



(10) 申请公布号 CN 116157444 A

(43) 申请公布日 2023.05.23

(21) 申请号 202180059736.4

(22) 申请日 2021.05.27

(30) 优先权数据

63/041,739 2020.06.19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.01.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/034462 2021.05.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/257262 EN 2021.12.23

(71) 申请人 耶鲁大学

地址 美国康涅狄格州

(72) 发明人 马克·W·萨尔茨曼 江宇航

莫利·格伦 亚历桑德拉·苏贝里

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

专利代理师 关旭颖 吴小明

(51) Int.Cl.

C08G 63/60 (2006.01)

权利要求书6页 说明书65页  
序列表2页 附图19页

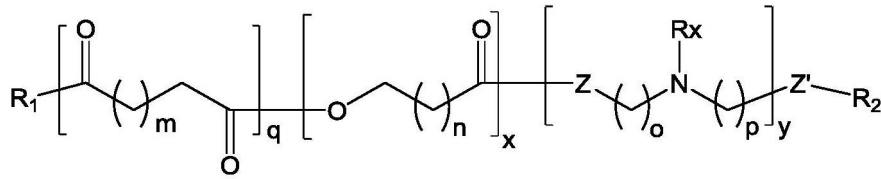
(54) 发明名称

具有改性的端基和增强的肺部递送的聚  
(胺-共-酯) 聚合物

(57) 摘要

已经开发了聚(胺-共-酯) 聚合物, 由其形成负载活性剂的多聚复合物和粒子的方法, 以及使用它们以最佳摄取来递送核酸药剂的方法。实施例展示了与暴露的羧基和/或羟基组合的关键分子量, 以及制备方法。典型地, 与其他对照转染试剂相比, 组合物具有较低的毒性, 在药物递送时更高效, 或者表现出其组合。在一些实施方案中, 组合物适合于体内递送, 并且可以向受试者全身施用以治疗疾病或病况。对于与聚乙二醇化聚(胺-共-酯) 聚合物混合的具有特定的含有胺基或羟基的端基的聚(胺-共-酯) 聚合物, 已经示出了通过吸入的向肺的体内递送。

1. 一种式I的聚合物:

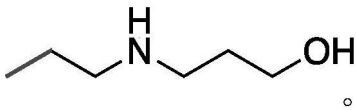


式 I

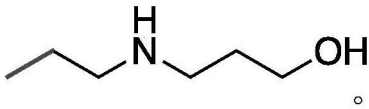
其中n为1-30的整数,m、o和p独立地为1-20的整数,x、y和q独立地为1-1000的整数,R为氢、取代或未取代的烷基、或者取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的烷氧基,Z和Z'独立地为O或NR',其中R'为氢、取代或未取代的烷基、或者取代或未取代的芳基,

其中R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>为含有羟基、伯胺基、仲胺基、叔胺基或其组合的化学实体。

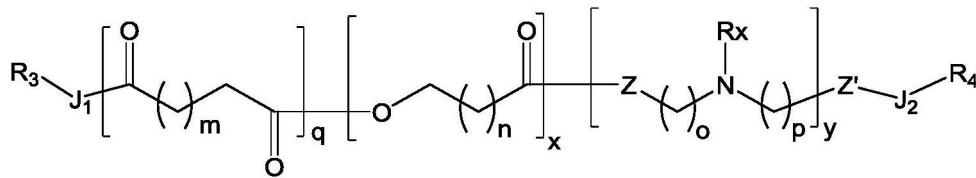
2. 根据权利要求1所述的聚合物,其中R1和/或R2不是



3. 根据权利要求1所述的聚合物,其中相对于其中R1和/或R2由以下组成的相应多聚复合物或粒子,由所述聚合物形成的多聚复合物或粒子显示出mRNA的改善的负载、改善的细胞转染、改善的细胞内内体释放或其组合:



4. 根据权利要求1所述的聚合物,其中所述聚合物具有式II的结构:

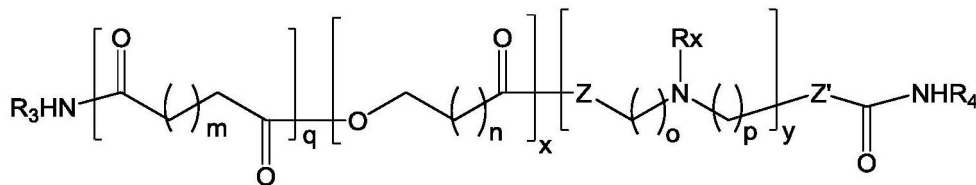


式 II

其中J<sub>1</sub>和J<sub>2</sub>独立地为连接部分或不存在,

R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>为含有羟基、伯胺基、仲胺基、叔胺基或其组合的取代的烷基。

5. 根据权利要求1所述的聚合物,其中所述聚合物具有式III的结构:



6. 根据权利要求1所述的聚合物,其中Z与Z'相同。

7. 根据权利要求1所述的聚合物,其中n为4、10、13或14。

8. 根据权利要求1所述的聚合物,其中m为5、6或7。

9. 根据权利要求1所述的聚合物,其中R<sub>x</sub>为取代或未取代的烷基。

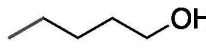
10. 根据权利要求1所述的聚合物,其中通过凝胶渗透色谱法使用窄多分散性聚苯乙烯

标准物测量的重均分子量为约2,000道尔顿至20,000道尔顿,优选地约2,000道尔顿至约10,000道尔顿,最优选地约2000道尔顿至约7,000道尔顿。

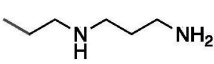
11. 根据权利要求4所述的聚合物,其中R<sub>3</sub>与R<sub>4</sub>相同。

12. 根据权利要求4所述的聚合物,其中R<sub>3</sub>和/或R<sub>4</sub>独立地选自由以下各项组成的组:

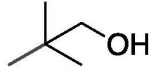
1



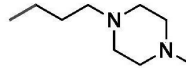
2



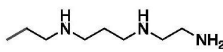
3



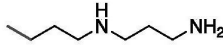
4



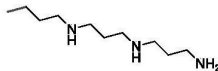
5



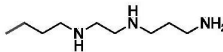
6



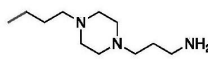
7



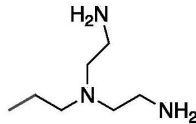
8



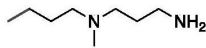
9



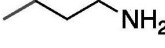
10



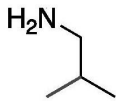
11



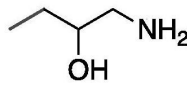
12



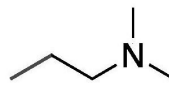
13



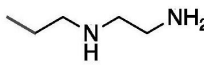
14



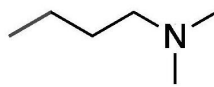
15



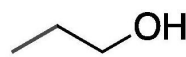
16



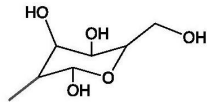
17



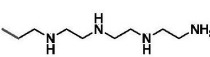
18



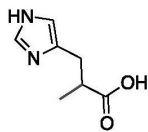
19



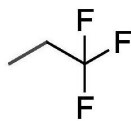
20



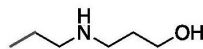
21



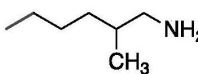
22



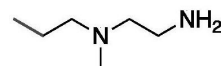
23



24



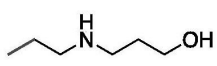
25



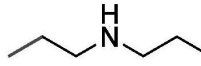
26



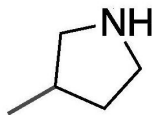
27



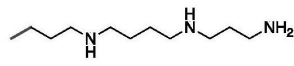
28



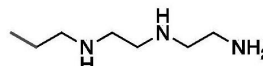
29



30



31



13. 根据权利要求4所述的聚合物,其中 $J_1$ 为-O-或-NH, $J_2$ 为-C(O)NH-或-C(O)O-或其组合。

14. 根据权利要求4所述的聚合物,其中 $R_3$ 、 $R_4$ 或二者含有伯胺基,以及任选的一个或多个仲胺基或叔胺基。

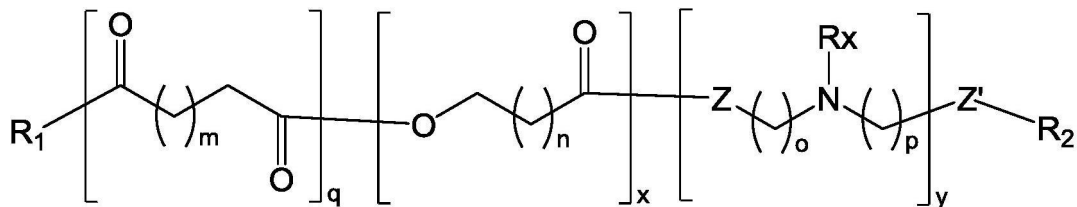
15. 根据权利要求4所述的聚合物,其中 $R_3$ 、 $R_4$ 或二者含有羟基,以及任选的一个或多个胺基。

16. 根据权利要求4所述的聚合物,其中 $R_3$ 、 $R_4$ 或二者含有羟基,并且不含胺基。

17. 根据权利要求4所述的聚合物,其中 $R_3$ 和 $R_4$ 中的至少一者不含羟基。

18. 根据权利要求4所述的聚合物,其中 $R_3$ 、 $R_4$ 或二者为-未取代的 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-Aq-未取代的 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-Bq、-未取代的 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-Aq-取代的 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-Bq、-取代的 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-Aq-未取代的 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-Bq或-取代的 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-Aq-取代的 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-Bq,其中Aq不存在或为-NR<sub>5</sub>-,并且Bq为羟基、伯胺、仲胺或叔胺,其中R<sub>5</sub>为氢、取代或未取代的烷基或者取代或未取代的芳基。

19. 根据权利要求1所述的聚合物,其中所述聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)具有以下结构,



式 I

其中 $n$ 为1-30的整数,

$m$ 、 $o$ 和 $p$ 独立地为1-20的整数,

$x$ 、 $y$ 和 $q$ 独立地为1-1000的整数,

$R_x$ 为氢、取代或未取代的烷基、或者取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的烷氧基,

$Z$ 和 $Z'$ 独立地为O或NR',其中R'为氢、取代或未取代的烷基或者取代或未取代的芳基,

$R_1$ 和 $R_2$ 为含有羟基、伯胺基、仲胺基、叔胺基或其组合的化学实体。

20. 根据权利要求19所述的聚合物,其中 $Z$ 与 $Z'$ 相同。

21. 根据权利要求20所述的聚合物,其中 $Z$ 为O并且 $Z'$ 为O, $Z$ 为NR'并且 $Z'$ 为NR'。

22. 根据权利要求19所述的聚合物,其中 $Z$ 为O并且 $Z'$ 为NR',或 $Z$ 为NR'并且 $Z'$ 为O。

23. 根据权利要求19所述的聚合物,其中 $Z'$ 为O,并且 $n$ 为1-24的整数,诸如4、10、13或14,任选地其中 $Z$ 也为O。

24. 根据权利要求23所述的聚合物,其中 $m$ 为1-10的整数,诸如4、5、6、7或8,任选地其中 $Z$ 也为O。

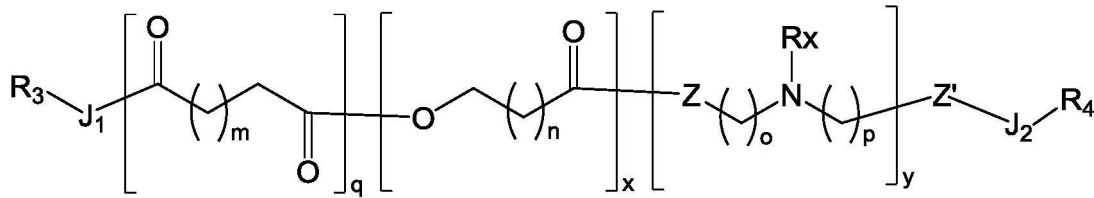
25. 根据权利要求19所述的聚合物,其中 $Z'$ 为O, $n$ 为1-24的整数,诸如4、10、13或14, $m$ 为1-10的整数,诸如4、5、6、7或8,并且 $o$ 和 $p$ 为1-6的相同整数,诸如2、3或4,任选地其中 $Z$ 也为O。

26. 根据权利要求19所述的聚合物,其中 $Z'$ 为O, $n$ 为1-24的整数,诸如4、10、13或14, $m$ 为1-10的整数,诸如4、5、6、7或8,并且R为烷基,诸如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁

基、异丁基、仲丁基、环己基、(环己基)甲基、环丙基甲基、或者例如正戊基、正己基、正庚基和正辛基的同系物和异构体,或者芳基,诸如苯基、萘基、蒽基、菲基、蒾基、茈基、甲苯基或二甲苯基,任选地其中Z也为O。

27. 根据权利要求19所述的聚合物,其中n为14,任选地十五内酯(PDL),m为7,任选地癸二酸,并且o和p为2,任选地N-甲基二乙醇胺(MDEA)。

28. 根据权利要求1所述的聚合物,所述聚合物具有式II的结构:



式 II

其中 $R_x$ 、 $Z$ 、 $Z'$ 、 $m$ 、 $n$ 、 $o$ 、 $p$ 、 $q$ 、 $x$ 和 $y$ 如以上关于式I所述,

$J_1$ 和 $J_2$ 独立地不存在或为连接部分,诸如 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-O-$ 和 $-NH-$ ,式II中的 $R_3$ 和 $R_4$ 独立地为含有羟基、伯胺基、仲胺基、叔胺基或其组合的取代的烷基。

29. 根据权利要求28所述的聚合物,其中

$J_1$ 为 $-O-$ 或 $-NH-$ ,并且

$J_2$ 为 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 或 $-C(O)O-$ 。

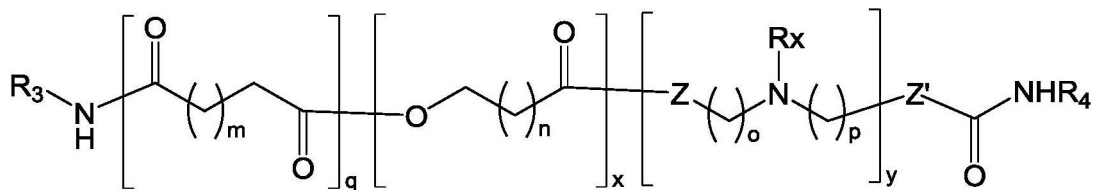
30. 根据权利要求28所述的聚合物,其中 $R_3$ 与 $R_4$ 相同,任选地其中 $R_3$ 和/或 $R_4$ 是直链的。

31. 根据权利要求30所述的聚合物,其中 $R_3$ 、 $R_4$ 或二者含有羟基,并且任选地, $R_3$ 、 $R_4$ 或二者含有羟基和一个或多个胺基,任选地仲胺基或叔胺基。

32. 根据权利要求28所述的聚合物,其中 $R_3$ 、 $R_4$ 或二者含有羟基,并且不含胺基。

33. 根据权利要求28所述的聚合物,其中 $R_3$ 和 $R_4$ 中的至少一者不含羟基。

34. 根据权利要求1所述的聚合物,所述聚合物具有式III的结构:



式 III

其中 $R_x$ 、 $Z$ 、 $Z'$ 、 $m$ 、 $n$ 、 $o$ 、 $p$ 、 $q$ 、 $x$ 和 $y$ 如以上关于式I所述,

$J_1$ 和 $J_2$ 独立地不存在或为连接部分,诸如 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-O-$ 和 $-NH-$ ,式II中的 $R_3$ 和 $R_4$ 独立地为含有羟基、伯胺基、仲胺基、叔胺基或其组合的取代的烷基。

35. 根据权利要求34所述的聚合物,其中

$J_1$ 为 $-O-$ 或 $-NH-$ ,并且

$J_2$ 为 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 或 $-C(O)O-$ 。

36. 根据权利要求34所述的聚合物,其中 $R_3$ 与 $R_4$ 相同,任选地其中 $R_3$ 和/或 $R_4$ 是直链的。

37. 根据权利要求34所述的聚合物,其中 $R_3$ 、 $R_4$ 或二者含有羟基,并且任选地, $R_3$ 、 $R_4$ 或二者含有羟基和一个或多个胺基,任选地仲胺基或叔胺基。

38. 根据权利要求34所述的聚合物,其中 $R_3$ 、 $R_4$ 或二者含有羟基,并且不含胺基。

39. 根据权利要求34所述的聚合物,其中 $R_3$ 和 $R_4$ 中的至少一者不含羟基。

40. 根据权利要求19-39中任一项所述的聚合物,其中所述聚合物的重均分子量大于20,000道尔顿,大于15,000道尔顿,大于10,000道尔顿,大于5,000道尔顿,或大于2,000道尔顿。

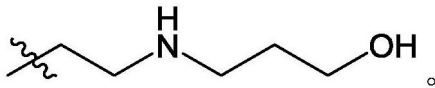
41. 根据权利要求40所述的聚合物,其中所述聚合物的重均分子量为约2,000道尔顿至约20,000道尔顿,更优选地约5,000道尔顿至约10,000道尔顿。

42. 根据权利要求19-41中任一项所述的聚合物,所述聚合物由一种或多种内酯、一种或多种胺-二醇( $Z$ 和 $Z' = O$ )或三胺( $Z$ 和 $Z' = NR'$ )以及一种或多种二酸或二酯制备,其中当使用两种以上不同的内酯、二酸或二酯和/或三胺或胺-二醇单体时, $n$ 、 $o$ 、 $p$ 和/或 $m$ 的值可以相同或不同。

43. 根据权利要求19-42中任一项所述的聚合物,所述聚合物被形成为其多聚复合物或粒子。

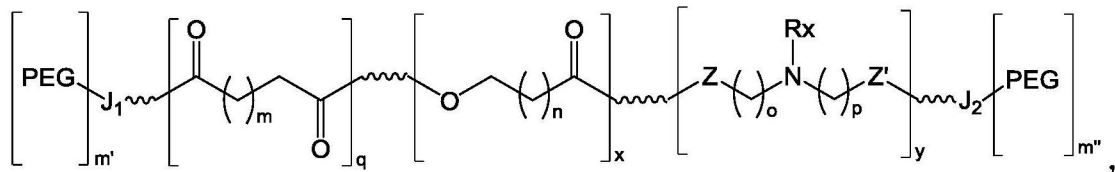
44. 根据权利要求43所述的聚合物,所述聚合物被形成为其多聚复合物或粒子,所述多聚复合物或粒子具有包封于其中的一种或多种核酸。

45. 根据权利要求44所述的聚合物,其中所述多聚复合物或粒子由其中 $R_1$ 和/或 $R_2$ 不由以下组成或不包含以下的聚合物形成:



46. 根据权利要求44所述的聚合物,所述聚合物被形成为其多聚复合物或粒子,其中所述聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)为含有与聚乙二醇(PEG)缀合的所述聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)即PEG缀合的聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)的混合物的形式。

47. 根据权利要求46所述的聚合物,其中所述PEG缀合的聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)含有以下结构:



式 XI

其中 $m'$ 和 $m''$ 独立地为0或1,条件是 $m' + m''$ 为1或2,

式XI中的 $J_1$ 和 $J_2$ 独立地不存在或为连接部分,诸如 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-O-$ 和 $-NH-$ ,

在式XI的一些形式中, $J_1$ 为 $-O-$ 或 $-NH-$ ,在式XI的一些形式中, $J_2$ 为 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 或 $-C(O)O-$ 。

48. 一种体内施用一种或多种治疗性、诊断性或预防性核酸药剂或其组合的方法,所述方法包括向有此需要的细胞或个体施用多聚复合物或粒子形式的根据权利要求1-47中任一项所述的聚合物。

49. 根据权利要求48所述的方法,所述方法包括通过使细胞与所述粒子或多聚复合物

接触来转染细胞。

50. 根据权利要求48所述的方法,其中向肺施用所述多聚复合物或粒子。

## 具有改性的端基和增强的肺部递送的聚(胺-共-酯)聚合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年6月19日提交的美国申请号63/041,739的权益和优先权,所述美国申请在此通过引用整体结合于此。

[0003] 关于联邦资助研究或开发的声明

[0004] 本发明在美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的EB000487的政府支持下完成。政府对本发明享有一定权利。

### 技术领域

[0005] 本发明的领域总体上涉及聚合物组合物以及用于诊断性、预防性和/或治疗性药剂、特别地基于核酸的药剂的改善递送(尤其是向肺)的方法。

### 背景技术

[0006] 用于基因递送的非病毒载体由于它们的有限免疫原性的潜力、容纳和递送大尺寸遗传物质的能力以及其表面结构的改性的潜力而在过去几十年引起了大量关注。非病毒载体的主要类别包括阳离子脂质和阳离子聚合物。Felgner及同事开辟的来源于阳离子脂质的载体代表了最广泛研究的用于非病毒基因递送的体系中的一些(Felgner等人,脂质转染:一种非常高效的脂质介导的DNA转染程序(Lipofection:a highly efficient,lipid-mediated DNA-transfection procedure),PNAS,84,7413-7417(1987))(Templeton等人,用于增加的全身递送和基因表达的改进的DNA:脂质体复合物(Improved DNA:liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression),Nat.Biotechnol.15,647-652(1997))(Chen等人,靶向纳米粒子将siRNA递送至黑色素瘤(Targeted nanoparticles deliver siRNA to melanoma),J.Invest.Dermatol.130,2790-2798(2010))。

[0007] 阳离子聚合物非病毒载体由于其针对特定生物医学应用的合成和结构改性的灵活性而得到了越来越多的关注。阳离子脂质和阳离子聚合物体系二者均通过依靠静电相互作用与带负电的DNA形成缩合复合物来递送基因:复合物形成保护DNA免于降解,并且促进其细胞摄取和到细胞核中的细胞内交通。

[0008] 在阳离子聚合物与DNA之间形成的多聚复合物(polyplex)通常比在阳离子脂质与DNA之间形成的脂质复合物(lipoplex)更稳定,但是二者在含有血清组分和盐的生理性液体中通常都不稳定,并且倾向于造成复合物分开或聚集(Al-Dosari等人,非病毒基因递送:原理、局限性和最新进展(Nonviral gene delivery:principle,limitations,and recent progress),AAPS J.11,671-681(2009))(Tros de Ilarduya等人,通过脂质复合物和多聚复合物的基因递送(Gene delivery by lipoplexes and polyplexes),Eur.J.Pharm.Sci.40,159-170(2010))。另外,虽然一些工作表明阴离子聚合物或甚至裸DNA在一定条件下可以提供一些水平的转染,但是通过脂质和聚合物二者的转染通常需要具有过量电荷的材料,导致在表面上具有净正电荷的多聚复合物或脂质复合物(Nicol等

人, *Gene Ther.* 9, 1351-1358 (2002)) (Schlegel等人, *J. Contr. Rel.* 152, 393-401 (2011)) (Liu等人, *AAPS J.* 9, E92-E104 (2007)) (Liu等人, *Gene Ther.* 6, 1258-1266 (1999))。当体内注射到循环系统中时,正表面电荷引起与细胞组分的带负电的血清分子或膜的复合物聚集体的快速形成,然后所述复合物聚集体被网状内皮系统(RES)清除。

[0009] 更重要地,迄今为止所开发的许多阳离子载体表现出大的毒性,这限制了它们的临床适用性(Tros de Ilarduya等人, *Eur. J. Pharm. Sci.* 40, 159-170 (2010)) (Gao等人, *Biomaterials* 32, 8613-8625 (2011)) (Felgner等人, *J. Biol. Chem.* 269, 2550-2561 (1994)) (Kafil等人, *BioImpacts* 1, 23-30 (2011)) (Lv等人, *J. Contr. Rel.* 114, 100-109 (2006))。这看上去也取决于电荷:复合物的表面上的过量正电荷可以与细胞组分诸如细胞膜相互作用,并且抑制正常细胞过程,诸如网格蛋白介导的内吞作用,离子通道、膜受体和酶的活性,或细胞存活信号传导(Gao等人, *Biomaterials* 32, 8613-8625 (2011)) (Felgner等人, *J. Biol. Chem.* 269, 2550-2561 (1994)) (Kafil等人, *BioImpacts* 1, 23-30 (2011))。

[0010] 结果,阳离子脂质通常在动物和人类中造成急性炎症反应,而阳离子聚合物诸如PEI使红细胞的质膜不稳定,并且引起细胞坏死、凋亡和自噬(Tros de Ilarduya等人, *Eur. J. Pharm. Sci.* 40, 159-170 (2010)) (Gao等人, *Biomaterials* 32, 8613-8625 (2011)) (Lv等人, *J. Contr. Rel.* 114, 100-109 (2006))。由于这些不期望的影响,需要具有较低电荷密度的非常高效的非病毒载体。

[0011] 在Liu等人, *J. Biomed. Mater. Res. A* 96A, 456-465 (2011) 和Jiang, Z, *Biomacromolecules* 11, 1089-1093 (2010) 中讨论了通过二酯与氨基取代的二醇的酶促共聚形成的生物可降解的聚(胺-共-酯)家族的合成。具有各种链长的二酯(例如,从琥珀酸酯到十二烷二酸酯)与在氮上具有烷基(甲基、乙基、正丁基、叔丁基)或芳基(苯基)取代基的二乙醇胺共聚。脂肪酶催化剂的高耐受性使得共聚反应能够一步完成,而无需氨基官能团的保护和脱保护。在微酸性条件下质子化后,这些聚(胺-共-酯)容易缩合DNA并且形成纳米尺寸的多聚复合物。筛选研究表明,这些材料之一即聚(N-甲基二亚乙基胺癸二酸酯)(PMSC)以与主要商业产品诸如Lipofectamine 2000和PEI14相当的效率转染各种细胞,包括HEK293、U87-MG和9L。PMSC先前一直用于基因递送,但是酶促合成的材料的递送效率比之前报告的任何材料高大约五个数量级(Wang等人, *Biomacromolecules* 8, 1028-1037 (2007)) (Wang等人, *Biomaterials* 28, 5358-5368 (2007))。然而,这些聚(胺-共-酯)对于体内的核酸的全身递送无效。这可能是由于以下事实:通过这些聚合物和遗传物质形成的多聚复合物(1)不具有对于体内应用来说足够的效率,和/或(2)在血液中不够稳定并且在循环期间瓦解或聚集。

[0012] 因此,仍需要适合于以高转染效率和低毒性高效地全身性体内或体外递送核酸的非病毒载体。

[0013] 还需要其中可以容易地控制和改变分子量、聚合物组成和/或端基的聚合物纳米载体。

[0014] 因此,本发明的一个目的是提供可以在体内或体外有效地递送治疗性、诊断性和/或预防性药剂(尤其是核酸)的改进聚合物,以及其制备和使用方法。

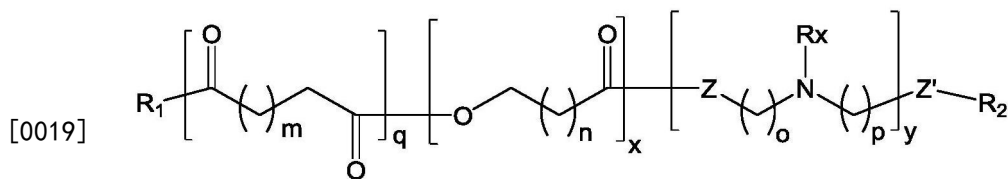
[0015] 本发明的一个目的是提供可以在体外以高效率将遗传物质有效地递送至细胞并且适合于体内递送核酸的改进聚合物,以及其制备方法。

[0016] 本发明的另一个目的是提供将改进聚合物用于在体内的核酸的肺部递送的方法。

### 发明内容

[0017] 具有改性的端基的聚(胺-共-酯)聚合物用于递送形成到由其形成的多聚复合物和粒子中的治疗性、诊断性和/或预防性药剂(尤其是基于核酸的药剂)。它们显示出核酸货物(cargo)(诸如RNA,更特别地mRNA)的改善的负载、改善的细胞转染、改善的细胞内内体释放或其组合。实施例展示了与暴露的羧基和/或羟基组合的关键分子量,以及制备方法。改性的聚合物在通过注射施用还显示出在特定组织中的优先摄取,并且在施用至肺系统时显示出高摄取水平。典型地,与其他对照转染试剂相比,组合物具有较低的毒性,在药物递送时更高效,或者表现出其组合。

[0018] 公开了具有式I的结构 of 的聚合物。



式 I

[0020] 其中n为1-30的整数,

[0021] m、o和p独立地为1-20的整数,

[0022] x、y和q独立地为1-1000的整数,

[0023]  $R_x$ 为氢、取代或未取代的烷基、或者取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的烷氧基,

[0024] Z和Z'独立地为O或NR',其中R'为氢、取代或未取代的烷基或者取代或未取代的芳基,

[0025]  $R_1$ 和 $R_2$ 为含有羟基、伯胺基、仲胺基、叔胺基或其组合的化学实体。

[0026] 在一些形式中,Z与Z'相同。

[0027] 在一些形式中,Z为O,并且Z'为O。在一些形式中,Z为NR',并且Z'为NR'。在一些形式中,Z为O,并且Z'为NR'。在一些形式中,Z为NR',并且Z'为O。

[0028] 在一些形式中,Z'为O,并且n为1-24的整数,诸如4、10、13或14。在一些形式中,Z也为O。

[0029] 在一些形式中,Z'为O,n为1-24的整数,诸如4、10、13或14,并且m为1-10的整数,诸如4、5、6、7或8。在一些形式中,Z也为O。

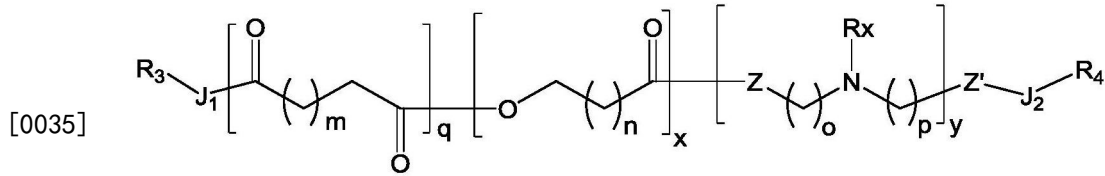
[0030] 在一些形式中,Z'为O,n为1-24的整数,诸如4、10、13或14,m为1-10的整数,诸如4、5、6、7或8,并且o和p为1-6的相同整数,诸如2、3或4。在一些形式中,Z也为O。

[0031] 在一些实施方案中,Z'为O,n为1-24的整数,诸如4、10、13或14,m为1-10的整数,诸如4、5、6、7或8,并且R为烷基,诸如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、环己基、(环己基)甲基、环丙基甲基、以及例如正戊基、正己基、正庚基和正辛基的同系物和异构体,或者芳基,诸如苯基、萘基、蒽基、菲基、蒾基、芘基、苝基、甲苯基或二甲苯基。在一些形式中,Z也为O。

[0032] 在一些形式中,  $n$  为 14 (例如, 十五内酯, PDL),  $m$  为 7 (例如, 癸二酸),  $o$  和  $p$  为 2 (例如,  $N$ -甲基二乙醇胺, MDEA)。

[0033] 在一些实施方案中, 所述多聚复合物或粒子由其中  $R_1$  和/或  $R_2$  不由以下组成或不包含以下的聚合物形成:

[0034] 在一些形式中, 聚合物具有式 II 的结构。



式 II

[0036] 其中  $J_1$  和  $J_2$  独立地为连接部分或不存在,

[0037]  $R_3$  和  $R_4$  为含有羟基、伯胺基、仲胺基、叔胺基或其组合的取代的烷基。

[0038] 在一些形式中,  $J_1$  为  $-O-$  或  $-NH-$ 。

[0039] 在一些形式中,  $J_2$  为  $-C(O)NH-$  或  $-C(O)O-$ 。

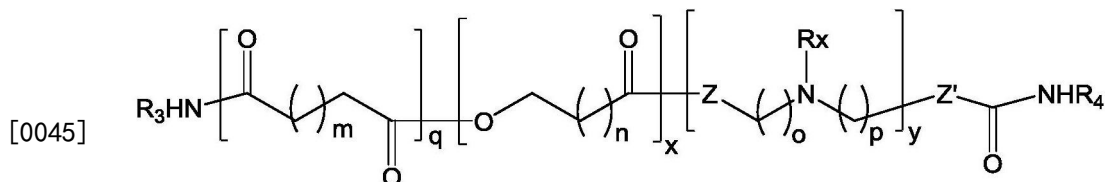
[0040] 在一些形式中,  $R_3$  与  $R_4$  相同。

[0041] 优选地,  $R_3$  和/或  $R_4$  是直链的。

[0042] 在一些形式中,  $R_3$ 、 $R_4$  或二者含有羟基。在一些形式中,  $R_3$ 、 $R_4$  或二者含有羟基和一个或多个胺基, 优选地仲胺基或叔胺基。在一些形式中,  $R_3$ 、 $R_4$  或二者含有羟基, 并且不含胺基。

[0043] 在一些形式中,  $R_3$  和  $R_4$  中的至少一者不含羟基。

[0044] 在一些形式中, 聚合物具有式 III 的结构。



式 III

[0046] 在具体实施方案中,  $x$ 、 $y$  和/或  $q$  的值使得聚合物的重均分子量大于 20,000 道尔顿, 大于 15,000 道尔顿, 大于 10,000 道尔顿, 大于 5,000 道尔顿, 大于 2,000 道尔顿。在一些形式中, 聚合物的重均分子量为约 2,000 道尔顿至约 20,000 道尔顿, 更优选地约 5,000 道尔顿至约 10,000 道尔顿。

[0047] 聚合物可以由一种或多种内酯、一种或多种胺-二醇 ( $Z$  和  $Z' = O$ ) 或三胺 ( $Z$  和  $Z' = NR'$ ) 和一种或多种二酸或二酯制备。在其中使用两种以上不同的内酯、二酸或二酯和/或三胺或胺-二醇单体的那些实施方案中,  $n$ 、 $o$ 、 $p$  和/或  $m$  的值可以相同或不同。

[0048] 在一些实施方案中, 聚合物为约 2kDa 至 20kDa, 或约 2kDa 至约 10kDa, 或约 2kDa 至约 5kDa。

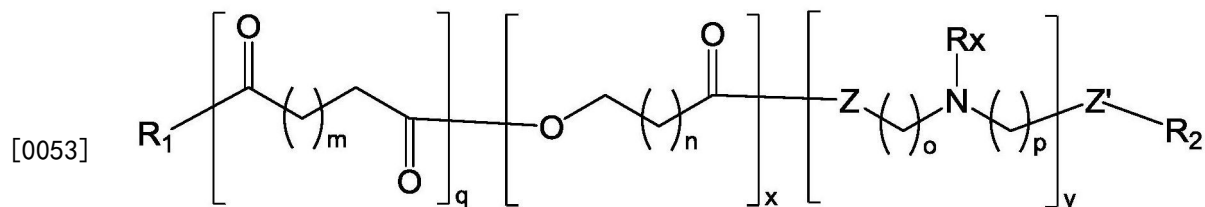
[0049] 聚合物可以用于形成具有包封于其中的一种或多种治疗性、诊断性和/或预防性药剂的微粒和/或纳米粒子。待包封和递送的药剂可以是小分子药剂 (例如, 分子量小于 2,000、1,500、1,000、750 或 500 道尔顿的非聚合物药剂), 或大分子 (例如, 低聚物或聚合物), 诸

如蛋白质、酶、肽、核酸等。粒子可以用于药剂的体内和/或体外递送。

[0050] 在一些实施方案中, 聚合物可以用于形成聚合物纳米颗粒多核苷酸载体(在本文中被称为多聚复合物), 其有效地在体外和体内将多核苷酸递送至细胞。

[0051] 已经开发出了具有改善的用于递送(包括向肺递送)的特性的聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)。

[0052] 聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)含有以下结构,



式 I

[0054] 其中n为1-30的整数,

[0055] m、o和p独立地为1-20的整数,

[0056] x、y和q独立地为1-1000的整数,

[0057]  $R_x$ 为氢、取代或未取代的烷基、或者取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的烷氧基,

[0058] Z和Z' 独立地为O或NR', 其中R' 为氢、取代或未取代的烷基或者取代或未取代的芳基,

[0059]  $R_1$ 和 $R_2$ 为含有羟基、伯胺基、仲胺基、叔胺基或其组合的化学实体。

[0060] 在一些形式中,Z与Z' 相同。

[0061] 在一些形式中,Z为O, 并且Z' 为O。在一些形式中,Z为NR', 并且Z' 为NR'。在一些形式中,Z为O, 并且Z' 为NR'。在一些形式中,Z为NR', 并且Z' 为O。

[0062] 在一些形式中,Z' 为O, 并且n为1-24的整数, 诸如4、10、13或14。在一些形式中,Z也为O。

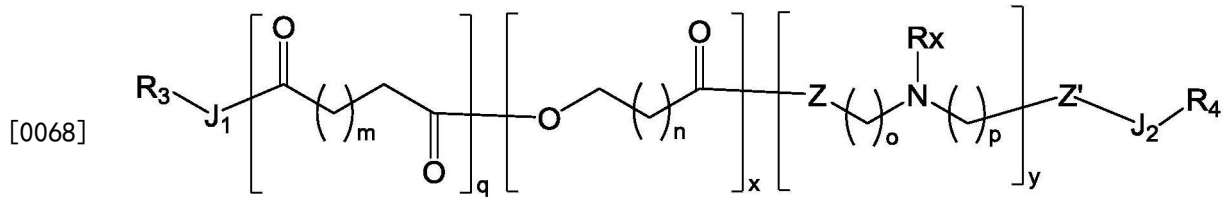
[0063] 在一些形式中,Z' 为O, n为1-24的整数, 诸如4、10、13或14, 并且m为1-10的整数, 诸如4、5、6、7或8。在一些形式中,Z也为O。

[0064] 在一些形式中,Z' 为O, n为1-24的整数, 诸如4、10、13或14, m为1-10的整数, 诸如4、5、6、7或8, 并且o和p为1-6的相同整数, 诸如2、3或4。在一些形式中,Z也为O。

[0065] 在一些实施方案中,Z' 为O, n为1-24的整数, 诸如4、10、13或14, m为1-10的整数, 诸如4、5、6、7或8, 并且R为烷基, 诸如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、环己基、(环己基)甲基、环丙基甲基、以及例如正戊基、正己基、正庚基和正辛基的同系物和异构体, 或者芳基, 诸如苯基、萘基、蒽基、菲基、蒾基、芘基、苊基、甲苯基或二甲苯基。在一些形式中,Z也为O。

[0066] 在一些形式中, n为14(例如, 十五内酯, PDL), m为7(例如, 癸二酸), o和p为2(例如, N-甲基二乙醇胺, MDEA)。

[0067] 在一些形式中, 聚合物含有式II的结构:



式 II

[0069] 其中 $R_x$ 、 $Z$ 、 $Z'$ 、 $m$ 、 $n$ 、 $o$ 、 $p$ 、 $q$ 、 $x$ 和 $y$ 如以上关于式I所述，

[0070]  $J_1$ 和 $J_2$ 独立地不存在或为连接部分，诸如 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-O-$ 和 $-NH-$ ，

[0071] 式II中的 $R_3$ 和 $R_4$ 独立地为含有羟基、伯胺基、仲胺基、叔胺基或其组合的取代的烷基。

[0072] 在一些形式中， $J_1$ 为 $-O-$ 或 $-NH-$ 。

[0073] 在一些形式中， $J_2$ 为 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 或 $-C(O)O-$ 。

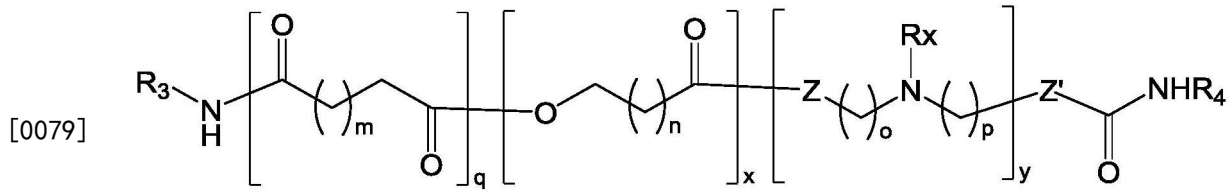
[0074] 在一些形式中， $R_3$ 与 $R_4$ 相同。

[0075] 优选地， $R_3$ 和/或 $R_4$ 是直链的。

[0076] 在一些形式中， $R_3$ 、 $R_4$ 或二者含有羟基。在一些形式中， $R_3$ 、 $R_4$ 或二者含有羟基和一个或多个胺基，优选地仲胺基或叔胺基。在一些形式中， $R_3$ 、 $R_4$ 或二者含有羟基，并且不含胺基。

[0077] 在一些形式中， $R_3$ 和 $R_4$ 中的至少一者不含羟基。

[0078] 在一些形式中，聚合物含有式III的结构：



式 III

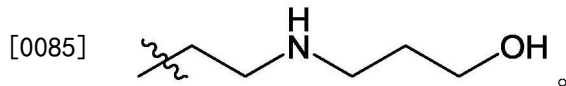
[0080] 其中 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_x$ 、 $Z$ 、 $Z'$ 、 $m$ 、 $n$ 、 $o$ 、 $p$ 、 $q$ 、 $x$ 和 $y$ 如以上关于式II所述。

[0081] 在具体实施方案中， $x$ 、 $y$ 和/或 $q$ 的值使得聚合物的重均分子量大于20,000道尔顿，大于15,000道尔顿，大于10,000道尔顿，大于5,000道尔顿，大于2,000道尔顿。在一些形式中，聚合物的重均分子量为约2,000道尔顿至约20,000道尔顿，更优选地约5,000道尔顿至约10,000道尔顿。

[0082] 聚合物可以由一种或多种内酯、一种或多种胺-二醇( $Z$ 和 $Z' = O$ )或三胺( $Z$ 和 $Z' = NR'$ )和一种或多种二酸或二酯制备。在其中使用两种以上不同的内酯、二酸或二酯和/或三胺或胺-二醇单体的那些实施方案中， $n$ 、 $o$ 、 $p$ 和/或 $m$ 的值可以相同或不同。

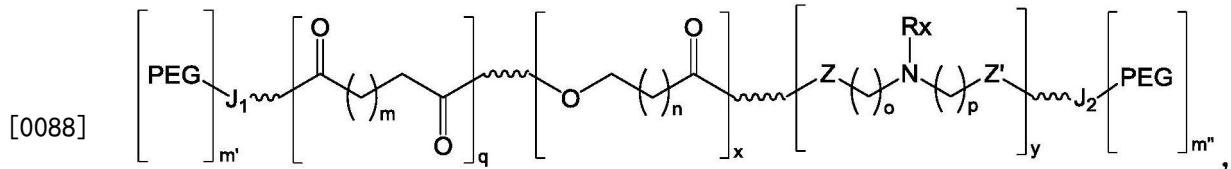
[0083] 在一些实施方案中，聚合物为约2kDa至20kDa，或约2kDa至约10kDa，或约2kDa至约5kDa。

[0084] 聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)可以用于形成具有包封于其中的一种或多种信使核糖核酸的多聚复合物、微粒和/或纳米粒子。在一些形式中，多聚复合物或粒子由其中 $R_1$ 和/或 $R_2$ 不由以下组成或不包含以下的聚合物形成：



[0086] 在一些形式中,聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)为含有与聚乙二醇(PEG)缀合的聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)即PEG缀合的聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)的混合物的形式。

[0087] 在一些形式中,PEG缀合的聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)含有以下结构:



式 XI

[0089] 其中 $m'$ 和 $m''$ 独立地为0或1,条件是 $m'+m''$ 为1或2,

[0090] 式XI中的 $J_1$ 和 $J_2$ 独立地不存在或为连接部分,诸如-C(O)-、-C(O)NH-、-C(O)O-、-O-和-NH-。

[0091] 在式XI的一些形式中, $J_1$ 为-O-或-NH-。在式XI的一些形式中, $J_2$ 为-C(O)-、-C(O)NH-或-C(O)O-。

[0092] 递送可以通过对聚合物的选择、将聚合物与亲水性聚合物诸如聚亚烷基二醇混合或缀合、控制端基及其混合、以及分子量来进行优化。

[0093] 实施例展示了递送的增强,以及在直接施用至细胞之后、在全身施用(诸如通过注射)或施用到肺中(肺部递送)之后的高转染水平。在肺部施用之后,具有限定分子量的与PEG混合或缀合的PACE产生在肺细胞中具有高转染水平而在其他组织中几乎没有转染的含有mRNA的多聚复合物。

## 附图说明

[0094] 图1示出了可以并入到式I中的 $R_3$ 和 $R_4$ 基团。

[0095] 图2是示出通过实施例2中举例说明的方法合成的MW为5kDa或10kDa的PACE-COOH和PACE-MAE的转染效率的柱状图。统计显著性通过学生t检验(Student's t-test)来确定(表示如下:\*, $P<0.05$ ;\*\*\*, $P<0.001$ )。

[0096] 图3A是示出使用具有10% PDL含量、分子量为2kDa、5kDa、10kDa和20kDa的典型PACE的MW的影响(平均LUC/mg蛋白质)的柱状图。

[0097] 图3B是示出使用10kDa典型PACE聚合物的PDL含量的影响(平均LUC/mg蛋白质)的柱状图。图3C是示出MW为5kDa的酸性PACE和典型PACE在10% PDL含量下的转染效率(平均LUC/mg蛋白质)的柱状图。结果表示为重复进行的三次独立实验的平均值 $\pm$ SD。

[0098] 图4是示出aPACE聚合物(5kDa-下部线;10kDa-中部线;20kDa-上部线)的重均MW(Da)在驱动(actuation)过程(以天计的驱动时间)期间的演变的线形图。

[0099] 图5A是示出根据驱动时间(天)的萤光素酶mRNA转染效率(平均LUC/mg蛋白质)的线形图,其展示了各MW的优选驱动时间(线表示为:20kDa-在0天的下部数据点;10kDa,在0天的中部数据点;5kDa-在0天的上部数据点)。图5B是示出使用不同初始MW的未驱动(non-

actuated) PACE和驱动PACE在其优选驱动时间(对于5kDa聚合物为5天,对于10kDa聚合物为10天,以及对于20kDa聚合物为30天,  $**p < 0.005$ )的转染效率(平均LUC/mg蛋白质)的柱状图。图5C是示出与mRNA:TransIT复合物(下部线)相比的mRNA:aPACE多聚复合物(5kDa 5D, 10kDa 10D, 20kDa 30D(上部线的群组))的细胞毒性特性(profile)(细胞存活率(%))的线形图。图5D是使用不同驱动温度( $**p < 0.005$ )的aPACE的转染效率(平均LUC/mg蛋白质)的柱状图。所有结果都表示为重复进行的三次独立实验的平均值 $\pm$ SD。

[0100] 图6A是示出在使用TransIT、5kDa的未驱动PACE、驱动5天的5kDa aPACE、10kDa的未驱动PACE或驱动10天的10kDa aPACE的mRNA(总计20mg)的IV施用之后6小时的EPO血液浓度的柱状图。结果表示为N=3个动物( $****p < 0.0001$ )的平均值 $\pm$ SD。图6B是示出在使用载体(下部线)、TransIT(中部线)、驱动10天的10kDa aPACE(上部线)的mRNA(总计20mg)的IV施用之后的EPO产生的时间进程的线形图。结果表示为N=3个动物( $***p < 0.001$ 且 $*p < 0.05$ )的平均值 $\pm$ SD。图6C-6F是示出在乙酸盐缓冲剂、游离mRNA或mRNA:aPACE多聚复合物的IV施用之后24小时和7天的血液化学(AST(图6C)、ALT(图6D)、尿素(图6E)、肌酸酐(图6F))分析的柱状图。结果表示为N=3个动物的平均值 $\pm$ SEM。

[0101] 图7是示出PACE端基(#对应于实施例5中指定的端基)对到多聚复合物上的mRNA负载的影响的柱状图。

[0102] 图8A是产生图8B-8D所示的结果的机理的示意图。图8B是示出PACE端基(#对应于表1中指定的端基)对多聚复合物的细胞摄取的影响的柱状图。图8C是示出PACE端基(#对应于表1中指定的端基)对内体逃逸的影响的柱状图。图8D是示出PACE端基(#对应于表1中指定的端基)对转染效率的影响的柱状图。

[0103] 图9A-9C是示出转染效率(表示为fluc活性)和不同转染步骤(包括mRNA负载(图9A)、摄取(图9B)和内体逃逸(图9C))的线性相关性的图。

[0104] 图10A-10B是证明了mRNA多聚复合物的体外翻译速率与转染效率不相关的图。含有mRNA、ddRLuc-Fc和PACE的多聚复合物被细胞内吞,然后编码荧光素酶基因的mRNA被释放并且翻译。图10A是荧光素酶有效期(expires)的量(对数)相对于翻译速率(AU)的图。图10B是翻译速率(AU)相对于包封效率的图。

[0105] 图11是表1中的聚合物2、4、14、15、16、17、20、25、27和31在4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8和6.0的pH下的转染效率(百分比)的图。结果展示了具有不同端基的PACE多聚复合物的最佳乙酸钠缓冲剂pH。

[0106] 图12A是PEG对多聚复合物的尺寸的影响的图,其将无PEG(与随着时间没有尺寸变化相比,显示出随着时间(分钟)的聚集)与0.25%PACE-PEG或1% PACE-PEG进行比较。图12B是作为PACE-PEG含量(%) (0、0.05、0.1、0.25、0.50和1)的函数的表1中的聚合物14、15、16、17、25、27和31的转染效率(%)的图。图12C是相同PACE-PEG混合物的EGFP表达的图,示出了PEG提高EGFP表达。

[0107] 图13A是0%、0.01%、0.1%、1%或10%的DSPE-PEG对尺寸(nm)和分散性的影响的图。图13B是DSPE-PEG含量对表1中的聚合物14、15、16、17、25、27和31的转染效率(%)的影响的图。图13C是DSPE-PEG浓度(0、0.05、0.10、0.25、0.50、1.0、2.5和5%)对EGFP表达的影响的图。

[0108] 图14A和14B是来自IVIS图像的数据的图,其示出了在I.P.注射(图12A)之后和在

I.V.注射(图12B)之后6小时通过生物发光分布测量的心脏、肺、肝、肾、脾、肠的多聚复合物的生物分布。

[0109] 图15是在肺部施用之后通过生物发光分布测量的多聚复合物的生物分布的图。

## 具体实施方式

[0110] I. 定义

[0111] 如本文中使用的术语“多聚复合物”是指典型地具有包封于其中、分散在其中和/或与其表面缔合的一种或多种多核苷酸的聚合物微粒和/或纳米粒子或胶束。

[0112] 术语粒子包括微球、微胶囊、微粒、纳米球体、纳米胶囊和纳米粒子。术语“微粒”包括微球和微胶囊,其全都具有平均小于约1000微米的尺寸。微粒可以是球形或非球形的,并且可以具有任何规则或不规则的形状。如果结构的直径小于约一微米(1000nm),则可以采用相应的本领域公认的术语“纳米球体”、“纳米胶囊”和“纳米粒子”。在一些实施方案中,纳米球体、纳米胶囊和纳米粒子的群体具有约500nm、200nm、100nm、50nm、10nm或1nm的平均直径。在一些实施方案中,粒子的平均直径为约200nm至约600nm,优选地约200至约500nm。术语“直径”在本文中用于指代物理直径或流体力学直径。大致球形的粒子的直径可以是指物理直径或流体力学直径。非球形粒子的直径可以优先是指流体力学直径。如本文中使用的,非球形粒子的直径可以是指粒子表面上的两点之间的最大直线距离。当涉及多个粒子时,粒子的直径典型地是指粒子的平均直径。粒子直径可以使用本领域中的各种技术测量,包括但不限于动态光散射。

[0113] 如本文中通常使用的,“药用”是指这样的那些化合物、材料、组合物和/或剂型,其在合理的医学判断范围内适合用于与人类和动物的组织、器官和/或体液接触,而没有过度的毒性、刺激性、变态反应或与合理的收益/风险比相称的其他问题或并发症。

[0114] 如本文中使用的术语“生物相容的”是指本身对宿主(例如,动物或人)没有毒性、也不在宿主中以产生有毒浓度的单体或低聚的亚基或其他副产物的速率降解(如果材料降解的话)的一种或多种材料。

[0115] 如本文中使用的术语“生物可降解的”意指材料降解或分解成其组分亚基,或者材料例如通过生物化学过程消化成更小的(例如,非聚合物的)亚基。

[0116] 如本文中使用的“缓释”是指与其中使物质的全部量一次可生物利用的推注(bolus)型施用相比,物质在延长的时间段内释放。

[0117] 短语“肠胃外施用”和“肠胃外地施用”是本领域公认的术语,并且包括除了肠内施用和局部施用以外的其他施用模式,诸如注射,并且包括但不限于:静脉内、肌内、胸膜内、血管内、心包内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内的注射和输注。

[0118] 如本文中使用的术语“表面活性剂”是指降低液体的表面张力的试剂。

[0119] 如本文中使用的,“瞬时”是指指数小时、数日或数周的时间段的非整合转基因的表达,其中表达的时间段小于在整合到基因组中或包含在宿主细胞中的稳定质粒复制子内的情况下的基因的表达的时间段。

[0120] 如本文中使用的,“启动子位点”是RNA聚合酶(诸如最初从噬菌体分离的DNA依赖性RNA聚合酶(Davanloo等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:2035-39(1984)所描述的),或

来源于其他来源)以高特异性与其结合的核苷酸序列,如Chamberlin等人,Nature,228:227-231(1970)所述。

[0121] 如本文中使用的,“聚(A)”是通过多腺苷酸化与mRNA相连的一系列腺苷。在用于瞬时表达的构建体的优选实施方案中,聚A为50至5000,优选地大于64,更优选地大于100,最优选地大于300或400。可以将聚(A)序列化学改性或酶促改性以调节mRNA功能,诸如翻译的定位(localization)、稳定性或效率。

[0122] 如本文中使用的,“开放阅读框”或“ORF”是含有可能编码多肽或蛋白质的碱基序列的一系列核苷酸。开放阅读框位于起始编码序列(起始密码或起始密码子)和终止密码子序列(终止密码子)之间。

[0123] 术语“构建体”是指具有一个或多个分离的多核苷酸序列的重组遗传分子。

[0124] 术语“表达控制序列”是指控制和调节另一个核酸序列的转录和/或翻译的核酸序列。例如,适合于原核生物的控制序列包括启动子、任选的操纵序列、核糖体结合位点等。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号和增强子。

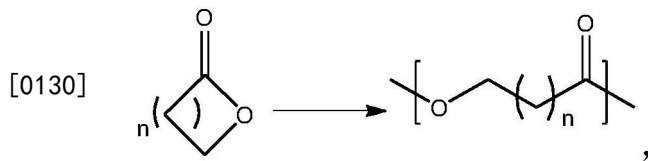
[0125] 术语“基因”是指通过其模板或信使RNA编码特征为特定的肽、多肽或蛋白质的氨基酸序列的DNA序列。术语“基因”还指编码RNA产物的DNA序列。如本文中关于基因组DNA使用的术语基因包括介于中间的非编码区以及调节区,并且可以包括5'端和3'端。

[0126] 术语多肽包括蛋白质及其片段。多肽可以是“外源性的”,这意味着它们是“异源性的”,即对于正在使用的宿主细胞来说是外来的,诸如由细菌细胞产生的人多肽。多肽含有氨基酸。氨基酸序列以从氨基末端到羧基末端的方向从左到右书写,并且用如下所示的三字母或单字母代码命名:丙氨酸(Ala,A),精氨酸(Arg,R),天冬酰胺(Asn,N),天冬氨酸(Asp,D),半胱氨酸(Cys,C),谷氨酰胺(Gln,Q),谷氨酸(Glu,E),甘氨酸(Gly,G),组氨酸(His,H),异亮氨酸(Ile,I),亮氨酸(Leu,L),赖氨酸(Lys,K),甲硫氨酸(Met,M),苯丙氨酸(Phe,F),脯氨酸(Pro,P),丝氨酸(Ser,S),苏氨酸(Thr,T),色氨酸(Trp,W),酪氨酸(Tyr,Y)和缬氨酸(Val,V)。

[0127] “变体”是指与参照多肽或多核苷酸不同但是保留基本性质的多肽或多核苷酸。多肽的一种典型变体在氨基酸序列方面与另一种参照多肽不同。通常,差异是有限的,使得参照多肽和变体的序列总体上非常相似,并且在许多区域中相同。变体和参照多肽可以在氨基酸序列方面相差一个或多个改性(例如,置换、添加和/或缺失)。置换的或插入的氨基酸残基可以是或可以不是由遗传密码编码的氨基酸残基。多肽的变体可以天然存在,诸如等位基因变体,或者其可以是已知非天然存在的变体。

[0128] 可以在多肽的结构中进行改性和改变,其不显著改变多肽的特性(例如,保守氨基酸置换)。例如,序列中的特定氨基酸可以置换为其他氨基酸而没有明显的活性损失。因为正是多肽的相互作用能力和性质限定了该多肽的生物功能活性,所以在多肽序列中可以进行特定氨基酸序列置换,但仍获得具有类似性质的多肽。在进行这样的改变时,可以考虑氨基酸的亲水指数。本领域中一般理解亲水氨基酸指数在对多肽赋予相互作用生物学功能方面的重要性。已知特定氨基酸可以被置换为具有类似亲水指数或分数的其他氨基酸,并且仍得到具有类似生物活性的多肽。类似氨基酸的置换也可以基于亲水性进行,特别是在旨在免疫学实施方案中使用由此产生的生物学功能等同的多肽或肽的情况下。氨基酸置换通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如,其疏水性、亲水性、电荷和尺寸。

[0129] 术语“内酯”和“内酯单元”用来描述包括环酯或由环酯中的酯键的断裂产生的开链化学结构的化合物。例如,内酯用来描述以下所示的环酯,并且相应的来源于内酯的开链结构:



[0131]  $n$ 为整数。开链结构通过本领域中已知的方法形成,包括但不限于溶剂解(诸如水解)和酶促断裂。

[0132] 术语“烷基”是指饱和脂族基团的原子团(radical),包括直链烷基、支链烷基、环烷基(脂环基)、烷基取代的环烷基和环烷基取代的烷基。

[0133] 在优选实施方案中,直链或支链烷基在其主链中具有30个以下的碳原子(例如,对于直链为 $C_1-C_{30}$ ,对于支链为 $C_3-C_{30}$ ),优选地20个以下,更优选地15个以下,最优选地10个以下。对于直链或支链烷基,1至30的主链碳原子数的所有整数值都被考虑并且公开。同样,优选的环烷基在其环结构中具有3-10个碳原子,并且更优选地在环结构中具有5、6或7个碳。对于环烷基,3至10的环碳原子数的所有整数值都被考虑并且公开。

[0134] 如在整个说明书、实施例和权利要求书中使用的术语“烷基”(或“低级烷基”)旨在包括“未取代的烷基”和“取代的烷基”二者,其中的后者是指具有取代在烃主链的一个或多个碳上的氢原子的一个或多个取代基的烷基部分。这样的取代基包括但不限于:卤素、羟基、羰基(诸如羧基、烷氧基羰基、甲酰基或酰基)、硫代羰基(诸如硫酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯)、烷氧基、磷酰基、磷酸酯、膦酸酯、亚膦酸酯、氨基、酰胺基、脒、亚胺、氰基、硝基、叠氮基、巯基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰基、磺酰胺基、磺酰基、杂环基、芳烷基或者芳族或杂芳族部分。

[0135] 除非另外指明碳数,否则如本文中使用的“低级烷基”意指如以上所定义但是在其主链结构中具有一至十个碳、更优选地一至六个碳原子的烷基。同样,“低级烯基”和“低级炔基”具有类似的链长。在整个申请中,优选的烷基是低级烷基。在优选实施方案中,在本文中称为烷基的取代基是低级烷基。

[0136] 本领域技术人员将会理解,在适当的情况下,在烃链上取代的部分本身可以被取代。例如,取代的烷基的取代基可以包括卤素、羟基、硝基、硫醇、氨基、叠氮基、亚氨基、酰胺基、磷酰基(包括膦酸酯和亚膦酸酯)、磺酰基(包括硫酸酯、磺酰胺基、氨磺酰基和磺酸酯)和甲硅烷基,以及醚、烷硫基、羰基(包括酮、醛、羧酸酯和酯)、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 等。环烷基可以以相同的方式被取代。

[0137] 如本文中使用的,“芳基”是指 $C_5-C_{10}$ 元芳族、杂环、稠合芳族、稠合杂环、联芳族或联杂环的环体系。在一些形式中,环体系具有3-50个碳原子。如本文中使用的,广义定义的“芳基”包括可以包含零至四个杂原子的5元、6元、7元、8元、9元、10元和24元单环芳族基团,例如,苯、萘、蒽、菲、蒽、芘、心环烯(corannulene)、蒽、吡咯、咪唑、噻吩、咪唑、噻唑、三唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪和嘧啶等。在环结构中具有杂原子的那些芳基基团也可以被称为“芳基杂环”或“杂芳族”。芳族环可以在一个或多个环位置处被一个或多个取代基取代,所述取代基包括但不限于:卤素、叠氮化物、烷基、芳烷基、烯基、炔基、环烷基、羟基、烷氧

基、氨基(或季铵化的氨基)、硝基、巯基、亚氨基、酰胺基、膦酸酯、亚膦酸酯、羰基、羧基、甲基硅烷基、醚、烷硫基、磺酰基、磺酰胺基、酮、醛、酯、杂环基、芳族或杂芳族部分、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CN}$ ;以及它们的组合。

[0138] 术语“芳基”还包括具有两个以上环状环的多环体系,其中两个邻接的环共有两个以上的碳(即“稠环”),其中环中的至少一个是芳族的,例如,一个或多个其他环状环可以是环烷基、环烯基、环炔基、芳基和/或杂环。杂环环的实例包括但不限于:苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并硫代呋喃基、苯并噻吩基、苯并噁唑基、苯并噁唑啉基、苯并噻唑基、苯并三唑基、苯并四唑基、苯并异噁唑基、苯并异噻唑基、苯并咪唑啉基、咪唑基、4aH咪唑基、咪唑基、色烷基、色烯基、噌啉基、十氢喹啉基、2H,6H-1,5,2-二噻嗪基、二氢呋喃并[2,3-b]四氢呋喃、呋喃基、呋咱基(furazanyl)、咪唑烷基、咪唑啉基、咪唑基、1H-吡唑基、吡咯烯基(indolenyl)、吡咯啉基、吡嗪基、吡啶基、3H-吡啶基、靛红酰基(isatinoyl)、异苯并呋喃基、异色烷基、异吡唑基、异吡啶基、异吡啶基、异喹啉基、异噻唑基、异噁唑基、亚甲基二氧基苯基、吗啉基、萘啶基、八氢异喹啉基、噁二唑基、1,2,3-噁二唑基、1,2,4-噁二唑基、1,2,5-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、噁唑烷基、噁唑基、吡啶酮基、嘧啶基、菲啶基、菲咯琳基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噁噻基、吩噁嗪基、酞嗪基、哌嗪基、哌啶基、哌啶酮基、4-哌啶酮基、胡椒基(piperonyl)、喋啶基、嘌呤基、吡喃基、吡嗪基、吡唑烷基、吡唑啉基、吡唑基、哒嗪基、吡啶并噁唑、吡啶并咪唑、吡啶并噻唑、吡啶基(pyridinyl)、吡啶基(pyridyl)、嘧啶基、吡咯烷基、吡咯啉基、2H-吡咯基、吡咯基、喹啉基、喹啉基、4H-喹啉基、喹啉基、奎宁环基、四氢呋喃基、四氢异喹啉基、四氢喹啉基、四唑基、6H-1,2,5-噻二嗪基、1,2,3-噻二唑基、1,2,4-噻二唑基、1,2,5-噻二唑基、1,3,4-噻二唑基、噻葱基、噻唑基、噻吩基、噻吩并噻唑基、噻吩并噁唑基、噻吩并咪唑基、苯硫基和咕吨基。环中的一个或多个可以如以上关于“芳基”所定义的被取代。

[0139] “烷氧基”是指通过氧桥连接的如以上定义的具有指定碳原子数的烷基。烷氧基的实例包括但不限于:甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、正戊氧基、仲戊氧基及其衍生物。

[0140] 在氮中的三个氢原子中的一个被取代或未取代的烷基或者取代或未取代的芳基替代时产生伯胺。仲胺具有与一个氮一起与氮结合的两个有机取代基(取代或未取代的烷基、取代或未取代的芳基或者它们的组合)。在叔胺中,氮具有三个有机取代基。

[0141] 如本文中使用的,“取代的”意指单体上的一个或多个原子或原子团已经被与正被替代的原子或原子团不同的一个或多个原子或原子团替代。在一些实施方案中,单体上的一个或多个氢被一个或多个原子或原子团替代。可以替代氢的官能团的实例在以上定义中列出。在一些实施方案中,可以添加一个或多个官能团,其改变所得单体/聚合物的化学和/或物理性质,诸如电荷或亲水性/疏水性等。示例性的取代基包括但不限于:卤素、羟基、羰基(诸如羧基、烷氧基羰基、甲酰基或酰基)、硫代羰基(诸如硫酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯)、烷氧基、磷酰基、磷酸酯、膦酸酯、亚膦酸酯、氨基、酰胺基、脘、亚胺、氰基、硝基、叠氮基、巯基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰基、磺酰胺基、磺酰基、硝基、杂环基、芳烷基或者芳族或杂芳族部分。

[0142] II. 聚合物

[0143] 包括聚(胺-共-酯)、聚(胺-共-酰胺)或其组合的聚合物,以及由其形成的多聚复

合物和固体芯粒子。WO 2013/082529、WO 2017/151623、WO 2017/197128、美国公开申请号2016/0251477、美国公开申请号2015/0073041和美国专利号9,272,043中讨论了聚(胺-共-酯)。

[0144] 当用于递送基因材料时,聚合物的转染效率强烈依赖于聚合物上的端基。当用二酸诸如癸二酸取代聚合物中的二酯单体时,可以获得具有羟基端基和羧基端基的混合的聚合物。这两种端基都可以用1,1'-羰基二咪唑活化。活化的产物可以与含胺分子反应以生成具有新端基的聚合物。

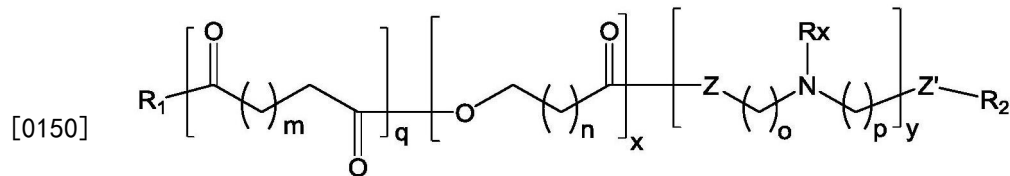
[0145] 可以将聚合物进一步水解以释放更多活性端基,诸如-OH和-COOH,二者均可以来源于聚合物中的酯键的水解(在本文中也称为“驱动”),这典型地通过将聚合物例如在控制温度(例如,37°C或100°C)温育数日或数周来进行。在一些实施方案中,聚合物不被水解,因此可以被称为“未驱动的”。

[0146] 在一些实施方案中,聚合物中的疏水性单体的含量相对于用于形成多聚复合物时的相同疏水性单体的含量提高。提高聚合物中的疏水性单体的含量形成可以在核酸(包括RNA)的存在下形成固体芯纳米粒子的聚合物。

[0147] 与多聚复合物不同,这些粒子在缓冲水或血清中的温育期间或者在施用(例如,注射)到动物中后长期稳定。它们还提供核酸(例如,sirRNA)的缓释,这导致长期活性(例如,sirRNA介导的敲落(sirRNA mediate-knockdown))。

[0148] A. 聚合物结构

[0149] 聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)具有如式I所示的结构:



式 I

[0151] 其中n为1-30的整数,

[0152] m、o和p独立地为1-20的整数,

[0153] x、y和q独立地为1-1000的整数,

[0154]  $R_x$ 为氢、取代或未取代的烷基、或者取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的烷氧基,

[0155] Z和Z'独立地为0或NR',其中R'为氢、取代或未取代的烷基或者取代或未取代的芳基,

[0156]  $R_1$ 和 $R_2$ 为含有羟基、伯胺基、仲胺基、叔胺基或其组合的化学实体。

[0157]  $R_x$ 和R'基团的实例包括但不限于:氢、甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、环己基、(环己基)甲基、环丙基甲基、以及例如正戊基、正己基、正庚基、正辛基的同系物和异构体、苯基、萘基、蒽基、菲基、蒾基、芘基、甲苯基、二甲苯基等。

[0158] 在具体实施方案中,x、y和/或q的值使得聚合物的重均分子量大于20,000道尔顿,大于15,000道尔顿,大于10,000道尔顿,大于5,000道尔顿,大于2,000道尔顿。在一些形式中,聚合物的重均分子量为约2,000道尔顿至约20,000道尔顿,更优选地约5,000道尔顿至

约10,000道尔顿。

[0159] 聚合物可以由一种或多种内酯、一种或多种胺-二醇 ( $Z$ 和 $Z' = 0$ )、三胺 ( $Z$ 和 $Z' = NR'$ )、或羟基-二胺 ( $Z=0$ 且 $Z' = NR'$ , 或 $Z=NR'$ 且 $Z' = 0$ ) 和一种或多种二酸或二酯制备。在其中使用两种以上不同的内酯、二酸或二酯和/或三胺、胺-二醇或羟基-二胺单体的那些实施方案中,  $n$ 、 $o$ 、 $p$ 和/或 $m$ 的值可以相同或不同。

[0160] 在一些形式中, 内酯单元的组成百分比为约10%至约100% (计算的内酯单元相对于(内酯单元+二酯/二酸))。按摩尔比表示, 内酯单元相对于(内酯单元+二酯/二酸)的含量为约0.1至约1, 即 $x/(x+q)$ 为约0.1至约1。优选地, 内酯单元中的碳原子数为约10至约24, 更优选地内酯单元中的碳原子数为约12至约16。最优选地, 内酯单元中的碳原子数为12(十二内酯)、15(十五内酯)或16(十六内酯)。在一些形式中,  $Z$ 与 $Z'$ 相同。

[0161] 在一些形式中,  $Z$ 为0, 并且 $Z'$ 为0。在一些形式中,  $Z$ 为 $NR'$ , 并且 $Z'$ 为 $NR'$ 。在一些形式中,  $Z$ 为0, 并且 $Z'$ 为 $NR'$ 。在一些形式中,  $Z$ 为 $NR'$ , 并且 $Z'$ 为0。

[0162] 在一些形式中,  $Z'$ 为0, 并且 $n$ 为1-24的整数, 诸如4、10、13或14。在一些形式中,  $Z$ 也为0。

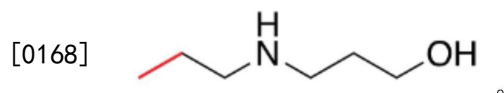
[0163] 在一些形式中,  $Z'$ 为0,  $n$ 为1-24的整数, 诸如4、10、13或14, 并且 $m$ 为1-10的整数, 诸如4、5、6、7或8。在一些形式中,  $Z$ 也为0。

[0164] 在一些形式中,  $Z'$ 为0,  $n$ 为1-24的整数, 诸如4、10、13或14,  $m$ 为1-10的整数, 诸如4、5、6、7或8, 并且 $o$ 和 $p$ 为1-6的相同整数, 诸如2、3或4。在一些形式中,  $Z$ 也为0。

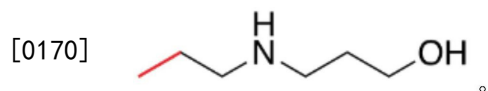
[0165] 在一些实施方案中,  $Z'$ 为0,  $n$ 为1-24的整数, 诸如4、10、13或14,  $m$ 为1-10的整数, 诸如4、5、6、7或8, 并且 $R$ 为烷基, 诸如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、环己基、(环己基)甲基、环丙基甲基、以及例如正戊基、正己基、正庚基和正辛基的同系物和异构体, 或者芳基, 诸如苯基、萘基、蒎基、菲基、蒽基、茚基、茚基、甲苯基或二甲苯基。在一些形式中,  $Z$ 也为0。

[0166] 在一些形式中,  $n$ 为14 (例如, 十五内酯, PDL),  $m$ 为7 (例如, 癸二酸),  $o$ 和 $p$ 为2 (例如, N-甲基二乙醇胺, MDEA)。

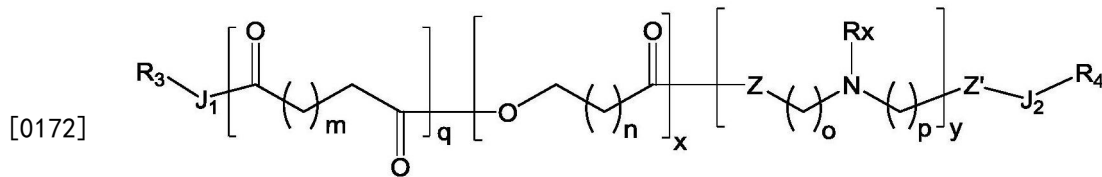
[0167] 在一些实施方案中, 相对于其中 $R_1$ 和/或 $R_2$ 由以下组成或包含以下的相应多聚复合物, 多聚复合物或粒子由其中 $R_1$ 和/或 $R_2$ 不由以下组成或不包含以下的聚合物形成:



[0169] 在一些实施方案中, 相对于其中 $R_1$ 和/或 $R_2$ 由以下组成或包含以下的相应多聚复合物, 由所述聚合物形成的多聚复合物或粒子显示出核酸货物 (诸如RNA, 更特别地mRNA) 的改善的负载、改善的细胞转染、改善的细胞内内体释放或其组合。



[0171] 在一些形式中, 聚合物具有式II的结构。



式 II

[0173] 其中 $J_1$ 和 $J_2$ 独立地为连接部分或不存在,

[0174]  $R_3$ 和 $R_4$ 独立地为含有羟基、伯胺基、仲胺基、叔胺基或其组合的取代的烷基。在一些形式中, $R_3$ 、 $R_4$ 或二者的分子量为500道尔顿以下、200道尔顿以下或100道尔顿以下。

[0175] 在一些形式中, $J_1$ 为-O-或-NH-。

[0176] 在一些形式中, $J_2$ 为-C(O)NH-或-C(O)O-。

[0177] 在一些形式中, $R_3$ 与 $R_4$ 相同。

[0178] 优选地, $R_3$ 和/或 $R_4$ 是直链的。

[0179] 在一些形式中, $R_3$ 、 $R_4$ 或二者含有伯胺基。在一些形式中, $R_3$ 、 $R_4$ 或二者含有伯胺基和一个或多个仲胺基或叔胺基。

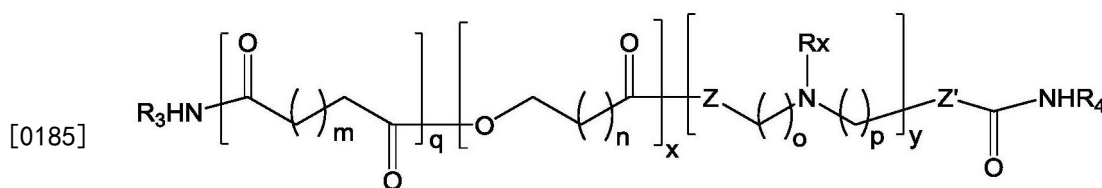
[0180] 在一些形式中, $R_3$ 、 $R_4$ 或二者含有羟基。在一些形式中, $R_3$ 、 $R_4$ 或二者含有羟基和一个或多个胺基,优选地仲胺基或叔胺基。在一些形式中, $R_3$ 、 $R_4$ 或二者含有羟基,并且不含胺基。

[0181] 在一些形式中, $R_3$ 和 $R_4$ 中的至少一者不含羟基。

[0182] 在一些形式中, $R_3$ 、 $R_4$ 或二者为-未取代的 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-Aq-未取代的 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-Bq、-未取代的 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-Aq-取代的 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-Bq、-取代的 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-Aq-未取代的 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-Bq或-取代的 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-Aq-取代的 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-Bq,其中Aq不存在或为-NR<sub>5</sub>-,并且Bq为羟基、伯胺、仲胺或叔胺,其中R<sub>5</sub>为氢、取代或未取代的烷基或者取代或未取代的芳基。

[0183] 在一些形式中, $R_3$ 、 $R_4$ 或二者选自图1中示出的基团。

[0184] 在一些形式中,聚合物具有式III的结构。



式 III

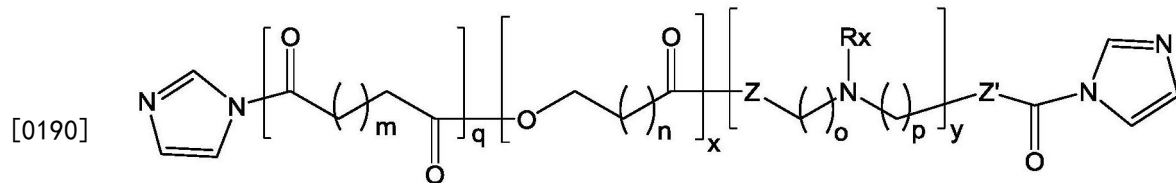
[0186] 单体单元可以在一个或多个位置处被一个或多个取代基取代。示例性的取代基包括但不限于:烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、卤素、羟基、羰基(诸如羧基、烷氧基羰基、甲酰基或酰基)、硫代羰基(诸如硫酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯)、烷氧基、磷酰基、磷酸酯、膦酸酯、亚膦酸酯、氨基、酰胺基、脒、亚胺、氰基、硝基、叠氮基、巯基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰基、磺酰胺基、磺酰基、硝基、杂环基、芳烷基或者芳族或杂芳族部分。

[0187] 聚合物是生物相容的。已知可容易获得的具有各种环尺寸的内酯具有低毒性:例如,由小的内酯制备的聚酯(诸如聚(己内酯)和聚(对二氧环己酮))是可商购获得的生物材料,其已经用于临床应用。大的(例如, $C_{16}$ - $C_{24}$ )内酯及其聚酯衍生物是已经在活生物体诸如

蜜蜂中鉴定出的天然产物。含有16至24个环碳原子的内酯被具体地考虑并且公开。

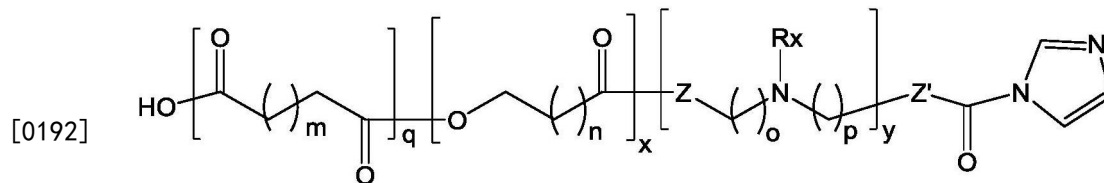
[0188] 在一些形式中,聚合物可以通过控温水解进一步活化,由此暴露一个或多个活化的端基。一个或多个活化的端基可以是:例如,羟基或羧酸端基,二者均可以通过聚合物内的酯键的水解生成。活化的聚合物可以具有约5至25kDa、优选地约5至10kDa的重均分子量。如本文中使用的,术语“约”意指在可接受参数范围内的微小变化。为了清楚起见,“约”是指给定值的 $\pm 10\%$ 。在一些形式中,活化的聚合物在一端含有 $R_1$ 或 $R_2$ ,并且在另一端含有通过水解生成的羟基或羧酸端基。

[0189] 在一些形式中,聚合物具有式IV的结构。



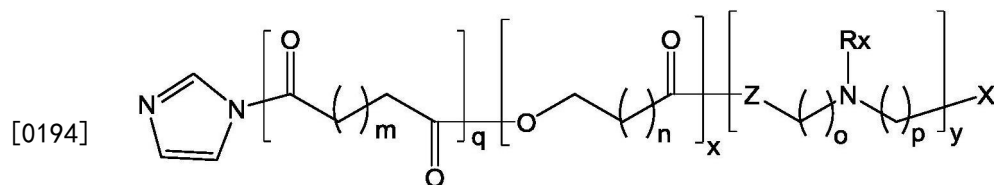
式 IV

[0191] 在一些形式中,聚合物具有式V的结构。



式 V

[0193] 在一些形式中,聚合物具有式VI的结构。



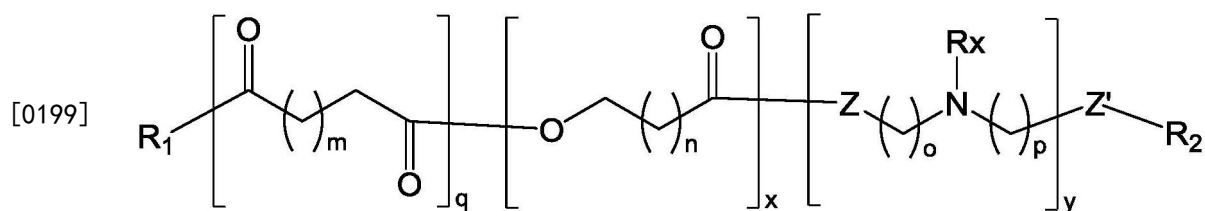
式 VI

[0195] 其中 $X'$ 为 $-OH$ 或 $-NHR'$ 。

[0196] 式VI、V和VI是中间产物的结构。它们可以用于合成具有式I、II或III的结构的各种聚合物。

[0197] 已经开发出了具有改善的用于递送(包括向肺递送)的特性的聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)。

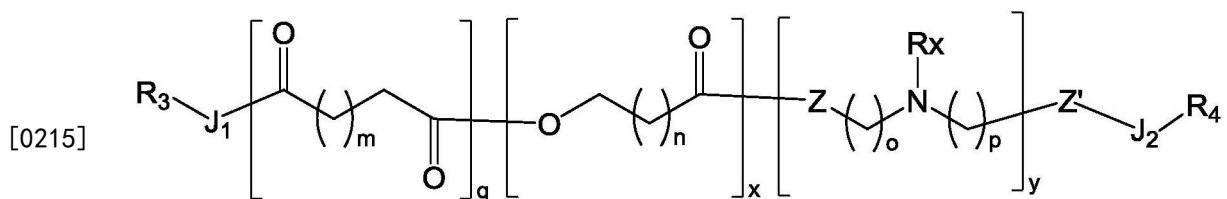
[0198] 聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)含有以下结构,



[0200]

式 I

- [0201] 其中n为1-30的整数，
- [0202] m、o和p独立地为1-20的整数，
- [0203] x、y和q独立地为1-1000的整数，
- [0204]  $R_x$ 为氢、取代或未取代的烷基、或者取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的烷氧基，
- [0205] Z和Z' 独立地为O或NR'，其中R' 为氢、取代或未取代的烷基或者取代或未取代的芳基，
- [0206]  $R_1$ 和 $R_2$ 为含有羟基、伯胺基、仲胺基、叔胺基或其组合的化学实体。
- [0207] 在一些形式中，Z与Z' 相同。
- [0208] 在一些形式中，Z为O，并且Z' 为O。在一些形式中，Z为NR'，并且Z' 为NR'。在一些形式中，Z为O，并且Z' 为NR'。在一些形式中，Z为NR'，并且Z' 为O。
- [0209] 在一些形式中，Z' 为O，并且n为1-24的整数，诸如4、10、13或14。在一些形式中，Z也为O。
- [0210] 在一些形式中，Z' 为O，n为1-24的整数，诸如4、10、13或14，并且m为1-10的整数，诸如4、5、6、7或8。在一些形式中，Z也为O。
- [0211] 在一些形式中，Z' 为O，n为1-24的整数，诸如4、10、13或14，m为1-10的整数，诸如4、5、6、7或8，并且o和p为1-6的相同整数，诸如2、3或4。在一些形式中，Z也为O。
- [0212] 在一些实施方案中，Z' 为O，n为1-24的整数，诸如4、10、13或14，m为1-10的整数，诸如4、5、6、7或8，并且R为烷基，诸如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、环己基、(环己基)甲基、环丙基甲基、以及例如正戊基、正己基、正庚基和正辛基的同系物和异构体，或者芳基，诸如苯基、萘基、蒎基、菲基、蒽基、茈基、茚基、茚基、甲苯基或二甲苯基。在一些形式中，Z也为O。
- [0213] 在一些形式中，n为14(例如，十五内酯，PDL)，m为7(例如，癸二酸)，o和p为2(例如，N-甲基二乙醇胺，MDEA)。
- [0214] 在一些形式中，聚合物含有式II的结构：



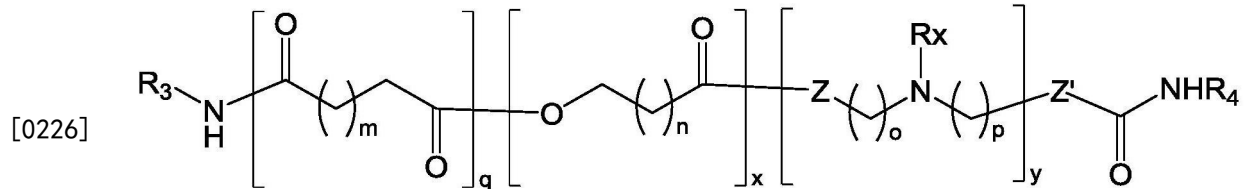
式 II

- [0216] 其中 $R_x$ 、Z、Z'、m、n、o、p、q、x和y如以上关于式I所述，
- [0217]  $J_1$ 和 $J_2$ 独立地不存在或为连接部分，诸如-C(O)-、-C(O)NH-、-C(O)O-、-O-和-NH-，
- [0218] 式II中的 $R_3$ 和 $R_4$ 独立地为含有羟基、伯胺基、仲胺基、叔胺基或其组合的取代的烷基。
- [0219] 在一些形式中， $J_1$ 为-O-或-NH-。
- [0220] 在一些形式中， $J_2$ 为-C(O)-、-C(O)NH-或-C(O)O-。
- [0221] 在一些形式中， $R_3$ 与 $R_4$ 相同。
- [0222] 优选地， $R_3$ 和/或 $R_4$ 是直链的。

[0223] 在一些形式中,  $R_3, R_4$  或二者含有羟基。在一些形式中,  $R_3, R_4$  或二者含有羟基和一个或多个胺基, 优选地仲胺基或叔胺基。在一些形式中,  $R_3, R_4$  或二者含有羟基, 并且不含胺基。

[0224] 在一些形式中,  $R_3$  和  $R_4$  中的至少一者不含羟基。

[0225] 在一些形式中, 聚合物含有式 III 的结构:



式 III

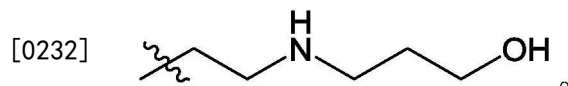
[0227] 其中  $R_3, R_4, Rx, Z, Z', m, n, o, p, q, x$  和  $y$  如以上关于式 II 所述。

[0228] 在具体实施方案中,  $x, y$  和/或  $q$  的值使得聚合物的重均分子量大于 20,000 道尔顿, 大于 15,000 道尔顿, 大于 10,000 道尔顿, 大于 5,000 道尔顿, 大于 2,000 道尔顿。在一些形式中, 聚合物的重均分子量为约 2,000 道尔顿至约 20,000 道尔顿, 更优选地约 5,000 道尔顿至约 10,000 道尔顿。

[0229] 聚合物可以由一种或多种内酯、一种或多种胺-二醇 ( $Z$  和  $Z' = O$ ) 或三胺 ( $Z$  和  $Z' = NR'$ ) 和一种或多种二酸或二酯制备。在其中使用两种以上不同的内酯、二酸或二酯和/或三胺或胺-二醇单体的那些实施方案中,  $n, o, p$  和/或  $m$  的值可以相同或不同。

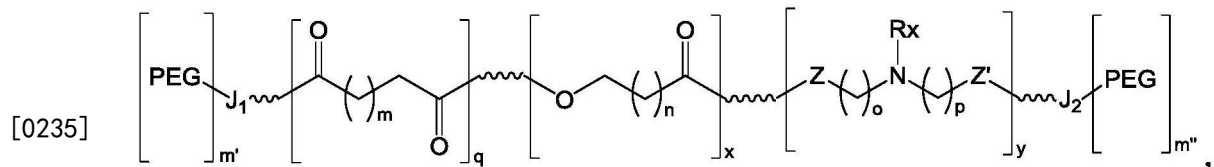
[0230] 在一些实施方案中, 聚合物为约 2kDa 至 20kDa, 或约 2kDa 至约 10kDa, 或约 2kDa 至约 5kDa。

[0231] 聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)可以用于形成具有包封于其中的一种或多种信使核糖核酸的多聚复合物、微粒和/或纳米粒子。在一些形式中, 多聚复合物或粒子由其中  $R_1$  和/或  $R_2$  不由以下组成或不包含以下的聚合物形成:



[0233] 在一些形式中, 聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)为含有与聚乙二醇 (PEG) 缀合的聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)即 PEG 缀合的聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)的混合物的形式。

[0234] 在一些形式中, PEG 缀合的聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)含有以下结构:



式 XI

[0236] 其中  $m'$  和  $m''$  独立地为 0 或 1, 条件是  $m' + m''$  为 1 或 2,

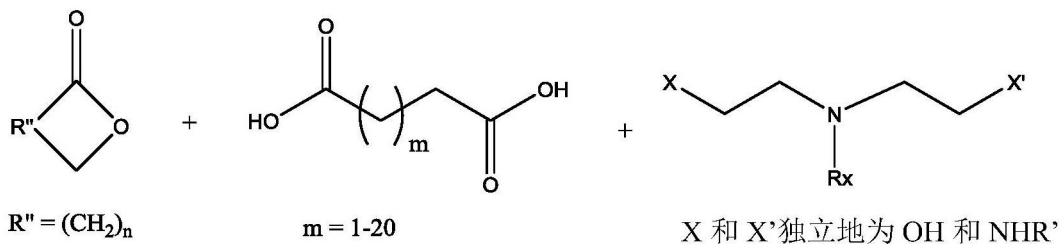
[0237] 式 XI 中的  $J_1$  和  $J_2$  独立地不存在或为连接部分, 诸如  $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-O-$  和  $-NH-$ 。

[0238] 在式XI的一些形式中,  $J_1$ 为-O-或-NH-。在式XI的一些形式中,  $J_2$ 为-C(O)-、-C(O)NH-或-C(O)O-。

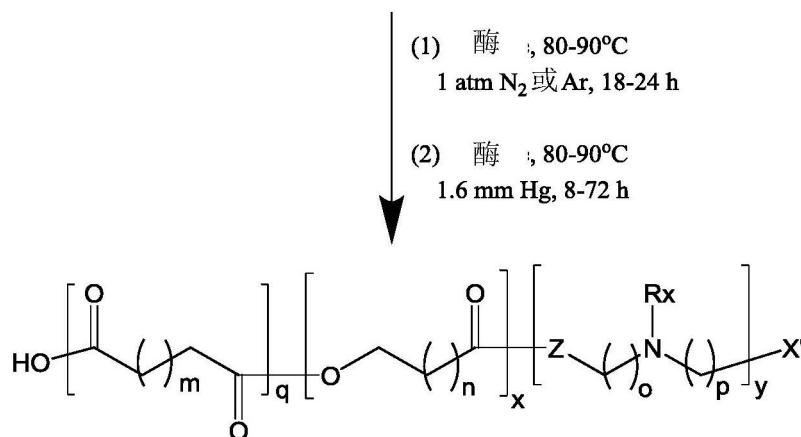
[0239] B. 制备聚合物的方法

[0240] 聚合物通常由合成聚合物改性。示例性的合成聚合物包括聚(胺-共-酯), 其由内酯、二烷基酸和二烷基胺形成。还提供了用于使用酶催化剂诸如脂肪酶由内酯、二烷基酸和二烷基胺合成聚(胺-共-酯)的方法。美国专利公开号US20170121454中公开了示例性的内酯。在一些形式中, 聚(胺-共-酯)如方案1所示制备:

[0241] 方案1: 未改性的聚(胺-共-酯)的制备



[0242]



式 VII

[0243] 单体的摩尔比(例如, 内酯:氨基二醇:二酸)可以改变, 例如从约10:90:90至约90:10:10改变。在一些实施方案中, 比率为10:90:90、20:80:80、40:60:60、60:40:40或80:20:20。如通过GPC使用窄多分散性聚苯乙烯标准物测定的重均分子量可以例如从约2,000道尔顿至约50,000道尔顿、优选地从约2,000道尔顿至约20,000道尔顿、更优选地从约5000道尔顿至约20,000道尔顿、最优选地从约5000道尔顿至约10,000道尔顿改变。

[0244] 聚合物的疏水性可以通过改变内酯的百分比(诸如约10%至约100%) (计算的内酯单元相对于(内酯单元+二酯/二酸))来调整。聚合物的分子量可以通过调节第二阶段反应时间(诸如约8至约72h)来调整。

[0245] 酶促方法允许合成具有各种链结构和可调节疏水性的聚合物。在一些实施方案中, 疏水性通过改变内酯单体的环尺寸和/或摩尔量来改变。可以使用具有各种环尺寸(例如,  $C_4$ - $C_{24}$ , 优选地 $C_6$ - $C_{24}$ , 更优选地 $C_6$ - $C_{16}$ )的内酯作为共聚单体。反应可以以单步进行, 而无需一个或多个氨基的保护和脱保护。这样的带有氨基的共聚酯非常难以使用常规的有机金属催化剂来制备, 因为这样的催化剂通常对有机胺敏感或者由于有机胺而失活。还已知这些催化剂对于聚合大的内酯环单体来说是无效的。由于酶的高活性和选择性以及得到的不

含金属的产物的高纯度,酶催化剂对于生产生物医学聚合物来说具有明显的优势。

[0246] 具有式IV、V或VI的结构的聚合物可以通过使式VII的未改性的聚合物与1,1'-羰基二咪唑(CDI)以约1:10至约1:60的摩尔比、优选地以约1:40的摩尔比反应来合成。

[0247] 具有式I或II的结构的聚合物可以通过使用现有技术中已知的偶联反应对式VII的未改性的聚合物的端基进行改性来获得。例如,具有式III的结构的聚合物可以通过以下方式合成:(1)使式VII的未改性的聚合物与CDI反应以获得式IV的聚合物,和(2)使式IV的聚合物与 $R_3-NH_2$ 和 $R_4-NH_2$ 反应。在一些形式中, $R_3$ 、 $R_4$ 或二者选自图1中示出的那些。优选地, $R_3$ 和 $R_4$ 相同。

[0248] 备选地,具有式III的结构的聚合物可以通过以下方式合成:(1)使式VII的未改性的聚合物与CDI反应以获得式V或VI的聚合物,(2)保护来自步骤(1)的聚合物中的-COOH基团或-X'基团,(3)使来自步骤(2)的经保护的聚合物与 $R_4-NH_2$ 或 $R_3-NH_2$ 反应,(4)对来自步骤(3)的聚合物中的-COOH基团或-X'基团进行脱保护,和(5)使来自步骤(4)的脱保护的聚合物与 $R_3-NH_2$ 或 $R_4-NH_2$ 反应。

[0249] 式I、II或III的聚合物的水解介导的活化可以以控温方式进行长达30天或更久。水解的持续时间可以根据待活化的聚合物的分子量而改变。较大分子量的聚合物(例如,约20-25kDa)最佳地水解较长的时间段,例如,约30至40天。较小分子量的聚合物(例如,约5-7kDa)最佳地水解较短的时间段,例如,约4至10天。

[0250] 在一些形式中,聚合物在约30°C至42°C的温度下或在高达约100°C的范围内的任何温度下水解。PACE聚合物可以在约35°C至40°C、例如约37°C的温度下水解。

[0251] 在一些形式中,聚合物例如在约1atm下水解。较高的压力加速该过程(例如,约1至约100atm的压力)。该过程的速率将由本领域技术人员针对正在制备的具体制剂来确定。

[0252] 所得水解产物的重均分子量可以从约5kDa至约25kDa、优选地从约5至约10kDa改变。

[0253] 优选地,聚合物中的一个或多个酯键水解。水解产物可以在一端具有 $R_1$ 或 $R_2$ ,并且在另一端具有通过水解生成的羧基或羟基。

[0254] PEG缀合的聚(胺-共-酯)或聚(胺-共-酰胺)可以在与方案1所述的那些类似的条件下合成,不同之处在于除了(i)内酯、(ii)二酸/二酯和(iii)胺二醇和/或三胺以外,可以将含有末端羧基、羟基或胺基的PEG添加到反应物中。

[0255] III. 由聚合物形成的微粒

[0256] 聚合物可以用于制备具有包封于其中的一种或多种治疗性、诊断性或预防性药剂的微粒和/或纳米粒子。药剂可以被包封在粒子内,分散于形成粒子的聚合物基体内,与粒子的表面共价或非共价地缔合,或其组合。

[0257] 在其他实施方案中,聚合物是生物相容的和生物可降解的。被粒子包封和/或与粒子缔合的一种或多种核酸可以通过不同的机理释放,包括聚合物基体的扩散和降解。释放速率可以通过改变聚合物的单体组成并且由此改变降解的速率来控制。例如,如果简单水解是降解的主要机理,则提高聚合物的疏水性可以减慢降解速率,因此增加释放的时间段。在所有情况下,聚合物组成都被选择为使得释放有效量的一种或多种核酸以实现所需的目的/结果。

[0258] 聚合物可以用于包封各种治疗性、预防性或诊断性药剂中的任一种,与其混合,或

与其离子地或共价地偶联。可以包封或掺入各种生物活性材料,用于通过聚合物递送至某一部位,或者向聚合物赋予特性,诸如生物粘附、细胞附着、增强细胞生长、抑制细菌生长和防止血块形成。

[0259] 在一些形式中,待包封和递送的药剂可以是小分子药剂(即分子量小于2,000、1500、1,000、750或500道尔顿的非聚合物药剂),或大分子(例如,低聚物或聚合物),诸如蛋白质、肽、核酸等。合适的小分子活性剂包括有机化合物、无机化合物和/或有机金属化合物。粒子可以用于药剂的体内和/或体外递送。

[0260] 合适的治疗性和预防性药剂的实例包括:合成的无机和有机化合物,蛋白质和肽,多糖和其他糖类,脂质,以及DNA和RNA核酸序列,其具有治疗性、预防性或诊断性活性。核酸序列包括基因,与互补DNA结合以抑制转录的反义分子,以及核酶。可以包封具有各种分子量的化合物,例如,每摩尔100至500,000克以上。合适的材料的实例包括:蛋白质诸如抗体、受体配体和酶,肽诸如粘附肽,糖类和多糖,合成的有机或无机药物,以及核酸。可以包封的材料的实例包括:酶、凝血因子、抑制剂或血块溶解剂,诸如链激酶和组织纤溶酶原激活剂;用于免疫接种的抗原;激素和生长因子;多糖,诸如肝素;寡核苷酸(诸如反义寡核苷酸)和核酶,以及用于基因疗法的逆转录病毒载体。聚合物也可以用于包封细胞和组织。

[0261] 可以掺入到粒子中的示例性的治疗性药剂包括但不限于:肿瘤抗原,CD4+ T细胞表位,细胞因子,化学治疗剂,放射性核素,小分子信号转导抑制剂,光热天线(触角, antenna),单克隆抗体,免疫危险信号传导分子,其他免疫治疗剂,酶,抗生素,抗病毒药(尤其是单独的或与用于治疗HIV或者乙型或丙型肝炎的核苷组合的蛋白酶抑制剂),抗寄生虫药(蠕虫、原生动物),生长因子,生长抑制剂,激素,激素拮抗剂,抗体及其生物活性片段(包括人源化、单链和嵌合抗体),抗原和疫苗制剂(包括佐剂),肽类药物,抗炎药,免疫调节剂(包括与Toll样受体结合以激活先天免疫系统的配体,动员和优化适应性免疫系统的分子,激活或上调细胞毒性T淋巴细胞、自然杀伤细胞和辅助T细胞的作用的分子,以及使抑制性或调节性T细胞去活或下调的分子),促进粒子到细胞中的摄取的药剂(包括树突状细胞和其他抗原呈递细胞),保健品诸如维生素,以及寡核苷酸药物(包括DNA、RNA、反义物、适体、小干扰RNA、核酶、用于核糖核酸酶P的外部引导序列和三链体形成剂)。

[0262] 代表性的抗癌剂包括但不限于:烷基化剂(诸如顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、氮芥(mechlorethamine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、达卡巴嗪(dacarbazine)、洛莫司汀(lomustine)、卡莫司汀(carmustine)、丙卡巴肼(procarbazine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)和异环磷酰胺(ifosfamide)),抗代谢药(诸如氟尿嘧啶(flourouracil)(5-FU)、吉西他滨(gemcitabine)、甲氨蝶呤(methotrexate)、阿糖胞苷(cytosine arabinoside)、氟达拉滨(fludarabine)和氟尿苷(floxuridine)),抗有丝分裂药(包括紫杉烷类(taxane),诸如紫杉醇(paclitaxel)和多西他赛(decetaxel),以及长春花生物碱(vinca alkaloid),诸如长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)、长春瑞滨(vinorelbine)和长春地辛(vindesine)),蒽环类药物(anthracycline)(包括多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、戊柔比星(valrubicin)、伊达比星(idarubicin)和表柔比星(epirubicin)以及放射菌素(actinomycin)诸如放射菌素D),细胞毒性抗生素(包括丝裂霉素(mitomycin)、普卡霉素(plicamycin)和博莱霉素

(bleomycin)), 拓扑异构酶抑制剂(包括喜树碱类(camptothecin), 诸如喜树碱(camptothecin)、伊立替康(irinotecan)和托泊替康(topotecan), 以及表鬼臼毒素(epipodophyllotoxin)的衍生物, 诸如安吡啶(amsacrine)、依托泊苷(etoposide)、磷酸依托泊苷(etoposide phosphate)和替尼泊苷(teniposide)), 血管内皮生长因子(VEGF)的抗体, 诸如贝伐单抗(bevacizumab) (**AVASTIN®**)、其他抗VEGF化合物; 沙利度胺(thalidomide) (**THALOMID®**) 及其衍生物, 诸如来那度胺(lenalidomide) (**REVLIMID®**); 内皮抑制素(endostatin); 血管抑制素(angiostatin); 受体酪氨酸激酶(RTK) 抑制剂, 诸如舒尼替尼(sunitinib) (**SUTENT®**); 酪氨酸激酶抑制剂, 诸如索拉非尼(sorafenib) (**Nexavar®**)、厄洛替尼(erlotinib) (**Tarceva®**)、帕唑帕尼(pazopanib)、阿昔替尼(axitinib)和拉帕替尼(lapatinib); 转化生长因子- $\alpha$ 或转化生长因子- $\beta$ 抑制剂, 以及表皮生长因子受体的抗体, 诸如帕尼单抗(panitumumab) (**VECTIBIX®**)和西妥昔单抗(cetuximab) (**ERBITUX®**)。

[0263] 示例性的免疫调节剂包括: 细胞因子, 黄嘌呤, 白细胞介素, 干扰素, 寡脱氧核苷酸, 葡聚糖, 生长因子(例如, TNF、CSF、GM-CSF和G-CSF), 激素诸如雌激素(己烯雌酚(diethylstilbestrol)、雌二醇(estradiol))、雄激素(睾酮(testosterone)、**HALOTESTIN®**(氟甲睾酮(flouxymesterone)))、孕激素(**MEGACE®**(醋酸甲地孕酮(megestrol acetate))、**PROVERA®**(醋酸甲羟孕酮(medroxyprogesterone acetate)))和皮质类固醇(泼尼松(prednisone)、地塞米松(dexamethasone)、氢化可的松(hydrocortisone))。

[0264] 可以与粒子缔合的免疫学佐剂的实例包括但不限于: TLR配体、C型凝集素受体配体、NOD样受体配体、RLR配体和RAGE配体。TLR配体可以包括脂多糖(LPS)及其衍生物, 以及脂质A及其衍生物, 包括但不限于单磷酸脂质A(MPL)、吡喃葡糖基(glycopyranosyl)脂质A、PET-脂质A和3-O-去酰基-4'-单磷酸脂质A。

[0265] 粒子还可以包含抗原和/或佐剂(即增强免疫反应的分子)。基于肽、蛋白质和DNA的疫苗可以用于诱导对各种疾病或病况的免疫力。需要细胞介导的免疫力以检测和破坏病毒感染的细胞。大部分传统疫苗(例如基于蛋白质的疫苗)仅可以诱导体液免疫力。基于DNA的疫苗表示一种独特的针对病毒或寄生虫接种疫苗的手段, 因为基于DNA的疫苗可以诱导体液免疫力和细胞介导的免疫力二者。另外, 基于DNA的疫苗可能比传统疫苗更安全。DNA疫苗相对更稳定, 并且制造和储存的成本效益更高。DNA疫苗由两种主要组分组成, 即DNA载体(或递送载剂)和DNA编码抗原。DNA载体保护DNA免于降解, 并且可以促进DNA进入到特定组织或细胞中以及以高效的水平表达。

[0266] 代表性的诊断剂是通过X射线、荧光、磁共振成像、放射性、超声、计算机断层扫描(CT)和正电子发射断层扫描(PET)可检测的药剂。超声造影剂典型地是气体, 诸如空气、氧气或全氟化碳(perfluorocarbons)。示例性的诊断剂包括顺磁分子、荧光化合物、磁性分子和放射性核素以及X射线成像剂。

[0267] 在一些实施方案中, 使用本文所述的方法制备的粒子含有小于80%、小于75%、小于70%、小于60%、小于50重量%、小于40重量%、小于30重量%、小于20重量%、小于15重

量%、小于10重量%、小于5重量%、小于1重量%、小于0.5重量%或小于0.1重量%的药剂。在一些实施方案中,药剂可以是药物活性剂的混合物。负载百分比取决于多种因素,包括待包封的药剂、用于制备粒子的聚合物以及用于制备粒子的方法。

[0268] 粒子可以提供药物的控释。例如,未改变的粒子可以提供有效量的药物基于药物从粒子的扩散速率和/或聚合物的降解速率的随着时间的释放。可以改变聚合物组成以操纵聚合物的降解行为,由此操纵待递送的药剂的释放速率/时间。备选地,可以将粒子用一种或多种材料涂覆以提供待递送的一种或多种药剂的控释,诸如缓释或延迟释放。

[0269] 缓释和延迟释放材料在本领域中是众所周知的。可以将通过脂肪酶水解的脂肪酸的固体酯喷涂到微粒上或药物粒子上。玉米醇溶蛋白是天然水不溶性蛋白质的一个实例。可以通过喷涂或通过湿法造粒技术将其涂覆到含有药物的微粒或药物粒子上。除了天然水不溶性材料以外,可以用交联程序处理消化酶的一些底物,导致形成不溶性网络。已经报告了通过化学手段和物理手段二者引发的使蛋白质交联的多种方法。最常用的获得交联的方法之一是使用化学交联剂。化学交联剂的实例包括醛(戊二醛和甲醛)、环氧化合物、碳二亚胺和京尼平(genipin)。除了这些交联剂以外,一直使用氧化的和天然的糖类来使明胶交联。交联也可以使用酶促手段来实现;例如,转谷氨酰胺酶已经被批准作为使海食品交联的GRAS物质。最后,交联可以通过物理手段来引发,诸如通过热处理、UV照射和 $\gamma$ 照射。

[0270] 为了产生围绕含有药物的微粒或药物粒子的交联蛋白质的涂层,可以将水溶性蛋白质喷涂到微粒上,随后通过上述方法之一进行交联。备选地,可以将含有药物的微粒通过凝聚-相分离(例如,通过加入盐)微包封在蛋白质内,随后进行交联。用于此目的的一些合适的蛋白质包括明胶、白蛋白、酪蛋白和谷蛋白。

[0271] 还可以使多糖交联以形成水不溶性网络。对于许多多糖,这可以通过与使主要聚合物链交联的钙盐或多价阳离子的反应来实现。在多价阳离子的存在下对果胶、藻酸盐、葡聚糖、直链淀粉和瓜尔胶进行交联。还可以形成带相反电荷的多糖之间的复合物;例如,果胶和壳聚糖可以通过静电相互作用来复合。

[0272] 本领域中已知的控释聚合物包括:丙烯酸和甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸甲酯共聚物、甲基丙烯酸乙氧基乙酯、甲基丙烯酸氰基乙酯、甲基丙烯酸氨基烷基酯共聚物、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、甲基丙烯酸烷基胺共聚物、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸)(酸酐)、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、聚(甲基丙烯酸酐)以及甲基丙烯酸缩水甘油酯共聚物。

[0273] 在某些优选实施方案中,丙烯酸聚合物由一种或多种甲基丙烯酸铵共聚物构成。甲基丙烯酸铵共聚物在本领域中是众所周知的,并且在NF XVII中被描述为丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯与低含量的季铵基团的充分聚合的共聚物。

[0274] 在一个优选实施方案中,丙烯酸聚合物是丙烯酸树脂漆,诸如可从Rohm Pharma以商品名EUDRAGIT<sup>®</sup>商购获得的丙烯酸树脂漆。在其他优选实施方案中,丙烯酸聚合物包括可从Rohm Pharma分别以商品名EUDRAGIT<sup>®</sup>RL30D和EUDRAGIT<sup>®</sup>RS30D商购获得的两种丙烯酸树脂漆的混合物。EUDRAGIT<sup>®</sup>RL30D和EUDRAGIT<sup>®</sup>RS30D是丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯与低含量的季铵基团的共聚物,铵基团与剩余的中性(甲基)丙烯酸酯的摩尔比在EUDRAGIT<sup>®</sup>RL30D中为1:20并且在EUDRAGIT<sup>®</sup>RS30D中为1:40。平均分子量

为约150,000。EUDRAGIT® S-100和EUDRAGIT® L-100也是优选的。代码名称RL(高渗透率)和RS(低渗透率)是指这些试剂的渗透性质。EUDRAGIT® RL/RS混合物在水中和在消化液中是不溶的。然而,被形成包括其的多颗粒体系在水溶液和消化液中是可溶胀且可渗透的。

[0275] 可以将聚合物(诸如EUDRAGIT® RL/RS)以任何所需比率混合到一起,以最终获得具有理想的溶解特性的缓释制剂。理想的缓释多颗粒体系可以例如由100% EUDRAGIT® RL、50% EUDRAGIT® RL和50% EUDRAGIT® RS、以及10% EUDRAGIT® RL和90% EUDRAGIT® RS获得。本领域技术人员会认识到,也可以使用其他丙烯酸聚合物,诸如例如EUDRAGIT® L。

[0276] 其他控释材料包括丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸甲酯、聚氯乙烯和聚乙烯。亲水性聚合物包括但不限于:纤维素聚合物,诸如甲基纤维素和乙基纤维素,羟烷基纤维素,诸如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和Carbopol® 934,聚氧化乙烯,以及它们的混合物。脂肪族(fatty)化合物包括但不限于:各种蜡,诸如巴西棕榈蜡和三硬脂酸甘油酯,以及蜡型物质,包括氢化蓖麻油或氢化植物油,或它们的混合物。

[0277] 用于实现延迟释放的合适的涂覆材料包括但不限于:纤维素聚合物,诸如羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、醋酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、醋酸纤维素、醋酸邻苯二甲酸纤维素、醋酸偏苯三酸纤维素和羧甲基纤维素钠;丙烯酸聚合物和共聚物,优选地由丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸甲酯和/或甲基丙烯酸乙酯以及可以商品名EUDRAGIT® (Rohm Pharma; 韦斯特施塔特,德国)获得的其他甲基丙烯酸树脂(包括EUDRAGIT® L30D-55和L100-55(在pH 5.5以上可溶)、EUDRAGIT® L-100(在pH 6.0以上可溶)、EUDRAGIT® S(在pH 7.0以上可溶,由于较高的酯化度)和EUDRAGITS® NE、RL和RS(具有不同程度的渗透性和膨胀性的水不溶性聚合物))形成;乙烯基聚合物和共聚物,诸如聚乙烯吡咯烷酮、乙酸乙烯酯、乙酸乙烯酯邻苯二甲酸酯、乙酸乙烯酯巴豆酸共聚物和乙烯-乙酸乙烯酯共聚物;酶促可降解的聚合物,诸如偶氮聚合物、果胶、壳聚糖、直链淀粉和瓜尔胶;玉米醇溶蛋白和虫胶(shellac)。

[0278] A. 用于多核苷酸的转染的组合物

[0279] 已经发现,多阳离子聚合物的基因递送能力是由多种因素造成的,包括聚合物分子量、疏水性和电荷密度。许多合成的多阳离子材料已经作为用于非病毒基因递送的载体进行试验,但是几乎全都由于其低效率或高毒性而是无效的。先前描述的大部分多阳离子载体表现出高的电荷密度,这已经被认为是有效的DNA缩合的一种主要需求。结果,它们能够在体外以高效率递送基因,但是由于与过量的电荷密度相关的毒性,对于体内应用受到限制。

[0280] 公开了高分子量聚合物(特别是三元共聚物),以及利用内酯与二烷基二酯和氨基二醇的酶催化共聚的其制备方法。这些聚(胺-共-酯)三元共聚物具有低的电荷密度。另外,它们的疏水性可以通过选择具有特定环尺寸的内酯共聚单体和通过调整聚合物中的内酯含量来改变。内酯-二酯-氨基二醇三元共聚物的高分子量和提高的疏水性补偿了低的电荷

密度,从而在最低毒性的情况下提供高效的基因递送。

[0281] 在优选实施方案中,三元共聚物在降低的毒性的情况下表现出高效的基因递送。三元共聚物可以比可商购获得的非病毒载体明显更高效。例如,三元共聚物可以比可商购获得的非病毒载体(诸如PEI和基于萤光素酶表达测定的LIPOFECTAMINE<sup>®</sup> 2000)更高效超过100倍,同时与这些可商购获得的非病毒载体相比表现出在高达0.5mg/ml毒性的剂量下的最低毒性。优选地,三元共聚物在适合于核酸的体外和体内转染二者的浓度下是无毒的。例如,在一些实施方案中,与细胞转染的其他方式相比,三元共聚物造成更少的非特异性细胞死亡。

[0282] 如以下更详细地描述的,在一些实施方案中,三元共聚物是含有20%PDL的 $\omega$ -十五内酯-癸二酸二乙酯-N-甲基二乙醇胺三元共聚物(也被称为三元共聚物III-20% PDL)。

[0283] IV. 由聚合物形成的胶束

[0284] A. 胶束性质

[0285] 1. 胶束尺寸

[0286] 聚合物诸如含有PEG嵌段的聚合物可以用于制备胶束。平均胶束尺寸典型地在约100至约500nm、优选地约100至约400nm、更优选地约100至约300nm、更优选地约150至约200nm、最优选地约160至约190nm的范围内,其在7.4的生理pH下在血清蛋白的存在下是稳定的。共聚物具有高的血液相容性,并且表现出最低的引起溶血和凝集的活性。

[0287] 2. 表面电荷

[0288] 发现当容纳胶束的水性介质的pH改变时,胶束的尺寸和 $\delta$ 电位(zeta potential)显著变化。例如,对于具有不同PDL含量(11%、30%和51%)的三种PEG2K-PPMS共聚物的胶束,尺寸-pH和 $\delta$ -pH曲线中的趋势非常相似。明显地,胶束样品的平均尺寸在将介质pH从7.4降低到5.0时逐渐增大,然后在pH值低于5.0时保持几乎不变。在pH从7.4降低到5.0时,预期对于胶束观察到的这种pH响应行为,胶束的PPMS芯被质子化并且变得更亲水,由此从水性介质吸收更多水分子以造成胶束的溶胀。胶束芯在5.0的pH下已经完全质子化,结果,在pH从5.0进一步降低的情况下胶束的尺寸保持相当恒定。PEG2K-PPMS共聚物中的PDL含量对7.4至5.0pH值的胶束尺寸变化幅度的影响也是显著的。随着共聚物中的PDL含量降低和叔氨基含量增加,预期胶束芯吸收质子和水分子的能力提高。因此,在pH从7.4降低到5.0时,与PEG2K-PPMS-30%PDL(从184nm到214nm)和PEG2K-PPMS-51%PDL(从163nm到182nm)相比,PEG2K-PPMS-11%PDL的平均胶束尺寸的变化(从200nm到234nm)更显著(图5A)。

[0289] 胶束在水性介质中的 $\delta$ 电位也表现出很大程度的pH依赖性。在生理和碱性pH(7.4至8.5)下,空白PEG2K-PPMS共聚物胶束的表面电荷为负,当介质的pH降低至酸性范围(4.0-6.0)时其变为正。例如,在7.4的pH下,PEG2K-PPMS-11%PDL、PEG2K-PPMS-30%PDL和PEG2K-PPMS-51%PDL的胶束分别具有-5.8、-7.1、-5.1mV的 $\delta$ 电位值,其在5.0的较低pH下相应地变为+7.6、+5.8、+4.0mV。在以上讨论的基础上,这种表面电荷对pH的依赖性可归因于胶束的PPMS芯在不同介质pH下的质子化或去质子化。在碱性pH(7.4-8.5)下,推测胶束中的大部分氨基未被质子化,并且胶束粒子由于PBS中的 $\text{HPO}_4^{2-}$ 和/或 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 阴离子被胶束吸收而保持带负电。特别地,在8.5的pH下,PEG2K-PPMS-11%PDL、PEG2K-PPMS-30%PDL和PEG2K-PPMS-51%PDL的 $\delta$ 电位值分别为-8.1mV、-7.9mV、-9.0mV。在pH从7.4降低到5.0时,胶束PPMS芯中的叔氨部分大部分被质子化,使胶束变为带正电的粒子。一致地,在三种胶束样品中,吸收

质子的能力最大的PEG2K-PPMS-11%PDL胶束在4.0-5.0的pH下显示出最高的 $\delta$ 电位值,而质子化能力最小的PEG2K-PPMS-51%PDL胶束显示出最低的 $\delta$ 电位。观察到的胶束表面电荷对介质pH的响应是非常理想的,因为胶束在生理pH下的负表面电荷可以减轻胶束与血液中的血清蛋白的相互作用并且延长其体内循环时间。另一方面,在大约6.5的肿瘤细胞外pH下反转为正表面电荷可以增强目标肿瘤细胞对这些胶束的摄取。

[0290] 粒子/胶束的表面电荷在PBS溶液(0.01M,pH=7.4)中是稍负的,这有利于胶束的体内药物递送应用。已知具有几乎中性表面电荷的纳米粒子( $\delta$ 电位为-10至+10mV)可以降低网状内皮系统(RES)对其的摄取并且延长其在血液中的循环时间。胶束的负表面电荷可以源于胶束粒子通过阴离子与PEG壳的醚基或PPMS芯的氨基之间的氢键相互作用对PBS中的 $\text{HPO}_4^{2-}$ 和/或 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 阴离子的吸收。对于两亲性嵌段共聚物胶束,预期胶束的外壳中的亲水性链段(例如,PEG)可以屏蔽胶束芯中的电荷,其中长链嵌段在降低 $\delta$ 电位方面比短链嵌段更有效。因此,与PEG2K-PPMS共聚物胶束相比,对于PEG5K-PPMS共聚物胶束观察到显著更低的 $\delta$ 电位值。

[0291] 共聚物胶束是pH响应性的:介质pH从7.4降低到5.0时,胶束的尺寸显著地增大胶束尺寸,同时胶束表明电荷从负电荷反转为正电荷。相应地,包封DTX的共聚物胶束在7.4的pH下显示出逐渐的持续药物释放,但是在5.0的酸性pH下显示出明显加速的DTX释放。这种现象可以用于改善药剂在肿瘤部位的释放,因为已知肿瘤微环境典型地因为乳酸堆积(由于差的氧灌注)而是弱酸性的(例如,5.7-7.0)。与此相比,正常组织和血液的细胞外pH是微碱性的(7.2-7.4的pH)。因此,对于这样的负载抗癌药的胶束预期增强的药物递送效率,所述胶束是pH响应性的并且可以通过酸性pH触发以加速药物释放。此外,在肿瘤细胞通过内吞路径摄取胶束后,在内体和溶酶体中遇到甚至更酸性的条件(pH=4.0-6.0),这可以进一步提高包封药物的胶束的细胞毒性。

[0292] V. 治疗性、预防性和诊断性药剂

[0293] 聚合物可以形成各种聚合物组合物,其可用于制备各种各样的生物可降解的医疗器械以及可用于药物递送。由PHA共聚物制备的器械可以用于各种各样的不同医疗应用。这样的应用的实例包括:治疗性、预防性或诊断性药剂的控释;药物递送;组织工程支架;细胞包封;靶向递送;生物相容性涂层;生物相容性植入物;引导组织再生术;伤口敷料;矫形器械;假体和骨水泥(包括粘合剂和/或结构填充剂);和诊断学。

[0294] 聚合物可以用于包封各种治疗性、预防性或诊断性药剂中的任一种,与其混合,或与其离子地或共价地偶联。可以包封或掺入各种生物活性材料,用于通过聚合物递送至某一部位,或者向聚合物赋予特性,诸如生物粘附、细胞附着、增强细胞生长、抑制细菌生长和防止血块形成。

[0295] 合适的治疗性和预防性药剂的实例包括:合成的无机和有机化合物,蛋白质和肽,多糖和其他糖类,脂质,以及DNA和RNA核酸序列,其具有治疗性、预防性或诊断性活性。核酸序列包括基因,与互补DNA结合以抑制转录的反义分子,以及核酶。可以包封具有各种分子量的化合物,例如,每摩尔100至500,000克以上。合适的材料的实例包括:蛋白质诸如抗体、受体配体和酶,肽诸如粘附肽,糖类和多糖,合成的有机或无机药物,以及核酸。可以包封的材料实例包括:酶、凝血因子、抑制剂或血块溶解剂,诸如链激酶和组织纤溶酶原激活剂;用于免疫接种的抗原;激素和生长因子;多糖,诸如肝素;寡核苷酸(诸如反义寡核苷酸)和

核酶,以及用于基因疗法的逆转录病毒载体。聚合物也可以用于包封细胞和组织。代表性的诊断剂是通过X射线、荧光、磁共振成像、放射性、超声、计算机断层扫描(CT)和正电子发射断层扫描(PET)可检测的药剂。超声诊断剂典型地是气体,诸如空气、氧气或全氟化碳。在一个优选实施方案中,聚合物用于递送核酸。

#### [0296] A. 多核苷酸

[0297] 如以下更详细地讨论的,三元共聚物可以用于与核酸一起转染细胞。因此,还公开了包含三元共聚物和一种或多种多核苷酸的多聚复合物。

[0298] 多核苷酸可以编码一种或多种蛋白质、功能核酸或其组合。多核苷酸可以是单顺反子的或多顺反子的。在一些实施方案中,多核苷酸是多基因的。

[0299] 在一些实施方案中,多核苷酸被转染到细胞中,并且保持在染色体外。在一些实施方案中,多核苷酸被引入到宿主细胞中,并且被整合到宿主细胞的基因组中。如以下更详细地讨论的,组合物可以用于基因疗法的方法。基因疗法的方法可以包括将多核苷酸引入到细胞中,其改变细胞的基因型。多核苷酸的引入可以通过基因重组来修正、替代或以其他方式改变内源性基因。方法可以包括引入有缺陷基因的整个替代拷贝、异源基因或小核酸分子诸如寡核苷酸。例如,可以将修正基因引入到宿主的基因组内的非特异性位置中。

[0300] 在一些实施方案中,多核苷酸被掺入到载体中,或者是载体的一部分。构建含有遗传序列以及合适的转录和翻译控制元件的表达载体的方法在本领域中是众所周知的。这些方法包括体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。表达载体通常含有调节序列以及用于插入的编码序列(其可以是例如感兴趣的多核苷酸)的翻译和/或转录的必需元件。编码序列可以可操作地连接至启动子和/或增强子以帮助控制所需基因产物的表达。生物技术中使用的启动子根据控制基因表达的目标类型而具有不同的类型。它们通常可以被分为组成型启动子、组织特异性或发育阶段特异性启动子、诱导型启动子以及合成启动子。

[0301] 例如,在一些实施方案中,感兴趣的多核苷酸可操作地连接至启动子或本领域中已知的其他调节元件。因此,多核苷酸可以是载体,诸如表达载体。用于原核系统或真核系统中的表达的多核苷酸的工程改造可以通过重组表达领域的技术人员通常已知的技术来进行。表达载体典型地包含在一种或多种启动子的控制下的组合物(组成成分, composition)中的一种。为了使编码序列“在启动子的控制下”,将阅读框的翻译起始位点的5'端定位在所选启动子的“下游”(即其3')的通常约1至50个核苷酸处。“上游”启动子刺激插入的DNA的转录,并且促进编码的重组蛋白的表达。这是此处使用的上下文中的“重组表达”的含义。

[0302] 多种标准技术可用于构建含有合适的核酸以及转录/翻译控制序列的表达载体,以在各种宿主表达系统中实现蛋白质或肽表达。可用于表达的细胞类型包括但不限于:细菌,诸如用重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的大肠杆菌(*E. coli*)和枯草杆菌(*B. subtilis*)。将会理解,可以使用聚合物来包装和递送这些载体中的任一种。

[0303] 用于哺乳动物细胞的表达载体通常包括复制起点(根据需要),位于待表达的基因之前的启动子,连同任何所需的核糖体结合位点、RNA剪接位点、多腺苷酸化位点和转录终止序列。复制起点可以通过将载体构建为包括外源性起点来提供,诸如可以来源于SV40或其他病毒(例如, Polyoma、Adeno、VSV、BPV)来源,或者可以通过宿主细胞染色体复制机制来提供。如果载体被整合到宿主细胞染色体中,则后者通常是足够的。

[0304] 启动子可以来源于哺乳动物细胞的基因组(例如,金属硫蛋白启动子),或来源于哺乳动物病毒(例如,腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)。另外,采用通常与所需基因序列相关联的启动子或控制序列也是可行的并且可以是理想的,前提条件是这样的控制序列与宿主细胞系统相容。

[0305] 可以采用多种基于病毒的表达系统,例如,常用的启动子来源于多瘤、腺病毒2、巨细胞病毒和猿猴病毒40(SV40)。SV40病毒的早期和晚期启动子是可用的,因为二者均容易作为还含有SV40病毒复制起点的片段从病毒获得。也可以使用较小或较大的SV40片段,前提条件是包括从HindIII位点朝位于病毒复制起点的BglII位点延伸的大约250bp序列。

[0306] 在使用腺病毒作为表达载体的情况下,编码序列可以连接至腺病毒转录/翻译控制复合物,例如,晚期启动子和三联体(tripartite)前导序列。这种嵌合基因然后可以通过体外或体内重组而插入到腺病毒基因组中。在病毒基因组的非必需区(例如,区域E1或E3)中的插入将会得到在感染的宿主中存活且能够表达蛋白质的重组病毒。

[0307] 组合物(组成成分,composition)的高效翻译可能还需要特定起始信号。这些信号包括ATG起始密码子和相邻序列。可能还需要提供外源性翻译控制信号(包括ATG起始密码子)。本领域普通技术人员将容易地能够确定这种需求并且提供所需的信号。众所周知的是,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框同框(或同相)以确保整个插入物的翻译。这些外源性翻译控制信号和起始密码子可以具有各种各样的来源(天然的和合成的二者)。表达的效率可以通过包含合适的转录增强子元件或转录终止子来增强。

[0308] 在真核表达中,如果原始克隆的区段内不含有合适的多腺苷酸化位点,则典型地还将需要将合适的多腺苷酸化位点并入到转录单元中。典型地,聚A添加位点位于在转录终止之前的位置处的蛋白质的终止位点的“下游”约30至2000个核苷酸处。

[0309] 对于重组蛋白的长期的高收率生产,稳定的表达是优选的。例如,可以工程改造稳定表达编码蛋白质的构建体的细胞系。可以利用通过适当的表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、多腺苷酸化位点等)控制的载体以及选择标记来转化宿主细胞,而不是使用含有病毒复制起点的表达载体。在引入外来DNA之后,可以使工程改造的细胞在富集培养基中生长1-2天,然后切换至选择性培养基。重组质粒中的选择标记赋予对选择的抗性,并且使得细胞能够稳定地将质粒整合到其染色体中,并且生长以形成座(foci),该座进而可以被克隆并且扩增到细胞系。

[0310] 在优选实施方案中,多核苷酸货物为RNA,诸如mRNA。mRNA可以编码感兴趣的多肽。

[0311] 在一些实施方案中,mRNA具有在5'端的帽和/或3'聚(A)尾,其可以调节核糖体结合、翻译的起始以及mRNA在细胞中的稳定性。

[0312] B. 感兴趣的多肽

[0313] 多核苷酸可以编码一种或多种感兴趣的多肽。多肽可以是任何多肽。例如,由多核苷酸编码的多肽可以是为生物体提供治疗性或预防性效果或者可以用于诊断生物体中的疾病或病症的多肽。例如,对于治疗癌症、自身免疫性病症、寄生虫、病毒、细菌、真菌或其他感染,待表达的一种或多种多核苷酸可以编码多肽,所述多肽用作免疫系统的细胞的配体或受体,或者可以用于刺激或抑制生物体的免疫系统。如以下实施例中讨论的,在治疗癌症的方法中,可以使用多聚复合物将编码TNF相关凋亡诱导配体(TRAIL)的多核苷酸递送至肿瘤细胞。

[0314] 在一些实施方案中,多核苷酸补充或替换生物体中有缺陷的多核苷酸。

[0315] 在一些实施方案中,多核苷酸包括选择标记,例如,在真核细胞中有效的选择标记,诸如抗药性选择标记。这种选择标记基因可以编码在选择性培养基中生长的转化的宿主细胞的存活或生长所需的因子。典型的选择基因编码这样的蛋白质,所述蛋白质赋予对抗生素或其他毒素(例如,氨苄西林(ampicillin)、新霉素(neomycin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、卡那霉素(kanamycin)、庆大霉素(gentamycin)、吉欧霉素(Zeocin)或四环素(tetracycline))的抗性,补充营养缺陷型缺陷,或者供应从培养基中保留的营养物。

[0316] 在一些实施方案中,多核苷酸包括报告基因。报告基因典型地是宿主细胞中不存在或不表达的基因。报告基因典型地编码提供一些表型变化或酶性质的蛋白质。Weising等人,Ann.Rev.Genetics,22,421(1988)提供了这样的基因的实例。优选的报告基因包括葡萄糖醛酸糖苷酶(GUS)基因和GFP基因。

[0317] C. 功能核酸

[0318] 多核苷酸可以是功能核酸,或者可以编码功能核酸。功能核酸是具有特定功能(诸如结合目标分子或催化特定反应)的核酸分子。功能核酸分子可以被分为以下非限制性类别:反义分子、siRNA、miRNA、适体、核酶、三链体形成分子、RNAi和外部引导序列。功能核酸分子可以作为目标分子所拥有的特定活性的效应物、抑制剂、调节剂和刺激物,或者功能核酸分子可以具有独立于任何其他分子的新生活性。

[0319] 功能核酸分子可以与任何大分子(诸如DNA、RNA、多肽或糖链)相互作用。因此,功能核酸可以与目标多肽的mRNA或基因组DNA相互作用,或者它们可以与多肽本身相互作用。通常,功能核酸被设计为基于目标分子与功能核酸分子之间的序列同源性与其它核酸相互作用。在其他情形下,功能核酸分子与目标分子之间的特异性识别不是基于功能核酸分子与目标分子之间的序列同源性,而是基于允许进行特异性识别的三级结构的形成。

[0320] 反义分子被设计为通过规范或非规范的碱基配对与目标核酸分子相互作用。反义分子和目标分子的相互作用被设计为促进目标分子通过例如RNAseH介导的RNA-DNA杂交降解的破坏。备选地,反义分子被设计为打断通常将对目标分子进行的加工功能,诸如转录或复制。反义分子可以基于目标分子的序列来设计。存在用于通过找到目标分子的最易到达区域来优化反义效率的大量方法。示例性的方法包括体外选择实验和使用DMS和DEPC的DNA修饰研究。优选的是反义分子以小于或等于 $10^{-6}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-10}$ 或 $10^{-12}$ 的解离常数( $K_d$ )结合目标分子。

[0321] 适体是与目标分子相互作用、优选地以特异性的方式相互作用的分子。典型地,适体是长度在15-50个碱基范围内的小核酸,其折叠为限定的二级结构和三级结构,诸如茎环或G-四联体(G-quartet)。适体可以结合小分子,诸如ATP和茶碱(theophiline),以及大分子,诸如逆转录酶和凝血酶。适体可以以小于 $10^{-12}$ M的与目标分子的 $K_d$ 非常紧密地结合。优选的是适体以小于 $10^{-6}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-10}$ 或 $10^{-12}$ 的 $K_d$ 结合目标分子。适体可以以非常高的特异性程度来结合目标分子。例如,已经分离出目标分子与仅在分子上的单个位置处有差异的另一个分子之间的结合亲和力差大于10,000倍的适体。优选的是适体与目标分子的 $K_d$ 比与背景结合分子的 $K_d$ 低至少10、100、1000、10,000或100,000倍。优选的是当对分子诸如多肽进行比较时,背景分子是不同的多肽。

[0322] 核酶是能够催化分子内或分子间的化学反应的核酸分子。优选的是核酶催化分子

间反应。存在催化核酸酶或核酸聚合酶型反应的多种不同类型的核酶,所述反应基于在自然系统中发现的核酶,诸如锤头状核酶。还存在自然系统中未发现、但是已经被工程改造为从头催化特定反应的多种核酶。优选的核酶切割RNA或DNA底物,并且更优选地切割RNA底物。核酶典型地通过识别并结合目标底物、随后进行切割来切割核酸底物。这种识别通常主要基于规范或非规范的碱基对相互作用。这种性质使核酶成为特别好的用于核酸的目标特异性切割的候选物,因为目标底物的识别基于目标底物序列。

[0323] 三链体形成功能核酸分子是可以与双链或单链核酸相互作用的分子。当三链体分子与目标区域相互作用时,形成被称为三链体的结构,其中存在根据沃森-克里克(Watson-Crick)和胡斯坦(Hoogsteen)碱基配对二者形成复合物的三个DNA链。三链体分子是优选的,因为它们可以以高亲和力和特异性结合目标区域。优选的是三链体形成分子以小于 $10^{-6}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-10}$ 或 $10^{-12}$ 的 $K_d$ 结合目标分子。

[0324] 外部引导序列(EGS)是结合形成复合物的目标核酸分子的分子,所述复合物被核糖核酸酶P识别,然后核糖核酸酶P切割目标分子。EGS可以被设计为特异性地靶向所选择的RNA分子。核糖核酸酶P辅助加工细胞内的转移RNA(tRNA)。可以募集细菌核糖核酸酶P来通过使用EGS切割几乎任何RNA序列,所述EGS造成目标RNA:EGS复合物模拟天然tRNA底物。类似地,真核EGS/核糖核酸酶P定向的RNA切割可以用于切割真核细胞内的所需目标。如何制备和使用EGS分子来促进各种不同目标分子的切割的代表性实例在本领域中是已知的。

[0325] 还可以通过RNA干扰(RNAi)以高度特异性的方式有效地沉默基因表达。这种沉默最初是通过添加双链RNA(dsRNA)观察到的(Fire等人,(1998)Nature,391:806-11;Napoli等人,(1990)Plant Cell 2:279-89;Hannon,(2002)Nature,418:244-51)。一旦dsRNA进入细胞,其就被核糖核酸酶III样酶Dicer切割成含有在3'端上的2个核苷酸突出端的长度为21-23个核苷酸的双链小干扰RNA(siRNA)(Elbashir等人,(2001)Genes Dev.,15:188-200;Bernstein等人,(2001)Nature,409:363-6;Hammond等人,(2000)Nature,404:293-6)。在ATP依赖性步骤中,siRNA被整合到通常被称为RNAi诱导沉默复合物(RISC)的多亚基蛋白质复合物中,所述多亚基蛋白质复合物将siRNA引导至目标RNA序列(Nykanen等人,(2001)Cell,107:309-21)。在一些点处,siRNA双链体解开,并且看上去反义链保持与RISC结合,并且通过核酸内切酶和核酸外切酶的组合引导互补mRNA序列的降解(Martinez等人,(2002)Cell,110:563-74)。然而,siRNA或其使用的效果不限于任何类型的机制。

[0326] 短干扰RNA(siRNA)是可以诱导序列特异性转录后基因沉默从而减低或甚至抑制基因表达的双链RNA。在一个实例中,在siRNA与目标RNA二者之间的序列同一性(序列一致性,sequence identity)的区域内,siRNA触发同源性RNA分子诸如mRNA的特异性降解。例如,WO 02/44321公开了当与3'突出端碱基配对时能够序列特异性降解目标mRNA的siRNA,制备这些siRNA的方法通过引用结合于此。可以使用合成的短双链RNA在哺乳动物细胞中实现序列特异性基因沉默,所述合成的短双链RNA模拟通过酶dicer产生的siRNA(Elbashir等人,(2001)Nature,411:494-498)(Ui-Tei等人,(2000)FEBS Lett 479:79-82)。siRNA可以化学合成或体外合成,或者可以是在细胞内部被加工成siRNA的短双链发夹状RNA(shRNA)的结果。合成的siRNA通常使用算法和常规DNA/RNA合成仪进行设计。供应商包括:Ambion(奥斯汀,德克萨斯州)、ChemGenes(阿什兰,马萨诸塞州)、Dharmacon(拉斐特,科罗拉多州)、Glen Research(斯特灵,弗吉尼亚州)、MWB Biotech(埃伯斯贝格,德国)、Proligo(博

尔德,科罗拉多州)和Qiagen(文托,荷兰)。siRNA也可以使用试剂盒诸如Ambion的SILENCER®siRNA构建试剂盒体外合成。

[0327] 更通常地通过短发夹RNA(short hairpin RNA,shRNA)的转录来由载体制备siRNA。用于制备包含shRNA的载体的试剂盒是可得的,诸如,例如,Imgenex的GENESUPPRESSOR™构建试剂盒和Invitrogen的BLOCK-IT™可诱导RNAi质粒和慢病毒载体。

[0328] 多核苷酸的组成

[0329] 多核苷酸可以是典型地包含杂环碱基(核酸碱基)、与杂环碱基相连的糖部分和将糖部分的羟基官能团酯化的磷酸酯部分的DNA或RNA核苷酸。主要的天然存在的核苷酸包括作为杂环碱基的尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤,以及通过磷酸二酯键连接的核糖和脱氧核糖。

[0330] 多核苷酸可以由已经化学改性以相对于DNA或RNA对应物改善稳定性、半衰期或对目标序列的特异性或亲和力的核苷酸类似物构成。化学改性包括核苷碱基、糖部分、核苷酸键或其组合的化学改性。如本文中使用的,“改性核苷酸”或“化学改性核苷酸”限定具有杂环碱基、糖部分或磷酸酯部分成分中的一种或多种的化学改性的核苷酸。在一些实施方案中,相对于相同核苷碱基序列的DNA或RNA寡核苷酸,改性核苷酸的电荷减少。例如,寡核苷酸可以具有低的负电荷,没有电荷,或具有正电荷。改性应不阻止并且优选地增强寡核苷酸进入细胞并且执行如以上讨论的功能(诸如抑制基因表达)的能力。

[0331] 典型地,核苷类似物支持能够通过沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对与标准多核苷酸碱基氢键键合的碱基,其中类似物主链以允许在寡核苷酸类似物分子与标准多核苷酸(例如,单链RNA或单链DNA)中的碱基之间以序列特异性方式进行这样的氢键键合的方式呈现碱基。优选的类似物是具有基本上不带电的含磷主链的那些。

[0332] 如以下更详细地讨论的,在一个优选实施方案中,寡核苷酸是吗啉基寡核苷酸。

[0333] 1. 杂环碱基

[0334] 主要的天然存在的核苷酸包括作为杂环碱基的尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤。寡核苷酸可以包括对其核苷碱基成分的化学改性。杂环碱基或杂环碱基类似物的化学改性可以有效地提高在结合目标序列时的结合亲和力或稳定性。化学改性的杂环碱基包括但不限于:肌苷、5-(1-丙炔基)尿嘧啶(pU)、5-(1-丙炔基)胞嘧啶(pC)、5-甲基胞嘧啶、8-氧代-腺嘌呤、假胞嘧啶(pseudocytosine)、假异胞嘧啶(pseudoisocytosine)、5和2-氨基-5-(2'-脱氧-β-D-呋喃核糖基)吡啶(2-氨基吡啶)以及各种吡咯并嘧啶和吡啶并嘧啶衍生物。

[0335] 2. 糖改性

[0336] 多核苷酸还可以含有具有改性的糖部分或糖部分类似物的核苷酸。糖部分改性包括但不限于:2'-O-氨基乙氧基(aminoethoxy)、2'-O-氨基乙基(aminoethyl)(2'-OAE)、2'-O-甲氧基、2'-O-甲基、2-胍基乙基(2'-OGE)、2'-O,4'-C-亚甲基(LNA)、2'-O-(甲氧基乙基)(2'-OME)和2'-O-(N-(甲基)乙酰胺基)(2'-OMA)。2'-O-氨基乙基糖部分取代是尤其优选的,因为它们在中性pH下被质子化,因此抑制TF0与目标双链体之间的电荷排斥。这种改性使核糖或脱氧核糖(dexyribose)的C3'-内型构象稳定,并且还与双链体的嘌呤链中的i-1磷酸酯形成桥。

[0337] 多核苷酸可以是什么基寡核苷酸。吗啉基寡核苷酸典型地由两个以上吗啉基单体

构成,所述吗啉基单体含有通过碱基特异性氢键键合有效地与多核苷酸中的碱基结合的嘌呤或嘧啶碱基配对部分,其通过一至三个原子长的含磷键连接到一起,将一个单体中的吗啉基氮与相邻单体的5'环外碳相连接。嘌呤或嘧啶碱基配对部分典型地是腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶或胸腺嘧啶。吗啉基寡聚体的合成、结构和结合特性在美国专利号5,698,685、5,217,866、5,142,047、5,034,506、5,166,315、5,521,063和5,506,337中详述。

[0338] 基于吗啉基的亚基的重要性质典型地包括:通过稳定的不带电主链键以寡聚体形式连接的能力;支持核苷酸碱基(例如腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶或肌苷)使得所形成的聚合物可以与互补碱基目标核酸(包括目标RNA)以高 $T_m$ 杂交的能力,即使是在短至10-14个碱基的寡聚体的情况下;寡聚体主动地输送到哺乳动物细胞中的能力;以及寡聚体:RNA异源双链体抵抗核糖核酸酶降解的能力。在一些实施方案中,寡核苷酸采用通过不带电键相连的带有碱基配对部分的基于吗啉基的亚基。

### [0339] 3. 核苷酸间键

[0340] 核苷酸间键是指在两个核苷部分之间的化学键。对DNA或RNA寡核苷酸的磷酸酯主链的改性可以提高多核苷酸的结合亲和力或稳定性,或者降低多核苷酸对核酸酶消化的敏感性。包括但不限于二乙基-乙二酰胺(DEED)或二甲基-氨基丙胺(DMAP)的阳离子改性由于降低寡核苷酸与目标之间的静电排斥而可以是特别有用的。磷酸酯主链的改性还可以包括用硫原子取代磷酸二酯键中的非桥接氧。这种取代产生硫代磷酸酯核苷间键代替磷酸二酯键。已经证明含有硫代磷酸酯核苷间键的寡核苷酸在体内更稳定。

[0341] 电荷减少的改性核苷酸的实例包括改性核苷酸间键,诸如具有非手性且不带电的亚基间键的磷酸酯类似物(例如,Sterchak等人,Organic Chem.,52:4202,(1987)),和具有非手性亚基间键的不带电的基于吗啉基的聚合物(参见例如美国专利号5,034,506),如以上所讨论的。一些核苷酸间键类似物包括吗啉酸酯(morpholidate)、缩醛和聚酰胺连接的杂环。

[0342] 在另一个实施方案中,寡核苷酸由锁核酸构成。锁核酸(LNA)是改性的RNA核苷酸(参见例如Braasch等人,Chem.Biol.,8(1):1-7(2001))。LNA与DNA形成比DNA/DNA杂交体更稳定的杂交体,其性质类似于肽核酸(PNA)/DNA杂交体的性质。因此,LNA可以正如PNA分子那样使用。在一些实施方案中,LNA结合效率可以通过向其添加正电荷来提高。使用商业核酸合成仪和标准亚磷酰胺化学来制备LNA。

[0343] 在一些实施方案中,寡核苷酸由肽核酸构成。肽核酸(PNA)是合成的DNA模拟物,其中通过重复N-(2-氨基乙基)-甘氨酸单元来整体地替代寡核苷酸的磷酸酯主链,并且磷酸二酯键一般被肽键替代。各种杂环碱基通过亚甲基羰基键连接至主链。PNA保持与常规DNA寡核苷酸类似的杂环碱基间距,但是是非手性且中性电荷的分子。肽核酸由肽核酸单体构成。

[0344] 其他主链改性包括肽和氨基酸变异和改性。因此,寡核苷酸诸如PNA的主链成分可以是肽键,或者备选地,它们可以是非肽肽键。实例包括乙酰基帽、氨基间隔物诸如8-氨基-3,6-二氧杂辛酸(在本文中被称为O-连接体)等,在PNA中需要正电荷的情况下,氨基酸诸如赖氨酸是特别有用的,等等。用于PNA的化学组装的方法是众所周知的。参见例如美国专利号5,539,082、5,527,675、5,623,049、5,714,331、5,736,336、5,773,571和5,786,571。

[0345] 多核苷酸任选地在任一端或两端包括一个或多个末端残基或改性以提高稳定性

和/或寡核苷酸对其目标的亲和力。常用的带正电的部分包括氨基酸赖氨酸和精氨酸,尽管其他带正电的部分也可以是可用的。例如,赖氨酸和精氨酸残基可以被添加至双PNA连接体,或者可以被添加至PNA链的羧基或N端。可以将多核苷酸进一步改性以进行封端,从而防止使用3' 丙胺基的降解。用于3' 或5' 加帽寡核苷酸的程序在本领域中是众所周知的。

#### [0346] VI. 用于多聚复合物的涂层剂

[0347] 使用聚合物的多核苷酸递送的效率可能受到多聚复合物表面上的正电荷影响。例如,+8.9mV的多聚复合物的 $\delta$ 电位可以在循环期间吸引并且结合血液中的带负电的血浆蛋白,并且导致被网状内皮系统 (RES) 快速清除。效率还可能受到多聚复合物纳米粒子的不稳定性影响。例如,如在以下实施例中讨论的,在含有10%血清的NaAc缓冲溶液中温育的多聚复合物粒子的尺寸在15分钟内几乎翻倍,并且在75分钟后增大超过10倍。由于这种尺寸增大,放大的多聚复合物可能通过在肝中的摄取而被从循环中清除。因此,在一些实施方案中,处理或涂覆多聚复合物以改善多核苷酸递送效率。在一些实施方案中,与对照相比,涂层改善多聚复合物的细胞特异性靶向,改善稳定性(即,使多聚复合物在体内的尺寸稳定),增加多聚复合物在体内的半衰期(即,在体循环中),或者其组合。在一些实施方案中,对照是没有涂层的多聚复合物。

[0348] 一种示例性的用于靶向肿瘤细胞的多聚复合物涂料是polyE-mRGD。如本文中使用的,polyE-mRGD是指含有以下三个片段的合成肽:包含聚谷氨酸(polyE)段的第一区段,其在生理pH下带负电,因此能够与多聚复合物的带正电表面静电结合;包含中性聚甘氨酸段的第二区段,其用作中性连接体;和包含RGD序列的第三区段,其通过RGD与 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 的相互作用结合肿瘤内皮。

[0349] 如以下更详细地讨论的,实施例中使用的polyE-mRGD反转了III-20%PDL/pLucDNA多聚复合物的表面电荷。当以5:1的肽/DNA重量比添加polyE-mRGD时,多聚复合物的 $\delta$ 电位从+8.9mV变为-5.8mV。肽涂覆的多聚复合物在含有10%血清的NaAc缓冲液中温育时是稳定的,并且抵抗聚集,这表明改性的多聚复合物在体内循环期间可以逃脱RES的清除。

[0350] 在一个实施方案中,polyE-mRGD包括序列EEEEEEEEEEEEEEEEEGGGGGGRGDK (SEQ ID NO:1),或RGDKGGGGGG EEEEEEEEEEEEEEEEE (SEQ ID NO:2),或与SEQ ID NO:1或2具有85%、90%、95%或超过95%的序列同一性的其变体。

[0351] 可以用于制备在体内保持其尺寸的电荷中性或带负电的粒子的另一种示例性涂料在Harris等人,Biomaterials,31:998-1006(2010)中进行描述,并且可以包括氨基酸序列GGGGGGEEEEEEEEEEEEEEEE (SEQ ID NO:3,poly-E),用于非特异性全身施用,或氨基酸序列GdPdLGdVdRG-GGGGGG-EEEEEEEEEEEEEEEEE-CONH2 (SEQ ID NO:4,poly-E-cat),其含有增加对脾、脊柱、胸骨和股骨的靶向的多阳离子序列。在一些实施方案中,涂料中使用的多肽是变体SEQ ID NO:3或4,其与SEQ ID NO:3或4具有85%、90%、95%或超过95%的序列同一性。

[0352] 体外研究已表明,免疫球蛋白G(IgG)和补体蛋白C3对纳米粒子的吸附增加了枯氏细胞(Kupffer cell)对其的摄取,并且在血清中的温育增加了肝灌注后的体内肝摄取(Nagayama等人,Int.J.Pharm.,342:215-21(2007))。报告还表明,半乳糖可以用于经由去唾液酸糖蛋白受体将聚合物基因递送粒子引导至肝细胞(Zhang等人,J.Controlled

Release, 102:749-63(2005))。

[0353] A. 用于改变表面电荷的组合物

[0354] 多聚复合物的多核苷酸递送效率可以通过用在生理pH下带负电的试剂涂覆粒子来改善。优选地,带负电的试剂能够与多聚复合物的带正电表面静电结合。带负电的试剂可以中和多聚复合物的电荷,或者反转多聚复合物的电荷。因此,在一些实施方案中,带负电的试剂向多聚复合物赋予净负电荷。

[0355] 在一些实施方案中,带负电的试剂是带负电的多肽。例如,多肽可以包括天冬氨酸、谷氨酸或其组合,使得多肽的总电荷在中性pH下为负。在一些实施方案中,多肽是由3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或超过20个天冬氨酸残基组成的聚天冬氨酸多肽。在一些实施方案中,多肽是由3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或超过20个谷氨酸残基组成的聚谷氨酸多肽。其他带负电的分子包括小分子(即,MW小于1500、100、750或500道尔顿),诸如透明质酸。

[0356] 增加离子表面上的负电荷可以减少或防止上述负面相互作用,其中带更多正电荷的粒子在循环期间吸引并且结合血液中的带负电的血浆蛋白,并且导致被网状内皮系统(RES)快速清除。在一些实施方案中,粒子的 $\delta$ 电位为约-15mV至约10mV,优选地约-15mV至约8mV,更优选地约-10mV至约8mV,更优选地约-8mV至约8mV。 $\delta$ 电位可以比以上范围更负或更正,前提条件是粒子是稳定的(即不聚集等),并且不容易被从血流中清除。 $\delta$ 电位可以通过用改变表面电荷的一个或多个部分涂覆或官能化粒子表面来操纵。备选地,可以将单体本身官能化,和/或可以将改变表面电荷的另外的单体引入到聚合物中。

[0357] B. 靶向部分

[0358] 在一些实施方案中,多聚复合物包括细胞类型或细胞状态特异性的靶向结构域或靶向信号。可以与多聚复合物相连或不相连的部分的实例包括例如提供分子向特定细胞的递送的靶向部分。靶向信号或序列可以特异于宿主、组织、器官、细胞、细胞器、非核细胞器或细胞区室。例如,本文中的组合物可以用半乳糖基封端的大分子改性以将组合物靶向肝或肝细胞。改性组合物在载体半乳糖残基与仅在肝细胞上大量且高亲和力存在的去唾液酸糖蛋白受体的相互作用后选择性地进入这些细胞。此外,可以将此处的组合物靶向其他特定细胞间区域、区室或细胞类型。

[0359] 在一个实施方案中,靶向信号与位于目标细胞表面上的其配体或受体结合以使载体和细胞膜彼此足够接近,从而使得载体能够渗透到细胞中。本公开的另外的实施方案涉及特异地将多核苷酸递送至特定组织或细胞类型,其中多核苷酸可以编码多肽或干扰不同多核苷酸的表达。递送至细胞的多核苷酸可以编码可以增强或有助于细胞功能的多肽。

[0360] 靶向部分可以是抗体或其抗原结合片段、抗体结构域、抗原、T细胞受体、细胞表面受体、细胞表面粘附分子、主要组织相容性位点蛋白、病毒包膜蛋白和通过噬菌体展示选择的与限定细胞特异性结合的肽。

[0361] 本领域技术人员会理解,可以仅通过改变靶向信号来改变所述多聚复合物的向性。本领域中已知在哺乳动物生物体中的组织中的几乎每种细胞类型都具有一些独特的细胞表面受体或抗原。因此,可以掺入用于细胞表面受体或抗原的几乎任何配体作为靶向信号。例如,肽基激素可以用作靶向部分以将递送靶向具有用于这样的激素的受体的那些细胞。趋化因子和细胞因子可以类似地用作靶向信号以将复合物的递送靶向其目标细胞。已

经开发了各种技术来鉴定在特定细胞或细胞状态中优先表达的基因,并且本领域技术人员可以采用这样的技术来鉴定在感兴趣的目标组织上优先或独特地表达的靶向信号。

#### [0362] 肿瘤靶向

[0363] 在一个实施方案中,靶向信号用于选择性地靶向肿瘤细胞。肿瘤细胞表达可以仅在肿瘤中表达或存在于非肿瘤细胞中但是优先在肿瘤细胞中呈现的细胞表面标记。可以靶向这样的标记以增加多聚复合物到肿瘤细胞的递送。

[0364] 例如,在一些实施方案中,靶向部分是包含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列的多肽。例如,靶向部分可以是精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-赖氨酸(RGDK, mRGD)其他多肽,其包含RGD序列并且能够通过RGD与 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 的相互作用与肿瘤内皮结合。在一些实施方案中,靶向部分包含多肽序列R/KxxR/K,其中“x”是任何氨基酸,并且其允许与神经纤毛蛋白-1(neuropilin-1)结合。与整合蛋白或神经纤毛蛋白-1的结合是用于改善在体内向肿瘤的肿瘤靶向和组织渗透性递送的两种方法。已经报告了类似的方法以促进在体外的配体特异性基因递送和在体内向肝、脾和骨髓的靶向基因递送。

[0365] 其他示例性的肿瘤特异性细胞表面标记包括但不限于:甲胎蛋白(AFP)、C反应蛋白(CRP)、癌抗原-50(CA-50)、与卵巢癌相关的癌抗原-125(CA-125)、与乳腺癌相关的癌抗原15-3(CA15-3)、与胃肠癌相关的癌抗原-19(CA-19)和癌抗原-242、癌胚抗原(CEA)、癌相关抗原(CAA)、嗜铬粒蛋白A、上皮粘蛋白抗原(MC5)、人上皮特异性抗原(HEA)、路易斯(a)抗原、黑色素瘤抗原、黑色素瘤相关抗原100、25和150、粘蛋白样癌相关抗原、多药耐药性相关蛋白(MRPM6)、多药耐药性相关蛋白(MRP41)、Neu癌基因蛋白(C-erbB-2)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、P糖蛋白(mdr1基因产物)、多药耐药性相关抗原、p170、多药耐药性相关抗原、前列腺特异性抗原(PSA)、CD56、NCAM、EGFR、CD44和叶酸受体。在一个实施方案中,靶向信号由对肿瘤细胞表面标记具有特异性的抗体组成。

#### [0366] 抗体

[0367] 另一个实施方案提供了与多聚复合物结合的抗体或其抗原结合片段作为靶向信号。抗体或其抗原结合片段可用于将多聚复合物导向细胞类型或细胞状态。在一个实施方案中,用作为抗体结合结构域的多肽涂覆多聚复合物,所述抗体结合结合域例如来自已知结合抗体的蛋白质,诸如来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的蛋白质A和蛋白质G。已知结合抗体的其他结构域在本领域中是已知的,并且可以被替换。抗体结合结构域将抗体或其抗原结合片段与多聚复合物相连。

[0368] 在特定实施方案中,作为靶向信号的抗体是多克隆的、单克隆的、线性的、人源化的、嵌合的或其片段。代表性的抗体片段是结合非病毒载体的抗体结合部的那些片段,并且包括Fab、Fab'、F(ab')、Fv双特异抗体、线性抗体、单链抗体和本领域中已知的双特异性抗体。

[0369] 在一些实施方案中,靶向信号包括将多聚复合物导向期望目标细胞类型或细胞状态的全部或部分抗体。抗体可以是单克隆的或多克隆的,但是优选地为单克隆的。对于人类基因疗法用途,抗体可以来源于人类基因,并且对细胞表面标记具有特异性,并且如本领域中已知的被产生为降低对人类宿主的潜在免疫原性。例如,可以采用含有整个人类免疫球蛋白基因簇的转基因小鼠,其能够产生“人类”抗体。在一个实施方案中,采用这样的人类抗体的片段作为靶向信号。在一个优选实施方案中,在原核培养物中制备以人类抗体为模型

的单链抗体。

[0370] 在一个实施方案中,靶向信号针对神经系统的细胞,包括大脑和周围神经系统。大脑中的细胞包括多种类型和状态,并且具有特异于所述类型的独特细胞表面分子。此外,细胞类型和状态可以通过常见细胞表面分子的呈递来进一步表征和分组。

[0371] 在一个实施方案中,靶向信号针对在神经系统的细胞表面上表达的特定神经递质受体。神经递质受体的分布在本领域中是众所周知的,并且技术人员可以通过使用神经递质受体特异性抗体作为靶向信号来引导所述组合物。此外,考虑到神经递质对其受体的向性,在一个实施方案中,靶向信号由能够与神经递质受体特异性结合的神经递质或配体组成。

[0372] 在一个实施方案中,靶向信号对神经系统的细胞具有特异性,所述细胞可以包括星形胶质细胞、小胶质细胞、神经元、少突细胞(oligodendrite)和施万细胞(Schwann cell)。这些细胞可以通过其功能、位置、形状、神经递质种类和病理状态进一步划分。神经系统的细胞还可以通过其分化状态来鉴定,例如,干细胞。示例性的特异于这些细胞类型和状态的标记在本领域中是众所周知的,并且包括但不限于CD133和神经球(Neurosphere)。

[0373] 在一个实施方案中,靶向信号针对肌肉骨骼系统的细胞。肌肉细胞包括多种类型,并且具有特异于所述类型和状态的独特细胞表面分子。此外,细胞类型和状态可以通过常见细胞表面分子的呈递来进一步表征和分组。

[0374] 在一个实施方案中,靶向信号针对在肌肉细胞表面上表达的特定神经递质受体。神经递质受体的分布在本领域中是众所周知的,并且技术人员可以通过使用神经递质受体特异性抗体作为靶向信号来引导所述组合物。此外,考虑到神经递质对其受体的向性,在一个实施方案中,靶向信号由神经递质组成。示例性的可以靶向的在肌肉细胞上表达的神经递质包括但不限于乙酰胆碱和去甲肾上腺素。

[0375] 在一个实施方案中,靶向信号对由两种主要分组即类型I和类型II组成的肌肉细胞具有特异性。这些细胞可以通过其功能、位置、形状、肌红蛋白含量和病理状态进一步划分。肌肉细胞还可以通过其分化状态来鉴定,例如,肌肉干细胞。示例性的特异于这些细胞类型和状态的标记在本领域中是众所周知的,包括但不限于MyoD、Pax7和MR4。

[0376] C. 连接体

[0377] 在一些实施方案中,可以用带负电的试剂和靶向部分二者涂覆多聚复合物。在一些实施方案中,带负电的试剂和靶向部分通过连接体连接到一起。连接体可以是多肽,或者本领域中已知的任何其他合适的连接体,例如,聚乙二醇(PEG)。

[0378] 在一些实施方案中,连接体是在生理pH下具有大致中性电荷的多肽。在一些实施方案中,连接体多肽是聚甘氨酸。例如,在一些实施方案中,连接体由3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个甘氨酸残基组成。在一个优选实施方案中,连接体是6-残基聚甘氨酸。

[0379] 在一些实施方案中,单独的或与靶向部分组合的带负电的试剂通过静电相互作用连接至多聚复合物。在一些实施方案中,带负电的试剂、靶向部分或其组合通过与聚合物主链或与连接至聚合物主链的侧链的共价缀合连接至多聚复合物。

[0380] D. 多聚复合物的尺寸以及减少聚集的方法

[0381] 抗聚集性可以是重要的,因为保持小的粒子尺寸限制被肝的清除,并且保持多聚

复合物粒子到目标细胞中的转染能力。因此,在优选实施方案中,多聚复合物具有抗聚集性。优选地,具有或不具有涂层的多聚复合物的半径为约1nm至1000nm,更优选地约1nm至约500nm,最优选地约15nm至约250nm。例如,在一些实施方案中,负载有多核苷酸的涂覆多聚复合物的半径为约150nm至275nm。

[0382] 多核苷酸重量与聚合物重量的比率(多核苷酸:聚合物)、多聚复合物涂层的含量和数量或其组合可以用于调整多聚复合物的尺寸。

[0383] 例如,以下实施例显示,在一些实施方案中,聚合物与DNA的比率为25:1的粒子的转染效率低于聚合物:DNA比率为50:1、100:1、150:1和200:1的粒子的转染效率。对于特定制剂来说最优选的聚合物:多核苷酸比率可以使用本领域中已知的方法(诸如以下实施例中描述的那些)根据经验确定。通常,聚合物:多核苷酸的重量:重量比优选地大于约10:1,更优选地大于约50:1,最优选地大于约100:1。聚合物:多核苷酸的重量:重量比优选地为约10:1至500:1,更优选地约25:1至250:1,最优选地约50:1至150:1。在一些实施方案中,聚合物:多核苷酸的重量比为约100:1。优选地,多聚复合物的形状为球形。

[0384] 实施例还显示,在一些实施方案中,粒子的转染效率受到涂层剂分子与多核苷酸分子的比率(涂层剂:多核苷酸)影响。所述比率以重量表示。对于特定制剂来说最优选的涂层剂:多核苷酸比率可以使用本领域中已知的方法(诸如以下实施例中描述的那些)根据经验确定。通常,涂层剂:多核苷酸的比率大于0,并且优选地低于约50:1,更优选地低于约25:1,最优选地低于约10:1。涂层剂:多核苷酸的比率优选地为约1:1至10:1,更优选地约2.5:1至7.5:1。在一些实施方案中,涂层剂:多核苷酸的比率为约5:1、10:1、5:1和2.5:1的涂层剂:多核苷酸的比率在本文中分别被称为10x、5x和2.5x。优选地,多聚复合物的形状为球形。

[0385] E. 含有PEG嵌段的聚合物

[0386] 聚合物可以用于药物递送,例如,形成粒子(诸如微粒或纳米粒子),或胶束,其可以在所需时间段内以控释方式释放一种或多种治疗性、预防性和/或诊断性药剂。

[0387] pH响应性胶束纳米载体通常通过两亲性嵌段共聚物的自组装形成,并且由亲水性(例如PEG)外壳和能够响应于介质pH的疏水性内芯组成。典型地,在介质pH从中性或微碱性变为弱酸性时,胶束芯经历加速降解,变得完全可溶于水,或者在水性介质中显著溶胀。结果,在生理pH下具有缓慢的药物释放速率的包封药物的胶束可以通过酸性pH触发以快速地卸载药物分子。在先前报道中的构成胶束芯的聚合物区段包括聚(原酸酯)、聚( $\beta$ -氨基酯)、聚(L-组氨酸)等。大部分先前胶束体系的主要缺点是制备共聚物需要多个步骤,以及在共聚物合成期间难以控制聚合物分子量和调整聚合物组成。

[0388] 共聚物表现出随着pH的释放速率变化。在PBS溶液中,在7.4的生理pH和5.0的酸性pH二者下研究了PEG2K-PPMS共聚物样品(PEG2K-PPMS-11%PDL、PEG2K-PPMS-30%PDL和PEG2K-PPMS-51%PDL)的包封DTX的胶束的体外药物释放行为。通常,从所有胶束样品的DTX释放都遵循两相释放动力学,并且表现出明显的pH依赖性。负载DTX的PEG2K-PPMS共聚物胶束在最初12h期间快速释放25-45%药物,然后在随后的132h更平缓地释放另外的25-40%药物。介质pH对药物释放速率的影响是显著的。例如,在温育期(144h)结束时,从PEG2K-PPMS-11%PDL、PEG2K-PPMS-30%PDL和PEG2K-PPMS-51%PDL共聚物的胶束释放的累积DTX的值在7.4的生理pH下分别为66%、60%和55%,其在5.0的酸性pH下相应地增加至85%、

81%和75%。观察到的pH触发的从PEG2K-PPMS共聚物胶束的DTX释放的加速与先前的观察结果一致,即介质pH从7.4变为5.0由于胶束PPMS芯的质子化和尺寸增大而造成胶束的显著溶胀。这种pH触发的胶束尺寸膨胀一定会促进捕获的DTX从胶束芯到水性介质的扩散。在给定pH下,推测DTX释放速率受药物与胶束芯中的PPMS基体之间的相互作用控制。因为预期富含PDL的PEG2K-PPMS共聚物在其胶束内芯中形成强疏水性结构域以更好地捕获和保留疏水性DTX分子,所以从这样的共聚物胶束的药物释放应更平缓 and 持久。这种假设得到实验结果支持,实验结果显示在7.4和5.0的两种pH下,从PEG2K-PPMS共聚物胶束的DTX释放速率随着共聚物的PPMS链段中的PDL含量增加而降低。

[0389] 已知在胶束被肿瘤细胞摄取时,胶束粒子经历在pH在5.5至6.0范围内的内体中和pH在4.5至5.0范围内的溶酶体中的捕获。如以上结果清楚地显示的,这些酸性环境必然会触发从PEG2K-PPMS共聚物胶束的快速DTX释放,因此增强负载药物的胶束的细胞毒性。共聚物中的氨基基团将作为质子海绵以促进内体逃逸。因此,PEG2K-PPMS共聚物胶束所表现的pH响应性是非常理想的,这使得它们成为用于递送抗癌药物的优秀载体。

#### [0390] VII. 制剂

[0391] 使用由被认为安全且有效并且可以施用至个体而不造成不期望的生物副作用或不希望的相互作用的材料构成的药用“载体”来制备制剂。“载体”是除了一种或多种活性成分以外的药物制剂中存在的所有组分。术语“载体”包括但不限于稀释剂、粘结剂、润滑剂、崩解剂、填充剂和包衣组合物。

[0392] 对于关于用于制备片剂和延迟释放剂型的材料、设备和工艺的详细信息,参见Lieberman等人编著的药物剂型:片剂(Pharmaceutical Dosage Forms:Tablets)(New York:Marcel Dekker, Inc., 1989),和Ansel等人,药物剂型和药物递送系统(Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems), 6.sup.th Ed. (Media, PA:Williams&Wilkins, 1995)。

#### [0393] VIII. 制备多聚复合物的方法

##### [0394] A. 用于制备粒子的方法

[0395] 粒子可以使用本领域中已知的各种技术来制备。所使用的技术可以取决于各种因素,包括用于形成纳米粒子的聚合物、所得粒子的所需尺寸范围和对要包封的材料的适用性。

[0396] 可以用于制备纳米粒子的本领域中已知的方法包括但不限于:聚电解质缩合(参见Suk等人, *Biomaterials*, 27, 5143-5150 (2006)); 单和双乳液; 纳米粒子成型和静电自组装(例如,聚乙烯亚胺-DNA或脂质体)。

[0397] 在一个实施方案中,负载的粒子通过将聚合物的溶液(典型地在有机溶剂中的溶液)与感兴趣的多核苷酸组合来制备。聚合物溶液通过将聚合物溶解或悬浮在溶剂中来制备。溶剂应被选择为使得其不负面影响要包封的核酸(例如,使要包封的核酸不稳定或降解)。合适的溶剂包括但不限于DMSO和二氯甲烷。溶剂中的聚合物的浓度可以根据需要改变。在一些实施方案中,浓度为例如25mg/ml。还可以将聚合物溶液在缓冲液例如乙酸钠缓冲液中稀释。

[0398] 接下来,将聚合物溶液与要包封的药剂诸如多核苷酸混合。在将药剂与聚合物溶液组合之前,可以将药剂溶解在溶剂中以形成溶液。在一些实施方案中,在将药剂与聚合物

溶液组合之前,将药剂溶解在生理缓冲液中。聚合物溶液体积与药剂溶液体积的比率可以是1:1。在将溶液用于其期望目的诸如转染之前,典型地将聚合物和药剂的组合温育几分钟以形成粒子。例如,在将溶液用于转染之前,可以将聚合物/多核苷酸溶液温育2、5、10或超过10分钟。温育可以在室温进行。

[0399] 在一些实施方案中,在使用之前,还将粒子与含有涂层剂的溶液一起温育。在将多聚复合物用于转染之前,可以将粒子溶液与涂层剂一起温育2、5、10或超过10分钟。温育可以在室温进行。

[0400] 在一些实施方案中,如果药剂是多核苷酸,则在与聚合物混合之前,首先将多核苷酸与多阳离子复合。复合可以通过将多核苷酸和多阳离子以适当摩尔比混合来实现。当使用多胺作为多阳离子物质时,确定多胺氮与多核苷酸磷酸酯的摩尔比(N/P比)是有用的。在一个优选实施方案中,将抑制性RNA和多胺混合到一起以形成N/P比为大约1:1至1:25、优选地约8:1至15:1的复合物。实现特定摩尔比所需的多胺溶液的体积可以根据下式确定:

$$V_{\text{NH}_2} = \frac{C_{\text{inhRNA, 最终}} \times M_{\text{w, inhRNA}} / C_{\text{inhRNA, 最终}} \times M_{\text{w, P}} \times \Phi_{\text{N:P}} \times \Phi V_{\text{最终}}}{C_{\text{NH}_2} / M_{\text{w, NH}_2}}$$

[0401]

[0402] 其中 $M_{\text{w, inhRNA}}$  = 抑制性RNA的分子量,  $M_{\text{w, P}}$  = 抑制性RNA的磷酸酯基团的分子量,  $\Phi_{\text{N:P}}$  = N:P比(来自多胺的氮与来自抑制性RNA的磷酸酯比率的摩尔比),  $C_{\text{NH}_2, \text{储备}}$  = 多胺储备溶液的浓度, 以及 $M_{\text{w, NH}_2}$  = 每多胺氮的分子量。将多核苷酸与多阳离子混合以缩合多核苷酸的方法在本领域中是已知的。参见例如美国公开申请号2011/0008451。

[0403] 术语“多阳离子”是指在选定pH、优选地生理pH下具有正电荷、优选地至少2个正电荷的化合物。多阳离子部分在选定pH值下具有约2至约15个正电荷, 优选地约2至约12个正电荷, 并且更优选地约2至约8个正电荷。许多多阳离子在本领域中是已知的。多阳离子的合适成分包括碱性氨基酸及其衍生物, 诸如精氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸和组氨酸; 阳离子树枝状聚合物; 以及氨基多糖。合适的多阳离子的结构可以是线性的(诸如线性四赖氨酸)、分支的或树枝状的。

[0404] 示例性的多阳离子包括但不限于: 基于丙烯酰胺和2-丙烯酰胺基-2-甲基丙烷三甲胺的合成多阳离子, 聚(N-乙基-4-乙烯基吡啶)或类似的季铵化聚吡啶, 二乙基氨基乙基聚合物和葡聚糖缀合物, 硫酸多粘菌素B, 脂多胺, 聚(烯丙胺)诸如强多阳离子聚(二甲基二烯丙基氯化铵), 聚乙烯亚胺, 聚凝胺(polybrene), 以及多肽诸如鱼精蛋白、组蛋白多肽、聚赖氨酸、聚精氨酸和聚鸟氨酸。

[0405] 在一些实施方案中, 多阳离子是多胺。多胺是具有两个以上伯胺基团的化合物。合适的天然存在的多胺包括但不限于: 精胺、亚精胺、尸胺和腐胺。在一个优选实施方案中, 多胺是亚精胺。

[0406] 在另一个实施方案中, 多阳离子是环状多胺。环状多胺在本领域中是已知的, 并且例如在美国专利号5,698,546、WO 1993/012096和WO 2002/010142中进行描述。示例性的环状多胺包括但不限于: 轮环藤宁(cyclen)。

[0407] 精胺和亚精胺是通过ODC(鸟氨酸脱羧酶)的作用由L-鸟氨酸产生的腐胺(1,4-二氨基丁烷)的衍生物。L-鸟氨酸是通过精氨酸酶的L-精氨酸降解的产物。亚精胺是通过亚精胺合酶(SpdS)产生的三胺结构, 所述亚精胺合酶利用脱羧的S-腺苷甲硫氨酸(dcAdoMet)3-

氨基丙基供体催化腐胺(1,4-二氨基丁烷)的单烷基化。用3-氨基丙基供体对腐胺的两个氨基的形式烷基化生成对称四胺精胺。精胺的生物合成通过在dcAdoMet的存在下的精胺合酶(SpmS)的作用进行至亚精胺。3-氨基丙基供体(dcAdoMet)由S-腺苷甲硫氨酸通过用甲硫氨酸腺苷转移酶对L-甲硫氨酸的顺序转化、然后用AdoMetDC(S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶)进行脱羧而得到。因此,腐胺、亚精胺和精胺是来源于氨基酸L-精氨酸(L-鸟氨酸,腐胺)和L-甲硫氨酸(dcAdoMet,氨基丙基供体)的代谢物。

[0408] IX. 使用粒子/胶束的方法

[0409] A. 药物递送

[0410] 粒子可以用于将有效量的一种或多种治疗性、诊断性和/或预防性药剂递送至对这样的治疗有需要的患者。待施用的药剂的量可以由处方医师容易地确定,并且取决于患者的年龄和体重以及要治疗的疾病或病症。

[0411] 粒子可用于药物递送(如本文中使用的“药物”包括治疗性、营养性、诊断性和预防性药剂),无论是静脉内注射、皮下注射或肌肉注射,施用至鼻部或肺部系统,注射到肿瘤环境中,施用至粘膜表面(阴道的、直肠的、颊的、舌下的),还是包封用于口服递送。粒子可以作为干粉,作为水性混悬剂(在水、盐水、缓冲盐水等中),在水凝胶、有机凝胶或脂质体中,在胶囊、片剂、锭剂或其他标准药物赋形剂中施用。

[0412] B. 转染

[0413] 组合物可以用于多核苷酸的细胞转染。如以下更详细地讨论的,转染可以在体外或在体内发生,并且可以应用于包括基因疗法和疾病治疗的应用。当与对照相比时,组合物可以更高效、毒性更低或其组合。在一些实施方案中,对照是用备选转染试剂诸如LIPOFECTAMINE 2000或聚乙烯亚胺(PEI)处理的细胞。

[0414] 转染通过使细胞与含有多聚复合物的溶液接触来进行。对于体内方法,接触典型地在将溶液施用至受试者之后在体内发生。对于体外方法,典型地将溶液添加到细胞培养物中,并且使其接触细胞数分钟、数小时或数日。随后可以洗涤细胞以移除过量的多聚复合物。

[0415] 由多聚复合物递送的具体多核苷酸可以由本领域技术人员根据要治疗的病况或疾病进行选择。多核苷酸可以是例如感兴趣的基因或cDNA、mRNA、功能核酸诸如抑制性RNA、tRNA、rRNA或编码感兴趣的基因或cDNA、功能核酸、tRNA或rRNA的表达载体。在一些实施方案中,组合施用两种以上的多核苷酸。

[0416] 组合物可以用于在体外将多核苷酸递送至细胞的方法。例如,多聚复合物可以用于细胞的体外转染。所述方法典型地包括使细胞与包含有效量的多核苷酸的多聚复合物接触以将多核苷酸引入到细胞的细胞质中。在一些实施方案中,将多核苷酸以有效量递送至细胞以改变细胞的基因型或表型。细胞可以是受试者分离的原代细胞,或确立细胞系中的细胞。细胞可以是同源细胞类型,或可以是不同细胞类型的异源混合物。例如,可以将多聚复合物引入到来自具有不同类型细胞的异源细胞系的细胞的细胞质中,诸如在饲养细胞培养物或各种分化状态下的混合培养物中。细胞可以是可以在细胞培养物中无限期维持的转化细胞系。示例性的细胞系是可从美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection)获得的包括肿瘤细胞系的那些。

[0417] 可以转染任何真核细胞以产生表达特定核酸(例如代谢基因)的细胞,包括原代细

胞以及确立细胞系。合适类型的细胞包括但不限于：未分化或部分分化的细胞，包括干细胞、全能细胞、多能细胞、胚胎干细胞、内细胞团(inner mass cell)、成体干细胞、骨髓细胞、来自脐带血的细胞以及来源于外胚层、中胚层或内胚层的细胞。合适的分化细胞包括：体细胞、神经元细胞、骨骼肌、平滑肌、胰细胞、肝细胞和心肌细胞。在另一个实施方案中，可以使用所述组合物将siRNA、反义多核苷酸(包括siRNA或反义多核苷酸)或抑制性RNA转染到细胞中。

[0418] 所述方法在个体化疗法领域中特别有用，例如，以修复有缺陷基因、去分化细胞或重编细胞。例如，首先使用本领域中已知的方法从供体分离目标细胞，使其与包含引起体外(离体)变化的多核苷酸的多聚复合物接触，并且将其施用至有此需要的患者。来源或细胞包括直接从患者或同种异体供体收获的细胞。在优选实施方案中，施用至受试者的目标细胞将是自体同源的，例如来源于受试者，或者是同系的。也可以从抗原匹配的遗传无关的供体(通过国家登记处鉴定)分离同种异体细胞，或者通过使用从遗传相关的兄弟姐妹或父母获得或得到的目标细胞分离出同种异体细胞。

[0419] 细胞可以通过阳性和/或阴性选择技术进行选择。例如，可以将结合特定细胞表面蛋白的抗体与磁珠缀合，并且采用免疫原性程序来回收所需的细胞类型。在瞬时转染之前富集目标细胞可以是理想的。如本文中使用的，在针对特定目标细胞富集的组合物(组成, composition)的情况下，“富集”表示所需成分(例如目标细胞)的比例高于在细胞的天然来源中发现的比例。相对于细胞的天然来源，细胞的组合物(组成, composition)可以富集至少一个数量级，优选地两个或三个数量级，并且更优选地10、100、200或1000个数量级。一旦分离出目标细胞，它们就可以根据本领域中已知的确立方法通过在合适的培养基中生长来繁殖。确立细胞系也可以用于所述方法。如果需要的话，在转染之前，可以将细胞冷冻储存。

[0420] 接下来，在体外使细胞与组合物接触，以修复、去分化和/或重编细胞。可以监测细胞，并且可以选择所需细胞类型用于治疗施用。

[0421] 在修复、去分化和/或再分化和/或重编之后，将细胞施用至有此需要的患者。在最优选的实施方案中，从同一患者分离细胞，并且将细胞施用回同一患者。在备选实施方案中，从一个患者分离细胞，并且将细胞施用至第二个患者。所述方法还可以用于产生可以长期储存以备后用的已改变细胞的冷冻储备物。在一个实施方案中，从患者分离成纤维细胞、角质形成细胞或造血干细胞，在体外将其修复、去分化或重编以为患者提供治疗性细胞。

#### [0422] C. 体内方法

[0423] 所述组合物可以用于在体内将多核苷酸递送至细胞的方法。已经发现，与包括LIPOFECTAMINE 2000、PEI和甚至其他PMSC的备选转染试剂相比，聚合物对于多核苷酸的全身体内转染来说更高效和/或毒性更低。因此，在一些实施方案中，在体内全身施用包含治疗性多核苷酸的细胞特异性多聚复合物以治疗疾病，例如癌症。

[0424] 在一些体内方法中，将组合物以治疗有效量施用至受试者。如在本文中使用的，术语“有效量”或“治疗有效量”意指足以治疗、抑制或缓解正在治疗的病症的一种或多种症状或者以其他方式提供所需的药理学和/或生理学效果的剂量。精确的剂量将会根据多种因素而改变，诸如依赖于受试者的变量(例如，年龄、免疫系统健康等)、疾病和正在进行的治疗。

[0425] 药物组合物可以用于通过肠胃外(肌内、腹膜内、静脉内(IV)或皮下注射)、经皮

(被动地或者使用离子电渗疗法或电穿孔)或经粘膜(鼻的、阴道的、直肠的或舌下的)的施用途径的施用,或者使用生物侵蚀性插入物的施用,并且可以以适合于每种施用途径的剂型进行配制。

[0426] 在一些实施方案中,组合物以对将组合物递送到目标细胞有效的量全身施用,例如,通过静脉内或腹膜内施用。其他可行途径包括经皮或口服。

[0427] 在一些实施方案中,组合物局部地施用,例如通过直接注射到要治疗的部位中。在一些实施方案中,将组合物注射或以其他方式直接施用至一个或多个肿瘤中。典型地,局部注射造成组合物的局部浓度升高,其大于通过全身施用可以实现的浓度。在一些实施方案中,通过使用导管或注射器将组合物局部地递送至适当的细胞。将这样的组合物局部递送至细胞的其他手段包括使用输液泵(例如,来自Alza Corporation,Palo Alto,Calif.)或将组合物并入到聚合物植入物中(参见例如,P.Johnson和J.G.Lloyd-Jones编著的药物递送系统(Drug Delivery Systems)(Chichester,England:Ellis Horwood Ltd.,1987),这可以实现多聚复合物向植入物的附近区域的缓释。

[0428] 可以将多聚复合物直接地(诸如通过使其与细胞接触)或间接地(诸如通过任何生物过程的作用)提供至细胞。例如,可以将多聚复合物配制到生理学可接受的载体或载剂中,并且注射到围绕细胞的组织或流体中。多聚复合物可以通过简单扩散、内吞作用或通过任何主动或被动转运机制跨过细胞膜。

[0429] 组合物可以在用于治疗基因相关疾病或病症的基因疗法方案中使用。还可以使用所述组合物和方法来治疗或减轻细胞功能障碍。在一些实施方案中,特别地以适合基因疗法的疾病为目标。疾病可以是儿童(例如小于18岁、典型地小于12岁的个体)或者成人(例如18岁以上的个体)的疾病。因此,本公开的实施方案涉及通过将包含多核苷酸的多聚复合物转染到受疾病影响的细胞中来治疗被诊断为患有疾病的宿主,并且其中所述多核苷酸编码治疗性蛋白质。在另一个实施方案中,抑制性RNA针对特定的细胞类型或状态以减少或消除蛋白质的表达,从而实现治疗效果。本公开涵盖了操纵、加强或替换基因以治疗由基因缺陷或异常引起的疾病。

[0430] 可以用本文中的组合物治疗的合适的基因类疾病包括但不限于:

[0431] 线粒体疾病:阿尔珀斯病(Alpers Disease);巴斯综合征(Barth syndrome); $\beta$ -氧化缺陷;肉碱-酰基-肉碱缺乏症;肉碱缺乏症;辅酶Q10缺乏症;复合物I缺乏症;复合物II缺乏症;复合物III缺乏症;复合物IV缺乏症;复合物V缺乏症;细胞色素c氧化酶(COX)缺乏症;LHON-利伯遗传性视神经病(Leber Hereditary Optic Neuropathy);MM-线粒体肌病(Mitochondrial Myopathy);LIMM-致死性婴儿线粒体肌病(Lethal Infantile Mitochondrial Myopathy);MMC-母体肌病和心肌病(Maternal Myopathy and Cardiomyopathy);NARP-神经源性肌无力、共济失调和视网膜色素变性(Neurogenic muscle weakness,Ataxia,and Retinitis Pigmentosa);利氏病(Leigh Disease);FICP-致命性婴儿心肌病Plus(Fatal Infantile Cardiomyopathy Plus),一种与MELAS相关的心肌病;MELAS-线粒体脑肌病伴乳酸性酸中毒和卒中样发作(Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Strokelike episodes);LDYT-利伯遗传性视神经病和张力障碍(Leber's hereditary optic neuropathy and Dystonia);MERRF-肌阵挛型癫痫伴破碎红肌纤维综合征(Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Muscle

Fibers);MHCM-母体遗传性肥厚性心肌病(Maternally inherited Hypertrophic CardioMyopathy);CPEO-慢性进行性眼外肌麻痹(Chronic Progressive External Ophthalmoplegia);KSS-卡恩斯-塞尔综合征(Kearns Sayre Syndrome);DM-糖尿病(Diabetes Mellitus);DMD糖尿病+耳聋(Diabetes Mellitus+Deafness);CIPO-慢性假性肠梗阻伴肌病和眼肌麻痹(Chronic Intestinal Pseudoobstruction with myopathy and Ophthalmoplegia);DEAF-母体遗传性耳聋或氨基糖苷类致聋(Maternally inherited DEAFness or aminoglycoside-induced DEAFness);PEM-进行性脑病(Progressive encephalopathy);SNHL-感觉神经性听力损失(SensoriNeural Hearing Loss);脑肌病(Encephalomyopathy);线粒体细胞病(Mitochondrial cytopathy);扩张型心肌病(Dilated CardioMyopathy);GER-胃肠反流(Gastrointestinal Reflux);DEMCHO-痴呆和舞蹈病(Dementia and Chorea);AMDF-共济失调,肌阵挛(Ataxia,Myoclonus);运动不耐(Exercise Intolerance);ESOC癫痫、卒中、视神经萎缩&认知功能减退(Epilepsy, Strokes,Optic atrophy,&Cognitive decline);FBSN家族性双侧纹状体坏死(Familial Bilateral Striatal Necrosis);FSGS局灶性节段性肾小球硬化(Focal Segmental Glomerulosclerosis);LIMM致死性婴儿线粒体肌病(Lethal Infantile Mitochondrial Myopathy);MDM肌病伴糖尿病(Myopathy and Diabetes Mellitus);MEPR肌阵挛型癫痫伴精神运动退化(Myoclonic Epilepsy and Psychomotor Regression);MERME MERRF/MELAS重叠病;MHCM母体遗传性肥厚性心肌病(Maternally Inherited Hypertrophic CardioMyopathy);MICM母体遗传性心肌病(Maternally Inherited CardioMyopathy);MILS母体遗传性利氏综合征(Maternally Inherited Leigh Syndrome);线粒体脑心肌病(Mitochondrial Encephalocardiomyopathy);多系统线粒体异常(Multisystem Mitochondrial Disorder)(肌病、脑病、失明、听力损失、周围神经病);NAION非动脉炎性前部缺血性视神经病变(Nonarteritic Anterior Ischemic Optic Neuropathy);NIDDM非胰岛素依赖型糖尿病(Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus);PEM进行性脑病(Progressive Encephalopathy);PME进行性肌阵挛型癫痫(Progressive Myoclonus Epilepsy);RTT雷特综合征(Rett Syndrome);SIDS婴儿猝死综合征(Sudden Infant Death Syndrome);MIDD母体遗传性糖尿病和耳聋(Maternally Inherited Diabetes and Deafness);以及MODY青少年的成年型糖尿病(Maturity-Onset Diabetes of the Young)。

[0432] 细胞核疾病:肌营养不良(Muscular Dystrophies),埃-范二氏综合征(Ellis-van Creveld syndrome),马凡综合征(Marfan syndrome),肌强直性营养不良(Myotonic dystrophy),脊髓性肌萎缩(Spinal muscular atrophy),软骨发育不全(Achondroplasia),肌萎缩性侧索硬化(Amyotrophic lateral sclerosis),夏-马-图三氏综合征(Charcot-Marie-Tooth syndrome),科凯恩综合征(Cockayne syndrome),骨畸形性发育不良(Diastrophic dysplasia),杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy),埃-范二氏综合征(Ellis-van Creveld syndrome),进行性骨化性纤维发育不良(Fibrodysplasia ossificans progressive),阿尔茨海默病(Alzheimer disease),快乐木偶综合征(Angelman syndrome),癫痫(Epilepsy),特发性震颤(Essential tremor),脆性X综合征(Fragile X syndrome),弗里德赖希共济失调(Friedreich's ataxia),亨廷顿病(Huntington disease),尼曼-皮克病(Niemann-Pick disease),帕金森病(Parkinson

disease), 普拉德-威利综合征 (Prader-Willi syndrome), 雷特综合征 (Rett syndrome), 脊髓小脑萎缩 (Spinocerebellar atrophy), 威廉姆斯综合征 (Williams syndrome), 共济失调毛细血管扩张症 (Ataxia telangiectasia), 贫血 (Anemia), 镰状细胞 (sickle cell), 伯基特淋巴瘤 (Burkitt lymphoma), 戈谢病 (Gaucher disease), 血友病 (Hemophilia), 白血病 (Leukemia), 阵发性睡眠性血红蛋白尿 (Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria), 卟啉病 (Porphyria), 地中海贫血 (Thalassemia), 克罗恩病 (Crohn's disease),  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶缺乏症 (Alpha-1-antitrypsin deficiency), 囊性纤维化 (Cystic fibrosis), 耳聋 (Deafness), 彭德莱综合征 (Pendred syndrome), 青光眼 (Glaucoma), 脑回状脉络膜视网膜萎缩 (Gyrate atrophy of the choroid and retina), 肾上腺增生 (Adrenal hyperplasia), 肾上腺脑白质营养不良 (Adrenoleukodystrophy), 科凯恩综合征 (Cockayne syndrome), 长QT综合征 (Long QT syndrome), 高IgM免疫缺陷, 奥尔波特综合征 (Alport syndrome), 埃-范二氏综合征 (Ellis-van Creveld syndrome), 进行性骨化性纤维发育不良 (Fibrodysplasia ossificans progressive), 瓦登伯格综合征 (Waardenburg syndrome), 沃纳综合征 (Werner syndrome)。

[0433] 传染病: 病毒性- 艾滋病 (AIDS), 艾滋病相关综合症 (AIDS Related Complex), 水痘 (Chickenpox) (水痘 (Varicella)), 普通感冒 (Common cold), 巨细胞病毒感染 (Cytomegalovirus Infection), 科罗拉多蜱传热 (Colorado tick fever), 登革热 (Dengue fever), 埃博拉出血热 (Ebola haemorrhagic fever), 流行性腮腺炎 (Epidemic parotitis), 流感 (Flu), 手足口病 (Hand, foot and mouth disease), 肝炎 (Hepatitis)- 单纯疱疹 (Herpes simplex), 带状疱疹 (Herpes zoster), HPV, 流行性感冒 (Influenza), 拉沙热 (Lassa fever), 麻疹 (Measles), 马尔堡出血热 (Marburg haemorrhagic fever), 传染性单核细胞增多症 (Infectious mononucleosis), 腮腺炎 (Mumps), 脊髓灰质炎 (Poliomyelitis), 进行性多灶性白质脑病 (Progressive multifocal leukoencephalopathy), 狂犬病 (Rabies), 风疹 (Rubella), SARS, 天花 (Smallpox) (痘疮 (Variola)), 病毒性脑炎 (Viral encephalitis), 病毒性胃肠炎 (Viral gastroenteritis), 病毒性脑膜炎 (Viral meningitis), 病毒性肺炎 (Viral pneumonia), 西尼罗河病 (West Nile disease)- 黄热病 (Yellow fever); 细菌性- 炭疽 (Anthrax), 细菌性脑膜炎 (Bacterial Meningitis), 布鲁氏菌病 (Brucellosis), 腺鼠疫 (Bubonic plague), 弯曲杆菌病 (Campylobacteriosis), 猫抓病 (Cat Scratch Disease), 霍乱 (Cholera), 白喉 (Diphtheria), 流行性斑疹伤寒 (Epidemic Typhus), 淋病 (Gonorrhea), 汉森氏病 (Hansen's Disease), 军团病 (Legionellosis), 麻风 (Leprosy), 钩端螺旋体病 (Leptospirosis), 李斯特菌病 (Listeriosis), 莱姆病 (Lyme Disease), 类鼻疽 (Melioidosis), MRSA感染, 诺卡菌病 (Nocardiosis), 百日咳 (Pertussis), 肺炎球菌性肺炎 (Pneumococcal pneumonia), 鹦鹉热 (Psittacosis), Q热 (Q fever), 落基山斑疹热 (Rocky Mountain Spotted Fever 或 RMSF), 沙门氏菌病 (Salmonellosis), 猩红热 (Scarlet Fever), 志贺氏菌病 (Shigellosis), 梅毒 (Syphilis), 破伤风 (Tetanus), 沙眼 (Trachoma), 结核病 (Tuberculosis), 兔热病 (Tularemia), 伤寒 (Typhoid Fever), 斑疹伤寒 (Typhus), 百日咳 (Whooping Cough); 寄生虫性- 非洲锥虫病 (African trypanosomiasis), 阿米巴病 (Amebiasis), 蛔虫病 (Ascariasis), 巴贝虫病 (Babesiosis), 查加斯病 (Chagas Disease),

支睾吸虫病 (Clonorchiasis), 隐孢子虫病 (Cryptosporidiosis), 囊虫病 (Cysticercosis), 裂头绦虫病 (Diphyllobothriasis), 龙线虫病 (Dracunculiasis), 包虫病 (Echinococcosis), 蛲虫病 (Enterobiasis), 片吸虫病 (Fascioliasis), 姜片虫病 (Fasciolopsiasis), 丝虫病 (Filariasis), 自由生活阿米巴感染 (Free-living amebic infection), 贾第虫病 (Giardiasis), 腭口线虫病 (Gnathostomiasis), 膜壳绦虫病 (Hymenolepiasis), 等孢球虫病 (Isosporiasis), 黑热病 (Kala-azar), 利什曼病 (Leishmaniasis), 疟疾 (Malaria), 后殖吸虫病 (Metagonimiasis), 蝇蛆病 (Myiasis), 盘尾丝虫病 (Onchocerciasis), 虱病 (Pediculosis), 蛲虫感染 (Pinworm Infection), 疥疮 (Scabies), 血吸虫病 (Schistosomiasis), 绦虫病 (Taeniasis), 弓蛔虫病 (Toxocariasis), 弓形虫病 (Toxoplasmosis), 旋毛虫病 (Trichinellosis), 毛线虫病 (Trichinosis), 鞭虫病 (Trichuriasis), 锥虫病 (Trypanosomiasis)。

[0434] 癌症: 乳腺和卵巢癌, 伯基特淋巴瘤 (Burkitt lymphoma), 慢性粒细胞性白血病 (Chronic myeloid leukemia), 结肠癌, 肺癌, 恶性黑色素瘤, 多发性内分泌瘤病 (Multiple endocrine neoplasia), 神经纤维瘤病, p53LiéFrauMeni, 胰腺癌, 前列腺癌, 视网膜母细胞瘤, 希-林二氏综合征 (von Hippel-Lindau syndrome), 多囊肾病, 结节性硬化症。

[0435] 代谢病: 肾上腺脑白质营养不良 (Adrenoleukodystrophy), 动脉粥样硬化 (Atherosclerosis), 卵黄状黄斑变性 (Best disease), 戈谢病 (Gaucher disease), 葡萄糖半乳糖吸收不良 (Glucose galactose malabsorption), 脑回状萎缩 (Gyrate atrophy), 幼年起病型糖尿病 (Juvenile onset diabetes), 肥胖 (Obesity), 阵发性睡眠性血红蛋白尿 (Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria), 苯丙酮尿症 (Phenylketonuria), 雷夫叙姆病 (Refsum disease), 丹吉尔病 (Tangier disease), 泰-萨二氏病 (Tay-Sachs disease), 肾上腺脑白质营养不良 (Adrenoleukodystrophy), 2型糖尿病 (Type 2Diabetes), 戈谢病 (Gaucher disease), 遗传性血色病 (Hereditary hemochromatosis), 莱-奈二氏综合征 (Lesch-Nyhan syndrome), 槭糖尿病 (Maple syrup urine disease), 门克斯综合征 (Menkes syndrome), 尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease), 胰腺癌 (Pancreatic cancer), 普拉德-威利综合征 (Prader-Willi syndrome), 卟啉病 (Porphyria), 雷夫叙姆病 (Refsum disease), 丹吉尔病 (Tangier disease), 威尔逊病 (Wilson's disease), 泽韦格综合征 (Zellweger syndrome), 早老症 (progerias), 重度联合免疫缺陷病 (SCID)。

[0436] 自身免疫性疾病: 自身免疫性多腺体综合征 (Autoimmune polyglandular syndrome), 狼疮 (lupus), I型糖尿病 (type I diabetes), 硬皮病 (scleroderma), 多发性硬化 (multiple sclerosis), 克罗恩病 (Crohn's disease), 慢性活动性肝炎 (chronic active hepatitis), 类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis), 格雷夫斯病 (Graves' disease), 重症肌无力 (myasthenia gravis), 肌炎 (myositis), 抗磷脂综合征 (antiphospholipid syndrome, APS), 葡萄膜炎 (uveitis), 多肌炎 (polymyositis), 雷诺氏现象 (Raynaud's phenomenon), 和脱髓鞘性神经病 (demyelinating neuropathies), 以及罕见病, 诸如风湿性多肌痛 (polymyalgia rheumatica), 颞动脉炎 (temporal arteritis), 舍格伦综合征 (Sjogren's syndrome), 白塞氏病 (Behcet's disease), 丘-施二氏综合征 (Churg-Strauss syndrome), 和高安氏动脉炎 (Takayasu's arteritis)。

[0437] 炎症性疾病: 脱发 (Alopecia), 骨畸形性发育不良 (Diastrophic dysplasia), 埃-范

二氏综合征 (Ellis-van Creveld syndrome), 哮喘 (Asthma), 关节炎 (Arthritis), 包括骨关节炎 (osteoarthritis), 类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis), 和脊柱关节病 (spondyloarthropathies)。

[0438] 年B相关疾病: 阿尔茨海默病 (Alzheimer Disease), 帕金森病 (Parkinson's Disease), 动脉粥样硬化 (Atherosclerosis), 年龄相关性黄斑变性 (Age-Related Macular Degeneration), 年龄相关性骨质疏松症 (Age-related Osteoporosis)。

[0439] 所述方法和组合物还可以用于治疗、管理或减轻与衰老相关的症状, 用于组织再生/再生医学、干细胞移植、诱导可逆基因修饰、表达抑制性RNA、认知增强、性能增强以及对人类或非人类动物的美容改变。

[0440] D. 转基因非人动物

[0441] 所述组合物和方法还可以用于产生转基因非人类动物。特别地, 合子显微注射、细胞核转移、卵裂球电融合和胚胎干 (ES) 细胞胞质杂种的囊胚注射各自为产生转基因动物提供了可行的策略。在一个实施方案中, 作为产生嵌合体小鼠的手段, 将胚胎干 (ES) 细胞转染并且注射到哺乳动物胚胎的囊胚中。在另一个实施方案中, 首先制备胚胎干 (ES) 细胞, 然后囊胚注射到胚胎中。携带感兴趣的特定基因和修饰的细胞的使用使得能够产生和研究转染的DNA的后果。理论上, 这种技术提供了将任何多核苷酸转移到整个生物体中的前景。例如, 所述方法和组合可以用于产生在特定的细胞类型或细胞状态中具有所递送的多核苷酸的小鼠。

[0442] 可以通过将本公开的组合物施用至非人类生物体来用组合物转染单细胞或多细胞非人类生物体、优选地非人类哺乳动物、更优选地小鼠。在一个实施方案中, 多核苷酸仍然是游离基因的, 并且不会稳定地整合到宿主生物体的基因组中。在另一个实施方案中, 多核苷酸阻止感兴趣的基因的表达。因此, 多核苷酸在宿主的特定细胞中的表达可以通过施用至宿主的多核苷酸的量来控制。

[0443] 经转染的非人类生物体相对于传统转基因生物体具有多个优点。例如, 与传统转基因生物体相比, 在没有有性生殖的情况下, 本文中的经转染的生物体可以在更少的时间内产生。此外, 感兴趣的多核苷酸在宿主中的表达可以通过施用至宿主的感兴趣的多核苷酸的量来直接调节。感兴趣的多核苷酸的剂量控制表达可能与所观察到的转染动物中的表型和变化相关。另外, 在感兴趣的多核苷酸中可以包含可诱导表达和/或复制控制元件以提供可诱导且剂量依赖性的表达和/或复制。合适的可诱导表达和/或复制控制元件在本领域中是已知的。此外, 可以在不影响动物的整个细胞的情况下研究在特定细胞类型和状态中的基因和基因修饰的影响。

[0444] X. 试剂盒

[0445] 还公开了试剂盒或套件 (pack), 其提供进行真核或原核生物体的转染、特别是特定细胞类型或细胞状态的转染所需的元件。根据一个实施方案, 提供了一种试剂盒, 其包含所述聚合物和任意的多聚复合物涂料, 例如目标特异性涂料。可以将所述聚合物与使用者选择的多核苷酸组合以形成可以用于转染宿主或宿主细胞的复合物。可以进一步将多聚复合物与涂料混合以提供细胞类型或细胞状态特异性向性。

[0446] 可以将试剂盒的各个组分包装到各种容器中, 例如, 小瓶、管、微量滴定孔板、瓶子等。其他试剂可以被包含在单独的容器中, 并且与试剂盒一起提供; 例如, 阳性对照样品、阴

性对照样品、缓冲剂、细胞培养基等。优选地,试剂盒还会包含使用说明书。

[0447] 实施例

[0448] 将参照以下非限制性实施例进一步理解本发明。

[0449] 要解决的问题:可以使用蛋白质治疗剂作为各种疾病的非常有效的医学治疗(Harris等人,Pharmacol.Biochem.Behav.150e151 48e56(2016),Jiang等人,J.Control Release 213 36e44(2015),Natarajan等人,Transl.Res.188 10e26(2017),Efremenko等人,J.Control Release 247 175e181(2017),Jiang等人,Funct.Mater.28(6)1703982(2018),Jiang等人,J.Control Release 231 38e49(2016))。然而,这种治疗类型的临床使用受其成本和全身施用后的不稳定性限制,表明需要新的方法以确保持续、高效且安全的递送(Carter,Exp.Cell Res.317(9)1261e1269(2011))。基因疗法由于在低施用频率下的持续蛋白质分泌的希望而有吸引力(Weissman,Expert Rev.Vaccines 14(2)265e281(2015))。

[0450] 尽管利用病毒的基于DNA的疗法提供了长期蛋白质表达的可能性,但是它们也引起大量安全问题,尤其是关于插入诱变的风险、严重免疫反应的诱导和难以控制蛋白质表达水平的问题。与DNA相比,mRNA在不进入细胞核的情况下引起编码蛋白质的表达,从而展示出在转染非分裂细胞时的更高效率,同时降低插入诱变的风险。mRNA疗法具有额外的益处,即其用量是可放大的,并且治疗与胞质溶胶中的mRNA稳定性瞬时相关。

[0451] 问题的解决方案:本文中提供了用于合成聚合物材料文库的“自上而下”的方法。聚(胺-共-酯)(PACE)已经用于基因递送。PACE:pDNA多聚复合物是最高效且毒性最低的非病毒载体之一(Zhou等人,Nat.Mater.11(1)82e90(2012))。PACE聚合物被设计为具有数个关键特征:(1)生物可降解性,其由聚合物的主链中的酯键提供;(2)低阳离子电荷密度,其允许与核酸的静电复合,同时避免与高阳离子聚合物相关的毒性;和(3)疏水性,其由使多聚复合物稳定的内酯基团提供。脂肪酶化学的耐受性提供了高化学通用性,这允许通过单体选择调整聚合物结构,以容易地生成不同材料的家族。这样的通用性有望将PACE技术转用于mRNA递送。

[0452] 已经对化学和显示为有效地将药剂递送至肺部系统的递送系统进行了进一步改进。

[0453] 实施例1:PACE聚合物可以递送mRNA

[0454] 材料和方法

[0455] 材料

[0456]  $\omega$ -十五内酯(PDL)、癸二酸二乙酯(DES)、癸二酸、N-甲基二乙醇胺(MDEA)、氯仿、二氯甲烷、己烷、氯仿-d、乙酰丙酮铬(III)、乙二胺、乙醇胺、甘氨酸和1,10-羰基二咪唑(CDI)购自Sigma Aldrich(圣路易斯,MO),并且原样使用。2-[(2-氨基乙基)(甲基)氨基]乙醇(AEMAE)购自ChemBridge Corporation(圣地亚哥,CA)。负载在丙烯酸树脂(Novozym 435)上的固定化南极假丝酵母脂肪酶B(Immobilized *Candida antarctica* lipase B)(CALB)也获自Sigma Aldrich,并且在使用之前将其在50°C在2.0mmHg下干燥20h。TransIT-mRNA转染试剂盒购自Mirus Bio LLC(麦迪逊,WI)。编码萤光素酶的改性Fluc mRNA和编码红细胞生成素(EPO)的鼠EPO mRNA购自TriLink Biotechnologies(圣地亚哥,CA)。HEK293细胞、Daoy细胞和SH-SY5Y细胞购自ATCC(马纳萨斯,VA)。

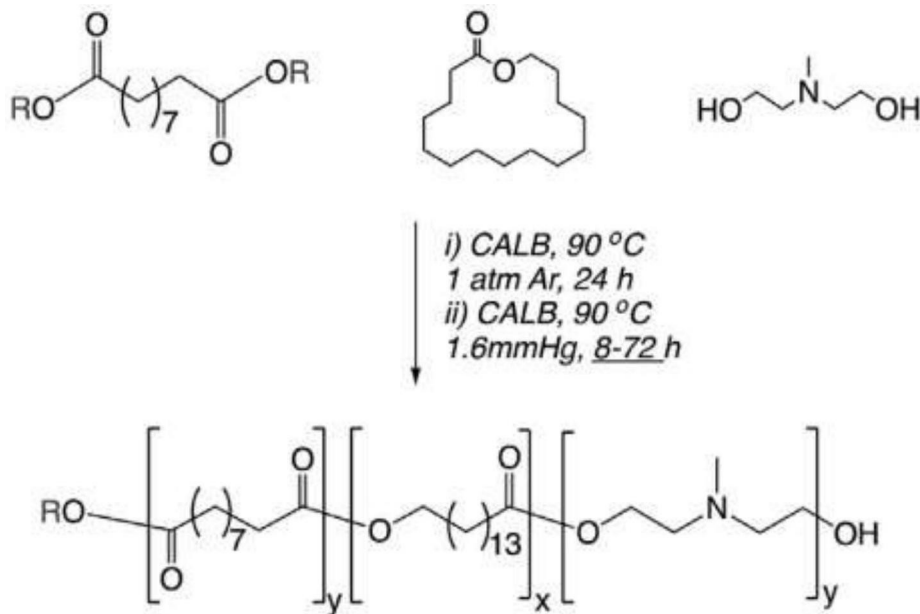
## [0457] 聚合物合成

[0458] PACE合成如Zhou等人, Nat. Mater. 11 (1) 82-90 (2012) 所述进行, 包括数个改性以产生具有不同结构的聚合物。简而言之, (1) 为了获得典型或酸性PACE, 将癸二酸二乙酯或癸二酸用于聚合; (2) 为了改变典型PACE的疏水性, 将不同百分比的PDL (10%或20%) 添加到反应物中, 并且 (3) 为了改变含有10% PDL的典型PACE的分子量(MW), 第二阶段反应时间在8至72h之间变化, 以获得MW为2kDa至20kDa的聚合物。

## [0459] 结果

[0460] PACE是通过二酯/二酸与氨基取代的二醇和内酯的酶促共聚形成的三元共聚物的家族。PACE可以高效地递送pDNA (Zhou等人, Nat. Mater. 11 (1) 82e90 (2012))、microRNA (Adams等人, Cancer Res. 76 (4) 927e939 (2016)) 和siRNA (Cui等人, Nat. Commun. 8 (1) 191 (2017))。然而, 考虑到mRNA与这些其他核酸之间的结构差异 (Kauffman等人, Nano Lett. 15 (11) 7300e7306 (2015)), 考虑了对现有PACE结构的改性和/或新PACE变体的开发作为改善递送的手段。脂肪酶催化剂的高耐受性提供了结构的通用性, 尤其是在疏水性和MW方面。从最高效的用于DNA的递送和转染的PACE组合物(典型PACE)之一开始, 合成了具有不同MW和内酯含量的不同聚合物以专门改善mRNA递送和转染。

[0461]



[0462] 调整PACE合成以改变最终聚合物中的不同参数。分别使用癸二酸二乙酯 (R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 或癸二酸 (R = H) 来制备典型 (酯/OH) 末端或酸性 (COOH/OH) 末端的PACE。在典型PACE的情况下, 合成的第二步的持续时间从8至72h变化以改变MW。改变PDL含量 (10%或20%) 以改变聚合物疏水性。

[0463] 使用凝胶渗透色谱法 (GPC) 来测定聚合物MW。所有PACE聚合物都能够复合mRNA, 并且形成具有中性或负表面电荷的纳米尺寸的多聚复合物。

[0464] 当使用RIBOGREEN®测定评价时, 所有聚合物都能够以在55%至76%范围内的效率包封mRNA。使用不同PACE聚合物在HEK-293细胞中转染表达萤光素酶 (LUC) 的mRNA的能力来筛选体外转染性能。代表不同结构改性的这些PACE聚合物均未提供与用作阳性对照的商业试剂TRANSIT®相当的转染水平 (图1A-1C)。然而, 观察到转染水平随着聚合物MW

的明显趋势。当聚合物MW从20kDa降低到5kDa时,观察到两个数量级的转染效率提高(分别为 $1.1 \times 10^5$  RLU/mg和 $4.4 \times 10^7$  RLU/mg)。然而,这种趋势在5kDa下看上去趋于平稳,因为使用2kDa的PACE MW时转染水平急剧降低,与使用游离mRNA获得的水平相当。先前的研究已经报道了,多阳离子与多阴离子之间的静电复合的强度和稳定性随着多阳离子的长度指数地增大(Akinc等人,Bioconj.Chem.14(5)979e988(2003),Tsuchida&Osada,Makromol.Chem.175(2)593e601(1974),Choosakoonkriang等人,J.Pharmaceut.Sci.92(8)1710e1722(2003),Schaffer等人,Biotechnol.Bioeng.67(5)598e606(2000))。

[0465] 这些结果显示,非常短的聚合物(2kDa)对于转染无效,这可能是由于mRNA的复合较差。在高于2kDa阈值时,较短的聚合物(5kDa)在递送mRNA时比较高MW聚合物(10kDa或20kDa)更高效,这可能是因为在细胞内部mRNA从高MW PACE多聚复合物的无效释放。高MW PACE链含有大量正电荷和疏水性结构域,这导致与mRNA的热力学稳定结合,并且防止其从多聚复合物释放。结果表明,高效的mRNA递送来自聚合物的MW的精细平衡:聚合物链长需要足够长以确保mRNA的复合以及多聚复合物的稳定化,但是对于在细胞内部的mRNA释放来说足够短。另一方面,将PDL含量从10kDa PACE聚合物的10%提高到20%不会显著影响转染效率(图1B),这与在pDNA的情况下已观察到的相反,并且证实聚合物结构得益于对各遗传物质的调节。

[0466] 这表明分子量为大于2kDa至小于10kDa、更优选地在3kDa至8kDa范围内、最优选地为5kDa的聚合物会是最有效的。

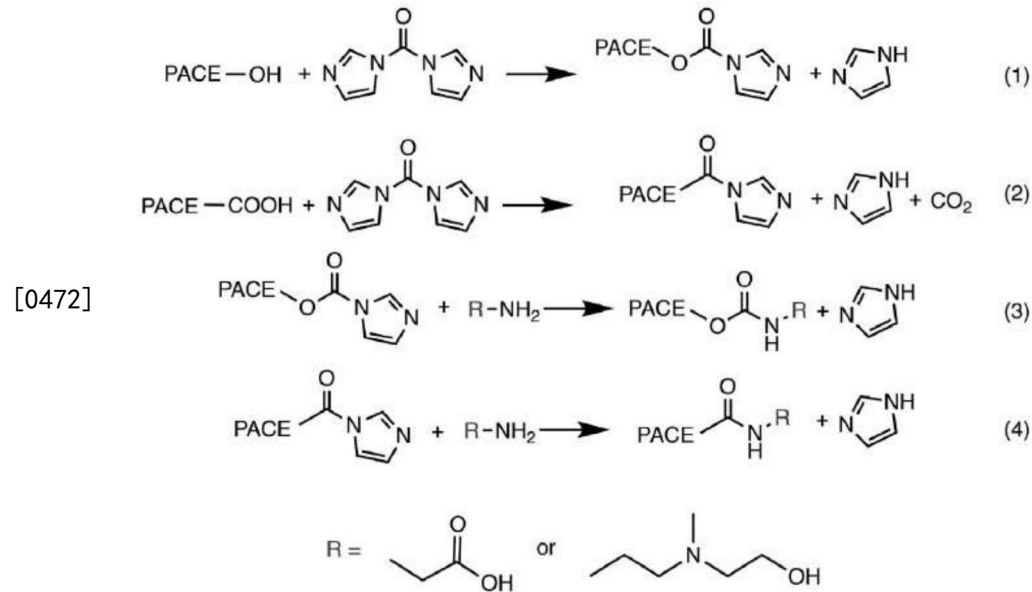
[0467] 实施例2:PACE转染效率高度依赖于其端基组成

[0468] 材料和方法

[0469] 聚合物端基的改性

[0470] 为了制备具有不同端基的PACE,用癸二酸代替癸二酸二乙酯来合成母体聚合物,这生成具有羟基和羧基端基的混合的PACE。然后通过在水二氯甲烷中在室温搅拌过夜,将两种端基以1:40摩尔比用CDI活化。将混合物用去离子水洗涤三次,然后在真空下蒸发DCM以获得反应物PACE-CDI(参见以下方案)。

[0471] 使PACE-CDI与含胺分子反应以生成具有新端基的PACE。具体地,分别使用甘氨酸和AEMAE来产生PACE-COOH和PACE-MAE。对于缀合,使5mM的甘氨酸或AEMAE与0.5mM的PACE-CDI在DMSO中在室温在连续搅拌下反应40h。在反应后,将混合物用10倍体积的去离子水洗涤,用DCM萃取,然后在真空下蒸发DCM以获得PACE-COOH和PACE-MAE。当采用此方案来合成10kDa酸性PACE时,以2:1的精确摩尔比添加5kDa PACE-CDI和乙二胺。



[0473] 如上所述,为了获得具有-COOH或-MAE端基的PACE,酸性PACE进行CDI活化(1、2),然后用含胺分子进行亲核取代(3、4;R=甘氨酸或AEMAE)。

[0474] 聚合物表征

[0475] 在Bruker AVANCE 500光谱仪上记录<sup>1</sup>H和<sup>13</sup>C NMR谱。对于反门控<sup>13</sup>C NMR,在氯仿-d中以50mg/mL的聚合物制备样品,并且添加浓度为5mg/mL的乙酰丙酮铬(III)(Cr(acac)<sub>3</sub>)作为弛豫剂。使用10s的T<sub>1</sub>弛豫时间来记录信号。聚合物的分子量(MW)通过凝胶渗透色谱法(GPC)使用配备有microSTYRAGEL柱(混合床;孔径100 Å - 10<sup>6</sup> Å)的Waters HPLC系统来测量。使用含有0.2重量%三乙胺的氯仿作为洗脱液,流速为1mL/min。使用2mg/mL的样品浓度和100μL的注入体积。聚合物MW基于通过来自Sigma Aldrich(圣路易斯,MO)的窄多分散性聚苯乙烯标准物产生的常规校准曲线来确定。使用Empower II GPC软件来运行GPC仪器并且进行MW计算。

[0476] 多聚复合物制备和表征

[0477] 除非指明,否则聚合物:mRNA多聚复合物以100:1的聚合物:mRNA重量比在25mM乙酸钠缓冲液(pH 5.8)中制备。对于体外实验,制备10μg mRNA/mL的溶液:首先将1μL的聚合物溶液(100mg/mL,在DMSO中)在50μL乙酸钠缓冲液中稀释。在简短涡旋后,将聚合物溶液与在50mL乙酸钠缓冲液中稀释的1μg mRNA混合,并且再次涡旋。在使用之前,将聚合物:mRNA混合物在室温温育10min。对于体内实验,通过相同的方法制备在乙酸钠缓冲液中的100μg mRNA/mL的溶液。

[0478] 在以2μg/mL的mRNA的浓度将多聚复合物在DI水中稀释后,通过动态光散射(DLS)使用Malvern Nano-ZS(Malvern Instruments,UK)测量多聚复合物的流体力学直径。为了测量δ电位,将相同的溶液装载到一次性毛细管池中,并且在Malvern Nano-ZS上进行分析。

[0479] 按照制造商的说明使用Quant-IT RiboGreen RNA试剂盒(Invitrogen,#R11491)来测量mRNA在多聚复合物中的包封效率(EE)。当RiboGreen测定测量溶液中的游离mRNA的量时,将该量从为了形成多聚复合物而添加的最初量中减去,从而获得在多聚复合物内复合的mRNA的量。

[0480] 细胞培养

[0481] HEK293细胞和SH-SY5Y细胞在补充有10% FBS和1% pen/strep的4.5g/L葡萄糖DMEM培养基(Gibco#11965)中在37°C和5% CO<sub>2</sub>下培养。Daoy细胞在补充有10% FBS和1% pen/strep的2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠和1500mg/L碳酸氢钠的EMEM培养基中(ATCC#30-2003)在37°C和5% CO<sub>2</sub>下培养。

#### [0482] 体外转染

[0483] 对于Fluc mRNA的体外转染,将细胞在500μL培养基中以75,000个细胞/孔的密度接种到24孔板中,并且温育过夜以确保粘附。将培养基替换为400μL的转染培养基(含有10% FBS但没有pen/strep的培养基),并且将100μL的多聚复合物(总计1μg的mRNA)添加到各孔中。对于游离mRNA对照,将1μg的mRNA在100μL的乙酸盐缓冲液中稀释,并且添加到孔中。使用商业mRNA转染试剂盒TransIT作为对照。简而言之,在100μL的OPTIMEM培养基(Gibco#11058021)中,将1μg的mRNA与0.7μL的Boost试剂和1.1μL的TransIT试剂混合。在转染后24h,测量萤光素酶表达。将细胞洗涤,并且使用200μL的1x裂解缓冲液(Promega,#E397A)和在-80°C的一个冻融循环来裂解。然后将20μL的裂解物与100μL的萤光素酶报告试剂(Promega,#E1483)混合,并且在Glomax发光计(Promega)上读取发光。裂解物蛋白质含量使用Pierce BCA蛋白质测定试剂盒(ThermoFisher,#23225)来测量。所有实验都重复进行三次独立试验。

#### [0484] 结果

[0485] 图2是示出通过实施例2中举例说明的方法合成的MW为5kDa或10kDa的PACE-COOH和PACE-MAE的转染效率的柱状图。统计显著性通过学生t检验来确定(表示如下:\*,P<0.05;\*\*\*,P<0.001)。

[0486] 通过癸二酸二乙酯、PDL和MDEA的三元共聚合成的PACE含有甲基(来自癸二酸二乙酯)和羟基(来自MDEA)端基的混合。当将单体癸二酸二乙酯替换为癸二酸来进行PACE合成以形成酸性PACE时,其mRNA转染效率加倍(图2)。相同聚合物上的不同端基可以显著影响pDNA的转染效率(Sunshine等人,Biomacromolecules 12(10)3592e3600(2011),Sunshine等人,Mol.Pharm.9(11)3375e3383(2012))。实验被设计为确定端基组成是否也可以影响mRNA转染,并且更特别地是否PACE上的改性端基可以改善mRNA递送。

[0487] 使用分子量为大约5kDa的含有羰基和羟基端基的混合的酸性PACE作为起始材料。这两种端基都可以通过1,10-羰基二咪唑(CDI)活化,其进一步被包括甘氨酸或AEMA的含胺分子取代,从而分别形成羧基(-COOH)端基(PACE-COOH)或(甲基氨基)乙醇(-MAE)端基(PACE-MAE)。

[0488] 具有-COOH或-MAE端基的PACE,酸性PACE通过CDI活化、然后用含胺分子进行亲核取代(3,4;R=甘氨酸或AEMA)来获得。

[0489] 选择这两种单体以模拟在酸性PACE中发现的天然存在的端基的混合,从而鉴定具有更高转染效率的端基。反应机理确保对于两种端基来说都超过90%的转化率,如通过NMR谱确认的。

[0490] 接下来,评价这些聚合物在体外转染mRNA的能力。图3A是示出使用具有10% PDL含量、分子量为2kDa、5kDa、10kDa和20kDa的典型PACE的MW的影响(平均LUC/mg蛋白质)的柱状图。图3B是示出10kDa典型PACE聚合物的使用10%或20% PDL的PDL含量的影响(平均LUC/mg蛋白质)的柱状图。图3C是示出MW为5kDa的酸性PACE和典型PACE在10% PDL含量下

的转染效率(平均LUC/mg蛋白质)的柱状图。结果表示为重复进行的三次独立实验的平均值 $\pm$ SD。

[0491] 在具有不同端基的PACE之间观察到转染效率的显著差异,因为5kDa PACE-MAE聚合物与具有相同MW的PACE-COOH相比展示出高两个数量级的转染效率(图3C)。这种效果可以通过这两种聚合物的EE差来解释,因为PACE-MAE包封总mRNA的98%,PACE-COOH仅能够包封18%。尽管由于技术挑战(当聚合物链生长得更长时,难以移除水副产物)而未直接合成分子量高于5kDa的酸性PACE,但是可以通过5kDa聚合物的CDI活化、然后利用乙二胺分子使两个聚合物链交联来获得10kDa酸性PACE。当用羧基或羟基端基对10kDa酸性PACE进行改性时,与其5kDa对应物相比,其转染效率得到显著改善(图3A),这意味着对于PACE-COOH和PACE-MAE聚合物,转染效率在MW增大时提高。

[0492] 这种行为与其转染效率随着MW增大而降低的典型PACE明显不同,这进一步证明了端基在转染效率中的重要性。虽然PACE-COOH的EE在其MW从5kDa增大到10kDa时从18%提高到45%,但是PACE-MAE的EE实际上没有太大变化(5kDa下的98%相对于10kDa下的95%),这表明EE提高不是转染效率改善的唯一解释。

[0493] 这些数据显示,PACE端基和MW的贡献大于添加剂。尽管PACE端基的性质看上去有助于其与mRNA复合的能力,但是MW在复合中也起作用,并且可以涉及下游生物步骤,诸如内体逃逸和/或胞质溶胶中的mRNA释放。

[0494] 实施例3:用于mRNA递送驱动PACE聚合物的PACE的“自上而下”的驱动

[0495] 材料和方法

[0496] 聚合物的驱动

[0497] 将具有不同起始MW的聚合物(20-30mg)均匀地铺展在玻璃小瓶的内表面上,形成薄膜以确保高效的空气渗透。然后将小瓶在暴露于流动湿空气的情况下在受控温度(典型地37 $^{\circ}$ C)温育不同的时长。

[0498] 体外毒性

[0499] 为了评价PACE聚合物和TransIT的细胞毒性,将HEK293细胞在100 $\mu$ L培养基中以10,000个细胞/孔的密度接种到96孔板中,并且温育过夜以确保粘附。聚合物:mRNA多聚复合物或TransIT/mRNA复合物使用与转染实验相同的w:w比来形成,并且在转染培养基中以不同浓度稀释。将100 $\mu$ L的含有多聚复合物的培养基添加到孔中以达到在0.01至20 $\mu$ g/mL范围内的mRNA的最终浓度。在温育后24h,使用MTT测定来测量细胞存活率。所有实验都重复进行三次独立试验。

[0500] 多聚复合物的冷冻干燥

[0501] PACE:mRNA多聚复合物使用乙酸钠缓冲液来制备,并且将不同浓度的海藻糖溶液(30mg/mL或60mg/mL,在25mM乙酸钠缓冲液中,pH=5.8)以1:1体积比添加到多聚复合物悬浮液中获得0、15或30mg/mL的最终海藻糖浓度。然后将混合物在液氮中急冻,并且冷冻干燥2天。在冷冻干燥结束时,将多聚复合物重新悬浮在乙酸钠缓冲液中,并且在HEK293细胞中评价转染效率。使用上述方法进行转染和基因表达的象征。

[0502] 结果

[0503] 在利用PACE文库的“自下而上”合成的初始筛选后,聚合物MW和端基组成被鉴定为决定该材料对于mRNA的转染效率的两个重要参数。在5kDa至10kDa的窄范围内,MW的作用看

上去显著影响转染效率。调整“自上而下”方法以通过高MW聚合物的受控水解同时改变PACE MW和端基。通过这样做,调节和鉴定具有更高转染效率的PACE端基和MW。

[0504] 这种方法产生被称为驱动PACE (aPACE) 的新材料家族。这些生物可降解aPACE聚合物在可忽略毒性的情况下在体外和在体内都产生高转染水平。

[0505] aPACE通过酯主链的受控水解产生。在中等温度下暴露于空气提供了用于PACE的水解的温和条件,由此减小其MW并且暴露羟基和羧基端基。

[0506] 为了确认这一点,通过NMR谱和GPC表征aPACE。aPACE的NMR分析证明,驱动过程导致羟基和羧基端基的暴露,因为观察到与典型未驱动PACE相比,羟基峰下面积增大(对于aPACE和典型PACE分别为58.2和58.9),并且在aPACE中出现在178ppm处的明显羧基峰。GPC显示驱动过程减小了所有PACE聚合物的MW(图4)。

[0507] 聚酯的水解是众所周知的。这些反应通常可以在高温、高压下和/或在催化剂的存在下进行。观察到与37°C相比,当在100°C进行时可以加速驱动。然而,使用更温和的温度提供了更加可重现的过程,这得到所需的aPACE的分子量。

[0508] 为了考察驱动方案对mRNA的PACE转染效率的影响,测试了在不同驱动时间段的情况下由不同起始MW制备的aPACE。由aPACE和mRNA制备的自组装多聚复合物在转染HEK293细胞时非常有效,得到与阳极对照TransIT相当的荧光素酶表达水平(图5A-5B)。转染效率看上去取决于驱动时间,和驱动聚合物的初始MW,其中各初始MW具有最佳驱动时间(图5A:对于5kDa聚合物为5天,对于10kDa聚合物为10天,并且对于20kDa聚合物为30天)。对于这些改善的驱动时间,所有aPACE聚合物都提供与TransIT相当的转染水平,以及与其未驱动对应物相比显著更高的转染水平(图2,  $p < 0.005$ )。

[0509] 当在不同浓度下测试细胞毒性时,TransIT引起显著的细胞死亡,而对于递送的类似量的mRNA,所有aPACE制剂都是非细胞毒性的(图5C)。

[0510] 其中将20kDa聚合物在100°C下驱动6h的加速驱动过程导致与在37°C下驱动30天的20kDa聚合物类似的转染水平(图5D)。尽管是加速驱动过程,但是与37°C相比,在100°C进行驱动时观察到类似的动力学特性。两种过程都表现出高达最佳值的转染效率提高,随后活性下降。这种观察结果表明,在两种温度下发生类似的时间依赖性过程。

[0511] 这些aPACE的MW彼此接近,在6kDa至8kDa的范围内。考虑到其转染效率的差异,数据表明在窄aPACE MW范围内的转染效率的快速变化,突出了使用“自上而下”驱动方法进行筛选的价值。因为应针对不同遗传物质的携带来调节递送载剂,所以受控的“自上而下”驱动过程构成一种直接且有力的针对每种遗传物质来优化MW和端基的组合的方式。这种过程的优点包括在微调关键因素如MW时的准确性,以及在驱动阶段由相同起始材料合成离散的聚合物文库的简单性。总而言之,结果证实,所述方法提供了针对mRNA递送和转染调整的MW和端基的最佳组合。

[0512] 为了确保aPACE的广泛功效,还在Daoy细胞(人类髓母细胞瘤细胞系)中和在SH-SY5Y细胞(人类神经母细胞瘤细胞系)中测试了这些聚合物的转染。如在HEK293细胞中观察到的,在两种细胞系中,驱动过程都显著提高了PACE转染效率。

[0513] 还测试了冷冻干燥对aPACE:mRNA多聚复合物的影响。使用海藻糖作为冷冻保护剂,并且在多聚复合物的重构之后,在HEK293细胞中评价转染效率。冷冻干燥的用aPACE制备的多聚复合物与新制多聚复合物一样高效,即使是在不存在冷冻保护剂的情况下,而添

加高浓度的海藻糖(6%)稍微提高了转染效率。

[0514] 实施例4:aPACE对于体内mRNA递送来说有效

[0515] 材料和方法

[0516] 体内研究

[0517] 所有动物工作都在耶鲁大学按照耶鲁动物资源中心(Yale Animal Resource Center, YARC)和动物保护和利用委员会(the Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)指南完成。雌性BALB/c小鼠(20g, Charles River, 威利曼蒂克, CT, 美国)用于实验。

[0518] 将PACE:mRNA多聚复合物(以mRNA计0.1mg/mL, N=3)、aPACE:mRNA多聚复合物(以mRNA计0.1mg/mL, N=3)、TransIT:mRNA复合物(以mRNA计0.1mg/mL, N=3)、在乙酸钠缓冲液中稀释的游离mRNA(以mRNA计0.1mg/mL, N=3)或乙酸钠缓冲液(25mM, pH 5.8, N=3)通过尾部静脉以200 $\mu$ L的体积静脉内施用。

[0519] 在粒子施用之前,以及在注射后6h、24h、48h、72h和7天,进行眶后血液采集(50 $\mu$ L)。在血液采集后立即将血浆通过离心(3000g, 10min)分离并且在-80 $^{\circ}$ C冷冻直到进一步分析。使用ELISA试剂盒(R&D Systems)来测量血浆中的EPO浓度。在注射后24h和7天,收集肝、肾和脾,将其处理以用于H&E染色,并且由外部病理学家对任何异常细胞形态进行评分。使用GraphPad软件(La Jolla California USA, www.graphpad.com/)进行绘图和统计分析。使用双尾未配对学生t检验以95%的置信水平来测试统计显著性。

[0520] 结果

[0521] 为了评价用于递送治疗相关的mRNA的aPACE聚合物,在小鼠中评价其递送表达EPO的mRNA的能力。测试两种aPACE聚合物(驱动5天的PACE 5kDa和驱动10天的PACE 10kDa),并且将其与阳性对照TransIT进行比较,所述阳性对照TransIT由于其已证实的体内mRNA递送的有效性而被选择(Kariko等人, Mol. Ther. 20(5) 948e953(2012))。未测试驱动30天的PACE 20kDa,因为所形成的多聚复合物在体内施用所需的高浓度下在尺寸方面不够稳定。

[0522] 将EPO mRNA:aPACE多聚复合物静脉内施用至野生型小鼠以递送总剂量为20mg的mRNA,并且在注射后的不同时间点收集血液以通过ELISA测量EPO水平。使用最佳aPACE聚合物的mRNA多聚复合物在EPO mRNA的递送中展示出高功效,如在后续EPO产生中所反映的。

[0523] 在注射后六小时,作为最好的未驱动聚合物的未驱动PACE 5kDa产生高水平的EPO(530ng/mL),高于阳性对照TRANSIT<sup>®</sup>(170ng/mL)。10kDa未驱动PACE在6h时产生较低的EPO水平(14ng/mL),证实了在体外关于未驱动聚合物所观察到的趋势,即由MW高于5kDa的聚合物形成的多聚复合物提供较低的转染效率。

[0524] 图5A是示出根据驱动时间(天)的萤光素酶mRNA转染效率(平均LUC/mg蛋白质)的线形图,其展示了各MW的优选驱动时间(线表示为:20kDa-在0天的下部数据点;10kDa,在0天的中部数据点;5kDa-在0天的上部数据点)。驱动的5kDa PACE与其未驱动形式相比不显著增加EPO产生,但是10kDa在37 $^{\circ}$ C驱动10天将EPO水平显著提高到1100ng/mL(图5A,  $p < 0.0001$ )。

[0525] 图5B是示出使用不同初始MW的未驱动PACE和驱动PACE在其优选驱动时间(对于5kDa聚合物为5天,对于10kDa聚合物为10天,以及对于20kDa聚合物为30天,  $**p < 0.005$ )的转染效率(平均LUC/mg蛋白质)的柱状图。图5C是示出与mRNA:TransIT复合物(下部线)相比

的mRNA:aPACE多聚复合物(5kDa 5D,10kDa 10D,20kDa 30D(上部线的群组))的细胞毒性特性(细胞存活率(%))的线形图。血液化学和组织学分析证明在施用后24h或7天,aPACE未引起全身毒性。图5D是使用不同驱动温度(\*\* $p < 0.005$ )的aPACE的转染效率(平均LUC/mg蛋白质)的柱状图。

[0526] 图6A是示出在使用TRANSIT®、5kDa的未驱动PACE、驱动5天的5kDa aPACE、10kDa的未驱动PACE或驱动10天的10kDa aPACE的mRNA(总计20mg)的IV施用之后6小时的EPO血液浓度的柱状图。结果表示为 $N = 3$ 个动物(\*\*\*\* $p < 0.0001$ )的平均值 $\pm$ SD。图6B是示出在使用载剂(下部线)、TransIT(中部线)、驱动10天的10kDa aPACE(上部线)的mRNA(总计20mg)的IV施用之后的EPO产生的时间进程的线形图。结果表示为 $N = 3$ 个动物(\*\* $p < 0.001$ 且 $*p < 0.05$ )的平均值 $\pm$ SD。图6C-6F是示出在乙酸盐缓冲液、游离mRNA或mRNA:aPACE多聚复合物的IV施用之后24小时和7天的血液化学(AST(图6C)、ALT(图6D)、尿素(图6E)、肌酸酐(图6F))分析的柱状图。结果表示为 $N = 3$ 个动物的平均值 $\pm$ SEM。

[0527] 对于TRANSIT®和aPACE多聚复合物二者,EPO产生在注射后6h达到峰值。注射乙酸盐缓冲液(载剂)然后反复出血随着时间引起EPO血液水平的稍微提高,但是在长达48h内,施用10kDa的驱动PACE多聚复合物后的EPO水平与在施用TRANSIT®后获得的水平相比显著更高(在6h时 $p < 0.001$ ,并且在24h和48h时 $p < 0.05$ )。

[0528] 使用最佳的aPACE聚合物(驱动10天的10kDa),在长达48h内获得显著的EPO产生,这显著长于游离EPO的血液半衰期(大约2h)。

[0529] 这些结果证明PACE的端基和MW影响其mRNA转染。驱动聚合物中的MW和端基的组合实现了在体外和体内的高效mRNA复合和转染,同时PACE的低阳离子密度确保了低毒性特性。

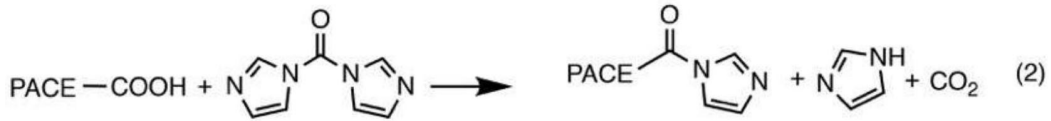
[0530] 实施例5:PACE端基影响到多聚复合物上的信使RNA负载

[0531] 材料和方法

[0532] 端基改性的聚合物和多聚复合物的合成

[0533] 由阳离子二醇、癸二酸二乙酯和内酯制成的PACE主链具有羟基和甲基端基的混合(Zhou等人,Nature Materials,11:82-90(2012)).[PMCID:PMC4180913]。

[0534] 为了用不同端基对PACE进行改性,用癸二酸代替癸二酸二乙酯来合成母体聚合物,这生成具有羟基和羧基端基的混合的PACE。通过在水二氯甲烷(DCM)中在室温搅拌过夜,将两种端基以1:40的摩尔比用羰基二咪唑(CDI)活化。将混合物用去离子水洗涤三次,然后在真空下蒸发DCM以得到反应物PACE-CDI:CDI活化(1、2),然后用含胺分子进行亲核取代(3、4),如下文和实施例1-4中所示。

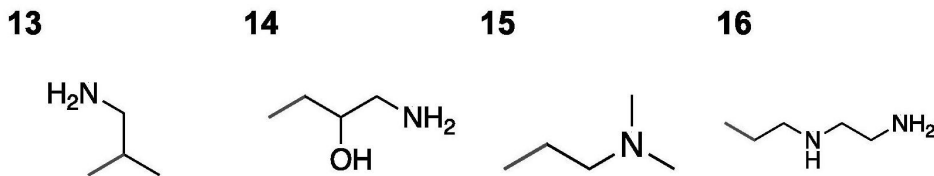
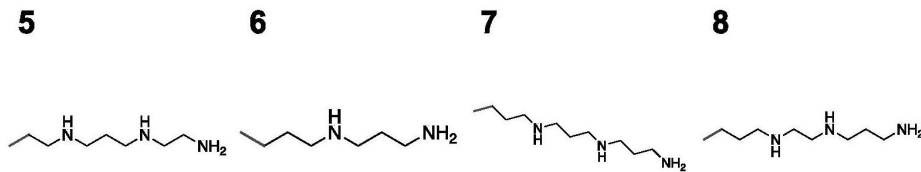


[0535]

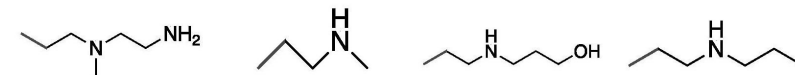
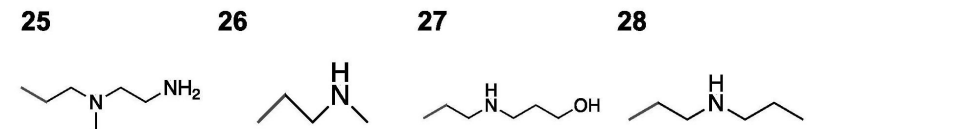
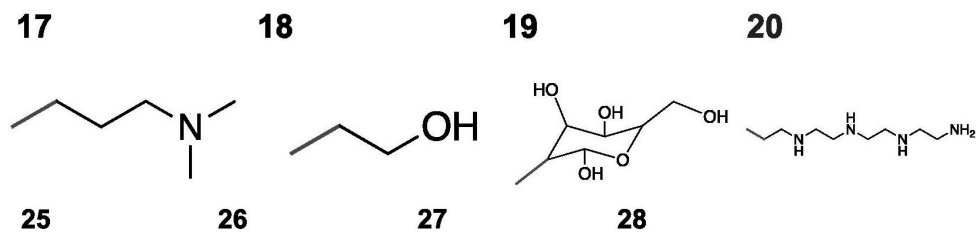


[0536] 对于缀合,使5mM的含胺分子与0.5mM的PACE-CDI在DMSO中在室温在连续搅拌下反应40小时。在反应后,将混合物用10倍体积的去离子水洗涤,用DCM萃取,然后在真空下蒸发DCM以获得具有新端基的PACE。

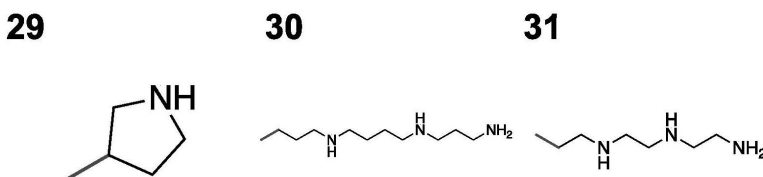
[0537] 端基的化学结构如下所示:



[0538]



[0539]



[0540] Ribogreen mRNA负载测定

[0541] Ribogreen是一种在与信使RNA结合后发射荧光的小染料。在与PACE复合后,信使RNA对于染料来说变得不可接近,并且将会观察到较少的荧光信号。将mRNA、多聚复合物和ribogreen混合,并且监测荧光。

[0542] Cy5 mRNA/多聚复合物摄取测定

[0543] 首先将ddRLuc-Fc蛋白质和编码fLuc的mRNA用PACE聚合物共同包封,然后在蛋白酶抑制剂环氧霉素(Epoxomicin)的存在下向Expi293F细胞供应7h。然后通过双荧光素酶测定检查细胞以显示RLuc活性(n=4)。将数据相对于TRANSIT®(设为1)进行归一化。

[0544] Cy5标记的mRNA与具有不同端基的PACE形成多聚复合物,将所述多聚复合物供应至HEK293细胞。监测细胞的荧光。

[0545] 内体逃逸测定

[0546] 利用ddRLuc系统对使用具有不同端基的PACE用fLuc mRNA制备的多聚复合物的内体逃逸进行定量。

[0547] 结果

[0548] PACE端基影响到多聚复合物上的信使RNA负载。ribogreen测定的结果在图7中示出,并且与相应的凝胶阻滞测定非常一致。

[0549] PACE端基影响多聚复合物的细胞摄取。细胞摄取测定的结果在图8A-8D中示出。图8A示出了发生了什么以产生图8B、8C和8D(其示出了mRNA包封的效率,摄取和内体逃逸,以及转染效率)中的结果的示意图。mRNA包封的效率通过Ribogreen测定(n=4)进行定量。将包封Cy5标记的mRNA的聚合物供应至Expi293F细胞,然后进行FACS以对摄取水平进行定量(n=3)(图8B)。在各具有mRNA的聚合物组之间用未配对学生t检验来分析统计学差异;\*表示 $p < 0.05$ ,\*\*表示 $p < 0.01$ ,\*\*\*表示 $p < 0.001$ ,\*\*\*\*表示 $p < 0.0001$ ,并且n.s.表示无显著差异。

[0550] 具有不同端基的PACE展示出不同的被细胞摄取的能力。PACE端基影响mRNA的内体逃逸。使用fLuc mRNA和具有不同端基的PACE的内体逃逸测定的结果在图8C中示出。

[0551] PACE端基化学影响聚合物递送系统的转染效率。PACE的转染效率通过由HEK293细胞产生的fLuc活性来测量。结果在图8D中示出。

[0552] 图9A-9C示出了转染效率(表示为fLuc活性)和不同转染步骤(包括mRNA负载(图9A)、摄取(图9B)和内体逃逸(图9C))的线性相关性。当生物步骤更接近蛋白质生产时,线性相关性的R<sup>2</sup>值变得更高,这表明更好的预测能力。

[0553] 实施例6:对用于mRNA递送的聚合物文库的内体逃逸进行定量

[0554] 材料和方法

[0555] 聚合物合成

[0556] 如上所述进行PACE合成,包括数个改性以产生具有不同端基的PACE聚合物。用癸二酸来合成母体聚合物,这生成具有羟基和羧基端基的混合的PACE。通过在水二氯甲烷中在室温搅拌过夜,将两种端基以1:40的摩尔比用CDI活化。将混合物用去离子水洗涤三次,然后在真空下蒸发DCM以得到反应物PACE-CDI。

[0557] 然后使PACE-CDI与含胺化合物(表1)反应以生成具有新端基的PACE。对于缀合,使5mM的各化合物与0.5mM的PACE-CDI在DMSO中在室温在连续搅拌下反应40小时。在反应后,将混合物用10倍体积的去离子水洗涤,用DCM萃取,然后在真空下蒸发DCM以获得如P1-P31所述的新聚合物(表1)。

[0558] 聚合物表征

[0559] 在Agilent DD2 400MHz NMR光谱仪上记录<sup>1</sup>H NMR谱。使用10秒的T<sub>1</sub>弛豫时间来记录信号。聚合物的分子量(MW)通过凝胶渗透色谱法(GPC)使用配备有microSTYRAGEL柱(混合床;孔径100 Å - 106 Å)的Waters HPLC系统来测量。使用含有0.2重量%三乙胺的氯仿作为洗脱液,流速为1mL/min。使用2mg/mL的样品浓度和100μL的注入体积。聚合物MW基于通过来自Sigma Aldrich(圣路易斯,MO,美国)的窄多分散性聚苯乙烯标准物产生的常规校准曲线来确定。使用Empower II GPC软件来运行GPC仪器并且进行MW计算。

[0560] 使用NMR谱检测PACE端基改性的反应。PACE的特征峰分布在1-4.5ppm区域中。当MDEA单体为端基时,在其末端侧的氢分别从4.2(g)移到3.6(g') ppm,以及从2.7(e)移到2.6(e') ppm。CDI活化由于形成两种不同的PACE-CDI缀合而导致在7-8.5ppm区域中形成分裂峰(图S2)。在MDEA单体的末端侧的氢分别从3.6(g')移到4.4(g'') ppm,以及从2.6(e')移到2.8(e'') ppm;在癸二酸单体的末端侧的氢分别从2.3(c)移到2.4(c'') ppm,以及从1.5(b)移到1.7(b'') ppm。然后通过7-8.5ppm区域中的分裂峰的消失以及g'、e'、c'和b'峰的迁移来确认31个小分子的缀合反应。

[0561]

#	名称	CAS #	GPC		Dh (nm)		PDI		$\zeta$ 电位(mV)	
			Mw	PDI	平均值	sem	平均值	sem	平均值	sem
1	4-氨基丁醇	13325-10-5	9.4x10 <sup>3</sup>	2.2	319.9	17.3	0.418	0.066	-24.4	2.0
2	N-(2-氨基乙基)-1,3-丙二胺	13531-52-7	6.1 x10 <sup>3</sup>	1.4	199.4	5.1	0.189	0.012	-10.0	0.4
3	2-氨基-2-甲基-1-丙醇	124-68-5	1.2 x10 <sup>4</sup>	2.8	210.4	4.9	0.200	0.017	39.7	0.8
4	3-(N-甲基哌嗪基)丙胺	4572-03-6	5.5 x10 <sup>3</sup>	2.3	236.2	9.0	0.248	0.006	-7.5	2.2
5	N,N'-双(2-氨基乙基)-1,3-丙二胺	4741-99-5	6.2 x10 <sup>3</sup>	1.6	171.4	5.2	0.298	0.025	60.7	0.4
6	双(3-氨基丙基)胺	56-18-8	6.3 x10 <sup>3</sup>	1.7	216.1	3.3	0.351	0.007	35.7	2.3
7	N,N'-双(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺	4605-14-5	9.3 x10 <sup>3</sup>	2.3	166.7	2.9	0.240	0.006	69.8	1.3
8	N,N'-双(3-氨基丙基)-1,2-二胺	10563-26-5	6.2 x10 <sup>3</sup>	1.7	169.8	8.4	0.295	0.018	56.9	1.5
9	1,4-双(3-氨基丙基)哌嗪	7209-38-3	6.0 x10 <sup>3</sup>	1.6	170.7	6.2	0.291	0.019	24.8	1.7
10	2,2',2"-三氨基三乙胺	4097-89-6	1.0 x10 <sup>4</sup>	2.5	179.2	3.7	0.182	0.014	-51.4	2.9
11	3,3-二氨基-N-甲基二丙胺	105-83-9	6.1 x10 <sup>3</sup>	1.6	212.9	15.3	0.116	0.009	-42.2	1.2
12	1,3-二氨基丙烷	109-76-2	9.6 x10 <sup>3</sup>	2.2	149.9	4.3	0.184	0.022	-53.8	1.0
13	1,2-二氨基丙烷	78-90-0	1.6 x10 <sup>4</sup>	2.1	170.8	6.4	0.225	0.054	-7.5	0.9
14	1,3-二氨基-2-羟基丙烷	616-29-5	6.7 x10 <sup>3</sup>	1.5	332.9	73.8	0.429	0.018	16.9	17.6
15	N,N-二甲基乙二胺	108-00-9	5.0 x10 <sup>3</sup>	2.7	157.2	1.7	0.178	0.010	61.2	4.4
16	二亚甲基三胺	111-40-0	6.4 x10 <sup>3</sup>	1.5	161.0	2.9	0.180	0.026	-32.3	1.3
17	1-氨基-3-(二甲基氨基)丙烷	109-55-7	4.3 x10 <sup>3</sup>	2.9	132.8	4.2	0.260	0.020	69.5	1.4
18	乙醇胺	141-43-5	1.0 x10 <sup>4</sup>	2.3	265.3	23.0	0.360	0.027	-33.3	4.8
19	D-(+)-葡萄糖胺	66-84-2	6.5 x10 <sup>3</sup>	1.8	328.9	88.5	0.436	0.043	-39.9	3.6
20	四亚甲基五胺	112-57-2	5.7 x10 <sup>3</sup>	1.5	152.0	4.7	0.207	0.014	64.8	2.8
21	L-组氨酸	5934-29-2	5.0 x10 <sup>3</sup>	1.8	194.8	3.7	0.194	0.010	-28.4	4.0
22	2,2,2-三氟乙胺	373-88-6	4.9 x10 <sup>3</sup>	1.7	343.6	3.7	0.309	0.021	-2.67	0.7
23	N-(3-羟基丙基)-乙二胺	56344-32-2	6.1 x10 <sup>3</sup>	1.9	220.1	14.3	0.180	0.014	-23.8	2.3
24	2-甲基尸胺	15520-10-2	5.3 x10 <sup>3</sup>	1.8	198.1	22.5	0.359	0.039	-19.5	2.1
25	N-甲基-2,2'-二氨基二乙胺	4097-88-5	4.7 x10 <sup>3</sup>	1.8	229.5	45.1	0.326	0.062	3.1	7.3

[0562]

26	N-甲基-乙烷-1,2-二胺	109-81-9	$5.5 \times 10^3$	1.5	141.4	5.4	0.214	0.016	66.0	1.7
27	2-(2-氨基乙基氨基)乙醇	111-41-1	$6.0 \times 10^3$	2.1	135.3	4.8	0.272	0.011	67.0	1.9
28	N-丙基乙烷-1,2-二胺	111-39-7	$4.7 \times 10^3$	1.7	222.8	13.7	0.268	0.024	48.0	2.9
29	吡咯烷-3-胺	79286-79-6	$4.9 \times 10^3$	1.7	201.1	13.1	0.224	0.011	-10.4	1.3
30	精胺	71-44-3	$4.7 \times 10^3$	1.7	318.9	85.4	0.374	0.068	11.9	4.1
31	三亚乙基四胺	112-24-3	$5.8 \times 10^3$	1.4	214.3	18.4	0.227	0.001	-0.2	1.7

**表 1 (以上): PACE 端基的列表和使用 FLuc mRNA 与具有不同端基的 PACE 聚合物制备的多聚复合物的动态光散射表征**

[0563] 多聚复合物制备和表征

[0564] 除非指明, 否则聚合物:mRNA多聚复合物以100:1的聚合物:mRNA重量比在25mM乙酸钠缓冲液(pH 5.8)中制备。对于体外实验, 制备10 $\mu$ g mRNA/mL的溶液: 首先将1 $\mu$ L的聚合

物溶液(100mg/mL,在DMSO中)在50 $\mu$ L乙酸钠缓冲液中稀释。在简短涡旋后,将聚合物溶液与在50 $\mu$ L乙酸钠缓冲液中稀释的1 $\mu$ g mRNA混合,并且再次涡旋。在使用之前,将聚合物:mRNA混合物在室温温育10min。对于体内实验,通过相同的方法制备在乙酸钠缓冲液中的100 $\mu$ g mRNA/mL的溶液。

[0565] 在以2 $\mu$ g/mL的mRNA的浓度将多聚复合物在去离子水中稀释后,通过动态光散射(DLS)使用Malvern Nano-ZS (Malvern Instruments,UK) 测量多聚复合物的流体力学直径。为了测量 $\delta$ 电位,将相同的溶液装载到一次性毛细管池中,并且在Malvern Nano-ZS上进行分析。

[0566] 透射电子显微术(TEM)

[0567] 将2 $\mu$ L纳米粒子涂布至TEM网格(Electron microscopy sciences,Cat#CF400-Cu-TH)。在1分钟后,小心地移除液体。然后,将一滴染色溶液(Nanoprobes,NANO-W)添加到网格的顶部上。在1分钟后,移除液体。将网格风干。使用TEM(FEI Tecnai Osiris 200kV TEM)来获取图像。

[0568] 细胞培养

[0569] 将Expi293F<sup>TM</sup>细胞(Thermo Fisher,Cat#A14527)在微板摇床(VWR,Cat#89032-092)上在连续摇动下在37 $^{\circ}$ C和8% CO<sub>2</sub>下保持在Expi293<sup>TM</sup>表达培养基(Thermo Fisher,Cat#A1435102)中。

[0570] ddRLuc-Fc纯化

[0571] 使用线型聚乙烯亚胺(Polysciences Inc,Cat#23966)将编码ddRLuc-Fc的质粒转染到Expi293F细胞中。在转染后60h,收获细胞,并且从细胞裂解物中纯化ddRLuc-Fc。将细胞在补充有0.5-1% Triton X-100(AmericanBio,Cat#AB02025)和无EDTA蛋白酶抑制剂混合物(Roche,Cat#11873580001)的TBS(10mM Tris,150mM NaCl,pH 7.5)中在4 $^{\circ}$ C裂解1h。然后通过4 $^{\circ}$ C在Optima L-100K超速离心机(Beckman Coulter)中以110,000 $\times$ g离心1h、然后通过0.22 $\mu$ m过滤器(EMD Millipore,Cat#SCGPT01RE)过滤来清除细胞裂解物。将蛋白质A-SEPHAROSE<sup>®</sup>珠(GE healthcare,Cat#17-0780-01)添加到经过滤的细胞裂解物中,并且在转动下在4 $^{\circ}$ C温育3h以用于蛋白质结合。将珠在TBS中洗涤,并且将蛋白质在100mM甘氨酸(pH 3.3)中洗脱。然后将洗脱液中和,浓缩,并且将缓冲液换为PBS。

[0572] 用PACE聚合物对FLuc mRNA和ddRLuc-Fc的共同包封

[0573] 进行琼脂糖凝胶阻滞测定以检查编码FLuc的mRNA和ddRLuc-Fc探针的共同包封效率。游离的mRNA和蛋白质能够迁移到凝胶中,而包封的mRNA和蛋白质保留在负载孔中。

[0574] 水平琼脂糖凝胶电泳

[0575] 将5 $\mu$ g的ddRLuc-Fc和1 $\mu$ g的编码FLuc的mRNA与100 $\mu$ g聚合物混合到一起(总体积为18 $\mu$ L),并且在室温温育10分钟。将2 $\mu$ L的10X DNA加样缓冲液添加到多聚复合物中,然后加样到1%琼脂糖凝胶上。使用紫外光来检测mRNA迁移,并且通过考马斯蓝染色(Bio-rad,Cat#161-0786)来检测蛋白质迁移。

[0576] 荧光素酶测定

[0577] 首先将Expi293F细胞在200nM环氧霉素(epoxomicin) (ApexBio Technology,Cat#A2606)中在37 $^{\circ}$ C处理30min,然后以200,000个细胞/孔添加到含有游离mRNA(阴性对照)、TRANSIT<sup>®</sup> (Mirus,Cat#MIR2250,阳性对照)或共同包封ddRLuc-Fc和FLuc mRNA的聚合

物的96-V底板。在转染后7h,将细胞用PBS洗涤三次,并且在50 $\mu$ L的补充有20 $\mu$ M z-VAD (OMe)-FMK (Abcam, Cat#ab120487)的被动裂解缓冲液(Promega, Cat#E1910)中在室温裂解20min。通过Centro XS3 LB 960高灵敏度微板发光计(Berthold, Cat#46970)来测定裂解物。RLuc发光使用天然-Coelenterazine (Nanolight Technology, Cat#303)测量1秒,并且FLuc发光使用萤光素酶测定系统(Promega, Cat#E1501)测量3秒。所有独立的实验重复进行三次。

#### [0578] 体外翻译(IVT)

[0579] 按照制造商的说明使用兔网织红细胞裂解物系统(Promega, Cat#L4960)来进行负载mRNA的多聚复合物的IVT。将负载有1 $\mu$ g的编码FLuc的mRNA的多聚复合物在50 $\mu$ L裂解物混合物中在37 $^{\circ}$ C温育75分钟。每15分钟从反应混合物中取出2 $\mu$ L样品,并且立即将其在干冰上冷冻。在样品收集后,使用萤光素酶测定系统(Promega, Cat#E1501)来测量所有样品中的FLuc活性。特定多聚复合物的IVT的速度以FLuc活性与采样时间之间的线性回归的斜率来评价。

#### [0580] 包封效率的测量

[0581] 按照制造商的说明使用Quant-IT RiboGreen RNA试剂盒(Invitrogen, #R11491)来测量mRNA在多聚复合物中的包封效率。当RIBOGREEN<sup>®</sup>测定测量溶液中的游离mRNA的量时,将该量从为了形成多聚复合物而添加的最初量中减去,从而获得在多聚复合物内复合的mRNA的量。

#### [0582] 荧光激活细胞分选(FACS)

[0583] 将Expi293F细胞以5,000个细胞/孔的浓度接种到24孔板中。12小时后,将包封Cy5 mRNA的纳米粒子添加到每个孔中。1小时之后,收集细胞用于FACS分析(Life technologies, Attune NxT)。

#### [0584] 结果

[0585] 结果在图10A-10B中示出。通过每小时的FLuc活性产生来测量所有多聚复合物的IVT速率。使用定量且归一化的数据来进行FLuc mRNA转染结果与IVT速率之间以及IVT速率与包封效率之间的简单线性回归。每个数据点都表示携带独特端基的PACE聚合物。直线表示最佳拟合。标记了R<sup>2</sup>值。

#### [0586] 聚合物端基和施用途径的影响

[0587] mRNA多聚复合物的体外翻译速率与转染效率不相关。图10A和10B是证明了mRNA多聚复合物的体外翻译速率与转染效率不相关的图。通过每小时的FLuc活性产生来测量所有多聚复合物的IVT速率。使用定量且归一化的数据来进行FLuc mRNA转染结果与IVT速率之间(图10A)以及IVT速率与包封效率之间(图10B)的简单线性回归。每个数据点都表示携带独特端基的PACE聚合物。直线表示最佳拟合。标记了R<sup>2</sup>值。

[0588] 实施例7:PACE-PEG共混的多聚复合物的制备和PACS-多聚复合物制剂的肺部递送。

[0589] 基于mRNA的疫苗是一种可以容易地适合新出现的病毒株诸如SARS-CoV-2的有前景的策略,但是关于递送策略需要更多研究以开发最佳的mRNA疫苗制剂。具有不同端基的阳离子聚(胺-共-酯)或PACE的文库已经证明其是一种高效且安全的mRNA递送载体。

[0590] 近期关于疾病诸如COVID-19以及所导致的肺部疾病的事件表明用于肺部递送的

改进制剂是至关重要的。以下是其中在体外筛选PACE多聚复合物以鉴定用于将mRNA吸入递送至肺的有前景的制剂。研究着眼于聚乙二醇(PEG)对mRNA转染效率的影响以及其在稳定纳米粒子中的作用。另外的研究证明了在多聚复合物的肺部递送之后在肺中的高转染水平。

#### [0591] 材料和方法

[0592] 如在上述实施例和表1中所述,针对尺寸、稳定性和EGFP mRNA在A459人肺细胞中的转染效率来筛选具有不同端基的PACE聚合物的文库。为了优化制剂,在pH在4.8至6范围内的缓冲溶液中制备多聚复合物,并且掺入小体积的PEG缀合的PACE (PACE-PEG)以改善多聚复合物稳定性。

#### [0593] 聚合物合成

[0594] 如上所述合成PACE聚合物。

#### [0595] 多聚复合物制剂

[0596] 所有PACE多聚复合物都以1:100的PACE与mRNA的重量比形成。在摇动的同时,在37℃将聚合物溶解于DMSO中(100mg/mL)过夜。为了形成多聚复合物,将mRNA以20-200µg/mL的浓度稀释到25mM乙酸钠缓冲液(pH 4.8-6.0)中。在单独的管中,将溶解的PACE在25mM乙酸钠缓冲液(pH 4.8-6.0)中稀释到2-20mg/mL的浓度,并且涡旋15s。然后将稀释的mRNA和稀释的PACE组合,并且涡旋25s。在使用前将溶液在室温静置10min以使多聚复合物形成。多聚复合物尺寸和 $\delta$ 电位通过动态光散射(DLS,Zetasizer Pro,Malvern Analytical)来表征。

[0597] 为了配制PACE-PEG-共混的多聚复合物,将PACE-PEG和PACE分别以100mg/mL的浓度溶解于DMSO中。将溶解的PACE-PEG在溶解的PACE中稀释(根据需要具有中间稀释)以产生具有所需PACE-PEG浓度的共混聚合物溶液。然后如上所述制备多聚复合物。

[0598] 通过将DSPE-PEG(PEG2k,Nano OCS)溶解在DMSO中(10mg/mL)来形成DSPE-PEG涂覆的多聚复合物。然后将溶解的DSPE-PEG与在DMSO中的PACE(100mg/mL)以1:10的体积比组合。根据需要进行在DMSO中的中间DSPE-PEG稀释以实现所需的DSPE-PEG与PACE的最终比率。然后如上所述,通过用在DMSO中的DSPE-PEG/PACE共混物替换在DMSO中的PACE,形成多聚复合物。

#### [0599] 多聚复合物稳定性研究

[0600] 为了评价多聚复合物稳定性,如上所述将多聚复合物配制为在乙酸钠缓冲液中1mg/mL的最终浓度。将20µL的多聚复合物溶液加入到具有1mL的磷酸盐缓冲盐水(PBS)的管中,然后将样品放入摇动恒温箱(300rpm,37℃)中,并且在不同时间点取出以用于通过DLS确定尺寸。Jiang Y,Lu Q,Wang Y等人,对用于mRNA递送的聚合物文库的内体逃逸进行定量(Quantitating Endosomal Escape of a Library of Polymers for mRNA Delivery), Nano Lett.2020;20(2):1117-1123.doi:10.1021/acs.nanolett.9b04426

#### [0601] 体外筛选

[0602] A549人肺细胞系(ATCC)用于所有体外筛选实验。细胞在DMEM:F12的1:1溶液(GE Healthcare)中生长,用10%胎牛血清(FBS,Atlanta Biologicals)和50µg/mL庆大霉素强化,并且在5% CO<sub>2</sub>下储存在37℃恒温箱中。在多聚复合物递送前24小时,将细胞以50,000个细胞/孔接种到24孔板中。直接在多聚复合物递送之前,将细胞培养基更新,并且使用PACE多聚复合物用0.5µg的EGFP mRNA(Trilink Biotechnologies)处理细胞。在处理24

小时,将细胞用PBS清洗,用TrypLE Express Enzyme(Thermo Fisher Scientific)解离15min,然后转移到96孔圆底板。将细胞用在PBS中的2%牛血清白蛋白(BSA)洗涤一次,然后按照制造商的说明用Zombie Live/Dead Fixable Near IR(Biolegend)染色。在染色后,将细胞用在PBS中的2% BSA再洗涤一次,然后通过流式细胞术(Attune NxT)进行分析。在FlowJo 10.6.2版中分析结果。

#### [0603] 体内测定

[0604] 所有动物工作都在耶鲁大学按照耶鲁动物资源中心(Yale Animal Resource Center, YARC)和动物保护和利用委员会(the Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)指南完成。雄性BALB/c小鼠(20g, Charles River, 威利曼蒂克, CT, 美国)用于实验。以200 $\mu$ L的体积静脉内或腹膜内施用在乙酸钠缓冲液中稀释的PACE:mRNA多聚复合物(0.1mg/mL mRNA, N=3)。在注射后6小时通过IVIS Spectrum(PerkinElmer)监测和定量体内生物发光(光子/秒/cm<sup>2</sup>/sr)。

#### [0605] 吸入递送

[0606] 体内实验在年龄为10-30周的C57BL/6小鼠(EGFP mRNA递送)和BALB/c小鼠(FLuc mRNA递送)中进行。直接在施用前制备多聚复合物溶液(10mg/mL聚合物)。对于吸入递送,将小鼠用异氟烷麻醉,并且通过门牙悬挂。将舌头用镊子缩回,并且将5 $\mu$ g的在PACE多聚复合物中的mRNA施用至口腔后部。将舌头保持在缩回位置达10次呼吸的持续时间,同时吸入多聚复合物。

[0607] 对于通过流式细胞术来分析EGFP表达,在24小时后将小鼠安乐死。将肺用10mL的PBS灌注,然后用1mL分散酶(50U/mL, Corning Life Sciences)灌注。然后将气管用钝头针插管,将肺用1mL的分散酶(50U/mL)膨胀,并且沿着气管用缝线结扎。将肺取出并且放入冰冷PBS中,直到进一步处理。为了制备用于流式细胞术的单细胞悬液,将肺组织用剪刀剪碎成2-3mm的块,转移到具有5mL的在PBS中的脱氧核糖核酸酶1(1mg/mL, Roche Diagnostics)和胶原酶1(5mg/mL, Worthington Biochemical)的15mL管中,并且温育(37 $^{\circ}$ C, 摇动)30min。然后将组织块吸到具有18号针头的5mL注射器中3-5次。在最后一次抽吸后,将流体排出到预先润湿的70 $\mu$ m过滤器上。使用注射器柱塞将在过滤器上的剩余组织轻轻地破裂,将过滤器用2mL的在PBS中的0.5% BSA清洗,并且将所得细胞悬液以1,200rpm离心5min。为了裂解剩余的红细胞,将细胞重新悬浮于2mL氯化铵钾(Ammonium-Chloride-Potassium) (ACK)裂解缓冲液中,并且在室温温育4分钟。然后将缓冲液用4mL的在PBS中的10% FBS中和,将细胞通过70 $\mu$ m过滤器重新过滤,并且以1,200rpm离心5min。将细胞重新悬浮于在PBS中的2% BSA中,转移至96孔圆底板,并且用在PBS中的2% BSA再洗涤一次。按照制造商的说明将细胞用Zombie Live/Dead Fixable Near IR(Biolegend)染色。将细胞用在PBS中的2% BSA再洗涤一次,然后通过流式细胞术进行分析。在FlowJo 10.6.2版中分析结果。

[0608] 肺中的荧光素酶表达通过体内成像系统(IVIS, PerkinElmer)并且通过对提取的肺蛋白质的直接测量来分析。在mRNA递送后6分钟,用150mg/kg D-荧光素对小鼠进行腹膜内注射,将其用异氟烷麻醉,并且在32min后通过IVIS来检测发光信号。在24小时后,用D-荧光素(150mg/kg)对小鼠进行再次注射,并且在15min后进行成像。在最初注射后30min,取出肺、脾、肝、肾和心脏,并且通过IVIS来检测离体器官发光。然后将肺和脾组织切碎并且放入具有1mL的Glo裂解缓冲液(Promega)的PreCellys裂解管(Bertin Instruments)中,并且以

6500rpm匀化两次,持续30s。将裂解物转移至Eppendorf管中,并且以21,000x g离心10min以移除细胞碎片。将20uL的裂解物与100uL的D-荧光素(Promega)组合,并且在发光计上测量发光,持续10s。将发光值相对于总蛋白质浓度进行归一化,所述总蛋白质浓度按照制造商的说明通过Pierce BCA蛋白质测定(Thermo Fisher Scientific)来测量。

[0609] 结果

[0610] pH

[0611] 图11是表1中的聚合物2、4、14、15、16、17、20、25、27和31在4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8和6.0的pH下的转染效率(百分比)的图。结果展示了具有不同端基的PACE多聚复合物的最佳乙酸钠缓冲液pH。

[0612] PACE转染效率强烈依赖于缓冲pH,并且最佳pH随着聚合物端基而改变。

[0613] PEG浓度

[0614] 如图12A所示,PACE-PEG的存在提高了多聚复合物稳定性。

[0615] 图12B是作为PACE-PEG含量(%) (0、0.05、0.10、0.25、0.50和1)的函数的表1中的聚合物14、15、16、17、25、27和31的转染效率(%)的图。图12C是相同PACE-PEG混合物的EGFP表达的图,示出了PEG提高EGFP表达。虽然低至0.05重量%的PACE-PEG浓度降低了大部分聚合物在体外的mRNA转染效率,但是一种聚合物(P14)在PEG浓度范围内保持高转染效率。

[0616] 开发基于mRNA的疫苗制剂用于吸入递送提出了特有的挑战,特别是在保持高转染能力的同时克服粘液屏障方面。通常采用PEG涂层来提高通过粘液的渗透,然而,必须优化PEG覆盖以确保不损失转染效率。

[0617] 通过将DSPE-PEG(PEG2k,Nano OCS)溶解在DMSO中(10mg/mL)来形成DSPE-PEG涂覆的多聚复合物。然后将溶解的DSPE-PEG与在DMSO中的PACE(100mg/mL)以1:10的体积比组合。根据需要进行在DMSO中的中间DSPE-PEG稀释以实现所需的DSPE-PEG与PACE的最终比率。然后如上所述,通过用在DMSO中的DSPE-PEG/PACE共混物替换在DMSO中的PACE,形成多聚复合物。

[0618] PEG对转染效率和基因表达的影响在图13A-13C中示出。图13A是0%、0.01%、0.1%、1%或10%的DSPE-PEG对尺寸(nm)和多分散性的影响的图。图13B是DSPE-PEG含量对表1中的聚合物14、15、16、17、25、27和31的转染效率(%)的影响的图。图13C是DSPE-PEG浓度(0、0.05、0.10、0.25、0.50、1.0、2.5和5%)对EGFP表达的影响的图。

[0619] 施用途径影响组织分布

[0620] 如图14A和14B所示,在I.V.注射和I.P.注射后6h的生物发光分布和解剖显示,在注射时,多聚复合物最初主要分布在脾中,然后在脾、肝和肠中

[0621] 与此相比,如图15所示,对肺的施用显示出出人意料地高的肺浓度,而在其他组织中几乎没有表达。

[0622] 这证实这种制剂是一种肺部施用的用于将核酸诸如mRNA递送至肺的有效且高度选择性的手段。





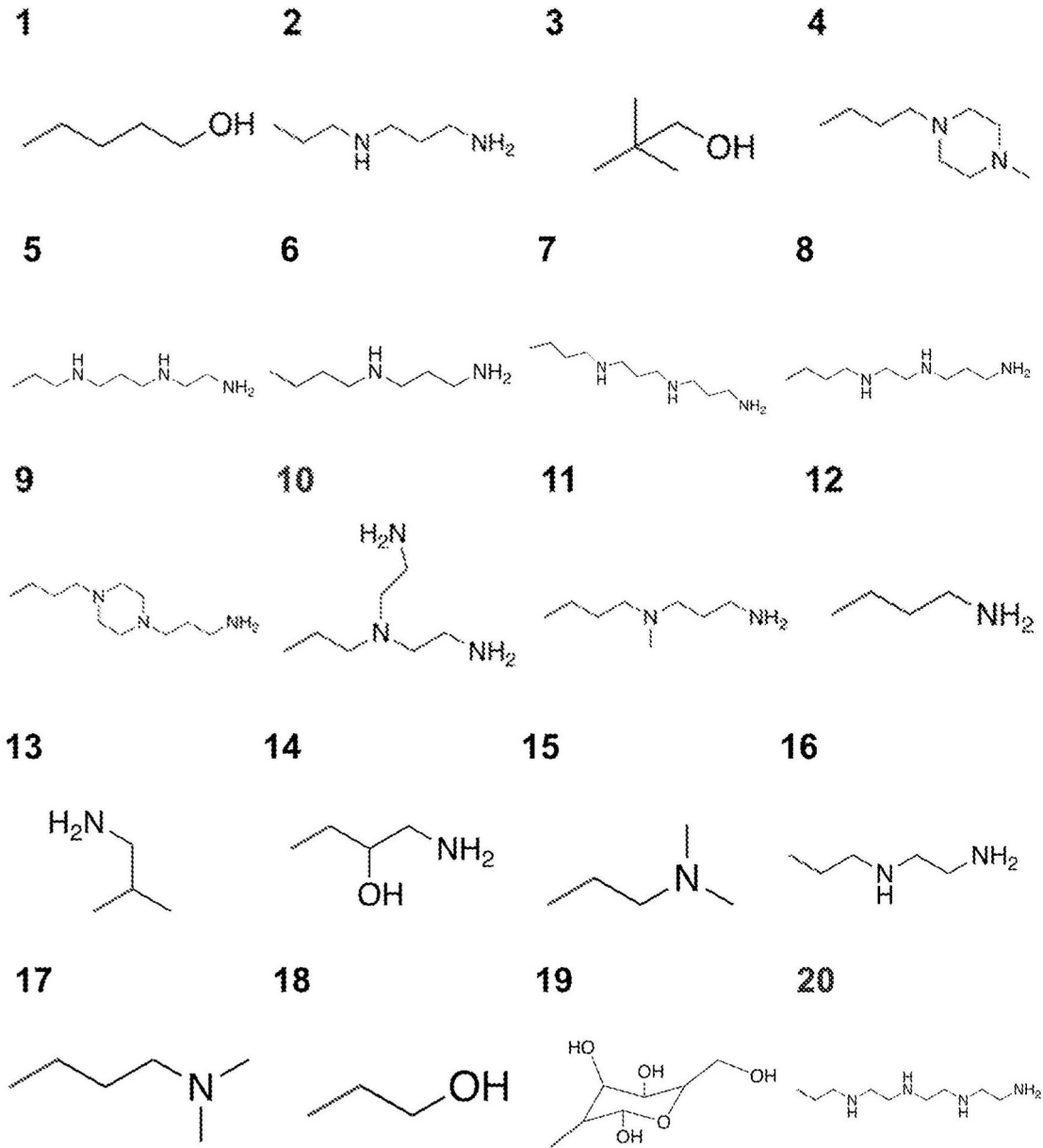


图1

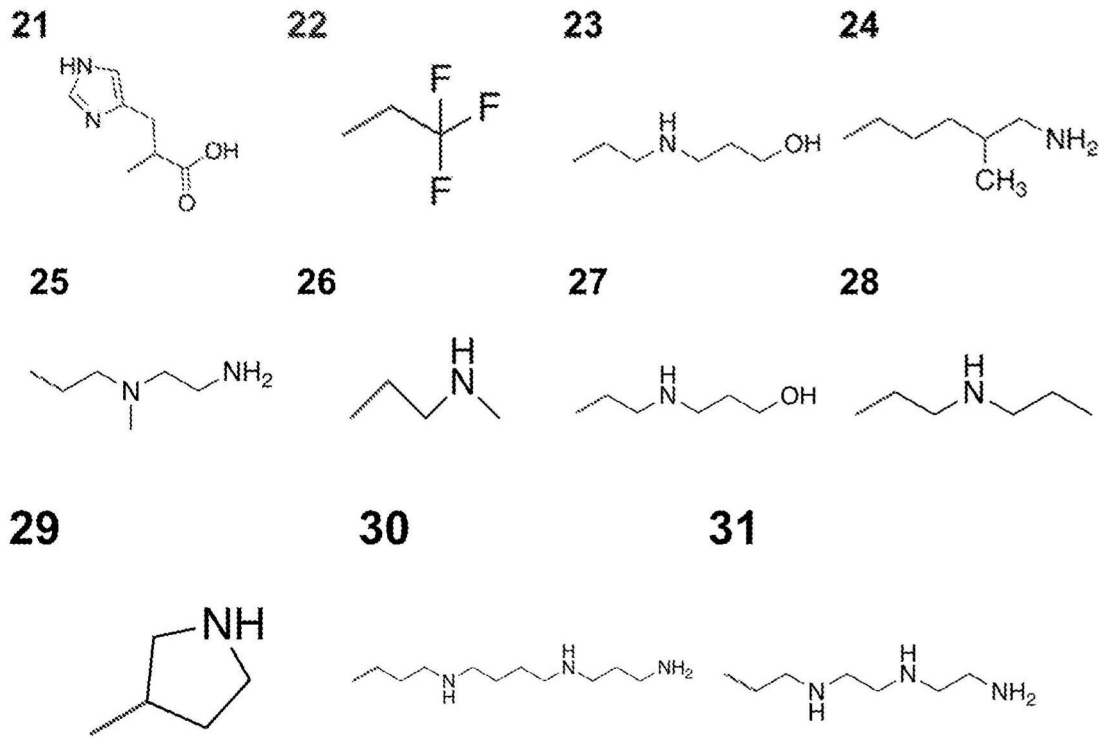


图1续

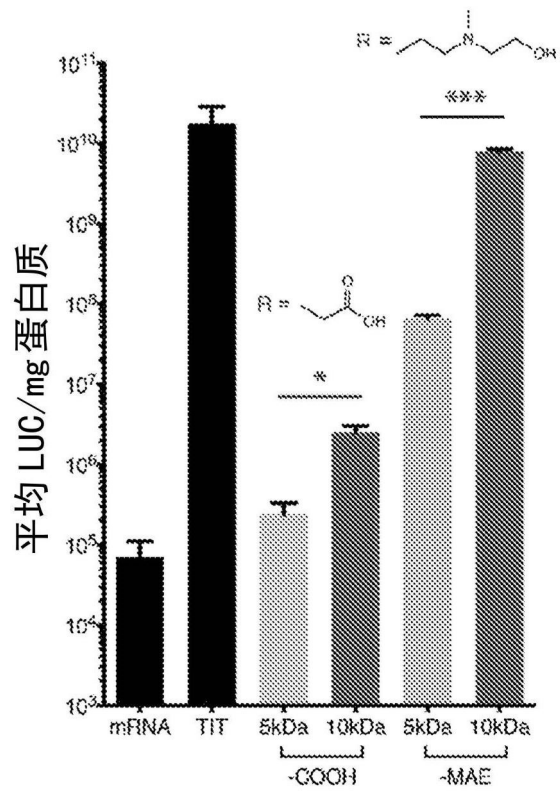


图2

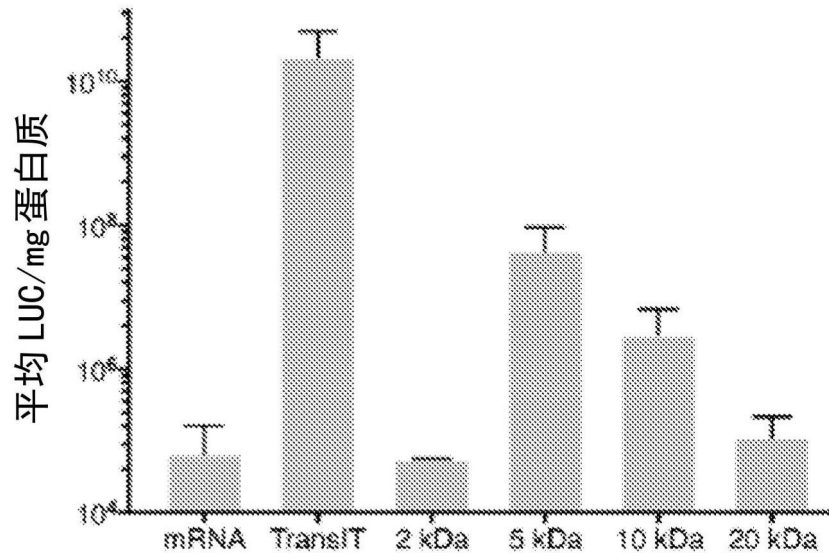


图3A

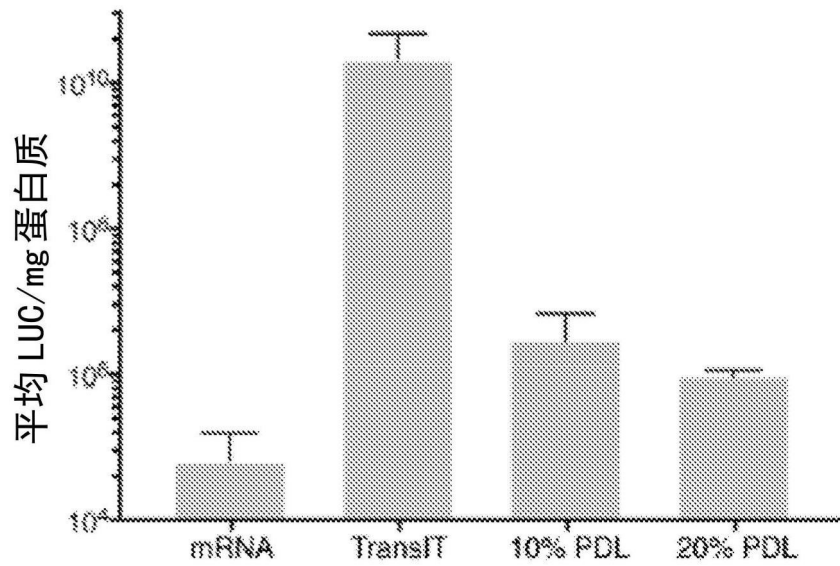


图3B

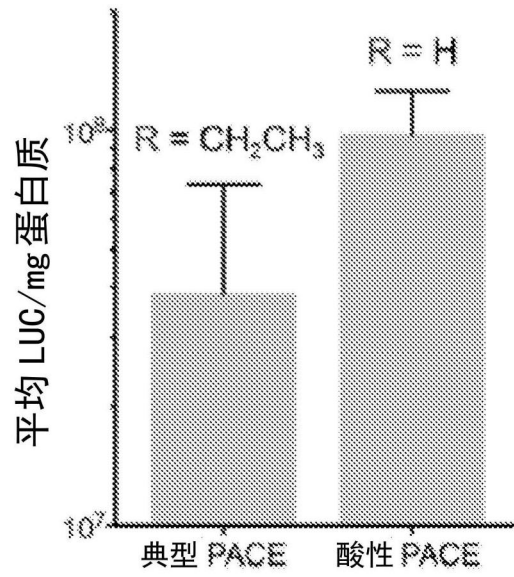


图3C

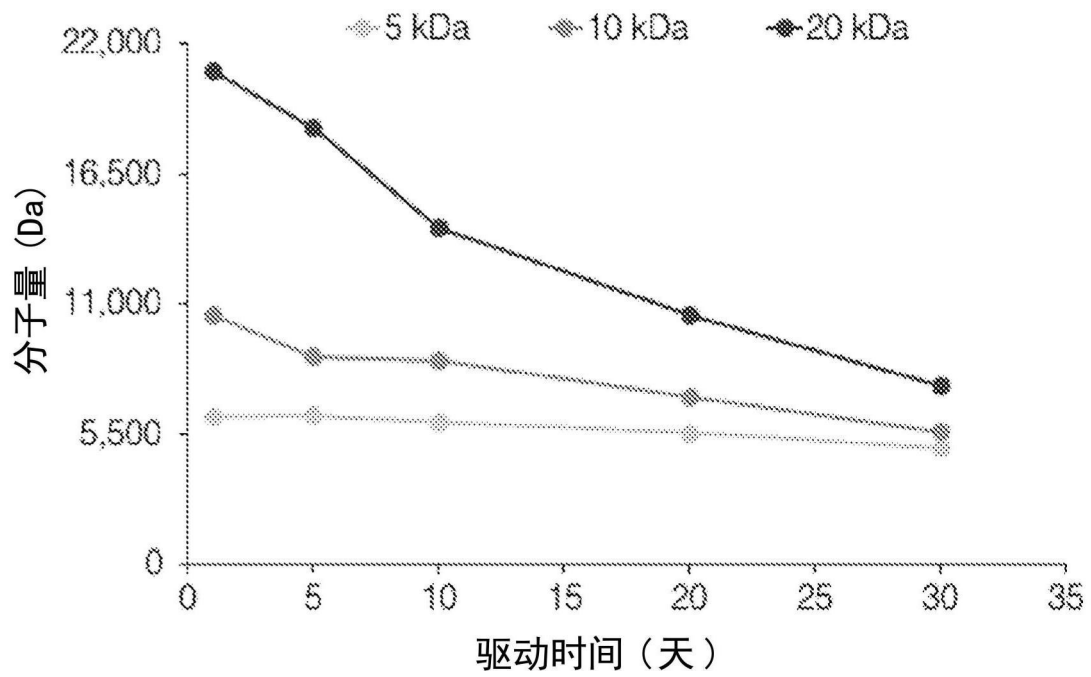


图4

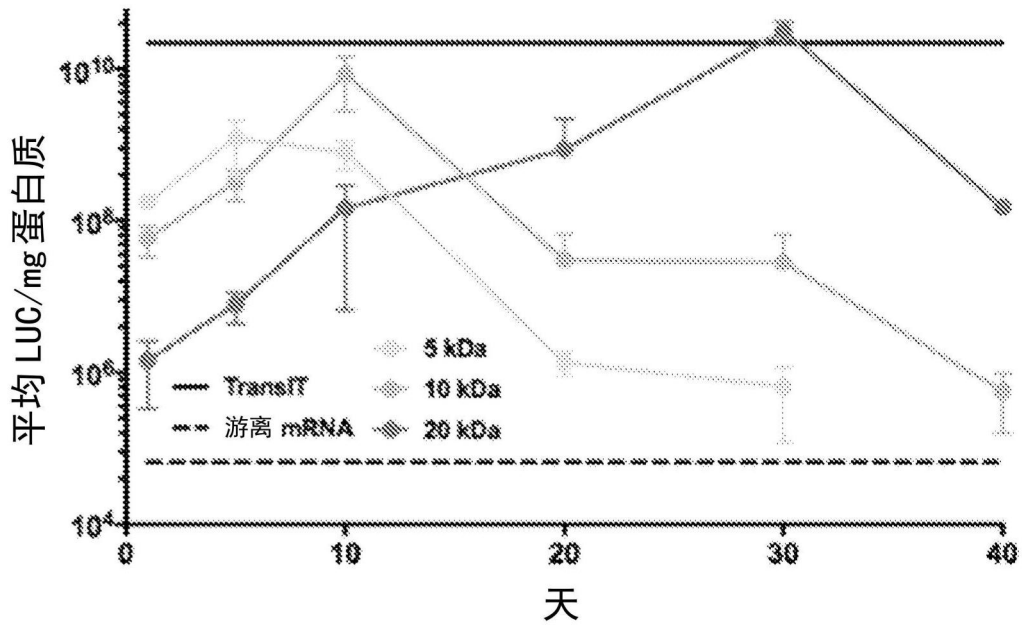


图5A

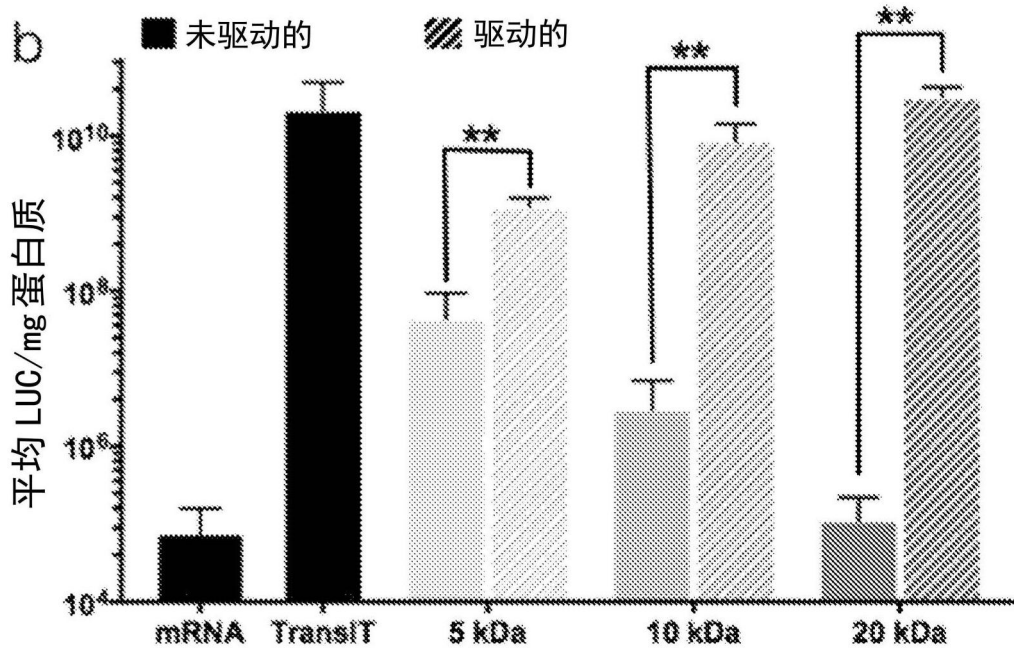


图5B

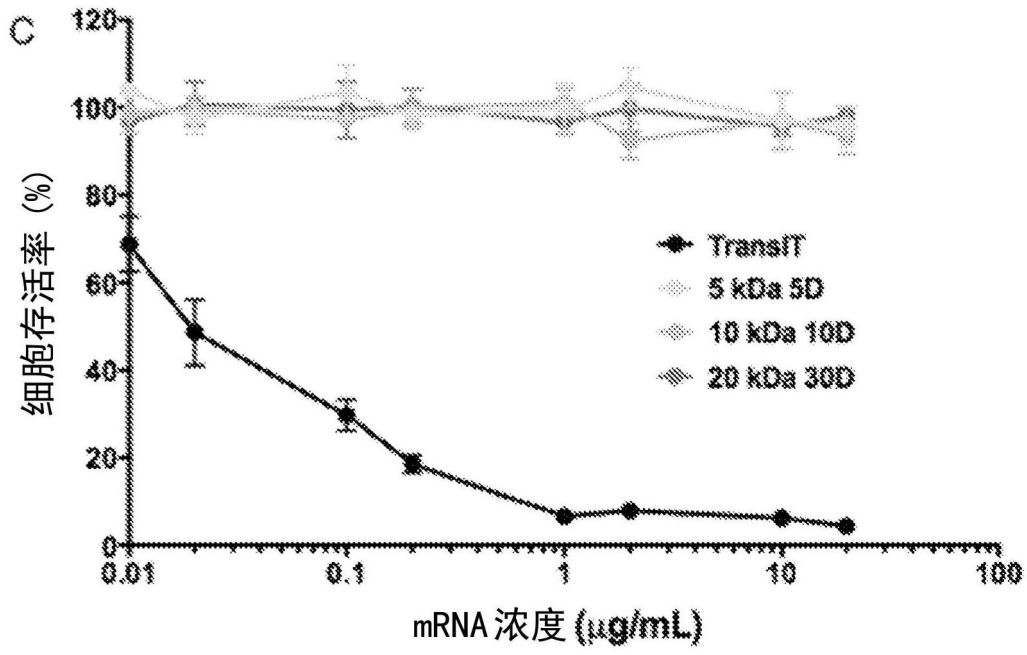


图5C

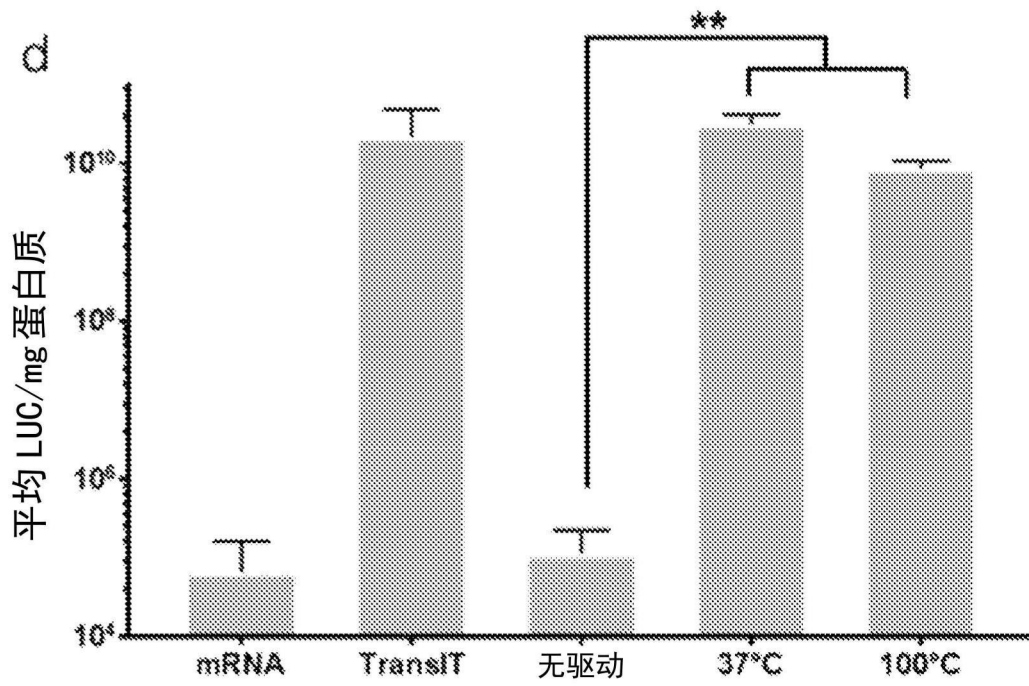


图5D

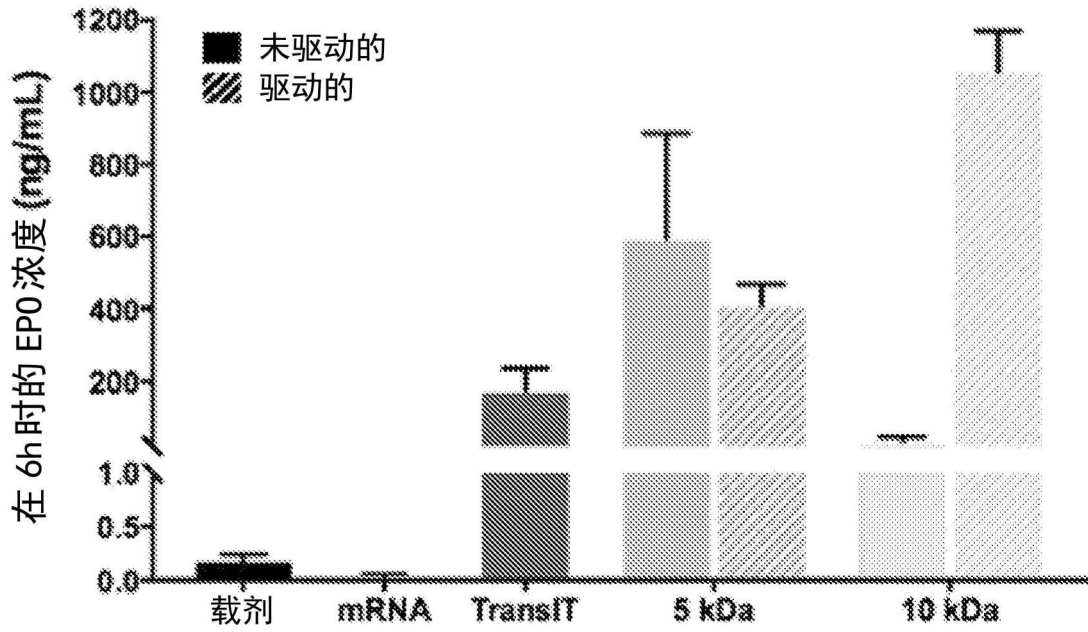


图6A

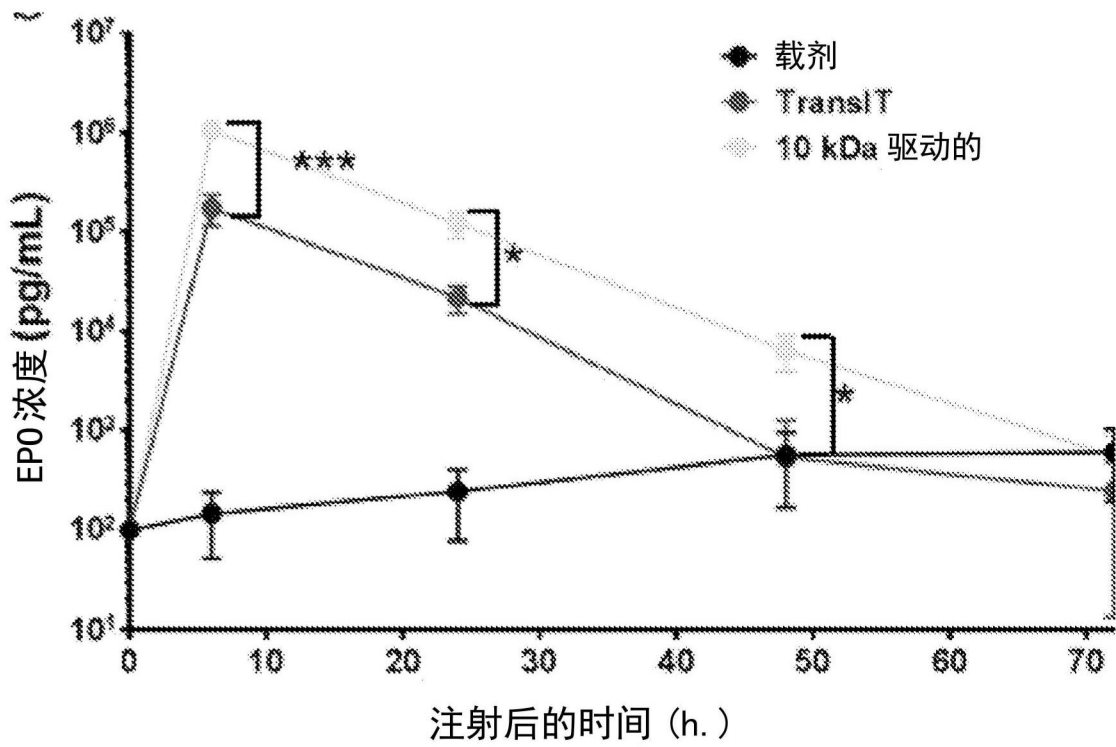


图6B

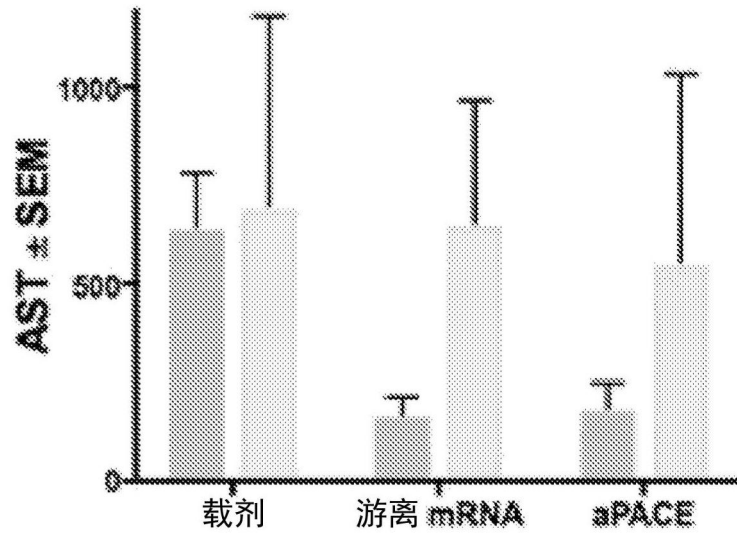


图6C

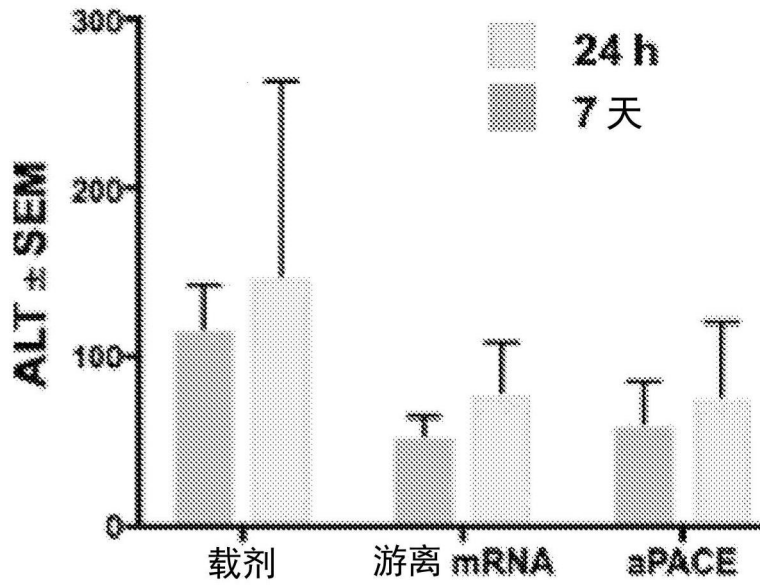


图6D

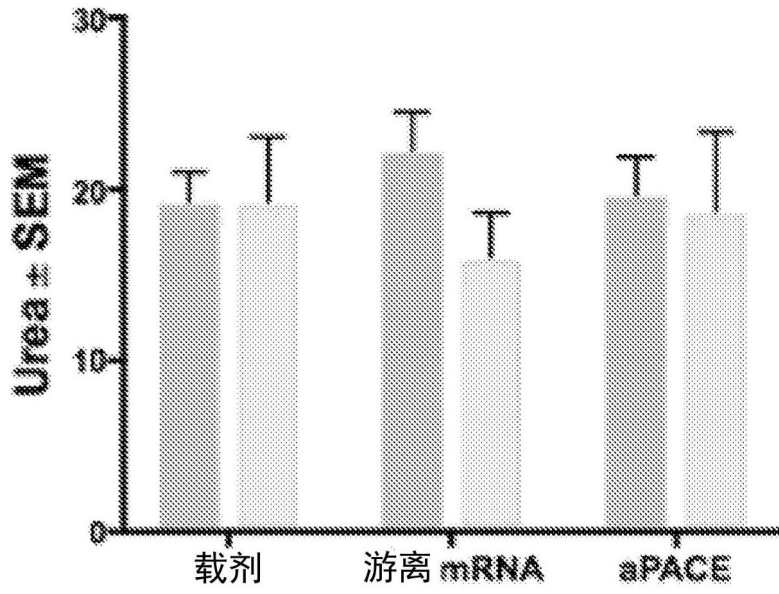


图6E

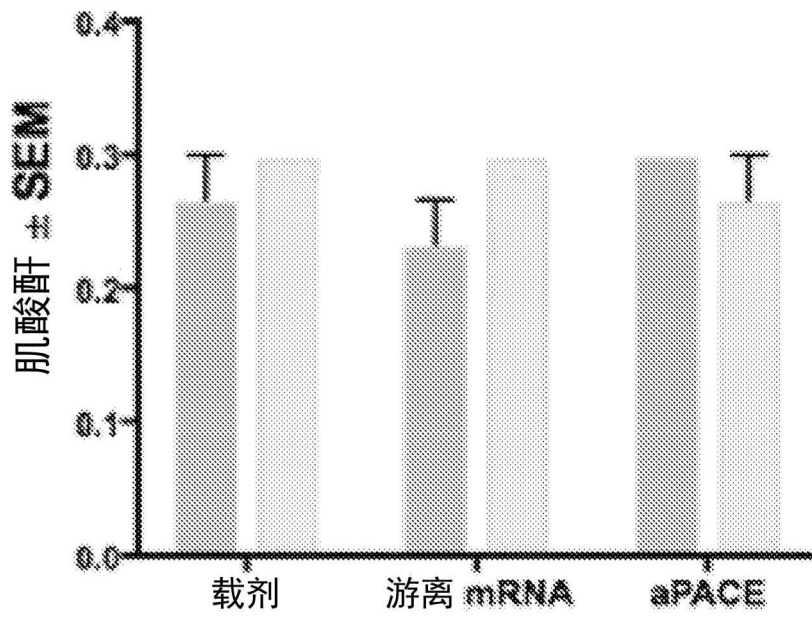


图6F

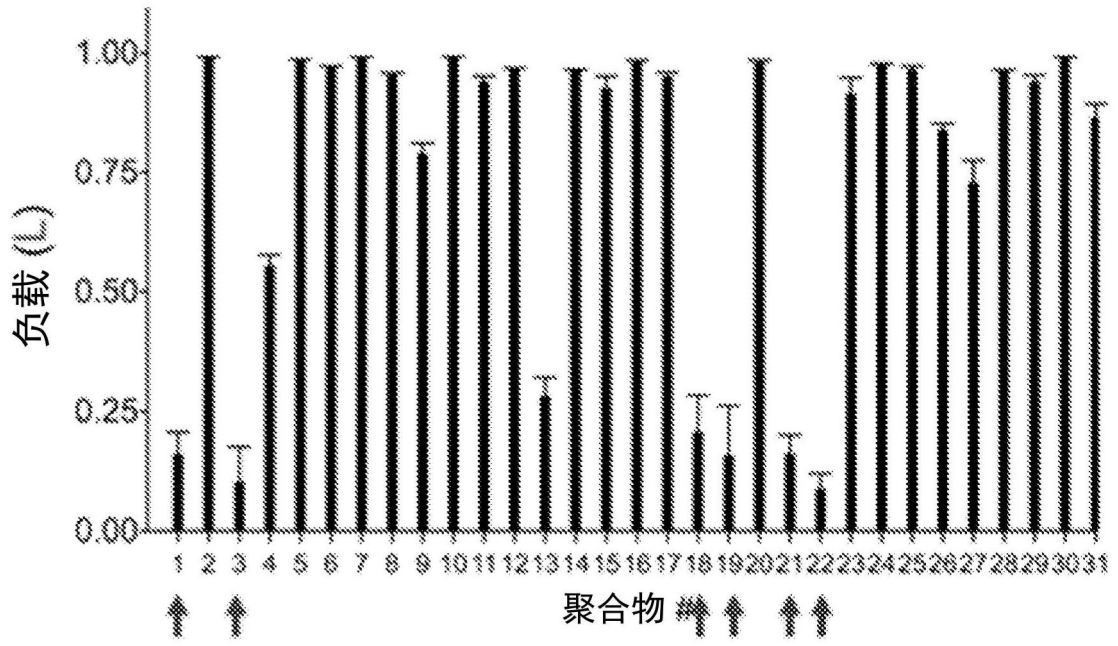


图7

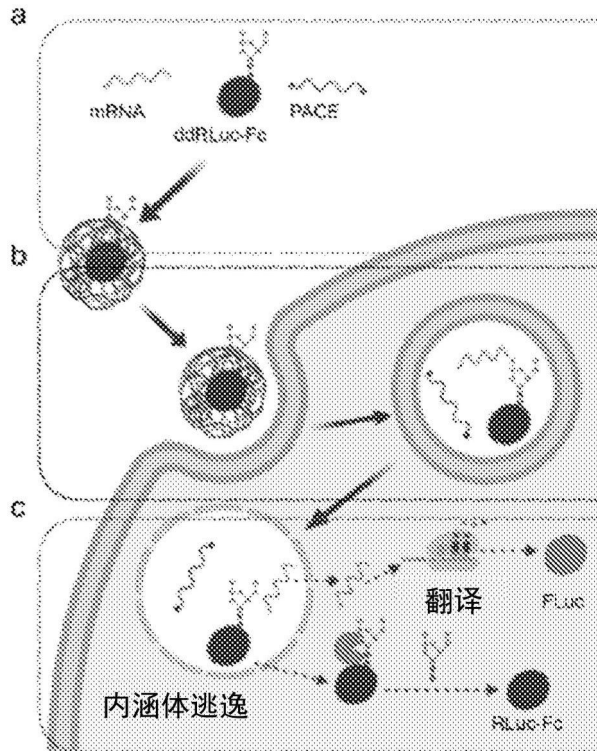


图8A

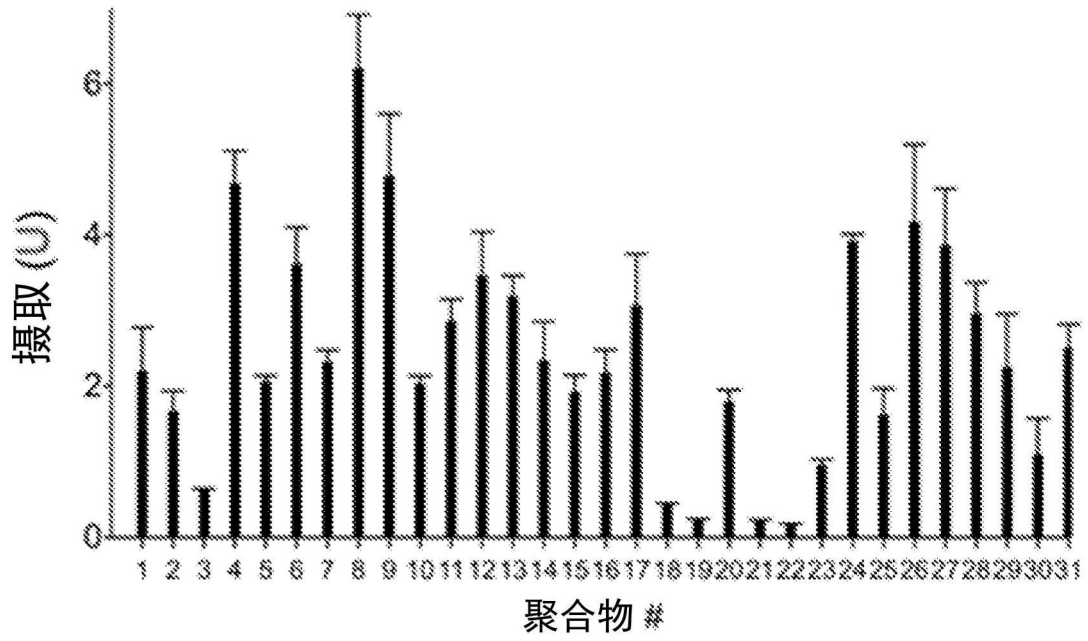


图8B

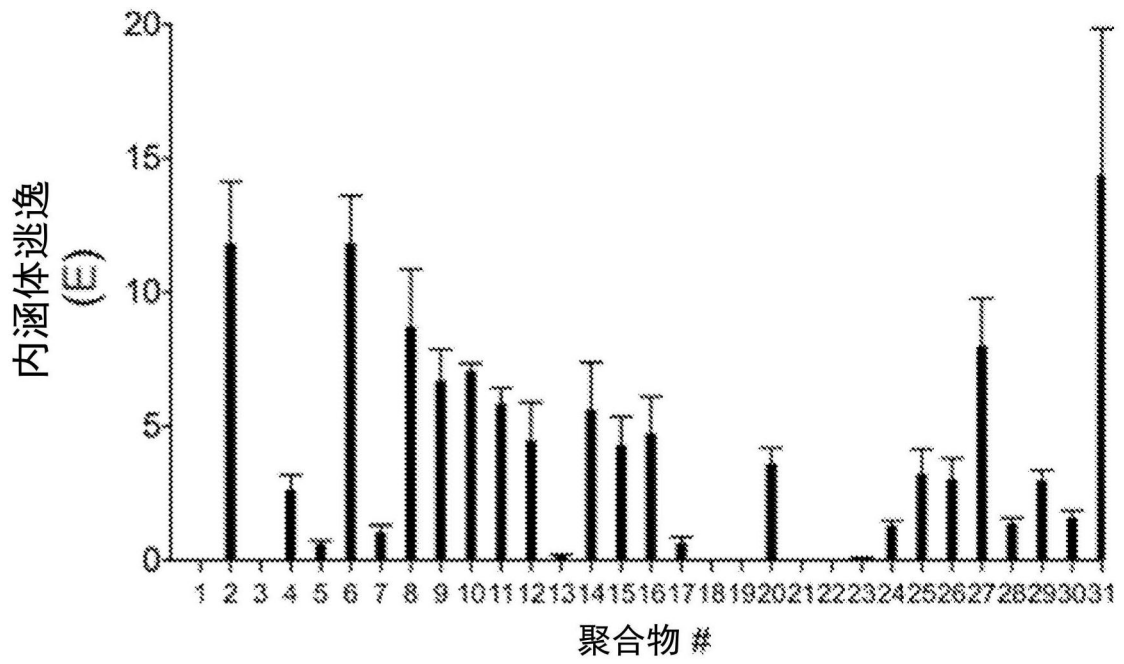


图8C

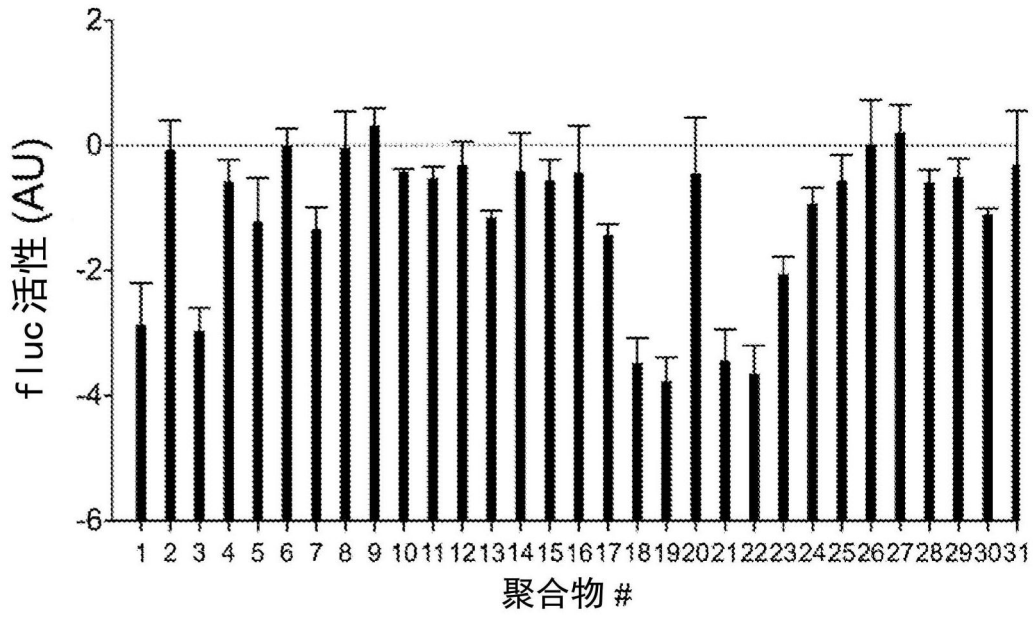
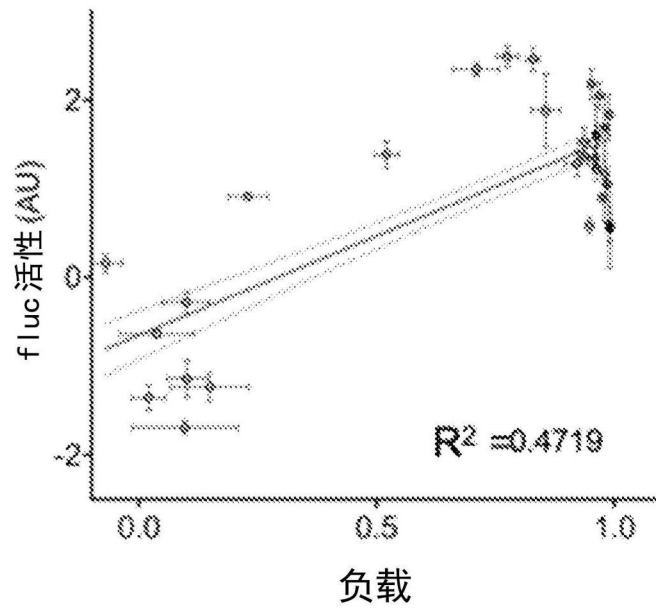


图8D



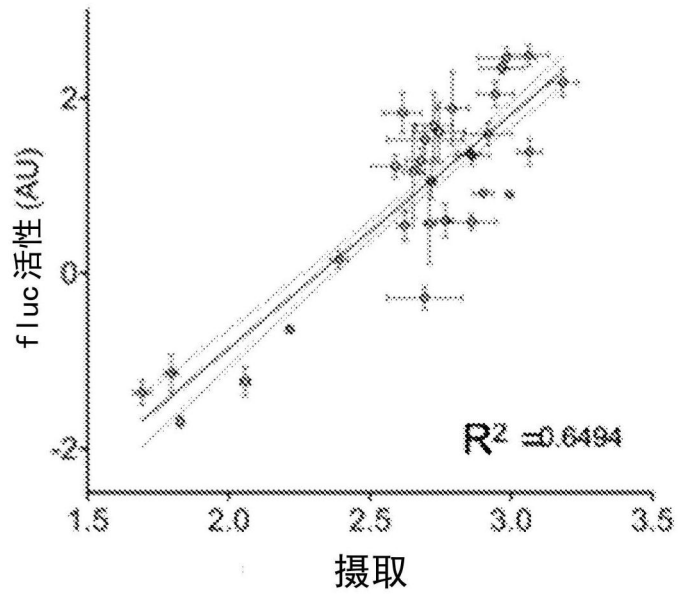


图9B

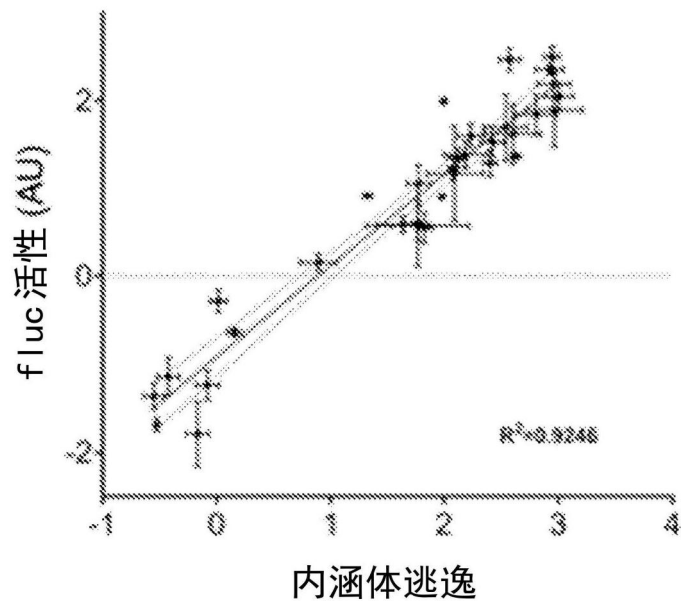


图9C

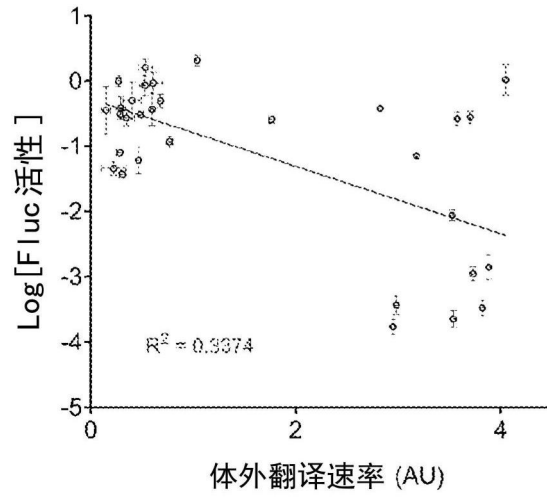


图10A

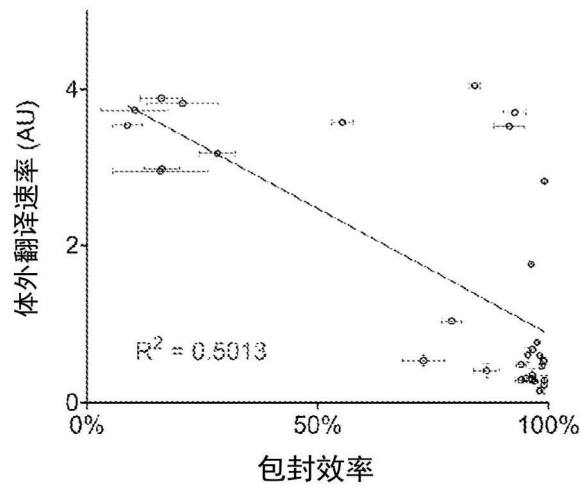


图10B

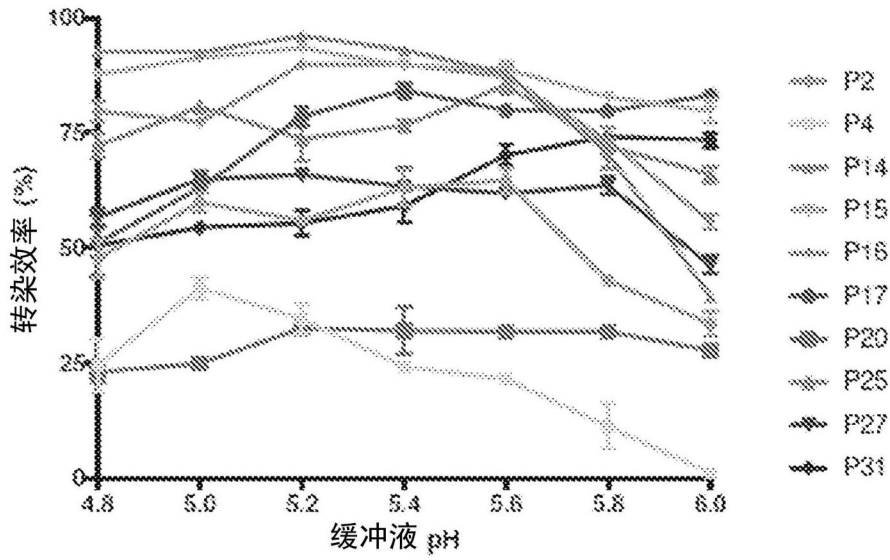


图11

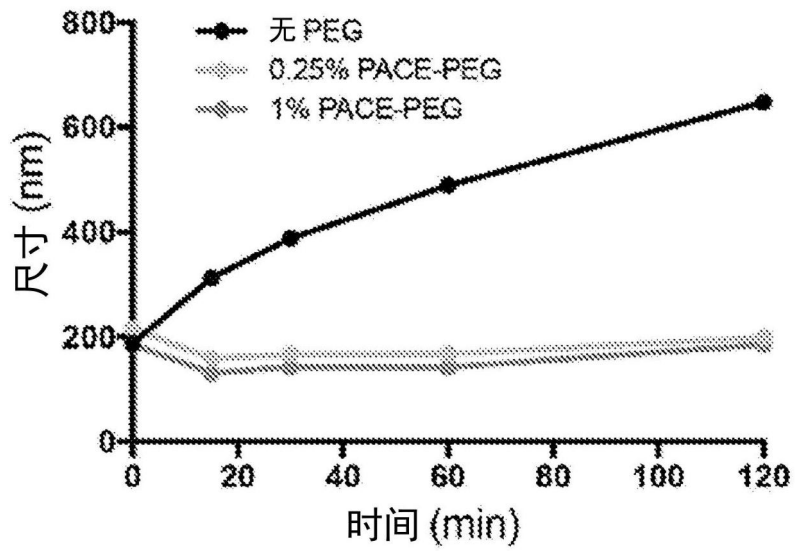


图12A

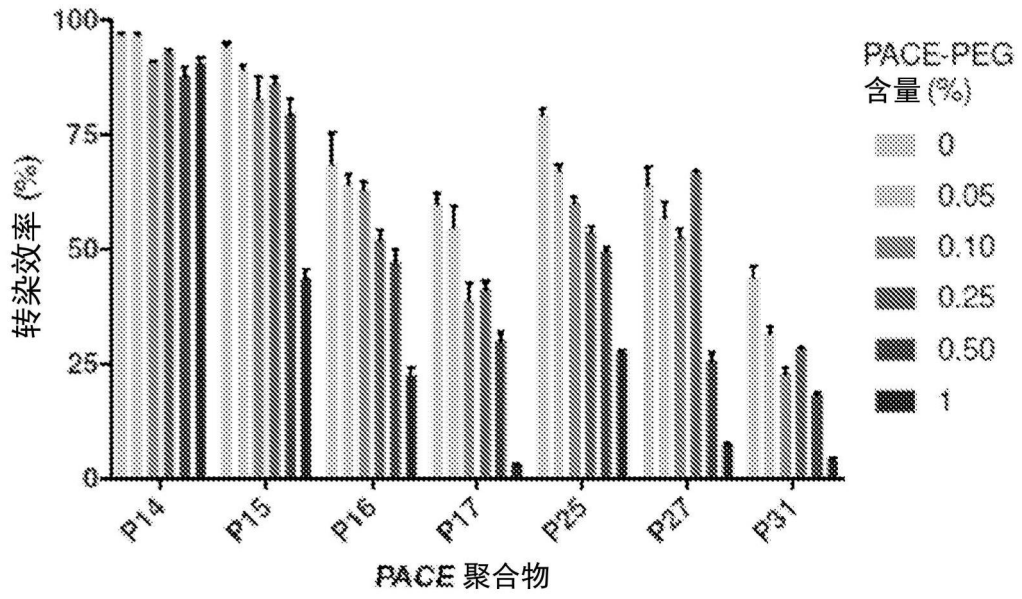


图12B

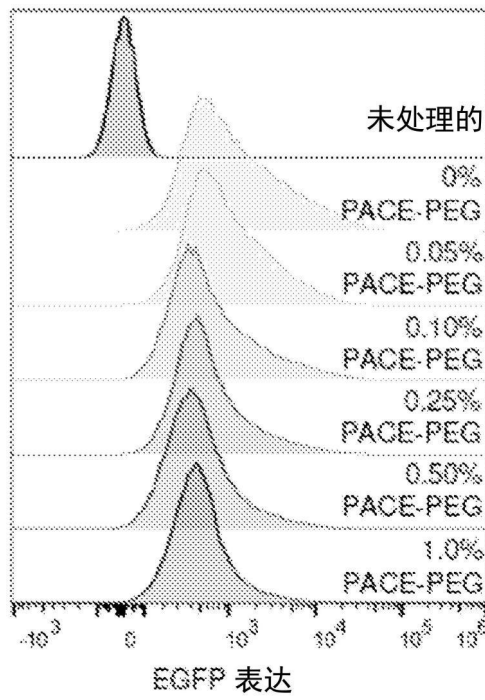


图12C

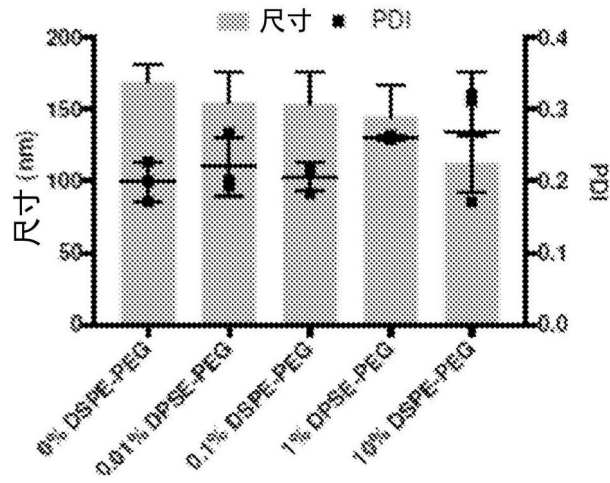


图13A

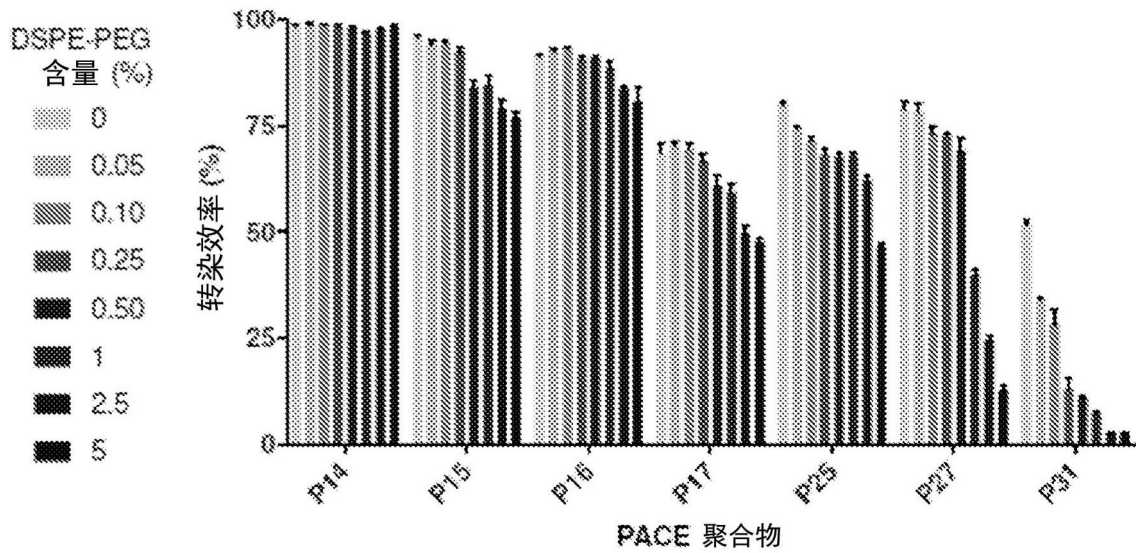


图13B

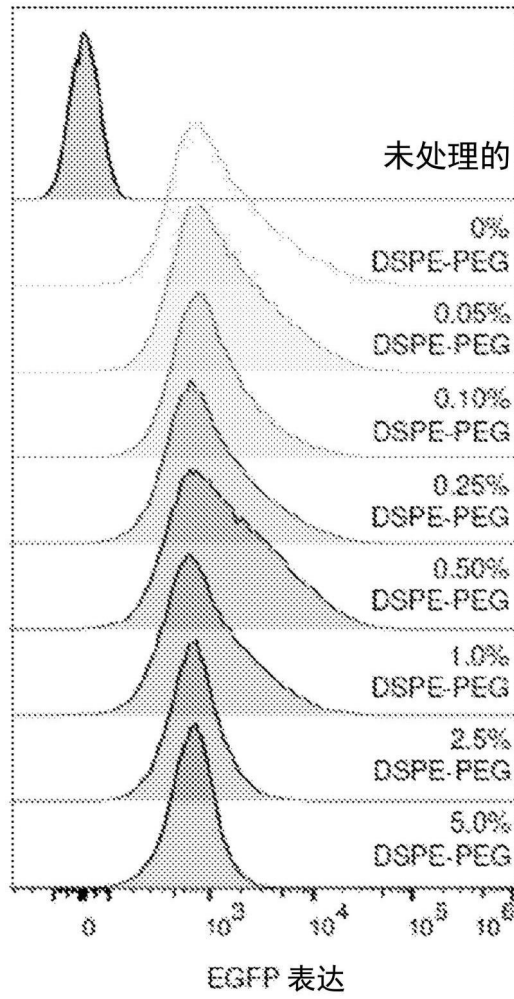


图13C

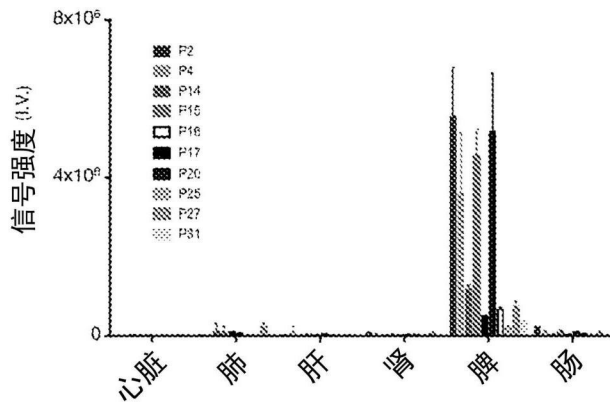


图14A

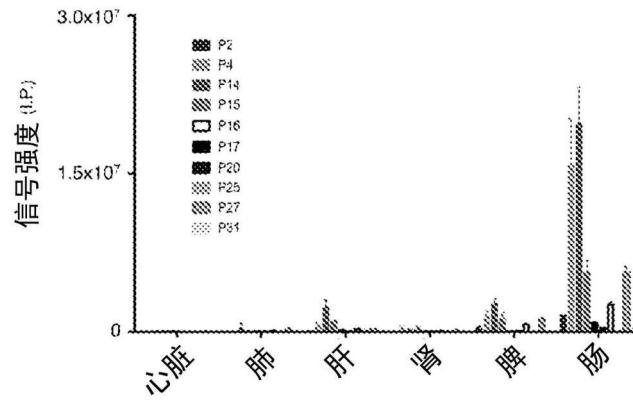


图14B

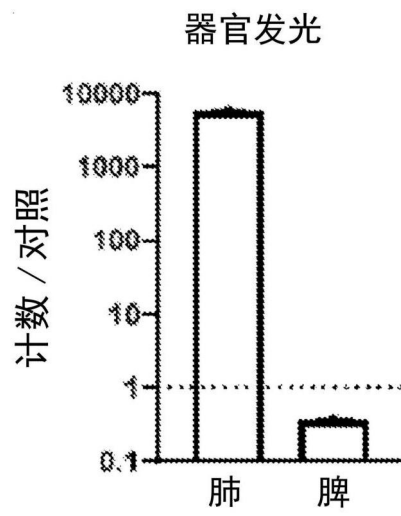


图15