

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 7 月 18 日 (18.07.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/149306 A1

(51) 国际专利分类号:
C08G 73/02 (2006.01) **A61K 31/7088** (2006.01)
A61K 47/34 (2017.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/071675

(22) 国际申请日: 2024 年 1 月 10 日 (10.01.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202310055564.4 2023 年 1 月 15 日 (15.01.2023) CN

(71) 申请人: 西安交通大学 (XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国陕西省西安市碑林区咸宁西路 28 号, Shaanxi 710049 (CN)。

(72) 发明人: 雍海洋 (YONG, Haiyang); 中国陕西省西安市碑林区咸宁西路 28 号, Shaanxi 710049 (CN)。

李建忠 (LI, Jianzhong); 中国陕西省西安市碑林区咸宁西路 28 号, Shaanxi 710049 (CN)。王凯旋 (WANG, Kaixuan); 中国陕西省西安市碑林区咸宁西路 28 号, Shaanxi 710049 (CN)。李智立 (LI, Zhili); 中国陕西省西安市碑林区咸宁西路 28 号, Shaanxi 710049 (CN)。王晨飞 (WANG, Chenfei); 中国陕西省西安市碑林区咸宁西路 28 号, Shaanxi 710049 (CN)。李明 (LI, Ming); 中国陕西省西安市碑林区咸宁西路 28 号, Shaanxi 710049 (CN)。潘超兰 (PAN, Chaolan); 中国陕西省西安市碑林区咸宁西路 28 号, Shaanxi 710049 (CN)。周德重 (ZHOU, Dezhong); 中国陕西省西安市碑林区咸宁西路 28 号, Shaanxi 710049 (CN)。

(74) 代理人: 西安通大专利代理有限公司 (XI'AN TONG DA PATENT AGENCY CO., LTD.);

(54) **Title:** HIGHLY BRANCHED POLY(β -AMINO ESTER) CONTAINING HYDROPHOBIC ALKYL CHAIN, AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE IN MRNA DELIVERY

(54) 发明名称: 含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)及其制备方法和 mRNA 递送应用

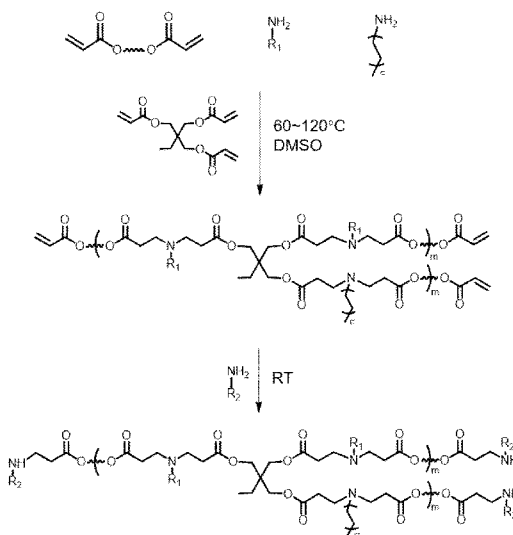


图 1

(57) **Abstract:** The present invention belongs to the technical field of biomedical materials, and discloses a highly branched poly(β -amino ester) containing a hydrophobic alkyl chain, and a preparation method therefor and the use in mRNA delivery. The method comprises: subjecting an acrylate monomer and a small molecule amine monomer to a Michael addition reaction to prepare a highly branched poly(β -amino ester); and performing functional end capping on the highly branched poly(β -amino ester) to prepare a highly branched poly(β -amino ester) containing a hydrophobic alkyl chain, so as to realize efficient mRNA delivery in cells such as HeLa. The highly branched poly(β -amino ester) containing the hydrophobic alkyl chain is low in price, easy to design and prepare and better in transfection performance, and has a remarkable clinical application potential in the delivery of mRNA drugs.

中国陕西省西安市高新区锦业路 32 号, Shaanxi 710075 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要: 本发明属于生物医学材料技术领域, 公开了一种含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)及其制备方法和mRNA递送应用, 将丙烯酸酯类单体和小分子胺单体通过迈克加成反应制备得到高度支化聚(β -氨基酯); 以氨基单体作为封端剂, 对高度支化聚(β -氨基酯)进行功能化封端, 制得含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯), 在HeLa等细胞中实现高效mRNA递送。本发明含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯), 价格便宜、易于设计制备、转染性能更优, 在mRNA药物递送方面具有显著的临床应用潜力。

含疏水烷基链的高度支化聚（ β -氨基酯）及其制备方法和 mRNA 递送应用

技术领域

本发明属于生物医学材料技术领域，具体涉及一种含疏水烷基链的高度支化聚（ β -氨基酯）及其制备方法和 mRNA 递送应用。

背景技术

mRNA 药物在传染病疫苗、肿瘤疾病、蛋白质替代与基因治疗等方面具有巨大的应用潜力。然而缺乏安全高效的载体限制了 mRNA 基因治疗在临床中的应用。目前，超过 70% 的临床实验使用的仍然是病毒载体，但病毒载体具有潜在的免疫原性和致畸性、制备程序繁琐、价格高昂。非病毒载体中商用的脂质纳米技术递送（LNP）技术由加拿大 Arbutus 公司掌控，短时间突破 LNPs 的相关技术专利目前看来相对困难，而且其低温储存和稳定性差也极大限制了在商业化中的应用；无机纳米颗粒虽然可以通过控制纳米颗粒的尺寸和表面修饰来调节无机材料潜在毒性，但是体内难降解性是其在实际应用中的需要考虑的重要因素。

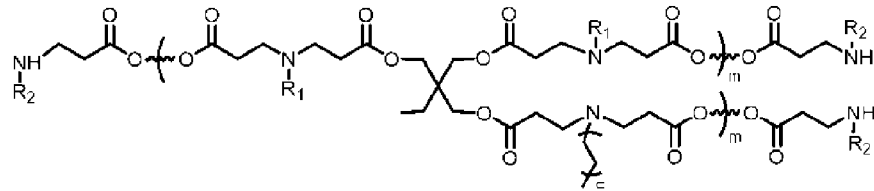
聚合物由于其低免疫反应、高安全性、灵活的设计、更容易的生产和化学修饰过程等特点而成为具有临床转化潜力的非病毒载体之一。聚（ β -氨基酯）由于其单体来源广、结构性能易调控、体内可降解等优点已在药物、蛋白、核酸递送方面显示出巨大的应用前景。然而，目前聚（ β -氨基酯）在 mRNA 递送中的应用只探究了以多元胺为支化单元制备的聚合物，以三（四）丙烯酸酯类单体为支化单元构建聚（ β -氨基酯）用于 mRNA 高效递送尚未有任何报道。

发明内容

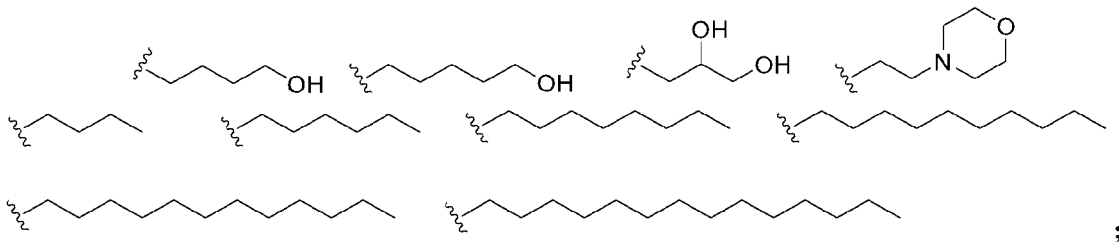
为了克服上述现有技术的缺点，本发明的目的在于提供一种含疏水烷基链的高度支化聚（ β -氨基酯）及其制备方法和 mRNA 递送应用，解决了现有技术

中聚(β -氨基酯)在 mRNA 递送中的应用只探究了以多元胺为支化单元制备的聚合物,以三(四)丙烯酸酯类单体为支化单元构建聚(β -氨基酯)用于 mRNA 高效递送尚未有任何报道的问题。

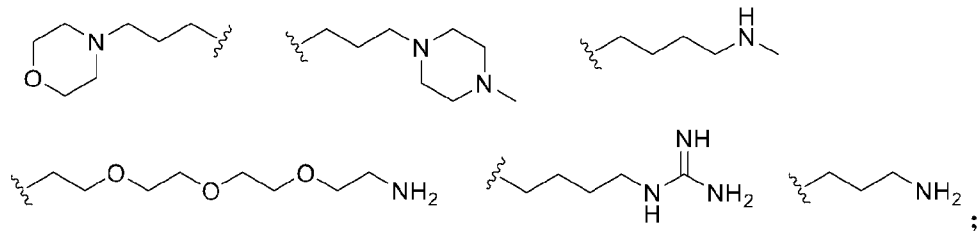
为了达到上述目的,本发明采用以下技术方案予以实现:含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯),所述高度支化聚(β -氨基酯)结构式如下:



其中, R_1 为下列结构中的一种:



R_2 是下列结构中的一种:



其中, $n=2-16$, $m=3-50$ 。

本发明还公开了一种含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)的制备方法,包括以下步骤:

步骤一、将丙烯酸酯类单体和小分子胺单体通过迈克加成反应制备得到高度支化聚(β -氨基酯);

步骤二、以氨基单体作为封端剂,对高度支化聚(β -氨基酯)进行功能化封端,制得含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)。

优选地,所述丙烯酸酯类单体包括二丙烯酸酯类单体和三(四)丙烯酸酯

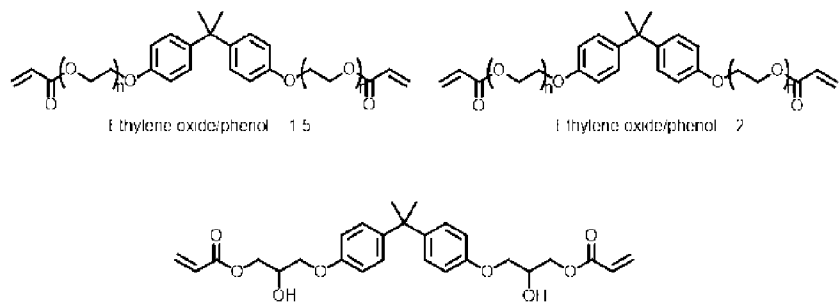
类单体；小分子胺单体包括亲水胺和疏水胺；丙烯酸酯类单体和小分子胺单体的反应摩尔比为 (1-2) : 1；其中二丙烯酸酯单体：三（四）丙烯酸酯单体=9：1-1：9；亲水胺：疏水胺=9：1-1：9。

优选地，步骤一中迈克加成反应是在 60-120 °C 下反应 12-48 h，反应物料溶解在二甲基亚砜中的浓度为 200-500 mg/mL。

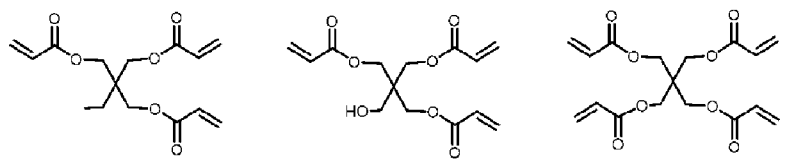
优选地，步骤二中封端剂与丙烯酸酯类单体的摩尔比为 0.5-3：1。

优选地，功能化封端反应温度为 25 °C，反应时间为 48 h。

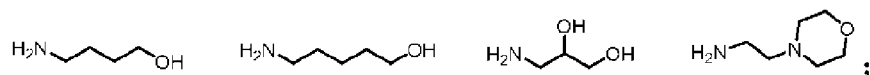
优选地，所述二丙烯酸酯类单体为如下结构中的一种：



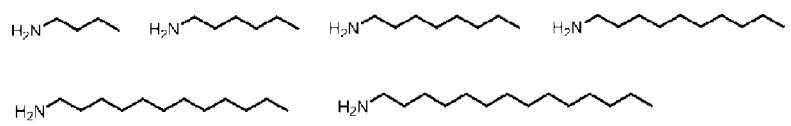
优选地，所述三（四）丙烯酸酯类单体为如下结构中的一种：



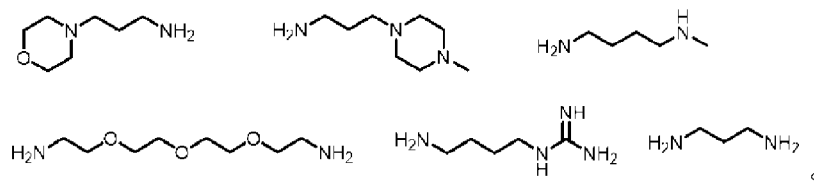
优选地，所述小分子亲水胺类单体为如下结构中的一种：



所述小分子疏水胺类单体包括如下结构中的一种：



所述含氨基的封端单体 R₂-NH₂ 为如下结构中的一种：



本发明还公开了含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯)在制备 mRNA 药物递送载体中的应用。

与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:本发明公开了含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯),通过使用三(四)丙烯酸酯类单体为支化单元构建聚(β-氨基酯)。通过使用不同的单体组合、调控支化结构,使用不同的封端单体,合成一类结构组分、结构、性能可调控的可生物降解的高度支化聚合物,由于其特殊的拓扑结构提高对 mRNA 的包裹和保护能力,具有较高的 mRNA 递送效率和细胞活性。与目前本领域技术中主要采用的商业化 mRNA 递送试剂 JetMESSENGER®和 Lipofectamine MessengerMAX™相比,本发明公开的含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯)具有较高的递送效率,毒性低,更具临床潜力。

本发明还公开了上述含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯)的制备方法,通过商业化的丙烯酸酯类单体试剂和小分子有机胺,以迈克尔加成方法制备出高度支化聚(β-氨基酯),通过凝胶渗透色谱监测聚合物分子量,分子量控制在 2000-40000 Da。以氨基单体作为封端剂,对高度支化聚(β-氨基酯)进行封端,一锅法制备出具有不同化学组成、支化结构以及末端基团的聚(β-氨基酯),表现出良好的 mRNA 转染性能。本发明公开的上述制备方法以低成本、合成路径简单、结构性能易调控的优势成功制备含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯)。

进一步地,二丙烯酸酯单体:三(四)丙烯酸酯单体的摩尔比一是调控反应速度,二是所得到的聚合物具有良好的 mRNA 递送效率和安全性。

进一步地,反应时间和温度范围内反应控制得较好,得到具有合适分子量的产物。

进一步地，封端剂与丙烯酸酯类单体摩尔比确保封端反应进行完全，同时又不会发生副反应。

本发明还公开了含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)在制备 mRNA 药物递送载体中的用途，由于其主链肽键结构，具有良好的生物降解性能；可离子化或带正电的基团能够有效的压缩 mRNA，从而实现递送，已在体外细胞实验中验证了该发明的有效性、准确性和广泛的适用性，具有良好的临床转化前景。

附图说明

图 1 为高度支化聚(β -氨基酯)的合成示意图；

图 2 为实施例 1 制得的含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)在 25℃时的物理相态示意图；

图 3 为实施例 1 制得的含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)的 ^1H NMR 谱图；

图 4 为实施例 1 制得的含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)纯化后凝胶渗透色谱(GPC)曲线；

图 5 为实施例 1 制得的含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)与 mRNA 所形成复合物的 TEM 微观形貌；

图 6 为实施例 1 制得的含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)与 mRNA 所形成复合物的电位；

图 7a 为实施例 1 制得的含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)在 HeLa 细胞中转染编码绿色荧光蛋白 mRNA 后细胞的荧光照片；

图 7b 为实施例 1 商业化 Lipo Messenger 在 HeLa 细胞中转染编码绿色荧光蛋白 mRNA 后细胞的荧光照片；

图 8 为实施例 1 制得的含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)在 HeLa 细胞中转染后的细胞活性；

图 9 为实施例 2 制得的含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)在 25℃时的物理相态示意图;

图 10 为实施例 2 制得的含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)的 ^1H NMR 谱图;

图 11 为实施例 2 制得的含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)纯化后凝胶渗透色谱(GPC)曲线;

图 12 为实施例 3 制得的含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)在 25℃时的物理相态示意图;

图 13 为实施例 3 制得的含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)的 ^1H NMR 谱图;

图 14 为实施例 3 制得的含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)纯化后凝胶渗透色谱(GPC)曲线。

具体实施方式

为了使本技术领域的人员更好地理解本发明方案,下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分的实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都应当属于本发明保护的范围。

需要说明的是,本发明的说明书和权利要求书及上述附图中的术语“第一”、“第二”等是用于区别类似的对象,而不必用于描述特定的顺序或先后次序。应该理解这样使用的数据在适当情况下可以互换,以便这里描述的本发明的实施例能够以除了在这里图示或描述的那些以外的顺序实施。此外,术语“包括”和“具有”以及他们的任何变形,意图在于覆盖不排他的包含,例如,包含了一系列步骤或单元的过程、方法、系统、产品或设备不必限于清楚地列出的那些步骤或单元,而是可包括没有清楚地列出的或对于这些过程、方法、产品或设备

固有的其它步骤或单元。

下面结合附图对本发明做进一步详细描述：

含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)的制备方法，合成路线，参见图 1，包括以下步骤：

步骤一、将一定量的丙烯酸酯类单体（二丙烯酸酯类单体、三（四）丙烯酸酯类单体等）和小分子有机胺（亲水胺、疏水胺）加入含二甲基亚砷的烧瓶中，丙烯酸酯类单体与小分子有机胺的投料摩尔比为（1-2）：1；其中二丙烯酸酯单体：三丙烯酸酯单体=9：1-1：9；亲水胺：疏水胺=9：1-1：9，在 60-120 °C 下反应 12-48 h；在反应过程中使用凝胶渗透色谱监测聚合物分子量，当聚合物的分子量到达 2000-40000 Da，终止反应；

步骤二、将一定量的封端剂和二甲基亚砷加入到反应瓶中，在 25 °C 下反应 48h，封端剂与原料丙烯酸酯类单体投料摩尔比为 0.5-3：1；使用沉淀法对产物进行提纯，真空干燥，得到含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)。

将本发明制得的功能性高度支化聚(β -氨基酯)用于 mRNA 的递送，包括以下步骤：

1) 细胞培养：HeLa 细胞在标准培养条件下进行培养，按照 0.5×10^4 - 2.0×10^4 个细胞/孔的密度接种在 96 孔板中，培养 24 h；

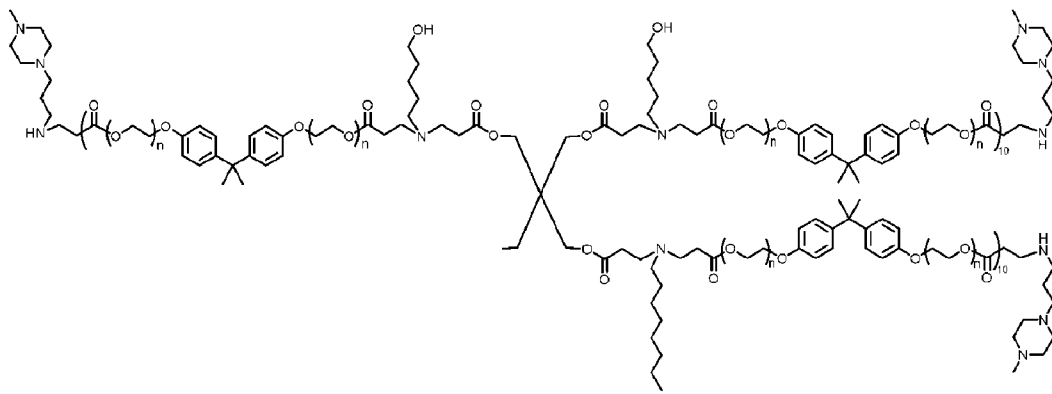
2) 将含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酯)的溶液与含编码绿色荧光蛋白的 mRNA 溶液混合均匀，静置孵育 15-30 min，然后转移至 96 孔板中进行转染，其中聚合物：mRNA 质量比=10-200：1，每孔 mRNA 质量为 25-250 ng；

3) 转染 24-48 h 后，在荧光显微镜下对转染的绿色荧光蛋白的细胞进行观察和拍照。

5) 转染 24-48 h 后，移除细胞上清液后加入 alamarBlue 溶液，在培养箱中孵育 30 min，进行细胞活性测试。

实施例 1

丙烯酸酯类单体（双酚 A 乙氧基化物二丙烯酸酯，EO/phenol = 1.5；三羟甲基丙烷三丙烯酸酯投料摩尔比为 5:1，）和有机小分子胺类单体（5-氨基-1-戊醇与正辛胺投料摩尔比为 8:1）的投料摩尔比为 1.5:1，体系反应物料在二甲基亚砜中的浓度为 400 mg/mL。在 80 °C 下反应 12 h；然后加入丙烯酸酯类单体摩尔用量 0.6 倍的 1-(3-氨基丙基)-4-甲基哌嗪，并在 25 °C 下反应 48 h；提纯干燥后得到的分子量支化聚（ β -氨基酯）分子量为 6000 Da，分子量分布为 2.3， m 等于 10。结构式如下：

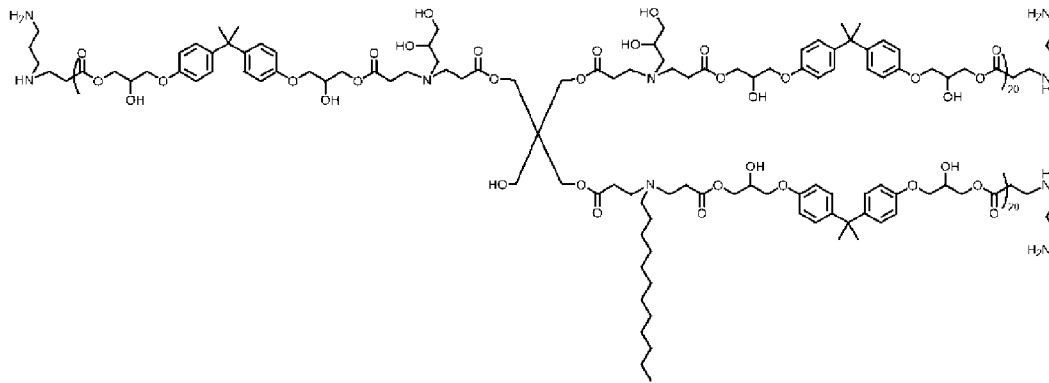


本实施例所得到的含疏水烷基链的高度支化聚（ β -氨基酯）在 25 °C 时的物理相态示意图如图 2 所示；本实施例制备得到的含疏水烷基链的高度支化聚（ β -氨基酯）的 ^1H NMR 谱图如图 3 所示；本实施例制备得到的含疏水烷基链的高度支化聚（ β -氨基酯）的 GPC 曲线如图 4 所示。

将本实施例制备的含疏水烷基链的高度支化聚（ β -氨基酯）在细胞外进行 mRNA 递送实验。将 HeLa 细胞以每孔 10000 个接种在 96 孔板里培养 24 h 后，以聚合物与 mRNA 质量比 10、30、60:1 均匀混合，每孔 mRNA 用量 25 ng，静止孵育 20 min 形成复合纳米颗粒，然后转移至 96 孔板中进行转染。其中 30:1 条件下的纳米颗粒微观形貌如图 5 所示，纳米颗粒尺寸均一，电位如图 6，随着聚合物的用量增加，正电荷相应增加，能够有效的压缩 mRNA；聚合物在 HeLa 细胞中的 mRNA 递送效率如图 7a 和图 7b，转染后细胞活性如图 8，聚合物的 mRNA 转染效率和安全性明显优于商业化产品。

实施例 2

丙烯酸酯类单体（双酚 A 甘油二丙烯酸酯：季戊四醇三丙烯酸酯投料摩尔比为=3: 1,）和有机小分子胺类单体（3-氨基-1,2-丙二醇与十二烷胺投料摩尔比为 6: 1) 的投料摩尔比为 1.1: 1, 体系反应物料在二甲基亚砷中的浓度为 200 mg/mL。在 100℃下反应 24h; 然后加入丙烯酸酯类单体摩尔用量 1 倍的丙二胺, 并在 25℃下反应 48h; 提纯干燥后得到的分子量支化聚(β-氨基酯) 分子量为 15000 Da, 分子量分布为 3.4, m 等于 20。结构式如下:

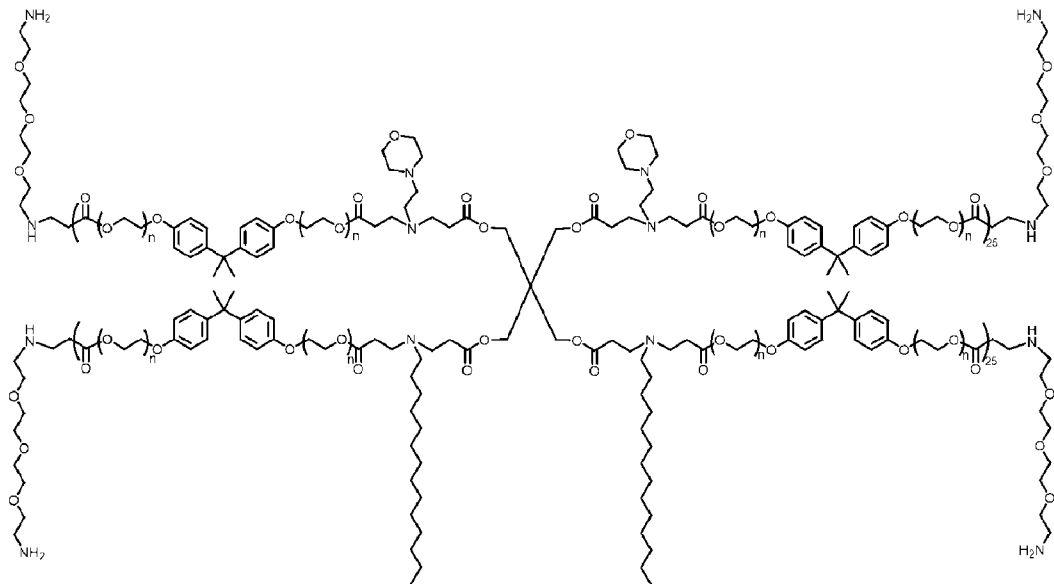


本实施例所得到的含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯)在 25℃时的物理相态示意图如图 9 所示; 本实施例制备得到的含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯)的 ¹H NMR 谱图如图 10 所示, 表明产物的化学组成与原料投料基本一致; 本实施例制备得到的含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯)的 GPC 曲线如图 11 所示。

实施例 3

丙烯酸酯类单体（双酚 A 乙氧基化物二丙烯酸酯, EO/phenol = 2: 季戊四醇四丙烯酸酯投料摩尔比为=9: 1,）和有机小分子胺类单体（2-氨基乙基吗啉与十四烷胺投料摩尔比为 4: 1) 的投料摩尔比为 1.3: 1, 体系反应物在二甲基亚砷中的料浓度为 350 mg/mL。在 80℃下反应 36 h; 然后加入丙烯酸酯类单体摩尔用量 1.3 倍的 1,11-二氨基-3,6,9-三氧杂十一烷, 并在 25℃下反应 48h; 提纯干燥后得到的分子量支化聚(β-氨基酯)分子量为 22000 Da, 分子量分布为 3.2,

m 等于 25。结构式如下：



本实施例所得到的含疏水烷基链的高度支化聚（ β -氨基酯）在 25℃ 时的物理相态示意图如图 12 所示；本实施例制备得到的含疏水烷基链的高度支化聚（ β -氨基酯）的 ^1H NMR 谱图如图 13 所示，表明产物的化学组成与原料投料一致；本实施例制备得到的含疏水烷基链的高度支化聚（ β -氨基酯）的 GPC 曲线如图 14 所示。

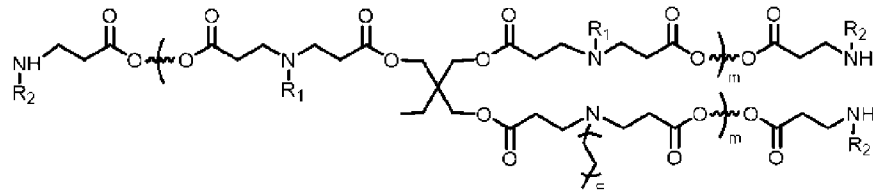
本发明公开了一类可生物降解的含疏水烷基链的高度支化聚（ β -氨基酯）的制备方法和其在 mRNA 递送方面的应用，属于生物医用材料技术领域。通过选用不同的丙烯酸酯类单体和小分子胺类单体制备出高度支化聚（ β -氨基酯），在典型 HeLa 细胞中实现高效递送 mRNA。该类聚合物与主流的商业转染试剂（jetPEI、Lipofectamine）相比，价格便宜、易于设计制备、转染性能更优，在 mRNA 药物递送方面具有显著的临床应用潜力。含疏水烷基链的高度支化聚（ β -氨基酯）相较于以小分子胺做支化单元，以三（四）丙烯酸酯类单体为支化单元能够引入更多的酯键，得到的聚合物能够更快地降解，相应的细胞毒性更低，更具临床应用前景。mRNA 有效封装保护其在翻译表达蛋白前免受体内核酸酶的降解。同时，目前已有研究表明 mRNA 在内涵体中的逃逸效率仅为 1-4%，

提高内涵体逃逸效率是实现高效 mRNA 转染的关键步骤。引入疏水烷基链，增加聚合物的疏水性，提高对 mRNA 的亲合力，从而对 mRNA 实现有效封装；此外，由于该疏水烷基链与内涵体膜发生膜融合，有效地增加了该 mRNA 在内涵体中的逃逸效率，从而提高转染效率。相较于传统的合成方法，提出通过多组分合成策略快速有效评价和筛选出性能更优异的支持化聚（ β -氨基酯）。这些结果进一步表明含疏水烷基链的高度支持化聚（ β -氨基酯）能够有效地降低生物毒性，增加 mRNA 封装效率和内涵体逃逸效率，实现有效的胞内 mRNA 递送。

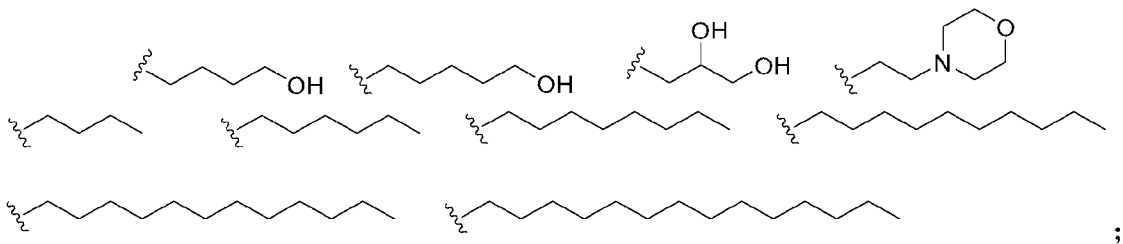
以上内容仅为说明本发明的技术思想，不能以此限定本发明的保护范围，凡是按照本发明提出的技术思想，在技术方案基础上所做的任何改动，均落入本发明权利要求书的保护范围之内。

权 利 要 求 书

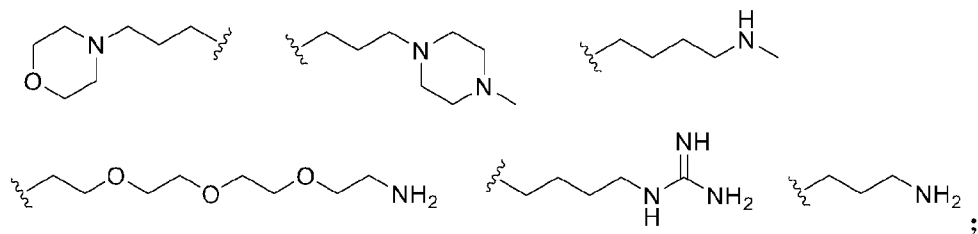
1. 含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯)，其特征在于，所述高度支化聚(β-氨基酯)结构式如下：



其中， R_1 为下列结构中的一种：



R_2 是下列结构中的一种：



其中， $n=2-16$ ， $m=3-50$ 。

2. 根据权利要求 1 所述的含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯)的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

步骤一、将丙烯酸酯类单体和小分子胺单体通过迈克加成反应制备得到高度支化聚(β-氨基酯)；

步骤二、以氨基单体作为封端剂，对高度支化聚(β-氨基酯)进行功能化封端，制得含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯)。

3. 根据权利要求 2 所述的含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯)的制备方法，其特征在于，所述丙烯酸酯类单体包括二丙烯酸酯类单体和三(四)丙烯酸酯类单体；小分子胺单体包括亲水胺和疏水胺；丙烯酸酯类单体和小分子胺单体的反应摩尔比为(1-2):1；其中二丙烯酸酯单体：三(四)丙烯酸酯单体

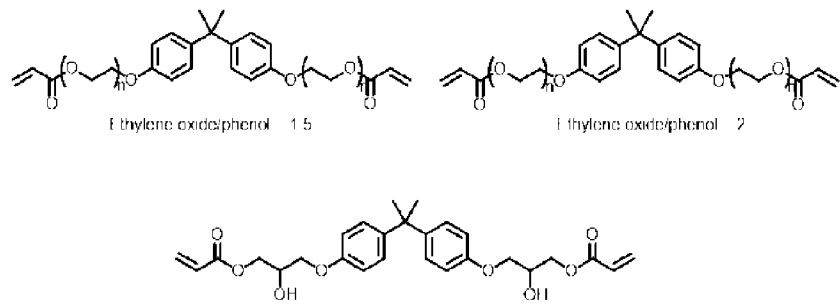
=9: 1-1: 9; 亲水胺: 疏水胺=9: 1-1: 9。

4.根据权利要求2所述的含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯)的制备方法,其特征在于,步骤一中迈克加成反应是在60-120℃下反应12-48h,反应物料溶解在二甲基亚砷中的浓度为200-500mg/mL。

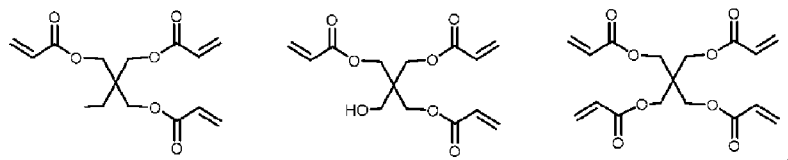
5.根据权利要求2所述的含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯)的制备方法,其特征在于,步骤二中封端剂与丙烯酸酯类单体的摩尔比为0.5-3:1。

6.根据权利要求2所述的含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯)的制备方法,其特征在于,功能化封端反应温度为25℃,反应时间为48h。

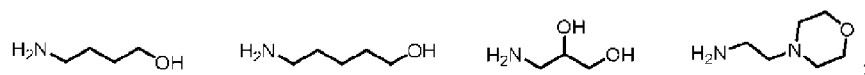
7.根据权利要求2-6任意一项所述的含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯)的制备方法,其特征在于,所述二丙烯酸酯类单体为如下结构中的一种:



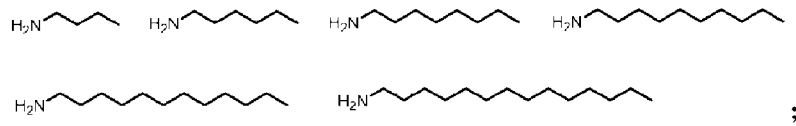
8.根据权利要求2-6任意一项所述的含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯)的制备方法,其特征在于,所述三(四)丙烯酸酯类单体为如下结构中的一种:



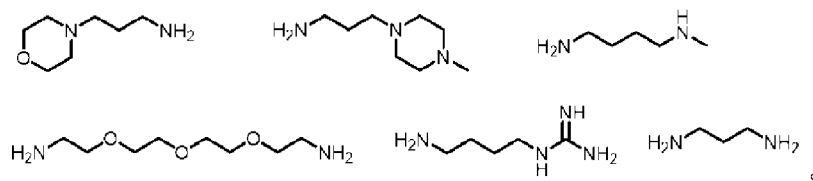
9.根据权利要求2-6中任意一项所述的含疏水烷基链的高度支化聚(β-氨基酯)的制备方法,其特征在于,所述小分子亲水胺类单体为如下结构中的一种:



所述小分子疏水胺类单体为如下结构中的一种：



所述含氨基的封端单体 R_2-NH_2 为如下结构中的一种：



10. 权利要求 1 所述的含疏水烷基链的高度支化聚(β -氨基酸)在制备 mRNA 药物递送载体中的应用。

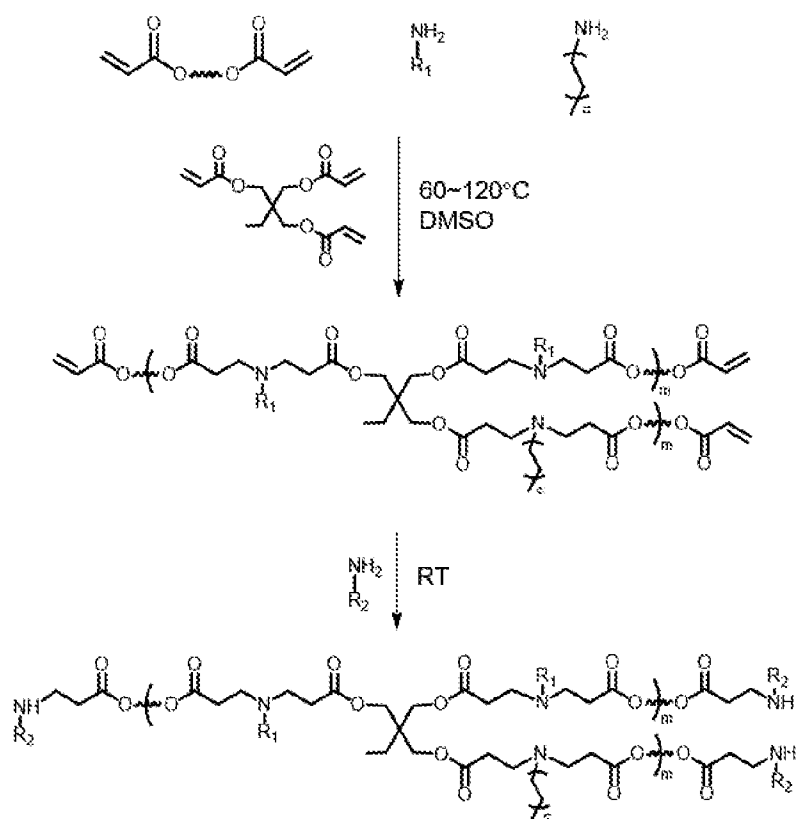


图 1

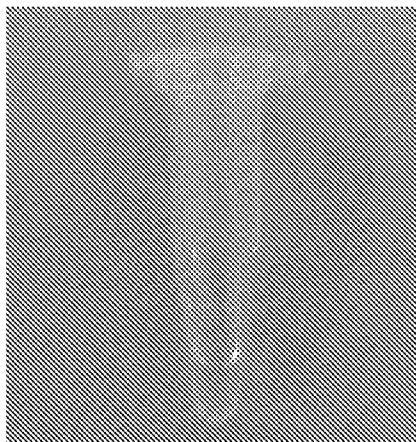


图 2

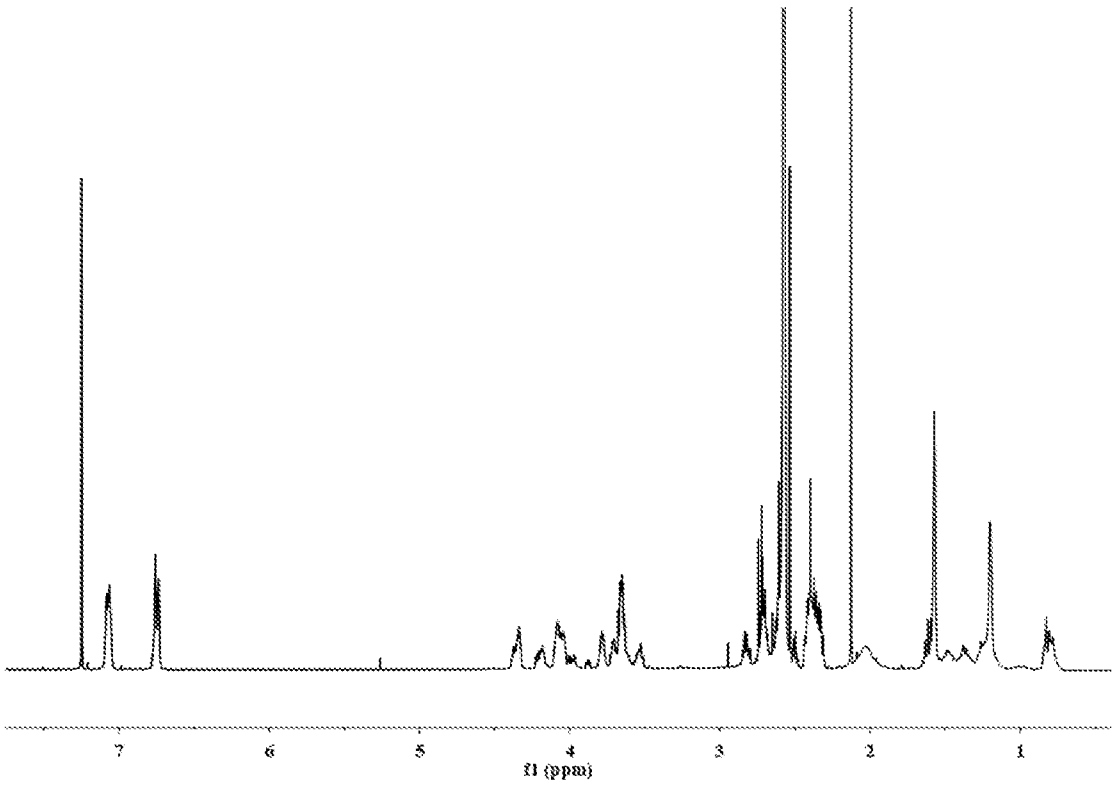


图 3

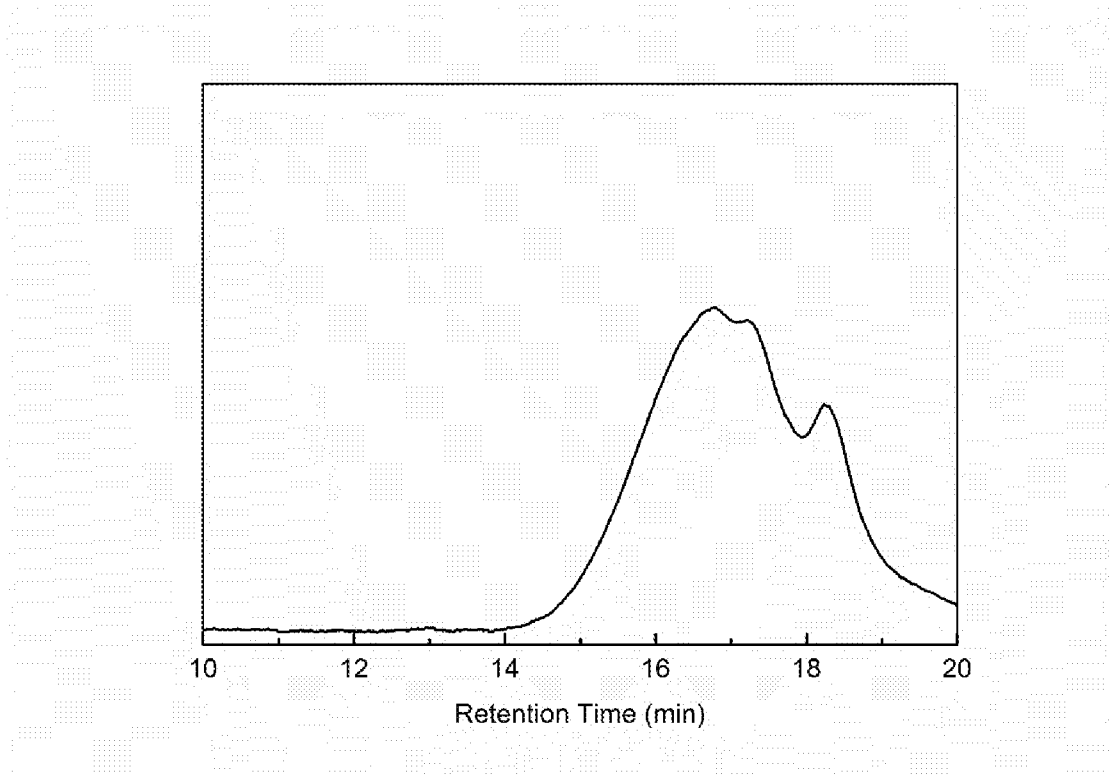


图 4

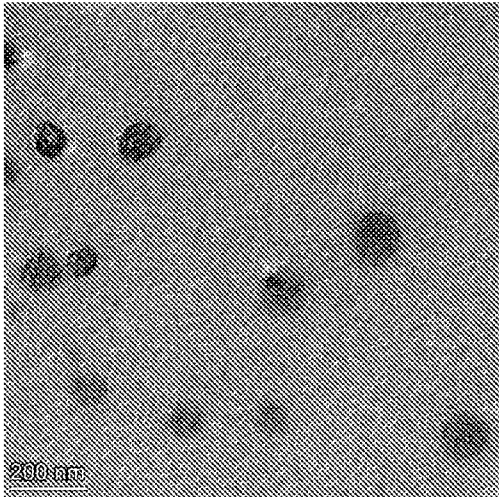


图 5

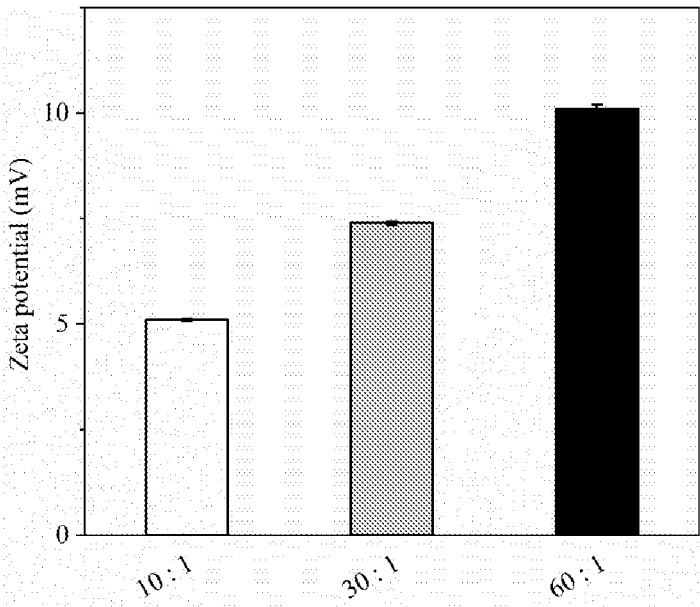


图 6

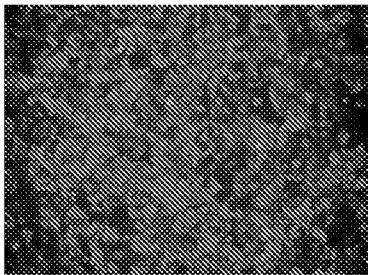


图 7a

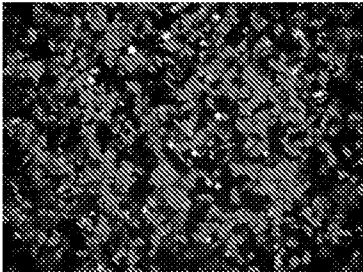


图 7b

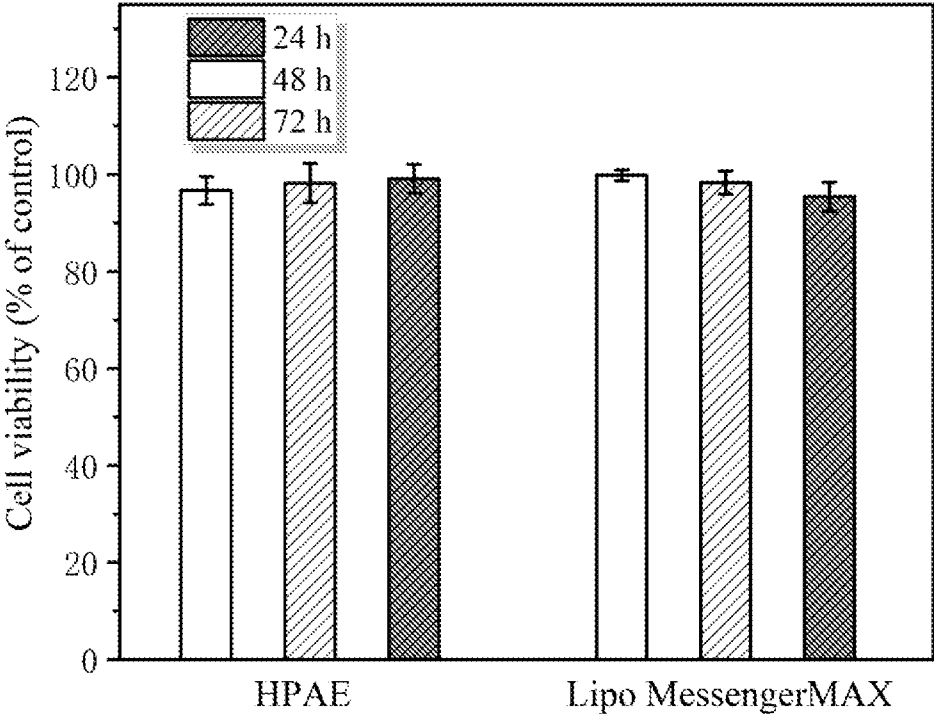


图 8

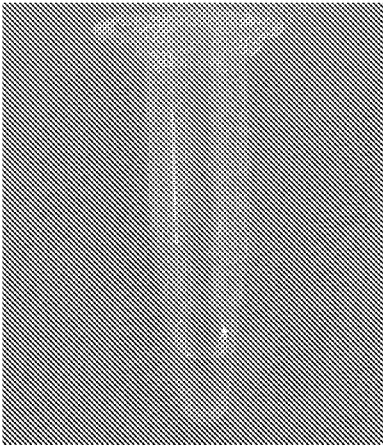


图 9

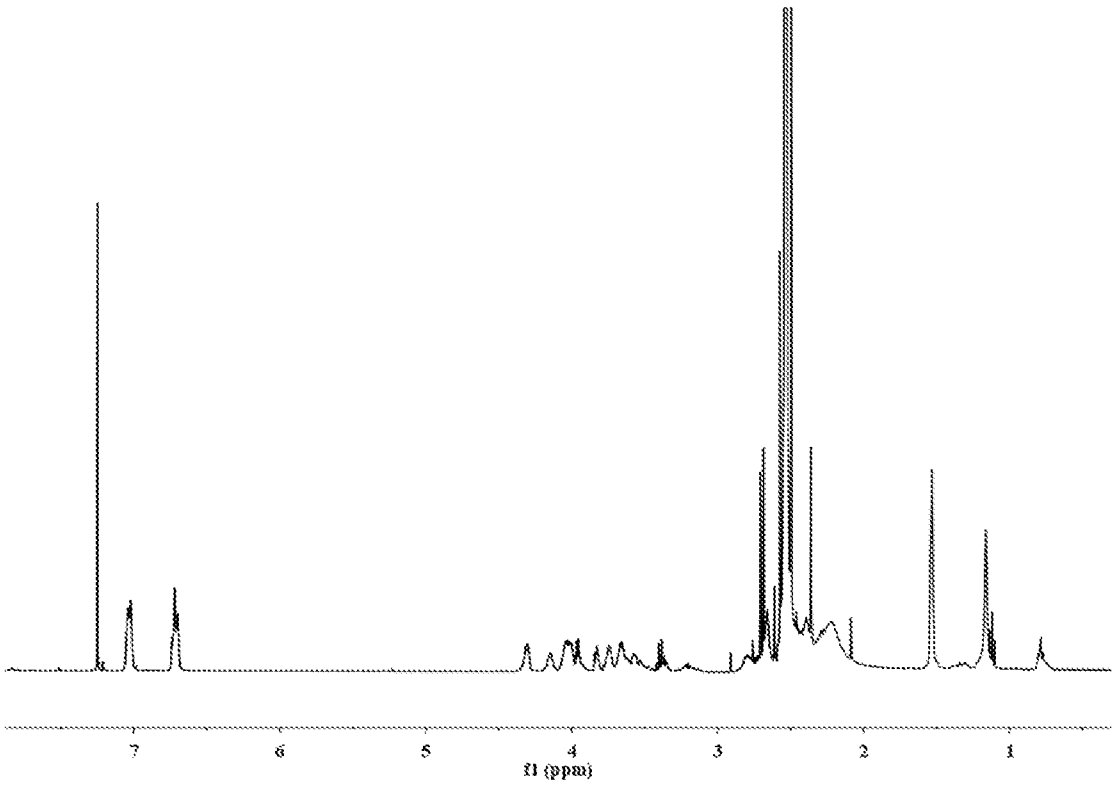


图 10

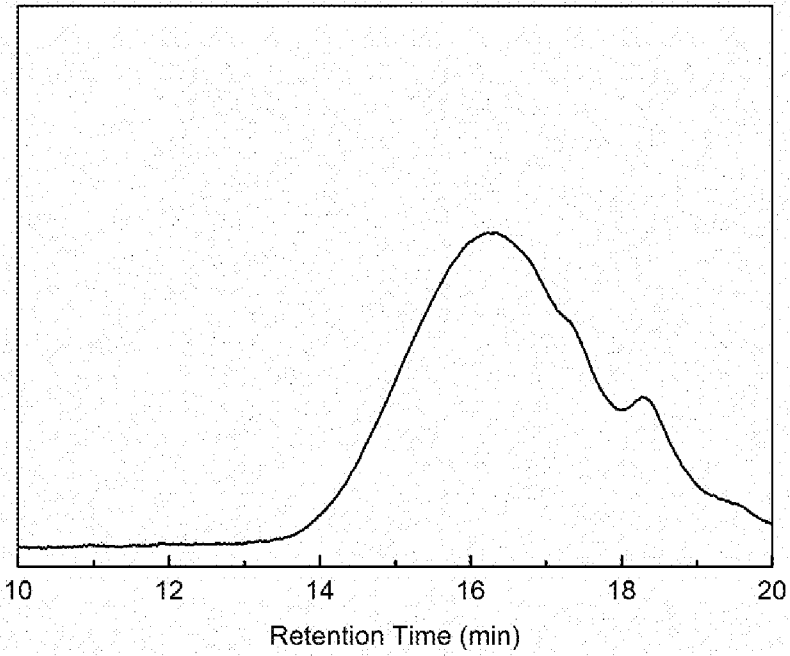


图 11

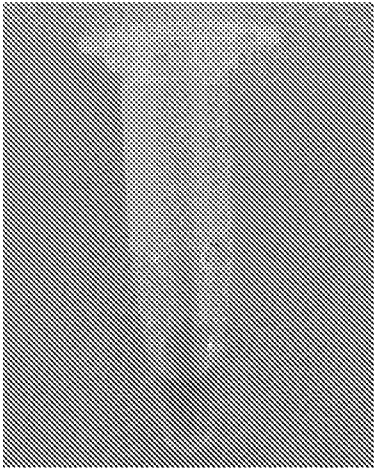


图 12

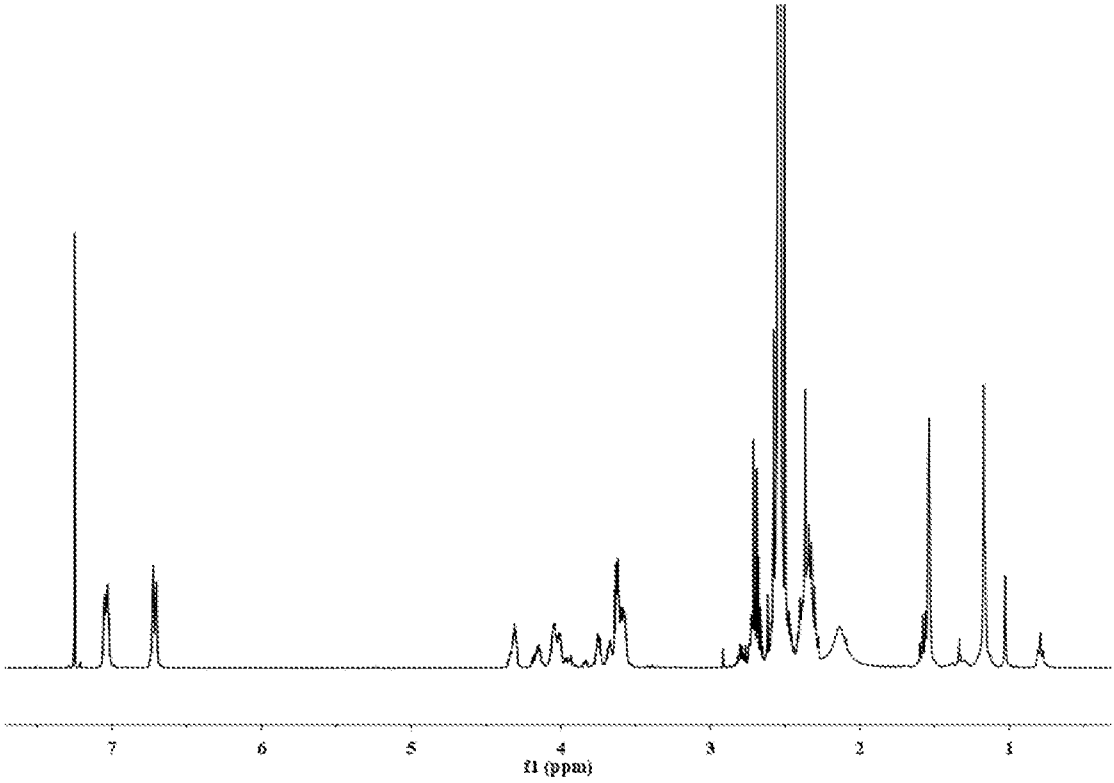


图 13

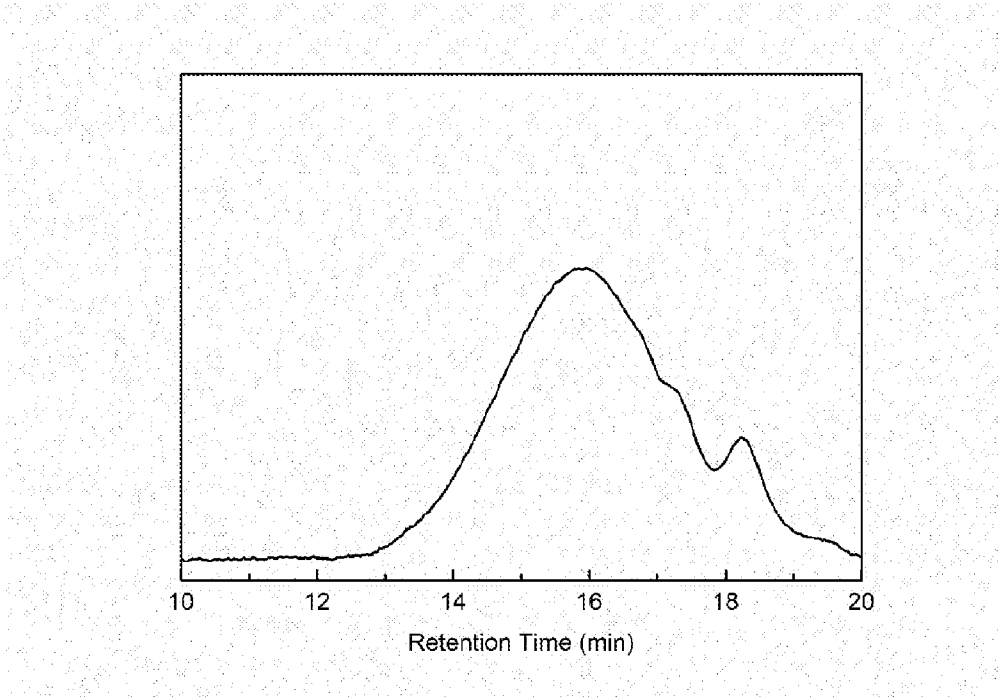


图 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/071675

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08G 73/02(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C08G 73/-; A61K 47/-; A61K 31/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI; CNTXT; CNABS; ENTXT; EPODOC; WPI; STN; ISI Web of Science: 西安交通大学, 支化, 聚 3w 氨基酯, 丙烯酸酯, 二丙烯酸酯, 三丙烯酸酯, 四丙烯酸酯, 胺, 迈克尔加成, 麦克尔加成, XIAN JIAOTONG UNIVERSITY, +branched, poly 3w amino w ester, acrylate, tetraacrylate, triacrylate, diacrylate, amin+, Michael addition

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 116003787 A (XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY) 25 April 2023 (2023-04-25) claims 1-10	1-10
X	US 2017216455 A1 (NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND, GALWAY) 03 August 2017 (2017-08-03) description, paragraphs 0013-0034	1-10
X	CN 110746599 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 04 February 2020 (2020-02-04) claims 1-10	1-10
X	CN 111718494 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 29 September 2020 (2020-09-29) claims 1-10	1-10
X	CN 113164614 A (AMRYT GENETICS LTD.) 23 July 2021 (2021-07-23) description, paragraphs 0217 and 0218	1-10
X	CN 114630855 A (UNIVERSITY COLLEGE DUBLIN, NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND) 14 June 2022 (2022-06-14) claims 1-20	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 April 2024

Date of mailing of the international search report

29 April 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/071675

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	116003787	A	25 April 2023	None			
US	2017216455	A1	03 August 2017	LT	3177670	T	25 June 2020
				WO	2016020474	A1	11 February 2016
				RS	60335	B1	31 July 2020
				PT	3177670	T	24 April 2020
				GB	201413907	D0	17 September 2014
				CY	1122850	T1	05 May 2021
				EP	3738992	A1	18 November 2020
				ES	2785248	T3	06 October 2020
				HRP	20200633	T1	07 August 2020
				PL	3177670	T3	13 July 2020
				DK	3177670	T3	27 April 2020
				EP	3177670	A1	14 June 2017
				EP	3177670	B1	18 March 2020
				SI	3177670	T1	31 July 2020
				HUE	049704	T2	28 October 2020
CN	110746599	A	04 February 2020	WO	2021063376	A1	08 April 2021
				US	2023000992	A1	05 January 2023
				CN	110746599	B	18 June 2021
CN	111718494	A	29 September 2020	None			
CN	113164614	A	23 July 2021	SG	11202105760	VA	29 July 2021
				WO	2020140116	A1	02 July 2020
				MX	2021007688	A	05 August 2021
				IL	284305	A	31 August 2021
				AU	2019413703	A1	03 June 2021
				KR	20210110791	A	09 September 2021
				CO	2021006679	A2	10 June 2021
				CA	3119794	A1	02 July 2020
				EP	3902566	A1	03 November 2021
				BR	112021009351	A2	10 August 2021
				JP	2022515980	A	24 February 2022
				US	2022096660	A1	31 March 2022
				CL	2021001708	A1	17 December 2021
CN	114630855	A	14 June 2022	EP	4034587	A1	03 August 2022
				EP	4034587	C0	20 September 2023
				BR	112022005381	A2	21 June 2022
				AU	2020355522	A1	31 March 2022
				CA	3151987	A1	01 April 2021
				WO	2021058491	A1	01 April 2021
				EP	3798250	A1	31 March 2021
				US	2022403105	A1	22 December 2022

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2024/071675
A. 主题的分类 C08G 73/02(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC: C08G 73/-; A61K 47/-; A61K 31/- 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNKI;CNTXT;CNABS;ENTXT;EPODOC;WPI;STN;ISI Web of Science;西安交通大学, 支化, 聚 3w 氨基酯, 丙烯酸酯, 二丙烯酸酯, 三丙烯酸酯, 四丙烯酸酯, 胺, 迈克尔加成, 迈克尔加成, XIAN JIAOTONG UNIVERSITY, +branched, poly 3w amino w ester, acrylate, tetraacrylate, triacrylate, diacrylate, amin+, Michael addition		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 116003787 A (西安交通大学) 2023年4月25日 (2023 - 04 - 25) 权利要求1-10	1-10
X	US 2017216455 A1 (NAT UNIV IRELAND GALWAY) 2017年8月3日 (2017 - 08 - 03) 说明书第0013-0034段	1-10
X	CN 110746599 A (苏州大学) 2020年2月4日 (2020 - 02 - 04) 权利要求1-10	1-10
X	CN 111718494 A (苏州大学) 2020年9月29日 (2020 - 09 - 29) 权利要求1-10	1-10
X	CN 113164614 A (安瑞特基因有限公司) 2021年7月23日 (2021 - 07 - 23) 说明书第0217和0218段	1-10
X	CN 114630855 A (爱尔兰国立都柏林大学) 2022年6月14日 (2022 - 06 - 14) 权利要求1-20	1-10
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2024年4月26日		国际检索报告邮寄日期 2024年4月29日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		授权官员 王东涛 电话号码 (+86) 010-62084413

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2024/071675

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)	
CN	116003787	A	2023年4月25日	无			
US	2017216455	A1	2017年8月3日	LT	3177670	T	2020年6月25日
				WO	2016020474	A1	2016年2月11日
				RS	60335	B1	2020年7月31日
				PT	3177670	T	2020年4月24日
				GB	201413907	D0	2014年9月17日
				CY	1122850	T1	2021年5月5日
				EP	3738992	A1	2020年11月18日
				ES	2785248	T3	2020年10月6日
				HRP	20200633	T1	2020年8月7日
				PL	3177670	T3	2020年7月13日
				DK	3177670	T3	2020年4月27日
				EP	3177670	A1	2017年6月14日
				EP	3177670	B1	2020年3月18日
				SI	3177670	T1	2020年7月31日
				HUE	049704	T2	2020年10月28日
CN	110746599	A	2020年2月4日	WO	2021063376	A1	2021年4月8日
				US	2023000992	A1	2023年1月5日
				CN	110746599	B	2021年6月18日
CN	111718494	A	2020年9月29日	无			
CN	113164614	A	2021年7月23日	SG	11202105760	VA	2021年7月29日
				WO	2020140116	A1	2020年7月2日
				MX	2021007688	A	2021年8月5日
				IL	284305	A	2021年8月31日
				AU	2019413703	A1	2021年6月3日
				KR	20210110791	A	2021年9月9日
				CO	2021006679	A2	2021年6月10日
				CA	3119794	A1	2020年7月2日
				EP	3902566	A1	2021年11月3日
				BR	112021009351	A2	2021年8月10日
				JP	2022515980	A	2022年2月24日
				US	2022096660	A1	2022年3月31日
				CL	2021001708	A1	2021年12月17日
CN	114630855	A	2022年6月14日	EP	4034587	A1	2022年8月3日
				EP	4034587	C0	2023年9月20日
				BR	112022005381	A2	2022年6月21日
				AU	2020355522	A1	2022年3月31日
				CA	3151987	A1	2021年4月1日
				WO	2021058491	A1	2021年4月1日
				EP	3798250	A1	2021年3月31日
				US	2022403105	A1	2022年12月22日