



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110582302 A

(43)申请公布日 2019.12.17

(21)申请号 201780084854.4

(72)发明人 A·R·沃森 C·福斯特

(22)申请日 2017.12.14

(74)专利代理机构 北京龙双利达知识产权代理有限公司 11329

(30)优先权数据

62/434,344 2016.12.14 US

62/443,522 2017.01.06 US

62/443,567 2017.01.06 US

62/517,346 2017.06.09 US

代理人 孙涛 肖鹏

(51)Int.Cl.

A61K 47/64(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

C12N 15/88(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.07.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/066545 2017.12.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/112282 EN 2018.06.21

(71)申请人 利甘达尔股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

权利要求书5页 说明书107页

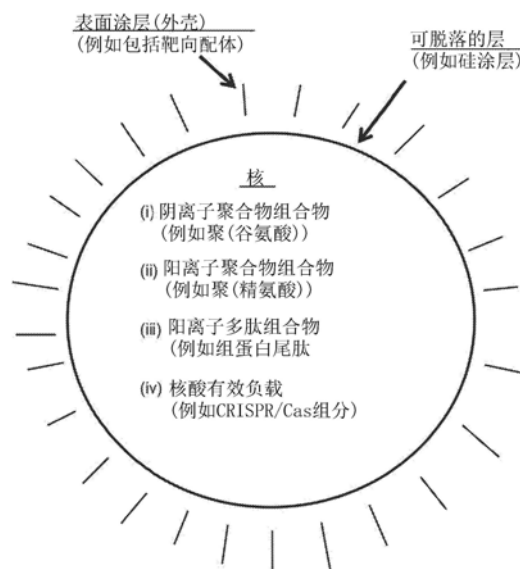
序列表93页 附图252页

(54)发明名称

用于核酸和/或蛋白有效负载递送的组合物和方法

(57)摘要

提供了用于将有效负载(例如,核酸和/或蛋白有效负载)纳米颗粒递送至细胞的方法和组合物。在一些实施方案中,主题纳米颗粒包括核和包封所述核的可脱落层,其中所述核包括(i)阴离子聚合物组合物;(ii)阳离子聚合物组合物;(iii)阳离子多肽组合物;(iv)核酸和/或蛋白有效负载;其中:(a)所述阴离子聚合物组合物包括阴离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阴离子氨基酸的L-异构体的聚合物,和/或(b)所述阳离子聚合物组合物包含阳离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阳离子氨基酸的L-异构体的聚合物。在一些情况下,所述阴离子和/或阳离子氨基酸的D-异构体的聚合物相对于所述L-异构体的聚合物以10:1至1:10范围的比率存在。



1. 一种纳米颗粒,其包含核和包封所述核的可脱落层,其中所述核包含:

- (i) 阴离子聚合物组合物;
- (ii) 阳离子聚合物组合物;
- (iii) 阳离子多肽组合物;和
- (iv) 核酸和/或蛋白质有效负载,

其中 (a) 所述阴离子聚合物组合物包含阴离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阴离子氨基酸的L-异构体的聚合物;和/或 (b) 所述阳离子聚合物组合物包含阳离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阳离子氨基酸的L-异构体的聚合物。

2. 根据权利要求1所述的纳米颗粒,其中所述阴离子聚合物组合物包含选自聚(D-谷氨酸)(PDEA)和聚(D-天冬氨酸)(PDDA)的第一阴离子聚合物;并且包含选自聚(L-谷氨酸)(PLEA)和聚(L-天冬氨酸)(PLDA)的第二阴离子聚合物。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的纳米颗粒,其中所述阳离子聚合物组合物包含选自聚(D-精氨酸)、聚(D-赖氨酸)、聚(D-组氨酸)、聚(D-鸟氨酸)和聚(D-瓜氨酸)的第一阳离子聚合物;并且包含选自聚(L-精氨酸)、聚(L-赖氨酸)、聚(L-组氨酸)、聚(L-鸟氨酸)和聚(L-瓜氨酸)的第二阳离子聚合物。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的纳米颗粒,其中所述阴离子氨基酸的D-异构体的聚合物相对于所述阴离子氨基酸的L-异构体的聚合物以10:1至1:10范围的比率存在。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的纳米颗粒,其中所述阳离子氨基酸的D-异构体的聚合物相对于所述阳离子氨基酸的L-异构体的聚合物以10:1至1:10范围的比率存在。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的纳米颗粒,其中所述可脱落层是阴离子涂层。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的纳米颗粒,其中所述可脱落层是pH和/或谷胱甘肽敏感的。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的纳米颗粒,其中所述可脱落层包含以下中的一种或多种:二氧化硅、类肽、聚半胱氨酸、钙、磷酸钙、硫酸钙、锰、磷酸锰、硫酸锰、镁、磷酸镁、硫酸镁、铁、磷酸铁、硫酸铁、锂、磷酸锂和硫酸锂。

9. 根据权利要求8所述的纳米颗粒,其中所述可脱落层是二氧化硅涂层。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的纳米颗粒,其还包含包围所述可脱落层的表面涂层。

11. 根据权利要求10所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层包含与所述可脱落层以静电方式相互作用的阳离子组分。

12. 根据权利要求10或权利要求11所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层包含以下中的一种或多种:阳离子氨基酸的聚合物、聚(精氨酸)、锚定结构域、阳离子锚定结构域、细胞穿透肽、病毒糖蛋白、硫酸肝素蛋白聚糖和靶向配体。

13. 根据权利要求10-12中任一项所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层是两性离子和多价的。

14. 根据权利要求10-13中任一项所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层包含一种或多种靶向配体。

15. 根据权利要求14所述的纳米颗粒,其中所述一种或多种靶向配体中的至少一种缀合至与所述可脱落层相互作用的锚定结构域。

16. 根据权利要求15所述的纳米颗粒,其中所述锚定结构域是选自RRRRRRRRR (SEQ ID NO:15)和HHHHHH (SEQ ID NO:16)的阳离子锚定结构域。

17. 根据权利要求15或权利要求16所述的纳米颗粒,其中所述锚定结构域通过接头缀合至所述一种或多种靶向配体中的至少一种。

18. 根据权利要求17所述的纳米颗粒,其中所述接头不是多肽。

19. 根据权利要求17所述的纳米颗粒,其中所述接头为多肽。

20. 根据权利要求17-19中任一项所述的纳米颗粒,其中所述接头通过巯基或胺反应性化学与所述靶向配体缀合,和/或所述接头通过巯基或胺反应性化学与所述锚定结构域缀合。

21. 根据权利要求17-20中任一项所述的纳米颗粒,其中所述一种或多种靶向配体中的至少一种包含半胱氨酸残基并通过所述半胱氨酸残基与所述接头缀合。

22. 根据权利要求14-21中任一项所述的纳米颗粒,其中所述一种或多种靶向配体提供与B家族G蛋白偶联受体 (GPCR) 的靶向结合。

23. 根据权利要求22所述的纳米颗粒,其中所述靶向配体相对于相应的野生型氨基酸序列在一个或多个内部氨基酸位置包含半胱氨酸取代。

24. 根据权利要求22或权利要求23所述的纳米颗粒,其中所述靶向配体包含与氨基酸序列HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO:1) 具有85%或更高同一性的氨基酸序列。

25. 根据权利要求24所述的纳米颗粒,其中所述靶向配体在SEQ ID NO:1) 所示的氨基酸序列的位置L10、S11和K12中的一处或多处包含半胱氨酸取代。

26. 根据权利要求25所述的纳米颗粒,其中所述靶向配体包含氨基酸序列HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO:2)。

27. 根据权利要求14-26中任一项所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层包含一种或多种靶向配体,所述靶向配体提供与选自c-Kit、CD27和CD150的细胞表面蛋白的靶向结合。

28. 根据权利要求14-27中任一项所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层包含一种或多种选自下组的靶向配体:狂犬病病毒糖蛋白 (RVG) 片段、ApoE-转铁蛋白、乳铁蛋白、黑素铁蛋白、卵转铁蛋白、L-选择蛋白、E-选择蛋白、P-选择蛋白、PSGL-1、ESL-1、CD44、死亡受体-3 (DR3)、LAMP1、LAMP2、Mac2-BP、干细胞因子 (SCF)、CD70、含SH2结构域的蛋白1A (SH2D1A)、毒蜥外泌肽-4、GLP-1、靶向 $\alpha 5\beta 1$ 的靶向配体、RGD、转铁蛋白配体、FGF片段、琥珀酸、二磷酸盐、CD90、CD45f、CD34、造血干细胞的趋化脂质、鞘氨醇、神经酰胺、鞘氨醇-1-磷酸、神经酰胺-1-磷酸和任何上述物质的活性靶向片段。

29. 根据权利要求14-28中任一项所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层包含干细胞因子 (SCF) 或其靶向片段,CD70或其靶向片段,及含有SH2结构域的蛋白1A (SH2D1A) 或其靶向片段。

30. 根据权利要求14-29中任一项所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层包含一种或多种靶向配体,所述靶向配体提供与选自以下的靶细胞的靶向结合:骨髓细胞、造血干细胞 (HSC)、造血干细胞和祖细胞 (HSPC)、外周血单核细胞 (PBMC)、骨髓祖细胞、淋巴祖细胞、T细胞、B细胞、NKT细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、粒细胞、红细胞、巨核细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、红系祖细胞、巨核细胞-红系祖细胞

(MEP)、共同髓系祖细胞(CMP)、多能祖细胞(MPP)、造血干细胞(HSC)、短期HSC(ST-HSC)、IT-HSC、长期HSC(LT-HSC)、内皮细胞、神经细胞、星形胶质细胞、胰腺细胞、胰岛β细胞、肝细胞、肌细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、脂肪细胞、肠细胞、结肠细胞和胃细胞。

31. 根据权利要求14-29中任一项所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层包含两种或更多种靶向配体,所述靶向配体的组合提供与选自以下的细胞的靶向结合:骨髓细胞、造血干细胞(HSC)、造血干细胞和祖细胞(HSPC)、外周血单核细胞(PBMC)、骨髓祖细胞、淋巴祖细胞、T细胞、B细胞、NKT细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、粒细胞、红细胞、巨核细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、红系祖细胞、巨核细胞-红系祖细胞(MEP)、共同髓系祖细胞(CMP)、多能祖细胞(MPP)、造血干细胞(HSC)、短期HSC(ST-HSC)、IT-HSC、长期HSC(LT-HSC)、内皮细胞、神经细胞、星形胶质细胞、胰腺细胞、胰岛β细胞、肝细胞、肌细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、脂肪细胞、肠细胞、结肠细胞和胃细胞。

32. 根据权利要求1-31中任一项所述的纳米颗粒,其中所述阳离子多肽组合物包含含有核定位信号(NLS)的多肽。

33. 根据权利要求32所述的纳米颗粒,其中所述NLS包含SEQ ID NO:151-157和201-264中任一个所示的氨基酸序列。

34. 根据权利要求1-33中任一项所述的纳米颗粒,其中所述阳离子多肽组合物包含组蛋白尾肽(HTP)。

35. 根据权利要求34所述的纳米颗粒,其中所述HTP与阳离子氨基酸聚合物缀合。

36. 根据权利要求35的纳米颗粒,其中所述HTP通过半胱氨酸残基与阳离子氨基酸聚合物缀合。

37. 根据权利要求35或权利要求36所述的纳米颗粒,其中所述阳离子氨基酸聚合物包含聚(赖氨酸)。

38. 根据权利要求33-37中任一项所述的纳米颗粒,其中所述阳离子多肽组合物包含具有支化结构的组蛋白肽。

39. 根据权利要求1-38中任一项所述的纳米颗粒,其中所述有效负载包括以下中的一种或多种:(i) CRISPR/Cas指导RNA,(ii) 编码CRISPR/Cas指导RNA的DNA分子,(iii) 编码CRISPR/Cas RNA指导的多肽的核酸分子,(iv) CRISPR/Cas RNA指导的多肽,(v) 与CRISPR/Cas RNA指导的多肽复合的CRISPR/Cas指导RNA,(vi) 编码锌指蛋白(ZFP)的核酸分子,(vii) ZFP,(viii) 编码转录活化因子样效应(TALE)蛋白的核酸分子,(ix) TALE蛋白,和(x) DNA供体模板。

40. 根据权利要求1-39中任一项所述的纳米颗粒,其中所述有效负载包含(i) CRISPR/Cas指导RNA和/或编码所述CRISPR/Cas指导RNA的DNA分子;(ii) CRISPR/Cas RNA指导的多肽和/或编码所述CRISPR/Cas RNA指导的多肽的核酸分子。

41. 根据权利要求40所述的纳米颗粒,其中所述有效负载还包含DNA供体模板。

42. 一种纳米颗粒制剂,其包含:

(a) 根据权利要求1-41中任一项所述的第一纳米颗粒,其中所述有效负载包含以下中的一种或多种:(i) CRISPR/Cas指导RNA,(ii) 编码CRISPR/Cas指导RNA的DNA分子,(iii) 编码CRISPR/Cas RNA指导的多肽的核酸分子,(iv) CRISPR/Cas RNA指导的多肽,(v) 与CRISPR/Cas RNA指导的多肽复合的CRISPR/Cas指导RNA,(vi) 编码锌指蛋白(ZFP)的核酸分

子, (vii) ZFP, (viii) 编码转录活化因子样效应 (TALE) 蛋白的核酸分子, 和 (ix) TALE 蛋白; 及

(b) 包含核酸有效负载的第二纳米颗粒, 所述核酸有效负载包含 DNA 供体模板。

43. 一种多层纳米颗粒, 其包含:

(a) 内核, 其包含含有 DNA 供体模板的有效负载;

(b) 包围所述内核的第一可脱落层;

(c) 包围所述第一可脱落层的中间核, 其中所述中间核包含以下中的一种或多种: (i) CRISPR/Cas 指导 RNA, (ii) 编码 CRISPR/Cas 指导 RNA 的 DNA 分子, (iii) 编码 CRISPR/Cas RNA 指导的多肽的核酸分子, (iv) CRISPR/Cas RNA 指导的多肽, (v) 与 CRISPR/Cas RNA 指导的多肽复合的 CRISPR/Cas 指导 RNA, (vi) 锌指蛋白 (ZFP), (vii) 编码 ZFP 的 DNA 分子, (viii) 编码转录活化因子样效应 (TALE) 蛋白, 和 (ix) 编码 TALE 蛋白的核酸分子; 及

(d) 包围所述中间核的第二可脱落层。

44. 根据权利要求 43 所述的多层纳米颗粒, 其中所述第一和/或第二可脱落层包括以下中的一种或多种: 二氧化硅、类肽、聚半胱氨酸、钙、磷酸钙、硫酸钙、锰、磷酸锰、硫酸锰、镁、磷酸镁、硫酸镁、铁、磷酸铁、硫酸铁、锂、磷酸锂和硫酸锂。

45. 根据权利要求 43 或权利要求 44 所述的多层纳米颗粒, 其包含包围所述第二可脱落层的表面涂层。

46. 根据权利要求 45 所述的多层纳米颗粒, 其中所述表面涂层包含与所述第二可脱落层以静电方式相互作用的阳离子组分。

47. 根据权利要求 45 或权利要求 46 所述的多层纳米颗粒, 其中所述表面涂层包含以下中的一种或多种: 阳离子氨基酸的聚合物、聚(精氨酸)、细胞穿透肽、病毒糖蛋白、硫酸肝素蛋白聚糖和靶向配体。

48. 根据权利要求 43-47 中任一项所述的多层纳米颗粒, 其中所述表面涂层是两性离子和多价的。

49. 根据权利要求 43-48 中任一项所述的多层纳米颗粒, 其中所述表面涂层包含一种或多种靶向配体。

50. 一种将核酸和/或蛋白有效负载递送至靶细胞的方法, 所述方法包括:

使真核靶细胞与权利要求 1-41 中任一项所述的纳米颗粒、权利要求 42 所述的纳米颗粒制剂和/或权利要求 43-49 中任一项所述的多层纳米颗粒接触。

51. 根据权利要求 50 所述的方法, 其中所述有效负载包括基因编辑工具。

52. 根据权利要求 50 或权利要求 51 所述的方法, 其中所述有效负载包括以下中的一种或多种: CRISPR/Cas 指导 RNA, 编码 CRISPR/Cas 指导 RNA 的 DNA 分子, CRISPR/Cas 指导的多肽, 编码 CRISPR/Cas 指导的多肽的核酸分子, 锌指核酸酶, 编码锌指核酸酶的核酸分子, TALE 或 TALEN, 编码 TALE 或 TALEN 的核酸分子, 和 DNA 供体模板。

53. 根据权利要求 50-52 中任一项所述的方法, 其中所述靶细胞是哺乳动物细胞。

54. 根据权利要求 50-53 中任一项所述的方法, 其中所述靶细胞是人细胞。

55. 根据权利要求 50-54 中任一项所述的方法, 其中所述靶细胞是体外培养的。

56. 根据权利要求 50-54 中任一项所述的方法, 其中所述靶细胞是体内的。

57. 根据权利要求 56 所述的方法, 其中所述接触包括将所述纳米颗粒施用给个体的步

骤。

58. 根据权利要求57所述的方法, 其中所述个体患有亨廷顿氏病、ALS、帕金森氏病、胰腺癌、糖尿病或冯维勒布兰德氏病。

59. 根据权利要求50-58中任一项所述的方法, 其中所述纳米颗粒包括含有靶向配体的表面涂层。

60. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述靶向配体提供与选自以下的细胞的靶向结合: 骨髓细胞、造血干细胞 (HSC)、造血干细胞和祖细胞 (HSPC)、外周血单核细胞 (PBMC)、骨髓祖细胞、淋巴祖细胞、T细胞、B细胞、NKT细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、粒细胞、红细胞、巨核细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、红系祖细胞、巨核细胞-红系祖细胞 (MEP)、共同髓系祖细胞 (CMP)、多能祖细胞 (MPP)、造血干细胞 (HSC)、短期HSC (ST-HSC)、IT-HSC、长期HSC (LT-HSC)、内皮细胞、神经细胞、星形胶质细胞、胰腺细胞、胰岛 β 细胞、肝细胞、肌细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、脂肪细胞、肠细胞、结肠细胞和胃细胞。

61. 根据权利要求50-60中任一项所述的方法, 其中所述靶细胞选自: 骨髓细胞、造血干细胞 (HSC)、造血干细胞和祖细胞 (HSPC)、外周血单核细胞 (PBMC)、骨髓祖细胞、淋巴祖细胞、T细胞、B细胞、NKT细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、粒细胞、红细胞、巨核细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、红系祖细胞、巨核细胞-红系祖细胞 (MEP)、共同髓系祖细胞 (CMP)、多能祖细胞 (MPP)、造血干细胞 (HSC)、短期HSC (ST-HSC)、IT-HSC、长期HSC (LT-HSC)、内皮细胞、神经细胞、星形胶质细胞、胰腺细胞、胰岛 β 细胞、肝细胞、肌细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、脂肪细胞、肠细胞、结肠细胞和胃细胞。

62. 一种支化组蛋白分子, 其包含: 一个或多个与阳离子聚合物的侧链缀合的组蛋白尾肽 (HTP)。

63. 根据权利要求62所述的支化组蛋白分子, 其中所述阳离子聚合物包括聚(精氨酸)或聚(赖氨酸)。

64. 根据权利要求63所述的支化组蛋白分子, 其中所述阳离子聚合物高达40%的侧链与所述一个或多个HTP缀合。

用于核酸和/或蛋白有效负载递送的组合物和方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年6月9日提交的美国临时专利申请第62/517,346号、于2017年1月6日提交的美国临时专利申请第62/443,567号、于2017年1月6日提交的美国临时专利申请第62/443,522号以及于2016年12月14日提交的美国临时专利申请第62/434,344号的权益,所述申请均通过引用整体并入本文。

[0003] 通过引用作为文本文件提供的序列列表并入

[0004] 序列列表在本文中作为于2017年12月14日创建并且大小为128KB的文本文件“LGDL-004_SeqList_ST25.txt”提供。文本文件的内容通过引用以全文并入本文。

背景技术

[0005] 将核酸和/或蛋白有效负载有效引入细胞,例如用于基因组编辑和/或改变基因表达,是治疗策略和研究方法的重要目标。为了有效地引入有效负载,重要的是适当地封装有效负载以保护其在进入细胞之前免于降解,允许进入细胞,引导有效负载远离溶酶体降解途径,并且引导递送至适当的亚细胞区室。此外,在进入细胞之后从包装中释放有效负载的定时可以影响有效负载的有效性。

[0006] 许多用于有效负载递送的基于纳米颗粒的技术提供低水平的细胞转染并且在转染时的效力有限。需要增强有效负载向细胞递送的有效性的组合物和方法。

发明内容

[0007] 提供了用于将有效负载(例如,核酸和/或蛋白有效负载)递送至细胞(例如纳米颗粒、病毒和非病毒递送有效负载至细胞)的组合物和方法。提供了针对血清稳定性,靶向递送至特定细胞类型,通过组蛋白和核小体样支化聚合物的内源核酸包装的仿生,核内的区室特异性解包,可变速释放动力学设计的纳米颗粒及其使用方法。在一些实施方案中,主题纳米颗粒包括核和包封所述核的可脱落层(例如,在细胞递送期间提供所述核的暂时稳定化),其中所述核包括(i)阴离子聚合物组合物;(ii)阳离子聚合物组合物;(iii)阳离子多肽组合物;(iv)核酸和/或蛋白有效负载;其中:(a)所述阴离子聚合物组合物包括阴离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阴离子氨基酸的L-异构体的聚合物,和/或(b)所述阳离子聚合物组合物包括阳离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阳离子氨基酸的L-异构体的聚合物。在一些情况下,阴离子氨基酸的D-异构体的聚合物相对于阴离子氨基酸的L-异构体的聚合物以10:1至1:10范围的比率存在。在一些情况下,阳离子氨基酸的D-异构体的聚合物相对于阳离子氨基酸的L-异构体的聚合物以10:1至1:10范围的比率存在。

[0008] 在一些情况下,本公开的纳米颗粒包括包围可脱落层的表面涂层。表面涂层可包括靶向配体,其提供与靶细胞的表面分子的靶向结合。在一些情况下,靶向配体(用或不用接头)与锚定结构域缀合,例如,用于将靶向配体锚定到纳米颗粒的可脱落层。

[0009] 还提供了多层纳米颗粒,其包括作为核的一部分的第一有效负载(例如,DNA供体模板),其中所述核被第一可脱落层包围,第一可脱落层被包括第二有效负载(例如,基因编

辑工具)的中间层包围,并且中间层被第二可脱落层包围。在一些情况下,第二可脱落层涂覆有表面涂层(例如,包括靶向配体的表面涂层)。

[0010] 还提供了包括两种或更多种纳米颗粒的纳米颗粒制剂,其中第一纳米颗粒的有效负载包括供体DNA模板且第二纳米颗粒的有效负载包括基因编辑工具(例如,(i) CRISPR/Cas指导RNA;(ii) 编码CRISPR/Cas指导RNA的DNA;(iii) 编码可编程基因编辑蛋白的DNA和/或RNA;和/或(iv) 可编程基因编辑蛋白)。

[0011] 还提供了作为同一包装的一部分共同递送多种有效负载(例如,两种或更多种有效负载)的方法。例如,提供了将核酸和/或蛋白有效负载递送至靶细胞的方法,其中该方法包括使真核靶细胞与病毒或非病毒递送载体接触,所述载体包括(a) 基因编辑工具;(b) 诱导靶细胞增殖和/或使靶细胞分化偏向的核酸或蛋白药剂。

附图说明

[0012] 当结合附图阅读时,从以下详细描述中可以最好地理解本发明。需要强调的是,根据惯例,附图的各种特征不是按比率的。相反,为了清楚起见,各种特征的尺寸被任意扩大或缩小。附图中包括以下附图。

[0013] 图1描绘了测试核酸有效负载凝聚的各种参数(例如阳离子:阴离子电荷比)的荧光测定法的结果。结果显示,例如,为2的电荷比对于编码Cas9和指导RNA分子的质粒的凝聚很有效。

[0014] 图2描绘产生的纳米颗粒核的粒度和 ζ 电位分布。数据是使用Metrix ZetaView NTA仪器获得的。纳米颗粒大小(峰值)为128.8nm, ζ 电位(峰值)为+10.5mV(100%)。

[0015] 图3描绘了稳定化纳米颗粒核(由可脱落层包封的核)的粒度和 ζ 电位分布。数据是使用Metrix ZetaView NTA仪器获得的。稳定化核的大小为110.6nm, ζ 电位为-42.1mV(95%)。

[0016] 图4描绘的数据显示具有外壳(外涂层)的纳米颗粒包括RVG9R,即融合至9-Arg肽序列(作为阳离子锚定结构域)的狂犬病病毒糖蛋白(RVG),其特征粒度为115.8nm且 ζ 电位为-3.1mV(100%)。最佳外涂层产生从-50mV(对于涂覆二氧化硅的核)到0和-10mV之间(添加外壳之后)的 ζ 电位转变。

[0017] 图5描绘了细胞培养实验的结果,其中使用不同的纳米颗粒来递送核酸有效负载。该图比较了包括聚(D-谷氨酸)作为核的一部分(除聚(L-精氨酸)之外)的纳米颗粒与不包含聚(D-谷氨酸)的纳米颗粒。三行代表重复。

[0018] 图6(图A-D)描绘了与纳米颗粒接触的神经干细胞的显微镜图像,所述纳米颗粒包括CRISPR/Cas9表达载体作为核酸有效负载。纳米颗粒的核包括用荧光团(FITC)标记的聚(L-精氨酸)(阳离子聚合物)。内体和细胞核分别用Lysotracker(红色)和Hoescht 3342(蓝色)染色。在接种后16小时将纳米颗粒(和作为对照的Lipofectamine 3000)引入细胞。在成像之前,将细胞与Hoescht 3342和Lysotracker Red一起温育。图C-D显示了条形图,其量化纳米颗粒核与细胞核和内体的共同定位。

[0019] 图7(图A-B)描绘用包括编码GFP的mRNA作为核酸有效负载的纳米颗粒转染的外周血单核细胞(PBMC)的显微图像。该图像证明,用包括核的纳米颗粒可以将mRNA表达延长至16天,所述核具有限定比率的阴离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阴离子氨基酸的L-异构

体的聚合物。在这种情况下,使用具有2:1比率的聚(D-谷氨酸)与聚(L-谷氨酸)的纳米颗粒核在16天时产生最大表达(图A=4天;图B=16天)。

[0020] 图8描绘主题纳米颗粒的示例实施方案的图示。

[0021] 图9描绘主题纳米颗粒的示例实施方案的图示。在这种情况下,纳米颗粒是多层的,具有被第一可脱落层包围的核(其包括第一有效负载),第一可脱落层被中间层(其包括另外的有效负载)包围,中间层被第二可脱落层包围,第二可脱落层有表面涂层(即,包括外壳)。

[0022] 图10(图A-B)描绘主题纳米颗粒表面涂层的递送分子的示例构造的图示。所描绘的递送分子包括与锚定结构域缀合的靶向配体,所述锚定结构域与纳米颗粒的可脱落层以静电方式相互作用。注意,靶向配体可以在N-或C-末端缀合(每个图的左侧),但也可以在内部位置缀合(每个图的右侧)。图A中的分子包括接头,而图B中的分子则不包括接头。

[0023] 图11提供了家族B GPCR的示意图,突出显示了在评估靶向配体时要考虑的单独结构域,例如,用于与变构/亲和力N-末端结构域和正构内体-分选/信号传导结构域结合。(图改编自Siu、Fai Yiu等人,《自然(Nature)》499.7459(2013):444-449)。

[0024] 图12提供了鉴定用于靶向配体的插入和/或取代(例如,用半胱氨酸残基取代),使得保持亲和力并且靶向配体参与促进核酸释放和限制核酸降解的长内体循环途径的内部氨基酸位置的实例。在这种情况下,靶向配体是毒蜥外泌肽-4并且氨基酸位置10、11和12被鉴定为可能插入和/或取代(例如,用半胱氨酸残基取代,例如S11C突变)的位点。图示出了模拟的毒蜥外泌肽-4(SEQ ID NO:1)与胰高血糖素-GCGR(4ERS)以及GLP1-GLP1R-ECD复合物(PDB:3IOL)的已知晶体结构的比对以及在3维空间中旋转的PDB渲染。

[0025] 图13示出了作为三元FGF2-FGFR1-肝素复合物(PDB上的1fq9)的一部分的tbFGF片段。确定CKNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS(突出显示的)(SEQ ID NO:43)对于FGFR1的亲和力是重要的。

[0026] 图14提供了用于确定HFKDPK(SEQ ID NO:5)是可以用于配体-受体正构活性和亲和力的肽的比对和PDB 3D渲染。

[0027] 图15提供了用于确定LESNNYNT(SEQ ID NO:6)是可以用于配体-受体正构活性和亲和力的肽的比对和PDB 3D渲染。

[0028] 图16提供了可以用作主题纳米颗粒的一部分(例如,作为含有NLS的肽;作为含有NLS的肽、含有NLS的肽、阴离子聚合物、阳离子聚合物和/或阳离子多肽等的一部分/与之缀合)的核定位信号(NLS)的非限制性实例。该图改编自Kosugi等人,《生物化学杂志》(J Biol Chem.) 2009年1月2日;284(1):478-85。[第1类,从上到下SEQ ID NO:201-221);第2类,从上到下(SEQ ID NO:222-224);第4类,从上到下(SEQ ID NO:225-230);第3类,从上到下(SEQ ID NO:231-245);第5类,从上到下(SEQ ID NO:246-264)]。

[0029] 图17(图A-B)描绘了小鼠(图A)和人(图B)造血细胞谱系,以及已经鉴定为谱系内各种细胞的标志物的图示。

[0030] 图18(图A-B)描绘了可用于影响细胞分化和/或增殖的miRNA(图A)和蛋白(图B)因子的图示。

[0031] 图19提供了具有有效负载:具有肽核酸(PNA)结合位点的VWF-EGFP pDNA的纳米颗粒上的凝聚曲线。

[0032] 图20提供了具有有效负载:与HBB gRNA复合的NLS-CAS9-NLS RNP的纳米颗粒上的凝聚曲线。

[0033] 图21提供了具有有效负载:HBB gRNA的纳米颗粒上的凝聚曲线。

[0034] 图22提供了具有有效负载:HBB gRNA的纳米颗粒上的凝聚曲线。

[0035] 图23提供了具有有效负载:与HBB gRNA复合的NLS-CAS9-NLS RNP的纳米颗粒上的凝聚曲线。

[0036] 图24提供了具有有效负载:具有肽核酸(PNA)结合位点的VWF-EGFP pDNA的纳米颗粒上的凝聚曲线。

[0037] 图25提供了具有有效负载:具有肽核酸(PNA)结合位点的VWF-EGFP pDNA的纳米颗粒上的凝聚曲线。

[0038] 图26提供了具有有效负载:具有HBB gRNA的NLS-CAS9-NLS的RNP的纳米颗粒上的凝聚曲线。

[0039] 图27提供了具有有效负载:具有肽核酸(PNA)结合位点的VWF-EGFP pDNA的纳米颗粒上的凝聚曲线。

[0040] 图28提供了具有有效负载: Cy5_EGFP mRNA的纳米颗粒上的凝聚曲线。

[0041] 图29提供了具有有效负载: BLOCK-iT Alexa Fluor 555 siRNA的纳米颗粒上的凝聚曲线。

[0042] 图30提供了具有有效负载:与HBB gRNA复合的NLS-Cas9-EGFP RNP的纳米颗粒上的凝聚曲线。

[0043] 图31提供了当使用具有Alexa 555Block-IT siRNA作为有效负载的纳米颗粒时收集的数据。

[0044] 图32提供了当使用由NLS-Cas9-GFP和HBB引导RNA形成的核糖核蛋白(RNP)作为有效负载的纳米颗粒时收集的数据。

[0045] 图33提供了当使用具有Cy5EGFP mRNA作为有效负载的纳米颗粒时收集的数据。

[0046] 图34提供了当使用具有有效负载:具有Cy5标记的肽核酸(PNA)结合位点的VWF-EGFP pDNA的纳米颗粒时收集的数据。

[0047] 图35提供了来自示出了通过加入阳离子多肽CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C,然后加入PLE100并且通过进一步向RNP中加入阳离子多肽来降低荧光强度的SYBR Gold排斥测定的数据。

[0048] 图36提供了来自示出了通过加入阳离子多肽CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C,然后加入PLE100并且通过进一步向siRNA中加入阳离子多肽并且进一步加入SYBR Gold而引起的荧光强度变化的SYBR Gold排斥测定的数据。

[0049] 图37提供了来自示出了通过加入阳离子多肽组蛋白肽H2A,然后加入CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C,并且通过进一步向具有HBB gRNA和SYBR Gold的NLS-Cas9-EGFP的RNP中加入PLE100而引起的荧光强度变化的SYBR Gold排斥测定的数据。

[0050] 图38提供了来自示出了通过一起加入阳离子多肽组蛋白肽H4和CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C,并且通过进一步向具有HBB gRNA和SYBR Gold的NLS-Cas9-EGFP的RNP中加入PLE100而引起的荧光强度变化的SYBR Gold排斥测定的数据。

[0051] 图39提供了来自示出了通过加入阳离子多肽CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C并且通

过进一步向mRNA中加入PLE100而引起的荧光强度变化的SYBR Gold排斥测定的数据。

[0052] 图40提供了来自示出了通过加入组蛋白H4并且通过进一步向mRNA中加入CD45-mSiglec-(4GS) 2_9R_c和PLE100而引起的荧光强度变化的SYBR Gold排斥测定的数据。

[0053] 图41提供了来自示出了通过加入组蛋白H2A并且通过进一步向mRNA中加入CD45-mSiglec-(4GS) 2_9R_c和PLE100而引起的荧光强度变化的SYBR Gold排斥测定的数据。

[0054] 图42提供了来自示出了通过加入阳离子多肽CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C,然后加入PLE100而引起的荧光强度变化的来自嵌入VWF_EGFP pDNA的SYBR Gold排斥测定的数据。

[0055] 图43提供了来自示出了通过加入组蛋白H4,然后加入阳离子多肽CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C,然后加入PLE100而引起的荧光强度变化的来自嵌入VWF_EGFP pDNA的SYBR Gold排斥测定的数据。

[0056] 图44提供了来自示出了通过加入组蛋白H4,然后加入阳离子多肽CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C,然后加入PLE100而引起的荧光强度变化的来自嵌入VWF_EGFP pDNA的SYBR Gold排斥测定的数据。

[0057] 图45(图A-C)提供了与复合物大小分布、二氧化硅涂覆大小和 ζ 电位分布以及配体涂覆的/官能化的颗粒大小和 ζ 电位分布有关的数据。

[0058] 图46提供了与支化组蛋白肽缀合物先导颗粒有关的数据。

[0059] 图47提供了与项目HSC.001.001相关的数据(参见表5)。

[0060] 图48提供了与项目HSC.001.002相关的数据(参见表5)。

[0061] 图49提供了与项目HSC.002.01(靶向配体-ESELLg_mESEL_(4GS) 2_9R_N)相关的数据(参见表5)。

[0062] 图50提供了与项目HSC.002.02(靶向配体-ESELLg_mESEL_(4GS) 2_9R_C)相关的数据(参见表5)。

[0063] 图51提供了与项目HSC.002.03(靶向配体-CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C)相关的数据(参见表5)。

[0064] 图52提供了与项目HSC.002.04(靶向配体-Cy5mRNA-SiO₂-PEG)相关的数据(参见表5)。

[0065] 图53提供了与项目BLOOD.002.88(靶向配体-CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C)相关的数据(参见表5)。

[0066] 图54提供了与项目BLOOD.002.89(靶向配体-CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C)相关的数据(参见表5)。

[0067] 图55提供了与项目BLOOD.002.90相关的数据(参见表5)。

[0068] 图56提供了与项目BLOOD.002.91(PLR50)相关的数据(参见表5)。

[0069] 图57提供了与项目BLOOD.002.92(靶向配体-CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C)相关的数据(参见表5)。

[0070] 图58提供了与项目TCELL.001.1相关的数据(参见表5)。

[0071] 图59提供了与项目TCELL.001.3相关的数据(参见表5)。

[0072] 图60提供了与项目TCELL.001.13相关的数据(参见表5)。

[0073] 图61提供了与项目TCELL.001.14相关的数据(参见表5)。

[0074] 图62提供了与项目TCELL.001.16相关的数据(参见表5)。

- [0075] 图63提供了与项目TCELL.001.18相关的数据(参见表5)。
- [0076] 图64提供了与项目TCELL.001.28相关的数据(参见表5)。
- [0077] 图65提供了与项目TCELL.001.29相关的数据(参见表5)。
- [0078] 图66提供了与项目TCELL.001.31相关的数据(参见表5)。
- [0079] 图67提供了与项目TCELL.001.33相关的数据(参见表5)。
- [0080] 图68提供了与项目TCELL.001.43相关的数据(参见表5)。
- [0081] 图69提供了与项目TCELL.001.44相关的数据(参见表5)。
- [0082] 图70提供了与项目TCELL.001.46相关的数据(参见表5)。
- [0083] 图71提供了与项目TCELL.001.48相关的数据(参见表5)。
- [0084] 图72提供了与项目TCELL.001.58相关的数据(参见表5)。
- [0085] 图73提供了与项目TCELL.001.59相关的数据(参见表5)。
- [0086] 图74提供了与项目CYNObM.002.82相关的数据(参见表5)。
- [0087] 图75提供了与项目CYNObM.002.83相关的数据(参见表5)。
- [0088] 图76提供了与项目CYNObM.002.84相关的数据(参见表5)。
- [0089] 图77提供了与项目CYNObM.002.85相关的数据(参见表5)。
- [0090] 图78提供了与项目CYNObM.002.86相关的数据(参见表5)。
- [0091] 图79提供了与项目CYNObM.002.76相关的数据(参见表5)。
- [0092] 图80提供了与项目CYNObM.002.77相关的数据(参见表5)。
- [0093] 图81提供了与项目CYNObM.002.78相关的数据(参见表5)。
- [0094] 图82提供了与项目CYNObM.002.79相关的数据(参见表5)。
- [0095] 图83提供了与项目CYNObM.002.80相关的数据(参见表5)。
- [0096] 图84提供了与CynoBM.002样品的未转染对照相关的数据。
- [0097] 图85提供了与NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP的lipofectamine CRISPRMAX递送相关的数据。
- [0098] 图86提供了与项目CynoBM.002RNP-仅对照相关的数据(参见表5)。
- [0099] 图87提供了与项目CynoBM.002.82相关的数据(参见表5)。
- [0100] 图88提供了与项目CynoBM.002.83相关的数据(参见表5)。
- [0101] 图89提供了与项目CYNObM.002.84相关的数据(参见表5)。
- [0102] 图90提供了与项目CynoBM.002.85相关的数据(参见表5)。
- [0103] 图91提供了与项目CynoBM.002.86相关的数据(参见表5)。
- [0104] 图92提供了与项目CynoBM.002.75相关的数据(参见表5)。
- [0105] 图93提供了与项目CynoBM.002.76相关的数据(参见表5)。
- [0106] 图94提供了与项目CynoBM.002.77相关的数据(参见表5)。
- [0107] 图95提供了与项目CynoBM.002.78相关的数据(参见表5)。
- [0108] 图96提供了与项目CynoBM.002.79相关的数据(参见表5)。
- [0109] 图97提供了与项目CynoBM.002.80相关的数据(参见表5)。
- [0110] 图98提供了与项目CynoBM.002.81相关的数据(参见表5)。
- [0111] 图99提供了CynoBM.002RNP-仅对照的定性图像。
- [0112] 图100提供了与项目HSC.004高含量筛选相关的数据(参见表5)。

- [0113] 图101提供了与项目TCELL.001高含量筛选相关的数据(参见表5)。
- [0114] 图102提供了与项目TCELL.001(参见表5) lipofectamine CRISPRMAX对照相关的数据。
- [0115] 图103提供了与项目TCe11.001.1相关的数据(参见表5)。
- [0116] 图104提供了与项目TCe11.001.2相关的数据(参见表5)。
- [0117] 图105提供了与项目TCe11.001.3相关的数据(参见表5)。
- [0118] 图106提供了与项目TCe11.001.4相关的数据(参见表5)。
- [0119] 图107提供了与项目TCe11.001.5相关的数据(参见表5)。
- [0120] 图108提供了与项目TCe11.001.6相关的数据(参见表5)。
- [0121] 图109提供了与项目TCe11.001.7相关的数据(参见表5)。
- [0122] 图110提供了与项目TCe11.001.8相关的数据(参见表5)。
- [0123] 图111提供了与项目TCe11.001.9相关的数据(参见表5)。
- [0124] 图112提供了与项目TCe11.001.10相关的数据(参见表5)。
- [0125] 图113提供了与项目TCe11.001.11相关的数据(参见表5)。
- [0126] 图114提供了与项目TCe11.001.12相关的数据(参见表5)。
- [0127] 图115提供了与项目TCe11.001.13相关的数据(参见表5)。
- [0128] 图116提供了与项目TCe11.001.14相关的数据(参见表5)。
- [0129] 图117提供了与项目TCe11.001.15相关的数据(参见表5)。
- [0130] 图118提供了与项目TCe11.001的阴性对照相关的数据(参见表5)。
- [0131] 图119提供了与项目Blood.002相关的数据(参见表5)。
- [0132] 图120提供了与项目TCe11.001.27相关的数据(参见表5)。
- [0133] 图121描绘了CRISPR RNP(可能的有效负载)的电荷密度图,其允许确定是否应添加阴离子或阳离子肽/材料以在蛋白表面上形成稳定的带电层。
- [0134] 图122描绘了睡美人转座子(Sleeping Beauty Transposons)(可能的有效负载)的电荷密度图,其允许确定是否应添加阴离子或阳离子肽/材料以在蛋白表面上形成稳定的带电层。
- [0135] 图123描绘了在(2)加入阳离子锚作为(2a)锚-接头-配体或独立的阳离子锚,添加或不添加(2b)后续多层化学、多种核酸或带电治疗剂的共同递送或通过交联进行层稳定之前的(1)锚定到CRISPR RNP表面上的阳离子位点的示例性阴离子肽(9-10个氨基酸长,大约按比率缩放到10nm直径的CRISPR RNP)。
- [0136] 图124描绘了基于可以包含Cas9RNP或任何均匀或两性离子带电表面的核模板的添加顺序和静电基质组合物的实例。
- [0137] 图125提供了与IL2R结合的IL2的模型结构。
- [0138] 图126提供了单链CD3抗体片段的模型结构。
- [0139] 图127提供了与N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)复合的唾液酸粘附素N-末端的模型结构。
- [0140] 图128提供了干细胞因子(SCF)的模型结构。
- [0141] 图129提供了在cKit受体片段的合理设计期间产生的示例图像。
- [0142] 图130提供了在cKit受体片段的合理设计期间产生的示例图像。

- [0143] 图131提供了在cKit受体片段的合理设计期间产生的示例图像。
- [0144] 图132提供了来自分析合理设计的cKit受体片段的圆二色性数据。
- [0145] 图133描绘了合理设计的cKit受体片段的稳定构象的模型。
- [0146] 图134描绘了其中HTP与阳离子聚合物主链的侧链缀合的支化组蛋白结构的实例。右侧的聚合物代表前体主链分子并且左侧的分子是支化结构的片段的实例。

具体实施方式

[0147] 如上所述,提供了用于将有效负载(例如,核酸和/或蛋白有效负载)纳米颗粒递送至细胞的组合物和方法。在一些实施方案中,主题纳米颗粒包括核和包封所述核的可脱落层(例如,在细胞递送期间提供所述核的暂时稳定化),其中所述核包括(i)阴离子聚合物组合物;(ii)阳离子聚合物组合物;(iii)阳离子多肽组合物;(iv)核酸和/或蛋白有效负载;其中:(a)所述阴离子聚合物组合物包括阴离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阴离子氨基酸的L-异构体的聚合物,和/或(b)所述阳离子聚合物组合物包含阳离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阳离子氨基酸的L-异构体的聚合物。在一些情况下,阴离子氨基酸的D-异构体的聚合物相对于阴离子氨基酸的L-异构体的聚合物以10:1至1:10范围的比率存在。在一些情况下,阳离子氨基酸的D-异构体的聚合物相对于阳离子氨基酸的L-异构体的聚合物以10:1至1:10范围的比率存在。

[0148] 在一些情况下,本公开的纳米颗粒包括包围可脱落层的表面涂层。表面涂层可包括靶向配体,其提供与靶细胞的表面分子的靶向结合。在一些情况下,靶向配体(用或不用接头)与锚定结构域缀合,例如,用于将靶向配体锚定到纳米颗粒的可脱落层。

[0149] 还提供了多层纳米颗粒,其包括作为核的一部分的第一有效负载(例如,DNA供体模板),其中所述核被第一可脱落层包围,第一可脱落层被包括第二有效负载(例如,基因编辑工具)的中间层包围,并且中间层被第二可脱落层包围。在一些情况下,第二可脱落层涂覆有表面涂层(例如,包括靶向配体的表面涂层)。

[0150] 还提供了包括两种或更多种纳米颗粒的纳米颗粒制剂,其中第一纳米颗粒的有效负载包括供体DNA模板且第二纳米颗粒的有效负载包括基因编辑工具(例如,(i)CRISPR/Cas指导RNA;(ii)编码CRISPR/Cas指导RNA的DNA;(iii)编码可编程基因编辑蛋白的DNA和/或RNA;和/或(iv)可编程基因编辑蛋白)。

[0151] 在描述本发明的方法和组合物之前,应理解本发明不限于所描述的特定方法或组合物,因此当然可以改变。也应理解,本文使用的术语仅仅为了描述具体实施方案的目的,并且不旨在是限制性的,因为本发明的范围仅仅由所附的权利要求限制。

[0152] 在提供值的范围时,应理解,除非上下文明确另外指出,该范围的上限和下限之间的至下限十分之一单位的每个中间值也具体地公开。在所述范围内的任何所述值或中间值与所述范围内的任何其他所述值或中间值之间的每个较小范围包含在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在所述范围内,并且在较小的范围内包括任一界限、不包括两个界限或包括两个界限的每个范围也包括在本发明内,遵从该叙述的范围中任何具体排除的界限。在叙述的范围包括一个或两个界限时,排除了那些包括的界限中的一个或两个的范围也包括在本发明内。

[0153] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普

通技术人员通常所理解的相同的含义。虽然类似或等效于本文所描述的那些方法和材料的任何方法和材料均可以用于实践或测试本发明,但是现在描述了一些潜在的以及优选的方法和材料。本文提及的所有公开案均以引用的方式并入本文中,从而公开和描述与所引用公开案相关的方法和/或材料。应当理解,在有矛盾的情况,本公开取代并入的出版物的任何公开内容。

[0154] 当阅读了本公开,对本领域技术人员显而易见,本文描述和阐释的每个单个实施方案具有分开的组分和特征,其可容易与任何其他数个实施方案的特征分开或结合,而不背离本发明的精神或范围。任何记载的方法可以按照所记载事件的顺序或以逻辑上可能的任何其它顺序进行。

[0155] 应注意,除非上下文另外明确规定,否则如本文和所附权利要求书中所用的单数形式“一”、“一种(一个)”以及“所述(该)”包括多个指示物。因此,例如,提及“细胞”时包含多个此类细胞并且提及“所述核酸内切酶”时包含提及本领域技术人员已知的一个/种或多个/种核酸内切酶及其等同物等。应当进一步指出,权利要求书可以撰写成排除任何要素(例如,任何任选的要素)。这样,本陈述旨在用作使用这种排除性术语,如结合权利要求要素而叙述的“唯一”、“仅仅”等,或使用“否定”限制的前置基础。

[0156] 本文论述的出版物仅提供其在本申请的申请日之前的公开内容。本文中的任何内容都不应被解释为承认本发明无权先于该出版物公开。另外,所提供的公开日期可不同于可能需要独立确认的实际公开日期。

[0157] 方法和组合物

[0158] 提供了用于将核酸、蛋白和/或核糖核蛋白有效负载递送到细胞的方法和组合物。在一些实施方案中,主题纳米颗粒包括(i)由(ii)可脱落层包封的核,并且在一些情况下,所述可脱落层被(iii)表面涂层包围,所述表面涂层可包括靶向配体。除了以下描述之外,国际专利申请公开号W02015042585特此通过引用整体并入本文。

[0159] i. 纳米颗粒核

[0160] 主题纳米颗粒的核包括阴离子聚合物组合物(例如,聚(谷氨酸))、阳离子聚合物组合物(例如,聚(精氨酸)、阳离子多肽组合物(例如,组蛋白尾肽)和有效负载(例如,核酸和/或蛋白有效负载)。在一些情况下,所述核通过阳离子氨基酸聚合物和有效负载在阴离子氨基酸聚合物存在下(并且在一些情况下在阳离子多肽组合物的阳离子多肽存在下)的凝聚产生。在一些实施方案中,与阳离子聚合物与有效负载的缀合物相比,构成核的组分的凝聚可介导提高的转染效率。在纳米颗粒核中包含阴离子聚合物可延长纳米颗粒在细胞内停留和有效负载释放的持续时间。

[0161] 对于核的阳离子和阴离子聚合物组合物,可以控制D-异构体聚合物与L-异构体聚合物的比率以便控制有效负载的定时释放,其中D-异构体聚合物与L-异构体聚合物的比率增加引起稳定性增加(有效负载释放速率降低),这例如可以使得由主题纳米颗粒递送的有效负载实现更持久的基因表达。在一些情况下,改变纳米颗粒核内D-与L异构体多肽的比率可导致基因表达谱(例如,由有效负载分子编码的蛋白的表达)为约1-90天(例如,1-80、1-70、1-60、1-50、1-40、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、3-90、3-80、3-70、3-60、3-50、3-40、3-30、3-25、3-20、3-15、3-10、5-90、5-80、5-70、5-60、5-50、5-40、5-30、5-25、5-20、5-15或5-10天)。有效负载释放的控制(例如,当递送基因编辑工具时)对于进行基因组编辑可特别有

效,例如,在需要同源定向修复的一些情况下。

[0162] 在一些实施方案中,纳米颗粒包括核和包封所述核的可脱落层,其中所述核包括:(a)阴离子聚合物组合物;(b)阳离子聚合物组合物;(c)阳离子多肽组合物;(d)核酸和/或蛋白有效负载,其中(a)和(b)中的一种包括氨基酸的D-异构体聚合物,(a)和(b)中的另一种包括氨基酸的L-异构体聚合物,其中D-异构体聚合物与L-异构体聚合物的比率在10:1至1.5:1的范围内(例如,8:1至1.5:1、6:1至1.5:1、5:1至1.5:1、4:1至1.5:1、3:1至1.5:1、2:1至1.5:1、10:1至2:1;8:1至2:1、6:1至2:1、5:1至2:1、10:1至3:1;8:1至3:1、6:1至3:1、5:1至3:1、10:1至4:1;4:1至2:1、6:1至4:1或10:1至5:1),或1:1.5至1:10的范围内(例如,1:1.5至1:8、1:1.5至1:6、1:1.5至1:5、1:1.5至1:4、1:1.5至1:3、1:1.5至1:2、1:2至1:10、1:2至1:8、1:2至1:6、1:2至1:5、1:2至1:4、1:2至1:3、1:3至1:10、1:3至1:8、1:3至1:6、1:3至1:5、1:4至1:10、1:4至1:8、1:4至1:6或1:5至1:10)。在一些此类情况下,D-异构体聚合物与L-异构体聚合物的比率不是1:1。在一些此类情况下,阴离子聚合物组合物包括选自聚(D-谷氨酸)(PDEA)和聚(D-天冬氨酸)(PDDA)的阴离子聚合物,其中(任选地)阳离子聚合物组合物可包括选自聚(L-精氨酸)、聚(L-赖氨酸)、聚(L-组氨酸)、聚(L-鸟氨酸)和聚(L-瓜氨酸)的阳离子聚合物。在一些情况下,阳离子聚合物组合物包含选自聚(D-精氨酸)、聚(D-赖氨酸)、聚(D-组氨酸)、聚(D-鸟氨酸)和聚(D-瓜氨酸)的阳离子聚合物,其中(任选地)阴离子聚合物组合物可包括选自聚(L-谷氨酸)(PLEA)和聚(L-天冬氨酸)(PLDA)的阴离子聚合物。

[0163] 在一些实施方案中,纳米颗粒包括核和包封所述核的可脱落层,其中所述核包括(i)阴离子聚合物组合物;(ii)阳离子聚合物组合物;(iii)阳离子多肽组合物;(iv)核酸和/或蛋白有效负载,其中(a)所述阴离子聚合物组合物包含阴离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阴离子氨基酸的L-异构体的聚合物,和/或(b)所述阳离子聚合物组合物包括阳离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阳离子氨基酸的L-异构体的聚合物。在一些此类情况下,所述阴离子聚合物组合物包含选自聚(D-谷氨酸)(PDEA)和聚(D-天冬氨酸)(PDDA)的第一阴离子聚合物;并且包含选自聚(L-谷氨酸)(PLEA)和聚(L-天冬氨酸)(PLDA)的第二阴离子聚合物。在一些情况下,所述阳离子聚合物组合物包含选自聚(D-精氨酸)、聚(D-赖氨酸)、聚(D-组氨酸)、聚(D-鸟氨酸)和聚(D-瓜氨酸)的第一阳离子聚合物;并且包含选自聚(L-精氨酸)、聚(L-赖氨酸)、聚(L-组氨酸)、聚(L-鸟氨酸)和聚(L-瓜氨酸)的第二阳离子聚合物。在一些情况下,阴离子氨基酸的D-异构体的聚合物相对于所述阴离子氨基酸的L-异构体的聚合物以10:1至1:10范围的比率存在。在一些情况下,阳离子氨基酸的D-异构体的聚合物相对于阳离子氨基酸的L-异构体的聚合物以10:1至1:10范围的比率存在。

[0164] 纳米颗粒组分的敏感性

[0165] 在一些实施方案中,可通过选择特定类型的蛋白,例如作为核的一部分(例如,阳离子多肽组合物的一部分、阳离子聚合物组合物的一部分和/或阴离子聚合物组合物的一部分)来控制有效负载释放的时间。例如,可能希望延迟有效负载释放持续特定时间范围,或直到有效负载存在于特定细胞位置(例如,细胞溶质、细胞核、溶酶体、内体)或在特定条件下(例如,低pH、高pH等)。因此,在一些情况下,使用对特定蛋白活性(例如,酶活性)敏感的蛋白(例如,作为核的一部分),例如,是特定蛋白活性(例如,酶活性)的底物,并且这与对普遍存在的细胞机制(例如一般降解机制)敏感大不相同。对特定蛋白活性敏感的蛋白在本文中称为“酶敏感蛋白”(ESP)。ESP的说明性实例包括但不限于:(i)作为基质金属蛋白酶

(MMP) 活性 (细胞外活性的实例) 的底物的蛋白, 例如包含 MMP 识别的基序的蛋白; (ii) 作为组织蛋白酶活性 (细胞内体活性的实例) 的底物的蛋白, 例如包含组织蛋白酶识别的基序的蛋白; (iii) 作为甲基转移酶和/或乙酰转移酶活性 (细胞内核活性的实例) 的底物的蛋白, 诸如组蛋白尾肽 (HTP), 例如包含可被酶促甲基化/去甲基化的基序和/或可以酶促乙酰化/去乙酰化的基序的蛋白。例如, 在一些情况下, 核酸有效负载与蛋白 (诸如组蛋白尾肽) 凝聚, 所述蛋白是乙酰转移酶活性的底物, 并且蛋白的乙酰化导致蛋白释放有效负载-因此, 人们可以运动通过选择使用或多或少对乙酰化敏感的蛋白来对有效负载释放进行控制。

[0166] 在一些情况下, 主题纳米颗粒的核包括酶中性多肽 (ENP), 其是多肽均聚物 (即, 具有重复序列的蛋白), 其中该多肽不具有特定活性并且是中性的。例如, 与都具有特定活性的 NLS 序列和 HTP 不同, ENP 没有特定活性。

[0167] 在一些情况下, 主题纳米颗粒的核包括酶保护多肽 (EPP), 其是对酶活性具有抗性的蛋白。PP 的实例包括但不限于: (i) 包括 D-异构体氨基酸 (例如 D-异构体聚合物) 的多肽, 其可以抵抗蛋白水解降解; (ii) 自我保护结构域, 诸如聚谷氨酰胺重复结构域 (例如, QQQQQQQQQ) (SEQ ID NO:170)。

[0168] 通过控制作为主题纳米颗粒的一部分 (例如, 纳米颗粒核的一部分) 的敏感蛋白 (ESP)、中性蛋白 (ENP) 和受保护蛋白 (EPP) 的相对量, 可以控制有效负载的释放。例如, 与使用更多的 EPP 相比, 使用更多的 ESP 通常可以导致有效负载更快地释放。此外, 使用更多的 ESP 通常可以导致有效负载的释放, 这取决于一组的特定条件/环境, 例如导致 ESP 敏感的蛋白 (例如酶) 活性的条件/环境。

[0169] 阴离子聚合物组合物

[0170] 阴离子聚合物组合物可以包含一种或多种阴离子氨基酸聚合物。例如, 在一些情况下, 主题阴离子聚合物组合物包含选自以下的聚合物: 聚 (谷氨酸) (PEA)、聚 (天冬氨酸) (PDA) 及其组合物。在一些情况下, 给定的阴离子氨基酸聚合物可以包含天冬氨酸和谷氨酸残基的混合。每种聚合物可以作为 L-异构体或 D-异构体的聚合物存在于组合物中, 其中 D-异构体在靶细胞中更稳定, 因为它们需要更长的时间来降解。因此, 在纳米颗粒核中包含 D-异构体聚 (氨基酸) 延迟了核降解 (以及随后的有效负载释放)。因此有效负载释放速率可以被控制并且与 D-异构体的聚合物与 L-异构体的聚合物的比率成比率, 其中 D-异构体与 L-异构体的较高比率增加了有效负载释放的持续时间 (即, 降低释放速率)。换句话说, D-异构体和 L-异构体的相对量可以调节纳米颗粒核的定时释放动力学以及对降解和有效负载释放的酶促敏感性。

[0171] 在一些情况下, 主题纳米颗粒的阴离子聚合物组合物包含阴离子氨基酸聚合物 (例如, 聚 (谷氨酸) ((PEA) 和聚 (天冬氨酸) (PDA)) 的 D-异构体的聚合物和 L-异构体的聚合物。在一些情况下, D-与 L-异构体比率在 10:1-1:10 的范围内 (例如, 8:1-1:10、6:1-1:10、4:1-1:10、3:1-1:10、2:1-1:10、1:1-1:10、10:1-1:8、8:1-1:8、6:1-1:8、4:1-1:8、3:1-1:8、2:1-1:8、1:1-1:8、10:1-1:6、8:1-1:6、6:1-1:6、4:1-1:6、3:1-1:6、2:1-1:6、1:1-1:6、10:1-1:4、8:1-1:4、6:1-1:4、4:1-1:4、3:1-1:4、2:1-1:4、1:1-1:4、10:1-1:3、8:1-1:3、6:1-1:3、4:1-1:3、3:1-1:3、2:1-1:3、1:1-1:3、10:1-1:2、8:1-1:2、6:1-1:2、4:1-1:2、3:1-1:2、2:1-1:2、1:1-1:2、10:1-1:1、8:1-1:1、6:1-1:1、4:1-1:1、3:1-1:1 或 2:1-1:1)。

[0172] 因此,在一些情况下,阴离子聚合物组合物包含第一阴离子聚合物(例如,氨基酸聚合物),所述第一阴离子聚合物是D-异构体的聚合物(例如,选自聚(D-谷氨酸)(PDEA)和聚(D-天冬氨酸)(PDDA));并且包含第二阴离子聚合物(例如,氨基酸聚合物),所述第二阴离子聚合物是L-异构体的聚合物(例如,选自聚(L-谷氨酸)(PLEA)和聚(L-天冬氨酸)(PLDA))。在一些情况下,第一阴离子聚合物(D-异构体)与第二阴离子聚合物(L-异构体)的比率在范围10:1-1:10的范围内(例如,8:1-1:10、6:1-1:10、4:1-1:10、3:1-1:10、2:1-1:10、1:1-1:10、10:1-1:8、8:1-1:8、6:1-1:8、4:1-1:8、3:1-1:8、2:1-1:8、1:1-1:8、10:1-1:6、8:1-1:6、6:1-1:6、4:1-1:6、3:1-1:6、2:1-1:6、1:1-1:6、10:1-1:4、8:1-1:4、6:1-1:4、4:1-1:4、3:1-1:4、2:1-1:4、1:1-1:4、10:1-1:3、8:1-1:3、6:1-1:3、4:1-1:3、3:1-1:3、2:1-1:3、1:1-1:3、10:1-1:2、8:1-1:2、6:1-1:2、4:1-1:2、3:1-1:2、2:1-1:2、1:1-1:2、10:1-1:1、8:1-1:1、6:1-1:1、4:1-1:1、3:1-1:1或2:1-1:1)。

[0173] 在一些实施方案中,主题纳米颗粒的核的阴离子聚合物组合物包含(例如,除阴离子聚合物的任何前述实例之外或代替阴离子聚合物的任何前述实例)糖胺聚糖、糖蛋白、多糖、聚(甘露糖醛酸)、聚(古洛糖醛酸)、肝素、硫酸肝素、软骨素、硫酸软骨素、角质素、硫酸角质素、聚集蛋白聚糖、聚(葡糖胺)或包括其任何组合的阴离子聚合物。

[0174] 在一些实施方案中,核内的阴离子聚合物可以具有的分子量范围为1-200kDa(例如,1-150kDa、1-100kDa、1-50kDa、5-200kDa、5-150kDa、5-100kDa、5-50kDa、10-200kDa、10-150kDa、10-100kDa、10-50kDa、15-200kDa、15-150kDa、15-100kDa或15-50kDa)。作为实例,在一些情况下,阴离子聚合物包含分子量约为15kDa的聚(谷氨酸)。

[0175] 在一些情况下,阴离子氨基酸聚合物包含半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基可以促进例如与接头、NLS和/或阳离子多肽(例如,组蛋白或HTP)的缀合。例如,半胱氨酸残基可用于通过巯基化学(例如,二硫键)和/或胺反应性化学进行交联(缀合)。因此,在一些实施方案中,阴离子聚合物组合物的阴离子氨基酸聚合物(例如,聚(谷氨酸)(PEA)、聚(天冬氨酸)(PDA)、聚(D-谷氨酸)(PDEA)、聚(D-天冬氨酸)(PDDA)、聚(L-谷氨酸)(PLEA)、聚(L-天冬氨酸)(PLDA))包含半胱氨酸残基。在一些情况下,所述阴离子氨基酸聚合物在N-末端和/或C-末端上包含半胱氨酸残基。在一些情况下,所述阴离子氨基酸聚合物包含内部半胱氨酸残基。

[0176] 在一些情况下,所述阴离子氨基酸聚合物包含(和/或缀合)核定位信号(NLS)(在下文更详细地描述)。因此,在一些实施方案中,阴离子聚合物组合物的阴离子氨基酸聚合物(例如,聚(谷氨酸)(PEA)、聚(天冬氨酸)(PDA)、聚(D-谷氨酸)(PDEA)、聚(D-天冬氨酸)(PDDA)、聚(L-谷氨酸)(PLEA)、聚(L-天冬氨酸)(PLDA))包含一个或多个(例如,两个或更多个、三个或更多个或者四个或更多个)NLS(和/或与其缀合)。在一些情况下,所述阴离子氨基酸聚合物在N-末端和/或C-末端上包含NLS。在一些情况下,所述阴离子氨基酸聚合物包含内部NLS。

[0177] 在一些情况下,当产生主题纳米颗粒核时,在阳离子聚合物之前添加阴离子聚合物。

[0178] 阳离子聚合物组合物

[0179] 阳离子聚合物组合物可包含一种或多种阳离子氨基酸聚合物。例如,在一些情况下,主题阳离子聚合物组合物包含选自以下的聚合物:聚(精氨酸)(PR)、聚(赖氨酸)(PK)、

聚(组氨酸)(PH)、聚(鸟氨酸)、聚(瓜氨酸)及其组合。在一些情况下,给定的阳离子氨基酸聚合物可以包含精氨酸、赖氨酸、组氨酸、鸟氨酸和瓜氨酸残基的混合(以任何方便的组合形式)。每种聚合物可以作为L-异构体或D-异构体的聚合物存在于组合物中,其中D-异构体在靶细胞中更稳定,因为它们需要更长的时间来降解。因此,在纳米颗粒核中包含D-异构体聚(氨基酸)延迟了核降解(以及随后的有效负载释放)。因此有效负载释放速率可以被控制并且与D-异构体的聚合物与L-异构体的聚合物的比率成比率,其中D-异构体与L-异构体的较高比率增加了有效负载释放的持续时间(即,降低释放速率)。换句话说,D-异构体和L-异构体的相对量可以调节纳米颗粒核的定时释放动力学以及对降解和有效负载释放的酶促敏感性。

[0180] 在一些情况下,主题纳米颗粒的阳离子聚合物组合物包括阳离子氨基酸聚合物(例如,聚(精氨酸)(PR)、聚(赖氨酸)(PK)、聚(组氨酸)(PH)、聚(鸟氨酸)、聚(瓜氨酸))的D-异构体聚合物和L-异构体聚合物。在一些情况下,D-与L-异构体比率在10:1-1:10的范围内(例如,8:1-1:10、6:1-1:10、4:1-1:10、3:1-1:10、2:1-1:10、1:1-1:10、10:1-1:8、8:1-1:8、6:1-1:8、4:1-1:8、3:1-1:8、2:1-1:8、1:1-1:8、10:1-1:6、8:1-1:6、6:1-1:6、4:1-1:6、3:1-1:6、2:1-1:6、1:1-1:6、10:1-1:4、8:1-1:4、6:1-1:4、4:1-1:4、3:1-1:4、2:1-1:4、1:1-1:4、10:1-1:3、8:1-1:3、6:1-1:3、4:1-1:3、3:1-1:3、2:1-1:3、1:1-1:3、10:1-1:2、8:1-1:2、6:1-1:2、4:1-1:2、3:1-1:2、2:1-1:2、1:1-1:2、10:1-1:1、8:1-1:1、6:1-1:1、4:1-1:1、3:1-1:1或2:1-1:1)。

[0181] 因此,在一些情况下,阳离子聚合物组合物包含第一阳离子聚合物(例如,氨基酸聚合物),所述第一阳离子聚合物是D-异构体的聚合物(例如,选自聚(D-精氨酸)、聚(D-赖氨酸)、聚(D-组氨酸)、聚(D-鸟氨酸)和聚(D-瓜氨酸));并且包含第二阳离子聚合物(例如,氨基酸聚合物),所述第二阳离子聚合物是L-异构体的聚合物(例如,选自聚(L-精氨酸)、聚(L-赖氨酸)、聚(L-组氨酸)、聚(L-鸟氨酸)和聚(L-瓜氨酸))。在一些情况下,第一阳离子聚合物(D-异构体)与第二阳离子聚合物(L-异构体)的比率在10:1-1:10的范围内(例如,8:1-1:10、6:1-1:10、4:1-1:10、3:1-1:10、2:1-1:10、1:1-1:10、10:1-1:8、8:1-1:8、6:1-1:8、4:1-1:8、3:1-1:8、2:1-1:8、1:1-1:8、10:1-1:6、8:1-1:6、6:1-1:6、4:1-1:6、3:1-1:6、2:1-1:6、1:1-1:6、10:1-1:4、8:1-1:4、6:1-1:4、4:1-1:4、3:1-1:4、2:1-1:4、1:1-1:4、10:1-1:3、8:1-1:3、6:1-1:3、4:1-1:3、3:1-1:3、2:1-1:3、1:1-1:3、10:1-1:2、8:1-1:2、6:1-1:2、4:1-1:2、3:1-1:2、2:1-1:2、1:1-1:2、10:1-1:1、8:1-1:1、6:1-1:1、4:1-1:1、3:1-1:1或2:1-1:1)。

[0182] 在一些实施方案中,主题纳米颗粒的核的阳离子聚合物组合物包含(例如,除阳离子聚合物的任何前述实例之外或代替阳离子聚合物的任何前述实例)聚(乙烯亚胺);聚(酰氨基胺)(PAMAM);聚(天冬酰胺);多肽(例如,用于形成用于核凝聚的“蜘蛛网”状支);电荷官能化聚酯;阳离子多糖;乙酰化氨基糖;脱乙酰壳多糖或包括其任何组合的阳离子聚合物(例如,以线性或支化的形式)。

[0183] 在一些实施方案中,核内的阳离子聚合物可以具有的分子量范围为1-200kDa(例如,1-150kDa、1-100kDa、1-50kDa、5-200kDa、5-150kDa、5-100kDa、5-50kDa、10-200kDa、10-150kDa、10-100kDa、10-50kDa、15-200kDa、15-150kDa、15-100kDa或15-50kDa)。作为实例,在一些情况下,阳离子聚合物包含例如分子量为约29kDa的聚(L-精氨酸)。作为另一个实

例,在一些情况下,阳离子聚合物包含分子量为约25kDa (PEI) 的线性聚(乙烯亚胺)。作为另一个实例,在一些情况下,阳离子聚合物包含分子量为约10kDa的支化聚(乙烯亚胺)。作为另一个实例,在一些情况下,阳离子聚合物包含分子量为约70kDa的支化聚(乙烯亚胺)。在一些情况下,阳离子聚合物包含PAMAM。

[0184] 在一些情况下,阳离子氨基酸聚合物包含半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基可以促进例如与接头、NLS和/或阳离子多肽(例如,组蛋白或HTP)的缀合。例如,半胱氨酸残基可用于通过巯基化学(例如,二硫键)和/或胺反应性化学进行交联(缀合)。因此,在一些实施方案中,阳离子聚合物组合物的阳离子氨基酸聚合物(例如,聚(精氨酸)(PR);聚(赖氨酸)(PK);聚(组氨酸)(PH);聚(鸟氨酸)和聚(瓜氨酸);聚(D-精氨酸)(PDR);聚(D-赖氨酸)(PDK);聚(D-组氨酸)(PDH);聚(D-鸟氨酸)和聚(D-瓜氨酸);聚(L-精氨酸)(PLR);聚(L-赖氨酸)(PLK);聚(L-组氨酸)(PLH);聚(L-鸟氨酸)和聚(L-瓜氨酸))包含半胱氨酸残基。在一些情况下,所述阳离子氨基酸聚合物在N-末端和/或C-末端上包含半胱氨酸残基。在一些情况下,所述阳离子氨基酸聚合物包含内部半胱氨酸残基。

[0185] 在一些情况下,所述阳离子氨基酸聚合物包含(和/或缀合)核定位信号(NLS)(在下文更详细地描述)。因此,在一些实施方案中,阳离子聚合物组合物的阳离子氨基酸聚合物(例如,聚(精氨酸)(PR);聚(赖氨酸)(PK);聚(组氨酸)(PH);聚(鸟氨酸)和聚(瓜氨酸);聚(D-精氨酸)(PDR);聚(D-赖氨酸)(PDK);聚(D-组氨酸)(PDH);聚(D-鸟氨酸)和聚(D-瓜氨酸);聚(L-精氨酸)(PLR);聚(L-赖氨酸)(PLK);聚(L-组氨酸)(PLH);聚(L-鸟氨酸)和聚(L-瓜氨酸))包含(和/或缀合至)一个或两个(例如,两个或更多个、三个或更多个或者四个或更多个)NLS。在一些情况下,所述阳离子氨基酸聚合物在N-末端和/或C-末端上包含NLS。在一些情况下,所述阳离子氨基酸聚合物包含内部NLS。

[0186] 阳离子多肽组合物

[0187] 在一些实施方案中,纳米颗粒的阳离子多肽组合物可介导稳定性、亚细胞区室化和/或有效负载释放。作为一个实例,主题纳米颗粒核内的组蛋白的N-末端片段(通常称为组蛋白尾肽)在某些情况下不但能够通过各种组蛋白修饰去质子化,如在组蛋白乙酰转移酶介导的乙酰化的情况下,而且可以介导纳米颗粒核的组分(例如,有效负载)的有效核特异性解包。在一些情况下,阳离子多肽组合物包含组蛋白和/或组蛋白尾肽(例如,阳离子多肽可以是组蛋白和/或组蛋白尾肽)。在一些情况下,阳离子多肽组合物包含含有NLS的肽(例如,阳离子多肽可以是含有NLS的肽)。在一些情况下,阳离子多肽组合物包含含有线粒体定位信号的肽(例如,阳离子多肽可以是包含线粒体定位信号的肽)。

[0188] 组蛋白尾肽(HTP)

[0189] 在一些实施方案中,主题纳米颗粒的阴离子多肽组合物包含组蛋白肽或组蛋白肽的片段,诸如N-末端组蛋白尾(例如,H1、H2(例如,H2A、H2AX、H2B)、H3或H4组蛋白的组蛋白尾)。组蛋白的尾部片段在本文中称为组蛋白尾肽(HTP)。因为此类蛋白(组蛋白和/或HTP)可以与作为主题纳米颗粒核的一部分的核酸有效负载凝聚,包含一个或多个组蛋白或HTP(例如,作为阳离子多肽组合物的一部分)的核在本文中有时称为核小体--模拟核。组蛋白和/或HTP也可以作为单体包含在内,并且在一些情况下,当核酸有效负载凝聚成纳米颗粒核时,可以形成二聚体、三聚体、四聚体和/或八聚体。在一些情况下,HTP不但能够通过各种组蛋白修饰去质子化,如在组蛋白乙酰转移酶介导的乙酰化的情况下,而且可以介导核组

分的有效核特异性解包(例如,释放有效负载)。包含组蛋白和/或HTP的核的运输可能依赖于利用通过高尔基体和内质网的逆行运输的替代内吞途径。此外,一些组蛋白包括先天核定位序列,并且核中包含NLS可以将核(包括有效负载)引导至靶细胞的细胞核。

[0190] 在一些实施方案中,主题阳离子多肽组合物包含具有H2A、H2AX、H2B、H3或H4蛋白的氨基酸序列的蛋白。在一些情况下,主题阳离子多肽组合物包含具有对应于组蛋白的N-末端区域的氨基酸序列的蛋白。例如,片段(HTP)可以包含组蛋白的前5个、前10个、前15个、前20个、前25个、前30个、前35个、前40个、前45个或前50个N-末端氨基酸。在一些情况下,主题HTP包含来自组蛋白的N-末端区域的5-50个氨基酸(例如,5-45个、5-40个、5-35个、5-30个、5-25个、5-20个、8-50个、8-45个、8-40个、8-35个、8-30个、10-50个、10-45个、10-40个、10-35个或10-30个氨基酸)。在一些情况下,主题阳离子多肽包含5-150个氨基酸(例如,5-100个、5-50个、5-35个、5-30个、5-25个、5-20个、8-150个、8-100个、8-50个、8-40个、8-35个、8-30个、10-150个、10-100个、10-50个、10-40个、10-35个或10-30个氨基酸)。

[0191] 在一些情况下,阳离子多肽组合物的阳离子多肽(例如,组蛋白或HTP,例如,H1、H2、H2A、H2AX、H2B、H3或H4)包含翻译后修饰(例如,在一些情况下,对一个或多个组氨酸、赖氨酸、精氨酸或其它互补残基进行修饰)。例如,在一些情况下,阳离子多肽甲基化(和/或易于甲基化/去甲基化);乙酰化(和/或易于乙酰化/去乙酰化);巴豆酰化(和/或易于巴豆酰化/去巴豆酰化);泛素化(和/或易于泛素化/去泛素化);磷酸化(和/或易于磷酸化/去磷酸化);SUMO化(和/或易于SUMO化/去SUMO化);法尼基化(和/或易于法尼基化/去法尼基化);硫酸化(和/或易于硫酸化/脱硫)或以其它方式被翻译后修饰。在一些情况下,阳离子多肽组合物的阳离子多肽(例如,组蛋白或HTP,例如,H1、H2、H2A、H2AX、H2B、H3、或H4)是p300/CBP底物(例如,参见以下的示例HTP,例如SEQ Nos.129-130)。在一些情况下,阳离子多肽组合物的阳离子多肽(例如,组蛋白或HTP,例如,H1、H2、H2A、H2AX、H2B、H3或H4)包含一个或多个硫醇残基(例如,可以包含硫酸化或易于硫酸化的半胱氨酸和/或甲硫氨酸残基)(例如,作为硫代硫酸盐硫转移酶底物)。在一些情况下,阳离子多肽的阳离子多肽(例如,组蛋白或HTP,例如,H1、H2、H2A、H2AX、H2B、H3或H4)在C-末端上酰胺化。组蛋白H2A、H2B、H3和H4(和/或HTP)可以在其任何赖氨酸处单甲基化、二甲基化或三甲基化以促进或抑制转录活性并且改变核特异性释放动力学。

[0192] 阳离子多肽可以用期望的修饰合成或者可以在体外反应中被修饰。可替换的是,可以在细胞群中表达阳离子多肽(例如,组蛋白或HTP)并且可以分离/纯化期望的修饰蛋白。在一些情况下,主题纳米颗粒的阳离子多肽组合物包含甲基化HTP,例如包含H3K4 (Me3)的HTP序列-包含如SEQ ID NO:75或88)所示氨基酸序列。在一些情况下,阳离子多肽组合物的阳离子多肽(例如,组蛋白或HTP,例如H1、H2、H2A、H2AX、H2B、H3或H4)包含C-末端酰胺。

[0193] 组蛋白和HTP的实例

[0194] 实例包含但不限于以下序列:

[0195] H2A

[0196] SGRGKQGGKARAKAKTRSSR (SEQ ID NO:62) [1-20]

[0197] SGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGGG (SEQ ID NO:63) [1-39]

[0198] MSGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYAERVGAGAPVYLAAYLEYLTAEILELAG
NAARDNKKTRIIPRHLQLAIRNDEELNKLKGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTESHKAKGK (SEQ ID NO:64)

[1-130]

[0199] H2AX

[0200] CKATQASQEY (SEQ ID NO:65) [134-143]

[0201] KKTSATVGPKAPSGGKKATQASQEY (SEQ ID NO:66) [KK 120-129]MSGRGKTGGKARAKAKS
RSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGHYAERVGAGAPVYLAHVLEYLTAIEILELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAIRNDEE
LNKLLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTSATVGPKAPSGGKKATQASQEY (SEQ ID NO:67) [1-143]

[0202] H2B

[0203] PEPA-K (cr) -SAPAPK (SEQ ID NO:68) [1-11H2BK5 (cr)]

[0204] [cr:巴豆酰化 (crotonylated) (巴豆酰化) (crotonylation)]

[0205] PEPAKSAPAPK (SEQ ID NO:69) [1-11]

[0206] AQKKDGKKRKRSRKE (SEQ ID NO:70) [21-35]

[0207] MPEPAKSAPAPKKGSKKAVTKAQKKDGKKRKRSRKESYSIYVYKVLKQVHPDTGISSKAMGIMNSFVN
DIFERIAGEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGLAKHAVSEGTKAVTKYTSSK (SEQ ID NO:71) [1-
126]

[0208] H3

[0209] ARTKQTAR (SEQ ID NO:72) [1-8]

[0210] ART-K (Me1) -QTARKS (SEQ ID NO:73) [1-8H3K4 (Me1)]

[0211] ART-K (Me2) -QTARKS (SEQ ID NO:74) [1-8H3K4 (Me2)]

[0212] ART-K (Me3) -QTARKS (SEQ ID NO:75) [1-8H3K4 (Me3)]

[0213] ARTKQTARK-pS-TGGKA (SEQ ID NO:76) [1-15H3pS10]

[0214] ARTKQTARKSTGGKAPRKWC-NH2 (SEQ ID NO:77) [1-18WC, 酰胺]

[0215] ARTKQTARKSTGG-K (Ac) -APRKQ (SEQ ID NO:78) [1-19H3K14 (Ac)]

[0216] ARTKQTARKSTGGKAPRKQL (SEQ ID NO:79) [1-20]

[0217] ARTKQTAR-K (Ac) -STGGKAPRKQL (SEQ ID NO:80) [1-20H3K9 (Ac)]

[0218] ARTKQTARKSTGGKAPRKQLA (SEQ ID NO:81) [1-21]

[0219] ARTKQTAR-K (Ac) -STGGKAPRKQLA (SEQ ID NO:82) [1-21H3K9 (Ac)]

[0220] ARTKQTAR-K (Me2) -STGGKAPRKQLA (SEQ ID NO:83) [1-21H3K9 (Me1)]

[0221] ARTKQTAR-K (Me2) -STGGKAPRKQLA (SEQ ID NO:84) [1-21H3K9 (Me2)]

[0222] ARTKQTAR-K (Me2) -STGGKAPRKQLA (SEQ ID NO:85) [1-21H3K9 (Me3)]

[0223] ART-K (Me1) -QTARKSTGGKAPRKQLA (SEQ ID NO:86) [1-21H3K4 (Me1)]

[0224] ART-K (Me2) -QTARKSTGGKAPRKQLA (SEQ ID NO:87) [1-21H3K4 (Me2)]

[0225] ART-K (Me3) -QTARKSTGGKAPRKQLA (SEQ ID NO:88) [1-21H3K4 (Me3)]

[0226] ARTKQTAR-K (Ac) -pS-TGGKAPRKQLA (SEQ ID NO:89) [1-21H3K9 (Ac) , pS10]

[0227] ART-K (Me3) -QTAR-K (Ac) -pS-TGGKAPRKQLA (SEQ ID NO:90) [1-21H3K4 (Me3) , K9
(Ac) , pS10]

[0228] ARTKQTARKSTGGKAPRKQLAC (SEQ ID NO:91) [1-21Cys]

[0229] ARTKQTAR-K (Ac) -STGGKAPRKQLATKA (SEQ ID NO:92) [1-24H3K9 (Ac)]

[0230] ARTKQTAR-K (Me3) -STGGKAPRKQLATKA (SEQ ID NO:93) [1-24H3K9 (Me3)]

[0231] ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAA (SEQ ID NO:94) [1-25]

- [0232] ART-K (Me3) -QTARKSTGGKAPRKQLATKAA (SEQ ID NO:95) [1-25H3K4 (Me3)]
- [0233] TKQTAR-K (Me1) -STGGKAPR (SEQ ID NO:96) [3-17 H3K9 (Me1)]
- [0234] TKQTAR-K (Me2) -STGGKAPR (SEQ ID NO:97) [3-17 H3K9 (Me2)]
- [0235] TKQTAR-K (Me3) -STGGKAPR (SEQ ID NO:98) [3-17 H3K9 (Me3)]
- [0236] KSTGG-K (Ac) -APRKQ (SEQ ID NO:99) [9-19 H3K14 (Ac)]
- [0237] QTARKSTGGKAPRKQLASK (SEQ ID NO:100) [5-23]
- [0238] APRKQLATKAARKSAPATGGVKKPH (SEQ ID NO:101) [15-39]
- [0239] ATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPG (SEQ ID NO:102) [21-44]
- [0240] KAARKSAPA (SEQ ID NO:103) [23-31]
- [0241] KAARKSAPATGG (SEQ ID NO:104) [23-34]
- [0242] KAARKSAPATGGC (SEQ ID NO:105) [23-34 Cys]
- [0243] KAAR-K (Ac) -SAPATGG (SEQ ID NO:106) [H3K27 (Ac)]
- [0244] KAAR-K (Me1) -SAPATGG (SEQ ID NO:107) [H3K27 (Me1)]
- [0245] KAAR-K (Me2) -SAPATGG (SEQ ID NO:108) [H3K27 (Me2)]
- [0246] KAAR-K (Me3) -SAPATGG (SEQ ID NO:109) [H3K27 (Me3)]
- [0247] AT-K (Ac) -AARKSAPSTGGVKKPHRYRPG (SEQ ID NO:110) [21-44H3K23 (Ac)]
- [0248] ATKAARK-pS-APATGGVKKPHRYRPG (SEQ ID NO:111) [21-44pS28]
- [0249] ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGV (SEQ ID NO:112) [1-35]
- [0250] STGGV-K (Me1) -KPHRY (SEQ ID NO:113) [31-41 H3K36 (Me1)]
- [0251] STGGV-K (Me2) -KPHRY (SEQ ID NO:114) [31-41 H3K36 (Me2)]
- [0252] STGGV-K (Me3) -KPHRY (SEQ ID NO:115) [31-41 H3K36 (Me3)]
- [0253] GTVALREIRRYQ-K (Ac) -STELLIR (SEQ ID NO:116) [44-63H3K56 (Ac)]
- [0254] ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALRE (SEQ ID NO:117) [1-50]
- [0255] TELLIRKLFPQRLVREIAQDF-K (Me1) -TDLRFQSAAI (SEQ ID NO:118) [H3K79 (Me1)]
- [0256] EIAQDFKTDLR (SEQ ID NO:119) [73-83]
- [0257] EIAQDF-K (Ac) -TDLR (SEQ ID NO:120) [73-83H3K79 (Ac)]
- [0258] EIAQDF-K (Me3) -TDLR (SEQ ID NO:121) [73-83H3K79 (Me3)]
- [0259] RLVREIAQDFKTDLRFQSSAV (SEQ ID NO:122) [69-89]
- [0260] RLVREIAQDFK- (Me1) -TDLRFQSSAV (SEQ ID NO:123) [69-89H3K79 (Me1) ,酰胺]
- [0261] RLVREIAQDFK- (Me2) -TDLRFQSSAV (SEQ ID NO:124) [69-89H3K79 (Me2) ,酰胺]
- [0262] RLVREIAQDFK- (Me3) -TDLRFQSSAV (SEQ ID NO:125) [69-89H3K79 (Me3) ,酰胺]
- [0263] KRVTIMPKDIQLARRIRGERA (SEQ ID NO:126) [116-136]
- [0264] MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALREIRRYQKSTELLIRKLFPQRLMREIAQDFKTDLRFQSSAVMALQEACESYLVGLFEDTNLCVIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA (SEQ ID NO:127) [1-136]
- [0265] H4
- [0266] SGRGKGG (SEQ ID NO:128) [1-7]
- [0267] RGKGGKGLGKGA (SEQ ID NO:129) [4-12]

- [0268] SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKV (SEQ ID NO:130) [1-21]
- [0269] KGLGKGGAKRHRKVLRDNC-NH2 (SEQ ID NO:131) [8-25WC, 酰胺]
- [0270] SGRG-K (Ac) -GG-K (Ac) -GLG-K (Ac) -GGA-K (Ac) -RHRKVLRDNGSGSK (SEQ ID NO:132) [1-25H4K5, 8, 12, 16 (Ac)]
- [0271] SGRGKGGKGLGKGGAKRHRK-NH2 (SEQ ID NO:133) [1-20H4PRMT7 (蛋白精氨酸甲基转移酶7) 底物, M1]
- [0272] SGRG-K (Ac) -GGKGLGKGGAKRHRK (SEQ ID NO:134) [1-20H4K5 (Ac)]
- [0273] SGRGKGG-K (Ac) -GLGKGGAKRHRK (SEQ ID NO:135) [1-20H4K8 (Ac)]
- [0274] SGRGKGGKGLG-K (Ac) -GAKRHRK (SEQ ID NO:136) [1-20H4K12 (Ac)]
- [0275] SGRGKGGKGLGKGG-K (Ac) -RHRK (SEQ ID NO:137) [1-20H4K16 (Ac)]
- [0276] KGLGKGGAKRHRKVLRDNC-NH2 (SEQ ID NO:138) [1-25WC, 酰胺]
- [0277] MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLIYEETRGVLKVFLNVIR DAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG (SEQ ID NO:139) [1-103]

[0278] 因此, 主题阳离子多肽组合物的阳离子多肽可以包含具有SEQ ID NO:62-139中的任一个所示氨基酸序列的氨基酸序列。在一些情况下, 主题阳离子多肽组合物的阳离子多肽包含与SEQ ID NO:62-139中任一个所示氨基酸序列具有80%或更高的序列同一性 (例如, 85%或更高、90%或更高、95%或更高、98%或更高、99%或更高或者100%的序列同一性) 的氨基酸序列。在一些情况下, 主题阳离子多肽组合物的阳离子多肽包含与SEQ ID NO:62-139中任一个所示氨基酸序列具有90%或更高的序列同一性 (例如, 95%或更高、98%或更高、99%或更高或者100%的序列同一性) 的氨基酸序列。阳离子多肽可以包含任何方便的修饰, 并且上文讨论了多种这种设想的修饰, 例如甲基化、乙酰化、巴豆酰化、泛素化、磷酸化、SUMO化、法尼基化、硫酸化等。

[0279] 在一些情况下, 阳离子多肽组合物的阳离子多肽包含与SEQ ID NO:94所示氨基酸序列具有80%或更高的序列同一性 (例如, 85%或更高、90%或更高、95%或更高、98%或更高、99%或更高或者100%的序列同一性) 的氨基酸序列。在一些情况下, 阳离子多肽组合物的阳离子多肽包含与SEQ ID NO:94所示氨基酸序列具有95%或更高的序列同一性 (例如, 98%或更高、99%或更高或者100%的序列同一性) 的氨基酸序列。在一些情况下, 阳离子多肽组合物的阳离子多肽包含SEQ ID NO:94所示的氨基酸序列。在一些情况下, 阳离子多肽组合物的阳离子多肽包含由H3K4 (Me3) (SEQ ID NO:95) 表示的序列, 所述阳离子多肽包括人组蛋白3蛋白的前25个氨基酸, 并且在赖氨酸4上三甲基化 (例如, 在一些情况下在C-末端上酰胺化)。

[0280] 在一些实施方案中, 阳离子多肽组合物的阳离子多肽 (例如, 组蛋白或HTP, 例如, H1、H2、H2A、H2AX、H2B、H3或H4) 包含半胱氨酸残基, 所述半胱氨酸残基可以促进与: 阳离子 (或者在一些情况下为阴离子) 氨基酸聚合物、接头、NLS和/或其它阳离子多肽的缀合 (例如, 在一些情况下形成支化组蛋白结构)。例如, 半胱氨酸残基可用于通过巯基化学 (例如, 二硫键) 和/或胺反应性化学进行交联 (缀合)。在一些情况下, 所述半胱氨酸残基是内部的。在一些情况下, 所述半胱氨酸残基定位于N-末端和/或C-末端处。在一些情况下, 阳离子多肽组合物的阳离子多肽 (例如, 组蛋白或HTP, 例如H1、H2、H2A、H2AX、H2B、H3或H4) 包含添加半胱氨酸残基的突变 (例如, 插入或取代)。包含半胱氨酸的HTP的实例包含但不限于:

[0281] CKATQASQEY (SEQ ID NO:140) -来自H2AX

[0282] ARTKQTARKSTGGKAPRKQLAC (SEQ ID NO:141) -来自H3

[0283] ARTKQTARKSTGGKAPRKWC (SEQ ID NO:142)

[0284] KAARKSAPATGGC (SEQ ID NO:143) -来自H3

[0285] KGLGKGGAKRHRKVLRLDNC (SEQ ID NO:144) -来自H4

[0286] MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALREIRRYQKSTELLIRKLFP
QRLMREIAQDFKTDLRQSSAVMALQEACESYLVGLFEDTNLCVIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA (SEQ ID
NO:145) -来自H3

[0287] 在一些实施方案中,阳离子多肽组合物的阳离子多肽(例如,组蛋白或HTP,例如,H1、H2、H2A、H2AX、H2B、H3或H4)与主题纳米颗粒的核的阳离子(和/或阴离子)氨基酸聚合物缀合。作为实例,组蛋白或HTP可以通过半胱氨酸残基与阳离子氨基酸聚合物(例如,包含聚(赖氨酸)的聚合物)缀合,例如,其中用与组蛋白或HTP的半胱氨酸键合的二硫化物取代聚合物的一个或多个赖氨酸的一个或多个吡啶基二硫化物基团。

[0288] 修饰的/支化结构

[0289] 在一些实施方案中,主题阳离子多肽组合物的阳离子多肽具有线性结构。在一些实施方案中,主题阳离子多肽组合物的阳离子多肽具有支化结构。

[0290] 例如,在一些情况下,阳离子多肽(例如,HTP;例如,具有半胱氨酸残基的HTP)与阳离子聚合物(例如,聚(L-精氨酸)、聚(D-赖氨酸)、聚(L-赖氨酸)、聚(D-赖氨酸))的末端(例如,在其C-末端处)缀合,从而形成延伸的线性多肽。在一些情况下,一个或多个(两个或更多个、三个或更多个等)阳离子多肽(例如,HTP;例如具有半胱氨酸残基的HTP)与阳离子聚合物(例如,聚(L-精氨酸)、聚(D-赖氨酸)、聚(L-赖氨酸)、聚(D-赖氨酸))的一个或多个末端(例如,在其C-末端处)缀合,从而形成延伸的线性多肽。在一些情况下,阳离子聚合物具有范围为4,500-150,000Da)的分子量。

[0291] 作为另一个实例,在一些情况下,一个或多个(两个或更多个,三个或更多个等)阳离子多肽(例如,HTP;例如具有半胱氨酸残基的HTP)与阳离子聚合物(例如,聚(L-精氨酸)、聚(D-赖氨酸)、聚(L-赖氨酸)、聚(D-赖氨酸))的侧链(例如,在其C-末端处)缀合,从而形成支化结构(支化多肽)。

[0292] 通过纳米颗粒核的组分(例如,主题阳离子多肽组合物的组分)形成支化结构在一些情况下可以增加可以实现的核(例如,核酸有效负载的)凝聚的量。因此,在一些情况下,期望使用形成支化结构的组分。支化结构的各种类型是目的支化结构,并且可以产生的支化结构的实例(例如,使用如HTP等主题阳离子多肽;例如,具有半胱氨酸残基的HTP;类肽;聚酰胺等)包含但不限于:刷状聚合物;网状(例如蜘蛛网);接枝聚合物;星形聚合物;梳状聚合物;聚合物网络;树状聚合物等。

[0293] 作为实例,图134描绘了刷状类型支化结构。在一些情况下,支化结构包含2-30个阳离子多肽(例如,HTP)(例如,2-25个、2-20个、2-15个、2-10个、2-5个、4-30个、4-25个、4-20个、4-15个或4-10个阳离子多肽),其中每个阳离子多肽可以与支化结构的其它阳离子多肽相同或不同(参见,例如,图134)。在一些情况下,阳离子聚合物具有范围为4,500-150,000Da)的分子量。在一些情况下,阳离子聚合物(例如,聚(L-精氨酸)、聚(D-赖氨酸)、聚(L-赖氨酸)、聚(D-赖氨酸))的5%或更多(例如,10%或更多、20%或更多、25%或更多、30%或

更多、40%或更多或者50%或更多)的侧链与主题阳离子多肽(例如,HTP;例如,具有半胱氨酸残基的HTP)缀合。在一些情况下,阳离子聚合物(例如,聚(L-精氨酸)、聚(D-赖氨酸)、聚(L-赖氨酸)、聚(D-赖氨酸))的高达50%(例如,高达40%、高达30%、高达25%、高达20%、高达15%、高达10%或高达5%)的侧链与主题阳离子多肽(例如,HTP;例如,具有半胱氨酸残基的HTP)缀合。因此,HTP可以从如阳离子氨基酸聚合物等聚合物的主链中分支出来。

[0294] 在一些情况下,可以使用如类肽(多肽)、聚酰胺、树状聚合物等组分促进支化结构的形成。例如,在一些情况下,类肽(例如,多肽)用作具有主题递送分子的组合物的一部分,例如,以产生网状(例如,蜘蛛网状)结构,所述网状结构在一些情况下可以促进凝聚。

[0295] 本文中的一个或多个天然或修饰的多肽序列可以用末端或间断的精氨酸、赖氨酸或组氨酸序列修饰。在一个实施例中,每个多肽包含在纳米颗粒核内的相等的胺摩尔浓度中。在该实施例中,每个多肽的C-末端可以用5R(5个精氨酸)修饰。在一些实施方案中,每个多肽的C-末端可以用9R(9个精氨酸)修饰。在一些实施方案中,每个多肽的N-末端可以用5R(5个精氨酸)修饰。在一些实施方案中,每个多肽的N-末端可以用9R(9个精氨酸)修饰。在一些情况下,H2A、H2B、H3和/或H4组蛋白片段(例如,HTP)各自与FKFL组织蛋白酶B蛋白水解切割结构域或RGFFP组织蛋白酶D蛋白水解切割结构域串联桥接。在一些情况下,H2A、H2B、H3和/或H4组蛋白片段(例如,HTP)可以由5R(5个精氨酸)、9R(9个精氨酸)、5K(5个赖氨酸)、9K(9个赖氨酸)、5H(5个组氨酸)或9H(9个组氨酸)阳离子间隔结构域串联桥接。在一些情况下,一个或多个H2A、H2B、H3和/或H4组蛋白片段(例如,HTP)在其N-末端处与鱼精蛋白二硫键合。

[0296] 为了说明如何产生支化组蛋白结构,提供了制备的示例方法。这种方法的一个实例包含以下:共摩尔比率的组蛋白H2AX[134-143]、组蛋白H3[1-21Cys]、组蛋白H3[23-34Cys]、组蛋白H4[8-25WC]以及SV40T-Ag衍生的NLS的共价修饰可以在与10%吡啶基二硫化物修饰的聚(L-赖氨酸)[MW=5400、18000或45000Da;n=30、100或250]的反应中进行。在典型的反应中,可以将29 μ L、700 μ M的Cys-修饰的组蛋白/NLS(20nmol)水溶液加入到57 μ L、0.2M的磷酸盐缓冲液(pH 8.0)中。其次,然后可以将14 μ L、100 μ M的吡啶基二硫化物保护的聚(赖氨酸)溶液添加到组蛋白溶液中以使最终体积达到100 μ L,其中吡啶基二硫化物基团与半胱氨酸残基的比率为1:2。该反应可以在室温下进行3小时。所述反应可以重复四次并且可以通过在343nm处的吡啶-2-硫酮的吸光度来确定缀合度。

[0297] 作为另一个实例,摩尔比为0:1、1:4、1:3、1:2、1:1、1:2、1:3、1:4或1:0的组蛋白H3[1-21Cys]肽、组蛋白H3[23-34Cys]肽的共价修饰可以在与10%吡啶基二硫化物修饰的聚(L-赖氨酸)或聚(L-精氨酸)[MW=5400、18000或45000Da;n=30、100或250]的反应中进行。在典型的反应中,可以将29 μ L、700 μ M的Cys-修饰的组蛋白(20nmol)水溶液加入到57 μ L、0.2M的磷酸盐缓冲液(pH 8.0)中。其次,然后可以将14 μ L、100 μ M的吡啶基二硫化物保护的聚(赖氨酸)溶液添加到组蛋白溶液中以使最终体积达到100 μ L,其中吡啶基二硫化物基团与半胱氨酸残基的比率为1:2。该反应可以在室温下进行3小时。所述反应可以重复四次并且可以通过在343nm处的吡啶-2-硫酮的吸光度来确定缀合度。

[0298] 在一些情况下,阴离子聚合物与靶向配体缀合。

[0299] 核定位序列(NLS)

[0300] 在一些实施方案中,阳离子多肽组合物的阳离子多肽(例如,组蛋白或HTP,例如

H1、H2、H2A、H2AX、H2B、H3或H4)包括(和/或缀合至)一个或多个(例如,两个或更多个,三个或更多个,或四个或更多个)核定位序列(NLS)。因此,在一些情况下,主题纳米颗粒的阳离子多肽组合物包括含有NLS的肽。在一些情况下,主题纳米颗粒的组蛋白蛋白(或HTP)包括一个或多个(例如,两个或更多个、三个或更多个)天然核定位信号(NLS)。在一些情况下,主题纳米颗粒的组蛋白(或HTP)包含与组蛋白异源的一个或多个(例如,两个或更多个、三个或更多个)NLS(即,作为组蛋白/HTP的一部分天然存在的NLS,例如,可以人为添加NLS)。在一些情况下,HTP在N-和/或C-末端包括NLS。

[0301] 在一些实施方案中,阳离子聚合物组合物的阳离子氨基酸聚合物(例如,聚(精氨酸)(PR);聚(赖氨酸)(PK);聚(组氨酸)(PH);聚(鸟氨酸);聚(瓜氨酸);聚(D-精氨酸)(PDR);聚(D-赖氨酸)(PDK);聚(D-组氨酸)(PDH);聚(D-鸟氨酸);聚(D-瓜氨酸);聚(L-精氨酸)(PLR);聚(L-赖氨酸)(PLK);聚(L-组氨酸)(PLH);聚(L-鸟氨酸)和聚(L-瓜氨酸))包含(和/或缀合至)一个或两个(例如,两个或更多个、三个或更多个或者四个或更多个)NLS。在一些情况下,所述阳离子氨基酸聚合物在N-末端和/或C-末端上包含NLS。在一些情况下,所述阳离子氨基酸聚合物包含内部NLS。

[0302] 在一些实施方案中,阴离子聚合物组合物的阴离子氨基酸聚合物(例如,聚(谷氨酸)(PEA)、聚(天冬氨酸)(PDA)、聚(D-谷氨酸)(PDEA)、聚(D-天冬氨酸)(PDDA)、聚(L-谷氨酸)(PLEA)、聚(L-天冬氨酸)(PLDA))包含一个或多个(例如,两个或更多个、三个或更多个或者四个或更多个)NLS(和/或与其缀合)。在一些情况下,所述阴离子氨基酸聚合物在N-末端和/或C-末端上包含NLS。在一些情况下,所述阴离子氨基酸聚合物包含内部NLS。

[0303] 可以使用任何方便的NLS(例如,与组蛋白、HTP、阳离子氨基酸聚合物、阴离子氨基酸聚合物等缀合)。实例包括但不限于1类和2类‘单颗粒NLS’,以及3-5类的NLS(参见例如图16,其改编自Kosugi等人,《生物化学杂志》(J Biol Chem.)2009年1月2日;284(1):478-85)。在一些情况下,NLS具有下公式: $(K/R)(K/R)X_{10-12}(K/R)_{3-5}$ 。在一些情况下,NLS具有以下公式: $K(K/R)X(K/R)$ 。

[0304] 在一些实施方案中,阳离子多肽组合物的阳离子多肽包括一个或多个(例如,两个或更多个,三个或更多个,或四个或更多个)NLS。在一些情况下,阳离子多肽不是组蛋白或组蛋白片段(例如,不是HTP)。因此,在一些情况下,阳离子多肽组合物的阳离子多肽是含NLS的肽。

[0305] 在一些情况下,含NLS的肽包含半胱氨酸残基,其可以促进缀合至:阳离子(或在一些情况下为阴离子)氨基酸聚合物、接头、HTP的组蛋白和/或其他阳离子多肽(例如,在某些情况下,作为支化组蛋白结构的一部分)。例如,半胱氨酸残基可用于通过巯基化学(例如,二硫键)和/或胺反应性化学进行交联(缀合)。在一些情况下,所述半胱氨酸残基是内部的。在一些情况下,所述半胱氨酸残基定位于N-末端和/或C-末端处。在一些情况下,阳离子多肽组合物的含NLS的肽包括添加半胱氨酸残基的突变(例如,插入或取代)(例如,相对于野生型氨基酸序列)。

[0306] 可用作含NLS的肽(或与任何方便的阳离子多肽如HTP或阳离子聚合物或阳离子氨基酸聚合物或阴离子氨基酸聚合物缀合)的NLS的实例包括但不限于(其中一些包括半胱氨酸残基):

[0307] PKKKRKV (SEQ ID NO:151) (T-ag NLS)

- [0308] PKKKRKVEDPYC (SEQ ID NO:152) -SV40T-Ag衍生的NLS
- [0309] PKKKRKVGPKKKRKVGPKKKRKVGPKKKRKVGC (SEQ ID NO:153) (NLS SV40)
- [0310] CYGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:154) -半胱氨酸-TAT的N-末端半胱氨酸
- [0311] CSIPPEVKFNKPFVYLI (SEQ ID NO:155)
- [0312] DRQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:156)
- [0313] PKKKRKVEDPYC (SEQ ID NO:157) -SV40T-Ag衍生的NLS的C-末端半胱氨酸
- [0314] PAAKRVKLD (SEQ ID NO:158) [cMyc NLS]
- [0315] 对于可以使用的NLS的非限制性实例,参见例如Kosugi等人,《生物化学杂志》(J Biol Chem.) 2009年1月2日;284(1):478-85,例如,参见本公开的图16。
- [0316] 线粒体定位信号
- [0317] 在一些实施方案中,主题纳米颗粒的阳离子多肽(例如,组蛋白或HTP,例如H1、H2、H2A、H2AX、H2B、H3或H4)、阴离子聚合物和/或阳离子聚合物包括(和/或缀合至)一个或多个(例如,两个或更多个,三个或更多个,或四个或更多个)线粒体定位序列。可以使用任何方便的线粒体定位序列。线粒体定位序列的实例包括但不限于:
PEDEIWLPEPESVDVPAKPISTSSMMMP (SEQ ID NO:149)、SDHB的线粒体定位序列、单/二/三苯基膦或其他膦、VAMP 1A、VAMP 1B、DGAT2的67个N端氨基酸和Bax的20个N端氨基酸。
- [0318] 有效负载
- [0319] 本公开的纳米颗粒包括由核酸和/或蛋白构成的有效负载。例如,在一些情况下,主题纳米颗粒用于递送核酸有效负载(例如,DNA和/或RNA)。核酸有效负载可以是任何目的核酸,例如,核酸有效负载可以是线性的或环状的,并且可以是质粒;病毒基因组;RNA(例如,如mRNA等编码RNA或如引导RNA、短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)等非编码RNA);DNA等。在一些情况下,所述核酸有效负载是RNAi剂(例如,shRNA、siRNA、miRNA等)或编码RNAi剂的DNA模板。在一些情况下,所述核酸有效负载是siRNA分子(例如,靶向mRNA的siRNA分子,靶向miRNA的siRNA分子)。在一些情况下,所述核酸有效负载是LNA分子(例如,靶向miRNA的LNA分子)。在一些情况下,所述核酸有效负载是miRNA。在一些情况下,所述核酸有效负载包含编码目的蛋白(例如,一种或多种重编程和/或转分化因子,如Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanog和Lin28;例如,单独或以任何期望的组合,如(i) Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc;(ii) Oct4、Sox2、Nanog和Lin28;等;基因编辑核酸内切酶;治疗性蛋白;等)的mRNA。在一些情况下,所述核酸有效负载包含非编码RNA(例如,RNAi剂、CRISPR/Cas引导RNA等)和/或编码非编码RNA的DNA分子。在一些实施方案中,核酸有效负载包括编码IL2R α 和IL12R γ 的核酸(DNA和/或mRNA)(例如,以调节靶细胞的行为或存活),并且在一些情况下,有效负载在7-90天(例如,7-80、7-60、7-50、7-40、7-35或7-30天)的过程中在细胞内从主题纳米颗粒释放。在一些实施方案中,核酸有效负载包含编码BCL-XL的核酸(DNA和/或mRNA)(例如,以防止由于Fas或TNF α 受体的接合而导致的靶细胞凋亡)。在一些实施方案中,核酸有效负载包含编码Foxp3的核酸(DNA和/或mRNA)(例如,以促进靶向T细胞中的免疫效应表型)。在一些实施方案中,核酸有效负载包含编码SCF的核酸(DNA和/或mRNA)。在一些实施方案中,核酸有效负载包含编码HoxB4的核酸(DNA和/或mRNA)。在一些实施方案中,核酸有效负载包含编码SIRT6的核酸(DNA和/或mRNA)。在一些实施方案中,核酸有效负载包含靶向(降低微RNA的表达)如miR-155等微RNA的核酸分子(例如,siRNA、LNA等)(参见,例如,MiR库

(Base) 登录号:MI0000681和MI0000177)。在一些实施例中,核酸有效负载包含靶向ku70的siRNA和/或靶向ku80的siRNA。

[0320] 术语“核酸有效负载”包含修饰的核酸。同样,术语“RNAi剂”和“siRNA”包含修饰的核酸。例如,核酸分子可以是模拟物;可以包含修饰的糖骨架、一个或多个修饰的核苷间连接(例如,一个或多个硫代磷酸酯和/或杂原子核苷间连接)、一个或多个修饰的碱基等。在一些实施例中,主题有效负载包含三链形成肽核酸(PNA)(参见,例如,McNeer等人,《基因疗法》(Gene Ther.) 2013年6月;20(6):658-69)。因此,在一些情况下,主题核包含PNA。在一些情况下,主题核包含PNA和DNA。

[0321] 主题核酸有效负载(例如,siRNA)可以具有吗啉代骨架结构。在一些情况下,主题核酸有效负载(例如,siRNA)可以具有一个或多个锁核酸(LNA)。合适的糖取代基包含甲氧基(-O-CH₃)、氨基丙氧基(--O-CH₂CH₂CH₂NH₂)、烯丙基(-CH₂-CH=CH₂)、-O-烯丙基(--O--CH₂-CH=CH₂)以及氟(F)。2'-糖取代基可以在阿拉伯糖(上)位置或核糖(下)位置。合适的碱基修饰包含合成核碱基和天然核碱基,如5-甲基胞嘧啶(5-me-C);5-羟甲基胞嘧啶;黄嘌呤;次黄嘌呤;2-氨基腺嘌呤;腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物;腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物;2-硫尿嘧啶;2-硫代胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶;5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶;5-丙炔基(-C≡C-CH₃)尿嘧啶和胞嘧啶以及其它嘧啶碱基的炔基衍生物;6-偶氮尿嘧啶;胞嘧啶和胸腺嘧啶;5-尿嘧啶(假尿嘧啶);4-硫尿嘧啶;8-卤素;8-氨基;8-硫醇;8-硫代烷基;8-羟基和其它8-取代腺嘌呤和鸟嘌呤;5-卤基尤其是5-溴、5-三氟甲基和其它5-取代尿嘧啶和胞嘧啶;7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤;2-F-腺嘌呤;2-氨基腺嘌呤;8-氮鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤;7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤;以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。进一步修饰的核碱基包含三环嘧啶,如吩恶嗪胞苷(1H-嘧啶并(5,4-b)(1,4)苯并恶嗪-2(3H)-酮);吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并(5,4-b)(1,4)苯并噻嗪-2(3H)-酮);G-钳位,如取代的吩恶嗪胞苷(例如9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶并(5,4-b)(1,4)苯并恶嗪-2(3H)-酮);咪唑胞苷(2H-嘧啶并(4,5-b)吡咯-2-酮);吡啶并咪唑胞苷(H-吡啶并(3',2':4,5)吡咯并(2,3-d)嘧啶-2-酮)。

[0322] 在一些情况下,核酸有效负载可以包含缀合物部分(例如,增强核酸有效负载的活性、稳定性、细胞分布或细胞摄取的一个缀合物部分)。这些部分或缀合物可以包含与如伯羟基基团或仲羟基基团等官能团共价结合的缀合物基团。缀合物基团包含但不限于嵌入剂、报告分子、聚胺、聚酰胺、聚乙二醇、聚醚、提高寡聚物的药效性质的基团以及提高寡聚物的药代动力学性质的基团。合适的缀合物基团包含但不限于胆固醇、脂质、磷脂、生物素、吩嗪、叶酸、菲啶、葱醌、吡啶、荧光素、罗丹明、香豆素以及染料。提高药效性质的基团包含改善摄取、提高抗降解性和/或增强与靶核酸的序列特异性杂交的基团。增强药代动力学性质的基团包含改善主题核酸的摄取、分布、代谢或排泄的基团。

[0323] 任何方便的多核苷酸都可以用作主题核酸有效负载。实例包含但不限于:RNA和DNA的种类,其包含mRNA、m1A修饰的mRNA(在腺苷的位置1处的单甲基化)、siRNA、miRNA、适配子、shRNA、AAV衍生的核酸和支架、吗啉代RNA、类肽和肽核酸、cDNA、DNA折纸、具有合成核苷酸的DNA和RNA、具有预定义二级结构的DNA和RNA、前述的多聚体和寡聚体以及其序列可以编码如期望表达的任何蛋白或多肽等其它产物的有效负载。

[0324] 在一些情况下,主题纳米颗粒的有效负载包含蛋白。蛋白有效负载的实例包含但

不限于：可编程基因编辑蛋白（例如，转录激活因子样（TAL）效应子（TALE）；TALE核酸酶（TALEN）；锌指蛋白（ZFP）；锌指核酸酶（ZFN）；如格氏嗜盐碱杆菌Argonaute（NgAgo）等DNA引导的多肽；如Cas9、CasX、CasY、Cpf1等CRISPR/Cas RNA引导的多肽等）；转座子（例如，I类或II类转座子—例如，piggybac、睡美人、Tc1/mariner、Tol2、PIF/harbinger、hAT、mutator、merlin、transib、helitron、maverick、青蛙王子、minos、Himar1等）；大范围核酸酶（例如，I-SceI、I-CeuI、I-CreI、I-DmoI、I-ChuI、I-DirI、I-FlmI、I-FlmII、I-Anil、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-PanII、I-PanMI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-LtrI、I-GpiI、I-GZeI、I-OnuI、I-HjeMI、I-MsoI、I-TevI、I-TevII、I-TevIII、PI-MleI、PI-MtuI、PI-PspI、PI-Tli I、PI-Tli II、PI-SceV等）；megaTALs（参见，例如，Boissel等人，《核酸研究（Nucleic Acids Res）》2014年2月；42（4）：2591-2601）；SCF；BCL-XL；Foxp3；HoxB4；以及SiRT6。对于以上任何蛋白，主题纳米颗粒的有效负载可以包含编码蛋白的核酸（DNA和/或mRNA）和/或可以包含实际蛋白。

[0325] 基因编辑工具

[0326] 在一些情况下，核酸有效负载包含或编码基因编辑工具（即，基因编辑系统，例如，如可编程基因编辑系统等位点特异性基因编辑系统的组分）。例如，核酸有效负载可以包含以下一种或多种：(i) CRISPR/Cas引导RNA；(ii) 编码CRISPR/Cas引导RNA的DNA；(iii) 编码如锌指蛋白（ZFP）（例如，锌指核酸酶—ZFN）、转录激活因子样效应子（TALE）蛋白（例如，融合到核酸酶—TALEN）、如格氏嗜盐碱杆菌Argonaute（NgAgo）等DNA引导的多肽和/或CRISPR/Cas RNA引导的多肽（例如，Cas9、CasX、CasY、Cpf1等）等可编程基因编辑蛋白的DNA和/或RNA；(iv) DNA供体模板；(v) 编码位点特异性重组酶（例如，Cre重组酶、Dre重组酶、Flp重组酶、KD重组酶、B2重组酶、B3重组酶、R重组酶、Hin重组酶、Tre重组酶、PhiC31整合酶、Bxb1整合酶、R4整合酶、 λ 整合酶、HK022整合酶、HP1整合酶等）的核酸分子（DNA，RNA）；(vi) 编码解离酶和/或转化酶（例如，Gln、Hin、 γ δ 3、Tn3、Sin、Beta等）的DNA；以及(vii) 转座子和/或衍生自转座子（例如，如Tn3、Tn5、Tn7、Tn9、Tn10、Tn903、Tn1681等细菌转座子；如Tc1/mariner超家族转座子、PiggyBac超家族转座子、hAT超家族转座子、PiggyBac、睡美人、青蛙王子、Minos、Himar1等真核转座子）的DNA。在一些情况下，主题纳米颗粒用于递送蛋白有效负载，例如，如ZFP（例如，ZFN）、TALE（例如，TALEN）、如格氏嗜盐碱杆菌Argonaute（NgAgo）等DNA引导的多肽和/或CRISPR/Cas RNA引导的多肽（例如，Cas9、CasX、CasY、Cpf1等）等基因编辑蛋白；位点特异性重组酶（例如，Cre重组酶、Dre重组酶、Flp重组酶、KD重组酶、B2重组酶、B3重组酶、R重组酶、Hin重组酶、Tre重组酶、PhiC31整合酶、Bxb1整合酶、R4整合酶、 λ 整合酶、HK022整合酶、HP1整合酶等）；解离酶/转化酶（例如，Gln、Hin、 γ δ 3、Tn3、Sin、Beta等）；和/或转座酶（例如，与转座子相关的转座酶，如细菌转座子，如Tn3、Tn5、Tn7、Tn9、Tn10、Tn903、Tn1681等；或者如Tc1/mariner超家族转座子、PiggyBac超家族转座子、hAT超家族转座子、PiggyBac、睡美人、青蛙王子、Minos、Himar1等真核转座子）。在一些情况下，纳米颗粒用于递送核酸有效负载和蛋白有效负载，并且在一些此类情况下，有效负载包括核糖核蛋白复合物（RNP）。

[0327] 根据系统的性质和期望的结果，基因编辑系统（例如，如可编程基因编辑系统等位点特异性基因编辑系统）可以包含单个组分（例如，ZFP、ZFN、TALE、TALEN、位点特异性重组酶、解离酶/整合酶、转座酶、转座子等）或者可以包含多种组分。在一些情况下，基因编辑系

统包含至少两种组分。例如,在一些情况下,基因编辑系统(例如可编程基因编辑系统)包含(i)供体模板核酸;以及(ii)基因编辑蛋白(例如,可编程基因编辑蛋白,如ZFP、ZFN、TALE、TALEN;如格氏嗜盐碱杆菌Argonaute (NgAgo)等DNA引导的多肽;如Cas9、CasX、CasY或Cpf1等CRISPR/Cas RNA引导的多肽)或编码基因编辑蛋白的核酸分子(例如,如质粒或mRNA等DNA或RNA)。作为另一个实例,在一些情况下,基因编辑系统(例如,可编程基因编辑系统)包含(i)CRISPR/Cas引导RNA,或编码CRISPR/Cas引导RNA的DNA;以及(ii)CRISPR/Cas RNA引导的多肽(例如,Cas9、CasX、CasY、Cpf1等),或编码RNA引导的多肽的核酸分子(例如,如质粒或mRNA等DNA或RNA)。作为另一个实例,在一些情况下,基因编辑系统(例如可编程基因编辑系统)包含(i)NgAgo类似的引导DNA;以及(ii)DNA引导的多肽(例如,NgAgo),或编码DNA引导的多肽的核酸分子(例如,如质粒或mRNA等DNA或RNA)。在一些情况下,基因编辑系统(例如可编程基因编辑系统)包含至少三种组分:(i)供体DNA模板;(ii)CRISPR/Cas引导RNA,或编码CRISPR/Cas引导RNA的DNA;以及(iii)CRISPR/Cas RNA引导的多肽(例如,Cas9、CasX、CasY、Cpf1),或编码RNA引导的多肽的核酸分子(例如,如质粒或mRNA等DNA或RNA)。在一些情况下,基因编辑系统(例如可编程基因编辑系统)包含至少三种组分:(i)供体DNA模板;(ii)NgAgo类似的引导DNA,或编码NgAgo类似的引导DNA的DNA;以及(iii)DNA引导的多肽(例如,NgAgo),或编码DNA引导的多肽的核酸分子(例如,如质粒或mRNA等DNA或RNA)。

[0328] 在一些实施方案中,主题纳米颗粒用于递送基因编辑工具。换句话说,在一些情况下,有效负载包含一个或多个基因编辑工具。本文中使用的术语“基因编辑工具”指的是基因编辑系统的一个或多个组分。因此,在一些情况下,有效负载包含基因编辑系统并且在一些情况下,有效负载包含基因编辑系统的一个或多个组分(即,一个或多个基因编辑工具)。例如,靶细胞可能已经包含基因编辑系统的组分中的一个组分并且用户只需要添加其余的组分。在这种情况下,主题纳米颗粒的有效负载不一定包含给定基因编辑系统的所有组分。因此,在一些情况下,有效负载包含一个或多个基因编辑工具。

[0329] 作为说明性实例,靶细胞可能已经包含基因编辑蛋白(例如,ZFP;TALE;DNA引导的多肽(例如,NgAgo);CRISPR/Cas RNA引导的多肽,如Cas9、CasX、CasY、Cpf1等;如Cre重组酶、Dre重组酶、Flp重组酶、KD重组酶、B2重组酶、B3重组酶、R重组酶、Hin重组酶、Tre重组酶、PhiC31整合酶、Bxb1整合酶、R4整合酶、 λ 整合酶、HK022整合酶、HP1整合酶等位点特异性重组酶;如Gin、Hin、 $\gamma\delta 3$ 、Tn3、Sin、Beta等溶解酶/转化酶;转座酶等)和/或编码所述蛋白的DNA或RNA,并且因此有效负载可以包含以下中的一个或多个:(i)供体模板;以及(ii)CRISPR/Cas引导RNA,或编码CRISPR/Cas引导RNA的DNA;或NgAgo类似的引导DNA。同样地,靶细胞可能已经包含CRISPR/Cas引导RNA和/或编码引导RNA的DNA或NgAgo类似的引导DNA,并且有效负载可以包含以下中的一个或多个:(i)供体模板;以及(ii)CRISPR/Cas RNA引导的多肽(例如,Cas9、CasX、CasY、Cpf1等),或编码RNA引导的多肽的核酸分子(例如,如质粒或mRNA等DNA或RNA);或DNA引导的多肽(例如,NgAgo),或编码DNA引导的多肽的核酸分子。

[0330] 如本领域普通技术人员将理解的,基因编辑系统不需要是“编辑”核酸的系统。例如,应充分认识到,基因编辑系统可以用于以多种方式修饰靶核酸(例如,DNA和/或RNA),而不会在靶DNA中产生双链断裂(DSB)。例如,在一些情况下,双链靶DNA被切口(一条链被切割),并且在一些情况下(例如,在基因编辑蛋白缺乏核酸酶活性的一些情况下,例如,CRISPR/Cas RNA引导多肽可能在催化核酸酶结构域中具有突变),靶核酸根本未被切割。例

如,在一些情况下,具有或不具有核酸酶活性的CRISPR/Cas蛋白(例如,Cas9、CasX、CasY、Cpf1)与异源蛋白结构域融合。异源蛋白结构域可以为融合蛋白提供活性,如(i) DNA修饰活性(例如,核酸酶活性、甲基转移酶活性、去甲基化酶活性、DNA修复活性、DNA损伤活性、脱氨活性、歧化酶活性、烷基化活性、脱嘌呤活性、氧化活性、嘧啶二聚体形成活性、整合酶活性、转座酶活性、重组酶活性、聚合酶活性、连接酶活性、解旋酶活性、光解酶活性或糖基化酶活性);(ii) 转录调节活性(例如,与转录抑制因子或激活因子的融合);或(iii) 修饰与靶DNA缔合的蛋白(例如组蛋白)的活性(例如甲基转移酶活性、去甲基化酶活性、乙酰转移酶活性、脱乙酰酶活性、激酶活性、磷酸酶活性、泛素连接酶活性、去泛素化活性、腺苷酸化活性、去腺苷酸化活性、SUMO化活性、去SUMO化活性、核糖基化活性、去核糖基化活性、豆蔻酰化活性或去豆蔻酰化活性)。因此,基因编辑系统可以用于以不切割靶核酸的方式修饰靶核酸的应用中,并且还可以用于调节来自靶DNA的转录的应用中。

[0331] 有关可编程基因编辑工具的另外的信息(例如,如Cas9、CasX、CasY和Cpf1等CRISPR/Cas RNA指导的蛋白;如锌指核酸酶等锌指蛋白;如TALEN等TALE蛋白;CRISPR/Cas引导RNA等等)参照例如Dreier等人,(2001)《生物化学杂志(J Biol Chem)》276:29466-78;Dreier等人,(2000)《生物化学杂志》303:489-502;Liu等人,(2002)《生物化学杂志》277:3850-6;Dreier等人,(2005)《生物化学杂志》280:35588-97;Jamieson等人,(2003)《自然评论药物发现(Nature Rev Drug Discov)》2:361-8;Durai等人,(2005)《核酸研究》33:5978-90;Segal,(2002)《方法(Methods)》26:76-83;Porteus和Carroll,(2005)《自然生物技术(Nat Biotechnol)》23:967-73;Pabo等人,(2001)《生物化学年鉴(Annu Rev Biochem)》70:313-40;Wolfe等人,(2000)《生物物理和生物分子结构年鉴(Ann Rev Biophys Biomol Struct)》29:183-212;Segal和Barbas,(2001)《生物技术新见(Curr Opin Biotechnol)》12:632-7;Segal等人,(2003)《生物化学(Biochemistry)》42:2137-48;Beerli和Barbas,(2002)《自然生物技术》20:135-41;Carroll等人,(2006)《自然实验手册(Nature Protocols)》1:1329;Ordiz等人,(2002)《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》99:13290-5;Guan等人,(2002)《美国国家科学院院刊》99:13296-301;Sanjana等人,《自然实验手册》,7:171-192(2012);Zetsche等人,《细胞(Cell)》2015年10月22日;163(3):759-71;Makarova等人,《自然评论微生物学(Nat Rev Microbiol.)》2015年11月;13(11):722-36;Shmakov等人,《分子细胞(Mol Cell)》2015年11月5日;60(3):385-97;Jinek等人,《科学(Science)》2012年8月17日;337(6096):816-21;Chylinski等人,《RNA生物学(RNA Biol.)》2013年5月;10(5):726-37;Ma等人,《生物医学国际化研究(Biomed Res Int.)》2013;2013:270805;Hou等人,《美国科学院院报(Proc Natl Acad Sci U S A.)》2013年9月24日;110(39):15644-9;Jinek等人,《Elife》2013;2:e00471;Pattanayak等人,《自然生物技术》2013年9月;31(9):839-43;Qi等人,《细胞》2013年2月28日;152(5):1173-83;Wang等人,《细胞》2013年5月9日;153(4):910-8;Auer等人,《基因组研究(Genome Res.)》2013年10月31日;Chen等人,《核酸研究》2013年11月1日;41(20):e19;Cheng等人,《细胞研究(Cell Res.)》2013年10月;23(10):1163-71;Cho等人,《遗传学(Genetics)》2013年11月;195(3):1177-80;DiCarlo等人,《核酸研究》2013年4月;41(7):4336-43;Dickinson等人,《自然方法(Nat Methods)》2013年10月;10(10):1028-34;Ebina等人,《科学报告(Sci Rep.)》2013;3:2510;Fujii等人,《核酸研究》2013年11月1日1;

41 (20) :e187;Hu等人,《细胞研究》2013年11月;23 (11) :1322-5;Jiang等人,《核酸研究》2003年11月1日;41 (20) :e188;Larson等人,《自然实验手册》2013年11月;8 (11) :2180-96;Mali等人,《自然方法》2013年10月;10 (10) :957-63;Nakayama等人,《遗传学》2013年12月;51 (12) :835-43;Ran等人,《自然实验手册》2013年11月;8 (11) :2281-308;Ran等人,《细胞》2013年9月12日;154 (6) :1380-9;Upadhyay等人,《G3 (Bethesda) 》2013年12月9日;3 (12) :2233-8;Walsh等人,《美国科学院院报》2013年9月24日;110 (39) :15514-5;Xie等人,《分子植物 (Mol Plant) 》2013年10月9日;Yang等人,《细胞》2013年9月12日;154 (6) :1370-9;Briner等人,《分子细胞》2014年10月23日;56 (2) :333-9;Burststein等人,《自然》2016年12月22日-印刷前的电子出版物;Gao等人,《自然生物技术》2016年7月,34 (7) :768-73;以及国际专利申请公开第W02002099084号;第W000/42219号;第W002/42459号;第W02003062455号;第W003/080809号;第W005/014791号;第W005/084190号;第W008/021207号;第W009/042186号;第W009/054985号;和第W010/065123号;美国专利申请公开第20030059767号、第20030108880号、第20140068797号;第20140170753号;第20140179006号;第20140179770号;第20140186843号;第20140186919号;第20140186958号;第20140189896号;第20140227787号;第20140234972号;第20140242664号;第20140242699号;第20140242700号;第20140242702号;第20140248702号;第20140256046号;第20140273037号;第20140273226号;第20140273230号;第20140273231号;第20140273232号;第20140273233号;第20140273234号;第20140273235号;第20140287938号;第20140295556号;第20140295557号;第20140298547号;第20140304853号;第20140309487号;第20140310828号;第20140310830号;第20140315985号;第20140335063号;第20140335620号;第20140342456号;第20140342457号;第20140342458号;第20140349400号;第20140349405号;第20140356867号;第20140356956号;第20140356958号;第20140356959号;第20140357523号;第20140357530号;第20140364333号;第20140377868号;第20150166983号;和第20160208243号;以及美国专利第6,140,466号;第6,511,808号;第6,453,242号;第8,685,737号;第8,906,616号;第8,895,308号;第8,889,418号;第8,889,356号;第8,871,445号;第8,865,406号;第8,795,965号;第8,771,945号;和第8,697,359号;这些文献中的全部内容通过引用以其全文并入本文。

[0332] 在一些实施方案中,多于一种有效负载作为相同包装(例如,纳米颗粒)的一部分递送,例如,在一些情况下,不同有效负载是不同核的一部分。将多种有效负载作为相同包装(例如,纳米颗粒)的一部分递送的一个优点是每种有效负载的效率不被削弱。作为说明性实例,如果有效负载A和有效负载B在两个单独的包装(分别为包装A和包装B)中递送,则效率倍增,例如,如果包装A和包装B各自具有1%的转染效率,将有效负载A和有效负载B递送到相同细胞的几率为0.01% ($1\% \times 1\%$)。然而,如果有效负载A和有效负载B都作为相同包装的一部分(例如,相同纳米颗粒-包装A的一部分)递送,则将有效负载A和有效负载B递送到同一细胞的几率为1%,比0.01%提高100倍。

[0333] 同样地,在包装A和包装B各自具有0.1%转染效率的情况下,将有效负载A和有效负载B递送到相同细胞的几率为0.0001% ($0.1\% \times 0.1\%$)。然而,如果在这种情况下有效负载A和有效负载B都作为相同包装的一部分(例如,相同纳米颗粒-包装A的一部分)递送,则将有效负载A和有效负载B递送到相同细胞的几率为0.1%,比0.0001%提高1000倍。

[0334] 因此,在一些实施方案中,一种或多种基因编辑工具(例如,如上所述)与(例如,作为相同纳米颗粒的一部分)蛋白(和/或编码蛋白的DNA或mRNA)和/或提高基因组编辑效率的非编码RNA组合递送。在一些情况下,一种或多种基因编辑工具(例如,如上所述)与(例如,作为相同纳米颗粒的一部分)蛋白(和/或编码蛋白的DNA或mRNA)和/或控制细胞分裂和/或分化的非编码RNA组合递送。在一些情况下,一种或多种基因编辑工具(例如,如上所述)与(例如,作为相同纳米颗粒的一部分)蛋白(和/或编码蛋白的DNA或mRNA)和/或使细胞DNA修复机制偏向非同源末端连接(NHEJ)或同源定向修复(HDR)的非编码RNA组合递送。

[0335] 作为上述的非限制性实例,在一些实施方案中,一种或多种基因编辑工具可以与以下一种或多种组合递送:SCF(和/或编码SCF的DNA或mRNA)、HoxB4(和/或编码HoxB4的DNA或mRNA)、BCL-XL(和/或编码BCL-XL的DNA或mRNA)、SIRT6(和/或编码SIRT6的DNA或mRNA)、抑制miR-155的核酸分子(例如,siRNA和/或LNA)、降低ku70表达的核酸分子(例如,siRNA、shRNA、微RNA)和降低ku80表达的核酸分子(例如,siRNA、shRNA、微RNA)。

[0336] 对于可以与基因编辑工具组合递送的微RNA的实例,参见图18A。例如,以下微RNA可用于以下目的:用于阻断多能干细胞向外胚层谱系的分化:miR-430/427/302(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000738、MI0000772、MI0000773、MI0000774、MI0006417、MI0006418、MI0000402、MI0003716、MI0003717和MI0003718);用于阻断多能干细胞向内胚层谱系的分化:miR-109和/或miR-24(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000080、MI0000081、MI0000231和MI0000572);用于驱动多能干细胞向内胚层谱系的分化:miR-122(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000442和MI0000256)和/或miR-192(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000234和MI0000551);用于驱动外胚层祖细胞向角化细胞命运的分化:miR-203(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000283、MI0017343和MI0000246);用于驱动神经嵴干细胞向平滑肌命运的分化:miR-145(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000461、MI0000169和MI0021890);用于驱动神经干细胞向神经胶质细胞命运和/或神经元命运的分化:miR-9(参见,例如,MiR Base登录:MI0000466、MI0000467、MI0000468、MI0000157、MI0000720和MI0000721)和/或miR-124a(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000443、MI0000444、MI0000445、MI0000150、MI0000716和MI0000717);用于阻断中胚层祖细胞向软骨细胞命运的分化:miR-199a(参见,例如,MiR Base登录:MI0000242、MI0000281、MI0000241和MI0000713);用于驱动中胚层祖细胞向成骨细胞命运的分化:miR-296(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000747和MI0000394)和/或miR-2861(参见,例如,MiR Base登录号:MI0013006和MI0013007);用于驱动中胚层祖细胞向心肌命运的分化:miR-1(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000437、MI0000651、MI0000139、MI0000652、MI0006283);用于阻断中胚层祖细胞向心肌命运的分化:miR-133(参见,例如,MiR Base登录:MI0000450、MI0000451、MI0000822、MI0000159、MI0000820、MI0000821和MI0021863);用于驱动中胚层祖细胞向骨骼肌命运的分化:miR-214(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000290和MI0000698)、miR-206(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000490和MI0000249)、miR-1和/或miR-26a(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000083、MI0000750、MI0000573和MI0000706);用于阻断中胚层祖细胞向骨骼肌命运的分化:miR-133(参见,例如,MiR Base登录:MI0000450、MI0000451、MI0000822、MI0000159、MI0000820、MI0000821和MI0021863)、miR-221(参见,例如,MiR碱基登录:MI0000298和MI0000709)和/或miR-222(参见,例如,MiR

Base登录号:MI0000299和MI0000710);用于驱动造血祖细胞向分化的分化:miR-223(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000300和MI0000703);用于阻断造血祖细胞向分化的分化:miR-128a(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000447和MI0000155)和/或miR-181a(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000269、MI0000289、MI0000223和MI0000697);用于驱动造血祖细胞向淋巴祖细胞分化:miR-181(参见,例如,MiR Base登录:MI0000269、MI0000270、MI0000271、MI0000289、MI0000683、MI0003139、MI0000223、MI0000723、MI0000697、MI0000724、MI0000823和MI0005450);用于阻断造血祖细胞向淋巴祖细胞分化:miR-146(参见,例如,MiR Base登录:MI0000477、MI0003129、MI0003782、MI0000170和MI0004665);用于阻断造血祖细胞向骨髓祖细胞分化:miR-155、miR-24a和/或miR-17(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000071和MI0000687);用于驱动淋巴祖细胞向T细胞命运的分化:miR-150(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000479和MI0000172);用于阻断骨髓祖细胞向粒细胞命运的分化:miR-223(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000300和MI0000703);用于阻断骨髓祖细胞向单核细胞命运的分化:miR-17-5p(参见,例如,MiR Base登录号:MIMAT0000070和MIMAT0000649)、miR-20a(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000076和MI0000568),和/或miR-106a(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000113和MI0000406);用于阻断骨髓祖细胞向红细胞命运的分化:miR-150(参见,例如,MiR Base登录:MI0000479和MI0000172)、miR-155、miR-221(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000298和MI0000709)和/或miR-222(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000299和MI0000710);和用于驱动骨髓祖细胞向红细胞命运的分化:miR-451(参见,例如,MiR Base登录号:MI0001729、MI0017360、MI0001730和MI0021960)和/或miR-16(参见,例如,MiR Base登录号:MI0000070、MI0000115、MI0000565和MI0000566)。

[0337] 对于可以与基因编辑工具组合递送(例如,作为蛋白或作为编码蛋白的DNA或RNA)的信号传导蛋白(例如,细胞外信号传导蛋白)的实例,参见图18B。相同的蛋白可以与靶向配体类似的方式用作主题纳米颗粒的外壳的一部分,例如,以便使接收纳米颗粒的靶细胞中的分化偏向。例如,以下信号传导蛋白(例如,细胞外信号传导蛋白)可用于以下目的:用于驱动造血干细胞向共同淋巴祖细胞谱系分化:IL-7(参见,例如,NCBI基因ID 3574);用于驱动造血干细胞向共同骨髓祖细胞谱系分化:IL-3(参见,例如,NCBI基因ID 3562)、GM-CSF(参见,例如,NCBI基因ID 1437)和/或M-CSF(参见,例如,NCBI基因ID 1435);用于驱动共同淋巴祖细胞向B细胞命运的分化:IL-3、IL-4(参见,例如,NCBI基因ID:3565)和/或IL-7;用于驱动共同淋巴祖细胞向自然杀伤细胞命运的分化:IL-15(参见,例如,NCBI基因ID 3600);用于驱动共同淋巴祖细胞向T细胞命运的分化:IL-2(参见,例如,NCBI基因ID 3558)、IL-7和/或Notch(参见,例如,NCBI基因ID 4851、4853、4854、4855);用于驱动共同淋巴祖细胞向树突细胞命运的分化:F1t-3配体(参见,例如,NCBI基因ID 2323);用于驱动共同骨髓祖细胞向树突细胞命运的分化:F1t-3配体、GM-CSF和/或TNF- α (参见,例如,NCBI基因ID 7124);用于驱动共同骨髓祖细胞向粒细胞-巨噬细胞祖细胞谱系分化:GM-CSF;用于驱动共同骨髓祖细胞向巨核细胞-红细胞祖细胞谱系分化:IL-3、SCF(参见,例如,NCBI基因ID 4254)和/或Tpo(参见,例如,NCBI基因ID 7173);用于驱动巨核细胞-红细胞祖细胞向巨核细胞命运的分化:IL-3、IL-6(参见,例如,NCBI基因ID 3569)、SCF和/或Tpo;用于驱动巨核细胞-红细胞祖细胞向红细胞命运的分化:促红细胞生成素(参见,例如,NCBI基因ID

2056) ;用于驱动巨核细胞向血小板命运的分化:IL-11 (参见,例如,NCBI基因ID 3589) 和/或Tpo;用于驱动粒细胞-巨噬细胞祖细胞向单核细胞谱系分化:GM-CSF和/或M-CSF;用于驱动粒细胞-巨噬细胞祖细胞向成髓细胞谱系分化:GM-CSF;用于驱动单核细胞向单核细胞衍生的树突细胞命运的分化:Flt-3配体、GM-CSF、IFN- α (参见,例如,NCBI基因ID 3439) 和/或IL-4;用于驱动单核细胞向巨噬细胞命运的分化:IFN- γ 、IL-6、IL-10 (参见,例如,NCBI基因ID 3586) 和/或M-CSF;用于驱动成髓细胞向中性粒细胞命运的分化:G-CSF (参见,例如,NCBI基因ID 1440)、GM-CSF、IL-6和/或SCF;用于驱动成髓细胞向嗜酸性粒细胞命运的分化:GM-CSF、IL-3和/或IL-5 (参见,例如,NCBI基因ID 3567);并且用于驱动成髓细胞向嗜碱性粒细胞命运的分化:G-CSF、GM-CSF和/或IL-3。

[0338] 可以与基因编辑工具组合递送的蛋白的实例(例如,作为蛋白和/或核酸,诸如编码所述蛋白的DNA或RNA)包括但不限于:SOX17、HEX、OSKM (Oct4/Sox2/Klf4/c-myc) 和/或bFGF (例如,以驱动向肝干细胞谱系的分化);HNF4a (例如,以驱动向肝细胞命运的分化);聚(I:C)、BMP-4、bFGF和/或8-Br-cAMP (例如,以驱动向内皮干细胞/祖细胞谱系的分化);VEGF (例如,以驱动向动脉内皮命运的分化);Sox-2、Brn4、Myt11、Neurod2、Ascl1 (例如,以驱动向神经干细胞/祖细胞谱系的分化);和BDNF、FCS、毛喉素 (Forskolin) 和/或SHH (例如,以驱动向神经元、星形胶质细胞和/或少突胶质细胞命运的分化)。

[0339] 可以与基因编辑工具组合递送(例如,作为蛋白和/或核酸,如编码所述蛋白的DNA或RNA)的信号传导蛋白(例如,细胞外信号传导蛋白)的实例包括但不限于:细胞因子(例如,IL-2和/或IL-15,例如,用于激活CD8+T细胞);配体和/或调节Notch、Wnt和/或Smad信号传导途径中的一种或多种的信号传导蛋白;SCF;干细胞分化因子(例如Sox2、Oct3/4、Nanog、Klf4、c-Myc等);和用于后续分离/纯化/浓缩的临时表面标记“标签”和/或荧光报告因子。例如,成纤维细胞可以通过Sox2的递送转化为神经干细胞,而在Oct3/4和小分子“表观遗传重置因子”的存在下它将变成心肌细胞。在有亨廷顿氏病 (Huntington's disease) 或CXCR4突变的患者中,这些成纤维细胞可分别编码与神经元和心肌细胞相关的患病表型性状。通过在单个包装中递送基因编辑校正和这些因子,可以显著降低由于引入的一种或多种但不是所有因子/有效负载而产生的有害影响的风险。

[0340] 因为可以控制有效负载释放的时间和/或位置(在本公开的其他地方有更详细的描述),所以将多个有效负载包装在相同包装(例如,相同纳米颗粒)中并不妨碍人们实现不同有效负载的不同释放时间和/或位置。例如上述蛋白(和/或编码蛋白的DNA或mRNA)和/或非编码RNA的释放可以与作为相同包装的一部分的所述一个或多个基因编辑工具的释放分别控制。例如,控制细胞增殖和/或分化,或控制向NHEJ或HDR的偏向的蛋白和/或核酸(例如,DNA、mRNA、非编码RNA、miRNA)可以比所述一种或多种基因编辑工具更早释放或者可以比所述一种或多种基因编辑工具更晚释放。这可以例如通过使用多于一层可脱落层和/或通过使用多于一个核来实现(例如,其中一个核具有与另一个核不同的释放曲线,例如,使用不同的D-与L-异构体比率,使用不同的ESP:ENP:EPP比率等)。

[0341] ii.可脱落层(可脱落涂层)

[0342] 在一些实施方案中,主题纳米颗粒包括包围(包封)核的可脱落层(在本文中也称为“瞬态稳定层”)。在一些情况下,主题可脱落层可在初始细胞摄取之前和期间保护有效负载。例如,没有可脱落层,在细胞内化期间可能会损失大部分有效负载。一旦处于细胞环境

内,可脱落层“脱落”(例如,该层可以是pH-和/或谷胱甘肽敏感的),暴露所述核的组分。

[0343] 在一些情况下,主题可脱落层包括二氧化硅。在一些情况下,当主题纳米颗粒包括可脱落层(例如,二氧化硅)时,尽管细胞摄取的可能性降低,但仍可观察到更高的细胞内递送效率。不希望受任何特定理论的束缚,用可脱落层(例如,二氧化硅涂层)涂覆纳米颗粒核可以密封该核,使其稳定直至该层脱落,这导致有效负载释放(例如,在预期亚细胞区室内进行处理)。通过受体介导的内吞作用进入细胞后,纳米颗粒脱落其最外层,可脱落层在内体的酸化环境或细胞溶质的还原环境中降解,并暴露所述核,在一些情况下暴露定位信号如核定位信号(NLS)和/或线粒体定位信号。而且,由可脱落层包封的纳米颗粒核可以在血清中稳定并且可以适于体内施用。

[0344] 可以使用任何所需可脱落层,并且本领域的普通技术人员可以考虑他们希望有效负载在靶细胞中释放的情况(例如,条件,诸如低pH)(例如,内体、细胞溶质、细胞核、溶酶体等)。根据期望可脱落涂层脱落(并因此释放有效负载)的时间、位置和/或条件,可能更需要不同的可脱落层。例如,可脱落层可以是酸不稳定的。在一些情况下,可脱落层是阴离子可脱落层(阴离子涂层)。在一些情况下,可脱落层包含二氧化硅、类肽、聚半胱氨酸和/或陶瓷(例如,生物陶瓷)。在一些情况下,可脱落层包括以下中的一种或多种:钙、锰、镁、铁(例如,可脱落层可以是磁性的,例如 Fe_3MnO_2)和锂。这些中的每一种均可包括磷酸盐或硫酸盐。因而,在某些情况下,可脱落物包括以下中的一种或多种:磷酸钙、硫酸钙、磷酸锰、硫酸锰、磷酸镁、硫酸镁、磷酸铁、硫酸铁、磷酸锂和硫酸锂;其中每一种都可以对可脱落层将要“脱落”的方式和/或条件产生特定影响。因此,在一些情况下,可脱落层包括以下中的一种或多种:二氧化硅、类肽、聚半胱氨酸、陶瓷(例如生物陶瓷)、钙、磷酸钙、硫酸钙、锰、磷酸锰、硫酸锰、镁、磷酸镁、硫酸镁、铁、磷酸铁、硫酸铁、锂、磷酸锂和硫酸锂(其任意组合)(例如,可脱落层可以是二氧化硅、类肽、聚半胱氨酸、陶瓷(例如,生物陶瓷)、磷酸钙、硫酸钙、磷酸锰、硫酸锰、磷酸镁、硫酸镁、磷酸铁、硫酸铁、磷酸锂、硫酸锂或其组合的涂层)。在一些情况下,可脱落层包括二氧化硅(例如,可脱落层可以是二氧化硅涂层)。在一些情况下,可脱落层包括藻酸盐凝胶。

[0345] 在一些情况下,需要不同有效负载的不同释放时间。例如,在一些情况下,希望早先释放有效负载(例如,在接触靶细胞的0.5-7天内),并且在一些情况下,希望稍晚释放有效负载(例如,在接触靶细胞的6-30天内)。例如,在一些情况下,可能需要在接触靶细胞的0.5-7天内(例如,在接触靶细胞的0.5-5天、0.5-3天、1-7天、1-5天、1-3天内)释放有效负载(例如,基因编辑工具,诸如CRISPR/Cas指导RNA,编码所述CRISPR/Cas指导RNA的DNA分子,CRISPR/Cas指导的多肽,和/或编码所述CRISPR/Cas RNA指导的多肽的核酸分子)。在一些情况下,可能需要在接触靶细胞的6-40天内(例如,在接触靶细胞的6-30、6-20、6-15、7-40、7-30、7-20、7-15、9-40、9-30、9-20或9-15天内)释放有效负载(例如,DNA供体模板,例如,用于同源定向修复-HDR)。在一些情况下,可通过在不同时间递送具有不同有效负载的纳米颗粒来控制释放时间。在一些情况下,可以通过同时递送纳米颗粒(作为不同制剂的一部分或作为相同制剂的一部分)来控制释放时间,其中纳米颗粒的组分被设计为实现所需释放时间。例如,可以使用降解更快或更慢的可脱落层,或多或少抗降解的核组分,或多或少易于解凝的核组分等-以及任何或所有组分可以以任何方便的组合选择以实现所需定时。

[0346] 在一些情况下,期望相对于另一有效负载(例如,一种或多种基因编辑工具)延迟

一种有效负载(例如,DNA供体模板)的释放。例如,在一些情况下,第一纳米颗粒包括供体DNA模板,因为有效负载被设计成使得有效负载在接触靶细胞的6-40天内(例如,在接触靶细胞的6-30、6-20、6-15、7-40、7-30、7-20、7-15、9-40、9-30、9-20或9-15天内)释放,而第二纳米颗粒包括一种或多种基因编辑工具(例如,ZFP或编码ZFP的核酸,TALE或编码TALE的核酸,ZFN或编码ZFN的核酸,TALEN或编码TALEN的核酸,CRISPR/Cas指导RNA或编码CRISPR/Cas指导RNA的DNA分子,CRISPR/Cas RNA指导的多肽或编码CRISPR/Cas RNA指导的多肽的核酸分子等),因为有效负载被设计成使得有效负载在接触靶细胞的0.5-7天内(例如,在接触靶细胞的0.5-5天、0.5-3天、1-7天、1-5天或1-3天内)释放。第二纳米颗粒可以是与第一纳米颗粒相同制剂的一部分或不同制剂的一部分。

[0347] 在一些情况下,纳米颗粒包括多于一种有效负载,其中期望有效负载在不同时间释放。这可以通过多种不同方式实现。例如,纳米颗粒可以具有多于一个核,其中一个核由可以提前(例如,在接触靶细胞的0.5-7天内,例如,在接触靶细胞的0.5-5天、0.5-3天、1-7天、1-5天或1-3天内)释放有效负载(例如,siRNA、mRNA和/或基因组编辑工具,诸如ZFP或编码ZFP的核酸,TALE或编码TALE的核酸,ZFN或编码ZFN的核酸,TALEN或编码TALEN的核酸,CRISPR/Cas指导RNA或编码CRISPR/Cas指导RNA的DNA分子,CRISPR/CasRNA指导的多肽或编码CRISPR/Cas RNA指导的多肽的核酸分子等)的组分制成而另一个由可以在延迟(例如,在接触靶细胞的6-40天内,例如在接触靶细胞的6-30、6-20、6-15、7-40、7-30、7-20、7-15、9-40、9-30、9-20或9-15天内)释放有效负载(例如,DNA供体模板)的组分制成。

[0348] 作为另一个实例,纳米颗粒可以包括一个以上的可脱落层,其中外部可脱落层脱落(释放有效负载)之后,内部可脱落层脱落(释放另一有效负载)。在一些情况下,内部有效负载是DNA供体模板(例如,用于同源定向修复-HDR)并且外部有效负载是一种或多种基因编辑工具(例如,ZFP或编码ZFP的核酸,TALE或核酸编码TALE的酸,ZFN或编码ZFN的核酸,TALEN或编码TALEN的核酸,CRISPR/Cas指导RNA或编码CRISPR/Cas指导RNA的DNA分子,CRISPR/Cas RNA指导的多肽或编码CRISPR/Cas RNA指导的多肽的核酸分子等)。内部和外部有效负载可以是任何所需有效负载,并且其中一种或两种可以包括例如一种或多种siRNA和/或一种或多种mRNA。因此,在一些情况下,纳米颗粒可具有多于一个可脱落层并且可设计成早先释放(例如,在接触靶细胞的0.5-7天内,例如,在接触靶细胞的0.5-5天、0.5-3天、1-7天、1-5天或1-3天内)一种有效负载(例如,siRNA、mRNA、基因组编辑工具,诸如ZFP或编码ZFP的核酸,TALE或编码TALE的核酸,ZFN或编码ZFN的核酸,TALEN或编码TALEN的核酸,CRISPR/Cas指导RNA或编码CRISPR/Cas指导RNA的DNA分子,CRISPR/Cas RNA指导的多肽或者编码CRISPR/Cas RNA指导的多肽的核酸分子等),而稍晚(例如,在接触靶细胞的6-40天内,例如,在接触靶细胞的6-30、6-20、6-15、7-40、7-30、7-20、7-15、9-40、9-30、9-20或9-15天内)释放另一种有效负载(例如,siRNA、mRNA、DNA供体模板)。

[0349] 在一些实施方案中(例如,在上文描述的实施方案中),改变的基因表达的时间可以用作有效负载释放时间的代表。作为说明性实例,如果期望确定到第12天是否已释放有效负载,则可以在第12天测定纳米颗粒递送的预期结果。例如,如果预期结果是例如通过递送siRNA降低靶细胞的靶基因的表达,则可以测定/监测靶基因的表达以确定siRNA是否已经释放。作为另一个实例,如果预期结果是例如通过递送编码目标蛋白的DNA或mRNA来表达目标蛋白,则可以测定/监测目标蛋白的表达以确定有效负载是否已经释放。作为又一个实

例,如果预期结果是例如通过切割基因组DNA和/或插入供体DNA模板来改变靶细胞的基因组,可以测定/监测来自靶基因座的表达和/或基因组改变的存在以确定有效负载是否已经释放。

[0350] 因此,在一些情况下,可脱落层提供纳米颗粒组分的阶段性释放。例如,在一些情况下,纳米颗粒具有多于一个(例如,两个、三个或四个)可脱落层。例如,对于具有两个可脱落层的纳米颗粒,此类纳米颗粒从最内部到最外部可以具有:核,例如具有第一有效负载;第一可脱落层、中间层,例如具有第二有效负载;和包围中间层的第二可脱落层(参见,例如图9)。此类构造(多个可脱模层)便于各种所需有效负载的阶段性释放。作为进一步的说明性实例,具有两个可脱落层的纳米颗粒(如上所述)可以包括在核中的一种或多种所需基因编辑工具(例如,以下中的一种或多种:DNA供体模板,CRISPR/Cas指导RNA,编码CRISPR/Cas指导RNA的DNA等),以及在中间层中的另一种所需基因编辑工具(例如,以下中的一种或多种:可编程基因编辑蛋白,诸如

[0351] CRISPR/Cas蛋白、ZFP、ZFN、TALE、TALEN等;编码可编程基因编辑蛋白的DNA或RNA;CRISPR/Cas指导RNA;编码CRISPR/Cas指导RNA的DNA;等等)-其呈任何所需的组合。

[0352] 在实施例部分中可以找到添加可脱落层(例如,以适当停留时间(流速)通过微流体混合芯片的两种溶液)的实例。

[0353] 替代包装(例如,脂质制剂)

[0354] 在一些实施方案中,主题核(例如,包括上述组分和/或构造的任何组合)是基于脂质的递送系统,例如阳离子脂质递送系统的一部分(参见,例如,Chesnoy和Huang,《生物物理学与生物分子结构年评》(Annu Rev Biophys Biomol Struct.) 2000,29:27-47;Hirko等人,《当代药物化学》(Curr Med Chem.) 2003年7月10日(14):1185-93;和Liu等人,《当代药物化学》(Curr Med Chem.) 2003年7月10日(14):1307-15)。在一些情况下,主题核(例如,包括上述组分和/或构造的任何组合)未被可脱落层包围。如上所述,核可包括阴离子聚合物组合物(例如,聚(谷氨酸))、阳离子聚合物组合物(例如,聚(精氨酸)、阳离子多肽组合物(例如,组蛋白尾肽)和有效负载(例如,核酸和/或蛋白有效负载)。

[0355] 在核是基于脂质的递送系统的一部分的一些情况下,设计核时考虑了定时和/或定位释放。例如,在一些情况下,核包括ESP、ENP和/或EPP,并且在一些此类情况下,这些组分成比率存在,使得有效负载释放延迟到核(例如,如上所述)遇到所需条件(例如,细胞位置、细胞条件诸如pH、特定酶的存在等)。在一些此类实施方案中,核包括阴离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阴离子氨基酸的L-异构体的聚合物,并且在一些情况下,D-和L-异构体的聚合物相对于彼此,在特定比率范围内(例如,如上所述)存在。在一些情况下,核包括阳离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阳离子氨基酸的L-异构体的聚合物,并且在一些情况下,D-和L-异构体的聚合物相对于彼此,在特定比率范围内(例如,如上所述)存在。在一些情况下,核包括阴离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阳离子氨基酸的L-异构体的聚合物,并且在一些情况下,D-和L-异构体的聚合物相对于彼此,在特定比率范围内(例如,如上所述)存在。在一些情况下,核包括阴离子氨基酸的L-异构体的聚合物和阳离子氨基酸的D-异构体的聚合物,并且在一些情况下,D-和L-异构体的聚合物相对于彼此,在特定比率范围内(例如,如上所述)存在。在一些情况下,核包括含有NLS(例如,如上所述)的蛋白。在一些情况下,核包括HTP(例如,如上所述)。

[0356] 阳离子脂质是非病毒载体,可用于基因递送并具有使质粒DNA凝聚的能力。在合成N-[1-(2,3-二油氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵用于脂质转染后,改善阳离子脂质的分子结构已成为活跃领域,包括头基、接头和疏水结构域修饰。修饰包括使用多价聚胺,其可以通过增强的表面电荷密度改善DNA结合和递送,以及使用基于甾醇的疏水性基团如3β-[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇,其可以限制毒性。辅助脂质如二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)可用于通过增强的脂质体疏水性和六方晶反相转变来改善转基因表达,以促进内体逃逸。在一些情况下,脂质制剂包括以下中的一种或多种:DLin-DMA、DLin-K-DMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA、98N12-5、C12-200、胆固醇、PEG-脂质、脂聚胺、地塞米松-精胺(DS)和二取代的精胺(D₂S)(例如,由地塞米松与聚胺精胺缀合产生)。DLin-DMA、DLin-K-DMA、DLin-KC2-DMA、98N12-5、C12-200和DLin-MC3-DMA可以通过本领域概述的方法合成(参见,例如,Heyes等人,《控制释放杂志》(J. Control Release),2005,107,276-287; Semple等人,《自然生物技术》(Nature Biotechnology),2010,28,172-176;Akinc等人,《自然生物技术》(Nature Biotechnology),2008,26,561-569;Love等人,PNAS,2010,107,1864-1869;国际专利申请公开W02010054401;其全部通过引用整体并入本文。

[0357] 各种基于脂质的递送系统的实例包括但不限于以下出版物中描述的那些:国际专利公开号W02016081029;美国专利申请公开号US20160263047和US20160237455;和美国专利号9,533,047;9,504,747;9,504,651;9,486,538;9,393,200;9,326,940;9,315,828;和9,308,267;其全部通过引用整体并入本文。

[0358] 因此,在一些情况下,主题核被脂质(例如,阳离子脂质,诸如LIPOFECTAMINE转染试剂)包围。在一些情况下,主题核存在于脂质制剂(例如,脂质纳米颗粒制剂)中。脂质制剂可包括脂质体和/或脂质复合物(lipoplex)。脂质制剂可包括乙醇稀释形成的自发性囊泡(SNALP)脂质体(例如,包含阳离子脂质和中性辅助脂质的脂质体可涂覆有聚乙二醇(PEG)和/或鱼精蛋白)。

[0359] 脂质制剂可以是基于类脂质(lipidoid)的制剂。已经广泛描述了类脂质的合成,并且含有这些化合物的制剂可以包括在主题脂质制剂中(参见,例如,Mahon等人,《生物共轭化学》(Bioconjug Chem.)2010 21:1448-1454;Schroeder等人,《内科杂志》(J Intern Med.)2010 267:9-21;Akinc等人,《自然生物科技》(Nat Biotechnol.)2008 26:561-569;Love等人,《美国国家科学协会公报》(Proc Natl Acad Sci USA.)2010 107:1864-1869;和Siegwart等人,《美国国家科学协会公报》(Proc Natl Acad Sci USA.)2011 108:12996-3001;其全部通过引用整体并入本文)。在一些情况下,主题脂质制剂可包括以下中的一种或多种(以任何所需组合):1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱(DOPC);1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(DOPE);N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA);1,2-二油酰氧基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP);双十八烷基酰胺基甘氨酸精胺(DOGS);N-(3-氨基丙基)-N,N-二甲基-2,3-双(十二烷氧基)-1(GAP-DLRIE);溴化丙炔;十六烷基三甲基溴化铵(CTAB);6-月桂基己鸟氨酸(LHON);1-(2,3-二油酰氧基丙基)-2,4,6-三甲基吡啶(20c);2,3-二油烯基氧基-N-[2(精胺甲酰氨基-乙基)-N,N-二甲基-1(DOSPA);三氟乙酸丙胺;1,2-二油烯基-3-三甲基铵-丙烷(DOPA);N-(2-羟乙基)-N,N-二甲基-2,3-双(十四烷氧基)-1(MDRIE);溴丙铵;二肉豆蔻氧基丙基二甲基羟乙基溴化铵(DMRI);3β-[N-(N',N'-二甲氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇DC-Chol;双胍-tren-胆固醇(BGTC);1,3-

二脱氧-2-(6-羧基-精)-丙酰胺(DOSPER);二甲基十八烷基溴化铵(DDAB);双十八烷基酰胺基甘氨酸亚精胺(DSL);rac-[2,3-双十八烷基氧基丙基)(2-羟乙基)]-二甲基铵(CLIP-1);氯化rac-[2(2,3-双十六烷基氧基丙基)(氧基甲氧基)乙基]三甲基溴化铵;乙基二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(EDMPC);1,2-二硬脂酰氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DSDMA);1,2-二肉豆蔻酰基-三甲基铵丙烷(DMTAP);0,0'-二肉豆蔻基-N-赖氨酸天冬氨酸(DMKE);1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-乙基磷酸胆碱(DSEPC);N-棕榈酰基D-赤型-鞘氨醇氨基甲酰-精胺(CCS);N-叔丁基-N'-十四烷基-3-十四烷基氨基丙脒;双C14脒;十八烯氧基[乙基-2-十七烯基-3-羟乙基]咪唑啉(DOTIM);氯化N1-胆甾基氧基羰基-3,7-二氮杂壬烷-1,9-二胺(CDAN);2-[3-[双(3-氨基丙基)氨基]丙基氨基]-N-[2-[二(十四烷基)氨基]-2-氧代乙基]乙酰胺(RPR209120);双十四烷基氨基甲酰甲基-乙酰胺;1,2-二亚油氧基-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]-二氧戊环;DLin-KC2-DMA;亚油基-甲基-4-二甲氨基丁酸酯;DLin-MC3-DMA;DLin-K-DMA;98N12-5;C12-200;胆固醇;PEG-脂质;脂聚胺;地塞米松-精胺(DS);和二取代的精胺(D₂S)。

[0360] iii. 表面涂层(外壳)

[0361] 在一些情况下,可脱落层(涂层)本身涂有附加层,本文称为“外壳”、“外涂层”或“表面涂层”。表面涂层可以起到多种不同的作用。例如,表面涂层可以增加递送效率和/或可以使主题纳米颗粒靶向特定细胞类型。表面涂层可包括肽、聚合物或配体-聚合物缀合物。表面涂层可包括靶向配体。例如,可以将一种或多种靶向配体(有或无接头结构域)的水溶液添加到有涂层的纳米颗粒悬浮液(涂覆有可脱落层的纳米颗粒的悬浮液)。例如,在一些情况下,(锚定结构域的)质子化锚定残基的最终浓度为25至300 μ M。在一些情况下,添加表面涂层的过程产生单分散的颗粒悬浮液,其平均粒度为50至150nm且 ζ 电位为0至-10mV。

[0362] 在一些情况下,表面涂层与最外面的可脱落层以静电方式相互作用。例如,在一些情况下,纳米颗粒具有两个可脱落层(例如,从最内部到最外部:核,例如具有第一有效负载;第一可脱落层、中间层,例如具有第二有效负载;和包围中间层的第二可脱落层),并且外壳(表面涂层)可以与第二可脱落层相互作用(例如,静电)。在一些情况下,纳米颗粒仅有一个可脱落层(例如,阴离子二氧化硅层),并且外壳在一些情况下可以与可脱落层以静电方式相互作用。

[0363] 因此,在可脱落层(例如,最外面的可脱落层)是阴离子型的情况下(例如,在可脱落层是二氧化硅涂层的一些情况下),如果表面涂层包含阳离子组分,则表面涂层可与可脱落层以静电方式相互作用。例如,在一些情况下,表面涂层包括递送分子,其中靶向配体与阳离子锚定结构域缀合。阳离子锚定域与可脱落层以静电方式相互作用并将递送分子锚定到纳米颗粒上。同样地,在可脱落层(例如,最外面的可脱落层)是阳离子型的情况下,如果表面涂层包含阴离子组分,则表面涂层可与可脱落层以静电方式相互作用。

[0364] 在一些实施方案中,表面涂层包括细胞穿透肽(CPP)。在一些情况下,阳离子氨基酸的聚合物可以充当CPP(也称为'蛋白转导结构域'-PTD),这是用于指利于穿过脂质双层、胶束、细胞膜、细胞器膜或囊泡膜的多肽、多核苷酸、碳水化合物或有机或无机化合物的术语。附着于另一分子的PTD(例如,嵌入主题纳米颗粒的可脱落层和/或与之相互作用),其范围可以从小的极性分子到大的大分子和/或纳米颗粒,促进分子穿过膜,例如,从细胞外空间到细胞内空间,或细胞溶质到细胞器(例如,细胞核)内。

[0365] CPP的实例包括但不限于最小十一肽蛋白转导结构域(对应于包含YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:160)的HIV-1TAT的残基47-57;包含足以引导进入细胞的多个精氨酸(例如,3、4、5、6、7、8、9、10或10-50个精氨酸)的聚精氨酸序列;VP22结构域(Zender等人(2002)《癌症基因疗法》(Cancer Gene Ther.) 9(6):489-96);果蝇触角足蛋白转导结构域(Noguchi等人(2003)《糖尿病》(Diabetes) 52(7):1732-1737);截短的人降钙素肽(Trehin等人(2004)《药学研究》(Pharm.Research) 21:1248-1256);聚赖氨酸(Wender等人(2000)《美国国家科学协会公报》(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 97:13003-13008);RRQRRTSKLMKR (SEQ ID NO:161);TransportanGWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO:162);KALAWAEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKCEA (SEQ ID NO:163);和RQIKIWQNRMRMKWK (SEQ ID NO:164)。示例性CPP包括但不限于:YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:160)、RKKRRQRRR (SEQ ID NO:165)、3个精氨酸残基至50个精氨酸残基的精氨酸均聚物、RKKRRQRR (SEQ ID NO:166)、YARAAARQARA (SEQ ID NO:167)、THRLPRRRRRR (SEQ ID NO:168)和GGRRARRRRRR (SEQ ID NO:169)。在一些实施方案中,CPP是可活化的CPP (ACPP) (Aguilera等人(2009)《整合生物学》(Integr Biol) (Camb) 6月;1(5-6):371-381)。ACPP包含通过可切割接头与匹配的聚阴离子(例如,Glu9或“E9”)连接的聚阳离子CPP(例如,Arg9或“R9”),其将净电荷降低至接近零,从而抑制粘附和摄入细胞。在切割接头后,聚阴离子被释放,局部地暴露出聚精氨酸及其固有的粘附性,从而“激活”ACPP以穿过膜。

[0366] 在一些情况下,可以通过使有涂层的核(被可脱落层包围的核)与包含CPP的组合物(例如,溶液)接触来将CPP添加到纳米颗粒中。然后CPP可与可脱落层相互作用(例如,静电)。

[0367] 在一些情况下,表面涂层包括阳离子氨基酸的聚合物(例如,聚(精氨酸)如聚(L-精氨酸)和/或聚(D-精氨酸),聚(赖氨酸)如聚(L-赖氨酸)和/或聚(D-赖氨酸),聚(组氨酸)如聚(L-组氨酸)和/或聚(D-组氨酸),聚(鸟氨酸)如聚(L-鸟氨酸)和/或聚(D-鸟氨酸),聚(瓜氨酸)如聚(L-瓜氨酸)和/或聚(D-瓜氨酸)等。因此,在一些情况下,表面涂层包括聚(精氨酸),例如聚(L-精氨酸)。

[0368] 在一些实施方案中,表面涂层包括七肽如selank (TKPRPGP-SEQ ID NO:147)(例如,N-乙酰基selank)和/或semax (MEHFPGP-SEQ ID NO:148)(例如,N-乙酰基semax)。因此,在一些情况下,表面涂层包括selank(例如,N-乙酰基selank)。在一些情况下,表面涂层包括semax(例如,N-乙酰基semax)。

[0369] 在一些实施方案中,表面涂层包括递送分子。递送分子包括靶向配体,并且在一些情况下,靶向配体与锚定结构域(例如阳离子锚定结构域)缀合。在一些情况下,靶向配体通过插入接头与锚定结构域(例如阳离子锚定结构域)缀合。

[0370] 靶向配体

[0371] 多种靶向配体(例如,作为主题递送分子的一部分)可以用作表面涂层的一部分,并且可以设想许多不同的靶向配体。在一些实施例中,所述靶向配体是野生型蛋白质的片段(例如,结合结构域)。例如,在一些情况下,主题递送分子的肽靶向配体可以具有4-50个氨基酸(例如,4-40个、4-35个、4-30个、4-25个、4-20个、4-15个、5-50个、5-40个、5-35个、5-30个、5-25个、5-20个、5-15个、7-50个、7-40个、7-35个、7-30个、7-25个、7-20个、7-15个、8-50个、8-40个、8-35个、8-30个、8-25个、8-20个或8-15个氨基酸)的长度。靶向配体可以是野

生型蛋白质的片段,但在一些情况下,所述靶向配体相对于野生型氨基酸序列具有突变(例如,插入、缺失、取代)(即,相对于相应的野生型蛋白质序列的突变)。例如,靶向配体可以包含增加或减少与靶细胞表面蛋白的结合亲和力的突变。

[0372] 在一些情况下,靶向配体是抗体的抗原结合区(例如,ScFv)。“Fv”是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。在双链Fv种类中,该区域由紧密、非共价缔合的一个重链和一个轻链可变结构域的二聚体组成。在单链Fv种类(scFv)中,一个重链和一个轻链可变结构域可以通过柔性肽接头共价连接,使得轻链和重链可以以类似于双链Fv种类中的“二聚体”结构缔合。关于scFv的综述,参见Pluckthun,在《单克隆抗体药理学》(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies)第113卷,Rosenburg和Moore编辑,Springer-Verlag,纽约,第269-315页(1994)。

[0373] 在一些情况下,靶向配体包括病毒糖蛋白,其在一些情况下与普遍存在的表面标志物如硫酸肝素蛋白多糖结合,并且可以通过胞膜边缘波动相关过程在一些细胞群中诱导微小细胞增多。聚(L-精氨酸)是靶向配体的另一个实例,其也可用于结合表面标志物如硫酸肝素蛋白多糖。

[0374] 在一些情况下,靶向配体可以包括添加半胱氨酸残基的突变,其可以促进与接头和/或锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)的缀合。例如,半胱氨酸可用于通过巯基化学(例如,二硫键)和/或胺反应性化学进行交联(缀合)。

[0375] 在一些情况下,靶向配体包含内部半胱氨酸残基。在一些情况下,靶向配体在N-末端和/或C-末端处包含半胱氨酸残基。在一些情况下,为了包含半胱氨酸残基,靶向配体例如相对于相应的野生型序列发生突变(例如,插入或取代)。因此,本文所述的任何靶向配体可通过在半胱氨酸残基中插入和/或取代(例如,半胱氨酸残基的内部、N-末端、C-末端插入或取代)来修饰。

[0376] 所谓“相应的”野生型序列是指从中衍生或可能已经衍生出主题序列的野生型序列(例如,与目的序列具有高度序列同一性的野生型蛋白质序列)。例如,对于一个或多个突变(例如,取代、插入)但反之与野生型序列高度相似的靶向配体,与所述靶向配体最相似的氨基酸序列可以被视作是相应的野生型氨基酸序列。

[0377] 相应的野生型蛋白质/序列不必是100%相同的(例如,可以是85%或更多相同的、90%或更多相同的、95%或更多相同的、98%或更多相同的、99%或更多相同的等)(在被修饰的一个或多个位置的外部),但靶向配体以及相应的野生型蛋白质(例如,野生型蛋白质的片段)可以与预期的细胞表面蛋白结合,并且保持足够使它们可以被视作是同源的序列同一性(被修饰的区域的外部)。可以使用任何方便的方法(例如,使用如BLAST、MUSCLE、T-COFFEE等任何方便的序列比较/比对软件)鉴别/评估“相应的”野生型蛋白质序列的氨基酸序列。

[0378] 可用作表面涂层的一部分的靶向配体的实例(例如,作为表面涂层的递送分子的一部分)包括但不限于表1中列出的那些。可以用作主题递送分子的一部分的靶向配体的实例包含但不限于表3中列出的那些靶向配体(表3中列出的多个序列包含通过接头(例如,GGGGSGGGGS)与阳离子多肽结构域(例如,9R、6R等)缀合的靶向配体(例如,第2行的SNRWLDVK)。可以包含在靶向配体中的氨基酸序列的实例包含但不限于:NPKLTRMLTFKFY (SEQ ID NO:xx) (IL2)、TSVGKYPNTGYG (SEQ ID NO:xx) (CD3)、SNRWLDVK (Siglec)、

EKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO:xx) (SCF); EKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO:xx) (SCF)、EKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO:xx) (SCF)、SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (SEQ ID NO:xx) (cKit) 和 Ac-SNYSaibADKAibANAibADDAibAEAibAKENS (SEQ ID NO:xx) (cKit)。因此, 在一些情况下, 靶向配体包含与 NPKLTRMLTFKFY (SEQ ID NO:xx) (IL2)、TSVGKYPNTGYYGD (SEQ ID NO:xx) (CD3)、SNRWLDVK (Siglec)、EKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO:xx) (SCF); EKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO:xx) (SCF)、EKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO:xx) (SCF) 或 SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS (SEQ ID NO:xx) (cKit) 具有 85% 或更高 (例如, 90% 或更高、95% 或更高、98% 或更高、99% 或更高或者 100%) 的序列同一性的氨基酸序列。

[0379] 表1. 靶向配体的实例

[0380]

细胞表面蛋白	靶向配体	序列	SEQ ID NO:
家族B GPCR	毒蜥外泌肽	HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVRLFIEW LKNGGPSSGAPPPS	1
	毒蜥外泌肽 (S11C)	HGEGTFTSDL CKQMEEEEAVRLFIEW LKNGGPSSGAPPPS	2
FGF受体	FGF片段	KRL YCKNGGFFLRIHPDGRVDGVRE KSDPHIKLQLQAEERGVS IKGVC A NRYLAMKEDGRLLASKCVTDECFF FERLESNNYNTY	3
	FGF片段	KNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS	4
	FGF片段	HFKDPK	5
	FGF片段	LESNNYNT	6
	E-选择蛋白	MIASQFLSALT LVLLIKESGA	7
	L-选择蛋白	MVFPWRCEGTYWGSRNILKLWVW TLLCCDFLIHHGTHC	8
		MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWT MLCCDFLAHHGTDC	9
		MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWT MLCC	10
P-选择蛋白	PSGL-1 (SELPLG)	MAVGASGLEGDKMAGAMPLQLLL LLILLGPGNSLQLWDTWADEAEKA LGPLLARDRRQATEYEYLDYDFLPE TEPPEMLRNSTD TTPLTGPGTPESTT VEPAARRSTGLDAGGAVTEL TTELA NMGNLSTDSAAMEIQTTQPAATEA QTTQPVPT EAQTTP LAATEAQTTRL TATEAQTTP LAATEAQTTPPAATEA QTTQPTGLEAQTTPAAMEAQT TA PAAMEAQTTPAAMEAQT TQTTAM EAQT TAPEATEAQT TQPTATEAQT T PLAAMEALSTEPSATEALSMEPTTK	271

[0381]

细胞表面蛋白	靶向配体	序列	SEQ ID NO:
		RGLFIPFSVSSVTHKGIPMAASNLSV NYPVGAPDHISVKQCLLAILILALVA TIFFVCTVVLAVRLSRKGHMYPVRN YSPTMVCISSLLPDGGEGPSATAN GGLSKAKSPGLTPEPREDREGDDL LHSFLP	
E-选择蛋白	ESL-1 (GLG1)	MAACGRVRRMFRLSAALHLLLFA AGAEKLPQGQGVHSQGGPGANFVS FVGQAGGGGPAGQQLPQLPQSSQL QQQQQQQQQQQQPPQPPQPPFAGG PPARRGGAGAGGGWKLAEEEESCRE DVTRVCPKHTWSNNLAVLECLQDV REPENEISSDCNHLWNYKLNLTDD PKFESVAREVCKSTITEIKECADEPV GKGYMVSCLDHRGNITEYQCHQY ITKMTAIIIFSDYRLICGFMDDCKNDI NILKCGSIRLGEKDAHSQGEVVSCL EKGLVKEAEEREPIQVSELCKKAIL RVAELSSDDFHLDRHLYFACRDDRE RFCENTQAGEGRVYKCLFNHKFEES MSEKCREALTTRQKLIAQDYKVSYS LAKSCKSDLKKYRCNVENLPRSREA RLSYLLMCLESVHRGRQVSSECQ GEMLDYRRMLMEDFSLSPEILSCR GEIEHHCSGLHRKGRTLHCLMKVV RGEKGNLGMNCQQALQTLIQETDP GADYRIDRALNEACESVIQTACKHI RSGDPMILSCLMEHLYTEKMVEDC EHRLELQYFISRDWKLDPVLYRKC QGDASRLCHTHGWNETSEFMPQGA VFSCLYRHAYRTEEQGRRLSRECRA EVQRILHQRAMDVKLDPALQDKCLI DLGKWCSEKTETGQELECLQDHLD	272

[0382]

细胞表面蛋白	靶向配体	序列	SEQ ID NO:
		DLVVECRDIVGNLTELESEDIQIEAL LMRACEPIIQNFCHDVADNQIDSGD LMECLIQNKHQKDMNEKCAIGVTH FQLVQMKDFRFSYKFKMACKEDVL KLCPNIKKKVDVVICLSTTVRNDTL QEAKEHRVSLKCRRQLRVEELEM T EDIRLEPDLYEACKSDIKNFCSAVQ YGNAQIIIECLKENKKQLSTRCHQKV FKLQETEMMDPELDYTLMRVCKQ MIKRFCPEADSKTMLQCLKQNKNS ELMDPKCKQMITKRQITQNTDYRL NPMLRKACKADIPKFCHGILTKAKD DSELEGQVISCLKLRYADQRLSSDC EDQIRIIQESALDYRLDPQLQLHCS DEISSLCAEEAAAQEQTGQVEECLK VNLLKIKTELCKKEVLNMLKESKA DIFVDPVLHTACALDIKHHCAAITPG RGRQMSCLMEALEDKRVRLQPECK KRLNDRIEMWSYAAKVAPADGFSD LAMQVMTSPSKNYILSVISGSICILFL IGLMCGRITKRVTRELKDRLQYRSE TMAYKGLVWSQDVTGSPA	
	PSGL-1 (SELPLG)	参见上文	271
	CD44	MDKFWWHAAWGLCLVPLSLAQID LNITCRFAGVFHVEKNGRYSISRTEA ADLCKAFNSTLPTMAQMEKALSIGF ETCRYGFIEGHVVIPRIHPNSICAA N NTGVYILTSNTSQYDTYCFNASAPP EEDCTSVTDLPNAFDGPITITIVNRD GTRYVQKGEYRTNPEDIYPSNPTDD DVSSGSSSERSSSTSGGYIFYTFSTVH PIPEDSPWITDSTDRIPTATLMSTSA	273

[0383]

细胞表面蛋白	靶向配体	序列	SEQ ID NO:
		TATETATKRQETWDWFSWLFLPSES KNHLHTTTQMAGTSSNTISAGWEP NEENEDERDRHLSFSGSGIDDDDFI SSTISTTPRAFDHTKQNQDWTQWNP SHSNPEVLLQTTTRMTDVDRNGTT AYEGNWNPEAHPPLIHHEHHEEEET PHSTSTIQATPSSTTEETATQKEQWF GNRWHEGYRQTPKEDSHSTTGTA ASAHTSHPMQGRTPSPEDSSWTDF FNPISHPMGRGHQAGRRMDMDSSH SITLQPTANPNTGLVEDLDRTGPLS MTTQQSNSQSFSSTHEGLEEDKDHP TTSTLTSSNRNDVTGGRRDPNHSEG STTLLEGYTSHYPHTKESRTFIPVTS AKTGSFGVTAVTVGDSNSNVNRSLS GDQDTFHPSGGSHHTHGSSESDGHS GSQEGGANTTSGPIRTPQIPEWLILA SLLALALILAVCIAVNSRRRCGQKK KLVINSNGNGAVEDRKPSGLNGEASK SQEMVHLVNKESSETPDQFMTADE TRNLQNVDKIGV	
	DR3 (TNFRSF25)	MEQRPRGCAAVAAALLVLLGARA QGGTRSPRCDCAGDFHKKIGLFCCR GCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCP QDTFLAWENHHNSECARCQACDEQ ASQVALENC SAVADTRCGCKPGWF VECQVSQCVSSSPFYCQPCLDCGAL HRHTRLLCSRRTDCGTCLPGFYEH GDGCVSCPTPPPSLAGAPWGAVQS AVPLSVAGGRVGVFWVQVLLAGLV VPLLGLATLTYYRHCWPHKPLVT ADEAGMEALTPPPATHLSPLDSAHT LLAPPSSEKICTVQLVGNSWTPGY	274

[0384]

细胞表面蛋白	靶向配体	序列	SEQ ID NO:
		PETQEALCPQVTWSWDQLPSRALG PAAAPTLSPESPAGSPAMMLQPGPQ LYDVMDAVPARRWKEFVRTLGLRE AEIEAVEVEIGRFRDQQYEMLKRW RQQQPAGLGAVYAALERMGLDGC VEDLRSRLQRGP	
	LAMP1	MAAPGSARRPLLLLLLLLLLGLMHC ASAAMFMVKNGNGTACIMANFSA AFSVNYDTKSGPKNMTFDLPSDAT VVLNRSSCGKENTS DP SLVIAFGRG HTLTLNFTRNATRYSVQLMSFVYNL SDTHLFPNASSKEIKTVESITDIRADI DKKYRCVSGTQVHMNNVTVTLHD ATIQAYLSNSSFSRGETRCEQDRPSP TTAPPAPPSPSPSPVPKSPSVDKYNV SGTNGTCLLASMGLQLNLTYERKD NTTVTRLNINPNKTSASGSCGAHL VTLELHSEGTTVLLFQFGMNASSSR FFLQGIQLNTILPDARDPAFKAANGS LRALQATVGNSYKCNAAEEHVRVTK AFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSV EECLLDENSMLPIAVGGALAGLVLI VLIAYLVGRKRSHAGYQTI	275
	LAMP2	MVCFRLFPVPGSGLVLVCLVLGAV RSYALELNLTDSENATCLYAKWQM NFTVRYETTNKTYKTVTISDHGTVT YNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFSW IANFTKAASTYSIDSVSFSYNTGDNT TFPDAEDKGILTVDELLAIRIPLNDL FRCNSLSTLEKNDVVQHYWDVLVQ AFVQNGTVSTNEFLCDKDKTSTVAP TIHTTVPSPTTTPTPKEKPEAGTYSV NNGNDTCLLATMGLQLNITQDKVA	276

[0385]

细胞表面蛋白	靶向配体	序列	SEQ ID NO:
		SVININPNTTHSTGSCRSHTALLRLN SSTIKYLDVFVFAVKNENRFYLKEVNI SMYLVNGSVFSIANNLSYWDAPL GSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFDL RVQPFNVTQGKYSTAQDCSADDDN FLVPIAVGAALAGVLILVLLAYFIGL KHHHAGYEQF	
	Mac2-BP (半乳糖凝集素3结合蛋白) (LGALS3BP)	MTPPRLFWVWLLVAGTQGVNDGD MRLADGGATNQGRVEIFYRGQWGT VCDNLWDLTDASVVCRALGFENAT QALGRAAFGQGSGPIMLDEVQCTG TEASLADCKSLGWLKSNCRHERDA GVVCTNETRSTHTLDLSRELSEALG QIFDSQRGCDLSISVNVQGEDALGF CGHTVILTANLEAQALWKEPGSNV TMSVDAECVPMVRDLLRYFYSRRI DITLSSVKCFHKLASAYGARQLQGY CASLFAILLPQDPSFQMPLDLYAYA VATGDALLEKLCLQFLAWNFEALT QAEAWPSVPTDLLQLLLPRSDLAVP SELALLKAVDTSWGERASHEEVE GLVEKIRFPMMLPEELFELQFNLSLY WSHEALFQKKTLQALEFHTVPFQLL ARYKGLNLTEDTYKPRIYTSPTWSA FVTDSSWSARKSQLVYQSRRGPLV KYSSDYFQAPSDYRYYPYQSFQTPQ HPSFLFQDKRVSWSLVYLPTIQSCW NYGFSCSSDELPVLGLTKSGGSDRTI AYENKALMLCEGLFVADVTD FEGW KAAIPSALDTNSSKSTSSFPCPAGHF NGFRTVIRPFYLTNSSGVD	277

[0386]

细胞表面蛋白	靶向配体	序列	SEQ ID NO:
转铁蛋白受体	转铁蛋白配体	THRPPMWSPVWP	11
$\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白	$\alpha 5\beta 1$ 配体	RRETAWA	12
		RGD	
		RGDGW	181
整联蛋白	整联蛋白结合肽	(Ac)-GCGYGRGDSPG-(NH ₂)	188
		GCGYGRGDSPG	182
$\alpha 5\beta 3$ 整联蛋白	$\alpha 5\beta 3$ 配体	DGARYCRGDGCFDG	187
	狂犬病病毒糖蛋白(RVG)	YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKR ASNGGGG	183
c-Kit受体 (CD117)	干细胞因子 (SCF)	EGICRNRVTNNVKDVTCLVANLPK DYMITLKYPGMDVLPSCHEWSEM VVQLSDSLTDLLDKFSNISEGLSNYS IIDKLVNIVDDLVECVKENS SKDLK KSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAF KDFVVASETSDCVVSSTLSPEKDSR VSVTKPFMLPPVA	184
CD27	CD70	PEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPL VAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLE SLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYW QGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHR DGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPT TLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTI ASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPS RNTDETFFGVQWVRP	185
CD150	含SH2结构域的蛋白 1A(SH2D1A)	SSGLVPRGSHMDAVAVYHGKISRET GEKLLLATGLDGSYLLRDSSESVPGV YCLCVLYHGYIYTYRVSQTETGSWS AETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKP DQGIVIPLQYPVEKKSSARSTQGTTG	186

[0387]	细胞表面蛋白	靶向配体	序列	SEQ ID NO:
			IREDPDVCLKAP	

[0388] 靶向配体(例如,递送分子的)可以包含氨基酸序列RGD和/或与SEQ ID NO:1-12中任一个所示氨基酸序列具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向配体包含氨基酸序列RGD和/或SEQ ID NO:1-12中任一个所示氨基酸序列。在一些实施例中,靶向配体可以包含半胱氨酸(内部、C-末端或N-末端),并且还可以包含氨基酸序列RGD和/或与SEQ ID NOs:1-12中的任一个所示氨基酸序列具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。

[0389] 靶向配体(例如,递送分子的)可以包含氨基酸序列RGD和/或与SEQ ID NO:1-12和181-187中任一个所示氨基酸序列具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向配体包含氨基酸序列RGD和/或SEQ ID NO:1-12和181-187中任一个所示氨基酸序列。在一些实施例中,靶向配体可以包含半胱氨酸(内部、C-末端或N-末端),并且还可以包含氨基酸序列RGD和/或与SEQ ID NOs:1-12和181-187中的任一个所示氨基酸序列具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。

[0390] 靶向配体(例如,递送分子的)可以包含氨基酸序列RGD和/或与SEQ ID NO:1-12、181-187和271-277中任一个所示氨基酸序列具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向配体包含氨基酸序列RGD和/或SEQ ID NO:1-12、181-187和271-277中任一个所示氨基酸序列。在一些实施例中,靶向配体可以包含半胱氨酸(内部、C-末端或N-末端),并且还可以包含氨基酸序列RGD和/或与SEQ ID NOs:1-12、181-187和271-277中的任一个所示氨基酸序列具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。

[0391] 在一些情况下,靶向配体(例如,递送分子的)可以包含与SEQ ID NO:181-187和271-277中任一个所示氨基酸序列具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向配体包含SEQ ID NO:181-187和271-277中任一个所示氨基酸序列。在一些实施例中,靶向配体可以包含半胱氨酸(内部、C-末端或N-末端),并且还可以包含氨基酸序列RGD和/或与SEQ ID NO:181-187和271-277中的任一个所示氨基酸序列具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。

[0392] 在一些情况下,靶向配体(例如,递送分子的)可以包含与SEQ ID NO:181-187中任

一个所示氨基酸序列具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向配体包括SEQ ID NO:181-187中任一个所示的氨基酸序列。在一些实施例中,靶向配体可以包含半胱氨酸(内部、C-末端或N-末端),并且还可以包含与SEQ ID NO:181-187中的任一个所示氨基酸序列具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。

[0393] 在一些情况下,靶向配体(例如,递送分子的)可以包含与SEQ ID NO:271-277中任一个所示氨基酸序列具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向配体包括SEQ ID NO:271-277中任一个所示的氨基酸序列。在一些实施例中,靶向配体可以包含半胱氨酸(内部、C-末端或N-末端),并且还可以包含与SEQ ID NOs:271-277中的任一个所示氨基酸序列具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。

[0394] 本文使用术语“靶标”和“靶向结合”以指代特异性结合。术语“特异性结合(specific binding)”、“特异性结合(specifically binds)”等是指相对于溶液或反应混合物中的其它分子或部分的与分子的非共价或共价优先结合(例如,特异性结合相对于其它可用多肽的特定多肽的抗体或特异性结合相对于其它可用受体的特定受体的配体)。在一些实施例中,一个分子对其特异性结合的另一个分子的亲和力由 10^{-5} M或更低(例如, 10^{-6} M或更低、 10^{-7} M或更低、 10^{-8} M或更低、 10^{-9} M或更低、 10^{-10} M或更低、 10^{-11} M或更低、 10^{-12} 或更低、 10^{-13} 或更低、 10^{-14} 或更低、 10^{-15} 或更低或 10^{-16} M或更低)的 K_d (离解常数)表征。“亲和力”是指结合强度,增加的结合亲和力与较低的 K_d 相关。

[0395] 在一些情况下,所述靶向配体提供与选自家族B G-蛋白偶联受体(GPCR)、受体酪氨酸激酶(RTK)、细胞表面糖蛋白以及细胞-细胞粘附分子的细胞表面蛋白的靶向结合。在受体对接时考虑配体的空间布置可以用于实现适当的期望的功能选择性和内体分选偏差,例如,使得配体与靶标之间的结构功能关系不会由于靶向配体与有效负载或带电聚合物多肽结构域的缀合而被破坏。例如,与核酸、蛋白、核糖核蛋白或锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)的缀合可潜在地干扰结合裂缝。

[0396] 因此,在一些情况下,当与其配体结合的期望靶标(细胞表面蛋白)的晶体结构可用时(或者当这种结构可用于相关蛋白质时),可以使用3D结构建模和序列线程来可视化在配体与靶标之间相互作用的位点。这可以促进例如选择内部位点以放置(例如,半胱氨酸残基的)取代和/或插入。

[0397] 作为实例,在一些情况下,所述靶向配体提供与家族B G蛋白偶联受体(GPCR)(也称为‘分泌素家族’)的结合。在一些情况下,所述靶向配体提供与家族B GPCR的变构-亲和结构域和正构结构域的结合以分别提供靶向结合和长内体再循环途径的接合(参见,例如,下文的实例部分以及图11和图12)。

[0398] G蛋白偶联受体(GPCR)共享共同的分子结构(具有七个推定的跨膜片段)和共同的信号传导机制,因为所述G蛋白偶联受体与G蛋白(异源三聚体GTP酶)相互作用以调节如环

AMP、肌醇磷酸盐、二酰基甘油和钙离子等细胞内第二信使的合成。GPCR的家族B(分泌素受体家族或‘家族2’)是小的但结构和功能多样化的蛋白质组,所述GPCR的家族B包含多肽激素的受体和被认为介导质膜处的细胞间相互作用的分子(参见,例如,Harmar等人,《基因组生物学(Genome Biol)》2001;2(12):REVIEWS3013)。与分泌素受体家族的成员有关的结构生物学已经取得了重要的进展,所述进展包含其N-末端的若干个晶体结构的发表、有或没有结合配体,这些工作扩展了对配体结合的理解并且为基于结构的配体设计提供了有用平台(参见例如,Poyner等人,《英国药理学杂志(Br J Pharmacol)》2012年5月;166(1):1-3)。

[0399] 例如,通过使用毒蜥外泌肽-4配体或其衍生物(例如,半胱氨酸取代的毒蜥外泌肽-4靶向配体,如SEQ ID NO:2所示的配体),可能期望使用主题递送分子靶向胰腺细胞表面蛋白GLP1R(例如,靶向β-胰岛)。因为GLP1R在脑和胰腺中很丰富,所以提供与GLP1R的靶向结合的靶向配体可用于靶向脑和胰腺。因此,靶向GLP1R有助于专注于治疗(例如,通过递送一种或多种基因编辑工具)疾病,如亨廷顿病(CAG重复扩增突变)、帕金森氏病(LRRK2突变)、ALS(SOD1突变)和其他CNS疾病的方法(例如,治疗方法)。靶向GLP1R还有助于专注于向胰腺β-胰岛递送有效负载,用于治疗疾病如I型糖尿病、II型糖尿病和胰腺癌(例如,通过递送一种或多种基因编辑工具)的方法(例如,治疗方法)。

[0400] 当使用毒蜥外泌肽-4的修饰形式靶向GLP1R时,可以通过使用PDB 3维渲染比对毒蜥外泌肽-4氨基酸序列即HGEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS(SEQ ID NO:1)与胰高血糖素-GCGR(4ERS)和GLP1-GLP1R-ECD复合物(PDB:3IOL)的晶体结构来鉴别用于半胱氨酸取代和/或插入(例如,用于缀合到核酸有效负载)的氨基酸,所述PDB 3维渲染可以在3D空间中旋转以预测交联的复合物必须面向以免破坏所述两个结合裂缝的方向(参见例如,下文的实例部分以及图11和图12)。当靶向配体(靶向家族B GPCR)的理想交联位点(例如,用于半胱氨酸残基的取代/插入的位点)与对应受体的两个结合裂缝充分正交时,高亲和力和结合可以发生以及伴随着长内体再循环途径整合(例如,用于最佳的有效负载释放)。在SEQ ID NO:1的氨基酸位置10、11和/或12处的半胱氨酸取代致使GS-偏向信号级联的双峰结合和特异性起始,β抑制蛋白的接合,和受体从肌动蛋白骨架解离。在一些情况下,这种靶向配体通过受体介导的内吞作用触发纳米颗粒的内化,这是不经由仅与GPCR's N-末端结构域接合且不伴随正构位点接合的机制(仅结合亲和链,毒蜥外泌肽-4[31-39]也是这种情况)。

[0401] 在一些情况下,主题靶向配体包含与毒蜥外泌肽-4氨基酸序列(SEQ ID NO:1)具有85%或更高(例如,90%或更高、95%或更高、98%或更高、99%或更高或者100%)的同一性的氨基酸序列。在一些此类情况下,所述靶向配体在对应于SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的L10、S11和K12的一个或多个位置处包含半胱氨酸取代或插入。在一些情况下,所述靶向配体在对应于SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的S11的位置处包含半胱氨酸取代或插入。在一些情况下,主题靶向配体包含具有毒蜥外泌肽-4氨基酸序列(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向配体与锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)缀合(有或无接头)。

[0402] 作为另一个实例,在一些情况下,根据本公开的靶向配体提供与受体酪氨酸激酶(RTK),诸如成纤维细胞生长因子(FGF)受体(FGFR)的结合。因此,在一些情况下,靶向配体是FGF的片段(即,包含FGF的氨基酸序列)。在一些情况下,所述靶向配体与在正构结合期间被占据的所述RTK的片段结合(例如,参见以下的实例部分)。在一些情况下,所述靶向配体

结合所述RTK的肝素-亲和结构域。在一些情况下,所述靶向配体提供与FGF受体的靶向结合并且包括与氨基酸序列KNGGFFLRHPDGRVDGVREKS (SEQ ID NO:4) 具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,所述靶向配体提供与FGF受体的靶向结合并且包括如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列。

[0403] 在一些情况下,占据RTK的正构位点的小结构域(例如,长度为5-40个氨基酸)可以用于接合与RTK的核分选(例如,FGFR)相关的内吞途径而不接合细胞增殖以及原始致癌信号级联,所述小结构域可以是天然生长因子配体所特有的。例如,截短的bFGF (tbFGF) 肽(氨基酸30-115) 含有bFGF受体结合位点和肝素结合位点的一部分,并且该肽可以在不刺激细胞增殖的情况下有效地结合细胞表面上的FGFR。tbFGF的序列是KRLYCKNGGFFLRHPDGRVDGVREKSDPHIKLQLQAEERGVVSIKGVCANRYLAMKEDGRLLASKCVTDECFFFERLESNNYNTY (SEQ ID NO:13) (参见例如,Cai等人,《国际药理学杂志(Int J Pharm)》2011年4月15日;408(1-2):173-82)。

[0404] 在一些情况下,所述靶向配体提供与FGF受体的靶向结合并且包括氨基酸序列HFKDPK (SEQ ID NO:5) (参见,例如,下文的实例部分)。在一些情况下,所述靶向配体提供与FGF受体的靶向结合,并且包括氨基酸序列LESNNYNT (SEQ ID NO:6) (参见,例如,下文的实例部分)。

[0405] 在一些情况下,根据本公开的靶向配体提供与细胞表面糖蛋白的靶向结合。在一些情况下,所述靶向配体提供与细胞-细胞粘附分子的靶向结合。例如,在一些情况下,所述靶向配体提供与CD34的靶向结合,CD34是作为细胞-细胞粘附因子起作用的细胞表面糖蛋白,并且是在造血干细胞(例如,骨髓)上发现的蛋白质。在一些情况下,所述靶向配体是如E-选择蛋白、L-选择蛋白或P-选择蛋白等选择蛋白的片段(例如,在选择蛋白的前40个氨基酸中发现的信号肽)。在一些情况下,主题靶向配体包含选择蛋白(例如,E-选择蛋白、L-选择蛋白、P-选择蛋白)的sushi结构域。

[0406] 在一些情况下,所述靶向配体包括与氨基酸序列MIASQFLSALTLVLLIKESGA (SEQ ID NO:7) 具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,所述靶向配体包括如SEQ ID NO:7所示氨基酸序列。在一些情况下,所述靶向配体包括与氨基酸序列MVFPWRCEGTYWGSRNILKLWVWTLCCDFLIHHGTHC (SEQ ID NO:8) 具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,所述靶向配体包括如SEQ ID NO:8所示氨基酸序列。在一些情况下,所述靶向配体包括与氨基酸序列MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWTMLCCDFLAHHGTDC (SEQ ID NO:9) 具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向配体包括如SEQ ID NO:9所示氨基酸序列。在一些情况下,靶向配体包括与氨基酸序列MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWTMLCC (SEQ ID NO:10) 具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向配体包括如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列。

[0407] 可以用作主题靶向配体的选择蛋白的片段(例如,在选择蛋白的前40个氨基酸中发现的信号肽)可以在一些情况下获得与特异性修饰的唾液酸蛋白的强结合,例如,各种唾液酸化的路易斯^x修饰/细胞外CD34的O-唾液酸化可以导致P-选择蛋白、L-选择蛋白和E-选择蛋白对骨髓、淋巴、脾和扁桃体区室的不同亲和力。相比之下,在一些情况下,靶向配体可以是CD34的细胞外部分。在一些此类情况下,可以利用配体的唾液酸化的修饰将靶向配体差异地靶向到各种选择蛋白。

[0408] 在一些情况下,根据本公开的靶向配体提供与E-选择蛋白的靶向结合。E-选择蛋白可介导肿瘤细胞与内皮细胞的粘附并且E-选择蛋白的配体可在癌症转移中发挥作用。例如,P-选择蛋白糖蛋白-1(PSGL-1)(例如,源自人嗜中性粒细胞)可以作为E-选择蛋白的高效配体(例如,由内皮细胞表达),并且主题靶向配体因此可以在一些情况下包括PSGL-1氨基酸序列(或其与E-选择蛋白结合的片段)。作为另一个实例,E-选择蛋白配体-1(ESL-1)可以结合E-选择蛋白,因此在一些情况下,主题靶向配体可以包括ESL-1氨基酸序列(或其与E-选择蛋白结合的片段)。在一些情况下,具有PSGL-1和/或ESL-1氨基酸序列(或其与E-选择蛋白结合片段的)的靶向配体带有一个或多个唾液酸基路易斯修饰以便结合E-选择蛋白。作为另一个实例,在一些情况下,CD44、死亡受体-3(DR3)、LAMP1、LAMP2和Mac2-BP可以结合E-选择蛋白,因此在某些情况下,主题靶向配体可以包括以下任何一种的氨基酸序列(或其与E-选择蛋白结合的片段):CD44、死亡受体-3(DR3)、LAMP1、LAMP2和Mac2-BP。

[0409] 在一些情况下,根据本发明的靶向配体提供与P-选择蛋白的靶向结合。在一些情况下,PSGL-1可以提供此类靶向结合。因此,在一些情况下,主题靶向配体可以在一些情况下包括PSGL-1氨基酸序列(或其与P-选择蛋白结合的片段)。在一些情况下,具有PSGL-1氨基酸序列(或其与P-选择蛋白结合的片段)的靶向配体带有一个或多个唾液酸基路易斯修饰以便结合P-选择蛋白。

[0410] 在一些情况下,根据本公开的靶向配体提供与转铁蛋白受体的靶向结合。在一些此类情况下,所述靶向配体包括与氨基酸序列THRPPMWSPVWP(SEQ ID NO:11)具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向配体包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。

[0411] 在一些情况下,根据本发明的靶向配体提供与整联蛋白(例如, $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白)的靶向结合。在一些此类情况下,所述靶向配体包括与氨基酸序列RRETAWA(SEQ ID NO:12)具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向配体包括如SEQ ID NO:12所示氨基酸序列。在一些情况下,所述靶向配体包括与氨基酸序列RGDGW(SEQ ID NO:181)具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向配体包括如SEQ ID NO:181所示氨基酸序列。在一些情况下,所述靶向配体包括氨基酸序列RGD。

[0412] 在一些情况下,根据本发明的靶向配体提供与整联蛋白的靶向结合。在一些此类情况下,所述靶向配体包括与氨基酸序列GCGYGRGDSPG(SEQ ID NO:182)具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%

或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,所述靶向配体包括如SEQ ID NO:182所示氨基酸序列。在一些情况下,此类靶向配体在N-末端乙酰化和/或在C-末端酰胺化(NH₂)。

[0413] 在一些情况下,根据本公开的靶向配体提供与整合蛋白(例如, $\alpha 5\beta 3$ 整合蛋白)的靶向结合。在一些此类情况下,所述靶向配体包括与氨基酸序列DGARYCRGDCFDG (SEQ ID NO:187)具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,所述靶向配体包括如SEQ ID NO:187所示氨基酸序列。

[0414] 在一些实施方案中,用于靶向脑部的靶向配体包括来自狂犬病病毒糖蛋白(RVG)的氨基酸序列(例如,YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNGGGG (SEQ ID NO:183))。在一些此类情况下,所述靶向配体包括与如SEQ ID NO:183所示的氨基酸序列具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。对于任何靶向配体(如本文其他地方所述),RVG可以与锚定结构域(例如,9R肽序列)缀合和/或融合。例如,用作主题纳米颗粒的表面涂层的一部分的主题递送分子可包括序列YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNGGGGRRRRRRRRR (SEQ ID NO:180)。

[0415] 在一些情况下,根据本公开的靶向配体提供与c-Kit受体的靶向结合。在一些此类情况下,所述靶向配体包括与如SEQ ID NO:184所示的氨基酸序列具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,所述靶向配体包括如SEQ ID NO:184所示氨基酸序列。

[0416] 在一些情况下,根据本发明的靶向配体提供与CD27的靶向结合。在一些此类情况下,所述靶向配体包括与如SEQ ID NO:185所示的氨基酸序列具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,所述靶向配体包括如SEQ ID NO:185所示氨基酸序列。

[0417] 在一些情况下,根据本发明的靶向配体提供与CD150的靶向结合。在一些这种情况下,所述靶向配体包括与如SEQ ID NO:186所示的氨基酸序列具有85%或更高的序列同一性(例如,90%或更高、95%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高、99.5%或更高或者100%的序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向配体包含SEQ ID NO:186所示的氨基酸序列。

[0418] 在一些实施方案中,靶向配体提供与KLS CD27+/IL-7Ra-/CD150+/CD34-造血干细胞和祖细胞(HSPC)的靶向结合。例如,可以引入基因编辑工具(本文其它地方所描述的)以破坏BCL11a转录因子的表达并且因此产生胎儿血红蛋白。作为另一个实例,可以直接靶向 β -珠蛋白(HBB)基因以用对应的同源定向修复供体模板校正改变的E7V取代。作为一个说明性实例CRISPR/Cas RNA指导的多肽(例如,Cas9,CasX,CasY,Cpf1)可以与适当的引导RNA一起递送,使得其将与HBB基因上的位点结合并且在基因组中产生双链或单链断裂,启动基因组修复。在一些情况下,引入DNA供体模板(单链或双链)(作为有效负载的一部分)并释放14-30天,同时可以在1-7天的过程中释放指导RNA/CRISPR/Cas蛋白复合物(核糖核蛋白复

合物)。在一些情况下,有效负载可以包含用于ku70或ku80的siRNA,例如,所述siRNA可以用于促进同源定向修复(HDR)并且限制插入缺失形成。在一些情况下,用于SIRT6的mRNA在14-30d内释放以在核酸酶介导的位点特异性切割之后促进HDR驱动的供体链的插入。

[0419] 在一些实施方案中,靶向配体提供与CD4+或CD8+T细胞、造血干细胞和祖细胞(HSPC)或外周血单核细胞(PBMC)的靶向结合,以修饰T细胞受体。例如,可以引入一个或多个基因编辑工具(本文其它地方所描述的)以修饰T细胞受体。可以直接靶向并且用对应的同源定向修复供体模板取代T细胞受体以形成新型T细胞受体。作为一个实例,CRISPR/Cas RNA引导的多肽(例如,Cas9,CasX,CasY,Cpf1)可以与适当的引导RNA一起递送,使得其将与TCR基因上的位点结合并且在基因组中产生双链或单链断裂,启动基因组修复。在一些情况下,引入用于HDR的DNA供体模板(单链或双链)(作为有效负载的一部分)。对于技术人员而言将显而易见的是,可以根据本公开使用其它CRISPR引导RNA和HDR供体序列、靶向 β -珠蛋白、CCR5、T细胞受体或任何其它目的基因和/或其它表达载体。

[0420] 还提供了具有两种不同肽序列的递送分子,所述递送分子一起构成靶向配体。例如,在一些情况下,靶向配体是二价的(例如,异二价的)。在一些情况下,细胞穿透肽和/或硫酸肝素蛋白多糖结合配体与本公开的任何靶向配体一起用作异二价内吞触发物。异二价靶向配体可以包含来自靶向配体中的一个靶向配体的亲和序列以及来自不同靶向配体的正构结合序列(例如,已知与期望的内吞运输途径接合的一个正构结合序列)。

[0421] 锚定结构域

[0422] 在一些实施方案中,表面涂层包括递送分子,递送分子包括与锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)缀合的靶向配体(参见例如图10,图A-B)。在一些情况下,靶向配体与靶向配体的活性区远端的锚定结构域(或接头)缀合,以保持活性。锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)可包括重复阳离子残基(例如,精氨酸、赖氨酸、组氨酸)。在一些情况下,阳离子锚定结构域的长度范围为3到30个氨基酸(例如,3-28个、3-25个、3-24个、3-20个、4-30个、4-28个、4-25个、4到24个或4-20个氨基酸)。在一些情况下,阳离子锚定结构域的长度范围为4到24个氨基酸。锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)的合适实例包括但不限于:RRRRRRRRR(9R)(SEQ ID NO:15)和HHHHHHH(6H)(SEQ ID NO:16)。

[0423] 在一些情况下,主题递送分子的锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)用作锚以用递送分子涂覆纳米颗粒表面,例如,使得靶向配体用于将纳米颗粒靶向到预期的细胞/细胞表面蛋白(参见,例如,图8、图9和图10)。因此,在一些情况下,锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)与纳米颗粒的带电可脱落层以静电方式相互作用。在一些情况下,稳定层具有负电荷并且因此带正电荷的锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)可以与稳定层相互作用,有效地将递送分子锚定到纳米颗粒并且用主题靶向配体涂覆纳米颗粒表面(参见,例如,图8、图9和图10)。

[0424] 靶向配体与锚定结构域的缀合可以通过任何方便的技术完成并且多种不同的缀合化学将是本领域普通技术人员所知晓的。在一些情况下,缀合是通过巯基化学(例如,二硫键)。在一些情况下,使用胺反应性化学(例如,来自锚定结构域中的氨基酸残基的侧链上存在的胺)完成缀合。如上所述,靶向配体可包括可促进缀合的半胱氨酸残基。同样地,锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)可以包括可以促进缀合的半胱氨酸残基。在一些情况下,靶向配体和锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)通过作为相同多肽的一部分而缀合。

[0425] 接头

[0426] 在一些实施方案中,根据本公开的靶向配体通过插入接头与锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)缀合(例如,参见图10)。接头可以是蛋白接头或非蛋白接头。在一些情况下,接头可以有助于稳定性,防止补体活化,和/或相对于锚定结构域为配体提供柔性。

[0427] 靶向配体与接头或接头与锚定结构域的缀合可以以多种不同的方式完成。在一些情况下,缀合是通过疏基化学(例如,二硫键;例如,在两个半胱氨酸残基之间;例如,参见图10)。在一些情况下,使用胺反应性化学完成缀合。在一些情况下,靶向配体包括半胱氨酸残基并通过半胱氨酸残基与接头缀合;和/或锚定结构域包括半胱氨酸残基并通过半胱氨酸残基与接头缀合。在一些情况下,接头是肽接头并且包括半胱氨酸残基。在一些情况下,靶向配体和肽接头由于是相同多肽的一部分而缀合;和/或锚定结构域和肽接头由于是相同多肽的一部分而缀合。

[0428] 在一些情况下,主题接头是多肽并且可以称为多肽接头。应当理解,虽然考虑了多肽接头,但在一些情况下使用非多肽接头(化学接头)。例如,在一些实施方案中,接头是聚乙二醇(PEG)接头。合适的蛋白接头包括长度为4个氨基酸至60个氨基酸之间(例如,长度为4-50、4-40、4-30、4-25、4-20、4-15、4-10、6-60、6-50、6-40、6-30、6-25、6-20、6-15、6-10、8-60、8-50、8-40、8-30、8-25、8-20或8-15个氨基酸)的多肽。

[0429] 在一些实施方案中,主题接头是刚性的(例如,包含一个或多个脯氨酸残基的接头)。刚性接头的非限制性实例是GAPGAPGAP (SEQ ID NO:17)。在一些情况下,多肽接头在N-或C-末端包含C残基。因此,在一些情况下,刚性接头选自:GAPGAPGAPC (SEQ ID NO:18)和CGAPGAPGAP (SEQ ID NO:19)。

[0430] 可以使用具有一定柔性的肽接头。因此,在一些情况下,主题接头是柔性的。连接肽实际上可以具有任何氨基酸序列,记住:柔性接头将具有产生一般柔性肽的序列。使用小氨基酸如甘氨酸和丙氨酸可用于产生柔性肽。此类序列的产生对于本领域技术人员来说是常规的。各种不同接头可商购并且被认为适于使用。示例接头多肽包含甘氨酸聚合物(G_n);甘氨酸-丝氨酸聚合物(包含例如 $(GS)_n$ 、 $GSGGS_n$ (SEQ ID NO:20)、 $GGSGGS_n$ (SEQ ID NO:21)和 $GGGS_n$ (SEQ ID NO:22),其中n是至少为一的整数);甘氨酸-丙氨酸聚合物;丙氨酸-丝氨酸聚合物。示例接头可包含氨基酸序列,包括但不限于GGSG (SEQ ID NO:23)、GGSGG (SEQ ID NO:24)、GSGSG (SEQ ID NO:25)、GSGGG (SEQ ID NO:26)、GGGSG (SEQ ID NO:27)、GSSSG (SEQ ID NO:28)等。普通技术人员将认识到,与上文描述的任何要素缀合的肽的设计可以包含完全或部分柔性的接头,使得所述接头可以包含柔性接头以及赋予较少柔性结构的一个或多个部分。柔性接头的其他实例包括但不限于:GGGGSGGGGG (SEQ ID NO:29)和GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:30)。如上文所提到的,在一些情况下,多肽接头在N-末端和/或C-末端处包含C残基。因此,在一些情况下,柔性接头包含选自以下的氨基酸序列:GGGGSGGGGGC (SEQ ID NO:31)、CGGGSGGGGG (SEQ ID NO:32)、GGGGSGGGGSC (SEQ ID NO:33)和CGGGSGGGGS (SEQ ID NO:34)。

[0431] 在一些情况下,主题多肽接头是内体溶解性的。内体溶解性多肽接头包括但不限于:KALA (SEQ ID NO:35)和GALA (SEQ ID NO:36)。如上所述,在一些情况下,多肽接头在N-或C-末端包含C残基。因此,在一些情况下,主题接头包括选自以下的氨基酸序列:CKALA (SEQ ID NO:37)、KALAC (SEQ ID NO:38)、CGALA (SEQ ID NO:39)和GALAC (SEQ ID NO:40)。

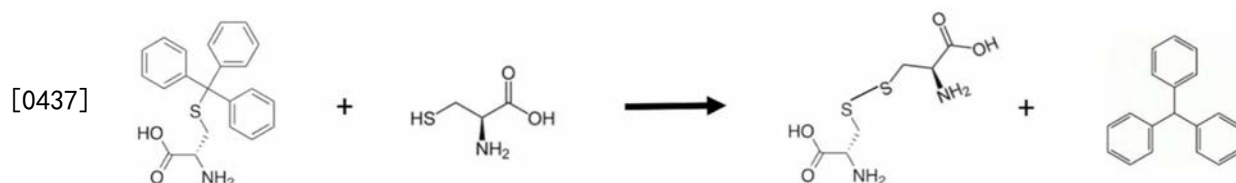
[0432] 巯基偶联反应的说明性实例

[0433] (例如,用于经由巯基化学,例如,使用半胱氨酸残基进行缀合)

[0434] (例如,用于将靶向配体缀合至接头,将靶向配体缀合至锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域),将接头缀合至锚定域(例如,阳离子锚定结构域)等)

[0435] 二硫键

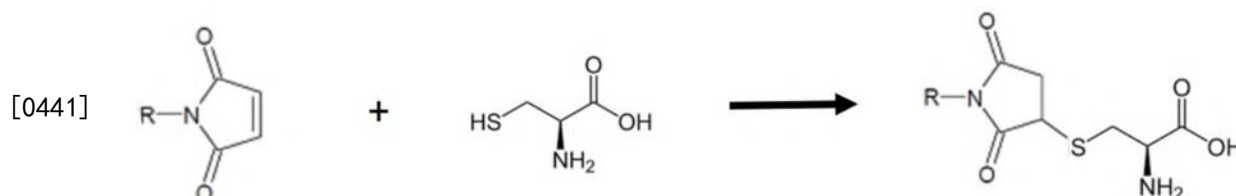
[0436] 在还原状态下包含游离巯基的半胱氨酸残基在典型的二硫化物交换反应中容易与受保护的硫醇形成二硫键。



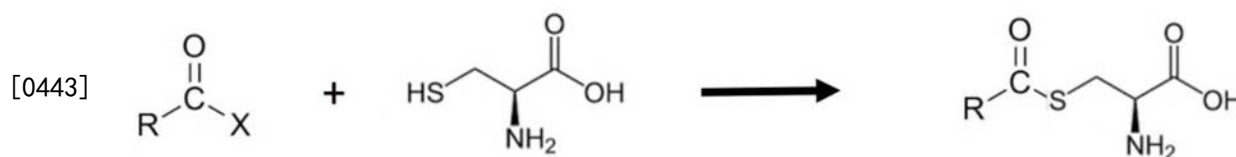
[0438] 硫醚/硫酯键

[0439] 半胱氨酸的巯基与马来酰亚胺和酰卤基团反应,分别形成稳定的硫醚和硫酯键。

[0440] 马来酰亚胺

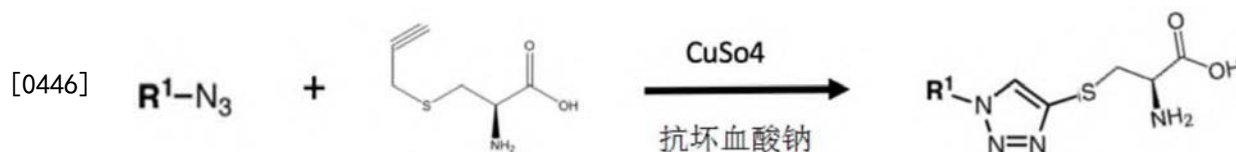


[0442] 酰卤



[0444] 叠氮化物-炔烃环加成

[0445] 通过使半胱氨酸残基包含炔键的化学修饰或通过合成肽制剂中使用L-炔丙基半胱氨酸(如下图所示)来促进这种缀合。然后借助Cu促进的点击化学实现偶联。



[0447] 靶向配体的实例

[0448] 靶向配体的实例包括但不限于包括以下氨基酸序列的那些:

[0449] SCF(靶向/结合c-Kit受体)

[0450] EGICRNRVTNNVKDVTCLVANLPKDYMITLKYVPGMDVLPSCWISEMVVQLSDSLTDLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS SKDLKKSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKDFVVAETSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVA (SEQ ID NO:184);

[0451] CD70(靶向/结合CD27)

[0452] PEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPDLKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRL

SFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP (SEQ ID NO:185); 和

[0453] 含SH2结构域的蛋白1A (SH2D1A) (靶向/结合

[0454] CD150) SSGLVPRGSHMDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSSESVPGVYCLCVLYHGYIY
TYRVSQTETGWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPVVEKKSSARSTQGTGIREDPDVCLKAP
(SEQ ID NO:186)

[0455] 因此, 靶向配体的非限制性实例 (可单独使用或与其他靶向配体组合使用) 包括:

[0456] 9R-SCF

[0457] RRRRRRRRRMEGICRNRVTNNVKDVTCLVANLPKDYMITLKYVPGMDVLPSCWISEMVVQLSDSLTD
LLDKFSNISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSKDLKKSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKDFVASE
TSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVA (SEQ ID NO:189)

[0458] 9R-CD70

[0459] RRRRRRRRRPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAEL
QLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHTTLAVGICSPA
SRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP (SEQ ID NO:190)

[0460] CD70-9R

[0461] PEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQ
DPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHTTLAVGICSPASRSISLLRL
SFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRPRRRRRRRRRR (SEQ ID NO:191)

[0462] 6H-SH2D1A

[0463] MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSSESVPGVYCLCVLYH
GYIITYRVSQTETGWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPVVEKKSSARSTQGTGIREDPDVC
LKAP (SEQ ID NO:192)

[0464] 6H-SH2D1A

[0465] RRRRRRRRRSSGLVPRGSHMDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSSESVPGVYCLCVLYH
YIITYRVSQTETGWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPVVEKKSSARSTQGTGIREDPDVCL
KAP (SEQ ID NO:193)

[0466] 递送分子和组分的说明性实例

[0467] (0a) 半胱氨酸缀合锚1 (CCA1)

[0468] [锚定结构域 (例如, 阳离子锚定结构域)-接头 (GAPGAPGAP)-半胱氨酸]

[0469] RRRRRRRRR GAPGAPGAP C (SEQ ID NO:41)

[0470] (0b) 半胱氨酸缀合锚2 (CCA2)

[0471] [半胱氨酸-接头 (GAPGAPGAP)-锚定结构域 (例如, 阳离子锚定结构域)]

[0472] C GAPGAPGAP RRRRRRRRR (SEQ ID NO:42)

[0473] (1a) $\alpha 5\beta 1$ 配体

[0474] [锚定结构域 (例如, 阳离子锚定结构域)-接头 (GAPGAPGAP)-靶向配体]

[0475] RRRRRRRRR GAPGAPGAP RRETAWA (SEQ ID NO:45)

[0476] (1b) $\alpha 5\beta 1$ 配体

[0477] [靶向配体-接头 (GAPGAPGAP)-锚定结构域 (例如, 阳离子锚定结构域)]

[0478] RRETAWAGAPGAPGAP RRRRRRRRR (SEQ ID NO:46)

- [0479] (1c) $\alpha 5\beta 1$ 配体-Cys左
- [0480] CGAPGAPGAP (SEQ ID NO:19)
- [0481] 注意:这可以通过巯基化学(例如,二硫键)或胺反应性化学缀合到CCA1(参见上文)。
- [0482] (1d) $\alpha 5\beta 1$ 配体-Cys右
- [0483] GAPGAPGAPC (SEQ ID NO:18)
- [0484] 注意:这可以通过巯基化学(例如,二硫键)或胺反应性化学缀合到CCA2(参见上文)。
- [0485] (2a) RGD $\alpha 5\beta 1$ 配体
- [0486] [锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)-接头(GAPGAPGAP)-靶向配体]
- [0487] RRRRRRRR GAPGAPGAP RGD (SEQ ID NO:47)
- [0488] (2b) RGD $\alpha 5\beta 1$ 配体
- [0489] [靶向配体-接头(GAPGAPGAP)-锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)]
- [0490] RGD GAPGAPGAP RRRRRRRR (SEQ ID NO:48)
- [0491] (2c) RGD配体-Cys左
- [0492] CRGD (SEQ ID NO:49)
- [0493] 注意:这可以通过巯基化学(例如,二硫键)或胺反应性化学缀合到CCA1(参见上文)。
- [0494] (2d) RGD配体-Cys右
- [0495] RGDC (SEQ ID NO:50)
- [0496] 注意:这可以通过巯基化学(例如,二硫键)或胺反应性化学缀合到CCA2(参见上文)。
- [0497] (3a) 转铁蛋白配体
- [0498] [锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)-接头(GAPGAPGAP)-靶向配体]
- [0499] RRRRRRRRGAPGAPGAP THRPPMWSPVWP (SEQ ID NO:51)
- [0500] (3b) 转铁蛋白配体
- [0501] [靶向配体-接头(GAPGAPGAP)-锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)]
- [0502] THRPPMWSPVWP GAPGAPGAP RRRRRRRR (SEQ ID NO:52)
- [0503] (3c) 转铁蛋白配体-Cys左
- [0504] CTHRPPMWSPVWP (SEQ ID NO:53)
- [0505] CPTHRPPMWSPVWP (SEQ ID NO:54)
- [0506] 注意:这可以通过巯基化学(例如,二硫键)或胺反应性化学缀合到CCA1(参见上文)。
- [0507] (3d) 转铁蛋白配体-Cys右
- [0508] THRPPMWSPVWPC (SEQ ID NO:55)
- [0509] 注意:这可以通过巯基化学(例如,二硫键)或胺反应性化学缀合到CCA2(参见上文)。
- [0510] (4a) E-选择蛋白配体[1-21]
- [0511] [锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)-接头(GAPGAPGAP)-靶向配体]

- [0512] RRRRRRRRGAPGAPGAP MIASQFLSALTLVLLIKESGA (SEQ ID NO:56)
- [0513] (4b) E-选择蛋白配体[1-21]
- [0514] [靶向配体-接头 (GAPGAPGAP)-锚定结构域 (例如, 阳离子锚定结构域)]
- [0515] MIASQFLSALTLVLLIKESGA GAPGAPGAP RRRRRRRRR (SEQ ID NO:57)
- [0516] (4c) E-选择蛋白配体[1-21]-Cys左
- [0517] CMIASQFLSALTLVLLIKESGA (SEQ ID NO:58)
- [0518] 注意:这可以通过巯基化学 (例如, 二硫键) 或胺反应性化学缀合到CCA1 (参见上文)。
- [0519] (4d) E-选择蛋白配体[1-21]-Cys右
- [0520] MIASQFLSALTLVLLIKESGAC (SEQ ID NO:59)
- [0521] 注意:这可以通过巯基化学 (例如, 二硫键) 或胺反应性化学缀合到CCA2 (参见上文)。
- [0522] (5a) FGF片段[26-47]
- [0523] [锚定结构域 (例如, 阳离子锚定结构域)-接头 (GAPGAPGAP)-靶向配体]
- [0524] RRRRRRRRGAPGAPGAP KNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS (SEQ ID NO:60)
- [0525] 注意:这可以通过巯基化学 (例如, 二硫键) 或胺反应性化学缀合到CCA1 (参见上文)。
- [0526] (5b) FGF片段[26-47]
- [0527] [靶向配体-接头 (GAPGAPGAP)-锚定结构域 (例如, 阳离子锚定结构域)]
- [0528] KNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS GAPGAPGAP RRRRRRRRR (SEQ ID NO:61)
- [0529] 注意:这可以通过巯基化学 (例如, 二硫键) 或胺反应性化学缀合到CCA1 (参见上文)。
- [0530] (5c) FGF片段[25-47]-左边的半胱氨酸是天然的。
- [0531] CKNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS (SEQ ID NO:43)
- [0532] 注意:这可以通过巯基化学 (例如, 二硫键) 或胺反应性化学缀合到CCA1 (参见上文)。
- [0533] (5d) FGF片段[26-47]-Cys右
- [0534] KNGGFFLRIHPDGRVDGVREKSC (SEQ ID NO:44)
- [0535] 注意:这可以通过巯基化学 (例如, 二硫键) 或胺反应性化学缀合到CCA2 (参见上文)。
- [0536] (6A) 毒蜥外泌肽 (S11C) [1-39]
- [0537] HGEFTFTSDLCKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO:2)
- [0538] 注意:这可以通过巯基化学 (例如, 二硫键) 或胺反应性化学缀合到CCA1 (参见上文)。
- [0539] 多价表面涂层
- [0540] 在一些情况下, 表面涂层包括以下中的任何一种或多种 (以任何所需组合): (i) 一种或多种上述聚合物, (ii) 一种或多种靶向配体, 一种或多种CPP和一种或多种七肽。例如, 在一些情况下, 表面涂层可包括一种或多种 (例如, 两种或更多种, 三种或更多种) 靶向配体, 但也可包括一种或多种上述阳离子聚合物。在一些情况下, 表面涂层可包括一种或多种

(例如,两种或更多种,三种或更多种)靶向配体,但也可包括一种或多种CPP。

[0541] 在一些情况下,表面涂层包含提供与CD34和硫酸肝素蛋白多糖的靶向结合的靶向配体的组合。例如,聚(L-精氨酸)可以用作表面涂层的一部分以提供与硫酸肝素蛋白多糖的靶向结合。因此,在一些情况下,在用阳离子聚合物(例如,聚(L-精氨酸))表面涂覆纳米颗粒之后,将有涂层的纳米颗粒与透明质酸一起温育,从而形成两性离子和多价表面。

[0542] 在一些实施方案中,表面涂层是多价的。多价表面涂层是包含两种或更多种靶向配体(例如,包含不同配体的两种或更多种递送分子)的组合物。多聚体(在这种情况下为三聚体)表面涂层(外壳)的实例是包含靶向配体干细胞因子(SCF)(其靶向c-Kit受体,也称为CD117)、CD70(其靶向CD27)和含SH2结构域的蛋白1A(SH2D1A)(其靶向CD150)的表面涂层。例如,在一些情况下,对于靶向造血干细胞(HSC) [KLS (c-Kit⁺Lin⁻Sca-1⁺) 和CD27⁺/IL-7Ra⁻/CD150⁺/CD34⁻], 主题纳米颗粒包含表面涂层,所述表面涂层包含分别靶向c-Kit、CD27和CD150的靶向配体SCF、CD70和含SH2结构域蛋白1A(SH2D1A)的组合物(参见,例如,表1)。在一些情况下,此类表面涂层可以选择性地靶向其它淋巴和骨髓祖细胞上的HSPC和长期HSC (c-Kit⁺/Lin⁻/Sca-1⁺/CD27⁺/IL-7Ra⁻/CD150⁺/CD34⁻)。

[0543] 在一些示例性实施方案中,所有三种靶向配体(SCF、CD70和SH2D1A)通过与阳离子锚定结构域(例如,诸如6H的聚组氨酸,诸如9R的聚精氨酸,等等)融合而锚定至纳米颗粒。例如,(1) 靶向多肽SCF(其靶向c-kit受体)可以包含XMEGICRNRVTNNVKDVTCLVANLPKDYMITLKYVPGMDVLPSCWISEMVVQLSDSLTDLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSKDLKKSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKDFVVASETSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVAX (SEQ ID NO:194), 其中X是阳离子锚定结构域(例如,诸如6H的聚组氨酸、诸如9R的聚精氨酸等), 例如,X在某些情况下可以存在于N-末端和/或C-末端处或者可以嵌入多肽序列中;(2) 靶向多肽CD70(其靶向CD27)可以包含XPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPDLKQGLRIHRDGIYMHVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLGTLLPSRNTDETFQVQWVRPX (SEQ ID NO:195), 其中X是阳离子锚定结构域(例如,诸如6H的聚组氨酸、诸如9R的聚精氨酸等), 例如,X在某些情况下可以存在于N-末端和/或C-末端处或者可以嵌入多肽序列中;以及(3) 靶向多肽SH2D1A(其靶向CD150)可以包含XSGLVPRGSHMDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSSEVPGVYCLCVLYHGYIYTYRVSQTETGWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPVLPVEKKSSARSTQGTGIREDPDVCLKAP (SEQ ID NO:196), 其中X是阳离子锚定结构域(例如,诸如6H的聚组氨酸、诸如9R的聚精氨酸等), 例如,X在某些情况下可以存在于N-末端和/或C-末端处或者可以嵌入多肽序列(例如,如MGSSXSGLVPRGSHMDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSSEVPGVYCLCVLYHGYIYTYRVSQTETGWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPVLPVEKKSSARSTQGTGIREDPDVCLKAP (SEQ ID NO:197)) 中。

[0544] 如上所述,本公开的纳米颗粒可以包括多个靶向配体(作为表面涂层的一部分), 以便靶向所需细胞类型,或者靶向所需细胞类型的组合。在图17(图A-B)中描绘了小鼠和人造血细胞谱系中的目标细胞的实例,以及对于那些细胞已经鉴定的标志物。例如,目标细胞表面标志物的各种组合包括但不限于:[小鼠] (i) CD150; (ii) Sca1, cKit, CD150; (iii) CD150和CD49b; (iv) Sca1, cKit, CD150和CD49b; (v) CD150和Flt3; (vi) Sca1, cKit, CD150和Flt3; (vii) Flt3和CD34; (viii) Flt3, CD34, Sca1和cKit; (ix) Flt3和CD127; (x) Sca1, cKit、

Flt3和CD127; (xi) CD34; (xii) cKit和CD34; (xiii) CD16/32和CD34; (xiv) cKit、CD16/32和CD34; 和 (xv) cKit; 以及[人] (i) CD90和CD49f; (ii) CD34, CD90和CD49f; (iii) CD34; (iv) CD45RA和CD10; (v) CD34, CD45RA和CD10; (vi) CD45RA和CD135; (vii) CD34、CD38、CD45RA和CD135; (viii) CD135; (ix) CD34、CD38和CD135; 和 (x) CD34和CD38。因此, 在一些情况下, 表面涂层包括提供与表面蛋白或表面蛋白的组的靶向结合的一种或多种靶向配体, 所述一种或多种靶向配体选自: [小鼠] (i) CD150; (ii) Sca1, cKit, CD150; (iii) CD150和CD49b; (iv) Sca1, cKit, CD150和CD49b; (v) CD150和Flt3; (vi) Sca1, cKit, CD150和Flt3; (vii) Flt3和CD34; (viii) Flt3、CD34、Sca1和cKit; (ix) Flt3和CD127; (x) Sca1, cKit, Flt3和CD127; (xi) CD34; (xii) cKit和CD34; (xiii) CD16/32和CD34; (xiv) cKit、CD16/32和CD34; 和 (xv) cKit; 以及[人] (i) CD90和CD49f; (ii) CD34, CD90和CD49f; (iii) CD34; (iv) CD45RA和CD10; (v) CD34, CD45RA和CD10; (vi) CD45RA和CD135; (vii) CD34、CD38、CD45RA和CD135; (viii) CD135; (ix) CD34、CD38和CD135; 和 (x) CD34和CD38。因为主题纳米颗粒可以包含多于一种靶向配体, 并且因为一些细胞包含重叠标记, 所以可以使用表面涂层的组合靶向多种不同的细胞类型, 例如, 在一些情况下, 表面涂层可以靶向一种特定细胞而在其它情况下, 表面涂层可以靶向多于一种特定细胞类型 (例如, 2种或更多种、3种或更多种、4种或更多种细胞类型)。例如, 可以靶向造血谱系内的任何细胞组合。作为说明性实例, 靶向CD34 (使用提供与CD34的靶向结合的靶向配体) 可以导致纳米颗粒将有效负载递送到造血谱系内的若干不同细胞 (参见, 例如图17, 图A和B)。

[0545] iv. 递送

[0546] 提供了将核酸、蛋白或核糖核蛋白有效负载递送到细胞的方法。如上所述, 在一些情况下, 有效负载包含基因编辑工具。因此, 在一些情况下, 使用主题方法来进行位点特异性基因组编辑, 其在一些情况下, 例如, 当在供体DNA模板的存在下进行, 导致同源定向修复。

[0547] 此类方法包括使细胞与主题纳米颗粒 (或主题病毒或非病毒递送载体) 接触的步骤。主题纳米颗粒 (或主题病毒或非病毒递送载体) 可用于将有效负载递送至任何预期的真核靶细胞。在一些情况下, 靶细胞是哺乳动物细胞 (例如, 啮齿动物、小鼠、大鼠、有蹄动物、牛、羊、猪、马、骆驼、兔子、犬 (狗)、猫科动物 (猫)、灵长类动物、非人类灵长类动物或人的细胞)。任何细胞类型都可以被靶向, 并且在一些情况下, 特定细胞的特异性靶向取决于靶向配体的存在, 例如作为表面涂层的一部分, 其中靶向配体提供与特定细胞类型的靶向结合。例如, 可以靶向的细胞包含但不限于骨髓细胞、造血干细胞 (HSC)、长期HSC、短期HSC、造血干细胞和祖细胞 (HSPC)、外周血单核细胞 (PBMC)、骨髓祖细胞、淋巴祖细胞、T细胞、B细胞、NKT细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、粒细胞、红细胞、巨核细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、红系祖细胞 (例如, HUDEP细胞)、巨核细胞-红系祖细胞 (MEP)、共同髓系祖细胞 (CMP)、多能祖细胞 (MPP)、造血干细胞 (HSC), 短期HSC (ST-HSC)、IT-HSC、长期HSC (LT-HSC)、内皮细胞、神经细胞、星形胶质细胞、胰腺细胞、胰岛β细胞、肌细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、脂肪细胞、肠细胞、结肠细胞和胃细胞。

[0548] 各种应用的实例 (例如, 用于靶向神经元、胰腺细胞、造血干细胞和多能祖细胞等) 在上文中, 例如, 在靶向配体的上下文进行了讨论。例如, 可以靶向造血干细胞和多能祖细胞以进行体内基因编辑 (例如, 插入)。甚至在体内编辑1%的骨髓细胞 (约150亿个细胞) 将

比离体治疗(约100亿个细胞)靶向更多的细胞。作为另一个实例,可以靶向胰腺细胞(例如, β 胰岛细胞),例如,以治疗胰腺癌、治疗糖尿病等。作为另一个实例,可以靶向如神经细胞等大脑中的体细胞,(例如,以治疗如亨廷顿病、帕金森病(例如,LRRK2突变)和ALS(例如,SOD1突变)等适应症)。在一些情况下,这可以通过直接颅内注射来实现。

[0549] 作为另一个实例,可以用主题纳米颗粒(或主题病毒或非病毒递送载体)靶向内皮细胞和造血系统的细胞(例如,巨核细胞和/或巨核细胞上游的任何祖细胞,如巨核细胞-红系祖细胞(MEP)、共同髓系祖细胞(CMP)、多能祖细胞(MPP)、造血干细胞(HSC)、短期HSC(ST-HSC)、IT-HSC、长期HSC(LT-HSC)-参见,例如图17)以治疗冯·维勒布兰德氏病。例如,可以靶向在编码冯·维勒布兰德因子(VWF)的基因中具有突变的细胞(例如,内皮细胞;巨核细胞和/或巨核细胞上游的任何祖细胞,如MEP、CMP、MPP、HSC(如ST-HSC、IT-HSC和/或LT-HSC))以引入活性蛋白(例如,通过递送功能性VWF蛋白和/或编码功能性VWF蛋白的核酸)和/或以编辑突变基因,例如,通过引入替代序列(例如,通过递送基因编辑工具并且递送DNA供体模板)。在以上一些情况下(例如,在与治疗冯维勒布兰德氏病相关的情况下;在与靶向在编码VWF的基因中具有突变的细胞相关的情况下),主题靶向配体提供与E-选择蛋白的靶向结合。

[0550] 作为另一个实例,可以用主题纳米颗粒(或主题病毒或非病毒递送载体)靶向干细胞谱系的细胞(例如,造血谱系的干细胞和/或祖细胞,例如,GMP、MEP、CMP、MLP、MPP和/或HSC)以增加细胞中干细胞因子(SCF)的表达,其因此可以驱动靶细胞的增殖。例如,主题纳米颗粒(或主题病毒或非病毒递送载体)可用于将SCF和/或编码SCF的核酸(DNA或mRNA)递送至靶细胞。

[0551] 本公开的方法和组合物可以用于治疗任何数量的疾病,包含与例如基因组中的突变等已知致病突变相关的任何疾病。例如,本公开的方法和组合物可以用于治疗镰状细胞病、 β 地中海贫血、HIV、骨髓增生异常综合征、JAK2介导的真性红细胞增多症、JAK2介导的原发性骨髓纤维化、JAK2介导的白血病以及各种血液病。作为另外的非限制性实例,本公开的方法和组合物还可以用于B细胞抗体产生、免疫疗法(例如,递送检查点阻断试剂)以及干细胞分化应用。

[0552] 如上文所提到的,在一些实施例中,靶向配体提供与KLS CD27+/IL-7Ra-/CD150+/CD34-造血干细胞和祖细胞(HSPC)的靶向结合。例如,可以引入基因编辑工具(本文其它地方所描述的)以破坏BCL11a转录因子的表达并且因此产生胎儿血红蛋白。作为另一个实例,可以直接靶向 β -珠蛋白(HBB)基因以用对应的同源定向修复供体模板校正改变的E7V取代。作为一个说明性实例CRISPR/Cas RNA指导的多肽(例如,Cas9、CasX、CasY、Cpf1)可以与适当的指导RNA一起递送,使得其将与HBB基因上的位点结合并且在基因组中产生双链或单链断裂,启动基因组修复。在一些情况下,引入DNA供体模板(单链或双链)(作为有效负载的一部分)并释放14-30天,同时可以在1-7天的过程中释放指导RNA/CRISPR/Cas蛋白复合物(核糖核蛋白复合物)。在一些情况下,有效负载可以包含用于ku70或ku80的siRNA,例如,所述siRNA可以用于促进同源定向修复(HDR)并且限制插入缺失形成。在一些情况下,用于SIRT6的mRNA在14-30d内释放以在核酸酶介导的位点特异性切割之后促进HDR驱动的供体链的插入。

[0553] 在一些实施方案中,靶向配体提供与CD4+或CD8+T细胞、造血干细胞和祖细胞

(HSPC) 或外周血单核细胞 (PBMC) 的靶向结合, 以修饰T细胞受体。例如, 可以引入一个或多个基因编辑工具 (本文其它地方所描述的) 以修饰T细胞受体。可以直接靶向并且用对应的同源定向修复供体模板取代T细胞受体以形成新型T细胞受体。作为一个实例, CRISPR/Cas RNA引导的多肽 (例如, Cas9, CasX, CasY, Cpf1) 可以与适当的引导RNA一起递送, 使得其将与TCR基因上的位点结合并且在基因组中产生双链或单链断裂, 启动基因组修复。在一些情况下, 引入用于HDR的DNA供体模板 (单链或双链) (作为有效负载的一部分)。对于技术人员而言将显而易见的是, 可以根据本公开使用其它CRISPR引导RNA和HDR供体序列、靶向 β -珠蛋白、CCR5、T细胞受体或任何其它目的基因和/或其它表达载体。

[0554] 在一些情况下, 使细胞与主题纳米颗粒 (或主题病毒或非病毒递送载体) 接触时, 接触是体外的 (例如, 细胞处于培养中), 例如, 细胞可以是已建立的组织培养细胞系的细胞。在一些情况下, 接触是离体的 (例如, 细胞是从个体 (例如患者) 分离的原代细胞 (或近后代)。在一些情况下, 细胞是体内的并且因此在生物体的 (部分的) 内部。作为体内接触的实例, 在一些情况下, 接触步骤包括向个体施用主题纳米颗粒 (或主题病毒或非病毒递送载体)。

[0555] 可以经由以下途径中的任何一种将主题纳米颗粒 (或主题病毒或非病毒递送载体) 引入到受试者体内 (即, 施用给个体): 全身的、局部的、肠胃外的、皮下的 (s.c.)、静脉内的 (i.v.)、颅内的 (i.c.)、脊柱内的、眼内的、皮内的 (i.d.)、肌肉内的 (i.m.)、淋巴管内的 (i.l.) 或进入脊髓液。可以通过注射 (例如, 全身注射、直接局部注射、局部注射到或接近肿瘤和/或肿瘤切除部位等) 导管等引入主题纳米颗粒 (或主题病毒或非病毒递送载体)。用于局部递送 (例如, 递送到肿瘤和/或癌症部位) 的方法的实例包含例如通过推注, 例如, 通过注射器, 例如, 注射到关节、肿瘤或器官中, 或者在关节、肿瘤或器官附近; 例如, 通过连续输注, 例如, 通过插管, 例如, 用对流 (参见, 例如, 美国申请第20070254842号, 通过引用并入本文)。

[0556] 对受试者的治疗施用次数可以变化。将主题纳米颗粒 (或主题病毒或非病毒递送载体) 引入个体可以是一次性事件; 但在某些情况下, 这种治疗可能会在一段有限的时间内引起改善并且需要进行一系列持续的重复治疗。在其它情况下, 在观察到效果之前, 可能需要多次施用主题纳米颗粒 (或主题病毒或非病毒递送载体)。如本领域普通技术人员将容易理解的, 确切的方案取决于疾病或病症、疾病的阶段和所治疗的个体的参数。

[0557] “治疗有效剂量”或“治疗剂量”是足以产生期望的临床结果 (即, 实现治疗效果) 的量。治疗有效剂量可以以一次或多次施用进行施用。出于本公开的目的, 主题纳米颗粒 (或主题病毒或非病毒递送载体) 的治疗有效剂量是当向个体施用时, 足以减轻、改善、稳定、逆转、防止、减缓或延迟疾病状态/病痛的进展的量。

[0558] 除了去除已经整合到宿主基因组中的任何逆转录病毒DNA之外, 示例治疗性干预是产生对HIV感染的抗性的干预。T细胞直接受HIV影响并且因此可以探索CD34+和CD45+细胞的混合血液靶向策略以递送双引导核酸酶。通过同时靶向HSC和T细胞并且通过多个引导核酸酶 (例如, 在单个颗粒内) 向CCR5- Δ 32和gag/rev/pol基因递送消融, 可以通过患者生命的持久性产生通用的HIV疗法。

[0559] v. 共同递送 (不一定是本公开的纳米颗粒)

[0560] 如上所述, 将多种有效负载作为相同包装的一部分递送的一个优点是每种有效负

载的效率不被削弱。因此,在一些实施方案中,一种或多种基因编辑工具(例如,如上所述)与蛋白(和/或编码蛋白的DNA或mRNA)和/或提高基因组编辑效率的非编码RNA组合(例如,作为相同包装/递送载体的一部分,其中递送载体不需要是本公开的纳米颗粒)递送。在一些实施方案中,一种或多种基因编辑工具与蛋白(和/或编码蛋白的DNA或mRNA)和/或控制细胞分裂和/或分化的非编码RNA组合(例如,作为相同包装/递送载体的一部分,其中递送载体不需要是本公开的纳米颗粒)递送。例如,在一些情况下,一种或多种基因编辑工具与蛋白(和/或编码蛋白的DNA或mRNA)和/或控制细胞分裂的非编码RNA组合(例如,作为相同包装/递送载体的一部分,其中递送载体不需要是本公开的纳米颗粒)递送。在一些情况下,一种或多种基因编辑工具与蛋白(和/或编码蛋白的DNA或mRNA)和/或控制分化的非编码RNA组合(例如,作为相同包装/递送载体的一部分,其中递送载体不需要是本公开的纳米颗粒)递送。在一些情况下,一种或多种基因编辑工具与蛋白(和/或编码蛋白的DNA或mRNA)和/或使细胞DNA修复机制偏向非同源末端连接(NHEJ)或同源定向修复(HDR)的非编码RNA组合(例如,作为相同包装/递送载体的一部分,其中递送载体不需要是本公开的纳米颗粒)递送。

[0561] 如上所述,在一些情况下,递送载体不需要是本公开的纳米颗粒。例如,在一些情况下,递送载体是病毒的,并且在一些情况下,递送载体是非病毒的。非病毒递送系统的实例包括可用于使多种核酸有效负载,或蛋白和核酸有效负载的组合共凝聚的材料。实例包括但不限于:(1)基于脂质的颗粒诸如两性或阳离子脂质,和外来体或外来体来源的囊泡;(2)无机/杂化复合颗粒,诸如包括与核酸和/或蛋白有效负载共凝聚的离子复合物,以及可以从Ca、Mg、Si、Fe的阳离子离子态和生理阴离子如 O^{2-} 、OH、 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 凝聚的复合物的那些;(3)碳水化合物递送载体如环糊精和/或藻酸盐;(4)聚合物和/或共聚物复合物,如基于聚(氨基酸)的静电复合物、聚(酰胺-胺)和阳离子聚(B-氨基酯);(5)病毒样颗粒(例如,基于蛋白和核酸的),诸如Li2016人工病毒。病毒递送系统的实例包括但不限于:AAV、腺病毒、逆转录病毒和慢病毒。

[0562] 用于共同递送的有效负载的实例

[0563] 在一些实施方案中,一种或多种基因编辑工具可以与以下一种或多种组合(例如,作为相同包装/递送载体的一部分,其中递送载体不需要是本公开的纳米颗粒)递送:SCF(和/或编码SCF的DNA或mRNA)、HoxB4(和/或编码HoxB4的DNA或mRNA)、BCL-XL(和/或编码BCL-XL的DNA或mRNA)、SIRT6(和/或编码SIRT6的DNA或mRNA)、抑制miR-155的核酸分子(例如,siRNA和/或LNA)、降低ku70表达的核酸分子(例如,siRNA、shRNA、微RNA)和降低ku80表达的核酸分子(例如,siRNA、shRNA、微RNA)。

[0564] 对于可以一起递送的微RNA(作为RNA递送或作为编码RNA的DNA递送)的实例,参见图18A。例如,以下微RNA可用于以下目的:用于阻断多能干细胞向外胚层谱系的分化:miR-430/427/302;用于阻断多能干细胞向内胚层谱系的分化:miR-109和/或miR-24;用于驱动多能干细胞向内胚层谱系的分化:miR-122和/或miR-192;用于驱动外胚层祖细胞向角化细胞命运的分化:miR-203;用于驱动神经嵴干细胞向平滑肌命运的分化:miR-145;用于驱动神经干细胞向神经胶质细胞命运和/或神经元命运的分化:miR-9和/或miR-124a;用于阻断中胚层祖细胞向软骨细胞命运的分化:miR-199a;用于驱动中胚层祖细胞向成骨细胞命运的分化:miR-296和/或miR-2861;用于驱动中胚层祖细胞向心肌命运的分化:miR-1;用于阻

断中胚层祖细胞向心肌命运的分化:miR-133;用于驱动中胚层祖细胞向骨骼肌命运的分化:miR-214、miR-206、miR-1和/或miR-26a;用于阻断中胚层祖细胞向骨骼肌命运的分化:miR-133、miR-221和/或miR-222;用于驱动造血祖细胞向分化的分化:miR-223;用于阻断造血祖细胞向分化的分化:miR-128a和/或miR-181a;用于驱动造血祖细胞向淋巴祖细胞分化:miR-181;用于阻断造血祖细胞向淋巴祖细胞分化:miR-146;用于阻断造血祖细胞向骨髓祖细胞分化:miR-155、miR-24a和/或miR-17;用于驱动淋巴祖细胞向T细胞命运的分化:miR-150;用于阻断骨髓祖细胞向粒细胞命运的分化:miR-223;用于阻断骨髓祖细胞向单核细胞命运的分化:miR-17-5p、miR-20a和/或miR-106a;用于阻断骨髓祖细胞向红细胞命运的分化:miR-150、miR-155、miR-221和/或miR-222;和用于驱动骨髓祖细胞向红细胞命运的分化:miR-451和/或miR-16。

[0565] 对于可以与一种或多种基因编辑工具(例如,如本文其他地方所述)一起递送的信号传导蛋白(例如,细胞外信号传导蛋白)的实例,参见图18B。例如,以下信号传导蛋白(例如,细胞外信号传导蛋白)(例如,作为担保或作为编码蛋白的核酸诸如DNA或RNA递送)可用于以下目的:用于驱动造血干细胞向共同淋巴祖细胞谱系分化:IL-7;用于驱动造血干细胞向共同骨髓祖细胞谱系分化:IL-3、GM-CSF和/或M-CSF;用于驱动共同淋巴祖细胞向B细胞命运的分化:IL-3、IL-4和/或IL-7;用于驱动共同淋巴祖细胞向自然杀伤细胞命运的分化:IL-15;用于驱动共同淋巴祖细胞向T细胞命运的分化:IL-2、IL-7和/或Notch;用于驱动共同淋巴祖细胞向树突细胞命运的分化:Flt-3配体;用于驱动共同骨髓祖细胞向树突细胞命运的分化:Flt-3配体、GM-CSF和/或TNF- α ;用于驱动共同骨髓祖细胞向粒细胞-巨噬细胞祖细胞谱系分化:GM-CSF;用于驱动共同骨髓祖细胞向巨核细胞-红细胞祖细胞谱系分化:IL-3、SCF和/或Tpo;用于驱动巨核细胞-红细胞祖细胞向巨核细胞命运的分化:IL-3、IL-6、SCF和/或Tpo;用于驱动巨核细胞-红细胞祖细胞向红细胞命运的分化:促红细胞生成素;用于驱动巨核细胞向血小板命运的分化:IL-11和/或Tpo;用于驱动粒细胞-巨噬细胞祖细胞向单核细胞谱系分化:GM-CSF和/或M-CSF;用于驱动粒细胞-巨噬细胞祖细胞向成髓细胞谱系分化:GM-CSF;用于驱动单核细胞向单核细胞衍生的树突细胞命运的分化:Flt-3配体、GM-CSF、IFN- α 和/或IL-4;用于驱动单核细胞向巨噬细胞命运的分化:IFN- γ 、IL-6、IL-10和/或M-CSF;用于驱动成髓细胞向中性粒细胞命运的分化:G-CSF、GM-CSF、IL-6和/或SCF;用于驱动成髓细胞向嗜酸性粒细胞命运的分化:GM-CSF、IL-3和/或IL-5;并且用于驱动成髓细胞向嗜碱性粒细胞命运的分化:G-CSF、GM-CSF和/或IL-3。

[0566] 可以与一种或多种基因编辑工具(例如,如本文其他地方所述)组合递送的蛋白的实例(例如,作为蛋白和/或核酸,诸如编码所述蛋白的DNA或RNA)包括但不限于:SOX17、HEX、OSKM(Oct4/Sox2/Klf4/c-myc)和/或bFGF(例如,以驱动向肝干细胞谱系的分化);HNF4a(例如,以驱动向肝细胞命运的分化);聚(I:C)、BMP-4、bFGF和/或8-Br-cAMP(例如,以驱动向内皮干细胞/祖细胞谱系的分化);VEGF(例如,以驱动向动脉内皮命运的分化);Sox-2、Brn4、Myt11、Neurod2、Ascl1(例如,以驱动向神经干细胞/祖细胞谱系的分化);和BDNF、FCS、毛喉素(Forskolin)和/或SHH(例如,以驱动向神经元、星形胶质细胞和/或少突胶质细胞命运的分化)。

[0567] 可以与一种或多种基因编辑工具(例如,如本文其他地方所述)组合递送(例如,作为蛋白和/或核酸,如编码所述蛋白的DNA或RNA)的信号传导蛋白(例如,细胞外信号传导蛋

白)的实例包括但不限于:细胞因子(例如,IL-2和/或IL-15,例如,用于激活CD8+T细胞);配体和/或调节Notch、Wnt和/或Smad信号传导途径中的一种或多种的信号传导蛋白;SCF;干细胞分化因子(例如Sox2、Oct3/4、Nanog、Klf4、c-Myc等);和用于后续分离/纯化/浓缩的临时表面标记“标签”和/或荧光报告因子。例如,成纤维细胞可以通过Sox2的递送转化为神经干细胞,而在Oct3/4和小分子“表观遗传重置因子”的存在下它将变成心肌细胞。在有亨廷顿氏病(Huntington's disease)或CXCR4突变的患者中,这些成纤维细胞可分别编码与神经元和心肌细胞相关的患病表型性状。通过在单个包装中递送基因编辑校正和这些因子,可以显著降低由于引入的一种或多种但不是所有因子/有效负载而产生的有害影响的风险。

[0568] 应用包括体内方法,其中细胞死亡提示可以以基因编辑不成功为条件,并且细胞分化/增殖/活化与组织/器官特异性启动子和/或外源因子相关。接受基因编辑的患病细胞可以活化和增殖,但由于存在另一个启动子驱动的表达盒(例如与肿瘤抑制因子如p21或p53不存在相关的表达盒),随后这些细胞将被消除。另一方面,可以触发表达所需特征的细胞以进一步分化成所需的下游谱系。

[0569] vi. 试剂盒

[0570] 试剂盒也在本公开的范围。例如,在一些情况下,主题试剂盒可包括以下中的一种或多种(以任何组合):(i) 靶向配体,(ii) 接头,(iii) 与接头缀合的靶向配体,(iv) 与锚定结构域缀合的靶向配体(例如,有或无接头),(v) 用作可脱落层的药剂(例如,二氧化硅),(vi) 有效负载,例如siRNA或siRNA或shRNA的转录模板;基因编辑工具等,(vii) 可用作阳离子聚合物的聚合物,(viii) 可用作阴离子聚合物的聚合物,(ix) 可用作阳离子多肽的多肽,例如,一种或多种HTP,和(x) 主题病毒或非病毒递送载体。在一些情况下,主题试剂盒可以包含使用说明。试剂盒通常包含指示试剂盒内容物的预期用途的标签。术语标签包含在试剂盒上或与试剂盒上一起提供的任何书写或记录材料,或者以其它方式随附于试剂盒的书写或记录材料。

[0571] 本公开的示例性非限制性方面

[0572] 上述本主题的各方面(包括实施例)可以单独或与一个或多个其它方面或实施例组合有益。在不限制前述描述的情况下,下面在组A(编号1-74)、组B(编号1-33)和组C(编号1-11)中提供了本公开的某些非限制性方面。对于本领域普通技术人员在阅读本公开时将显而易见的是,每个单独编号的方面可以与前面或后面的任何单独编号的方面一起使用或组合。这旨在为所有这些方面的组合提供支持,并且不限于以下明确提供的方面的组合:

[0573] 方面(组A)

[0574] 1. 一种纳米颗粒,其包含核和包封所述核的可脱落层,其中所述核包含:

[0575] (i) 阴离子聚合物组合物;

[0576] (ii) 阳离子聚合物组合物;

[0577] (iii) 阳离子多肽组合物;和

[0578] (iv) 核酸和/或蛋白质有效负载,

[0579] 其中(a)所述阴离子聚合物组合物包含阴离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阴离子氨基酸的L-异构体的聚合物;和/或(b)所述阳离子聚合物组合物包含阳离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阳离子氨基酸的L-异构体的聚合物。

[0580] 2. 根据1所述的纳米颗粒,其中所述阴离子聚合物组合物包含选自聚(D-谷氨酸)(PDEA)和聚(D-天冬氨酸)(PDDA)的第一阴离子聚合物;并且包含选自聚(L-谷氨酸)(PLEA)和聚(L-天冬氨酸)(PLDA)的第二阴离子聚合物。

[0581] 3. 根据1或2所述的纳米颗粒,其中所述阳离子聚合物组合物包含选自聚(D-精氨酸)、聚(D-赖氨酸)、聚(D-组氨酸)、聚(D-鸟氨酸)和聚(D-瓜氨酸)的第一阳离子聚合物;并且包含选自聚(L-精氨酸)、聚(L-赖氨酸)、聚(L-组氨酸)、聚(L-鸟氨酸)和聚(L-瓜氨酸)的第二阳离子聚合物。

[0582] 4. 根据1-3中任一项所述的纳米颗粒,其中所述阴离子氨基酸的D-异构体的聚合物相对于所述阴离子氨基酸的L-异构体的聚合物以10:1至1:10范围的比率存在。

[0583] 5. 根据1-4中任一项所述的纳米颗粒,其中所述阳离子氨基酸的D-异构体的聚合物相对于所述阳离子氨基酸的L-异构体的聚合物以10:1至1:10范围的比率存在。

[0584] 6. 一种纳米颗粒,其包含核和包封所述核的可脱落层,其中所述核包含:

[0585] (a) 阴离子聚合物组合物;

[0586] (b) 阳离子聚合物组合物;

[0587] (c) 阳离子多肽组合物;和

[0588] (d) 核酸和/或蛋白有效负载,

[0589] 其中(a)和(b)之一包含氨基酸的D-异构体聚合物,(a)和(b)中的另一种包含氨基酸的L-异构体聚合物,并且其中D-异构体聚合物与L-异构体聚合物的比率在10:1至1.5:1,或1:1.5至1:10的范围内。

[0590] 7. 根据6所述的纳米颗粒,其中所述阴离子聚合物组合物包含选自聚(D-谷氨酸)(PDEA)和聚(D-天冬氨酸)(PDDA)的阴离子聚合物。

[0591] 8. 根据7所述的纳米颗粒,其中所述阳离子聚合物组合物包含选自聚(L-精氨酸)、聚(L-赖氨酸)、聚(L-组氨酸)、聚(L-鸟氨酸)和聚(L-瓜氨酸)的阳离子聚合物。

[0592] 9. 根据6所述的纳米颗粒,其中所述阳离子聚合物组合物包含选自聚(D-精氨酸)、聚(D-赖氨酸)、聚(D-组氨酸)、聚(D-鸟氨酸)和聚(D-瓜氨酸)的阳离子聚合物。

[0593] 10. 根据9所述的纳米颗粒,其中所述阴离子聚合物组合物包含选自聚(L-谷氨酸)(PLEA)和聚(L-天冬氨酸)(PLDA)的阴离子聚合物。

[0594] 11. 根据1-10中任一项所述的纳米颗粒,其中所述可脱落层是阴离子涂层。

[0595] 12. 根据1-11中任一项所述的纳米颗粒,其中所述可脱落层是pH和/或谷胱甘肽敏感的。

[0596] 13. 根据1-12中任一项所述的纳米颗粒,其中所述可脱落层包含以下中的一种或多种:二氧化硅、类肽、聚半胱氨酸、钙,磷酸钙、硫酸钙、锰、磷酸锰、硫酸锰、镁、磷酸镁、硫酸镁、铁、磷酸铁、硫酸铁、锂、磷酸锂和硫酸锂。

[0597] 14. 根据8所述的纳米颗粒,其中所述可脱落层是二氧化硅涂层。

[0598] 15. 根据1-14中任一项所述的纳米颗粒,其还包含包围所述可脱落层的表面涂层。

[0599] 16. 根据15所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层包含与所述可脱落层静电相互作用的阳离子组分。

[0600] 17. 根据15或16所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层包含以下中的一种或多种:阳离子氨基酸的聚合物、聚(精氨酸)、锚定结构域、阳离子锚定结构域、细胞穿透肽、病毒糖蛋

白、硫酸肝素蛋白聚糖和靶向配体。

[0601] 18. 根据15-17中任一项所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层是两性离子和多价的。

[0602] 19. 根据15-18中任一项所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层包含一种或多种靶向配体。

[0603] 20. 根据19所述的纳米颗粒,其中所述一种或多种靶向配体中的至少一种缀合至与所述可脱落层相互作用的锚定结构域。

[0604] 21. 根据21所述的纳米颗粒,其中所述锚定结构域是选自RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 15) 和HHHHHH (SEQ ID NO:16) 的阳离子锚定结构域。

[0605] 22. 根据21或21所述的纳米颗粒,其中所述锚定结构域通过接头缀合至所述一种或多种靶向配体中的至少一种。

[0606] 23. 根据22所述的纳米颗粒,其中所述接头不是多肽。

[0607] 24. 根据22所述的纳米颗粒,其中所述接头是多肽。

[0608] 25. 根据22-24中任一项所述的纳米颗粒,其中所述接头通过巯基或胺反应性化学与所述靶向配体缀合,和/或所述接头通过巯基或胺反应性化学与所述锚定结构域缀合。

[0609] 26. 根据22-25中任一项所述的纳米颗粒,其中所述一种或多种靶向配体中的至少一种包含半胱氨酸残基并通过所述半胱氨酸残基与所述接头缀合。

[0610] 27. 根据19-26中任一项所述的纳米颗粒,其中所述一种或多种靶向配体提供与B家族G蛋白偶联受体 (GPCR) 的靶向结合。

[0611] 28. 根据27所述的纳米颗粒,其中所述靶向配体相对于相应的野生型氨基酸序列在一个或多个内部氨基酸位置包含半胱氨酸取代。

[0612] 29. 根据27或28所述的纳米颗粒,其中所述靶向配体包含与氨基酸序列HGEGTFTS DLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO:1) 具有85%或更高同一性的氨基酸序列。

[0613] 30. 根据29所述的纳米颗粒,其中所述靶向配体在SEQ ID NO:1) 所示的氨基酸序列的位置L10、S11和K12中的一处或多处包含半胱氨酸取代。

[0614] 31. 根据30所述的纳米颗粒,其中所述靶向配体包含氨基酸序列HGEGTFTSDLCKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO:2) 。

[0615] 32. 根据19-31中任一项所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层包含一种或多种靶向配体,所述靶向配体提供与选自c-Kit、CD27和CD150的细胞表面蛋白的靶向结合。

[0616] 33. 根据19-32中任一项所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层包含一种或多种选自下组的靶向配体:狂犬病病毒糖蛋白 (RVG) 片段、ApoE-转铁蛋白、乳铁蛋白、黑素铁蛋白、卵转铁蛋白、L-选择素、E-选择素、P-选择素、PSGL-1、ESL-1、CD44、死亡受体-3 (DR3)、LAMP1、LAMP2、Mac2-BP、干细胞因子 (SCF)、CD70、含SH2结构域的蛋白1A (SH2D1A)、毒蜥外泌肽-4、GLP-1、靶向 $\alpha 5 \beta 1$ 的靶向配体、RGD、转铁蛋白配体、FGF片段、琥珀酸、二磷酸盐、CD90、CD45f、CD34、造血干细胞的趋化脂质、鞘氨醇、神经酰胺、鞘氨醇-1-磷酸、神经酰胺-1-磷酸和任何上述物质的活性靶向片段。

[0617] 34. 根据19-33中任一项所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层包含干细胞因子 (SCF) 或其靶向片段,CD70或其靶向片段,及含有SH2结构域的蛋白1A (SH2D1A) 或其靶向片段。

[0618] 35. 根据19-34中任一项所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层包含一种或多种靶向配体,所述靶向配体提供与选自以下的靶细胞的靶向结合:骨髓细胞、造血干细胞(HSC)、造血干细胞和祖细胞(HSPC)、外周血单核细胞(PBMC)、骨髓祖细胞、淋巴祖细胞、T细胞、B细胞、NKT细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、粒细胞、红细胞、巨核细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、红系祖细胞、巨核细胞-红系祖细胞(MEP)、共同髓系祖细胞(CMP)、多能祖细胞(MPP)、造血干细胞(HSC)、短期HSC(ST-HSC)、IT-HSC、长期HSC(LT-HSC)、内皮细胞、神经细胞、星形胶质细胞、胰腺细胞、胰岛β细胞、肝细胞、肌细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、脂肪细胞、肠细胞、结肠细胞和胃细胞。

[0619] 36. 根据19-34中任一项所述的纳米颗粒,其中所述表面涂层包含两种或更多种靶向配体,所述靶向配体的组合提供与选自以下的细胞的靶向结合:骨髓细胞、造血干细胞(HSC)、造血干细胞和祖细胞(HSPC)、外周血单核细胞(PBMC)、骨髓祖细胞、淋巴祖细胞、T细胞、B细胞、NKT细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、粒细胞、红细胞、巨核细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、红系祖细胞、巨核细胞-红系祖细胞(MEP)、共同髓系祖细胞(CMP)、多能祖细胞(MPP)、造血干细胞(HSC)、短期HSC(ST-HSC)、IT-HSC、长期HSC(LT-HSC)、内皮细胞、神经细胞、星形胶质细胞、胰腺细胞、胰岛β细胞、肝细胞、肌细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、脂肪细胞、肠细胞、结肠细胞和胃细胞。

[0620] 37. 根据1-36中任一项所述的纳米颗粒,其中所述阳离子多肽组合物包含含有核定位信号(NLS)的多肽。

[0621] 38. 根据37所述的纳米颗粒,其中所述NLS包含SEQ ID NO:151-157和201-264中任一个所示的氨基酸序列。

[0622] 39. 根据1-38中任一项所述的纳米颗粒,其中所述阳离子多肽组合物包含组蛋白尾肽(HTP)。

[0623] 40. 根据39所述的纳米颗粒,其中所述HTP与阳离子氨基酸聚合物缀合。

[0624] 41. 根据40的纳米颗粒,其中所述HTP通过半胱氨酸残基与阳离子氨基酸聚合物缀合。

[0625] 42. 根据40或41所述的纳米颗粒,其中所述阳离子氨基酸聚合物包含聚(赖氨酸)。

[0626] 43. 根据38-42中任一项所述的纳米颗粒,其中所述阳离子多肽组合物包含具有支化结构的组蛋白肽。

[0627] 44. 根据1-43中任一项所述的纳米颗粒,其中所述有效负载包括以下中的一种或多种:(i) CRISPR/Cas指导RNA, (ii) 编码CRISPR/Cas指导RNA的DNA分子,

[0628] (iii) 编码CRISPR/Cas RNA指导的多肽的核酸分子, (iv) CRISPR/Cas RNA指导的多肽, (v) 与CRISPR/Cas RNA指导的多肽复合的CRISPR/Cas指导RNA, (vi) 编码锌指蛋白(ZFP)的核酸分子, (vii) ZFP, (viii) 编码转录活化因子样效应(TALE)蛋白的核酸分子, (ix) TALE蛋白, 和(x) DNA供体模板。

[0629] 45. 根据1-44中任一项所述的纳米颗粒,其中所述有效负载包含(i) CRISPR/Cas指导RNA和/或编码所述CRISPR/Cas指导RNA的DNA分子; (ii) CRISPR/Cas RNA指导的多肽和/或编码所述CRISPR/Cas RNA指导的多肽的核酸分子。

[0630] 46. 根据45所述的纳米颗粒,其中所述有效负载还包含DNA供体模板。

[0631] 47. 根据1-46中任一项所述的纳米颗粒,其还包含以下的一种或多种:SCF、编码

SCF的核酸、HoxB4、编码HoxB4的核酸、BCL-XL、编码BCL-XL的核酸、SIRT6、编码SIRT6的核酸、抑制miR-155的核酸分子(例如, siRNA、LNA)、降低ku70表达的核酸分子(例如, siRNA、shRNA、微RNA)和降低ku80表达的核酸分子(例如, siRNA、shRNA、微RNA)。

[0632] 48. 一种纳米颗粒制剂, 其包含:

[0633] (a) 根据1-47中任一项所述的第一纳米颗粒, 其中所述有效负载包含以下中的一种或多种: (i) CRISPR/Cas指导RNA, (ii) 编码CRISPR/Cas指导RNA的DNA分子, (iii) 编码CRISPR/Cas RNA指导的多肽的核酸分子, (iv) CRISPR/Cas RNA指导的多肽, (v) 与CRISPR/Cas RNA指导的多肽复合的CRISPR/Cas指导RNA, (vi) 编码锌指蛋白(ZFP)的核酸分子, (vii) ZFP, (viii) 编码转录活化因子样效应(TALE)蛋白的核酸分子, 和(ix) TALE蛋白; 和

[0634] (b) 包含核酸有效负载的第二纳米颗粒, 所述核酸有效负载包含DNA供体模板。

[0635] 49. 一种多层纳米颗粒, 其包含:

[0636] (a) 内核, 其包含含有DNA供体模板的有效负载;

[0637] (b) 包围所述内核的第一可脱落层;

[0638] (c) 包围所述第一可脱落层的中间核, 其中所述中间核包含以下中的一种或多种: (i) CRISPR/Cas指导RNA, (ii) 编码CRISPR/Cas指导RNA的DNA分子, (iii) 编码CRISPR/Cas RNA指导的多肽的核酸分子, (iv) CRISPR/Cas RNA指导的多肽, (v) 与CRISPR/Cas RNA指导的多肽复合的CRISPR/Cas指导RNA, (vi) 锌指蛋白(ZFP), (vii) 编码ZFP的DNA分子, (viii) 编码转录活化因子样效应(TALE)蛋白, 和(ix) 编码TALE蛋白的核酸分子; 及

[0639] (d) 包围所述中间核的第二可脱落层。

[0640] 50. 根据49所述的多层纳米颗粒, 其中所述第一和/或第二可脱落层包括以下中的一种或多种: 二氧化硅、类肽、聚半胱氨酸、钙、磷酸钙、硫酸钙、锰、磷酸锰、硫酸锰、镁、磷酸镁、硫酸镁、铁、磷酸铁、硫酸铁、锂、磷酸锂和硫酸锂。

[0641] 51. 根据49或50所述的多层纳米颗粒, 其包含包围所述第二可脱落层的表面涂层。

[0642] 52. 根据51所述的多层纳米颗粒, 其中所述表面涂层包含与所述第二可脱落层静电相互作用的阳离子组分。

[0643] 53. 根据51或52所述的多层纳米颗粒, 其中所述表面涂层包含以下中的一种或多种: 阳离子氨基酸的聚合物、聚(精氨酸)、细胞穿透肽、病毒糖蛋白、硫酸肝素蛋白聚糖和靶向配体。

[0644] 54. 根据49-53中任一项所述的多层纳米颗粒, 其中所述表面涂层是两性离子和多价的。

[0645] 55. 根据49-54中任一项所述的多层纳米颗粒, 其中所述表面涂层包含一种或多种靶向配体。

[0646] 56. 一种将核酸和/或蛋白质有效负载递送至靶细胞的方法, 所述方法包括: 使真核靶细胞与1-47中任一项所述的纳米颗粒、48所述的纳米颗粒制剂和/或49-55中任一项所述的多层纳米颗粒接触。

[0647] 57. 根据56所述的方法, 其中所述有效负载包括基因编辑工具。

[0648] 58. 根据56或57所述的方法, 其中所述有效负载包括以下中的一种或多种: CRISPR/Cas指导RNA, 编码CRISPR/Cas指导RNA的DNA分子, CRISPR/Cas RNA指导的多肽, 编码CRISPR/Cas RNA指导的多肽的核酸分子, 锌指核酸酶, 编码锌指核酸酶的核酸分子, TALE

或TALEN,编码TALE或TALEN的核酸分子,DNA供体模板,编码位点特异性重组酶(例如,Cre重组酶、Dre重组酶、Flp重组酶、KD重组酶、B2重组酶、B3重组酶、R重组酶、Hin重组酶、Tre重组酶、PhiC31整合酶、Bxb1整合酶、R4整合酶、 λ 整合酶、HK022整合酶、HP1整合酶)的核酸分子,位点特异性重组酶,编码解离酶和/或转化酶(例如,Gin、Hin、 γ δ 3、Tn3、Sin、Beta)的核酸分子,解离酶和/或转化酶(例如,Gin、Hin、 γ δ 3、Tn3、Sin、Beta),转座子和/或源自转座子的DNA(例如,细菌转座子如Tn3、Tn5、Tn7、Tn9、Tn10、Tn903、Tn1681;真核转座子,如Tc1/mariner超家族转座子、PiggyBac超家族转座子、hAT超家族转座子、PiggyBac、睡美人、青蛙王子、Minos、Himar1、mariner)和转座酶。

[0649] 59. 根据56-58中任一项所述的方法,其中所述靶细胞是哺乳动物细胞。

[0650] 60. 根据56-59中任一项所述的方法,其中所述靶细胞是人细胞。

[0651] 61. 根据56-60中任一项所述的方法,其中所述靶细胞是体外培养的。

[0652] 62. 根据56-60中任一项所述的方法,其中所述靶细胞是体内的。

[0653] 63. 根据62所述的方法,其中所述接触包括将所述纳米颗粒施用给个体的步骤。

[0654] 64. 根据63所述的方法,其中所述个体患有亨廷顿氏病、ALS、帕金森氏病、胰腺癌、糖尿病或冯维勒布兰德氏病。

[0655] 65. 根据56-64中任一项所述的方法,其中所述纳米颗粒包括含有靶向配体的表面涂层。

[0656] 66. 根据65所述的方法,其中所述靶向配体提供与选自以下的细胞的靶向结合:骨髓细胞、造血干细胞(HSC)、造血干细胞和祖细胞(HSPC)、外周血单核细胞(PBMC)、骨髓祖细胞、淋巴祖细胞、T细胞、B细胞、NKT细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、粒细胞、红细胞、巨核细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、红系祖细胞(例如,HUDEP细胞)、巨核细胞-红系祖细胞(MEP)、共同髓系祖细胞(CMP)、多能祖细胞(MPP)、造血干细胞(HSC)、短期HSC(ST-HSC)、IT-HSC、长期HSC(LT-HSC)、内皮细胞、神经细胞、星形胶质细胞、胰腺细胞、胰岛 β 细胞、肝细胞、肌细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、脂肪细胞、肠细胞、结肠细胞和胃细胞。

[0657] 67. 根据56-66中任一项所述的方法,其中所述靶细胞选自:骨髓细胞、造血干细胞(HSC)、造血干细胞和祖细胞(HSPC)、外周血单核细胞(PBMC)、骨髓祖细胞、淋巴祖细胞、T细胞、B细胞、NKT细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、粒细胞、红细胞、巨核细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、红系祖细胞、巨核细胞-红系祖细胞(MEP)、共同髓系祖细胞(CMP)、多能祖细胞(MPP)、造血干细胞(HSC)、短期HSC(ST-HSC)、IT-HSC、长期HSC(LT-HSC)、内皮细胞、神经细胞、星形胶质细胞、胰腺细胞、胰岛 β 细胞、肝细胞、肌细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、脂肪细胞、肠细胞、结肠细胞和胃细胞。

[0658] 68. 根据56-67中任一项所述的方法,其中所述靶细胞是干细胞和/或祖细胞,并且所述有效负载包含干细胞因子(SCF)和/或编码SCF的核酸。

[0659] 69. 根据56-67中任一项所述的方法,其中(i)靶细胞来自患有冯维勒布兰德氏病的个体和/或靶细胞包括编码VWF的基因中的基因组突变,使得细胞产生亚正常水平的功能性VWF;(ii)靶细胞是以下任何一种:巨核细胞、内皮细胞、MEP、CMP、MPP、HSC、ST-HSC和LT-HSC;(iii)有效负载包括功能性VWF蛋白和/或编码功能性VWF的核酸。

[0660] 70. 一种支化组蛋白分子,其包含:一个或多个与阳离子聚合物的侧链缀合的组蛋

白尾肽 (HTP)。

[0661] 71. 根据70所述的支化组蛋白分子,其中所述阳离子聚合物包括聚(精氨酸)或聚(赖氨酸)。

[0662] 72. 根据70或71所述的支化组蛋白分子,其中所述阳离子聚合物高达40%的侧链与所述一个或多个HTP缀合。

[0663] 73. 一种支化组蛋白分子,其包含:一个或多个彼此缀合的组蛋白尾肽 (HTP),使得所述支化组蛋白分子形成选自以下的结构:刷状聚合物、网(例如蛛网结构)、接枝聚合物、星形聚合物、梳形聚合物、聚合物网络和树枝状大分子。

[0664] 74. 根据73所述的支化组蛋白分子,其中所述支化组蛋白分子形成网状结构。

[0665] 方面(组B)

[0666] 1. 一种用于递送蛋白和/或核酸有效负载的脂质制剂,所述脂质制剂包含:脂质和核,其中所述核包含:

[0667] (i) 阴离子聚合物组合物;

[0668] (ii) 阳离子聚合物组合物;

[0669] (iii) 阳离子多肽组合物;和

[0670] (iv) 核酸和/或蛋白质有效负载,

[0671] 其中(a)所述阴离子聚合物组合物包含阴离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阴离子氨基酸的L-异构体的聚合物;和/或(b)所述阳离子聚合物组合物包含阳离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阳离子氨基酸的L-异构体的聚合物。

[0672] 2. 根据1所述的脂质制剂,其中所述阴离子聚合物组合物包含选自聚(D-谷氨酸)(PDEA)和聚(D-天冬氨酸)(PDDA)的第一阴离子聚合物;并且包含选自聚(L-谷氨酸)(PLEA)和聚(L-天冬氨酸)(PLDA)的第二阴离子聚合物。

[0673] 3. 根据1或2所述的脂质制剂,其中所述阳离子聚合物组合物包含选自聚(D-精氨酸)、聚(D-赖氨酸)、聚(D-组氨酸),聚(D-鸟氨酸)和聚(D-瓜氨酸)的第一阳离子聚合物;并且包含选自聚(L-精氨酸)、聚(L-赖氨酸)、聚(L-组氨酸)、聚(L-鸟氨酸)和聚(L-瓜氨酸)的第二阳离子聚合物。

[0674] 4. 根据1-3中任一项所述的脂质制剂,其中所述阴离子氨基酸的D-异构体的聚合物相对于所述阴离子氨基酸的L-异构体的聚合物以10:1至1:10范围的比率存在。

[0675] 5. 根据1-4中任一项所述的脂质制剂,其中所述阳离子氨基酸的D-异构体的聚合物相对于所述阳离子氨基酸的L-异构体的聚合物以10:1至1:10范围的比率存在。

[0676] 6. 一种用于递送蛋白和/或核酸有效负载的脂质制剂,所述脂质制剂包含:脂质和核,其中所述核包含:

[0677] (a) 阴离子聚合物组合物;

[0678] (b) 阳离子聚合物组合物;

[0679] (c) 阳离子多肽组合物;和

[0680] (d) 核酸和/或蛋白有效负载,

[0681] 其中(a)和(b)之一包含氨基酸的D-异构体聚合物,(a)和(b)中的另一种包含氨基酸的L-异构体聚合物。

[0682] 7. 根据6所述的脂质制剂,其中D-异构体聚合物与L-异构体聚合物的比率为10:1

至1.5:1,或1:1.5至1:10。

[0683] 8. 根据7所述的脂质制剂,其中所述阴离子聚合物组合物包含选自聚(D-谷氨酸)(PDEA)和聚(D-天冬氨酸)(PDDA)的阴离子聚合物。

[0684] 9. 根据8所述的脂质制剂,其中所述阳离子聚合物组合物包含选自聚(L-精氨酸)、聚(L-赖氨酸)、聚(L-组氨酸)、聚(L-鸟氨酸)和聚(L-瓜氨酸)的阳离子聚合物。

[0685] 10. 根据7所述的脂质制剂,其中所述阳离子聚合物组合物包含选自聚(D-精氨酸)、聚(D-赖氨酸)、聚(D-组氨酸),聚(D-鸟氨酸)和聚(D-瓜氨酸)的阳离子聚合物。

[0686] 11. 根据10所述的脂质制剂,其中所述阴离子聚合物组合物包含选自聚(L-谷氨酸)(PLEA)和聚(L-天冬氨酸)(PLDA)的阴离子聚合物。

[0687] 12. 根据1-11中任一项所述的脂质制剂,其中所述阳离子多肽组合物包含含有核定位信号(NLS)的多肽。

[0688] 13. 根据12所述的脂质制剂,其中所述NLS包含SEQ ID NO:151-157和201-264中任一个所示的氨基酸序列。

[0689] 14. 根据1-13中任一项所述的脂质制剂,其中所述阳离子多肽组合物包含组蛋白尾肽(HTP)。

[0690] 15. 根据14所述的脂质制剂,其中所述HTP与阳离子氨基酸聚合物缀合。

[0691] 16. 根据15的脂质制剂,其中所述HTP通过半胱氨酸残基与阳离子氨基酸聚合物缀合。

[0692] 17. 根据14或15所述的脂质制剂,其中所述阳离子氨基酸聚合物包含聚(赖氨酸)。

[0693] 18. 根据1-17中任一项所述的脂质制剂,其中所述阳离子多肽组合物包含具有支化结构的组蛋白肽。

[0694] 19. 根据1-18中任一项所述的脂质制剂,其中所述有效负载包括以下中的一种或多种:(i) CRISPR/Cas指导RNA, (ii) 编码CRISPR/Cas指导RNA的DNA分子, (iii) 编码CRISPR/Cas RNA指导的多肽的核酸分子, (iv) CRISPR/Cas RNA指导的多肽, (v) 与CRISPR/Cas RNA指导的多肽复合的CRISPR/Cas指导RNA, (vi) 编码锌指蛋白(ZFP)的核酸分子, (vii) ZFP, (viii) 编码转录活化因子样效应(TALE)蛋白的核酸分子, (ix) TALE蛋白, (x) DNA供体模板, (xi) 编码位点特异性重组酶(例如, Cre重组酶、Dre重组酶、Flp重组酶、KD重组酶、B2重组酶、B3重组酶、R重组酶、Hin重组酶、Tre重组酶、PhiC31整合酶、Bxb1整合酶、R4整合酶、λ整合酶、HK022整合酶、HP1整合酶)的核酸分子, (xii) 位点特异性重组酶, (xiii) 编码解离酶和/或转化酶(例如, Gin、Hin、γ δ3、Tn3、Sin、Beta)的核酸分子, (xiv) 解离酶和/或转化酶(例如, Gin、Hin、γ δ3、Tn3、Sin、Beta), (xv) 转座子和/或源自转座子的DNA(例如, 细菌转座子如Tn3、Tn5、Tn7、Tn9、Tn10、Tn903、Tn1681; 真核转座子, 如Tc1/mariner超家族转座子、PiggyBac超家族转座子、hAT超家族转座子、PiggyBac、睡美人、青蛙王子、Minos、Himar1、mariner)和(xvi) 转座酶。

[0695] 20. 根据1-19中任一项所述的脂质制剂,其中所述有效负载包含(i) CRISPR/Cas指导RNA和/或编码所述CRISPR/Cas指导RNA的DNA分子; (ii) CRISPR/Cas RNA指导的多肽和/或编码所述CRISPR/Cas RNA指导的多肽的核酸分子。

[0696] 21. 根据20所述的脂质制剂,其中所述有效负载还包含DNA供体模板。

[0697] 22. 一种将核酸和/或蛋白有效负载递送至靶细胞的方法,所述方法包括:使真核

靶细胞与1-21中任一项所述的脂质制剂接触。

[0698] 23. 根据22所述的方法,其中所述有效负载包括基因编辑工具。

[0699] 24. 根据22或23所述的方法,其中所述有效负载包括以下中的一种或多种: CRISPR/Cas指导RNA,编码CRISPR/Cas指导RNA的DNA分子,CRISPR/CasRNA指导的多肽,编码CRISPR/Cas RNA指导的多肽的核酸分子,锌指核酸酶,编码锌指核酸酶的核酸分子,TALE或TALEN,编码TALE或TALEN的核酸分子,DNA供体模板,编码位点特异性重组酶(例如,Cre重组酶、Dre重组酶、Flp重组酶、KD重组酶、B2重组酶、B3重组酶、R重组酶、Hin重组酶、Tre重组酶、PhiC31整合酶、Bxb1整合酶、R4整合酶、 λ 整合酶、HK022整合酶、HP1整合酶)的核酸分子,位点特异性重组酶,编码解离酶和/或转化酶(例如,Gin、Hin、 γ δ 3、Tn3、Sin、Beta)的核酸分子,解离酶和/或转化酶(例如,Gin、Hin、 γ δ 3、Tn3、Sin、Beta),转座子和/或源自转座子的DNA(例如,细菌转座子如Tn3、Tn5、Tn7、Tn9、Tn10、Tn903、Tn1681;真核转座子,如Tc1/mariner超家族转座子、PiggyBac超家族转座子、hAT超家族转座子、PiggyBac、睡美人、青蛙王子、Minos、Himar1、mariner)和转座酶。

[0700] 25. 根据22-24中任一项所述的方法,其中所述靶细胞是哺乳动物细胞。

[0701] 26. 根据22-25中任一项所述的方法,其中所述靶细胞是人细胞。

[0702] 27. 根据22-26中任一项所述的方法,其中所述靶细胞是体外培养的。

[0703] 28. 根据22-26中任一项所述的方法,其中所述靶细胞是体内的。

[0704] 29. 根据28所述的方法,其中所述接触包括将所述脂质制剂施用给个体的步骤。

[0705] 30. 根据29所述的方法,其中所述个体患有亨廷顿氏病、ALS、帕金森氏病、胰腺癌、糖尿病或冯维勒布兰德氏病。

[0706] 31. 根据22-30中任一项所述的方法,其中所述靶细胞选自:骨髓细胞、造血干细胞(HSC)、造血干细胞和祖细胞(HSPC)、外周血单核细胞(PBMC)、骨髓祖细胞、淋巴祖细胞、T细胞、B细胞、NKT细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、粒细胞、红细胞、巨核细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、红系祖细胞、巨核细胞-红系祖细胞(MEP)、共同髓系祖细胞(CMP)、多能祖细胞(MPP)、造血干细胞(HSC)、短期HSC(ST-HSC)、IT-HSC、长期HSC(LT-HSC)、内皮细胞、神经细胞、星形胶质细胞、胰腺细胞、胰岛 β 细胞、肝细胞、肌细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、脂肪细胞、肠细胞、结肠细胞和胃细胞。

[0707] 32. 根据22-31中任一项所述的方法,其中所述靶细胞是干细胞和/或祖细胞,并且所述有效负载包含干细胞因子(SCF)和/或编码SCF的核酸。

[0708] 33. 根据22-31中任一项所述的方法,其中(i)靶细胞是患有冯维勒布兰德氏病的个体的细胞和/或靶细胞包括编码VWF的基因中的基因组突变,使得细胞产生亚正常水平的功能性VWF;(ii)靶细胞是以下任何一种:巨核细胞、内皮细胞、MEP、CMP、MPP、HSC、ST-HSC和LT-HSC;(iii)有效负载包括功能性VWF蛋白和/或编码功能性VWF的核酸。

[0709] 方面(组C)

[0710] 1. 一种将核酸和/或蛋白有效负载递送至靶细胞的方法,所述方法包括:使真核靶细胞与病毒或非病毒递送载体接触,所述递送载体包含:

[0711] (a) 基因编辑工具;和

[0712] (b) 诱导靶细胞增殖和/或使靶细胞分化偏向的核酸或蛋白药剂。

[0713] 2. 根据1所述的方法,其中(a)包括以下中的一种或多种:(i) CRISPR/Cas指导RNA,

(ii) 编码CRISPR/Cas指导RNA的DNA分子, (iii) 编码CRISPR/Cas RNA指导的多肽的核酸分子, (iv) CRISPR/Cas RNA指导的多肽, (v) 与CRISPR/Cas RNA指导的多肽复合的CRISPR/Cas指导RNA, (vi) 编码锌指蛋白(ZFP)的核酸分子, (vii) ZFP, (viii) 编码转录活化因子样效应(TALE)蛋白的核酸分子, (ix) TALE蛋白, (x) DNA供体模板, (xi) 编码位点特异性重组酶(例如, Cre重组酶、Dre重组酶、Flp重组酶、KD重组酶、B2重组酶、B3重组酶、R重组酶、Hin重组酶、Tre重组酶、PhiC31整合酶、Bxb1整合酶、R4整合酶、 λ 整合酶、HK022整合酶、HP1整合酶)的核酸分子, (xii) 位点特异性重组酶, (xiii) 编码解离酶和/或转化酶(例如, Gin、Hin、 $\gamma\delta$ 3、Tn3、Sin、Beta)的核酸分子, (xiv) 解离酶和/或转化酶(例如, Gin、Hin、 $\gamma\delta$ 3、Tn3、Sin、Beta), (xv) 转座子和/或源自转座子的DNA(例如, 细菌转座子如Tn3、Tn5、Tn7、Tn9、Tn10、Tn903、Tn1681; 真核转座子, 如Tc1/mariner超家族转座子、PiggyBac超家族转座子、hAT超家族转座子、PiggyBac、睡美人、青蛙王子、Minos、Himar1、mariner)和(xvi)转座酶。

[0714] 3. 根据1或2所述的方法, 其中(b)包含诱导靶细胞增殖的核酸或蛋白药剂。

[0715] 4. 根据1-3中任一项所述的方法, 其中(b)包含使靶细胞分化偏向的核酸或蛋白药剂。

[0716] 5. 根据1-4中任一项所述的方法, 其中(b)包含以下的一种或多种: SCF、编码SCF的核酸、HoxB4、编码HoxB4的核酸、BCL-XL、编码BCL-XL的核酸、SIRT6、编码SIRT6的核酸、抑制miR-155的核酸分子(例如, siRNA、LNA)、降低ku70表达的核酸分子(例如, siRNA、shRNA、微RNA)和降低ku80表达的核酸分子(例如, siRNA、shRNA、微RNA)。

[0717] 6. 根据1-5中任一项所述的方法, 其中(b)包含用于阻断或驱动靶细胞分化的微RNA。

[0718] 7. 根据1-6中任一项所述的方法, 其中(b)包含用于靶细胞分化的信号传导蛋白。

[0719] 8. 根据1-7中任一项所述的方法, 其中递送载体是非病毒的。

[0720] 9. 根据1-7中任一项所述的方法, 其中递送载体是病毒的。

[0721] 10. 根据1-9中任一项所述的方法, 其中递送载体不是纳米颗粒。

[0722] 11. 根据1-9中任一项所述的方法, 其中递送载体是纳米颗粒, 例如, 如本文所述的纳米颗粒。

[0723] 本领域普通技术人员显而易见的是可在不脱离本发明的精神和范围的情况下作出各种改变和修改。

[0724] 实验

[0725] 提出以下实例以便向本领域普通技术人员提供如何制造和使用本发明的完整公开和描述, 并且不旨在限制本发明的范围, 它们也不旨在表示以下实验是进行的全部或仅有的实验。虽然已努力确保关于使用的数字(例如, 量、温度等)的准确性, 但是应当对一些实验误差和偏差进行解释。除非另外指明, 否则部分是重量部份, 分子量是重量平均分子量, 温度是摄氏度, 并且压力是处于大气压或接近大气压。

[0726] 本说明书中所引用的所有公开案和专利申请均以引用的方式并入本文中, 就如同各个别公开案或专利申请专门且单独地指出以引用的方式并入一般。

[0727] 已经根据发现或提出的包含用于实践本发明的优选模式的特定实施例描述了本发明。本领域技术人员将理解的是, 鉴于本公开, 在不脱离本发明的预期范围的情况下, 可以对例示的特定实施例进行多种修改和改变。例如, 由于密码子冗余, 可以在不影响蛋白质

序列的情况下在底层DNA序列中进行改变。此外,由于生物功能等效性的考虑,可以在不影响生物作用的种类或数量的情况下在蛋白质结构中进行改变。希望所有此类修改包括于所附权利要求书的范围内。

[0728] 实施例1

[0729] 为了确定核制剂参数,使用荧光光谱法监测核酸凝聚(对于双链DNA有效负载而言)。在以增加的电荷比添加凝聚剂之后测量嵌入溴乙锭(EtBr)的发射光谱。由聚合物诱导的核酸凝聚引起的溴乙锭脱嵌导致荧光信号的下降。这是因为溴乙锭在DNA结合状态下显示出比未结合状态高得多的量子荧光产率。结果如图1所示。

[0730] 图1描绘了测试核酸有效负载凝聚的各种参数(例如阳离子:阴离子电荷比)的荧光测定法的结果。结果显示,例如,为2的电荷比对于编码Cas9和指导RNA分子的质粒的凝聚很有效。向每个孔中添加100 μ l阴离子溶液:100ng/ μ l DNA、80ng/ μ l聚(D-谷氨酸)(PDE)、0.5ng/ μ l溴乙锭。对于每个数据点,以12.5 μ l滴定凝聚物质。溶液中凝聚剂的总浓度(m/v)为0.4 μ g/ μ l,组蛋白尾肽(HTP)[H3K4(me3)]和聚(L-精氨酸)(PLR)的不同组成由括号中的质量分数表示。每次滴定后,在605nm下以250nm激发对板读数。对于每个测试的电荷比,对照包括:(i)“仅DNA”,其是没有EtBr的DNA;(ii)“DNA”,其为DNA加EtBr,不存在PDE、PLR或HTP;以及(iii)“DNA+PDE”,其为DNA加EtBr加PDE,不存在PLR或HTP。

[0731] 实施例2:示例合成方法

[0732] 程序是在无菌、无粉尘的环境(BSL-II罩)内进行的。气密注射器用70%乙醇灭菌,之后用经过滤的不含核酸酶的水漂洗3次,并在使用前储存在4 $^{\circ}$ C下。使用之前用RNA酶抑制剂处理表面。

[0733] 纳米颗粒核

[0734] 通过组合适量的有效负载(在这种情况下为质粒DNA(EGFP-N1质粒))与聚(D-谷氨酸)和聚(L-谷氨酸)的含水混合物(“阴离子聚合物组合物”),制备第一溶液(阴离子溶液)。用pH 8.5的10mM Tris-HCl将该溶液稀释至适当体积。通过用pH 5.5的60mM HEPES将含有适量凝聚剂的浓缩溶液稀释至适当体积,制备第二溶液(阳离子溶液),其为“阳离子聚合物组合物”和“阳离子多肽组合物”的组合。在这种情况下,“阳离子聚合物组合物”是聚(L-精氨酸),“阳离子多肽组合物”是16 μ g的H3K4(me3)(组蛋白H3的尾部,在K4上三甲基化)。

[0735] 通过将凝聚溶液滴加到玻璃小瓶或低蛋白结合离心管中的有效负载溶液中,然后在4 $^{\circ}$ C下温育30分钟,可以进行小于200 μ l批次的纳米颗粒核沉淀。对于大于200 μ l的批次,可以使用标准混合芯片(例如Dolomite Micromixer)或流体动力学流动聚焦芯片以微流体形式组合两种溶液。在每种情况下,可确定最佳输入流速,使得所得纳米颗粒核的悬浮液是单分散的,表现出低于100nm的平均粒度。

[0736] 在这种情况下,制备上述两种等体积溶液(一种阳离子凝聚剂溶液和一种阴离子凝聚剂溶液)用于混合。对于阳离子凝聚剂溶液,将聚合物/肽溶液添加到一根蛋白低结合管(eppendorf)中,然后用60mM HEPES(pH 5.5)稀释至总体积为100 μ l(如上所述)。将该溶液保持在室温下,同时制备阴离子溶液。对于阴离子凝聚剂溶液,将阴离子溶液在冰上冷却,同时最小程度地曝光。用10mM Tris-HCl(pH 8.5)稀释10 μ g核酸水溶液(大致1 μ g/ μ l)和7 μ g聚(D-谷氨酸)[.1%]水溶液至总体积100 μ l(如上所述)。

[0737] 使用.2微米注射器过滤器过滤两种溶液中的每一种,并转移至其自身的Hamilton 1ml气密注射器(玻璃,(插入产品编号))。将每个注射器放在Harvard Pump 11Elite双重注射泵上。用管形材料将注射器连接到Dolomite Micro Mixer芯片的适当入口,并且注射泵以120 μ l/分钟运行,总体积为100 μ l。所得溶液包括核组合物(其现在包括核酸有效负载、阴离子组分和阳离子组分)。纳米颗粒尺寸(峰值)为128.8nm, ζ 电位(峰值)为+10.5mV(100%) (例如,参见图2)。

[0738] 核稳定(添加可脱落层)

[0739] 为了用可脱落层涂覆所述核,然后将所得纳米颗粒核悬浮液与硅酸钠在10mM Tris HCl (pH8.5,10-500mM) 或氯化钙在10mM PBS (pH8.5,10-500mM) 中的稀释溶液组合,并使其在室温下温育1-2小时。在这种情况下,将核组合物添加到稀释的硅酸钠溶液中以用聚合二氧化硅的酸不稳定性涂层(可脱落层的实例)涂覆所述核。为此,首先将10 μ l储备硅酸钠(Sigma)溶解在1.99ml的Tris缓冲液(10mM Tris pH=8.5,1:200稀释度)中并充分混合。使用无菌0.1微米注射器过滤器过滤硅酸盐溶液,并将其转移至安装在注射泵上的无菌Hamilton气密注射器中。将上述核组合物也转移到也安装在注射泵上的无菌Hamilton气密注射器中。用PTFE管形材料将注射器连接到Dolomite Micro Mixer芯片的适当入口,并且注射泵以120 μ l/分钟运行。

[0740] 可以使用标准离心过滤装置(100kDa Amicon Ultra,Millipore)或使用高分子量截留膜在30mM HEPES (pH 7.4) 中透析来纯化稳定的(有涂层的)核。在这种情况下,使用离心过滤装置纯化稳定的(有涂层的)核。用稀释的PBS (1:800) 或HEPES洗涤收集的有涂层的纳米颗粒(纳米颗粒溶液)并再次过滤(可将溶液重新悬浮于500 μ l无菌分散缓冲液或无核酸酶的水中用于储存)。证明了有效的二氧化硅涂层。稳定化核的大小为110.6nm, ζ 电位为-42.1mV(95%) (图3)。

[0741] 表面涂层(外壳)

[0742] 表面涂层(也称为外壳)的添加,有时称为“表面官能化”,通过将配体物质(在这种情况下,是与作为阳离子锚定结构域的9-Arg肽序列融合的狂犬病病毒糖蛋白-‘RVG9R’)静电接枝到稳定的(在这种情况下是有二氧化硅涂层的)纳米颗粒的带负电荷的表面来实现。从二氧化硅涂层纳米颗粒开始,将其过滤并重新悬浮在分散缓冲液或水中,测定每种纳米颗粒分散体的最终体积,以及使得质子化胺基团的最终浓度为至少75 μ M所添加的聚合物或肽的所需量。添加所需的表面组成部分,将溶液超声处理20-30秒,然后温育1小时。在300kDa下进行离心过滤(可以使用标准离心过滤装置,例如来自Amicon Ultra Millipore的300-500kDa,或使用高分子量截留膜,例如在30mM HEPES (pH 7.4) 中透析来纯化最终产物),最终重新悬浮于细胞培养基或分散缓冲液中。在一些情况下,最佳外壳添加产生单分散的颗粒悬浮液,其平均粒度为50至150nm且 ζ 电位为0至-10mV。在这种情况下,具有外壳的纳米颗粒的大小为115.8nm, ζ 电位为-3.1mV(100%) (图4)。

[0743] 实施例3:纳米颗粒摄取

[0744] 在这些研究中(例如,参见图5),测试了具有各种表面化学和电荷比的纳米颗粒。配方是(电荷比是指纳米颗粒核):

[0745] HTT018B:电荷比(阳离子/阴离子)为2;表面涂层为聚(L-精氨酸)

[0746] HTT019B:电荷比为5;表面涂层为聚(L-精氨酸)

- [0747] HTT020B:电荷比为2,表面涂层为N-乙酰基Semax
- [0748] HTT021B:电荷比为5,表面涂层为N-乙酰基Semax
- [0749] HTT022B:电荷比为2,表面涂层为N-乙酰基Selank
- [0750] HTT023B:电荷比为5,表面涂层为N-乙酰基Selank
- [0751] L3000GFP:编码GFP的核酸(编码GFP的质粒)的lipofectamine(非纳米颗粒)递送
- [0752] L3000CRISPR:无GFP或荧光标签的CRISPR/Cas组分的lipofectamine(非纳米颗粒)递送。
- [0753] 产生纳米颗粒。对于HTT018B-023B,核组分包括核酸有效负载(CRISPR/Cas编码核酸:编码Cas9指导RNA的一个质粒和编码Cas9蛋白的第二质粒)和聚(L-精氨酸)(阳离子聚合物组合物),其用荧光团(FITC)标记使得可以通过荧光显微镜评估摄取。对于L3000GFP(阳性对照),不使用纳米颗粒,并且递送的核酸是编码GFP的质粒。对于L3000CRISPR(阴性对照),不使用纳米颗粒,并且递送的核酸是编码CRISPR组分的质粒,但是没有使用的质粒编码GFP,并且没有用FITC标记。
- [0754] 以每孔 10^5 个细胞(96孔板)的密度接种神经干细胞,并使其在补充有成纤维细胞生长因子(FGF)(1:1000)的Neurobasal培养基中生长。在接种后24小时,将纳米颗粒和Lipofectamine 3000(0.75 μ L试剂/ μ gDNA)引入细胞,每孔转染400ng的DNA有效负载。将纳米颗粒样品施加至培养的神经干细胞中,并温育4-24小时,然后用PBS洗涤多达3次,以去除任何非内化颗粒。通过以适当的激光激发和滤光器选择成像来确定摄取。使用20X物镜用Zeiss LSM780对细胞成像。作为替代或补充,可以使用高含量成像和流式细胞术获得定量摄取数据。三行描绘了三种不同的重复。
- [0755] 如上所述,样品HTT18B、HTT20B和HTT22B以2的电荷比制备,而样品HTT19B、HTT21B和HTT23B以5的电荷比制备。数据显示,电荷比为2(对于核的凝聚而言)导致比电荷比为5更高的内化。此外,七肽适应原Selank和Semax的表面涂层(外壳)促进比包括细胞穿透肽聚(L-精氨酸)[9.7kDa]的表面涂层更高层次的内化。
- [0756] 实施例4:表征纳米颗粒内化行为和亚细胞运输
- [0757] 使神经干细胞与包含CRISPR/Cas9质粒作为核酸有效负载的纳米颗粒接触。纳米颗粒核包括用荧光团(FITC)标记的聚(L-精氨酸)(阳离子聚合物组合物),使得可以通过荧光显微镜评估摄取。内体和细胞核分别用Lysotracker(红色)和Hoescht 3342(蓝色)染色。在接种后16小时,将纳米颗粒和Lipofectamine3000(0.75 μ L试剂/ μ gDNA)引入细胞,每孔转染400ng的DNA有效负载。在成像之前,将细胞与Hoescht 3342和Lysotracker Red一起孵育。在转染后2.5小时和5小时用Cellomics CX5,使用10x物镜对细胞成像(图6,图A-B)。定量测量纳米颗粒的荧光信号与染色内体和细胞核的荧光信号的共同定位,并且用所得皮尔逊积差系数表示共同定位程度(图6,图C-D)。
- [0758] 对于表2中列出的所有纳米颗粒(参见图6),核包括(i)表中所示的阳离子多肽组合物,(ii)核酸有效负载,(iii)聚(L-精氨酸)[阳离子氨基酸]聚合物和(iv)聚(L-谷氨酸)[阴离子氨基酸聚合物]。可脱落层是二氧化硅涂层,表面涂层如表2所示。
- [0759] 表2.

[0760]	样品名称	核的阳离子多肽组合物	表面涂层
	CAS9005	组蛋白尾肽(HTP)=H3K4(me3) [组蛋白H3的尾部, 在K4上三甲基化]	聚(L-精氨酸)(PLR)
	CAS9007	与上述相同	‘RVG’: 与9-Arg肽序列(作为阳离子锚定结构域)融合的狂犬病毒糖蛋白(RVG)
	CAS9009	与上述相同	TAT
[0761]	样品名称	核的阳离子多肽组合物	表面涂层
			(细胞穿透肽)
	HTT024	与上述相同	N-乙酰基Selank
	CAS9006	SV40 NLS	与9-Arg肽序列融合的RVG
	CAS9008	SV40 NLS	TAT (细胞穿透肽)

[0762] 图6,图C描绘了纳米颗粒聚合物(FITC标记的核聚合物)和Hoescht DNA染剂之间或纳米颗粒聚合物(FITC标记的核聚合物)和Lyotracker之间的皮尔逊积矩相关系数。在图A和B中生成图像的同时计算相关系数。将所有值标准化为阴性对照(Cas9Lipofectamine 3000)的值。在2.5小时和5小时时间点之间,Hoescht和FITC之间的皮尔逊相关性降低表明纳米颗粒聚合物随时间推移而降解,释放或扩散到核以外的区室。图6,图D描绘了纳米颗粒聚合物和内体(Lysotracker Red)之间的皮尔逊积矩相关系数。在图A和B中生成图像的同时计算相关系数。将所有值标准化为阴性对照(Cas9Lipofectamine 3000)的值。2.5小时和5小时时间点的比较表明内体随时间逃逸。

[0763] 实施例5:定时释放

[0764] 图7描绘了用纳米颗粒转染的外周血单核细胞(PBMC)的显微镜图像,其中核酸有效负载是编码GFP的mRNA。该图像证明,用包括核的纳米颗粒将mRNA表达延长至16天,所述核具有限定比率的阴离子氨基酸的D-异构体的聚合物和阴离子氨基酸的L-异构体的聚合物。在这种情况下,使用具有2:1比率的聚(D-谷氨酸)与聚(L-谷氨酸)的纳米颗粒核在16天时产生最大表达(图A=4天;图B=16天)。纳米颗粒核包括(i)阴离子聚合物组合物:总共7μg聚(谷氨酸)(即,D-和L-异构体组合总计7μg);(ii)阳离子聚合物组合物:聚(L-精氨酸);(iii)阳离子多肽组合物:H3K4(me3)[即组蛋白H3的尾部,在K4上三甲基化];和(iv)核酸有效负载:编码GFP的mRNA。纳米颗粒核由二氧化硅涂层(可脱落层)包封,表面涂层为聚(L-精氨酸)(PLR)。

[0765] 实施例6:提供与家族B GPCR的靶向结合的靶向配体

[0766] 图11提供了家族B GPCR的示意图,突出了在评估靶向配体时要考虑单独结构域,例如,用于结合变构/亲和力N-末端结构域和正构内体-分选/信号传导结构域。(图改编自Siu、Fai Yiu等人,《自然 (Nature)》499.7459 (2013):444-449)。当在靶向配体毒蜥外泌肽-4内选择用于半胱氨酸取代的位点时,考虑这种结构域。

[0767] 在图12中,半胱氨酸11取代(S11C)被鉴别为一种可能的氨基酸修饰,用于使毒蜥外泌肽-4与锚定结构域(例如,阳离子锚定结构域)缀合,其方式保持亲和力并且还接合促进核酸释放和限制核酸降解的长内体再循环途径。在模拟的毒蜥外泌肽-4 (SEQ ID NO:1)与胰高血糖素-GCGR (4ERS)以及GLP1-GLP1R-ECD复合物 (PDB:3IOL)的已知晶体结构的比对之后,PDB渲染在3维空间中旋转以预测交联的复合物必须面对的方向以免破坏两个结合裂缝。当分泌素-家族配体的交联位点与对应的分泌素-家族受体的两个结合裂缝充分正交时,于是确定高亲和力结合可以发生以及伴随着用于最佳的有效负载释放的长内体再循环途径整合。使用该技术,毒蜥外泌肽-4的氨基酸位置10、11和12被鉴别为用于插入半胱氨酸残基或被半胱氨酸残基取代的位置。

[0768] 实施例7:提供与RTK的靶向结合的靶向配体

[0769] 图13示出了作为三元FGF2-FGFR1-肝素复合物 (PDB上的1fq9)的一部分的tbFGF片段。确定CKNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS (突出显示的) (SEQ ID NO:14)对于FGFR1的亲和力是重要的。图14显示HFKDPK (SEQ ID NO:5)被确定是用于配体-受体正构活性和亲和力的肽。图15显示LESNNYNT (SEQ ID NO:6)也被确定是用于配体-受体正构活性和亲和力的肽。

[0770] 实施例8

[0771] 表3-表5提供了以下实验中使用的组分的指南(例如,凝聚数据、生理化学数据以及流式细胞术和成像数据)。

[0772] 表3.在以下实验中使用的递送分子的特征。靶向配体名称/命名格式:A_B_C_D_E_F其中A=受体名称:受体配体的名称是靶向的;B=靶向配体来源:靶向受体的配体名称(如果配体不是野生型,则修饰前缀为“m”或“rm”);C=接头名称;D=带电多肽名称;E=基于B的接头末端;以及F=版本号(以区分来自相同WT但AA序列不同的两种修饰的靶向配体);

[0773]

靶向配体(TL)/ 肽目录名称	序列	SEQ ID NO:	锚电荷	锚Mers/ 总Mers	接头 Mers/总 Mers	配体 Mers/ 总 Mers
PLR10	RRRRRRRRRR		10	100.00%	0.00%	0.00%
CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	SNRWLDVKGGG GGSGGGGSRRR RRRRRR		9	32.14%	35.71%	32.14%
CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRRGG GGSGGGGSVV LKYEKDAFKR		9	26.47%	29.41%	44.12%
CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	VVLKYEKDAFK RGGGGSGGGG SRRRRRRRRR		9	26.47%	29.41%	44.12%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	RRRRRRRRRRGG GGSGGGGSEN VLNE		9	34.62%	38.46%	26.92%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	ENLVLNEG SGGGGSRRRRRR RRR		9	34.62%	38.46%	26.92%
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	RRRRRRRRRRGG GGSGGGGSPTG MIRIHQM		9	31.03%	34.48%	34.48%
CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRRGG GGSGGGGSAA QEE		9	36.00%	40.00%	24.00%
CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRRGG GGSGGGGSTSV GKYPNTGYYGD		9	27.27%	30.30%	42.42%
CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C	TSVGKYPNTGY YGDGGGGSGGG GSRRRRRRRRR		9	27.27%	30.30%	42.42%
IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRRGG GGSGGGGSNPK LTRMLTFKFY		9	28.13%	31.25%	40.63%
IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C	NPKLTRMLTFKF YGGGGSGGGGS RRRRRRRRR		9	28.13%	31.25%	40.63%
PLK10_PEG22	KKKKKKKKKK- PEG22		10	31.25%	68.75%	0.00%

[0774]

靶向配体(TL)/ 肽目录名称	序列	SEQ ID NO:	锚电荷	锚Mers/ 总Mers	接头 Mers/总 Mers	配体 Mers/ 总 Mers
ALL_LIGANDS_EQUIMOLAR	N/A		9	30.25%	33.61%	36.13%
ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGG GGSGGGGSMIAS QFLSALTLLVLLIK ESGA		9	22.50%	25.00%	52.50%
ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_C	MIASQFLSALT VLLIKESGAGGG GSGGGGSRRRR RRRRR		9	22.50%	25.00%	52.50%
cKit_mSCF_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRGG GGSGGGGSEKFI LKVRPAFKAV		10	31.25%	68.75%	0.00%
EPOR_mEPO_6R_N	RRRRRRRTYSCHF GPLTWVCKPQG G		6	25.00%	0.00%	
EPOR_mEPO_6R_C	TYSCHFGLTWV CKPQGRRRRR R		6	25.00%	0.00%	
TfR_TfTP_6R_N	RRRRRRTHRPPM WSPVWP		6	33.33%	0.00%	
TfR_TfTP_6R_C	THRPPMWSPVW PRRRRRR		6	33.33%	0.00%	
mH3_K4Me3_1	ART-K(Me3)- QTARKSTGGKA PRKQLA		6	100.00%	0.00%	0.00%
mH4_K16Ac_1	SGRGKGGKGLG KGGA-K(Ac)- RHRK		8	100.00%	0.00%	0.00%
mH2A_1	SGRGKQGKAR AKAKTRSSR		8	100.00%	0.00%	0.00%
SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C	Ac- SNYSAibADKAib ANAibADDAibAE AibAKENSGGGG SGGGGSRRRRRR RRR		9	19.15%	21.28%	59.57%

[0775]

靶向配体(TL)/ 肽目录名称	序列	SEQ ID NO:	锚电荷	锚Mers/ 总Mers	接头 Mers/总 Mers	配体 Mers/ 总 Mers
cKit_rmSCF_(4GS)2_9R_N	RRRRRRRRRRGG GGSGGGGSEKFI LKVRPAFKAV		10			

[0776] 表4. 以下实验中使用的有效负载。

[0777]

有效负载	核苷酸	单链或双链?	蛋白分子量
BLOCK-iT Alexa Fluor 555 siRNA	20	2	N/A
NLS-Cas9-EGFP + gRNA	98	1	186229.4531
Cy5 EGFP mRNA	998	1	N/A
VWF-GFP pDNA + Cy5 PNA	13000	2	N/A

[0778] 表5. 用于以下实验中使用的组分的指南关键: 关键: N=“纳米颗粒” cat.=“阳离子”; an.=“阴离子”; spec.=“种类”; c:p=“羧基:磷酸盐”;

[0779]

项目代码	N	有效负载(PI)	靶向配体(TL)	Cat.Spec.	An. Spec.	C:P 比	+/-比
TCell.001	1	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	N/A	PLR10	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	2	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	N/A	PLK10_PEG22	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	3	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	4	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	5	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	6	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	7	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	8	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	9	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	10	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	11	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1

[0780]

项目代码	N	有效负载(PI)	靶向配体(TL)	Cat.Spec	An. Spec.	C:P 比	+/-比
TCell.001	12	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	13	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	14	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	15	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	ALL_LIGANDS_EQUIMOLAR (C7-C18)	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	16	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLR10	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	17	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLK10_PEG22	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	18	Cy5_EGFP_mRNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	19	Cy5_EGFP_mRNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	20	Cy5_EGFP_mRNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	21	Cy5_EGFP_mRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	22	Cy5_EGFP_mRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	23	Cy5_EGFP_mRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	24	Cy5_EGFP_mRNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	25	Cy5_EGFP_mRNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	26	Cy5_EGFP_mRNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	27	Cy5_EGFP_mRNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	28	Cy5_EGFP_mRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	29	Cy5_EGFP_mRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	30	Cy5_EGFP_mRNA	ALL_LIGANDS_EQUIMOLAR (C7-C18)	TL	pLE100:pDE100	1.35:1	0.82:1
TCell.001	31	VWF_GFP_Cy5_pDNA	N/A	PLR10	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	32	VWF_GFP_Cy5_pDNA	N/A	PLK10_PEG22	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	33	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1

[0781]

项目代码	N	有效负载(PI)	靶向配体(TL)	Cat.Spec	An. Spec.	C:P 比	+/-比
TCell.001	34	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	35	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	36	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	37	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	38	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	39	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	40	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	41	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	42	VWF_GFP_Cy5_pDNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	43	VWF_GFP_Cy5_pDNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	44	VWF_GFP_Cy5_pDNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	45	VWF_GFP_Cy5_pDNA	ALL_LIGANDS_EQUIMOLAR (C7-C18)	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	46	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_55_siRNA	N/A	PLR10	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	47	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_55_siRNA	N/A	PLK10_PEG22	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	48	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_55_siRNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	49	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_55_siRNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	50	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_55_siRNA	CD28_mCD80_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	51	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_55_siRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_1	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	52	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_55_siRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	53	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_55_siRNA	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	54	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_55_siRNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	55	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_55_siRNA	CD137_m41BB_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	56	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_55_siRNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1

[0782]

项目代码	N	有效负载(PI)	靶向配体(TL)	Cat.Spec	An. Spec.	C:P 比	+/-比
TCell.001	57	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	58	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	59	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.001	60	BLOCK_iT_Alexa_Fluor_555_siRNA	ALL_LIGANDS_EQUIMOLAR (C7-C18)	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.002	61	NLS_Cas9_gRNA_RNP	N/A	PLR10	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.002	62	NLS_Cas9_gRNA_RNP	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.002	63	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.002	64	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.002	65	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.002	66	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N + CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_2	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.002	67	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N + CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_3 + CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
TCell.002	68	NLS_Cas9_gRNA_RNP	CD3_mCD3Ab_(4GS)2_9R_N + CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N_3 + CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C + IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
HSC.004	69	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLR10	pLE20	2:1	2:1
HSC.004	70	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLR50	pLE20	2:1	2:1
HSC.004	71	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLK10_PEG22	pLE20	2:1	2:1
HSC.004	72	Cy5_EGFP_mRNA	ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N	TL	pLE20	2:1	2:1
HSC.004	73	Cy5_EGFP_mRNA	ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N + cKit_rmSCF_(4GS)2_9R_N	TL	pLE20	2:1	2:1

[0783]

项目代码	N	有效负载(PI)	靶向配体(TL)	Cat.Spec	An. Spec.	C:P 比	+/-比
HSC.004	74	Cy5_EGFP_mRNA	cKit_rmSCF_(4GS)2_9R_N	TL	pLE20	2:1	2:1
CynoBM.002	75	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	N/A	PLR10	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	76	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	N/A	mH4_K16Ac_1 : mH2A_1	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	77	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	78	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	79	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	SCF_mckit_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	80	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	d	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	81	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N + ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N + cKit_mSCF_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	82	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP + Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLR50	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	83	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP + Cy5_EGFP_mRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	84	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP + Cy5_EGFP_mRNA	ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	85	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP + Cy5_EGFP_mRNA	cKit_mSCF_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
CynoBM.002	86	NLS_Cas9_gRNA_EGFP_RNP + Cy5_EGFP_mRNA	IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N + ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N + cKit_mSCF_(4GS)2_9R_N	TL	pLE100:pDE100	2:1	2:1
Blood.001	87	Cy5_EGFP_mRNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100	1.35:1	0.82:1
Blood.002	88	Cy5_EGFP_mRNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100	1.35:1	0.82:1
Blood.002	89	Cy5_EGFP_mRNA	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100	1.35:1	0.82:1
Blood.002	90	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLK30_PEG113	pLE100		
Blood.002	91	Cy5_EGFP_mRNA	N/A	PLR50	pLE100		
Blood.002	92	载体	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	TL	pLE100	N/A	1.93:1

[0784] 纳米颗粒调配物中使用的*亚细胞运输肽是与某些有效负载(例如,“NLS_Cas9.....”)缀合的核定位信号肽纳米颗粒调配物中使用的*阳离子种类与靶向配体(TL)缀合为氨基酸长度为9(9R)的聚(精氨酸)链。无靶向配体的纳米颗粒包含长度为10的非缀合阳离子种类聚(精氨酸)AA链(PLR10)或AA链长度为10的聚乙二醇化聚(赖氨酸)。表中所有阳离子种类的L:D异构体比率为1:0。*HSC=造血干细胞;BM=骨髓细胞;Tcell=T细胞;

血=全血;cynoBM=食蟹猴骨髓

[0785] 材料和方法

[0786] 配体合成

[0787] 大多数靶向配体序列由内部设计并且由第3方提供商定制。肽配体衍生自天然多肽序列并且在一些情况下突变以提高结合亲和力。通过使用罗塞塔 (Rosetta) 软件实现结合动力学的计算分析和最佳突变的确定。在其中在内部制造靶向配体的情况下,方法和材料如下:

[0788] 使用标准的基于Fmoc的固相肽合成 (SPPS) 合成肽。在Rink-酰胺 (amide) AM树脂上合成肽。用O-(1H-6-氯苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐 (HCTU) 偶联剂和N-甲基吗啉 (NMM) 在二甲基甲酰胺 (DMF) 中进行氨基酸偶联。用三氟乙酸 (TFA)、三异丙基硅烷 (TIPS) 和水进行肽的脱保护和切割。通过反相HPLC (RP-HPLC) 纯化粗肽混合物。将纯肽段冷冻并冻干以得到纯化的肽。

[0789] 纳米颗粒合成

[0790] 纳米颗粒在室温37°C或37°C和室温的温差下在阳离子与阴离子组分之间合成。在阳离子与阴离子组分混合期间利用天然静电相互作用在水性缓冲液中制备溶液。开始时,将阴离子组分溶于Tris缓冲液 (30mM-60mM;pH=7.4-9) 或HEPES缓冲液 (30mM,pH=5.5) 中,同时将阳离子组分溶于HEPES缓冲液 (30mM-60mM,pH=5-6.5) 中。

[0791] 具体地,有效负载 (例如,遗传物质 (RNA或DNA),遗传物质-蛋白质-核定位信号多肽复合物 (核糖核蛋白) 或多肽) 在碱性、中性或酸性缓冲液中重构。出于分析的目的,有效负载被制造成与荧光团共价标记或者遗传性地编码荧光团。利用pDNA有效负载,对TATATA串联重复具有特异性的Cy5标记的肽核酸 (PNA) 用于荧光标记荧光报告载体和荧光报告-治疗基因载体。也可以充当带负电荷的凝胶物质 (例如聚 (谷氨酸)) 的定时释放组分也在碱性、中性或酸性缓冲液中重构。具有与接头-锚序列缀合的野生型衍生或野生型突变靶向肽的靶向配体在酸性缓冲液中重构。在纳米颗粒中包含另外的凝聚物质或核定位信号肽的情况下,这些也在作为阳离子种类的0.03%w/v和阴离子种类的0.015%w/v的工作溶液的缓冲液中重构。还用用于阳离子物质的0.1%w/v和用于阴离子物质的0.1%w/v的工作溶液进行实验。除了与遗传物质复合的那些多肽外,对所有多肽进行十分钟的超声处理以提高溶解性。

[0792] 然后将纳米颗粒的每个单独重构的组分以所研究的添加顺序混合。所研究的不同添加顺序包含:

[0793] 1) 有效负载<阳离子物质

[0794] 2) 有效负载<阳离子物质 (锚)<阳离子物质 (锚-接头-配体)

[0795] 3) 有效负载<阴离子物质<阳离子物质

[0796] 4) 有效负载<阳离子物质<阴离子物质

[0797] 5) 有效负载<阳离子物质 (锚)<阳离子物质 (锚-接头-配体)<阴离子物质

[0798] 6) 有效负载<阴离子物质<阳离子物质 (锚)+阳离子物质 (锚-接头-配体)

[0799] 7) 有效负载+阴离子物质<阳离子物质 (锚)+阳离子物质 (锚-接头-配体)

[0800] 8) 有效负载1 (核糖核蛋白或其它遗传/蛋白质物质)<阳离子物质 (组蛋白片段、NLS或无接头-配体的带电多肽锚)<阴离子物质

[0801] 9) 有效负载1 (核糖核蛋白或其它遗传/蛋白质物质) <阳离子物质 (组蛋白片段、NLS或无接头-配体的带电多肽锚) <阴离子物质 <阳离子物质 (组蛋白片段、NLS或有或没有接头-配体的带电多肽锚)

[0802] 10) 有效负载1 (核糖核蛋白或其它遗传/蛋白质物质) <阳离子物质 (组蛋白片段、NLS或无接头-配体的带电多肽锚) <有效负载2/3/4 (一种或多种有效负载) <阳离子物质 (组蛋白片段、NLS或有或没有接头-配体的带电多肽锚)

[0803] 11) 有效负载1 (核糖核蛋白或其它遗传/蛋白质物质) <阳离子物质 (组蛋白片段、NLS或无接头-配体的带电多肽锚) <有效负载2/3/4 (一种或多种有效负载) + 阴离子物质 <阳离子物质 (组蛋白片段、NLS或有或没有接头-配体的带电多肽锚)

[0804] 12) 有效负载1/2/3/4 (一种或多种核糖核蛋白、蛋白质或核酸有效负载) + 阴离子物质 <阳离子物质 (组蛋白片段、NLS或有或没有接头-配体的带电多肽锚)

[0805] 13) 有效负载1/2/3/4 (一种或多种核糖核蛋白、蛋白质或核酸有效负载) <阳离子物质 (组蛋白片段、NLS或有或没有接头-配体的带电多肽锚)

[0806] 细胞培养

[0807] T细胞

[0808] 转染前24小时, 将含有20M人原代Pan-T细胞 (干细胞#70024) 的冷冻管解冻并且以200 μ l和75,000个细胞/孔 (1.5E6细胞/ml) 接种于4个96孔板的4x 66孔中。细胞在补充有10%FBS和L-谷氨酰胺的无抗生素的RPMI 1640培养基 (赛默飞世尔#11875119) 中培养, 并且通过每2天更换培养基来维持。

[0809] 造血干细胞 (HSC)

[0810] 转染前24小时, 将含有500k人原代CD34+细胞 (干细胞#70002) 的冷冻管解冻并且以200 μ l和10-12k个细胞每孔接种于96孔板的48个孔中。培养基由补充有10%的FBS、25ng/ml的TP0、50ng/ml的Flt-3配体和50ng/ml的SCF的Stemspan SFEM II (干细胞#09605) 组成并且通过每2天更换培养基来维持细胞。食蟹猴骨髓 (HSC)

[0811] 转染前48小时, 将含有1.25M食蟹猴骨髓细胞 (IQ生命科学#IQB-MnBM1) 的冷冻管解冻并且以200 μ l和~30k个细胞/孔接种于圆底96孔板的48个孔中。细胞在补充有12%FBS的无抗生素的RPMI 1640培养基中培养, 并且通过每2天更换培养基来维持。

[0812] 人全血

[0813] 通过静脉穿刺抽取5mL全血。将1mL全血与14mL的PBS混合。将纳米颗粒直接转染到15mL管中, 或者在纳米颗粒转染之前将100 μ l的血滴定到96孔板的每个孔中。

[0814] 转染

[0815] 在形成纳米颗粒的储备溶液后, 在96孔板的每个孔中加入10 μ l纳米颗粒并且在不改变细胞培养条件或培养基的补充物的情况下进行孵育 (参见表6)。在活细胞成像期间, 在CO2和温度控制的环境下, 通过BioTek Cytation 5来维持96孔板。

[0816] 表6.

[0817]	有效负载	每孔的剂量 (96孔板)	纳米颗粒悬浮液的体 积
	mRNA	100ng mRNA	10ul
	CRISPR RNP	100ng sgRNA,	10ul
	pDNA	200ng pDNA	10ul
	siRNA	50ng	10ul

[0818] 分析

[0819] 凝聚和包合曲线

[0820] 通过将含有0.0044ug/ μ l的血红蛋白 β 亚基 (HBB) gRNA或具有pDNA结合位点或mRNA或siRNA的冯维勒布兰德因子 (VWF)-EGFP-pDNA的50 μ l溶液与悬浮于30mM Tris缓冲液 (pH=7.4-8.5) 中的1 μ l的SYBR 0.4x混合来产生凝聚曲线。HBB gRNA在RNP中被复合而存在。在单独添加PLE20、PLE35、PLE100或PLE100:PDE100 (1:1的D:L比率) 之前和之后监测来自嵌入的SYBR Gold的荧光发射,其中羧酸盐与磷酸盐 (C:P) 之比的范围在1与150之间。然后,加入阳离子种类以达到期望的胺与磷酸盐 (N:P) 或胺与磷酸盐+羧酸盐 [N: (P+C)] 的比率。代表性的阳离子种类包含PLR10;PLR50;PLR150、锚-接头肽;与缀合到带电聚 (精氨酸) 链的GGGSGGGGS (SEQ ID NO:xx) 接头缀合的各种突变靶向配体 (即,内部名称:SCF_mcKit_ (4GS) 2_9R_C);组蛋白_H3K4 (Me3) 肽 [1-22] (mH3_K4Me3_1);组蛋白_H4K16 (Ac) 肽 [1-20] (mH4_K16Ac_1);组蛋白_H2A肽 [1-20] (mH2A_1),对应于不同的正负电荷比 (CR)。在一些实验中,根据上述说明,在阴离子种类之前加入阳离子种类。

[0821] 在将稀释于30mM Tris缓冲液 (pH=7.4) 中的SYBR GOLD 0.2x多次添加到悬浮于含有包封在不同的纳米颗粒调配物中的VWF-EGFP-pDNA、gRNA HBB、Alexa555Block-IT-siRNA的已知量 (100至600ng) 的60mM HEPES (pH=5.5) 溶液中的纳米颗粒后获得包合曲线。

[0822] 使用Synergy Neo2Hybrid多模式读数器 (伯腾仪器有限公司 (Biotek), 美国) 或CLARIOstar微孔板读数器 (BMG, 德国) 在平底半区96孔板中记录来自GFP通道中的嵌入的SYBR Gold的荧光发射。

[0823] 纳米颗粒跟踪分析 (ζ)

[0824] 使用ZetaView仪器 (Particle Metrix, 德国), 通过纳米颗粒跟踪分析研究纳米颗粒调配物的流体动力学直径和 ζ 电位。在注入仪器之前,将样品在PBS (1:12) 中以1:100稀释。为了获得测量结果,在分析之前将相机设置调整到最佳的灵敏度和粒子/帧 ($\sim$ 100-150)。

[0825] 荧光显微镜-BioTek Cytation 5

[0826] 在通过流式细胞术评估之前,使用Cytation 5高含量筛选活细胞成像显微镜 (伯腾仪器有限公司, 美国) 对转染效率进行成像。简而言之,在转染前对细胞进行成像,转染后

4小时以15m的增量成像,并且然后在接下来的12小时内,利用GFP和/或Cy5通道以及10x物镜下的明视场以2h的增量进行成像。随后收集图像作为连续动力学或离散的1-18、24、36或48小时时间点的代表。

[0827] 流式细胞术

[0828] 进行细胞标记实验,进行洗涤步骤以移除细胞培养基,然后在室温下用溶于PBS的Zombie NIR活性试剂盒染色(Zombie NIR viability kit stain)和/或CellEvent Tm半胱天冬酶-3/7Green(英杰(Invitrogen),USA)孵育细胞30分钟。活性标记混合物的总体积为每孔25 μ l。然后将一板荧光第一抗体添加到混合物中(每孔0.25 μ l每种抗体)并且保持孵育15分钟。使用UltraComp eBeads补偿珠粒和阴性珠粒或活细胞的Cy5核染色产生阳性对照和阴性单通道对照。所有孵育步骤都在旋转振荡器上和黑暗中进行。在已应用不同通道之间的适当补偿后,使用Attune NxT流式细胞仪(赛默飞世尔(ThermoFisher),美国)对活细胞进行Attune多参数流式细胞术测量。通过选择适当的正向和侧向散射强度门来选择代表性的细胞群。继续检测细胞荧光,直到收集至少10000个事件。

[0829] 结果/数据

[0830] 图19-图44:凝聚数据

[0831] 图19.(a) SYBR Gold排斥测定示出荧光强度变化作为含有具有最初嵌入SYBR Gold的PNA有效负载的VWF-EGFP pDNA的纳米颗粒中的正负电荷比(CR)的函数。图例中显示的羧酸盐与磷酸盐(C:P)的比率基于在阴离子多肽种类(PL100)上的羧酸盐基团与在有效负载的遗传物质上的磷酸基团的纳米颗粒的比率。

[0832] 通过逐步添加阳离子PLR150来增加CR。观察到的荧光的减少示出了通过添加PLR150来增加CR导致SYBR在颗粒凝聚时从有效负载中移位。另外,在各种c:p比率下,凝聚保持一致。空白溶液在没有有效负载的情况下包含SYBR Gold。(b) 荧光强度变化作为无PL100的纳米颗粒中的正负电荷比(CR)的函数。

[0833] 图20.SYBR Gold排斥测定示出荧光强度变化作为含有最初嵌入SYBR Gold的NLS-CAS9-NLS RNP复合的w/HBB gRNA有效负载的纳米颗粒中的正负电荷比(CR*)的函数。另外,CR*的确定不包含通过与cas9复合而屏蔽的gRNA的带负电荷的部分。图例中显示的羧酸盐与磷酸盐(C:P)的比率基于在阴离子多肽物质(PL100)上的羧酸盐基团与在有效负载的遗传物质上的磷酸基团的纳米颗粒的比率。

[0834] 通过逐步添加阳离子PLR150来增加CR。空白溶液在没有有效负载的情况下包含SYBR Gold。观察到的荧光的减少示出了通过添加PLR150来增加CR导致SYBR在颗粒凝聚时从有效负载中移位。另外,在各种c:p比率下,凝聚保持一致。

[0835] 图21.SYBR Gold排斥测定示出荧光强度变化作为含有最初嵌入SYBR Gold的gRNA HBB有效负载的纳米颗粒中的正负电荷比(CR)的函数。图例中显示的羧酸盐与磷酸盐(C:P)的比率基于在阴离子多肽物质(PL100)上的羧酸盐基团与在有效负载的遗传物质上的磷酸基团的纳米颗粒的比率。

[0836] 通过逐步添加PLR150来增加CR。空白溶液在没有有效负载的情况下包含SYBR Gold。观察到的荧光的减少示出了通过添加PLR150来增加CR导致SYBR在颗粒凝聚时从有效负载中移位。另外,在各种c:p比率下,关于CR的凝聚保持一致。

[0837] 表7:在凝聚端点处测量一些调配物的流体动力学直径和 ζ 电位并且在下表中进行

了报告。

[0838]	有效负载	C:P	流体动力学直径 [nm]	ζ电位[mV]
	pDNA	0	120 ± 49	-
	HBB gRNA	0	99 ± 32	6.7 ± 0.6
	RNP (NLS-Cas9-NLS和HBB gRNA)	0	90 ± 36	-0.6 ± 0.9
	RNP (NLS-Cas9-NLS和HBB gRNA)	15	110 ± 49	26.7 ± 1
	pDNA	15	88 ± 49	11.7 ± 0.6

[0839] 图22-图24:使用肽SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C作为阳离子材料的凝聚曲线

[0840] 图22. (a) (b) SYBR Gold排斥测定示出荧光强度变化作为含有最初嵌入SYBR Gold的HBB gRNA有效负载的纳米颗粒中的正负电荷比 (CR) 的函数。图例中显示的羧酸盐与磷酸盐 (C:P) 的比率基于在阴离子多肽物质 (PLE100) 上的羧酸盐基团与在有效负载的遗传物质上的磷酸基团的纳米颗粒的比率。通过逐步添加与缀合到带正电荷的聚(精氨酸)的 (GGGS) 2接头缀合的阳离子突变cKit靶向配体 (内部配体名称:SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C) 来增加CR。观察到的荧光的减少示出了通过添加SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C来增加CR导致SYBR在颗粒凝聚时从有效负载中移位。另外,在各种c:p比率下,凝聚保持一致。空白溶液在没有有效负载的情况下包含SYBR Gold。

[0841] 图23. (a) (b) SYBR Gold排斥测定示出荧光强度变化作为含有最初嵌入SYBR Gold的NLS-CAS9-NLS RNP复合的w/HBB gRNA有效负载的纳米颗粒中的正负电荷比 (CR) 的函数。图例中显示的羧酸盐与磷酸盐 (C:P) 的比率基于在阴离子多肽物质 (PLE100) 上的羧酸盐基团与在有效负载的遗传物质上的磷酸基团的纳米颗粒的比率。

[0842] 通过逐步添加与缀合到带正电荷的聚(精氨酸)的 (GGGS) 2接头缀合的阳离子突变cKit靶向配体 (内部配体名称:SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C) 来增加CR。观察到的荧光的减少示出了通过添加SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C来增加CR导致SYBR在颗粒凝聚时从有效负载中移位。另外,在各种c:p比率下,凝聚保持一致。空白溶液在没有有效负载的情况下包含SYBR Gold。

[0843] 图24. (a) (b) SYBR Gold排斥测定示出荧光强度变化作为含有具有最初嵌入SYBR Gold的PNA有效负载的VWF-EGFP pDNA的纳米颗粒中的正负电荷比 (CR) 的函数。图例中显示的羧酸盐与磷酸盐 (C:P) 的比率基于在阴离子多肽物质 (PLE100) 上的羧酸盐基团与在有效负载的遗传物质上的磷酸基团的纳米颗粒的比率。

[0844] 通过逐步添加与缀合到带正电荷的聚(精氨酸)的 (GGGS) 2接头缀合的阳离子突变cKit靶向配体 (内部配体名称:SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C) 来增加CR。观察到的荧光的减少示出了通过添加SCF_rmAc-cKit_(4GS)2_9R_C来增加CR导致SYBR在颗粒凝聚时从有效负载中移位。另外,在各种c:p比率下,凝聚保持一致。空白溶液在没有有效负载的情况下包含SYBR Gold。

[0845] 图25-图26:组蛋白H3K4Me作为阳离子材料的凝聚曲线

[0846] 图25.SYBR Gold排斥测定示出荧光强度变化作为含有具有最初嵌入SYBR Gold的PNA有效负载的VWF-EGFP pDNA的纳米颗粒中的正负电荷比 (CR) 的函数。图例中显示的羧酸盐与磷酸盐 (C:P) 的比率基于在阴离子多肽物质 (PLE100) 上的羧酸盐基团与在有效负载的遗传物质上的磷酸基团的纳米颗粒的比率。通过逐步添加阳离子突变组蛋白_H3K4 (Me3) 肽 [1-22] (内部肽名称mH3_K4Me3_1) 来增加CR。观察到的荧光变化示出了在PLE100存在下,通过添加mH3_K4Me3_1来增加CR,不能充分地使SYBR从有效负载中移位。空白溶液在没有有效负载的情况下包含SYBR Gold。

[0847] 图26. (a) SYBR Gold排斥测定示出荧光强度变化作为含有最初嵌入SYBR Gold的NLS-CAS9-NLS RNP复合的w/HBB gRNA有效负载的纳米颗粒中的正负电荷比 (CR) 的函数。图例中显示的羧酸盐与磷酸盐 (C:P) 的比率基于在阴离子多肽物质 (PLE100) 上的羧酸盐基团与在有效负载的遗传物质上的磷酸基团的纳米颗粒的比率。通过逐步添加阳离子突变组蛋白_H3K4 (Me3) 肽 [1-22] (内部肽名称mH3_K4Me3_1) 来增加CR。观察到的荧光变化示出了在PLE100存在下,通过添加mH3_K4Me3_1来增加CR,不能始终导致SYBR从有效负载中移位。然而,在不存在阴离子多肽的情况下,当 $CR \leq 8:1$ 时,组蛋白_H3K4 (Me3) 被示出为有效凝聚剂。

[0848] 图27-图30:使用肽CD45_aSiglec_(4GS) 2_9R_C作为阳离子材料的凝聚曲线

[0849] 图27.SYBR Gold排斥测定示出荧光强度变化作为含有具有最初嵌入SYBR Gold的PNA有效负载的VWF-EGFP pDNA的纳米颗粒中的正负电荷比 (CR) 的函数。图例中显示的羧酸盐与磷酸盐 (C:P) 的比率基于在阴离子多肽物质 (PLE100) 上的羧酸盐基团与在有效负载的遗传物质上的磷酸基团的纳米颗粒的比率。通过逐步添加与缀合到带正电荷的聚(精氨酸)的 (GGGS) 2接头缀合的阳离子突变CD45受体靶向配体 (内部配体名称:CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C) 来增加CR。空符号代表在没有有效负载的情况下,空白溶液包含SYBR Gold。

[0850] 观察到的荧光的减少示出了通过添加CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C来增加CR导致SYBR在颗粒凝聚时从有效负载中移位。另外,在各种C:P比率下,凝聚保持一致。

[0851] 图28.SYBR Gold排斥测定示出荧光强度变化作为含有最初嵌入SYBR Gold的Cy5-EGFP mRNA有效负载的纳米颗粒中的正负电荷比 (CR) 的函数。图例中显示的羧酸盐与磷酸盐 (C:P) 的比率基于在阴离子多肽物质 (PLE100) 上的羧酸盐基团与在有效负载的遗传物质上的磷酸基团的纳米颗粒的比率。

[0852] 通过逐步添加与缀合到带正电荷的聚(精氨酸)的 (GGGS) 2接头缀合的阳离子突变CD45受体靶向配体 (内部配体名称:CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C) 来增加CR。观察到的荧光的减少示出了通过添加CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C来增加CR导致SYBR在颗粒凝聚时从有效负载中移位。另外,在各种c:p比率下,凝聚保持一致。

[0853] 图29.SYBR Gold排斥测定示出荧光强度变化作为含有最初嵌入SYBR Gold的BLOCK-iT Alexa Fluor 555siRNA有效负载的纳米颗粒中的正负电荷比 (CR) 的函数。图例中显示的羧酸盐与磷酸盐 (C:P) 的比率基于在阴离子多肽物质 (PLE100) 上的羧酸盐基团与在有效负载的遗传物质上的磷酸基团的纳米颗粒的比率。通过逐步添加与缀合到带正电荷的聚(精氨酸)的 (GGGS) 2接头缀合的阳离子突变CD45受体靶向配体 (内部配体名称:CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C) 来增加CR。观察到的荧光的减少示出了通过添加CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C来增加CR导致SYBR在颗粒凝聚时从有效负载中移位。另外,在各种C:P比率下,凝聚保持一致。

[0854] 图30. (a) SYBR Gold排斥测定示出荧光强度变化作为含有与最初嵌入SYBR Gold的HBB gRNA有效负载复合的NLS-Cas9-EGFP RNP的纳米颗粒中的正负电荷比 (CR) 的函数。图例中显示的羧酸盐与磷酸盐 (C:P) 的比率基于在阴离子多肽物质 (PLE100) 上的羧酸盐基团与在有效负载的遗传物质上的磷酸基团的纳米颗粒的比率。

[0855] 通过逐步添加与缀合到带正电荷的聚(精氨酸)的 (GGGS) 2接头缀合的阳离子突变CD45受体靶向配体 (内部配体名称:CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C) 来增加CR。填充符号代表在没有有效负载的情况下,空白溶液包含SYBR Gold。

[0856] 观察到的荧光的减少示出了通过添加CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C来增加CR导致SYBR在颗粒凝聚时从有效负载中移位。另外,在各种c:p比率下,凝聚保持一致。

[0857] (b) 无PLE并且电荷比=22的纳米颗粒的流体动力学直径分布的代表性图像。平均直径 $\langle d \rangle = 134\text{nm} \pm 65$ 。

[0858] 表8:在凝聚端点处测量一些调配物的流体动力学直径和 ζ 电位并且在下表中进行了报告。

[0859]	有效负载	C:P	阳离子肽	流体动力学直径[nm]	ζ 电位 [mV]
	RNP (NLS-Cas9-EGFP和gRNA)	0	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	134±65	13±1
	RNP (NLS-Cas9-EGFP和gRNA)	10	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	166 ±75	19.2±1
	RNP (NLS-Cas9-EGFP和gRNA)	20	CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C	179±92	21± 1

[0860] 图31-图34:包含曲线

[0861] 图31.SYBR Gold包含测定示出作为向所有含有150ng BLOCK-iT Alexa Fluor 555siRNA有效负载的不同纳米颗粒调配物中逐步添加SYBR的函数的荧光强度变化。从0 μ l到50 μ l的SYBR的荧光的 δ 变化指示纳米颗粒调配物的稳定性。调配物凝聚的越不稳定,SYBR Gold嵌入遗传有效负载的可能性越大。Lipofectamine RNAiMAX在此用作阳性对照。表2-4。

[0862] 图32.SYBR Gold包含测定示出作为向所有含有300ng HBB gRNA有效负载的不同纳米颗粒调配物中逐步添加SYBR的函数的荧光强度变化。从0 μ l到50 μ l的SYBR的荧光的 δ 变化指示纳米颗粒调配物的稳定性。调配物凝聚的越不稳定,SYBR Gold嵌入遗传有效负载的

可能性越大。Lipofectamine CRISPRMAX在此用作阳性对照。表2-4。

[0863] 图33.SYBR Gold包含测定示出作为向所有含有Cy5EGFP mRNA有效负载的不同纳米颗粒调配物中逐步添加SYBR的函数的荧光强度变化。从0 μ l到50 μ l的SYBR的荧光的 δ 变化指示纳米颗粒调配物的稳定性。调配物凝聚的越不稳定,SYBR Gold嵌入遗传有效负载的可能性越大。Lipofectamine信使MAX在此用作阳性对照。表2-4。

[0864] 图34.SYBR Gold包含测定示出作为向所有含有600ng的具有Cy5标记的肽核酸(PNA)结合位点有效负载的VWF-EGFP pDNA的不同纳米颗粒调配物中逐步添加SYBR的函数的荧光强度变化。从0 μ l到50 μ l的SYBR的荧光的 δ 变化指示纳米颗粒调配物的稳定性。调配物凝聚的越不稳定,SYBR Gold嵌入遗传有效负载的可能性越大。Lipofectamine 3000在此用作阳性对照。表2-4。

[0865] 图35-图44:TC.001上的SYBR包含/凝聚分析(参见表2-4)

[0866] 这些数据显示,实验TC.001中使用的调配物是稳定的,而且所述数据显示,与H3不同,H2A和H4组蛋白尾肽本身就是用于所有列出的有效负载的有效凝聚剂。所述数据还显示,H2A和H4可以进一步与锚-接头-配体结合。最后,证据表明,随后添加阴离子聚合物(在该实施例中为PLE100)不影响颗粒稳定性,或者如通过在添加到阴离子聚合物之前在与核酸或核糖核蛋白缀合的各种锚-接头-配体肽上测量的大小和 ζ 电位所证明的增强稳定性。

[0867] 图35.SYBR Gold排斥测定示出了通过加入阳离子多肽CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C,然后加入PLE100并且通过进一步向RNP中加入阳离子多肽来降低荧光强度。由于来自RNP的GFP荧光引起的荧光背景信号id。

[0868] 图36.SYBR Gold排斥测定示出了通过加入阳离子多肽CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C,然后加入PLE100并且通过进一步向siRNA中加入阳离子多肽并且进一步加入SYBR Gold引起的荧光强度变化。

[0869] 图37.SYBR Gold排斥测定示出了通过加入阳离子多肽组蛋白肽H2A,然后加入CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C,并且通过进一步向具有HBB gRNA和SYBR Gold的NLS-Cas9-EGFP的RNP中加入PLE100而引起的荧光强度变化。

[0870] 图38.SYBR Gold排斥测定示出了通过一起加入阳离子多肽组蛋白肽H4和CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C,并且通过进一步向具有HBB gRNA和SYBRGold的NLS-Cas9-EGFP的RNP中加入PLE100而引起的荧光强度变化。

[0871] 图39.SYBR Gold排斥测定示出了通过加入阳离子多肽CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C并且通过进一步向mRNA中加入PLE100而引起的荧光强度变化。

[0872] 图40.SYBR Gold排斥测定示出了通过加入组蛋白H4并且通过进一步向mRNA中加入CD45-mSiglec-(4GS)2_9R_c和PLE100而引起的荧光强度变化。

[0873] 图41.SYBR Gold排斥测定示出了通过加入组蛋白H2A并且通过进一步向mRNA中加入CD45-mSiglec-(4GS)2_9R_c和PLE100而引起的荧光强度变化。

[0874] 图42.来自嵌入VWF-EGFP pDNA的SYBR Gold排斥测定示出了通过加入阳离子多肽CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C,然后加入PLE100而引起的荧光强度变化。

[0875] 图43.来自嵌入VWF-EGFP pDNA的SYBR Gold排斥测定示出了通过加入组蛋白H4,然后加入阳离子多肽CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C,然后加入PLE100而引起的荧光强度变化。

[0876] 图44. 来自嵌入VWF_EGFP pDNA的SYBR Gold排斥测定示出了通过加入组蛋白H4, 然后加入阳离子多肽CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C, 然后加入PLE100而引起的荧光强度变化。

[0877] 图45-图83: 物理化学数据

[0878] 颗粒大小和 ζ 电位是用于表征胶体纳米材料的常规测量。这些测量主要通过如DLS (动态光散射) 等光散射技术获得。纳米颗粒跟踪分析 (NTA) 利用激光散射显微镜和图像分析来获得具有高分辨率的颗粒大小和 ζ 电位的测量结果。

[0879] 分析

[0880] 分散度是样品异质性的量度并且由分布确定分散度, 其中低标准差和单峰指示颗粒均匀性。

[0881] 通过固相肽合成来合成由具有配体的多肽组成的靶向配体、(GGGGS) 2接头和静电锚结构域并且用于使携带pEGFP-N1质粒DNA有效负载的颗粒的二氧化硅表面(可脱落层) 官能化。使用ZetaVIEW仪器 (Particle Metrix, 德国), 通过纳米颗粒跟踪分析获得所产生的颗粒大小和 ζ 电位分布。

[0882] 图45. (A) 核心复合物大小分布, 由与H3K4 (Me3) 和聚 (L-精氨酸) (29kD, n=150) 复合的pEGFP-N1质粒组成。(B) 图45A的具有二氧化硅可脱落层的复合物表现出特性负 ζ 电位和124nm的平均颗粒大小。(C) 具有N末端锚和甘氨酸-丝氨酸接头 ((GGGGS) 2) 的E选择蛋白配体涂覆在图45B中所示的颗粒上。

[0883] 图46. 支化组蛋白肽缀合物先导颗粒。具有C-末端半胱氨酸的组蛋白H3肽与具有10%侧链硫醇取代的48kD聚 (L-赖氨酸) 缀合。通过离心过滤和分子量排斥而纯化的最终产物用于复合质粒DNA (pEGFP-N1)。图46描绘的所产生的测量结果显示了较窄的大小分布。与质粒DNA (pEGFP-N1) 复合的H3-聚 (L-赖氨酸) 缀合物的大小分布

[0884] 对于图47-图83, 数据由实验编号 (项目代码) 索引。在多种情况下, 这可以与表5的项目代码交叉参考 (HSC=造血干细胞; BM=骨髓细胞; Tcell=T细胞; blood=全血; cynoBM=食蟹猴骨髓)。

[0885] 图47提供了与项目HSC.001.001相关的数据。

[0886] 图48提供了与项目HSC.001.002相关的数据, 其使用与PNA标记的pDNA和E-选择蛋白靶向肽 (ESELLg_mESEL_(4GS) 2_9R_N) 复合的H3-聚 (L-赖氨酸) 缀合物。

[0887] 图49-图52提供了实验数据, 其中将各种靶向配体或隐形分子涂覆于二氧化硅涂覆的颗粒和二氧化硅涂覆的纳米钻石上 (用于诊断的增强型荧光应用)。大小和 ζ 电位分布与相关统计一起呈现。靶向配体分别是ESELLg_mESEL_(4GS) 2_9R_N、ESELLg_mESEL_(4GS) 2_9R_C、CD45_mSiglec_(4GS) 2_9R_C和Cy5mRNA-SiO2-PEG。

[0888] 在随后的所有数据中, 纳米调配物和靶向配体的性能显著改善-通过各种有效负载和配体-靶向方法, 消除了二氧化硅层并且用带电阴离子可脱落多肽基质替代显著提高了纳米颗粒在所有调配物中的转染效率。然而, 以上数据中使用的多层技术, 以及支化组蛋白复合物的增强型凝聚和随后的肽基质工程化 (工作实例在Tcell.001、HSC.004、CYN0BM.002和Blood.002中呈现) 证明了技术 (例如, 多层化) 和核心生物材料的灵活性 (例如, 参见本公开整体和随后的实验)。本文描述的所有技术可以应用于任何颗粒核心, 无论是诊断的还是治疗的, 以及自组装的材料。例如, 支化组蛋白可以与接头-配体结构域缀合

或与多个实施例及其用途共凝聚。

[0889] 图53-图57描绘了携带Cy5-EGFP mRNA有效负载的颗粒,所述颗粒与可脱落聚(谷氨酸)表面基质以及CD45配体复合。使用该调配物生产的纳米颗粒的颗粒大小和 ζ 电位是高度均匀的。在SIGLEC衍生的肽与mRNA缔合(BLOOD.002.88)后加入具有聚(谷氨酸)的颗粒比在SIGLEC衍生的肽与mRNA和聚(谷氨酸)缔合之前加入具有聚(谷氨酸)的颗粒更稳定和单分散化,指示特定的加入顺序可以有助于形成更稳定的颗粒。另外,由不含磷酸核酸的SIGLEC衍生肽与聚(谷氨酸)复合形成的颗粒是高度阴离子单分散的(BLOOD.002.92)。在PLR与mRNA缔合后加入的PLR50与PLE100形成的颗粒是高度稳定的、单分散的、阳离子化的(BLOOD.002.91)。相反,在PLE100添加之前PLK-PEG与mRNA的缔合导致具有异质电荷分布的非常小的颗粒。通过流式细胞术数据证明了这些添加顺序和SIGLEC衍生肽的功效,其中配体靶向的SIGLEC衍生颗粒导致全血细胞中的Cy5强度增加了近两个数量级,尽管与聚乙二醇化对照的转染效率相似。

[0890] 图53提供了来自BLOOD.002.88的数据。纳米颗粒的 ζ 电位为 $-3.32\pm 0.29\text{mV}$,其中90%的直径小于180nm。根据流式细胞术数据,这些纳米颗粒在全血中产生58.6%的有效Cy5_EGFP_mRNA摄取。窄而均匀的峰是极好的电荷分布的示例性典范并且在TCELL.001.18中形成净阴离子颗粒时是可再现的。这证明了SIGLEC衍生靶向肽对于全身递送的广泛适用性(例如,参见以下的流式细胞术和成像数据)。

[0891] 图54提供了来自BLOOD.002.89的数据。纳米颗粒的 ζ 电位为 $-0.25\pm 0.12\text{mV}$,其中90%的直径小于176nm。根据流式细胞术数据,这些纳米颗粒分别在全血中产生58.6%的有效Cy5_EGFP_mRNA摄取。这证明了Siglec衍生靶向肽对于全身递送的广泛适用性(例如,参见以下的流式细胞术和成像数据)。

[0892] 图55提供了来自BLOOD.002.90的数据。纳米颗粒的 ζ 电位为 $2.54\pm 0.03\text{mV}$,其中90%的直径小于99nm。根据流式细胞术数据,这些纳米颗粒分别在全血中产生79.9%的有效Cy5_EGFP_mRNA摄取(例如,参见以下的流式细胞术和成像数据)。

[0893] 图56提供了来自BLOOD.002.91的数据。纳米颗粒的 ζ 电位为 $27.10\text{FWHM}18.40\text{mV}$,其中90%的直径小于130nm。根据流式细胞术数据,这些纳米颗粒分别在全血中产生96.7%的有效Cy5_EGFP_mRNA摄取(例如,参见以下的流式细胞术和成像数据)。强正电荷的 ζ 电位导致全血细胞上Cy5+信号的高效率和强度。简而言之,在该实施例中,将较大剂量的PLR50(15 μl PLR50 0.1%w/v溶液)加入到具有2.5ug Cy5mRNA的100 μl 、pH5.5、30mM的HEPES中(TriLink)。在37°C下5分钟后,向溶液中加入1.5 μl 的0.1%PLE100。相比之下,其它实验涉及将相对较大体积(总溶液体积的5-20%)的PLE100加入到预形成的阳离子聚合物+阴离子材料核心。

[0894] 图57提供了来自BLOOD.002.92的数据。纳米颗粒的 ζ 电位为 $-22.16\text{FWHM}18.40\text{mV}$,其中90%的直径小于130nm。根据流式细胞术数据,这些纳米颗粒不会导致全血中可检测到的Cy5_EGFP_mRNA摄取,因为它们未用荧光团标记(例如,参见以下的流式细胞术和成像数据)。没有有效负载(载体)的这些纳米颗粒的有效凝聚也对非遗传物质有效负载的递送,如带电聚合物与小分子或化学治疗剂的缀合有影响。

[0895] 图58-图73描绘了用于表征含有CRISPR核糖核蛋白(RNP)(TCELL.001.01-TCELL.001.15)、mRNA(TCELL.001.16-TCELL.001.30)、质粒DNA(TCELL.001.31-

TCELL.001.45)和siRNA(TCELL.001.46-TCELL.001.60)的代表性颗粒的实验结果并且在对应的组中用相同的配体图案化。

[0896] 图58提供了来自TCELL.001.1的数据。纳米颗粒的 ζ 电位为 $-3.24\pm 0.32\text{mV}$,其中90%的直径小于77nm。根据流式细胞术数据,这些纳米颗粒分别在活的CD4⁺和CD8a⁺pan T细胞中产生99.16%和98.47%的有效CRISPR-GFP-RNP摄取(例如,参见以下的流式细胞术和成像数据)。这些调配物还反映了所有CYN0BM.002.75的物理化学性质,以及充当用于CYN0BM.002.82-CYN0BM.002.85中后续分层的基质的核心,其中PLR10涂覆的颗粒与一个或多个阴离子多肽的可脱落阴离子涂层、核酸和/或一系列D:L比率、分子量和组合物的带电大分子复合。随后在CYN0BM.002.82-CYN0BM.002.85中加入带电聚合物或带电锚-接头-配体之前,将PLE100+mRNA涂覆于TCELL.001.1。

[0897] 图59提供了来自TCELL.001.3的数据。纳米颗粒的 ζ 电位为 $-0.98\pm 0.08\text{mV}$,其中90%的直径小于65nm。尽管大小范围是理想的,但是根据流式细胞术数据,与TCELL.001.1中在相同细胞群中达到约99%的效率的强阴离子相似大小的颗粒相比,这些纳米颗粒分别在活的CD4⁺和CD8a⁺pan T细胞中产生11.6%和13.2%的有效CRISPR-GFP-RNP摄取。通过本文描述的实验显示,粒子大小与稳定的负 ζ 电位的的关系及其方法和用途是可预测的约束条件。理想的纳米颗粒具有大部分<70nm、 ζ 电位<-5mV的粒子,并且本文所描述的可脱落阴离子涂层方法以及CYN0BM.002中描述的用于共同递送的多级分层可脱落基质实现了来自人和食蟹猴血液、骨髓和上文所提及的具体细胞的敏感原代细胞的稳定且极其高效的转染。TCELL.001.3的降低的效率与TCELL.01.27的结果形成鲜明对比,其中相比用于该特定CRISPR调配物的配体,相同的配体在改变的胺与磷酸盐与羧酸盐的比率下实现了mRNA的稳定凝聚,而不是用于该mRNA(例如,参见下文的流式细胞术和成像数据)。

[0898] 图60提供了来自TCELL.001.13的数据。纳米颗粒的 ζ 电位为 $2.19\pm 0.08\text{mV}$,其中90%的直径小于101nm。参见以下的流式细胞术/成像数据以获得活CD4⁺和CD8a⁺pan T细胞中CRISPR-GFP-RNP摄取的效率。

[0899] 图61提供了来自TCELL.001.14的数据。纳米颗粒的 ζ 电位为 $-9.37\pm 0.16\text{mV}$,其中90%的直径小于111nm。根据流式细胞术数据,这些纳米颗粒分别在活的CD4⁺和CD8a⁺pan T细胞中产生25.7%和28.6%的有效CRISPR-GFP-RNP摄取。(例如,参见以下的流式细胞术和成像数据)。

[0900] 图62提供了来自TCELL.001.16的数据。

[0901] 图63提供了来自TCELL.001.18的数据。这些颗粒的大小和 ζ 电位显示了平均颗粒大小为80.9nm、 ζ 电位为 $-20.26\pm 0.15\text{mV}$ 并且90%的颗粒的直径为39.2-129.8nm,指示在1.35的羧酸盐比磷酸盐(C:P)以及0.85的胺比磷酸盐的比率下的颗粒具有强稳定性,其中在包合阳离子锚-接头-配体后加入聚(谷氨酸)。请参考TCELL.001.2、TCELL.001.18和CYN0BM.002的所有 ζ 电位、大小、流式细胞数和显微镜数据,以获得与获得高效原代细胞转染相关的其它一般模式、工程约束、观察结果和经验测量(例如,参见表5和以下的流式细胞术和成像数据)。

[0902] 图64提供了来自TCELL.001.28的数据。图65提供了来自TCELL.001.29的数据。图66提供了来自TCELL.001.31的数据。图67提供了来自TCELL.001.33的数据。图68提供了来自TCELL.001.43的数据。图69提供了来自TCELL.001.44的数据。图70提供了来自

TCELL.001.46的数据。图71提供了来自TCELL.001.48的数据。图72提供了来自TCELL.001.58的数据。图73提供了来自TCELL.001.59的数据。

[0903] 图74-图83描绘了表征食蟹猴骨髓细胞中使用的调配物的结果。

[0904] 图74提供了CYN0BM.002.82的数据。如通过3%的活细胞中的胎儿血红蛋白表达所证明的,颗粒成功地删除了在整个骨髓红系祖细胞中的BCL11a红系增强子。CYN0BM.002.82纳米颗粒的 ζ 电位为 2.96 ± 0.14 mV,其中90%的直径小于132 nm并且50%的颗粒的直径小于30 nm。根据流式细胞术数据,这些纳米颗粒分别在活的CD3⁺、CD45⁺和CD34⁺骨髓亚群中产生~48%、~53%和~97%的CRISPR RNP和Cy5 mRNA的有效RISPR-GFP-RNP+Cy5_EGFP_mRNA的共同定位摄取,尽管仅有11.4%的总体骨髓活亚群靶向。

[0905] 相比之下,具有由PLR10、PLE100、PDE100和Cas9RNP组成的相同核心模板但没有mRNA共同递送组分或PLR50的附加层的CYN0BM.002.75,根据流式细胞术数据,分别在活CD3⁺、CD45⁺和CD34⁺骨髓亚群中展示出约20%、~14%和~100%的有效CRISPR-GFP-RNP摄取,以及18.0%的总体骨髓活亚群靶向。

[0906] 利用这些数据,可以推断出即使在看到混合骨髓原代群内的总体转染效率有微小增强的情况下,较大的颗粒可能也不太经得起选择性靶向的检验。颗粒的双模分布对原代细胞培养转染的影响仍有待确定。在先前的工作中,发现成骨细胞高效地内吞150-200 nm的颗粒。显著地,大多数具有CYN0BM.002.82的颗粒群处于85 nm的峰值以下,与TCELL.001.1类似,但是在底层的PLE、PDE、mRNA和Cas9RNP的多肽-核糖核蛋白-mRNA-蛋白质基质周围围绕着PLR50的带正电荷的基质。

[0907] 另外,3.0%的总活细胞对胎儿血红蛋白呈阳性,这些细胞中没有一个是CD34⁺,表现了CD34-红系祖细胞内的BCL11a红系祖细胞敲除群的成功克隆扩增。(例如,参见以下的流式细胞术和成像数据)。结果还可能表示在内皮细胞、成骨细胞、破骨细胞和骨髓的其它细胞中的成功的靶向。

[0908] 图75提供了来自CYN0BM.002.83的数据。如通过1.9%的活细胞(这些细胞中没有一个是CD34⁺)中的胎儿血红蛋白表达所证明的,颗粒成功地删除了在整个骨髓红系祖细胞中的BCL11a红系增强子。纳米颗粒具有 -2.47 ± 0.33 mV的 ζ 电位,其中90%具有小于206 nm的直径,导致相对于具有相同的IL2-模拟肽涂层的CYN0BM.002.03,转染效率提高。尾部大约-50 mV和+25 mV的大电荷分布指示多分散颗粒群具有颗粒稳定性的变化,与CYN0BM.002.83类似,并且与具有-18 mV的稳定阴离子单峰 ζ 电位的CYN0BM.002.84形成对比并且与其它CRISPR+mRNA共同递送颗粒组(CYN0BM.002.82-CYN0BM.002.85)相比,细胞活力对应增加。就整体食蟹猴骨髓共同递送而言,次佳纳米颗粒组是CYN0BM.002.86,其表现出相似的-20 mV的高净负电荷 ζ 电位和对应的高效转染、CD34克隆扩增和来自BCL11a红系增强子敲除的胎儿血红蛋白生成。根据流式细胞术数据,这些纳米颗粒在混合细胞群以及8.1%的全骨髓活亚群内的活CD34⁺骨髓细胞中产生~100%的有效CRISPR-GFP-RNP+Cy5_EGFP_mRNA摄取。流式细胞术数据指示在食蟹猴骨髓细胞中诱导选择性CD34⁺增殖,指示CD34-红系祖细胞内BCL11a红系祖细胞敲除群的成功克隆扩增。(例如,参见以下的流式细胞术和成像数据)。结果还表示在内皮细胞、成骨细胞、破骨细胞和/或骨髓的其它细胞中的成功的靶向。

[0909] 图76提供了来自CYN0BM.002.84的数据。如在9.5%的活的全骨髓细胞中的胎儿血

红蛋白蛋白质表达所证明的,颗粒成功地删除了全骨髓红系祖细胞中的BCL11a红系增强子,并且如通过每个选择性亚群中的Cy5-mRNA+和CRISPR-GFP-RNP+门所测量的,尽管转染效率中等,但CD34+、CD45或CD3+亚群中没有阳性的胎儿血红蛋白测量结果。CYN0BM.002.84纳米颗粒的 ζ 电位为 -18.07 ± 0.71 mV,其中90%的直径小于205nm。高净负电荷指示稳定的颗粒形成。根据流式细胞术数据,这些纳米颗粒在活的CD3+、CD45+和CD34+骨髓细胞中分别产生76.5%、71%和~100%的有效CRISPR-GFP-RNP+Cy5_EGFP_mRNA摄取,以及25.5%的全骨髓活亚群。另外,9.5%的总活细胞对胎儿血红蛋白呈阳性,这些细胞中没有一个是CD34+,这表现了CD34-红系祖细胞内的BCL11a红系祖细胞敲除群的成功克隆扩增。(例如,参见以下的流式细胞术和成像数据)。结果还表示在内皮细胞、成骨细胞、破骨细胞和/或骨髓的其它细胞中的成功的靶向。

[0910] 图77提供了来自CYN0BM.002.85的数据。纳米颗粒的 ζ 电位为 -12.54 ± 0.25 mV,其中90%的直径小于186nm。根据流式细胞术数据,这些纳米颗粒分别在活的CD3+、CD45+和CD34+骨髓细胞中产生~33%、~23%和~100%的有效CRISPR-GFP-RNP+Cy5_EGFP_mRNA摄取。(例如,参见以下的流式细胞术和成像数据)。结果可能表示在内皮细胞、成骨细胞、破骨细胞和骨髓的其它细胞中的成功的靶向。颗粒大小和电荷分布与随后的CYN0BM.002组及其在食蟹猴骨髓CRISPR和/或mRNA递送中的预期的生物学性能一致。

[0911] 图78提供了来自CYN0BM.002.86的数据。纳米颗粒的 ζ 电位为 -20.02 ± 0.10 mV,其中90%的直径小于120nm。根据流式细胞术数据,这些纳米颗粒在活的食蟹猴骨髓中产生20.1%的CRISPR-GFP-RNP+Cy5_EGFP_mRNA的有效共同递送,具有~68%、70%和~97%的有效CD3+、CD45+和CD34+分别的靶向。(例如,参见以下的流式细胞术和成像数据)。结果可能表示在内皮细胞、成骨细胞、破骨细胞和骨髓的其它细胞中的成功的靶向。高负电荷的 ζ 电位和90%的颗粒计数<200nm预测了高效率。

[0912] 图79提供了来自CYN0BM.002.76的数据。纳米颗粒的 ζ 电位为 -12.02 ± 0.59 mV,其中90%的直径小于135nm。根据流式细胞术数据,这些纳米颗粒分别在活的CD3+、CD45+和CD34+骨髓细胞中产生18.4%、10.3%和100%的有效CRISPR-GFP-RNP摄取(例如,参见以下的流式细胞术和成像数据)。另外,如组蛋白模拟颗粒(如在CYN0BM.002.78中所见的,具有高负 ζ 电位、第10-第50百分位的颗粒大小为25.8-80.6nm、无大的聚合物)所期望的,颗粒展现出有限的毒性,在~500m处加入大体积峰的情况下,其展现出类似的 ζ 电位分布和大小。

[0913] 图80提供了来自CYN0BM.002.77的数据。90%的纳米颗粒的直径低于254nm,其中大部分在171-254nm范围内。(例如,参见以下的流式细胞术和成像数据)。另外,按数量计算的第10-到第50百分位的颗粒为70-172nm,指示该群内的颗粒大小分布合理。与其中溶液中存在大量>200nm和/或具有大的、分布的 ζ 电位和/或非阴离子 ζ 电位的颗粒的其它研究一致,这些颗粒导致显著的细胞死亡。这些纳米颗粒总体上导致高摄取百分比,但是大量细胞(>90%)已经死亡。最终,根据流式细胞术数据,颗粒在活的CD3+、CD45+和CD34+骨髓细胞中、在CRISPR-GFP-RNP的检测限度下产生可忽略的摄取,并且在全骨髓活亚群中产生3.8%的CRISPR摄取。相反,具有相同表面涂层的90%的CYN0BM.002.83(CRISPR和mRNA共同递送变体)颗粒低于200nm,平均数为121nm。通过与TCELL.001.01-TCELL.001.15中具有相似调配物的颗粒不同的方法生产的CYN0BM.002.75-CYN0BM.002.81中的其它颗粒具有更有利的

大小和 ζ 电位分布并且在活的人CD4⁺和CD8a⁺T细胞中产生高转染效率(高达99%)。

[0914] 图81提供了来自CYN0BM.002.78的数据。纳米颗粒的 ζ 电位为 $-11.72\pm 0.79\text{mV}$,其中90%的直径小于223nm。(例如,参见以下的流式细胞术和成像数据)。类似地,90%的具有相同表面涂层的CYN0BM.002.84(CRISPR和mRNA共同递送变体)颗粒低于200nm,其中平均数为125nm,尽管CYN0BM.002.84的 ζ 电位显著更负(-18.07mV 对 -11.72mV),指示利用阴离子可脱落层间台阶中间体增强稳定性,使初始Cas9RNP电荷与PLR10均匀化并且随后用配体或另外任选的分子量交错聚合物或多肽涂覆增强稳定性。这些单递送对共同递送(或间层对配体与RNP的直接缀合)纳米颗粒的不同物理化学性质及其各自的大小范围与转染效率和毒性相关。

[0915] 图82提供了来自CYN0BM.002.79的数据。纳米颗粒的直径小于200nm。这些纳米粒子导致骨髓中GFP-RNP的整体摄取非常低(3.7%),但培养基中的细胞保留了极高的活力(70.0%对阴性对照的71.6%)。尽管总体摄取非常低,但是根据流式细胞仪数据,颗粒显示对活的CD3⁺细胞的选择性摄取为 $\sim 9.0\%$ 、活的CD45⁺细胞为约4.4%、活的CD34⁺细胞为约100%,这是CD34⁺亚群中用于细胞计数的检测极限。(例如,参见以下的流式细胞术和成像数据)。结果表示混合细胞群内的CD34⁺造血干细胞的特异性靶向。

[0916] 图83提供了来自CYN0BM.002.80的数据。纳米粒子的 ζ 电位为 $1.36\pm 1.69\text{mV}$ 。根据流式细胞术数据,这些纳米颗粒在活的CD34⁺骨髓细胞中产生8%的转染效率和 $\sim 100\%$ 的有效CRISPR-GFP-RNP摄取,这是用于细胞计数的检测极限。(例如,参见以下的流式细胞术和成像数据)。结果可能表示在内皮细胞、成骨细胞、破骨细胞和骨髓的其它细胞中的成功的靶向。具有宽表面的 $\sim 0\text{mV}$ 处的均匀峰指示两性离子颗粒表面。高度的细胞活力指示该大小的颗粒具有良好的耐受性并且c-Kit-受体-衍生的颗粒表面可能在细胞-细胞相互作用期间模拟骨髓内天然干细胞群表面标志物的呈递。

[0917] 图84-图120:流式细胞术和成像数据

[0918] 图84.在食蟹猴骨髓中的CynoBM.002样品的未转染对照。显微镜图像-上图:数字相位对比;中图:GFP;下图:合并。流式细胞术数据-具有活力;CD34、CD3和CD45染色。

[0919] 图85.NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP的Lipofectamine CRISPRMAX递送在活细胞中获得2.5%的转染效率并且造成显著的毒性,与食蟹猴骨髓中的阴性对照相比,CD45和CD3相对亚群的百分比显著降低。如通过剩余的CD3⁺细胞和可忽略不计的剩余的CD45⁺和CD34⁺的群的7.4%的有效靶向所例示的,Lipofectamine CRISPRMAX没有表现出细胞选择性。显微镜图像-上图:数字相位对比;中图:GFP;下图:合并。

[0920] 图86.CynoBM.002RNP-仅对照示出了NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP在没有递送载体但在转染前预先组合了两种有效负载的情况下在食蟹猴骨髓中获得可忽略的转染效率。尽管没有递送载体和最小事件,但是高度的共同定位指示核糖核蛋白复合物与mRNA的缔合,以及CRISPR RNP的阴离子官能化的示例。(在该实例下,mRNA充当RNP的松散缔合的可脱落涂层并且可以进一步用阳离子材料分层)。计算共同定位系数。X:活细胞中CRISPR摄取的%:

[0921] Y:活细胞中mRNA摄取的%

[0922] C:具有CRISPR和mRNA的细胞的%

[0923] Z:X或Y的值,哪个较大

[0924] 共同定位系数=C/ZCas9-mRNA共同定位系数:92.2%

[0925] 图87.CynoBM.002.82显示,非特异性靶向的NLS-Cas9-EGFP实现了将11.3%的有效mRNA和11.4%的有效CRISPR递送到食蟹猴骨髓,其中共同定位系数为98.9%。亚细胞定位显示,非特异性靶向的NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP与Cy5mRNA共同定位并且获得高转染效率。高度的共同定位确定离散颗粒装有两种有效负载。另外,可以看到Cas9整齐地定位于与mRNA分离的区室中,其中mRNA在核相关Cas9周围形成环状结构。这指示了两种有效负载的细胞溶质(mRNA)对核(CRISPR)定位。显微镜图像-上图:数字相位对比;中图: Cy5mRNA;下图:合并以及上图:Cas9-GFP RNP;下图:与Cas9-GFP RNP共同定位的Cy5mRNA。

[0926] 物理化学参数和附加观察结果参见以上数据。CYNOMB.002.82的 ζ 电位为2.96+/-0.14mV,其中90%的直径小于132nm并且50%的颗粒的直径小于30nm。这些纳米颗粒在活的CD3+、CD45+和CD34+骨髓亚群中分别产生45.5%、56.0%和97.3%的有效CRISPR-GFP-RNP+Cy5_EGFP_mRNA摄取,尽管仅有11.4%的全骨髓活亚群靶向。Cas9-mRNA共同定位系数:94.8%。活的CD34+和CRISPR+:97.2%的活的CD34+。胎儿血红蛋白阳性:3.022%的活细胞

[0927] 图88.CynoBM.002.83实现了将8.1%的有效mRNA和8.1%的有效CRISPR递送到食蟹猴骨髓,其中共同定位系数为93.0%。亚细胞定位显示,与NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP缔合的IL2衍生肽与Cy5mRNA共同定位并且获得高转染效率。高度的共同定位确定离散颗粒装有两种有效负载。另外,可以看到Cas9整齐地定位于与mRNA分离的区室中,其中mRNA在核相关Cas9周围形成环状结构。这指示了两种有效负载的细胞溶质(mRNA)对核(CRISPR)定位。显微镜图像-上图:数字相位对比;中图: Cy5mRNA;下图:合并以及上图:Cas9-GFP RNP;下图:与Cas9-GFP RNP共同定位的Cy5mRNA。

[0928] 物理化学参数和附加观察结果参见以上数据。这些纳米颗粒分别在活的CD3+、CD45+和CD34+骨髓细胞中产生~27%、41%和~100%的有效CRISPR-GFP-RNP+Cy5_EGFP_mRNA摄取。Cas9-mRNA共同定位系数:93.0%。胎儿血红蛋白阳性:1.9%的活细胞

[0929] 图89.如在9.5%的活的全骨髓细胞中的胎儿血红蛋白蛋白质表达所证明的,CYNOMB.002.84颗粒成功地删除了全骨髓红系祖细胞中的BCL11a红系增强子,并且如通过每个选择性亚群中的Cy5-mRNA+和CRISPR-GFP-RNP+门所测量的,尽管转染效率中等,但CD34+、CD45或CD3+亚群中没有阳性的胎儿血红蛋白测量结果。亚细胞定位显示,与NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP缔合的E-选择蛋白衍生肽与Cy5mRNA共同定位并且获得高转染效率。高度的共同定位确定离散颗粒装有两种有效负载。另外,可以看到Cas9整齐地定位于与mRNA分离的区室中,其中mRNA在核相关Cas9周围形成环状结构。这指示了两种有效负载的细胞溶质(mRNA)对核(CRISPR)定位。显微镜图像-上图:数字相位对比;中图: Cy5mRNA;下图:合并以及上图:Cas9-GFP RNP;下图:与Cas9-GFP RNP共同定位的Cy5mRNA。

[0930] 物理化学参数和附加观察结果参见以上数据。根据流式细胞术数据,这些纳米颗粒在活的CD3+、CD45+和CD34+骨髓细胞中分别产生76.5%、71%和~100%的有效CRISPR-GFP-RNP+Cy5_EGFP_mRNA共同定位摄取,以及~25.5%的全骨髓活亚群。另外,9.5%的总活细胞对胎儿血红蛋白呈阳性,这些细胞中没有一个是CD34+、CD3+或CD45+,表现了CD34-红系祖细胞内的BCL11a红系祖细胞敲除群的成功克隆扩增。Cas9-mRNA共同定位系数:97.1%。胎儿血红蛋白(HbF)阳性:9.5%的活细胞14%的CD34+细胞;CD34+和HbF+的0%的共同定位

[0931] 图90.CynoBM.002.85实现了将5.2%的有效mRNA和5.3%的有效CRISPR递送到食蟹猴骨髓,其中共同定位系数为87.2%。尽管将5.3%的有效CRISPR递送到活细胞,但CynoBM.002.85并未如在其它共同递送实施例中所见的导致伴随而来的胎儿血红蛋白阳性细胞的增加。亚细胞定位显示,与NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP缔合的SCF衍生肽与Cy5mRNA共同定位并且获得高转染效率。高度的共同定位确定离散颗粒装有两种有效负载。另外,可以看到Cas9整齐地定位于与mRNA分离的区室中,其中mRNA在核相关Cas9周围形成环状结构。这指示了两种有效负载的细胞溶质(mRNA)对核(CRISPR)定位。显微镜图像-上图:数字相位对比;中图: Cy5mRNA;下图:合并以及上图: Cas9-GFP RNP;下图:与Cas9-GFP RNP共同定位的Cy5mRNA。

[0932] 附加物理化学特性参见以上数据。这些纳米颗粒分别在活的CD3+、CD45+和CD34+骨髓细胞中产生~33%、~23%和~100%的有效CRISPR-GFP-RNP+Cy5_EGFP_mRNA摄取。Cas9-mRNA共同定位系数:87.2%。胎儿血红蛋白阳性:0.9%的活细胞

[0933] 图91.CynoBM.002.86实现了将20.1%的有效mRNA和21.8%的有效CRISPR递送到食蟹猴骨髓,其中共同定位系数为98.6%。亚细胞定位显示,异质三价靶向的IL2-、E-选择蛋白和SCF-衍生的NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP与Cy5mRNA共同定位并且获得高转染效率。高度的共同定位确定离散颗粒装有两种有效负载。另外,可以看到Cas9整齐地定位于与mRNA分离的区室中,其中mRNA在核相关Cas9周围形成环状结构。这指示了两种有效负载的细胞溶质(mRNA)对核(CRISPR)定位。显微镜图像-上图:数字相位对比;中图: Cy5mRNA;下图:合并以及上图: Cas9-GFP RNP;下图:与Cas9-GFP RNP共同定位的Cy5mRNA;

[0934] 附加物理化学特性参见以上数据。Cas9-mRNA共同定位系数:91.3%。胎儿血红蛋白阳性:7.6%的活细胞

[0935] 图92.CynoBM.002.75显示,具有可脱落阴离子多肽涂层的非特异性靶向的NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP在活的食蟹猴骨髓中获得了18.0%的转染效率。总体而言,20%的活的CD3+T细胞在本文的混合群食蟹猴骨髓培养模型中是CRISPR+,而在人原代Pan T细胞中97-99%的活的CD4和CD8a T细胞是TCELL.001中的CRISPR+。相同调配物的颗粒大小在TCELL1中更小且更均匀,所述制剂通过流体处理机器人而不是通过手工合成。附加的定性和定量注释以及数据比较参见以上数据。上图:数字相位对比;中图: GFP;下图:合并。

[0936] 图93.CynoBM.002.76显示,与食蟹猴骨髓中的阴性对照相比,双组蛋白片段缔合的和非特异性靶向的NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP获得13.1%的转染效率和有限毒性。18%、10%和0%的CD3+、CD45+和CD34+活亚群是CRISPR+。附加物理化学特性和观察结果参见以上数据。上图:数字相位对比;中图: GFP;下图:合并。

[0937] 图94.CynoBM.002.77显示,与食蟹猴骨髓中的阴性对照相比,与NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP缔合的同质价态靶向的IL2衍生肽获得3.8%的转染效率和增强的活力。~90%的转染细胞死亡。最终,颗粒在活的CD3+、CD45+和CD34+骨髓细胞中、在CRISPR-GFP-RNP的检测限度下产生可忽略的摄取,指示剩余的3.8%的活的CRISPR+细胞并非来自这些亚群。大小数据支持在大颗粒多分散性和~999nm的第90体积百分位颗粒大小中的毒性的致病作用。附加的物理化学性质参见以上数据。上图:数字相位对比;中图: GFP;下图:合并。

[0938] 图95.CynoBM.002.78显示,与NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP缔合的同质价态靶向的E-选择蛋白衍生肽获得~71%的总体转染效率(包含死细胞),仅有4.5%的活细胞

仍在食蟹猴骨髓中转染。这指示了颗粒毒性并且可能与大尺寸分布相关,尽管以数量计,50%的颗粒为33.1-113.1nm。包括溶液中大部分颗粒质量和容量的>250nm的颗粒可能导致该实验的活力降低。在该实施例中,CD45+和CD3+亚群密度也是多方面减少的。更详细的比较来自相同转染的纳米颗粒组的物理化学特性和定性观察结果参见以上数据。上图:数字相位对比;中图:GFP;下图:合并。

[0939] 图96.CynoBM.002.79显示,与食蟹猴骨髓中的阴性对照相比,与NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP缔合的同质价态靶向的SCF衍生肽获得3.7%的转染效率和极好的活力。

[0940] 这些纳米粒子导致骨髓中GFP-RNP的整体摄取非常低(3.7%),但培养基中的细胞保留了极高的活力(69.0%对阴性对照的71.6%)。尽管总体摄取非常低,但是颗粒显示对活的CD3+细胞的选择性摄取为~5%、活的CD45+细胞为约~4%并且活的CD34+细胞为约100%(后者在数值上处于检测极限)。高度的细胞活力加上呈强负性的ζ电位以及显著多于其它组的CD45+细胞,显示了SCF模拟颗粒表面在建立干细胞龕靶向和增殖和/或存活技术中的多因素作用。附加的物理化学参数参见以上数据。

[0941] 上图:数字相位对比;中图:GFP;下图:合并。

[0942] 图97.CynoBM.002.80显示,与NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP缀合的同源价态靶向的c-Kit-(CD117)衍生肽获得了8.097%的转染效率。转染效率分别为3.3%、2.4%,并且分别处于CD3+、CD45+和CD34+活亚群的检测极限,指示对CD3+和CD45+细胞的低选择性。更多的定量和定性数据参见以上数据。上图:数字相位对比;中图:GFP;下图:合并。(续):流式细胞术数据。

[0943] 图98.CynoBM.002.81显示,异质三价靶向的IL2-、E-选择蛋白-和SCF衍生的NLS-Cas9-EGFP BCL11a gRNA RNP在食蟹猴骨髓中获得5%的转染效率,尽管仅有0.48%的细胞是CD34+,但是~10%的转染细胞是活的CD34+细胞。这指示CD34+细胞的有效选择性转染接近100%。上图:数字相位对比;中图:GFP;下图:合并。

[0944] 图99.CynoBM.002RNP-仅对照的定性图像示出了NLS-Cas9-EGFPBCL11a gRNA RNP在没有递送载体的情况下在食蟹猴骨髓中获得轻度的阳性信号。上图:数字相位对比;中图:GFP;下图:合并。

[0945] 图100.HSC.004(纳米颗粒69-74,参见表5)高含量筛选。在原代人CD34+造血干细胞中转染后12-15小时的HSC.004Cy5mRNA递送的荧光显微图像(Cy5mRNA)。利用mRNA调配物的这种特定实施例,用SCF肽和E-选择蛋白进行异质双价靶向,以及用E-选择蛋白而不用SCF肽进行同质价态靶向,实现比Lipofectamine信使MAX更高的转染效率。HSC.001.69:A1-A6;HSC.001.70:B1-B6;HSC.001.71:C1-C6;HSC.001.72:D1-D6;HSC.001.73:E1-E6;HSC.001.74:F1-F6;HSC.004Lipofectamine信使MAX剂量1:G1-G2和G4-G5;TC.001Lipofectamine信使MAX剂量2:H1-H2和H4-H5;TC.001阴性:G3、G6、H3、H6

[0946] 图101.TCELL.001(纳米颗粒1-15,参见表5)高含量筛选。对TC.001.1-TC.001.60实行机器人调配物,代表4个有效负载(CRISPR RNP、mRNA、siRNA和pDNA)中的15个配体。示出了T细胞CRISPR递送和定性转染效率的实施例-复合显微镜下转染后12-15小时的TCELL.001CRISPR-EGFP RNP递送到原代人Pan T细胞的缩略图。板布局:TC.001.1:A1-C1;TC.001.3:D1-F1;TC.001.4:A2-C2;TC.001.5:D2-F2;TC.001.6:A3-C3;TC.001.7:D3-F3;TC.001.8:A4-C4;TC.001.9:D4-F4;TC.001.10:A5-C5TC.001.11:D5-F5;TC.001.12:A6-C6;

TC.001.13:D6-F6;TC.001.14:A7-A9;TC.001.15:B7-B9;TC.001.2:A10-A12;TC.001Lipofectamine CRISPRMAX剂量1:B10-B12;TC.001Lipofectamine CRISPRMAX剂量2:C7-C9;仅TC.001RNP:C10-C12;TC.001阴性:D7-E12。

[0947] 图102.TCELL.001Lipofectamine CRISPRMAX。在转染后24小时,Lipofectamine CRISPRMAX在人原代Pan T细胞的活的CD4+和CD8a+亚群中分别获得4.7%和4.8%的NLS-Cas9-EGFP RNP的有效递送。总体而言,12.5%的CRISPR+细胞和65.9%的整体细胞是活的。

[0948] 图103:在转染后24小时,TCe11.001.1在人原代Pan T细胞的活的CD4+和CD8a+亚群中分别表现出99.163%和98.447%的有效的非特异性靶向的CRISPR-GFP核糖核蛋白摄取。总体而言,60.2%的CRISPR+细胞和57.2%的整体细胞是有活力的。

[0949] 图104.在转染后24小时,TCe11.001.2,非特异性靶向的聚乙二醇化对照,在人原代Pan T细胞的活的CD4+和CD8a+亚群中分别表现出5.5%和6.9%的有效的CRISPR-GFP核糖核蛋白摄取。总体而言,5.6%的CRISPR+细胞和40.5%的整体细胞是有活力的。

[0950] 图105.TCe11.001.3显示,在转染后24小时,与CRISPR-GFP核糖核蛋白缀合的同质价态靶向的唾液酸粘附素衍生肽在人原代Pan T细胞的活的CD4+和CD8a+亚群中分别产生11.6%和13.2%的有效摄取。总体而言,40.0%的CRISPR+细胞和79.2%的整体细胞是活的。

[0951] 图106.TCe11.001.4显示,在转染后24小时,与CRISPR-GFP核糖核蛋白缀合的同质价态靶向的CD80衍生肽在人原代Pan T细胞的活的CD4+和CD8a+亚群中分别产生6.8%和8.8%的有效摄取。总体而言,12.9%的CRISPR+细胞和60.2%的整体细胞是活的。

[0952] 图107.TCe11.001.5显示,在转染后24小时,与CRISPR-GFP核糖核蛋白缀合的同质价态靶向的CD80衍生肽在人原代Pan T细胞的活的CD4+和CD8a+亚群中分别产生10.3%和10.9%的有效的CRISPR-GFP核糖核蛋白摄取。总体而言,48.3%的CRISPR+细胞和85.1%的整体细胞是活的。注意,在阴性对照的9个孔中(对于TCELL.001流式细胞术,n=3阴性),活力分别为81.4%、84.7%和82.5%,这表明C末端锚定的、CD80衍生的CD28靶向肽可能对培养液中未转染的细胞有轻微的生存促进作用。相反,TCe11.001.4,相同的N末端锚定肽,显示出明显的毒性,TC.001.6和TC.001.7也是如此,它们也是CD80衍生片段,具有针对CD28跨膜受体的不同变构。

[0953] 图108.TCe11.001.6显示,在转染后24小时,与CRISPR-GFP核糖核蛋白缀合的同质价态靶向的CD86衍生肽在人原代Pan T细胞的活的CD4+和CD8a+亚群中分别产生1.7%和2.9%的有效摄取。总体而言,6.8%的CRISPR+细胞和69.1%的整体细胞是活的。

[0954] 图109.TCe11.001.7显示,在转染后24小时,与CRISPR-GFP核糖核蛋白缀合的同质价态靶向的CD86衍生肽在人原代Pan T细胞的活的CD4+和CD8a+亚群中分别产生1.6%和2.1%的有效摄取。总体而言,10.3%的CRISPR+细胞和76.4%的整体细胞是活的。

[0955] 图110.TCe11.001.8显示,在转染后24小时,与CRISPR-GFP核糖核蛋白缀合的同质价态靶向的CD86衍生肽在人原代Pan T细胞的活的CD4+和CD8a+亚群中分别产生14.5%和16.0%的有效摄取。总体而言,39.1%的CRISPR+细胞和76.3%的整体细胞是活的。

[0956] 图111.TCe11.001.9显示,在转染后24小时,与CRISPR-GFP核糖核蛋白缀合的同质价态靶向的4-1BB衍生肽在人原代Pan T细胞的活的CD4+和CD8a+亚群中分别产生3.6%和3.2%的有效摄取。总体而言,27.5%的CRISPR+细胞和87.8%的整体细胞是活的。注意,在

阴性对照的9个孔中(对于TCELL.001流式细胞术,n=3阴性),活力分别为81.4%、84.7%和82.5%,这表明具有先天的T细胞生存信号的C末端锚定的、4-1BB衍生的CD137靶向肽可能对培养液中未转染的细胞有轻微的生存促进作用。

[0957] 图112.TCell.001.10显示,在转染后24小时,与CRISPR-GFP核糖核蛋白缀合的同质价态靶向的4-1BB衍生肽在人原代Pan T细胞的活的CD4+和CD8a+亚群中分别产生5.8%和5.4%的有效摄取。总体而言,30.8%的CRISPR+细胞和84.2%的整体细胞是活的。注意,在阴性对照的9个孔中(对于TCELL.001流式细胞术,n=3阴性),活力分别为81.4%、84.7%和82.5%,这表明具有先天的T细胞生存信号的C末端锚定的、4-1BB衍生的CD137靶向肽在培养液中没有表现出总体毒性。

[0958] 图113.TCell.001.11显示,在转染后24小时,与CRISPR-GFP核糖核蛋白缀合的同质价态靶向的CD3-Ab衍生肽在人原代Pan T细胞的活的CD4+和CD8a+亚群中分别产生12.9%和12.4%的有效摄取。总体而言,50.0%的CRISPR+细胞和77.6%的整体细胞是活的。

[0959] 图114.TCell.001.12显示,在转染后24小时,与CRISPR-GFP核糖核蛋白缀合的同质价态靶向的CD3-Ab衍生肽在人原代Pan T细胞的活的CD4+和CD8a+亚群中分别产生9.0%和9.5%的有效摄取。总体而言,38.9%的CRISPR+细胞和80.7%的整体细胞是有活力的。

[0960] 图115.TCell.001.13显示,在转染后24小时,与CRISPR-GFP核糖核蛋白缀合的同质价态靶向的IL2衍生肽在人原代Pan T细胞的活的CD4+和CD8a+亚群中分别产生25.7%和28.6%的有效摄取。总体而言,40.3%的CRISPR+细胞和68.1%的整体细胞是有活力的。

[0961] 图116.TCell.001.14显示,在转染后24小时,与CRISPR-GFP核糖核蛋白缀合的同质价态靶向的IL2衍生肽在人原代Pan T细胞的活的CD4+和CD8a+亚群中分别产生24.9%和25.8%的有效摄取。总体而言,45.9%的CRISPR+细胞和70.1%的整体细胞是活的。

[0962] 图117.TCell.001.15,十二价态靶向的12配体变体,不会导致内吞摄取或CRISPR递送。总体而言,59.8%的整体细胞是活的。

[0963] 图118.TCELL.001阴性对照。来自阴性(未转染)对照的9个孔中的一个孔的代表性结果。总体而言,细胞接种后52小时(转染后24小时),81.4%、84.7%和82.5%的整体细胞是活的。

[0964] 图119.通过利用SIGLEC衍生物进行糖基化细胞表面标记物靶向,Blood.002在人全血的淋巴细胞门中获得60%–97%的mRNA递送效率;示出了通过Attune NxT流式细胞仪测定的Cy5标记的EGFP mRNA。与聚乙二醇化对照相比,配体靶向是细胞信号的显著增强子。预测纳米颗粒行为的附加的物理化学性质参见以上数据。Blood.002对照:未转染。Blood.002.88:CD45-和Neu5Ac靶向的SIGLEC衍生物(在阴离子聚合物之前加入阳离子锚-接头-配体肽)。Blood.002.89:CD45-和Neu5Ac靶向的SIGLEC衍生物(在阴离子聚合物之后加入阳离子锚-接头-配体肽)。Blood.002.90:聚乙二醇化对照(在阴离子聚合物之前加入阳离子锚-PEG)。Blood.002.91:非特异性靶向变体。Blood.002.92:无有效负载的CD45-和Neu5Ac-靶向的SIGLEC衍生物(锚-接头-配体直接与阴离子聚合物缀合,阴性荧光对照)。

[0965] 图120.TCell.001.27显示,如通过流式细胞术所测量的,在转染后5小时,同质价态靶向的SIGLEC衍生肽在人原代Pan T细胞的活的CD8a+和CD4+亚群中指导45%的有效Cy5mRNA摄取。这些颗粒的大小和 ζ 电位显示了平均颗粒大小为171nm、 ζ 电位为-25.5+/-

0.15mV,指示在1.35的羧酸盐比磷酸盐(C:P)以及0.85的胺比磷酸盐的比率下的颗粒具有强稳定性,其中在包合阳离子锚-接头-配体后加入聚(谷氨酸)。TCe11.001.2和TCe11.001.18的 ζ 电位和大小数据参见以上数据。附加的定量细节参见以上数据。右上:明视场;右中: Cy5mRNA;右下:合并上图:阴性对照的明视场;下图:阴性对照的Cy5通道。

[0966] 实施例9

[0967] 图121.用于核糖核蛋白和蛋白质递送的基本原理。CRISPR RNP的电荷密度图允许确定是否应添加阴离子或阳离子肽/材料以在蛋白质表面上形成稳定的带电层。在一个实施例中,暴露的核酸(阴离子)和阴离子电荷袋在加入带电阴离子之前充当带阴阳离子的强静电锚定位点,或者充当它们自己的配体-接头阴离子锚。比例尺:电荷。

[0968] 图122.用于核糖核蛋白和蛋白质递送的基本原理。睡美人转座子的电荷密度图允许确定是否应添加阴离子或阳离子肽/材料以在蛋白质表面上形成稳定的带电层。在另一个实施例中,阳离子电荷袋在加入带阴阳离子之前充当带电阴离子的强静电锚定位点,或者作为它们自己的配体-接头-阴离子锚定结构域。比例尺:电荷。

[0969] 图123.在(2)加入阳离子锚作为(2a)锚-接头-配体或独立的阳离子锚,添加或不添加(2b)后续多层化学、多种核酸或带电治疗剂的共同递送或通过交联进行层稳定之前的(1)锚定到CRISPR RNP表面上的阳离子位点的示例性阴离子肽(9-10个氨基酸长,大约按比率缩放到10nm直径的CRISPR RNP)。

[0970] 手绘图从左到右转换为文本:‘阳离子锚’。‘间隔区’。‘配体’。‘和/或’。‘2d’。‘阳离子聚合物和/或多肽’。‘2b然后是层间化学’。

[0971] 图124.用于有效负载与带电蛋白质核心模板的共同递送的基本原理。基于可以包含Cas9RNP或任何均匀或两性离子带电表面的核心模板的添加顺序和静电基质组合物的实例。示出了用于使用各种聚合物均化两性离子表面电荷的方法。由与gRNA结合的CRISPR-Cas9RNP组成的~10nm核心颗粒与两性离子结构域一起示出。简而言之,在加入带相反电荷的聚合物之前,可以加入阳离子聚合物或阴离子聚合物以使表面电荷均匀化。阴离子成分的交错分子量被证明可以提高具有RNP核心和mRNA-PLE层间的颗粒的转染效率和基因编辑效率,其中CYN0BM.002.82-CYN0BM.002-86中的多个表面涂层对CYN0BM.002.75-CYN0BM.002.81中的单个有效负载递送变体。带电核心模板实施例包括任何带电表面,所述带电表面包含带电树枝状大分子或寡糖-树枝状大分子、重组或合成组蛋白二聚体/三聚体/四聚体/八聚体、纳米钻石、金纳米颗粒、量子点、MRI造影剂或其与以上的组合。

[0972] 手绘图从左到右转换为文本:‘带负电荷的涂层可以用阳离子聚合物或锚-接头-配体层压,其中锚是阳离子的。’‘氨基糖’。‘带电糖胺聚糖’。‘pDNA’。‘共同递送’。‘暴露的gRNA’。‘净负可脱落聚合物涂层’。‘聚糖’。‘cas9上的阳离子蛋白质结构域’。‘~10nm cas9RNP’。‘cas9上的阳离子蛋白质结构域’。‘PLR’。‘PDE(5-100)’。‘PLE(5-100)’。‘cas9上的阴离子蛋白质结构域’。‘mRNA’。‘糖肽上的支化阳离子聚合物’。‘组蛋白’。‘siRNA’。‘带负电荷的涂层也可以是阴离子锚-接头-配体或独立的阴离子基质组合物的结构域。一致聚合物的交错mw提高了胶体稳定性和基因编辑效率’。

[0973] 实施例10

[0974] 图125.肽工程-用于IL2R靶向的新型IL2模拟片段。白细胞介素-2(左)与白细胞介素-2受体(右)结合(PDB:1Z92)选自IL2(PDB 1Z92)的序列ASN(33)-PRO(34)-LYS(35)-LEU

(36)-THR (37)-ARG (38)-MET (39)-LEU (40)-THR (41)-PHE (42)-LYS (43)-PHE (44)-TYR (45) 与IL2受体 α 链的活性结合区域相关。通过选择IL2R与IL2的相互作用基序来工程化互补的结合:此处,为来自IL2受体的两个结合基序选择序列CYS (3)-ASP (4)-ASP (5)-ASP (6)-MET (25)-LEU (26)-ASN (27)-CYS (28)-GLU (29)。

[0975] 图126:肽工程-CD3概念下的新型抗体衍生的“活性结合袋”工程验证。选自CD3抗体(PDB 1XIW)的序列THR (30)-GLY (31)-ASN (52)-PRO (53)-TYR (54)-LYS (55)-GLY (56)-VAL (57)-SER (58)-THR (59)-TYR (101)-TYR (102)-GLY (103)-ASP (104) 与CD3 ϵ 和 δ 链的活性结合区域相关。氨基酸的顺序被重布置成反映结合袋中肽的2维平面的结合动力学,所述肽不再具有由较大蛋白质维持的三级结构。这种数据降维导致:THR (59)-SER (58)-VAL (57)-GLY (56)-LYS (55)-TYR (54)-PRO (53)-ASN (52)-THR (30)-GLY (31)-TYR (101)-TYR (102)-GLY (103)-ASP (104)。

[0976] 图127:肽工程-用于CD45糖基化靶向的新型SIGLEC衍生物。与N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)复合的唾液酸粘附素N-末端的PDB渲染(RCS PDB 10DA)。在渲染中位于唾液酸粘附素近侧的唾液酸粘附素片段用于靶向糖基化的CD45和其它复合的细胞表面糖蛋白。它在TCELL.001.3中成功靶向具有CRISPR RNP的T细胞以及在BLOOD.002.1-BLOOD.002.2中成功靶向全血淋巴细胞门中的mRNA。配体序列为SNRWLDVK (SEQ ID NO:xx)。

[0977] 图128:肽工程-用于c-Kit靶向的新型SCF片段。虚线圆圈-干细胞因子(RCS PDB 1SCF)的信号肽结构域代表c-Kit活性所必需的二聚体结构域。可以在在CynoBM.002.79(~5%的效率)和CynoBM.002.85(~56%的效率)之间比较和对比配体呈现对由于特定纳米颗粒表面大小+SCF涂层密度引起的细胞摄取的影响。另外,人CD34+造血干细胞转染的定性图像显示了对比,其中E-选择蛋白+SCF片段(HSC.004.73)实现了高效率,但SCF片段本身未实现高效率(HSC.004.74)。行为的显著差异表明二聚体肽在产生内吞线索和随后核靶向核酸和/或核糖核蛋白材料中的特定作用。配体序列为EKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO:xx) (mSCF); 和EKFILKVRPAFKAV (SEQ ID NO:xx) (rmSCF)。

[0978] 图129:肽工程-用于膜结合SCF靶向的新型cKit受体片段。干细胞因子靶向肽的合理设计衍生自c-Kit,以模拟内皮细胞和骨髓细胞上的造血干细胞滚动行为的行为并且提高系统转染效率(参见CynoBM.002.80)。评估折叠的序列:名称SCFN,序列:RRRRRRRRRGGGGSGGGGSEGICRNRVTNNVKDVTCLVANLPK (SEQ ID NO:xx)。用Rosetta和NAMD模拟包评估序列-Rosetta结果:将缩短的序列放置于Rosetta中用于从头折叠(GGSEGICRNRVTNNVKDVTCLVANLPK) (SEQ ID NO:xx)。

[0979] 图130:肽工程-cKit受体片段(续)。用分子动力学模拟的锚定-接头-配体的锚片段保持在适当位置以允许模拟如将在纳米颗粒表面上呈现的熵有利的构象。每个结果含有相同的评分因子,这意味着很难确定这些结构中的任何结构是否是优选的。Rosetta也不进行折叠动力学,因此很可能这些序列不会折叠成螺旋状结构。

[0980] NAMD结果:因为Rosetta不进行折叠动力学,所以检查完整序列是否会快速折叠成二级结构。在NAMD中使用副本交换分子动力学(REMD)在介于300-500K之间的16或32个副本上进行模拟并且在每个复制品上模拟10ns。锚部分(聚-R)被固定成线性以模拟蛋白质与颗粒的结合。示出了最低能量快照。

[0981] 对衍生自KIT的序列的进一步分析显示,它可能不具有大量固有顺序。橙色卡通部

分属于最初从KIT中选择的序列。

[0982] 图131:肽工程-cKit受体片段(续)。通过用氨基异丁酸修饰关键疏水性结构域,将具有强配体-接头的稳定化随机卷曲肽自折叠成稳定的螺旋肽,用于有效的配体呈现。

[0983] 蓝色链代表KIT中存在的更有序的螺旋,范围从残基71到94:SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS。具有锚和接头的KIT残基71到94的NAMD模拟:RRRRRRRRRGGGGSGGGGSSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS

[0984] 聚合成其中链与接头残基在很大程度上相互作用的结构。对于残基71到94,存在通过与KIT中的其它两个螺旋相互作用来稳定螺旋的疏水性残基。疏水性残基以红色示出(下划线):SNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENS。改变序列以移除疏水性残基并且用氨基异丁酸(Aib)取代,帮助诱导螺旋折叠,以得到以下序列:KIT7194_AIB1:SNYS AibADK AibANAibA DD AibAEAibAKENS。含有Aib的序列在Rink树脂上合成并且在游离胺和酰化胺(Ac)上分离。通过圆二色性检查二级结构。

[0985] 图132:肽工程-cKit受体片段(续)SCF_mcKit_(4GS)2_9R_N和SCF_mcKit(Ac)_(4GS)2_9R_N的圆二色性。配体末端的乙酰化可以用于中和带电多肽末端的电荷。上图:KIT7194_AIB1的CD在222附近略有下降并且在208附近大幅下跌,与包含Aib单元的 α -螺旋和螺旋的二级结构一致。下图:KIT7194_AIB1_Ac示出了与KIT7194_AIB1相似的CD。有时酰化可以帮助折叠,但似乎没有必要。乙酰化也可以帮助配体相互作用,因为终端胺需要是中性的而不是带电荷的。完整锚-接头-KIT7194_AIB1构建体:RRRRRRRRR-GGGGSGGGGS-SNYS AibADK AibANAibA DDAibAEAibAKENS。

[0986] 图133:肽工程-cKit受体片段。在用氨基异丁酸修饰关键疏水残基后,SCF_mcKit(Ac)_(4GS)2_9R_N的稳定构象。

序列表

<110> A • R • 沃森

C • 福斯特

<120> 用于核酸和/或蛋白有效负载递送的组合物和方法

<130> LGDL-004

<150> US 62/443,522

<151> 2017-01-06

<150> US 62/434,344

<151> 2016-12-14

<150> US 62/443,567

<151> 2017-01-06

<150> US 62/517,346

<151> 2017-06-09

<160> 277

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 1

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 2

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Cys Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35
<210> 3
<211> 86
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列
<400> 3
Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro
1 5 10 15
Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys
20 25 30
Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val
35 40 45
Cys Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala
50 55 60
Ser Lys Cys Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser
65 70 75 80
Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr
85
<210> 4
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列
<400> 4
Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp
1 5 10 15
Gly Val Arg Glu Lys Ser
20
<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 5

His Phe Lys Asp Pro Lys

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 6

Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr

1 5

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 7

Met Ile Ala Ser Gln Phe Leu Ser Ala Leu Thr Leu Val Leu Leu Ile

1 5 10 15

Lys Glu Ser Gly Ala

20

<210> 8

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 8

Met Val Phe Pro Trp Arg Cys Glu Gly Thr Tyr Trp Gly Ser Arg Asn

1 5 10 15

Ile Leu Lys Leu Trp Val Trp Thr Leu Leu Cys Cys Asp Phe Leu Ile

20 25 30

His His Gly Thr His Cys

35

<210> 9

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 9

Met Ile Phe Pro Trp Lys Cys Gln Ser Thr Gln Arg Asp Leu Trp Asn

1 5 10 15

Ile Phe Lys Leu Trp Gly Trp Thr Met Leu Cys Cys Asp Phe Leu Ala

20 25 30

His His Gly Thr Asp Cys

35

<210> 10

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 10

Met Ile Phe Pro Trp Lys Cys Gln Ser Thr Gln Arg Asp Leu Trp Asn

1 5 10 15

Ile Phe Lys Leu Trp Gly Trp Thr Met Leu Cys Cys

20 25

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 11

Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro

1 5 10

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 12

Arg Arg Glu Thr Ala Trp Ala

1 5

<210> 13

<211> 86

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 13

Lys	Arg	Leu	Tyr	Cys	Lys	Asn	Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Arg	Ile	His	Pro
1				5					10					15	
Asp	Gly	Arg	Val	Asp	Gly	Val	Arg	Glu	Lys	Ser	Asp	Pro	His	Ile	Lys
			20					25					30		
Leu	Gln	Leu	Gln	Ala	Glu	Glu	Arg	Gly	Val	Val	Ser	Ile	Lys	Gly	Val
			35					40					45		
Cys	Ala	Asn	Arg	Tyr	Leu	Ala	Met	Lys	Glu	Asp	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala
			50				55				60				
Ser	Lys	Cys	Val	Thr	Asp	Glu	Cys	Phe	Phe	Phe	Glu	Arg	Leu	Glu	Ser
65					70				75					80	
Asn	Asn	Tyr	Asn	Thr	Tyr										
															85

<210> 14

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 14

Cys	Lys	Asn	Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Asp	Gly	Arg	Val
1				5					10					15	
Asp	Gly	Val	Arg	Glu	Lys	Ser									
															20

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 15

Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg							
1															5

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 16

His His His His His His

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 17

Gly Ala Pro Gly Ala Pro Cys Ala Pro

1 5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 18

Gly Ala Pro Gly Ala Pro Cys Ala Pro Cys

1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 19

Cys Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro

1 5 10

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 20

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 21

Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 22

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 23

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 24
Gly Gly Ser Gly Gly
1 5
<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列
<400> 25
Gly Ser Gly Ser Gly
1 5
<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列
<400> 26
Gly Ser Gly Gly Gly
1 5
<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列
<400> 27
Gly Gly Gly Ser Gly
1 5
<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列
<400> 28
Gly Ser Ser Ser Gly
1 5

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 29

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Cys
1 5 10

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 32

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 33

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys

1 5 10

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 34

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 35

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 35

Lys Ala Leu Ala

1

<210> 36

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 36

Gly Ala Leu Ala

1

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 37

Cys Lys Ala Leu Ala

1 5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 38

Lys Ala Leu Ala Cys

1 5

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 39

Cys Gly Ala Leu Ala

1 5

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 40

Gly Ala Leu Ala Cys

1 5

<210> 41

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 41

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly

1 5 10 15

Ala Pro Cys

<210> 42

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 42

Cys Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg Arg

<210> 43

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 43

Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val

1 5 10 15

Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser

20

<210> 44

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 44

Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp

1 5 10 15

Gly Val Arg Glu Lys Ser Cys

20

<210> 45

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 45

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly
1 5 10 15
Ala Pro Arg Arg Glu Thr Ala Trp Ala
 20 25

<210> 46

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 46

Arg Arg Glu Thr Ala Trp Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro
1 5 10 15
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 20 25

<210> 47

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 47

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly
1 5 10 15
Ala Pro Arg Gly Asp
 20

<210> 48

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 48

Arg Gly Asp Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15
Arg Arg Arg Arg Arg
 20

<210> 49

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 49

Cys Arg Gly Asp

1

<210> 50

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 50

Arg Gly Asp Cys

1

<210> 51

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 51

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly

1 5 10 15

Ala Pro Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro

20 25 30

<210> 52

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 52

Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro Gly Ala Pro Gly

1 5 10 15

Ala Pro Gly Ala Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

20 25 30

<210> 53

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 53

Cys Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro

1 5 10

<210> 54

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 54

Cys Pro Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro

1 5 10

<210> 55

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 55

Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro Cys

1 5 10

<210> 56

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 56

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly

1 5 10 15

Ala Pro Met Ile Ala Ser Gln Phe Leu Ser Ala Leu Thr Leu Val Leu

20 25 30

Leu Ile Lys Glu Ser Gly Ala

35

<210> 57

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 57

Met Ile Ala Ser Gln Phe Leu Ser Ala Leu Thr Leu Val Leu Leu Ile

1 5 10 15

Lys Glu Ser Gly Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Arg Arg

20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

35

<210> 58

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 58

Cys Met Ile Ala Ser Gln Phe Leu Ser Ala Leu Thr Leu Val Leu Leu

1 5 10 15

Ile Lys Glu Ser Gly Ala

20

<210> 59

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 59

Met Ile Ala Ser Gln Phe Leu Ser Ala Leu Thr Leu Val Leu Leu Ile

1 5 10 15

Lys Glu Ser Gly Ala Cys

20

<210> 60

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 60

Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly
1				5						10				15		
Ala	Pro	Lys	Asn	Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Asp	Gly	Arg	
			20					25					30			
Val	Asp	Gly	Val	Arg	Glu	Lys	Ser									
		35					40									

<210> 61

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 61

Lys	Asn	Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Asp	Gly	Arg	Val	Asp
1				5					10					15	
Gly	Val	Arg	Glu	Lys	Ser	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	Arg
			20					25					30		
Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg								
		35					40								

<210> 62

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 62

Ser	Gly	Arg	Gly	Lys	Gln	Gly	Gly	Lys	Ala	Arg	Ala	Lys	Ala	Lys	Thr
1				5					10					15	
Arg	Ser	Ser	Arg												
			20												

<210> 63

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 63

Ser Gly Arg Gly Lys Gln Gly Gly Lys Ala Arg Ala Lys Ala Lys Thr
1 5 10 15
Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His Arg
 20 25 30
Leu Leu Arg Lys Gly Gly Gly
 35

<210> 64

<211> 130

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 64

Met Ser Gly Arg Gly Lys Gln Gly Gly Lys Ala Arg Ala Lys Ala Lys
1 5 10 15
Thr Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His
 20 25 30
Arg Leu Leu Arg Lys Gly Asn Tyr Ala Glu Arg Val Gly Ala Gly Ala
 35 40 45
Pro Val Tyr Leu Ala Ala Val Leu Glu Tyr Leu Thr Ala Glu Ile Leu
 50 55 60
Glu Leu Ala Gly Asn Ala Ala Arg Asp Asn Lys Lys Thr Arg Ile Ile
65 70 75 80
Pro Arg His Leu Gln Leu Ala Ile Arg Asn Asp Glu Glu Leu Asn Lys
 85 90 95
Leu Leu Gly Lys Val Thr Ile Ala Gln Gly Gly Val Leu Pro Asn Ile
 100 105 110
Gln Ala Val Leu Leu Pro Lys Lys Thr Glu Ser His His Lys Ala Lys
 115 120 125
Gly Lys
 130

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 65

Cys Lys Ala Thr Gln Ala Ser Gln Glu Tyr

1 5 10

<210> 66

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 66

Lys Lys Thr Ser Ala Thr Val Gly Pro Lys Ala Pro Ser Gly Gly Lys

1 5 10 15

Lys Ala Thr Gln Ala Ser Gln Glu Tyr

20 25

<210> 67

<211> 143

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 67

Met Ser Gly Arg Gly Lys Thr Gly Gly Lys Ala Arg Ala Lys Ala Lys

1 5 10 15

Ser Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His

20 25 30

Arg Leu Leu Arg Lys Gly His Tyr Ala Glu Arg Val Gly Ala Gly Ala

35 40 45

Pro Val Tyr Leu Ala Ala Val Leu Glu Tyr Leu Thr Ala Glu Ile Leu

50 55 60

Glu Leu Ala Gly Asn Ala Ala Arg Asp Asn Lys Lys Thr Arg Ile Ile

65 70 75 80

Pro Arg His Leu Gln Leu Ala Ile Arg Asn Asp Glu Glu Leu Asn Lys

85 90 95

Leu Leu Gly Gly Val Thr Ile Ala Gln Gly Gly Val Leu Pro Asn Ile

100 105 110

Gln Ala Val Leu Leu Pro Lys Lys Thr Ser Ala Thr Val Gly Pro Lys

115 120 125

Ala Pro Ser Gly Gly Lys Lys Ala Thr Gln Ala Ser Gln Glu Tyr

130 135 140

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 68

Pro Glu Pro Ala Lys Ser Ala Pro Ala Pro Lys

1 5 10

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 69

Pro Glu Pro Ala Lys Ser Ala Pro Ala Pro Lys

1 5 10

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 70

Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys Lys Arg Lys Arg Ser Arg Lys Glu

1 5 10 15

<210> 71

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 71

Met Pro Glu Pro Ala Lys Ser Ala Pro Ala Pro Lys Lys Gly Ser Lys

1 5 10 15

Lys Ala Val Thr Lys Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys Lys Arg Lys Arg

20 25 30

Ser Arg Lys Glu Ser Tyr Ser Ile Tyr Val Tyr Lys Val Leu Lys Gln

35	40	45
Val His Pro Asp Thr Gly Ile Ser Ser Lys Ala Met Gly Ile Met Asn		
50	55	60
Ser Phe Val Asn Asp Ile Phe Glu Arg Ile Ala Gly Glu Ala Ser Arg		
65	70	75
Leu Ala His Tyr Asn Lys Arg Ser Thr Ile Thr Ser Arg Glu Ile Gln		
85	90	95
Thr Ala Val Arg Leu Leu Leu Pro Gly Glu Leu Ala Lys His Ala Val		
100	105	110
Ser Glu Gly Thr Lys Ala Val Thr Lys Tyr Thr Ser Ser Lys		
115	120	125

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 72

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg

1 5

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 73

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser

1 5 10

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 74

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser

1 5 10

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 75

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser

1 5 10

<210> 76

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 76

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala

1 5 10 15

<210> 77

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 77

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Trp Cys

20

<210> 78

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 78

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln

<210> 79

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 79

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu

20

<210> 80

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 80

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu

20

<210> 81

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 81

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala

20

<210> 82

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 82

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro
1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala
20

<210> 83

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 83

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro
1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala
20

<210> 84

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 84

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro
1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala
20

<210> 85

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 85

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro
1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala
20

<210> 86

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 86

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro
1 5 10 15
Arg Lys Gln Leu Ala
 20

<210> 87

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 87

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro
1 5 10 15
Arg Lys Gln Leu Ala
 20

<210> 88

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 88

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro
1 5 10 15
Arg Lys Gln Leu Ala
 20

<210> 89

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 89

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1	5	10	15
Arg Lys Gln Leu Ala			
20			
<210> 90			
<211> 21			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成序列			
<400> 90			
Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro			
1	5	10	15
Arg Lys Gln Leu Ala			
20			
<210> 91			
<211> 22			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成序列			
<400> 91			
Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro			
1	5	10	15
Arg Lys Gln Leu Ala Cys			
20			
<210> 92			
<211> 24			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成序列			
<400> 92			
Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro			
1	5	10	15
Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala			
20			
<210> 93			
<211> 24			
<212> PRT			

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 93

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala

20

<210> 94

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 94

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala

20

25

<210> 95

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 95

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala

20

25

<210> 96

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 96

Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro Arg

1 5 10 15

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 97

Thr	Lys	Gln	Thr	Ala	Arg	Lys	Ser	Thr	Gly	Gly	Lys	Ala	Pro	Arg
1				5					10				15	

<210> 98

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 98

Thr	Lys	Gln	Thr	Ala	Arg	Lys	Ser	Thr	Gly	Gly	Lys	Ala	Pro	Arg
1				5					10				15	

<210> 99

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 99

Lys	Ser	Thr	Gly	Gly	Lys	Ala	Pro	Arg	Lys	Gln
1				5					10	

<210> 100

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 100

Gln	Thr	Ala	Arg	Lys	Ser	Thr	Gly	Gly	Lys	Ala	Pro	Arg	Lys	Gln	Leu
1				5					10				15		

Ala Ser Lys

<210> 101

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 101

Ala Pro Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro

1 5 10 15

Ala Thr Gly Gly Val Lys Lys Pro His

20 25

<210> 102

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 102

Ala Thr Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly Val Lys

1 5 10 15

Lys Pro His Arg Tyr Arg Pro Gly

20

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 103

Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala

1 5

<210> 104

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 104

Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly

1 5 10

<210> 105

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 105

Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly Cys

1 5 10

<210> 106

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 106

Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly

1 5 10

<210> 107

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 107

Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly

1 5 10

<210> 108

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 108

Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly

1 5 10

<210> 109

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 109

Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly

1 5 10

<210> 110

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 110

Ala Thr Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ser Thr Gly Gly Val Lys

1 5 10 15

Lys Pro His Arg Tyr Arg Pro Gly

20

<210> 111

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 111

Ala Thr Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ser Thr Gly Gly Val Lys

1 5 10 15

Lys Pro His Arg Tyr Arg Pro Gly

20

<210> 112

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 112

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr

20 25 30

Gly Gly Val

35

<210> 113

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 113

Ser Thr Gly Gly Val Lys Lys Pro His Arg Tyr

1 5 10

<210> 114

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 114

Ser Thr Gly Gly Val Lys Lys Pro His Arg Tyr

1 5 10

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 115

Ser Thr Gly Gly Val Lys Lys Pro His Arg Tyr

1 5 10

<210> 116

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 116

Gly Thr Val Ala Leu Arg Glu Ile Arg Arg Tyr Gln Lys Ser Thr Glu

1 5 10 15

Leu Leu Ile Arg

20

<210> 117

<211> 50

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 117

Ala	Arg	Thr	Lys	Gln	Thr	Ala	Arg	Lys	Ser	Thr	Gly	Gly	Lys	Ala	Pro
1				5					10					15	
Arg	Lys	Gln	Leu	Ala	Thr	Lys	Ala	Ala	Arg	Lys	Ser	Ala	Pro	Ala	Thr
			20					25					30		
Gly	Gly	Val	Lys	Lys	Pro	His	Arg	Tyr	Arg	Pro	Gly	Thr	Val	Ala	Leu
			35				40					45			
Arg	Glu														
	50														

<210> 118

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 118

Thr	Glu	Leu	Leu	Ile	Arg	Lys	Leu	Pro	Phe	Gln	Arg	Leu	Val	Arg	Glu
1				5					10					15	
Ile	Ala	Gln	Asp	Phe	Lys	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Gln	Ser	Ala	Ala	Ile
			20					25					30		

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 119

Glu	Ile	Ala	Gln	Asp	Phe	Lys	Thr	Asp	Leu	Arg
1				5					10	

<210> 120

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 120

Glu Ile Ala Gln Asp Phe Lys Thr Asp Leu Arg

1 5 10

<210> 121

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 121

Glu Ile Ala Gln Asp Phe Lys Thr Asp Leu Arg

1 5 10

<210> 122

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 122

Arg Leu Val Arg Glu Ile Ala Gln Asp Phe Lys Thr Asp Leu Arg Phe

1 5 10 15

Gln Ser Ser Ala Val

20

<210> 123

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 123

Arg Leu Val Arg Glu Ile Ala Gln Asp Phe Lys Thr Asp Leu Arg Phe

1 5 10 15

Gln Ser Ser Ala Val

20

<210> 124

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 124

Arg Leu Val Arg Glu Ile Ala Gln Asp Phe Lys Thr Asp Leu Arg Phe

1 5 10 15

Gln Ser Ser Ala Val

20

<210> 125

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 125

Arg Leu Val Arg Glu Ile Ala Gln Asp Phe Lys Thr Asp Leu Arg Phe

1 5 10 15

Gln Ser Ser Ala Val

20

<210> 126

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 126

Lys Arg Val Thr Ile Met Pro Lys Asp Ile Gln Leu Ala Arg Arg Ile

1 5 10 15

Arg Gly Glu Arg Ala

20

<210> 127

<211> 136

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 127

Met Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala

1 5 10 15

Pro	Arg	Lys	Gln	Leu	Ala	Thr	Lys	Val	Ala	Arg	Lys	Ser	Ala	Pro	Ala
20				25				30							
Thr	Gly	Gly	Val	Lys	Lys	Pro	His	Arg	Tyr	Arg	Pro	Gly	Thr	Val	Ala
35				40				45							
Leu	Arg	Glu	Ile	Arg	Arg	Tyr	Gln	Lys	Ser	Thr	Glu	Leu	Leu	Ile	Arg
50				55				60							
Lys	Leu	Pro	Phe	Gln	Arg	Leu	Met	Arg	Glu	Ile	Ala	Gln	Asp	Phe	Lys
65				70				75				80			
Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Gln	Ser	Ser	Ala	Val	Met	Ala	Leu	Gln	Glu	Ala
85				90				95							
Cys	Glu	Ser	Tyr	Leu	Val	Gly	Leu	Phe	Glu	Asp	Thr	Asn	Leu	Cys	Val
100				105				110							
Ile	His	Ala	Lys	Arg	Val	Thr	Ile	Met	Pro	Lys	Asp	Ile	Gln	Leu	Ala
115				120				125							
Arg	Arg	Ile	Arg	Gly	Glu	Arg	Ala								
130				135											

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 128

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly

1 5

<210> 129

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 129

Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Ala

1 5 10

<210> 130

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 130

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys

1 5 10 15

Arg His Arg Lys Val

20

<210> 131

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 131

Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys Arg His Arg Lys Val Leu Arg

1 5 10 15

Asp Asn Trp Cys

20

<210> 132

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 132

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys

1 5 10 15

Arg His Arg Lys Val Leu Arg Asp Asn Gly Ser Gly Ser Lys

20

25

30

<210> 133

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 133

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys

1 5 10 15

Arg His Arg Lys

20

<210> 134

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 134

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys

1 5 10 15

Arg His Arg Lys

20

<210> 135

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 135

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys

1 5 10 15

Arg His Arg Lys

20

<210> 136

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 136

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys

1 5 10 15

Arg His Arg Lys

20

<210> 137

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 137

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys

1 5 10 15

Arg His Arg Lys

20

<210> 138

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 138

Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys Arg His Arg Lys Val Leu Arg

1 5 10 15

Asp Asn Trp Cys

20

<210> 139

<211> 103

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 139

Met Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala

1 5 10 15

Lys Arg His Arg Lys Val Leu Arg Asp Asn Ile Gln Gly Ile Thr Lys

20 25 30

Pro Ala Ile Arg Arg Leu Ala Arg Arg Gly Gly Val Lys Arg Ile Ser

35 40 45

Gly Leu Ile Tyr Glu Glu Thr Arg Gly Val Leu Lys Val Phe Leu Glu

50 55 60

Asn Val Ile Arg Asp Ala Val Thr Tyr Thr Glu His Ala Lys Arg Lys

65 70 75 80

Thr Val Thr Ala Met Asp Val Val Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg

85 90 95

Thr Leu Tyr Gly Phe Gly Gly

100

<210> 140

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 140

Cys Lys Ala Thr Gln Ala Ser Gln Glu Tyr

1 5 10

<210> 141

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 141

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Cys

20

<210> 142

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 142

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro

1 5 10 15

Arg Lys Trp Cys

20

<210> 143

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 143

Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly Cys

1 5 10

<210> 144

$\langle 211 \rangle$ 20

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 合成序列

$\langle 400 \rangle$ 144

Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys Arg His Arg Lys Val Leu Arg

1 5 10 15

Asp Asn Trp Cys

20

145 $\langle 210 \rangle$

136 $\langle 211 \rangle$

⟨212⟩ PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 合成序列

<400> 145

Met Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala

1
5
10
15

Pro Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Val Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala

20 25 30

Thr Gly Gly Val Lys Lys Pro His Arg Tyr Arg Pro Gly Thr Val Ala

35 40 45

Leu Arg Glu Ile Arg Arg Tyr Gln Lys Ser Thr Glu Leu Leu Ile Arg

50 55 60

Lys Leu Pro Phe Gln Arg Leu Met Arg Glu Ile Ala Gln Asp Phe Lys

65 70 75 80

Thr Asp Leu Arg Phe Gln Ser Ser Ala Val Met Ala Leu Gln Glu Ala

85 90 95

Cys Glu Ser Tyr Leu Val Gly Leu Phe Glu Asp Thr Asn Leu Cys Val

100 105 110

Ile His Ala Lys Arg Val Thr Ile Met Pro Lys Asp Ile Gln Leu Ala

115 120 125

Arg Arg Ile Arg Gly Glu Arg Ala

130 135

⟨210⟩ 146

⟨211⟩ 4

⟨212⟩ PRT

〈213〉 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 146

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 147

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 147

Thr Lys Pro Arg Pro Gly Pro

1

5

<210> 148

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 148

Met Glu His Phe Pro Gly Pro

1

5

<210> 149

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 149

Pro Glu Asp Glu Ile Trp Leu Pro Glu Pro Glu Ser Val Asp Val Pro

1

5

10

15

Ala Lys Pro Ile Ser Thr Ser Ser Met Met Met Pro

20

25

<210> 150

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 150

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 151

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 151

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1

5

<210> 152

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 152

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Tyr Cys

1

5

10

<210> 153

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 153

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly

1

5

10

15

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly

20

25

30

Cys

<210> 154

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 154

Cys Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 155

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 155

Cys Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Tyr Leu

1 5 10 15

Ile

<210> 156

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 156

Asp Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys

1 5 10 15

Lys

<210> 157

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 157

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Tyr Cys

1 5 10

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 158

Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp

1 5

<210> 159

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 159

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 160

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 160

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 161

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 161

Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg

1 5 10

<210> 162

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 162

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> 163

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 163

Lys Ala Leu Ala Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala
1 5 10 15
Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Cys Glu
20 25 30

Ala

<210> 164

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 164

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 165

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 165

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210> 166

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 166

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg

1 5

<210> 167

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 167

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 168

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 168

Thr His Arg Leu Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 169

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 169

Gly Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 170

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 170

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln

1 5 10

<210> 171

<211> 186

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 171

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

35 40 45

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

50 55 60

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

65 70 75 80

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

85 90 95

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

100 105 110

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

115 120 125

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

130 135 140

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

145 150 155 160

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

165 170 175

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

180 185

<210> 172

<211> 64

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 172

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
35 40 45

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
50 55 60

<210> 173

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 173

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 174

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 174

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 175

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 175

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
20 25 30

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
35 40 45

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
50 55 60

〈213〉 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 179

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 180

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 180

Tyr Thr Ile Trp Met Pro Glu Asn Pro Arg Pro Gly Thr Pro Cys Asp

1 5 10 15

Ile Phe Thr Asn Ser Arg Gly Lys Arg Ala Ser Asn Gly Gly Gly Gly

20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

35 40

<210> 181

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 181

Arg Gly Asp Gly Trp

1 5

<210> 182

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 182

Gly Cys Gly Tyr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly

1 5 10

<210> 183

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 183

Tyr	Thr	Ile	Trp	Met	Pro	Glu	Asn	Pro	Arg	Pro	Gly	Thr	Pro	Cys	Asp
1				5				10					15		
Ile	Phe	Thr	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Arg	Ala	Ser	Asn	Gly	Gly	Gly	Gly
			20					25					30		

<210> 184

<211> 164

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 184

Glu	Gly	Ile	Cys	Arg	Asn	Arg	Val	Thr	Asn	Asn	Val	Lys	Asp	Val	Thr
1			5					10					15		
Lys	Leu	Val	Ala	Asn	Leu	Pro	Lys	Asp	Tyr	Met	Ile	Thr	Leu	Lys	Tyr
			20					25					30		
Val	Pro	Gly	Met	Asp	Val	Leu	Pro	Ser	His	Cys	Trp	Ile	Ser	Glu	Met
			35					40					45		
Val	Val	Gln	Leu	Ser	Asp	Ser	Leu	Thr	Asp	Leu	Leu	Asp	Lys	Phe	Ser
			50				55				60				
Asn	Ile	Ser	Glu	Gly	Leu	Ser	Asn	Tyr	Ser	Ile	Ile	Asp	Lys	Leu	Val
65				70					75					80	
Asn	Ile	Val	Asp	Asp	Leu	Val	Glu	Cys	Val	Lys	Glu	Asn	Ser	Ser	Lys
			85					90					95		
Asp	Leu	Lys	Lys	Ser	Phe	Lys	Ser	Pro	Glu	Pro	Arg	Leu	Phe	Thr	Pro
			100					105					110		
Glu	Glu	Phe	Phe	Arg	Ile	Phe	Asn	Arg	Ser	Ile	Asp	Ala	Phe	Lys	Asp
			115				120					125			
Phe	Val	Val	Ala	Ser	Glu	Thr	Ser	Asp	Cys	Val	Val	Ser	Ser	Thr	Leu
			130				135				140				
Ser	Pro	Glu	Lys	Asp	Ser	Arg	Val	Ser	Val	Thr	Lys	Pro	Phe	Met	Leu
145				150					155					160	
Pro	Pro	Val	Ala												

<210> 185

<211> 192

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 185

```

Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly Cys
1           5           10           15
Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Cys
          20           25           30
Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu Pro
          35           40           45
Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His Thr
          50           55           60
Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala Leu
65           70           75           80
Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu Arg
          85           90           95
Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu Ala
          100          105          110
Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu Ala
          115          120          125
Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg Leu
          130          135          140
Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro Leu
145          150          155          160
Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu Pro
          165          170          175
Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg Pro
          180          185          190

```

<210> 186

<211> 138

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 186

```

Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His Met Asp Ala Val Ala Val
1           5           10           15
Tyr His Gly Lys Ile Ser Arg Glu Thr Gly Glu Lys Leu Leu Leu Ala
          20           25           30

```

Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Ser	Tyr	Leu	Leu	Arg	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro
35				40				45							
Gly	Val	Tyr	Cys	Leu	Cys	Val	Leu	Tyr	His	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Thr	Tyr
50				55				60							
Arg	Val	Ser	Gln	Thr	Glu	Thr	Gly	Ser	Trp	Ser	Ala	Glu	Thr	Ala	Pro
65				70				75				80			
Gly	Val	His	Lys	Arg	Tyr	Phe	Arg	Lys	Ile	Lys	Asn	Leu	Ile	Ser	Ala
85				90				95							
Phe	Gln	Lys	Pro	Asp	Gln	Gly	Ile	Val	Ile	Pro	Leu	Gln	Tyr	Pro	Val
100				105				110							
Glu	Lys	Lys	Ser	Ser	Ala	Arg	Ser	Thr	Gln	Gly	Thr	Thr	Gly	Ile	Arg
115				120				125							
Glu	Asp	Pro	Asp	Val	Cys	Leu	Lys	Ala	Pro						
130				135											

<210> 187

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 187

Asp	Gly	Ala	Arg	Tyr	Cys	Arg	Gly	Asp	Cys	Phe	Asp	Gly
1				5					10			

<210> 188

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 188

Gly	Cys	Gly	Tyr	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Pro	Gly
1				5					10	

<210> 189

<211> 174

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 189

Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Met	Glu	Gly	Ile	Cys	Arg	Asn
1				5					10					15	
Arg	Val	Thr	Asn	Asn	Val	Lys	Asp	Val	Thr	Lys	Leu	Val	Ala	Asn	Leu
			20					25					30		
Pro	Lys	Asp	Tyr	Met	Ile	Thr	Leu	Lys	Tyr	Val	Pro	Gly	Met	Asp	Val
		35					40					45			
Leu	Pro	Ser	His	Cys	Trp	Ile	Ser	Glu	Met	Val	Val	Gln	Leu	Ser	Asp
		50				55					60				
Ser	Leu	Thr	Asp	Leu	Leu	Asp	Lys	Phe	Ser	Asn	Ile	Ser	Glu	Gly	Leu
65				70					75					80	
Ser	Asn	Tyr	Ser	Ile	Ile	Asp	Lys	Leu	Val	Asn	Ile	Val	Asp	Asp	Leu
			85					90					95		
Val	Glu	Cys	Val	Lys	Glu	Asn	Ser	Ser	Lys	Asp	Leu	Lys	Lys	Ser	Phe
			100					105					110		
Lys	Ser	Pro	Glu	Pro	Arg	Leu	Phe	Thr	Pro	Glu	Glu	Phe	Phe	Arg	Ile
		115				120						125			
Phe	Asn	Arg	Ser	Ile	Asp	Ala	Phe	Lys	Asp	Phe	Val	Val	Ala	Ser	Glu
	130					135					140				
Thr	Ser	Asp	Cys	Val	Val	Ser	Ser	Thr	Leu	Ser	Pro	Glu	Lys	Asp	Ser
145				150					155					160	
Arg	Val	Ser	Val	Thr	Lys	Pro	Phe	Met	Leu	Pro	Pro	Val	Ala		
			165					170							

<210> 190

<211> 201

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 190

Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Pro	Glu	Glu	Gly	Ser	Gly	Cys
1				5					10					15	
Ser	Val	Arg	Arg	Arg	Pro	Tyr	Gly	Cys	Val	Leu	Arg	Ala	Ala	Leu	Val
			20					25					30		
Pro	Leu	Val	Ala	Gly	Leu	Val	Ile	Cys	Leu	Val	Val	Cys	Ile	Gln	Arg
		35					40					45			
Phe	Ala	Gln	Ala	Gln	Gln	Gln	Leu	Pro	Leu	Glu	Ser	Leu	Gly	Trp	Asp
	50					55					60				
Val	Ala	Glu	Leu	Gln	Leu	Asn	His	Thr	Gly	Pro	Gln	Gln	Asp	Pro	Arg
65				70					75					80	

Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly		
	85	90 95
Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr		
	100	105 110
Met Val His Ile Gln Val Thr Leu Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala		
	115	120 125
Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala		
	130	135 140
Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr		
	145	150 155 160
Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys		
	165	170 175
Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr		
	180	185 190
Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg Pro		
	195	200

<210> 191

<211> 201

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 191

Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly Cys		
1	5	10 15
Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Cys		
	20	25 30
Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Leu Pro		
	35	40 45
Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His Thr		
	50	55 60
Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala Leu		
65	70	75 80
Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu Arg		
	85	90 95
Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu Ala		
	100	105 110
Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu Ala		
	115	120 125

Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg Leu
 130 135 140
 Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro Leu
 145 150 155 160
 Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu Pro
 165 170 175
 Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg Pro
 180 185 190
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 195 200

<210> 192

<211> 148

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 192

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15
 Arg Gly Ser His Met Asp Ala Val Ala Val Tyr His Gly Lys Ile Ser
 20 25 30
 Arg Glu Thr Gly Glu Lys Leu Leu Leu Ala Thr Gly Leu Asp Gly Ser
 35 40 45
 Tyr Leu Leu Arg Asp Ser Glu Ser Val Pro Gly Val Tyr Cys Leu Cys
 50 55 60
 Val Leu Tyr His Gly Tyr Ile Tyr Thr Tyr Arg Val Ser Gln Thr Glu
 65 70 75 80
 Thr Gly Ser Trp Ser Ala Glu Thr Ala Pro Gly Val His Lys Arg Tyr
 85 90 95
 Phe Arg Lys Ile Lys Asn Leu Ile Ser Ala Phe Gln Lys Pro Asp Gln
 100 105 110
 Gly Ile Val Ile Pro Leu Gln Tyr Pro Val Glu Lys Lys Ser Ser Ala
 115 120 125
 Arg Ser Thr Gln Gly Thr Thr Gly Ile Arg Glu Asp Pro Asp Val Cys
 130 135 140
 Leu Lys Ala Pro
 145

<210> 193

<211> 147

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 193

Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Ser	Gly	Leu	Val	Pro	Arg
1				5					10					15	
Gly	Ser	His	Met	Asp	Ala	Val	Ala	Val	Tyr	His	Gly	Lys	Ile	Ser	Arg
			20					25					30		
Glu	Thr	Gly	Glu	Lys	Leu	Leu	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Ser	Tyr
			35				40					45			
Leu	Leu	Arg	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Gly	Val	Tyr	Cys	Leu	Cys	Val
	50					55				60					
Leu	Tyr	His	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Thr	Tyr	Arg	Val	Ser	Gln	Thr	Glu	Thr
65					70				75					80	
Gly	Ser	Trp	Ser	Ala	Glu	Thr	Ala	Pro	Gly	Val	His	Lys	Arg	Tyr	Phe
			85					90					95		
Arg	Lys	Ile	Lys	Asn	Leu	Ile	Ser	Ala	Phe	Gln	Lys	Pro	Asp	Gln	Gly
			100					105					110		
Ile	Val	Ile	Pro	Leu	Gln	Tyr	Pro	Val	Glu	Lys	Lys	Ser	Ser	Ala	Arg
		115					120					125			
Ser	Thr	Gln	Gly	Thr	Thr	Gly	Ile	Arg	Glu	Asp	Pro	Asp	Val	Cys	Leu
	130					135					140				

Lys Ala Pro

145

<210> 194

<211> 167

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (167) .. (167)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 194

Xaa Met Glu Gly Ile Cys Arg Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp
 1 5 10 15
 Val Thr Lys Leu Val Ala Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu
 20 25 30
 Lys Tyr Val Pro Gly Met Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser
 35 40 45
 Glu Met Val Val Gln Leu Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys
 50 55 60
 Phe Ser Asn Ile Ser Glu Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys
 65 70 75 80
 Leu Val Asn Ile Val Asp Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser
 85 90 95
 Ser Lys Asp Leu Lys Lys Ser Phe Lys Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe
 100 105 110
 Thr Pro Glu Glu Phe Phe Arg Ile Phe Asn Arg Ser Ile Asp Ala Phe
 115 120 125
 Lys Asp Phe Val Val Ala Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val Ser Ser
 130 135 140
 Thr Leu Ser Pro Glu Lys Asp Ser Arg Val Ser Val Thr Lys Pro Phe
 145 150 155 160
 Met Leu Pro Pro Val Ala Xaa
 165

<210> 195

<211> 194

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (194) .. (194)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 195

Xaa Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly

1	5	10	15
Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile			
20	25	30	
Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu			
35	40	45	
Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His			
50	55	60	
Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala			
65	70	75	80
Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu			
85	90	95	
Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu			
100	105	110	
Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu			
115	120	125	
Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg			
130	135	140	
Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro			
145	150	155	160
Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu			
165	170	175	
Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg			
180	185	190	

Pro Xaa

<210> 196

<211> 139

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 196

Xaa Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His Met Asp Ala Val Ala			
1	5	10	15
Val Tyr His Gly Lys Ile Ser Arg Glu Thr Gly Glu Lys Leu Leu Leu			
20	25	30	

Ala Thr Gly Leu Asp Gly Ser Tyr Leu Leu Arg Asp Ser Glu Ser Val
 35 40 45
 Pro Gly Val Tyr Cys Leu Cys Val Leu Tyr His Gly Tyr Ile Tyr Thr
 50 55 60
 Tyr Arg Val Ser Gln Thr Glu Thr Gly Ser Trp Ser Ala Glu Thr Ala
 65 70 75 80
 Pro Gly Val His Lys Arg Tyr Phe Arg Lys Ile Lys Asn Leu Ile Ser
 85 90 95
 Ala Phe Gln Lys Pro Asp Gln Gly Ile Val Ile Pro Leu Gln Tyr Pro
 100 105 110
 Val Glu Lys Lys Ser Ser Ala Arg Ser Thr Gln Gly Thr Thr Gly Ile
 115 120 125
 Arg Glu Asp Pro Asp Val Cys Leu Lys Ala Pro
 130 135

<210> 197

<211> 143

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 197

Met Gly Ser Ser Xaa Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His Met
 1 5 10 15
 Asp Ala Val Ala Val Tyr His Gly Lys Ile Ser Arg Glu Thr Gly Glu
 20 25 30
 Lys Leu Leu Leu Ala Thr Gly Leu Asp Gly Ser Tyr Leu Leu Arg Asp
 35 40 45
 Ser Glu Ser Val Pro Gly Val Tyr Cys Leu Cys Val Leu Tyr His Gly
 50 55 60
 Tyr Ile Tyr Thr Tyr Arg Val Ser Gln Thr Glu Thr Gly Ser Trp Ser
 65 70 75 80
 Ala Glu Thr Ala Pro Gly Val His Lys Arg Tyr Phe Arg Lys Ile Lys
 85 90 95
 Asn Leu Ile Ser Ala Phe Gln Lys Pro Asp Gln Gly Ile Val Ile Pro
 100 105 110

Leu Gln Tyr Pro Val Glu Lys Lys Ser Ser Ala Arg Ser Thr Gln Gly
115 120 125

Thr Thr Gly Ile Arg Glu Asp Pro Asp Val Cys Leu Lys Ala Pro
130 135 140

<210> 198

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 198

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 199

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 199

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 200

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 200

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 201

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 201

Leu Pro Lys Lys Arg Lys Phe Ser Glu Ile Ser Ser

1	5	10
<210> 202		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列		
<400> 202		
Lys Arg Lys Arg Trp Glu Asn Asp Ile Pro		
1	5	10
<210> 203		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列		
<400> 203		
Lys Arg Lys Arg Trp Glu Asn Asn Ile Pro		
1	5	10
<210> 204		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列		
<400> 204		
Thr Gly Gly Val Met Lys Arg Lys Arg Gly Ser Val		
1	5	10
<210> 205		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列		
<400> 205		
Pro Ile Leu Pro Leu Ile Cys Arg Arg Arg Gly Ser Pro		
1	5	10
<210> 206		
<211> 12		

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 206

Thr Tyr Ser Gly Val Lys Arg Lys Arg Asn Val Val

1 5 10

<210> 207

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 207

Thr His Ile Gly Tyr Lys Arg Lys Arg Asp Ser Val

1 5 10

<210> 208

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 208

Leu Ser Gly Thr Lys Arg Lys Arg Ala Tyr Phe Ile

1 5 10

<210> 209

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 209

Gln Arg Arg Leu Leu Lys Arg Lys Arg Gly Ser Leu

1 5 10

<210> 210

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 210

Gln Ile Gly Lys Lys Arg Lys Arg Asp Tyr Leu Asp

1 5 10

<210> 211

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 211

Lys Arg Gly Lys Arg Lys Arg Leu Val Arg Pro Trp

1 5 10

<210> 212

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 212

Lys Lys Gly Lys Arg Lys Arg Leu Val Arg Pro Trp

1 5 10

<210> 213

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 213

Pro Ser Arg Lys Arg Lys Arg Glu Ser Asp His Ile

1 5 10

<210> 214

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 214

Pro Ser Arg Lys Arg Lys Arg Asp His Tyr Ala Val

1	5	10
<210> 215		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列		
<400> 215		
Ile Ser Arg Lys Arg Lys Arg Asp Leu Glu Phe Val		
1	5	10
<210> 216		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列		
<400> 216		
Ile Thr Arg Lys Arg Lys Arg Asp Leu Val Phe Thr		
1	5	10
<210> 217		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列		
<400> 217		
Glu Pro Asn Pro Arg Lys Arg Lys Arg Ser Glu Leu		
1	5	10
<210> 218		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列		
<400> 218		
Thr Ser Pro Ser Arg Lys Arg Lys Trp Asp Gln Val		
1	5	10
<210> 219		
<211> 12		

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 219

Thr Leu Glu Arg Lys Arg Lys Leu Ala Val Leu Tyr

1 5 10

<210> 220

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 220

Arg Arg Arg Lys Arg Arg Arg Glu Trp Glu Asp Phe

1 5 10

<210> 221

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 221

His Arg Tyr Cys Gly Lys Arg Arg Arg Arg Thr Arg

1 5 10

<210> 222

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 222

Ser Val Leu Gly Lys Arg Ser Arg Thr Trp Glu

1 5 10

<210> 223

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 223

Tyr Gly Arg Val Ser Lys Arg Pro Arg Tyr Gln Phe

1 5 10

<210> 224

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 224

Arg Lys Arg Gly Arg Lys Arg Phe Arg Ser Val

1 5 10

<210> 225

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 225

Lys Arg Lys Tyr Ala Val Phe Leu Glu Ser Gln Asn

1 5 10

<210> 226

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 226

Lys Arg Lys Tyr Ser Ile Tyr Leu Gly Ser Gln Ser

1 5 10

<210> 227

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 227

Lys Arg Lys Trp Met Ala Phe Val Met Gly Asp Pro

1	5	10
---	---	----

<210> 228
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列
<400> 228
Lys Arg Lys Cys Ala Val Phe Leu Glu Gly Gln Asn
1 5 10
<210> 229
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列
<400> 229
Ile Pro Arg Lys Arg Ser Phe Ala Glu Leu Tyr Asp
1 5 10
<210> 230
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列
<400> 230
Arg Leu Thr Pro Arg Lys Arg Ala Phe Ser Glu Val
1 5 10
<210> 231
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列
<400> 231
Lys Arg Ser Trp Ser Met Ala Phe Cys
1 5
<210> 232
<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 232

Lys Arg Thr Asn Ala Gln Ala Phe Thr Glu

1 5 10

<210> 233

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 233

Lys Arg Pro Tyr Ser Ile Ala Phe Pro Leu Gly Gln

1 5 10

<210> 234

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 234

Arg Arg Arg Ser Val Leu Lys Arg Ser Trp Ser Val Ala Phe

1 5 10

<210> 235

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 235

Lys Arg Arg Tyr Ser Asp Ala Phe Arg Leu Pro Val

1 5 10

<210> 236

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 236

Lys Arg Lys Tyr Ser Asp Ala Phe Gly Leu Pro Val

1 5 10

<210> 237

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 237

Ile Gly Arg Lys Arg Gly Tyr Ser Val Ala Phe Gly

1 5 10

<210> 238

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 238

Ile Gly Arg Lys Arg Val Asn Ala Val Ala Phe Tyr

1 5 10

<210> 239

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 239

Trp Ala Gly Arg Lys Arg Thr Trp Arg Asp Ala Phe

1 5 10

<210> 240

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 240

Ser Ser His Arg Lys Arg Lys Phe Ser Asp Ala Phe

1	5	10
<210> 241		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列		
<400> 241		
Pro Ser His Arg Lys Arg Lys Phe Ser Asp Ala Phe		
1	5	10
<210> 242		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列		
<400> 242		
Thr Ala His Arg Lys Arg Lys Phe Ser Asp Ala Phe		
1	5	10
<210> 243		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列		
<400> 243		
Arg Val Gln Arg Lys Arg Lys Trp Ser Glu Ala Phe		
1	5	10
<210> 244		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列		
<400> 244		
Arg Leu Thr Arg Lys Arg Lys Tyr Asp Cys Ala Phe		
1	5	10
<210> 245		
<211> 12		

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 245

Leu Val Asn Arg Lys Arg Arg Tyr Trp Glu Ala Phe

1 5 10

<210> 246

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 246

Leu Gly Lys Arg Tyr Asp Arg Asp Trp Asp Tyr Lys

1 5 10

<210> 247

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 247

Arg Ser Ser Gly Ile Leu Gly Lys Arg Lys Phe Glu

1 5 10

<210> 248

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 248

Val His Lys Thr Val Leu Gly Lys Arg Lys Tyr Trp

1 5 10

<210> 249

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 249

Ser Ile Leu Gly Lys Arg Lys Asn Arg Asp Pro Ser

1 5 10

<210> 250

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 250

Gln Ser Val Leu Gly Lys Arg Lys Ser Arg Pro Phe

1 5 10

<210> 251

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 251

Thr Val His Leu Gly Lys Arg Arg Leu Arg Pro Trp

1 5 10

<210> 252

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 252

Arg Val Leu Gly Lys Arg Lys Thr Gly Arg Ser Pro

1 5 10

<210> 253

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 253

Val Leu Gly Lys Arg Lys Arg Asp Asp Cys Trp

1 5 10

<210> 254

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 254

His Gly Arg Gln Val Leu Gly Lys Arg Lys Arg

1 5 10

<210> 255

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 255

Ser Val Leu Gly Lys Arg Lys Arg His Pro Lys Val

1 5 10

<210> 256

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 256

Ser Val Leu Gly Lys Arg Lys Arg His His Leu Asp

1 5 10

<210> 257

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 257

Pro Val Leu Gly Lys Arg Lys Arg Ser Leu Ser Ser

1 5 10

<210> 258

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 258

Arg Val Leu Gly Lys Arg Lys Arg Glu Asp Arg Pro

1 5 10

<210> 259

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 259

Ile Leu Gly Lys Arg Lys Arg Ser His His Pro Tyr

1 5 10

<210> 260

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 260

Pro Ile Leu Gly Lys Arg Lys Arg His Leu Phe Leu

1 5 10

<210> 261

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 261

Leu Leu Gly Lys Arg Lys Arg Pro Ser Ile Glu His

1 5 10

<210> 262

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 262

Ser Met Leu Gly Lys Arg Lys Arg Cys Ile Ile Ser

1 5 10

<210> 263

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 263

Thr Leu Gly Lys Arg Lys Arg Ile Ser Cys Val Thr

1 5 10

<210> 264

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 264

Asp Thr Arg Leu Gly Lys Arg Lys Arg Arg Pro Trp

1 5 10

<210> 265

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 265

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 266

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 266

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 267

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 267

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 268

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 268

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 269

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 269

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 270

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 270

Ala Ala Ala Ala

1

<210> 271

<211> 428

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 271

Met	Ala	Val	Gly	Ala	Ser	Gly	Leu	Glu	Gly	Asp	Lys	Met	Ala	Gly	Ala
1				5					10					15	
Met	Pro	Leu	Gln	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	Gly	Pro	Gly	Asn
			20				25						30		
Ser	Leu	Gln	Leu	Trp	Asp	Thr	Trp	Ala	Asp	Glu	Ala	Glu	Lys	Ala	Leu
		35				40						45			
Gly	Pro	Leu	Leu	Ala	Arg	Asp	Arg	Arg	Gln	Ala	Thr	Glu	Tyr	Glu	Tyr
	50					55					60				
Leu	Asp	Tyr	Asp	Phe	Leu	Pro	Glu	Thr	Glu	Pro	Pro	Glu	Met	Leu	Arg
65				70					75					80	
Asn	Ser	Thr	Asp	Thr	Thr	Pro	Leu	Thr	Gly	Pro	Gly	Thr	Pro	Glu	Ser
			85						90					95	
Thr	Thr	Val	Glu	Pro	Ala	Ala	Arg	Arg	Ser	Thr	Gly	Leu	Asp	Ala	Gly
		100						105					110		
Gly	Ala	Val	Thr	Glu	Leu	Thr	Thr	Glu	Leu	Ala	Asn	Met	Gly	Asn	Leu
	115					120						125			
Ser	Thr	Asp	Ser	Ala	Ala	Met	Glu	Ile	Gln	Thr	Thr	Gln	Pro	Ala	Ala
	130					135						140			
Thr	Glu	Ala	Gln	Thr	Thr	Gln	Pro	Val	Pro	Thr	Glu	Ala	Gln	Thr	Thr
145				150						155				160	
Pro	Leu	Ala	Ala	Thr	Glu	Ala	Gln	Thr	Thr	Arg	Leu	Thr	Ala	Thr	Glu
			165						170				175		
Ala	Gln	Thr	Thr	Pro	Leu	Ala	Ala	Thr	Glu	Ala	Gln	Thr	Thr	Pro	Pro
		180						185					190		
Ala	Ala	Thr	Glu	Ala	Gln	Thr	Thr	Gln	Pro	Thr	Gly	Leu	Glu	Ala	Gln
	195					200					205				
Thr	Thr	Ala	Pro	Ala	Ala	Met	Glu	Ala	Gln	Thr	Thr	Ala	Pro	Ala	Ala
	210					215					220				
Met	Glu	Ala	Gln	Thr	Thr	Pro	Pro	Ala	Ala	Met	Glu	Ala	Gln	Thr	Thr
225				230						235				240	
Gln	Thr	Thr	Ala	Met	Glu	Ala	Gln	Thr	Thr	Ala	Pro	Glu	Ala	Thr	Glu
			245						250				255		
Ala	Gln	Thr	Thr	Gln	Pro	Thr	Ala	Thr	Glu	Ala	Gln	Thr	Thr	Pro	Leu
		260						265					270		

Ala Ala Met Glu Ala Leu Ser Thr Glu Pro Ser Ala Thr Glu Ala Leu
 275 280 285
 Ser Met Glu Pro Thr Thr Lys Arg Gly Leu Phe Ile Pro Phe Ser Val
 290 295 300
 Ser Ser Val Thr His Lys Gly Ile Pro Met Ala Ala Ser Asn Leu Ser
 305 310 315 320
 Val Asn Tyr Pro Val Gly Ala Pro Asp His Ile Ser Val Lys Gln Cys
 325 330 335
 Leu Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Leu Val Ala Thr Ile Phe Phe Val
 340 345 350
 Cys Thr Val Val Leu Ala Val Arg Leu Ser Arg Lys Gly His Met Tyr
 355 360 365
 Pro Val Arg Asn Tyr Ser Pro Thr Glu Met Val Cys Ile Ser Ser Leu
 370 375 380
 Leu Pro Asp Gly Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Ala Asn Gly Gly Leu
 385 390 395 400
 Ser Lys Ala Lys Ser Pro Gly Leu Thr Pro Glu Pro Arg Glu Asp Arg
 405 410 415
 Glu Gly Asp Asp Leu Thr Leu His Ser Phe Leu Pro
 420 425

<210> 272

<211> 1203

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 272

Met Ala Ala Cys Gly Arg Val Arg Arg Met Phe Arg Leu Ser Ala Ala
 1 5 10 15
 Leu His Leu Leu Leu Leu Phe Ala Ala Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly
 20 25 30
 Gln Gly Val His Ser Gln Gly Gln Gly Pro Gly Ala Asn Phe Val Ser
 35 40 45
 Phe Val Gly Gln Ala Gly Gly Gly Gly Pro Ala Gly Gln Gln Leu Pro
 50 55 60
 Gln Leu Pro Gln Ser Ser Gln Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 65 70 75 80
 Gln Gln Gln Gln Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Phe Pro Ala Gly Gly
 85 90 95

Pro	Pro	Ala	Arg	Arg	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Trp	Lys	Leu				
																100	105	110	
Ala	Glu	Glu	Glu	Ser	Cys	Arg	Glu	Asp	Val	Thr	Arg	Val	Cys	Pro	Lys				
																115	120	125	
His	Thr	Trp	Ser	Asn	Asn	Leu	Ala	Val	Leu	Glu	Cys	Leu	Gln	Asp	Val				
																130	135	140	
Arg	Glu	Pro	Glu	Asn	Glu	Ile	Ser	Ser	Asp	Cys	Asn	His	Leu	Leu	Trp				
																145	150	155	160
Asn	Tyr	Lys	Leu	Asn	Leu	Thr	Thr	Asp	Pro	Lys	Phe	Glu	Ser	Val	Ala				
																165	170	175	
Arg	Glu	Val	Cys	Lys	Ser	Thr	Ile	Thr	Glu	Ile	Lys	Glu	Cys	Ala	Asp				
																180	185	190	
Glu	Pro	Val	Gly	Lys	Gly	Tyr	Met	Val	Ser	Cys	Leu	Val	Asp	His	Arg				
																195	200	205	
Gly	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Gln	Cys	His	Gln	Tyr	Ile	Thr	Lys	Met	Thr				
																210	215	220	
Ala	Ile	Ile	Phe	Ser	Asp	Tyr	Arg	Leu	Ile	Cys	Gly	Phe	Met	Asp	Asp				
																225	230	235	240
Cys	Lys	Asn	Asp	Ile	Asn	Ile	Leu	Lys	Cys	Gly	Ser	Ile	Arg	Leu	Gly				
																245	250	255	
Glu	Lys	Asp	Ala	His	Ser	Gln	Gly	Glu	Val	Val	Ser	Cys	Leu	Glu	Lys				
																260	265	270	
Gly	Leu	Val	Lys	Glu	Ala	Glu	Glu	Arg	Glu	Pro	Lys	Ile	Gln	Val	Ser				
																275	280	285	
Glu	Leu	Cys	Lys	Lys	Ala	Ile	Leu	Arg	Val	Ala	Glu	Leu	Ser	Ser	Asp				
																290	295	300	
Asp	Phe	His	Leu	Asp	Arg	His	Leu	Tyr	Phe	Ala	Cys	Arg	Asp	Asp	Arg				
																305	310	315	320
Glu	Arg	Phe	Cys	Glu	Asn	Thr	Gln	Ala	Gly	Glu	Gly	Arg	Val	Tyr	Lys				
																325	330	335	
Cys	Leu	Phe	Asn	His	Lys	Phe	Glu	Glu	Ser	Met	Ser	Glu	Lys	Cys	Arg				
																340	345	350	
Glu	Ala	Leu	Thr	Thr	Arg	Gln	Lys	Leu	Ile	Ala	Gln	Asp	Tyr	Lys	Val				
																355	360	365	
Ser	Tyr	Ser	Leu	Ala	Lys	Ser	Cys	Lys	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Tyr	Arg				
																370	375	380	
Cys	Asn	Val	Glu	Asn	Leu	Pro	Arg	Ser	Arg	Glu	Ala	Arg	Leu	Ser	Tyr				
																385	390	395	400
Leu	Leu	Met	Cys	Leu	Glu	Ser	Ala	Val	His	Arg	Gly	Arg	Gln	Val	Ser				

			405					410					415				
Ser	Glu	Cys	Gln	Gly	Glu	Met	Leu	Asp	Tyr	Arg	Arg	Met	Leu	Met	Glu		
			420					425					430				
Asp	Phe	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu	Ile	Ile	Leu	Ser	Cys	Arg	Gly	Glu	Ile		
			435					440					445				
Glu	His	His	Cys	Ser	Gly	Leu	His	Arg	Lys	Gly	Arg	Thr	Leu	His	Cys		
			450					455					460				
Leu	Met	Lys	Val	Val	Arg	Gly	Glu	Lys	Gly	Asn	Leu	Gly	Met	Asn	Cys		
465			470					475					480				
Gln	Gln	Ala	Leu	Gln	Thr	Leu	Ile	Gln	Glu	Thr	Asp	Pro	Gly	Ala	Asp		
			485					490					495				
Tyr	Arg	Ile	Asp	Arg	Ala	Leu	Asn	Glu	Ala	Cys	Glu	Ser	Val	Ile	Gln		
			500					505					510				
Thr	Ala	Cys	Lys	His	Ile	Arg	Ser	Gly	Asp	Pro	Met	Ile	Leu	Ser	Cys		
			515					520					525				
Leu	Met	Glu	His	Leu	Tyr	Thr	Glu	Lys	Met	Val	Glu	Asp	Cys	Glu	His		
530			535					540									
Arg	Leu	Leu	Glu	Leu	Gln	Tyr	Phe	Ile	Ser	Arg	Asp	Trp	Lys	Leu	Asp		
545			550					555					560				
Pro	Val	Leu	Tyr	Arg	Lys	Cys	Gln	Gly	Asp	Ala	Ser	Arg	Leu	Cys	His		
			565					570					575				
Thr	His	Gly	Trp	Asn	Glu	Thr	Ser	Glu	Phe	Met	Pro	Gln	Gly	Ala	Val		
			580					585					590				
Phe	Ser	Cys	Leu	Tyr	Arg	His	Ala	Tyr	Arg	Thr	Glu	Glu	Gln	Gly	Arg		
595			600					605									
Arg	Leu	Ser	Arg	Glu	Cys	Arg	Ala	Glu	Val	Gln	Arg	Ile	Leu	His	Gln		
610			615					620									
Arg	Ala	Met	Asp	Val	Lys	Leu	Asp	Pro	Ala	Leu	Gln	Asp	Lys	Cys	Leu		
625			630					635					640				
Ile	Asp	Leu	Gly	Lys	Trp	Cys	Ser	Glu	Lys	Thr	Glu	Thr	Gly	Gln	Glu		
			645					650					655				
Leu	Glu	Cys	Leu	Gln	Asp	His	Leu	Asp	Asp	Leu	Val	Val	Glu	Cys	Arg		
			660					665					670				
Asp	Ile	Val	Gly	Asn	Leu	Thr	Glu	Leu	Glu	Ser	Glu	Asp	Ile	Gln	Ile		
675			680					685									
Glu	Ala	Leu	Leu	Met	Arg	Ala	Cys	Glu	Pro	Ile	Ile	Gln	Asn	Phe	Cys		
690			695					700									
His	Asp	Val	Ala	Asp	Asn	Gln	Ile	Asp	Ser	Gly	Asp	Leu	Met	Glu	Cys		
705			710					715					720				

Leu Ile Gln Asn Lys His Gln Lys Asp Met Asn Glu Lys Cys Ala Ile		
725	730	735
Gly Val Thr His Phe Gln Leu Val Gln Met Lys Asp Phe Arg Phe Ser		
740	745	750
Tyr Lys Phe Lys Met Ala Cys Lys Glu Asp Val Leu Lys Leu Cys Pro		
755	760	765
Asn Ile Lys Lys Lys Val Asp Val Val Ile Cys Leu Ser Thr Thr Val		
770	775	780
Arg Asn Asp Thr Leu Gln Glu Ala Lys Glu His Arg Val Ser Leu Lys		
785	790	795
Cys Arg Arg Gln Leu Arg Val Glu Glu Leu Glu Met Thr Glu Asp Ile		
805	810	815
Arg Leu Glu Pro Asp Leu Tyr Glu Ala Cys Lys Ser Asp Ile Lys Asn		
820	825	830
Phe Cys Ser Ala Val Gln Tyr Gly Asn Ala Gln Ile Ile Glu Cys Leu		
835	840	845
Lys Glu Asn Lys Lys Gln Leu Ser Thr Arg Cys His Gln Lys Val Phe		
850	855	860
Lys Leu Gln Glu Thr Glu Met Met Asp Pro Glu Leu Asp Tyr Thr Leu		
865	870	875
Met Arg Val Cys Lys Gln Met Ile Lys Arg Phe Cys Pro Glu Ala Asp		
885	890	895
Ser Lys Thr Met Leu Gln Cys Leu Lys Gln Asn Lys Asn Ser Glu Leu		
900	905	910
Met Asp Pro Lys Cys Lys Gln Met Ile Thr Lys Arg Gln Ile Thr Gln		
915	920	925
Asn Thr Asp Tyr Arg Leu Asn Pro Met Leu Arg Lys Ala Cys Lys Ala		
930	935	940
Asp Ile Pro Lys Phe Cys His Gly Ile Leu Thr Lys Ala Lys Asp Asp		
945	950	955
Ser Glu Leu Glu Gly Gln Val Ile Ser Cys Leu Lys Leu Arg Tyr Ala		
965	970	975
Asp Gln Arg Leu Ser Ser Asp Cys Glu Asp Gln Ile Arg Ile Ile Ile		
980	985	990
Gln Glu Ser Ala Leu Asp Tyr Arg Leu Asp Pro Gln Leu Gln Leu His		
995	1000	1005
Cys Ser Asp Glu Ile Ser Ser Leu Cys Ala Glu Glu Ala Ala Ala		
1010	1015	1020
Gln Glu Gln Thr Gly Gln Val Glu Glu Cys Leu Lys Val Asn Leu		

1025	1030	1035
Leu Lys Ile Lys Thr Glu	Leu Cys Lys Lys Glu	Val Leu Asn Met
1040	1045	1050
Leu Lys Glu Ser Lys Ala	Asp Ile Phe Val Asp	Pro Val Leu His
1055	1060	1065
Thr Ala Cys Ala Leu Asp	Ile Lys His His Cys	Ala Ala Ile Thr
1070	1075	1080
Pro Gly Arg Gly Arg Gln	Met Ser Cys Leu Met	Glu Ala Leu Glu
1085	1090	1095
Asp Lys Arg Val Arg Leu	Gln Pro Glu Cys Lys	Lys Arg Leu Asn
1100	1105	1110
Asp Arg Ile Glu Met Trp	Ser Tyr Ala Ala Lys	Val Ala Pro Ala
1115	1120	1125
Asp Gly Phe Ser Asp Leu	Ala Met Gln Val Met	Thr Ser Pro Ser
1130	1135	1140
Lys Asn Tyr Ile Leu Ser	Val Ile Ser Gly Ser	Ile Cys Ile Leu
1145	1150	1155
Phe Leu Ile Gly Leu Met	Cys Gly Arg Ile Thr	Lys Arg Val Thr
1160	1165	1170
Arg Glu Leu Lys Asp Arg	Leu Gln Tyr Arg Ser	Glu Thr Met Ala
1175	1180	1185
Tyr Lys Gly Leu Val Trp	Ser Gln Asp Val Thr	Gly Ser Pro Ala
1190	1195	1200

<210> 273

<211> 742

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 合成序列

<400> 273

Met	Asp	Lys	Phe	Trp	Trp	His	Ala	Ala	Trp	Gly	Leu	Cys	Leu	Val	Pro
1				5					10					15	
Leu	Ser	Leu	Ala	Gln	Ile	Asp	Leu	Asn	Ile	Thr	Cys	Arg	Phe	Ala	Gly
			20					25					30		
Val	Phe	His	Val	Glu	Lys	Asn	Gly	Arg	Tyr	Ser	Ile	Ser	Arg	Thr	Glu
		35					40					45			
Ala	Ala	Asp	Leu	Cys	Lys	Ala	Phe	Asn	Ser	Thr	Leu	Pro	Thr	Met	Ala
	50					55					60				
Gln	Met	Glu	Lys	Ala	Leu	Ser	Ile	Gly	Phe	Glu	Thr	Cys	Arg	Tyr	Gly

65	70	75	80
Phe Ile Glu Gly His Val Val Ile Pro Arg Ile His Pro Asn Ser Ile			
	85	90	95
Cys Ala Ala Asn Asn Thr Gly Val Tyr Ile Leu Thr Ser Asn Thr Ser			
	100	105	110
Gln Tyr Asp Thr Tyr Cys Phe Asn Ala Ser Ala Pro Pro Glu Glu Asp			
	115	120	125
Cys Thr Ser Val Thr Asp Leu Pro Asn Ala Phe Asp Gly Pro Ile Thr			
	130	135	140
Ile Thr Ile Val Asn Arg Asp Gly Thr Arg Tyr Val Gln Lys Gly Glu			
145	150	155	160
Tyr Arg Thr Asn Pro Glu Asp Ile Tyr Pro Ser Asn Pro Thr Asp Asp			
	165	170	175
Asp Val Ser Ser Gly Ser Ser Ser Glu Arg Ser Ser Thr Ser Gly Gly			
	180	185	190
Tyr Ile Phe Tyr Thr Phe Ser Thr Val His Pro Ile Pro Asp Glu Asp			
	195	200	205
Ser Pro Trp Ile Thr Asp Ser Thr Asp Arg Ile Pro Ala Thr Thr Leu			
	210	215	220
Met Ser Thr Ser Ala Thr Ala Thr Glu Thr Ala Thr Lys Arg Gln Glu			
225	230	235	240
Thr Trp Asp Trp Phe Ser Trp Leu Phe Leu Pro Ser Glu Ser Lys Asn			
	245	250	255
His Leu His Thr Thr Thr Gln Met Ala Gly Thr Ser Ser Asn Thr Ile			
	260	265	270
Ser Ala Gly Trp Glu Pro Asn Glu Glu Asn Glu Asp Glu Arg Asp Arg			
	275	280	285
His Leu Ser Phe Ser Gly Ser Gly Ile Asp Asp Asp Glu Asp Phe Ile			
	290	295	300
Ser Ser Thr Ile Ser Thr Thr Pro Arg Ala Phe Asp His Thr Lys Gln			
305	310	315	320
Asn Gln Asp Trp Thr Gln Trp Asn Pro Ser His Ser Asn Pro Glu Val			
	325	330	335
Leu Leu Gln Thr Thr Thr Arg Met Thr Asp Val Asp Arg Asn Gly Thr			
	340	345	350
Thr Ala Tyr Glu Gly Asn Trp Asn Pro Glu Ala His Pro Pro Leu Ile			
	355	360	365
His His Glu His His Glu Glu Glu Glu Thr Pro His Ser Thr Ser Thr			
	370	375	380

Ile	Gln	Ala	Thr	Pro	Ser	Ser	Thr	Thr	Glu	Glu	Thr	Ala	Thr	Gln	Lys
385					390				395						400
Glu	Gln	Trp	Phe	Gly	Asn	Arg	Trp	His	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gln	Thr	Pro
				405					410						415
Lys	Glu	Asp	Ser	His	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	His
			420					425					430		
Thr	Ser	His	Pro	Met	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Glu	Asp	Ser
			435				440					445			
Ser	Trp	Thr	Asp	Phe	Phe	Asn	Pro	Ile	Ser	His	Pro	Met	Gly	Arg	Gly
			450			455					460				
His	Gln	Ala	Gly	Arg	Arg	Met	Asp	Met	Asp	Ser	Ser	His	Ser	Ile	Thr
465					470				475						480
Leu	Gln	Pro	Thr	Ala	Asn	Pro	Asn	Thr	Gly	Leu	Val	Glu	Asp	Leu	Asp
				485					490						495
Arg	Thr	Gly	Pro	Leu	Ser	Met	Thr	Thr	Gln	Gln	Ser	Asn	Ser	Gln	Ser
			500						505				510		
Phe	Ser	Thr	Ser	His	Glu	Gly	Leu	Glu	Glu	Asp	Lys	Asp	His	Pro	Thr
			515				520					525			
Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ser	Ser	Asn	Arg	Asn	Asp	Val	Thr	Gly	Gly	Arg
			530				535				540				
Arg	Asp	Pro	Asn	His	Ser	Glu	Gly	Ser	Thr	Thr	Leu	Leu	Glu	Gly	Tyr
545					550				555						560
Thr	Ser	His	Tyr	Pro	His	Thr	Lys	Glu	Ser	Arg	Thr	Phe	Ile	Pro	Val
			565					570					575		
Thr	Ser	Ala	Lys	Thr	Gly	Ser	Phe	Gly	Val	Thr	Ala	Val	Thr	Val	Gly
			580					585					590		
Asp	Ser	Asn	Ser	Asn	Val	Asn	Arg	Ser	Leu	Ser	Gly	Asp	Gln	Asp	Thr
			595				600					605			
Phe	His	Pro	Ser	Gly	Gly	Ser	His	Thr	Thr	His	Gly	Ser	Glu	Ser	Asp
			610			615				620					
Gly	His	Ser	His	Gly	Ser	Gln	Glu	Gly	Gly	Ala	Asn	Thr	Thr	Ser	Gly
625					630				635						640
Pro	Ile	Arg	Thr	Pro	Gln	Ile	Pro	Glu	Trp	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala	Ser
			645					650					655		
Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	Ile	Leu	Ala	Val	Cys	Ile	Ala	Val	Asn	Ser
			660					665					670		
Arg	Arg	Arg	Cys	Gly	Gln	Lys	Lys	Lys	Leu	Val	Ile	Asn	Ser	Gly	Asn
			675				680					685			
Gly	Ala	Val	Glu	Asp	Arg	Lys	Pro	Ser	Gly	Leu	Asn	Gly	Glu	Ala	Ser

690	695	700
Lys Ser Gln Glu Met Val His Leu Val Asn Lys Glu Ser Ser Glu Thr		
705	710	715
Pro Asp Gln Phe Met Thr Ala Asp Glu Thr Arg Asn Leu Gln Asn Val		720
	725	730
Asp Met Lys Ile Gly Val		735
	740	
<210> 274		
<211> 426		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列		
<400> 274		
Met Glu Gln Arg Pro Arg Gly Cys Ala Ala Val Ala Ala Ala Leu Leu		
1	5	10
Leu Val Leu Leu Gly Ala Arg Ala Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg		
	20	25
Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys		30
	35	40
Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro		45
	50	55
Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala		60
65	70	75
Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp		80
	85	90
Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp		95
	100	105
Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser		110
	115	120
Gln Cys Val Ser Ser Ser Pro Phe Tyr Cys Gln Pro Cys Leu Asp Cys		125
	130	135
Gly Ala Leu His Arg His Thr Arg Leu Leu Cys Ser Arg Arg Asp Thr		140
145	150	155
Asp Cys Gly Thr Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Glu His Gly Asp Gly Cys		160
	165	170
Val Ser Cys Pro Thr Pro Pro Pro Ser Leu Ala Gly Ala Pro Trp Gly		175
	180	185
Ala Val Gln Ser Ala Val Pro Leu Ser Val Ala Gly Gly Arg Val Gly		190

195	200	205
Val Phe Trp Val Gln Val Leu Leu Ala Gly Leu Val Val Pro Leu Leu		
210	215	220
Leu Gly Ala Thr Leu Thr Tyr Thr Tyr Arg His Cys Trp Pro His Lys		
225	230	235
Pro Leu Val Thr Ala Asp Glu Ala Gly Met Glu Ala Leu Thr Pro Pro		
245	250	255
Pro Ala Thr His Leu Ser Pro Leu Asp Ser Ala His Thr Leu Leu Ala		
260	265	270
Pro Pro Asp Ser Ser Glu Lys Ile Cys Thr Val Gln Leu Val Gly Asn		
275	280	285
Ser Trp Thr Pro Gly Tyr Pro Glu Thr Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln		
290	295	300
Val Thr Trp Ser Trp Asp Gln Leu Pro Ser Arg Ala Leu Gly Pro Ala		
305	310	315
Ala Ala Pro Thr Leu Ser Pro Glu Ser Pro Ala Gly Ser Pro Ala Met		
325	330	335
Met Leu Gln Pro Gly Pro Gln Leu Tyr Asp Val Met Asp Ala Val Pro		
340	345	350
Ala Arg Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala		
355	360	365
Glu Ile Glu Ala Val Glu Val Glu Ile Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln		
370	375	380
Tyr Glu Met Leu Lys Arg Trp Arg Gln Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly		
385	390	395
Ala Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Met Gly Leu Asp Gly Cys Val Glu		
405	410	415
Asp Leu Arg Ser Arg Leu Gln Arg Gly Pro		
420	425	

<210> 275

<211> 417

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 275

Met Ala Ala Pro Gly Ser Ala Arg Arg Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu			
1	5	10	15
Leu Leu Leu Leu Gly Leu Met His Cys Ala Ser Ala Ala Met Phe Met			

20	25	30
Val Lys Asn Gly Asn Gly Thr Ala Cys Ile Met Ala Asn Phe Ser Ala		
35	40	45
Ala Phe Ser Val Asn Tyr Asp Thr Lys Ser Gly Pro Lys Asn Met Thr		
50	55	60
Phe Asp Leu Pro Ser Asp Ala Thr Val Val Leu Asn Arg Ser Ser Cys		
65	70	75
Gly Lys Glu Asn Thr Ser Asp Pro Ser Leu Val Ile Ala Phe Gly Arg		
85	90	95
Gly His Thr Leu Thr Leu Asn Phe Thr Arg Asn Ala Thr Arg Tyr Ser		
100	105	110
Val Gln Leu Met Ser Phe Val Tyr Asn Leu Ser Asp Thr His Leu Phe		
115	120	125
Pro Asn Ala Ser Ser Lys Glu Ile Lys Thr Val Glu Ser Ile Thr Asp		
130	135	140
Ile Arg Ala Asp Ile Asp Lys Lys Tyr Arg Cys Val Ser Gly Thr Gln		
145	150	155
Val His Met Asn Asn Val Thr Val Thr Leu His Asp Ala Thr Ile Gln		
165	170	175
Ala Tyr Leu Ser Asn Ser Ser Phe Ser Arg Gly Glu Thr Arg Cys Glu		
180	185	190
Gln Asp Arg Pro Ser Pro Thr Thr Ala Pro Pro Ala Pro Pro Ser Pro		
195	200	205
Ser Pro Ser Pro Val Pro Lys Ser Pro Ser Val Asp Lys Tyr Asn Val		
210	215	220
Ser Gly Thr Asn Gly Thr Cys Leu Leu Ala Ser Met Gly Leu Gln Leu		
225	230	235
Asn Leu Thr Tyr Glu Arg Lys Asp Asn Thr Thr Val Thr Arg Leu Leu		
245	250	255
Asn Ile Asn Pro Asn Lys Thr Ser Ala Ser Gly Ser Cys Gly Ala His		
260	265	270
Leu Val Thr Leu Glu Leu His Ser Glu Gly Thr Thr Val Leu Leu Phe		
275	280	285
Gln Phe Gly Met Asn Ala Ser Ser Ser Arg Phe Phe Leu Gln Gly Ile		
290	295	300
Gln Leu Asn Thr Ile Leu Pro Asp Ala Arg Asp Pro Ala Phe Lys Ala		
305	310	315
Ala Asn Gly Ser Leu Arg Ala Leu Gln Ala Thr Val Gly Asn Ser Tyr		
325	330	335

Lys Cys Asn Ala Glu Glu His Val Arg Val Thr Lys Ala Phe Ser Val
 340 345 350
 Asn Ile Phe Lys Val Trp Val Gln Ala Phe Lys Val Glu Gly Gly Gln
 355 360 365
 Phe Gly Ser Val Glu Glu Cys Leu Leu Asp Glu Asn Ser Met Leu Ile
 370 375 380
 Pro Ile Ala Val Gly Gly Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ile Val Leu
 385 390 395 400
 Ile Ala Tyr Leu Val Gly Arg Lys Arg Ser His Ala Gly Tyr Gln Thr
 405 410 415
 Ile
 <210> 276
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列
 <400> 276
 Met Val Cys Phe Arg Leu Phe Pro Val Pro Gly Ser Gly Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Val Cys Leu Val Leu Gly Ala Val Arg Ser Tyr Ala Leu Glu Leu Asn
 20 25 30
 Leu Thr Asp Ser Glu Asn Ala Thr Cys Leu Tyr Ala Lys Trp Gln Met
 35 40 45
 Asn Phe Thr Val Arg Tyr Glu Thr Thr Asn Lys Thr Tyr Lys Thr Val
 50 55 60
 Thr Ile Ser Asp His Gly Thr Val Thr Tyr Asn Gly Ser Ile Cys Gly
 65 70 75 80
 Asp Asp Gln Asn Gly Pro Lys Ile Ala Val Gln Phe Gly Pro Gly Phe
 85 90 95
 Ser Trp Ile Ala Asn Phe Thr Lys Ala Ala Ser Thr Tyr Ser Ile Asp
 100 105 110
 Ser Val Ser Phe Ser Tyr Asn Thr Gly Asp Asn Thr Thr Phe Pro Asp
 115 120 125
 Ala Glu Asp Lys Gly Ile Leu Thr Val Asp Glu Leu Leu Ala Ile Arg
 130 135 140
 Ile Pro Leu Asn Asp Leu Phe Arg Cys Asn Ser Leu Ser Thr Leu Glu
 145 150 155 160
 Lys Asn Asp Val Val Gln His Tyr Trp Asp Val Leu Val Gln Ala Phe

				165					170					175			
Val	Gln	Asn	Gly	Thr	Val	Ser	Thr	Asn	Glu	Phe	Leu	Cys	Asp	Lys	Asp		
				180					185					190			
Lys	Thr	Ser	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Ile	His	Thr	Thr	Val	Pro	Ser	Pro		
				195					200					205			
Thr	Thr	Thr	Pro	Thr	Pro	Lys	Glu	Lys	Pro	Glu	Ala	Gly	Thr	Tyr	Ser		
				210					215					220			
Val	Asn	Asn	Gly	Asn	Asp	Thr	Cys	Leu	Leu	Ala	Thr	Met	Gly	Leu	Gln		
225						230				235					240		
Leu	Asn	Ile	Thr	Gln	Asp	Lys	Val	Ala	Ser	Val	Ile	Asn	Ile	Asn	Pro		
				245					250					255			
Asn	Thr	Thr	His	Ser	Thr	Gly	Ser	Cys	Arg	Ser	His	Thr	Ala	Leu	Leu		
				260					265					270			
Arg	Leu	Asn	Ser	Ser	Thr	Ile	Lys	Tyr	Leu	Asp	Phe	Val	Phe	Ala	Val		
				275					280					285			
Lys	Asn	Glu	Asn	Arg	Phe	Tyr	Leu	Lys	Glu	Val	Asn	Ile	Ser	Met	Tyr		
				290					295					300			
Leu	Val	Asn	Gly	Ser	Val	Phe	Ser	Ile	Ala	Asn	Asn	Asn	Leu	Ser	Tyr		
305						310				315					320		
Trp	Asp	Ala	Pro	Leu	Gly	Ser	Ser	Tyr	Met	Cys	Asn	Lys	Glu	Gln	Thr		
				325					330					335			
Val	Ser	Val	Ser	Gly	Ala	Phe	Gln	Ile	Asn	Thr	Phe	Asp	Leu	Arg	Val		
				340					345					350			
Gln	Pro	Phe	Asn	Val	Thr	Gln	Gly	Lys	Tyr	Ser	Thr	Ala	Gln	Asp	Cys		
				355					360					365			
Ser	Ala	Asp	Asp	Asp	Asn	Phe	Leu	Val	Pro	Ile	Ala	Val	Gly	Ala	Ala		
				370					375					380			
Leu	Ala	Gly	Val	Leu	Ile	Leu	Val	Leu	Leu	Ala	Tyr	Phe	Ile	Gly	Leu		
385						390				395					400		
Lys	His	His	His	Ala	Gly	Tyr	Glu	Gln	Phe								
				405					410								

<210> 277

<211> 585

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 277

Met Thr Pro Pro Arg Leu Phe Trp Val Trp Leu Leu Val Ala Gly Thr

1	5	10	15
Gln Gly Val Asn Asp Gly Asp Met Arg Leu Ala Asp Gly Gly Ala Thr			
20	25	30	
Asn Gln Gly Arg Val Glu Ile Phe Tyr Arg Gly Gln Trp Gly Thr Val			
35	40	45	
Cys Asp Asn Leu Trp Asp Leu Thr Asp Ala Ser Val Val Cys Arg Ala			
50	55	60	
Leu Gly Phe Glu Asn Ala Thr Gln Ala Leu Gly Arg Ala Ala Phe Gly			
65	70	75	80
Gln Gly Ser Gly Pro Ile Met Leu Asp Glu Val Gln Cys Thr Gly Thr			
85	90	95	
Glu Ala Ser Leu Ala Asp Cys Lys Ser Leu Gly Trp Leu Lys Ser Asn			
100	105	110	
Cys Arg His Glu Arg Asp Ala Gly Val Val Cys Thr Asn Glu Thr Arg			
115	120	125	
Ser Thr His Thr Leu Asp Leu Ser Arg Glu Leu Ser Glu Ala Leu Gly			
130	135	140	
Gln Ile Phe Asp Ser Gln Arg Gly Cys Asp Leu Ser Ile Ser Val Asn			
145	150	155	160
Val Gln Gly Glu Asp Ala Leu Gly Phe Cys Gly His Thr Val Ile Leu			
165	170	175	
Thr Ala Asn Leu Glu Ala Gln Ala Leu Trp Lys Glu Pro Gly Ser Asn			
180	185	190	
Val Thr Met Ser Val Asp Ala Glu Cys Val Pro Met Val Arg Asp Leu			
195	200	205	
Leu Arg Tyr Phe Tyr Ser Arg Arg Ile Asp Ile Thr Leu Ser Ser Val			
210	215	220	
Lys Cys Phe His Lys Leu Ala Ser Ala Tyr Gly Ala Arg Gln Leu Gln			
225	230	235	240
Gly Tyr Cys Ala Ser Leu Phe Ala Ile Leu Leu Pro Gln Asp Pro Ser			
245	250	255	
Phe Gln Met Pro Leu Asp Leu Tyr Ala Tyr Ala Val Ala Thr Gly Asp			
260	265	270	
Ala Leu Leu Glu Lys Leu Cys Leu Gln Phe Leu Ala Trp Asn Phe Glu			
275	280	285	
Ala Leu Thr Gln Ala Glu Ala Trp Pro Ser Val Pro Thr Asp Leu Leu			
290	295	300	
Gln Leu Leu Leu Pro Arg Ser Asp Leu Ala Val Pro Ser Glu Leu Ala			
305	310	315	320

Leu	Leu	Lys	Ala	Val	Asp	Thr	Trp	Ser	Trp	Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	His	
					325					330					335	
Glu	Glu	Val	Glu	Gly	Leu	Val	Glu	Lys	Ile	Arg	Phe	Pro	Met	Met	Leu	
					340					345					350	
Pro	Glu	Glu	Leu	Phe	Glu	Leu	Gln	Phe	Asn	Leu	Ser	Leu	Tyr	Trp	Ser	
					355					360					365	
His	Glu	Ala	Leu	Phe	Gln	Lys	Lys	Thr	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Phe	His	
					370					375					380	
Thr	Val	Pro	Phe	Gln	Leu	Leu	Ala	Arg	Tyr	Lys	Gly	Leu	Asn	Leu	Thr	
385							390				395					400
Glu	Asp	Thr	Tyr	Lys	Pro	Arg	Ile	Tyr	Thr	Ser	Pro	Thr	Trp	Ser	Ala	
					405					410					415	
Phe	Val	Thr	Asp	Ser	Ser	Trp	Ser	Ala	Arg	Lys	Ser	Gln	Leu	Val	Tyr	
					420					425					430	
Gln	Ser	Arg	Arg	Gly	Pro	Leu	Val	Lys	Tyr	Ser	Ser	Asp	Tyr	Phe	Gln	
					435					440					445	
Ala	Pro	Ser	Asp	Tyr	Arg	Tyr	Tyr	Pro	Tyr	Gln	Ser	Phe	Gln	Thr	Pro	
					450					455					460	
Gln	His	Pro	Ser	Phe	Leu	Phe	Gln	Asp	Lys	Arg	Val	Ser	Trp	Ser	Leu	
465							470				475					480
Val	Tyr	Leu	Pro	Thr	Ile	Gln	Ser	Cys	Trp	Asn	Tyr	Gly	Phe	Ser	Cys	
					485					490					495	
Ser	Ser	Asp	Glu	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	Leu	Thr	Lys	Ser	Gly	Gly	Ser	
					500					505					510	
Asp	Arg	Thr	Ile	Ala	Tyr	Glu	Asn	Lys	Ala	Leu	Met	Leu	Cys	Glu	Gly	
					515					520					525	
Leu	Phe	Val	Ala	Asp	Val	Thr	Asp	Phe	Glu	Gly	Trp	Lys	Ala	Ala	Ile	
					530					535					540	
Pro	Ser	Ala	Leu	Asp	Thr	Asn	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Ser	Phe	Pro	
545							550				555					560
Cys	Pro	Ala	Gly	His	Phe	Asn	Gly	Phe	Arg	Thr	Val	Ile	Arg	Pro	Phe	
					565					570					575	
Tyr	Leu	Thr	Asn	Ser	Ser	Gly	Val	Asp								
					580					585						

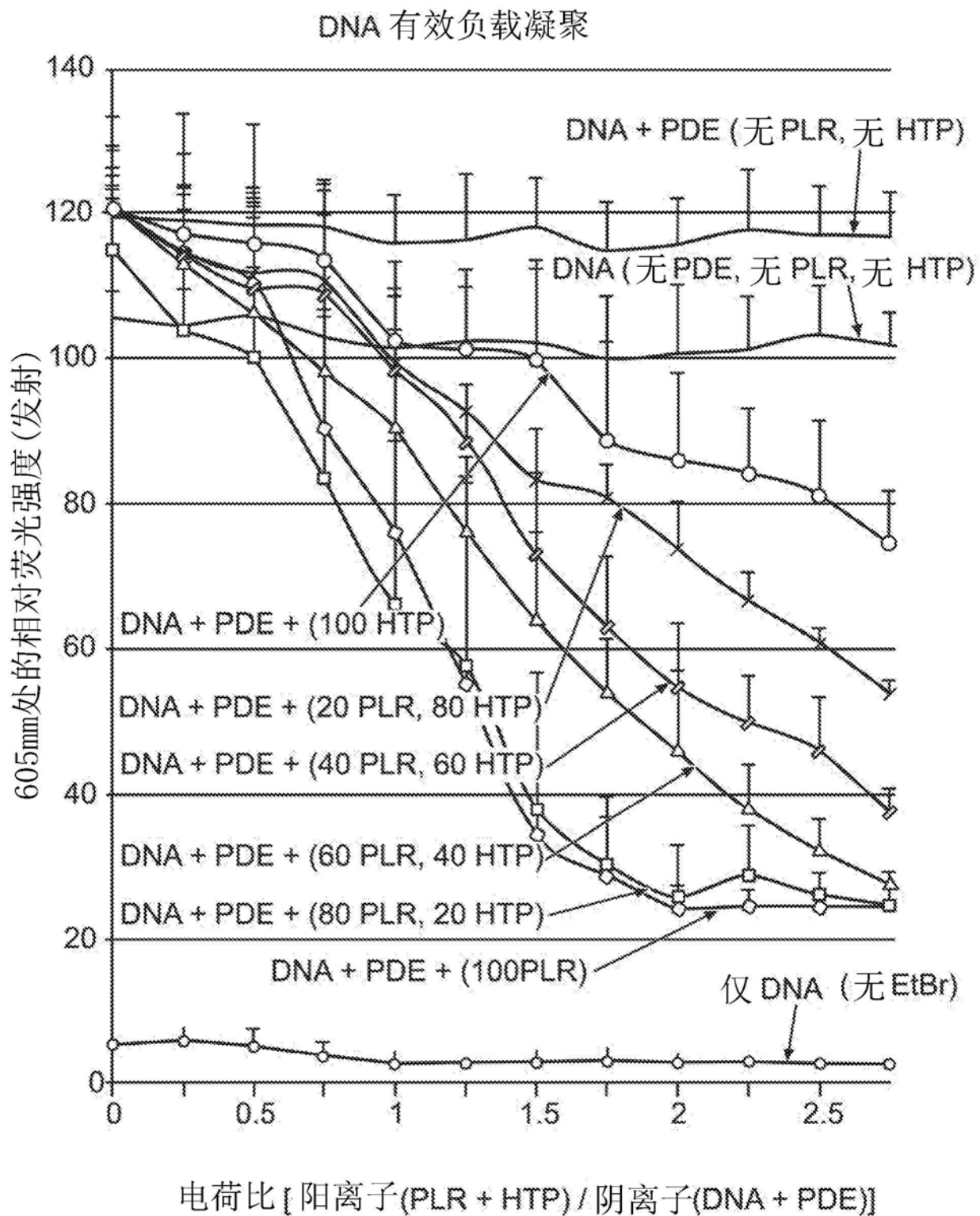


图1

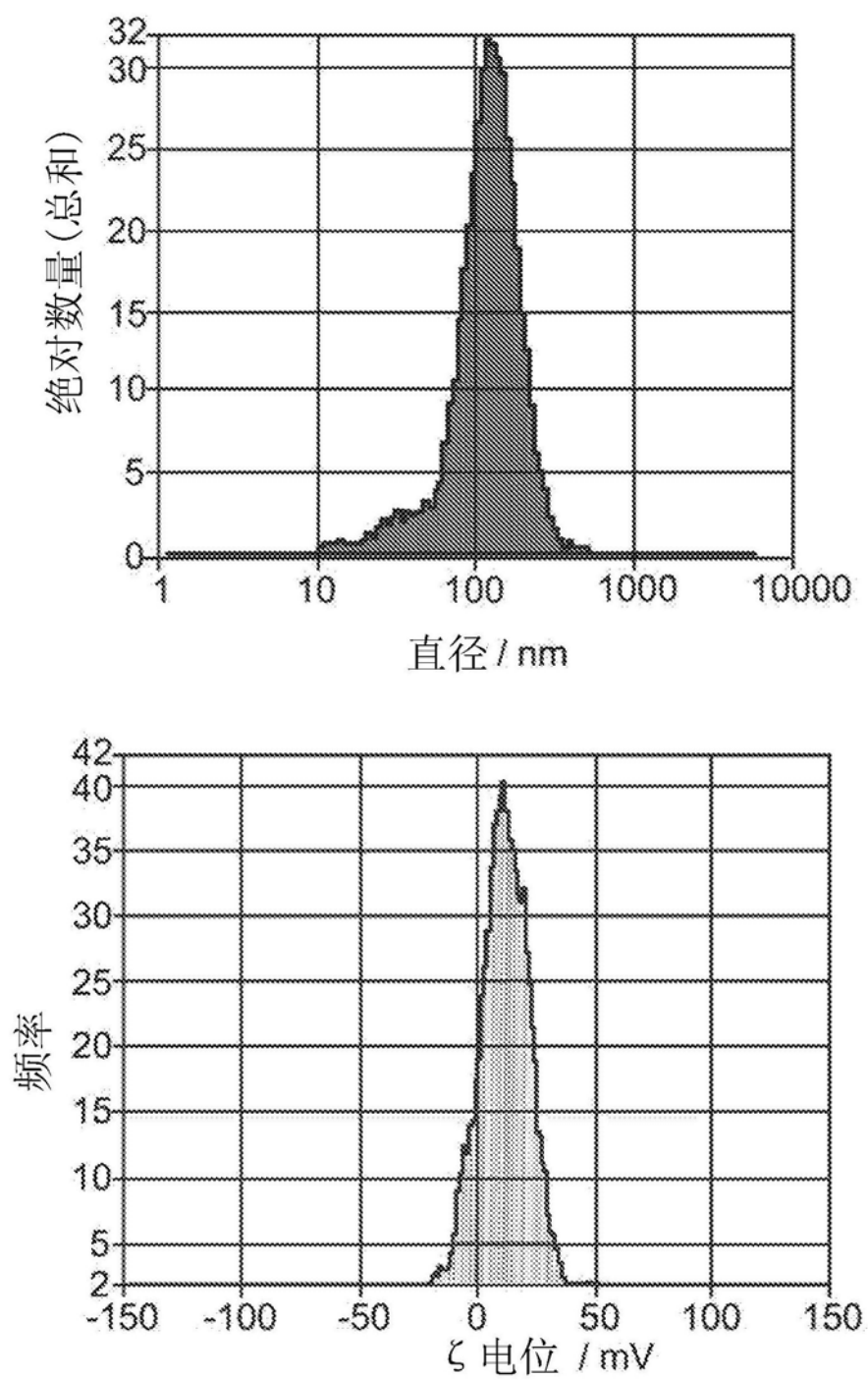


图2

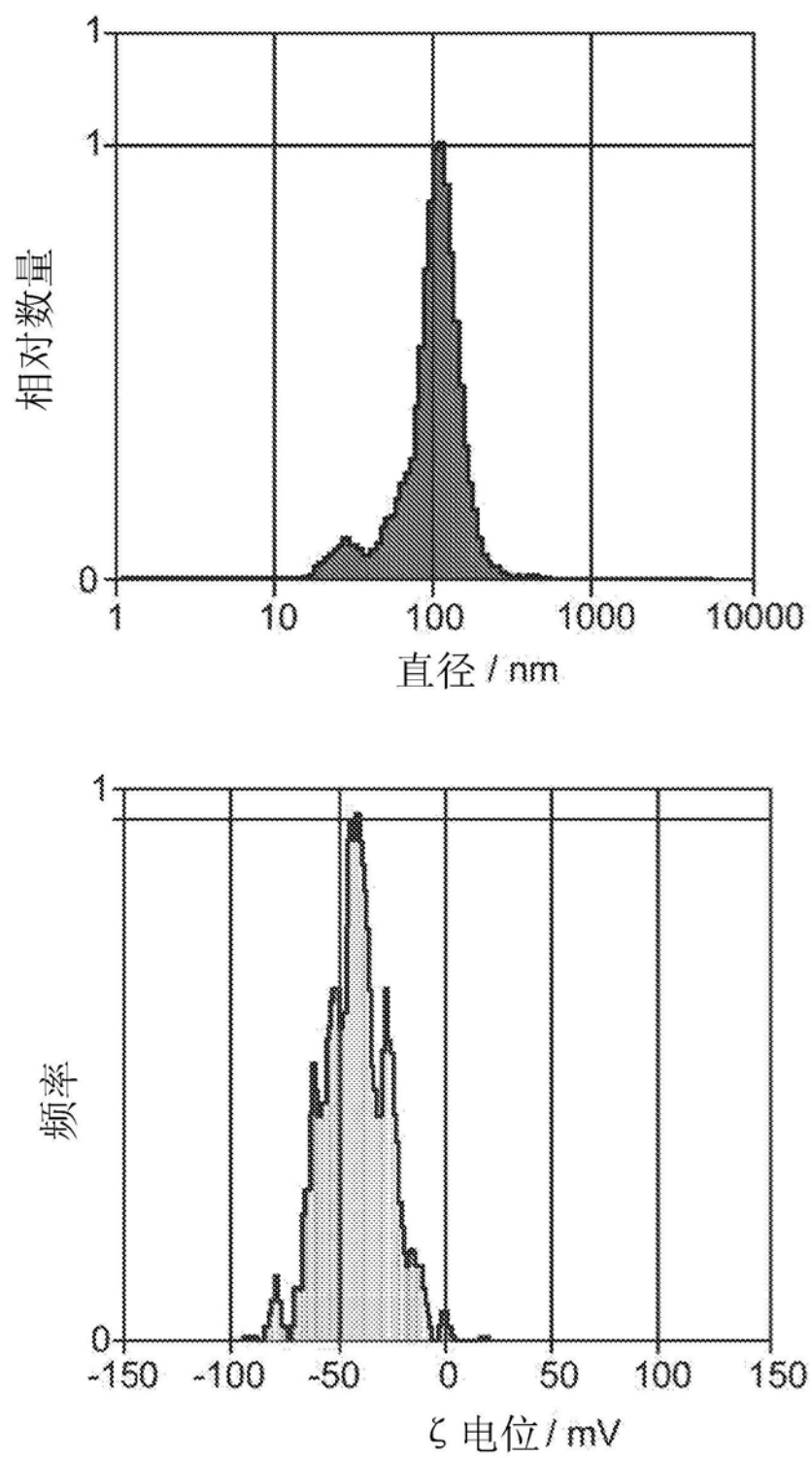


图3

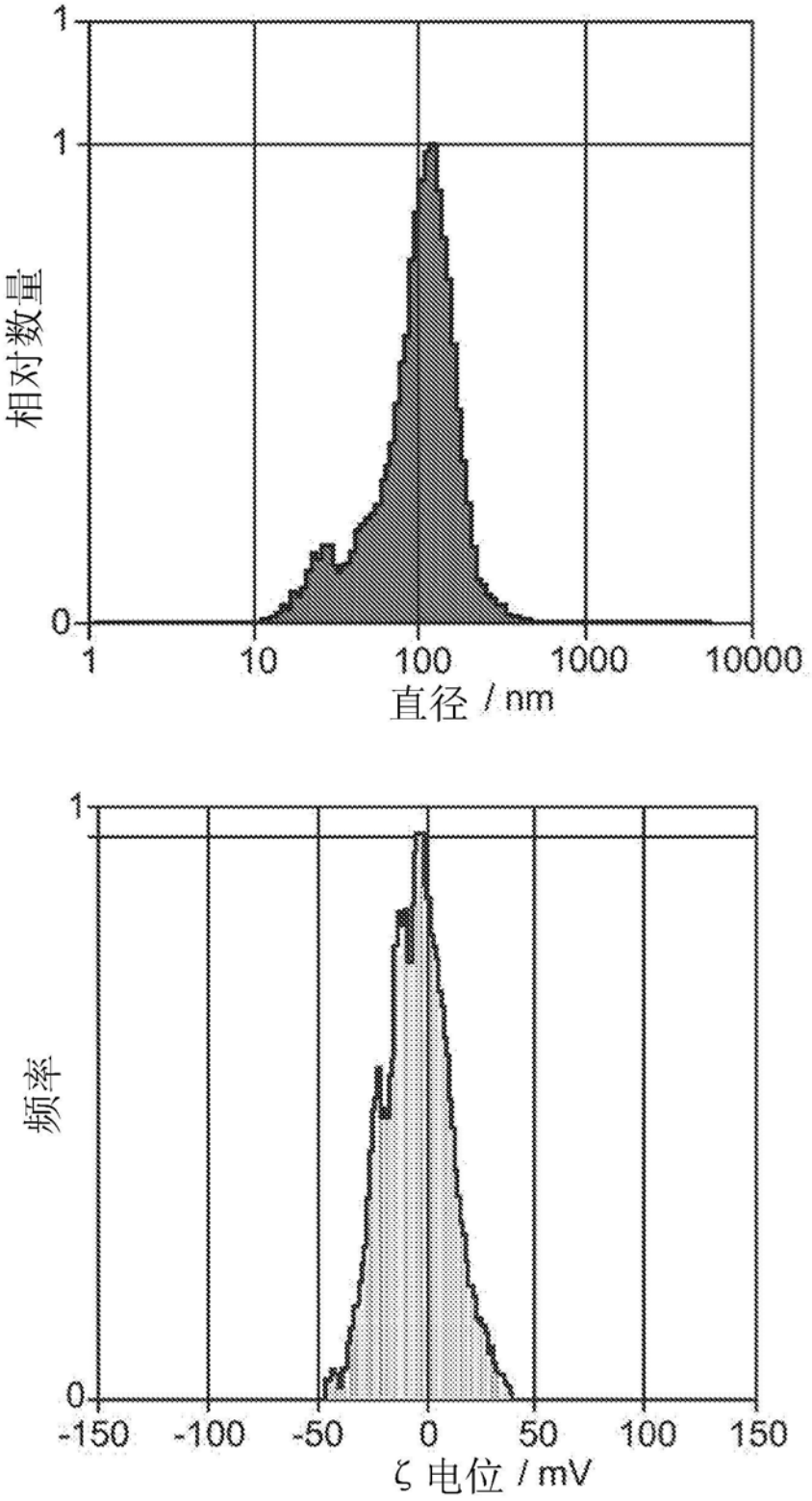


图4

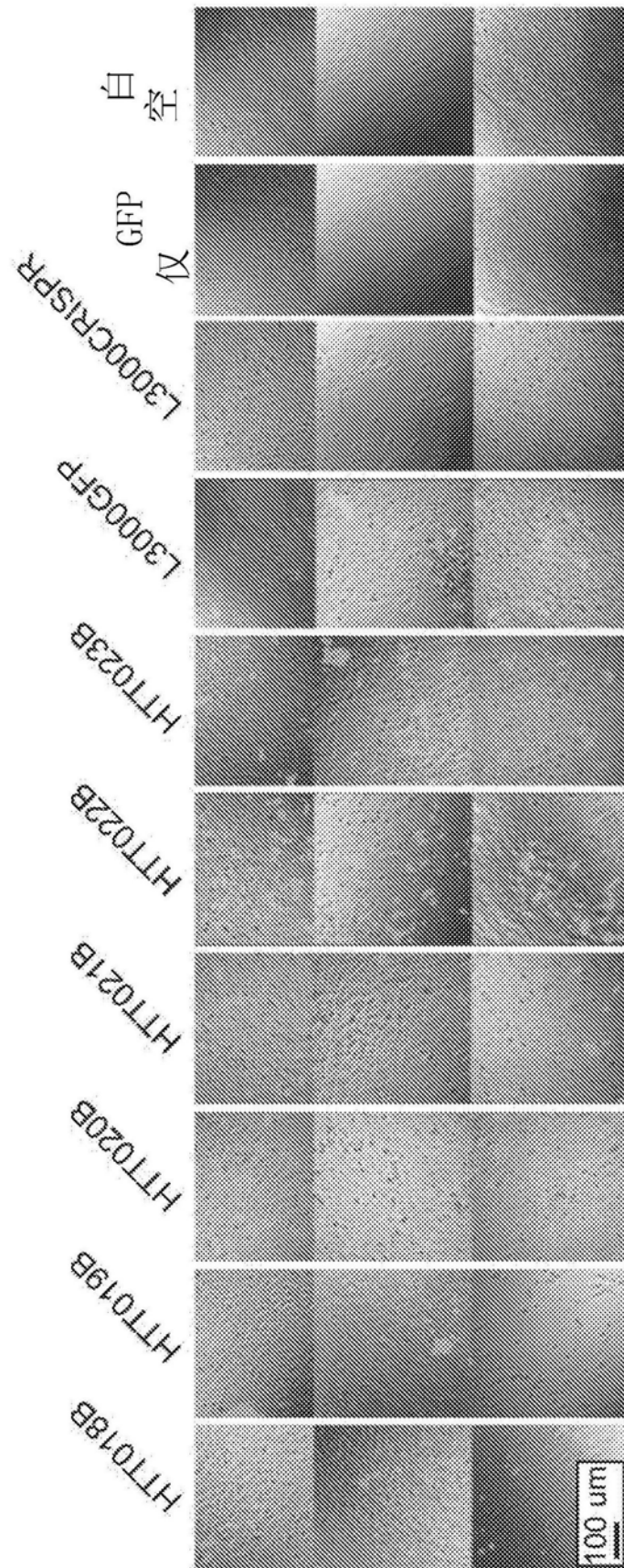


图5

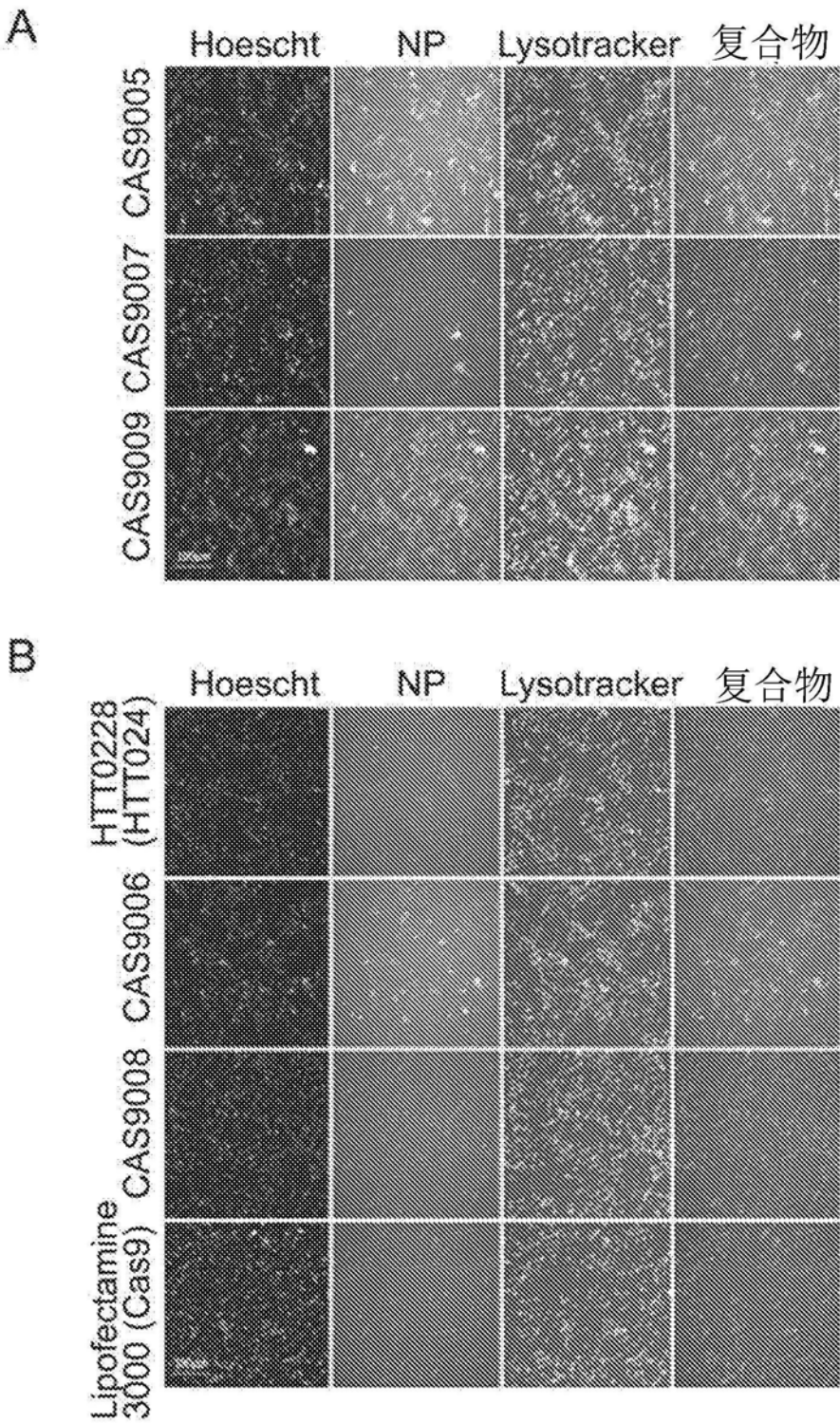


图6

C

细胞核-NP共同定位的比较

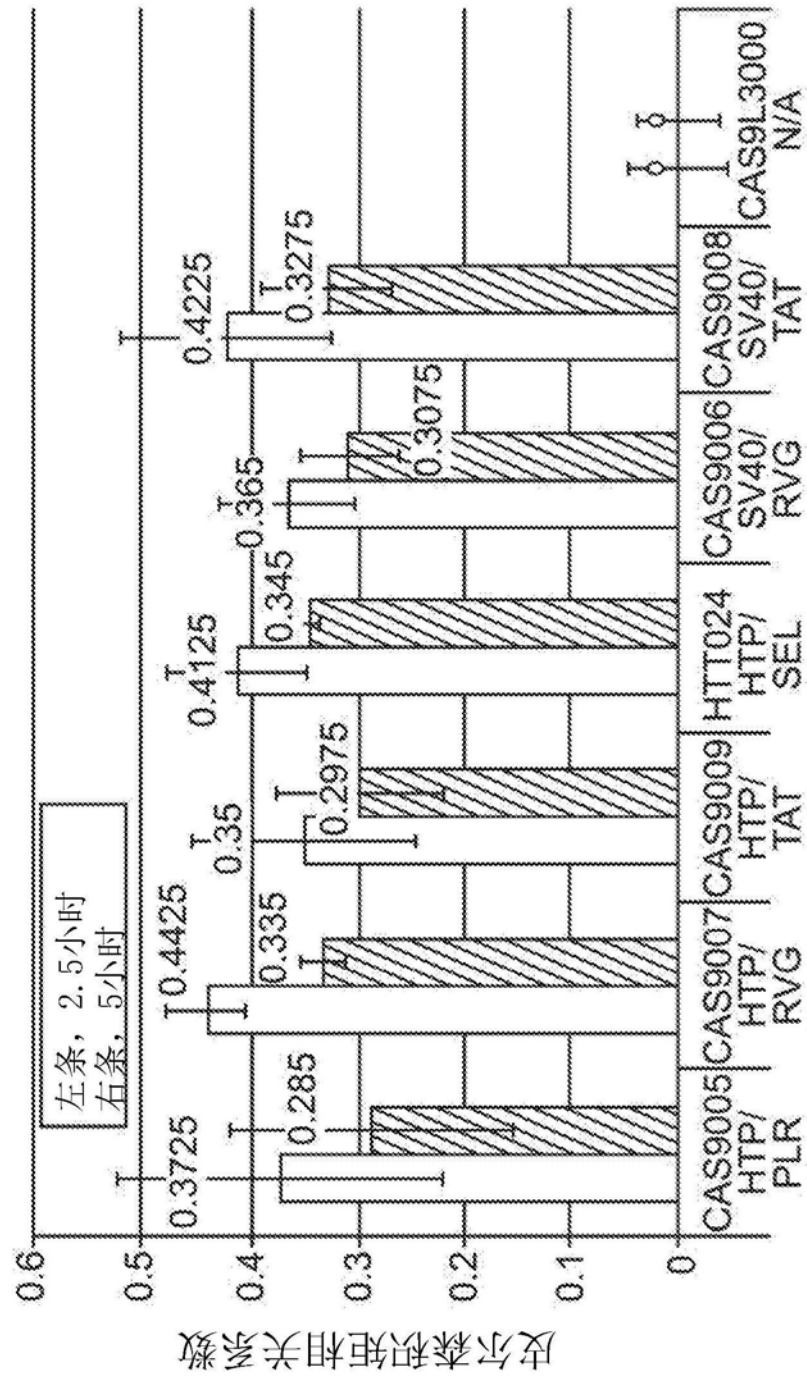


图6(续)

D

核内体-NP共同定位的比较

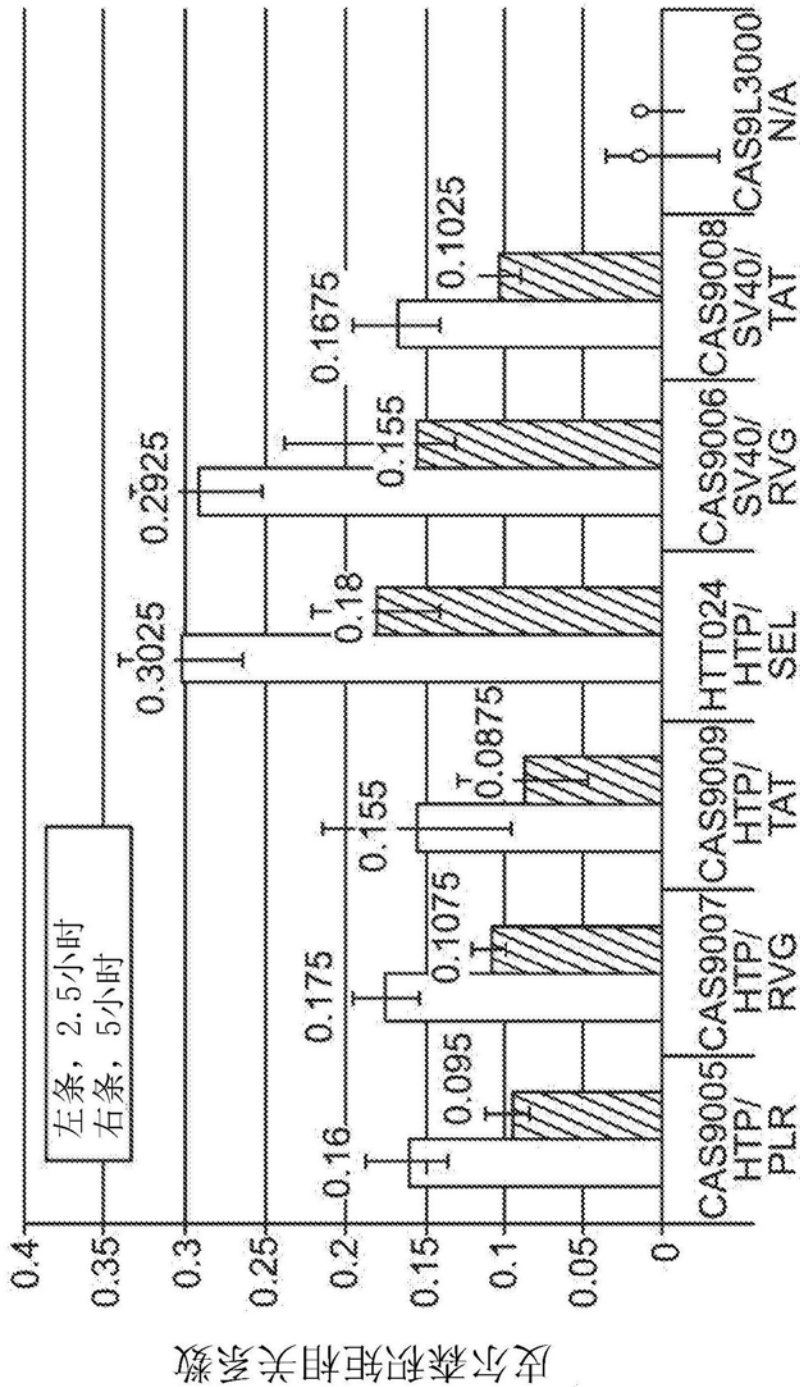


图6(续)

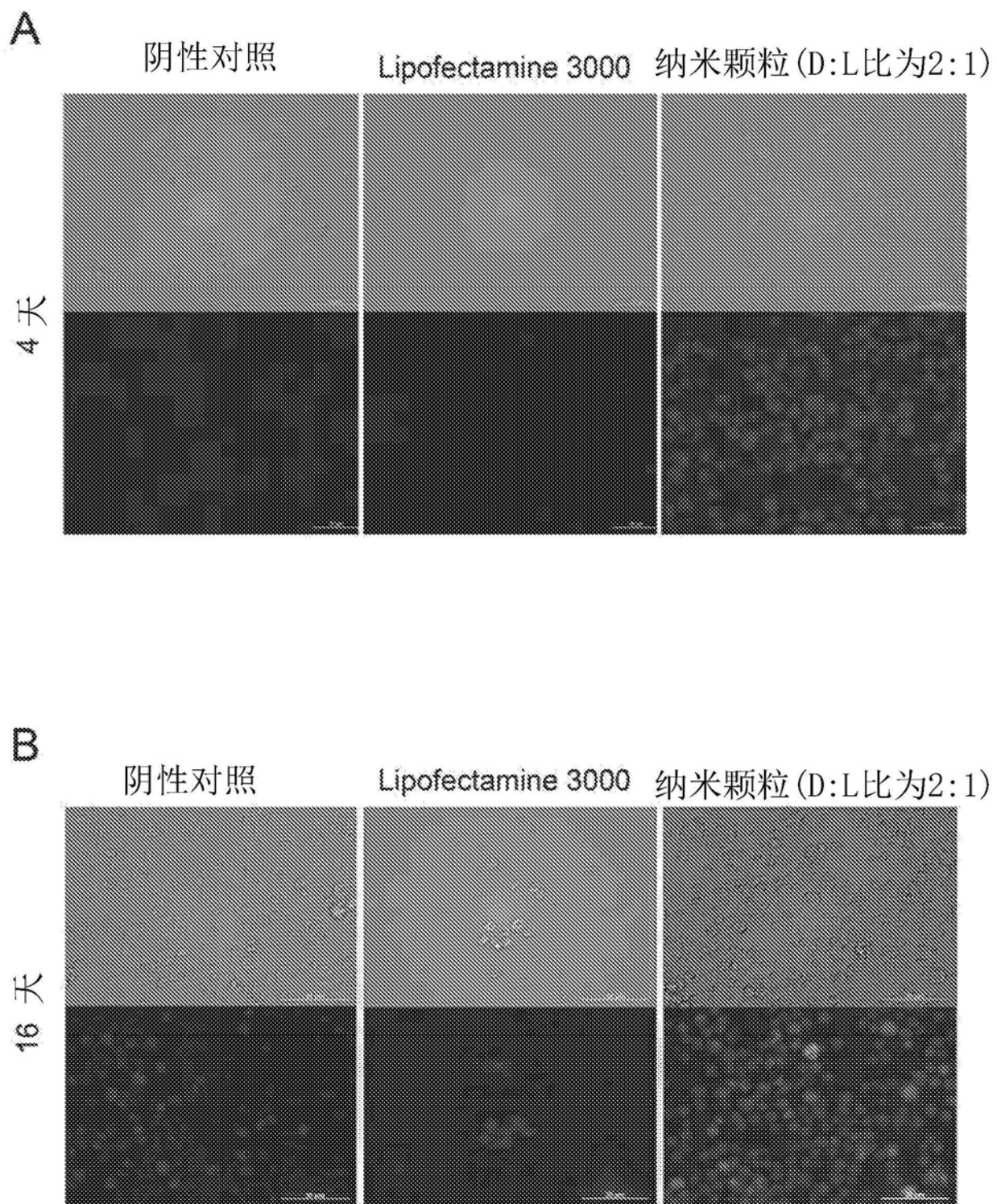


图7

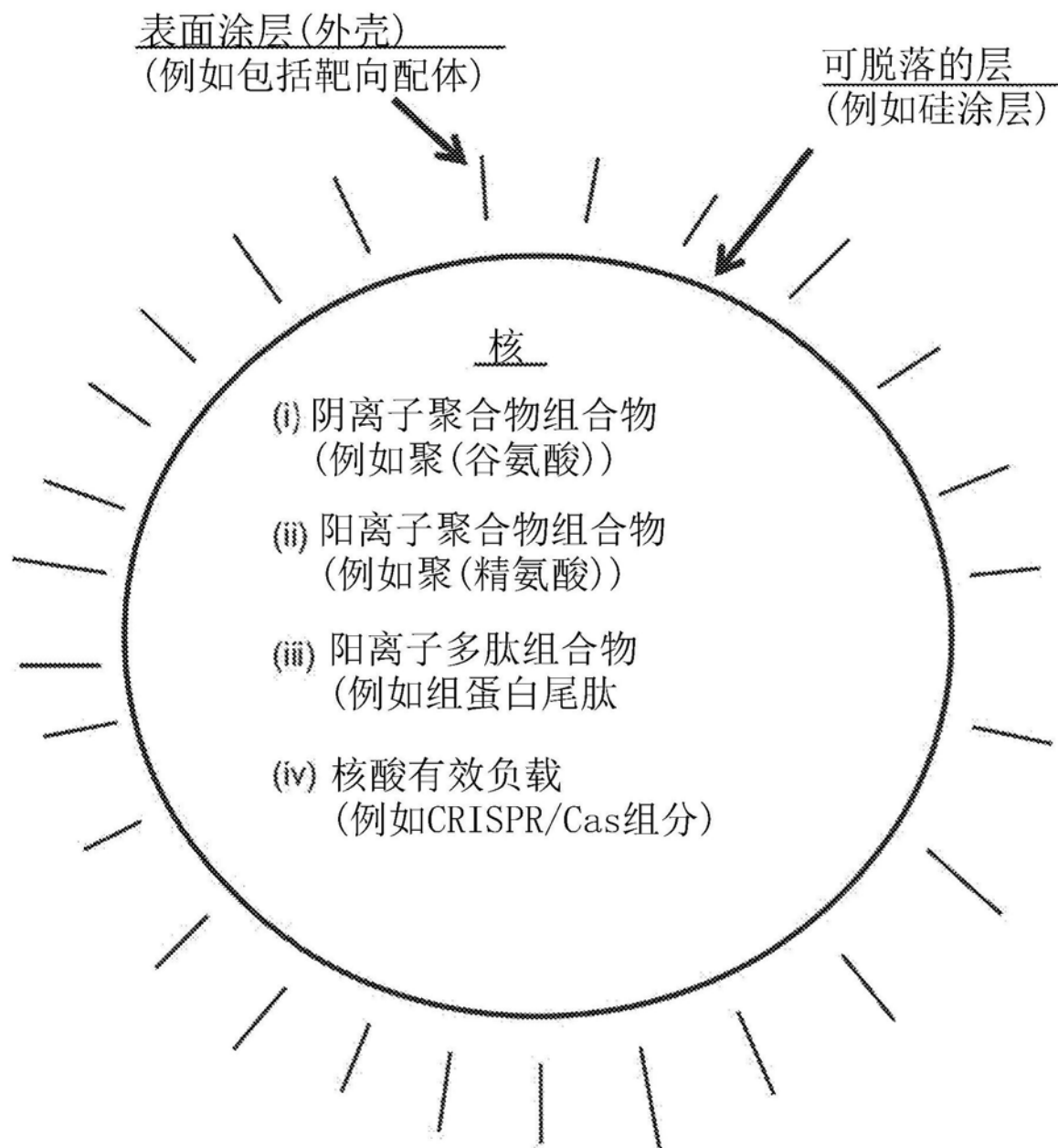


图8

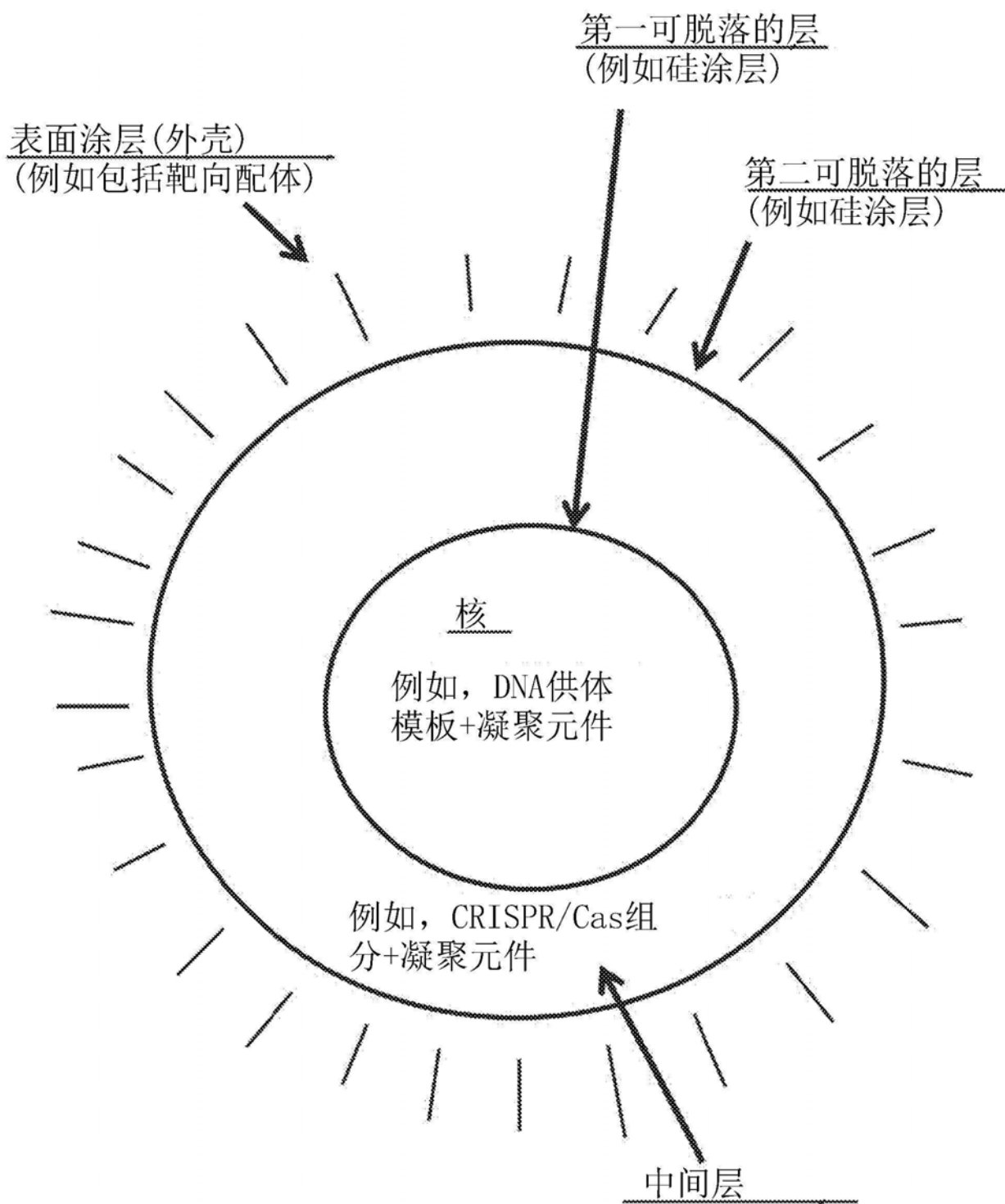


图9

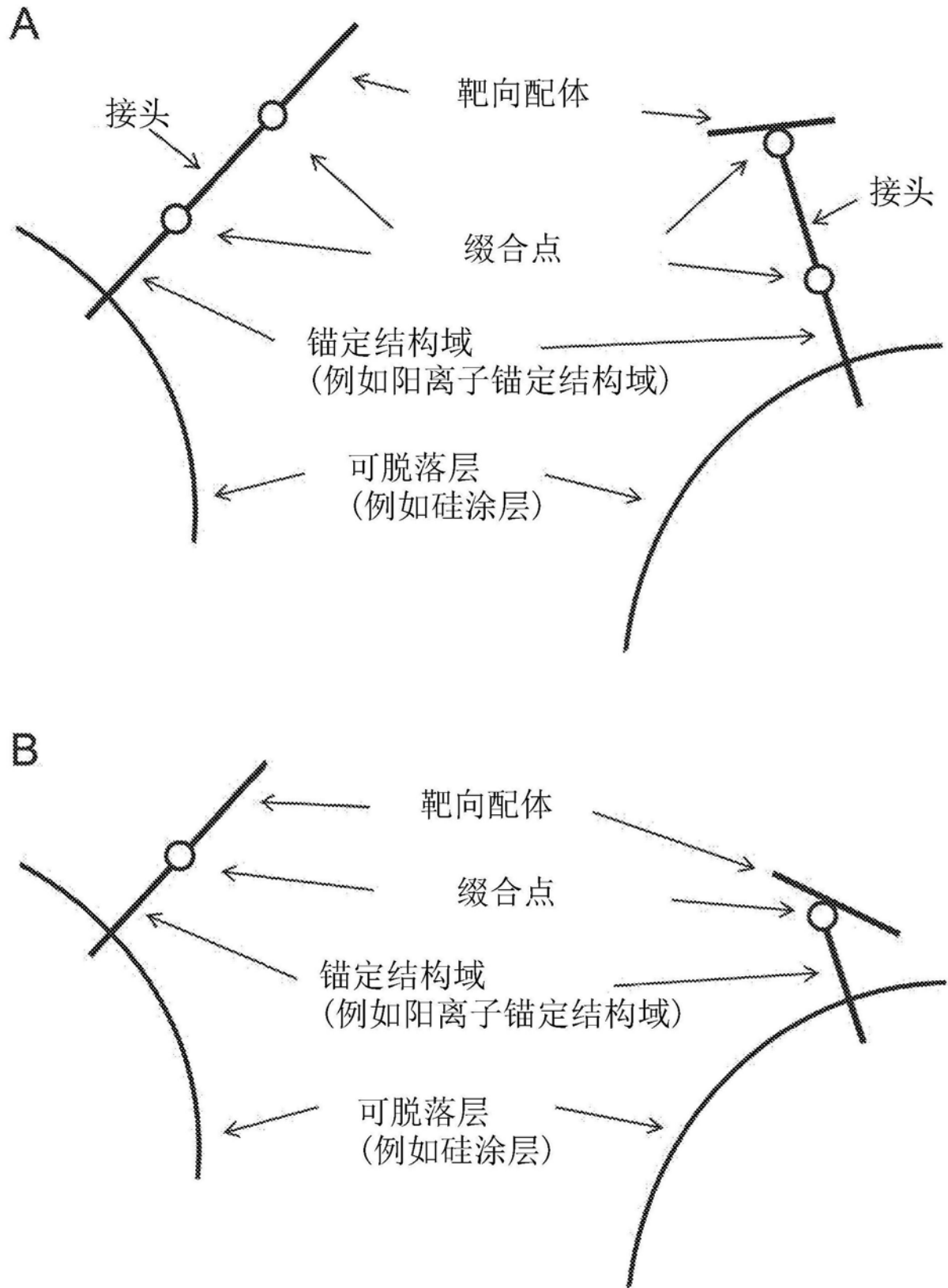


图10

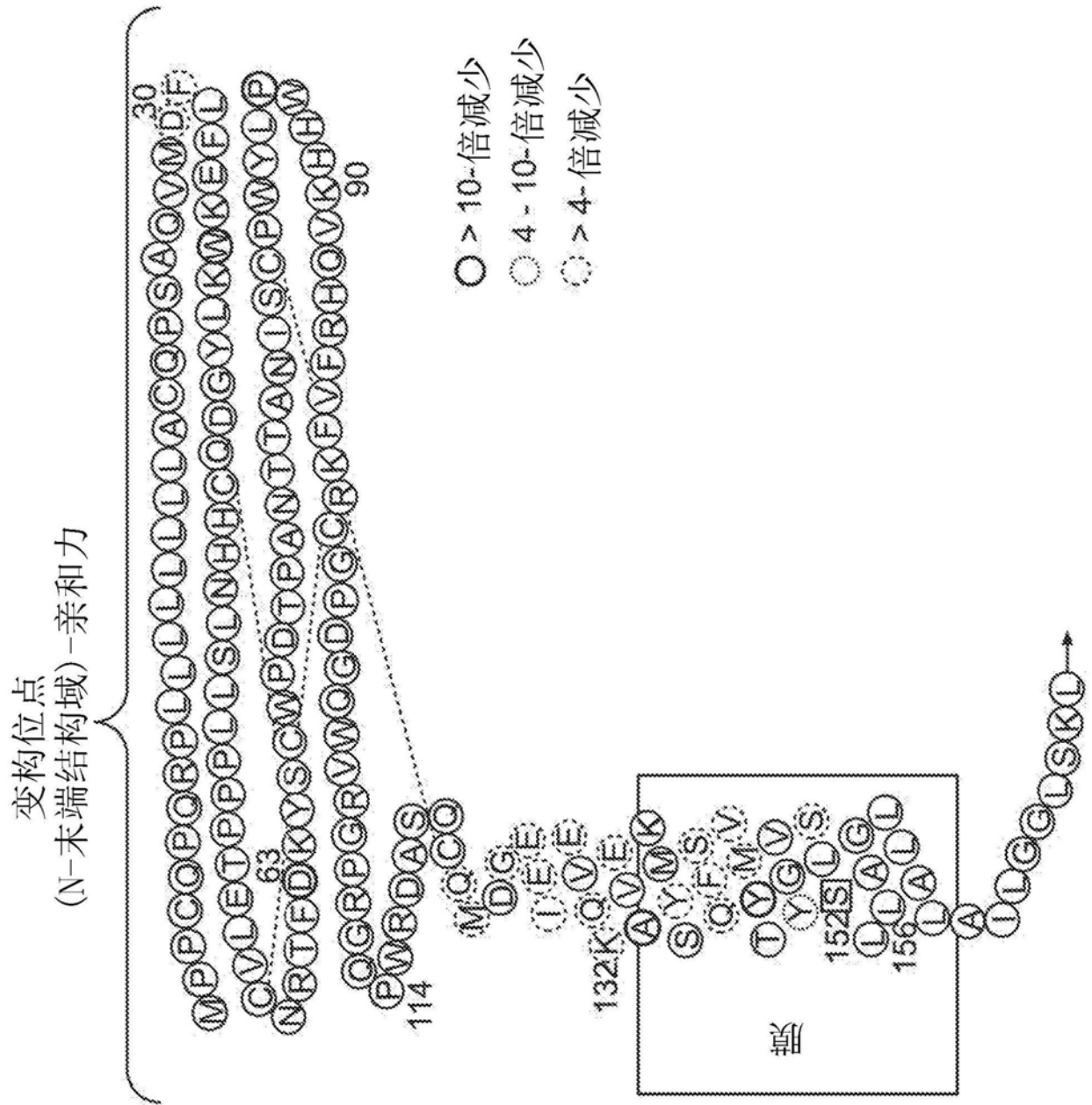


图11

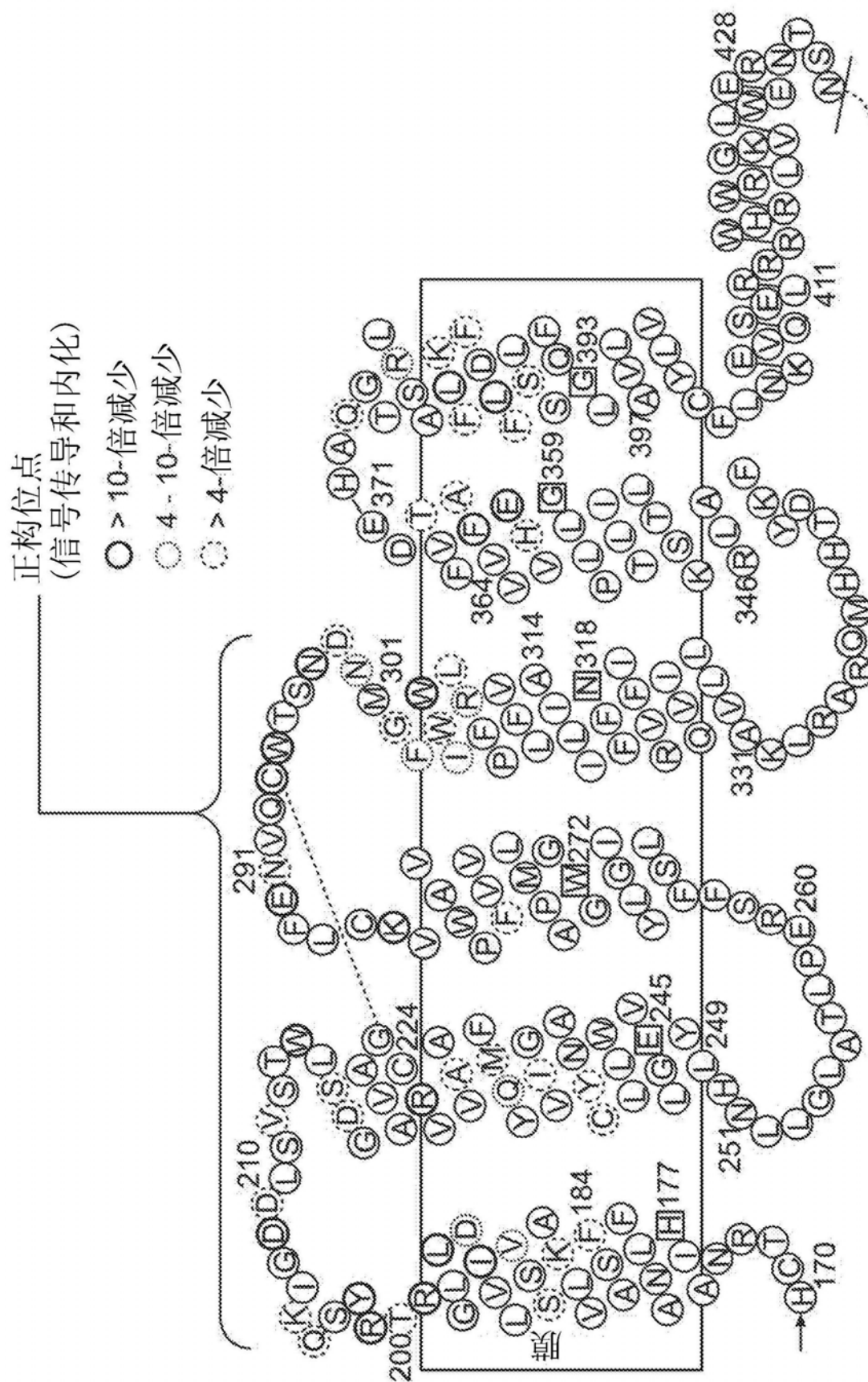


图11 (续)

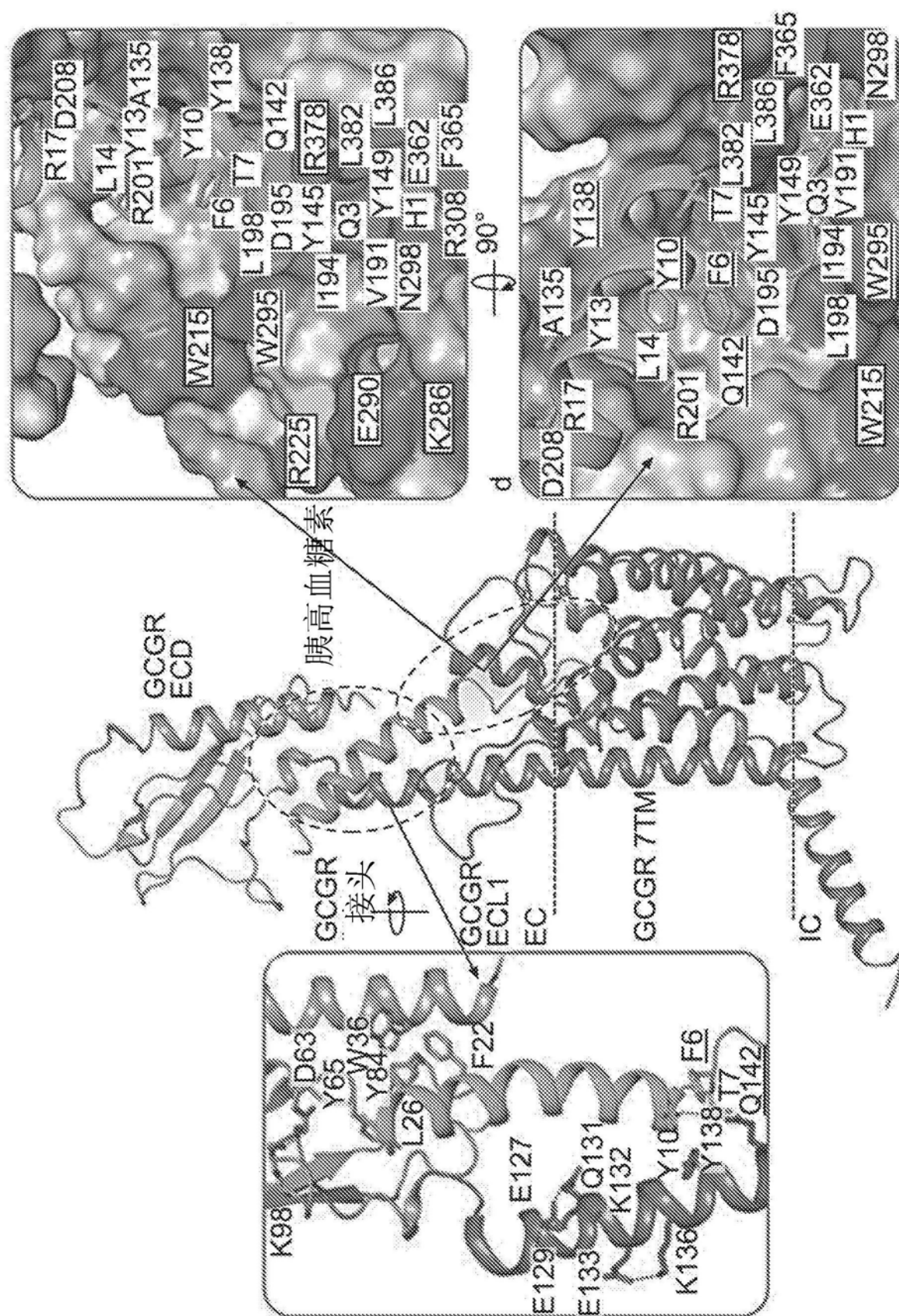


图12

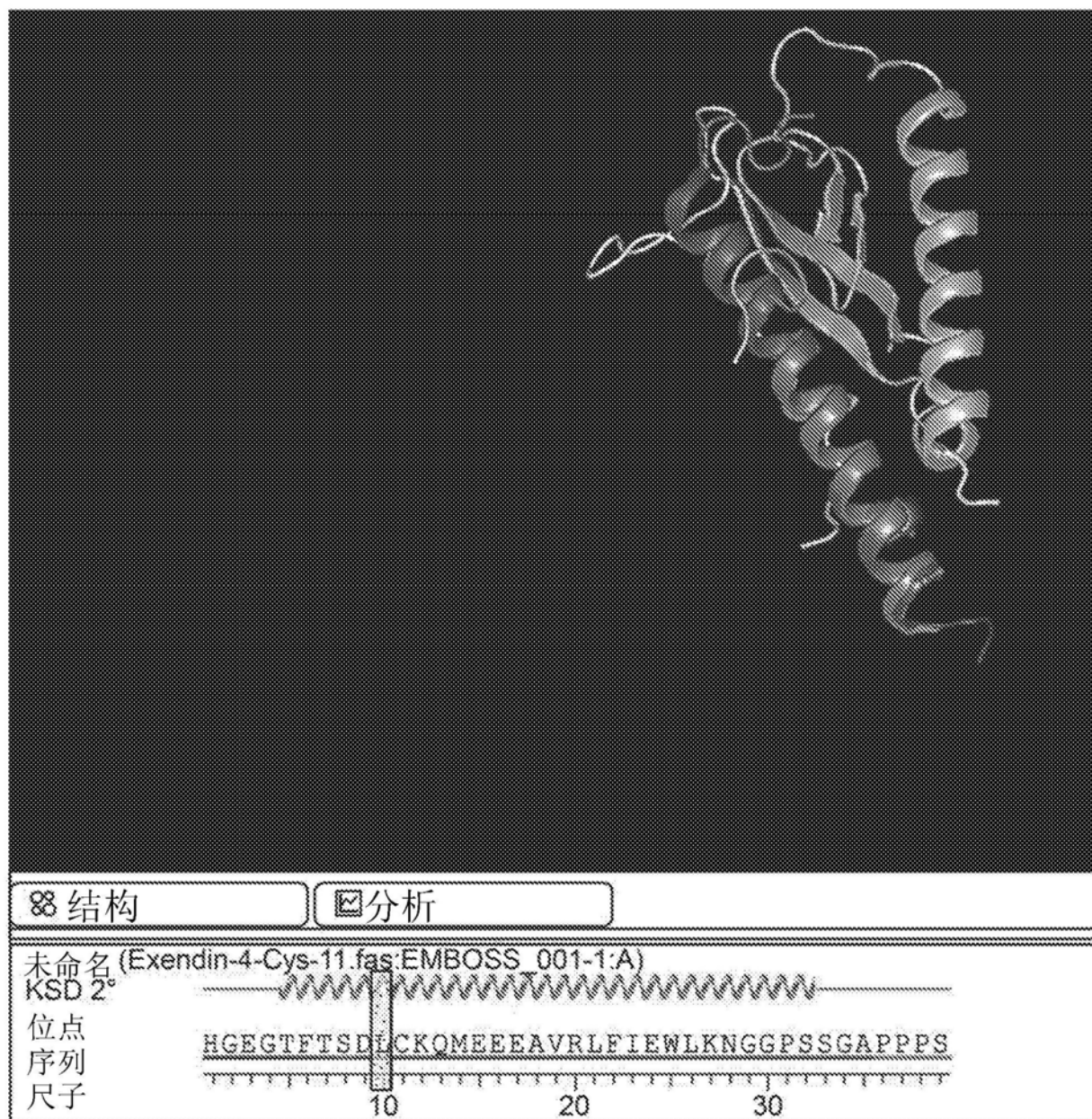


图12(续)

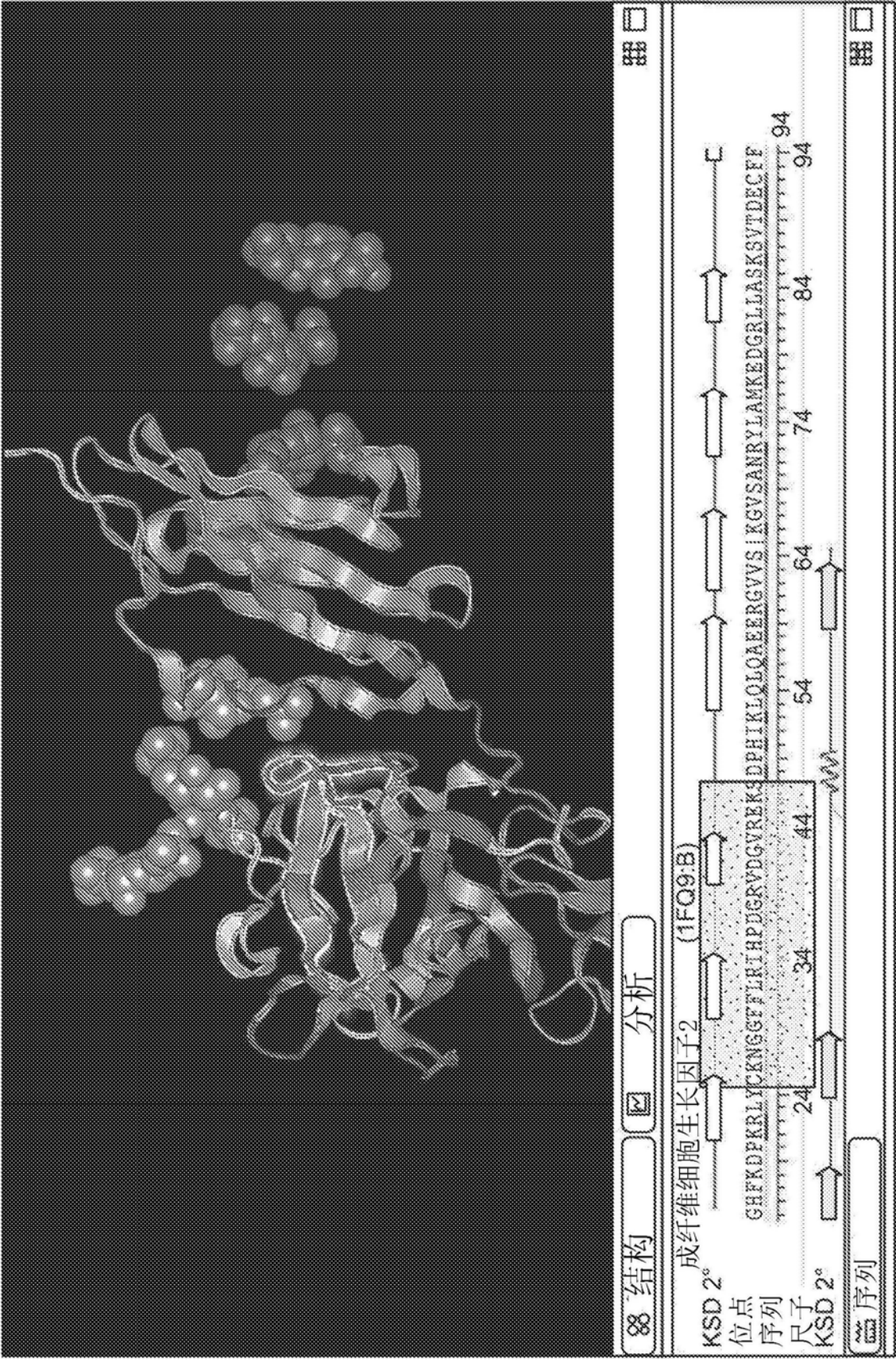


图13

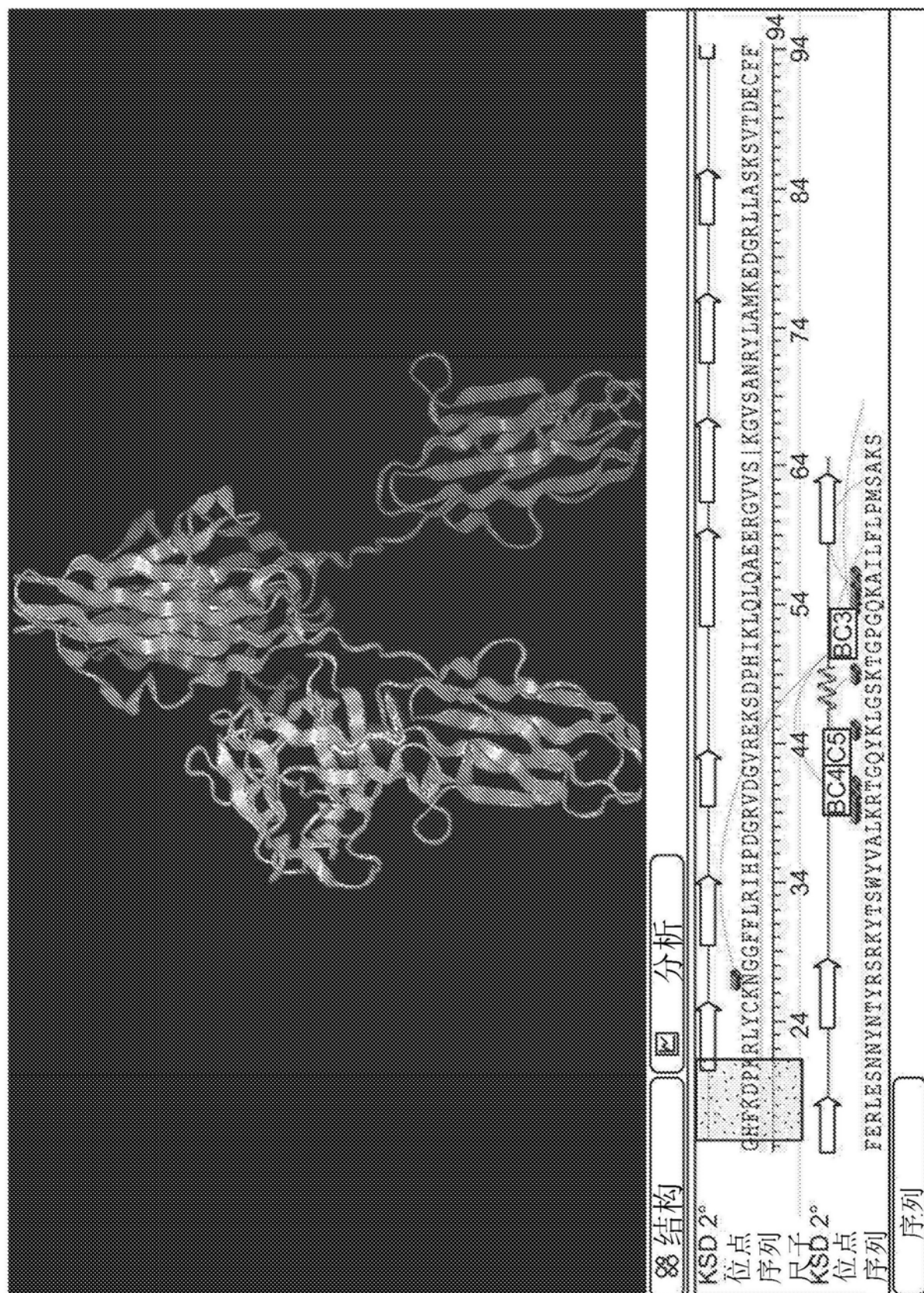


图14

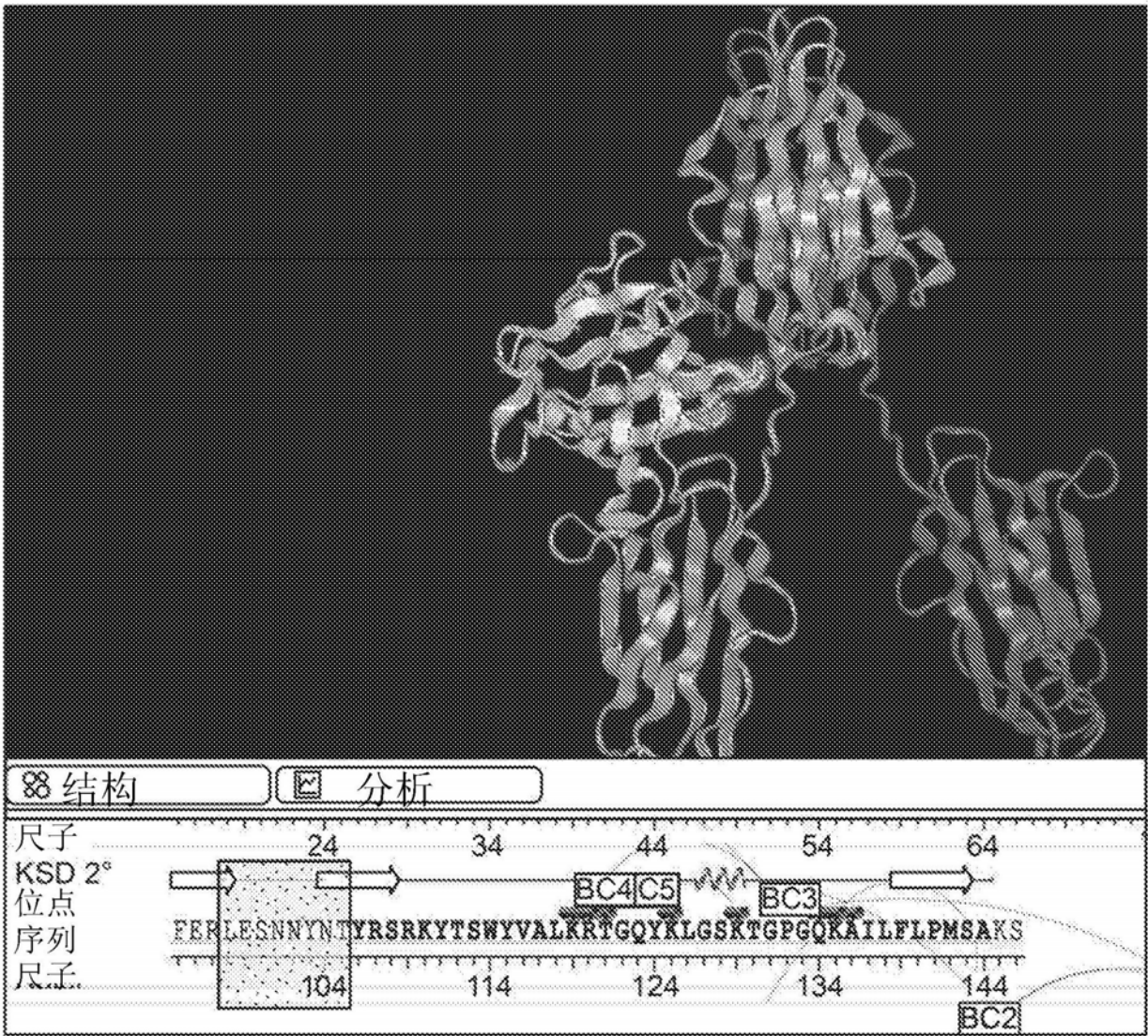


图15

第1类

LPKKRKFSEISS
 KRKRWENDIP
 KRKRWENNIP
 TGGVMKRKRGSV
 PILPLKRRRGSP
 TYSGVKRKRNVV
 THIGYKRKRDSV
 LSGTKRKRAYFI
 QRRLLKRKRGS
 QIGKKRKRKYLD
 KRGKRKRRLVRPW
 KKGKRKRRLVRPW
 PSRKRKRRESCHI
 PSRKRKRRESCHI
 ISRKRKRRESCHI
 ITRKRKRRESCHI
 EPNPRKRKRSEL
 TSPSRKRKRWDQV
 TLERKRKRKLAVLY
 RRRKRKRRESCHI
 HRYCGKRKRRESCHI

第2类

SVLGKRKRRTWE
 YGRVSKRKRPRYQF
 RKRGRKRKRERSV

第4类

KRKYAVFLESQN
 KRKYSIYLGSSQ
 KRKWMAFVMGDP
 KRKCAVFLEGQN
 IPRKRKRFAELYD
 RLTPRKRAFSEV

第3类

KRSWSMAFC
 KRTWAQAFTE
 KRPYSIAFPLGQ
 RRRSVLKRSWSVAF
 KRRYSDAFRLPV
 KRKYSDAFGLPV
 IGRKRGYSVAFG
 IGRKRVWAVAFY
 WAGRKRRTWRDAF
 SSHRKRKRKFSDAF
 PSHRKRKRKFSDAF
 TAHRKRKRKFSDAF
 RVQRKRKRKFSDAF
 RLTRKRKRKYDCAF
 LVNRKRKRKYWEAF

第5类

LGKRYDRDWDYK
 RSSGILGKRKFE
 VHKTVLGKRKYW
 SILGKRKRNRDPS
 QSVLGKRKRSRPF
 TVHLGKRKRRLRPW
 RVLGKRKRKTGRSP
 VLGKRKRKRDDCW
 HGRQVLGKRKR
 SVLGKRKRKRHPKV
 SVLGKRKRKRHHLD
 PVLGKRKRKRSLSS
 RVLGKRKRKRREDRP
 ILGKRKRKRSHHPY
 PILGKRKRKRHLFL
 LLGKRKRKRPSIEH
 SMLGKRKRKRCTIS
 TLGKRKRKRISCVT
 DTRLGKRKRKRKPW

图16

A

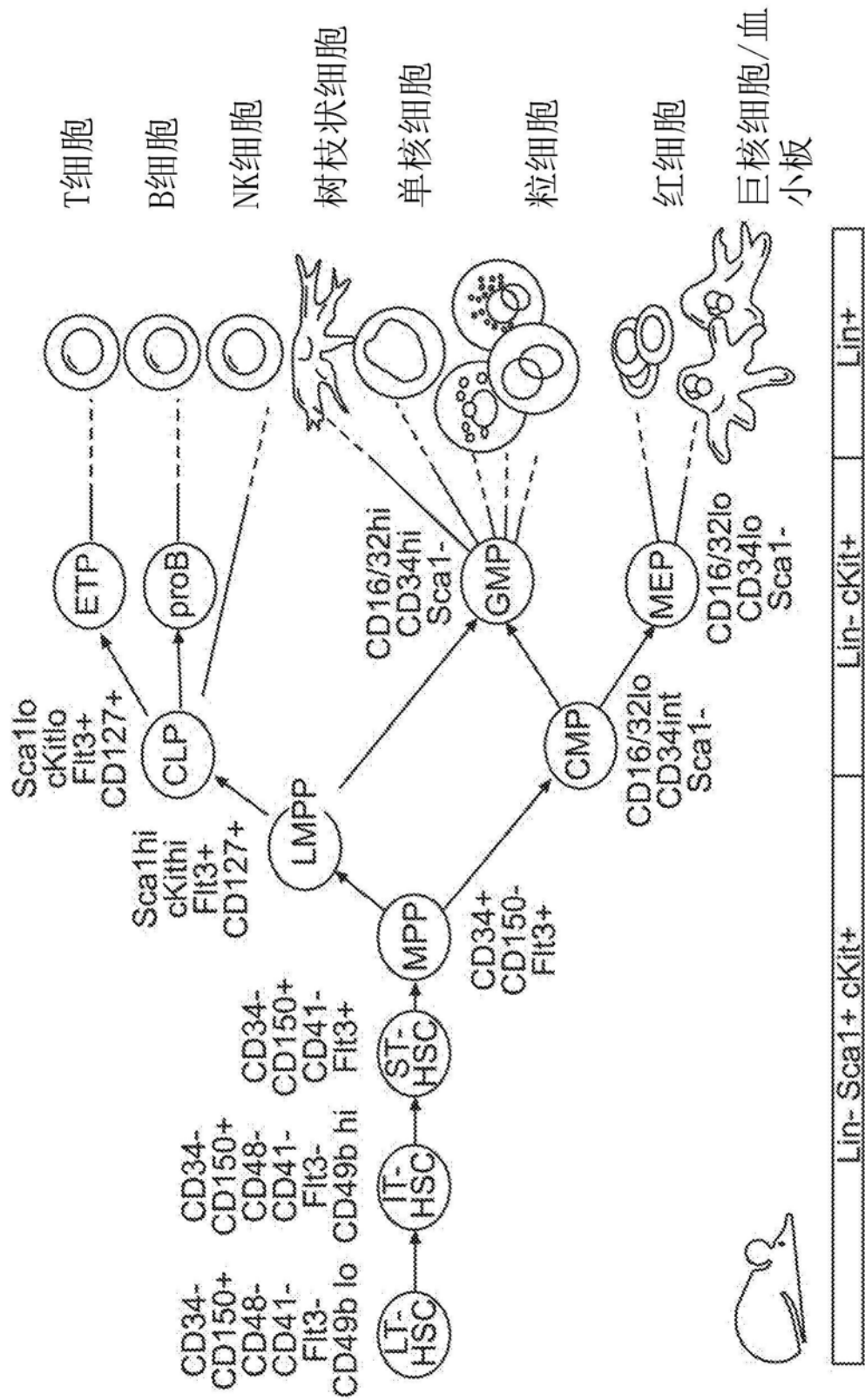


图17

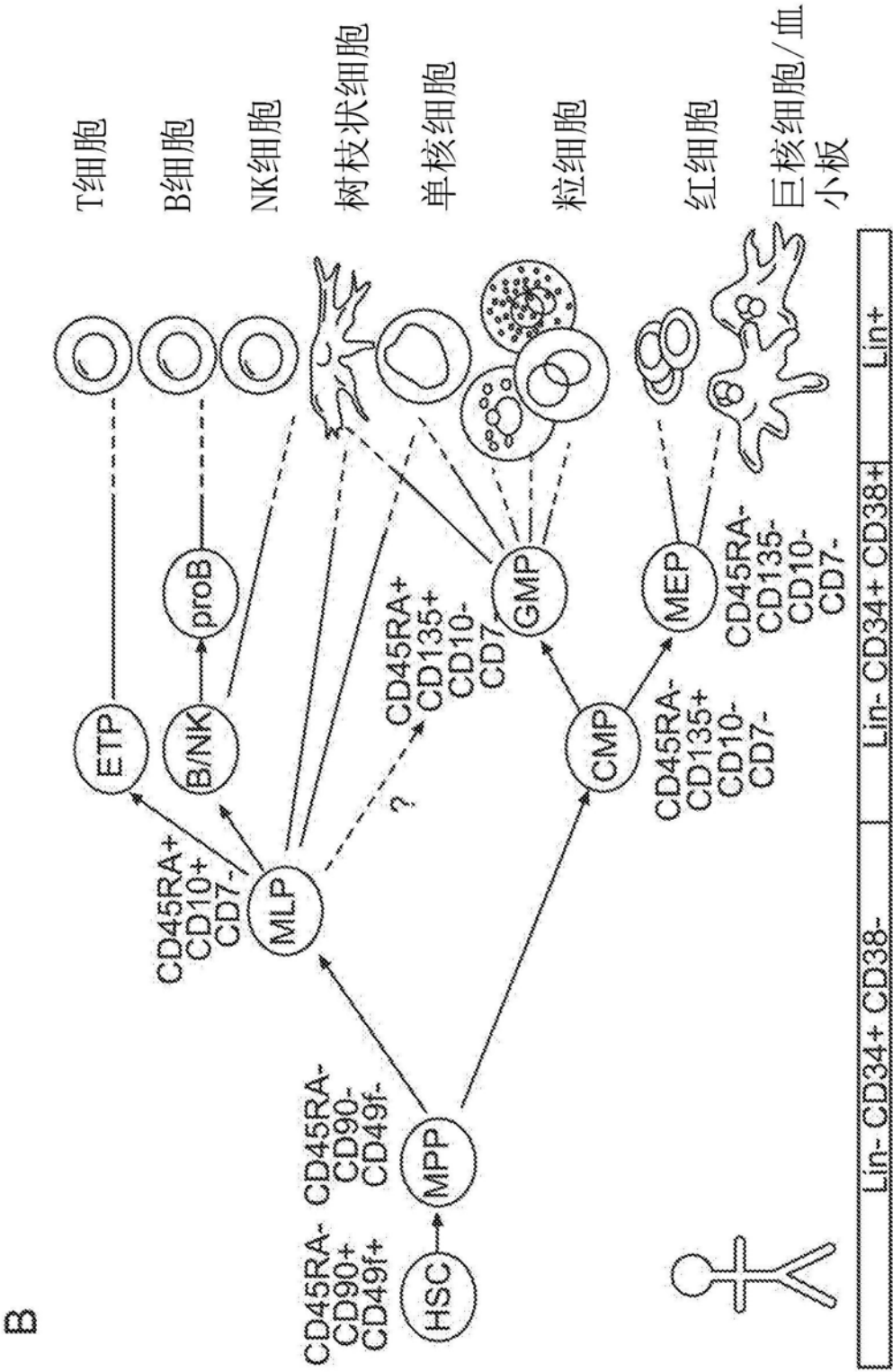


图17 (续)

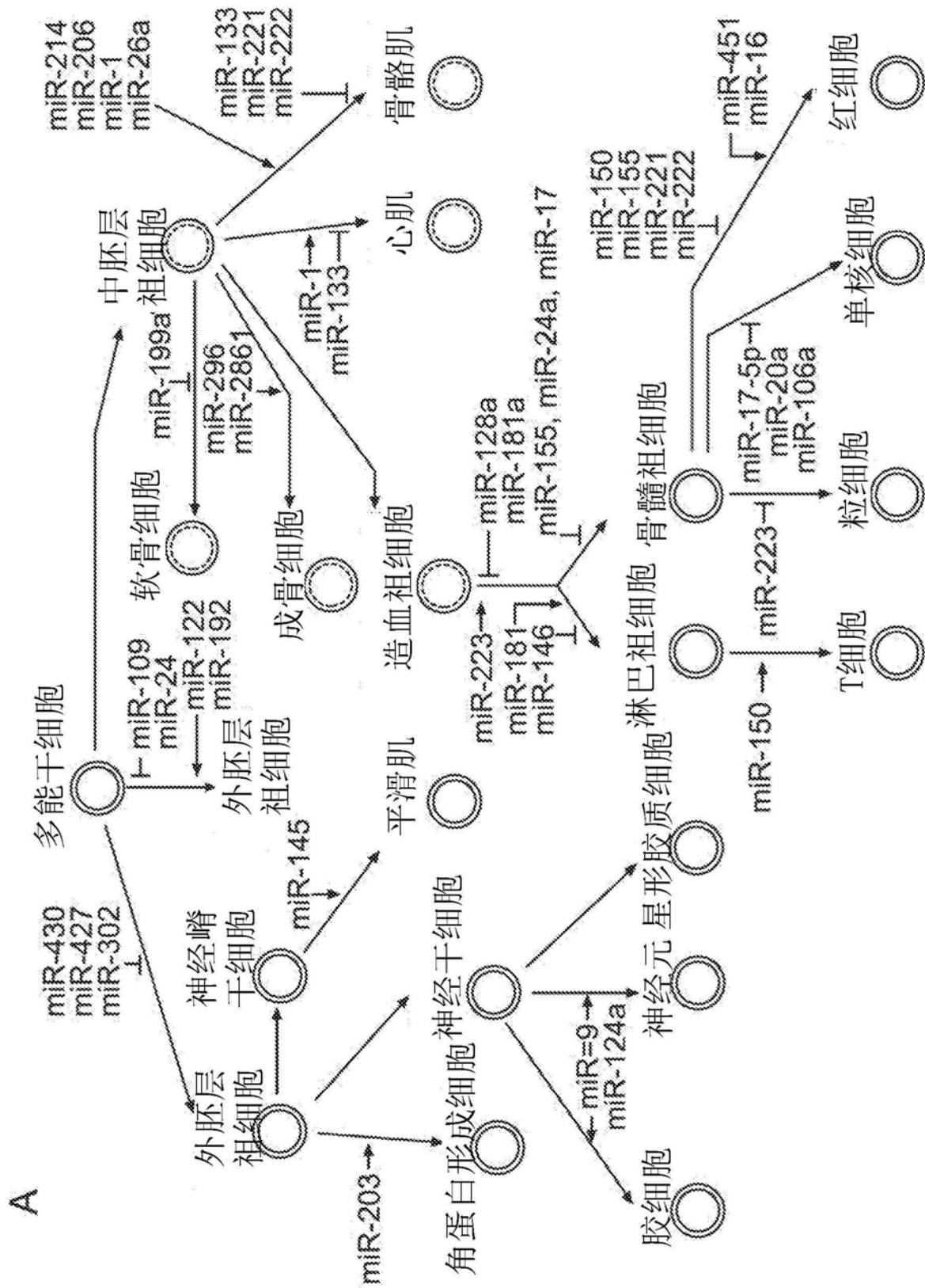


图18

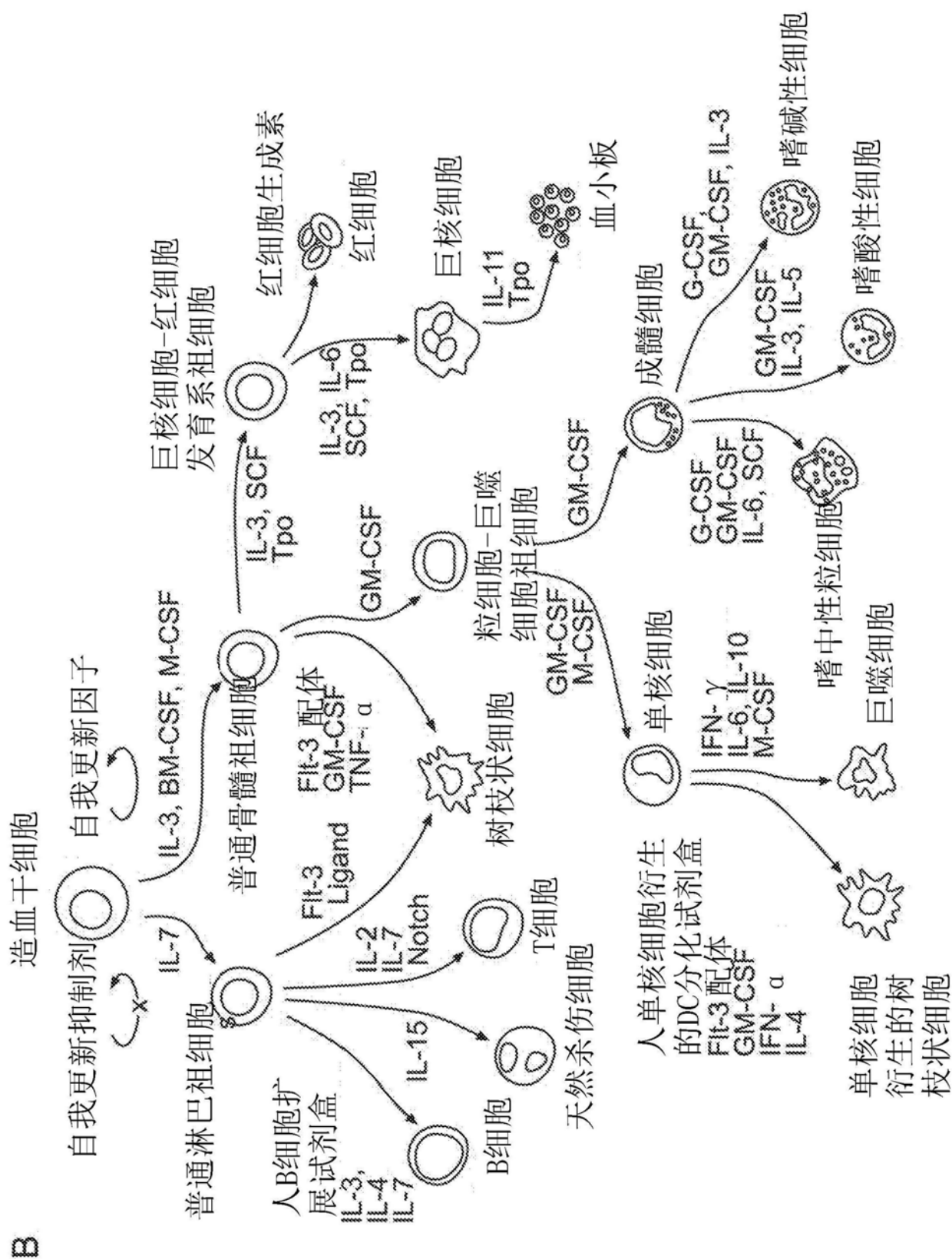


图18(续)

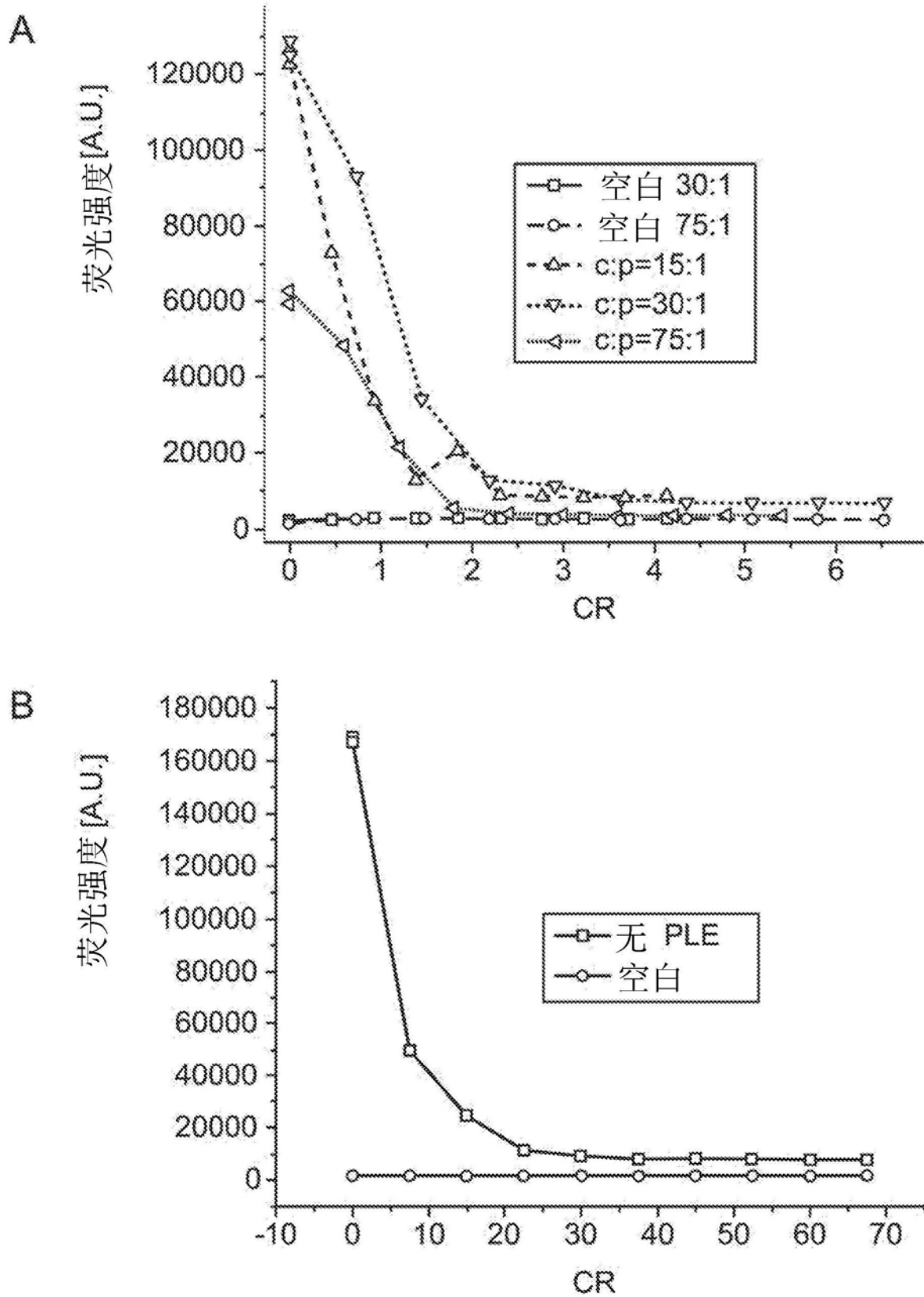


图19

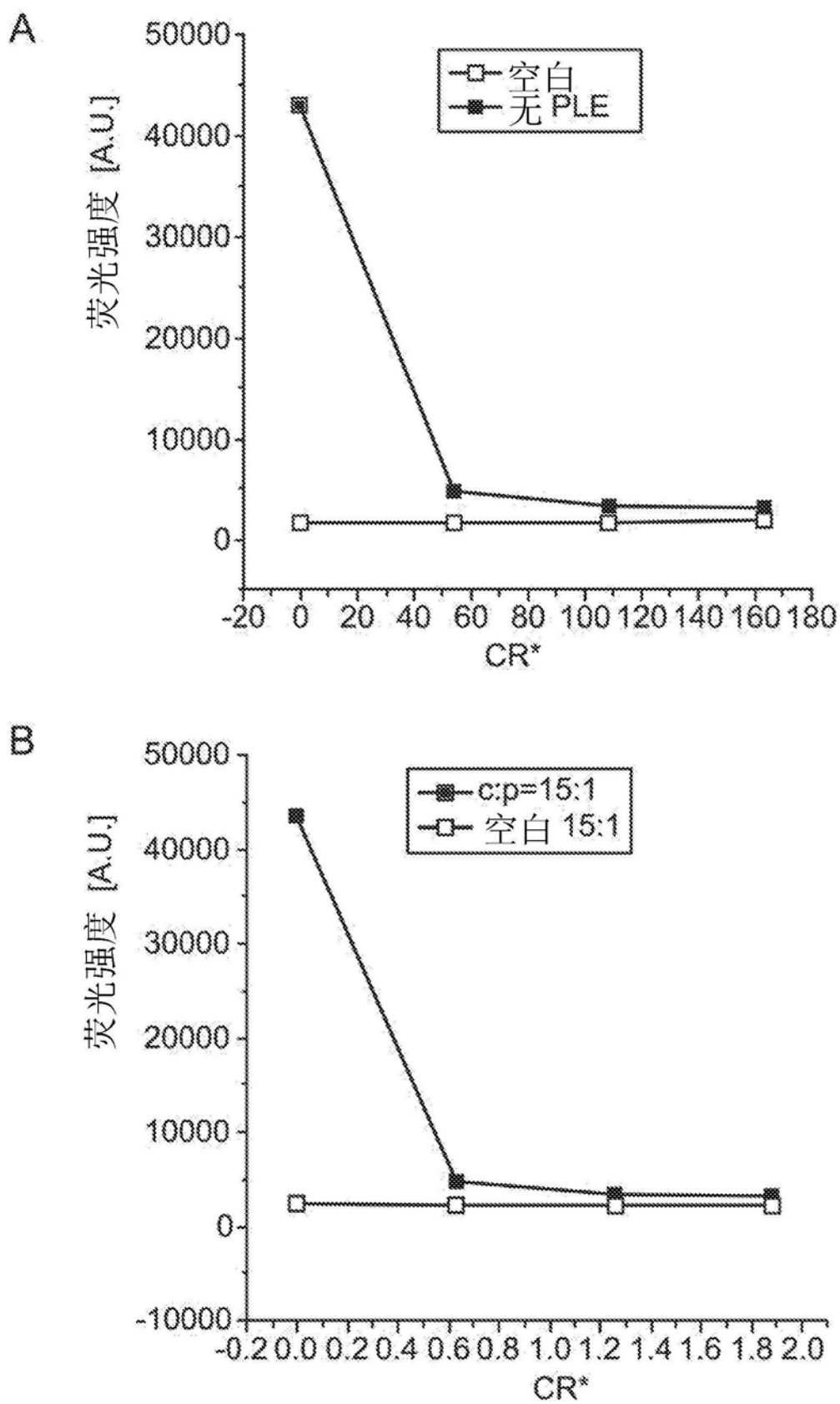


图20

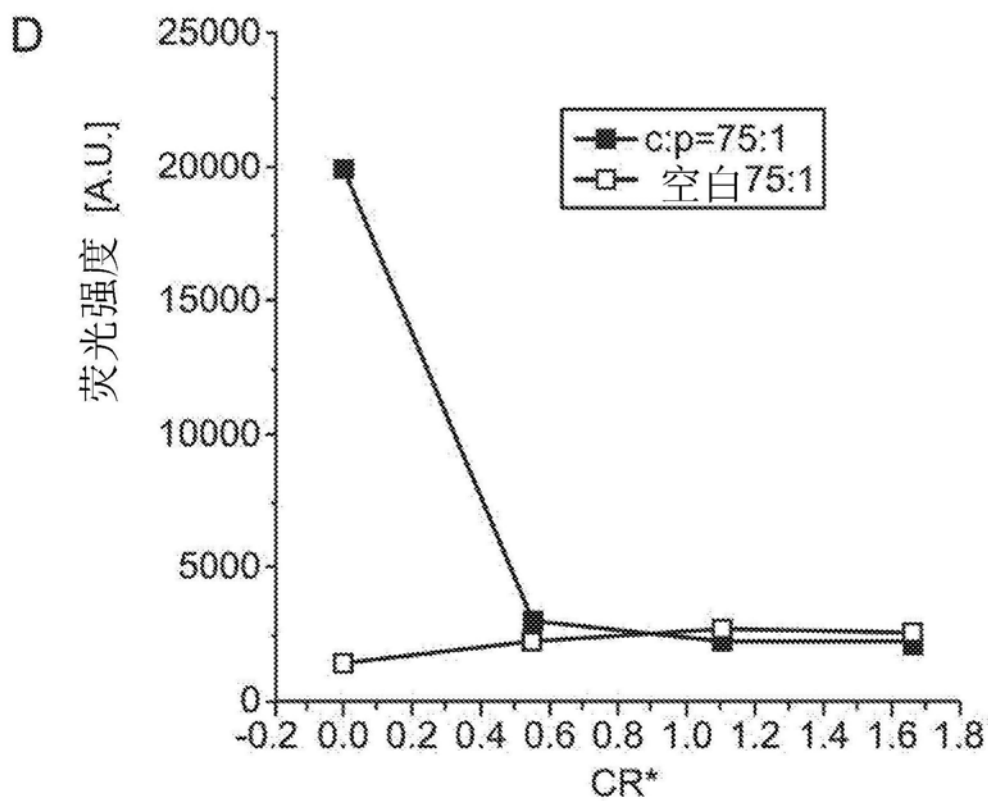
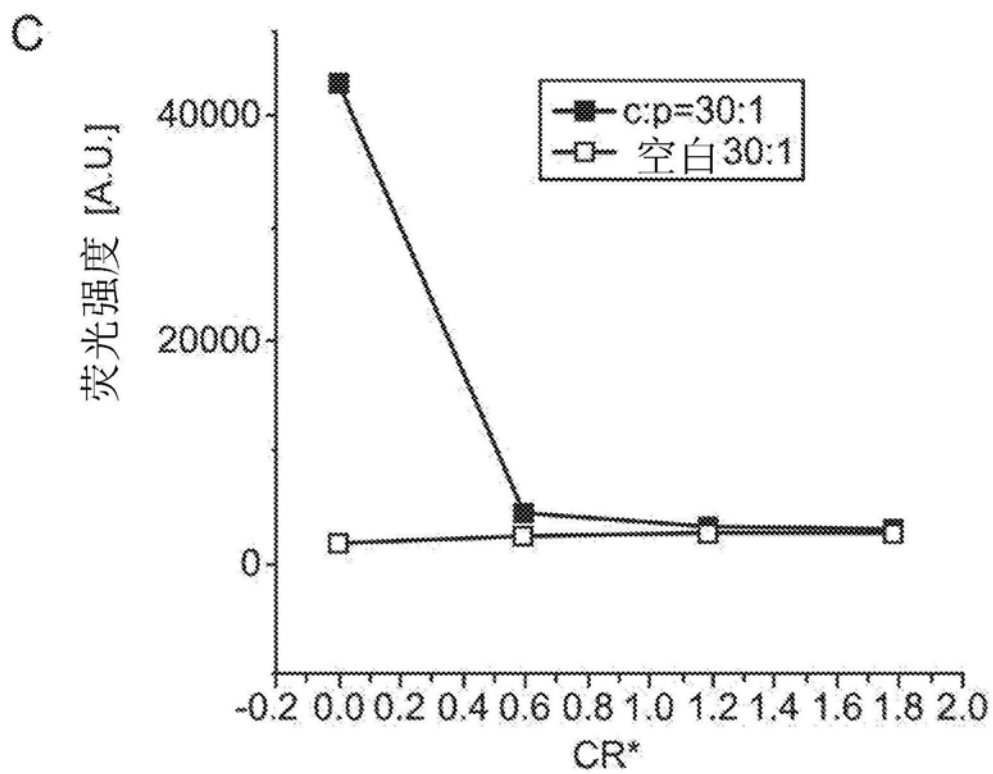


图20 (续)

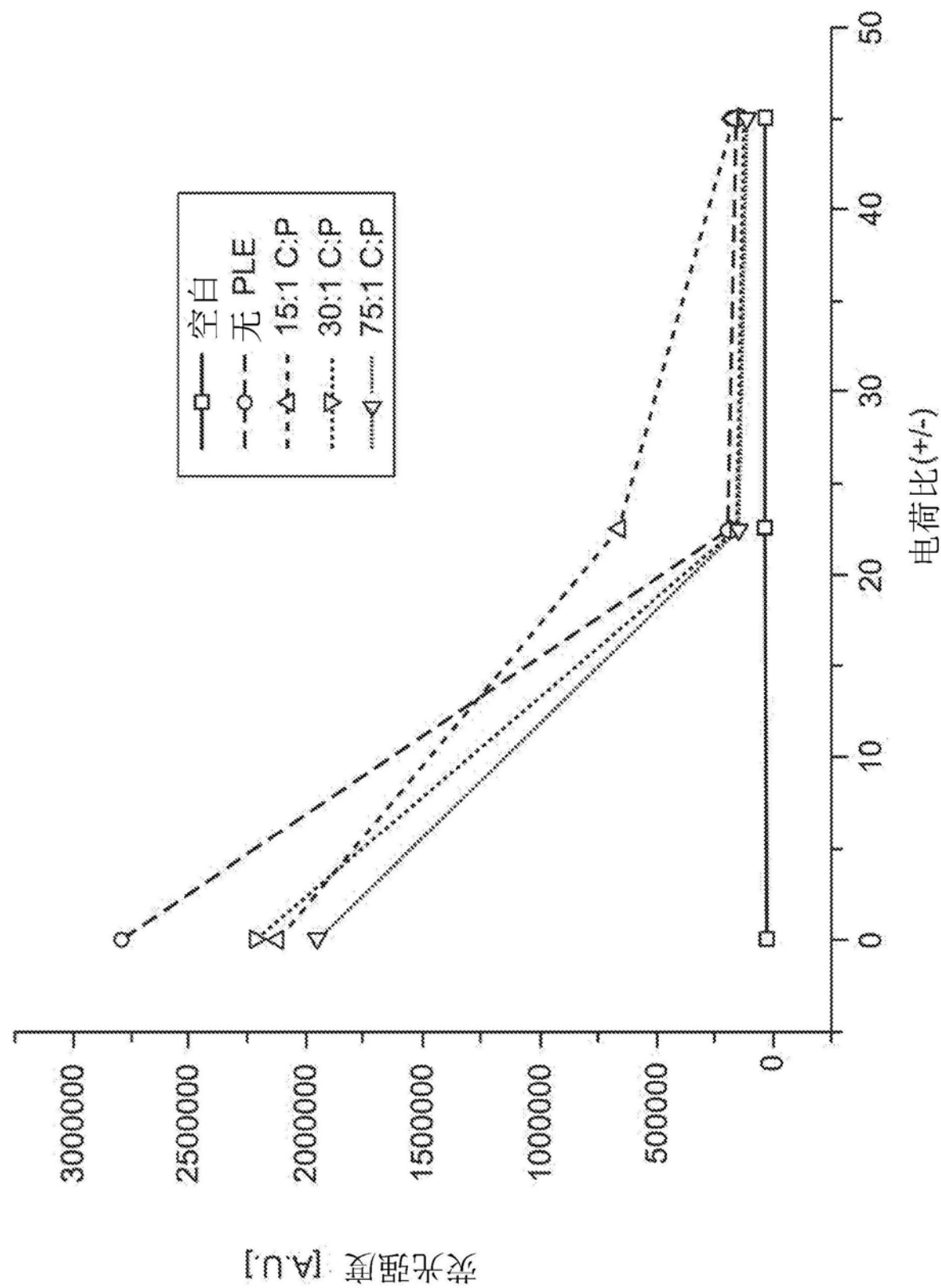


图21

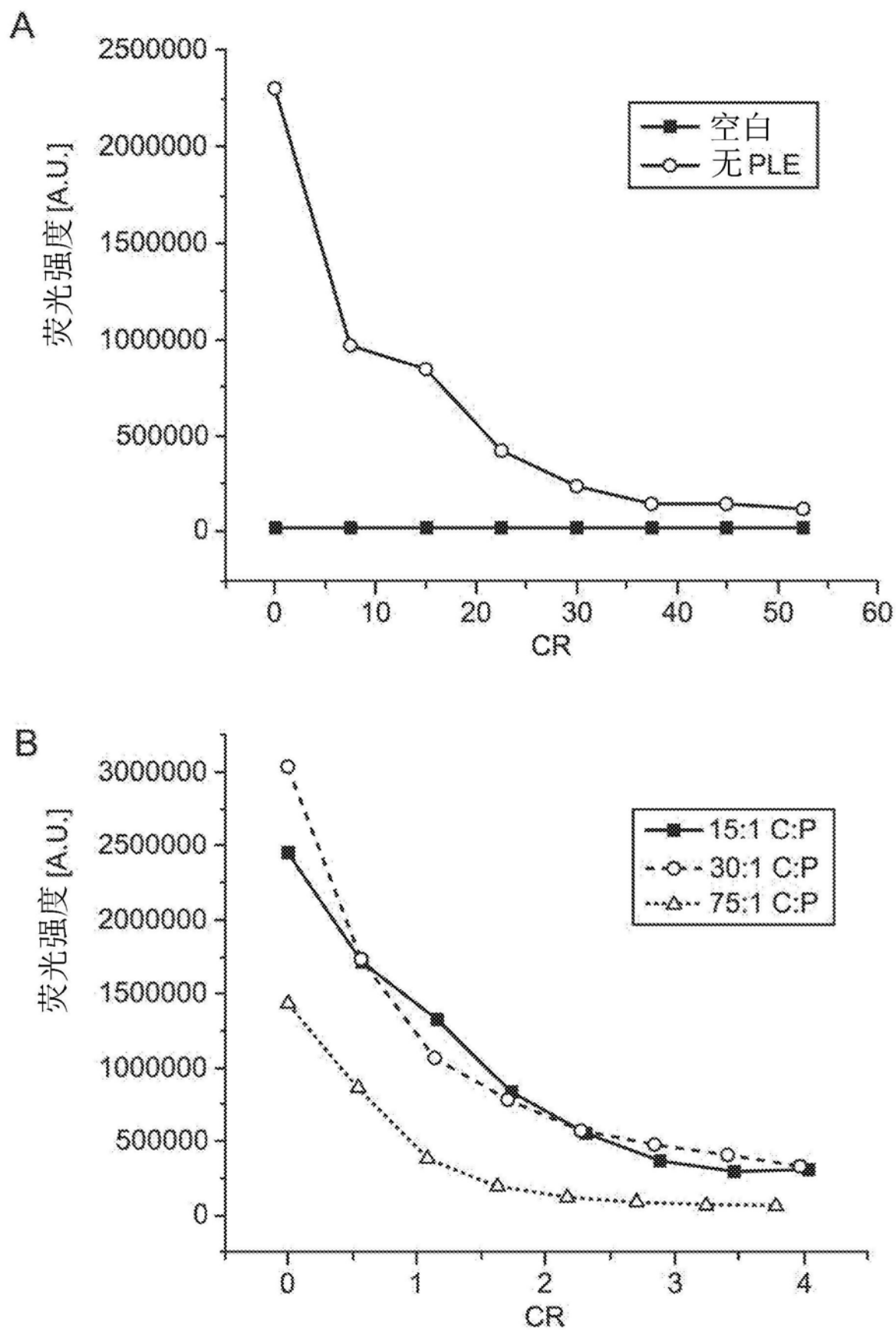


图22

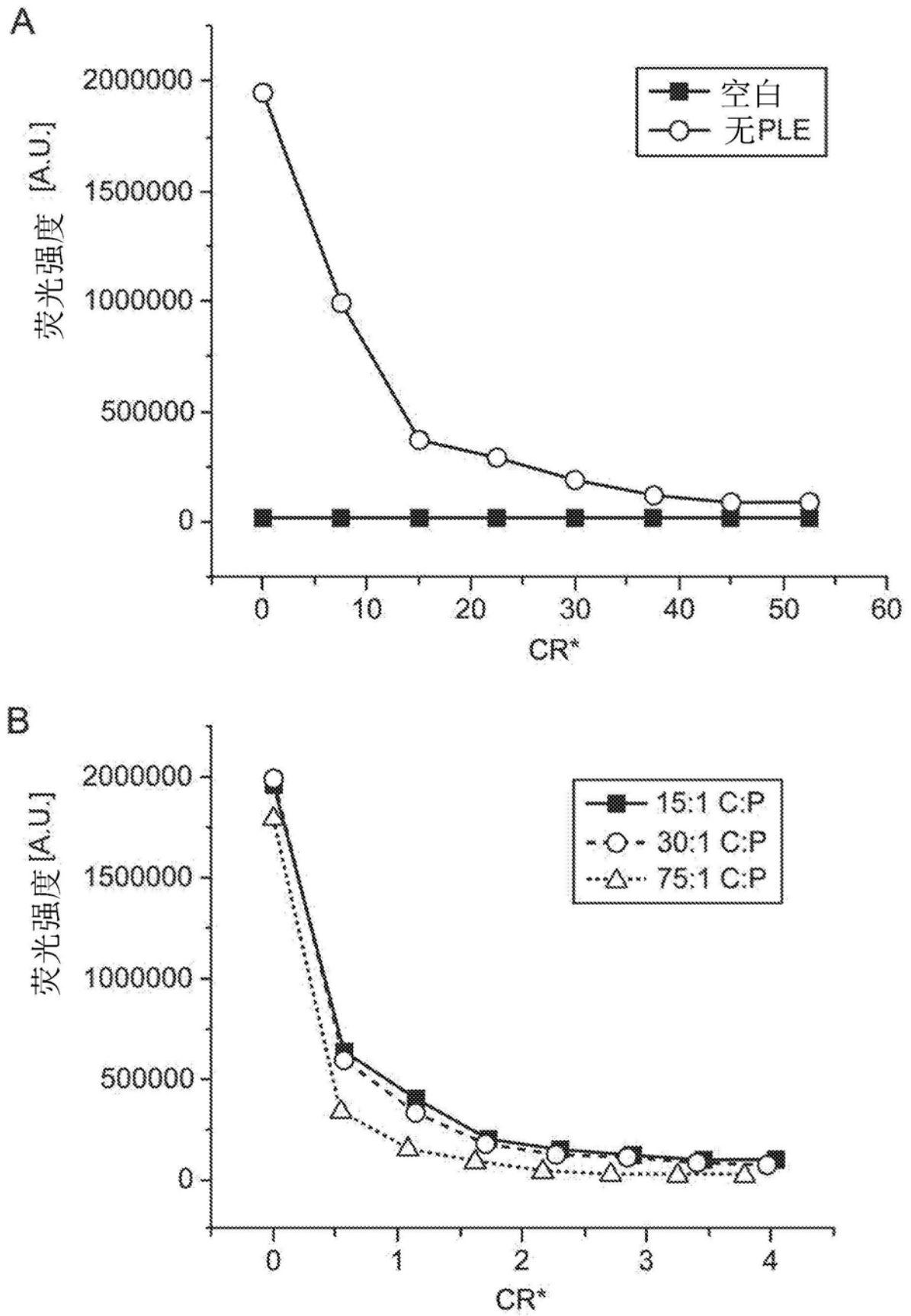


图23

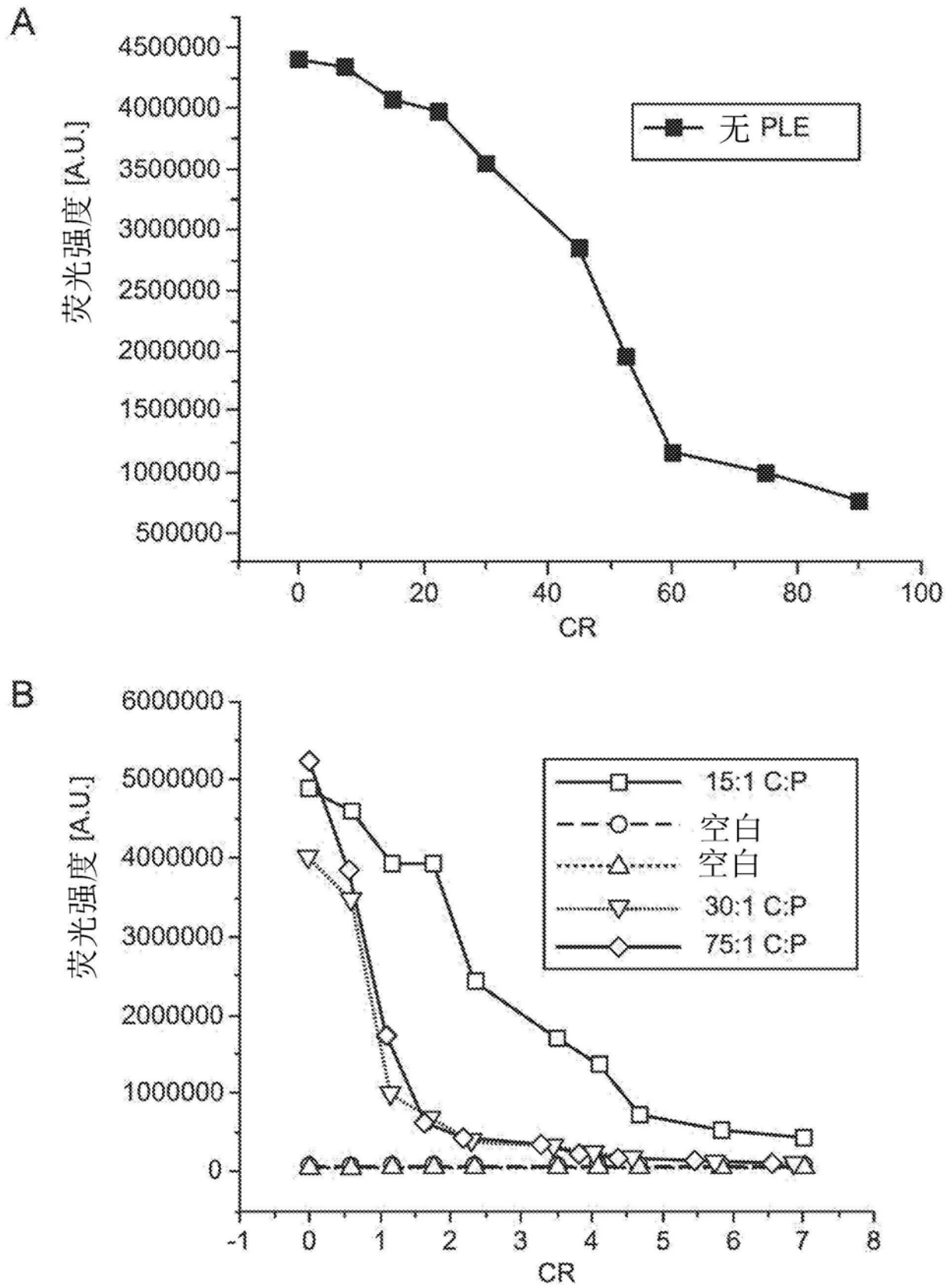


图24

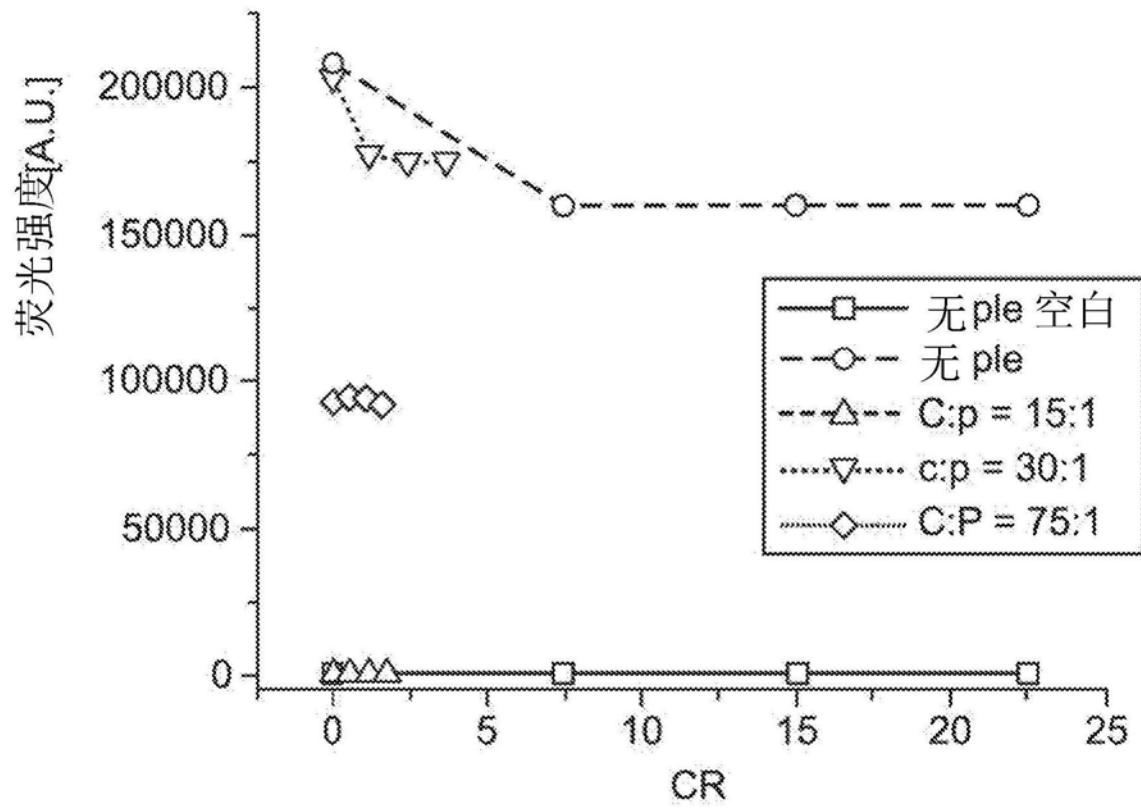


图25

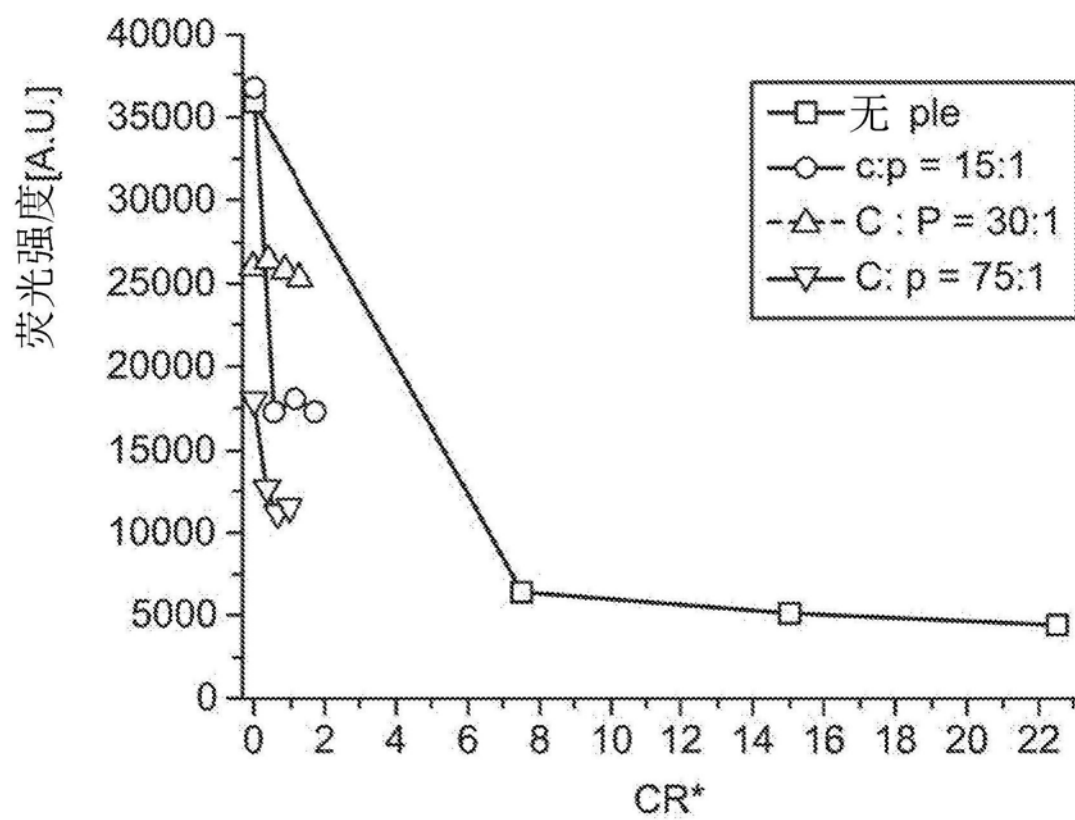


图26

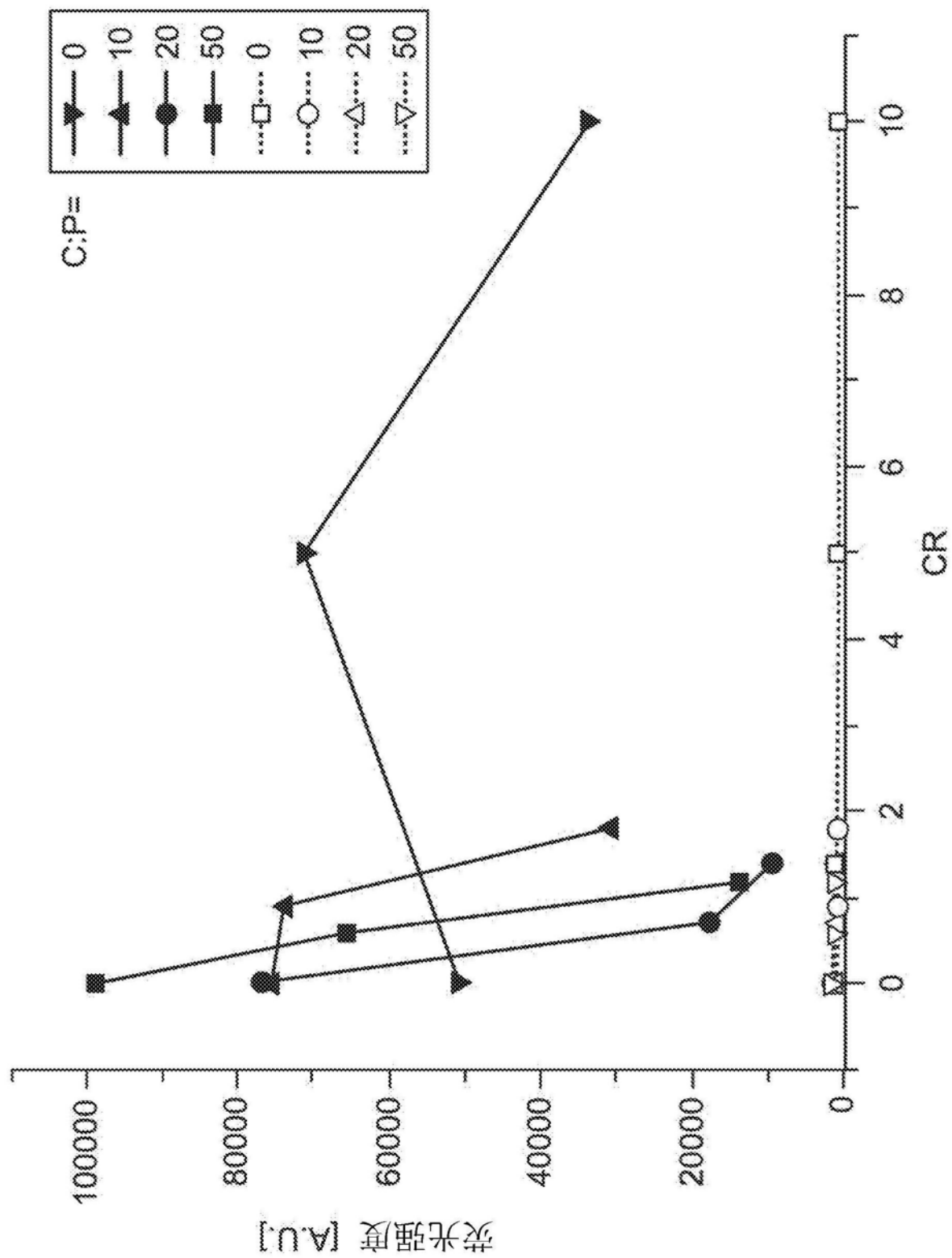


图27

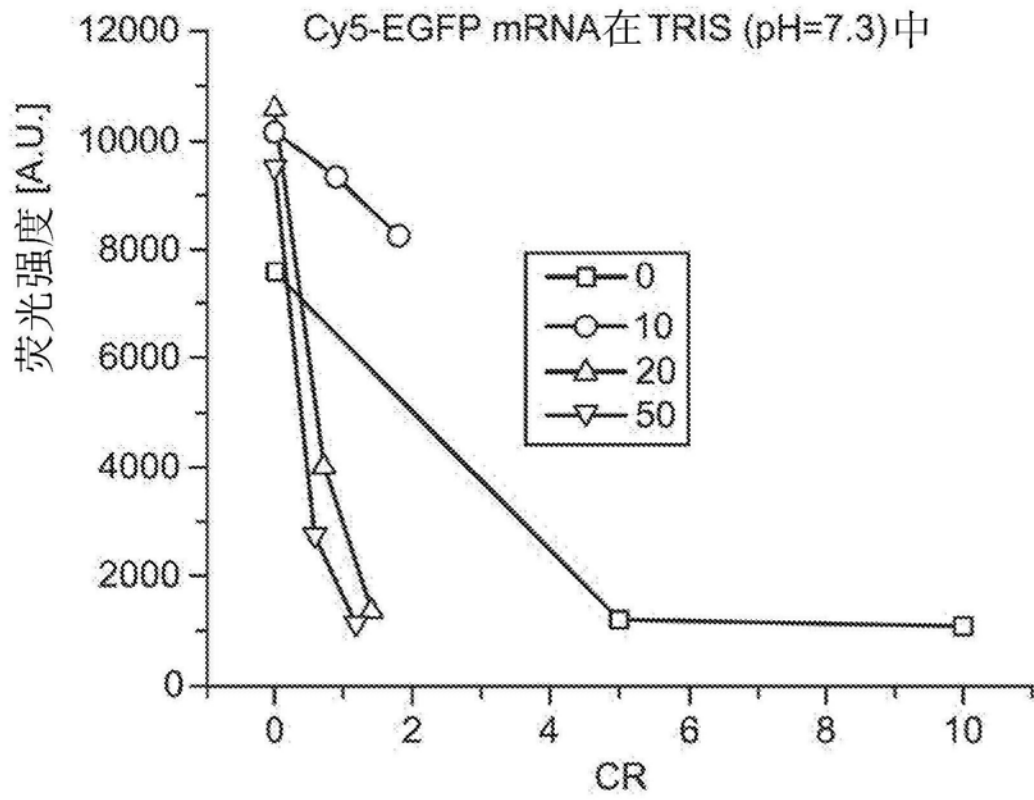


图28

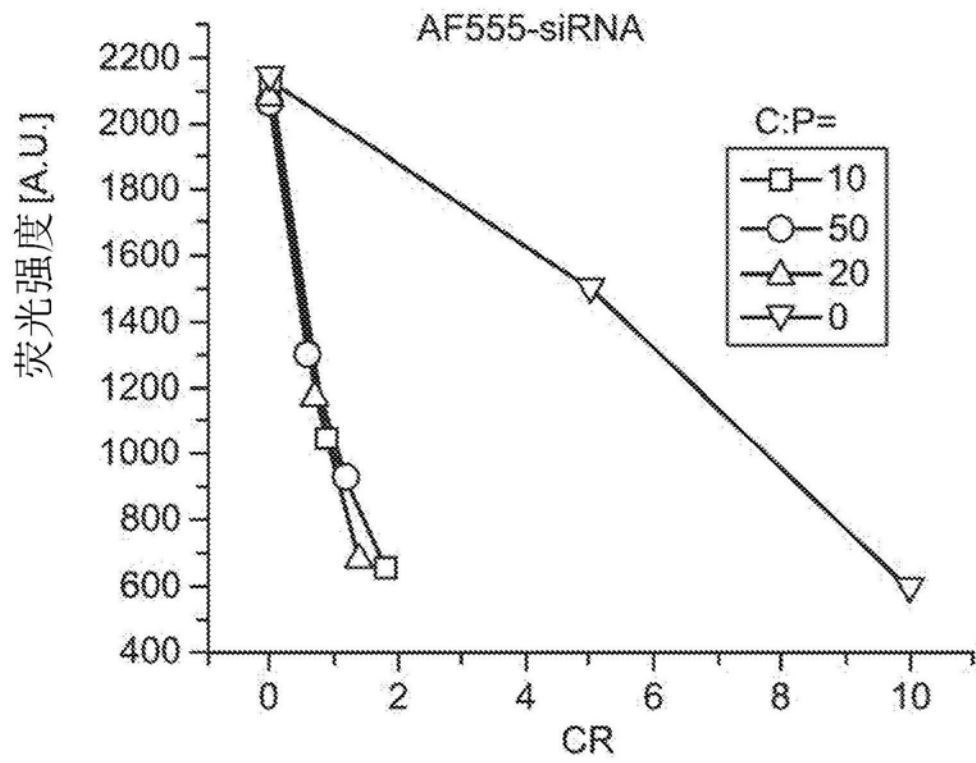


图29

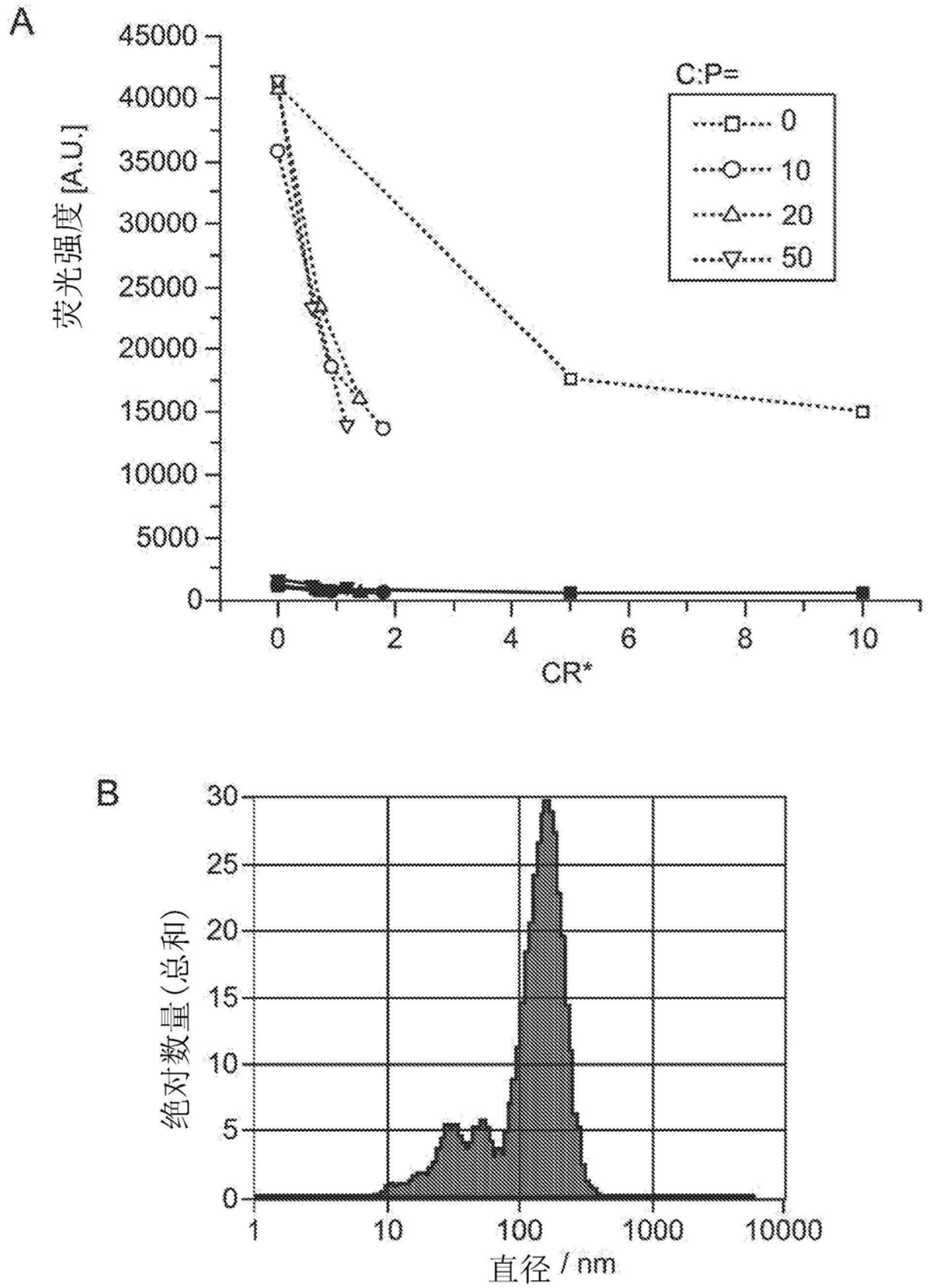


图30

A

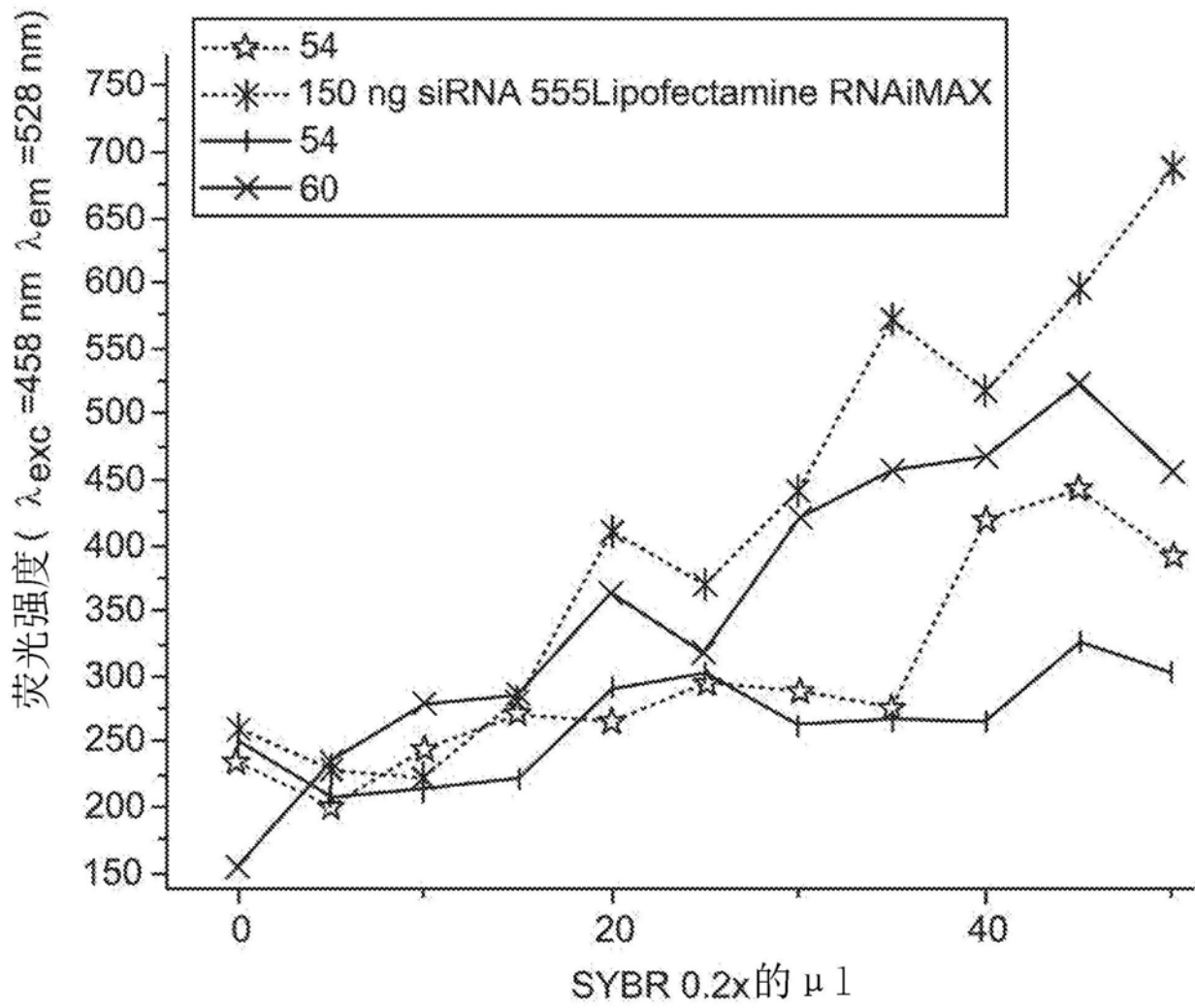


图31

B

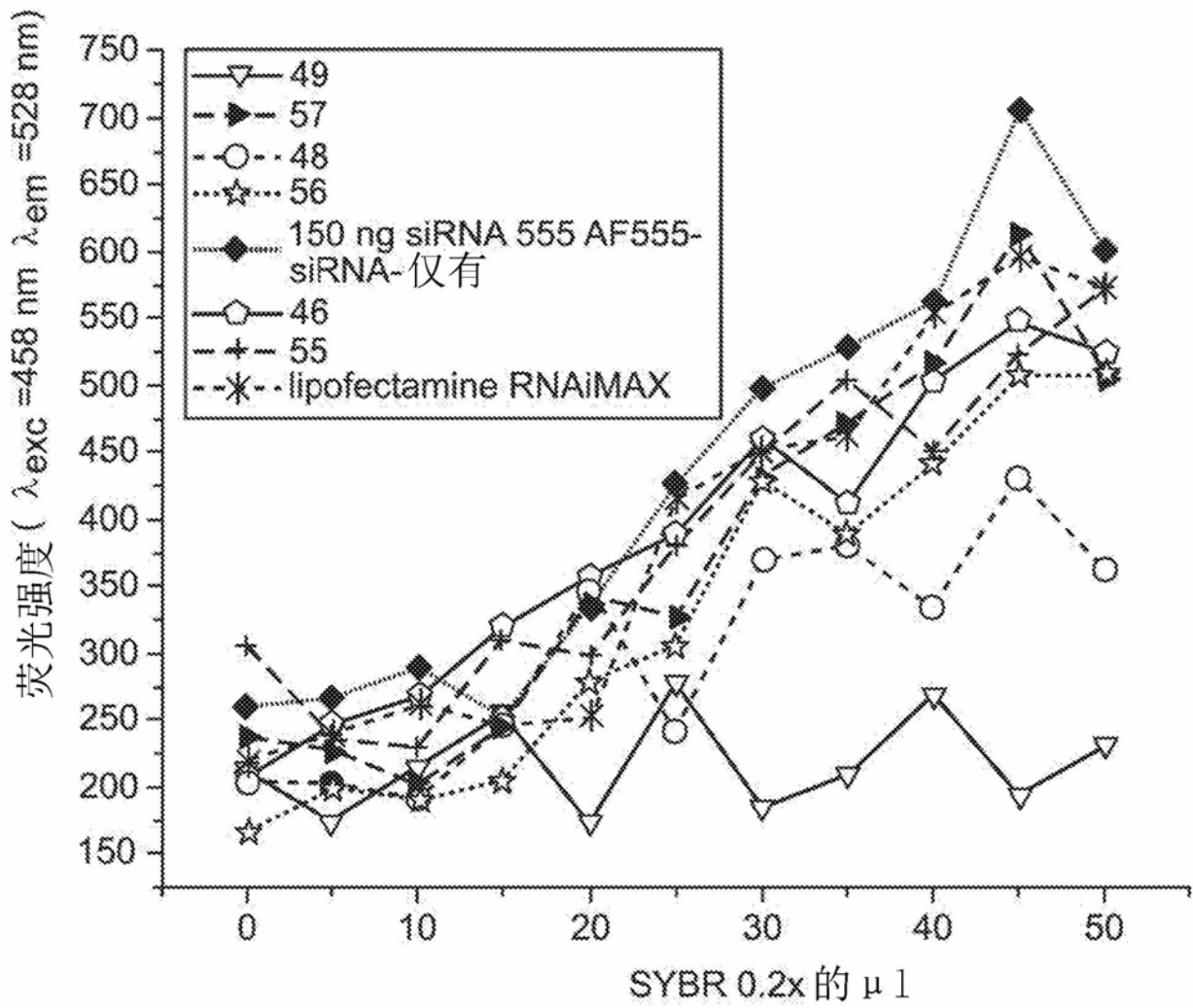


图31(续)

C

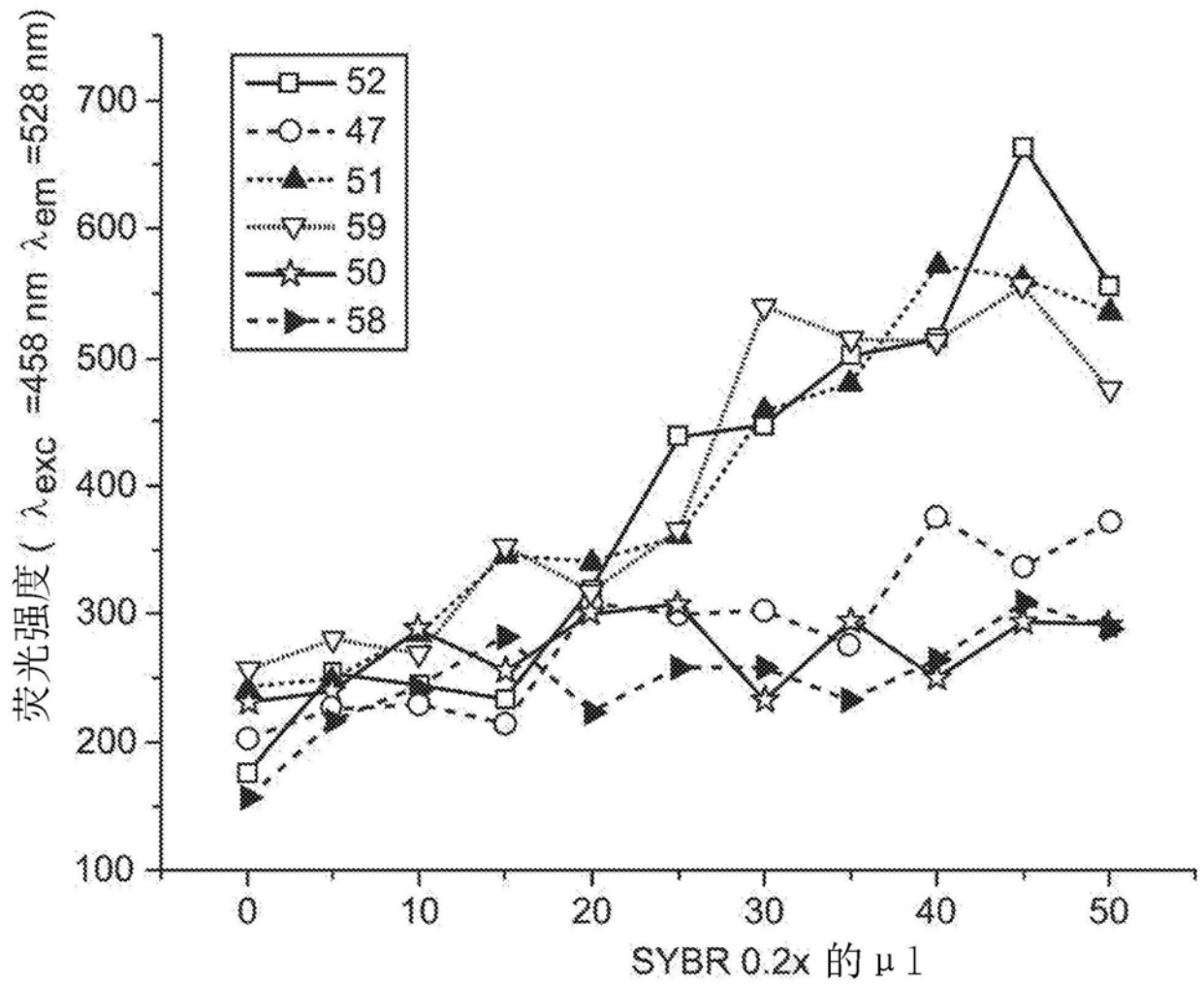


图31(续)

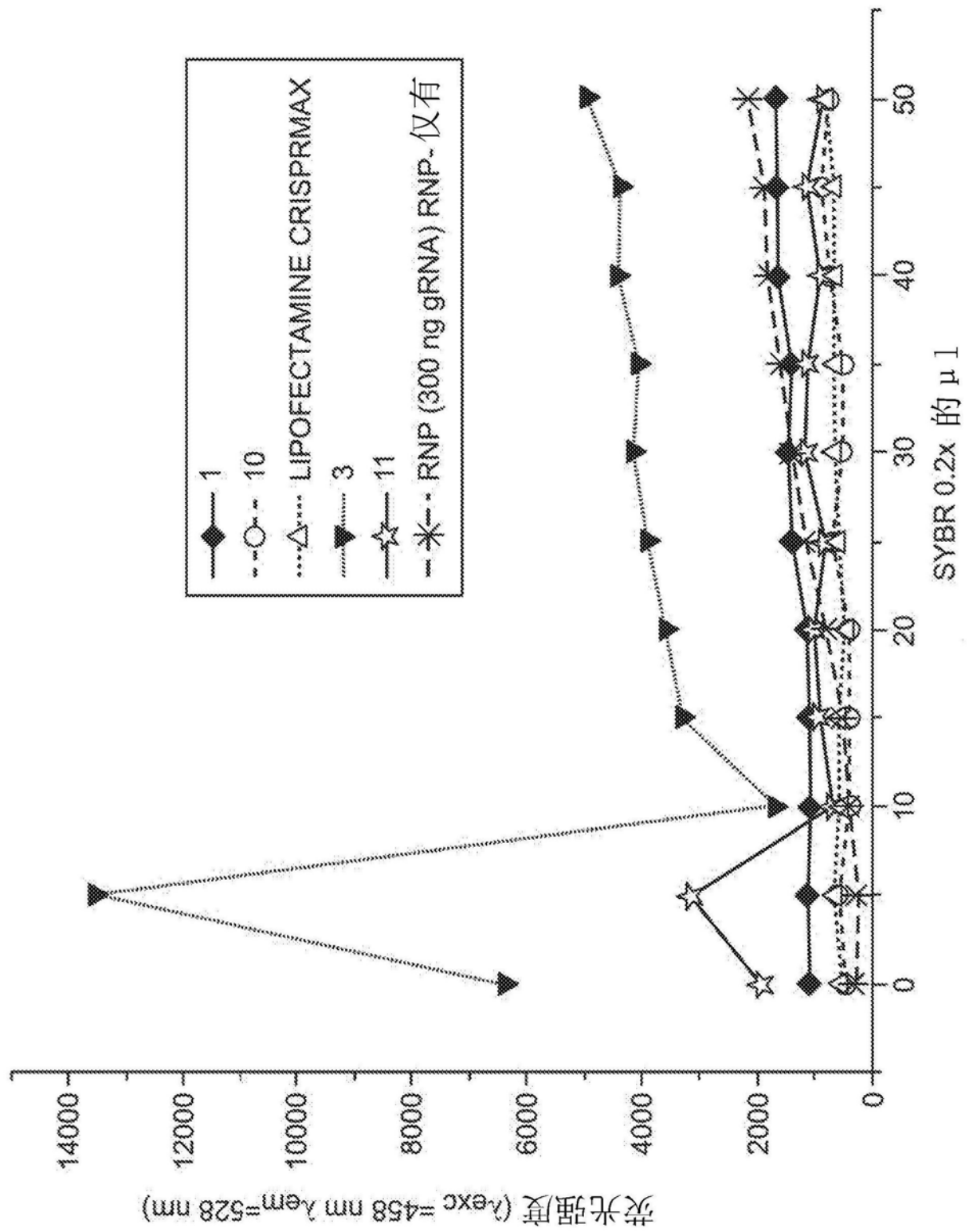


图32

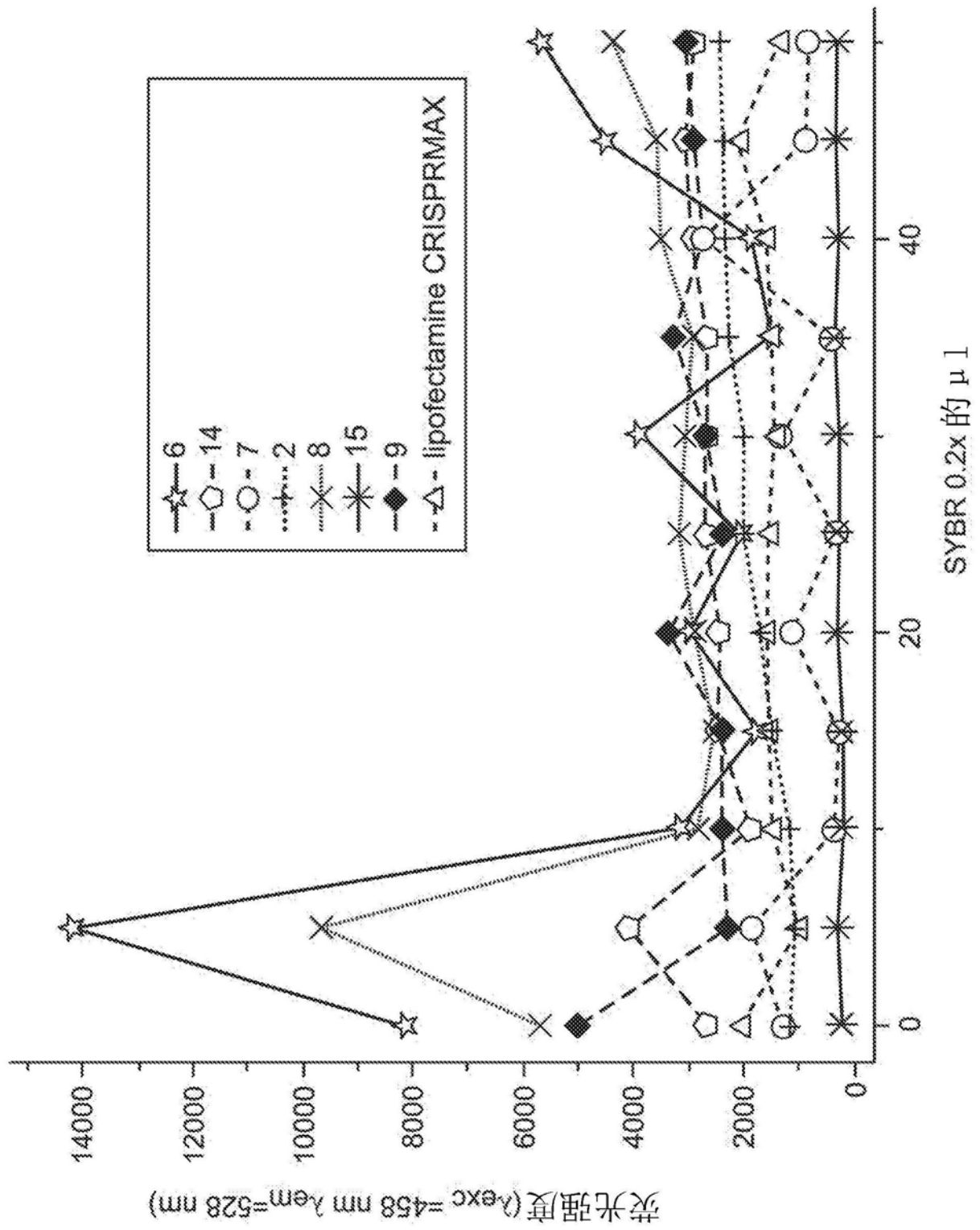


图32(续)

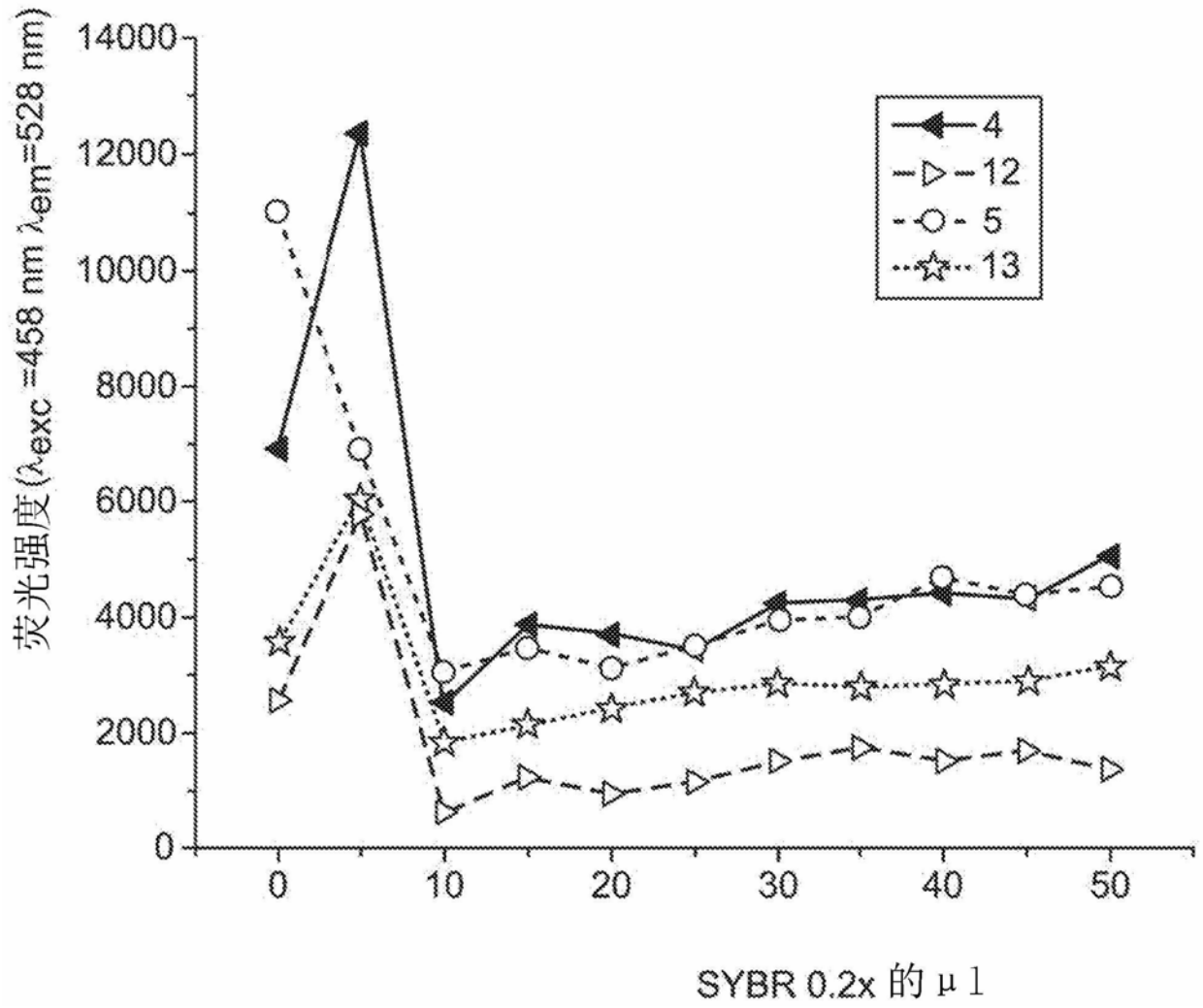


图32(续)

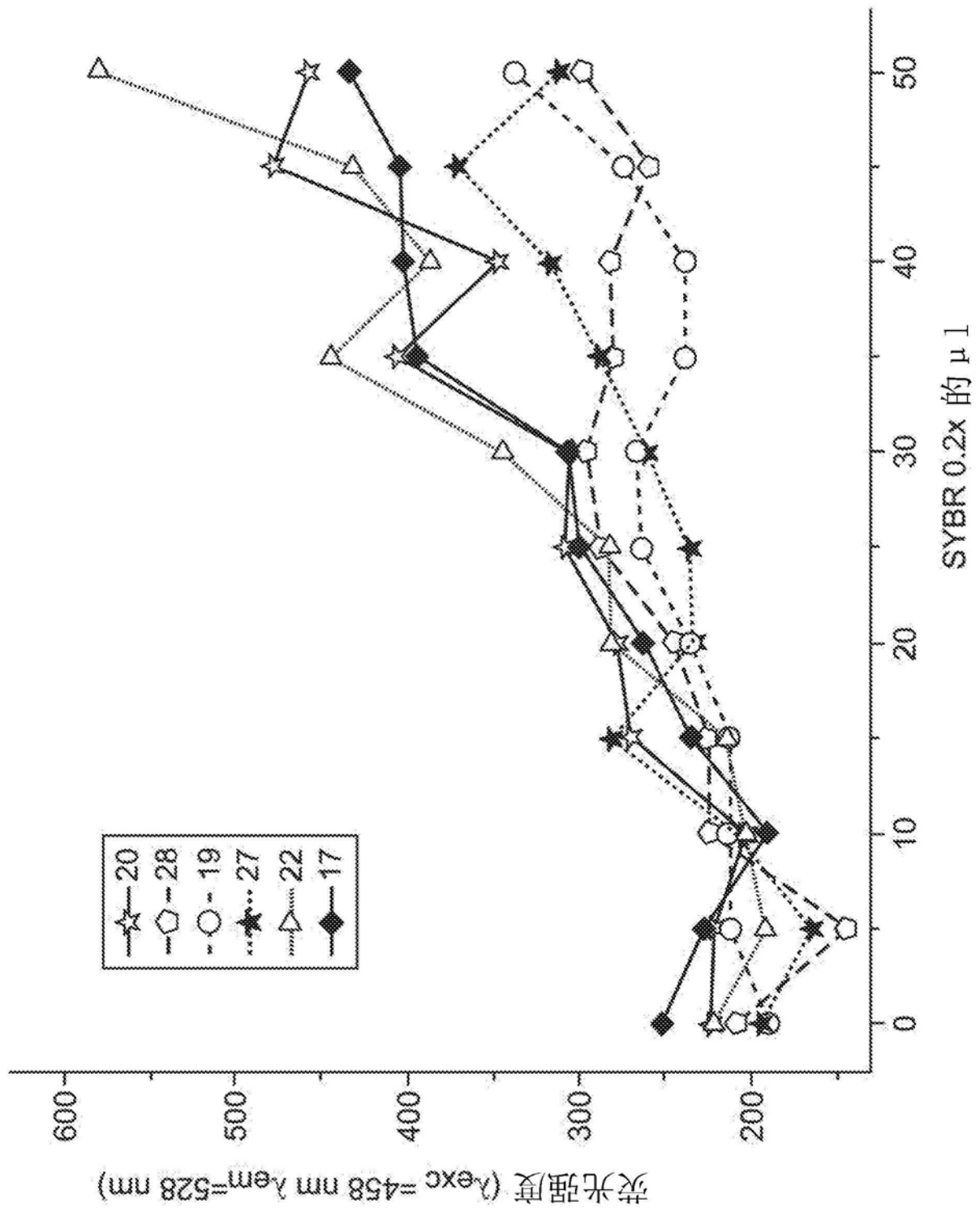


图33

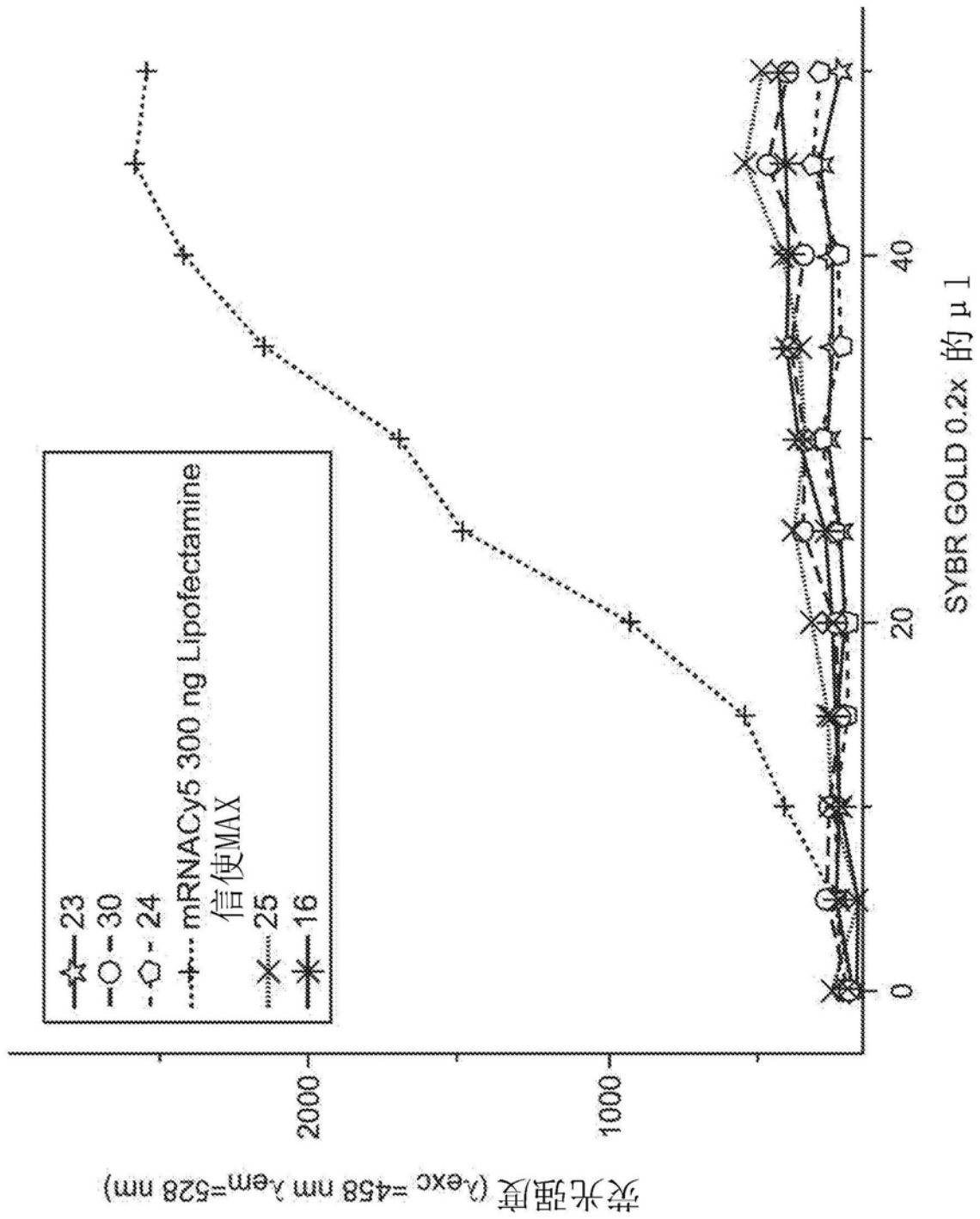


图33(续)

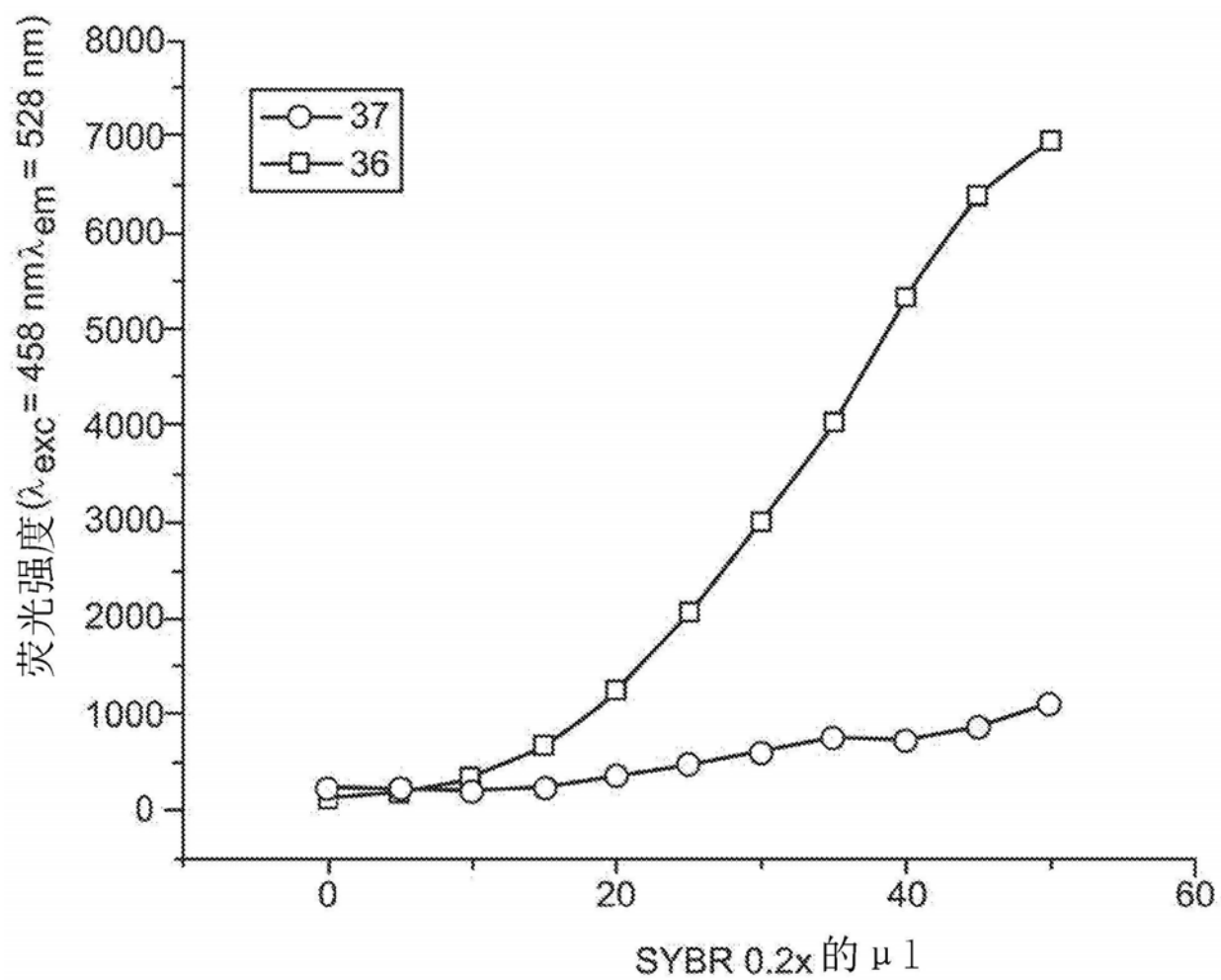


图34

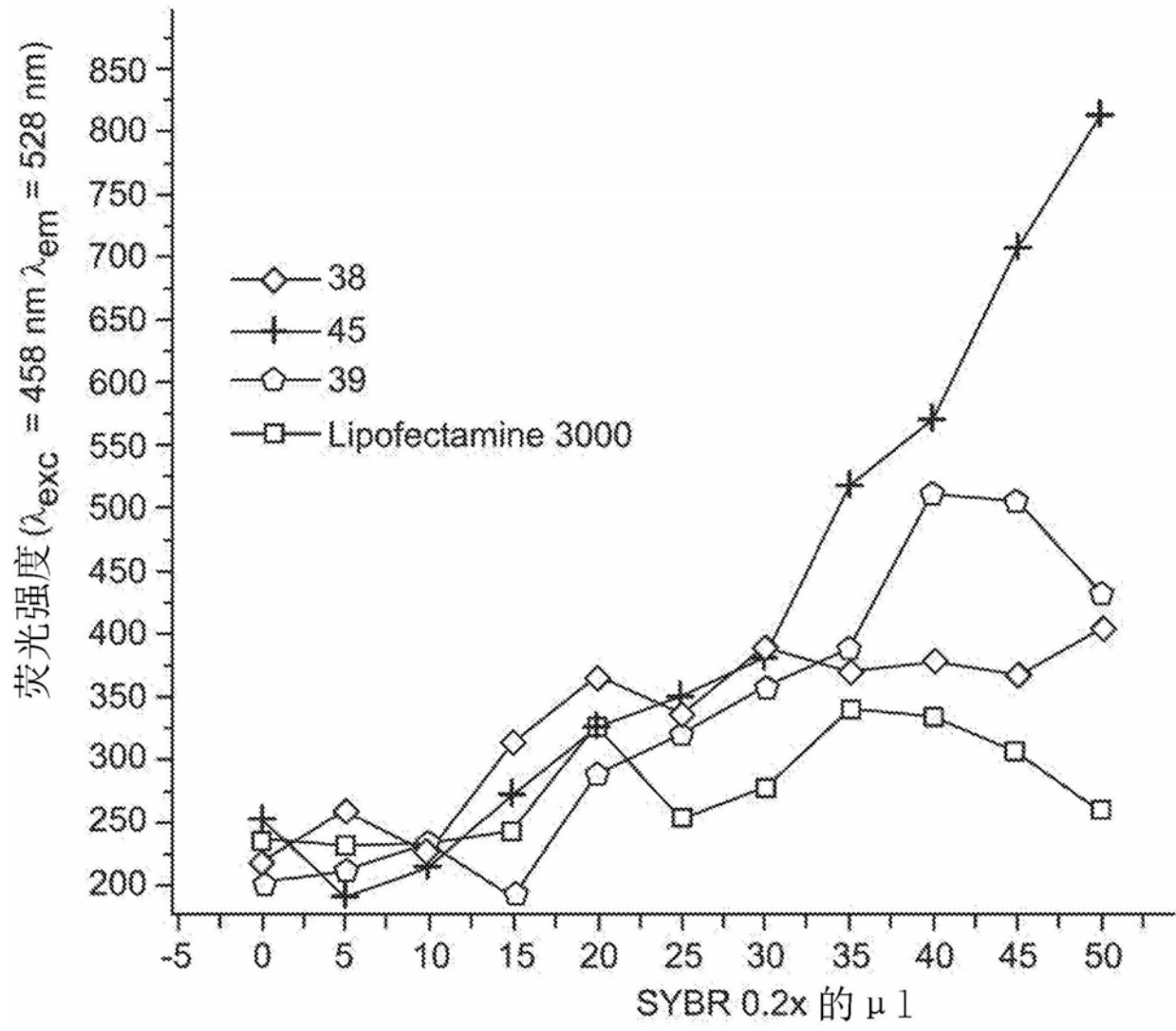


图34(续)

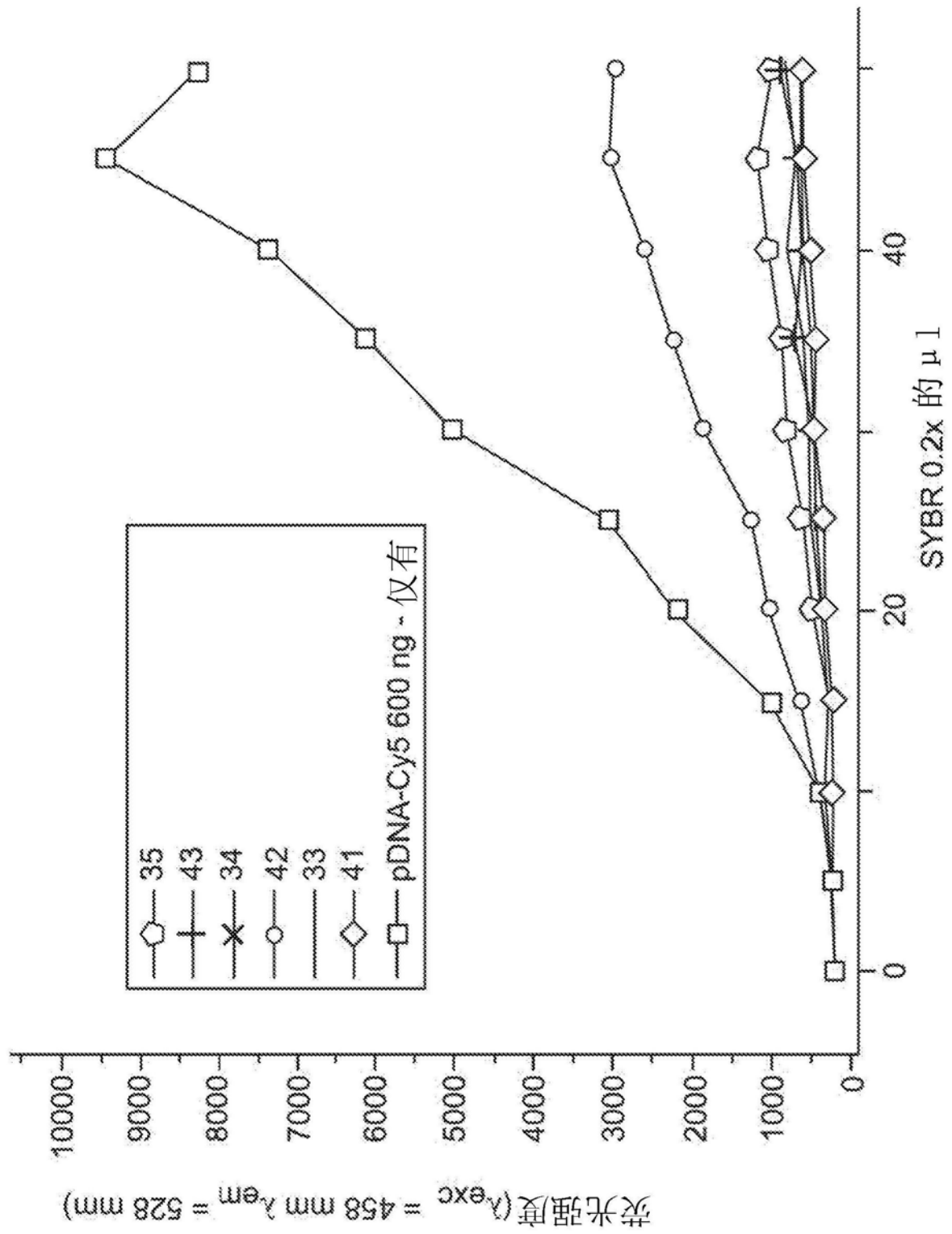


图34(续)

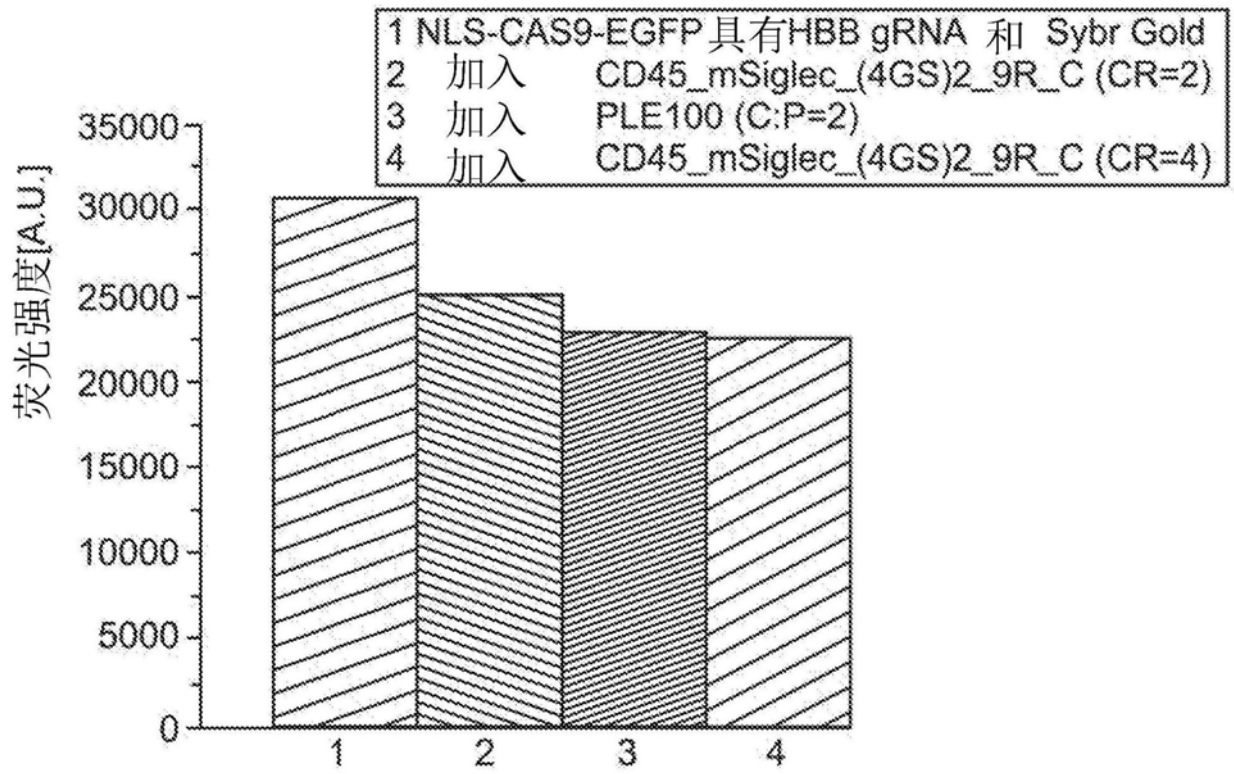


图35

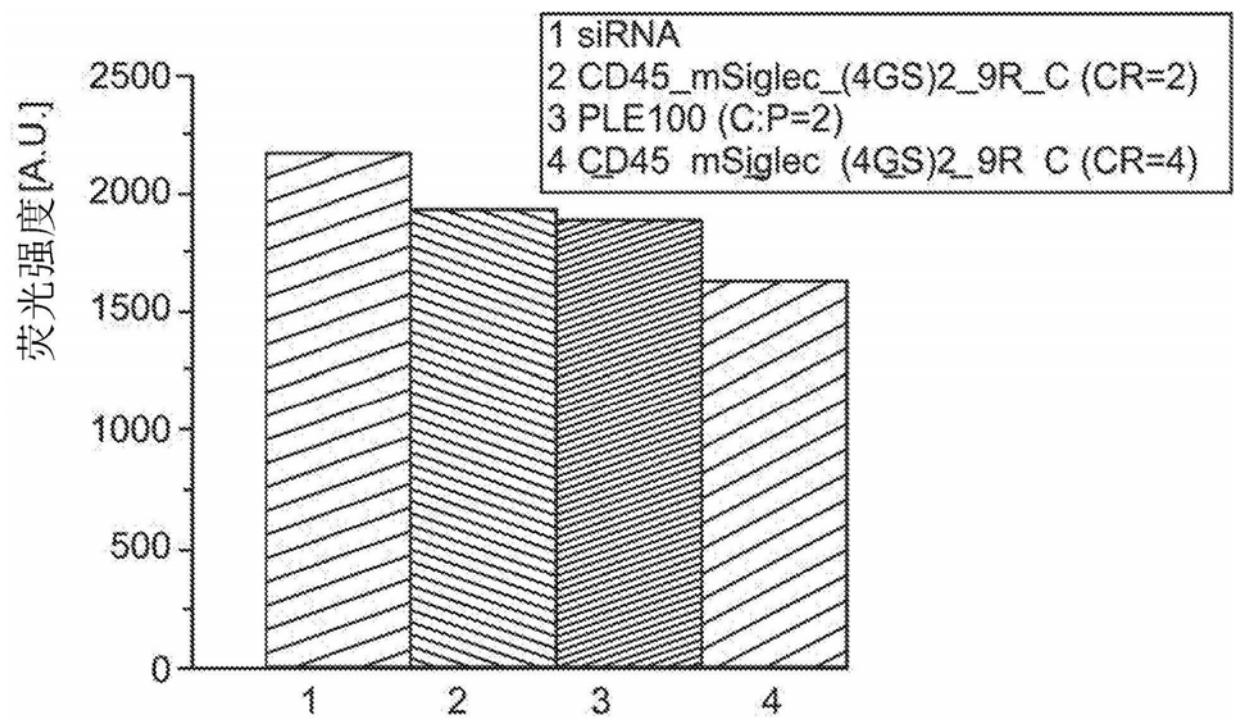


图36

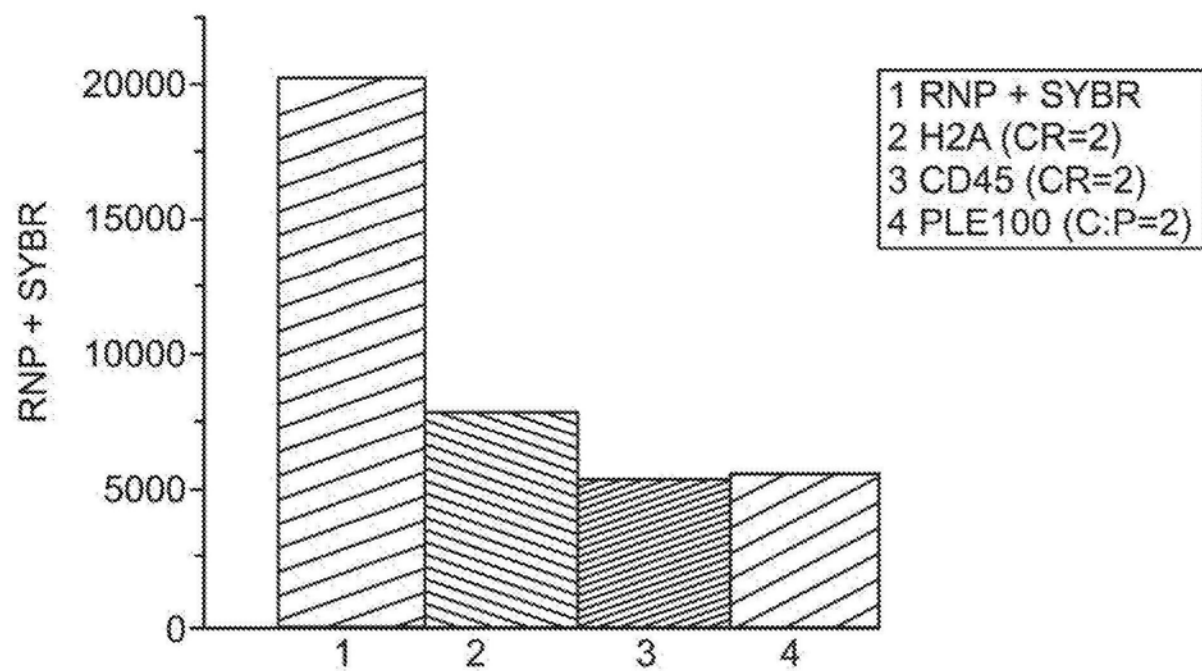


图37

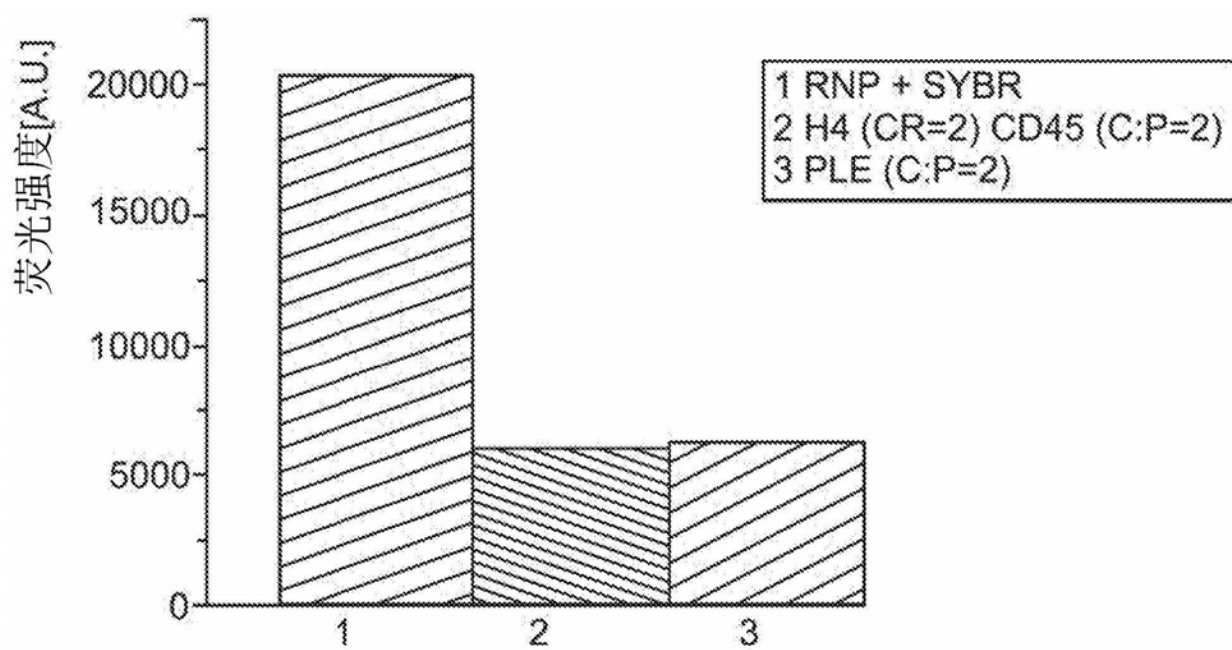


图38

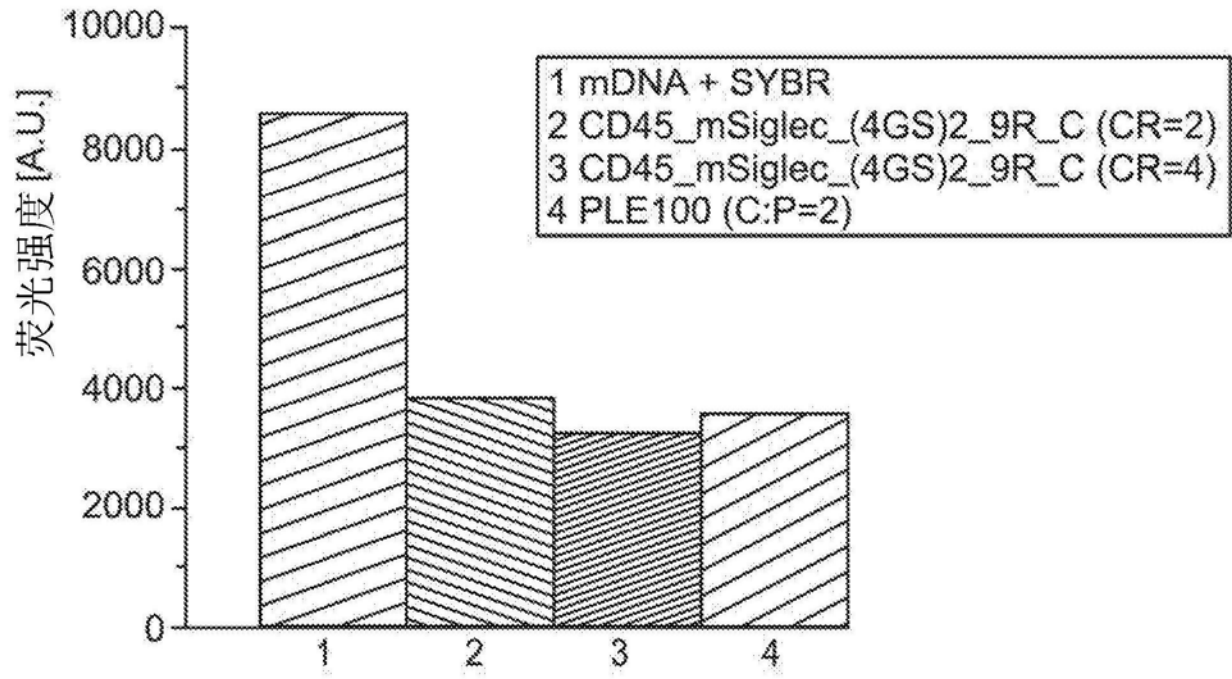


图39

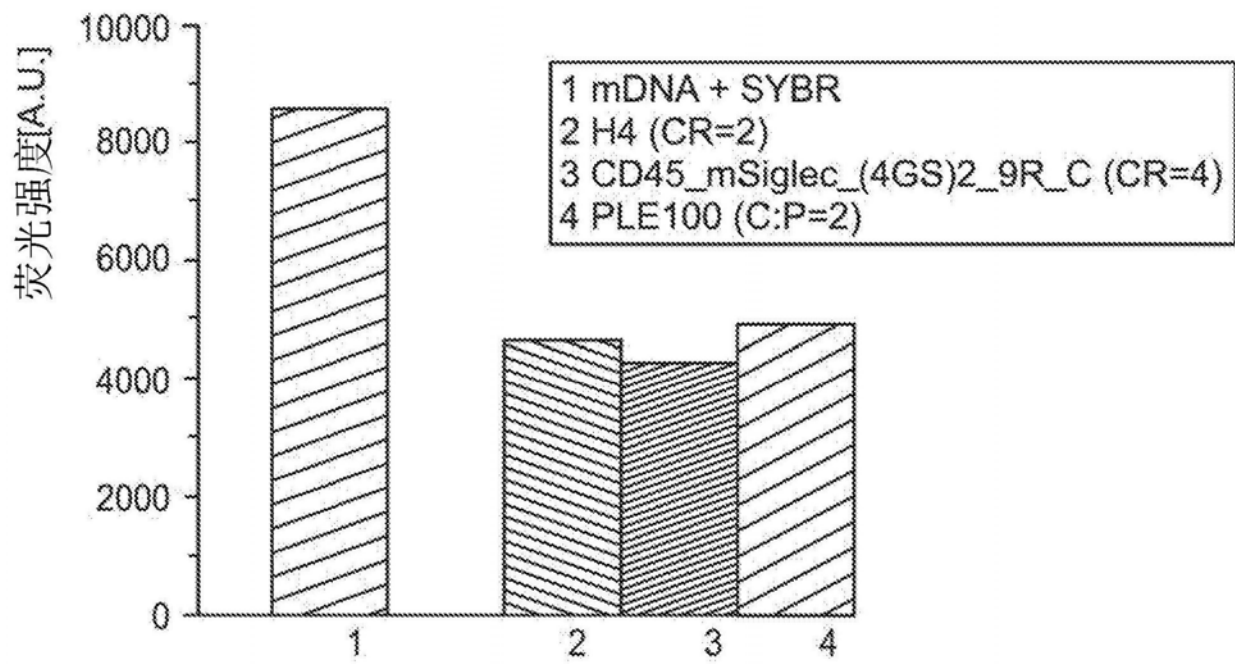


图40

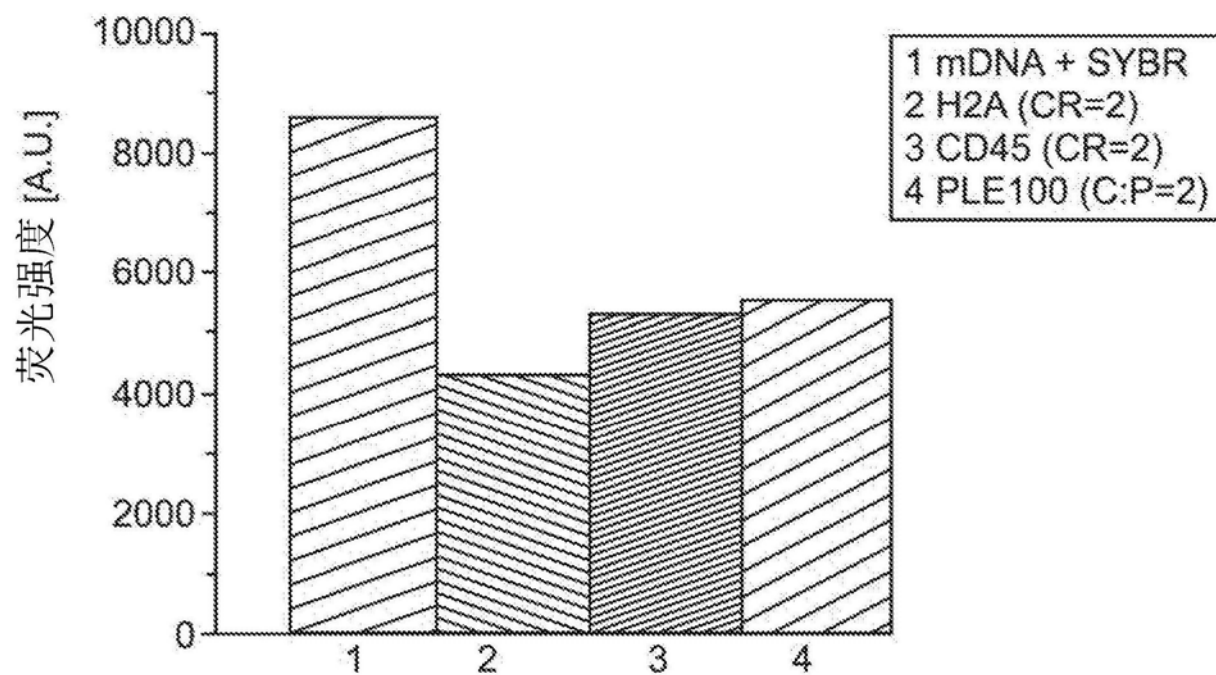


图41

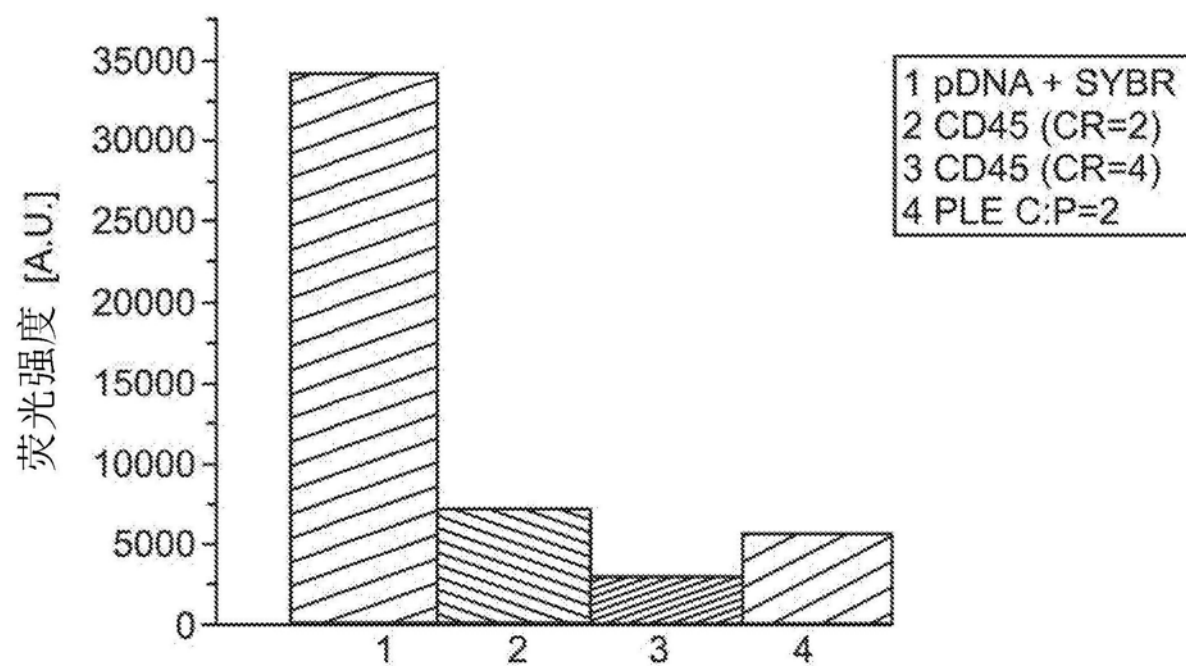


图42

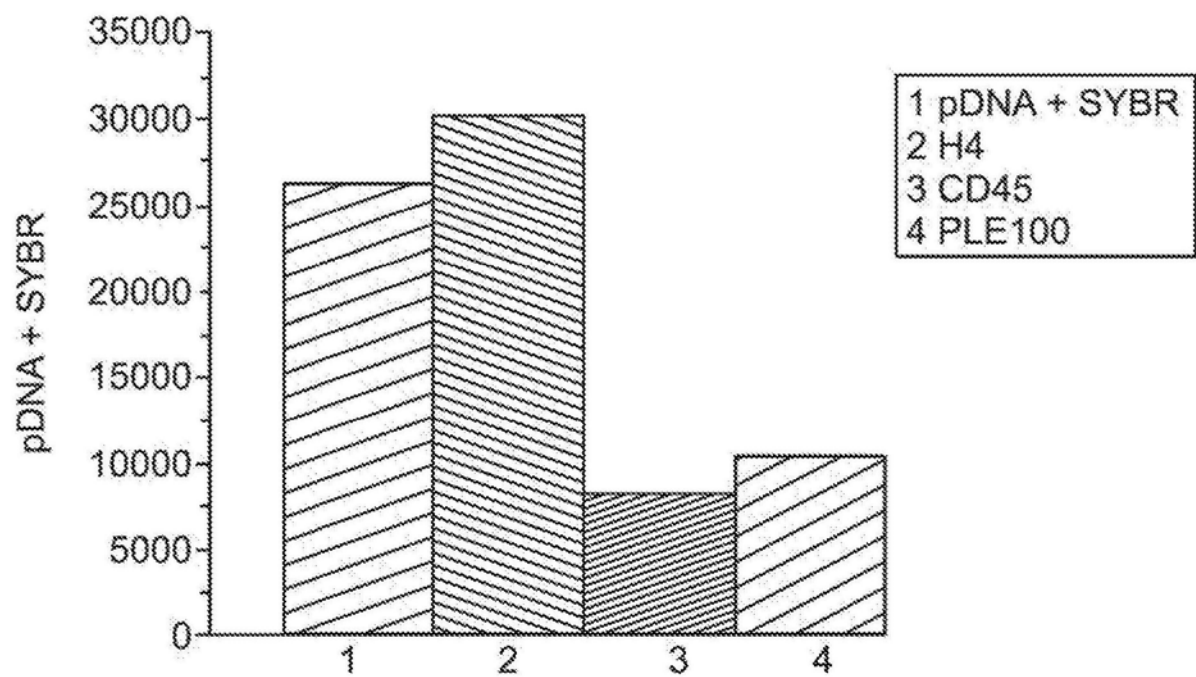


图43

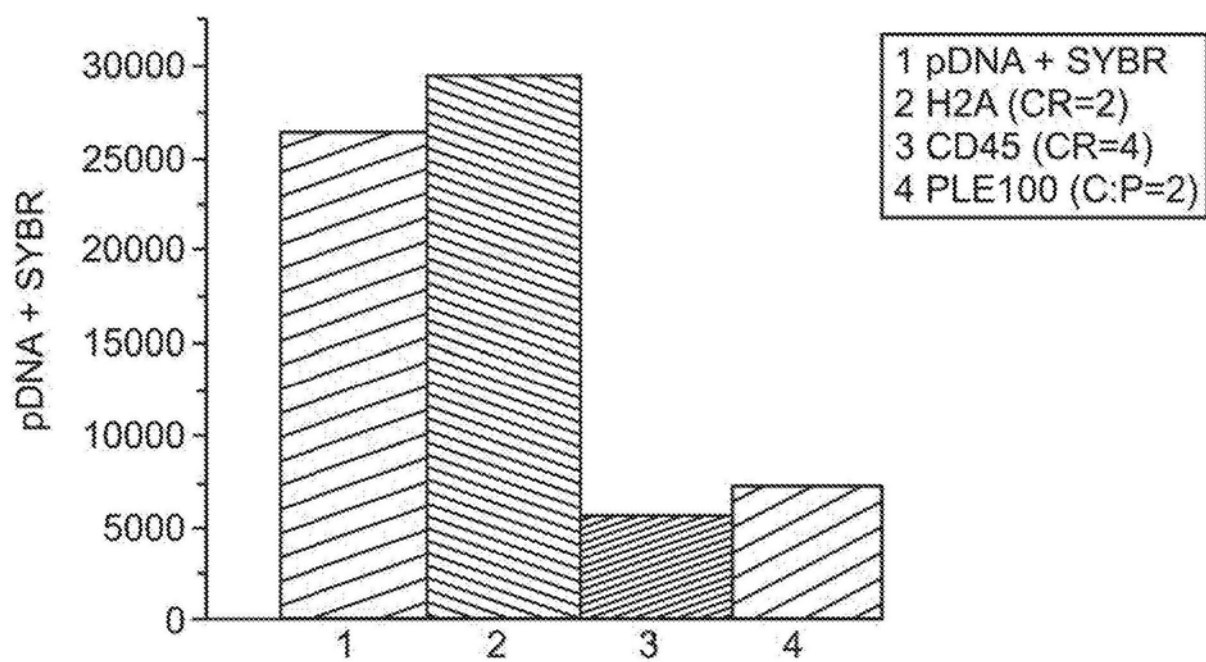
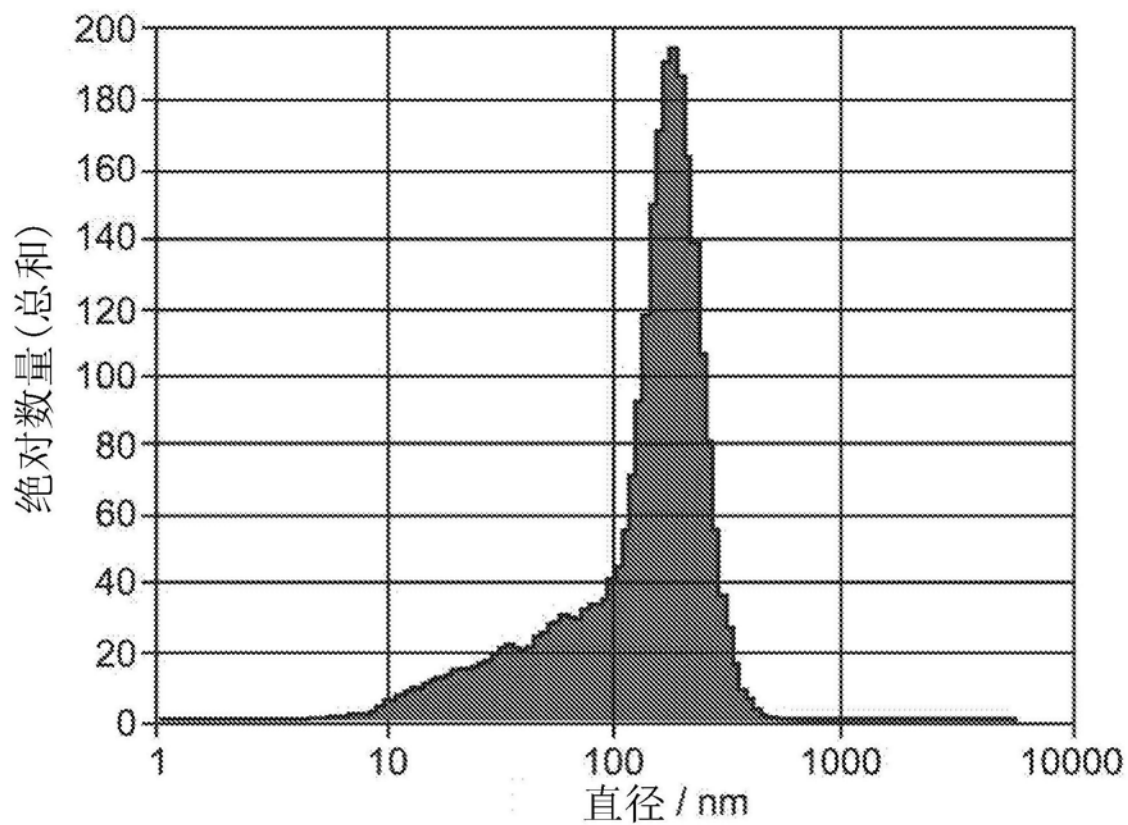


图44

A

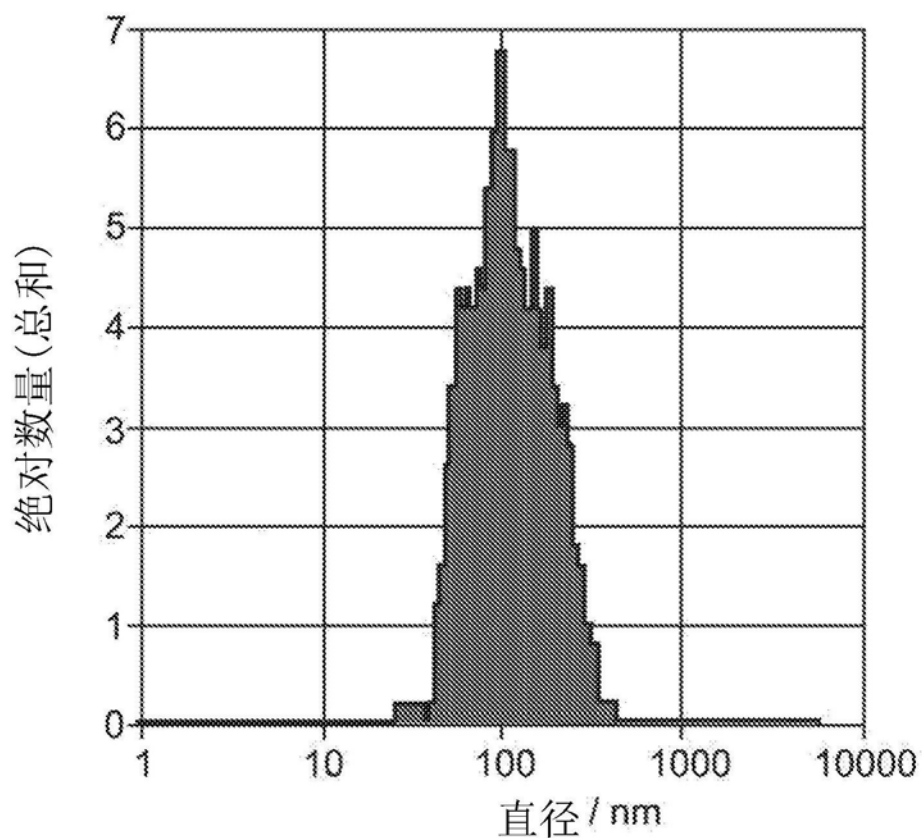


峰分析(绝对数量)

直径/ nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
181.0	194.4	116.0	100.0
X值			
	数量	浓度	体积
X10	34.7	34.7	152.3
X50	155.8	155.8	214.4
X90	232.1	232.1	314.7
跨度	1.3	1.3	0.8
均值	151.5	151.5	233.4
标准方差	76.2	76.2	70.6

图45

B



峰分析(绝对数量)

直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
100.0	6.6	143.6	100.0
X值			
	数量	浓度	体积
X10	54.9	54.9	115.8
X50	102.0	102.0	209.3
X90	207.8	207.8	343.7
跨度	1.5	1.5	1.1
均值	124.5	124.5	226.6
标准方差	65.7	65.7	78.0

图45(续)

B (续)

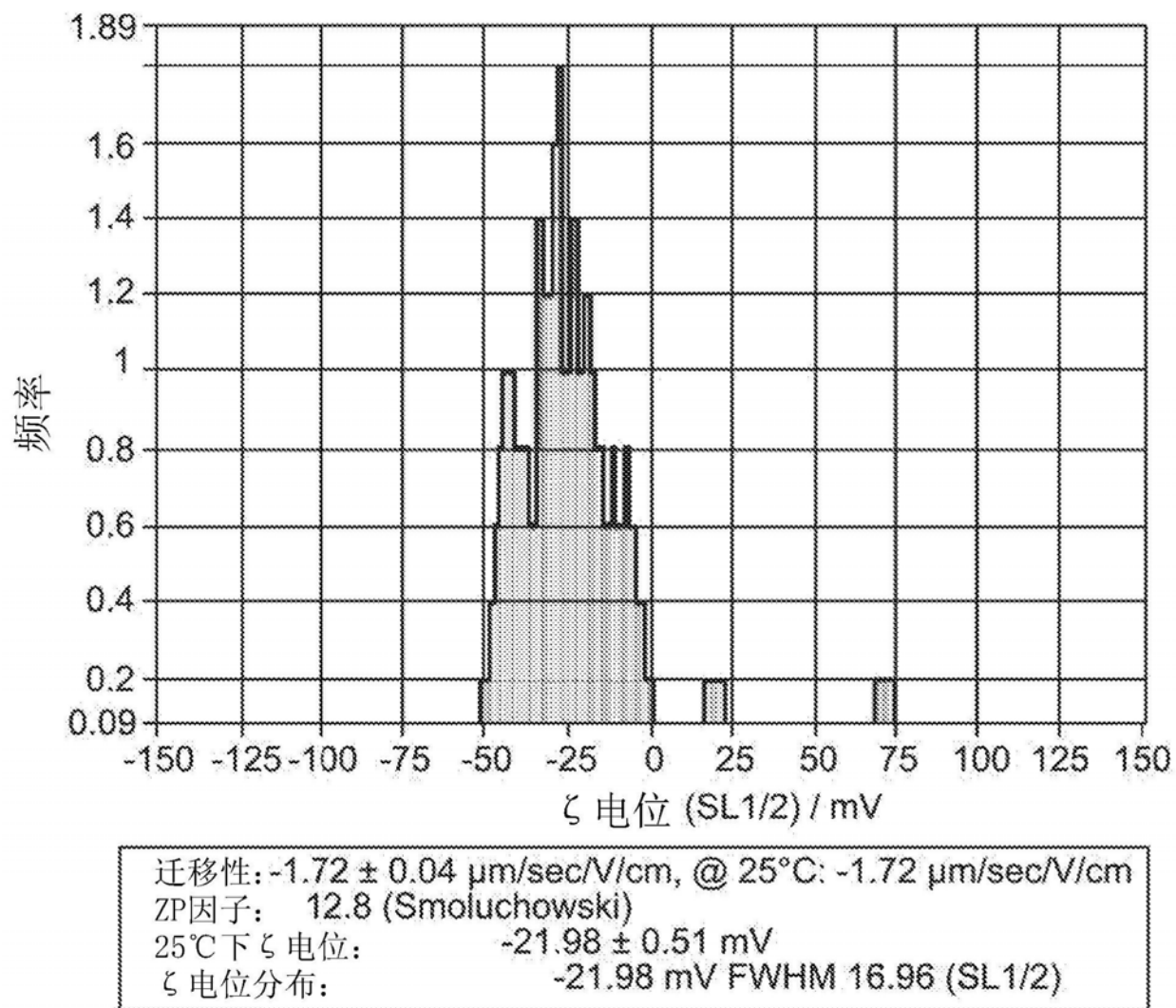
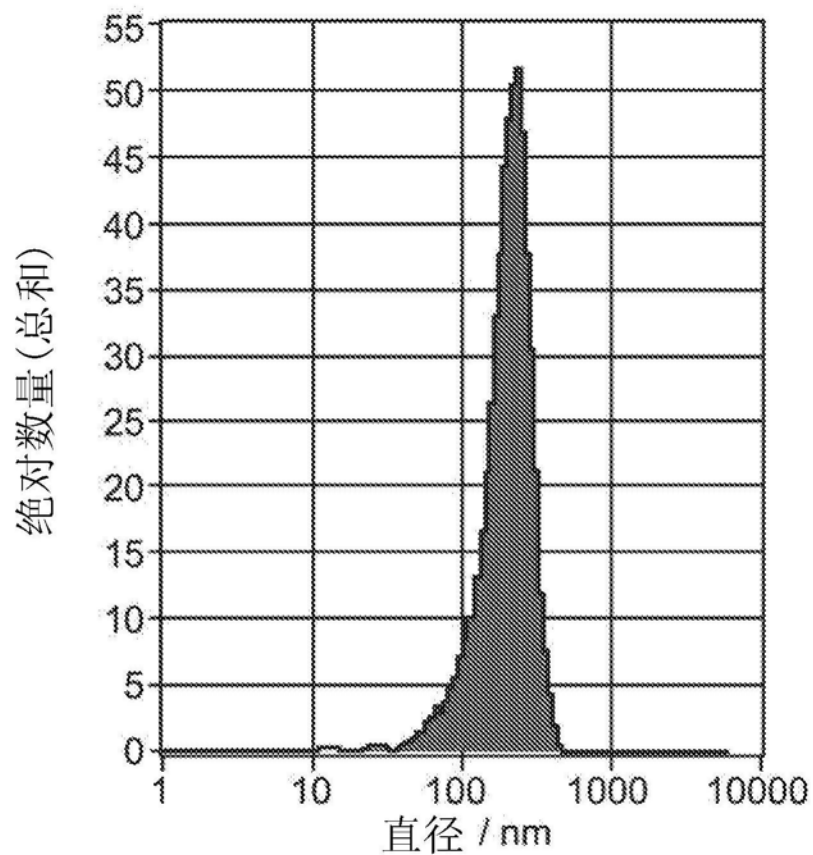


图45 (续)

C

Ligandal 配体目录 # ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N

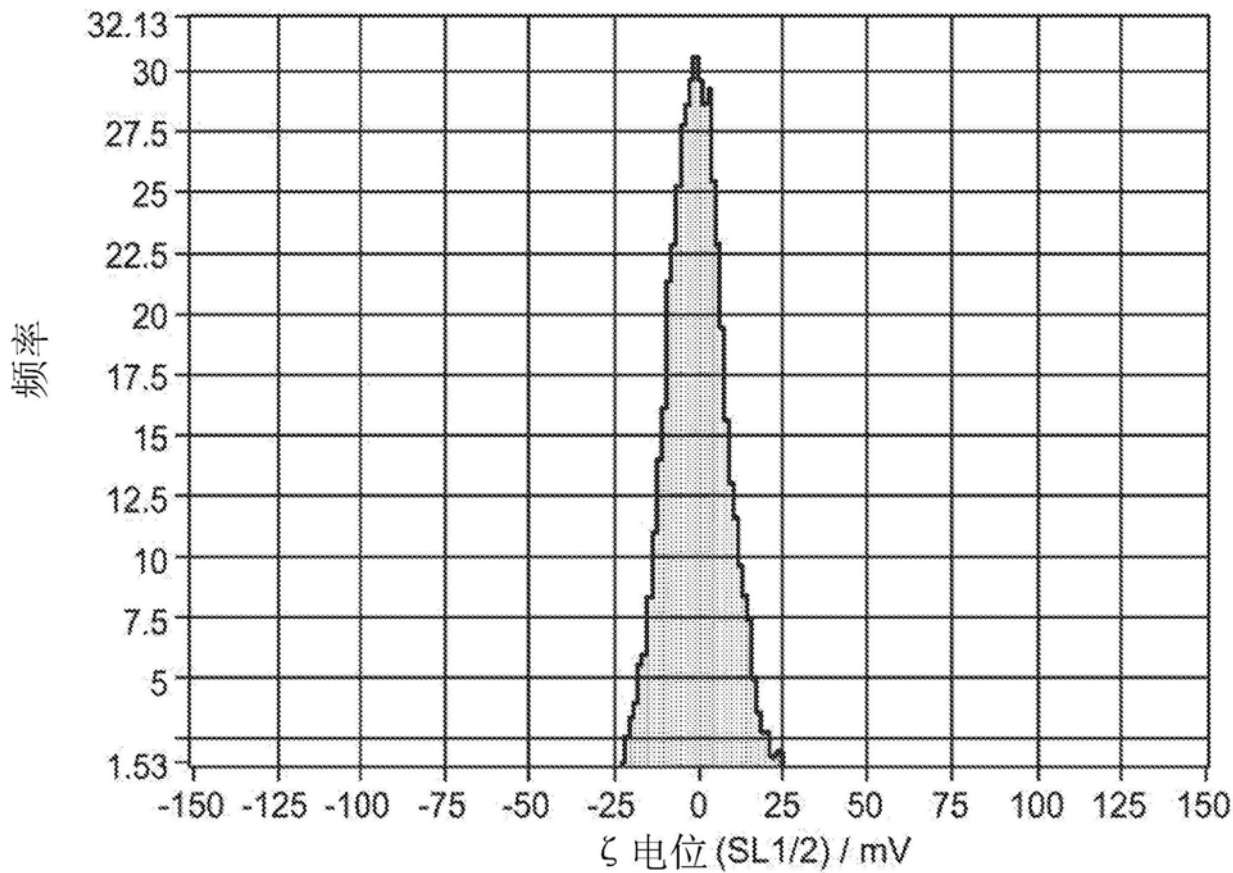


峰分析(绝对数量)

直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
224.4	50.2	149.2	100.0
X值			
	数量	浓度	体积
X10	110.9	110.9	182.7
X50	205.8	205.8	253.2
X90	279.9	279.9	333.5
跨度	0.8	0.8	0.6
均值	209.3	209.3	263.1
标准方差	68.2	68.2	58.4

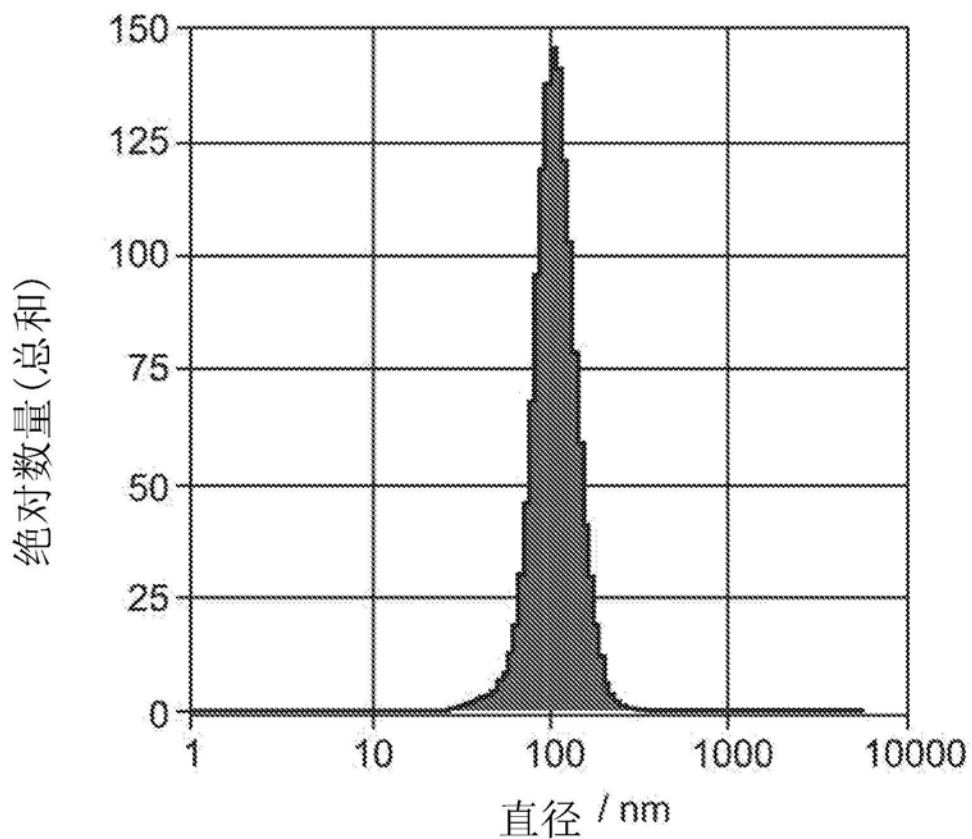
图45(续)

C (续)



迁移性: $-0.03 \pm 0.07 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C: $-0.03 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: 13.7 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: $-0.36 \pm 0.96 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-0.36 \text{ mV FWHM } 21.36 \text{ (SL1/2)}$

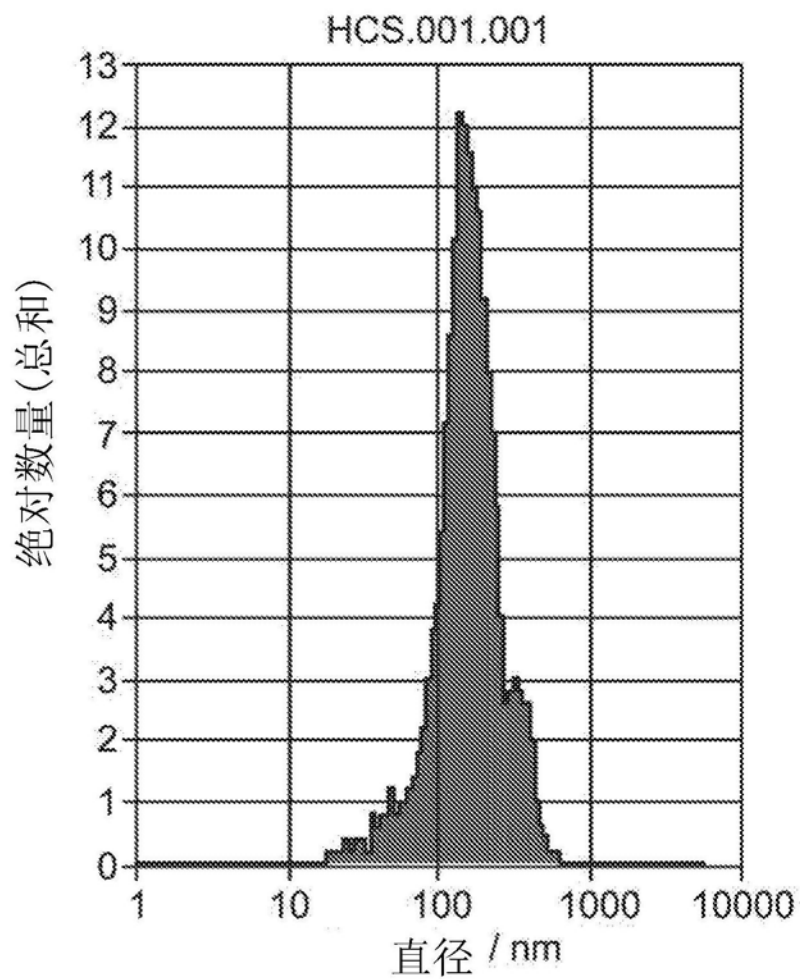
图45 (续)



峰分析(绝对数量)

直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
X值	107.0	145.4	61.0
	数量	浓度	体积
X10	75.9	75.9	91.9
X50	103.2	103.2	124.5
X90	143.6	143.6	180.8
跨度	0.7	0.7	0.7
均值	110.3	110.3	137.0
标准方差	29.6	29.6	40.4

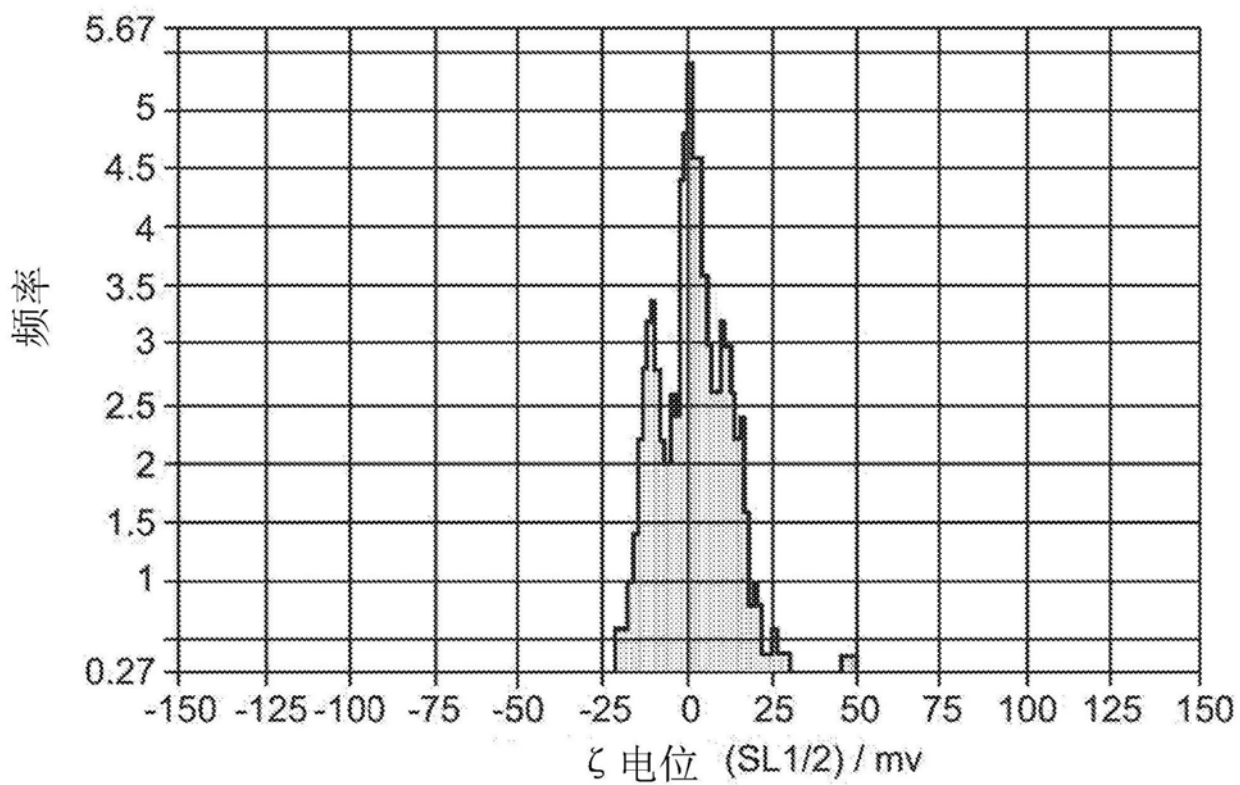
图46



峰分析(绝对数量)

直径/ nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
156.6	11.7	129.3	100.0
X值			
	数量	浓度	体积
X10	82.2	82.2	153.2
X50	150.9	150.9	319.1
X90	277.0	277.0	440.7
跨度	1.3	1.3	0.9
均值	173.5	173.5	308.2
标准方差	85.6	85.6	112.7

图47



迁移性: $0.31 \pm 0.07 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C: $0.33 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: -13.6 (Smoluchowski)
25°C 下 ζ 电位: $4.18 \pm 0.93 \text{ mV}$
ζ 电位分布: 4.18 mV FWHM 10.97 (SL1/2)

图47 (续)

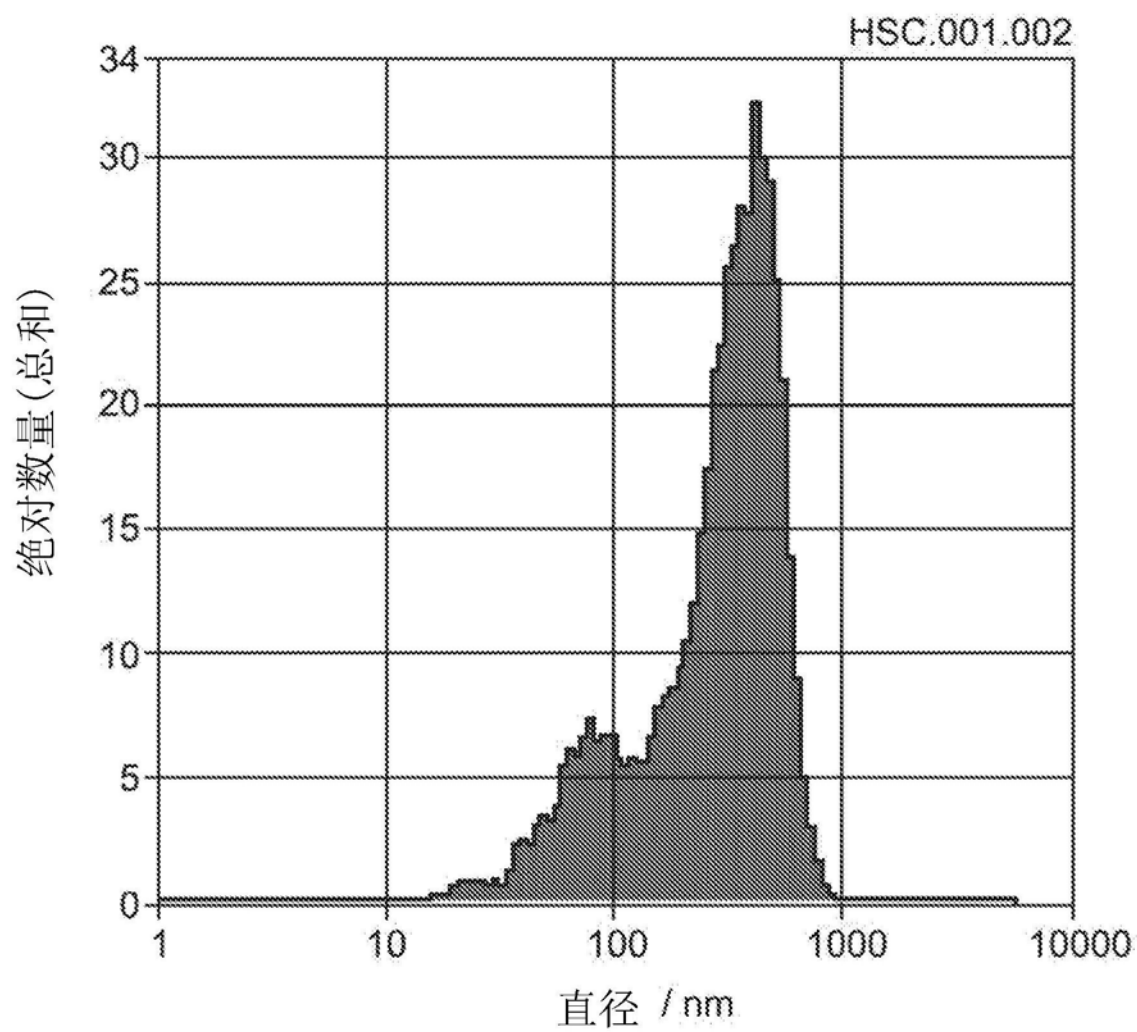
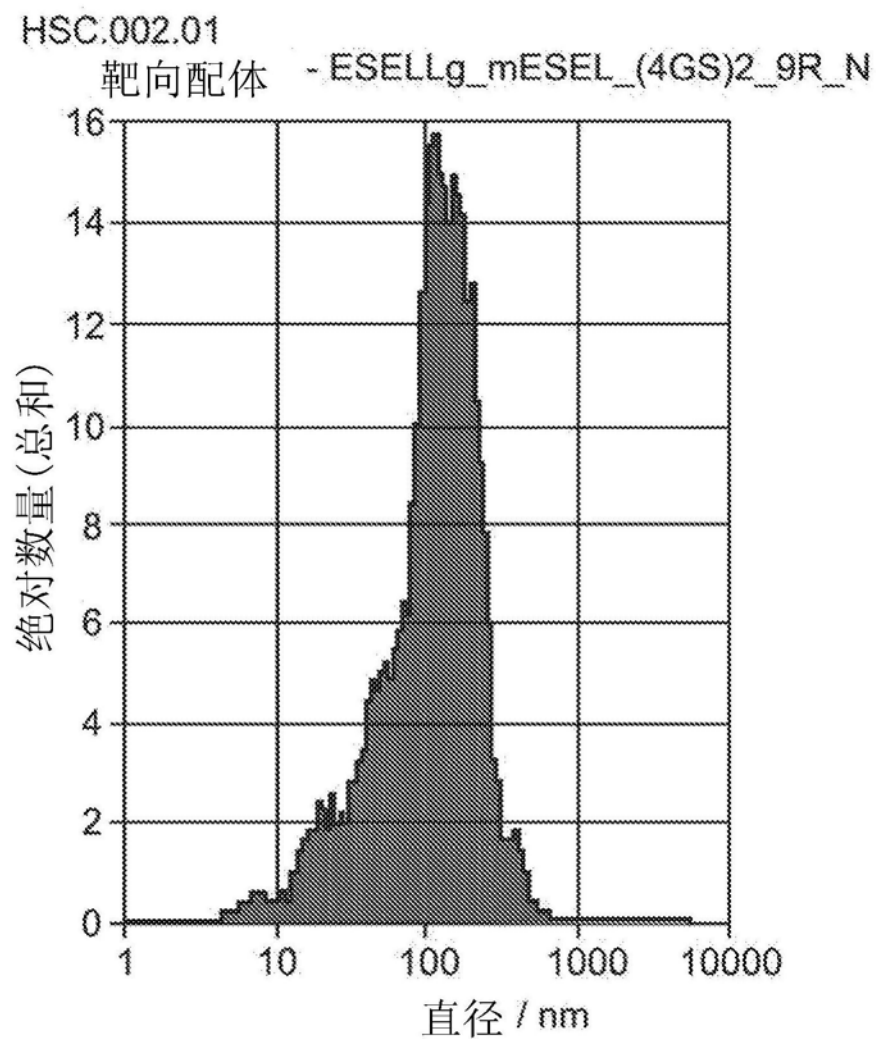


图48



峰分析(绝对数量)

直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
127.3	14.9	161.8	100.0
X值			
	数量	浓度	体积
X10	31.3	31.3	137.3
X50	109.8	109.8	245.7
X90	217.7	217.7	448.7
跨度	1.7	1.7	1.3
均值	126.7	126.7	288.4
标准方差	81.3	81.3	130.0

图49

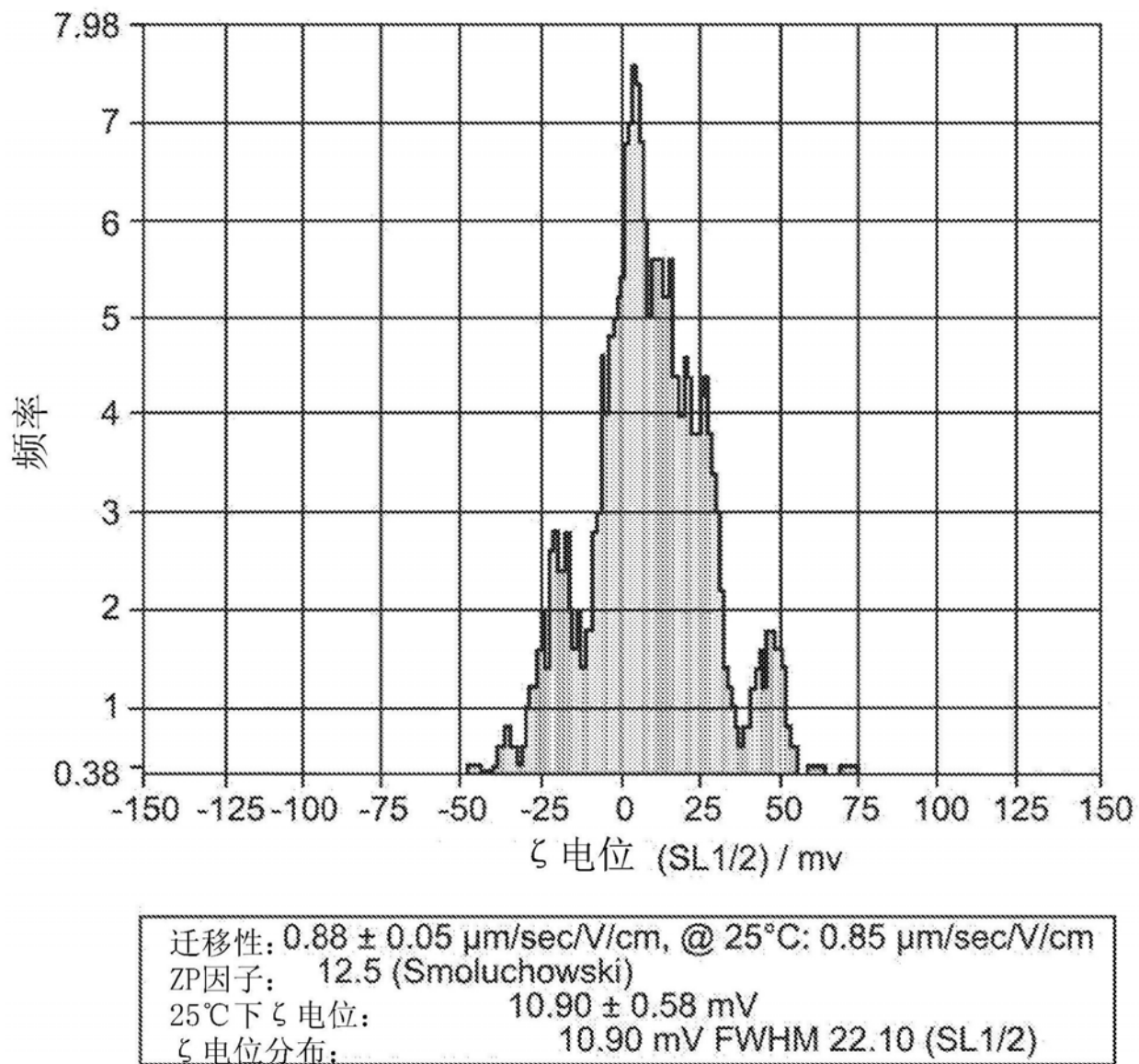
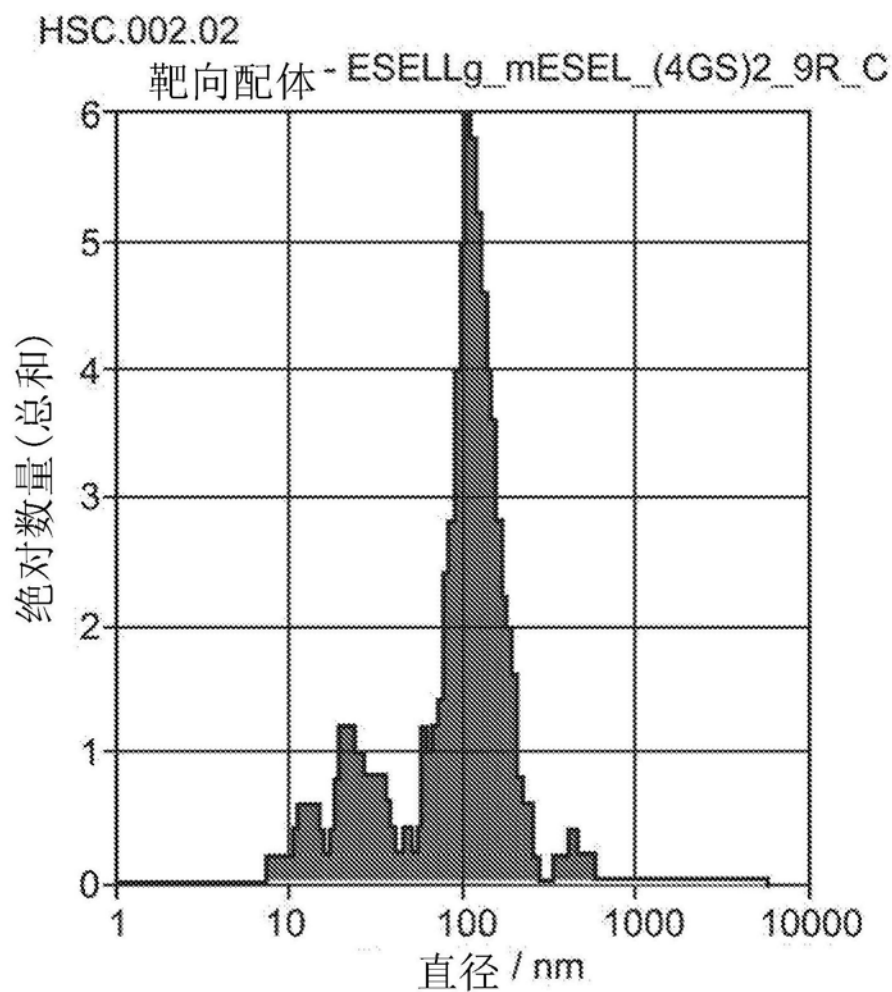


图49 (续)



峰分析(绝对数量)

直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
114.6	5.7	70.3	80.0
23.9	1.1	19.3	20.0
X值			
数量	浓度	体积	
X10	21.4	21.4	114.4
X50	102.0	102.0	373.5
X90	166.0	166.0	473.5
跨度	1.4	1.4	1.0
均值	108.9	108.9	319.5
标准方差	74.5	74.5	153.6

图50

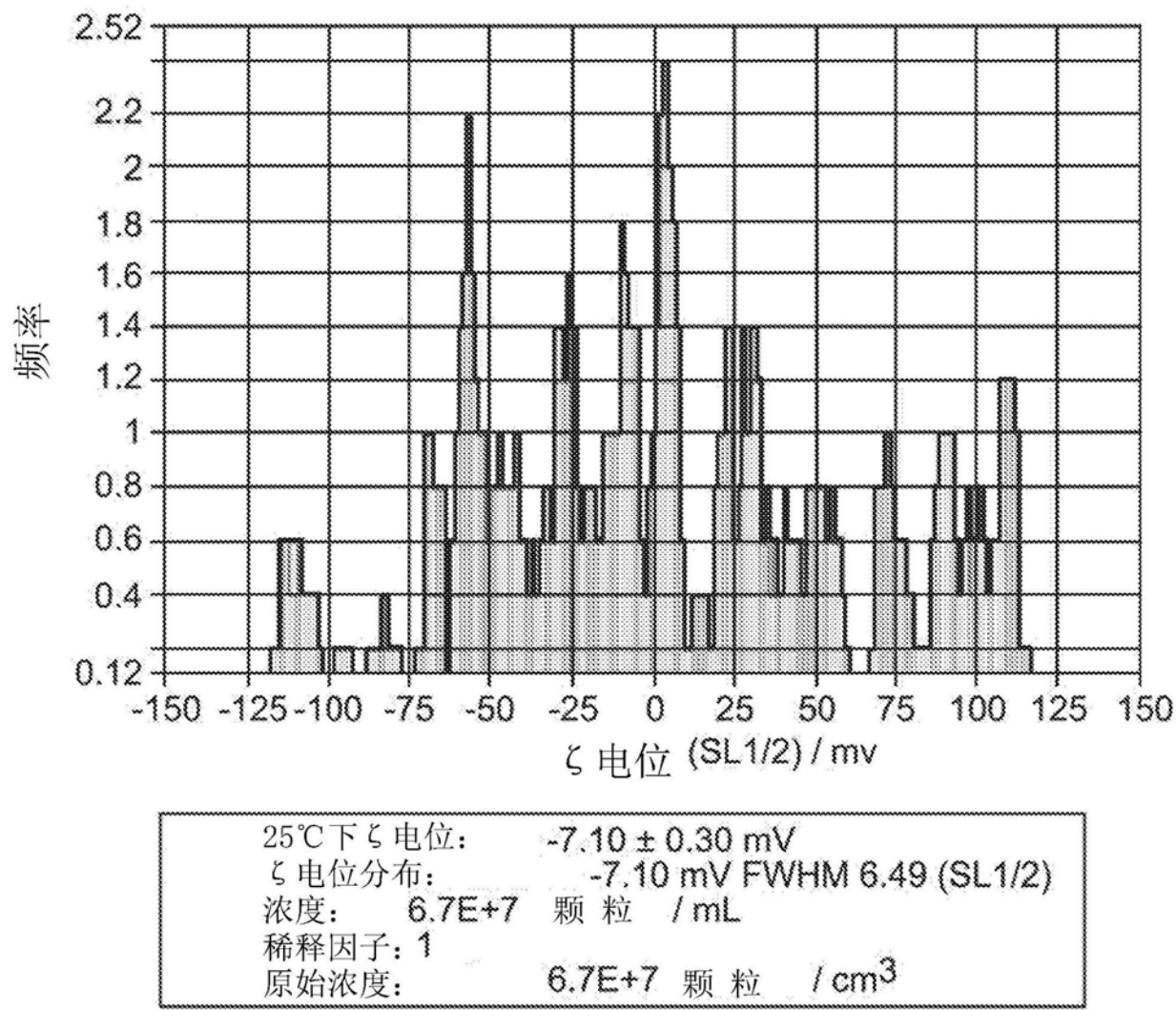
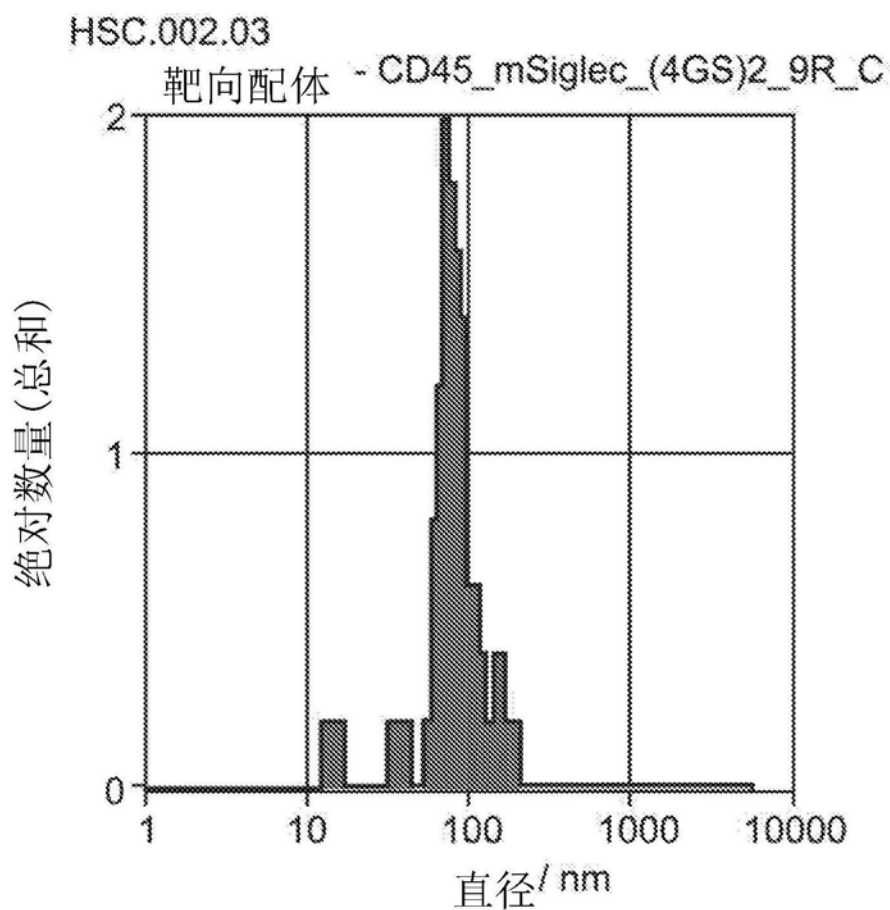


图50 (续)



峰分析(绝对数量)			
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
78.2	1.8	32.3	100.0
X值			
	数量	浓度	体积
X10	36.7	36.7	70.9
X50	75.4	75.4	130.6
X90	132.6	132.6	167.8
跨度	1.3	1.3	0.7
均值	82.6	82.6	124.1
标准方差	35.3	35.3	42.6

图51

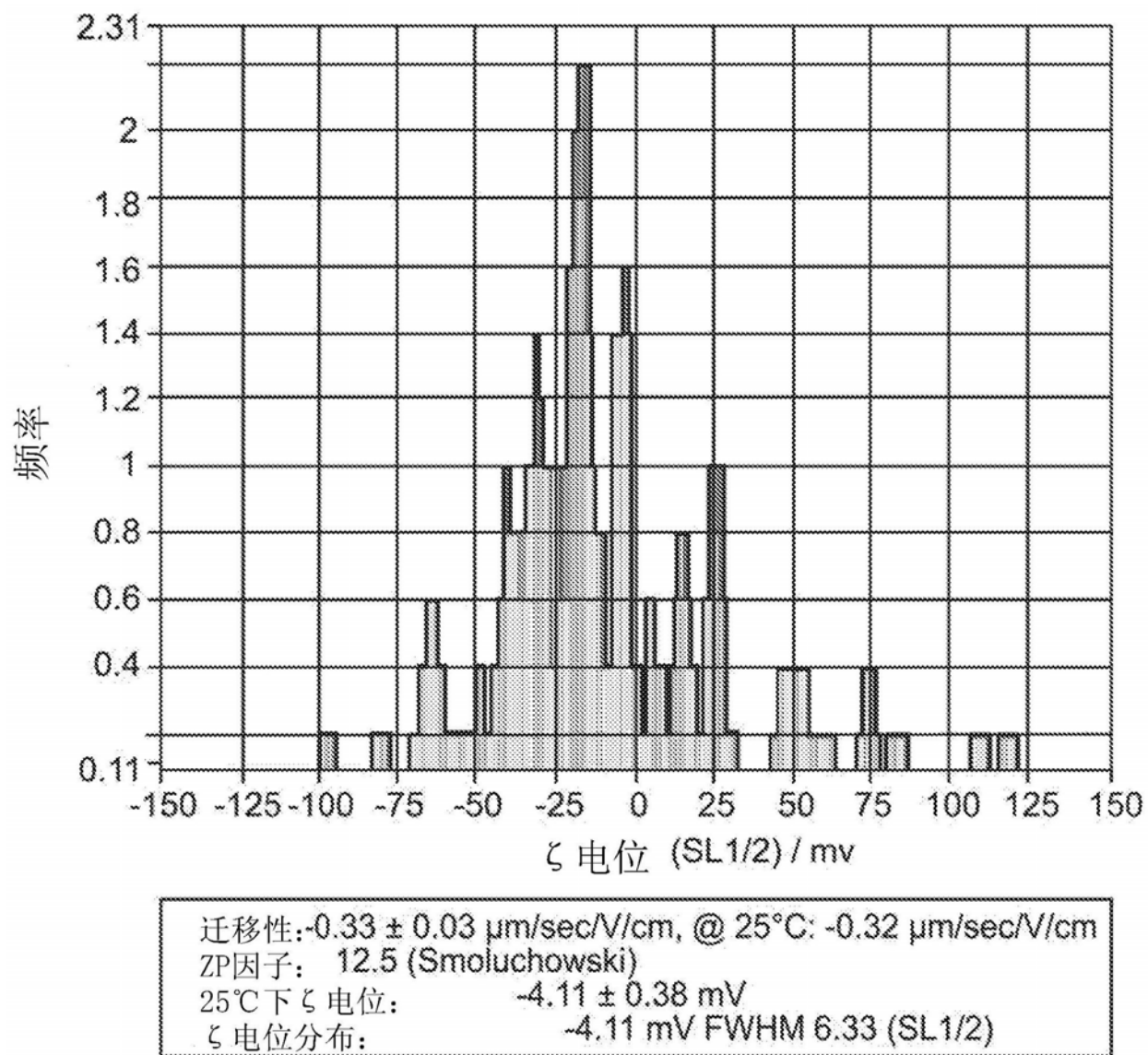
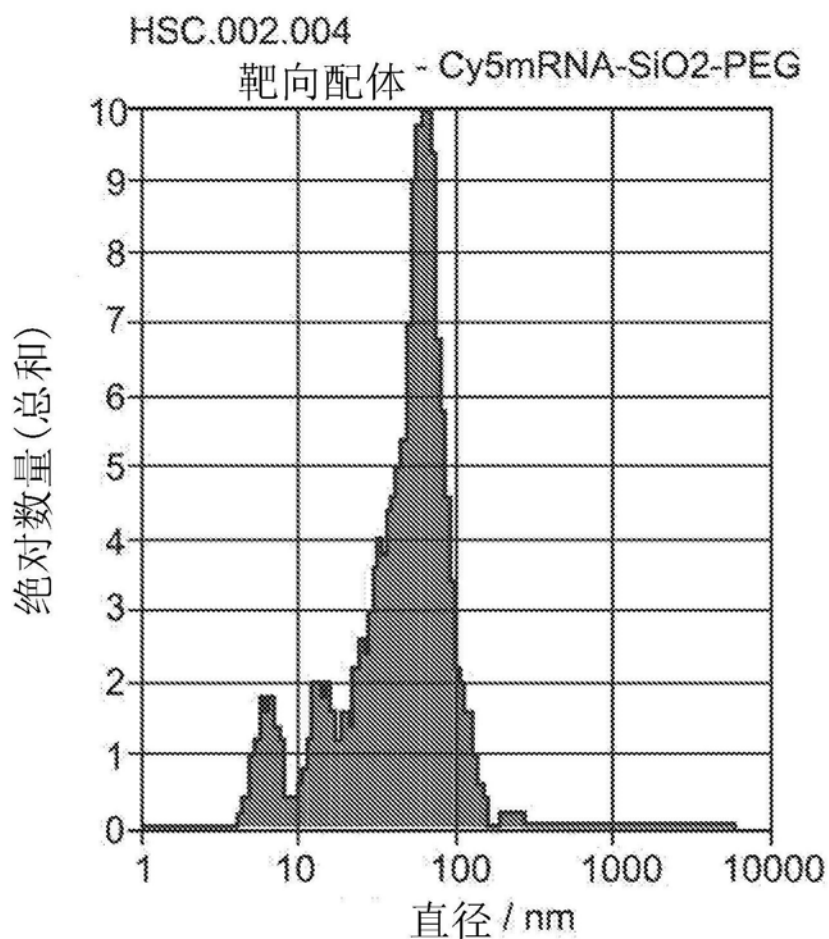


图51 (续)



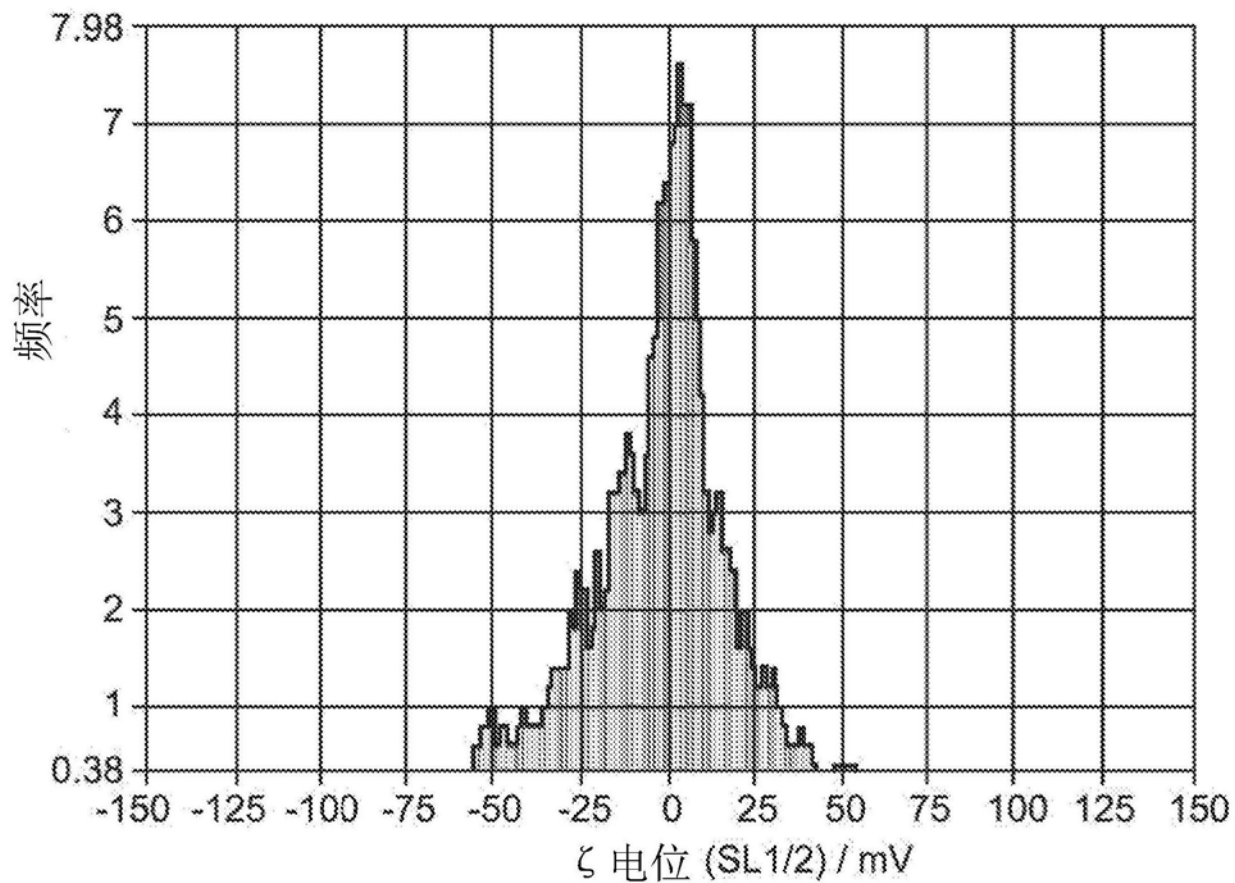
峰分析(绝对数量)

直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
60.8	9.8	40.9	83.8
15.2	2.0	5.9	8.7
6.3	1.6	2.9	7.5

X值

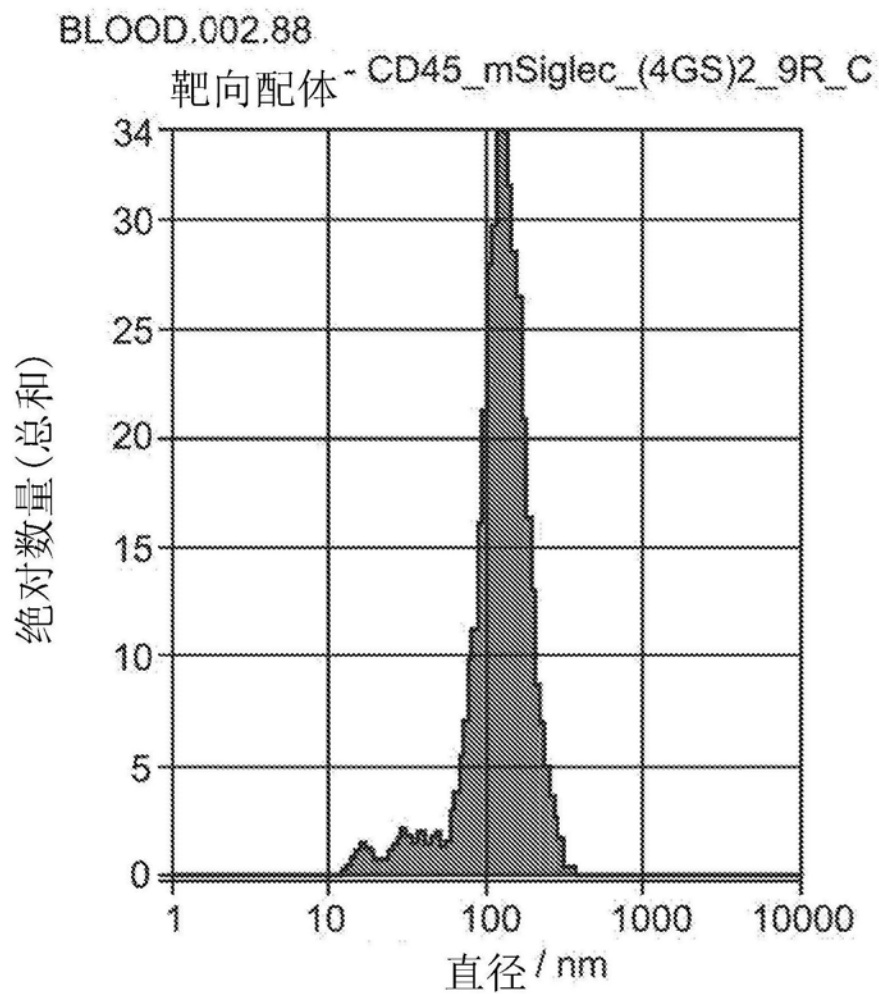
	数量	浓度	体积
X10	12.2	12.2	54.9
X50	50.5	50.5	90.0
X90	79.6	79.6	219.1
跨度	1.3	1.3	1.8
均值	51.1	51.1	117.2
标准方差	31.0	31.0	64.8

图52



迁移性: $-0.15 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, @ 25°C : $-0.15 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$
ZP因子: 12.4 (Smoluchowski)
25°C下ζ 电位: $-1.86 \pm 0.58 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-1.86 \text{ mV FWHM } 15.86 \text{ (SL1/2)}$

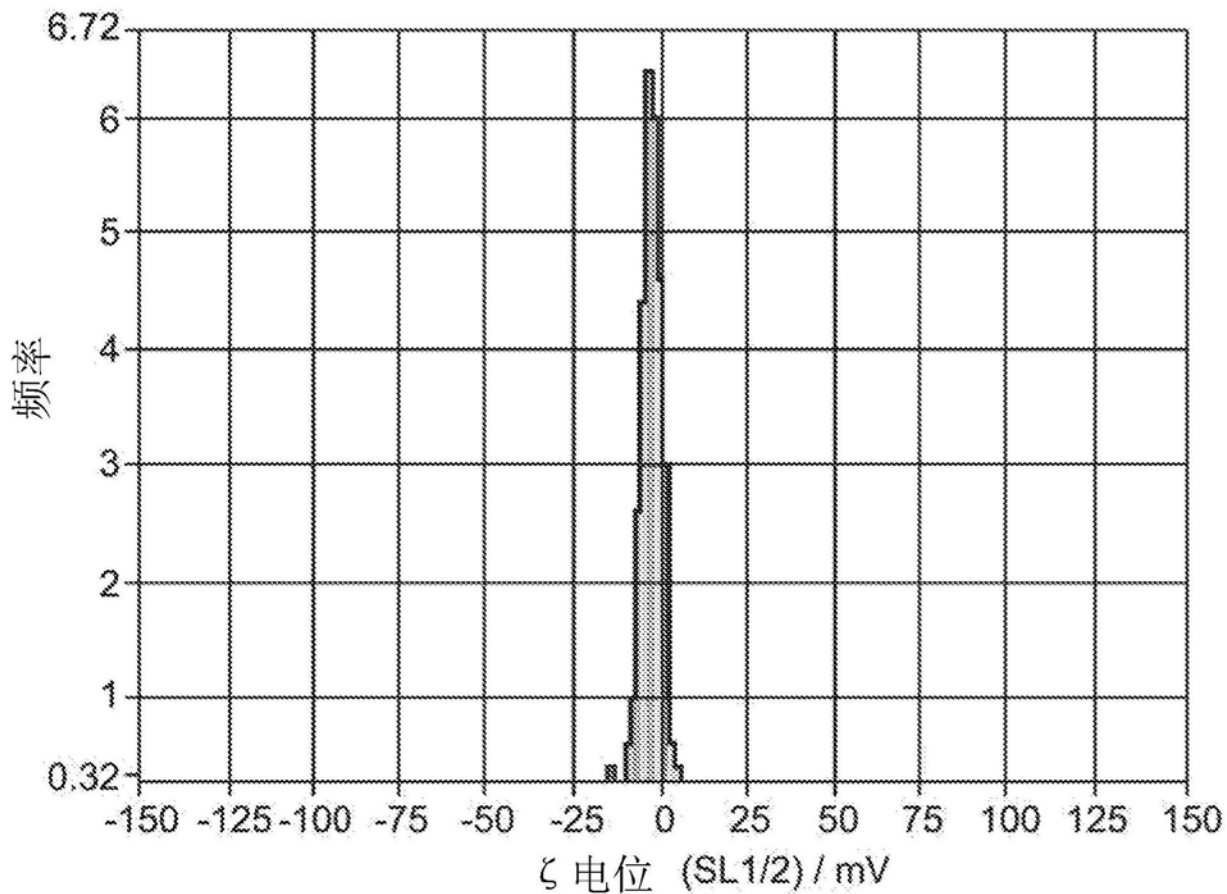
图52(续)



峰分析(绝对数量)

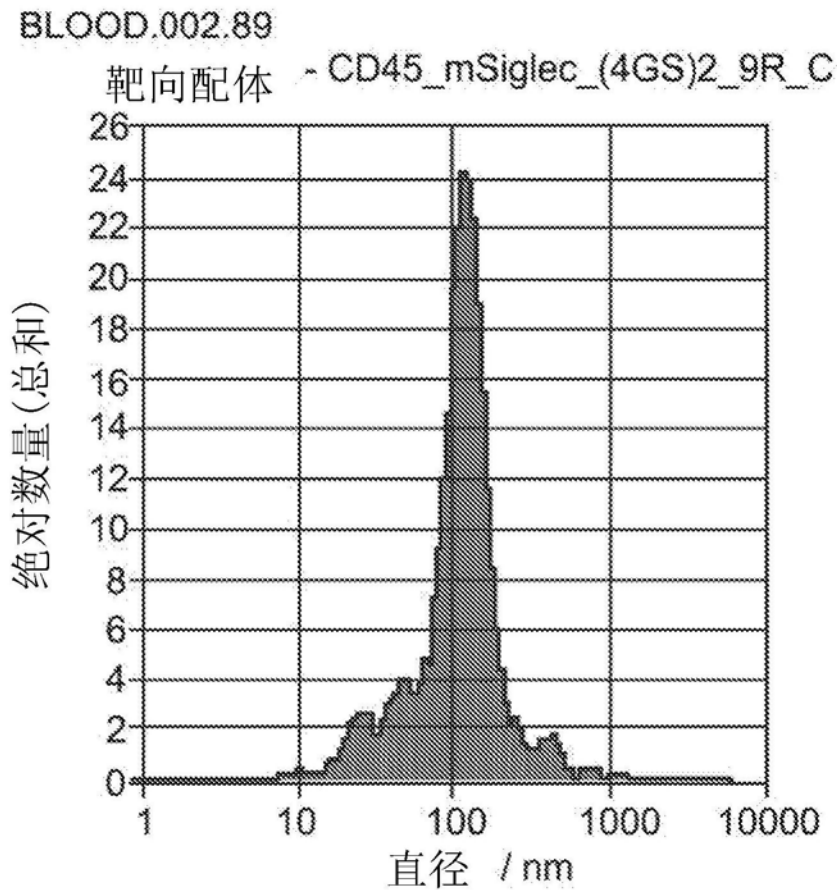
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
129.1	34.0	88.1	100.0
X值			
	数量	浓度	体积
X10	69.0	69.0	111.6
X50	120.1	120.1	164.4
X90	179.8	179.8	246.4
跨度	0.9	0.9	0.8
均值	128.4	128.4	177.9
标准方差	48.5	48.5	53.0

图53



迁移性: $-0.26 \pm 0.02 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C: $-0.26 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: 12.8 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: $-3.32 \pm 0.29 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-3.32 \text{ mV FWHM } 7.13 \text{ (SL1/2)}$

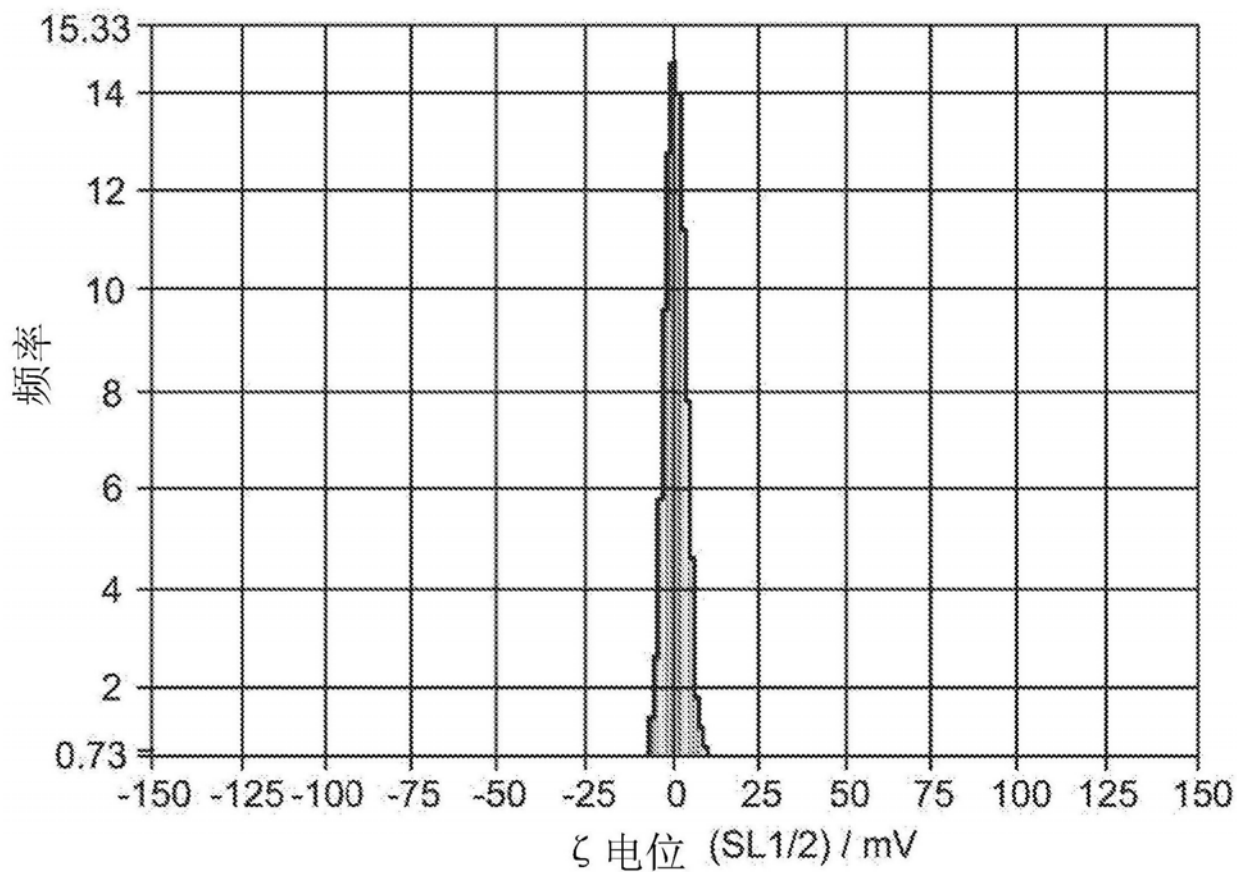
图53 (续)



峰分析(绝对数量)

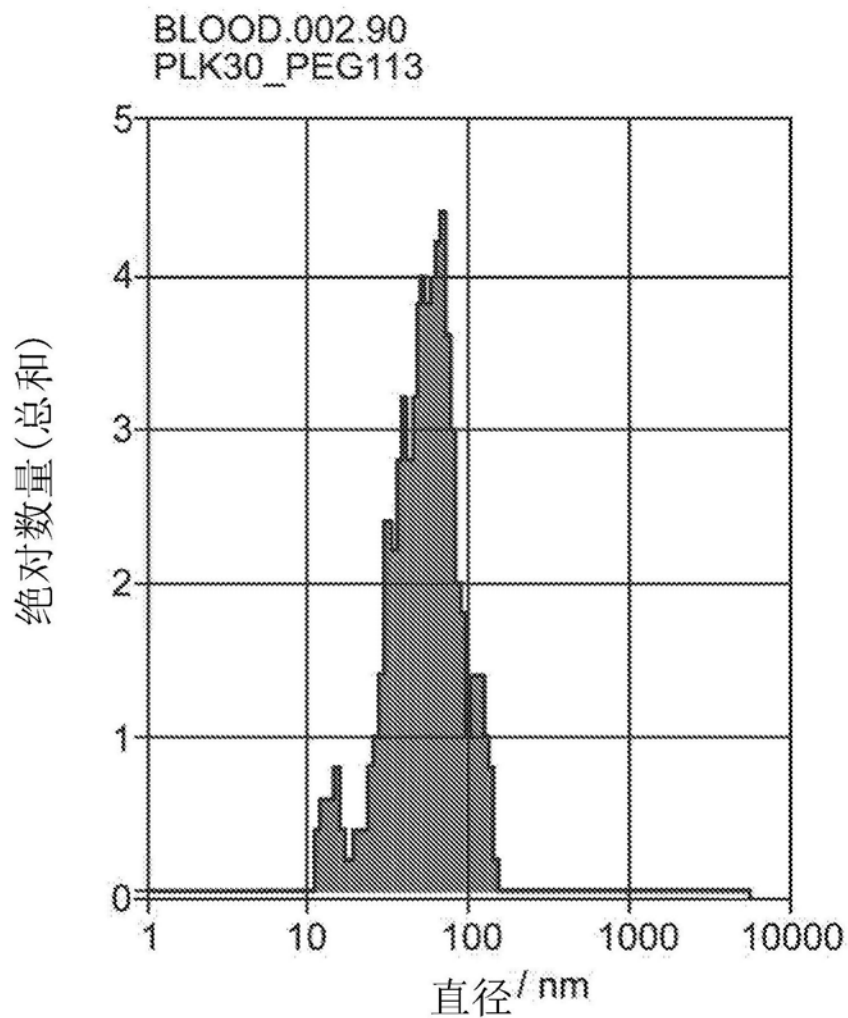
直径 /nm	绝对数量	FWHM/nm	百分比
117.1	24.1	72.3	100.0
X值	数量	浓度	体积
X10	40.1	40.1	156.8
X50	108.4	108.4	705.8
X90	175.4	175.4	1086.1
跨度	1.2	1.2	1.3
均值	126.0	126.0	710.0
标准方差	103.9	103.9	363.6

图54



迁移性: $-0.02 \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, @ 25°C: $-0.02 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$
ZP因子: 12.9 (Smoluchowski)
25°C 下 ζ 电位: $-0.25 \pm 0.12 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-0.25 \text{ mV FWHM } 7.51 \text{ (SL1/2)}$

图54 (续)

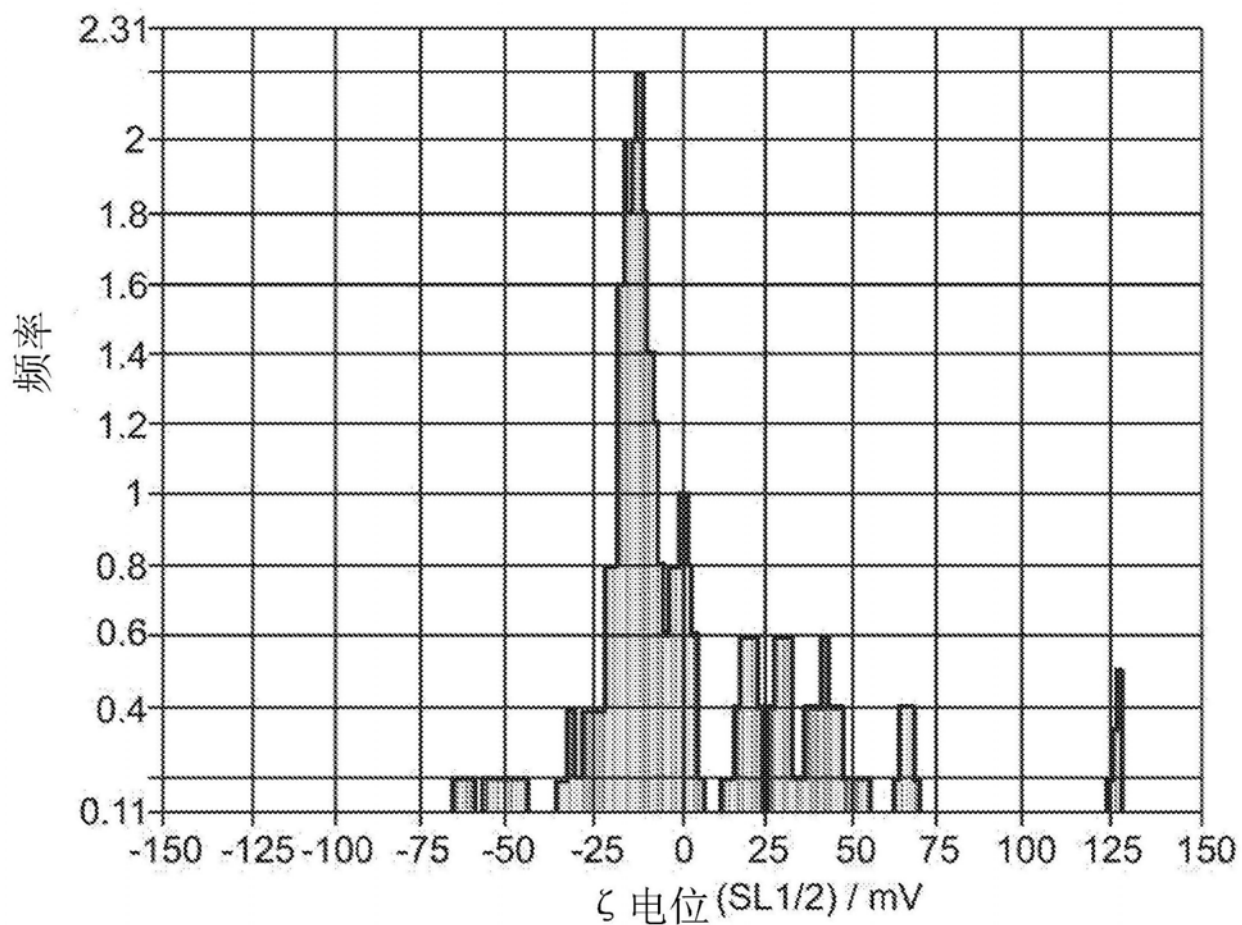


峰分析(绝对数量)

直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
60.1	4.0	49.7	94.8
14.4	0.6	4.8	5.2

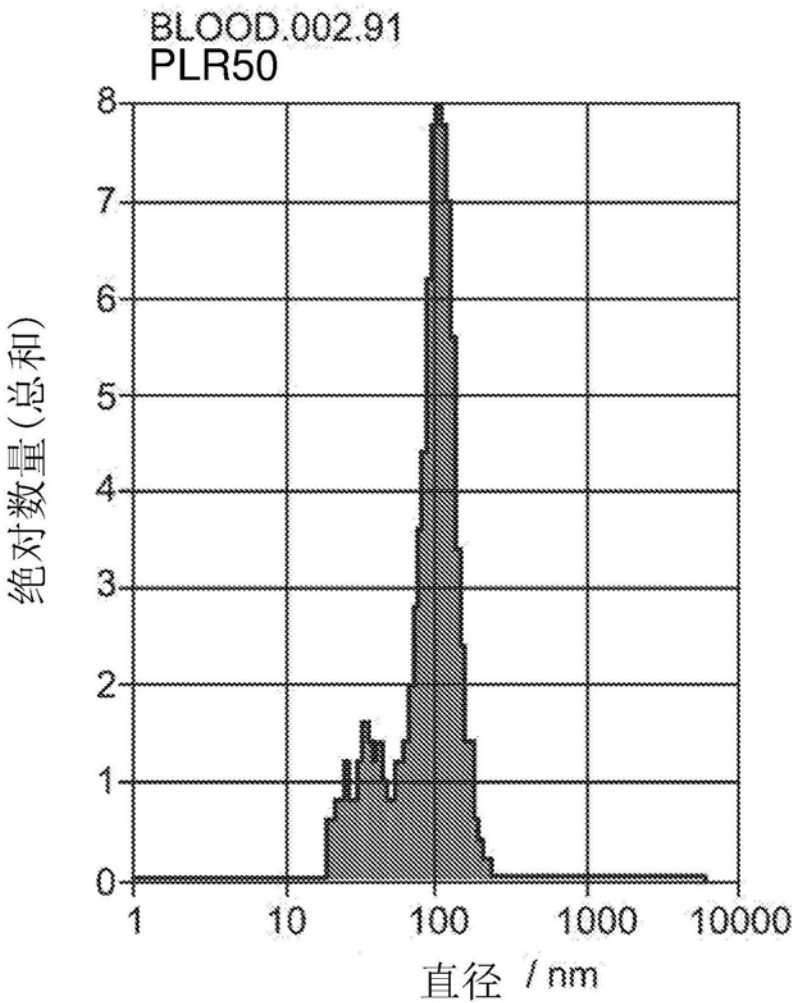
X值	数量	浓度	体积
X10	27.4	27.4	54.0
X50	53.4	53.4	89.3
X90	98.8	98.8	121.0
跨度	1.3	1.3	0.8
均值	58.1	58.1	92.6
标准方差	27.3	27.3	29.1

图55



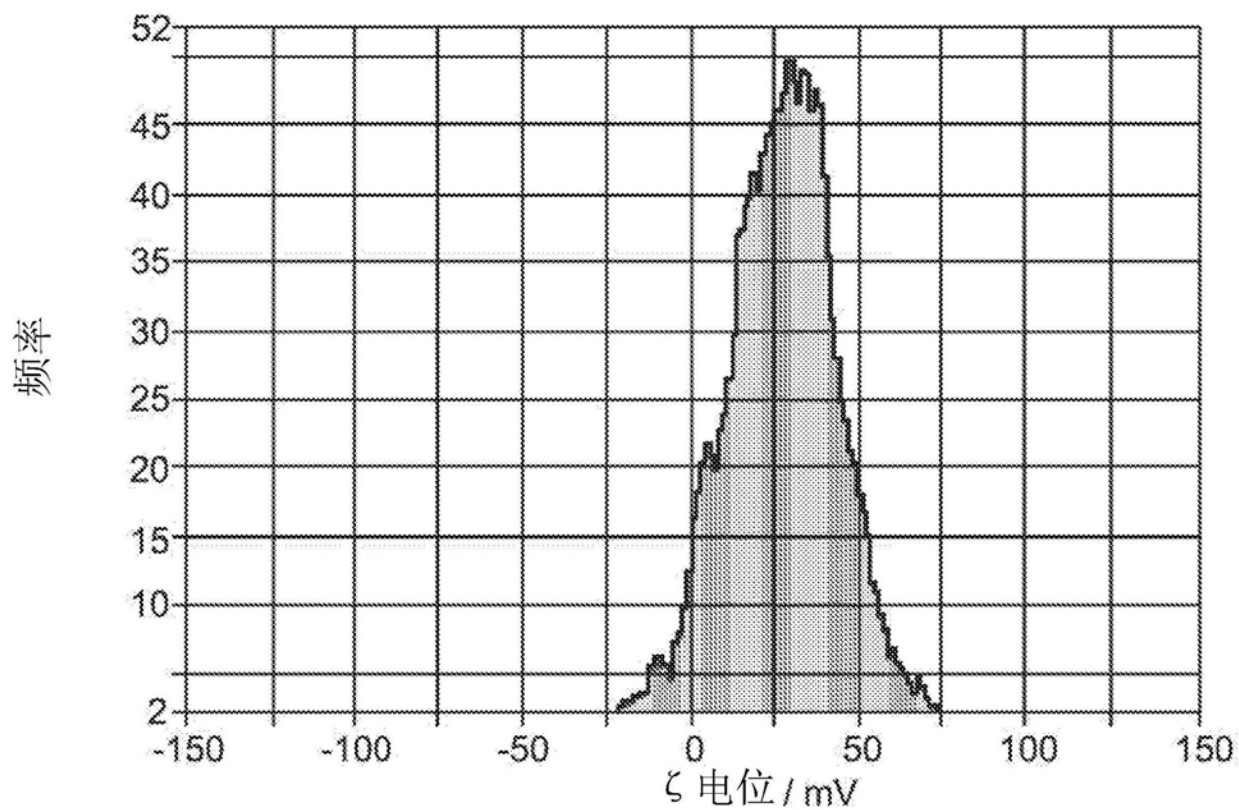
迁移性: $0.20 \pm 0.03 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C : $0.20 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: 12.9 (Smoluchowski)
25°C下ζ 电位: $2.54 \pm 0.34 \text{ mV}$
ζ 电位分布: 2.54 mV FWHM 11.52 (SL1/2)

图55 (续)



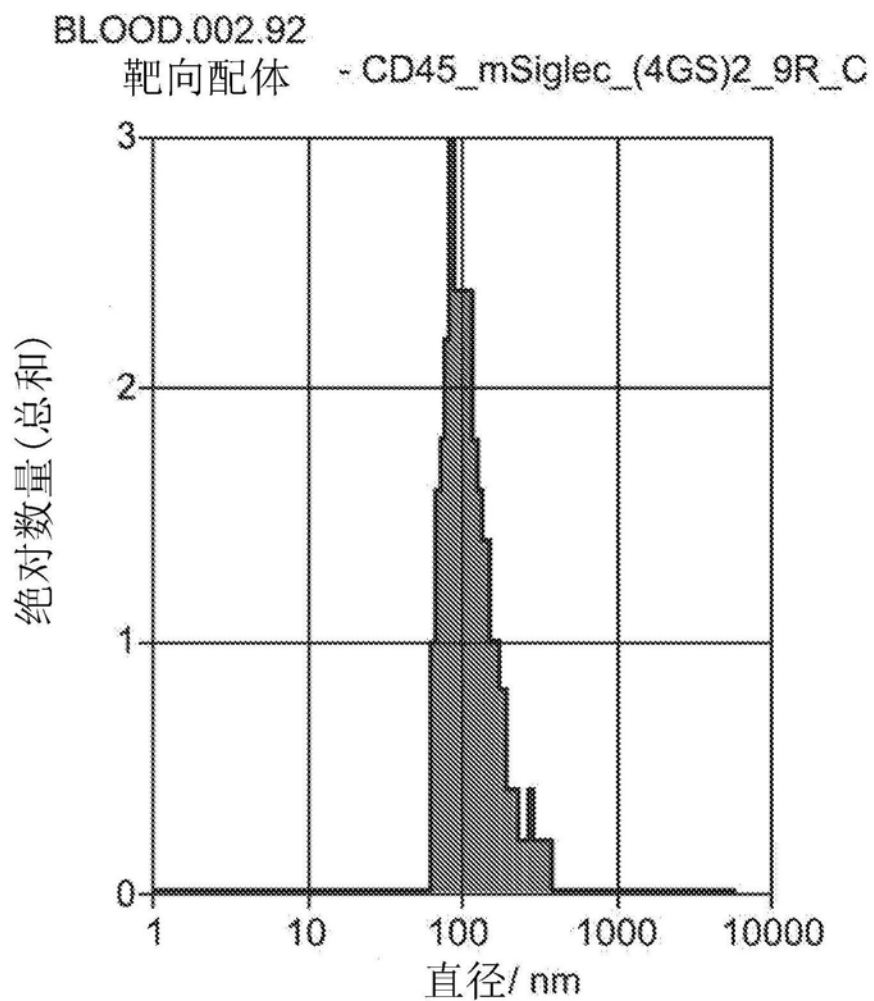
峰分析(绝对数量)			
直径/ nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
106.7	8.0	53.7	83.1
37.9	1.4	18.9	16.9
X值	数量	浓度	体积
X10	36.1	36.1	88.5
X50	98.5	98.5	115.5
X90	129.1	129.1	165.2
跨度	0.9	0.9	0.7
均值	94.6	94.6	126.4
标准方差	36.7	36.7	31.6

图56



迁移性: 2.09 FWHM 2.69 $\mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, @ 25°C: 2.12 $\mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$
ZP因子: 12.9 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: 27.10 FWHM 18.40 mV
浓度: 3.6E+7 颗粒 / mL

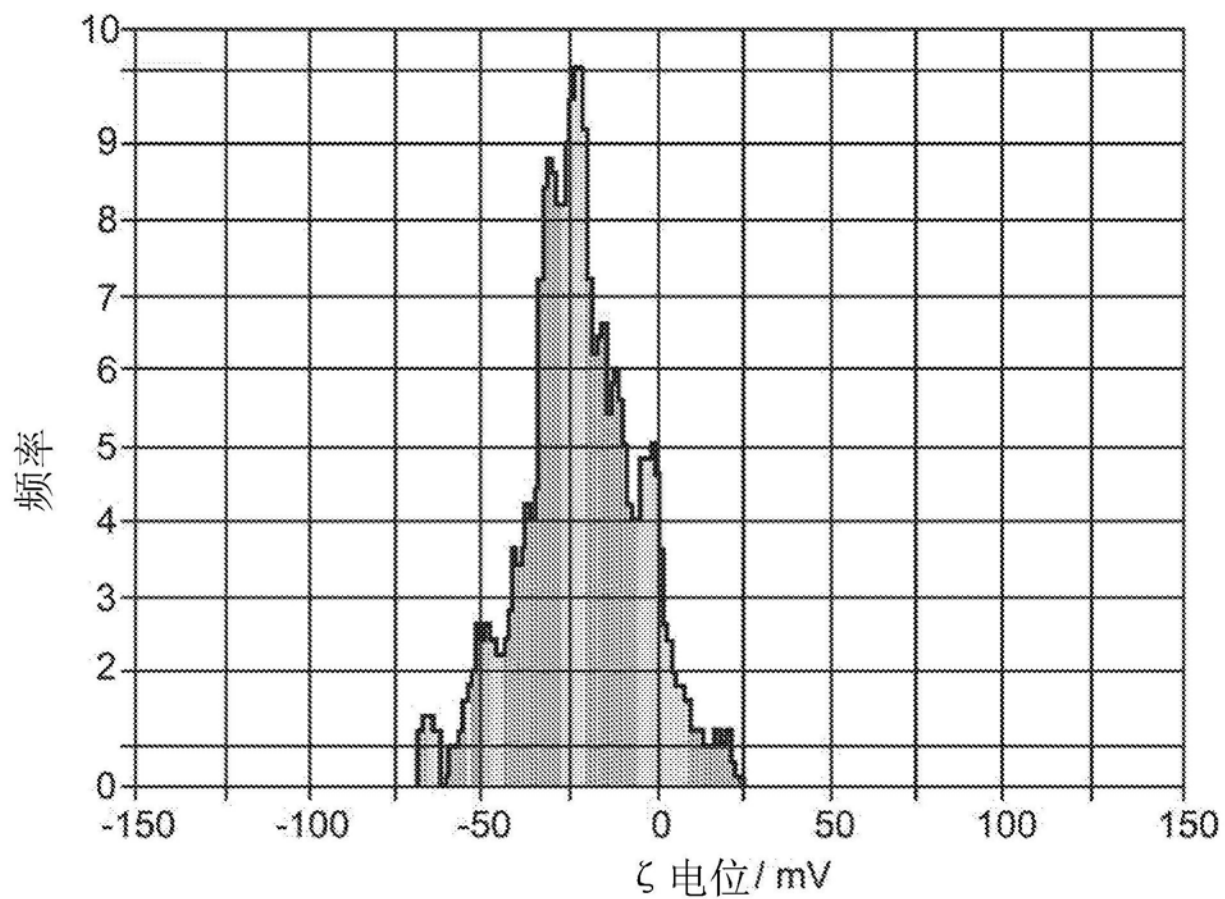
图56 (续)



峰分析(绝对数量)

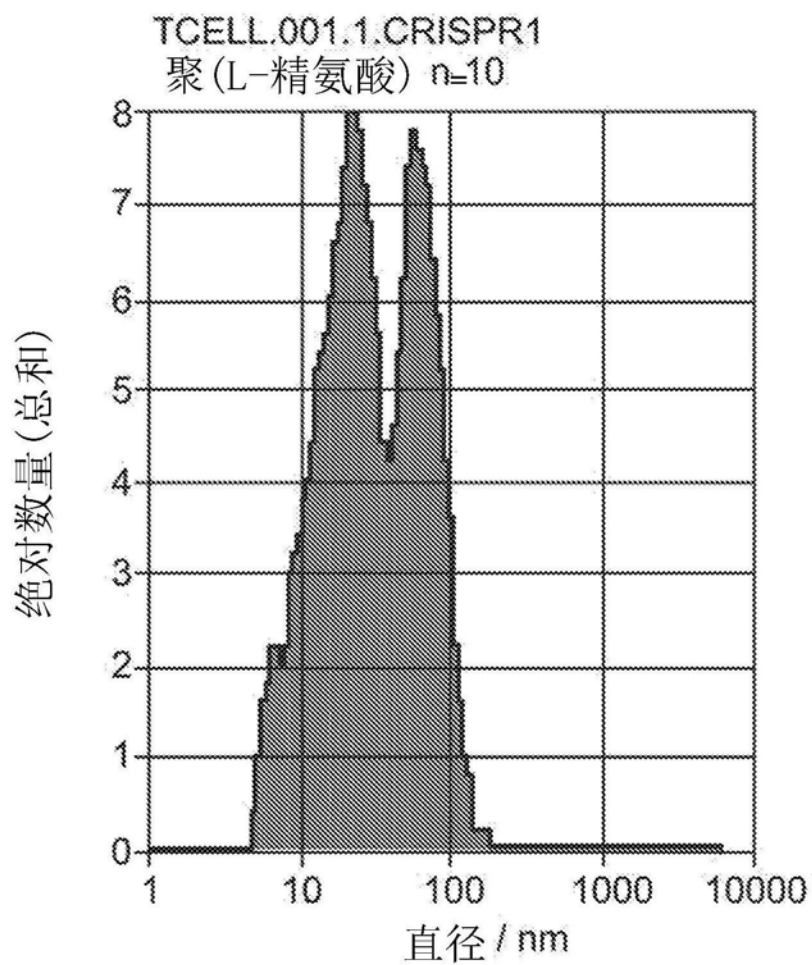
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
95.8	2.4	65.5	100.0
X值	数量	浓度	体积
X10	72.8	72.8	98.4
X50	100.3	100.3	194.2
X90	170.0	170.0	312.4
跨度	1.0	1.0	1.1
均值	120.8	120.8	215.5
标准方差	54.0	54.0	86.4

图57



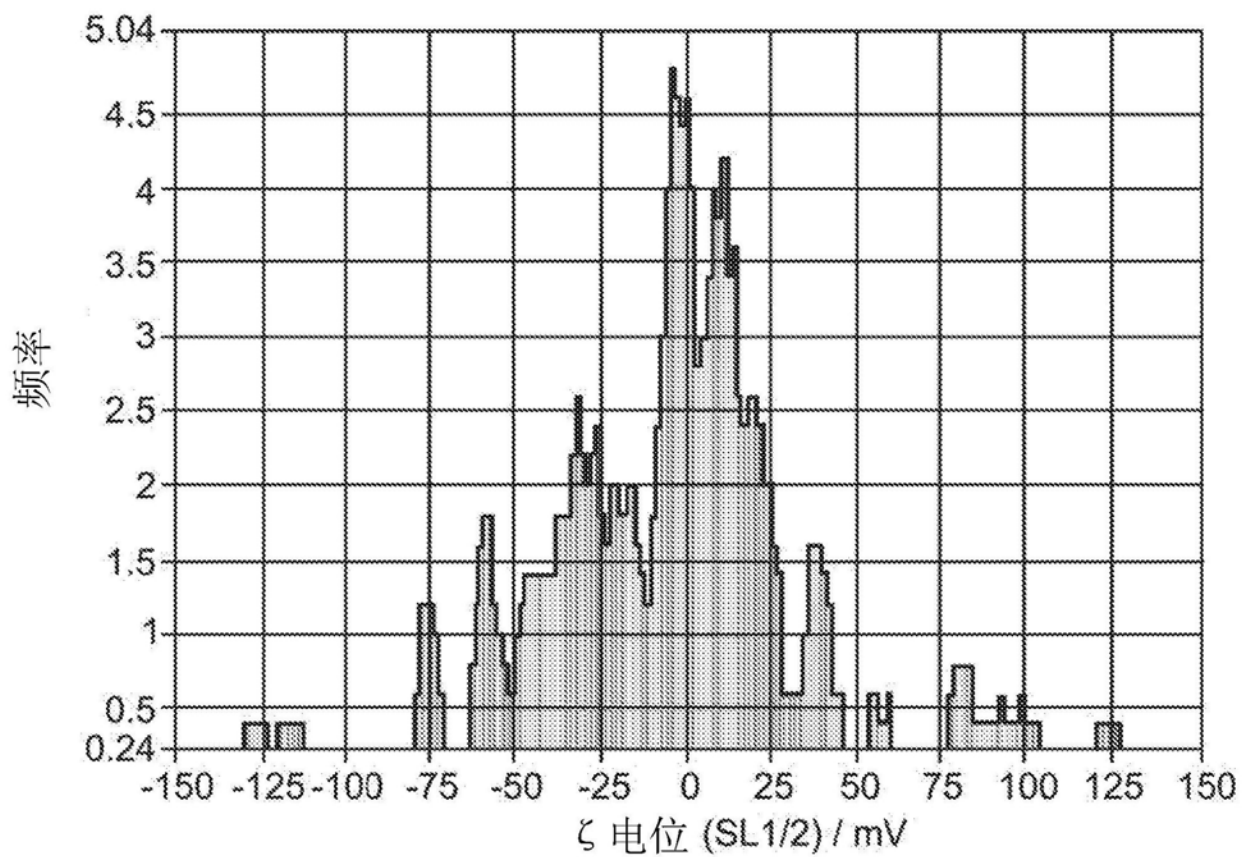
迁移性: -1.73 FWHM 1.98 $\mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, @ 25°C: -1.73 $\mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$
ZP因子: 12.8 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: -22.16 FWHM 19.85 mV
浓度: 5.2E+6 颗粒 / mL

图57 (续)



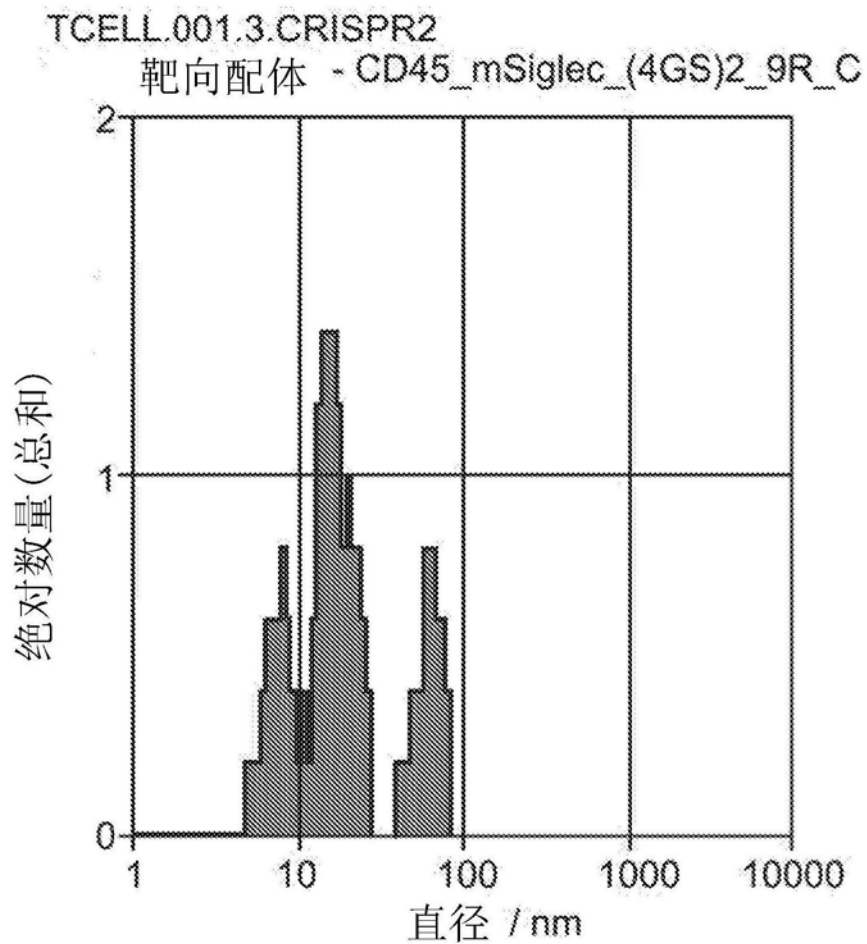
峰分析(绝对数量)			
直径/nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
22.7	8.0	25.9	60.4
61.5	7.6	55.1	39.6
X值	数量	浓度	体积
X10	9.9	9.9	50.3
X50	27.4	27.4	81.1
X90	76.9	76.9	112.3
跨度	2.4	2.4	0.8
均值	38.6	38.6	85.9
标准方差	27.6	27.6	29.9

图58



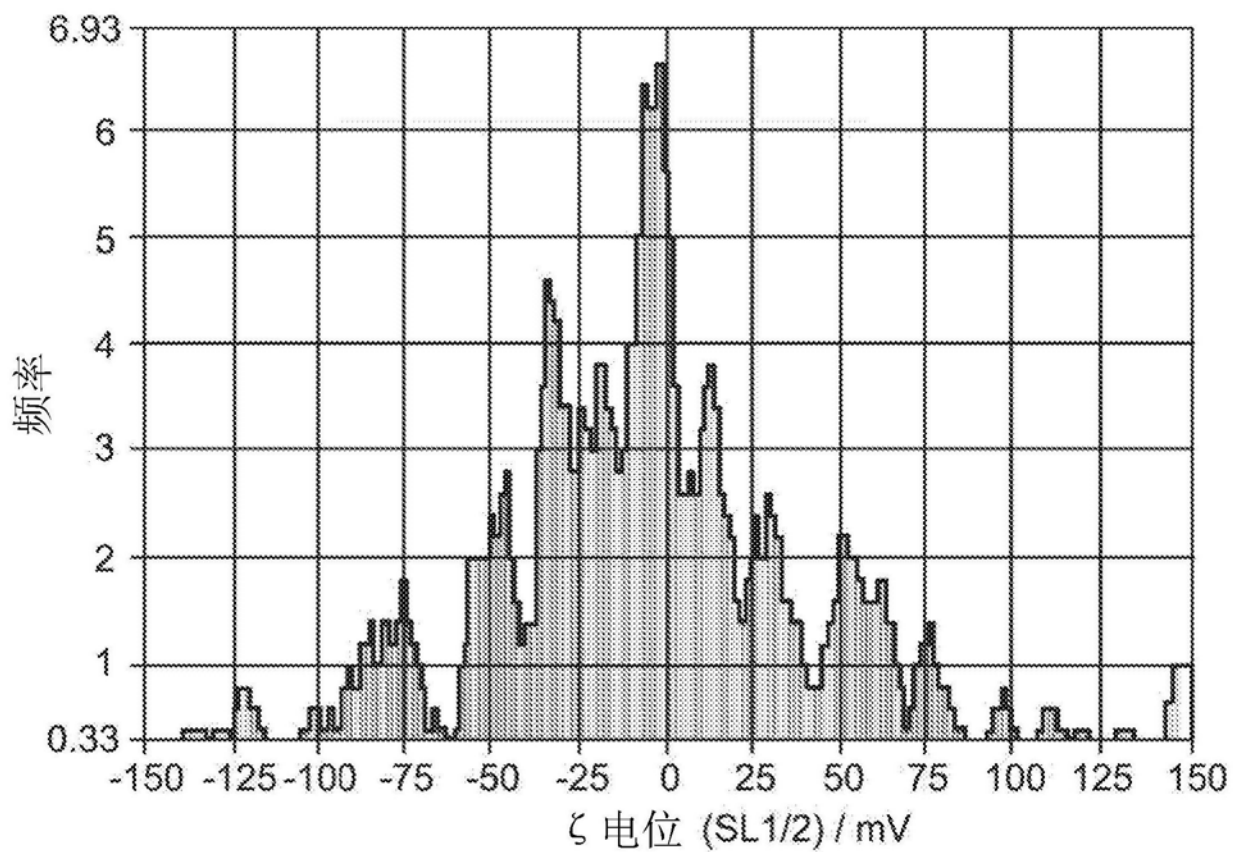
迁移性: $-0.22 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, @ 25°C : $-0.25 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$
ZP因子: 14.8 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: $-3.24 \pm 0.32 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-3.24 \text{ mV FWHM } 26.36 \text{ (SL1/2)}$
浓度: $4.1\text{E}+7$ 颗粒 / mL

图58(续)



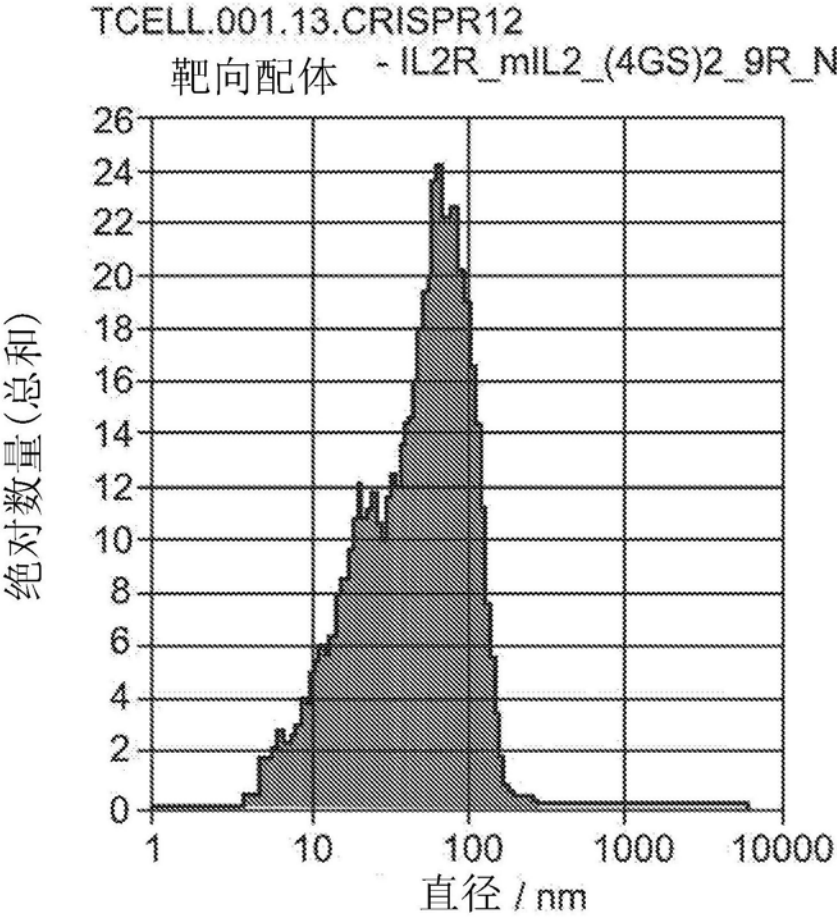
峰分析(绝对数量)			
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
16.3	1.4	11.4	56.4
62.9	0.8	23.4	22.7
7.7	0.6	3.2	20.9
X值	数量	浓度	体积
X10	7.2	7.2	44.8
X50	15.3	15.3	65.2
X90	64.2	64.2	68.8
跨度	3.7	3.7	0.4
均值	25.2	25.2	62.3
标准方差	21.2	21.2	NaN

图59



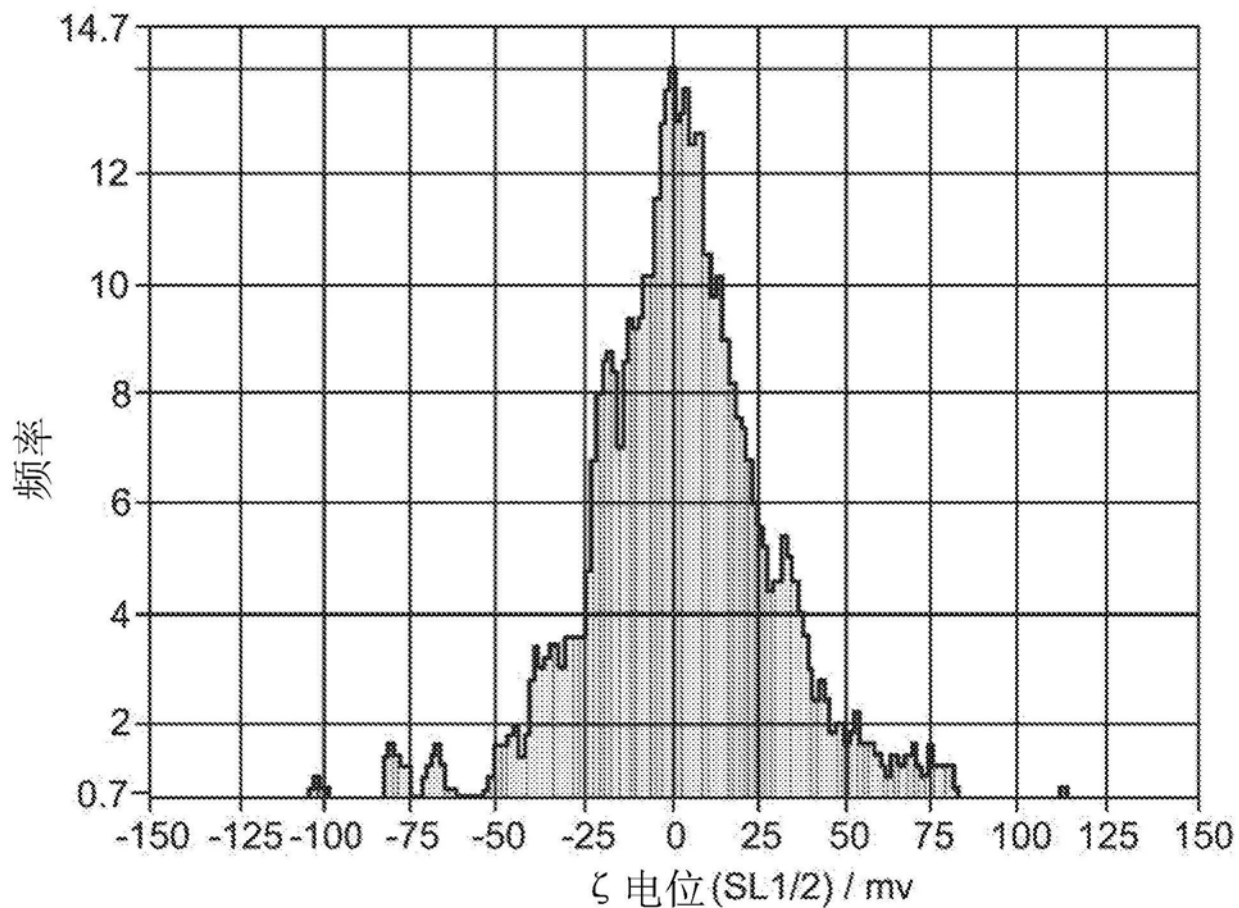
迁移性: $-0.07 \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, @ 25°C : $-0.08 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$
ZP因子: 14.7 (Smoluchowski)
25°C下ζ电位: $-0.98 \pm 0.08 \text{ mV}$
ζ电位分布: -98 mV FWHM 11.33 (SL1/2)
浓度: $7.2\text{E}+7$ 颗粒 / mL

图59(续)



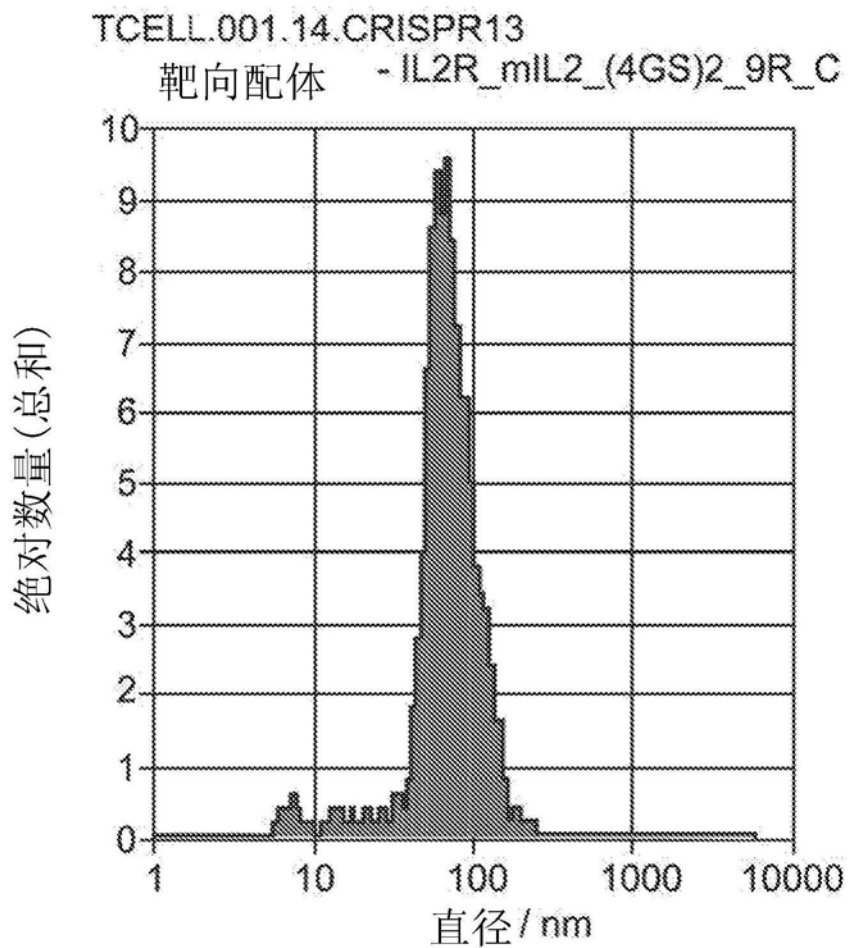
峰分析(绝对数量)			
直径/ nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
69.6	22.2	83.8	100.0
X值	数量	浓度	体积
X10	13.0	13.0	62.5
X50	49.7	49.7	102.0
X90	100.7	100.7	156.9
跨度	1.8	1.8	0.9
均值	55.1	55.1	112.2
标准方差	35.6	35.6	43.8

图60



迁移性: $0.15 \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, @ 25°C : $0.17 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$
ZP因子: 14.8 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: $2.19 \pm 0.08 \text{ mV}$
ζ 电位分布: 2.19 mV FWHM 42.28 (SL1/2)
浓度: $6.5\text{E}+7$ 颗粒 / mL

图60 (续)



峰分析(绝对数量)

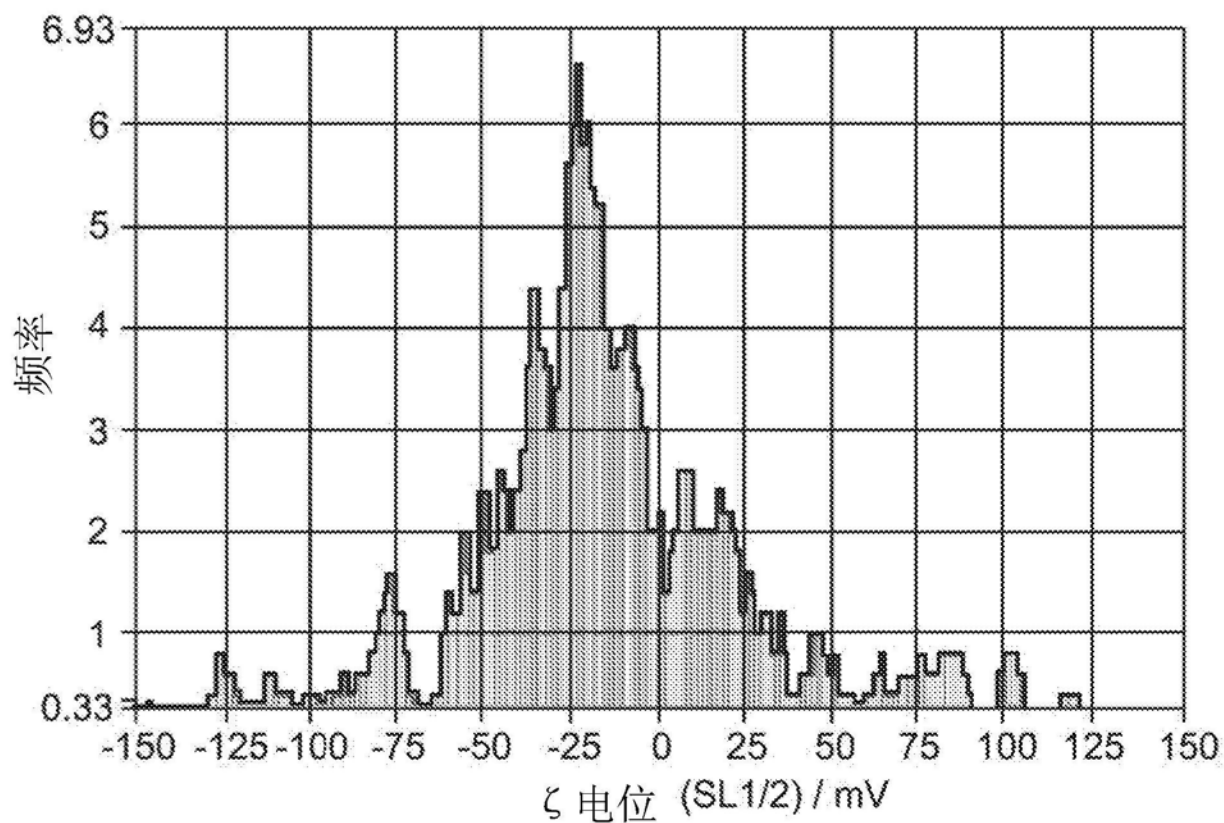
直径 / nm
67.6

绝对数量
9.2

FWHM / nm
49.2

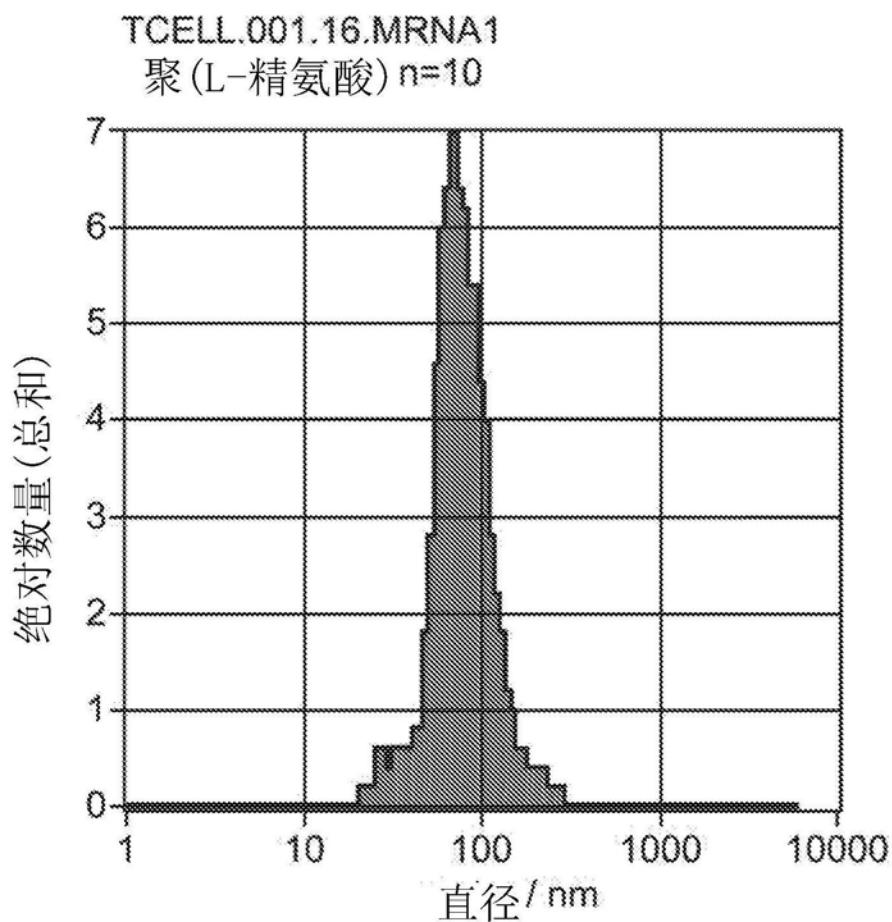
X值	数量	浓度	体积
X10	45.0	45.0	62.8
X50	65.9	65.9	106.8
X90	110.6	110.6	199.2
跨度	1.0	1.0	1.3
均值	74.4	74.4	118.3
标准方差	32.0	32.0	46.5

图61



迁移性: $-0.63 \pm 0.01 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C : $-0.73 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: 14.9 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: $-9.37 \pm 0.16 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-9.37 \text{ mV FWHM } 27.63 \text{ (SL1/2)}$
浓度: $3.5\text{E}+7$ 颗粒 / mL

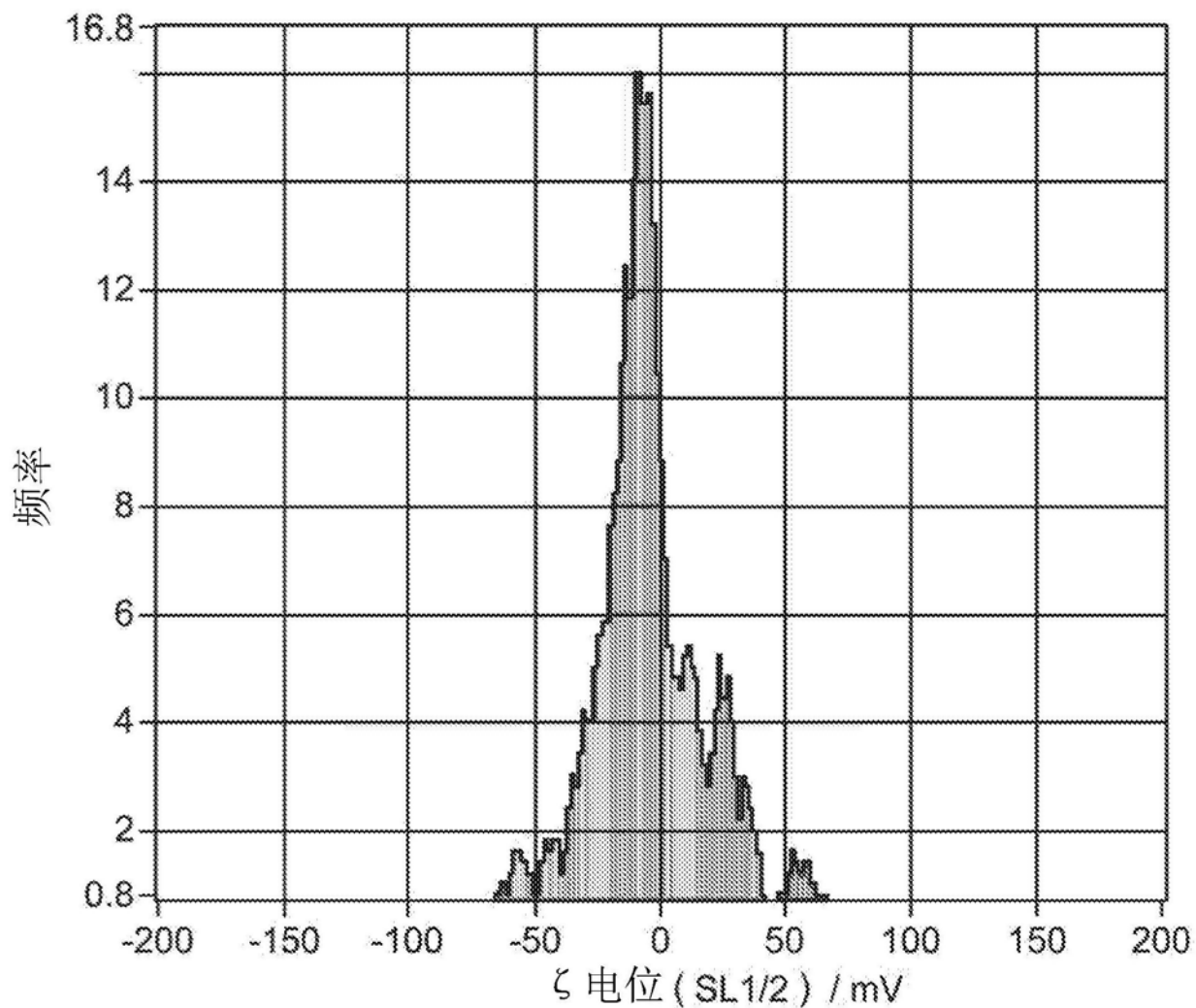
图61 (续)



峰分析(绝对数量)

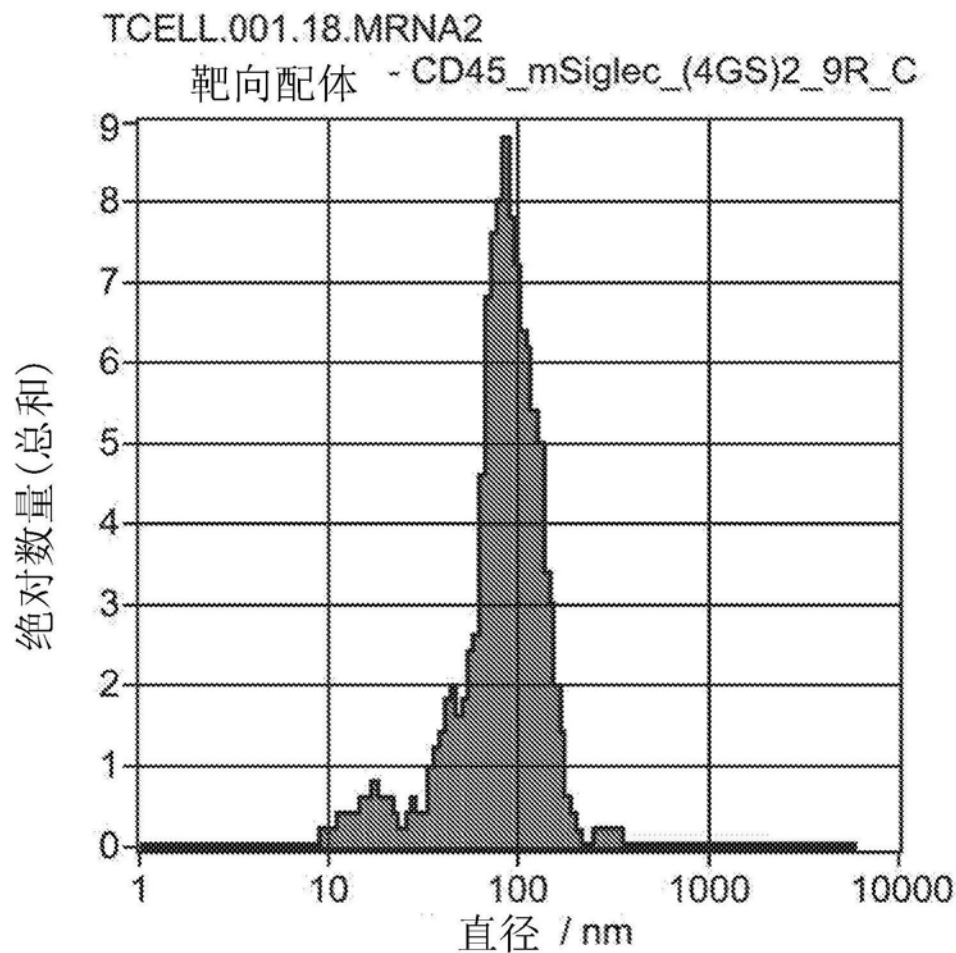
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
74.0	6.5	54.3	100.0
X值	数量	浓度	体积
X10	52.5	52.5	68.4
X50	73.9	73.9	120.7
X90	117.5	117.5	233.2
跨度	0.9	0.9	1.4
均值	83.0	83.0	142.0
标准方差	34.8	34.8	62.2

图62



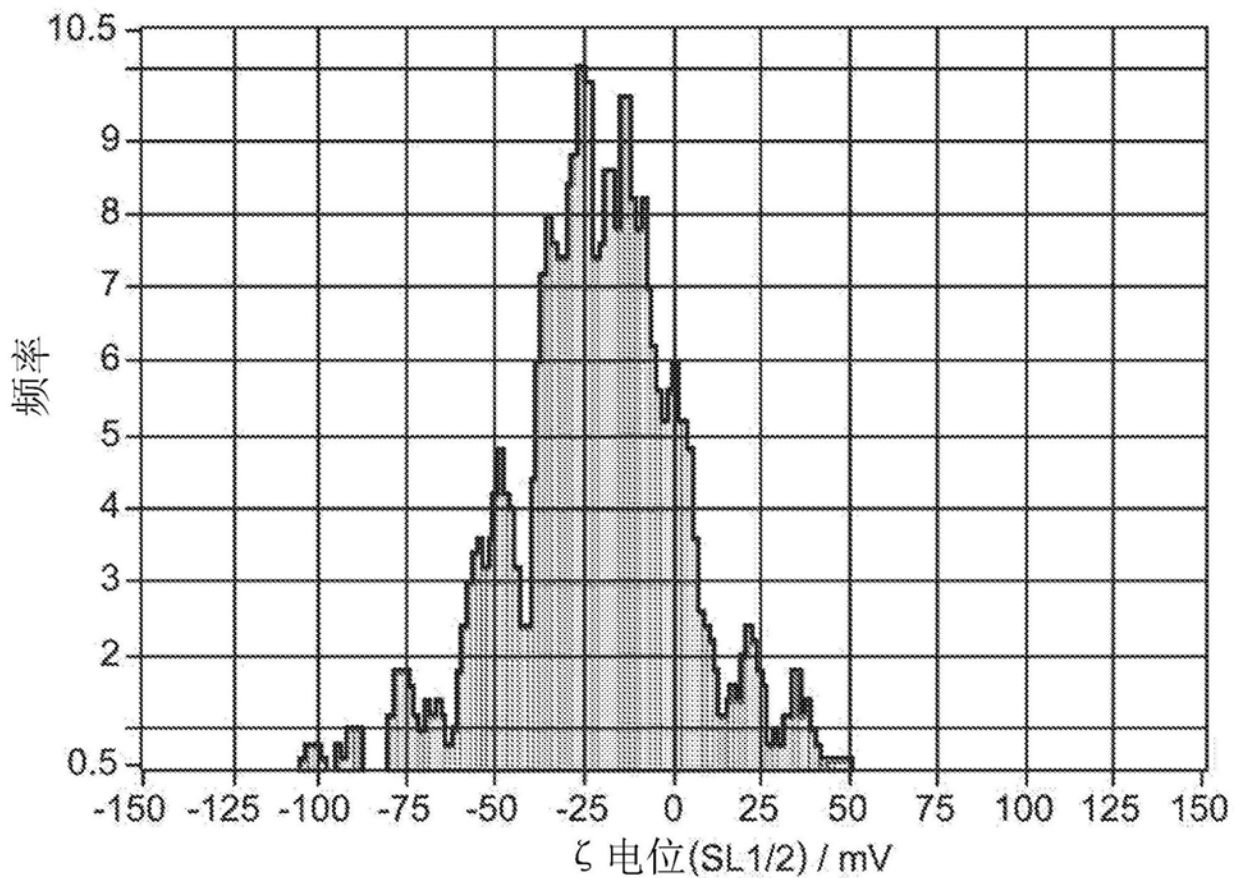
迁移性: $-0.13 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, @ 25°C : $-0.15 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$
ZP因子: 15.3 (Smoluchowski)
25°C 下 ζ 电位: $-1.96 \pm 0.30 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-1.96 \text{ mV FWHM } 21.84 \text{ (SL1/2)}$
浓度: $3.5\text{E}+7$ 颗粒 / mL

图62 (续)



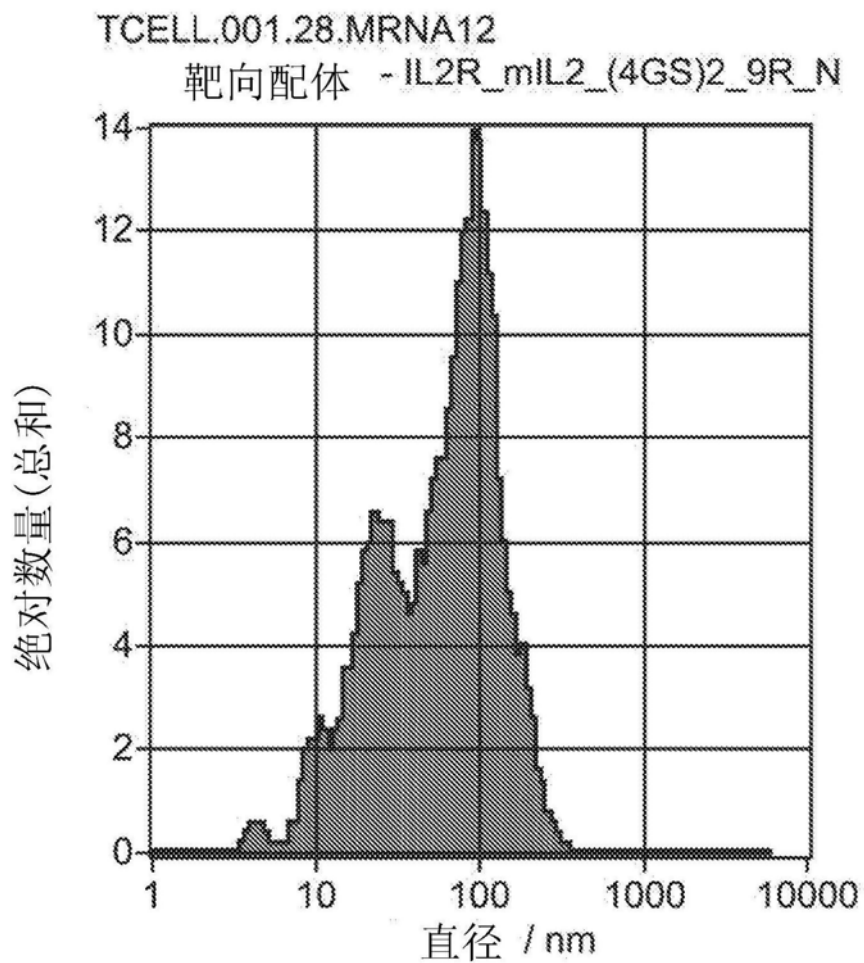
峰分析(绝对数量)			
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
88.0	8.4	68.7	100.0
X值	数量	浓度	体积
X10	39.2	39.2	78.6
X50	80.9	80.9	127.5
X90	129.8	129.8	287.4
跨度	1.1	1.1	1.6
均值	88.6	88.6	156.1
标准方差	40.6	40.6	76.4

图63



迁移性: $-1.36 \pm 0.01 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C: $-1.58 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: 14.9 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: $-20.26 \pm 0.15 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-20.26 \text{ mV FWHM } 20.45 \text{ (SL1/2)}$
浓度: $2.0\text{E}+7$ 颗粒 / mL

图63 (续)

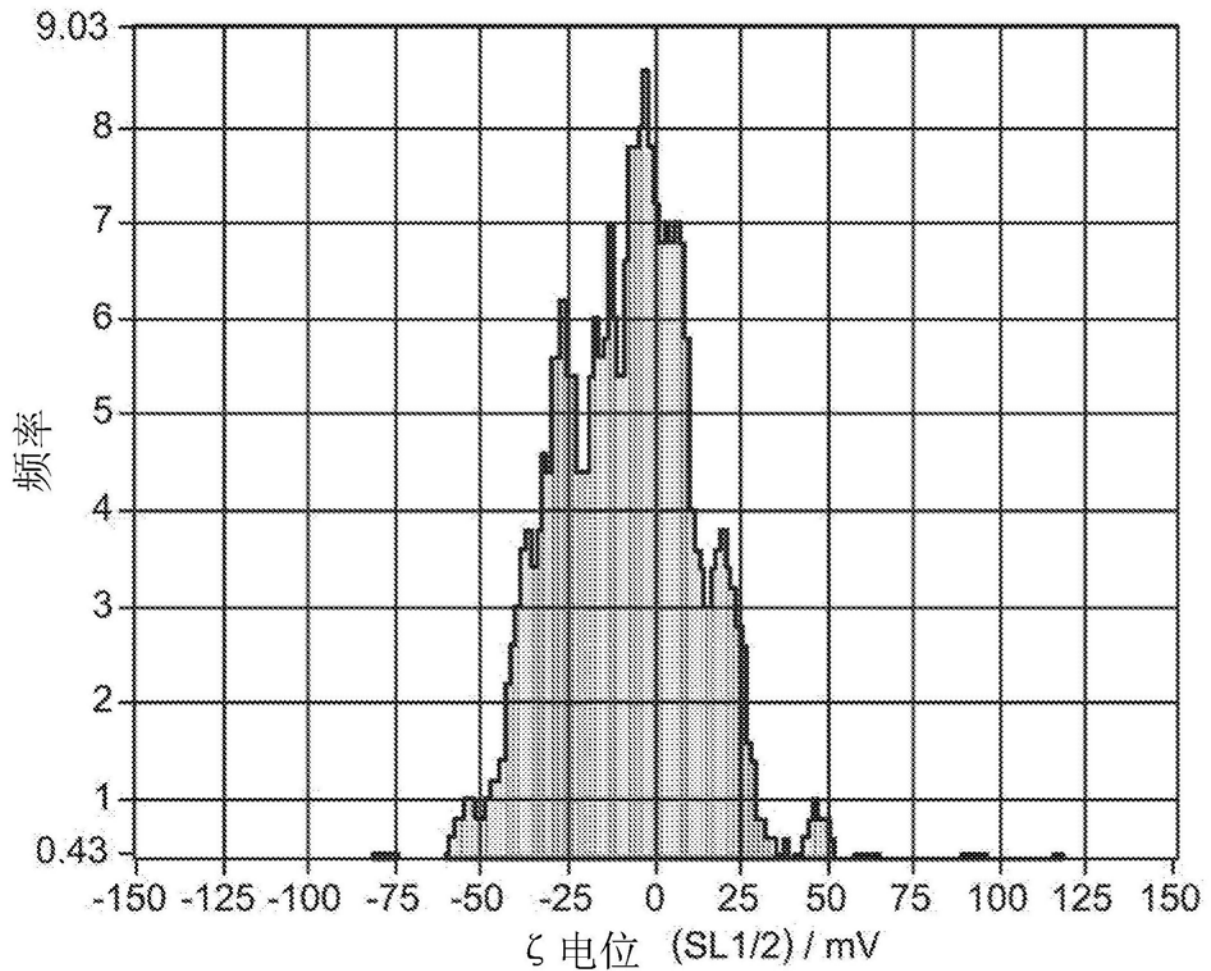


峰分析(绝对数量)

直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
92.3	14.0	79.7	70.3
24.9	6.4	17.7	29.7

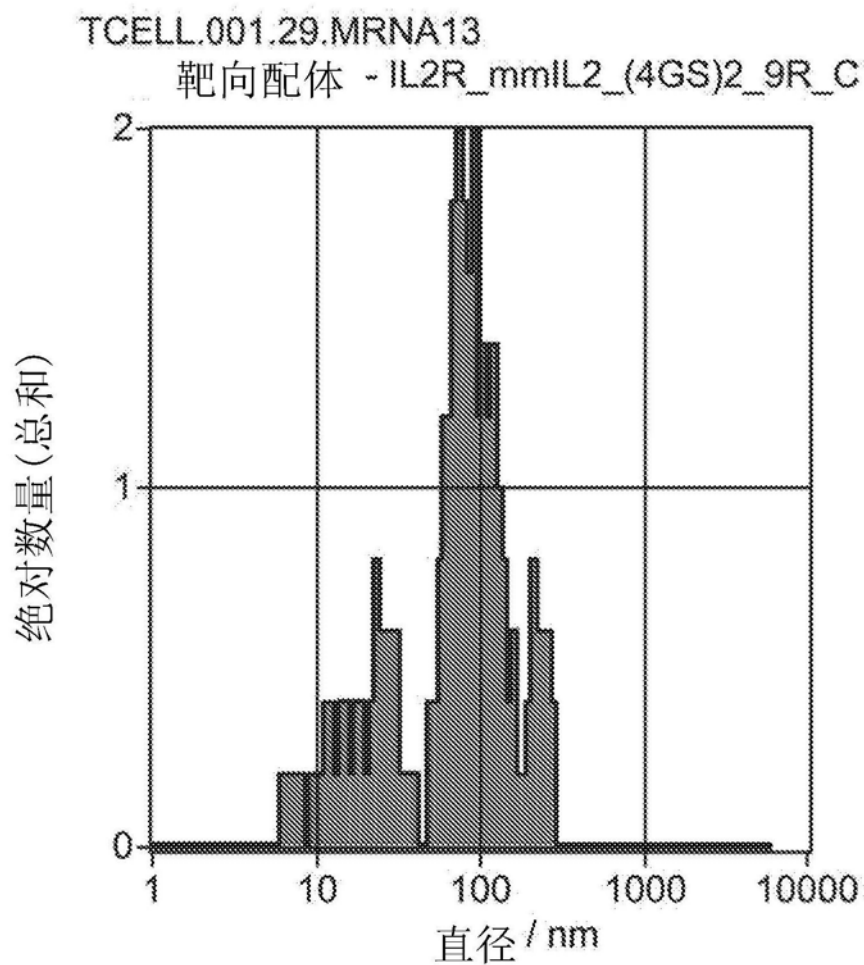
X值	数量	浓度	体积
X10	16.4	16.4	86.1
X50	63.9	63.9	160.6
X90	133.4	133.4	251.4
跨度	1.8	1.8	1.0
均值	73.1	73.1	168.2
标准方差	51.9	51.9	64.7

图64



迁移性: $-0.29 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, @ 25°C : $-0.34 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$
ZP因子: 14.8 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: $-4.30 \pm 0.23 \text{ mV}$
 ζ 电位分布: -4.30 mV FWHM 35.23 (SL1/2)
浓度: $4.6\text{E}+7$ 颗粒 / mL

图64 (续)

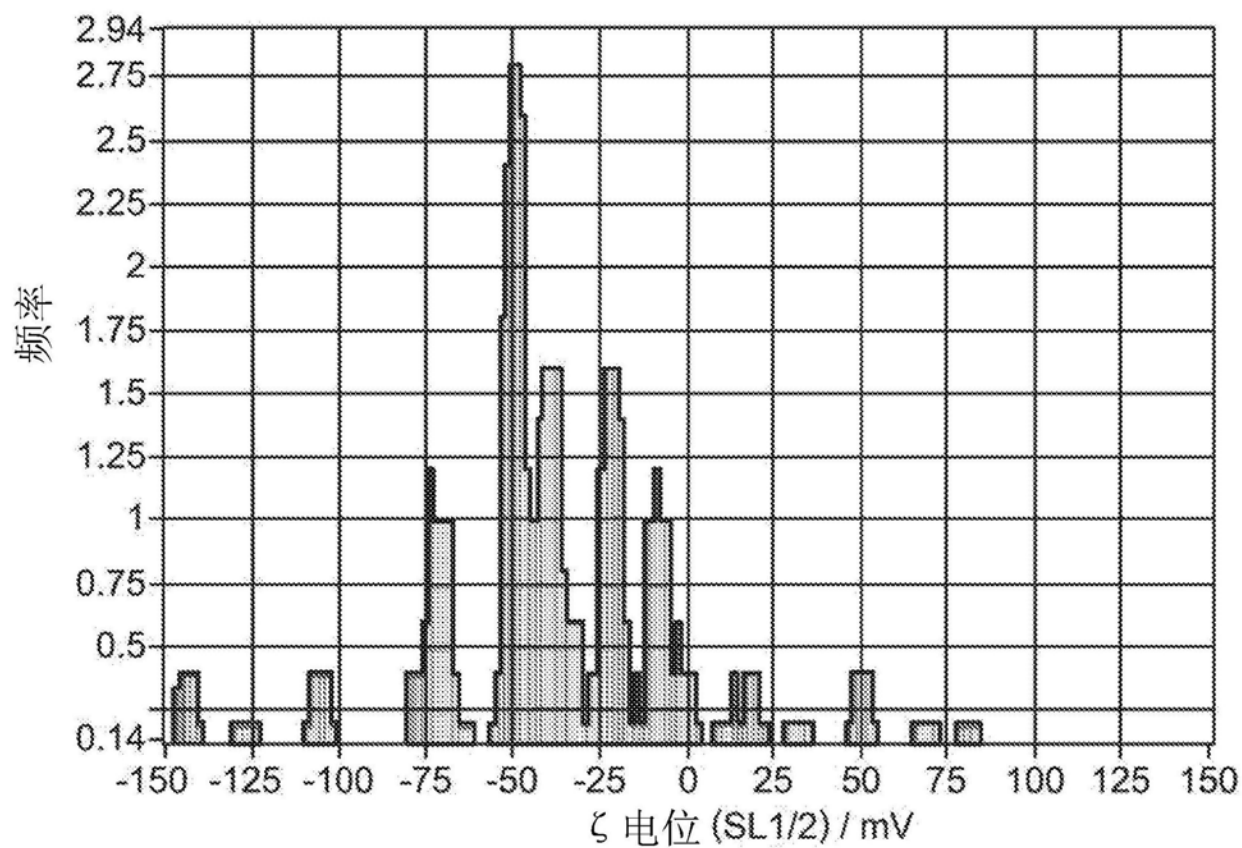


峰分析(绝对数量)

直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
81.6	1.7	71.1	62.9
218.1	0.7	81.1	11.2
25.6	0.6	9.0	17.1
14.7	0.4	2.5	8.8

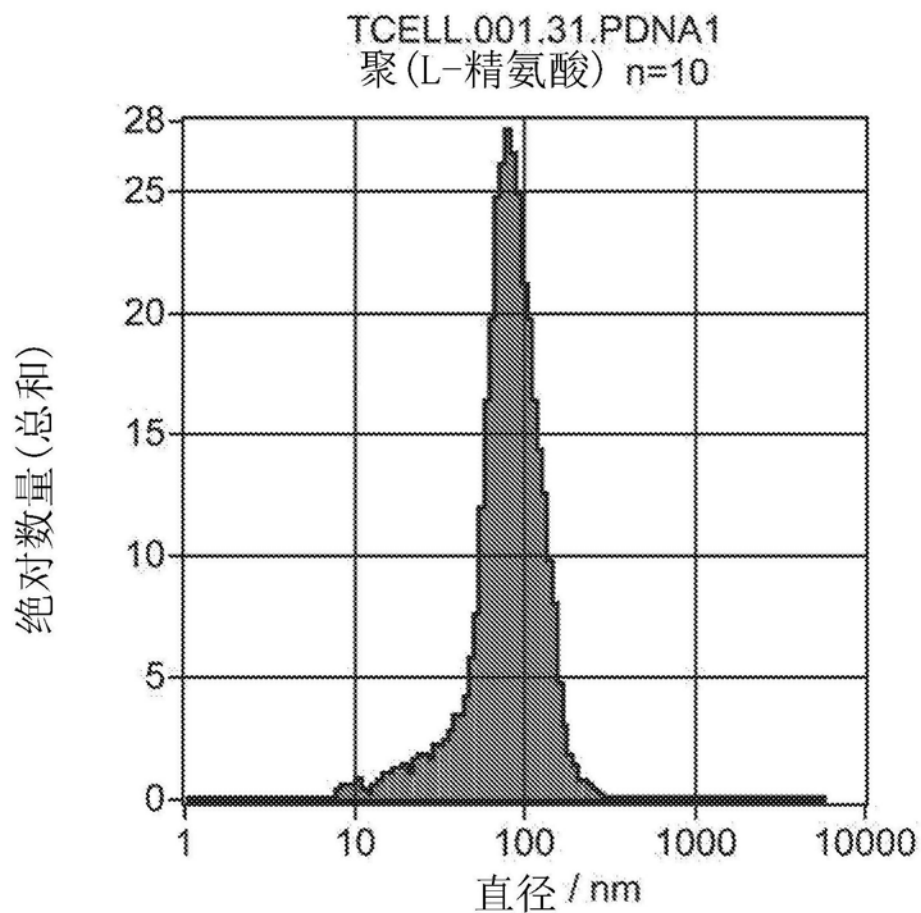
X值	数量	浓度	体积
X10	15.7	15.7	97.8
X50	76.9	76.9	219.9
X90	178.5	178.5	238.0
跨度	2.1	2.1	0.6
均值	87.6	87.6	194.2
标准方差	62.8	62.8	59.8

图65



迁移性: $-2.47 \pm 0.04 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C : $-2.86 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: 14.8 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: $-36.64 \pm 0.64 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-36.64 \text{ mV FWHM } 8.84 \text{ (SL1/2)}$

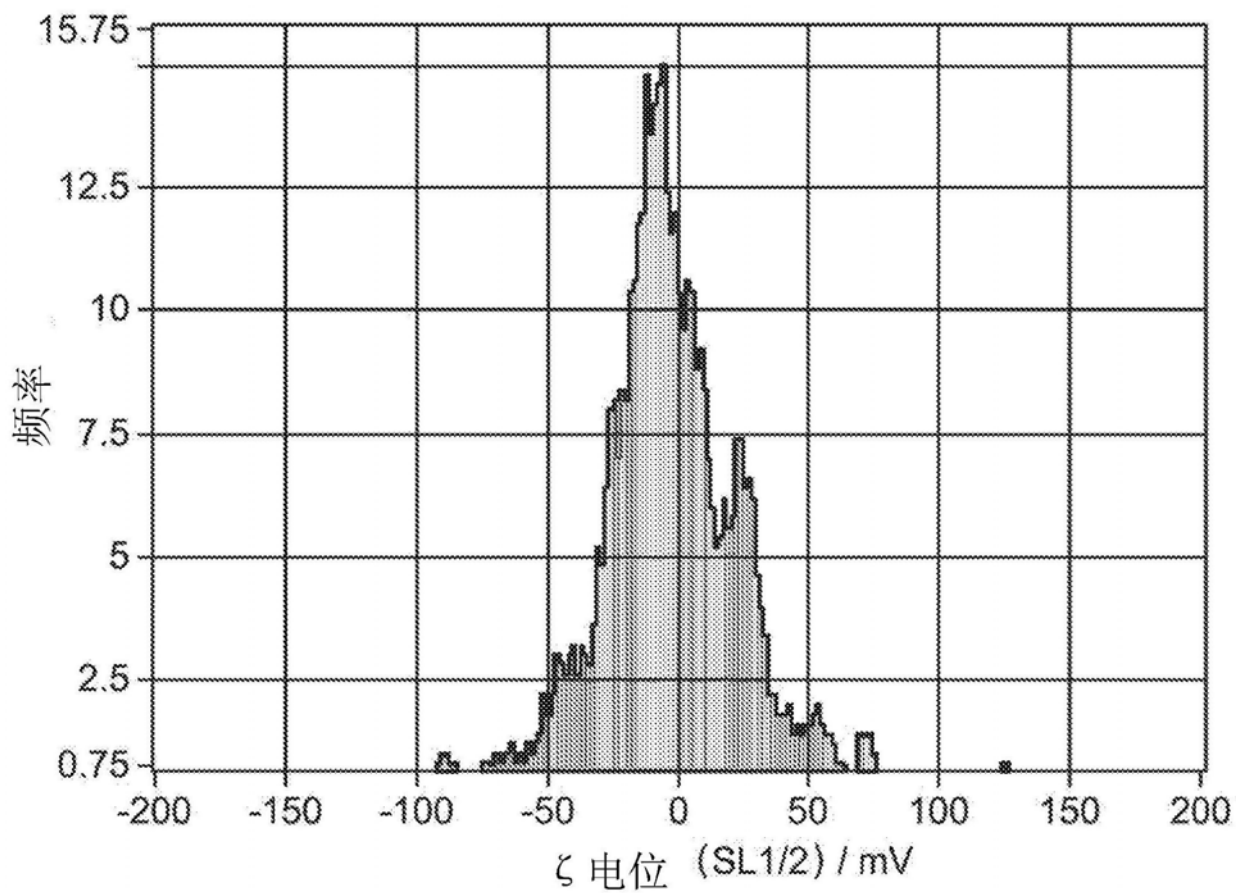
图65 (续)



峰分析(绝对数量)

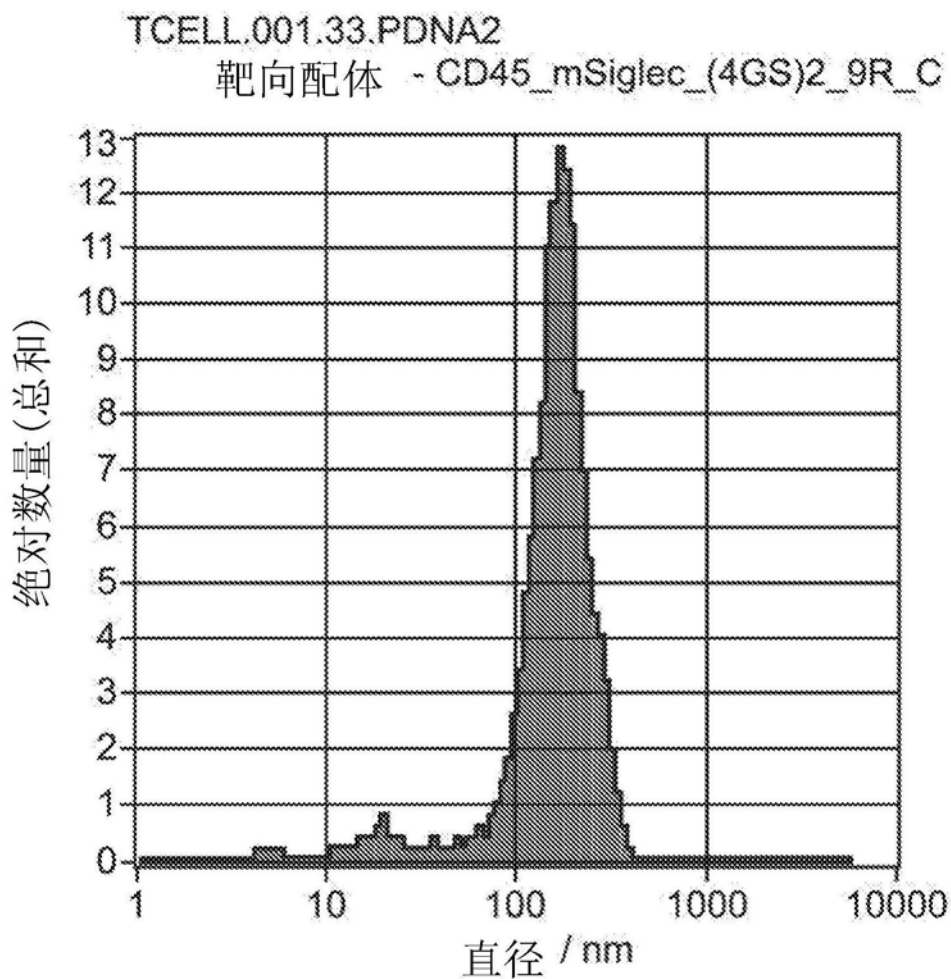
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
82.0	27.3	65.7	100.0
X值	数量	浓度	体积
X10	42.8	42.8	74.8
X50	78.5	78.5	118.4
X90	126.2	126.2	198.6
跨度	1.1	1.1	1.0
均值	85.5	85.5	128.7
标准方差	35.0	35.0	46.3

图66



迁移性: $-0.21 \pm 0.05 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C: $-0.25 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: 15.5 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: $-3.22 \pm 0.73 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-3.22 \text{ mV FWHM } 40.03 \text{ (SL1/2)}$
浓度: $4.0\text{E}+7$ 颗粒 / mL

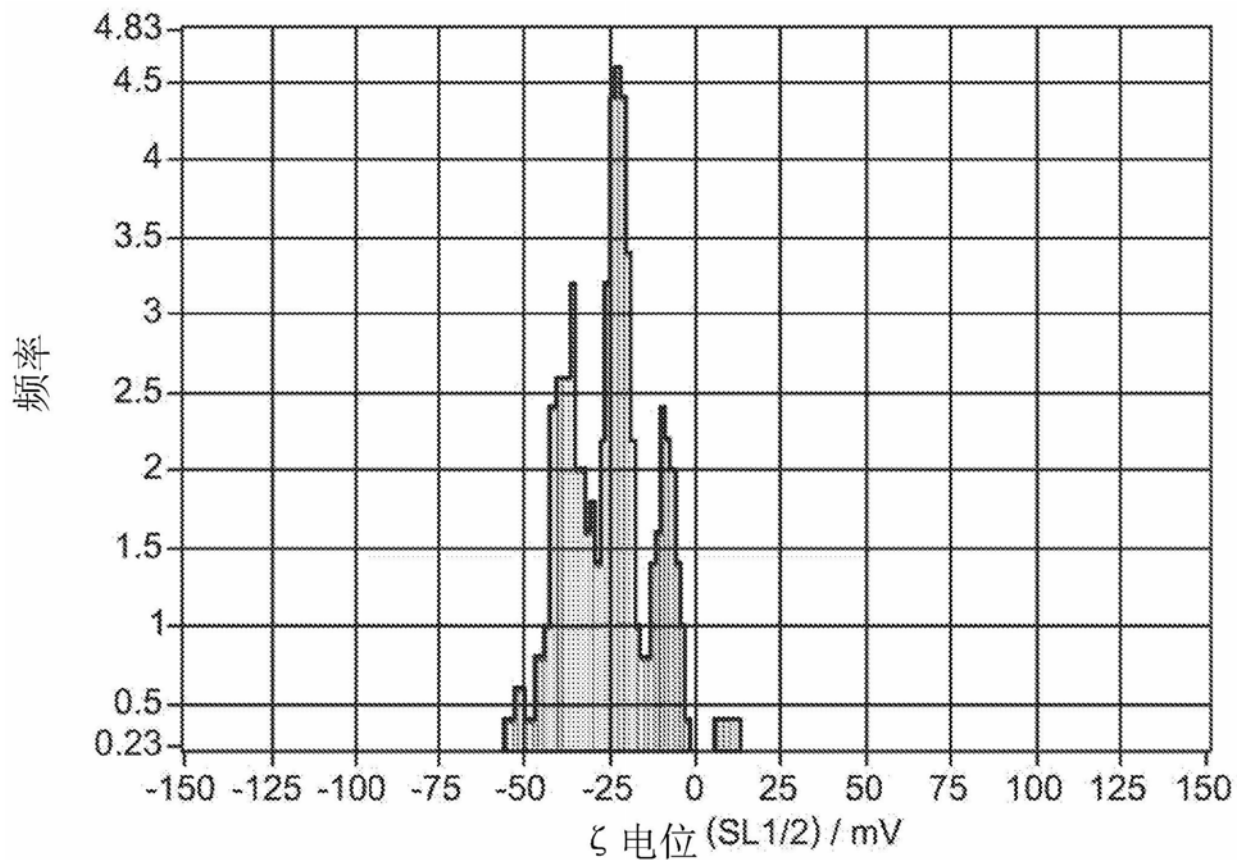
图66 (续)



峰分析(绝对数量)

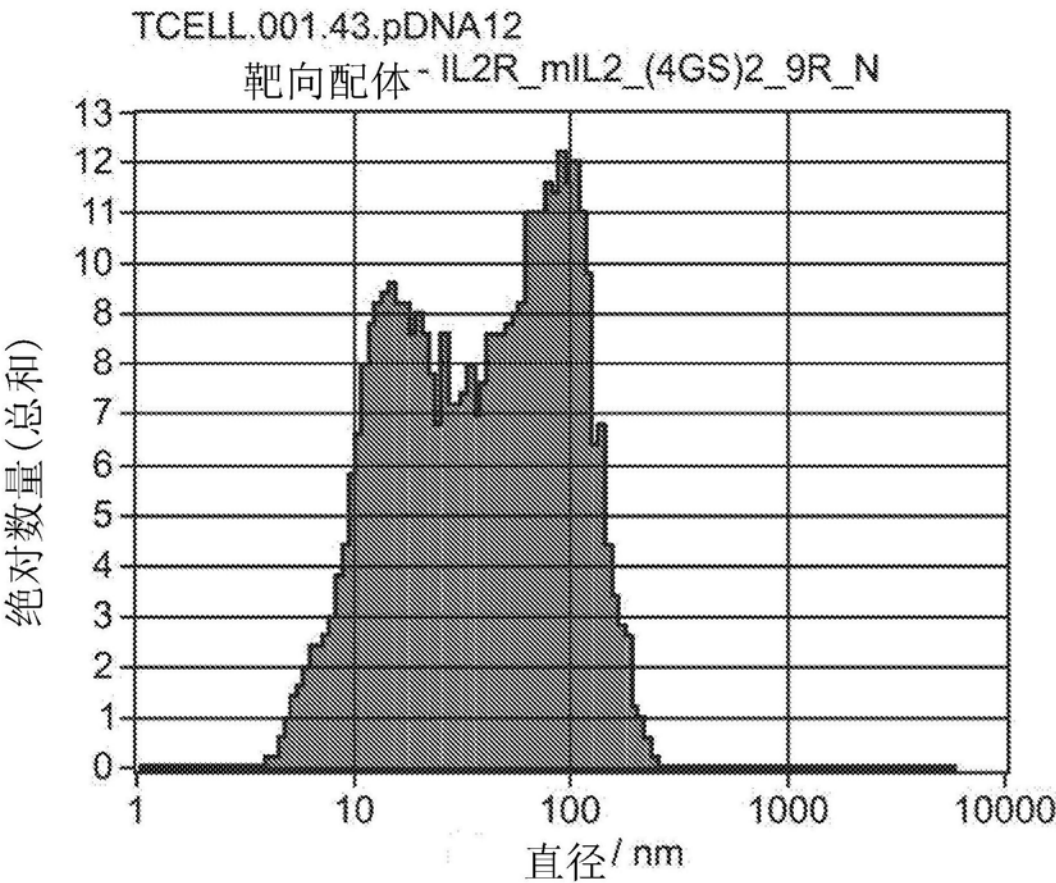
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
171.2	12.8	106.8	100.0
X值	数量	浓度	体积
X10	89.8	89.8	149.0
X50	163.5	163.5	212.2
X90	246.7	246.7	299.9
跨度	1.0	1.0	0.7
均值	167.6	167.6	227.0
标准方差	64.5	64.5	59.5

图67



迁移性: $-1.73 \pm 0.01 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C: $-1.99 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: 14.7 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: $-25.51 \pm 0.16 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-25.51 \text{ mV FWHM } 8.59 \text{ (SL1/2)}$
浓度: $9.0\text{E}+6$ 颗粒 / mL

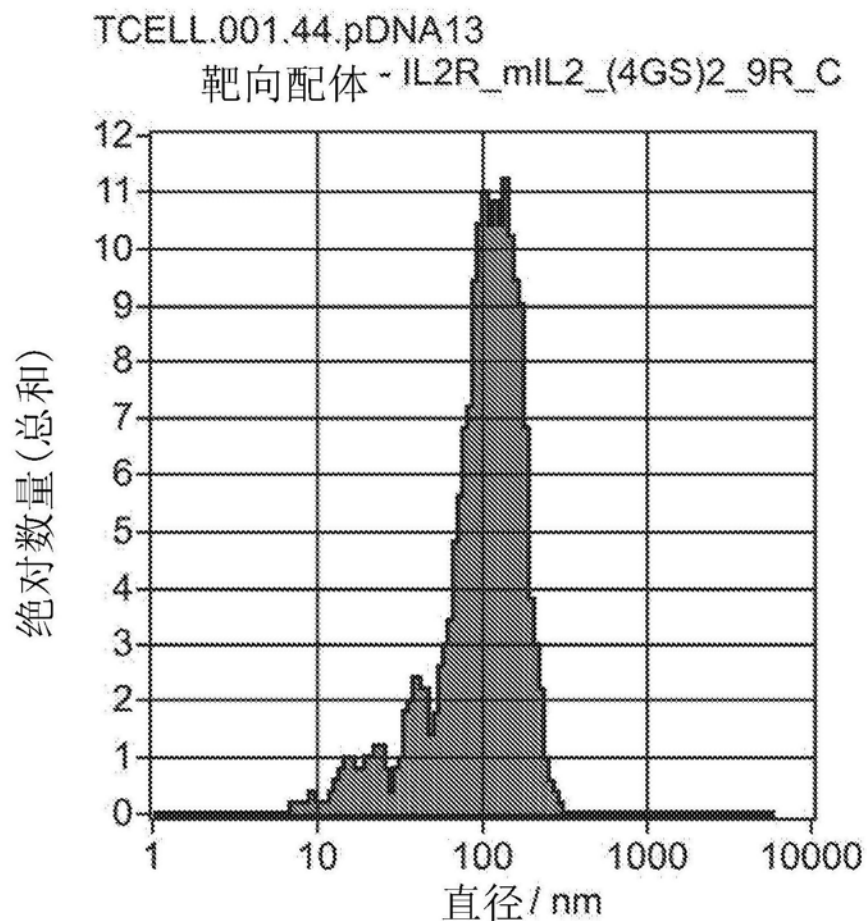
图67 (续)



峰分析(绝对数量)

直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
88.5	11.8	109.4	57.6
15.9	9.4	20.8	42.4
X值	数量	浓度	体积
X10	11.0	11.0	73.3
X50	40.4	40.4	121.0
X90	113.7	113.7	186.2
跨度	2.5	2.5	0.9
均值	54.4	54.4	130.3
标准方差	43.2	43.2	42.5

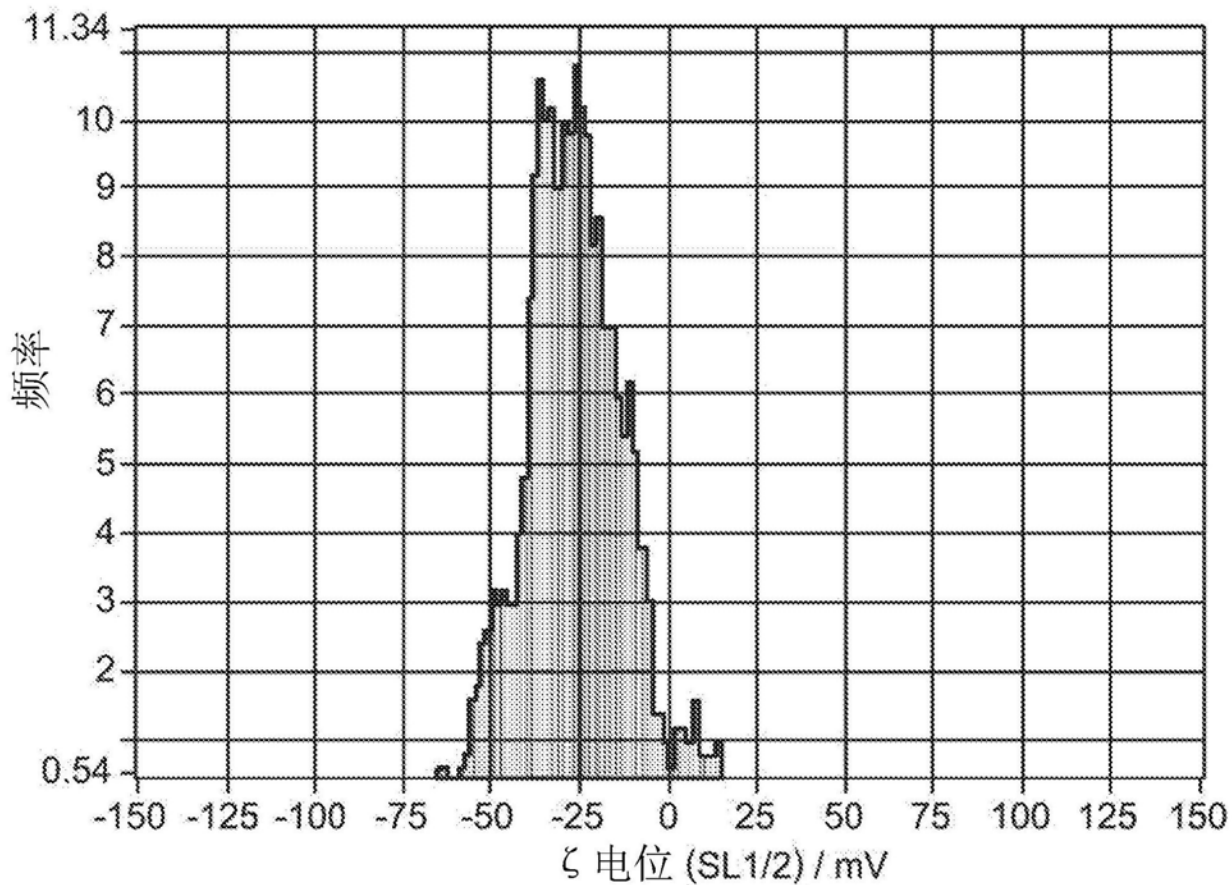
图68



峰分析(绝对数量)

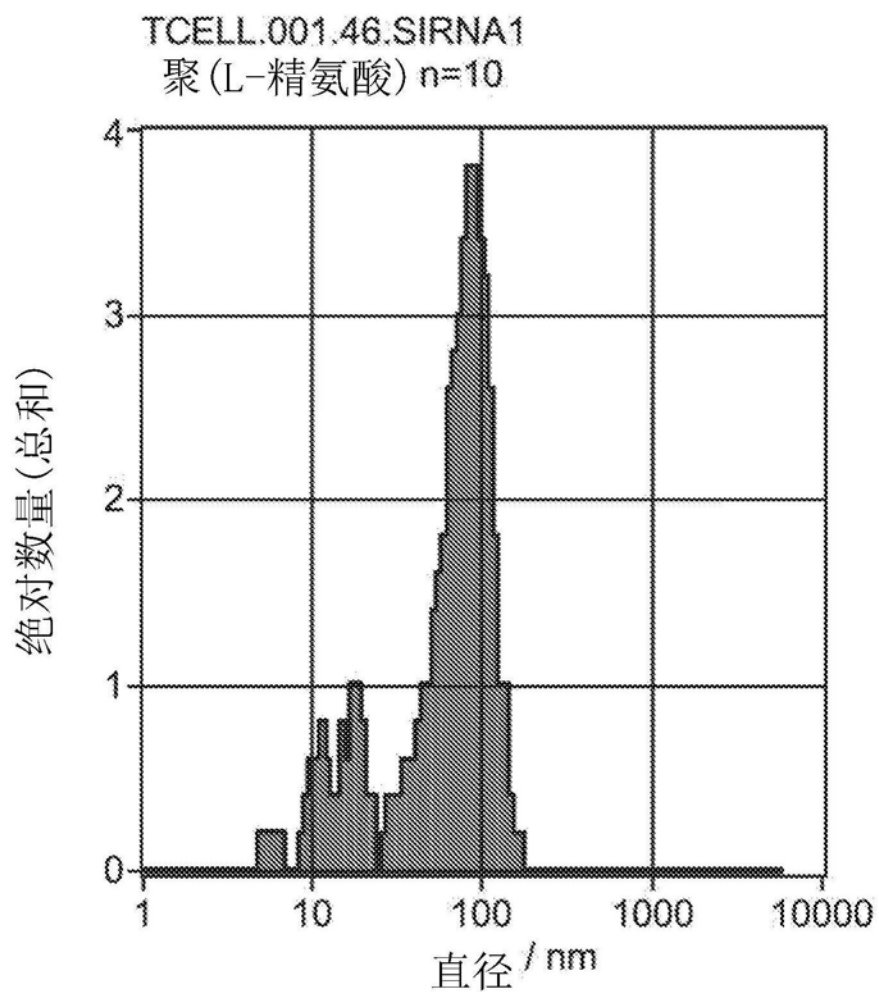
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
122.3	10.7	113.9	93.2
20.1	1.0	13.2	6.8
X值	数量	浓度	体积
X10	37.6	37.6	102.4
X50	104.6	104.6	154.1
X90	166.1	166.1	215.1
跨度	1.2	1.2	0.7
均值	109.6	109.6	162.5
标准方差	50.6	50.6	44.1

图69



迁移性: $-1.76 \pm 0.01 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C: $-2.02 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: 14.8 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: $-25.91 \pm 0.14 \text{ mV}$
 ζ 电位分布: $-25.91 \text{ mV FWHM } 31.89 \text{ (SL1/2)}$
浓度: $4.3\text{E}+7$ 颗粒 / mL
稀释因子: 1
原始浓度: $4.3\text{E}+7$ 颗粒 / cm^3

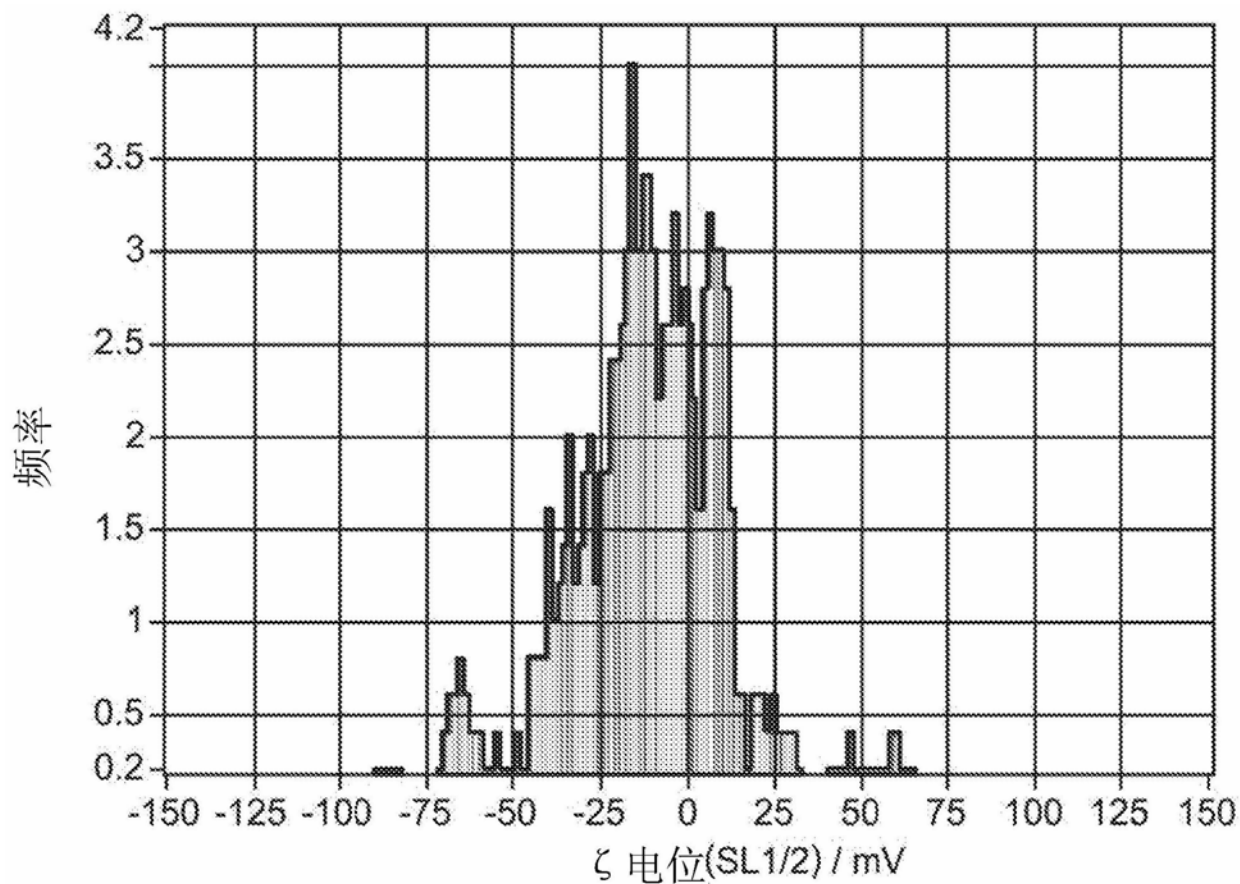
图69(续)



峰分析(绝对数量)

直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
87.1	3.8	58.9	81.5
17.2	0.9	6.7	18.5
X值	数量	浓度	体积
X10	15.7	15.7	70.9
X50	71.7	71.7	99.4
X90	105.0	105.0	139.5
跨度	1.2	1.2	0.7
均值	69.5	69.5	103.9
标准方差	35.8	35.8	25.2

图70

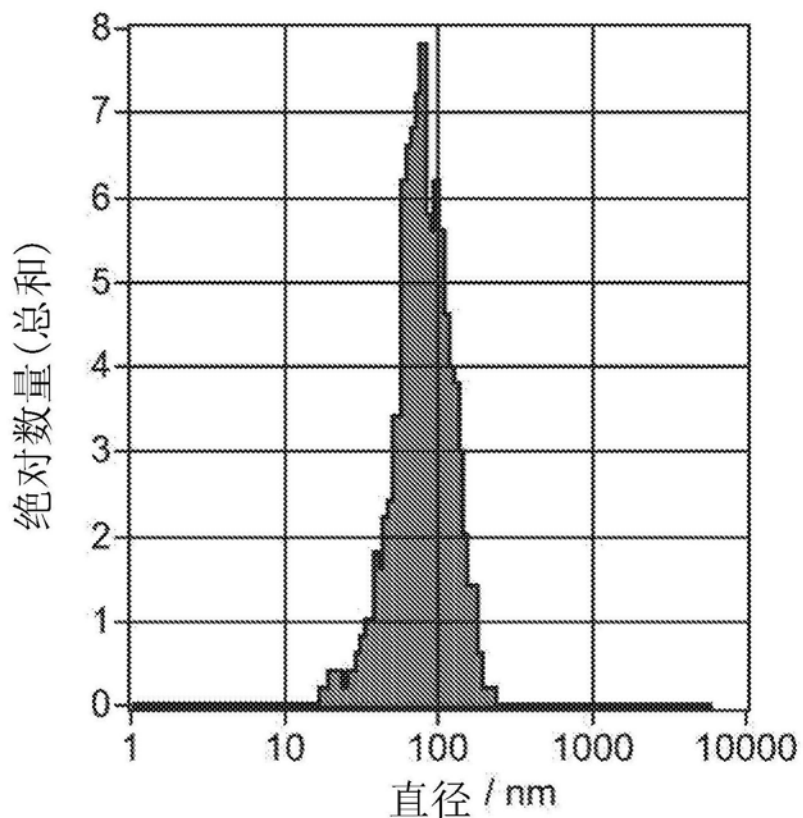


迁移性: $-0.75 \pm 0.13 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, @ 25°C: $-0.87 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$
ZP因子: 15.0 (Smoluchowski)
25°C下ζ 电位: $-11.17 \pm 1.97 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-11.17 \text{ mV FWHM } 25.31 \text{ (SL1/2)}$
浓度: $6.7\text{E}+6$ 颗粒 / mL

图70(续)

TCELL.001.48.SIRNA2

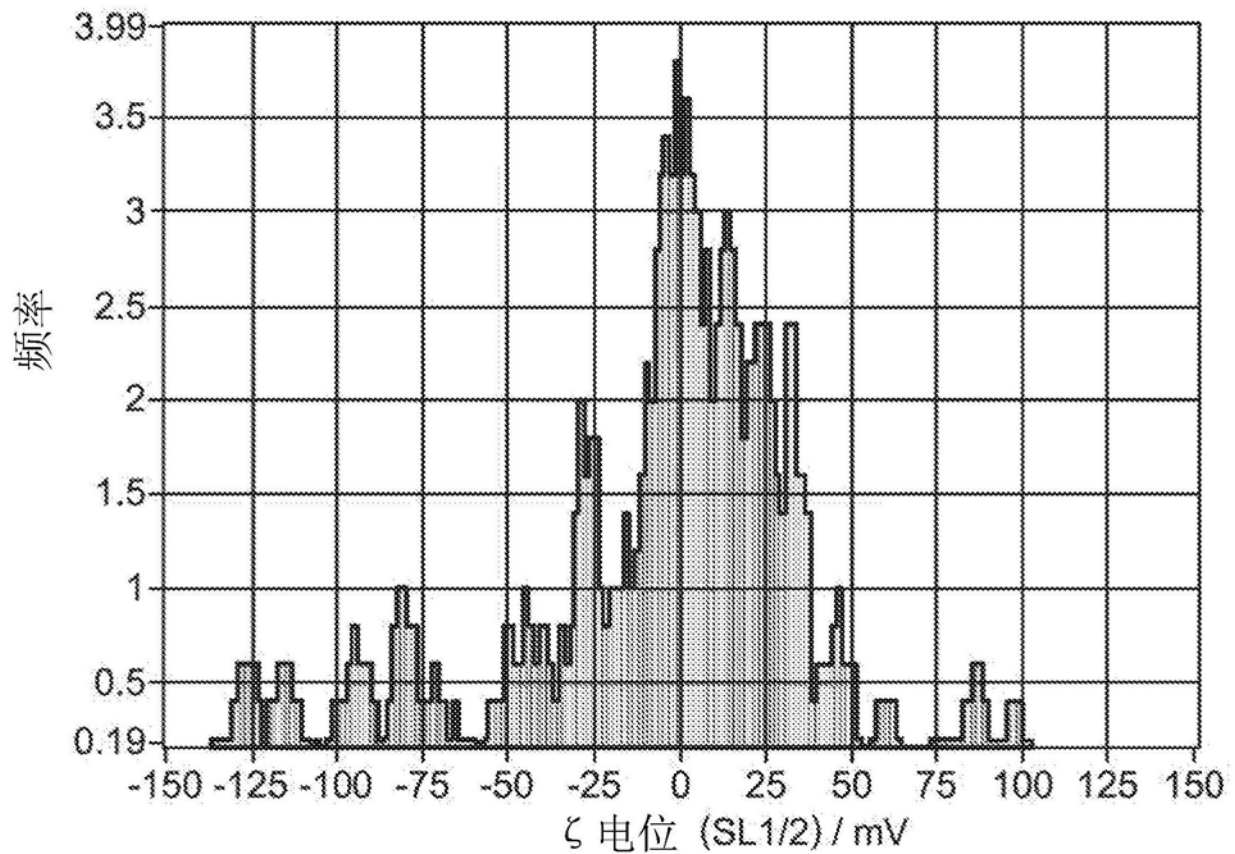
靶向配体 - CD45_mSiglec_(4GS)2_9R_C



峰分析(绝对数量)

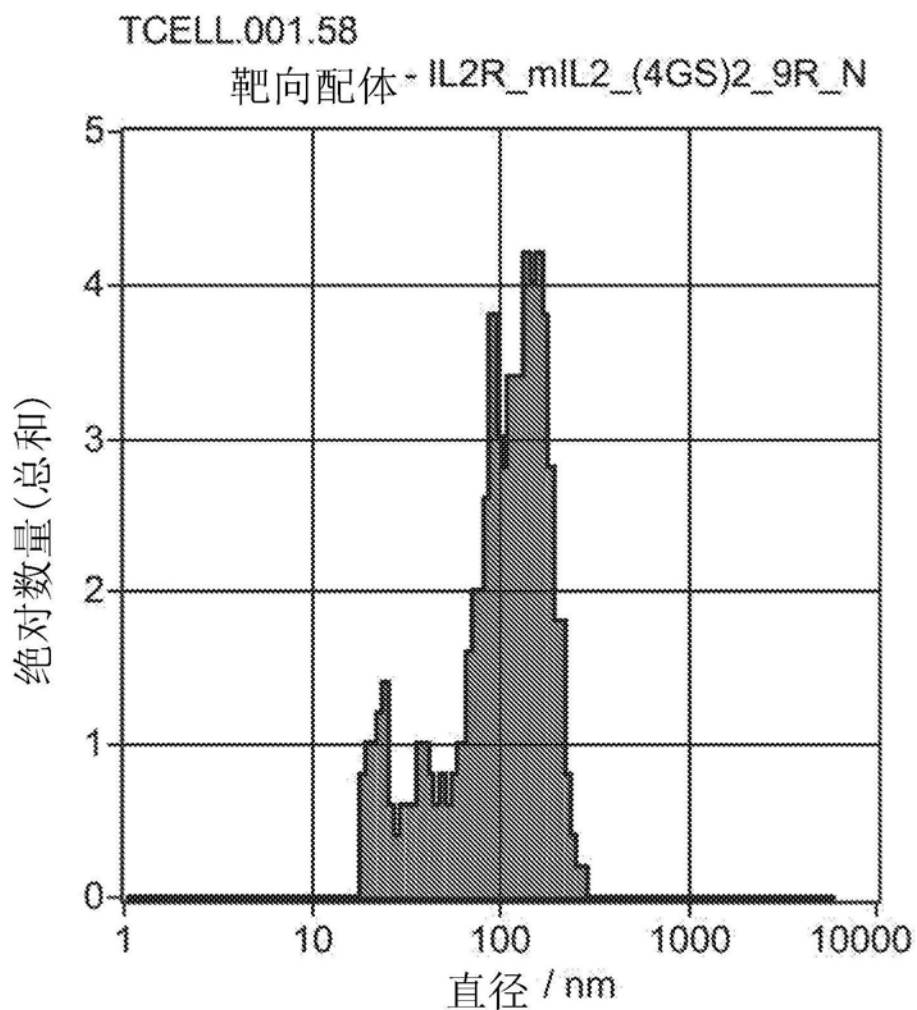
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
78.8	7.7	68.1	100.0
X值	数量	浓度	体积
X10	44.2	44.2	69.5
X50	74.7	74.7	115.0
X90	124.1	124.1	157.9
跨度	1.1	1.1	0.8
均值	84.4	84.4	121.6
标准方差	33.1	33.1	37.1

图71



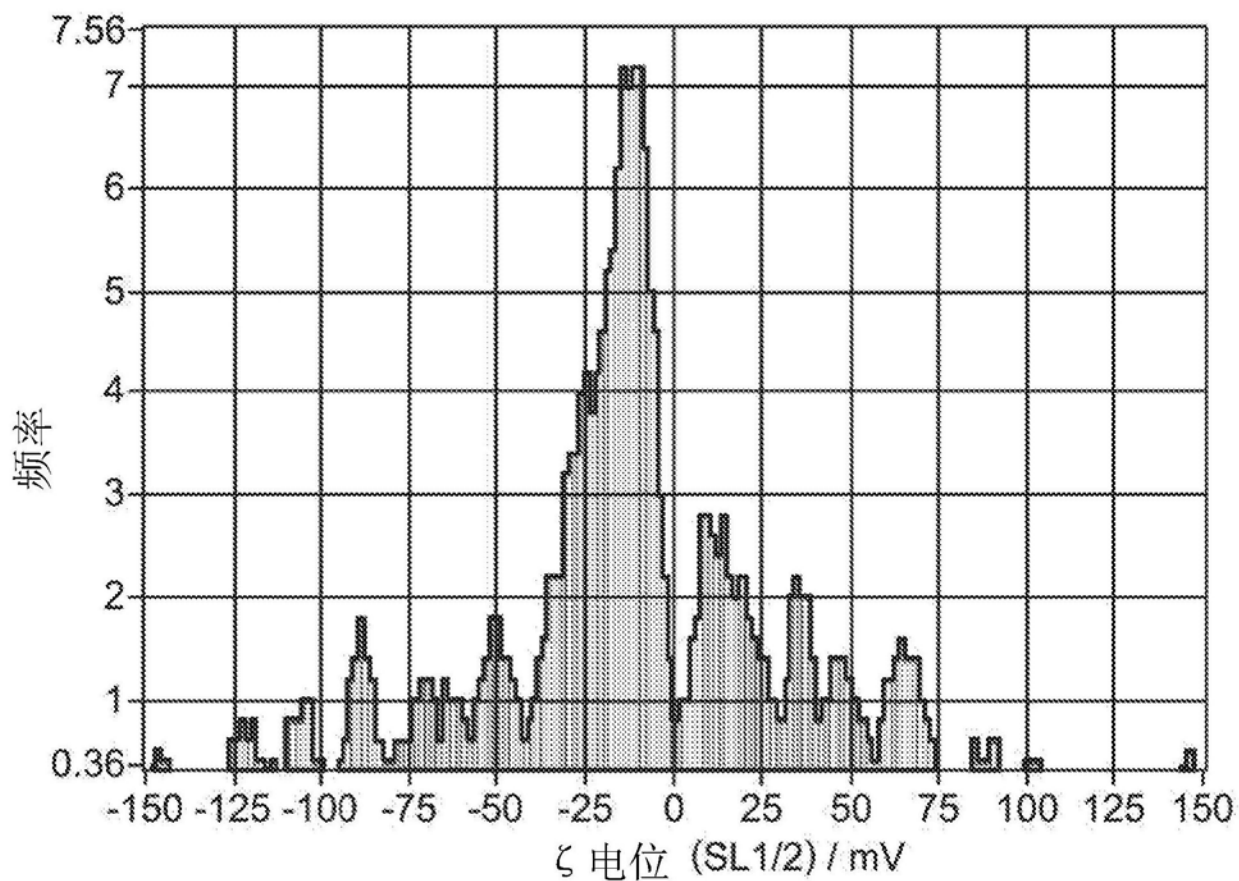
迁移性: $-1.04 \pm 0.00 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, @ 25°C : $-1.19 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$
ZP因子: 14.7 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: $-15.25 \pm 0.06 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-15.25 \text{ mV FWHM } 32.55 \text{ (SL1/2)}$
浓度: $3.8\text{E}+7$ 颗粒 / mL

图71(续)



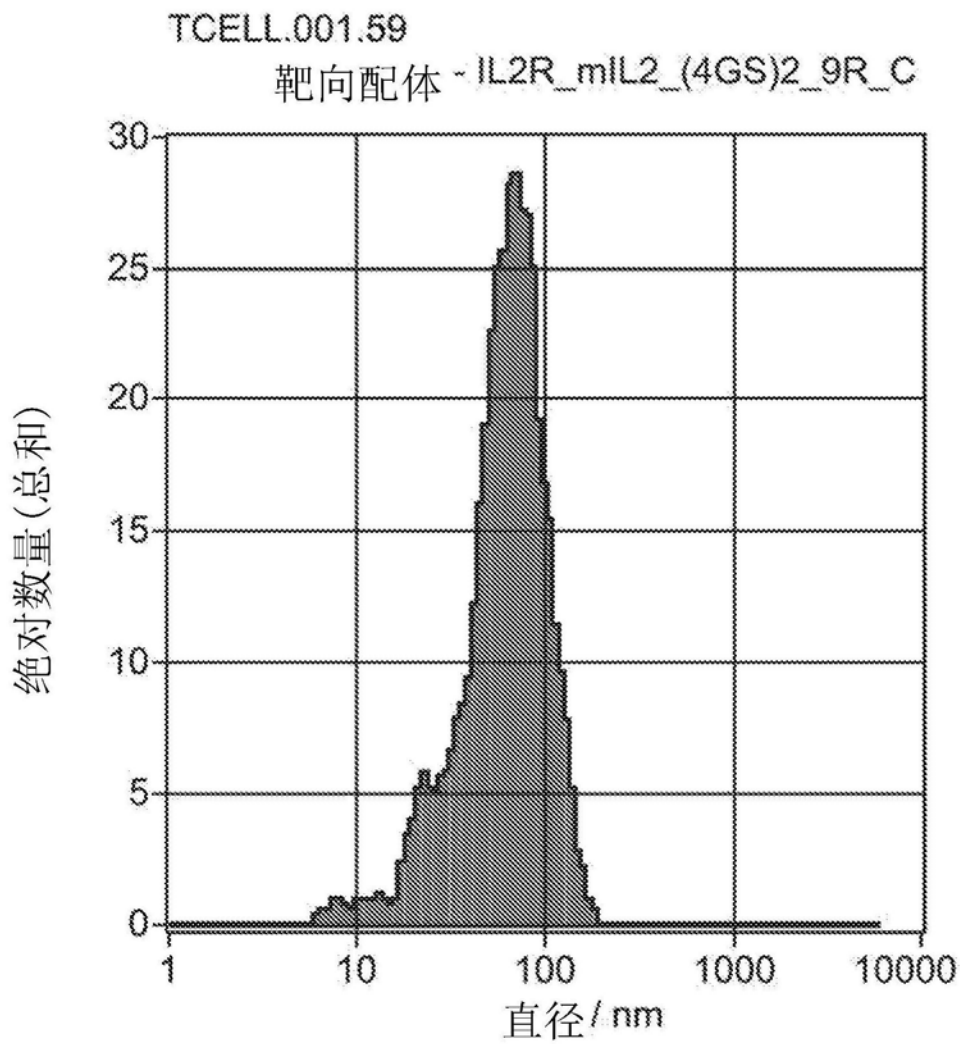
峰分析(绝对数量)			
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
139.8	4.2	111.6	90.6
23.6	1.3	7.7	9.4
X值	数量	浓度	体积
X10	28.0	28.0	103.5
X50	103.2	103.2	157.6
X90	176.5	176.5	208.2
跨度	1.4	1.4	0.7
均值	110.4	110.4	165.5
标准方差	54.1	54.1	40.8

图72



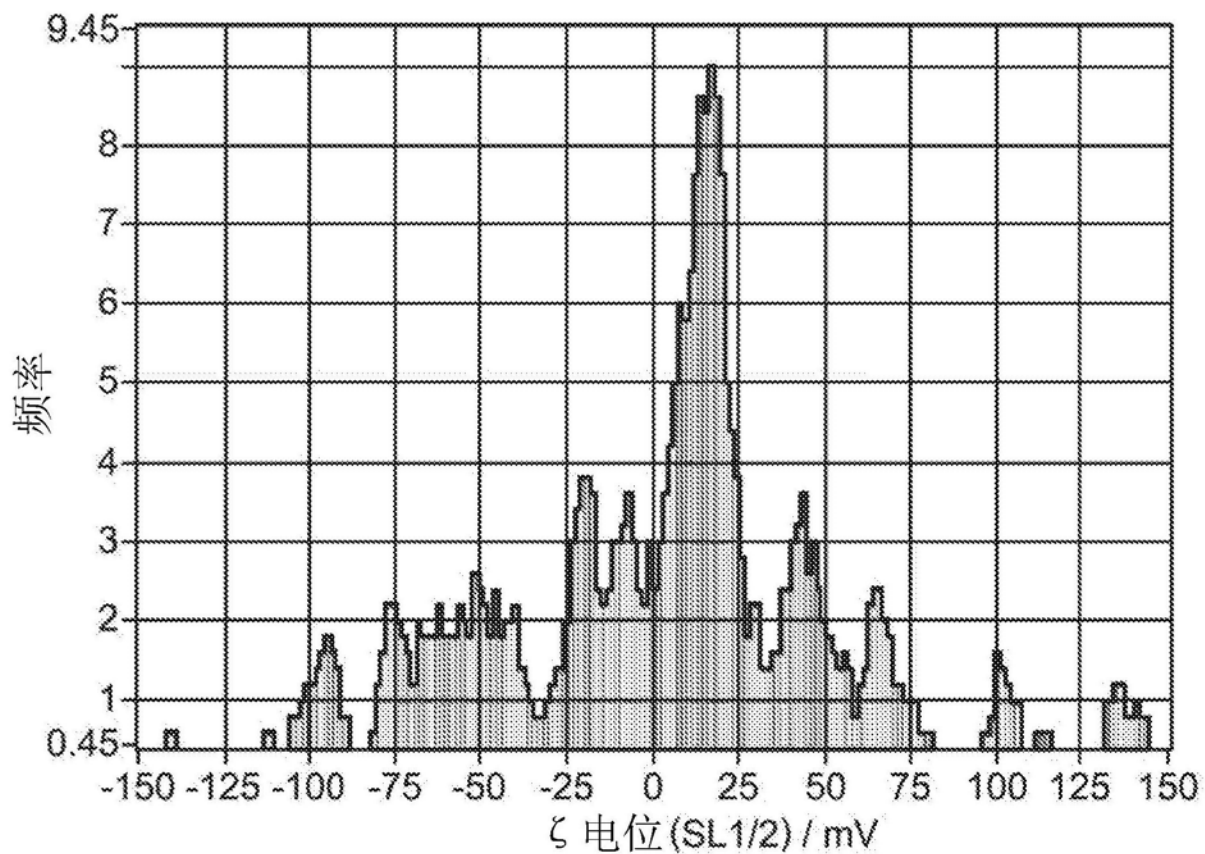
迁移性: $-0.68 \pm 0.01 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C: $-0.79 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: 14.9 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: $-10.09 \pm 0.12 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-10.09 \text{ mV FWHM } 21.02 \text{ (SL1/2)}$
浓度: $1.6\text{E}+7$ 颗粒 / mL

图72(续)



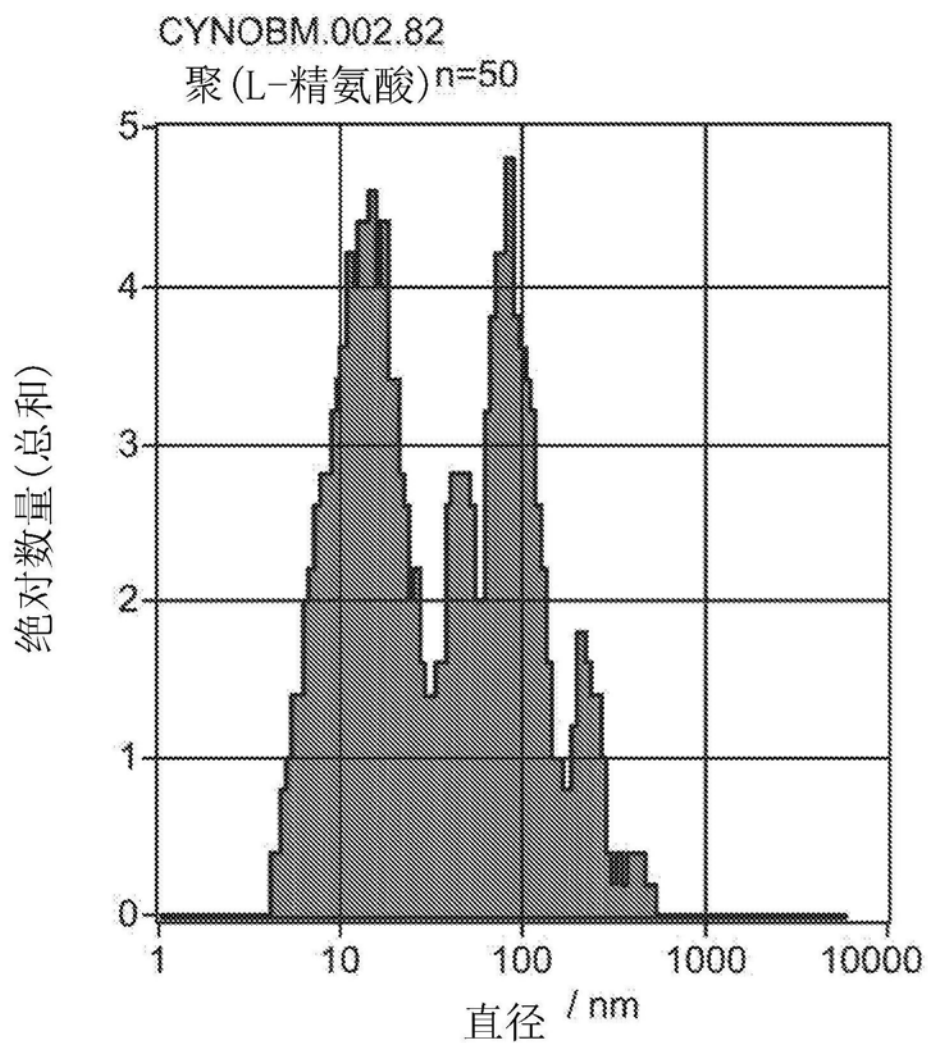
峰分析(绝对数量)			
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
68.7	28.5	62.9	100.0
X值	数量	浓度	体积
X10	26.3	26.3	60.5
X50	62.4	62.4	95.6
X90	104.5	104.5	137.9
跨度	1.3	1.3	0.8
均值	66.6	66.6	100.8
标准方差	29.7	29.7	30.1

图73



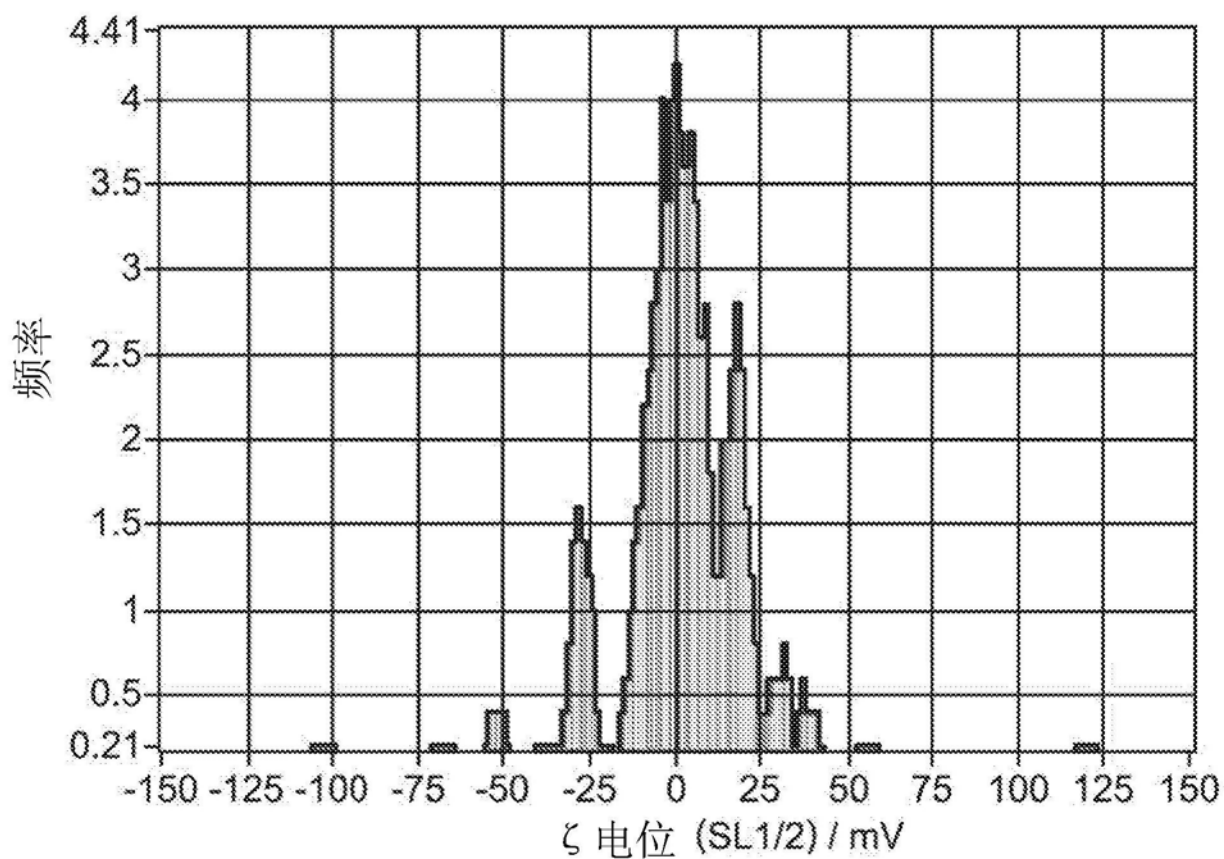
迁移性: $0.26 \pm 0.23 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C: $0.31 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: 14.9 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: $3.95 \pm 3.43 \text{ mV}$
ζ 电位分布: 3.95 mV FWHM 16.95 (SL1/2)
浓度: $4.2\text{E}+7$ 颗粒 / mL

图73 (续)



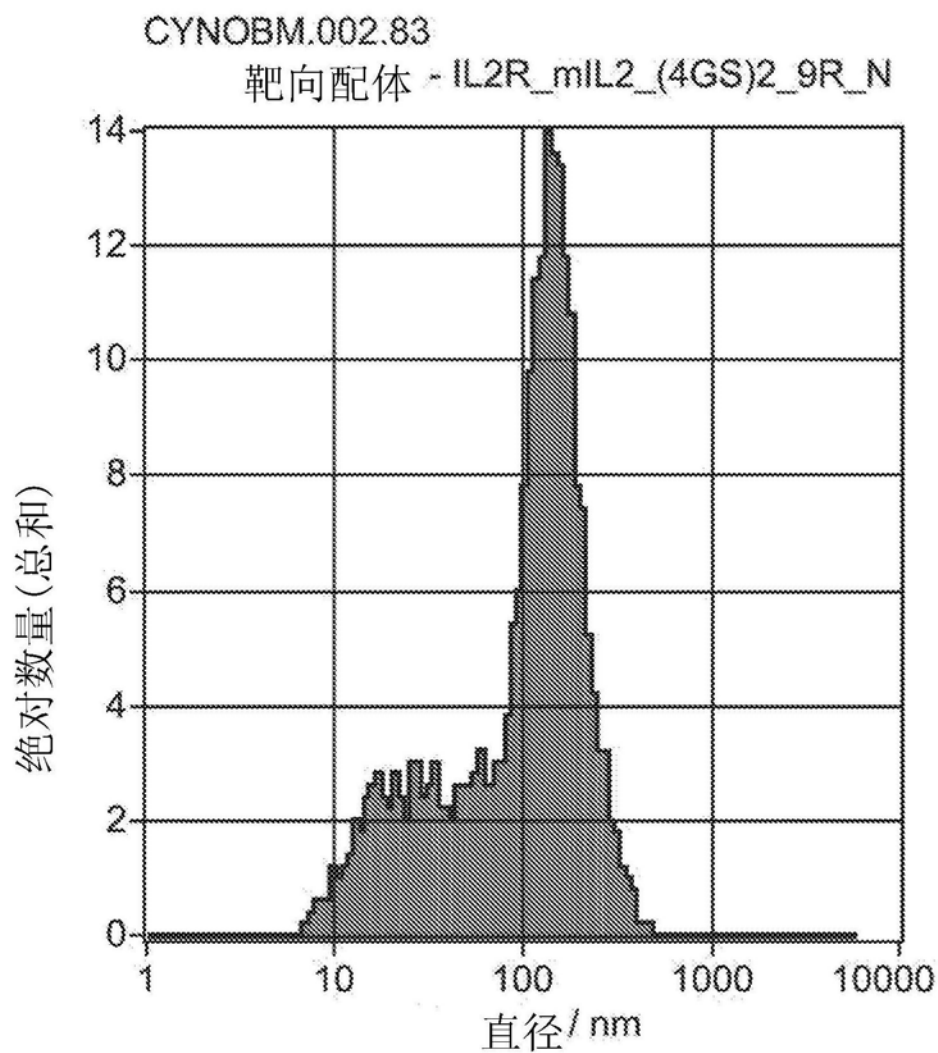
峰分析(绝对数量)			
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
85.1	4.7	53.1	41.8
14.2	4.4	16.7	49.9
220.3	1.7	94.2	8.3
X值	数量	浓度	体积
X10	8.3	8.3	123.5
X50	30.1	30.1	285.3
X90	132.2	132.2	439.2
跨度	4.1	4.1	1.1
均值	61.4	61.4	307.4
标准方差	73.3	73.3	121.3

图74



迁移性: $0.22 \pm 0.01 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C : $0.23 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: 13.6 (Smoluchowski)
25°C下ζ电位: $2.96 \pm 0.14 \text{ mV}$
ζ电位分布: 2.96 mV FWHM 19.98 (SL1/2)
浓度: $7.8\text{E}+6$ 颗粒 / mL

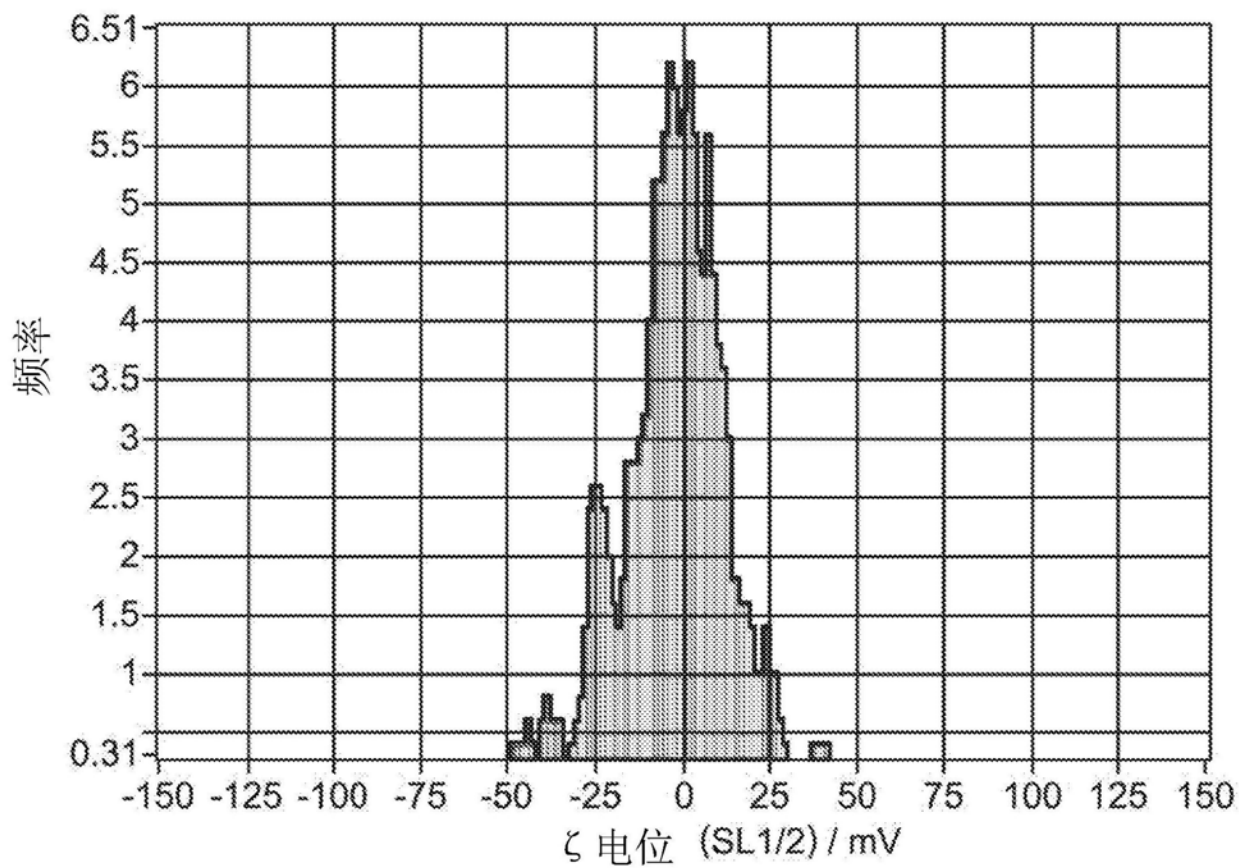
图74(续)



峰分析(绝对数量)

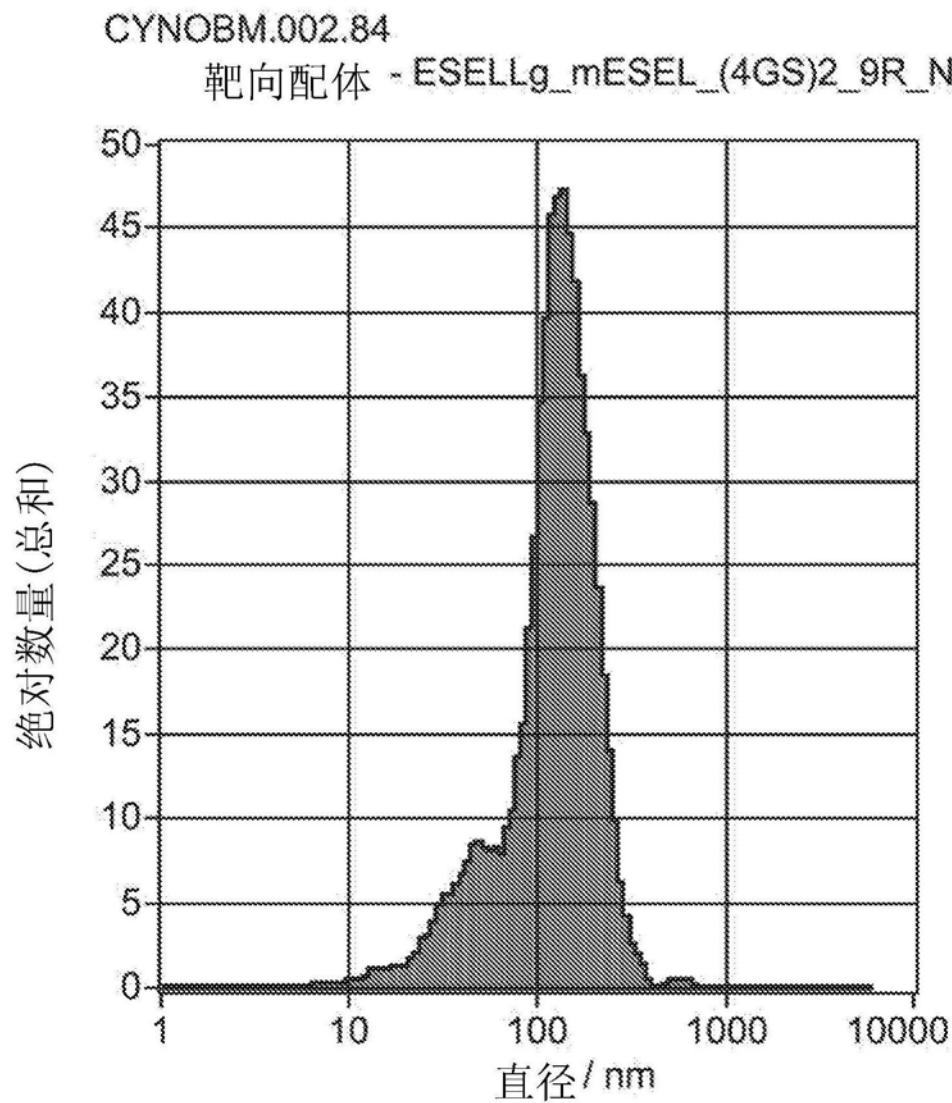
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
145.8	13.7	110.9	79.1
29.8	2.6	27.6	20.9
X值	数量	浓度	体积
X10	19.7	19.7	131.8
X50	120.6	120.6	214.2
X90	205.8	205.8	336.7
跨度	1.5	1.5	1.0
均值	121.8	121.8	236.6
标准方差	77.0	77.0	86.7

图75



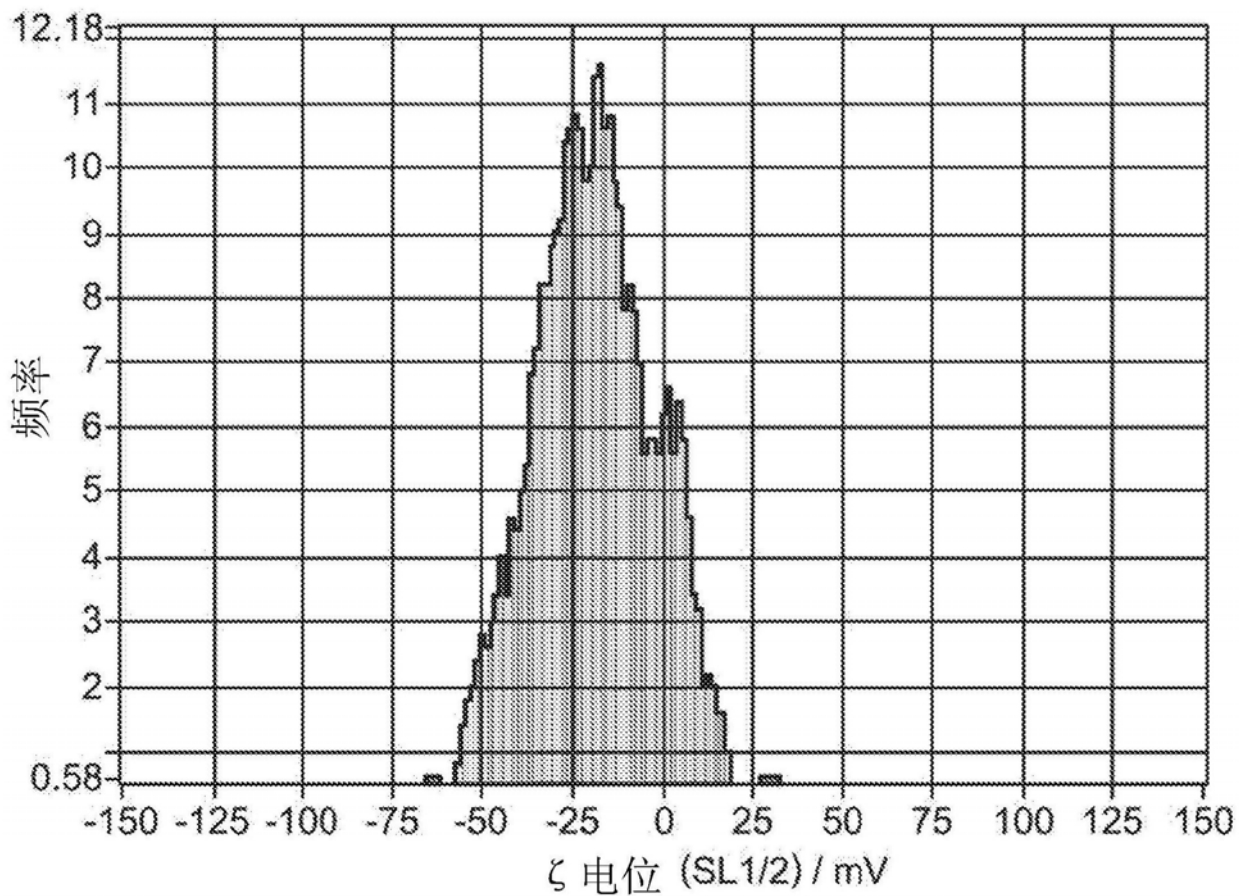
迁移性: $-0.18 \pm 0.02 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C : $-0.19 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: 13.6 (Smoluchowski)
25°C下ζ电位: $-2.47 \pm 0.33 \text{ mV}$
ζ电位分布: $-2.47 \text{ mV FWHM } 24.95 \text{ (SL1/2)}$
浓度: $1.3\text{E}+7$ 颗粒 / mL

图75 (续)



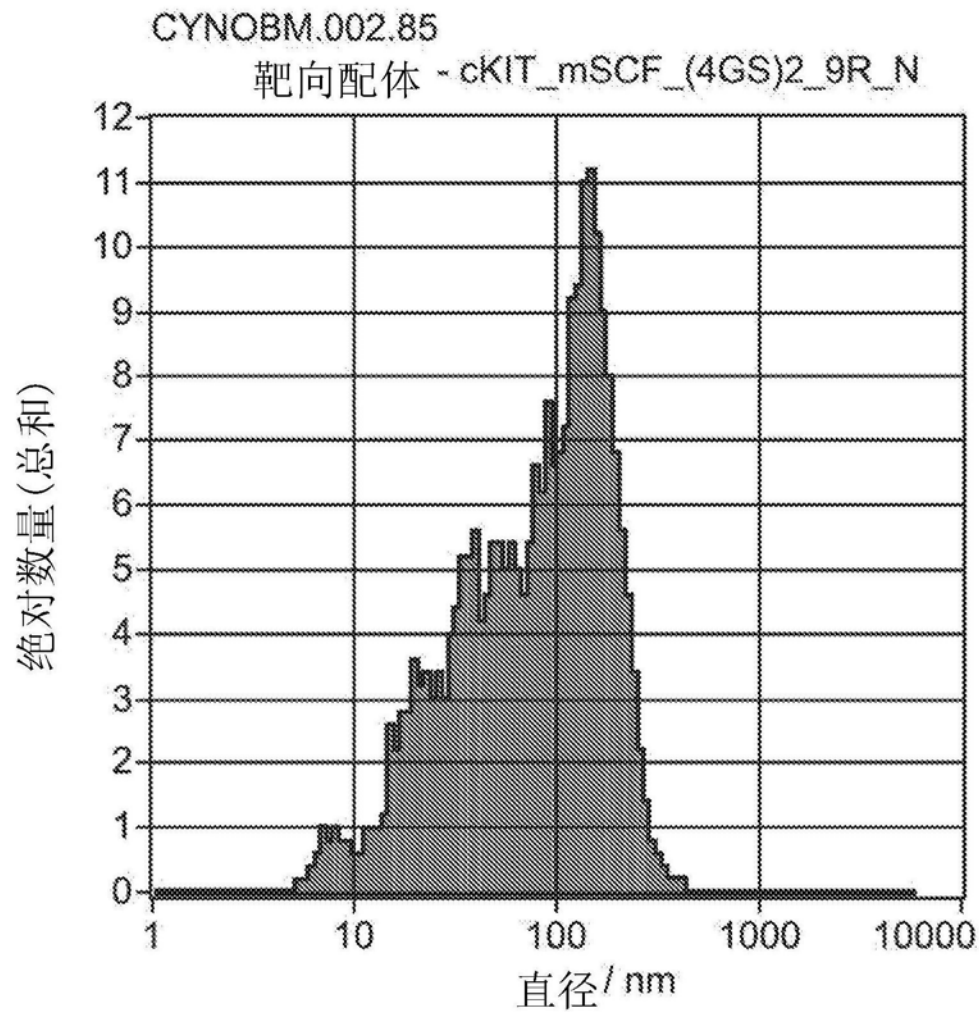
峰分析(绝对数量)			
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
137.3	47.1	115.7	100.0
X值	数量	浓度	体积
X10	46.9	46.9	124.0
X50	124.8	124.8	201.2
X90	204.3	204.3	534.7
跨度	1.3	1.3	2.0
均值	132.8	132.8	249.1
标准方差	64.5	64.5	138.2

图76



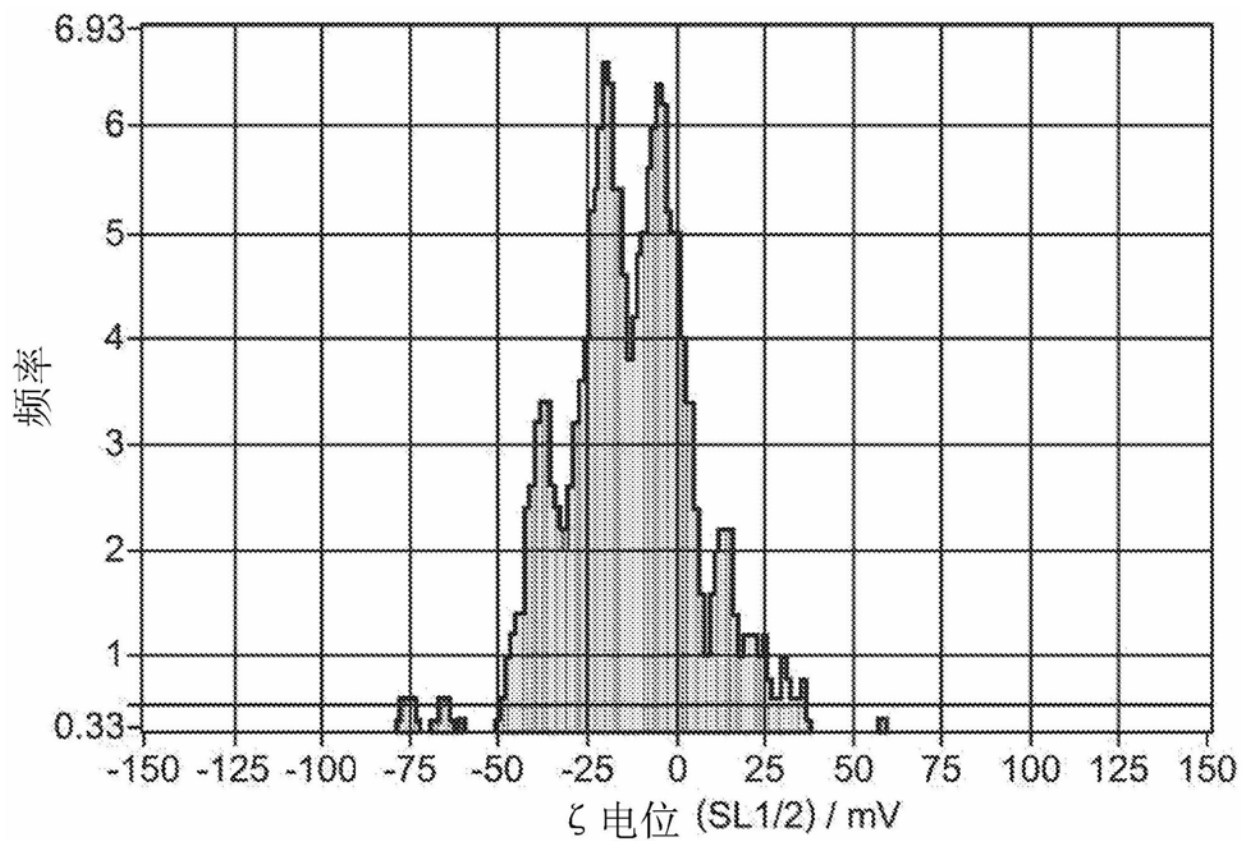
迁移性: $-1.33 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, @ 25°C : $-1.41 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$
ZP因子: 13.6 (Smoluchowski)
25°C下ζ电位: $-18.07 \pm 0.71 \text{ mV}$
ζ电位分布: $-18.07 \text{ mV FWHM } 33.89 \text{ (SL1/2)}$
浓度: $3.2\text{E}+7$ 颗粒 / mL

图76(续)



峰分析(绝对数量)			
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
145.1	11.1	135.0	69.8
46.5	4.7	27.3	30.2
X值	数量	浓度	体积
X10	19.9	19.9	122.4
X50	85.8	85.8	189.5
X90	186.0	186.0	287.1
跨度	1.9	1.9	0.9
均值	99.0	99.0	203.3
标准方差	67.7	67.7	70.4

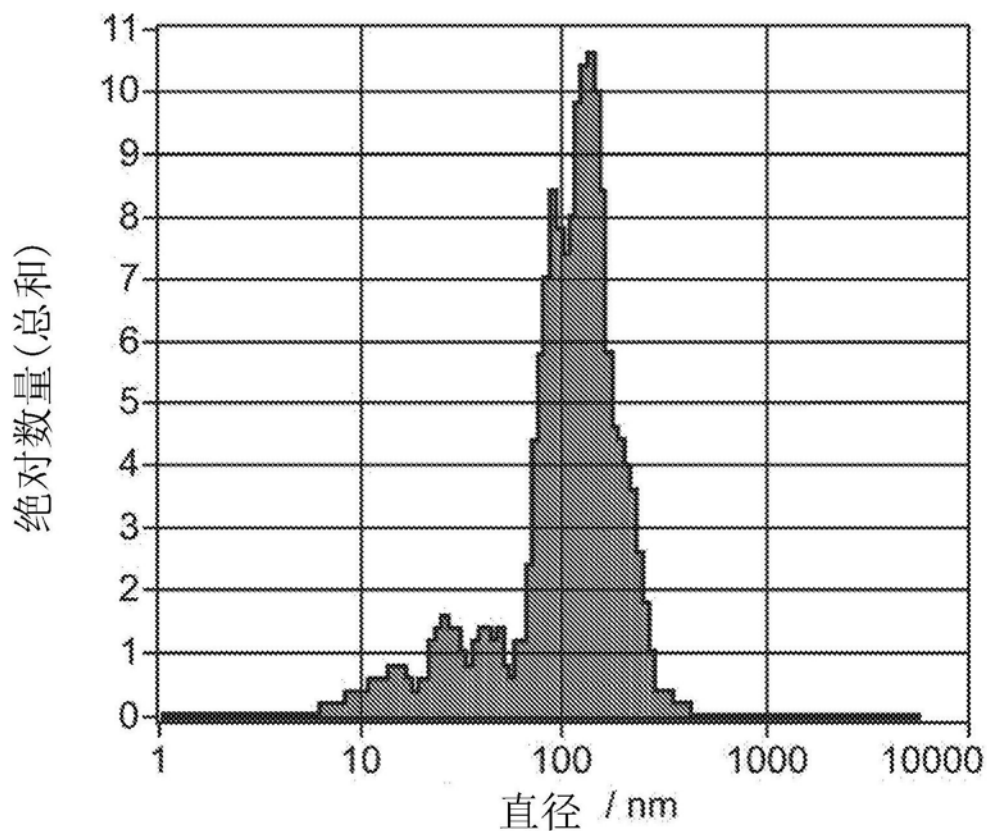
图77



迁移性: $-0.93 \pm 0.02 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C: $-0.98 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: 13.6 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: $-12.54 \pm 0.25 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-12.54 \text{ mV FWHM } 11.66 \text{ (SL1/2)}$
浓度: $1.2\text{E}+7$ 颗粒 / mL

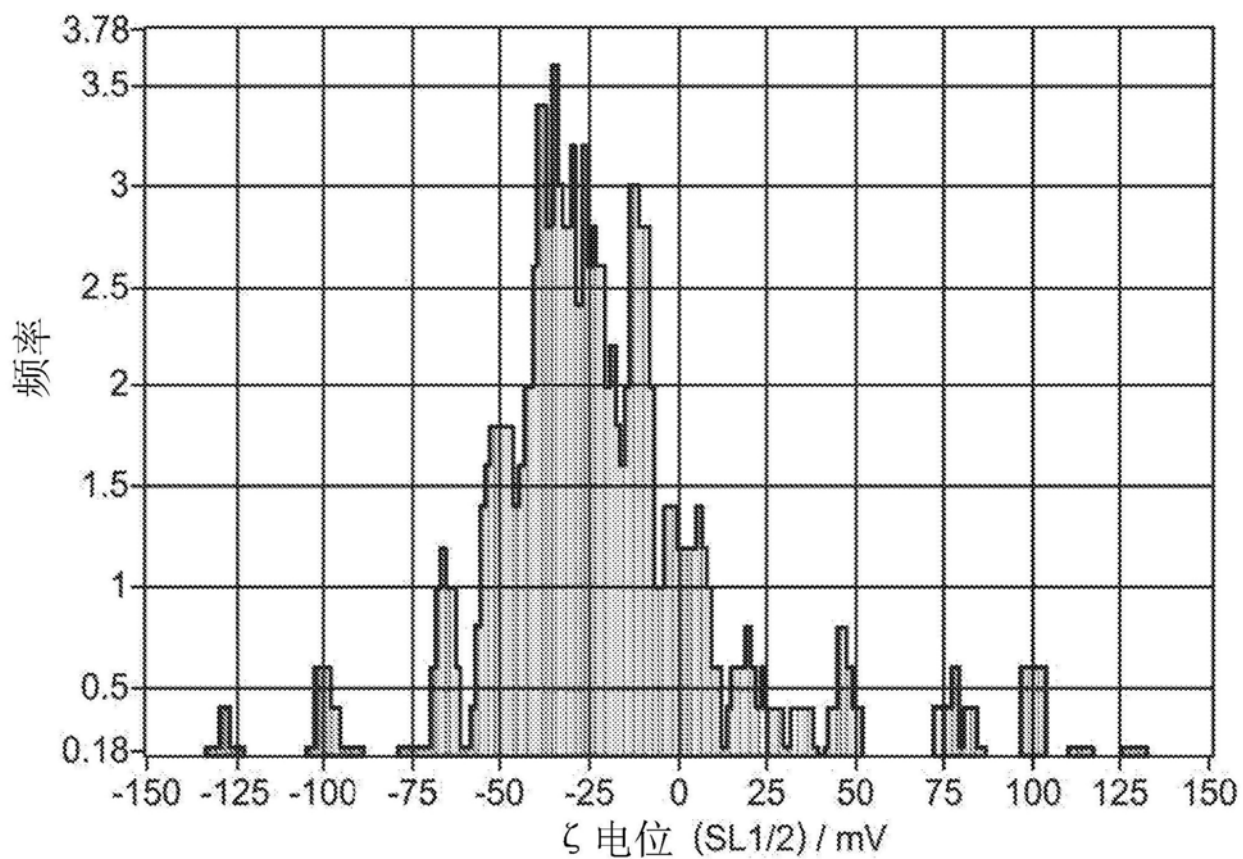
图77 (续)

CYN0BM.002.86

靶向配体 - IL2R_mIL2_(4GS)2_9R_N,
ESELLg_mESEL_(4GS)2_9R_N, cKIT_mSCF_(4GS)2_9R_N

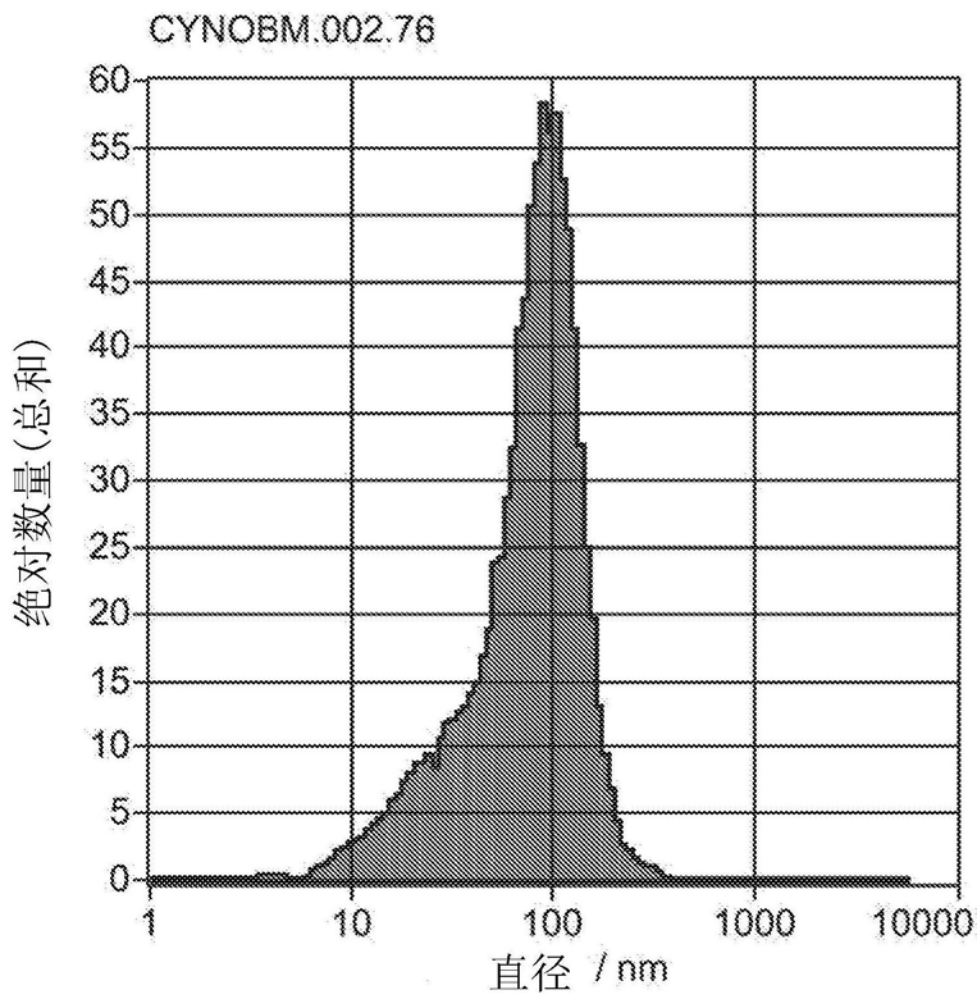
峰分析(绝对数量)			
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
126.5			
30.4	10.2	98.1	84.7
	1.4	12.9	15.3
X值	数量	浓度	体积
X10	30.0	30.0	117.0
X50	115.1	115.1	189.6
X90	194.4	194.4	297.0
跨度	1.4	1.4	0.9
均值	118.8	118.8	202.2
标准方差	61.2	61.2	75.1

图78



迁移性: $-1.47 \pm 0.01 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C: $-1.56 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: 13.6 (Smoluchowski)
25°C 下 ζ 电位: $-20.02 \pm 0.10 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-20.02 \text{ mV FWHM } 26.45 \text{ (SL1/2)}$
浓度: $3.7\text{E}+7$ 颗粒 / mL

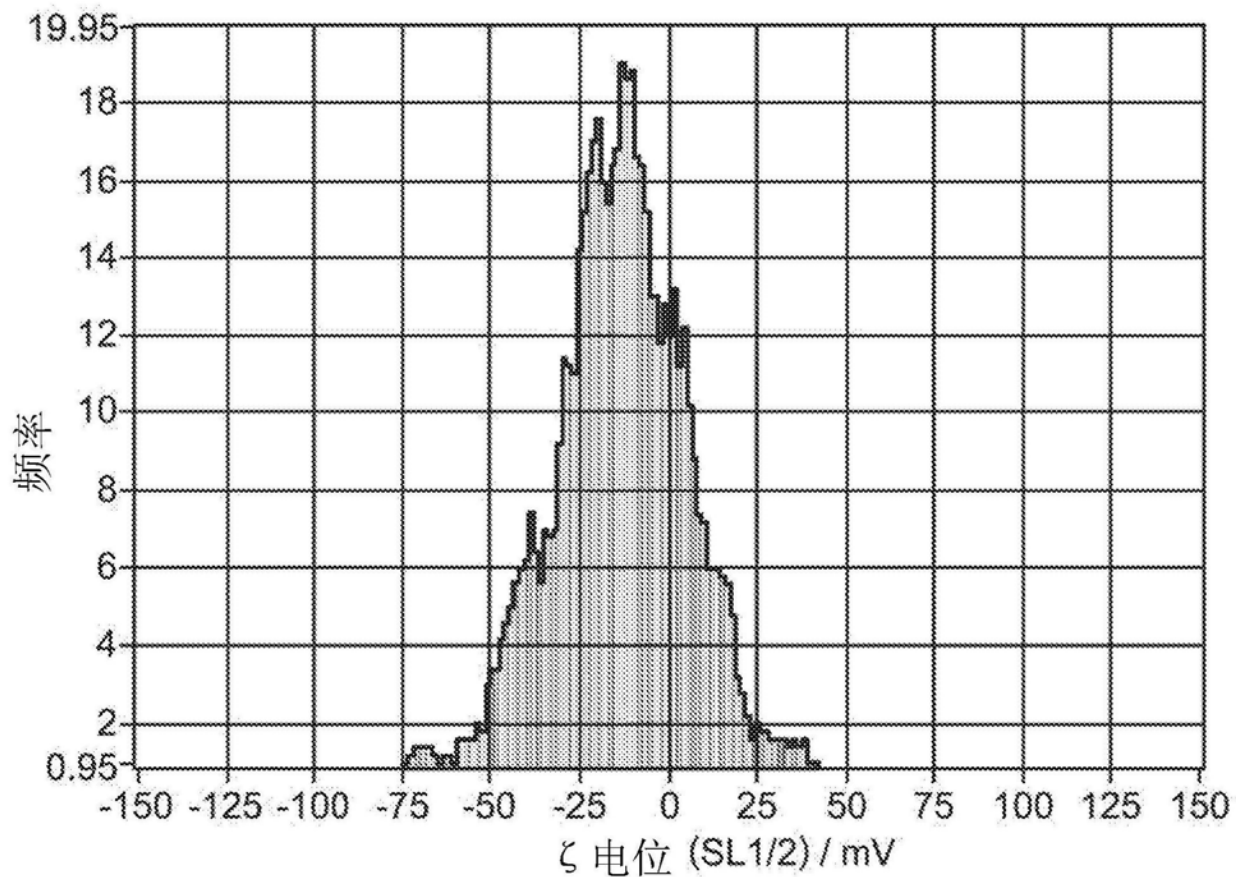
图78 (续)



峰分析(绝对数量)

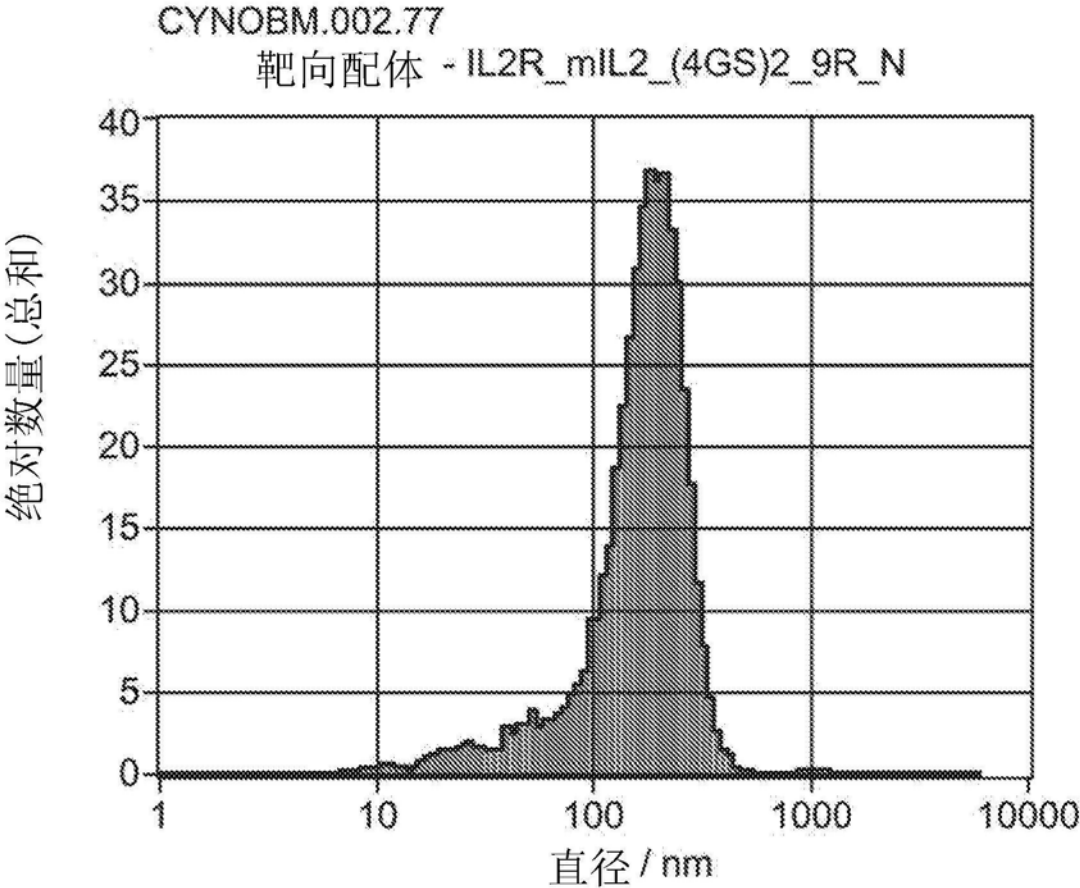
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
96.7	56.8	82.4	100.0
X值	数量	浓度	体积
X10	25.8	25.8	84.3
X50	80.6	80.6	132.8
X90	134.9	134.9	263.9
跨度	1.4	1.4	1.4
均值	85.6	85.6	153.4
标准方差	44.9	44.9	64.4

图79



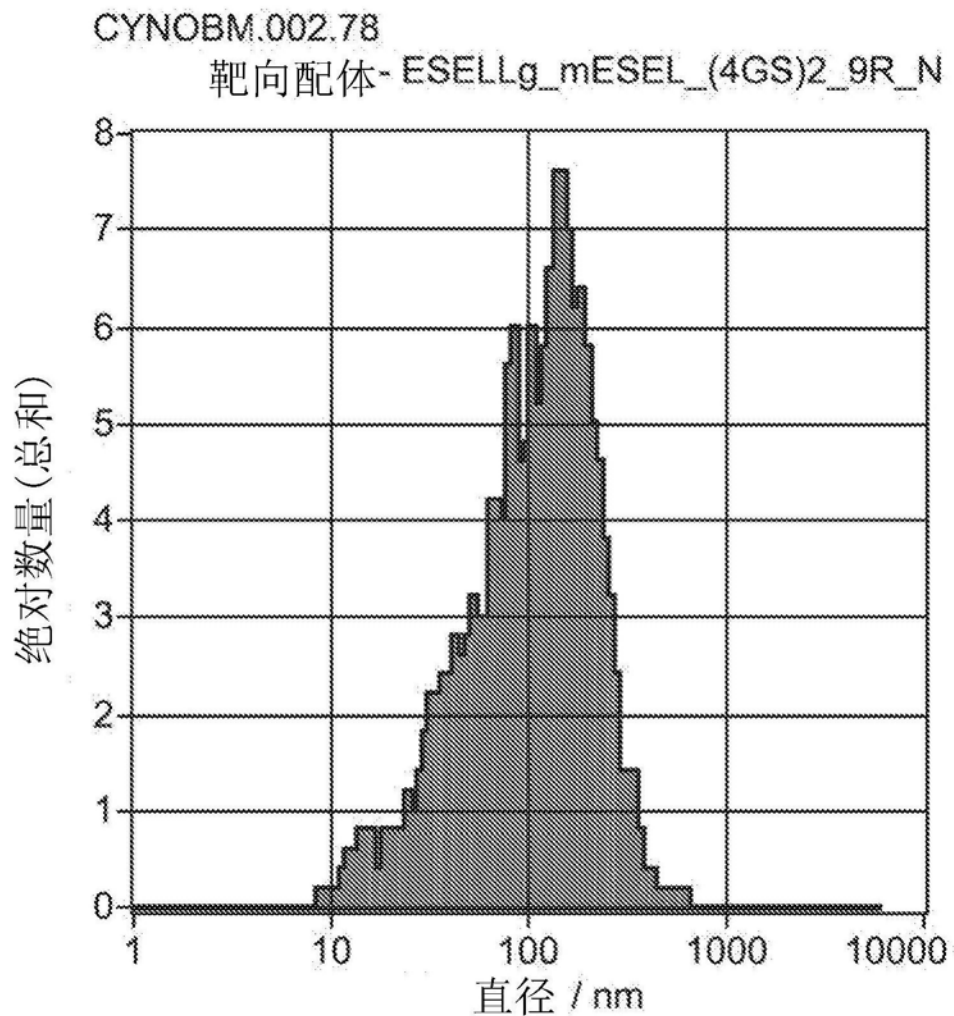
迁移性: $-0.89 \pm 0.04 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, @ 25°C : $-0.94 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$
ZP因子: 13.5 (Smoluchowski)
25°C 下 ζ 电位: $-12.02 \pm 0.59 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-12.02 \text{ mV FWHM } 39.15 \text{ (SL1/2)}$
浓度: $5.1\text{E}+7$ 颗粒 / mL

图79 (续)



峰分析(绝对数量)			
直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
193.2	36.4	145.6	100.0
X值	数量	浓度	体积
X10	70.1	70.1	166.5
X50	171.6	171.6	250.9
X90	253.6	253.6	999.6
跨度	1.1	1.1	3.3
均值	176.1	176.1	415.4
标准方差	82.1	82.1	330.0

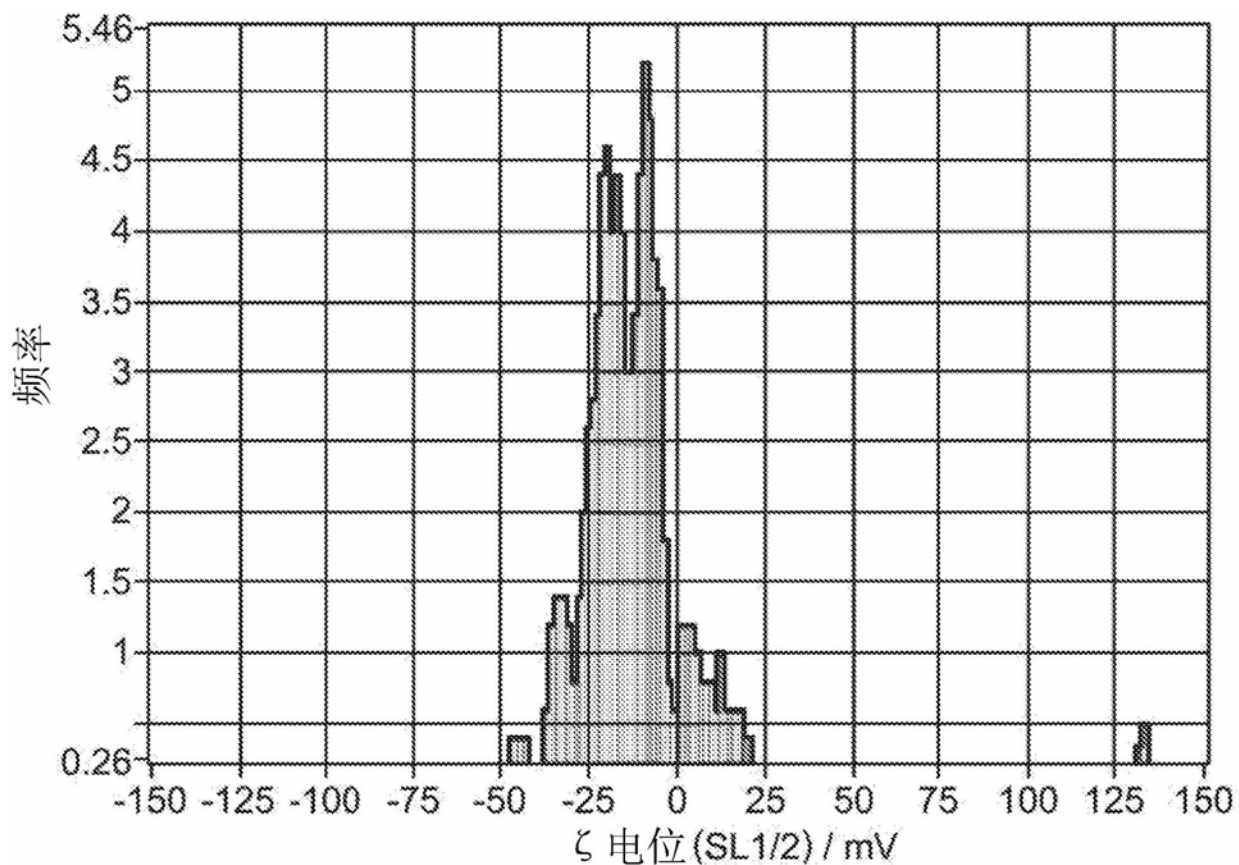
图80



峰分析(绝对数量)

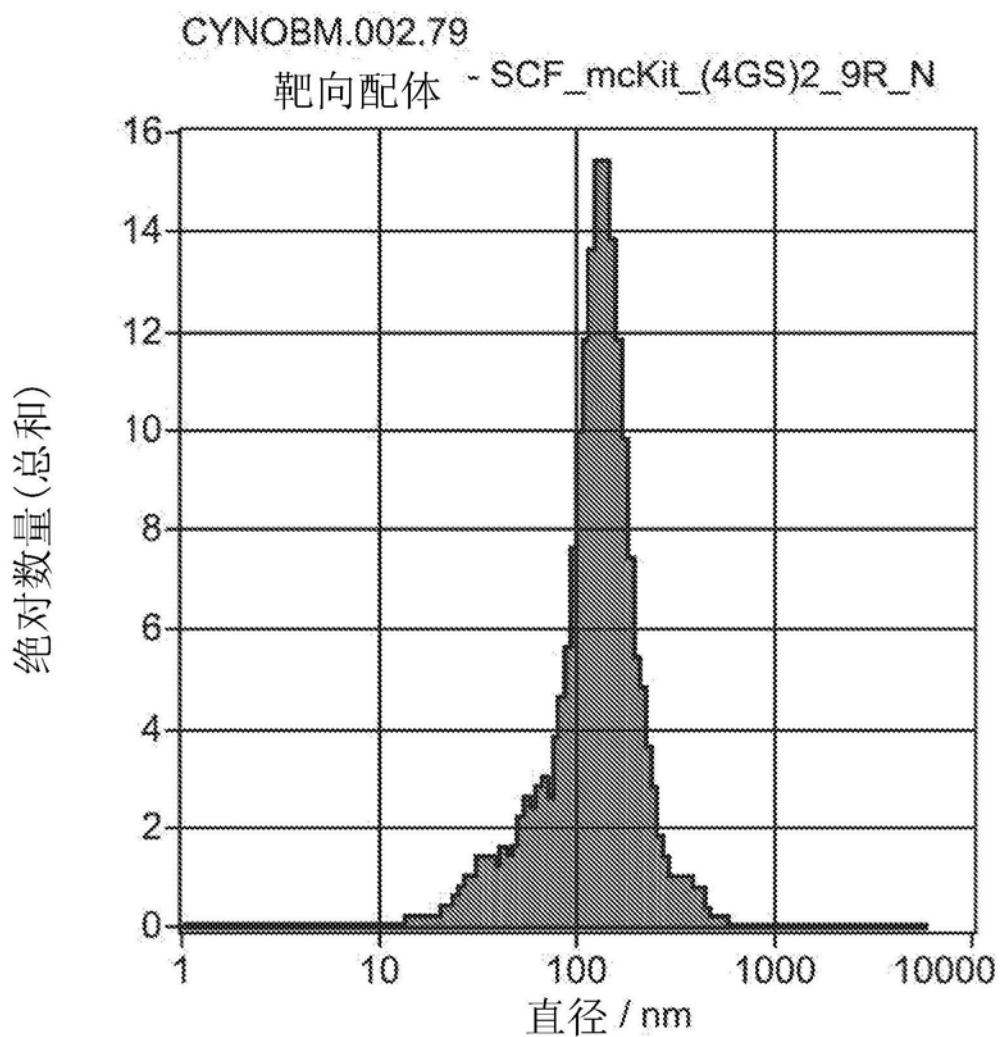
直径/ nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
152.0	7.4	178.1	100.0
X值	数量	浓度	体积
X10	33.1	33.1	141.5
X50	113.1	113.1	254.4
X90	222.1	222.1	534.3
跨度	1.7	1.7	1.5
均值	126.4	126.4	302.3
标准方差	83.9	83.9	142.8

图81



迁移性: $-0.87 \pm 0.06 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C: $-0.91 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: 13.5 (Smoluchowski)
25°C下 ζ 电位: $-11.72 \pm 0.79 \text{ mV}$
ζ 电位分布: $-11.72 \text{ mV FWHM } 10.76 \text{ (SL1/2)}$
浓度: $7.1\text{E}+6$ 颗粒 / mL

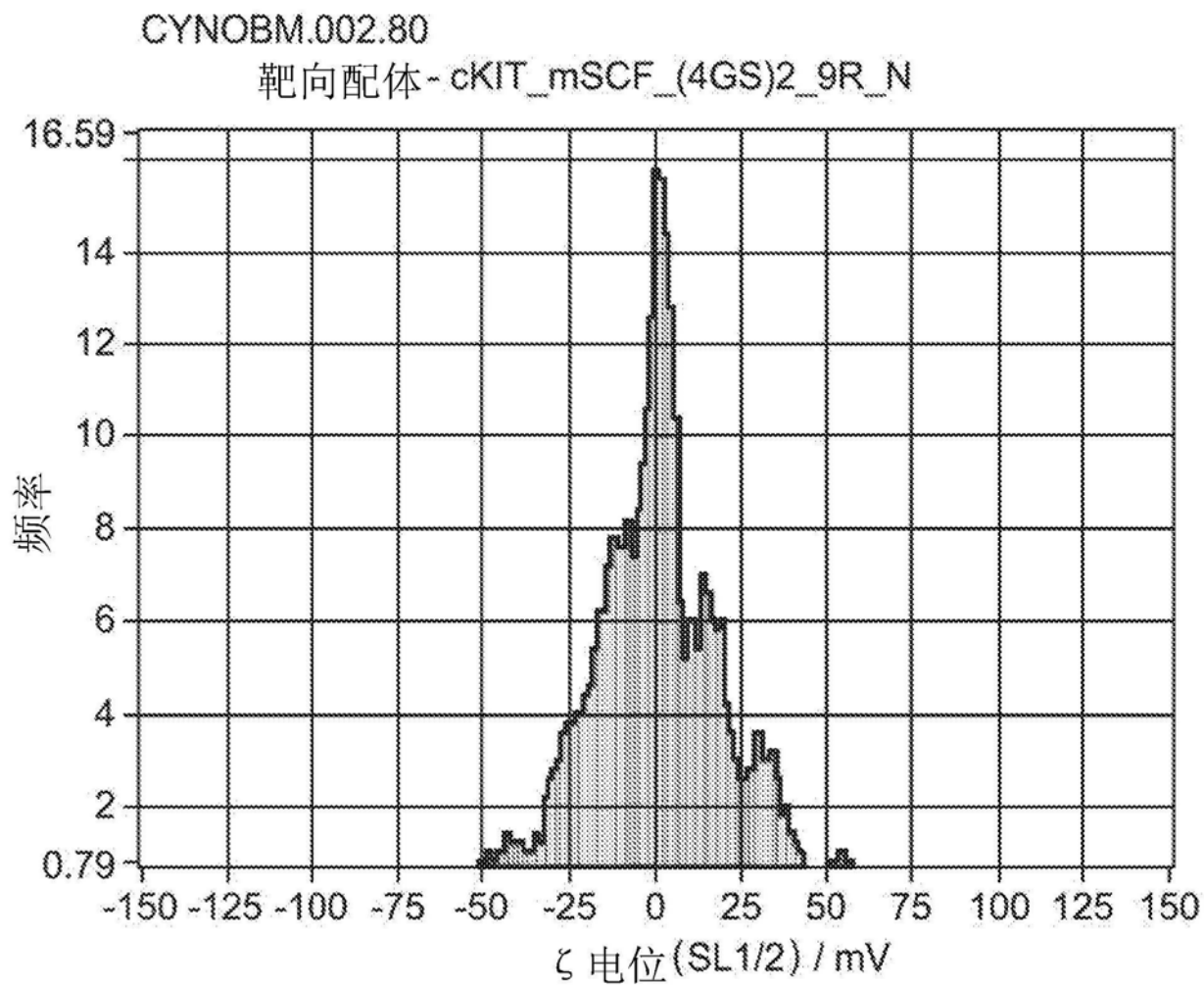
图81 (续)



峰分析(绝对数量)

直径 / nm	绝对数量	FWHM / nm	百分比
134.2	15.4	83.1	100.0
X值	数量	浓度	体积
X10	56.3	56.3	124.8
X50	125.0	125.0	221.3
X90	199.9	199.9	456.5
跨度	1.1	1.1	1.5
均值	135.2	135.2	263.1
标准方差	67.6	67.6	120.8

图82



迁移性: $0.10 \pm 0.12 \mu\text{m/sec/V/cm}$, @ 25°C: $0.11 \mu\text{m/sec/V/cm}$
ZP因子: 13.5 (Smoluchowski)
25°C 下 ζ 电位: $1.36 \pm 1.69 \text{ mV}$
ζ 电位分布: 1.36 mV FWHM 12.99 (SL1/2)
浓度: $2.5\text{E}+7$ 颗粒 / mL

图83

CynoBM.002 未转染对照

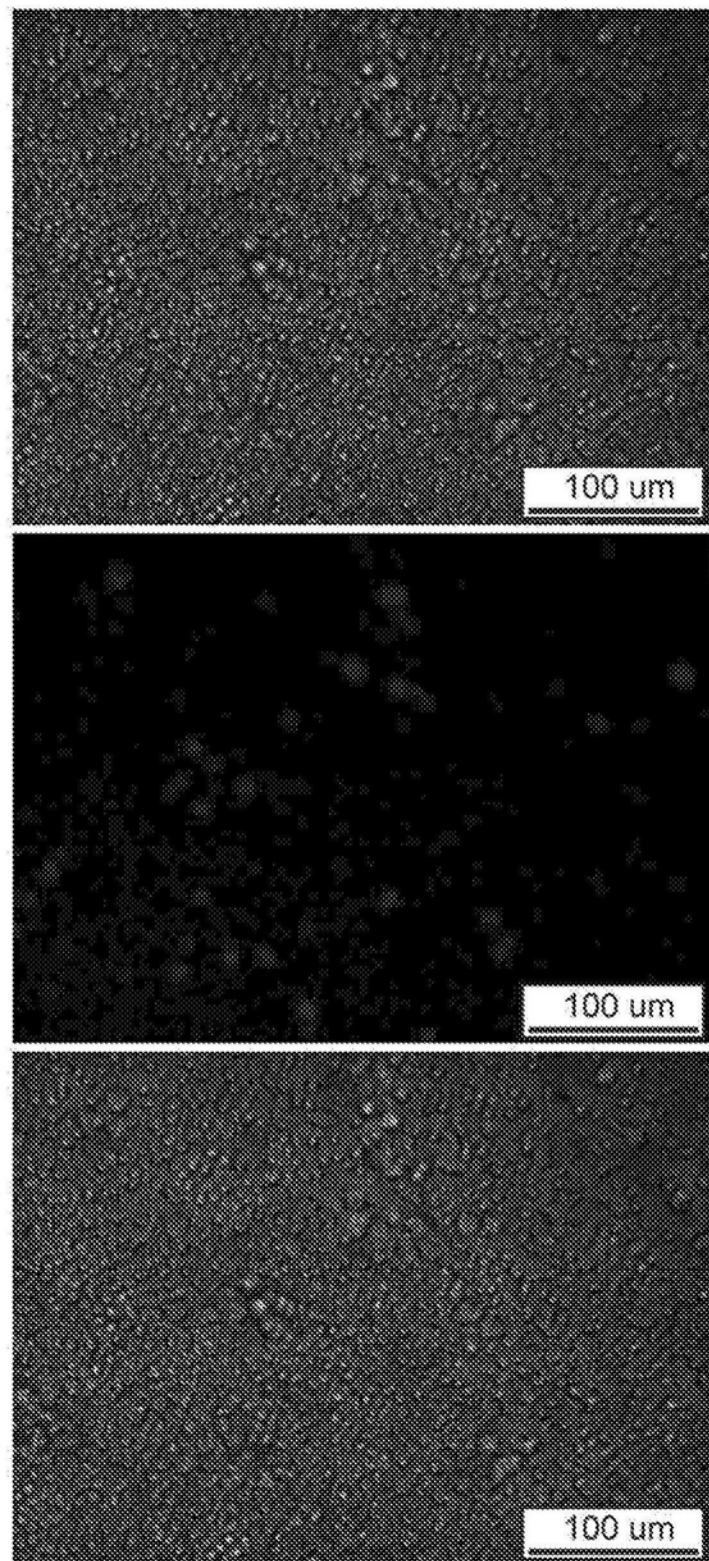
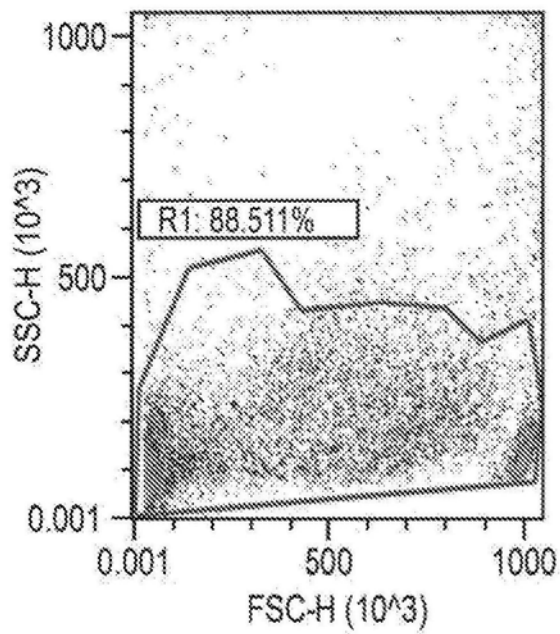
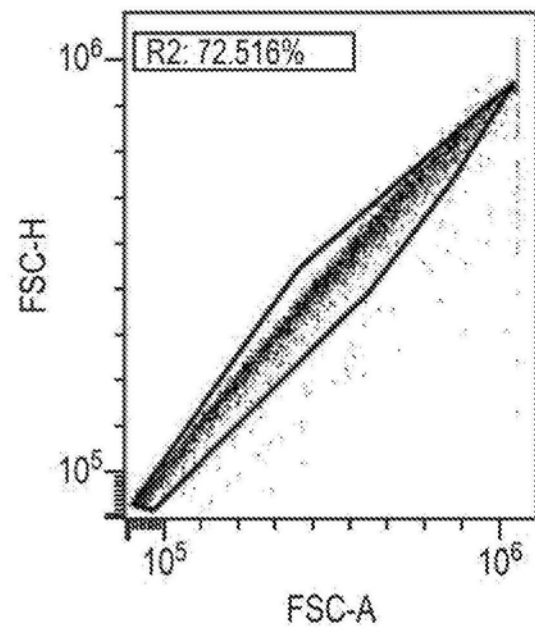


图84

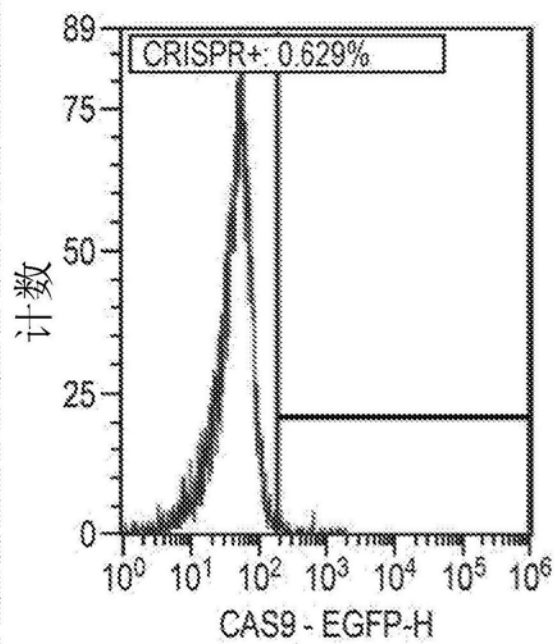
所有事件 - Cyno.002 未转染 A7-...



R1 - Cyno.002 未转染 A7-C7



活的 - Cyno.002 未转染 A7-C7



活的 - Cyno.002 未转染 A7-C7

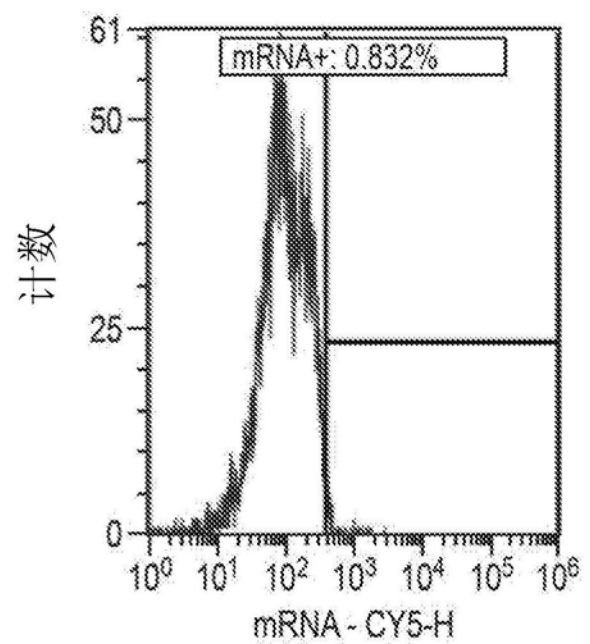


图84(续)

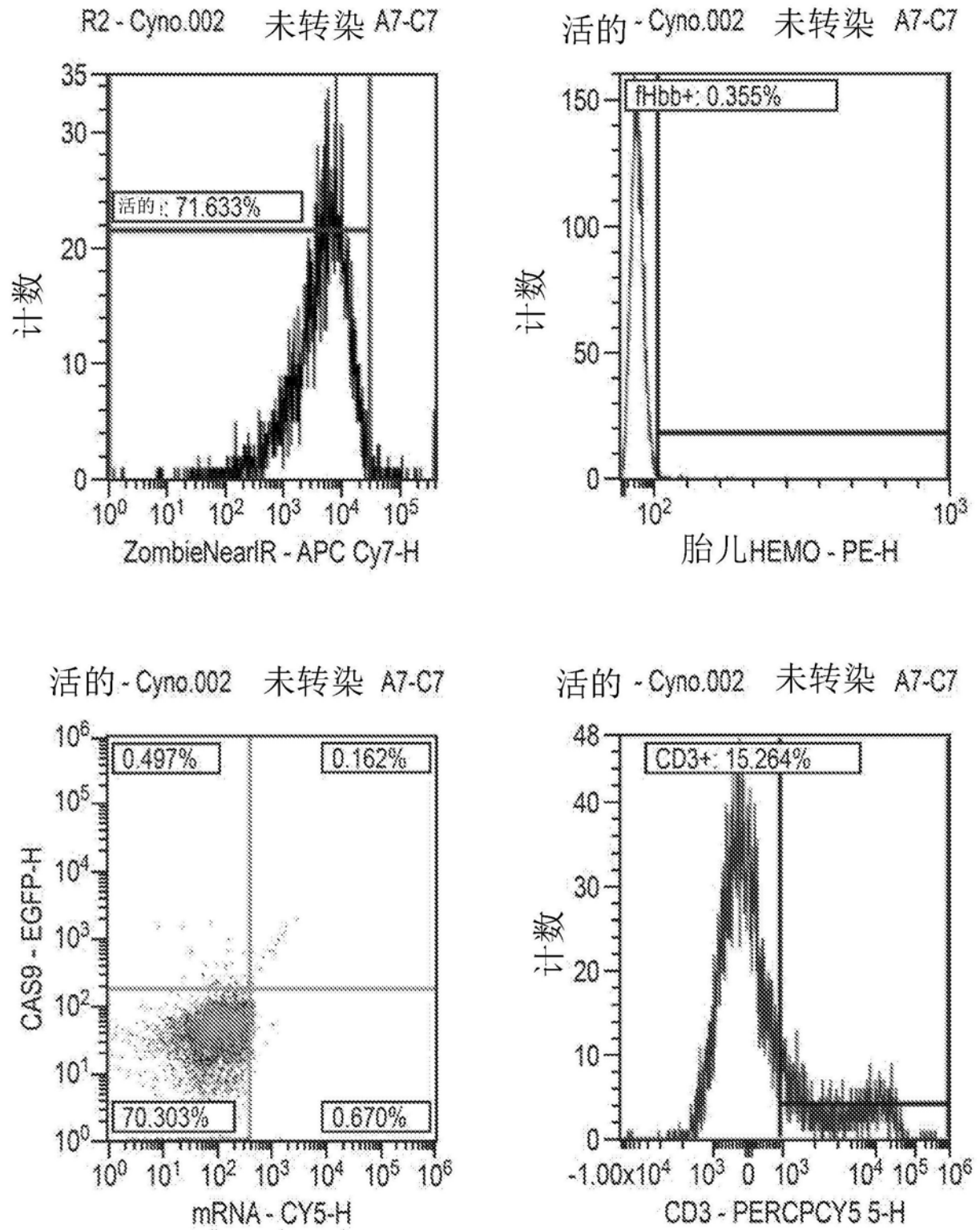


图84(续)

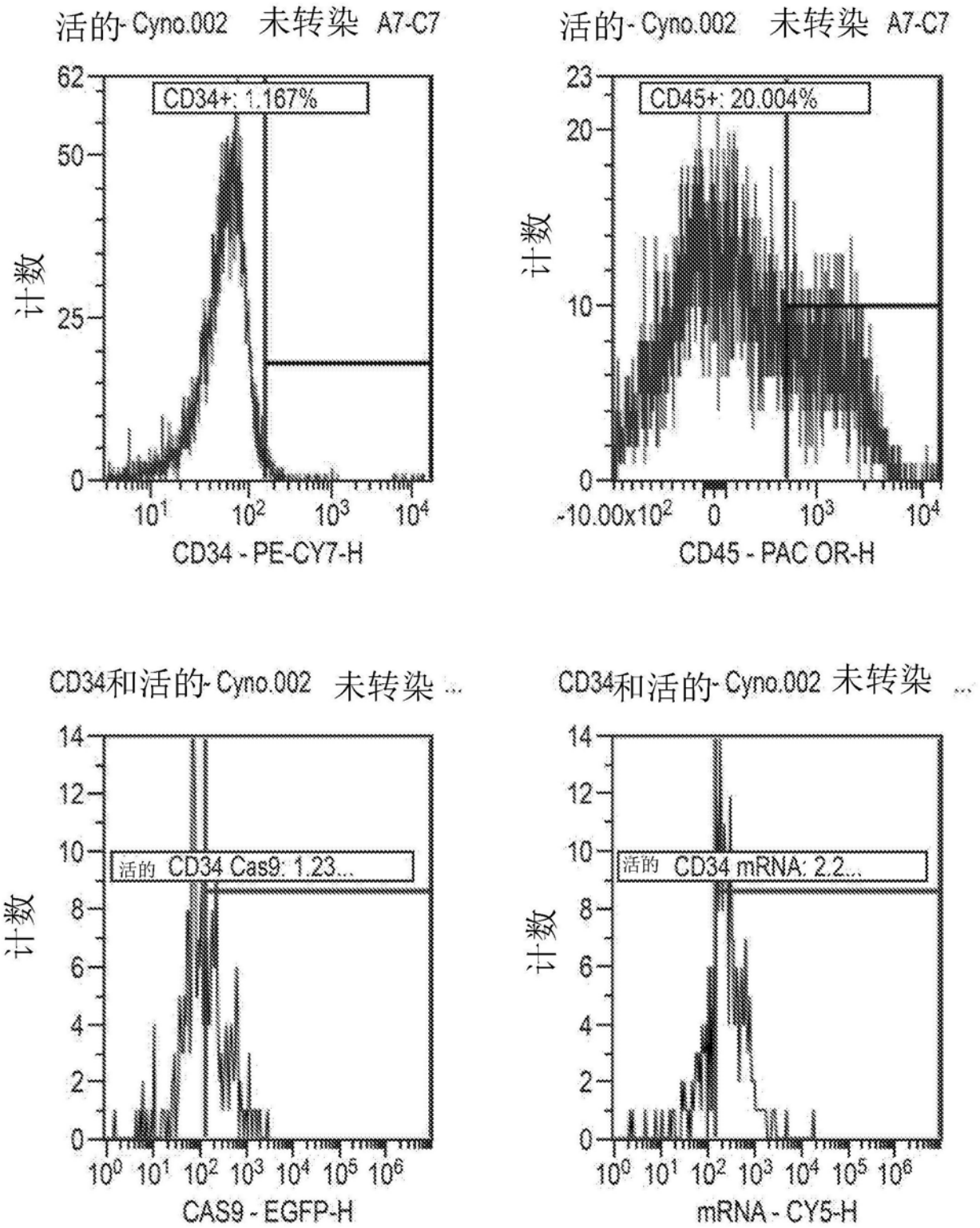


图84 (续)

CynoBM.002 Lipfectamine CRISPRMAX

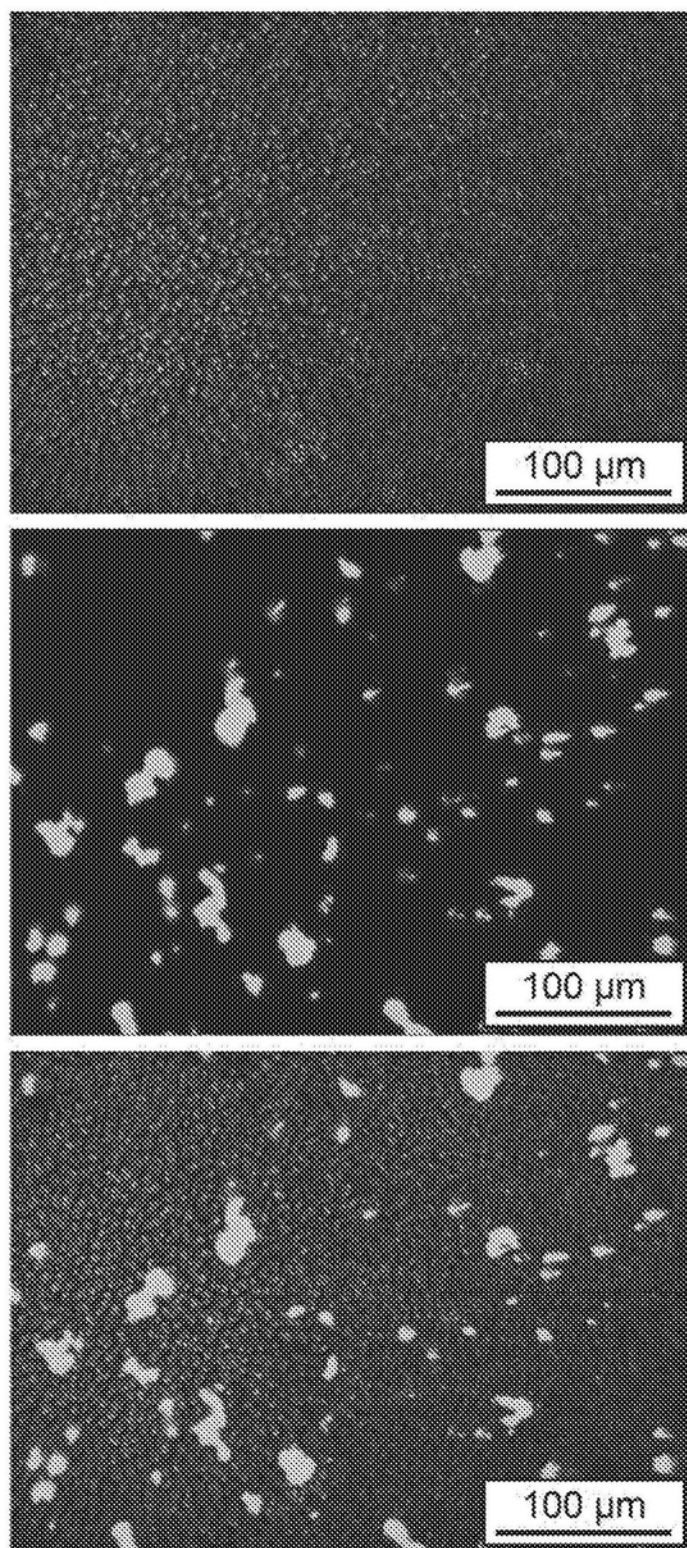
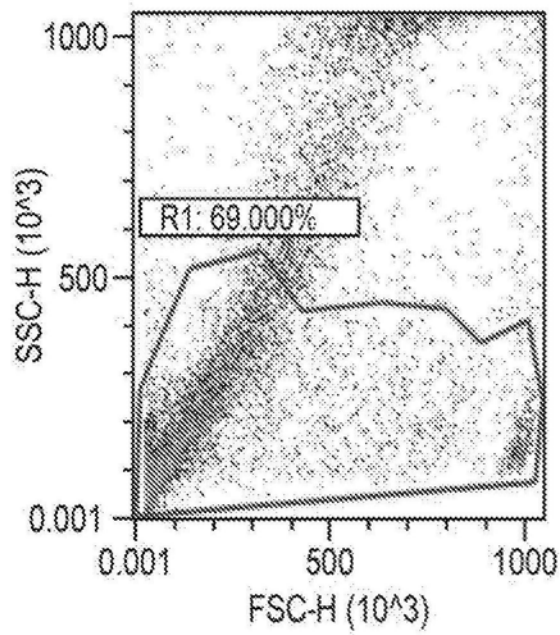
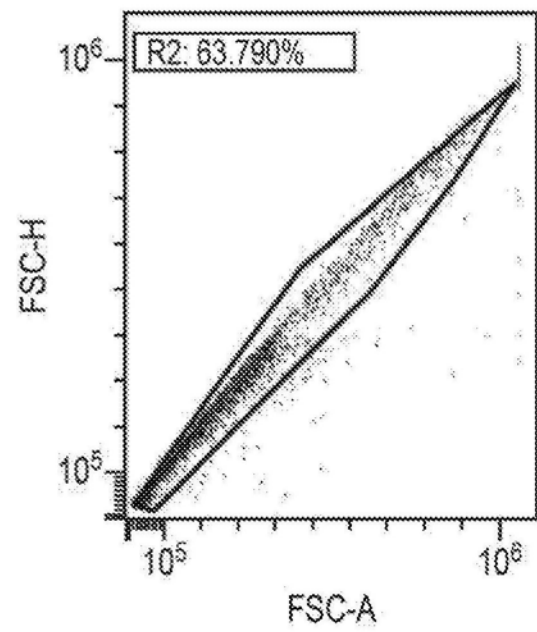


图85

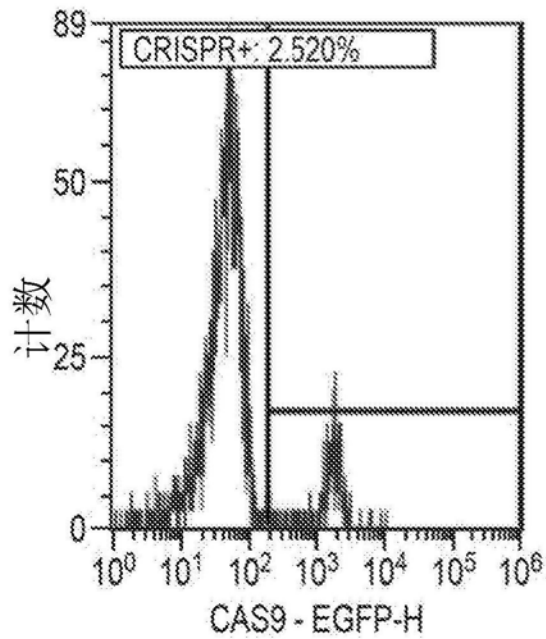
所有事件- Cyno.002 LIPOFECTAMINE...



R1 - Cyno.002 LIPOFECTAMINE C1-C3



活的 Cyno.002 LIPOFECTAMINE C1-C3



活的 - Cyno.002 LIPOFECTAMINE C1-C3

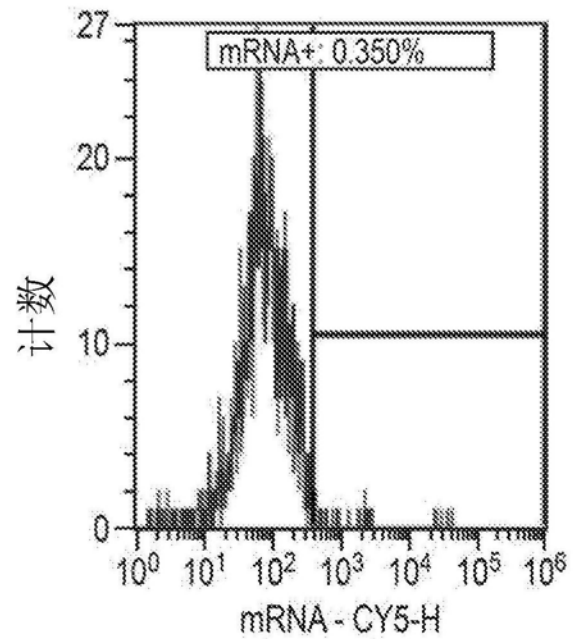


图85 (续)

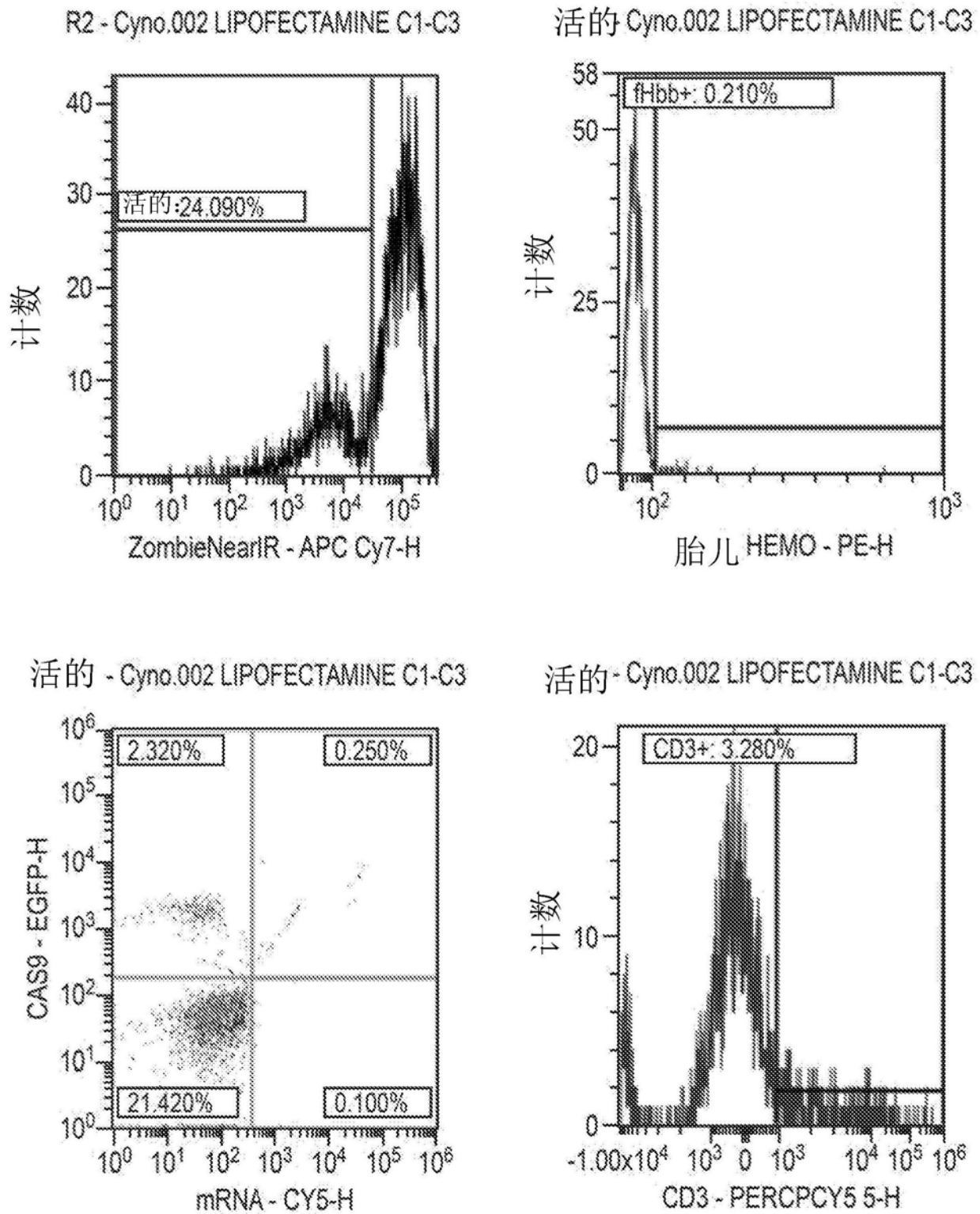


图85 (续)

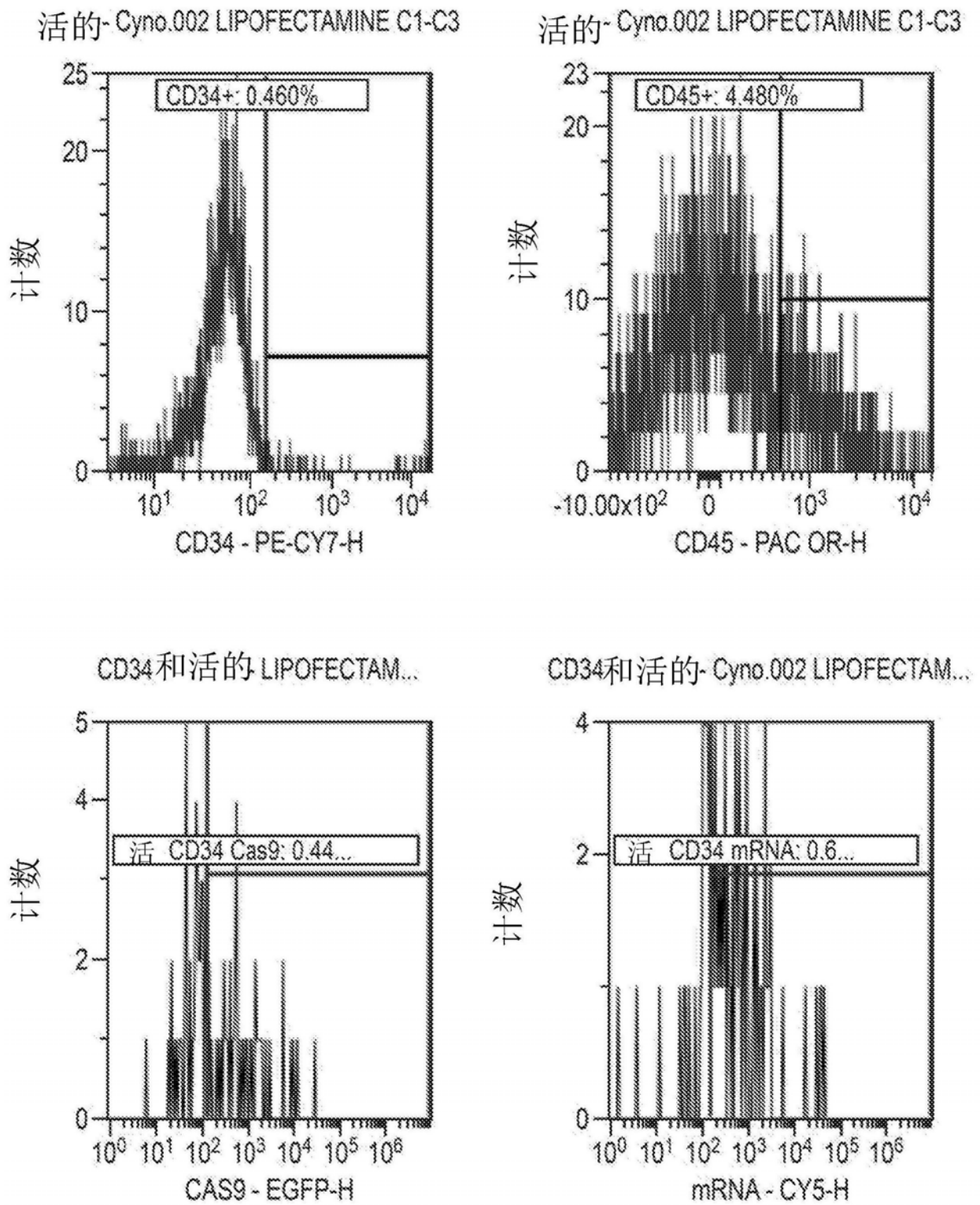
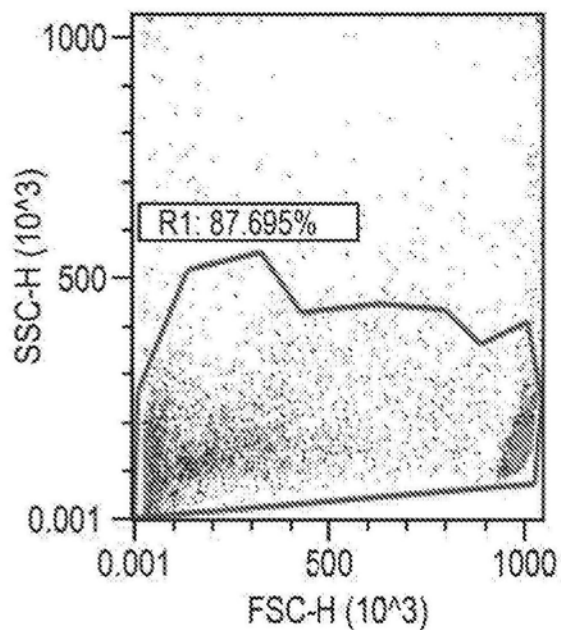


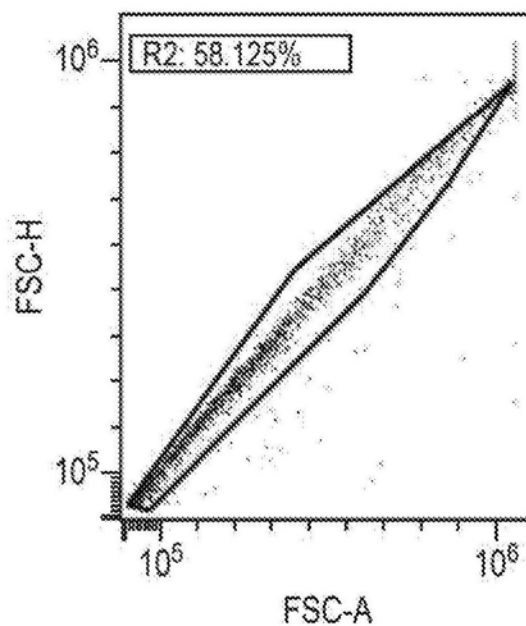
图85 (续)

仅 CynoBM.002 EGFP-RNP & Cy5 mRNA

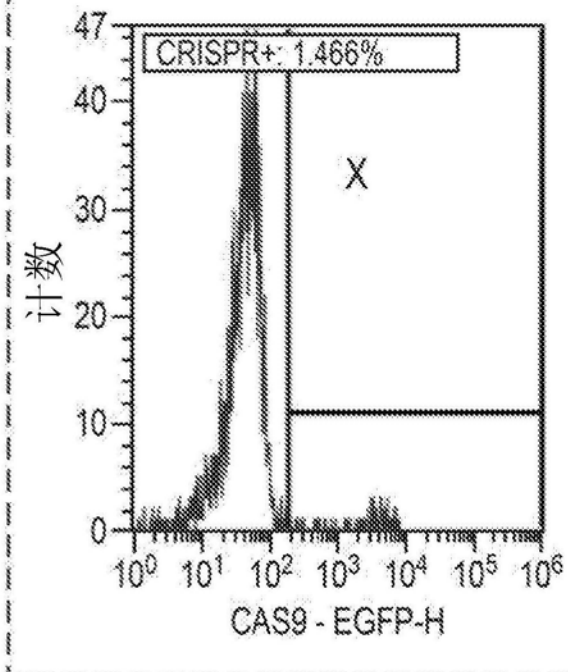
所有事件 - Cyno.002 mRNA 和 CRISP...



R1 - 仅Cyno.002 mRNA 和 CRISPR



活的 - Cyno.002 mRNA 和 CRISPR 仅 ...



活的 - Cyno.002 mRNA 和 CRISPR 仅 ...

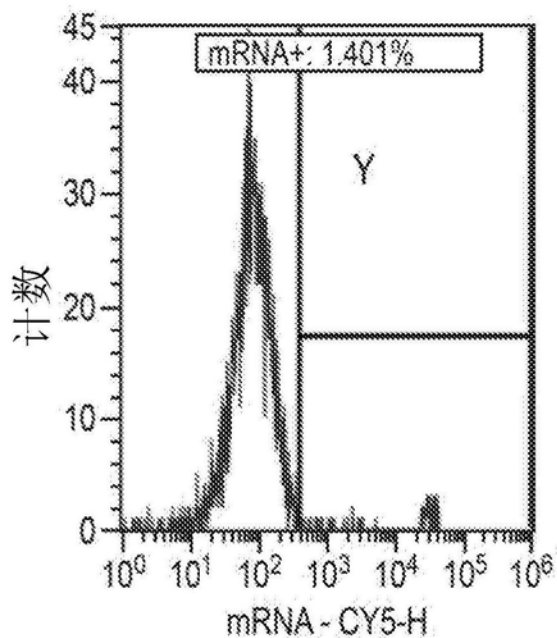


图86

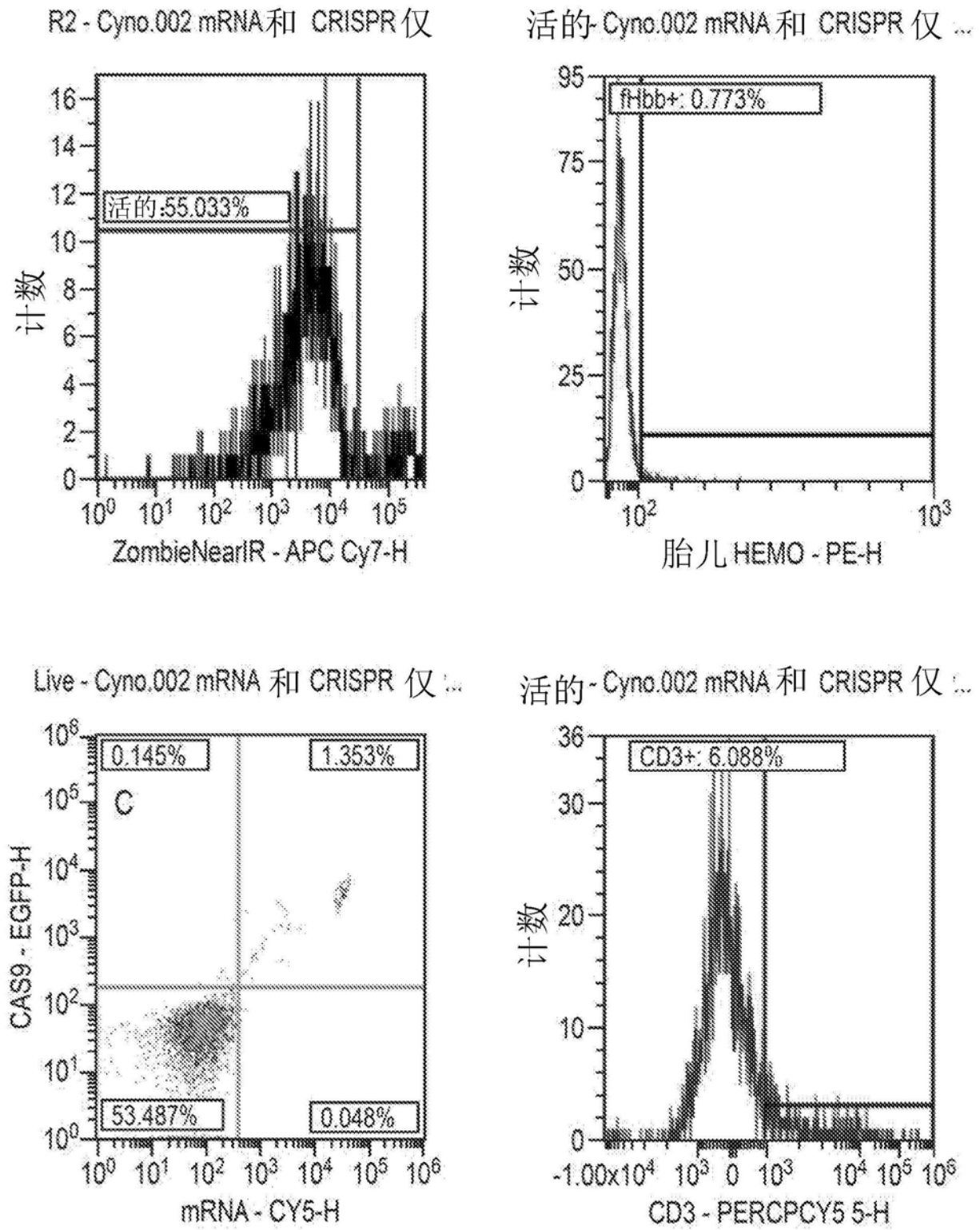
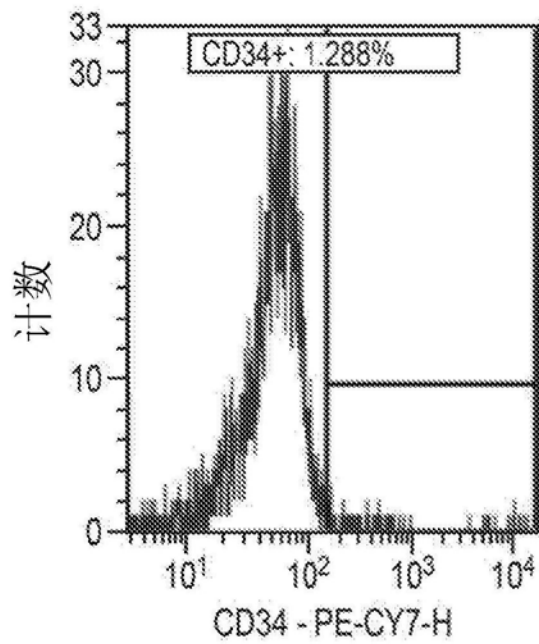
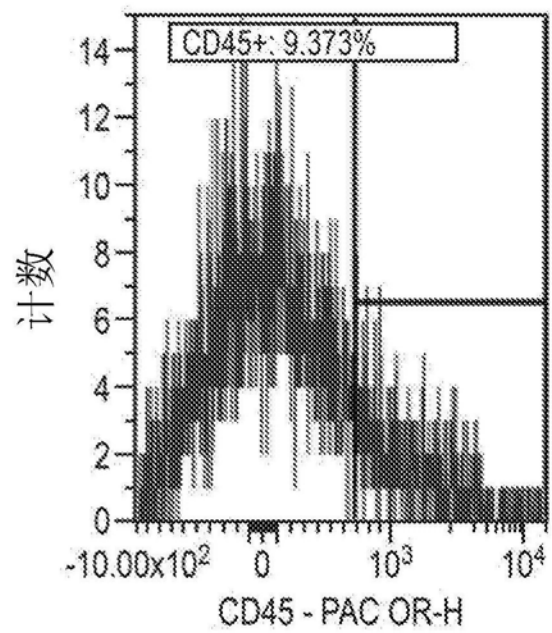


图86 (续)

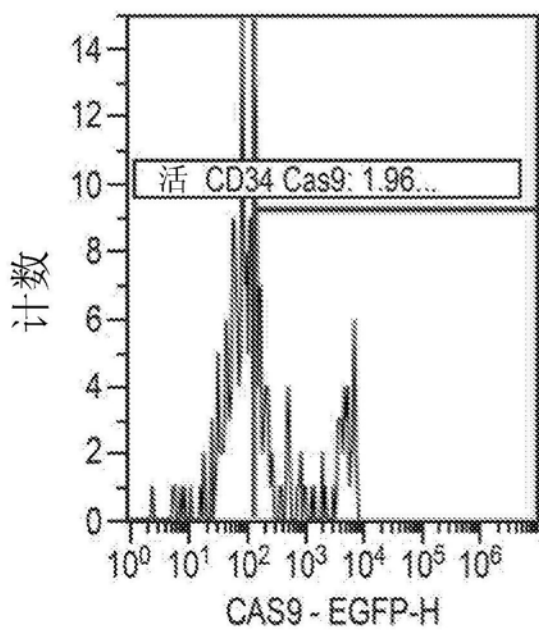
活的 - Cyno.002 mRNA 和 CRISPR 仅 ...



活的 - Cyno.002 mRNA 和 CRISPR 仅 ...



CD34和活的 Cyno.002 mRNA 和 C...



CD34和活的 - Cyno.002 mRNA 和 C...

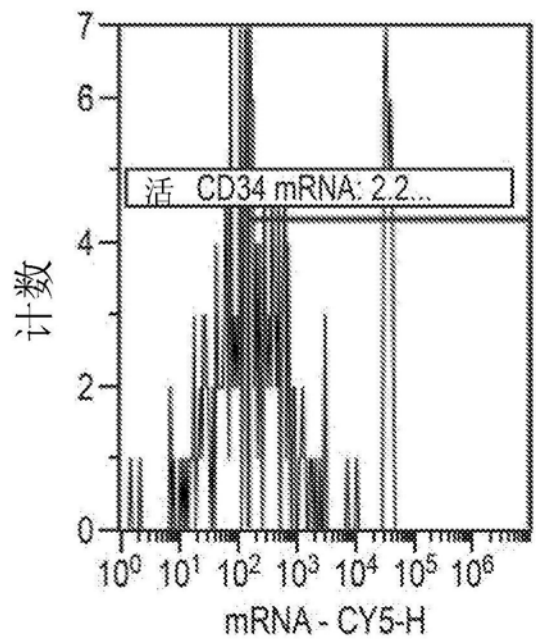


图86 (续)

CynoBM.002.82

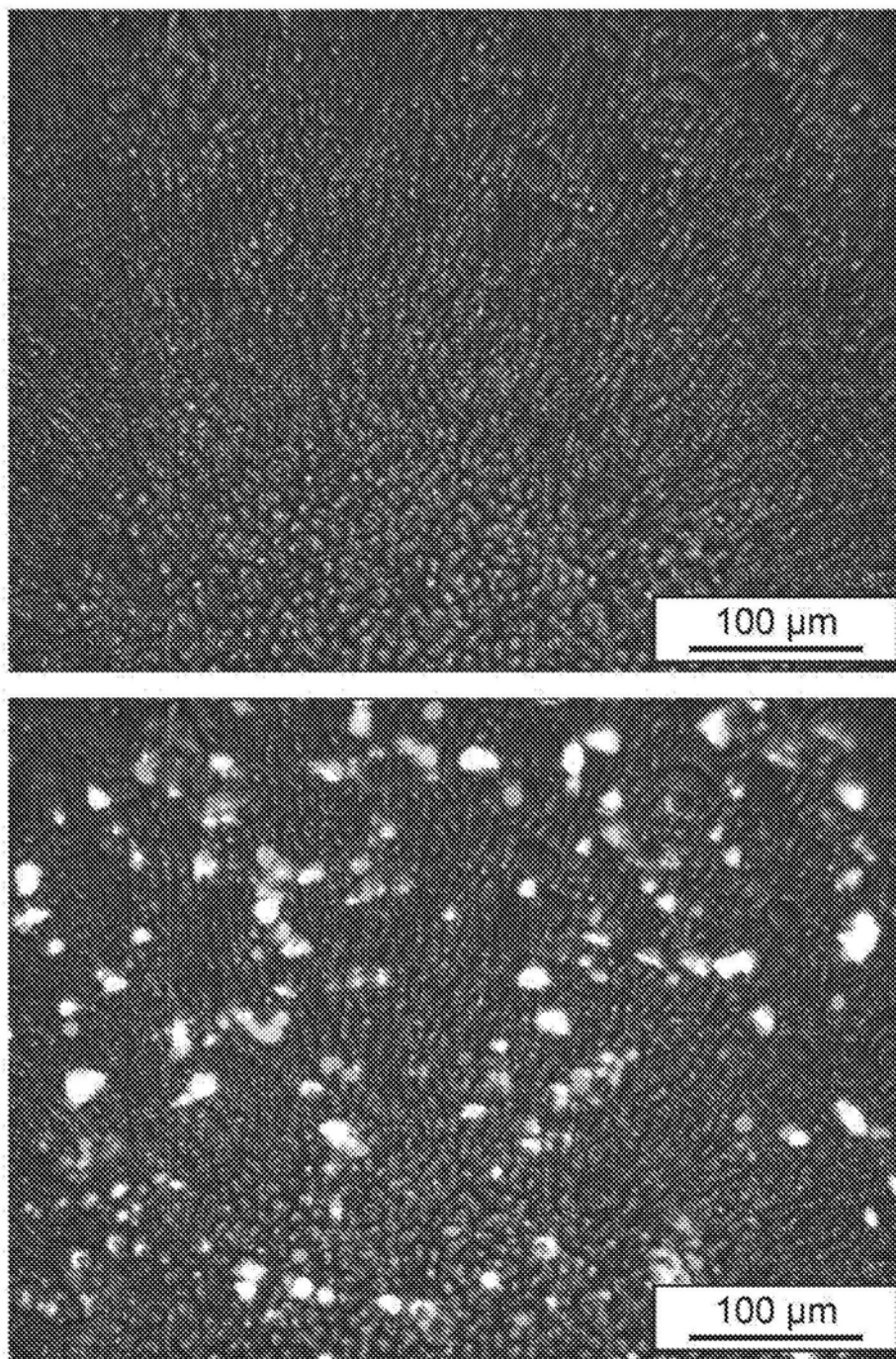


图87

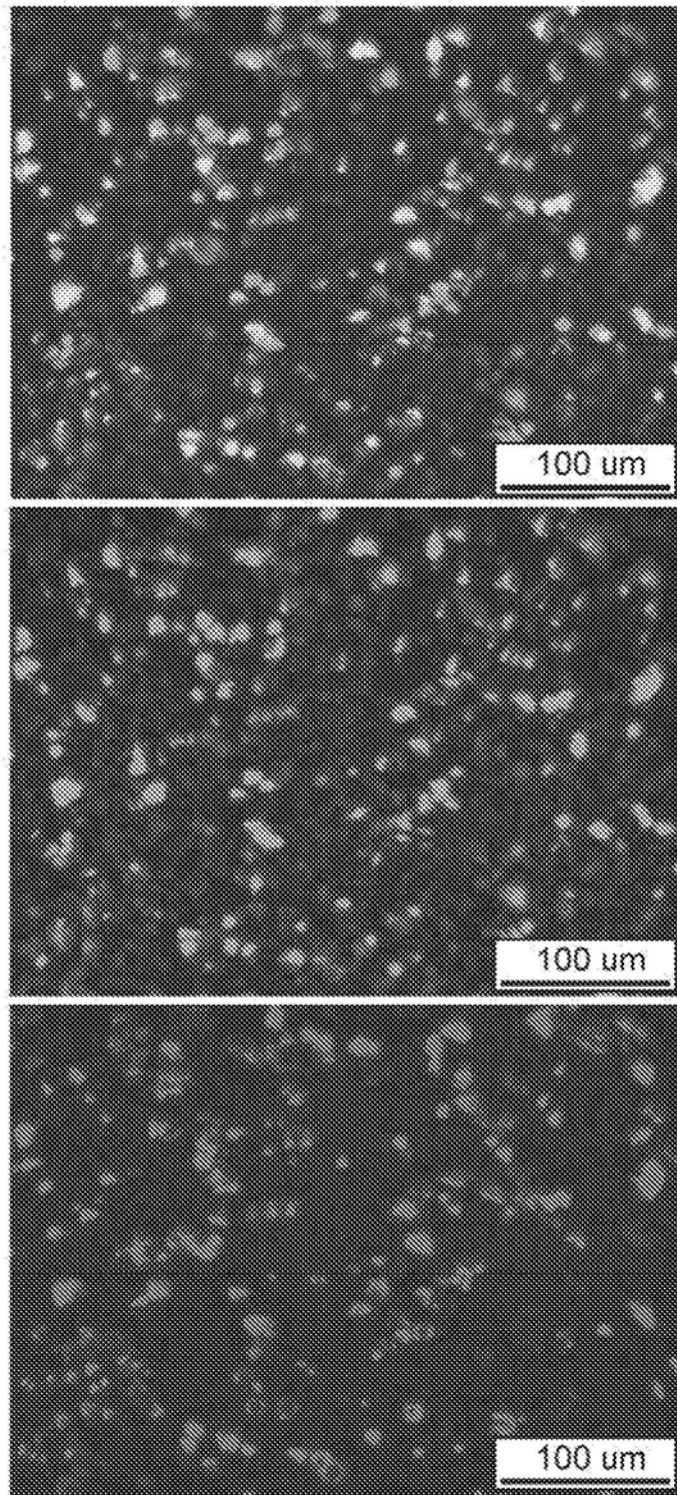


图87(续)

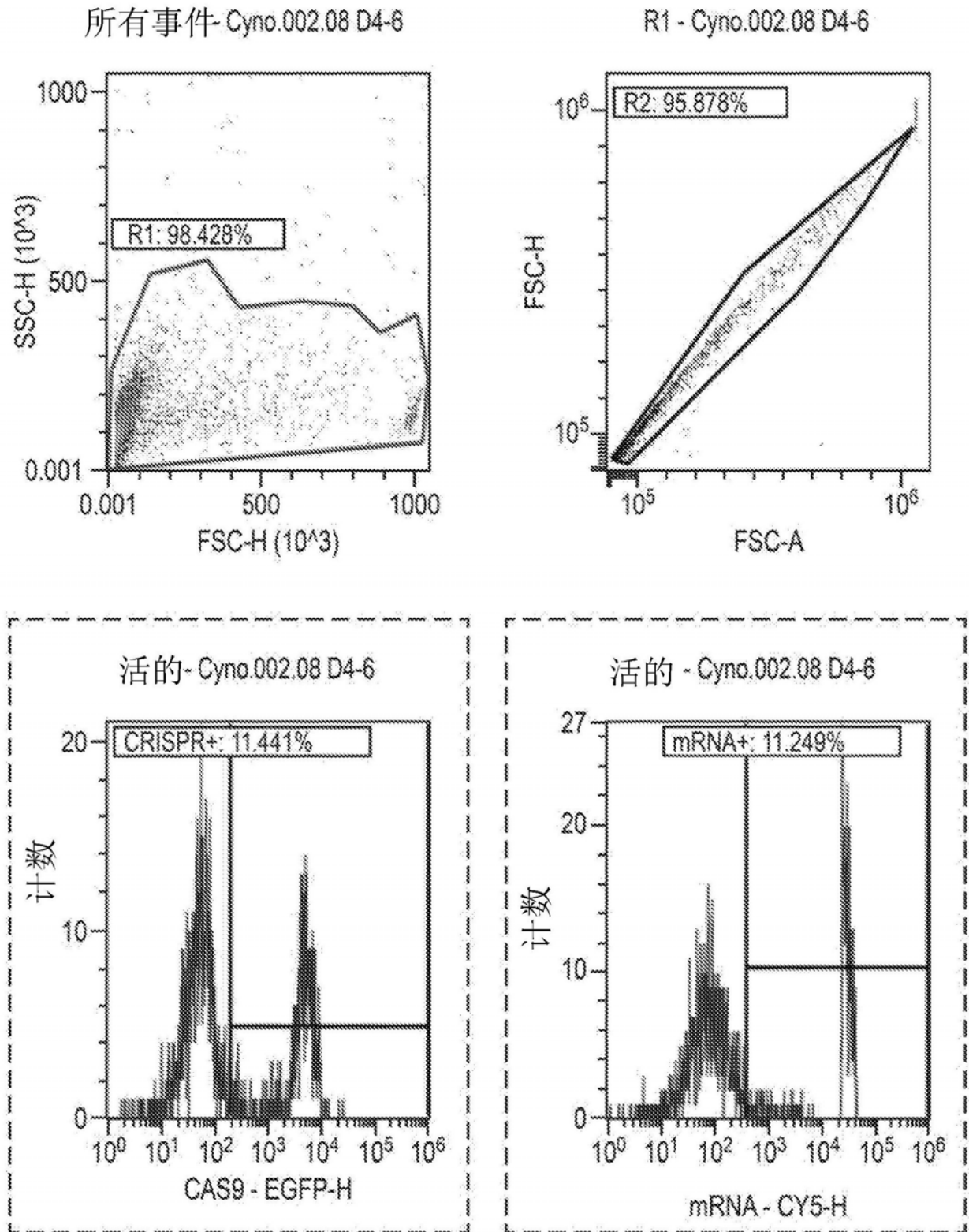


图87(续)

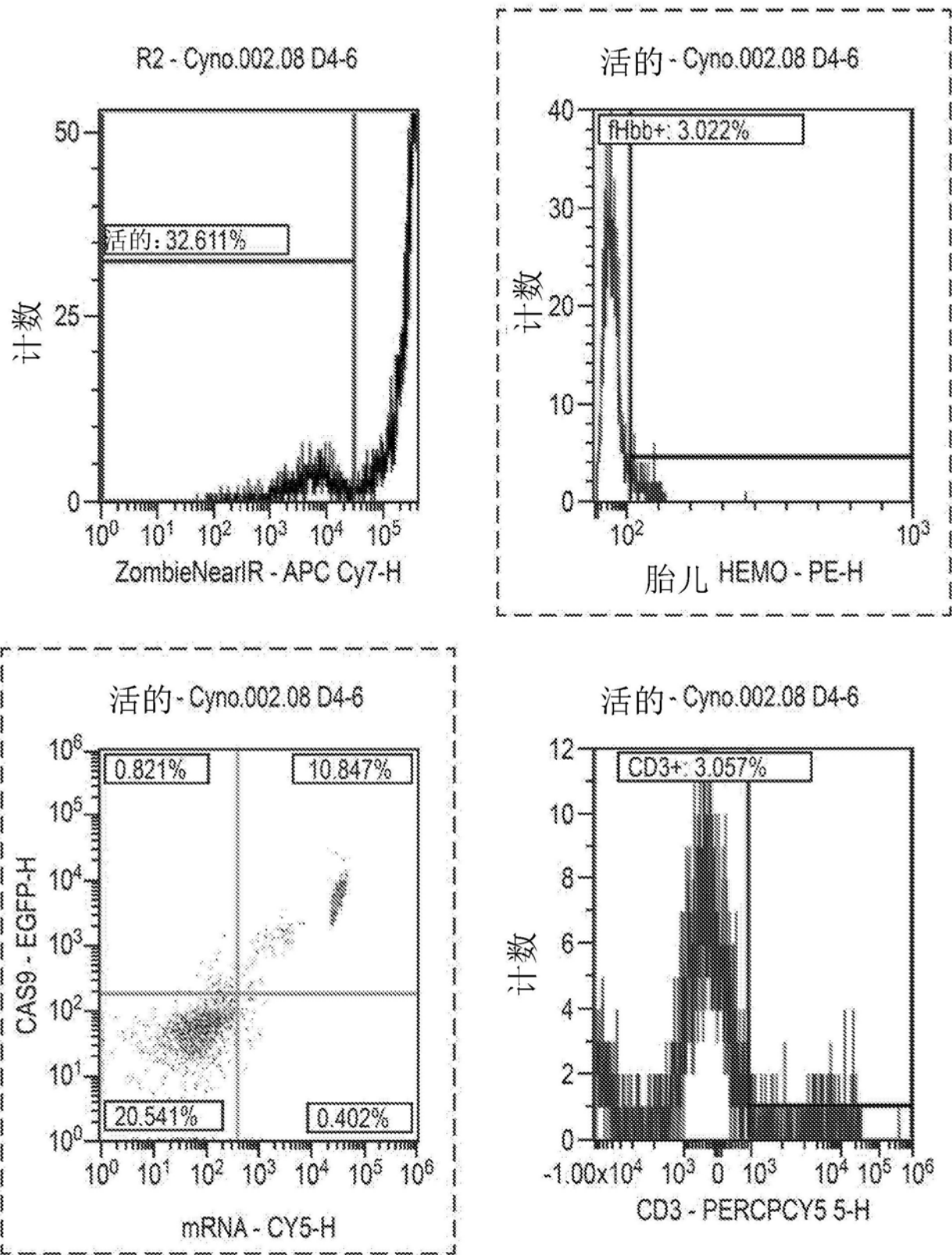


图87(续)

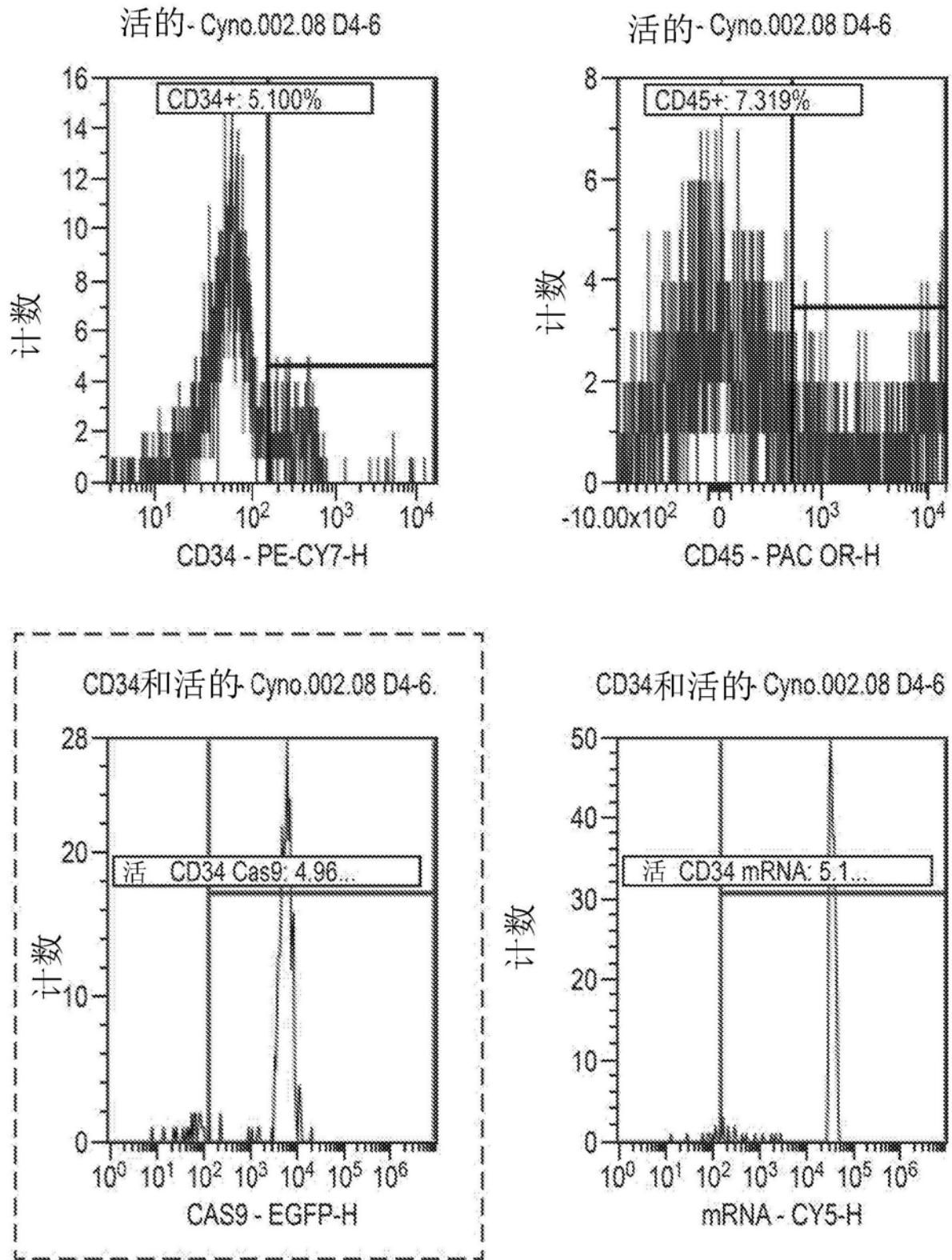


图87(续)

CynoBM.002.83

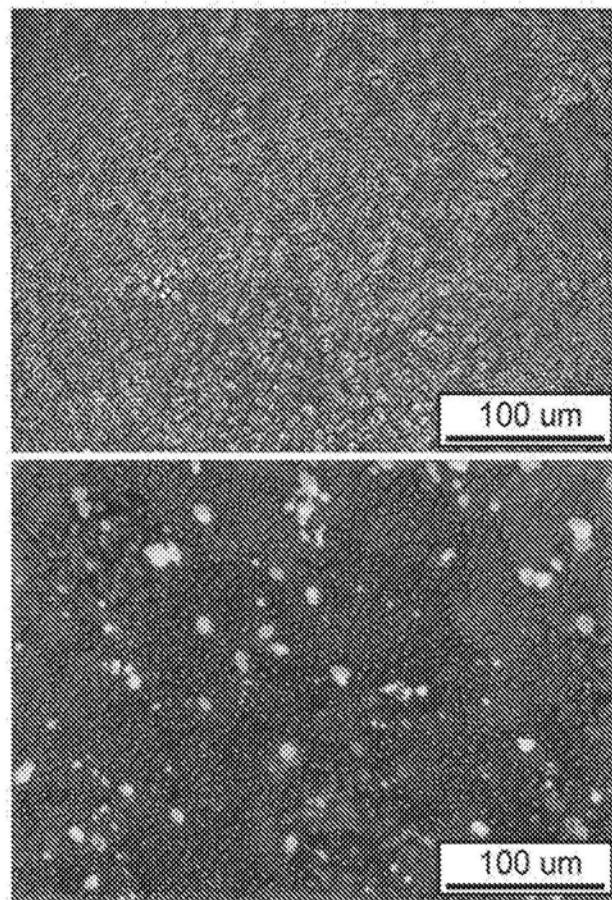


图88

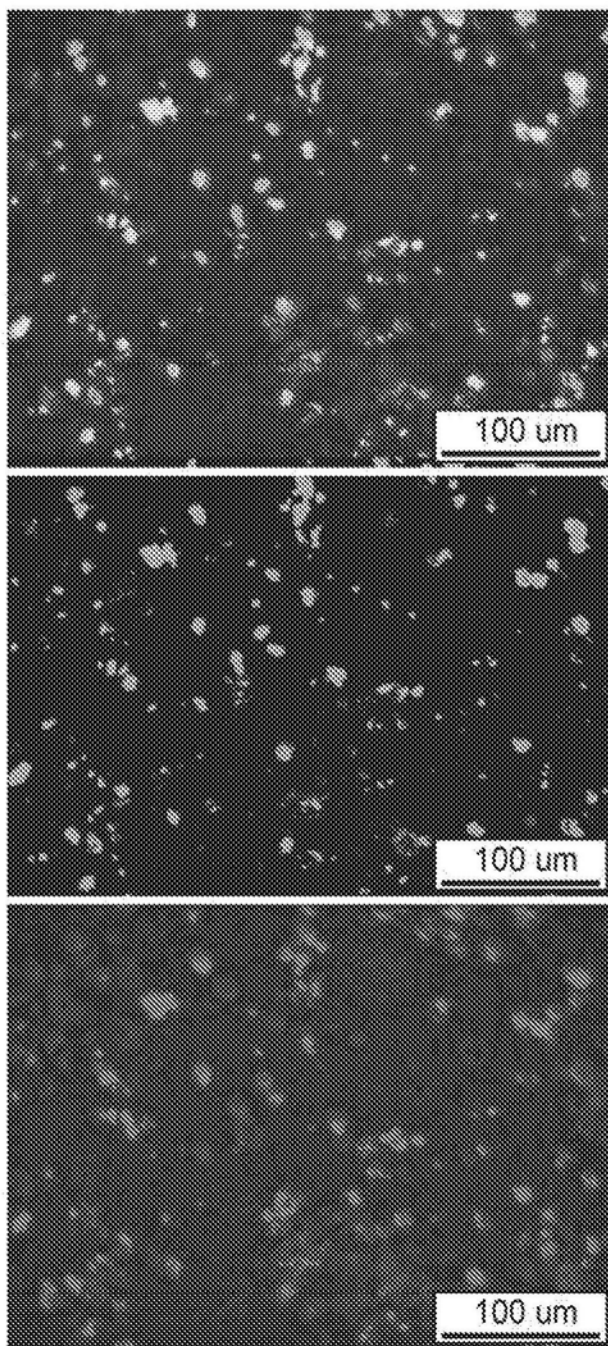


图88(续)

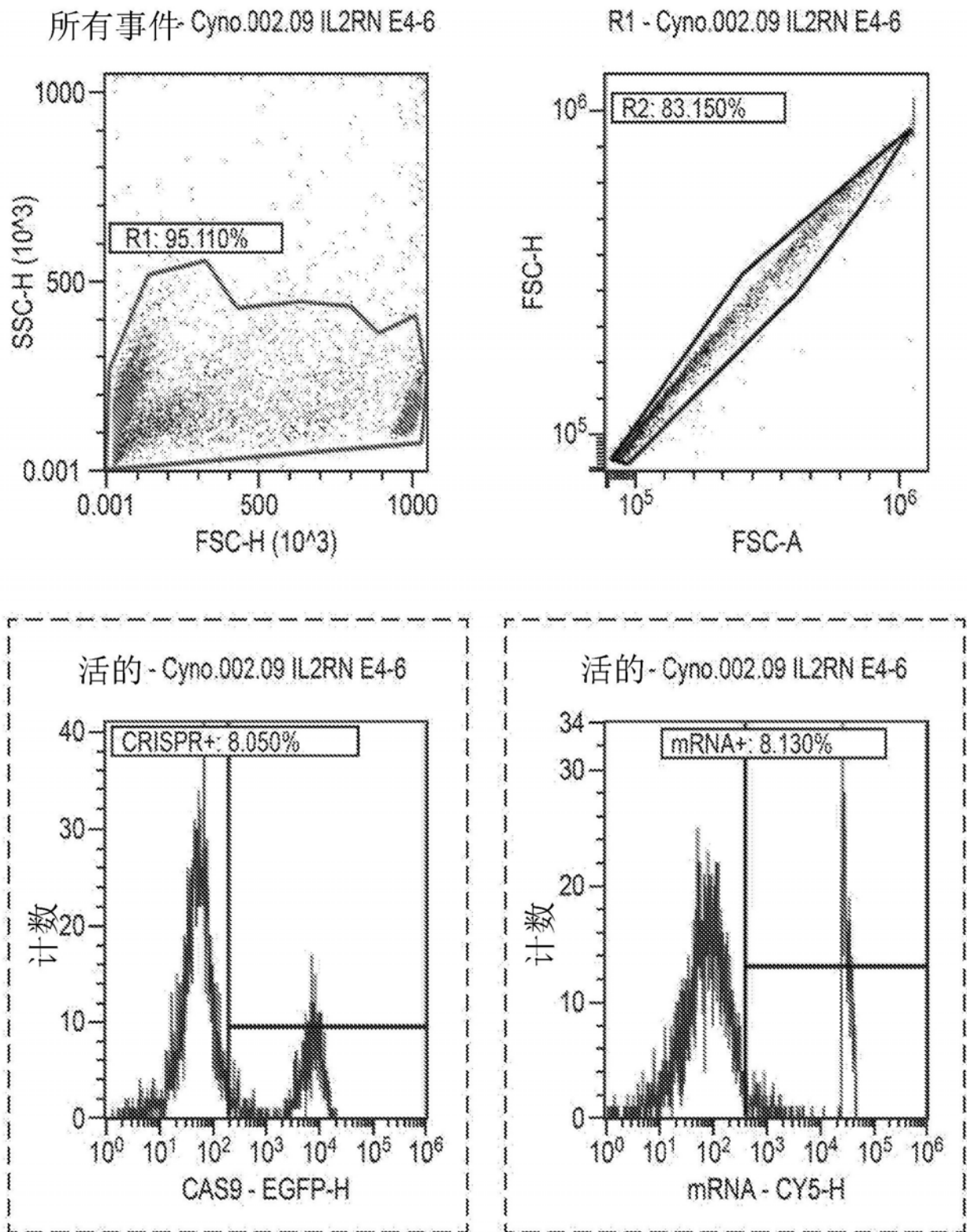


图88(续)

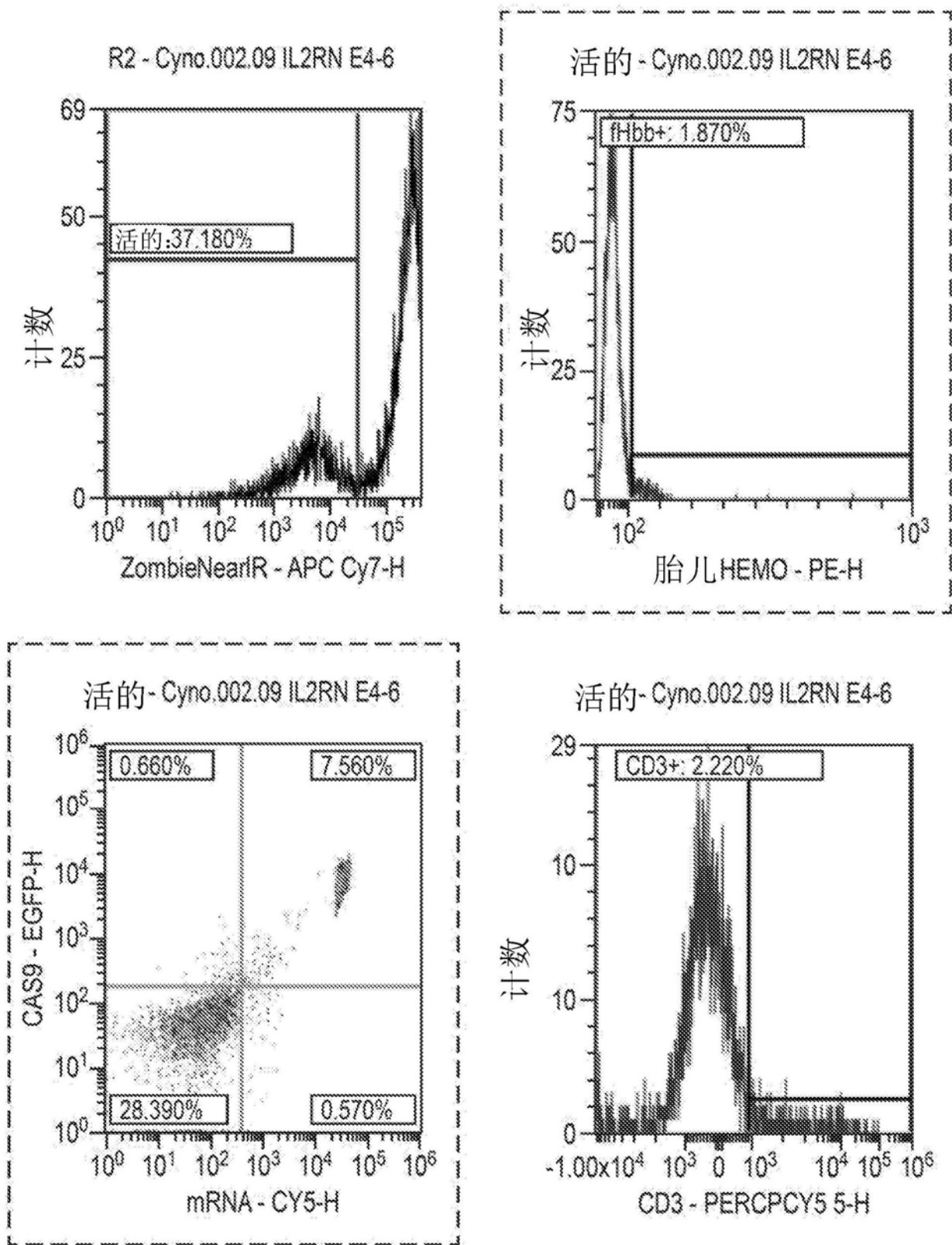


图88(续)

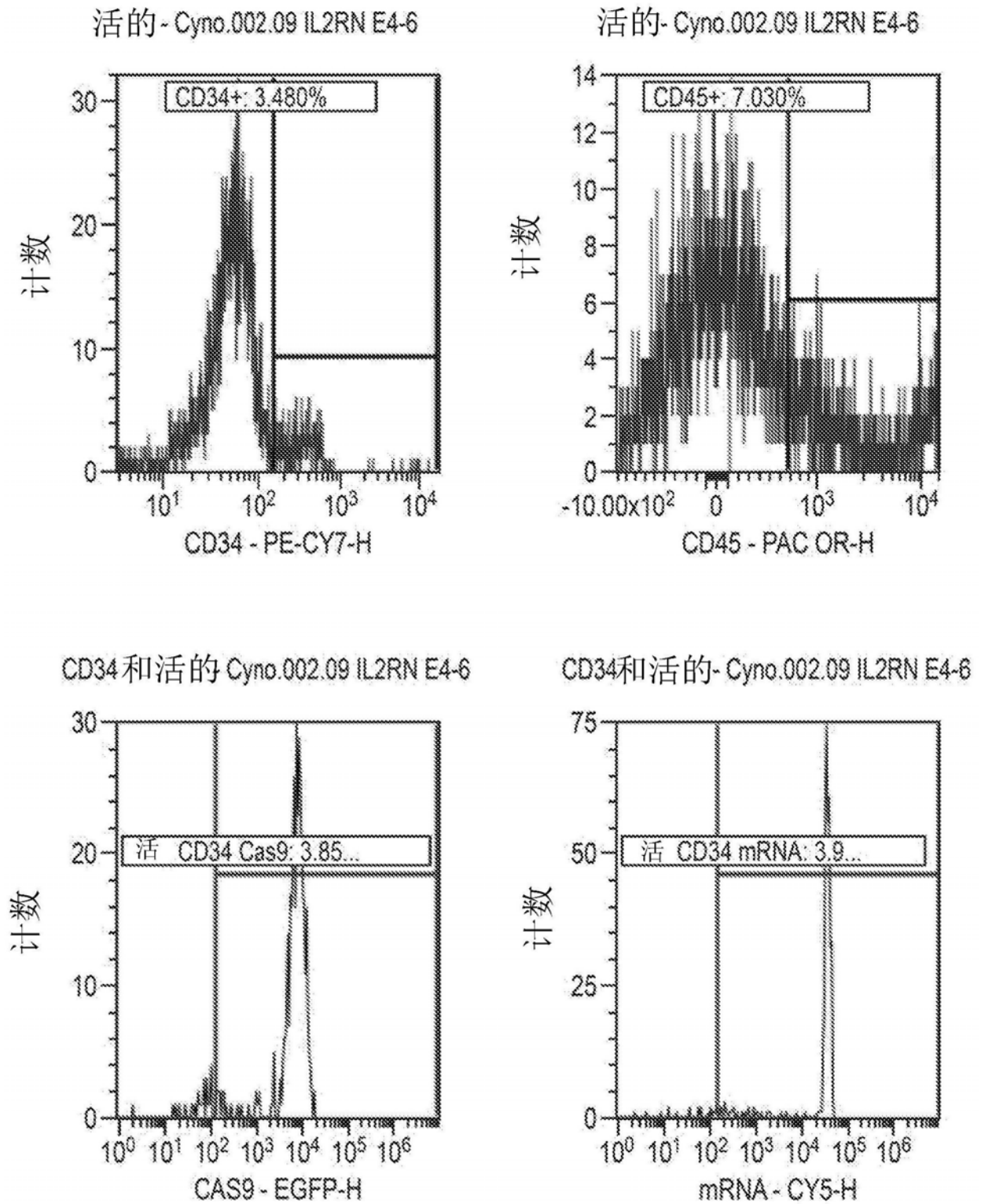


图88(续)

CynoBM.002.84

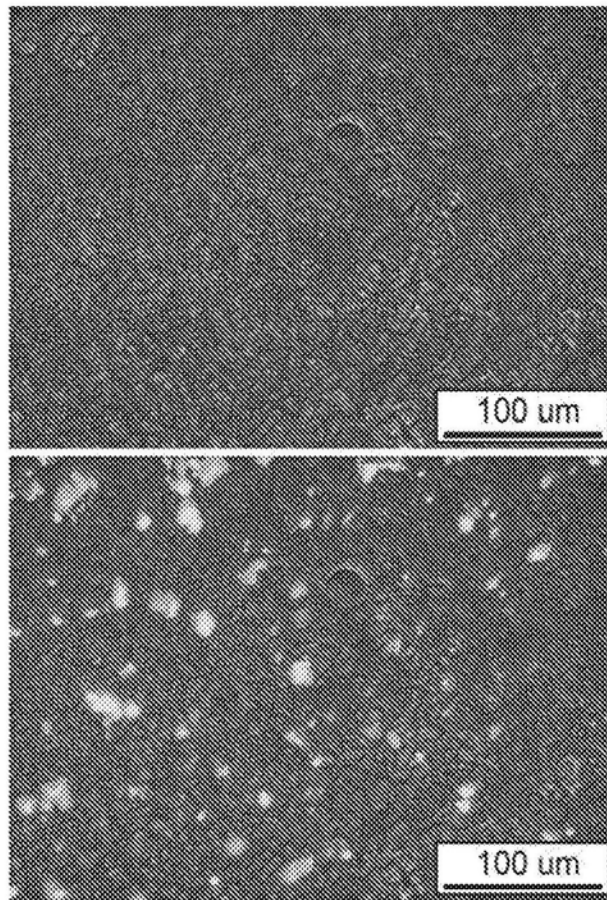


图89

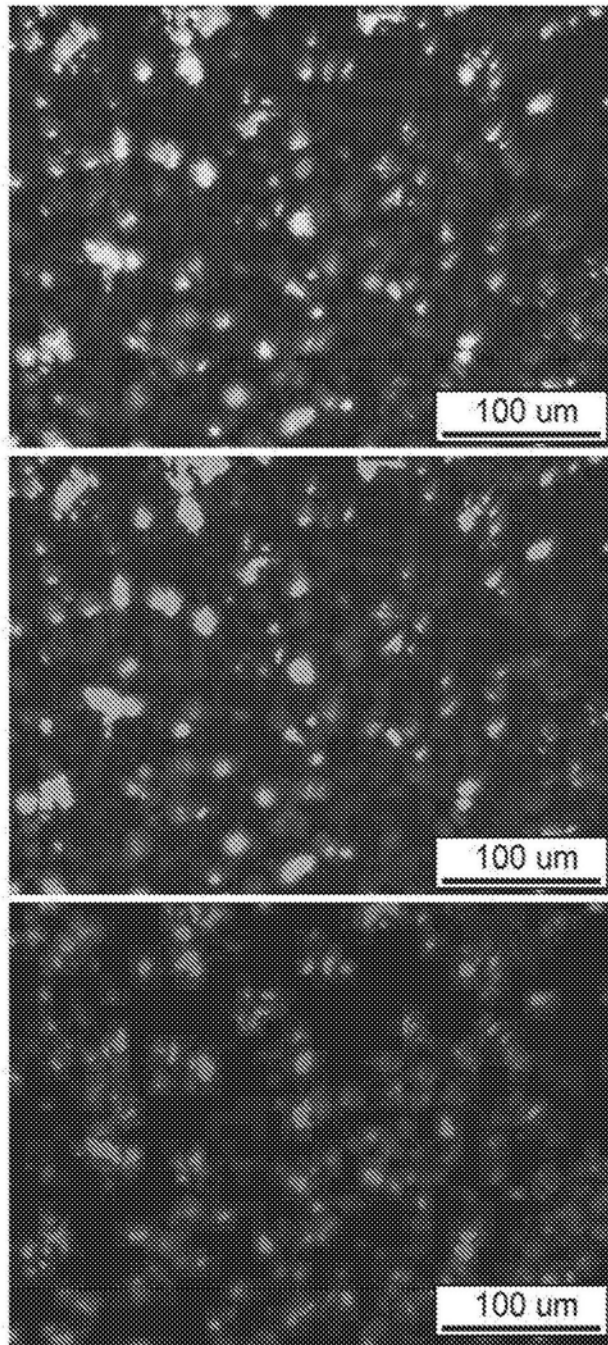


图89(续)

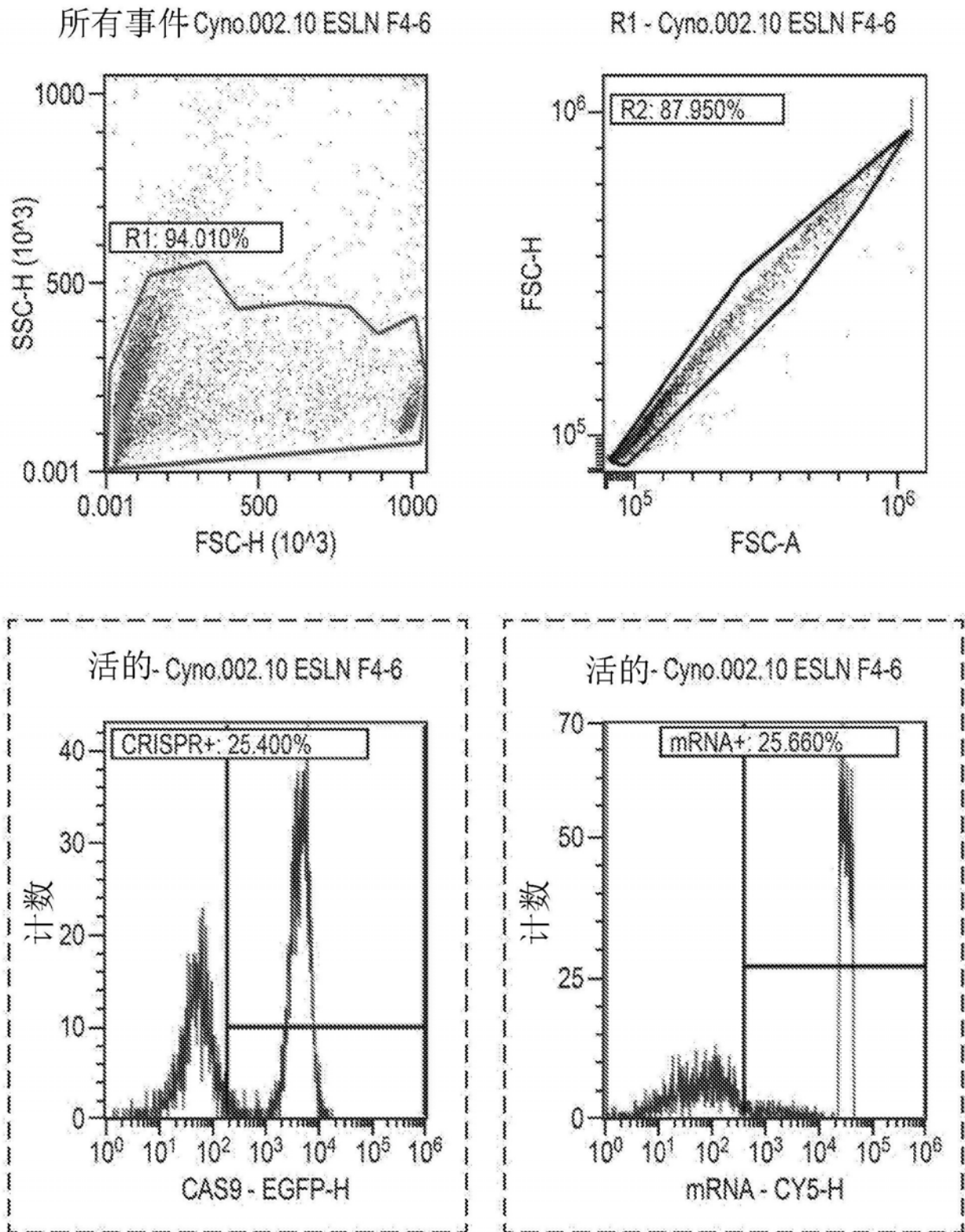


图89 (续)

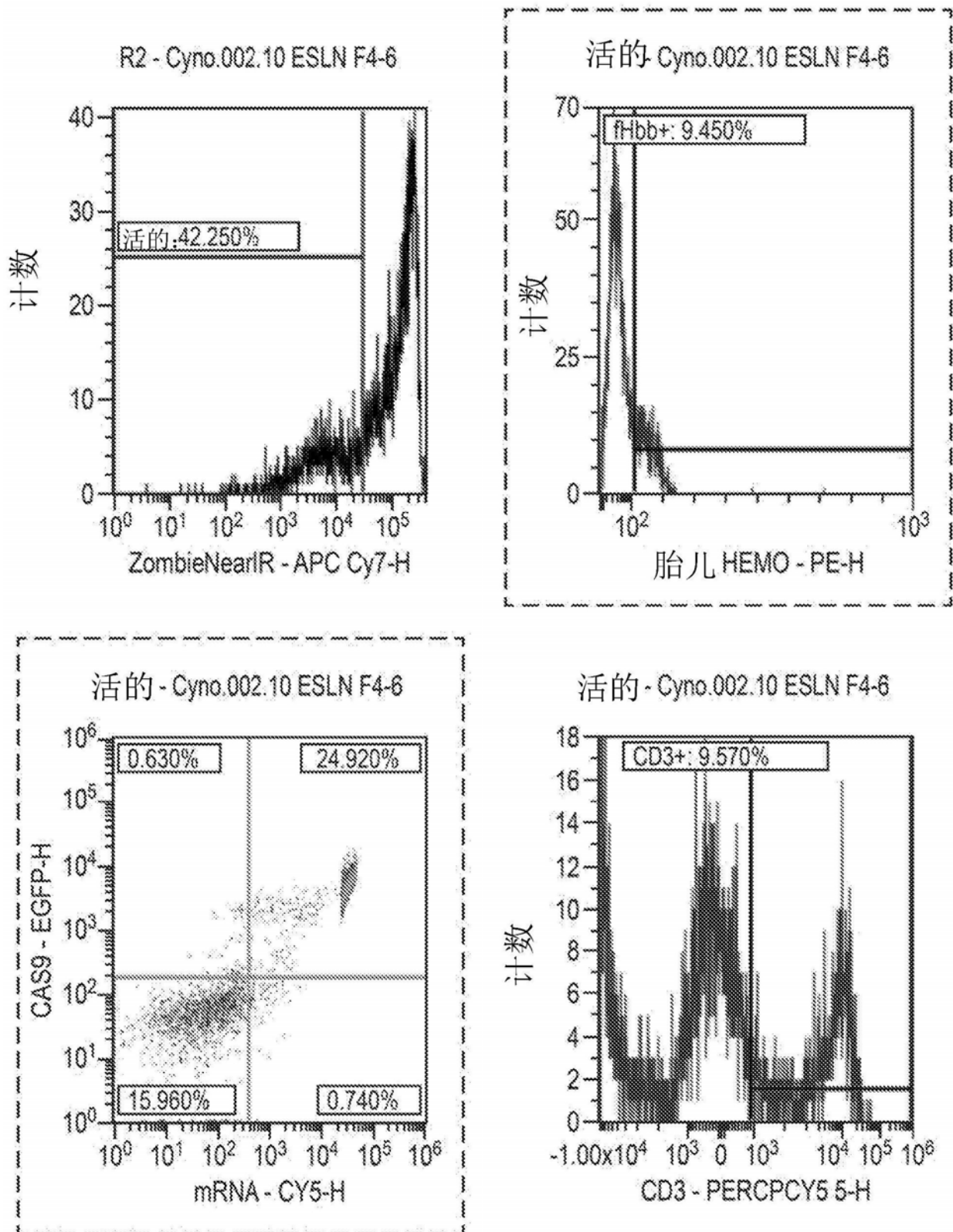


图89 (续)

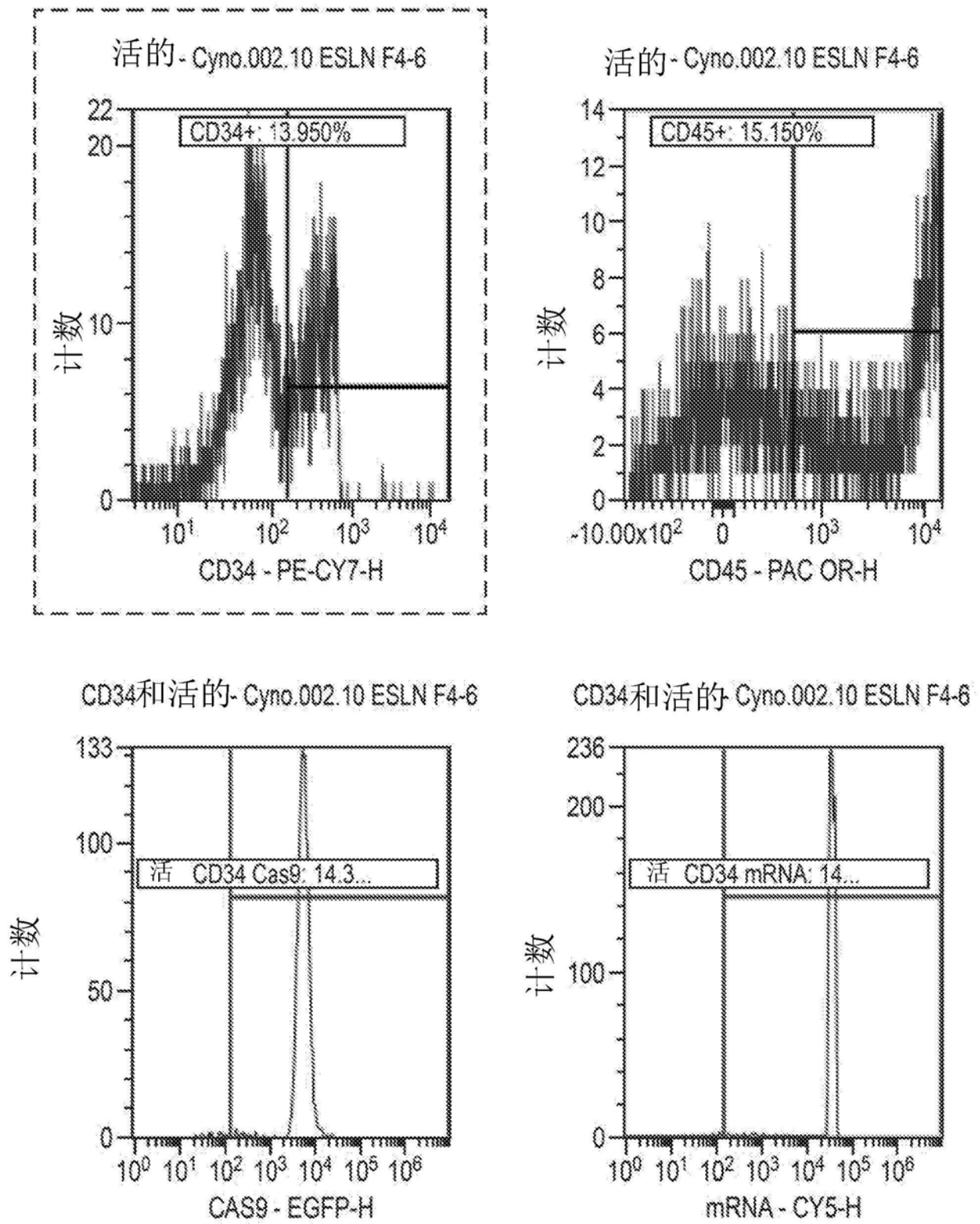


图89(续)

CynoBM.002.85

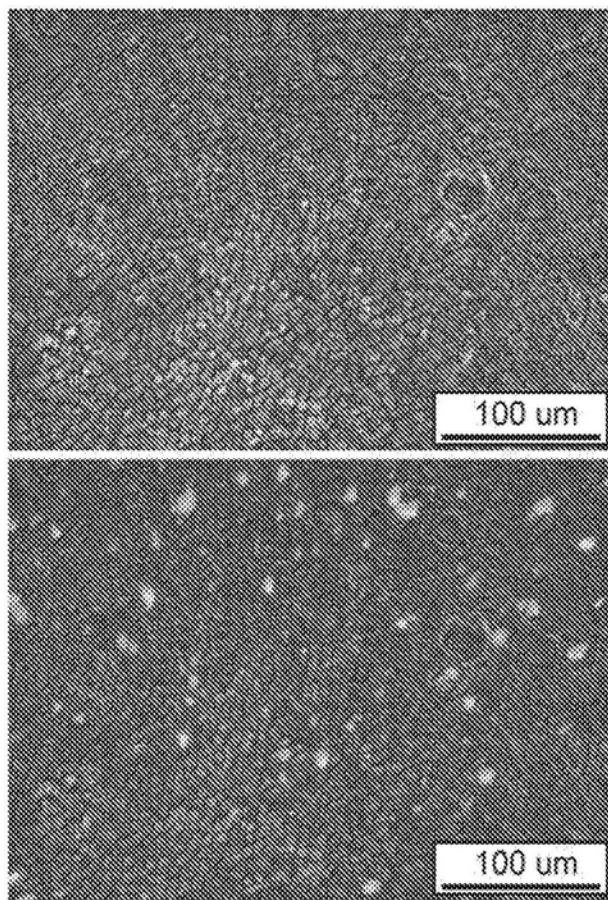


图90

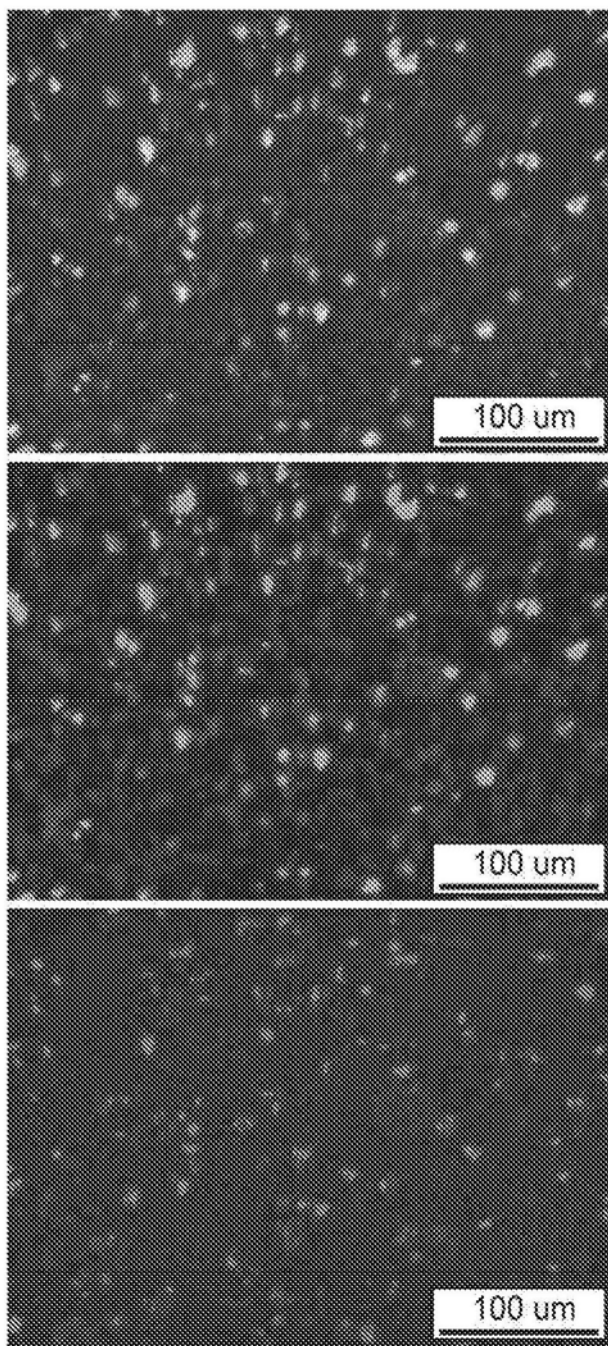


图90 (续)

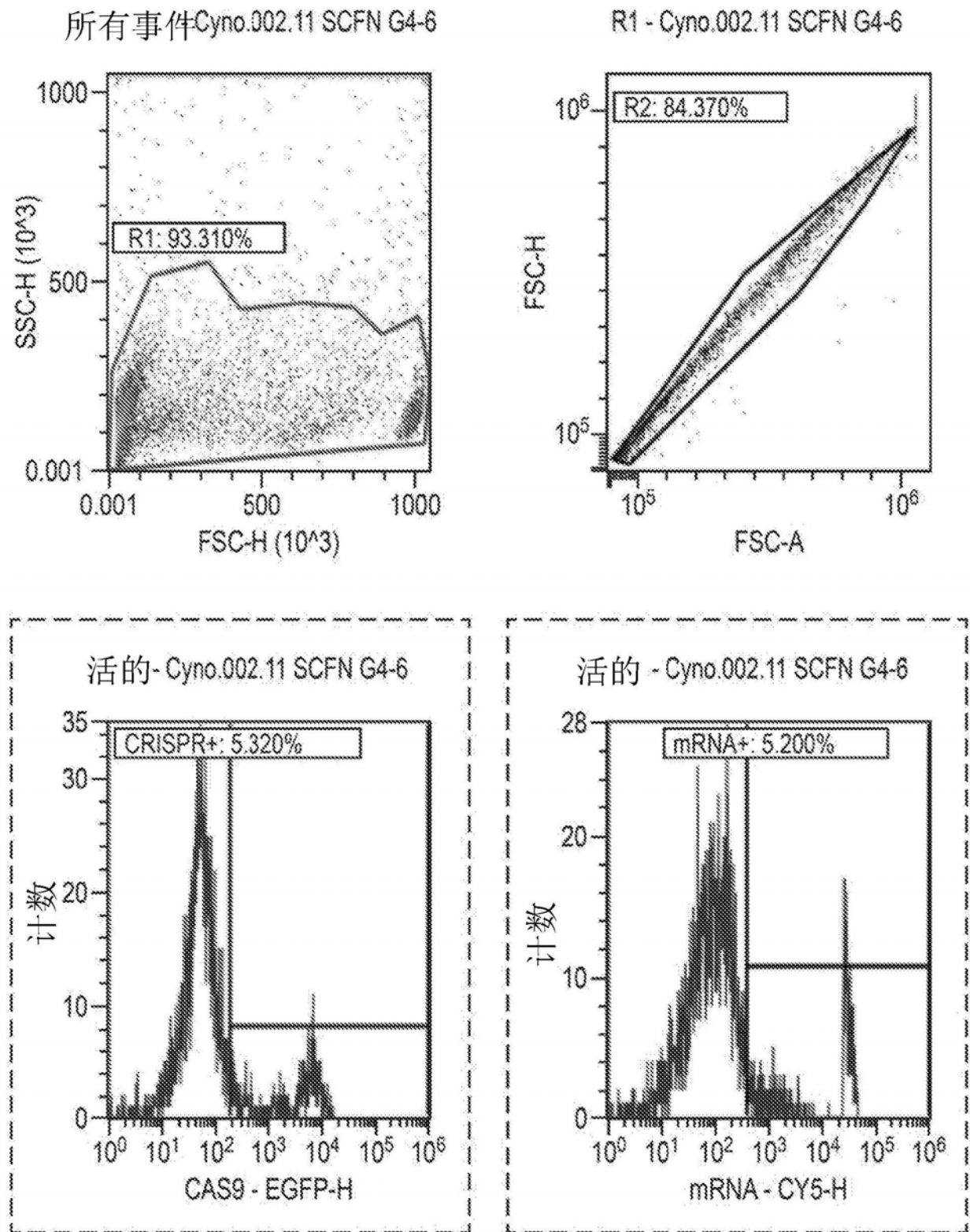


图90 (续)

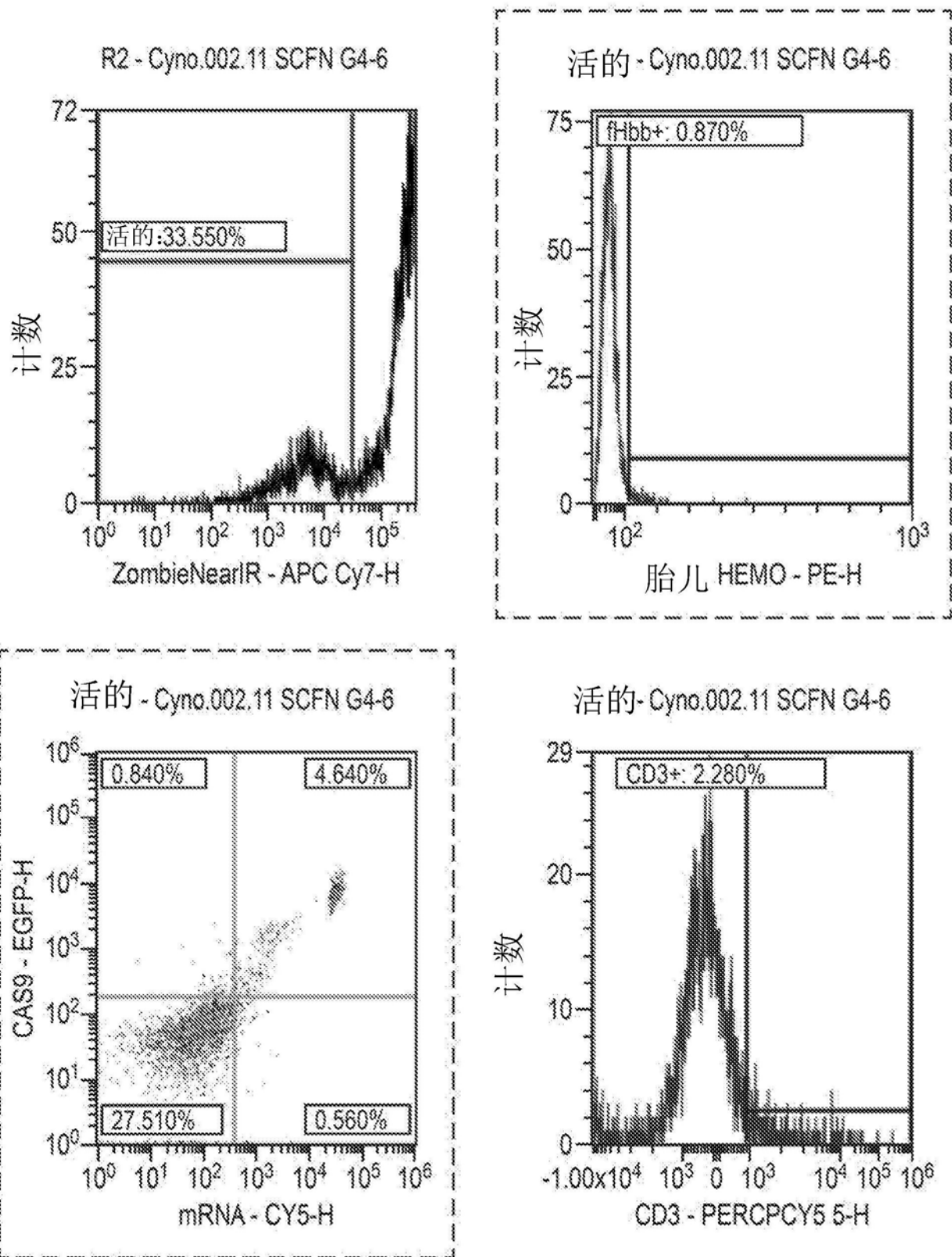


图90 (续)

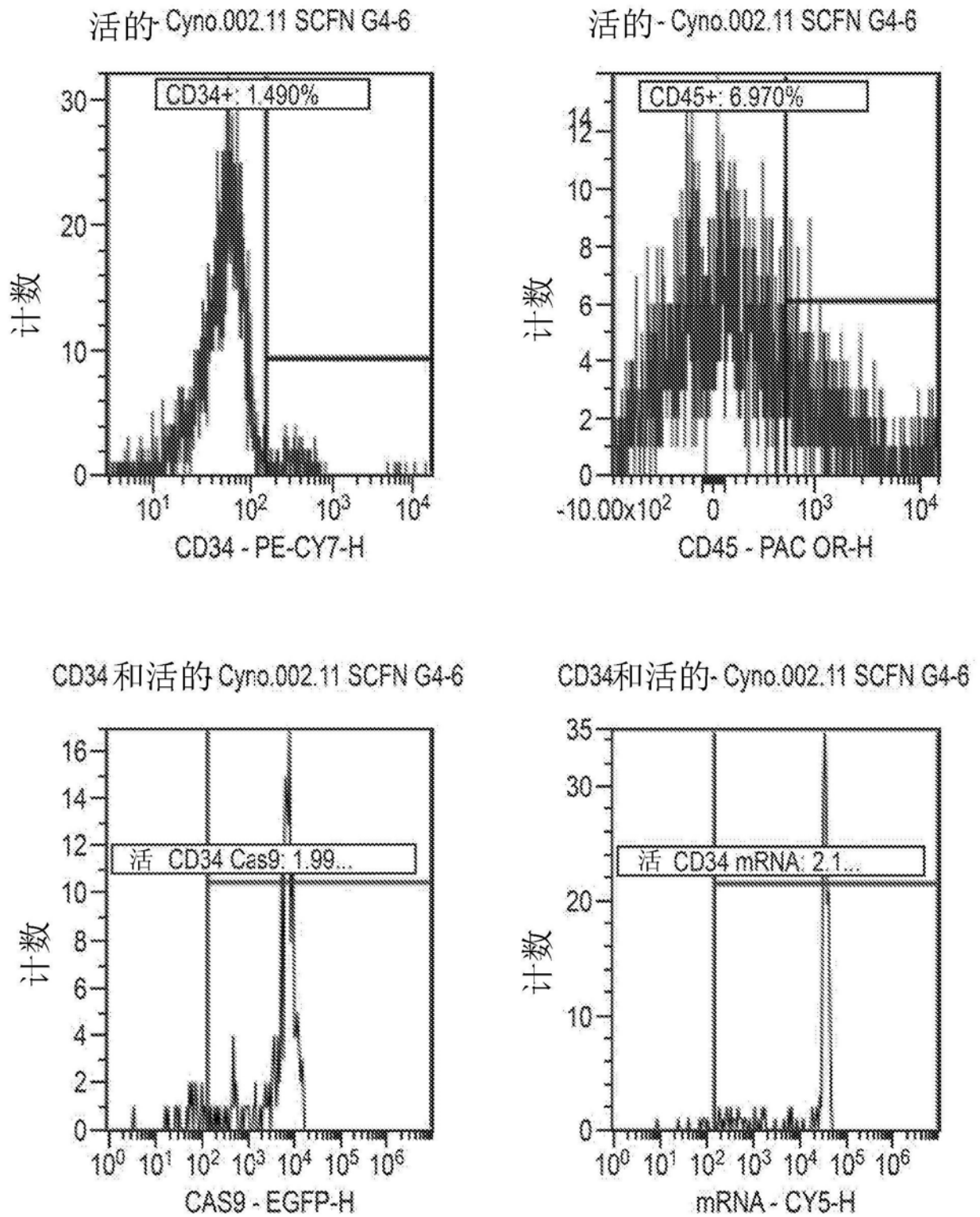


图90 (续)

CynoBM.002.86

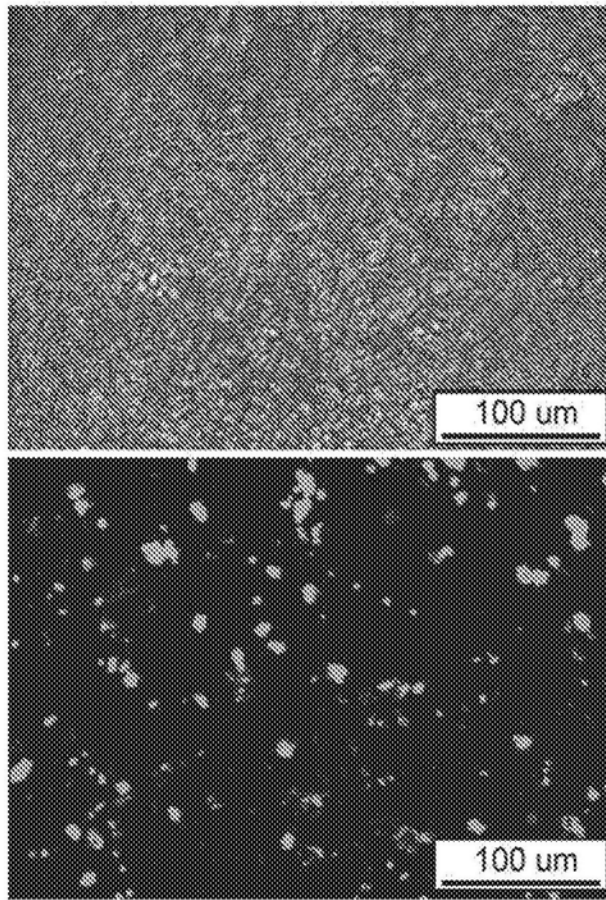


图91

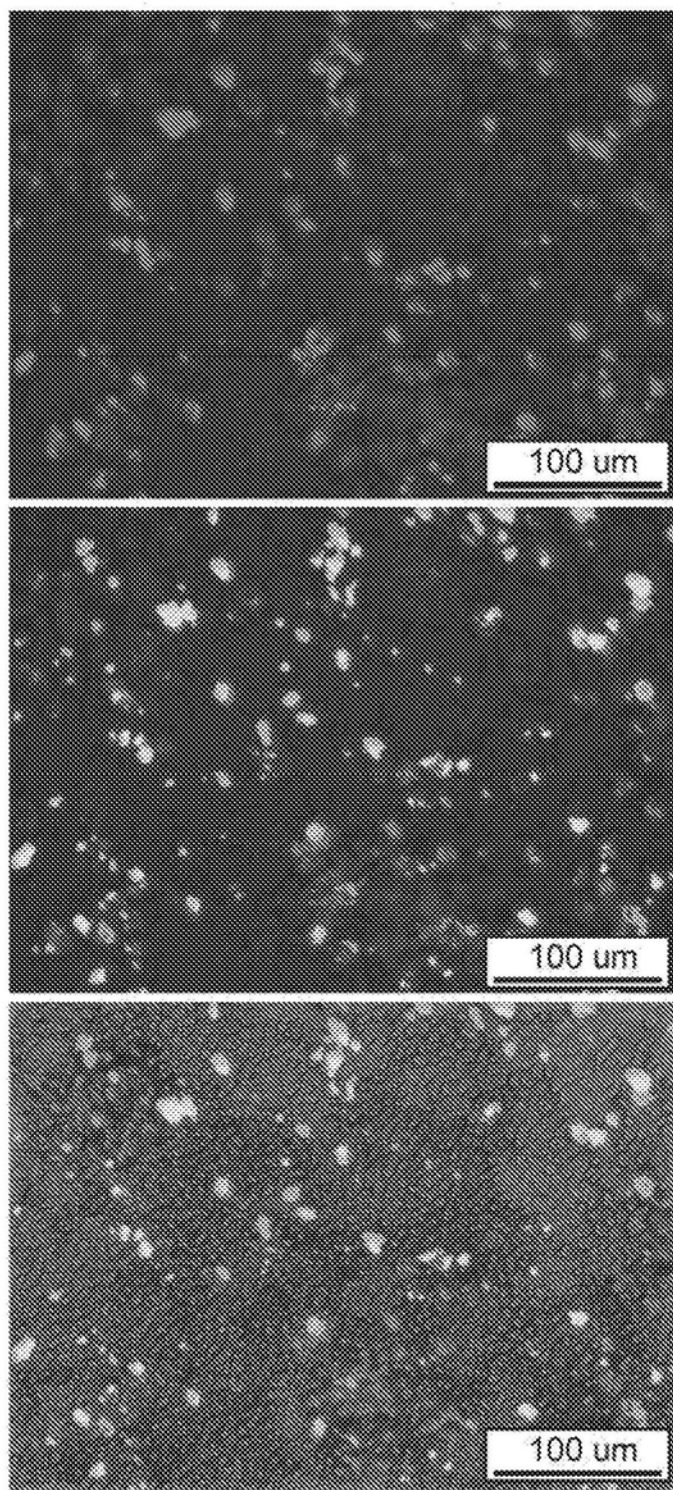
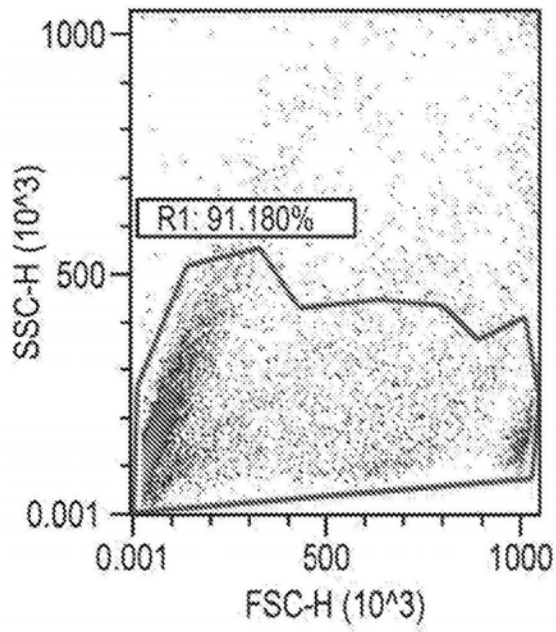


图91 (续)

所有事件- Cyno.002.12 三价 H4...



R1 - Cyno.002.12 三价 H4-6

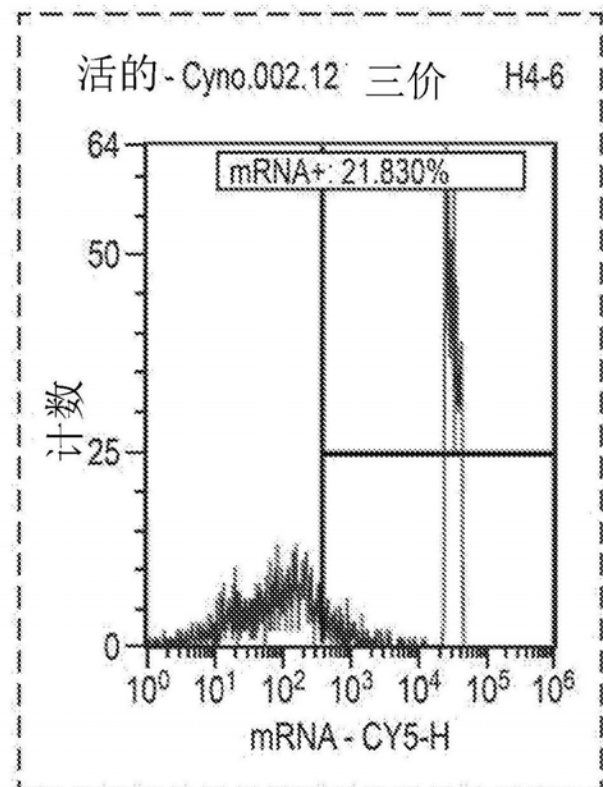
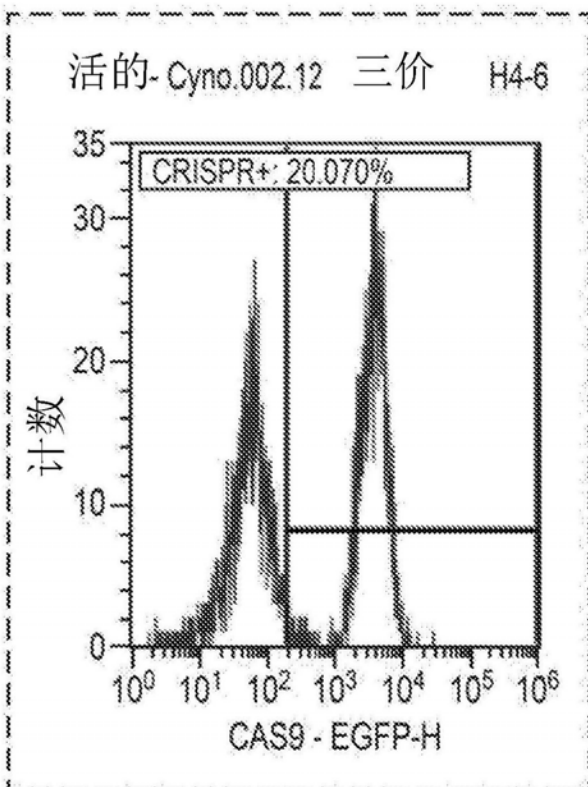
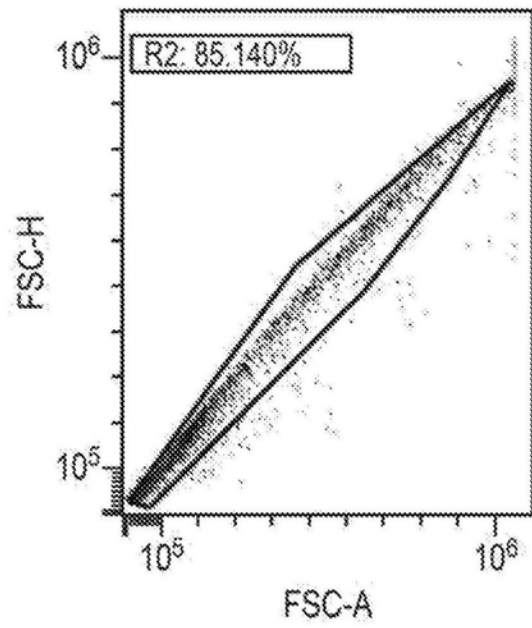


图91 (续)

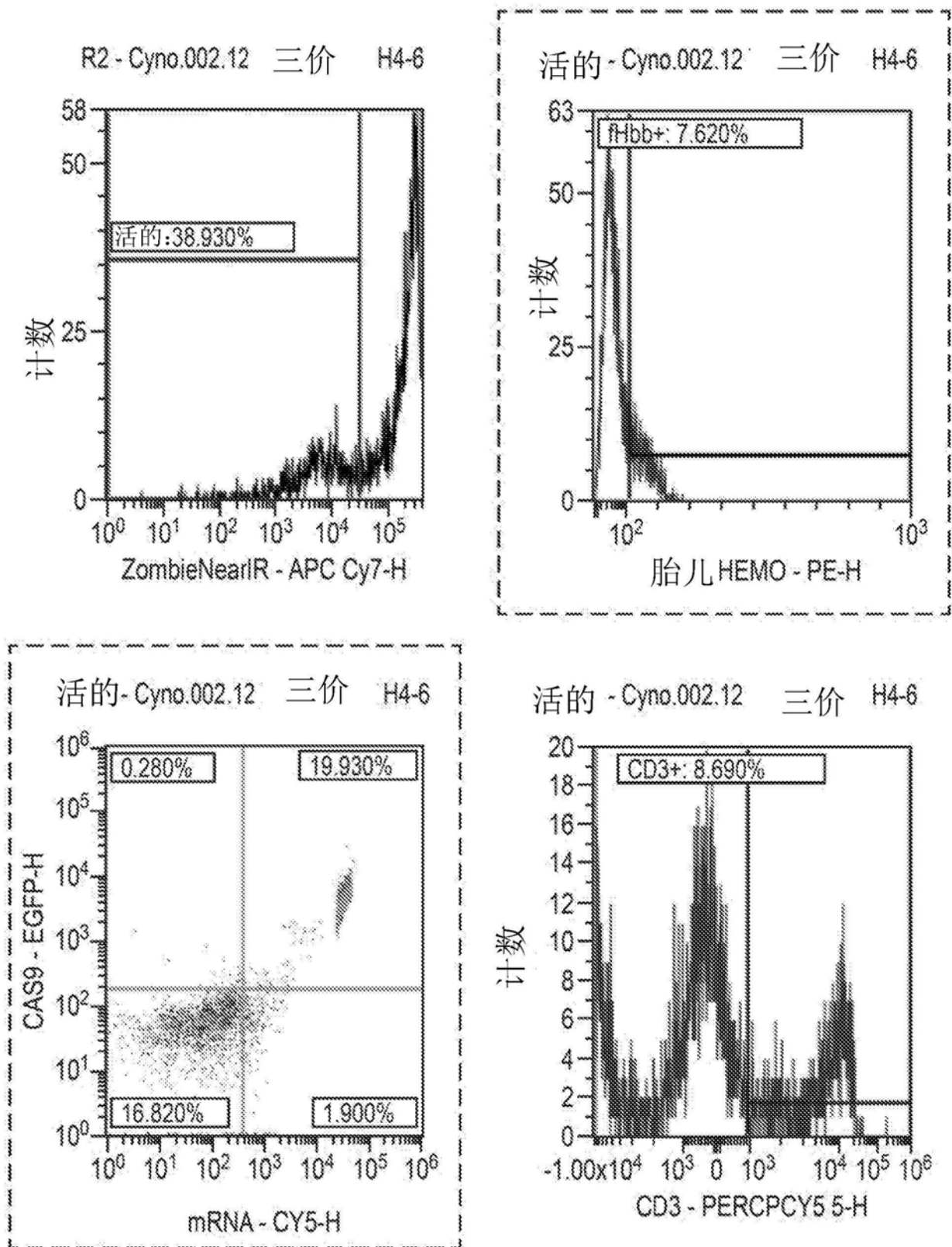


图91 (续)

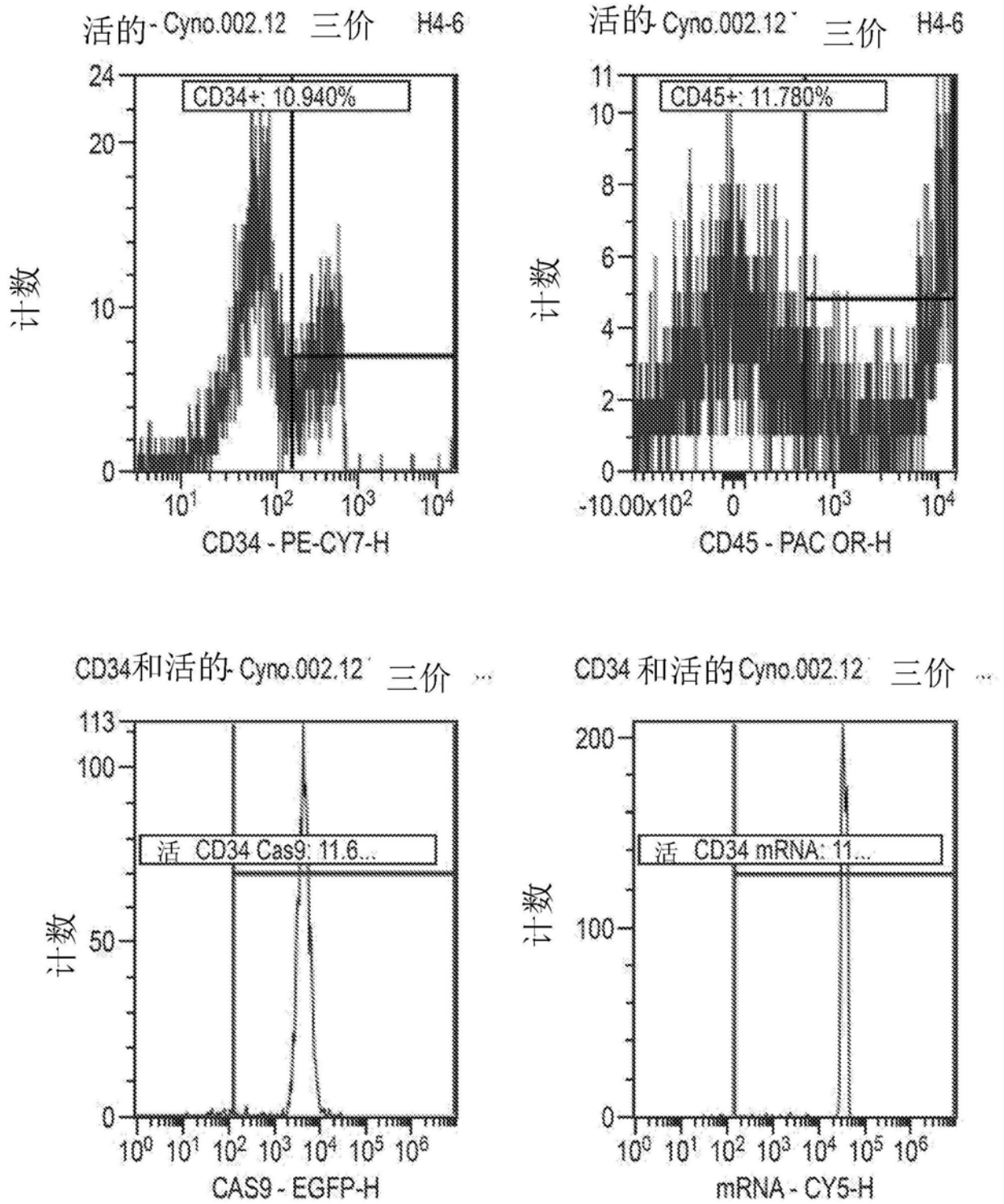


图91 (续)

CynoBM.002.75

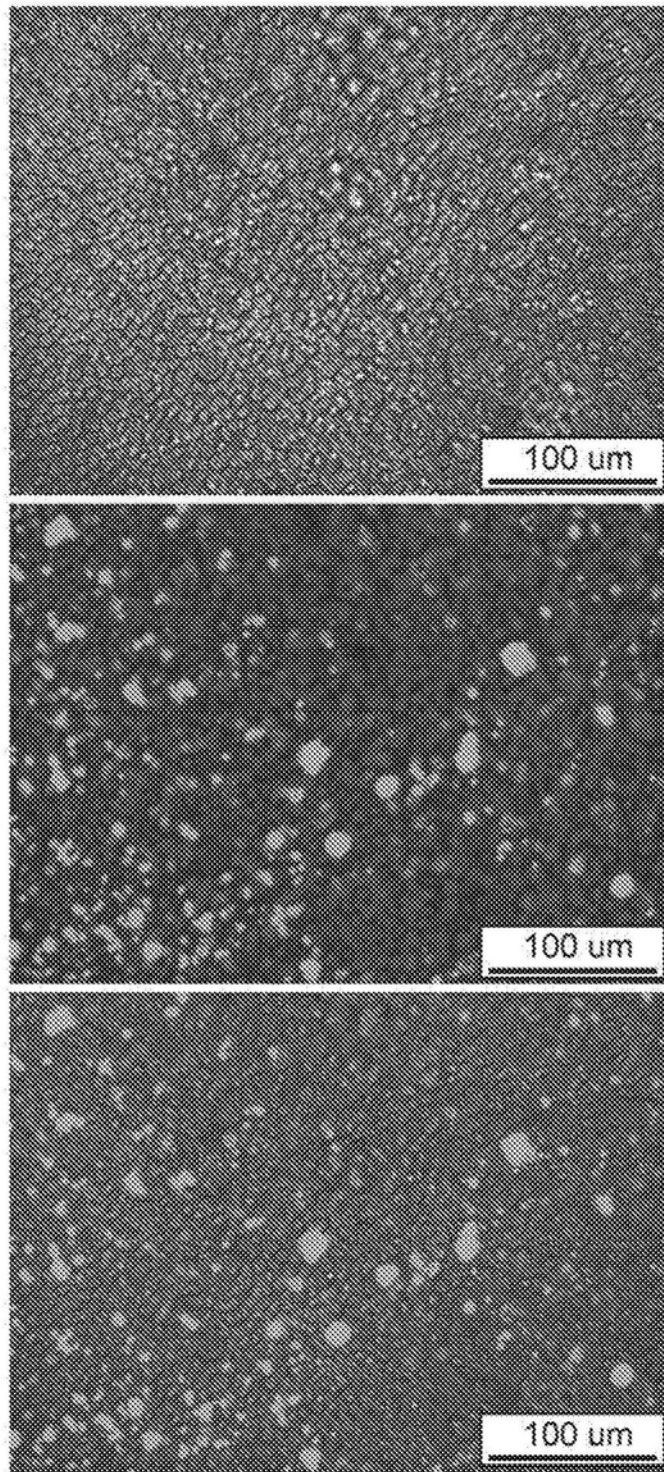


图92

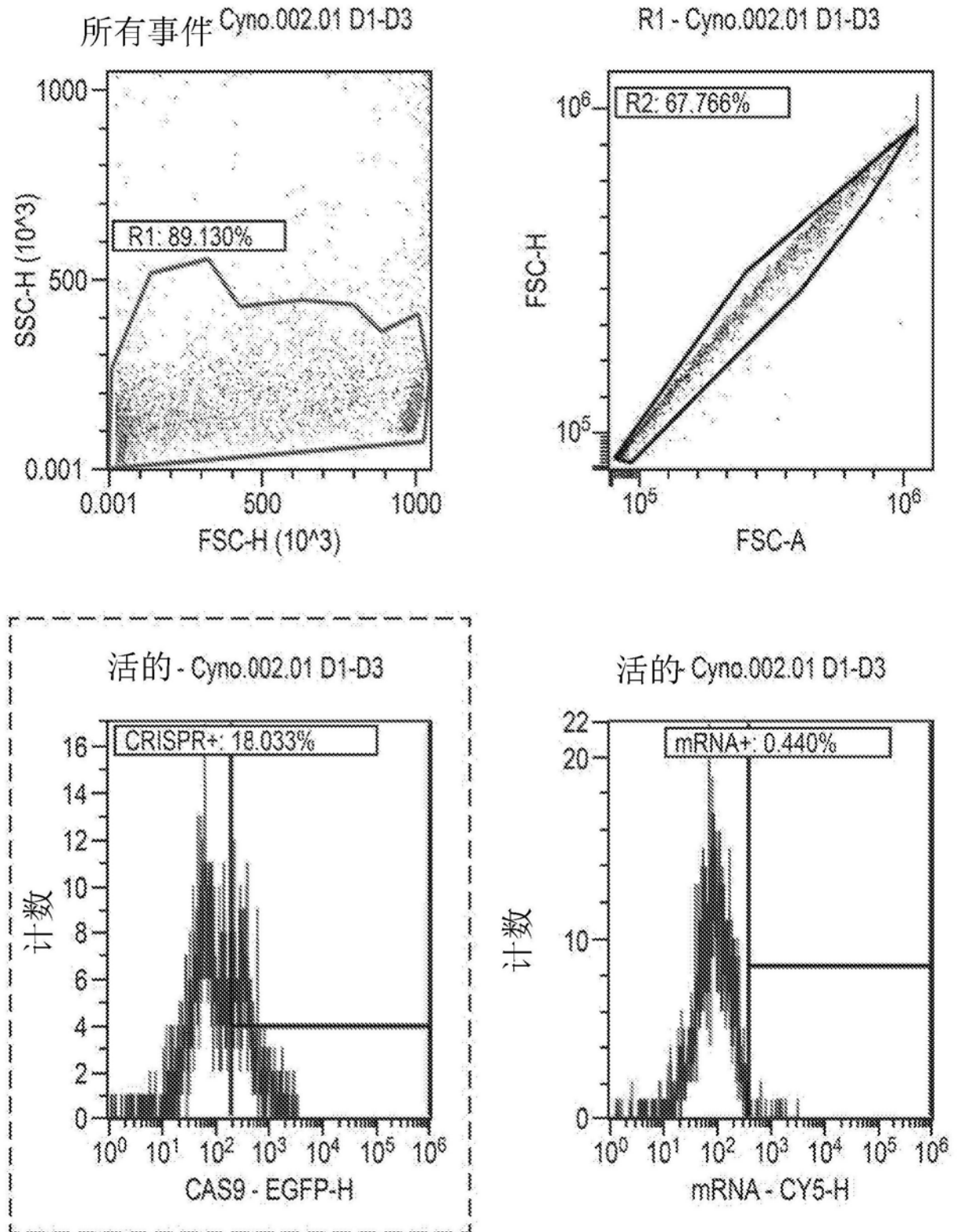


图92(续)

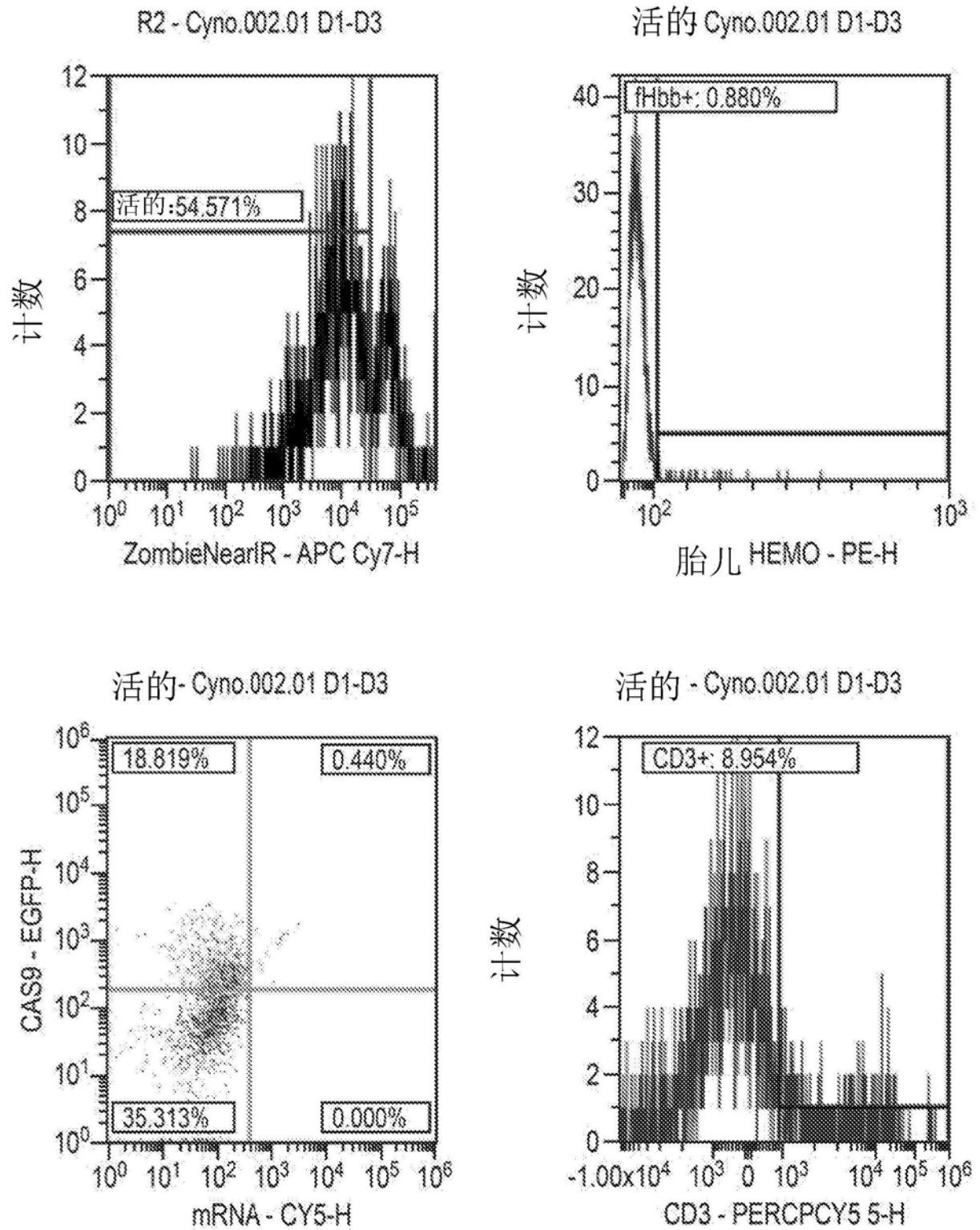


图92 (续)

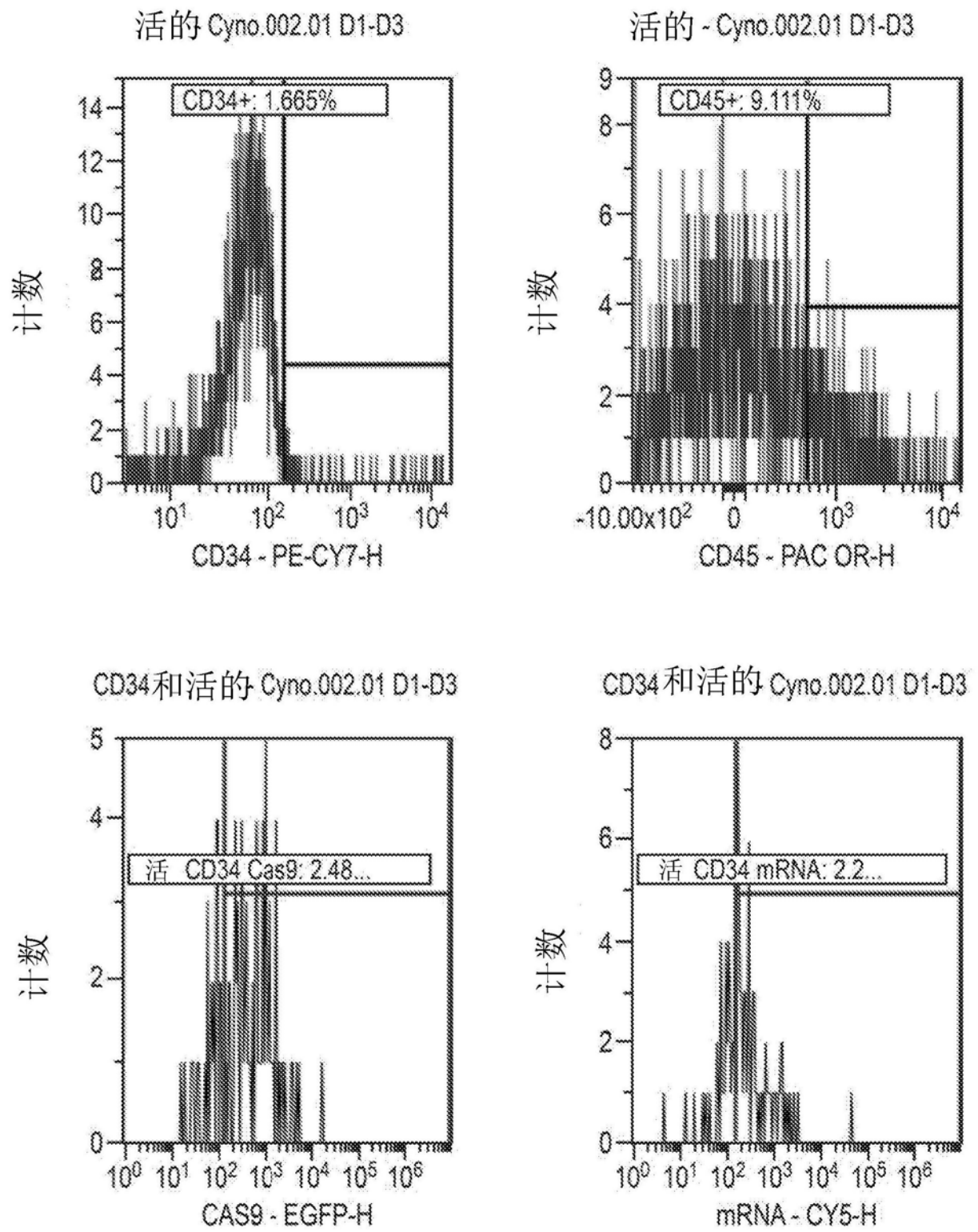


图92 (续)

CynoBM.002.76

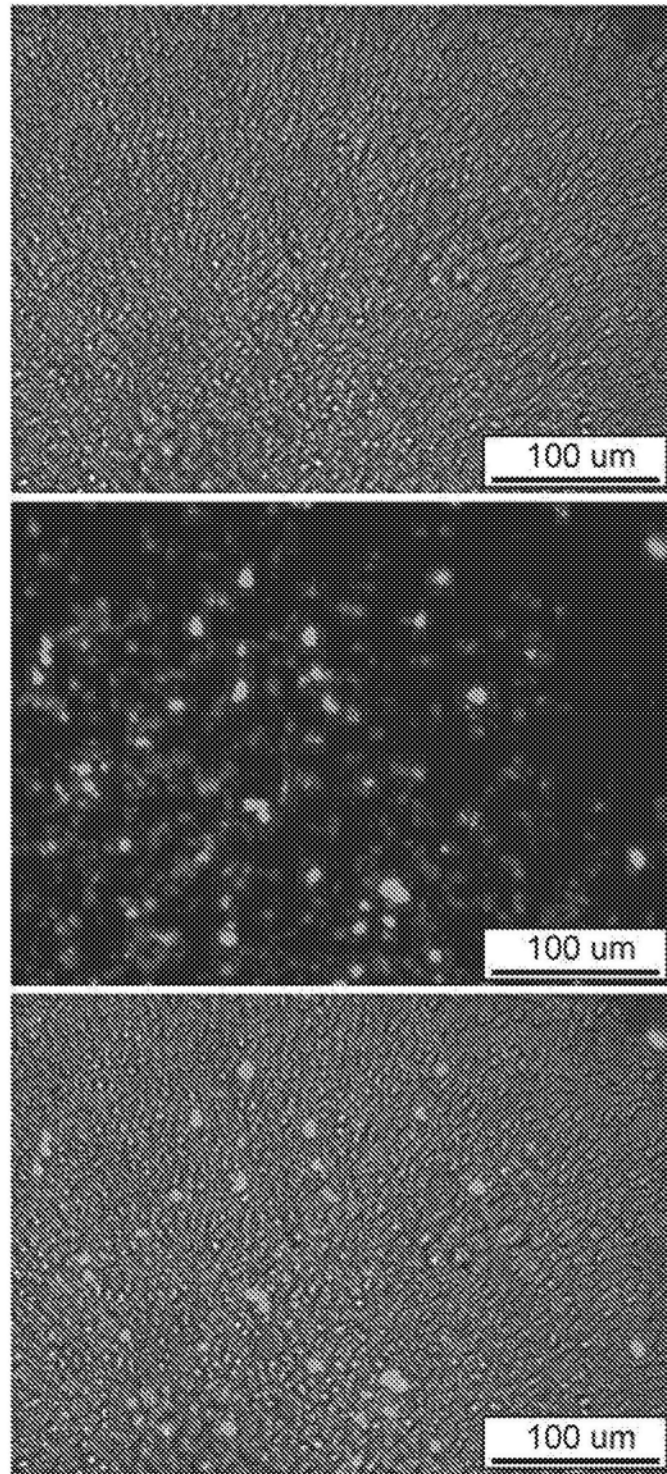


图93

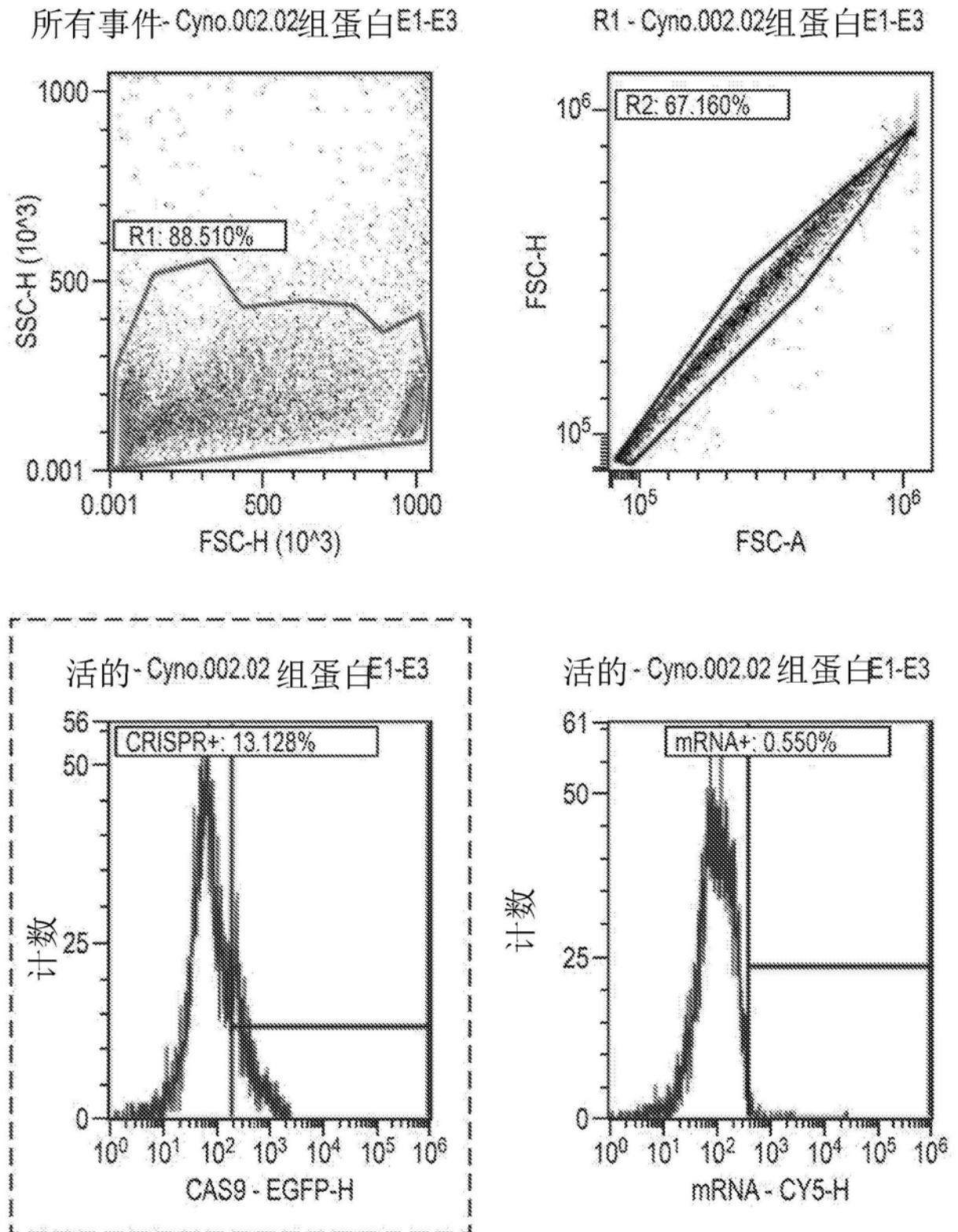


图93 (续)

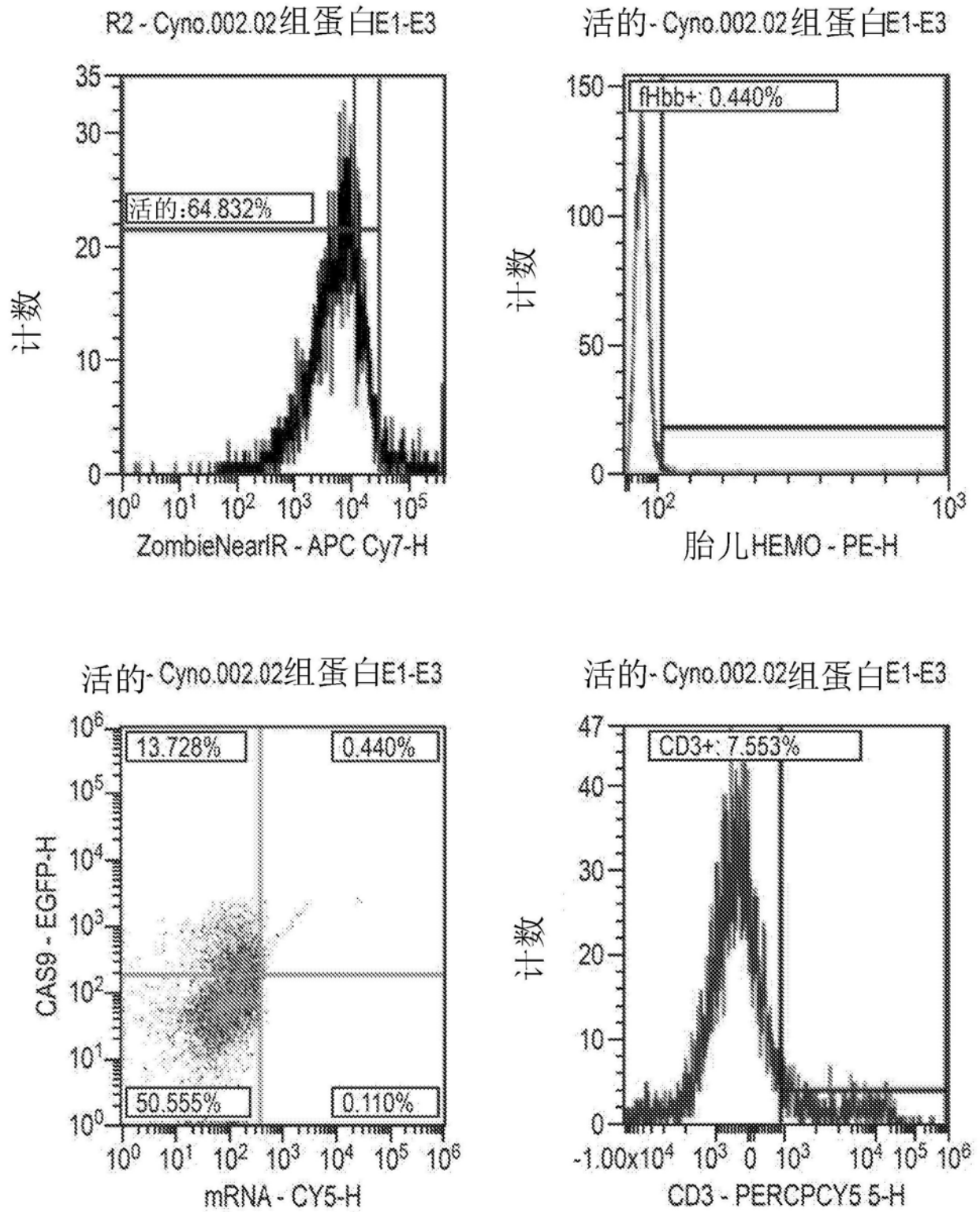


图93 (续)

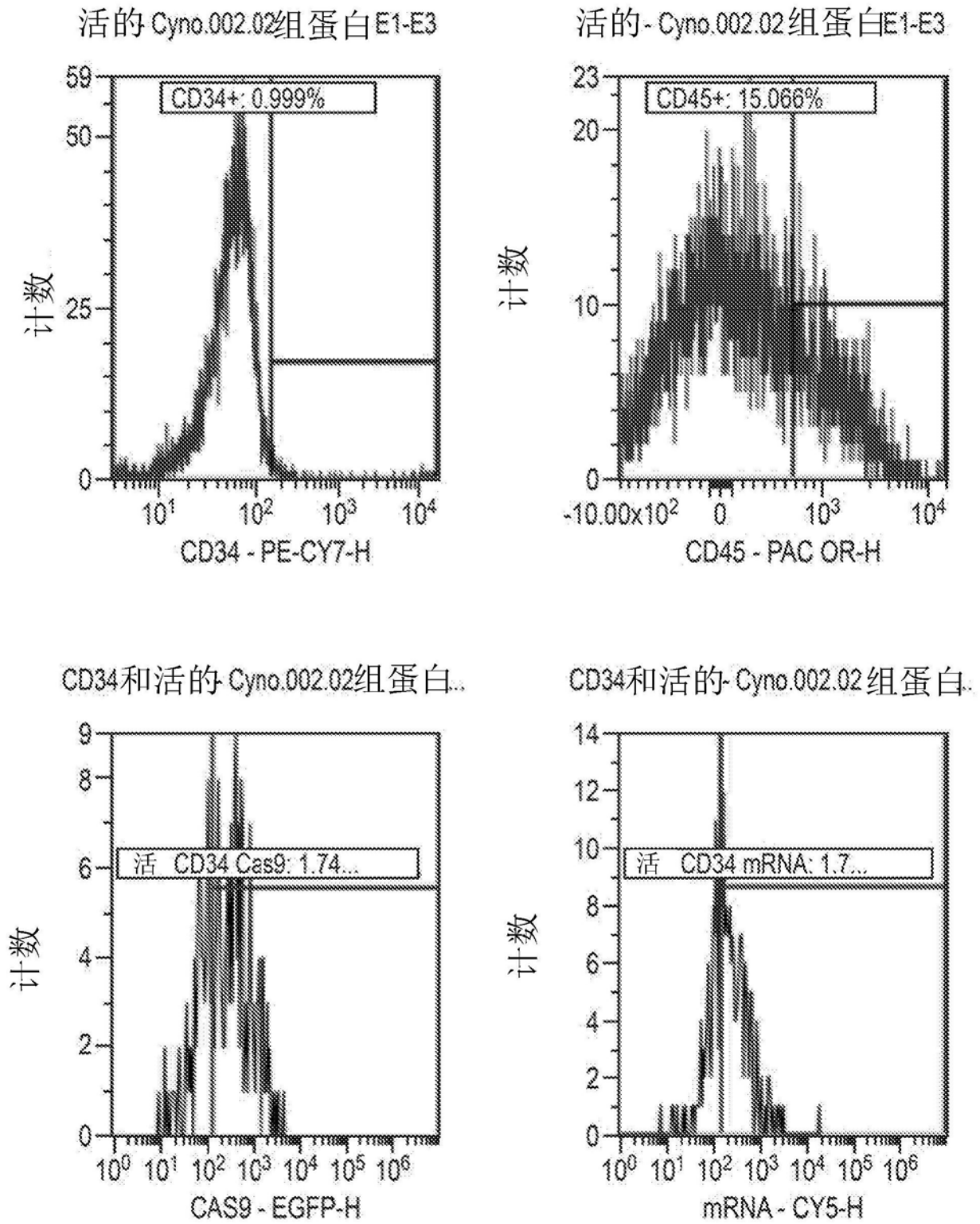


图93 (续)

CynoBM.002.77

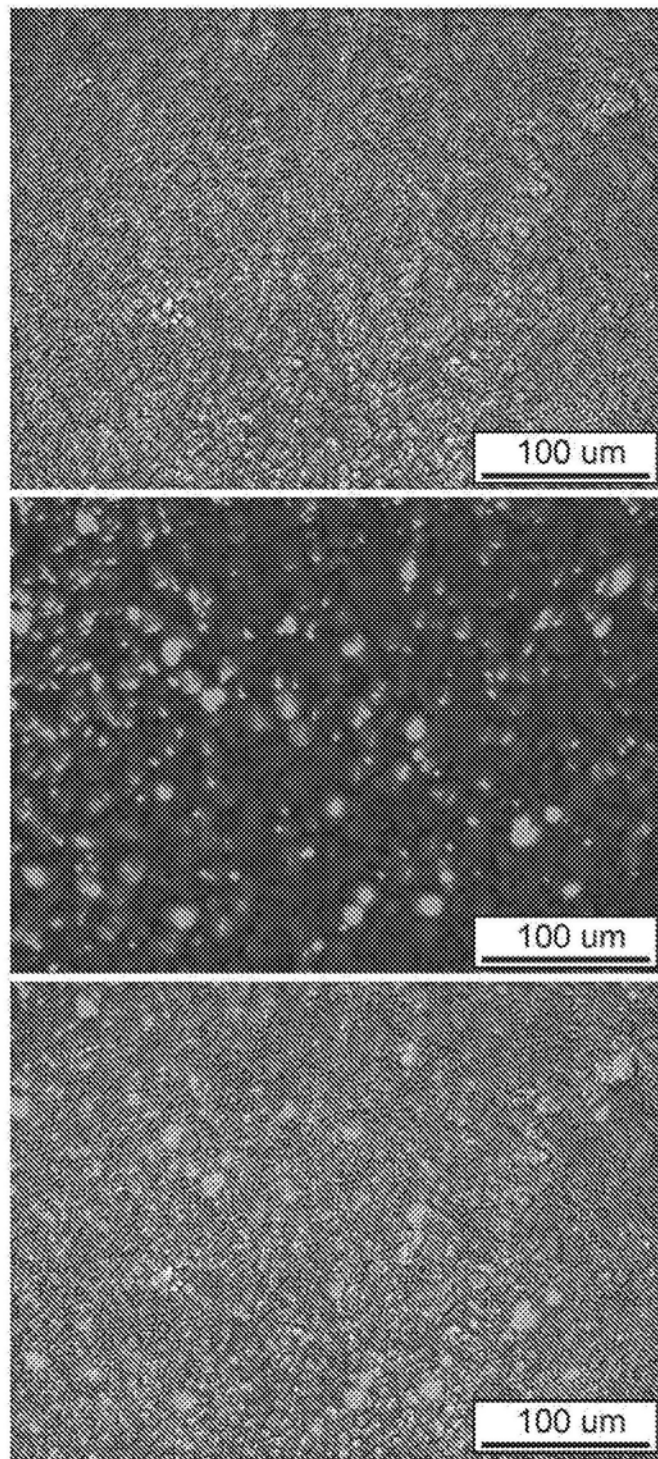


图94

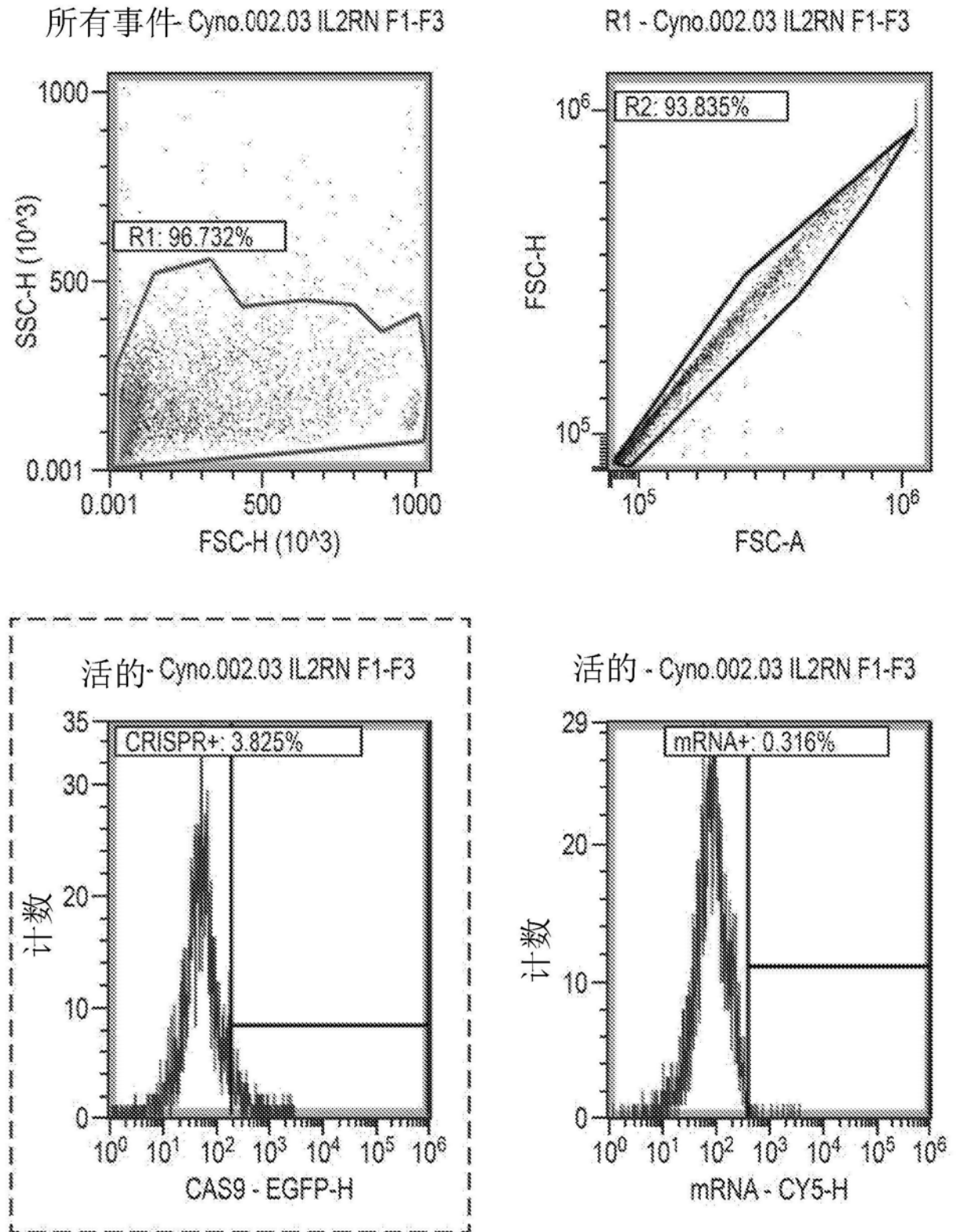


图94 (续)

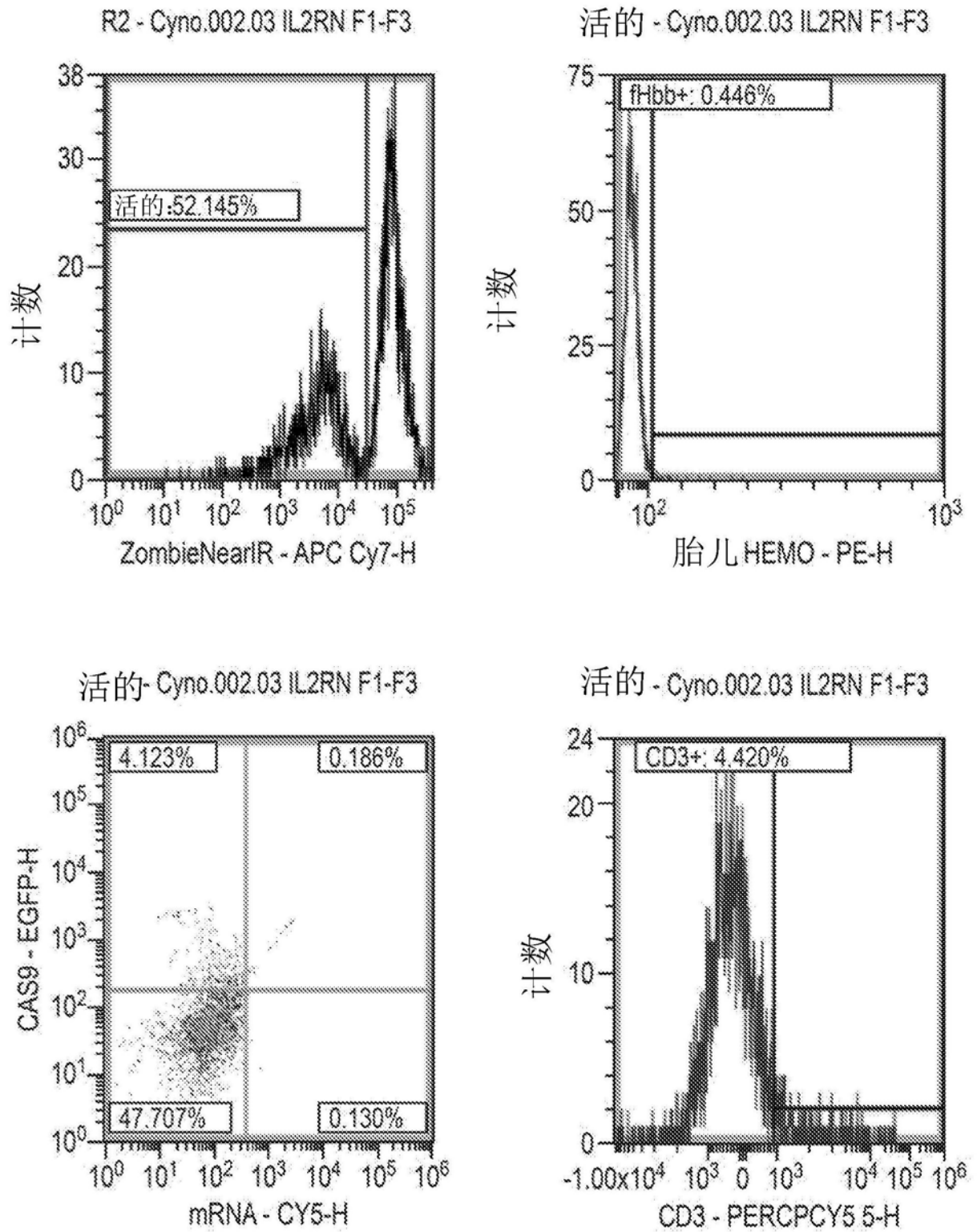


图94 (续)

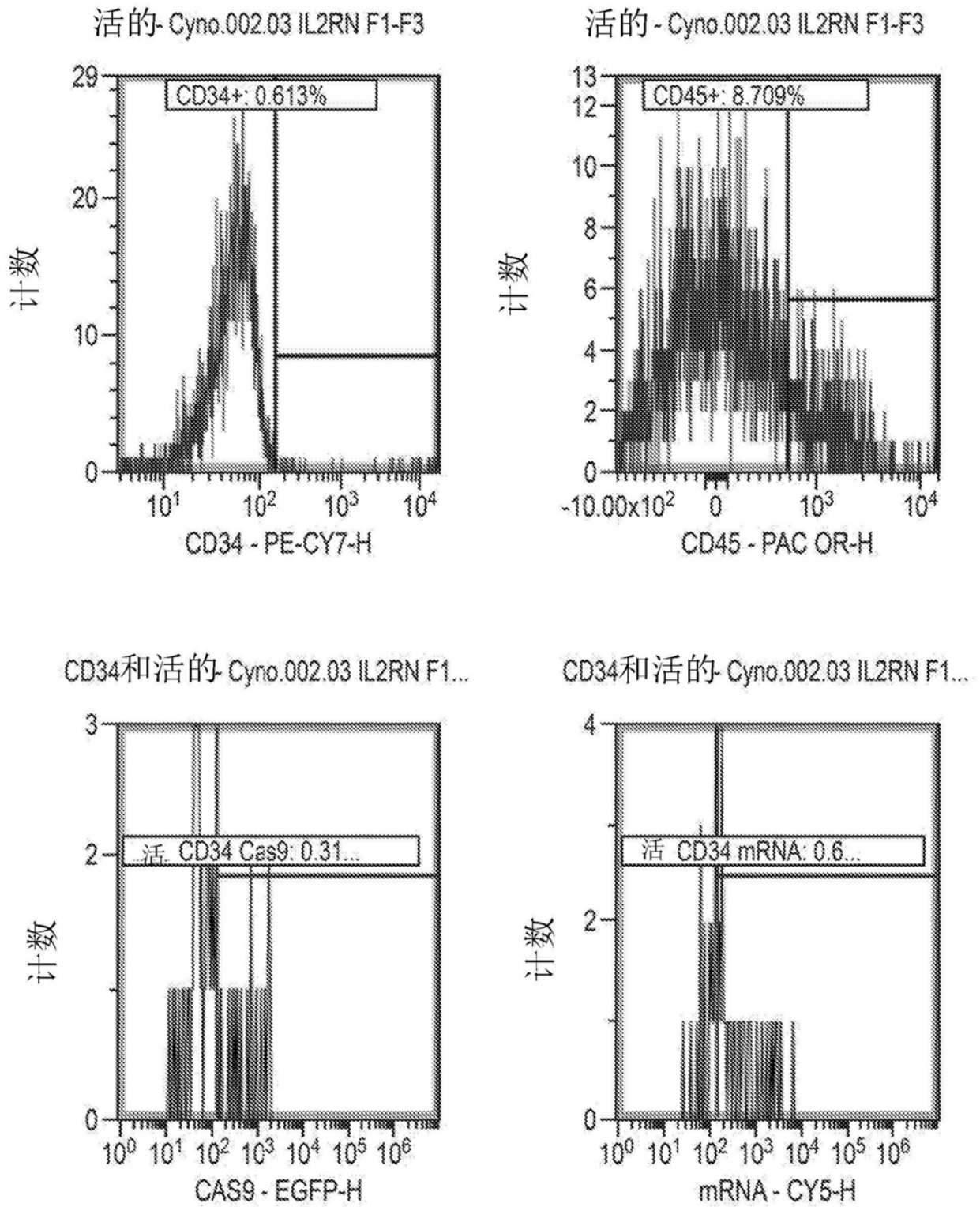


图94 (续)

CynoBM.002.78

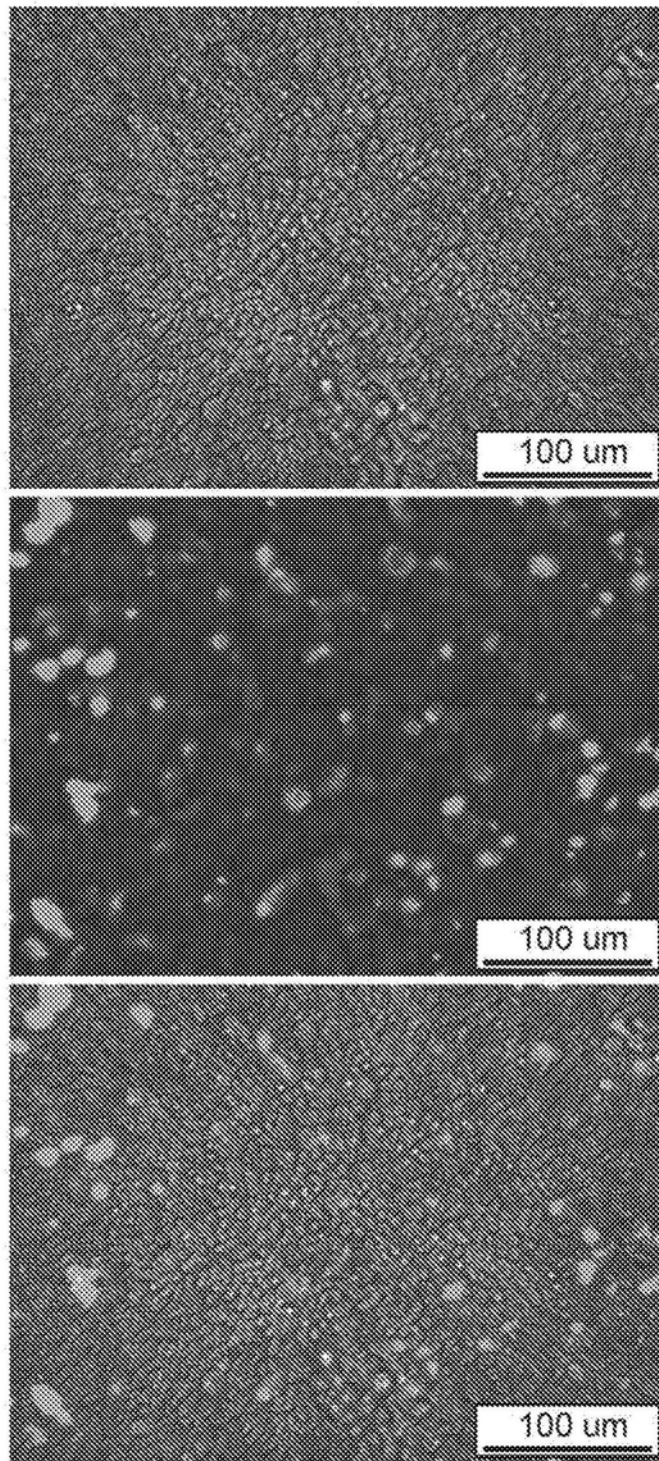


图95

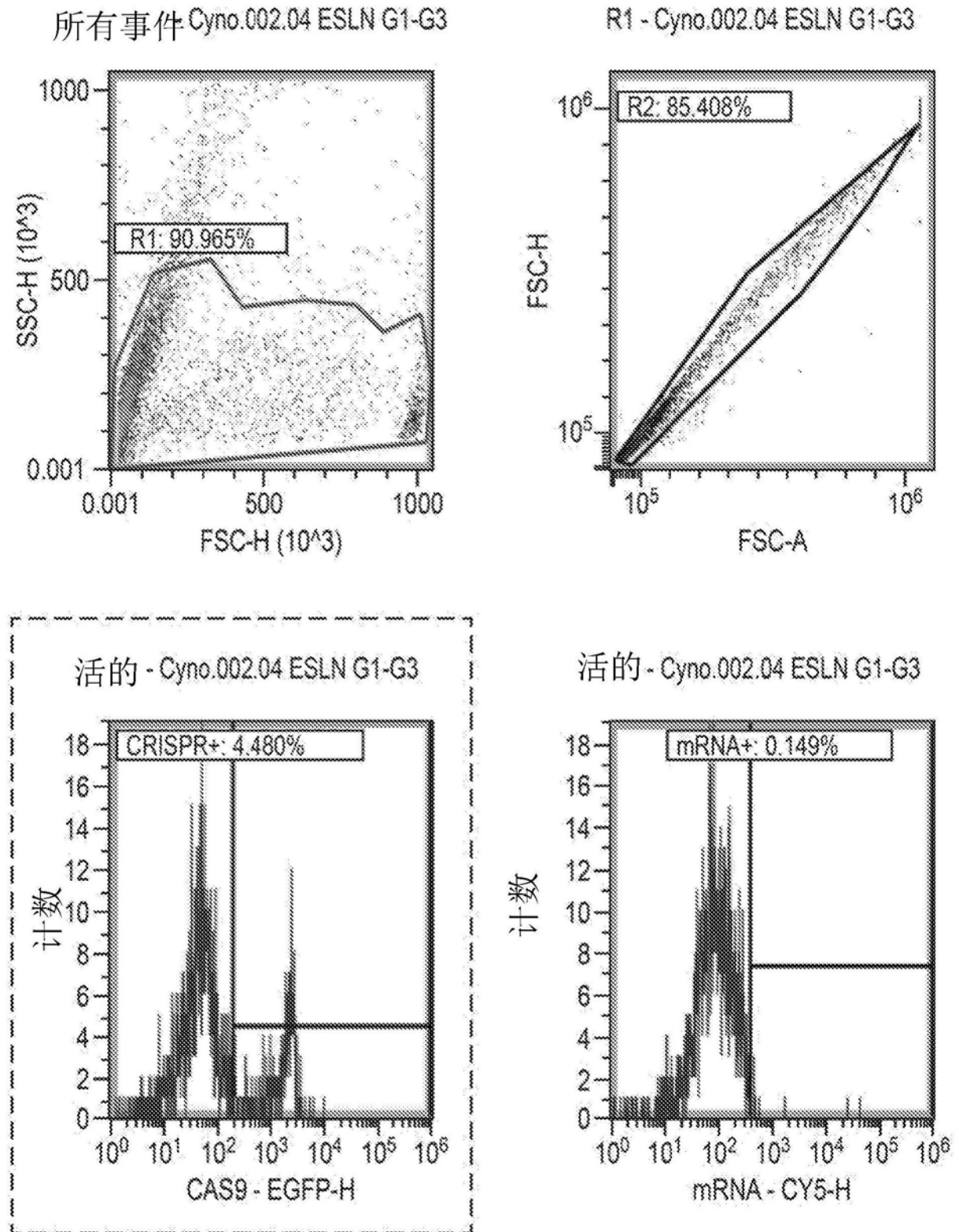


图95 (续)

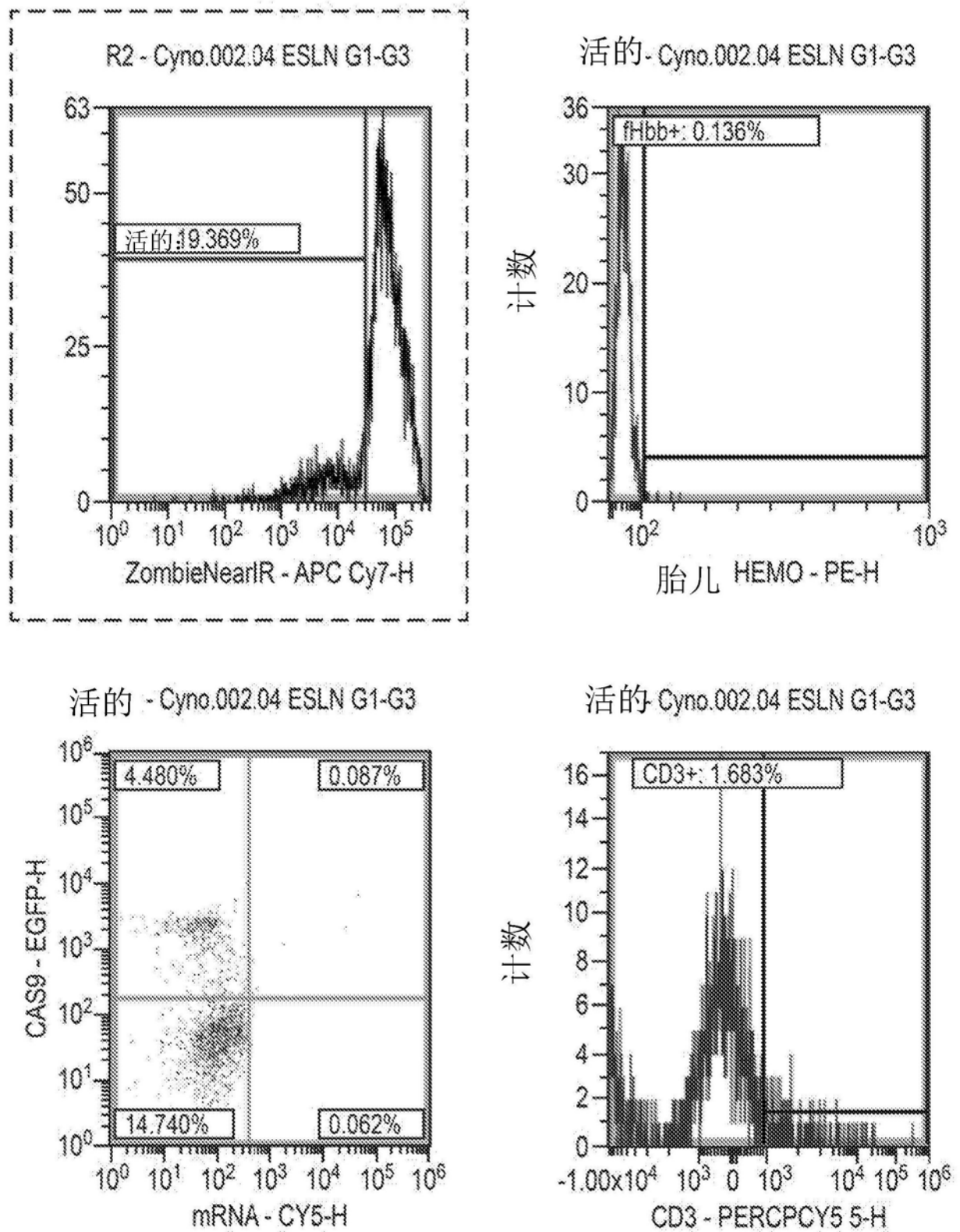


图95 (续)

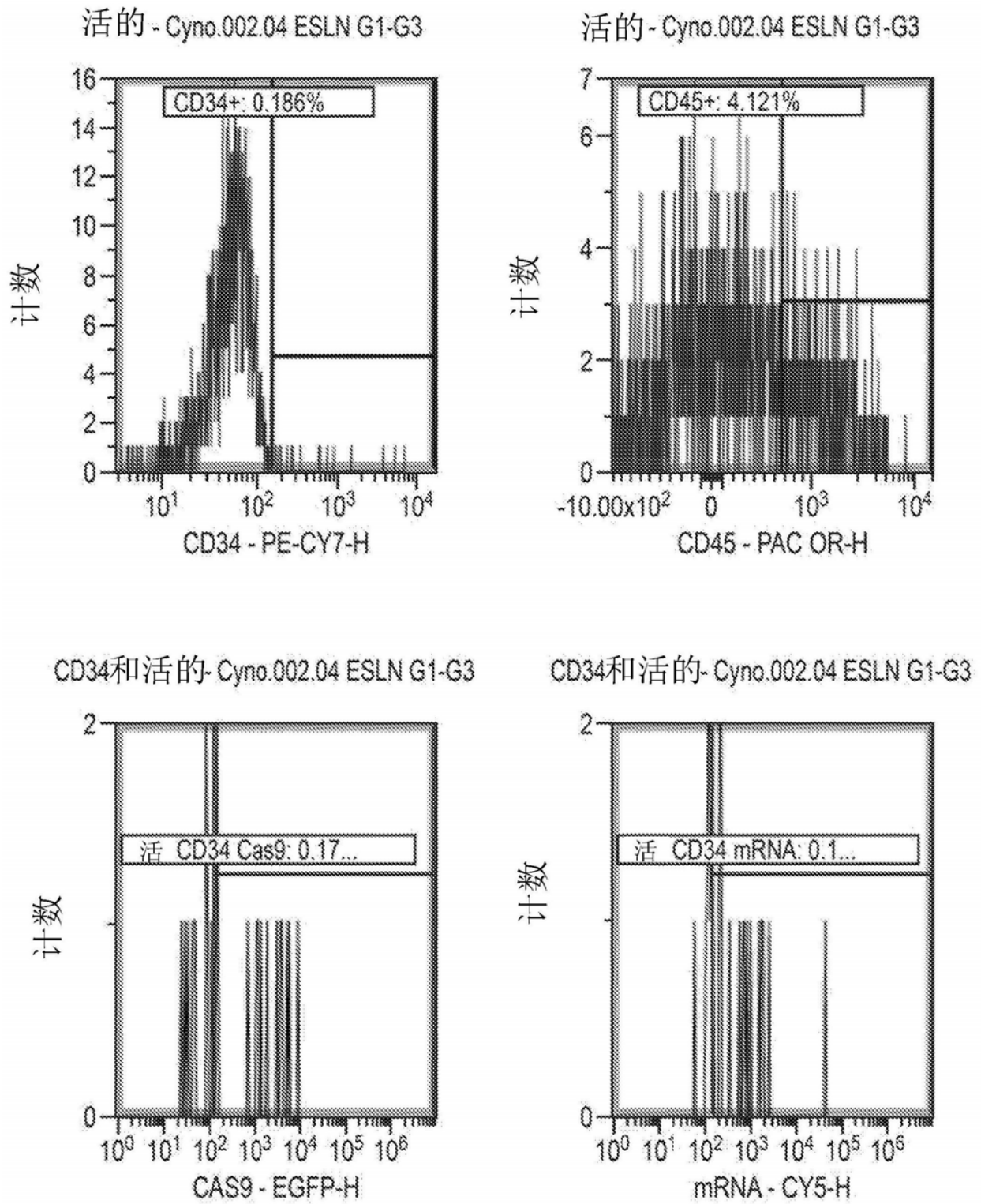


图95 (续)

CynoBM.002.79

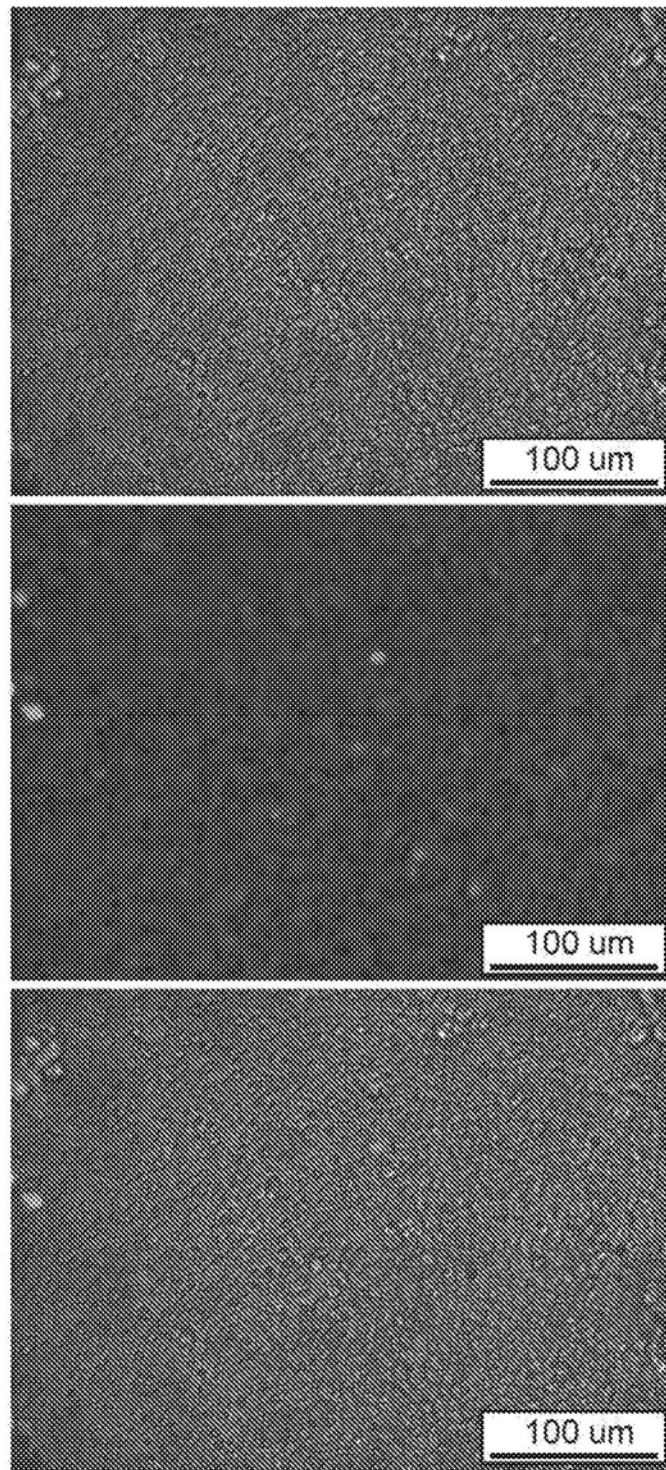


图96

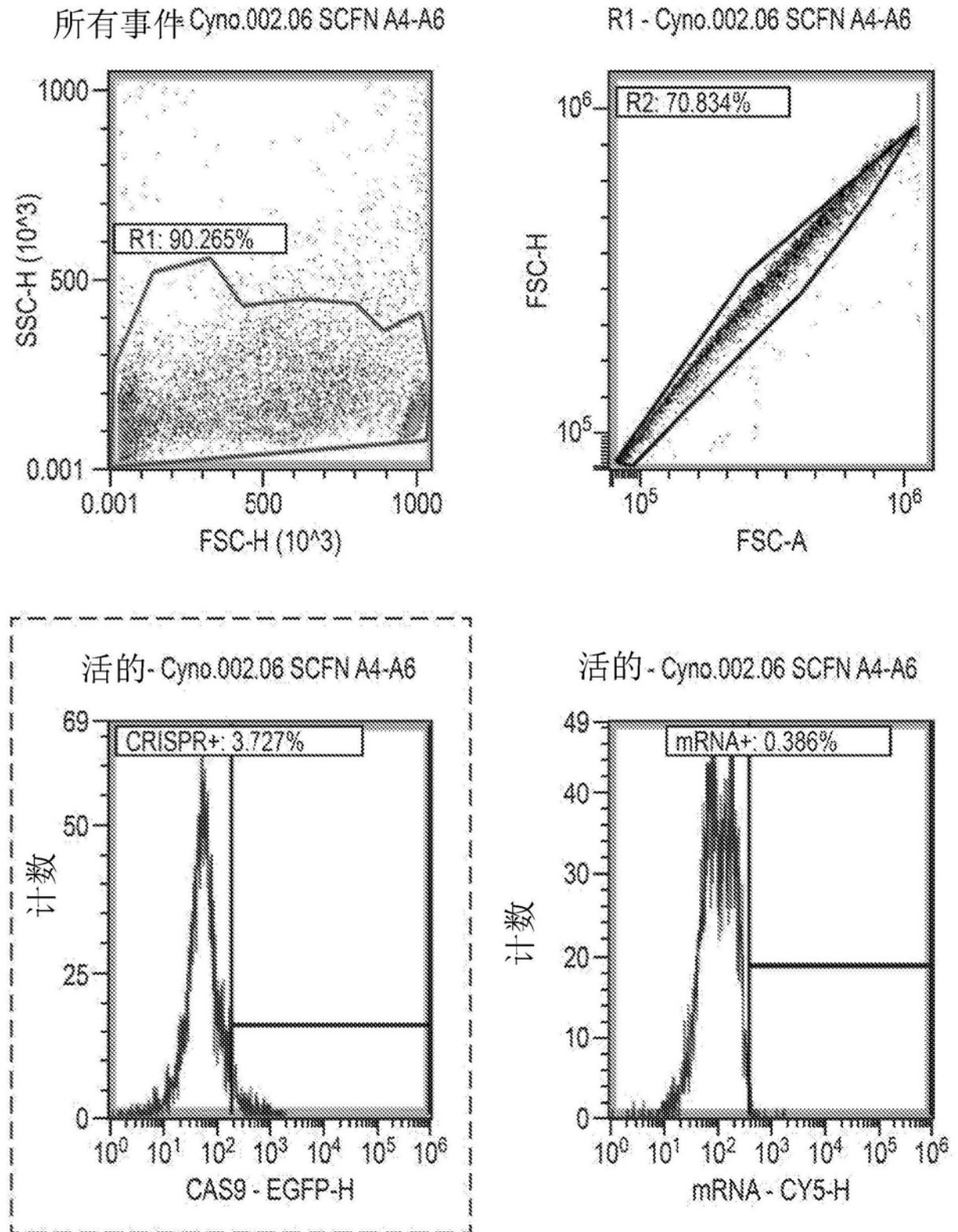


图96 (续)

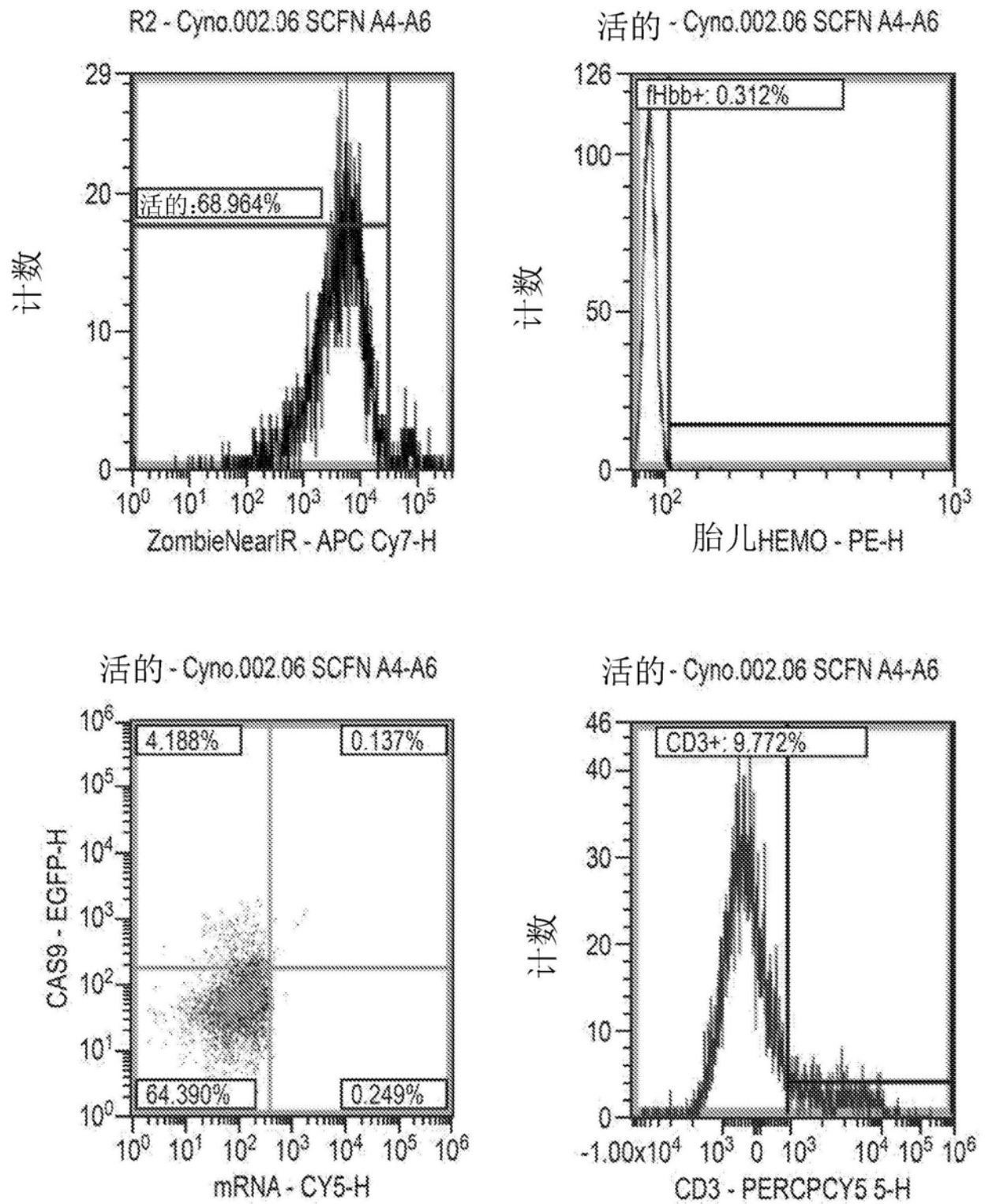


图96 (续)

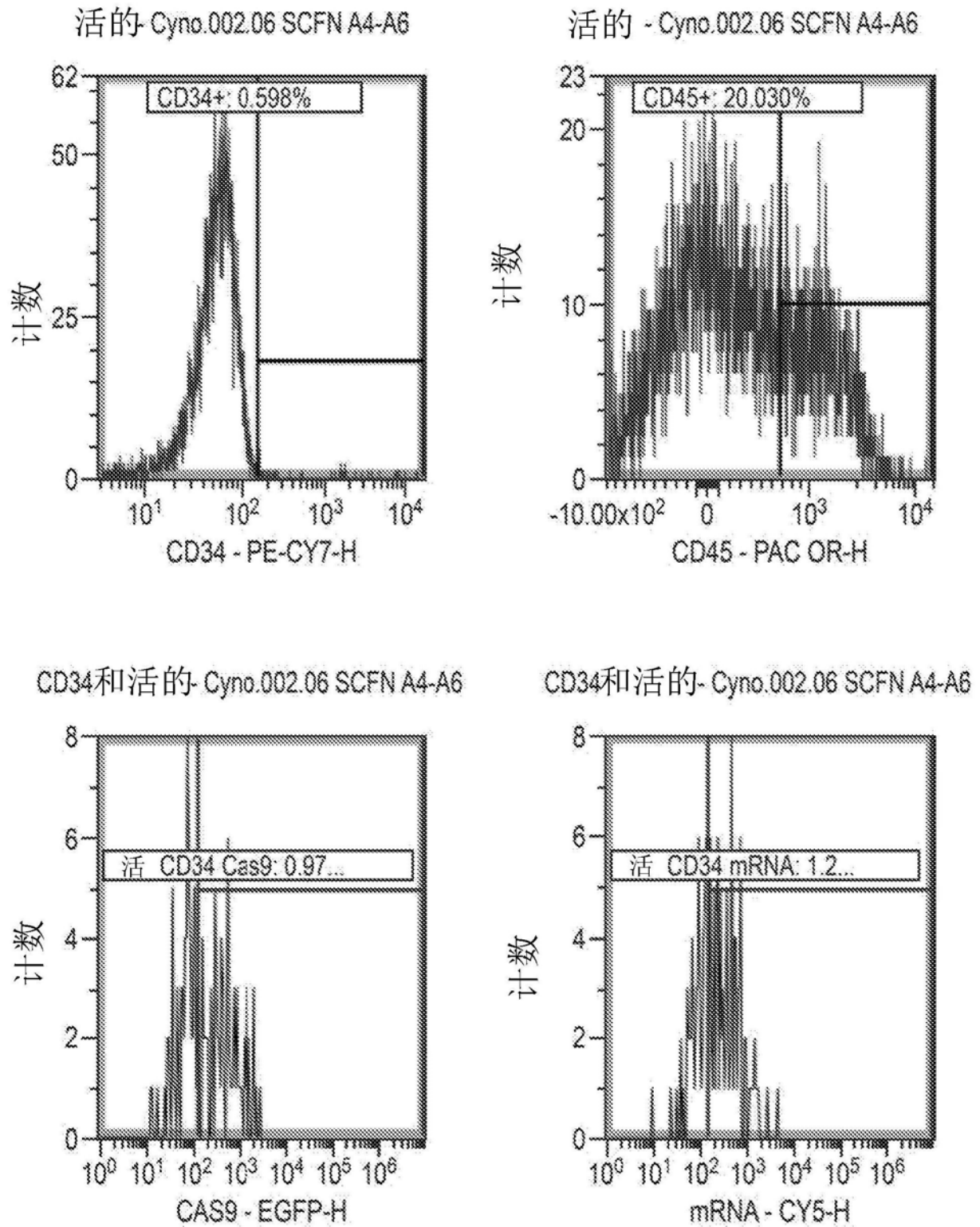


图96 (续)

CynoBM.002.80

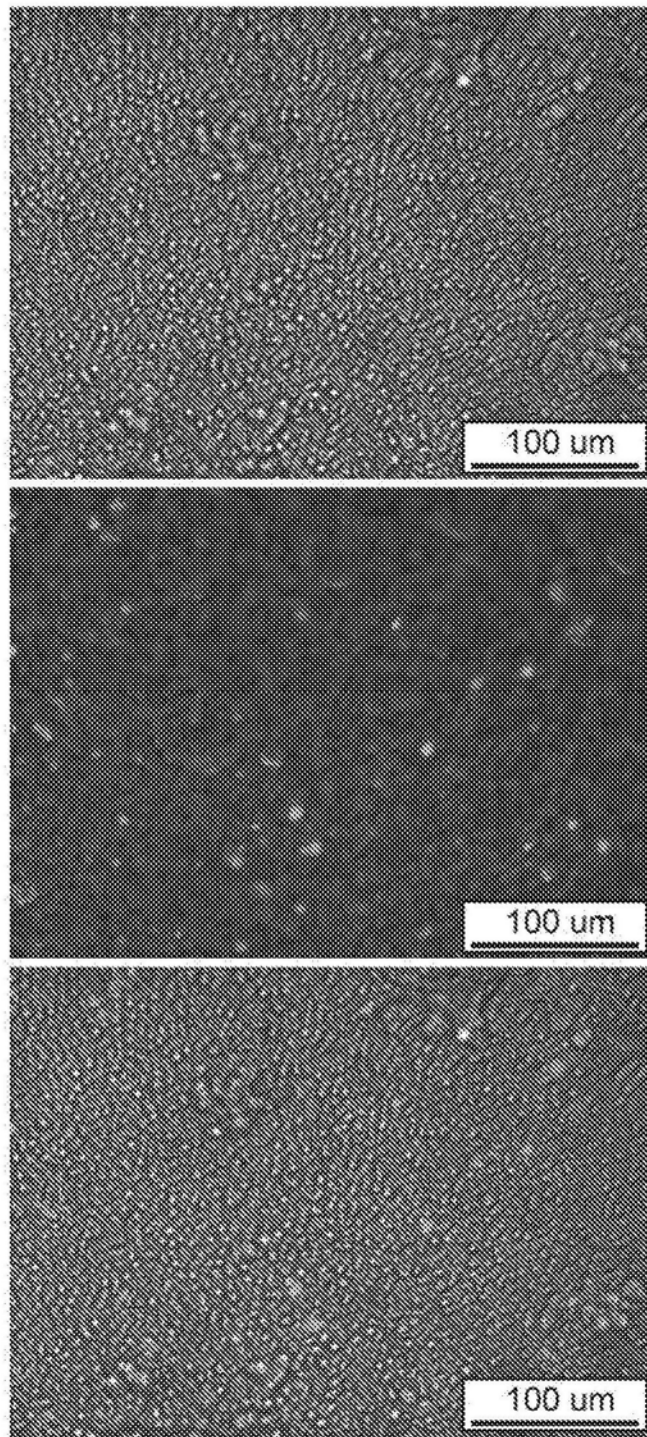


图97

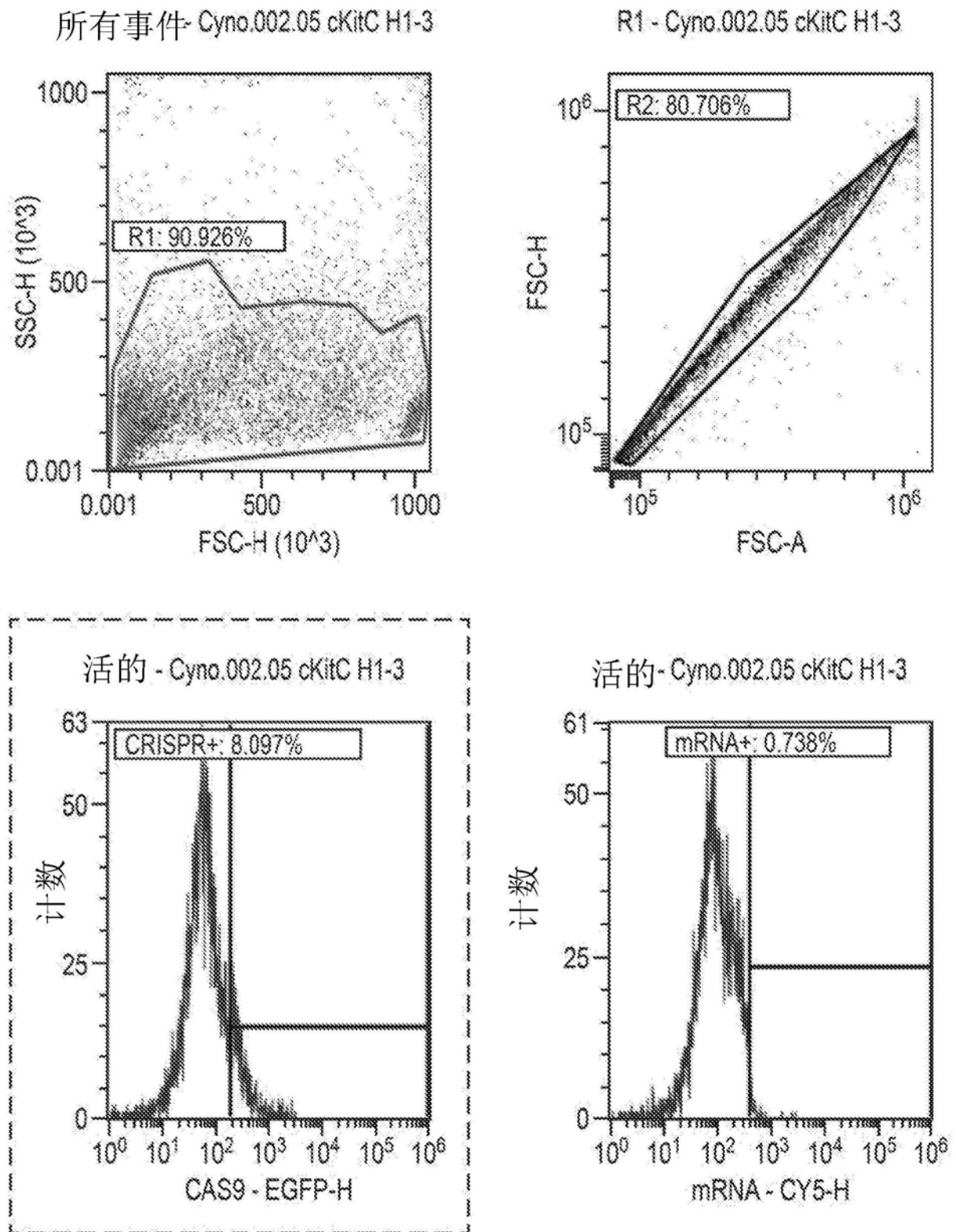


图97 (续)

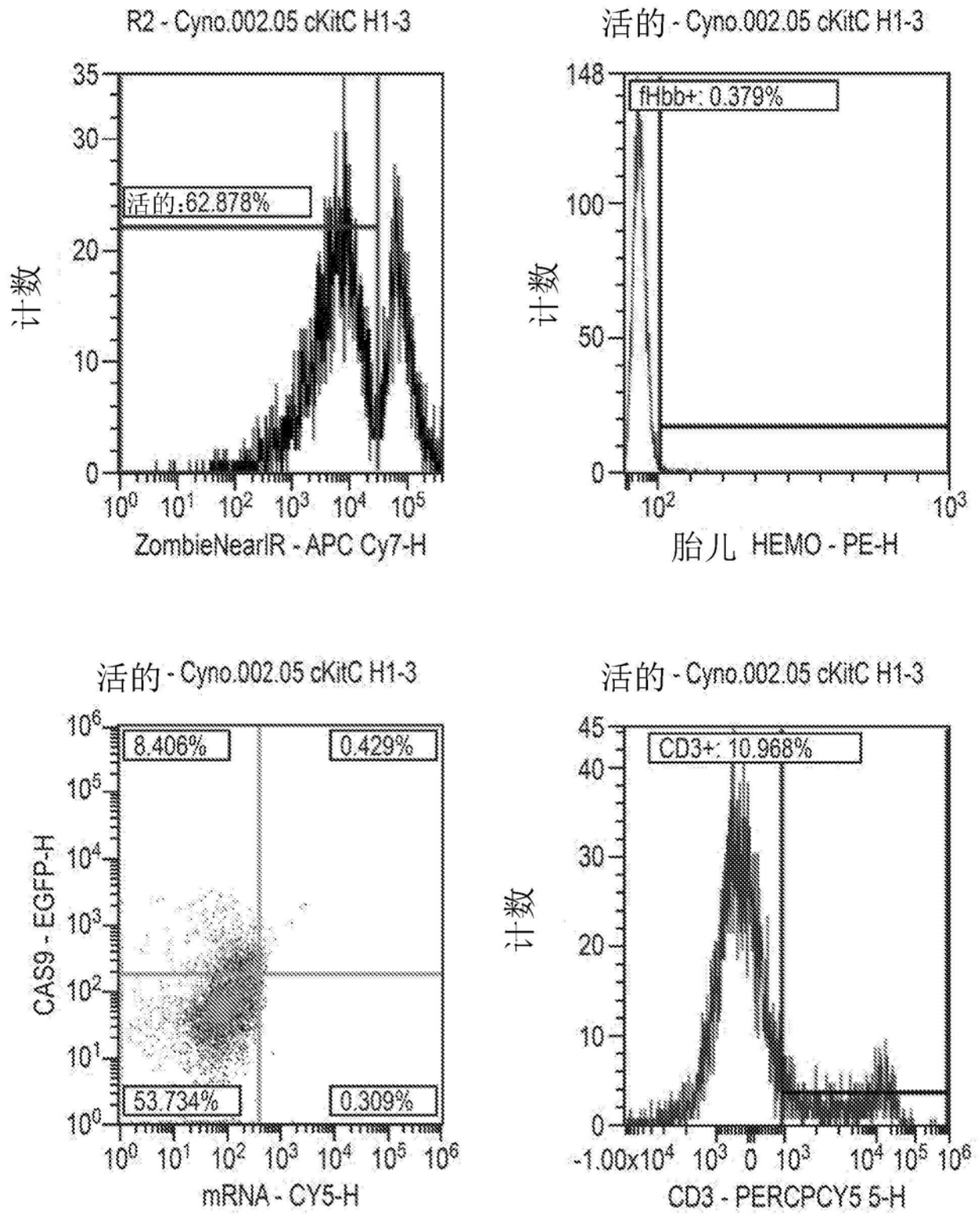


图97(续)

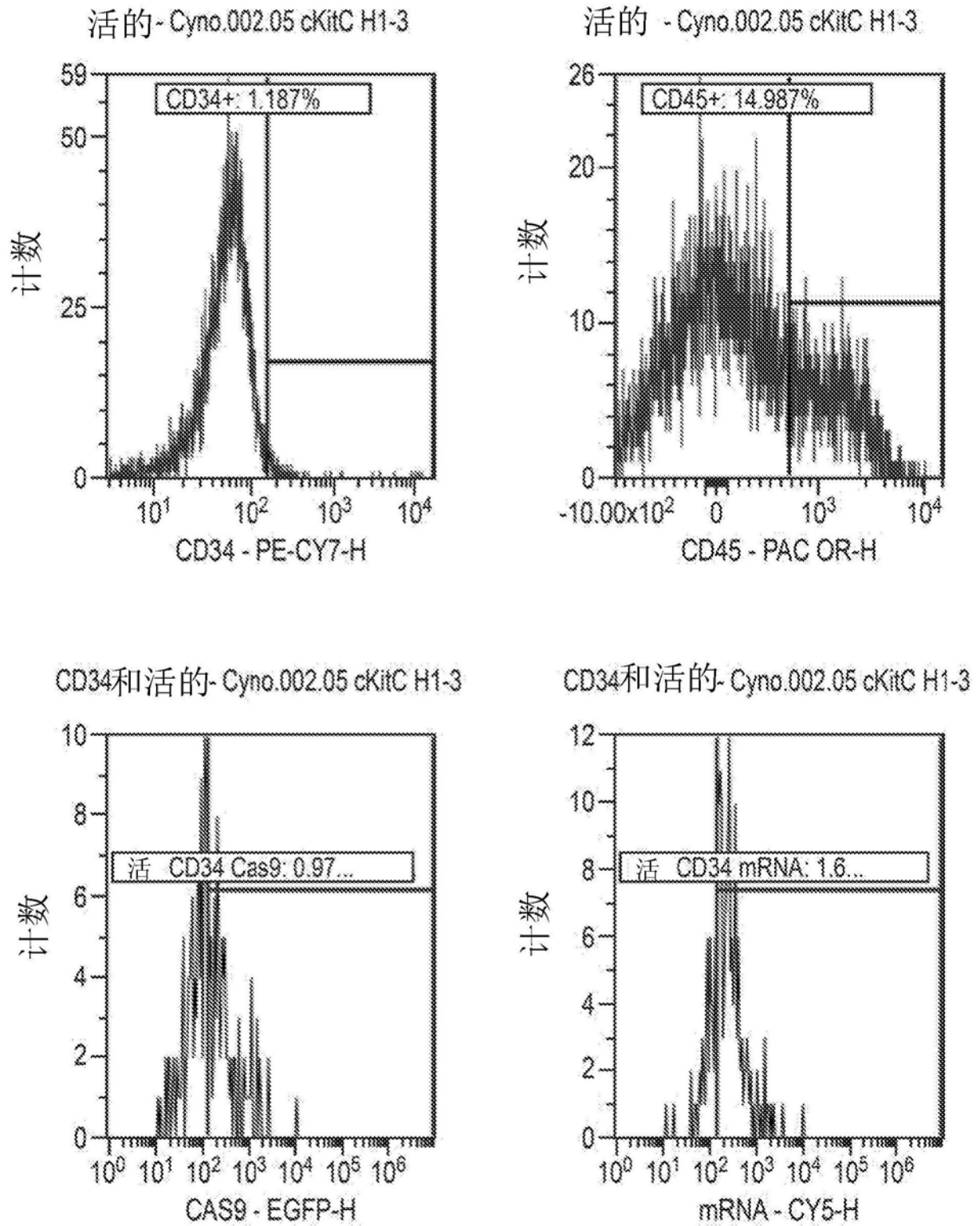


图97 (续)

CynoBM.002.81

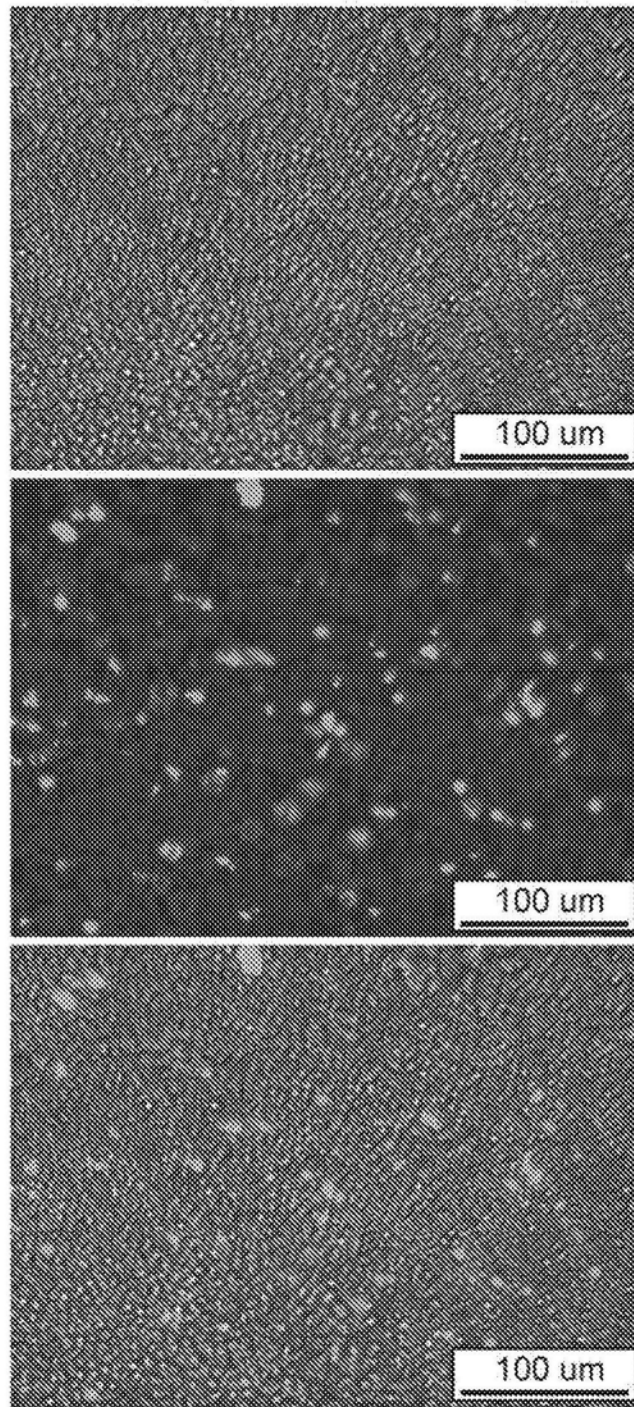


图98

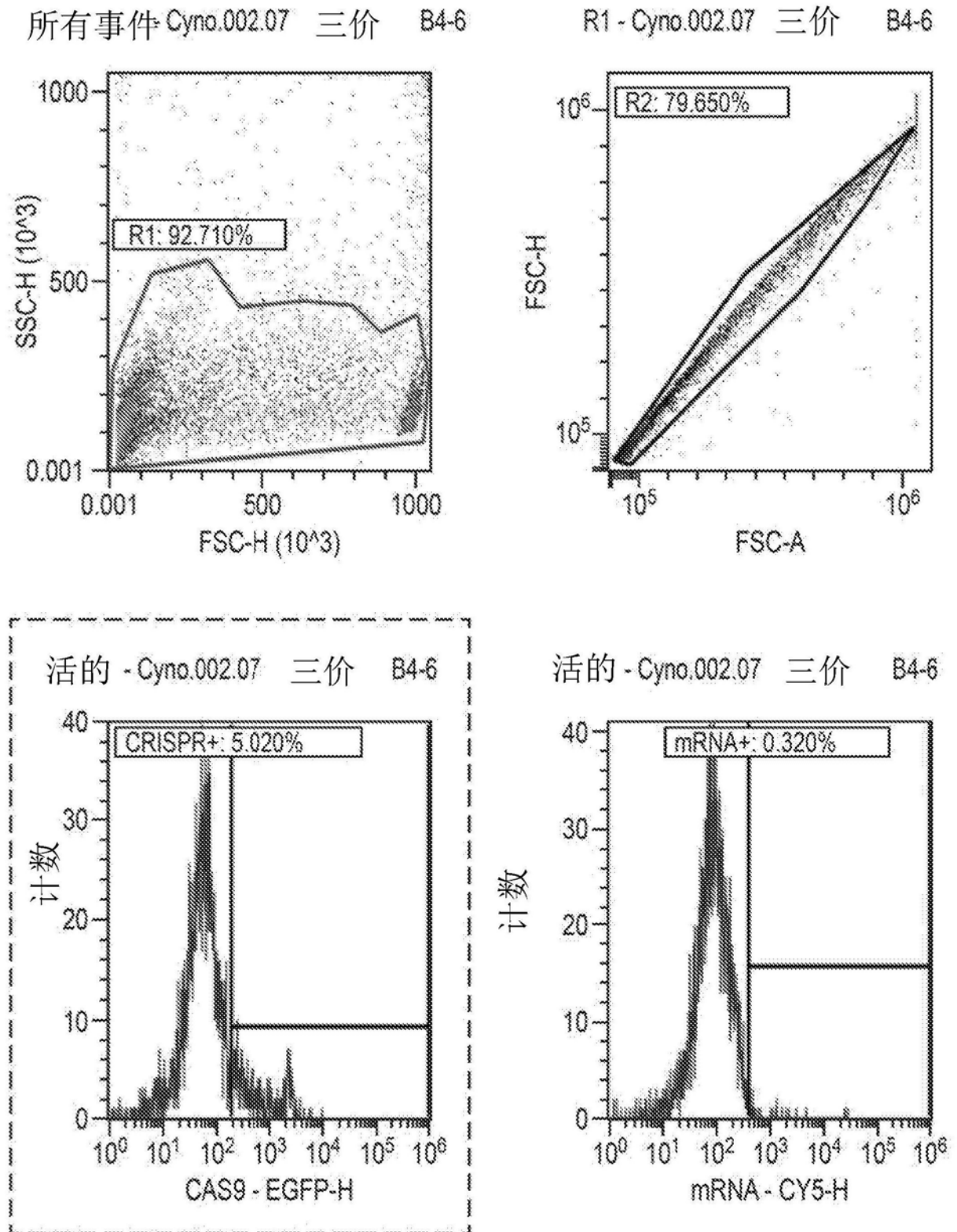


图98 (续)

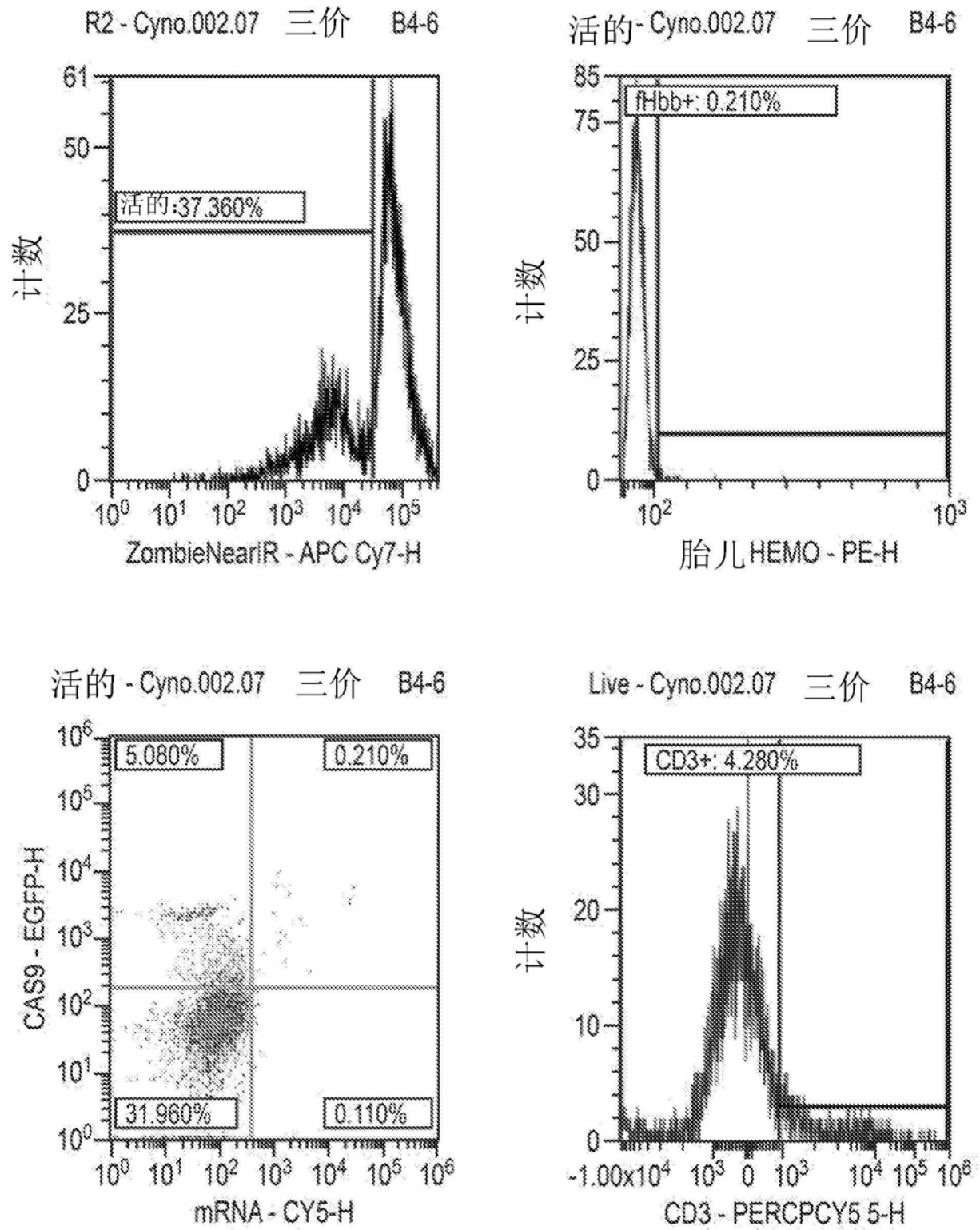


图98 (续)

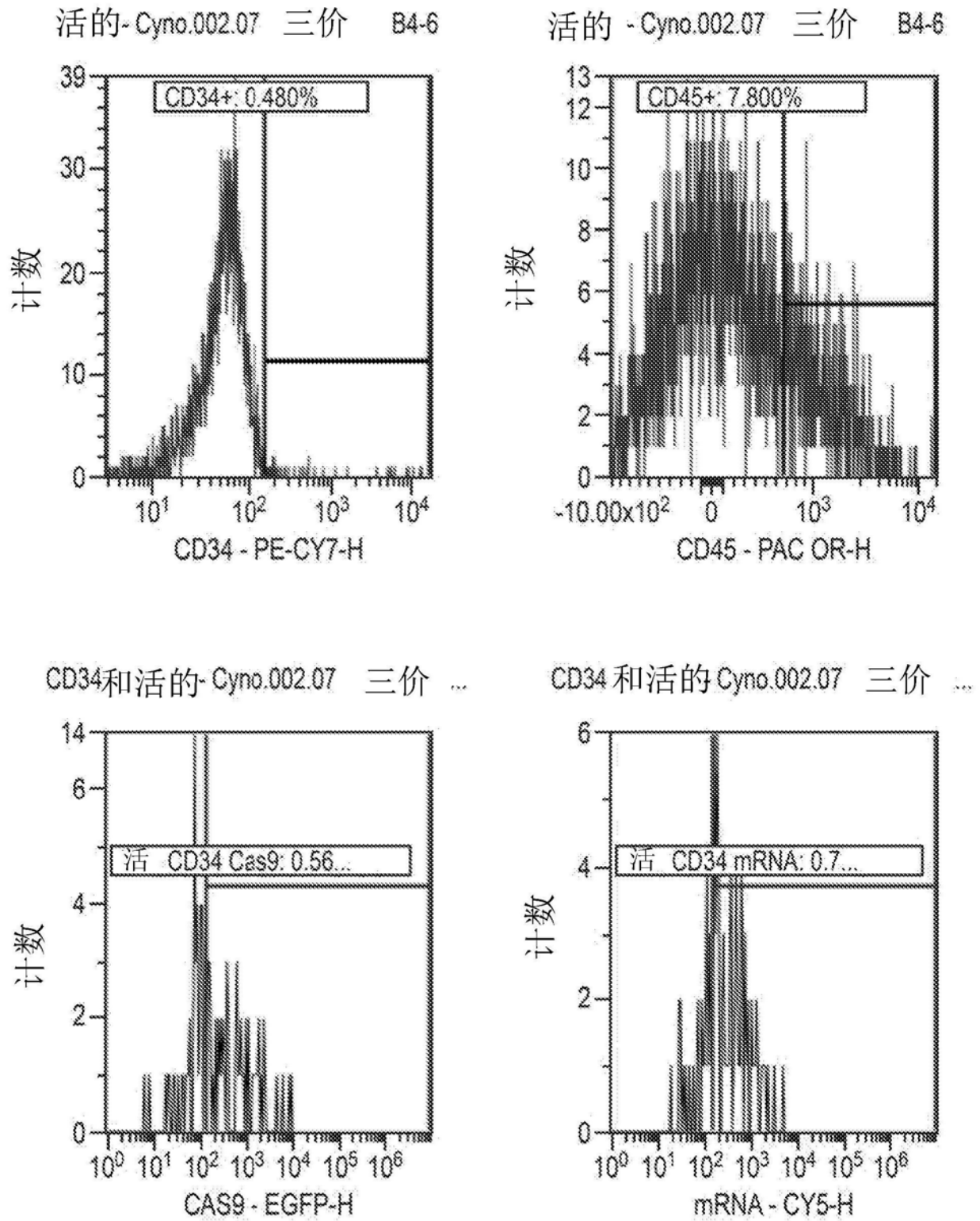


图98 (续)

仅 CynoBM.002 EGFP-RNP

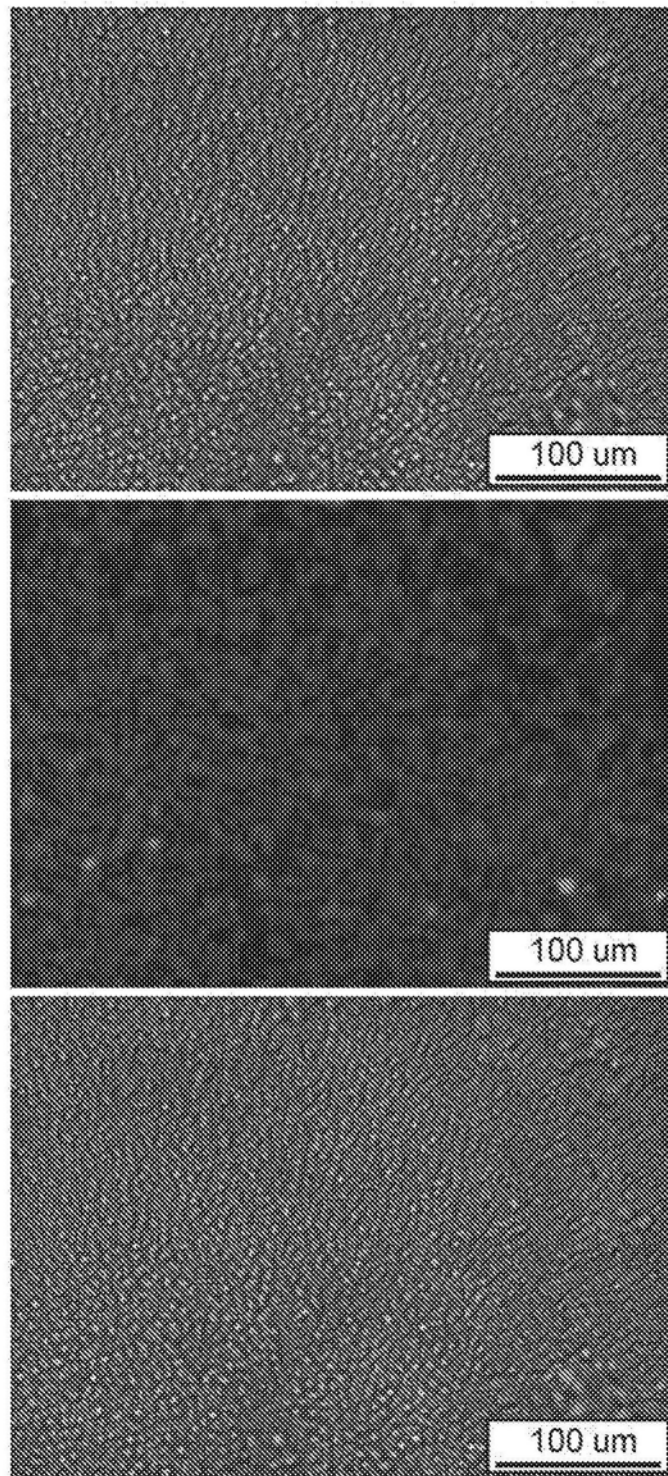


图99

HSC.004 高含量筛选

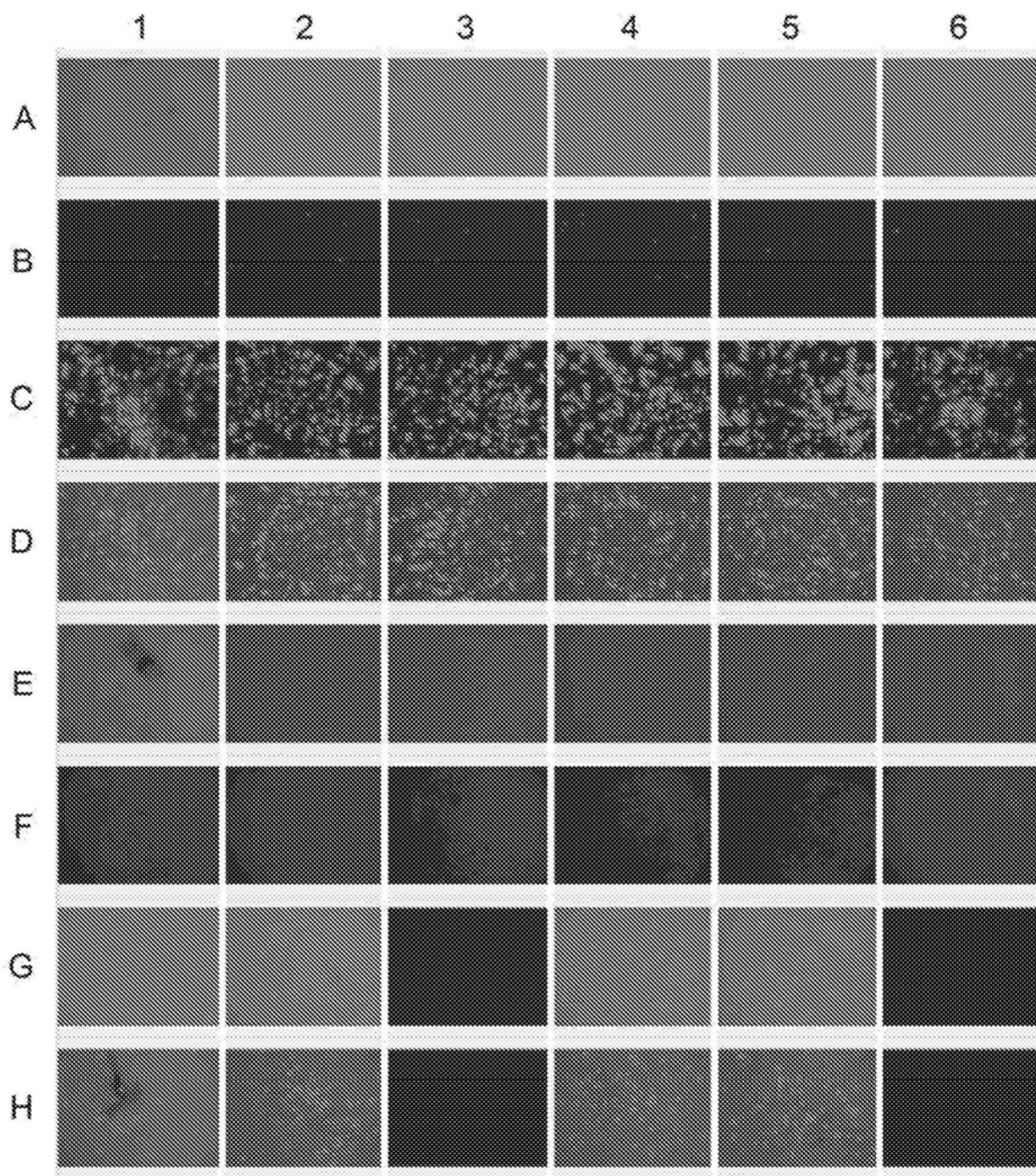


图100

TCELL.001 高含量筛选

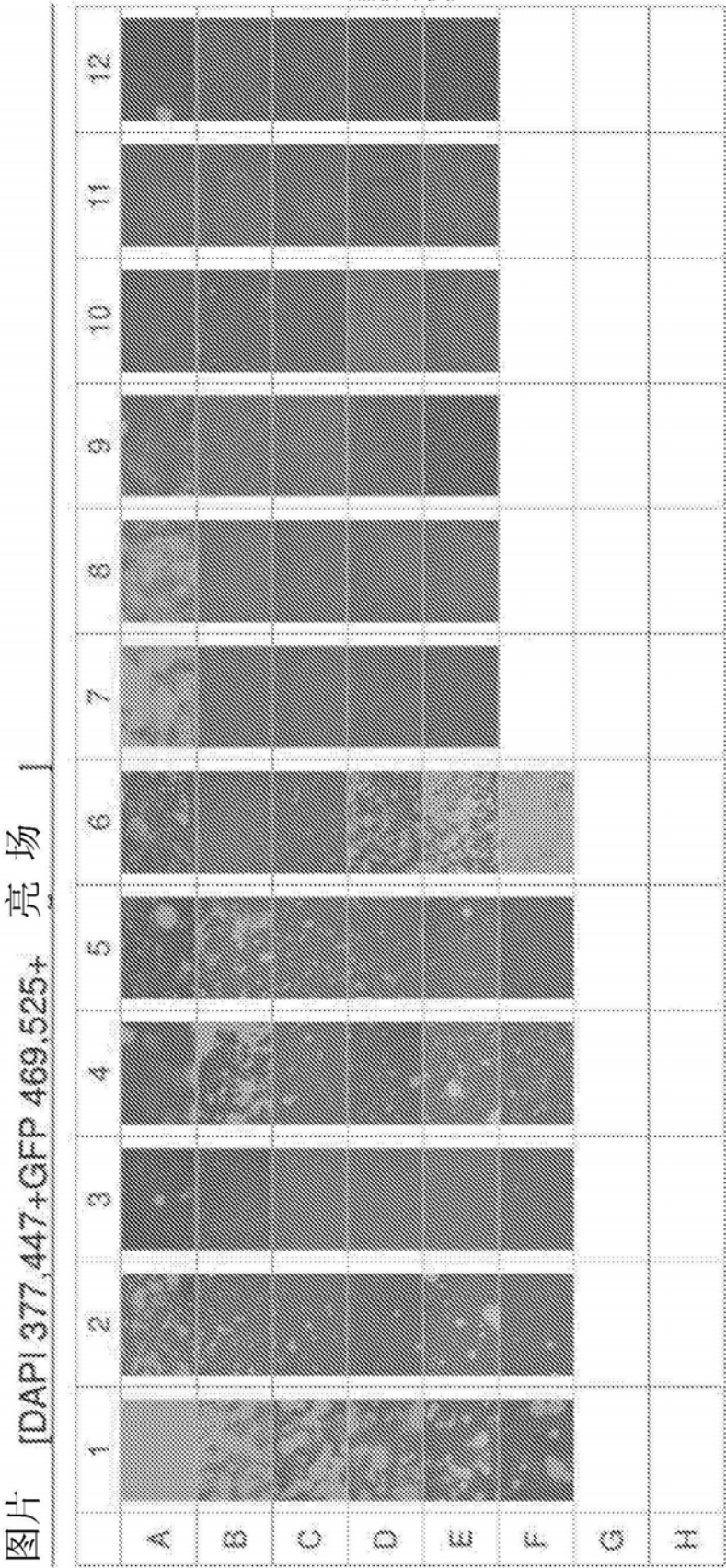


图101

TCELL.001 Lipofectamine CRISPRMAX

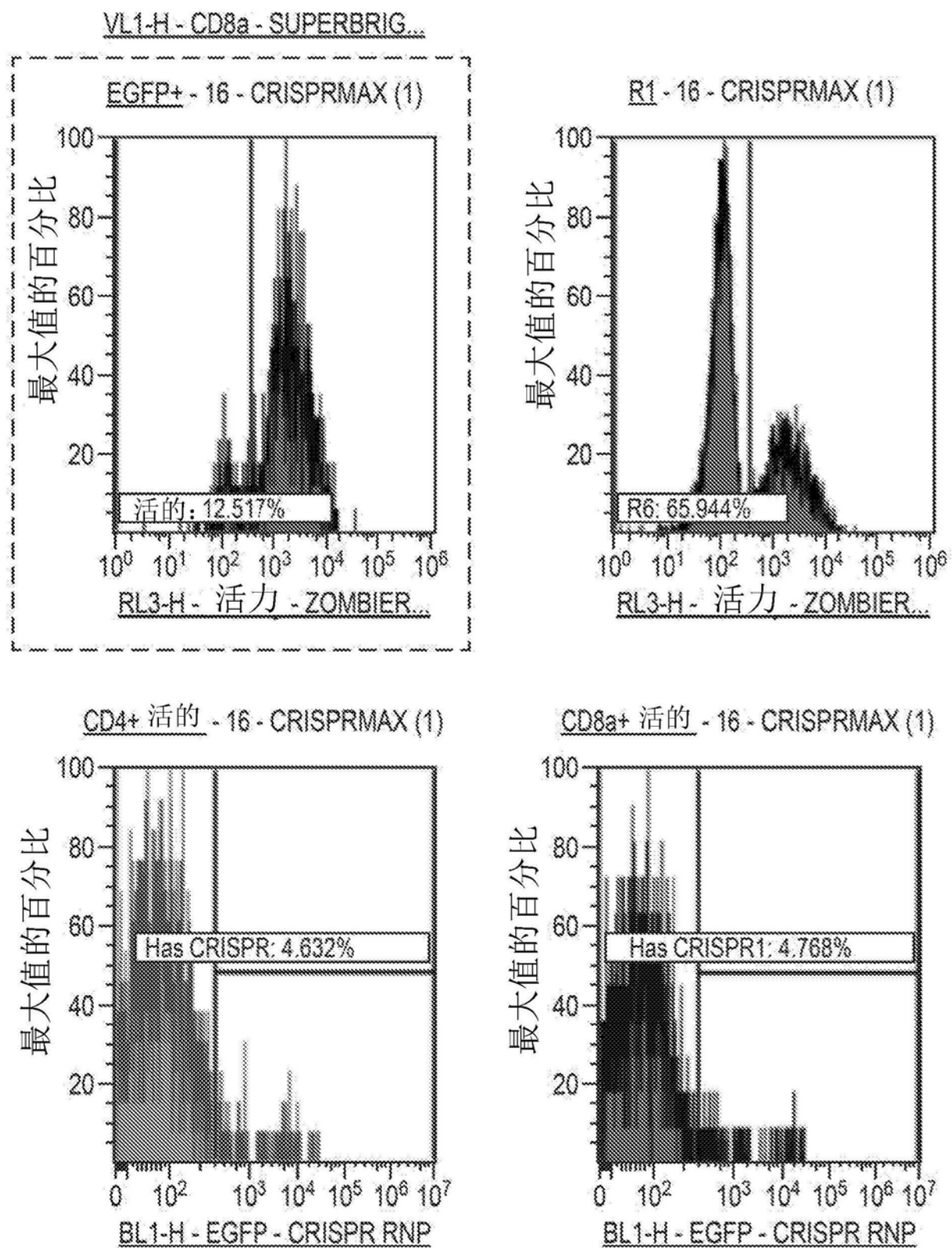


图102

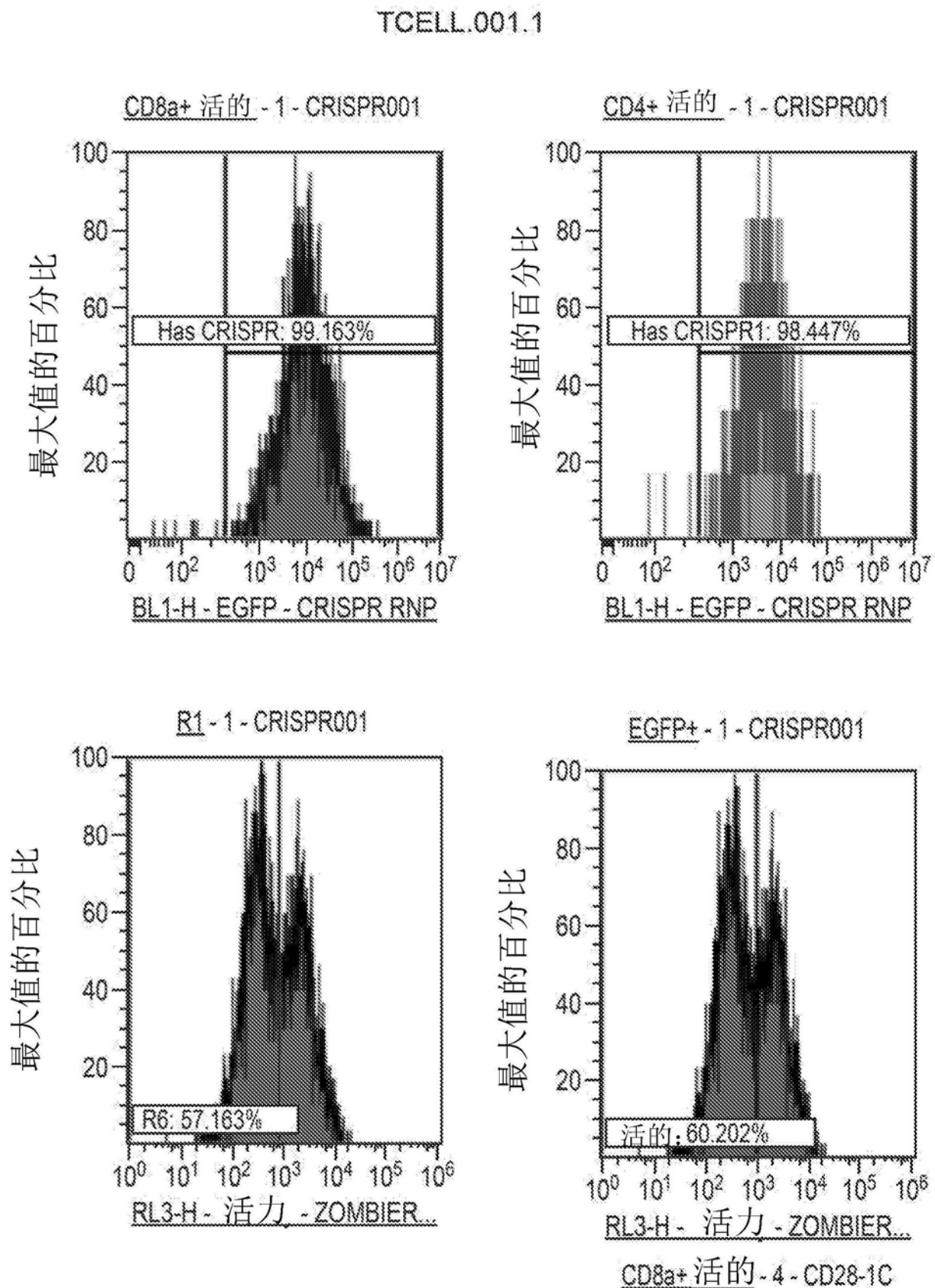


图103

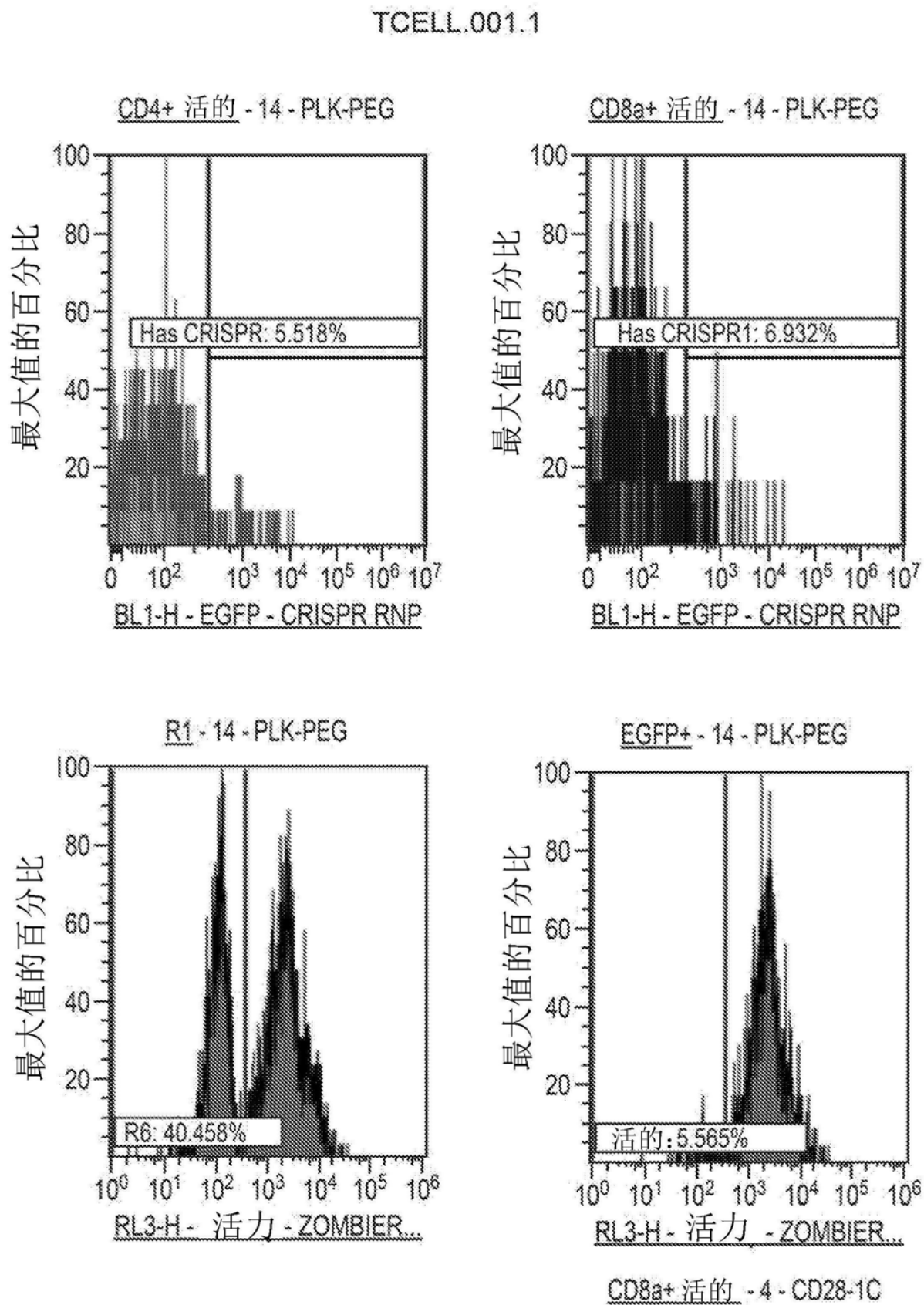


图104

TCELL.001.3

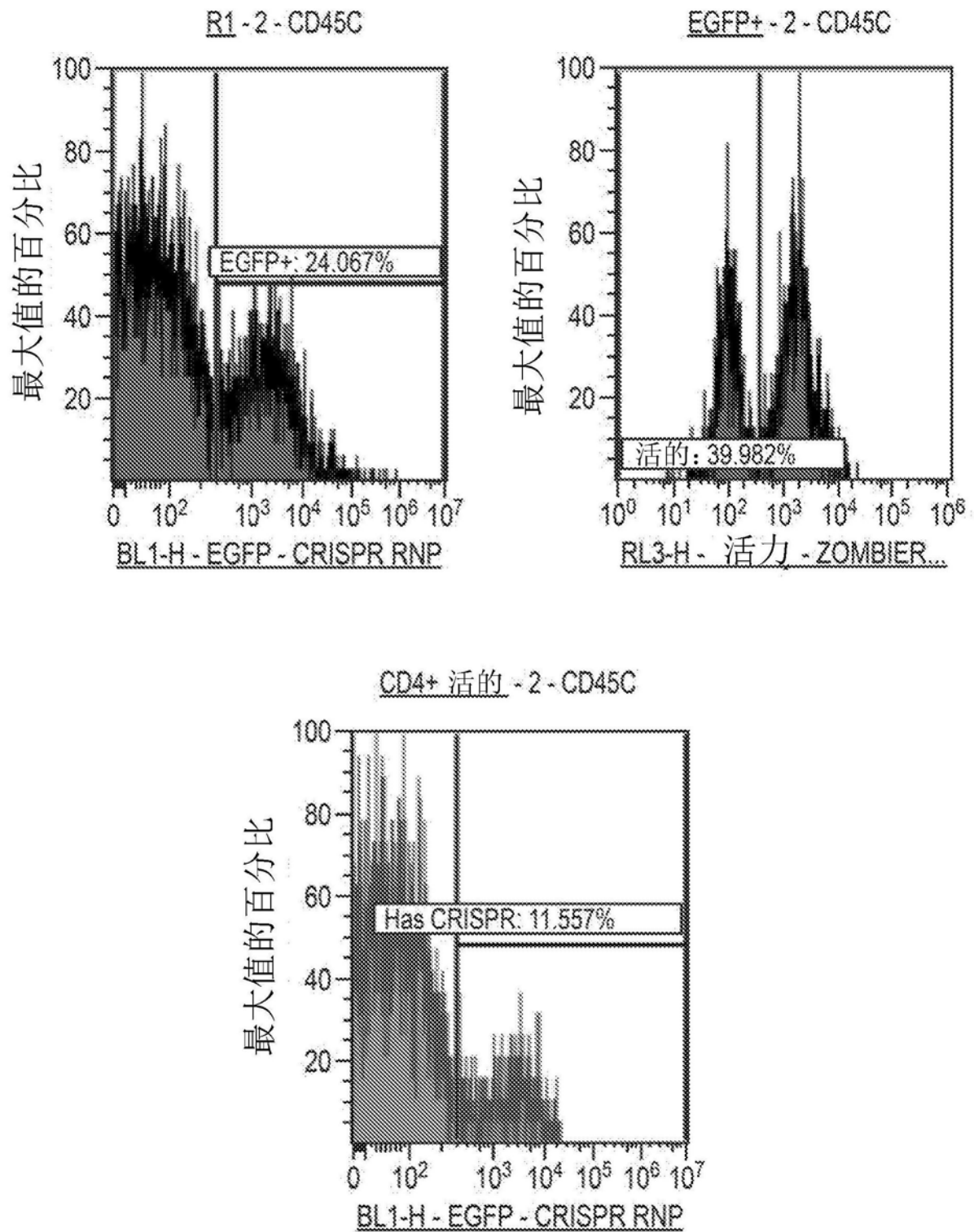


图105

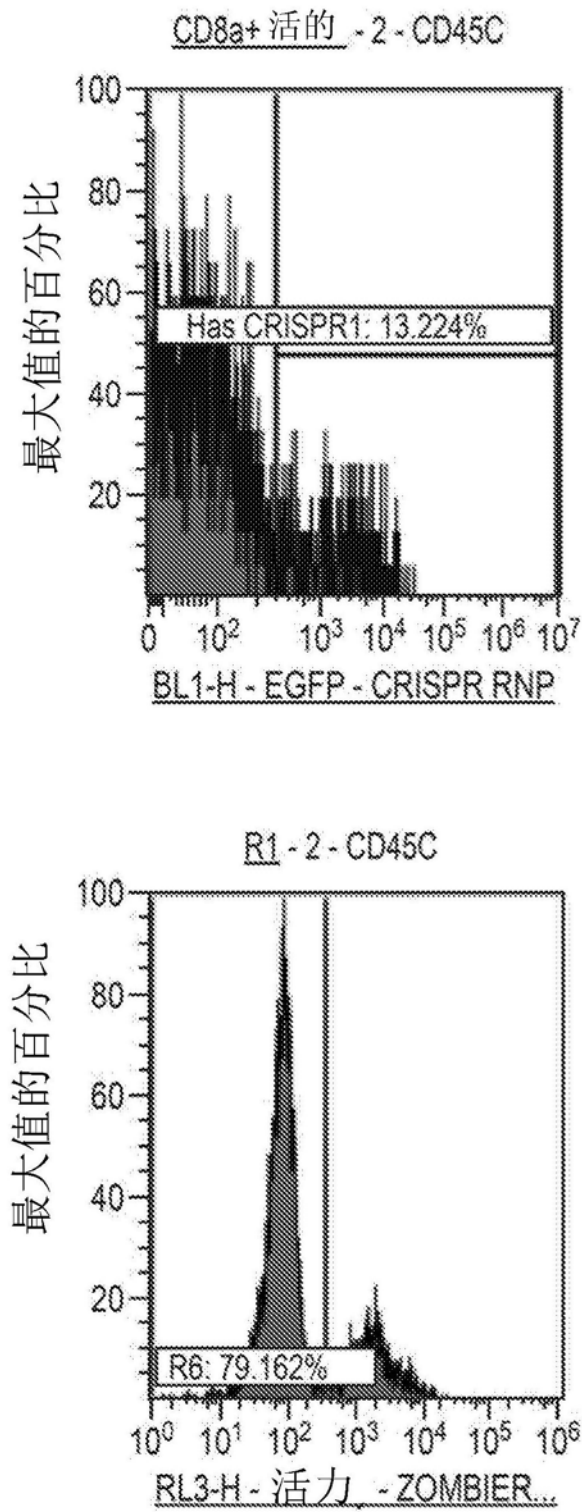


图105 (续)

TCELL.001.4

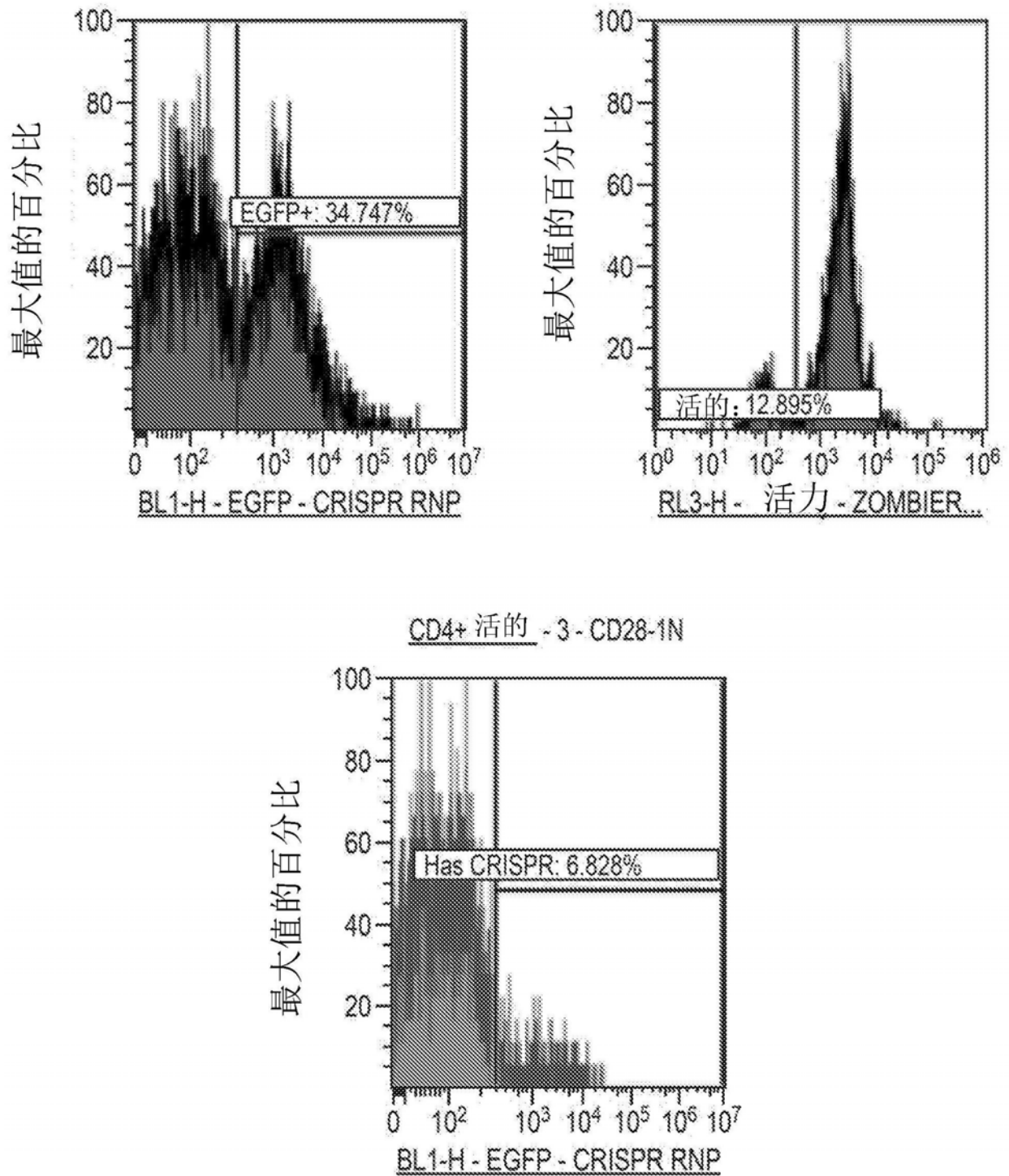


图106

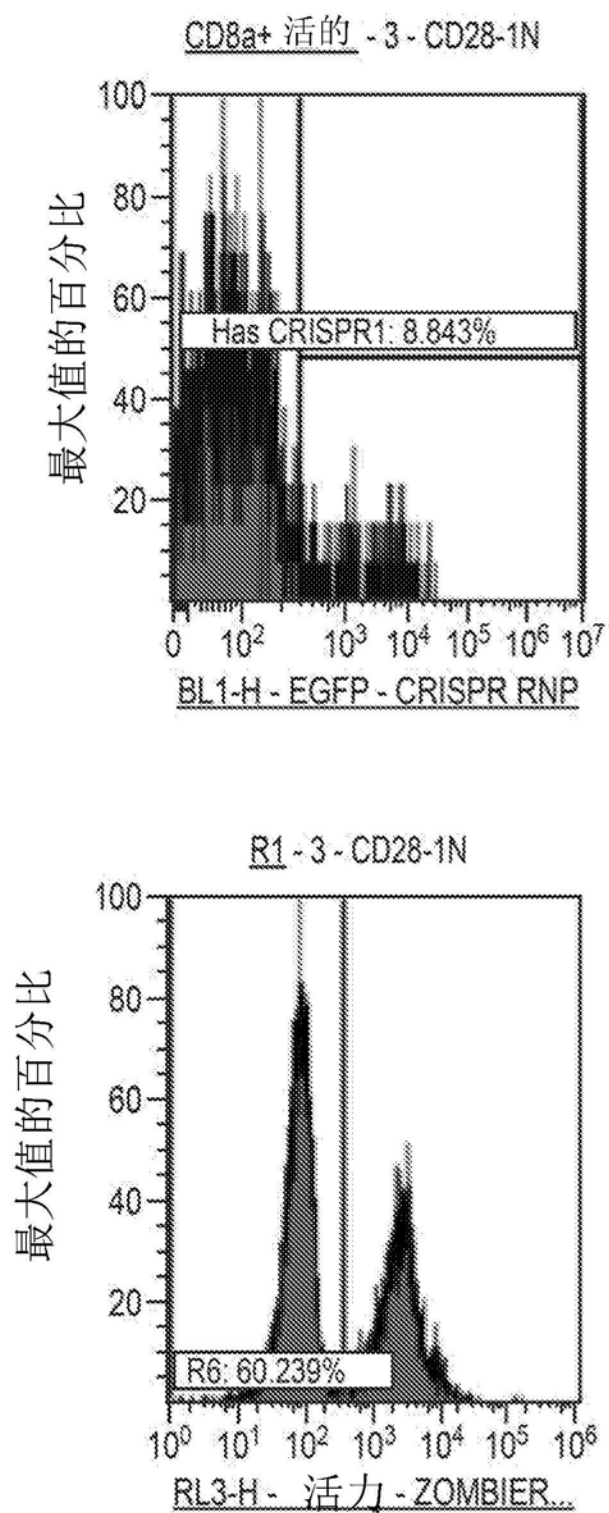


图106 (续)

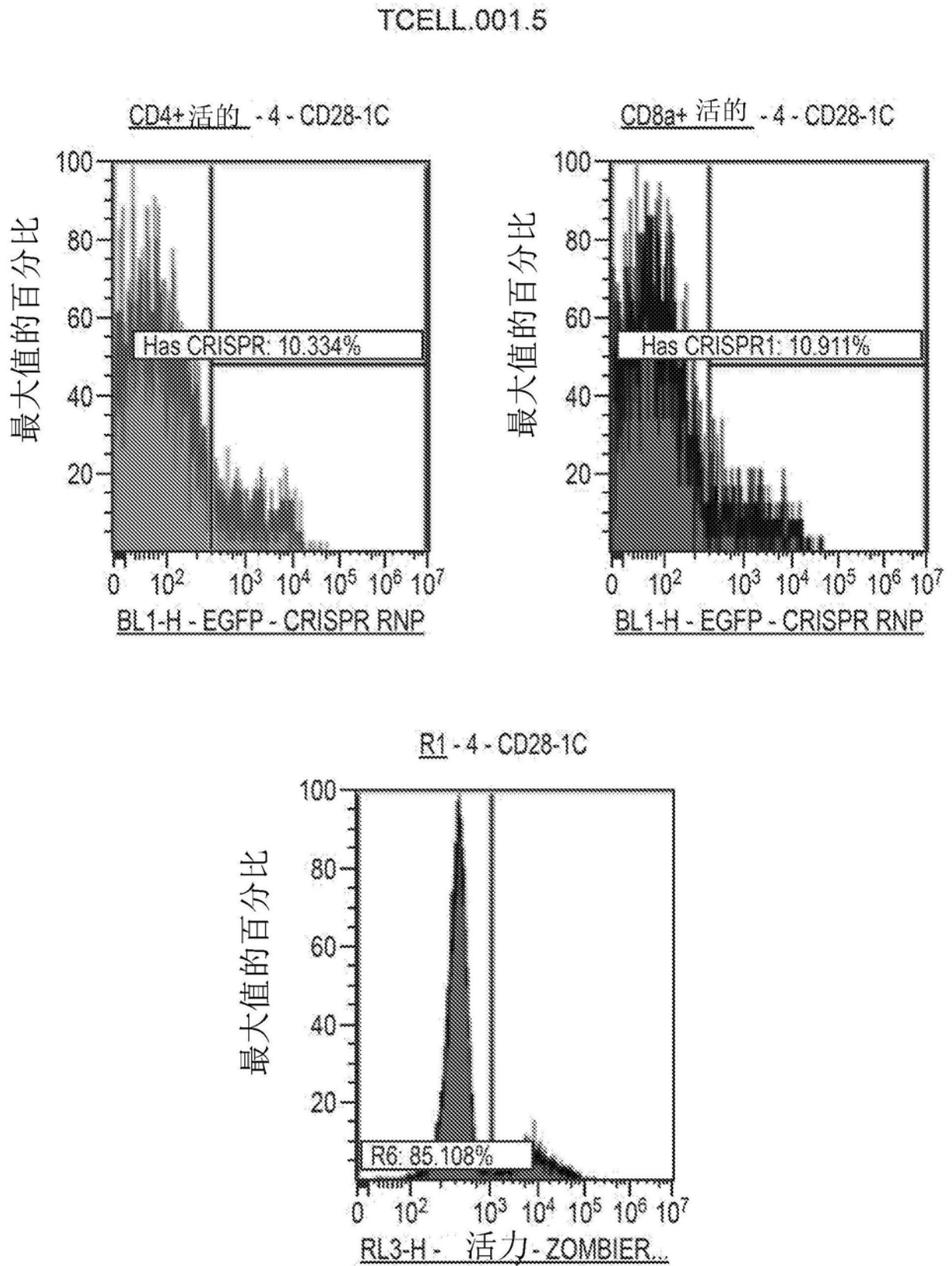


图107

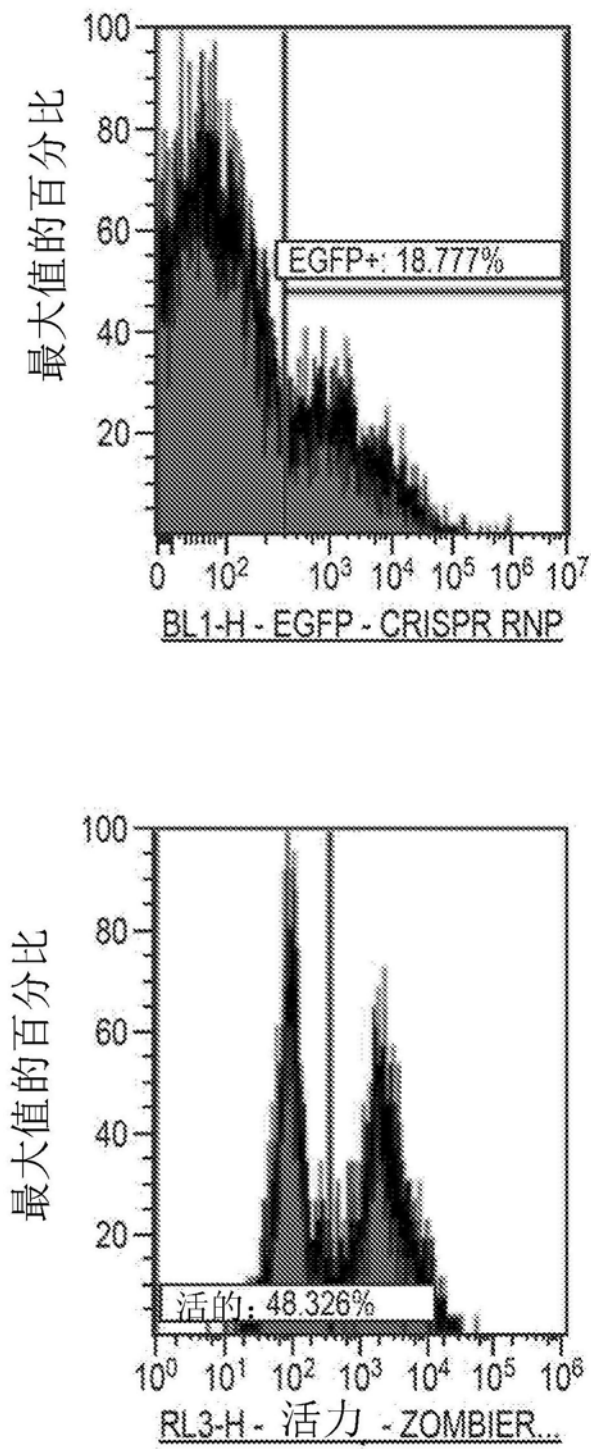


图107 (续)

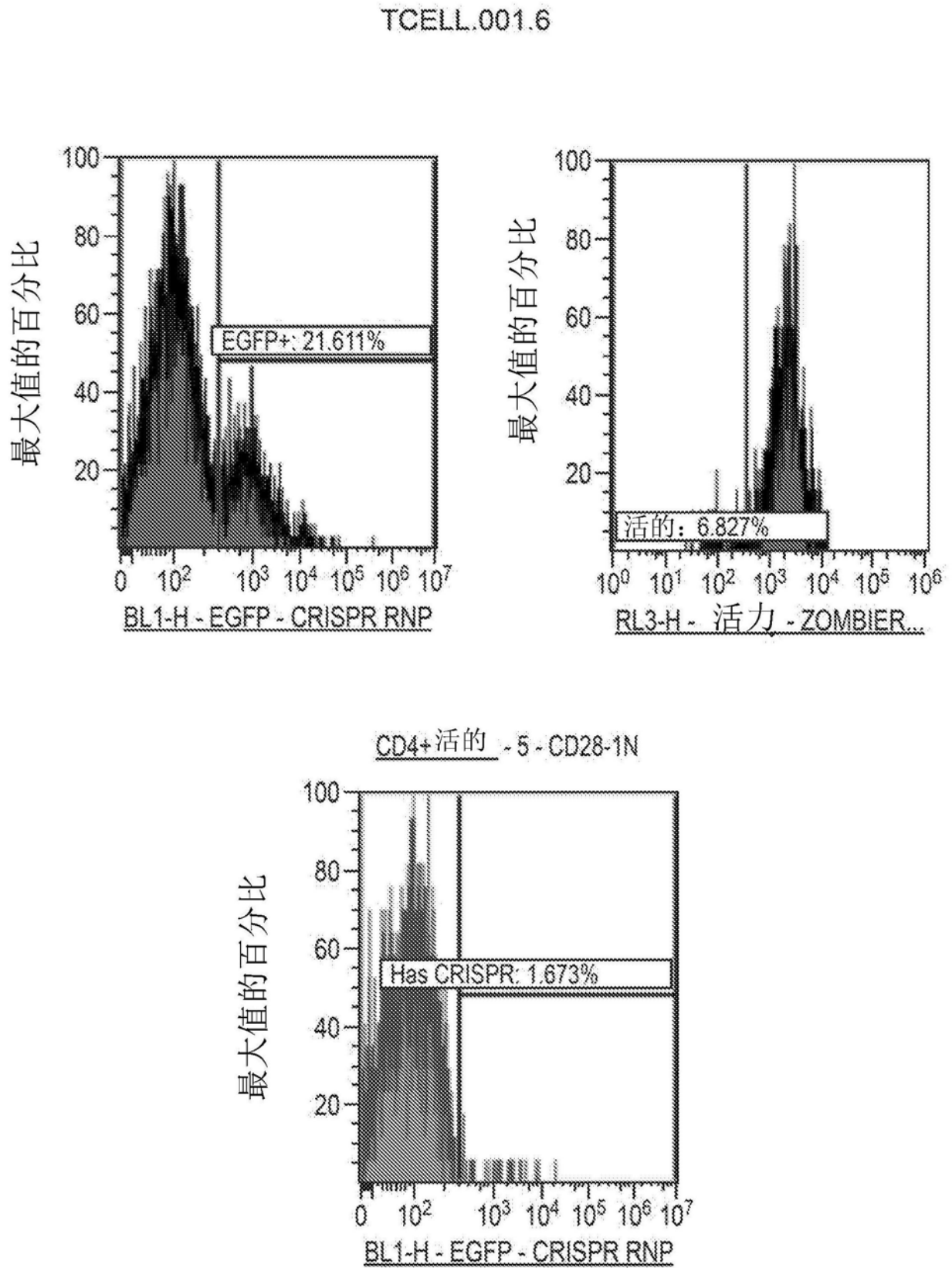


图108

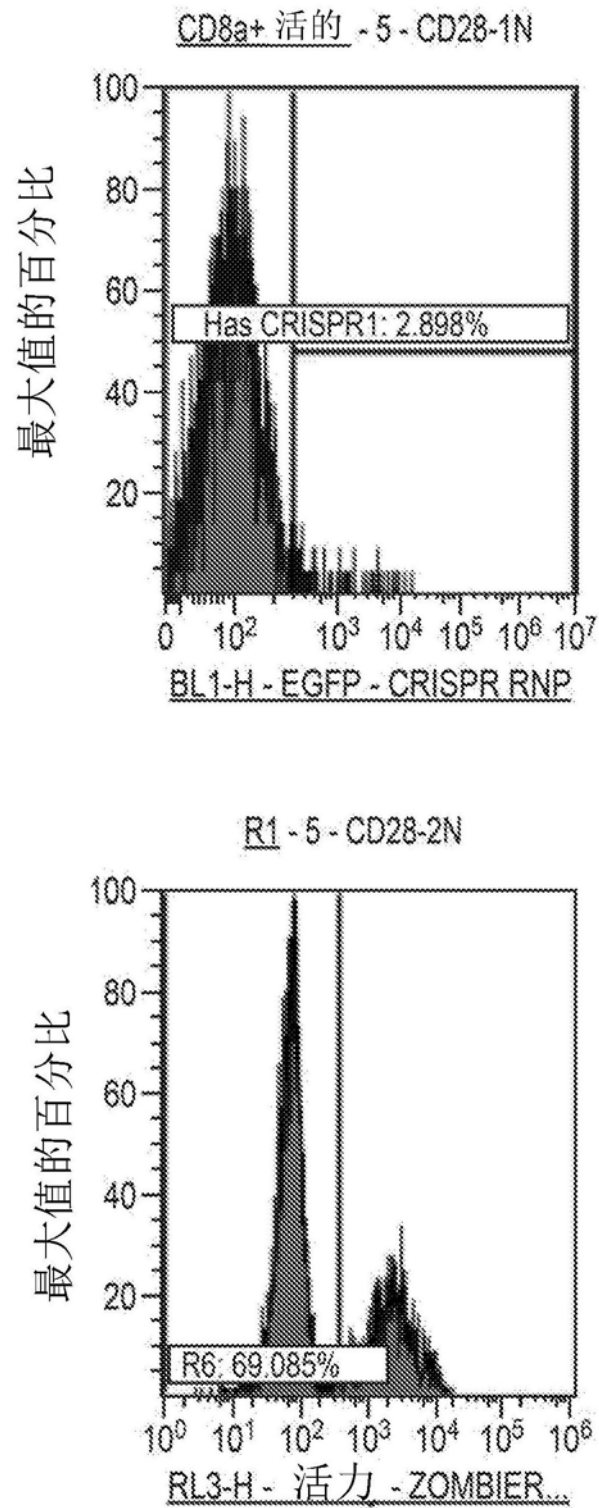


图108 (续)

TCELL.001.7

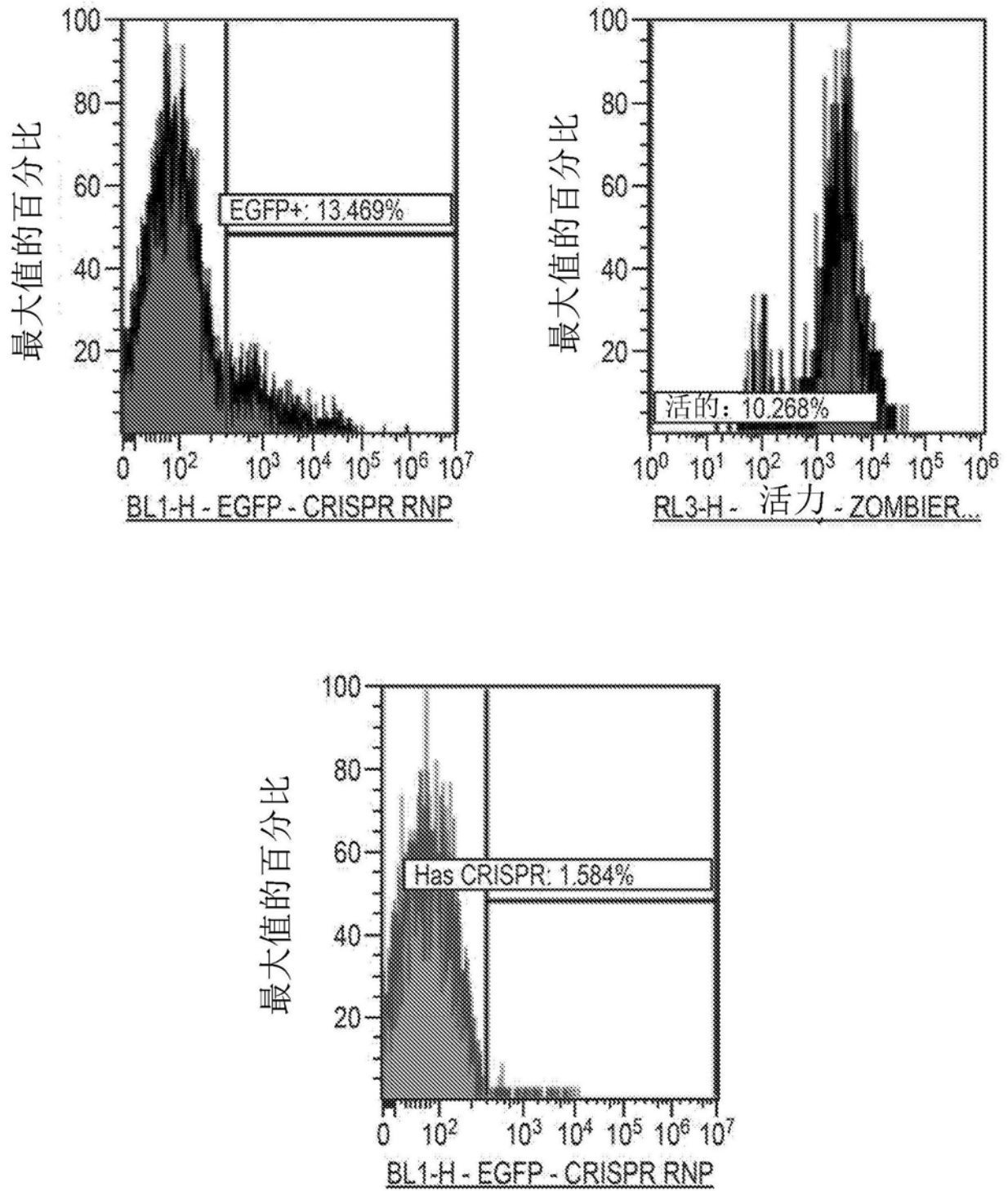


图109

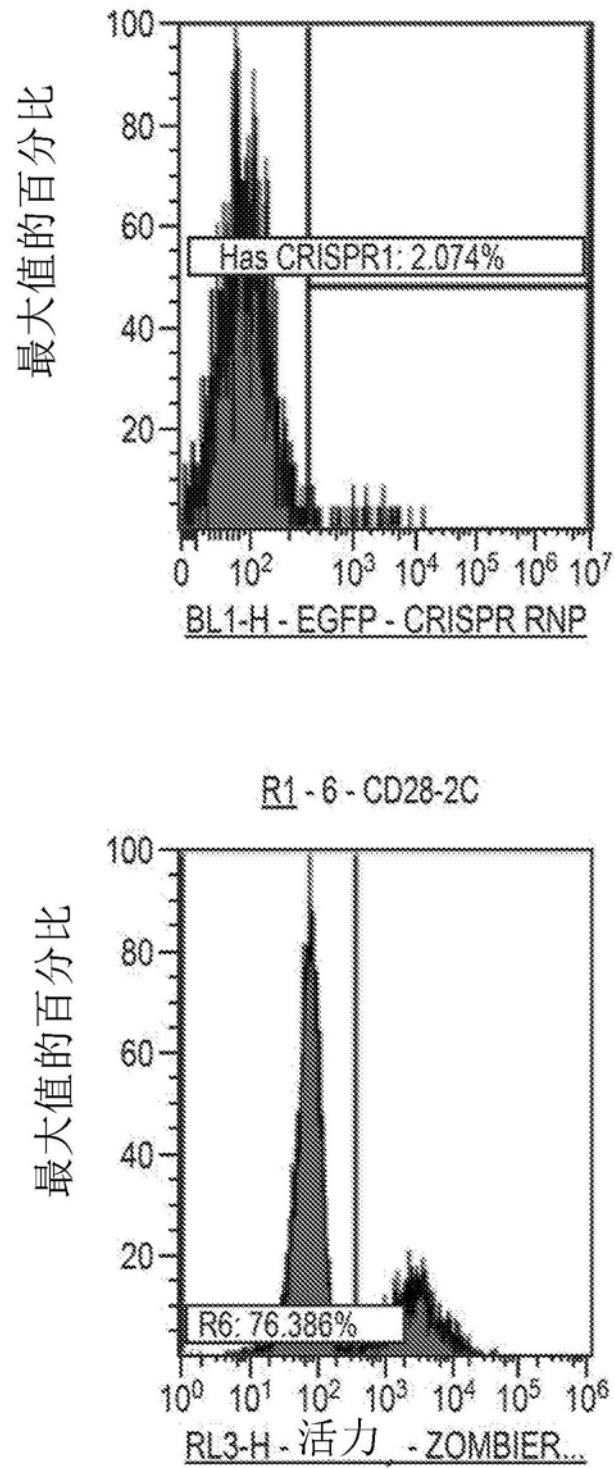


图109 (续)

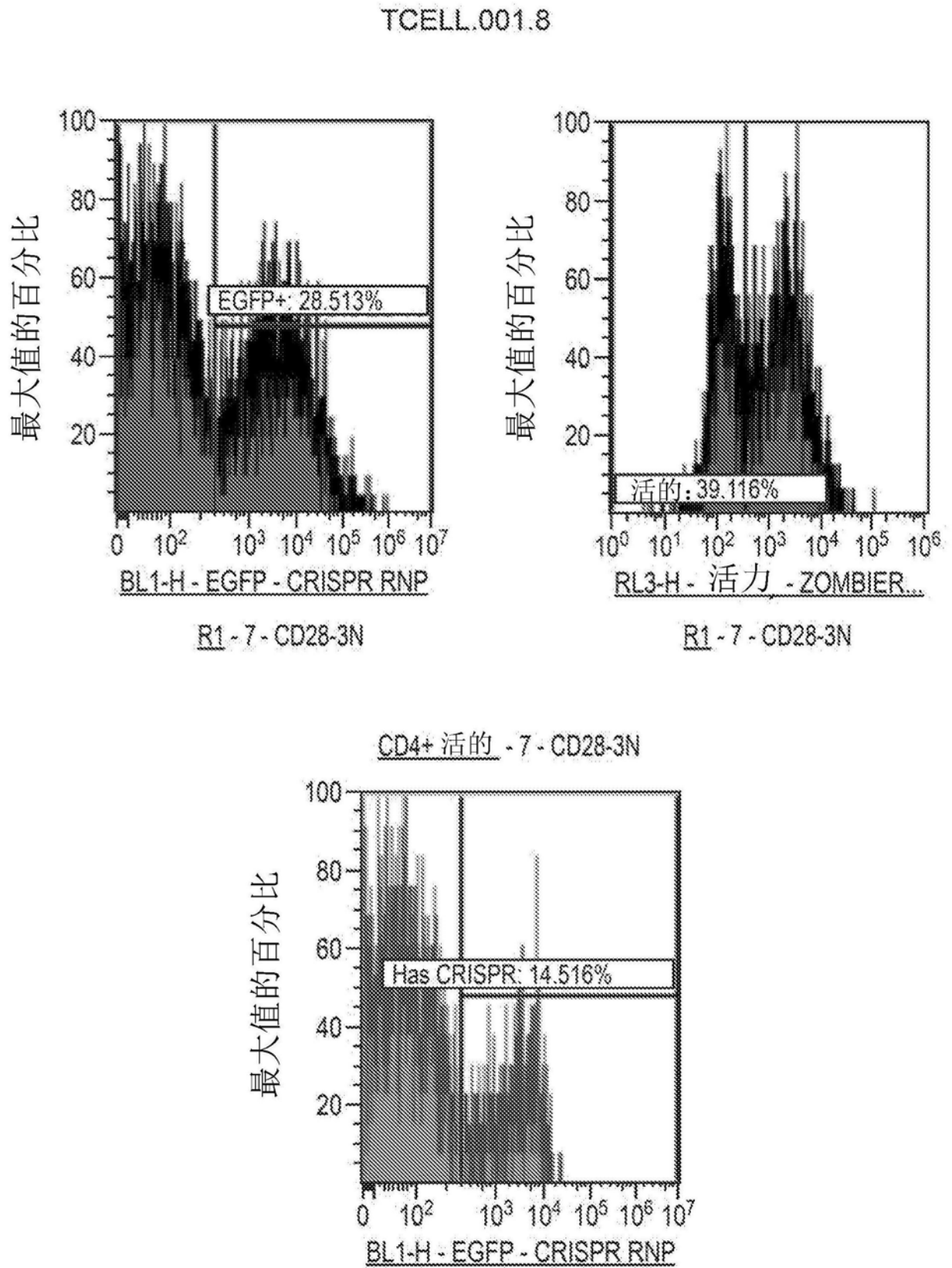


图110

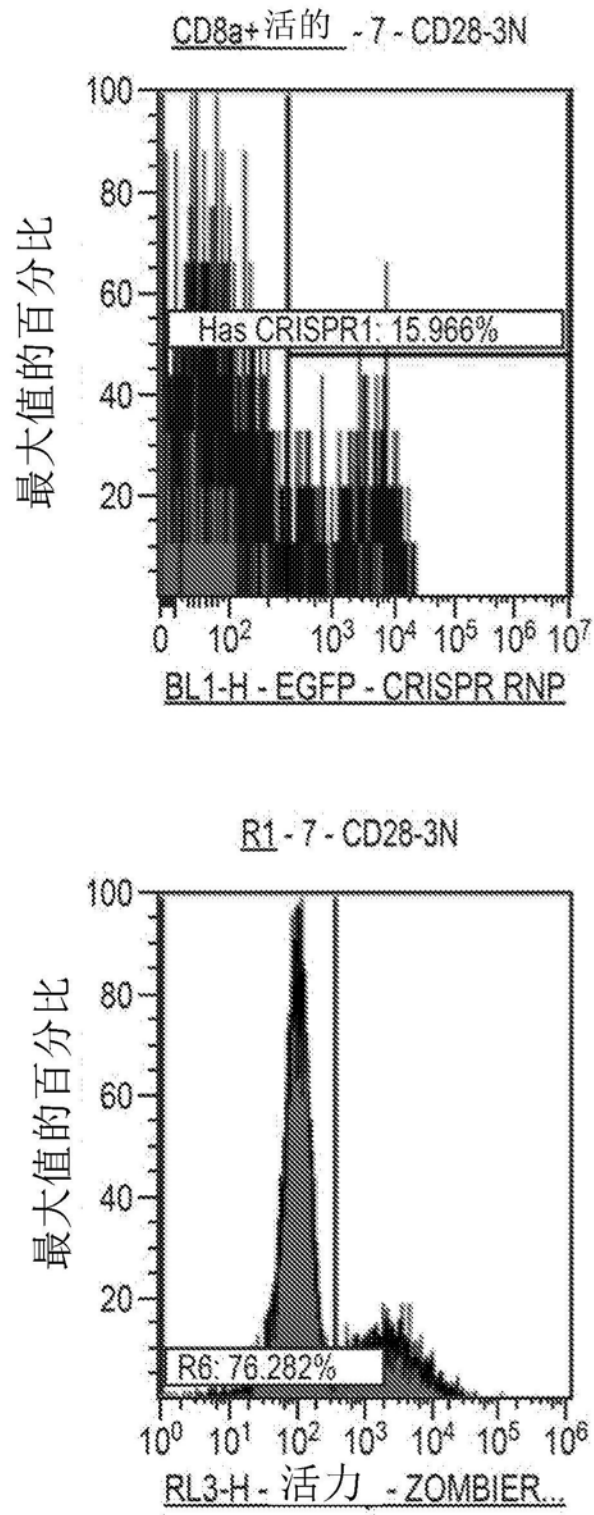


图110 (续)

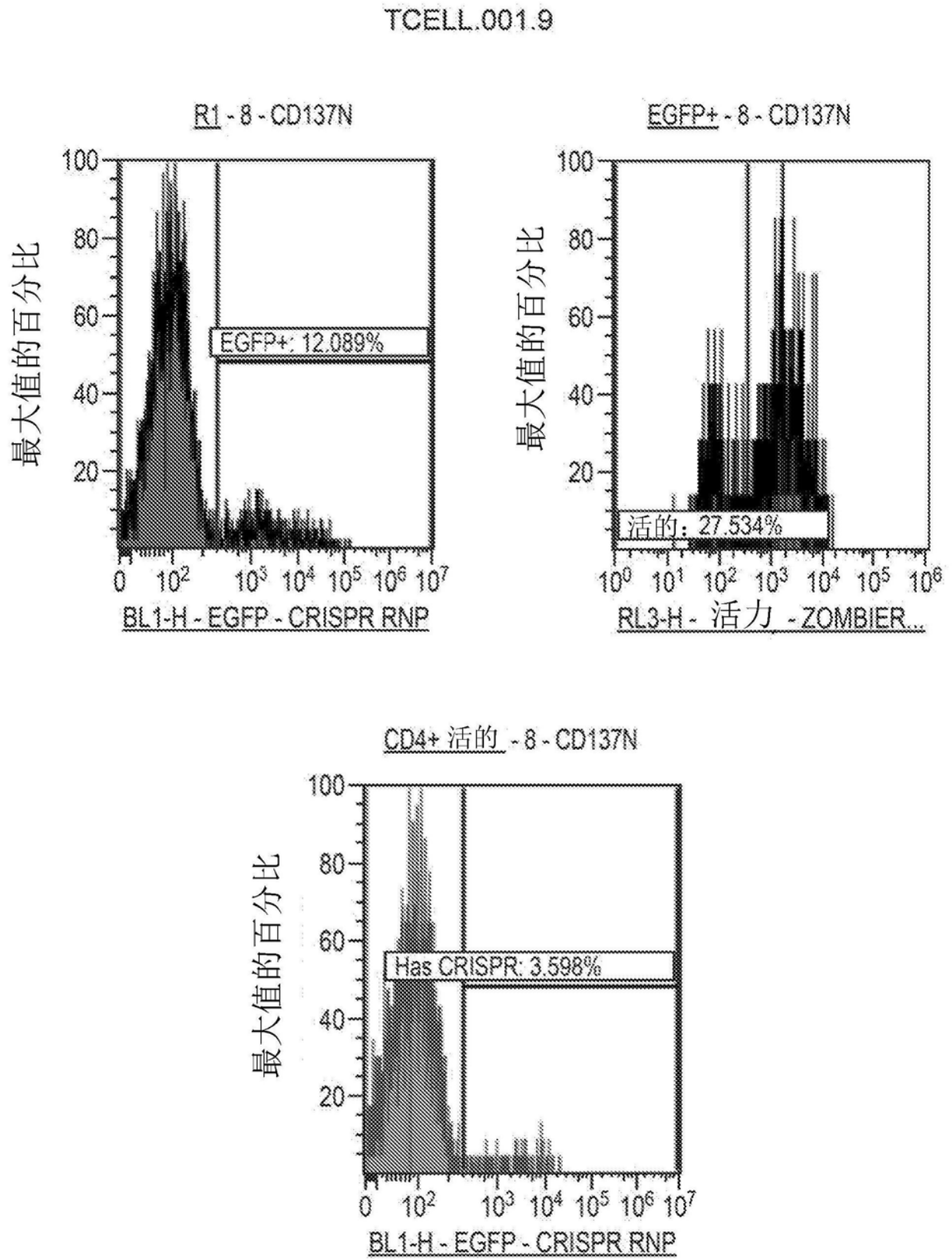


图111

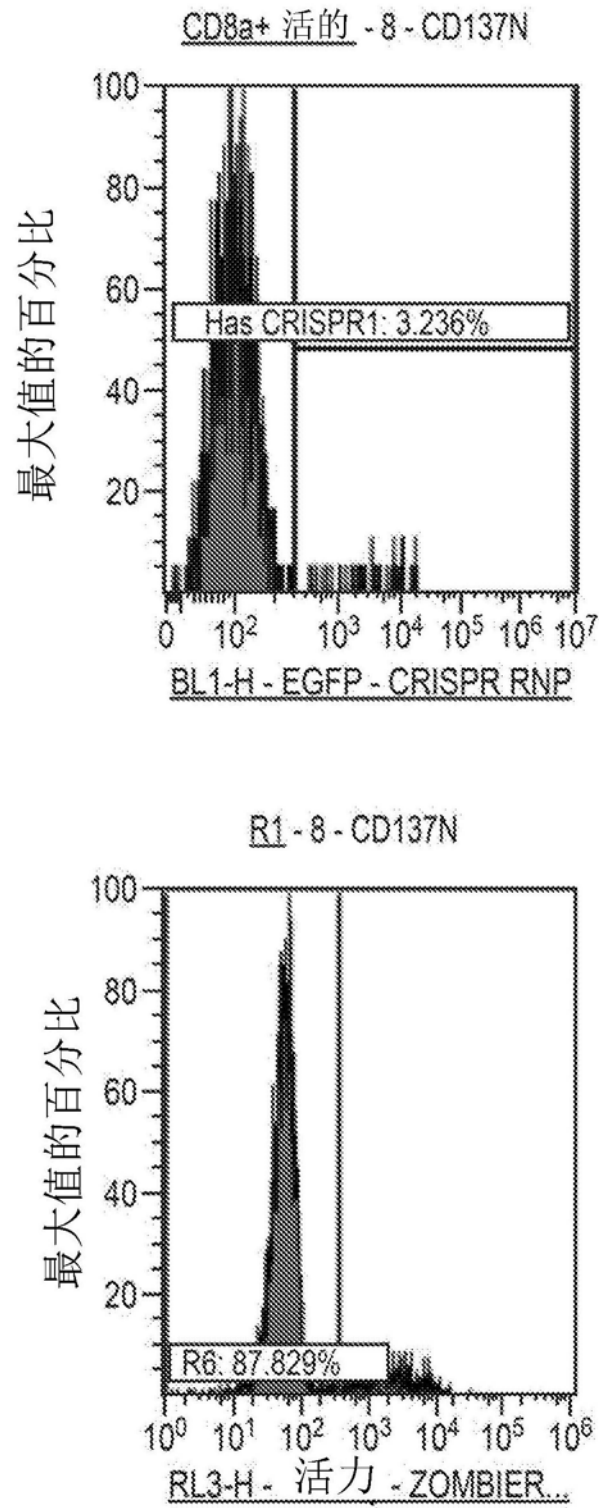


图111 (续)

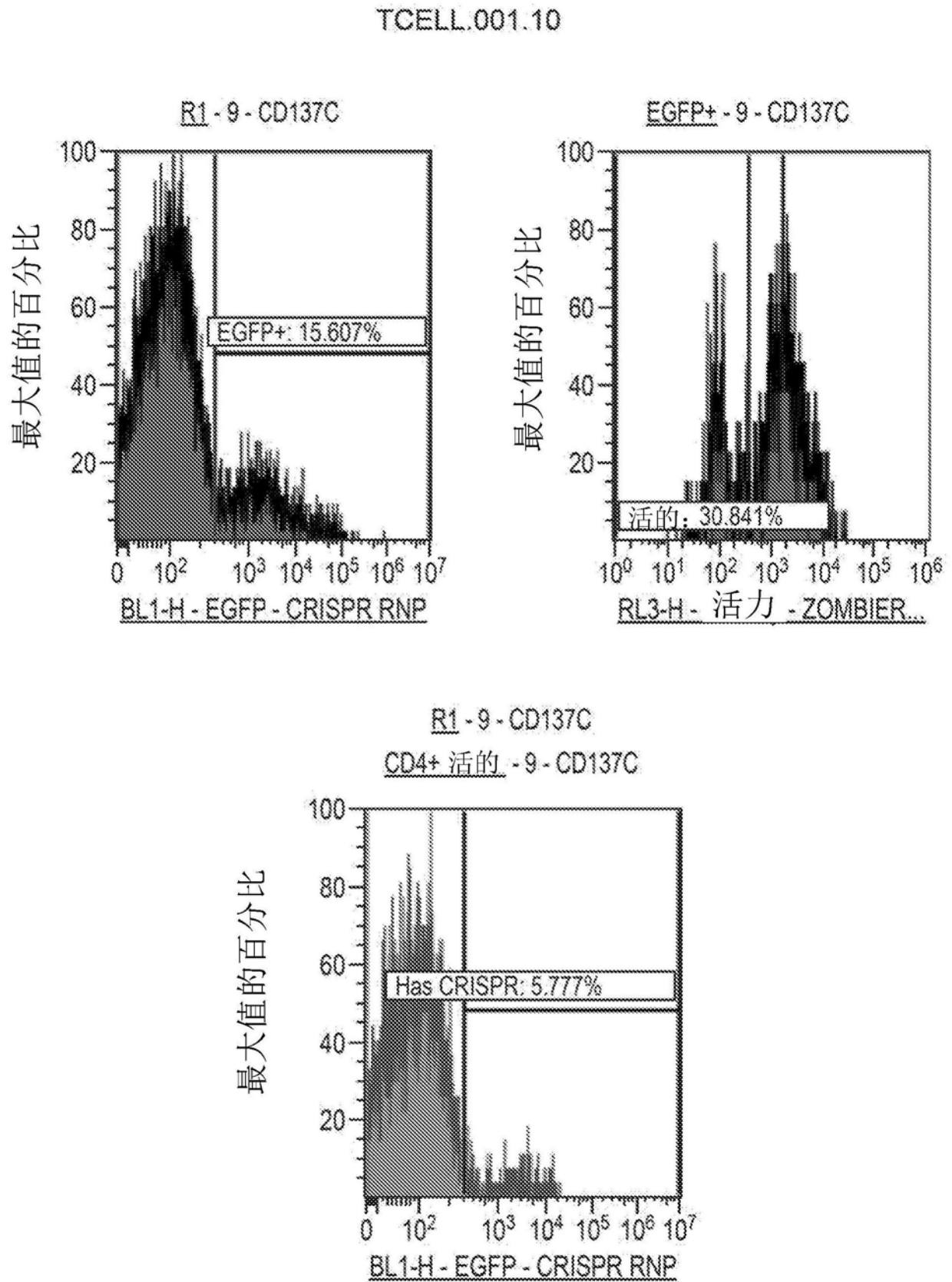


图112

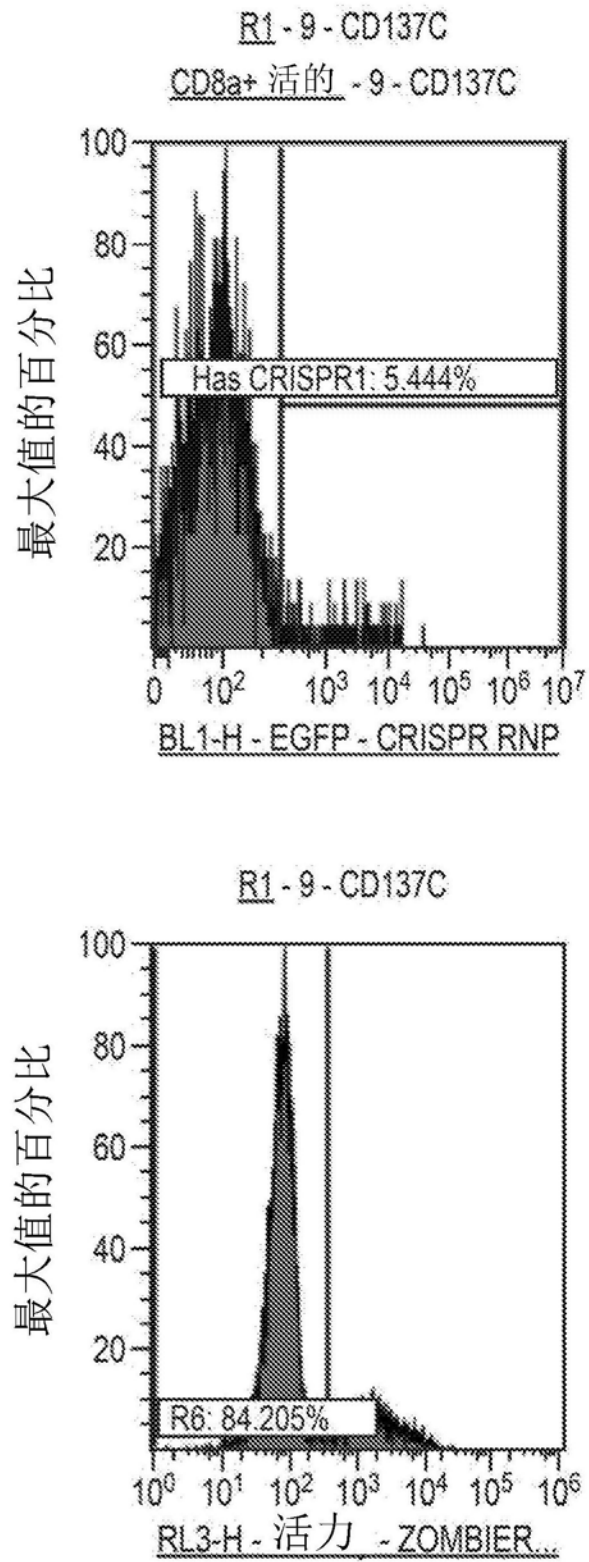


图112 (续)

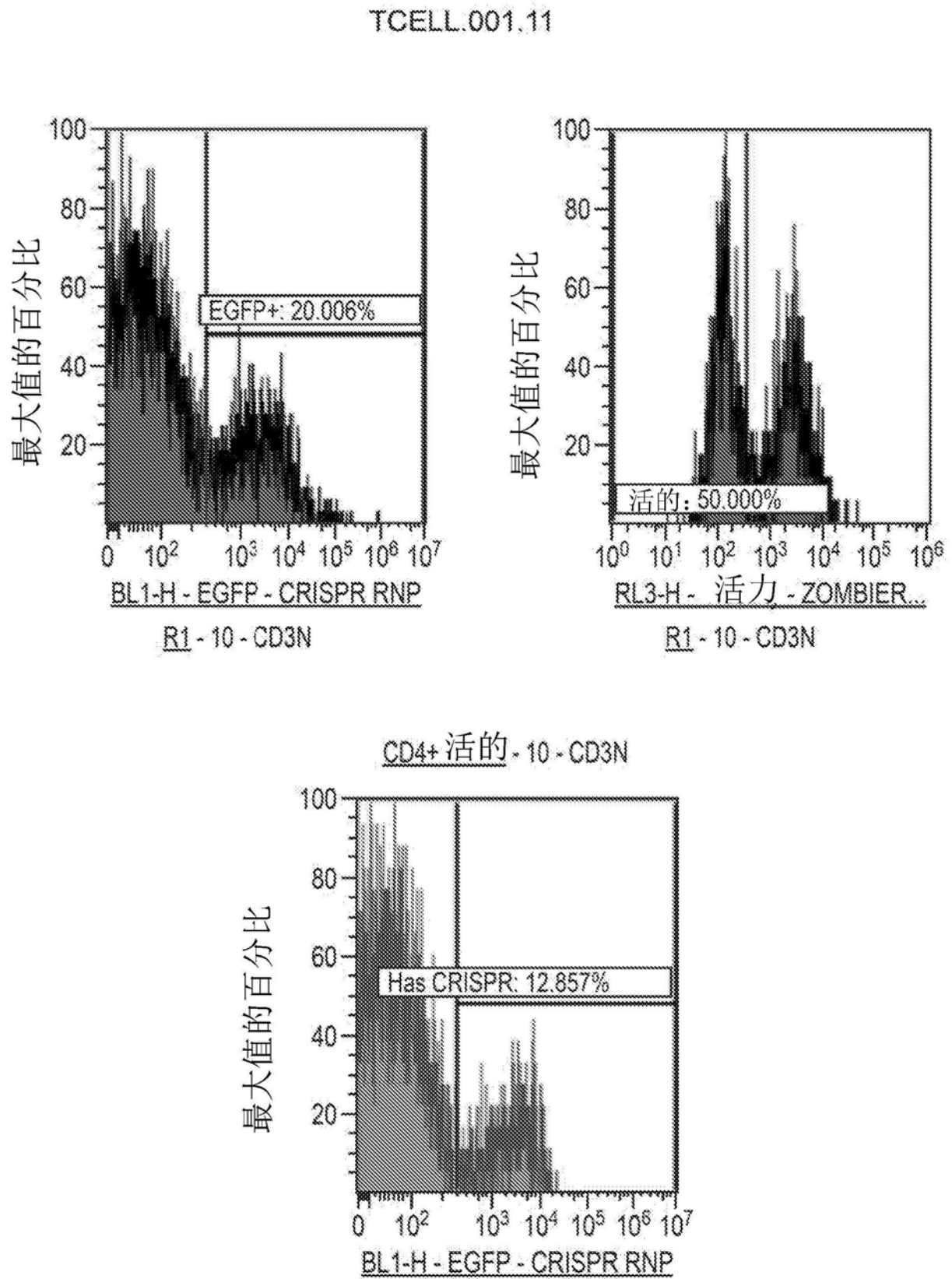


图113

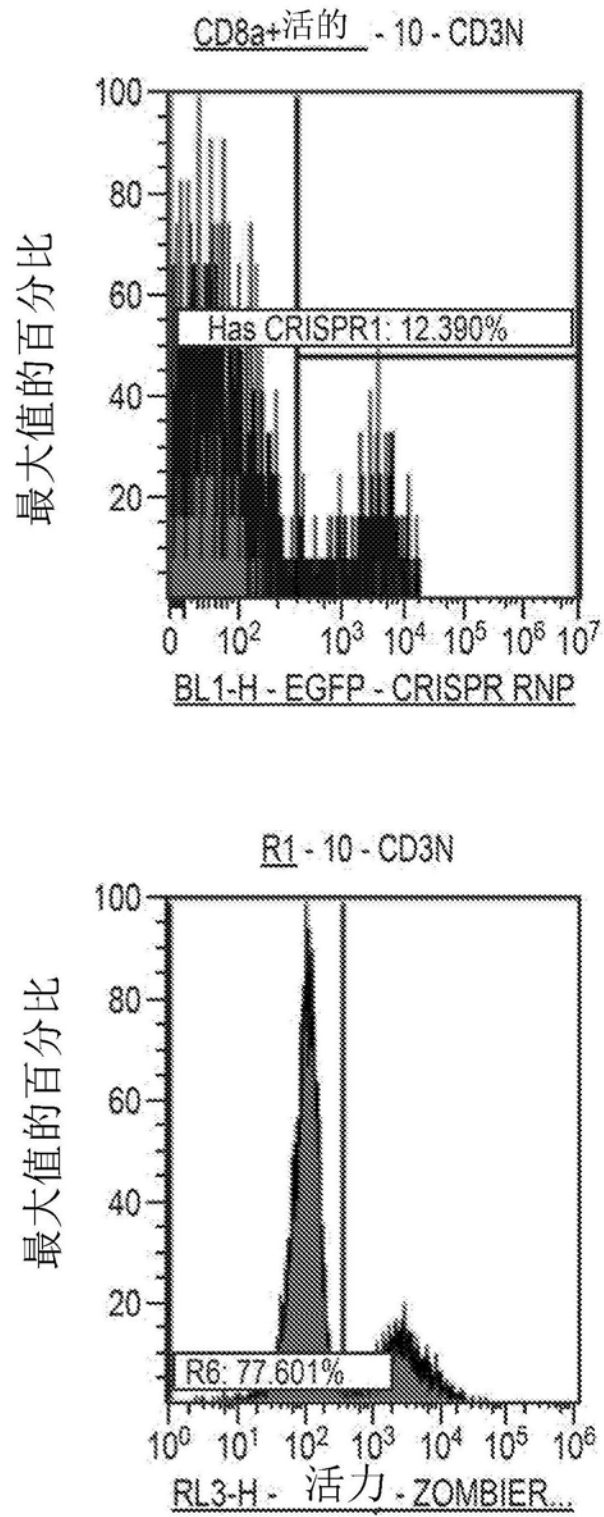


图113 (续)

TCELL.001.12

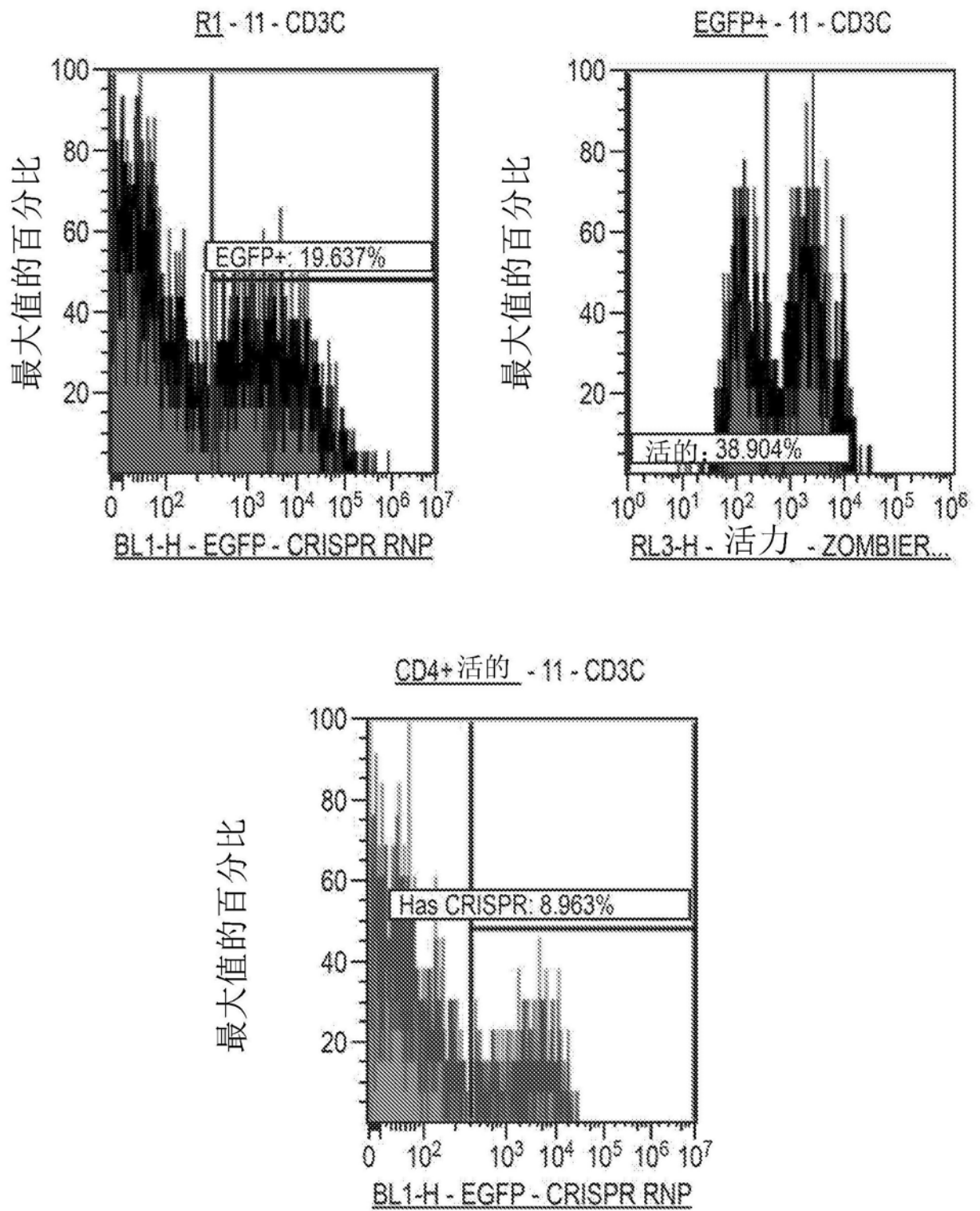


图114

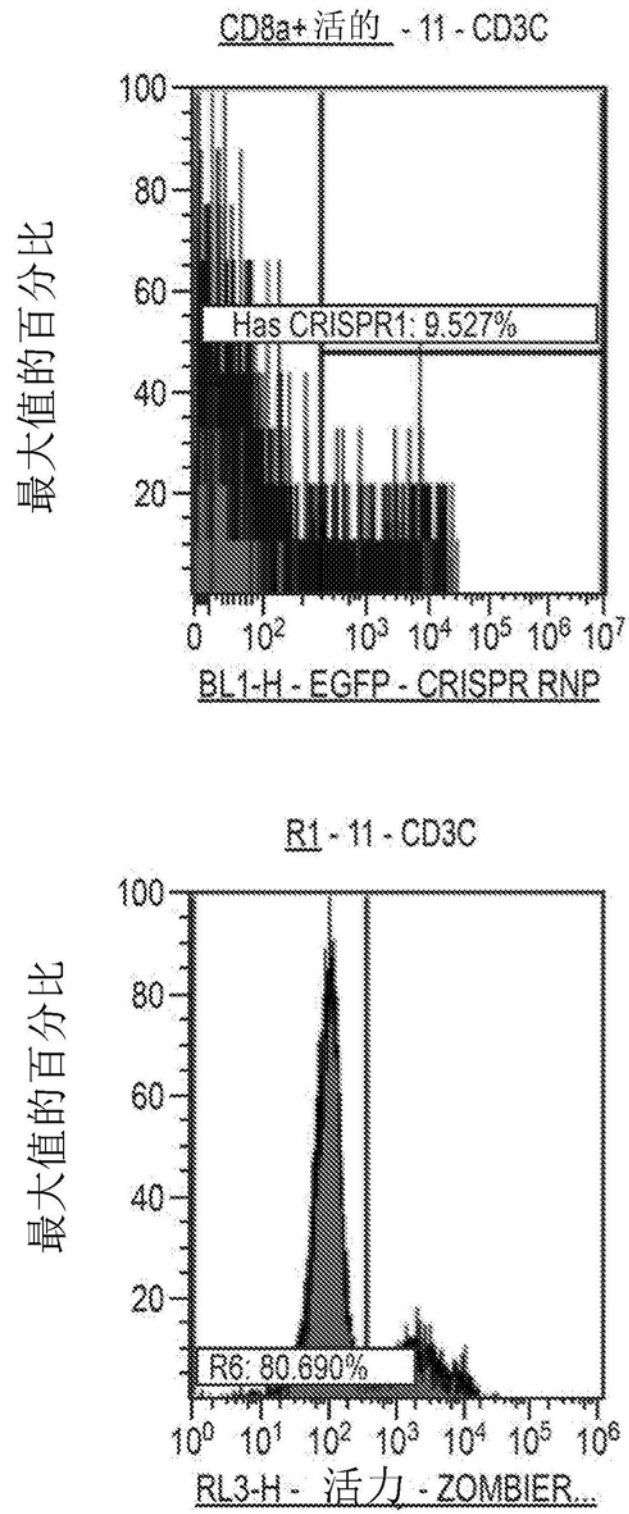


图114 (续)

TCELL.001.13

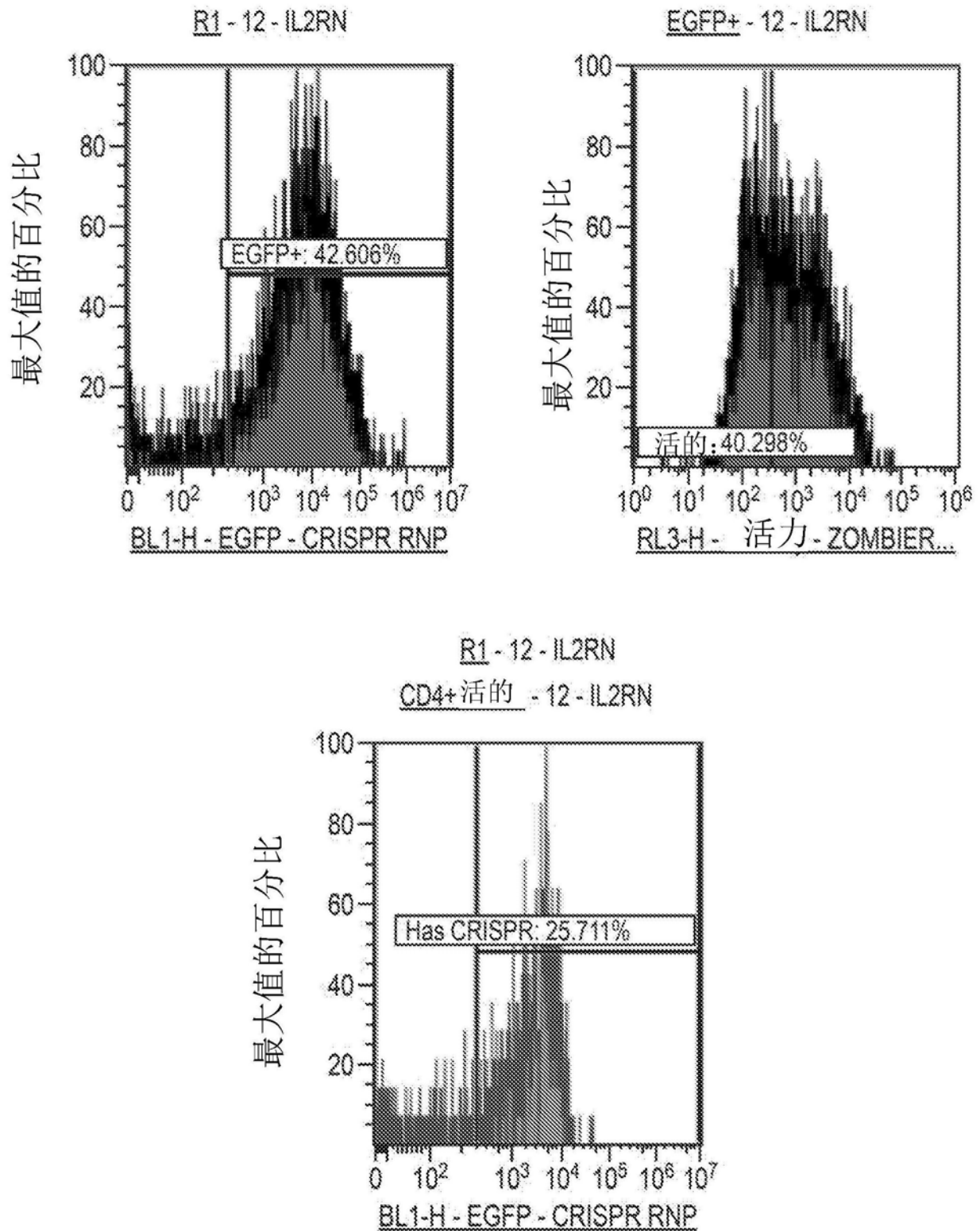


图115

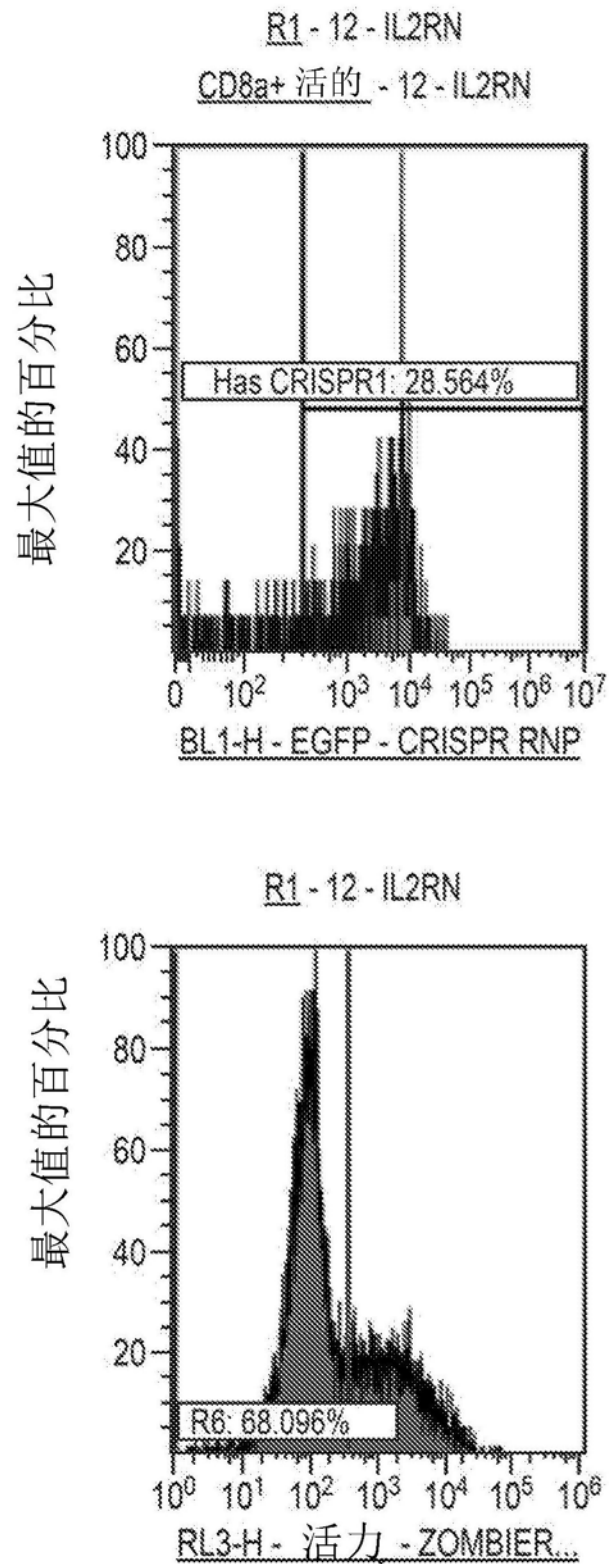


图115 (续)

TCELL.001.14

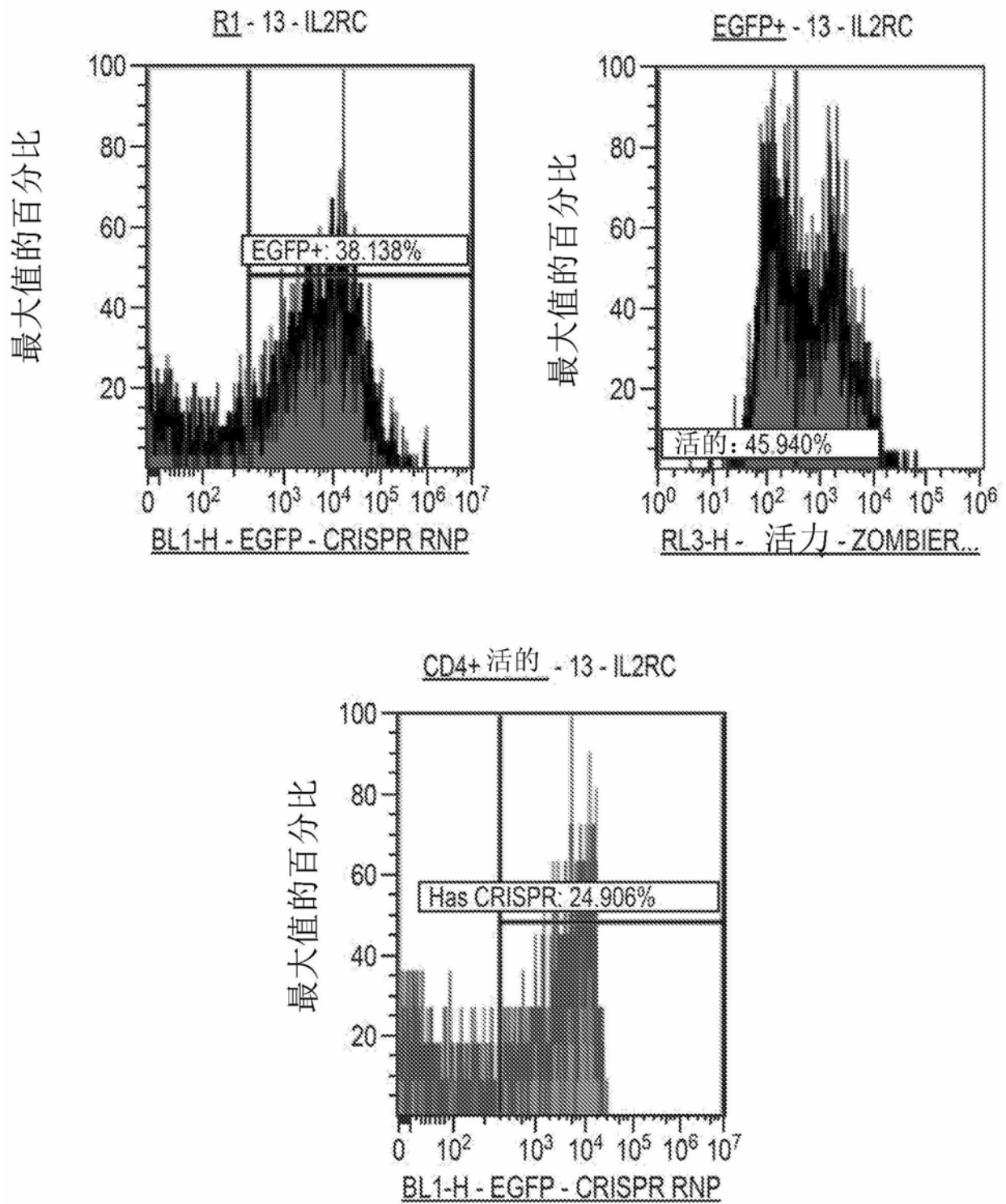


图116

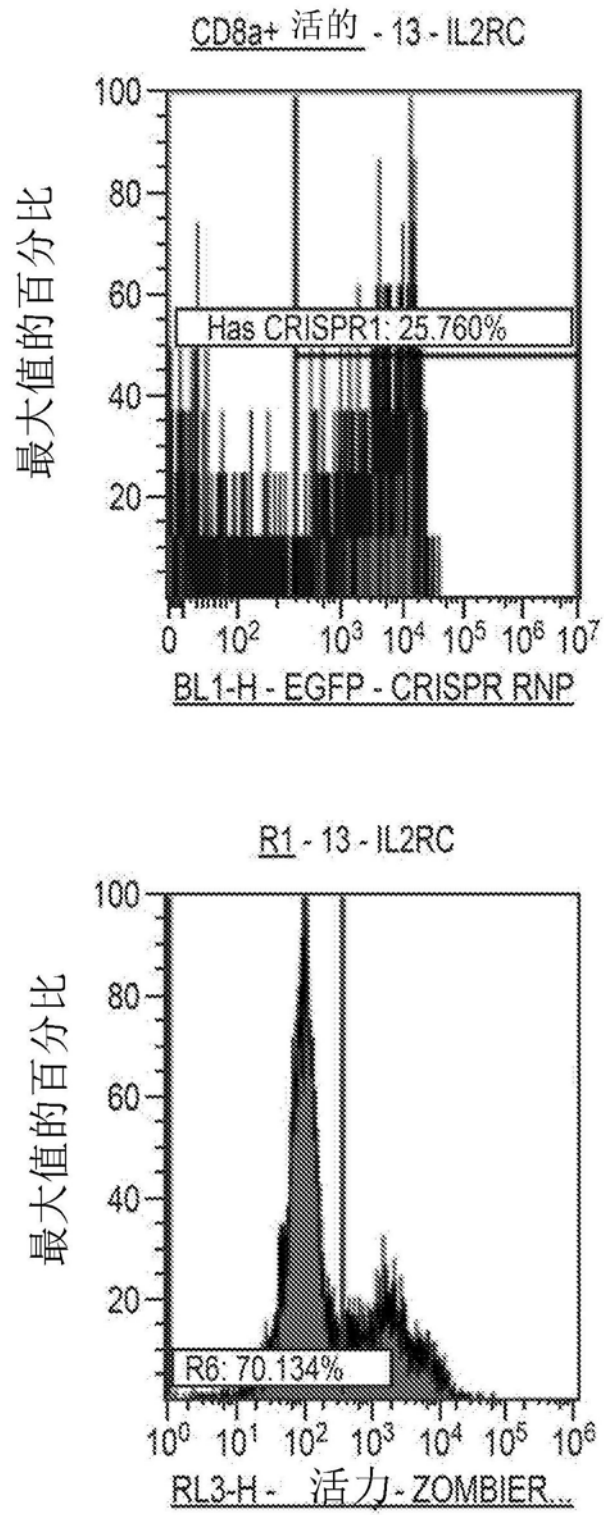


图116 (续)

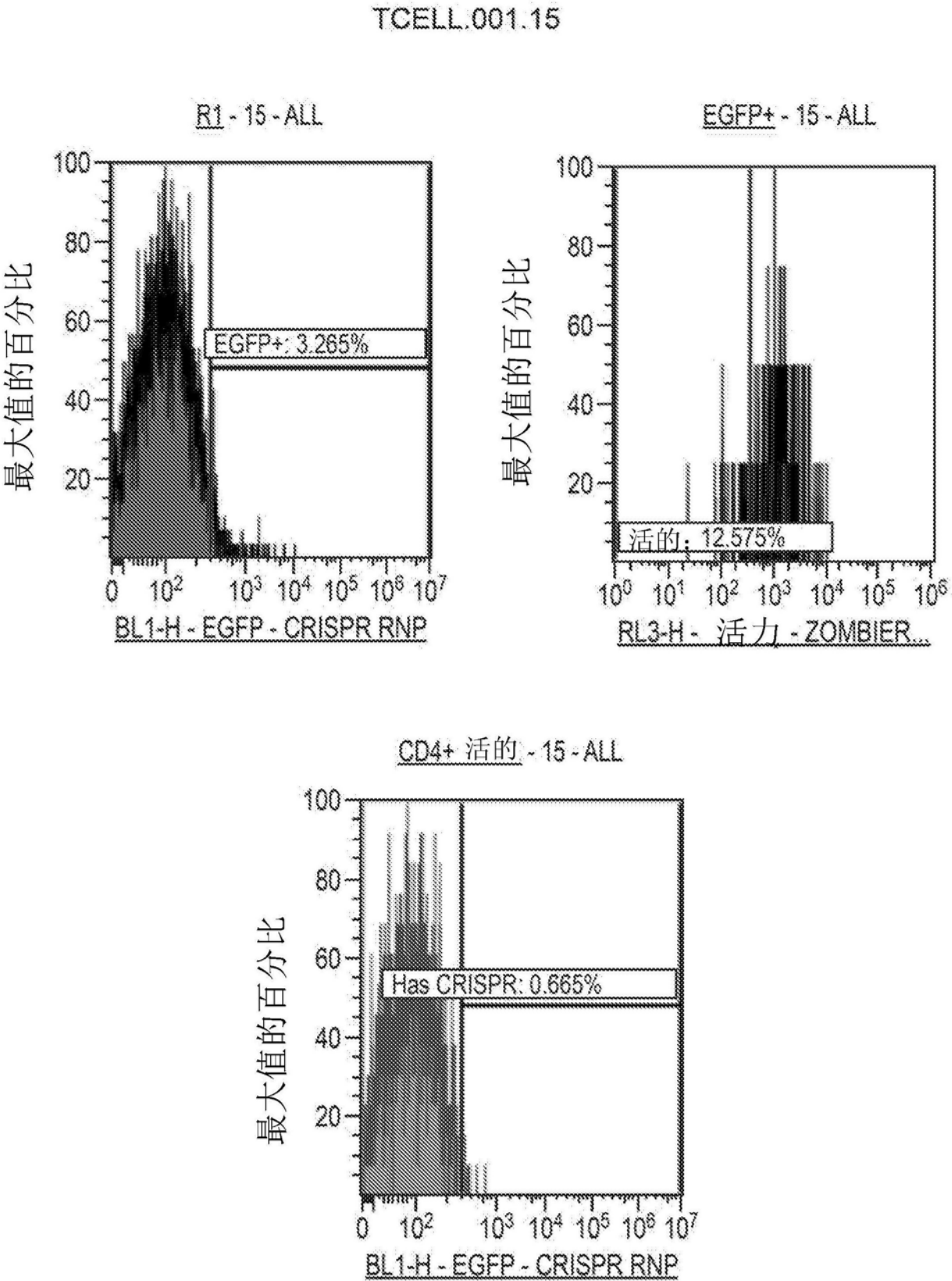


图117

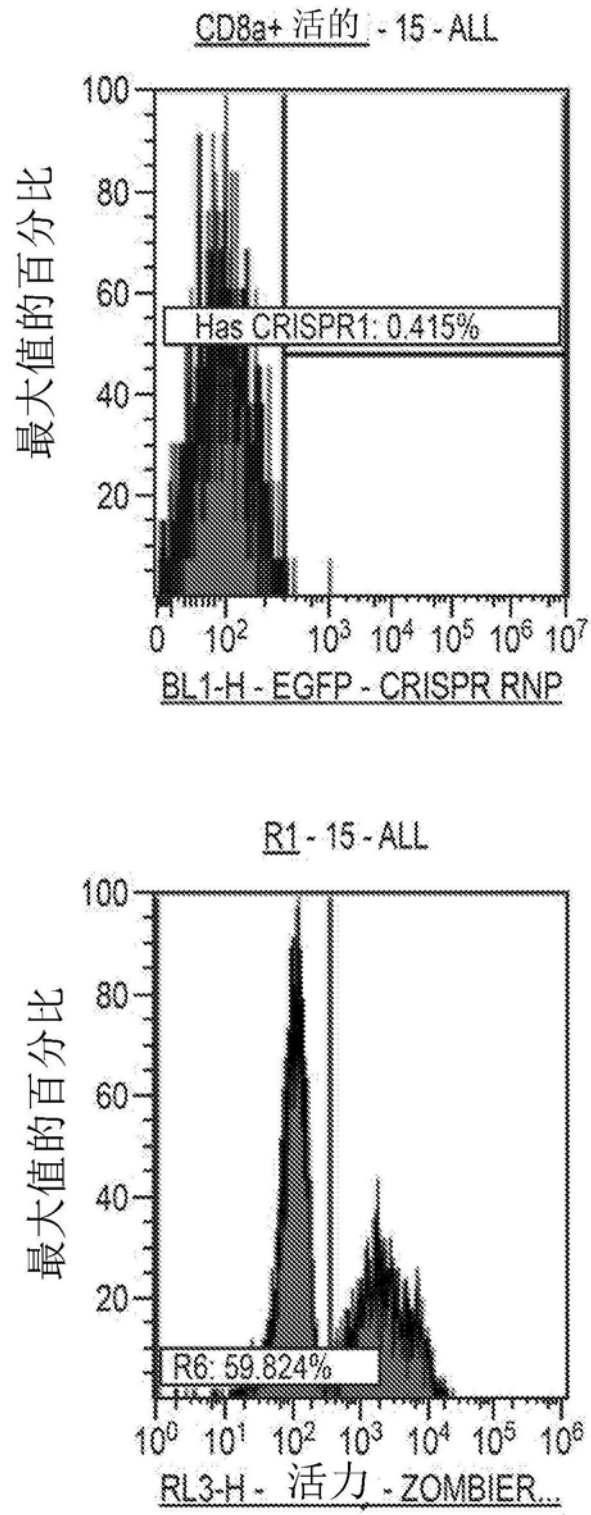


图117 (续)

TCELL.001 阴性对照

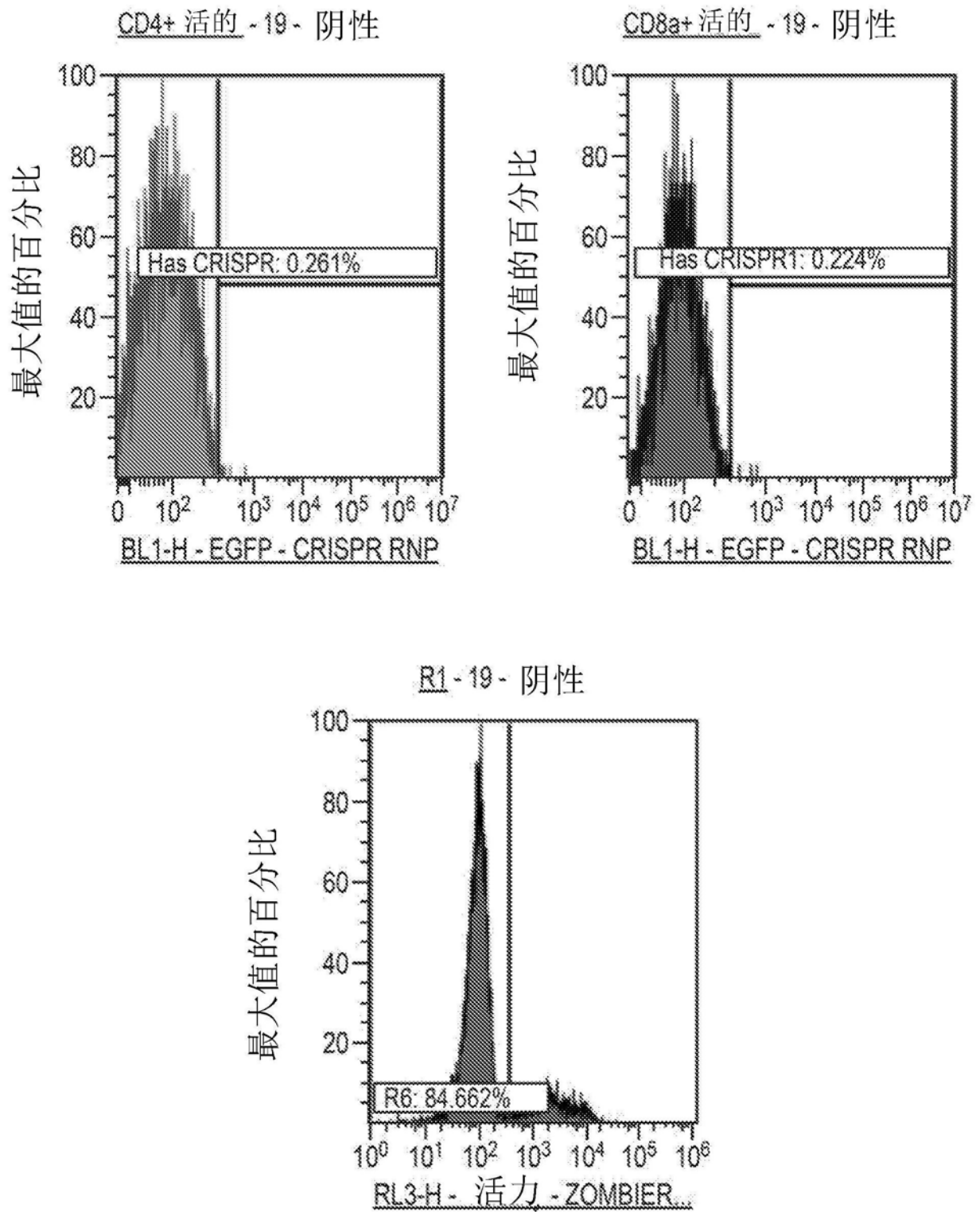


图118

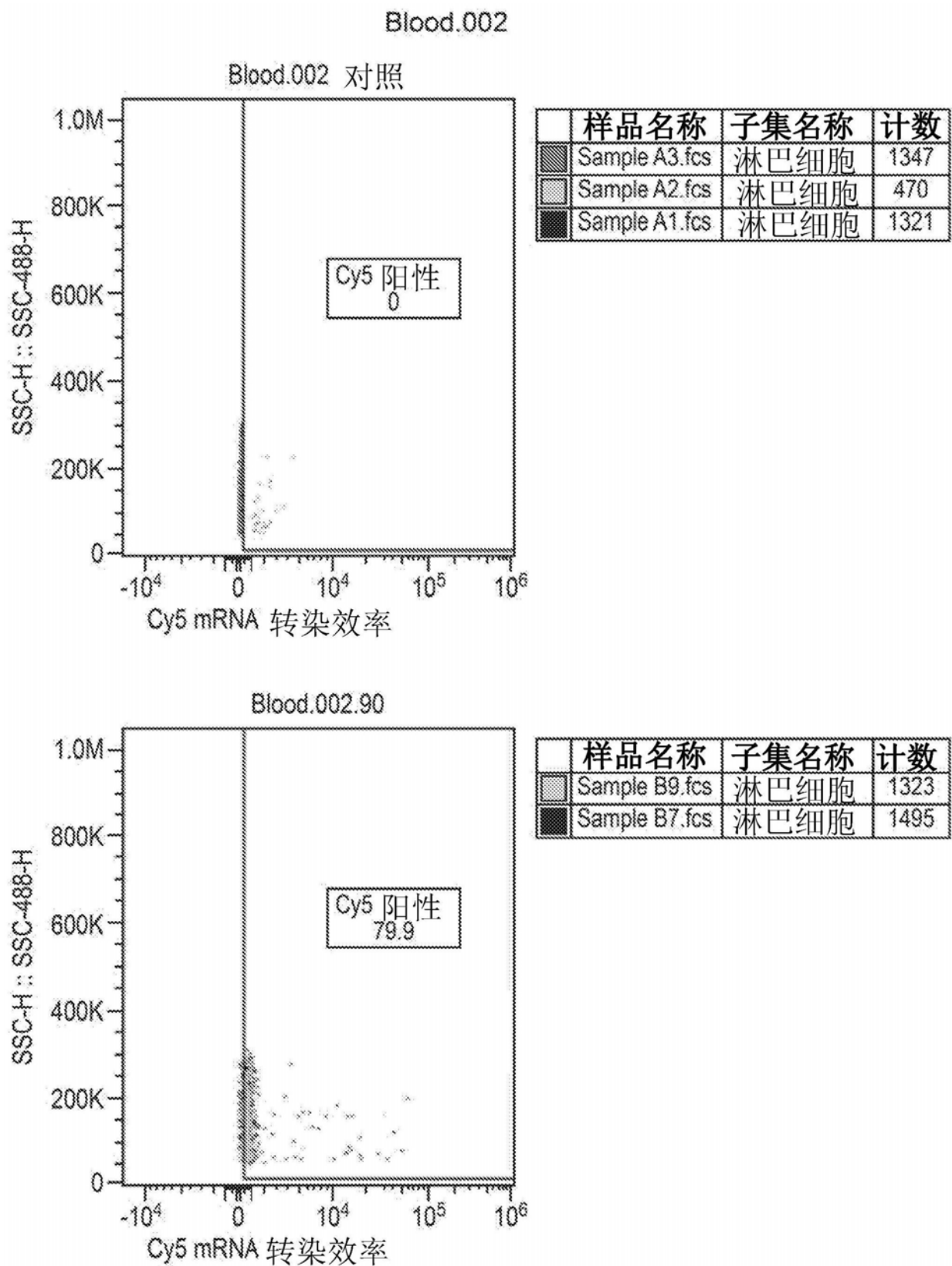
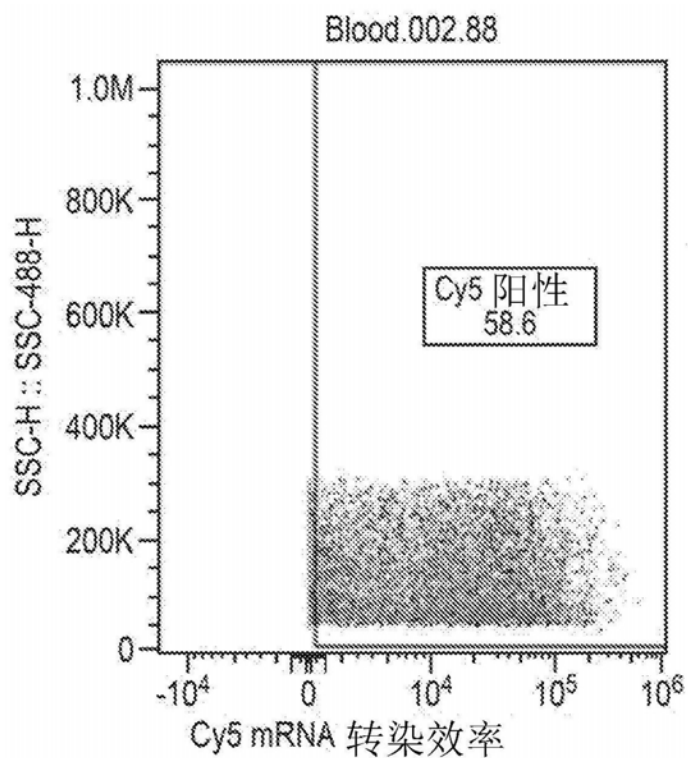
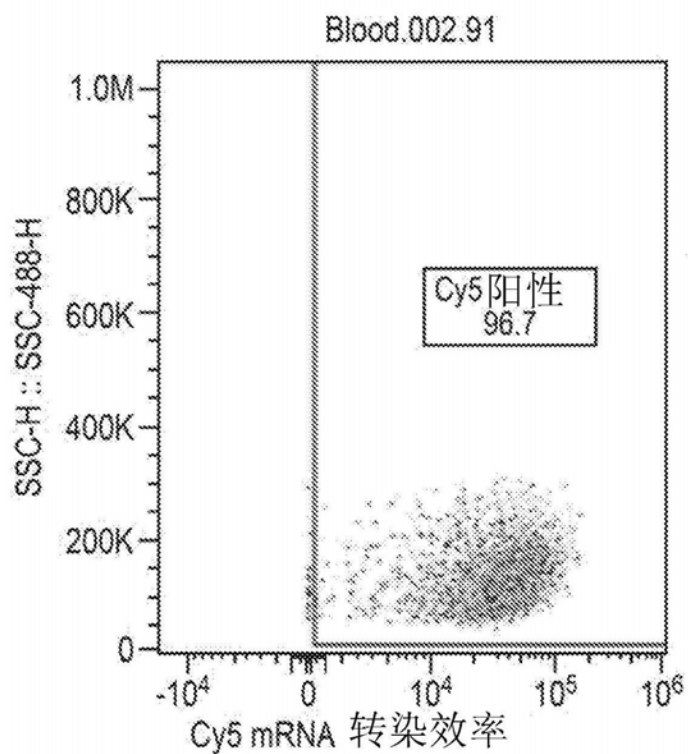


图119



	样品名称	子集名称	计数
	Sample B3.fcs	淋巴细胞	80288
	Sample B2.fcs	淋巴细胞	90468
	Sample B1.fcs	淋巴细胞	3226



	样品名称	子集名称	计数
	Sample B12.fcs	淋巴细胞	1252
	Sample B11.fcs	淋巴细胞	1186
	Sample B10.fcs	淋巴细胞	737

图119 (续)

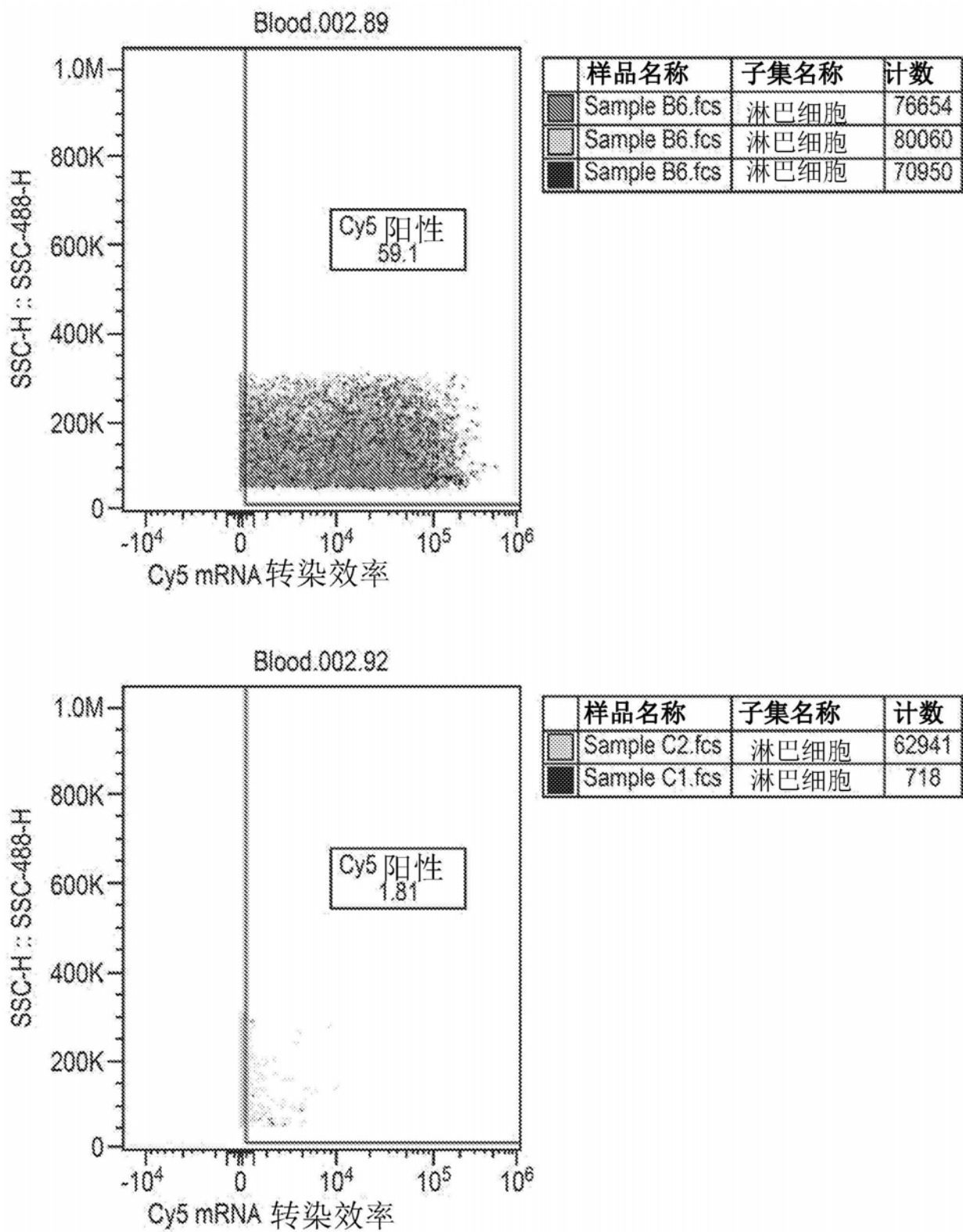


图119 (续)

TCELL.001.27

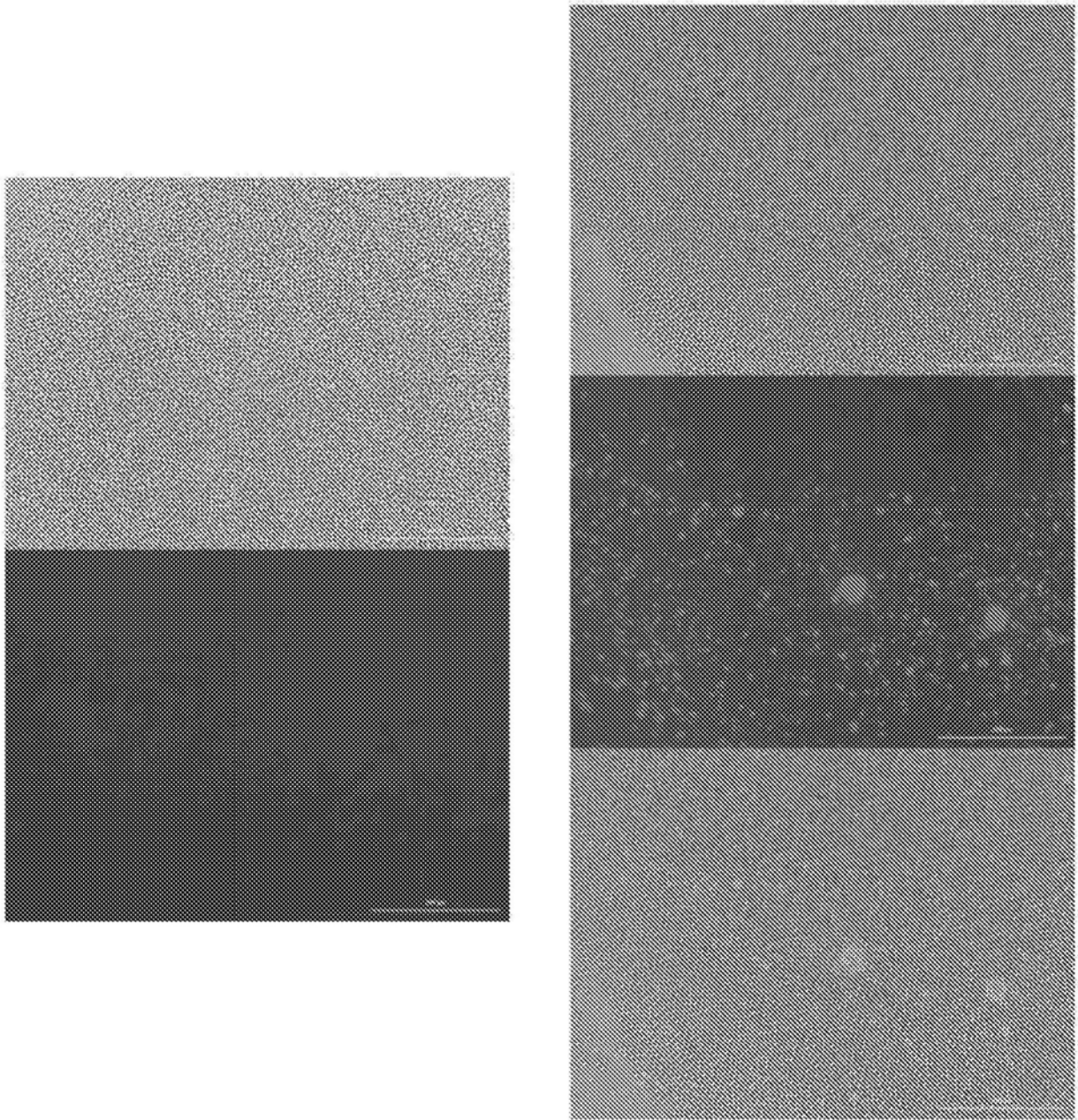


图120

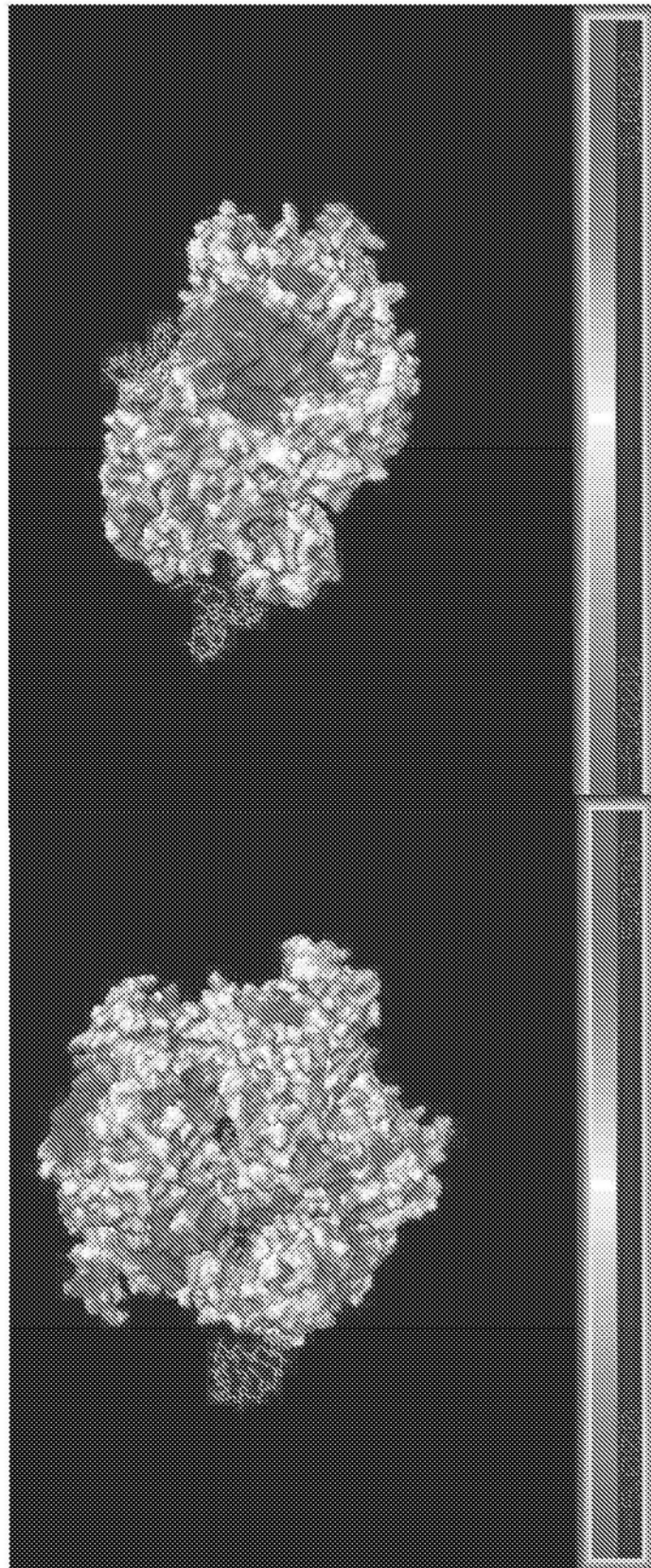


图121

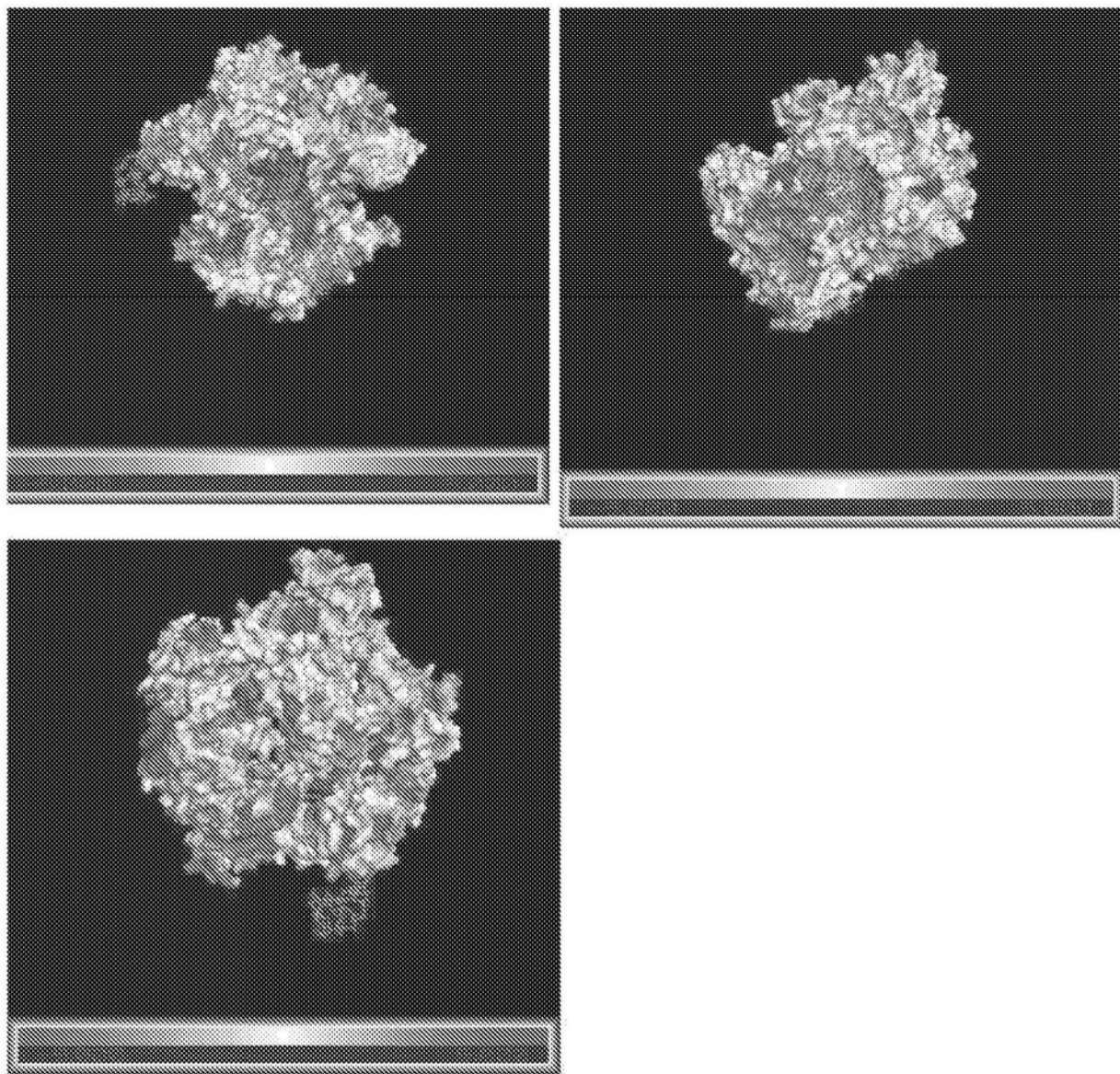


图121 (续)

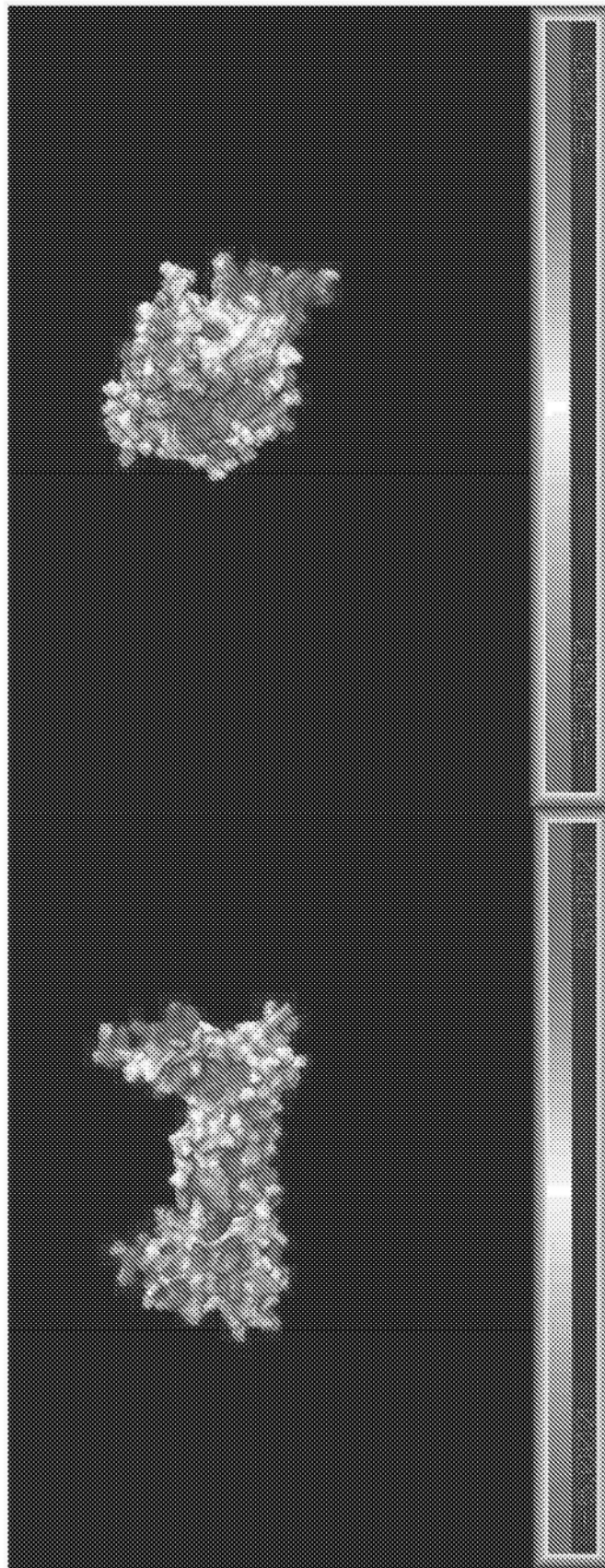


图122

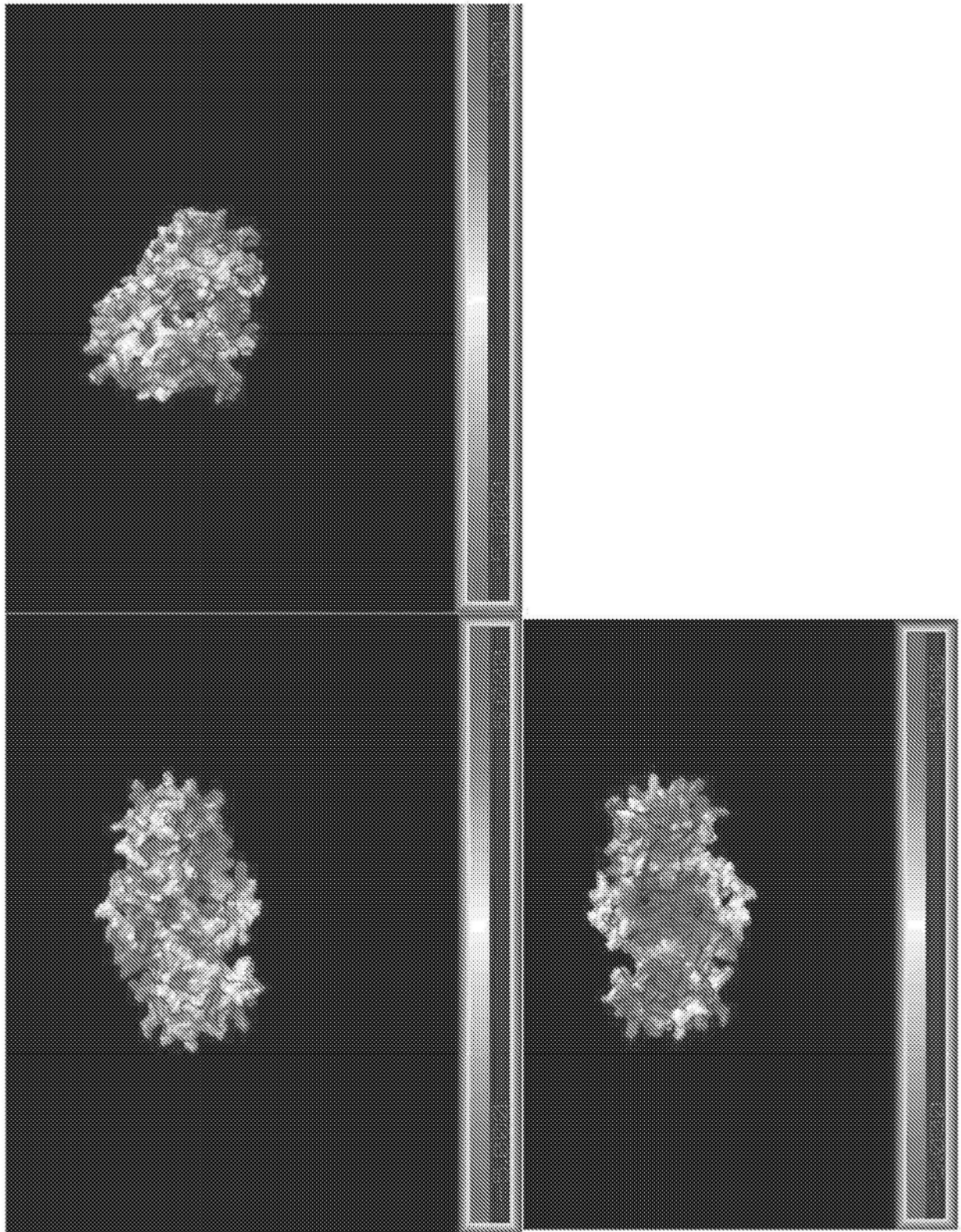


图122 (续)

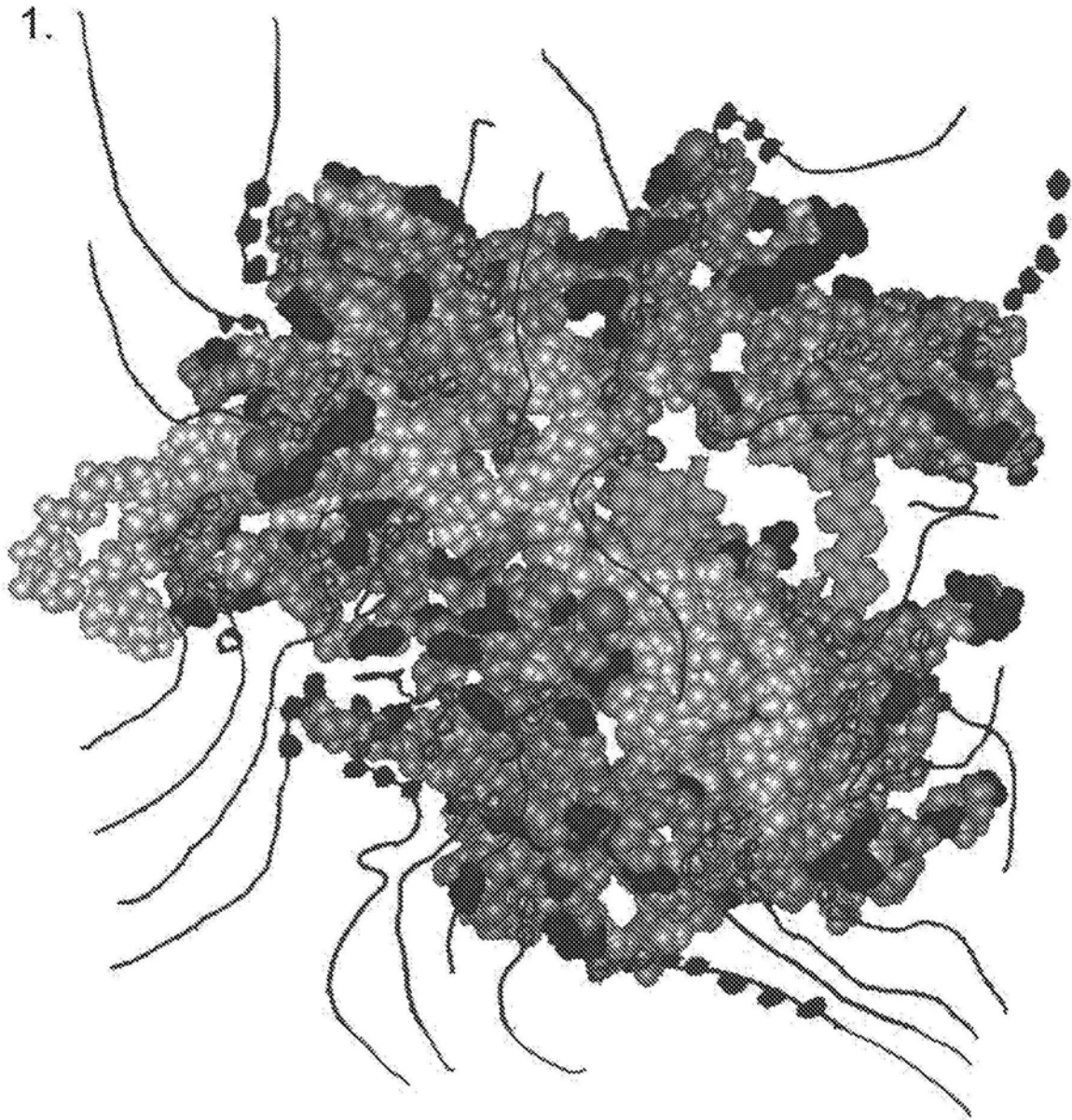


图123

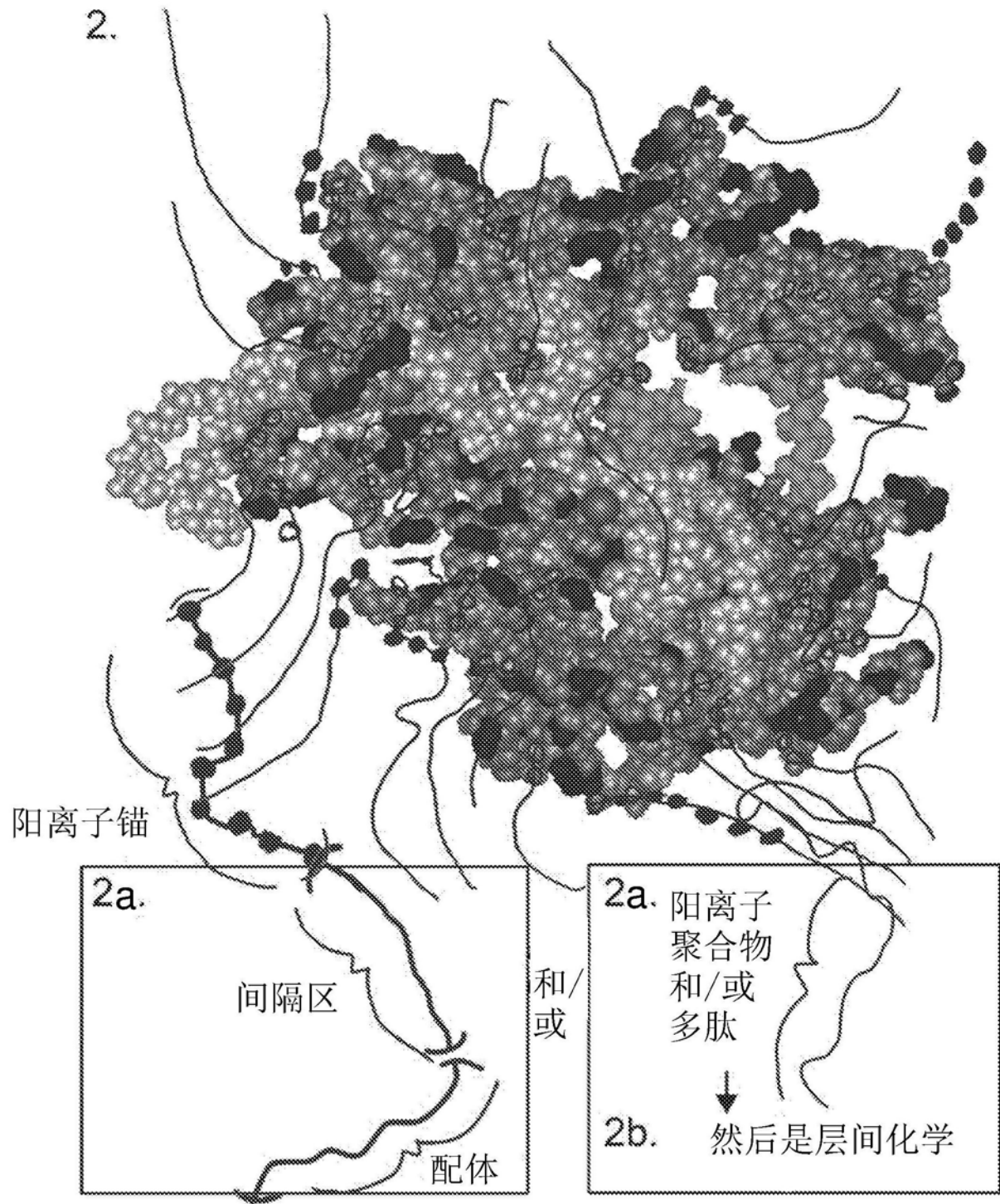
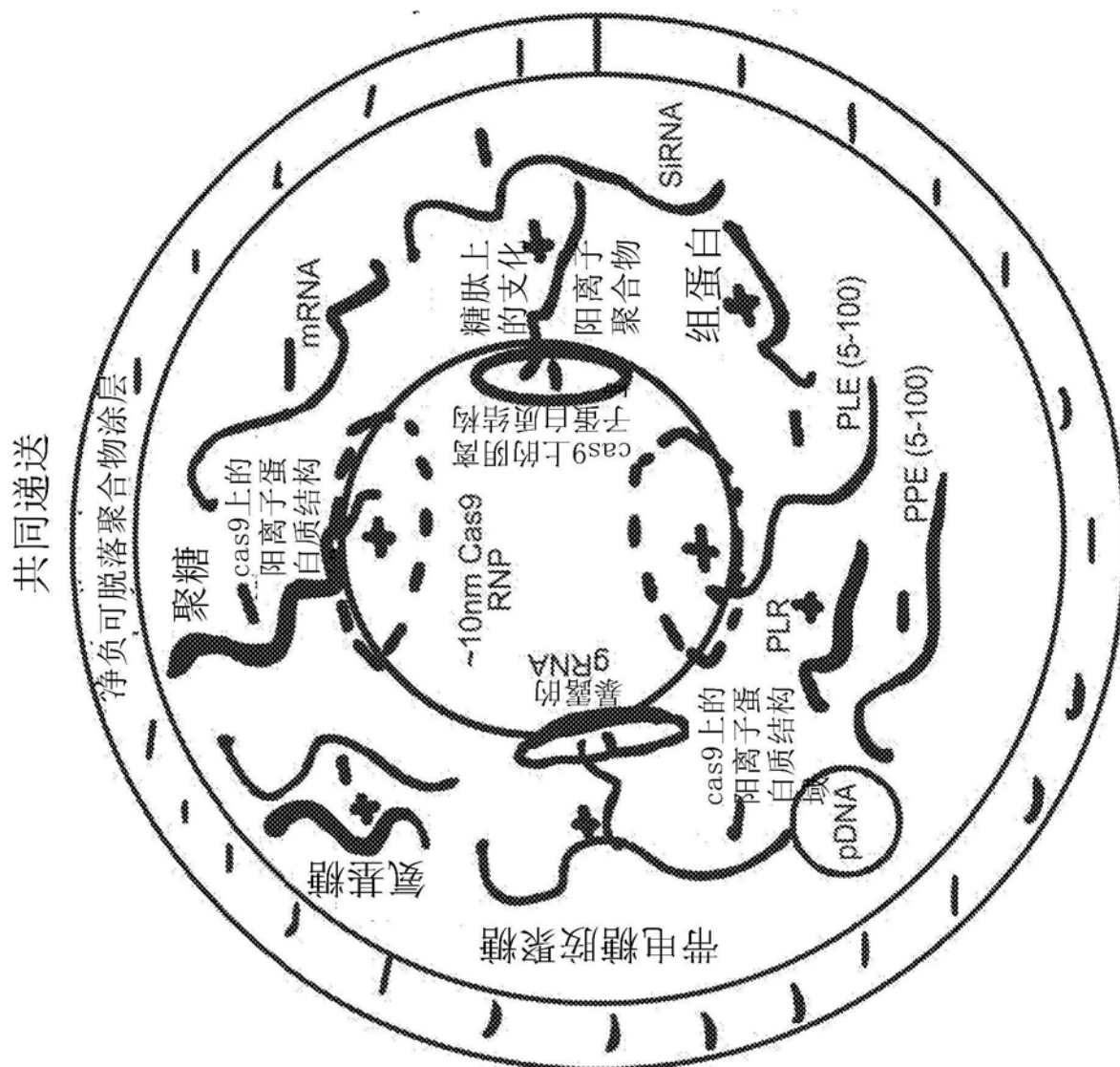


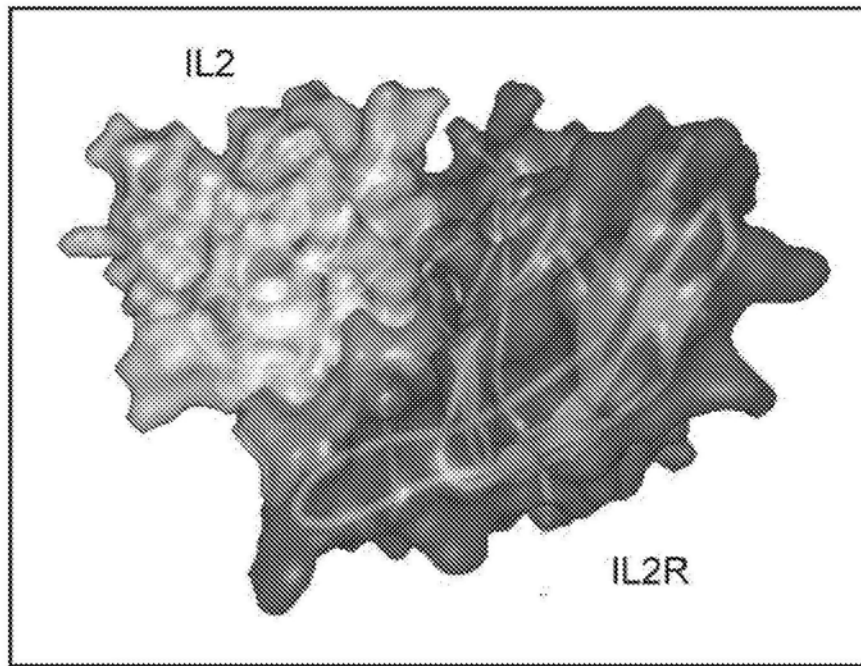
图123

带负电荷的涂层也可以是阴离子锚-接头-配体或独立离子的基质的结构域。聚合物的交错了胶体稳定性和基因编辑效率。



带负电的涂层可以用阳离子聚合物或锚-配体层压, 其中, 锚是阳离子的

图124

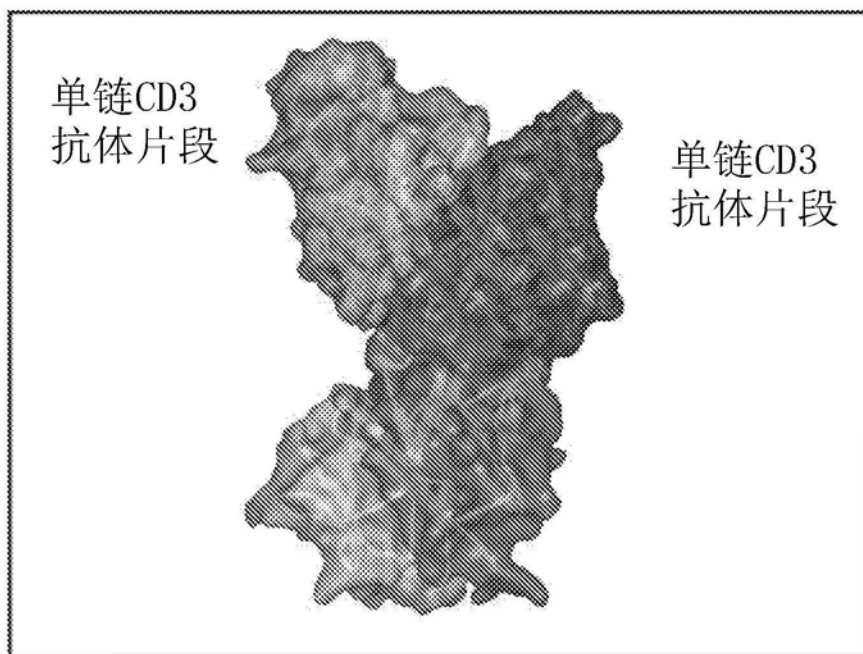


▶ 人 A 20 ASP	▶ 人 A 132 LEU
▶ 人 A 21 LEU	▶ 人 A 135 THR
▶ 人 A 22 GLN	▼ ∞ 链B: 白细胞介素-2
▶ 人 A 23 MET	受体 α 链
▶ 人 A 24 ILE	▶ 人 B - 1 ASP
▶ 人 A 25 LEU	▶ 人 B 0 PRO
▶ 人 A 26 ASN	▶ 人 B 1 GLU
▶ 人 A 27 GLY	▶ 人 B 2 LEU
▶ 人 A 28 ILE	▶ 人 B 3 CYS
▶ 人 A 29 ASN	▶ 人 B 4 ASP
▶ 人 A 30 ASN	▶ 人 B 5 ASP
▶ 人 A 31 TYR	▶ 人 B 6 ASP
▶ 人 A 32 LYS	▶ 人 B 7 PRO
▶ 人 A 33 ASN	▶ 人 B 8 PRO
	▶ 人 B 9 GLU

图125

▶ 人 A 34 PRO	▶ 人 B 10 ILE
▶ 人 A 35 LYS	▶ 人 B 11 PRO
▶ 人 A 36 LEU	▶ 人 B 12 HIS
▶ 人 A 37 THR	▶ 人 B 13 ALA
▶ 人 A 38 ARG	▶ 人 B 14 THR
▶ 人 A 39 MET	▶ 人 B 15 PHE
▶ 人 A 40 LEU	▶ 人 B 16 LYS
▶ 人 A 41 THR	▶ 人 B 17 ALA
▶ 人 A 42 PHE	▶ 人 B 18 MET
▶ 人 A 43 LYS	▶ 人 B 19 ALA
▶ 人 A 44 PHE	▶ 人 B 20 TYR
▶ 人 A 45 TYR	▶ 人 B 21 LYS
▶ 人 A 46 MET	▶ 人 B 22 GLU
▶ 人 A 47 PRO	▶ 人 B 23 GLY
▶ 人 A 48 LYS	▶ 人 B 24 THR
▶ 人 A 49 LYS	▶ 人 B 25 MET
▶ 人 A 50 ALA	▶ 人 B 26 LEU
▶ 人 A 51 THR	▶ 人 B 27 ASN
▶ 人 A 52 GLU	▶ 人 B 28 CYS
▶ 人 A 53 LEU	▶ 人 B 29 GLU

图125 (续)



▶  D 2 VAL	▶  D 40 SER	▶  D 91 SER
▶  D 3 GLN	▶  D 41 HIS	▶  D 92 ALA
▶  D 4 LEU	▶  D 42 GLY	▶  D 93 VAL
▶  D 5 GLN	▶  D 43 LYS	▶  D 94 TYR
▶  D 6 GLN	▶  D 44 ASN	▶  D 95 TYR
▶  D 7 SER	▶  D 45 LEU	▶  D 96 CYS
▶  D 8 GLY	▶  D 46 GLU	▶  D 97 ALA
▶  D 9 PRO	▶  D 47 TRP	▶  D 98 ARG
▶  D 10 GLU	▶  D 48 MET	▶  D 99 SER
▶  D 11 LEU	▶  D 49 GLY	▶  D 100 GLY
▶  D 12 VAL	▶  D 50 LEU	▶  D 101 TYR
▶  D 13 LYS	▶  D 51 ILE	▶  D 102 TYR
▶  D 14 PRO	▶  D 52 ASN	▶  D 103 GLY
▶  D 15 CLY	▶  D 53 PRO	▶  D 104 ASP

图126

▶  D 16 ALA	▶  D 54 TYR	▶  D 105 SER
▶  D 17 SER	▶  D 55 LYS	▶  D 106 ASP
▶  D 18 MET	▶  D 56 GLY	▶  D 107 TRP
▶  D 19 LYS	▶  D 57 VAL	▶  D 108 TYR
▶  D 20 ILE	▶  D 58 SER	▶  D 109 PHE
▶  D 21 SER	▶  D 59 THR	▶  D 110 ASP
▶  D 22 CYS	▶  D 60 TYR	▶  D 111 VAL
▶  D 23 LYS	▶  D 61 ASN	▶  D 112 TRP
▶  D 24 ALA	▶  D 62 GLN	▶  D 113 GLY
▶  D 25 SER	▶  D 63 LYS	▶  D 114 GLN
▶  D 26 GLY	▶  D 64 PHE	▶  D 115 GLY
▶  D 27 TRY	▶  D 65 LYS	▶  D 116 THR
▶  D 28SER	▶  D 66 ASP	▶  D 117 THR
▶  D 29 PHE	▶  D 67 LYS	▶  D 118 LEU
▶  D 30 THR	▶  D 68 ALA	▶  D 119 THR
▶  D 31 GLY	▶  D 69 THR	▶  D 120 VAL
▶  D 32 TYR	▶  D 70 LEU	▶  D 121 PHE
▶  D 33 THR	▶  D 71 THR	▶  D 122 SER
▶  D 34 MET	▶  D 72 VAL	▶  水分子
▶  D 35 ASN	▶  D 73 ASP	

图126 (续)

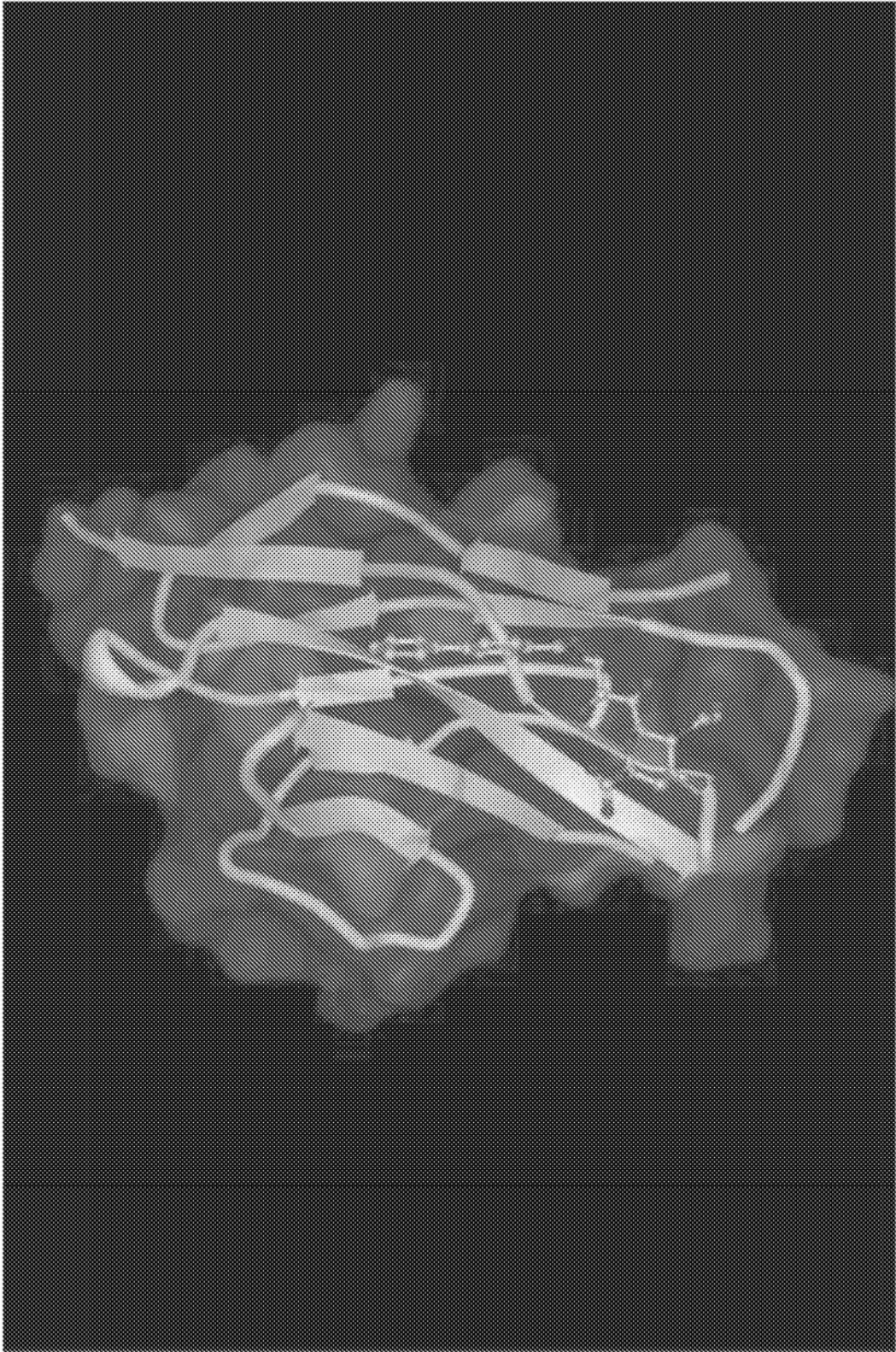


图127

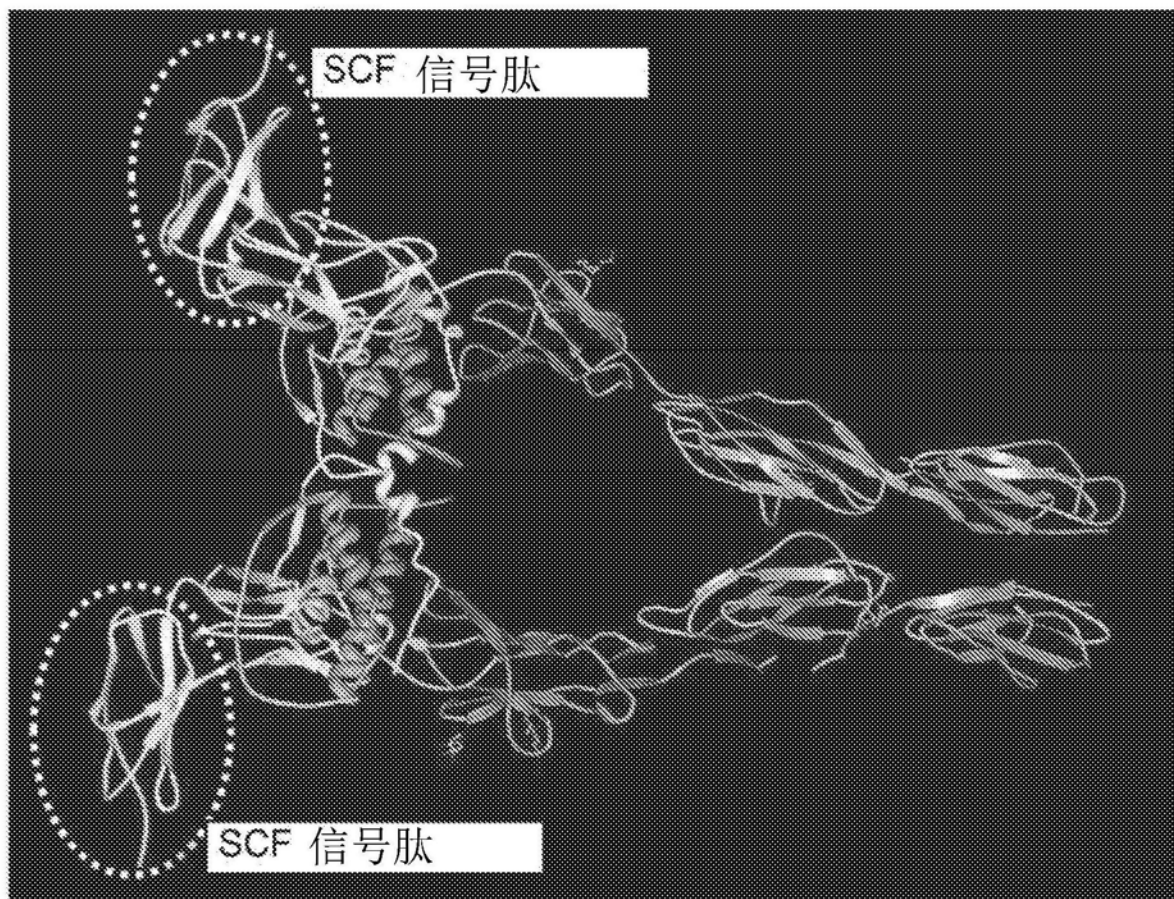


图128

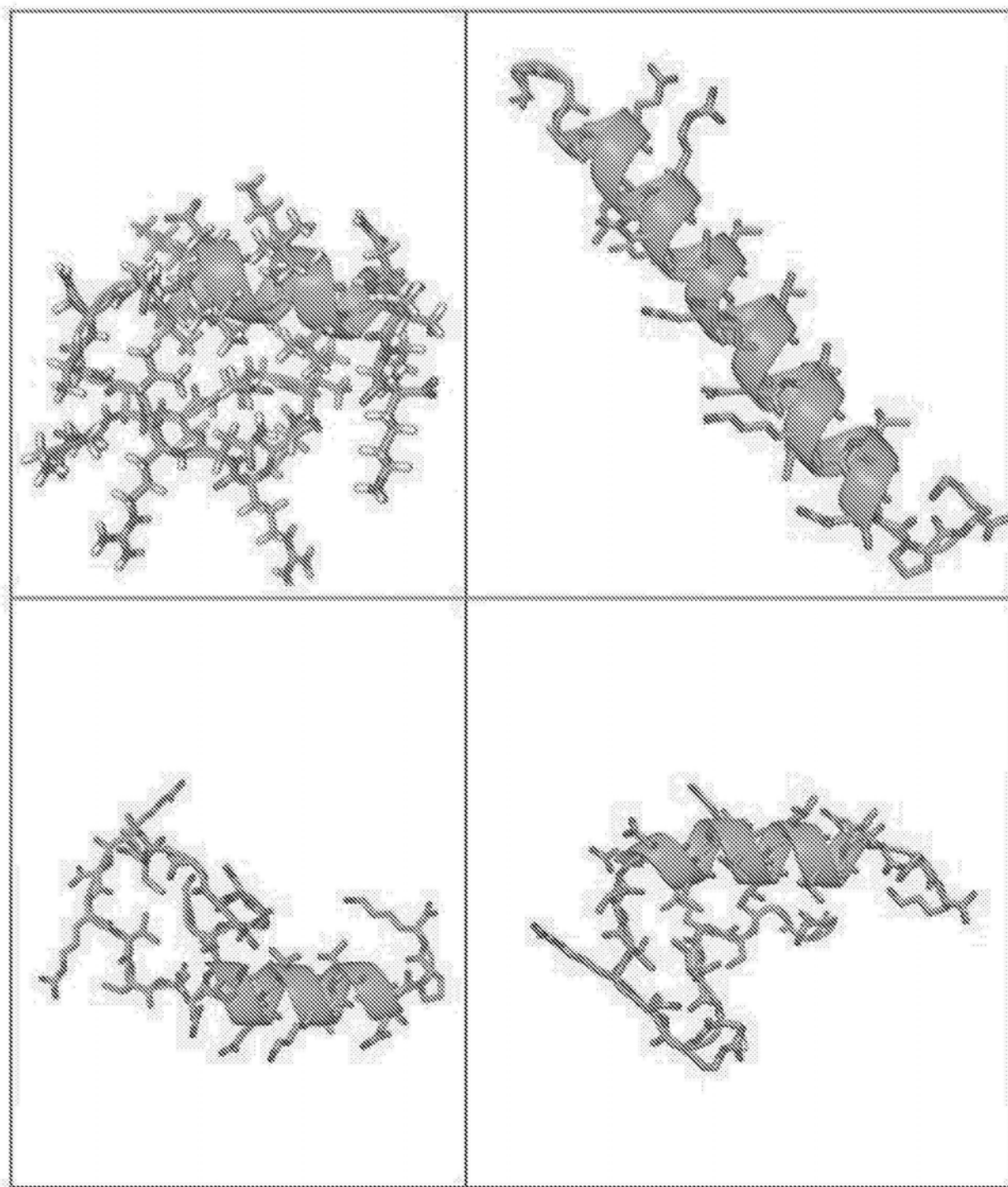


图129

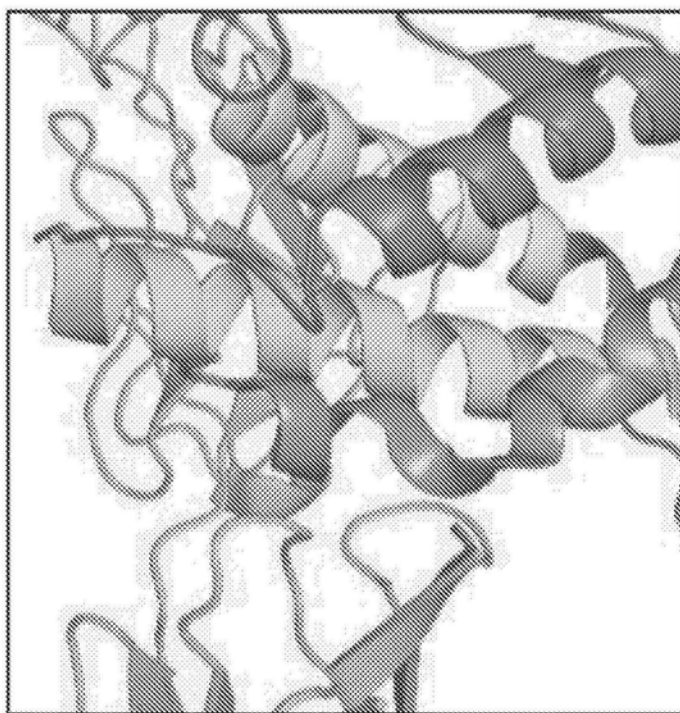
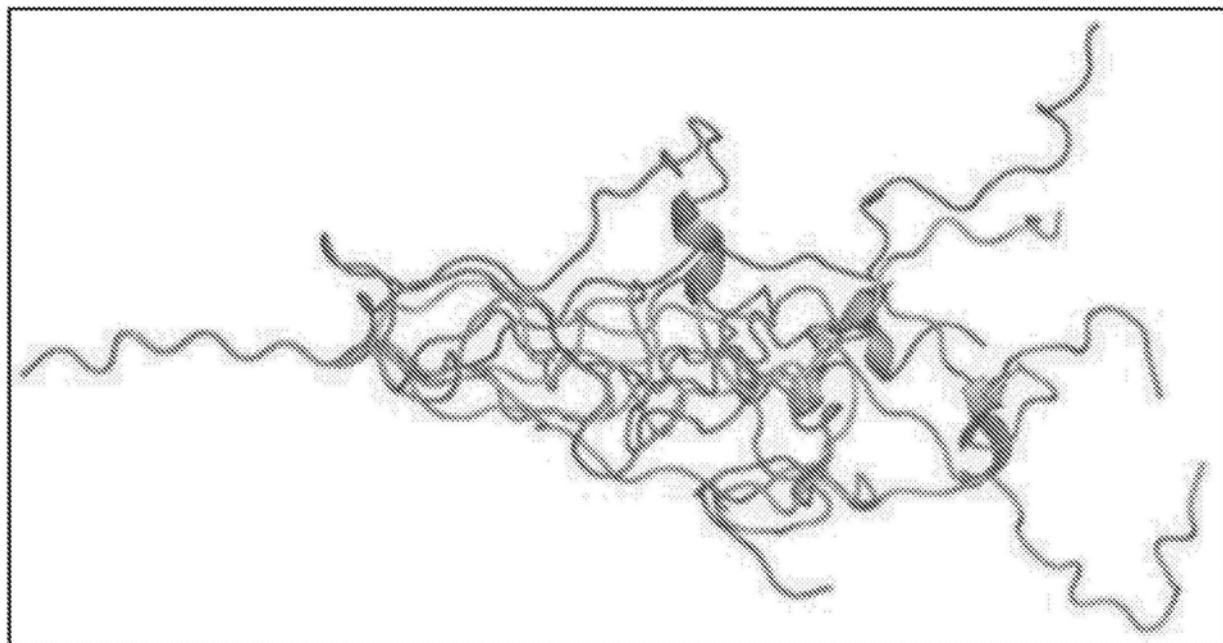
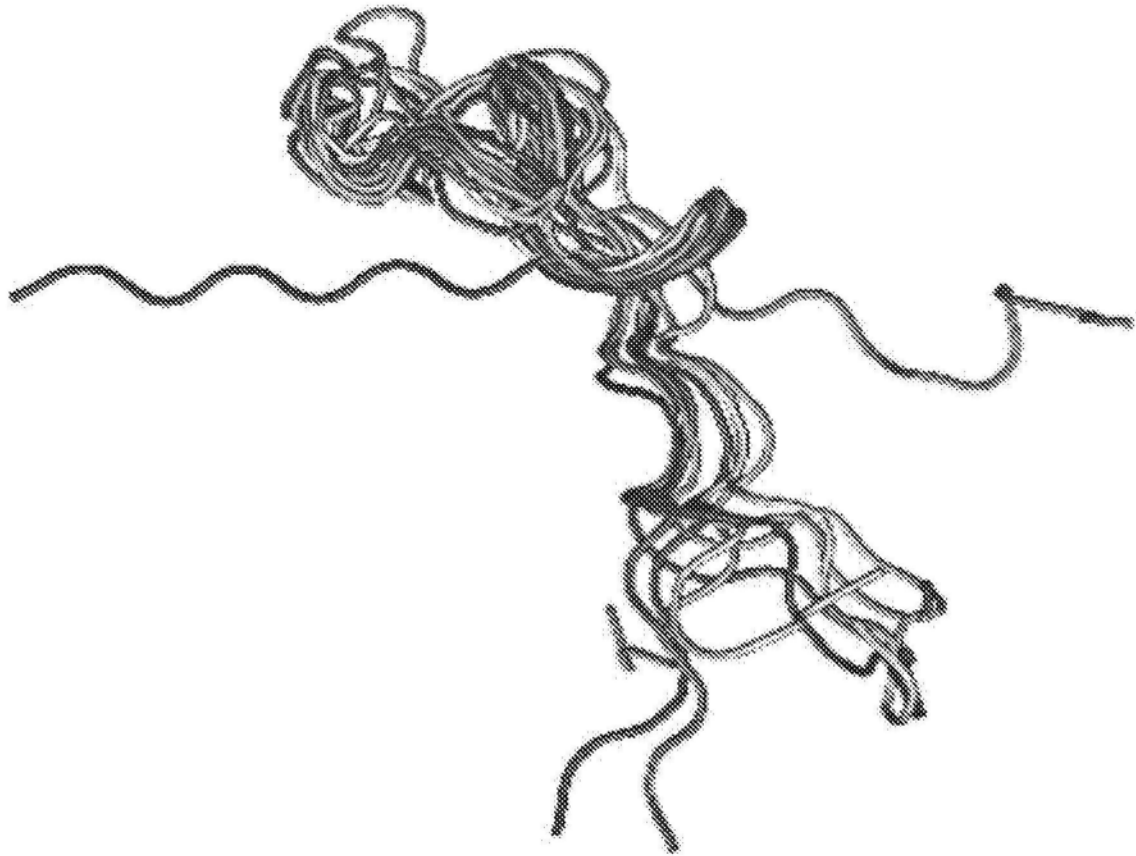


图130



聚合成其中链与接头残基在很大程度上相互作用的结构

对于残基71到94，存在通过与KIT中的其它两个螺旋相互作用来稳定螺旋的疏水性残基。疏水性残基以红色示出(下划线)：

SNYS IIDK LVNIV DD LVECV KENS

改变序列以移除疏水性残基并且用氨基异丁酸(Aib)取代，帮助诱导螺旋折叠。

SNYS IIDK LVNIV DD LVECV KENS

KIT7194_AIB1: SNYS AibADK AibANAibA DD AibAEAibAKENS

图131

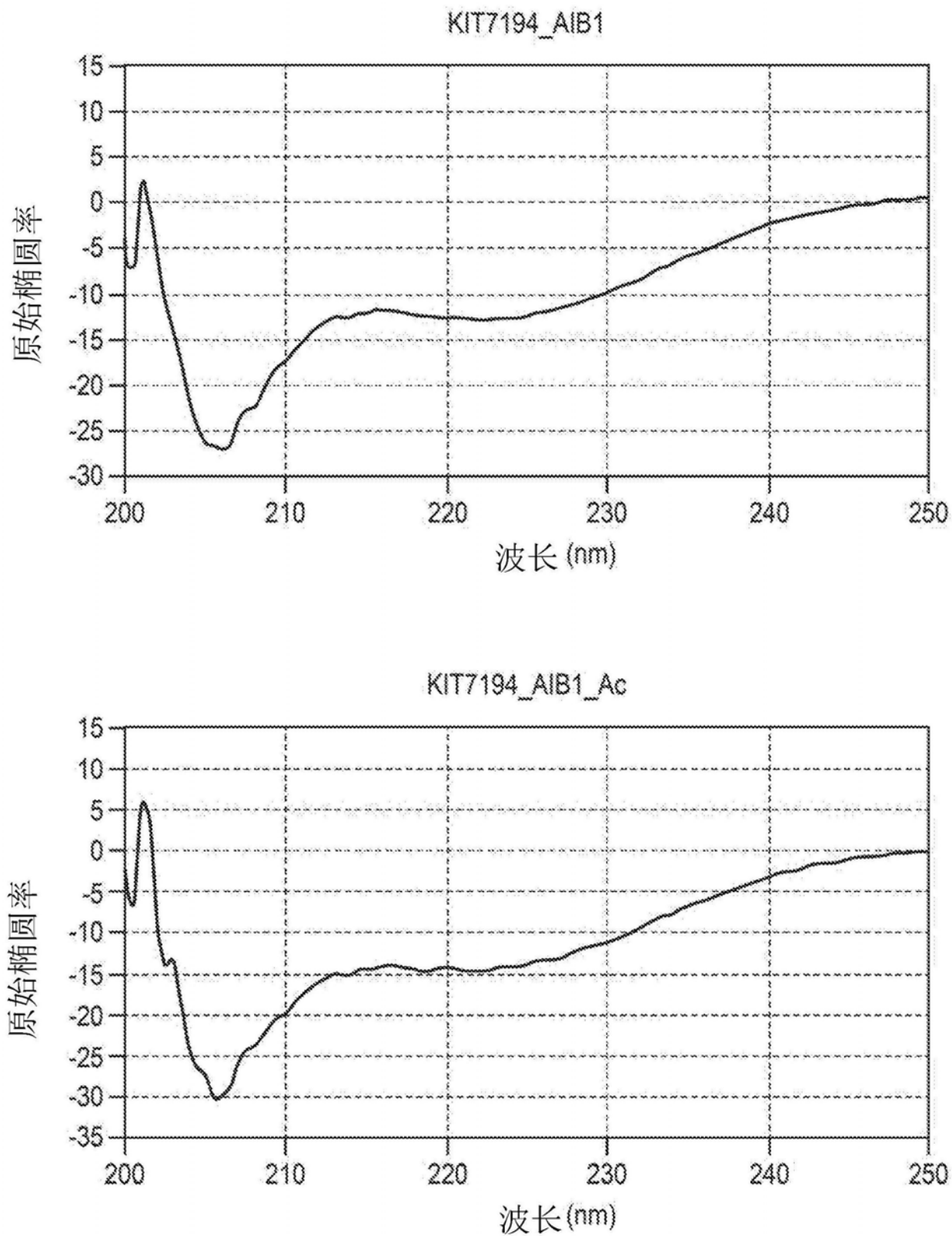


图132

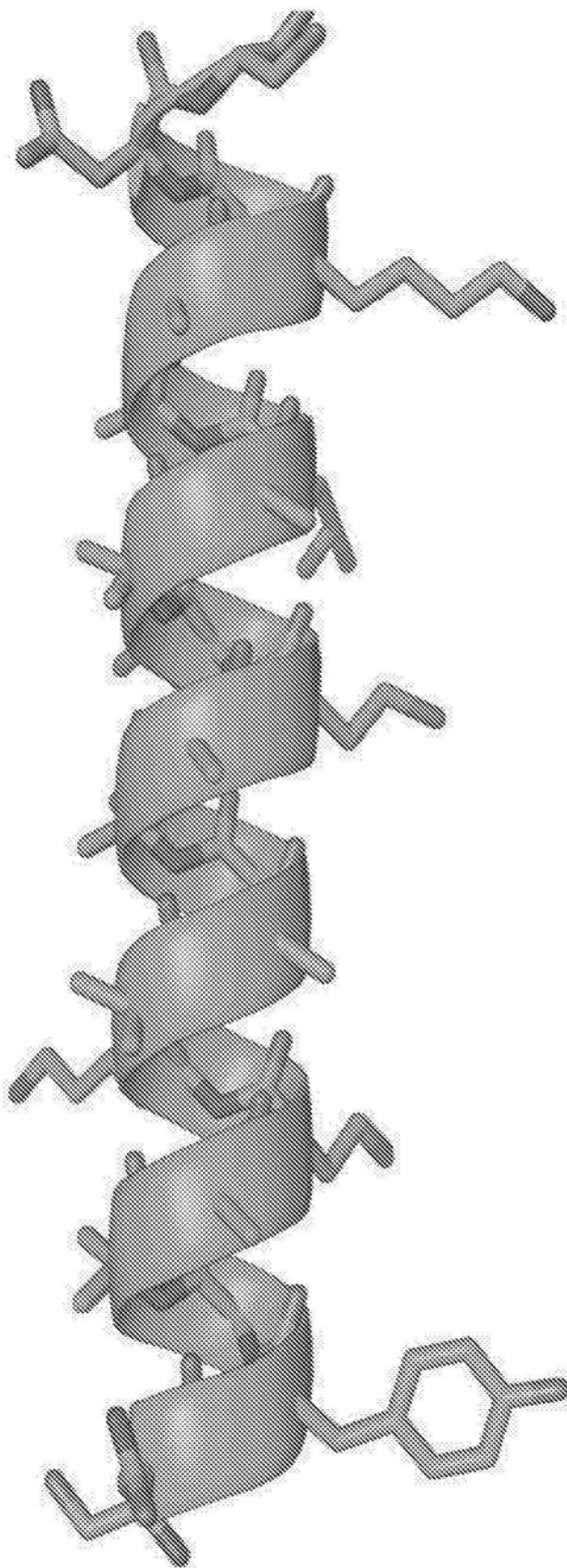


图133

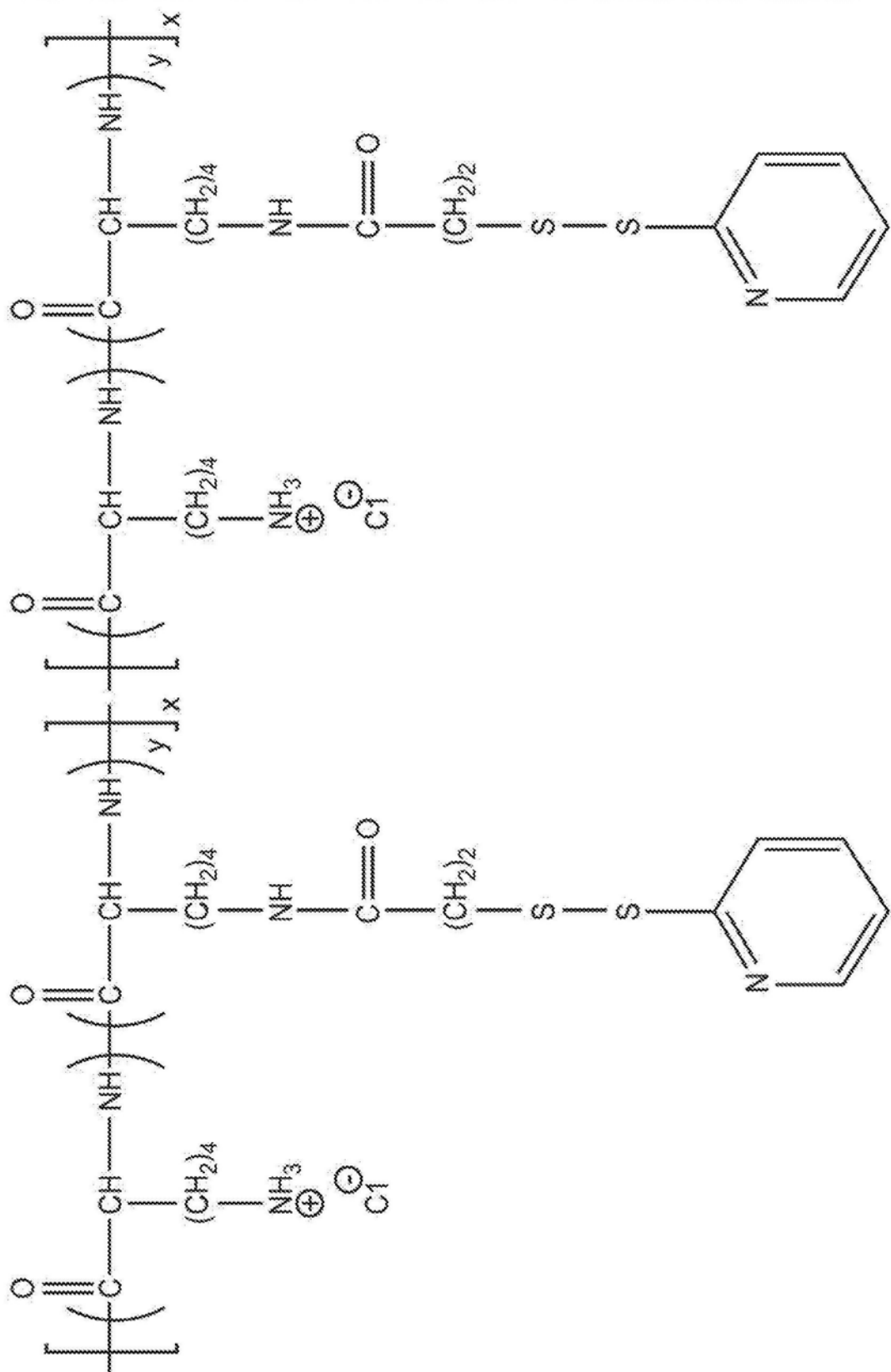


图134

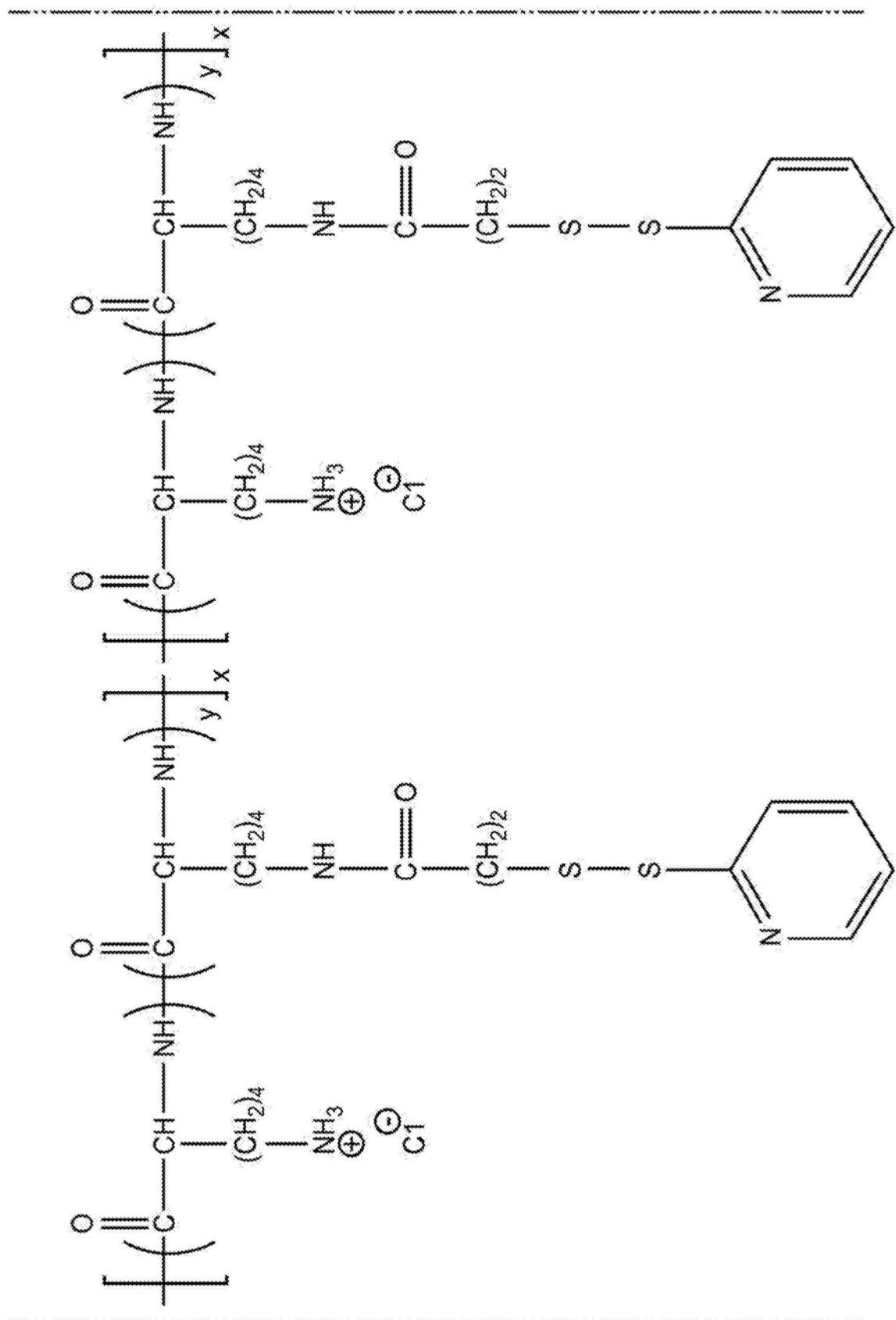


图134 (续)

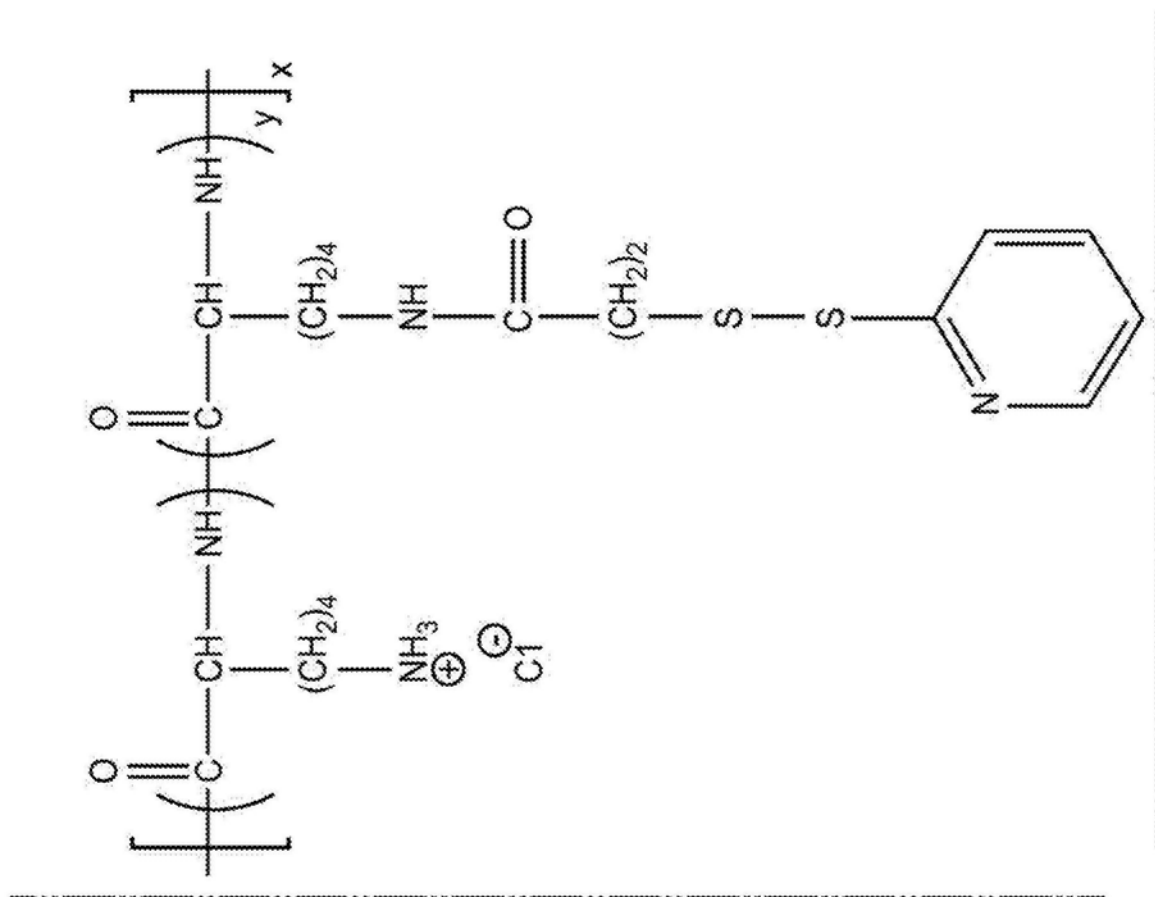


图134 (续)

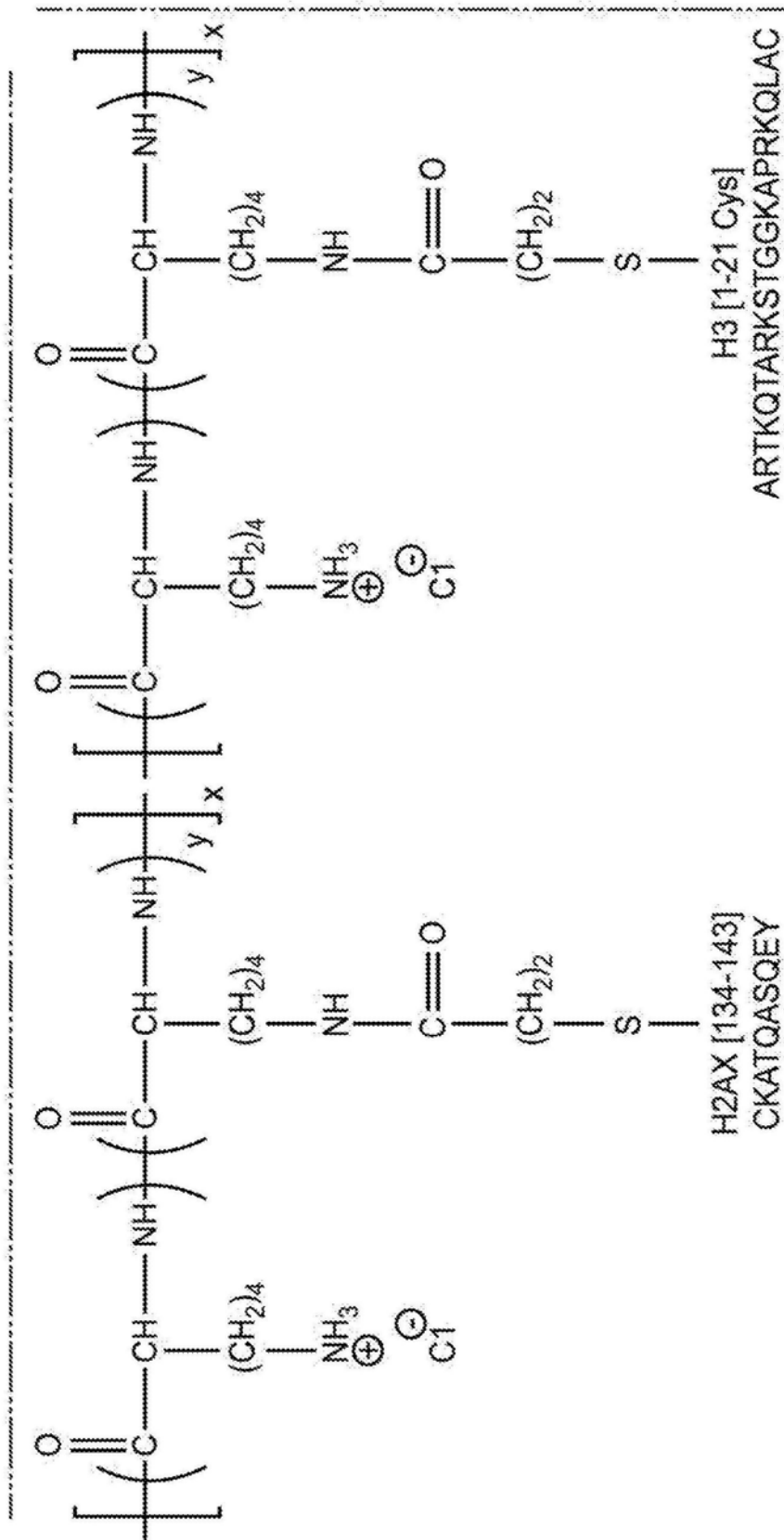


图134 (续)

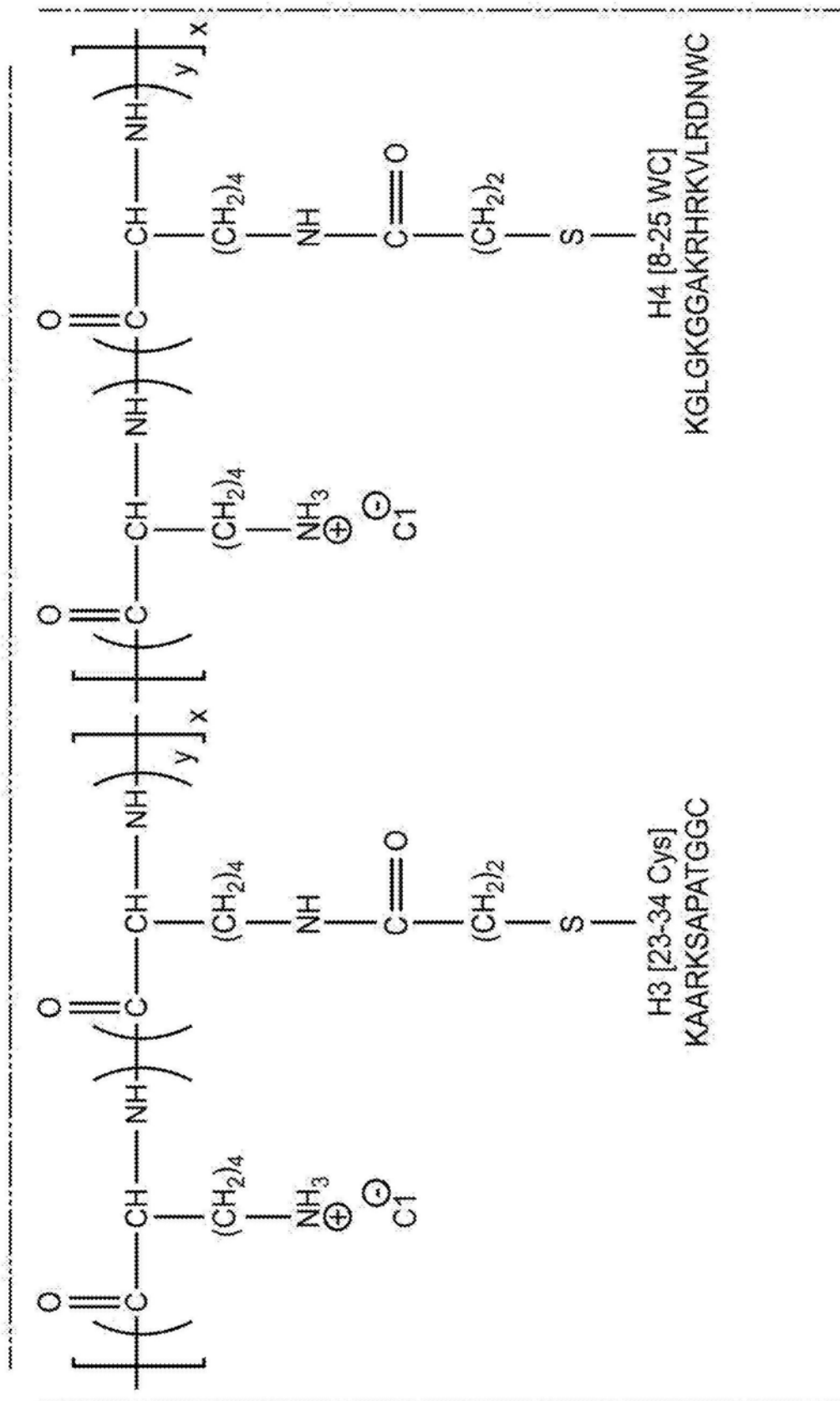


图134 (续)

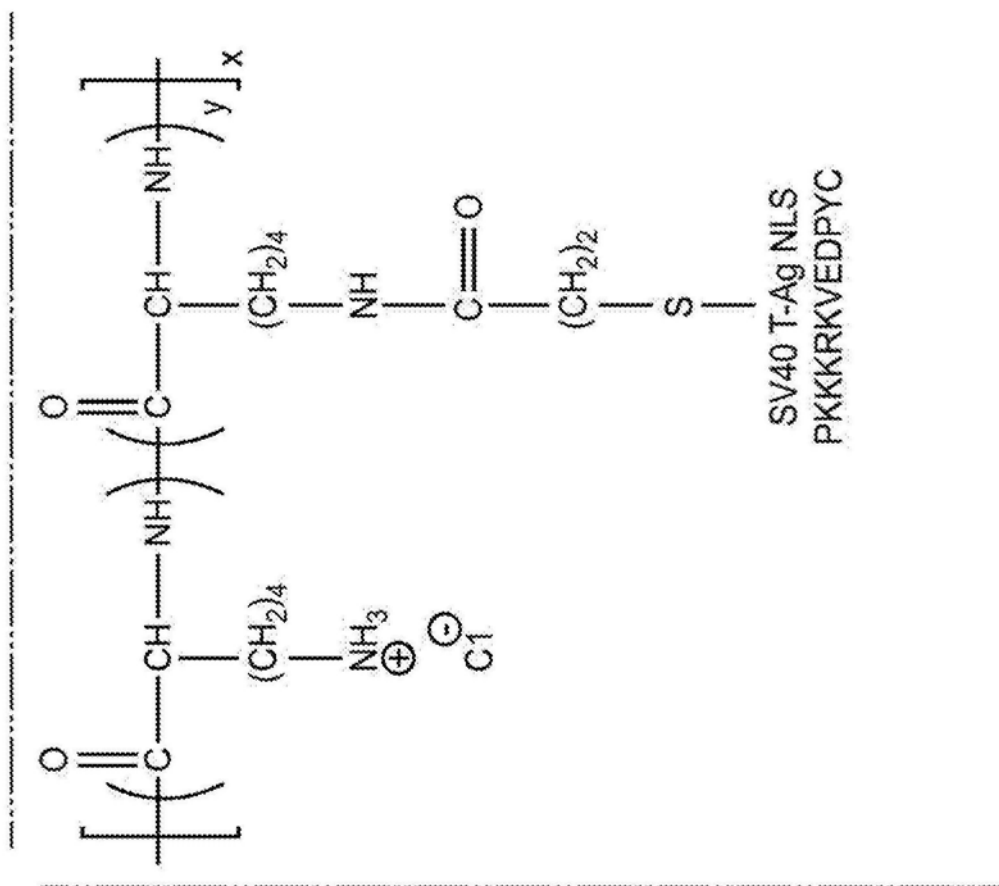


图134 (续)