trộn có hình dạng chữ T. Các kết quả thêm này được tổng kết dưới đây trong các Bảng 3-5.

Đối với các dạng chế phẩm có sử dụng thiết bị lắc trộn đa đầu vào trong ví dụ này, bốn dòng này hội tụ trong cấu kiện trộn bằng thép không gỉ ở tổng tốc độ dòng chảy là 120 mL/phút như được mô tả trong Ví dụ 1, với tỷ số tốc độ dòng chảy lipid:ARN là 1:3. Hệ thống ống Peek được sử dụng cho bơm piston áp suất cao có ID 0,03 inso đối với dòng ARN và ID 0,01 inso đối với dòng lipid. Tỷ số pha loãng là 1:2 và 1:3, và các bước tinh chế và cô là như được mô tả trong Ví dụ 1.

Đối với các dạng chế phẩm có sử dụng Cấu kiện T có thể tăng quy mô được trong ví dụ này, hai dòng này hội tụ trong cấu kiện trộn bằng thép không gỉ ở tổng tốc độ dòng chảy là 300 mL/phút như được mô tả trong Ví dụ 1, với tỷ số tốc độ dòng chảy lipid:ARN là 1:3. Hệ thống ống Peek được sử dụng cho bơm piston áp suất cao có ID 0,03 inso đối với dòng ARN và ID 0,01 inso đối với dòng lipid. Các bước tinh chế và cô được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 1.

Bảng 3

| Mô tả về cấu kiện                        | Chế phẩm lipid<br>Lipit cation:<br>DSPC: CHOL:<br>lipit-PEG<br>(tỷ số mol) | ARN                             | Z-trung bình (nm) | PDI   | %Encap | Kích cỡ mê |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------|-------|--------|------------|
| Thiết bị lắc trộn đa đầu vào, quy mô vừa | 50:7:41,5:1,5                                                              | ARN tự sao                      | 64,22             | 0,077 | 90,1   | 1,5 mg     |
|                                          | 50:10:38,5:1,5                                                             | chép luxiferaza                 | 62,22             | 0,078 | 89,6   |            |
|                                          | 50:13:35,5:1,5                                                             | (cấu trúc số pARM2807, 9693 nt) | 62,97             | 0,078 | 89,8   |            |

Bảng 4

| Mô tả về cấu kiện | Chế phẩm lipid<br>Lipit cation:<br>DSPC: CHOL: | ARN | Z-trung bình (nm) | PDI | %Encap | Kích cỡ mê |
|-------------------|------------------------------------------------|-----|-------------------|-----|--------|------------|
|-------------------|------------------------------------------------|-----|-------------------|-----|--------|------------|

|                                                   | <b>lipit-PEG<br/>(tỷ số mol)</b> |                                        |       |       |      |        |
|---------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|-------|-------|------|--------|
| Thiết bị lắc<br>trộn đa đầu<br>vào, quy<br>mô vừa | 50:10:38,5:1,5                   | ARN tự<br>sao<br>chép,<br>11,665<br>nt | 66,52 | 0,180 | 95,9 | 1,5 mg |
|                                                   | 50:13:35,5:1,5                   |                                        | 65,85 | 0,095 | 94,7 |        |

Bảng 5

| <b>Mô tả về cấu<br/>kiện</b> | <b>Chế phẩm lipit<br/>Lipit cation:<br/>DSPC: CHOL:ARN<br/>lipit-PEG<br/>(tỷ số mol)</b> |                                                          | <b>Z-trung<br/>bình<br/>(nm)</b> | <b>PDI</b> | <b>%Encap</b> | <b>Kích<br/>cỡ mē</b> |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------|------------|---------------|-----------------------|
| Cấu kiện T                   | 50:7:41,5:1,5                                                                            | ARN tự sao<br>chép<br>luxiferaza,<br>pARM2807,<br>9693nt | 95,35                            | 0,236      | 90,3          | 3 mg                  |
|                              | 50:10:38,5:1,5                                                                           |                                                          | 91,48                            | 0,238      | 89,8          |                       |
|                              | 50:13:35,5:1,5                                                                           |                                                          | 92,11                            | 0,231      | 88,1          |                       |

**Ví dụ 4: Tác dụng của việc bổ sung muối và độ pH của chất đệm pha loãng thứ 1**

Để cải thiện quy trình, phương pháp đánh giá về việc bổ sung muối và độ pH của chất đệm pha loãng thứ 1 (chất đệm phosphat 45 mM) được thực hiện. Chế phẩm của dạng chế phẩm và quy trình là như được mô tả trong Ví dụ 2 bằng cách sử dụng Precision Nano Assembler.

Như được thể hiện trong Bảng 6, việc bổ sung NaCl trong chất đệm phosphat đã không cải thiện thêm chất lượng LNP, đem lại kích cỡ hạt lớn, với độ đa phân tán (PDI) cao hơn và tỷ lệ phần trăm của hiệu quả bao nang (%encap) thấp hơn.

Bảng 6

| <b>[Lipit IP]</b> | <b>Chất đệm<br/>xitrat</b> | <b>Chất đệm<br/>phosphat</b> | <b>Chất đông</b> |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|------------------|
|-------------------|----------------------------|------------------------------|------------------|

|   | [Xitrat] | Độ pH | NaCl (mM) | Độ pH | PS   | PDI   | %Encap |
|---|----------|-------|-----------|-------|------|-------|--------|
| 4 | 5        | 3,5   | 0         | 6,0   | 78,8 | 0,221 | 90,2   |
| 4 | 5        | 3,5   | 25        | 6,0   | 86,7 | 0,246 | 90,1   |
| 4 | 5        | 3,5   | 50        | 6,0   | 88,7 | 0,254 | 86,6   |
| 4 | 5        | 3,5   | 100       | 6,0   | 89,9 | 0,272 | 88,2   |

Việc đánh giá thêm, bao gồm cả mức thay đổi độ pH của chất đệm phosphat, được thực hiện. Độ pH là 6,5 được chọn lựa dựa trên pKa của lipid cation có thể ion hóa được trong dạng chế phẩm này (~6,4). Sự thay đổi này đã cải thiện một cách mạnh mẽ hiệu quả bao nang của hạt nano lipid như được thể hiện trong Bảng 7. Chế phẩm của lipid cation có thể ion hóa được: tỷ số mol DSPC: CHOL: PEG-DMG2000=50:13:35,5:1,5 được sử dụng trong dạng chế phẩm này.

Bảng 7

| [Lipit IP] | Chất đệm xitrat |       | Chất đệm phosphat |       | Chất đông |       |        |
|------------|-----------------|-------|-------------------|-------|-----------|-------|--------|
|            | [Xitrat]        | Độ pH | NaCl (mM)         | Độ pH | PS        | PDI   | %Encap |
| 4          | 5               | 4     | 10                | 6,5   | 71,03     | 0,202 | 95,8   |

#### Ví dụ 5: Tác dụng của tốc độ dòng chảy trong các hệ thống MIVM và Cấu kiện T

Chế phẩm của lipid cation có thể ion hóa được: tỷ số mol DSPC: CHOL: PEG-DMG2000=50:10:38,5:1,5 có tỷ số trọng lượng tổng lipid: ARN là khoảng 35,78:1 được sử dụng trong ví dụ này. ARN tự sao chép luxiferaza (cấu trúc số pARM2807, 9693 nt) được sử dụng. Quy trình tạo dạng chế phẩm của hệ thống MIVM và hệ thống Cấu kiện T là lần lượt như được mô tả trong Ví dụ 3.

Đáng ngạc nhiên là, tốc độ dòng chảy thấp hơn đã phát huy tác dụng tốt hơn đối với các dạng chế phẩm ARN lớn được bao nang của cả hệ thống MIVM và hệ thống Cấu kiện-tạo dạng chế phẩm. Với tốc độ dòng chảy thấp hơn, kích cỡ hạt (Z-trung bình) và PDI là nhỏ hơn, và %encap thì cao hơn. (Được thể hiện trong Bảng 8 và Bảng 9). Nhằm cố gắng đạt được cả tốc độ sản xuất có thể chấp nhận được và chất lượng LNP có thể chấp nhận

được, 100 ml/phút đối với hệ thống MIVM và 160 ml/phút đối với hệ thống Cấu kiện T được chọn để phát triển thêm.

Bảng 8

| Hệ thống tạo dạng chế phẩm | Tổng tốc độ dòng chảy (ml/phút) | Chất đồng |       |        |
|----------------------------|---------------------------------|-----------|-------|--------|
|                            |                                 | PS        | PDI   | %Encap |
| MIVM                       | 100                             | 73,33     | 0,117 | 94,4   |
|                            | 120                             | 75,16     | 0,132 | 94,8   |
|                            | 160                             | 82,13     | 0,152 | 93,4   |

Bảng 9

| Hệ thống tạo dạng chế phẩm | Tổng tốc độ dòng chảy (ml/phút) | Chất đồng |       |        |
|----------------------------|---------------------------------|-----------|-------|--------|
|                            |                                 | PS        | PDI   | %Encap |
| ARC                        | 120                             | 79,75     | 0,15  | 94,1   |
|                            | 160                             | 82,21     | 0,161 | 95,4   |
|                            | 200                             | 87,70     | 0,205 | 94,3   |
|                            | 333                             | 103,3     | 0,242 | 91,9   |

Kết quả phát hiện trong ví dụ này là đối nghịch với những gì được quan sát thấy đối với các dạng chế phẩm ARN nhỏ được bao nang bằng hạt nano lipid như được thể hiện trong Bảng 10. Tốc độ dòng chảy cao hơn đem lại kích cỡ hạt nhỏ hơn và PDI thấp hơn đối với ARN nhỏ được bao nang bằng hạt nano lipid. Đối với quy trình có các kết quả của ARN nhỏ được bao nang bằng LNP trong Bảng 10, sử dụng siARN có độ dài 23 nt.

Bảng 10

| ARN           | Hệ thống tạo dạng chế phẩm | Tổng tốc độ dòng chảy (ml/phút) | Chất đồng         |       |        |
|---------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------|-------|--------|
|               |                            |                                 | Z-trung bình (nm) | PDI   | %Encap |
| siARN (23 nt) | Cấu kiện T                 | 100                             | 106,9             | 0,087 | 99,1   |
|               |                            | 200                             | 75,7              | 0,080 | 99,4   |
|               |                            | 300                             | 71,2              | 0,066 | 99,3   |
|               |                            | 333                             | 69,7              | 0,063 | 99,5   |

**Ví dụ 6: Sản xuất ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid trong hệ thống MIVM và hệ thống Cấu kiện-tạo dạng chế phẩm có thể tăng quy mô được**

Với tất cả các cải thiện được đề cập trong các Ví dụ 2-5, quy trình tạo dạng chế phẩm dùng cho ARN lớn được bao nang bằng LNP (ARN tự sao chép luxiferaza, pARM2807, 9693 nt; và một ARN tự sao chép khác, 11,665 nt) khắp các hệ thống tạo dạng chế phẩm có thể tăng quy mô được (MIVM và Cấu kiện T) được phát triển, và quy trình này có thể áp dụng được cho các chế phẩm khác nhau (Bảng 11). Các điều kiện và quy trình tạo dạng chế phẩm trong ví dụ này là như được mô tả trong các ví dụ trên đây, trừ khi được chỉ ra khác.

Bảng 11

| Mô tả về cấu kiện | Chế phẩm lipid<br>Lipit cation:<br>DSPC: CHOL:ARN<br>lipit-PEG<br>(tỷ số mol) |                                                           | Z-trung<br>bình (nm) | PDI   | %Encap | Thể tích<br>mê của 1 g<br>ARN (L) |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------|-------|--------|-----------------------------------|
| MIVM              | 50:7:41,5:1,5                                                                 | ARN tự sao<br>chép<br>luxiferaza,<br>pARM2807,<br>9693 nt | 75,02                | 0,163 | 93,3   | 167,5                             |
|                   | 50:10:38,5:1,5                                                                |                                                           | 74,54                | 0,18  | 93,1   |                                   |
|                   | 50:13:35,5:1,5                                                                |                                                           | 78,34                | 0,184 | 91     |                                   |
| Cấu kiện T        | 50:7:41,5:1,5                                                                 | ARN tự sao<br>chép<br>luxiferaza,<br>pARM2807,<br>9693 nt | 89,17                | 0,217 | 92     |                                   |
|                   | 50:10:38,5:1,5                                                                |                                                           | 88,74                | 0,196 | 91,3   |                                   |
|                   | 50:13:35,5:1,5                                                                |                                                           | 89,47                | 0,195 | 90,5   |                                   |

Để đáp ứng các yêu cầu sản xuất, khả năng về việc sắp đặt tất cả trong dòng để sản xuất liên tục được kiểm nghiệm. Hệ thống ống dài giữa lần pha loãng thứ 1 và lần pha loãng thứ 2 được sử dụng để kéo dài thời gian giữ giữa cả hai lần pha loãng. Điều này là dựa trên kết quả tìm hiểu được từ các ví dụ trước. Như được thể hiện trong Bảng 12, chất lượng của ARN lớn được bao nang bằng LNP không bị ảnh hưởng bởi việc sắp đặt tất cả trong dòng.

Bảng 12

| Mô tả về cấu kiện | Thời gian giữ lần pha loãng thứ 1 và lần pha loãng thứ 2 | Chế phẩm lipit Lipit cation: DSPC: CHOL: lipit-PEG (tỷ số mol) | ARN                           | Z-trung bình (nm) | PDI   | %Encap | Thể tích mẻ của 1 g ARN(L) |
|-------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------|-------|--------|----------------------------|
| MIVM              | 20s                                                      | 50:10:38,5:1,5                                                 | ARN tự sao chép               | 73,11             | 0,133 | 92,2   | 167,5                      |
|                   | 30s                                                      |                                                                | luxiferaza, pARM2807, 9693 nt | 76,48             | 0,173 | 93,3   |                            |

**Ví dụ 7: Tăng quy mô của quy trình sản xuất ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipit bằng hệ thống MIVM và hệ thống tạo dạng chế phẩm Cấu kiện T**

Quy trình tạo dạng chế phẩm được mô tả trong Ví dụ 6 được thể hiện là phát huy tác dụng tốt đối với việc sản xuất ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipit, nhưng thể tích mẻ và tốc độ sản xuất đã thể hiện nhu cầu về sự cải thiện thêm. Theo các phương án trong ví dụ này, đã thực hiện nhiều phương pháp để đạt được mục đích này.

Tất cả các chế phẩm của dạng chế phẩm, các điều kiện và quy trình trong ví dụ này là tương tự với Ví dụ 6, trừ khi được chỉ ra khác.

Làm tăng nồng độ trong quy trình bằng việc bổ sung NaCl trong chất đệm xitrat

Theo phương án này, đã làm tăng nồng độ trong quy trình vì mục đích tăng quy mô, và đã phát hiện ra mối quan hệ giữa nồng độ trong quy trình và nồng độ NaCl trong chất đệm xitrat (Được thể hiện trong Bảng 13 và Bảng 14), phát hiện này là khắp các cấu kiện sản xuất khác nhau. Nồng độ NaCl cao hơn trong chất đệm xitrat là cần thiết cho việc tạo dạng chế phẩm nồng độ trong quy trình cao hơn, và nó đã đem lại kích cỡ hạt nhỏ, PDI và %encap cao. Nhưng một khi đạt tới ngưỡng, thì không cần làm tăng nồng độ NaCl cao hơn chút nào nữa. Một nồng độ NaCl trong chất đệm xitrat đúng đắn là cần thiết đối với

việc sản xuất ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid, và điều này là tương hợp với việc sắp đặt tất cả trong dòng, đem lại khả năng sản xuất quy mô lớn liên tục.

Bảng 13

| Quy trình tạo dạng chế phẩm                    | [Lipit IP] | Nồng độ NaCl trong chất đệm xitrat (mM) | Chất đồng |       |        | Thể tích mẻ (L/g mARN) |
|------------------------------------------------|------------|-----------------------------------------|-----------|-------|--------|------------------------|
|                                                |            |                                         | PS (nm)   | PDI   | %Encap |                        |
| MIVM                                           | 4          | 10                                      | 73,3      | 0,117 | 94,4   | 167,5                  |
|                                                | 8          | 10                                      | 86,7      | 0,176 | 94,3   | 83,8                   |
|                                                | 12         | 10                                      | 93,8      | 0,179 | 95,6   | 55,8                   |
|                                                | 12         | 30                                      | 82,5      | 0,152 | 95,1   |                        |
|                                                | 12         | 50                                      | 79,12     | 0,126 | 95,6   |                        |
| MIVM, tất cả trong dòng, thời gian giữ 30 giây | 12         | 50                                      | 81,01     | 0,148 | 95,7   |                        |

Bảng 14

| Quy trình tạo dạng chế phẩm  | [Lipit IP] | Nồng độ NaCl Trong chất đệm xitrat (mM) | Chất đồng |       |        | Thể tích mẻ (L/g mARN) |
|------------------------------|------------|-----------------------------------------|-----------|-------|--------|------------------------|
|                              |            |                                         | PS (nm)   | PDI   | %Encap |                        |
| Cấu kiện T                   | 16         | 50                                      | 83,91     | 0,156 | 96,4   | 41,9                   |
|                              | 12         | 50                                      | 71,35     | 0,125 | 96     | 55,8                   |
| Cấu kiện T tất cả trong dòng | 12         | 50                                      | 71,59     | 0,094 | 96,1   |                        |

#### Làm giảm tỷ số pha loãng để tăng quy mô

Để làm giảm thêm thể tích mẻ, đã đánh giá mức giảm tỷ số pha loãng. Như được mô tả trong Ví dụ 1, phương pháp pha loãng 2 bước là cần thiết đối với quy trình sản xuất ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid. Trong tất cả các ví dụ trước, mức pha loãng 1:2 với chất đệm phosphat 45 mM và mức pha loãng 1:3 với chất đệm HEPES 50 mM, độ pH 8,0 chứa NaCl 50 mM và sucroza 9% được thực hiện. Theo phương án này, tỷ số pha loãng thấp hơn được kiểm nghiệm trong một khoảng duy trì nồng độ etanol và độ pH

đúng dẫn trong dạng chế phẩm được pha loãng. Thời gian giữ 8 giờ trước quy trình tinh chế (TFF) cũng được kiểm nghiệm để đảm bảo tính ổn định của dạng chế phẩm trong suốt quy trình tinh chế sản xuất quy mô lớn (Bảng 15).

Như được thể hiện trong Bảng 15, các thuộc tính hóa lý của dạng chế phẩm không bị ảnh hưởng bởi việc làm giảm tỷ số pha loãng của quy trình. Sau 8 giờ giữ, các thuộc tính hóa lý của dạng chế phẩm cũng được duy trì. Trong ví dụ này, độ tinh khiết và tính nguyên vẹn của mARN cũng được kiểm nghiệm bằng thiết bị phân tích Mạch để đảm bảo độ công hiệu của mARN có thể được duy trì trong suốt quá trình sản xuất. Độ tinh khiết và tính nguyên vẹn của mARN được ghi nhận so với độ tinh khiết và tính nguyên vẹn của mARN trước khi bao nang.

Lipit ở 12 mM [IP], với NaCl 50 mM trong chất đệm xitrat 5 mM độ pH 4,0, mức pha loãng phosphat 1:1,5, sau đó là mức pha loãng chất đệm HEPES 1:2,5, LNP có chất lượng tốt và là ổn định về các thuộc tính hóa lý và độ tinh khiết của mARN trong ít nhất 8 giờ trước khi bắt đầu quy trình tinh chế (TFF), điều này đảm bảo tính ổn định của LNP trong suốt quy trình sản xuất.

Bảng 15

| Mức pha loãng thứ 1 | Mức pha loãng thứ 2 | Mô tả về quy trình         | Thời gian giữ trước TFF (giờ) | Đường kính (nm) | PDI   | %Encap | Độ tinh khiết của mARN (%) | Thể tích mẻ (L/g mARN) |
|---------------------|---------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------|-------|--------|----------------------------|------------------------|
| 1:1                 | 1:2,5               | Cấu kiện                   | 0                             | 67,97           | 0,105 | 92     | 90,8                       | 32,6                   |
| 1:1,5               | 1:2                 | T, 160                     | 0                             | 71,46           | 0,114 | 94     | 89,2                       | 34,9                   |
| 1:1,5               | 1:2,5               | mL/phút,                   | 0                             | 70,91           | 0,069 | 95     | 87,7                       | 40,7                   |
| 1:2                 | 1:2                 | lipit 12                   | 0                             | 70,81           | 0,085 | 90     | 90,8                       | 42                     |
| 1:1,5               | 1:2,5               | mM IP,                     | 0                             | 76,75           | 0,111 | 96     | 92,3                       | 40,7                   |
| 1:1,5               | 1:2,5               | xitrat 5 mM độ pH 4,0+NaCl | 8                             | 77,65           | 0,108 | 95     | 96,9                       |                        |

|  |  |                                                     |  |  |  |  |  |  |
|--|--|-----------------------------------------------------|--|--|--|--|--|--|
|  |  | 50 mM;<br>Tất cả<br>trong<br>dòng (giữ<br>30 giây). |  |  |  |  |  |  |
|--|--|-----------------------------------------------------|--|--|--|--|--|--|

**Ví dụ 8: Kiểu sắp đặt hệ thống ống và áp suất ngược đối với việc sản xuất ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid**

Đối với việc sản xuất ARN nhỏ hơn được bao nang bằng hạt nano lipid, để tăng áp suất ngược của bơm pít tông áp suất cao được sử dụng trong cấu kiện, thường sử dụng hệ thống ống nhỏ hơn (ID 0,01, 0,02 inso). Để tránh hiện tượng xung động của dòng ARN, thường sử dụng kẹp trên hệ thống ống mà kết nối hệ thống ống Peek và cấu kiện trộn. Ví dụ này đã thể hiện điểm ngưỡng thất bại bằng cách sử dụng quy trình sản xuất được phát triển trong Ví dụ 7 nhưng bằng cách sử dụng hệ thống ống Peek có ID 0,02 inso đối với dòng ARN và kẹp trên hệ thống ống giữa hệ thống ống Peek và Cấu kiện T. Sau đó, phương pháp đánh giá về tác dụng của kiểu sắp đặt hệ thống ống và áp suất ngược được thực hiện. (Bảng 16). Trong ví dụ này, tất cả chế phẩm của dạng chế phẩm, các điều kiện và quy trình là tương tự với Ví dụ 7, trừ khi được đề cập khác.

Bảng 16

| Hệ thống ống bơm (ID tính bằng inso và độ dài tính bằng cm)           | Áp suất ngược của bơm            | Z-trung bình | PDI   | %Encap |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------|-------|--------|
| Dạng sắp đặt phát triển ban đầu: ARN 0,03 (27 cm); Lipit 0,03 (30 cm) | ARN 18 psi; Lipit 55-60 psi      | 80,96        | 0,153 | 94,1   |
| Dạng sắp đặt sản xuất 1: ARN 0,02 (50 cm); Lipit: 0,01 (30 cm)        | ARN 250 psi; Lipit 395-405 psi   | 99,80        | 0,247 | 81,4   |
| Dạng sắp đặt nghiên cứu: ARN 0,03 (50 cm); Lipit: 0,01 (30 cm)        | ARN 19-21 psi; Lipit 395-405 psi | 82,13        | 0,152 | 95,2   |

Như được thể hiện trong Bảng 16, kích cỡ hạt và PDI thì cao hơn một cách đáng ngạc nhiên trong khi %encap thì thấp một cách đáng ngạc nhiên khi sử dụng hệ thống ống

Peek 0,02 inso đối với dòng ARN và hệ thống ống 0,01 inso đối với dòng lipit trong suốt quá trình sản xuất. Để hiểu đường nào đã tạo ra sự khác biệt, dạng sắp đặt nghiên cứu: ARN 0,03 (50 cm); Lipit: 0,01 (30 cm) được sử dụng và đã tạo ra các LNP chất lượng tốt. So sánh 3 dạng sắp đặt này, các kết quả đã thể hiện một cách rõ ràng rằng hệ thống ống dòng ARN có tác dụng quan trọng đối với chất lượng LNP. Tuy nhiên, đã không biết rằng ID của hệ thống ống, áp suất cao, hay cả hai là nguyên nhân.

Vì vậy, một tập hợp gồm các kiểm nghiệm với độ dài và kích cỡ của hệ thống ống dòng ARN khác nhau được thực hiện (Bảng 17). Các kết quả đã thể hiện rằng chất lượng LNP bị ảnh hưởng khi sử dụng hệ thống ống 0,02 inso, thậm chí đối với độ dài cực kỳ ngắn.

Bảng 17

| Hệ thống ống bơm (ID tính bằng inso và độ dài tính bằng cm) | Áp suất ngược của bơm (psi) | Z-trung bình | PDI   | %Encap |
|-------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------|-------|--------|
| ARN: 0,03 (27 cm); Lipit: 0,01 (30 cm)                      | ARN 19-21; Lipit 395-405    | 82,13        | 0,152 | 95,2   |
| ARN: 0,02 (40 cm); Lipit: 0,01 (30 cm)                      | ARN 152; LIPIT 412          | 97,91        | 0,230 | 77,1   |
| ARN: 0,02 (25 cm); Lipit: 0,01 (30 cm)                      | ARN 104; LIPIT 401          | 99,57        | 0,294 | 76,0   |
| ARN: 0,02 (10 cm); Lipit: 0,01 (30 cm)                      | ARN 61; LIPIT 415           | 97,6         | 0,238 | 80,9   |
| ARN: 0,03 (27 cm) +0,02 (5 cm); Lipit: 0,01-30 cm)          | ARN 60; LIPIT 396           | 95,1         | 0,194 | 88,5   |

Đã thực hiện nghiên cứu thêm có kết quả được thể hiện trong Bảng 18. Việc loại bỏ kẹp là tốt cho dạng chế phẩm. Tuy nhiên, khi sử dụng hệ thống ống có ID 0,03 inso cho cả hai đường và hệ thống ống dài trong đường ARN (90 cm) để tránh hiện tượng xung động, thì các kết quả là không thuận lợi. Khi sử dụng độ dài ống vừa phải (48 cm) có kẹp trong đường ARN thông qua cấu kiện trộn để duy trì áp suất ngược trong khi trộn ở dạng kết hợp với hệ thống ống nhỏ hơn đối với dòng lipit (ID 0,01 inso) thì tốt cho dạng chế phẩm. Áp suất khoảng 70 psi là an toàn cho dạng chế phẩm.

Bảng 18

| Hệ thống ống bơm (ID tính bằng inso và độ dài tính bằng cm)                           | Áp suất ngược của bơm (psi) | Z-trung bình | PDI   | %Encap |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------|-------|--------|
| ARN 0,03 (27 cm); Lipit 0,03 (30 cm)                                                  | ARN 30 psi; Lipit 53 psi    | 68,69        | 0,138 | 98     |
| ARN 0,03 (90cm) để làm tăng áp suất và tránh hiện tượng xung động; Lipit 0,03 (30cm)  | ARN 64 psi; Lipit 50 psi    | 88,9         | 0,166 | 96,1   |
| ARN 0,03 (48cm) +kẹp; Lipit 0,01 (30cm) để tránh hiện tượng xung động của cả hai dòng | ARN 68 psi; Lipit 487 psi   | 75,37        | 0,158 | 95,6   |

#### Ví dụ 9: Cơ chế khả dĩ của các phát hiện của các Ví dụ 1-8

Với tất cả các phát hiện trên đây, cơ chế khả dĩ được bàn luận trong ví dụ này. Vì tất cả các phát hiện này chỉ áp dụng cho ARN lớn (~6000-13000nt), và chất lượng ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipit bị ảnh hưởng bởi nồng độ ARN trong chất đệm xitrat, nồng độ NaCl trong chất đệm xitrat, kích cỡ hệ thống ống của dòng ARN+xitrat và tốc độ dòng chảy của dòng ARN. Một giả thuyết rằng ARN lớn (~6000-13000nt) thì nhạy cảm hơn với ứng suất cọ xát và tốc độ cọ xát.

Có thể giải thích các phát hiện như vậy bằng cách sử dụng các công thức dưới đây:

$$\dot{\gamma} = \frac{4Q}{\pi r^3}$$

Tốc độ cọ xát:

Tốc độ dòng chảy theo thể tích Q; bán kính trong của ống dẫn r.

Ứng suất cọ xát: Đối với thành chất lưu Newton, ứng suất cọ xát ( $\tau_w$ ) có thể liên quan đến

tốc độ cọ xát theo  $\tau_w = \gamma_x \mu$ , trong đó  $\mu$  là độ nhớt động lực của chất lưu. Vì vậy, ứng suất cọ xát sẽ tăng khi mà tốc độ cọ xát hoặc độ nhớt động lực tăng. Bởi đó, tốc độ cọ xát là tỷ lệ nghịch với bán kính trong của ống dẫn trong khi độ nhớt động lực sẽ bị ảnh hưởng bởi các điều kiện chất đệm và chất lưu cũng như kích cỡ ARN.

Có thể đánh giá độ nhớt động lực thêm của chất lưu và phép tính toán, như sẽ được nhận thấy bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

**Ví dụ 10: Cải thiện thêm và tăng quy mô của quy trình sản xuất ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid**

Trong ví dụ này, tất cả các điều kiện và quy trình tạo dạng chế phẩm là tương tự với Ví dụ 7, ID của kích cỡ hệ thống ống Peek của dòng ARN là 0,04 inso trong ví dụ này, trừ khi được chỉ ra khác.

Với các kết quả tìm hiểu được từ các Ví dụ 1-9, đã đạt được mức cải thiện thêm nhờ kiểu thiết kế. Trong thành quả đạt được này, thể tích mẻ được làm giảm một cách mạnh mẽ, và tốc độ sản xuất được cải thiện rất nhiều, chất lượng ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid được cải thiện. Có thể sử dụng phương pháp chỉ áp dụng kẹp trên dòng ARN để tránh hiện tượng xung động khi tổng tốc độ dòng chảy là đủ cao (300 ml/phút). Áp suất trên dòng ARN ở mức ~80 psi được thể hiện là điều kiện an toàn, nhưng mức cao hơn 100 psi sẽ ảnh hưởng một cách bất lợi đến chất lượng hạt nano lipid.

Bảng 19 và Bảng 20 đã thể hiện sự cải thiện đáng kể của quy trình sản xuất ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid nhờ kiểu thiết kế dựa trên việc tìm hiểu thông qua các Ví dụ 1-9. Chất lượng LNP được duy trì tốt, thể tích mẻ được làm giảm một cách mạnh mẽ nhờ sự kết hợp của tốc độ dòng chảy, nồng độ NaCl trong chất đệm xitrat và ID của hệ thống ống dòng ARN tăng. Với 300 ml/phút trong vai trò là tổng tốc độ dòng chảy, không cần đến kẹp trên dòng ARN.

Bảng 19

| Nồng độ trong quy trình | Tổng tốc độ dòng chảy (ml/phút) | NaCl trong chất đệm xitrat (mM) | ID của hệ thống ống dòng ARN (inso) | Áp suất ngược trên Cấu kiện T nhờ kẹp | Z-trung bình (nm) | PDI   | %Encap |
|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|-------|--------|
| 12                      | 160                             | 50                              | 0,03                                | Có                                    | 78,25             | 0,141 | 95,7   |
| 12                      | 240                             | 50                              | 0,04                                | Có                                    | 76,72             | 0,138 | 95,8   |
| 16                      | 240                             | 50                              | 0,04                                | Có                                    | 86,72             | 0,2   | 97,9   |
| 16                      | 240                             | 75                              | 0,04                                | Có                                    | 70,74             | 0,122 | 98,4   |

|    |     |     |      |       |       |       |      |
|----|-----|-----|------|-------|-------|-------|------|
| 16 | 240 | 100 | 0,04 | Có    | 68,9  | 0,125 | 98,2 |
| 20 | 300 | 100 | 0,04 | Có    | 76,37 | 0,139 | 98,9 |
| 20 | 300 | 150 | 0,04 | Có    | 72,02 | 0,113 | 98   |
| 20 | 300 | 150 | 0,04 | Không | 70,67 | 0,113 | 98,7 |
| 20 | 240 | 100 | 0,04 | Có    | 70,55 | 0,116 | 98,5 |
| 24 | 300 | 150 | 0,04 | Có    | 78,34 | 0,134 | 98,6 |
| 24 | 300 | 100 | 0,04 | Có    | 80,87 | 0,157 | 97,9 |
| 24 | 240 | 100 | 0,04 | Có    | 78,61 | 0,132 | 98,5 |
| 24 | 240 | 150 | 0,04 | Có    | 76,78 | 0,124 | 98,7 |
| 24 | 300 | 200 | 0,04 | Có    | 76,11 | 0,125 | 98,7 |

Bảng 20

| Lipit [IP] | Nồng độ NaCl trong chất đệm xitrat | Tỷ số pha loãng | Kích cỡ lỗ màng (L) | Z-trung bình (nm) | PDI       | Độ tinh khiết theo mảnh (% so với nguyên liệu gốc ARN ban đầu) | %Encap |
|------------|------------------------------------|-----------------|---------------------|-------------------|-----------|----------------------------------------------------------------|--------|
| 20 mM      | NaCl 150 mM                        | 1:1,5;<br>1:1,5 | 17,5                | 75,12             | 0,17      | 82,9                                                           | 98,5   |
| 24 mM      | NaCl 150 mM                        | 1:1,5;<br>1:1,5 | 14,5                | 87,89             | 0,19      | 97,1                                                           | 97,7   |
| 24 mM      | NaCl 200 mM                        | 1:1,5;<br>1,5   | 14,5                | 76,78             | 0,13      | 98,5                                                           | 98,7   |
| 28 mM      | NaCl 200 mM                        | 1:1,5;<br>1,5   | 12,5                | 82,40             | 0,13      | 94,1                                                           | 98,1   |
| 28 mM      | NaCl 250 mM                        | 1:1,5;<br>1,5   | 12,5                | 80,21             | 0,10      | 92,6                                                           | 98,2   |
| 32 mM      | NaCl 250 mM                        | 1:1,5;<br>1,5   | 10,9                | 88,49             | 0,10<br>7 | 86,5                                                           | 97,3   |
| 32 mM      | NaCl 300 mM                        | 1:1,5;<br>1,5   | 10,9                | 89,55             | 0,13      | 82,4                                                           | 97,4   |

**Ví dụ 11: Sự cải thiện thêm và tăng quy mô của quy trình sản xuất ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid trong một hệ thống chất đệm khác**

Sự sản xuất ARN được bao nang bằng LNP đông khô là quan trọng đối với việc đem lại được phẩm có tính ổn định trong các môi trường nhất định. Một phần của quy trình làm đông khô bao gồm việc điều chế huyền phù của các LNP trong cơ chất đúng đắn. Đơn đăng ký bằng sáng chế tại Hoa Kỳ số 17/402,077 mô tả các phương pháp làm đông khô các ARN được bao nang bằng hạt nano lipid và được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Để phát triển được phẩm ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid đông khô, quy trình sản xuất ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid trong hệ thống chất đệm Tris được phát triển dựa trên các kết quả tìm hiểu được từ các Ví dụ 1-10. Các điều kiện và dạng sắp đặt quy trình tạo dạng chế phẩm là tương tự với Ví dụ 10 với việc sắp đặt tất cả trong dòng ở thời gian giữ từ 15 giây đến 25 giây. Sự khác biệt duy nhất là chất đệm pha loãng thứ 2 là Tris 50 mM, độ pH 8,0 chứa NaCl 50 mM và sucroza 9%, và chất đệm lọc pha loãng qua màng là Tris 20 mM, độ pH 8,0 chứa NaCl 50 mM và sucroza 9%. (Bảng 21) Tất cả các kết quả tìm hiểu được từ các Ví dụ 1-10 là có thể áp dụng được đối với việc tạo dạng chế phẩm hệ thống chất đệm Tris.

Bảng 21

| Thời gian giữ trước TFF | Lipid [IP] | Nồng độ NaCl trong chất đệm xitrat | Tỷ số pha loãng | Kích cỡ mê 1 gam (L) | Z-trung bình | PDI   | Độ tinh khiết theo mảnh (% so với nguyên liệu gốc ARN ban đầu) | %Encap |
|-------------------------|------------|------------------------------------|-----------------|----------------------|--------------|-------|----------------------------------------------------------------|--------|
| T-0                     | 20 mM      | 150 mM                             | 1:1,5;          | 17,2                 | 72,43        | 0,143 | 89,2                                                           | 98     |
| T=8                     |            |                                    | 1:1,5           |                      | 71,99        | 0,16  | 86,3                                                           | 96,9   |
| T-0                     | 24 mM      | 200 mM                             | 1:1,5;          | 14,5                 | 75           | 0,195 | 86,5                                                           | 97,2   |
| T=8                     |            |                                    | 1:1,5           |                      | 74,1         | 0,122 | 89,0                                                           | 97,5   |
| T-0                     | 28 mM      | 200 mM                             | 1:1,5;          | 12,5                 | 78,44        | 0,13  | 93,2                                                           | 98,4   |
| T=8                     |            |                                    | 1:1,5           |                      | 79,55        | 0,122 | 89,0                                                           | 97,6   |

|     |       |        |        |       |       |       |      |      |
|-----|-------|--------|--------|-------|-------|-------|------|------|
| T-0 | 32 mM | 250 mM | 1:1,5; | 10,9  | 82,62 | 0,115 | 89,2 | 97,5 |
| T=8 |       |        | 1:1,5  |       | 83,51 | 0,09  | 86,3 | 97,6 |
| T-0 | 32 mM | 250 mM | 1:1,5, | 13,08 | 85,95 | 0,1   | 93,2 | 98   |
| T=8 |       |        | 1:2    |       | 87,68 | 0,129 | 86,3 | 97,4 |

**Ví dụ 12: Bổ sung EDTA trong suốt quá trình pha loãng và lần xác nhận cuối cùng quy trình sản xuất ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid**

Trong ví dụ này, tất cả các điều kiện và dạng sắp đặt quy trình tạo dạng chế phẩm là tương tự với Ví dụ 11, trừ khi được nêu khác. Tác dụng của việc bổ sung EDTA trong suốt lần pha loãng thứ hai và loại bỏ trong suốt quá trình lọc pha loãng qua màng được kiểm nghiệm trong ví dụ này, và quy trình sản xuất được tăng quy mô ở mức cao cuối cùng được xác nhận ở dạng nồng độ lipid 28 mM IP có thời gian giữ giữa lần pha loãng thứ 1 và lần pha loãng thứ 2 là 20 giây, tỷ số pha loãng là 1:1,5, 1:2, có hoặc không có sự bổ sung EDTA để tạo ra ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid chất lượng cao. (Bảng 22)

Bảng 22

| Thời gian giữ | IP [mM] | NaCl trong Xitrat | Giữ giữa lần pha loãng thứ 1 và lần pha loãng thứ 2 | Tỷ số pha loãng | Bổ sung EDTA? | Đường kính (nm) | PDI   | %Encap |
|---------------|---------|-------------------|-----------------------------------------------------|-----------------|---------------|-----------------|-------|--------|
| T-0           | 28 mM   | NaCl 200 mM       | 15 giây                                             | 1:1,5;1:1,5     | Không         | 81,6            | 0,121 | 98,2   |
| T=8           |         |                   |                                                     |                 |               | 79,44           | 0,116 | 98,2   |
| T-0           | 28 mM   | NaCl 200 mM       | 25 giây                                             |                 |               | 81,66           | 0,094 | 98,5   |
| T=8           |         |                   |                                                     |                 |               | 79,39           | 0,149 | 98,8   |
| T-0           | 28 mM   | NaCl 200          | 15 giây                                             | 1:1,5;1:2       |               | 82,19           | 0,163 | 98,1   |
| T=8           |         |                   |                                                     |                 |               | 77,5            | 0,125 | 98,3   |

| Thời gian giữ | IP [mM] | NaCl trong Xitrat mM | Giữ giữa lần pha loãng thứ 1 và lần pha loãng thứ 2 | Tỷ số pha loãng | Bổ sung EDTA? | Đường kính (nm) | PDI   | %Encap |
|---------------|---------|----------------------|-----------------------------------------------------|-----------------|---------------|-----------------|-------|--------|
| T-0           | 28      | NaCl 200 mM          | 15 giây                                             | 1:1,5;1:2,5     |               | 84,21           | 0,155 | 98     |
| T=8           | mM      |                      |                                                     |                 |               | 79,34           | 0,128 | 98,5   |
| T-0           | 28      | NaCl 200 mM          | 15 giây                                             | 1:1,5;1:1,5     |               | 78,38           | 0,13  | 98,4   |
| T=8           | Mm      |                      |                                                     |                 |               | 79,37           | 0,125 | 98,7   |
| T-0           | 28      | NaCl 200 mM          | 25 giây                                             |                 | Có            | 78,98           | 0,09  | 98,4   |
| T=8           | mM      |                      |                                                     |                 |               | 79,39           | 0,151 | 98,8   |

**Ví dụ 13: Tác dụng của sự cải thiện quy trình sản xuất ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid đối với độ hiệu nghiệm *in vivo***

Theo phương án này, Hình 4 đã thể hiện rằng không chỉ các thuộc tính hóa lý của ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid được duy trì và cải thiện tốt nhờ việc sử dụng các quy trình được tăng quy mô được mô tả trong bản mô tả này, mà độ hiệu nghiệm *in vivo* cũng được duy trì và cải thiện. Bảng 23 đã thể hiện sự khác biệt sản xuất của hai quy trình này, không phải là những gì được mô tả trong Bảng 23, tất cả các điều kiện tạo dạng chế phẩm và dạng sắp đặt quy trình khác là tương tự với Ví dụ 7.

Theo phương án này, 50 µl của ARN lớn được bao nang bằng hạt nano lipid có ARN mã hóa protein gai của COVID được tiêm ở cả hai chân của chuột nhắt Balb/c theo kiểu trong cơ để đem lại liều lượng như được mô tả trên Hình 4. Năm con chuột nhắt trong mỗi nhóm. 40 Ngày sau, huyết thanh được thu gom và được kiểm nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm Luminex - hệ thống thử nghiệm miễn dịch được dồn ghép trên cơ sở hòn trong dạng thức vi đĩa để kiểm tra mức biểu hiện kháng thể protein gai của COVID.

Bảng 23

| Lipit [IP]     | Tổng tốc độ dòng chảy ml/phút | Nồng độ NaCl trong chất đệm xitrat (mM) | ID của hệ thống ống dòng ARN (inso) | Áp suất ngược trên Cấu kiện T nhờ kẹp | Đường kính (nm) | PDI   | %Encap | Mảnh (% của độ tinh khiết) |
|----------------|-------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-----------------|-------|--------|----------------------------|
| 12 Quy trình A | 160                           | 50                                      | 0,03                                | Có                                    | 79,59           | 0,177 | 98,2   | Mẫu: 69<br>Tiêu chuẩn 71   |
| 20 Quy trình B | 300                           | 150                                     | 0,04                                | Không                                 | 75,71           | 0,169 | 98,8   | Mẫu: 70<br>Tiêu chuẩn 71   |

#### Các cân nhắc thêm

Phần mô tả trên đây được đưa ra để giúp chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này thực hành được các kiểu sắp đặt khác nhau được mô tả trong bản mô tả này. Có thể có nhiều cách khác để thực hiện công nghệ đối tượng. Các chức năng và yếu tố khác nhau được mô tả trong bản mô tả này có thể được phân bố một cách khác biệt với những chức năng và yếu tố được thể hiện mà không đi trệch khỏi phạm vi của công nghệ đối tượng. Các dạng cải biến khác nhau của các kiểu sắp đặt này sẽ trở nên sáng tỏ đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này một cách dễ dàng, và các nguyên lý chung được định nghĩa trong bản mô tả này có thể được áp dụng cho các kiểu sắp đặt khác. Vì vậy, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tạo ra nhiều dạng thay đổi và cải biến cho công nghệ đối tượng, mà không đi trệch khỏi phạm vi của công nghệ đối tượng.

Mặc dù phần mô tả chi tiết sáng chế chứa nhiều điểm cụ thể, nhưng không nên hiểu các điểm này là làm giới hạn phạm vi của công nghệ đối tượng, nhưng thuần túy là minh họa

các ví dụ và khía cạnh khác nhau của công nghệ đối tượng. Cần phải nhận thấy được rằng phạm vi của công nghệ đối tượng bao gồm các phương án khác không được bàn luận chi tiết trên đây. Có thể tạo ra các dạng cải biến, thay đổi và biến đổi khác nhau về dạng sắp xếp, vận hành và các chi tiết của phương pháp và thiết bị của công nghệ đối tượng được bộc lộ trong bản mô tả này mà không đi trệch khỏi phạm vi của sáng chế này. Ngoài ra, cũng không cần thiết để thiết bị hoặc phương pháp nào đó giải quyết mọi vấn đề mà có thể giải quyết được (hoặc sở hữu mọi ưu điểm mà có thể đạt được) nhờ các phương án khác nhau theo sáng chế để được bao quát trong phạm vi của sáng chế. Cách sử dụng trong bản mô tả này của “có thể” và các dạng phái sinh của nó sẽ được hiểu theo nghĩa là “có lẽ” hoặc “tùy ý” đối ngược với dạng khẳng định.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất hạt nano ARN được bao nang bằng lipid, bao gồm các bước
  - a) cho dung dịch nước chứa ARN chảy qua ống thứ 1 có đường kính trong (inner diameter - ID) là từ khoảng 0,01 inơ đến khoảng 0,08 inơ; trong đó độ pH của dung dịch nước này nằm trong khoảng từ khoảng 3,0 đến khoảng 4,5 với nồng độ NaCl tùy ý là lên đến khoảng 300 mM;

trong đó ARN này chứa từ khoảng 6.000 đến khoảng 13.000 nucleotit;

- b) cho dung dịch etanol chứa các lipid chảy qua ống thứ 2 có ID là từ khoảng 0,01 inơ đến khoảng 0,04 inơ ở tốc độ dòng chảy là khoảng 0,2 đến khoảng 1 lần tốc độ dòng chảy của dung dịch nước qua ống thứ 1, trong đó các lipid này bao gồm lipid cation; và

- c) trộn dung dịch etanol với dung dịch nước;

trong đó phương pháp trộn này tạo ra dung dịch đầu ra chảy trong ống thứ 1 bao gồm dòng chảy nhiễu loạn của ARN và các lipid trong etanol khoảng 10% đến 75% thể tích/thể tích; và

trong đó hạt nano ARN được bao nang bằng lipid này có cấu trúc hai lớp.

2. Phương pháp sản xuất hạt nano ARN được bao nang bằng lipid, bao gồm các bước
  - a) cho dung dịch nước chứa ARN chảy qua ống thứ 1 có đường kính trong (ID) thứ nhất;

trong đó ARN này chứa từ khoảng 6.000 đến khoảng 13.000 nucleotit;

- b) cho dung dịch etanol chứa các lipid chảy qua ống thứ 2 có đường kính trong (ID) thứ hai, ở tốc độ dòng chảy là khoảng 0,2 đến khoảng 1 lần tốc độ dòng chảy của dung dịch nước qua ống thứ 1, trong đó các lipid này bao gồm lipid cation; và

- c) trộn dung dịch etanol với dung dịch nước;

trong đó ID thứ nhất và ID thứ hai và tốc độ dòng chảy qua ống thứ 1 và ống thứ 2 được chọn lựa để tạo ra lực cọ xát đủ thấp để giữ nguyên tính nguyên vẹn của ARN;

trong đó phương pháp trộn này tạo ra dung dịch đầu ra chảy trong ống thứ 1 bao gồm dòng chảy nhiễu loạn của ARN và các lipid trong etanol từ khoảng 10% đến 75% thể tích/thể tích; và

trong đó hạt nano ARN được bao nang bằng lipid này có cấu trúc hai lớp.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phương pháp trộn này bao gồm việc cho dung dịch ethanol và dung dịch nước chảy vào cấu kiện trộn gồm ống thứ 2 được nối liền theo kiểu vuông góc với ống thứ 1.
4. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phương pháp trộn này bao gồm việc cho dung dịch ethanol và dung dịch nước chảy vào thiết bị lắc trộn đa đầu vào.
5. Phương pháp theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó nồng độ của ARN trong dung dịch nước này nằm trong khoảng từ khoảng 85 microgam/mL đến khoảng 2100 microgam/mL.
6. Phương pháp theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó nồng độ của lipid trong dung dịch ethanol nằm trong khoảng từ khoảng 5,0 mg/mL đến khoảng 125 mg/mL.
7. Phương pháp theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó dung dịch nước được bơm qua ống thứ 1 bằng bơm thứ 1 có áp suất ngược là không nhiều hơn khoảng 200 psi, và dung dịch ethanol được bơm qua ống thứ 2 bằng bơm thứ 2.
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ống thứ 1 có ID nằm trong khoảng từ khoảng 0,02 inso đến khoảng 0,03 inso và ống thứ 2 có ID nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 inso đến khoảng 0,02 inso.
9. Phương pháp theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó dung dịch nước được bơm ở tốc độ dòng chảy nằm trong khoảng từ khoảng 40 mL/phút đến khoảng 375 mL/phút.
10. Phương pháp theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó các dung dịch nước, ethanol, và dầu ra được duy trì trong khoảng nhiệt độ từ khoảng 10 °C đến khoảng 25 °C.
11. Phương pháp theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, còn bao gồm việc bơm chất đệm pha loãng thứ nhất và trộn chất đệm pha loãng với dung dịch dầu ra bằng cách đưa chất đệm pha loãng vào dung dịch dầu ra để tạo ra dung dịch dầu ra được pha loãng thứ nhất.
12. Phương pháp theo điểm 11, còn bao gồm việc bơm chất đệm pha loãng thứ hai vào dung dịch dầu ra được pha loãng thứ nhất, nhờ đó tạo thành dung dịch dầu ra được pha loãng cuối cùng, trong đó có thời gian trì hoãn giữa lần bơm chất đệm pha loãng thứ nhất và chất đệm pha loãng thứ hai.

13. Phương pháp theo điểm 11 hoặc 12, trong đó chất đệm pha loãng thứ nhất bao gồm:

- a) chất đệm có độ pH từ khoảng 5,5 đến khoảng 7,0; và
- b) tùy ý, nồng độ natri clorua lên đến khoảng 100 mM; và,

chất đệm pha loãng thứ hai bao gồm:

- a) chất đệm có độ pH từ khoảng 7,4 đến 8,0; và
- b) tùy ý, nồng độ natri clorua lên đến khoảng 100 mM.

14. Phương pháp theo điểm 12 hoặc 13, trong đó chất đệm thứ hai này bao gồm sucroza lên đến khoảng 15% trọng lượng/thể tích, chất chống oxy hóa lên đến khoảng 0,5% trọng lượng/thể tích, lên đến 20 mM của chất tạo chelat, hoặc kết hợp bất kỳ của các yếu tố này.

15. Phương pháp theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 14, trong đó dung dịch đầu ra được pha loãng thứ nhất này chứa khoảng 1,0% đến khoảng 10,0% etanol.

16. Phương pháp theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 15, trong đó chất đệm pha loãng thứ nhất được bơm ở tốc độ dòng chảy từ khoảng 80 mL/phút đến khoảng 900 mL/phút và chất đệm pha loãng thứ hai được bơm ở tốc độ dòng chảy từ khoảng 240 mL/phút đến khoảng 5400 mL/phút.

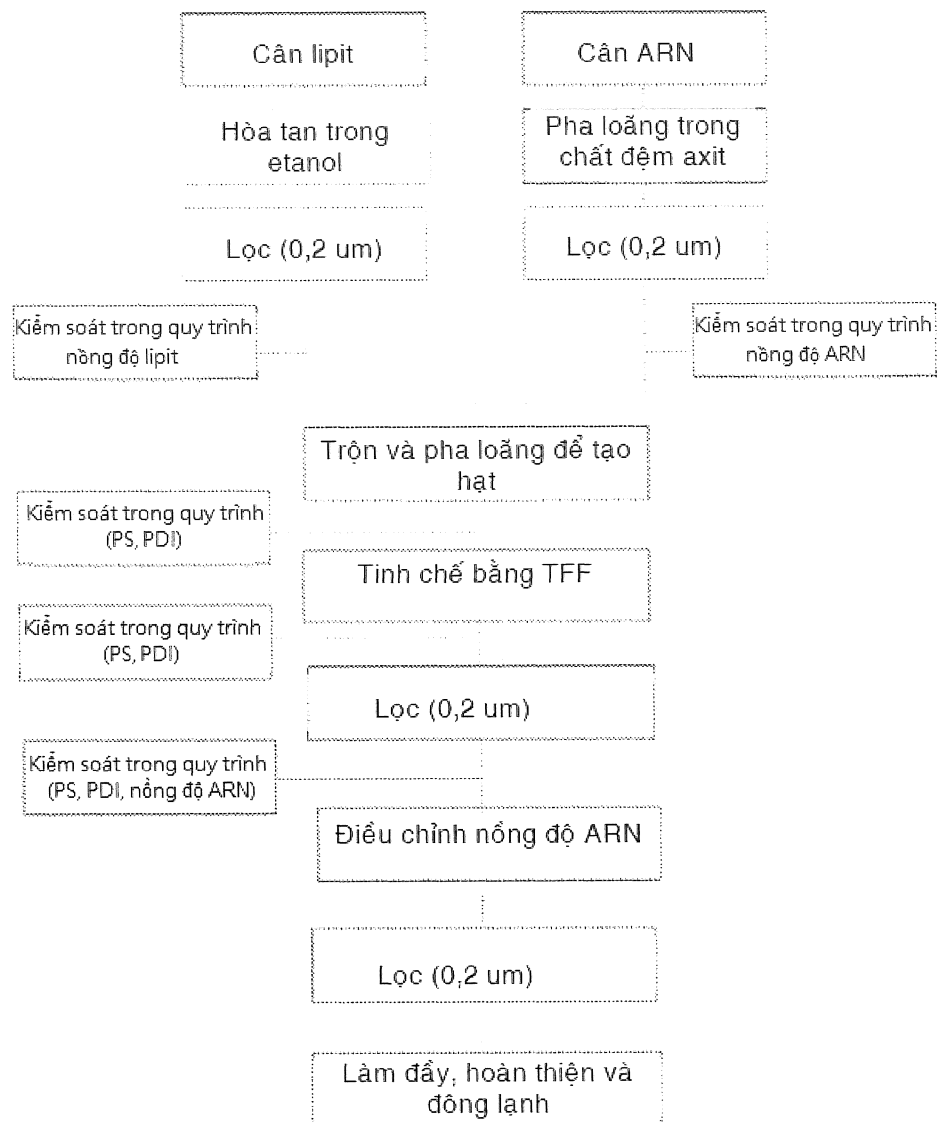
17. Phương pháp theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, trong đó hạt nano ARN được bao nang bằng lipit này có kích cỡ hạt trung bình nằm trong khoảng từ khoảng 50 nm đến khoảng 120 nm.

18. Phương pháp theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó phần lipit của hạt nano ARN được bao nang bằng lipit còn bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn lựa từ nhóm gồm lipit trợ giúp, cholesterol, và thể tiếp hợp lipit PEG.

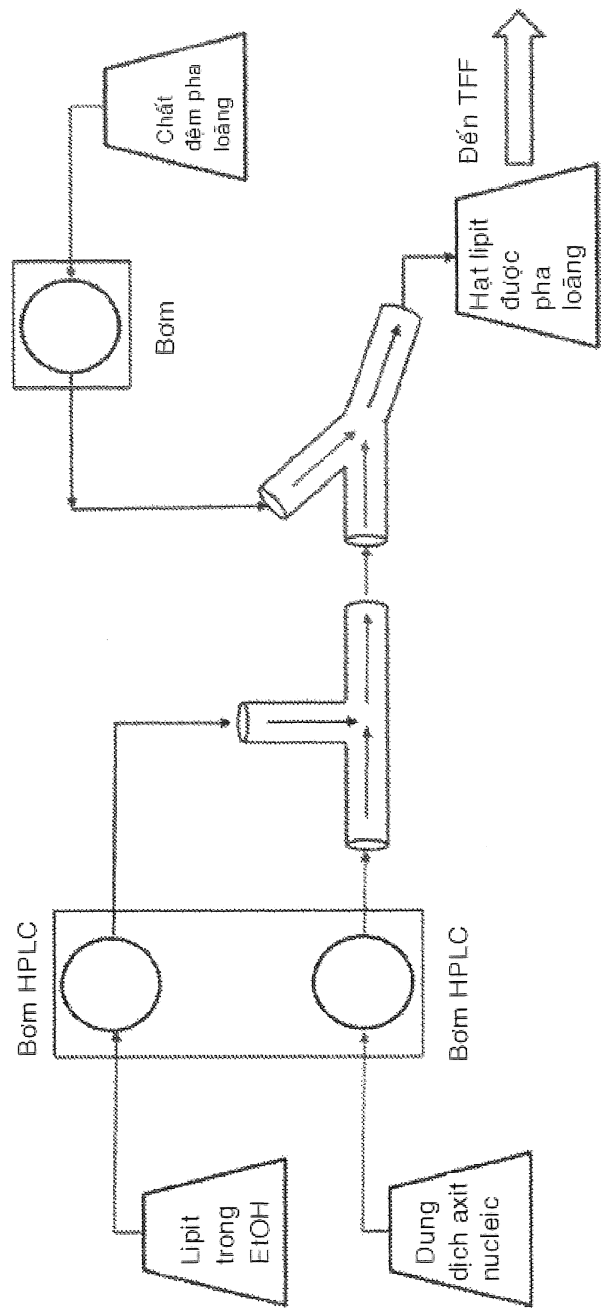
19. Phương pháp theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, trong đó ARN này là ARN tự sao chép.

20. Phương pháp theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 19, còn bao gồm việc làm đông khô dung dịch đầu ra được pha loãng cuối cùng.

1/4

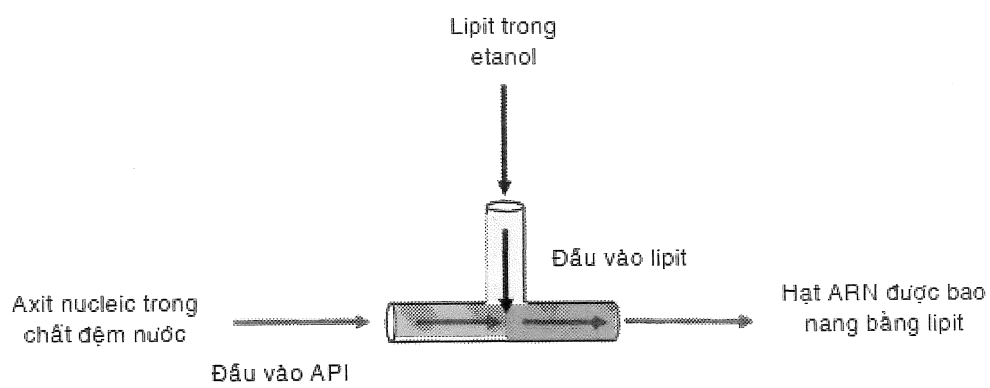


HÌNH 1



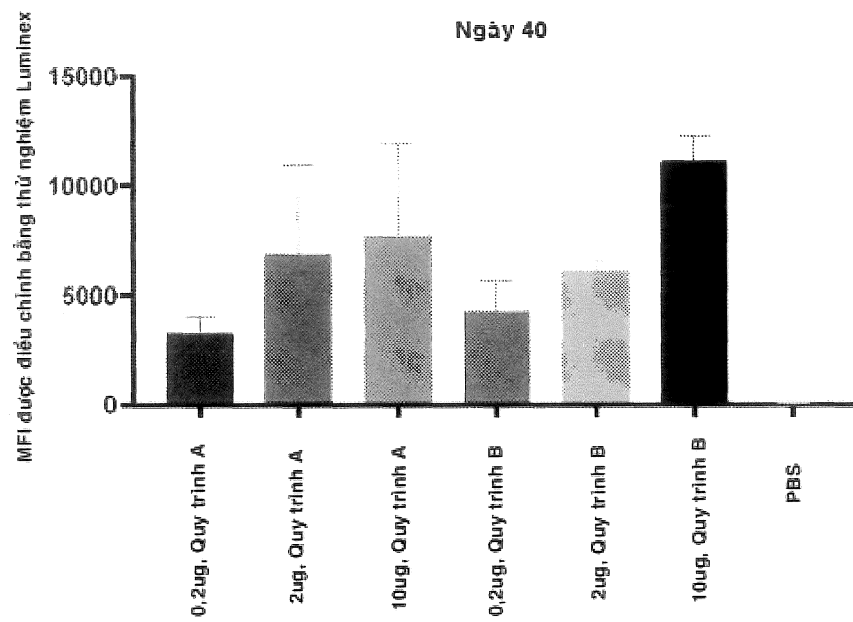
HÌNH 2

3/4



HÌNH 3

4/4



HÌNH 4