



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107530436 B

(45) 授权公告日 2022.03.29

(21) 申请号 201680017499.4
(22) 申请日 2016.01.21
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 107530436 A
(43) 申请公布日 2018.01.02
(30) 优先权数据
 62/106,024 2015.01.21 US
 62/173,847 2015.06.10 US
 62/233,568 2015.09.28 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2017.09.21
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2016/014232 2016.01.21
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02016/118697 EN 2016.07.28
(73) 专利权人 菲泽尔克斯公司
 地址 美国华盛顿州
(72) 发明人 M·G·普瑞夫 M·E·小豪斯顿
 P·哈维 S·D·莫纳汉
(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
 11256
 代理人 陈文平
(51) Int.Cl.
 A61K 47/32 (2006.01)
 A61K 47/18 (2006.01)
 A61K 9/127 (2006.01)
 A61K 9/51 (2006.01)
 A61K 31/7105 (2006.01)
 A61K 48/00 (2006.01)
 C08F 293/00 (2006.01)
(56) 对比文件
 CN 102083878 A, 2011.06.01
 审查员 齐丹丹
 权利要求书1页 说明书119页
 序列表53页 附图3页

(54) 发明名称

用于将治疗剂和诊断剂递送到细胞中的方法、组合物和系统

(57) 摘要

本文公开了用于将治疗剂或诊断剂递送至受试者中的细胞的细胞溶质的方法。所公开的方法通常包括向受试者施用有效量的包含治疗剂或诊断剂的脂质纳米颗粒和有效量的膜去稳定化聚合物。本文还公开了相关的组合物和递送系统。

1. 式Vi的pH敏感性膜去稳定化聚合物:



其中

D是DMAEMA;

P是PAA;

B是BMA;

NAG是N-乙酰基半乳糖胺残基;

PEG₁₂是包含具有12个乙二醇单元的聚乙二醇的连接部分;

HMA是甲基丙烯酸己酯残基;

m是0.7至0.85和n是0.15至0.3,其中m大于n且m+n=1;

q是0.25至0.4的摩尔分数;

r是0.07至0.15的摩尔分数;

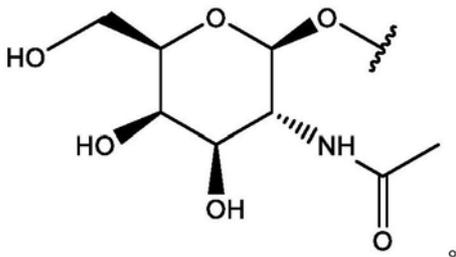
s是0.5至0.65的摩尔分数;

q+r+s=1;

v是2.5至7kDa; 和

w是4至7kDa。

2. 权利要求1所述的pH敏感性聚合物,其中所述NAG是



用于将治疗剂和诊断剂递送到细胞中的方法、组合物和系统

[0001] 序列表的引用

[0002] 本申请含有已经通过EFS-Web以ASCII格式提交并在此通过引用整体并入的序列表。所述ASCII副本于2016年1月13日创建,命名为“3900_PCT1_Seq_Listing_ST25”,大小为66,448字节。

背景技术

[0003] 脂质纳米颗粒(LNP)是用于生物活性化合物例如治疗性核酸、蛋白质和肽的有效药物递送系统,所述生物活性化合物否则是细胞不可渗透的。还已经开发了用于小分子药物的脂质体制剂,其目的通常是在某些组织中富集药物以及减轻毒性。

[0004] 基于核酸的药物,其包括大的核酸分子,例如体外转录的信使RNA(mRNA)以及与信使RNA或基因相互作用的较小的多核苷酸,必须被递送至适当的细胞区室以起效。例如,双链核酸如双链RNA分子(dsRNA)(包括例如siRNA)受到使其对细胞不可渗透的物理化学性质的影响。在递送到适当的区室中后,siRNA通过称为RNA干扰(RNAi)的高度保守的调节机制阻断基因表达。通常,siRNA尺寸较大,分子量在12-17kDa范围内,并且由于其具有至多50个负电荷的磷酸酯骨架而是高度阴离子性的。此外,两条互补RNA链产生刚性螺旋。这些特征造成siRNA的差的“药物样”性质。当静脉施用,siRNA从体内迅速排泄,典型半衰期在仅仅10分钟的范围内。此外,siRNA通过存在于血液和其它流体或组织中的核酸酶迅速降解,并且已被显示在体外和体内刺激强的免疫应答。参见例如Robbins等,Oligonucleotides 19:89-102,2009.mRNA分子遭受类似的不渗透性、脆性和免疫原性的问题。

[0005] 通过引入适当的化学修饰,可以增加对核酸酶的稳定性,同时可以抑制免疫刺激。亲脂性小分子与siRNA的缀合改善了双链RNA分子的药代动力学特征。已经证明,这些小分子siRNA缀合物在啮齿动物的肝细胞中表达的基因的特异性下调中是有效的。然而,为了引发期望生物效应,需要大的剂量。参见Soutschek等,Nature 432:173-178,2004。

[0006] 脂质纳米颗粒制剂在体内具有改善的核酸递送。例如,这样的制剂已经显著降低在体内实现靶标敲低所必需的siRNA剂量。参见Zimmermann等,Nature 441:111-114,2006。通常,这样的脂质纳米颗粒药物递送系统是包含阳离子脂质、辅助脂质和含有聚乙二醇的脂质的多组分制剂。带正电荷的阳离子脂质结合阴离子核酸,而其它组分支持脂质纳米颗粒的稳定自组装。

[0007] 已经尝试改善脂质纳米颗粒制剂的递送功效。已经有许多这样的努力针对开发更合适的阳离子脂质。参见例如Akinc等,Nature Biotechnology 26:561-569,2008;Love等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 107:1864-1869,2010;Baigude等,Journal of Controlled Release 107:276-287,2005;Semple等,Nature Biotechnology 28:172-176,2010。尽管有这些努力,仍然需要在增加功效和/或降低毒性方面的改进,特别是对于旨在用于治疗用途的基于脂质纳米颗粒的药物递送系统。

发明内容

[0008] 在一个方面,本发明提供用于将治疗剂或诊断剂递送至受试者内的靶细胞的细胞溶质的方法。所述方法一般包括向所述受试者施用 (a) 有效量的包含所述治疗剂或诊断剂的脂质纳米颗粒和 (b) 有效量的膜去稳定化聚合物,其中所述治疗剂或诊断剂被递送至所述靶细胞的细胞溶质。所述脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物可以单独地施用(例如,所述膜去稳定化聚合物在施用所述脂质纳米颗粒后施用),或者在单一组合内一起施用。通常,脂质纳米颗粒尺寸小于约200 nm。在某些变化方式中,脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物以重复剂量方案施用(例如,每周或每两周重复的施用方案)。

[0009] 在一些实施方式中,所述脂质纳米颗粒包含阳离子脂质。特别适合的阳离子脂质包括N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA),N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP),1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-乙基磷酸胆碱(DOPEC),1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-乙基磷酸胆碱(DLEPC),1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-乙基磷酸胆碱(DMEPC),1,2-二肉豆蔻油酰基-sn-甘油基-3-乙基磷酸胆碱(14:1),N1-[2-((1S)-1-[(3-氨基丙基)氨基]-4-[二(3-氨基-丙基)氨基]丁基甲酰胺基)乙基]-3,4-二[油基氧基]-苯甲酰胺(MVL5),双十八烷基酰胺基-甘氨酸精胺(DOGS),3b-[N-(N',N'-二甲基氨基乙基)氨基甲酰基]胆固醇(DC-Chol),双十八烷基二甲基溴化铵(DDAB),Saint脂质(例如,SAINT-2,N-甲基-4-(二油基)甲基吡啶鎓),1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-二甲基羟乙基溴化铵(DMRIE),1,2-二油酰基-3-二甲基-羟乙基溴化铵(DORIE),1,2-二油酰基氧基丙基-3-二甲基羟乙基氯化铵(DORI),二烷基化氨基酸(DILA²) (例如,C18:1-norArg-C16),二油基二甲基氯化铵(DODAC),1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-乙基磷酸胆碱(POEPC),和1,2-二肉豆蔻油酰基-sn-甘油基-3-乙基磷酸胆碱(MOEPC)。在一些变化方式中,所述阳离子脂质是可电离的阳离子脂质,例如双十八烷基二甲基溴化铵(DDAB),1,2-二亚油基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDMA),2,2-二亚油基-4-(二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA),4-(二甲基氨基)丁酸三十七-6,9,28,31-四烯-19-酯(DLin-MC3-DMA),1,2-二油酰基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DODAP),1,2-二油基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DODMA),吗啉基胆固醇(Mo-CHOL),二油酸(R)-5-(二甲基氨基)戊-1,2-二酯盐酸盐(DODAPen-Cl),二油酸(R)-5-胍基戊-1,2-二酯盐酸盐(DOPen-G),(R)-N,N,N-三甲基-4,5-双(油酰基氧基)戊-1-氯化铵(DOTAPen)。在一些实施方式中,脂质纳米颗粒包含两种或更多种阳离子脂质(例如,两种或更多种上述阳离子脂质)的组合。

[0010] 在上述方法的一些实施方式中,脂质纳米颗粒包含可电离的阴离子脂质,例如半琥珀酸胆固醇酯(CHEMS),磷脂酰丝氨酸,棕榈酰高丝氨酸,或 α -生育酚半琥珀酸酯。在某些变化方式中,脂质纳米颗粒包含两种或更多种可电离的阴离子脂质(例如,两种或更多种上述可电离的阴离子脂质)的组合。

[0011] 在上述方法的一些变化方式中,脂质纳米颗粒包含辅助脂质。特别适合的辅助脂质包括胆固醇(CHOL),1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC),1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPPC),1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DMPC),1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE),1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE),1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DMPE),和1,2-二植烷酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DPHyPE)。在某些实施方式中,脂质纳米颗粒包含两种或更多种辅助脂质

(例如,两种或更多种上述辅助脂质)的组合。

[0012] 在上述方法的某些实施方式中,脂质纳米颗粒包含聚乙二醇-脂质缀合物(PEG-脂质),例如N-(羰基-甲氧基聚乙二醇_n)-1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DMPE-PEG_n,其中n是350、500、750、1000或2000),N-(羰基-甲氧基聚乙二醇_n)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DSPE-PEG PEG_n,其中n是350、500、750、1000或2000),DSPE-聚甘油(polyglycelin)-环己基-羧酸,DSPE-聚甘油-2-甲基戊二(methylglutar)-羧酸,聚乙二醇-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG),聚乙二醇-二硬脂酰基甘油(PEG-DSG),或N-辛酰基-鞘氨醇-1-{琥珀酰基[甲氧基(聚乙二醇)2000]}(C8 PEG2000神经酰胺)。在DMPE-PEG_n的一些变化方式中,其中n是350、500、750、1000或2000,PEG-脂质是N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DMPE-PEG 2,000)。在DSPE-PEG_n的一些变化方式中,其中n是350、500、750、1000或2000,PEG-脂质是N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DSPE-PEG PEG 2,000)。在某些实施方式中,脂质纳米颗粒包含两种或更多种PEG-脂质(例如,两种或更多种上述PEG-脂质)的组合。

[0013] 在上述方法的一些实施方式中,所述脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物中的至少一种包含特异性结合靶细胞表面上的分子的第一靶向配体。膜去稳定化聚合物,脂质纳米颗粒,或者膜去稳定化聚合物和脂质纳米颗粒二者可以包含第一靶向配体。在一些实施方式中,所述脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物中的一种包含第一靶向配体,并且所述脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物中的另一种包含第二靶向配体,所述第二靶向配体不同于所述第一靶向配体,并且(i)特异性结合由所述第一靶向配体识别的相同细胞表面分子或(ii)特异性结合所述靶细胞表面上的不同细胞表面分子。在特别的变化方式中,第一靶向配体、第二靶向配体或者第一靶向配体和第二靶向配体二者特异性结合选自以下的细胞表面分子:1型转铁蛋白受体、2型转铁蛋白受体、EGF受体、HER2/Neu、VEGF受体、PDGF受体、整合素、NGF受体、CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD22、CD33、CD43、CD38、CD56、CD69、脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、叶酸受体和σ受体。

[0014] 在其中脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物中的至少一种包含第一靶向配体(并且脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物中的另一种任选地包含第二靶向配体)的上述方法的某些实施方式中,所述第一和/或第二靶向配体包含小分子靶向部分。在具体变化方式中,所述小分子靶向部分是糖(例如乳糖、半乳糖、N-乙酰半乳糖胺(NAG,也称为GalNAc)、甘露糖和甘露糖-6-磷酸(M6P))、维生素(例如,叶酸)、二磷酸盐或其类似物。在其它实施方式中,所述第一和/或第二靶向配体是蛋白质,例如抗体、肽适体或衍生自所述细胞表面分子的天然配体的蛋白质。在又一些实施方式中,所述第一和/或第二靶向配体是肽,例如整合素结合肽、LOX-1结合肽和表皮生长因子(EGF)肽、神经降压素肽、NL4肽或YIGSR层粘连蛋白肽。

[0015] 在上述方法的某些实施方式中,靶细胞选自分泌细胞、软骨细胞、上皮细胞、神经细胞、肌细胞、血细胞、内皮细胞、周细胞、成纤维细胞、胶质细胞和树突状细胞。其它合适的靶细胞包括癌细胞、免疫细胞、细菌感染细胞、病毒感染细胞或具有异常代谢活性的细胞。

[0016] 在所述靶细胞是分泌细胞的特别的变化方式中,靶向分泌细胞是肝细胞。在这样的一些实施方式中,所述脂质纳米颗粒和所述膜去稳定化聚合物中的至少一种包含特异性结合肝细胞表面上的分子的第一靶向配体。在某些实施方式中,所述第一靶向配体特异性

结合脱唾液酸糖蛋白受体 (ASGPR) ;例如,在特别的变化方式中,所述第一靶向配体包含N-乙酰半乳糖胺 (NAG) 残基。在包含与肝细胞表面上的分子结合的第一靶向配体的一些上述实施方式中,所述脂质纳米颗粒和所述膜去稳定化聚合物二者均包含所述第一靶向配体。在其它实施方式中,所述脂质纳米颗粒和所述膜去稳定化聚合物中的一种包含所述第一靶向配体,而所述脂质纳米颗粒和所述膜去稳定化聚合物中的另一种包含第二靶向配体,所述第二靶向配体不同于所述第一靶向配体,并且 (i) 特异性结合所述脱唾液酸糖蛋白受体 (ASGPR) 或 (ii) 特异性结合所述肝细胞表面上的不同细胞表面分子。在一些这样的实施方式中,所述第二靶向配体包含N-乙酰半乳糖胺 (NAG) 残基。

[0017] 在上述方法的一些实施方式中,所述膜去稳定化聚合物是共聚物、合成肽、膜去稳定化毒素或其衍生物、或病毒融合肽 (fusogenic peptide) 或其衍生物。在特别的变化方式中,所述膜去稳定化聚合物是pH敏感性聚合物,例如pH敏感性共聚物。所述共聚物可以是嵌段共聚物,例如二嵌段共聚物。在一些变化方式中,所述嵌段共聚物包含疏水性的膜去稳定化嵌段和亲水性嵌段。在一些这样的实施方式中,所述亲水性嵌段由亲水性单体和疏水性单体二者聚合而成,使得在所述亲水性嵌段中具有比疏水性单体残基更多的亲水性单体残基。所述亲水性嵌段可以与疏水性嵌段可切割地连接,例如通过二硫键或 pH敏感性键。在一些实施方式中,所述亲水性嵌段包含与侧屏蔽部分连接的单体残基,所述侧屏蔽部分例如聚乙二醇 (PEG) 部分。所述屏蔽部分可以与所述亲水性嵌段可切割地连接,例如通过二硫键或pH敏感性键。特别合适的pH敏感性键(用于连接所述亲水性和疏水性嵌段或所述屏蔽部分与所述亲水嵌段的连接)包括脘、缩醛、缩酮、亚胺、原酸酯、碳酸酯和马来酰胺酸键。

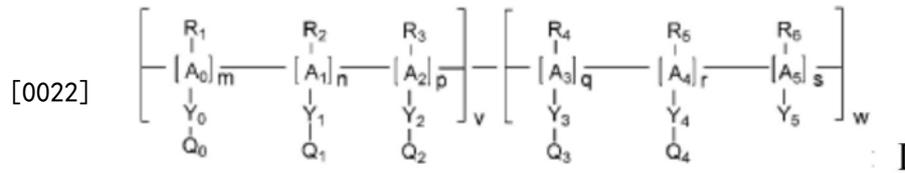
[0018] 所述pH敏感性聚合物可包含具有羧酸官能团的单体残基、具有胺官能团的单体残基和/或具有疏水性官能团的单体残基。在一些变化方式中,所述pH敏感性聚合物包含衍生自(C₂-C₈) 烷基丙烯酸(例如,丙基丙烯酸)的聚合的单体残基;衍生自乙基丙烯酸(C₂-C₈) 烷基酯、甲基丙烯酸(C₂-C₈) 烷基酯或丙烯酸(C₂-C₈) 烷基酯的聚合的单体残基;和/或衍生自乙基丙烯酸(N,N-二(C₁-C₆) 烷基-氨基(C₁-C₆) 烷基酯、甲基丙烯酸(N,N-二(C₁-C₆) 烷基-氨基(C₁-C₆) 烷基酯或丙烯酸(N,N-二(C₁-C₆) 烷基-氨基(C₁-C₆) 烷基酯)的聚合的单体残基。在具体变化方式中,所述pH敏感性聚合物包含具有单体残基的无规共聚物链,该单体残基衍生自丙基丙烯酸、甲基丙烯酸N,N-二甲基氨基乙酯和甲基丙烯酸丁酯的聚合;在一些这样的实施方式中,所述pH敏感性聚合物是包含作为膜破坏性聚合物嵌段的所述无规共聚物链,并且还包含一个或多个另外的嵌段的嵌段共聚物。

[0019] 在某些实施方式中,所述pH敏感性膜去稳定化聚合物是具有亲水性无规共聚物嵌段和疏水性无规共聚物嵌段的二嵌段共聚物,其中 (i) 所述亲水性嵌段是包含亲水性单体残基和疏水性单体残基二者的两亲性嵌段,其中所述亲水性嵌段中的亲水性单体残基的数量大于疏水性单体残基的数量, (ii) 所述疏水性嵌段是包含疏水性单体残基和亲水性单体残基二者,并且在约7.4的pH下具有总体疏水特性的两亲性的膜去稳定化嵌段;并且 (iii) 所述亲水性和疏水性嵌段的所述亲水性单体残基各自独立地选自在约7.4的pH下为离子性的单体残基、在约7.4的pH下为中性的单体残基、和在约7.4的pH下为两性离子性的单体残基。

[0020] 在又一些变化方式中,所述pH敏感性聚合物与膜去稳定化肽共价连接。在一些这样的实施方式中,所述pH敏感性聚合物包含多个侧连接基团,并且多个膜去稳定化肽通过

所述多个侧连接基团与所述pH敏感性聚合物连接。

[0021] 在一些实施方式中,所述pH敏感性聚合物包含式I的无规嵌段共聚物:



[0023] 其中

[0024] A_0 、 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 和 A_5 各自独立地选自 $-C-C-$ 、 $-C(O)(C)_aC(O)O-$ 、 $-O(C)_aC(O)-$ 、 $-O(C)_b-$ 和 $-CR_8-CR_9$;其中未完全被 R_1-R_6 和 Y_0-Y_5 取代的 A_0-A_5 的四价碳原子被适当数量的氢原子补齐;其中a和b各自独立地是1-4;并且其中 R_8 和 R_9 各自独立地选自 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)O$ 烷基和 $-C(O)NR_{10}$,其中 R_8 和 R_9 任选地共价连接在一起以形成环结构(例如,环状酸酐或环状酰亚胺);

[0025] Y_5 是氢或选自 $-(1C-10C)$ 烷基、 $-(3C-6C)$ 环烷基、 $-O-(1C-10C)$ 烷基、 $-C(O)O(1C-10C)$ 烷基、 $-C(O)NR_{11}(1C-10C)$ 烷基和 $-(6C-10C)$ 芳基,其任一种任选地被一个或多个氟原子取代;

[0026] Y_0 、 Y_3 和 Y_4 各自独立地选自共价键、 $-(1C-10C)$ 烷基、 $-C(O)O(2C-10C)$ 烷基、 $-OC(O)(1C-10C)$ 烷基、 $-O(2C-10C)$ 烷基、 $-S(2C-10C)$ 烷基和 $-C(O)NR_{12}(2C-10C)$ 烷基;

[0027] Y_1 和 Y_2 各自独立地选自共价键、 $-(1C-18C)$ 烷基、 $-(3C-18C)$ 支链烷基、 $-C(O)O(2C-18C)$ 烷基、 $-C(O)O(2C-18C)$ 支链烷基、 $-OC(O)(1C-18C)$ 烷基、 $-OC(O)(1C-18C)$ 支链烷基、 $-O(2C-18C)$ 烷基、 $-O(2C-18C)$ 支链烷基、 $-S(2C-18C)$ 烷基、 $-S(2C-18C)$ 支链烷基、 $-C(O)NR_{12}(2C-18C)$ 烷基和 $-C(O)NR_{12}(2C-18C)$ 支链烷基,其中 Y_1 或 Y_2 的任何烷基或支链烷基基团任选地被一个或多个氟原子取代;

[0028] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 和 R_{12} 各自独立地是氢、 $-CN$,或选自烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基,其任一种任选地被一个或多个氟原子取代;

[0029] Q_0 是选自以下的残基:在生理pH下为亲水性的残基; $O-[(C)_{2-3}-O]_x-R_7$;和 $O-[(C)_{2-3}-O]_x-C(O)-NR_{13}R_{14}$;其中x是1-48; R_7 是 $-CH_3$ 或 $-CO_2H$;且 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是氢、 $-CN$,或选自烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基,其任一种任选地被一个或多个氟原子取代;

[0030] Q_1 和 Q_2 各自独立地不存在或选自在正常生理pH下为亲水性的残基;可缀合或可官能化的残基;在正常生理pH下为疏水性的残基;任选地被一个或多个氟原子取代的烷基;和任选地被一个或多个氟原子取代的支链烷基;

[0031] Q_3 是在正常生理pH下带正电的残基;

[0032] Q_4 是在正常生理pH下带负电,但在较低pH下经历质子化的残基;

[0033] m是大于0至1.0的摩尔分数;

[0034] n是0至小于1.0的摩尔分数;

[0035] p是0至小于1.0的摩尔分数;其中 $m+n+p=1$;

[0036] q是0.1至0.9的摩尔分数;

[0037] r是0.05至0.9的摩尔分数;

[0038] s以至多0.85的摩尔分数存在;其中 $q+r+s=1$;

[0039] v为1至25kDa;且

[0040] w为1至50kDa。

[0041] 在包含上述式I的pH敏感性聚合物的一些实施方式中,m大于 n+p。在一些这样的变化方式中,p是0。

[0042] 在包含上述式I的pH敏感性聚合物的一些实施方式中,n大于0。在一些这样的变化方式中, Y_1 和 Q_1 中的至少一种含有被一个或多个氟原子取代的烷基或支链烷基。在更特别的变化方式中,p是0和、或m大于n。

[0043] 在包含式I的pH敏感性聚合物的某些实施方式中,所述pH敏感性聚合物是式II的聚合物:

[0044] $T1-1-[PEGMA_m-PDSMA_n-BPAM_p]_v-[DMAEMA_q-PAA_r-BMA_s]_w$ II

[0045] 其中

[0046] PEGMA是具有2-20个乙二醇单元的聚甲基丙烯酸乙二醇酯残基;

[0047] PDSMA是吡啶基二硫化物甲基丙烯酸酯残基;

[0048] BPAM是甲基丙烯酸2-[2-Boc氨基乙氧基]乙酯残基;

[0049] BMA是甲基丙烯酸丁酯残基;

[0050] PAA是丙基丙烯酸残基;

[0051] DMAEMA是甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯残基;

[0052] m是0.6至1的摩尔分数;

[0053] n是0至0.4(例如,0至0.2)的摩尔分数;

[0054] p是0至0.4(例如,0至0.2)的摩尔分数;

[0055] $m+n+p=1$;

[0056] q是0.2至0.75的摩尔分数;

[0057] r是0.05至0.6的摩尔分数;

[0058] s是0.2至0.75的摩尔分数;

[0059] $q+r+s=1$;

[0060] v为1至25kDa;

[0061] w为1至25kDa;

[0062] T1不存在或为第一靶向配体;且

[0063] L不存在或为连接部分。

[0064] 在包含式I的pH敏感性聚合物的其它实施方式中,所述pH敏感性聚合物是式V的聚合物:

[0065] $T1-L-[PEGMA_m-M2_n]_v-[DMAEMA_q-PAA_r-BMA_s]_w$ V

[0066] 其中

[0067] PEGMA是具有2-20个乙二醇单元的聚甲基丙烯酸乙二醇酯残基;

[0068] M2是选自以下的甲基丙烯酸酯残基

[0069] 甲基丙烯酸(C4-C18)烷基酯残基;

[0070] 甲基丙烯酸(C4-C18)支链烷基酯残基;

[0071] 甲基丙烯酸胆固醇酯残基;

[0072] 被一个或多个氟原子取代的甲基丙烯酸(C4-C18)烷基酯残基;和

- [0073] 被一个或多个氟原子取代的甲基丙烯酸(C4-C18)支链烷基酯残基;
- [0074] BMA是甲基丙烯酸丁酯残基;
- [0075] PAA是丙基丙烯酸残基;
- [0076] DMAEMA是甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯残基;
- [0077] m和n各自为大于0的摩尔分数,其中m大于n且 $m+n=1$;
- [0078] q是0.2至0.75的摩尔分数;
- [0079] r是0.05至0.6的摩尔分数;
- [0080] s是0.2至0.75的摩尔分数;
- [0081] $q+r+s=1$;
- [0082] v为1至25kDa;
- [0083] w为1至25kDa;
- [0084] T1不存在或为所述第一靶向配体;且
- [0085] L不存在或为连接部分。
- [0086] 在式V聚合物的一些特定实施方式中,M2选自甲基丙烯酸 2,2,3,3,4,4,4-七氟丁酯残基;甲基丙烯酸3,3,4,4,5,6,6,6-八氟-5(三氟甲基)己酯残基;2-甲基丙烯酸2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十五氟辛酯残基;甲基丙烯酸3,3,4,4,5,5,6,6,6-九氟己酯残基(也称为2-丙烯酸2-甲基-3,3,4,4,5,5,6,6,6-九氟己酯残基);甲基丙烯酸 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十三氟辛酯残基;甲基丙烯酸1,1,1-三氟-2-(三氟甲基)-2-羟基-4-甲基-5-戊酯残基;甲基丙烯酸2-[(1',1',1'-三氟-2'-(三氟甲基)-2'-羟基)丙基]-3-降苈酯残基;甲基丙烯酸2-乙基己酯残基;甲基丙烯酸丁酯残基;甲基丙烯酸己酯残基;甲基丙烯酸辛酯残基;甲基丙烯酸正癸酯残基;甲基丙烯酸月桂酯残基;甲基丙烯酸肉豆蔻酯残基;甲基丙烯酸硬脂酯残基;甲基丙烯酸胆固醇酯残基;乙二醇苯基醚甲基丙烯酸酯残基;2-丙烯酸2-甲基-2-苯乙酯残基;2-丙烯酸 2-甲基-2-[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]氨基]乙酯残基;2-丙烯酸2-甲基-2-(1H-咪唑-1-基)乙酯残基;2-丙烯酸2-甲基-环己酯残基;2-丙烯酸 2-甲基-2-[双(1-甲基乙基)氨基]乙酯残基;2-丙烯酸2-甲基-3-甲基丁酯残基;甲基丙烯酸新戊酯残基;甲基丙烯酸叔丁酯残基;甲基丙烯酸3,3,5-三甲基环己酯残基;甲基丙烯酸2-羟基丙酯残基;甲基丙烯酸5-壬酯残基;甲基丙烯酸2-丁基-1-辛酯残基;甲基丙烯酸2-己基-1-癸酯残基;和甲基丙烯酸2-(叔丁基氨基)乙酯残基。
- [0087] 在包含式II或式V的pH敏感性聚合物的上述方法的特别的变化方式中,PEGMA具有4-5个乙二醇单元或7-8个乙二醇单元;T1和 L存在,并且T1包含N-乙酰半乳糖胺(NAG)残基;和/或L包含具有2-20个乙二醇单元的聚乙二醇(PEG)部分。
- [0088] 在某些实施方式中,所述脂质纳米颗粒包含所述治疗剂。所述治疗剂可为抗癌剂、抗病毒剂、免疫调节剂、抗炎剂或调节细胞代谢活性的药剂。合适的治疗剂可选自多核苷酸、蛋白质、肽和小分子。
- [0089] 在一些实施方式中,所述治疗剂是多核苷酸。在一些这样的变化方式中,所述脂质纳米颗粒具有约1至约30的N:P(氮:磷酸盐)比率。在某些实施方式中,所述多核苷酸是mRNA,例如编码与蛋白质缺乏疾病相关的功能蛋白的mRNA。在特别的变化方式中,所述靶细胞是肝细胞,并且所述mRNA编码选自以下的蛋白质: α -1-抗胰蛋白酶(A1AT)、氨基甲酰基磷酸合成酶I(CPS1)、延胡索酰乙酰乙酸酶(FAH)、丙氨酸:乙醛酸-氨基转移酶(AGT)、甲基丙

二酰CoA 变位酶 (MUT)、丙酰CoA羧化酶 α 亚基 (PCCA)、丙酰CoA羧化酶 β 亚基 (PCCB)、支链酮酸脱氢酶 (BCKDH) 亚基、鸟氨酸转氨甲酰酶 (OTC)、铜转运ATP酶Atp7B、胆红素尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (BGT)、铁调素、葡萄糖-6-磷酸酶 (G6Pase)、葡萄糖-6-磷酸转位酶、溶酶体葡糖脑苷脂酶 (GB)、尼曼-匹克C1蛋白 (NPC1)、尼曼-匹克C2蛋白 (NPC2)、酸性鞘磷脂酶 (ASM)、因子IX、半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶、半乳糖激酶、UDP-半乳糖4-差向异构酶、转甲状腺素蛋白、补体调节蛋白、苯丙氨酸羟化酶 (PAH)、尿黑酸 1,2-双加氧酶、胆色素原脱氢酶、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HGPRT)、精氨基琥珀酸裂解酶 (ASL)、精氨基琥珀酸合成酶 (ASS1)、P型ATP酶蛋白FIC-1、 α -半乳糖苷酶A、酸性神经酰胺酶、酸性 α -L-岩藻糖苷酶、酸性 β -半乳糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、 α -L-艾杜糖醛酸酶、半乳糖脑苷脂酶、酸性 α -甘露糖苷酶、 β -甘露糖苷酶、芳基硫酸酯酶B、芳基硫酸酯酶A、N-乙酰氨基半乳糖-6-硫酸硫酸酯酶、酸性 β -半乳糖苷酶、酸性 α -葡萄糖苷酶、 β -氨基己糖苷酶B、乙酰肝素-N-硫酸酯酶、 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、乙酰 CoA: α -氨基葡萄糖苷-N-乙酰转移酶、N-乙酰氨基葡萄糖-6-硫酸硫酸酯酶、 α -N-乙酰氨基半乳糖苷酶、唾液酸酶、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶和 β -氨基己糖苷酶A。在一些实施方式中,所述多核苷酸是DNA。例如编码与蛋白质缺乏疾病相关的功能蛋白(例如,选自上文列举的蛋白质的蛋白质)的DNA。

[0090] 在某些实施方式中,所述治疗剂是编码分泌蛋白的mRNA。合适的分泌蛋白包括激素、细胞因子、生长因子、凝血因子、抗蛋白酶蛋白、血管生成蛋白、抗血管生成蛋白、趋化因子和抗体。在特别的变化方式中,所述分泌蛋白选自促红细胞生成素 (EPO),促血小板生成素 (TPO),粒细胞集落刺激因子 (G-CSF),粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF),瘦素,血小板衍生生长因子(例如血小板衍生生长因子B (PDGF-B)),角化细胞生长因子 (KGF),骨形态发生蛋白2 (BMP-2),骨形态发生蛋白7 (BMP-7),胰岛素,胰高血糖素样肽-1 (GLP-1),人生长激素 (HGF),因子VII,因子 VIII,因子IX,松弛素(例如,松弛素-2),干扰素(例如,干扰素- α (IFN- α),干扰素- β (IFN- β),干扰素- γ (IFN- γ)),白细胞介素-2 (IL-2),白细胞介素-4 (IL-4),白细胞介素-10 (IL-10),白细胞介素-11 (IL-11),白细胞介素-12 (IL-12),白细胞介素-18 (IL-18),白介素-21 (IL-21),CC亚家族趋化因子,CXC亚家族趋化因子,C 亚家族趋化因子和CX3C亚家族趋化因子。在其中所述分泌蛋白是抗体的一些实施方式中,所述抗体是选自嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体(例如单链Fv (scFv))和双特异性抗体的遗传工程化抗体。

[0091] 在其中所述治疗剂是多核苷酸的其它实施方式中,所述多核苷酸是寡核苷酸。合适的寡核苷酸治疗剂包括siRNA、反义寡核苷酸、抗 miR (antagomiR)、基于锁核酸 (LNA) 的寡核苷酸、dicer底物、miRNA、aiRNA、shRNA、核酶和核酸适体。

[0092] 在某些实施方式中,所述治疗剂是蛋白质,例如,抗体或肽适体。抗体治疗剂的特别的变化方式包括单链抗体和双特异性抗体。

[0093] 在一些实施方式中,所述治疗剂是肽。示例性的肽治疗剂包括包含来自疾病相关抗原(例如,肿瘤抗原)的一个或多个短或长氨基酸序列的肽疫苗。

[0094] 在其它实施方式中,所述治疗剂是小分子。在具体变化方式中,所述小分子选自抗微管蛋白剂、DNA小沟区结合剂和DNA复制抑制剂。在其它变化方式中,所述小分子选自蒽环类、阿里他汀 (auristatin)、喜树碱、倍癌霉素 (ducarmycin)、依托泊苷、美登木素生物碱、长春花生物碱和铂(II)化合物。

[0095] 在其它实施方式中,所述治疗剂是破坏或纠正与疾病相关的基因的基因编辑系统的组分。在一些实施方式中,所述基因编辑系统的组分是编码核酸酶的多核苷酸(例如,mRNA)。特别合适的核酸酶包括锌指核酸酶(ZFN),转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN),CRISPR相关蛋白9(Cas9)和工程化归巢核酸内切酶(engineered meganuclease)。在其中所述核酸酶是Cas9的特别的变化方式中,所述脂质纳米颗粒还包含将所述核酸酶靶向至所述靶细胞基因组中的特定位点的指导RNA。在针对上述基因编辑的一些变化方式中,所述脂质纳米颗粒还包含含有用于通过同源重组纠正所述疾病相关基因的DNA供体序列的多核苷酸。在其它变化方式中,所述方法还包括向所述受试者施用有效量的第二脂质纳米颗粒,其包含含有用于通过同源重组纠正所述疾病相关基因的DNA供体序列的多核苷酸。

[0096] 在一些实施方式中,所述治疗剂是免疫原。合适的免疫原包括肽、蛋白质、mRNA、短RNA、DNA或者简单或复杂的碳水化合物。在某些变化方式中,所述免疫原来源于感染源(例如,病毒或细菌)或癌细胞。在一些这样的实施方式中,所述膜去稳定化聚合物也与免疫原缔合,所述免疫原可与所述脂质纳米颗粒的免疫原相同或不同。

[0097] 在其中所述治疗剂是多核苷酸的上述方法的某些实施方式中,所述脂质纳米颗粒包含脂质组分的混合物,其包含:(i)在生理pH下永久带电的阳离子脂质,其中所述阳离子脂质以约35摩尔%至约55摩尔%存在于所述混合物中;(ii)可电离的阴离子脂质,其中所述阴离子脂质任选地不存在,且如果存在,则以约25摩尔%至约40摩尔%存在于所述混合物中;(iii)辅助脂质,其中如果不存在所述可电离的阴离子脂质,则所述辅助脂质以约40摩尔%至约50摩尔%存在于所述混合物中,且如果存在所述可电离的阴离子脂质,则所述辅助脂质以约5摩尔%至约20摩尔%存在于所述混合物中;和(iv)PEG-脂质,其中所述PEG-脂质以约2摩尔%至约15摩尔%存在于所述混合物中。在一些这样的实施方式中,所述阳离子脂质是DOTAP,所述可电离的阴离子脂质是CHEMS,所述辅助脂质是CHOL,和/或所述PEG-脂质是DSPE-PEG2k或DMPE-PEG2k。在包含上述脂质纳米颗粒的方法的一些变化方式中,不存在所述可电离的阴离子脂质,所述阳离子脂质以约35摩尔%至约45摩尔%存在,且PEG-脂质以约5%摩尔%至约15摩尔%存在。在其它变化方式中,存在所述可电离的阴离子脂质,且所述阳离子脂质以约40摩尔%至约55摩尔%存在;在一些这样的变化方式中,所述PEG-脂质以约5摩尔%至约15摩尔%存在。在更特别的实施方式中,(a)所述阳离子脂质是DOTAP,所述可电离的阴离子脂质不存在,所述辅助脂质是CHOL,所述PEG-脂质是DSPE-PEG2k,并且DOTAP:CHOL:DSPE-PEG2k的摩尔比为约40:50:10;(b)所述阳离子脂质是DOTAP,所述可电离的阴离子脂质是CHEMS,所述辅助脂质是CHOL,所述PEG-脂质是DMPE-PEG2k,并且DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2k的摩尔比为约50:32:16:2;(c)所述阳离子脂质是DOTAP,所述可电离的阴离子脂质是CHEMS,所述辅助脂质是CHOL,所述PEG-脂质是DSPE-PEG2k,并且DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k的摩尔比为约50:32:8:10;或(d)所述阳离子脂质是DOTAP,所述可电离的阴离子脂质是CHEMS,所述辅助脂质是CHOL,所述PEG-脂质是DMPE-PEG2k,并且DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2k的摩尔比为约50:32:8:10。

[0098] 在另一个方面中,本发明提供了用于将治疗剂或诊断剂递送至受试者内的靶细胞的细胞溶质的组合物。所述组合物通常包含:(a)包含所述治疗剂或诊断剂的脂质纳米颗粒,和(b)膜去稳定化聚合物。在一些实施方式中,所述脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物中的至少一种包含特异性结合所述靶细胞表面上的分子的第一靶向配体。所述组合物的所

述脂质纳米颗粒、膜去稳定化聚合物、治疗剂和/或靶向配体包括上文对于用于将治疗剂或诊断剂递送至细胞的方法描述的各种实施方式。

[0099] 在又一个方面中,本发明提供了用于将治疗剂或诊断剂递送至受试者内的靶细胞的细胞溶质的递送系统。所述系统通常包含:(a) 包含脂质纳米颗粒的载体组合物,其中所述脂质纳米颗粒包含所述治疗剂或诊断剂,和(b) 包含膜去稳定化聚合物的增强剂组合物。在一些实施方式中,所述脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物中的至少一种包含特异性结合所述靶细胞表面上的分子的第一靶向配体。所述组合物的所述脂质纳米颗粒、膜去稳定化聚合物、治疗剂和/或靶向配体包括上文对于用于将治疗剂或诊断剂递送至细胞的方法描述的各种实施方式。

[0100] 在又一个方面中,本发明提供了用于治疗特征在于导致功能蛋白缺乏的遗传缺陷的疾病的方法。所述方法通常包括:向具有所述疾病的受试者施用(a) 有效量的包含编码所述功能蛋白或与所述功能蛋白具有相同生物活性的蛋白质的mRNA的脂质纳米颗粒和(b) 有效量的膜去稳定化聚合物,其中所述mRNA被递送至与所述疾病相关的靶组织的靶细胞的细胞溶质,且其中所述mRNA在蛋白合成期间被翻译以在所述靶组织内产生编码的蛋白质,由此治疗所述疾病。在一些实施方式中,所述脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物中的至少一种包含特异性结合所述靶组织的靶细胞表面上的分子的第一靶向配体。所述脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物可以单独地施用(例如,所述膜去稳定化聚合物在施用所述脂质纳米颗粒后施用),或者在单一组合物内一起施用。所述脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物包括上文对于用于将治疗剂或诊断剂递送至细胞的方法描述的各种实施方式,条件是如果所述治疗剂是mRNA,则所述脂质纳米颗粒包含阳离子脂质(例如,可电离的阳离子脂质),且所述靶向配体(如果存在) 被选择为结合呈现蛋白质缺乏的靶组织的靶细胞。在某些变化方式中,以重复给药方案(例如,每周或每两周重复的施用方案)施用所述脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物。

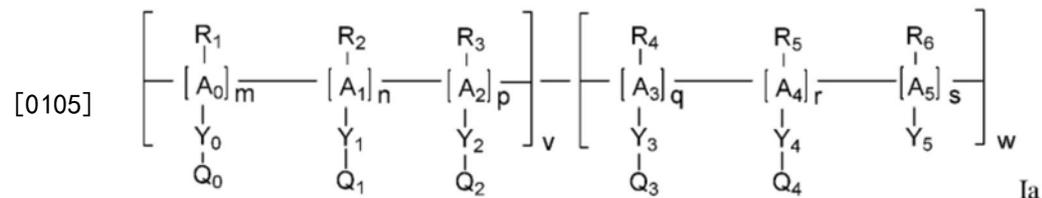
[0101] 在某些实施方式中,所述疾病是肝脏的蛋白质缺乏疾病。在一些这样的实施方式中,所述mRNA编码选自以下功能蛋白: α -1-抗胰蛋白酶(A1AT)、氨基甲酰基磷酸合成酶I(CPS1)、延胡索酰乙酰乙酸酶(FAH)、丙氨酸:乙醛酸-氨基转移酶(AGT)、甲基丙二酰 CoA变位酶(MUT)、丙酰CoA羧化酶 α 亚基(PCCA)、丙酰CoA羧化酶 β 亚基(PCCB)、支链酮酸脱氢酶(BCKDH)亚基、鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)、铜转运ATP酶Atp7B、胆红素尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(BGT)、铁调素、葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)、葡萄糖-6-磷酸转位酶、溶酶体葡糖脑苷脂酶(GB)、尼曼-匹克C1蛋白(NPC1)、尼曼-匹克C2蛋白(NPC2)、酸性鞘磷脂酶(ASM)、因子IX、半乳糖-1-磷酸尿苷基酰转移酶、半乳糖激酶、UDP-半乳糖-4-差向异构酶、转甲状腺素蛋白、补体调节蛋白、苯丙氨酸羟化酶(PAH)、尿黑酸1,2-双加氧酶、胆色素原脱氨酶、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT)、精氨基琥珀酸裂解酶(ASL)、精氨基琥珀酸合成酶(ASS1)、P型ATP酶蛋白F1C-1、 α -半乳糖苷酶A、酸性神经酰胺酶、酸性 α -L-岩藻糖苷酶、酸性 β -半乳糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、 α -L-艾杜糖醛酸酶、半乳糖脑苷脂酶、酸性 α -甘露糖苷酶、 β -甘露糖苷酶、芳基硫酸酯酶B、芳基硫酸酯酶A、N-乙酰氨基半乳糖-6-硫酸硫酸酯酶、酸性 β -半乳糖苷酶、酸性 α -葡萄糖苷酶、 β -氨基己糖苷酶B、乙酰肝素-N-硫酸酯酶、 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、乙酰CoA: α -氨基葡萄糖苷-N-乙酰转移酶、N-乙酰氨基葡萄糖-6-硫酸硫酸酯酶、 α -N-乙酰氨基半乳糖苷酶、唾液酸酶、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶和 β -氨基己糖苷酶

A。

[0102] 在其中所述疾病是肝脏的蛋白质缺乏疾病的其它实施方式中,所述疾病是尿素循环障碍。在一些这样的实施方式中,所述尿素循环障碍选自鸟氨酸转氨甲酰酶 (OTC) 缺乏症,氨基甲酰基磷酸合成酶 I (CPS1) 缺乏症,精氨酸琥珀酸尿症 (精氨酸琥珀酸裂解酶 (ASL) 缺乏症) 和瓜氨酸血症 (精氨酸琥珀酸合成酶 (ASS1) 缺乏症)。在其中所述尿素循环障碍是鸟氨酸转氨甲酰酶 (OTC) 缺乏症的某些变化方式中,所述 mRNA 编码包含与 SEQ ID NO:1 的残基 35-354 具有至少 90% 或至少 95% 序列一致性的氨基酸序列的功能性 OTC 蛋白。在其中所述尿素循环障碍是精氨酸琥珀酸尿症 (精氨酸琥珀酸裂解酶 (ASL) 缺乏症) 的某些变化方式中,所述 mRNA 编码包含与 SEQ ID NO:48 具有至少 90% 或至少 95% 序列一致性的氨基酸序列的功能性 ASL 蛋白。在其中所述尿素循环障碍是瓜氨酸血症 (精氨酸琥珀酸合成酶 (ASS1) 缺乏症) 的某些变化方式中,所述 mRNA 编码包含与 SEQ ID NO:50 具有至少 90% 或至少 95% 序列一致性的氨基酸序列的功能性 ASS1 蛋白。

[0103] 在上述用于治疗肝脏的蛋白质缺乏疾病的某些实施方式中,所述膜去稳定化聚合物和所述脂质纳米颗粒中的至少一种包含特异性结合所述脱唾液酸糖蛋白受体 (ASGPR) 的靶向配体。特别合适的 ASGPR 特异性靶向配体包含 N-乙酰半乳糖胺 (NAG) 残基。

[0104] 在另一个方面中,本发明提供了 pH 敏感性膜去稳定化聚合物。在一些实施方式中,所述 pH 敏感性膜去稳定化聚合物包含式 Ia 的无规嵌段共聚物:



[0106] 其中

[0107] A_0 、 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 和 A_5 各自独立地选自 $-C-C-$ 、 $-C(O)(C)_aC(O)O-$ 、 $-O(C)_aC(O)-$ 、 $-O(C)_b-$ 和 $-CR_8-CR_9$; 其中未完全被 R_1-R_6 和 Y_0-Y_5 取代的 A_0-A_5 的四价碳原子被适当数量的氢原子补齐; 其中 a 和 b 各自独立地是 1-4; 并且其中 R_8 和 R_9 各自独立地选自 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)O$ 烷基和 $-C(O)NR_{10}$, 其中 R_8 和 R_9 任选地共价连接在一起以形成环结构;

[0108] Y_5 是氢或选自 $-(1C-10C)$ 烷基、 $-(3C-6C)$ 环烷基、 $-O-(1C-10C)$ 烷基、 $-C(O)O(1C-10C)$ 烷基、 $-C(O)NR_{11}(1C-10C)$ 烷基和 $-(6C-10C)$ 芳基, 其任一种任选地被一个或多个氟原子取代;

[0109] Y_0 、 Y_3 和 Y_4 各自独立地选自共价键、 $-(1C-10C)$ 烷基、 $-C(O)O(2C-10C)$ 烷基、 $-OC(O)(1C-10C)$ 烷基、 $-O(2C-10C)$ 烷基、 $-S(2C-10C)$ 烷基和 $-C(O)NR_{12}(2C-10C)$ 烷基;

[0110] Y_1 和 Y_2 各自独立地选自共价键、 $-(1C-18C)$ 烷基、 $-(3C-18C)$ 支链烷基、 $-C(O)O(2C-18C)$ 烷基、 $-C(O)O(2C-18C)$ 支链烷基、 $-OC(O)(1C-18C)$ 烷基、 $-OC(O)(1C-18C)$ 支链烷基、 $-O(2C-18C)$ 烷基、 $-O(2C-18C)$ 支链烷基、 $-S(2C-18C)$ 烷基、 $-S(2C-18C)$ 支链烷基、 $-C(O)NR_{12}(2C-18C)$ 烷基和 $-C(O)NR_{12}(2C-18C)$ 支链烷基, 其中 Y_1 或 Y_2 的任何烷基或支链烷基基团任选地被一个或多个氟原子取代;

[0111] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 和 R_{12} 各自独立地是氢、 $-CN$, 或选自烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基, 其任一种任选地被一个或多个氟原子取代;

[0112] Q_0 是选自以下的残基:在生理pH下为亲水性的残基; $0-[(C)_{2-3}-O]_x-R_7$; 和 $0-[(C)_{2-3}-O]_x-C(O)-NR_{13}R_{14}$; 其中x是1-48; R_7 是 $-CH_3$ 或 $-CO_2H$; 且 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是氢、 $-CN$, 或选自烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基, 其任一种任选地被一个或多个氟原子取代;

[0113] Q_1 和 Q_2 各自独立地不存在, 或选自在正常生理pH下为亲水性的残基; 可缀合或可官能化的残基; 在正常生理pH下为疏水性的残基; 任选地被一个或多个氟原子取代的烷基; 和任选地被一个或多个氟原子取代的支链烷基;

[0114] Q_3 是在正常生理pH下带正电的残基;

[0115] Q_4 是在正常生理pH下带负电, 但在较低pH下经历质子化的残基;

[0116] m是大于0.5至小于1.0的摩尔分数;

[0117] n是大于0至小于0.5的摩尔分数;

[0118] p是0至小于0.5的摩尔分数; 其中 $m+n+p=1$;

[0119] q是0.1至0.9的摩尔分数;

[0120] r是0.05至0.9的摩尔分数;

[0121] s以至多0.85的摩尔分数存在; 其中 $q+r+s=1$;

[0122] v为1至25kDa;

[0123] w为1至50kDa; 且

[0124] Y_1 和 Q_1 中的至少一种含有被一个或多个氟原子取代的烷基或支链烷基。

[0125] 在包含上述式Ia共聚物的pH敏感性聚合物的一些实施方式中, p是0。

[0126] 在包含上述式Ia共聚物的pH敏感性聚合物的一些实施方式中, $R_2-A_1-Y_1-Q_1$ 合起来为选自以下的甲基丙烯酸酯残基: 甲基丙烯酸 2,2,3,3,4,4,4-七氟丁酯残基; 甲基丙烯酸3,3,4,4,5,6,6,6-八氟-5(三氟甲基)己酯残基; 2-甲基丙烯酸2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十五氟辛酯残基; 甲基丙烯酸3,3,4,4,5,5,6,6,6-九氟己酯残基(也称为2-丙烯酸2-甲基-3,3,4,4,5,5,6,6,6-九氟己基酯残基); 甲基丙烯酸 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十三氟辛酯残基; 甲基丙烯酸1,1,1-三氟-2-(三氟甲基)-2-羟基-4-甲基-5-戊酯残基; 和甲基丙烯酸2-[(1',1',1'-三氟-2'-(三氟甲基)-2'-羟基)丙基]-3-降苈酯残基。

[0127] 在包含上述式Ia共聚物的pH敏感性聚合物的一些实施方式中,

[0128] (a) Y_3 是 $-C(O)OCH_2CH_2$, Q_3 是二甲基氨基, 和/或 R_4 是 $-CH_3$;

[0129] (b) Y_4 是共价键, Q_4 是羧基残基, 和/或 R_5 是 $-CH_2CH_2CH_3$;

[0130] (c) Y_5 是 $-C(O)O(CH_2)_3CH_3$ 和/或 R_6 是 $-CH_3$; 和/或

[0131] (d) Y_0 是 $-C(O)O(2C-10C)$ 烷基-, Q_0 是 $0-[(C)_{2-3}-O]_x-R_7$ (其中x是1-48且 R_7 是 $-CH_3$), 和/或 R_1 是 $-CH_3$ 。

[0132] 在包含上述式Ia共聚物的pH敏感性聚合物的某些实施方式中, 所述pH敏感性聚合物是式Va的聚合物:

[0133] $T1-L-[PEGMA_m-M2_n]_v-[DMAEMA_q-PAA_r-BMA_s]_w$ Va

[0134] 其中

[0135] PEGMA是具有2-20个乙二醇单元的聚甲基丙烯酸乙二醇酯残基;

[0136] M2是选自以下的甲基丙烯酸酯残基:

[0137] 被一个或多个氟原子取代的甲基丙烯酸(C4-C18)烷基酯残基, 和

- [0138] 被一个或多个氟原子取代的甲基丙烯酸 (C4-C18) 支链烷基酯残基,
- [0139] BMA是甲基丙烯酸丁酯残基;
- [0140] PAA是丙基丙烯酸残基;
- [0141] DMAEMA是甲基丙烯酸二甲基氨乙酯残基;
- [0142] m和n各自为大于0的摩尔分数,其中m大于n且 $m+n=1$;
- [0143] q是0.2至0.75的摩尔分数;
- [0144] r是0.05至0.6的摩尔分数;
- [0145] s是0.2至0.75的摩尔分数;
- [0146] $q+r+s=1$;
- [0147] v为1至25kDa;
- [0148] w为1至25kDa;
- [0149] T1不存在或为所述第一靶向配体;且
- [0150] L不存在或为连接部分。
- [0151] 在上述式Va的pH敏感性聚合物的某些变化方式中,M2是选自以下的甲基丙烯酸酯残基:甲基丙烯酸2,2,3,3,4,4,4-七氟丁酯残基;甲基丙烯酸3,3,4,4,5,6,6,6-八氟-5(三氟甲基)己酯残基;2-甲基丙烯酸 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十五氟辛酯残基;甲基丙烯酸3,3,4,4,5,5,6,6,6-九氟己酯残基;和甲基丙烯酸3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十三氟辛酯残基;甲基丙烯酸1,1,1-三氟-2-(三氟甲基)-2-羟基-4-甲基-5-戊酯残基;和甲基丙烯酸2-[(1',1',1'-三氟-2'-(三氟甲基)-2'-羟基)丙基]-3-降莰酯残基。
- [0152] 在其它实施方式中,pH敏感性膜去稳定化聚合物是式V的聚合物:
- [0153] $T1-L-[PEGMA_m-M2_n]_v-[DMAEMA_q-PAA_r-BMA_s]_w$ V
- [0154] 其中
- [0155] PEGMA是具有2-20个乙二醇单元的聚甲基丙烯酸乙二醇酯残基;
- [0156] M2是选自以下的甲基丙烯酸酯残基
- [0157] 甲基丙烯酸 (C4-C18) 烷基酯残基;
- [0158] 甲基丙烯酸 (C4-C18) 支链烷基酯残基;
- [0159] 甲基丙烯酸胆固醇酯残基;
- [0160] 被一个或多个氟原子取代的甲基丙烯酸 (C4-C18) 烷基酯残基;和
- [0161] 被一个或多个氟原子取代的甲基丙烯酸 (C4-C18) 支链烷基酯残基;
- [0162] BMA是甲基丙烯酸丁酯残基;
- [0163] PAA是丙基丙烯酸残基;
- [0164] DMAEMA是甲基丙烯酸二甲基氨乙酯残基;
- [0165] m和n各自为大于0的摩尔分数,其中m大于n且 $m+n=1$;
- [0166] q是0.2至0.75的摩尔分数;
- [0167] r是0.05至0.6的摩尔分数;
- [0168] s是0.2至0.75的摩尔分数;
- [0169] $q+r+s=1$;
- [0170] v为1至25kDa;
- [0171] w为1至25kDa;

[0172] T1不存在或为所述第一靶向配体；且

[0173] L不存在或为连接部分。

[0174] 在上述式V的pH敏感性聚合物的某些变化方式中，M2是选自以下的甲基丙烯酸酯残基：甲基丙烯酸2,2,3,3,4,4,4-七氟丁酯残基；甲基丙烯酸3,3,4,4,5,6,6,6-八氟-5(三氟甲基)己酯残基；2-甲基丙烯酸2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十五氟辛酯残基；甲基丙烯酸3,3,4,4,5,5,6,6,6-九氟己酯残基；甲基丙烯酸3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十三氟辛酯残基；甲基丙烯酸1,1,1-三氟-2-(三氟甲基)-2-羟基-4-甲基-5-戊酯残基；甲基丙烯酸2-[(1',1',1'-三氟-2'-(三氟甲基)-2'-羟基)丙基]-3-降苈酯残基；甲基丙烯酸2-乙基己酯残基；甲基丙烯酸丁酯残基；甲基丙烯酸己酯残基；甲基丙烯酸辛酯残基；甲基丙烯酸正癸酯残基；甲基丙烯酸月桂酯残基；甲基丙烯酸肉豆蔻酯残基；甲基丙烯酸硬脂酯残基；甲基丙烯酸胆固醇酯残基；乙二醇苯基醚甲基丙烯酸酯残基；2-丙烯酸2-甲基-2-苯乙酯残基；2-丙烯酸2-甲基-2-[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]氨基]乙酯残基；2-丙烯酸2-甲基-2-(1H-咪唑-1-基)乙酯残基；2-丙烯酸2-甲基-环己酯残基；2-丙烯酸2-甲基-2-[双(1-甲基乙基)氨基]乙酯残基；2-丙烯酸2-甲基-3-甲基丁酯残基；甲基丙烯酸新戊酯残基；甲基丙烯酸叔丁酯残基；甲基丙烯酸3,3,5-三甲基环己酯残基；甲基丙烯酸2-羟基丙酯残基；甲基丙烯酸5-壬酯残基；甲基丙烯酸2-丁基-1-辛酯残基；甲基丙烯酸2-己基-1-癸酯残基；和甲基丙烯酸2-(叔丁基氨基)乙酯残基。

[0175] 在又一个方面中，本发明提供了一种脂质纳米颗粒。在一些实施方式中，所述脂质纳米颗粒包含：(a) 多核苷酸；和(b) 包含以下的脂质组分的混合物：(i) 在生理pH下永久带电的阳离子脂质，其中所述阳离子脂质以约35摩尔%至约55摩尔%存在于所述混合物中；(ii) 可电离的阴离子脂质，其中所述阴离子脂质任选地不存在，且如果存在，则以约25摩尔%至约40摩尔%存在于所述混合物中；(iii) 辅助脂质，其中如果不存在所述可电离的阴离子脂质，则所述辅助脂质以约40摩尔%至约50摩尔%存在于所述混合物中，且如果存在所述可电离的阴离子脂质，则所述辅助脂质以约5摩尔%至约20摩尔%存在于所述混合物中；和(iv) PEG-脂质，其中所述PEG-脂质以约5摩尔%至约15摩尔%存在于所述混合物中。在一些这样的实施方式中，所述阳离子脂质是DOTAP，所述可电离的阴离子脂质是CHEMS，所述辅助脂质是CHOL，和/或所述PEG-脂质是DSPE-PEG2k或 DMPE-PEG2k。在上述脂质纳米颗粒的一些变化方式中，不存在所述可电离的阴离子脂质，且所述阳离子脂质以约35摩尔%至约45摩尔%存在。在其它变化方式中，存在所述可电离的阴离子脂质，且所述阳离子脂质以约40摩尔%至约55摩尔%存在。在更特别的实施方式中，(a) 所述阳离子脂质是DOTAP，所述可电离的阴离子脂质不存在，所述辅助脂质是CHOL，所述PEG-脂质是DSPE-PEG2k，并且 DOTAP:CHOL:DSPE-PEG2k的摩尔比为约40:50:10；(b) 所述阳离子脂质是DOTAP，所述可电离的阴离子脂质是CHEMS，所述辅助脂质是CHOL，所述PEG-脂质是DSPE-PEG2k，并且 DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k的摩尔比为约50:32:8:10；或(c) 所述阳离子脂质是DOTAP，所述可电离的阴离子脂质是CHEMS，所述辅助脂质是CHOL，所述PEG-脂质是DMPE-PEG2k，并且 DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2k的摩尔比为约50:32:8:10。在上述脂质纳米颗粒的某些实施方式中，所述多核苷酸是mRNA。

[0176] 通过参考本发明的以下详细说明，本发明的这些和其它方面将变得显而易见。

[0177] 定义

[0178] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与如所述方法和组合物相关的领域中的普通技术人员所通常理解的相同的含义。除非另有说明,否则如本文所用的以下术语和短语具有归于它们的含义。

[0179] 术语“一(a)”、“一个(an)”和“该(the)”包括复数指示,除非上下文另有明确指出。

[0180] 如本文所用的,术语“脂质纳米颗粒”或“LNP”是指采用至少一种脂质分子种类配制的小于约1000nm,通常小于约200nm的颗粒。脂质纳米颗粒包括(但不限于)脂质体,不论其片层性、形状或结构如何。如本文所用的,“脂质体”是具有包封水性内部的含脂质膜的结构。脂质体可以具有一个或多个脂质膜。单层脂质体被称为是“单层的”且多层脂质体被称为是“多层的”。脂质纳米颗粒可以还包含一种或多种另外的脂质和/或其它组分,其可以被包含在脂质体组合物中用于各种目的,例如稳定脂质膜、防止脂质氧化或将配体连接在脂质体表面上。可以存在任何数量的脂质,包括两亲性脂质、中性脂质、阳离子脂质和阴离子脂质。脂质纳米颗粒可与包括多核苷酸、蛋白质、肽或小分子的治疗剂或诊断剂复合,并且可用作体内递送介质。

[0181] 术语“阳离子脂质”是指在生理pH下携带净正电荷的多种脂质种类中的任一种。这样的脂质包括但不限于DODAC、DOTMA、DOTAP、DC-Chol、DMRIE、DOEPC、DLEPC、DMEPC,14:1、MVL5、DOGS、DORIE、DORI和DILA²。

[0182] 术语“中性脂质”是指在生理pH下以不带电荷或中性两性离子形式存在的多种脂种类中的任一种。这样的脂质包括例如胆固醇、DOPE、DLPE、DLPC、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂和脑苷脂。

[0183] 术语“非阳离子脂质”是指如上所述的任何中性脂质以及阴离子脂质(即,在生理pH下携带净负电荷的脂质种类)。阴离子脂质的实例包括但不限于心磷脂、磷脂酰丝氨酸和磷脂酸。

[0184] “可电离的阴离子脂质”是指在pH朝向脂质的 pK_a 降低时经历质子化的阴离子脂质。在可电离的阴离子脂质的 pK_a 处,脂质的一半为阴离子形式且脂质的一半为质子化形式。在脂质纳米颗粒的背景中,在高于可电离的阴离子脂质的 pK_a 的pH值下,更多的脂质带负电荷,并且脂质的带负电荷形式可以稳定双层组织中的其他脂质,从而允许形成双层囊泡。然后这些囊泡在pH朝向可电离的阴离子脂质的 pK_a 降低时融合,例如在核内体环境中,并且更多的可电离的阴离子脂质变为质子化的。可电离的阴离子脂质的实例包括半琥珀酸胆固醇酯(CHEMS)、磷脂酰丝氨酸、棕榈酰高丝氨酸和 α -生育酚半琥珀酸酯。

[0185] “可电离的阳离子脂质”是指在pH朝向脂质的 pK_a 降低时经历质子化的阳离子脂质。在可电离的阳离子脂质的 pK_a 处,脂质的一半为质子化形式且脂质的一半为中性形式。在脂质纳米颗粒的背景中,在低于可电离的阳离子脂质的 pK_a 的pH值下,脂质的带正电荷形式可以与带负电荷的寡核苷酸相互作用,从而允许将寡核苷酸包封在囊泡和纳米颗粒的内部。在高于 pK_a 的pH值下,更多的阳离子脂质是中性的,且这种电荷的缺乏可以影响脂质纳米颗粒的表面电位以及影响寡核苷酸从这些脂质释放。另外,适当设计的具有不饱和尾部的阳离子脂质可以通过经历层状到逆向六边形的相变而介导与其它膜的融合事件。这样的融合事件可以导致内体裂解(endosomolysis),其可以使得能够将材料递送到细胞溶质中。可电离的阴离子脂质的实例包括 DDAB、DlinDMA、Dlin-KC2-DMA、MC3脂质(Dlin-MC3-DMA)、DODAP、DODMA和Mo-CHOL。

[0186] “可交换的PEG-脂质”是指在生理温度下在脂质纳米颗粒(LNP)膜中不稳定的PEG-脂质,使得LNP中的PEG-脂质分子随时间离开LNP膜。离开LNP膜的可交换的PEG-脂质通常移动到生物膜(例如血细胞膜)中,或者可以自身形成胶束。PEG-脂质从LNP释放的速率主要是烷基链长度和烷基链中的不饱和度水平(即,碳-碳双键的数量)的函数。通常,具有14个碳或更少碳的饱和链的PEG-脂质将是可交换的。具有一个或多个双键的C18链(例如18:1、18:2)也将是可交换的。通常,具有大于18个碳原子的烷基链的PEG-脂质将不是可交换的或者以比具有14个碳或更少的烷基链的PEG-脂质低得多的速率交换。可以增加PEG-脂质释放速率的其他因素包括烷基链中的不对称性(例如,具有不同烷基链长度的PEG-神经酰胺(例如,cerC8))以及PEG部分的大小,更大分子量的PEG部分有助于脂质的可交换性。

[0187] 如本文所用的,“两亲的”或“两亲性的”化合物具有亲水性(水溶性)和疏水性(水不溶性)部分二者。

[0188] 如本文所用的,术语“治疗剂”是指在递送到细胞中后可具有治疗作用的任何分子种类(例如多核苷酸、蛋白质、肽或小分子)。在多核苷酸的情况下,该作用可以由核酸自身(例如反义多核苷酸)、转录后(例如反义RNA、核酶、干扰dsRNA、mRNA)或表达成蛋白质后介导。表达的蛋白质在减弱或预防疾病状态方面的“治疗”作用可以通过蛋白质停留在细胞内、保持在膜中连接到细胞、或从细胞分泌和解离(其中它可以进入体循环和血液)而实现。可以具有治疗性的分泌蛋白包括激素、细胞因子、生长因子、凝血因子、抗蛋白酶蛋白(例如, α 1-抗胰蛋白酶)、血管生成蛋白(例如血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子)、抗血管生成蛋白(例如内皮抑素、血管抑素)和存在于血液中的其它蛋白。膜上的蛋白质可以通过提供使细胞摄取蛋白或脂蛋白的受体而具有治疗作用。停留在细胞内的治疗性蛋白(细胞内蛋白)可以是清除循环毒性代谢物(如在苯丙酮尿症中)的酶。它们还可以导致癌细胞更少地增殖或更低癌性(例如更少的转移)或干扰病毒的复制。细胞内蛋白可以是细胞骨架的部分(例如肌动蛋白、肌营养不良蛋白、肌球蛋白、肌聚糖蛋白和肌营养不良蛋白聚糖)并因此在心肌病和肌肉骨骼疾病(例如,杜氏肌营养不良、肢带疾病)中具有治疗作用。蛋白试剂也可以直接递送到细胞中(即,呈蛋白形式,而不是待表达的编码多核苷酸)。治疗心脏病的特别令人感兴趣的其它治疗性蛋白包括影响心肌收缩性的多肽(例如钙和钠通道)、再狭窄抑制剂(例如,一氧化氮合成酶)、血管生成因子和抗血管生成因子。蛋白试剂还可以包括针对胞内靶标的抗体(例如小单链抗体或双特异性抗体)。其他示例性的“治疗剂”包括小分子,例如细胞内靶分子的小分子抑制剂或激动剂(例如激酶抑制剂、DNA合成途径抑制剂)或对细胞具有细胞毒性或细胞抑制作用的小分子(例如用于癌症治疗的化疗剂);抗感染剂(例如抗病毒剂或抗菌剂);或疫苗(其可以包括蛋白质、肽、DNA或RNA)。在一些实施方式中,“治疗剂”是破坏或纠正造成疾病的基因的基因编辑系统的组分(例如,编码核酸酶的多核苷酸;可以用编码核酸酶的多核苷酸配制的指导RNA;或用于通过同源重组纠正基因的供体DNA序列)。

[0189] 如本文所用的,术语“诊断剂”是指可以在受试者或来自受试者的测试样本中检测到的成分。示例性的诊断剂包括放射性试剂、荧光剂、造影剂(例如,MRI或X射线造影剂)和其它成像试剂。诊断剂还包括例如免疫诊断试剂(例如针对细胞内靶标的抗体)以及其它特异性结合剂。诊断剂可以由例如与脂质纳米颗粒复合的诊断上可检测的标记组成,或者可以包含与另一分子(例如,特异性结合分子,例如肽、蛋白质或多核苷酸)缀合的诊断上可检

测的标记。本领域中存在许多不同标记,并且标记方法是本领域技术人员众所周知的。可以在本发明中使用的标记的一般类别包括但不限于放射性同位素、顺磁性同位素、可通过正电子发射断层显像(PET)成像的化合物、荧光或有色化合物、可以通过磁共振成像的化合物、化学发光化合物、生物发光化合物等。特别合适的可检测标记包括但不限于放射性标记、荧光标记、荧光发生标记或发色标记。通过 γ 计数器、闪烁计数器或自动射线照相术简单地检测的有用的放射性标记物(放射性核素)包括但不限于 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 和 ^{14}C 。

[0190] 如本文所用,术语“膜去稳定化聚合物”是指能够对生物膜诱导一种或多种以下作用的聚合物:允许小分子渗透的改变或破坏、膜中的孔形成、膜的融合和/或分裂、允许大分子渗透性的改变或破坏、膜的溶解或导致紧密连接打开并使得能够进行细胞旁转运的膜扰乱。该改变可以通过化合物在至少一种以下试验中的活性而在功能上定义:红细胞裂解(溶血)、脂质体渗漏、脂质体融合、细胞融合、细胞裂解和内体内容物的释放。通常,膜去稳定化聚合物允许分子量大于50 原子质量单位的分子跨膜转运。该运输可以通过膜结构的丧失或膜中洞或孔的形成而实现。在特别的变化方式中,膜去稳定化聚合物是共聚物(例如两亲性共聚物)、合成的两亲性肽、膜活性毒素(例如,豹毒素(pardaxin)、蜂毒肽、天蚕素(cecropin)、蛙皮素、PGLa、indolicidin、皮抑菌肽(dermaseptin)或其衍生物)或病毒融合肽(例如,流感病毒血凝素亚基HA-2肽)。

[0191] 如本文所用,“嵌段共聚物”是指包含结构单元或单体单元的一个或多个亚组合的结构。在一些实施方式中,嵌段共聚物是二嵌段共聚物、三嵌段共聚物或更高阶的嵌段共聚物。例如,二嵌段共聚物可以包含两个嵌段;这样的聚合物的示意性概括由以下表示: $[A_a - B_b - C_c - \dots]_m - [X_x - Y_y - Z_z - \dots]_n$ 或 $[A_a - B_b - C_c - \dots]_m - b - [X_x - Y_y - Z_z - \dots]_n$,其中每个字母代表构成或单体单元,且其中构成单元的每个下标表示该单元在特定嵌段中的摩尔分数,三个点表示每个嵌段中可以有更多的(也可以是更少的)构成单元,且m和n表示二嵌段共聚物中每个嵌段的分子量(或重量分数)。如这样的图示所表明的,在一些情况下,对每个嵌段单独地控制各构成单元的数量和性质。该图示无意于并且不应被解释为推断在每个嵌段中构成单元的数量之间或不同类型的构成单元的数量之间的任何关系。该图示也不是旨在描述特定嵌段内的构成单元的任何特定数量或排列。除非另有明确说明,否则在每个嵌段中构成单元可以以纯无规、交替无规、规则交替、规则嵌段或无规嵌段构型布置。例如,纯无规构型可以具有以下形式: $x-x-y-z-x-y-y-z-y-z-z-z\dots$ 。示例性的交替无规构型可以具有以下形式: $x-y-x-z-y-x-y-z-y-x-z\dots$,并且示例性的规则交替构型可以具有以下形式: $x-y-z-x-y-z-x-y-z\dots$ 。示例性的规则嵌段构型可以具有以下一般构型: $\dots x-x-x-y-y-y-z-z-z-x-x-x\dots$,而示例性的无规嵌段构型可以具有以下一般构型: $\dots x-x-x-z-z-x-x-y-y-y-y-z-z-z-x-x-z-z-z\dots$ 。在梯度聚合物中,一种或多种单体单元的含量从聚合物的 α 末端到 ω 末端以梯度方式增加或减少。在前述一般实例中,个体构成单元或嵌段的特别并列,或者嵌段中构成单元的数量,或者嵌段数量都不意味着也不应被解释为以任何方式影响或限制形成本发明聚合物载体的嵌段共聚物的实际结构。

[0192] 如本文所用,包围构成单元的括号并不意味着且不应被解释为意味着构成单元自身形成嵌段。即,方括号内的构成单元可以以任何方式与嵌段内的其他构成单元组合,即纯无规、交替无规、规则交替、规则嵌段或无规嵌段构型。本文所述的嵌段共聚物任选是交替、梯度或无规嵌段共聚物。

[0193] 如本文所用,聚合物或聚合物嵌段的术语“分子量”是数均分子量。在本领域中可以理解,聚合物分子群体将具有不同分子量的分布。这种分子量分布可以通过术语分散指数或多分散指数(PI或PDI)描述,其为重均分子量/数均分子量。

[0194] 如本文所用,术语“多核苷酸”是指包含两个或更多个核苷酸单体单元(“核苷酸”)的聚合物。根据本发明的某些实施方式的典型多核苷酸包括包含7-20,000个核苷酸单体单元、7-15,000个核苷酸单体单元、7-10,000个核苷酸单体单元、7-5,000个核苷酸单体单元和7-1000个核苷酸单体单元的那些。小于200个核苷酸的多核苷酸通常被称为“寡核苷酸”。多核苷酸包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA),或其衍生物,以及DNA、RNA的组合。DNA可为以下形式:cDNA、体外聚合的DNA、质粒DNA、质粒DNA的部分、源自病毒的遗传物质、线性DNA、载体(PI、PAC、BAC、YAC和人工染色体)、表达载体、表达盒、嵌合序列、重组DNA、染色体DNA、反义DNA或这些组的衍生物。RNA可为以下形式:信使RNA(mRNA)、体外聚合的RNA、重组RNA、转移RNA(tRNA)、小核RNA(snRNA)、核糖体RNA(rRNA)、嵌合序列、dicer底物及其前体、锁核酸、反义RNA、干扰RNA(RNAi)、不对称干扰RNA(aiRNA)、小干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)、核酶、外部指导序列、小型非信使RNA(snmRNA)、非翻译RNA(utrRNA)、snoRNA(24聚体,通过反义机制起作用的修饰snmRNA)、微小非编码RNA(tncRNA)、小发夹RNA(shRNA)或其衍生物。此外,DNA和RNA可为单链、双链、三链或四链的。双链RNA(dsRNA)和siRNA与RNA干扰的现象尤其相关。如本文所用的寡核苷酸的实例包括但不限于siRNA、反义寡核苷酸,dicer底物、miRNA、aiRNA或shRNA。如本文所用的寡核苷酸的其它实例包括但不限于长度为17至29个核苷酸或19至25个核苷酸的dsRNA,并且(dsRNA的核苷酸的)至少90%、或95%或100%与治疗相关蛋白或抗原的核酸序列的编码区或非编码区互补。90%互补意味着长度为20个核苷酸的dsRNA含有不超过2个与mRNA的相应部分没有相应的互补性的核苷酸。如本文所用的多核苷酸的又一些实例包括但不限于可以是修饰或未修饰的单链mRNA。修饰mRNA包括至少一个修饰和可翻译区。(一个或多个)修饰可以位于骨架、核酸分子的核苷和/或5'帽结构上。例如,修饰可以位于核苷上(例如用假尿苷取代尿苷残基),或者修饰可以位于核苷和骨架连接两者上。通常,根据本发明的某些组合物和方法的mRNA包括包含300-20,000个核苷酸单体单元、300-15,000个核苷酸单体单元、300-10,000个核苷酸单体单元、300-5,000个核苷酸单体单元、300-2000个核苷酸单体单元、300-1,500个核苷酸单体单元和300-1000个核苷酸单体单元的那些。在一些变化方式中,根据本公开的组合物和方法的mRNA是至少500、至少1,000、至少1,200或至少1,500个核苷酸单体单元。

[0195] 多核苷酸可以包括相对于天然存在的核苷酸经修饰的核苷酸。经修饰的核苷酸可以在糖部分和/或嘧啶或嘌呤碱基部分中具有改变。糖修饰包括例如用卤素、烷基、胺和叠氮基替换一个或多个羟基,或者糖可以被官能化为醚或酯。此外,整个糖部分可以用空间和电子相似的结构替代,例如氮杂-糖和碳环糖类似物。碱基部分中的修饰的实例包括烷基化嘌呤和嘧啶、酰化嘌呤或嘧啶、或其它众所周知的杂环替代物。核苷酸单体单元可以通过磷酸二酯键或这样的键的类似物进行连接。磷酸二酯键的类似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯(phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯、苯胺硫代磷酸酯(phosphoroanilothioate)、苯胺磷酸酯(phosphoranilidate)、氨基磷酸酯等。术语“多核苷酸”还包括所谓的“肽核酸”,其包含连接到聚酰胺骨架上的天然存在的或经修饰的核酸碱基。

[0196] “多肽”是通过肽键连接的氨基酸残基的聚合物,无论是天然产生还是合成产生的。小于约50个氨基酸残基的多肽通常称为“肽”。

[0197] “蛋白质”是包含一个或多个多肽链的大分子。蛋白质还可以包含非肽组分,例如碳水化合物基团。碳水化合物和其它非肽取代基可以通过其中产生蛋白质的细胞而添加到蛋白质上,并且将随细胞类型变化。蛋白质在本文中根据其氨基酸骨架结构定义;取代基如碳水化合物基团通常不指定,但也可以给出。

[0198] 关于如本文所述的蛋白质,提到对应于由SEQ ID NO限定的那些的氨基酸残基包括这样的残基的翻译后修饰。

[0199] 如本文所用,术语“抗体”是指特异性结合抗原的任何免疫球蛋白,以及其抗原结合片段和其工程化变体。因此,术语“抗体”包括例如多克隆抗体、单克隆抗体和含有完整抗体的互补位的抗原结合抗体片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂和F(v)片段)。还包括遗传工程化的完整抗体和片段,例如嵌合抗体、人源化抗体、单链Fv片段、单链抗体、双抗体、微型抗体、线性抗体、多价或多特异性杂交抗体等。因此,术语“抗体”被广泛地用于包括包含抗体的抗原结合位点并且能够结合其抗原的任何蛋白质。在一些实施方式中,抗体对细胞表面分子具有亲和力。

[0200] 术语“遗传工程化抗体”是指其中氨基酸序列已经与天然抗体的氨基酸序列不同的抗体。由于重组DNA技术在抗体产生中的相关性,不需要局限于在天然抗体中发现的氨基酸序列;可以重新设计抗体以获得期望的特征。存在许多可能的变化,范围从改变仅仅一个或几个氨基酸到完全重新设计例如可变区或恒定区。通常,为了改善或改变特征,例如补体固定、与细胞的相互作用和其它效应子功能,对恒定区进行改变。通常,为了改善抗原结合特性、改善可变区稳定性或降低免疫原性的风险,对可变区进行改变。

[0201] “抗体的抗原结合位点”是足以结合其抗原的抗体部分。最小的这样的区域通常是可变结构域或其基因工程化变体。单结构域结合位点可以从骆驼抗体(参见Muyldermans和Lauwereys, *J. Mol. Recog.* 12: 131-140, 1999; Nguyen等, *EMBO J.* 19:921-930, 2000)或从其他物种的V_H结构域产生以产生单结构域抗体(“dAbs”;参见Ward等, *Nature* 341:544-546, 1989; Winter等的美国专利号6,248,516)。在某些变化方式中,抗原结合位点是仅具有天然或非天然存在的(例如,诱变的)重链可变结构域或轻链可变结构域或其组合的2个互补决定区(CDR)的多肽区域(参见例如, Pessi等, *Nature* 362:367-369, 1993; Qiu等, *Nature Biotechnol.* 25:921-929, 2007)。更常见地,抗体的抗原结合位点包含结合共同表位的重链可变结构域和轻链可变结构域二者。包含抗体的抗原结合位点的分子的实例是本领域已知的,并且包括例如Fv片段、单链Fv片段(scFv)、Fab片段、双抗体、微型抗体、Fab-scFv融合体、双特异性(scFv)₄-IgG和双特异性(scFv)₂-Fab(参见例如Hu等, *Cancer Res.* 56:3055-3061, 1996; Atwell 等, *Molecular Immunology* 33:1301-1312, 1996; Carter和Merchant, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:449-454, 1997; Zuo等, *Protein Engineering* 13: 361-367, 2000; 和Lu等, *J. Immunol. Methods* 267:213-226, 2002)。

[0202] 如本文所用,术语“单链Fv”和“单链抗体”是指在单个多肽链内包含来自重链和轻链二者的可变区,但是缺少恒定区的抗体片段。通常,单链抗体还包含V_H和V_L结构域之间的多肽接头,其使单链抗体能够形成允许抗原结合的期望结构。单链抗体由例如Pluckthun在 *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷(Rosenburg和Moore 编,

Springer-Verlag, New York, 1994), 269-315页中详细论述(还参见WIPO公布WO 88/01649; 美国专利号4,946,778和5,260,203; Bird等, Science 242:423-426, 1988)。单链抗体也可以是双特异性的和/或人源化的。

[0203] “双特异性抗体”是具有两个不同重/轻链对和两个不同结合位点的杂合抗体。双特异性抗体在本领域中被公认为产生结合两种不同决定簇的单一蛋白质的标准技术。参见例如Kufer等, Trends Biotechnol. 22:238-244, 2004。双特异性抗体可以以许多不同形式制备,其包括但不限于四价体瘤(quadroma)、F(ab')₂、四价、异二聚体scFv、双特异性scFv、串联scFv、双抗体和微型体形式,或者附接于全抗体或与其重组融合的scFv。参见例如Kufer等, 2004; Holliger和Hudson Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005; Morrison和Coloma, WO95/09917。

[0204] 如本文所用,“免疫原”是诱导免疫应答的实体(例如,肽、蛋白质、核酸或碳水化合物),所述免疫应答可以包括先天性或适应性免疫应答(例如,保护受试者免受感染或癌症)。适应性免疫应答可以是体液和/或细胞介导的免疫应答。在某些实施方式中,本公开上下文中的免疫原用作疫苗。

[0205] 如本文所用,术语“糖”是指糖类,例如单糖、二糖、寡糖和多糖。通常,如本文所用的糖将共聚物靶向或递送至靶细胞或组织或者特定细胞类型,并增强分子与靶细胞的缔合。例如,肝细胞含有脱唾液酸糖蛋白(ASGP)受体。因此,含有半乳糖的靶向基因可用于靶向肝细胞。含有半乳糖的靶向基因的实例包括但不限于半乳糖或半乳糖衍生物,例如其受保护的类似物、N-乙酰半乳糖胺(NAG,也称为GalNAc)或N-乙酰半乳糖胺衍生物,例如其受保护的类似物、寡糖和糖簇,例如Tyr-Glu-Glu-(氨基己基GalNAc)₃,基于赖氨酸的半乳糖簇和基于胆烷的半乳糖簇。糖的其它实例包括但不限于甘露糖和甘露糖衍生物,例如其受保护的类似物。在一些变化方式中,糖是包含两个或更多个糖部分(例如,三个或四个部分)的多价结构。在一些这样的多价糖实施方式中,每个部分通过接头连接到共同的分支点。示例性的多价糖是具有三个NAG部分的三-N-乙酰半乳糖胺(三-NAG)结构。三-NAG结构在本领域中公知的,并且在例如描述在Lee等, Carbohydrates and Chemistry and Biology (B.Ernst, GWHart & P.Senay编, Wiley-WCH: Weinheim, 2000), 第4卷, 第459页(以及其中引用的参考文献); Biessen等J. Med. Chem. 38:1538, 1995; Sliedregt等, J. Med. Chem. 42: 609, 1999; Rensen等, J. Med. Chem. 47:5798, 2004; Khorev等, Bioorg. Med. Chem. 16:5216, 2008中。另一种示例性多价糖是具有两个甘露糖-6-磷酸部分的双甘露糖-6-磷酸(双M6P)结构(参见例如Zhu等的US 8,399,657)。

[0206] 如本文所用,术语“维生素”是指以微量对于活生物体的正常生长和活性而言必需的各种脂溶性或水溶性有机物质中的任一种。示例性的维生素包括维生素A(视黄醇)、维生素B1(硫胺素)、维生素C(抗坏血酸)、维生素D(钙化醇)、维生素B2(核黄素)、维生素E(生育酚)、维生素B12(钴胺素)、维生素K1(叶绿醌)、维生素B5(泛酸)、维生素B7(生物素)、维生素B6(吡哆醇)、维生素B3(烟酸)、维生素B9(叶酸)及其衍生物。通常,如本文所用的维生素将脂质纳米颗粒和/或膜去稳定化聚合物靶向或递送至靶细胞或组织或者特定细胞类型,并增强分子与靶细胞的缔合。如本文所用的维生素的实例包括维生素B₉,其包括叶酸、叶酸盐及其衍生物。

[0207] 如本文所用,“靶向配体”是指能够特异性结合靶细胞(例如受试者的靶组织内的

细胞) 表面上的分子的部分。特异性结合靶向部分的分子(例如, 细胞表面分子) 在本文中也称为“结合伴侣”。

[0208] 如本文所用, “烷基”是指完全饱和(无双键或三键)的直链或支链烃(仅碳和氢)基团, 其任选具有作为烃链的部分(在链的末端位置或非末端位置)的环烷基。本文中的烷基含有主链中的1至10个碳原子和至多20个碳原子, 并且可以是直链或支链的。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基和己基。如本文所用, “烷基”包括“亚烷基”基团, 其是指具有两个而非一个用于与其它基团键合的开放价的完全饱和的直链或支链烃基。亚烷基的实例包括但不限于亚甲基(-CH₂-)、亚乙基(-CH₂CH₂-)、亚丙基(-CH₂CH₂CH₂-)、亚正丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)、亚仲丁基(-CH₂CH₂CH(CH₃)-)等。本公开的烷基可以任选地被一个或多个氟基团取代。

[0209] 如本文所用, “mC至nC”、“C_m至C_n”或“C_m至C_n” (其中m和n是整数)是指指定基团中可能的碳原子的数量。即, 该基团可以含有“m”至“n”个(包含本数)碳原子。本公开的烷基可以包含1至18个碳原子, 即m为1且n为18。当然, 特别的烷基可以更加限制。例如但不限于, 本公开的烷基可以由3至8个碳原子组成, 在该情况下, 它将被命名为(3C-8C)烷基。这些数字是包含性的并且包含具有指定碳原子数的所有直链或支链结构。例如但不限于, “1C至4C烷基”或“(1C-4C)烷基”基团是指具有1至4个碳的全部烷基, 即, CH₃-、CH₃CH₂-、CH₃CH₂CH₂-、CH₃CH(CH₃)-、CH₃CH₂CH₂CH₂-、CH₃CH₂CH(CH₃)-、(CH₃)₂CHCH₂-和(CH₃)₃CH-。

[0210] 如本文所用, 术语“芳基”或“芳基基团”是指具有总共5至14个环成员的任选取代的单环、二环和三环环体系, 其中体系中的至少一个环是芳族的, 并且其中体系中的每个环含有3至7个环成员。如本文使用的单独或作为另一基团的部分的术语“芳基(aryl)”或“芳(ar)”表示任选取代的同素环芳族基团, 优选在环部分中含有6至12个碳的单环或二环基团, 例如苯基、联苯基、萘基、取代的苯基、取代的联苯基或取代的萘基。苯基和取代的苯基是更加优选的芳基。

[0211] 如本文所用, 术语“杂烷基”是指其中至少一个骨架碳原子被杂原子代替的烷基。

[0212] 如本文所用, 术语“杂芳基”是指其中环成员中的至少一个是杂原子, 并且优选在每个环中5个或6个原子的芳基。杂芳基优选在环中具有1个或2个氧原子、1个或2个硫原子和/或1至4个氮原子, 并且可以通过碳或杂原子与分子的其余部分键合。示例性的杂芳族化合物包括咪唑基、噻吩基、吡啶基、噁唑基、吡咯基、吡啶基、喹啉基或异喹啉基等。示例性的取代基包括以下基团中的一种或多种: 烷基、取代烷基、酮(即=O)、羟基、受保护的羟基、酰基、酰氧基、烷氧基、烯氧基、炔氧基、芳氧基、卤素、酰氨基、氨基、硝基、氰基、巯基、缩酮、缩醛、酯和醚。

[0213] 如本文所用, “环烷基”是指其中烷基链的末端碳原子彼此共价键合的烷基。数字“m”和“n”是指所形成的环中的碳原子数。因此, 例如, (3C-8C)环烷基是指3、4、5、6、7或8元环, 即, 环丙烷、环丁烷、环戊烷、环己烷、环庚烷和环辛烷。本发明的环烷基可任选地被一个或多个氟基团和/或一个或多个烷基基团取代。

[0214] 如本文所用, 术语“杂环烷基”是指其中至少一个骨架碳原子被杂原子代替的环烷基。

[0215] 如本文所用, 术语“炔基”是指具有2至10个碳原子的不饱和直链烃基, 并且其中至少两个碳原子通过三键键合在一起。

[0216] 如本文所用,术语“烯基”是指具有2至10个碳原子的不饱和直链烃基,并且其中至少两个碳原子通过双键键合在一起。

[0217] 当官能团(例如胺)被称为“保护的”时,这意味着该基团是处于修饰的形式,以阻止在该受保护位点处发生不期望的副反应。考虑到本领域的技术水平,并且参考标准教科书,例如Greene, T.W.等, *Protective Groups in Organic Synthesis* Wiley, New York (1991), 将从本申请中认识到本公开的共聚物的合适保护基。羧基可以作为其酯受保护,例如甲酯、乙酯、叔丁酯、苄酯和4-硝基苄酯。羟基可以作为其醚或酯受保护,例如甲氧基甲基醚、四氢吡喃基醚、苄基醚、乙酸酯或苯甲酸酯。巯基可以作为硫醚或硫酯受保护,例如吡啶基硫醚、马来酰亚胺硫醚、叔丁基硫醚、硫代乙酸酯或硫代苯甲酸酯。氨基可以作为氨基甲酸酯受保护,例如叔丁氧羰基衍生物,或作为酰胺受保护,例如乙酰胺和苯甲酰胺。

[0218] 如本领域众所周知的,PEG分子量的命名法可以使用总体分子量(包括PEG端基)或重复单元的数量。例如PEG₁₂也称为PEG_{0.6kDa}或PEG_{0.6k}。PEG₃₆也称为PEG_{1.6kDa}或PEG_{1.6k}。PEG₄₈也称为PEG_{2.2kDa}或PEG_{2.2k}。PEG₄₈的特定形式也称为PEG₂₄-酰氨基-PEG₂₄,但也一般描述为PEG_{2.2kDa}或PEG_{2.2k}。

[0219] PEGMA₄₋₅(聚(乙二醇)甲基醚甲基丙烯酸酯,平均Mn=300)也称为PEGMA_{0.3kDa}或PEGMA_{0.3k}或PEGMA₃₀₀,其是PEGMA₄和PEGMA₅的混合物的平均分子量。类似地,PEGMA₇₋₉(聚(乙二醇)甲基醚甲基丙烯酸酯,平均Mn=500)也称为PEGMA_{0.5kDa}或PEGMA_{0.5k}或PEGMA₅₀₀,其是PEG₇和PEG₉的混合物的平均分子量。类似地,PEGMA₁₇₋₁₉(聚(乙二醇)甲基醚甲基丙烯酸酯,平均Mn=1000)也称为PEGMA_{1kDa}或PEGMA_{1k}或PEGMA₁₀₀₀,其是PEGMA₁₇和PEGMA₁₉的混合物的平均分子量。

[0220] 如本文所用,“不稳定键”是能够被选择性破坏的共价键。即,不稳定的键可以在其他共价键的存在下被破坏而其它共价键不被破坏。例如,二硫键能够在硫醇存在下被破坏,而也可能存在于分子中的其它键,例如碳-碳、碳-氧、碳-硫,碳-氮键不切割。不稳定还意指“可切割的”。

[0221] 如本文所用,“不稳定连接”是含有不稳定键并在两个其它基团之间提供连接或或间隔物的化学化合物。所连接的基团可以选自化合物,例如生物活性化合物、膜活性化合物、抑制膜活性的化合物、功能反应性基团、单体和细胞靶向信号的化合物。间隔基团可以含有选自包括以下的基团的化学部分:烷烃、烯烃、酯、醚、丙三醇、酰胺、糖、多糖和杂原子如氧、硫或氮。间隔物可以是电子中性的,可以携带正电荷或负电荷,或者可以携带正电荷和负电荷二者而总电荷为中性、正性或负性的。

[0222] 如本文所用,“pH不稳定”或“pH敏感”是指共价键在酸性条件(pH < 7)下的选择性断裂,或者共价键在酸性条件(pH < 7)下比在中性条件下更快地断裂。即,在存在不断裂的其它共价键的情况下,pH 不稳定键可以在酸性条件下断裂。

[0223] 如本文所用,“胶束”包括包含核心和亲水性外壳的颗粒,其中所述核心至少部分地、主要地或基本上通过疏水相互作用保持在一起。在某些情况下,如本文所用,“胶束”是包含至少两个域(内部域或核心,和外部域或外壳)的多组分纳米颗粒。所述核心至少部分地、主要地或基本上通过疏水相互作用保持在一起,并且存在于胶束的中心。如本文所用,“胶束外壳”被定义为胶束的非核心部分。

[0224] 如本文所用,如果颗粒或组合物基本上表现得像胶束,则其为“胶束样”: (1) 其是

通过嵌段共聚物的自发自缔合以在从水混溶性溶剂（例如但不限于乙醇）稀释至水性溶剂（例如磷酸盐缓冲盐水，pH 7.4）时形成组织化组装物（例如胶束）而形成；(2) 其对稀释是稳定的（例如，降低至100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的聚合物浓度，其构成临界稳定性浓度或临界胶束浓度(CMC)）；和/或(3) 随着有机溶剂浓度增加，其具有逐渐增加的不稳定性，这样的有机溶剂包括但不限于二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砷(DMS) 和二氧六环。

[0225] 在如本文所述的用于通过向受试者施用脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物而在细胞内递送治疗剂或诊断剂的方法的背景中，术语“有效量”是指一起足以实现治疗剂或诊断剂至靶细胞或靶组织的细胞溶质的可检测递送的脂质纳米颗粒的量和膜去稳定化聚合物的量。本文提及治疗剂或诊断剂递送至“细胞溶质”包括递送这种治疗剂或诊断剂，其可在递送至细胞溶质之后最终靶向至细胞的细胞核。

[0226] 在如本文所述的通过向受试者施用脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物而治疗疾病的背景中，术语“有效量”或“治疗有效量”是指在一起足以抑制受试者中疾病的一种或多种症状的发生或改善该症状的脂质纳米颗粒(包含治疗剂) 的量和膜去稳定化聚合物的量，其有效量的含试剂的脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物根据本方法以“有效方案”施用。术语“有效方案”是指足以实现疾病的治疗或预防的所施用的含试剂的脂质纳米颗粒、所施用的膜去稳定化聚合物和剂量频率的组合。

[0227] 在如本文所述的治疗剂或诊断剂的体内递送背景中，术语“患者”或“受试者”包括人和其它哺乳动物受试者。

[0228] 序列一致性百分数由常规方法确定。参见，例如，Altschul等，Bull.Math.Bio.48:603,1986,以及Henikoff和Henikoff,Proc.Natl. Acad.Sci.USA 89:10915,1992。例如，可将两个氨基酸序列对齐以使用10的空位开放罚分、1的空位延伸罚分以及Henikoff和Henikoff（出处同上）的“BLOSUM62”评分矩阵优化比对评分。然后将一致性百分数计算为：([相同匹配的总数]/[较长序列的长度加上引入较长序列中以对齐两个序列的空位数]) (100)。本领域技术人员理解有许多已建立的算法可用于比对两个氨基酸序列。Pearson和Lipman的“FASTA”相似性检索算法(Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 85:2444,1988 和Pearson,Meth.Enzytnol.183:63,1990) 是用于检查本文公开的氨基酸序列与第二氨基酸序列共有的一致性水平的适合的蛋白质比对方法。

[0229] 当这一值被表示为“约”X或“大约”X时，X的所述值将被理解为精确至 $\pm 10\%$ 。

附图说明

[0230] 图1A和1B显示了用编码鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)的mRNA 处理的高氨血症OTC-spf^{ash}小鼠中乳清酸(OA)和血浆氨水平的降低。通过用AAV2/8载体/OTC shRNA处理在OTC-spf^{ash}小鼠中诱导高氨血症，并在AAV给药后4天，用1mg/kg在N:P为7的DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG_{2k}(50:32:16:2)中配制的OTC mRNA+共注射50mg/kg P67每周两次处理小鼠。参见实施例21。分析在第6天和第13天(AAV处理后)收集的尿液中的OA水平，其针对肌酐水平标准化，并分析在第13天收集的血浆的氨水平。图1A 中显示了乳清酸水平(黑色填充=第6天；平行线填充=第13天)。图1B中显示了血浆氨水平。

[0231] 图2A和2B显示了用编码鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)的mRNA 处理的高氨血症OTC-

spf^{ash}小鼠中乳清酸(OA)和血浆氨水平的降低。通过用AAV2/8载体/OTC shRNA处理在OTC-spf^{ash}小鼠中诱导高氨血症,并在AAV给药后4天,用1mg/kg在N:P为7的 DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG_{2k}(50:32:8:10)中配制的OTC mRNA+共注射35mg/kg P82每周两次处理小鼠。参见实施例21。分析在第6天和第13天(AAV处理后)收集的尿液中的OA水平(其针对肌酐水平标准化),并分析在第13天收集的血浆的氨水平。图2A中显示了乳清酸水平(黑色填充=第6天;平行线填充=第13天)。图2B中显示了血浆氨水平。

[0232] 图3示意性描述了提出的根据本公开的实施方式使用膜去稳定化聚合物和LNP载体将mRNA递送至靶细胞的细胞溶质的作用机制。(A)制备两种单独的纳米颗粒溶液:一种纳米颗粒含有膜去稳定化聚合物,和第二种纳米颗粒是包含mRNA的LNP。(B)然后在体内施用之前即时混合两种纳米颗粒溶液。(C)虽然并非旨在受到理论约束,但据信聚合物和mRNA/LNP纳米颗粒在靶细胞的相同细胞内囊泡(例如,内体)内共定位,其中(D)膜去稳定化聚合物触发将mRNA释放到细胞溶质中以翻译成蛋白质。

具体实施方式

[0233] 本发明涉及用于将治疗剂或诊断剂体内递送至靶细胞的细胞溶质(例如,将试剂体内递送至靶组织内的多个靶细胞的细胞溶质)的方法、组合物和递送系统。所述方法、组合物和递送系统可用于多种多样分子试剂(包括多核苷酸、肽、蛋白质和小分子)的细胞内递送,并且因此具有各种诊断和治疗应用,包括例如治疗癌症、传染病以及以蛋白质缺乏为特征的疾病。

[0234] 本发明特别涉及用于递送治疗剂或诊断剂的制剂。通常,将治疗剂或诊断剂配制在脂质纳米颗粒("LNP";例如脂质体)中,并且或者将膜去稳定化聚合物添加至制剂(用于共注射LNP和聚合物的共制剂),或者将LNP"载体"制剂和膜去稳定化聚合物通过单独(例如,顺序)注射到受试者中而分别使用。LNP和膜去稳定化聚合物中的任一者或两者可以包含结合期望细胞靶标表面上的分子的靶向配体。在某些其它实施方式中,LNP和膜去稳定化聚合物都不具有靶向配体。脂质纳米颗粒的作用是包封治疗剂或诊断剂,防止其与系统循环的各种成分发生相互作用并促进递送和摄取到期望组织和细胞中。脂质纳米颗粒也可以参与内体的裂解。虽然并非旨在受到理论约束,但据信膜去稳定化聚合物作为可能通过改善LNP从内体的内体逃逸而引发或增强治疗剂或诊断剂递送到靶细胞的细胞溶质中的试剂起作用。例如,脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物可共定位于靶细胞内的胞内囊泡,在此处膜去稳定化聚合物可以通过破坏囊泡膜而促进治疗剂或诊断剂的释放。如本文工作实施例中所示,与单独使用LNP相比,LNP和膜去稳定化聚合物的组合证实了所递送的试剂(使用共注射或顺序注射)的增强的活性。参见下文实施例1、2、18和20。再次地,不希望受到理论约束,据信该结果是由于当聚合物与LNP载体组合使用时,试剂到靶细胞中的增强递送。

[0235] 因此,在一个方面中,本发明提供了用于将治疗剂或诊断剂递送至靶细胞的细胞溶质的方法。该方法通常包括向受试者施用(a)有效量的包含治疗剂或诊断剂的脂质纳米颗粒和(b)有效量的膜去稳定化聚合物,其中治疗剂或诊断剂被递送至靶细胞的细胞溶质。在该方法的一些实施方式中,脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物中的至少一种包含特异性结合靶细胞表面上的分子的第一靶向配体。

[0236] 在另一个方面中,本发明提供了用于将治疗剂或诊断剂递送至靶细胞的细胞溶质

的组合物。该组合物通常包含 (a) 包含治疗剂或诊断剂的脂质纳米颗粒, 和 (b) 膜去稳定化聚合物。在该组合物的一些实施方式中, 脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物中的至少一种包含特异性结合靶细胞表面上的分子的第一靶向配体。这样的组合物可用于本文所述的递送方法的某些实施方式中, 特别是包括共注射膜去稳定化聚合物和包含治疗剂或诊断剂的脂质纳米颗粒的实施方式。

[0237] 在另一个方面中, 本发明提供了用于将治疗剂或诊断剂递送至靶细胞的细胞溶质的递送系统。该递送系统通常包含 (a) 包含脂质纳米颗粒的载体组合物, 其中脂质纳米颗粒包含治疗剂或诊断剂, 和 (b) 包含膜去稳定化聚合物的增强剂组合物。在该递送系统的一些实施方式中, 脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物中的至少一种包含特异性结合靶细胞表面上的分子的第一靶向配体。这样的递送系统可用于本文所述的递送方法的某些实施方式中, 特别是包括单独 (例如, 顺序) 注射膜去稳定化聚合物和包含治疗剂或诊断剂的脂质纳米颗粒的实施方式。

[0238] 在另一个方面中, 本发明提供了如本文所述的膜去稳定化聚合物。

[0239] 在另一个方面中, 本发明提供了如本文所述的脂质纳米颗粒。

[0240] 通常, 当根据本公开将膜去稳定化聚合物添加至脂质纳米颗粒制剂 (例如, 制备包含 (a) 包含治疗剂或诊断剂的脂质纳米颗粒和 (b) 膜去稳定化聚合物的组合物) 时, 聚合物不包含在脂质纳米颗粒内。在本文公开的各个方面的某些实施方式中, 膜去稳定化聚合物形成在组成上与脂质纳米颗粒不同的纳米颗粒。例如, 当膜去稳定化聚合物是包含亲水性和疏水性区段的聚合物时, 聚合物可以在水溶液中形成胶束或胶束样颗粒。

[0241] 各种治疗剂和诊断剂通常是已知的, 并且可以根据本发明的方法、组合物和递送系统使用。待递送的治疗剂或诊断剂可以是例如多核苷酸、蛋白质、肽或小分子。治疗剂的适合类别包括例如抗癌剂、抗感染剂 (例如抗病毒剂或抗细菌剂)、免疫调节剂 (例如免疫抑制剂或免疫刺激剂)、抗炎剂或调节细胞代谢活性的试剂。适合的诊断剂包括例如各种可检测的试剂, 其可以单独使用或作为与具有可用于诊断方法中的期望性质 (例如, 对于期望细胞内靶标的结合特异性) 的另一分子 (例如多核苷酸、蛋白质、肽或小分子) 的缀合物 (标记) 而使用。可以在本发明中使用的标记的一般类别包括但不限于放射性同位素、顺磁性同位素、可通过正电子发射断层显像 (PET) 成像的化合物、荧光或有色化合物、可以通过磁共振成像的化合物、化学发光化合物、生物发光化合物和其它成像试剂。

[0242] 用于配制用于药物递送的脂质纳米颗粒的方法在本领域中是公知的, 并且可以适用于本发明的情况中。例如, 用于递送小RNA的脂质纳米颗粒制剂在例如Hong和Nam, *Theranostics* 4:1211-1232, 2014; Asai和Oku, *Biol. Pharm. Bull.* 37:201-205, 2014; 和Tarn 等, *Pharmaceutics* 5:498-507, 2013中论述。用于药物递送的脂质颗粒制剂和脂质设计还在例如Samad等, *Current Drug Delivery* 4: 297-305, 2007; Martin等, *Current Pharmaceutical Design* 11:375-394, 2005; Hafez等, *Biophysical Journal* 79:1438-1446, 2000; Jayaraman 等, *Angew. Chem. Int. Ed.* 51:8529-8533, 2012; Li和Schick, *Biophysical Journal* 80:1703-1711, 2001; Adami等, *Molecular Therapy* 19: 1141-1151, 2011; Dabkowska等, *J. R. Soc. Interface* 9:548-561, 2012; Gubernator, *Expert Opinion on Drug Delivery* 8:565-80, 2011; Whitehead等, *Nat. Commun.* 5:4277, 2014; 和Dong等, *Proc. Natl. Acad. Set USA* 111:3955-60, 2014中论述。

[0243] 对于包含多核苷酸试剂的LNP制剂,脂质纳米颗粒包含一种或多种阳离子脂质,其特别可用于通过静电相互作用与多核苷酸复合。脂质纳米颗粒可以还包含另外的脂质,其可以用于各种目的,例如有助于制造和储存稳定性以及调节生物分布。生物分布还可以通过引入与脂质纳米颗粒的脂质部分缀合的靶向配体而调节。包含多核苷酸的脂质纳米颗粒通常以约1至约30范围的N:P比率配制。在更具体的变化方式中,N:P比率为约1至约14、1至约7、或约3至约7(例如,约3、约3.5或约7的N:P比率)。

[0244] 在某些实施方式中,用于形成脂质纳米颗粒的阳离子脂质包含季胺,且因此永久带正电荷。可用于多核苷酸LNP制剂中的特别适合的永久带电的阳离子脂质包括,例如,N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA),N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP),1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-乙基磷酸胆碱(DOEPIC),1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-乙基磷酸胆碱(DLEPC),1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-乙基磷酸胆碱(DMEPC),1,2-二肉豆蔻酰油酰基-sn-甘油基-3-乙基磷酸胆碱(14:1),N1-[2-((1S)-1-[(3-氨基丙基)氨基]-4-[二(3-氨基-丙基)氨基]丁基甲酰胺基)乙基]-3,4-二[油基氧基]-苯甲酰胺(MVL5),双十八烷基酰胺基-甘氨酸精胺(DOGS),3b-[N-(N',N'-二甲基氨基乙基)氨基甲酰基]胆固醇(DC-Chol),双十八烷基二甲基溴化铵(DDAB),Saint脂质例如SAINT-2,N-甲基-4-(二油基)甲基吡啶鎓,1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-二甲基羟乙基溴化铵(DMRIE),1,2-二油酰基-3-二甲基-羟乙基溴化铵(DORIE),1,2-二油酰基氧基丙基-3-二甲基羟乙基氯化铵(DORI),二烷基化氨基酸(DILA²) (例如,C18:1-norArg-C16),二油基二甲基氯化铵(DODAC),1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-乙基磷酸胆碱(POEPC),1,2-二肉豆蔻酰油酰基-sn-甘油基-3-乙基磷酸胆碱(MOEPC)和(R)-N,N,N-三甲基-4,5-双(油酰基氧基)戊-1-基氯化铵(DOTAPen)。还适合的是在生理pH条件下具有带电荷的头基的阳离子脂质,例如伯胺(例如,DODAG N',N'-双十八烷基-N-4,8-二氮杂-10-氨基癸酰基甘氨酸)和胍基头基(例如双胍-亚精胺-胆固醇(BGSC)、双-胍三氨基乙基胺胆固醇(bis-guanidiniumtren-cholesterol)(BGTC)、PONA和二油酸(R)-5-胍基戊-1,2-二酯盐酸盐(DOPen-G))。又一种适合的阳离子脂质是二油酸(R)-5-(二甲基氨基)戊-1,2-二酯盐酸盐(DODAPen-Cl)。在某些实施方式中,阳离子脂质是特定的对映异构体或外消旋体形式,并且包括上文所述的阳离子脂质的各种盐形式(例如氯化物或硫酸盐)。例如,在一些实施方式中,阳离子脂质是N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP-Cl)或N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基硫酸铵(DOTAP-硫酸盐)。

[0245] 在某些变化方式中,用于形成脂质纳米颗粒的阳离子脂质利用氨基酸的侧链作为头基,其中 α -氨基和 α -羧基用作疏水尾部的附着位点(也称为“DiLA²”架构;参见Adami等,Molecular Therapy 19: 1141-1151,2011)。具有DiLA²结构的阳离子脂质的特别变化方式是C18:1-norArg-C16。参见上述Adami等。

[0246] 通常,包含上文阳离子脂质的脂质纳米颗粒包含一种或多种另外的脂质。适于引入脂质纳米颗粒中的另外的脂质可以包括阴离子脂质、中性辅助脂质和PEG-缀合脂质(本文中也称为“PEG-脂质”)中的一种或多种。因此,在某些实施方式中,提供了包含上文阳离子脂质和选自阴离子脂质、辅助脂质和PEG-脂质的一种或多种另外的脂质的脂质纳米颗粒。

[0247] 用于含阳离子脂质的LNP制剂中的阴离子脂质通常是可电离的阴离子脂质。尽管

在高于阴离子脂质的 pK_a 的pH值下带负电,可电离的阴离子脂质通常将稳定LNP中的其它脂质并允许形成双层囊泡,但在pH朝向 pK_a 减小时,例如在细胞的酸性内体环境中,其促进这些囊泡融合。适合的可电离的阴离子脂质包括半琥珀酸胆固醇酯 (CHEMS)、磷脂酰丝氨酸、棕榈酰高丝氨酸和 α -生育酚半琥珀酸酯。

[0248] 辅助脂质是中性脂质,其有助于形成稳定的脂质体分散体,并且还可增强基于阳离子脂质的递送制剂的有效性。胆固醇 (CHOL) 是用于脂质纳米颗粒制剂中的特别适合的辅助脂质。适合的辅助脂质还包括中性两性离子脂质,例如,1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (DSPC), 1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (DPPC), 1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (DMPC), 或任何相关的磷脂酰胆碱如天然鞘磷脂 (SM) 及其合成衍生物如1-油酰基-2-胆固醇基-半琥珀酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (OChemPC)。其它适合的辅助脂质包括1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DOPE), 1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DLPE), 1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DMPE) 和1,2-二植烷酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DPHyPE)。

[0249] 在一些实施方式中,LNP含有用亲水性聚合物例如聚乙二醇改性的不带电的脂质(本文也称为“PEG-脂质”)。这样的PEG-脂质通常用于帮助纳米颗粒在其制造期间中的组装、稳定脂质纳米颗粒、避免其聚集并防止其与血清蛋白质、调理素和RBC的相互作用。聚乙二醇 (PEG) 的大小可以在约1至约5kDa之间变化。取决于制剂中这些分子的相对量和烃链的长度,PEG-脂质可影响制剂的药代动力学特征、生物分布和功效。具有约14个碳的相对短的脂质烃链的PEG-脂质在体内血浆中从LNP解离,半衰期小于1小时。相比之下,具有约18个碳的相对长的脂质烃链长度的PEG-脂质与制剂完全缔合循环数天。因此,在典型的实施方式中,PEG-脂质包含12至20个碳原子、14至18个碳原子或14个碳原子的脂质烃链。通常,PEG-脂质的浓度为约0.5至10mol%。适合的PEG修饰脂质的实例包括PEG化的神经酰胺缀合物和PEG化的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (PEG-DSPE)。可用于稳定脂质纳米颗粒的其它化合物包括神经节苷脂 (GM₁、GM₃ 等)。优选的PEG-脂质具有约1至约5kDa的PEG大小,优选大小范围为约2至约5kDa。具体实例是甲氧基-聚乙二醇-氨基甲酰基-二肉豆蔻基氧基-丙胺 (PEG2000-C-DMA), α -(3'-(1,2-二肉豆蔻酰基-3-丙酰氧基)-甲酰胺-丙基)- ω -甲氧基-聚氧乙烯 (PEG2000-C-DOMG), N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DMPE-PEG 2,000), 聚乙二醇-二肉豆蔻酰基甘油 (PEG-DMG) 和N-辛酰基-鞘氨醇-1-{琥珀酰基[甲氧基(聚乙二醇)2000]} (C8 PEG2000神经酰胺)。在其中n为350、500、750、1000 或2000的DMPE-PEG_n的一些变化方式中,PEG-脂质是N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DMPE-PEG 2,000)。在其中n为350、500、750、1000或2000的 DSPE-PEG_n的一些变化方式中,PEG-脂质是N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DSPE-PEG 2,000)。在一些实施方式中,PEG-脂质与特异性结合靶细胞表面上的分子的靶向配体(例如N-乙酰半乳糖胺 (NAG) 糖残基)缀合;这样的PEG-脂质特别可用于配制如本文进一步描述的包含靶向配体的脂质纳米颗粒。包含NAG部分的示例性PEG-脂质是 DSPE-PEG2k-NAG(参见例如下文的实施例19和22)。

[0250] 在某些实施方式中,上文的脂质纳米颗粒包含可电离的阳离子脂质,通常替代任何永久带电的阳离子脂质。可电离的阳离子脂质将具有至少一个可质子化或可去质子化的

基团,通常使得脂质在处于或低于生理pH(例如pH 7.4)的pH下为带正电的,并在第二pH(优选处于或高于生理pH)下为中性。应当理解,随pH变化的质子添加或去除是平衡过程,并且提到带电或中性脂质是指主要种类的性质,而不是要求所有脂质以带电或中性形式存在。在某些实施方式中,可电离的阳离子脂质具有在约4至约11的范围内的可质子化基团的 pK_a 。最优选的是约4至约7的 pK_a ,因为这些脂质在较低pH制剂阶段将是阳离子的,而在pH 7.4附近的生理pH下,颗粒将大部分(尽管不是完全地)是表面中合的。这种 pK_a 的益处之一是至少一些与颗粒外表面缔合的核酸在生理pH下失去其静电相互作用,并通过简单的透析去除;因此大大降低了颗粒对清除的敏感性。根据本发明使用的合适的可电离的阳离子脂质包括例如,双十八烷基二甲基溴化铵(DDAB),1,2-二亚油基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDMA),2,2-二亚油基-4-(2二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA),4-(二甲基氨基)丁酸三十七-6,9,28,31-四烯-19-基酯(DLin-MC3-DMA),1,2-二油酰基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DODAP),1,2-二油基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DODMA),吗啉基胆固醇(Mo-CHOL),类脂质(lipidoid)如C12-200(参见Love等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 107:1864-9,2010),脂肽型化合物如cKK-E12(Dong等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 111:3955-60,2014),和脂质如AIC-0217和AIC-0218(Acuitas Therapeutics,Vancouver, BC)。其它合适的可电离的阳离子脂质可以例如衍生自本文之前所述的阳离子脂质结构。

[0251] 在一些实施方式中,脂质纳米颗粒组合物含有作为脂质和递送增强组分的总量的约0.5%至约70%(摩尔%)的一种或多种阳离子脂质,包括任何聚合物(例如PEG)组分,但不包括多核苷酸(例如,RNA)组分。在更特别的变化方式中,脂质纳米颗粒组合物含有约10%至约55%的一种或多种阳离子脂质、约15%至约35%的一种或多种阳离子脂质、或约35%至约55%的一种或多种阳离子脂质。

[0252] 在某些实施方式中,脂质纳米颗粒组合物含有一种或多种非阳离子脂质,其中非阳离子脂质是脂质和递送增强组分的总量(其包括任何聚合物(例如PEG)组分,但不包括多核苷酸(例如,RNA)组分)的约2%至约95%(摩尔%)。在一些实施方式中,脂质纳米颗粒组合物含有约20%至约75%、或约45%至约75%、或约45%至约55%的一种或多种非阳离子脂质。在其它变化方式中,脂质纳米颗粒组合物含有约10%至约50%的一种或多种非阳离子脂质。

[0253] 在一些实施方式中,脂质纳米颗粒组合物含有一种或多种聚合物脂质(例如,PEG-脂质),其中该聚合物脂质是脂质和递送增强成分的总量(包括任何聚合物(例如PEG)组分,但不包括多核苷酸(例如,RNA)组分)的约0.2%至约20%(摩尔%)。在一些实施方式中,脂质纳米颗粒组合物含有约0.5%至约10%的一种或多种聚合物脂质、或组合物的约1%至约5%的一种或多种聚合物脂质。

[0254] 包含小分子试剂的脂质纳米颗粒制剂也是已知的。参见例如, Gubernator, Expert Opinion on Drug Delivery 8:565-80,2011。例如,可以使用被动或主动加载方法将小分子包封在例如 DSPC:CHOL:DSPE-PEG(50:45:5摩尔%)脂质体中。基本上,对于被动加载方法,将脂质溶解在有机溶剂中,然后蒸发溶剂以形成薄脂质膜,其用含有待包封的亲水性或疏水性药物的水溶液进行水化。然后通常通过涡旋将脂质体混合物均质化并通过聚碳酸酯膜挤出以降低粒度(例如降低至~100nm)。使用透析或柱过滤可以除去未包封的药物。

[0255] 可电离的小分子可以被主动捕获到脂质体中(远程加载方法)。通常,在该特定情况下,药物在预先形成的脂质体内质子化或沉淀,由此保持被捕获在脂质体核心中。通常,使用在脂质体内部区室和外部区室之间具有1至3个pH单位差异的pH梯度(乙酸盐、柠檬酸盐或硫酸铵)以包封可电离的小分子。金属梯度(Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 或 Mg^{2+} 梯度)也可用于将药物主动加载到脂质体中。也可以使用离子载体如 A23187以使用 K^+ 、 Mn^{2+} 或 Mg^{2+} 在脂质体中产生pH梯度。EDTA梯度法也可用于将小分子主动捕获到脂质体内。在远程加载方法中,脂质体通常通过简单的脂质-膜水合技术形成(例如,上文对于被动捕获方法所描述的,区别在于水合缓冲液含有生成跨脂质双层的梯度所需要的溶质)。通常通过透析或柱过滤除去未包封的溶质。在形成脂质体和建立跨脂质体双层的梯度之后,未质子化的药物加入到脂质体外部的加载缓冲液中,并且可以穿过脂质双层而在脂质体内变为质子化的,然后通过脂质体的内部水性区室中存在的阴离子而变得稳定。悬浮液可能需要在脂质体脂质的相转变温度以上孵育以加速药物加载。可以通过透析或通过离子交换色谱法去除未包封的游离药物。

[0256] 用于蛋白质或肽治疗剂的脂质纳米颗粒制剂也是公知的。在一些实施方式中,通过脂质膜水合法将蛋白质性试剂合并入脂质体中。例如,蛋白质可以被合并入由例如磷脂酰胆碱(EPC)、胆固醇、胆固醇-3-硫酸钠和二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-N-PEG 2000 (DSPE-PEG [2000])组成的聚乙二醇化脂质体中。这样的制剂方法显示出实质性增加合并到脂质体中的tPA的药代动力学。参见Kim等, *Biomaterials* 30:5751-5756, 2009。

[0257] 在一些实施方式中,脂质纳米颗粒组合物包含阳离子脂质、阴离子脂质、辅助脂质和PEG-脂质。这样的LNP脂质组分的混合物可以由式 $[\text{阳离子脂质}]_w : [\text{阴离子脂质}]_x : [\text{辅助脂质}]_y : [\text{PEG-脂质}]_z$ 表示,其中下标w、x、y和z代表混合物(不包括LNP的治疗剂或诊断剂组分(例如,多核苷酸))中每种脂质组分的摩尔%。该式或者可以表示为 $[\text{阳离子脂质}] : [\text{阴离子脂质}] : [\text{辅助脂质}] : [\text{PEG-脂质}]$ (w:x:y:z),其中w、x、y和z分别表示阳离子脂质、阴离子脂质、辅助脂质和PEG-脂质的摩尔%。在各种实施方式中,阳离子脂质、阴离子脂质、辅助脂质和PEG-脂质中的每一种均选自本文公开的示例性脂质。在一些实施方式中,w为约10至约70、约30至约60或约35至约55; x为0至约60、0至约50、约10至约50或约20至约45; y为约5至约40、约5至约30或约5至约20;且z为约1至约20、约2至约20或约5至约15。例如,具有以约50摩尔%存在的阳离子脂质 DOTAP、以约32摩尔%存在的阴离子脂质CHEMS、以约8摩尔%存在的辅助脂质CHOL和以约10摩尔%存在的PEG-脂质DMPE-PEG2k的脂质混合物可以表示为 $\text{DOTAP}_{50} : \text{CHEMS}_{32} : \text{CHOL}_8 : \text{DMPE-PEG2k}_{10}$ 或表示为DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2k (50:32:8:10)。

[0258] 在特别的实施方式中,根据本发明使用的脂质纳米颗粒包含脂质组分的混合物,其包含(i)约30摩尔%至约60摩尔%的阳离子脂质;(ii)0摩尔%至约50摩尔%的阴离子脂质;(iii)约1摩尔%至约50摩尔%的辅助脂质;和(iv)约1摩尔%至约20摩尔%的PEG-脂质。通常,阳离子脂质是在生理pH下永久带电的阳离子脂质(例如DOTAP)。如果存在,则阴离子脂质通常是可电离的阴离子脂质,例如CHEMS。用于这样的实施方式的特别适合的辅助脂质是胆固醇(CHOL),且特别适合的PEG-脂质包括DSPE-PEG2k和DMPE-PEG2k。阳离子脂质相对于阴离子脂质(如果存在)过量是优选的。在一些变化方式中,(i)阳离子脂质(例如,DOTAP)以约35摩尔%至约55摩尔%、约40摩尔%至约55摩尔%、约45摩尔%至约55摩尔%或约40摩尔%至约50摩尔%存在于脂质混合物中;(ii)阴离子脂质(例如,CHEMS)以0

摩尔%至约45摩尔%、约10摩尔%至约45摩尔%、约20摩尔%至约45摩尔%、约30摩尔%至约45摩尔%或约30摩尔%至约40摩尔%存在于脂质混合物中；(iii) 辅助脂质(例如CHOL)以约5摩尔%至约50摩尔%、约5摩尔%至约40摩尔%、约5摩尔%至约30摩尔%、约5摩尔%至约20摩尔%或约5摩尔%至约10摩尔%存在于脂质混合物中；且(iv) PEG-脂质(例如,DSPE-PEG2k或DMPE-PEG2k)以约1摩尔%至约5摩尔%、约2摩尔%至约20摩尔%、约2摩尔%至约15摩尔%、约2摩尔%至约10摩尔%、约5摩尔%至约20摩尔%、约5摩尔%至约15摩尔%或约5摩尔%至约10摩尔%存在于脂质混合物中。在一些优选的实施方式中,PEG-脂质以大于5的摩尔%(例如,从大于5的摩尔%至约20摩尔%、至约15摩尔%或至约10摩尔%)存在于脂质混合物中；在一些这样的实施方式中,PEG-脂质以至少约6、至少约7、至少约8、至少约9或至少约10的摩尔%存在。在其中不存在阴离子脂质的上文LNP组合物的一些实施方式中,阳离子脂质(例如,DOTAP)以约35摩尔%至约45摩尔%存在于脂质混合物中；辅助脂质(例如,CHOL)以约40摩尔%至约50摩尔%存在于脂质混合物中；并且PEG-脂质(例如,DSPE-PEG2k或DMPE-PEG2k)以约5摩尔%至约15摩尔%存在于脂质混合物中；在一些这样的实施方式中,[阳离子脂质]:[辅助脂质]:[PEG-脂质]的摩尔比约为约40:50:10。在其中存在阴离子脂质的上文LNP组合物的其它实施方式中,阳离子脂质(例如,DOTAP)以约40摩尔%至约55摩尔%存在于脂质混合物中；阴离子脂质(例如CHEMS)以约25摩尔%至约40摩尔%存在于脂质混合物中；辅助脂质(例如,CHOL)以约5摩尔%至约20摩尔%存在于脂质混合物中；且PEG-脂质(例如,DSPE-PEG2k或DMPE-PEG2k)以约2摩尔%至约15摩尔%、约2摩尔%至约10摩尔%或约5摩尔%至约15摩尔%存在于脂质混合物中；在一些这样的实施方式中,[阳离子脂质]:[阴离子脂质]:[辅助脂质]:[PEG-脂质]的摩尔比为约50:32:16:2或约50:32:8:10。在更特别的变化方式中,LNP组合物包含选自以下的脂质组分(括号中为指定组分的摩尔比)的混合物:(a) DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2k (50:32:16:2)；(b) DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k (50:32:8:10)；(c) DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2k (50:32:8:10)；和(d) DOTAP:CHOL:DSPE-PEG2k (40:50:10)。上文所述的脂质组分的混合物特别适用于包含多核苷酸例如mRNA的脂质纳米颗粒组合物。包含高PEG-脂质含量(例如,大于5的摩尔%,例如约10%)的LNP代表用于多核苷酸(例如,mRNA)递送的一些优选实施方式,并且如本文所述研究所示,在将多核苷酸体内递送至细胞的方法中,较高的PEG-脂质含量是特别有效的。参见例如实施例20。

[0259] 在一些实施方式中,脂质纳米颗粒的尺寸小于约200nm。例如,脂质纳米颗粒的尺寸可以为约30nm至约150nm。在某些变化方式中,脂质纳米颗粒的尺寸(例如约30nm至约150nm之间)通过增强的渗透和保留作用促进向肝脏的递送。脂质纳米颗粒可以还包含将颗粒靶向到期望组织的靶向配体。脂质纳米颗粒可以具有正或负的 ζ 电位；在一些变化方式中,脂质纳米颗粒的 ζ 电位是基本上中性的。

[0260] 根据本发明,膜去稳定化聚合物或者与含有治疗剂或诊断剂的脂质纳米颗粒共同配制以共注射到受试者中,或者分别配制以单独注射(例如,顺序注射)LNP和膜去稳定化聚合物。通常,对于共注射变化方式,脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物最初被配制为单独的组合物,然后在施用前混合成单一组合物(通常在施用前1小时内,更通常在施用前30分钟内,且优选在施用前15分钟内或5分钟内)。膜去稳定化聚合物引起细胞膜结构(例如内体膜)的渗透性变化,以允许大分子或生物分子或小分子进入细胞或离开细胞囊泡(例如内体

或溶酶体)。各种各样的膜去稳定化聚合物是本领域公知的,并且可以根据本文所述的本发明方法使用。已知类型的膜去稳定化聚合物包括,例如,共聚物如两亲性共聚物、聚阳离子或两亲性肽、膜活性毒素和病毒融合肽。特别适合的膜去稳定化聚合物的某些类型描述在例如PCT国际申请公布号W02009/140427和W02009/140429中,其各自通过引用整体并入本文。

[0261] 在一些实施方式中,膜去稳定化聚合物是或包含膜去稳定化肽。在特别的变化方式中,膜去稳定化肽选自

[0262] GALA(例如,WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA (SEQ ID NO:15));

[0263] 截短的GALA(例如,CAEALAEALAEALAEALA (SEQ ID NO: 16));

[0264] 蜂毒肽(例如,GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ (SEQ ID NO:17) 或 CGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ (SEQ ID NO: 18));

[0265] HPH-1(例如,FIIDIIAFLLMGGFIVYVKNL (SEQ ID NO:19) 或 CAAFIIDIIAFLLMGGFIVYVKNL (SEQ ID NO:20));

[0266] sHGP(例如,CARGWEVLKYWWNLLQY (SEQ ID NO:21));

[0267] bPrPp(例如,MVKSIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKP (SEQ ID NO:22));

[0268] MAP(例如,KLALKLALKALKAALKLA (SEQ ID NO:23));

[0269] PTD4(例如,YARAAARQARA (SEQ ID NO:24));

[0270] Maurocalcine(例如,GDCLPHLKLCKENKCCSKKCKRRGTNIE (SEQ ID NO:25));

[0271] SynB3(例如,RRLSYSRRRF (SEQ ID NO:26));

[0272] SynB1(例如,RGRLSYSRRRFSTSTGR (SEQ ID NO:27));

[0273] YTA4(例如,IAWVKAFIRKLKGPLG (SEQ ID NO:28));

[0274] YTA2(例如,YTAIAWVKAFIRKLK (SEQ ID NO:29));

[0275] CADY(例如,GLWRALWRLRLSLWRLWRA (SEQ ID NO: 30));

[0276] Pep-3(例如,KWFETWFTEWPKKRK (SEQ ID NO:31));

[0277] Pep-1(例如,KETWWETWWTEWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 32));

[0278] PepFect(例如,AGYLLGK (eNHa) INLKALAALAKKIL (SEQ ID NO:33));

[0279] PepFect-3(例如,AGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 34));

[0280] Penetratin(例如,RQIKIWFQNRMRKWK (SEQ ID NO:35));

[0281] KALA(例如,WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALAKACEA (SEQ ID NO:36));

[0282] pVEC(例如,LLIILRRRIRKQAHASK (SEQ ID NO:37));

[0283] RVG(例如,YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG (SEQ ID NO:38));

[0284] MPS(例如,AAVALLPAVLLALLAK (SEQ ID NO:39));

[0285] Transportan(例如,GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO:40));

[0286] TAT(例如,GRKKRRQRRPPQ (SEQ ID NO:41));

[0287] BMV Gag-(7-25)(例如,KMTRAQRRAAARRNRRTAR (SEQ ID NO:42));

[0288] hCT(18-32)-k7(例如,KKRKAPKKRKA-KFHTFPQTAIGVGAP (SEQ ID NO:43));

[0289] M1073(例如,MVTVLFRRLRIRRASGPPRRV (SEQ ID NO: 44));

[0290] EB1(例如,LIRLWSHLIHIWFQNRRLKWK (SEQ ID NO: 45));和

[0291] MPG- β (例如,GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV (SEQ ID NO:46) 或

GALFLAFLAAALSLMGLWSQPKKRKY (SEQ ID NO:47))。

[0292] 膜去稳定化聚合物可以是在期望pH下具有膜去稳定化活性的 pH敏感性聚合物。在一些实施方式中,本文提供的膜去稳定化聚合物(例如共聚物,例如嵌段共聚物)在内体pH下是膜去稳定化的(例如在水性介质中)。在一些实施方式中,膜去稳定化聚合物在约6.5或更低的pH下,优选在约5.0至约6.5范围的pH下,或在约6.2或更低的pH下,优选在约5.0至约6.2范围的pH下,或在约6.0或更低的pH下,优选在约5.0至约6.0范围的pH下是膜去稳定化的(例如在水性介质中)。

[0293] 通常,在每种情况下,膜去稳定化聚合物可以在聚合物的期望量(例如浓度)下具有膜去稳定化活性。聚合物的膜去稳定特性可以通过本领域已知的适合试验确定。例如,聚合物的膜去稳定化活性可以在体外细胞试验如红细胞溶血试验或脂质体渗漏试验中确定。可以在体外细胞试验中测定内体裂解性聚合物活性。

[0294] 通常,膜去稳定化聚合物由具有特定性质的单体残基组成。例如,聚合物可以具有作为伯、仲、叔或季胺的胺,并且其驱动聚合物与膜的相互作用。这些胺可以是永久带电的或具有4至14的 pK_a 。特别地,这些 pK_a 可以在4.5和7.5之间,以使它们可以在内体中经历酸碱反应。聚合物也可以具有疏水基团以进一步增强与膜的相互作用。聚合物还可以具有羧基官能团,其 pK_a 在4.0至7.5的范围内。

[0295] 在某些实施方式中,膜去稳定化聚合物包含选自阴离子、阳离子、疏水性和亲水性单体残基的一种或多种单体种类。阴离子单体残基包括使阴离子带电或可使阴离子带电的种类,其包括可质子化的阴离子种类。阴离子单体残基在7.2-7.4的大约中性的pH下可以是阴离子性的。阳离子单体残基包括使阳离子带电或可使阳离子带电的种类,其包括可去质子化的阳离子种类。阳离子单体残基在7.2-7.4的大约中性的pH下可以是阳离子性的。疏水性单体残基包括疏水性种类。亲水性单体残基包括亲水性种类。

[0296] 在一些变化方式中,膜去稳定化聚合物是或包含至少一个疏水性的聚合物链。在一些这样的实施方式中,聚合物是或包含至少一个含有多个阴离子单体残基的聚合物链。在这方面,例如,聚合物可以是或包含至少一个聚合物链,所述聚合物链包含(i)具有疏水性种类的多个疏水性单体残基,和(ii)优选在大约中性的pH下为阴离子性的,且在内体pH或弱酸性pH下为基本上中性或不带电的多个阴离子单体残基。

[0297] 在这样的上述实施方式中,聚合物可以还包括多个阳离子种类。因此,例如,聚合物可以是或包含至少一个聚合物链,所述聚合物链包含多个阴离子单体残基(例如,具有在约中性pH下为阴离子性的种类)和多个疏水性单体残基(例如,具有疏水性种类),和任选的多个阳离子单体残基(例如,具有在约中性pH下为阳离子性的种类)。在这样的实施方式中,并且如下文进一步讨论的,聚合物可以是或包含至少一个聚合物链,所述聚合物链是电荷调节的,并且是优选电荷平衡的——是基本上电荷总体中性的。

[0298] 在一些实施方式中,膜去稳定化聚合物是包含膜去稳定化区段(例如,作为聚合物的嵌段或区域)的嵌段共聚物。膜去稳定化区段可以包含多个阴离子单体残基(例如,具有在约中性pH下为阴离子性的种类)和多个疏水性单体残基(例如,具有疏水性种类),和任选的多个阳离子单体残基(例如,具有在约中性pH下为阳离子性的种类)。在这样的实施方式中,区段(例如,嵌段或区域)可以总体看作是疏水性的。在这样的实施方式中,嵌段共聚物可以还包含亲水性区段。

[0299] 在包含膜去稳定化嵌段的嵌段共聚物的一些实施方式中,嵌段共聚物包含限定共聚物的第一嵌段A的第一聚合物链和限定共聚物的第二嵌段B的第二膜去稳定化聚合物链。例如,嵌段共聚物可以包含限定共聚物的第一嵌段A的第一聚合物链,其是亲水性的,和限定共聚物的第二嵌段B的第二聚合物链,其包含 (i) 多个疏水性单体残基和 (ii) 多个阴离子单体残基,其在血清生理pH下为阴离子性的且在体内pH下为基本上中性或不带电的。

[0300] 在一些实施方式中,膜去稳定化聚合物是或包含至少一个聚合物链,该聚合物链包含比率适于增强膜去稳定化或聚合物链的膜去稳定化活性的多个阴离子单体残基、多个疏水性单体残基和任选的多个阳离子单体残基。例如但不限于,在这样的实施方式中,在pH 7.4下,疏水性:(阴离子+阳离子)种类的比率范围为约1:2至约3:1,且阴离子:阳离子种类的比率范围为约1:0至约1:5。在其它这样的实施方式中,在pH 7.4下,疏水性:(阴离子+阳离子)种类的比率范围为约 1:1至约2:1,且阴离子:阳离子种类的比率范围为约4:1至约1:5。

[0301] 在一些实施方式中,膜去稳定化聚合物是或包含至少一个聚合物链,其包括比率适应于增强膜去稳定化或聚合物链的膜去稳定化活性的多个阳离子单体残基、多个疏水性单体残基和任选的多个阴离子单体残基。例如但不限于,在这样的实施方式中,在pH 7.4下,疏水性:(阳离子+阴离子)种类的比率范围为约1:2至约3:1,且阳离子:阴离子种类的比率范围为约1:0至约1:20。在其它这样的实施方式中,在 pH 7.4下,疏水性:(阳离子+阴离子)种类的比率范围为约1:1至约 2:1,且阴离子:阳离子种类的比率范围为约1:0至约1:5。

[0302] 在一些实施方式中,膜去稳定化聚合物是或包含至少一个聚合物链,其包含比率适应于增强膜去稳定化或聚合物链的膜去稳定化活性的多个阳离子单体残基和任选的多个疏水单体残基。例如但不限于,在这样的实施方式中,在pH 7.4下,疏水性:阳离子种类的比率范围为约0:1至约5:1。在其它这样的实施方式中,在pH 7.4下,疏水性:阳离子种类的比率范围为约0:1至约2:1。

[0303] 通常,膜去稳定化聚合物可以是或包含至少一个电荷调节的聚合物链,例如包括疏水性单体残基以及阴离子单体残基和阳离子单体残基二者。可以控制阴离子单体残基和阳离子单体残基的相对比率以达到期望的总体电荷特性。在典型实施方式中,例如,这样的聚合物或聚合物链可以是电荷平衡的——在水性介质中在生理pH(例如pH 7.2 至7.4)下具有基本上中性的总体电荷。

[0304] 包含嵌段共聚物的实施方式(其中至少一个嵌段是或包含膜去稳定化聚合物,例如疏水性膜去稳定化聚合物)可以包含一个或多个另外的聚合物链作为嵌段共聚物的另外的嵌段。通常,这样的另外的聚合物嵌段不是严密确定的,并且可以是或包含作为亲水性、疏水性、两亲性的聚合物链,且在每种情况下,所述聚合物链在总体电荷特性上是中性的、阴离子性的或阳离子性的。

[0305] 在一些实施方式中,膜去稳定化聚合物是或包含适应于促进一种或多种另外的组成成分和/或功能特征的聚合物链。例如,这样的聚合物链可以包含适于直接或间接共价连接到靶向配体(亲和试剂)或屏蔽试剂的末端官能基(例如,在聚合物链的 α 末端或 ω 末端上)。另外或替代地,这样的聚合物链可以包含具有适合与试剂缀合的侧官能团的一个或多个单体残基。这样的可缀合单体残基可以用于直接或间接地共价连接到亲和试剂、屏蔽试

剂或其它生物分子试剂。另外或替代地,这样的聚合物链可以包含具有屏蔽种类的一个或多个单体残基。例如,屏蔽单体残基可以直接衍生自包括包含屏蔽部分的可聚合单体的聚合反应。屏蔽试剂包括聚乙二醇单体和/或聚合物。另外或替代地,这样的聚合物链可以包含具有适用于聚合物链之间的交联的两个或更多个侧官能团的一个或多个单体残基。这样的交联单体残基可以是交联聚合物或聚合物链的组成部分,如直接衍生自包括包含多官能(例如双官能)交联单体的一种或多种可聚合单体的聚合反应。

[0306] 通常,嵌段共聚物的一个或多个嵌段可以是包含两种或更多种组成上不同的单体残基的无规共聚物嵌段。

[0307] 通常,单个单体残基可以包括具有不同官能度的多个部分,例如可以包含疏水性种类以及阴离子种类,可以包含疏水性种类以及阳离子种类,或者可以包含阴离子种类以及阳离子种类。因此,在任一实施方式中,聚合物可以是或可以包含含有单体残基例如阴离子疏水性单体残基(包括疏水性种类和阴离子种类(例如,在约中性pH下为阴离子的种类))的聚合物。

[0308] 在典型的变化方式中,阴离子单体残基包含可质子化的阴离子种类。总体上考虑,当并入聚合物链中时,这样的阴离子单体残基在pH 7.0或大于7.0时可以是基本上阴离子性的,并且在pH 6.0或小于6.0时可以是基本上中性的(不带电的)。优选地,这样的阴离子单体残基的 pK_a 范围为约4至约6.8(例如约4至约6、约4至约5、约5至约6、约5至约6.8、或约5.5至6.8)。阴离子单体残基可以独立地包含具有选自以下的可质子化阴离子种类的多个单体残基:羧酸、磺酰胺、硼酸、磺酸、亚磺酸、硫酸、磷酸、次膦酸和亚磷酸基团,及其组合。特别适合的阴离子单体残基可以衍生自(C₂-C₈)烷基丙烯酸聚合。

[0309] 通常,疏水性单体残基可以带电或不带电。一些实施方式包括中性(不带电)疏水性单体残基。在一些实施方式中,聚合物链可以独立地包含具有选自以下的疏水性种类的多个单体残基:(C₁-C₁₈)烷基(例如(C₂-C₈)烷基)、(C₁-C₁₈)烯基(例如(C₂-C₈)烯基)、(C₁-C₁₈)炔基(例如,(C₂-C₈)炔基)、芳基、杂芳基和胆固醇(各自可以任选地被取代)。在某些实施方式中,多个单体残基可以衍生自乙基丙烯酸(C₁-C₁₈)烷基酯(例如,乙基丙烯酸(C₂-C₈)烷基酯)、甲基丙烯酸(C₁-C₁₈)烷基酯(例如,甲基丙烯酸(C₂-C₈)烷基酯)或丙烯酸(C₁-C₁₈)烷基酯(例如丙烯酸(C₂-C₈)烷基酯)(其各自可以任选地被取代)的聚合。

[0310] 阳离子单体残基可优选包含可去质子化的阳离子种类。总体上考虑,当并入聚合物链中时,这样的阳离子单体残基在pH 7.0或大于7.0时可以是基本上阳离子性的。优选地,这样的阳离子单体残基的 pK_a 范围为约5.5至约9.0(例如约6.5至约9.0)。阳离子单体残基可以独立地包含多个具有选自无环胺、无环亚胺、环胺、环亚胺和含氮杂芳基的可去质子化的阳离子种类的单体残基。优选的阳离子单体残基可以衍生自(在各个情况下任选地被取代的)乙基丙烯酸(N,N-二(C₁-C₆)烷基-氨基(C₁-C₆)烷基酯、甲基丙烯酸N,N-二(C₁-C₆)烷基-氨基(C₁-C₆)烷基酯或丙烯酸N,N-二(C₁-C₆)烷基-氨基(C₁-C₆)烷基酯)的聚合。

[0311] 在一些实施方式中,pH敏感性膜去稳定化聚合物包含无规共聚物链,例如包含上文所述的两种或更多种单体残基种类的无规共聚物链。例如,在特别的变化方式中,无规共聚物链具有衍生自丙基丙烯酸、甲基丙烯酸N,N-二甲基氨基乙酯和甲基丙烯酸丁酯的聚合的单体残基。在特别的实施方式中,pH敏感性聚合物是包含作为膜去稳定化聚合物嵌段的无规共聚物链,并且还包含一个或多个另外的嵌段(例如亲水性嵌段)的嵌段共聚物。例

如,在一些实施方式中,聚合物是包含膜去稳定化无规共聚物嵌段和第二嵌段的二嵌段共聚物,其可由图示 $[A]_v - [B]_w$ 表示,其中[B]代表膜去稳定化嵌段,[A]代表第二嵌段(例如,亲水性嵌段或两亲性嵌段),且字母v和w代表共聚物中相应嵌段的分子量(数均)。在包含膜去稳定化聚合物嵌段和亲水性嵌段的嵌段共聚物的某些变化方式中,亲水性嵌段衍生自亲水性单体和疏水性单体二者的聚合,使得在亲水性嵌段中具有比疏水性单体残基更多的亲水性单体残基。

[0312] 在一些变化方式中,pH敏感性膜去稳定化聚合物是具有亲水性无规共聚物嵌段和疏水性无规共聚物嵌段的二嵌段共聚物,其中(i)亲水性嵌段是包含亲水性单体残基和疏水性单体残基二者的两亲性嵌段,其中亲水性嵌段中的亲水性单体残基的数量大于疏水性单体残基的数量,(ii)疏水性嵌段是包含疏水性单体残基和亲水性单体残基二者,并在约7.4的pH下具有总体疏水特性的两亲性膜去稳定化嵌段,和(iii)亲水性和疏水性嵌段的亲水性单体残基各自独立地选自在约7.4的pH下为离子性的单体残基、在约7.4的pH下为中性的单体残基和在约7.4的pH下为两性离子性的单体残基。在一些这样的实施方式中,用于制备二嵌段共聚物的单体包括丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺和/或甲基丙烯酰胺。在特别的变化方式中,亲水性嵌段包括在约7.4的pH下为中性的亲水性单体残基,和/或疏水性嵌段包含在约7.4的pH下为阳离子性的亲水性单体残基和在约7.4的pH下为阴离子性的亲水性单体残基二者。本文进一步描述了用于上文二嵌段共聚物中的适合的亲水性和疏水性单体残基。在一些实施方式中,上文二嵌段共聚物是本文所述的式I的无规嵌段共聚物。

[0313] 在一些变化方式中,pH敏感性膜去稳定化聚合物是具有亲水性无规共聚物嵌段和疏水性无规共聚物嵌段的二嵌段共聚物,其中(i)亲水嵌段是包含亲水性单体残基和疏水性单体残基二者,并在约7.4的pH下具有总体亲水特性的两亲性嵌段,(ii)疏水性嵌段是包含疏水性单体残基和亲水性单体残基二者,并且在约7.4的pH下具有总体疏水特性的两亲性膜去稳定化嵌段,和(iii)亲水性和疏水性嵌段的亲水性单体残基各自独立地选自在约7.4的pH下为离子性的单体残基、在约7.4的pH下为中性的单体残基和在约7.4的pH下为两性离子性的单体残基。在一些这样的实施方式中,用于制备二嵌段共聚物的单体包括丙烯酸酯类、甲基丙烯酸酯类、丙烯酰胺类和/或甲基丙烯酰胺类。

[0314] 在某些实施方式中,pH敏感性聚合物与膜去稳定化肽共价连接。例如,pH敏感性聚合物可以包括多个侧连接基团,并且多个膜去稳定化肽可以经由多个侧连接基团与pH敏感性聚合物连接。在一些变化方式中,包含在氨基或羧基末端处的半胱氨酸残基的肽通过半胱氨酸硫醇与含有二硫化物部分的单体偶联以形成二硫键。可以连接至聚合物的示例性膜去稳定化肽包括,例如,

[0315] GALA(例如,WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA (SEQ ID NO:15));

[0316] 截短的GALA(例如,CAEALAEALAEALAEALA (SEQ ID NO: 16));

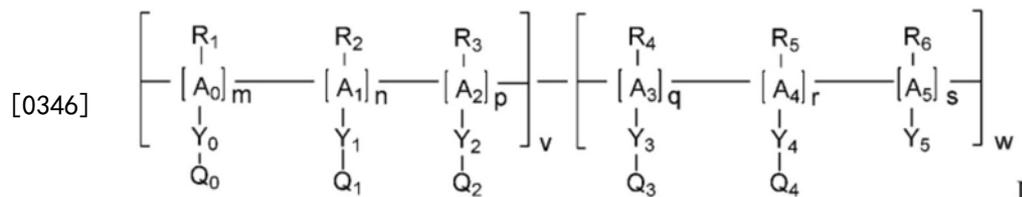
[0317] 蜂毒肽(例如,GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ (SEQ ID NO:17)或CGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ (SEQ ID NO: 18));

[0318] HPH-1(例如,FIIDIIAFLLMGGFIVYVKNL (SEQ ID NO:19)或CAAFIIDIIFLLMGGFIVYVKNL (SEQ ID NO:20));

[0319] sHGP(例如,CARGWEVLKYWNLLQY (SEQ ID NO:21));

[0320] bPrPp(例如,MVKSIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKP (SEQ ID NO:22));

- [0321] MAP (例如, KLALKLALKALKAALKLA (SEQ ID NO:23));
- [0322] PTD4 (例如, YARAAARQARA (SEQ ID NO:24));
- [0323] Maurocalcine (例如, GDCLPHLKLCKENKDCCSKKCKRRGTNIE (SEQ ID NO:25));
- [0324] SynB3 (例如, RRLSYSRRRF (SEQ ID NO:26));
- [0325] SynB1 (例如, RGGRLSYSRRRFSTSTGR (SEQ ID NO:27));
- [0326] YTA4 (例如, IAWVKAFIRKLRKGPLG (SEQ ID NO:28));
- [0327] YTA2 (例如, YTAIAWVKAFIRKLRK (SEQ ID NO:29));
- [0328] CADY (例如, GLWRALWRLLRSLWRLWRA (SEQ ID NO: 30));
- [0329] Pep-3 (例如, KWFETWFTEWPKKRK (SEQ ID NO:31));
- [0330] Pep-1 (例如, KETWWETWWTEWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 32));
- [0331] PepFect (例如, AGYLLGK (eNha) INLKALAALAKKIL (SEQ ID NO:33));
- [0332] PepFect-3 (例如, AGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 34));
- [0333] Penetratin (例如, RQIKIWFQNRMRKWK (SEQ ID NO:35));
- [0334] KALA (例如, WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALAKACEA (SEQ ID NO:36));
- [0335] pVEC (例如, LLIIILRRRIRKQAHASK (SEQ ID NO:37));
- [0336] RVG (例如, YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG (SEQ ID NO:38));
- [0337] MPS (例如, AAVALLPAVLLALLAK (SEQ ID NO:39));
- [0338] Transportan (例如, GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO:40));
- [0339] TAT (例如, GRKKRRQRRPPQ (SEQ ID NO:41));
- [0340] BMV Gag- (7-25) (例如, KMTRAQRRAAARRNRRTAR (SEQ ID NO:42));
- [0341] hCT (18-32) -k7 (例如, KKRKAPKKRKA-KFHTFPQTAIGVGAP (SEQ ID NO:43));
- [0342] M1073 (例如, MVTVLFRRLRIRASGPPRVV (SEQ ID NO: 44));
- [0343] EB1 (例如, LIRLWSHLIHIWFQNRRLKWK (SEQ ID NO: 45));
- [0344] MPG- β (例如, GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV (SEQ ID NO:46) 或 GALFLAFLAAALSLMGLWSQPKKKRKV (SEQ ID NO:47))。
- [0345] 在一些实施方式中, pH敏感性聚合物包括式I的无规嵌段共聚物:



[0347] 其中

- [0348] A_0 、 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 和 A_5 各自独立地选自 $-C-C-$ 、 $-C(O)(C)_aC(O)O-$ 、 $-O(C)_aC(O)-$ 、 $-O(C)_b-$ 和 $-CR_8-CR_9$; 其中未完全被 R_1-R_6 和 Y_0-Y_5 取代的 A_0-A_5 的四价碳原子被适当数量的氢原子补齐; 其中 a 和 b 各自独立地是1-4; 并且其中 R_8 和 R_9 各自独立地选自 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)O$ 烷基和 $-C(O)NR_{10}$, 其中 R_8 和 R_9 任选地共价连接在一起以形成环结构(例如环酐或环状亚胺);
- [0349] Y_5 是氢或选自 $-(1C-10C)$ 烷基、 $-(3C-6C)$ 环烷基、 $-O-(1C-10C)$ 烷基、 $-C(O)O(1C-10C)$ 烷基、 $-C(O)NR_{11}$ (1C-10C)烷基和 $-(6C-10C)$ 芳基, 其任一种任选地被一个或多个氟原子取代;

[0350] Y_0 、 Y_3 和 Y_4 各自独立地选自共价键、-(1C-10C)烷基-、-C(O)O(2C-10C)烷基-、-OC(O)(1C-10C)烷基-、-O(2C-10C)烷基-、-S(2C-10C)烷基-和-C(O)NR₁₂(2C-10C)烷基-；

[0351] Y_1 和 Y_2 各自独立地选自共价键、-(1C-18C)烷基-、-(3C-18C)支链烷基-、-C(O)O(2C-18C)烷基-、-C(O)O(2C-18C)支链烷基-、-OC(O)(1C-18C)烷基-、-OC(O)(1C-18C)支链烷基-、-O(2C-18C)烷基-、-O(2C-18C)支链烷基-、-S(2C-18C)烷基-、-S(2C-18C)支链烷基-、-C(O)NR₁₂(2C-18C)烷基-和-C(O)NR₁₂(2C-18C)支链烷基-，其中 Y_1 或 Y_2 的任何烷基或支链烷基基团任选地被一个或多个氟原子取代；

[0352] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 和 R_{12} 各自独立地是氢、-CN，或选自烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基，其任一种任选地被一个或多个氟原子取代；

[0353] Q_0 是选自以下的残基：在生理pH下为亲水性的残基； $O-[C]_{2-3}-O]_x-R_7$ ；和 $O-[C]_{2-3}-O]_x-C(O)-NR_{13}R_{14}$ ；其中x是1-48； R_7 是-CH₃或-CO₂H；且 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是氢、-CN，或选自烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基，其任一种任选地被一个或多个氟原子取代；

[0354] Q_1 和 Q_2 各自独立地不存在或选自在正常生理pH下为亲水性的残基；可缀合或可官能化的残基；在正常生理pH下为疏水性的残基；任选地被一个或多个氟原子取代的烷基；和任选地被一个或多个氟原子取代的支链烷基；

[0355] Q_3 是在正常生理pH下带正电的残基；

[0356] Q_4 是在正常生理pH下带负电，但在较低pH下经历质子化的残基；

[0357] m是大于0至1.0的摩尔分数；

[0358] n是0至小于1.0的摩尔分数；

[0359] p是0至小于1.0的摩尔分数；其中 $m+n+p=1$ ；

[0360] q是0.1至0.9的摩尔分数；

[0361] r是0.05至0.9的摩尔分数；

[0362] s以至多0.85的摩尔分数存在；其中 $q+r+s=1$ ；

[0363] v为1至25kDa；且

[0364] w为1至50kDa。

[0365] 在上文式I聚合物的某些实施方式中，m大于n+p。在一些这样的变化方式中，p是0。

[0366] 在上文式I聚合物的某些实施方式中，n大于0。其中n大于0的特别适合的式I聚合物包括其中 $R_2-A_1-Y_1-Q_1$ 合起来是具有总体疏水特性的单体残基的聚合物。在一些这样的变化方式中，疏水性单体含有被一个或多个氟原子取代的烷基或支链烷基（例如， Y_1 和 Q_1 中的至少一种含有如式I中针对 Y_1 和 Q_1 规定的烷基或支链烷基；并且其中烷基或支链烷基被一个或多个氟原子取代）。

[0367] 在其中n大于0的式I聚合物的一些变化方式中，p是0。在一些这样的实施方式中，m大于n。例如，m通常大于n，其中 $R_2-A_1-Y_1-Q_1$ 合起来是具有总体疏水特性的单体残基。

[0368] 在式I聚合物的一些具体实施方式中，w:v的比率范围为约1:1 至约5:1，或约1:1 至约2:1。

[0369] 示例性但非限制性的膜去稳定化聚合物可以是或包含是由式1表示的无规共聚物的聚合物链，任选具有一个或多个抗衡离子。

[0370] 在某些实施方式中，式1的第二嵌段的构成单元衍生自可聚合单体甲基丙烯酸N，

N-二甲基氨基乙酯 (DMAEMA)、丙基丙烯酸 (PAA) 和甲基丙烯酸丁酯 (BMA)。

[0371] 在包含式I的pH敏感性聚合物的某些实施方式中,pH敏感性聚合物是式II的聚合物:



[0373] 其中

[0374] PEGMA是具有2-20个乙二醇单元的聚甲基丙烯酸乙二醇酯残基;

[0375] PDSMA是吡啶基二硫化物甲基丙烯酸酯残基;

[0376] BPAM是甲基丙烯酸2-[2-Boc氨基乙氧基]乙酯残基;

[0377] BMA是甲基丙烯酸丁酯残基;

[0378] PAA是丙基丙烯酸残基;

[0379] DMAEMA是甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯残基;

[0380] m是0.6至1的摩尔分数;

[0381] n是0至0.4(例如,0至0.2)的摩尔分数;

[0382] p是0至0.4(例如,0至0.2)的摩尔分数;

[0383] $m+n+p=1$;

[0384] q是0.2至0.75的摩尔分数;

[0385] r是0.05至0.6的摩尔分数;

[0386] s是0.2至0.75的摩尔分数;

[0387] $q+r+s=1$;

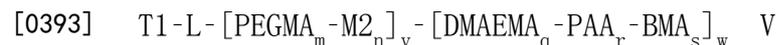
[0388] v为1至25kDa;

[0389] w为1至25kDa;

[0390] T1不存在或为第一靶向配体;且

[0391] L不存在或为连接部分。

[0392] 在包含式I的pH敏感性聚合物的其它实施方式中,pH敏感性聚合物是式V的聚合物:



[0394] 其中

[0395] PEGMA是具有2-20个乙二醇单元的聚甲基丙烯酸乙二醇酯残基;

[0396] M2是选自以下的甲基丙烯酸酯残基

[0397] 甲基丙烯酸(C4-C18)烷基酯残基;

[0398] 甲基丙烯酸(C4-C18)支链烷基酯残基;

[0399] 甲基丙烯酸胆固醇酯残基;

[0400] 被一个或多个氟原子取代的甲基丙烯酸(C4-C18)烷基酯残基;和

[0401] 被一个或多个氟原子取代的甲基丙烯酸(C4-C18)支链烷基酯残基;

[0402] BMA是甲基丙烯酸丁酯残基;

[0403] PAA是丙基丙烯酸残基;

[0404] DMAEMA是甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯残基;

[0405] m和n各自为大于0的摩尔分数,其中m大于n且 $m+n=1$;

[0406] q是0.2至0.75的摩尔分数;

[0407] r是0.05至0.6的摩尔分数；

[0408] s是0.2至0.75的摩尔分数；

[0409] $q+r+s=1$ ；

[0410] v为1至25kDa；

[0411] w为1至25kDa；

[0412] T1不存在或为第一靶向配体；且

[0413] L不存在或为连接部分。

[0414] 用于式V的聚合物中的特别适合的M2甲基丙烯酸酯残基包括甲基丙烯酸2,2,3,3,4,4,4-七氟丁酯残基,甲基丙烯酸3,3,4,4,5,6,6,6-八氟-5(三氟甲基)己酯残基,2-甲基丙烯酸2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十五氟辛酯残基,甲基丙烯酸3,3,4,4,5,5,6,6,6-九氟己酯残基(也称为2-丙烯酸2-甲基-3,3,4,4,5,5,6,6,6-九氟己酯残基),甲基丙烯酸3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十三氟辛酯残基,甲基丙烯酸1,1,1-三氟-2-(三氟甲基)-2-羟基-4-甲基-5-戊酯残基,甲基丙烯酸2-[(1',1',1'-三氟-2'-(三氟甲基)-2'-羟基)丙基]-3-降苈酯残基,甲基丙烯酸2-乙基己酯残基,甲基丙烯酸丁酯残基,甲基丙烯酸己酯残基,甲基丙烯酸辛酯残基,甲基丙烯酸正癸酯残基,甲基丙烯酸月桂酯残基,甲基丙烯酸肉豆蔻酯残基,甲基丙烯酸硬脂酯残基,甲基丙烯酸胆固醇酯残基,乙二醇苯基醚甲基丙烯酸酯残基,2-丙烯酸2-甲基-2-苯乙酯残基,2-丙烯酸2-甲基-2-[(1,1-二甲氧乙氧基)羰基]氨基]乙酯残基,2-丙烯酸2-甲基-2-(1H-咪唑-1-基)乙酯残基,2-丙烯酸2-甲基-环己酯残基,2-丙烯酸2-甲基-2-[双(1-甲基乙基)氨基]乙酯残基,2-丙烯酸2-甲基-3-甲基丁酯残基,甲基丙烯酸新戊酯残基,甲基丙烯酸叔丁酯残基,甲基丙烯酸3,3,5-三甲基环己酯残基,甲基丙烯酸2-羟基丙酯残基,甲基丙烯酸5-壬酯残基,甲基丙烯酸2-丁基-1-辛酯残基,甲基丙烯酸2-己基-1-癸酯残基,和甲基丙烯酸2-(叔丁基氨基)乙酯残基。

[0415] 在式II或式V的pH敏感性聚合物的特别变化方式中,PEGMA具有4-5个乙二醇单元或7-8个乙二醇单元。在一些实施方式中,T1和L存在。T1可以包括例如N-乙酰半乳糖胺(NAG)残基,例如如本文进一步描述之三-NAG部分。L可以是亲水性部分,例如包含一个或多个PEG链的部分。在一些实施方式中,L是包含2至240个乙二醇单元的亲水性部分(例如,具有2-20个乙二醇单元的聚乙二醇(PEG)部分)。

[0416] 在具体实施方式中,式II的pH敏感性聚合物选自

[0417] $\text{NAG-PEG}_{12}-[\text{PEGMA}_{300}\text{-PDSMA}_n]_v-[\text{D}_q\text{-P}_r\text{-B}_s]_w$ IIa

[0418] $\text{NAG-PEG}_{12}-[\text{PEGMA}_{300}\text{-PDSMA}_n\text{-BPAM}_p]_v-[\text{D}_q\text{-P}_r\text{-B}_s]_w$ IIb

[0419] 其中“D”是上文针对式II所定义的DMAEMA,“P”是上文针对式II所定义的PAA,“B”是上文针对式II所定义的BMA,“NAG”是N-乙酰半乳糖胺残基,“PEG₁₂”是具有12个乙二醇单元,并且在每一末端处进行官能化以用于连接到NAG残基和链转移剂的聚乙二醇,“PEGMA”,“PDSMA”和“BPAM”为上文针对式II所定义,且m、n、p、q、r、s、v和w的值为上文针对式II所定义。在式IIa聚合物的特别的变化方式中,m为0.85至0.9、n为0.1至0.15、q为0.33至0.37、r为0.07至0.15、s为0.52至0.57、v为3kDa至4.5kDa和/或w为5.5kDa至7kDa。在式IIb聚合物的特别的变化方式中,m为0.75至0.8、n为0.1至0.13、p为0.1至0.12、q为0.25至0.37、r为0.07至0.25、s为0.5至0.57、v为3kDa至4.5kDa、且w为5.5kDa至7kDa。在一些具体实施方式中,w:v的比率范围为约1:1至约5:1,或约1:1至约2:1。

[0420] 在具体实施方式中,式V的pH敏感性聚合物选自

[0421] $\text{NAG-PEG}_{12}-[\text{PEGMA300}_m-\text{(F1-BMA)}_n]_v-[\text{D}_q-\text{P}_r-\text{B}_s]_w$ Vb

[0422] $\text{NAG-PEG}_{12}-[\text{PEGMA300}_m-\text{(OF1-5TFM-HMA)}_n]_v-[\text{D}_q-\text{P}_r-\text{B}_s]_w$ Vc

[0423] $\text{NAG-PEG}_{12}-[\text{PEGMA300}_m-\text{(F115-OMA)}_n]_v-[\text{D}_q-\text{P}_r-\text{B}_s]_w$ Vd

[0424] $\text{NAG-PEG}_{12}-[\text{PEGMA300}_m-\text{(B-F1-HMA)}_n]_v-[\text{D}_q-\text{P}_r-\text{B}_s]_w$ Ve

[0425] $\text{NAG-PEG}_{12}-[\text{PEGMA300}_m-\text{(B-F1-OMA)}_n]_v-[\text{D}_q-\text{P}_r-\text{B}_s]_w$ Vf

[0426] $\text{NAG-PEG}_{12}-[\text{PEGMA300}_m-\text{EHMA}_n]_v-[\text{D}_q-\text{P}_r-\text{B}_s]_w$ Vg

[0427] $\text{NAG-PEG}_{12}-[\text{PEGMA300}_m-\text{B}_n]_v-[\text{D}_q-\text{P}_r-\text{B}_s]_w$ Vh

[0428] $\text{NAG-PEG}_{12}-[\text{PEGMA300}_m-\text{HMA}_n]_v-[\text{D}_q-\text{P}_r-\text{B}_s]_w$ Vi

[0429] $\text{NAG-PEG}_{12}-[\text{PEGMA300}_m-\text{C8MA}_n]_v-[\text{D}_q-\text{P}_r-\text{B}_s]_w$ Vj

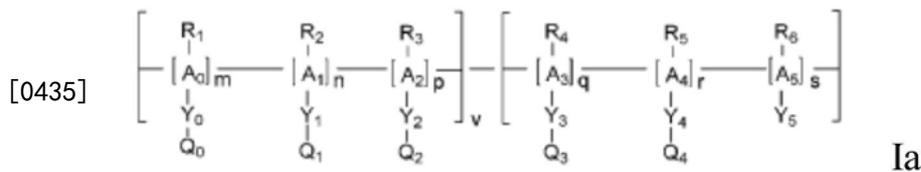
[0430] $\text{NAG-PEG}_{12}-[\text{PEGMA300}_m-\text{C12MA}_n]_v-[\text{D}_q-\text{P}_r-\text{B}_s]_w$ Vkl

[0431] $\text{NAG-PEG}_{12}-[\text{PEGMA300}_m-\text{Bu1-OMA}_n]_v-[\text{D}_q-\text{P}_r-\text{B}_s]_w$ VI

[0432] $\text{NAG-PEG}_{12}-[\text{PEGMA300}_m-\text{NMA}_n]_v-[\text{D}_q-\text{P}_r-\text{B}_s]_w$ Vm

[0433] 其中“D”是上文针对式V所定义的DMAEMA,“P”是上文针对式V所定义的PAA,“B”是上文针对式V所定义的BMA,“NAG”是N-乙酰半乳糖胺残基,“PEG₁₂”是具有12个乙二醇单元,并且在每一末端进行官能化以用于连接到NAG残基和链转移剂的聚乙二醇,“PEGMA”为上文针对式V所定义,“F1-BMA”是甲基丙烯酸 2,2,3,3,4,4,4-七氟丁酯残基,“OF1-5TFM-HMA”是甲基丙烯酸 3,3,4,4,5,6,6,6-八氟-5(三氟甲基)己酯残基,“F115-OMA”是2-甲基丙烯酸2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十五氟辛酯残基,“B-F1-HMA”是甲基丙烯酸3,3,4,4,5,5,6,6,6-九氟己酯残基,“B-F1-OMA”是甲基丙烯酸 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十三氟辛酯残基,“EHMA”是甲基丙烯酸2-乙基己酯残基,“HMA”是甲基丙烯酸己酯残基,“C8MA”是甲基丙烯酸辛酯残基,“C12MA”是甲基丙烯酸月桂酯残基,“2-Bu1-OMA”是甲基丙烯酸2-丁基-1-辛酯残基,“5-NMA”是甲基丙烯酸5-壬酯残基,且m、n、q、r、s、v和w值为上文针对式V所定义。

[0434] 在一些实施方式中,pH敏感性的膜去稳定化聚合物包含式Ia的无规嵌段共聚物:



[0436] 其中

[0437] A₀、A₁、A₂、A₃、A₄和A₅各自独立地选自-C-C-、-C(O)(C)_aC(O)O-、-O(C)_aC(O)-、-O(C)_b-和-CR₈-CR₉;其中未完全被R₁-R₆和Y₀-Y₅取代的A₀-A₅的四价碳原子被适当数量的氢原子补齐;其中a和b各自独立地是1-4;并且其中R₈和R₉各自独立地选自-C(O)OH、-C(O)O烷基和-C(O)NR₁₀,其中R₈和R₉任选地共价连接在一起以形成环结构;

[0438] Y₅是氢或选自-(1C-10C)烷基、-(3C-6C)环烷基、-O-(1C-10C)烷基、-C(O)O(1C-10C)烷基、-C(O)NR₁₁(1C-10C)烷基和-(6C-10C)芳基,其任一种任选地被一个或多个氟原子取代;

[0439] Y₀、Y₃和Y₄各自独立地选自共价键、-(1C-10C)烷基、-C(O)O(2C-10C)烷基、-OC(O)(1C-10C)烷基、-O(2C-10C)烷基、-S(2C-10C)烷基和-C(O)NR₁₂(2C-10C)烷基-;

[0440] Y_1 和 Y_2 各自独立地选自共价键、-(1C-18C)烷基-、-(3C-18C)支链烷基、-C(O)O(2C-18C)烷基-、-C(O)O(2C-18C)支链烷基、-OC(O)(1C-18C)烷基-、-OC(O)(1C-18C)支链烷基-、-O(2C-18C)烷基-、-O(2C-18C)支链烷基-、-S(2C-18C)烷基-、-S(2C-18C)支链烷基-、-C(O)NR₁₂(2C-18C)烷基-和-C(O)NR₁₂(2C-18C)支链烷基-，其中 Y_1 或 Y_2 的任何烷基或支链烷基基团任选地被一个或多个氟原子取代；

[0441] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 和 R_{12} 各自独立地是氢、-CN，或选自烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基，其任一种任选地被一个或多个氟原子取代；

[0442] Q_0 是选自以下的残基：在生理pH下为亲水性的残基； $O-[(C)_{2-3}-O]_x-R_7$ ；和 $O-[(C)_{2-3}-O]_x-C(O)-NR_{13}R_{14}$ ；其中 x 是1-48； R_7 是-CH₃或-CO₂H；且 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是氢、-CN，或选自烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基，其任一种任选地被一个或多个氟原子取代；

[0443] Q_1 和 Q_2 各自独立地不存在或选自在正常生理pH下为亲水性的残基；可缀合或可官能化的残基；在正常生理pH下为疏水性的残基；任选地被一个或多个氟原子取代的烷基；和任选地被一个或多个氟原子取代的支链烷基；

[0444] Q_3 是在正常生理pH下带正电的残基；

[0445] Q_4 是在正常生理pH下带负电，但在较低pH下经历质子化的残基；

[0446] m 是大于0.5至小于1.0的摩尔分数；

[0447] n 是大于0至小于0.5的摩尔分数；

[0448] p 是0至小于0.5的摩尔分数；其中 $m+n+p=1$ ；

[0449] q 是0.1至0.9的摩尔分数；

[0450] r 是0.05至0.9的摩尔分数；

[0451] s 以至多0.85的摩尔分数存在；其中 $q+r+s=1$ ；

[0452] v 为1至25kDa；

[0453] w 为1至50kDa；且

[0454] Y_1 和 Q_1 中的至少一种含有被一个或多个氟原子取代的烷基或支链烷基。

[0455] 在包含上文式Ia共聚物的pH敏感性聚合物的一些实施方式中， p 是0。

[0456] 适合的Ia共聚物包括其中 $R_2-A_1-Y_1-Q_1$ 合起来为选自以下的甲基丙烯酸酯残基的聚合物：甲基丙烯酸2,2,3,3,4,4,4-七氟丁酯残基，甲基丙烯酸3,3,4,4,5,6,6,6-八氟-5-(三氟甲基)己酯残基，2-甲基丙烯酸2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十五氟辛酯残基，甲基丙烯酸3,3,4,4,5,5,6,6,6-九氟己酯残基，甲基丙烯酸3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十三氟辛酯残基，甲基丙烯酸1,1,1-三氟-2-(三氟甲基)-2-羟基-4-甲基-5-戊酯残基，和甲基丙烯酸2-[(1',1',1'-三氟-2'-(三氟甲基)-2'-羟基)丙基]-3-降苈酯残基。

[0457] 在包含上文式Ia共聚物的pH敏感性聚合物的各种实施方式中，(a) Y_3 是-C(O)OCH₂CH₂， Q_3 是二甲基氨基和/或 R_4 是-CH₃；(b) Y_4 是共价键， Q_4 是羧基残基和/或 R_5 是-CH₂CH₂CH₃；(c) Y_5 是-C(O)O(CH₂)₃CH₃和/或 R_6 是-CH₃；和/或(d) Y_0 是-C(O)O(2C-10C)烷基-， Q_0 是 $O-[(C)_{2-3}-O]_x-R_7$ （其中 x 是1-48且 R_7 是-CH₃），和/或 R_1 是-CH₃。例如，在更特别的变化方式中， $R_4-A_3-Y_3-Q_3$ 合起来是甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯残基(DMAEMA)； $R_5-A_4-Y_4-Q_4$ 合起来是丙烯酸残基(PAA)； $R_6-A_5-Y_5$ 合起来是甲基丙烯酸丁酯残基(BMA)；和/或 $R_1-A_0-Y_0-Q_0$ 合起来是具有2-20个乙二醇单元的聚甲基丙烯酸乙二醇酯残基(PEGMA)。

[0458] 在包含上文式Ia共聚物的聚合物的一些实施方式中,pH敏感性聚合物是式Va的聚合物:

[0459] $T1-L-[PEGMA_m-M2_n]_v-[DMAEMA_q-PAA_r-BMA_s]_w$ Va

[0460] 其中

[0461] PEGMA是具有2-20个乙二醇单元的聚甲基丙烯酸乙二醇酯残基;

[0462] M2是选自以下的甲基丙烯酸酯残基

[0463] 被一个或多个氟原子取代的甲基丙烯酸(C4-C18)烷基酯残基,和

[0464] 被一个或多个氟原子取代的甲基丙烯酸(C4-C18)支链烷基酯残基,

[0465] BMA是甲基丙烯酸丁酯残基;

[0466] PAA是丙基丙烯酸残基;

[0467] DMAEMA是甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯残基;

[0468] m和n各自为大于0的摩尔分数,其中m大于n且m+n=1;

[0469] q是0.2至0.75的摩尔分数;

[0470] r是0.05至0.6的摩尔分数;

[0471] s是0.2至0.75的摩尔分数;

[0472] q+r+s=1;

[0473] v为1至25kDa;

[0474] w为1至25kDa;

[0475] T1不存在或为第一靶向配体;且

[0476] L不存在或为连接部分。

[0477] 用于式Va聚合物中的特别适合的M2甲基丙烯酸酯残基包括甲基丙烯酸2,2,3,3,4,4,4-七氟丁酯残基;甲基丙烯酸3,3,4,4,5,6,6,6-八氟-5(三氟甲基)己酯残基;2-甲基丙烯酸2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十五氟辛酯残基;甲基丙烯酸3,3,4,4,5,5,6,6,6-九氟己酯残基;甲基丙烯酸3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十三氟辛酯残基;甲基丙烯酸1,1,1-三氟-2-(三氟甲基)-2-羟基-4-甲基-5-戊酯残基;和甲基丙烯酸2-[(1',1',1'-三氟-2'-(三氟甲基)-2'-羟基)丙基]-3-降苕酯残基。

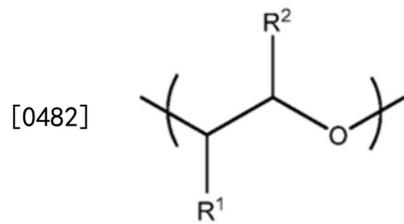
[0478] 在式V、式Va或式Vb-Vm任一的聚合物的特别的变化方式中, m为0.55至0.9(例如,0.65至0.9或0.7至0.85)、n为0.1至0.45(例如,0.1至0.35或0.15至0.3)、q为0.25至0.4(例如,0.28至0.37)、r为0.07至0.15(例如,0.9至0.15)、s为0.5至0.65(例如,0.5至0.6)、v为2.5kDa至10kDa(例如,2.5kDa至7kDa、2.5kDa至5kDa、2.5kDa至4.5kDa或0.29至4kDa)和/或w为4kDa至9kDa(例如,4kDa至7kDa、4kDa至6kDa或5kDa至7kDa)。在一些具体实施方式中,w:v的比率范围为约1:0.8至约5:1,或约1:1至约2:1。

[0479] 通常,膜去稳定化聚合物(或作为构成部分被包含的聚合物链如嵌段共聚物的嵌段)可以包含屏蔽试剂或增溶剂。屏蔽试剂对于提高聚合物链的溶解度是有效的。屏蔽试剂也可有效降低某些组合物的毒性。在一些实施方式中,屏蔽试剂可以是包含多个中性亲水性单体残基的聚合物。屏蔽聚合物可以直接或间接地通过聚合物的端基或通过聚合物的一个或多个单体残基的侧官能团共价偶联到膜去稳定化聚合物。在一些实施方式中,聚合物链的多个单体残基可以具有屏蔽种类;优选地,这样的屏蔽种类是来自可聚合单体(屏蔽单体残基从其衍生)的侧基部分。例如,聚合物可以包含多个具有包含屏蔽低聚物的侧基的单

体残基。屏蔽/增溶种类可以通过不稳定的键,例如pH敏感性键或接头与聚合物缀合。特别适合的pH敏感性键和接头包括脞、缩醛、缩酮、亚胺、原酸酯、碳酸酯和马来酰胺酸键。不稳定键可用于例如经由具有侧连接基团的多个单体残基的连接或用于将包含屏蔽种类的聚合物嵌段连接到另一聚合物嵌段的连接(例如将屏蔽嵌段连接到膜去稳定化嵌段)。

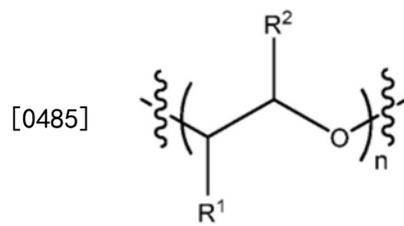
[0480] 优选的屏蔽/增溶聚合物可以是聚乙二醇(PEG)低聚物(例如,具有20个或更少的重复单元)或聚合物(例如,具有多于20个重复单元)。PEG可被描述为聚乙二醇或聚环氧乙烷,并且被理解为是来自 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 重复单元的低聚物或聚合物(该重复单元在本文中也称为“乙二醇单元”或“环氧乙烷单元”)。在某些实施方式中,嵌段共聚物的一个嵌段可以是或包含聚乙二醇(PEG)低聚物或聚合物,例如与共聚物的膜去稳定化嵌段的 α 末端或 ω 末端共价连接的。在另一个实施方式中,聚乙二醇(PEG)低聚物或聚合物可以通过共轭单体残基共价偶联到聚合物上,所述共轭单体残基具有包含适合直接或间接与聚乙二醇低聚物或聚合物连接的官能团的种类。在另一个实施方式中,单体残基可以衍生自可聚合单体,其包括侧接到单体的聚乙二醇低聚物(例如,上文所述的PEGMA)。

[0481] 在一个一般方法中,PEG链或嵌段共价偶联到膜去稳定化聚合物链。对于这样的实施方式,例如,PEG链或嵌段可以具有约1,000至约30,000范围的分子量。在一些实施方式中,PEG有效地作为(即,被并入)嵌段共聚物的第二嵌段中。例如,PEG可以是与包含膜去稳定化聚合物的嵌段共价偶联的第二嵌段。在一些实施方式中,PEG与嵌段共聚物末端基团缀合,或者与聚合化合物中存在的一个或多个可修饰的侧基缀合,例如与聚合物(例如,嵌段共聚物)的亲水性部分或嵌段(例如第二嵌段)内的可修饰基团缀合。作为实例,共聚物的嵌段可以是具有式III重复单元的屏蔽聚合物或可以与之缀合



[0483] 其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自氢、卤素、羟基和任选地被取代的 C_1-C_3 烷基,并且具有约1,500至约15,000的分子量。

[0484] 在另一个一般方法中,单体残基衍生自包含PEG低聚物的可聚合单体;例如,在聚合过程中,可将这样的单体残基并入聚合物中或嵌段共聚物的一个或多个嵌段中。在优选的实施方式中,单体残基可以衍生自具有包含式IV低聚物的侧基的可聚合单体



[0486] 其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自氢、卤素、羟基和任选地被取代的 C_1-C_3 烷基,并且 n 是2至20的整数。

[0487] 通常,可以以任何适合方式制备膜去稳定化聚合物(或作为构成部分被包含的聚合物链如嵌段共聚物的嵌段)。用于产生例如膜去稳定化共聚物的适合合成方法包括(作为

非限制性实例)公知的“活性聚合(living polymerization)”方法,例如阳离子、阴离子和自由基聚合。

[0488] 使用活性聚合,可以获得具有非常低的多分散性或链长差异的聚合物。多分散性通常通过将聚合物链的重均分子量除以其数均分子量而测量。数均分子量是个体链分子量的总和除以链数量。重均分子量与分子量的平方除以具有该分子量的分子的数量成比率。由于重均分子量总是大于数均分子量,所以多分散性总是大于或等于1。随着数字越来越接近于相同,即随着多分散值接近1,聚合物变得更接近于单分散的,其中每个链具有完全相同数量的构成单元。使用自由基活性聚合可以实现接近于1的多分散性值。测定多分散性的方法例如但不限于尺寸排阻色谱、动态光散射、基质辅助激光解吸/电离质谱和电喷雾质谱是本领域公知的。

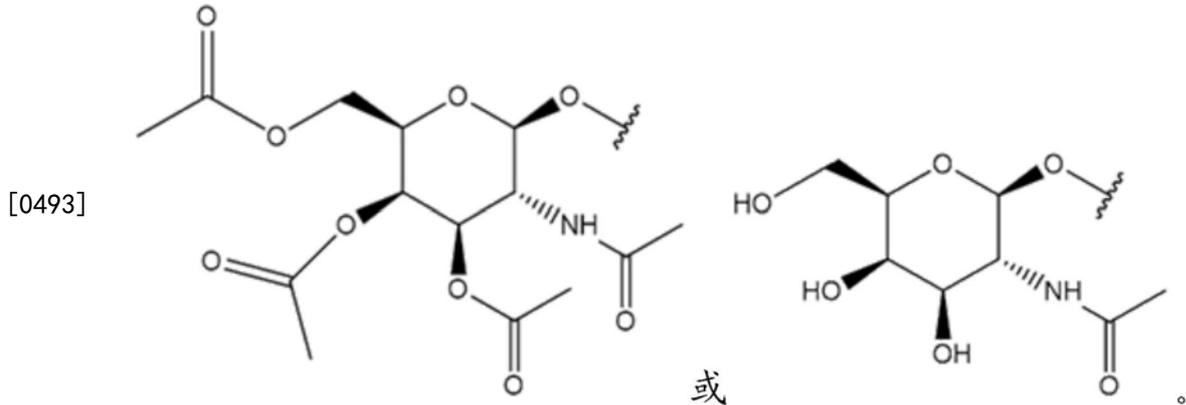
[0489] 可逆加成-断裂链转移或RAFT是用于合成烯属骨架聚合物的示例性活性聚合技术。RAFT是本领域技术人员所熟知的。RAFT包括自由基退化链转移过程。大多数RAFT程序使用硫代羰基硫代化合物例如但不限于二硫酯、二硫代氨基甲酸酯、三硫代碳酸酯和黄原酸酯以通过可逆链转移机理介导聚合。聚合自由基与任何前述化合物的 C=S基团的反应导致形成稳定的自由基中间体。这些稳定的自由基中间体不经历标准自由基聚合特有的终止反应,而是重新引入能够与单体重新引发或扩增的自由基,在该过程中重整C=S键。这个加成到 C=S键及后面接着发生的自由基的断裂的循环连续进行直至所有单体都已被消耗或者反应被淬灭。活性自由基在任何特定时间的低浓度限制正常的终止反应。在其它实施方式中,聚合物通过大分子设计经由黄原酸酯的可逆加成-断裂链转移(MADIX)而合成(Direct Synthesis of Double Hydrophilic Statistical Di-and Triblock Copolymers Comprised of Acrylamide and Acrylic Acid Units via the MADIX Process”,Daniel Taton等,Macromolecular Rapid Communications, 22:1497-1503, 2001)。

[0490] 在本发明的某些实施方式中,脂质纳米颗粒和/或膜去稳定化聚合物包含特异性结合靶细胞表面上的分子的至少一个靶向配体。在一些实施方式中,膜去稳定化聚合物包含靶向配体。在一些实施方式中,脂质纳米颗粒包含靶向配体。在一些实施方式中,膜去稳定化聚合物和脂质纳米颗粒二者均包含靶向配体,其可以相同或不同(例如,结合相同靶细胞的不同靶向配体种类)。

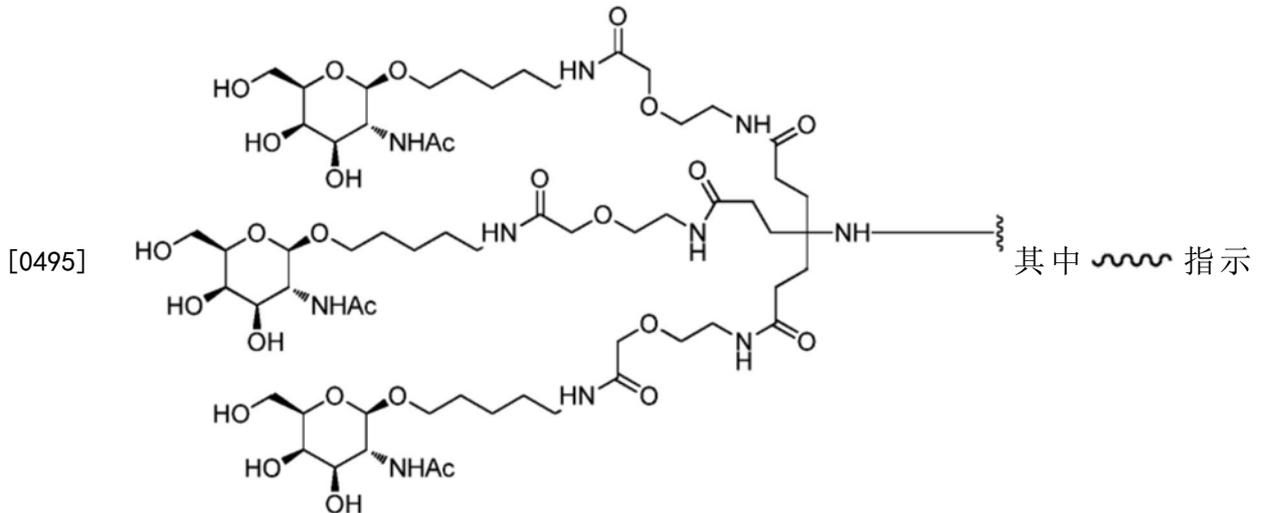
[0491] 靶向配体特异性识别靶细胞表面上的分子,例如细胞表面受体。特别适合的靶向部分包括抗体、抗体样分子、多肽、蛋白质(例如,胰岛素样生长因子II(IGF-II))、肽(例如,整合素结合肽,例如含RGD的肽)以及小分子,例如糖(例如乳糖、半乳糖、N-乙酰半乳糖胺(NAG)、甘露糖、甘露糖-6-磷酸(M6P))或维生素(例如叶酸)。在一些变化方式中,靶向部分是衍生自细胞表面分子的天然配体的蛋白质(例如,衍生自细胞因子或衍生自结合细胞表面反受体的细胞表面受体的胞外结构域)。可由本文提供的共聚物的靶向部分所靶向的细胞表面分子的实例包括但不限于转铁蛋白受体1型和2型、EGF受体、HER2/Neu、VEGF受体、整合素、NGF、CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD22、CD33、CD43、CD38、CD56、CD69、脱唾液酸糖蛋白受体、甘露糖受体、阳离子非依赖性甘露糖-6-磷酸/IGF-II受体、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、叶酸受体和 σ 受体。

[0492] 在特别的变化方式中,靶向配体包括与肝细胞上的脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)

特异性结合的N-乙酰半乳糖胺(NAG)糖残基。在一些这样的实施方式中,靶向配体具有下式



[0494] 在包含NAG糖残基的其它实施方式中,靶向配体包含多个NAG糖残基(例如,三个NAG残基,本文也称为“三-NAG”结构),其可以相对于单价NAG部分增加对唾液酸糖蛋白受体的亲和力。在一些这样的实施方式中,三-NAG结构具有下式



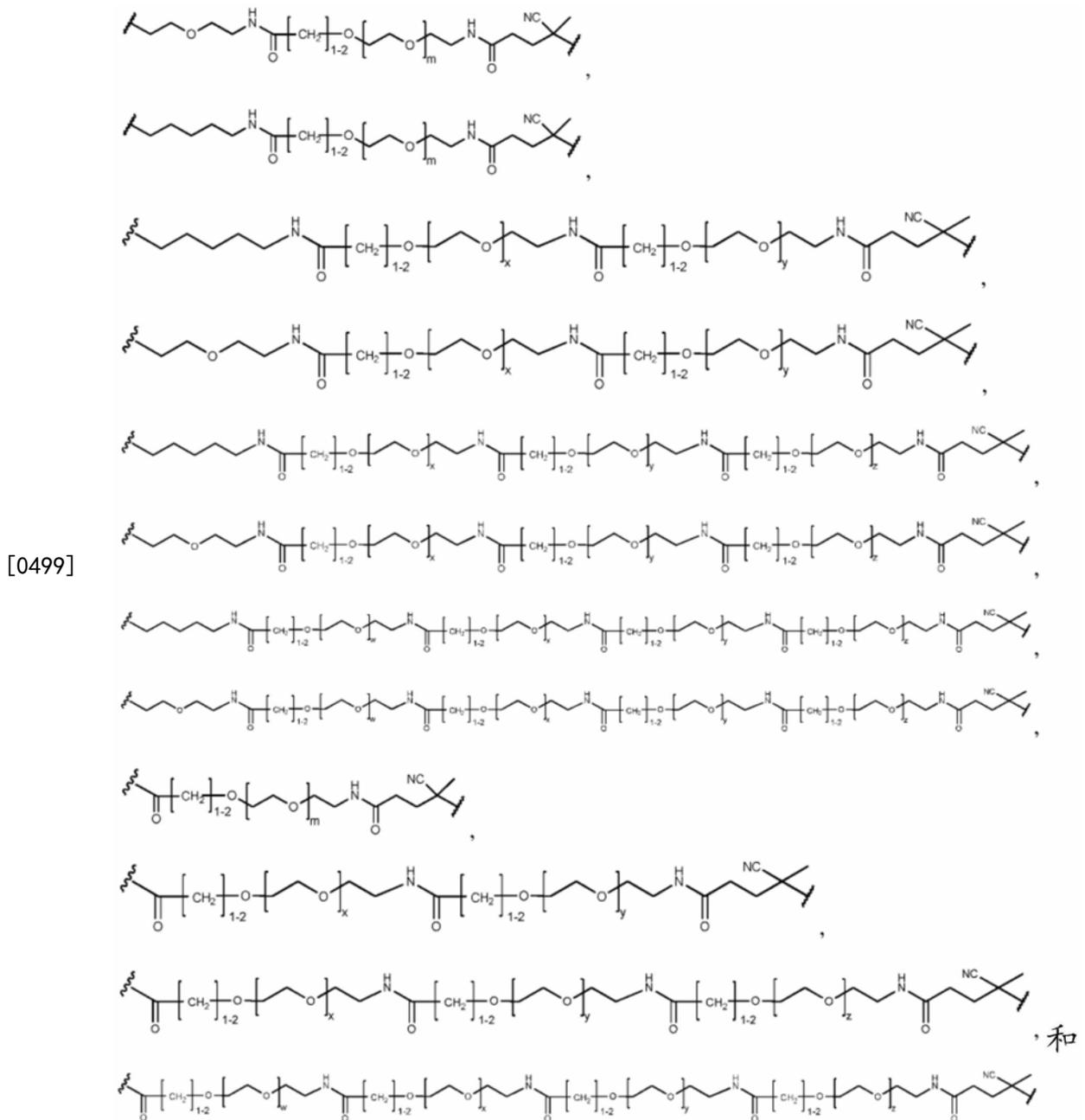
连接点。

[0496] 在各种实施方式中,将靶向配体连接至膜去稳定化聚合物(例如,嵌段共聚物)的任一末端、连接至单体单元的侧链、并入聚合物嵌段中、或连接至脂质纳米颗粒的脂质或聚合物组分。以任何适合的方式实现靶向配体与膜去稳定化聚合物或LNP的连接,例如,通过包括但不限于以下的多种缀合化学方法中的任一种:胺-羧基接头、胺-巯基接头、胺-碳水化合物接头、胺-羟基接头、胺-胺接头、羧基-巯基接头、羧基-碳水化合物接头、羧基-羟基接头、羧基-羧基接头、巯基-碳水化合物接头、巯基-羟基接头、巯基-巯基接头、碳水化合物-羟基接头、碳水化合物-碳水化合物接头和羟基-羟基接头。在具体实施方式中,使用“点击”化学将靶向配体连接到聚合物上(例如“点击”反应,参见Wu和Fokin,“Catalytic Azide-Alkyne Cycloaddition: Reactivity and Applications”, *Aldrichim. Acta* 40:7-17, 2007)。任选地使用各种偶联化学(参见,例如, *Bioconjugation*, Aslam和Dent编, Macmillan, 1998及其中的章节)。在一些实施方式中,将靶向配体连接到单体,然后将所得化合物用于聚合物(例如,嵌段共聚物)的聚合合成。在一些实施方式中,将靶向部分连接到混合的聚合物胶束组装体中的第一嵌段共聚物的嵌段或第二嵌段共聚物的嵌段。

[0497] 此前已经描述了使用各种靶向配体的脂质颗粒的靶向。参见例如,美国专利号4,

957,773和4,603,044。靶向机制通常要求以使得靶向部分可用于与靶标(例如细胞表面受体)的相互作用的方式将靶向配体设置在脂质颗粒的表面上。多种不同的靶向配体和方法是本领域已知和可用的,包括在上文以及例如在Sapra和Allen, *Prog. Lipid Res.* 42:439-62, 2003和Abra等, *J. Liposome Res.* 12:1-3, 2002中描述的那些。各种靶向反受体可以结合到脂质体的表面,例如抗体、抗体片段、碳水化合物、维生素和转运蛋白。例如,为了靶向到肝脏,脂质体可以用支链型半乳糖基脂质衍生物改性以靶向脱唾液酸糖蛋白受体。参见Kato和Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14:287, 1997; Murahashi等, *Biol. Pharm. Bull.* 20:259, 1997。在组织靶向的更一般的方法中,采用对由靶细胞表达的分子具有特异性的生物素化抗体预标记靶细胞。参见Harasym等, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99, 1998。在游离抗体的血浆消除后,施用链霉亲和素缀合的脂质体。在另一种方法中,将靶向抗体直接连接至脂质体。参见Harasym等,同上。

[0498] 在具体变化方式中,使用具有选自下式的接头将靶向配体连接到聚合物



[0500] 其中 m 为1-100或10-250,且 w 、 x 、 y 和 z 各自独立地为1-48。在包含上文 m 的接头的某些变化方式中, m 为1-15、10-20、20-30、20-25、11或12。在包含上文 m 的接头的其它变化方式中, m 为20-60、25-60、25-55、25-50、25-48、30-60、30-55、30-50、30-48、34-60、34-55、34-50、34-48、36-60、36-55、36-50、36-48、36或48。在包含上文 m 的接头的又一些实施方式中, m 为60-250、100-250、150-250或200-250。在包含上文 x 和 y 、 x 、 y 和 z 或 w 、 x 、 y 和 z 的L1的某些变化方式中, w 、 x 、 y 和 z 各自独立地为20-30、20-25或23。在包含上文 x 和 y 、 x 、 y 和 z 或 w 、 x 、 y 和 z 的L1的其它变化方式中, w 、 x 、 y 和 z 各自独立地为1-12、1-24、1-36、8-16、10-14、20-28、22-26、32-40、34-38、8-48、10-48、20-48、22-48、32-48、34-48或44-48。

[0501] 本发明的特别的实施方式涉及治疗剂的体内递送。在一些实施方式中,治疗剂是多核苷酸。适合的多核苷酸治疗剂包括DNA剂,其可以为以下形式:cDNA、体外聚合的DNA、质粒DNA、源自病毒的遗传物质、线性DNA、载体、表达载体、表达盒、嵌合序列、重组DNA、反义

DNA或这些组的衍生物。其他适合的多核苷酸治疗剂包括RNA,其可以为以下形式:信使RNA (mRNA)、体外聚合的 RNA、重组RNA、转移RNA (tRNA)、小核RNA (snRNA)、核糖体RNA (rRNA)、嵌合序列、dicer底物及其前体、锁核酸、反义 RNA、干扰RNA (RNAi)、不对称干扰RNA (aiRNA)、小干扰 RNA (siRNA)、微RNA (miRNA)、核酶、外部引导序列、小型非信使RNA (snmRNA)、非翻译RNA (utRNA)、snoRNA (24-聚体,通过反义机制起作用的修饰snmRNA)、微小非编码RNA (tncRNA)、小发夹RNA (shRNA)或其衍生物。双链RNA (dsRNA) 和siRNA因与RNA干扰现象相关而特别令人感兴趣。如本文所用的治疗性寡核苷酸的实例包括但不限于siRNA、反义寡核苷酸、dicer底物、miRNA、aiRNA或shRNA。如本文所用的大型治疗性多核苷酸的实例包括但不限于编码用于基因替代疗法的功能蛋白的信使 RNA (mRNA)。多核苷酸治疗剂还可以是核酸适体,其是特异性结合其他大分子的核酸寡聚体;与其它大分子特异性结合的这样的适体可以通过已知技术如SELEX从这样的寡聚体的文库容易地分离。参见,例如,Stoltenburg等,Biomol.Eng.,24:381,2007。

[0502] 在其它实施方式中,治疗剂是蛋白质或肽。例如,在某些变化方式中,所述试剂是与细胞内靶标结合并拮抗或激动所述细胞内靶标的抗体。本发明中使用的抗体可以通过任何已知的方法产生,例如通过将免疫原注射到小鼠中,随后融合淋巴细胞以产生杂交瘤。然后可以使用这样的杂交瘤(a)直接产生抗体或(b)克隆编码抗体片段的cDNA用于后续基因操作。为了举例说明使用后一策略的一种方法,从杂交瘤细胞中分离mRNA,使用反义寡聚-dT或免疫球蛋白基因特异性引物逆转录成cDNA,并克隆到质粒载体中。对克隆体进行测序和表征。然后根据标准方案对其进行工程化以将抗体的重链和轻链组合到细菌或哺乳动物表达载体中以产生例如单链scFv。通过将由短肽接头分开的两种不同抗体各自的重链和轻链组合到细菌或哺乳动物表达载体中,可以使用类似的方法产生重组双特异性抗体。然后根据在细菌或哺乳动物细胞中广泛确立的方案表达和纯化重组抗体。参见例如 Kufer等,2004,同上;Antibody Engineering:A Practical Approach, McCafferty, Hoogenboom和Chiswell编,IRL Press 1996。抗体或其它似蛋白质性治疗分子例如肽也可以通过展示技术产生,所述展示技术允许通过筛选例如由噬菌体表达的免疫球蛋白结构域或肽的非常大的文库而选择相互作用的亲和试剂(Antibody Engineering:A Practical Approach, McCafferty, Hoogenboom和Chiswell编,IRL Press 1996)。抗体也可以通过移植人免疫球蛋白结构域而人源化,或从具有人免疫球蛋白基因/cDNA的转基因小鼠或噬菌体文库制造。在本发明的一些实施方式中,特异性结合蛋白治疗剂可以包括能够特异性结合靶标的抗体以外的结构,其包括但不限于亲和体(avimers)(参见 Silverman等,Nature Biotechnology 23:1556-1561,2005)、锚蛋白重复系列(参见Zahnd等,J.Mol.Biol.369:1015-1028,2007)和 adnectins(参见美国专利7,115,396),以及具有可以演化以产生针对抗原的特异性亲和力的结构域的其他蛋白质,统称为“抗体样分子”。蛋白质治疗剂通过在合成过程中引入非天然氨基酸的改性可用于改善其性质(参见 Datta等,J.Am.Chem.Soc.124:5652-5653,2002;和Liu等,Nat.Methods 4:239-244,2007)。这样的修饰可具有多种益处,包括增加促进后续缀合反应的化学基团。

[0503] 在一些实施方式中,治疗剂是肽。在某些变化方式中,所述肽是双特异性肽。可以容易地制备和筛选肽以产生识别和结合大分子例如蛋白质的亲和试剂。参见例如,Johnsson和Ge,Current Topics in Microbiology and Immunology,243:87-105,1999。

[0504] 在其它实施方式中,蛋白质治疗剂是肽适体。肽适体包含特异性结合靶蛋白并干扰所述靶蛋白的功能性能力的肽分子。参见例如, Kolonin等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14266, 1998。肽适体由连接在蛋白质支架两端的可变肽环组成。这样的肽适体通常可具有与抗体相当的结合亲和力(纳摩尔范围)。由于肽适体的高度选择性特性,它们不仅可用于靶向特定蛋白质,还可用于靶向给定蛋白质的特定功能(例如,信号传导功能)。此外,可以通过使用以时间、空间或可诱导方式调节表达的启动子以受控的方式表达肽适体。肽适体显性地发挥作用,因此它们可用于分析不可获得功能丧失突变体的蛋白质。通常通过从肽的随机池或文库按照其与特定靶标的结合亲和力选择适体而制备肽适体。可以通过酵母双杂交筛选从随机肽文库分离肽适体。参见,例如, Xu等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12473, 1997。它们也可以从噬菌体文库(参见,例如, Hoogenboom等, Immunotechnology 4:1, 1998)或化学产生的肽/文库分离。

[0505] 在又一些实施方式中,治疗剂是小分子治疗剂。小分子治疗剂通常是本领域熟知的,并且可以根据本发明使用。这样的分子包括抗感染(例如,抗病毒)小分子、免疫调节小分子和抗癌小分子(仅列举了几个大类)。在一些变化方式中,小分子治疗剂是疏水性小分子。小分子抗癌治疗剂包括例如各种化疗药物,例如酪氨酸激酶抑制剂(TKI)、影响DNA或RNA的小分子、或通过阻止微管的聚合或解聚而抑制细胞有丝分裂的小分子。小分子化疗剂的特别实例包括抗代谢物(例如硫唑嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨磷酸盐、氟达拉滨、吉西他滨、阿糖胞苷、克拉霉素,卡培他滨、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶和羟基脲);烷化剂(例如美法仑、白消安、顺铂、卡铂、环磷酰胺、异环磷酰胺、达卡他滨、丙卡巴肼、苯丁酸氮芥、噻替哌、洛莫司汀、替莫唑胺);抗有丝分裂剂(例如长春瑞滨、长春新碱、长春花碱、多西紫杉醇、紫杉醇);拓扑异构酶抑制剂(例如多柔比星、安吡啶、伊立替康、柔红霉素、表柔比星、丝裂霉素、米托蒽醌、伊达比星、替尼泊苷、依托泊苷、拓扑替康);抗生素(例如放线菌素和博来霉素);天冬酰胺酶;萜环类和紫杉烷类。在某些变化方式中,小分子化疗剂选自抗微管蛋白剂、DNA小沟结合剂、DNA复制抑制剂和酪氨酸激酶抑制剂。在其他具体变化方式中,小分子化疗剂是萜环类、阿里他汀、喜树碱、倍癌霉素、依托泊苷、美登木素生物碱、长春花生物碱或铂(II)化合物。

[0506] 在又一些实施方式中,治疗剂是破坏或纠正导致疾病的基因的基因编辑系统的组分。这些包括例如锌指核酸酶(ZFN)(参见例如Smith等, Nucleic Acid Res. 28:3361-3369, 2000)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)(参见例如Li等, Nucleic Acid Res. 39:359-372, 2011)、CRISPR/Cas系统(参见,例如, Richter等, Int. J. Mol. Sci. 14:14518-14531, 2013)和工程化归巢核酸内切酶(参见例如, Silva等, Curr. Gene Ther. 11:11-27, 2011)。在这样的实施方式中,核酸酶由配制在脂质纳米颗粒中的一种或多种核酸例如mRNA或DNA所编码。在一些变化方式中,将多种mRNA配制在LNP载体中将以两种核酸酶递送至相同细胞用于发生基因编辑(例如,对于ZFN或TALEN基因编辑系统,其通常需要两种核酸酶以识别基因组内的特定靶位点以在该位点处引起修饰)。在本公开的上下文中,膜去稳定化聚合物促进将核酸递送到细胞质,在此处发生翻译或随后的核递送。在一些变化方式中,基因编辑系统的一种或多种另外的组分与编码核酸酶的一种或多种核酸一起递送到靶细胞。例如,在CRISPR/Cas系统中,除了编码Cas9蛋白的核酸之外,通常将使酶靶向到基因组中的特定位点的短指导RNA配制在LNP载体内。在某些实施方式中,为了通过同源重组

纠正基因,也可以在与编码核酸酶的核酸相同或不同的LNP中递送和配制供体DNA序列。在其中基因编辑系统纠正与疾病相关的基因的某些实施方式中,该疾病的特征在于如本文公开的功能蛋白的缺乏(参见,例如,下文蛋白质缺乏疾病的论述)。

[0507] 在一些实施方式中,治疗剂是免疫原。使用如本文公开的方法,可以将免疫原有效地递送到各种免疫细胞以引发免疫应答。在一些变化方式中,仅LNP包含免疫原。在其它实施方式中,膜去稳定化聚合物也与免疫原缔合(例如共价偶联)。适合的免疫原包括肽、蛋白质、mRNA、短RNA、DNA、简单或复杂的碳水化合物以及源自病毒、细菌、癌细胞等的物质。在一些变化方式中,半抗原或佐剂组分与膜去稳定化聚合物或LNP连接(缀合)或自缔合。在其中膜去稳定化聚合物和LNP都与免疫原缔合的某些实施方式中,与聚合物缔合的免疫原不同于与LNP缔合的免疫原;或者,聚合物和LNP都具有相同的免疫原性载荷。例如,在一些变化方式中,将作为混杂T细胞表位的免疫原性肽连接到膜去稳定化聚合物或LNP以使能够发生更稳健的免疫应答。该半抗原可以衍生自例如由LNP的mRNA组分编码的蛋白质序列,或者可以来自另一蛋白质或多于一种T细胞表位的组合。作为另一个实例,免疫原可以是连接到聚合物或LNP的细菌细胞壁的组分,以通过充当佐剂增强免疫应答。在又一些变化方式中,将免疫刺激性寡核苷酸或长核酸与聚合物或LNP连接或自缔合以激活先天免疫应答。利用本文描述的递送系统的双重性质(使用膜去稳定化聚合物组分和LNP组分二者),可以使用一种组分引发T细胞应答,而使用另一组分引发B细胞应答。可以使用混合递送系统的聚合物和LNP组分通过免疫原性物质的连接或自缔合而引发先天免疫应答、T细胞应答、B细胞应答或其组合。在一些实施方式中,使用第一聚合物以连接和携带免疫原,而使用第二膜去稳定化聚合物以使得能够吸收到抗原呈递细胞中。在如本文公开的用于将免疫原递送至细胞的某些实施方式中,聚合物和LNP中的至少一种具有靶向配体以将聚合物和/或LNP指引至感兴趣的免疫细胞。

[0508] 为了将治疗剂或诊断剂递送至靶细胞的细胞溶质(例如,为了递送至包含靶细胞的靶组织),将膜去稳定化聚合物和包含治疗剂或诊断剂的脂质纳米颗粒各自以有效实现试剂细胞内递送的量施用于受试者。可以将脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物共配制为单一组合物以共注射到受试者中。或者,可以分别配制脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物以分别施用。通常,对于分别施用,顺序地施用脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物。例如,在特别的实施方式中,在施用脂质纳米颗粒后施用膜去稳定化聚合物。在具体变化方式中,LNP和聚合物施用之间的时间为约2小时或更短、通常约1小时或更短、更通常约30分钟或更短、约10分钟或更短、约5分钟或更短、或约1分钟或更短。在一些实施方式中,LNP和聚合物施用之间的时间为约30分钟、约15分钟、约10分钟、约5分钟或约1分钟。通常,在包括共注射脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物的变化方式中,首先将LNP和聚合物配制成单独的组合物,然后在施用前将其混合在一起为单一组合物。

[0509] 使用本发明的方法,试剂递送可以靶向任何细胞类型或相应的组织。适合的靶细胞包括例如软骨细胞、上皮细胞、神经细胞、肌肉细胞、血细胞(例如淋巴细胞或骨髓白细胞)、内皮细胞、周细胞、成纤维细胞、胶质细胞和树突状细胞。其它适合的靶细胞包括癌细胞、免疫细胞、细菌感染细胞、病毒感染细胞或具有异常代谢活性的细胞。在其中靶细胞是分泌细胞的特别的变化方式中,靶分泌细胞是肝细胞。在一些这样的实施方式中,LNP和膜去稳定化聚合物中的任一或两者包含特异性结合脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)的靶向配

体;例如,在特别的变化方式中,靶向配体包括N-乙酰半乳糖胺(NAG)残基(例如,单价NAG部分或三-NAG结构)。靶细胞还包括其中细胞是在哺乳动物中的那些细胞,所述哺乳动物包括例如人、啮齿动物、鼠、牛、犬、猫、绵羊、马和猿猴哺乳动物。

[0510] 在包括多核苷酸的递送的特别实施方式中,多核苷酸是编码功能蛋白(例如与蛋白质缺乏疾病相关的功能蛋白)的mRNA分子,并且该方法增加靶细胞内的功能蛋白的量。例如,在具体变化方式中,mRNA编码选自以下的蛋白质:红细胞生成素、血小板生成素、因子VII,因子VIII、LDL受体、 α -1-抗胰蛋白酶(A1AT)、氨基甲酰基磷酸合成酶I(CPS1)、延胡索酰乙酰乙酸酶(FAH)、丙氨酸:乙醛酸-氨基转移酶(AGT)、甲基丙二酰CoA变位酶(MUT)、丙酰CoA羧化酶 α 亚基(PCCA)、丙酰CoA羧化酶 β 亚基(PCCB)、支链酮酸脱氢酶(BCKDH)的亚基、鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)、铜转运ATP酶Atp7B、胆红素尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(BGT)、铁调素、葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)、葡萄糖-6-磷酸转位酶、溶酶体葡糖脑苷脂酶(GB)、尼曼-匹克C1蛋白(NPC1)、尼曼-匹克C2蛋白(NPC2)、酸性鞘磷脂酶(ASM)、因子IX、半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶、半乳糖激酶、UDP-半乳糖4-差向异构酶、转甲状腺素蛋白、补体调节蛋白、苯丙氨酸羟化酶(PAH)、尿黑酸1,2-双加氧酶、胆色素原脱氨酶、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT)、精氨基琥珀酸裂解酶(ASL)、精氨基琥珀酸合成酶(ASS1)、P型ATP酶蛋白FIC-1、 α -半乳糖苷酶A、酸性神经酰胺酶、酸性 α -L-岩藻糖苷酶、酸性 β -半乳糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、 α -L-艾杜糖醛酸酶、半乳糖脑苷脂酶、酸性 α -甘露糖苷酶、 β -甘露糖苷酶、芳基硫酸酯酶B、芳基硫酸酯酶A、N-乙酰氨基半乳糖-6-硫酸硫酸酯酶、酸性 β -半乳糖苷酶、酸性 α -葡萄糖苷酶、 β -氨基己糖苷酶B、乙酰肝素-N-硫酸酯酶、 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、乙酰CoA: α -氨基葡萄糖苷-N-乙酰转移酶、N-乙酰氨基葡萄糖-6-硫酸硫酸酯酶、 α -N-乙酰氨基半乳糖苷酶、唾液酸酶、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶和 β -氨基己糖苷酶A。

[0511] 在包括递送编码功能蛋白的mRNA分子的某些实施方式中,mRNA编码分泌蛋白。示例性的分泌蛋白包括促红细胞生成素,促血小板生成素,粒细胞集落刺激因子,粒细胞巨噬细胞集落刺激因子,瘦素,血小板衍生生长因子(例如,血小板衍生生长因子B),角化细胞生长因子,骨形态发生蛋白2、骨形态发生蛋白7、胰岛素、胰高血糖素样肽-1、人生长激素、凝血因子(例如,因子VII、因子VIII、因子IX)、松弛素(例如,松弛素-2)、干扰素(例如,干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ)、白细胞介素(例如,白细胞介素-2、白细胞介素-4、白细胞介素-10、白细胞介素-11、白细胞介素-12、白细胞介素-18、白细胞介素-21)和趋化因子(例如,CC亚家族趋化因子、CXC亚家族趋化因子、C亚家族趋化因子和CX3C亚家族趋化因子)。分泌蛋白还包括抗体,其可以选自本文所述的各种抗体实施方式。特别适合的抗体包括基因工程化抗体,例如嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体(例如,单链Fv(scFv))和双特异性抗体。在一些变化方式中,mRNA编码特异性结合并拮抗选自以下的蛋白的抗体:血管内皮生长因子A(VEGF-A)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-17A(IL-17A)、白细胞介素-17F(IL-17F)、白细胞介素-21(IL-21)、白细胞介素-23(IL-23)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)和程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)。

[0512] 在包括增加细胞中的蛋白质质量的某些实施方式中,所述蛋白质是鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)。在这样的实施方式中,将编码OTC蛋白的mRNA配制到脂质纳米颗粒组合中,并且通过与如本文所述的膜去稳定化聚合物共注射或分开注射而施用于受试者。在特别的变化方式中,mRNA分子编码OTC蛋白,其包含与SEQ ID NO:1的残基35-354具有至少90%或至少

95%序列一致性的氨基酸序列(例如,与SEQ ID NO:1的残基35-354至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%的序列一致性)。为将编码的OTC蛋白指引至细胞的线粒体,编码OTC蛋白的mRNA分子包含编码线粒体靶向信号肽(本文也称为“线粒体前导序列”)的序列。线粒体前导序列可以是天然OTC蛋白的线粒体前导序列(例如,SEQ ID NO:1的残基1-34(天然人线粒体前导序列)或SEQ ID NO:2的残基1-34(天然小鼠线粒体前导序列)),或者可以源自包含线粒体靶向信号肽的另一蛋白质,或者从头合成。可以在线粒体前导序列与多肽的其余部分之间的接合处包含工程化的切割位点以优化细胞中的蛋白水解加工。线粒体前导序列与编码成熟OTC蛋白的mRNA序列可操作地连接,即,两个序列在正确的阅读框中连接并布置成将新合成的多肽指导至细胞的线粒体。线粒体前导序列通常位于蛋白质的氨基末端。在具体变化方式中,具有线粒体前导序列的编码OTC蛋白具有如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列。编码SEQ ID NO:1的OTC蛋白并且可以配制到脂质纳米颗粒组合物中的适合的 mRNA序列可以包含如SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8所示的序列(各自对应于残基48-1112的编码序列(CDS))。编码SEQ ID NO:2的OTC蛋白并且可以配制到脂质纳米颗粒组合物中的适合的 mRNA序列可以包含如SEQ ID NO:7所示的序列(对应于残基48-1112的编码序列(CDS))。用于与脂质纳米颗粒一起配制的OTC 编码mRNA通常在其3'末端还包含聚(A)(例如,约50至约500个腺嘌呤残基的聚A尾),其可以使用众所周知的基因工程技术(例如,通过PCR)添加到构建体。可用于插入到适合的DNA载体中以产生和制备SEQ ID NO.6-8的mRNA构建体的示例性DNA序列分别在SEQ ID NO.3-5中示出。

[0513] 在包括增加细胞中蛋白质的量的其它实施方式中,所述蛋白质是甲基丙二酰CoA变位酶(MUT)、丙酰CoA羧化酶A亚基(PCCA)、丙酰CoA羧化酶B亚基(PCCB)或支链酮酸脱氢酶(BCKDH)的亚基。在这样的实施方式中,将编码MUT、PCCA、PCCB或BCKDH亚基蛋白的mRNA配制到脂质纳米颗粒组合物中,并且通过与如本文所述的膜去稳定化聚合物共注射或分开注射而施用于受试者。在特别的变化方式中,mRNA分子编码MUT蛋白,其包含与SEQ ID NO:9的残基33-750具有至少90%或至少95%序列一致性的氨基酸序列(例如,与SEQ ID NO:9的残基33-750至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%的序列一致性)。在其他变化方式中,mRNA分子编码PCCA蛋白,其包含与SEQ ID NO:11的残基53-728具有至少90%或至少95%序列一致性的氨基酸序列(例如,与SEQ ID NO:11的残基53-728至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%的序列一致性)。在其它变化方式中,mRNA分子编码PCCB蛋白,其包含与SEQ ID NO:13的残基29-539具有至少90%或至少95%序列一致性的氨基酸序列(例如,与SEQ ID NO:13的残基29-539至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%的序列一致性)。为将编码的MUT、PCCA、PCCB或BCKDH亚基蛋白引导至细胞的线粒体,编码蛋白质的mRNA分子包含编码线粒体前导序列的序列。线粒体前导序列可以是天然蛋白质的线粒体前导序列(例如,SEQ ID NO:9的残基1-32(天然人MUT线粒体前导序列)、SEQ ID NO:11的残基1-52(天然人PCCA线粒体前导序列)或SEQ ID NO:13的残基1-28(天然人PCCB线粒体前导序列)),或者可以衍生自包含线粒体靶向信号肽的另一蛋白质,或者从头合成。可以在线粒体前导序列和多肽的其余部分之间的接合处包含工程化的切割位点,以优化细胞中的蛋白水解加工。线粒体前导序列与编码成熟MUT、PCCA、PCCB或BCKDH亚基蛋白的mRNA序列可操作地连接,即,两个序列在正确的阅读框架中连接并设置成将新合成的多肽导向细胞的线粒体。在具体变化方式中,具有线

粒体前导序列的编码MUT蛋白具有如SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列,具有线粒体前导序列的编码PCCA蛋白具有如SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列,或具有线粒体前导序列的编码PCCB 蛋白具有如SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列。编码SEQ ID NO: 9的MUT蛋白并且可以配制到包含根据本公开的脂质纳米颗粒的组合物中的适合的mRNA序列可以包含SEQ ID NO:10中所示的序列(对应于残基48-2297的编码序列)。编码SEQ ID NO:11的PCCA 蛋白并且可以配制到包含根据本公开的脂质纳米颗粒的组合物中的适合的mRNA序列可以包含SEQ ID NO:12中所示的序列(对应残基48-2231的编码序列)。编码SEQ ID NO:13的PCCB 蛋白并且可以配制到包含根据本公开的脂质纳米颗粒的组合物中的适合的 mRNA序列可以包含SEQ ID NO:14中所示的序列(对应于残基 48-1664的编码序列)。用于与脂质纳米颗粒一起配制的MUT-、PCCA-、PCCB-或BCKDH- 亚基编码mRNA通常在其3'末端包含聚(A)(例如,约50至约500个腺嘌呤残基的聚A尾)。

[0514] 在包括增加细胞中蛋白质的量的又一些实施方式中,所述蛋白质是精氨基琥珀酸裂解酶(ASL)或精氨基琥珀酸合成酶(ASS1)。在这样的实施方式中,将编码ASL或ASS1蛋白的mRNA配制到脂质纳米颗粒组合物中,并且通过与如本文所述的膜去稳定化聚合物共注射或分开注射而施用于受试者。在特别的变化方式中,mRNA分子编码ASL蛋白,其包含与SEQ ID NO:48具有至少90%或至少95%序列一致性的氨基酸序列(例如,与SEQ ID NO:48至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%的序列一致性)。在其它变化方式中,mRNA分子编码ASS1蛋白,其包含与SEQ ID NO:50具有至少90%或至少95%序列一致性的氨基酸序列(例如,与SEQ ID NO:50至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%的序列一致性)。编码SEQ ID NO:48的ASL蛋白并且可以配制入包含根据本公开的脂质纳米颗粒的组合物中的适合的mRNA序列可以包含SEQ ID NO:49中所示的序列(对应于残基 48-1439的编码序列)。编码SEQ ID NO:50的ASS1蛋白并且可以配制到包含根据本公开的脂质纳米颗粒的组合物中的适合的mRNA 序列可以包含SEQ ID NO:51中所示的序列(对应于残基48-1283 的编码序列)。与脂质纳米颗粒一起配制的ASL-或ASS1-编码mRNA 通常在其3'末端包含聚(A)(例如,约50至约500个腺嘌呤残基的聚A尾)。

[0515] 因此,在本发明的某些实施方式中,将mRNA配制到作为mRNA 载体的脂质纳米颗粒中。在一些变化方式中,在mRNA/LNP之后约1 至15分钟给予膜去稳定化聚合物纳米颗粒的顺序注射,其增强mRNA 到靶细胞的细胞质的递送。在本公开的一些实施方式中,LNP包含阳离子脂质、PEG-脂质、胆固醇和阴离子脂质。脂质通常单独溶解例如在100%乙醇中,通常为20mg/mL至200mg/mL,然后混合在一起以获得例如以下脂质比率范围:20-60mol%阳离子脂质、0-50mol%阴离子脂质、0-40mol%胆固醇和0-15mol%PEG-脂质。乙醇中的脂质混合物通常在1mg/mL至40mg/mL的范围内制备。可以根据公知程序使用标准体外转录反应制备mRNA。通常在大致正常生理pH(例如,pH 7.4)下,以0.01mg/mL至1mg/mL的浓度在水性/等渗缓冲液中稀释mRNA溶液。然后使用微流体装置以1:3的脂质:mRNA比率将乙醇中的脂质混合物与mRNA水溶液混合在一起。可以调节脂质浓度、mRNA浓度和混合比率以制备N:P比率(阳离子脂质和mRNA 之间的氮磷比)为0.5至40的脂质:mRNA制剂。在孵育时间之后,通常在水性/等渗缓冲液中将mRNA/LNP透析过夜。可以在大致正常生理pH(例如,pH 7.4)下将聚合物溶解在水性/等渗缓冲液中。溶解的聚合物的特别适合的浓度范围为1mg/mL至50mg/mL。制剂可以用于将mRNA递送到靶细胞中(例如,可以将制剂与细胞体外接触,或者体内施用于受

试者,例如小鼠)。

[0516] 在其中根据本公开将mRNA配制到脂质纳米颗粒中并递送的另一一些变化方式中,mRNA/LNP经配制以减少或消除受试者中不期望的免疫应答。例如,体外转录的RNA通常含有多种污染物,包括由失败的启动事件产生的短RNA,以及通过RNA模板和RNA依赖性RNA聚合酶活性的自身互补性3'延伸、RNA引发转录所产生的双链(ds) RNA。参见Karikó等,Nucleic Acids Research,2011,1-10,doi: 10.1093/nar/gkr695。这些dsRNA污染物可通过结合和激活大量先天免疫受体(包括tol1样受体TLR3、TLR7、TLR8、视黄酸诱导基因I (RIG-I)和RNA依赖性蛋白激酶(PKR))而具有免疫刺激性。此外,包封在含有表面缔合的PEG的脂质纳米颗粒中的免疫刺激性核酸的存在可以刺激针对载体的免疫应答。参见Semple等,J.Pharmacol. Exp. Ther. 312:1020-1026,2005。Semple等显示该免疫应答取决于LNP中不可交换的PEG-脂质(DSPE-PEG2000或PEG神经酰胺C₂₀)的存在,并导致随后重复施用的脂质体包封的寡脱氧核苷酸(ODN)的快速血浆消除;相比之下,在含有具有较短酰基链的可交换PEG-脂质(PEG神经酰胺C₁₄)的LNP中包封的核酸在重复施用后未显示循环水平的变化。参见Semple等,同上。

[0517] 为减少或消除针对包封在LNP中的mRNA的潜在免疫应答,以及减少或消除重复施用mRNA/LNP后的潜在快速血浆清除,可以使用mRNA或mRNA/LNP制剂的某些变化方式。例如,可以纯化mRNA(例如,使用HPLC纯化)以除去免疫刺激性dsRNA污染物。已经显示HPLC纯化的mRNA避免刺激性I型干扰素细胞因子(IFN- α 、IFN- β 和TNF- α)。参见Karikó等,同上。在一些变化方式中,mRNA序列中的一个或多个尿苷被假尿苷或N1-甲基-假尿苷取代,其已显示避免激活先天免疫受体(参见,同上)。在其它实施方式中,mRNA序列可以进行密码子优化以除去或减少可以激活先天免疫应答的尿苷的数量。在又一些实施方式中,LNP中的可交换PEG-脂质(例如,DMPE-PEG2000)用于在重复施用后维持活性。这些变化方式中的任何一种或多种可用于根据本公开的mRNA体内递送和相关治疗方法。

[0518] 用于纯化mRNA的方法是本领域公知的,并且可以用于制备用根据本公开的脂质纳米颗粒配制的mRNA。例如,在从转录混合物中分离体外转录的(IVT)mRNA构建体后,可以使用离子对/反相HPLC或阴离子交换HPLC进行材料的进一步纯化。当在变性条件下进行时,这些技术可以去除基于长度的序列变体和其他核酸杂质。离子对/反相HPLC使用传统的C8或C18固定相(或者,可以使用基于聚合物的介质)和含有适合的离子配对剂如乙酸三乙铵的流动相体系。传统上使用乙腈梯度洗脱材料。纯化在变性条件下(通常在>55°C的温度下)发生。还可以使用强或弱阴离子交换HPLC。例如,强阴离子交换柱(在固定相中使用季铵)可以与在中性至碱性pH下缓冲的流动相体系(例如,pH 8.0的20mM磷酸钠)一起使用,通过更强盐溶液(例如,1M溴化钠)的梯度添加调节洗脱以置换核酸骨架与柱固定相的相互作用。因为强离子环境增加mRNA构象的稳定性(并因此赋予相对于离子对/反相分离更高的T_m),所以纯化可能需要更高的温度和/或pH环境以完全融化二级或双链结构。

[0519] 在本发明的某些实施方式中,将治疗剂细胞内递送至靶组织的细胞以治疗适于用所述治疗剂治疗的疾病。在这样的实施方式中,通常以否则与寻求治疗的疾病或紊乱的管理相关的常规方法学一致的方式,通过如本文所述组合施用膜去稳定化聚合物和包含治疗剂的脂质纳米颗粒将治疗剂递送至靶组织。根据本文的公开内容,在足以预防或治疗疾病的条件下,向需要这样的治疗的受试者施用治疗有效量的药剂足以预防或治疗疾病时

间。

[0520] 对其如本文所述施用治疗剂的受试者包括处于发生特定疾病的高风险的患者以及呈现出具有现存疾病的患者。在某些实施方式中,受试者已被诊断具有寻求治疗的疾病。此外,可以在治疗过程期间监测受试者的任何疾病变化(例如,监测疾病临床症状的增加或减少)。

[0521] 在预防性应用中,向易感特定疾病或另外处于特定疾病的风险中的患者以足以消除或降低风险或延迟疾病发作的量施用药物组合物。在治疗性应用中,向怀疑患有或已经患有这样的疾病的患者以足以治愈或至少部分阻止疾病及其并发症的症状的量施用组合物。足以实现此目的的量被称为治疗或药学上有效的剂量或量。在预防性和治疗性方案二者中,通常以多个剂量施用药剂直到实现足够的响应。通常,监测响应并且如果期望的响应开始消退,则给予重复剂量。

[0522] 为了鉴别用于根据本发明的方法进行治疗的受试患者,可以使用公认的筛选方法确定与具体疾病相关的风险因素或确定受试者中识别的现存疾病的状态。这样的方法可以包括例如确定个体是否具有已被诊断患有特定疾病的亲属。筛选方法还可以包括例如血液检验以分析由肝脏中缺失或突变的蛋白质引起的代谢物积累(对于某些肝脏疾病)或常规检查以确定已知具有可遗传成分的特定疾病的家族状态(例如,已知各种癌症和蛋白质缺乏疾病具有某些可遗传成分)。癌症的可遗传成分包括例如发生转化的多个基因(例如Ras、Raf、EGFR、cmet等)中的突变,某些HLA和杀伤抑制受体(KIR)分子的存在或不存在,或者癌细胞能够直接或间接调节细胞如NK细胞和T细胞的免疫抑制的机制(参见例如Junggren和Malmberg, *Nature Rev. Immunol.* 7:329-339, 2007; Boyton和Altmann, *Clin. Exp Immunol.* 149: 1-8, 2007)。为此目的,可以常规使用核苷酸探针以识别携带与感兴趣的特定疾病相关的遗传标志物的个体。此外,本领域已知广泛的免疫学方法可用于识别特定疾病的标志物。例如,各种ELISA免疫测定方法是本领域中可用且熟知的,其使用单克隆抗体探针以检测与特定肿瘤相关的抗原。如已知的患者症状、年龄因素、相关危险因素等指示的,可以实施筛选。这些方法允许临床医师常规选择需要本文所述方法进行治疗的患者。

[0523] 对于施用,将脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物配制为单一药物组合物(用于共注射实施方式;通常在施用前即时混合在一起)或配制为分开的药物组合物(用于分开施用实施方式)。可以根据已知方法配制包含LNP和/或膜去稳定化聚合物的药物组合物以制备药学上有用的组合物,由此将LNP和/或聚合物组分组合在与药学上可接受的载体的混合物中。如果组合物的施用可以被受体患者耐受,则该组合物被称为“药学上可接受的载体”。无菌磷酸缓冲盐水是药学上可接受的载体的一个实例。其它适合的载体是本领域技术人员所熟知的(参见,例如,Gennaro(编), *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Company, 第19版, 1995))。制剂还可以包括一种或多种赋形剂、防腐剂、增溶剂、缓冲剂等。

[0524] 对于疾病治疗,以治疗有效量将药物组合物施用于受试者。根据本发明的方法,可以通过各种给药方式向受试者施用脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物,包括例如肌内、皮下、静脉内、心房内、关节内、胃肠外、鼻内、肺内、透皮、胸膜内、鞘内和口服给药途径。为了预防和治疗目的,可以以单次浓注递送、长时间段内的连续递送(例如,连续经皮递送)或以重复施用方案(例如,基于每小时、每天、每周或每两周)将组合物施用于受试者。

[0525] 对于特定情况确定适当的剂量是在本领域能力范围内。在该背景下有效剂量的确定通常是基于动物模型研究和随后的人体临床试验,并通过确定显著减少模型受试者中受试者疾病的发生或严重性的有效剂量和施用方案而指导。本发明组合物的有效剂量根据许多不同因素而变化,包括施用方式、靶位点、患者生理状态、患者是人类还是动物、施用的其他药物、治疗是预防性还是治疗性的、以及组合物自身的具体活性及其在个体中引起期望响应的能力。通常,患者是人,但在一些疾病中,患者可以是非人哺乳动物。通常,调整剂量方案以提供最佳治疗响应,即以优化安全性和功效。因此,治疗或预防有效量也是其中有益效果胜过任何不期望的附带效应的量。对于治疗剂的施用,剂量通常范围为约0.1 μ g至约100mg/kg或约1 μ g/kg至约50mg/kg,更通常为约1 μ g/kg至约10mg/kg或约10 μ g至约5mg/kg受试者体重,不包括其它LNP组分。在更具体的实施方式中,药剂的有效量在约1 μ g/kg和约20mg/kg之间,约10 μ g/kg和约10mg/kg之间,或约0.1mg/kg和约5mg/kg之间,不包括其它LNP组分。膜去稳定化聚合物的量可以变化或调节,例如约10 μ g至约200mg/kg,约10 μ g至约100mg/kg,约0.1mg/kg至约100mg/kg,约0.1mg/kg至约50mg/kg,或约0.5mg/kg至约50mg/kg。该范围内的剂量可以通过单次或多次施用实现,包括例如每天或每日多次施用、每周、每两周或每月施用。例如,在某些变化方式中,方案由初始施用,然后是每周或每两周间隔的多次后续施用组成。另一种方案由初始施用,然后是每月或每两月间隔的多次后续施用组成。或者,施用可以基于通过监测疾病和/或疾病临床症状的生理相关性所指示而不是不规则的。

[0526] 脂质纳米颗粒可以吸附至几乎任何类型的细胞,然后缓慢释放所包封的药剂。或者,吸附的脂质纳米颗粒可以被细胞(例如,吞噬性的细胞)内吞。内吞作用之后通常是LNP脂质的溶酶体内降解和所包封的药剂的释放(参见Scherphof等,Ann.N.Y.Acad.Sci.446:368,1985)。静脉内施用后,脂质纳米颗粒(例如,约0.1至1.0 μ m的脂质体)通常被主要位于肝脏和脾脏中的网状内皮系统的细胞摄取。网状内皮系统的细胞对较小脂质体的这种优先摄取已被用于将化疗剂递送至巨噬细胞和至肝脏肿瘤。如本文所述,据信将脂质纳米颗粒的施用和膜去稳定化聚合物的施用组合增强将LNP缔合治疗剂递送至细胞的细胞溶质的效能。

[0527] 可以通过多种方法规避网状内皮系统,包括用大剂量的脂质纳米颗粒进行饱和,或通过药理学方式的选择性巨噬细胞失活(参见 Claassen等,Biochim.Biophys.Acta 802:428,1984)。此外,将糖脂或聚乙二醇衍生化磷脂并入脂质体膜已经显示导致网状内皮系统的摄取显著降低(参见Allen等,Biochim.Biophys.Acta 1068:133,1991;Allen等,Biochim.Biophys.Acta 1150:9,1993)。

[0528] 还可以通过改变脂质纳米颗粒的磷脂组成制备脂质纳米颗粒以靶向特定的细胞或组织。例如,用高含量的非离子表面活性剂制备的脂质体已被用于靶向肝脏(参见例如, Hayakawa等的日本专利 04-244,018;Kato等,Biol.Pharm.Bull.16:960,1993)。这些制剂通过以下步骤制备:在甲醇中混合大豆磷脂酰胆碱、 α -生育酚和乙氧基化氢化蓖麻油(HCO-60),在真空下浓缩混合物,然后用水重构混合物。具有大豆来源的甾醇糖苷混合物(SG)和胆固醇(Ch)的二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)的脂质体制剂也已经显示靶向肝脏(参见 Shimizu等,Biol.Pharm.Bull.20:881,1997)。

[0529] 还可以通过使用如本文所讨论的靶向配体制备脂质纳米颗粒和/或膜去稳定化

聚合物以靶向特定的细胞或组织。

[0530] 在一些实施方式中,如本文所述的脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物在用于治疗与受试者中的缺陷性基因表达和/或活性相关的疾病的方法中使用。这样的治疗方法包括向具有与缺陷性基因表达和/或活性相关的疾病的受试者施用(a)有效量的包含多核苷酸的脂质纳米颗粒,所述多核苷酸与基因同源并可例如通过切割使所述基因沉默,或者所述多核苷酸指定蛋白质的氨基酸序列并在蛋白质合成过程中被翻译,和(b)有效量的膜去稳定化聚合物,其中多核苷酸被递送到与疾病相关的靶组织的靶细胞的细胞溶质中,由此治疗该疾病。在一些实施方式中,脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物中的至少一种包含特异性结合受试者内靶组织的靶细胞表面上的分子的靶向配体。可以通过本文公开的方法治疗的与受试者中的缺陷性基因表达和/或活性相关的疾病的实例包括肝癌(例如肝细胞癌)、肝炎、高胆固醇血症、肝纤维化和血色素沉着症。在其它变化方式中,可以通过本文公开的方法治疗的与受试者中的缺陷性基因表达和/或活性相关的疾病或病症是乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、子宫内膜癌、肺癌、肾癌、结肠癌、脑癌(例如成胶质细胞瘤)或具有造血系统起源的骨髓细胞癌。

[0531] 在某些实施方式中,与缺陷性基因表达相关的疾病是特征在于功能性多肽缺乏的疾病(本文中也称为“与蛋白质缺乏相关的疾病”或“蛋白质缺乏疾病”)。这样的治疗方法包括向具有蛋白质缺乏疾病的受试者施用(a)有效量的脂质纳米颗粒,其包含编码功能蛋白或与功能蛋白具有相同生物活性的蛋白质的mRNA,和(b)有效量的膜去稳定化聚合物,其中将mRNA递送到与蛋白质缺乏相关的靶组织的靶细胞的细胞溶质中,并且其中mRNA在蛋白质合成期间被翻译,以在靶组织内产生足以治疗疾病的量的编码蛋白质。在一些实施方式中,脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物中的至少一种包含特异性结合靶组织的靶细胞表面上的分子的靶向配体。在具体变化方式中,mRNA编码功能性促红细胞生成素、 α -半乳糖苷酶A、LDL受体、因子VII、因子VIII、因子IX、 α -L-艾杜糖醛酸酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、乙酰肝素-N-硫酸酯酶、 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、半乳糖6-硫酸酯酶、酸性 β -半乳糖苷酶、溶酶体酸性脂肪酶、鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)、 α -1-抗胰蛋白酶、芳基硫酸酯酶A、芳基硫酸酯酶B、酸性神经酰胺酶、酸性 α -L-岩藻糖苷酶、酸性 β -葡萄糖苷酶(也称为葡糖脑苷脂酶)、半乳糖脑苷脂酶、酸性 α -甘露糖苷酶、酸性 β -甘露糖苷酶、N-乙酰氨基半乳糖-6-硫酸硫酸酯酶、酸性鞘磷脂酶、酸性 α -葡萄糖苷酶、 β -氨基己糖苷酶B、乙酰CoA: α -氨基葡萄糖苷-N-乙酰转移酶、N-乙酰氨基葡萄糖-6-硫酸硫酸酯酶、 α -N-乙酰氨基半乳糖苷酶、唾液酸酶、 β -葡萄糖醛酸酶或 β -氨基己糖苷酶A。在其它实施方式中,mRNA编码功能性视网膜母细胞瘤蛋白(pRb)、p53肿瘤抑制蛋白、磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)、Von Hippel-Lindau肿瘤抑制因子(pVHL)、腺瘤性结肠息肉病(APC)、FAS受体(FasR)、致瘤性5的抑制(ST5)、YPEL3、致瘤性蛋白7抑制因子(ST7)或致瘤性14蛋白抑制因子(ST14)。在又一些实施方式中,mRNA编码功能性半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶、半乳糖激酶、UDP-半乳糖-4-差向异构酶、转甲状腺素蛋白、补体调节蛋白(例如因子H、因子I或膜辅因子蛋白)、苯丙氨酸羟化酶(PAH)、尿黑酸1,2-双加氧酶、胆色素原脱氨酶、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT)、精氨基琥珀酸裂解酶(ASL)、精氨基琥珀酸合成酶(ASS1)或P型ATP酶蛋白,FIC-1。

[0532] 可以通过本文公开的方法治疗的与受试者中缺陷性基因表达和/或活性相关的疾病或病症的其它实例包括与肝脏中的单基因代谢缺陷相关的蛋白质缺乏疾病。示例性的

肝脏蛋白质缺乏疾病包括与尿素循环缺陷相关的疾病(例如,鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)缺乏症、氨基甲酰基磷酸合成酶I(CPS1)缺乏症、精氨基琥珀酸尿症(精氨基琥珀酸裂解酶(ASL)缺乏症))和瓜氨酸血症(精氨基琥珀酸合成酶(ASS1)缺乏症);1型酪氨酸血症(延胡索酰乙酰乙酸酶(FAH)缺乏症);1型原发性高草酸尿症(丙氨酸:乙醛酸-氨基转移酶(AGT)缺乏症);有机酸血症(例如,甲基丙二酸血症(MMA;例如甲基丙二酰CoA变位酶缺乏症)、丙酸血症(PA;丙酰CoA羧化酶(PCC)缺乏症)和槭糖尿病(MSUD;支链酮酸脱氢酶(BCKDH)缺乏症));Wilson氏病(铜转运ATP酶缺陷,Atp7B);Crigler-Najjar综合征1型(胆红素尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(BGT)酶缺乏症);血色沉着病(铁调素缺乏症);1a型糖原贮积病(GSD)(葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)缺乏症);1b型糖原贮积病(葡萄糖-6-磷酸转位酶缺乏症);溶酶体贮积病(LSD;缺乏溶酶体酶),例如戈谢病1、2和3型(溶酶体葡糖脑苷脂酶(GB)缺乏症)、尼曼-匹克病C型(NPC1或NPC2基因中的突变)和尼曼-匹克疾病A和B型(酸性鞘脂酶(ASM)缺乏症); α -1-抗胰蛋白酶(A1AT)缺乏症;血友病B(因子IX缺乏症);1、2和3型半乳糖血症(分别为半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶、半乳糖激酶和UDP-半乳糖4-差向异构酶缺乏症);转甲状腺素蛋白相关性遗传性淀粉样变性(TTR-家族性淀粉样多发性神经病;转甲状腺素蛋白缺乏症);非典型溶血性尿毒症综合征-1(缺乏补体调节蛋白,例如因子H、因子I或膜辅因子蛋白);苯丙酮尿症(苯丙氨酸羟化酶(PAH)缺乏症);尿黑酸尿症(尿黑酸1,2-双加氧酶缺乏症);急性间歇性卟啉症(胆色素原脱氨酶缺乏症);Lesch-Nyhan综合征(次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT)缺乏症);和进行性家族性肝内胆汁郁积(PFIC)(P型ATP酶蛋白 FIC-1缺乏症)。作为溶酶体贮积病(LSD)的蛋白质缺乏病的其他实例包括法布里病(α -半乳糖苷酶A缺乏症);法伯病(酸性神经酰胺酶缺乏症);岩藻糖苷贮积症(酸性 α -L-岩藻糖苷酶缺乏症);GM1神经节苷脂贮积病(酸性 β -半乳糖苷酶缺乏症);Hunter综合征(II型黏多糖病(MPS II));艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶缺乏症);Hurler-Scheie、Hurler和Scheie综合征(I型黏多糖病(MPS I)); α -L-艾杜糖醛酸酶缺乏症);克拉伯病(半乳糖脑苷脂酶缺乏症); α -甘露糖苷贮积症(酸性 α -甘露糖苷酶缺乏症); β -甘露糖苷贮积症(酸性 β -甘露糖苷酶缺乏症);马-拉氏综合征(VI型黏多糖病(MPS VI));芳基硫酸酯酶B缺乏症);异染性脑白质营养不良(芳基硫酸酯酶A缺乏症);A型莫基奥综合征(IV型黏多糖病(MPS IVA));N-乙酰氨基半乳糖-6-硫酸酯酶缺乏症);B型莫基奥综合征(IVB型黏多糖病(MPS IVB));酸性 β -半乳糖苷酶缺乏症);庞贝氏病(酸性 α -葡萄糖苷酶缺乏症);桑德霍夫病(β -己糖胺酶B缺乏症);A型沙费利波综合征(IIIA型黏多糖病(MPS IIIA));乙酰肝素-N-硫酸酯酶缺乏症);B型沙费利波综合征(IIIB型黏多糖病(MPS IIIB)); α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶缺乏症);C型沙费利波综合征(IIIC型黏多糖病(MPS IIIC));乙酰CoA: α -氨基葡萄糖N-乙酰转移酶缺乏症);D型沙费利波综合征(IIID型黏多糖病(MPS IIID));N-乙酰氨基葡萄糖-6-硫酸酯酶缺乏症);Schindler/Kanzaki病(α -N-乙酰氨基半乳糖酶缺乏症);唾液酸沉积症(唾液酸酶缺乏症);Sly综合征(VII型黏多糖病(MPS VII)); β -葡糖苷酸酶缺乏症)和Tay-Sachs病(β -氨基己糖苷酶A缺乏症)。

[0533] 在特别的变化方式中,根据本发明方法递送编码鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)蛋白的mRNA以治疗鸟氨酸转氨甲酰酶缺乏症(OTCD)。OTCD是可引发高氨血症的尿素循环紊乱,高氨血症是导致脑损伤、昏迷或甚至死亡的危及生命的疾病。这是由于OTC活性的缺乏,OTC是主要发生在肝脏中并负责去除体内过量的氮的尿素循环中的关键酶。氨氮从蛋白质摄入

以及体内蛋白质分解产生。在肝脏中,这种氨氮在尿素循环中通过酶转化为尿素。通常,尿素是无毒的,且容易在尿中通过肾脏清除。然而,当OTC酶缺乏时,血液中的氨水平升高并引起严重脑损伤。具有严重OTC缺乏症的患者最通常在出生后2-3天确认,其中所述患者具有显著升高的血氨水平并最终导致昏迷。具有较轻微的OTC缺乏症的患者在应激期间可以具有危象,导致升高的氨水平,其也可以导致昏迷。当前疗法包括用于高氨血症患者中的氨清除药物(Buphenyl,Ravicti)。

[0534] OTC基因是X连锁的。该疾病存在于具有一个突变等位基因的雄性中,并且存在于突变体等位基因纯合或杂合的雌性中。雄性患者通常是出生后就发现具有最严重的OTC缺乏症的那些患者。除了血氨水平升高外,尿乳清酸水平也升高。在具有严重OTC缺乏的患者中,OTC酶活性小于正常水平的20%。在具有较轻微的OTC缺乏的患者中,OTC酶活性为正常水平的至多30%。

[0535] 采用包含OTC编码mRNA的脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物治疗OTCD的方法通常包括向具有OTCD的受试者施用有效量的脂质纳米颗粒和有效量的膜去稳定化聚合物,其中脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物中的至少一种包含在受试者内特异性结合肝细胞表面上的分子的靶向配体,且由此将OTC编码mRNA递送至肝细胞并在蛋白质合成过程中翻译以产生OTC蛋白。OTC编码mRNA可以是上文对于增加细胞中的OTC蛋白的方法所述的mRNA。

[0536] 用于治疗疾病的组合物或方法的功效可以在疾病的动物模型中进行体内评估。用于评估用于治疗OTCD的[脂质纳米颗粒]/[膜去稳定化学聚合物]组合物(或LNP组合物和聚合物组合物的组合)的功效的特别适合的动物模型包括具有肝脏中的OTC酶缺乏的已知小鼠模型。一种这样的小鼠模型,OTC-spf^{ash}(稀疏绒毛以及异常的皮肤和毛发)小鼠,含有导致降低的OTC蛋白水平并在肝脏中仅具有正常酶活性水平的5-10%的R129H突变(参见Hodges等,Proc.Natl. Acad.Sci.USA 86:4142-4146,1989)。另一种模型,OTC-spf小鼠,含有导致酶活性水平降低至正常水平的5-10%的H117N突变(参见Rosenberg等,Science 222:426-428,1983)。与其野生型同窝小鼠相比,这两种小鼠模型都具有提高的尿乳清酸水平。OTC缺乏症的第三种模型是在OTC-spf或OTC-spf^{ash}小鼠中诱导高氨血症(Cunningham等,Mol Ther 19:854-859,2011)。用OTC siRNA或AAV2/8载体/OTC shRNA处理这些小鼠以敲低残留内源性OTC表达和活性。血浆氨水平升高且小鼠在约7-28天内死亡。

[0537] 在另外的变化方式中,根据本发明方法递送编码有机酸血症中缺乏的酶的mRNA以治疗有机酸血症。有机酸血症(也称为酸尿症)(OA)是特征在于分泌非氨基有机酸到尿液中的一组紊乱。大多数有机酸血症是由氨基酸分解代谢中的特定步骤的功能障碍引起,通常是缺陷性酶活性的结果。大多数有机酸紊乱是由支链氨基酸或赖氨酸的异常氨基酸分解代谢所引起的。它们包括丙酸血症(PA)、甲基丙二酸血症(MMA)、槭糖尿病(MSUD)等等。这些有机酸血症以常染色体隐性方式遗传。受OA影响的新生儿通常在出生时和生命的头几天表现良好。通常的临床表现是中毒性脑病的那些,且包括呕吐、喂养困难、神经系统症状如癫痫和异常声调、以及昏睡进展为昏迷。在生命的头十天通过诊断和治疗可以改善预后。在较年长的儿童或青少年中,变体形式的OA可以表现为智力功能丧失、共济失调或其他局灶性神经系统症状、瑞氏综合征、复发性酮酸中毒或精神病症状。

[0538] 临床实验室研究结果表明,有机酸血症包括酸中毒、酮病、高氨血症、肝功能异常、低血糖症和嗜中性白细胞减少症。有机酸血症的一线诊断是使用具有质谱的气相色谱(GC/

MS) 进行的尿有机酸分析。面对急性疾病时,尿有机酸谱图几乎总是异常的。确证性测试包括淋巴细胞或培养的成纤维细胞中的缺陷性酶的活性的试验和/或分子遗传学测试。三种主要紊乱的特征总结在表1中。

[0539] 表1:由异常氨基酸分解代谢导致的有机酸血症中的代谢发现

紊乱	受影响的氨基酸通路	酶	通过GC/MS和定量氨基酸分析的诊断分析物
丙酸血症 (PA)	异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸	丙酰CoA羧化酶 (PCC) (由三个PCCA亚基和三个PCCB亚基组成)	尿中的丙酸、3-OH丙酸、甲基柠檬酸、丙酰甘氨酸;血中的丙酰肉碱、增加的甘氨酸
[0540] 甲基丙二酸血症 (MMA)	异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸	甲基丙二酰CoA变位酶 (MUT)	血和尿中的甲基丙二酸 尿中的丙酸、3-OH丙酸、柠檬酸甲酯;血中的酰基肉碱、增加的甘氨酸
槭糖尿病 (MSUD)	亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸	支链酮酸脱氢酶 (BCKDH) (由四个不同亚基组成)	尿中的支链酮酸和羧基酸 血浆中的别异亮氨酸

[0541] 一旦特定分析物的检测缩小了诊断的可能性,则在淋巴细胞或培养的成纤维细胞中分析缺陷性酶的活性作为确证性测试。对于许多途径,没有单一的酶试验可以确立诊断。对于其它途径,需要进行诸如补充研究的测试。

[0542] 治疗目的是恢复生化和生理内稳态。取决于具体生物化学病变、代谢阻断位置以及有毒化合物的作用,新生儿需要紧急诊断和治疗。治疗策略包括:(1)前体氨基酸的饮食限制和(2)使用辅助化合物以(a)处理有毒代谢物或(b)增加缺陷性酶的活性。肝移植已在少数受影响的个体中成功。即使采用当前的临床管理方法,具有有机酸血症的个体仍具有较大的感染风险和较高的胰腺炎发病率,其可能是致命的。

[0543] 通过特定mRNA递送至肝脏的酶替代疗法为有机酸血症提供了最有效的治疗。在用于治疗有机酸血症的方法的某些实施方式中,根据本发明的方法将编码甲基丙二酰CoA变位酶(MUT)的mRNA递送至受试者以治疗甲基丙二酸血症MMA。在其它实施方式中,根据本发明方法将编码PCC亚基(PCCA或PCCB)的mRNA递送至受试者以治疗丙酸血症(PA)。在又一些实施方式中,根据本发明方法将编码BCKDH亚基的mRNA递送至受试者以治疗槭糖尿病(MSUD)。采用包含Mut、Pcca/b或BCKDH亚基mRNA的脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物治疗MMA、PA或MSUD的方法通常包括向具有指定类型的有机酸血症的受试者施用有效量的脂质纳米颗粒和有效量的膜去稳定化聚合物,其中脂质纳米颗粒和膜去稳定化聚合物中的至少一种包含在受试者内特异性结合肝细胞表面上的分子的靶向配体,由此将Mut、Pcca/b或

BCKDH亚基mRNA递送至肝细胞并在蛋白质合成过程中翻译以产生相应的蛋白质。Mut或Pcca/b mRNA可以是上文对于在细胞中增加相应的蛋白质的方法所述的 mRNA。

[0544] 可以在疾病的动物模型中体内评估用于治疗有机酸血症疾病的组合物或方法的功效。例如,用于评估用于治疗MMA和PA的 mRNA/LNP和聚合物组合物(或mRNA/LNP组合物和聚合物组合物的组合)的功效的特别适合的动物模型如下。已经采用甲基丙二酰-CoA变位酶(Mut)基因的肝细胞定向递送成功地治疗具有MMA的严重形式的Mut^{-/-}新生小鼠(其通常在生命的头21天内死亡)。在肝内注射表达鼠Mut基因的腺相关病毒后,Mut^{-/-}小鼠获救并存活超过1年(Carrillo-Carrasco等,Hum.Gene Ther.21:1147-1154,2010)。小鼠存活到成年期的另一种MMA疾病模型是具有在隔离的、肌肉特异性启动子的控制下表达的Mut cDNA的Mut^{-/-}小鼠(Mut^{-/-}; Tg^{INS-MCK-Mut}) (Manoli等,2011,SIMD Abstract)。这些小鼠具有如通过¹³C丙酸盐氧化/呼吸试验测量的升高的血浆甲基丙二酸水平和降低的氧化能力。PA的小鼠模型(Pcca^{-/-}小鼠)在出生后24-36小时死亡,且与致命性酮酸中毒有关(Miyazaki等,J.Biol.Chem.276: 35995-35999,2001)。在转基因小鼠品系的肝脏中提供10-20%的出生后PCC活性的Pcca基因转移减弱了新生小鼠的致命性酮酸中毒(Miyazaki等,2001,同上)。最近,在新生Pcca^{-/-}小鼠中测试了对于人Pcca的肝内腺相关病毒介导的基因转移(Chandler等,Hum.Gene Ther.22:477-481,2010)。作者发现了如约64%的生存率和疾病相关代谢物的减少所证实的持续治疗作用(Chandler等,2010,同上)。PA的另一种小鼠疾病模型是其中Pcca^{-/-}小鼠表达携带PCCA蛋白的A138T突变体的转基因的亚效等位基因模型。这些小鼠具有2%的野生型PCC活性,存活至成年期并具有与疾病相关的代谢物的升高(Guenzel等,Mol.Ther.21:1316-1323,2013)。用表达人PCCA cDNA的腺病毒或AAV载体治疗这些小鼠导致提高的PCC酶活性和疾病标志物水平的纠正(Guenzel等,2013,同上)。总之,在MMA和PA的鼠模型中,基因转移方法拯救新生小鼠,或者在成年疾病模型中恢复酶活性并纠正疾病代谢物水平,由此允许评估用于恢复缺陷性酶的mRNA递送。

[0545] 在另外的变化方式中,分别根据本发明的方法递送编码精氨基琥珀酸裂解酶(ASL)或精氨基琥珀酸合成酶(ASS1)的mRNA以治疗精氨酸琥珀酸尿症(ASA)或I型瓜氨酸血症(CTLN I)。用于评估mRNA/LNP和聚合物治疗ASA和CTLN I的功效的适合的动物模型如下。ASL亚效等位基因小鼠具有插入到内含子9中的新霉素基因,其导致ASL酶缺乏(mRNA和蛋白质的野生型水平的~10%)和精氨基琥珀酸和瓜氨酸血浆水平的升高(Erez等,Nat Med.17:1619-1626, 2011),其为ASA的特征。这些小鼠如果不经治疗,则将在约3周龄左右开始自行死亡。在4周龄时用表达小鼠ASL的辅助依赖性腺病毒载体治疗这些小鼠导致改善的存活率,正常化的ASL蛋白表达,和精氨基琥珀酸和瓜氨酸血浆水平的降低(Nagamani等,Am J Humgenet.90:836-846,2012)。ASS1亚效等位基因小鼠由称为滤泡营养不良(follicular dystrophy) (fold)的自发隐性突变(T389I 置换)造成。该突变导致不稳定的ASS1蛋白结构和~5-10%的正常酶活性。纯合fold/fold小鼠具有升高的血浆瓜氨酸和氨水平。如果未经治疗,这些小鼠也将自行死亡(Perez等,Am J Pathol.177:1958-1968, 2010)。用表达人ASS1的AAV8载体治疗这些小鼠导致改善的存活和降低的血浆瓜氨酸和氨水平(Chandler等,Gene Ther.20: 1188-1191,2013)。因此,在ASA和CTLN I的鼠模型中,肝基因转移方法恢复酶活性并纠正疾病,由此允许评估用于恢复缺陷性酶的mRNA递送。

[0546] 在治疗与缺陷性基因表达和/或活性相关的疾病的方法的某些其它实施方式中,

基因选自生长因子基因、生长因子受体基因、编码酶（例如，磷酸酶或激酶，如蛋白酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸激酶）的基因、衔接蛋白基因、编码G蛋白超家族分子的基因或编码转录因子的基因。

[0547] 如本文所述可用于治疗与缺陷性基因表达和/或活性相关的疾病的方法中的适合的基因靶标的另一些实例包括以下基因或编码以下蛋白质的基因：MEX3、MMP2、ApoB、ERBB2、血管内皮生长因子（VEGF）、血管内皮生长因子受体（VEGFR）、血小板衍生生长因子受体（PDGF），ABL、KITT、FMS样酪氨酸激酶3（FLT3），Cav-1、表皮生长因子受体（EGFR）、H-Ras、K-Ras、N-Ras、Bcl-2、存活素、FAK、STAT-3、HER-3、 β -连环蛋白、鸟氨酸转氨甲酰酶、 α -1-抗胰蛋白酶和Src。

[0548] 如本文所述可用于治疗与缺陷性基因表达和/或活性相关的疾病的方法中的适合的基因靶标的其他实例包括肿瘤抑制因子，其中突变基因的功能丧失可以通过递送编码功能蛋白的mRNA而纠正以治疗癌症。适合的肿瘤抑制因子靶标包括视网膜母细胞瘤蛋白（pRb）、p53肿瘤抑制蛋白、磷酸酶和张力蛋白同源物（PTEN）、Von Hippel-Lindau肿瘤抑制因子（pVHL）、腺瘤性结肠息肉病（APC）、FAS受体（FasR）、致瘤性5的抑制（ST5）、YPEL3、致瘤性蛋白7抑制因子（ST7）和致瘤性14蛋白抑制因子（ST14）。

[0549] 在某些实施方式中，如本文所述的膜去稳定化聚合物和包含治疗剂的脂质纳米颗粒用于制备治疗适于用治疗剂治疗的疾病的药物或药物组合。在一些这样的实施方式中，疾病是与受试者中的缺陷性基因表达和/或活性相关的疾病。

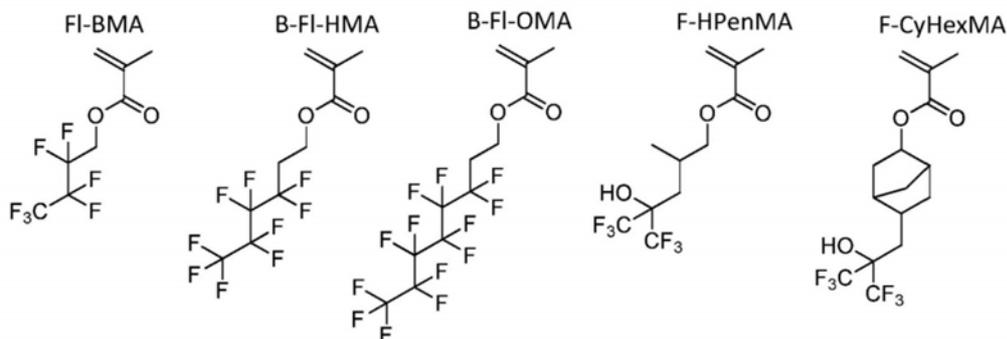
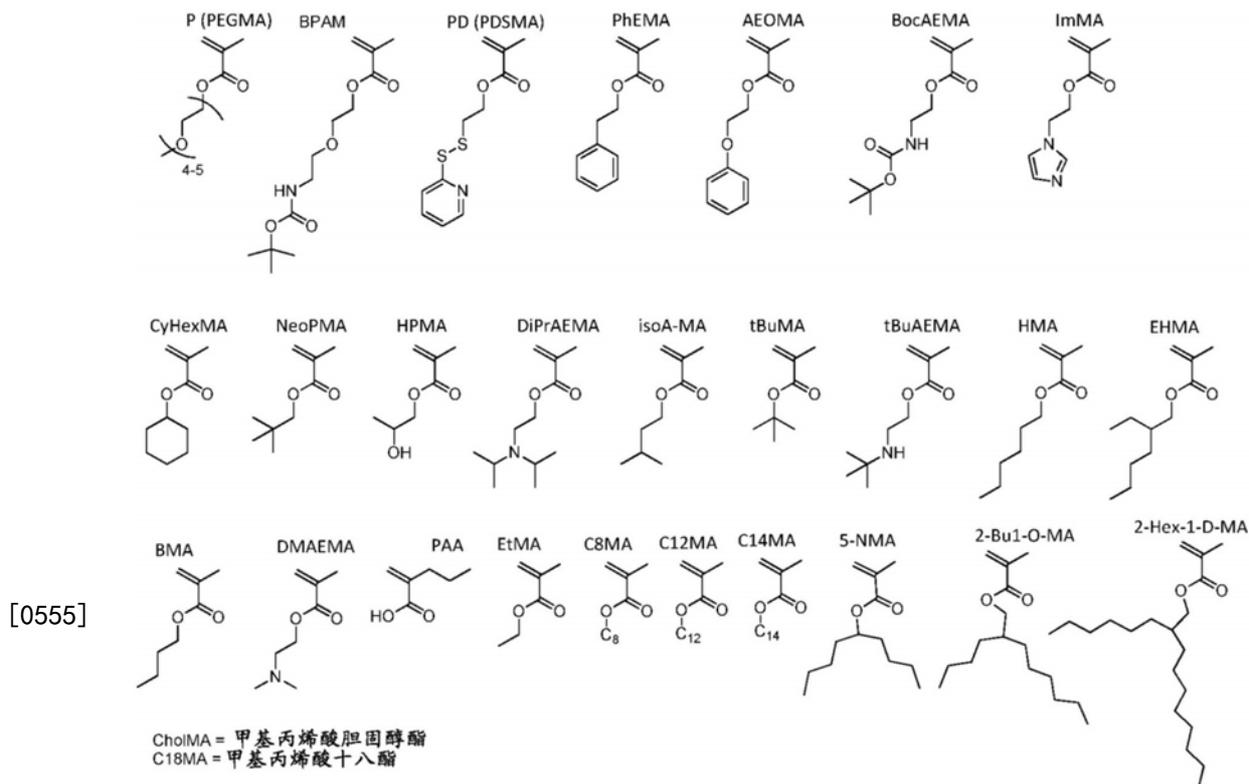
[0550] 在一些实施方式中，如本文所述的膜去稳定化聚合物和包含编码功能蛋白的mRNA的脂质纳米颗粒用于制备用于治疗与功能蛋白的缺乏相关的疾病的药物或药物组合。

[0551] 本发明通过以下非限制性实施例进一步说明。

[0552] 实施例

[0553] 在本说明书全文中，各种已知的首字母缩写词和缩写用于描述单体或来自这样的单体的聚合的单体残基。不限于此，除非另有说明：“BMA”（或字母“B”作为等同简化符号）表示甲基丙烯酸丁酯或其衍生的单体残基；“DMAEMA”（或字母“D”作为等同简化符号）表示甲基丙烯酸N,N-二甲基氨乙酯或其衍生的单体残基；“PAA”（或字母“P”作为等同简化符号）表示2-丙基丙烯酸或其衍生的单体残基；“PEGMA_n”（其中n=8-9或4-5）是指聚乙二醇化甲基丙烯酸单体， $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ 或其衍生的单体残基；“PDSMA”表示甲基丙烯酸2-(吡啶-2-基二硫(sulfanyl))乙酯或其衍生的单体残基；“TFPMA”表示甲基丙烯酸2,3,5,6-四氟苯酯或其衍生的单体残基；“PFPMA”表示甲基丙烯酸五氟苯酯或其衍生的单体残基。在每种情况下，任何这样的名称均表示单体（包括其所有的盐或离子类似物）、或源自单体聚合的单体残基（包括其所有的盐或离子类似物），并且对于本领域技术人员而言，具体表示形式通过上下文是显而易见的。以下实施例中的聚合物或大分子CTA的图示并不意味着描述特定嵌段内的结构单元的任何特定布置。如本文所用的“kDa”和“k”是指以千道尔顿为单位的分子量。

[0554] 以下图形说明了用于制备聚合物的单体的结构：



[0556] 在25°C下的氘化溶剂中在Varian 400M Hz上记录单体和聚合物的¹H NMR谱。

[0557] 使用以下设置在Bruker Esquire Ion Trap仪器上获得质谱:电喷雾离子化,毛细管出口电压为100.0V,从80.00m/z至2200.00m/z 扫描,干燥气流为6.0L/min。质谱还在配备有具有UV检测器的 Agilent 1290Infinity UHPLC系统的6520Accurate Mass Q-TOF LC/MS上进行。

[0558] 使用ViscotekGPC max VE2001和折射计VE3580 (Viscotek, Houston, TX),使用凝胶渗透色谱(GPC)测定DMF中共聚物样品的分子量和多分散性(PDI, M_w/M_n)。使用57°C下具有匹配保护柱的串联的两个PolarGel-M柱(300mM×7.5mM, Agilent Technologies) 或57°C下具有匹配保护柱的串联的两个PolarGel-L柱(300mM×7.5 mM, Agilent Technologies) 或57°C下串联的两个TSKgel G3000SW 柱(300mM×7.5mM, 10μm, Tosoh Biosciences LLC) 进行分析。使用含有1.0重量%LiBr的HPLC级二甲基甲酰胺(DMF)作为流动相。

[0559] 使用NanoDrop UV/Vis光谱仪(路径长度0.1cm)进行UV/Vis 光谱法。

[0560] 使用Malvern Zetasizer Nano ZS通过动态光散射测量聚合物的粒径。

[0561] 采用具有C18分析型反相柱 (ES Industries Chromega Columns, Sonoma C18产品目录号155B21-SMA-C18 (2), 100 \AA , $25.0\text{cm} \times 4.6 \text{ mM}$ 柱, 柱加热至 30°C ; 或加热至 30°C 的具有保护柱的C18 Phenomenex $5\mu 100\text{\AA} 250 \times 4.6\text{mM} \times 5$ 微米 (Part#00G-4252-E0) Luna柱) 的可变波长UV检测器在Shimadzu LD-20AB上进行HPLC分析。

[0562] 除非另有说明, 否则所有试剂均来自商业来源, 并且在用于聚合反应之前将单体自微量的稳定剂纯化。氰基-4-(乙基硫基硫代羰基) 硫戊酸 (ECT) 从Omm Scientific获得。除非另有说明, 否则在所有聚合反应中使用偶氮二异丁腈 (AIBN) (Wako chemicals) 作为自由基引发剂。

[0563] 实施例1: 聚合物顺序注射的脂质mRNA纳米颗粒制剂

[0564] 在15分钟内在室温下将DOTAP (Corden Pharma, Boulder, Colorado, USA; 产品目录号LP-R4-117) 或DOTMA (Avanti Polar Lipid Alabaster, Alabama, USA; 产品目录号890898P) 以 200mg/mL 溶解在200酒精标准强度乙醇中。在15分钟内在室温下将DMPE-PEG_{2K} (Corden Pharma, Boulder, Colorado, USA; 产品目录号LP-R4-123) 以 25mg/mL 溶解在200酒精标准强度乙醇中。在5分钟内在 75°C 下单独地将半琥珀酸胆固醇酯 (CHEMS) (Avanti Polar Lipid Alabaster, Alabama, USA; 产品目录号850524P) 和胆固醇 (CHOL) (Corden Pharma, Boulder, Colorado, USA; 产品目录号CH-0355) 以 25mg/mL 溶解在200酒精标准强度乙醇中。通常, 对于N:P比为7的 DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG_{2K} (50:32:16:2摩尔%) LNP的 2mL 制备物, 制备含有 $22\mu\text{L}$ 在200酒精标准强度乙醇中 200mg/mL 的 DOTAP、 $79\mu\text{L}$ 在200酒精标准强度乙醇中 25mg/mL 的CHEMS、 $31.4 \mu\text{L}$ 在200酒精标准强度乙醇中 25mg/mL 的CHOL、 $27.4 \mu\text{L}$ 在200酒精标准强度乙醇中 25mg/mL 的DMPE-PEG_{2K}和 $506\mu\text{L}$ 的200酒精标准强度乙醇的脂质乙醇混合物, 最终体积为 0.666mL 且最终脂质浓度为 11.83mg/mL 。基于DOTAP或DOTMA浓度, 以3.5至28的 N:P (氮:磷酸盐) 比制备脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂。以各种N:P比分别将DOTAP:CHEMS或DOTMA:CHEMS比率以50:32摩尔%固定为1.6。DMPE-PEG_{2K}从2至5摩尔%变化。调整CHOL摩尔%以得到 100摩尔%最终脂质浓度。

[0565] 将在 10mM Tris-HCl (pH7.5) (TriLink Biotechnologies, San Diego, California, USA; 产品目录号L-6107) 中 1mg/mL 的Fluc (萤火虫荧光素酶) mRNA储备溶液在 20mM HEPES/5%葡萄糖, pH 7.4 缓冲液 (HEPES缓冲液) 中稀释至 0.225mg/mL 。通过使用来自 Precision NanoSystems Inc (Vancouver BC, Canada) 的微流体装置在 12mL/分钟 的流速下以1:3的比率 (乙醇中的脂质混合物, HEPES缓冲液中的mRNA) 混合乙醇脂质溶液与在HEPES缓冲液中 0.225 mg/mL 的mRNA而以3.5至28的N:P比率组装mRNA/LNP。然后在室温下在33%乙醇中孵育mRNA/LNP 60分钟, 之后用100体积 (200 mL) 的HEPES缓冲液透析18小时。

[0566] 采用400RPM搅拌, 在1小时内将用于顺序注射的聚合物, 聚合物P1435 (NAG-C₅N-PEG_{0.6k}-[PEGMA₃₀₀_{87.9%}-PDSMA_{12.1%}]_{3.9kDa}-b-[DMAEMA_{34.7%}-BMA_{53.5%}-PAA_{11.8%}]_{6.1kDa}), 以 20mg/mL 溶解在 HEPES缓冲液中, 然后在 4°C 下储存过夜。注射前在HEPES缓冲液中将聚合物稀释至 7.5mg/mL 。

[0567] 如果共注射mRNA/LNP和聚合物, 则制备各自的2X溶液。恰好在给料前, 将溶液混合并立即注射。

[0568] 通过将 $10\mu\text{L}$ 制剂添加到一次性微量比色皿中的 $90\mu\text{L}$ HEPES缓冲液并使用Malvern Instrument ZETASIZER NANO-ZS分析来测量制剂粒径。LNP显示出 52nm (z-平均) 的粒径。通

过将10 μ L制剂添加到一次性1mL比色皿中的740 μ L HEPES缓冲液来测定pH 7.4下的制剂zeta-电位。通过将10 μ L制剂添加到一次性1mL比色皿中的 740 μ L的蔗糖乙酸酯缓冲液 (pH 4) 来测量pH 4下的制剂zeta-电位。将zeta浸入式单元 (dip cell) 插入1mL比色皿中, 并使用ZETASIZER NANO-ZS分析制剂。通常, DOTMA LNP在pH7下具有+12mV的 zeta电位, 在pH 4.0下具有+16mV的zeta电位。使用SYBR Gold染料可及性试验在96孔板中测量LNP紧密结合mRNA的能力。通常, 将0.01mg/mL mRNA的50 μ L脂质制剂加入到150 μ L稀释SYBR Gold储备溶液 (在3mL HEPES缓冲液中的1 μ L储备SYBR Gold) 中, 并在室温下伴随搅拌 (100RPM) 孵育15分钟。在495nm的激发波长和538nm的发射波长下读取荧光。通过将经配制的mRNA的荧光强度除以游离mRNA的荧光强度再乘以100计算百分染料可及性。当在HEPES缓冲液中制备时, DOTMA LNP显示2%染料可及性。下表2显示了示例性LNP制剂的表征。

[0569] 表2

样品#	RP450-2
聚合物或脂质	DOTMA:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2K (50:32:13:5)
N/P	27
聚合物或脂质浓度 (mg/mL)	10.0
视觉外观	乳白色(+)
染料可及性% HEPES pH 7.4	2%
Z-平均 (nm)	52
PDI	0.200
数量 (nm)	30
Pk 1平均Int (nm)	57
Pk 2平均 Int (nm)	4191

[0570]

样品#	RP450-2
Pk 1面积Int (%)	97
Pk 2面积Int (%)	4
ZP pH 7.4 (mV)	12
ZP pH 4 (mV)	16
尺寸分类数据质量	良好

[0571] 实施例2: 脂质-mRNA制剂及聚合物的共注射或顺序注射的mRNA体内表达

[0572] 使用雌性CD-1小鼠 (7-10周龄) 评估Fluc mRNA/LNP+聚合物制剂。以1mg/kg的mRNA和13至103mg/kg的脂质静脉施用制剂, 每组注射5只小鼠。以共注射形式或在Fluc mRNA/LNP注射后1、5、10、30、60或120分钟顺序地注射的方法, 静脉内注射75mg/kg的单独聚合物P1435。将注射HEPES缓冲液的小鼠用作对照。对于每次注射, 给予小鼠约0.25mL的最终剂量体积或基于个体体重的10 m/kg。

[0573] 使用Xenogen IVIS Lumina II成像系统 (Caliper Life Sciences, 现为Perkin

Elmer), 通过检测小鼠中的发光评估荧光素酶的体内表达。在给药后6小时进行成像。在成像前15分钟, 每只小鼠通过腹膜内注射以15mg/mL (溶解在PBS中) 接受0.25mL D-荧光素(Perkin Elmer), 其是荧光素酶底物。在成像前几分钟, 将小鼠置于异氟烷室中以诱导麻醉(异氟烷浓度为~3%)。随后, 将小鼠移入IVIS成像室中, 鼻子连接到装有异氟烷的鼻锥, 小鼠的腹侧朝上。使用Living Image软件(Caliper Life Sciences) 获得发光图像, 曝光时间、分箱 (binning) 和F/Stop在整个研究中保持不变。成像一完成便将小鼠放回笼中, 它们在1-3分钟内恢复。

[0574] 对所有小鼠完成图像采集后, 使用Living Image软件分析发光结果。简而言之, 首先调整每个图像的色度以显示特定的发光信号并消除背景信号。然后使用ROI工具定义肝脏的感兴趣区域 (ROI), 并点击ROI测量按钮以显示光子通量数据。使用每只动物的ROI的总通量 (光子/秒) 表示发光强度。对于每个制剂组, 从全部5只小鼠的总通量取平均数用于比较。

[0575] 表3显示了采用DOTMA:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG_{2k}+Fluc mRNA纳米颗粒处理的动物的肝脏中的发光值, 具有或不具有在第一次注射后10分钟的聚合物P1435的顺序注射。数据在给药后6小时获得。单独的Fluc mRNA LNP显示出很少的发光 (仅比缓冲液高3 倍), 但是采用聚合物P1435顺序注射, 检测到发光信号的100倍提高。

表3

总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	脂质 剂量 (mg/kg)	mRNA 剂量 (mg/kg)	聚合物	聚合物 剂量 (mg/kg)	注射之间的 时间 安排	几何 平均值	STDEV
缓冲液	0	0	无	0	NA	3.38E+05	1.00E+00
DOTMA:CHEMS: CHOL:DMPE- PEG2K (50:32:13:5) N:P 27 + Fluc mRNA	100	1	无	0	NA	6.24E+05	2.66E+05
	100	1	P1435	75	10 min	6.97E+07	4.86E+07

[0577] 表4显示了采用DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG_{2k}+Fluc mRNA纳米颗粒处理的动物的肝脏中的发光值, 具有或不具有在第一次注射后10分钟的聚合物P1435或聚合物P1299的顺序注射。评估从14至27的N:P比率和从至5摩尔%的DMPE-PEG_{2k}变化。数据在给药后6小时获得。再次地, 单独的mRNA/LNP显示出很少的发光, 但是采用聚合物P1435顺序注射, 检测到发光信号的100倍提高。将N:P比率从27降至14, 并将DMPE-PEG_{2k}从5降至3.5摩尔%进一步使发光信号再提高3倍。顺序注射聚合物P1299 (NAG-C₅N-PEG_{0.6k}-[PEGMA₃₀₀_{80%}-PDSMA_{10%}-BPAM_{10%}]_{3.5kDa}-b-[DMAEMA_{34%}-BPAM_{56%}-PAA_{10%}]_{6.3kDa}) 相比于单独的 mRNA/LNP显示出发光信号的5倍提高。

表4

总通量
(光子/秒)

[0578]

脂质-mRNA 纳米颗粒	N:P	DMPE- PEG2k mol%	脂质 剂量 (mg/kg)	mRNA 剂量 (mg/kg)	聚合物	注射之 间的时 间安 排	几何 平均 值	STDEV
缓冲液	NA	NA	0	0	无	NA	2.58E+05	NA
DOTAP:CHE MS:CHOL:	27	5	113	1	无	NA	1.70E+06	8.94E+05
DMPE- PEG2K (2-5%) (50:32:13: X mol %) + Fluc mRNA	21	5	88	1	P1435 75 mg/kg	10 min	1.38E+08	1.88E+08
	14	5	59	1			2.51E+08	2.07E+08
	27	3.5	107	1			3.43E+08	9.68E+07
	14	3.5	56	1			3.80E+08	1.26E+08
	27	2	102	1			2.26E+08	2.24E+08
	27	5	113	1			P1299 75 mg/kg	8.34E+06

[0579] 表5显示了采用DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2k+Fluc mRNA纳米颗粒处理的动物的肝脏中发光值,具有或不具有在第一次注射或共注射后10分钟聚合物P1435的顺序注射。评估3.5至14的 N:P比率。数据在给药后6小时获得。再次地,单独的mRNA/LNP 显示出很少的发光,但是采用聚合物P1435顺序注射,检测到发光信号的300倍提高。将N:P比率从14降至7,并将DMPE-PEG2k降至 2摩尔%导致与单独的mRNA/LNP相比,发光信号接近500倍的提高。将N:P比率进一步降至3.5导致更低的发光。顺序注射mRNA/LNP 和聚合物P1435相比于共注射显示出略微更好的发光信号。

表5

总通量(光子/秒)

[0580]

脂质-mRNA 纳米颗粒	N:P	脂质 剂量 (mg/kg)	mRNA 剂量 (mg/kg)	聚合物	注射之 间的时 间安 排	几何 平均 值	STDEV
缓冲液	NA	0	0	无	NA	3.19E+05	NA
DOTAP:CHE MS:CHOL:	14	53	1	无	NA	1.07E+06	1.31E+05
DMPE- PEG2K (50:32:14.5:2 mol %) + Fluc mRNA	3.5	13	1	P1435 75 mg/kg	10 min	5.82E+07	5.61E+07
	7	26	1			5.07E+08	6.21E+08
	14	53	1			3.58E+08	3.93E+08
	14	53	1		共注射	2.48E+08	3.69E+08

[0581] 表6显示了采用DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2k+Fluc mRNA纳米颗粒处理的动物的肝脏中的发光值,具有在第一次注射或共注射后1至120分钟的聚合物P1435顺序注射。数据在给药后6小时获得。发光信号在1和10分钟之间相似,并从30分钟至120分钟下降。顺序注射mRNA/LNP和聚合物P1435相比于共注射显示出高 4倍的发光信号。

表6

总通量(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	聚合物	注射之间的 时间 安排	mRNA 剂量 (mg/kg)	几何 平均值	STDEV
缓冲液	无	NA	0	2.52E+05	NA
[0582] DOTAP:CHEMS: CHOL: DMPE- PEG2K (50:32:16:2) N:P 7 26 mg/kg + Fluc mRNA	P1435 75 mg/kg	共注射	1	1.57E+08	1.38E+08
		1 min	1	6.09E+08	3.40E+08
		5 min	1	8.24E+07	2.28E+08
		10 min	1	3.22E+08	2.43E+08
		30 min	1	7.69E+07	5.23E+07
		60 min	1	1.57E+07	1.24E+07
		120 min	1	6.03E+06	1.30E+07

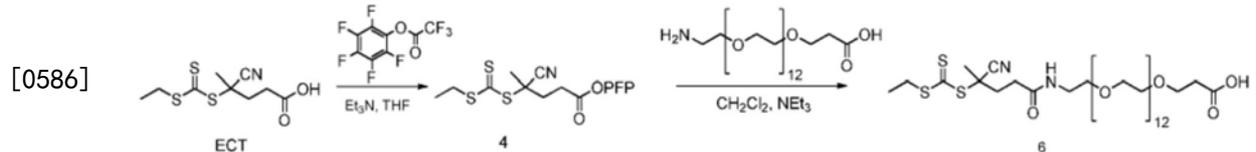
[0583] 表7显示了采用DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2k+Fluc mRNA纳米颗粒处理的动物的肝脏中的发光值,具有在第一次注射后1分钟聚合物P1435的顺序注射。数据在给药后6小时获得。在本研究中,测试了两种不同的Fluc mRNA。Fluc 2 mRNA相比于Fluc 1 mRNA显示出发光信号的15倍提高。相比于具有ARCA帽结构、伪U/5-甲基-C修饰和120个碱基的聚A尾长度的Fluc 1,Fluc 2 mRNA 含有仅伪U、通过酶促加帽获得的帽1结构和更长的聚A尾(约为Fluc 1的聚A尾的两倍~220个碱基)

表7

总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	聚合物	Fluc mRNA	注射之间的 时间 安排	mRNA 剂量 (mg/kg)	几何 平均值	STDEV
缓冲液	无	无	NA	0	1.82E+05	NA
[0584] DOTAP:CHEMS: CHOL:DMPE- PEG2K (50:32:16:2) N:P 7 26 mg/kg	P1435 75 mg/kg	Fluc 1 mRNA	1 min	1	2.10E+08	1.57E+08
		Fluc 2 mRNA		1	3.04E+09	2.12E+09

[0585] 实施例3:PEG_{0.6k}-CTA(化合物6)的合成



[0587] HOOC-PEG_{0.6k}-ECT(化合物6)。向100mL单颈圆底烧瓶中加入ECT(473mg,2.0mmol,0mm Scientific),然后加入无水四氢呋喃(20mL)和三乙胺(0.307mL,2.2mmol)。在0℃下搅拌该混合物5分钟,然后将三氟乙酸五氟苯酯(0.368mL,2.14mmol)滴加至搅拌反应物中。在0℃下搅拌混合物5分钟,然后加温至室温。

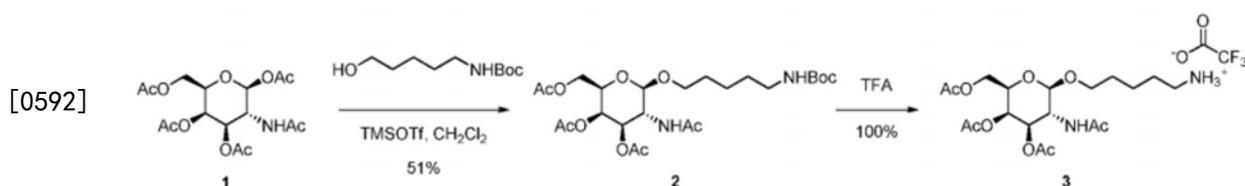
[0588] 使得在室温下反应20分钟后,将反应物稀释至EtOAc(100mL)中并用饱和NaHCO₃水溶液(3×40mL)萃取。分离EtOAc层,经Na₂SO₄干燥,过滤,然后蒸发,从而提供黄色油状的粗PFP-酯4。

[0589] 将粗酯4溶于无水CH₂Cl₂(20mL)中,然后冷却至0℃。向冷却的搅拌溶液中加入三乙

胺(0.251mL,1.8mmol)和氨基-dPEG12-酸(1.12g,1.8mmol,Quanta Biodesign),并将混合物加温至室温。在室温下搅拌20分钟后,使用旋转蒸发仪蒸发反应混合物,提供黄色油状物。将黄色油状物溶于 CH_2Cl_2 (约2mL)中并通过快速色谱(SiO_2 ,柱尺寸为5.0cm ID \times 10.0cm长;100% CH_2Cl_2 等度洗脱500 mL;然后 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$,20:1v/v等度洗脱500mL;然后 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$,10:1v/v等度洗脱3.0L)纯化产物。将通过TLC测定的含产物级分合并,通过旋转蒸发除去溶剂,从而提供750mg(48%)的橙色油状的期望化合物6。 $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): δ 1.35(t,3H, $J=7.5$ Hz, CH_3),1.89(s,3H, CH_3),2.38-2.57(m,6H),3.32-3.41(m,4H),3.50-3.75(m,48H)。

[0590] 实施例4:Nag(OAc4)C5N-PEG_{0.6k}-CTA(化合物8)的合成

[0591] 步骤1.化合物3的合成.



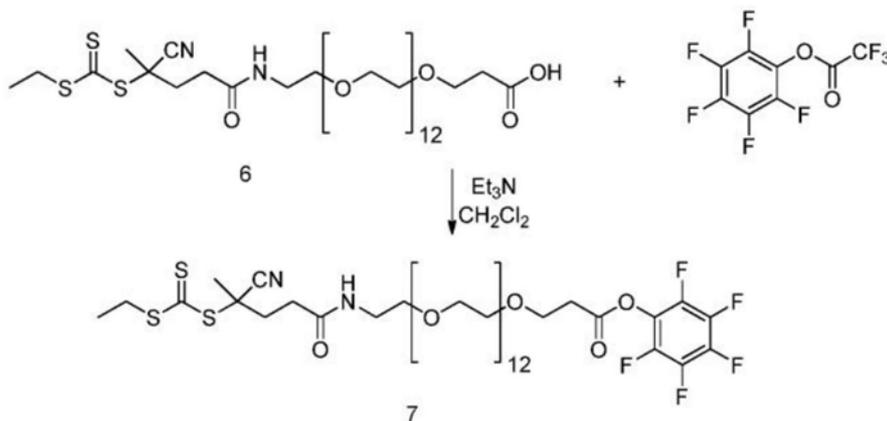
[0593] N-t-Boc-5-氨基-1-戊醇。向含有5-氨基-1-戊醇(15.0g,145.4 mmol)在水(140mL)和饱和 NaHCO_3 水溶液(1.4mL)中的溶液的1.0L单颈圆底烧瓶中加入二碳酸二叔丁酯(33.3g,152.7mmol)在THF(280mL)中的溶液。然后将混合物在室温下搅拌过夜,烧瓶向大气开放。将反应混合物用饱和 NaHCO_3 水溶液(90mL)稀释,并用EtOAc(400mL)萃取。分离有机层,经 Na_2SO_4 干燥,过滤并蒸发溶剂,从而提供28.9g(98%)无色澄清油的最终产物。 $^1\text{H NMR}$ 分析显示产物不含杂质,且不再尝试进一步纯化。或者,N-t-Boc-5-氨基-1-戊醇可以从TCI America of Portland,OR获得。

[0594] 化合物2.通过文献(Westerlind,U等,Glycoconj.J.2004,21,227-241)中采用的方法制备化合物2。向500mL单颈圆底烧瓶中加入2-乙酰氨基-1,3,4,6-四-O-乙酰基-2-脱氧-D-吡喃半乳糖1(12.8g,32.8mmol),然后加入无水 CH_2Cl_2 (150mL)和三氟甲磺酸三甲基硅酯(14.3mL,79.2mmol)。在氩气流下回流搅拌该混合物过夜(约18小时)。将反应混合物冷却至 0°C 并用三乙胺(6.4mL,45.9mmol)处理30分钟,然后加温至室温,接着用饱和 NaHCO_3 水溶液(100mL)洗涤。分离有机层并经 Na_2SO_4 干燥,过滤并蒸发,从而提供粗噁唑啉中间体。向该粗噁唑啉产物中加入无水 CH_2Cl_2 (200mL)、N-t-Boc-5-氨基-1-戊醇(10.0g,49.2mmol)和3 Å分子筛(18.0g,在 150°C 下干燥 $>24\text{h}$)。在氩气覆盖层下室温搅拌该混合物30分钟。将三氟甲磺酸三甲基硅酯(2.97mL,16.4mmol)加入到反应混合物中,并在室温下搅拌溶液过夜。将溶液冷却至 0°C 并用三乙胺(3.2mL,23.07 mmol)处理30分钟,然后升温至室温。反应达到室温后,过滤混合物并蒸发母液,从而提供棕色油状的粗产物,将粗产物溶于无水吡啶(100mL)中并用乙酸酐(36mL,38.2mmol)处理。在氩气氛下室温搅拌该混合物过夜,然后在真空下蒸发,得到棕色液体,将棕色液体溶于 CH_2Cl_2 (200mL)中。在室温下将该溶液与饱和 NaHCO_3 水溶液(100mL)和固体 NaHCO_3 在开放烧瓶中剧烈搅拌以淬灭剩余的 Ac_2O ,并分离有机层。用 CH_2Cl_2 (1 \times 200mL)萃取水层并合并所有有机层。用饱和 NaHCO_3 水溶液(1 \times 100mL)洗涤有机层,分离,经 Na_2SO_4 干燥,过滤并蒸发,从而提供棕色油状的粗产物,然后将粗产物溶于 CH_2Cl_2 (15mL)中并使用柱色谱(SiO_2 ,柱尺寸为7.5cm ID \times 16.0cm长;用EtOAc:己烷1:3v/v洗脱500mL,EtOAc:己烷4:1v/v洗脱500mL,100%EtOAc洗脱1.0L,EtOAc中10v/

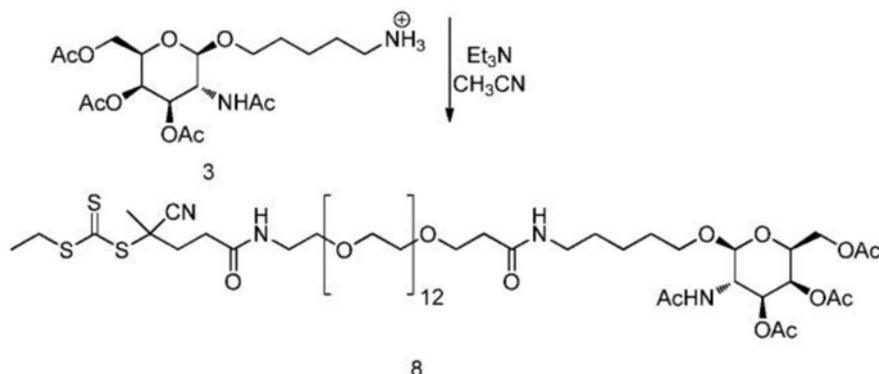
v%的MeOH洗脱3.0L) 纯化。合并含有产物的级分并在真空下蒸发至白色固体, 通过用乙醚研磨而进一步纯化白色固体以得到白色固体的期望产物 (5g, 29%)。ESI MS $[M+H]^+$ m/z 533.4。

[0595] 化合物3。向100mL圆底烧瓶中加入化合物2 (3.14g, 5.9mmol), 然后加入三氟乙酸 (10mL, TFA)。搅拌混合物直到所有碳水化合物完全溶解, 然后在真空下蒸发TFA以得到淡黄色油状物。向该油状残余物中加入乙醚 (10mL), 将混合物超声处理2-5分钟, 倾析上清液。重复研磨过程 ($3 \times 10\text{mL Et}_2\text{O}$) 并在真空下干燥粗产物以得到白色泡沫状物 (3.2g), 其如下所述使用。

[0596] 步骤2.



[0597]



[0598] 化合物7。向250mL单颈圆底烧瓶中加入化合物6 (3.37g, 3.9 mmol, HPLC纯化的), 然后加入无水 CH_2Cl_2 (40.0mL) 和三乙胺 (2.17mL, 15.6mmol)。在低氩气流下在 0°C 下搅拌该溶液5分钟, 然后将三氟乙酸五氟苯酯 (737 μL , 4.29mmol) 滴加至反应混合物。然后将混合物加温至室温并在室温下搅拌30分钟。

[0599] 通过查看起始原料 ($R_f = 0.30$) 的消失和PFP活化产物 ($R_f = 0.64$) 的出现, 通过TLC (SiO_2 , CH_2Cl_2 和MeOH, 9:1v/v) 跟踪反应进程。一旦通过TLC确认起始原料消耗, 则用 CH_2Cl_2 (300mL) 稀释粗反应, 并使用 NaHCO_3 ($3 \times 50\text{mL}$) 萃取混合物。分离有机层, 经 Na_2SO_4 干燥, 过滤并蒸发, 提供3.9g (97%) 橙色油状的最终产物。使用高真空彻底除去所有溶剂和挥发性试剂过夜, 然后粗产物继续进行下一合成步骤。

[0600] 化合物8。向100mL单颈圆底烧瓶中加入化合物7 (3.6g, 3.5 mmol), 然后加入无水乙腈 (7.5mL) 和三乙胺 (1.46mL, 10.5mmol)。在氩气流下搅拌混合物直至所有物质溶解, 然后用冰浴冷却至 0°C 。将脱保护的胺3 (1.81g, 3.32mmol) 溶于无水乙腈 (7.5mL) 中, 并在 0°C

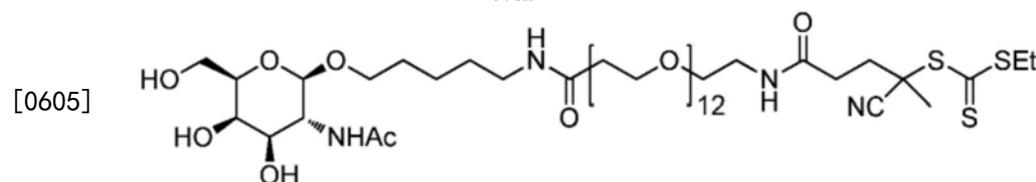
下在5分钟内将所得溶液滴加到反应混合物中。使反应物升温至室温,并在室温下搅拌过夜。使用旋转蒸发仪蒸发溶剂,并在高真空下干燥粗产物。通过将反应混合物(5 μ L)稀释到CH₃CN(695 μ L)中而通过分析型HPLC跟踪反应进程,并通过HPLC(10%CH₃CN 2分钟,然后是经20分钟从10%至60%CH₃CN的线性梯度,总流速为1.0mL/min)分析50 μ L的稀释混合物。期望产物的保留时间为21.0分钟。

[0601] 将粗产物溶于MeOH(约40mL)中并使用制备型反相HPLC(Phenomenex,Luna 5C18(2),100Å,25.0cm \times 21.2mm,配备有SecurityGuard PREP Cartridge,C18 15 \times 21.2mm ID,CH₃CN/H₂O,30% CH₃CN 5分钟,然后是经20分钟从30%至53%CH₃CN的线性梯度,总流速为20.0mL/min)在2mL等分试样中纯化。在22.0和23.0分钟之间洗脱期望产物。将含有期望产物的所有级分合并,并使用旋转蒸发仪完全除去溶剂以在真空下过夜干燥后得到2.54g(60%)化合物8。

[0602] ESI MS:m/z 1277.6([M+H]⁺),650.6([M+Na+H]²⁺),658.5([M+K+H]²⁺),661.7([M+2Na]²⁺),669.7([M+Na+K]²⁺),677.5([M+2K]²⁺)。

[0603] ¹H NMR(CD₃OD): δ 1.35(t,3H,J=7.5Hz),1.33-1.62(m,6H),1.88(s,3H),1.93(s,3H),1.95(s,3H),2.03(s,3H),2.15(s,3H),2.32-2.56(m,6H),3.15-3.25(m,2H),3.25-3.42(m,6H),3.50-3.70(m,44H),3.97-4.20(m,4H),4.55(d,1H,J=8.4Hz),5.05(dd,1H,J₁=11.4Hz,J₂=3.4Hz),5.33(dd,1H,J₁=3.4Hz,J₂=0.9Hz)。

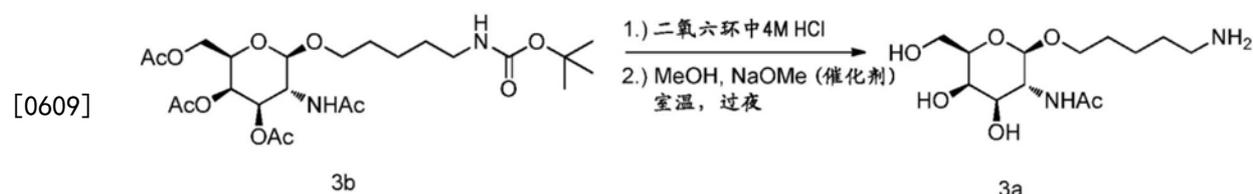
[0604] 实施例5:Nag(OH)C5N-PEG_{0.6K}-CTA(化合物8a)的制备



[0606] 化合物8a

[0607] 除了用化合物3a的无保护糖化合物替换实施例4中的化合物3以及实施例3的化合物6和实施例4的化合物3之间的偶联反应已经如下所示针对化合物6a和3a进行了修改以外,以与实施例4中Nag(OAc₄)C5N-PEG_{0.6K}-CTA(化合物8)类似的方式制备Nag(OH)C5N-PEG_{0.6K}-CTA(化合物8a)。

[0608] 如下从化合物3b制备化合物3a。



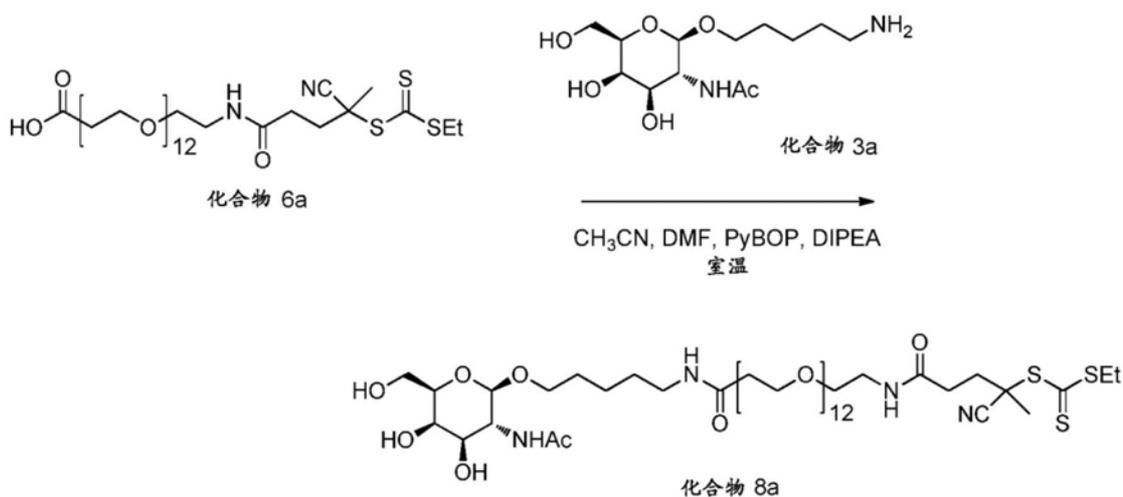
[0610] 向250mL单颈圆底烧瓶中加入化合物3b(1.86g,3.5mmol),然后加入二氧六环中的4M HCl(30mL)。搅拌并超声处理该混合物直至所有糖完全溶解。然后在旋转蒸发仪上蒸发混合物,以提供油状残留物。为完全除去所有HCl气体,将化合物溶于二氧六环(30mL)中并通过旋转蒸发除去溶剂。总共进行溶剂交换过程3次以完全除去所有HCl。然后将烧瓶置于高真空下>30分钟,提供白色泡沫状固体。将粗化合物溶于无水MeOH(25mL)中并用MeOH中的0.5M甲醇钠溶液(5.80g,7.175mL,3.59mmol,1.025当量,按重量测量以确保加入的准确

度)处理。第一当量的NaOMe用于使季胺盐去质子化,从而释放游离胺。仅需要超出一当量的少许过量NaOMe(即0.025当量,0.09mmol)以促进乙酰基脱保护。一旦加入NaOMe,则在氩气流下室温下搅拌混合物过夜。通过将产物以约1.0 μ g/mL溶解在MeOH中,使用Agilent Q-TOF液相色谱质谱仪通过LCMS监测反应进展。LC使用C18 UPLC柱(Agilent Eclipse Plus C18,产品目录号 959757-902,1.8 μ m,2.1mm \times 50mm,室温柱,含有0.1%甲酸的CH₃CN/H₂O,5%CH₃CN的1分钟等度梯度,然后是从5%至90%CH₃CN的4分钟线性梯度,总流速为0.4mL/min)。使用上述HPLC条件,期望产物在0.4-0.5分钟之间洗脱,而粗中间产物(即,除去Boc,而乙酰基仍然存在)在2.0-2.2分钟之间洗脱。一旦将糖完全脱保护,则通过向反应混合物中加入稍微过量的乙酸(10 μ L,0.175 mmol)淬灭催化性NaOMe(0.09mmol)。然后通过旋转蒸发仪上蒸发除去所有溶剂。该方法得到1.1g(100%)白色固体状的最终产物。使用具有CD₃OD作为溶剂的400MHz ¹H NMR表征最终产物,且所有光谱与期望产物化合物3a一致。

[0611] 如下制备Nag(OH)C5N-PEG_{0.6K}-CTA(Nag(OH)C5N-PEG₁₂-CTA;化合物8a)。如实施例3中(化合物6)所述制备化合物6a。

[0612] 向250mL单颈圆底烧瓶中加入化合物6a(3.17g,3.68mmol),然后加入无水乙腈(10mL)。在单独的烧瓶中将化合物3a(1.07g,3.5mmol)溶于无水DMF(10mL)中。一旦化合物3a部分地溶解为乳白色悬浮液,则将溶液转移到100mL加料漏斗中。在另一烧瓶中加入PyBOP(2.0g,3.85mmol)和无水DMF(10mL)。将PyBOP/DMF溶液置于20mL注射器中。然后将所有3种溶液(化合物6a/CH₃CN、化合物3a/DMF和PyBOB/DMF)同时且尽可能快地合并,同时剧烈搅拌反应溶液。一旦添加完成,则用N,N'-二异丙基乙胺(1.22 mL,7.0mmol)处理反应物,并在氩气流下室温搅拌溶液30分钟。通过将粗反应物(1.0 μ L)溶解在MeOH(1.0mL)中并注射1.0 μ L,使用Agilent Q-TOF液相色谱质谱仪测定反应进程(图1-2)。LC使用C18 UPLC柱(Agilent Eclipse Plus C18,产品目录号959757-902,1.8 μ m,2.1mm \times 50mm,室温柱,含有0.1%甲酸的CH₃CN/H₂O,5%CH₃CN的1分钟等度梯度,然后是从5%至90%CH₃CN的4分钟线性梯度,总流速为0.4mL/min)。使用上述HPLC条件,期望产物在3.0-3.1分钟之间洗脱。在室温下搅拌反应30分钟后,在质谱分析中未检测到糖起始原料(即,化合物3a)。质谱分析证实存在化合物8a([M+Na]⁺¹=1173.5207m/z;[M+H]⁺¹=1151.5397m/z)。

[0613] 反应30分钟后,通过加入H₂O(25mL)稀释化合物8a的粗反应混合物,并使用Shimadzu的C18制备型反相HPLC(Phenomenex,Luna 5C18(2),部件号00G-4252-P0-AX,100 Å ,25.0cm \times 21.2mm,具有SecurityGuard PREP Cartridge,C18 15 \times 21.2mm ID,部件号AJ0-7839,具有0.01%TFA的CH₃CN/H₂O,5%CH₃CN的5分钟等度梯度,然后是从5%至50%CH₃CN的17分钟线性梯度,然后是从50%至53%CH₃CN的3分钟线性梯度,总流速为20.0mL/min,室温柱)纯化。每次HPLC运行注射2.0mL溶解在DMF/H₂O中的粗化合物(约75mg/mL)。使用上述HPLC纯化条件,期望产物化合物8a在21.5和22.5分钟之间洗脱。合并含有期望产物的所有级分并使用旋转蒸发仪将水/CH₃CN溶剂完全除去,然后高真空下过夜。HPLC纯化和高真空过夜后的最终产物的综合产率产生3.05g(76%)亮橙色固体状的期望产物。¹H NMR分析与期望产物化合物8a的存在一致。



[0614]

[0615] 实施例6: 聚合物合成的一般程序

[0616] 第一嵌段合成的一般程序: 使用以下近似比率制备第一嵌段聚合物: [单体/CTA/引发剂] = [15-20/1/0.5], 在DMF中为约1.3M。用氮气或氩气的氧吹扫后, 将聚合反应加热至60-68°C一定的时间(通常为1小时15分钟至3小时), 直至达到期望分子量。通过放置在冰浴中并将反应向空气开放停止聚合反应。通过使用2kDa MWC0透析管进行甲醇透析(3-7天)纯化期望聚合物。通过在减压下除去溶剂分离所得聚合物。

[0617] 第二嵌段合成的一般程序: 使用以下近似比率制备第二嵌段聚合物: [单体/CTA/引发剂] = [100-130/1/0.5], 在DMF中为约2-3M。用氮气或氩气的氧吹扫后, 将聚合反应加热至60-68°C一定的时间(通常为3-6小时), 直至达到期望分子量。通过放置在冰浴中并将反应向空气开放停止聚合反应。通过沉淀到乙醚/己烷中和/或使用2kDa MWC0透析管进行甲醇透析(3-5天)纯化期望聚合物。可以通过在减压下除去溶剂, 或使用2kDa MWC0透析管进行水透析, 然后冻干来分离所得聚合物。

[0618] 实施例7: 测定聚合物合成期间聚合物的单个嵌段内的单体掺入

[0619] 已经通过以下程序测定本文示例和请求保护的聚合物的给定聚合物嵌段(通常为第一或亲水性聚合物嵌段)内给定单体的量。通过分析型HPLC分析在聚合反应之前和之后(即T₀(零时)和T_f(终时))采集的样品, 以测定单体消耗和/或单体掺入的程度。

[0620] 通过在氮气或氩气吹扫之前取样聚合反应溶液而测定聚合反应中的初始单体量(0时, T₀)。将反应溶液的样品(20μL)从反应溶液中取出并稀释到180μL甲醇(MeOH)中。将所得溶液的一部分(10 μL)进一步稀释到590μL MeOH中, 以得到总体稀释度为1:600(从聚合反应开始)的用于通过分析型HPLC分析的测试样品。

[0621] 聚合反应完成后, 类似于上述T₀样品来制备终时(T_f)样品。

[0622] 使用加热至30°C的具有保护柱的C18 Phenomenex 5μ100Å 250×4.6mm×5微米(Part#00G-4252-E0) Luna柱进行T₀和T_f样品的分析型HPLC分析。对每个时间点(即, T₀和T_f)制备三个独立稀释物, 并对每个时间点进行分析。将10μL样品注射到柱上并用以下梯度洗脱。保持具有0.1% TFA的5%乙腈/水等度洗脱2分钟。切换到从5%至95%乙腈的25分钟线性梯度。保持95%乙腈等度洗脱5分钟。返回至5%乙腈0.01分钟。保持5分钟具有0.1% TFA的5%乙腈/水等度洗脱。对于T₀和T_f二者使用至少三个独立样品制备物计算嵌段内的单体掺入。

[0623] 使用以下方法计算给定单体的掺入%：

[0624] a. 计算三个独立样品制备物的平均 T_0 和 T_f 单体峰面积

[0625] b. 计算反应中单个单体的消耗(单体消耗%)：

[0626] $= (1 - (T_{f, \text{平均}} \text{单体峰面积} / T_{0, \text{平均}} \text{单体峰面积})) \times 100$ 。

[0627] c. 基于单体投入百分比计算单个单体的消耗摩尔分数

[0628] $= (\text{单体转化}\% (\text{在上述步骤 (b) 中计算}) \times 0.01) \times \text{单体进料}\%$ 。

[0629] d. 聚合反应中的总单体消耗和总转化百分比：

[0630] i. 总单体消耗 = 在上述步骤 (c) 中计算的单个单体消耗摩尔分数之和。

[0631] ii. 总转化% = 总单体消耗 (在上述步骤 (d) (i) 中计算) $\times 100$ 。

[0632] e. 计算聚合物中各个单体的单体掺入百分比

[0633] i. $= (\text{消耗单体摩尔分数 (上述步骤 (c))} / \text{总消耗单体 (上述步骤 (d) (i))}) \times 100$ 。

[0634] 实施例8:测定聚合物合成期间聚合物的单个嵌段内的单体掺入

[0635] 已经通过以下程序测定本文示例和请求保护的聚合物的给定聚合物嵌段(通常为第二聚合物嵌段或含有PAA、BMA和DMAEMA的聚合物嵌段)内的给定单体的量。通过分析型HPLC分析在聚合反应之前和之后(即 T_0 (零时)和 T_f (终时))采集的样品,以测定单体消耗和/或单体掺入的程度。

[0636] 通过在氮气吹扫之前取样聚合反应溶液而测定聚合反应中的初始单体量(0时, T_0)。将反应溶液的样品(20 μL)取出并稀释到180 μL 含有0.1%TFA的1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP/甲醇(MeOH)/纳米纯水(H_2O))(2:1:1, v/v)中。将所得溶液的一部分(10 μL)进一步稀释到590 μL 含有0.1%TFA的HFIP/MeOH/ H_2O (2:1:1, v/v)中,以提供总体稀释度为1:600(从聚合反应开始)的用于通过分析型HPLC分析的测试样品。

[0637] 聚合反应完成后,类似于上述 T_0 样品制备终时(T_f)样品。将反应溶液的样品(20 μL)取出并稀释到180 μL 含有0.1%TFA的1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP/甲醇(MeOH)/纳米纯水(H_2O))(2:1:1, v/v)中。将所得溶液的一部分(10 μL)进一步稀释到590 μL 含有0.1%TFA的HFIP/MeOH/ H_2O (2:1:1, v/v)中,以提供总体稀释度为1:600(从聚合反应开始)的用于通过分析型HPLC分析的测试样品。

[0638] 使用加热至30 $^{\circ}\text{C}$ 的具有保护柱的C18 Phenomenex 5 μm 100 \AA 250 \times 4.6mm \times 5微米(Part#00G-4252-E0)Luna柱进行 T_0 和 T_f 样品的分析型HPLC分析。针对每个时间点(即, T_0 和 T_f)制备和分析三个独立稀释物。将10 μL 样品注射到柱上并用以下梯度洗脱。保持10分钟具有0.1%TFA的5%乙腈/水的等度洗脱。切换到从5%至15%乙腈的10分钟线性梯度。切换到从15%至95%乙腈的20分钟线性梯度。保持5分钟95%洗脱乙腈的等度洗脱。返回至5%乙腈0.01分钟。保持5分钟具有0.1%TFA的5%乙腈/水的等度洗脱。对于 T_0 和 T_f 二者使用至少三个独立样品制备物计算嵌段内的单体掺入。

[0639] 使用以下方法计算给定单体的掺入%：

[0640] a. 计算三个独立样品制备物的平均 T_0 和 T_f 单体峰面积

[0641] b. 计算反应中单个单体的消耗(单体消耗%)：

[0642] $= (1 - (T_{f, \text{平均}} \text{单体峰面积} / T_{0, \text{平均}} \text{单体峰面积})) \times 100$ 。

[0643] c. 基于单体投入百分比计算单个单体的消耗摩尔分数

[0644] $= (\text{单体转化}\% (\text{上述步骤 b 中计算}) \times 0.01) \times \text{单体进料}\%$ (例如, DMAEMA=0.25,

PAA=0.25, BMA=0.50)

[0645] d. 聚合反应中的总单体消耗和总转化百分比:

[0646] i. 总单体消耗=步骤(c)中计算的单个单体的消耗摩尔分数之和。

[0647] ii. 总转化%=总单体消耗(步骤(d)(i)中计算) $\times 100$ 。

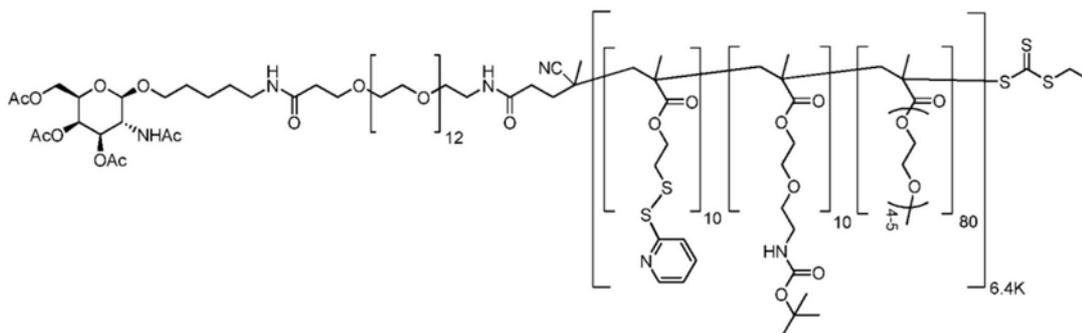
[0648] e. 计算聚合物中各个单体的单体掺入百分比

[0649] i. = (消耗单体摩尔分数(上述步骤(c)中计算)/总消耗单体(步骤(d)(i)中计算)) $\times 100$ 。

[0650] 实施例9: 聚合物NagC5N-PEG_{0.6}-[PEGMA4-5₈₀-PDSMA₁₀-BPAM₁₀]_{6.4}-b-[D₂₅-B₅₀-P₂₅]_{6.3}(P1)的合成

[0651] 实施例9.1: 大分子CTA (macro-CTA) C1的合成

[0652]

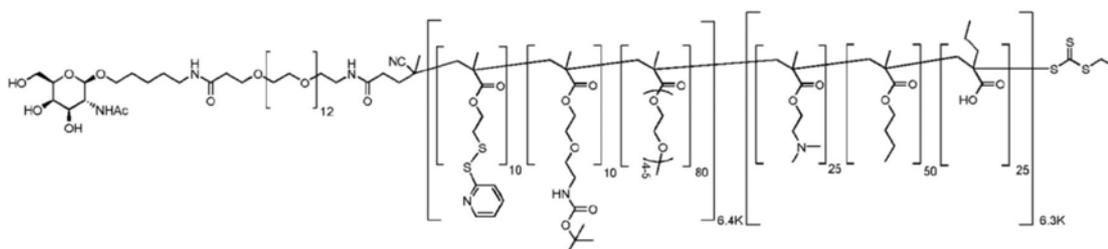


C1

[0653] 在氮气下将PEGMA4-5 (0.675g, 2.25mmol)、PDSMA (0.072 g, 0.282mmol)、BPAM (0.077g, 0.282mmol)、Nag(OAc)₄C5N-PEG_{0.6K}-CTA (化合物8) (0.090g, 0.0704mmol; 1:40CTA:单体)、AIBN (0.578mg, 0.00252mmol; CTA:AIBN 20:1) 和DMF (1.65g) 引入密封的小瓶中。通过鼓泡氮气将混合物脱气30分钟,并在68°C下伴随快速搅拌使反应进行2小时。通过将小瓶置于冰中并将混合物暴露于空气而停止反应。通过甲醇透析24小时而纯化聚合物(Spectrum Labs, Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO: 2000),然后在真空下除去溶剂。在真空下干燥所得大分子CTA 6小时。通过¹H NMR验证纯化聚合物的结构和组成,其也证实不存在对应于未掺入单体的乙烯基的信号。通过GPC分析证实聚合物的纯度。 $M_{n, GPC} = 7.7\text{kDa}$, $dn/dc = 0.05700$, $PDI = 1.28$ 。

[0654] 实施例9.2: 聚合物P1的合成

[0655]



P1

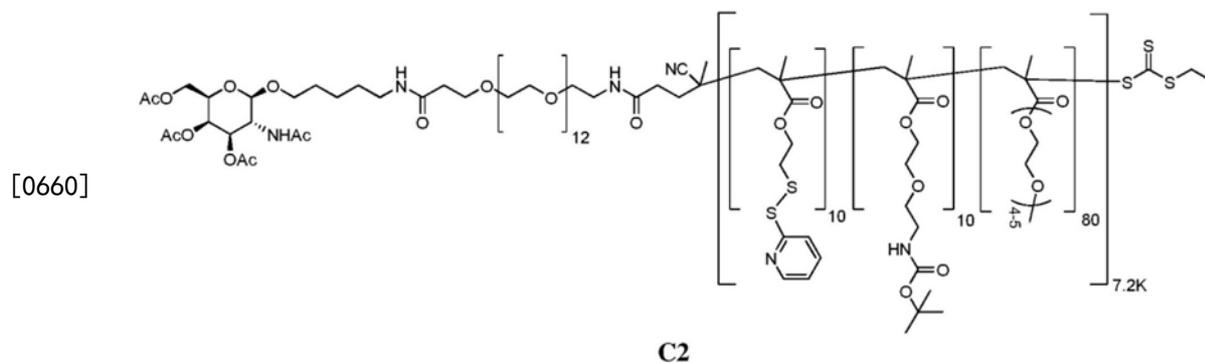
[0656] 将BMA (0.246g, 1.73mmol)、PAA (0.099g, 0.87mmol)、DMAEMA (0.136g, 0.87mmol)、大分子CTA C1 (0.113g, 0.0147 mmol; 1:236CTA:单体)、AIBN (0.241mg, 0.00147mmol; CTA:AIBN 10:1) 和DMF (0.615g) 引入小瓶中。通过将氮气鼓泡到混合物中对混合物脱气30分钟,然后在67-68°C下反应10小时。通过将小瓶置于冰中并将混合物暴露于空气而停止反应。通过从丙酮/DMF 1:1透析到己烷/乙醚75/25中(三次)而纯化聚合物。在真空下干燥所得聚合

物至少8小时。通过¹H NMR验证纯化聚合物的结构和组成,其也证实不存在对应于来自未掺入单体的乙烯基的信号。GPC分析: $M_n = 13.996\text{kDa}$, $dn/dc = 0.056505$, $PDI = 1.26$ 。

[0657] 通过在氩气氛和室温下用无水甲醇/氯仿中的甲醇钠(6当量)处理聚合物1.0小时而除去乙酰基。在室温下,在氩气流下,聚合物用 2,2'-二吡啶基二硫化物(相对于聚合物中的吡啶基二硫化物残基为2 当量)封端1.0小时。封端后,用MeOH稀释反应并过滤。将滤液转移至截止分子量为2000g/mol的透析膜(Spectrum Labs,Spectra/Por Dialysis Membrane MWC0:2000),并甲醇透析24小时,然后是水透析。蒸发溶剂,并在真空下干燥聚合物。

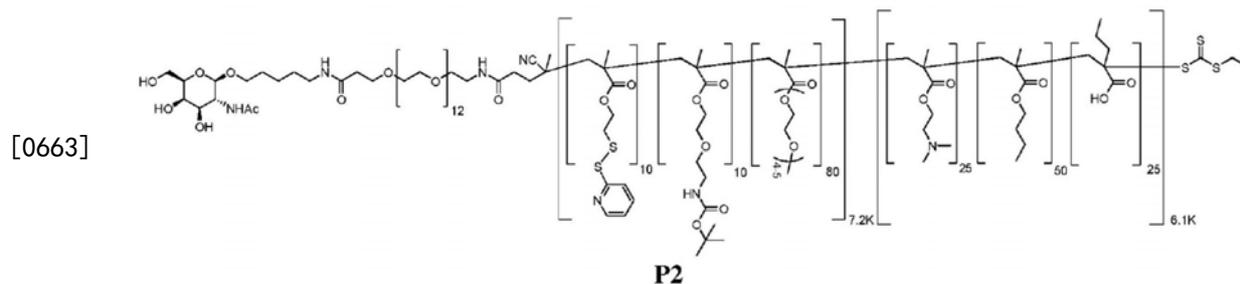
[0658] 实施例10: 聚合物 $\text{NagC5N-PEG}_{0.6}\text{-[PEGMA4-5}_{80}\text{-PDSMA}_{10}\text{-BPAM}_{10}]_{7.2}\text{-b-[D}_{25}\text{-B}_{50}\text{-P}_{25}]_{6.1}$ (P2)的合成

[0659] 实施例10.1:大分子CTA C2的制备



[0661] 如实施例9.1中所述,由PEGMA4-5 (8.083g, 27.0mmol)、PDSMA (0.860g, 3.37mmol)、BPAM (0.921g, 3.37mmol)、Nag (OAc) C5N-PEG_{0.6}K-CTA(化合物8) (1.076g, 0.842mmol; 1:40 CTA:单体)、AIBN (6.914mg, 0.0421mmol; CTA:AIBN 20:1) 和 DMF (19.73g) 起始制备大分子CTA C2。聚合时间为2小时55分钟。GPC: $M_n = 8.500\text{kDa}$; $PDI \sim 1.23$; $dn/dc = 0.5780$ 。

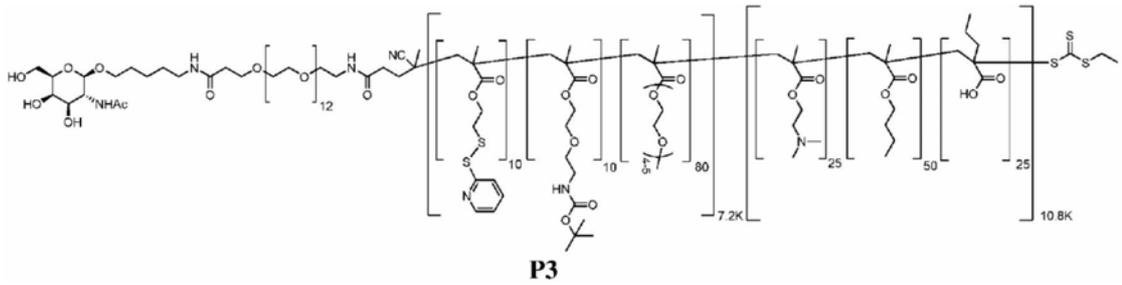
[0662] 实施例10.2:聚合物P2的制备



[0664] 如实施例10.1中所述,使用BMA (0.553g, 3.89mmol)、PAA (0.226g, 1.98mmol)、DMAEMA (0.311g, 1.98mmol)、大分子 CTA C2 (0.560g, 0.0659mmol; 1:118CTA:单体)、AIBN (1.082mg, 0.00659mmol; CTA:AIBN 10:1) 和DMF (1.37g+0.69g) 进行通过 RAFT聚合的大分子CTA C2延伸。5小时后停止聚合,并通过从丙酮/DMF 1:1透析到己烷/乙醚75/25(三次)而纯化产物。GPC: $dn/dc = 0.053188$; $M_n = 14.7\text{kDa}$; $PDI = 1.31$ 。如实施例9.2所述,用NaOMe除去乙酰基。

[0665] 实施例11: 聚合物 $\text{NagC5N-PEG}_{0.6}\text{-[PEGMA4-5}_{80}\text{-PDSMA}_{10}\text{-BPAM}_{10}]_{7.2}\text{-b-[D}_{25}\text{-B}_{50}\text{-P}_{25}]_{10.8}$ (P3)的合成

[0666]

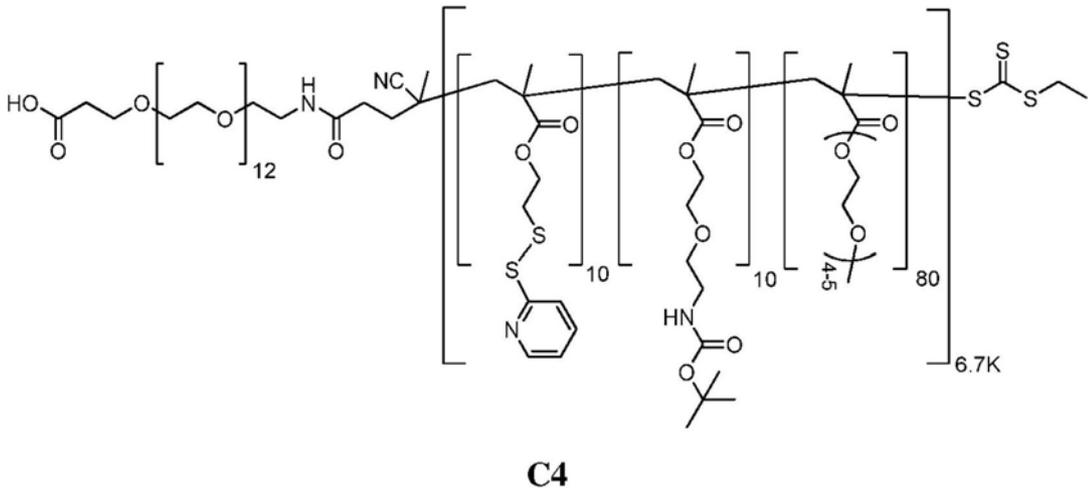


[0667] 如实施例10.2中所述,使用BMA (0.197g, 1.39mmol)、PAA (0.079g, 0.69mmol)、DMAEMA (0.109g, 0.69mmol)、大分子CTA (0.100g, 0.0118mmol; 1:236CTA:单体)、AIBN (0.193mg, 0.00118mmol; CTA:AIBN 10:1) 和DMF (0.492g) 通过RAFT聚合 4.5小时而延伸大分子CTA C2(实施例10), 并通过从丙酮/DMF 1:1 透析到己烷/乙醚75/25中(三次)而纯化产物。GPC: $dn/dc=0.053160$; $M_n=19.3kDa$; $PDI=1.39$ 。如实施例10.2所述,用NaOMe除去乙酰基。

[0668] 实施例12: 聚合物 $PEG_{0.6}-[PEGMA4-5_{80}-PDSMA_{10}-BPAM_{10}]_{6.7}-b-[D_{25}-B_{50}-P_{25}]_{6.2}$ (P4) 的合成

[0669] 实施例12.1: 大分子CTA C4的制备

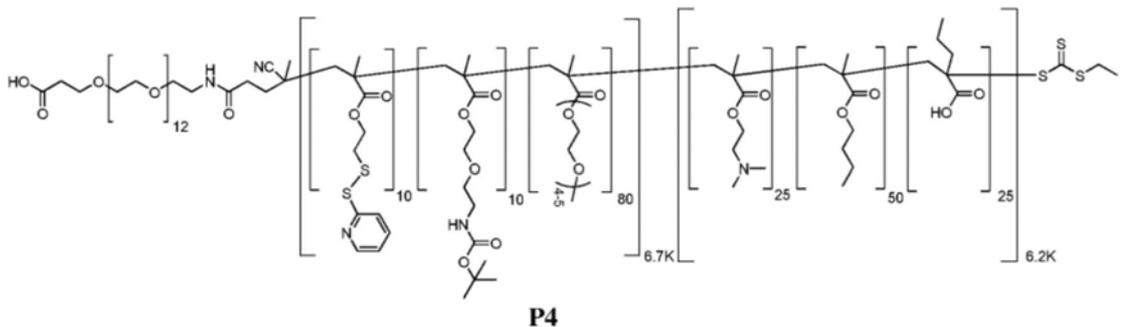
[0670]



[0671] 如实施例9中所述,由PEGMA4-5 (5.128g, 17.1mmol)、PDSMA (0.546g, 2.14mmol)、BPAM (0.584g, 2.14mmol)、 $PEG_{0.6K}$ -CTA (化合物6) (0.461g, 0.534mmol; 1:40CTA:单体)、AIBN (4.385mg, 0.0267mmol; CTA:AIBN 20:1) 和DMF (12.52g) 起始制备大分子 CTA C4; 反应时间为1小时40分钟。GPC: $M_n=7.50kDa$; $PDI\sim 1.20$; $dn/dc=0.053910$ 。

[0672] 实施例12.2: 聚合物P4的制备

[0673]

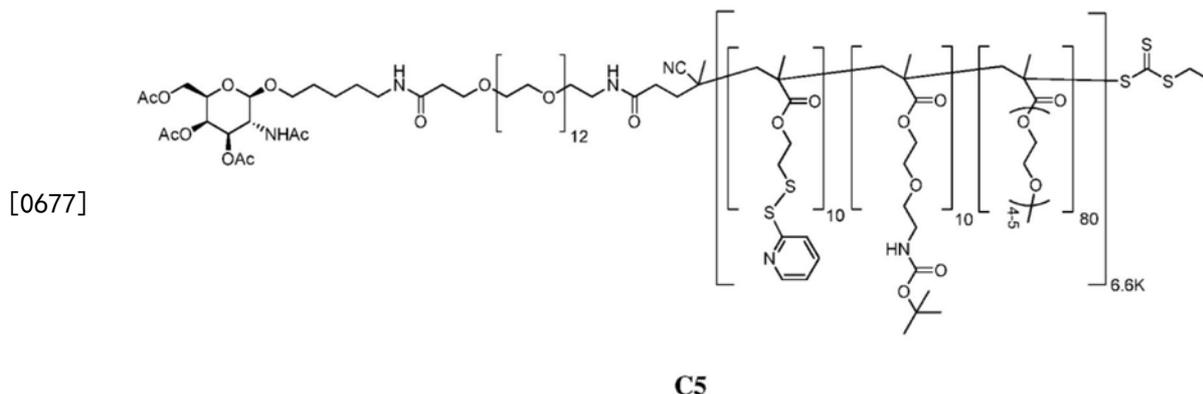


[0674] 如实施例8.2中所述,使用BMA (1.656g, 11.6mmol)、PAA (0.676g, 5.92mmol)、

DMAEMA (0.931g, 5.92mmol)、大分子 CTA C4 (1.5g, 0.197mmol; 1:118CTA:单体)、AIBN (3.241mg, 0.0197mmol; CTA:AIBN 10:1) 和DMF (4.16g+2.08g) 进行聚合物 P4的合成和纯化。GPC:dn/dc=0.050; M_n =13.8kDa; PDI=1.1。

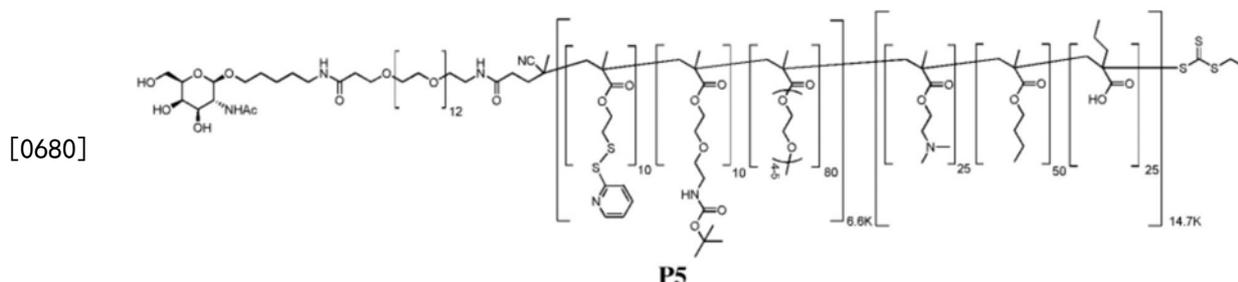
[0675] 实施例13: 聚合物 $\text{NagC5N-PEG}_{0.6} - [\text{PEGMA4-5}_{80} - \text{PDSMA}_{10} - \text{BPAM}_{10}]_{6.6} - b - [\text{D}_{25} - \text{B}_{50} - \text{P}_{25}]_{14.7}$ (P5) 的合成

[0676] 实施例13.1: 大分子CTA C5的制备



[0678] 如实施例9.1中所述,由PEGMA4-5 (0.5g, 1.67mmol)、PDSMA (0.053g, 0.208mmol)、BPAM (0.057g, 0.208mmol)、Nag (OAc) C5N-PEG_{0.6K}-CTA (化合物8) (0.0665g, 0.0521mmol; 1:40CTA:单体)、AIBN (0.428mg, 0.0026mmol; CTA:AIBN 20:1) 和DMF (1.22g) 起始合成大分子CTA C5。聚合时间为2小时30分钟。GPC: M_n =7.85kDa; PDI=1.18; dn/dc=0.066。

[0679] 实施例13.2: 聚合物P5的制备

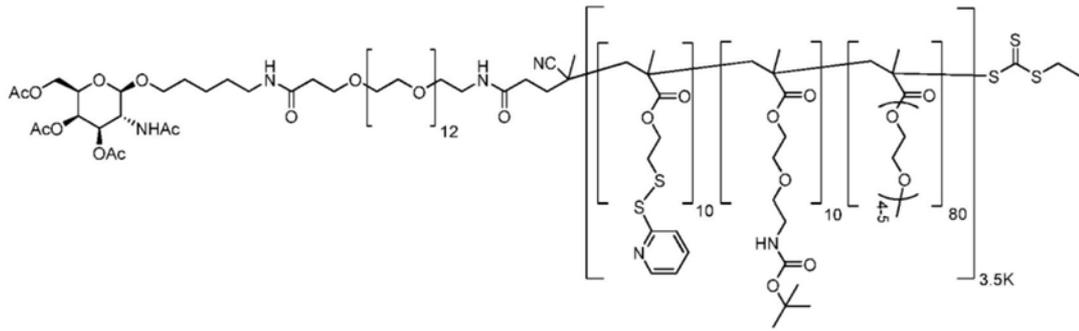


[0681] 如实施例9.2中所述,使用BMA (0.62g, 4.36mmol)、PAA (0.249 g, 2.18mmol)、DMAEMA (0.342g, 2.18mmol)、大分子CTA C5 (0.189g, 0.0242mmol; 1:360CTA:单体)、AIBN (0.398mg, 0.00242 mmol; CTA:AIBN 10:1) 和DMF (1.55g) 进行聚合物P5的合成和纯化。使聚合进行10小时。GPC:dn/dc=0.063851; M_n =22.5kDa; PDI=1.41。如实施例9.2中所述进行脱保护。

[0682] 实施例14: 聚合物 $\text{NagC5N-PEG}_{0.6} - [\text{PEGMA4-5}_{80} - \text{PDSMA}_{10} - \text{BPAM}_{10}]_{3.5} - b - [\text{D}_{25} - \text{B}_{50} - \text{P}_{25}]_{6.3}$ (P6) 的合成

[0683] 实施例14.1: 大分子CTA C6的制备

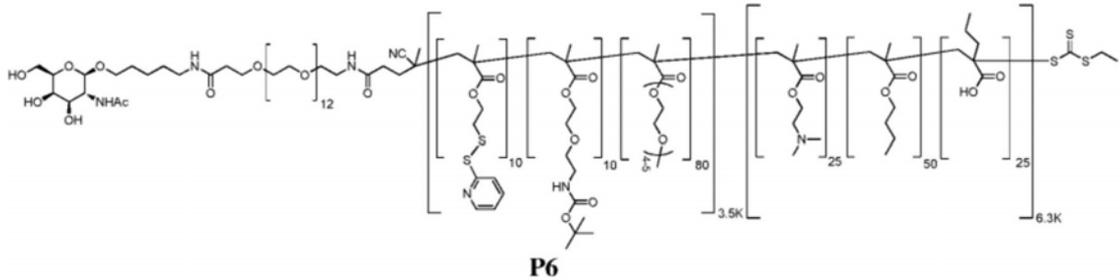
[0684]

**C6**

[0685] 如实施例9.1中所述,由PEGMA4-5 (1.503g, 5.00mmol)、PDSMA (0.160g, 0.626mmol)、BPAM (0.171g, 0.626mmol)、Nag(OAc)₄C₅N-PEG_{0.6K}-CTA (化合物8) (0.500g, 0.391mmol; 1:40 CTA:单体)、AIBN (3.213mg, 0.0196mmol; CTA:AIBN 20:1) 和 DMF (3.668g) 起始合成大分子CTA C6; 反应时间为1小时45分钟。GPC: $M_n = 4.8\text{kDa}$; $PDI = 1.19$; $dn/dc = 0.061481$ 。

[0686] 实施例14.2: 聚合物P6的制备

[0687]

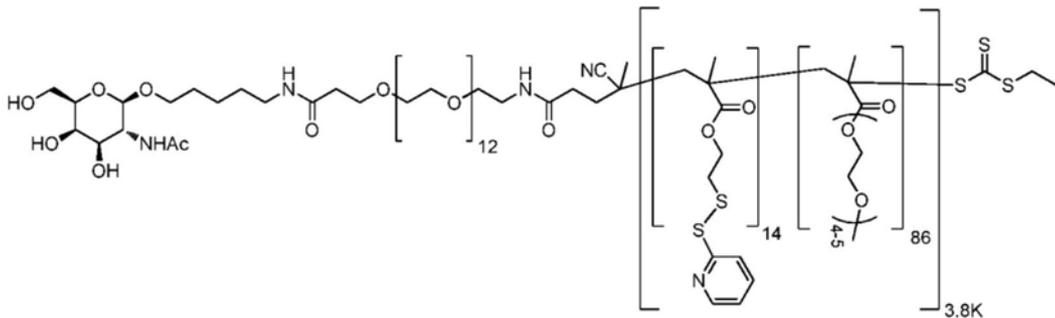
**P6**

[0688] 如实施例9.2中所述,使用BMA (0.218g, 1.54mmol)、PAA (0.089g, 0.781mmol)、DMAEMA (0.123g, 0.781mmol)、大分子CTA C6 (0.125g, 0.0260mmol; 1:118CTA:单体)、AIBN (0.428 mg, 0.00260mmol; CTA:AIBN 10:1) 和DMF (0.830g) 进行聚合物 P6的的合成和纯化。使聚合进行4小时50分钟。GPC: $dn/dc = 0.05812$; $M_n = 11.1\text{kDa}$; $PDI = 1.38$ 。如实施例9.2中所述进行脱保护。

[0689] 实施例15: 聚合物NagC₅N-PEG_{0.6}-[PEGMA4-5₈₆-PDSMA₁₄]_{3.82kDa}-[BMA₄₅-PAA₁₅-DMAEMA₄₀]_{5.98kDa} (P7) 的合成

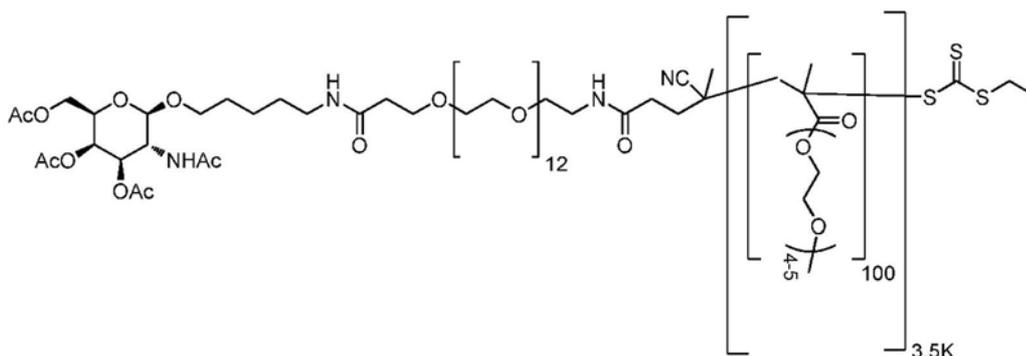
[0690] 实施例15.1: 大分子CTA C7的制备:

[0691]

**C7**

[0692] 在40mL反应容器中,将AIBN/DMF (21.93g的DMF中1.05603 mg/g AIBN) 加入到

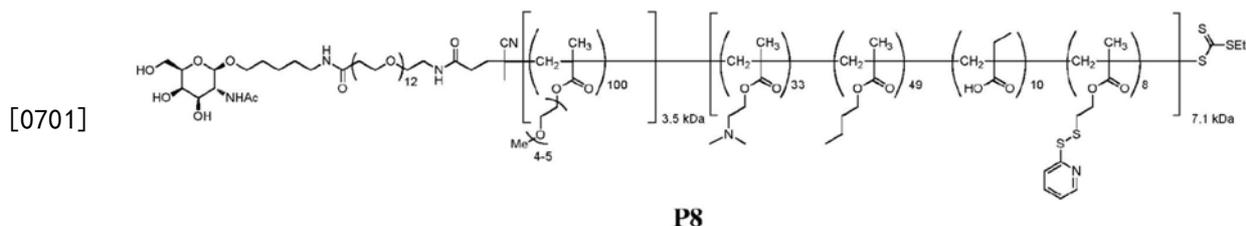
[0698]



C8

[0699] 向20mL反应小瓶中加入Nag(OH) C5N-PEG_{0.6K}-CTA(如实施例5中,化合物8a所述合成)(794.6mg,0.6922mmol,CTA),然后加入AIBN溶液(以1.1268mg/g浓度溶解在DMF中的5.0438g溶液,5.68mg AIBN,0.03461mmol,2,2'-偶氮双(2-甲基丙腈),化合物重结晶自MeOH),然后加入另外量的DMF(432.2mg),使该反应中使用的DMF总量为5.4760g。将该溶液混合并涡旋数分钟直至所有CTA完全溶解。一旦所有的CTA完全溶解,则将PEGMA(3219.3mg,10.730mmol,平均 $M_n=300$ g/mol的聚(乙二醇)甲基醚甲基丙烯酸酯,用100ppm MEHQ和300ppm BHT抑制剂抑制,Aldrich产品号447935-500mL,通过使净单体通过Al₂O₃塞而除去抑制剂)加入到反应小瓶中。搅拌该混合物数分钟。将反应小瓶部分密封并使用冰浴冷却至0℃,同时通过剧烈鼓泡氮气30分钟并磁力搅拌反应溶液而使混合物脱气。然后将小瓶完全密封并放到加热块中。搅拌速度设定为300rpm,温度计设定为68℃并在整个过程中保持在该温度下。在68℃下搅拌反应物1小时47分钟。反应完成后,通过打开小瓶和然后将反应小瓶置于冰中而使混合物暴露于空气将反应淬灭。将反应小瓶用MeOH(10mL)稀释,并转移至具有2000g/mol截留分子量的透析膜(Spectrum Labs,Spectrum Spectra/Por 6Dialysis Membrane Tubing MWC0:2000),并MeOH(3×4000mL)透析4天。每天更换透析溶液,共重复3次。根据以下程序分析透析袋中的聚合物:将透析溶液的小等分样品(约500-1000μL)从透析管中取出并置于配衡小瓶中。然后使用旋转蒸发仪蒸发溶液。一旦去除溶剂,则将小瓶转移至高真空管线并置于高真空下。干燥化合物<15分钟。一旦小瓶重量恒定,则立即将化合物溶解在具有1重量%LiBr溶液的DMF中。在具有1重量%LiBr的DMF(按重量测量DMF,然后转换成体积)中,聚合物的最终浓度为约8mg/mL。然后将以大致3mg/mL的浓度溶解在具有1重量%LiBr的DMF中(按重量测量DMF,然后转换成体积)的20kDa聚苯乙烯标准品(Fluka,产品号81407-1G)注射(100 μL)到GPC上,然后注射感兴趣的聚合物样品(60、80、100和120 μL)。一旦测定最终GPC分析,则将透析溶液转移到40mL反应小瓶中,然后使用旋转蒸发仪除去溶剂。然后将材料放置在高真空管线(压力<0.5托)上>24小时。该方法提供682.9mg最终产物。然后通过NMR和GPC分析最终产物。在室温和高真空下储存最终产物。NMR与提出的结构一致。GPC结果: $M_n=4.600$, $dn/dc=0.053354$ 。

[0700] 实施例16.2.聚合物P8的合成



[0702] 向40mL反应小瓶中加入大分子CTA C8 (682.1mg, 0.148mmol), 然后加入AIBN溶液 (以1.0927mg/g的浓度溶解在DMF中的2.2338 g溶液, 2.44mg AIBN, 0.0148mmol, 2,2'-偶氮双(2-甲基丙腈), 化合物重结晶自MeOH), 然后加入另外量的DMF (2.6163g), 使该反应中使用的DMF总量为4.8501g。将该溶液混合并涡旋数分钟直至所有CTA完全溶解。一旦所有CTA完全溶解, 则加入BMA (1.1849 g, 8.314mmol, 通过使净单体通过Al₂O₃塞而纯化, 甲基丙烯酸丁酯, d-0.894g/mL)、PAA (488.0mg, 4.231mmol, 未纯化的2-丙基丙烯酸, d-0.951g/mL)、DMAEMA (661.8mg, 4.231mmol, 通过使净单体通过Al₂O₃塞而纯化, 甲基丙烯酸2-(二甲基氨基)乙酯, d-0.933 g/mL) 和PDSMA (227.0mg, 0.891mmol)。搅拌该混合物数分钟。然后将反应混合物转移至含有磁力搅拌棒的全新20mL反应小瓶。将反应小瓶部分密封并使用冰浴冷却至0°C, 同时通过剧烈鼓泡氮气30分钟并磁力搅拌反应溶液而使混合物脱气。然后将小瓶完全密封并放置到加热块中。搅拌速度设定为300, 温度计设定为62°C。在62°C下搅拌反应物5小时50分钟。反应完成后, 通过打开小瓶和然后将反应小瓶置于冰中而使混合物暴露于空气将反应淬灭。然后将反应溶液用丙酮 (~5mL, 与反应小瓶中使用的DMF大致相同体积的丙酮) 稀释, 并在玻璃烧杯中沉淀到Et₂O/己烷 (1000mL, 1:4v/v) 的搅拌混合物中。在聚合物沉降到底部 (约15分钟) 后, 倾出溶剂。将溶解在MeOH中的沉淀聚合物转移至截留分子量为2000g/mol的透析膜 (Spectrum Labs, Spectrum Spectra/Por 6 Dialysis Membrane Tubing MWC0:2000), 并MeOH (3×4000mL) 透析3天 (72小时)。每天更换透析溶液, 共重复3次。在MeOH透析3天 (72小时) 后, 将透析溶液变为纳米纯H₂O, 并H₂O (5×4000mL) 透析5小时。大致每小时更换透析溶液, 共重复5次。透析完成后, 将溶液转移至配衡小瓶并使用干冰桶冷冻固体。然后将材料放到冻干机中>4天的总干燥时间。该方法提供1.0325g最终产物。然后通过NMR和GPC分析最终产物。通过¹H-NMR分析聚合物指示保留不具有乙烯基的聚合物以及PDSMA的存在。NMR对于提出的结构是一致的。GPC结果: Mn=11.7kDa, dn/dc=0.058046。将最终产物储存在用氩气吹扫并用石蜡膜密封的具有橡胶隔片的玻璃小瓶中。将小瓶储存在-20°C下。

[0703] 实施例17: 聚合物合成

[0704] 通过类似的方法, 根据下表8-67中所示的以下条件合成以下聚合物。

[0705] A. P67: NAG-PEG12- [PEGMA (300, 79.1%) -BPAM (10.0%) -PDSMA (10.9%)] 3.56kDa-b- [DMAEMA (34.7%) -BMA (54.7%) -PAA (10.5%)] 4.71kDa

[0706] 表8

[0707]

P67	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.8:1.6:1.6/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.17M	2.61M
时间	1h 45m	5h 35m
温度	67°C	61°C

[0708] CTA=Nag (OH) C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0709] B.P68:NAG-PEG12-[PEGMA (300;89.8%) -PhEMA (10.2%)]3.23 kDa-b-[DMAEMA (33%) -BMA (57%) -PAA (10%)]6.0kDa

[0710] 表9

[0711] P68	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[13.95:1.55/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.2M	2.3M
时间	1h 30m	4h 30m
温度	67°C	65°C

[0712] CTA=Nag (OH) C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0713] C.P69:NAG-PEG12-[PEGMA (300;78.7%) -PhEMA (21.3%)]3.25 kDa-b-[DMAEMA (32.9%) -BMA (54.8%) -PAA (12.3%)]5.4kDa

[0714] 表10

[0715] P69	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.4:3.1/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.2M	2.3M
时间	1h 30m	4h 30m
温度	67°C	65°C

[0716] CTA=Nag (OH) C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0717] D.P70:NAG-PEG12-[PEGMA (300,88.6) -PhEMA (11.4%)]3.02 kDa-b-[DMAEMA (36.8%) -BMA (56.3%) -PAA (6.9%)]4.39kDa

[0718] 表11

[0719] P70	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.4:3.1/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.2M	2.3M
时间	1h 30m	4h 30m
温度	67°C	65°C

[0720] CTA=Nag (OH) C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0721] E.P71: NAG-PEG12-[PEGMA (300,69.5%) -BPAM (19.2%) -PDSMA (11.3%)]3.5 9kDa-b-[DMAEMA (35.2%) -BMA (53.9%) -PAA (10.9%)]5.27kDa

[0722] 表12

[0723] P71	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.8:3.2:1.65/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.22M	2.62M
时间	1h 45m	5h 35m
温度	67°C	61°C

[0724] CTA=Nag (OH) C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0725] F.P72:NAG-PEG12-[PEGMA (300,80.3%) -ImMA (19.7)]3.7 kDa-b-[DMAEMA

(35.9%) -BMA (53.9%) -PAA (10.2%)]4.7kDa

[0726] 表13

[0727]	P72	嵌段1	嵌段2
	[M/CTA/I]	[13:4.1/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
	[浓度]	1.2M	2.3M
	时间	1h 30m	5h
	温度	67°C	65°C

[0728] CTA=Nag (OH) C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0729] G.P73: NAG-PEG12- [PEGMA (300,73.1%) -BMA (14.4%) -PhEMA (12.5%)]3.8 kDa-b- [DMAEMA (37.6%) -BMA (52.3%) -PAA (10.1%)]4.2kDa

[0730] 表14

[0731]	P73	嵌段1	嵌段2
	[M/CTA/I]	[12.8:1.6:1.6/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
	[浓度]	1.2M	2.3M
	时间	1h 30m	5h
	温度	67°C	61°C

[0732] CTA=Nag (OH) C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0733] H.P74: NAG-PEG12- [PEGMA (300,80.3%) -BMA (23.3%)]3.8 kDa-b- [DMAEMA (38.2%) -BMA (51.5%) -PAA (10.3%)]3.5kDa

[0734] 表15

[0735]	P74	嵌段1	嵌段2
	[M/CTA/I]	[12.8:3.2/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
	[浓度]	1.2M	2.3M
	时间	1h 30m	5h
	温度	67°C	61°C

[0736] CTA=Nag (OH) C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0737] I.P75: NAG-PEG12- [PEGMA (300,75.8%) -isoA-MA (11.8%) -PhEMA (12.4%)]3.3kDa-b- [DMAEMA (39.3%) -BMA (51.6%) -PAA (9%)]4.95kDa

[0738] 表16

[0739]	P75	嵌段1	嵌段2
	[M/CTA/I]	[12.8:1.6:1.6/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
	[浓度]	1.2M	2.3M
	时间	1h 40m	5h
	温度	67°C	61°C

[0740] CTA=Nag (OH) C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0741] J.P76: NAG-PEG12- [PEGMA (300,74.9%) -isoA-MA (25.1%)]2.9 kDa-b- [DMAEMA (38%) -BMA (53%) -PAA (9.1%)]5.2kDa

[0742] 表17

[0743]	P76	嵌段1	嵌段2
	[M/CTA/I]	[12.8:3.2/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
	[浓度]	1.2M	2.3M
	时间	1h 40m	5h
	温度	67℃	61℃

[0744] CTA=Nag(OH) C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0745] K.P77:NAG-PEG12-[PEGMA(300,86%)-CyHexMA(14%)]2.98 kDa-b-[DMAEMA(36.2%)-BMA(51.7%)-PAA(12.2%)]4.66kDa

[0746] 表18

[0747]	P77	嵌段1	嵌段2
	[M/CTA/I]	[12.8:2.2/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
	[浓度]	1.21M	2.6M
	时间	2h 35m	5h
	温度	67℃	61℃

[0748] CTA=Nag(OH) C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0749] L.P78:NAG-PEG12-[PEGMA(300,72.5%)-BPAM(27.5%)]3.8 kDa-b-[DMAEMA(25.6%)-BMA(64.8%)-PAA(9.6%)]5.5kDa

[0750] 表19

[0751]	P78	嵌段1	嵌段2
	[M/CTA/I]	[12.8:5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
	[浓度]	1.2M	2.3M
	时间	1h 45m	5h 15m
	温度	67℃	61℃

[0752] CTA=Nag(OH) C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0753] M.P79:NAG-PEG12-[PEGMA(300,69.9%)-HMA(30.1%)]2.93 kDa-b-[DMAEMA(34.4%)-BMA(53.6%)-PAA(12%)]4.43kDa

[0754] 表20

[0755]	P79	嵌段1	嵌段2
	[M/CTA/I]	[10.8:5.2/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
	[浓度]	1.21M	2.96M
	时间	1h 50m	4h 40m
	温度	68℃	61℃

[0756] CTA=Nag(OH) C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0757] N.P80:NAG-PEG12-[PEGMA(300,85.4%)-EHMA(14.6%)]3.36 kDa-b-[DMAEMA(36.5%)-BMA(53.7%)-PAA(9.7%)]4.18kDa

[0758] 表21

[0759]	P80	嵌段1	嵌段2
	[M/CTA/I]	[16/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]

[浓度]	1.21M	2.62M
时间	2h	5h
温度	68℃	61℃

[0760] CTA=Nag(OH)C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0761] O.P81: NAG-PEG12-[PEGMA(300,72%)-F1-BMA(28%)]3.75 kDa-b-[DMAEMA(30.7%)-BMA(56.7%)-PAA(12.6%)]5.7kDa

[0762] 表22

P81	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.8:3.5/1/0.05]	[26:51:26/1/0.1]
[浓度]	1.2M	2.3M
时间	1h 35m	5h 15m
温度	67℃	61℃

[0764] CTA=Nag(OH)C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0765] P.P82: NAG-PEG12-[PEGMA(300,71.9%)-F1-BMA(28.1%)]3.55 kDa-b-[DMAEMA(29.9%)-BMA(57.6%)-PAA(12.4%)]5.3kDa

[0766] 表23

P82	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.8:3.5/1/0.05]	[26:51:26/1/0.1]
[浓度]	1.2M	2.3M
时间	1h 35m	5h 15m
温度	67℃	61℃

[0768] CTA=Nag(OH)C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0769] Q.P83: NAG-PEG12-[PEGMA(300,78.9%)-F-CyHexMA(21.1%)]4.56 kDa-b-[DMAEMA(33.2%)-BMA(55.4%)-PAA(11.4%)]5.3kDa

[0770] 表24

P83	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.8:3.5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.2M	2.3M
时间	1h 35m	5h 15m
温度	67℃	61℃

[0772] CTA=Nag(OH)C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0773] R.P84: NAG-PEG12-[PEGMA(300,77.9%)-F-HPenMA(22.1%)]3.26 kDa-b-[DMAEMA(30.9%)-BMA(57.4%)-PAA(11.6%)]6.5kDa

[0774] 表25

P84	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.8:4/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.2M	2.3M
时间	1h 35m	5h 15m

温度	67℃	61℃
----	-----	-----

[0776] CTA=Nag(OH)C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0777] S.P85:NAG-PEG12-[PEGMA(300,79%)-BMA(21%)]2.9 kDa-b-[DMAEMA(29.3%)-BMA(26.6%)-F1-BMA(34.6%)-PAA(9.5%)]5.8kDa

[0778] 表26

P85	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.8:3.2/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.2M	2.3M
时间	1h 40m	5h 15m
温度	67℃	61℃

[0780] CTA=Nag(OH)C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0781] T.P86:NAG-PEG12-[PEGMA(300,78.1%)-C12MA(21.9%)]3.67 kDa-b-[DMAEMA(32.1%)-BMA(53.7%)-PAA(14.2%)]4.7kDa

[0782] 表27

P86	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.8:3.2/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.21M	2.38M
时间	2h 35m	5h 30m
温度	68℃	61℃

[0784] CTA=Nag(OH)C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0785] U.P87:NAG-PEG12-[PEGMA(300,69.7%)-EHMA(30.3%)]3.9 kDa-b-[DMAEMA(31.1%)-BMA(56.7%)-PAA(12.1%)]5.1kDa

[0786] 表28

P87	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[15.1:6.3/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.24M	2.96M
时间	2h 15m	6h
温度	68℃	62℃

[0788] CTA=Nag(OH)C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0789] V.P88:NAG-PEG12-[PEGMA(300,76%)-5-NMA(24%)]3.0 kDa-b-[DMAEMA(34.4%)-BMA(54%)-PAA(11.6%)]5.6kDa

[0790] 表29

P88	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[13.5:4.5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.21M	2.6M
时间	2h	6h
温度	67℃	61.5℃

[0792] CTA=Nag(OH)C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0793] W.P89:NAG-PEG12-[PEGMA(300,73.8%)-BMA(26.2%)]3.5 kDa-b-[DMAEMA(30.7%)-BMA(58.9%)-PAA(10.4%)]4.9kDa

[0794] 表30

P89	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[13.5:4.5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.29M	2.61M
时间	2h 5m	5h 45m
温度	69℃	61℃

[0796] CTA=Nag(OH)C5N-PEG₁₂-CTA;I=AIBN

[0797] X.P90:NAG-PEG12-[PEGMA(300,72.6%)-HMA(27.4%)]3.58 kDa-b-[DMAEMA(30.6%)-BMA(56.2%)-PAA(13.3%)]5.6kDa

[0798] 表31

P90	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[13:4.5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.3M	2.72M
时间	2h 30m	5h 48m
温度	69℃	61℃

[0800] CTA Nag(OH)C5N-PEG₁₂-CTA;I=AIBN

[0801] Y.P91:CH30-PEG12-[PEGMA(300,92.8%)-PDSMA(7.2%)]3.6 kDa-b-[DMAEMA(34.2%)-BMA(54.7%)-PAA(11%)]6.5kDa

[0802] 表32

P91	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[14:1.55/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.21M	2.35M
时间	1h 45m	5h
温度	67℃	65.5℃

[0804] CTA CH30-PEG₁₂-CTA;I=AIBN

[0805] Z.P92:NAG-PEG12-[PEGMA(300,83.2%)-AEOMA(16.8%)]3.0 kDa-b-[DMAEMA(36.2%)-BMA(52.2%)-PAA(11.6%)]5.6kDa

[0806] 表33

P92	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/1]	[12.8:2.2/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.21M	2.5M
时间	1h 50m	5h 20m
温度	67℃	61℃

[0808] CTA Nag(OH)C5N-PEG₁₂-CTA;I=AIBN

[0809] AA.P93:NAG-PEG12-[PEGMA(300,77.6%)-CyHexMA(22.4%)]2.64 kDa-b-[DMAEMA(32.1%)-BMA(43.1%)-PAA(12.6%)-CyHexMA(12.3%)]4.67kDa

[0810] 表34

[0811] P93	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[8.4:2.3/1/0.05]	[30:45:30:10/1/0.1]
[浓度]	1.21M	2.3M
时间	1h 55m	4h
温度	68℃	61℃

[0812] CTA Nag (OH) C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0813] BB.P94: NAG-PEG12-[PEGMA (300,72.2%) -B-F1-HMA (27.8%)]4.2 kDa-b-[DMAEMA (35.7%) -BMA (54.4%) -PAA (9.9%)]4.7kDa

[0814] 表35

[0815] P94	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[13:4.5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.2M	2.3M
时间	1h 35m	5h 15m
温度	67℃	61℃

[0816] CTA Nag (OH) C5N-PEG₁₂-CTA; I=AIBN

[0817] CC.P95:NAG-PEG12-[PEGMA (300,71.2%) -F1-BMA (28.8%)]3.55 kDa-b-[DMAEMA (34.2%) -BMA (57.9%) -PAA (7.9%)]4.9kDa

[0818] 表36

[0819] P95	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.8:3.5/1/0.05]	[26:51:26/1/0.1]
[浓度]	1.2M	2.3M
时间	1h 35m	5h 15m
温度	67℃	61℃

[0820] DD.P96:NAG-PEG12-[PEGMA (300,72.6%) -F1-BMA (27.4%)]3.55 kDa-b-[DMAEMA (30.7%) -BMA (56.1%) -PAA (13.2%)]4.9kDa

[0821] 表37

[0822] P96	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.8:3.5/1/0.05]	[26:51:26/1/0.1]
[浓度]	1.2M	2.3M
时间	1h 35m	5h 15m
温度	67℃	61℃

[0823] EE.P97:NAG-PEG12-[PEGMA (300,70.0%) -F1-BMA (30.0%)]3.55 kDa-b-[DMAEMA (31.3%) -BMA (60.7%) -PAA (8.0%)]5.1kDa

[0824] 表38

[0825] P97	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.8:3.5/1/0.05]	[26:51:26/1/0.1]
[浓度]	1.2M	2.3M

时间	1h 35m	5h 15m
温度	67℃	61℃

[0826] FF.P98:NAG-PEG12-[PEGMA(300,75%)-2-Bu1-OMA(25%)]4.26 kDa-b-[DMAEMA(32.1%)-BMA(55.7%)-PAA(12.2%)]5.69kDa

[0827] 表39

P98	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[15:6.1/1/0.05]	[30:59.5:30/1/0.1]
[浓度]	1.3M	2.97M
时间	2h 30m	5h 45m
温度	70℃	62℃

[0829] GG.P99:NAG-PEG12-[PEGMA(300,73.3%)-5-NMA(26.7%)]4.05 kDa-b-[DMAEMA(31.5%)-BMA(55.2%)-PAA(13.3%)]5.20kDa

[0830] 表40

P99	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[15:6.1/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.3M	2.76M
时间	2h 30m	5h 40m
温度	70℃	62℃

[0832] HH.P100: NAG-PEG12-[PEGMA(300,74.1%)-F1-BMA(25.9%)]3.79 kDa-b-[DMAEMA(29.9%)-BMA(56.2%)-PAA(13.9%)]5.44kDa

[0833] 表41

P100	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[13:3.5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.22M	2.52M
时间	2h 5m	5h 35m
温度	68℃	62℃

[0835] II.P101:NAG-PEG12-[PEGMA(300,72.2%)-B-F1-OMA(27.8%)]4.2 kDa-b-[DMAEMA(35.7%)-BMA(54.4%)-PAA(9.9%)]5.6kDa

[0836] 表42

P101	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[13:5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.2M	2.3M
时间	1h 35m	5h 15m
温度	67℃	61℃

[0838] JJ.P102:NAG-PEG12-[PEGMA(300,71.9%)-F1-BMA(28.1%)]3.55 kDa-b-[DMAEMA(27.3%)-BMA(60.9%)-PAA(11.9%)]4.55kDa

[0839] 表43

P102	嵌段1	嵌段2
------	-----	-----

[M/CTA/I]	[12.8:3.5/1/0.05]	[26:51:26/1/0.1]
[浓度]	1.2M	2.3M
时间	1h 35m	5h 15m
温度	67℃	61℃

[0841] KK.P106:NAG-PEG12-[PEGMA (300,74%) -HMA (26%)]4.1 kDa-b-[DMAEMA (31%) -BMA (56%) -PAA (13%)]*5kDa

[0842] 表44

[0843]

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[15.5:4.5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.35M	2.3M
时间	3h 15min	5h 30m
温度	69℃	61℃

[0844] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0845] LL.P107:NAG-PEG12-[PEGMA (300,74%) -HMA (26%)]*4.1 kDa-b-[DMAEMA (31%) -BMA (56%) -PAA (13%)]*4.2kDa

[0846] 表45

[0847]

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[15.5:4.5/1/0.05]	[27:51:36.5/1/0.1]
[浓度]	1.35M	2.3M
时间	3h 15m	5h 30m
温度	69℃	61℃

[0848] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0849] MM.P108:NAG-PEG12-[PEGMA (300,80%) -HMA (20%)]*4.96 kDa-b-[DMAEMA (31%) -BMA (56%) -PAA (13%)]*5.5kDa

[0850] 表46

[0851]

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[19.5:4.5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.5M	2.3M
时间	3h 10m	6h 10m
温度	69℃	61℃

[0852] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0853] NN.P109:NAG-PEG12-[PEGMA (300,80%) -HMA (20%)]*4.96 kDa-b-[DMAEMA (31%) -BMA (56%) -PAA (13%)]*6.5kDa

[0854] 表47

[0855]

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[19.5:4.5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.5M	2.9M
时间	3h 10m	7h

温度	69℃	62℃
----	-----	-----

[0856] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0857] 00.P110:NAG-PEG12-[PEGMA(300,77.7%)-EHMA(22.3%)]4.37 kDa-b-[DMAEMA(31%)-BMA(56%)-PAA(13%)]*6kDa

[0858] 表48

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[16:5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.3M	3M
时间	3h	6h 30m
温度	68℃	62℃

[0860] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0861] PP.P111:NAG-PEG12-[PEGMA(300,77%)-F1-BMA(23%)]5.80 kDa-b-[DMAEMA(27.3%)-BMA(60.9%)-PAA(11.9%)]*5.74kDa

[0862] 表49

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[20:4.3/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.5M	2.3M
时间	3h	6h 20m
温度	68℃	61℃

[0864] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0865] QQ.P112:NAG-PEG12-[PEGMA(300,77%)-F1-BMA(23%)]5.80 kDa-b-[DMAEMA(27.3%)-BMA(60.9%)-PAA(11.9%)]*6.10kDa

[0866] 表50

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[20:4.3/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.5M	2.3M
时间	3h	7h 20m
温度	68℃	61℃

[0868] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0869] RR.P113: NAG-PEG12-[PEGMA(300,84.9%)-Cho1-MA(15.1%)]*3.5 kDa-b-[DMAEMA(31%)-BMA(56%)-PAA(13%)]*4.67kDa

[0870] 表51

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.8:2.2/1/0.05]	[26:51:26/1/0.1]
[浓度]	0.97M	2.3M
时间	2h 15m	5h
温度	67℃	63℃

[0872] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0873] SS.P114:NAG-PEG12-[PEGMA (300,67%) -HMA (33%)]*5.7 kDa-b-[DMAEMA (31%) -BMA (56%) -PAA (13%)]*6.15kDa

[0874] 表52

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[20:7.5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.55M	2.89M
时间	4h	5h 45m
温度	68°C	62°C

[0876] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0877] TT.P115:NAG-PEG12-[PEGMA (300,67%) -HMA (33%)]*5.7 kDa-b-[DMAEMA (31%) -BMA (56%) -PAA (13%)]*6kDa

[0878] 表53

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[20:7.5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.55M	2.89M
时间	4h	7h
温度	68°C	62°C

[0880] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0881] UU.P116:NAG-PEG12-[PEGMA (300,73%) -F1-BMA (27%)]*⁺6.3 kDa-b-[DMAEMA (27.3%) -BMA (60.9%) -PAA (11.9%)]*⁺5.9kDa

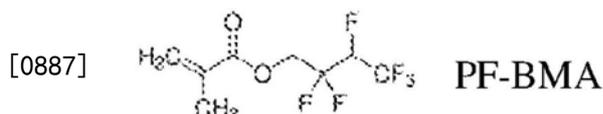
[0882] 表54

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[20:6.5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.5M	2.3M
时间	3h	7h
温度	68°C	61°C

[0884] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0885] +基于与具有已知分子量的聚合物的迹线重叠(trace overlay)而估计嵌段的分子量

[0886] VV.P117:



[0888] NAG-PEG12-[PEGMA (300,72%) -PF-BMA (28%)]*⁺3.7 kDa-b-[DMAEMA (27.3%) -BMA (60.9%) -PAA (11.9%)]*5.0kDa

[0889] 表55

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.8:3.5/1/0.05]	[26:51:26/1/0.1]

[浓度]	1.5M	2.3M
时间	1h 45min	5h 20min
温度	68℃	61℃

[0891] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0892] +基于与具有已知分子量的聚合物的迹线重叠而估计嵌段的分子量

[0893] WW.P118:NAG-PEG12-[PEGMA (300,70%) -HMA (30%)]*5.2 kDa-b-[DMAEMA (31%) -BMA (56%) -PAA (13%)]*5.7kDa

[0894] 表56

[0895]

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[20:7/1/0.05]	[30.7:60:30.7/1/0.1]
[浓度]	1.5M	2.3M
时间	3h 15m	5h 45m
温度	69℃	61℃

[0896] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0897] XX.P119:NAG-PEG12-[PEGMA (300,70%) -HMA (30%)]*5.2 kDa-b-[DMAEMA (31%) -BMA (56%) -PAA (13%)]*5kDa

[0898] 表57

[0899]

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[20:7/1/0.05]	[26:52:26/1/0.1]
[浓度]	1.5M	2.3M
时间	3h 15m	5h 25m
温度	69℃	61℃

[0900] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0901] YY.P120:NAG-PEG12-[PEGMA (300,75%) -CyHexMA (25%)]*4 kDa-b-[DMAEMA (31%) -BMA (56%) -PAA (13%)]*5.2kDa

[0902] 表58

[0903]

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[15.5:4.5/1/0.05]	[30.7:60:30.7/1/0.1]
[浓度]	1.3M	2.3M
时间	3h	5h 40m
温度	69℃	61℃

[0904] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0905] ZZ.P121: NAG-PEG12-[PEGMA (300,75%) -Me-CyHexMA (25%)]*4.3 kDa-b-[DMAEMA (31%) -BMA (56%) -PAA (13%)]*5.1kDa

[0906] 表59

[0907]

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[16:4/1/0.05]	[30.7:60:30.7/1/0.1]
[浓度]	1.3M	2.3M

时间	3h	5h 35m
温度	69℃	61℃

[0908] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0909] AAA.P122:NAG-PEG12-[PEGMA(300,73%)-F1-BMA(27%)]*⁺6.3 kDa-b-[DMAEMA(27.3%)-BMA(60.9%)-PAA(11.9%)]*⁺6.9kDa

[0910] 表60

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[20:6.5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.5M	2.6M
时间	3h	9h
温度	68℃	61℃

[0912] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0913] +基于与具有已知分子量的聚合物的迹线重叠而估计嵌段的分子量

[0914] BBB.P123:NAG-PEG12-[PEGMA(300,79%)-Bu1-0-MA(21%)]*4.88 kDa-b-[DMAEMA(31%)-BMA(56%)-PAA(13%)]*4.6kDa

[0915] 表61

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[16:4/1/0.05]	[30.7:60:30.7/1/0.1]
[浓度]	1.3M	2.3M
时间	3h 30m	5h 20m
温度	69℃	61℃

[0917] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0918] CCC.P124:NAG-PEG12-[PEGMA(300,74%)-HMA(26%)]*4.15 kDa-b-[DMAEMA(31%)-BMA(56%)-PAA(13%)]*5kDa

[0919] 表62

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[15.5:4.5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.35M	2.3M
时间	3h 15min	5h 30m
温度	69℃	61℃

[0921] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0922] DDD.P125:NAG-PEG12-[PEGMA(300,74%)-HMA(26%)]*4.15 kDa-b-[DMAEMA(31%)-BMA(56%)-PAA(13%)]*5kDa

[0923] 表63

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[15.5:4.5/1/0.05]	[30:59:30/1/0.1]
[浓度]	1.35M	2.3M
时间	3h 15min	5h 30m

温度	69℃	61℃
----	-----	-----

[0925] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0926] EEE.P103: NAG-PEG12-[PEGMA (300,70.3%) -F1-BMA (29.7%)]3.6 kDa-b-[DMAEMA (32.2%) -BMA (57.6%) -PAA (10.2%)]5kDa

[0927] 表64

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.8:3.5/1/0.05]	[26:52:26/1/0.1]
[浓度]	1.2M	2.3M
时间	1h 42m	5h 30m
温度	68℃	61℃

[0929] FFF.P104: NAG-PEG12-[PEGMA (300,68%) -F1-BMA (32%)]*3.7 kDa-b-[DMAEMA (31%) -BMA (56%) -PAA (13%)]*5.3kDa

[0930] 表65

P#	嵌段1	嵌段2	Block 2
[M/CTA/I]		[12.8:3.5/1/0.05]	[26:51:26/1/0.1]
[浓度]		1.2M	2.3M
时间		1h 40min	5h 30m
温度		67℃	61℃

[0932] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0933] GGG.P105: NAG-PEG12-[PEGMA (300,73%) -F1-BMA (27%)]*⁺4.3 kDa-b-[DMAEMA (31%) -BMA (56%) -PAA (13%)]*⁺5.3kDa

[0934] 表66

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.8:3.5/1/0.05]	[26:51:26/1/0.1]
[浓度]	1.2M	2.3M
时间	1h 40min	5h 30m
温度	67℃	61℃

[0936] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0937] +基于与具有已知分子量的聚合物的迹线重叠而估计嵌段的分子量

[0938] HHH.P106: NAG-PEG12-[PEGMA (300,73%) -F1-BMA (27%)]*⁺4.3 kDa-b-[DMAEMA (31%) -BMA (56%) -PAA (13%)]*⁺5.3kDa

[0939] 表67

P#	嵌段1	嵌段2
[M/CTA/I]	[12.8:3.5/1/0.05]	[26:51:26/1/0.1]
[浓度]	1.2M	2.3M
时间	1h 40min	5h 30m
温度	67℃	61℃

[0941] *基于历史掺入水平估计嵌段的单体掺入

[0942] +基于与具有已知分子量的聚合物的迹线重叠而估计嵌段的分子量

[0943] 实施例18:脂质-mRNA制剂及另外聚合物的共注射或顺序注射情况下的mRNA体内表达

[0944] 使用与实施例2中所述相同的方法,用mRNA/LNP顺序注射或共注射测试另外的聚合物。

[0945] 表68显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2k+Fluc mRNA 纳米颗粒处理的动物的肝脏中的发光值,在第一次注射后1分钟顺序注射聚合物P1435、P1299或P67。数据在给药后6小时获得。与聚合物P1435或P1299相比,mRNA/LNP+聚合物P67分别显示出发光信号的5倍和8倍提高。

表68 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	聚合物	Fluc mRNA	注射之间的 时间安排	mRNA剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
缓冲液	无	无	NA	0	1.83E+05	NA
DOTAP:CHEMS: CHOL: DMPE- PEG2K (50:32:16:2) N:P 7 26 mg/kg	P1435 75 mg/kg	Fluc 3 mRNA	1 min	1	1.23E+09	1.15E+09
	P1299 75 mg/kg	Fluc 3 mRNA		1	7.80E+08	2.19E+09
	P67 75 mg/kg	Fluc 3 mRNA		1	6.23E+09	7.28E+09

[0947] 表69显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2k+Fluc mRNA 纳米颗粒处理的动物的肝脏中的发光值,在第一次注射后1分钟顺序注射聚合物P67。数据在给药后6小时获得。在本研究中,测试两种不同Fluc mRNA。与Fluc 1 mRNA相比,Fluc 2 mRNA显示发光信号的21倍提高。Fluc 1和Fluc 2 mRNA的修饰如上文实施例2所述。

表69 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	聚合物	Fluc mRNA	注射之间的 时间安排	mRNA剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
缓冲液	无	无	NA	0	2.81E+05	NA
DOTAP:CHEMS: CHOL: DMPE- PEG2K (50:32:16:2) N:P 7 26 mg/kg	P67 75 mg/kg	Fluc 1 mRNA	1 min	1	4.20E+08	1.82E+08
		Fluc 2 mRNA		1	8.85E+09	3.90E+09

[0949] 表70显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2k+Fluc mRNA 纳米颗粒处理的动物的肝脏中的发光值,具有NAG靶向聚合物P67 的共注射(与非靶向聚合物P91相比)。将mRNA/LNP+聚合物以1:1 的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。与非靶向聚合物P91相比,mRNA/LNP+NAG靶向聚合物P67显示发光信号的130倍提高。

表70 总通量
(光子/秒)

[0950]	脂质-mRNA 纳米颗粒	聚合物	Fluc mRNA	注射之间的 时间安排	mRNA剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
	缓冲液	无	无	NA	0	2.03E+05	
	DOTAP:CHEMS: CHOL: DMPE- PEG2K (50:32:16:2) N:P 7 26 mg/kg	P67 75 mg/kg	Fluc 2 mRNA	共注射	1	4.03E+09	7.04E+09
		P91 75 mg/kg	Fluc 2 mRNA		1	3.07E+07	9.45E+06

[0951] 实施例19:DOTAP:CHEMS:胆固醇:DSPE-PEG_{2k}和DOTAP:CHEMS:胆固醇:DSPE-PEG_{2k}-NAG mRNA纳米颗粒制剂以及聚合物:制剂顺序注射或共注射的特征

[0952] 在室温下将DOTAP (Corden Pharma, Boulder, Colorado, USA; 产品目录号LP-R4-117) 以50mg/mL溶解在200酒精标准强度乙醇中。在室温下将DSPE-PEG_{2k} (Corden Pharma, Boulder, Colorado, USA; 产品目录号LP-R4-039) 或DSPE-PEG-NAG (PhaseRx Inc.) 以50mg/mL在15分钟内溶解在200酒精标准强度乙醇中。在75℃下将半琥珀酸胆固醇酯 (CHEMS) (Avanti Polar Lipid Alabaster, Alabama, USA; 产品目录号850524P) 和胆固醇 (CHOL) (Corden Pharma, Boulder, Colorado, USA; 产品目录号CH-0355) 单独地以 25mg/mL在5分钟内溶解在200酒精标准强度乙醇中。通常,对于 N:P比率为7的DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG_{2k} (50:32:8:10摩尔%) LNP的2mL制备物,制备含有178μL在200酒精标准强度乙醇中的50mg/mL DOTAP、158μL在200酒精标准强度乙醇中25 mg/mL的CHEMS、31μL在200酒精标准强度乙醇中25mg/mL的 CHOL、143μL在200酒精标准强度乙醇中50mg/mL的DSPE-PEG_{2k}和156μL的200酒精标准强度乙醇的脂质乙醇混合物,最终体积为 0.666mL且总脂质浓度为31mg/mL。对于N:P比率为7的 DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG_{2k}-NAG (50:32:8:10摩尔%) LNP的2mL制备物,制备含有178μL在200酒精标准强度乙醇中50 mg/mL的DOTAP、158μL在200酒精标准强度乙醇中25mg/mL的 CHEMS、31μL在200酒精标准强度乙醇中25mg/mL的CHOL、160 μL在200酒精标准强度乙醇中50mg/mL的DSPE-PEG_{2k}-NAG和161 μL的200酒精标准强度乙醇的脂质乙醇混合物,最终体积为0.666mL 且总脂质浓度为32.5mg/mL。

[0953] 基于DOTAP浓度,以1.75至14的N:P(氮:磷酸盐)比率制备脂质纳米颗粒(LNP)制剂。分别在各个N:P比率下将DOTAP:CHEMS 比率以50:32摩尔%固定为1.6。DSPE-PEG_{2k}或DSPE-PEG_{2k}-NAG从 1变化至15摩尔%。调整CHOL摩尔%以得到100摩尔%最终脂质浓度。

[0954] 在300mM蔗糖20mM磷酸盐,pH 7.4缓冲液(SUP缓冲液)中将在10mM Tris-HCl(pH 7.5)中1mg/mL的Fluc(萤火虫荧光素酶)mRNA储备溶液稀释至0.45mg/mL。使用来自Precision NanoSystems Inc(Vancouver BC, Canada)的微流体装置,通过在12 mL/分钟流速下以1:2的比率(脂质乙醇混合物:SUP缓冲液中的 mRNA)混合乙醇脂质溶液与SUP缓冲液中的0.45mg/mL mRNA而以1.75至14的N:P比率组装mRNA/LNP。然后在室温下孵育33%乙醇中的mRNA/LNP 60分钟,之后用100倍体积(200mL)的SUP 缓冲液透析18小时。

[0955] 伴随400rpm搅拌,将用于顺序注射或共注射的聚合物以20 mg/mL在1小时内溶解在SUP缓冲液中,然后在4℃下储存过夜。注射前在SUP缓冲液中将聚合物稀释至5-10mg/mL。

[0956] 如果共注射mRNA/LNP和聚合物,则制备各自的2X溶液。在给药前不久,将溶液混合并立即注射。

[0957] 通过在一次性微量比色皿中将10 μ L制剂加入到90 μ L SUP缓冲液测量制剂粒径,并使用Malvern Instrument ZETASIZER NANO-ZS 分析。LNP显示85nm的粒径(z-平均)。通过在一次性1mL比色皿中将10 μ L制剂加入到740 μ L SUP缓冲液测量pH 7.4下的制剂 zeta-电位。通过在一次性1mL比色皿中将10 μ L制剂加入到740 μ L 蔗糖乙酸盐缓冲液(pH 4)测量pH 4下的制剂zeta-电位。将zeta浸入式单元插入到1mL比色皿中,并使用ZETASIZER NANO-ZS 分析制剂。通常, DOTAP LNP在pH 7下具有+1.6mV的zeta电位,在pH 4.0下具有+10mV的zeta电位。使用SYBR Gold染料可及性试验在 96孔板中测量LNP紧密结合mRNA的能力。通常,将mRNA 0.01 mg/mL的50 μ L脂质制剂加入到150 μ L稀释SYBR Gold储备溶液(1 μ L储备SYBR Gold在3mL SUP缓冲液中),并在室温下伴随搅拌(100RPM)孵育15分钟。在495nm的激发波长和538nm的发射波长下读取荧光。通过将经配制mRNA的荧光强度除以游离mRNA 的荧光强度,再乘以100来计算百分染料可及性。当在SUP缓冲液中制备时, DOTAP LNP显示8%染料可及性。下表71显示了示例性 LNP制剂的表征。

[0958] 表71:LNP特性

样品#	RP600-1	RP495-13
脂质	DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2K (50:32:8:10)	DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2K-NAG (50:32:8:10)
N/P	7	7
脂质浓度 (mg/mL)	9.5	10.8
视觉外观	乳白色(+)	乳白色(+)
染料可及性% SUP pH 7.4	8%	8%
Z-平均 (nm)	85	98
[0959] PDI	0.242	0.312
数量 (nm)	38	37
Pk 1平均Int (nm)	105	232
Pk 2平均 Int (nm)	4536	63
Pk 1面积Int (%)	97	57
Pk 2面积Int (%)	3	43
ZP pH 7.4 (mV)	1.6	-5
ZP pH 4 (mV)	10	8
尺寸分类数据质量	良好	良好

[0960] 实施例20: DOTAP:CHEMS:胆固醇:DSPE-PEG_{2k}和DOTAP:CHEMS:胆固醇:DSPE-PEG_{2k}-NAG mRNA制剂以及聚合物共注射或顺序注射的mRNA体内表达

[0961] 使用顺序注射或共注射以及与所述相同的方法,采用各种聚合物测试实施例19中所述的另外LNP。

[0962] 表72显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2k、DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k或DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k-NAG+Fluc mRNA纳米颗粒处理以及共注射聚合物P67的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+ 聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6、24 和48小时获得。DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k-NAG和 DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2kLNP二者均显示更长的表达持续时间,与DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2k LNP相

比,以曲线下面积 (AUC) 值表示的发光信号分别大8.7倍和2.6倍。

表72

总通量
(光子/秒)

[0963]

脂质-mRNA 纳米颗粒	聚合物	Fluc 2 mRNA 剂量 (mg/kg)	成像 时间点	几何 平均值	STDEV	AUC	与DMPE- PEG2k LNP相比 的倍数 变化
缓冲液	无	0	6 h	3.34E+05			
DOTAP:CHEMS: CHOL: DMPE- PEG2K (50:32:16:2) N:P 7 26 mg/kg	P67 75 mg/kg	1	6 h	3.61E+09	7.87E+08	4.02E+10	1.0
			24 h	3.17E+08	1.23E+08		
			48 h	1.11E+07	3.07E+06		
DOTAP:CHEMS: CHOL: DSPE- PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 35 mg/kg	P67 75 mg/kg	1	6 h	7.23E+09	3.87E+09	1.05E+11	2.6
			24 h	1.16E+09	1.08E+09		
			48 h	2.15E+08	9.83E+07		
DOTAP:CHEMS: CHOL: DSPE- PEG2K-NAG (50:32:8:10) N:P 7 36 mg/kg	P67 75 mg/kg	1	6 h	1.51E+10	2.15E+10	3.49E+11	8.7
			24 h	4.14E+09	6.19E+09		
			48 h	1.19E+08	2.03E+08		

[0964] 表73显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k或 DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k-NAG+Fluc mRNA纳米颗粒处理以及共注射聚合物P71或P81的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6、24、48、72和96小时获得。DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k和 DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k-NAG LNP+P81显示与LNP+P71相比以曲线下面积 (AUC) 值表示的发光信号分别大7倍和2.8倍。

表73 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	聚合物	Fluc 2 mRNA 剂量 (mg/kg)	成像 时间点	几何 平均值	STDEV	AUC
缓冲液	无	0	6 h	1.35E+05		
DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 35 mg/kg	P71 50 mg/kg	1	6 h	1.19E+10	9.52E+09	2.88E+11
			24 h	5.45E+09	3.96E+09	
			48 h	9.81E+07	8.21E+07	
			72 h	6.66E+06	4.99E+06	
			96 h	1.86E+06	1.17E+06	
DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 35 mg/kg	P81 45 mg/kg	1	6 h	9.40E+10	5.40E+10	2.01E+12
			24 h	3.26E+10	3.23E+10	
			48 h	6.91E+08	7.29E+08	
			72 h	4.28E+07	4.38E+07	
			96 h	1.05E+07	9.19E+06	
DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K-NAG (50:32:8:10) N:P 7 36 mg/kg	P71 50 mg/kg	0.5	6 h	2.17E+10	1.88E+10	3.95E+11
			24 h	5.84E+09	4.45E+09	
			48 h	8.88E+07	9.94E+07	
			72 h	7.06E+06	6.69E+06	
			96 h	2.10E+06	2.09E+06	
DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K-NAG (50:32:8:10) N:P 7 36 mg/kg	P81 35 mg/kg	0.5	6 h	6.06E+10	1.16E+10	7.95E+11
			24 h	9.87E+09	6.23E+09	
			48 h	1.60E+08	1.33E+08	
			72 h	1.21E+07	7.43E+06	
			96 h	3.91E+06	2.24E+06	

[0965]

[0966] 表74显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+Fluc 2 mRNA 纳米颗粒处理以及共注射聚合物P71或P92的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。Fluc mRNA/DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P71显示与P92相比大4至13倍的发光信号。

表74 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	Fluc mRNA 剂量 (mg/kg)	聚合物	聚合物 剂量 (mg/kg)	几何 平均值	STDEV
DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 35 mg/kg	1	P71	50	5.97E+09	8.09E+09
	1	P92	25	4.71E+08	7.35E+08
	1	P92	50	1.37E+09	1.62E+09

[0967]

[0968] 表75显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+Fluc 2 mRNA 纳米颗粒处理以及共注射聚合物P71、P93、P79或P80的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。Fluc mRNA/DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P80或P79显示相比于P71分别大5倍或2倍的发光信号。P93显示与P71相似的活性。

表75 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	Fluc 2 mRNA 剂量 (mg/kg)	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
[0969] DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 3.5 mg/kg	0.1	P71	50	4.74E+08	3.69E+08
	0.1	P93	25	2.04E+08	2.05E+08
	0.1	P93	50	3.41E+08	3.65E+08
	0.1	P79	25	1.12E+09	4.36E+08
	0.1	P80	25	2.37E+09	1.93E+09

[0970] 表76显示了用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+Fluc 2 mRNA纳米颗粒处理以及共注射聚合物P71、P82、P94或P86的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。Fluc mRNA/DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P82、P94或P86显示相比于P71大6-13倍的发光信号。

表76 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	Fluc 2 mRNA 剂量 (mg/kg)	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
[0971] DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 35 mg/kg	0.5	P71	50	1.61E+09	1.75E+09
	1	P82	30	1.62E+10	6.45E+09
	1	P82	40	1.53E+10	1.80E+10
	1	P94	40	2.01E+10	7.91E+09
	1	P86	40	1.00E+10	1.21E+10

[0972] 表77显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+Fluc 2 mRNA 纳米颗粒处理以及共注射聚合物P71、P87、P88或P89的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。Fluc mRNA/DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P87、P88或P89显示相比于P71大3-18倍的发光信号。

表77 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	Fluc 2 mRNA 剂量 (mg/kg)	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
[0973] DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 3.5 mg/kg	0.1	P71	50	1.54E+08	1.23E+08
	0.1	P87	25	4.05E+08	7.71E+08
	0.1	P87	35	2.85E+09	3.22E+09
	0.1	P88	25	1.26E+09	1.87E+09
	0.1	P89	25	3.89E+08	2.19E+08
	0.1	P89	35	6.06E+08	6.54E+08
	0.1	P89	50	1.11E+09	9.00E+08

[0974] 表78显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+Fluc 2 mRNA 纳米颗粒处理以及共注射聚合物P95、P90、P96或P87的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。Fluc mRNA/DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P90、P96或P87显示与P95相似的发光信号。

表78 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	Fluc 2 mRNA 剂量 (mg/kg)	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
[0975] DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 35 mg/kg	1	P95	30	1.17E+10	1.34E+10
	1	P95	40	4.18E+10	2.54E+10
	1	P96	35	2.09E+10	2.35E+10
	1	P90	30	1.59E+10	1.78E+10
	1	P87	35	3.27E+10	1.39E+10

[0976] 表79显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+Fluc 2 mRNA 纳米颗粒处理以及共注射聚合物P71、P77或P78的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。Fluc mRNA/DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P77或P78显示相比于P71大3-8倍的发光信号。

表79 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	Fluc 2 mRNA 剂量 (mg/kg)	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
[0977] DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 17 mg/kg	0.5	P71	50	1.10E+09	1.02E+09
	0.5	P77	25	1.90E+09	1.01E+09
	0.5	P77	50	1.12E+09	2.37E+09
	0.5	P77	75	9.02E+09	1.00E+10
	0.5	P78	25	3.46E+08	3.56E+08
	0.5	P78	50	3.78E+09	1.85E+09

[0978] 表80显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+Fluc 2 mRNA 纳米颗粒处理以及共注射聚合物P96、P98、P99或P100的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。Fluc mRNA/DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P98、P99或P100 显示相比于P96大3-5倍的发光信号。

表80 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	Fluc 2 mRNA 剂量 (mg/kg)	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
[0979] DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 3.5 mg/kg	0.1	P96	35	1.30E+09	1.17E+09
	0.1	P98	25	1.23E+09	2.46E+09
	0.1	P98	35	4.62E+09	2.14E+09
	0.1	P99	25	5.80E+09	1.54E+09
	0.1	P100	25	1.22E+09	2.18E+09
	0.1	P100	35	3.24E+09	5.98E+09

[0980] 表81显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+Fluc 2 mRNA 纳米颗粒处理以及共注射聚合物P82、P90、P106或P107的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。Fluc mRNA/DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P90、P106或P107 显示相比于P82大3-10倍的发光信号。

表81 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	Fluc 2 mRNA 剂量 (mg/kg)	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
[0981] DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 17.5 mg/kg	0.5	P82	30	3.78E+09	9.23E+09
	0.5	P90	25	7.12E+09	3.69E+09
	0.5	P90	35	2.74E+10	8.39E+09
	0.5	P106	25	1.85E+10	1.43E+10
	0.5	P106	35	4.12E+10	1.26E+10
	0.5	P106	45	1.65E+10	3.47E+10
	0.5	P107	25	7.93E+09	4.97E+09
	0.5	P107	35	1.47E+10	9.46E+09
	0.5	P107	45	1.35E+10	1.34E+10

[0982] 表82显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+Fluc 2 mRNA 纳米颗粒处理以及共注射聚合物P97、P104、P108或P109的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。Fluc mRNA/DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P104、P108或P109 显示相比于P97大至多2倍的发光信号。

表82 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	Fluc 2 mRNA 剂量 (mg/kg)	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
[0983] DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 17.5 mg/kg	0.5	P97	30	1.08E+10	5.89E+09
	0.5	P104	25	4.49E+09	9.32E+08
	0.5	P104	30	6.82E+09	2.69E+10
	0.5	P104	35	2.58E+10	3.59E+09
	0.5	P108	25	1.37E+10	1.40E+10
	0.5	P108	35	1.36E+10	1.58E+10
	0.5	P108	45	2.37E+10	2.28E+10
	0.5	P109	25	8.33E+09	1.25E+10
	0.5	P109	35	2.07E+10	2.31E+10

[0984] 表83显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+Fluc 2 mRNA 纳米颗粒处理以及共注射聚合物P103、P90、P106或P108的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。Fluc mRNA/DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P90、P106或P108 显示相比于P103大至多2倍的发光信号。

表83 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	Fluc 2 mRNA 剂量(mg/kg)	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
[0985] DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 17.5 mg/kg	0.5	P103	30	5.94E+10	3.36E+10
	0.5	P103	35	7.11E+10	4.71E+10
	0.5	P90	30	1.52E+10	2.78E+10
	0.5	P90	35	7.65E+09	2.03E+10
	0.5	P106	30	1.18E+11	2.23E+10
	0.5	P106	35	4.94E+10	4.68E+10
	0.5	P108	30	9.45E+10	2.12E+10
	0.5	P108	35	4.99E+10	5.03E+10

[0986] 表84显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+Fluc 2 mRNA 纳米颗粒处理以及共注射聚合物P95、P111或P112的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。Fluc mRNA/DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P111或P112显示相比于P95大至多4倍的发光信号。

表84 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	Fluc 2 mRNA 剂量(mg/kg)	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
[0987] DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 17.5 mg/kg	0.5	P95	30	6.19E+09	1.71E+10
	0.5	P111	25	4.12E+09	6.41E+09
	0.5	P111	35	1.90E+10	3.63E+09
	0.5	P112	25	7.28E+09	1.15E+10
	0.5	P112	35	1.98E+10	1.49E+10
	0.5	P112	45	2.66E+10	1.46E+10

[0988] 表85显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+Fluc 2 mRNA 纳米颗粒处理以及共注射聚合物P103、P106、P114或P115的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。Fluc mRNA/DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P106、P114或P115 显示相比于P103大至多7倍的发光信号。

表85 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	Fluc 2 mRNA 剂量(mg/kg)	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
[0989] DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 17.5 mg/kg	0.5	P103	30	3.54E+09	5.27E+09
	0.5	P106	20	6.96E+09	4.36E+09
	0.5	P106	25	1.19E+10	1.10E+10
	0.5	P114	25	2.46E+10	1.16E+10
	0.5	P115	25	8.28E+09	1.93E+10

[0990] 表86显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+Fluc 2 mRNA 纳米颗粒处理以及共注射聚合物P103、P116或P117的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。Fluc mRNA/DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P116或P117显示相比于P103更低的发光信号。

表86 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	Fluc 2 mRNA 剂量(mg/kg)	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
[0991] DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 17.5 mg/kg	0.5	P103	30	2.72E+10	1.13E+10
	0.5	P116	25	5.31E+09	3.32E+09
	0.5	P116	35	1.20E+10	9.23E+09
	0.5	P117	25	5.53E+08	5.10E+08
	0.5	P117	35	1.35E+09	1.44E+09

[0992] 表87显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+Fluc 2 mRNA 纳米颗粒处理以及共注射聚合物P105、P98或P123的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。Fluc mRNA/DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P98或P123显示与 P105相似的发光信号。

表87 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	Fluc 2 mRNA 剂量(mg/kg)	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
[0993] DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 17.5 mg/kg	0.5	P105	30	2.11E+10	2.54E+10
	0.5	P98	20	1.85E+10	1.60E+10
	0.5	P98	30	7.79E+09	1.93E+10
	0.5	P98	40	2.07E+10	3.92E+10
	0.5	P123	20	3.21E+10	1.56E+10
	0.5	P123	30	2.77E+10	3.78E+10
	0.5	P123	40	3.50E+10	3.16E+10

[0994] 表88显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+Fluc 2 mRNA 纳米颗粒处理以及共注射聚合物P105、P106、P124或P125的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。Fluc mRNA/DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P106、P124或P125 显示相比于P105大至多2倍的发光信号。

表88 总通量
(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	Fluc 2 mRNA 剂量(mg/kg)	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
[0995] DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 17.5 mg/kg	0.5	P105	30	1.80E+10	1.00E+10
	0.5	P106	25	6.46E+09	1.85E+10
	0.5	P124	15	1.34E+10	2.10E+09
	0.5	P124	25	4.16E+10	2.27E+10
	0.5	P125	15	6.31E+09	9.98E+09
	0.5	P125	25	3.79E+10	2.02E+10

[0996] 表89显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+Fluc 2 mRNA 纳米颗粒处理以及共注射聚合物P105、P118、P119或P110的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。Fluc mRNA/DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P118、P119或P110 显示与P105相似的发光信号。

表89

总通量
(光子/秒)

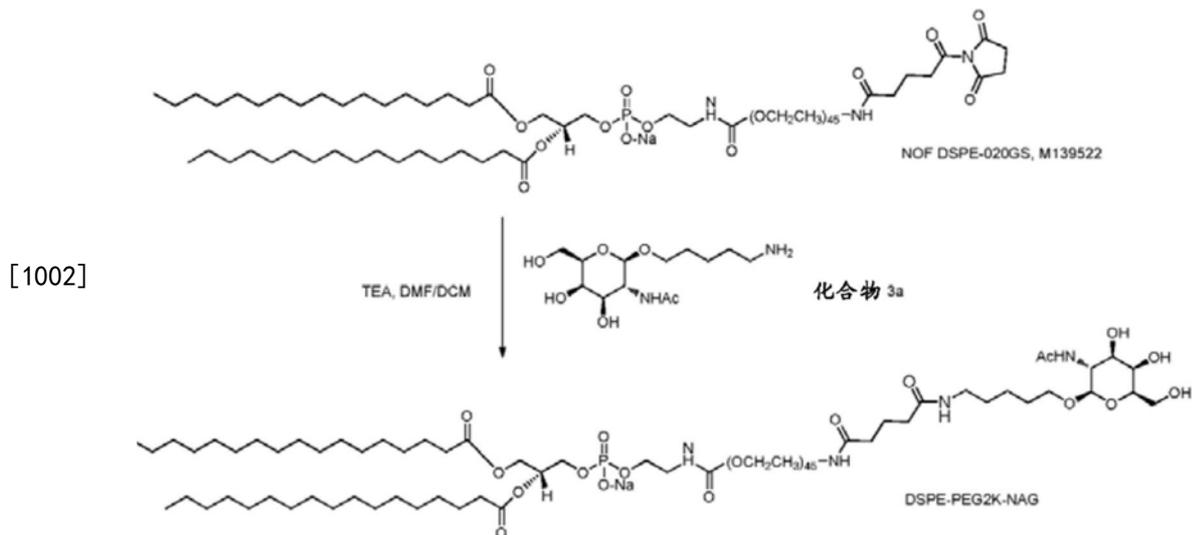
脂质-mRNA 纳米颗粒	Fluc 2 mRNA 剂量(mg/kg)	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
[0997] DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 17.5 mg/kg	0.5	P105	30	2.78E+10	1.32E+10
	0.5	P118	20	1.99E+10	6.98E+09
	0.5	P118	30	2.86E+10	1.66E+10
	0.5	P119	20	2.36E+10	8.30E+09
	0.5	P119	30	2.42E+10	1.07E+10
	0.5	P110	20	9.48E+09	1.10E+10
	0.5	P110	30	2.22E+10	1.95E+10

[0998] 实施例21:在鸟氨酸转氨甲酰酶缺陷小鼠中,在脂质mRNA制剂和聚合物共注射情况下mRNA的治疗功效

[0999] 在用AAV2/8载体/OTC shRNA处理以敲低残留的内源性OTC表达和活性的OTC-sp^{ash}小鼠中诱导高氨血症(Cunningham等,Mol Ther 19:854-859,2011)。在这些小鼠中,血浆氨水平和乳酸水平升高。在AAV给药后四(4)天,将在N:P 7下在 DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG_{2k} (50:32:16:2) 中配制的1mg/kg OTC mRNA+共注射50mg/kg P67每周两次给予这些小鼠。在AAV 处理后第6天(单次mRNA剂量后)和第13天(3次重复mRNA剂量后)收集尿液,并分析针对肌酐水平标准化的乳酸水平。在OTC mRNA处理后,观察到乳酸显著减少至接近正常水平(参见图1A)。在AAV处理后第13天(3次重复mRNA剂量后)收集血浆,并分析氨水平。相比高氨缓冲液处理的小鼠,OTC mRNA处理的小鼠中的血浆氨处于与野生型和未处理的OTC-sp^{ash}小鼠相似的正常水平(参见图1B)。

[1000] 在与上文类似的OTC-sp^{ash}小鼠的单独高氨血症研究中,将在N:P 7下在DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG_{2k} (50:32:8:10) 中配制的1 mg/kg OTC mRNA+共注射35mg/kg P82每周两次给予这些小鼠。在 AAV处理后第6天(单次mRNA剂量后)和第13天(3次重复mRNA 剂量后)收集尿液,并分析针对肌酐水平标准化的乳酸水平。在 OTC mRNA处理后,观察到乳酸显著减少至正常水平(参见图2A)。在AAV处理后第13天(3次重复mRNA剂量后)收集血浆,并分析氨水平。OTC mRNA处理的小鼠中的血浆氨与高氨缓冲液处理的小鼠相比被正常化(参见图2B)。

[1001] 实施例22:DSPE-PEG_{2k}-NAG的制备



[1003] 向化合物3a (204mg, 0.665mmol, 2当量) 中加入DMF (1.5mL), 并搅拌溶液25分钟。向所得溶液中加入三甲胺 (TEA, 185 μ L, 1.33 mmol, 4当量)。5分钟后, 加入DSPE-020GS (NOF, 1.00g, 0.332 mmol, 1当量), 然后加入二氯甲烷 (DCM, 2.0mL) 和另外的DMF (0.5mL), 并在环境温度下搅拌所得溶液。5小时后, 在减压下除去溶剂, 并将残留物溶于DCM (100mL) 中。用饱和NaHCO₃ (30mL) 洗涤DCM层。用DCM (50mL) 洗涤所得NaHCO₃层。干燥 (Na₂SO₄) 合并的有机层, 并在减压下浓缩。通过硅胶色谱纯化所得残留物 (2.5 \times 7.5cm, 洗脱剂=10% MeOH/DCM (300mL), 然后是15% MeOH/DCM (400mL), 然后是20% MeOH/DCM (600mL), 级分大小=18 \times 150mM试管, 在从柱中洗脱125mL洗脱液后收集的级分)。在减压下浓缩级分11-40以提供DSPE-PEG_{2K}-NAG (439mg, 41%收率)。

[1004] 实施例23: 重复剂量的DOTAP:CHEMS:胆固醇:DMPE-PEG2k和DOTAP:CHEMS:胆固醇:DSPE-PEG_{2k} mRNA制剂及共注射聚合物情况下的mRNA体内表达

[1005] 使用重复给药方案测试与聚合物共注射的LNP制剂的mRNA表达。使用与实施例2中所述相同的方法进行mRNA/LNP+聚合物的共注射和体内荧光素酶表达的评估。

[1006] 表90显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2k或 DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+Fluc mRNA纳米颗粒处理以及共注射聚合物P103的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在每次给药后6小时获得。在CD-1小鼠中, 通过每周一次IV施用共10周, 重复施用制剂。重复施用含有可交换的PEG脂质 (DMPE-PEG2K) 的LNP导致在每周给药到10周的相似的发光信号。相比之下, 重复施用含有稳定PEG脂质 (DSPE-PEG2K) 的LNP导致从第3周开始的活性的 20倍显著降低。在后续8次重复施用中, 这种降低与第1周活性相比为4-30倍活性下降。

表90

总通量(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	Fluc 2 mRNA 剂量 (mg/kg)	聚合物	重复给药 时间点	几何平均值	STDEV	相比第1周 活性的 倍数降低
DOTAP:CHEMS :CHOL: DMPE- PEG2K (50:32:16:2) N:P 7 13 mg/kg	0.5	30 mg/kg P103	第1周	3.07E+10	1.70E+10	1
			第2周	3.02E+10	2.79E+10	1.0
			第3周	4.35E+10	2.16E+10	0.7
			第4周	1.95E+10	1.16E+10	1.6
			第5周	8.85E+09	5.78E+09	3.5
			第6周	3.05E+10	1.24E+10	1.0
			第7周	2.57E+10	1.21E+10	1.2
			第8周	1.55E+10	1.07E+10	2.0
			第9周	2.72E+10	1.49E+10	1.1
			第10周	1.41E+10	5.50E+09	2.2
DOTAP:CHEMS :CHOL: DSPE- PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 17 mg/kg	0.5	30 mg/kg P103	第1周	1.45E+10	9.30E+09	1
			第2周	8.83E+09	7.23E+09	1.6
			第3周	7.03E+08	1.15E+09	20.6
			第4周	7.49E+08	7.48E+08	19.4
			第5周	4.72E+08	3.54E+08	30.7
			第6周	3.39E+09	3.53E+09	4.3
			第7周	9.52E+08	9.55E+08	15.2
			第8周	1.39E+09	1.16E+09	10.4
			第9周	2.67E+09	2.32E+09	5.4
			第10周	1.75E+09	1.89E+09	8.3

[1007]

[1008] 实施例24:在亚效等位基因精氨酸琥珀酸裂解酶(ASL)小鼠模型中用mRNA制剂的精氨酸琥珀酸尿症治疗

[1009] 通过静脉内途径施用在脂质纳米颗粒中配制的编码精氨酸琥珀酸裂解酶(ASL)的mRNA以及共注射或顺序注射如本文所述的靶向肝脏中的肝细胞的膜去稳定化聚合物,处理5-10只亚效等位基因 $As1^{Neo/Neo}$ 小鼠的组,由此实现ASL的表达和活性。用介质对照或0.1-5 mg/kg的As1 mRNA处理小鼠。以各种给药间隔(例如,每天、每2天、每2周等)进行单次或重复给药。对于短期作用,在最终剂量后3小时至72小时范围内,或者对于作用持续时间,在剂量后至多2周的不同时间点收集血液以检查血浆氨基酸(精氨酸琥珀酸、瓜氨酸、精氨酸)、血浆氨和血清转氨酶。在这些时间点,处死小鼠,收集肝脏并取样以测量ASL酶活性、通过western分析的ASL蛋白表达和肝组织切片的免疫荧光。如果进行更长期的研究,则测量体重以监测生长和存活,因为 $As1^{Neo/Neo}$ 小鼠具有显著的生长受限,并且小鼠在生命的第6至14周内死亡,即便持续采用三联疗法(苯甲酸钠、亚硝酸钠、L-精氨酸)治疗(Erez等, Nat Med 2011.17:1619-1626)。

[1010] 将结果与介质处理的小鼠以及具有正常水平的ASL蛋白表达、血浆氨基酸水平、血浆氨和血清转氨酶的野生型同窝小鼠进行比较。通过western和免疫荧光评估的ASL蛋白表达的可检测水平(其高于在介质处理的小鼠中检测到的水平)显示功效。在野生型同窝小鼠中,通常检测不到血浆精氨酸琥珀酸(ASA)水平,且血浆瓜氨酸水平为 $\sim 70\mu\text{M}$,而 $As1^{Neo/Neo}$ 小鼠具有 $\sim 100\mu\text{M}$ ASA和 $\sim 200\mu\text{M}$ 瓜氨酸水平。野生型同窝小鼠中血浆氨水平正常,为 $\sim 50\mu\text{M}$,而 $As1^{Neo/Neo}$ 小鼠中的血浆氨水平升高至100-500 μM 范围。按照血浆氨基酸和血浆氨水

平的功效是朝向在野生型同窝小鼠中看到的水平的校正。在长期研究中,通过与介质处理的小鼠相比增加的生长和存活率显示功效。

[1011] 实施例25:在CTLN1的精氨酸琥珀酸合成酶 (ASS1) 缺陷鼠模型 (fold/fold) 中用 mRNA 制剂治疗 1 型瓜氨酸血症 (CTLN1)

[1012] 通过静脉内途径施用在脂质纳米颗粒中配制的编码精氨酸琥珀酸合成酶 (ASS1) 的 mRNA 并且共注射或顺序注射如本文所述的靶向肝脏中的肝细胞的膜去稳定化聚合物,处理 5-10 只 Ass1^{fold/fold} 小鼠的组,由此实现 ASS1 的表达和活性。用介质对照或 0.1-5mg/kg 的 Ass1 mRNA 处理小鼠。以各种给药间隔 (例如,每天、每 2 天、每 2 周等) 进行单次或重复给药。对于短期作用,在最终剂量后 3 小时至 72 小时范围内,或者对于作用持续时间,在剂量后至多 2 周的不同时间点收集血液以检查血浆氨基酸 (瓜氨酸、精氨酸) 和血浆氨水平。在这些时间点,处死小鼠,收集肝脏并取样以测量 ASS1 酶活性、通过 western 分析的 ASS1 蛋白表达和肝组织切片的免疫荧光。如果进行更长期的研究,则测量体重以监测生长和存活,因为 Ass1^{fold/fold} 小鼠具有生长受限,并且如果不用苯甲酸钠和 L-精氨酸治疗则在寿命的前 3 周内死亡 (Perez 等, Am J Pathol. 177:1958-1968, 2010)。

[1013] 将结果与介质处理的小鼠以及具有正常水平的 ASS1 酶活性、血浆氨基酸和血浆氨水平的野生型同窝小鼠进行比较。通过高于在介质处理的小鼠中检测到的水平的 ASS1 酶活性校正而显示功效。野生型同窝小鼠中血浆瓜氨酸水平为 ~70 μ M, 而 Ass1^{fold/fold} 小鼠具有显著升高的瓜氨酸水平,为 ~2000-3000 μ M。野生型同窝小鼠中血浆氨水平正常,为 ~50 μ M, 而 Ass1^{fold/fold} 小鼠具有 100-500 μ M 范围内的升高。如果小鼠不采用苯甲酸钠和 L-精氨酸治疗,则水平是高的。按照血浆氨基酸和血浆氨水平的功效是朝向在野生型同窝小鼠中看到的水平的校正。在更长期研究中,如果中止小鼠的苯甲酸钠和 L-精氨酸治疗,通过与介质处理的小鼠相比增加的生长和存活率而显示功效。

[1014] 实施例 26:DOTAPen:CHEMS:胆固醇:DMPE-PEG_{2k} mRNA 纳米颗粒制剂以及顺序注射或共注射聚合物:制剂的特征

[1015] 如实施例 34 中所述合成 (R)-N,N,N-三甲基-4,5-双(油酰基氧基)戊-1-氯化铵 (DOTAPen) 并在室温下将其在 15 分钟内以 50mg/mL 溶解在 200 酒精标准强度乙醇中。在室温下将 DMPE-PEG_{2k} (Corden Pharma, Boulder, Colorado, USA; 产品目录号 LP-R4-123) 在 15 分钟内以 50mg/mL 溶解在 200 酒精标准强度乙醇中。在 75 $^{\circ}$ C 下将半琥珀酸胆固醇酯 (CHEMS) (Avanti Polar Lipid Alabaster, Alabama, USA; 产品目录号 850524P) 和胆固醇 (CHOL) (Corden Pharma, Boulder, Colorado, USA; 产品目录号 CH-0355) 在 5 分钟内以 25 mg/mL 单独地溶解在 200 酒精标准强度乙醇中。对于 N:P 比率为 7 的 DOTAPen:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG_{2k} (50:32:16:2 摩尔%) LNP 的 2mL 制备物,制备含有 92 μ L 在 200 酒精标准强度乙醇中 50mg/mL 的 DOTAPen、79 μ L 在 200 酒精标准强度乙醇中 25mg/mL 的 CHEMS、32 μ L 在 200 酒精标准强度乙醇中 25mg/mL 的 CHOL、14 μ L 在 200 酒精标准强度乙醇中 50mg/mL 的 DMPE-PEG_{2k} 和 450 μ L 的 200 酒精标准强度乙醇的脂质乙醇混合物,最终体积为 0.666mL 且总脂质浓度为 27mg/mL。

[1016] 基于 DOTAPen 浓度,以 7 至 10 的 N:P (氮:磷酸盐) 比率制备脂质纳米颗粒 (LNP) 制剂。分别经各个 N:P 比率将 DOTAPen:CHEMS 比率以 50:32 摩尔% 固定为 1.6。

[1017] 在 300mM 蔗糖 20mM 磷酸盐, pH 7.4 缓冲液 (SUP 缓冲液) 中将在 10mM Tris-HCl (pH 7.5) 中为 1mg/mL 的 Fluc (萤火虫荧光素酶) mRNA 储备溶液稀释至 0.225mg/mL。使用来自

Precision NanoSystems Inc (Vancouver BC, Canada) 的微流体装置,通过在12 mL/分钟的流速下以1:2的比率(脂质乙醇混合物:SUP缓冲液中的 mRNA)混合乙醇脂质溶液与在SUP缓冲液中0.225mg/mL的mRNA 而以7或10的N:P比组装mRNA/LNP。然后在室温下孵育在33%乙醇中的mRNA/LNP 60分钟,之后用100体积(200mL)的SUP缓冲液透析18小时。

[1018] 采用400RPM搅拌,将用于共注射的聚合物在1小时内以20 mg/mL溶解在SUP缓冲液中,然后在4°C下储存过夜。注射前在SUP 缓冲液中将聚合物稀释至6mg/mL。

[1019] 由于mRNA/LNP和聚合物被共注射,制备各自的2X溶液。恰好在给药前,将溶液混合并立即注射。

[1020] 通过在一一次性微量比色皿中将10 μ L制剂加入到90 μ L SUP缓冲液测量制剂粒径,并使用Malvern Instrument ZETASIZER NANO-ZS 分析。LNP显示88nm的粒径(z-平均)。通过在一一次性1mL比色皿中将10 μ L制剂加入到740 μ L SUP缓冲液而测量pH 7.4下的制剂 zeta-电位。通过在一一次性1mL比色皿中将10 μ L制剂加入到740 μ L 的蔗糖乙酸盐缓冲液(pH 4)而测量pH 4下的制剂zeta-电位。将zeta 浸入式单元插入到1mL比色皿中,并使用ZETASIZER NANO-ZS分析制剂。DOTAPe LNP在pH 7下具有-4mV的zeta电位,在pH 4下具有+12mV的zeta电位。使用Ribo Green染料可及性试验在96孔板中测量LNP紧密结合mRNA的能力。将100 μ L在SUP中1:64稀释用于染料可及性mRNA测量的纳米颗粒或100 μ L在SUP中1:200稀释用于总mRNA测量的纳米颗粒加载到96孔板中。为此,将在SUP 缓冲液中1:200稀释用于染料可及性测量的100 μ L RiboGreen试剂或在0.2%TritonX-100/SUP缓冲液中1:200稀释用于总mRNA测量的 100 μ L RiboGreen试剂分别加入各孔中。在室温下暗处孵育平板5分钟。使用Molecular Devices SpectraMaxM5,以480nm处的激发和 520nm的发射读取荧光。最后,通过从总mRNA的 μ M浓度减去染料可及性mRNA的 μ M浓度,将所得值除以总mRNA的 μ M浓度,再乘以100来计算百分染料可及性。

[1021] 当在SUP缓冲液中制备时, DOTAPenLNP显示28%染料可及性。下表91显示了示例性LNP制剂的表征。

[1022] 表91:LNP特性

样品#	RP659-1	RP659-2
脂质	DOTAPen:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2K (50:32:16:2)	
N/P	10	7
脂质浓度 (mg/mL)	3.9	2.7
视觉外观	乳白色 (+)	乳白色 (+)
染料可及性% SUP pH 7.4	50%	28%
Z-平均 (nm)	83	88
PDI	0.051	0.070
数量 (nm)	64	63
Pk 1平均Int (nm)	88	95
Pk 2平均 Int (nm)	0	0
Pk 1面积Int (%)	100	100
Pk 2面积Int (%)	0	0
ZP pH 7.4 (mV)	-6	-4
ZP pH 4 (mV)	10	12
尺寸分类数据质量	良好	良好

[1024] 实施例27:在DOTAPen:CHEMS:胆固醇:DMPE-PEG_{2k} mRNA制剂和聚合物共注射情况下的mRNA体内表达

[1025] 使用共注射以及与实施例2中所述相同的方法采用P105测试实施例26中所述的含DOTAPen的LNP。

[1026] 表92显示用N:P比7或10的 DOTAPen:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2k+Fluc mRNA纳米颗粒处理以及共注射聚合物P105的动物的肝脏中的发光值。将含DOTAPen的 LNP的活性与DOTAPen:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG2k+Fluc mRNA 纳米颗粒及共注射聚合物相比较。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在给药后6小时获得。Fluc mRNA/DOTAPen:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P105相比于Fluc mRNA/DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k LNP+P105显示低3-6倍的发光信号。

表92 总通量 (光子/秒)

脂质-mRNA纳米颗粒	Fluc 2 mRNA 剂量 (mg/kg)	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	几何平均值	STDEV
DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 17.5 mg/kg	0.5	P105	30	1.80E+10	1.00E+10
DOTAPen:CHEMS:CHOL: DMPE-PEG2K (50:32:16:2) N:P 10 17.5 mg/kg	0.5	P105	30	5.16E+09	5.74E+09
DOTAPen:CHEMS:CHOL: DMPE-PEG2K (50:32:16:2) N:P 7 17.5 mg/kg	0.5	P105	30	2.93E+09	3.45E+09

[1028] 实施例28:在DOTAP:CHEMS:胆固醇:DSPE-PEG_{2k} mRNA制剂和聚合物共注射情况下的

hEPO mRNA体内表达

[1029] 使用雌性CD-1小鼠(7-10周龄)评估在DOTAP:CHEMS:胆固醇:DSPE-PEG2k LNP中配制hEPO mRNA及共注射P96聚合物。以1 mg/kg mRNA、35mg/kg脂质和35mg/kg聚合物静脉给药该制剂,每组注射5只小鼠。将注射蔗糖磷酸盐缓冲液的小鼠用作对照。对于每次注射,给予小鼠约0.25mL的最终剂量体积或基于个体体重的10 mL/kg。

[1030] 在剂量后6小时收集的小鼠血清中评估hEPO mRNA的体内表达。通过眼眶后采样取血,并将其收集在血清分离管中。通过离心分离血清,并在-20℃下冷冻储存直至进行分析。对于ELISA试验,在PBS中稀释血清,然后根据制造商方案使用Human Epo Quantikine IVD ELISA (R&D Systems#DEP00) 进行运行。简言之,将100μL 稀释样品与100μL Epo试验稀释液在ELISA板中混合,并以500RPM 振荡1小时。除去溶液并用200μL抗体缀合物代替,且再振荡一小时。然后洗涤平板和使用二组分HRP/TMB系统显影,并在450nm 下读数。

[1031] 表93显示用缓冲液处理,或者用hEPO mRNA/LNP及共注射聚合物P96处理的动物的hEPO血清水平。与用1mg/kg的hEPO mRNA 检测到的 2.98×10^6 pg/mL的hEPO相比,在缓冲液处理的小鼠中没有观察到可检测水平的hEPO。

脂质-mRNA纳米颗粒	hEPO mRNA 剂量 (mg/kg)	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	平均值	STDEV
无	0	无	无	<2.5	
DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 35 mg/kg	1	P96	35	2.98E+06	1.24E+06

[1032] 实施例29:在DOTAP:CHEMS:胆固醇:DSPE-PEG_{2k} mRNA制剂和聚合物共注射情况下, HPLC纯化和未纯化mRNA的体内细胞因子分析

[1034] 使用雌性CD-1小鼠(7-10周龄)评估在DOTAP:CHEMS:胆固醇:DSPE-PEG2k LNP中配制的HPLC纯化和未纯化Fluc mRNA及共注射P95聚合物。以1mg/kg mRNA、35mg/kg脂质和30mg/kg聚合物静脉内给药该制剂,每组注射5只小鼠。注射蔗糖磷酸盐缓冲液的小鼠用作对照。对于每次注射,给予小鼠约0.25mL的最终剂量体积或基于个体体重的10mL/kg。

[1035] 使用R&D systems Mouse CXCL10/IP-10/CRG-2Quantikine ELISA试剂盒(#SMCX100) 定量小鼠IP-10细胞因子水平。在剂量后3小时通过眼眶后采样取血,并将其收集在血清分离管中。通过离心分离血清,并在-20℃下冷冻储存直至进行分析。对于ELISA,在PBS中稀释血清,然后根据制造商的方案运行。简言之,将50μL稀释样品与50μL试验稀释液在ELISA平板中混合,并在室温下孵育2 小时。除去溶液并用200μL抗体缀合物代替,且在室温下孵育2小时。然后洗涤平板和使用二组分HRP/TMB系统显影,并在450nm 下读数。

[1036] 表94显示用缓冲液处理,或者用在LNP中配制的HPLC纯化或未纯化Fluc mRNA及共注射聚合物P95处理的动物的IP-10血清水平。与采用未纯化Fluc mRNA诱导的高IP-10细胞因子水平相比,采用HPLC纯化Fluc mRNA在剂量后3小时的IP-10细胞因子水平显著降低。

表94

小鼠 IP-10 血清水平
(pg/mL)

脂质-mRNA纳米颗粒	mRNA	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	平均值	STDEV
无	0	无	无	< 30	
[1037] DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:16:2) N:P 7 17 或 35 mg/kg	0.5 mg/kg 未纯化的 Fluc 2 mRNA	P95	30	10293	4524
	1 mg/kg 未纯化的 Fluc 2 mRNA	P95	30	14827	2824
	0.5 mg/kg HPLC 纯化的 Fluc 2 mRNA	P95	30	644	639
	1 mg/kg HPLC 纯化的 Fluc 2 mRNA	P95	30	2377	3175

[1038] 实施例30:在重复给药后DOTAP:CHEMS:胆固醇:DSPE-PEG_{2k}和聚合物共注射情况下HPLC纯化或未纯化Fluc mRNA的体内表达

[1039] 使用实施例2中所述相同的方法,在CD-1小鼠中重复给药在 DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2kLNP中配制的HPLC纯化Fluc 2 mRNA和未纯化Fluc 2 mRNA及P95共注射。

[1040] 表95显示用DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG2k+HPLC纯化或未纯化Fluc 2 mRNA纳米颗粒处理且共注射聚合物P95的动物的肝脏中的发光值。将mRNA/LNP+聚合物以1:1的比率混合并立即注射到小鼠中。数据在每次给药后6小时获得。在CD-1小鼠中,通过一周一次IV施用重复给药制剂5周。重复施用HPLC纯化Fluc mRNA导致在5周的每周剂量下发光信号降低很少(至多8倍)。相比之下,重复施用未纯化Fluc mRNA导致在5周的每周剂量下发光信号降低至多76倍。

表95

总通量(光子/秒)

脂质-mRNA 纳米颗粒	mRNA 剂量	聚合物	重复剂量 时间点	几何平均值	STDEV	自第1周 活性的 倍数降低
[1041] DOTAP:CHEMS: CHOL: DMPE- PEG2K (50:32:16:2) N:P 7 17.5 mg/kg	0.5 mg/kg 未纯化的 Fluc 2 mRNA	30 mg/kg P95	第1周	8.02E+09	5.83E+09	1
			第2周	1.50E+09	3.16E+09	5.3
			第3周	1.79E+08	2.32E+08	44.9
			第4周	1.05E+08	4.96E+07	76.6
			第5周	3.10E+08	9.54E+08	25.9
	0.5 mg/kg HPLC 纯化的 Fluc 2 mRNA	30 mg/kg P95	第1周	1.09E+10	1.12E+10	1
			第2周	4.82E+09	2.03E+09	2.3
			第3周	1.30E+09	8.92E+09	8.4
			第4周	1.82E+09	4.61E+09	6.0
			第5周	5.29E+09	1.20E+10	2.1

[1042] 实施例31:在DOTAP:CHEMS:胆固醇:DSPE-PEG_{2k}mRNA制剂和聚合物共注射情况下

HPLC纯化和未纯化mRNA的体内细胞因子分析

[1043] 使用雄性OTC-sp^{f^{ash}}小鼠(8-12周龄)评估在DOTAP:CHEMS:胆固醇:DMPE-PEG2k LNP中配制的HPLC纯化和未纯化hOTC或非翻译的hOTC对照mRNA(AUG起始密码子突变为AAG)及共注射 P103聚合物。以1mg/kg mRNA、27mg/kg脂质和30mg/kg聚合物静脉给药该制剂,每组注射5只小鼠。将注射蔗糖磷酸盐缓冲液的小鼠用作对照。对于每次注射,给予小鼠约0.25mL的最终剂量体积或基于个体体重的10mL/kg。

[1044] 使用R&D systems Mouse CXCL10/IP-10/CRG-2Quantikine ELISA试剂盒(#SMCX100)定量小鼠IP-10细胞因子水平。在剂量后3小时通过眼眶后采样取血,并将其收集在血清分离管中。通过离心分离血清,并在-20℃下冷冻储存直至进行分析。对于ELISA,在PBS中稀释血清,然后根据制造商的方案运行。简言之,将50μL稀释样品与50μL试验稀释液在ELISA板中混合,并在室温下孵育2小时。除去溶液并用200μL抗体缀合物代替,并在室温下孵育2小时。然后洗涤平板和使用二组分HRP/TMB系统显影,并在450nm下读数。

[1045] 表96显示用缓冲液处理,或者用在LNP中配制的HPLC纯化或未纯化hOTC mRNA或非翻译的hOTC对照mRNA及共注射聚合物 P103处理的动物的IP-10血清水平。与采用未纯化mRNA诱导的高IP-10细胞因子水平相比,采用HPLC纯化mRNA观察到在剂量后3小时无IP-10细胞因子水平的诱导。

脂质-mRNA纳米颗粒	mRNA	聚合物	聚合物剂量 (mg/kg)	平均值	STDEV
无-缓冲液	0	无	无	< 30	
[1046] DOTAP:CHEMS:CHOL: DMPE-PEG2K (50:32:16:2) N:P 7 27 mg/kg	1 mg/kg HPLC 纯化 hOTC	P103	30	< 30	
	1 mg/kg 未纯化 hOTC	P103	30	8337	506
	1 mg/kg HPLC纯化的不可翻译的hOTC对照	P103	30	< 30	
	1 mg/kg 未纯化的不可翻译的hOTC对照	P103	30	5622	1330

[1047] 实施例32:在鸟氨酸转氨甲酰酶缺陷小鼠中脂质mRNA制剂和聚合物共注射情况下HPLC纯化mRNA的治疗功效

[1048] 如实施例21中所述在OTC-sp^{f^{ash}}小鼠中诱导高氨血症。在AAV 给药后四(4)天,每3-4天施用在N:P为7的 DOTAP:CHEMS:CHOL:DMPE-PEG_{2k} (50:32:16:2)中配制的1mg/kg的HPLC纯化OTC mRNA或1mg/kg的HPLC纯化的非翻译的OTC 对照mRNA+共注射30mg/kg聚合物P103,共计3次重复剂量。在第二mRNA剂量后48小时(在AAV处理后第9天)收集尿液,并分析针对肌酐水平标准化的乳清酸水平。与缓冲液处理(999±192μmol OA/mmol肌酐)或非翻译的对照mRNA处理(882±192μmol OA/mmol肌酐)相比,OTC mRNA处理后的乳清酸(OA)水平降低(336±166 μmol OA/mmol肌酐)。在AAV处理后第12天(第3次重复mRNA 剂量后24小时)收集血浆,并分析氨水平。与用非翻译的对照mRNA (217±119μM氨)或缓冲液处理(110±24μM氨)处理的高氨血症小鼠相比,用OTC mRNA处理后的血浆氨水平降低到正常水平 (43±29μM氨)。为检查在施用HPLC纯化OTC或非翻译的对照 mRNA后是否观察到任何细胞因子

诱导,在第一mRNA剂量后3小时收集血清并检查IP-10水平。与缓冲液处理的小鼠类似,在HPLC 纯化OTC mRNA和非翻译的对照mRNA处理的小鼠二者中,IP-10 水平均低于定量水平(<30pg/mL)。相比之下,未纯化Fluc 2 mRNA 对照显示IP-10血清水平的高诱导(13,009±4932pg/mL)。

[1049] 实施例33:在鸟氨酸转氨甲酰酶缺乏症小鼠中脂质mRNA制剂和聚合物共注射情况下OTC mRNA的表达

[1050] 向OTC-spf^{ash}小鼠施用单一IV剂量的3mg/kg OTC mRNA、3 mg/kg非翻译的OTC对照mRNA,或缓冲液。各mRNA在N:P为 7DOTAP:CHEMS:CHOL:DSPE-PEG_{2k} (50:32:18:10) 中配制+30mg/kg 聚合物P105共注射。在剂量后6、24或48小时处死小鼠并收集肝组织样品用于OTC western分析。为从肝组织制备蛋白质提取物,将 400-600μL新鲜制备的Pierce T-PER组织裂解缓冲液(1个Pierce蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物片剂用于10mL裂解缓冲液)加入到含有约200mg肝组织的各个样品管中。然后将管装载到MP Bio Fastprep-24Instrument (Cat# 116004500) 上,以6m/s速度均质化组织20秒。在4℃,13,000RPM下离心每个组织匀浆15分钟,并将上清液转移到新的Eppendorf管中。通过BCA试验(Thermo Scientific, Cat# 23225) 进一步分析该全细胞裂解物的总蛋白浓度。在将蛋白提取物与4X样品缓冲液(Bio-Rad,Cat#161-0791) 和20X XT还原试剂(Bio-Rad,Cat#161-0792) 混合至最终蛋白浓度为5μg/μL后,将每个泳道25μg各个样品加载到4-12%SDS-PAGE凝胶(Bio-Rad, Cat#345-0124) 上。然后在跑胶之前,在95℃下加热样品5分钟。电泳后,通过在Bio-Rad Transfer-Blot Turbo系统(Cat#170-4155) 下将蛋白质从凝胶转移到PVDF膜(Bio-Rad,Cat#170-4157) 而进行印迹。随后,在室温下在Odyssey封闭缓冲液(LI-COR,Cat# 927-40000) 中将印迹封闭1小时,然后与OTC(Sigma,Cat# HPA000243,1:2000稀释) 或HSP90(Origene,Cat#TA500494, 1:8000 稀释) 一抗在4℃下孵育过夜。在TBST缓冲液中洗涤几次后,将印迹与HRP缀合的二抗(Cell Signaling,Cat#7076S,1:2000) 在室温下孵育1小时。为使蛋白条带可视化,将经洗涤的印迹与基于发光的HRP底物(Millipore,Cat#WBLUF0500) 一起孵育,然后在Bio-Rad ChemiDoc XRS系统(Cat#170-8265) 下成像。使用与ChemiDoc系统连接的Bio-Rad Image Lab软件(Cat#170-9690) 进行western的定量。为定量经处理OTC-spf^{ash}样品中相对于野生型同窝样品的OTC表达水平,将OTC蛋白条带的强度除以相同样品中加载对照HSP90的强度。然后将该比率除以野生型同窝样品的相似比率。这被看做是相对于野生型的OTC表达%。

[1051] 表97显示了采用3mg/kg OTC mRNA、3mg/kg非翻译对照 mRNA或缓冲液处理的OTC-spf^{ash}小鼠相对于野生型同窝小鼠的OTC 表达%。在剂量后24和48小时,OTC-spf^{ash}小鼠中的OTC mRNA处理显示约40%的野生型OTC表达水平。从非翻译对照mRNA检测不到高于采用缓冲液处理看到的水平的OTC表达。

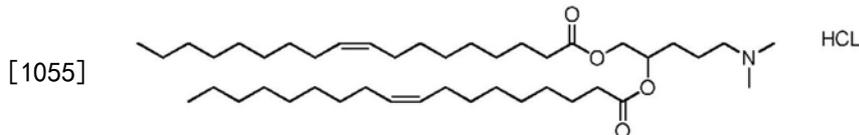
表97

相对于野生型的
OTC表达%

脂质-mRNA纳米颗粒	处理	聚合物剂量 (mg/kg)	时间点 (h)	AVG	STDEV
[1052] DOTAP:CHEMS:CHOL: DSPE-PEG2K (50:32:8:10) N:P 7 105 mg/kg	缓冲液	无	6 h	10.4%	2%
	3 mg/kg OTC mRNA	30 mg/kg	6 h	13.4%	4.2%
			24 h	41.1%	13.1%
			48 h	41.6%	10.1%
	3 mg/kg 不可翻译的 对照mRNA	30 mg/kg	6 h	10.1%	1%
			24 h	9.9%	1.2%

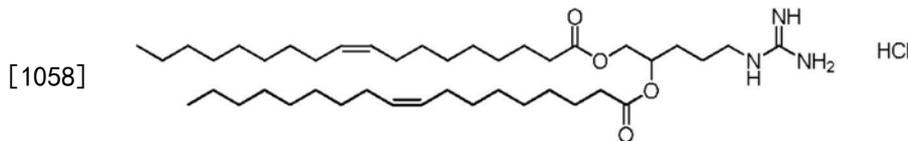
[1053] 实施例34:阳离子脂质的合成

[1054] 部分1:二油酸(R)-5-(二甲基氨基)戊-1,2-二酯盐酸盐(DODAPen-C1)的合成



[1056] 在配有磁力搅拌棒的100mL圆底烧瓶中,将二油酸(R)-5-溴戊-1,2-二酯(1.66g, 2.33mmol)溶解在无水乙腈(50.0mL)中。将盐酸二甲胺(0.951g,11.7mmol)和二异丙基乙胺(2.03mL,11.7mmol)依次加入到悬浮液中,并在油浴中将混合物加热至60℃ 16小时。将当前澄清的溶液冷却至室温(在那时其变浑浊),并在旋转蒸发仪上减压除去溶剂以提供棕色油状残留物。使用二氯甲烷:甲醇(0至10%)的梯度,通过硅胶色谱纯化粗残留物以提供浅棕色半固体状的清洁产物(1.20g,1.77mmol,收率:76%)。通过向油状产物中加入浓盐酸,在旋转蒸发仪上浓缩并随后在高真空下将混合物浓缩至干而获得盐酸盐。获得灰白色蜡状的最最终产物。通过NMR(400MHz ¹H NMR,采用CD₃OD作为溶剂)表征最终产物,所有谱都与期望的一致。

[1057] 部分2:二油酸(R)-5-胍基戊-1,2-二酯盐酸盐(DOPen-G)的合成



[1059] 部分2A:二油酸(R)-5-((叔丁氧羰基)氨基)戊-1,2-二酯的合成

[1060] 在配有磁力搅拌棒的250mL圆底烧瓶中,将氨基甲酸(R)-叔丁基-(4,5-二羟基戊基)酯(2.10g,9.58mmol)溶解在无水二氯甲烷(50.0 mL)中。向该混合物中加入油酸(5.70g,20.2mmol),并在冰浴中将搅拌溶液冷却至0℃。将二环己基碳二亚胺(4.94g,23.9mmol)和二甲基氨基吡啶(1.17g,9.58mmol)加入到冷溶液中,并经16小时将反应物升温至室温。在布氏漏斗上滤出固体二环己基脲沉淀物并用二氯甲烷(4×25mL)洗涤。在旋转蒸发仪上减压浓缩二氯甲烷滤液以获得油状残留物。使用己烷:乙酸乙酯(0至10%)梯度,通过硅胶色谱纯化所得残留物。获得无色油状的纯产物(6.89g,9.21 mmol)。收率:96%。通过NMR(400MHz ¹H NMR,采用CD₃OD 作为溶剂)表征产物,所有谱都与二油酸(R)-5-((叔丁氧羰基)氨基)戊-1,2-二酯一致。

[1061] 部分2B:二油酸(R)-5-氨基戊-1,2-二酯盐酸盐的合成

[1062] 在配有磁力搅拌棒的250mL圆底烧瓶中,将二油酸(R)-5-((叔丁氧羰基)氨基)戊-

1,2-二酯(6.87g,9.18mmol)溶解在无水1,4-二氧六环(50.0mL)中。加入1,4-二氧六环中的4N盐酸(46.0mL,184 mmol),并在室温下搅拌溶液4小时。在旋转蒸发仪上减压除去溶剂,并在高真空下干燥产物16小时。以定量的收率获得粘性无色油状的纯产物(6.29g,9.18mmol)。通过NMR(400MHz ¹H NMR,采用CD₃OD作为溶剂)表征产物,所有谱都与二油酸(R)-5-氨基戊-1,2-二酯盐酸盐一致。

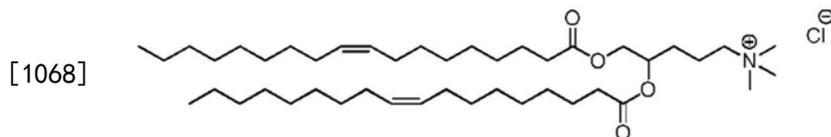
[1063] 部分2C:二油酸(R)-5-(2,3-双(叔丁氧羰基)胍基)戊-1,2-二酯的合成

[1064] 在配有磁力搅拌棒的250mL圆底烧瓶中,将二油酸(R)-5-氨基戊-1,2-二酯盐酸盐(2.46g,3.59mmol)溶解在无水二氯甲烷(50.0mL)中。依次加入三乙胺(1.00mL,7.17mmol)和1,3-二叔丁氧羰基-2-(三氟甲基磺酰基)胍(1.55g,3.96mmol),并在环境温度下搅拌混合物22小时。在旋转蒸发仪上减压浓缩溶液以得到油状残留物。使用己烷:乙酸乙酯(0至10%)的梯度,通过硅胶色谱纯化所得残留物。获得无色油状的纯产物(3.00g,3.37mmol)。收率:94%。通过NMR(400MHz ¹H NMR,采用CDCl₃作为溶剂)表征产物,所有谱都与二油酸(R)-5-(2,3-双(叔丁氧羰基)胍基)戊-1,2-二酯一致。

[1065] 部分D:二油酸(R)-5-胍基戊-1,2-二酯盐酸盐(DOPen-G)的合成

[1066] 在配有磁力搅拌棒的250mL圆底烧瓶中,将二油酸(R)-5-(2,3-双(叔丁氧羰基)胍基)戊-1,2-二酯(1.81g,2.03mmol)溶解在无水1,4-二氧六环(20.0mL)中。加入在1,4-二氧六环中的4N盐酸(30.2mL,121mmol),并在室温下搅拌溶液48小时。在旋转蒸发仪上减压除去溶剂以得到油状残留物。在硅胶色谱上使用二氯甲烷:甲醇(0至100%)梯度纯化所得残留物。在高真空下干燥纯产物20小时以得到灰白色半固体(1.00g,1.38mmol)。收率:68%。通过NMR(400MHz ¹H NMR,采用CD₃OD作为溶剂)表征产物,所有光谱都与DOPen-G一致。

[1067] 部分3:(R)-N,N,N-三甲基-4,5-双(油酰基氧基)戊-1-基氯化铵(DOTAPen)的合成



[1069] 在配有磁力搅拌棒的100mL圆底烧瓶中,将二油酸(R)-5-(二甲基氨基)戊-1,2-二酯(DODAPen,0.700g,1.04mmol)溶解在无水乙腈(10.0mL)中。依次加入二异丙基乙胺(1.80mL,10.3mmol)和碘甲烷(1.93mL,31.0mmol),并在85°C下回流溶液20小时。将溶液冷却至室温,并用乙醚(300mL)稀释,在那时形成二异丙基乙基碘化铵盐的沉淀。过滤出固体沉淀物,并在旋转蒸发仪上减压浓缩合并的有机相。使用二氯甲烷和甲醇(10%)的混合物,使粗残留物通过短硅胶柱。获得棕红色半固体状的纯产物(碘盐)(780mg)。然后将产物通过Amberlite IRA 400氯离子交换树脂柱,并用二氯甲烷:甲醇(33%)的混合物洗脱。重复该柱程序10次以获得氯化物盐形式的期望产物。在高真空下干燥后,获得浅棕色蜡状固体的纯产物(430mg,0.592mmol)。收率:57%。通过NMR(400MHz ¹H NMR,采用CD₃OD作为溶剂)表征产物,所有光谱都与DOTAPen一致。

[1070] 从上述内容将认识到,虽然为了说明的目的而在本文中描述了本发明的具体实施方式,但是可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下进行各种修改。因此,除了所附权利要求之外,本发明不受限制。出于所有目的,本文引用的所有出版物、专利和专利申请的全

部内容都通过引用并入本文。

序列表

<110> PhaseRx, Inc.
 <120> 用于将治疗剂和诊断剂递送到细胞中的方法、组合物和系统
 <130> 3900.PCT1
 <150> US 62/106024
 <151> 2015-01-21
 <150> US 62/173847
 <151> 2015-06-10
 <150> US 62/233568
 <151> 2015-09-28
 <160> 51
 <170> PatentIn 版本 3.5
 [0001] <210> 1
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> TRANSIT
 <222> (1)..(34)
 <223> 天然线粒体前导序列
 <400> 1
 Met Leu Phe Asn Leu Arg Ile Leu Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg Asn
 1 5 10 15
 Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Gln
 20 25 30
 Asn Lys Val Gln Leu Lys Gly Arg Asp Leu Leu Thr Leu Lys Asn Phe
 35 40 45

Thr Gly Glu Glu Ile Lys Tyr Met Leu Trp Leu Ser Ala Asp Leu Lys
 50 55 60

Phe Arg Ile Lys Gln Lys Gly Glu Tyr Leu Pro Leu Leu Gln Gly Lys
 65 70 75 80

Ser Leu Gly Met Ile Phe Glu Lys Arg Ser Thr Arg Thr Arg Leu Ser
 85 90 95

Thr Glu Thr Gly Phe Ala Leu Leu Gly Gly His Pro Cys Phe Leu Thr
 100 105 110

Thr Gln Asp Ile His Leu Gly Val Asn Glu Ser Leu Thr Asp Thr Ala
 115 120 125

[0002] Arg Val Leu Ser Ser Met Ala Asp Ala Val Leu Ala Arg Val Tyr Lys
 130 135 140

Gln Ser Asp Leu Asp Thr Leu Ala Lys Glu Ala Ser Ile Pro Ile Ile
 145 150 155 160

Asn Gly Leu Ser Asp Leu Tyr His Pro Ile Gln Ile Leu Ala Asp Tyr
 165 170 175

Leu Thr Leu Gln Glu His Tyr Ser Ser Leu Lys Gly Leu Thr Leu Ser
 180 185 190

Trp Ile Gly Asp Gly Asn Asn Ile Leu His Ser Ile Met Met Ser Ala
 195 200 205

Ala Lys Phe Gly Met His Leu Gln Ala Ala Thr Pro Lys Gly Tyr Glu
 210 215 220

<223> 具有小鼠线粒体前导序列的人鸟氨酸转氨甲酰酶

<220>

<221> TRANSIT

<222> (1)..(34)

<223> 小鼠线粒体前导序列

<400> 2

Met Leu Ser Asn Leu Arg Ile Leu Leu Asn Asn Ala Ala Leu Arg Lys
1 5 10 15

Gly His Thr Ser Val Val Arg His Phe Trp Cys Gly Lys Pro Val Gln
 20 25 30

Ser Gln Val Gln Leu Lys Gly Arg Asp Leu Leu Thr Leu Lys Asn Phe
 35 40 45

[0004]

Thr Gly Glu Glu Ile Lys Tyr Met Leu Trp Leu Ser Ala Asp Leu Lys
50 55 60

Phe Arg Ile Lys Gln Lys Gly Glu Tyr Leu Pro Leu Leu Gln Gly Lys
65 70 75 80

Ser Leu Gly Met Ile Phe Glu Lys Arg Ser Thr Arg Thr Arg Leu Ser
 85 90 95

Thr Glu Thr Gly Phe Ala Leu Leu Gly Gly His Pro Cys Phe Leu Thr
 100 105 110

Thr Gln Asp Ile His Leu Gly Val Asn Glu Ser Leu Thr Asp Thr Ala
 115 120 125

Arg Val Leu Ser Ser Met Ala Asp Ala Val Leu Ala Arg Val Tyr Lys
130 135 140

	Gln Ser Asp Leu Asp Thr Leu Ala Lys Glu Ala Ser Ile Pro Ile Ile		
	145	150	155 160
	Asn Gly Leu Ser Asp Leu Tyr His Pro Ile Gln Ile Leu Ala Asp Tyr		
		165	170 175
	Leu Thr Leu Gln Glu His Tyr Ser Ser Leu Lys Gly Leu Thr Leu Ser		
		180	185 190
	Trp Ile Gly Asp Gly Asn Asn Ile Leu His Ser Ile Met Met Ser Ala		
		195	200 205
	Ala Lys Phe Gly Met His Leu Gln Ala Ala Thr Pro Lys Gly Tyr Glu		
		210	215 220
[0005]	Pro Asp Ala Ser Val Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Ala Lys Glu Asn		
	225	230	235 240
	Gly Thr Lys Leu Leu Leu Thr Asn Asp Pro Leu Glu Ala Ala His Gly		
		245	250 255
	Gly Asn Val Leu Ile Thr Asp Thr Trp Ile Ser Met Gly Gln Glu Glu		
		260	265 270
	Glu Lys Lys Lys Arg Leu Gln Ala Phe Gln Gly Tyr Gln Val Thr Met		
		275	280 285
	Lys Thr Ala Lys Val Ala Ala Ser Asp Trp Thr Phe Leu His Cys Leu		
		290	295 300
	Pro Arg Lys Pro Glu Glu Val Asp Asp Glu Val Phe Tyr Ser Pro Arg		
	305	310	315 320

Ser Leu Val Phe Pro Glu Ala Glu Asn Arg Lys Trp Thr Ile Met Ala
 325 330 335

Val Met Val Ser Leu Leu Thr Asp Tyr Ser Pro Gln Leu Gln Lys Pro
 340 345 350

Lys Phe

<210> 3

<211> 1262

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 编码人鸟氨酸转氨甲酰酶的 cDNA, 密码子优化用于小鼠表达

[0006]

<220>

<221> 启动子

<222> (1).. (20)

<223> T7 启动子

<400> 3

taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60

caccatgctg ttcaacctca gaatcctcct caataacgcc gccttagaa acggtcataa 120

cttcatggtc agaaacttta gatgtgggtca gcctctccag aacaaagtgc agctcaaggg 180

gcgggacctg ctcacctga aaaatttcac aggcgaggaa atcaagtaca tgctctggct 240

gtctgccgat ctgaagttca ggatcaagca gaaggcgaa tatctccac tgctccaggg 300

gaaaagtctg ggtatgatct tcgaaaagcg gagtactagg accagactgt caacagagac 360

tggattcgct ctgctcggag gacacccatg ctttctgacc acacaggaca ttcattctcg 420

tgtgaacgag tcactgaccg acacagctcg agtcctcage tccatggcag atgccgtgct 480

ggcaagggtc tacaacaga gtgacctga taccctggct aaggaagcaa gcatcccat	540
cattaatgga ctctccgacc tgtatcacc tatccagatt ctggccgatt acctcacct	600
gcaggagcat tattctagtc tgaaagggtc cacactgagc tggattggcg acggaaacaa	660
tatcctgcac tccattatga tgtctgccgc taagtttggc atgcatctgc aggcagccac	720
accaaaagga tacgaaccgg atgcttccgt gactaagctg gccgaacagt atgctaaaga	780
gaacggaact aagctgctcc tgaccaatga cccctggag gctgcacacg ggggtaact	840
cctgatcact gatacctgga tttccatggg ccaggaggaa gagaagaaaa agcgcctgca	900
ggcattccag ggataccagg tgacaatgaa aactgccaaag gtcgccgctt ctgattggac	960
ttttctccat tgtctgcccc gaaagcctga agaggtggac gatgaggtct tctattcacc	1020
tcggagcctg gtgtttccag aagccgagaa tcgcaagtgg acaatcatgg cagtgatggt	1080
gtccctctct acagactatt ccccacagct ccagaagccc aagttttgag cggccgctta	1140
[0007] attaatgctgc cttctgcggg gcttgccctc tggccatgcc cttcttctct cccttgacc	1200
tgtacctctt ggtctttgaa taaagcctga gtaggaagtc tagagtttaa acatttaa	1260
ct	1262

<210> 4

<211> 1262

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 编码具有小鼠线粒体前导序列的人鸟氨酸转氨甲酰酶的 cDNA，密码子优化用于小鼠表达

<220>

<221> 启动子

<222> (1)..(20)

<223> T7 启动子

<400> 4		
taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc		60
caccatgctc tctaacctca ggattctgct caacaacgct gctctgcgga aaggccatac		120
ctctgtcgtc aggcacttct ggtgtgggaa acccgtgcag agccaggtgc agctcaaggg		180
gcgggacctg ctcaccctga aaaatttcac aggcgaggaa atcaagtaca tgctctggct		240
gtctgccgat ctgaagtcca ggatcaagca gaaggcgaa tatctccac tgctccaggg		300
gaaaagtctg ggtatgatct tcgaaaagcg gagtactagg accagactgt caacagagac		360
tggattcgtc ctgctcggag gacacccatg ctttctgacc acacaggaca ttcattctcg		420
tgtgaacgag tctactgacc acacagctcg agtcctcagc tccatggcag atgccgtgct		480
ggcaagggtc tacaacaga gtgacctga taccctggct aaggaagcaa gcatccccat		540
cattaatgga ctctccgacc tgtatcaccc tatccagatt ctggccgatt acctcacct		600
[0008] gcaggagcat tattctagtc tgaaagggtc cacactgagc tggattggcg acggaacaa		660
tatcctgcac tccattatga tgtctgccgc taagtttggc atgcatctgc aggcagccac		720
acaaaaagga tacgaacctg atgcttccgt gactaagctg gccgaacagt atgctaaaga		780
gaacggaact aagctgctcc tgaccaatga cccctggag gctgcacacg ggggtaact		840
cctgatcact gataacctgga tttccatggg ccaggaggaa gagaagaaaa agcgcctgca		900
ggcattccag ggataccagg tgacaatgaa aactgccaag gtcgccgctt ctgattggac		960
tttttccat tgctgcccc gaaagcctga agagggtggac gatgaggtct tctattcacc		1020
tcggagcctg gtgtttccag aagccgagaa tcgcaagtgg acaatcatgg cagtgatggt		1080
gtccctctc acagactatt cccacagct ccagaagccc aagttttgag cgccgctta		1140
attaagctgc ctctgcggg gcttgcttc tggccatgcc cttctctct cccttgacc		1200
tgtacctctt ggtctttgaa taaagcctga gtaggaagtc tagagtttaa acatttaaat		1260

	ct	1262
	<210> 5	
	<211> 1262	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 编码人鸟氨酸转氨甲酰酶的 cDNA, 密码子优化用于人表达	
	<220>	
	<221> 启动子	
	<222> (1).. (20)	
	<223> T7 启动子	
	<400> 5	
	taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc	60
	caccatgctg tttaacctga ggattctgct gaacaacgct gcttttcgga acggccacaa	120
[0009]	ctttatggtg cggaactttc ggtgctggaca gccactgcag aacaaagtgc agctgaaggg	180
	gagggacctg ctgaccctga aaaatttcac aggagaggaa atcaagtaca tgctgtggct	240
	gtctgccgat ctgaagtcc ggatcaagca gaaggcgcaa tatctgccac tgctgcaggg	300
	caaaagtctg gggatgatct tcgaaaagag gagtactcgg accagactgt caacagagac	360
	tggattcgct ctgctgggag gacacccatg ctttctgacc acacaggaca ttcatctggg	420
	cgtgaacgag tcaactgaccg acacagctcg agtcctgagc tccatggcag atgccgtgct	480
	ggcacgggtc taaaacaga gcgacctgga taccctggct aaggaagcaa gcatcccat	540
	cattaatggg ctgtccgacc tgtatcacc tatccagatt ctggccgatt acctgaccct	600
	gcaggagcat tattctagtc tgaaaggcct gacactgagc tggattgggg acggaacaa	660
	tatctgcac tccattatga tgtctgccgc taagtttggga atgcatctgc aggcagccac	720
	accaaaaggc tacgaaccg atgccagtgt gactaagetg gccgaacagt atgctaaaga	780

	gaacggcact aagctgctgc tgaccaatga ccctctggag gctgcacacg gaggcaacgt	840
	cctgatcact gatacctgga ttccatggg ccaggaggaa gagaagaaaa agcgcctgca	900
	ggcattccag ggtaccagg tgacaatgaa aactgccaag gtcgccgctt ctgattggac	960
	ttttctgcat tgtctgcccc gaaaacctga agaggtggac gatgaggctt tctattcacc	1020
	taggagcctg gtgtttccag aagccgagaa tcgcaagtgg acaatcatgg ctgtgatggt	1080
	gtccctgctg actgattatt cccccagct gcagaaacct aagttctgag cggccgctta	1140
	attaagctgc cttctgcggg gcttgccctt tggccatgcc cttcttctct cccttgcacc	1200
	tgtacctctt ggtctttgaa taaagcctga gtaggaagtc tagagtttaa acatttaaat	1260
	ct	1262
	<210> 6	
	<211> 1221	
	<212> RNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 编码人鸟氨酸转氨甲酰酶的 mRNA, 密码子优化用于小鼠表达	
	<400> 6	
	gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaaag agccaccaug cuguucaacc	60
	ucagaauccu ccucaauaac gccgccuuua gaaacgguca uaacuucaug gucagaaacu	120
	uuagaugugg ucagccucuc cagaacaaag ugcagcucaa ggggcgggac cugcucaccc	180
	ugaaaauuu cacaggcgag gaaaucaagu acaugcucug gcugucugcc gaucugaagu	240
	ucaggaucaa gcagaagggc gaauaucucc cacugcucca ggggaaaagu cuggguauga	300
	ucuucgaaaa gcggaguacu aggaccagac ugucaacaga gacuggauuc gcucugcucg	360
	gaggacacc augcuuucug accacacagg acauucaucu cggugugaac gagucacuga	420
	ccgacacagc ucgaguccuc agcuccaugg cagaugccgu gcuggcaagg gucuacaac	480

[0010]

	agagugaccu cgauaccug gcuaaggaag caagcaucc caucauuau ggacucuccg	540
	accuguauca ccuauccag auucuggccg auuaccucac ccugcaggag cauuauucua	600
	gucugaaagg gcucacacug agcuggauug gcgacggaaa caauauccug cacuccauua	660
	ugaugucugc cgcuaaguuu ggcaugcauc ugcaggcagc cacacaaaa ggauacgaac	720
	ccgaugcuuc cgugacuaag cuggccgaac aguaugcuaa agagaacgga acuaagcugc	780
	uccugaccau ugacccccug gaggcugcac acggggguua cguccugauc acugauaccu	840
	ggauuuccau gggccaggag gaagagaaga aaaagcgccu gcaggcauuc cagggauacc	900
	aggugacaau gaaaacugcc aaggucgccg cuucugauug gacuuuucuc cauugucugc	960
	cccgaaagcc ugaagaggug gacgaugagg ucuucuauuc accucggagc cugguguuuc	1020
	cagaagccga gaaucgcaag uggacaauc uggcagugau gguguccuc cucacagacu	1080
	auccccaca gcuccagaag cccaaguuuu gagcggccgc uuaauuaagc ugccuucugc	1140
[0011]	ggggcuugcc uucuggccau gccuucuc ucuccuugc accuguaccu cuuggucuuu	1200
	gaauaaagcc ugaguaggaa g	1221

<210> 7

<211> 1221

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 编码具有小鼠线粒体前导序列的人鸟氨酸转氨甲酰酶的 mRNA，密码子优化用于小鼠表达

<400> 7

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaag agccaccaug cucucuaacc 60

ucaggauucu gcucaacaac gcugcucugc gaaaggcca uaccucugc gucaggcacu 120

ucuggugugg gaaacccgug cagagccagg ugcagcuca ggggcgggac cugcucacce 180

	ugaaaaauuu cacagcgag gaaaucaagu acaugcucug gcugucugcc gaucugaagu	240
	ucaggaucaa gcagaagggc gaauaucucc cacugcucca ggggaaaagu cuggguauga	300
	ucuucgaaaa gcggaguacu aggaccagac ugucaacaga gacuggauuc gcucugcucg	360
	gaggacaccc augcuuucug accacacagg acauucaucu cggugugaac gagucacuga	420
	ccgacacagc ucgaguccuc agcuccaugg cagaugccgu gcuggcaagg gucuacaaac	480
	agagugaccu cgauaccug gcuaaggaag caagcaucc caucauuau ggacucuccg	540
	accuguauc cccuauccag auucuggccg auuaccucac ccugcaggag cauuauucua	600
	gucugaaagg gcucacacug agcuggauug gcgacggaaa caauauccug cacuccauua	660
	ugaugucugc cgcuaaguuu ggcaugcauc ugcaggcagc cacacaaaa ggauacgaac	720
	ccgaugcuuc cgugacuaag cuggccgaac aguaugcuaa agagaacgga acuaagcugc	780
	uccugacca ugaacccug gaggcugcac acggggguaa cguccugauc acugauaccu	840
[0012]	ggauuucau gggccaggag gaagagaaga aaaagcgc cuucugauug gacuuuuc cauugucugc	900
	aggugacaau gaaaacugcc aaggucgccg cuucugauug gacuuuuc cauugucugc	960
	cccgaaagcc ugaagaggug gacgaugagg ucuucuauuc accucggagc cugguguuuc	1020
	cagaagccga gaaucgcaag uggacaauca uggcagugau gguguccuc cucacagacu	1080
	auuccccaca gcuccagaag cccaaguuuu gagcggccgc uuaauuaagc ugccuucugc	1140
	ggggcuugcc uucuggccau gccuucuuc ucuccuugc accuguaccu cuuggucuuu	1200
	gaauaaagcc ugaguaggaa g	1221

<210> 8

<211> 1221

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 编码人鸟氨酸转氨甲酰酶的 mRNA, 密码子优化用于人表达

<400> 8

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaaag agccaccaug cuguuuuacc	60
ugaggauucu gcugaacaac gcugcuuuuc ggaacggcca caacuuuug gucggaacu	120
uucggugcgg acagccacug cagaacaaag ugcagcugaa ggggaggac cugcugacce	180
ugaaaauuu cacaggagag gaaaucaagu acaugcugug gcugucugcc gaucugaagu	240
uccggaucaa gcagaagggc gaauaucugc cacugcugca gggcaaaagu cuggggauga	300
ucuucgaaaa gaggaguacu cggaccagac ugucaacaga gacuggauuc gcucucugg	360
gaggacaccc augcuuucug accacacagg acauucaucu gggcgugaac gagucacuga	420
ccgacacagc ucgaguccug agcuccaugg cagaugccgu gcuggcacgg gucuacaaac	480
agagcgaccu ggauaccug gcuaaggaag caagcaucc caucauuau gggcuguccg	540
[0013] accuguauca ccuauccag auucuggccg auuaccugac ccugcaggag cauuauucua	600
gucugaaagg ccugacacug agcuggauug gggacggaaa caauaaccug cacuccauua	660
ugaugucugc cgcuaaguuu ggaugcauc ugcaggcagc cacacaaaa ggcuaacgaac	720
ccgaugccag ugugacuaag cuggccgaac aguaugcuaa agagaacggc acuaagcugc	780
ugcugaccau ugaccucug gaggcugcac acggaggcaa cguccugauc acugauaccu	840
ggauuuccau ggccaggag gaagagaaga aaaagcgccu gcaggcauuc caggguacc	900
aggugacaau gaaaacugcc aaggucgcc cuucugauug gacuuuucug cauugucugc	960
cccgaaaacc ugaagaggug gacgaugagg ucuucuauuc accuaggagc cugguguuuc	1020
cagaagccga gaaucgcaag uggacaauca uggcugugau gguguccug cugacugauu	1080
auuccccca gcugcagaaa ccuaaguucu gageggccgc uuaauuaagc ugccuucugc	1140
ggggcuugcc uucuggccau gccuucuuc ucuccuugc accuguaccu cuuggucuuu	1200

gaauaaagcc ugaguaggaa g

1221

<210> 9

<211> 750

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> TRANSIT

<222> (1)..(32)

<223> 天然线粒体前导序列

<400> 9

Met Leu Arg Ala Lys Asn Gln Leu Phe Leu Leu Ser Pro His Tyr Leu
 1 5 10 15

[0014]

Arg Gln Val Lys Glu Ser Ser Gly Ser Arg Leu Ile Gln Gln Arg Leu
 20 25 30

Leu His Gln Gln Gln Pro Leu His Pro Glu Trp Ala Ala Leu Ala Lys
 35 40 45

Lys Gln Leu Lys Gly Lys Asn Pro Glu Asp Leu Ile Trp His Thr Pro
 50 55 60

Glu Gly Ile Ser Ile Lys Pro Leu Tyr Ser Lys Arg Asp Thr Met Asp
 65 70 75 80

Leu Pro Glu Glu Leu Pro Gly Val Lys Pro Phe Thr Arg Gly Pro Tyr
 85 90 95

Pro Thr Met Tyr Thr Phe Arg Pro Trp Thr Ile Arg Gln Tyr Ala Gly
 100 105 110

Phe Ser Thr Val Glu Glu Ser Asn Lys Phe Tyr Lys Asp Asn Ile Lys
 115 120 125

Ala Gly Gln Gln Gly Leu Ser Val Ala Phe Asp Leu Ala Thr His Arg
 130 135 140

Gly Tyr Asp Ser Asp Asn Pro Arg Val Arg Gly Asp Val Gly Met Ala
 145 150 155 160

Gly Val Ala Ile Asp Thr Val Glu Asp Thr Lys Ile Leu Phe Asp Gly
 165 170 175

Ile Pro Leu Glu Lys Met Ser Val Ser Met Thr Met Asn Gly Ala Val
 180 185 190

[0015]

Ile Pro Val Leu Ala Asn Phe Ile Val Thr Gly Glu Glu Gln Gly Val
 195 200 205

Pro Lys Glu Lys Leu Thr Gly Thr Ile Gln Asn Asp Ile Leu Lys Glu
 210 215 220

Phe Met Val Arg Asn Thr Tyr Ile Phe Pro Pro Glu Pro Ser Met Lys
 225 230 235 240

Ile Ile Ala Asp Ile Phe Glu Tyr Thr Ala Lys His Met Pro Lys Phe
 245 250 255

Asn Ser Ile Ser Ile Ser Gly Tyr His Met Gln Glu Ala Gly Ala Asp
 260 265 270

Ala Ile Leu Glu Leu Ala Tyr Thr Leu Ala Asp Gly Leu Glu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Thr Gly Leu Gln Ala Gly Leu Thr Ile Asp Glu Phe Ala Pro Arg
 290 295 300

Leu Ser Phe Phe Trp Gly Ile Gly Met Asn Phe Tyr Met Glu Ile Ala
 305 310 315 320

Lys Met Arg Ala Gly Arg Arg Leu Trp Ala His Leu Ile Glu Lys Met
 325 330 335

Phe Gln Pro Lys Asn Ser Lys Ser Leu Leu Leu Arg Ala His Cys Gln
 340 345 350

Thr Ser Gly Trp Ser Leu Thr Glu Gln Asp Pro Tyr Asn Asn Ile Val
 355 360 365

[0016] Arg Thr Ala Ile Glu Ala Met Ala Ala Val Phe Gly Gly Thr Gln Ser
 370 375 380

Leu His Thr Asn Ser Phe Asp Glu Ala Leu Gly Leu Pro Thr Val Lys
 385 390 395 400

Ser Ala Arg Ile Ala Arg Asn Thr Gln Ile Ile Ile Gln Glu Glu Ser
 405 410 415

Gly Ile Pro Lys Val Ala Asp Pro Trp Gly Gly Ser Tyr Met Met Glu
 420 425 430

Cys Leu Thr Asn Asp Val Tyr Asp Ala Ala Leu Lys Leu Ile Asn Glu
 435 440 445

Ile Glu Glu Met Gly Gly Met Ala Lys Ala Val Ala Glu Gly Ile Pro
 450 455 460

Lys Leu Arg Ile Glu Glu Cys Ala Ala Arg Arg Gln Ala Arg Ile Asp
 465 470 475 480

Ser Gly Ser Glu Val Ile Val Gly Val Asn Lys Tyr Gln Leu Glu Lys
 485 490 495

Glu Asp Ala Val Glu Val Leu Ala Ile Asp Asn Thr Ser Val Arg Asn
 500 505 510

Arg Gln Ile Glu Lys Leu Lys Lys Ile Lys Ser Ser Arg Asp Gln Ala
 515 520 525

Leu Ala Glu Arg Cys Leu Ala Ala Leu Thr Glu Cys Ala Ala Ser Gly
 530 535 540

[0017] Asp Gly Asn Ile Leu Ala Leu Ala Val Asp Ala Ser Arg Ala Arg Cys
 545 550 555 560

Thr Val Gly Glu Ile Thr Asp Ala Leu Lys Lys Val Phe Gly Glu His
 565 570 575

Lys Ala Asn Asp Arg Met Val Ser Gly Ala Tyr Arg Gln Glu Phe Gly
 580 585 590

Glu Ser Lys Glu Ile Thr Ser Ala Ile Lys Arg Val His Lys Phe Met
 595 600 605

Glu Arg Glu Gly Arg Arg Pro Arg Leu Leu Val Ala Lys Met Gly Gln
 610 615 620

Asp Gly His Asp Arg Gly Ala Lys Val Ile Ala Thr Gly Phe Ala Asp
 625 630 635 640

Leu Gly Phe Asp Val Asp Ile Gly Pro Leu Phe Gln Thr Pro Arg Glu
645 650 655

Val Ala Gln Gln Ala Val Asp Ala Asp Val His Ala Val Gly Ile Ser
660 665 670

Thr Leu Ala Ala Gly His Lys Thr Leu Val Pro Glu Leu Ile Lys Glu
675 680 685

Leu Asn Ser Leu Gly Arg Pro Asp Ile Leu Val Met Cys Gly Gly Val
690 695 700

Ile Pro Pro Gln Asp Tyr Glu Phe Leu Phe Glu Val Gly Val Ser Asn
705 710 715 720

Val Phe Gly Pro Gly Thr Arg Ile Pro Lys Ala Ala Val Gln Val Leu
725 730 735

[0018]

Asp Asp Ile Glu Lys Cys Leu Glu Lys Lys Gln Gln Ser Val
740 745 750

<210> 10

<211> 2409

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 编码人甲基丙二酰辅酶 A 变位酶的 mRNA

<400> 10

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaaag agccaccaug uuaagagcua 60

agaaucagcu uuuuuuacuu ucaccucauu accugaggca gguaaaagaa ucaucaggcu 120

ccaggcucuu acagcaacga cuucucacacc agcaacagcc ccuucaccca gaaugggcug 180

cccuggcuaa aaagcagcug aaaggcaaaa acccagaaga ccuaauaugg cacaccccg 240

	aagggaucuc uauaaaacc uuguauucca agagagauac uauggacuua ccugaagaac	300
	uuccaggagu gaagccauuc acacuggac cauauccuac cauguauacc uuuaggccu	360
	ggaccauccg ccaguaugcu gguuuuagua cuguggaaga aagcaauaag uucuauaag	420
	acaacauuaa ggcuggucag cagggauuau caguugccuu ugaucuggcg acacaucgug	480
	gcuaugauuc agacaaccu cgaguucgug gugauguugg aauggcugga guugcuauug	540
	acacugugga agauaccaa auucuuuuug auggauuucc uuuagaaaa augucaguuu	600
	ccaugacuau gaauaggaca guuauuccag uucuugcaa uuuuauagua acuggagaag	660
	aacaaggugu accuaaagag aagcuuacug guaccaucca aaugauuaa cuaaaggaau	720
	uuauugguucg aaauacauac auuuuuccuc cagaaccauc caugaaaau auugcugaca	780
	uauuugaaua uacagcaaag cacaugcca aauuuuuuuc aauuucauu aguggauacc	840
	auaugcagga agcaggggcu gaugccauuc uggagcuggc cuauacuuua gcagauggau	900
[0019]	uggaguacuc uagaacugga cuccaggcug gccugacaau ugaugaauuu gcaccaaggu	960
	ugucuuuuuu cuggggaauu ggaaugaauu ucuauaugga aaauagcaaag augagagcug	1020
	guagaagacu cugggcucac uuaauagaga aaauuuuca gccuaaaac ucaaaaucuc	1080
	uuuucuaag agcacacugu cagacaucug gauggucacu uacugagcag gauccuaca	1140
	auaauauugu ccguacugca auagaagcaa uggcagcagu auuuggaggg acucagucuu	1200
	ugcacacaaa uucuuuugau gaagcuuugg guuugccaac ugugaaaagu gcucgaauug	1260
	ccaggaacac acaaaucuc auucaagaag aaucugggau ucccaaagug gcugaucuu	1320
	ggggagguuc uuacaugaug gaauugucua caaauaugu uuaugaugcu gcuuuuagc	1380
	ucauuuauuga aaugaagaa auggguggaa ugcccaaagc uguagcugag ggaauaccua	1440
	aacuucgaau ugaagaangu gcugcccga gacaagcuag aaugaauuc gguucugaag	1500
	uaauuguugg aguaauaag uaccaguugg aaaaagaaga cgcuguagaa guucugcaa	1560

	uugauaaauac uucagugcga aacaggcaga uugaaaaacu uaagaagauc aaauccagca	1620
	gggaucaagc uuuggcugaa cguugucuug cugcacuaac cgaaugugcu gcuagcggag	1680
	auggaaauau ccuggcucuu gcaguggaug caucucgggc aagauguaca gugggagaaa	1740
	ucacagaugc ccugaaaaag guauuuggug aacauaaagc gaaugaucga auggugagug	1800
	gagcauauagc ccaggaauuu ggagaaagua aagagauaac aucugcuauc aagaggguuc	1860
	auaaaauicau ggaacgugaa ggucgcagac cugcucuucu uguagcaaaa augggacaag	1920
	auggccauga cagaggagca aaaguuauug cuacaggauu ugcugaucuu gguuuugaug	1980
	uggacauagg cccucuuuuc cagacuccuc gugaaguggc ccagcaggcu guggaugcgg	2040
	augugcaugc ugugggcaua agcacccucg cugcugguca uaaaaccua guuccugaac	2100
	ucaucaaaga acuuaacucc cuuggacggc cagauauucu ugucaugugu ggagggguga	2160
	uaccaccuca ggauuaugaa uuucuguuug aaguuggugu uuccaungua uuugguccug	2220
[0020]	ggacucgaau uccaaaggcu gccguucagg ugcuuuga uauugagaag uguuuuggaaa	2280
	agaagcagca aucuguauaa gcggccgcuu aauuaagcug ccuucugcgg ggcuugccuu	2340
	cuggccaugc ccuucuuuc ucuccuugcac cuguaccucu uggucuuuga auaaagccug	2400
	aguaggaag	2409
	<210> 11	
	<211> 728	
	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<220>	
	<221> TRANSIT	
	<222> (1).. (52)	
	<223> 天然线粒体前导序列	
	<400> 11	

Lys Ile Glu Ser Lys Leu Leu Ala Lys Lys Ala Glu Val Asn Thr Ile
 180 185 190

Pro Gly Phe Asp Gly Val Val Lys Asp Ala Glu Glu Ala Val Arg Ile
 195 200 205

Ala Arg Glu Ile Gly Tyr Pro Val Met Ile Lys Ala Ser Ala Gly Gly
 210 215 220

Gly Gly Lys Gly Met Arg Ile Ala Trp Asp Asp Glu Glu Thr Arg Asp
 225 230 235 240

Gly Phe Arg Leu Ser Ser Gln Glu Ala Ala Ser Ser Phe Gly Asp Asp
 245 250 255

[0022]

Arg Leu Leu Ile Glu Lys Phe Ile Asp Asn Pro Arg His Ile Glu Ile
 260 265 270

Gln Val Leu Gly Asp Lys His Gly Asn Ala Leu Trp Leu Asn Glu Arg
 275 280 285

Glu Cys Ser Ile Gln Arg Arg Asn Gln Lys Val Val Glu Glu Ala Pro
 290 295 300

Ser Ile Phe Leu Asp Ala Glu Thr Arg Arg Ala Met Gly Glu Gln Ala
 305 310 315 320

Val Ala Leu Ala Arg Ala Val Lys Tyr Ser Ser Ala Gly Thr Val Glu
 325 330 335

Phe Leu Val Asp Ser Lys Lys Asn Phe Tyr Phe Leu Glu Met Asn Thr
 340 345 350

	Arg Leu Gln Val Glu His Pro Val Thr Glu Cys Ile Thr Gly Leu Asp		
	355	360	365
	Leu Val Gln Glu Met Ile Arg Val Ala Lys Gly Tyr Pro Leu Arg His		
	370	375	380
	Lys Gln Ala Asp Ile Arg Ile Asn Gly Trp Ala Val Glu Cys Arg Val		
	385	390	395 400
	Tyr Ala Glu Asp Pro Tyr Lys Ser Phe Gly Leu Pro Ser Ile Gly Arg		
	405	410	415
	Leu Ser Gln Tyr Gln Glu Pro Leu His Leu Pro Gly Val Arg Val Asp		
	420	425	430
[0023]	Ser Gly Ile Gln Pro Gly Ser Asp Ile Ser Ile Tyr Tyr Asp Pro Met		
	435	440	445
	Ile Ser Lys Leu Ile Thr Tyr Gly Ser Asp Arg Thr Glu Ala Leu Lys		
	450	455	460
	Arg Met Ala Asp Ala Leu Asp Asn Tyr Val Ile Arg Gly Val Thr His		
	465	470	475 480
	Asn Ile Ala Leu Leu Arg Glu Val Ile Ile Asn Ser Arg Phe Val Lys		
	485	490	495
	Gly Asp Ile Ser Thr Lys Phe Leu Ser Asp Val Tyr Pro Asp Gly Phe		
	500	505	510
	Lys Gly His Met Leu Thr Lys Ser Glu Lys Asn Gln Leu Leu Ala Ile		
	515	520	525

Ala Ser Ser Leu Phe Val Ala Phe Gln Leu Arg Ala Gln His Phe Gln
530 535 540

Glu Asn Ser Arg Met Pro Val Ile Lys Pro Asp Ile Ala Asn Trp Glu
545 550 555 560

Leu Ser Val Lys Leu His Asp Lys Val His Thr Val Val Ala Ser Asn
565 570 575

Asn Gly Ser Val Phe Ser Val Glu Val Asp Gly Ser Lys Leu Asn Val
580 585 590

Thr Ser Thr Trp Asn Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ser Val Ser Val Asp
595 600 605

[0024] Gly Thr Gln Arg Thr Val Gln Cys Leu Ser Arg Glu Ala Gly Gly Asn
610 615 620

Met Ser Ile Gln Phe Leu Gly Thr Val Tyr Lys Val Asn Ile Leu Thr
625 630 635 640

Arg Leu Ala Ala Glu Leu Asn Lys Phe Met Leu Glu Lys Val Thr Glu
645 650 655

Asp Thr Ser Ser Val Leu Arg Ser Pro Met Pro Gly Val Val Val Ala
660 665 670

Val Ser Val Lys Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Gly Gln Glu Ile Cys
675 680 685

Val Ile Glu Ala Met Lys Met Gln Asn Ser Met Thr Ala Gly Lys Thr
690 695 700

	caucucaaga agcugcuucu aguuuuggcg augauagacu acuaauagaa aaauuuauug	840
	auaauccucg ucatauagaa auccagguuc uaggugauaa acaugggaau gcuuuauugc	900
	uuauagaaag agagugcuca auucagagaa gaaaucagaa ggugguggag gaagcaccaa	960
	gcuuuuuuuu ggauvcggag acucgaagag cgaugggaga acaagcugua gcucuugcca	1020
	gagcaguaaa auauuccucu gcugggaccg uggaguuccu uguggacucu aagaagaauu	1080
	uuuauuuuuu ggaaaugaau acaagacucc agguugagca uccugucaca gaaugcauuu	1140
	cuggccugga ccuaguccag gaaaugauc guguugcuaa gggcuaccu cucaggcaca	1200
	aacaagcuga uauvcgcauc aacggcuggg caguugaauug ucggguuuau gcugaggacc	1260
	ccuacaaguc uuuvguuuu ccaucuauug ggagauuguc ucaguaccaa gaaccguuac	1320
	aucuaccugg ugucgagug gacaguggca uccaaccagg aagugauuuu agcauuuuu	1380
	augauccuau gauuucaaaa cuauucacau auggcucuga uagaacugag gcacugaaga	1440
[0026]	gaauggcaga ugcacuggau aacuauguua uucgaggugu uacacauuuu auugcauuac	1500
	uucgagaggu gauaaucaac ucacgcuuug uaaaaggaga caucagcacu aaauuucucu	1560
	ccgaugugua uccugauggc uucaaaggac acaugcuaac caagagugag aagaaccagu	1620
	uuuvgcaau agcaucauca uuguuvugg cauuccagu uagagcaca cauuuucaag	1680
	aaaauucaag auvgccuguu auuaaaccag acauvgcca cuvggagcuc ucaguuaauu	1740
	ugcaugauaa aguucavacc guaguagcau caaacaavg gucaguguuc ucvgvggaag	1800
	uugauggguc gaaacuaauu gugaccagca cvgugaaccu ggcuvvcccc uuauugucug	1860
	ucagcvuga uvgcacucag aggacuvucc aguvuuuuc ucgagaagca gvggaaaca	1920
	ugagcauua guuuuvvggu acaguvuaa agvgaaauu cuuaaccaga cuvgccgag	1980
	aauvgaaca auuuavguc gaaaaaguga cvgaggacac aagcaguvuu cvgcguucc	2040
	cvavgcccgv agvgvgvgug gccgucucug ucaavgcvg agacvcgguu gcagaavguc	2100

aagaaauuug ugugauugaa gccaugaaaa ugcagaauag uaugacagcu gggaaaacug 2160
gcacggugaa aucugugcac ugucaagcug gagacacagu uggagaagg gaucugcucg 2220
uggagcugga augagcggcc gcuuaauuaa gcugccuucu gcggggcuug ccuucuggcc 2280
augcccuucu ucucuccuu gcaccuguac cucuuggucu uugaauaaag ccugaguagg 2340
aag 2343

<210> 13
<211> 539
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> TRANSIT
<222> (1)..(28)
<223> 天然线粒体前导序列

[0027]

<400> 13

Met Ala Ala Ala Leu Arg Val Ala Ala Val Gly Ala Arg Leu Ser Val
1 5 10 15

Leu Ala Ser Gly Leu Arg Ala Ala Val Arg Ser Leu Cys Ser Gln Ala
 20 25 30

Thr Ser Val Asn Glu Arg Ile Glu Asn Lys Arg Arg Thr Ala Leu Leu
 35 40 45

Gly Gly Gly Gln Arg Arg Ile Asp Ala Gln His Lys Arg Gly Lys Leu
 50 55 60

Thr Ala Arg Glu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Asp Pro Gly Ser Phe Val
65 70 75 80

	Glu Ser Asp Met Phe Val Glu His Arg Cys Ala Asp Phe Gly Met Ala		
		85	90 95
	Ala Asp Lys Asn Lys Phe Pro Gly Asp Ser Val Val Thr Gly Arg Gly		
		100	105 110
	Arg Ile Asn Gly Arg Leu Val Tyr Val Phe Ser Gln Asp Phe Thr Val		
		115	120 125
	Phe Gly Gly Ser Leu Ser Gly Ala His Ala Gln Lys Ile Cys Lys Ile		
		130	135 140
	Met Asp Gln Ala Ile Thr Val Gly Ala Pro Val Ile Gly Leu Asn Asp		
		145	150 155 160
[0028]	Ser Gly Gly Ala Arg Ile Gln Glu Gly Val Glu Ser Leu Ala Gly Tyr		
		165	170 175
	Ala Asp Ile Phe Leu Arg Asn Val Thr Ala Ser Gly Val Ile Pro Gln		
		180	185 190
	Ile Ser Leu Ile Met Gly Pro Cys Ala Gly Gly Ala Val Tyr Ser Pro		
		195	200 205
	Ala Leu Thr Asp Phe Thr Phe Met Val Lys Asp Thr Ser Tyr Leu Phe		
		210	215 220
	Ile Thr Gly Pro Asp Val Val Lys Ser Val Thr Asn Glu Asp Val Thr		
		225	230 235 240
	Gln Glu Glu Leu Gly Gly Ala Lys Thr His Thr Thr Met Ser Gly Val		
		245	250 255

Ala His Arg Ala Phe Glu Asn Asp Val Asp Ala Leu Cys Asn Leu Arg
 260 265 270

Asp Phe Phe Asn Tyr Leu Pro Leu Ser Ser Gln Asp Pro Ala Pro Val
 275 280 285

Arg Glu Cys His Asp Pro Ser Asp Arg Leu Val Pro Glu Leu Asp Thr
 290 295 300

Ile Val Pro Leu Glu Ser Thr Lys Ala Tyr Asn Met Val Asp Ile Ile
 305 310 315 320

His Ser Val Val Asp Glu Arg Glu Phe Phe Glu Ile Met Pro Asn Tyr
 325 330 335

[0029]

Ala Lys Asn Ile Ile Val Gly Phe Ala Arg Met Asn Gly Arg Thr Val
 340 345 350

Gly Ile Val Gly Asn Gln Pro Lys Val Ala Ser Gly Cys Leu Asp Ile
 355 360 365

Asn Ser Ser Val Lys Gly Ala Arg Phe Val Arg Phe Cys Asp Ala Phe
 370 375 380

Asn Ile Pro Leu Ile Thr Phe Val Asp Val Pro Gly Phe Leu Pro Gly
 385 390 395 400

Thr Ala Gln Glu Tyr Gly Gly Ile Ile Arg His Gly Ala Lys Leu Leu
 405 410 415

Tyr Ala Phe Ala Glu Ala Thr Val Pro Lys Val Thr Val Ile Thr Arg
 420 425 430

Lys Ala Tyr Gly Gly Ala Tyr Asp Val Met Ser Ser Lys His Leu Cys
 435 440 445

Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Trp Pro Thr Ala Glu Ile Ala Val Met Gly
 450 455 460

Ala Lys Gly Ala Val Glu Ile Ile Phe Lys Gly His Glu Asn Val Glu
 465 470 475 480

Ala Ala Gln Ala Glu Tyr Ile Glu Lys Phe Ala Asn Pro Phe Pro Ala
 485 490 495

Ala Val Arg Gly Phe Val Asp Asp Ile Ile Gln Pro Ser Ser Thr Arg
 500 505 510

[0030] Ala Arg Ile Cys Cys Asp Leu Asp Val Leu Ala Ser Lys Lys Val Gln
 515 520 525

Arg Pro Trp Arg Lys His Ala Asn Ile Pro Leu
 530 535

<210> 14

<211> 1776

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 编码人丙酰 CoA 羧化酶β多肽(PCCB)的 mRNA

<400> 14

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaag agccaccaug gcggcggcgau 60

uacggguggc ggcggucggg gcaaggcuca gcguucuggc gageggucuc cgcgccgagg 120

uccgcagccu uugcagccag gccaccucug uuaacgaacg caucgaaaac aagcgcggga 180

	ccgcgcugcu gggagggggc caacgccgua uugacgcgca gcacaagcga ggaaagcuaa	240
	cagccagga gaggauca cuuugcugg acccuggcag cuuuguugag agcgacaugu	300
	uuguggaaca cagaugugca gauuuuggaa uggcugcuga uaagaauaag uuuccuggag	360
	acagcguggu cacuggacga ggccgaauca auggaagauu gguuuuuguc uucagucagg	420
	auuuuacagu uuuuggagc agucugucag gaggcacaugc ccaaaagauc ugcaaaaauca	480
	uggaccaggc cauaacggug ggggcuccag ugauugggcu gaaugacucu gggggagcac	540
	ggauccaaga aggaguggag uuuuggcug gcuaugcaga caucuucug aggaauuuu	600
	cggcauccgg agucauccu cagauuucuc ugaucaggc ccaaugugcu gguggggccg	660
	ucuacucucc agccuaaca gacuucacgu ucauguaaa ggacaccucc uaccuguuca	720
	ucacuggccc ugauguugug aagucuguca ccaaugagga uguuaccag gaggagcug	780
	guggugccaa gaccacacc accaugucag gugugccca cagagcuuuu gaaaauaug	840
[0031]	uugaugccuu gugaaucuc cgggauuucu ucaacuaccu gcccugagc agucaggacc	900
	cggcucccgu ccgugagugc cacgaucca gugaccgucu gguuccugag cuugacaca	960
	uuguccuuu ggaaucaacc aaagccuaca acauggugga caucauacac ucuguuguug	1020
	augagcguga auuuuuugag aucaugcca auuauccaa gaacaucau guugguuuug	1080
	caagaugaa ugggaggacu guuggaauug uuggcaacca accuaaggug gccucaggau	1140
	gcuuggauau uaauucaucu gugaaaggg cucguuuugu cagauucugu gaugcauua	1200
	auauccacu caucacuuuu guugaugucc cuggcuuucu accuggcaca gcacaggaau	1260
	acgggggcau cauccggcau ggugccaagc uucucuacgc auuugcugag gcaacuguac	1320
	ccaaagucac agucaucacc aggaaggccu auggaggugc cuaugauguc augagcucua	1380
	agcaccuuug uggugauacc aacuaugccu ggcccaccgc agagauugca gucaugggag	1440
	caaagggcgc uguggagauc aucuucaag ggcaugagaa uguggaagcu gcucaggcag	1500

aguacaucga gaaguuugcc aacccuuucc cugcagcagu gcgaggguuu guggaugaca 1560
ucauccaacc uucuuccaca cgugcccgaa ucugcuguga ccuggauguc uuggccagca 1620
agaagguaca acguccuugg agaaaacaug caaaauuucc auuguaagcg gccgcuaau 1680
uaagcugccu ucugcggggc uugccuucug gccaugcccu ucuucucucc cuugcaccug 1740
uaccucuugg ucuuugaaua aagccugagu aggaag 1776

<210> 15
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> GALA 肽

<400> 15

[0032]

Trp Glu Ala Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu His
1 5 10 15

Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Ala
20 25 30

<210> 16
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 截短的 GALA 肽

<400> 16

Cys Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 17
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 意蜂

<400> 17

Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu
 1 5 10 15

Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln
 20 25

[0033]

<210> 18
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 具有N端半胱氨酸的蜂毒肽

<400> 18

Cys Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala
 1 5 10 15

Leu Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln
 20 25

<210> 19
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> HPH-1 肽

<400> 19

Phe Ile Ile Asp Ile Ile Ala Phe Leu Leu Met Gly Gly Phe Ile Val
1 5 10 15

Tyr Val Lys Asn Leu
 20

<210> 20

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 具有 N 端 Cys-Ala-Ala 的 HPH-1 肽

<400> 20

[0034] Cys Ala Ala Phe Ile Ile Asp Ile Ile Ala Phe Leu Leu Met Gly Gly
1 5 10 15

Phe Ile Val Tyr Val Lys Asn Leu
 20

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> sHGP 肽

<400> 21

Cys Ala Arg Gly Trp Glu Val Leu Lys Tyr Trp Trp Asn Leu Leu Gln
1 5 10 15

Tyr

<210> 22
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> bPrPp 肽

<400> 22

Met Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Trp Ile Leu Val Leu Phe Val Ala
 1 5 10 15

Met Trp Ser Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro
 20 25 30

[0035]

<210> 23
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> MAP 肽

<400> 23

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ala

<210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> PTD4 肽

<400> 24

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
1 5 10

<210> 25

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> Maurocalcine 肽

<400> 25

Gly Asp Cys Leu Pro His Leu Lys Leu Cys Lys Glu Asn Lys Asp Cys
1 5 10 15

[0036]

Cys Ser Lys Lys Cys Lys Arg Arg Gly Thr Asn Ile Glu
 20 25

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> SynB3 肽

<400> 26

Arg Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe
1 5 10

<210> 27

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> SynB1 肽

<400> 27

Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

[0037]

<223> YTA4 肽

<400> 28

Ile Ala Trp Val Lys Ala Phe Ile Arg Lys Leu Arg Lys Gly Pro Leu
1 5 10 15

Gly

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> YTA2 肽

<400> 29

Tyr Thr Ala Ile Ala Trp Val Lys Ala Phe Ile Arg Lys Leu Arg Lys

<210> 35
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> Penetratin 肽

<400> 35

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

<210> 36
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> KALA 肽

[0040]

<400> 36

Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His
 1 5 10 15

Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala
 20 25 30

<210> 37
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> pVEC 肽

<400> 37

Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His

<220>

<223> Transportan 肽

<400> 40

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
 1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
 20 25

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> TAT 肽

<400> 41

[0042]

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Pro Pro Gln
 1 5 10

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> BMV Gag-(7-25)肽

<400> 42

Lys Met Thr Arg Ala Gln Arg Arg Ala Ala Ala Arg Arg Asn Arg Arg
 1 5 10 15

Trp Thr Ala Arg
 20

<210> 43
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> hCT(18-32)-k7 肽 (Ala13 和 Lys14 之间的支链结构)

<400> 43

Lys Lys Arg Lys Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Phe Ala Lys Phe His
 1 5 10 15

Thr Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
 20 25

[0043]

<210> 44
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> M1073 肽

<400> 44

Met Val Thr Val Leu Phe Arg Arg Leu Arg Ile Arg Arg Ala Ser Gly
 1 5 10 15

Pro Pro Arg Val Arg Val
 20

<210> 45
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> EB1 肽

<400> 45

Leu Ile Arg Leu Trp Ser His Leu Ile His Ile Trp Phe Gln Asn Arg
1 5 10 15

Arg Leu Lys Trp Lys Lys Lys
20

<210> 46

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> MPG-β 肽

<400> 46

[0044]

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20 25

<210> 47

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> MPG-β 肽

<400> 47

Gly Ala Leu Phe Leu Ala Phe Leu Ala Ala Ala Leu Ser Leu Met Gly
1 5 10 15

Leu Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

20

25

<210> 48
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 48

Met Ala Ser Glu Ser Gly Lys Leu Trp Gly Gly Arg Phe Val Gly Ala
 1 5 10 15

Val Asp Pro Ile Met Glu Lys Phe Asn Ala Ser Ile Ala Tyr Asp Arg
 20 25 30

His Leu Trp Glu Val Asp Val Gln Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Arg Gly
 35 40 45

[0045]

Leu Glu Lys Ala Gly Leu Leu Thr Lys Ala Glu Met Asp Gln Ile Leu
 50 55 60

His Gly Leu Asp Lys Val Ala Glu Glu Trp Ala Gln Gly Thr Phe Lys
 65 70 75 80

Leu Asn Ser Asn Asp Glu Asp Ile His Thr Ala Asn Glu Arg Arg Leu
 85 90 95

Lys Glu Leu Ile Gly Ala Thr Ala Gly Lys Leu His Thr Gly Arg Ser
 100 105 110

Arg Asn Asp Gln Val Val Thr Asp Leu Arg Leu Trp Met Arg Gln Thr
 115 120 125

Cys Ser Thr Leu Ser Gly Leu Leu Trp Glu Leu Ile Arg Thr Met Val
 130 135 140

	Asp Arg Ala Glu Ala Glu Arg Asp Val Leu Phe Pro Gly Tyr Thr His			
	145	150	155	160
	Leu Gln Arg Ala Gln Pro Ile Arg Trp Ser His Trp Ile Leu Ser His			
		165	170	175
	Ala Val Ala Leu Thr Arg Asp Ser Glu Arg Leu Leu Glu Val Arg Lys			
		180	185	190
	Arg Ile Asn Val Leu Pro Leu Gly Ser Gly Ala Ile Ala Gly Asn Pro			
		195	200	205
	Leu Gly Val Asp Arg Glu Leu Leu Arg Ala Glu Leu Asn Phe Gly Ala			
	210	215	220	
[0046]	Ile Thr Leu Asn Ser Met Asp Ala Thr Ser Glu Arg Asp Phe Val Ala			
	225	230	235	240
	Glu Phe Leu Phe Trp Ala Ser Leu Cys Met Thr His Leu Ser Arg Met			
		245	250	255
	Ala Glu Asp Leu Ile Leu Tyr Cys Thr Lys Glu Phe Ser Phe Val Gln			
		260	265	270
	Leu Ser Asp Ala Tyr Ser Thr Gly Ser Ser Leu Met Pro Gln Lys Lys			
		275	280	285
	Asn Pro Asp Ser Leu Glu Leu Ile Arg Ser Lys Ala Gly Arg Val Phe			
	290	295	300	
	Gly Arg Cys Ala Gly Leu Leu Met Thr Leu Lys Gly Leu Pro Ser Thr			
	305	310	315	320

Tyr Asn Lys Asp Leu Gln Glu Asp Lys Glu Ala Val Phe Glu Val Ser
 325 330 335

Asp Thr Met Ser Ala Val Leu Gln Val Ala Thr Gly Val Ile Ser Thr
 340 345 350

Leu Gln Ile His Gln Glu Asn Met Gly Gln Ala Leu Ser Pro Asp Met
 355 360 365

Leu Ala Thr Asp Leu Ala Tyr Tyr Leu Val Arg Lys Gly Met Pro Phe
 370 375 380

Arg Gln Ala His Glu Ala Ser Gly Lys Ala Val Phe Met Ala Glu Thr
 385 390 395 400

[0047] Lys Gly Val Ala Leu Asn Gln Leu Ser Leu Gln Glu Leu Gln Thr Ile
 405 410 415

Ser Pro Leu Phe Ser Gly Asp Val Ile Cys Val Trp Asp Tyr Gly His
 420 425 430

Ser Val Glu Gln Tyr Gly Ala Leu Gly Gly Thr Ala Arg Ser Ser Val
 435 440 445

Asp Trp Gln Ile Arg Gln Val Arg Ala Leu Leu Gln Ala Gln Gln Ala
 450 455 460

<210> 49

<211> 1551

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 编码人精氨基琥珀酸裂解酶(ASL)同种型 1 的 mRNA, 密码子优化用于小鼠表达

<400> 49

gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaaag agccaccaug gcaucagaga	60
gcgguaaaacu gugggguggg agauucuggg gugccgucga uccuauuaug gagaaauuca	120
acgccagcau ugccuacgac agacaccugu gggaggugga cguccagggc ucaaaggccu	180
acagccgggg ucuggagaag gcaggccugc ucacaaaagc cgaaauggac cagaucugc	240
acggacucga uaagguggcu gaggaauagg cacaggggac auucaaacug aacucuaacg	300
acgaggauau ccacacugcu aacgagagga gacugaagga acucauuggc gccacagcug	360
gaaaacugca uacuggacgg agccgcaacg accagguggu cacagaucug agacucugga	420
ugcggcagac cugcucuaca cugaguggac ugcucuggga gcucauucga acuauggugg	480
acagggcaga ggccgaaaga gacguccugu uuccaggaua uaccaccug cagcgagcac	540
[0048] agccaucag guggucucac uggauucuga gucacgcugu ggcacucacc cgcgauucug	600
agcgacugcu cgaagugcga aagaggauca acguccugcc ucucgggagu ggugccauug	660
cugggaaucc acugggugug gacagggagc ugcucagagc ugaacugaac uucggcgcaa	720
ucaccugaa uucaauggac gccacaagcg agcgcgauuu ugucgccgaa uuccucuuuu	780
gggcuagucu gugcaugacc caucucuaa ggauggcuga ggaccugauc cucuacugua	840
caaaggaauu cagcuuugug cagcuguccg acgcauuuc uacugguagc ucccugaugc	900
cccagaagaa aaaccugac ucccuggagc ucauuagauc uaaggcagga cgaguguucg	960
gaaggugcgc agggcugcuc augacucuga aaggccuccc auccaccuac aauaaggacc	1020
ugcaggagga uaaagaagcc guguuugaag ucagugacac aaugucagcu gugcugcagg	1080
ucgcaacugg ugugaucagc acccugcaga uucaccagga aaacauggga caggcucugu	1140
ccccagacau gcuggccacu gaucucgcuu acuaucuggu gcgaaaggga augccuuuca	1200

ggcaggcaca cgaggccagc ggcaaggcag uguuuauggc cgaaaccaa ggcgucgcc 1260
 ugaaucagcu guccuccag gagcugcaga caaucagccc ccucuucucc ggggacguga 1320
 uuugugucug ggauuacgga cacucugugg aacaguacgg ggcccugggc ggaaccgcu 1380
 gaagcagcgu cgauuggcag auuaggcagg uccgagcccu ccuccaggca cagcaggccu 1440
 gagcggccgc uuaauaagc ugccuucugc ggggcuugcc uucuggccau gccuucuc 1500
 ucucccuugc accuguaccu cuuggucuuu gaauaaagcc ugaguaggaa g 1551

<210> 50
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> 智人

 <400> 50

[0049]

Met Ser Ser Lys Gly Ser Val Val Leu Ala Tyr Ser Gly Gly Leu Asp
 1 5 10 15

 Thr Ser Cys Ile Leu Val Trp Leu Lys Glu Gln Gly Tyr Asp Val Ile
 20 25 30

 Ala Tyr Leu Ala Asn Ile Gly Gln Lys Glu Asp Phe Glu Glu Ala Arg
 35 40 45

 Lys Lys Ala Leu Lys Leu Gly Ala Lys Lys Val Phe Ile Glu Asp Val
 50 55 60

 Ser Arg Glu Phe Val Glu Glu Phe Ile Trp Pro Ala Ile Gln Ser Ser
 65 70 75 80

 Ala Leu Tyr Glu Asp Arg Tyr Leu Leu Gly Thr Ser Leu Ala Arg Pro
 85 90 95

Cys Ile Ala Arg Lys Gln Val Glu Ile Ala Gln Arg Glu Gly Ala Lys
 100 105 110

Tyr Val Ser His Gly Ala Thr Gly Lys Gly Asn Asp Gln Val Arg Phe
 115 120 125

Glu Leu Ser Cys Tyr Ser Leu Ala Pro Gln Ile Lys Val Ile Ala Pro
 130 135 140

Trp Arg Met Pro Glu Phe Tyr Asn Arg Phe Lys Gly Arg Asn Asp Leu
 145 150 155 160

Met Glu Tyr Ala Lys Gln His Gly Ile Pro Ile Pro Val Thr Pro Lys
 165 170 175

[0050] Asn Pro Trp Ser Met Asp Glu Asn Leu Met His Ile Ser Tyr Glu Ala
 180 185 190

Gly Ile Leu Glu Asn Pro Lys Asn Gln Ala Pro Pro Gly Leu Tyr Thr
 195 200 205

Lys Thr Gln Asp Pro Ala Lys Ala Pro Asn Thr Pro Asp Ile Leu Glu
 210 215 220

Ile Glu Phe Lys Lys Gly Val Pro Val Lys Val Thr Asn Val Lys Asp
 225 230 235 240

Gly Thr Thr His Gln Thr Ser Leu Glu Leu Phe Met Tyr Leu Asn Glu
 245 250 255

Val Ala Gly Lys His Gly Val Gly Arg Ile Asp Ile Val Glu Asn Arg
 260 265 270

Phe Ile Gly Met Lys Ser Arg Gly Ile Tyr Glu Thr Pro Ala Gly Thr
 275 280 285

Ile Leu Tyr His Ala His Leu Asp Ile Glu Ala Phe Thr Met Asp Arg
 290 295 300

Glu Val Arg Lys Ile Lys Gln Gly Leu Gly Leu Lys Phe Ala Glu Leu
 305 310 315 320

Val Tyr Thr Gly Phe Trp His Ser Pro Glu Cys Glu Phe Val Arg His
 325 330 335

Cys Ile Ala Lys Ser Gln Glu Arg Val Glu Gly Lys Val Gln Val Ser
 340 345 350

Val Leu Lys Gly Gln Val Tyr Ile Leu Gly Arg Glu Ser Pro Leu Ser
 355 360 365

[0051]

Leu Tyr Asn Glu Glu Leu Val Ser Met Asn Val Gln Gly Asp Tyr Glu
 370 375 380

Pro Thr Asp Ala Thr Gly Phe Ile Asn Ile Asn Ser Leu Arg Leu Lys
 385 390 395 400

Glu Tyr His Arg Leu Gln Ser Lys Val Thr Ala Lys
 405 410

<210> 51

<211> 1395

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 编码人精氨基琥珀酸合成酶(ASS1)的 mRNA, 密码子优化用于小鼠
 表达

<400> 51	
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaaag agccaccaug agcucaaagg	60
ggaguguggu gcuggccuau ucuggcgggc uggauaccuc uugcauucug guguggcuga	120
aggaacaggg uuacgacgug aucgcauacc uggccaacau ugggcagaag gaggauuuug	180
aggaagcuag aaagaaagca cugaaacucg gcgccaagaa aguguucauc gaggacgucu	240
cccgggaauu cguggaggaa uuuauucugc cagccauuca gagcuccgcu cuguacgagg	300
auagauaucu gcucggaacc agccucgcac gaccucgcau cgccaggaag cagguggaga	360
uugcucagcg cgaaggggca aaguacgucu cccacggugc cacaggcaa gaaacgacc	420
aggugcgauu ugagcugucu uguuauaguc ugcacccca gaucaagguc auugccccc	480
ggcgcaugcc cgaguucuc aaccgguua agggccgcaa cgaccugaug gaauacgcu	540
aacagcacgg aaucceaau cccgugacuc cuaagaacce cugguccaug gaugagauc	600
[0052] ugauvcuau cucuuacgag gcugggauuc ucgaaaacc uaagaucag gcacccccug	660
gucuguauac uaagaccag gaccagcca aagcuccaa cacaccugau auccuggaga	720
uugaauuuua gaaaggggug ccugucuaag ugacuaacgu gaaagacggu accacacacc	780
agaccucucu ggagcucuuu auguaccuga acgaagucgc aggcaagcac ggggugggua	840
gaaucgauau ugucgagaau cgguucaucg ggaugaaaag ucgcgguaau uacgaaacc	900
cugcuggaac aaucugua cagcccauc ucgacauuga ggcuucaca auggauagag	960
aagugagaaa gaucaaacag gccucggac ucaaguucgc cgagcuggug uacacugau	1020
uuuggcacuc uccagagugc gaauucguc gacauuguau cgcuagagu caggagagg	1080
ucgaaggaa ggucaggug ucaguccuga aaggccaggu guacauucuc ggacgggagu	1140
cacccugag ccucuauaac gaggaacugg ugagcaugaa guccagggc gacuacgaac	1200
cuacagacgc cacuggauuc aucaacauca acucacucag gcucaaggaa uaccacaggc	1260

	uccagucaaa agucacagca aaguaggcgg ccgcuaaauu aagcugccuu cugcggggcu	1320
[0053]	ugccuucugg ccaugccuuu cuucucuccc uugcaccugu accucuuggu cuuugaauaa	1380
	agccugagua ggaag	1395

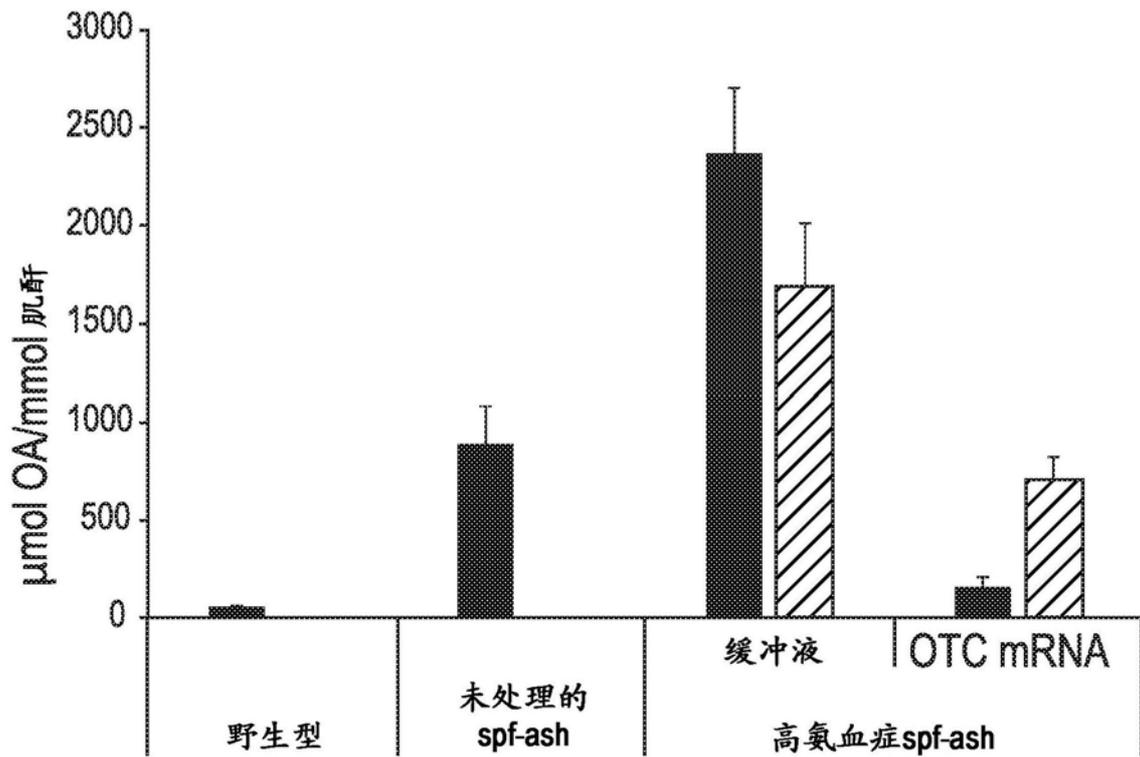


图1A

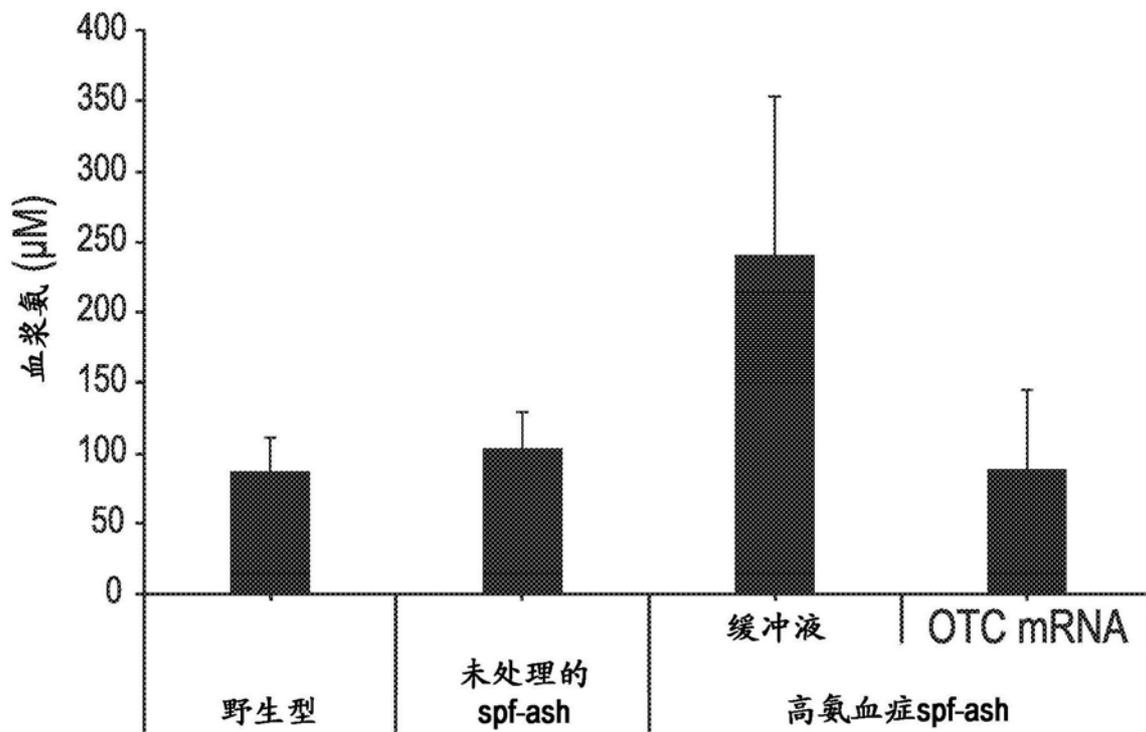


图1B

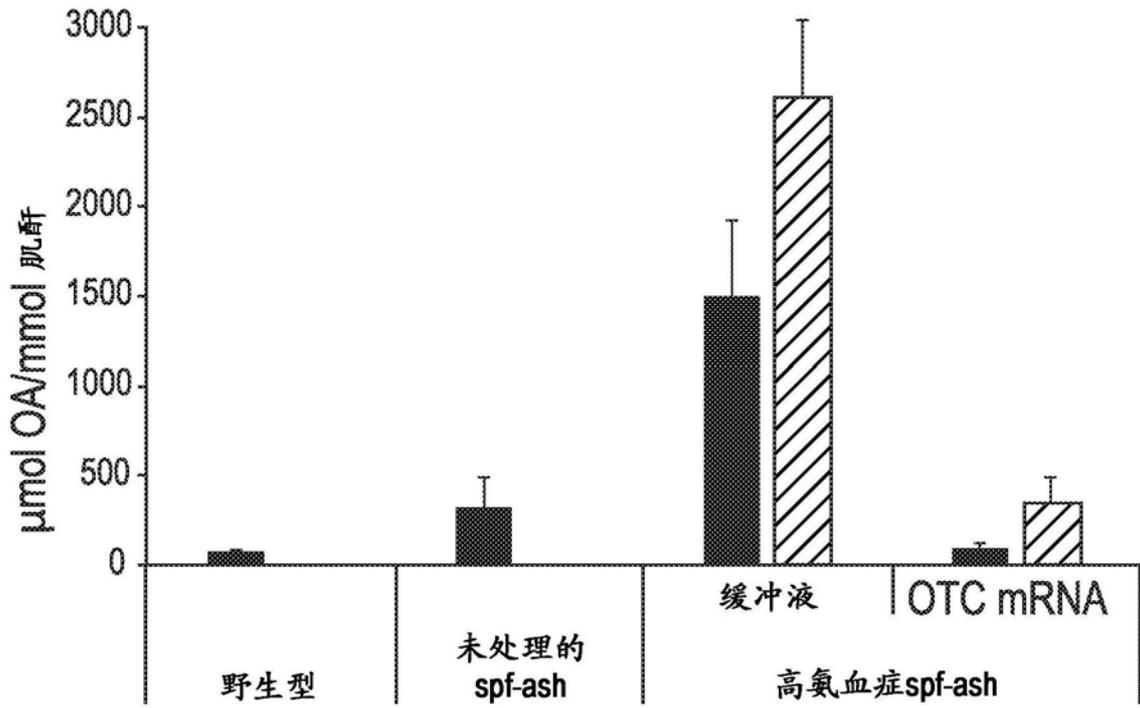


图2A

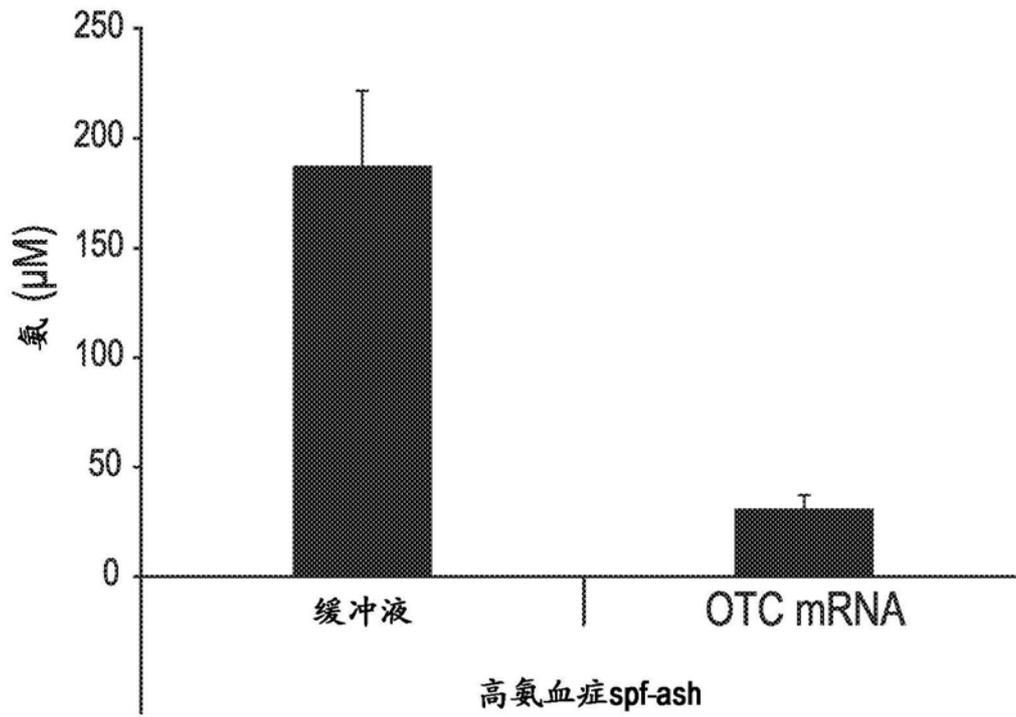


图2B

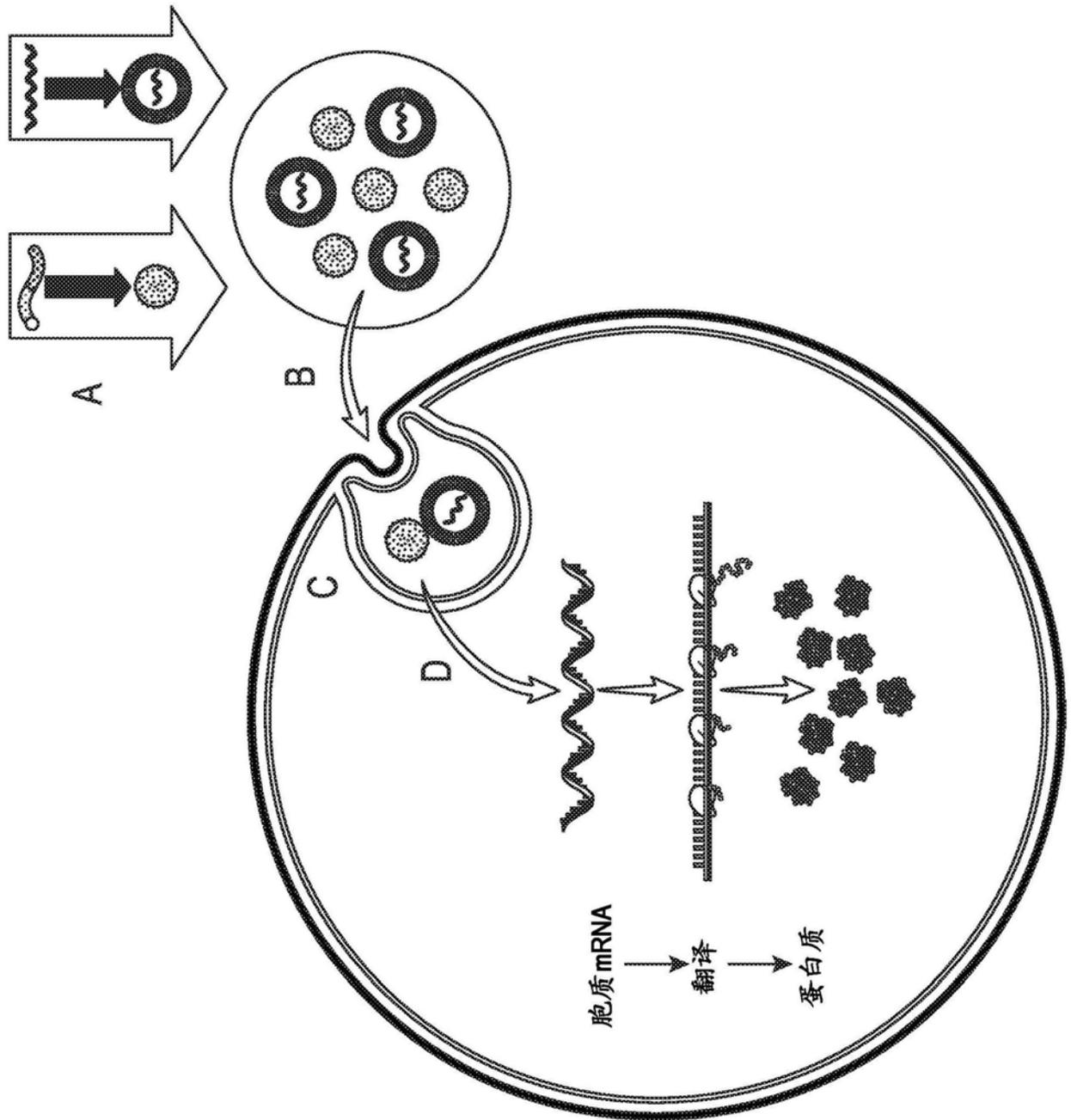


图3