(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115702005 A
(43)申请公布日 2023.02.14

(21)申请号 202180040759.0
(22)申请日 2021.04.02
(30)优先权数据
63/005,853 2020.04.06 US
63/145,086 2021.02.03 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.12.06
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/025542 2021.04.02
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/207020 EN 2021.10.14
(71)申请人 蒂巴生物技术有限公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 P·塔卢克达尔 J·查哈尔 黄进 K·鲁平
(74)专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司 11283
专利代理师 刘依云
(51)Int.Cl.
A61K 47/51(2006.01)
A61K 47/56(2006.01)
C12P 19/34(2006.01)
C40B 40/06(2006.01)
A61K 31/7088(2006.01)
A61K 31/713(2006.01)
C12N 15/113(2006.01)

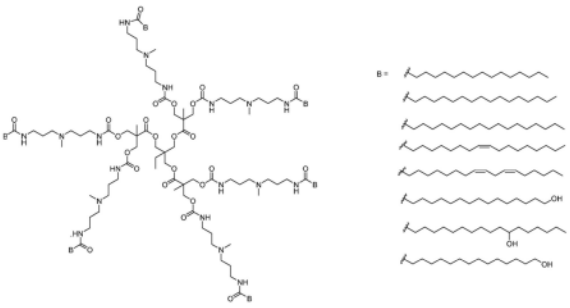
权利要求书7页 说明书56页 附图22页

(54)发明名称

用于有效核酸递送的载体

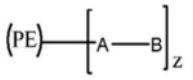
(57)摘要

本发明描述了用于将核酸递送至受试者的纳米颗粒组合物,其包括包含聚酯(PE)树枝状聚合物或树枝化基元的载体,以及包封在所述PE树枝状聚合物或树枝化基元内的治疗性或免疫原性核酸试剂。提供了通过施用纳米颗粒组合物治疗或预防受试者的疾病或病症的方法,所述纳米颗粒组合物提供免疫应答和协同治疗或预防效果。



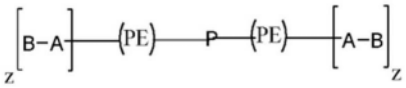
CN 115702005 A

1.一种具有式Ia或式Ib结构的核酸载体：



或

Ia；



Ib；

其中，PE是聚酯树枝状聚合物或树枝化基元，其包括核和形成一代或多代的多个单体聚酯单元，A是胺连接基，B是疏水单元，并且z是表面基团的数目。

2.根据权利要求1所述的核酸载体，其中，PE如式II所示：

$[(core)_c\text{-}Gn\text{-}O]$，　　II

其中，c是核的重复度或源自核的楔形的数目，其值独立地在1至6的范围内，G是树枝状聚合物或树枝化基元的层或代，n是代数且在1至10的范围内。

3.根据权利要求1所述的核酸载体，其中，所述多个单体聚酯单元是2,2-双(羟甲基)丙酸或2,2-双(羟甲基)丁酸。

4.根据权利要求1所述的核酸载体，其中，Z如式III所示：

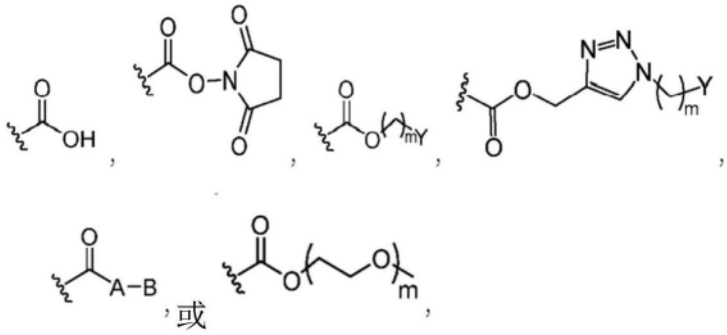
$z=cb^n$，　　III

其中b是分支点的重复度，或在每个分支点处的分支的数目；c是核的重复度或源自核的楔形的数量且在1至6的范围内，n是代数且在1至10的范围内。

5.根据权利要求2所述的核酸载体，其中，c是1，且所述核是单向核。

6.根据权利要求5所述的核酸载体，其中，所述单向核是羧酸或其衍生物。

7.根据权利要求5所述的核酸载体，其中，所述核选自：

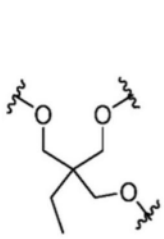


其中，Y选自甲基、异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基、新戊基、3-甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、叠氮化物(N_3)、卤素(Cl、Br或I)、乙炔(C_2H_2)、羟基(-OH)或巯基(-SH)、-吡喃糖基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环；A是胺连接基；B是疏水单元；m是1-20。

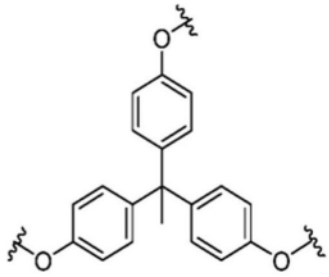
8.根据权利要求7所述的核酸载体，其中，所述环烷基、芳基、杂芳基和杂环被至少一个选自卤素、羟基(-OH)和烷基的基团取代。

9.根据权利要求2所述的核酸载体，其中，c是3，且所述核是三向核。

10.根据权利要求9所述的核酸载体，其中，所述三向核是三羟甲基丙烷或1,1,1-三(羟基苯基乙烷)，且分别具有以下结构：



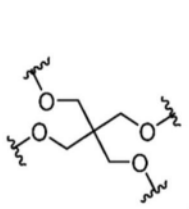
或



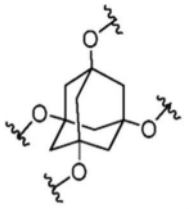
。

11.根据权利要求2所述的核酸载体，其中，c是4，且所述核是四向核。

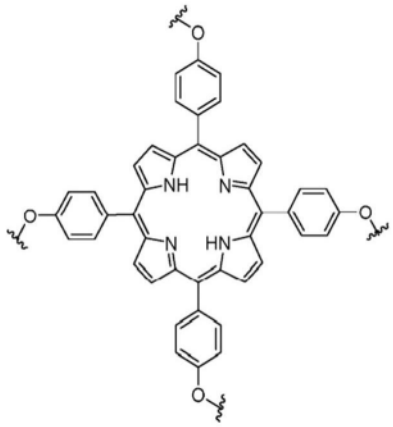
12.根据权利要求11所述的核酸载体，其中，所述四向核选自：季戊四醇、金刚烷-1,3,5,7-四醇或5,10,15,20-四(4-羟基苯基)-21H、23H-卟吩、[1,1'-联苯]-3,3',5,5'-四醇、2,3,6,7-四羟基-9,10-二甲基-蒽、9,10-二甲基-9,10-二氢-9,10-桥亚乙基蒽-2,3,6,7-四醇、6,13-二氢-并五苯-5,7,12,14-四醇、六氢-[1,4]二恶英[2,3-b][1,4]二噁英-2,3,6,7-四醇、蒽-1,4,9,10-四醇、芘-1,3,6,8-四醇和3,3,3',3'-四甲基-2,2',3,3'-四氢-1,1'-螺[茚]-5,5',6,6'-四醇，分别具有如下结构：



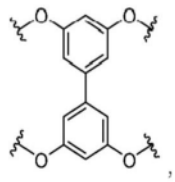
，



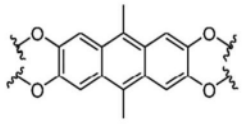
，



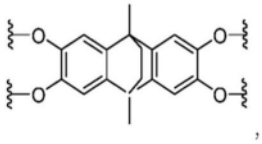
，



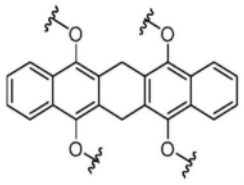
，



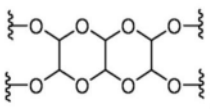
，



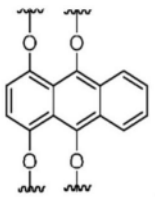
，



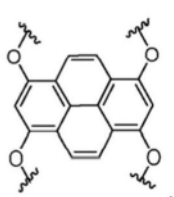
，



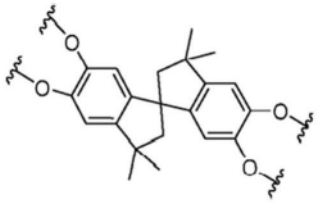
，



，

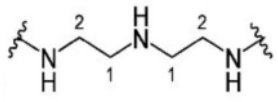


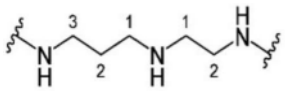
，或

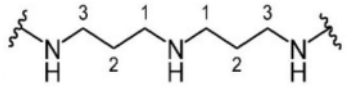


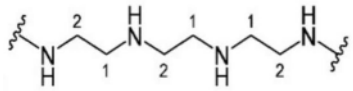
。

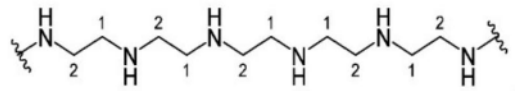
13.根据权利要求1所述的核酸载体，其中，A衍生自：N1-(2-氨基乙基)乙烷-1,2-二胺、N1-(2-氨基乙基)丙烷-1,3-二胺、N1-(3-氨基丙基)丙烷-1,3-二胺、N1,N1'-(乙烷-1,2-二基)双(乙烷-1,2-二胺)、N1,N1'-(乙烷-1,2-二基)双(N2-(2-氨基乙基)乙烷-1,2-二胺)、N1-(2-(4-(2-氨基乙基)哌嗪-1-基)乙基)乙烷-1,2-二胺、N1-(2-氨基乙基)-N1-甲基乙烷-1,2-二胺、N1-(3-氨基丙基)-N1-甲基丙烷-1,3-二胺、N1-(3-氨基丙基)-N1-乙基丙烷-1,3-二胺、3-((3-氨基丙基)(甲基)氨基)丙烷-1-醇、3,3'-(甲基氮杂二基)双(丙烷-1-醇)、N1-(3-氨基丙基)-N1-甲基丁烷-1,4-二胺、4-((3-氨基丙基)(甲基)氨基)丁-1-醇、4-((3-羟丙基)(甲基)氨基)丁-1-醇、4-((3-羟丙基)(甲基)氨基)丁-1-醇、N1-(4-氨基丁基)-N1-甲基丁-1,4-二胺、4-((4-氨基丁基)(甲基)氨基)丁-1-醇、4,4'-(甲基氮杂二基)双(丁-1-醇)、3-((3-氨基丙基)(乙基)氨基)丙-1-醇、3,3'-(乙基氮杂二基)双(丙-1-醇)、N1-(3-氨基丙基)-N1-乙基丁-1,4-二胺、4-((3-氨基丙基)(乙基)氨基)丁-1-醇、4-(乙基(3-羟丙基)氨基)丁-1-醇、N1-(2-氨基乙基)-N1-甲基丙-1,3-二胺、N1-(4-氨基丁基)-N1-乙基丁-1,4-二胺、4,4'-(乙基氮杂二基)双(丁-1-醇)、3-((3-氨基丙基)氨基)丙-1-醇、N1-(3-氨基丙基)丁烷-1,4-二胺、4-((3-羟基丙基)氨基)丁-1-醇、N1-(4-氨基丁基)丁烷-1,4-二胺、3,3'-氮杂二基双(丙-1-醇)、4-((3-氨基丙基)氨基)丁-1-醇、4,4'-氮杂二基双(丁-1-醇)和N1,N1'-(丁烷-1,4-二基)双(丙烷-1,3-二胺)；且分别具有如下结构：

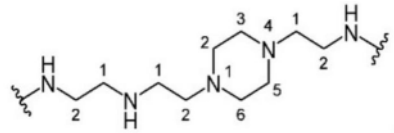
(1) 

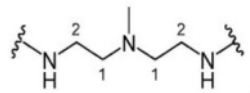
(2) 

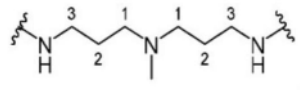
(3) 

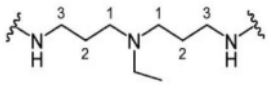
(4) 

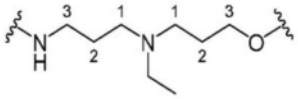
(5) 

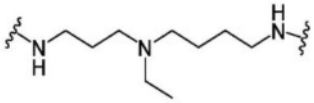
(6) 

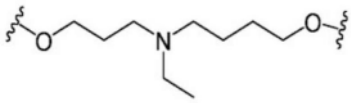
(7) 

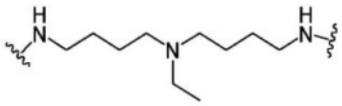
(8) 

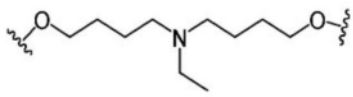
(9)  ,

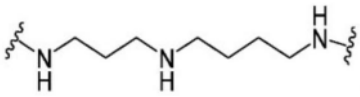
(10)  ,

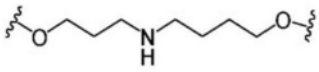
(11)  ,

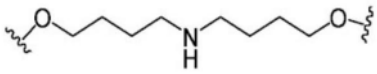
(12)  ,

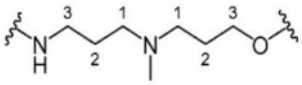
(13)  ,

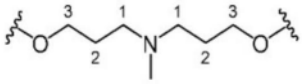
(14)  ,

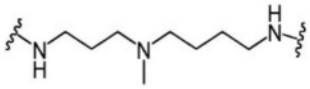
(15)  ,

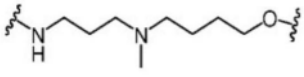
(16)  ,

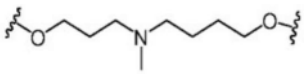
(17)  ,

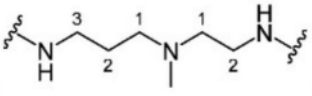
(18)  ,

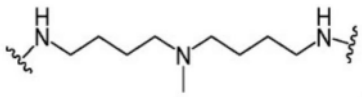
(19)  ,

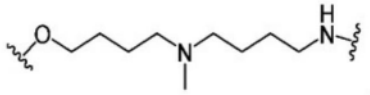
(20)  ,

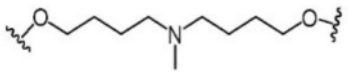
(21)  ,

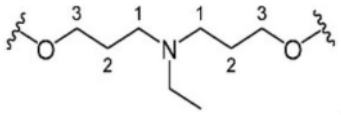
(22)  ,

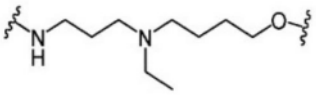
(23)  ,

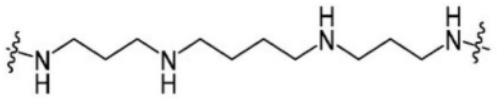
(24)  ,

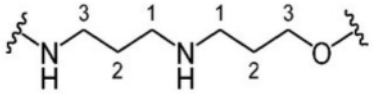
(25)  ,

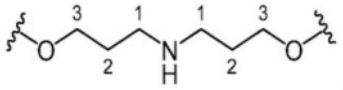
(26)  ,

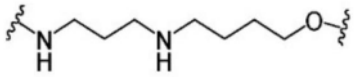
(27)  ,

(28)  ,

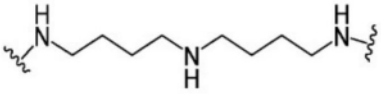
(29)  ,

(30)  ,

(31)  ,

(32)  ,

和

(33) 

。

14.根据权利要求1所述的核酸载体,其中,B是C_1-C_{22}烷基或C_2-C_{22}烯基。

15.根据权利要求14所述的核酸载体,其中,所述C_1-C_{22}烷基或C_2-C_{22}烯基被一至四个选自以下的取代基取代:卤素、-CN、-NO_2、-N_3、C_1-C_6烷基、卤代(C_1-C_6烷基)、-OR、-NR_2、-CO_2R、-OC(O)R、-CON(R)$_2$、-OC(O)N(R)$_2$、-NHC(O)N(R)$_2$、-NHC(NH)N(R)$_2$、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基、芳基、杂芳基和杂环,且R选自:氢、C_1-C_6烷基、卤代(C_1-C_6烷基)、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基、芳基、杂芳基和杂环。

16.根据权利要求15所述的核酸载体,其中,一至四个取代基选自OR、-NR_2、-CO_2R、-OC(O)R、-CON(R)$_2$、-OC(O)N(R)$_2$、-NHC(O)N(R)$_2$及-NHC(NH)N(R)$_2$。

17.根据权利要求16所述的核酸载体,其中,每个环烷基、环烯基、芳基、杂芳基和杂环进一步被R'取代,并且R'独立地选自:卤素、-CN、-NO_2、-N_3、C_1-C_6烷基和卤代(C_1-C_6烷基)。

18.根据权利要求1所述的核酸载体，其中，B是不饱和烃基。

19.根据权利要求1所述的核酸载体，其中，B选自：甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、癸基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、丁-3-烯-1-基、辛-7-烯-1-基、12-十三烯基、14-十五烯基、17-十八烯基、油烯基、亚油基和花生四烯基。

20.根据权利要求1所述的核酸载体，其中，B衍生自脂肪酸或其衍生物。

21.根据权利要求20所述的核酸载体，其中，所述脂肪酸选自：辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸。

22.根据权利要求21所述的核酸载体，其中，所述脂肪酸衍生物选自：12-羟基-9-顺式-十八碳烯酸、12-甲基十四烷酸、12-甲基十三烷酸、14-甲基十六烷酸、14-甲基十六酸、18-甲基十九烷酸、19-甲基花生酸、异棕榈酸、异硬脂酸、植烷酸、(±)-2-羟基辛酸、(±)-3-羟基癸酸、(±)-3-羟基辛酸、10-羟基癸酸、12-羟基十八烷酸、15-羟基十五烷酸、16-羟基十六烷酸、2-羟基十六烷酸、2-羟基十四烷酸、2-羟基十二烷酸、DL-α-羟基硬脂酸、DL-β-羟基尿酸、DL-β-羟基肉豆蔻酸和DL-β-羟基棕榈酸。

23.根据权利要求20所述的核酸载体，其中，所述脂肪酸包含一种或多种稳定同位素。

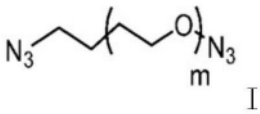
24.根据权利要求23所述的核酸载体，其中，所述稳定同位素是碳或氢的稳定同位素。

25.根据权利要求24所述的核酸载体，其中，所述碳的稳定同位素是^{13}C。

26.根据权利要求24所述的核酸载体，其中，所述氢的稳定同位素是^{2}H。

27.根据权利要求23所述的核酸载体，其中，包含稳定同位素的脂肪酸选自：辛酸-1-^{13}C、辛酸-8-^{13}C、辛酸-8,8,8-d3、辛酸-$^{2}H15$、癸酸-1-^{13}C、癸酸-10-^{13}C、癸酸-10,10,10-d3、癸酸-d19、十一酸-1-^{13}C、月桂酸-12,12,12-$^{2}H3$、月桂酸-$^{2}H23$、月桂酸-1-^{13}C、月桂酸-1,12-$^{13}C2$、十三酸-2,2-$^{2}H2$、肉豆蔻酸-14-^{13}C、肉豆蔻酸-1-^{13}C、肉豆蔻酸-14,14,14-$^{2}H3$、肉豆蔻酸-$^{2}H27$、棕榈酸-1-^{13}C、棕榈酸-16-^{13}C、棕榈酸-16-^{13}C,16,16,16-$^{2}H3$、棕榈酸-$^{2}H31$、硬脂酸-1-^{13}C、硬脂酸-18-^{13}C、硬脂酸-18,18,18-$^{2}H3$、硬脂酸-$^{2}H35$、油酸-1-^{13}C、油酸-$^{2}H34$、亚油酸-1-^{13}C、亚油酸-$^{2}H32$、花生四烯酸-5,6,8,9,11,12,14,15-$^{2}H8$和二十烷酸-$^{2}H39$。

28.根据权利要求1所述的核酸载体，其中，P是具有两个叠氮基的双官能接头，并且具有式IV的结构：



IV，其中m是1-20的数。

29.一种纳米颗粒组合物，其包含权利要求1-28中任一项所述的核酸载体和包封在其中的治疗性或免疫原性核酸试剂。

30.根据权利要求29所述的纳米颗粒组合物，其中，所述治疗性或免疫原性核酸试剂选自：多核苷酸、寡核苷酸、DNA、cDNA、RNA、repRNA、siRNA、miRNA、sgRNA和mRNA。

31.根据权利要求29所述的纳米颗粒组合物，其中，所述治疗性或免疫原性核酸试剂编码选自传染病、病原体、癌症、自身免疫病和过敏性疾病的一种或多种抗原。

32.根据权利要求29所述的纳米颗粒组合物，其中，所述治疗性或免疫原性核酸试剂包含能够沉默、抑制或修饰基因活性的RNA或DNA。

33.根据权利要求29所述的纳米颗粒组合物，其还包含PEG-脂质。

34.根据权利要求33的纳米颗粒组合物,其中,所述PEG-脂质是1,2-二肉豆蔻酰基-sn-丙三基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]或1,2-二肉豆蔻酰基-rac-丙三基-3-甲氧基聚乙二醇-2000。

35.根据权利要求33所述的纳米颗粒组合物,其中,所述纳米颗粒组合物包含所述PEG-脂质的量为以纳米颗粒组合物为基准1摩尔%至10摩尔%的所述PEG-脂质。

36.根据权利要求33所述的纳米颗粒组合物,其还包含磷脂和胆固醇或其衍生物。

37.根据权利要求36所述的纳米微粒组合物,其中,所述磷脂是二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)或二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)。

38.根据权利要求36所述的纳米颗粒组合物,其中,所述纳米颗粒组合物包含的磷脂为以纳米颗粒组合物为基准10摩尔%至15摩尔%的磷脂。

39.根据权利要求36所述的纳米粒子组合物,其中,所述纳米粒子组合物包含所述胆固醇或其衍生物的量为以纳米粒子组合物为基准50摩尔%至75摩尔%的所述胆固醇或其衍生物。

40.一种用于治疗或预防受试者的疾病或病状的方法,其包括:向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求29所述的纳米颗粒组合物。

41.根据权利要求40所述的方法,其中,所述治疗有效量的纳米颗粒组合物包含相对于每kg受试者体重0.01mg核酸至10mg核酸的治疗性或免疫原性核酸试剂。

42.根据权利要求40所述的方法,其中,所述受试者是哺乳动物。

43.根据权利要求42所述的方法,其中,所述哺乳动物选自:鸡、啮齿动物、犬、灵长类动物、马、高价值农业动物和人。

用于有效核酸递送的载体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年4月6日提交的名称为用于有效核酸递送的载体的第63/005,853号美国临时申请和2021年2月3日提交的名称为用于有效核酸递送的载体的第63/145,086号美国临时申请的权益,这两个申请均通过引用并入本文,如同完全阐述一样。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于将核酸有效递送至受试者以治疗或预防疾病和/或病症的载体,以及包含所述载体和核酸的纳米颗粒组合物。本发明还涉及配制纳米颗粒组合物的方法和用这样的纳米颗粒组合物治疗受试者的疾病和/或病症的方法。

背景技术

[0004] 近年来,核酸疫苗和治疗剂已经成为预防和治疗几种疾病或病症的有前途的方法,包括在基因治疗中的应用。然而,核酸是大的亲水性分子,其不能穿过细胞膜并且容易在血流中被酶降解。(Mendes等,2017,Molecules 22(9),1401;Jones等,2013,Mol.Pharmaceutics 10,4082-4098;Nishikawa和Huang,2001Hum.Gene Ther.12,861-870)。

[0005] 因此,大多数提出的核酸策略依赖于递送载体,理想地,应当克服不同的胞外和胞内屏障,将核酸以最小毒性有效地递送至细胞中(Jones等,2013,Mol.Pharmaceuticas10,4082-4098;Gomes等,2014MRS Bull.39,60-70;and Nishikawa and Huang,2001Hum.Gene Ther.12,861-870).。

[0006] 成功的核酸治疗的障碍包括以下:通过核酸内切酶降解核酸、细胞内化、内体逃逸、将有效载荷从载体中释放并接近所需靶标、以及载体的胞内和胞外累积。(Jones等,2013,Mol.Pharmaceutical10,4082-4098;Nishikawa and Huang,2001Hum.Gene Ther.12,861-870;Gomes等,2014MRS Bull.39,60-70;and Dufes等,2005,Adv.Drug Delivery Rev.57,2177-2202)。

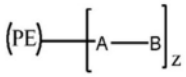
[0007] 非病毒载体,如脂质、聚合物和树枝状聚合物,最近受到了很大的关注(Jones等,2013,Mol.Pharmaceutics 10,4082-4098;Nishikawa和Huang,2001Hum Gene Ther.12,861-870;和Mintzer和Simanek,2009,Chem Rev.109,259-302)。这些物质的共同特征是具有阳离子或可离子化性质。二十多年来,在非病毒载体中,基于树状聚体的载体作为潜在的核酸递送载体引起了极大的兴趣。然而,使用生物可降解的单分子载体仍然是一个挑战(Mintzer和Grinstaff,2010,Chem Soc,Rev.40,173-190;Raviña 等,2010,Macromolecules 43,6953-6961;Nouri et al.,2012,J.Mater.Sci.Mater.Med.23,2967-2980;Pandita等,2011,Biomacromolecules 12,472-481;Rodrigues等,2011,New J.Chem.35,1938-1943;Santos等,2010,J.Controlled Release 144,55-64;Santos et al.,2009,J.Controlled Release 134,141-148;Santos et al.,2010,Mol.Pharmaceutics 7,763-774;and Duncan and Izzo,2005,Adv.Drug Delivery

Rev.57,2215-2237)。

[0008] 理想的核酸递送载体应该是生物可降解的,以防止积累和随后的细胞毒性(Duncan和Izzo,2005,Adv.Drug Delivery Rev.57,2215-2237)。据报道,称为“生物支架”的聚酯树枝状聚合物,其具有已知的能够在体内生物相容或可降解为天然代谢物的结构单元(Carnahan和Grinstaff,2001,J.Am Chem,SoC.123,2905;Carnahan和Grinstaff,2001,Macromolecules 34,7648;以及Carnahan和Grinstaff,2006,Macromolecules 39,609)。尽管被证实为小分子递送的载体,但它们不适合于核酸递送。在其它要求中,为了成为有效的核酸递送载体,树枝状聚合物应与核酸形成复合物,优选自组装成纳米颗粒组合物,其保护核酸免于降解的同时确保转运至细胞。

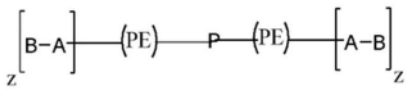
发明内容

[0009] 一方面,本发明涉及具有式Ia或Ib的核酸载体:



Ia;或

[0010]



Ib,

[0011] 其中,PE是聚酯树枝状聚合物或树枝化基元,其包括核和形成一代或多代的多个单体聚酯单元,A是胺连接基,B是疏水单元,z是表面基团的数目,并且P是连接两个聚酯树枝化基元的连接基。

[0012] 在一个方面,本发明涉及纳米颗粒组合物,其包含本文公开的核酸载体中的任一种、包封在其中的治疗性或免疫原性核酸试剂和缀合的脂质。

[0013] 在一个方面,本发明涉及纳米颗粒组合物,其包含本文公开的任何一种核酸载体、包封在其中的治疗性或免疫原性核酸试剂、本文公开的一种缀合的脂质(例如PEG-脂质)和磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物,以改善细胞内递送以及纳米颗粒体内稳定性。

[0014] 在一个方面,本发明涉及用于治疗或预防受试者的疾病或病症的方法。所述方法涉及提供本文所公开的纳米颗粒组合物中的任一种,并且向受试者施用治疗有效量的纳米颗粒组合物。

附图说明

[0015] 当结合附图阅读时,将更好地理解本发明的优选实施例的以下详细描述。为了说明本发明,在附图中示出了特定实施例。然而,应当理解,本发明不限于所示的精确布置和手段。

[0016] 在附图中:

[0017] 图1是具有用于修饰的脂肪酸侧链(B)的第1代修饰的聚酯树枝状聚合物的示意图。在该图中,脂肪酸侧链B可选自C_4-C_{28}脂肪酸中的任一种。

[0018] 图2说明了用于制备设计用于改进自组装的纳米颗粒组合物的方法,所述纳米颗粒组合物包括修饰的树枝状聚合物(PE-硬脂酸)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-丙三基-3-磷酰乙

醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]和mRNA。

[0019] 图3示出了基于纳米颗粒的尺寸(d)以强度测量的纳米颗粒组合物的分布。

[0020] 图4说明显示修饰的树状聚合物与RNA结合的琼脂糖凝胶照片。用溴化乙锭(EB)染色凝胶,在Syngene G Box成像系统(Syngene,USA)上拍摄凝胶图像。

[0021] 图5显示了在配制RNA的方法中使用的树枝状聚合物在中性pH和pH 5.0下的稳定性。

[0022] 图6A-6E显示了通过DLS和琼脂糖凝胶保留分析测量的PBS中RNA-PE硬脂酸纳米颗粒的稳定性:

[0023] 图6A示出了基于纳米颗粒的尺寸(d)以强度测量的纳米颗粒组合物的分布(透析后即刻测量);

[0024] 图6B显示了通过DLS测量在4℃下储存3周后PE-硬脂酸PR8 HA mRNA的稳定性;

[0025] 图6C显示了通过DLS测量在室温(RT)储存3天后PE-硬脂酸PR8 HA mRNA的稳定性;

[0026] 图6D显示了通过DLS测量在37℃下储存2小时后PE-硬脂酸PR8 HA mRNA的稳定性;和

[0027] 图6E显示了基于凝胶保留试验的稳定性结果:泳道1-PR8 HA mRNA,泳道2-PE-硬脂酸PR8 HA mRNA,4℃,3周,泳道3-PE-硬脂酸PR8 HA mRNA,rt,3天,泳道4-PE-硬脂酸PR8 HA mRNA,37℃,1小时,以及泳道5-PE-硬脂酸PR8 HA mRNA,37℃,2小时。

[0028] 图7A和7B显示了在细胞培养物中萤光素酶的表达,萤光素酶mRNA通过修饰的聚酯树枝状聚合物的纳米颗粒递送到哺乳动物细胞中,并通过使用发光测定法对细胞内萤光素酶活性进行定量来测量:

[0029] 图7A说明与裸萤光素酶mRNA(阴性对照)相比,由含有PE-亚油酸、PE-硬脂酸、PE-棕榈酸的纳米颗粒递送的萤光素酶mRNA的细胞培养物表达;以及

[0030] 图7B说明与裸萤光素酶mRNA相比,由含有PE-十七酸、PE-硬脂酸、PE-油酸和PE-16-羟基棕榈酸的纳米颗粒递送的萤光素酶mRNA的细胞培养物表达。

[0031] 图8说明在基于修饰的聚酯树枝状聚合物的纳米颗粒中递送PR8 HA mRNA后细胞培养物中HA表达的蛋白质印迹分析。

[0032] 图9显示了通过肌内注射包含纳米颗粒的PR8 HA mRNA诱导HA特异性抗体,并通过血凝素抑制试验(HAI)测定。

[0033] 图10示出了基于纳米颗粒的尺寸(d)以强度测量的DNA纳米颗粒组合物的分布。

[0034] 图11显示通过定量(Quantiblue)分析含有DNA和修饰的聚酯树枝状聚合物的纳米颗粒的SEAP体外表达。

[0035] 图12说明了在pH4.0或5.0下配制成修饰的聚酯树枝化纳米颗粒的表达SEAP的复制子RNA的SEAP比色信号。

[0036] 图13说明在基于聚酯树状聚体和树突的纳米颗粒中递送SARS-CoV-2刺突复制子RNA后细胞培养物中刺突表达的蛋白质印迹分析。

[0037] 图14说明用PE树枝化基元-G2-蓖麻油酸递送材料与复制子刺突RNA配制的制剂接种时,产生的特异性争对COVID-19刺突蛋白的小鼠IgG的终点稀释血清滴度。

[0038] 图15说明了注射了用PE树枝化基元G2-5A2-5蓖麻油酸与7.2μg编码萤光素酶的复制子RNA配制的制剂或与31.4μg相同RNA配制成的脂质纳米颗粒(LNP)的小鼠,在处理6、16

和42小时后,以相对光单位(RLU)测量的心脏和脾脏中的相对萤光素酶表达。

[0039] 图16示出了基于纳米颗粒的尺寸(d)以强度测量的纳米颗粒组合物的分布。

[0040] 图17说明了PE树枝化基元G2-A1-蓖麻油酸和(PE树枝化基元G2-A1-蓖麻油酸)2 PEG 200纳米颗粒与表达SEAP的复制子RNA配制的制剂的SEAP比色信号。

具体实施方式

[0041] 在以下描述中使用的某些术语仅为了方便而非限制。

[0042] “纳米颗粒组合物”是指包括修饰的树枝状聚合物和包封在其中的核酸有效负载分子的组合物。

[0043] 术语“取代”是指在保持母体结构上所有原子的化合价的前提下,将一个官能团或其中包括的部分改变为其中的另一个官能团或部分的能力。取代的基团在本文中可互换地称为“取代”或“取代基”。“当任何给定结构中的一个以上位置被一个以上选自特定基团的取代基取代时,在每个位置的取代基可以相同或不同。

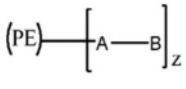
[0044] 本文所用的术语“胺连接基”是指将疏水尾部(为方便起见,在本文中描述为组分“B”)与存在于树枝状聚合物或树枝化基元表面上的末端化学基团连接或连接的含胺连接基。存在于胺连接基中的胺是含有带孤对电子的碱性氮原子的官能团。胺在形式上是氨的衍生物,其中一个或多个氢原子已经被取代基如烷基取代。

[0045] 除非另有说明,本文所用的术语“烷基”是指含有1至28个,优选1至20个碳原子的直链或支链烃。烷基链长可用于控制核酸载体的疏水性和自组装性质。烷基的代表性实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、3-甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、正庚基、正辛基、正壬基和正癸基。当”烷基“是两个其它部分之间的连接基团时,则它也可以是直链或支链。烷基的实例包括但不限于-CH_2-、-CH_2CH_2-、-CHCHCHC(CH)和CHCH(CHCH)CH-。

[0046] 本文所用的术语”表面基团“是指核酸载体表面上的端基。本文核酸载体的表面用疏水尾部(本文描述为组分“B”)修饰以帮助自组装性质。

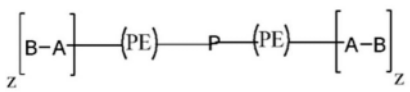
[0047] 除非另外特别说明,否则权利要求书和说明书的相应部分中使用的词语“一”和“一个”被定义为包括一个或多个所引用的项。该术语包括上面具体提到的词语、其派生词和具有类似含义的词语。跟在两个或更多个项目的列表后面的短语“至少一个”,例如“A、B或C”或“A、B和C”意指A、B或C中的任何单独一个以及其任何组合。

[0048] 在一个实施方式中,提供了具有式Ia或Ib的核酸载体:



式 Ia;或

[0049]



式 Ib,

[0050] 其中PE是聚酯树枝状聚合物(polyester dendrlmer)或树枝化基元(dendron),其包括核和围绕所述核成层以形成树状结构的单体聚酯单元,其中每层称为代(G),A是胺连接基,B是疏水单元,z是表面基团的数目,并且P是连接两个聚酯树枝化基元的连接基。胺连

接基可以在生理pH下含有质子化的带电胺基。

[0051] 在一个实施方式中,PE可具有式II的结构:

[0052] [(core)$_c$-Gn-O] 式II,

[0053] 其中c是核的重复度或源自核的楔形的数目,c值在1至6的范围内,树枝化基元可以由源自单个可化学处理的焦点的超支化楔组成,所述单个可化学处理的焦点在本文中也称为核。因此,对于具有单向核的树枝化基元,c等于1。G是树枝状聚合物或树枝化基元的层或代;n是代数,其值的范围是1-10;聚酯单体单元可以是2,2-双(羟甲基)丙酸或2,2-双(羟甲基)丁酸;Z具有式III的结构:

[0054] $z=b^n$, 式III

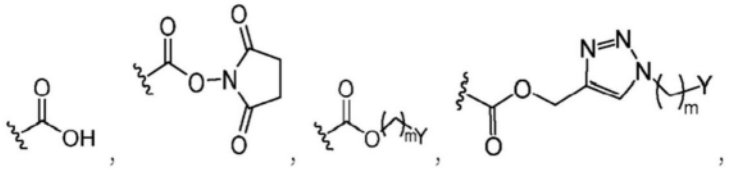
[0055] 其中b是分支点的重复度或在每个分支点处的分支的数目;c为1-6,n为代数。

[0056] 在包含2,2-双(羟甲基)丙酸或2,2-双(羟甲基)丁酸作为单体聚酯单元的核酸载体中,支化点的重复度或每个支化点处的支化数b为2。

[0057] 核的结构可以影响表面的官能团的数目、胺和/或电荷密度、直径和所得核酸载体的柔性,这可以调节载体的物理化学性质、与核酸的相互作用和基因转移活性。

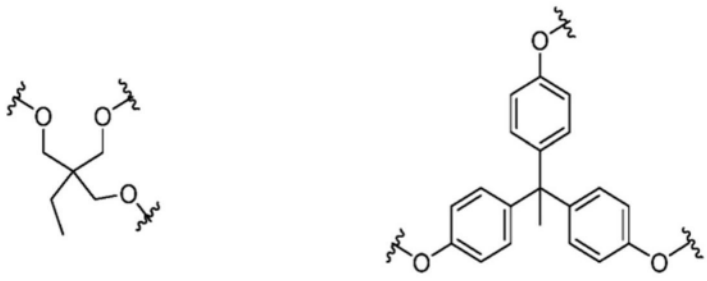
[0058] 在一个实施方式中,核可以是单向的,其中式II中的c是1。单向核可以是羧酸或其衍生物。

[0059] 单向核可以选自以下骨架:

[0060] 

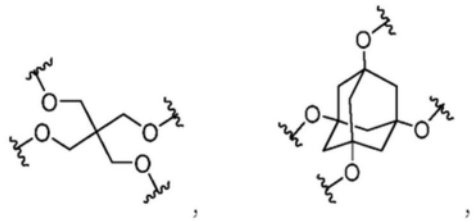
[0061] 其中,Y选自甲基、异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基、新戊基、3-甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、叠氮化物(N_3)、卤素(Cl、Br或I)、乙炔(C_2H_2)、羟基(-OH)、或硫醇(-SH)、吡喃糖基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环,其中环烷基、芳基、杂芳基和杂环各自可被卤素、羟基和烷基取代;A是胺连接基;B是疏水单元;和m是1-20。

[0062] 在一个实施方式中,所述核可以是三向核,其中式II中的c为3。三向核可以是三羟甲基丙烷或1,1,1-三(羟基苯基乙烷)。作为参考,上述核的结构以如下骨架结构的形式图示:

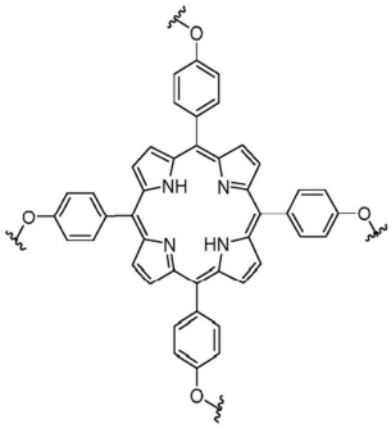
[0063] 

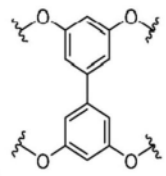
[0064] 在一个实施方式中,所述核可以是四向核,其中式II中的c为4。

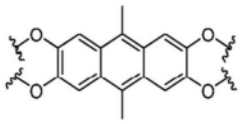
[0065] 四向核可以是但不限于季戊四醇、金刚烷-1,3,5,7-四醇或5,10,15,20-四(4-羟基苯基)-21H、23H-卟吩、[1,1'-联苯]-3,3',5,5'-四醇、2,3,6,7-四羟基-9,10-二甲基-蒽、9,10-二甲基-9,10-二氢-9,10-桥亚乙基蒽-2,3,6,7-四醇、6,13-二氢-并五苯-5,7,12,14-四醇、六氢-[1,4]二恶英[2,3-b][1,4]二噁英-2,3,6,7-四醇、蒽-1,4,9,10-四醇、芘-1,3,6,8-四醇和3,3,3',3'-四甲基-2,2',3,3'-四氢-1,1'-螺茚-5,5'6,6'-四醇。四向核的结构如下所示：

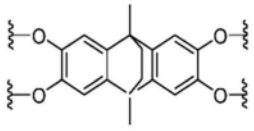


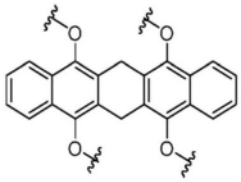
[0066]

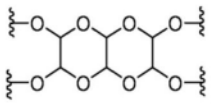




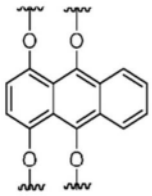


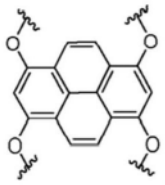


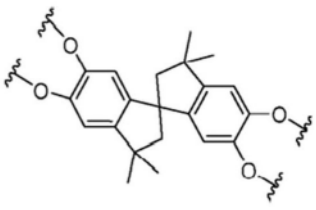




[0067]





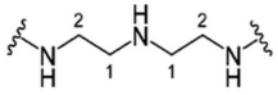


或。

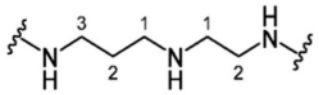
[0068] 胺连接基A是通过含有一个或多个具有孤对电子的氮原子而赋予核酸载体分子质子接受官能团的部分。因此，胺连接基能够在酸性条件下接受游离质子(H+)。在优选的实施方式中，氮原子以仲胺或叔胺的形式存在。胺连接基可衍生自N1-(2-氨基乙基)乙烷-1,2-二胺、N1-(2-氨基乙基)丙烷-1,3-二胺、N1-(3-氨基丙基)丙烷-1,3-二胺、N1,N1'-(乙烷-1,2-二基)双(乙烷-1,2-二胺)、N1,N1'-(乙烷-1,2-二基)双(N2-(2-氨基乙基)乙烷-1,2-二胺)、N1-(2-(4-(2-氨基乙基)哌嗪-1-基)乙基)乙烷-1,2-二胺、N1-(2-氨基乙基)-N1-甲基乙烷-1,2-二胺、N1-(3-氨基丙基)-N1-甲基丙烷-1,3-二胺、N1-(3-氨基丙基)-N1-乙基丙烷-1,3-二胺、3-((3-氨基丙基)(甲基)氨基)丙-1-醇、3,3'-(甲基氮杂二基)双(丙-1-

醇)、N1-(3-氨基丙基)-N1-甲基丁烷-1,4-二胺、4-((3-氨基丙基)(甲基)氨基)丁-1-醇、4-((3-羟丙基)(甲基)氨基)丁-1-醇、4-((3-羟丙基)(甲基)氨基)丁-1-醇、N1-(4-氨基丁基)-N1-甲基丁-1,4-二胺、4-((4-氨基丁基)(甲基)氨基)丁-1-醇、4,4'-(甲基氮杂二基)双(丁-1-醇)、3-((3-氨基丙基)(乙基)氨基)丙-1-醇、3,3'-(乙基氮杂二基)双(丙-1-醇)、N1-(3-氨基丙基)-N1-乙基丁-1,4-二胺、4-((3-氨基丙基)(乙基)氨基)丁-1-醇、4-(乙基(3-羟丙基)氨基)丁-1-醇、N1-(2-氨基乙基)-N1-甲基丙-1,3-二胺、N1-(4-氨基丁基)-N1-乙基丁-1,4-二胺、4,4'-(乙基氮杂二基)双(丁-1-醇)、3-((3-氨基丙基)氨基)丙-1-醇、N1-(3-氨基丙基)丁烷-1,4-二胺、4-((3-羟丙基)氨基)丁-1-醇、N1-(4-氨基丁基)丁-1,4-二胺、3,3'-氮杂二基双(丙-1-醇)、4-((3-氨基丙基)氨基)丁-1-醇、4,4'-氮杂二基双(丁-1-醇)和N1,N1'-(丁-1,4-二基)双(丙-1,3-二胺)。作为参考,上述胺的结构以如下结构图示:

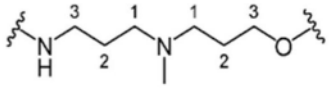
[0069]



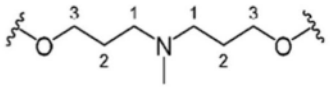
(1) pKa: 3.6 ± 0.3 ,



(2) pKa: 5.7 ± 0.1 ,

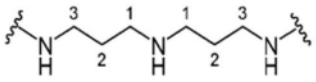


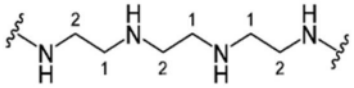
(18) pKa: 7.8 ± 0.5 ,

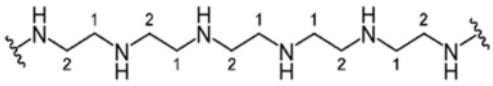


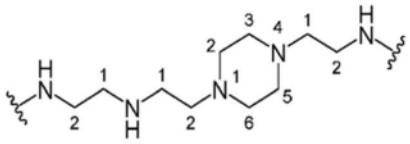
(19) pKa: 8.8 ± 0.5 ,

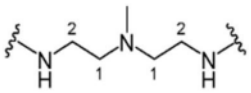
[0070]

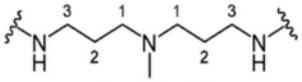
(3)  pKa: 7.6 ± 0.1 ,

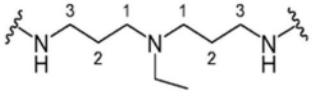
(4)  pKa: 3.1± 0.4 ,

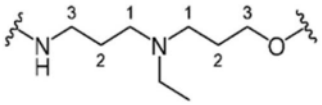
(5)  pKa: 3.1± 0.5, 3.6± 0.4, 6.4± 0.1, 9.6± 0.2 ,

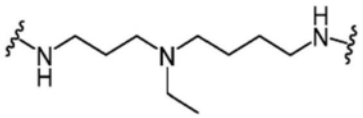
(6)  pKa: 3.1± 0.5, 3.6± 0.4, 6.4± 0.1, 9.6± 0.2 ,

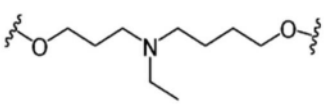
(7)  pKa: 3.3 ± 0.3 ,

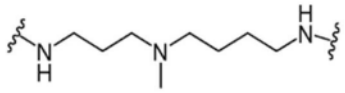
(8)  pKa: 6.7 ± 0.5 ,

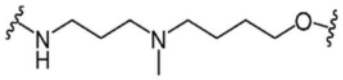
(9)  pKa: 8.1± 0.5 ,

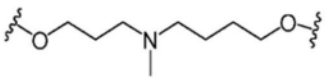
(10)  pKa: 7.8 ± 0.5 ,

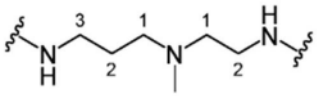
(11)  pKa: 7.7 ± 0.5 ,

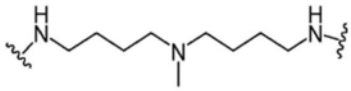
(12)  pKa: 9.2 ± 0.5 ,

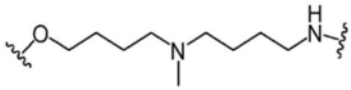
(20)  pKa: 7.7 ± 0.5 ,

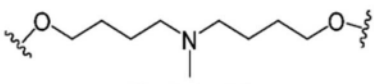
(21)  pKa: 8.1 ± 0.5 ,

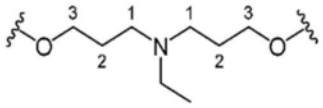
(22)  pKa: 10.2 ± 0.2 ,

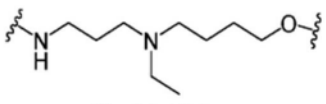
(23)  pKa: 5.6 ± 0.5 ,

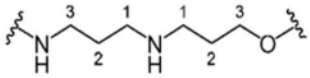
(24)  pKa: 8.6 ± 0.5 ,

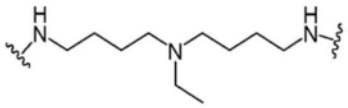
(25)  pKa: 9.9 ± 0.1 ,

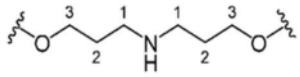
(26)  pKa: 9.4 ± 0.5 ,

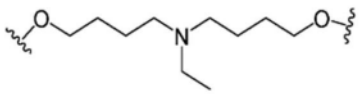
(27)  pKa: 8.9 ± 0.5 ,

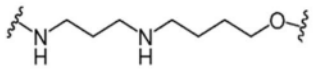
(28)  pKa: 8.2 ± 0.5 ,

(29)  pKa: 8.5 ± 0.2 ,

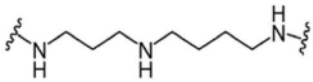
(13)  pKa: 8.7 ± 0.5 ,

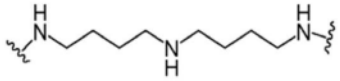
(30)  pKa: 10.2 ± 0.2 ,

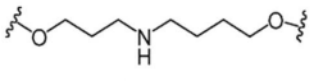
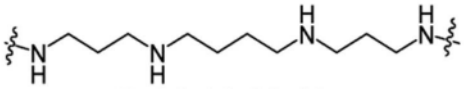
(14)  pKa: 9.5 ± 0.5 ,

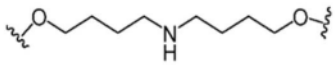
(31)  pKa: 8.8 ± 0.1 ,

[0071]

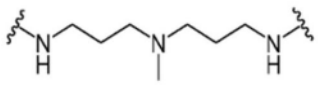
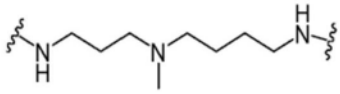
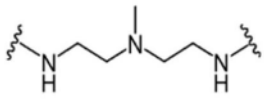
(15)  pKa: 8.8 ± 0.2 ,

(32)  pKa: 9.3 ± 0.2 ,or

(16)  pKa: 10.2 ± 0.2 , (33)  pKa: 8.5± 0.1, 9.1± 0.1

(17)  pKa: 10.4 ± 0.2 ,

[0072] 如上所列,可质子化的树枝状聚合物/树枝化基元的可质子化基团的酸解离常数(pKa)约3.3至约10.4。在酸性pH条件下与核酸配制期间,这些递送分子将是阳离子性的。在这样的条件下,离子相互作用将导致它们与带负电荷的核酸缩合。在分析可电离聚酯树枝状聚合物/树枝化基元分子的结构-活性关系时,发现可电离递送分子的pKa与纳米颗粒递送功能活性复制子RNA的能力之间的出乎意料的关系。作为一个实例,含有下面说明的预测pKa值分别为6.7和7.7的Amine1和Amine2的递送分子能够将mRNA递送至细胞(如图12中SEAP表达所证明的),而含有Amine3的树枝状大分子(预测pKa为3.3)不能递送有效负载。pKa值使用ACD/percepta pKa预测工具计算。

[0073]  Amine1 pKa 6.7±0.5  Amine2 pKa 7.7±0.5  Amine3 pKa 3.3±0.3

[0074] 疏水单元B可以是C_1-C_{22}烷基或C_2-C_{22}烯基。C_1-C_{22}烷基或C_2-C_{22}烯基中的每一个基团可任选被一至四个选自卤素、-CN、-NO_2、-N_3、C_1-C_6烷基、卤代(C_1-C_6烷基)、-OR、-NR_2、-CO_2R、-OC(O)R、-CON(R)$_2$、-OC(O)N(R)$_2$、-NHC(O)N(R)$_2$、-NHC(NH)N(R)$_2$、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基、芳基、杂芳基或杂环的取代基取代。每个R可以独立地选自氢、C_1-C_6烷基、卤代(C_1-C_6烷基)、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基、芳基、杂芳基或杂环。每个环烷基、环烯基、芳基、杂芳基和杂环可进一步任选被R'取代,其中R'可独立选自卤素、-CN、-NO_2、-N_3、C_1-C_6烷基或卤代(C_1-C_6烷基)。

[0075] 式Ia和式Ib的疏水单元B可通过使PE树枝状聚合物或树枝化基元与功能性试剂如脂肪酸或其衍生物接触而引入。脂肪酸可以是具有C_4-C_{28}链的饱和或不饱和脂肪酸。脂肪酸可以是,但不限于,花生四烯酸、油酸、二十碳五烯酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸或亚麻酸。脂肪酸衍生物可以是,但不限于,12-羟基-9-顺式-十八碳烯

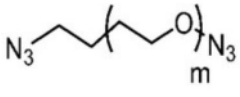
酸、12-甲基十四烷酸、12-甲基十三烷酸、14-甲基十六烷酸、14-甲基十六酸、18-甲基十九烷酸、19-甲基花生酸、异棕榈酸、异硬脂酸、植烷酸、(±)-2-羟基辛酸、(±)-3-羟基癸酸、(±)-3-羟基辛酸、10-羟基癸酸、12-羟基十八烷酸、15-羟基十五烷酸、16-羟基十六烷酸、2-羟基十六烷酸、2-羟基十四烷酸、2-羟基十二烷酸、DL-α-羟基硬脂酸、DL-β-羟基尿酸、DL-β-羟基肉豆蔻酸或DL-β-羟基棕榈酸。

[0076] 疏水单元B可以是甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、丁-3-烯-1-基、辛-7-烯-1-基、12-十三烯基、14-十五烯基、17-十八烯基、油烯基、亚油基、花生四烯酸基或16-羟基十六烷基。

[0077] 式I的核酸载体的疏水单元B可以是不饱和烃基。当将载体配制成纳米颗粒组合物时,核酸载体中不饱和烃基的存在可以防止纳米颗粒再循环(recycling)。与饱和烷基相比,不饱和烃基可以是更具流动性的,并且可以具有更低的结晶温度,因此,当包含核酸载体的纳米颗粒与细胞膜的磷脂双层相互作用并使内体破裂时,可以具有将含有核酸载体的纳米颗粒形态学改变为融合形式的能力。因此,纳米颗粒可能变得受限制,并且可能仅在注射部位处保留在细胞内,并且可能不被运输到别处。

[0078] 在一个实施方式中,核酸载体可以包含适于在体外和体内追踪递送材料的官能团。核酸载体可以具有含有碳(C)或氢(H)的稳定同位素的脂肪酸,所述同位素例如^{13}C或^{2}H(本文也称为氘、D或d)。当核酸载体与核酸(如复制子RNA)一起配制成纳米颗粒时,在施用纳米颗粒后可以通过诸如质谱或核磁共振成像的技术在体外和体内跟踪。包含稳定同位素对于鉴定递送分子可能是有益的,因为这些同位素不同于组织中丰富的^{12}C和^{1}H同位素。跟踪可用于识别在施用纳米颗粒后的生物分布、材料清除和分子稳定性以及相关问题。同位素标记的脂肪酸可以是但不限于辛酸-1-^{13}C、辛酸-8-^{13}C、辛酸-8,8,8-$^{2}H3$、辛酸-$^{2}H15$、癸酸-1-^{13}C、癸酸-10-^{13}C、癸酸-10,10,10-$^{2}H3$、癸酸-$^{2}H19$、十一酸-1-^{13}C、月桂酸-12,12,12-$^{2}H3$、月桂酸-$^{2}H23$、月桂酸-1-^{13}C、月桂酸-1,12-$^{13}C2$、十三酸-2,2-$^{2}H2$、肉豆蔻酸-14-^{13}C、肉豆蔻酸-1-^{13}C、肉豆蔻酸-14,14,14-$^{2}H3$、肉豆蔻酸-d27、棕榈酸-1-^{13}C、棕榈酸-16-^{13}C、棕榈酸-16-^{13}C,16,16,16-$^{2}H3$、棕榈酸-$^{2}H31$、硬脂酸-1-^{13}C、硬脂酸-18-^{13}C、硬脂酸-18,18,18-$^{2}H3$、硬脂酸-$^{2}H35$、油酸-1-^{13}C、油酸-1-$^{2}H34$、亚油酸-1-^{13}C、亚油酸-1-$^{2}H32$、花生四烯酸-5,6,8,9,11,12,14,15-$^{2}H8$或二十烷酸-$^{2}H39$。

[0079] 式Ib的连接单元P可以是具有两个叠氮基的双官能连接单元。它可以用于二聚体分子的合成。在一个实施方式中,P可以具有式IV的结构:

[0080]  其中,m的范围为1至20。

,

[0081] 在一个实施方式中,提供了包含本文所述的任一种核酸载体的纳米颗粒组合物。本文的纳米颗粒组合物可用于将试剂引入细胞。所述试剂可以是核酸。本文的纳米颗粒组合物可用作转染剂。本文的纳米颗粒组合物可用于治疗方法。

[0082] 在一个实施方式中,纳米颗粒组合物可以包含核酸载体的混合物,它们中的每一个包含不同的胺密度或侧链。这些核酸载体可以以固定的比例混合。对于具有三种树枝状聚合物的混合物的实例,第一核酸载体与第二核酸载体和与第三核酸载体的比率可以是i:

j:k其中i,j和k独立地选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20,或前述值中的任何两个之间的值。

[0083] 在一个实施方式中,纳米颗粒组合物可以包含一种或多种治疗性或免疫原性核酸试剂。如本文所用,术语“核酸”是指任何天然或合成的DNA或RNA分子。本文组合物的治疗性或免疫原性核酸试剂可以与纳米颗粒组合物的核酸载体复合或包封在纳米颗粒组合物的核酸载体中。

[0084] 在一个实施方式中,治疗性或免疫原性核酸试剂可以是RNA或DNA分子。术语“DNA”或“DNA分子”或“脱氧核糖核酸分子”是指脱氧核糖核苷酸的聚合物。DNA分子可以是多核苷酸、寡核苷酸、DNA或cDNA。DNA分子可以编码野生型或工程化的蛋白质、肽或多肽,例如抗原。术语“RNA”或“RNA分子”或“核糖核酸分子”是指核糖核苷酸(例如,2、3、4、5、10、15、20、25、30或更多个核糖核苷酸)的聚合物。RNA分子可以是复制子RNA(replicon RNA,repRNA)、小干扰RNA(siRNA)、miRNA、单链引导RNA(sgRNA)、信使RNA(mRNA)或转移RNA(tRNA)。复制子RNA(repRNA)是指不能产生感染性子代病毒体的有复制能力的、子代缺陷型RNA病毒基因组。通常被修饰用作repRNA的病毒基因组包括“正链”RNA病毒。修饰的病毒基因组同时作为mRNA和复制的模板。小干扰RNA(siRNA)是指包含约10-50个核苷酸(或核苷酸类似物)的RNA(或RNA类似物),其能够指导或介导RNA干扰。微小RNAs(miRNAs)是指通过影响编码mRNA的稳定性和翻译中的一者或两者而参与真核生物中基因表达的转录后调节的小(20-24nt)调节性非编码RNA。信使RNAs(mRNAs)通常是单链RNAs,并且定义了一条或多条多肽链的氨基酸序列。当核糖体与mRNA结合时,该信息在蛋白质合成期间被翻译。DNA或RNA分子可以是化学修饰的。

[0085] RNA分子可以是单顺反子或多顺反子mRNA。单顺反子mRNA是指仅包含一个编码蛋白质、多肽或肽的序列的mRNA。多顺反子mRNA通常指编码两种或更多种蛋白质、多肽或肽的两种或更多种序列。mRNA可编码作为抗原的蛋白质、多肽或肽。

[0086] 在一个实施方式中,DNA分子可以是多核苷酸、寡核苷酸、DNA或cDNA。RNA分子可以是复制子RNA(repRNA)、小干扰RNA(siRNA)、miRNA、单链引导RNA(sgRNA)、信使RNA(mRNA)或转移RNA(tRNA)。治疗性或免疫原性核酸试剂可以与非共价结合或共价结合核酸载体。治疗性或免疫原性核酸试剂可以通过离子键静电结合带电核酸载体。

[0087] 在一个实施方式中,本文所述的纳米颗粒组合物可以包括编码抗原的免疫原性或治疗性核酸试剂。

[0088] 如本文所用,“包封的”可以指提供活性剂或治疗剂(例如核酸(例如信使RNA))的纳米颗粒,其具有完全包封、部分包封或两者的结合。在优选的实施方式中,核酸完全包封在纳米颗粒中。在核酸治疗剂的情况下,完全包封可以通过Ribogreen®分析来确定。RiboGreen®是一种用于定量溶液中的寡核苷酸和单链DNA或RNA的超灵敏荧光核酸染色剂(可从Thermo Fisher Scientific-US获得)。

[0089] 本文所用的“抗原”定义为触发免疫应答的分子。免疫应答可涉及抗体产生或特异性免疫活性细胞的活化或两者的结合。抗原可以指能够刺激免疫应答的任何分子,包括大分子,例如蛋白质、肽或多肽。抗原可以是病原体或癌细胞的结构组分。抗原可以是合成的,在宿主中重组产生的,或者可以来源于生物样品,包括但不限于组织样品、细胞或生物流体。

[0090] 抗原可以是但不限于疫苗抗原、寄生虫抗原、细菌抗原、肿瘤抗原、环境抗原、治疗性抗原或变应原。如本文所用，核苷酸疫苗是基于DNA或RNA的预防性或治疗性组合物，其能够通过递送抗原刺激受试者体内的适应性免疫应答。由接种诱导的免疫应答通常导致免疫记忆的发展，以及生物体对随后遇到抗原或传染物快速应答的能力。

[0091] 优选使用本文所述的“核酸载体”作为核酸的载体，并且出于该原因使用名称“核酸载体”。然而，实施方式还包括本文的核酸载体与含有负电荷或部分负电荷的试剂的组合。所述试剂可以是药物、蛋白质或脂质缀合物。

[0092] 在一个实施方式中，纳米颗粒组合物可以被配制成包括含有负电荷或部分负电荷的药物。纳米颗粒可以通过核酸载体中质子化的胺基的负电荷与正电荷的静电缔合来配制。带负电荷的药物可以是离子药物。术语“离子药物”是指电不对称分子，其在蒸馏水溶液中是水溶性的和可电离的。离子药物可以含有磷酸盐、膦酸酯或次膦酸酯官能团。包括磷酸基团的药物可以是含磷酸的核苷酸类似物，例如，用于治疗癌症和病毒化学疗法的药物。含磷酸盐的药物可以是，但不限于，噻吟和嘧啶核苷类似物、阿糖胞苷(ara-C)、Ara-C单磷酸(ara-CMP)、叠氮胸苷(AZT)、AZT单磷酸(AZTMP)、2’3’-双脱氧胞苷(ddCD)、环腺苷单磷酸(cAMP)、替诺福韦或阿德福韦。

[0093] 在一个实施方式中，纳米颗粒组合物可以包含一种或多种蛋白质。一种或多种蛋白质非限制性实例包括抗体或抗体片段、细胞因子如干扰素(IFN)-α或白介素(IL)-2、病原体衍生的抗原如SARS-CoV刺突蛋白或其受体结合结构域(RBD)、癌症衍生的抗原如Kirsten大鼠肉瘤2病毒癌基因同源物(KRAS)的突变体形式、或其它治疗性生物制剂如胰岛素、因子VIII或促红细胞生成素。本发明的组合物的蛋白质可以在本体组合物中，和/或与纳米颗粒组合物的核酸载体复合或包封在纳米颗粒组合物的核酸载体中。

[0094] 在一个实施方式中，本文所述的纳米颗粒组合物可包含脂质缀合物。脂质缀合物可以是有用的，因为它可以防止颗粒的聚集。可以在本文组合物中的脂质缀合物包括但不限于PEG-脂质缀合物。PEG-脂质的非限制性实例包括，与脂质偶联的PEG例如DMG-PEG 2000，与磷脂偶联的PEG例如磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)，与胆固醇或其衍生物偶联的PEG，及其混合物。在某些情况下，PEG可以任选地被烷基、烷氧基、酰基或芳基取代。

[0095] PEG是具有两个末端羟基的乙烯PEG重复单元的线性水溶性聚合物。PEGs根据它们的分子量分类；例如，PEG 2000表示平均分子量约为2,000道尔顿，PEG 5000表示平均分子量约为5,000道尔顿。PEG可商购自Avanti Polar Lipids。本文所述的PEG-脂质缀合物的PEG部分的平均分子量约为550道尔顿至10,000道尔顿。

[0096] 具有不同链长和饱和度的各种酰基链基团的磷脂酰乙醇胺可缀合至PEG以形成脂质缀合物。磷脂酰乙醇胺可通过商购获得，或者可以使用常规技术分离或合成。磷脂酰乙醇胺可以包含碳链长度为C_{10}至C_{20}的饱和或不饱和脂肪酸。磷脂酰乙醇胺可包含单或多不饱和脂肪酸以及饱和和不饱和脂肪酸的混合物。所涵盖的磷脂酰乙醇胺包括但不限于二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺(dimyristoylphosphatidylethanolamine，简称DMPE)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二油酰磷脂酰乙醇胺(dioleoylphosphatidylethanolamine，简称DOPE)和二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)。

[0097] PEG-脂质可以包含缀合至胆固醇或胆固醇衍生物的PEG。胆固醇衍生物的实例包括但不限于胆甾烷醇、胆甾烷酮、胆甾烯酮、粪甾烷醇、胆固醇基-2’-羟乙基醚、胆固醇基-

4'-羟丁基醚及其混合物。

[0098] 包含在纳米颗粒组合物中的PEG-脂质的大小、相对量和分布可影响纳米颗粒组合物的物理性质。可以控制的物理性质可以是但不限于纳米颗粒的直径、纳米颗粒聚集的倾向、每个纳米颗粒内部的核酸分子的数目或纳米颗粒组合物中纳米颗粒的浓度、治疗性和免疫原性核酸试剂的细胞内递送的功效和/或纳米颗粒被细胞摄取的功效。

[0099] 所述纳米颗粒组合物可以含有以纳米颗粒组合物为基准10摩尔%或更少的PEG-脂质。纳米颗粒组合物可包含约10摩尔%、约9摩尔%、约8摩尔%、约7摩尔%、约6摩尔%、约5摩尔%、约4摩尔%、约3摩尔%、约2摩尔%或约1摩尔%,或以纳米颗粒组合物为基准介于前述整数中的任两个之间的任何量的PEG-脂质。包含PEG-脂质的纳米颗粒组合物可包含直径小于缺少PEG-脂质的组合物的纳米颗粒。纳米颗粒组合物还可以包含纳米颗粒,其具有比缺少PEG-脂质的组合物的纳米颗粒更高的纳米颗粒聚集倾向。

[0100] 纳米颗粒组合物可以含有"两亲脂质"。如本文所用,"两亲脂质"是指具有非极性疏水"尾部"和极性"头部"的任何物质。"极性基团"可包括磷酸根、羧基、硫酸根、氨基、巯基、硝基、羟基或其它类似基团。非极性基团可包括但不限于长链饱和和不饱和脂族烃基和被一个或多个环烷基、环烯基、芳基、杂芳基或杂环基团取代的长链饱和与不饱和脂族烃基。两亲性脂质的实例包括但不限于磷脂、氨基脂和鞘脂。磷脂的代表性实例包括但不限于磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱(dioleoylphosphatidylcholine)、二硬脂酰磷脂酰胆碱和二亚油酰磷脂酰胆碱(dilinoleoylphosphatidylcholine)。

[0101] 所述纳米颗粒组合物可包含两亲性脂质,其量为以纳米颗粒组合物为基准10摩尔%至15摩尔%两亲性脂质。

[0102] 在一个实施方式中,纳米颗粒组合物可以包括胆固醇或胆固醇衍生物。胆固醇衍生物的实例包括但不限于胆甾烷醇(cholestanol)、5,6-环氧胆甾烷醇(5,6-epoxy cholestanol)、胆甾烷酮(cholestanone)、胆甾醇酮(cholestenone)、粪甾烷醇(coprostanol)、胆固醇-2'-羟乙基醚(cholesteryl-2'-hydroxyethyl ether)、胆固醇-4'-羟丁基醚(cholesteryl-4'-hydroxybutyl ether)、24-乙基胆固醇(24-ethyl cholesterol)、24-甲基胆固醇(24-methyl cholesterol)、胆烯酸(cholenic Acid,)、3-羟基-5-胆烯酸(3-hydroxy-5-cholestenoic Acid,)、棕榈酸胆固醇酯(cholesteryl palmitate)、花生四烯酸胆固醇酯(cholesteryl arachidonate)、胆甾醇花生四烯酸酯(cholesteryl arachidate)、肉豆蔻酸胆固醇酯(cholesteryl myristate)、胆固醇棕榈酸酯(cholesteryl palmitoleate)、木蜡酸胆固醇酯(cholesteryl lignocerate)、胆固醇油酸酯、硬脂酸胆固醇酯、芥酸胆固醇酯(cholesteryl erucate)、胆固醇α-亚麻酸酯(cholesterol a-linolenate,)、胆固醇亚油酸酯、高-γ-亚麻酸胆固醇酯、4-羟基胆固醇、6-羟基胆固醇、7-羟基胆固醇、19-羟基胆固醇、20-羟基胆固醇、22-羟基胆固醇、24-羟基胆固醇、25-羟基胆固醇、27-羟基胆固醇、27-炔胆固醇、7-酮胆固醇、7-脱氢胆固醇、8-脱氢胆固醇、24-脱氢胆固醇、5α-羟基-6-酮胆固醇、20,22-二羟基胆固醇、7,25-二羟基胆固醇、7,27-二羟基胆固醇、7-酮-25-羟基胆固醇、岩藻甾醇、植物甾醇、胆固醇11,14-二十烯酸酯(cholesteryl11,14-eicosadienoate)、二甲基羟乙基氨基丙烷氨基甲酰基胆固醇碘化物

及其混合物。胆固醇衍生物可以包含糖部分，例如甘露糖、半乳糖。胆固醇衍生物可以包含糖部分和/或氨基酸，例如丝氨酸、苏氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸或它们的衍生物。所述纳米颗粒组合物可以包含所述胆固醇或胆固醇衍生物，其量为以纳米颗粒组合物为基准50摩尔％至75摩尔％的胆固醇或其衍生物。

[0103] 本文的药物组合物可以通过常规的、众所周知的灭菌技术进行灭菌。水溶液可以包装使用或冻干。冻干制剂可以在给药前与无菌水溶液混合。

[0104] 在一个实施方式中，纳米颗粒组合物可以包括药学上可接受的载体。本文所用的术语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或媒介物，例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、制造助剂(例如润滑剂、滑石粉、硬脂酸镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌或硬脂酸)或溶剂包封材料，其涉及将主题化合物从一个器官或身体的一部分携带或转运至另一个器官或身体的另一部分。与制剂的其它成分相容并且对患者无害，则各种载体是“可接受的”。可以用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括：(1)糖，例如乳糖、葡萄糖、甘露糖和/或蔗糖；(2)淀粉，例如玉米淀粉和/或马铃薯淀粉；(3)纤维素及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素和/或醋酸纤维素；(4)粉末状西黄蓍胶(tragacanth)；(5)麦芽；(6)明胶；(7)润滑剂，例如硬脂酸镁、月桂基硫酸钠和/或滑石；(S)赋形剂，例如可可脂和/或栓剂蜡；(9)油，例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和/或大豆油；(10)二醇，例如丙二醇；(11)多元醇，例如甘油、山梨醇和/或甘露醇；(12)酯，例如甘油酯、油酸乙酯和/或月桂酸乙酯；(13)琼脂；(14)缓冲剂，例如氢氧化镁和/或氢氧化铝；(15)海藻酸；(16)无热原水；(17)稀释剂，例如等渗盐水，和/或PEG400；(I8)林格氏溶液；(19)C_2-C_{12}醇，例如乙醇；(20)脂肪酸；(21)pH缓冲溶液；(22)填充剂，例如多肽和/或氨基酸(23)血清组分，例如血清白蛋白、HDL和LDL；(24)表面活性剂，例如聚山梨醇酯(吐温80)和/或泊洛沙姆；和/或(25)其它用于药物制剂的无毒相容物质：例如填充剂、粘合剂、润湿剂、着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂、芳香剂、防腐剂和/或抗氧化剂。术语“赋形剂”、“载体”、“药学上可接受的载体”等在本文中可互换使用。

[0105] 一个实施方式包括用于治疗或预防受试者的疾病或病症的方法。所述方法可包括提供本文所述的任一纳米颗粒组合物。所述方法可包括向受试者施用治疗有效量的纳米颗粒组合物。

[0106] 如本文所用，术语“治疗有效量”是指有效产生所需治疗效果的纳米颗粒组合物的量。治疗效果可以在动物的至少一个细胞亚群中。可以以适用于医学治疗的合理的效益/风险比实现治疗效果。“治疗有效量”可以指足以在血清中产生明显的抗原特异性抗体的量。“治疗有效量”可以指足以引起疾病症状减轻的量。“治疗有效量”可以指足以引起疾病症状消失的量。当治疗病毒感染时，疾病症状的减轻可以通过粪便、体液或分泌产物中病毒的减少来评估。纳米颗粒组合物可以使用有效产生免疫应答的量和施用途径来施用。

[0107] 治疗功效可取决于活性剂的有效量和实现期望结果所必需的给药时间。施用纳米颗粒组合物可以是预防性措施。施用纳米颗粒组合物可以是促进对感染因子的免疫、使与免疫的缓慢发展相关的并发症最小化的治疗措施，尤其是在具有弱免疫系统的患者、老年人或婴儿中。

[0108] 确切的剂量可以由医师基于多种因素并考虑到个体患者来选择。可以调整剂量和给药以提供足够水平的活性剂或维持所需的效果。例如，可以考虑的因素可以包括疾病的

类型和严重性;患者的年龄和性别;药物组合;以及个体对治疗的反应。

[0109] 纳米颗粒组合物中活性剂的治疗功效和毒性可通过标准药学方法确定,例如通过确定体外培养的细胞或实验动物中50%群体的治疗有效剂量(ED50)和50%群体的致死剂量(LD50)。纳米颗粒组合物可以基于毒性对治疗效果的剂量比(LD50/ED50)来评价,称为治疗指数,其大的值可以用于评估。从细胞和动物研究获得的数据可用于配制人用剂量。

[0110] 治疗有效剂量可以最初从细胞培养物测定来估计。治疗有效剂量可在动物模型中配制以达到包括IC50(即达到症状的半数最大抑制的治疗剂浓度)的循环血浆浓度范围,如在细胞培养中测定的。血浆中的水平可以例如通过高效液相色谱法测量。任何特定剂量的效果可以通过合适的生物测定来监测。

[0111] 治疗有效剂量可以是相对于每kg受试者体重0.0001μg至1mg治疗性或免疫原性核酸,或0.00001μg至1mg(μg)单位/剂量/受试者,并且可以每日施用。然而,可以提供大于1mg的剂量。例如,剂量中的量可以是至少一毫克,或约3×1mg,或约10×1mg单位的核酸/剂量/受试者。由于纳米颗粒疫苗可以容易地生产和廉价地设计和储存,对于大型动物受试者而言较大剂量可能是经济上可行的。对于动物受试者,比本文实施例中使用的实验动物大几个数量级,剂量可以容易地调整,例如,对于动物,例如人或小农业动物,剂量中的量可以是约3×10×1μg,或约3×20×1μg,或约3×30×1μg。然而,剂量中的量可以是约3×40×1μg、3×50×1μg或甚至约3×60×1μg,例如对于高价值动物园动物或农业动物,例如大象。对于预防性免疫接种、或定期治疗、或治疗小型野生动物,剂量中的量可以是每剂量小于约3×1μg、小于1μg、小于约500ng、小于约250ng、小于约100ng、小于约50ng、小于约25ng、小于约10ng、小于约5ng、小于约1ng、小于约500pg、小于约250pg、小于约100pg,或在任何前述之间的范围内。治疗性和免疫原性核酸可以是每治疗剂量使用的不同核酸的组合。术语"受试者"和"个体"在本文中可互换使用,并且是指人或动物。优选地,动物是脊椎动物,例如灵长类、啮齿类、家畜或狩猎动物(game animal)。灵长类包括黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴和猕猴,例如恒河猴。啮齿动物可选自小鼠、大鼠、豚鼠、土拨鼠、雪貂、兔和仓鼠。家畜或狩猎动物可以选自牛、马、猪、鹿、野牛、水牛、猫科动物(如家猫)、犬科动物(如犬、狐、狼)、鸟类(如鸡、鸸鹋、鸵鸟)和鱼类(如鳟鱼、鲶鱼和鲑鱼)。患者或受试者可以选自前述或前述亚组。患者或受试者可以选自所有上述患者或受试者,但排除一个或多个组或物种,例如人、灵长类或啮齿类。在一个实施方式中,患者或受试者可以是哺乳动物,例如灵长类动物,例如人。术语"患者"和"受试者"在本文中可互换使用。

[0112] 优选地,所述受试者是哺乳动物。哺乳动物可以是人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、犬、猫、马或牛,但不限于这些实例。除人以外的哺乳动物可以是代表疾病或病症的动物模型的受试者。此外,本文所述的方法可涉及治疗家养动物和/或宠物。受试者可以是男性或女性。

[0113] 如本文所用,术语"施用"等是指将组合物放置到受试者中。可以通过导致组合物至少部分定位在所需部位的方法或途径进行施用,从而产生所需的效果。本文所述的纳米颗粒组合物可以通过本领域已知的任何合适的途径施用,包括但不限于口服或肠胃外途径,包括静脉内、肌内、皮下、经皮、气道(气雾剂)、肺、鼻、直肠或局部(包括口腔和舌下)施用。

[0114] 示例性的给药模式包括但不限于注射、输注、滴注、吸入或摄入。"注射"包括但不

限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、心室内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下腔、脊柱内、脑内和胸骨内注射和输注。在一个实施方式中，组合物可以通过静脉内输注或注射施用。

[0115] 纳米颗粒组合物可用于递送治疗性或免疫原性核酸以用于基因靶向。治疗性或免疫原性核酸可以是反义寡核苷酸(AON)或双链小干扰RNA(siRNA)。典型地，siRNA的长度在21和23个核苷酸之间。所述siRNA可以包含与靶基因在宿主细胞中表达时的mRNA转录物中所含序列互补的序列。反义寡核苷酸可以是吗啉代反义寡核苷酸。反义寡核苷酸可以包括与靶基因的mRNA转录物中含有的序列互补的序列。治疗性或免疫原性核酸可以是针对特定靶生物体内的特定靶基因的干扰RNA(iRNA)。iRNA可以诱导靶多核苷酸的表达或翻译的序列特异性沉默，从而下调或阻止基因表达。iRNA可以完全抑制靶基因的表达。iRNA与未处理的对照相比可降低靶基因的表达水平。治疗性或免疫原性核酸可以是微RNA(miRNA)。miRNA可以是短RNA，例如发夹RNA(hpRNA)。miRNA可以在靶细胞内通过内源细胞酶的活性被切割成生物活性dsRNA。RNA可以是双链RNA(dsRNA)。dsRNA的长度可以是至少25个核苷酸或更长。dsRNA可以含有与靶基因或基因序列互补的序列。

[0116] 在一个实施方式中，治疗性或免疫原性核酸可以是或可以编码完全或部分降低、抑制、干扰或调节编码靶蛋白的一种或多种基因的活性或合成的试剂。靶基因可以是宿主生物体基因组中包含的任何基因。治疗性或免疫原性核酸的序列可以不与靶基因的核酸序列100％互补。

[0117] 在一个实施方式中，纳米颗粒组合物可用于受试者中遗传信息的靶向的、特异性的改变。一个实施方式包括受试者中遗传信息的靶向的、特异性的改变，包括施用本文的纳米颗粒组合物。如本文所用，术语“改变”是指受试者细胞中基因组的任何变化。改变可以是在靶基因的序列中插入或缺失核苷酸。“插入”是指向靶基因的序列中添加一个或多个核苷酸。术语“缺失”是指靶基因的序列中一个或多个核苷酸的缺失或去除。改变可以是靶基因序列的校正。“校正”是指靶基因序列中一个或多个核苷酸的改变，例如通过插入、缺失或取代，这可导致基因的更有利表达，表现为宿主生物的基因型和/或表型的改善。

[0118] 遗传信息的改变可以通过基因组编辑技术来实现。如本文所用，“基因组编辑”是指以精确或受控的方式修饰基因组中核苷酸序列的过程。

[0119] 示例性基因组编辑系统是成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)系统，例如在WO2018/154387中所述，其在2018年8月30日出版，并且通过引用如同完全阐述一样并入本文。一般而言，“CRISPR系统”是指参与CRISPR相关(Cas)基因表达的转录物和其他元件，包括编码Cas基因的序列、tracr(反式激活CRISPR)序列、tracr配对序列、指导序列、或来自CRISPR基因座的其他序列和转录物。一个或多个tracr配对序列可以在加工之前可操作地连接至指导序列或在由核酸酶加工之后可操作地连接至crRNA。tracrRNA和crRNA可以连接，并且可以形成嵌合crRNA-tracrRNA杂合体，其中成熟crRNA通过合成茎环与部分tracrRNA融合，以模拟天然crRNA：如Cong等，Science，15:339(6121):819-823(2013)和Jinek等，Science，337(6096):816-21(2012)中所述的tracrRNA双链体，其通过引用并入本文，如同完全阐述一样。单个融合的crRNA-tracrRNA构建体在本文中也称为向导RNA或gRNA，或单指导RNA(sgRNA)。在sgRNA内，crRNA部分被鉴定为“靶序列”，tracrRNA通常被称为“支架”。在一个实施方式中，本文所述的纳米颗粒组合物可用于递送sgRNA。

[0120] 在一个实施方式中，纳米颗粒组合物可用于应用其它示例性基因组编辑系统，包括巨核酸酶(meganucleases)、归巢核酸内切酶、基于TALEN的系统或锌指核酸酶。纳米颗粒组合物可用于递送编码这些基因编辑工具的序列的核酸(RNA和/或DNA)和实际基因产物、蛋白质或其它分子。

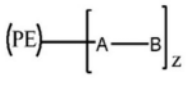
[0121] 在一个实施方式中，纳米颗粒组合物可用于在受试者体内或离体的基因靶向，例如通过从受试者分离细胞、编辑基因和将编辑的细胞植回到受试者中。一个实施方式包括一种方法，包括将本文的纳米粒子组合物施用到受试者的分离的细胞。该方法可以包括基因靶向。该方法可以包括将编辑的细胞植回到受试者中。

[0122] 一个实施方式包括用于将试剂引入细胞的方法。所述方法可包括将细胞暴露于本文的纳米颗粒组合物。所述试剂可以是核酸。该试剂可以是上述的一种。当试剂是核酸时，该方法可以是转染方法。可以通过将如本文所述组成的纳米颗粒溶液与细胞在其中培养的液体培养基混合而将试剂引入细胞中。下面提供了示例。

[0123] 以下实施方式列表包括本发明的特定实施方式。但是，该列举不是限制性的，并且不排除替代实施方式或本文另外描述的实施方式。

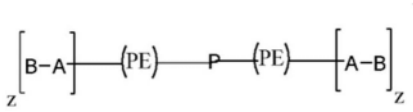
[0124] 实施方式列表

[0125] 1.一种具有式Ia或式Ib结构的核酸载体：



Ia；或

[0126]



Ib；

[0127] 其中PE是聚酯树枝状聚合物或树枝化基元，其包括核和形成一代或多代的多个单体聚酯单元，A是胺连接基，B是疏水单元，并且z是表面基团的数目。

[0128] 2.根据实施方式1的核酸载体，其中，PE如式II所示：

[0129] $[(core)_c\text{-}Gn\text{-}O]$， II

[0130] 其中c是核的重复度或源自核的楔形的数目，其值独立地在1至6的范围内，G是树枝状聚合物或树枝化基元的层或代，n是代数且在1至10的范围内。

[0131] 3.根据实施方式1的核酸载体，其中，所述多个单体聚酯单元是2,2-双(羟甲基)丙酸或2,2-双(羟甲基)丁酸。

[0132] 4.根据实施方式1的核酸载体，其中，Z如式III所示：

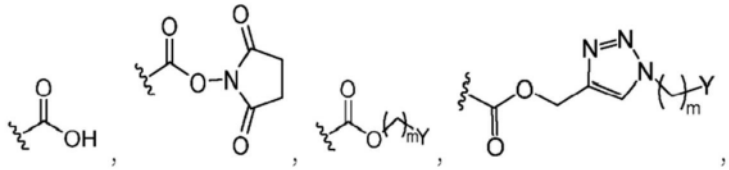
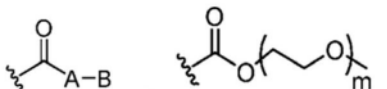
[0133] $z=cb^n$，III

[0134] 其中b是分支点的重复度，或在每个分支点处的分支的数目；c是核的重复度或源自核的楔的数量且在1至6的范围内，n是代数且在1至10的范围内。

[0135] 5.根据实施方式2的核酸载体，其中，c是1，并且所述核是单向核。

[0136] 6.根据实施方式5的核酸载体，其中，所述单向核是羧酸或其衍生物。

[0137] 7.根据实施方式5的核酸载体，其中，所述核选自：

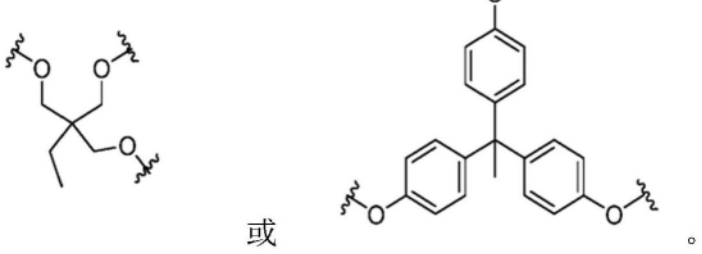
[0138] 

或

[0139] 其中，Y选自甲基、异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基、新戊基、3-甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、叠氮化物(N_3)、卤素(Cl、Br或I)、乙炔(C_2H_2)、羟基(-OH)或巯基(-SH)、-吡喃糖基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环；A是胺连接基；B是疏水单元；和m是1-20。

[0140] 8.根据实施方式7的核酸，其中，所述环烷基、芳基、杂芳基和杂环被至少一个选自卤素、羟基(-OH)和烷基的基团取代。

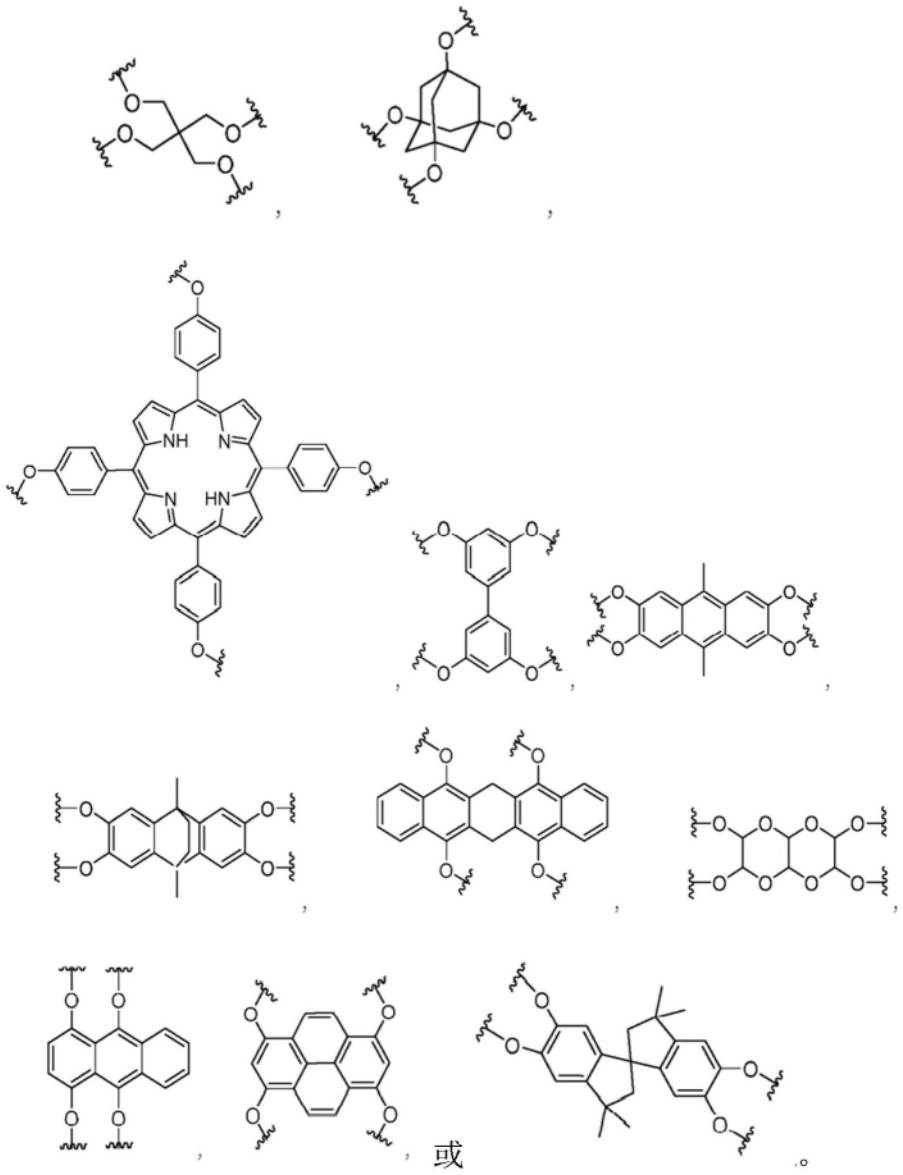
[0141] 9.根据实施方式2的核酸载体，其中，c是3，并且所述核是三向核。

[0142] 10.根据实施方式9的核酸载体，其中，所述三向核是三羟甲基丙烷或1,1,1-三(羟基苯基乙烷)，并且分别具有以下结构：

[0143] 
或 。

[0144] 11.根据实施方式2的核酸载体，其中c是4，并且所述核是四向核。

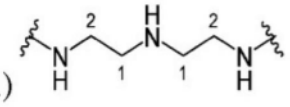
[0145] 12.根据实施方式11的核酸载体，其中所述四向核选自：季戊四醇、金刚烷-1,3,5,7-四醇或5,10,15,20-四(4-羟基苯基)-21H、23H-卟吩、[1,1'-联苯]-3,3',5,5'-四醇、2,3,6,7-四羟基-9,10-二甲基-蒽、9,10-二甲基-9,10-二氢-9,10-桥亚乙基蒽-2,3,6,7-四醇、6,13-二氢-并五苯-5,7,12,14-四醇、六氢-[1,4]二恶英[2,3-b][1,4]二噁英-2,3,6,7-四醇、蒽-1,4,9,10-四醇、芘-1,3,6,8-四醇、和3,3,3',3'-四甲基-2,2',3,3'-四氢-1,1'-螺[茚]-5,5',6,6'-四醇，分别具有如下结构：

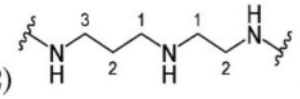
[0146] 

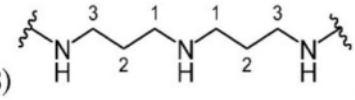
或。

[0147] 13.根据实施方式1的核酸载体，其中A衍生自：N1-(2-氨基乙基)乙烷-1,2-二胺、N1-(2-氨基乙基)丙烷-1,3-二胺、N1-(3-氨基丙基)丙烷-1,3-二胺、N1,N1'-(乙烷-1,2-二基)双(乙烷-1,2-二胺)、N1,N1'-(乙烷-1,2-二基)双(N2-(2-氨基乙基)乙烷-1,2-二胺)、N1-(2-(4-(2-氨基乙基)哌嗪-1-基)乙基)乙烷-1,2-二胺、N1-(2-氨基乙基)-N1-甲基乙烷-1,2-二胺、N1-(3-氨基丙基)-N1-甲基丙烷-1,3-二胺、N1-(3-氨基丙基)-N1-乙基丙烷-1,3-二胺、3-((3-氨基丙基)(甲基)氨基)丙烷-1-醇、3,3'-(甲基氮杂二基)双(丙烷-1-醇)、N1-(3-氨基丙基)-N1-甲基丁烷-1,4-二胺、4-((3-氨基丙基)(甲基)氨基)丁-1-醇、4-((3-羟丙基)(甲基)氨基)丁-1-醇、4-((3-羟丙基)(甲基)氨基)丁-1-醇、N1-(4-氨基丁基)-N1-甲基丁-1,4-二胺、4-((4-氨基丁基)(甲基)氨基)丁-1-醇、4,4'-(甲基氮杂二基)双(丁-1-醇)、3-((3-氨基丙基)(乙基)氨基)丙-1-醇、3,3'-(乙基氮杂二基)双(丙-1-醇)、N1-(3-氨基丙基)-N1-乙基丁-1,4-二胺、4-((3-氨基丙基)(乙基)氨基)丁-1-醇、4-(乙基(3-羟丙基)氨基)丁-1-醇、N1-(2-氨基乙基)-N1-甲基丙-1,3-二胺、N1-(4-氨基丁基)-N1-乙基丁-1,4-二胺、4,4'-(乙基氮杂二基)双(丁-1-醇)、3-((3-氨基丙基)氨基)丙-1-醇、N1-(3-氨基丙基)丁烷-1,4-二胺、4-((3-羟基丙基)氨基)丁-1-醇、N1-(4-氨基丁基)丁烷-

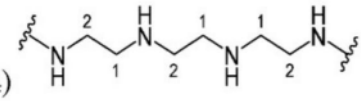
1,4-二胺、3,3'-氮杂二基双(丙-1-醇)、4-((3-氨基丙基)氨基)丁-1-醇、4,4'-氮杂二基双(丁-1-醇)和N1,N1'-(丁烷-1,4-二基)双(丙烷-1,3-二胺);且分别具有如下结构:

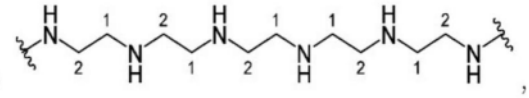
(1)  ,

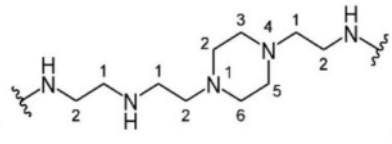
(2)  ,

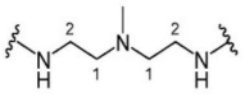
(3)  ,

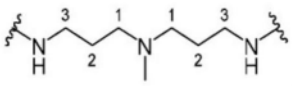
[0148]

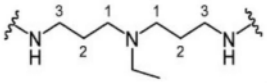
(4)  ,

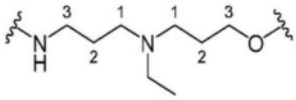
(5)  ,

(6)  ,

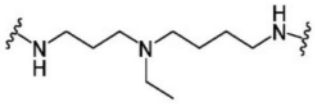
(7)  ,

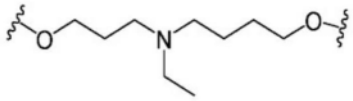
(8)  ,

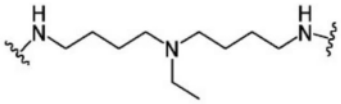
(9)  ,

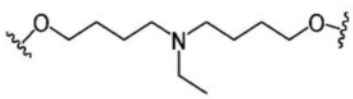
(10)  ,

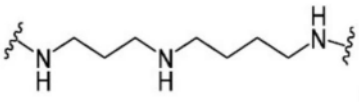
[0149]

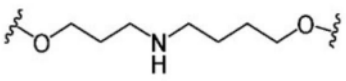
(11)  ,

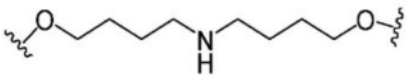
(12)  ,

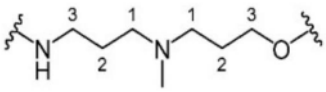
(13)  ,

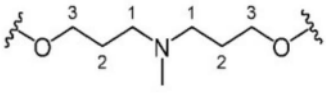
(14)  ,

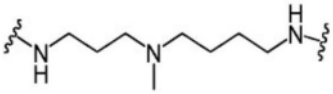
(15)  ,

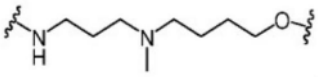
(16)  ,

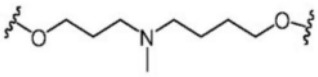
(17)  ,

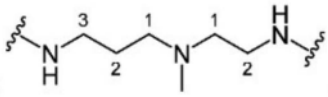
(18)  ,

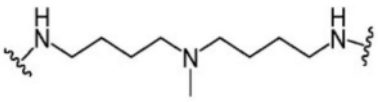
(19)  ,

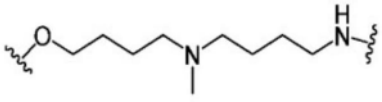
[0150] (20)  ,

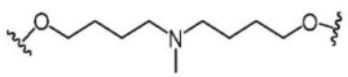
(21)  ,

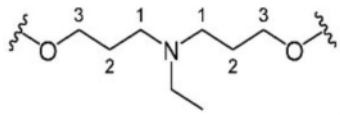
(22)  ,

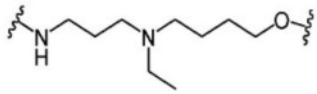
(23)  ,

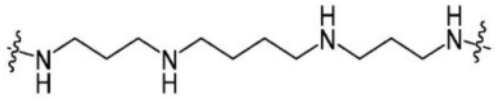
(24)  ,

(25)  ,

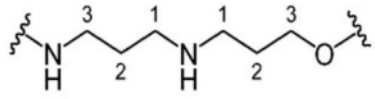
(26)  ,

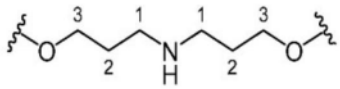
(27)  ,

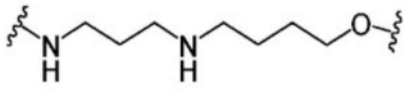
(28)  ,

(29)  ,

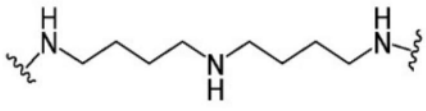
[0151]

(30)  ,

(31)  ,

(32)  ,

和

(33)  。

[0152] 14.根据实施方式1的核酸载体,其中,B是C_1-C_{22}烷基或C_2-C_{22}烯基。

[0153] 15.根据实施方式14的核酸载体,其中,所述C_1-C_{22}烷基或C_2-C_{22}烯基被一至四个选自以下的取代基取代:卤素、-CN、-NO_2、-N_3、C_1-C_6烷基、卤代(C_1-C_6烷基)、-OR、-NR_2、-CO_2R、-OC(O)R、-CON(R)$_2$、-OC(O)N(R)$_2$、-NHC(O)N(R)$_2$、-NHC(NH)N(R)$_2$、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基、芳基、杂芳基和杂环,且R选自:氢、C1-C6烷基、卤代(C_1-C_6烷基)、C_3-C_8环烷基、C_3-C_8环烯基、芳基、杂芳基和杂环。

[0154] 16.根据实施方式15的核酸载体,其中,一至四个取代基选自OR、-NR_2、-CO_2R、-OC(O)R、-CON(R)$_2$、-OC(O)N(R)$_2$、-NHC(O)N(R)$_2$及-NHC(NH)N(R)$_2$。

[0155] 17.根据实施方式16的核酸载体，其中，每个环烷基、环烯基、芳基、杂芳基和杂环进一步被R'取代，并且R'独立地选自：卤素、-CN、-NO_2、-N_3、C_1-C_6烷基和卤代(C_1-C_6烷基)。

[0156] 18.根据实施方式1的核酸载体，其中，B是不饱和烃基。

[0157] 19.根据实施方式1的核酸载体，其中，B选自：甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、癸基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、丁-3-烯-1-基、辛-7-烯-1-基、12-十三烯基、14-十五烯基、17-十八烯基、油烯基、亚油基和花生四烯基。

[0158] 20.根据实施方式1的核酸载体，其中，B衍生自脂肪酸或其衍生物。

[0159] 21.根据实施方式20的核酸载体，其中，所述脂肪酸选自：辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸。

[0160] 22.根据实施方式21的核酸载体，其中，所述脂肪酸衍生物选自：12-羟基-9-顺式-十八碳烯酸、12-甲基十四烷酸、12-甲基十三烷酸、14-甲基十六烷酸、14-甲基十六酸、18-甲基十九烷酸、19-甲基花生酸、异棕榈酸、异硬脂酸、植烷酸、(±)-2-羟基辛酸、(±)-3-羟基癸酸、(±)-3-羟基辛酸、10-羟基癸酸、12-羟基十八烷酸、15-羟基十五烷酸、16-羟基十六烷酸、2-羟基十六烷酸、2-羟基十四烷酸、2-羟基十二烷酸、DL-α-羟基硬脂酸、DL-β-羟基尿酸、DL-β-羟基肉豆蔻酸和DL-β-羟基棕榈酸。

[0161] 23.根据实施方式20的核酸载体，其中，所述脂肪酸包含一种或多种稳定同位素。

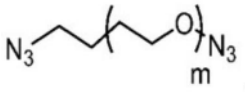
[0162] 24.根据实施方式23的核酸载体，其中，所述稳定同位素是碳或氢的稳定同位素。

[0163] 25.根据实施方式24的核酸载体，其中，所述碳的稳定同位素是^{13}C。

[0164] 26.根据实施方式24的核酸载体，其中，所述氢的稳定同位素是^{2}H。

[0165] 27.根据实施方式23的核酸载体，其中，所述包含稳定同位素的脂肪酸选自：辛酸-1-^{13}C、辛酸-8-^{13}C、辛酸-8,8,8-$^{2}d3$、辛酸-$^{2}H15$、癸酸-1-^{13}C、癸酸-10-^{13}C、癸酸-10,10,10-d3、癸酸-d19、十一酸-1-^{13}C、月桂酸-12,12,12-$^{2}H3$、月桂酸-$^{2}H23$、月桂酸-1-^{13}C、月桂酸-1,12-$^{13}C2$、十三酸-2,2-$^{2}H2$、肉豆蔻酸-14-^{13}C、肉豆蔻酸-1-^{13}C、肉豆蔻酸-14,14,14-$^{2}H3$、肉豆蔻酸-$^{2}H27$、棕榈酸-1-^{13}C、棕榈酸-16-^{13}C、棕榈酸-16-^{13}C,16,16,16-$^{2}H3$、棕榈酸-$^{2}H31$、硬脂酸-1-^{13}C、硬脂酸-18-^{13}C、硬脂酸-18,18,18-$^{2}H3$、硬脂酸-$^{2}H35$、油酸-1-^{13}C、油酸-$^{2}H34$、亚油酸-1-^{13}C、亚油酸-$^{2}H32$、花生四烯酸-5,6,8,9,11,12,14,15-$^{2}H8$或二十烷酸-$^{2}H39$。

[0166] 28.根据实施方式1的核酸载体，其中，P是具有两个叠氮基的双官能接头，并且具有式IV的结构：

[0167]  其中m是1-20的数。

IV，

[0168] 29.一种纳米颗粒组合物，其包含实施方式1-28中任一项所述的核酸载体和包封在其中的治疗性或免疫原性核酸试剂。

[0169] 30.根据实施方式29所述的纳米颗粒组合物，其中，所述治疗性或免疫原性核酸试剂选自：多核苷酸、寡核苷酸、DNA、cDNA、RNA、repRNA、siRNA、miRNA、sgRNA和mRNA。

[0170] 31.根据实施方式29所述的纳米颗粒组合物，其中，所述治疗性或免疫原性核酸试剂编码选自传染病、病原体、癌症、自身免疫病和过敏性疾病的一种或多种抗原。

[0171] 32.根据实施方式29所述的纳米颗粒组合物，其中，所述治疗性或免疫原性核酸试

剂包含能够沉默、抑制或修饰基因活性的RNA或DNA。

[0172] 33.根据实施方式29所述的纳米颗粒组合物，其还包含PEG-脂质。

[0173] 34.根据实施方式33的纳米颗粒组合物，其中，所述PEG-脂质是1,2-二肉豆蔻酰基-sn-丙三基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]或1,2-二肉豆蔻酰基-rac-丙三基-3-甲氧基聚乙二醇-2000。

[0174] 35.根据实施方式33所述的纳米颗粒组合物，其中，所述纳米颗粒组合物包含所述PEG-脂质的量为以纳米颗粒组合物为基准1摩尔％至10摩尔％的所述PEG-脂质。

[0175] 36.根据实施方式33所述的纳米颗粒组合物，其还包含磷脂和胆固醇或其衍生物。

[0176] 37.根据实施方式36所述的纳米微粒组合物，其中，所述磷脂是二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)或二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)。

[0177] 38.根据实施方式36所述的纳米颗粒组合物，其中，所述纳米颗粒组合物包含的磷脂为以纳米颗粒组合物为基准10摩尔％至15摩尔％的磷脂。

[0178] 39.根据实施方式36所述的纳米粒子组合物，其中，所述纳米粒子组合物包含所述胆固醇或其衍生物的量为以纳米粒子组合物为基准50摩尔％至75摩尔％的所述胆固醇或其衍生物。

[0179] 40.一种用于治疗或预防受试者的疾病或病状的方法，其包括：向有需要的受试者施用治疗有效量的实施方式29所述的纳米颗粒组合物。

[0180] 41.根据实施方式40所述的方法，其中，所述治疗有效量的纳米颗粒组合物包含相对于每kg受试者体重0.01mg核酸至10mg核酸的治疗性或免疫原性核酸试剂。

[0181] 42.根据实施方式40的方法，其中，所述受试者是哺乳动物。

[0182] 43.根据实施方式42的方法，其中，所述哺乳动物选自：鸡、啮齿动物、犬、灵长类动物、马、高价值农业动物和人。

[0183] 实施例

[0184] 提供以下非限制性实施例以说明特定实施方式。全文中的实施方式可以用来自以下一个或多个示例的一个或多个细节来补充，和/或来自实施方式的一个或多个元素可以用来自以下一个或多个示例的一个或多个细节来替换。

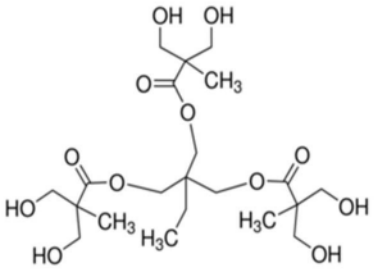
[0185] 实施例1.含有用脂肪酸修饰的可生物降解的树枝状聚合物的纳米颗粒组合物

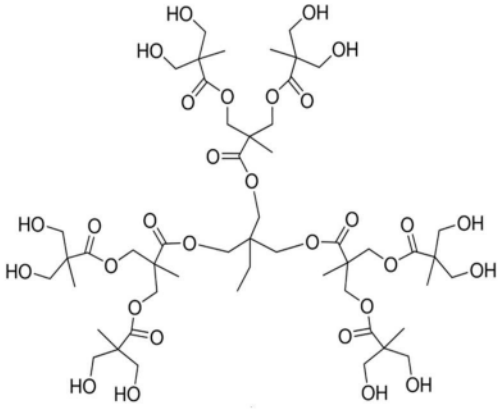
[0186] 树枝状聚合物的表面基团的特性决定了它们的物理化学性质、生物活性和生物相容性。理想的基因送递载体应该是可生物降解的，以防止生物累积和随后的细胞毒性。大的树枝状聚合物具有较高程度的聚集(packaging)，因此难以生物降解。需要可与核酸复合并穿过细胞膜易位同时保持可生物降解性并避免细胞毒性的低代树枝状聚合物。

[0187] 优选地，单体单元上存在的化学键是酯键，并且低代聚酯树枝状聚合物的端层通过酰胺键被内源性/必需脂肪酸侧链取代，使得它们易于在血浆中被酯酶和酰胺酶水解，因此是可生物降解的。这种具有脂肪酸链的低代树枝状聚合物可通过其动态平衡性质与核酸非共价结合以形成纳米颗粒。

[0188] 本实施例修饰的树枝状聚合物由如下(1)双-MPA-OH或2,2-双(羟甲基)丙酸树枝状聚合物，具有三羟甲基丙烷核(1代和2代)或(2)季戊四醇核(1代和2代)或(3)1,1,1-三(羟基苯基乙烷)核或(4)金刚烷核组成。

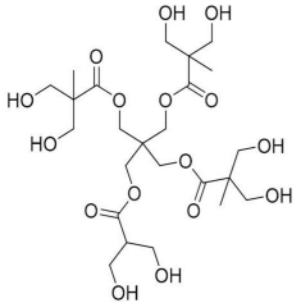
[0189] (1).具有三羟甲基丙烷核的双-MPA-OH树枝状聚合物(1和2代)：

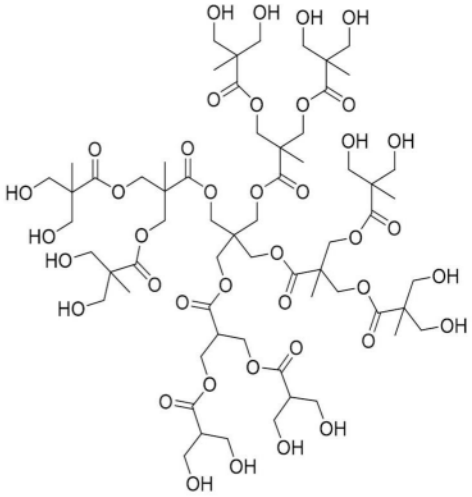
[0190] 



1代 2代

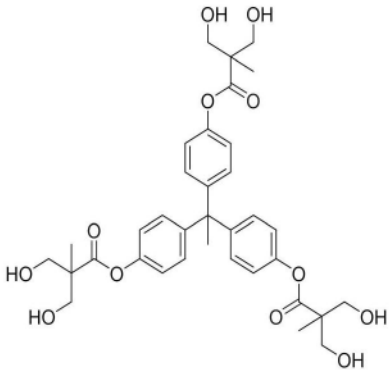
[0191] (2).具有季戊四醇核的双-MPA-OH树枝状聚合物(1和2代)：

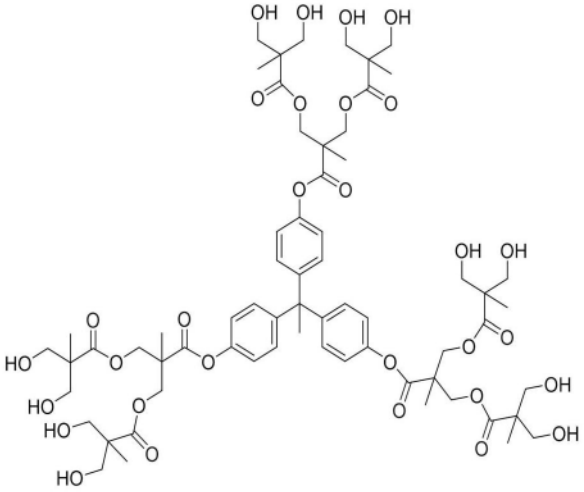
[0192] 



季戊四醇核（1代） 季戊四醇核（2代）

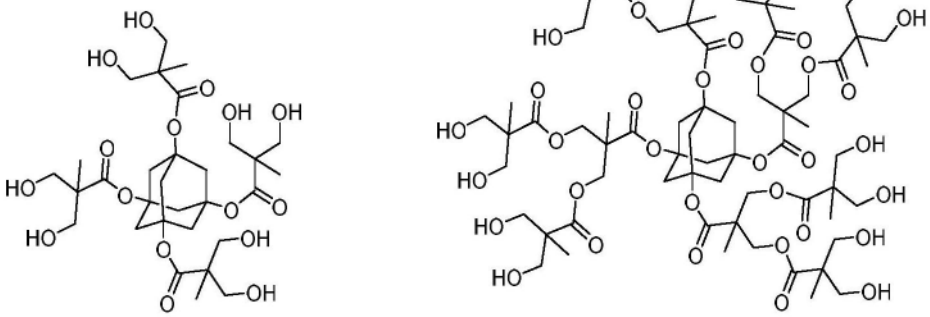
[0193] (3).具有1,1,1-三(羟基苯基乙烷)核的双-MPA-OH树枝状聚合物(1和2代)：

[0194] 



1,1,1-三(羟基苯基乙烷)核（1代） 1,1,1-三(羟基苯基乙烷)核（2代）

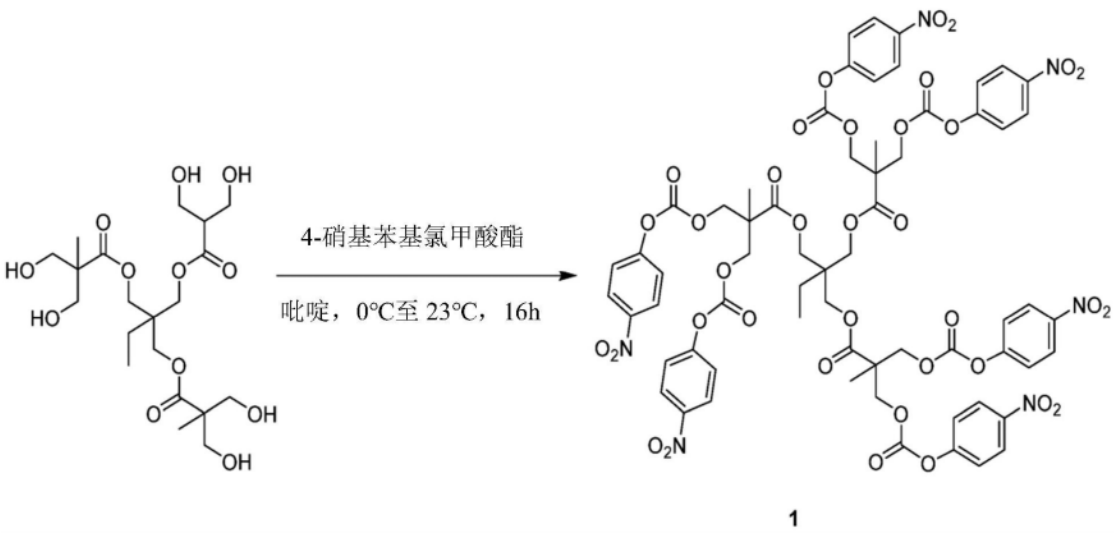
[0195] 4).具有金刚烷核的双-MPA-OH树枝状聚合物(1和2代)：

[0196] 

1代 2代

[0197] 图1是第1代修饰的聚酯树枝状大分子和可用于修饰的脂肪酸侧链(B)的示意图。在该图中,脂肪酸侧链B可选自C_4-C_{28}脂肪酸中的任一种。

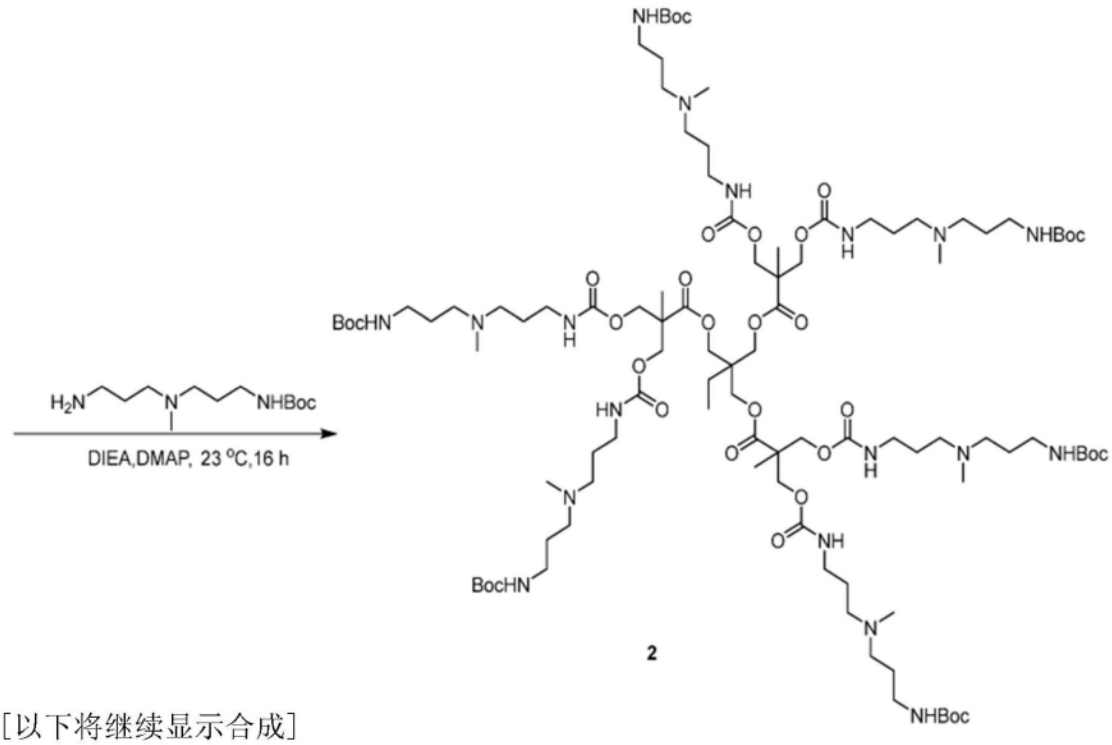
[0198] PE-亚油酸的合成的一个实例如下:

[0199] 

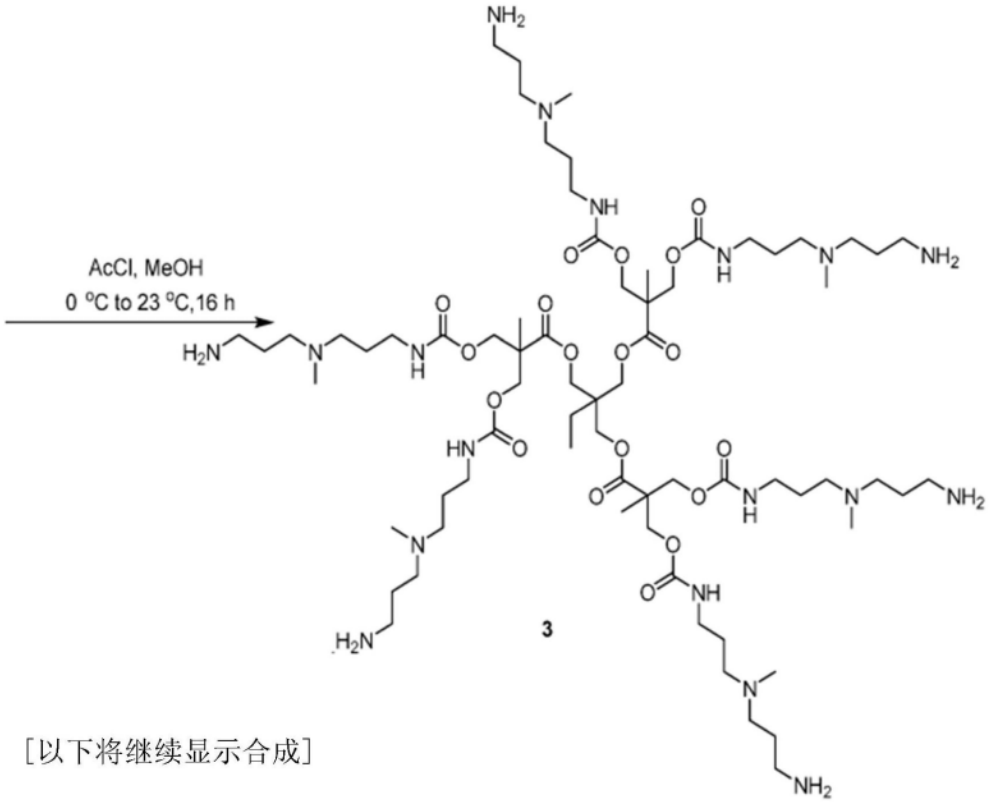
1

[0200] [以下将继续显示合成]

[0201]

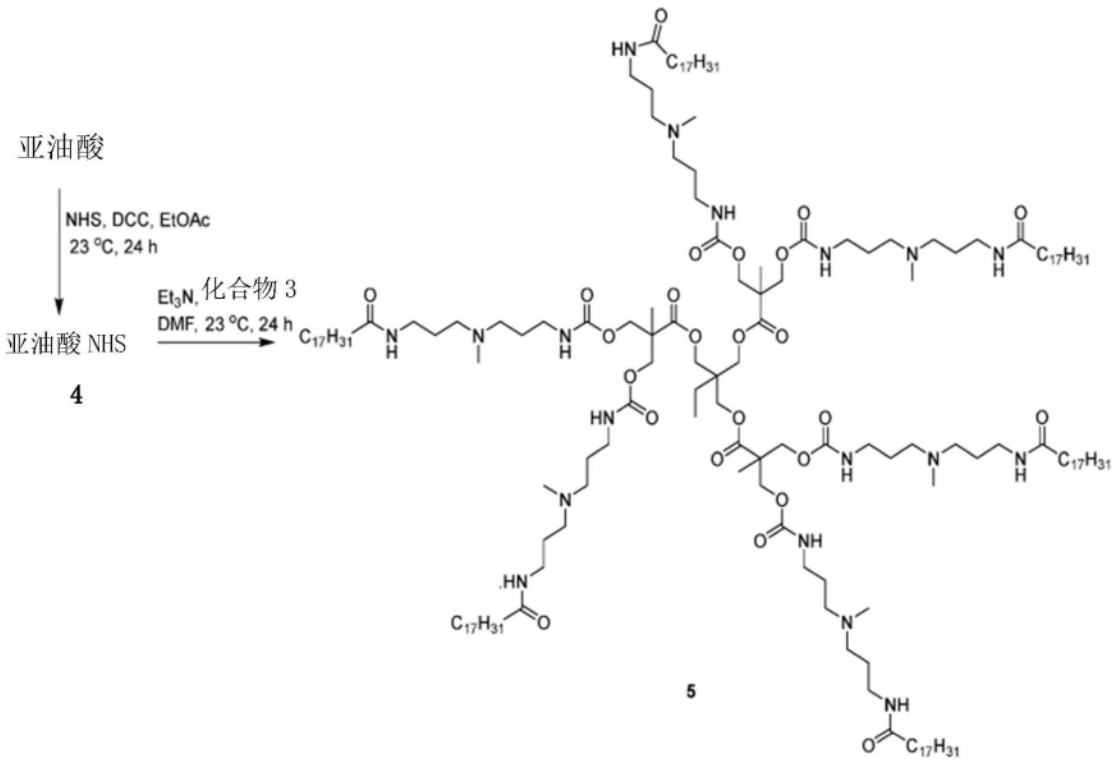


[以下将继续显示合成]



[以下将继续显示合成]

[0202]



[0203] 化合物1:将起始材料双-MPA-OH树枝状聚合物三羟甲基丙烷核,1代(300mg,0.62mmol)溶解在无水DCM(6mL)中,加入吡啶(0.9mL,4.96mmol),随后加入溶解在无水DCM(25mL)中的对硝基苯基氯甲酸酯(2.1g,10mmol),将反应混合物在0℃至室温(23℃)下搅拌过夜(16小时)。次日TLC显示产物形成。用1.33M $NaHSO_4$稀释反应混合物,用EtOAc萃取。将有机层用盐水洗涤并蒸发。将粗反应混合物上样到40g硅胶柱上。然后通过快速色谱法用

DCM/EtOAc纯化负载的化合物。化合物在8% EtOAc下开始洗脱，得到所需产物，为浅黄色油(870mg，65%)。1H NMR(301MHz，CHLOROFORM-d)δppm 0.93-1.02(m，3H)，1.34-1.42(m，9H)，1.54-1.65(m，2H)，4.19-4.25(m，6H)，4.42-4.56(m，12H)，7.27-7.37(m，12H)，8.15-8.24(m，12H)。

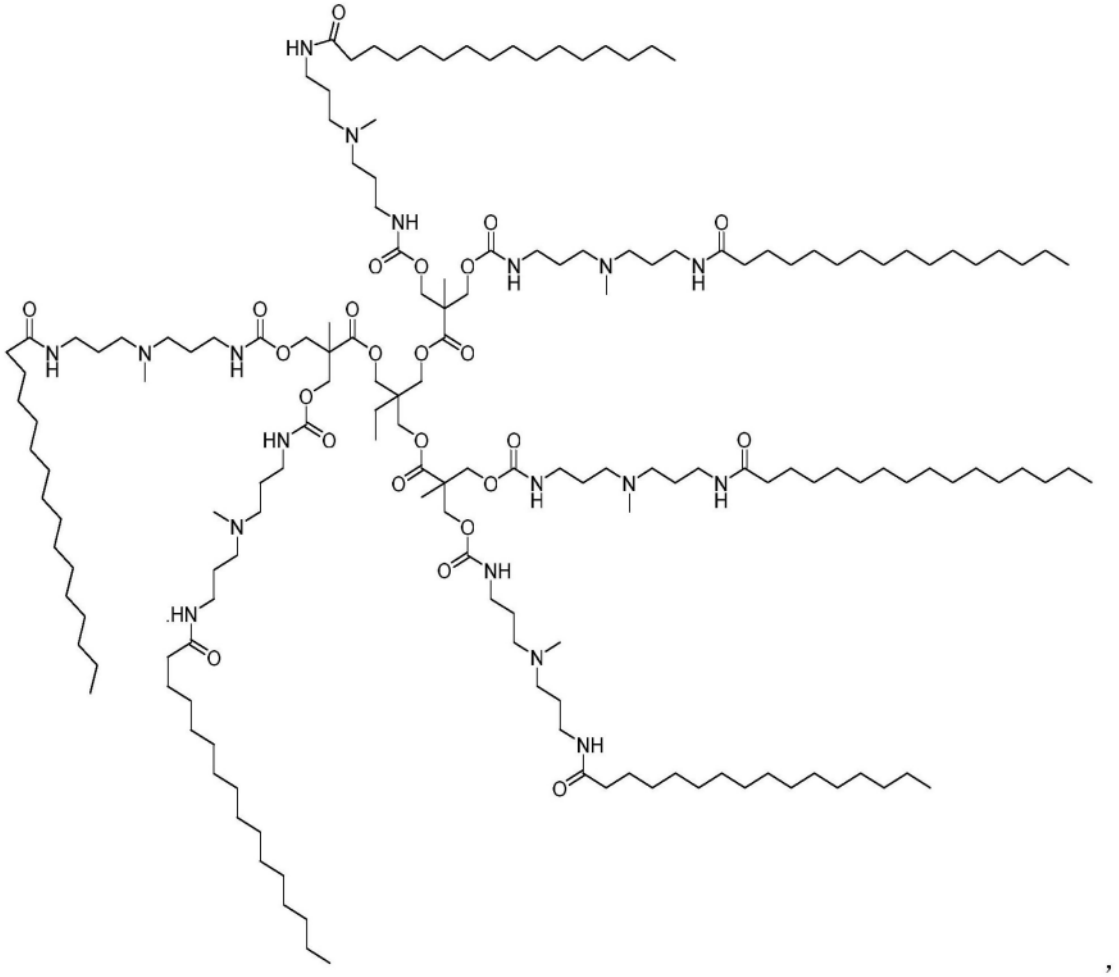
[0204] 化合物2：将化合物1，PNP碳酸酯(450mg，0.31mmol)溶解在无水DCM(6mL)中的溶液加入到过量的单-Boc-DAPMA(453mg，1.85mmol)溶解在无水DCM(6mL)中。加入DMAP(76mg，0.62mmol)和DIPEA(0.32mL，1.86mmol)的无水DCM(4mL)溶液，将反应混合物在23℃和氩气气氛下搅拌过夜16小时。TLC证实反应完成。然后通过快速色谱法用流动相a(DCM)/流动相b(CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OHaq)纯化粗产物。化合物在40％流动相b(Rf＝0.1(1:1流动相a/流动相b)开始洗脱，得到所需产物，为淡黄色油状物(400mg，62％)；1H NMR(301MHz，CHLOROFORM-d)δppm 0.66-0.78(m，3H)，0.98-1.07(m，9H)，1.18-1.28(m，54H)，1.38-1.52(m，24H)，1.97-2.06(m，18H)，2.12-2.24(m，24H)，2.85-3.00(m，24H)，3.17-3.25(m，12H)；^{13}C NMR(76MHz，METHANOL-d_4)δppm 17.92，27.95，28.04，28.71，39.58，40.11，42.18，42.59，48.01，54.69，56.01，56.08，64.76，66.72，79.66，158.03，158.25，174.08。

[0205] 化合物5：将171mg化合物4(0.082mmol)溶解于3ml MeOH后，用34eq AcCl(0.2ml)处理，将反应在0℃至23℃搅拌16小时，蒸发至干，溶解于2ml DMF中，加入0.1ml Et3N(0.73mmol，9eq)，随后加入365mg溶解于2ml DMF中的亚油酸-NHS(按照公开的方法合成：Talukder等，公开号WO/2020/132196，将其引入本文作为参考，如同完全阐明一样)。将反应混合物于23℃搅拌24小时，在Genevac中减压浓缩，用硅胶柱快速色谱法纯化，用100％CH_2Cl_2至75:22:3CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OHaq(体积比)梯度洗脱40分钟以上。以50:7:1CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OHaq洗脱所需产物。合并含有产物的级分，在逐渐升高的真空下干燥12小时，得到所需产物，为淡黄色油状物(40mg，16％)，并在4℃下储存直至使用。.^{1}H NMR(300MHz，CHLOROFORM-d)δppm 0.85-0.94(m，21H)，1.13-1.40(m，93H)，1.44-1.51(m，2H)1.51-1.71(m，43H)，1.94-2.06(m，24H)，2.09-2.22(m，34H)，2.34-2.44(m，24H)，2.69-2.79(m，9H)，3.09-3.33(m，26H)，3.97-4.26(m，17H)，5.22-5.46(m，22H)。

[0206] 实施例2.式(I)的化合物

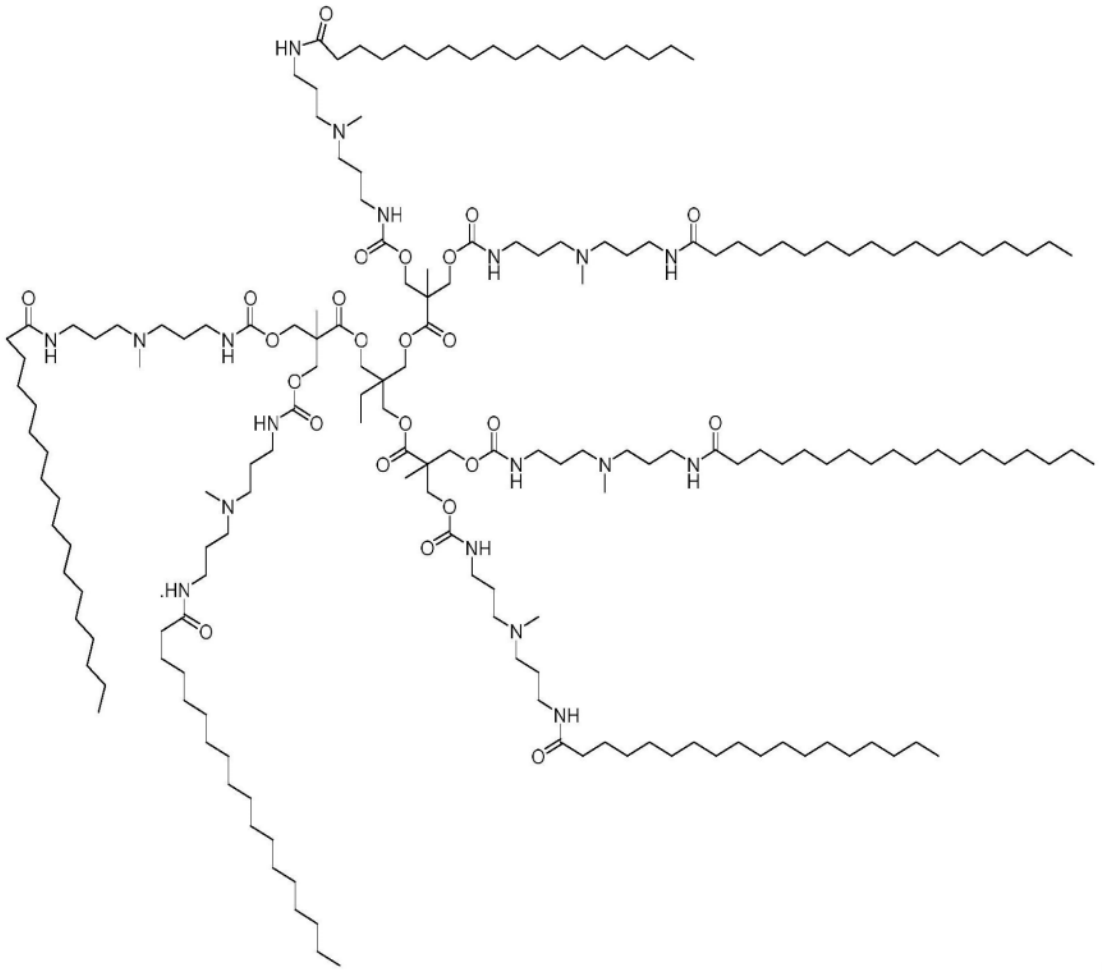
[0207] 根据上述方法可以制备下列化合物，其中需要时对起始原料进行改进以提供所需

产物：

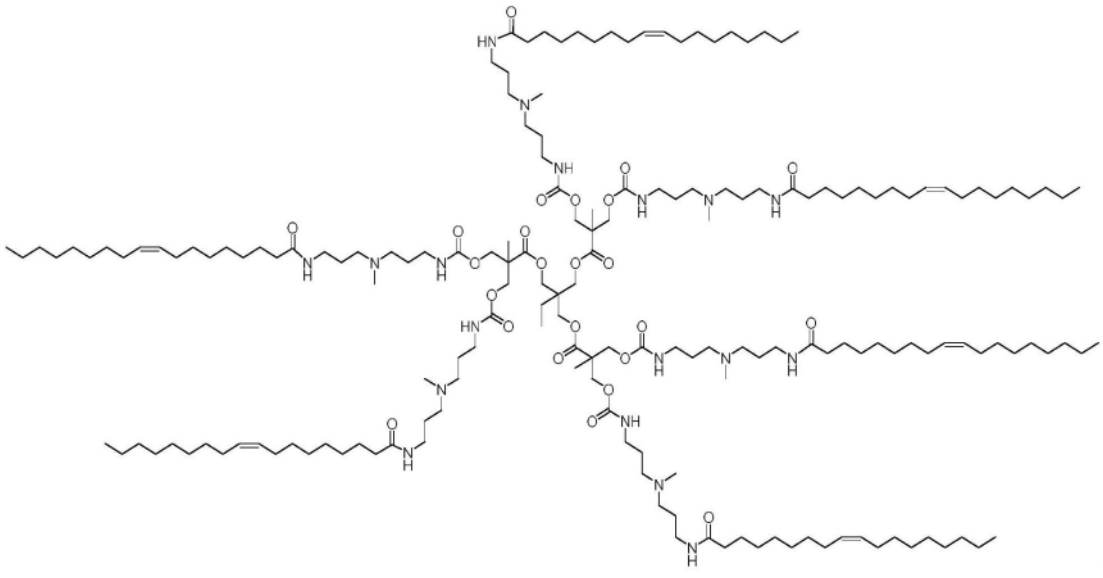


，

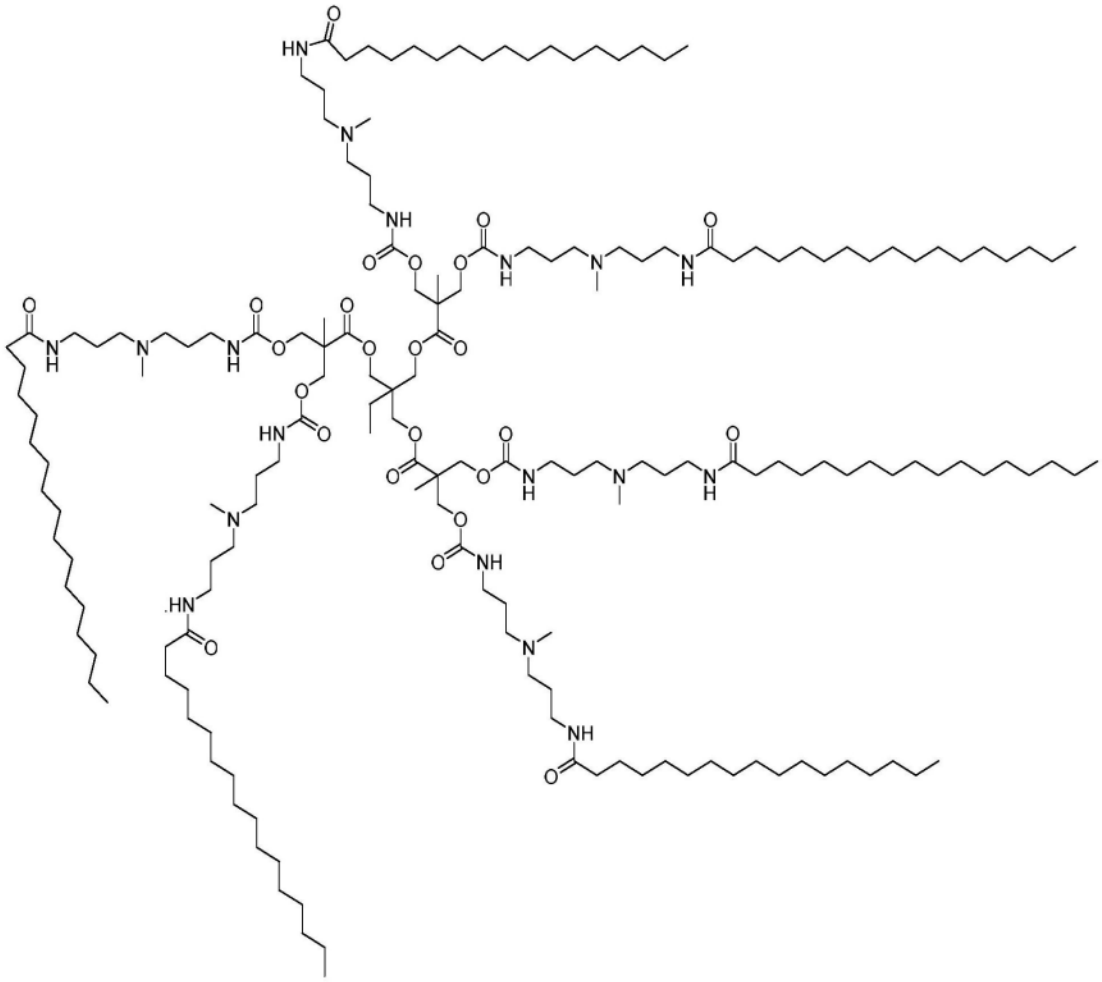
[0208] PE-棕榈酸

[0209] 

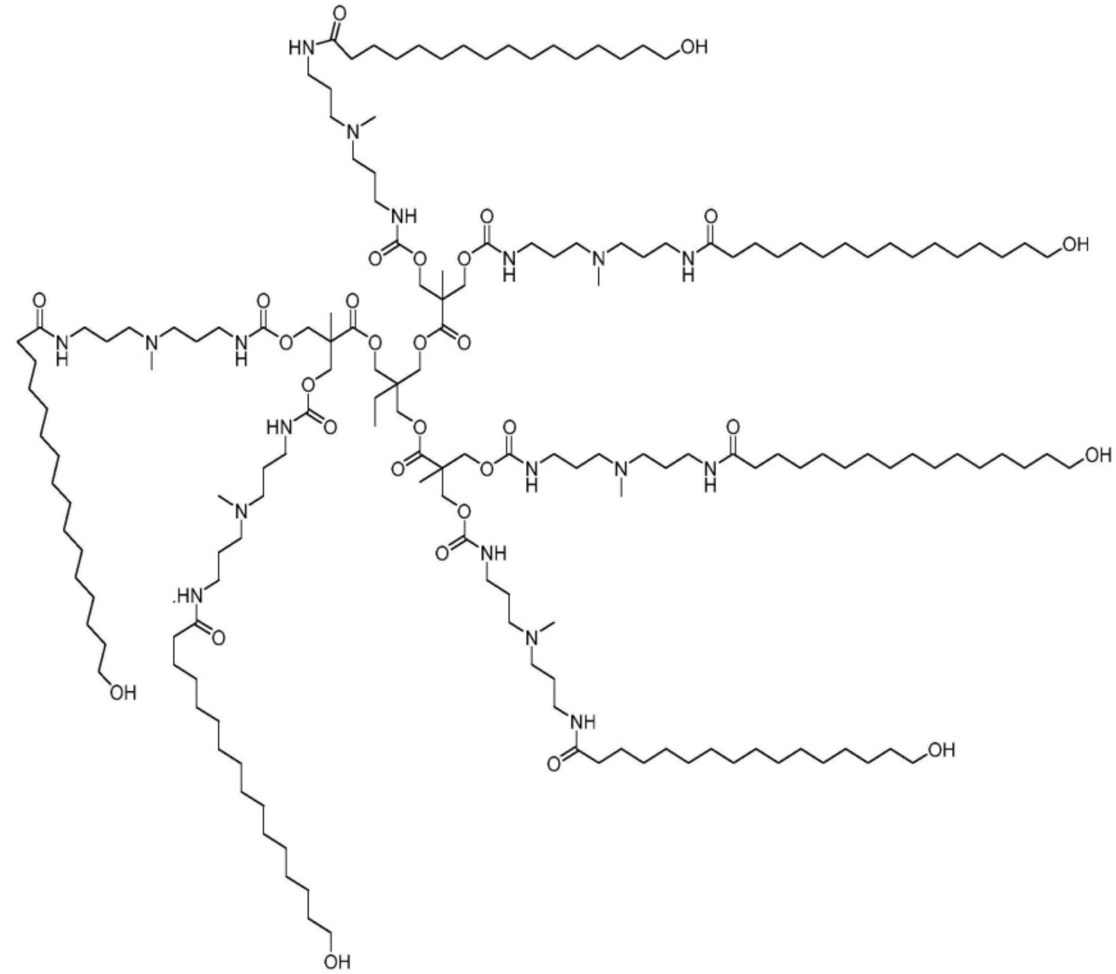
[0210] PE-硬脂酸

[0211] 

[0212] PE油酸

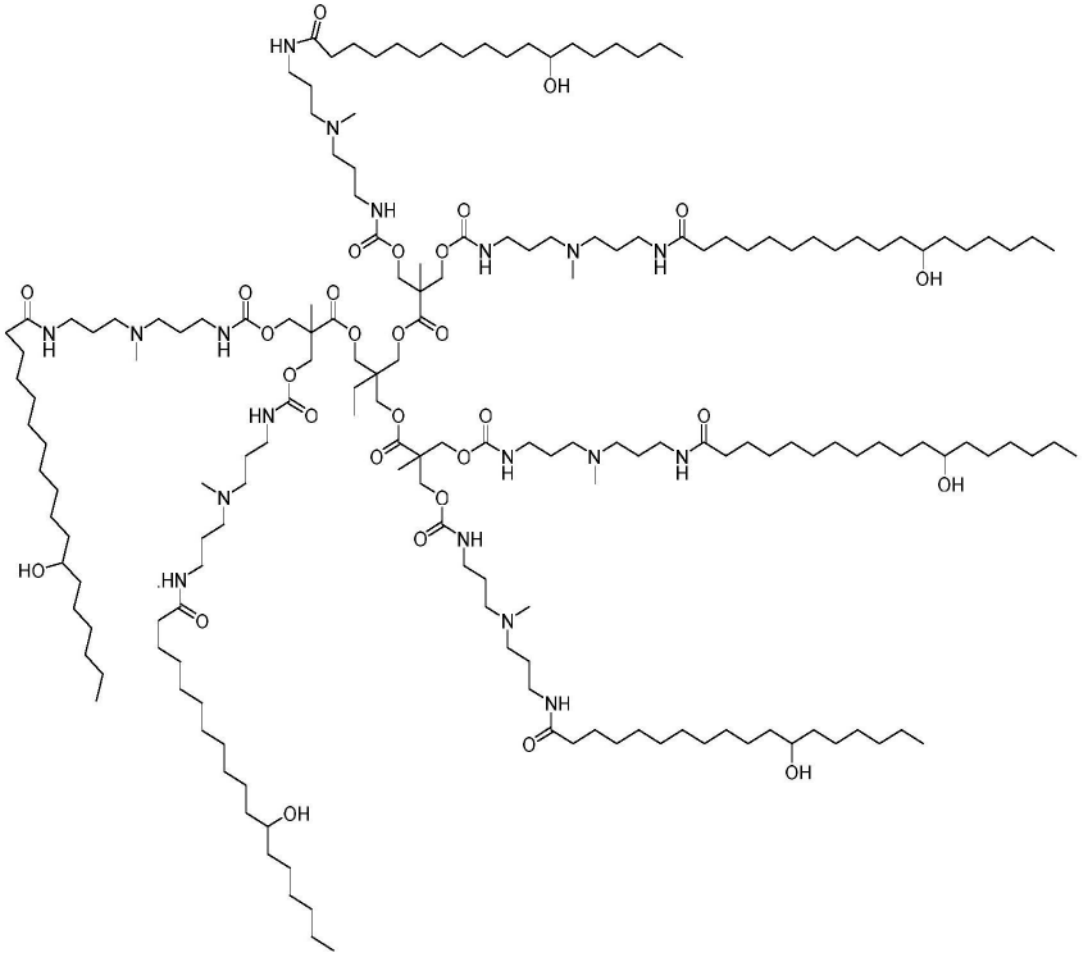
[0213] 

[0214] PE-十七酸

[0215] 

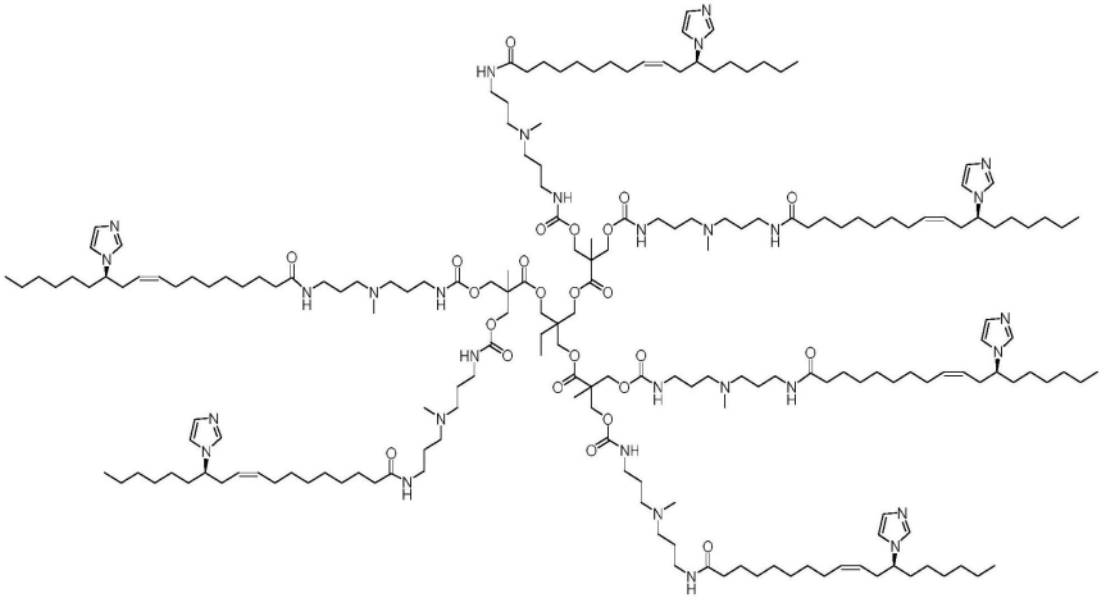
，

[0216] PE-16-羟基十六烷酸

[0217] 

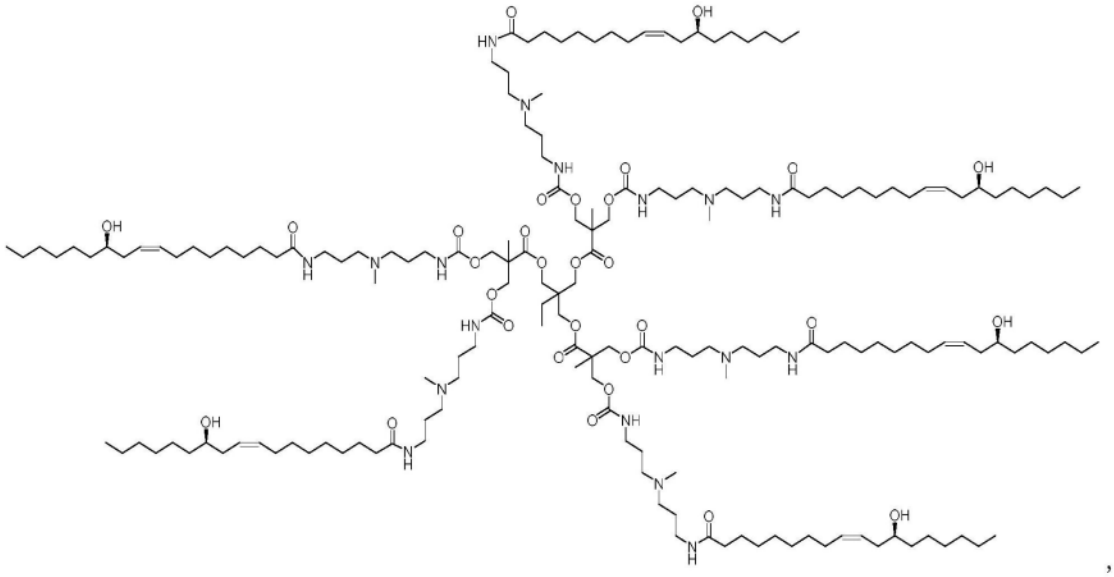
,

[0218] PE-12-羟基硬脂酸

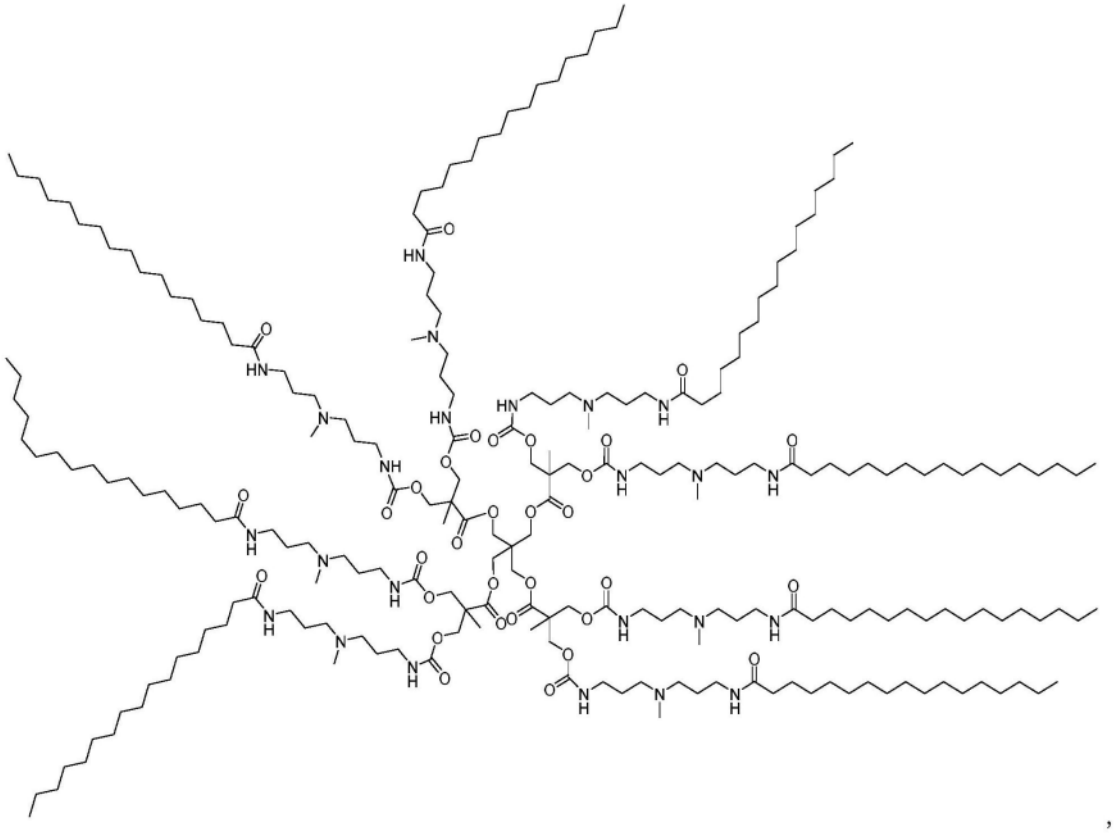
[0219] 

,

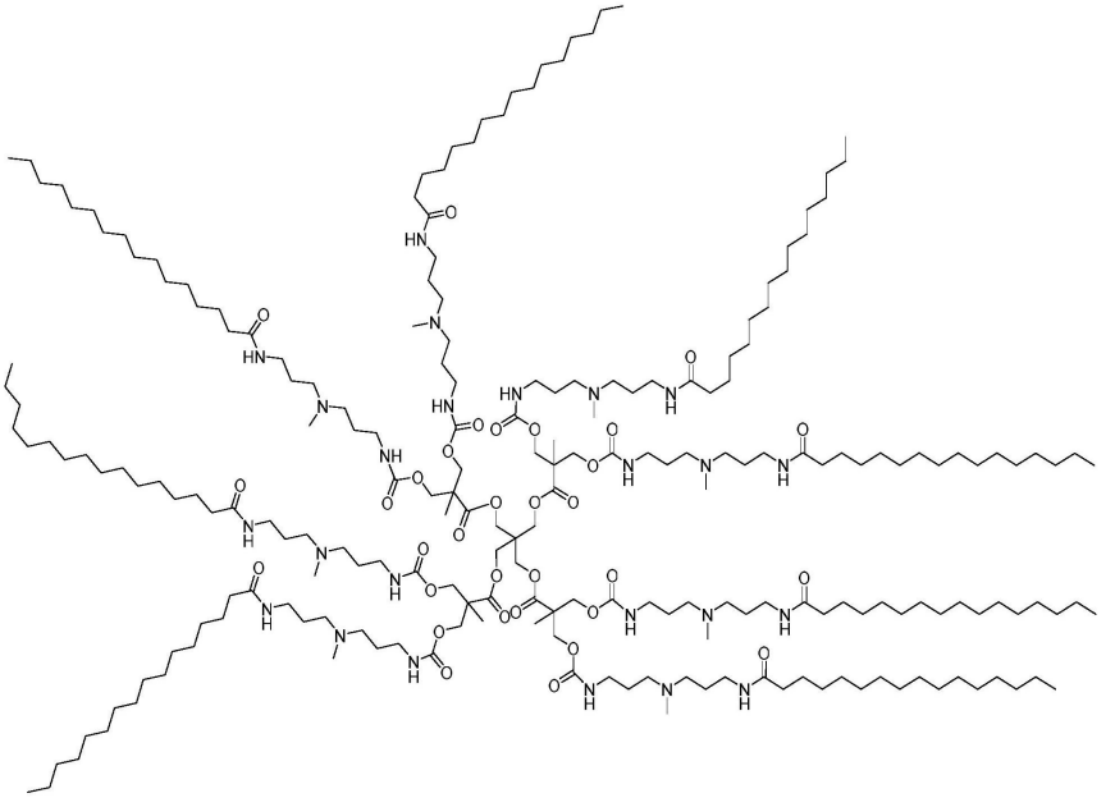
[0220] PE-咪唑基油酸(imidazolyloleic)，

[0221] 
,

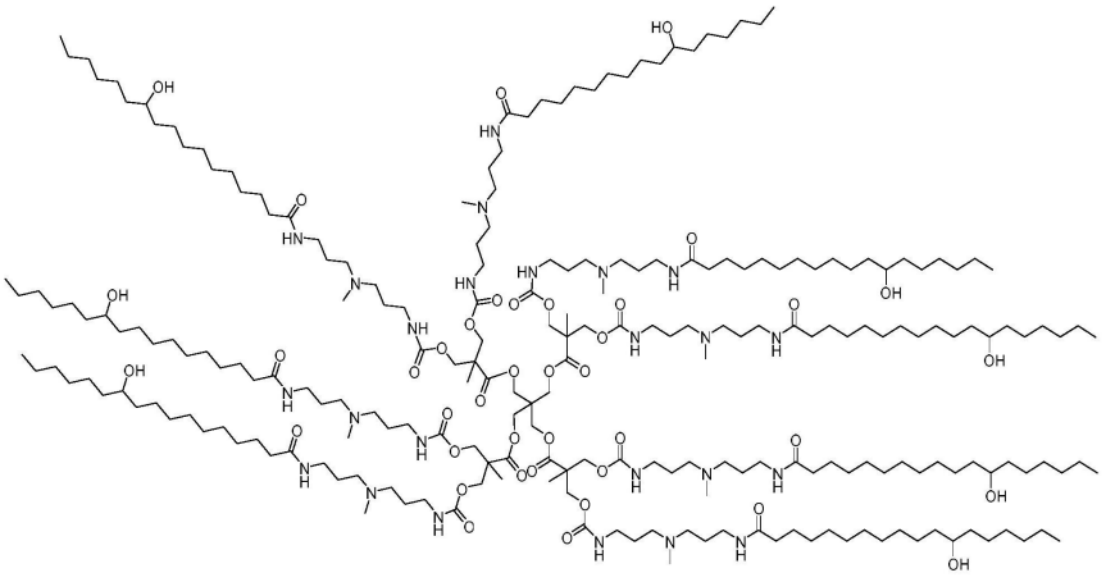
[0222] PE-蓖麻油酸

[0223] 
,

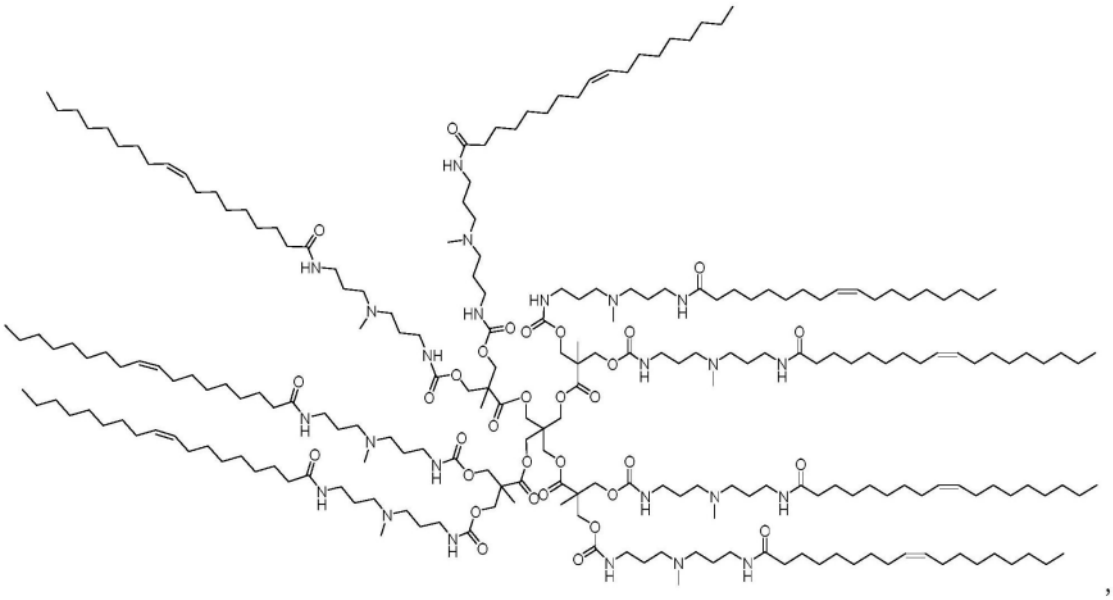
[0224] PE-4-十七酸

[0225] 

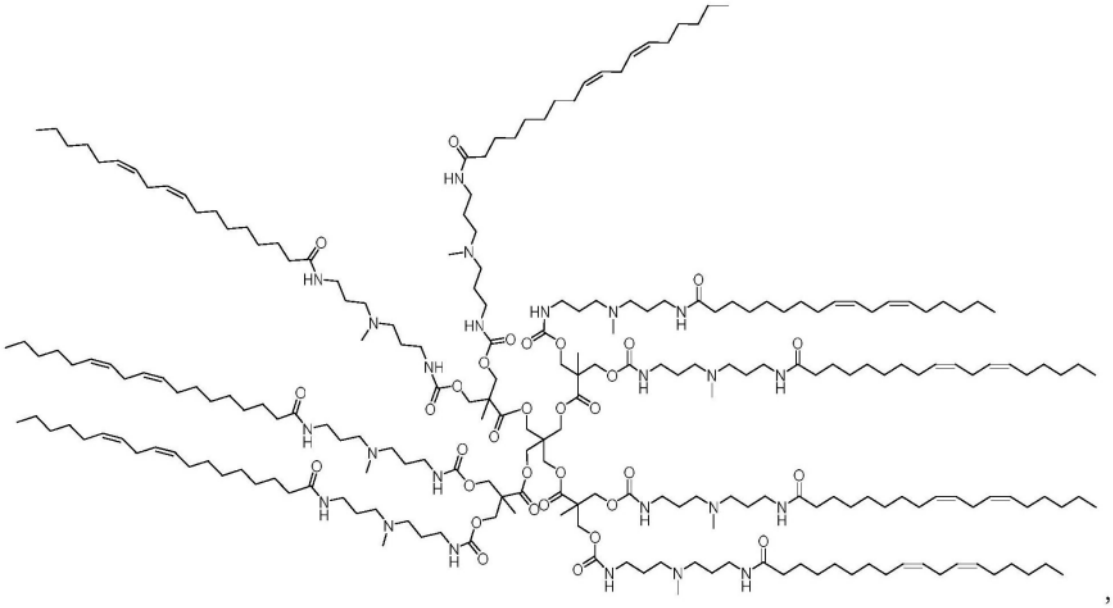
[0226] PE-4-棕榈酸

[0227] 

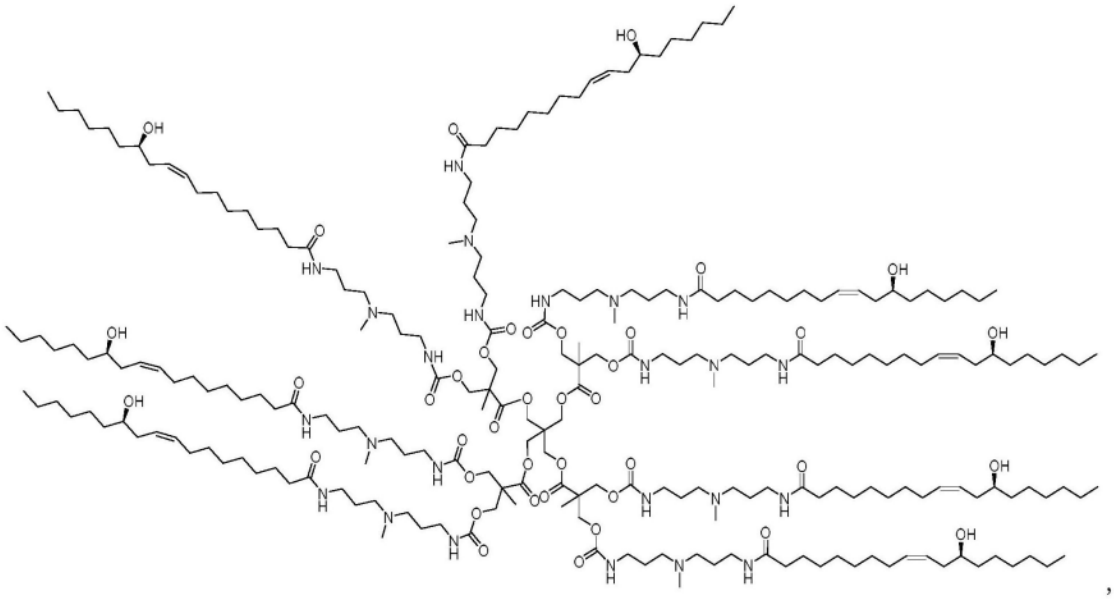
[0228] PE-4-12-羟基硬脂酸

[0229] 

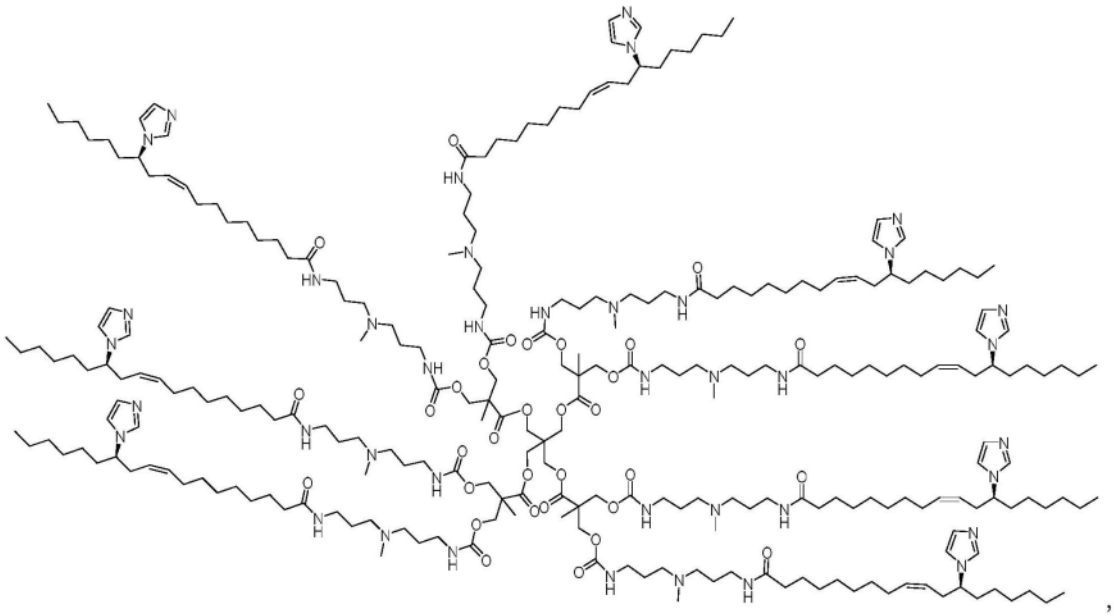
[0230] PE-4-油酸

[0231] 

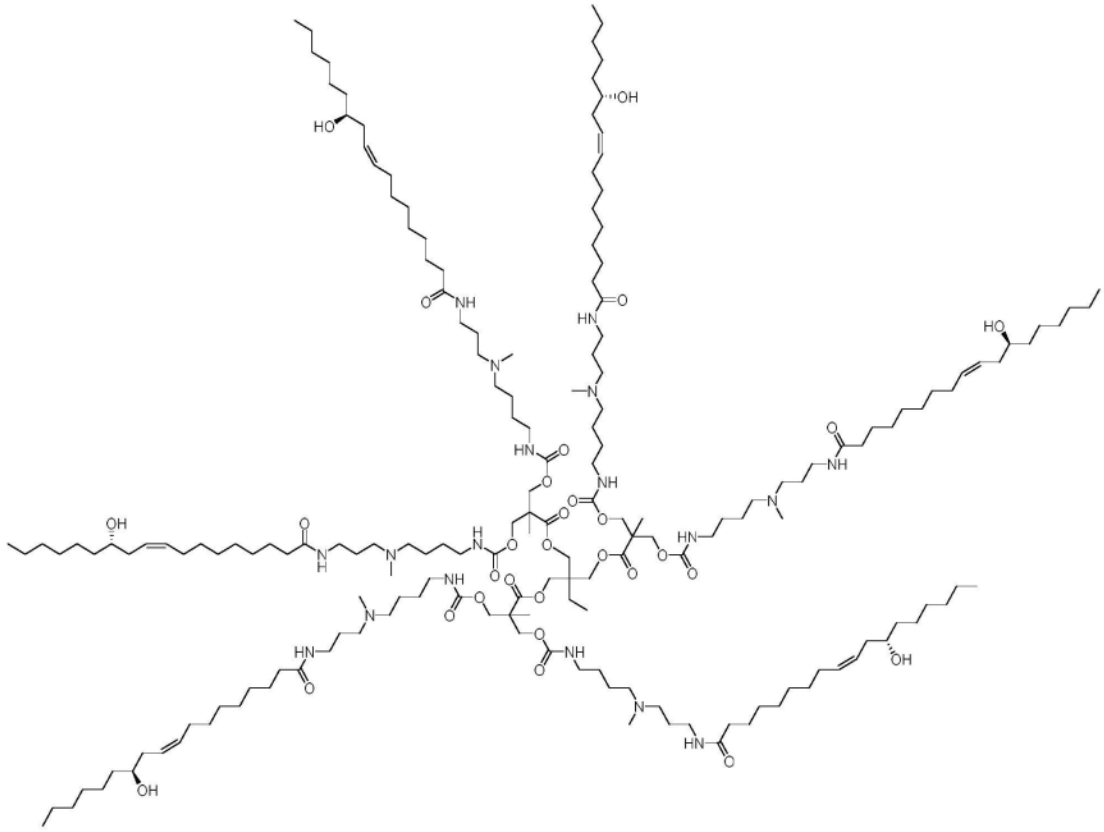
[0232] PE-4-亚油酸

[0233] 

[0234] PE-4-蓖麻油酸

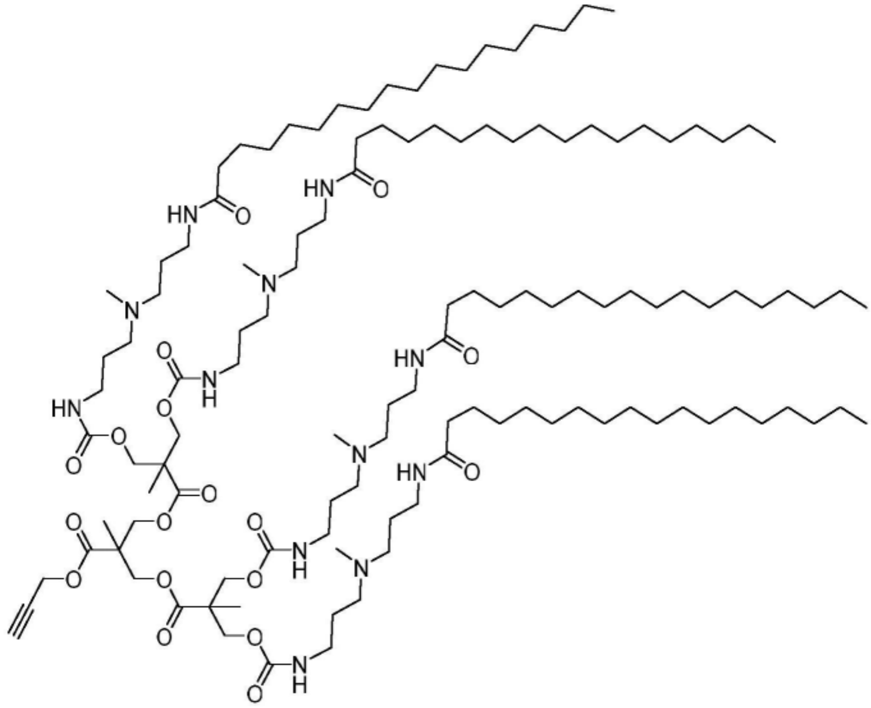
[0235] 

[0236] PE-4-咪唑基油酸

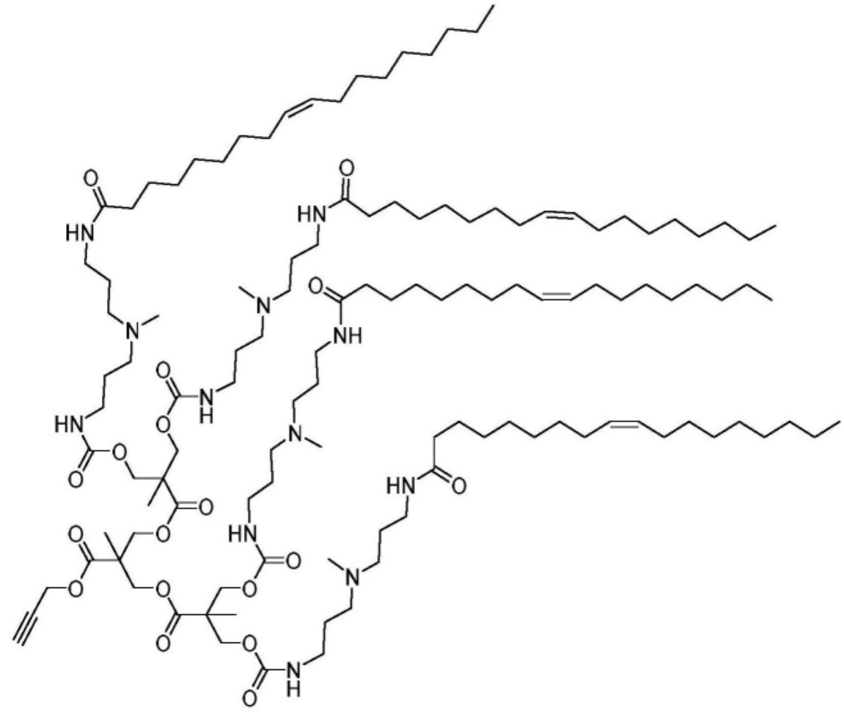
[0237] 

，

[0238] PE-A2-蓖麻油酸，

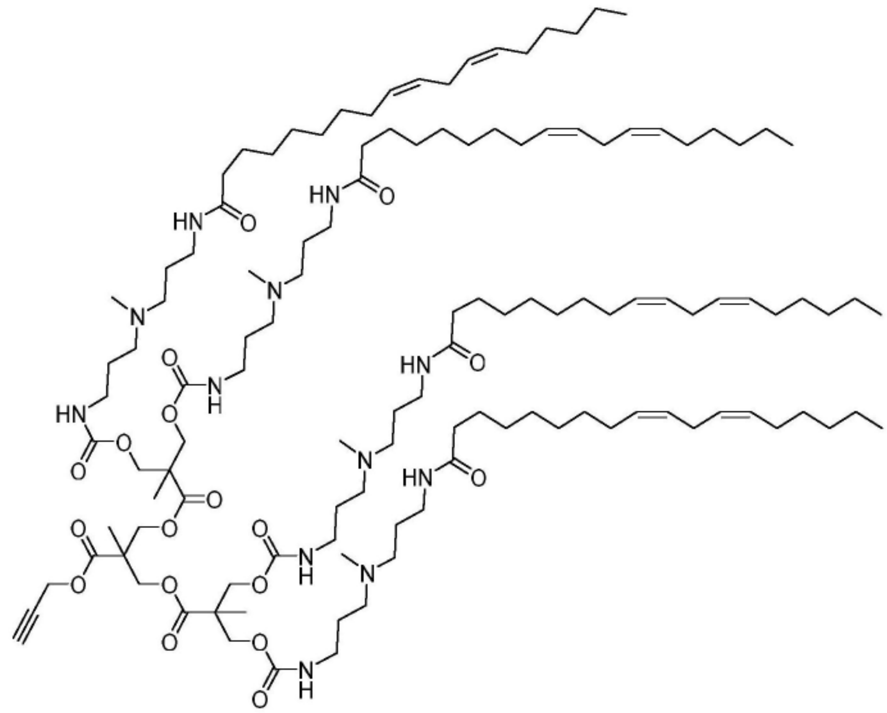
[0239] 

[0240] PE-树枝化基元-G2-A1-硬脂酸

[0241] 

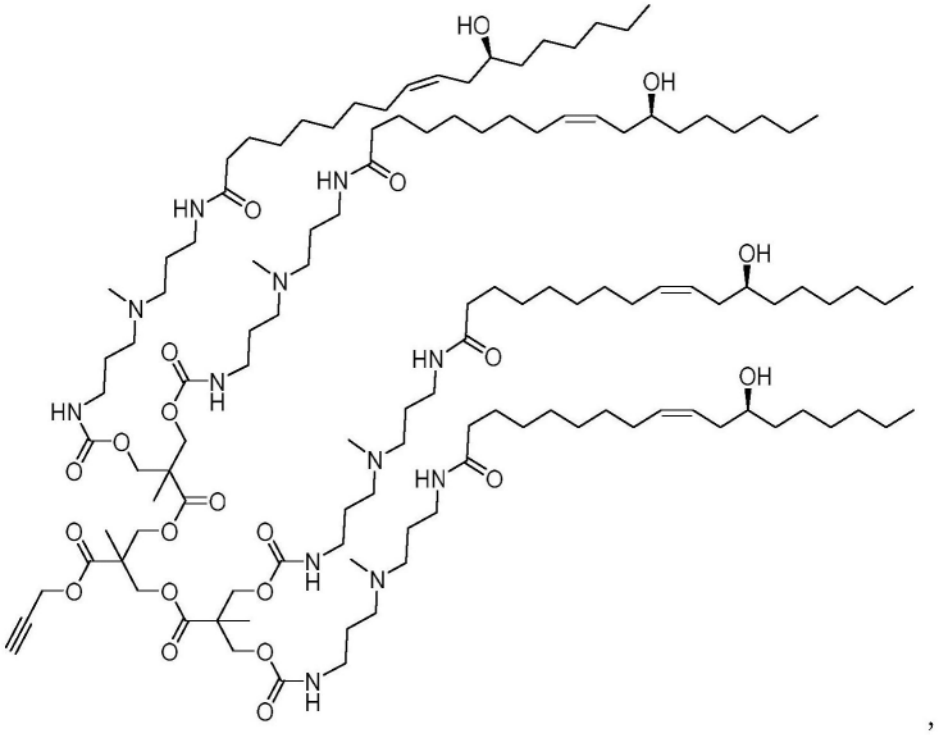
，

[0242] PE-树枝化基元-G2-A1-油酸

[0243] 

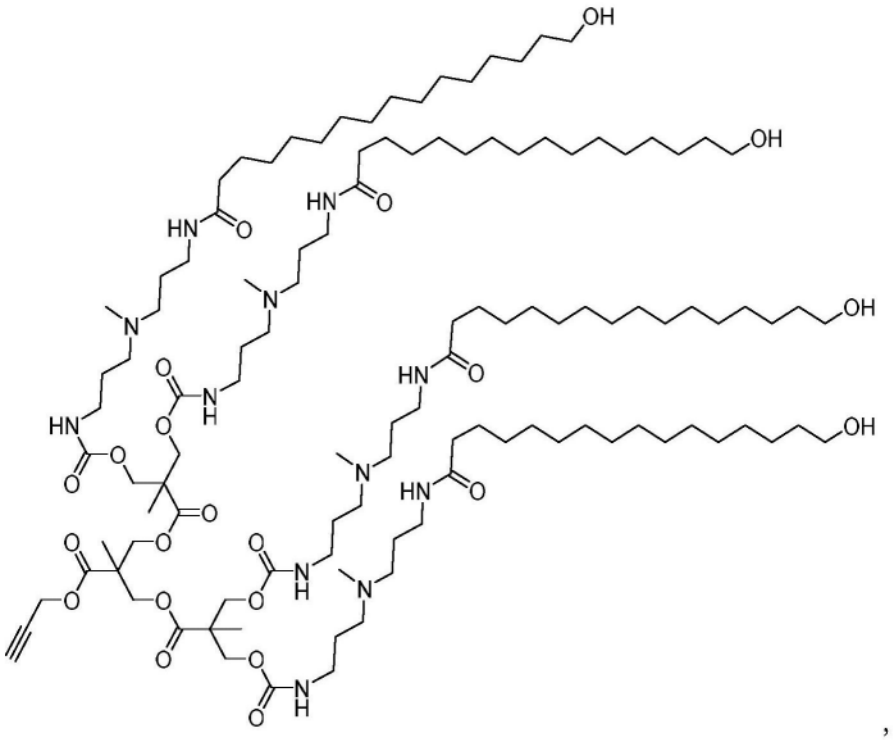
，

[0244] PE-树枝化基元-G2-A1-亚油酸

[0245] 

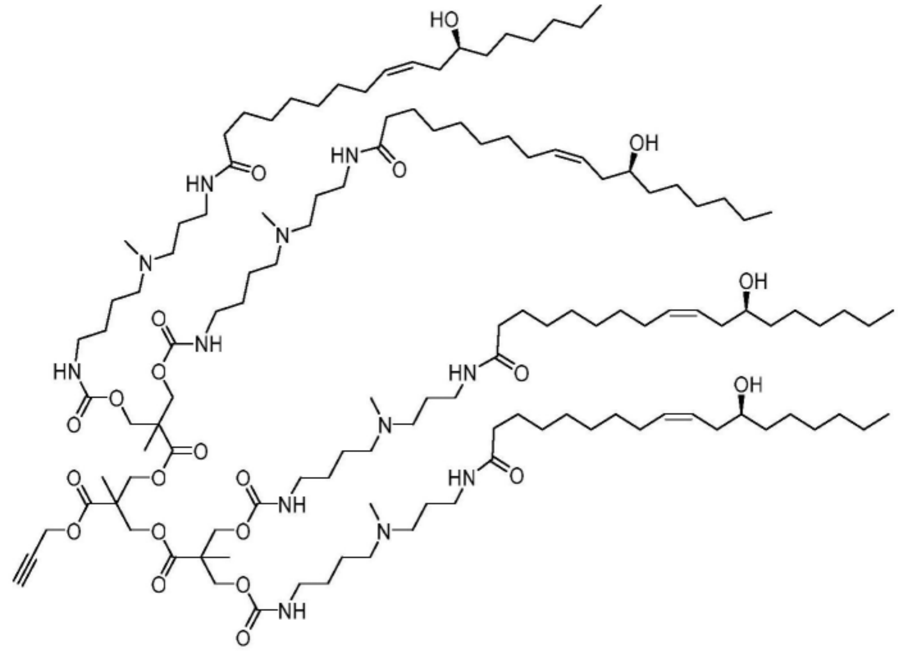
,

[0246] PE-树枝化基元-G2-A1-蓖麻油酸

[0247] 

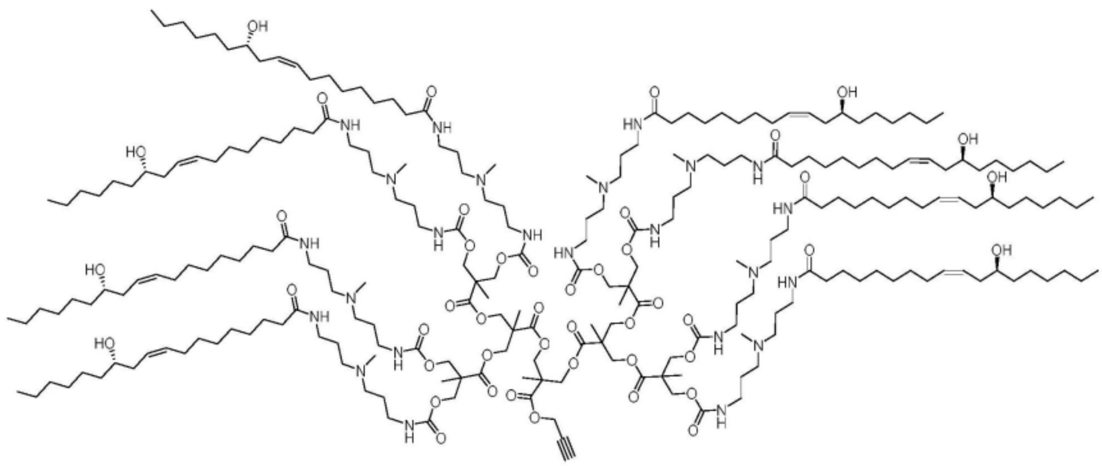
,

[0248] PE-树枝化基元-G2-A1-16-羟基棕榈酸

[0249] 

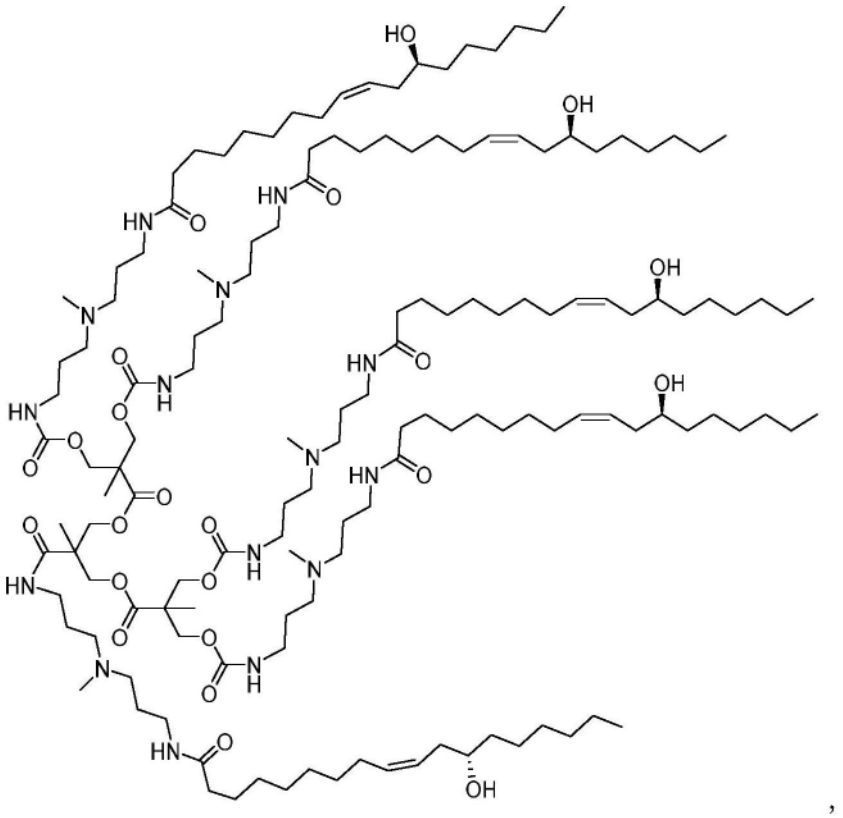
，

[0250] PE-树枝化基元-G2-A2-蓖麻油酸

[0251] 

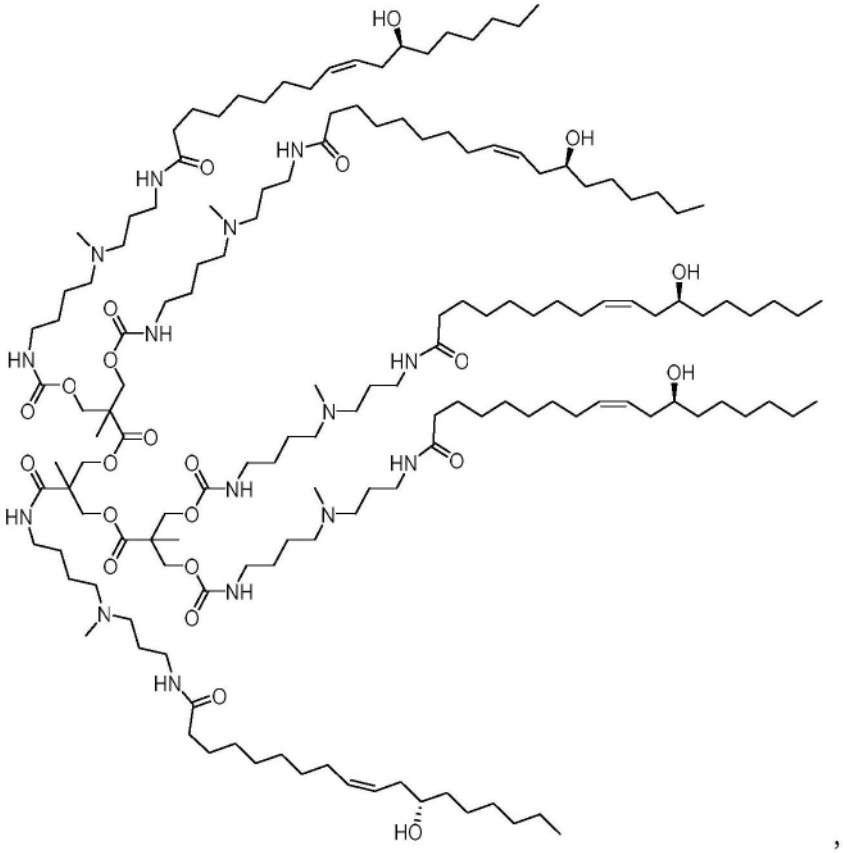
，

[0252] PE-树枝化基元-G3-A1-蓖麻油酸

[0253] 

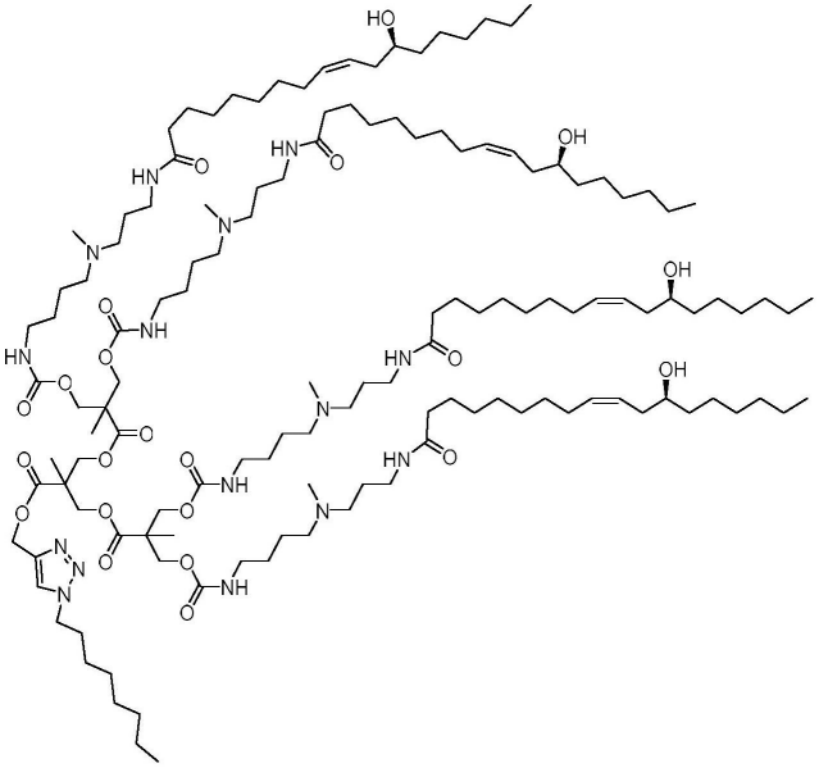
,

[0254] PE-树枝化基元-G2-5A1-5-蓖麻油酸

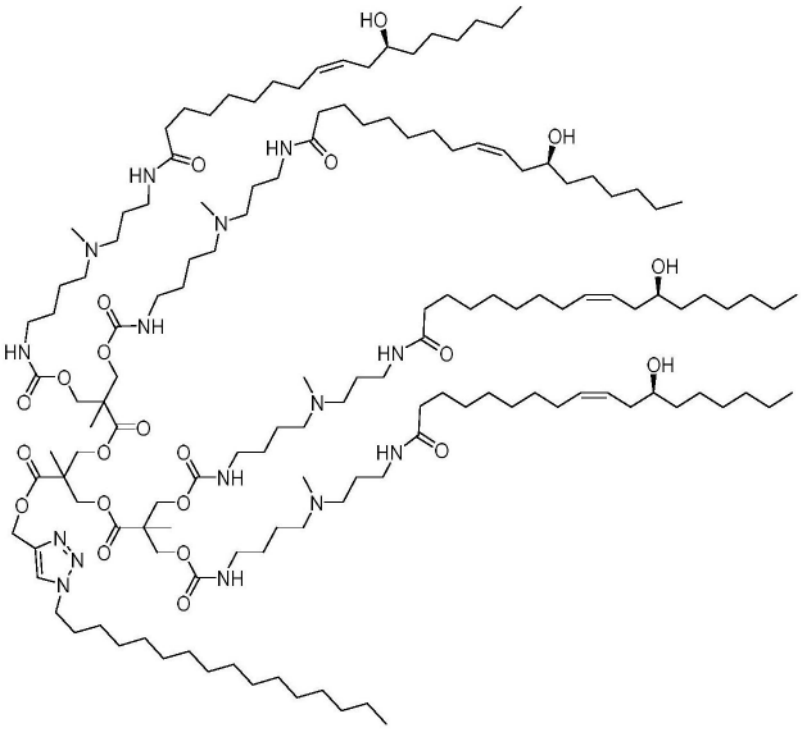
[0255] 

,

[0256] PE-树枝化基元-G2-5A2-5-蓖麻油酸

[0257] 

[0258] PE-树枝化基元-G2-辛基-A2-蓖麻油酸,或

[0259] 

[0260] PE-树枝化基元-G2-十六烷基-A2-蓖麻油酸

[0261] 实施例3.纳米颗粒制剂

[0262] 图2示出了用于制备设计用于改进自组装的纳米颗粒组合物的方法。通过将30μl含有修饰的树状聚合物(PE-硬脂酸)的乙醇相与1,2-二肉豆蔻酰基-sn-丙三基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](PEG-脂质,Avanti Polar Lipids)的组合与90μl用超纯、无DNase/RNase、无内毒素的蒸馏水(Invitrogen)和无菌100mM(pH 5.0)QB柠檬酸盐缓

冲液(Teknova)稀释至最终柠檬酸盐浓度为10mM的萤光素酶mRNA直接混合来配制纳米颗粒。所得纳米颗粒含有6:1:2质量比的修饰的树状聚合物、PEG-脂质和RNA。将制剂稀释1000倍以使用Zetasizer Nano ZS(Malvern Panalytical)分析粒度分布、Z-平均值和衍生的计数率。

[0263] 实施例4.流体动力学尺寸测量

[0264] 图3说明了纳米颗粒组合物的分布,其测量为基于纳米颗粒的尺寸(d.nm;直径,以nm计)的强度。参考图3,“Z平均值”是通过动态光散射(DLS)测量的粒子集合体的强度加权平均流体动力学尺寸。参照图3,对于尺寸为248.4d.nm的纳米颗粒,观察到最强的强度。

[0265] 实施例5.凝胶阻滞试验

[0266] 根据已知方法(Geall等人10.1073/pnas.1209367109,其通过引用并入本文,如同完整阐述),进行琼脂糖凝胶电泳以评价修饰的树枝状聚合物与RNA的结合。图4是显示修饰的树枝状聚合物与RNA的结合的琼脂糖凝胶照片。用溴化乙锭(EB)染色凝胶,并在Syngene G Box成像系统(Syngene,USA)上拍摄凝胶图像。参考图4,泳道1含有未配制的萤光素酶mRNA,泳道2含有PE-棕榈酸树枝状聚合物和萤光素酶mRNA的配制产物,泳道3含有PE-十七酸和萤光素酶mRNA的配制产物,泳道4含有PE-硬脂酸和萤光素酶mRNA的配制产物,泳道5含有PE-油酸和萤光素酶mRNA的配制产物,泳道6含有PE-亚油酸和萤光素酶mRNA的配制产物。在上样前,将样品与甲醛负载染料孵育,在65℃变性10分钟,并冷却至室温。凝胶在90V下运行,并在Syngene Box成像系统(Syngene,USA)上拍摄凝胶图像。对于RNA检测,凝胶用溴化乙锭染色。参照图4,下方的条带对应于小尺寸游离RNA(泳道1),上方的条带代表通过RNA与树枝状聚合物载体结合形成的大尺寸纳米颗粒。

[0267] 实施例6.材料稳定性

[0268] 聚酯树枝状聚合物构成独特的一类材料,因为它们由于酯键的水解敏感性而容易降解。然而,理想的核酸载体在制剂pH以及贮存pH下应该是稳定的。因此,在不同的pH下检查树枝状聚合物材料的稳定性。图5显示了树枝状聚合物在中性pH和pH 5下的LCMS色谱图,在室温下中性pH和pH 5下显示单峰(洗脱时间13.42分钟)的色谱图表明,当在pH 5下配制RNA时,聚酯树枝状聚合物结构应该是完整的。

[0269] 实施例7.含有用脂肪酸修饰的聚酯树枝状聚合物的纳米颗粒组合物的胶体稳定性

[0270] 通过比较配制后且在4℃下储存21天后的粒度分布与透析2小时后立即测量的粒度分布来确定纳米颗粒的稳定性。相同的聚酯树枝状聚合物在室温以及37℃下在PBS中显示良好的稳定性,而没有充分的聚集。图6A-6E显示了通过DLS和琼脂糖凝胶电泳测量的PBS中RNA-PE硬脂酸纳米颗粒的稳定性。图6A示出了透析后纳米颗粒组合物的分布,其测量为基于纳米颗粒尺寸(d)的强度。图6B显示了在4℃下储存3周后通过DLS测量的PE-硬脂酸PR8 HA mRNA的稳定性。图6C显示了在室温(RT)下储存3天后通过DLS测量的PE-硬脂酸PR8 HA mRNA的稳定性。图6D显示了在37℃下储存2小时后通过DLS测量的PE-硬脂酸PR8 HA mRNA的稳定性。图6E显示了基于凝胶保留试验的稳定性结果:泳道1-PR8 HA mRNA,泳道2-PE-硬脂酸PR8 HA mRNA,4℃,3周,泳道3-PE-硬脂酸PR8 HA mRNA,室温,3天,泳道4-PE-硬脂酸PR8 HA mRNA,37℃,1小时,以及泳道5-PE-硬脂酸PR8 HA mRNA,37℃,2小时。观察到粒度分布是相同的,表明了在这些储存条件下的稳定性。

[0271] 实施例8.基于细胞的萤光素酶mRNA表达分析。

[0272] 设计了萤光素酶cDNA表达盒,其由5'UTR、萤光素酶ORF、3'UTR和polyA尾组成。合成该表达盒,并通过GenScript将其克隆到pcDNA3.1载体中T7启动子下游的NheI/KpnI位点。衍生的表达载体用作通过基于T7的体外转录(Hongene,#ON-040)和痘苗加帽系统(Hongene,#ON-028)合成萤光素酶mRNA的DNA模板。在通过氯化锂沉淀纯化后,将萤光素酶mRNAs与聚酯树枝状聚合物配制以形成纳米颗粒用于进一步分析。从ATCC获得的RAW264.7(ATCC,TIB-71)和A549(ATCC,CCL-185)细胞按照ATCC建议的方案培养和维持。为了测试新配制的纳米颗粒将mRNA递送到哺乳动物细胞中导致蛋白质表达的能力,用50μl PBS中的50ng萤光素酶mRNA纳米颗粒/孔转染在96孔板中生长的RAW264.7或A549细胞单层。在37℃下培养1小时后,以每孔50μl加入生长培养基。在转染后的指定时间点,裂解细胞,并使用萤光素酶一步发光测定试剂盒(ThermoFisher,#88263)测量萤光素酶活性。图7A和7B显示了在基于修饰的聚酯树枝状聚合物的纳米颗粒中从递送到哺乳动物细胞中的萤光素酶mRNA在细胞培养物中的萤光素酶表达,并使用发光测定法通过定量细胞内萤光素酶活性来测量。图7A说明与裸萤光素酶mRNA相比,在含有PE-亚油酸、PE-硬脂酸、PE-棕榈酸的纳米颗粒中递送的萤光素酶mRNA的细胞培养物表达。图7B说明与裸萤光素酶mRNA相比,在含有PE-十七酸、PE-硬脂酸、PE-油酸和PE-16-羟基棕榈酸的纳米颗粒中递送的萤光素酶mRNA的细胞培养物表达。参考这些图,观察到所有的RNA纳米颗粒都能够被RAW264.7细胞摄取,导致基因表达。

[0273] 实施例9.HA表达的蛋白质印迹分析

[0274] 合成流感HA表达盒并将其克隆到T7启动子下游的pcDNA3.1载体中,所述流感HA表达盒由侧翼为5'UTR和3'UTR,随后为polyA尾的全长HA ORF(PR8 HA)组成。HA表达载体用作DNA模板,通过体外T7转录(Hongene,#ON-040)和痘苗加帽系统(Hongene,#ON-028)合成HA mRNA。在通过氯化锂沉淀纯化后,将HA mRNA配制成基于树枝状聚合物的纳米颗粒。对于蛋白质印迹分析,用1ml PBS中每孔2μg HA mRNA纳米颗粒转染生长在12孔板中的A549细胞。在37℃下培养1小时后,向每个孔中加入1ml生长培养基。转染后24小时,收集细胞,并根据制造商的方案用RIPA缓冲液(Biovision,#2114)裂解。将细胞裂解物与Laemmli样品缓冲液混合,通过SDS-PAGE(10% Bis-Tris Plus凝胶,ThermoFisher,#NW00100BOX)分析,并电印迹到PVDF转移膜(ThermoFisher,#IB24002)上。在5%脱脂奶粉和0.1%吐温-20的PBS溶液中封闭过夜后,将膜与在相同缓冲液中稀释的流感A病毒H1N1 HA抗体(GeneTex,#GTX127357)在室温下温育1小时。图8显示HA表达的蛋白质印迹分析。使用与HRP(ThermoFisher,#A12172)缀合的羊抗兔IgG(H+L)第二抗体和化学发光检测系统(ProSignal®Femto ECL试剂,Promethyeus#20-302),在Chemi-XRS系统(SynGene)上观察HA蛋白(图8,箭头所示)。参考图8,观察到一些RNA纳米颗粒能够被A549细胞吸收,导致基因表达。

[0275] 实施例10.血凝素抑制试验(HAI)

[0276] 根据标准推荐的WHO方案[世界卫生组织.(2002)WHO关于动物流感诊断和监测的手册2002.5Rev.1.2002],对接种疫苗的动物血清进行HAI试验。将血清用受体破坏酶(Denka Seiken有限公司,东京,日本)在37℃处理过夜,然后在56℃热灭活30分钟,在冷却至室温后,将这些血清样品与2体积的25%火鸡红细胞(RBC,Rockland Immunochemicals)

悬浮液混合，并在室温下温育2小时，随后离心除去RBC。将处理过的血清(现在认为是1:10稀释)连续稀释，并与4HA单位的灭活甲型流感病毒(PR/8/34，Virusys#IAV210)在室温下孵育30分钟。向每个孔中加入等体积的0.5％火鸡RBC并在室温下孵育30分钟。HAI滴度被记录为完全抑制血细胞凝集的血清最高稀释度。

[0277] 在初次接种后，在用5μg使用PE-油酸配制的纳米颗粒疫苗免疫的HA mRNA组中观察到通过HI滴度测量的体液免疫应答(图9)。在第4周，该组的平均HI滴度为40，用相同疫苗剂量加强免疫一周后，在第5周，平均HI滴度继续升高到192。这与用裸mRNA免疫的组相反，在裸mRNA免疫的组中HI滴度在所有时间点都保持在基线10。

[0278] 实施例11.含有DNA的纳米颗粒组合物

[0279] 通过将SEAP序列克隆到pcDNA3质粒中产生SEAP DNA。该质粒含有在细菌培养物中维持和增殖所必需的复制起点和氨苄青霉素抗性基因、在基因克隆位点上游以驱动在组织培养物中的哺乳动物细胞中表达的哺乳动物CMV启动子、以及在CMV启动子下游以允许编码以BspQI限制性位点终止的克隆遗传序列的mRNA体外转录的噬菌体T7转录启动子。使用In-Fusion(Clontech实验室)克隆试剂盒从商业来源的DNA片段构建质粒。

[0280] 通过将20μL含有修饰的树枝状聚合物(PE-亚油酸)的乙醇相与1,2-二肉豆蔻酰基-sn-丙三基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](PEG-脂质，Avanti Polar Lipids)的组合与60μL用超纯、无DNAase/RNase、无内毒素的蒸馏水(Invitrogen)和无菌100mM(pH 5.0)QB柠檬酸盐缓冲液(Teknova)稀释至10mM的最终柠檬酸盐浓度和0.38mg/mL的最终DNA浓度的SEAP DNA的直接混合物配制PE-亚油酸-SEAP DNA纳米颗粒。乙醇和柠檬酸盐流以1:3的乙醇体积与柠檬酸盐体积比混合以产生纳米颗粒。所得纳米颗粒含有6:1:2质量比的修饰的树状聚合物、PEG-脂质和DNA。将制剂稀释1000倍以使用Zetasizer Nano ZS(Malvern Panalytical)分析粒度分布、Z-平均值和衍生的计数率。

[0281] 图10示出了由PE-亚油酸修饰的树状聚合物和SEAP DNA的混合物产生的纳米颗粒的粒度分布。

[0282] 表1.含有修饰的树状聚合物和SEAP DNA的纳米颗粒的DLS分析

[0283]

样品名称	Z-平均值(d.nm)	多分散指数(PdI)	Y形截距	衍生计数率(kcps)
PE-亚油酸	324.4	0.130	0.821	206.6

[0284] 为了测试这些纳米颗粒在体外表达SEAP的能力，用纳米颗粒处理293T细胞。用10μL(约0.25μg)的每种制剂产品处理293Ts的96孔盘的每个孔，每个制剂产品用1:10ptimem:PBS混合液稀释至200μL的最终体积。未处理的孔具有200μL的50/50PBS/OptiMEM。处理或转染后二十四小时，从每个培养物中收集经处理的培养基。使用QuantiBlue分析(InvivoGen)分析培养基。将180μL QuantiBlue试剂与50μL来自孔的培养基混合。40分钟后通过按照制造商的方案指示测量650nm处的吸光度进行读数。对于无处理阴性对照，将50μL来自未用纳米颗粒处理的孔的培养基加入180μL QuantiBlue试剂中。在测定的所有步骤中，以与所有其它样品相同的方式处理这些样品。

[0285] 图11说明了用于处理293T细胞的具有修饰的树枝状大分子的纳米颗粒制剂的体外SEAP表达。用PE-十七烷酸、PE-油酸和PE-亚油酸生产的纳米颗粒配制的SEAP DNA，其引

起了SEAP表达。

[0286] 实施例12.包含用脂肪酸修饰的聚酯树枝基元的纳米颗粒组合物

[0287] 含有修饰为在其末端包括脂肪酸尾的PE树枝状聚合物的纳米颗粒(例如摩尔比为1:0.5:2.4:0.035的PE树枝化基元_G2-A1-蓖麻油酸:DSPC:胆固醇:DMG-PEG2k),使用NanoAssemblBenchtp(Precision NanoSystems Inc,Vancouver,BC,Canada)配制。用无DNase/RNase的、无内毒素的蒸馏水和无菌柠檬酸盐缓冲液将RNA稀释至最终所需的pH。在超净工作台(Benchtop)上配制时,在水相与有机相的比例为3:1的条件下,总流速保持在每分钟12mL。使用玻璃器皿在1.0M NaOH中洗涤24小时以去除内毒素,并在蒸汽高压灭菌器中灭菌,或通过在250℃下加热24小时而去除热原,使用20,000分子量截留透析,用无菌、无内毒素的PBS对纳米颗粒透析。使用0.2微米聚(醚砜)过滤器无菌过滤透析的纳米颗粒,并用Zetasizer NanoZS机器(Malvern)表征。由具有低多分散指数的单峰表征尺寸分布,表明相对单分散的尺寸。使用Ribogreen®试验(Geall等人10.1073/pnas.1209367109,其通过引用并入本文,如同完全列出)测量含有PE树枝化基元_G2-A1-蓖麻油酸和SEAP复制子RNA(在pH 5配制)的纳米颗粒组合物的包封率为95%。

[0288] 为了测试修饰的PE树枝状聚合物的制剂,使用分泌的胚胎碱性磷酸酶SEAP报道系统。对于体内试验,给小鼠注射5μg SEAP复制子RNA剂量的纳米颗粒,16小时后,从小鼠中收集血清。使用Invitrogen NovaBright™Phosha-Light™EXP测定试剂盒根据制造商的方案进行SEAP检测来定量分析的量。如在BioTek Synergy HTX微量培养板读数器中测量的,小鼠血清样品中SEAP的量以任意单位报道。误差棒为±标准误差。参见图12,观察到与pH 4.0相比,SEAP量在pH 5.0制剂中更高,因为RNA由于较弱的结合而更快地从pH 5.0制剂中释放。

[0289] 实施例13.刺突表达的蛋白质印迹分析

[0290] 使用实施例12中描述的方法,用由聚酯树枝化基元和树枝状聚合物分子配制的刺突复制子RNA处理12孔培养皿中～80%融合率的BHK细胞。除去培养基,用5μg纳米颗粒处理细胞。细胞在37℃培养过夜,处理～16小时后刮取收获。将细胞颗粒在13000rpm离心3分钟,并重新悬浮于100μL RIPA(补充有HALT™蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物和Pierce™通用核酸酶),随后加入25μL 6X SDS Laemmli缓冲液。将样品煮沸10分钟并离心以除去颗粒。将20μL各样品在10孔Bolt Bis-Tris SDS-PAGE凝胶上电泳分离。包括来自先前已验证过刺突表达的不相关实验的样品作为阳性对照。使用iBlot2干转移系统将蛋白质从凝胶转移至PVDF膜。转移后,用TBST+10%牛奶封闭膜30分钟,然后加入在TBST+10%牛奶中1:1000稀释的兔抗刺突抗体。将膜在室温下温育45分钟,然后用TBST洗涤三次。然后将膜在TBST+10%牛奶中与1:2000稀释的羊抗兔HRP抗体一起温育30分钟。用TBST洗涤该膜三次,然后用Promethyus™ProSignal™Dura化学发光底物显色。使用GeneSys成像系统使化学发光反应可视化。参考图13,观察到使用PE树枝化基元_G2-A1-蓖麻油酸配制的RNA纳米颗粒能够被BHK细胞吸收,导致基因表达。

[0291] 实施例14.COVID-19刺突三聚体的直接血清ELISA

[0292] 使用实施例12中描述的方法,通过在腿部肌肉中双侧IM注射10μg用PE树枝化基元-G2-蓖麻油酸配制的刺突复制子RNA接种小鼠(BALB/c)。(总体积100μL PBS中)。注射后21天和28天对小鼠放血,通过在10000RCF离心凝固的样品1.5分钟从全血分离血清。通过直

接ELISA测定该血清的抗刺突抗体滴度。Nunc MaxiSorp ELISA板用pH 9.5的含有重组刺突三聚体蛋白质的碳酸氢盐包被缓冲液在4℃包被过夜。孔用PBS+1％ BSA封闭，然后将血清加入到孔中，以1:100开始稀释，并用在PBS+1％ BSA中的1:2系列溶液直至1:12800。将样品于室温温育1小时，用PBST洗涤3次，然后以1:3000的比例在PBS+1％ BSA中加入山羊抗鼠IgG HRP并温育1小时。再次用PBST洗涤平板5次，并使用显色HRP底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色。通过加入H_2SO_4终止反应，并在450nm和570nm测量吸光度。终点滴度被指定为最高稀释度，在该最高稀释度下在450的吸光度-在570的吸光度的值≥0.08。在第3周，用10μg使用PE树枝化基元G2-A1-蓖麻油酸配制的纳米颗粒疫苗免疫的组(图14)的终点稀释滴度为512-1024，在第4周继续升高至平均超过2048。这与未免疫的血清阴性组相反，其中在所有时间点滴度均保持在100的基线。

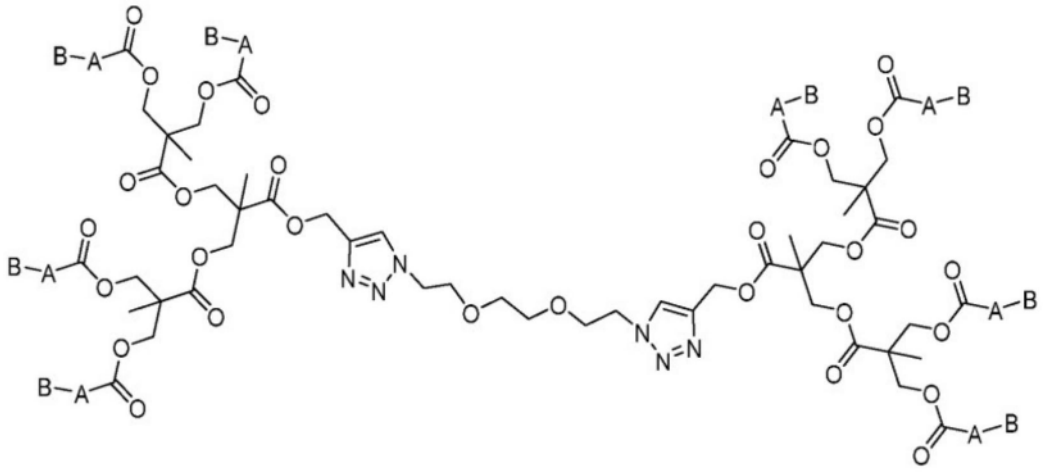
[0293] 实施例15.心脏和脾脏组织的RNA递送

[0294] 每个实验组六只BALB/c小鼠通过静脉注射施用所示的编码荧光素酶报道基因的复制子RNA的纳米颗粒制剂。对于DlinMC$_3$DMA LNP对照制剂，注射31.4μg RNA，对于PE树枝化基元G2-5A2-5蓖麻油酸制剂，注射7.2μg RNA。在注射后6、16和42小时，处死两只小鼠，取出心脏和脾脏并保存在液氮中，直到收集所有时间点。为了定量分离的心脏和脾脏中荧光素酶基因的表达，使用VWR®Mini Bead Mill匀浆器将每个完整器官在1ml PBS中匀浆30秒，并将原始匀浆在4℃16000RCF下离心10分钟。离心后，将150μL的每种上清液(澄清的匀浆)样品置于白壁96孔测定板中，并加入150μL的Pierce™Firefly Luc One-Step Glow Assay试剂。在BioTek Synergy HTX微量培养板读数器中测量来自每个孔的相对光单位(RLU)。背景信号值定义为未接受RNA注射的相同基因型和年龄的对照小鼠的器官测量的RLU。成像数据显示静脉内注射的纳米颗粒在心脏和脾脏中的高萤光素酶表达(图15)。

[0295] 实施例16.含有式Ib的核酸载体的纳米颗粒组合物：

[0296] 树枝状-线性嵌段共聚物是通常为线性链的杂化物，其用树枝状链段末端官能化。几组报道了用于递送杂化结构的适宜合成方法，所述杂化结构以优异的产率获得并且含有双-MPA树枝状部分(PE)和线性聚合物(P)。这些基于PEG的杂交体已经通过CuAAC点击化学法成功构建。对于这些材料，含有PEG端基的初级叠氮基中间体用于向树枝化基元的会聚偶联反应，所述树枝化基元在核中包含互补的单击基团。这些杂交体的代表性结构如下所示。

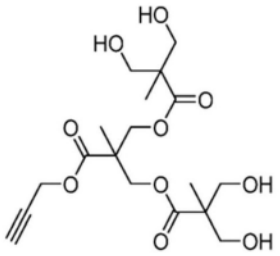
[0297]



[0298] A是胺连接基，B是疏水单元，PEG 200是连接两个聚酯树枝基元的连接基。

[0299] (PE树枝化基元G2 A1蓖麻油酸)2PEG 200的合成的实例如下。

[0300]



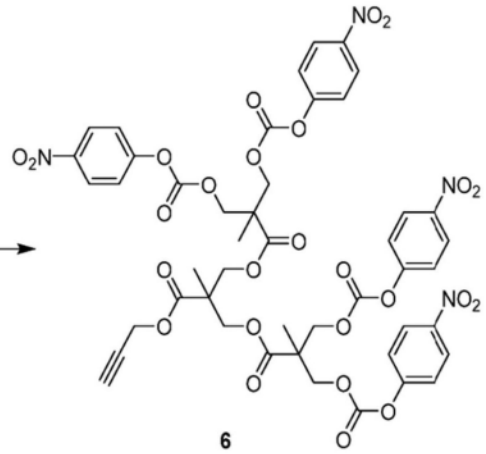
化学式：$C_{18}H_{28}O_{10}$

分子量：404.41

PE-G2-乙炔-OH

4-硝基苯基氯甲酸酯

吡啶，室温，过夜

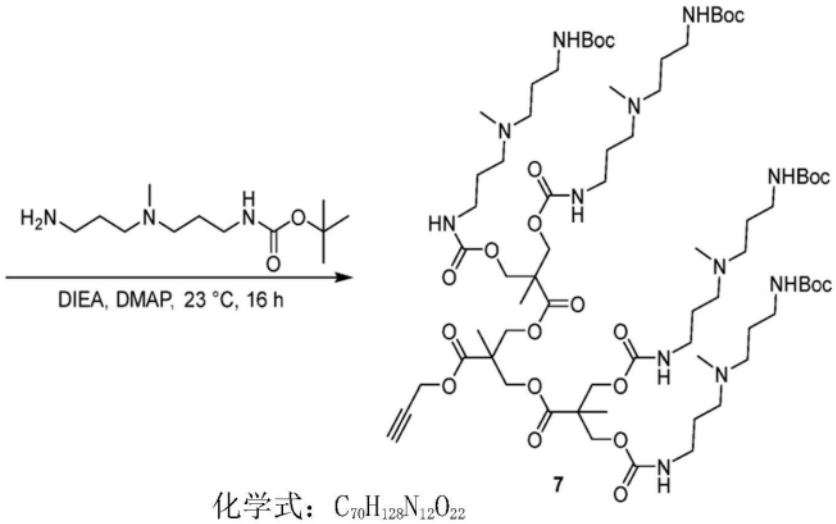


6

化学式：$C_{46}H_{40}N_4O_{26}$

分子量：1064.83

[以下将继续显示合成]

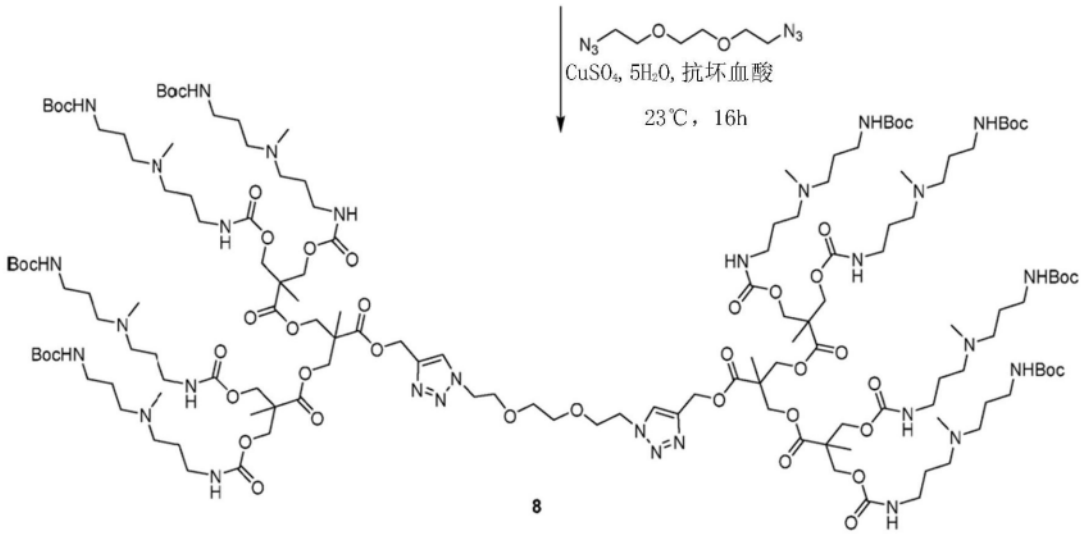


化学式：$C_{70}H_{128}N_{12}O_{22}$

分子量：1489.86

[以下将继续显示合成]

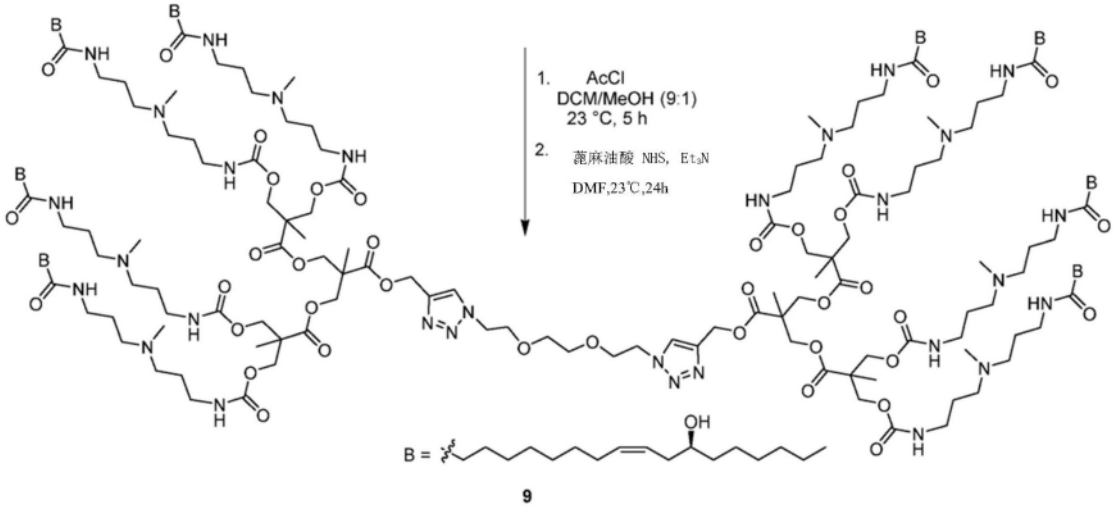
[0301]



化学式：$C_{146}H_{268}N_{30}O_{46}$

分子量：3179.91

[以下将继续显示合成]

[0302] 

9

[0303] 化合物6:将起始原料PE树枝状基元G2乙炔-OH(300mg,0.62mmol)溶解在无水DCM(6mL)中,加入吡啶(0.9mL,4.96mmol),随后加入溶解在无水DCM(15mL)中的对硝基苯基氯甲酸酯(2.1g,10mmol),将反应混合物在0℃至23℃搅拌16小时,次日TLC显示产物形成。用1.33M $NaHSO_4$稀释反应混合物,用EtOAc萃取。有机层用盐水洗涤,在Rotavap中蒸发。然后将粗产物通过快速色谱法用DCM/EtOAc纯化。化合物在45% EtOAc(Rf=0.9,在1:9EtOAc/DCM中)开始洗脱,得到所需产物,为淡黄色油状物(553mg,70%)。

[0304] 化合物7:将化合物6(438mg,0.41mmol)的无水DCM(6mL)溶液加入到过量的单-Boc-DAPMA(0.45mL,1.64mmol)的无水DCM(6mL)溶液中。加入DMAP(100mg,0.82mmol)和DIPEA(0.29mL,1.64mmol)的无水DCM(1mL)溶液,将反应混合物在23℃和氩气气氛下搅拌16小时。TLC证实反应完成。将粗产物在Rotavap中减压浓缩,并通过快速色谱法在硅胶柱上纯化,用100% CH_2Cl_2(流动相a)至75:22:3CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OHaq(体积,流动相b)梯度洗脱40分钟以上。所需产物用45%流动相b洗脱。(在1:1流动相a/流动相b中Rf=0.4)以产生所需产物,为浅黄色油(404mg,66%)。1H NMR(301MHz,CHLOROFORM-d)δppm1.10-1.27(m,9H)1.33-1.43(m,36H)1.52-1.65(m,15H)2.08-2.16(m,12H)2.26-2.37(m,16H)2.51-2.54(m,1H)3.02-3.20(m,15H)3.36-3.42(m,3H)4.01-4.26(m,10H)4.66-4.70(m,2H)5.24-5.27(m,3H)5.28-5.39(m,3H)5.88-5.97(m,3H)。

[0305] 化合物8:将PEG-200-叠氮化物(MW:200,11.4mg,57μmol)置于50mL RBF中,然后将溶解于THF(0.6mL)中的化合物7(MW:1490,170mg,114μmol)与$CuSO_4 \cdot 5H_2O$(3mg,11.4μmol,10mol%,MW 249.69)和抗坏血酸钠(4.5mg,22.8μmol,20mol%,MW 198.11)一起加入,并脱气THF:H_2O(2mL,1:1),将反应混合物在23℃搅拌16小时。第二天TLC证实反应完成。反应混合物用硅胶柱快速色谱法纯化,用100% CH_2Cl_2(流动相a)至75:22:3CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OHaq(体积,流动相b)梯度洗脱40分钟以上。所需产物用76%流动相b洗脱。(Rf=0.65,在75:22:3CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OHaq中),得到所需产物,为黄色油状物(71mg,20%)。MS(ESI)计算$C_{146}H_{268}N_{30}O_{46}$[M+4H]4+m/z 795.5,实测值794.9;[M+3H]3+m/z1059.96,实测值1060.2。

[0306] 化合物9:将70mg化合物8(0.022mmol)溶于3ml MeOH后用20eq AcCl(0.03ml,0.44mmol)处理,将反应物在23℃搅拌5小时,蒸发至干,溶于2ml DMF,加入0.06ml Et_3N(0.44mmol),随后加入104mg溶于2ml DMF的蓖麻油酸-NHS(按照公开的方案合成:Talukder等,公开号WO/2020/132196,其在此引入作为参考,如同完全阐明一样)。将反应混合物于23

℃搅拌24小时，经硅胶柱快速层析纯化，用100％ CH_2Cl_2(流动相a)到75:22:3CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OHaq(体积为流动相b)梯度洗脱40分钟。所需产物用55％流动相b洗脱。(Rf＝0.85(70:24:6CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OHaq)，得到所需产物，为黄色油状物(60mg，43％)：1H NMR(301MHz，CHLOROFORM-d)δppm 0.72-1.00(m,28H)，1.03-1.22(m,26H)，1.22-1.46(m,148H)，1.51-1.59(m,13H)，1.91-2.07(m,20H)2.08-2.25(m,60H)2.30-2.46(m,33H)3.11-3.34(m,33H)3.45(s,3H)3.52-3.72(m,17H)3.87(br s,4H)3.98-4.32(m,25H)4.54(br s,3H)5.22(s,3H)5.38-5.58(m,16H)6.12-6.36(m,7H)6.86(br s,7H)7.83(s,2H)。

[0307] 含有式Ib核酸载体的纳米颗粒(例如摩尔比为1:0.5:2.4:0.035的[PE树枝状基元G2-A1-蓖麻油酸]2PEG 200:DSPC:胆固醇:DMG-PEG2k)，使用NanoAssemblr Benchtp(Precision NanoSystems Inc,Vancouver,BC,Canada)配制成的。用无DNase/RNase的、无内毒素的蒸馏水和无菌柠檬酸盐缓冲液将RNA稀释至最终所需的pH。在超净工作台上配制时，在水相与有机相的比例为3:1的条件下，总流速保持在每分钟12mL。使用玻璃器皿在1.0M NaOH中洗涤24小时以去除内毒素，并在蒸汽高压灭菌器中灭菌，或通过在250℃下加热24小时而去除热原，用无菌、无内毒素的PBS透析纳米颗粒，使用20,000的截留分子量。使用0.2微米聚(醚砜)过滤器无菌过滤透析的纳米颗粒，并用Zetasizer NanoZS机器(Malvern)表征。尺寸分布的特征在于具有低多分散指数的单峰，表明相对单分散的尺寸(图16)。

[0308] 为了测试(PE树枝化基元G2-A1-蓖麻油酸)2PEG 200的制剂，使用分泌的胚胎碱性磷酸酶SEAP报道系统。对于体内试验，给小鼠注射剂量为2.5μg SEAP复制子RNA的纳米颗粒，1天、3天、5天和7天后，从小鼠收集血清。使用Invitrogen NovaBright™Phosha-Light™EXP测定试剂盒根据制造商的方案进行SEAP检测来定量分析的量。如在BioTek Synergy HTX微量培养板读数器中测量的，小鼠血清样品中SEAP的量以任意单位报道。误差棒为±标准误差，参见图17，观察到二聚体(PE树枝化基元G2-A1-蓖麻油酸)2PEG 200的SEAP量比单体PE树枝化基元_G2-A1-蓖麻油酸的SEAP量高。

[0309] 实施例17.纳米颗粒组合物的示踪

[0310] 为了促进在体外和体内跟踪递送材料，修饰的树枝状聚合物可具有含有碳(C)或氢(H)的稳定同位素如^{13}C或^{2}H的核。当将修饰的树枝状聚合物与核酸例如复制子RNA一起配制成纳米颗粒时，可通过任何已知的技术例如质谱法或核磁共振成像在施用后在体外和体内跟踪它们。稳定同位素的包含使得递送分子的鉴定更容易，因为它们变得不同于主要在组织中发现的丰富的^{12}C和^{1}H同位素。跟踪可用于识别纳米颗粒在施用后的生物分布、材料清除和分子稳定性以及相关问题。

[0311] 参考文献：

[0312] 本申请中引用的参考文献被并入本文和参考文献中，以用于所有显而易见的目的，如同每个参考文献都被充分阐述一样。为了说明，本文在特定位置引用了这些参考文献中的特定参考文献。在特定位置引用参考文献表示引用参考文献的教导的方式。然而，在特定位置引用参考文献并不限制引用参考文献的所有教导出于所有目的结合的方式。

[0313] (1)(a)Jones,C.H.,Chen,C.-K.,Ravikrishnan,A.,Rane,S.,and Pfeifer,B.A.(2013)Overcoming nonviral gene delivery barriers:perspective and future.Mol.Pharmaceutics 10,4082-4098.(b)Gomes,C.P.,Lopes,C.D.F.,Moreno,

P.M.D.,Varela-Moreira,A.,Alonso,M.J.,and Pêgo,A.P.(2014)Translating chitosan to clinical delivery of nucleic acid-based drugs.MRS Bull.39,60-70.(c)Mendes,L.P.,Pan,J.,Torchilin,V.P.(2017)Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy.Molecules 22(9),1401.

[0314] (2)Nishikawa,M.,and Huang,L.(2001)Nonviral vectors in the new millennium:delivery barriers in gene transfer.Hum.Gene Ther.12,861-870

[0315] (3)Dufes,C.,Uchegbu,I.,and Schatzlein,A.(2005)Dendrimers in gene delivery.Adv.Drug Delivery Rev.57,2177-2202.

[0316] (4)Clare,E.T.,Anja,E.,and Mark,A.K.(2003)Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy.Nat.Rev.Genet.4,346-358.

[0317] (5)Mintzer,M.A.,and Simanek,E.E.(2009)Nonviral Vectors for Gene Delivery.Chem.Rev.109,259-302.

[0318] (6)Mintzer,M.A.,and Grinstaff,M.W.(2010)Biomedical applications of dendrimers:a tutorial.Chem.Soc.Rev.40,173-190.

[0319] (7)(a)Raviña,M.,de la Fuente,M.,Correa,J.,Sousa-Herves,A.,Pinto,J.,Fernandez-Megia,E.,Riguera,R.,Sanchez,A.,and Alonso,M.J.(2010)Core-shell dendriplexes with sterically induced stoichiometry for gene delivery.Macromolecules 43,6953-6961.

[0320] (b)Nouri,A.,Castro,R.,Kairys,V.,Santos,J.L.,Rodrigues,J.,Li,Y.,and Tomás,H.(2012)Insight into the role of N,N-dimethylaminoethyl methacrylate(DMAEMA)conjugation onto poly(ethylenimine):cell viability and gene transfection studies.J.Mater.Sci.Mater.Med.23,2967-2980.

[0321] (c)Pandita,D.,Santos,J.L.,Rodrigues,J.,Pêgo,A.P.,Granja,P.L.,and Tomás,H.(2011)Gene delivery into mesenchymal stem cells:a biomimetic approach using RGD nanoclusters based on poly-(amidoamine)dendrimers.Biomacromolecules 12,472-481.

[0322] (d)Rodrigues,J.,Jardim,M.G.,Figueira,J.,Gouveia,M.,Tomás,H.,and Rissanen,K.(2011)Poly(alkylidenamines)dendrimers as scaffolds for the preparation of low-generation ruthenium based metallodendrimers.New J.Chem.35,1938-1943.

[0323] (e)Santos,J.L.,Oliveira,H.,Pandita,D.,Rodrigues,J.,Pêgo,A.P.,Granja,P.L.,and Tomás,H.(2010)Functionalization of poly(amidoamine)dendrimers with hydrophobic chains for improved gene delivery in mesenchymal stem cells.J.Controlled Release 144,55-64.

[0324] (f)Santos,J.L.,Oramas,E.,Pêgo,A.P.,Granja,P.L.,and Tomás,H.(2009)Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells using PAMAM dendrimers as gene delivery vectors.J.Controlled Release 134,141-148.

[0325] (g)Santos,J.L.,Pandita,D.,Rodrigues,J.,Pêgo,A.P.,Granja,P.L.,Balian,G.,and Tomás,H.(2010)Receptor-mediated gene delivery using PAMAM dendrimers conjugated with peptides recognized by mesenchymal stem cells.Mol.Pharmaceutics 7,763-774.

[0326] (8)(a)Duncan,R.,and Izzo,L.(2005)Dendrimer biocompatibility and toxicity.Adv.Drug Delivery Rev.57,2215-2237.

[0327] (9)(a)Welsh,D.J.,Jones,S.P.,and Smith,D.K.(2009)"On-off"multivalent recognition:degradable dendrons for temporary highaffinity DNA binding.Angew.Chem.,Int.Ed.48,4047-4051.

[0328] (b)Barnard,A.,Posocco,P.,Pricl,S.,Calderon,M.,Haag,R.,Hwang,M.E.,Shum,V.W.,Pack,D.W.,and Smith,D.K.(2011)Degradable self-assembling dendrons for gene delivery:experimental and theoretical insights into the barriers to cellular uptake.J.Am.Chem.Soc.133,20288-20300.

[0329] (10)M.A.Carnahan,M.W.Grinstaff,J.Am.Chem.Soc.123(2001)2905.M.A.Carnahan,M.W.Grinstaff,Macromolecules 34(2001)7648.M.A.Carnahan,M.W.Grinstaff,Macromolecules 39(2006)609.

[0330] (11)O.Boussif,F.Lezoualc'h,M.A.Zanta,M.D.Mergny,D.Scherman,B.Demeneix,J.Behr,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.92(1995)7297.

[0331] (12)LUNDBERG,A.,KULKARNI,S.,KLEIN,L.,PADMANABHAN,H.K.ARATYN,Y.S.COMPOSITIONS AND METHODS FOR GENE EDITING,WO/2018/154387.

[0332] (13)Geall AJ,Verma A,Otten GR,Shaw CA,Hekele A,Banerjee K,Cu Y,Beard CW,Brito LA,Krucker T,O'Hagan DT,Singh M,Mason PW,Valiante NM,Dormitzer PR,Barnett SW,Rappuoli R,Ulmer JB,Mandl CW.Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines.Proc Natl Acad Sci U S A.2012Sep 4;109(36):14604-9.doi:10.1073/pnas.1209367109.Epub 2012 Aug 20.PMID:22908294;PMCID:PMC3437863.

[0333] (14)World Health Organization.(2002).WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance2002.5 Rev.1.2002.

[0334] (15)Poulami Talukder,Jasdave S.Chahal,Justine S.McPartlan,Omar Khan,Karl Ruping.Nanoparticle Compositions for Efficient Nucleic Acid Delivery and Methods of Making and Using the Same.PCT/US19/67402.

[0335] 因此,应当理解,本发明不限于所公开的特定实施方式,而是旨在覆盖落入由随附的权利要求书限定的、以上说明书和/或随附的附图示出的本发明的精神和范围内的所有变化方式。

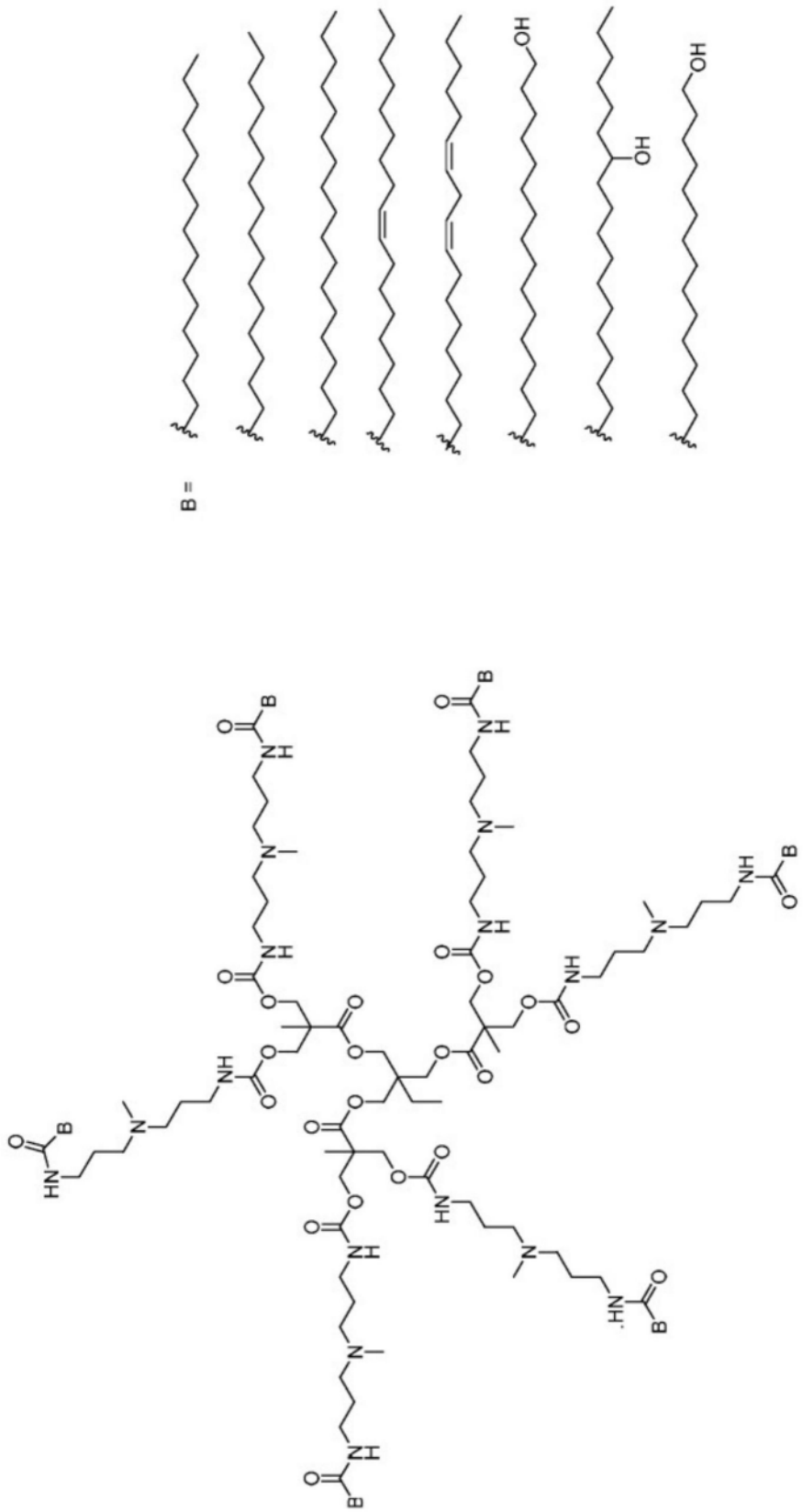
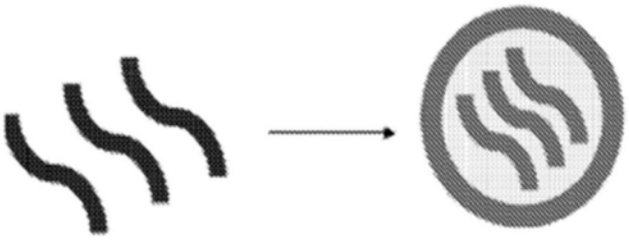
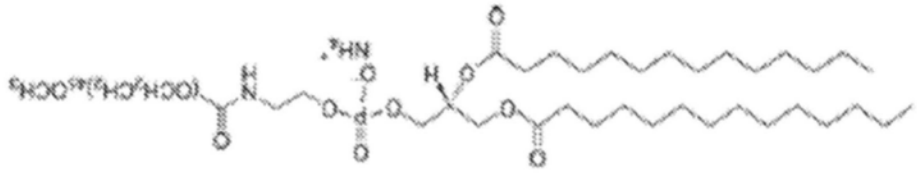
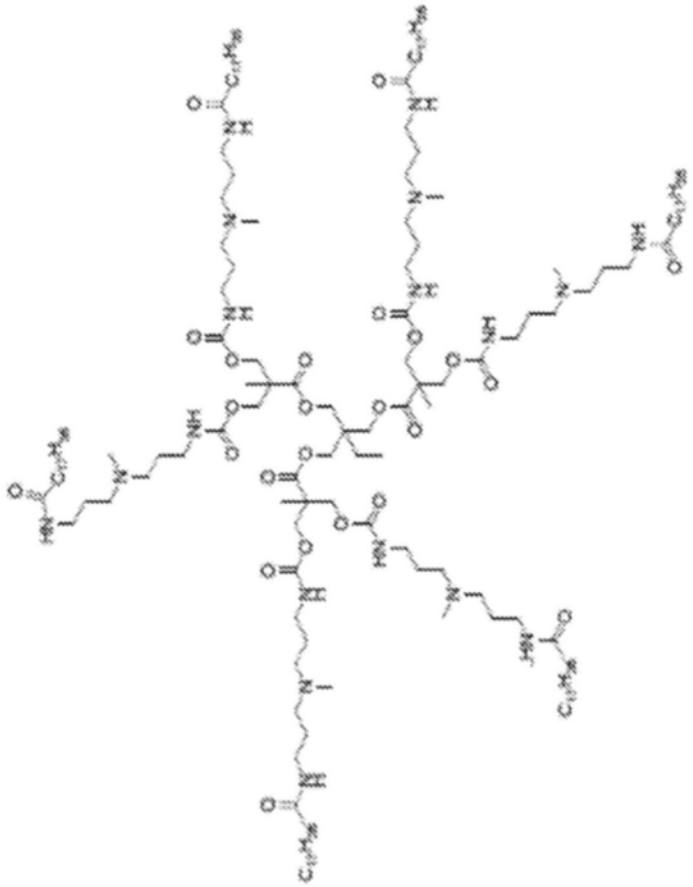


图1



RNA 与我们修饰的树枝状聚合物的结合





PE-硬脂酸

图2

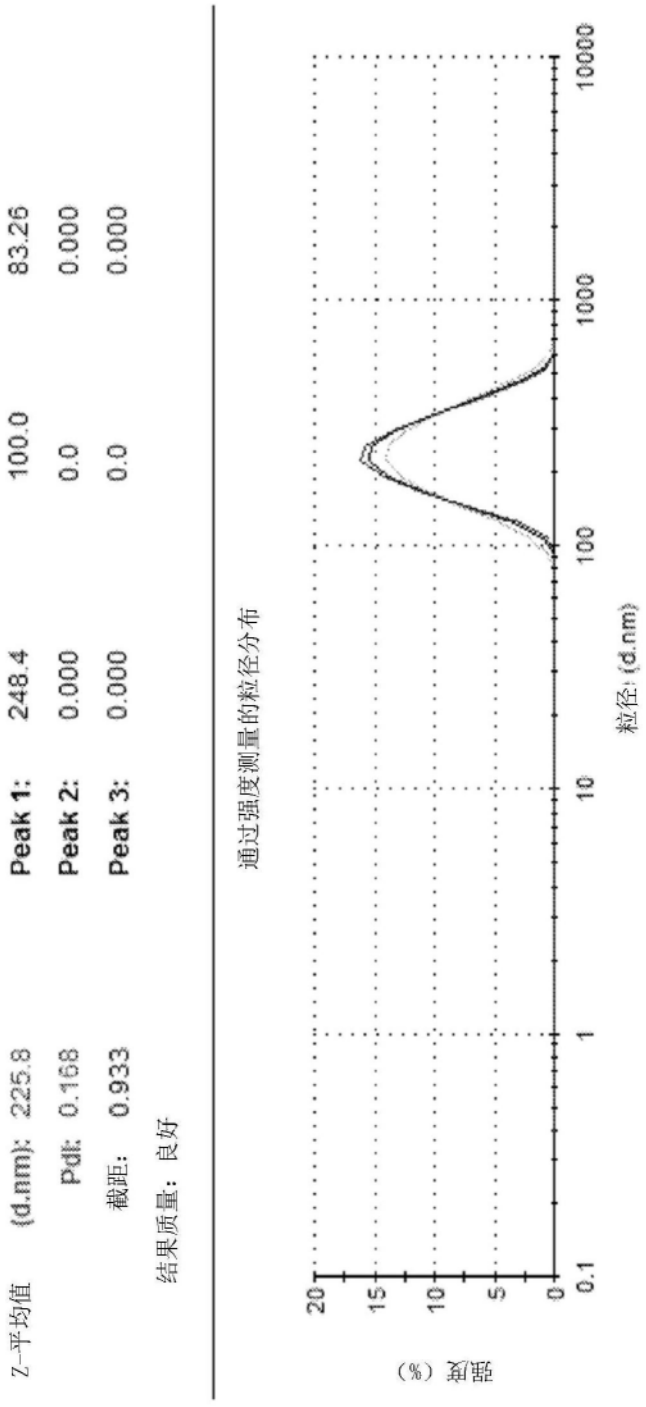

粒径 (d.nm): % 强度 St Dev (d.nm):
Peak 1: 248.4 100.0 83.26
Peak 2: 0.000 0.0 0.000
Peak 3: 0.000 0.0 0.000
Z-平均值 (d.nm): 225.8
Pdi: 0.168
截距: 0.933
结果质量：良好
通过强度测量的粒径分布
强度 (%)
粒径 (d.nm)
0.1
1
10
100
1000
10000
0
5
10
15
20

图3

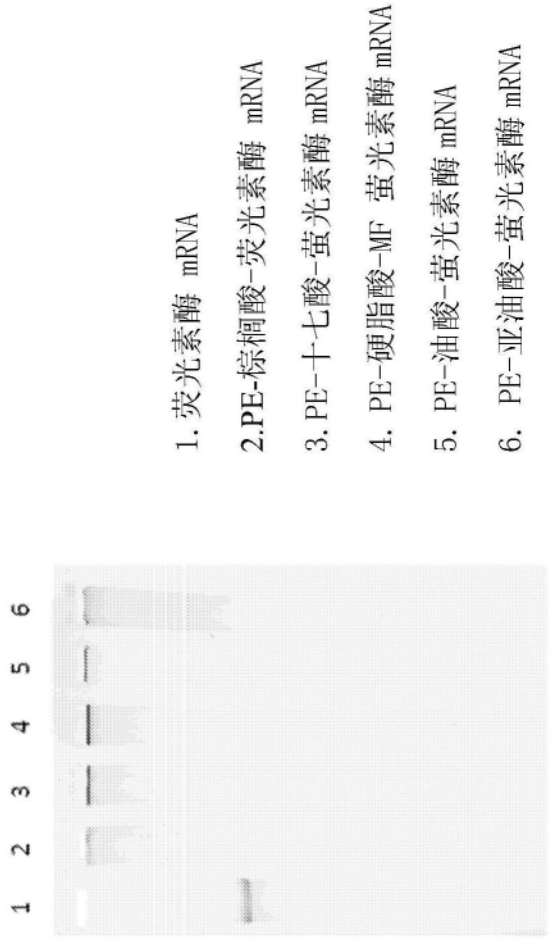

1. 荧光素酶 mRNA
2.PE-棕榈酸-荧光素酶 mRNA
3. PE-十七酸-萤光素酶 mRNA
4. PE-硬脂酸-MF 萤光素酶 mRNA
5. PE-油酸-萤光素酶 mRNA
6. PE-亚油酸-萤光素酶 mRNA
1 2 3 4 5 6

图4

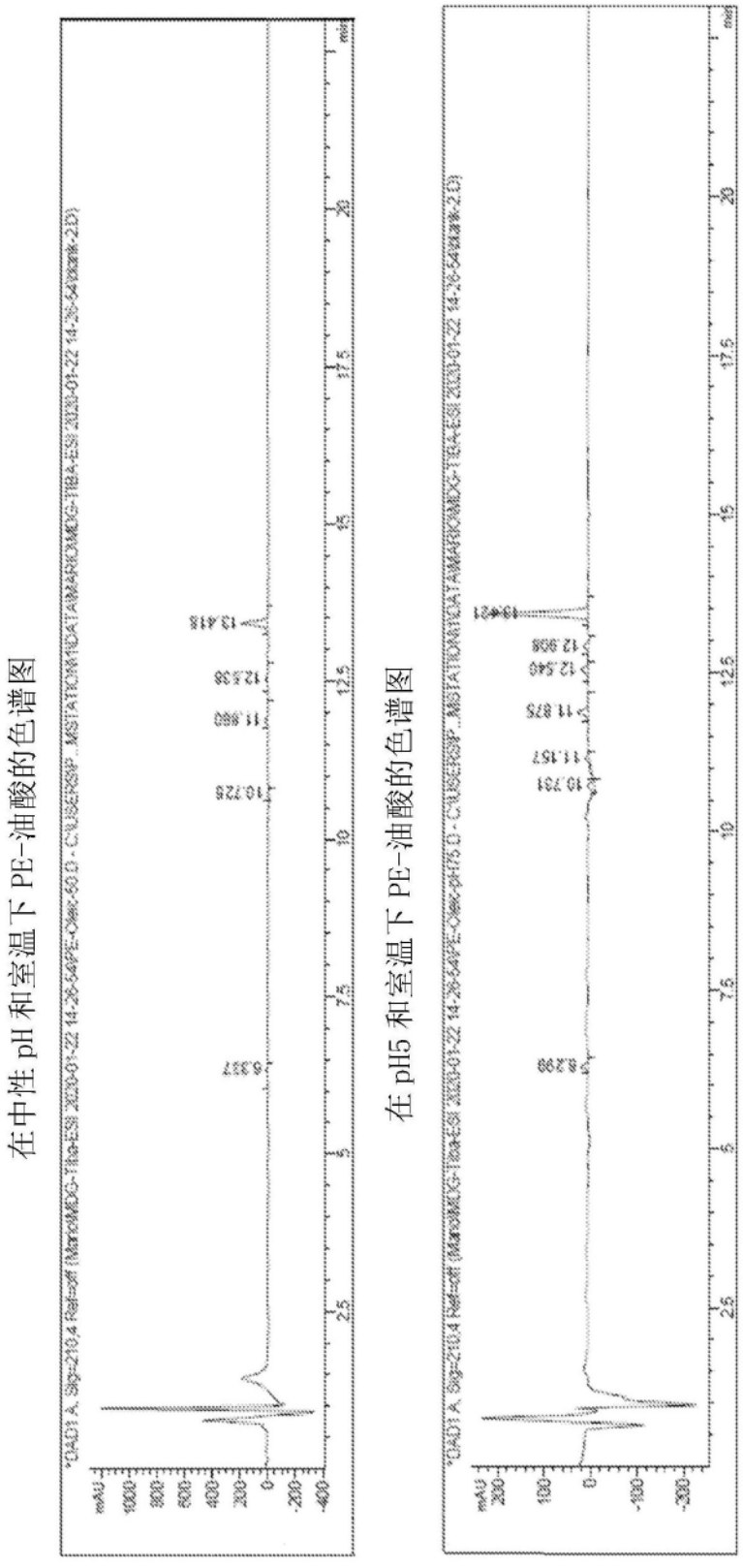


图5

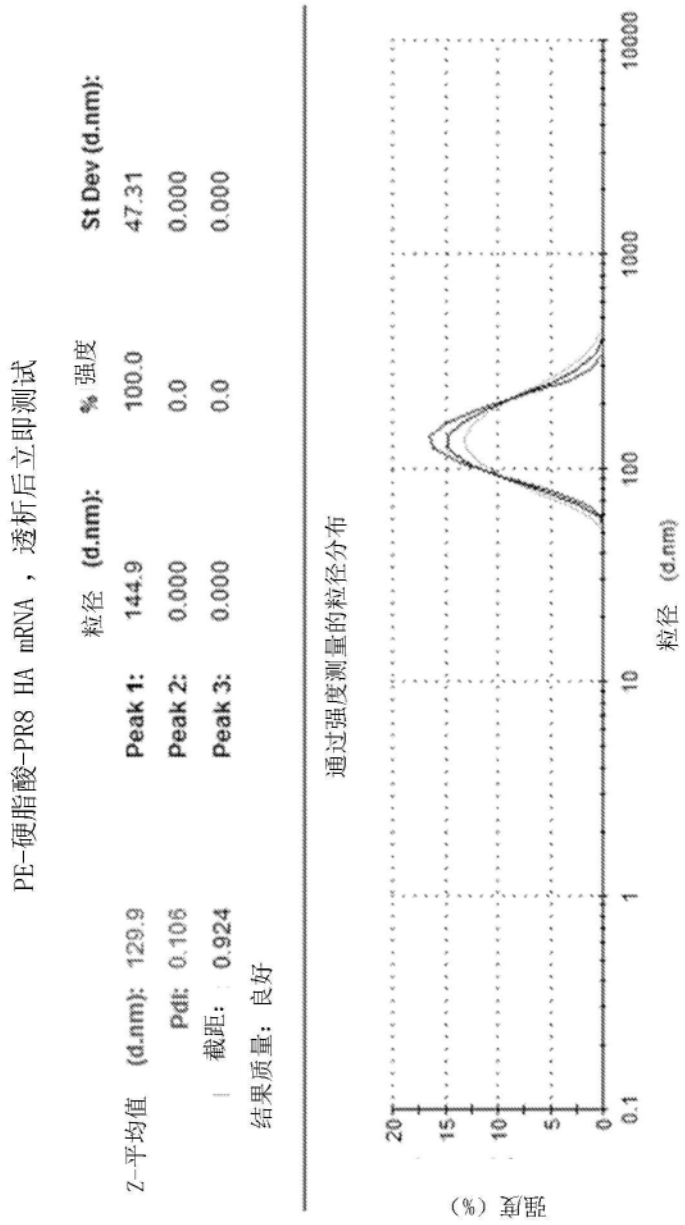

PE-硬脂酸-PR8 HA mRNA ，透析后立即测试
粒径 (d.nm): % 强度 St Dev (d.nm):
Z-平均值 (d.nm): 129.9 Peak 1: 144.9 100.0 47.31
PdI: 0.106 Peak 2: 0.000 0.0 0.000
截距: 0.924 Peak 3: 0.000 0.0 0.000
结果质量：良好
通过强度测量的粒径分布
强度 (%)
粒径 (d.nm)

图6A

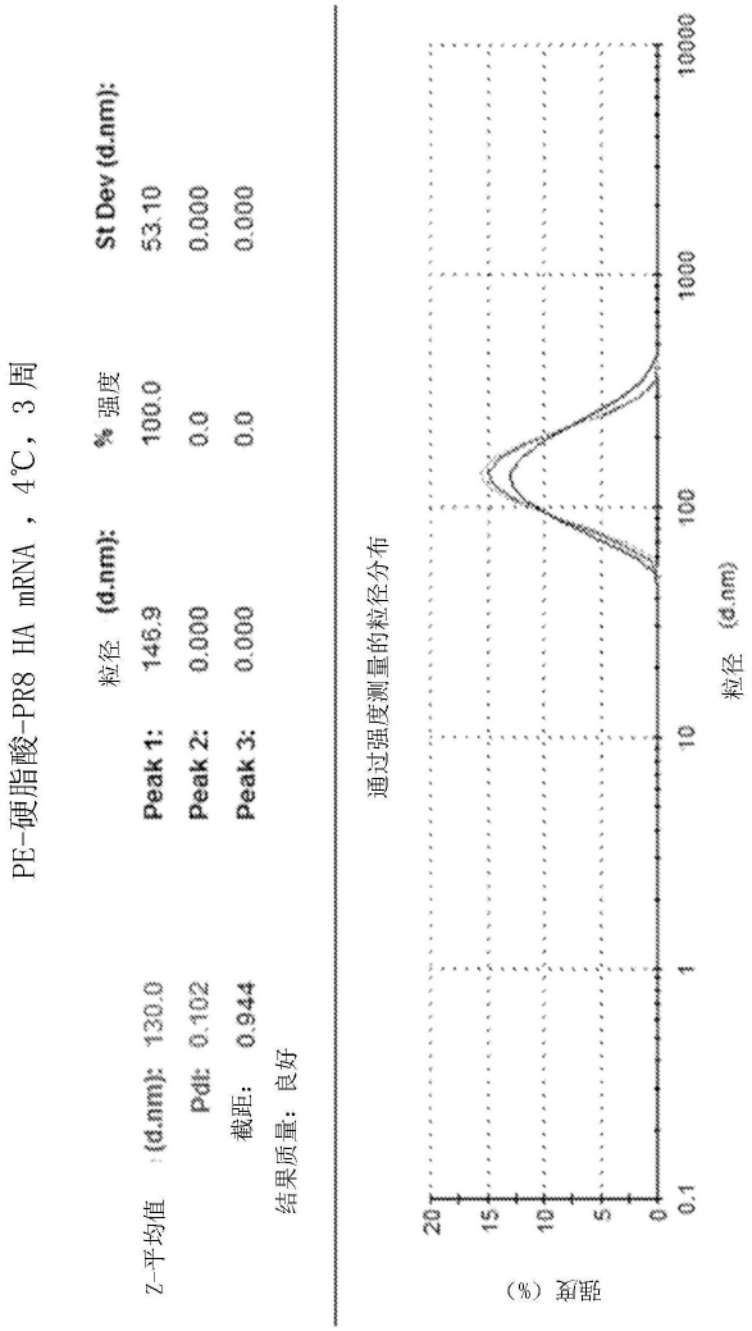

PE-硬脂酸-PR8 HA mRNA ，4℃，3 周
粒径 (d.nm): % 强度 St Dev (d.nm):
Z-平均值 (d.nm): 130.0 Peak 1: 146.9 100.0 53.10
Pdi: 0.102 Peak 2: 0.000 0.0 0.000
截距: 0.944 Peak 3: 0.000 0.0 0.000
结果质量：良好
通过强度测量的粒径分布
强度 (%)
粒径 (d.nm)
20
15
10
5
0
0.1
1
10
100
1000
10000

图6B

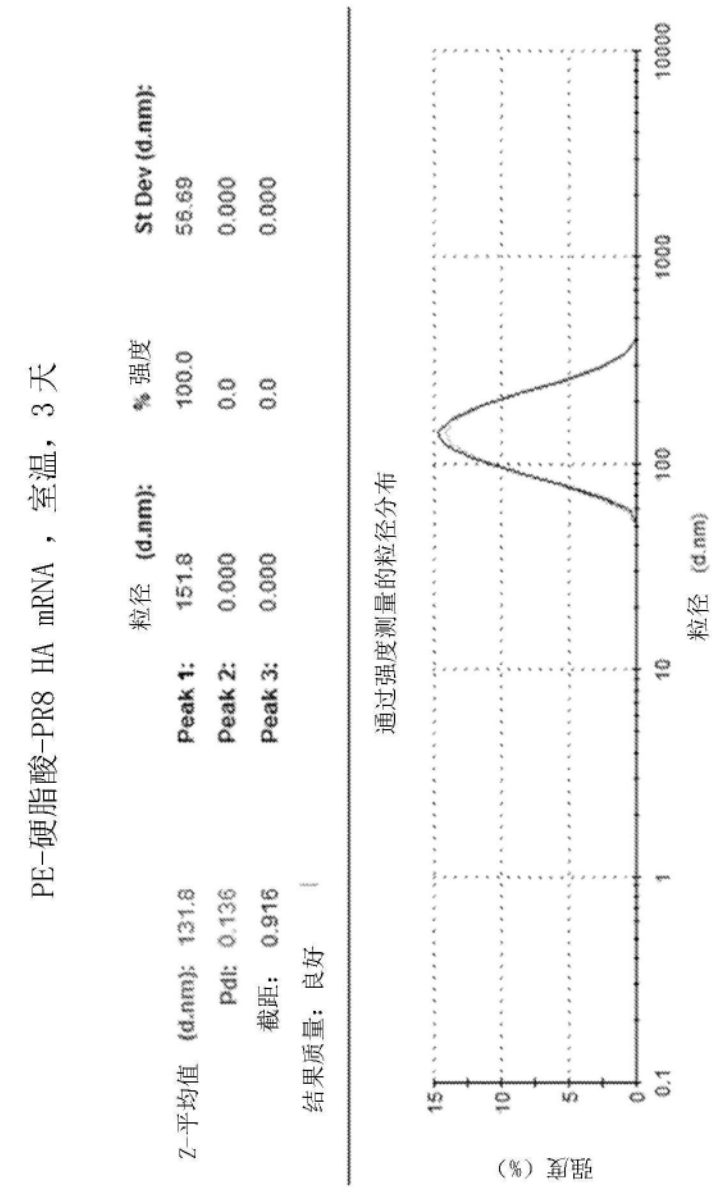

PE-硬脂酸-PR8 HA mRNA ，室温，3 天
粒径 (d.nm): % 强度 St Dev (d.nm):
Z-平均值 (d.nm): 131.8 Peak 1: 151.8 100.0 56.69
PdI: 0.136 Peak 2: 0.000 0.0 0.000
截距: 0.916 Peak 3: 0.000 0.0 0.000
结果质量：良好
通过强度测量的粒径分布
强度 (%)
粒径 (d.nm)
15
10
5
0
0.1
1
10
100
1000
10000

图6C

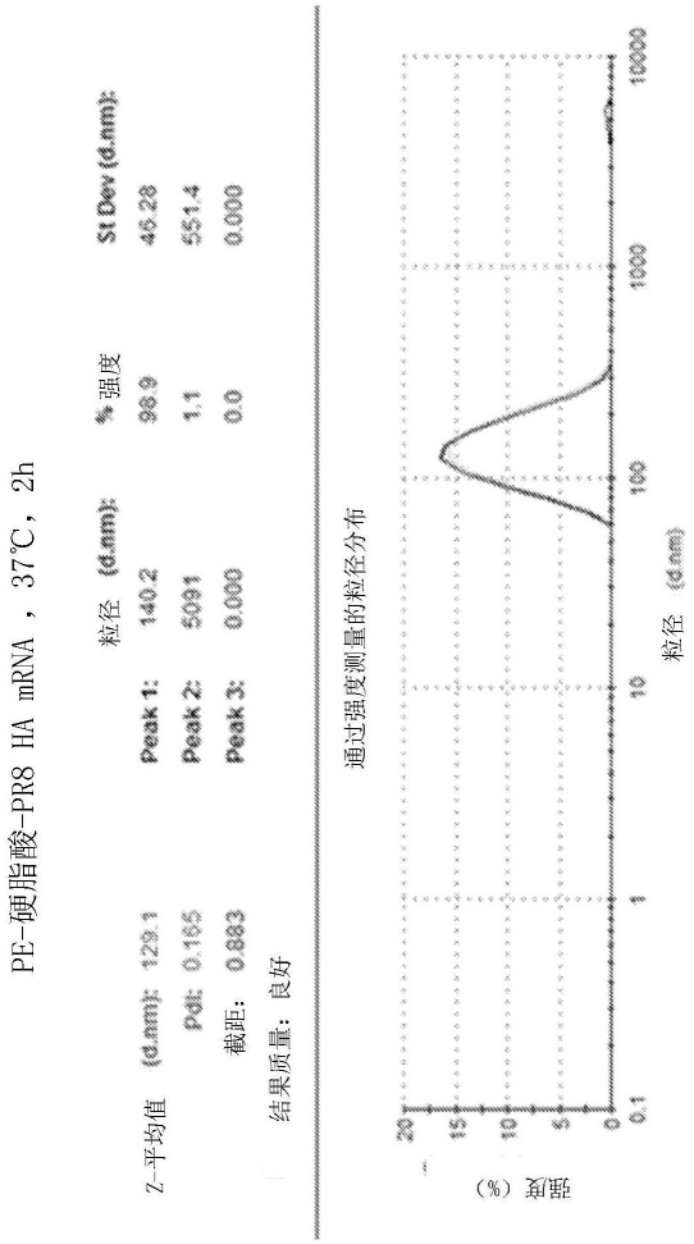

PE-硬脂酸-PR8 HA mRNA，37℃，2h
粒径 (d.nm): % 强度 St Dev (d.nm):
Z-平均值 (d.nm): 129.1 Peak 1: 140.2 98.9 46.28
PdI: 0.165 Peak 2: 5091 1.1 551.4
截距: 0.883 Peak 3: 0.000 0.0 0.000
结果质量：良好
通过强度测量的粒径分布
强度 (%)
粒径 (d.nm)
0.1
1
10
100
1000
10000
0
5
10
15
20

图6D

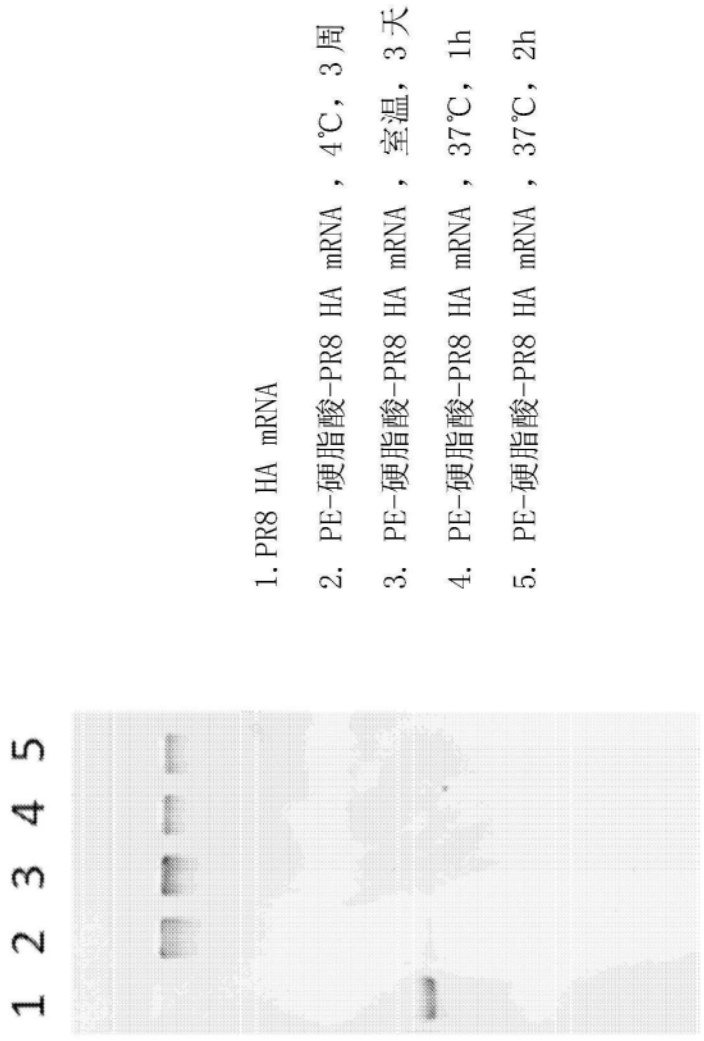

1. PR8 HA mRNA
2. PE-硬脂酸-PR8 HA mRNA，4℃，3周
3. PE-硬脂酸-PR8 HA mRNA，室温，3天
4. PE-硬脂酸-PR8 HA mRNA，37℃，1h
5. PE-硬脂酸-PR8 HA mRNA，37℃，2h
1 2 3 4 5

图6E

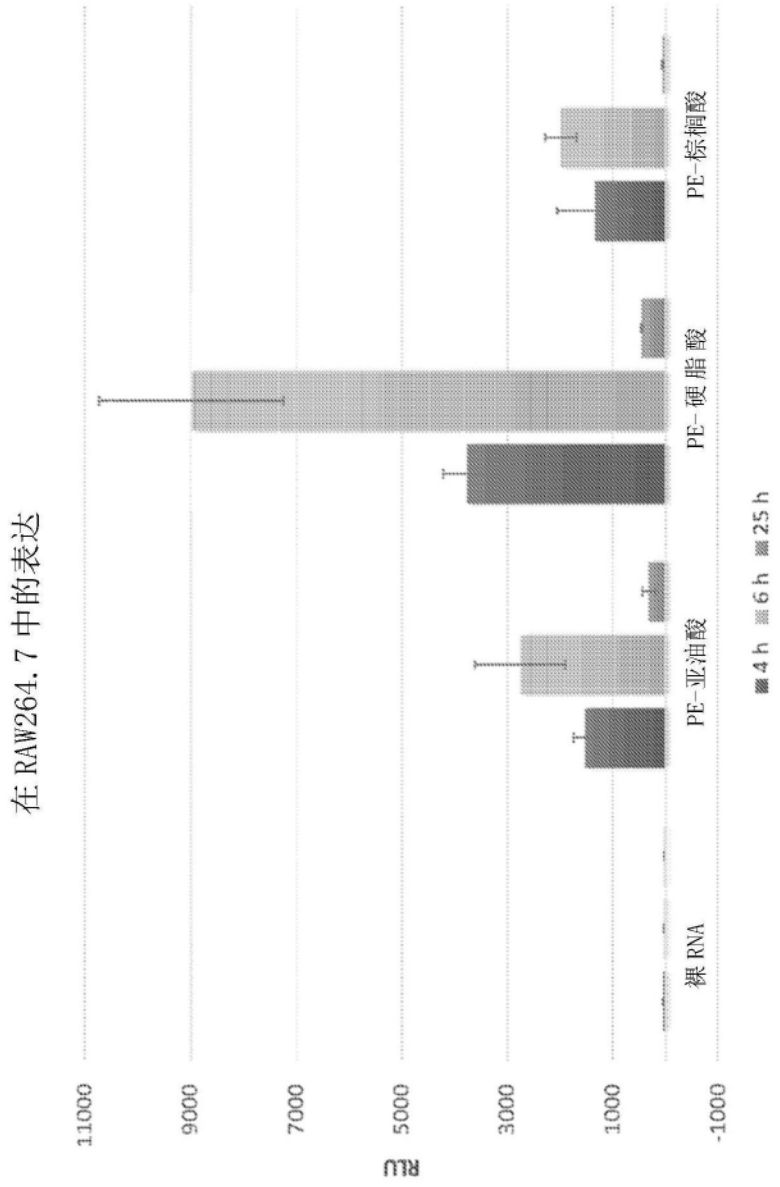

在 RAW264.7 中的表达
RLU
11000
9000
7000
5000
3000
1000
-1000
裸 RNA
PE-亚油酸
PE-硬脂酸
PE-棕榈酸
4 h
6 h
25 h

图7A

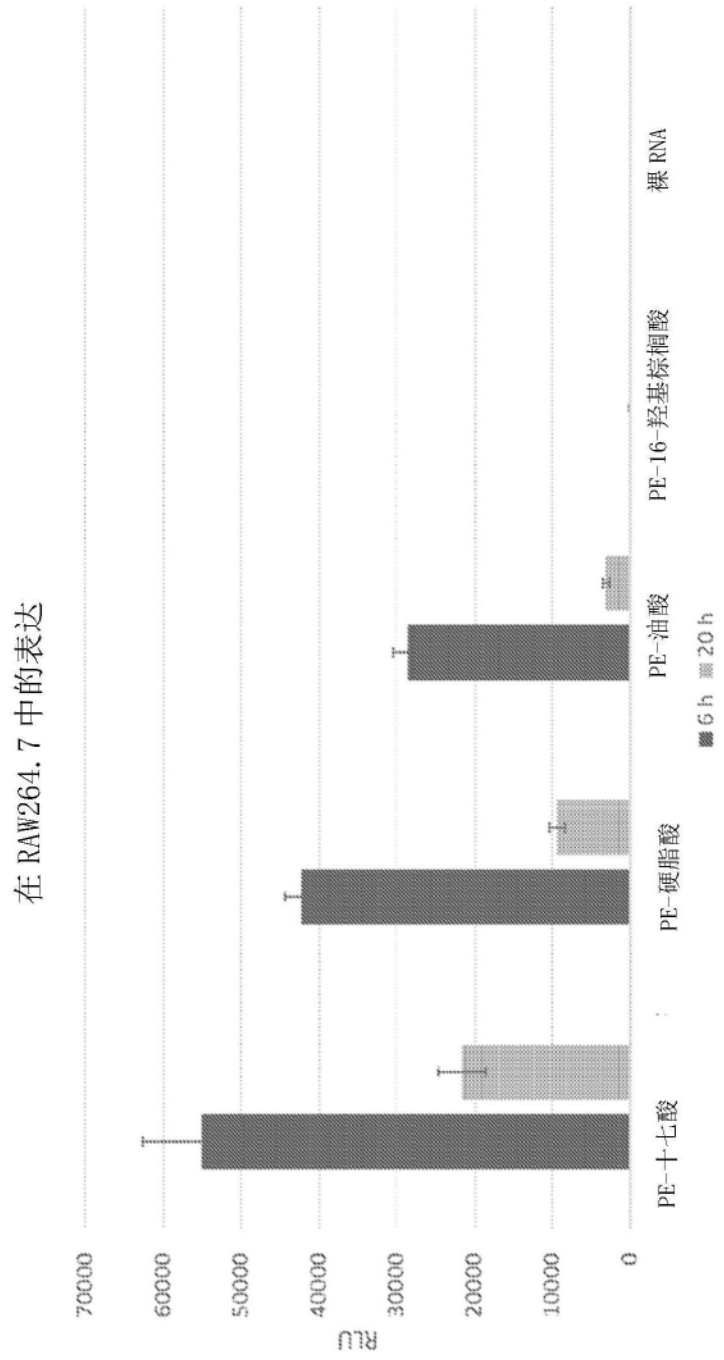

在 RAW264.7 中的表达
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
PE-十七酸
PE-硬脂酸
PE-油酸
PE-16-羟基棕榈酸
裸 RNA
6 h
20 h

图7B

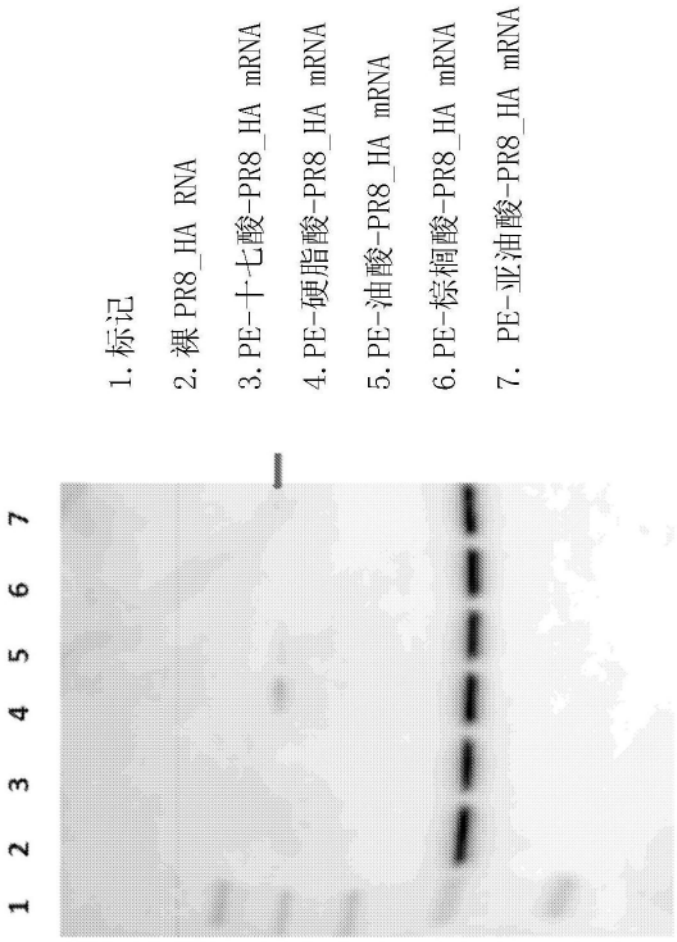

1.标记
2.裸 PR8_HA RNA
3.PE-十七酸-PR8_HA mRNA
4.PE-硬脂酸-PR8_HA mRNA
5.PE-油酸-PR8_HA mRNA
6.PE-棕榈酸-PR8_HA mRNA
7. PE-亚油酸-PR8_HA mRNA
1 2 3 4 5 6 7

图8

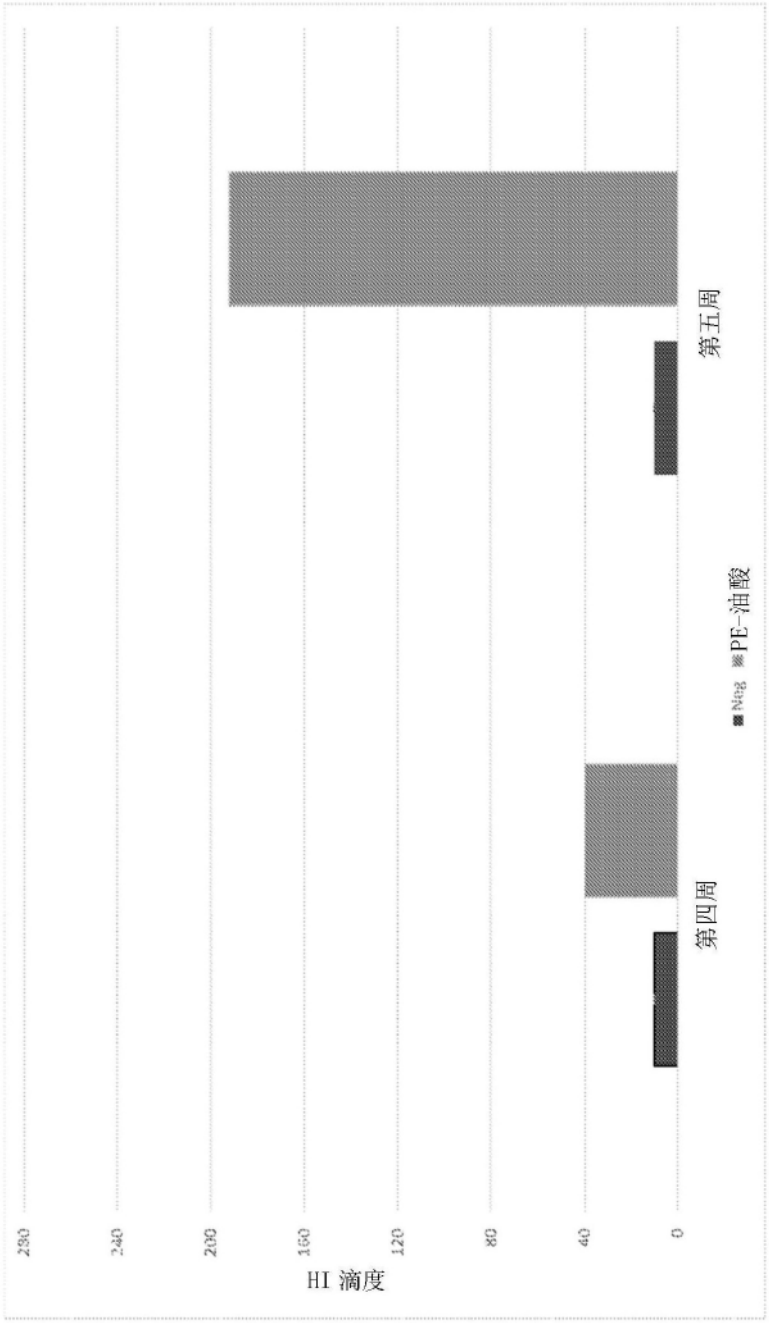


图9

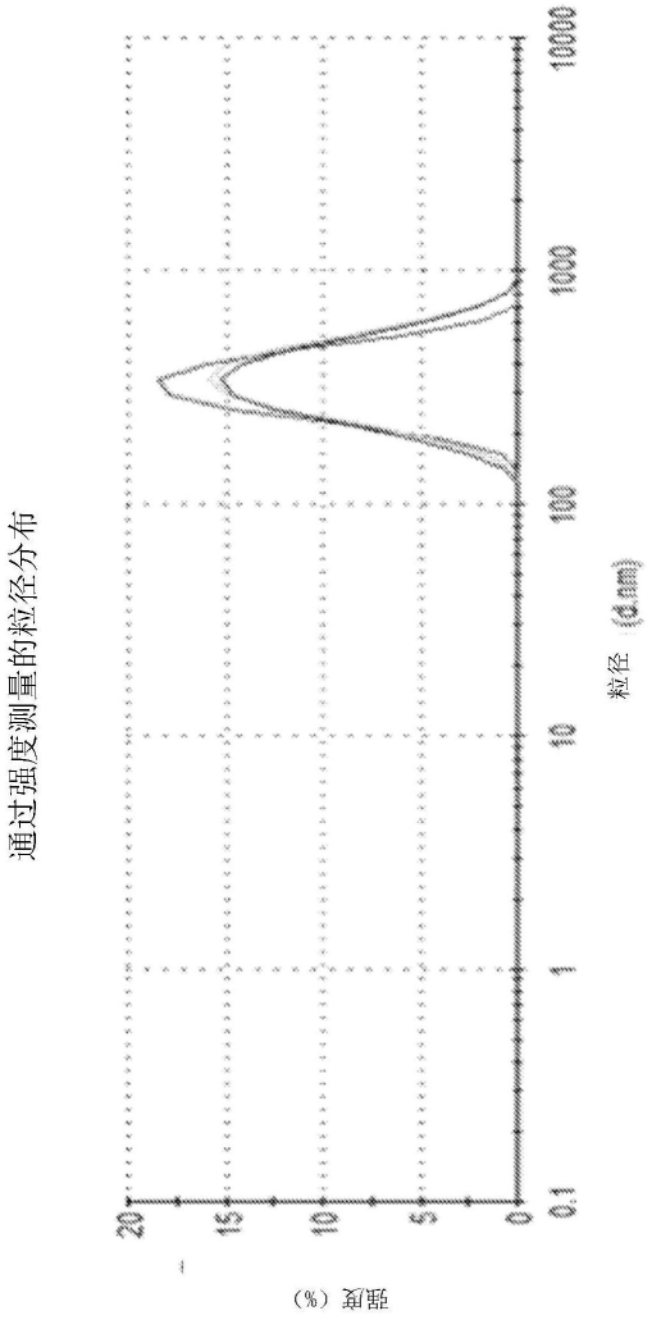


图10

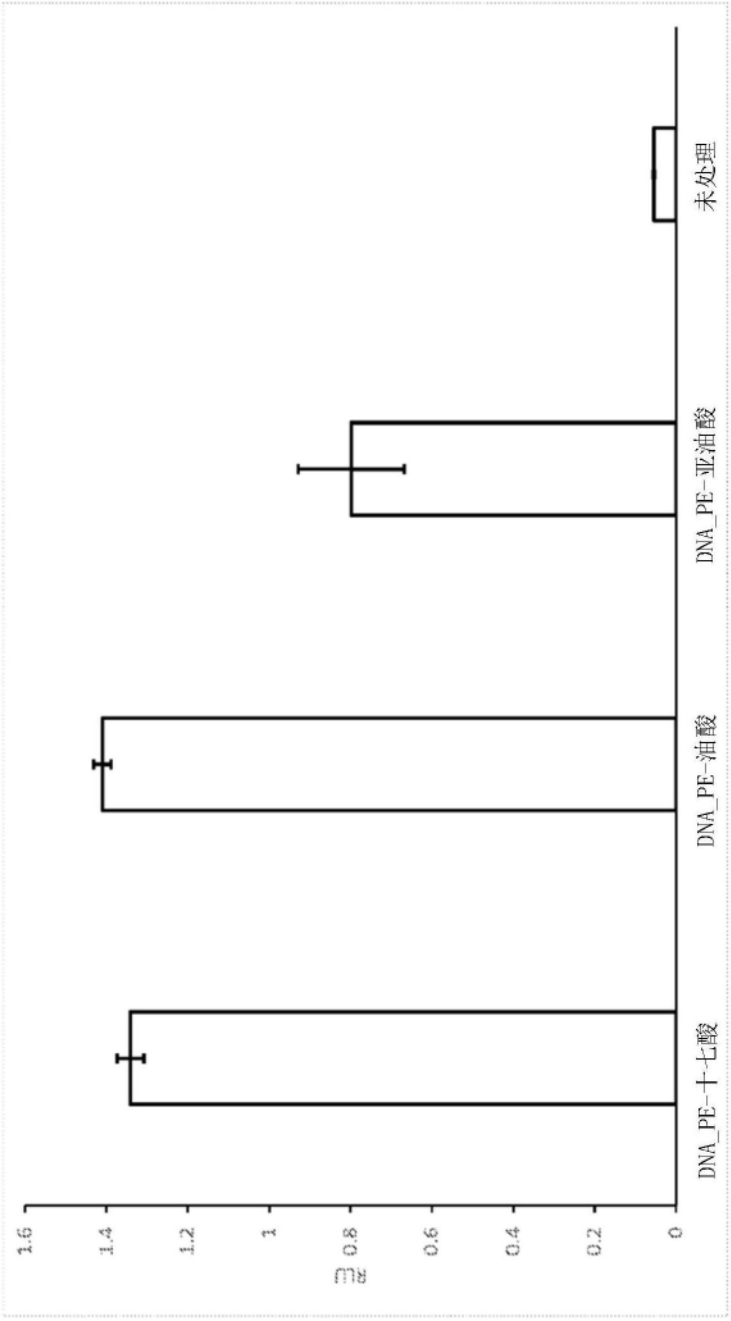
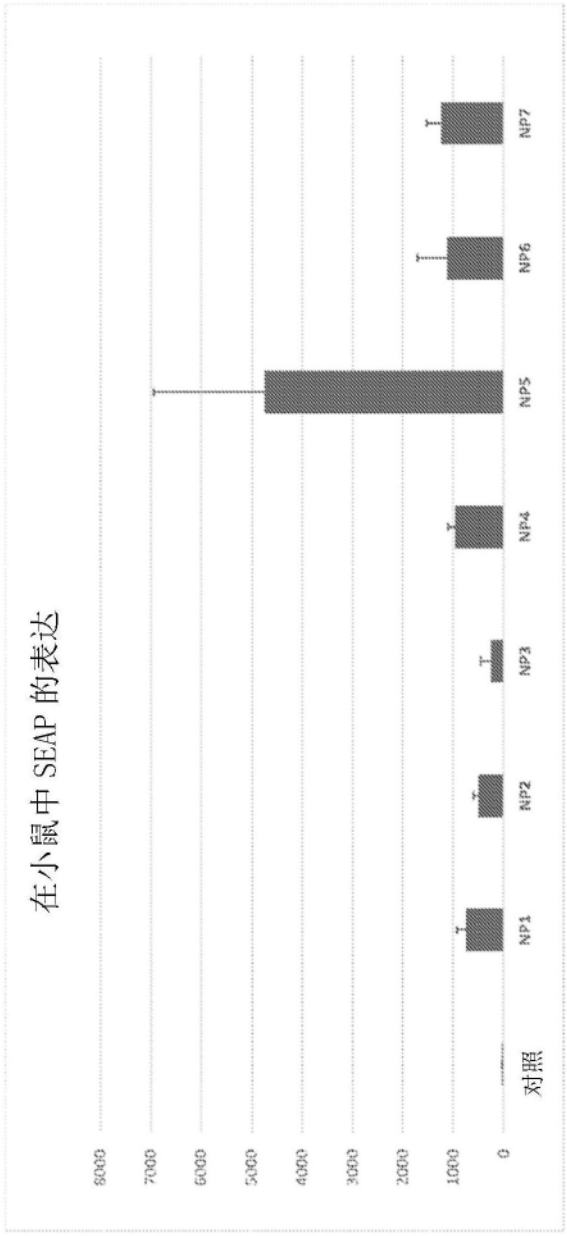


图11



NP1：7.5:1 质量比，PE-树枝化基元_G2-A1-蓖麻油酸，PEG，DSPC，胆固醇 1:0.035:0.5:2.4，TFR 12ml/min，10mM 柠檬酸盐，pH5

NP2：7.5:1 质量比，PE-树枝化基元_G2-A1-蓖麻油酸，PEG，DSPC，胆固醇 1:0.035:0.5:2.4，TFR 12ml/min，10mM 柠檬酸盐，pH4

NP3：7.5:1 质量比，PE-树枝化基元_G2-A1-蓖麻油酸，PEG，DSPC，胆固醇 1:0.035:0.5:2.4，TFR 12ml/min，10mM 柠檬酸盐，pH4.5

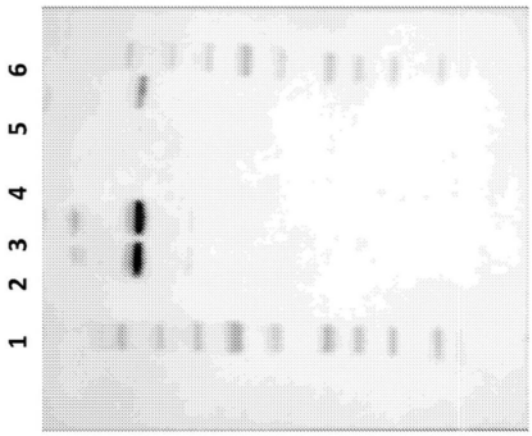
NP4：7.5:1 质量比，PE-树枝化基元_G2-A1-蓖麻油酸，PEG，DSPC，胆固醇 1:0.035:0.5:2.4，TFR1 2ml/min，50mM 柠檬酸盐，pH5

NP5：7.5:1 质量比，PE-树枝化基元_G2-5A1-5-蓖麻油酸，PEG，DSPC，胆固醇 1:0.042:0.66:2.8，TFR 12ml/min，10mM 柠檬酸盐，pH5

NP6：7.5:1 质量比，PE-树枝化基元_G2-5A1-5-蓖麻油酸，PEG，DSPC，胆固醇 1:0.042:0.66:2.8，TFR 12ml/min，10mM 柠檬酸盐，pH4

NP7：7.5:1 质量比，PE-树枝化基元_G2-A2-蓖麻油酸，PEG，DSPC，胆固醇 1:0.03:0.5:2.4，TFR 12ml/min，10mM 柠檬酸盐，pH5

图12



1.Ladder
2.未处理
3. NP-1，(7.5:1质量比，pH5,PE-树枝化基元_G2-A1-蓖麻油酸，PEG，DSPC，胆固醇1:0.03:0.5:2.4)
4. NP-2，(10:1质量比，pH5,PE-树枝化基元_G2-A1-蓖麻油酸，PEG，DSPC，胆固醇1:0.03:0.5:2.4)
5. NP-3，(7.5:1 质量比，pH5,PE-蓖麻油酸，PEG，DSPC，胆固醇1:0.03:0.5:2.4)
6. NP-4，(10:1 质量比，pH5,PE-蓖麻油酸，PEG，DSPC，胆固醇1:0.03:0.5:2.4)
7.UPITT 刺突复制子转染
8. Ladder

图13

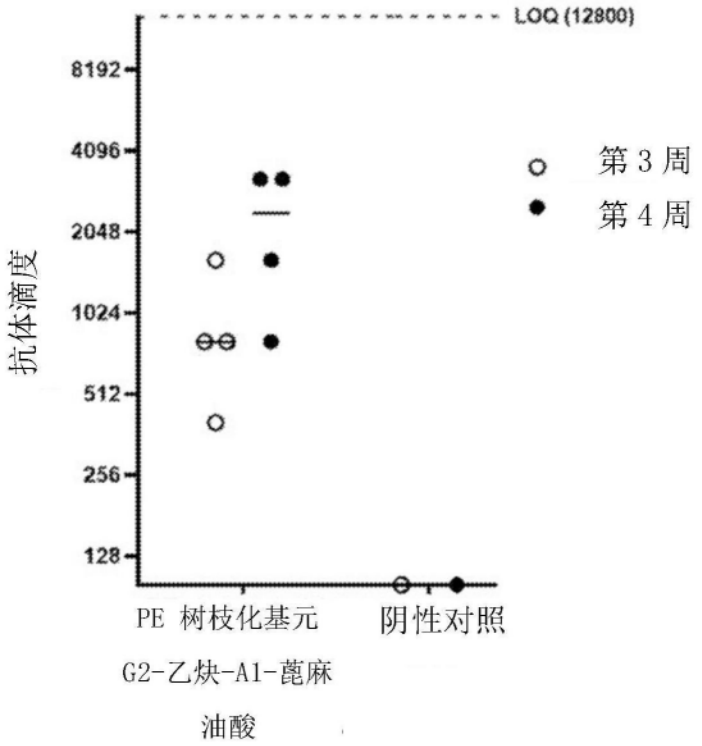

LOQ (12800)
8192
4096
2048
1024
512
256
128
抗体滴度
第 3 周
第 4 周
PE 树枝化基元
G2-乙炔-A1-蓖麻
油酸
阴性对照

图14

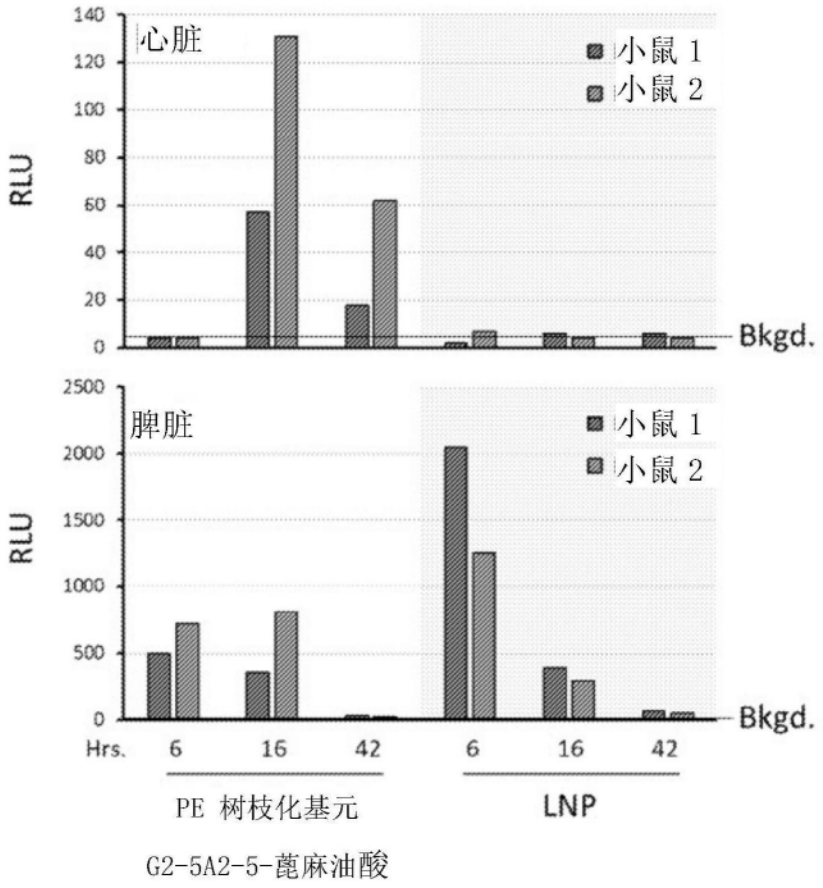

心脏
小鼠 1
小鼠 2
RLU
140
120
100
80
60
40
20
0
Bkgd.
脾脏
小鼠 1
小鼠 2
RLU
2500
2000
1500
1000
500
0
Bkgd.
Hrs.
6
16
42
6
16
42
PE 树枝化基元
LNP
G2-5A2-5-蓖麻油酸

图15

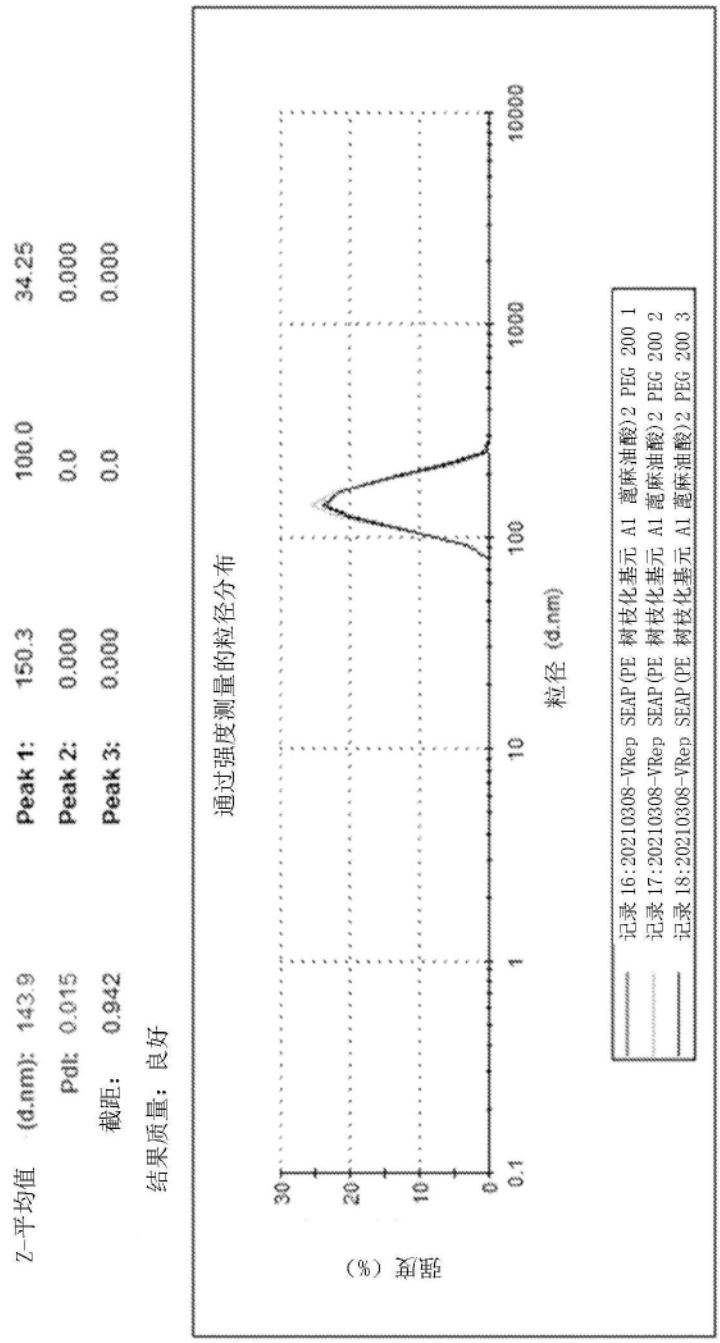

粒径 (d.nm): % 强度 St Dev (d.nm):
Z-平均值 (d.nm): 143.9 Peak 1: 150.3 100.0 34.25
PdI: 0.015 Peak 2: 0.000 0.0 0.000
截距: 0.942 Peak 3: 0.000 0.0 0.000
结果质量：良好
通过强度测量的粒径分布
强度 (%)
粒径 (d.nm)
记录 16:20210308-VRep SEAP(PE 树枝化基元 A1 蓖麻油酸)2 PEG 200 1
记录 17:20210308-VRep SEAP(PE 树枝化基元 A1 蓖麻油酸)2 PEG 200 2
记录 18:20210308-VRep SEAP(PE 树枝化基元 A1 蓖麻油酸)2 PEG 200 3

图16

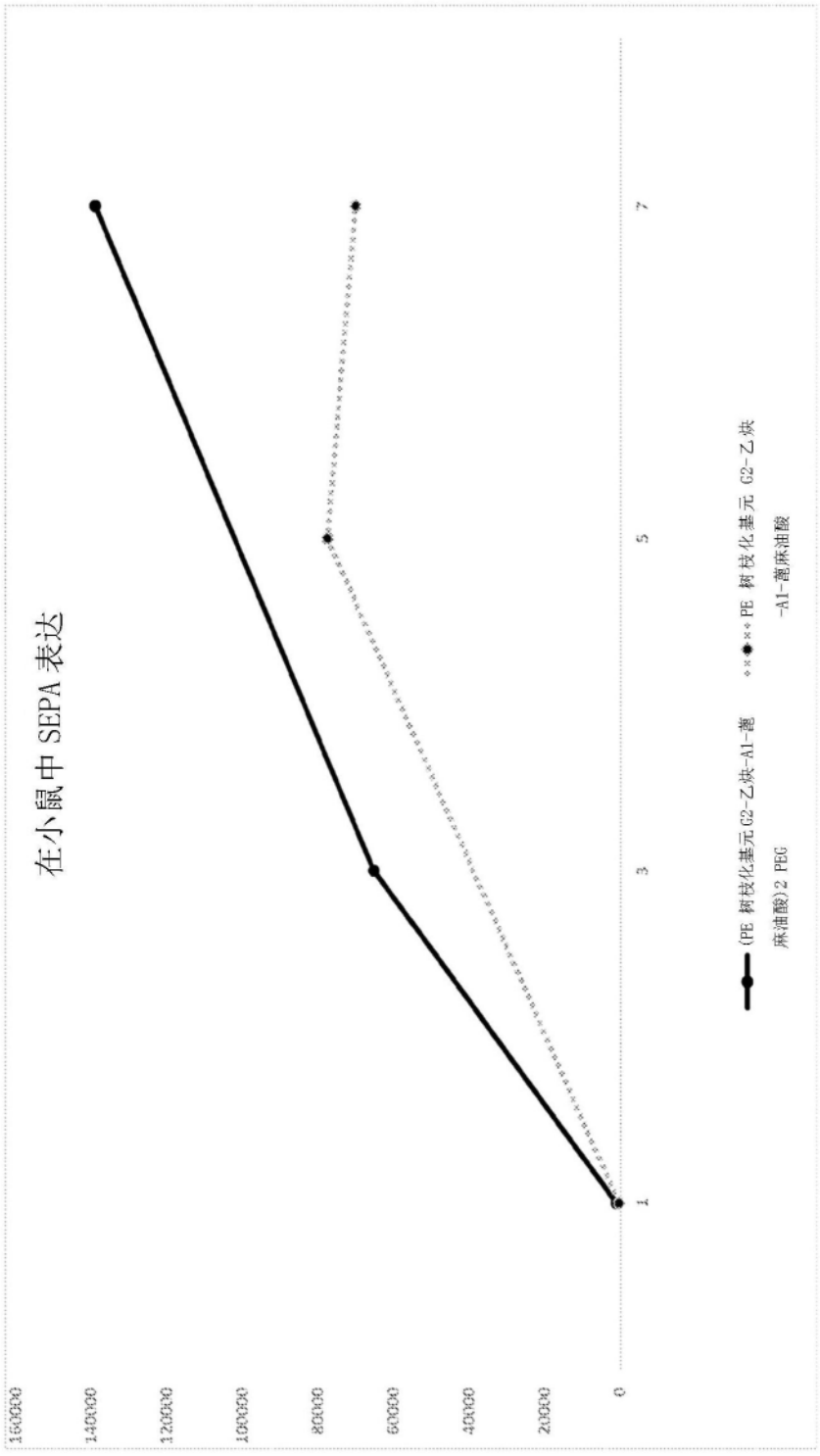

在小鼠中 SEPA 表达
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
1
3
5
7
(PE 树枝化基元 G2-乙炔-A1-蓖麻油酸)2 PEG
PE 树枝化基元 G2-乙炔-A1-蓖麻油酸

图17