(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102065902 A
(43)申请公布日 2011.05.18

(21)申请号 200980123439.0

(22)申请日 2009.05.13

(30)优先权数据
61/052,908 2008.05.13 US
61/052,914 2008.05.13 US
61/091,294 2008.08.22 US
61/112,054 2008.11.06 US
61/140,779 2008.12.24 US
61/171,358 2009.04.21 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2010.12.22

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2009/043837 2009.05.13

(87)PCT申请的公布数据
WO2009/140421 EN 2009.11.19

(71)申请人 华盛顿大学
地址 美国华盛顿
申请人 菲泽尔克斯公司

(72)发明人 P·S·司泰同 A·S·霍夫曼
A·J·肯沃汀 C·L·杜瓦尔
D·本诺特 R·欧沃瑞尔
P·约翰逊 A·高尔 M·普里福
A·帕沙尔 C·迪亚布 P·德

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 刘晓东

(51)Int.Cl.
A61K 47/34(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61K 31/7088(2006.01)

权利要求书 5 页 说明书 63 页 附图 20 页

(54)发明名称

聚合物载体

(57)摘要

本文中提供了适合用于将多核苷酸（例如，寡核苷酸）和/或其他治疗剂递送入活细胞的聚合物载体。

聚合物	结构 $[D]_{MW_1}$-$[B_x$-P_y-$D_z]_{MW_2}$	Mn Kda	嵌段比例 MW_2/MW_1
P7v1	$[D]_{9.1K}$-$[B_{48}$-P_{29}-$D_{23}]_{11.3?K}$	19	1.2
P7v2	$[D]_{10K}$-$[B_{66}$-P_{18}-$D_{37}]_{8.9K}$	19	0.9
P7v3	$[D]_{6.5K}$-$[B_{41}$-P_{39}-$D_{20}]_{5.5K}$	16	1.5
P7v6	$[D]_{9.1K}$-$[B_{52}$-P_{26}-$D_{22}]_{21.9K}$	31	2.4

x, y和z是摩尔%。分子量是使用PMMA标准通过凝胶渗透色谱法测定的。组成是通过NMR光谱法测定的。

A

聚合物	第一嵌段 Mn (kDa)	PDI	% PEGMA	% DMAEMA	第二嵌段 Mn (kDa)	PDI	% BMA	% DMAEMA	%PAA
P7-PEGMA100	22.24	1.34	100	0	45.5	1.48	50	28	22
P7-PEGMA20	11.44	1.33	77	83	41.0	1.52	56	23	21
P7-PEGMA10	11.01	1.31	10	90	42.0	1.42	51	23	26
P7-PEGMA5	10.69	1.17	5	95	27.1	1.27	-	-	-
P7-PEGMA-50-	14.50	1.35	46	54	38.1	1.44	55	25	20
P7-PEGMA-30-	24.25	1.23	47	53	38.4	1.45	52	23	25

B

CN 102065902 A

1. 一种聚合物载体，其包含：

a. 多个聚合物，其为装配成聚合物载体的嵌段共聚物，所述聚合物载体包含芯和壳，该嵌段共聚物包含：

i. 至少一个疏水性嵌段；

ii. 多个在约中性 pH 下包含第一阴离子性种类的单体单元；和

b. 至少 1 个多核苷酸，

其中所述多核苷酸不存在于该聚合物载体的芯中。

2. 权利要求 1 的聚合物载体，其中所述第一阴离子性种类在 pH 约 5.0 至约 6.5 下基本上是中性的或不带电荷。

3. 权利要求 1 至 2 中任一项的聚合物载体，其中所述至少一个多核苷酸是寡核苷酸。

4. 权利要求 1 至 3 中任一项的聚合物载体，其中所述多核苷酸是寡核苷酸基因表达调节剂。

5. 权利要求 1 至 4 中任一项的聚合物载体，其中所述多核苷酸是寡核苷酸敲低剂。

6. 权利要求 5 的聚合物载体，其中所述敲低剂是 s iRNA、反义寡核苷酸、切丁酶底物、miRNA、a iRNA 或 shRNA。

7. 权利要求 1 至 6 中任一项的聚合物载体，其还包含靶向部分。

8. 权利要求 7 的聚合物载体，其中所述靶向部分被连接至聚合物载体的壳部分。

9. 权利要求 8 的聚合物载体，其中所述靶向部分通过与聚合物共价键合被连接至壳部分。

10. 权利要求 1 至 9 中任一项的聚合物载体，其中所述聚合物是梯度聚合物。

11. 权利要求 1 至 10 的聚合物载体，其中所述聚合物的多分散性指数低于 2、低于 1.8、低于 1.5、低于 1.4 或低于 1.3。

12. 权利要求 1 至 6 中任一项的聚合物载体，其中所述多个聚合物被装配成胶束。

13. 权利要求 1 的聚合物载体，其中所述聚合物载体是膜去稳定化的。

14. 权利要求 1 的聚合物载体，其中所述疏水性嵌段包含多个第一可带电荷种类。

15. 权利要求 14 的聚合物载体，其中所述多个第一可带电荷种类在内体 pH 下基本上不带电荷。

16. 权利要求 14 的聚合物载体，其中所述多个第一可带电荷种类在约 6 或更低的 pH 下基本上不带电荷。

17. 权利要求 1 至 6 中任一项的聚合物载体，其中还包含多个疏水性单体单元，所述疏水性单体单元为疏水性嵌段的一部分或作为疏水性嵌段的补充。

18. 权利要求 1 至 6 中任一项的聚合物载体，其中所述多个聚合物已自发地自我装配成所述聚合物载体。

19. 权利要求 1 的聚合物载体，其中所述多核苷酸是该聚合物的嵌段。

20. 权利要求 1 至 6 中任一项的聚合物载体，其中所述聚合物载体的壳包含所述多核苷酸。

21. 权利要求 1 至 6 中任一项的聚合物载体，其中所述多个聚合物中的至少一个包含多核苷酸载体嵌段。

22. 权利要求 21 的聚合物载体，其中所述聚合物载体的壳包含所述多核苷酸载体嵌

段。

23. 权利要求 22 的聚合物载体，其中所述至少一个多核苷酸通过共价键、非共价相互作用或其组合而连接至该多核苷酸载体嵌段。

24. 权利要求 21 至 23 中任一项的聚合物载体，其中所述多核苷酸载体嵌段在约中性 pH 和 / 或约内体 pH 下不带电荷。

25. 权利要求 21 至 23 中任一项的聚合物载体，其中所述多核苷酸载体嵌段在约中性 pH 和 / 或约内体 pH 下为聚阴离子性的。

26. 权利要求 21 至 23 中任一项的聚合物载体，其中所述多核苷酸载体嵌段在约中性 pH 和 / 或约内体 pH 下为两性离子性的。

27. 权利要求 21 至 23 中任一项的聚合物载体，其中所述多核苷酸载体嵌段在约中性 pH 和 / 或约内体 pH 下为聚阳离子性的。

28. 权利要求 27 的聚合物载体，其中所述至少一个多核苷酸是包含 x 个阴离子的聚阴离子，并且其中所述多核苷酸载体嵌段包含约 0.7 • x 个阳离子或更多阳离子。

29. 权利要求 21 至 28 中任一项的聚合物载体，其中所述多核苷酸载体嵌段是均聚物嵌段。

30. 权利要求 29 的聚合物载体，其中所述均聚物嵌段是聚 -N，N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 乙基丙烯酸酯、聚 -N，N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 甲基丙烯酸酯或聚 -N，N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 丙烯酸酯。

31. 权利要求 21 至 30 中任一项的聚合物载体，其中所述多核苷酸载体嵌段包含 (i) 至少一个 N，N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 乙基丙烯酸酯单体单元、至少一个 N，N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 甲基丙烯酸酯、至少一个 N，N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 丙烯酸酯或其组合 ；和 (ii) 至少一个间隔子单体单元。

32. 权利要求 1 至 6 中任一项的聚合物载体，其中所述第一阴离子性种类是羧酸根、磺酰胺基团、硼酸、磺酸根、亚磺酸根、硫酸根、磷酸根、次膦酸根或亚磷酸根或其共轭碱。

33. 权利要求 1 至 6 的聚合物载体，其中所述疏水性嵌段还包含至少一个间隔子单体单元。

34. 权利要求 1 至 6 中任一项的聚合物载体，其中所述疏水性嵌段还包含第二可带电荷种类。

35. 权利要求 34 的聚合物载体，其中所述第二可带电荷种类在质子化后为阳离子性种类。

36. 权利要求 35 的聚合物载体，其中所述阳离子性种类具有约 6.5 至约 9 的 pKa。

37. 权利要求 36 的聚合物载体，其中所述第二可带电荷种类是非环胺或亚胺、环胺或亚胺或含氮的杂芳基。

38. 权利要求 34 的聚合物载体，其中所述至少一个第一可带电荷种类和至少一个第二可带电荷种类存在于单个单体单元上。

39. 权利要求 34 的聚合物载体，其中所述第一可带电荷种类被发现存在于第一可带电荷的单体单元上，并且所述第二可带电荷种类在第二可带电荷的单体单元上。

40. 权利要求 34 的聚合物载体，其中所述第一可带电荷种类在去质子化后为阴离子性种类，所述第二可带电荷种类在质子化后为阳离子性种类，并且其中所述阴离子性种类与

所述阳离子性种类之比在约中性 pH 下为约 1 ： 4 至约 4 ： 1。

41. 权利要求 39 的聚合物载体，其中所述第一可带电荷的单体单元与第二可带电荷的单体单元之比为约 1 ： 4 至约 4 ： 1。

42. 权利要求 39 的聚合物载体，其中所述第一可带电荷的单体单元是 (C_2-C_8) 烷基丙烯酸。

43. 权利要求 39 的聚合物载体，其中低于 50％的第二可带电荷的单体单元在 pH 约 8 下带电荷成为阳离子性种类。

44. 权利要求 39 的聚合物载体，其中所述第二可带电荷的单体单元是 N，N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 乙基丙烯酸酯、N，N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 甲基丙烯酸酯或 N，N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 丙烯酸酯。

45. 权利要求 1 的聚合物载体，其中所述疏水性嵌段包含至少一个不可带电荷的单体单元。

46. 权利要求 45 的聚合物载体，其中所述不可带电荷的单体单元是 (C_2-C_8) 烷基 - 乙基丙烯酸酯、(C_2-C_8) 烷基 - 甲基丙烯酸酯或 (C_2-C_8) 烷基 - 丙烯酸酯。

47. 权利要求 1 的聚合物载体，其中所述聚合物还包含间隔子嵌段。

48. 权利要求 1 至 47 中任一项的聚合物载体，其中所述聚合物载体在 pH 约 7.4 的含水介质中具有约 10nm 至约 200nm 的平均流体动力学直径。

49. 权利要求 48 的聚合物载体，其中所述聚合物载体在 pH 约 7.4 的含水介质中具有约 20nm 至约 100nm 的平均流体动力学直径。

50. 权利要求 49 的聚合物载体，其中所述聚合物载体在 pH 约 7.4 的含水介质中具有约 30nm 至约 80nm 的平均流体动力学直径。

51. 权利要求 5 的聚合物载体，其中所述敲低剂是 siRNA。

52. 权利要求 51 的聚合物载体，其中所述聚合物载体包含 1-5 个 siRNA。

53. 权利要求 51 的聚合物载体，其中所述聚合物载体包含 5-10 个 siRNA。

54. 权利要求 51 的聚合物载体，其中所述聚合物载体包含 10-100 个 siRNA。

55. 权利要求 20 的聚合物载体，其中所述疏水性嵌段的数均分子量与所述多核苷酸载体嵌段的数均分子量之比是约 1 ： 1 至约 5 ： 1。

56. 权利要求 20 的聚合物载体，其中所述疏水性嵌段的数均分子量与所述多核苷酸载体嵌段的数均分子量之比是约 2 ： 1。

57. 权利要求 20 的聚合物载体，其中所述多核苷酸载体嵌段是 s i RNA 载体嵌段。

58. 权利要求 55 至 57 中任一项的聚合物载体，其中所述多核苷酸载体嵌段具有约 7,000 道尔顿至约 40,000 道尔顿的数均分子量 (Mn)。

59. 权利要求 55 至 57 中任一项的聚合物载体，其中所述多核苷酸载体嵌段具有约 10,000 道尔顿至约 20,000 道尔顿的数均分子量 (Mn)。

60. 权利要求 55 至 57 中任一项的聚合物载体，其中所述多核苷酸载体嵌段具有约 10,000 道尔顿的数均分子量 (Mn)。

61. 权利要求 55 至 57 中任一项的聚合物载体，其中所述 siRNA 载体嵌段具有约 20,000 道尔顿的数均分子量 (Mn)。

62. 权利要求 1 的聚合物载体，其中所述疏水性嵌段具有约 10,000 道尔顿至约

100,000 道尔顿的数均分子量 (Mn)。

63. 权利要求 62 的聚合物载体，其中所述疏水性嵌段具有约 20,000 道尔顿至约 50,000 道尔顿的数均分子量 (Mn)。

64. 权利要求 1 至 63 中任一项的聚合物载体，其中所述聚合物载体在 pH 约 7.4 下是稳定的。

65. 权利要求 65 的聚合物载体，其中所述聚合物载体在 pH 约 5.8 下明显不如在 pH 约 7.4 下稳定。

66. 权利要求 65 的聚合物载体，其中所述聚合物载体包含多核苷酸，并且其中在 pH 约 5.8 和浓度约 18μg/mL 下 90％以上的所述聚合物载体丧失了将多核苷酸递送入细胞的能力，并且在 pH 约 7.4 和浓度约 18μg/mL 下少于 10％的所述聚合物载体丧失了将多核苷酸递送入细胞的能力。

67. 权利要求 1 至 66 中任一项的聚合物载体，其中所述聚合物载体在 50％的人血清中稳定至少 2 小时，在至少 50％的人血浆中稳定至少 2 小时，在 50％的小鼠血清中稳定至少 2 小时，在 50％的小鼠血浆中稳定至少 2 小时，或其组合。

68. 权利要求 1 至 67 中任一项的聚合物载体，其包含至少两种不同的多核苷酸。

69. 权利要求 1 至 68 中任一项的聚合物载体，其中所述聚合物载体包含 5 个以上、20 个以上、50 个以上或 100 个以上的第一可带电荷种类，其中各第一可带电荷种类是带电荷或可带电荷成为阴离子性种类。

70. 权利要求 1 至 69 中任一项的聚合物载体，其中所述聚合物载体包含 5 个以上、20 个以上、50 个以上或 100 个以上的第二可带电荷种类，其中各第二可带电荷种类是带电荷或可带电荷成为阳离子性种类。

71. 权利要求 1 至 70 中任一项的聚合物载体，其中所述疏水性嵌段包含 5 个以上、20 个以上、50 个以上或 100 个以上的第一可带电荷种类，其中各第一可带电荷种类是带电荷或可带电荷成为阴离子性种类。

72. 权利要求 1 至 71 中任一项的聚合物载体，其中所述疏水性嵌段是共聚物嵌段。

73. 一种聚合物载体，其包含：

a. 多个为装配成聚合物载体的共聚物的聚合物，所述聚合物载体包含芯和壳，该嵌段共聚物包含：

i. 至少一个疏水性嵌段，所述疏水性嵌段包含多个在约中性 pH 下为阳离子性的种类；

ii. 多核苷酸载体嵌段，所述多核苷酸载体嵌段在约中性 pH 下为聚阴离子性的；和

b. 至少一个多核苷酸，

74. 权利要求 73 的聚合物载体，其中所述多核苷酸不存在于所述聚合物载体的芯中。

75. 权利要求 73 或 74 中任一项的聚合物载体，其中所述至少一个疏水性嵌段在约中性 pH 下包含多个阳离子性种类。

76. 聚合物载体，其包含：

a. 多个为装配成聚合物载体的共聚物的聚合物，所述聚合物载体包含芯和壳，该嵌段共聚物包含：

i. 至少一个疏水性嵌段，所述疏水性嵌段包含多个在约中性 pH 下为阴离子性的种类；

ii. 多核苷酸载体嵌段；和

b. 至少 10 个多核苷酸，所述多核苷酸不存在于所述聚合物载体的芯中。

77. 权利要求 76 的聚合物载体，其中所述聚合物载体包含至少 20 个多核苷酸。

78. 一种聚合物载体，其包含 ：

a. 多个为装配成聚合物载体的共聚物的聚合物，所述聚合物载体包含芯和壳，该嵌段共聚物包含 ：

i. 至少一个疏水性嵌段 ；

ii. 包含多个在约中性 pH 下为阴离子性的种类的多个单体单元 ；和

b. 至少一个多核苷酸，

所述聚合物载体在具有 pH 约 7.4 的含水介质中具有约 10nm 至约 200nm 的流体动力学直径。

聚合物载体

[0001] 交叉参考

[0002] 本申请要求2008年5月13日提交的美国临时申请号61/052,908、2008年5月13日提交的美国临时申请号61/052,914、2008年8月22日提交的美国临时申请号61/091,294、2008年11月6日提交的美国临时申请号61/112,054、2008年12月24日提交的美国临时申请号61/140,779和2009年4月21日提交的美国临时申请号61/171,358的利益，将上述各申请通过参考完整引入本文。

[0003] 关于联邦政府资助的研究的申明

[0004] 本申请是在由国立卫生研究院提供的合同号NIH1R01EB002991下的政府资助下进行的。政府具有本发明的某些权利。

[0005] 发明背景

[0006] 在某些情况下，给活细胞提供多核苷酸（例如，寡核苷酸）是有益的。在一些情况中，给活细胞递送这种多核苷酸提供了治疗有益性。

[0007] 发明概述

[0008] 本文中描述了用于向细胞内递送（即，胞内递送）至少一个核苷酸和/或其他治疗剂的组合物。在某些实施方案中，这种胞内递送是体外的；在其他实施方案中，这种胞内递送是体内的。在某些实施方案中，用于递送的组合物包含聚合物，包括聚合物载体。此类聚合物载体任选地以胶束，特别是真实胶束的形式存在。因此，本文中描述了与至少一个核苷酸和/或其他治疗剂组合的聚合物载体（例如，胶束）。此类组合任选地以共价和/或非共价相互作用的形式存在。此类组合任选地还包含另外的试剂例如用于将该组合靶向期望的细胞的试剂。本文中还描述了此类胞内递送组合物用于治疗和/或诊断目的的用途。此类用途包括改变细胞中的基因表达，例如，在细胞中敲低或激活基因。

[0009] 在本文中的某些实施方案中提供了聚合物载体，其包含(i)多个装配成聚合物载体的聚合物，所述聚合物载体包含芯和壳，该聚合物包含：至少一个疏水性部分；多个在约中性pH包含第一阴离子性种类的单体单元；和(ii)至少一个核苷酸（例如，至少一个多核苷酸）。在某些实施方案中，所述聚合物包括共聚物、嵌段共聚物等。当pH约为该可带电荷种类的pKa时，所述可带电荷种类的两种形式之间将存在平衡分布。在阴离子性种类的情况下，当pH为该阴离子性种类的pKa时，约50％的群体是阴离子性的，并且约50％将不带电荷。pH离该可带电荷种类的pKa越远，则这种平衡将存在相应移动，从而在更高的pH值下，阴离子形式占优势，而在更低的pH值下，不带电荷形式占优势。本文中描述的实施方案包括在任意pH值下的共聚物形式。

[0010] 本文中的某些实施方案中提供了聚合物载体，其包含：

[0011] a.多个为装配成聚合物载体的嵌段共聚物的聚合物，所述聚合物载体包含芯和壳，该嵌段共聚物包含：

[0012] i.至少一个疏水性嵌段；

[0013] ii.多个单体单元，所述单体单元在约中性pH下包含多个阴离子性种类；和

[0014] b.至少1个核苷酸（例如，至少一个多核苷酸）。

[0015] 在具体的实施方案中，所述至少一个核苷酸（例如，至少一个多核苷酸）不存在于聚合物载体的芯中。

[0016] 本文中的一些实施方案中提供了聚合物载体（聚合物组合物），其包含：

[0017] a. 多个为装配成聚合物载体的嵌段共聚物的聚合物，所述聚合物载体包含芯和壳，该共聚物包含：

[0018] i. 至少一个疏水性嵌段，所述疏水性嵌段在约中性 pH 下包含多个阴离子性种类；

[0019] ii. 多核苷酸载体嵌段，所述多核苷酸载体嵌段在约中性 pH 下为亲水性的；

[0020] b. 至少 1 个多核苷酸。

[0021] 在一些实施方案中，所述多核苷酸载体嵌段在约中性 pH 为聚阳离子性的，在约中性 pH 为聚阴离子性的，在约中性 pH 下不带电荷（即，基本上不带电荷），或在约中性 pH 下为两性离子性的。在一些实施方案中，约中性 pH 为 pH 约 7（例如，pH 约 7.2 至约 7.4）。

[0022] 在本文中的一些实施方案中提供了聚合物载体（聚合物组合物），其包含：

[0023] a. 多个为装配成聚合物载体的嵌段共聚物的聚合物，所述聚合物载体包含芯和壳，该共聚物包含：

[0024] i. 至少一个疏水性嵌段，所述疏水性嵌段在约中性 pH 下包含多个阴离子性种类；

[0025] ii. 多核苷酸载体嵌段，所述多核苷酸载体嵌段在约中性 pH 下为聚阳离子性的；

[0026] b. 至少 1 个多核苷酸。

[0027] 在具体的实施方案中，所述多核苷酸不存在于聚合物载体的芯中。在一些具体的实施方案中，所述至少一个疏水性嵌段在约中性 pH 下包含多个阳离子性种类。

[0028] 在本文中的某些实施方案中，提供了聚合物载体（或聚合物组合物），其包含：

[0029] a. 多个为装配成聚合物载体的嵌段共聚物的聚合物，所述聚合物载体包含芯和壳，该嵌段共聚物包含：

[0030] i. 至少一个疏水性嵌段，所述疏水性嵌段在约中性 pH 下包含多个阴离子性种类；

[0031] ii. 多核苷酸载体嵌段；

[0032] b. 至少 10 个多核苷酸，所述多核苷酸不存在于聚合物载体的芯中。

[0033] 在具体的实施方案中，所述聚合物载体（聚合物组合物）包含至少 20 个多核苷酸。

[0034] 在本文中的一些实施方案中提供了聚合物载体，其包含：

[0035] a. 多个为装配成聚合物载体的嵌段共聚物的聚合物，所述聚合物载体包含芯和壳，该嵌段共聚物包含：

[0036] i. 至少一个疏水性嵌段；

[0037] ii. 在约中性 pH 下的多个阴离子性种类；和

[0038] b. 至少一个多核苷酸。

[0039] 在具体的实施方案中，所述聚合物载体在具有 pH 约 7.4 的含水介质中具有约 10nm 至约 200nm 的流体动力学直径。

[0040] 在一些实施方案中，本文中描述的任意聚合物载体的所述至少一个核苷酸连接至聚合物载体（或其组成聚合物），其中此类连接以任意适当的方式（例如，非共价相互作用，例如静电相互作用、疏水性相互作用、亲水性相互作用等；共价相互作用等或其组合）来实现。在某些实施方案中，本文中描述的任意聚合物载体的至少一个核苷酸是多核苷酸（例

如，第一多核苷酸）。在一些实施方案中，所述聚合物载体包含多个多核苷酸（例如，多个第一多核苷酸和/或多个第二多核苷酸，并且如所述一样多的许多不同的多核苷酸）。在具体的实施方案中，多核苷酸是基因表达调节剂，在更具体要求的实施方案中，基因表达调节剂包括敲低剂（例如，敲低寡核苷酸）。在更具体的实施方案中，敲低剂是 siRNA、反义寡核苷酸、miRNA 或 shRNA。在更具体的实施方案中，敲低剂是 siRNA。

[0041] 在一些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体包含靶向部分。在具体的实施方案中，靶向部分被连接至聚合物载体的壳部分。在更具体的实施方案中，通过与多核苷酸共价键合将靶向部分连接至壳部分。

[0042] 在某些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体的聚合物是嵌段共聚物、单嵌段共聚物或梯度聚合物。在一些实施方案中，本文中描述的任意聚合物载体还包含不连接至多核苷酸的另外的聚合物。在一些实施方案中，所述另外的聚合物是稀释聚合物或靶向部分载体聚合物。在某些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体还包含连接至至少一个第二核苷酸（例如，第二多核苷酸）的另外的聚合物。在某些实施方案中，所述至少一个第二核苷酸（例如，第二多核苷酸）与所述至少一个核苷酸（例如，第一多核苷酸）不同。

[0043] 在一些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体包含多个聚合物，聚合物中具有芯部分的每一个（全部）聚合物基本上是相同的。

[0044] 在某些实施方案中，本文中提供的聚合物载体是膜去稳定化的。在具体的实施方案中，聚合物载体在酸性 pH（例如，内体 pH）下是膜去稳定化的，但在约中性 pH 下不是膜去稳定化的。

[0045] 在具体的实施方案中，本文中提供了作为胶束、特别是真实胶束形式的聚合物载体。

[0046] 在某些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体包含具有疏水性嵌段的聚合物，其中所述疏水性嵌段包含多个第一可带电荷种类。在一些实施方案中，所述多个第一可带电荷种类在约中性 pH 下基本上是阴离子性的。在某些实施方案中，所述多个第一可带电荷种类在约酸性 pH 或内体 pH 下基本上不带电荷。在一些实施方案中，所述多个第一可带电荷种类在约 7 或更低、约 6.8 或更低、约 6.6 或更低、约 6.4 或更低、约 6.2 或更低、约 6 或更低、约 5.8 或更低或约 5.6 或更低的 pH 下基本上不带电荷。在具体的实施方案中，所述多个第一可带电荷种类在约 6 或更低的 pH 下基本上不带电荷。在具体的实施方案中，所述多核苷酸载体嵌段的形式（例如，聚阳离子性的、聚阴离子性的、中性的或两性离子性的）在酸性 pH（例如，内体 pH）下与其在约中性 pH 下的形式基本上相同。

[0047] 在一些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体还包含多个具有大于 1 的 π 值的疏水性单体单元，该疏水性单体单元为疏水性嵌段的一部分或作为该疏水性嵌段的补充。化合物的 π 值是其相对亲水性-亲脂性值的度量（例如，参见 Cates, L.A., ″ Calculation of DrugSolubilities by Pharmacy Students″ Am.J.Pharm. Educ.45:11-13(1981)）。

[0048] 在某些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体包含多个已自发地自我装配成聚合物载体的聚合物。在一些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体包含一个或多个聚合物，其中所述至少一个核苷酸（例如，多核苷酸）是所述聚合物的嵌段。在一些实施方案中，所述多核苷酸形成或存在于聚合物载体的壳中。在某些实施方案中，本文中提供的任

意聚合物载体在聚合物的壳中包含至少一个多核苷酸。在一些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体包含膜去稳定化的可带电荷的疏水性嵌段。

[0049] 在一些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体包含至少一个包含多核苷酸载体嵌段的聚合物。在某些实施方案中，聚合物载体的壳包含所述多核苷酸载体嵌段．在一些实施方案中，多核苷酸载体嵌段是非肽的（即，不是聚氨基酸）。在某些实施方案中本文中提供的，通过共价键、非共价相互作用或其组合将聚合物载体的所述至少一个核苷酸连接至多核苷酸载体嵌段。在一些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体的多核苷酸载体嵌段是聚阳离子性的。在某些实施方案中，所述多核苷酸载体嵌段是 siRNA 载体嵌段。在一些实施方案中，所述多核苷酸载体嵌段（例如，siRNA 载体嵌段）未被 PEG 化。在更具体的实施方案中，所述多核苷酸载体嵌段的骨架未被 PEG 化。在某些实施方案中，所述至少一个核苷酸（例如，多核苷酸，包括寡核苷酸）是包含 x 个阴离子的聚阴离子，并且其中所述多核苷酸载体嵌段（例如，siRNA 载体嵌段）包含约 0.7•x 个阳离子或更多个阳离子。在某些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体的多核苷酸载体嵌段是均聚物嵌段。在具体的实施方案中，所述均聚物嵌段是聚 N,N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 乙基丙烯酸酯 (ethacrylate)、聚 N，N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 甲基丙烯酸酯或聚 N，N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 丙烯酸酯。在一些实施方案中，多核苷酸载体嵌段是共聚物，其包含例如 (i) 至少一个 N,N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 乙基丙烯酸酯单体单元、至少一个 N,N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 甲基丙烯酸酯、至少一个 N，N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 丙烯酸酯或其组合；和 (ii) 至少一个间隔子单体单元。

[0050] 在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体包含第一可带电荷种类，所述种类为羧酸根、磺酰胺基团、磺酸根、亚磺酸根、硫酸根、磷酸根、次膦酸根或亚磷酸根。在某些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体的聚合物在任意嵌段（例如，疏水性嵌段，亲水性嵌段、壳嵌段、芯嵌段等）中包含间隔子单体单元。在一些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体包含含有至少一个间隔子单体单元的疏水性嵌段。

[0051] 在某些实施方案中，本文中提供的聚合物载体包含含有第一和第二可带电荷种类的疏水性嵌段。在一些实施方案中，所述第一可带电荷种类是如本文中描述的，并且所述第二可带电荷种类在质子化时为阳离子性的种类。在具体的实施方案中，所述第二可带电荷种类的 pKa 为约 6.5 至约 9。在一些实施方案中，所述第二可带电荷电荷的种类是非环胺或亚胺、环胺或亚胺或含氮的杂芳基。在某些实施方案中，至少一个所述第一可带电荷种类和至少一个所述第二可带电荷种类存在于单个单体单元上。在一些实施方案中，所述第一可带电荷种类发现存在于第一可带电荷的单体单元上，并且所述第二可带电荷种类在第二可带电荷的单体单元上。在某些实施方案中，所述第一可带电荷种类在去质子化时为阴离子性种类，第二可带电荷种类在质子化时为阳离子性种类，并且其中所述阴离子性种类与所述阳离子性种类之比在约中性 pH 下为约 1 ： 4 至约 4 ： 1。在一些实施方案中，所述第一可带电荷单体单元与所述第二可带电荷单体单元之比为约 1 ： 4 至约 4 ： 1。在某些实施方案中，所述第一可带电荷的单体单元是 (C_2-C_8) 烷基丙烯酸。在一些实施方案中，低于 50％的第二可带电荷单体单元在 pH 约 8 下带电荷成为阳离子性种类。在某些实施方案中，所述第二可带电荷的单体单元是 N,N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 乙基丙烯酸

酯、N，N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 甲基丙烯酸酯或 N，N- 二 (C_1-C_6) 烷基 - 氨基 (C_1-C_6) 烷基 - 丙烯酸酯。

[0052] 在某些实施方案中，所述聚合物载体包含 5 个以上、20 个以上、50 个以上或 100 个以上为带电荷或可带电荷成为阴离子性种类的可带电荷种类。在一些实施方案中，所述聚合物载体包含 5 个以上、20 个以上、50 个以上或 100 个以上带电荷或可带电荷成为阳离子性种类的可带电荷种类。在某些实施方案中，所述聚合物载体包含 5 个以上、20 个以上、50 个以上或 100 个以上第一可带电荷种类。在具体的实施方案中，各第一可带电荷种类带电荷或可带电荷成为阴离子性种类。在某些实施方案中，所述聚合物载体包含 5 个以上、20 个以上、50 个以上或 100 个以上第二可带电荷种类。在具体的实施方案中，各第二可带电荷种类带电荷或可带电荷成为阳离子性种类。在某些实施方案中，本文中提供的聚合物载体中存在的嵌段共聚物的疏水性嵌段中包含 5 个以上、20 个以上、50 个以上或 100 个以上第一可带电荷种类。在具体实施方案中，各第一可带电荷种类带电荷或可带电荷成为阴离子性种类。在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体中存在的嵌段共聚物的疏水性嵌段包含 5 个以上、20 个以上、50 个以上或 100 个以上第二可带电荷种类。在具体的实施方案中，各第二可带电荷种类带电荷或可带电荷成为阳离子性种类。

[0053] 在本文中描述的任意聚合物载体实施方案的某些另外或可替代选择的实施方案中提供了包含膜去稳定化的可带电荷的疏水性嵌段的聚合物载体，所述疏水性嵌段包含多个不可带电荷的单体单元。在一些情况下，该不可带电荷的单体单元包含疏水性种类。在其他情况下，第一和 / 或第二可带电荷种类包含或也包含所述疏水性种类。在一些实施方案中，该不可带电荷的单体单元是 (C_2-C_8) 烷基 - 乙基丙烯酸酯、(C_2-C_8) 烷基 - 甲基丙烯酸酯或 (C_2-C_8) 烷基 - 丙烯酸酯。

[0054] 在一些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体在 pH 约 7.4 的含水介质中具有约 10nm 至约 200nm 的平均流体动力学直径。在一些实施方案中，聚合物载体在 pH 约 7.4 的含水介质中具有约 20nm 至约 100nm 的平均流体动力学直径。在某些实施方案中，聚合物载体在 pH 约 7.4 的含水介质中具有约 30nm 至约 80nm 的平均流体动力学直径。

[0055] 在一些实施方案中，本文中提供了聚合物载体，其包含至少 1 个、至少 2 个、至少 5 个、至少 20 个、至少 25 个、至少 30 个、至少 40 个、至少 50 个、至少 100 个、至少 200 或至少 250 个多核苷酸 (例如，寡核苷酸或 siRNA)。在一些实施方案中，本文中提供了聚合物载体，其包含 1 至约 250 个、2 至约 250 个、5 至约 250 个、20 至约 250 个、约 25 至约 250 个、约 30 至约 250 个、40 至约 250 个、50 至约 250 个、约 100 至约 250 个和 200 至约 250 个单个多核苷酸 (例如，寡核苷酸或 siRNA)。在某些实施方案中，本文中提供了包含至少 2 个多核苷酸 (例如寡核苷酸或 siRNA) 的聚合物载体。在某些实施方案中，此类多核苷酸以任意适当的方式连接至本文中的聚合物载体和 / 或聚合物。在一些实施方案中，所述多核苷酸是 siRNA。

[0056] 在某些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体包含嵌段共聚物，其中疏水性嵌段的数均分子量与多核苷酸载体嵌段的数均分子量之比是约 1 ： 5 至约 5 ： 1，或约 1 ： 1 至约 5 ： 1(或例如约 5 ： 4 至 5 ： 1)。在一些实施方案中，疏水性嵌段的数均分子量与多核苷酸载体嵌段的数均分子量之比是约 3 ： 2 至约 3 ： 1。在具体的实施方案中，疏水性嵌段的数均分子量与多核苷酸载体嵌段的数均分子量之比是约 2 ： 1。

[0057] 在某些实施方案中，本文中提供的任何聚合物载体包含作为 siRNA 载体嵌段的多核苷酸载体嵌段。在一些实施方案中，所述 siRNA 载体嵌段具有约 7,000 道尔顿至约 50,000 道尔顿的数均分子量 (Mn)。在一些实施方案中，所述 siRNA 载体嵌段具有约 7,000 道尔顿至约 20,000 道尔顿的数均分子量 (Mn)。在某些实施方案中，所述 siRNA 载体嵌段具有约 10,000 道尔顿至约 20,000 道尔顿的数均分子量 (Mn)。在一些实施方案中，所述 siRNA 载体嵌段具有约 10,000 道尔顿的数均分子量 (Mn)。在某些实施方案中，所述 siRNA 载体嵌段具有约 20,000 道尔顿的数均分子量 (Mn)。在一些实施方案中，所述疏水性嵌段具有约 2,000 道尔顿至约 200,000 道尔顿、约 2,000 道尔顿至约 200,000 道尔顿、约 2,000 道尔顿至约 100,000 道尔顿、约 10,000 道尔顿至约 100,000 道尔顿的数均分子量 (Mn)。在一些实施方案中，所述疏水性嵌段具有大约约 10,000 道尔顿至约 50,000 道尔顿的数均分子量 (Mn)。在某些实施方案中，所述疏水性嵌段具有大约 20,000 道尔顿至约 50,000 道尔顿的数均分子量 (Mn)。在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体包含多个膜去稳定化嵌段共聚物，其拥有数均分子量 (Mn) 大于 100,000 道尔顿的芯嵌段。在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体包含多个膜去稳定化嵌段共聚物，其拥有数均分子量 (Mn) 大于 50,000 道尔顿的壳嵌段。

[0058] 在一些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体的嵌段共聚物具有小于 2、小于 1.8、小于 1.6、小于 1.5、小于 1.4 或小于 1.3 的多分散性指数。

[0059] 在一些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体在 pH 约 7.4 下是稳定的。在某些实施方案中，所述聚合物载体在 pH 约 5.8 下明显不如在 pH 约 7.4 下稳定。在一些实施方案中，在 pH 约 5.8 和浓度约 18μg/mL 下 90％以上的聚合物载体是去稳定化的，并且在 pH 约 7.4 和浓度约 18μg/mL 下少于 10％的聚合物载体是去稳定化的。

[0060] 在某些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体在 50％的人血清中稳定至少 2 小时、至少 4 小时、至少 6 小时、至少 8 小时、至少 12 小时、至少 18 小时、至少 24 小时、至少 48 小时或更长时间。在一些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体在至少 50％的人血浆中稳定至少 2 小时、至少 4 小时、至少 6 小时、至少 8 小时、至少 12 小时、至少 18 小时、至少 24 小时、至少 48 小时或更长时间。在某些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体在 50％的小鼠血清中稳定至少 2 小时、至少 4 小时、至少 6 小时、至少 8 小时、至少 12 小时、至少 18 小时、至少 24 小时、至少 48 小时或更长时间。在某些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体在 50％的小鼠血浆中稳定至少 2 小时、至少 4 小时、至少 6 小时、至少 8 小时、至少 12 小时、至少 18 小时、至少 24 小时、至少 48 小时或更长时间。在一些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体在 50％的人血清中稳定至少 2 小时，在至少 50％的人血浆中稳定至少 2 小时，在 50％小鼠血清中稳定至少 2 小时，在至少 50％的小鼠血浆中稳定至少 2 小时，或其组合。

[0061] 在某些实施方案中，本文中描述了组成本文中描述的聚合物载体的任意聚合物。即，聚合物亚单元（例如，膜去稳定化嵌段共聚物）或单个的聚合物（无论是否以聚合物载体的形式存在）也是本文中描述的实施方案。为了清楚起见，本文中提供的各个和每一个膜去稳定化嵌段共聚物（作为单个聚合物或作为本文中描述的聚合物载体的聚合物单元 / 链 / 组分）均在本文中描述的本发明的范围内。

[0062] 附图概述

[0063] 本发明的新特征特别在所附权利要求中举出。通过参照举出示例性的其中使用本发明原理的实施方案和附图的如下详细描述，可以更好地理解本发明的特征和优点：

[0064] 图 1A：RAFT 合成聚合物的组成和特性的示例性实例；

[0065] 图 1B：PEGMA-DMAEMA 共聚物的组成和性质的示例性实例；

[0066] 图 2：嵌段共聚物 PRx0729v6 的 NMR 光谱分析的举例说明性实例；

[0067] 图 3：与 s iRNA 复合的聚合物 PRx0729v6 的粒度的动态光散射 (DLS) 测定的举例说明性实例。

[0068] 图 4：不同电荷比的聚合物 PRx0729v6/siRNA 复合物的凝胶迁移分析的举例说明性实例。

[0069] 图 5：聚合物 PRx0729v6 的临界稳定性浓度 (critical stabilityconcentration，CSC) 的举例说明性实例。

[0070] 图 6：有机溶剂中聚合物 PRx0729v6 颗粒的稳定性的举例说明性实例。

[0071] 图 7：siRNA- 胶束复合物在培养的哺乳动物细胞中的敲低活性的举例说明性实例。

[0072] 图 8：聚合物胶束及其 siRNA 复合物的膜去稳定化活性的举例说明性证明。

[0073] 图 9：聚合物 PRx0729v6 的举例说明性透射电子显微镜 (TEM) 分析的举例说明性实例。

[0074] 图 10：聚合物 -siRNA 复合物的细胞摄取和细胞内分布的荧光显微镜检查的举例说明性实例。

[0075] 图 11：pH 对聚合物结构的影响的举例说明性实例。

[0076] 图 12：siRNA- 胶束复合物在培养的哺乳动物细胞中的敲低数据的举例说明性概述。

[0077] 图 13：半乳糖末端官能化的聚 [DMAEMA]-macro CTA 的举例说明性实例。

[0078] 图 14：[PEGMA-MAA(NHS)]-[B-P-D] 的合成的举例说明性实例。

[0079] 图 15：PEGMA 和 MAA-NHS 的 RAFT 共聚合的举例说明性实例。

[0080] 图 16：半乳糖官能化的 DMAEMA-MAA(NHS) 或 PEGMA-MAA(NHS) 二嵌段共聚物的举例说明性实例。

[0081] 图 17：可缀合的 siRNA、肽和吡啶基二硫胺的结构的举例说明性实例。

[0082] 发明详述

[0083] 本文中提供了适合用于将多核苷酸（包括例如寡核苷酸）递送至活细胞的聚合物载体。在一些实施方案中，聚合物载体包含多个聚合物单元和任选地至少一个多核苷酸。在某些实施方案中，本文中提供的聚合物载体是生物相容性的、稳定的（包括化学和 / 或物理稳定的）和 / 或可重现地合成的。此外，在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体是无毒性的（例如，展示低毒性），保护多核苷酸（例如寡核苷酸）净载荷 (payload) 免于降解，通过天然存在的过程（例如，通过内吞作用）进入活细胞，和 / 或在与细胞接触后将多核苷酸（例如，寡核苷酸）净载荷递送入活细胞的细胞质。在某些情况下，多核苷酸（例如，寡核苷酸）是 siRNA 和 / 或另一种改变细胞中至少一个基因表达的“基于核苷酸的”试剂。因此，在某些实施方案中，本文中提供的聚合物载体可用于将 siRNA 递送入细胞。在某些情况下，所述细胞是体外的，而在其他情况下，所述细胞是体内的。在一些实施方案中，给有此需

要（例如具有敲低某一基因的需要，其中所述基因能够被施用的 siRNA 敲低）的个体施用治疗有效量的包含 siRNA 的聚合物载体。在具体的情况下，所述聚合物载体可用于或经特殊设计用于将 siRNA 递送至个体内被特异性靶向的细胞。

[0084] 具体地，在本文中的某些实施方案中，提供了具有芯 - 壳结构的聚合物载体，其包含 :(i) 多个装配成聚合物载体的嵌段共聚物 ;和 (ii) 存在于载体的壳中的至少一个寡核苷酸。在某些实施方案中，聚合物载体是纳米粒。在具体的实施方案中，所述聚合物载体是胶束，特别地是真实的胶束。在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体包含 a.）多个为装配成聚合物载体的嵌段共聚物的聚合物，该聚合物载体包含芯和壳，所述嵌段共聚物包含 (i.）至少一个疏水性嵌段，和 (ii.）多个单体单元，其在约中性 pH 下包含第一阴离子性种类，和 b.）至少一个多核苷酸。

[0085] 在一个实施方案中，本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）或其组成部分是膜去稳定化的（例如，包含膜去稳定化嵌段、基团、部分等）。在另外或可替代选择的实施方案中，所述多个嵌段共聚物形成聚合物载体（例如，胶束）的壳和芯。在具体的实施方案中，所述聚合物载体包含亲水性和 / 或带电荷的壳。在另外的或可替代选择的实施例中，所述聚合物载体包含基本上是疏水性的芯（例如，芯包含疏水性基团、单体单元、部分、嵌段等）。在具体的实施方案中，一个或多个所述嵌段共聚物，各自包含 (1) 形成聚合物载体（例如，胶束）的壳的亲水性带电荷嵌段 ;和 (2) 形成聚合物载体（例如，胶束）的芯的基本上疏水的嵌段。在一些实施方案中，一个或多个所述嵌段共聚物包含多个第一可带电荷种类和多个疏水性增强子。在具体的实施方案中，所述第一可带电荷种类是阴离子性的可带电荷种类（例如，在特定 pH 下带电荷或变得带电荷）。在另外的实施方案中，所述一个或多个嵌段共聚物包含第二可带电荷种类（即，亲水性嵌段可具有 1 种以上不同类型的阴离子性种类）。在某些实施方案中，所述聚合物载体（例如，胶束）包含至少一个多核苷酸（例如，寡核苷酸）。在具体的实施方案中，所述多核苷酸（例如，寡核苷酸）不存在于聚合物载体（例如，胶束）的芯中。

[0086] 在某些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体包含具有疏水性嵌段的聚合物，其中所述疏水性嵌段包含多个第一可带电荷种类。在一些实施方案中，所述多个可带电荷种类在约中性 pH 下基本上是阴离子的。在某些实施方案中，所述多个第一可带电荷种类在约酸性 pH 或内体 pH 下基本上不带电荷。在一些实施方案中，所述多个第一可带电荷种类在 pH 约 7 或更低、约 6.8 或更低、约 6.6 或更低、约 6.4 或更低、约 6.2 或更低、约 6 或更低、约 5.8 或更低、或约 5.6 或更低下基本上不带电荷。在具体的实施方案中，所述多个第一可带电荷种类在 pH 约 6 或更低下基本上不带电荷。在某些实施方案中，本文中提供的聚合物载体包含含有第一和第二可带电荷种类的疏水性嵌段。在一些实施方案中，所述第一可带电荷种类是如本文所述，并且第二可带电荷种类在质子化时为阳离子性种类。在具体的实施方案中，第二可带电荷种类的 pKa 为约 6.5 至约 9、约 5 至约 9、约 6 至约 9、约 6 至约 8 或约 6.5 至约 8。

[0087] 在一些实施方案中，本文中提供的任意聚合物载体还包含多个疏水性单体单元，该疏水性单体单元是疏水性嵌段的部分或作为疏水性嵌段的补充。

[0088] 在一些实施方案中，本文中的聚合物载体（例如，胶束）和 / 或聚合物是非肽的。

[0089] 在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）包含多个单嵌段聚合

物。在某些实施方案中，单嵌段聚合物和 / 或聚合物载体（例如，其单体单元、部分、种类和 / 或基团）是膜去稳定化的。在某些实施方案中，至少一个所述单嵌段聚合物包含多个阴离子性的可带电荷种类和多个疏水性种类。所述聚合物载体（例如，胶束）包含至少一个多核苷酸（例如，寡核苷酸）。在具体的实施方案中，所述多核苷酸（例如，寡核苷酸）不存在于聚合物载体（例如，胶束）的芯中。

[0090] 在一个实施方案中，本文中提供的膜去稳定化聚合物载体（例如，胶束）包含多个嵌段共聚物。在一些实施方案中，此类嵌段共聚物形成聚合物载体（例如，胶束）的壳和芯。在某些实施方案中，所述壳和 / 或壳嵌段是亲水性的和 / 或带电荷的。在一些实施方案中，所述芯和 / 或芯嵌段基本上是疏水性的。在具体的实施方案中，所述基本上疏水性的芯包含正电荷和 / 或负电荷。在更具体的实施方案中，所述疏水性芯和 / 或芯嵌段包含大体上相等数目的正电荷和负电荷（即，芯和 / 或芯嵌段的电荷大体上是净中性的）。在一些实施方案中，一个或多个或全部所述嵌段共聚物各自包含 (1) 形成聚合物载体（例如，胶束）的壳的亲水性带电荷的嵌段；和 (2) 形成聚合物载体（例如，胶束）的芯的大体上疏水性的嵌段。在一些实施方案中，所述嵌段共聚物包含多个阴离子性的可带电荷种类，多个疏水性部分，并且是膜去稳定化的。聚合物载体（例如，胶束）的芯或嵌段共聚物的芯嵌段任选地包含阳离子性种类。在一些实施方案中，聚合物载体（例如，胶束）或嵌段共聚物的芯嵌段任选地包含阴离子性种类。在具体的实施方案中，聚合物载体（例如，胶束）或嵌段共聚物的芯嵌段包含至少一个阳离子性种类和至少一个阴离子性种类。胶束还包含至少一个多核苷酸（例如，寡核苷酸）。在具体的实施方案中，所述至少一个多核苷酸（例如，寡核苷酸）不存在于胶束的芯中。

[0091] 在一些情况下，所述聚合物载体（例如，胶束）是由多个嵌段共聚物形成的，其通过嵌段共聚物的疏水性嵌段（例如，芯嵌段）的相互作用自缔合，和 / 或通过它们芯中的疏水性相互作用来稳定。在一些实施方案中，聚合物载体（例如，胶束）包含两种或更多种具有不同结构和功能的不同嵌段共聚物种类。

[0092] 在某些实施方案中，本文中提供的聚合物载体可用于将多核苷酸（例如，寡核苷酸）递送入有此需要的个体。在一些实施方案中，本文中描述的聚合物载体的聚合物（例如，嵌段共聚物或单嵌段聚合物）包含多核苷酸载体的嵌段（或在单嵌段共聚物的情况下包含多核苷酸载体部分）。在一些实施方案中，嵌段共聚物的壳嵌段或亲水性嵌段是或包含多核苷酸载体嵌段。所述多核苷酸载体嵌段包含一个或多个类型的单体单元（例如，为均聚物嵌段或异聚物嵌段）。在一些实施方案中，所述聚合物载体包含多核苷酸（例如，寡核苷酸），所述多核苷酸非共价地和 / 或共价地连接至聚合物载体的一个或多个嵌段共聚物的多核苷酸载体嵌段。在具体的实施方案中，siRNA 共价地连接至聚合物载体（例如，胶束）的嵌段共聚物。在一些具体的实施方案中，siRNA 非共价地连接至聚合物载体（例如，胶束）的嵌段共聚物。在具体的实施方案中，siRNA 非共价地和共价地连接至聚合物载体（例如，胶束）的嵌段共聚物。在一些具体的实施方案中，siRNA 形成聚合物载体的壳的至少一部分（例如，存在于其中）。在一些具体的实施方案中，siRNA 共价地连接至疏水性嵌段。

[0093] 在某些实施方案中，本文中提供的任何聚合物载体包含嵌段共聚物，其中疏水性嵌段和 / 或芯嵌段的数均分子量与多核苷酸载体嵌段和 / 或壳嵌段的数均分子量之比是

约 1 ： 10 至约 5 ： 1、约 1 ： 5 至约 5 ： 1，或约 1 ： 1 至约 5 ： 1（或例如，约 5 ： 4 至 5 ： 1）。在一些实施方案中，所述疏水性嵌段和 / 或芯嵌段的数均分子量与所述多核苷酸载体嵌段和 / 或壳嵌段的数均分子量之比是约 3 ： 2 至约 3 ： 1。在具体的实施方案中，所述疏水性嵌段和 / 或芯嵌段的数均分子量与所述多核苷酸载体嵌段和 / 或壳嵌段的数均分子量之比是约 2 ： 1。

[0094] 在某些实施方案中，本文中提供的聚合物载体包含多个膜去稳定化嵌段共聚物。这样，聚合物载体在本文中还被描述为膜去稳定化的，因为它们至少部分地由膜去稳定化嵌段共聚物组成。

[0095] 在一些实施方案中，膜去稳定化的嵌段共聚物包含 (i) 多个疏水性单体残基，(ii) 多个具有可带电荷种类的阴离子性单体残基，该可带电荷种类在血清生理 pH 下是阴离子性的，并且在内体 pH 下基本上是中性的或不带电荷，以及 (iii) 任选地多个阳离子性的单体残基。在一些实施方案中，嵌段共聚物中阴离子性与阳离子性种类之比的变动可以改变本文中提供的聚合物载体的膜去稳定化活性。在一些此类实施方案中，嵌段共聚物中阴离子性：阳离子性种类的比例在血清生理 pH 下在约 4 ： 1 至约 1 ： 4 的范围内。在一些此类实施方案中，嵌段聚合物的疏水性嵌段中阴离子性与阳离子性种类之比的变化可以改变本文中描述的聚合物载体的膜去稳定化活性。在一些此类实施方案中，本文中描述的嵌段共聚物的疏水性嵌段中阴离子性：阳离子性种类之比在血清生理 pH 下在约 1 ： 2 至约 3 ： 1，或约 1 ： 1 至约 2 ： 1 的范围内。

[0096] 在一些实施方案中，本文中描述的聚合物载体以 pH 依赖性的方式使内体膜去稳定。在不同的实施方案中，所述膜去稳定化嵌段共聚物当装配在聚合物载体中和 / 或当独立于装配的聚合物载体形式（例如，当聚合物载体被解离和 / 或去稳定化时）而存在时，能使膜去稳定。在一些实施方案中，在生理 pH（例如，循环生理 pH）下或其附近，组成聚合物载体的聚合物具有程度最低的膜去稳定化作用，但在暴露于降低的 pH（例如，内体 pH）时，聚合物是膜去稳定化的。在某些情况下，这种向膜去稳定化状态的转变是通过掺入聚合物中的微酸性残基的质子化发生的，这样的质子化导致聚合物的疏水性增加。在某些情况下，聚合物的增加的疏水性导致聚合物载体的构象变化，从而使聚合物载体具有膜去稳定化性质（例如，引起膜的去稳定化）。在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体的膜去稳定化机制不依赖于聚阳离子例如 PEI 或其他聚阳离子的完全质子 - 海绵膜去稳定化机制。

[0097] 在某些实施方案中，本文中提供的聚合物载体包含一个或多个多核苷酸，例如一个或多个寡核苷酸、一个或多个 RNAi 试剂、一个或多个 RNA、一个或多个 DNA、一个或多个 cDNA、一个或多个 miRNA、一个或多个 siRNA、一个或多个 shRNA、一个或多个 RNAa、一个或多个切丁酶底物等或其组合。

[0098] 聚合物载体

[0099] 在某些实施方案中，聚合物载体是纳米粒。在具体的实施方案中，聚合物载体是胶束。在另外的实施方案中，聚合物载体是具有约 10nm 至约 200nm、约 10nm 至约 100nm、约 30-80nm 大小的胶束。粒度可以以任意方式来测定包括但不限于凝胶渗透色谱法 (GPC)、动态光散射 (DLS)、电子显微镜检查技术（例如，TEM）和其他方法。

[0100] 在一些实施方案中，通过本文中描述的聚合物的自发地自我装配来制备本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）。在某些实施方案中，在 (a) 将与水混溶的有机溶剂中的聚

合物溶液稀释至含水介质中；或 (b) 直接溶解于含水溶液后，本文中描述的聚合物装配成本文中提供的聚合物载体。在一些实施方案中，本文中描述的聚合物在多核苷酸不存在的情况下装配成本文中提供的聚合物载体。

[0101] 在一些实施方案中，聚合物载体（例如，胶束）对于含水溶液中的稀释是稳定的。在具体的实施方案中，聚合物载体（例如，胶束）在约中性 pH 下对稀释稳定，其临界稳定性浓度（例如，临界胶束浓度 (CMC)）为约 50 至约 100 μ g/mL 或约 10 至约 50 μ g/mL、低于 10 μ g/ml、低于 5 μ g/mL、低于 2 μ g/mL、低于 0.5 μ g/mL 或低于 0.1 μ g/mL。如本文中所用的，“胶束的去稳定化”意指形成胶束的聚合物链至少部分地解聚，结构改变（例如，大小的扩大和 / 改变形状），和 / 或可能形成无定形超分子结构（例如，非胶束超分子结构）。术语临界稳定性浓度 (CSC) 和临界胶束浓度 (CMC) 在本文中可互换使用。

[0102] 在具体的实施方案中，聚合物载体（例如，胶束）包含形成聚合物载体（例如，胶束）的壳和芯的多个嵌段共聚物。在某些实施方案中，所述壳和 / 或壳嵌段是亲水性的和 / 或带电荷的（例如，阳离子性的、聚阳离子性的或两性离子性的）。在具体的实施方案中，所述壳和 / 或壳嵌段包含净正电荷。在一些实施方案中，所述芯和 / 或芯嵌段是疏水性的和 / 或包含疏水性基团、部分、单体单元、种类等。在具体的实施方案中，所述疏水性核和 / 或芯嵌段包含多个疏水性基团、部分、单体单元、种类等以及多个可带电荷种类或单体单元。在更具体的实施方案，所述多个可带电荷的单体单元或种类包含多个阴离子性的可带电荷单体单元或种类。在更具体的实施方案中，所述多个可带电荷的单体单元或种类包含多个阳离子性的单体单元或种类和多个阴离子性的可带电荷单体单元或种类。在一些实施方案中，嵌段共聚物各自具有 (1) 形成聚合物载体（例如，胶束）的壳的亲水性的带电荷嵌段（例如，阳离子性的或聚阳离子性的，(2) 疏水性嵌段，和 (3) 多个阴离子性的可带电荷种类，并且为膜去稳定化的（例如，以 pH 依赖性的方式变成膜去稳定化的）。在某些实施方案中，所述疏水性芯和 / 或芯嵌段任选地包含可包含或可不包含疏水性基团、可带电荷的基团或其组合的间隔子单体单元。在一些实施方案中，形成聚合物载体（例如，胶束）的芯或存在于其中的聚合物嵌段（例如，共聚物的一个或多个芯嵌段）是可带电荷的（例如，在生理 pH 下包含阳离子性种类和 / 或阴离子性种类）。如本文中所用的，可带电荷种类和 / 或单体单元包括以带电荷和不带电荷两种状态存在的种类和单体单元。在一些情况下，本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）是从自缔合的多个嵌段共聚物形成的。在某些情况下，自缔合通过嵌段共聚物的疏水性嵌段的相互作用发生，并且所得的聚合物载体（例如，胶束）通过存在于聚合物载体的芯中的疏水性嵌段的疏水性相互作用来稳定。

[0103] 在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体在 pH 约 7.4 下是稳定的，并且在 pH 约 5.8 下显著不如在 pH 约 7.4 下稳定。在一些情况下，在 pH 约 5.8 和浓度约 10 μ g/mL 下 90％以上的聚合物载体是去稳定化的，并且在 pH 约 7.4 和浓度约 10 μ g/mL 下 10％以下的聚合物载体是去稳定化的。

[0104] 在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）在 50％的人血清中保持活性（例如，聚合物载体递送多核苷酸的活性）至少 2 小时、至少 4 小时、至少 6 小时、至少 8 小时、至少 12 小时或至少 24 小时。在另外的或可替代选择的实施方案中，本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）在至少 50％的人血浆中保持活性（例如，聚合物载体递送多核苷酸的活性）至少 2 小时、至少 4 小时、至少 6 小时、至少 8 小时、至少 12 小时或至少

24 小时。在另外的或可替代选择的实施方案中，本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）在50％的小鼠血清中保持活性（例如，聚合物载体递送多核苷酸的活性）至少 2 小时、至少 4 小时、至少 6 小时、至少 8 小时、至少 12 小时或至少 24 小时。在另外的或可替代选择的实施方案中，本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）在至少 50％的小鼠血浆中保持活性（例如，聚合物载体递送治疗剂例如多核苷酸的活性）至少 2 小时、至少 4 小时、至少 6 小时、至少 8 小时、至少 12 小时或至少 24 小时。在具体的实施方案中，本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）在 50％的人血清中保持活性（例如，聚合物载体递送治疗剂，例如，多核苷酸的活性）至少 2 小时，在至少 50％的人血浆中保持活性至少 2 小时，在 50％小鼠血清中保持活性至少 2 小时，在至少 50％的小鼠血浆中保持活性至少 2 小时或其组合。

[0105] 在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）的特征在于一个或多个下列方面：(1) 通过在从与水混溶的溶剂（例如但不限于乙醇）稀释至含水溶剂（例如磷酸缓冲盐溶液，pH7.4) 时嵌段共聚物的自发自缔合来形成有组织的装配体（例如胶束，由此形成所述）；(2) 聚合物载体（例如，胶束）对于稀释（例如，低至构成临界稳定性浓度或临界胶束浓度 (CMC) 的 100μg/ml、50μg/ml、10μg/ml、5μg/ml、2μg/ml、0.5μg/ml 或 0.1μg/ml 的聚合物浓度）是稳定的；(3) 聚合物载体（例如，胶束）对于周围介质的高离子强度（例如，0.5M NaCl) 是稳定的；和 / 或 (4) 聚合物载体（例如，胶束）随着有机溶剂的浓度增加而稳定性降低，此类有机溶剂包括但不限于二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲基亚砜 (DMS) 和二噁烷。在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）特征在于具有至少两个上述特性。在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）的特征在于具有至少 3 个上述特性。在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）的特征在于具有全部上述特性。

[0106] 在某些实施方案中，本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）的另外或可替代选择的特征在于其他标准：(1) 减少或增加单个嵌段的分子量及其相对长度比以控制形成的胶束的大小和其相对稳定性和，和 (2) 改变形成壳的聚合物阳离子性嵌段的大小以提供与寡核苷酸药物的有效复合物形成和 / 或所述寡核苷酸药物的电荷中和。

[0107] 在某些实施方案中，本发明的胶束选择性地将小的疏水性分子例如茚摄入胶束的疏水性芯内。

[0108] 包含多核苷酸的聚合物载体

[0109] 在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体可用于将多核苷酸（例如，寡核苷酸）递送至有此需要的个体。在某些实施方案中，本文中提供了多核苷酸载体，其包含至少一个多核苷酸。在更具体的实施方案中，所述聚合物载体包含至少 2、至少 4、至少 5、至少 10、至少 20、至少 30、至少 40、至少 50、至少 100 个多核苷酸。在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体包含 2 至 50 个多核苷酸、5 至 40 个多核苷酸、5 至 30 个多核苷酸、5 至 25 个多核苷酸、20 至 40 个多核苷酸等。在某些实施方案中，所述多核苷酸是寡核苷酸基因表达调节剂。在另外的实施方案中，所述多核苷酸是寡核苷酸敲低剂。在具体的实施方案中，所述多核苷酸是 RNAi 试剂、切丁酶底物或 siRNA。在其他具体的实施方案中，所述多核苷酸是 aiRNA(Asymmetric RNA duplexes mediate RNAinterference in mammalian cells.Xiangao Sun, Harry A Rogoff, Chiang J Li Nature Biotechnology 26,1379-1382(2008))。在某些实施方案中，所述聚合物载体是包含芯、壳和一个或多个多

核苷酸的纳米粒（例如，胶束），其中所述多核苷酸不存在于胶束的芯中。在具体的实施方案中，将所述多核苷酸掺入多聚物载体的壳（例如，存在于其中和/或形成其部分）。在一些实施方案中，将一个或多个多核苷酸（例如，寡核苷酸或siRNA）连接至形成聚合物载体的多嵌段共聚物的siRNA多核苷酸载体嵌段。在不同的实施方案中，通过一个或多个共价键、一个或多个非共价相互作用或其组合实现连接。在一些实施方案中，siRNA共价连接至嵌段共聚物的疏水性嵌段（例如，芯嵌段）。在具体的实施方案中，将siRNA共价连接至嵌段共聚物的疏水性嵌段（例如，芯嵌段）并且形成所述聚合物载体的壳的至少一部分。在更具体的实施方案中，siRNA是嵌段共聚物的亲水性嵌段（例如，壳嵌段）。在其他实施方案中，siRNA连接至嵌段共聚物的亲水性嵌段或连接至任选的聚合物嵌段。

[0110] 在一些实施方案中，以任意适当的方式，例如通过非共价缔合将一个或多个多核苷酸（例如，寡核苷酸或siRNA）连接至本文中提供的嵌段共聚物。以任何适当的方式，包括但不限于静电相互作用（包括与具有阳离子性基团的聚合物和具有阴离子性基团的多核苷酸的静电相互作用）、疏水性相互作用、亲和相互作用或其组合，来实现(i)本文中提供的聚合物和/或聚合物的装配体（例如，由多个聚合物形成的胶束）与(ii)一个或多个多核苷酸（例如，寡核苷酸）之间的非共价缔合。在某些实施方案中，用化学部分修饰所述一个或多个多核苷酸和/或聚合物载体（例如，胶束）的聚合物，所述化学部分提供一个或多核苷酸和/或聚合物（它们彼此具有亲和力），并且是可商购获得的，例如芳基硼酸-水杨基羟肟酸、亮氨酸拉链或其他肽基元，或胶束和多核苷酸上的正电荷与负电荷之间的离子相互作用，或其他类型的非共价化学亲和键。此外，在一些实施方案中，将双链多核苷酸与本文中所述的聚合物或聚合物载体（例如，胶束）相缔合（例如，复合）。在一些实施方案中，将聚合物或聚合物载体（例如，胶束）与连接（例如，共价地）至聚合物载体（例如，胶束）的组分（例如，聚合物）的核酸小沟结合剂或嵌入试剂缔合（例如，复合）。

[0111] 在一些实施方案中，所述多核苷酸（例如，寡核苷酸）包含至少一个负电荷（例如，包含带负电荷的骨架），并且与聚合物载体（例如，胶束）的阳离子性壳和/或聚合物载体的嵌段共聚物的阳离子性壳嵌段缔合。在具体的实施方案中，所述阳离子性壳或壳嵌段至少部分地中和存在于所述一个或多个连接至或存在于聚合物载体中的多核苷酸（例如，寡核苷酸）中的负电荷。在某些实施方案中，一个或多个多核苷酸（例如一个或多个寡核苷酸，一个或多个siRNA或其组合）与聚合物载体（例如，胶束）的聚阳离子性多核苷酸载体嵌段缔合物（例如，复合物）。在一些实施方案中，以任意期望的形成聚合物载体（例如，胶束）的嵌段共聚物与多核苷酸（例如，寡核苷酸或siRNA）的电荷比（例如1：1至16：1）来形成聚合物载体（例如，胶束）与多核苷酸（例如，寡核苷酸或siRNA）之间的缔合物（例如，复合物）。在具体的实施方案中，以2：1、4：1或8：1的电荷比形成胶束与siRNA之间的复合物。换句话说，在一些实施方案中，存在于聚合物载体的壳中的阳离子性电荷的数量与存在于多核苷酸中的阴离子性电荷的数量之比是任意期望的值，例如约1：1至约16：1、约2：1至约8：1、约4：1至约12：1、约2：1、约4：1或约8：1。在一些实施方案中，siRNA被形成聚合物载体的嵌段共聚物的聚阳离子性嵌段所电荷中和。例如，在一些具体的实施方案中，将在生理pH下包含40个负电荷的20碱基对多核苷酸（例如，寡核苷酸或siRNA）与包含具有pKa为约7.4的聚DMAEMA多核苷酸载体嵌段（长度为80个单体单元，MW＝11,680）的聚合物载体（例如，胶束）缔合（例如，

复合）。在该 pH(pKa) 上，聚 DMAEMA 包含 40 个负电荷，从而导致在电荷上基本上是净中性的多核苷酸 - 多核苷酸载体嵌段缔合物（例如，复合物）。在某些情况下，避免大量的过量正电荷将有助于减少体外和体内毒性。在一些实施方案中，多核苷酸（例如，寡核苷酸或 siRNA) 自发地与本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）的带正电荷的壳缔合。

[0112] 在一些实施方案中，通过任意适当的化学缀合技术将多核苷酸（例如，寡核苷酸）与聚合物载体（例如，胶束）和 / 或与聚合物载体（例如，胶束）的一个或多个聚合物化学缀合。在一些实施方案中，通过将 RNAi 试剂与已形成的包含多个聚合物（例如，嵌段共聚物）的聚合物载体（例如，胶束）缀合来形成包含 RNAi 试剂的聚合物载体（例如，胶束）。在其他实施方案中，通过将 RNAi 试剂与聚合物（例如，嵌段共聚物）缀合，然后以任意适当的方式（例如通过所得的缀合物自我装配成包含 RNAi 试剂的聚合物载体（例如，胶束））来形成包含 RNAi 试剂的聚合物载体（例如，胶束）。在不同的实施方案中，这样的聚合物载体任选地还包含与 RNAi 试剂缀合的聚合物相似、相同或不同的未缀合的聚合物（例如，嵌段共聚物）。本文中描述的聚合物载体的聚合物与多核苷酸之间的共价键任选地是不可切割的或可切割的。在某些实施方案中，将一个或多个 RNAi 试剂（例如，切丁酶底物）的前体连接至聚合物载体（例如，胶束）或聚合物载体（例如，通过不可切割的键形成的胶束）的聚合物单元。在一些实施方案中，通过可切割的键连接一个或多个 RNAi 试剂。在某些实施方案中，本文中描述的聚合物载体中使用的可切割的键包括（作为非限制性实例）二硫键（例如，在细胞质的还原性环境中解离的二硫键）。在一些实施方案中，聚合物载体（包括其组分）与多核苷酸（例如，寡核苷酸或 s iRNA) 之间的共价缔合通过任意适当的化学缀合方法来实现，所述方法包括但不限于胺 - 羧基连接基、胺 - 硫氢基连接基、胺 - 碳水化合物连接基、胺 - 羟基连接基、胺 - 胺连接基、羧基 - 硫氢基连接基、羧基 - 碳水化合物连接基、羧基 - 羟基连接基、羧基 - 羧基连接基、硫氢基 - 碳水化合物连接基、硫氢基 - 羟基连接基、硫氢基 - 硫氢基连接基、碳水化合物 - 羟基连接基、碳水化合物 - 碳水化合物连接基和羟基 - 羟基连接基。在一些实施方案中，可使用 pH 敏感性键和连接基（包括但不限于腙和乙缩醛键）来进行缀合。任选地也使用任何其他适当的缀合方法，例如许多种缀合化学法是可获得的（参见，例如，Biconjugation，Aslam 和 Dent，Eds，Macmillan，1998 和本文中的章节）。

[0113] 在某些实施方案中，按照以下方法制备一个或多个多核苷酸（例如，寡核苷酸）与本文中提供的聚合物（例如，嵌段共聚物）的缀合物（其中所述聚合物是单聚体 (unimer) 或存在于装配的聚合物载体中），所述方法包括下列两个步骤：(1) 使用任意适当的活化剂，例如、但不限于 1- 乙基 -3,3- 二甲基氨基丙基碳二亚胺 (EDAC)、咪唑、N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和二环己基碳二亚胺 (DCC)、HOBt(1- 羟基苯并三唑）、对硝基苯基氯甲酸酯、羰基二咪唑 (CDI) 和 N，N′ - 二琥珀酰亚胺基碳酸酯 (DSC)，活化寡核苷酸的可修饰末端基团（例如 5′ - 或 3′ - 羟基）；和 (2) 将嵌段共聚物共价地连接至寡核苷酸的末端。在一些实施方案中，在与嵌段共聚物缀合之前用其他官能团取代寡核苷酸的 5′ - 或 3′ - 末端可修饰基团。例如，任选地用携有硫氢基 (-SH)、羧基 (-COOH) 或胺基 (-NH2) 的连接基取代羟基 (-OH)。

[0114] 在另一个实施方案中，按照任意适当的方法，使用活化剂或反应性双官能连接基将包含已引入至一个或多个碱基（例如，5- 氨基烷基嘧啶）的官能团的寡核苷酸与本文

中提供的聚合物（例如，嵌段共聚物）缀合，其中所述聚合物是单聚体或存在于装配的聚合物载体中。许多种此类活化剂和双官能连接基可从这样的提供商如 Sigma、Pierce、Invitrogen 等商购获得。

[0115] 在一些实施方案中，通过自发地自我装配形成包含寡核苷酸或多个寡核苷酸的聚合物载体（例如，胶束）。在一些实施方案中，在单个坩埚 (pot) 中实现聚合物载体的自发自我装配。例如，在一些实施方案中，将通过用含水介质（例如，水或 PBS) 稀释处于有机溶剂（例如，乙醇）中的本文中描述的聚合物（例如，嵌段共聚物）溶液而自我装配的聚合物载体（例如，胶束）与一个或多个多核苷酸（例如，寡核苷酸或 s iRNA) 组合，由此自发形成包含聚合物和一个或多个多核苷酸的聚合物载体。在其他实施方案中，通过 (1) 将一个或多个关注的多核苷酸（例如，寡核苷酸或 siRNA) 与本文中描述的聚合物（例如，嵌段共聚物或单嵌段聚合物）接触以形成聚合物 - 多核苷酸缀合物；和 (2) 将聚合物 - 多核苷酸缀合物经历适合提供使聚合物 - 多核苷酸缀合物自我装配成本文中描述的聚合物载体的条件来发生自发自我装配。

[0116] 聚合物结构

[0117] 在具体的实施方案中，本文中提供的聚合物载体包含嵌段共聚物，例如具有不同嵌段的共聚物和梯度共聚物。在某些实施方案中，梯度共聚物是具有亲水性节段（其被理解为本文中描述的嵌段共聚物的亲水性嵌段的种类）和疏水性节段（其被理解为本文中描述的嵌段共聚物的疏水性嵌段的种类）的共聚物。在某些实施方案中，亲水性节段是亲水性嵌段并且疏水性节段是疏水性嵌段。在一些实施方案中，此类聚合物是非肽的。在其他实施方案中，亲水性节段和疏水性节段在单嵌段梯度共聚物的不同区域。在不同的情况下，“聚合物节段”是具有给定的物理性质（例如，本文中描述的嵌段的物理性质，例如，疏水性、亲水性、荷电率 (chargeability) 等）的聚合物部分或包含一个或多个具有相似物理性质（例如，疏水性、亲水性、荷电率等）的嵌段的聚合物部分。

[0118] 在某些实施方案中，本文中描述的聚合物载体的嵌段共聚物各自具有 (1) 形成聚合物载体（例如，胶束）的壳的亲水性嵌段（例如，壳嵌段）；和 (2) 形成聚合物载体（例如，胶束）的疏水性芯的基本上疏水的嵌段（例如，芯嵌段），所述聚合物载体通过形成芯的聚合物节段的疏水性相互作用来稳定。

[0119] 在某些实施方案中，本文中描述的聚合物载体的嵌段共聚物各自具有 (1) 形成聚合物载体（例如，胶束）的壳的中性或不带电荷的（例如，基本上不带电荷的）亲水性嵌段（例如，壳嵌段）；和 (2) 形成聚合物载体（例如，胶束）的疏水性芯的基本上疏水的嵌段（例如，芯嵌段），所述聚合物载体通过形成芯的聚合物节段的疏水性相互作用来稳定。在某些实施方案中，所述中性或不带电荷的亲水性嵌段包含中性单体残基例如 HPMA 的单体单元。

[0120] 在某些实施方案中，本文中描述的聚合物载体的嵌段共聚物各自具有 (1) 形成聚合物载体（例如，胶束）的壳的阳离子性或聚阳离子性带电荷的亲水性嵌段（例如，壳嵌段）；和 (2) 形成聚合物载体（例如，胶束）的疏水性芯的基本上疏水的嵌段（例如，芯嵌段），所述聚合物载体通过形成芯的聚合物节段的疏水性相互作用来稳定化。在某些实施方案中，亲水性嵌段包含阳离子性残基例如 DMAEMA 的单体单元。在一些实施方案中，所述亲水性嵌段还包含至少部分地隔离亲水性嵌段的电荷的种类。此类隔离包括基于空间的隔

离。

[0121] 在某些实施方案中，本文中描述的聚合物载体的嵌段共聚物各自具有 (1) 形成聚合物载体（例如，胶束）的壳的阴离子性或聚阴离子性带电荷的亲水性嵌段（例如，壳嵌段）；和 (2) 形成聚合物载体（例如，胶束）的疏水性芯的基本上疏水的嵌段（例如，芯嵌段），所述聚合物载体通过形成芯的聚合物节段的疏水性相互作用来稳定。在某些实施方案中，所述阴离子性或聚阴离子性带电荷的亲水性嵌段包含具有阴离子性残基例如丙烯酸或水解的马来酸酐的单体单元。

[0122] 在某些实施方案中，本文中描述的聚合物载体的嵌段共聚物各自具有 (1) 形成聚合物载体（例如，胶束）的壳的两性离子性或聚两性离子性带电荷的亲水性嵌段（例如，壳嵌段）；和 (2) 形成聚合物载体（例如，胶束）的疏水性芯的基本上疏水性的嵌段（例如，芯嵌段），所述聚合物载体通过形成芯的聚合物节段的疏水性相互作用来稳定化。

[0123] 在具体的实施方案中，所述亲水性嵌段的性质（例如，阳离子性、阴离子性、中性或两性离子性）在酸性 pH 下（例如，在内体 pH) 下与其在约中性 pH 值下基本上一样。因此，在聚合物载体被摄入内体时，所述亲水性嵌段以基本上与其在被内体摄取前相同的形式存在。

[0124] 在一些情况下，亲水性节段可起至少 2 个作用：一是形成胶束结构的壳，第二是结合一个或多个多核苷酸（例如，基于寡核苷酸的治疗性分子，例如 siRNA，或基于寡核苷酸的诊断剂，例如用可检测试剂例如放射性标记、质量标记、荧光基团、PET 标记、生色团等标记的 siRNA)。在一些实施方案中，嵌段共聚物还包含可带电荷的或带电荷的种类（例如，在生理 pH 下阴离子性和 / 或阳离子性种类 / 单体单元）并且是膜去稳定化的（例如，以 pH 依赖性的方式使膜去稳定）。在一些实施方案中，所述基本上疏水的嵌段（例如，芯嵌段）和 / 或聚合物载体的芯基本上是净中性的（即，作为一个整体，正电荷和负电荷是基本平衡的）。在一些实施方案中，基本上疏水的嵌段（例如，芯嵌段）和 / 或聚合物载体的芯包含一个或多个可带电荷种类（例如，单体单元、部分、基团等）。在更具体的实施方案中，所述基本上疏水的嵌段和 / 或聚合物载体的芯包含多个阳离子性种类和多个阴离子性种类。在更具体的实施方案中，所述基本上疏水的嵌段和 / 或聚合物载体的芯包含基本上相似数量的阳离子性和阴离子性种类（即，疏水性嵌段和 / 或芯基本上是净中性的）。

[0125] 在某些实施方案中，本文中提供的聚合物载体包含含有第一和第二可带电荷种类的疏水性核嵌段。在一些实施方案中，所述第一可带电荷种类是如本文中所描述的，并且第二可带电荷种类当质子化时为阳离子性种类。在具体的实施方案中，所述第一可带电荷种类在酸性 pH（例如，内体 pH，低于约 6.5 的 pH，低于约 6.0 的 pH，低于约 5.8 的 pH，低于约 5.7 的 pH 等）下不带电荷。在具体的实施方案中，第二可带电荷种类的 pKa 为约 6 至约 10、约 6.5 至约 9、约 6.5 至约 8、约 6.5 至约 7.5 或任意其他适当的 pKa。在某些实施方案中，至少一个所述第一可带电荷种类和至少一个所述第二可带电荷种类存在于单个单体单元上。在一些实施方案中，所述第一可带电荷种类发现存在于第一可带电荷的单体单元上，并且第二可带电荷种类在第二可带电荷的单体单元上。在某些实施方案中，第一可带电荷种类在去质子化时为阴离子性种类，第二可带电荷种类在质子化时为阳离子性种类，并且所述阴离子性种类与阳离子性种类之比在约中性 pH 下在约 1 ： 10 至约 10 ： 1，约 1 ： 6 至约 6 ： 1、约 1 ： 4 至约 4 ： 1、约 1 ： 2 至约 2 ： 1、约 1 ： 2 至 3 ： 2 之间或为约 1 ： 1。

在一些实施方案中，第一可带电荷的单体单元与第二可带电荷的单体单元之比是约 1 ： 10 和约 10 ： 1、约 1 ： 6 和约 6 ： 1、约 1 ： 4 和约 4 ： 1、约 1 ： 2 和约 2 ： 1、约 1 ： 2 和 3 ： 2 或为约 1 ： 1。

[0126] 术语“共聚物”，如本文中所使用的，表示聚合物是两个或更多个不同单体聚合的结果。

[0127] “单嵌段聚合物”是单个聚合步骤的合成产物。术语单嵌段聚合物包括共聚物（即，一种以上类型的单体的聚合产物）和均聚物（即，单一类型的单体的聚合产物）。

[0128] “嵌段”共聚物是指包含结构单元或单体单元的一个或多个亚组合的结构。在一些实施方案中，结构单元通过另外的过程从一个或多个可聚合的单体衍生而来。在一些实施方案中，本文中描述的嵌段共聚物包含非脂质结构单元或单体单元。在一些实施方案中，所述嵌段共聚物是二嵌段共聚物。二嵌段共聚物包含两个嵌段；这种聚合物的图示概括表示如下：$[A_aB_bC_c...]_m-[X_xY_yZ_z...]_n$，其中每个字母表示结构单元或单体单元，并且其中每个结构单元的下标表示具体嵌段中该单元的摩尔分数，三个点表示每个嵌段中可以存在更多（也可以更少）个结构单元，且 m 和 n 表示二嵌段共聚物中每个嵌段的分子量。正如图示提示的，在一些情况中，对每个嵌段分别控制每个结构单元的数量和性质。图示并不意味着且不应解释为推定各嵌段中结构单元数或不同类型结构单元数之间何种情况下的任意关系。该图示也不意味着描述具体嵌段内的结构单元的任意具体数量或排列。在每一嵌段中，除非另有特别描述，否则结构单元可以以纯粹随机、交替随机、规整交替、规整嵌段或随机嵌段结构形式排列。例如，纯粹随机结构可以具有形式：x-x-y-z-x-y-y-z-y-z-z-z...。示例性交替随机结构可以具有形式：x-y-x-z-y-x-y-z-y-x-z...，示例性的规整交替结构可以具有形式：x-y-z-x-y-z-x-y-z...。示例性的规整嵌段结构可以具有下列一般结构：...x-x-x-y-y-y-z-z-z-x-x-x...，而示例性的随机嵌段结构可以具有一般结构：...x-x-x-z-z-x-x-y-y-y-y-z-z-z-x-x-z-z-z-...。在梯度聚合物中，一个或多个单体单元的含量从聚合物的 α 端值到 ω 端以梯度方式增加或减少。在上述一般实例中无一指的是单个结构单元或嵌段的具体并列或嵌段中结构单元的数量或嵌段数量，也不应将它们视为以任意方式具有或限制形成本发明的聚合物载体的嵌段共聚物的实际结构。

[0129] 如本文中所使用的，括入结构单元的括号并非意指且并非视为意指结构单元自身形成嵌段。即方括号内的单体单元可以以任意方式与嵌段内的其他结构单元组合，即纯粹随机、交替随机、规整交替、规整嵌段或随机嵌段结构。本文中描述的嵌段共聚物任选地是交替、梯度或随机嵌段共聚物。在一些实施方案中，嵌段共聚物是树状、星型或接枝共聚物。

[0130] 在某些实施方案中，嵌段共聚物包含乙烯型 (ethylenically) 不饱和单体。术语“乙烯型不饱和单体”在本文中定义为具有至少一个碳双键或三键的化合物。乙烯型不饱和单体的非限定性实例是：（烷基）丙烯酸烷基酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酸酯、烷基丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、丙烯酰胺、苯乙烯、烯丙胺、烯丙基铵、二烯丙基胺、二烯丙基铵、N- 乙烯基甲酰胺、乙烯醚、乙烯磺酸酯、丙烯酸、磺基甜菜碱 (sulfobetaine)、羧基甜菜碱、磷酸甜菜碱 (phosphobetaine) 或马来酸酐。

[0131] 在不同实施方案中，使用适合用于提供本文中描述的聚合物和 / 或聚合物载体的任意单体。在一些实施方案中，适合用于制备本文中提供的聚合物和聚合物载体的（包括例如膜去稳定化嵌段共聚物）的单体包括但不限于例如一个或多个下列单体：甲基丙烯酸

甲酯、丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸丙酯（全部同分异构体）、甲基丙烯酸丁酯（全部同分异构体）、甲基丙烯酸 2- 乙基己酯、甲基丙烯酸异冰片酯、甲基丙烯酸、甲基丙烯酸苄酯、甲基丙烯酸苯酯、甲基丙烯腈、α - 甲基苯乙烯、丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸苯酯（全部同分异构体）、丙烯酸丁酯（全部同分异构体）、丙烯酸 2- 乙基己酯、丙烯酸异冰片酯、丙烯酸、丙烯酸苄酯、丙烯酸苯酯、丙烯腈、苯乙烯、选自如下的丙烯酸酯类和苯乙烯类：甲基丙烯酸缩水甘油酯、甲基丙烯酸 2- 羟基乙酯、甲基丙烯酸羟丙酯（全部异构体）、甲基丙烯酸羟丁酯（全部异构体）、甲基丙烯酸 N，N- 二甲氨基乙酯、甲基丙烯酸 N，N- 二乙基氨基乙酯、甲基丙烯酸三乙二醇酯、甲基丙烯酸寡乙二醇酯、衣康酸酐、衣康酸、丙烯酸缩水甘油酯、丙烯酸 2- 羟乙酯、丙烯酸羟丙酯（全部异构体）、丙烯酸羟丁酯（全部异构体）、丙烯酸 N，N- 二甲氨基乙酯、丙烯酸 N，N- 二乙氨基乙酯、丙烯酸三乙二醇酯、甲基丙烯酰胺、N- 甲基丙烯酰胺、N，N- 二甲基丙烯酰胺、N- 叔丁基甲基丙烯酰胺、N- 正丁基甲基丙烯酰胺、N- 羟甲基丙烯酰胺 (N-methylolacrylamide)、N- 羟乙基丙烯酰胺、乙烯基苯甲酸（全部异构体）、二乙氨基苯乙烯（全部异构体）、α - 甲基乙烯基苯甲酸（全部异构体）、二乙氨基 α - 甲基苯乙烯（全部异构体）、对 - 乙烯基苯磺酸、对 - 乙烯基苯磺酸钠盐、甲基丙烯酸三甲氧基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸三乙氧基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸三丁氧基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸二甲氧基甲基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸二乙氧基甲基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸二丁氧基甲基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸二异丙氧基甲基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸二甲氧基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸二乙氧基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸二丁氧基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸二异丙氧基甲硅烷基丙酯、丙烯酸三甲氧基甲硅烷基丙酯、丙烯酸三乙氧基甲硅烷基丙酯、丙烯酸三丁氧基甲硅烷基丙酯、丙烯酸二甲氧基甲基甲硅烷基丙酯、丙烯酸二乙氧基甲基甲硅烷基丙酯、丙烯酸二丁氧基甲基甲硅烷基丙酯、丙烯酸二异丙氧基甲基甲硅烷基丙酯、丙烯酸二甲氧基甲硅烷基丙酯、丙烯酸二乙氧基甲硅烷基丙酯、丙烯酸二丁氧基甲硅烷基丙酯、丙烯酸二异丙氧基甲硅烷基丙酯、乙酸乙烯酯、丁酸乙烯酯、苯甲酸乙烯酯、乙烯基氯、乙烯基氟、乙烯基溴、马来酸酐、N- 芳基马来酰亚胺、N- 苯基马来酰亚胺、N- 烷基马来酰亚胺、N- 丁基马来酰亚胺、N- 乙烯基吡咯烷酮、N- 乙烯基咔唑、丁二烯、异戊二烯、氯丁二烯、乙烯、丙烯、1，5- 己二烯类、1，4- 己二烯类、1，3- 丁二烯类、1，4- 戊二烯类、乙烯醇、乙烯基胺、N- 烷基乙烯基胺、烯丙基胺、N- 烷基烯丙基胺、二烯丙基胺、N- 烷基二烯丙基胺、亚烷基亚胺、丙烯酸、烷基丙烯酸酯类、丙烯酰胺类、甲基丙烯酸、烷基甲基丙烯酸酯类、甲基丙烯酰胺类、N- 烷基丙烯酰胺类、N- 烷基甲基丙烯酰胺类、苯乙烯、N- 异丙基丙烯酰胺、乙烯基萘、乙烯基吡啶、乙基乙烯基苯、氨基苯乙烯、乙烯基吡啶、乙烯基咪唑、乙烯基联苯、乙烯基茴香醚、乙烯基咪唑基、乙烯基吡啶基、乙烯基聚乙二醇、二甲氨基甲基苯乙烯、三甲基铵乙基甲基丙烯酸酯、三甲基铵乙基丙烯酸酯、二甲氨基丙基丙烯酰胺、三甲基铵乙基丙烯酸酯、三甲基铵乙基甲基丙烯酸酯、三甲基铵丙基丙烯酰胺、丙烯酸十二烷基酯、丙烯酸十八酯或甲基丙烯酸十八酯单体或其组合。

[0132] 在一些实施方案中，任选地使用此类单体的官能化形式。官能化的单体，如本文中所使用的，是包含掩蔽或未掩蔽的官能团（例如在聚合后可以连接其他部分的基团）的单体。此类基团的非限定性实例是伯氨基、羧基、硫氢基、羟基、叠氮化物和氰基。几个适当的掩蔽基团是可供利用的（参见，例如，T.W.Greene&P.G.M.Wuts、Protective Groupsin Organic Synthesis（第 2 版）J.Wiley&Sons、1991.P.J.Kocienski、Protecting Groups、

Georg Thieme Verlag、1994)。

[0133] 按照任意适当的方式制备此处所述的聚合物。用于产生本文中提供的聚合物的适当合成方法包括但不限于例如阳离子、阴离子和自由基聚合。在一些情况下，当使用阳离子方法时，用催化剂处理单体以引发聚合。任选地，一种或多种单体用于形成共聚物。在一些实施方案中，这种催化剂是引发剂，包括例如质子酸（布郎斯台德酸）或路易斯酸，在使用路易斯酸的情况下，还任选地使用一些促进剂例如水或醇。在一些实施方案中，催化剂是但不限于例如碘化氢、高氯酸、硫酸、磷酸、氟化氢、氯磺酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、三氯化铝、烷基氯化铝、三氟化硼复合物、四氯化锡、五氯化锑、氯化锌、四氯化钛、五氯化磷、三氯氧磷或氯氧化铬。在某些实施方案中，聚合物合成在净环境中或任意适合的溶剂中进行。适当的溶剂包括但不限于戊烷、己烷、二氯甲烷、氯仿或二甲基甲酰胺 (DMF)。在某些实施方案中，在任意适当的反应温度下，包括例如约 -50℃至约 100℃或约 0℃至约 70℃的温度下进行聚合物合成。

[0134] 在某些实施方案中，通过自由基聚合制备所述聚合物。当使用自由基聚合方法时，提供 (i) 单体、(ii) 任选地共聚单体和 (iii) 任选的自由基来源以引发自由基聚合过程。在一些实施方案中，自由基的来源是任选的，因为一些单体可在于高温下加热时自我引发。在某些情况下，在形成聚合混合物后，使混合物处于聚合条件下。聚合条件是如本文中所述引起至少一种单体形成至少一种聚合物的条件。这种条件任选地可改变至任意适当的水平，包括但不限于例如温度、压力、气氛、聚合混合物中使用的原料的比例和反应时间。以任意适当的方式包括例如在溶液、分散体、悬浮液、乳剂中或批量进行聚合。

[0135] 在一些实施方案中，引发剂存在于反应混合物中。如果可用于本文中描述的聚合方法，则任选地使用任意适当的引发剂。这种引发剂包括但不限于例如一种或多种烷基过氧化物、取代的烷基过氧化物、芳基过氧化物、取代的芳基过氧化物、酰基过氧化物、烷基氢过氧化物、取代的烷基氢过氧化物、芳基氢过氧化物、取代的芳基氢过氧化物、杂烷基过氧化物、取代的杂烷基过氧化物、杂烷基氢过氧化物、取代的杂烷基氢过氧化物、杂芳基过氧化物、取代的杂芳基过氧化物、杂芳基氢过氧化物、取代的杂芳基氢过氧化物、烷基过酸酯、取代的烷基过酸酯、芳基过酸酯、取代的芳基过酸酯或偶氮化合物。在具体的实施方案中，过氧化苯甲酰 (BPO) 和 / 或 AIBN 用作引发剂。

[0136] 在一些实施方案中，聚合过程以活泼形式按照任意适合的方式进行，例如，但不限于原子转移自由基聚合 (ATRP)、一氧化二氮 - 为介体的活泼自由基聚合 (NMP)、开环聚合 (ROP)、简并性转移 (DT) 或可逆添加分段转移 (RAFT)。使用常规和 / 或活泼 / 受控聚合方法，可以生产各种聚合物结构，例如、但不限于嵌段、接枝、星形和梯度共聚物，从而单体单元在整个链上以统计学方式或以梯度方式分布，或以嵌段顺序或侧链接形式均聚化。在其他实施方案中，通过大分子设计，经黄原酸酯类 (MADIX) 的可逆添加 - 分段链转移合成聚合物 (Direct Synthesis ofDouble Hydrophilic Statistical Di-and Triblock CopolymersComprised of Acrylamide and Acrylic Acid Unitsvia the MADIXProcess ″，Daniel Taton，等 人，Macromolecular RapidCommunications,22, No.18,1497-1503(2001).)。

[0137] 在某些实施方案中，可逆添加 - 分段链转移或 RAFT 用于合成本发明的乙烯型骨架聚合物。RAFT 是一种活泼聚合过程。RAFT 包含自由基简并性链转移过程。在一些实施方

案中，用于制备本文所述聚合物的 RAFT 方法使用硫羰基硫基化合物，例如、但不限于二硫酯类、二硫氨基甲酸酯类和黄原酸酯类，以通过可逆链转移机制介导聚合。在一些情况中，聚合物自由基与任意上述化合物的 C ＝ S 基团的反应导致形成稳定化的自由基中间体。典型地，这些稳定化的自由基中间体不发生标准自由基聚合所典型的终止反应，而是再引入能够再引发或增殖单体的自由基，从而在该过程中重新形成 C ＝ S 键。在大部分情况中，这种添加到 C ＝ S 键上、然后使随后的自由基断裂的循环持续至全部单体耗尽或反应被淬灭。一般而言，低浓度的活性自由基在任意具体时间均限制正常终止反应。

[0138] 在一些实施方案中，用于本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）中的嵌段共聚物具有较低的多分散性指数 (PDI) 或在链长上的差异。可以按照任意适合的方式测定多分散性指数 (PDI)，例如通过将聚合物链的重均分子量除以其数均分子量来测量。数均分子量是各链分子量的总和除以链数量。重均分子量与分子量的平方除以该分子量的分子的数量成正比。由于重均分子量始终大于数均分子量，所以多分散性始终大于或等于 1。当数值越来越接近相同时，即当多分散性趋近于值 1 时，聚合物变成更加接近单分散性，其中每一链具有实际上相同数目的结构单元。趋近于 1 的多分散性值可以使用活泼自由基聚合得到。测定多分散性的方法例如、但不限于尺寸排阻色谱法、动态光散射、基质辅助的激光解吸 / 电离色谱法和电喷雾质量色谱法是本领域众所周知的。在一些实施方案中，本文提供的聚合物载体（例如胶束）的嵌段共聚物具有小于 2.0，或小于 1.5，或小于 1.4，或小于 1.3，或小于 1.2 的多分散性指数 (PDI)。

[0139] 本文所述的聚合过程任选在任意适合的溶剂或其混合物中发生。适当的溶剂包括水、醇（例如，甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、丁醇）、四氢呋喃 (THF) 二甲基亚砜 (DMSO)、二甲基甲酰胺 (DMF)、丙酮、乙腈、六甲基磷酰胺、乙酸、甲酸、己烷、环己烷、苯、甲苯、二噁烷、二氯甲烷、醚（例如乙醚）、氯仿和乙酸乙酯。在一个方面，溶剂包括水，以及水与水易溶混有机溶剂例如 DMF 的混合物。

[0140] 在某些实施方案中，以任意合适的方式制备本文中使用的聚 (DMAEMA) 和其他聚合物实体（例如，BMA、DMAEMA 和 PAA 的共聚物或共聚物嵌段）。在一个实施方案中，通过在 RAFT CTA、ECT 和自由基引发剂存在的情况下聚合 DMAEMA 来制备聚 (DMAEMA)。在一些实施方案中，将嵌段聚 (DMAEMA)macroCTA 用于制备一系列二嵌段共聚物，其中第二嵌段包含 BMA、DMAEMA 和 PAA。在其他具体的实施方案中，反转二嵌段聚合物上嵌段的方向，以使在自我装配后，聚合物的 ω 末端暴露在胶束或聚合物载体的亲水性节段上。在不同的实施方案中，这通过任意适当的方式包括许多合成方法来实现。例如，在一些实施方案中，本文中描述的嵌段共聚物的合成始于形成芯的 PAA/BMA/DMAEMA 疏水性嵌段的制备，然后在第二合成步骤中通过将所得的 PAA/BMA/DMAEMA macroCTA 经历第二 RAFT 聚合步骤来加入形成壳的亲水性带电荷嵌段。变通方法包括还原 PAA/BMA/DMAEMA macroCTA 以形成硫氢基末端，然后将预先形成的亲水性带电荷聚合物共价连接至形成的硫氢基。该合成方法提供了在暴露于胶束表面的聚合物链的 ω- 末端上引入反应性基团的方法，从而提供对胶束进行化学缀合的可选择的方法。

[0141] 在一些实施方案中，通过化学缀合由分别的聚合方法制备的几种聚合物嵌段来合成嵌段共聚物。

[0142] 带电荷的种类和疏水性芯

[0143] 在某些情况下，疏水性嵌段还包含一个或多个类型的可带电荷种类。在特定的实施方案中，所述可带电荷种类可带电荷成为阳离子性种类。包含可带电荷种类的本文中描述的聚合物载体包括这样的聚合物载体，其中每一个可带电荷种类各自单个地以带电荷的状态或不带电荷的状态存在于聚合物载体中。此外，在本文中描述的聚合物载体包括第一可带电荷种类的群体、第二可带电荷种类的群体和 / 或任意另外的可带电荷种类的群体时，本文中描述的聚合物载体包括这样的聚合物载体，其中第一、第二以及任意地另外的可带电荷种类的群体中每一个各自单个地以完全带电荷的状态、部分带电荷的状态或完全不带电荷的状态存在于该聚合物载体中。

[0144] 在一些实施方案中，阴离子性的可带电荷种类是在选择的聚合方法中任选地作为被保护的种类例如酯或作为游离酸存在的任意有机或无机酸残基。在一些实施方案中，阴离子性的可带电荷种类是弱酸，例如但不限于下列基团：硼酸、磺酰胺、膦酸、肿酸、次膦酸、磷酸盐 / 酯、羧酸、呫吨 (xanthene)、四唑或它们的衍生物 (例如酯)。在某些实施方案，单体例如马来酸酐 (Scott M.Henry、Mohamed E.H.El-Sayed、Christopher M.Pirie、Allan S.Hoffman、和 Patrick S.StaytonpH-Responsive Poly(styrene-alt-maleic anhydride) AlkylamideCopolymers for Intracellular Drug Delivery.Biomacromolecules2006、7、2407-2414) 用于通过马来酸酐单体单元的聚合后水解而引入第一可带电荷种类。在具体的实施方案中，在正常生理 pH 下为阴离子性的可带电荷种类是羧酸，例如但不限于 2- 丙基丙烯酸，或更确切地，从其衍生的结构单元，2- 丙基丙酸 $-CH_2C((CH_2)_2CH_3)(COOH)-$(PAA)。

[0145] 在一些实施方案中，所述可带电荷种类是阳离子性的。在某些实施方案中，所述可带电荷种类在生理 pH 是阳离子性的。在具体的实施方案中，在生理 pH 下是阳离子性的种类是氮种类例如铵、-NRR'R"、胍鎓盐 (-NRC(＝ NR' H)$^+$NR"R'"，包括对于本领域技术人员来说是已知的标准形式)，其中 R 基团独立地是氢、烷基、环烷基或芳基，或连接至相同或相邻氮原子的两个 R 基团还可以彼此连接以形成杂环种类例如、但不限于吡咯、咪唑或吲哚等。在一些实施方案中，膜破裂的两个机制：(a) 聚阳离子 (例如 DMAEMA) 和 (b) 疏水化的聚阴离子 (例如丙基丙烯酸) 一起作用的组合对由聚合物提供的膜去稳定化作用的潜能具有累加或协同作用。

[0146] 在一些实施方案中，嵌段共聚物包含多个疏水性种类。在一些实施方案中，嵌段共聚物包含疏水性单体单元。在某些实施方案中，疏水性单体单元是乙烯基取代的芳香族化合物或杂芳香族化合物。在另外的实施方案中，疏水性单体是烷基 (烷基) 丙烯酸酯。在具体的实施方案中，疏水性单体是苯乙烯衍生物。

[0147] 在一些实施方案中，聚合物包含两性离子性单体单元，其中阳离子性的可带电荷种类和阴离子性的可带电荷种类在同一单体单元中存在。

[0148] 在一些情况下，嵌段共聚物包含具有反应性基团的单体，所述反应性基团可用于通过本领域内已知的化学法例如“Click”化学 (关于例如“Click”反应，参见 Wu, P. ; Fokin, V.V.Catalytic Azide-AlkyneCycloaddition :Reactivity and Applications. Aldrichim.Acta,2007,40,7-17) 聚合后引入额外的官能性。在某些实施方案中，反应性基因是被活化的基团，包括但还不限于 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯、HOBt(1- 羟基苯并三唑) 酯、对硝基苯酯、四氟苯酯、五氟苯酯、吡啶二硫基等。

[0149] 在特定的情况下，本文中提供了下列结构的聚合物：

[0150] $\alpha-[D_s-X_t]_b-[B_x-P_y-D_z]_a-\omega$ [结构 1]

[0151] $\alpha-[B_x-P_y-D_z]_a-[D_s-X_t]_b-\omega$ [结构 2]

[0152] 其中 x、y、z、s 和 t 是各个单体单元 D(DMAEMA)、B(BMA)、P(PAA) 和亲水性的中性单体 (X) 在聚合物嵌段中的摩尔数百分比组成（通常为 0-50％），a 和 b 是嵌段的分子量，$[D_s-X_t]$ 是亲水性嵌段，α 和 ω 表示聚合物的相对末端。在某些实施方案中，x 为 50％、y 为 25％并且 z 为 25％。在某些实施方案中，x 为 60％、y 为 20％以及 z 为 20％。在某些实施方案中，x 为 70％、y 为 15％以及 z 为 15％。在某些实施方案中，x 为 50％、y 为 25％并且 z 为 25％．在某些实施方案中，x 为 33％、y 为 33％并且 z 为 33％。在某些实施方案中，x 为 50％、y 为 20％并且 z 为 30％。在某些实施方案中，x 为 20％、y 为 40％并且 z 为 40％。在某些实施方案中，x 为 30％、y 为 40％并且 z 为 30％。在一些实施方案中，本文中描述的聚合物载体包含约 2,000Da 至约 30,000Da、约 5,000Da 至约 20,000Da 或约 7,000Da 至约 15,000Da 的亲水性嵌段。在具体的实施方案中，亲水性嵌段为约 7,000Da、8,000Da、9,000Da、10,000Da、11,000Da、12,000Da、13,000Da、14,000Da 或 15,000Da。在某些实施方案中，本文中描述的聚合物载体包含约 2,000Da 至约 50,000Da、约 10,000Da 至约 50,000Da、约 15,000Da 至约 35,000Da 或约 20,000Da 至约 30,000Da 的疏水性嵌段。在一些具体的实施方案中，具有 12,500Da 的亲水性嵌段和 25,000Da 的疏水性嵌段（1 ： 2 的长度比）的聚合物形成聚合物载体（例如，胶束）。在一些具体的实施方案中，具有 10,000Da 的亲水性嵌段和 30,000Da 的疏水性嵌段（1 ： 3 的长度比）的聚合物形成聚合物载体（例如，胶束）。在一些具体的实施方案中，具有 10,000Da 的亲水性嵌段和 25,000Da 的疏水性嵌段（1 ： 2.5 的长度比）的聚合物形成约 45nm（如通过动态光散射测量或电子显微镜检查测定的）的聚合物载体（例如，胶束）。在一些具体的实施方案中，胶束为 80 或 130nm（例如通过动态光散射测量或电子显微镜检查测定的）。通常，随着形成胶束壳的 $[D_s-X_t]$ 的分子量（或长度）相对于 $[B_x-P_y-D_z]$（形成芯的疏水性嵌段）增加，胶束的大小增加。在一些情况下，形成壳的聚合物阳离子嵌段（$[D_s-X_t]$）的大小在提供与寡核苷酸药物的有效复合物形成 / 电荷中和中非常重要。例如，在某些情况下，对于约 20 个碱基对（即，40 个阴离子电荷）的 s iRNA，阳离子性嵌段具有适合于提供有效结合的长度，例如 40 个阳离子电荷。对于包含 80 个 pKa 值为 7.4 的 DMAEMA 单体 (MW ＝ 11,680) 的壳嵌段，嵌段在 pH 7.4 下包含 40 个阳离子电荷。在一些情况下，稳定的聚合物 -siRNA 缀合物（例如，复合物）通过相似数目的相反电荷之间的静电相互作用形成。在某些情况下，避免大量的过量正电荷有助于防止显著的体外和体内毒性。

[0153] 在具体的实施方案中，嵌段共聚物的疏水性嵌段包含多个阳离子性的可带电荷种类，例如，甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯 (DMAEMA)。因此，在一些实施方案中，此类聚合物节段的结构由结构 3 表示 ：

[0154] $Q_1-[BMA_x-PAA_y-DMAEMA_z]-Q_2$ [结构 3]

[0155] 其中 x、y 和 z 是单个单体单元的摩尔数百分比组成（通常为 0-50％），并且上述命名表示其他聚合物嵌段或末端官能团。在某些情况下，各单体单元发挥单独的和协同的功能。例如，包含阴离子性种类和疏水性种类的聚丙基丙烯酸（具有约 6.7 的 pKa 值）在高于约 6.7 的 pH 下是亲水性的，并且在低于约 6.7 的 pH 下疏水性逐渐增加，其中羧酸根开始质子化。在某些情况下，例如通过增加嵌段中占主导的疏水性单体单元 BMA 的摩尔数百

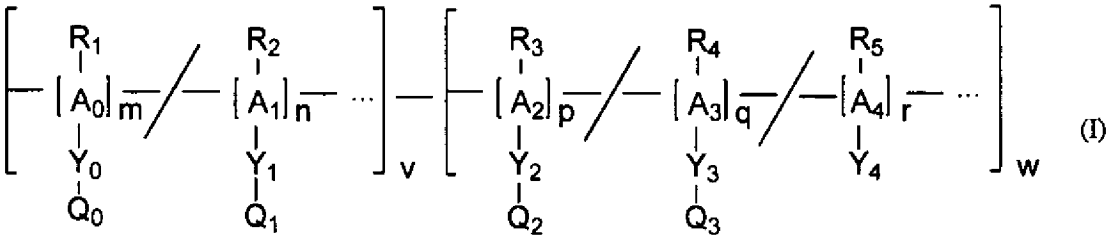
分比来增加局部环境的疏水性，可以提高 PAA 的 pKa，从而导致 PAA 在更高的 pH 下质子化，即，包含 PAA 的嵌段在更高的 pH 下变得更加具有膜去稳定性，从而在低于生理 pH ～ 7.4 的 pH 下对更小的酸性变化更敏感。在一些情况下，PAA 的质子化导致疏水性的大大增加和随后的构象变化，从而产生具有膜去稳定化性质的形式。上述聚合物嵌段中的第三单体单元是阳离子性种类，例如 DMAEMA，其在一些情况下起着多个作用，包括但不限于下列作用。当以等摩尔量与 PAA 阴离子性种类匹配时，其产生电荷中和和形成可促成胶束结构疏水性芯的稳定性的静电相互作用的电位，其中上述结构中的 Q_1 或 Q_2 是亲水性均聚物嵌段，例如聚 DMAEMA。

[0156] 嵌段排列

[0157] 在一些实施方案中，所述多核苷酸载体嵌段在生理 pH（例如，循环人血浆的 pH）下或其附近是阳离子性的。在一些实施方案中，所述多核苷酸嵌段包含聚阳离子。在一些实施方案中，所述核酸（例如，siRNA）是包含 x 个阴离子的聚阴离子，并且所述多核苷酸载体嵌段包含约 0.6x、约 0.7x、约 0.8x、约 0.9x、约 1.0x、约 1.1x 个阳离子或更多阳离子。在具体的实施方案中，所述核酸（例如，s iRNA）是包含 x 个阴离子的聚阴离子，并且所述多核苷酸载体嵌段包含约 0.7•x 个阳离子或更多个阳离子。在某些实施方案中，多核苷酸载体的阳离子性种类是氮种类，例如但不限于铵、-NRR' R"、胍鎓盐 (-NRC(= NR' H)$^+$NR"R'"，包括对于本领域技术人员来说是已知的标准形式），其中 R 基团独立地是氢、烷基、环烷基或芳基，或连接至相同或相邻的氮原子的两个 R 基团还可以彼此连接以形成杂环种类例如但不限于吡咯、咪唑或吲哚等。在一些实施方案中，多核苷酸载体嵌段是结合核酸的聚酰胺、嵌入剂或者形成双链体或三链体的寡核苷酸。多核苷酸载体嵌段可以是嵌段共聚物的 α - 末端嵌段或 ω - 末端嵌段。在具体的实施方案中，多核苷酸载体嵌段具有约 10,000 道尔顿至约 200,000 道尔顿的数均分子量 (Mn)。在其他实施方案中，所述疏水性嵌段具有约 2,000 道尔顿至约 50,000 道尔顿或约 10,000 道尔顿至约 50,000 道尔顿的数均分子量 (Mn)。

[0158] 在具体的实施方案中，所述嵌段共聚物（例如，二嵌段共聚物）具有化学式 I：

[0159]



(I)

[0160] 在一些实施方案中：

[0161] A_0、A_1、A_2、A_3 和 A_4 选自 -C-、-C-C-、-C(O)(C)$_a$C(O)O-、-O(C)$_a$C(O)- 和 -O(C)$_b$O-；其中，

[0162] a 是 1-4；

[0163] b 是 2-4；

[0164] Y_4 选自氢、(1C-10C) 烷基、(3C-6C) 环烷基、O-(1C-10C) 烷基、-C(O)O(1C-10C) 烷基 -、-C(O)NR$_6$(1C-10C)-、-(4C-10C) 杂芳基 - 和芳基 (6C-10C) 芳基，它们中任意个任选被一个或多个氟基团取代；

[0165] Y_0，Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、(1C-10C) 烷基 -、-C(O)O(2C-10C) 烷基 -、-OC(O)

(1C-10C) 烷基 -、-O(2C-10C) 烷基 - 和 -S(2C-10C) 烷基 -、-C(O)NR_6(2C-10C) 烷基 -、-(4C-10C) 杂芳基 - 和 -(6C-10C) 芳基 - ;

[0166] Y_3 选自共价键、-(1C-10C) 烷基 -、-(4C-10C) 杂芳基 - 和 -(6C-10C) 芳基 - ;

[0167] 其中用适当数量的氢原子完成未完全被 R_1-R_5 和 Y_0-Y_4 取代的 A_1-A_4 四价碳原子 ;

[0168] R_1、R_2、R_3、R_4、R_5 和 R_6 独立地选自氢、-CN、烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基,它们中任意个可以任选地被一个或多个氟原子取代 ;

[0169] Q_0 是选自如下残基的残基 :在生理 pH 下为亲水性的并且在生理 pH 下至少部分带正电荷的残基(例如,氨基、烷氨基、铵、烷基铵、胍、咪唑基、吡啶基等)、在生理 pH 下至少部分带负电荷但在更低 pH 下发生质子化的残基(例如,羧基、磺酰胺、硼酸根、膦酸根、磷酸根等)、在生理 pH 下基本上呈中性(或不带电荷)的残基(例如,羟基、聚氧化烷基、聚乙二醇、聚丙二醇、硫氢基等)、在生理 pH 下至少为部分两性离子性的残基(例如在生理 pH 下包含磷酸根和铵基的单体残基)、可缀合的或可官能化的残基(例如,包含反应性基团的残基例如叠氮化物、炔烃、琥珀酰亚胺酯、四氟苯酯、五氟苯酯、对硝基苯酯、吡啶基二硫化物等)或氢 ;

[0170] Q_1 是在生理 pH 下为亲水性并且在生理 pH 下至少部分带正电荷的残基(例如,氨基、烷氨基、铵、烷基铵、胍、咪唑基、吡啶基等) ;在生理 pH 下至少部分带负电荷但在更低 pH 下发生质子化的残基(例如,羧基、磺酰胺、硼酸根、膦酸根、磷酸根等)、在生理 pH 下基本为中性的残基(例如,羟基、聚氧化烷基、聚乙二醇、聚丙二醇、硫氢基等)、或在生理 pH 下至少部分为两性离子性的残基(例如在生理 pH 下包含磷酸根和铵基) ;

[0171] Q_2 是在生理 pH 下带正电荷的残基,包括但不限于氨基、烷氨基、铵、烷基铵、胍、咪唑基、吡啶基 ;

[0172] Q_3 在生理 pH 下带负电荷但在更低 pH 下发生质子化的残基,包括但不限于羧基、磺酰胺、硼酸根、膦酸根和磷酸根 ;

[0173] m 为约 0 至小于 1.0(例如,0 至约 0.49) ;

[0174] n 为大于 0 至约 1.0(例如,约 0.51 至约 1.0) ;其中

[0175] m+n = 1

[0176] p 为约 0.1 至约 0.9(例如,约 0.2 至约 0.5) ;

[0177] q 为约 0.1 至约 0.9(例如,约 0.2 至约 0.5) ;其中

[0178] r 为 0 至约 0.8(例如,0 至约 0.6) ;其中

[0179] p+q+r = 1

[0180] v 为约 1 至约 25kDa ;或约 5 至约 25kDa ;以及,

[0181] w 为约 1 至约 50kDa,或约 5 至约 50kDa。

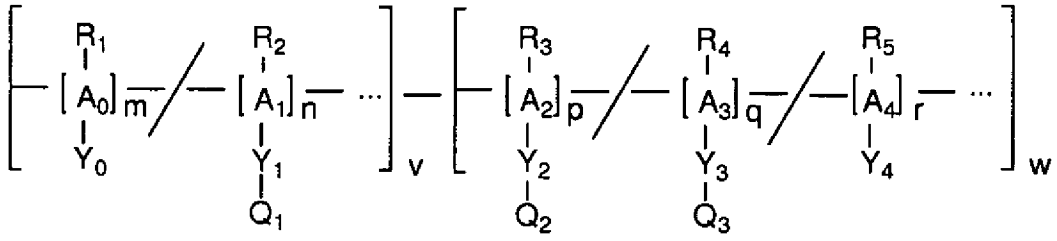
[0182] 在一些实施方案中,p 和 q 表示的单体残基的数目或比率在彼此的约 30%,彼此的约 20%,彼此的约 10%等范围内。在具体的实施方案中,p 大体上与 q 相同。在某些实施方案中,至少部分带电荷通常包括痕量以上的带电荷种类,包括例如至少 20%的残基带电荷,至少 30%的残基带电荷,至少 40%的残基带电荷,至少 50%的残基带电荷,至少 60%的残基带电荷,至少 70%的残基带电荷等。

[0183] 在某些实施方案中,m 是 0,且 Q1 是亲水性的并且生理 pH 下基本上为中性(或不带电荷)的残基。在一些实施方案中,基本上不带电荷包括例如,低于 5%带电荷,低于 3%

带电荷，低于1％带电荷等。在某些实施方案中，m是0，并且Q1是亲水性的且在生理pH下至少部分为阳离子性的残基。在某些实施方案中，m是0，并且Q_1是亲水性的且在生理pH下至少部分为阴离子的残基。在某些实施方案中，m大于0，并且n大于0，并且Q_0或Q_1之一是亲水性的且在生理pH下至少部分为阳离子性的残基，并且Q_0或Q_1中的另一个是亲水性的且在生理pH下基本上为中性的残基。在某些实施方案中，m大于0，并且n大于0，并且Q_0或Q_1之一是为亲水性的且在生理pH下至少部分为阴离子性的残基，并且Q_0或Q_1中另一个是亲水性的且在生理pH下基本上为中性的残基。在某些实施方案中，m大于0，并且n大于0，并且Q_1是亲水性的且在生理pH下至少部分为阳离子性的残基，并且Q_0是可缀合的或可官能化的残基。在某些实施方案中，m大于0且n大于0，并且Q_1是亲水性的且在生理pH下基本上为中性的残基，并且Q_0是可缀合的或可官能化的残基。

[0184] 在某些实施方案中，本文中描述的聚合物载体包含式II的嵌段共聚物：

[0185]



(II)

[0186] 在一些实施方案中：

[0187] A_0、A_1、A_2、A_3和A_4选自-C-C-、-C(O)(C)$_a$C(O)O-、-O(C)$_a$C(O)-和-O(C)$_b$O-；其中，

[0188] a是1-4；

[0189] b是2-4；

[0190] Y_0和Y_4独立地选自氢、(1C-10C)烷基、(3C-6C)环烷基、O-(1C-10C)烷基、-C(O)O(1C-10C)烷基、C(O)NR_6(1C-10C)、(4C-10C)杂芳基和(6C-10C)芳基，它们中任意个任选被一个或多个氟基团取代；

[0191] Y_1和Y_2独立地选自共价键、(1C-10C)烷基-、-C(O)O(2C-10C)烷基-、-OC(O)(1C-10C)烷基-、-O(2C-10C)烷基-、-S(2C-10C)烷基-、-C(O)NR_6(2C-10C)烷基-、(4C-10C)杂芳基和(6C-10C)芳基；

[0192] Y_3选自共价键、(1C-10C)烷基、(4C-10C)杂芳基和(6C-10C)芳基；其中

[0193] 用适当数量的氢原子完成未完全被R_1-R_5和Y_0-Y_4取代的A_1-A_4四价碳原子；

[0194] R_1、R_2、R_3、R_4、R_5和R_6独立地选自氢、-CN、烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基，它们中任意个任选被一个或多个氟原子取代；

[0195] Q_1和Q_2是在生理pH下带正电荷的残基，包括但不限于氨基、烷氨基、铵、烷基铵、胍、咪唑基和吡啶基；

[0196] Q_3是在生理pH下带负电荷但在更低pH下发生质子化的残基，包括但不限于羧基、磺酰胺、硼酸根、膦酸根和磷酸根；

[0197] m为0至约0.49；

[0198] n为约0.51至约1.0；其中

[0199] m+n = 1

[0200] p为约0.2至约0.5；

[0201] q 为约 0.2 至约 0.5 ;其中 :

[0202] p 大体上与 q 相同 ;

[0203] r 为 0 至约 0.6 ;其中

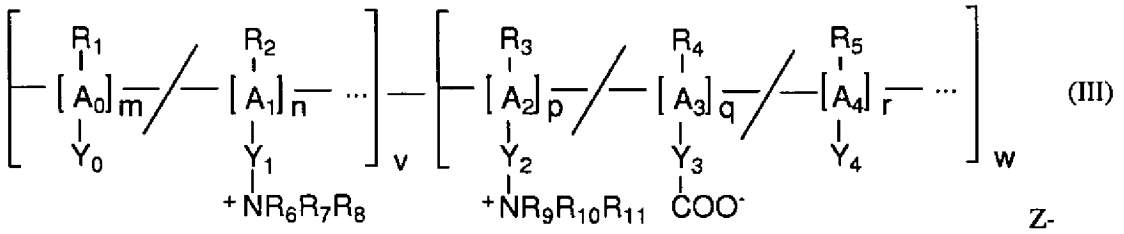
[0204] p+q+r = 1

[0205] v 为约 5 至约 25kDa ;以及,

[0206] w 为约 5 至约 50kDa。

[0207] 在某些实施方案中,本文中描述的聚合物载体包含式 III 的嵌段共聚物(例如,在正常生理 pH 下):

[0208]



(III)

[0209] 在某些实施方案中,如所示被取代的 A_0、A_1、A_2、A_3 和 A_4 包含式 III 聚合物的结构单元(在本文中可与"单体单元"和"单体残基"互换使用)。在具体的实施方案中,构成式 III 的 A 基团的单体单元在适当的条件下是聚合相容性的。在某些情况下,使用包含碳-碳双键 > C = C < 的单体聚合乙烯型骨架或结构单元 -(C-C-)$_m$- 聚合物,其中每个 C 被 H 和 / 或任意其他适合的基团二取代。在某些实施方案中,每个 A 基团(例如 A_0、A_1、A_2、A_3 和 A_4 中每一个)可以是(即独立地选自)-C-C-(即乙烯型单体单元或聚合物骨架)、-C(O)(C)$_a$C(O)O-(即聚酸酐单体单元或聚合物骨架)、-O(C)$_a$C(O)-(即聚酯单体单元或聚合物骨架)、-O(C)$_b$O-(即聚亚烷基二醇单体单元或聚合物骨架)等(其中每个 C 被 H 和 / 或任意其他适合的基团二取代,例如本文所述的,包括如上所述的 R_{12} 和 / 或 R_{13})。在具体的实施方案中,术语"a"是从 1 至 4 的整数,并且"b"是从 2 至 4 的整数。在某些情况下,与式 III 骨架连接的每个" Y" 和" R" 基团(即 Y_0、Y_1、Y_2、Y_3、Y_4、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5 中任一个)与该具体单体单元的任意" C" (包括任意 (C)$_a$ 或 (C)$_b$) 键合。在一些具体的实施方案中,一个具体单体单元的 Y 和 R 连接在同一" C" 上。在一些具体的实施方案中,一个具体单体单元的 Y 和 R 连接在同一" C" 上,如果存在的话,则该" C" 位于该单体单元的羰基的 α 位。

[0210] 在具体的实施方案中,R_1-R_{11} 独立地选自氢、烷基(例如,1C-5C 烷基)、环烷基(例如,3C-6C 环烷基)或苯基,其中 R_1-R_{11} 中任意个任选被一个或多个氟、环烷基或苯基取代,它们可以任选地进一步被一个或多个烷基取代。

[0211] 在某些具体的实施方案中,Y_0 和 Y_4 独立地选自氢、烷基(例如,1C-10C 烷基)、环烷基(例如,3C-6C 环烷基)、O- 烷基(例如,O-(2C-10C) 烷基、-C(O)O- 烷基(例如 -C(O)O-(2C-10C) 烷基)或苯基,它们中任意个任选被一个或多个氟取代。

[0212] 在一些实施方案中,Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、烷基(优选 (1C-10C) 烷基)、-C(O)O- 烷基(优选 -C(O)O-(2C-10C) 烷基)、-OC(O) 烷基(优选 -OC(O)-(2C-10C) 烷基)、O- 烷基(优选 -O(2C-10C) 烷基)和 -S- 烷基(优选 -S-(2C-10C) 烷基)。在某些实施方案中,Y_3 选自共价键、烷基(优选 (1C-5C) 烷基)和苯基。

[0213] 在一些实施方案中,Z- 存在或不存在。在某一些实施方案中,其中 R_1 和 / 或 R_4 是

氢，Z- 是 OH-。在某些实施方案中，Z^- 是任意的抗衡离子（例如，一种或多种抗衡离子），优选生物相容性抗衡离子，例如但不限于例如氯化物、无机或有机磷酸根、硫酸根、磺酸根、乙酸根、丙酸根、丁酸根、戊酸根、己酸根、辛酸根、癸酸根、月桂酸根、肉豆蔻酸根、软脂酸根、硬脂酸根、棕榈酸根、油酸根、亚油酸根、花生酸根、鳕油酸根、牛痘酸根、乳酸根、羟乙酸根、水杨酸根、脱氨基苯丙氨酸、脱氨基丝氨酸、脱氨基苏氨酸、ε - 羟基己酸根、3- 羟基丁酸根、4- 羟基丁酸根或 3- 羟基戊酸根。在一些实施方案中，当 Y、R 和任选的氟中每一个与所选择的骨架上的碳共价键合时，未完全取代的任意碳由适合数量的氢原子完成。数目 m、n、p、q 和 r 表示其嵌段中每个结构单元的摩尔分数，且 v 和 w 提供每个嵌段的分子量。

[0214] 在某些实施方案中，

[0215] A_0、A_1、A_2、A_3 和 A_4 选自 -C-、-C-C-、$-C(O)(CR_{12}R_{13})_aC(O)O-$、$-O(CR_{12}R_{13})_aC(O)-$ 和 $O(CR_{12}R_{13})b_0$；其中，

[0216] a 是 1-4；

[0217] b 是 2-4；

[0218] R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、R_{10}、R_{11}、R_{12} 和 R_{13} 独立地选自氢、(1C-5C) 烷基、(3C-6C) 环烷基、(5C-10C) 芳基、(4C-10C) 杂芳基，它们中任意个可以任选被一个或多个氟原子取代；

[0219] Y_0 和 Y_4 独立地选自氢、(1C-10C) 烷基、(3C-6C) 环烷基、O-(1C-10C) 烷基、-C(O)O(1C-10C) 烷基和苯基，它们中任意个任选被一个或多个氟基团取代；

[0220] Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、(1C-10C) 烷基 -、-C(O)O(2C-10C) 烷基 -、-OC(O)(1C-10C) 烷基 -、-O(2C-10C) 烷基 - 和 -S(2C-10C) 烷基 -；

[0221] Y_3 选自共价键、(1C-5C) 烷基和苯基；其中用适当数量的氢原子完成未完全被 R_1-R_5 和 Y_0-Y_4 取代的 A_1-A_4 四价碳原子；

[0222] Z 是一种或多种生理上可接受的抗衡离子，

[0223] m 为 0 至约 0.49；

[0224] n 为约 0.51 至约 1.0；其中

[0225] m+n ＝ 1

[0226] p 为约 0.2 至约 0.5；

[0227] q 为约 0.2 至约 0.5；其中：

[0228] p 大体上与 q 相同；

[0229] r 为 0 至约 0.6；其中

[0230] p+q+r ＝ 1

[0231] v 为约 1 至约 25kDa，或约 5 至约 25kDa；以及，

[0232] w 为约 1 至约 50kDa，或约 5 至约 50kDa。

[0233] 在一个具体的实施方案中，

[0234] A_0、A_1、A_2、A_3 和 A_4 选自 $-C-C-$、$-C(O)(C)_aC(O)O-$、$-O(C)_aC(O)-$ 和 $-O(C)_bO-$；其中，

[0235] a 是 1-4；

[0236] b 是 2-4；

[0237] R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7.R_8、R_9、R_{10} 和 R_{11} 独立地选自氢、(1C-5C) 烷基、(3C-6C) 环烷基和苯基，它们中任意个可以任选被一个或多个氟原子取代；

[0238] Y_0 和 Y_4 独立地选自氢、(1C-10C) 烷基、(3C-6C) 环烷基、O-(1C-10C) 烷基、-C(O)O(1C-10C) 烷基和苯基，它们中任意个任选被一个或多个氟基团取代；

[0239] Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、(1C-10C) 烷基 -、-C(O)O(2C-10C) 烷基 -、-OC(O)(1C-10C) 烷基 -、-O(2C-10C) 烷基 - 和 -S(2C-10C) 烷基 -；

[0240] Y_3 选自共价键、(1C-5C) 烷基和苯基；其中用适当数量的氢原子完成未完全被 R_1-R_5 和 Y_0-Y_4 取代的 A_1-A_4 四价碳原子；

[0241] Z 为生理上可接受的抗衡离子，

[0242] m 为 0 至约 0.49；

[0243] n 为约 0.51 至约 1.0；

[0244] 其中 m+n ＝ 1

[0245] p 为约 0.2 至约 0.5；

[0246] q 为约 0.2 至约 0.5；其中：

[0247] p 大体上与 q 相同；

[0248] r 为 0 至约 0.6；其中

[0249] p+q+r ＝ 1

[0250] v 为约 5 至约 25kDa；且，

[0251] w 为约 5 至约 25kDa。

[0252] 在一些实施方案中，

[0253] A_1 是 -C-C-

[0254] Y_1 是 $-C(O)OCH_2CH_2-$；

[0255] R_6 是氢；

[0256] R_7 和 R_8 各自是 $-CH_3$；且，

[0257] R_2 是 $-CH_3$。

[0258] 在一些实施方案中，

[0259] A_2 是 -C-C-；

[0260] Y_2 是 $-C(O)OCH_2CH_2-$；

[0261] R_9 是氢；

[0262] R_{10} 和 R_{11} 各自是 $-CH_3$；且，

[0263] R_3 是 $-CH_3$。

[0264] 在一些实施方案中，

[0265] A_3 是 -C-C-；

[0266] R_4 是 $CH_3CH_2CH_2-$；

[0267] Y_3 是共价键；

[0268] 以及 Z^- 是生理上可接受的阴离子。

[0269] 在一些实施方案中，

[0270] A_4 是 -C-C-；

[0271] R_5 选自氢和 $-CH_3$；且，

[0272] Y_4 是 $-C(O)O(CH_2)_3CH_3$。

[0273] [00173] 在一些实施方案中，

[0274] A_0 是 C-C-

[0275] R_1 选自氢和 (1C-3C) 烷基 ;且,

[0276] Y_0 选自 -C(O)O(1C-3C) 烷基。

[0277] 在一些实施方案中,m 是 0。

[0278] 在一些实施方案中,r 是 0。

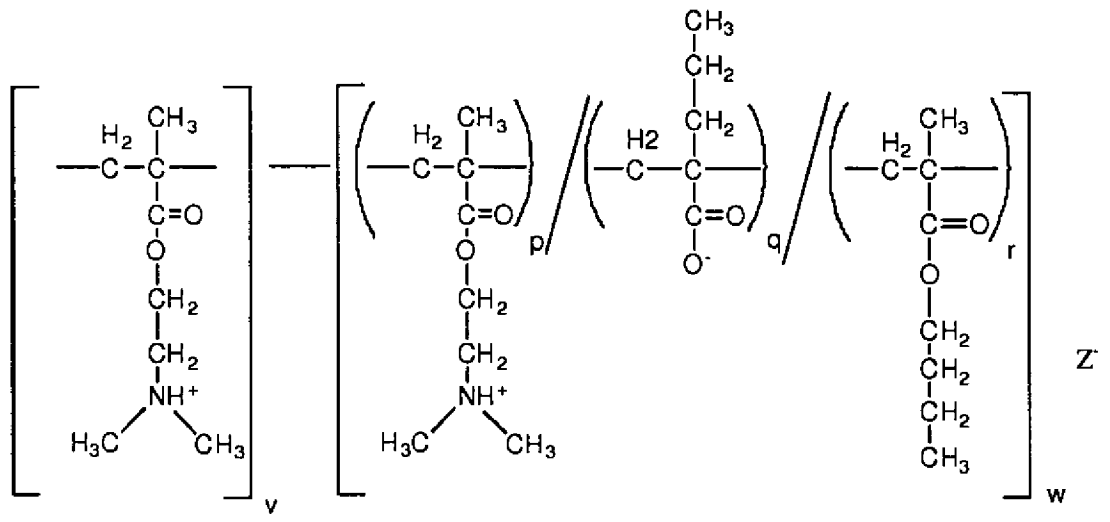
[0279] 在一些实施方案中,m 和 r 都是 0。

[0280] 在本文中描述的不同实施方案中,本文中描述的在生理 pH 下为阳离子性或带正电荷的结构单元(包括例如某些亲水性结构单元)包含一个或多个氨基、烷氨基、胍基、咪唑基、吡啶基等或其质子化、烷基化或以其它方式带电荷的形式。在一些实施方案中,本文中使用的在正常生理 pH 下为阳离子性的结构单元包括但不限于例如甲基丙烯酸二甲基氨基烷基酯(例如,DMAEMA)的单体残基。在本文中描述的不同实施方案中,本文中描述的在生理 pH 下为阴离子性或带负电荷的结构单元(包括例如某些亲水性结构单元)包含一个或多个酸基团或其共轭碱,包括但不限于例如,羧酸根、磺酰胺、硼酸根、膦酸根、磷酸根等。在一些实施方案中,本文中使用的在正常生理 pH 下为阴离子性或带负电荷的结构单元包含但不限于例如丙烯酸、烷基丙烯酸(例如,甲基丙烯酸、乙基丙烯酸、丙基丙烯酸等)等的单体残基。在本文中描述的不同实施方案中,在生理 pH 下为中性的亲水性结构单元包含一个或多个亲水性基团,例如羟基、聚氧化烷基、聚乙二醇、聚丙二醇、硫氢基等。在一些实施方案中,本文中使用的在正常生理 pH 下为中性的亲水性结构单元包括但不限于例如 PEG 化的丙烯酸、PEG 化的甲基丙烯酸、羟基烷基丙烯酸、羟基烷基烷基丙烯酸(hydroxyalkylalkacrylic acid)(例如,HPMA)等的单体残基。在本文中描述的不同实施方案中,在生理 pH 下为两性离子性的亲水性结构单元包含在生理 pH 下为阴离子性或带负电荷的基团以及在生理 pH 下为阳离子性或带正电荷的基团。在一些实施方案中,本文中使用的在正常生理 pH 下为两性离子性的亲水性结构单元包括但不限于例如在生理 pH 下包含磷酸根基团和铵基的单体残基,例如在 US 7,300,990(将该文献的这种公开内容引入本文)等中举出的。

[0281] 在某些实施方案中,本文中提供的聚合物还包含一个或多个包含可缀合的或可官能化的侧链(例如单体残基的侧基)的结构单元。在一些情况下,可缀合的或可官能化的侧链是具有一个或多个反应性基团的基团,其可用于聚合后通过化学领域公知的化学方法(例如" click" 化学)引入其他官能团(关于例如“click”反应,参见 Wu, P. ; Fokin, V.V.Catalytic Azide-Alkyne Cycloaddition :Reactivity andApplications. Aldrichim.Acta,2007,40,7-17)。在某些实施方案中,本文中提供的可缀合的或可官能化的侧链包含一个或多个任意适当的活化基团,例如但不限于 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯、HOBt(1- 羟基苯并三唑)酯、对硝基苯酯、四氟苯酯、五氟苯酯、吡啶二硫基等。

[0282] 在某些实施方案中提供的嵌段共聚物是二嵌段共聚物,其具有式 IV1 的化学式(在正常生理或约中性 pH 下):

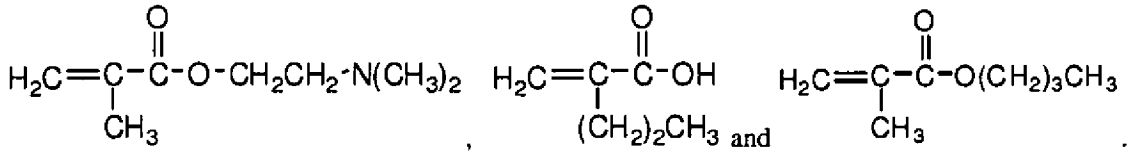
[0283]



(IV1)

[0284] 在某些情况下，化合物 IV1 的结构单元如左边的方括号和右边圆括号中显示的，并且它们从以下单体衍生而来：

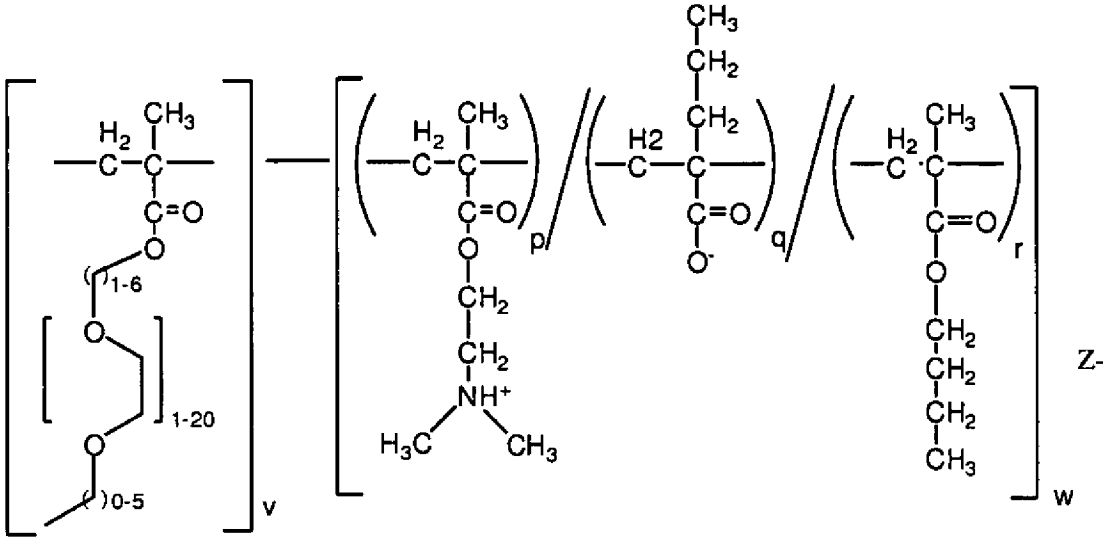
[0285]



[0286] 字母 p、q 和 r 表示其嵌段内各结构单元的摩尔分数。字母 v 和 w 表示二嵌段共聚物中各嵌段的分子量（数均分子量）。

[0287] 在一些实施方案中，本文中提供的化合物是具有下列结构的化合物：

[0288]



(IV2)

[0289] 如上所述，字母 p、q 和 r 表示其嵌段内各结构单元的摩尔分数。字母 v 和 w 代表二嵌段共聚物中各嵌段的分子量（数均分子量）。

[0290] 在一些实施方案中，本文中提供了下列聚合物：

[0291] $[DMAEMA]_v-[B_p-/-P_q-/-D_r]_w$ IV3

[0292] $[PEGMA]_V-[B_p-/-P_q-/-D_r]_w$ IV4

[0293] $[PEGMA_m-/-DMAEMA_n]_v-[B_p-/-P_q-/-D_r]_w$ IV5

[0294] $[PEGMA_m-/-MAA(NHS)_n]_v-[B_p-/-P_q-/-D_r]_w$ IV6

[0295] $[DMAEMA_m-/-MAA(NHS)_n]_v-[B_p-/-P_q-/-D_r]_w$ IV7

[0296] $[HPMA_m-/-PDSM_n]_v-[B_p-/-P_q-/-D_r]_w$ IV8

[0297] $[PEGMA_m-/-PDSM_n]_v-[B_p-/-P_q-/-D_r]_w$ IV9

[0298] 在一些实施方案中，B 是甲基丙烯酸丁酯残基；P 是丙基丙烯酸残基；D 和 DMAEMA 是甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯残基；PEGMA 是甲基丙烯酸聚乙二醇酯残基（例如，具有 1-20 个环氧乙烷单元，例如化合物 IV2 中举例说明的，或 4-5 个环氧乙烷单元或 7-8 个环氧乙烷单元）；MAA(NHS) 是甲基丙烯酸 -N- 羟基琥珀酰亚胺残基；HPMA 是 N-(2- 羟丙基）甲基丙烯酰胺残基；且 PDSM 是吡啶二硫基甲基丙烯酸酯残基。在某些实施方案中，术语 m、n、p、q、r、w 和 v 是如本文中所描述的。在具体的实施方案中，w 是 v 的 0.1 倍至约 5 倍或约 1 倍至约 5 倍。

[0299] 式 IV1-IV9 的化合物是本文提供的聚合物实例，其包含构成聚合物第一嵌段的多个结构单元。在一些实施方案中，改变或以化学方式处理第一嵌段的结构单元以产生聚合物，其中，第一嵌段是或包含为中性（例如，PEGMA）、阳离子性（例如，DMAEMA）、阴离子性（例如，PEGMA-NHS，其中 NHS 被水解成其酸，或丙烯酸）、两性（例如，DMAEMA-NHS，其中 NHS 被水解成其酸）或两性离子性（例如，聚 [2- 甲基丙烯酰氧基 -2′ 三甲基铵乙基磷酸]) 的结构单元。在一些实施方案中，在第一嵌段中包含吡啶二硫基官能团的聚合物例如 [PEGMA-PDSM]-[B-P-D] 可以与、并且任选地与硫氢基化 siRNA 反应，形成聚合物 -siRNA 缀合物。

[0300] 在一个具体的实施方案中，式 IV3 的化合物是如本文所述的 P7 类聚合物并且具有如表 1 中举出的分子量、多分散性和单体组成。

[0301]

表 1：一种 P7 聚合物的分子量、多分散性和单体组成	
聚合物类型	P7
“v” 嵌段的 Mn[a]	9100
“w” 嵌段的 Mn[a]	11300
PDI	1.45
“w” 嵌段的 BMA 残基%理论值	40
“w” 嵌段的 PPA 残基%理论值	30
“w” 嵌段的 DMAEMA 残基%理论值	30
“w” 嵌段的 BMA 残基%实验值[b]	48
“w” 嵌段的 PPA 残基%实验值[b]	29
“w” 嵌段的 DMAEMA 残基%实验值[b]	23

[0302] [a] 如通过与 Viscotek GPCmax VE2001 和折射计 VE 3580(Viscotek，Houston，TX) 串联的 SEC Tosoh TSK-GEL R-3000 和 R-4000 柱 (TosohBioscience，Montgomery ville，PA) 测定的。包含 0.1wt％ LiBr 的 HPLC- 级 DMF 用作流动相。使用一系列聚（甲基丙烯酸甲酯）标准品测定合成共聚物的分子量。

[0303] [b] 如通过 ^{1}H NMR 光谱法（在 $CDCl_3$ 中 3wt％；Bruker DRX 499）测定的。

[0304] 在一个具体的实施方案中，式 IV 3 的聚合物是表 2 中 P7 类的聚合物。

[0305] 表 2

[0306]

聚合物	结构	嵌段比(w/v)	粒度(nm)
PRx-1	$[D]_{11.3K}$-$[B_{50}$-P_{30}-$D_{20}]_{20.7K}$	1.83	41
PRx-2	$[D]_{14.5K}$-$[B_{57}$-P_{23}-$D_{20}]_{26.4K}$	1.82	49
PRx-3	$[D]_{11.5K}$-$[B_{35}$-P_{27}-$D_{38}]_{33.4K}$	2.92	60
PRx-4	$[D]_{10.7K}$-$[B_{50}$-P_{27}-$D_{23}]_{33.8K}$	3.16	50
PRx-5	$[D]_{10.7K}$-$[B_{40}$-P_{31}-$D_{29}]_{32.2K}$	3.00	59
PRx-6	$[D]_{14.5K}$-$[B_{52}$-P_{31}-$D_{16}]_{67.0K}$	4.62	115

[0307] 在一些具体的实施方案，式 IV3 的聚合物是称为 PRx0729v6 的 P7 类聚合物。在本申请中和在各优先权申请中 PRx0729v6 可与 P7v6 互换使用。

[0308] 间隔子嵌段

[0309] 在一些实施方案中，本发明的嵌段共聚物包含一个或多个任选嵌段。此类嵌段可以是间隔子嵌段。

[0310] 在某些实施方案中，至少一个本文中所述的嵌段共聚物还包含间隔子嵌段。在一些实施方案中，所述间隔子嵌段是疏水性嵌段与多核苷酸载体嵌段之间的亲水性嵌段。

[0311] 隔离亲水性节段 / 嵌段

[0312] 在某些实施方案中，本文中描述的聚合物载体包含一个或多个隔离剂 (shielding agent)。在一些实施方案中，所述多核苷酸载体嵌段 / 节段包含 PEG 取代的单体单元（例如，PEG 是侧链并且不包含多核苷酸载体嵌段的骨架）。在一些情况下，用于本文中所述聚合物载体的一个或多个聚合物（例如，嵌段共聚物）包含具有约 1,000 至约 30,000 分子量的聚乙二醇 (PEG) 链或嵌段。在一些实施方案中，PEG 与聚合物末端基团，或与存在于本文中提供的聚合物载体的聚合物中的一个或多个侧链可修饰基团缀合。在一些实施方案中，PEG 残基与本文中提供的聚合物载体的聚合物（例如，嵌段共聚物）的亲水性节段或嵌段（例如，壳嵌段）内的可修饰基团缀合。在某些实施方案中，将包含 2-20 个环氧乙烷单元的 PEG 残基的单体共聚合以形成形成本文中提供的聚合物载体的聚合物的亲水性部分。

[0313] 在一些情况下，隔离剂可增强治疗剂（例如，多核苷酸或肽等）在血浆中抗酶促降解的稳定性。在一些情况下，隔离剂减少本文中描述的聚合物载体（例如，连接至多核苷酸的嵌段共聚物）的毒性。在一些情况下，隔离剂赋予聚合物载体以有利的表面性质。在一些实施方案中，隔离剂包含多个中性的亲水性单体残基。在一些情况下，通过聚合物的末端基团将隔离聚合物共价偶合至膜去稳定化嵌段共聚物。在一些实施方案中，隔离剂是连接至聚合物的一个或多个单体残基的共价偶合侧链部分。在一些实施方案中，本文中描述的聚合物载体中的多个单体残基包含通过官能团共价偶合至聚乙二醇寡聚体或多聚体的侧链隔离种类（例如，聚乙二醇 (PEG) 寡聚体（例如，具有 20 个或更少的重复单元）或多聚体（例如，具有 20 个以上的重复单元））。在一些情况下，嵌段共聚物包含共价偶合至共聚物的膜去稳定化嵌段的 α 末端或 ω 末端的聚乙二醇 (PEG) 寡聚体或多聚体。

[0314] 在某些实施方案中，多核苷酸载体嵌段 / 节段包含用于至少部分地隔离多核苷酸

载体嵌段 / 节段上的电荷（例如，阳离子电荷）的单体单元。在具体的实施方案中，这种隔离至少部分地导致在单体单元上形成侧链部分，所述单体单元包含至少部分多核苷酸载体嵌段 / 节段。此类隔离任选地可降低来自该节段中过量电荷的细胞毒性。

[0315] 多核苷酸至聚合物载体的聚合物的连接

[0316] 在一些实施方案中，将多核苷酸（例如，寡核苷酸）连接（例如，共价地或非共价地）至本文中所述的任意聚合物载体的多个聚合物中的一个或多个聚合物。在此类实施方案中，可通过任意适当的技术（例如，化学缀合技术）将多核苷酸连接至聚合物。在具体的实施方案中，将多核苷酸连接至聚合物载体的聚合物的多核苷酸载体嵌段或节段。在某些具体的实施方案中，将多核苷酸连接至本文中所述的任意聚合物载体的聚合物的 α 末端（即，其中起始聚合的末端）或其附近或者在 ω 末端（即，其中终止聚合的末端）或其附近。在一些具体的实施方案中，通过在聚合物的 α 末端将多核苷酸与可缀合部分缀合来将多核苷酸连接至本文中描述的任意聚合物载体的聚合物。在某些具体的实施方案中，通过在聚合物的 ω 末端将多核苷酸与可缀合部分缀合来将多核苷酸连接至本文中所述的任意聚合物载体的聚合物。在不同的实施方案中，通过连接部分（例如，共价键或化学部分）将多核苷酸与连接至聚合物的聚合物 α 末端上的可缀合部分缀合来将多核苷酸连接至本文中所述的任意聚合物载体的聚合物。在一些实施方案中，将多核苷酸与连接至聚合物单体单元的侧基缀合。在不同的实施方案中，所述连接部分任选地是不可切割的或可切割的。在某些实施方案中，将多核苷酸连接至本文中所述聚合物载体的聚合物上的可切割键包括，作为非限制性实例，二硫键（例如，在细胞质的还原性环境中解离的二硫键）。在一些实施方案中，连接部分是可切割的和 / 或包含在内体条件下可切割的键。在一些实施方案中，连接部分是可切割的和 / 或包含可被特定酶（例如，磷酸酶或蛋白酶）切割的键。在一些实施方案中，连接部分是可切割的和 / 或包含在细胞内参数（例如，pH、氧化还原电位）变化时可切割的键。在一些实施方案中，通过任意适当的化学缀合方法获得聚合物（例如，聚合物的 α 或 ω 末端可缀合基团）与多核苷酸（例如，寡核苷酸或 s i RNA）之间的共价缔合，所述方法包括但不限于胺 - 羧基连接基、胺 - 醛连接基、胺 - 酮连接基、胺 - 碳水化合物连接基、胺 - 羟基连接基、胺 - 胺连接基、羧基 - 硫氢基连接基、羧基 - 碳水化合物连接基、羧基 - 羟基连接基、羧基 - 羧基连接基、硫氢基 - 碳水化合物连接基、硫氢基 - 羟基连接基、硫氢基 - 硫氢基连接基、碳水化合物 - 羟基连接基、碳水化合物 - 碳水化合物连接基和羟基 - 羟基连接基。在一些实施方案中，将双功能交联剂用于实现多核苷酸的适当的可缀合基团与本文中所述聚合物载体的聚合物之间的共价缀合。在一些实施方案中，还使用 pH 敏感性键和连接基包括但不限于腙和乙缩醛连接进行连接。在某些实施方案中，通过将硼酸与多核苷酸的末端核糖残基的 2′ 和 3′ 羟基形成酯来将多核苷酸共价连接至已掺入聚合物的 α 或 ω 末端的硼酸官能性（例如，苯硼酸残基）。同样任选地使用任何其他适当的缀合 / 连接方法，例如，有许多种缀合化学法可供利用（参见，例如，Bioconjugation，Aslam 和 Dent，Eds，Macmillan，1998 和其中的章节）。此外，在某些实施方案中，通过将多核苷酸与聚合物通过离子（即，阴离子 - 阳离子）相互作用进行复合来将多核苷酸连接至聚合物载体的聚合物或其多核苷酸载体嵌段（例如，带阳离子电荷的多核苷酸载体嵌段）。

[0317] 靶向

[0318] 在特定情况下，本文中提供的聚合物载体可用于将多核苷酸（例如，寡核苷酸）递

送至个体的细胞（其可以是针对选择的细胞类型而被特异性靶向）。在某些情况下，通过将靶向部分掺入聚合物载体内或其表面上来增加聚合物载体（例如，包含多核苷酸例如寡核苷酸或 siRNA 的聚合物载体）的细胞摄取效率。这样，在一些实施方案中，本文中提供了包含靶向试剂的聚合物载体。“靶向部分”（可与“靶向试剂”互换使用）识别细胞（例如，选择的细胞）的表面。在具体实施方案中，靶向部分结合细胞（例如，选择的细胞）的表面。在一些实施方案中，靶向部分识别细胞表面抗原或结合靶细胞的表面上的受体。合适的靶向部分包括，作为非限制性实例，例如抗体、抗体样分子或肽，例如整联蛋白结合肽例如含有 RGD 的肽或小分子例如维生素，例如叶酸、糖例如乳糖和半乳糖或其他小分子。细胞表面抗原包括细胞表面分子例如细胞表面上的蛋白质、糖、脂质或其他抗原。在具体实施方案中，细胞表面抗原发生内化。被本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）的靶向部分所靶向的细胞表面抗原的实例包括但不限于转铁蛋白受体 1 型和 2 型、EGF 受体、HER2/Neu、VEGF 受体、整联蛋白、NGF、CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD22、CD33、CD43、CD38、CD56、CD69 和脱唾液酸糖蛋白受体。

[0319] 在不同实施方案中，将靶向部分连接至聚合物（例如，嵌段共聚物）的任一末端，或连接至单体单元的侧链，或掺入聚合物嵌段。以任意适当的方式，例如通过许多缀合化学方法（包括但不限于胺 - 羧基连接基、胺 - 硫氢基连接基、胺 - 碳水化合物连接基、胺 - 羟基连接基、胺 - 胺连接基、羧基 - 硫氢基连接基、羧基 - 碳水化合物连接基、羧基 - 羟基连接基、羧基 - 羧基连接基、硫氢基 - 碳水化合物连接基、硫氢基 - 羟基连接基、硫氢基 - 硫氢基连接基、碳水化合物 - 羟基连接基、碳水化合物 - 碳水化合物连接基和羟基 - 羟基连接基）中的任一种方法实现靶向部分至聚合物的连接。在具体实施方案中，将“Click”化学法用于将靶向配体连接至形成本文中提供的聚合物载体的嵌段共聚物（关于“Click”反应的实例，参见 Wu、P. ;Fokin、V.V.Catalytic Azide-AlkyneCycloaddition :Reactivity and Applications.Aldrichim.Acta2007,40、7-17）。有许多种缀合化学法可任选地使用（参见，例如，Bioconjugation.Aslam 和 Dent，Eds，Macmillan、1998 和本文中的章节）。在一些实施方案中，将靶向配体连接至单体，然后将所得的化合物用于用本文中描述的聚合物载体中采用的聚合物（例如，嵌段共聚物）的聚合合成。在一些实施方案中，将靶向部分连接至第一嵌段共聚物的嵌段，或连接至第二嵌段共聚物的嵌段（例如，其中将第一嵌段共聚物连接至多核苷酸，例如 siRNA）。在一些实施方案中，将靶向配体连接至与嵌段共聚物相结合的 siRNA 的有义或反义链。在某些实施方案中，将靶向试剂连接至有义或反义链的 5′ 或 3′ 末端。

[0320] 在具体的实施方案中，形成本文中提供的聚合物载体的嵌段共聚物是生物相容性的。如本文所用的，″生物相容性″意指聚合物的一种特性，其特征在于它本身或它在体内的降解产物不会损伤活组织或对其损伤至少是最低限度的和 / 或可修补性的 ;和 / 或不会导致或至少最低限度地和可控地导致活组织中的免疫反应。就盐而言，目前优选阳离子性种类和阴离子性种类都是生物相容性的。如本文所用的的，“生理可接受的″与生物相容性可互换使用。在一些情况中，本文中所用的聚合物载体和 / 或聚合物（例如共聚物）与阳离子性脂质相比显示低毒性。

[0321] 在一些实施方案中，本文中提供的载体物载体相对于用于递送多核苷酸的其他技术而言具有更优越的商业效力 (commercial viability)，包括但不限于 :在体内反复施用

后降低的载体免疫原性；装配递送载体的多个元件所需的步骤更少，从而导致商品成本更低；和制造的可重现性，如通过制造在生物物理测定性质（包括但不限于例如 HPLC、GPC、DLS 和 TEM）上具有低于 5%，低于 10%或低于 20%的逐批差异的重复批次的产品的能力判断。

[0322] 细胞摄取

[0323] 在一些实施方案中，包含多核苷酸（例如寡核苷酸或 siRNA）的聚合物载体因胞吞作用被递送至细胞。在本说明书上下文中，胞内小囊泡和内体可互换使用。多核苷酸（例如寡核苷酸或 siRNA）成功递送入细胞质一般具有内体逃逸机制。在某些情况下，本文提供的包含多核苷酸（例如寡核苷酸或 siRNA）的聚合物载体在胞吞作用时对内体区室中的较低 pH 敏感。在一些情况中，胞吞作用引起聚合物载体的可带阴离子电荷的种类（例如丙基丙烯酸单元）的质子化或电荷中和，导致聚合物载体的构象转换。在某些情况下，这种构象转换产生更具疏水性的膜去稳定化的形式，其介导多核苷酸（例如寡核苷酸或 siRNA）从内体释放至细胞质。在包含 siRNA 的那些聚合物载体中，siRNA 向细胞质的递送使其 mRNA 敲低效应发生。在那些包含其他类型寡核苷酸的聚合物载体中，向细胞质的递送使其期望的作用发生。

[0324] 多核苷酸

[0325] 本文中描述的聚合物载体还可用于将多核苷酸递送至有此需要的受试者。多核苷酸是具有多个核苷酸例如 200 个以上的核苷酸的核酸聚合物。在一个实施方案中，多核苷酸是哺乳动物表达载体。在另一个实施方案中，多核苷酸被设计成与人中的内源基因序列重组并且修正其。在一些实施方案中，本文中所述的聚合物载体中提供的多核苷酸是基因表达调节剂。在某些实施方案中，本文中所述的聚合物载体中提供的多核苷酸是敲低剂（例如，敲低寡核苷酸，例如 siRNA）。本文中使用的多核苷酸还任选地包括信使 RNA(mRNA) 以及 RNA 或 DNA 诱饵（例如，竞争内源核酸序列对其细胞内靶的结合）或核酸适体（例如，结合细胞内大分子）。

[0326] 哺乳动物表达载体包含功能性连接至启动子以便启动子驱动 cDNA 表达的互补 DNA 序列（“cDNA”或小基因 (mini-gene)）。在某些情况下，哺乳动物表达载体还在 cDNA 的 3′ 末端包含多聚腺苷酸化信号。启动子区域是被 RNA 聚合酶分子识别以起始 RNA 合成（即转录）的核苷酸节段，并且还可包括其他转录调控元件例如增强子。任何数目的转录调控序列可用于介导哺乳动物表达载体中连接的基因的表达。启动子包括但不限于逆转录病毒启动子、其他病毒启动子例如来源于 HSV 或 CMV 的启动子和来自内源细胞基因的启动子。哺乳动物表达载体通常还具有来自大肠杆菌 (E.Coli) 的复制起点以使得能够以质粒的形式在细菌中扩增。

[0327] 期望能够将哺乳动物表达载体引入培养中的或体内的哺乳动物细胞。在一些实施方案中，使用本发明的聚合物载体将表达载体转染入哺乳动物细胞。

[0328] 如本文中所描述的，在一些实施方案中，使用本文中提供的聚合物载体将多核苷酸递送入细胞或有此需要的个体。在某些实施方案中，聚合物载体的聚阳离子性嵌段结合哺乳动物表达载体 DNA 并且使 DNA 与聚合物载体复合。在某些情况下，聚阳离子结合哺乳动物表达载体 DNA 并且与其复合。在一些实施方案中，包含多核苷酸复合物的聚合物载体是电荷中和的（例如，聚合物载体的壳或聚合物载体的聚合物的壳嵌段和多核苷酸被基本

上电荷中和）。取决于多核苷酸的长度，任选地调整聚阳离子性嵌段的长度以为所述多核苷酸提供电荷中和。在一些情况下，通过向制剂加入阳离子和/或聚阳离子实现电荷中和。在一些实施方案中，必要时接着将包含聚合物和多核苷酸（例如，200 聚体）的聚合物载体稀释于适当的缓冲液并且直接加至培养中的细胞。通过将驱动指示基因例如荧光素酶、氯霉素乙酰转移酶或 GFP 的表达盒包含在该哺乳动物表达载体中，可容易地测量转染基因或 cDNA 在所得的细胞中的表达。此类基因可容易地获得并且已描述了报告基因测定法。

[0329] 在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体用于基因疗法。利用基因疗法治疗疾病和障碍通常包括将新的遗传信息转移入细胞。“基因疗法载体”包含待递送的新的遗传物质，其任选地存在于哺乳动物表达载体中。聚合物载体的用途包括 DNA 序列递送用于基因替代、基因表达的抑制、基因修正或基因增强，或者引入基因以实现一些其他期望的作用例如免疫应答的调节。以任意适当的方式，包括（作为非限制性实例）通过在表达 shRNA 或其他 RNAi 试剂的细胞中表达基因盒，来实现基因表达的抑制。

[0330] 在一些实施方案中，将具有非芯的聚阳离子性嵌段的聚合物载体与基因治疗载体相混合，使得它们与聚合物载体结合。然后通过一些途径，包括但不限于静脉内、关节内、鞘内、颅内、吸入、皮下或眼内，将处于合适赋型剂（见下文）中的聚合物载体 - 基因治疗载体复合物施用给活的受试者。

[0331] 用途 -GeneRx

[0332] 包含多核苷酸的聚合物载体可用于治疗许多疾病。适合使用本文中提供的聚合物载体 - 基因治疗性载体治疗的此类疾病的非限定性列表包括但不限于 ：血友病 A 和 B ；囊性纤维化 ；高胆固醇血症 ；血红蛋白病例如地中海贫血和镰状细胞性贫血 ；癌症 ；炎性疾病和溶酶体贮积症。

[0333] 靶基因家族和疾病。

[0334] 任选地使用本文中提供的聚合物载体（例如，包含 siRNA 的聚合物载体）治疗的疾病包括但不限于病原性障碍、癌症、炎性疾病、酶缺陷、先天性代谢紊乱、感染、自身免疫疾病、心血管疾病、神经学疾病、神经变性疾病、神经肌肉疾病、血液病和凝血障碍 (clotting disorder)。在一些实施方案中，siRNA 的非限定性实例减少或下调 PTP1B，双持异性磷酸酶 (DSP)、c-myc、c-myb、c-fos、c-jun、c-raf、c-src、bcl-2、血管内皮生长因子 (VEGF)、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 或 PIGF 的表达，或可衍生自这些基因。

[0335] 在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）可用于治疗处于发生与胆固醇、载脂蛋白 b 和/或 LDL 胆固醇的高血浆水平相关和/或由其引起的障碍（例如高胆固醇血症）的风险中或患有所述障碍的受试者。在某些实施方案中，治疗包括提供包含多核苷酸试剂（例如，寡核苷酸试剂）的聚合物载体，其中所述多核苷酸沉默（例如，通过断裂）促进此类病症的基因或基因产物。在一些实施方案中，该多核苷酸试剂沉默负责调控低密度脂蛋白 (LDLR) 水平和功能的前蛋白转化酶 (proprotein convertase) 枯草杆菌蛋白酶 /kexin 类型 9(PCSK9) 基因，从而利用包含此类多核苷酸试剂的聚合物载体治疗患有与胆固醇、载脂蛋白 b 和/或 LDL 胆固醇的高血浆水平相关和/或由其引起的障碍（例如高胆固醇血症）或处于发生所述障碍的风险中的受试者。在一些实施方案中，聚合物载体将 PCSK9- 沉默多核苷酸试剂（例如，s iRNA）递送至表达 PCSK9 的细胞。在一些实施方案中，所述细胞是肝细胞。

[0336] 在一些实施方案中，本文中提供的聚合物载体（例如，胶束）可用于治疗处于不期望的细胞增殖（例如，恶性或非恶性细胞增殖）的风险中或患有所述疾病的受试者。治疗包括提供包含多核苷酸试剂（例如，寡核苷酸试剂）的聚合物载体，其中所述多核苷酸与促进不期望细胞增殖的基因同源并且可沉默（例如，通过断裂）所述基因；和给受试者（例如，人受试者）施用治疗有效剂量的聚合物载体。

[0337] 在某些实施方案中，所述基因是、但不限于生长因子或生长因子受体基因、磷酸酶、激酶例如蛋白质酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸激酶基因、衔接蛋白基因、编码 G 蛋白超家族分子的基因或编码转录因子的基因。在一些情况下，聚合物载体包含沉默在特定组织或器官（包括但不限于肺、胰腺、肝、肾、卵巢、肌肉、皮肤、乳腺、结肠、胃等）中表达的基因的多核苷酸。

[0338] 在一些实施方案中，所述寡核苷酸试剂沉默一个或多个下列基因：PDGF β 基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 PDGF β 表达的障碍（例如睾丸癌和肺癌）或处于发生所述障碍的风险之中的受试者；Erb-B 基因（例如，Erb-B-2 或 Erb-B-3），从而可用于治疗患有特征在于不期望的 Erb-B 表达的障碍（例如乳腺癌或肺癌）或处于发生所述障碍的风险之中的受试者；Src 基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 Src 表达的障碍（例如结肠癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；CRK 基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 CRK 表达的障碍（例如结肠癌和肺癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；GRB2 基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 GRB2 表达的障碍（例如鳞状细胞癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；RAS 基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 RAS 表达的障碍（例如胰腺癌、结肠癌和肺癌）以及慢性白血病或处于发生所述障碍的风险中的受试者；MEKK 基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 MEKK 表达的障碍（例如鳞状细胞癌、黑色素瘤或白血病）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；JNK 基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 JNK 表达的障碍（例如胰腺癌或乳腺癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；RAF 基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 RAF 表达的障碍（例如肺癌或白血病）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；Erk1/2 基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 Erk1/2 表达的障碍（例如肺癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；PCNA(p21) 基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 PCNA 表达的障碍（例如肺癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；MYB 基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 MYB 表达的障碍（例如结肠癌或慢性粒细胞白血病）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；c-MYC 基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 c-MYC 表达的障碍（例如伯基特淋巴瘤或神经母细胞瘤）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；JUN 基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 JUN 表达的障碍（例如卵巢癌、前列腺癌或乳腺癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；FOS 基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 FOS 表达的障碍（例如皮肤癌或前列腺癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；BCL-2 基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 BCL-2 表达的障碍（例如肺癌或前列腺癌或非何杰金淋巴瘤）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；细胞周期蛋白 D 基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的细胞周期蛋白 D 表达的障碍（例如食道癌和结肠癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；VEGF 基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 VEGF 表达的障碍（例如食道癌和结肠癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；EGFR

基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的EGFR表达的障碍（例如乳腺癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；细胞周期蛋白A基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的细胞周期蛋白A表达的障碍（例如肺癌和宫颈癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；细胞周期蛋白E基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的细胞周期蛋白E表达的障碍（例如肺癌和乳腺癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；WNT-1基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的WNT-1表达的障碍（例如基底细胞癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；β-连环蛋白(beta-catenin)基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的β-连环蛋白表达的障碍（例如腺癌或肝细胞癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；c-MET基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的c-MET表达的障碍（例如肝细胞癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；PKC基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的PKC表达的障碍（例如乳腺癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；NFKB基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的NFKB表达的障碍（例如乳腺癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；STAT3基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的STAT3表达的障碍（例如前列腺癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；存活素(survivin)基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的存活素表达的障碍（例如宫颈癌或胰腺癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；Her2/Neu基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的Her2/Neu表达的障碍（例如乳腺癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；拓扑异构酶I基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的拓扑异构酶I表达的障碍（例如卵巢癌和结肠癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；拓扑异构酶IIα基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的拓扑异构酶II表达的障碍（例如乳腺癌和结肠癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者。

[0339] 在其他实施方案中，所述寡核苷酸试剂沉默下列基因之一的突变：p73基因，从而可用于治疗特征在于不期望的p73表达的障碍（例如结肠直肠腺癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；p21(WAF1/CIP1)基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的p21(WAF1/CIP1)表达的障碍（例如肝癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；p27(KIP1)基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的p27(KIP1)表达的障碍（例如肝癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；PPM1D基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的PPM1D表达的障碍（例如乳腺癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；RAS基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的RAS表达的障碍（例如乳腺癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；小窝蛋白I基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的小窝蛋白I表达的障碍（例如食道鳞状细胞癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；MIB I基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的MIB I表达的障碍（例如男性乳腺癌(MBC)）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；MTA1基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的MTA1表达的障碍（例如卵巢癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；M68基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的M68表达的障碍（例如食道、胃、结肠和直肠的人腺癌）或处于发生所述障碍的风险中的受试者。

[0340] 在一些实施方案中，所述寡核苷酸试剂沉默肿瘤抑制基因的突变，从而可用作与化疗药物组合促进细胞凋亡活性的方法。在一些实施方案中，所述肿瘤抑制基因选自下列肿瘤抑制基因中的一个或多个基因：p53肿瘤抑制基因、p53家族成员DN-p63、pRb肿瘤抑

制基因、APC1 肿瘤抑制基因、BRCA1 肿瘤抑制基因、PTEN 肿瘤抑制基因。

[0341] 在一些实施方案中，所述寡核苷酸试剂沉默下列融合基因之一：mLL 融合基因例如 mLL-AF9，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 mLL 融合基因表达的障碍（例如急性白血病）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；BCR/ABL 融合基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 BCR/ABL 融合基因表达的障碍（例如急性和慢性白血病）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；TEL/AML1 融合基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 TEL/AML1 融合基因表达的障碍（例如儿童急性白血病）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；EWS/FLI1 融合基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 EWS/FLI1 融合基因表达的障碍（例如尤因肉瘤 (Ewing Sarcoma)）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；TLS/FUS1 融合基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 TLS/FUS1 融合基因表达的障碍（例如粘液样脂肪肉瘤）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；PAX3/FKHR 融合基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 PAX3/FKHR 融合基因表达的障碍（例如粘液样脂肪肉瘤）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；AML1/ETO 融合基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 AML1/ETO 融合基因表达的障碍（例如急性白血病）或处于发生所述障碍的风险中的受试者。

[0342] 在本文中的一些方面，聚合物载体提供了治疗剂，所述治疗剂用于治疗处于可受益于血管生成抑制的疾病或障碍（例如癌症或视网膜变性）的风险中或患有所述疾病的受试者，例如人。治疗包括提供包含寡核苷酸试剂的聚合物载体，其中所述寡核苷酸试剂与介导血管生成的基因（例如，VEGF-R1、VEGF-R2 或编码此类受体途径的信号转导蛋白的基因）同源和 / 或可例如通过断裂沉默所述基因；和给受试者（例如人受试者）施用治疗有效剂量的包含所述寡核苷酸试剂的所述聚合物载体。

[0343] 在一些实施方案中，所述寡核苷酸试剂沉默下列基因之一：α v- 整联蛋白基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 α V 整联蛋白的障碍（例如脑瘤或上皮来源的肿瘤）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；Flt-1 受体基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的 Flt-1 受体的障碍（例如癌症和类风湿性关节炎）或处于发生所述障碍的风险中的受试者；微管蛋白基因，从而可用于治疗患有特征在于不期望的微管蛋白的障碍（例如癌症和视网膜新血管形成）或处于发生所述障碍的受试者。

[0344] 在一些方面，本文中提供的包含寡核苷酸试剂的聚合物载体涉及治疗被病毒感染或处于发生与病毒感染相关的障碍或疾病的风险中的或患有所述疾病或障碍的受试者的方法。所述方法包括提供包含寡核苷酸试剂的聚合物载体，其中所述寡核苷酸试剂与介导病毒功能例如进入或生长的病毒基因或细胞基因同源和 / 或可通过例如断裂而沉默所述基因；和给受试者（例如人受试者）施用治疗有效剂量的所述寡核苷酸试剂。

[0345] 在一些实施方案中，包含寡核苷酸试剂的聚合物载体可用于治疗被人乳头瘤病毒 (HPV) 感染的或处于发生由 HPV 介导的障碍（例如宫颈癌）的风险中的或患有所述障碍的受试者。

[0346] 在一些实施方案中，聚合物载体包含沉默 HPV 基因表达的寡核苷酸试剂。在一些实施方案中，所述 HPV 基因选自 E2、E6 或 E7。

[0347] 在另一个实施方案中，减少 HPV 复制所需的人基因的表达。

[0348] 在一些实施方案中，所述聚合物载体包含如下寡核苷酸试剂，其可用于治疗被人

免疫缺陷病毒 (HIV) 感染的或处于发生由 HIV 介导的障碍 (例如获得性免疫缺陷综合征，AIDS) 的风险中的或患有所述障碍的患者。在一些实施方案中，减少 HIV 基因的表达。在其他实施方案中，所述 HIV 基因是 CCR5、Gag 或 Rev。在一些实施方案中，减少 HIV 复制所必需的人基因的表达。在一些实施方案中，所述基因是 CD4 或 Tsg101。

[0349] 在一些实施方案中，所述聚合物载体包含如下寡核苷酸试剂，所述寡核苷酸试剂可用于治疗被乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的或处于发生由 HBV 介导的障碍 (例如肝硬化和肝细胞癌) 的风险中的或患有所述障碍的患者。在一个实施方案中，减少 HBV 基因的表达。在其他实施方案中，被靶向的 HBV 基因编码下组蛋白之一 :HBV 核心蛋白的尾区域、pre-cregious(pre-c) 区或 cregious(c) 区。在其他实施方案中，被靶向的 HBV-RNA 序列由 poly(A) 尾组成。在一些实施方案中，减少 HBV 复制所必需的人基因的表达。

[0350] 在一些实施方案中，所述聚合物载体包含可用于治疗被病毒感染或处于由病毒介导的障碍的风险中的或患有所述障碍的患者的寡核苷酸试剂，所述病毒选自下列病毒 :甲型肝炎病毒 (HAV) ;丙型肝炎病毒 (HCV) ;包括肝炎 D、E、F、G 或 H 的肝炎病毒株系组中的任意株系 ;呼吸道合胞病毒 (Respiratory Syncytial Virus)(RSV) ;疱疹巨细胞病毒 (CMV) ;疱疹爱泼斯坦 - 巴尔病毒 (Epstein Barr Virus)(EBV) ;卡波西肉瘤相关疱疹病毒 (KSHV) ;JC 病毒 (JCV) ;粘病毒 (例如，引起流感的病毒)、鼻病毒 (例如，引起普通感冒的病毒) 或冠状病毒 (例如，引起普通感冒的病毒) ;圣路易斯脑炎黄病毒 (S t.Louis Encephalitisflavivirus) ;蜱传脑炎黄病毒 ;墨莱溪谷脑炎黄病毒 (Murray Valleyencephalitis flavivirus) ;登革热黄病毒 ;猿猴病毒 40(SV40) ;脑心肌炎病毒 (EMCV) ;麻疹病毒 (MV) ;水痘带状疱疹病毒 (VZV) ;腺病毒 (例如，引起呼吸道感染的病毒) ;脊髓灰质炎病毒或痘病毒 (引起天花的痘病毒)。在一些实施方案中，减少此类病毒复制所必需的人基因的表达。

[0351] 在一些实施方案中，所述聚合物载体包含如下寡核苷酸试剂，所述寡核苷酸试剂可用于治疗被单纯疱疹病毒 (HSV) 感染的或处于发生由 HSV 介导的障碍例如生殖器疱疹和感冒疮以及威胁生命或损害视力的疾病 (例如，主要在免疫受损的患者中) 的风险中的或患有所述疾病的患者。在一些实施方案中，减少 HSV 基因的表达。在其他实施方案中，被靶向的 HSV 基因编码 DNA 聚合酶或解螺旋酶 - 引发酶。在一些实施方案中，减少 HSV 复制所必需的人基因的表达。

[0352] 在一些实施方案中，所述聚合物载体包含如下寡核苷酸试剂，所述寡核苷酸试剂可用于治疗被西尼罗病毒感染的或处于发生由西尼罗病毒介导的障碍的风险中的或患有所述障碍的患者。在一些实施方案中，减少西尼罗病毒基因的表达。在其他优选实施方案中，所述西尼罗病毒基因选自 E、NS3 或 NS5。在一些实施方案中，减少西尼罗病毒复制所必需的人基因的表达。

[0353] 在一些实施方案中，所述聚合物载体包含如下寡核苷酸试剂，所述寡核苷酸试剂可用于治疗被人嗜 T 淋巴细胞病毒 (HTLV) 感染的或患有与该病毒相关的疾病或障碍 (例如白血病或脊髓病) 的患者。在一些实施方案中，减少 HTLV 基因的表达。在一些实施方案中，所述 HTLV1 基因是 Tax 转录激活因子。在一些实施方案中，减少 HTLV 复制所必需的人基因的表达。

[0354] 在一些方面，所述聚合物载体包含可用于治疗被病原体 (例如细菌、阿米巴、寄生

虫或真菌病原体）感染的受试者的寡核苷酸试剂。治疗的方法包括提供包含寡核苷酸试剂的聚合物载体，其中所述寡核苷酸与病原体基因或参与病原体生长的基因同源和 / 或可以例如通过断裂而沉默所述基因；和给受试者（例如人受试者）施用治疗有效剂量的所述寡核苷酸试剂。靶基因可选自参与病原体生长、细胞壁合成、蛋白质合成、转录、能量代谢例如三羧酸循环或毒素产生的基因。

[0355] 因此，在一些实施方案中，所述聚合物载体包含可用于治疗被引起疟疾的疟原虫感染的患者的寡核苷酸试剂。在一些实施方案中，减少疟原虫基因的表达。在其他实施方案中，所述基因是顶膜抗原 1(AMA1)。在一些实施方案中，减少疟原虫复制所必需的人基因的表达。

[0356] 在一些实施方案中，聚合物载体包含可用于治疗被溃疡分枝杆菌 (Mycobacterium ulcerans)、结核分枝杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)、麻风分枝杆菌 (Mycobacterium leprae)、金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)、肺炎链球菌 (Streptococcuspneumoniae)、酿脓链球菌 (Streptococcus pyogenes)、肺炎衣原体 (Chlamydia pneumoniae)、肺炎支原体 (Mycoplasma pneumoniae) 感染的患者或者与此类病原体中任意种相关的疾病或障碍的寡核苷酸。在一些实施方案中，减少此类细菌的复制所必需的细菌基因和 / 或人基因的表达。

[0357] 在一些实施方案中，利用本文中提供的聚合物载体治疗的疾病可以是全身性的或存在于特定组织例如肺、皮肤、肝、乳腺、肾、胰腺、CNS 等中。在某些方面，所述寡核苷酸沉默介导或参与代谢疾病或障碍例如糖尿病、肥胖症等的基因。在某些实施方案中，所述寡核苷酸沉默介导或参与肺疾病或障碍（例如慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、囊性纤维化或肺癌）的基因。

[0358] 在本文中的一些方面，所述聚合物载体包含如下寡核苷酸试剂，所述寡核苷酸试剂可用于和 / 或涉及治疗受试者例如人的方法，所述受试者处于发生特征在于不期望的免疫应答的疾病或障碍（例如炎性疾病或障碍或者自身免疫疾病或障碍）的风险中或患有所述疾病。该方法包括提供包含寡核苷酸试剂的聚合物载体，其中所述寡核苷酸试剂与介导不期望的免疫应答的基因同源和 / 或可以例如通过断裂而沉默所述基因；和给受试者例如人受试者施用所述寡核苷酸试剂。在一些实施方案中，所述疾病或障碍是局部缺血或再灌注损伤，例如与急性心肌梗塞、不稳定型心绞痛、心肺转流术、外科手术（例如血管成形术，例如经皮腔内冠状动脉成形术）、对移植器官或组织例如移植的心脏或血管组织的反应或溶栓相关的局部缺血或再灌注损伤。在其他实施方案中，所述疾病或病症是再狭窄，例如与外科手术（例如血管成形术，例如经皮腔内冠状动脉成形术）相关的再狭窄。在其他实施方案中，所述疾病或病症是炎性肠病，例如克罗恩病或溃疡性结肠炎。在一些实施方案中，所述疾病或障碍是与感染或损伤相关的炎症。在其他实施方案中，所述疾病或障碍是哮喘、过敏症、狼疮、多发性硬化、糖尿病例如 I I 型糖尿病、关节炎例如类风湿性或牛皮癣性关节炎。在某些实施方案中，所述寡核苷酸试剂沉默整联蛋白或其协同配体 (co-ligand)，例如、VLA4、VCAM、ICAM。在其他实施方案中，所述寡核苷酸试剂沉默选择蛋白或其协同配体，例如 P- 选择蛋白、E- 选择蛋白 (ELAM)、I- 选择蛋白、P- 选择蛋白糖蛋白 -1(PSGL-1)。在某些实施方案中，所述寡核苷酸试剂沉默补体系统的成分例如 C3、C5、C3aR、C5aR、C3 转化酶和 C5 转化酶。在一些实施方案中，所述寡核苷酸试剂沉默趋化因子或其受体例如 TNFI、TNFJ、

IL-1I、IL-1J、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-6、IL-8、TNFRI、TNFRI I、I gE、SCYA11 和 CCR3。在其他实施方案中，所述寡核苷酸试剂沉默 GCSF、Gro1、Gro2、Gro 3、PF4、MI G、促血小板碱性蛋白 (PPBP)、MIP-1I、MIP-1J、RANTES、MCP-1、MCP-2、MCP-3、CMBKR1、CMBKR2、CMBKR3、CMBKR5、AIF-1 或 I-309。

[0359] 在一些方面，聚合物载体包含可用于治疗受试者例如人的寡核苷酸试剂，所述受试者处于发生神经学疾病 (neurological di sease) 或障碍的风险中或患有所述疾病或障碍。该方法包括提供包含寡核苷酸试剂的聚合物载体，其中所述寡核苷酸与介导神经学疾病或障碍的基因同源和 / 或可以例如通过断裂而沉默所述基因；和给受试者例如人施用治疗有效剂量的所述寡核苷酸试剂。在一些实施方案中，所述疾病或障碍是阿尔茨海默病或帕金森病。在某些实施方案中，所述寡核苷酸试剂沉默淀粉样蛋白家族基因，例如 APP；早老素 (presenilin) 基因，例如 PSEN1 和 PSEN2 或 I- 突触核蛋白。在其他实施方案中，所述疾病或障碍是神经变性三核苷酸重复障碍 (tr inucleot ide repeat disorder)，例如亨廷顿病、齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩 (dentatorubralpallidoluysian atrophy) 或脊髓小脑性共济失调 (spinocerebellarataxia)，例如 SCA1、SCA2、SCA3(马 - 约病 (Machado-Joseph disease))、SCA7 或 SCA8。在一些实施方案中，所述寡核苷酸试剂沉默 HD、DRPLA、SCA1、SCA2、MJD1、CACNL1A4、SCA7 或 SCA8。

[0360] 在某些方面，本文中提供的聚合物载体包含能够切割或沉默 1 个以上基因的寡核苷酸试剂。在此类实施方案中，寡核苷酸试剂被选择成能够使其对在 1 个以上基因中发现的序列 (例如在这些基因间保守的序列) 具有充分的同源性。因而在一些实施方案中，靶向此类序列的寡核苷酸试剂有效地沉默该整个基因的集合。

[0361] 在一些方面，本文中提供的聚合物载体包含两个或更多个类型的寡核苷酸试剂，其中所述寡核苷酸试剂沉默相同疾病或不同疾病的不同基因。

[0362] 在一些实施方案中，将本文中提供的聚合物载体 (例如，包含寡核苷酸的) 与另一种疗法结合施用以治疗被靶向的疾病病症。在一些实施方案中，将本文中提供的聚合物载体 (例如，包含寡核苷酸) 与有效地抗炎性疾病 (例如 RA 或银屑病) 的治疗剂结合施用。本说明书中组合地有用和有效的试剂的实例包括非甾体抗炎药 (NSAID)、氨甲蝶呤、金化合物、D- 青霉胺、抗疟药、柳氮磺胺吡啶、糖皮质激素类和其他 TNF-α 中和剂例如英夫利昔单抗和 entracept。在某些情况下，将非寡核苷酸封装在胶束的芯中。

[0363] 当涉及联合治疗或预防方法时，不应理解为本文中描述的试剂受到该组合的具体性质的限制。例如，任选地以作为单一混合物的形式以及作为化学杂交体 (chemical hybrid) 的形式组合施用本文中描述的试剂。此外，任选地分开或同时施用联合治疗。

[0364] 如本文中所用的，术语“药物组合”、“施用另外的疗法”、“施用另外的治疗剂”等是指通过将一种以上活性成分混合或组合产生的药物治疗，其包括活性成分的固定的和非固定的组合。术语“固定的组合”意指以单一实体或剂量的形式将至少一种本文中描述的试剂和至少一种辅剂 (co-agent) 同时给患者施用。术语“非固定的组合”意指以分开的实体，以可变的间隔时间同时、共同或相继地将至少一种本文中描述的试剂和至少一种辅剂给患者施用，其中此类施用在患者体内提供了有效水平的所述两种或更多种试剂。在一些情况下，施用辅剂一次或施用一段时间，之后施用所述试剂一次或施用一段时间。在其他情况下，将辅剂施用一段时间，之后，施用包括辅剂和所述试剂的施用的治疗。在其他实施方案

中，施用所述试剂一次或一段时间，然后，施用辅剂一次或一段时间。这些还可用于鸡尾酒疗法 (cocktail therapies)，例如施用 3 种或更多种活性成分。

[0365] 如本文中所用的，术语“共施用”、“与 ..... 组合施用”和其语法等价物意指包括将选择的治疗剂给单个患者的施用，并且旨在包括其中通过相同或不同的施用途径或在相同或不同的时间上施用试剂的治疗方案。在一些实施方案中，将本文中描述的试剂与其他试剂共施用。此类术语包括两种或更多种试剂至动物的施用，以便试剂和 / 或其代谢产物同时存在于动物中。它们包括在分开的组合物中的同时施用，在分开的组合物于不同的时间施用和 / 或两种试剂都存在于其中的组合物的施用。因此，在一些实施方案中，在单一组合物中施用本文中所述的试剂和所述其他试剂。在一些实施方案中，将本文中所述的试剂与所述其他试剂混合于组合物中。

[0366] 术语“有效量”或“治疗有效量”，如本文中所用的，是指被施用的至少一种试剂达到期望结果（例如将待治疗的疾病或病症的一个或多个症状缓解至一定程度）的充足量。在某些情况下，所述结果是疾病的体征、症状或原因的减轻和 / 或缓解或生物系统的任何其他期望的改变。在具体情况下，所述结果是被靶向的基因的显著敲低，从而提供一定结果，例如被治疗的疾病或病症或与其相关的症状的减轻。在某些情况下，用于治疗性用途的“有效量”是提供疾病的临床显著减轻所必需的包含本文中所示试剂的组合物的量。可使用任何适当的技术例如剂量递增研究 (dose escalation study) 确定任意单个案例中的适当的“有效”量。

[0367] 术语“给药 (administer)”、“进行给药 (administering)”、“施用”等，如本文中所用的，是指可用于使试剂或组合物递送至期望的生物作用部位的方法。此类方法包括但不限于口服途径、十二指肠内途径、胃肠外注射（包括静脉内、皮下、腹膜内、肌内、血管内或输注）、经皮肤、局部和直肠施用。本领域技术人员熟悉可用于本文中描述的试剂和方法的施用技术，例如，如 Goodman 和 Gilman，ThePharmacological Basis of Therapeutics，current ed. ;Pergamon ;and Remington′ s Pharmaceutical Sciences （最新版本），MackPublishing Co.，Easton，Pa. 中所论述的。在某些实施方案中，通过胃肠外注射（例如静脉内、皮下、腹膜内、肌内、血管内或输注）施用本文中描述的聚合物载体。

[0368] 制剂

[0369] 可以以任意方式（例如在使用或不使用稳定剂、缓冲剂等以形成药物组合物的情况下）将本文中提供的聚合物载体 - 寡核苷酸组合物给患者施用。在一些实施方案中，配制本文中提供的聚合物载体并且以片剂、胶囊剂或酏剂（用于口服施用）、栓剂（用于直肠施用）、无菌溶液、悬浮液（用于注射施用）和任意其他适当的组合物的形式使用其。

[0370] 提供了本文中所述组合物的药学上可接受的制剂。此类制剂包括上述化合物的盐例如酸加成盐，例如盐酸、氢溴酸、乙酸和苯磺酸的盐。药物组合物或制剂是指以适合于施用（例如全身性施用）至细胞或患者（包括例如人）内的形式存在的组合物或制剂。适当的形式部分地取决于用途或进入的途径，例如口服、经皮肤或通过注射。因此，在其中聚合物载体包含和将递送多核苷酸的具体实施方案中，制剂以不阻止聚合物载体、更具体地多核苷酸（例如，寡核苷酸或 siRNA）到达靶细胞同时保持多核苷酸完整性和 / 或功能的形式存在。例如，在某些实施方案中，注射入血流的药物组合物是可溶性的和 / 或可分散的。此外，本文中所述的药物组合物优选是无毒的。在其中施用本文中所述的聚合物载体以获得

治疗益处的一些实施方案中，施用治疗有效量的包含所述多核苷酸（例如siRNA）的所述聚合物载体。在示例性实施方案中，治疗有效量包括足以提供约10mg或更少siRNA/kg个体的聚合物载体的量。

[0371] 在一些实施方案中，全身性施用包含含有多核苷酸（例如，多核苷酸或si RNA）的聚合物载体的药物组合物。如本文中所使用的，“全身性施用”意指在血流中体内全身性吸收或积累药物，然后分布在整个身体中。导致全身性吸收的施用途径包括但不限于：静脉内、皮下、腹膜内、吸入、口服、肺内和肌内途径。在一些实施方案中，局部施用寡核苷酸-聚合物载体组合物。

[0372] 在一些实施方案中，制备组合物以用于贮存或施用，所述组合物在药学上可接受的载体或稀释剂中包含药物有效量的寡核苷酸-聚合物载体组合物。本文中任选地利用任意可接受的载体或稀释剂。在例如Remington′s Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Co.、A.R.Gennaro Ed.、1985中描述了具体的载体和稀释剂。例如，任选地加入防腐剂、稳定剂、染料和调味剂。此类试剂包括苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸的酯。此外，任选地使用抗氧化剂和悬浮剂。如本文中所用的，术语“药学上可接受的载体”意指无毒的惰性固体、半固体或液体充填剂、稀释剂、封装材料或任意类型的制剂助剂。任选地用作药学上可接受的载体的材料的一些实例是糖，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；纤维素和其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素；西黄蓍胶粉；麦芽；明胶；滑石；赋形剂例如可可脂和栓剂蜡（suppository waxe）；油，例如花生油、棉籽油；红花油；芝麻油；橄榄油；玉米油和大豆油；二醇类例如丙二醇；酯例如油酸乙酯和十二烷酸乙酯；琼脂；去垢剂例如Tween 80；缓冲剂例如氢氧化镁和氢氧化铝；海藻酸；无热源水；等渗盐水；林格氏溶液；乙醇；和磷酸缓冲液以及其他无毒的相容性润滑剂例如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁、以及着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可存在于组合物中，这决定于配制者的判断。在一些实施方案中，给人和/或动物经口服、直肠、胃肠外、硬骨内（intracistemally）、阴道内、鼻内、腹膜内、局部（如通过粉剂、乳膏剂、软膏或滴剂）、皮下、经口腔施用或作为口腔或鼻腔喷雾剂施用本文中提供的药物组合物。

[0373] 在不同的实施方案中，用于口服施用的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、悬浮液、糖浆剂和酏剂。除了活性成份（即，本发明的胶束-寡核苷酸复合物）外，液体剂型任选地还包含惰性稀释剂或赋形剂，例如作为非限制性实例，水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油（特别是棉子、落花生、玉米、胚芽（germ）、橄榄、蓖麻和芝麻油）、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨醇的脂肪酸酯和其混合物。除了惰性稀释剂以外，口服组合物中任选地还包括佐剂例如湿润剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂和芳香剂。

[0374] 在一些实施方案中，相应地以任意适当的方式，例如使用分散剂、湿润剂和/或悬浮剂，配制可注射制剂例如无菌可注射水性或油性悬浮液。无菌可注射制剂任选地是无毒性的胃肠外可接受稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液、悬浮液或乳剂，例如，1,3-丁二醇中的溶液。其中，任选地使用的可接受的媒介物和溶剂是水、林格氏溶液、U.S.P和等渗氯化钠溶液。此外，无菌不挥发性油也常规地用作溶剂或悬浮介质。为此目的，任选地使用任意刺激性小的不挥发性油，包括合成的甘油一酯或甘油二酯。在另外的实施方案中，将脂肪酸例

如油酸用于制备可注射的制剂。在具体实施方案中，将聚合物载体颗粒悬浮于包含 1％ (w/v) 羧甲基纤维素钠和 0.1％ (v/v)Tween 80 的载体流体中。

[0375] 在一些实施方案中，例如，通过例如将可注射制剂通过细菌截留滤器 (bacteria-reta ining filter) 过滤或通过掺入以无菌固体组合物的形式存在的灭菌剂（任选地在使用之前将其溶解或分散在无菌水或其他可注射介质中）来对可注射制剂进行灭菌。

[0376] 在某些实施方案中，用于直肠或阴道施用的组合物是栓剂。任选地通过将聚合物载体载体 - 寡核苷酸复合物与适当的非刺激性赋形剂或载体（所述赋形剂或载体在环境温度下是固体但在体温下是液体，从而在直肠或阴道腔内熔化并且释放聚合物载体微粒）例如可可脂、聚乙二醇或栓剂蜡混合来制备栓剂。

[0377] 用于口服施用的适当的固体剂型包括，作为非限制性实例，胶囊剂、片剂、丸剂、粉剂和颗粒。在这样的固体剂型中，将包含多核苷酸（例如，寡核苷酸）的聚合物载体与至少一种惰性的药学上可接受的赋形剂或载体（例如柠檬酸钠或磷酸二钙）和 / 或 a) 充填剂或增充剂（例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸），b) 粘合剂（例如，羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶），c) 保湿剂（例如甘油），d) 崩解剂（例如琼脂 - 琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠），e) 溶液阻滞剂（例如石蜡），f) 吸收促进剂（例如季铵类化合物），g) 湿润剂（例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯），h) 吸收剂（例如高岭土和膨润土粘土）和 i) 润滑剂（例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠）和其混合物相混合。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下，剂型还可包含缓冲剂。

[0378] 通过使用赋形剂如乳糖或奶糖 (milk sugar) 以及高分子量聚乙二醇等，相似类型的固体组合物也可任选地作为充填剂用于软和硬填充的明胶胶囊。

[0379] 在一些实施方案中，用包衣和壳例如肠溶包衣和其他适当的包衣制备片剂、锭剂、胶囊剂、丸剂和颗粒剂的固体剂型。它们任选地包含遮光剂。在某些实施方案中，它们的组成是其只在或优先在肠道的某些部分（任选地以延迟的方式）释放活性成分。适当的包埋组合物的实例包括例如聚合物物质和蜡（作为非限制性实例）。

[0380] 通过使用这样的赋形剂如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇等，任选地将相似类型的固体组合物作为充填剂用于软和硬填充的明胶胶囊。

[0381] 用于本发明药物组合物的局部或经皮肤施用的剂型包括但不限于例如软膏、糊剂、乳膏剂、洗剂、凝胶、粉剂、溶液、喷雾剂、吸入剂或贴剂。在一些实施方案中，在无菌条件下将包含多核苷酸（例如，寡核苷酸或 siRNA) 的聚合物载体和药学上可接受的载体以及任选地一种或多种防腐剂、一种或多种缓冲剂或其组合（例如，当需要时）混合。眼科制剂 (Ophthalmic formulation)、滴耳剂和滴眼剂也包括在本发明的范围内。

[0382] 本文中提供的软膏、糊剂、乳膏剂、凝胶，除了包含多核苷酸（例如，寡核苷酸或 siRNA) 的聚合物载体外，任选地还包含赋形剂例如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石和氧化锌或其混合物。

[0383] 除了包含多核苷酸（例如，寡核苷酸或 siRNA) 的聚合物载体外，粉剂和喷雾剂任选地还包含赋形剂例如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉剂或此类物质的混合物。在一些实施方案中，喷雾剂额外地包含常规喷射剂例如氯氟化烃。

[0384] 透皮贴剂具有给身体提供受控的化合物递送的其他有利方面。以任意适当的方式，例如通过将微粒或纳米粒溶解或分散于恰当的介质中来制备此类剂型。任选地使用吸收促进剂来增加化合物穿过皮肤的通量 (flux)。可通过提供速率控制膜 (rate controlling membrane) 或通过将聚合物载体 - 寡核苷酸复合物分散在聚合物基质或凝胶中来控制速率。

[0385] 在本发明的一些方面，聚合物载体提供了通常通过赋形剂进行的一些性质（例如，机械、热学性质等），从而减少了制剂所需的此类赋形剂的量。

[0386] 用作研究试剂

[0387] 本文中提供的聚合物载体还任选地用作用于将寡聚核苷酸或多聚核苷酸引入哺乳动物细胞的研究试剂或试剂盒。可通过磷酸钙转染 (Graham 和 Vander Eb. (1973) Virol. 52 :456-467)、DEAE- 葡聚糖转染 (Lopata, M. A. 等人，(1984) Nuclo Acids Res. 12 : 5707) 和电穿孔 (Potter, H. 等人 (1984) PNAS 81 :7161) 以及使用可商购获得的试剂例如 Lipofectamine(ref.) 来进行用于将寡核苷酸或多核苷酸例如哺乳动物表达载体体外引入（转染）哺乳动物细胞的现有方法。此类方法存在毒性问题，因此期望具有毒性较低但仍然高效的转染系统，例如本文中描述的系统。可使用本文中提供的聚合物载体来递送的其他寡核苷酸或多核苷酸包括但不限于编码蛋白质的 RNA、核酶、适体、敲低剂和诱饵。本文中提供的聚合物载体尤其适合用作用于将 RNAi 试剂递送入培养的或体内的细胞的研究试剂。

[0388] 某些定义

[0389] 有关本申请应理解，除非另有特别指定，否则应用的单数形式包括复数形式，且反之亦然。即无冠词修饰或 " 一种（个）(a)" 和 " 所述的 (the)" 均意指该词所修饰名称的一种（个）或多种（个）。例如，" 所述聚合物 " 或 " 核苷酸 " 可以意指一种 / 个聚合物或核苷酸或者多种聚合物或核苷酸。作为相同标记，除非也有另外特别指定或上下文中明显表明没有这种意图，否则 " 聚合物 " 和 " 核苷酸 " 可以意指一种 / 个聚合物或一种 / 个核苷酸和多种 / 个聚合物或核苷酸。

[0390] 如本文所用的，两个部分或化合物，如果通过任意相互作用保持在一起（作为非限制性实例，包括一个或多个共价键、一个或多个非共价相互作用，例如离子键、静力、范德瓦尔斯相互作用、其组合等，或其组合），则它们是 " 结合的 " 或“缔合的”，这些术语在本文中可互换使用。

[0391] 如本文所用的，如果聚合物不解离或不变得不稳定，那么本文中所述的聚合物载体是“稳定的”。在某些情况下，稳定的聚合物载体是具有的流体动力学粒度在包含相同 siRNA 和相同嵌段共聚物并且最初在 pH 7.4 水溶液中形成的聚合物载体之流体动力学粒度的约 60％、50％、40％、30％、20％或 10％范围内的聚合物载体。在一些情况下，稳定的聚合物载体是具有的装配浓度在包含相同 s iRNA 和多嵌段共聚物并且最初在 pH 7.4 水溶液中形成的聚合物载体之装配浓度的约 60％、50％、40％、30％、20％或 10％范围内的聚合物载体。

[0392] 如本文所用的 " 可带电荷种类 "、" 可带电荷的基团 " 或 " 可带电荷的单体单元 " 是带电荷或不带电荷状态的种类、基团或单体单元。在某些情况下，" 可带电荷的单体单元 " 是可以通过添加或除去亲电体（例如质子 (H^+)，例如以 pH 依赖性方式）转化成带电荷状态（阴离子性或阳离子性带电荷状态）的单体单元。除非另有说明，否则应用的任

意术语″可带电荷的种类″、″可带电荷的基团″或″可带电荷的单体单元″包括公开″可带电荷种类″、″可带电荷的基团″或″可带电荷的单体单元″中的任意其他用语。作为″带电荷或可带电荷成为阴离子″或″带电荷或可带电荷成为阴离子性种类″的″可带电荷种类″是阴离子性的带电荷状态或不带电荷状态的种类或基团，但在不带电荷状态下能够通过例如亲电体例如质子（H^+）的除去而被转化成阴离子性的带电荷状态。在具体的实施方案中，可带电荷种类是在约中性 pH 下带电荷成为阴离子的种类。应强调的是，并非聚合物上的每一可带电荷种类在接近该可带电荷种类的 pKa（酸解离常数）的 pH 下是阴离子性的，而是阴离子性的和非阴离子性种类的平衡共存。作为″带电荷或可带电荷成为阳离子″或″带电荷或可带电荷成为阳离子性种类″的″可带电荷种类″是阳离子性的带电荷状态或不带电荷状态的种类或基团，但在不带电荷状态下能够通过例如亲电体例如质子（H^+）的添加而被转化成阳离子性的带电荷状态。在具体的实施方案中，可带电荷种类是在约中性 pH 下带电荷成为阳离子的种类。应强调的是，并非聚合物上的每一带电荷种类在接近该带电荷的阳离子性种类的 pKa（酸解离常数）的 pH 下是阳离子性的，而是阳离子性的和非阳离子性种类的平衡共存。本文所述的″可带电荷的单体单元″可与″可带电荷的单体残基″互换使用。

[0393] 本文所用的″电荷中和的″意指这样的颗粒，所述颗粒具有 ±10-±30mV 的 ζ 电位和 / 或存在第一数目 (z) 的可带负电荷的可带电荷种类（例如在去质子化时变成阴离子性的酸性种类）和第二数目 (0.5 • z) 的可带正电荷的可带电荷种类（例如在质子化时变成阳离子性的碱性种类）。

[0394] 寡核苷酸基因表达调节剂：如本文中所使用的，“寡核苷酸基因表达调节剂”是这样的寡核苷酸试剂，其能够通过一些机制（包括但不限于反义机制）或通过 RNA 干扰 (RNAi) 介导的途径（其可包括 (i) 转录失活；(ii)mRNA 降解或螯合 (sequestration)；(iii) 转录抑制或弱化；或 (iv) 翻译的抑制或弱化）在活细胞中诱导基因表达的选择性调节。寡核苷酸基因表达调节剂包括调控 RNA（包括实际上任意调控 RNA），例如但不限于反义寡核苷酸、miRNA、siRNA、RNAi、shRNA、aiRNA、切丁酶底物、适体和其任意类似物或前体。

[0395] 寡核苷酸敲低剂：如本文所用的，″寡核苷酸敲低剂″是这样的寡核苷酸种类，它们可以通过以序列特异性方式靶向和结合胞内核酸来抑制基因表达。寡核苷酸敲低剂的非限制性实例包括 siRNA、miRNA、shRNA、切丁酶底物、反义寡核苷酸、诱饵 DNA 或 RNA、反基因寡核苷酸及其任意类似物和前体。

[0396] 抑制：术语“抑制”、“沉默”和“弱化”，如本文中所使用的，是指与在敲低剂不存在的情况下靶 mRNA 或相应蛋白质的表达相比较而言，靶 mRNA 或相应蛋白质的表达的可测量的减少。“敲低”或者靶 mRNA 或相应蛋白质的表达的减少可通过使用本领域内熟知的技术测量 mRNA 的水平来估量，所述技术是例如定量聚合酶链式反应 (qPCR) 扩增、RNA 溶液杂交、核酸酶保护、northern 印迹和杂交以及使用微阵列的基因表达监控；以及在蛋白质的情况下利用本领域内熟知的技术例如 SDS-PAGE、抗体结合、wes tern 印迹分析、免疫沉淀、放射免疫测定或酶联免疫吸附测定 (ELI SA)、荧光激活细胞分析和免疫细胞化学来估量。

[0397] 核苷酸：如本文所用的，术语″核苷酸″在其最广义上意指掺入或可以掺入多核苷酸（例如寡核苷酸）链的任意化合物和 / 或物质。在一些实施方案中，核苷酸是通过或可通过磷酸二酯键掺入多核苷酸（例如寡核苷酸）链的化合物和 / 或物质。在一些实施方

案中，″核苷酸″意指各核酸残基（例如核苷酸和/或核苷）。在某些实施方案中，″至少一个核苷酸″意指存在一个或多个核苷酸；在不同的实施方案中，所述一个或多个核苷酸是离散的核苷酸、彼此以非共价键方式结合或彼此以共价键方式结合。照此，在某些情况中，″至少一个核苷酸″意指一个或多个多核苷酸（例如寡核苷酸）。在某些情况中，多核苷酸是包含至少两个核苷酸单体单元的聚合物。

[0398] 如本文所用的，术语″寡核苷酸″意指包含 7-200 个核苷酸单体单元的聚合物。在一些实施方案中，″寡核苷酸″包括单和或/双链 RNA 以及单和/或双链 DNA。此外，术语″核苷酸″、″核酸″、″ DNA″、″ RNA″和/或类似术语包括核酸类似物，即具有被修饰的骨架的类似物，包括、但不限于肽核酸 (PNA)、锁定的核酸 (LNA)、膦酰基 -PNA、吗啉代核酸或具有被修饰的磷酸酯基的核酸（例如硫代磷酸酯、膦酸酯、5′ -N- 亚磷酰胺键）。核苷酸可以纯化自天然来源、使用重组表达系统产生并任选地纯化、化学合成等。本文所用的″核苷″是描述包含单糖和碱基的化合物的术语。单糖包括、但不限于戊糖和己糖单糖。单糖还包括单糖模拟物和通过用卤素、甲氧基、氢或氨基取代羟基或通过酯化其他羟基而修饰的单糖。在一些实施方案中，核苷酸是或包含天然核苷磷酸酯（例如腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷磷酸）。在一些实施方案中，碱基包括天然存在于各种核酸中的任意碱基和其他模拟或类似这种天然存在碱基的修饰物。被修饰或衍生的碱基的非限制性实例包括 5- 氟尿嘧啶、5- 溴尿嘧啶、5- 氯尿嘧啶、5- 碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4- 乙酰胞嘧啶、5-（羧基羟甲基）尿嘧啶、5- 羧甲基氨甲基 -2- 硫尿苷、5- 羧甲基氨甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、β -D-galactosylqueosine、肌苷、N6- 异戊烯腺嘌呤、1- 甲基鸟嘌呤、1- 甲基肌苷、2,2- 二甲基鸟嘌呤、2- 甲基腺嘌呤、2- 甲基鸟嘌呤、3- 甲基胞嘧啶、5- 甲基胞嘧啶、N6- 腺嘌呤、7- 甲基鸟嘌呤、5- 甲氨基甲基尿嘧啶、5- 甲氧基氨甲基 -2- 硫脲嘧啶、β -D-mannosylqueosine、5′ - 甲氧基羧甲基尿嘧啶、5- 甲氧基尿嘧啶、2- 甲硫基 -N6- 异戊烯腺嘌呤、尿嘧啶 -5- 氧基乙酸、怀丁苷 (wybutoxosine)、假尿嘧啶、queosine、2- 硫胞嘧啶、5- 甲基 -2- 硫尿嘧啶、2- 硫尿嘧啶、4- 硫尿嘧啶、5- 甲基尿嘧啶、尿嘧啶 -5- 氧基乙酸甲酯、尿嘧啶 -5- 氧基乙酸、5- 甲基 -2- 硫脲嘧啶、3-(3- 氨基 -3-N-2- 羧丙基）尿嘧啶、2- 氨基尿嘌呤、吡咯并嘧啶和 2,6- 二氨基嘌呤。核苷碱基还包括通用核碱基例如二氟甲苯基、硝基吲哚基、硝基吡咯基或硝基咪唑基。核苷酸还包括携有标记或包含脱碱基即缺乏碱基的单体的核苷酸。除非另有指示，否则核酸序列以 5′ -3′ 方向显示。核苷酸可以以序列特异性方式通过经 Watson-Crick 碱基对的氢键结合另一个核苷酸。这种碱基对被称为彼此互补。寡核苷酸可以是单链、双链或三链的。

[0399] 在某些情况下，本文中所述的聚合物载体（或聚合物材料/组合物）包含多个装配入聚合物载体的共聚物和任选地至少一个核苷酸、寡核苷酸、多核苷酸等。

[0400] 如本文所用的，正常生理 pH 意指哺乳动物体的主要流体例如血液、血清、正常细胞的细胞溶胶等的 pH。在一些情况中，正常生理 pH 约为中性 pH，包括例如 pH 约 7.2- 约 7.4。如本文所用的，术语中性 pH、生理和生理学 pH 是同义词并且可互换使用。

[0401] RNA 干扰 (RNAi)：如本文中所用的，术语“RNA 干扰”或“RNAi”是指由至少部分双链 RNA（所述双链 RNA 还包含与靶 RNA 实质上互补的部分）介导的基因表达的序列特异性抑制和/或靶 mRNA 和蛋白质水平的减少。

[0402] RNAi 试剂：如本文所用的，术语″ RNAi 试剂″意指可以通过 RNAi 机制介导基因

表达抑制的寡核苷酸，包括、但不限于 siRNA、microRNA(miRNA)、短发夹 RNA(shRNA)、不对称干扰 RNA(aiRNA)、切丁酶底物及其前体。

[0403] 短干扰 RNA(siRNA)：本文所用的术语″短干扰 RNA″或″ siRNA″意指包含约 15-50 个碱基对长度且任选包含 0-2 个单链突出端的 RNAi 试剂。siRNA 的一个链包括与以互补方式与靶 RNA 杂交的部分。在一些实施方案中，siRNA 与靶 RNA 的被靶向部分之间可能存在一个或多个错配。在一些实施方案中，siRNAs 通过导致靶转录物降解而介导基因表达抑制。

[0404] 短发夹 RNA(shRNA)：短发夹 RNA(shRNA) 意指具有至少两个杂交或能够彼此杂交形成双链（双链体）结构的互补性部分和至少一个单链部分的寡核苷酸。抑制基因表达：如本文中所用的，短语“抑制基因表达”意指引起所述基因的表达产物在量上的任意可测量的减少。表达产物可以是从该基因转录的 RNA（例如 mRNA）和 / 或从该基因转录的 mRNA 翻译的多肽。可使用用于测量 mRNA 或蛋白质的标准技术测定表达的水平。

[0405] 切丁酶底物：″切丁酶底物″是大于约 25 个碱基对的双链体 RNA，其为细胞中 RNase III 家族成员切丁酶 (Dicer) 的底物。切丁酶底物被切割而产生约 21 个碱基对的双链体小干扰 RNAs(siRNAs)，它引起 RNA 干扰效应，从而通过 mRNA 敲低而引起基因沉默。

[0406] 治疗剂：本文所用的，术语″治疗剂″意指在对受试者、器官、组织或细胞给药时具有治疗效果和 / 或引起期望的生物学和 / 或药理学效应的任意试剂。

[0407] 治疗有效量：如本文所用的，术语治疗剂的″治疗有效量″意指在对患有或易感疾病、障碍和 / 或病症的受试者给药时足以治疗、诊断、预防和 / 或延缓该疾病、障碍和 / 或病症的症状发作的用量。

[0408] 纳米粒：如本文所用的，术语″纳米粒″意指具有低于 1000 纳米 (nm) 的直径的任意颗粒。一般而言，纳米粒应具有小到足以使其被真核细胞摄取的尺寸。典型地，纳米粒具有的最长直线尺寸（例如直径）为 200nm 或更低。在一些实施方案中，纳米粒具有的直径为 100nm 或更低。较小的纳米粒，例如具有直径约 10nm- 约 200nm、约 20nm- 约 100nm、约 50nm 或更低，例如 5nm-30nm 的纳米粒被用于一些实施方案中。

[0409] 如本文中所用的，″胶束″包括包含芯和亲水性壳的颗粒，其中芯至少部分地、主要地或基本上通过疏水性相互作用而保持在一起。在某些情况中，本文所用的″胶束″是多成分纳米粒，其包含至少两个结构域，即内域（或芯）和外域（或壳）。芯至少部分地、主要地或基本上通过疏水性相互作用而保持在一起，并且存在于胶束中心。如本文所用的，″胶束壳″定义为胶束的非芯部分。

[0410] 阴离子性单体：本文所用的″阴离子性单体″或″阴离子性单体单元″是指这样的单体或单体单元，其具有以阴离子性带电荷状态存在的基团，或以不带电荷状态存在、但处于不带电荷状态时能够变成阴离子性带电荷状态（例如在除去亲电体例如质子 (H+)，例如以 pH 依赖性方式时）的基团。在某些情况中，该基团在约生理 pH 下基本上带负电，但在弱酸性 pH 下发生质子化并且变成基本上中性。这种基团的非限制性实例包括羧基、巴比妥酸及其衍生物、黄嘌呤及其衍生物、硼酸、次膦酸类、膦酸类、亚磺酸类、磷酸类和磺酰类。

[0411] 阴离子性种类：本文所用的″阴离子性种类″是这样的基团、残基或分子，其在约中性（例如，约 7，例如约 7.2 至约 7.4）或生理 pH 下以阴离子性带电荷状态存在，但在微酸性 pH 下发生质子化并且变成基本上中性。

[0412] 不受权利要求中没有特别引述的理论约束，膜去稳定化聚合物可以直接或间接引起细胞膜结构（例如内体膜）的改变（例如渗透性改变），从而允许试剂例如（例如，多核苷酸）（其与聚合物载体（或其组成聚合物）缔合或与之独立地）通过这种膜结构－例如进入细胞或离开细胞囊泡（例如内体）。膜去稳定化聚合物可以是（但不一定是）膜破裂性聚合物。膜破裂性聚合物可以直接或间接引起细胞囊泡的裂解或细胞膜破裂（例如针对大部分细胞膜群体所观察到的）。

[0413] 一般而言，可以通过各种方式评价聚合物或聚合物载体的膜去稳定化或膜破裂特性。在一种非限制性手段中，可以通过试验评价来观察细胞膜结构改变，所述试验用于测定（直接或间接）试剂（例如多核苷酸）从细胞膜（例如内体膜）的释放－例如通过在对这种膜而言是外部的环境中测定这种活性剂的存在或不存在或者这种活性剂的活性。另一种非限制性手段包括测定红细胞溶解（溶血）-例如作为所关注细胞膜的替代试验。这种试验可以在单一 pH 值下或在一个 pH 值范围内进行。

[0414] 疏水性种类：本文所用的″疏水性种类″（在本文中可与″增强疏水性的部分″互换使用）是这样的部分，例如取代基、残基或基团，其在与分子（例如单体或聚合物）共价连接时，能增加分子的疏水性或用作增强疏水性的部分。

[0415] 术语″疏水性″是描述根据化合物在非极性溶剂与水之间的转移自由能测量的物理特性的专门术语 (Hydrophobicity regained.KarplusP.A.，Protein ScL,1997,6：1302-1307)。化合物的疏水性可以根据其 logP 值即分配系数 (P) 的对数确定，其被定义为化合物在两种不能溶混的溶剂例如辛醇和水的混合物的两相中的浓度比。疏水性的实验测定方法和计算机辅助的 logP 值计算方法是本领域技术人员公知的。本发明的疏水性种类包括、但不限于脂族基团、杂脂族基团、芳基和杂芳基。

[0416] 脂族或脂族基团：本文所用的术语″脂族″或″脂族基团″意指烃部分，其可以是直链（即无支链的）、支链或环状（包括稠合、桥连和螺稠合的多环），并且可以是完全饱和的或可以包含一个或多个不饱和单元，但不是芳族的。除非另有指定，否则脂族基团包含 1-20 个碳原子。

[0417] 杂原子：术语″杂原子″意指除了氢或碳外的原子，例如，氧、硫、氮、磷、硼、砷、硒或硅原子。

[0418] 芳基或芳基基团：如本文所用的，术语″芳基″或″芳基基团″意指具有总计 5-14 个环成员的单环、双环和三环环系，其中该环系中至少一个环是芳族的，且其中该环系中的每一个环都包含 3-7 个环成员。

[0419] 杂烷基：术语″杂烷基″意指其中至少一个骨架碳原子被杂原子替代的烷基。

[0420] 杂芳基：术语″杂芳基″意指其中至少一个环成员是杂原子的芳基。

[0421] 下列实施例用于举例说明的目的，并且不应被解释为限定本发明。本文中引述的所有出版物就针对其引述出版物的信息通过引用合并入本文。

实施例

[0422] 在本发明上下文的描述中，利用不同的已知首字母缩写和缩写描述单体或衍生自这种单体的聚合的单体残基。除非另有指定，例如：″ BMA″（或字母″ B″作为等效的速记符号）表示甲基丙烯酸丁酯或衍生自它的单体残基；″ DMAEMA″（或字母″ D″作为等

效的速记符号）表示甲基丙烯酸N,N-二甲氨基乙酯或衍生自它的单体残基；" Gal" 意指半乳糖或半乳糖残基，任选包括羟基保护部分（例如乙酰基）或其聚乙二醇化衍生物（如下所述）；HPMA 表示甲基丙烯酸 2- 羟丙酯或衍生自它的单体残基；" MAA" 表示甲基丙烯酸或衍生自它的单体残基；" MAA(NHS)" 表示甲基丙烯酸的 N- 羟基 - 琥珀酰亚胺酯或衍生自它的单体残基；" PAA" （或字母" P" 作为等效的速记符号）表示 2- 丙基丙烯酸或衍生自它的单体残基；" PEGMA" 意指聚乙二醇化的甲基丙烯酸单体 $CH_3O(CH_2O)_{7-8}OC(O)C(CH_3)CH_2$ 或衍生自它的单体残基。在每种情况中，任意这种命名均表示单体（包括其全部的盐或离子性类似物）或衍生自该单体的聚合的单体残基（包括其全部的盐或离子性类似物），且上下文中具体显示的形式对本领域技术人员显而易见。

[0423] 实施例 1 ：共聚物的制备

[0424] 制备下列通式的二嵌段聚合物和共聚物：

[0425] $[A1_x-/-A2_y]_n-[B1_x-/-B2_y-/-B3_z]_{1-5n}$

[0426] 其中 [A1-A2] 是由单体 A1 和 A2 的残基组成的第一嵌段共聚物，[B1-B2-B3] 是由单体 B1、B2、B3 的残基组成的第二嵌段共聚物，

[0427] x、y、z 是以摩尔百分比单体残基计的聚合物组成

[0428] n 是分子量

[0429] 示例性二嵌段共聚物：

[0430] [DMAEMA]-[B-/-P-/-D]

[0431] $[PEGMA_w]$-[B-/-P-/-D]

[0432] $[PEGMA_W$-DMAEMA]-[B-/-P-/-D]

[0433] $[PEGMA_W$-MAA(NHS)]-[B-/-P-/-D]

[0434] [DMAEMA-/-MAA(NHS)]-[B-/-P-/-D]

[0435] [HPMA-/-PDSM]-[B-/-P-/-D]

[0436] 其中：

[0437] B 是甲基丙烯酸丁酯

[0438] P 是丙基丙烯酸

[0439] D 是 DMAEMA，其为甲基丙烯酸二甲氨基乙酯

[0440] PEGMA 是甲基丙烯酸聚乙二醇酯，其中，例如，w ＝ 4 至 5 个或 7 至 8 个环氧乙烷单元）

[0441] MAA(NHS) 是甲基丙烯酸 -N- 羟基琥珀酰亚胺

[0442] HPMA 是 N-(2- 羟丙基）甲基丙烯酰胺

[0443] PDSM 是吡啶基二硫化物甲基丙烯酸酯

[0444] 这些聚合物表示这样的结构，其中聚合物或共聚物的第一嵌段的组成被改变或以化学方式被处理，以生成其中第一嵌段是中性的（例如 PEGMA）、阳离子性的 (DMAEMA)、阴离子性的 (PEGMA-NHS，其中 NHS 被水解成酸）、两性的 (DMAEMA-NHS，其中 NHS 被水解成酸）或两性离子性的（例如聚 [2- 甲基丙烯酰氧基 -2′ 三甲铵乙基磷酸]）的聚合物。此外，[PEGMA-PDSM]-[B-P-D] 聚合物在第一嵌段中包含吡啶二硫基官能团，其可以与硫氢基化 siRNA 反应，形成聚合物 -siRNA 缀合物。

[0445] 实施例 1.1 ：使用 RAFT 聚合合成嵌段共聚物

[0446] A. RAFT 链转移剂。

[0447] 采用 Moad 等人、Polymer、2005、46(19) :8458-68 的方法稍加改动用于合成用于下列 RAFT 聚合的链转移剂 (CTA)4- 氰基 -4-(乙基硫烷基硫羰基) 硫烷基戊酸 (ECT)。简言之,在 0℃在 10 分钟内向搅拌的氢化钠 (60%的油溶液)(3.15g、79mmo l) 在乙醚 (150ml) 中的混悬液中加入乙硫醇 (4.72g、76mmol)。然后将该溶液搅拌 10 分钟,然后添加二硫化碳 (6.0g、79mmol)。通过过滤收集粗 S- 乙基三硫代碳酸钠 (7.85g、0.049mol),混悬于乙醚 (100mL),与碘 (6.3g、0.025mol) 反应。1 小时后,过滤该溶液,用硫代硫酸钠水溶液洗涤,用硫酸钠干燥。然后通过旋转蒸发分离粗的双 (乙基硫烷基硫羰基) 二硫化物。将双 -(乙基硫烷基硫羰基) 二硫化物 (1.37g、0.005mol) 和 4,4′ - 偶氮双 (4- 氰基戊酸)(2.10g、0.0075mol) 在乙酸乙酯 (50mL) 中的溶液在回流状态下加热 18 小时。旋转蒸发溶剂后,通过柱色谱法、使用硅胶作为固定相和 50 ∶ 50 乙酸乙酯己烷作为洗脱剂分离粗的 4- 氰基 -4-(乙基硫烷基硫羰基) 硫烷基戊酸 (ECT)。

[0448] B. 聚 (甲基丙烯酸 N,N- 二甲氨基乙酯) 大链转移剂 (聚 DMAEMAmacroCTA)

[0449] DMAEMA 的 RAFT 聚合在 30℃、在氮气气氛中、在 DMF 中使用 ECT 和 2,2′ - 偶氮双 (4- 甲氧基 -2.4- 二甲基戊腈)(V-70)(Wako chemicals) 作为自由基引发剂进行 18 小时。起始单体与 CTA 之比 ($[CTA]_0/[M]_0$) 能使得在 100%转化率下的理论值 Mn 是 10,000(g/mo l)。起始 CTA 与引发剂之比 ($[CTA]_0/[I]_0$) 是 10 ∶ 1。通过沉淀入 50 ∶ 50v ∶ v 乙醚 / 戊烷分离所得的聚 DMAEMA 大链转移剂。将得到的聚合物再溶于丙酮,然后沉淀入戊烷 (x3),真空干燥过夜。

[0450] C. DMAEMA、PAA 和 BMA 从聚 (DMAMEA)macroCTA 的嵌段共聚合

[0451] 将期望的化学计算量的 DMAEMA、PAA 和 BMA 加入到溶于 N,N- 二甲基甲酰胺的聚 (DMAEMA)macroCTA 中 (25wt%单体和 macroCTA :溶剂)。就全部聚合而言,$[M]_0/[CTA]_0$ 和 $[CTA]_0/[I]_0$ 分别是 250 ∶ 1 和 10 ∶ 1。在添加 V70 后,用氮气将溶液净化 30 分钟,使其在 30℃反应 18 小时。通过沉淀入 50 ∶ 50v ∶ v 乙醚 / 戊烷分离所得的二嵌段共聚物。然后将沉淀的聚合物再溶于丙酮,然后沉淀入戊烷 (x3),真空干燥过夜。利用凝胶渗透色谱法 (GPC) 测定在 DMF 中的聚 (DMAEMA)macroCTA 和二嵌段共聚物样品相对于聚甲基丙烯酸甲酯标准品而言的分子量和多分散性 (PDI、Mw/Mn)(与 Viscotek GPCmax VE2001 和折射计 VE 3580(Viscotek、Houston、TX) 串联的 SEC Tosoh TSK-GEL R-3000 和 R-4000 柱 (TosohBioscience、Montgomery ville、PA))。包含 1.0wt% LiBr 的 HPLC- 级 DMF 用作流动相。图 1 概括了一些 RAFT 合成聚合物的分子量、组成和嵌段比例。

[0452] 实施例 1.2. 由聚 (PEGMA)macroCTA 制备 DMAEMA、PAA 和 BMA 的第二嵌段 (B1-B2-B3) 共聚物

[0453] 将期望的化学计算量的 DMAEMA、PAA 和 BMA 加入到溶于 N,N- 二甲基甲酰胺的聚 (PEGMA)macroCTA 中 (25wt%单体和 macroCTA :溶剂)。就全部聚合而言,$[M]_0/[CTA]_0$ 和 $[CTA]_0/[I]_0$ 分别是 250 ∶ 1 和 10 ∶ 1。在添加 AIBN 后,用氮气将溶液净化 30mi n,使其在 68℃反应 6-12h。通过沉淀入 50 ∶ 50v ∶ v 乙醚 / 戊烷分离所得的二嵌段共聚物。然后将沉淀的聚合物再溶于丙酮,然后沉淀入戊烷 (x3),真空干燥过夜。利用凝胶渗透色谱法 (GPC),使用 Vi scotek GPCmax VE2001 和折射计 VE3580(Vi scotek、Hous ton、TX) 测定在 DMF 中的聚 (PEGMA)macroCTA 和二嵌段共聚物样品的分子量和多分散性 (PDI、Mw/Mn)。包

含 1.0wt% LiBr 的 HPLC- 级 DMF 用作流动相。$CDCl_3$ 中的 NMR 光谱法用于证实聚合物结构和计算第二嵌段的组成。

[0454] 实施例 1.3.PEGMA-DMAEMA 共聚物的制备和表征

[0455] 使用与实施例 1.1 和 1.2 中所述类似的方法进行聚合物合成。通过使用各单体的不同投料比改变 PEGM 和 DMAEMA 在第一嵌段中的比例，生成图 1B 中所述的共聚物。

[0456] 实施例 1.4.PEGMA-MAA(NHS) 共聚物的制备和表征。

[0457] 使用单体进料比，如实施例 1.1 和 1.2 所述进行聚合物合成，得到期望的第一嵌段共聚物的组成。在一些情况下，制备 [$PEGMA_W$-MAA(NHS)]-[B-P-D] 聚合物，其中第一嵌段中单体的共聚物之比是 75 ： 30。可以在室温或 37℃、在 pH 7.4-8.5 的含水缓冲液（磷酸盐或碳酸氢盐）中将包含 NHS 的聚合物孵育 1-4 小时，生成水解（酸性）形式。

[0458] 实施例 1.5.DMAEMA-MAA(NHS) 共聚物的制备和表征。

[0459] 使用单体进料比，如实施例 1.1 和 1.2 所述进行聚合物合成，得到期望的第一嵌段共聚物的组成。在某些情况下，制备 [DMAEMA-MAA(NHS)]-[B-P-D] 聚合物，其中第一嵌段中单体的共聚物之比是 70 ： 30。可以在室温或 37℃、在 pH 7.4-8.5 的含水缓冲液（磷酸盐或碳酸氢盐）中将包含 NHS 的聚合物孵育 1-4 小时，生成水解（酸性）形式 .

[0460] 实施例 2. 用于 siRNA 药物递送的 HPMA-PDS(RNA) 共聚物缀合物的制备和表征。

[0461] A. 吡啶二硫基甲基丙烯酸酯单体 (PDSMA) 的合成

[0462] 将 Aldrithiol-2™(5g、22.59mmol) 溶于 40ml 甲醇和 1.8ml AcOH。将该溶液在 30 分钟内加入 2- 氨基乙硫醇 .HCl(1.28g、11.30mmol) 在 20ml 甲醇中的溶液。将该反应体系在 N_2 气氛中在 R.T. 搅拌 48 小时。蒸发溶剂后，用 40ml 乙醚将残余油状物洗涤 2 次。将粗化合物溶于 10ml 甲醇，用 50ml 乙醚将产物沉淀 2 次，得到期望的化合物 1，为淡黄色固体。收率 :95%。

[0463] 将吡啶二硫乙胺 (6.7g、30.07mmo l) 和三乙胺 (4.23ml、30.37mmo l) 溶于 DMF(25ml) 和吡啶 (25ml)，在 0℃通过注射器缓慢加入甲基丙烯酰氯 (3.33ml、33.08mmol)。将该反应混合物在 R.T. 搅拌 2h。反应后，用饱和 $NaHCO_3$(350ml) 使反应停止，用乙酸乙酯 (350ml) 萃取。再用 10% HCl(100ml、1 次) 和纯水 (100ml、2 次) 洗涤合并的有机层，用 $MgSO_4$ 干燥。通过柱色谱法纯化纯产物 (EA/Hex :1/10-2/1)，为黄色糖浆状物。Rf ＝ 0.28(EA/Hex ＝ 1/1)。收率 :55%。

[0464] B.HPMA-PDSMA 共聚物合成

[0465] N-(2- 羟丙基）甲基丙烯酰胺 (HPMA) 和吡啶二硫基甲基丙烯酸酯（典型地以 70 ： 30 的单体比）的 RAFT 聚合在 DMF(50 重量% 单体 ： 溶剂）中、在 68℃、在氮气气氛中使用 2,2′ - 偶氮 - 双 - 异丁腈 (AIBN) 作为自由基引发剂进行 8 小时。CTA 与 AIBN 的摩尔比为 10 ： 1，设定单体与 CTA 之比，使得若转化率为 100% 则可以得到 25,000g/mol 的分子量。通过反复从甲醇中沉淀入乙醚分离聚 (HPMA-PDS)macro-CTA。

[0466] 真空干燥 macro-CTA 24 小时，然后用于甲基丙烯酸二甲氨基乙酯 (DMAEMA)、丙基丙烯酸 (PAA) 和甲基丙烯酸丁酯 (BMA) 的嵌段共聚合。将等摩尔量的 DMAEMA、PAA 和 BMA($[M]_0/[CTA]_0$ ＝ 250) 加入到溶于 N,N- 二甲基甲酰胺的 HPMA-PDS macroCTA 中 (25wt% 单体和 macroCTA ： 溶剂）。加入自由基引发剂 AIBN，其中 CTA 与引发剂之比为 10 ： 1。使聚合在氮气气氛中在 68℃进行 8 小时。然后通过沉淀入 50 ： 50 乙醚 / 戊烷（进行 4 次），

在沉淀之间再溶于乙醇而分离所得的二嵌段聚合物。然后用乙醚将产物洗涤 1 次，真空干燥过夜。

[0467] C. siRNA 与 HPMA-PDSMA 其聚物的缀合

[0468] 硫氢基化 s iRNA 以商品方式得到 (Agilent、Boulder、CO)，为具有二硫基修饰的 5′ - 有义链的双链体 RNA。通过将冻干化合物溶于水制备用于缀合的游离硫醇形式，用固定在琼脂糖凝胶内的二硫化物还原剂 TCEP 处理 1 小时。然后将还原的 RNA(400uM) 与吡啶基二硫化物 - 官能化聚合物在包含 5mM 乙二胺四乙酸 (EDTA) 的磷酸盐缓冲液 (pH 7) 中反应 24 小时。

[0469] 吡啶基二硫化物聚合物与 RNA 硫醇的反应生成 2- 吡啶硫酮，其可以以分光光度方式测定以表征缀合效率。为了进一步验证二硫化物交换，使缀合物上 SDS-PAGE 16.5％三（羟甲基）甲基甘氨酸凝胶。平行用固定的 TCEP 处理缀合反应的等分部分，然后上 SDS-PAGE，以验证在还原环境中 RNA 从聚合物中释放。缀合反应以聚合物 /RNA 化学计量比为 1、2 和 5 进行。在 343nm 对 2- 吡啶硫酮释放的 UV 分光光度吸光度测量值用于测定缀合效率。

[0470] 实施例 3 :用细胞靶向剂合成聚合物 :叠氮基 - 终止的聚合物与叶酸炔丙酯的 Click 反应。

[0471] 受控自由基聚合和叠氮化物 - 炔 click 化学法的组合用于制备与生物配体（例如叶酸）缀合的嵌段共聚物胶束，这种生物配体具有活跃地靶向包含所关注特异性受体的特异性组织 / 细胞的潜能（例如叶酸）。通过如实施例 1 所述的可逆添加 - 分段链转移 (RAFT) 聚合合成嵌段共聚物，只是使用叠氮基链转移剂 (CTA)。然后使聚合物的叠氮基末端与靶向剂（例如叶酸）的炔衍生物反应，产生包含靶向剂的聚合物。

[0472] RAFT 剂的合成。

[0473] 如下制备 RAFT 链转移剂 (CTA)2- 十二烷基硫烷基硫羰基硫烷基 -2- 甲基 - 丙酸 3- 叠氮基丙酯 (C12-CTAN3) :

[0474] 3- 叠氮基丙醇的合成。使 3- 氯 -1- 丙醇 (5.0g、53mmol、1.0 当量）和叠氮化钠 (8.59g、132mmol、2.5 当量）在 DMF(26.5mL) 中、在 100℃反应 48 小时。将该反应混合物冷却至室温，倾入乙醚 (200mL)，用饱和 NaCl 水溶液 (500mL) 萃取。分离有机层，用 $MgSO_4$ 干燥，过滤。浓缩上清液，得到产物 (5.1g、95％收率）。

[0475] 2- 十二烷基硫烷基硫羰基硫烷基 -2- 甲基 - 丙酰氯 (DMP-Cl) 的合成

[0476] 在 50mL 圆底烧瓶中将 2- 十二烷基硫烷基硫羰基硫烷基 -2- 甲基 - 丙酸 (DMP、Noveon ＞ 95％）(1.0g、2.7mmol、1.0 当量）溶于二氯甲烷 (15mL)，将该溶液冷却至约 0℃。在氮气气氛中缓慢加入草酰氯 (0.417g、3.3mmol、1.2 当量），使该溶液达到室温，总计搅拌 3 小时。减压浓缩所得的溶液，得到酰氯产物 (1.0g、99％收率）。

[0477] 2- 十二烷基硫烷基硫羰基硫烷基 -2- 甲基 - 丙酸 3- 叠氮基丙酯的合成。

[0478] 在 50mL 圆底烧瓶中将 3- 叠氮基丙醇 (265mg、2.62mmol、1.0 当量）溶于二氯甲烷 (5mL)，将该溶液冷却至约 0℃。在 10 分钟内滴加三乙胺 (0.73mL) 在二氯甲烷 (5mL) 中的溶液。滴加 DMP-Cl(1.0g、2.6mmol) 在二氯甲烷 (5mL) 中的溶液，使该溶液达到室温，同时搅拌 3 小时。减压浓缩该溶液，用乙醚 (100mL) 稀释，用饱和碳酸氢钠水溶液 (50mL)、水 (50mL) 和饱和 NaCl 溶液 (50mL) 依次洗涤。分离有机层，用 $MgSO_4$ 干燥 (1.0g)，过滤。减

压浓缩上清液，得到产物（1.05g、90％收率），为残余油状物。

[0479] 叶酸炔丙酯的合成。

[0480] 将叶酸（1.0g、0.0022mol）溶于 DMF(10mL)，用水 / 冰浴冷却。加入 N- 羟基琥珀酰亚胺（260mg、0.0025mol）和 EDC(440mg、0.0025mol)，将得到的混合物在冰浴中搅拌 30 分钟，得到白色沉淀。加入炔丙胺（124mg、2.25mmol）在 DMF(5.0mL) 中的溶液，将得到的混合物温至室温，搅拌 24h。将该反应混合物倾入水（100mL)，搅拌 30 分钟，形成沉淀。过滤橙 - 黄色沉淀，用丙酮洗涤，真空干燥 6 小时，得到 1.01g 产物（93％收率）。

[0481] 叠氮基 - 终止的聚合物与叶酸炔丙酯的 Click 反应。

[0482] 通过下列实施例方法将叠氮基终止的聚合物与叶酸炔丙酯反应。用氮气将 $N3-\alpha-[D_s-X_t]_b-[B_x-P_y-D_z]_a-\omega$（0.0800mmol）在 DMF(7mL) 中的溶液和五甲基二亚乙三胺（PMDETA、Aldrich、99％）(8.7mg、0.050mmol) 净化 60 分钟，在氮气气氛中通过注射器转移入安装了磁搅拌棒的包含 CuBr(7.2mg、0.050mmol) 和叶酸炔丙酯（42mg、0.088mmol）的小瓶中。将该反应混合物在 26℃、在没有氧存在的情况下搅拌 22 小时。使反应混合物接触空气，使该溶液通过中性氧化铝柱。真空除去 DMF，并且将产物沉淀入己烷。将所得的以叶酸 - 终止的嵌段共聚物叶酸 $-\alpha-[D_s-X_t]_b-[B_x-P_y-D_z]_a-\omega$ 溶于 THF，过滤，以除去过量叶酸炔丙酯。除去 THF，然后将聚合物溶解于去离子（DI）水，使用具有 1000Da 的分子量截留值的膜透析 6 小时。通过冻干分离聚合物。

[0483] 实施例 4 :嵌段共聚物 PRx 0729v6（也称为 P7v6）的 NMR 光谱（图 2）

[0484] 本实施例使用 NMR 光谱法提供了聚合物 PRx0729v6 在水溶液形成胶束样结构的证据。

[0485] 在 25℃在氘代氯仿（$CDCl_3$）和氘代水（D_2O）中用 Bruker AV301 记录 ^{1}HNMR 光谱。使用氘锁（$CDCl_3$、D_2O），以 ppm 计来自四甲基硅烷（用于 $CDCl_3$）和 3-（三甲代甲硅烷基）丙 -2,2,3,3-d4 酸钠盐（用于 D_2O）的化学位移。聚合物浓度是 6mg/mL。

[0486] 使用聚合物 PRx0729v6 作为实例的合成聚合物在含水缓冲液中的 NMR 光谱提供了本发明二嵌段聚合物在水溶液中形成胶束的证据。胶束的形成导致隔离的粘性内芯形成，它限制了形成芯区段的质子运动并且防止了溶剂与芯的质子之间的氘交换。这反映为相应质子的 ^{1}H NMR 信号显著抑制或消失。我们使用这种溶液 NMR 光谱法的内在特性证实胶束芯的疏水性嵌段被有效隔离。如果胶束在含水介质中形成，则应出现因疏水性共聚物嵌段的质子导致的信号消失。

[0487] 图 2 显示聚合物 PRx0729v6 在 $CDCl_3$（有机溶剂）和 D_2O（含水溶剂）中的 ^{1}H NMR 实验。在室温下聚合物在 $CDCl_3$ 中的 ^{1}H NMR 光谱（图 2A）显示信号归因于全部聚合物质子，显示聚合物链在 $CDCl_3$ 中保持分散（未聚集），保留了其运动，所以，其质子可以与溶剂交换。这显示具有隔离芯的稳定胶束不能由 PRx0729v6 在有机溶剂中形成。图 2B 显示 PRx0729v6 在 D_2O 中的 ^{1}H NMR 光谱。代表疏水性嵌段（BMA、PAA、DMAEMA）质子的信号从光谱中消失。这显示具有隔离芯的稳定胶束由 PRx0729v6 在水溶液中形成。此外，在同一光谱中，归因于 DMAEMA(2.28ppm) 的两个甲基的质子共振的信号发生显著抑制，这意味着仅构成壳的第一聚 DMAEMA 嵌段接触水，即主要是 DMAEMA 的带电荷基团。简单计算显示从 $CDCl_3$ 中的信号（5600）扣除疏水性嵌段的 PAA、DMAEMA 的积分百分比（2900）得到在 D_2O 中同一信号的近似值（2811），符合该结论。

[0488] ^{1}H NMR 实验结果共同显示聚合物 PRx0729v6 形成具有有序芯 - 壳结构的胶束，其中第一嵌段聚 DMAEMA 形成包围由疏水性单元 (BMA) 和带相反电荷的静电稳定单元 (PAA、DMAEMA) 组成的芯的水化外壳。

[0489] 实施例 5 :动态光散射 (DLS) 测定与 s iRNA 复合的聚合物 PRx0729v6 的粒度 (图 3)

[0490] 下列实施例证实了聚合物 PRx0729v6 单独时形成均匀的 45nm 颗粒，而在结合 siRNA 之后形成 47nm 大小的颗粒。

[0491] 通过动态光散射 (DLS)、使用 Malvern Zetas izer Nano ZS 测定单独聚合物或聚合物 /siRNA 复合物的粒度。将冻干的聚合物以 10-50mg/ml 溶于 100％乙醇，然后 10 倍稀释入磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 中。就单独的 PRx0729v6 而言以 1mg/mL 或就与 1uM GAPDH- 特异性 21mer-siRNA(Ambion) 复合的 PRx0729v6 而言以 0.7mg/mL 测定磷酸缓冲盐水 pH 7.4(PBS) 中的聚合物，其中复合物中理论电荷比为 4 ： 1，即聚合物上的正电荷 :siRNA 上的负电荷。单独的 PRx0729v6(45nm) 和与 siRNA 复合的 PRx0729v6(47nm)(图 3) 显示具有接近均匀分布的类似粒度，PDI ＜ 0.1。

[0492] 实施例 6 :不同电荷比的聚合物 PRx0729v6/siRNA 复合物的凝胶迁移分析 (图 4)

[0493] 下列实施例证实聚合物 PRx0729v6 以不同电荷比结合 siRNA，产生电泳迁移率降低的复合物。

[0494] 通过凝胶电泳分析聚合物 siRNA 结合 (图 4)，显示完全的 siRNA 与聚合物结合在聚合物 /siRNA 电荷比为 4 ： 1 及更高时发生。

[0495] 实施例 7. 聚合物 PRx0729v6 的临界胶束浓度 (CMC)(图 5)

[0496] 下列实施例显示由聚合物 PRx0729v6 形成的胶束对 100- 倍稀释稳定。

[0497] 将聚合物 PRx0729v6 以 1mg/mL±0.5M NaCl 的浓度溶解在 PBS 缓冲液 pH 7.4 中。通过动态光散射、在从 1mg/mL 到 1.6ug/mL 的 5- 倍连续稀释度 (PBS±0.5M NaC l) 范围内测定粒度。图 5 显示约 45nm 的粒度对降至约 10ug/mL 的浓度稳定。聚合物 PRx0729v6 显示在低于约 5ug/mL(即 CMC) 下不稳定，在该浓度下各聚合物链解离并且形成非特异性聚集物。

[0498] 实施例 8. 聚合物 PRx0729v6 颗粒在有机溶剂中的稳定性 (图 6)

[0499] 本实施例显示聚合物 PRx0729v6 的胶束结构在有机溶剂中解离，这符合胶束芯的疏水性质。

[0500] 将聚合物 PRx0729v6 以 1mg/mL 的浓度溶于各种有机溶剂，通过动态光散射测定粒度。图 6 显示增加浓度的二甲基甲酰胺 (DMF) 导致胶束解离成聚集的链。

[0501] 实施例 9 :siRNA- 胶束复合物在培养的哺乳动物细胞中的敲低活性 (图 7 和图 12)

[0502] 在 96- 孔格中通过测定用 PRx0729v6 :siRNA 复合物处理 24 小时后特异性基因的表达来检测 siRNA/ 聚合物 PRx0729v6 复合物的敲低 (KD) 活性。在 25uL 中混合聚合物和靶向 GAPDH 的 siRNA 或阴性对照 siRNA(Ambion)，得到不同电荷比和超过最终转染浓度 5- 倍的浓度，使其复合 30 分钟，然后添加到包含 10％ FBS 的 100uL 标准培养基中的 HeLa 细胞中。在 100、50、25 和 12.5nM 评价最终 siRNA 浓度。以 4 ： 1、2 ： 1 或 1 ： 1 电荷比或 18、9、4.5 和 2.2ug/mL 的固定聚合物浓度添加聚合物，以测定何种条件产生最高 KD 活性。就电荷比而言 (图 7A)，制备较高浓度的复合物，孵育 30 分钟，然后恰在添加到细胞中前系列

稀释至高于图表所示浓度 5- 倍的浓度。就固定的聚合物浓度而言（图 7B），以如图所示浓度的 5- 倍浓度复合 siRNA 和聚合物，孵育 30 分钟，然后添加到细胞中至图 7 所示终浓度。图 7C 是阴性对照。处理后 24 小时分离总 RNA，通过定量 PCR 测定相对于 2 种内部校准基因 RPL13A 和 HPRT 的 GAPDH 表达。图 7 以及图 12A 和图 12B 的结果显示，使用 9ug/mL 和更高浓度的 PRx0729v6 在测试的全部 siRNA 浓度下均得到＞ 60％ KD 活性（阴影）。该浓度符合来自粒度分析的稳定胶束形成。与较低浓度（4.5ug/mL 固定的聚合物浓度）下的复合物形成相比，仅当以高浓度制备复合物并且系列稀释时（4 ： 1 电荷比）使用 4.5ug/mL PRx0729v6/12.5nMsiRNA 观察到高 KD 活性。另外，仅 100nM siRNA 与 4.5ug/mL PRx0729v6 显示高 KD 活性，而更低的 siRNA 浓度没有显示高活性。概括地说，PRx0729v6 胶束对降至～ 10ug/mL 的稀释稳定，KD 活性在低于～ 5ug/mL 时失去，显示稳定的胶束是良好 KD 活性所需的。

[0503] 实施例 10 ：切丁酶底物 GAPDH siRNA- 聚合物复合物在培养的哺乳动物细胞中的敲低活性

[0504] 在 96- 孔格中通过测定用聚合物 ：GAPDH 切丁酶 siRNA 复合物处理 24 小时后的 GAPDH 基因表达而检测 GAPDH 特异性切丁酶底物 siRNA/ 聚合物复合物的敲低 (KD) 活性。GAPDH 切丁酶 siRNA 序列为 ：有义链 ：rGrGrUrCrArUrCrCrArUrGrArCrArArCrUrUrUrGrGrUrAdTdC ；反义链 ：rGrArUrArCrCrArArArGrUrUrGrUrCrArUrGrGrArUrGrArCrCrUrU。在 25uL 中混合聚合物和靶向 GAPDH 的 siRNA 或阴性对照 siRNA(IDT)，得到不同电荷比和超过最终转染浓度 5- 倍的浓度，使其复合 30 分钟，然后添加到包含 10％ FBS 的 100uL 标准培养基中的 HeLa 细胞中。在 100、50、25 和 12.5nM 检验最终 s i RNA 浓度。以 4 ： 1、2 ： 1 或 1 ： 1 电荷比或 40、20、10 和 5ug/mL 的固定聚合物浓度添加聚合物，以测定何种条件产生最高 KD 活性。处理后 24 小时分离总 RNA，通过定量 PCR 测定相对于 2 种内部校准基因 RPL13A 和 HPRT 的 GAPDH 表达。结果显示，在测试的全部 siRNA 浓度下，使用 10ug/mL 和更高浓度的聚合物得到＞ 60％ KD 活性。这种聚合物浓度符合从粒度分析得到的稳定胶束形成。

[0505] 实施例 11 ：ApoB100siRNA- 聚合物复合物在培养的哺乳动物细胞中的敲低活性

[0506] 在 96- 孔格中通过测定用聚合物 ：ApoB siRNA 复合物处理 24 小时后 ApoB100 基因的表达来检测与聚合物复合的 ApoB100 特异性 siRNA 或切丁酶底物 siRNA 的敲低 (KD) 活性。ApoB100siRNA 序列为 ：有义链 ：5′ rGrArArUrGrUrGrGrGrUrGrGrCrArArCrUrUrUrArG-S′ ；反义链 ：5′ -rArArArGrUrUrGrCrCrArCrCrCrArCrArUrUrCrArG-3′ 。ApoB100 切丁酶底物 s iRNA 序列为 ：有义链 ：5′ -rGrArArUrGrUrGrGrGrUrGrGrCrArArCrUrUrUrArArArGdGdA ；反义链 ：5′ -rUrCrCrUrUrUrArArArGrUrUrGrCrCrArCrCrCrCrArCrArUrUrCrArG-3′ 。在 25uL 中混合聚合物和靶向 ApoB 的 siRNA 或阴性对照 siRNA(IDT)，得到不同电荷比和超过最终转染浓度 5- 倍的浓度，使其复合 30 分钟，然后添加到包含 10％ FBS 的 100uL 标准培养基中的 HepG2 细胞中。在 100、50、25 和 12.5nM 检验最终 siRNA 浓度。以 4 ： 1、2 ： 1 或 1 ： 1 电荷比或 40、20、10 和 5ug/mL 的固定聚合物浓度添加聚合物，以测定何种条件产生最高 KD 活性。处理后 24 小时分离总 RNA，通过定量 PCR 测定相对于 2 种内部校准基因 RPL13A 和 HPRT 的 ApoB100 表达。结果显示，在测试的全部 siRNA 浓度下，使用 10ug/mL 和更高浓度的聚合物得到＞ 60％ KD 活性。这种聚合物浓度符合从粒度分析得到的稳定胶束形成。

[0507] 实施例 12 :ApoB100siRNA- 聚合物复合物在小鼠模型中的敲低活性

[0508] 通过测定肝组织中 ApoB100 的表达和血清胆固醇水平,测定小鼠模型中 ApoB100 特异性 siRNA/ 聚合物复合物的敲低活性。通过尾静脉对 Balb/C 小鼠静脉内给予 1、2 或 5mg/kg 的与聚合物以 1 ： 1、2 ： 1 或 4 ： 1 电荷比 (聚合物 :siRNA) 复合的 ApoB 特异性 siRNA 或盐水对照。最终剂量后 48 小时处死小鼠,分离血液和肝样品。测定血清中的胆固醇水平。从肝中分离总 RNA,通过定量 PCR 测定相对于 2 种内部校准基因 HPRT 和 GAPDH 的 ApoB100 表达。

[0509] 实施例 13.ApoB100 反义 DNA 寡核苷酸 - 聚合物复合物在培养的哺乳动物细胞中的敲低活性

[0510] 在 96- 孔格中通过测定用聚合物 :ApoB 反义 DNA 寡核苷酸复合物处理 24 小时后的 ApoB100 基因表达,检测与聚合物复合的 ApoB100 特异性反义 DNA 寡核苷酸的敲低 (KD) 能力。对小鼠 ApoB 具有特异性的 2 种 ApoB100 反义寡核苷酸为 :

[0511] (1)5′ -GTCCCTGAAGATGTCAATGC-3′ ,编码区的 541 位 ;和

[0512] (2)5′ -ATGTCAATGCCACATGTCCA-3′ ,编码区的 531 位。

[0513] 在 25uL 中混合聚合物和靶向 ApoB 的反义 DNA 寡核苷酸或阴性对照 DNA 寡核苷酸 (乱序的序列),得到不同电荷比和超过最终转染浓度 5- 倍的浓度,使其复合 30 分钟,然后添加到包含 10％ FBS 的 100uL 标准培养基中的 HepG2 细胞中。在 100、50、25 和 12.5nM 检验最终寡核苷酸浓度。以 4 ： 1、2 ： 1 或 1 ： 1 电荷比或 40、20、10 和 5ug/mL 的固定聚合物浓度添加聚合物,以测定何种条件产生最高 KD 活性。处理后 24 小时分离总 RNA,通过定量 PCR 测定相对于 2 种内部校准基因 RPL13A 和 HPRT 的 ApoB100 表达。

[0514] 实施例 14 :证实聚合物胶束及其 s iRNA 复合物的膜去稳定化活性 (图 8)

[0515] 通过将单独聚合物或将 PRx0729v6 :siRNA 复合物滴定入人红细胞 (RBC) 制品,并且根据血红蛋白释放测定膜裂解活性 (在 540nm 吸光度读数),由此检测 pH 响应性膜去稳定化活性。3 种不同的 pH 条件用于模拟内体 pH 环境 (胞外 pH ＝ 7.4,初级内体＝ 6.6,次级内体＝ 5.8)。通过离心从采集在包含 EDTA 的真空容器中的全血中分离人红细胞 (RBC)。用生理盐水将 RBC 洗涤 3 次,使在特定 pH(5.8、6.6 或 7.4) 的 PBS 中达到 2％ RBC 的终浓度。在恰好高于和低于如所示的临界胶束浓度 (CMC) 的浓度下测试单独的 PRx0729v6 或 PRx0729v6/s iRNA 复合物 (图 5)。就聚合物 /siRNA 复合物而言,将 25nM si RNA 以 1 ： 1、2 ： 1、4 ： 1 和 8 ： 1 电荷比加入到 PRx0729v6(对于单独聚合物,采用相同的聚合物浓度)。在 20X 最终检测浓度下形成单独的聚合物或聚合物 -s iRNA 复合物的溶液 30 分钟,将其稀释到各 RBC 制品中。将 2 种 PRx0729v6 聚合物储备溶液的不同制品比较制备后 9 和 15 天的活性稳定性,从制备日开始就贮存在 4℃。将 RBC 与单独的聚合物或聚合物 /s iRNA 复合物一起在 37℃孵育 60 分钟,离心以除去完整 RBC。将上清液转入比色杯,在 540nm 测定吸光度。将溶血百分比表示为 A_{540} 样品 / 经 1％ Triton X-100 处理的 RBC 的 A_{540}(对照组 100％裂解)。结果显示,单独的 PRx0729v6(图 8A) 或 PRx0729v6/s i RNA 复合物 (图 8B) 在 pH 7.4 下是非溶血性的,而在与内体相关的较低 pH 值和较高聚合物浓度下逐步变得更具溶血性。

[0516] 实施例 15 :聚合物 PRx0729v6 的透射电子显微镜检查 (TEM) 分析 (图 9)

[0517] 本实施例使用电子光谱法提供了聚合物 PRx0729v6 形成球形胶束样颗粒的证据。

[0518] 将聚合物 PRx0729v6 在 PBS 中的 0.5mg/mL 溶液施用于碳涂敷的铜载网 30 分钟。将该网在 Karnovsky 溶液中固定，用二甲基胂酸盐缓冲液洗涤一次，然后用水洗涤 8 次。用乙酸双氧铀的 6％溶液将该网染色 15 分钟，然后干燥至分析为止。用 JEOL 显微镜进行透射电子显微镜检查 (TEM)。图 9 显示了聚合物 PRx0729v6 的典型电子显微照片，证实了具有与通过动态光散射法在溶液中测定的胶束芯预期尺寸近似大小的球形颗粒。

[0519] 实施例 16. 聚合物 -siRNA 复合物的细胞摄取和胞内分布的荧光显微镜检查 (图 10)

[0520] 本实施例显示聚合物 PRx0729v6 可以介导比基于脂质的转染试剂更有效的荧光标记 s i RNA 的细胞摄取和内体释放。

[0521] 将 HeLa 细胞在 Lab-Tek II 分室盖玻片上铺板。过夜孵育后，用 100nM FAM-siRNA/lipofectamine 2000 或 100nM FAM-s iRNA 以聚合物 -siRNA 4 ： 1 的电荷比转染细胞。复合物在 PBS pH 7.4 中以 5X 浓度形成 30 分钟，将其加入到细胞中达最终 1X 浓度，孵育过夜。用 DAPI (用于使核显影) 染色细胞 10 分钟，然后在 3.7％甲醛 -1X PBS 中固定 5 分钟，用 PBS 洗涤。用 Zeiss Axiovert 荧光显微镜使样品成像。图 10B 显示与 lipofectamine (图 10A) 相比而言聚合物 -siRNA 的细胞摄取和胞内分布的荧光显微镜检查。lipofectamine-siRNA 复合物的颗粒染色启示了内体定位，而聚合物 -siRNA 复合物的弥散性胞质染色显示它们已经从内体释放入胞质。

[0522] 实施例 17. 小的疏水性分子被摄入聚合物 PRx0729v6 胶束

[0523] 本实施例显示小的疏水性分子被聚合物 PRx0729v6 的主要疏水性胶束芯摄入。

[0524] 通过使用芘 ($C_{15}H_{10}$、MW ＝ 202) 的荧光探针技术证实具有或不具有 siRNA 的聚合物胶束的形成，其中可以使用芘光谱的 2 个发射最大值之比确定芘在胶束芯中的分配。使用 395nm 的固定激发波长与恒定芘浓度 $6x10^{-7}$M 测定 300-360nm 下聚合物胶束溶液中芘的荧光发射光谱。在有或没有 100nM siRNA 的情况下聚合物在 0.001％至 20％ (w/w) 之间变化。使用 Varian 荧光分光光度计获取光谱数据。全部荧光实验均在 25℃进行。通过绘制作为聚合物浓度函数的强度比 I_{336}/I_{333} 的图确定临界胶束浓度 (CMC)。CMC 值经计算为约 2μg/ml。

[0525] 类似地，如下将模型小分子药物双嘧达莫 (2-{[9-(双 (2- 羟乙基) 氨基)-2,7- 双 (1- 哌啶基)-3,5,8,10- 四氮杂双环 [4.4.0] 癸 -2,4,7,9,11- 戊烯 -4- 基]-(2- 羟乙基) 氨基 } 乙醇 ；$C_{24}H_{40}N_8O_4$，MW ＝ 505) 掺入 PRx0729v6 的胶束芯。将聚合物 (1.0mg) 和双嘧达莫 (DIP) (0.2mg) 溶于 THF(0.5mL)。滴加去离子水 (10mL)，将该溶液在 50℃搅拌 6 小时以将药物掺入胶束的疏水性芯，分开该溶液 (2.5mL)，在 25 和 37℃通过 UV-vis 光谱法在 415nm 测定双嘧达莫的吸光度。还通过测定在没有共聚物存在时去离子水中的双嘧达莫吸光度的时间依赖性减小进行对照品测量。对每一时间点测定 25 和 37℃的吸光度，从在该溶液中观察到的值中扣除该值。

[0526] 实施例 18. pH 对聚合物结构的影响 (图 11)

[0527] 本实施例显示聚合物 PRx0729v6.2 的胶束结构在 pH 从 7.4 降至 4.7 时解离。

[0528] 通过在 pH 7.4 以及低至 pH4.7 的一系列酸性 pH 值下在 PBS 中以从 0.5mg/mL 到 0.004mg/mL 的 5- 倍连续稀释度进行动态光散射法测定聚合物 PRx0729v6.2 的粒度。图 11A 显示在 pH 7.4，聚合物在低至 4μg/ml 的稀释稳定，而在 4μg/ml 开始解离成产生聚集物的

形式。图 11B 显示在增加的酸性 pH 值（低至 pH 4.7）时，聚合物从胶束结构的解离得到促进，即以较高聚合物浓度发生，产生增加水平的 1-8nm 大小的聚合物单体。

[0529] 实施例 19：靶向配体和多核苷酸与共聚物缀合的方法

[0530] 下列实施例显示靶向配体（例如半乳糖）或多核苷酸治疗剂（例如 siRNA）与二嵌段共聚物的缀合方法。(1) 使用可逆添加断裂链转移 (RAFT) 制备聚合物 (Chiefari 等人 Macromolecules. 1998；31(16)：5559-5562)，以便使用具有半乳糖作为 R- 基团取代基的链转移剂形成半乳糖末端官能化的二嵌段共聚物。(2) 将二嵌段共聚物的第一嵌段制备成包含甲基丙烯酸 -N- 羟基琥珀酰亚胺 (MAA(NHS)) 的共聚物，其中半乳糖 -PEG- 胺与 NHS 基团缀合，或其中氨基 - 二硫化 siRNA 与 NHS 缀合，或其中吡啶基二硫化胺与 NHS 基团反应，形成吡啶基二硫化物，其随后与硫氢基化 RNA 反应，形成聚合物 -RNA 缀合物。

[0531] 实施例 19.1：半乳糖 -PEG- 胺和半乳糖 -CTA 的制备

[0532] 反应路线 1 示例半乳糖 -PEG- 胺（化合物 3）和半乳糖 -CTA（链转移剂）（化合物 4）的合成反应路线。

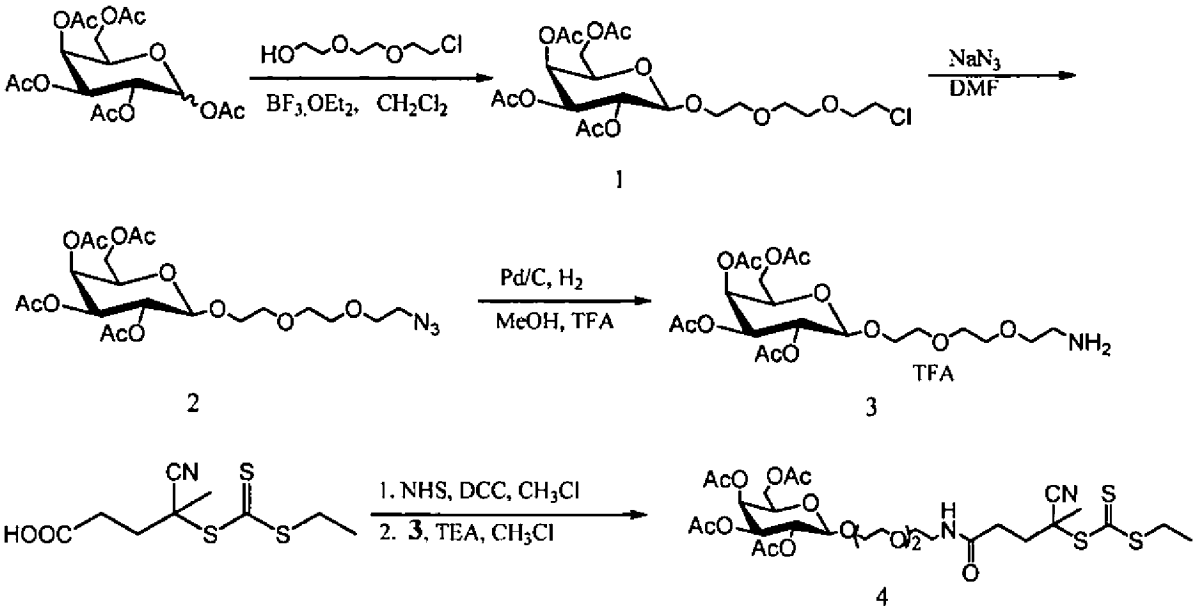
[0533] 化合物 1：将半乳糖五乙酸酯 (10g、25.6mmol) 和 2-[2-(2- 氯乙氧基）乙氧基］乙醇 (5.6mL、38.4mmol) 溶于无水 CH_2Cl_2(64mL)，将该反应混合物在 RT 搅拌 1 小时。在 1 小时内在冰浴中将 $BF_3.OEt_2$(9.5ml、76.8mmol) 滴加到上述混合物中。将该反应混合物在室温 (RT) 搅拌 48 小时。反应后，加入 30mL CH_2Cl_2 以稀释该反应体系。用饱和 $NaHCO_3$（水溶液）中和有机层，用盐水洗涤，然后用 $MgSO_4$ 干燥。减压除去 CH_2Cl_2，得到粗产物。通过闪蒸柱色谱法纯化粗产物，得到终产物 1，为淡黄色油状物。收率：55％ TLC(I_2 和对 - 茴香醛）：EA/Hex：1/1(Rf：β ＝ 0.33；α ＝ 0.32；未反应的 S.M 0.30)。

[0534] 化合物 2：将化合物 1(1.46g、2.9mmol) 溶于无水 DMF(35mL)，在 RT 将 NaN_3(1.5g、23.2mmol) 加入到该混合物中。将该反应混合物加热至 85-90℃过夜。反应后，将 EA(15mL) 加入到该溶液中，水 (50mL) 用于洗涤有机层 5 次。用 $MgSO_4$ 干燥有机层，通过闪蒸柱色谱法纯化，得到化合物 2，为无色油状物。收率：80％、TLC(I_2 和对 - 茴香醛）：EA/Hex：1/1(Rf：0.33)。

[0535] 化合物 3：将化合物 2(1.034g、2.05mmo 1) 溶于 MeOH(24mL)，用 N_2 发泡 10 分钟，然后将 Pd/C(10％）(90mg) 和 TFA(80uL) 加入到上述溶液中。用 H_2 使该反应混合物再发泡 30 分钟，然后在 RT 下、在 H_2 气氛中将该反应体系再搅拌 3 小时。用 C 盐除去 Pd/C，蒸发 MeOH，得到化合物 3，为粘稠凝胶。化合物 3 可以不经进一步纯化而使用。收率：95％．TLC（对 - 茴香醛）：MeOH/CH_2Cl_2：1/4(Rf：0.05)。

[0536] 化合物 4：在 0℃下将 ECT(0.5g、1.9mmol)、NHS(0.33g、2.85mmol) 和 DCC(0.45g、2.19mmol) 溶于 $CHCl_3$(15mL)。将该反应混合物在 RT 连续搅拌过夜。在 0℃向上述反应体系中缓慢加入在 $CHCl_3$(10mL) 中的化合物 3(1.13g、1.9mmol) 和 TEA(0.28mL、2.00mmol)。将该反应混合物在 RT 连续搅拌过夜。减压除去 CH_3Cl，通过闪蒸柱色谱法纯化粗产物，得到化合物 4，为黄色凝胶。收率 (35％）。TLC：MeOH/CH_2Cl_2：1/9(Rf：0.75)。

[0537]



[0538] 反应路线 1. 半乳糖 -PEG- 胺（化合物 3）和半乳糖 -CTA（化合物 4）的合成

[0539] 实施例 19.2 :[DMAEMA]-[BMA-PAA-DMAEMA] 的合成

[0540] A. DMAEMA macroCTA 的合成

[0541] 聚合 :在 20mL 玻璃小瓶（带有隔离帽）中加入 33.5mg ECT(RAFTCTA)、2.1mg AIBN（从甲醇中重结晶 2 次）、3.0g DMAEMA(Aldrich、98％，使用前过小的氧化铝柱，以除去抑制剂）和 3.0g DMF（高纯度，不含抑制剂）。用隔离帽封闭玻璃小瓶，用干燥氮气净化（在搅拌下在冰浴中进行）30 分钟。在 70℃将反应小瓶放入预加热的反应块。将该反应混合物搅拌 2 小时 40 分钟。打开隔离帽，在冰浴中将小瓶内的混合物搅拌 2-3 分钟以终止聚合反应。

[0542] 纯化 :将 3mL 丙酮加入到反应混合物中。在 300mL 烧杯中加入 240mL 己烷和 60mL 乙醚 (80/20(v/v))，在搅拌下将该反应混合物滴加到烧杯中。最初产生油状物，通过旋降混浊溶液收集 ;收率＝ 1.35g(45％）。从丙酮溶液中进行几次己烷 / 乙醚 (80/20(v/v)) 混合溶剂中的沉淀（例如 6 次）。最终在 RT 真空干燥聚合物 8 小时 ;收率～ 1g。

[0543] 概述 :($M_{n,理论}$＝ 11,000g/mol，45％转化率）

[0544]

名称	FW (g/mol)	当量	mol	重量	实际重量
DMAEMA	157.21	150	0.0191	3.0 g	3.01 g
ECT	263.4	1	$1.2722x10^{-4}$	33.5 mg	33.8 mg
AIBN	164.21	0.1	$1.2722x10^{-5}$	2.1 mg	2.3 mg

[0545] DMF ＝ 3.0g ;N_2 净化 :30min ;在 70℃进行聚合 2 小时 45 分钟。

[0546] B. 由 DMAEMA macroCTA 合成 [BMA-PAA-DMAEMA]

[0547] 除非另有指定，否则全部化学品和试剂购自 Sigma-AldrichCompany。使甲基丙烯酸丁酯 (BMA)(99％）、甲基丙烯酸 2-（二甲氨基）乙酯 (DMAEMA)(98％）通过碱性氧化铝柱 (150 目），以除去聚合抑制剂。采购不含抑制剂的 2- 丙基丙烯酸 (PAA)（＞ 99％）并且原样使用。使偶氮（双异丁腈 (AIBN)(99％）从甲醇中重结晶，真空干燥。合成 DMAEMA macroCTA，如上所述纯化 (Mn ～ 10000 ;PDI-1.3 ;＞ 98％）。N,N- 二甲基甲酰胺 (DMF)(99.99％）（购自 EMD) 为试剂级并且原样使用。己烷、戊烷和乙醚购自 EMD 并且原样用于聚合物纯化。

[0548] 聚合 :在密封小瓶中、在氮气气氛中加入 BMA(2.1g、14.7mmoles)、PAA(0.8389g、

7.5mmoles)、DMAEMA(1.156g、7.35mmoles)、MacroCTA(0.8g、0.0816mmoles)、AIBN(1.34mg、0.00816mmoles;CTA ： AIBN 10 ： 1) 和 DMF(5.34ml)。使用的 CTA ：单体比为 1 ： 360(推定 50％转化率)。单体浓度为 3M。然后通过使氮气进入该混合物发泡 30 分钟给该混合物脱气,然后放入加热块(温度计 :67℃;显示 :70-71 ;搅拌速度 300-400rpm)。将该反应体系静置 6 小时,然后通过将小瓶放入冰和使该混合物接触空气而使反应停止。

[0549] 纯化 :将聚合物纯化从丙酮 /DMF 1 ： 1 到己烷 / 乙醚 75/25 进行 (3 次)。将得到的聚合物真空干燥至少 18 小时。NMR 光谱显示高纯度聚合物。未观察到乙烯基。将该聚合物从乙醇对双去离子水透析 4 天,然后冻干。通过凝胶渗透色谱法 (GPC)、使用如下条件分析该聚合物 :溶剂 :DMF/LiBr 1％ ;流速 :0.75ml/ 分钟。注射体积 :100ul。

[0550] 柱温 :60℃。聚 (苯乙烯) 用于校准检测器。得到的聚合物的 GPC 分析 :Mn ＝ 40889g/mol ;PDI ＝ 1.43 ;dn/dc ＝ 0.049967。

[0551] 实施例 19.3.gal-[DMAEMA]-[BMA-PAA-DMAEMA] 的合成

[0552] 如实施例 19.2 所述进行合成。首先,制备半乳糖 -DMAEMAmacroCTA(实施例 19.2.A.),只是使用半乳糖 -CTA(实施例 19.1、化合物 4) 替代 ECT 作为链转移剂。这导致合成具有末端官能化半乳糖的聚 DMAEMA(图 13)。然后半乳糖 -[DMAEMA]-macro-CTA 如实施例 19.2.B 所述用于合成第二嵌段 [BMA-PAA-DMAEMA]。合成后,通过在 pH 8.5 的 100mM 碳酸氢钠缓冲液中孵育 2 小时除去半乳糖上的乙酰基保护基,然后透析,冻干。NMR 光谱法用于证实聚合物上存在脱保护的半乳糖。

[0553] 实施例 19.4.[PEGMA-MAA(NHS)]-[B-P-D] 和 DMAEMA-MMA(NHS)-[B-P-D] 二嵌段共聚物的制备和表征

[0554] 图 14 中概述了 [PEGMA-MAA(NHS)]-[B-P-D] 聚合物的合成,其中第一嵌段中单体的共聚物比为 70 ： 30,并且图 15 概述了 [PEGMA-MAA(NHS)]-[B-P-D] 聚合物的表征,其中第一嵌段中单体的共聚物比为 70 ： 30。

[0555] 实施例 19.5. 半乳糖 -PEG- 胺与 PEGMA-MAA(NHS) 缀合产生 [PEGMA-MAA(Gal)]-[B-P-D] 聚合物

[0556] 图 16 示例半乳糖官能化的 DMAEMA-MAA(NHS) 或 PEGMA-MAA(NHS) 二嵌段共聚物的制备。将聚合物 [DMAEMA-MAA(NHS)]-[B-P-D] 或 [PEGMA-MAA(NHS)]-[B-P-D] 以 1-20mg/mL 的浓度溶于 DMF。用 1-2 当量的三乙胺中和如实施例 19.1(化合物 3) 所述制备的半乳糖 -PEG- 胺,以 5 ： 1 的胺 ： 聚合物之比加入到该反应混合物中。反应在 35℃进行 6-12 小时,然后添加等体积的丙酮,对去离子水透析,进行 1 天,冻干。

[0557] 实施例 19.6.siRNA 与 PEGMA-MAA(NHS)]-[B-P-D] 缀合产生 [PEGMA-MAA(RNA)]-[B-P-D] 聚合物

[0558] 图 17A 和图 17B 显示 2 种修饰的 s i RNAs 的结构,其可以与包含 NHS 的聚合物缀合。siRNAs 获自 Agilent(Boulder、CO)。图 17C 显示用于衍生包含 NHS 的聚合物,得到二硫基反应基团用于缀合硫氢基化 RNA 的吡啶基二硫化胺的结构 (图 17B)。

[0559] 包含 NHS 的聚合物与氨基 - 二硫基 -siRNA 的反应。该反应在由有机溶剂 (例如 DMF 或 DMSO 或混合溶剂 DMSO/ 缓冲液 pH 7.8) 组成的标准条件下在 35℃进行 4-8 小时,然后添加等体积的丙酮,对去离子水透析 1 天,冻干。

[0560] 包含 NHS 的聚合物与吡啶基 - 二硫化物 - 胺的反应和与硫氢基化 siRNA 的反应。

进行吡啶基二硫化胺与包含 NHS 的聚合物的反应。然后将冻干的聚合物以 50mg/mL 溶于乙醇，用 pH8 的碳酸氢钠缓冲液稀释 10- 倍。在 35℃将硫氢基化 siRNA（图 16B）以 2-5 摩尔过量在聚合物 NHS 基团上反应 4-8 小时，然后对 pH 7.4 磷酸盐缓冲液透析。

[0561] 实施例 21.7. 治疗性肽与吡啶基二硫化物修饰的聚合物的缀合

[0562] 还可将实施例 21.6 中描述的吡啶基二硫化物修饰的聚合物 PEGMA-MAA(NHS)]-[B-P-D] 用于与治疗性肽缀合（图 17D）。合成所述肽，制备其用于缀合，并且如下所述进行缀合反应以产生 [PEGMA-MAA（肽）]-[B-P-D] 聚合物。

[0563] 将与肽转导结构域肽转运子（t ransportin)（也称为触角足肽 (Antennapedia peptide)(Antp)）序列的融合用于合成含有羧基末端半胱氨酸残基的 Bak-BH3 肽 (Antp-BH3)(NH2-RQIKIWFQNRRMKWKKMGQVGRQLAIIGDDINRRYDSC-COOH) 的细胞内化形式。为了确保用于缀合的游离硫氢基，在水中重建肽，并且用固定在琼脂糖凝胶内的二硫化物还原剂 TCEP 处理 1 小时。然后将还原的肽 (400μM) 与吡啶基二硫化物末端官能化的聚合物在含有 5mM 乙二胺四乙酸 (EDTA) 的磷酸盐缓冲液 (pH7) 中反应 24 小时。

[0564] 吡啶基二硫化物聚合物末端基团与肽半胱氨酸的反应产生 2- 吡啶基硫酮，可通过分光光度计测量来鉴定缀合效率。为了进一步证实二硫化物交换，将缀合物在 SDS-PAGE 16.5％三（羟甲基）甲基甘氨酸凝胶上进行电泳。平行用固定的 TCEP 处理缀合反应的等分部分，然后上 SDS-PAGE，以验证在还原环境中肽从聚合物中释放。

[0565] 缀合反应以聚合物 / 肽化学计量比为 1、2 和 5 进行。343nm 下对 2- 吡啶基硫酮释放的 UV 分光光度吸光度测量值指示了缀合效率。SDSPAGE 凝胶用于进一步表征肽 - 聚合物缀合物。在聚合物 / 肽摩尔比为 1 时有可检测量的肽通过末端半胱氨酸经二硫桥接形成二聚体。然而，偏好的是形成吡啶基二硫化物的硫氢基反应，在聚合物 / 肽比率等于或大于 2 时不再看到游离肽条带。通过用还原剂 TCEP 处理缀合物，有可能切割聚合物 - 肽二硫键，如由此类样品中肽条带的出现所表明的。

聚合物	结构 $[D]_{MW_1}$-$[B_x$-P_y-$D_z]_{MW_2}$	Mn Kda	嵌段比例 MW_2/MW_1
P7v1	$[D]_{9.1K}$-$[B_{48}$-P_{29}-$D_{23}]_{11.37K}$	19	1.2
P7v2	$[D]_{10K}$-$[B_{46}$-P_{18}-$D_{37}]_{8.9K}$	19	0.9
P7v3	$[D]_{6.5K}$-$[B_{41}$-P_{39}-$D_{20}]_{9.5K}$	16	1.5
P7v6	$[D]_{9.1K}$-$[B_{52}$-P_{26}-$D_{22}]_{21.9K}$	31	2.4

x, y和z是摩尔%。分子量是使用PMMA标准通过凝胶渗透色谱法测定的。组成是通过NMR光谱法测定的。

图 1A

聚合物	第一嵌段			第二嵌段					
	Mn (kDa)	PDI	%PEGMA	%DMAEMA	Mn (kDa)	PDI	%BMA	%DMAEMA	%PAA
P7-PEGMA100	22.24	1.34	100	0	45.5	1.48	50	28	22
P7-PEGMA20	11.44	1.33	17	83	41.0	1.52	56	23	21
P7-PEGMA10	11.01	1.31	10	90	42.0	1.42	51	23	26
P7-PEGMA5	10.60	1.17	5	95	27.1	1.27	-	-	-
P7-PEGMA-50-	14.50	1.35	46	54	38.1	1.44	55	25	20
P7-PEGMA-50-	24.25	1.23	47	53	38.4	1.45	52	23	25

图 1B

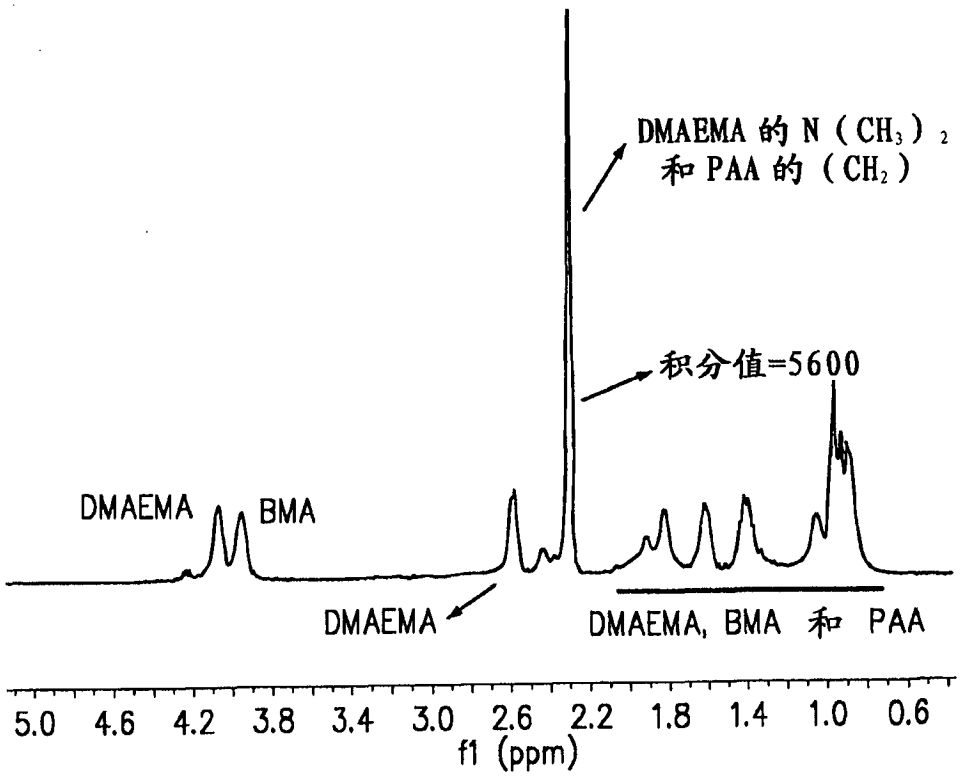

DMAEMA 的 N（CH_3）$_2$
和 PAA 的（CH_2）
积分值=5600
DMAEMA
BMA
DMAEMA
DMAEMA, BMA 和 PAA
5.0 4.6 4.2 3.8 3.4 3.0 2.6 2.2 1.8 1.4 1.0 0.6
f1 (ppm)

图 2A

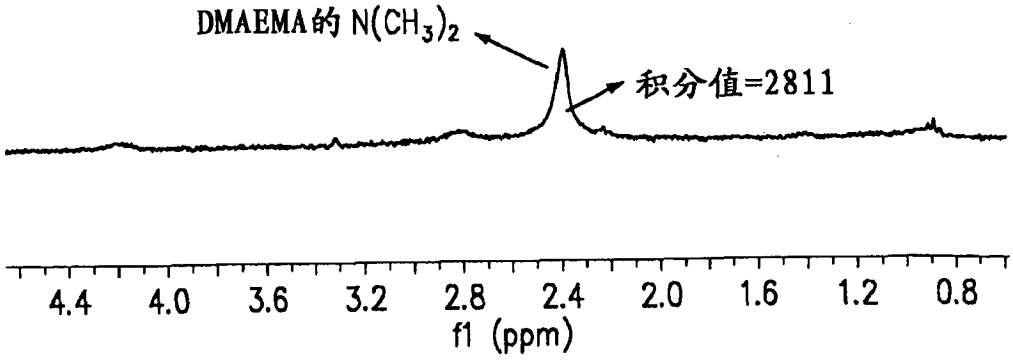

DMAEMA的 $N(CH_3)_2$
积分值=2811
4.4 4.0 3.6 3.2 2.8 2.4 2.0 1.6 1.2 0.8
f1 (ppm)

图 2B

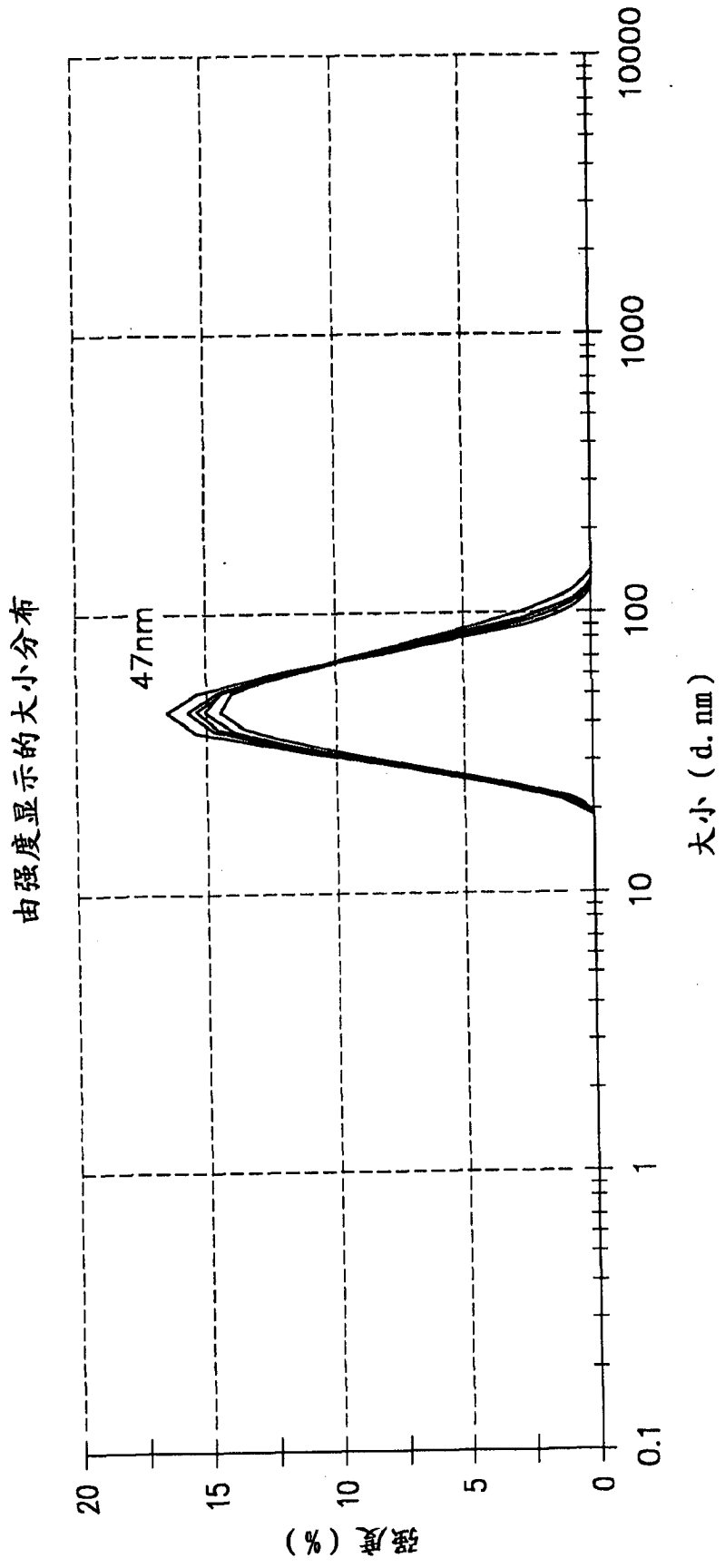


图 3

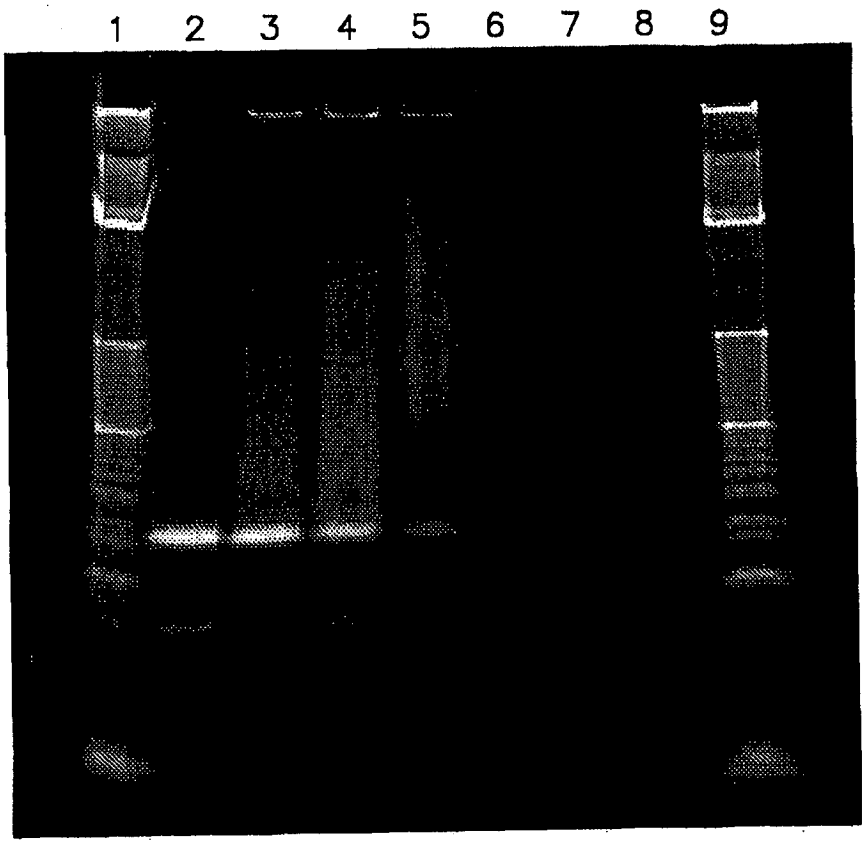

1 2 3 4 5 6 7 8 9
PRx0729v6+5μM siRNA
siRNA 0.13 0.27 0.54 1.1 2.1 4.3 ug/ul
单独 0.5:1 1:1 2:1 4:1 8:1 16:1

图 4

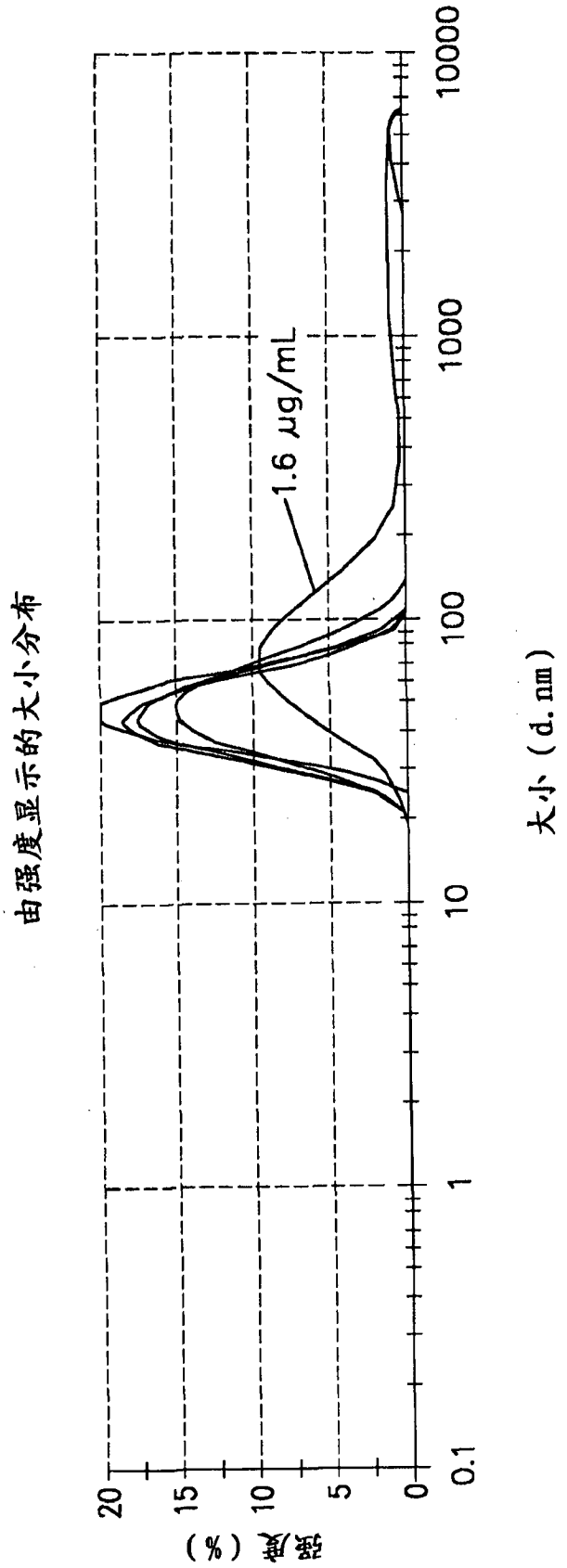


图 5

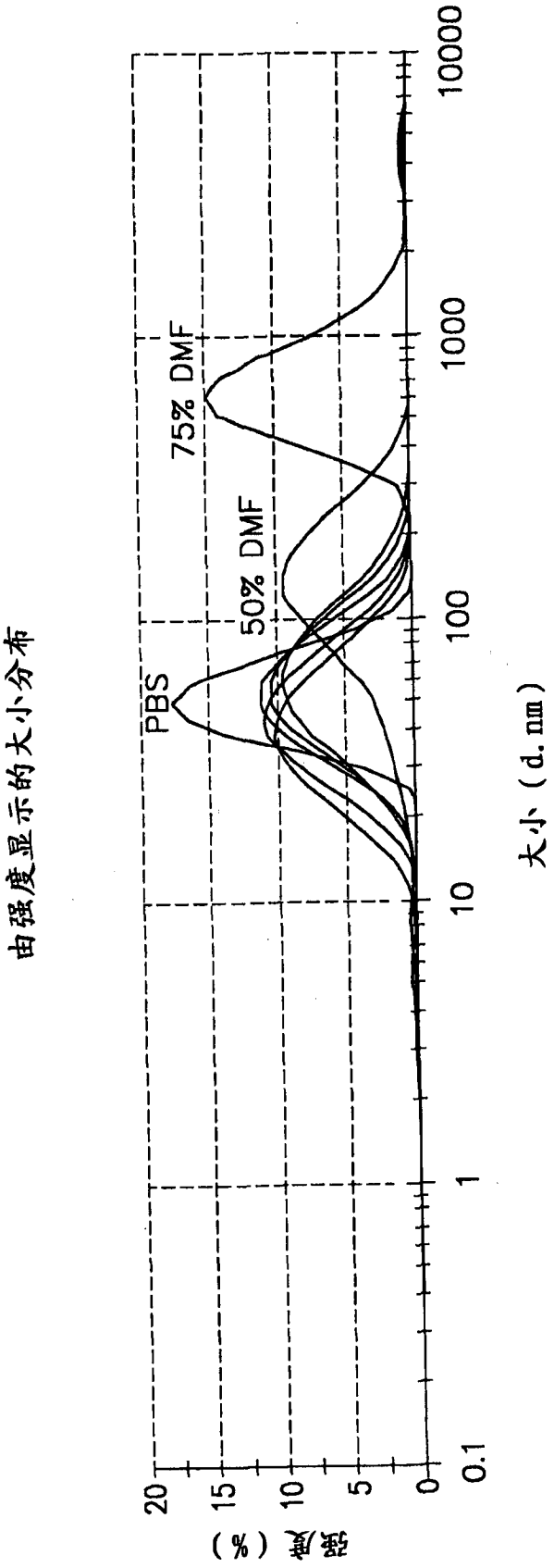

由强度显示的大小分布
强度（%）
20
15
10
5
0
0.1
1
10
100
1000
10000
大小（d.nm）
PBS
50% DMF
75% DMF

图 6

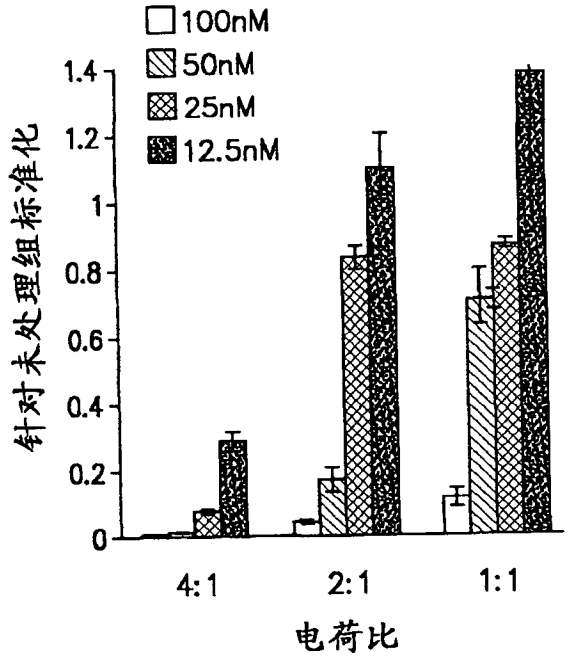

100nM
50nM
25nM
12.5nM
针对未处理组标准化
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
4:1
2:1
1:1
电荷比

图 7A

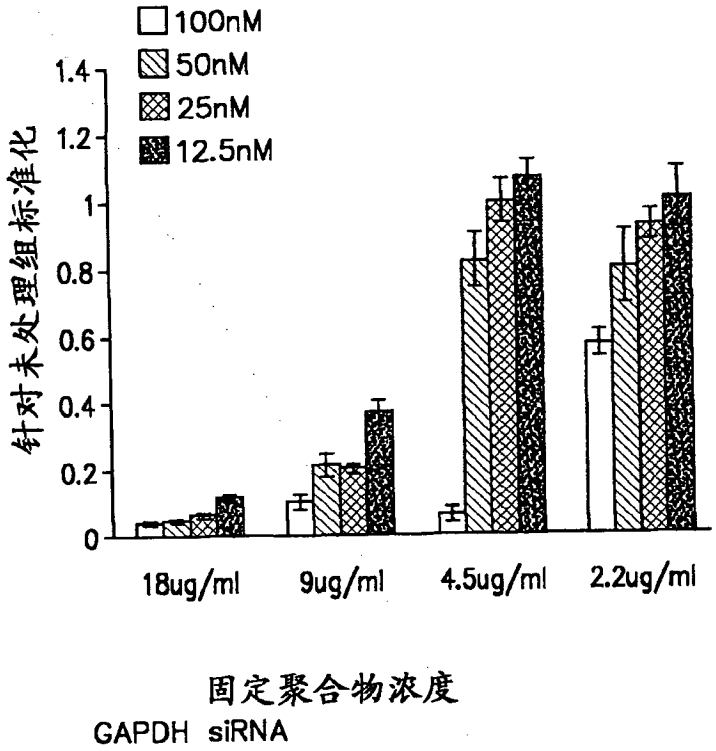

100nM
50nM
25nM
12.5nM
针对未处理组标准化
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
18ug/ml
9ug/ml
4.5ug/ml
2.2ug/ml
固定聚合物浓度
GAPDH siRNA

图 7B

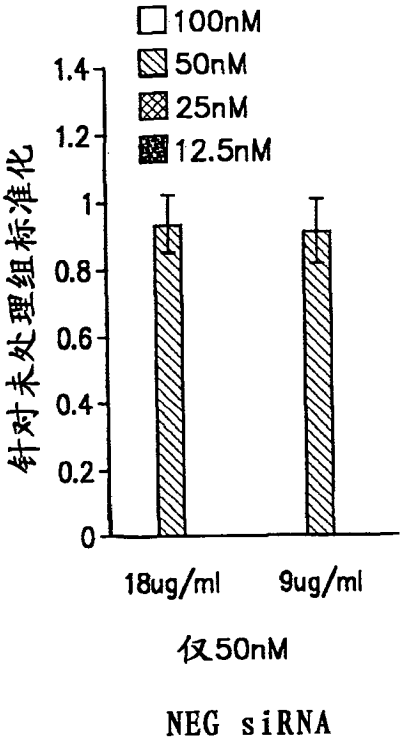

100nM
50nM
25nM
12.5nM
针对未处理组标准化
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
18ug/ml
9ug/ml
仅50nM
NEG siRNA

图 7C

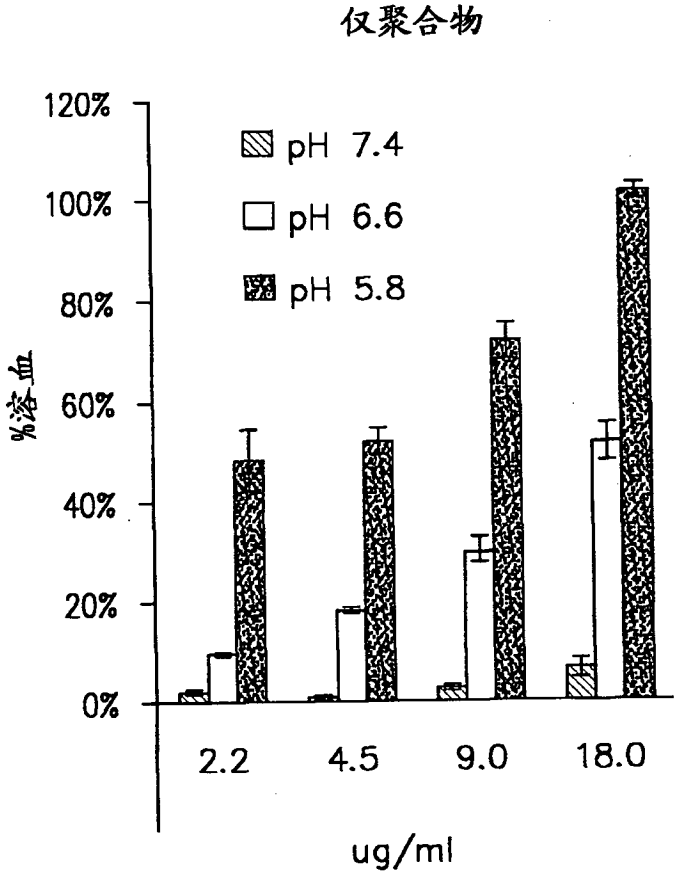


图 8A

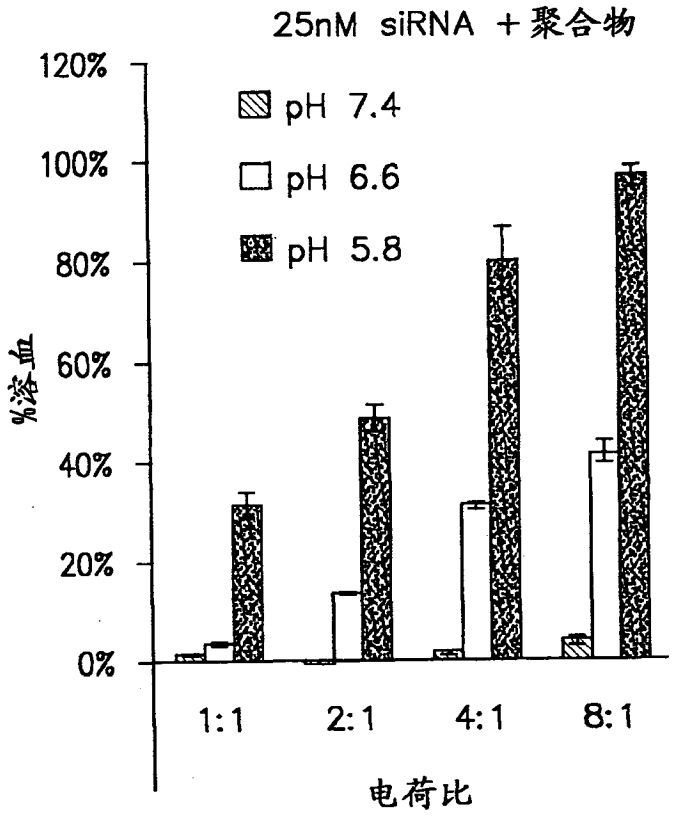

25nM siRNA +聚合物
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
%溶血
pH 7.4
pH 6.6
pH 5.8
1:1
2:1
4:1
8:1
电荷比

图 8B

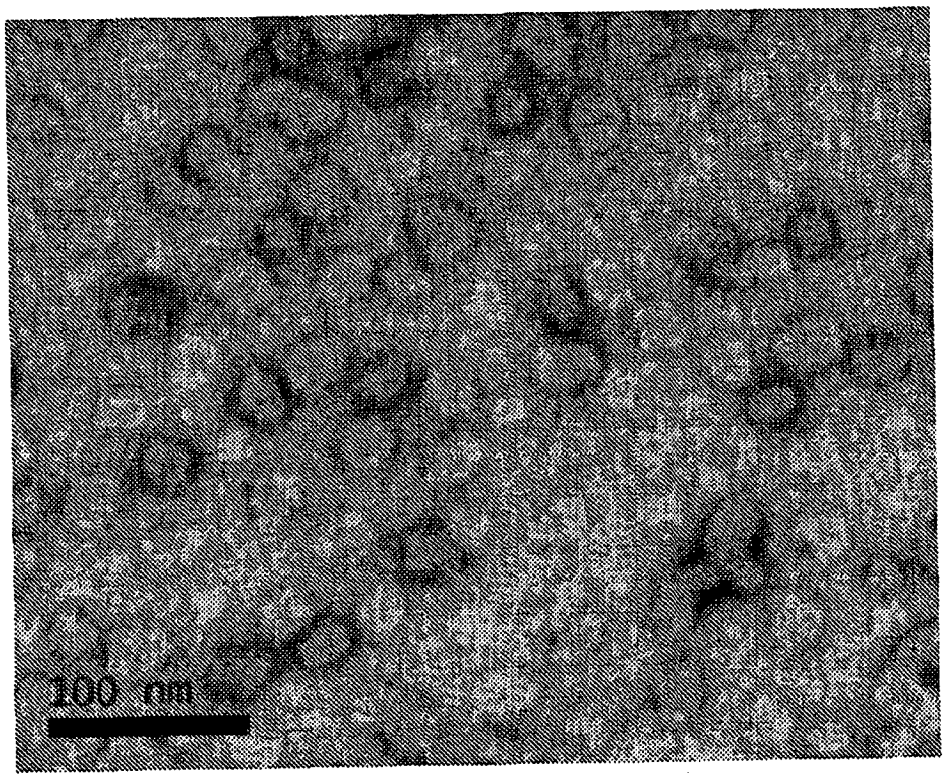


图 9



图 10A

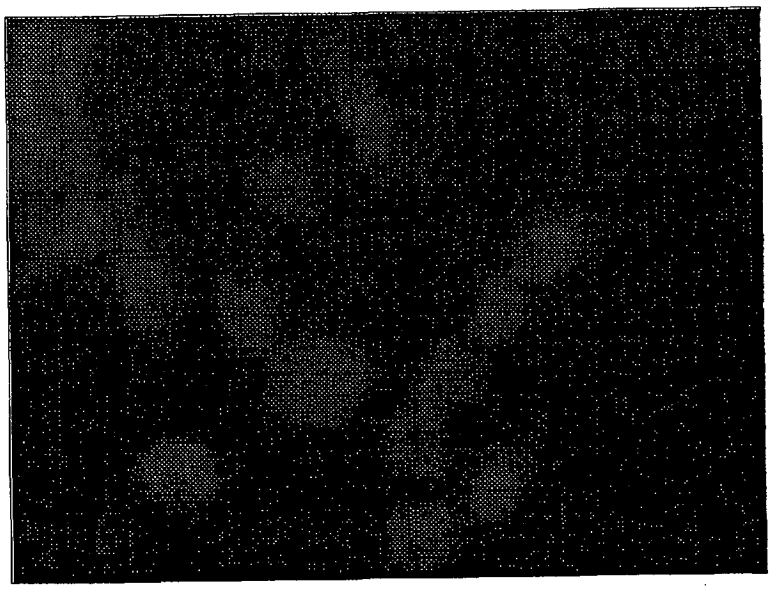


图 10B

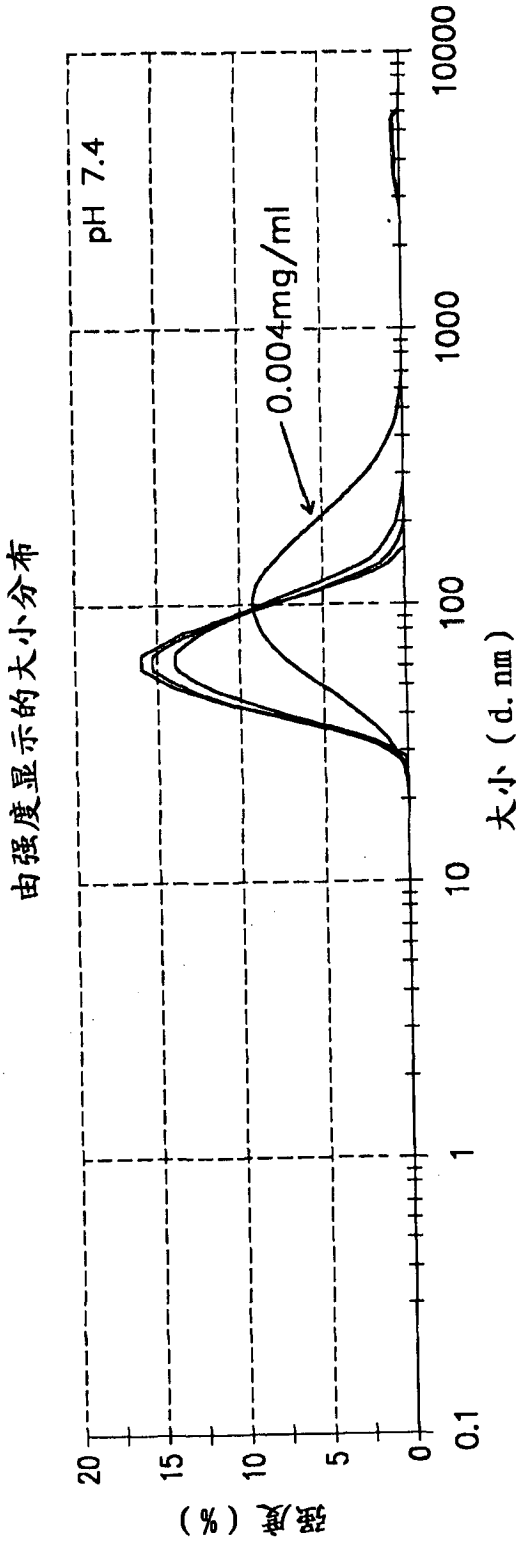

由强度显示的大小分布
pH 7.4
0.004mg/ml
强度（%）
大小（d.nm）
0
5
10
15
20
0.1
1
10
100
1000
10000

图 11A

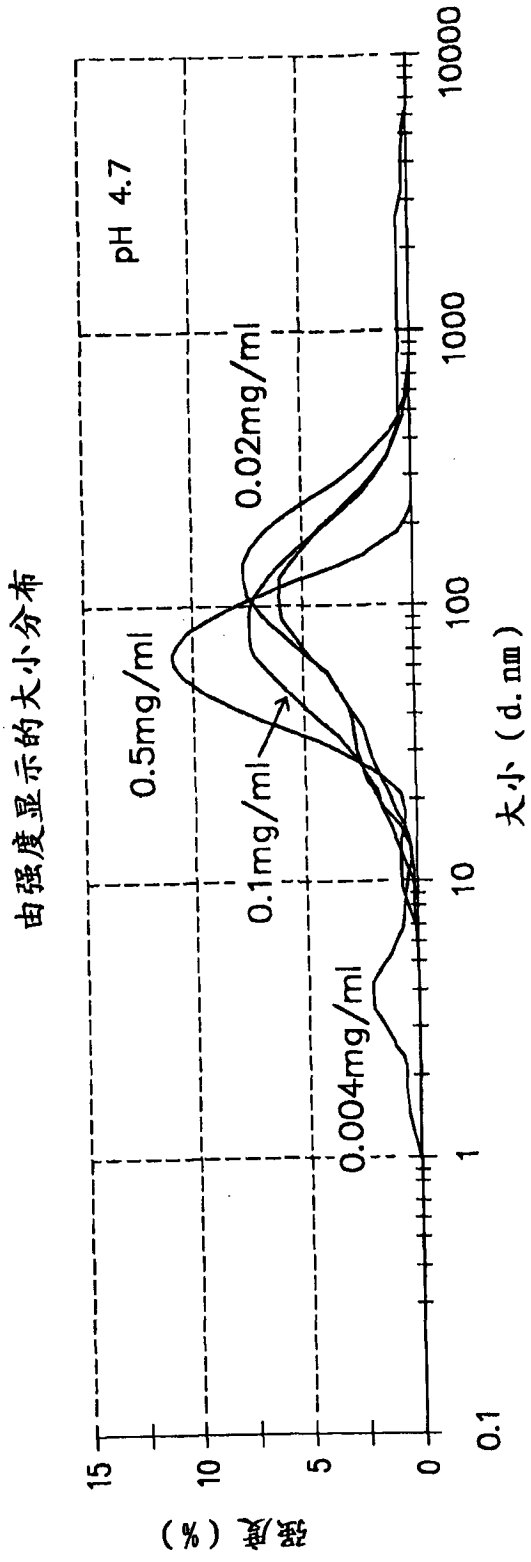

由强度显示的大小分布
pH 4.7
0.5mg/ml
0.02mg/ml
0.1mg/ml
0.004mg/ml
强度（%）
大小（d.nm）
0
5
10
15
0.1
1
10
100
1000
10000

图 11B

聚合物浓度和电荷比

	100 nM	50 nM	25 nM	12.5 nM
4:1	36 ug/ml	18 ug/ml	9 ug/ml	4.5 ug/ml
2:1	18 ug/ml	9 ug/ml	4.5 ug/ml	2.2 ug/ml
1:1	9 ug/ml	4.5 ug/ml	2.2 ug/ml	1.1 ug/ml
18 ug/ml	2:1	4:1	8:1	16:1
9 ug/ml	1:1	2:1	4:1	8:1
4.5 ug/ml	0.5:1	1:1	2:1	4:1
2.2 ug/ml	0.25:1	0.5:1	1:1	2:1

图 12A

%敲低结果

100 nM	50 nM	25 nM	12.5 nM
99%	98%	92%	71%
95%	82%	16%	-10%
88%	28%	13%	-38%
96%	95%	93%	88%
89%	78%	79%	63%
94%	18%	0%	-7%
43%	19%	7%	0%

图 12B

半乳糖末端官能化的聚[DMAEMA]-macro CTA

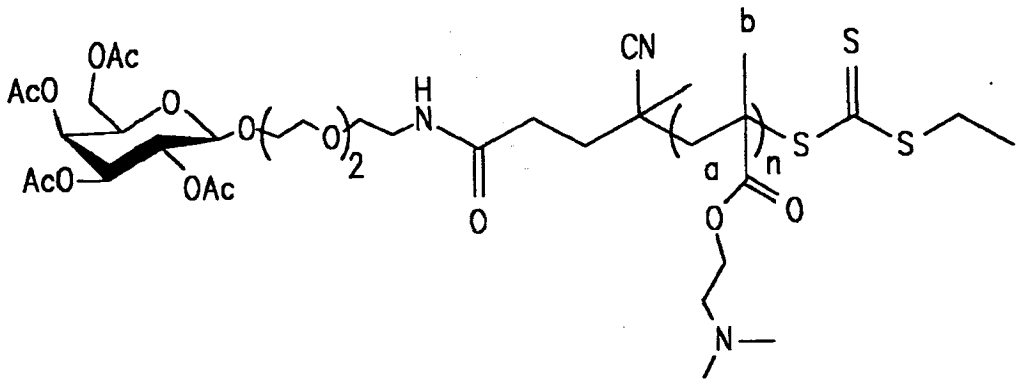


图 13

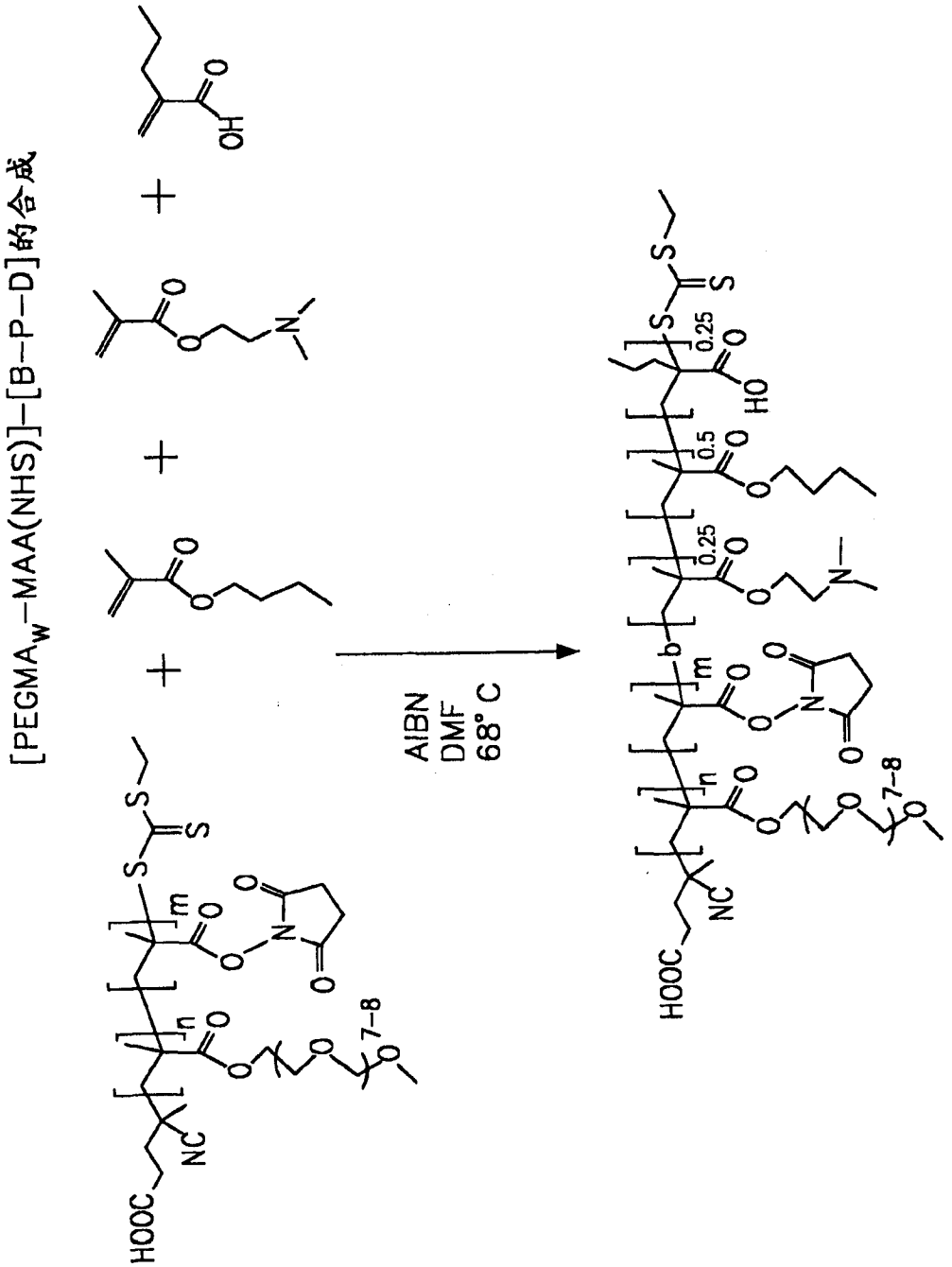


图 14

PEGMA和MAA-NHS的RAFT共聚合

[PEGMA]:[MAA-NHS]=75:25

名称	FW(g/mol)	EQUIV.	mol	重量	真实重量
PEGMA	475	112.5	5.5958×10^{-3}	2.658g	2.6641g
MAA-NHS	183.16	37.5	1.8672×10^{-3}	0.342g	0.3422g
ECT	263.4	1	4.9740×10^{-5}	13.1mg	13.8mg
AIBN	164.21	0.04	1.9896×10^{-6}	0.33mg	0.34mg

DMF=3.0 g;N_2净化：30 min;在68℃进行聚合，聚合时间=2h 5m。使用分子量截留膜2K,将共聚物对甲醇（1L×8）透析；在通风橱中除去甲醇，真空干燥3小时，最后冻干3小时。

图15A

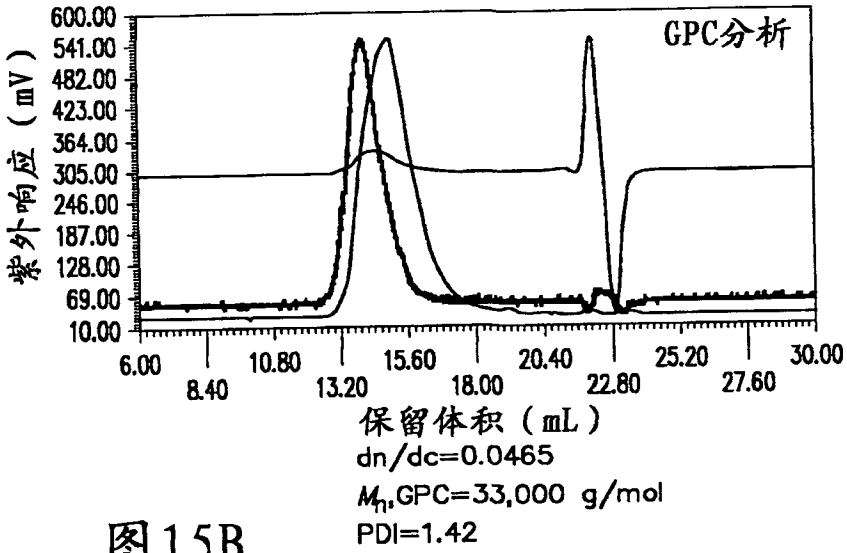


图15B

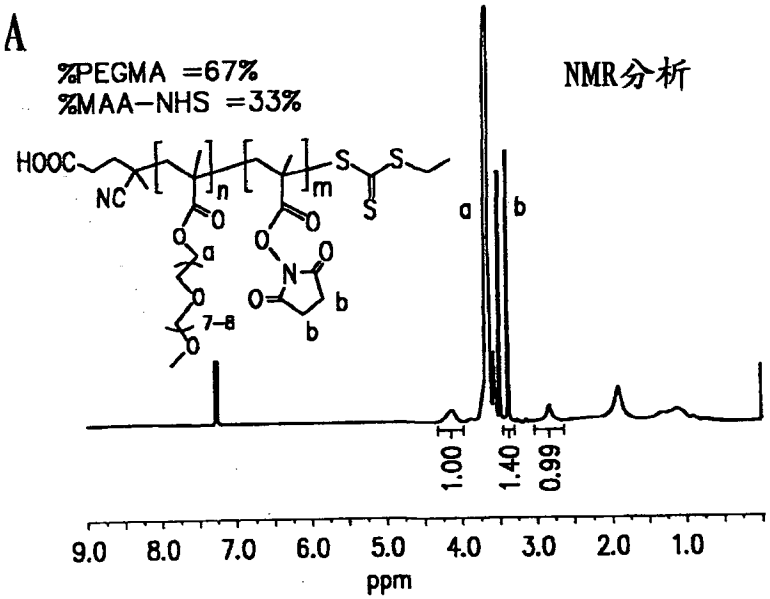


图15C

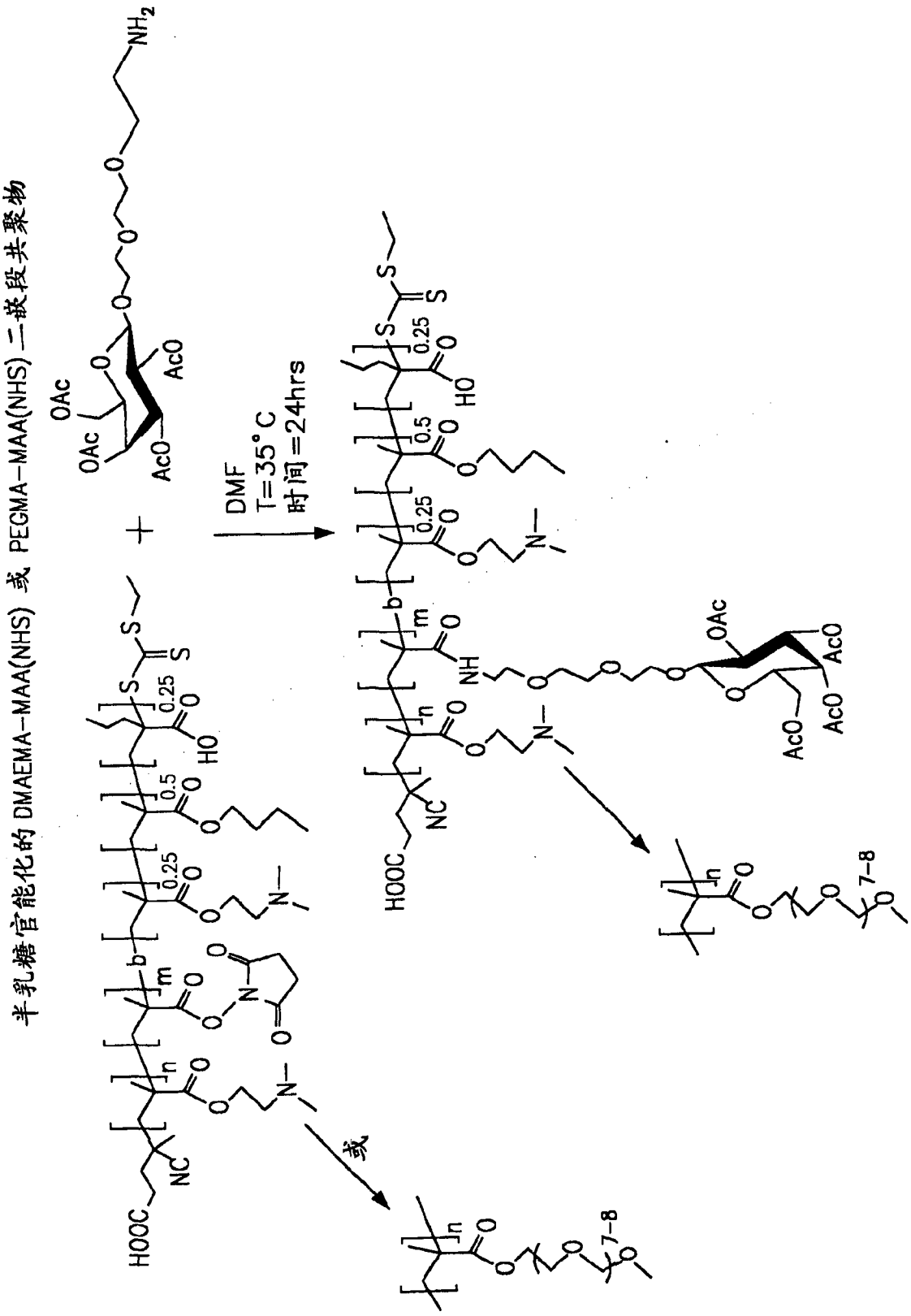

半乳糖官能化的 DMAEMA-MAA(NHS) 或 PEGMA-MAA(NHS) 二嵌段共聚物
DMF
T=35°C
时间=24hrs
或

图 16

可缀合siRNA、肽和吡啶二硫基胺的结构

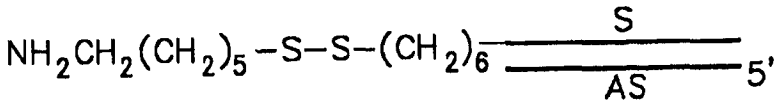


图 17A

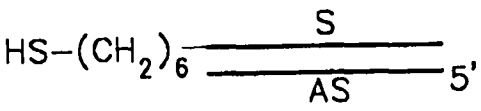


图 17B

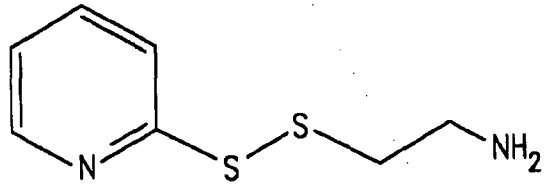


图 17C

肽



图 17D