



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111643479 B

(45) 授权公告日 2023.10.27

(21) 申请号 202010303591.5

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

(22) 申请日 2016.06.13

有限公司 11262

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理人 牟静芳 郑霞

申请公布号 CN 111643479 A

(51) Int.CI.

(43) 申请公布日 2020.09.11

A61K 9/51 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/7088 (2006.01)

62/187,366 2015.07.01 US

A61K 47/34 (2017.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 35/00 (2006.01)

201680050424.6 2016.06.13

(56) 对比文件

(73) 专利权人 加州理工学院

WO 2014/133549 A1, 2014.09.04

地址 美国加利福尼亚州

“聚乙二醇化聚乙烯亚胺作为肺部基因递释载体的研究”.聚乙二醇化聚乙烯亚胺作为肺部基因递释载体的研究.《复旦大学硕士学位论文》.2006,

(72) 发明人 马克·E·戴维斯 多罗西·潘

审查员 徐妮娜

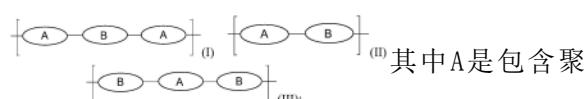
权利要求书5页 说明书42页 附图24页

## (54) 发明名称

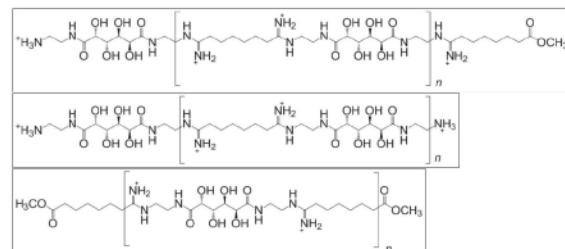
基于阳离子粘酸聚合物的递送系统

## (57) 摘要

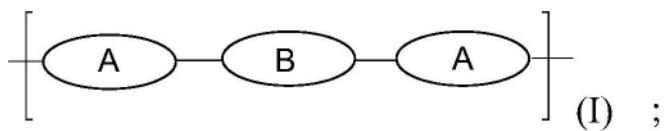
本申请涉及基于阳离子粘酸聚合物的递送系统。本公开内容涉及用于递送生物剂的基于聚合物和聚合物缀合物的纳米颗粒递送系统，以及制备和使用这些组合物的方法。本公开内容的某些实施方案提供包含交替的带电荷的和不带电荷的区段的聚合物，所述交替的带电荷的和不带电荷的区段包含以下式(I)或式(II)或式(III)的结构单元中的一种或更多种：



亚烷基二醇的不带电荷区段；并且B是包含至少一种多羟基连接部分的带阳离子电荷的区段。



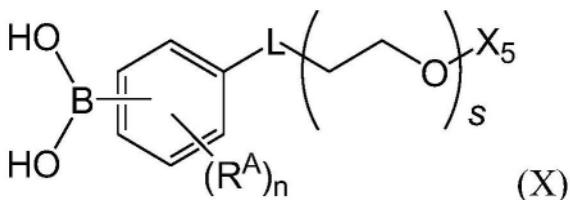
1. 一种包含聚合物的纳米颗粒, 所述聚合物包含根据式(I)的交替的带电荷的和不带电荷的区段:



其中

A是不带电荷的区段, 所述不带电荷的区段包含聚乙二醇或聚丙二醇; 并且

B是带阳离子电荷的区段, 所述带阳离子电荷的区段包含至少一种多羟基连接部分, 所述至少一种多羟基连接部分含有至少一对邻位二醇; 并且所述带阳离子电荷的区段还包含至少一种含硼酸聚合物, 所述至少一种含硼酸聚合物包含式(X)的结构



其中所述至少一种含硼酸聚合物中的每一种通过在式(X)的硼酸部分与式(I)的多羟基连接部分的至少一对邻位二醇之间的硼酸酯缩合连接部分缀合至所述至少一对邻位二醇, X<sub>5</sub>在此硼酸酯缩合连接部分的远端处;

R<sup>A</sup>是硝基;

n是0或1;

s是20-1200;

L是在苯基环和聚环氧乙烷连接部分之间的连接基团, 所述连接基团是-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-NH-C(=O)-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-、-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-C(=O)-NH-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-、-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-O-C(=O)-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-或-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-C(=O)-O-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-; 并且

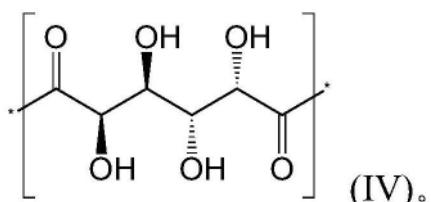
X<sub>5</sub>是任选地被-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)、-N(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的类似物取代的C<sub>1-6</sub>烷基。

2. 如权利要求1所述的纳米颗粒, 其中A包含聚乙二醇和适当的连接基团。

3. 如权利要求1所述的纳米颗粒, 其中所述聚乙二醇或聚丙二醇具有在从500道尔顿至50,000道尔顿的范围内的标称数均分子量。

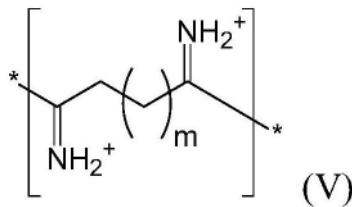
4. 如权利要求1所述的纳米颗粒, 其中B包含至少一种多羟基糖连接部分, 所述至少一种多羟基糖连接部分包含至少一对邻位二醇。

5. 如权利要求1所述的纳米颗粒, 其中B包含至少一种重复的亚单元, 所述重复的亚单元包含式(IV)的结构:



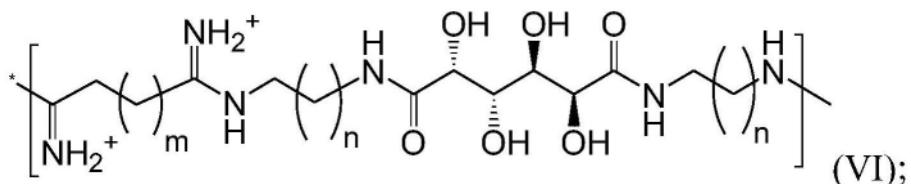
6. 如权利要求1所述的纳米颗粒, 其中B还包含至少一种重复的亚单元, 所述重复的亚

单元包含式(V)的结构:



其中m是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

7. 如权利要求1所述的纳米颗粒,其中B包含至少一种重复的亚单元,所述重复的亚单元包含cMAP,所述cMAP的亚单元结构表示为式(VI):



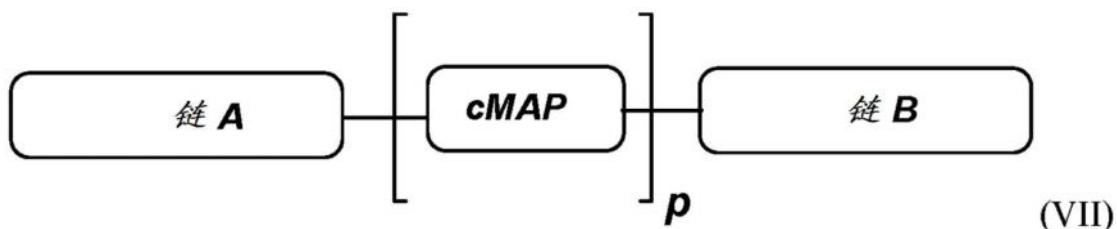
其中

m在每次出现时独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;并且

n在每次出现时独立地是1、2、3、4或5。

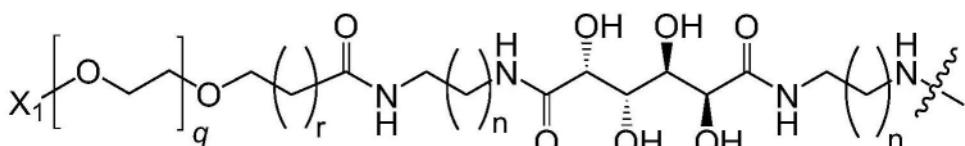
8. 如权利要求7所述的纳米颗粒,其中m在每次出现时独立地是4、5或6。

9. 如权利要求1所述的纳米颗粒,其中所述聚合物由式(VII)的结构描述:

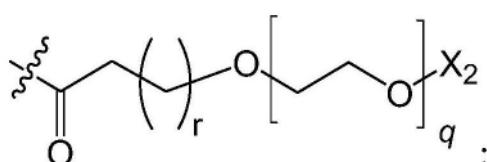


其中

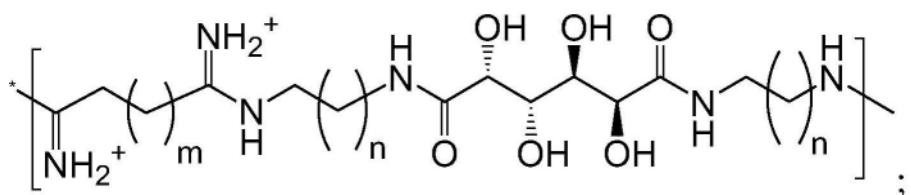
链A是:



链B是:



cMAP是:



p在从1至100的范围内；

q在从12至1200的范围内；

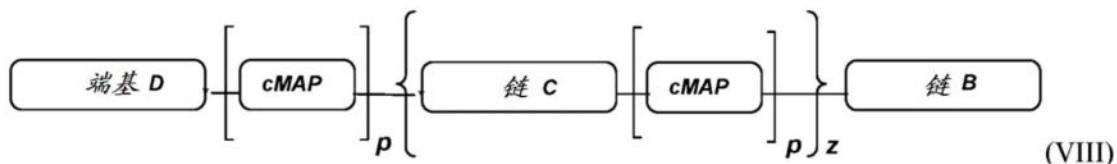
m在每次出现时独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

n和r在每次出现时独立地是0、1、2、3、4或5；并且

$X_1$ 和 $X_2$ 在每次出现时独立地是任选地被-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)、-N(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的类似物取代的C<sub>1-6</sub>烷基。

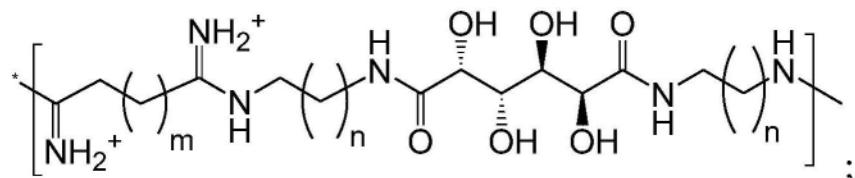
10. 如权利要求9所述的纳米颗粒，其中m在每次出现时独立地是4、5或6。

11. 如权利要求1所述的纳米颗粒，其中所述聚合物由式(VIII)的结构描述：

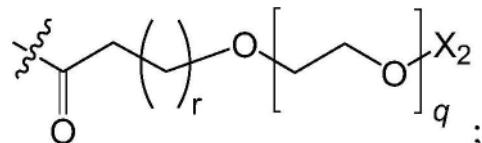


其中

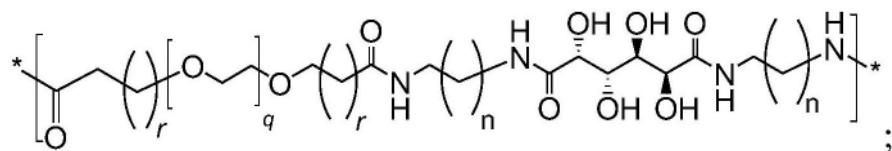
cMAP是：



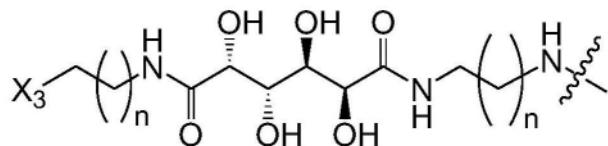
链B是：



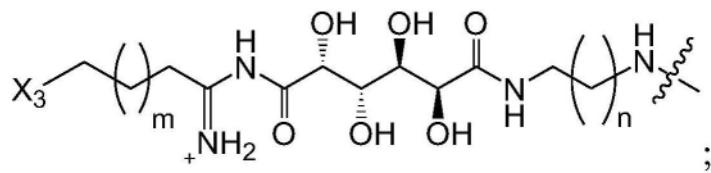
链C是：



端基D是：



或



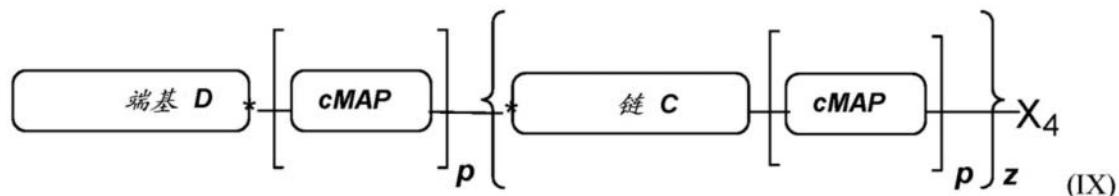
p在从1至100的范围内；

q在从12至1200的范围内；

m在每次出现时独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；  
n和r在每次出现时独立地是0、1、2、3、4或5；  
z等于或大于1且多达10；并且  
X<sub>2</sub>在每次出现时独立地是任选地被-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的类似物取代的C<sub>1-6</sub>烷基；并且  
X<sub>3</sub>是-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的类似物。

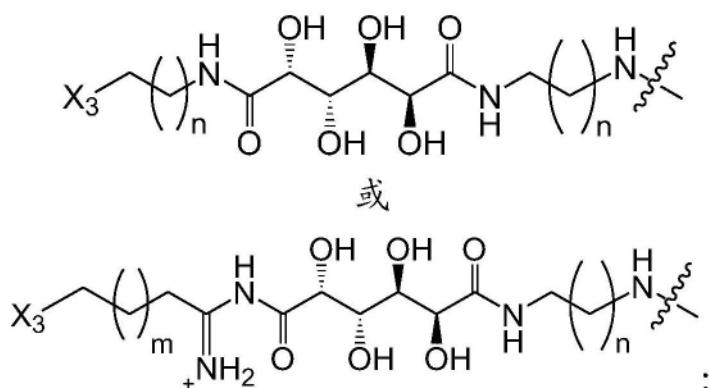
12. 如权利要求11所述的纳米颗粒，其中m在每次出现时独立地是4、5或6。

13. 如权利要求1所述的纳米颗粒，其中所述聚合物由式(IX)的结构描述：

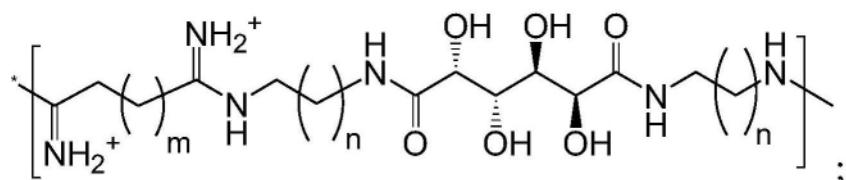


其中

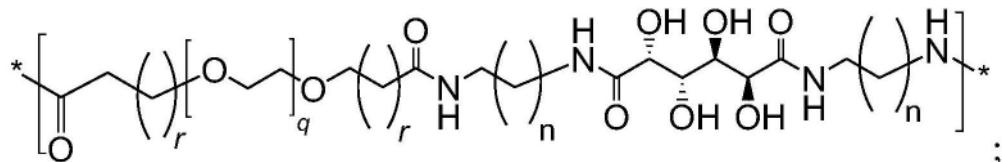
端基D是：



cMAP是：



链C是：



p在从1至100的范围内；

q在从12至1200的范围内；

m在每次出现时独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

n和r在每次出现时独立地是0、1、2、3、4或5；

z等于或大于1且多达10，并且

$X_3$ 和 $X_4$ 在每次出现时独立地是-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)、-N(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的类似物。

14. 如权利要求13所述的纳米颗粒,其中m在每次出现时独立地是4、5或6。
15. 如权利要求6所述的纳米颗粒,其中m是4、5或6。
16. 如权利要求7所述的纳米颗粒,其中n是1。
17. 如权利要求1所述的纳米颗粒,其中对于(R<sup>A</sup>)n,n是1。
18. 如权利要求1所述的纳米颗粒,其中L是-NH-C(=O)-、-C(=O)-NH-、-O-C(=O)-或-C(=O)-O-。
19. 如权利要求1所述的纳米颗粒,所述纳米颗粒是大体上球形的并且具有在从20nm至300nm的范围内的横截面直径。
20. 如权利要求1所述的纳米颗粒,还缀合至至少一种靶向配体,其中缀合通过在所述至少一种含硼酸聚合物的远端和所述靶向配体之间的缩合连接来发生。
21. 如权利要求20所述的纳米颗粒,其中所述至少一种靶向配体包括抗体、转铁蛋白、细胞受体的配体、细胞受体蛋白、适体;或者抗体、转铁蛋白、细胞受体的配体、或细胞受体蛋白的片段。
22. 如权利要求20所述的纳米颗粒,其中单个靶向配体被缀合至每个纳米颗粒。
23. 如权利要求20所述的纳米颗粒,其中多于一个的靶向配体经由缀合至所述纳米颗粒的多于一种的含硼酸聚合物被缀合至所述纳米颗粒。
24. 如权利要求1至23中任一项所述的纳米颗粒,还包含包封的或缀合的生物剂。
25. 如权利要求24所述的纳米颗粒,其中所述生物剂是多核苷酸或小分子治疗剂。
26. 如权利要求24所述的纳米颗粒,其中所述生物剂是小分子药物、抗生素、类固醇、多核苷酸、质粒、肽、肽片段、螯合剂或生物活性大分子。
27. 如权利要求24所述的纳米颗粒,其中所述生物剂是化疗剂。
28. 如权利要求24所述的纳米颗粒,其中所述生物剂是埃博霉素、基于喜树碱的药物、紫杉醇、siRNA、shRNA、miRNA、反义寡核苷酸、适体或其组合。
29. 如权利要求26所述的纳米颗粒,其中所述多核苷酸是基因组DNA、cDNA、mRNA、siRNA、shRNA、miRNA、反义寡核苷酸或嵌合多核苷酸。
30. 一种药物组合物,包含至少一种如权利要求24-29中任一项所述的纳米颗粒,以及药学上可接受的载体或赋形剂。
31. 一种药物组合物,包含多于一个如权利要求24-29中任一项所述的纳米颗粒,以及药学上可接受的载体或赋形剂。
32. 如权利要求30或31所述的药物组合物,呈含水悬浮液的形式。
33. 如权利要求32所述的药物组合物,其中所述含水悬浮液还包含生理学上可接受的缓冲液。
34. 如权利要求24-29中任一项所述的纳米颗粒在制造药物中的用途,其中所述生物剂的生物利用度相对于施用所述生物剂本身被改进。

## 基于阳离子粘酸聚合物的递送系统

[0001] 本申请是申请日为2016年06月13日,申请号为201680050424.6,发明名称为“基于阳离子粘酸聚合物的递送系统”的申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2015年7月1日提交的美国专利申请序号62/187,366的优先权的权益,该专利申请的内容为了所有目的通过引用并入本文。

### 技术领域

[0004] 本公开内容涉及用于递送生物剂的基于聚合物和聚合物缀合物的纳米颗粒递送系统,以及制备和使用这些组合物的方法。

[0005] 背景

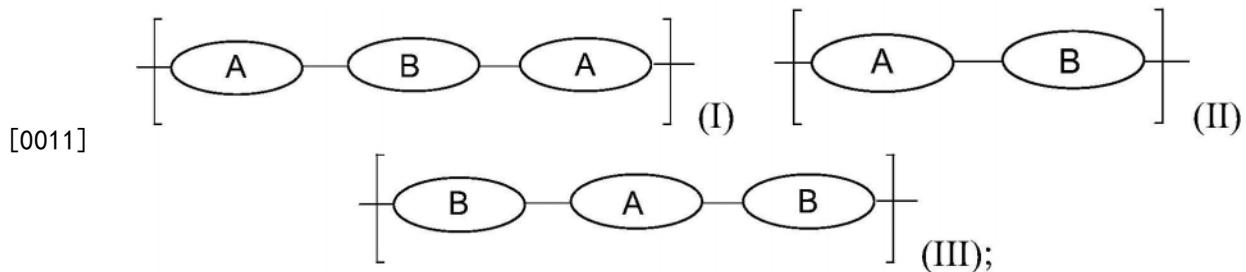
[0006] 使用RNA干扰(RNAi)作为其作用机制的治疗剂对于治疗人类疾病具有很大的前景。例如,siRNA对于用作治疗剂具有有吸引力的特征,包括:(i)基本上靶向任何基因的能力(因此,所有靶在原则上是可成药的),(ii)对于在良好设计的siRNA中的mRNA抑制的有效性、单位数的、皮摩尔的IC<sub>50</sub>(50%抑制所需的浓度),(iii)可以使脱靶效应(off-target effect)和免疫刺激最小化而没有损害效力和靶特异性的化学改性和序列设计,以及(iv)催化的RNAi作用机制,导致对mRNA靶表达的延长的siRNA抑制。尽管将siRNA翻译成有效且高效的治疗剂的主要障碍是将核酸递送至靶,但基于siRNA的实验性治疗剂已经到达临床。

[0007] 为了癌症治疗研究的治疗剂主要是全身施用的,并且在其制剂中使用某种类型的合成化合物(带正电荷的脂类或聚合物)来递送siRNA。现在许多的这些制剂被称为纳米颗粒(NP)。CALAA-01是第一种到达临床用于治疗癌症的基于siRNA的治疗剂。此靶向纳米颗粒包含通过聚合物上的正电荷和siRNA骨架上的负电荷之间的静电相互作用与siRNA一起组装的基于环糊精的聚阳离子(CDP)。CALAA-01能够将siRNA递送至患者中的实体瘤,并释放利用RNAi机制抑制靶的功能性siRNA(人类中的第一个实例)。虽然CALAA-01揭示了若干积极的属性,但其缺点中的一个是有非常有限的循环时间(circulation time)。在动物(小鼠、大鼠、狗和非人类灵长类动物)中观察到的CALAA-01的快速清除也在人类中观察到。

[0008] 概述

[0009] 开发既增加含siRNA的纳米颗粒的循环时间且减少制剂中的非siRNA组分的量的用于siRNA递送的聚合物体系将是有利的。本公开内容涉及克服现有技术中的某些缺点的递送系统。在本公开内容的各方面中的是用于体内siRNA递送的基于阳离子粘酸的聚合物(cMAP)的家族(包括二嵌段共聚物和三嵌段共聚物)以及由其衍生的纳米颗粒。在本说明书中更多地描述了这些化合物和结构以及它们的制备方法和使用方法。

[0010] 本公开内容的某些实施方案提供了包含交替的带电荷的和不带电荷的区段的聚合物,所述交替的带电荷的和不带电荷的区段包含以下式(I)或式(II)或式(III)的结构单元中的一种或更多种:



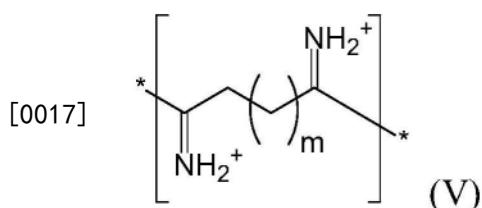
[0012] 其中

[0013] A是不带电荷的区段,所述不带电荷的区段包含聚亚烷基二醇(polyalkylene glycol);

[0014] B是带阳离子电荷的区段(cationically charged segment),所述带阳离子电荷的区段包含至少一种多羟基连接部分(polyhydroxy linkage),所述至少一种多羟基连接部分包含至少一对邻位二醇。

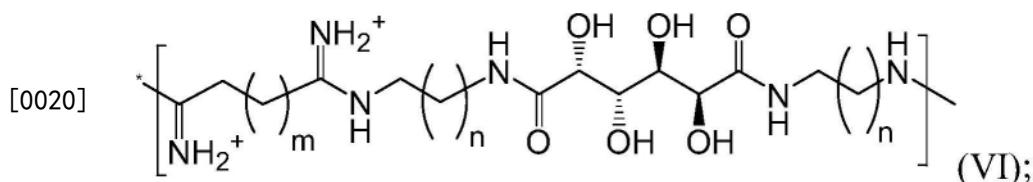
[0015] 在某些方面中,A是或包含聚乙二醇和适当的连接基团。在其他实施方案中,这些聚合物中的聚亚烷基二醇部分具有在从约500道尔顿至约50,000道尔顿的范围内的标称数均分子量。

[0016] 在重叠的方面中,B是包含至少一种多羟基的带阳离子电荷的区段,所述至少一种多羟基包含至少一对邻位二醇,所述至少一对邻位二醇包含糖连接部分。在某些实施方案中,这些多羟基连接部分包括粘酸。B还可以包含至少一种重复的亚单元,所述重复的亚单元包含式(V)的结构:



[0018] 其中m是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,优选地4-6或5。

[0019] 在其他实施方案中,在这些聚合物中,B可以包含至少一种重复的亚单元,所述重复的亚单元包含cMAP,所述cMAP的亚单元结构表示为式(VI):

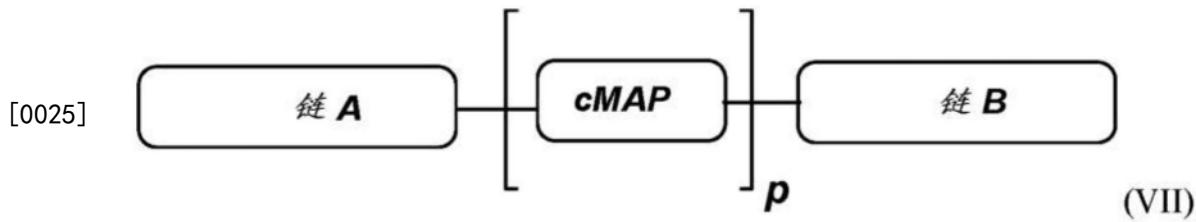


[0021] 其中

[0022] m在每次出现时独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,优选地4-6或5;并且

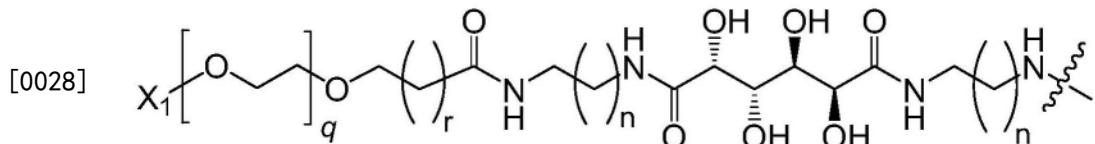
[0023] n在每次出现时独立地是1、2、3、4或5。

[0024] 在某些特定的实施方案中,聚合物可以由式(VII)的结构描述:

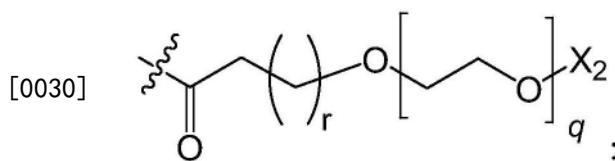


[0026] 其中

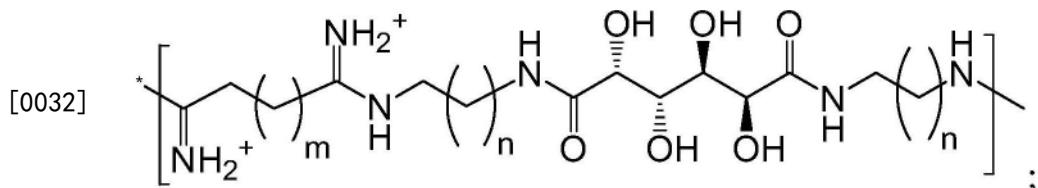
[0027] 链A是



[0029] 链B是



[0031] cMAP是



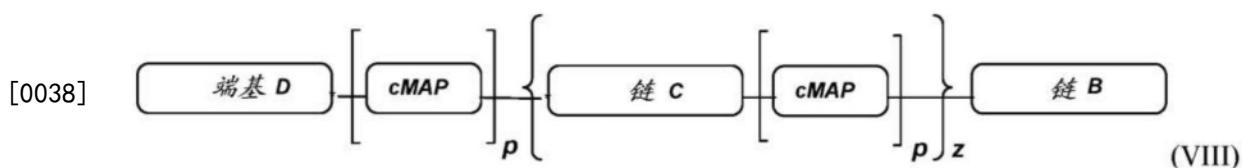
[0033] p和q足以分别包含cMAP和PEG的亚单元提供独立地在从约500Da至约50,000Da的范围内的数均分子量；

[0034] m在每次出现时独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，优选地4-6或5；

[0035] n和r在每次出现时独立地是0、1、2、3、4或5；并且

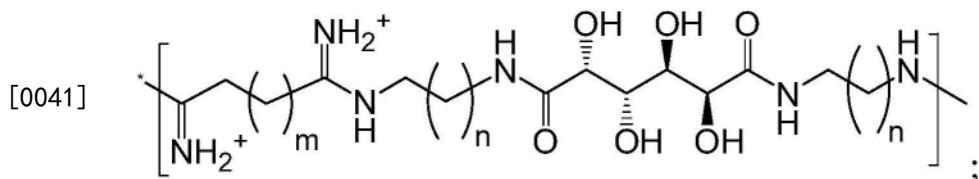
[0036] X<sub>1</sub>和X<sub>2</sub>在每次出现时独立地是任选地被-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)、-N(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的类似物取代的C<sub>1-6</sub>烷基。

[0037] 被认为在本公开内容的范围内的其他结构包括由式(VIII)的结构描述的那些聚合物：

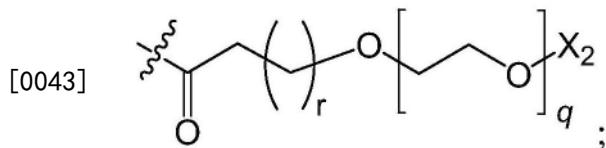


[0039] 其中

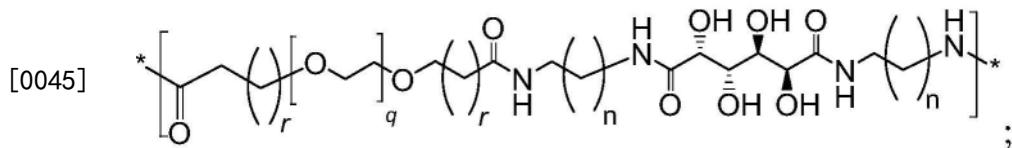
[0040] cMAP是



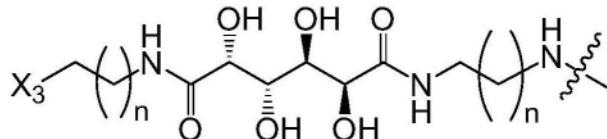
[0042] 链B是



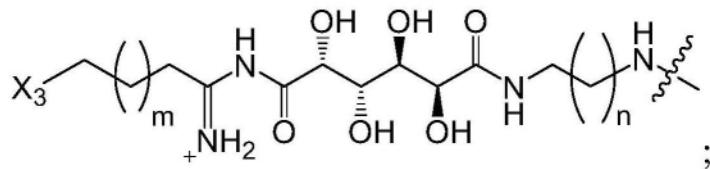
[0044] 链C是



[0046] 端基D是：



[0047] 或



[0048] p和q足以以为分别包含cMAP和PEG的亚单元提供独立地在从约500Da至约50,000Da的范围内的数均分子量；

[0049] m在每次出现时独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，优选地4-6或5；

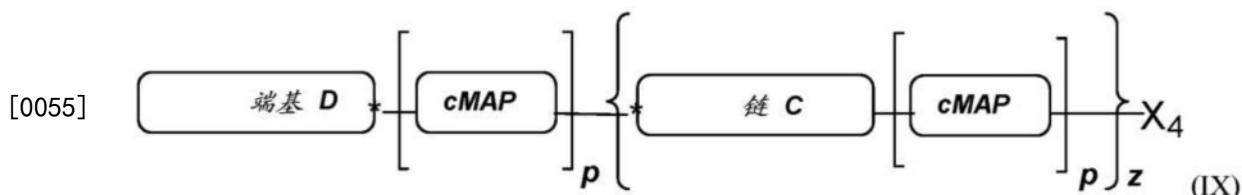
[0050] n和r在每次出现时独立地是0、1、2、3、4或5；

[0051] z等于或大于1(多达约2、4、6、8或10)；并且

[0052] X<sub>2</sub>在每次出现时独立地是任选地被-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)、-N(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的类似物取代的C<sub>1-6</sub>烷基；并且

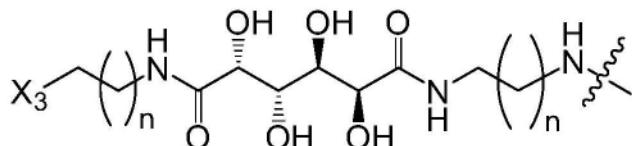
[0053] X<sub>3</sub>是-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)、-N(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的类似物。

[0054] 另外其他的聚合物可以由式(IX)的结构描述：

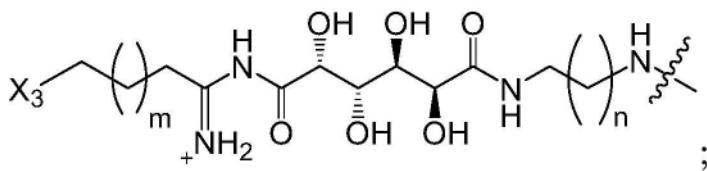


[0056] 其中

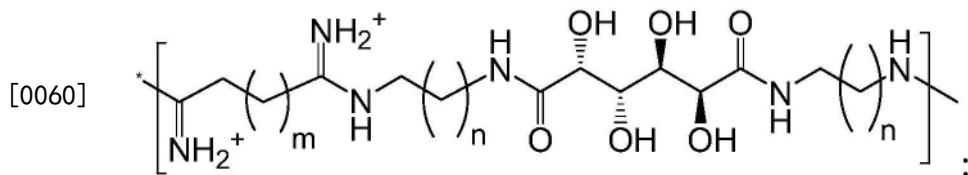
[0057] 端基D是：



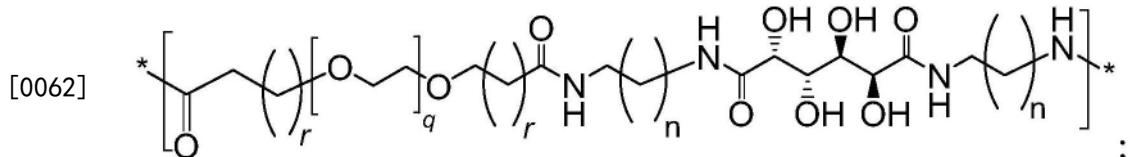
[0058] 或



[0059] cMAP是



[0061] 链C是



[0063] p和q足以为分别包含cMAP和PEG的亚单元提供独立地在从约500Da至约50,000Da、优选地从约1000Da至约5000Da的范围内的数均分子量；

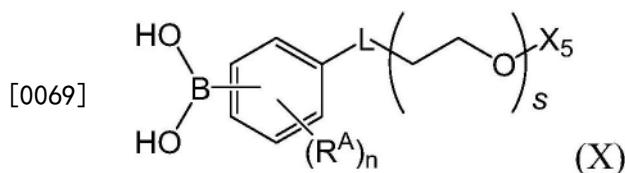
[0064] m在每次出现时独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，优选地4-6或5；

[0065] n和r在每次出现时独立地是0、1、2、3、4或5；

[0066] z等于或大于1(多达约2、4、6、8或10)；并且

[0067] X<sub>3</sub>和X<sub>4</sub>在每次出现时独立地是-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的类似物。

[0068] 还被认为在本公开内容的范围内的是聚合物缀合物，每个聚合物缀合物包含具有前述结构中的任一种的聚合物和包含式(X)的结构的第二含硼酸(boronic acid)聚合物



[0070] 其中

[0071] 聚合物和第二含硼酸聚合物通过在式(X)的硼酸部分与式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)或式(IX)的多羟基连接部分的至少一对邻位二醇之间的硼酸酯缩合连接部分彼此可逆地连接，X<sub>5</sub>在此连接的远端处；

[0072] R<sup>A</sup>是硝基(或其他吸电子基团)；

[0073] n是0、1、2、3或4，优选地1；

[0074] s是20-1200；

[0075] L是在苯基环和聚环氧乙烷连接部分之间的连接基团;并且

[0076] X<sub>5</sub>是任选地被-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的类似物取代的C<sub>1-6</sub>烷基。

[0077] 本公开内容还包括包含任何本文描述的聚合物或聚合物缀合物的一种纳米颗粒或多于一种的(plurality of)纳米颗粒。优选地,纳米颗粒是单分散的。纳米颗粒还可以包含包封的生物剂例如siRNA,和/或可以被进一步缀合至一种或更多种靶向配体(targeting ligand)。当施用至患者时,生物剂的生物利用度比当施用生物剂本身时生物剂的相同的生物利用度更好。

[0078] 在某些另外的实施方案中,任选地包含生物剂和/或靶向配体的聚合物、聚合物缀合物和纳米颗粒被配制成药物组合物。其他实施方案提供通过将这些被配制的组合物施用至需要通过各自的生物剂治疗的患者来治疗患者的方法。

[0079] 另外其他的实施方案提供制备本发明的聚合物的方法。

[0080] 附图简述

[0081] 当结合附图阅读时,进一步地理解本申请。为了说明本主题的目的,在这些附图中示出了本主题的示例性实施方案;然而,本文公开的主题不限于所公开的具体的方法、装置和系统。此外,附图不一定按比例绘制。

[0082] 在附图中:

[0083] 图1示出阳离子粘酸聚合物(cMAP)的合成的示意图。

[0084] 图2示出cMAP-PEG共聚物的合成的示意图。

[0085] 图3示出mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物的合成的示意图。

[0086] 图4示出5-硝基苯基硼酸-PEGm的合成的示意图。

[0087] 图5示出粘酸乙二胺的结构(参见表1)。

[0088] 图6示出辛二亚氨酸二甲酯(Dimethyl Suberimidate)的结构(参见表2)。

[0089] 图7示出水解成二甲酯的辛二亚氨酸二甲酯的结构(参见表2)。

[0090] 图8示出一侧水解成羧酸盐的辛二亚氨酸二甲酯的结构(参见表2)。

[0091] 图9示出阳离子粘酸聚合物(cMAP)的结构。

[0092] 图10示出cMAP的示例性端基。聚合物可以具有一个胺端基和一个甲氧基端基(上面)、两个胺端基(中间)或两个甲氧基端基(下面)。少量的羧酸还被观察到,并且将由DMS的一端的水解产生。

[0093] 图11是cMAP的<sup>1</sup>H NMR (600MHz)光谱,其示出了来自邻近端基官能团的甲氧基基团和亚甲基基团的共振。

[0094] 图12示出使用RiboGreen测定的siRNA的百分比与电荷比(被cMAP、cMAP-PEG5k共聚物和mPEG5k-cMAP-PEG5km三嵌段聚合物包封的)之间的关系。

[0095] 图13示出cMAP-PEG共聚物RiboGreen测定,其示出对于3.4k PEG嵌段和5k PEG嵌段的以3+/-的电荷比的siRNA包封。

[0096] 图14示出mPEG-cMAP-PEGm三嵌段RiboGreen测定,其示出对于2k PEG嵌段和5k PEG嵌段的以3+/-的电荷比的siRNA包封。

[0097] 图15示出5-硝基苯基硼酸-PEGm的pH依赖性,5-硝基苯基硼酸-PEGm在约7.4的生理pH与cMAP上的邻位二醇形成硼酸酯,但硼酸酯将在酸性pH解离。

[0098] 图16A和图16B示出了示出所形成的具有siRNA的多种NP的两个图解的示意图：cMAP(I, 不稳定的且未注射的)、cMAP+5-nPBA-PEGm(A)、cMAP-PEG共聚物(B)、cMAP-PEG共聚物+5-nPBA-PEGm(C)、mPEG-cMAP-PEGm三嵌段(D)以及mPEG-cMAP-PEGm三嵌段+5-nPBA-PEGm(E)。(注：插图不按比例或化学计量绘制，并且不反映颗粒如何被配制-例如在PEG化的制剂中，在添加siRNA之前，首先将PEG添加至聚合物)。

[0099] 图17示出cMAP siRNA NP盐稳定性数据。在没有PEG的情况下，cMAP-siRNA NP一旦在1X PBS中就不稳定，但当使用5-nPBA-PEGm来稳定NP时，其持续2天是稳定的。

[0100] 图18示出cMAP-PEG-cMAP纯的三嵌段siRNA NP盐稳定性。在没有添加5-nPBA-PEGm的情况下，以1+/-电荷比配制的cMAP-PEG3.4k-cMAP siRNA NP一旦在1X PBS中就聚集，但当cMAP上每两个二醇基团添加至少一个5-nPBA-PEGm(0.5个PEG)至制剂时，其是稳定的。

[0101] 图19示出cMAP-PEG-cMAP纯的三嵌段siRNA NP盐稳定性。在没有添加5-nPBA-PEGm的情况下，以3+/-电荷比配制的cMAP-PEG3.4k-cMAP siRNA NP一旦在1X PBS中就聚集，但当cMAP上每两个二醇基团添加至少一个5-nPBA-PEGm(0.5个PEG)至制剂时，其是稳定的。

[0102] 图20示出cMAP-PEG-cMAP纯的三嵌段siRNA NP盐稳定性。在没有添加5-nPBA-PEGm的情况下，以1+/-电荷比配制的cMAP-PEG5k-cMAP siRNA NP一旦在1X PBS中就聚集，但当cMAP上每两个二醇基团添加至少一个5-nPBA-PEGm(0.5个PEG)至制剂时，其是稳定的。

[0103] 图21示出NP制剂的低温TEM图像：cMAP+5-nPBA-PEG5km(A)、cMAP-PEG5K共聚物(B)、cMAP-PEG5K共聚物+5-nPBA-PEG5km(C)、mPEG5k-cMAP-PEG5km(D)以及mPEG5k-cMAP-PEG5km+5-nPBA-PEG5km(E)。

[0104] 图22A-22E示出DLS纳米颗粒尺寸分布：关于cMAP+5-nPBA-PEGm NP的通过DLS的对数正态尺寸分布(图22A)；关于CMAP-PEG共聚物NP的通过DLS的对数正态尺寸分布(图22B)；关于cMAP-PEG共聚物+5-nPBA-PEGm NP的通过DLS的对数正态尺寸分布(图22C)；关于mPEG-cMAP-PEGm NP的通过DLS的对数正态尺寸分布(图22D)；以及关于mPEG-cMAP-PEGm+5-nPBA-PEGm NP的通过DLS的对数正态尺寸分布(图22E)。

[0105] 图23A-23E示出关于cMAP+5-nPBA-PEGm NP的通过低温TEM的尺寸分布(图23A)；关于cMAP-PEG共聚物NP的通过低温TEM的尺寸分布(图23B)；关于cMAP-PEG共聚物+5-nPBA-PEGm NP的通过低温TEM的尺寸分布(图23C)；关于mPEG-cMAP-PEGm NP的通过低温TEM的尺寸分布(图23D)；以及关于mPEG-cMAP-PEGm+5-nPBA-PEGm NP的通过低温TEM的尺寸分布(图23E)。

[0106] 图24A-24C示出与单独的siRNA相比，配制的siRNA NP的PK。图24A示出单独的siRNA与CALAA-01、具有用于稳定的AD<sub>2</sub>-PEG的CDP系统、以及cMAP+5-nPBA-PEGm的比较，cMAP+5-nPBA-PEGm示出比具有AD<sub>2</sub>-PEG的CDP和CALAA-01更强的稳定性。图24B示出cMAP+5-nPBA-PEGm与共聚物制剂和三嵌段制剂的比较。图24C示出cMAP+5-nPBA-PEGm与过量组分被过滤掉的三嵌段制剂的比较。n=3只小鼠。

[0107] 图25示出在Balb/c小鼠和裸小鼠中，mPEG-cMAP-PEGm siRNA NP的循环时间的数据是类似的。n=3只小鼠。血清中余留的Cy3-siRNA分数作为时间的函数(至60min)

[0108] 说明性实施方案的详述

[0109] 本公开内容涉及克服现有技术中的某些缺点的递送系统。

[0110] 本发明人已经研究了本文其它地方提到的短循环时间的起源，并且已经示出

CALAA-01在肾脏中的肾小球基底膜(GBM)处分解(disassemble)。本发明人推测此清除机制可能影响主要通过阳离子递送组分与阴离子核酸之间的静电相互作用来组装的任何NP制剂。使用阳离子聚合物或脂类的其他siRNA递送系统已示出类似的短循环时间和肾清除率。

[0111] 除了用于在空间上稳定所形成的NP的大量材料例如聚(乙二醇)(PEG)之外,用于体内递送siRNA的许多当前的聚合物系统和脂质体系统在其制剂中包含过量的阳离子组分(正负电荷比通常大于1)。过量的阳离子组分在体内可能具有不需要的副作用,引起例如血小板聚集、补体活化以及炎症反应的不良反应。

[0112] 开发既增加含siRNA的纳米颗粒的循环时间且减少制剂中的非siRNA组分的量的用于siRNA递送的聚合物系统将是有利的。本文描述的是用于体内siRNA递送的基于阳离子粘酸的聚合物(cMAP)的家族。此聚合物递送系统具有类似于CDP系统的某些特征,因为后一系统确实在人类中起作用。此处开发的阳离子聚合物使用较简单的糖,示例为粘酸,而不是环糊精,并且使可选择的策略能够用于表面官能化。与经由用金刚烷(AD)的包合络合物形成(CDP)的纳米颗粒表面官能化相反,cMAP包含邻位二醇,所述邻位二醇是用于硼酸的结合位点,硼酸可以用于PEG化和靶向基于cMAP的纳米颗粒。用于递送小分子药物的、用包含粘酸的聚合物形成的纳米颗粒已经由此组装方法并入靶向剂(targeting agent)。基本的cMAP还与官能化的PEG进一步反应成直链的嵌段共聚物。在cMAP的端基处与双活化的羧酸-PEG或活化的羧酸-PEG-甲氧基(PEGm)反应产生两种可能的共聚物:cMAP-PEG共聚物或mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物。cMAP-PEG共聚物可以与siRNA组装以在表面上形成PEG环(PEG loop)来稳定纳米颗粒,而mPEG-cMAP-PEGm三嵌段可以在纳米颗粒表面上形成PEG刷子构型(PEG brush configuration)。后者的三嵌段方法先前已经用CDP和质粒DNA(pDNA)来探索,并且该三嵌段聚合物不具有包封pDNA的能力。已经示出包封pDNA的聚合物可能不善于缩合siRNA,并且反之亦然。此处,我们展示了mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物能够形成具有在小鼠中增加的循环时间的含siRNA的纳米颗粒(其可以使制剂中的约30wt%是siRNA)。另外,纳米颗粒可以直接在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中容易地组装,而没有任何另外的5-nPBA-PEGm来稳定NP。

[0113] 本公开内容可以通过参照与附图和实施例相关的以下描述而更容易地理解,其全部形成本公开内容的一部分。应理解,本公开内容不限于本文中描述的或示出的具体的产物、方法、条件或参数,并且本文中使用的术语是用于仅通过实例的方式描述具体实施方案的目的且不意图是任何要求保护的发明的限制。类似地,除非另外具体陈述,否则关于用于改进的可能的作用机制或作用模式或者理由的任何描述意味着仅是例证性的,并且本文中的公开内容将不被用于改进的任何这样建议的作用机制或作用模式或者理由的正确性或不正确性所约束。贯穿本文,认识到的是,该描述涉及组合物以及制造和使用所述组合物的方法。换言之,在本公开内容描述或要求保护与组合物或者制备或使用组合物的方法相关的特征或实施方案时,应理解的是,这样的描述或权利要求意图使这些特征或实施方案扩展至在这些上下文中的每个中的实施方案(即组合物、制备方法和使用方法)。

[0114] 在本公开内容中,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数指代物,并且对具体数值的提及包括至少该具体值,除非上下文另外清楚地指示。因此,例如,对“一种材料”的提及是对本领域技术人员已知的此类材料及其等同物中的至少一种的提及,等等。

[0115] 当值通过使用叙词“约”被表示为近似值时,将理解,该具体值形成另一个实施方

案。通常，术语“约”的使用指示近似值并且将在该术语被使用的具体上下文中基于该术语的功能来理解，该近似值可以取决于通过公开的主题所寻求获得的期望的性质而变化。本领域技术人员将能够按常规解释该术语。在某些情况下，用于具体值的有效数字的数目可以是确定词语“约”的程度的一个非限制性方法。在其他情况下，在一系列值中使用的分级可以用于确定对于用于每个值的术语“约”是可用的预期范围。如果存在，那么所有的范围是包括端点的并且是可组合的。换言之，对以范围陈述的值的提及包括在该范围内的每个值。

[0116] 将理解的是，为了清楚起见，在本文中的不同的实施方案的上下文中描述的本公开内容的某些特征也可以在单一的实施方案中被组合地提供。换言之，除非明显地不相容的或具体地排除的，否则每个单个的实施方案被视为与任何其他实施方案是可组合的并且这样的组合被认为是另一个实施方案。相反地，为了简洁起见，在单一的实施方案的上下文中描述的本公开内容的各种特征也可以被单独提供或以任何子组合来提供。最后，虽然实施方案可以被描述为一系列步骤的一部分或更通用的结构的一部分，但是每个所述步骤也可以被认为是与其他实施方案可组合的、本身独立的实施方案。

[0117] 过渡性术语“包含 (comprising)”、“基本上由……组成”和“由……组成 (consisting) ”意图包含在专利行话中它们被普遍接受的含义；即，(i) 与“包括 (including)”、“包含 (containing)”或“以……为特征”同义的“包含 (comprising)”是包括端点的或开放式的并且不排除另外的、未叙述的要素或方法步骤；(ii) “由……组成”排除在权利要求中未指定的任何要素、步骤或成分；并且(iii) “基本上由……组成”将权利要求的范围限制于要求保护的发明的指定的材料或步骤“以及不实质地影响要求保护的发明的基本特性和新颖特性的材料或步骤”。作为实例，以措辞“包含”(或其等同物)描述的实施方案也提供以“由……组成”和“基本上由……组成”独立地描述的那些。对于以“基本上由……组成”提供的那些实施方案，基本的且新颖的特性是制备和使用本发明的材料的方法(和在此类方法中使用的系统以及由其获得的组合物)的简便的可操作性、以及材料本身，其中该方法和材料能够仅使用权利要求中提供的要素递送重要的性质。即，虽然其他材料也可以在本发明的组合物中存在，但是这些额外材料的存在对于提供所描述的那些组合物的益处不是必需的(即，效果可以是累加的)和/或这些另外的材料不损害产品组合物的性能。类似地，在另外的步骤也可以在该方法中使用的情况下，另外的步骤的存在对于实现所描述的效果或益处不是必需的和/或它们不损害所陈述的效果或益处。

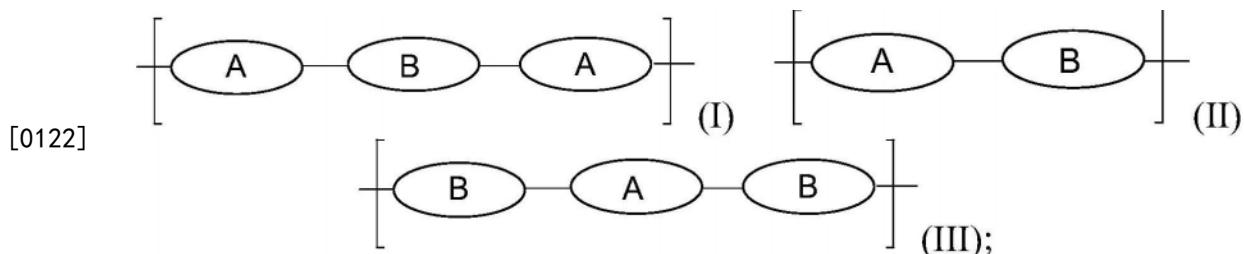
[0118] 当呈现出清单时，除非另外陈述，否则将理解，该清单的每个单个的要素以及该清单的每种组合是单独的实施方案。例如，呈现为“A、B或C”的实施方案的清单将被解释为包括实施方案“A”、“B”、“C”、“A或B”、“A或C”、“B或C”或“A、B或C”。类似地，诸如C<sub>1-3</sub>烷基的术语还包括作为单独的实施方案的C<sub>1</sub>烷基、C<sub>2</sub>烷基、C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1-2</sub>烷基和C<sub>2-3</sub>烷基。

[0119] 贯穿本说明书，词语被赋予它们的通常含义，如相关领域技术人员将理解的。然而，为了避免误解，某些术语的含义将被特别地定义或澄清。

[0120] 提到的醇、醛、胺、羧酸、酮或其他类似的反应性官能团还包括它们的被保护的类似物。例如，提到的羟基或醇还包括其中羟基被以下保护的那些取代基：乙酰基(Ac)、苯甲酰基(Bz)、苄基(Bn、Bn1)、β-甲氧基乙氧基甲基醚(MEM)、二甲氧基三苯甲基即[双-(4-甲氧基苯基)苯基甲基](DMT)、甲氧基甲基醚(MOM)、甲氧基三苯甲基即[(4-甲氧基苯基)二苯基

甲基]MMT)、对-甲氧基苄基醚(PMB)、甲硫基甲基醚、新戊酰(Piv)、四氢吡喃基(THP)、四氢呋喃(THF)、三苯甲基(三苯基甲基、Tr)、甲硅烷基醚(最常用的甲硅烷基醚包括三甲基甲硅烷基(TMS)醚、叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)醚、三异丙基甲硅烷基氧基甲基(TOM)醚、和三异丙基甲硅烷基(TIPS)醚)、乙氧基乙基醚(EE)。提到的胺还包括其中胺被以下保护的那些取代基:BOC甘氨酸、苄氧羰基(Cbz)、对甲氧基苄基羰基(Moz或MeOZ)、叔丁氧羰基(BOC)、9-芴甲氧羰基(FMOC)、乙酰基(Ac)、苯甲酰基(Bz)、苄基(Bn)、氨基甲酸酯、对甲氧基苄基(PMB)、3,4-二甲氧基苄基(DMPM)、对甲氧基苯基(PMP)、甲苯磺酰基(Ts)基团、或磺酰胺(Nosyl和Nps)基团。提到的包含羰基基团的取代基还包括其中羰基被以下保护的那些取代基:缩醛基团或缩酮基团、缩羰酯基团、或diathane基团。提到的包含羧酸或羧酸酯基团的取代基还包括其中羧酸或羧酸酯基团被以下保护的那些取代基:其甲酯、苄酯、叔丁酯、2,6-二取代的苯酚(例如2,6-二甲基苯酚、2,6-二异丙基苯酚、2,6-二叔丁基苯酚)的酯、甲硅烷基酯、原酸酯或噁唑啉。

[0121] 本公开内容的实施方案包括聚合物,所述聚合物包含交替的带电荷的和不带电荷的区段,所述交替的带电荷的和不带电荷的区段包含以下式(I)或式(II)或式(III)的结构单元中的一种或更多种:

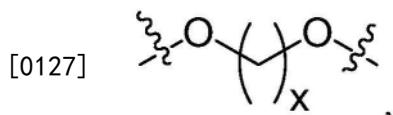


[0123] 其中

[0124] A是不带电荷的区段,所述不带电荷的区段包含聚亚烷基二醇;

[0125] B是带阳离子电荷的区段,所述带阳离子电荷的区段包含至少一种多羟基连接部分,所述至少一种多羟基连接部分包含至少一对邻位二醇。

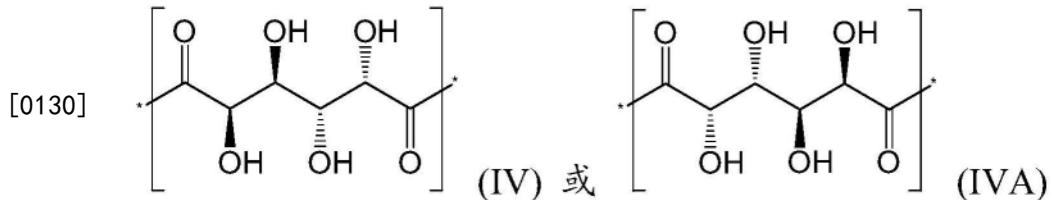
[0126] 在本公开内容的聚合物中,术语聚亚烷基二醇指的是包含以下官能连接部分的任何聚合物:



[0128] 其中x在从1至约6的范围内,尽管实际上且优选地是2或3、优选地2(在较高的x值,聚亚烷基二醇示出差的亲水性)。因此,在优选的实施方案中,A是或包含聚乙二醇和任选的(但优选地)适当的连接基团,该连接基团对于结合至一般聚合物的其他组分是必要的。优选地,在每次出现时,聚亚烷基二醇通常具有并且聚乙二醇特别地具有在从约500道尔顿至约50,000道尔顿的范围内的标称数均分子量( $MW_n$ )。在更具体的实施方案中,聚亚烷基二醇/聚乙二醇部分具有以下的 $MW_n$ 值:从约500Da至约1kDa、从约1kDa至约5kDa、从约5kDa至约10kDa、从约10kDa至约15kDa、从约15kDa至约20kDa、从约20kDa至约30kDa、从约30kDa至约40kDa、从约40kDa至约50kDa、或这些范围中的两个或更多个的任何组合。

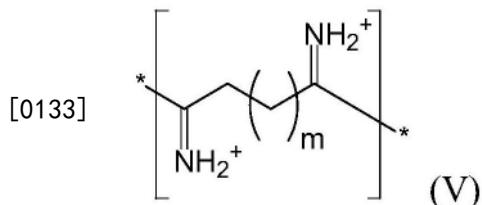
[0129] 在这些实施方案的某些中,B是带阳离子电荷的区段,所述带阳离子电荷的区段包

含至少一种多羟基连接部分,所述至少一种多羟基连接部分包含至少一对邻位二醇。多羟基糖连接部分或碳水化合物连接部分(carbohydrate linkage)对于其生物相容性是优选的,尽管还可以使用手性和非手性的合成的多羟基连接部分(例如,多羟基(甲基)丙烯酸)。在某些优选的实施方案中,多羟基连接部分包括粘酸,其中B包含至少一种重复的亚单元,所述重复的亚单元包含式(IV)的结构,式(IV)的结构呈现为(IV)或(IVA):

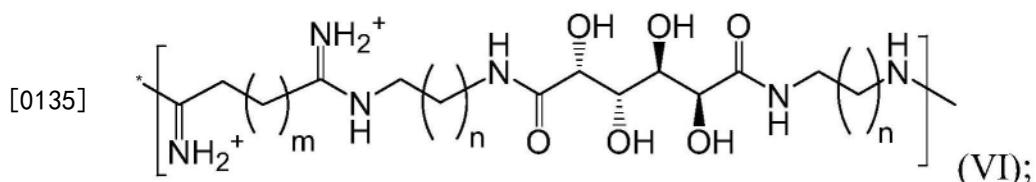


[0131] 这些结构是彼此的旋转异构体,并且为了本发明的目的在功能上是等效的。如本文使用的,这些结构中的一种的表述在使用其的上下文中意味着这些结构中的任一种或两种。

[0132] 在其他实施方案中,B还包含至少一种重复的亚单元,所述重复的亚单元包含式(V)的结构:



[0134] 其中m是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,优选地4-6或5。此类连接部分对于其阳离子特性和对于其便于在连接多羟基(例如粘酸)部分与聚亚烷基二醇中使用是有用的连接基团。当与上文描述的粘酸连接部分组合时,连接部分(IV)和连接部分(V)的组合提供包含至少一种重复的亚单元的亚结构,所述至少一种重复的亚单元包含cMAP,所述cMAP的亚单元结构表示为式(VI):

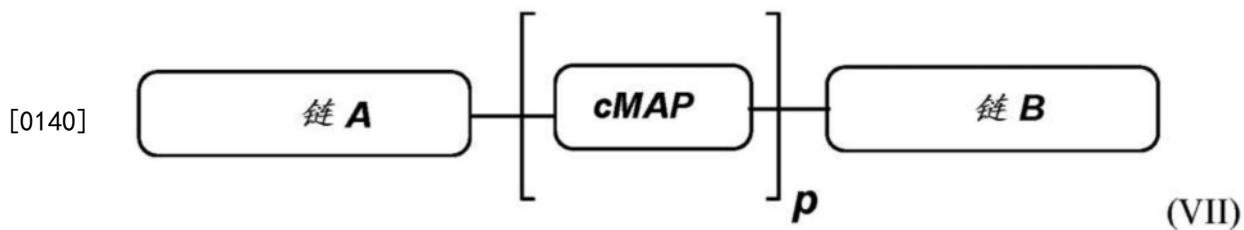


[0136] 其中

[0137] m在每次出现时独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,优选地4-6或5;并且

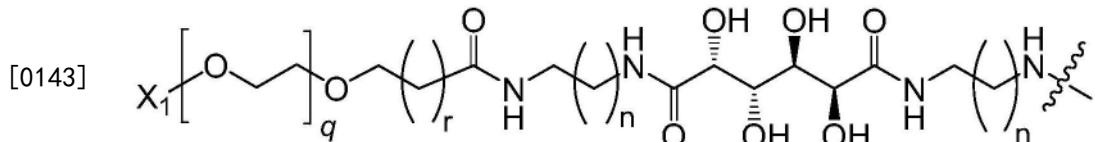
[0138] n在每次出现时独立地是1、2、3、4或5,优选地1。注意,m和n不必限于这些值,并且这些变量的更大的值也可以被认为在本公开内容的范围内。

[0139] 通过这些结构单元(building block),描述一系列更具体的三嵌段聚合物和二嵌段聚合物是可能的。再次地,可以使用实施例中描述的方法、使用那里描述的反应物的同系物来制备下文描述的结构。例如,在某些实施方案中,本公开内容的聚合物包括由式(VII)的结构描述的那些聚合物:

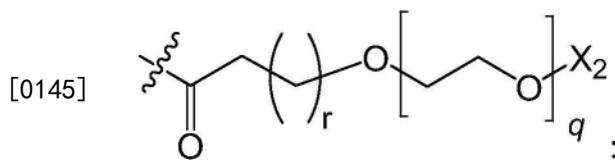


[0141] 其中

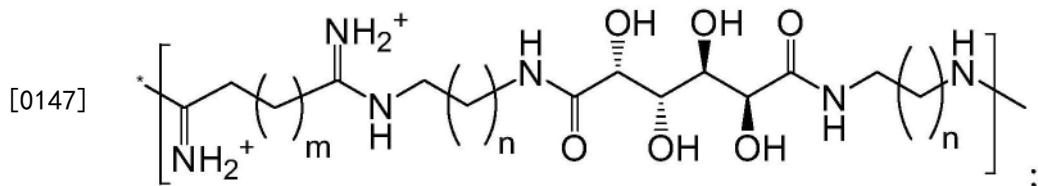
[0142] 链A是



[0144] 链B是



[0146] cMAP是



[0148] p和q足以以为分别包含cMAP和PEG的亚单元提供独立地在从约500Da至约50,000Da的范围内的数均分子量;

[0149] m在每次出现时独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10(或甚至更高),优选地4-6或5;

[0150] n和r在每次出现时独立地是0、1、2、3、4或5(或甚至更高);并且

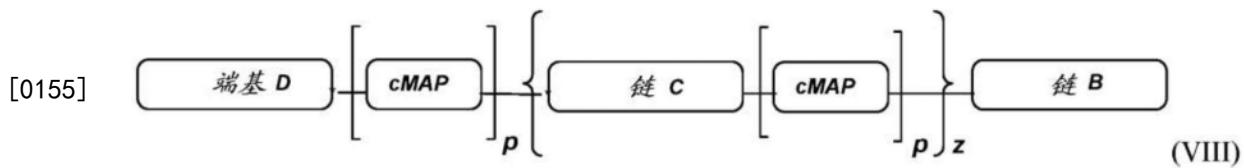
[0151] X<sub>1</sub>和X<sub>2</sub>在每次出现时独立地是任选地被-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)、-N(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的类似物取代的C<sub>1-6</sub>烷基。

[0152] 再次地,p和q的值在每次出现时可以是相同的或不同的,并且彼此相同或不同。对于n和r同样如此;即n和r的值在每次出现时可以是相同的或不同的,并且彼此相同或不同。在某些实施方案中,当m是5并且n是1时,p的数值对应于从约1至约100、优选地从约10至约100的范围。特定的实施方案包括其中p在从约1至约10、从约10至约25、从约25至约50、从约50至约75、从75至约100的范围内、或这些范围中的两个或更多个的任何组合内的那些实施方案。对应于所引用的MW<sub>n</sub>范围的q的数值包括在从约12至约1200的范围内的那些数值。特定的实施方案包括其中q在从约12至约100、从约100至约400、从约400至约800、从约800至约1200的范围内、或这些范围中的两个或更多个的任何组合内的那些实施方案。在特定的实施方案中,q还可以在从约100至约500的范围内。在此实施方案的其他子集中,X<sub>1</sub>和X<sub>2</sub>在每次出现时独立地是-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>-COOH和/或-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>-NH<sub>2</sub>。

[0153] 考虑到链A和链B的性质,此类结构还可以被指定为PEG-cMAP-PEG三嵌段聚合物。

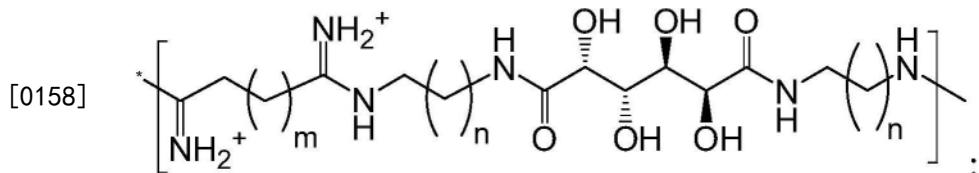
[0154] 在其他实施方案中,本公开内容的聚合物包括由式(VIII)的结构描述的那些聚合

物：

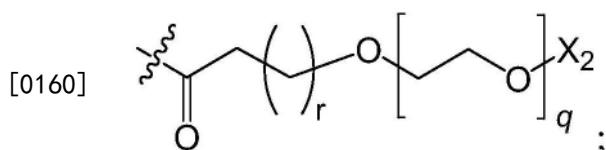


[0156] 其中

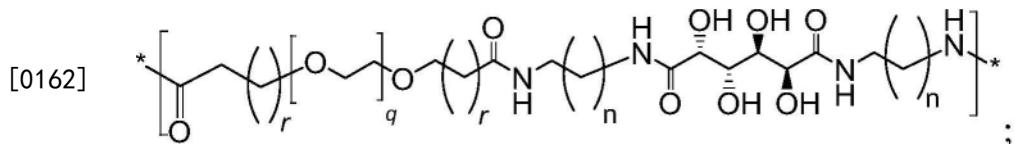
[0157] cMAP是



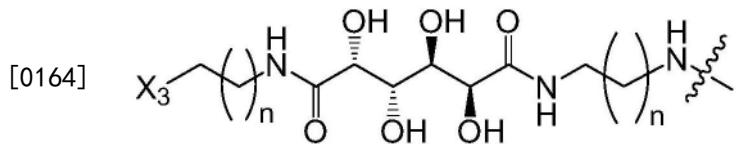
[0159] 链B是



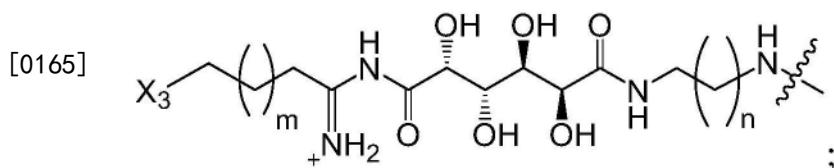
[0161] 链C是



[0163] 端基D是：



或



[0166] p和q足以分别包含cMAP和PEG的亚单元提供独立地在从约500Da至约50,000Da的范围内的数均分子量；

[0167] m在每次出现时独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，优选地4-6或5；

[0168] n和r在每次出现时独立地是0、1、2、3、4或5；

[0169] z等于或大于1(多达约2、4、6、8或10)；并且

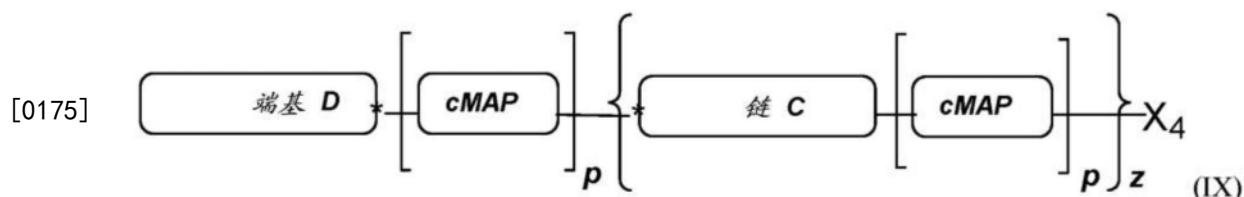
[0170] X<sub>2</sub>在每次出现时独立地是任选地被-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)、-N(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的变体取代的C<sub>1-6</sub>烷基；并且

[0171] X<sub>3</sub>独立地是-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)、-N(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的类似物。

[0172] 再次地, p和q的值在每次出现时可以是相同的或不同的, 并且彼此相同或不同。对于n和r同样如此; 即n和r的值在每次出现时可以是相同的或不同的, 并且彼此相同或不同。在某些实施方案中, 当m是5并且n是1时, p的数值对应于从约1至约100、优选地从约10至约100的范围。特定的实施方案包括其中p在从约1至约10、从约10至约25、从约25至约50、从约50至约75、从75至约100的范围内、或这些范围中的两个或更多个的任何组合内的那些实施方案。对于所引用的MW<sub>n</sub>范围的q的数值包括在从约12至约1200的范围内的那些数值。特定的实施方案包括其中q在从约12至约100、从约100至约400、从约400至约800、从约800至约1200的范围内、或这些范围中的两个或更多个的任何组合内的那些实施方案。在特定的实施方案中, q还可以在从约100至约500的范围内。在此实施方案的其他子集中, X<sub>1</sub>和X<sub>2</sub>在每次出现时独立地是-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>-COOH和/或-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>-NH<sub>2</sub>。

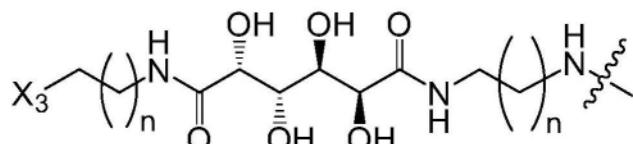
[0173] 考虑到各种链要素和端基要素的性质, 此类结构还可以被指定为cMAP-PEG二嵌段聚合物或PEG-cMAP二嵌段聚合物。

[0174] 在另外其他实施方案中, 本公开内容的聚合物包括由式(IX)的结构描述的那些聚合物:

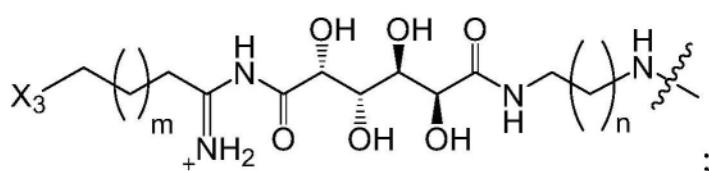


[0176] 其中

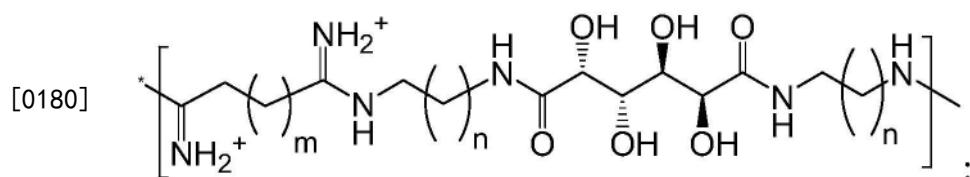
[0177] 端基D是:



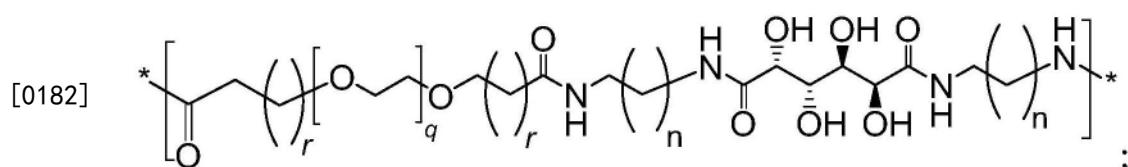
[0178] 或



[0179] cMAP是



[0181] 链C是



[0183] p和q足以分别包含cMAP和PEG的亚单元提供独立地在从约500Da至约50,000Da、优选地从约1000Da至约5000Da的范围内的数均分子量；

[0184] m在每次出现时独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，优选地4-6或5；

[0185] n和r在每次出现时独立地是0、1、2、3、4或5；

[0186] z等于或大于1(多达约2、4、6、8或10)；并且

[0187]  $X_3$ 和 $X_4$ 在每次出现时独立地是-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)、-N(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的类似物。

[0188] 再次地，p和q的值在每次出现时可以是相同的或不同的，并且彼此相同或不同。对于n和r同样如此；即n和r的值在每次出现时可以是相同的或不同的，并且彼此相同或不同。在某些实施方案中，当m是5并且n是1时，p的数值对应于从约1至约100、优选地从约10至约100的范围。特定的实施方案包括其中p在从约1至约10、从约10至约25、从约25至约50、从约50至约75、从75至约100的范围内、或这些范围中的两个或更多个的任何组合内的那些实施方案。对应于所引用的MW<sub>n</sub>范围的q的数值包括在从约12至约1200的范围内的那些数值。具体的实施方案包括其中q在从约12至约100、从约100至约400、从约400至约800、从约800至约1200的范围内、或这些范围中的两个或更多个的任何组合内的那些实施方案。在特定的实施方案中，q还可以在从约100至约500的范围内。在此实施方案的其他子集中， $X_1$ 和 $X_2$ 在每次出现时独立地是-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>-COOH和/或-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>-NH<sub>2</sub>。

[0189] 考虑到各种链要素和端基要素的性质，此类结构还可以被指定为cMAP-PEG-cMAP三嵌段聚合物。

[0190] 在提供的结构的每个中，特定的独立的实施方案包括其中m独立地是4、5或6的那些实施方案。在某些实施方案中，m在每次出现时是5。

[0191] 在提供的结构的每个中，特定的独立的实施方案包括其中n是1的那些实施方案。

[0192] 在提供的结构的每个中，特定的独立的实施方案包括其中r独立地是2、3或4的那些实施方案。在这些实施方案中的某些中，r在每次出现时是3。

[0193] 在提供的结构的每个中，特定的独立的实施方案包括其中p足以提供在从约5kDa至约15kDa、从约6kDa至约14kDa、7kDa至约13kDa、从约8kDa至约12kDa、9kDa至约11kDa、或约10kDa的范围内的包含cMAP的亚单元的数均分子量的那些实施方案。在cMAP片段具有约420Da的MW的情况下，这分别对应于在约12至约36、从约14至约33、从约17至约31、从约19至约29、从约22至约26、或约24的范围内的p的数值。

[0194] 在提供的结构的每个中，特定的独立的实施方案包括其中q足以提供在从约500Da至约50kDa、从约1kDa至约40kDa、5kDa至约30kDa、或从约5kDa至约20kDa的范围内的包含PEG的亚单元的数均分子量的那些实施方案。在聚亚烷基二醇部分是聚乙二醇，并且考虑到乙二醇片段具有约44Da的MW的情况下，这对应于在约11至约1200、从约23至约910、从约110至约680、或从约110至约450的范围内的q的数值。

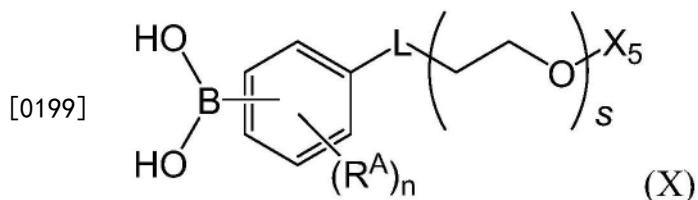
[0195] 本文描述的m、n、p、q、r或z的值与 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 和/或 $X_4$ 的任何适当的定义的每个组合代表离散的实施方案，并且这些实施方案的任何组合提供另外的实施方案的定义。

[0196] 用于制备本文描述的各种聚合物的示例性、非限制性的方案在实施例中提供。这些合成路线中的每个以及使用具体描述的试剂的同系物的那些合成路线被认为在本公开内容的范围内。如此处使用的，术语同系物指的是与示例相差一个或更多个亚甲基基团的

化合物。在一种方法中，聚合物可以通过以下来制备：通过使用至少一种连接基团来连接至少一种包含聚亚烷基二醇的不带电荷的区段和至少一种包含至少一种多羟基连接部分的带阳离子电荷的区段。在其中带阳离子电荷的区段是上文描述的粘酸衍生物中的一种的情况下，此方法包括使两种PEG聚合物与粘酸聚合物、使两种粘酸聚合物与一种PEG聚合物、或使一种粘酸聚合物与一种PEG聚合物化学计量地反应，各自具有合适的连接基团以形成期望的二嵌段聚合物或三嵌段聚合物。此类偶联反应可以如本文描述的使用羧酸/氨基缩合反应以形成酰胺连接部分来实现。

[0197] 根据本公开内容的若干实施方案的纳米颗粒的形成可以用本领域技术人员已知的技术和程序来分析。

[0198] 本公开内容的另外其他的实施方案包括本文描述的含cMAP/PEG的聚合物的聚合物缀合物。此类聚合物缀合物包括任何含cMAP/PEG的聚合物以及包含式(X)的结构的第二含硼酸聚合物，



[0200] 其中

[0201] 含cMAP/PEG的聚合物和第二含硼酸聚合物通过在式(X)的硼酸部分与式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)或式(IX)的多羟基连接部分的至少一对邻位二醇之间的硼酸酯缩合连接部分彼此可逆地连接，X<sub>5</sub>在此连接的远端处；

[0202] R<sup>A</sup>是硝基(或其他吸电子基团)；

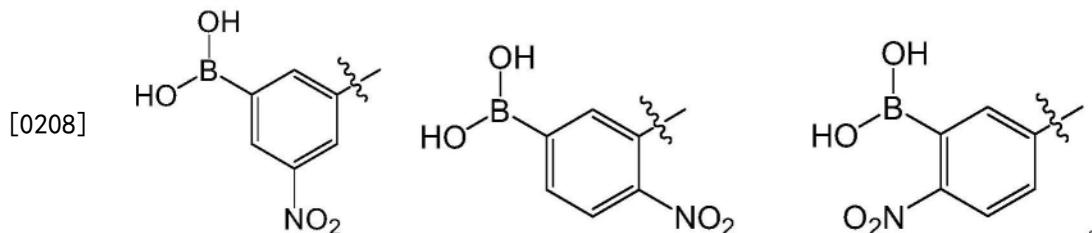
[0203] n是0、1、2、3或4，优选地1；

[0204] s是20-1200；

[0205] L是在苯基环与聚环氧乙烷连接部分之间的连接基团；并且

[0206] X<sub>5</sub>是任选地被-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)、-N(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的类似物取代的C<sub>1-6</sub>烷基。

[0207] 在这些实施方案的某些中，n是1。这些实施方案中，示例性结构包括：



[0209] 在聚合物缀合物的某些实施方案中，s在从20至约120、从约120至约240、从约240至约480、从约480至约720、从约720至约960、从约960至约1200的范围内、或这些范围中的两个或更多个的任何组合内。

[0210] 在聚合物缀合物的其他实施方案中，L是-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-NH-C(=O)-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-、-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-C(=O)-NH-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-、-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-O-C(=O)-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-或-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-C(=O)-O-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-。在这些实施方案的子集中，L是-NH-C(=O)-、-C

(=O)-NH-、-O-C(=O)-或-C(=O)-O-。单个或多于一个的L连接基团可以与任何聚合物一起使用。

[0211] 在这一点上,本公开内容已经在聚合物或聚合物缀合物方面被描述,但是本公开内容的重要要素包括从这些聚合物或聚合物缀合物获得的纳米颗粒,并且为这些聚合物和聚合物缀合物提供的定义同样用于描述缔合的纳米颗粒。这些纳米颗粒趋向于大体上类似,并且取决于各种cMAP或PEG片段的尺寸和/或与含硼酸聚合物缔合的链的长度,这些纳米颗粒具有在从约20nm至约300nm的范围内的横截面尺寸(即直径)。特定的实施方案还可以将这些纳米颗粒描述为具有在从约20nm至约40nm、从约40nm至约80nm、从约80nm至约120nm、从约120nm至约180nm、从约180nm至约240nm、从约240nm至约300nm的范围内、或这些范围中的两个或更多个的组合内的直径。

[0212] 同样地,提到的单个纳米颗粒还应当被认为包括涵盖纳米颗粒的群体或多于一种的纳米颗粒的单独的实施方案。在某些实施方案中,该多于一种的纳米颗粒是大体上单分散的,独立的实施方案提供相对于平均值小于20%、30%、40%、50%或60%的纳米颗粒中横截面尺寸的标准偏差,如通过低温透射电子显微术(低温-TEM)测量的。粒度以及颗粒分布可以通过包括低温-TEM显微照片分析的各种方法来定义。在此方法中,通过测量颗粒的平均直径、计数在预先确定的尺寸分数梯度内的颗粒并且使这些数值在统计学上相关联,在代表性的低温-透射电子显微照片中分析预先确定数目的颗粒(大于100)(典型地来源于已经在液体乙烷中冷冻的大于3种的随机选定的液体样品)。另外的信息还参见实施例和附录。

[0213] 这些纳米颗粒(包括本发明的聚合物或聚合物缀合物中的任何一种或更多种)由于其携带生物“货物(cargo)”的能力是特别有吸引力的,并且在某些实施方案中,这些纳米颗粒还包含包封的生物剂。这些生物剂可以被共价结合或以其他方式被包含在纳米颗粒内或通过纳米颗粒被共价结合或以其他方式被包含。在某些实施方案中,生物剂是多核苷酸或小分子治疗剂。此类治疗剂的实例包括但不限于小分子药物、抗生素、类固醇、多核苷酸(例如基因组DNA、cDNA、mRNA、siRNA、shRNA、miRNA、反义寡核苷酸、病毒以及嵌合多核苷酸)、质粒、肽、肽片段、小分子(例如多柔比星)、螯合剂(例如去铁胺(DESFERAL)、乙二胺四乙酸(EDTA))、天然产物(例如紫杉醇、两性霉素)以及其他生物活性大分子诸如例如蛋白质和酶。另外参见美国专利第6,048,736号,其列出了可以与本文描述的纳米颗粒一起用作治疗剂的活性剂(治疗剂)。小分子治疗剂不仅可以是复合颗粒内的治疗剂,而且在另外的实施方案中可以被共价结合至复合材料中的聚合物。在若干实施方案中,共价键是可逆的(例如通过前药形式(prodrug form)或生物可降解的连接部分比如二硫化物)并提供另一种递送治疗剂的方式。在若干实施方案中,可以与本文描述的纳米颗粒一起递送的治疗剂包括化疗药物,例如埃博霉素、基于喜树碱的药物、紫杉醇或核酸比如质粒、siRNA、shRNA、miRNA、反义寡核苷酸适体或其组合,以及技术人员在阅读本公开内容之后可识别的另外的药物。

[0214] 在某些优选的实施方案中,生物剂是多核苷酸,所述多核苷酸是RNA分子。在这些实施方案的某些中,RNA分子是siRNA分子。

[0215] 不意图被任何特定的理论的正确性所束缚,似乎当分散在含水介质中时,纳米颗粒通过向其含水环境提供亲水性连接部分并将阳离子物质保持在内部空腔中来自我组织

(参见例如图16A和图16B)。带负电荷的货物(包括核酸)与cMAP结构上的正电荷缔合,在某些情况下辅助纳米颗粒的自组装。

[0216] 在纳米颗粒包含官能化的含(硝基)硼酸聚合物连接部分的情况下,纳米颗粒还可以被缀合至一种或更多种靶向配体。在这种情况下,缀合通过在含硼酸聚合物的远端与靶向配体之间的缩合连接发生。在某些实施方案中,此靶向配体包括以下中的任一种:抗体、转铁蛋白、细胞受体的配体、或细胞受体蛋白、适体,或者抗体、转铁蛋白、细胞受体的配体、或细胞受体蛋白的片段。在特定的实施方案中,单一类型的靶向配体被缀合至每个聚合物或纳米颗粒或纳米颗粒的群体。在其他实施方案中,多种类型的靶向配体被缀合至每个聚合物或纳米颗粒或被缀合至纳米颗粒的群体内。在另外其他实施方案中,靶向配体的单个分子实体被缀合至每个单独的纳米颗粒。单个分子实体缀合至单独的纳米颗粒的能力在2013年3月1日提交的美国专利申请第13/782,458号中被描述,该专利申请至少为了此目的通过引用并入本文。在其他实施方案中,靶向配体的多个分子被缀合至每个单独的纳米颗粒。

[0217] 如上文表明的,在某些实施方案中,聚合物、聚合物-缀合物和/或纳米颗粒可以作为含水介质中的分散体存在,所述含水介质任选地还包含缓冲剂、表面活性剂或其他改性剂。本公开内容还预期药物组合物,所述药物组合物包含一种或更多种生物活性剂和本文描述的聚合物或聚合物缀合物或纳米颗粒或多于一种的纳米颗粒中的任何以及药学上可接受的媒介物、载体或赋形剂。

[0218] 如本文使用的术语“媒介物”指示通常充当用于纳米颗粒的溶剂、载体、粘合剂、赋形剂或稀释剂的各种介质中的任何,所述纳米颗粒作为活性成分包含在组合物中。

[0219] 如本文使用的术语“赋形剂”指示用作药物的活性成分的载体的非活性物质。用于本文公开的药物组合物的合适的赋形剂包括增强个体的身体吸收纳米颗粒的能力的任何物质。合适的赋形剂还包括可以用于使具有纳米颗粒的制剂胀大(bulk up)以允许方便的且精确的给药的任何物质。除了其以单剂量的量使用之外,赋形剂还可以用于制造工艺中以辅助处理纳米颗粒。取决于施用的途径和药物的形式,可以使用不同的赋形剂。示例性的赋形剂包括但不限于抗粘剂、粘合剂、包衣崩解剂、填充剂、调味剂(例如增甜剂)和色素、助流剂(glidant)、润滑剂、防腐剂、吸附剂。

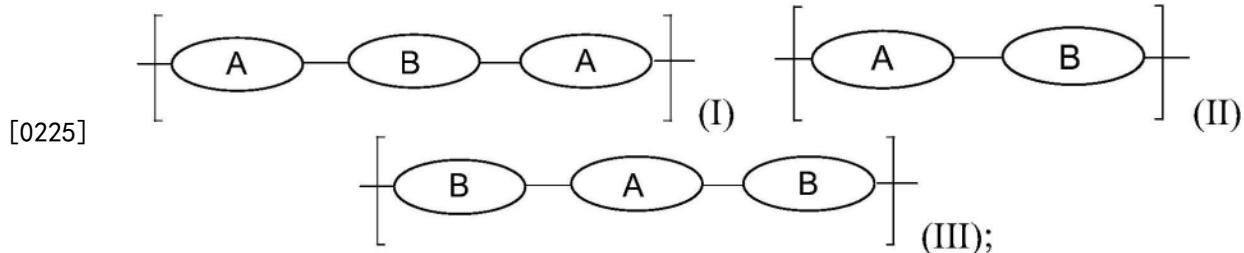
[0220] 如本文使用的术语“稀释剂”指示被用于稀释或携带组合物的活性成分的稀释剂。合适的稀释剂包括可以降低药物制剂的粘度的任何物质。

[0221] 本领域技术人员在阅读本公开内容之后可以确定关于确定组合物的合适的载体剂(carrier agent)或助剂以及通常地试剂盒的制造和包装的另外的细节。

[0222] 特别地由于本发明的聚合物、聚合物缀合物和/或纳米颗粒造成的增强的生物利用度,包含生物活性剂以及本公开内容的聚合物、聚合物缀合物和/或纳米颗粒的组合物(包括该组合物的药物组合物)可用于治疗需要治疗的患者。相对于相同的一种或更多种生物活性剂通过其本身或通过其本身与cMAP一起的递送,此类组合物的生物利用度的改进程度是令人惊讶地高的。参见实施例。因此,重要的实施方案包括其中将包含生物活性剂以及本公开内容的聚合物、聚合物缀合物和/或纳米颗粒的组合物(包括该组合物的药物组合物)施用至需要被施用的生物活性剂的患者的那些实施方案。

[0223] 以下实施方案的清单意图补充而非代替或取代之前的描述。

[0224] 实施方案1.一种聚合物,包含交替的带电荷的和不带电荷的区段,所述交替的带电荷的和不带电荷的片段包含以下式(I)或式(II)或式(III)的结构单元中的一种或更多种:



[0226] 其中

[0227] A是不带电荷的区段,所述不带电荷的区段包含聚亚烷基二醇;

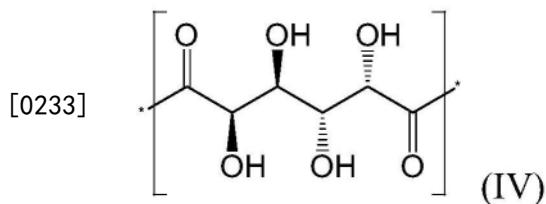
[0228] B是带阳离子电荷的区段,所述带阳离子电荷的区段包含至少一种多羟基连接部分,所述至少一种多羟基连接部分包含至少一对邻位二醇。在某些子集实施方案中,A和B独立地具有在500Da至约5000Da、大于5000Da至约10kDa、大于10kDa至约20kDa、大于20kDa至约30kDa、大于30kDa至约40kDa、大于40kDa至约50kDa的范围内、或其任何组合内的数均分子量。在其他子集中,A或B,或者A和B两者,具有在大于5000Da至约50,000Da的范围内的数均分子量。

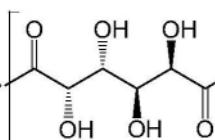
[0229] 实施方案2.如实施方案1所述的聚合物,其中A是或包括聚乙二醇和适当的连接基团。

[0230] 实施方案3.如实施方案1或2所述的聚合物,其中所述聚亚烷基二醇具有在从约500道尔顿至约50,000道尔顿的范围内的标称数均分子量。在此实施方案的某些子集中,聚亚烷基二醇具有在从约500Da至约1kDa、大于1kDa至约5kDa、大于5kDa至约10kDa、大于10kDa至约15kDa、大于15kDa至约20kDa、大于20kDa至约30kDa、大于30kDa至约40kDa、大于40kDa至约50kDa的范围内、或这些范围中的两个或更多个的任何组合内的标称数均分子量。

[0231] 实施方案4.如实施方案1至3中任一项所述的聚合物,其中B是带阳离子电荷的区段,所述带阳离子电荷的区段包含至少一种多羟基糖连接部分,所述多羟基糖连接部分包含至少一对邻位二醇。

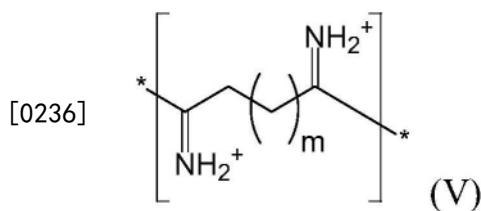
[0232] 实施方案5.如实施方案1至4中任一项所述的聚合物,其中B包含至少一种重复的亚单元,所述重复的亚单元包含式(IV)的结构:



[0234] 注意被指定为的结构在功能上等效于在式(IV)中提供的结构,

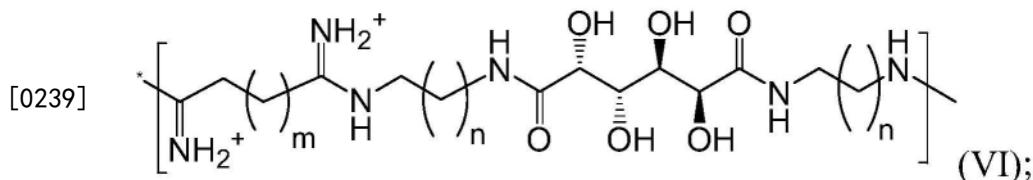
并且此表述意图指的是两者。

[0235] 实施方案6.如实施方案1至5中任一项所述的聚合物,其中B还包含至少一种重复的亚单元,所述重复的亚单元包含式(V)的结构:



[0237] 其中m是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,优选地4-6或5。

[0238] 实施方案7.如实施方案1至6中任一项所述的聚合物,其中B包含至少一种重复的亚单元,所述重复的亚单元包含cMAP,所述cMAP的亚单元结构表示为式(VI):

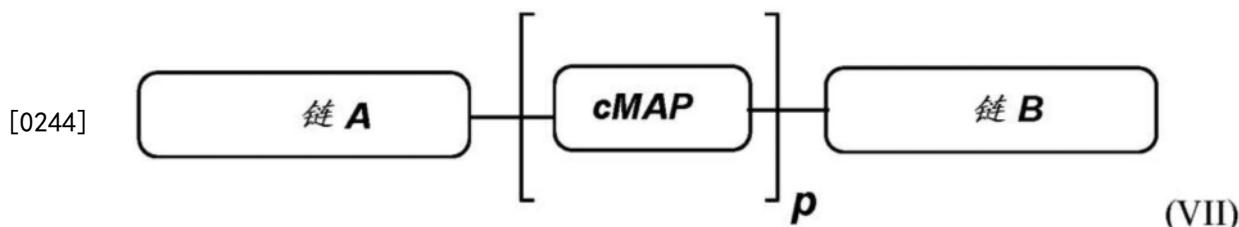


[0240] 其中

[0241] m在每次出现时独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,优选地4-6或5;并且

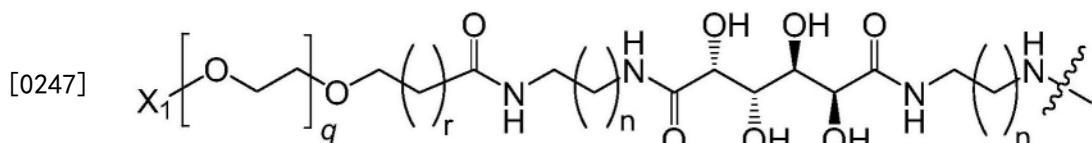
[0242] n在每次出现时独立地是1、2、3、4或5。在其他有关的实施方案中,m和n可以更大,例如至约10。

[0243] 实施方案8.如实施方案1至7中任一项所述的聚合物,由式(VII)的结构描述:

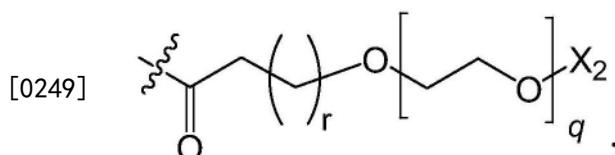


[0245] 其中

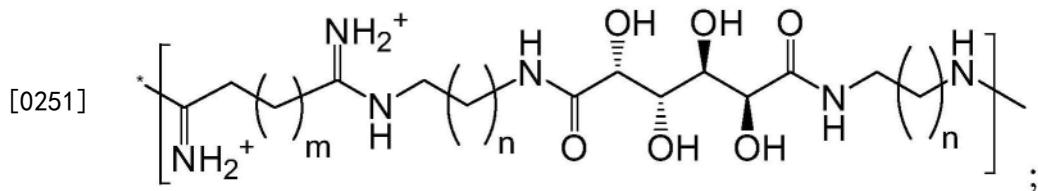
[0246] 链A是



[0248] 链B是



[0250] cMAP是



[0252] p和q足以分别包含cMAP和PEG的亚单元提供独立地在从约500Da至约50,000Da的范围内的数均分子量；

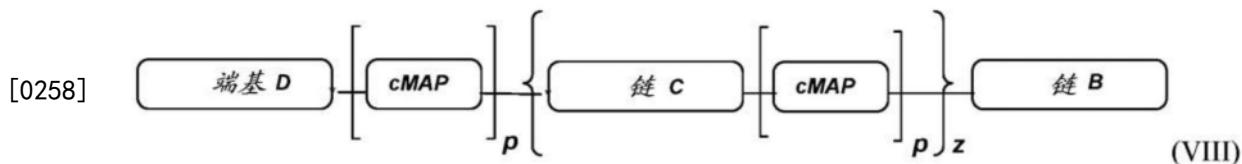
[0253] m在每次出现时独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，优选地4-6或5；

[0254] n和r在每次出现时独立地是0、1、2、3、4或5；并且

[0255] X<sub>1</sub>和X<sub>2</sub>在每次出现时独立地是任选地被-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)、-N(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的类似物取代的C<sub>1-6</sub>烷基。

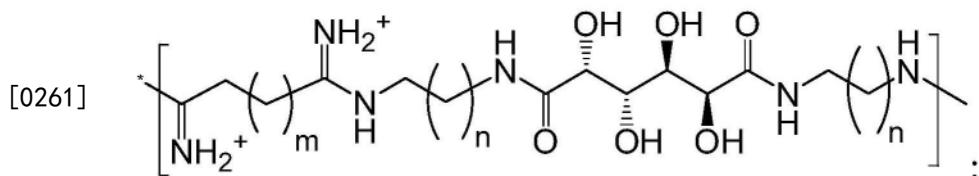
[0256] 注意，为了满足分子量限制，p的数值对应于从约1至约100、优选地从约10至约100的范围，并且q的数值对应于从约12至约1200的范围。在这些实施方案的子集中，q还可以在从约100至约500的范围内。在本实施方案的某些子集中，p和q足以分别包含cMAP和PEG的亚单元提供独立地在从约500Da至约1000Da、大于1000Da至约5000Da、大于5000Da至约10,000Da、大于10,000Da至约25,000Da、大于25,000Da至约50,000Da的范围内、或这些范围中的两个或更多个的任何组合内的数均分子量，以及这些MW<sub>n</sub>范围的对应的数值的数均分子量。在本实施方案的其他子集中，X<sub>1</sub>和X<sub>2</sub>独立地是-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>-COOH和-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>-NH<sub>2</sub>。

[0257] 实施方案9. 如实施方案1至7中任一项所述的聚合物，由式(VII)的结构描述：

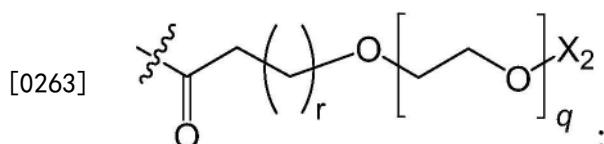


[0259] 其中

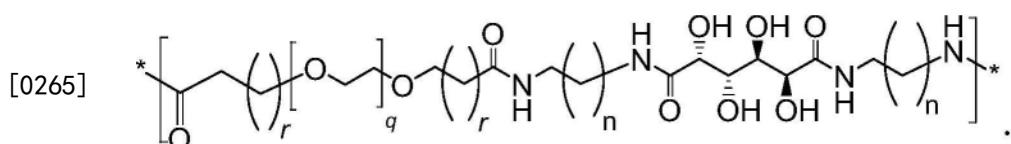
[0260] cMAP是



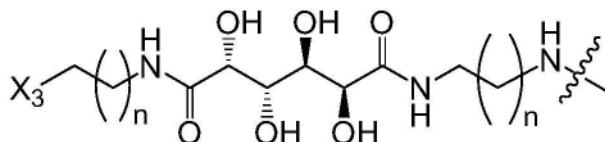
[0262] 链B是



[0264] 链C是

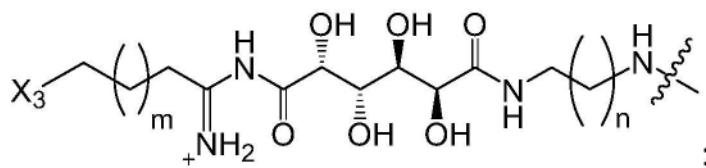


[0266] 端基D是：



[0267]

或



[0268] p和q足以分别包含cMAP和PEG的亚单元提供独立地在从约500Da至约50,000Da的范围内的数均分子量；

[0269] m在每次出现时独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，优选地4-6或5；

[0270] n和r在每次出现时独立地是0、1、2、3、4或5；

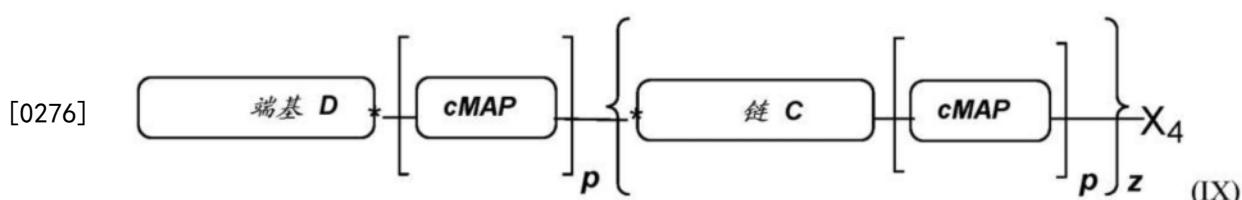
[0271] z等于或大于1(多达约2、4、6、8或10)；并且

[0272]  $X_2$ 在每次出现时独立地是任选地被-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)、-N(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的类似物取代的C<sub>1-6</sub>烷基；并且

[0273]  $X_3$ 是-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)、-N(烷基)<sub>2</sub>或其盐或其被保护的类似物。

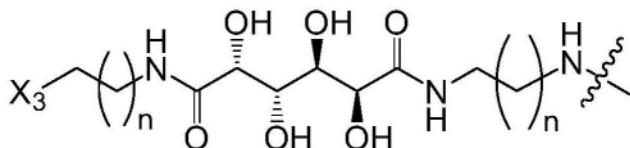
[0274] 再次地，如在实施方案9中，为了满足分子量限制，p的数值对应于从约1至约100、优选地从约10至约100的范围，并且q的数值对应于从约12至约1200的范围。在这些实施方案的子集中，q还可以在从约100至约500的范围内。在本实施方案的某些子集中，p和q足以分别包含cMAP和PEG的亚单元提供独立地在从约500Da至约1000Da、大于1000Da至约5000Da、大于5000Da至约10,000Da、大于10,000Da至约25,000Da、大于25,000Da至约50,000Da的范围内、或这些范围中的两个或更多个的任何组合内的数均分子量，以及这些MW<sub>n</sub>范围的对应的数值的数均分子量。在本实施方案的其他子集中， $X_1$ 和 $X_2$ 独立地是-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>-COOH和-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>-NH<sub>2</sub>。

[0275] 实施方案10. 如实施方案1至7中任一项所述的聚合物，由式(IX)的结构描述：

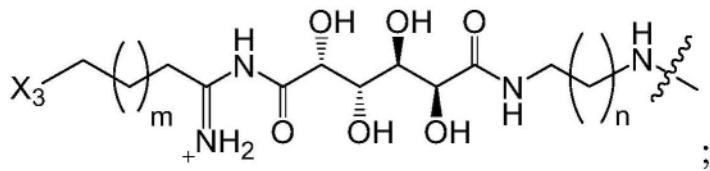


[0277] 其中

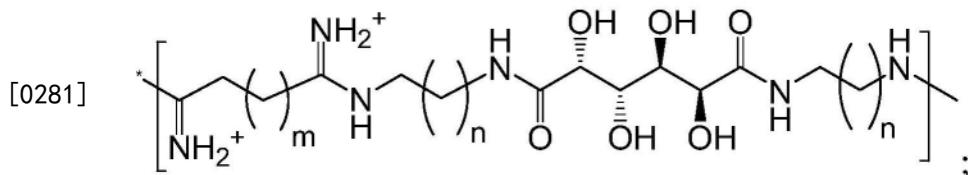
[0278] 端基D是：



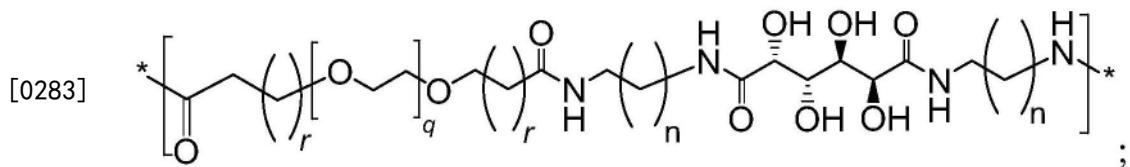
[0279] 或



[0280] cMAP是



[0282] 链C是



[0284] p和q足以分别包含cMAP和PEG的亚单元提供独立地在从约500Da至约50,000Da、优选地从约1000Da至约5000Da的范围内的数均分子量；

[0285] m在每次出现时独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，优选地4-6或5；

[0286] n和r在每次出现时独立地是0、1、2、3、4或5；

[0287] z等于或大于1(多达约2、4、6、8或10)；并且

[0288] X<sub>3</sub>和X<sub>4</sub>在每次出现时独立地是-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)、-N(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或其被保护的类似物。

[0289] 再次地，如在实施方案9和实施方案10中，为了满足分子量限制，p的数值对应于从约1至约100、优选地从约10至约100的范围，并且q的数值对应于从约12至约1200的范围。在这些实施方案的子集中，q还可以在从约100至约500的范围内。在本实施方案的某些子集中，p和q足以分别包含cMAP和PEG的亚单元提供独立地在从约500Da至约1000Da、大于1000Da至约5000Da、大于5000Da至约10,000Da、大于10,000Da至约25,000Da、大于25,000Da至约50,000Da的范围内、或这些范围中的两个或更多个的任何组合内的数均分子量，以及这些MW<sub>n</sub>范围的对应的数值的数均分子量。在本实施方案的其他子集中，X<sub>1</sub>和X<sub>2</sub>独立地是-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>-COOH和-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>-NH<sub>2</sub>。

[0290] 实施方案11. 如实施方案6至10中任一项所述的聚合物，其中m是4、5或6，优选地5。

[0291] 实施方案12. 如实施方案7至11中任一项所述的聚合物，其中n是1。

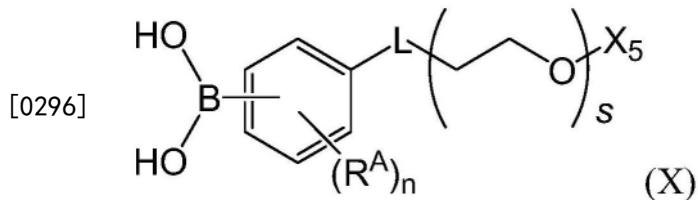
[0292] 实施方案13. 如实施方案7至12中任一项所述的聚合物，其中r是2、3或4，优选地3。

[0293] 实施方案14. 根据实施方案8至13中任一项所述的聚合物，其中p足以提供在从约或大于5kDa至约15kDa、从约或大于6kDa至约14kDa、从约或大于7kDa至约13kDa、从约或大

于8kDa至约12kDa、从约或大于9kDa至约11kDa、或约10kDa的范围内的包含cMAP的亚单元的数均分子量。在某些子集实施方案中,例如在cMAP片段具有约420Da的MW<sub>n</sub>的情况下,这对应于p具有在约12至约36、从约14至约33、从约17至约31、从约19至约29、从约22至约26、或约24的范围内的数值。

[0294] 实施方案15.根据实施方案8至13中任一项所述的聚合物,其中q足以提供在从约或大于500Da至约50kDa、从约或大于1kDa至约40kDa、从约或大于5kDa至约30kDa、或从约或大于5kDa至约20kDa的范围内的包含PEG的亚单元的数均分子量。在这些实施方案的某些中,例如假定乙二醇片段具有约44Da的MW<sub>n</sub>,这对应于q具有在约11至约1200、从约23至约910、从约110至约680、或从约110至约450的范围内的数值。

[0295] 实施方案16.一种聚合物缀合物,包含实施方案1至15中任一项所述的聚合物和第二含硼酸聚合物,所述第二含硼酸聚合物包含式(X)的结构



[0297] 其中

[0298] 所述聚合物和所述第二含硼酸聚合物通过在式(X)的硼酸部分与式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)或式(IX)的多羟基连接部分的至少一对邻位二醇之间的硼酸酯缩合连接部分彼此可逆地连接,X<sub>5</sub>在此连接的远端处;

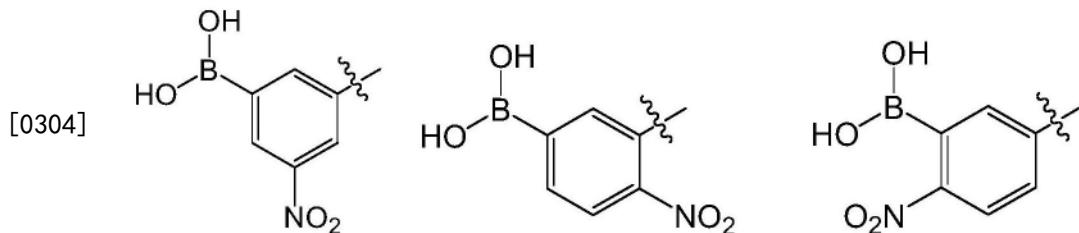
[0299] R<sup>A</sup>是硝基(或其他吸电子基团);

[0300] n是0、1、2、3或4,优选地1;

[0301] s是20-1200;

[0302] L是在苯基环和聚环氧乙烷连接部分之间的连接基团;并且

[0303] X<sub>5</sub>是任选地被-OH、-COOH、-C(=O)O(烷基)、-C(=O)O(芳基)、-NH<sub>2</sub>、-NH(烷基)、-N(烷基)<sub>2</sub>、或其盐或被其保护的类似物取代的C<sub>1-6</sub>烷基。示例性结构被提供为:



[0305] 实施方案17.如实施方案16所述的聚合物缀合物,其中L是-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-NH-C(=O)-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-、-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-C(=O)-NH-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-、-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-O-C(=O)-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-或-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-C(=O)-O-(C<sub>0-2</sub>亚烷基)-。

[0306] 实施方案18.如实施方案17所述的聚合物缀合物,其中L是-NH-C(=O)-、-C(=O)-NH-、-O-C(=O)-、或-C(=O)-O-。

[0307] 实施方案19.一种纳米颗粒,包含实施方案1至15中任一项所述的聚合物。

[0308] 实施方案20.一种纳米颗粒,包含实施方案16至18中任一项所述的聚合物缀合物。

[0309] 实施方案21.如实施方案10至16中任一项所述的纳米颗粒,所述纳米颗粒是大体

上球形的并且具有在从约20nm至约300nm的范围内的横截面尺寸。

[0310] 实施方案22.多于一种的纳米颗粒,每种单独的纳米颗粒由实施方案19至21中任一项所述的组合物描述。

[0311] 实施方案23.多于一种的纳米颗粒,每种单独的纳米颗粒由实施方案19至22中任一项所述的组合物描述,所述多于一种的纳米颗粒是大体上单分散的,呈现小于20%、30%、40%、50%、或60%的所述纳米颗粒中横截面尺寸(即直径)的标准偏差,如通过低温-透射电子显微术(低温-TEM)测量的。

[0312] 实施方案24.一种纳米颗粒,包含实施方案1至15中任一项所述的聚合物或实施方案16至18中任一项所述的聚合物缀合物,所述纳米颗粒还包含包封的生物剂。

[0313] 实施方案25.如实施方案24所述的纳米颗粒,其中所述生物剂被共价结合至所述聚合物或所述聚合物缀合物。

[0314] 实施方案26.如实施方案24或25所述的纳米颗粒,其中所述生物剂是多核苷酸或小分子治疗剂。

[0315] 实施方案27.如实施方案24或25所述的纳米颗粒,其中所述生物剂是多核苷酸,所述多核苷酸是RNA分子。

[0316] 实施方案28.如实施方案27所述的纳米颗粒,其中所述RNA分子是siRNA分子。  
[0317] 实施方案29.如实施方案20至28中任一项所述的纳米颗粒,还缀合至靶向配体,其中缀合通过在所述含硼酸聚合物的远端与所述靶向配体之间的缩合连接发生。

[0318] 实施方案30.如实施方案29所述的纳米颗粒,其中单个靶向配体被缀合至每个聚合物。

[0319] 实施方案31.如实施方案29所述的纳米颗粒,其中多于一个的靶向配体被缀合至每个聚合物。

[0320] 实施方案32.一种药物组合物,包含生物活性剂和实施方案1至18中任一项所述的聚合物或聚合物缀合物以及药学上可接受的载体或赋形剂。

[0321] 实施方案33.一种药物组合物,包含生物活性剂和实施方案19至31中任一项所述的纳米颗粒或多于一种的纳米颗粒以及药学上可接受的载体或赋形剂。

[0322] 实施方案34.一种方法,包括将实施方案24至28中任一项所述的纳米颗粒施用至患者,其中所述生物剂的生物利用度相对于施用所述生物剂本身被改进。

[0323] 实施方案35.一种制备实施方案1至15中任一项所述的聚合物的方法,包括通过使用至少一种连接基团使至少一种包含聚亚烷基二醇的不带电荷的区段与至少一种包含至少一种多羟基连接部分的带阳离子电荷的区段共价地连接。示例性的方法在实施例和附录中提供。包括使所引用的具体的反应物的同系物反应的这些方法也被认为在本公开内容的范围内。

[0324] 实施方案36.如实施方案35所述的方法,其中所述至少一种多羟基连接部分包括粘酸并且至少一种连接基团是酰胺。

## 实施例

[0325] 提供以下实施例以例证在本公开内容中描述的概念中的一些。虽然每个实施例被认为是提供组合物、制备方法和用途的具体的单独的实施方案,但是没有一个实施例应当

被认为限制本文描述的较一般的实施方案。

[0326] 在以下实施例中,已作出努力来确保关于所使用的数字(例如量、温度等等)的准确度,但是某些实验误差和偏差应当被考虑在内。除非另外指示,否则温度以摄氏度计,压力为在大气压或接近大气压。除非另外说明,否则任何提到的分子量意图指的是数均分子量。

[0327] 实验结果的总结

[0328] 具有基于粘酸和辛二亚氨酸二甲酯的重复单元的新的阳离子聚合物被合成并且表示为cMAP。将cMAP进一步改性成具有在cMAP两侧的mPEG的三嵌段聚合物mPEG-cMAP-PEGm,得到具有约20kDa的分子量的明确定义的聚合物。此三嵌段聚合物能够以2+/-或更大的电荷比充分包封siRNA。包含此三嵌段聚合物和siRNA的稳定的NP可以在PBS中直接配制,具有约30nm的直径(通过DLS和低温TEM两者),并且在10mM磷酸盐缓冲液pH 7.4和1mM KCl pH 5.5两者中具有约0.4mV的略微正的表面电荷。在注射到小鼠中之后,与用cMAP和cMAP-PEG共聚物配制的NP相比,用mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物形成的这些NP示出延长的循环,在1小时之后5%-10%的制剂保留在循环中。当将过量的三嵌段聚合物的一部分从制剂中除去时,循环时间保持相同。不存在任何过量的阳离子聚合物对于使这些实体在体内引起任何副作用最小化是有利的。

[0329] 实施例1.材料和方法。

[0330] 粘酸和草酰氯购自Sigma-Aldrich,N-boc-乙二胺购自AK Scientific,辛二亚氨酸二甲酯购自Thermo Fisher Scientific或Sigma-Aldrich,并且3-羧基-5-硝基苯基硼酸购自Alfa-Aesar。聚乙二醇试剂购自Jenkem Technology USA或Laysan Bio,Inc.辛二亚氨酸二甲酯(粘酸乙二胺与其聚合的带电荷的单体)按从Thermo Fisher Scientific或Sigma-Aldrich购买的使用。为了归属(assign)cMAP的质子光谱和碳光谱中的峰,获得辛二亚氨酸二甲酯的NMR光谱。DMS的质子NMR光谱和碳NMR光谱两者均比预计的复杂,表明在刚打开的瓶中存在某些水解。参见表2。

[0331] 在25摄氏度在Varian 300MHz、500MHz或600MHz仪器上获得核磁共振(NMR)光谱,在500MHz或600MHz没有旋转。对于大多数<sup>1</sup>H质子光谱,使用1-1.5s的延迟时间;对于聚合物的定量积分,使用25s延迟。<sup>13</sup>C碳光谱是在500MHz以默认设置获得的。<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C异核单量子相干(heteronuclear single quantum coherence)(HSQC)光谱,<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H相关光谱术(COSY)光谱和<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C异核多键相关光谱术(heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy)(HMBC)光谱使用默认的VNMRJ3.0 HSQCAD、COSY和HMBC设置获得。另外,对于合成的聚合物,使用具有对流补偿的双极性脉冲对刺激的回波(bipolar pulse pair stimulated echo with convection compensation)(Dbppste\_cc)方法、在VNMRJ3.0中以4.0ms的扩散梯度长度和100.0ms的扩散延迟获得扩散排序光谱术(diffusion ordered spectroscopy)(DOSY)光谱。

[0332] 使用Finnigan LCQ离子阱质谱仪获得小分子的电喷雾离子化质量。使用10mg/mL α-氰基-4-羟基肉桂酸基质,在Applied Biosystems Voyager DE-PRO上获得聚合物的基质辅助激光解吸/电离-飞行时间(MALDI-TOF)质谱。

[0333] 实施例2.包含粘酸的聚合物的合成。

[0334] 实施例2.1.阳离子粘酸聚合物(cMAP)的合成(图1)。将甲醇(360mL)添加至在包含

搅拌棒的500mL圆底烧瓶中的粘酸(15g, 71mmol, 1当量)。将浓硫酸(1.2mL, 22.5mmol, 0.3当量)添加至此悬浮液, 然后将该悬浮液搅拌过夜并在85℃回流。将混合物冷却至室温, 并使用Whatman#5滤纸通过布氏漏斗过滤。将固体用600mL的甲醇洗涤, 并且然后返回至500mL圆底烧瓶。添加240mL的甲醇和1.5mL的三乙胺, 并在85℃回流下将固体重结晶持续1h。将混合物冷却至室温, 通过布氏漏斗过滤, 并用600mL的甲醇洗涤。将固体在75℃在真空下干燥过夜, 以提供粘酸二甲酯(13.72g, 80%收率), 白色固体。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, DMSO-d6) : 4.91 (d, 2H), 4.80 (q, 2H), 4.29 (d, 2H), 3.76 (q, 2H), 3.62 (s, 6H)。

[0335] 将甲醇(220mL)添加至在包含搅拌棒的500mL圆底烧瓶中的粘酸二甲酯(13.72g, 57.6mmol, 1当量)。添加三乙胺(20.9mL, 150mmol, 2.6当量), 并且将混合物搅拌并在85℃回流持续30min, 在此时间期间形成黄色悬浮液。将在甲醇(55mL)中的N-boc-乙二胺(23.7mL, 150mmol, 2.6当量)添加至悬浮液, 并且重新开始搅拌并在85℃回流过夜。将混合物冷却至室温, 并使用Whatman#5滤纸通过布氏漏斗过滤。将固体用甲醇(750mL)洗涤并用甲醇(350mL)在85℃重结晶持续1.5h。将混合物再次冷却至室温, 通过布氏漏斗过滤, 并用甲醇(750mL)洗涤。将固体在75℃在真空下干燥过夜, 以提供N-boc保护的粘酸乙二胺(19.27g, 68%收率), 白色固体。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, DMSO-d6) : 7.71 (t, 2H), 6.81 (t, 2H), 5.13 (d, 2H), 4.35 (q, 2H), 4.10 (d, 2H), 3.77 (q, 2H), 3.13 (m, 4H), 2.97 (m, 4H), 1.36 (s, 18H)。ESI 495.1 [M+H]<sup>+</sup>, 517.4 [M+Na]<sup>+</sup>。

[0336] 将在具有搅拌棒的500mL圆底烧瓶中的N-boc保护的粘酸乙二胺(19.2g)放置在水浴中。将甲醇(260mL), 随后是浓的12N盐酸(65mL)添加至烧瓶以制备在甲醇中的3N HCl。将反应烧瓶用隔膜密封并用针头来排气。将水浴设定为25℃, 并搅拌悬浮液持续6-8h。使用在CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中的1%甲醇的流动相通过薄层色谱法(TLC)监测反应, 并在碘槽(iodine tank)中使斑点可视化。还通过ESI来证实反应完成。将浆料通过具有细颗粒的玻璃熔块(glass frit)过滤, 并用甲醇(750mL)洗涤, 直到滤液接近中性pH。将固体在80℃在真空下干燥过夜, 以提供作为白色固体的粘酸乙二胺(12.96g, 91%收率)。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d6) : 7.97-7.83 (m, 8H), 5.30 (d, 2H), 4.55 (d, 2H), 4.16 (d, 2H), 3.82 (m, 2H), 2.85 (m, 4H)。<sup>13</sup>C NMR (500MHz, DMSO-d6) : 174.79, 71.39, 70.98, 39.25, 36.76。ESI 295.1 [M+H]<sup>+</sup>, 588.93 [2M+H]<sup>+</sup>。

[0337] 将粘酸乙二胺(100mg, 0.3mmol, 1当量)添加至具有搅拌棒的4mL玻璃小瓶。将在nanopure水(1mL)中的0.5M碳酸钠溶液添加至小瓶, 并且将溶液搅拌持续5min。然后将辛二亚氨酸二甲酯(DMS) (74.4mg, 0.3mmol, 1当量)添加至混合物, 并在25℃搅拌反应体系持续16h过夜。将反应体系用nanopure水(10mL)稀释, 并逐滴地添加1N HCl以将pH调节至4。产生的溶液用15mL Amicon Ultra 3kD旋转过滤器相对于nanopure水透析, 直至滤液pH是中性的。将聚合物溶液浓缩至3-4mL, 通过0.2μm PVDF注射器式过滤器过滤到预先称重的20mL玻璃小瓶中, 并冻干至干燥, 以提供作为白色固体的阳离子粘酸聚合物(29.2mg, 16%收率), 将该阳离子粘酸聚合物在-20℃在氩气下储存。<sup>1</sup>H NMR (600MHz, DMSO-d6) : 9.59-8.74, 7.92, 5.40, 4.53, 4.16, 3.82, 3.55, 3.26, 2.86-2.00, 1.60, 1.28。<sup>13</sup>C NMR (125MHz, DMSO-d6) : 174.61, 168.12, 71.19, 70.96, 51.67, 42.09, 36.71, 32.48, 27.84, 26.65。

[0338] 实施例2.2.cMAP-PEG共聚物的合成(图2)。将起始材料在其从-20℃冷冻器取出之后平衡至室温持续1h。将cMAP(50mg, 0.009mmol, 2当量)和二-SPA-PEG-3.5kD(琥珀酰亚胺基丙酸酯, 15.7mg, 0.0046mmol, 1当量)称重到具有搅拌棒的烘干的10mL烧瓶中。将烧瓶用

隔膜加盖,将两种固体在真空下干燥持续1h,并且然后有氩气填充烧瓶。使用针头和注射器添加无水DMSO(2mL)以溶解两种白色固体,并将溶液搅拌持续24h。添加nanopure水(20mL)以稀释DMSO,并且使用10kD MWCO Amicon Ultra过滤器相对于nanopure水透析溶液>8次。将渗余物cMAP-PEG3.4k共聚物通过0.2μm PVDF膜过滤并冻干成白色粉末(29.6mg,45%收率)。

[0339]  $^1\text{H}$  NMR (600MHz, DMSO-d6) : 9.84-8.48, 7.90, 5.41, 4.53, 4.15, 3.82, 3.55, 3.49 (PEG), 3.26, 2.86-2.00, 1.59, 1.27.  $^{13}\text{C}$  NMR (125MHz, DMSO-d6) : 174.66, 168.17, 71.24, 71.00, 70.24, 67.22, 51.69, 42.11, 36.75, 32.58, 27.89, 26.66。使用5kD二-SVA-PEG(琥珀酰亚胺基戊酸酯)遵循类似的程序以合成cMAP-PEG5k共聚物,使用15kD SpectraPor 7MWCO膜(Spectrum Labs)用于透析。

[0340] 通过具有各种MWCO的离心旋转过滤器经由分级将cMAP-PEG-cMAP三嵌段聚合物与cMAP-PEG共聚物分离。使用20kD MWCO离心旋转过滤器透析cMAP-PEG3.4k共聚物,并且然后将滤液通过10kD MWCO旋转过滤器透析以分离cMAP-PEG3.4K-cMAP,将cMAP-PEG3.4K-cMAP通过0.2μm PVDF膜过滤并冻干成白色粉末(10.6mg,16%收率)。以相同的方式分离cMAP-PEG5k-cMAP。

[0341] 实施例2.3.mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物的合成(图3)。将起始材料在其从-20℃冷冻器取出之后平衡至室温持续1h。将cMAP(40mg,0.006mmol,2当量)和mPEG5k-SVA(85.7mg,0.017mmol,3当量)称重到具有搅拌棒的烘干的10mL烧瓶中。将烧瓶用隔膜加盖,将两种固体在真空下干燥持续1h,并且然后用氩气填充烧瓶。使用针头和注射器添加无水DMSO(4mL)以溶解两种白色固体,并将溶液搅拌持续48h。添加nanopure水(40mL)以稀释DMSO,并且使用20kD MWCO离心旋转过滤器相对于nanopure水透析溶液>8次。将渗余物mPEG5k-cMAP-PEG5km通过0.2μm PVDF膜过滤并冻干成白色粉末(11.3mg,9%收率)。 $^1\text{H}$  NMR (600MHz, DMSO-d6) : 9.84-8.48, 7.90, 5.41, 4.53, 4.15, 3.82, 3.55, 3.49 (PEG), 3.26, 3.20, 2.86-2.00, 1.59, 1.27。

[0342] 使用2kD mPEG-SVA遵循类似的程序以合成具有2kD嵌段的mPEG-cMAP-PEGm。对于2kD PEG,使用10kD MWCO离心旋转过滤器来分离三嵌段聚合物。

[0343] 实施例2.4. 5-硝基苯基硼酸-PEGm(5-nPBA-PEGm)的合成(图4)。

[0344] 将3-羧基-5-硝基苯基硼酸(200mg,0.95mmol,1当量)添加至包含干燥的搅拌棒的烘干的2颈10mL圆底烧瓶。烧瓶用氩气通气并用橡胶隔膜密封。添加具有BHT抑制剂的无水四氢呋喃(5mL)以溶解硼酸,然后添加无水DMF(14.7μL,0.19mmol,0.2当量)。将烧瓶在冰水浴中冷却至0℃。然后,将草酰氯(195.4μL,2.28mmol,2.4当量)逐滴地添加至反应混合物。在草酰氯添加完成之后,移除冰水浴,并且在室温搅拌继续反应持续2小时,用氩气通气以允许挥发物的逸出。经由旋转蒸发器除去溶剂和DMF,并且然后在黑暗中在真空下持续2天,以提供作为黄色固体的3-酰基氯-5-硝基苯基硼酸(217.5mg,100%收率)。

[0345] 将3-酰基氯-5-硝基苯基硼酸(27.5mg,0.12mmol,2当量)添加至包含干燥的搅拌棒的烘干的25mL圆底烧瓶。烧瓶用橡胶隔膜密封,用氩气通气,并在冰水浴中冷却至0℃。添加无水二氯甲烷(4mL)以溶解硼酸。将在用氩气通气的烘干的10mL圆底烧瓶中的、溶解于用活化的分子筛干燥的无水二氯甲烷(5mL)和二异丙基乙胺(DIPEA,20.9μL,0.12mmol,2当量)中的5kD mPEG-胺(300mg,0.06mmol,1当量)缓慢地添加至硼酸溶液。将反应烧瓶留在冰

水浴中以缓慢加温至室温，并将反应体系在黑暗中搅拌过夜。经由旋转蒸发器除去溶剂和 DIPEA，并且然后在黑暗中在真空下持续2天。使固体残余物在0.5N HCl (5mL) 中重构 (reconstitute) 并搅拌持续15min。将产生的悬浮液通过0.2μm Supor注射器式过滤器过滤，并且将产生的澄清溶液用15mL Amicon Ultra 3kD旋转过滤器相对于nanopure水透析直到pH恒定。将聚合物溶液浓缩至3-4mL，通过0.2μm PVDF注射器式过滤器过滤到预先称重的20mL玻璃小瓶中，并冻干至干燥，以提供作为蓬松的白色固体的5-硝基苯基硼酸-PEGm (219.2mg, 70% 收率)。<sup>1</sup>H NMR (600MHz, DMSO-d6) : 8.89 (t, 1H), 8.72 (m, 1H), 8.68 (m, 1H), 8.64 (m, 1H), 8.60 (s, 2H), 3.5 (s-PEG, 510H), 3.22 (s, 3H)。<sup>11</sup>B NMR (160MHz, 在D<sub>2</sub>O中的10mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.4) : 11.26 (宽的单峰)。MALDI: 5825.5.

[0346] 实施例3. 聚合物表征

[0347] 实施例3.1. 凝胶渗透色谱法。将具有二元泵和注射器的Agilent 1100HPLC连接至具有Wyatt DAWN HELEOS光散射和Wyatt Optilab Rex折射率检测的Tosoh TSKgel G3000PWXL-CP尺寸排阻柱。将冻干的聚合物以六种不同的浓度溶解在0.1M NaNO<sub>3</sub>中，并经由注射泵直接注射到折射率检测器中用于dn/dc确定。为了通过光散射进行绝对分子量确定，将100μL的聚合物溶液注射到柱上，并使用ASTRA V软件分析检测到的聚合物峰。

[0348] 实施例3.2. 用于伯胺的cMAP的TNBSA测定。遵循由Thermo Fisher Scientific提供的关于甲醇储备溶液中的2,4,6-三硝基苯磺酸5%w/v的说明，具有如接下来所描述的修改。简言之，将cMAP和甘氨酸各自溶解在反应缓冲液中，并分别地连续地稀释为2mg/mL至0.0039mg/mL以及20mg/mL至0.00195mg/mL的浓度范围。将100μL的每个样品浓度和50μL的TNBSA工作溶液一式三份地添加至96孔板，并简单地振摇。在Tecan infinite M200板读数器上在335nm的波长处读取吸光度，在37摄氏度温育持续2h，并再次读取。甘氨酸被用作阳性对照。

[0349] 实施例3.3. 聚合物siRNA包封测定。使用以下两种方法分析cMAP聚合物包封siRNA的能力：凝胶阻滞分析和RiboGreen测定。对于凝胶阻滞分析，将增加体积的0.5mg/mL聚合物与1μL的1mg/mL siRNA以0、0.5、1、1.5、2、2.5、3和5的(+/-)电荷比在水中混合，总体积为15μL。将混合物简单地涡旋，离心，并允许在室温搁置持续15min。将3μL的6X DNA加载染料 (loading dye) 添加至每种混合物，然后将混合物加载到1wt%琼脂糖凝胶上，并在95V在0.5x TBE缓冲液中运行持续1.5h。将凝胶在UVP BioDoc-It成像系统上成像。

[0350] 以与凝胶阻滞分析类似的方式进行RiboGreen测定，除了在96孔板中使用总体积为100μL的水中的增加体积的0.1mg/mL聚合物和1μL的0.1mg/mL siRNA。向这些混合物中的每一种，添加根据试剂盒的操作方案 (kit's protocol) 制备的100μL的Quant-iT RiboGreen RNA试剂工作溶液。

[0351] 将板简单地振摇，在黑暗中在室温温育持续5min，并在Tecan infinite M200板读数器上在480nm的激发波长和520nm的发射波长处读取荧光强度。一式三份地进行测量。

[0352] 实施例4. 纳米颗粒配制和表征。

[0353] 实施例4.1. 纳米颗粒配制。通过首先在10mM磷酸盐缓冲液pH7.4中将1:1摩尔比的cMAP邻位二醇与5-nPBA-PEGm (1mg cMAP与22mg 5-nPBA-mPEG) 混合，简单地涡旋，离心，并使混合物在室温搁置持续15min来配制cMAP NP。然后以cMAP与siRNA的3:1的电荷比并以多达0.8mg/mL siRNA的浓度添加在相等体积的无RNA酶的水中的siRNA。以类似的方式制备

cMAP-PEG共聚物制剂、cMAP-PEG-cMAP三嵌段制剂和mPEG-cMAP-PEGm三嵌段制剂,尽管电荷比从3:1向下变化至聚合物与siRNA的1:1电荷比,并且以多达1mg/mL siRNA的浓度。对于没有任何5-nPBA-PEGm的制剂,将聚合物和siRNA以相等体积以适当的电荷比简单地混合。为了注射到小鼠中,添加0.1体积的10X磷酸盐缓冲的盐水(PBS)以获得1X PBS溶液,最终浓度为0.73mg/mL siRNA。对于在PBS中配制的cMAP-PEG共聚物和mPEG-cMAP-PEGm NP,聚合物溶液和siRNA溶液两者均在PBS中,并且然后混合在一起;这能够被直接注射到小鼠中。

[0354] 为了除去过量的组分(即聚合物、PEG),将NP制剂放置在0.5mL 30kD MWCO Amicon Ultra旋转过滤器中并用PBS以2,000rpm透析持续10min 5-10次。

[0355] 实施例4.2.纳米尺寸和 $\zeta$ 电势。使用以下两种不同的方法确定NP尺寸:动态光散射(DLS)和低温-透射电子显微术(低温TEM)。DLS在具有BIC Particle Sizing软件的Brookhaven Instruments Corporation(BIC) Zeta-PALS上进行。取决于制剂,将颗粒稀释低至0.2mg/mL siRNA或更小的浓度,直到对于十个1分钟测量记录到稳定的尺寸。对至少10个测量结果求平均值。

[0356] 在使用FEI Mark IV Vitrobot、用2s印迹时间(印迹力(blot force) 6)和1s排出时间(drain time)、用滤纸印迹之后,对在液体乙烷中的R2/2Quantifoil网格上冷冻的在溶液中的颗粒进行低温TEM成像。在装配有Gatan 2k x 2k UltraScan CCD照相机和Serial EM自动化软件的Tecnai 120-keV透射电子显微镜上收集图像。使用ImageJ软件分析获得的图像以测量NP直径。

[0357] 使用具有添加的Brookhaven含水电极组件的、用于DLS的相同的Zeta-PALS来测量NP的表面电荷或 $\zeta$ 电势。将10 $\mu$ L的颗粒制剂与1.5mL的10mM磷酸盐缓冲液pH 7.4或1mM氯化钾pH 5.5在比色皿(cuvette)中混合。将电极插入到比色皿中,并使用BIC PALS $\zeta$ 电势分析仪(BIC PALS Zeta Potential Analyzer)软件测量 $\zeta$ 电势,具有0.012的靶残留(target residual)。对至少10个测量结果求平均值。

[0358] 实施例4.3.纳米颗粒化学计量学。

[0359] 实施例4.3.1.结合至NP的5-nPBA-PEGm的定量。如上文描述的,用5-nPBA-PEGm配制NP并除去过量的组分。将来自30kD MWCO旋转过滤器的50 $\mu$ L的滤液(包含过量的组分)注射到具有四元泵和连接至Phenomenex Gemini C18反相柱的自动取样器以及多波长检测器的Agilent 1200HPLC上。记录在254nm处的吸光度并与5-nPBA-PEGm的校准曲线比较。

[0360] 实施例4.3.2.结合至NP的阳离子聚合物的定量。在不存在5-nPBA-PEGm的情况下配制NP。对于cMAP,如上文描述的将过量的阳离子聚合物从聚集的NP除去。通过从包含NP的30kD MWCO旋转过滤器取出渗余物,并使用BcMag<sup>TM</sup> SAX(强阴离子交换)磁珠(Bioclone Inc)将siRNA分解并隔绝(sequester)来直接定量结合至NP的阳离子聚合物。将50 $\mu$ L的包含cMAP的液体注射到上文描述的GPC设备上,并且使用与cMAP校准曲线相比较的折射率信号直接确定结合至NP的聚合物的量。对于cMAP-PEG共聚物和mPEG-cMAP-PEGm,将50 $\mu$ L的制剂注射到上文描述的GPC设备上。记录对应于未结合至NP的聚合物的折射率信号,并与相同的阳离子聚合物的校准曲线比较。将此量从用于制剂的聚合物的总量中减去以确定结合至NP的聚合物的百分比。

[0361] 实施例5.体内小鼠药代动力学(PK)研究。

[0362] 所有动物研究均由在Caltech的机构动物护理和使用委员会(Institutional

Animal Care and Use Committee)批准。如上文描述的配制NP,除了用Cy3-荧光团标记的 siRNA替换20%的siRNA。将NP制剂经由小鼠尾静脉以5mg siRNA每kg小鼠的剂量静脉地注射。将Balb/c小鼠(Taconic and Jackson Labs)的后肢剃毛,用于将血液从隐静脉收集在红盖包含促凝剂(clot activator)的Sarstedt Microvette CB300毛细管中。在NP注射之后2分钟时开始在各个时间点收集血液,多达6个点每只小鼠。将管在4°C以14,000xg离心持续15min,并将在管的顶部的血清用于激发波长530nm和发射波长570nm的Cy3荧光的分析,其与小鼠血清中的NP制剂的标准曲线相比较。使用血清体积,基于小鼠重量和注射的制剂的量,计算血清中余留的Cy3-siRNA的分数。数据点来自3只小鼠每个制剂。

[0363] 实施例6.结果和讨论

[0364] 实施例6.1.cMAP合成、NMR表征和端基确定。通过使用图1中示意地图示的一系列反应来合成阳离子粘酸聚合物(cMAP)。导致制备粘酸乙二胺的粘酸产物和中间反应产物被充分地表征(表1)。

表 1. 粘酸乙二胺的 NMR 峰归属(参见图 6)			
	在 D <sub>2</sub> O 中的 <sup>1</sup> H 化学位移(ppm)	在 DMSO-d <sub>6</sub> 中的 <sup>1</sup> H 化学位移(ppm)	在 DMSO-d <sub>6</sub> 中的 <sup>13</sup> C 化学位移(ppm)
[0365]	亚甲基 A	3.04	2.85
	亚甲基 B	3.45	未观察到
	次甲基 A	3.9	39.25
	次甲基 B	4.32	70.98
	羟基 A	4.32	71.39
	羟基 B	4.55	N/A
	酰胺和胺	5.30	N/A
	酰胺羰基碳	7.83, 7.97	174.78

[0366] 粘酸乙二胺和辛二亚氨酸二甲酯(DMS)之间的缩合反应产生cMAP材料。因为DMS可能在像用于聚合的那些条件一样的条件下水解,所以我们研究了此反应的反应路径和所形成的产物(表2)。

表 2: 具有变化的水解程度的辛二亚氨酸二甲酯的 <sup>1</sup> H NMR 峰归属(参见图 6-8)				
	甲氧基	亚甲基A	亚甲基B	亚甲基C
辛二亚氨酸二甲酯(图6)	4.08	2.64	1.60	1.30
辛二亚氨酸二甲酯水解成二甲酯(图7)	3.55	2.25	1.45	1.20
辛二亚氨酸二甲酯水解	无	2.01	1.46	1.20
成羧酸盐(图8)				

[0368] 包含完全水解成羧酸盐基团的一个甲氧基基团的辛二亚氨酸二甲酯的存在通过在 187.9 的 m/z 的 ESI 质谱峰和 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR 光谱两者被进一步证实。在这种情况下, 亚甲基 A 峰在 <sup>1</sup>H NMR 上存在, 具有 2.01 ppm 的化学位移。

[0369] 此信息有助于cMAP产物的表征。

[0370] cMAP的NMR分析(包括<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC NMR数据、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY NMR数据和<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR数据(表3-4))使得所有共振能够归属于聚合物中的各种碳和氢环境。重要的是确定cMAP的端基组成,因为这些官能团用于与官能化的PEG的随后的反应,以形成cMAP-PEG共聚

物或mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物。

**表3: cMAP 的<sup>1</sup>H NMR 峰归属; 参见图9**

	起源的单体	DMSO中的 <sup>1</sup> H化学位移(ppm)
脒	粘酸和辛二亚氨酸二甲酯	9.65
脒	粘酸和辛二亚氨酸二甲酯	9.28
脒	粘酸和辛二亚氨酸二甲酯	8.78
酰胺	粘酸和辛二亚氨酸二甲酯	7.92
羟基B	粘酸	5.42
羟基A	粘酸	4.56
次甲基B	粘酸	4.18
次甲基A	粘酸	3.84
甲氧基(端基)	辛二亚氨酸二甲酯	3.58
亚甲基B	粘酸	3.40
亚甲基A	粘酸	3.29
亚甲基A(端基)	粘酸	2.87
亚甲基A	辛二亚氨酸二甲酯	2.42
亚甲基A(端基)	辛二亚氨酸二甲酯	2.30
亚甲基A(端基)	辛二亚氨酸二甲酯-水解成羧酸盐	2.03
亚甲基B	辛二亚氨酸二甲酯	1.63
亚甲基B(端基)	辛二亚氨酸二甲酯	1.52
亚甲基C	辛二亚氨酸二甲酯	1.30

**表4: cMAP的<sup>13</sup>C NMR峰归属; 参见图9。**

	起源的单体	DMSO中的 <sup>13</sup> C化学位移(ppm)
酰胺羰基	粘酸	174.29
甲氧基羰基(端基)	辛二亚氨酸二甲酯	173.47

[0371]

[0372]

[0373]

酰胺羰基(端基)	粘酸	171.03
脒羰基	辛二亚氨酸二甲酯	167.79, 166.82
次甲基B	粘酸	70.83
次甲基A	粘酸	70.61
甲氧基(端基)	辛二亚氨酸二甲酯	51.31
亚甲基A	粘酸	41.73
亚甲基B	粘酸	36.37
亚甲基A	辛二亚氨酸二甲酯	32.15
亚甲基C	辛二亚氨酸二甲酯	27.48
亚甲基B	辛二亚氨酸二甲酯	26.31
亚甲基A(端基)	辛二亚氨酸二甲酯-水解成羧酸盐	35.06
亚甲基A(端基)	辛二亚氨酸二甲酯	33.22
亚甲基B(端基)	辛二亚氨酸二甲酯	24.23

[0374] cMAP端基包括甲氧基酯的甲氧基、胺和少量的羧酸(图10)。cMAP的<sup>1</sup>H NMR分析示出在3.55ppm处的特征性尖锐的甲氧基峰的存在(图11),并且此归属被<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC NMR测量(未示出)所支持。甲氧基基团来源于通过水解从DMS的亚氨酸酯基团失去氨(表2,图6-8),并且先前已被报告。邻近甲氧基的亚甲基基团可以作为在<sup>1</sup>H NMR光谱中在2.25ppm处的三重峰被观察到(图11)。来源于粘酸乙二胺的胺端基不能用<sup>1</sup>H NMR直接观察到。然而,对单体的NMR光谱和cMAP的HMBC NMR光谱的分析能够将在2.85ppm处的三重峰归属为来自邻近胺官能团的亚甲基基团。另外,对伯胺的TNBSA测定是阳性的,因此证实cMAP具有作为端基的末端伯胺。最后,存在少量的羧酸作为由甲酯的完全水解产生的端基或作为起始DMS中的杂质。邻近羧酸的亚甲基基团作为在<sup>1</sup>H NMR光谱中在2.00ppm处的小的三重峰被观察到(图11)。在一批cMAP中的这些端基的比率可以通过比较在2.85ppm处(胺)的三重峰、在2.25ppm处(甲氧基)的三重峰和在2.00ppm处(羧酸盐)的三重峰的积分来确定,并且在表5中显示8个批次。%胺、%甲氧基和%羧酸盐的平均值分别是49%、42%和9%。

[0375]

**表5:** 通过比较NMR积分的在8个批次的cMAP中的胺端基:甲氧基端基:羧酸盐端基的比率。

批次	%胺	%甲氧基	%羧酸盐
11	52.52	33.96	13.52
12	38.45	54.15	7.40

[0376]

13	48.58	45.89	5.53
14	47.07	45.71	7.22
15	47.75	51.17	1.08
16	55.58	37.14	7.28
17	63.22	29.92	6.86
18	38.76	39.50	21.75
平均值	48.99 ± 2.93	42.18 ± 2.99	6.22 ± 2.20

[0377] 实施例6.1.cMAP-PEG共聚物和mPEG-cMAP-PEGm三嵌段。使cMAP与PEG上的活化的羧酸端基例如琥珀酰亚胺基丙酸酯(SPA)或琥珀酰亚胺基戊酸酯(SVA)反应。与二-SPA-PEG或mPEG-SVA反应的cMAP分别产生共聚物或三嵌段聚合物,具有2kD、3.4kD或5kD的PEG长度。

[0378] 因为在cMAP混合物中存在大量的二胺封端的聚合物链,所以与二-SPA-PEG的反应(图2)产生具有大的尺寸分布的cMAP-PEG共聚物(共聚物在从仅略微大于10kD的二嵌段cMAP-PEG共聚物至由cMAP上的甲酯或羧酸封端的cMAP-PEG-cMAP三嵌段聚合物、至超过100kD的长聚合物的范围内;表6-7中报告的尺寸分布来自通过使粗聚合物通过顺序地较小分子量截留离心旋转过滤器(sequentially smaller molecular weight cutoff centrifugal spin filter)分级获得的聚合物收率)。

**表6:** 在分级粗cMAP-PEG3.4k共聚物之后, 在每个MWCO过滤器上的保留的质量。

MWCO(kD)	质量(mg)	评论
100	9.5	高分子量cMAP-PEG共聚物
50	3.4	高分子量cMAP-PEG共聚物
30	5	高分子量cMAP-PEG共聚物
20	12.3	
10	10.6	<b>纯的cMAP-PEG-cMAP三嵌段</b>
3	13.2	未反应的cMAP, 过量的PEG
总计	54	

反应用50 mg的cMAP和16.5 mg的二-SPA-PEG3.4k开始。在搅拌持续24小时之后, 将反应体系在水中稀释并通过顺序地较小分子量截留(MWCO)Amicon离心旋转过滤器过滤。某些材料损失不是在过滤器膜上和转移步骤期间发生, 但示出在冻干至干燥之后在这些过滤器的每个上的保留的材料。由于在cMAP上的二胺端基的存在, 在合成中形成大量的高分子量cMAP-PEG3.4k共聚物。

**表7:** 在分级粗cMAP-PEG5k共聚物之后在每个MWCO过滤器上的保留的质量。

MWCO(kD)	质量(mg)	评论
30	18.3	高分子量cMAP-PEG共聚物

20	20.8	
10	12	<b>纯的cMAP-PEG-cMAP三嵌段 + cMAP-PEG二嵌段</b>
总计	51.1	

[0381] 类似地, 反应用50 mg的cMAP和22.3 mg的二-SVA-PEG5k开始。在搅拌持续24小时之后, 将反应体系在水中稀释并通过顺序地较小分子量截留(MWCO)Amicon离心旋转过滤器过滤。某些材料损失不是在过滤器膜上和转移步骤期间发生, 但示出冻干至干燥之后在这些过滤器的每个上的保留的材料。类似于上文的类似的反应, 在此合成中形成大量的较高分子量cMAP-PEG5k共聚物。

[0382] 因为具有这样大的分子量的聚合物可能在体内产生实质的毒性, 所以在努力合成具有合理长度的明确定义的聚合物时, 使用此分级方法使cMAP-PEG-cMAP三嵌段聚合物物质与共聚物分离。位于PEG或PLA聚合物两侧的阳离子聚合物的此重复结构的其他三嵌段聚合物先前已经被探索用于基因和铁氧化物-碳纳米管递送。

[0383] 使cMAP与mPEG-SVA反应将产生的产物的结构限于mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物(图3)。某些cMAP-PEGm二嵌段聚合物也存在并通过分级与期望的三嵌段分离。

[0384] 实施例6.2.通过GPC的聚合物的分子量。使用凝胶渗透色谱法来表征cMAP的分子量。尽管聚合物的洗脱时间可以与其尺寸相关,但是在新的阳离子聚合物的情况下,没有用

于校准的理想的尺寸标准品。因此,我们使用多角度光散射检测器来确定聚合物的绝对分子量。此方法的优点是它仅取决于聚合物的散射能力和聚合物的浓度;它不需要用于比较的标准品。确定cMAP的相对于浓度的示差折射率dn/dc(表8)并用于测量分子量。9个批次的cMAP的平均分子量是约6kD,具有小于1.1的多分散指数(PDI)(表8)。来自单个批次的结果可以在表9中找到。

**表8 基于 cMAP 的聚合物的分子量。**

[0385]

聚合物	dn/dc (mL/g)	Mn (kD)	Mw (kD)	PDI (Mw/Mn)
cMAP (9 个批次 ± 标准误差)	0.1806 ± 0.0002	6.30 ± 0.40	6.76 ± 0.40	1.08 ± 0.01
cMAP-PEG5k 共聚物 (2 个批次 ± 标准误差)	0.1660 ± 0.0003	28.72 ± 4.55	41.49 ± 14.65	1.40 ± 0.29
mPEG5k-cMAP-PEG5km (3 个批次 ± 标准误差)	0.1420 ± 0.0004	20.98 ± 0.67	21.95 ± 0.67	1.05 ± 0.02

[0386]

**表9: cMAP批次的凝胶渗透色谱法分析。**

[0387]

样品	Mn	Mw	Mw/Mn (PDI)
cMAP-DP11	5323	6068	1.14
cMAP-DP12	5213	5839	1.12
cMAP-DP13	5936	6365	1.07
cMAP-DP14	5747	5940	1.03
cMAP-DP15	5050	5568	1.10
cMAP-DP16	6102	6357	1.04
cMAP-DP17	7712	8235	1.07
cMAP-DP18	7313	7524	1.03
cMAP-DP19	8353	8984	1.08

值被报告为3次运行的平均值。

[0388] 使用类似的方法,5k cMAP-PEG共聚物具有以1.4的PDI的更大的尺寸分布,以及42kD的Mw和29kD的Mn(表8)。5k mPEG-cMAP-PEGm三嵌段是约21kD,具有小于1.1的PDI(表8)。另外,3.4kD PEG cMAP-PEG共聚物和2kD PEG mPEG-cMAP-PEGm三嵌段、以及从分级cMAP-PEG共聚物获得的cMAP-PEG-cMAP三嵌段的结果全部在表10中报告。

**表10: cMAP共聚物和三嵌段的GPC分析(不同于主要文章文本中报告的5kD PEG)。**

聚合物	dn/dc (mL/g)	Mn (kD)	Mw (kD)	PDI (Mw/Mn)
cMAP-PEG3.4k共聚物	0.1660	128.30	289.25	2.27
cMAP-PEG3.4k -cMAP	使用 0.1660(对于 纯的三嵌段 不使用)	12.89	14.20	1.10
cMAP-PEG5k-cMAP	使用 0.1660(对于 纯的三嵌段 不使用)	24.17	26.84	1.11
mPEG2k-cMAP-PEG2km	0.1654	9.75	9.81	1.01

[0389] [0390] 实施例6.3.通过基于cMAP的聚合物的siRNA包封。使用RiboGreen测定和凝胶阻滞分析两者来证实cMAP、cMAP-PEG共聚物和mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物包封siRNA的能力。使用荧光RiboGreen测定,cMAP能够以1+/-的电荷比(+/-)包封siRNA,并且cMAP-PEG5k共聚物和mPEG5k-cMAP-PEG5km三嵌段两者均能够分别以3或2的电荷比充分包封siRNA(图12)。对于具有其他PEG长度的共聚物和三嵌段聚合物,类似的siRNA包封数据在图13-14中被报告。RiboGreen测定的结果可能是更敏感的,但与来自凝胶阻滞分析的那些结果是可比较的。

[0391] [0392] 实施例7.纳米颗粒制剂和性质。

[0392] 实施例7.1.制剂。5-硝基苯基硼酸-PEGm(5-nPBA-PEGm)包含硼酸基团,硼酸基团允许在高于6.8的pH时此5kD PEG的一端结合至cMAP中的粘酸上的邻位二醇基团,以提供含siRNA的NP的空间稳定作用(steric stabilization),如图15中图示的。在具有或不具有额外的5-nPBA-PEGm的情况下,使用cMAP、cMAP-PEG共聚物和mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物的多种NP制剂在图16A-16B中示出。在不添加5-nPBA-PEGm的情况下,通过以3+/-电荷比混合cMAP和siRNA制备的NP虽然在水中是稳定的,但在PBS中是不稳定的(每二醇添加一个5-nPBA-PEGm至该制剂,图17)。

[0393] 与单独的cMAP相比,cMAP-PEG共聚物和mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物能够在没有另外的5-nPBA-PEGm的情况下形成稳定的颗粒。然而,与cMAP-PEG共聚物分离的纯的cMAP-PEG-cMAP三嵌段聚合物不能在没有添加的5-nPBA-PEGm的情况下形成稳定的含siRNA的NP,可能是因为它不包含足够的PEG以充分地屏蔽和空间上稳定NP(表11和图18-20)。

**表11：**使用与cMAP-PEG共聚物分离的cMAP-PEG-cMAP三嵌段在没有额外的5-nPBA-PEGm的情况下形成的NP在1X PBS中聚集，但当每2个二醇基团添加至少一个PEG至制剂时该NP是稳定的。

制剂	10 mM磷酸盐缓冲液	PBS
	平均尺寸(nm)	平均尺寸(nm)
3.4k三嵌段, 1:1, 0 PEG	176.6 ± 1.0	聚集
3.4k三嵌段, 1:1, 0.5 PEG	100.1 ± 0.8	
3.4k三嵌段, 1:1, 1 PEG	149.5 ± 1.6	
3.4k三嵌段, 1:1, 2 PEG	85.9 ± 2.0	
3.4k三嵌段, 3:1, 0 PEG	392.3 ± 5.0	
3.4k三嵌段, 3:1, 0.5 PEG	42.8 ± 2.0	
3.4k三嵌段, 3:1, 1 PEG	61.3 ± 2.3	
3.4k三嵌段, 3:1, 2 PEG	115.9 ± 11.4	96.6 ± 1.6
5k三嵌段, 1:1, 0 PEG	165.2 ± 4.7	聚集
5k三嵌段, 1:1, 0.5 PEG	141.3 ± 5.2	
5k三嵌段, 1:1, 1 PEG	109.2 ± 3.6	
5k三嵌段, 1:1, 2 PEG	179.1 ± 19.9	

[0394] 尽管cMAP-PEG共聚物和mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物在PBS中形成稳定的NP,但是还制备了具有另外的5-nPBA-PEGm的制剂以测试当在体内测试时,额外的PEG是否向NP提供更大的空间稳定性。结合至NP的PEG的量是约20% (表13)。将NP的聚合物组分与相等体积的siRNA混合在一起以形成以0.8-1mg siRNA/mL的浓度的NP。此外,cMAP-PEG共聚物和mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物能够直接在PBS中配制稳定的NP,消除了首先在低盐缓冲液中配制稳定的颗粒,随后添加PBS(cMAP所需的)的需求。

[0397] 实施例7.2.纳米颗粒尺寸。通过动态光散射(DLS)和低温-透射电子显微术(低温TEM)来表征所配制的NP的尺寸。这些NP的直径全部是约30-40nm,如通过DLS和低温TEM两者所确定的(表12)。NP具有球形形态(低温TEM成像,在图21中示出的)。通过DLS和低温TEM两者的另外的图像和尺寸分布在图22A-22E和图23A-23E中报告。

**表 12. 配制的纳米颗粒的尺寸和表面电荷。**

制剂	通过 DLS 的流体动力学直径(nm)	通过低温 TEM 的直径(nm)	在 10 mM 磷酸盐缓冲液 pH7.4 中的 $\zeta$ 电势(mV)	在 1 mM KCl pH 5.5 中的 $\zeta$ 电势(mV)
cMAP + 5-nPBA-PEG5km	40.9 ± 8.9	29.3 ± 12.8	-3.14 ± 0.56	0.76 ± 0.37
cMAP-PEG5k 共聚物	25.1 ± 5.6	27.0 ± 7.9	0.69 ± 0.71	1.77 ± 0.76
cMAP-PEG5k 共聚物 + 5-nPBA-PEG5km	38.1 ± 15.3	34.4 ± 19.7	-2.25 ± 0.64	0.70 ± 0.74
mPEG5k-cMAP-PEG5km	36.8 ± 20.2	33.6 ± 16.7	0.42 ± 0.73	0.40 ± 0.64
mPEG5k-cMAP-PEG5km + 5-nPBA-PEG5km	29.8 ± 9.2	27.8 ± 12.9	-0.36 ± 0.64	1.44 ± 0.83

[0399] 实施例7.3.纳米颗粒 $\zeta$ 电势。在以下两种具有不同pH的溶液中测量NP的 $\zeta$ 电势(NP表面电荷的测量):当5-nPBA-PEGm将被结合至cMAP上的邻位二醇时,在pH7.4缓冲的10mM磷酸盐;以及当5-nPBA-PEGm将与粘酸的二醇解离时,在pH5.5处的1mM KCl。当5-nPBA-mPEG存在于NP上时,具有5-nPBA-mPEG的cMAP-siRNA NP在pH 7.4磷酸盐缓冲液中具有在-3mV的略微负的 $\zeta$ 电位。然而,当这些NP被放置在pH 5.5的1mM KCl中时, $\zeta$ 电势是约+1mV。这些结果与

硼酸结合至粘酸上的二醇以在pH 7.4形成四面体硼酸酯络合物一致,所述四面体硼酸酯络合物屏蔽cMAP上的正电荷,并且与硼酸在酸性pH 5.5从NP解离一致。在具有和不具有5-nPBA-PEGm的情况下,关于cMAP-PEG共聚物和mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物观察到类似的效果(表12)。

[0400] 实施例7.4.纳米颗粒化学计量学。结合至NP的cMAP和共聚物的量在表13中示出。对于全部三种聚合物(cMAP、cMAP-PEG共聚物和mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物),用于制剂的总聚合物的约33%被结合用于1+/-的有效NP电荷比。在包含用于稳定的过量PEG的NP制剂上存在的5-nPBA-PEGm的量也在表13中示出。结合至cMAP+5-nPBA-PEGm NP的5-nPBA-PEGm的量是约34%,或一个PEG每二醇(表13)。发现约20%的PEG被结合至关于cMAP-PEG共聚物NP制剂和mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物NP制剂的NP。考虑到当以3+/-电荷比配制颗粒时存在过量的阳离子聚合物,并且由于有效的NP电荷比是1+/-,这意味着略小于1个PEG每二醇存在于NP上。事实上,全部的siRNA被包封在NP中,如上文关于siRNA包封的数据中示出的(图12)。

**表 13.** 用于以 3+/- 的电荷比配制的 NP 的纳米颗粒组成。3 次运行(对于 PEG)或 2 次运行(对于聚合物)的平均 +/- S.E.M.。

制剂	结合至 NP 的 %5-nPBA-PEGm	结合至 NP 的 % 阳离子聚 合物
<b>cMAP</b>	N/A	33.0 ± 0.2
<b>cMAP + 5-nPBA-PEG5km</b>	34.2 ± 8.7	N/A
<b>cMAP-PEG5k 共聚物</b>	N/A	46.1 ± 1.3
<b>cMAP-PEG5k 共聚物 + 5-nPBA-PEG5km</b>	21.5 ± 1.7	N/A
<b>mPEG5k-cMAP-PEG5km</b>	N/A	34.4 ± 0.8
<b>mPEG5k-cMAP-PEG5km + 5-nPBA-PEG5km</b>	18.4 ± 4.5	N/A

[0402] 实施例8.小鼠中的体内药代动力学研究。

[0403] 经由尾静脉注射到Balb/c小鼠中来体内测试NP的稳定制剂。在注射的剂量,从任何制剂都没有观察到毒性。测量各种NP的PK,并且将结果在图24A-24C)中图示。

[0404] 测试包含以3+/-电荷比混合的cMAP聚合物和siRNA并用5-nPBA-PEGm稳定的NP,因为此NP制剂类似于用于临床研究的CDP制剂(CALAA-01)。基于cMAP的NP具有比CALAA-01略微长的循环时间。由于CALAA-01使用包含络合物用于CDP与金刚烷-PEG(AD-PEG)的相互作用,所以在循环期间AD-PEG可能从NP脱离,以使得NP失去稳定性。其他人已经合成了AD<sub>2</sub>-PEG,并且已经示出此化合物具有比原始CALAA-01制剂中的AD-PEG更强的稳定基于CDP的NP的能力。这被认为是由于两个金刚烷每PEG(至两个CD)的增强的结合,该增强的结合因此导致在循环期间的更大的空间稳定作用(图24A)。在本发明的cMAP硼酸系统的情况下,在PEG化合物与聚合物之间的相互作用是通过由硼酸和聚合物上的二醇形成的硼酸酯,约30%的PEG结合至NP。因为仅1/3的用于配制NP的cMAP被结合至颗粒(表3),这大致等同于每二醇存在一个PEG。硼酸-二醇相互作用预期地比金刚烷与环糊精之间的包含络合物更强,使得5-nPBA-PEGm能够保持附接至cMAP比AD-PEG附接至CDP时间更长以导致更大的空间稳定作用和循环时间的改进。

[0405] 使用cMAP-PEG共聚物形成的NP可以在没有使用5-nPBA-mPEG的情况下在PBS中以3

+/-电荷比与siRNA一起被稳定地配制成NP(参见上文)。认为cMAP-PEG共聚物中的PEG形成PEG环以屏蔽NP芯。另外的5-nPBA-mPEG可以用于进一步稳定NP。除了通过测量过滤掉的过量PEG的量得到的结合至颗粒的20%PEG之外,ζ电势从在pH 7.4的负值转换成在pH 5.5的正值示出5-nPBA-PEGm能够与NP制剂中的cMAP-PEG共聚物相互作用。用cMAP-PEG共聚物配制的NP不提供超过基于cMAP:5-nPBA-PEGm的NP的更长的循环时间,无论是否添加5-nPBA-PEGm(图24B)。

[0406] 使用mPEG-cMAP-PEGm三嵌段形成的NP在PBS中形成稳定的NP(参见上文),并被认为具有在NP的表面上的PEG的刷样构型。如通过图24B中提供的数据示出的,与所有其他的基于cMAP的NP相比,将这些NP注射到小鼠中导致改进的PK概况,在60分钟之后,约5%-10%的NP保留在小鼠循环中(其他制剂经由60分钟低于检测限)。在裸鼠中关于此制剂观察到类似的结果(图25)。这些较长的循环时间与具有可推测地源自于NP的表面上的PEG聚合物刷状构型的较大的空间稳定程度的NP一致。将5-nPBA-PEGm添加至三嵌段聚合物-siRNA NP不提供循环时间的改进(图24B)。此外,通过经由用30kD MWCO膜旋转过滤制剂、从3+/-NP制剂除去66%过量的三嵌段聚合物中的某些获得的具有2+/-的电荷比的包含siRNA的NP制剂不导致循环时间的减少(图24C)。使用此纯化方法,难以除去所有的过量的聚合物。这些结果表明未包含在NP中的聚合物不改变PK。

[0407] 此处研究的聚合物变体中,mPEG-cMAP-PEGm NP提供最长的循环时间并且循环时间不随着另外结合的5-nPBA-PEGm而增加。尽管5-nPBA-PEGm与cMAP上的二醇的相互作用很可能比金刚烷与CDP之间的相互作用更强,但是仍然很可能存在从NP脱落的某些量的PEG。另一方面,具有2个PEG每cMAP单元的三嵌段聚合物可以已经能够实现对于良好的刷层(brush layer)所需的NP表面上的PEG密度。然而,在此三嵌段聚合物上共价连接的PEG的量小于在cMAP+5-nPBA-PEGm NP上共价连接的PEG的量。来自这些系统的PK数据表明在循环期间仍然发生PEG脱落,但是比用CDP-金刚烷系统发生的少。5-nPBA-PEGm中的某些在循环期间必须保持留在NP上。

[0408] 为了提供NP在循环期间保持完整的另外的证据,将从给药后20分钟的小鼠收集的血清在凝胶上运行,并通过溴乙啶或荧光团标记的siRNA在Typhoon成像仪上使siRNA可视化。来自这些实验的结果示出siRNA和荧光标记的siRNA当在体内循环时保留在完整的NP中。

[0409] 在理解本公开内容的某些方面中以下参考文献可能是有用的:

[0410] 1.Wu,S.Y.,Lopez-Berestein,G.,Calin,G.A.&Sood,A.K.(2014) RNAi Therapies:Drugging the Undruggable.Science Transl.Med.6,240ps7.

[0411] 2.Kanasty,R.,Dorkin,J.R.,Vegas,A.&Anderson,D.(2013)Delivery materials for siRNA therapeutics.Nat.Mater.12,967-977.

[0412] 3.Davis,M.E.(2009)The First Targeted Delivery of siRNA in Humans via a Self-Assembling Cyclodextrin Polymer-Based nanoparticle:From Concept to Clinic.Mol.Pharm.6,659-668.

[0413] 4.Davis,M.E.等人.(2010)Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles.Nature 464,1067-1070.

[0414] 5.Zuckerman,J.E.等人.(2014)Correlating animal and human phase Ia/Ib

clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111, 11449-11454.

[0415] 6. Zuckerman, J.E., Choi, C.H.J., Hah, H., 和 Davis, M.E. (2012) Polycation-siRNA nanoparticles can disassemble at the kidney glomerular basement membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 3137-3142.

[0416] 7. Naeye, B., Deschout, H., Caveliers, V., Descamps, B., Braeckmans, K., Vanhove, C., Demeester, J., Lahoutte, T., De Smedt, S.C., Raemdonck, K. (2013) In vivo disassembly of IV administered siRNA matrix nanoparticles at the renal filtration barrier. Biomaterials, 34, 2350-2358.

[0417] 8. Christie, R.J., Matsumoto, Y., Miyata, K., Nomoto, T., Fukushima, S., Osada, K., Halnaut, J., Pittella, F., Kim, H.J., Nishiyama, N., 和 Kataoka, K. (2012) Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection. ACS Nano., 6, 5174-5189.

[0418] 9. Nelson, C.E., Kintzing, J.R., Hanna, A., Shannon, J.M., Gupta, M.K., 和 Duvall, C.L. (2013) Balancing cationic and hydrophobic content of PEGylated siRNA polyplexes enhances endosome escape, stability, blood circulation time, and bioactivity in vivo. ACS Nano., 7, 8870-8880.

[0419] 10. Barrett, S.E., 等人. (2014) Development of a liver-targeted siRNA delivery platform with a broad therapeutic window utilizing biodegradable polypeptide-based polymer conjugates. Journal of Controlled Release, 183, 124-137.

[0420] 11. Gallas, A., Alexander, C., Davies, M.C., Puri, S., 和 Allen, S. (2012) Chemistry and formulations for siRNA therapeutics. Chem. Soc. Rev., 42, 7983-7997.

[0421] 12. Barros, S.A., 和 Gollob, J.A. (2012) Safety profile of RNAi nanomedicines. Advanced Drug Delivery Reviews, 64, 1730-1737.

[0422] 13. Ballarin-Gonzalez, B. 和 Howard, K.A. (2012) Polycation-based nanoparticle delivery of RNAi therapeutics: Adverse effects and solutions. Advanced Drug Delivery Reviews, 64, 1717-1729.

[0423] 14. Gomes-da-Silva, L.C., Simoes, S., Moreira, J.N. (2013) Challenging the future of siRNA therapeutics against cancer: the crucial role of nanotechnology. Cell. Mol. Life. Sci., 71, 1417-1438.

[0424] 15. Han, H. 和 Davis, M.E. (2013) Targeted nanoparticles assembled via complexation of boronic acid-containing targeting moieties to diol-containing polymers. Bioconjugate Chem. 24, 669-677.

[0425] 16. Han, H. 和 Davis, M.E. (2013) Single-Antibody, Targeted Nanoparticle Delivery of Camptothecin. Mol. Pharmaceutics 10, 2558-2567.

[0426] 17. Pun, S.H. 和 Davis, M.E. (2002) Development of a nonviral gene delivery vehicle for systemic application. Bioconjugate Chem. 13, 630-639.

[0427] 18. Brissault, B., Leborgne, C., Scherman, D., Guis, C., 和 Kichler, A. (2011)

Synthesis of poly(propylene glycol)-block-polyethylenimine tri block copolymers for the delivery of nucleic acids. *Macromol. Biosci.*, 11, 652-661.

[0428] 19. Xue, L., Ingle, N.P., Reineke, T.M. (2013) Highlighting the role of polymer length, carbohydrate size, and nucleic acid type in potency of glycopolycation agents for pDNA and siRNA delivery. *Biomacromolecules*, 14, 3903-3915.

[0429] 20. Yuthavong, Y., Feldman, N., 和 Boyer, P. (1975) Some chemical characteristics of dimethylsuberimidate and its effect on sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 382, 116-124.

[0430] 21. Zhong, Z., Feijen, J., Lok, M.C., Hennink, W.E., Christensen, L.V., Yockman, J.W., Kim, Y.-H., 和 Kim, S.W. (2005) Low molecular weight linear polyethyleneimine-b-poly(ethylene glycol)-b-polyethyleneimine triblock copolymers: Synthesis, characterization, and in vitro gene transfer properties. *Biomacromolecules*, 6, 3440-3448.

[0431] 22. Adeli, M., Ashiri, M., Chegeni, B.K., 和 Sasanpour, P. (2013) Tumor-targeted drug delivery systems based on supramolecular interactions between iron oxide-carbon nanotubes PAMAM-PEG-PAMAM linear-dendritic copolymers, *J. Iran. Chem. Soc.*, 10, 701-708.

[0432] 23. Zhu, Y., Sheng, R., Luo, T., Li, H., Sun, W., Li, Y., 和 Cao, A. (2011) Amphiphilic cationic [dendritic poly(L-lysine)]-block-poly(L-lactide)-block-[dendritic poly(L-lysine)]s in aqueous solution: Self-aggregation and interaction with DNA as gene delivery carriers. *Macromol. Biosci.*, 11, 174-186.

[0433] 24. Sato, A., Choi, S.W., Hirai, M., Yamayoshi, A., Moriyama, R., Yamano, T., Takagi, M., Kano, A., Shimamoto, A., Maruyama, A. (2007) Polymer brush-stabilized polyplex for a siRNA carrier with long circulatory half-life. *Journal of Controlled Release*, 122, 209-216.

[0434] 25. D'Addio, S.M., Saad, W., Ansell, S.M., Squiers, J.J., Adamson, D.H., Herrera-Alonso, M., Wohl, A.R., Hoye, T.R., Macosko, C.W., Mayer, L.D., Vauthier, C., 和 Prud'homme, R.K. (2012) Effects of block copolymer properties on nanocarrier protection from in vivo clearance. *Journal of Controlled Release*, 162, 208-217.

[0435] 26. Han, H. Development of targeted, polymeric delivery vehicles for camptothecin and siRNA via boronic acid-diol complexation. Ph.D. Thesis, California Institute of Technology, Pasadena, CA, 2012.

[0436] 27. Eriksen, F. Relationship between in vitro stability and in vivo pharmacokinetic behavior of a polymeric gene delivery system. M.S. Thesis, ETH, Zurich, Switzerland, 2011.

[0437] 如本领域技术人员将理解的,本公开内容的许多修改和变化根据这些教导是可能的,并且所有此类修改和变化据此被设想。例如,除本文描述的实施方案之外,本公开内容设想并且要求保护由本文中引用的本公开内容的特征与补充本公开内容的特征的所引用

的现有技术参考文献的那些特征的组合得到的那些发明。类似地,将理解,任何所描述的材料、特征或制品都可以与任何其他的材料、特征或制品组合使用,并且此类组合被认为是在本公开内容的范围内。

[0438] 为了所有目的,在本文件中引用或描述的每个专利、专利申请和出版物的公开内容据此通过引用各自以其整体并入本文。除了已经提及的参考文献之外,本公开内容还包括与2009年8月12日提交的美国专利申请序号12/540,319,现为美国专利8,557,292;2013年3月1日提交的13/782,458;2013年3月1日提交的13/782,486;2013年3月28日提交的13/852,303;以及2009年8月12日提交的国际申请第PCT/US2009/053620号有关的主题,这些参考文献的内容为了所有的目的通过引用被并入,包括其化学、应用以及制备和使用其中描述的嵌段共聚物的方法的教导。

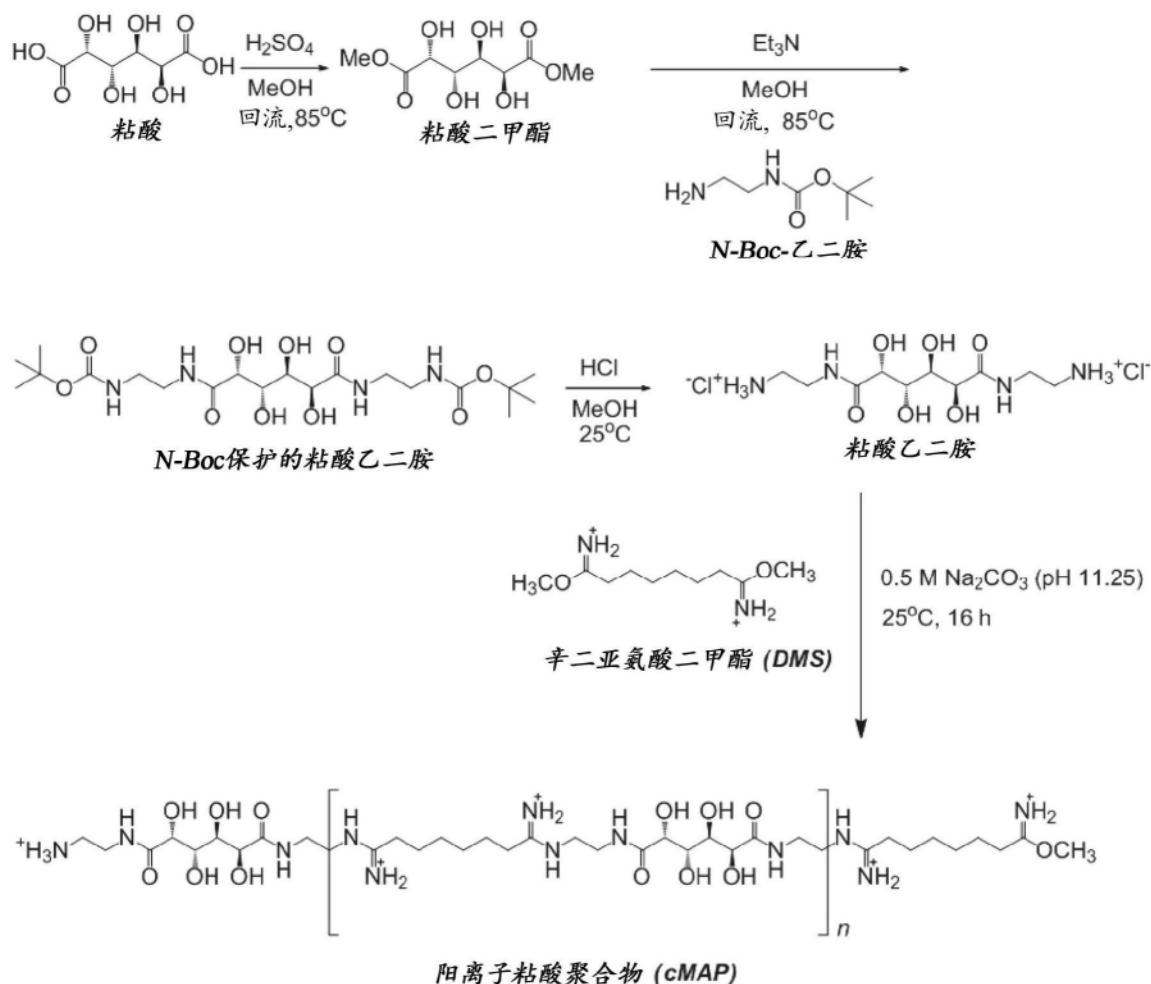


图1

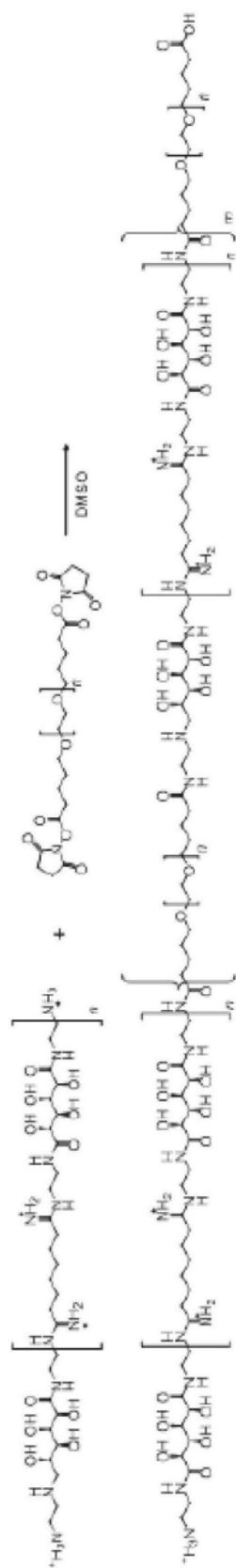


图2

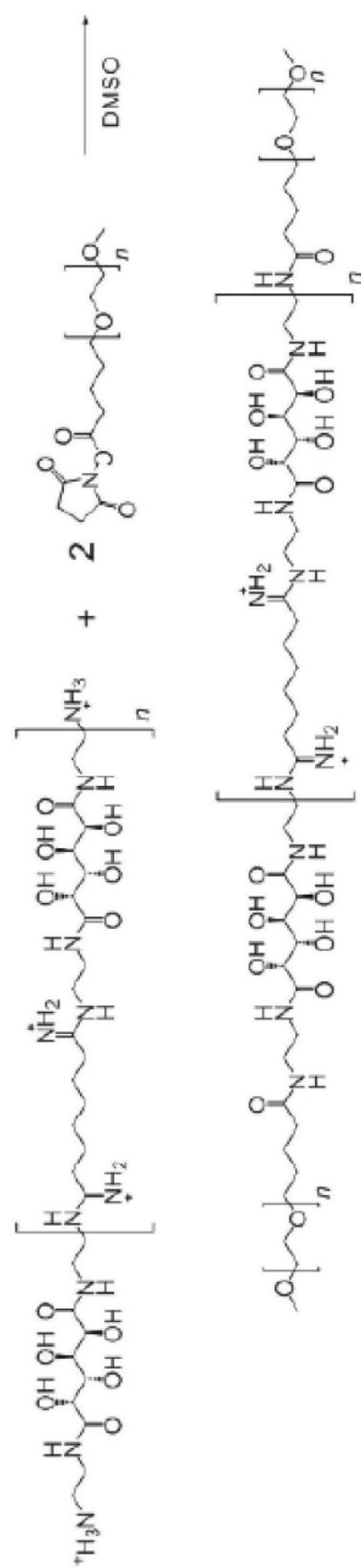


图3

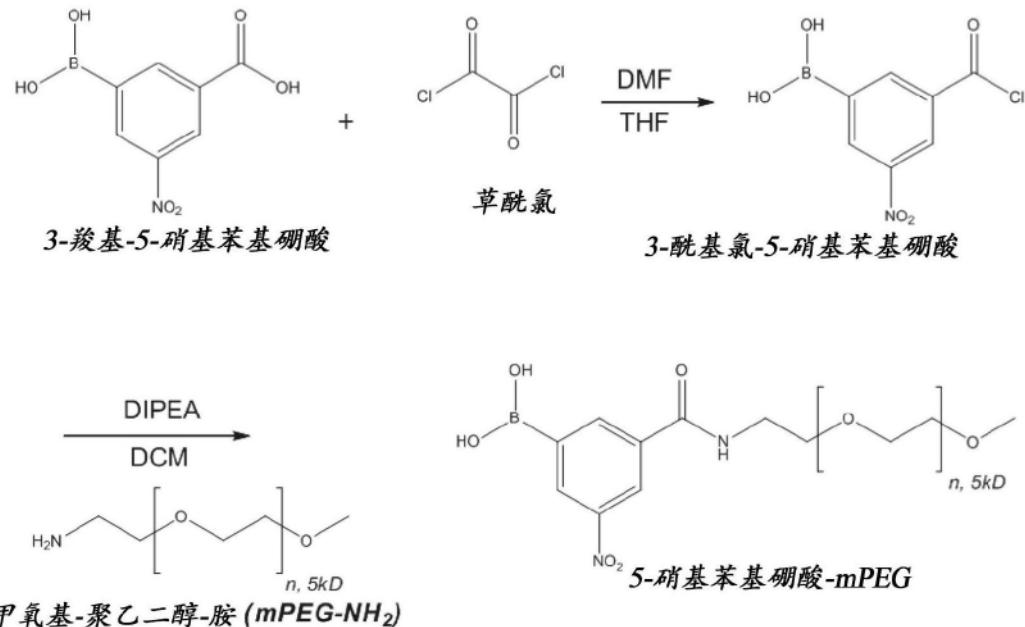


图4

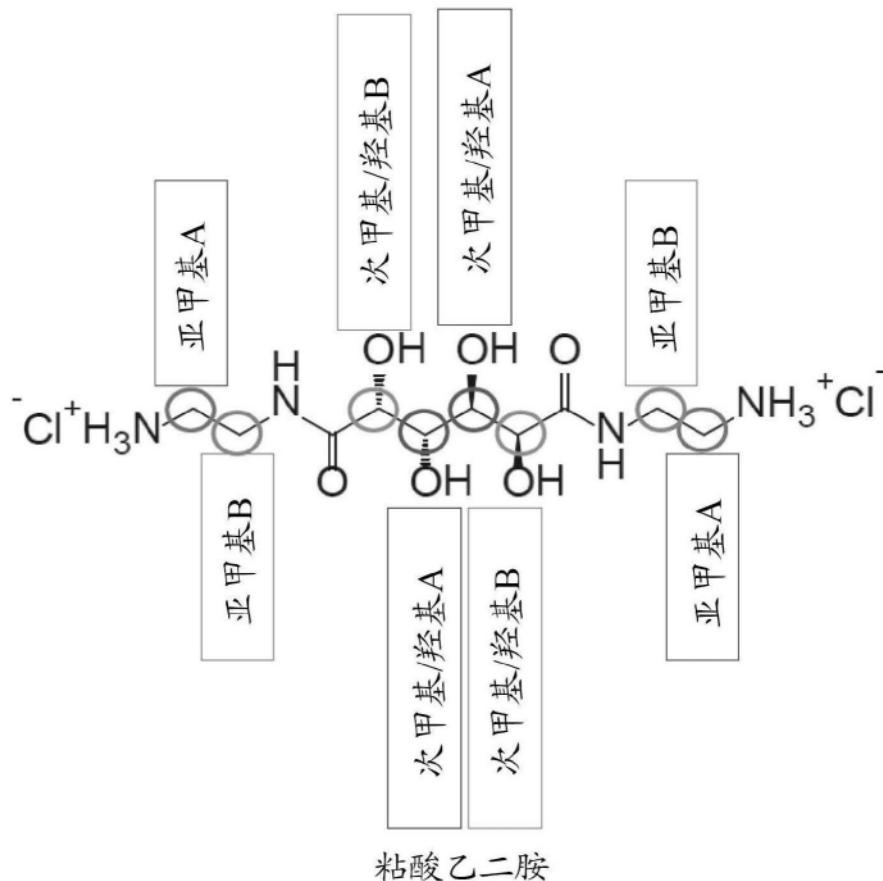


图5

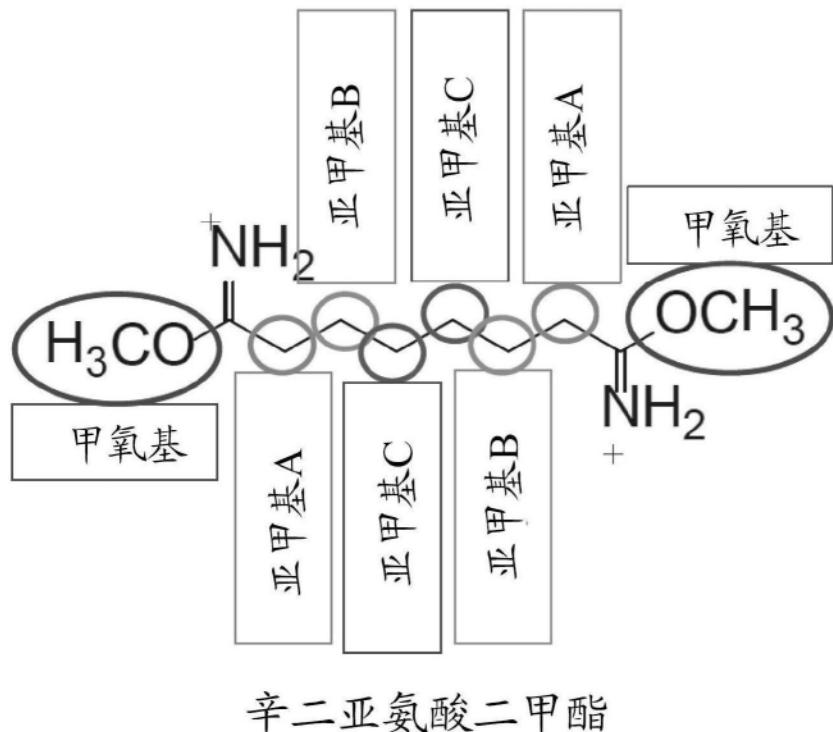
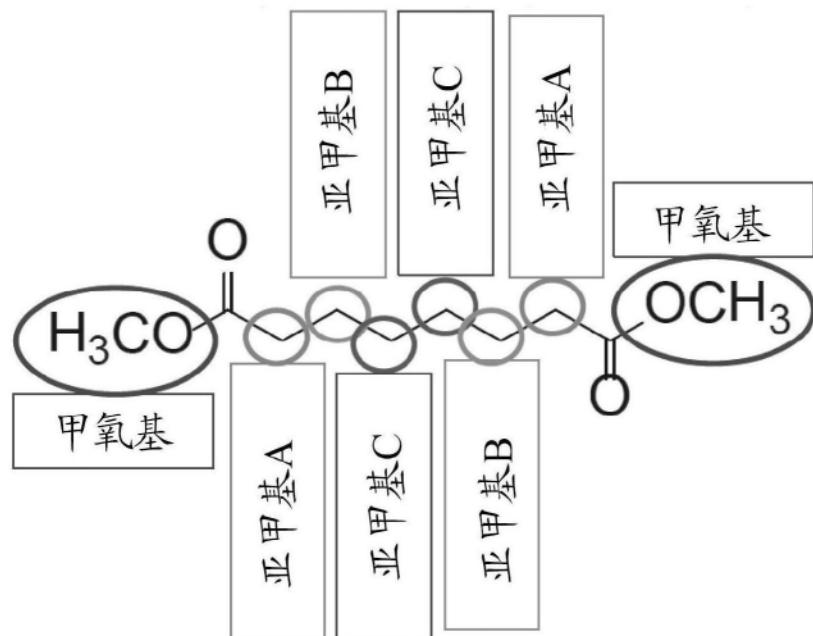


图6



辛二亚氨酸二甲酯-水解的

图7

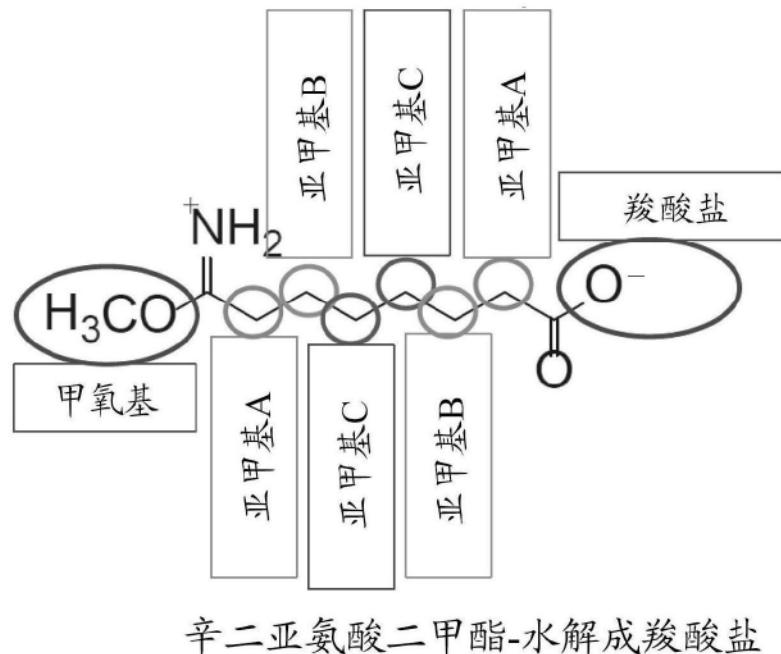


图8

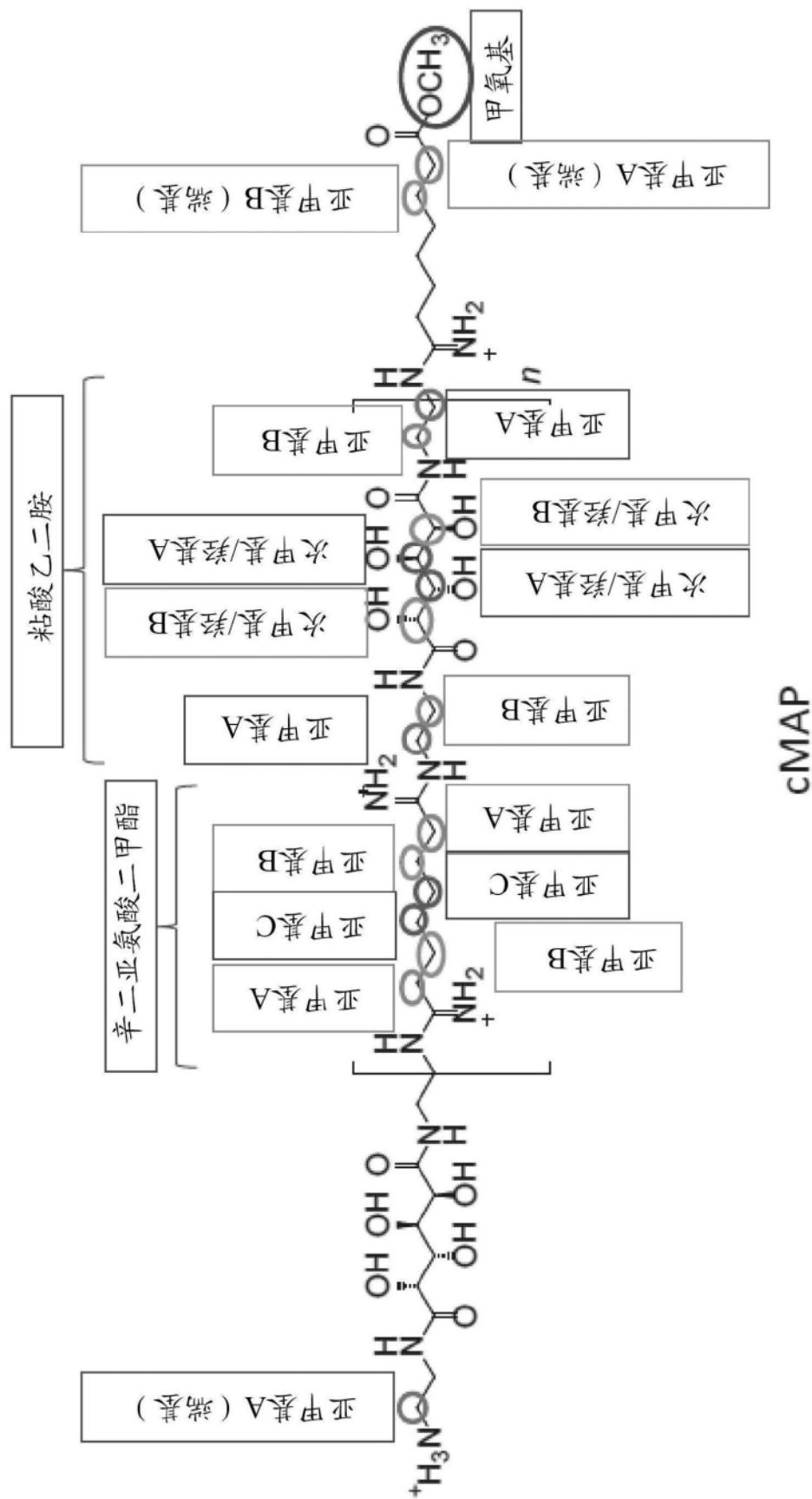


图9

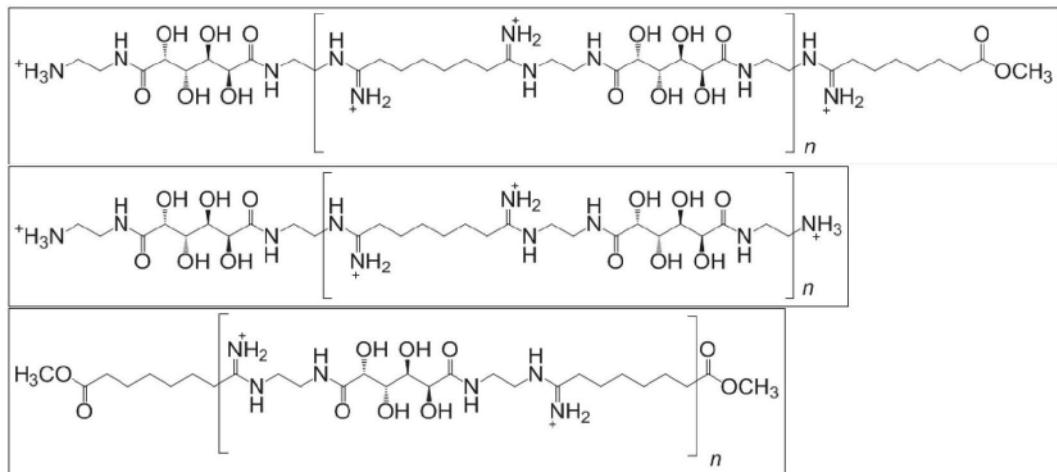


图10

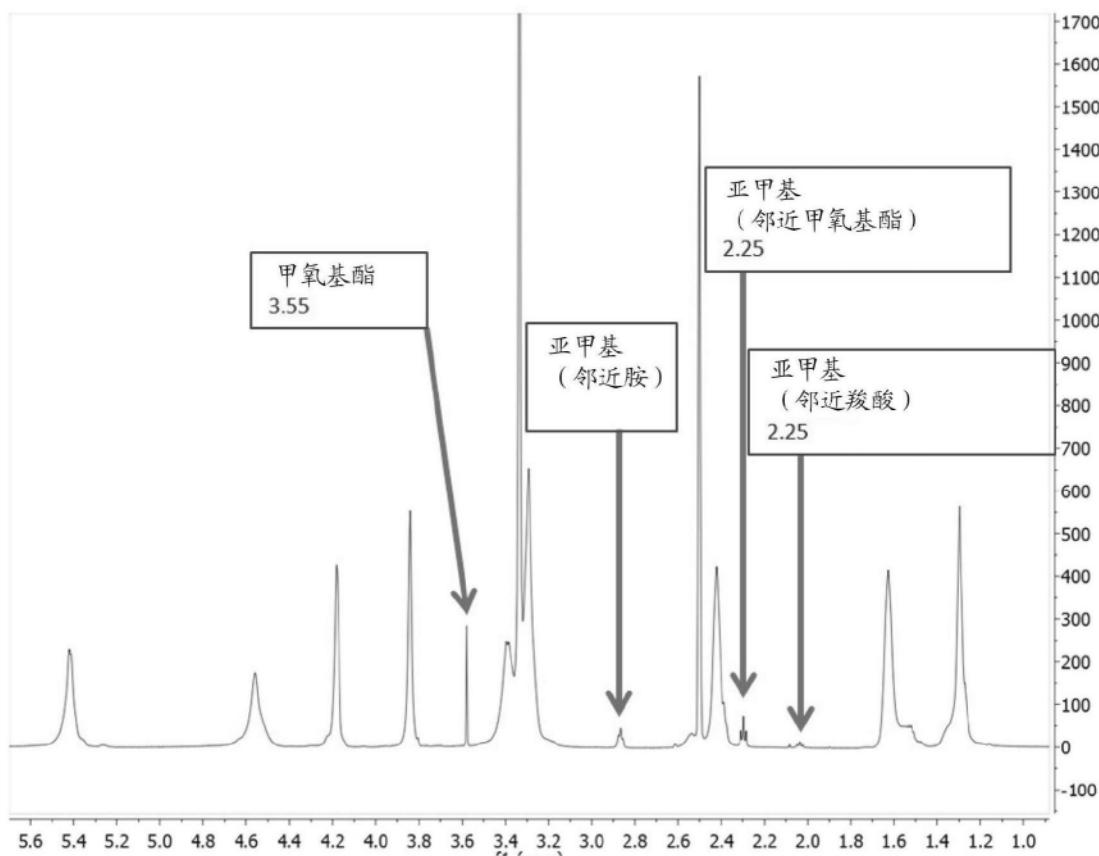


图11

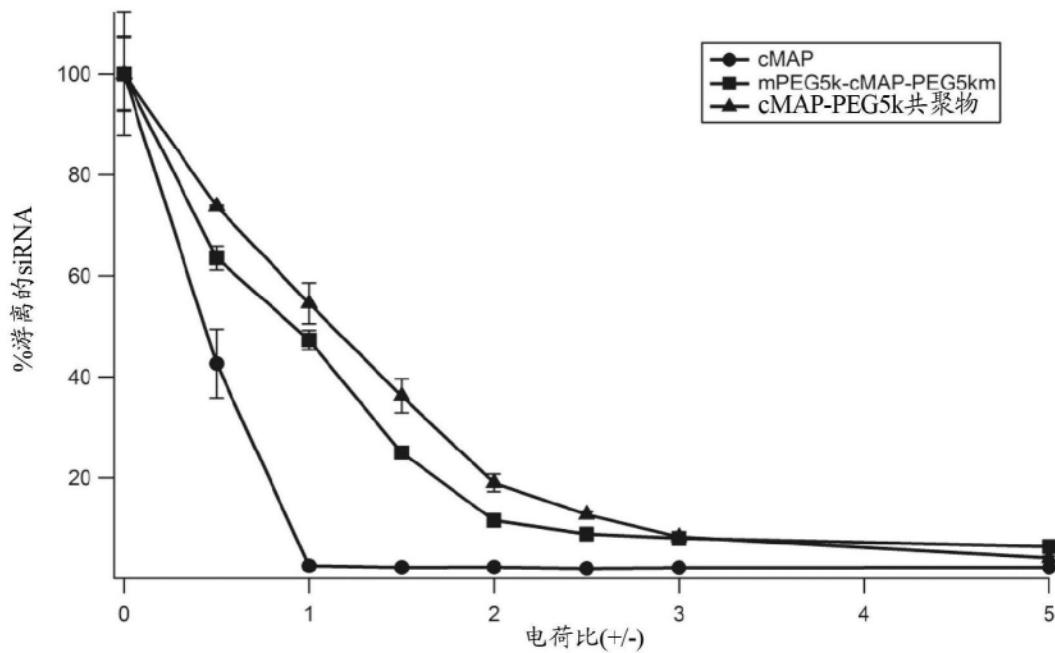


图12

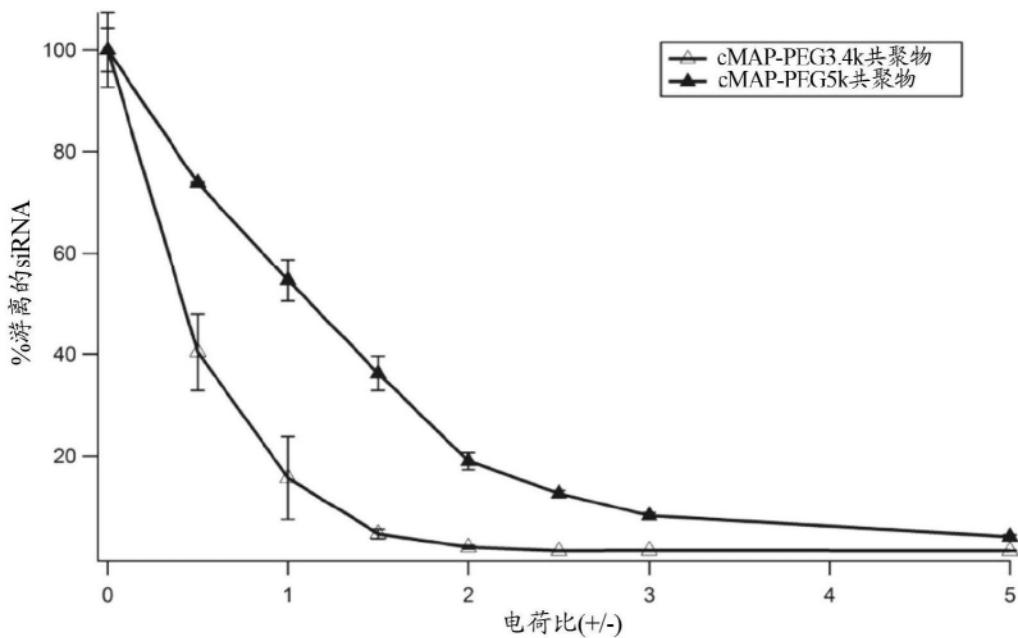


图13

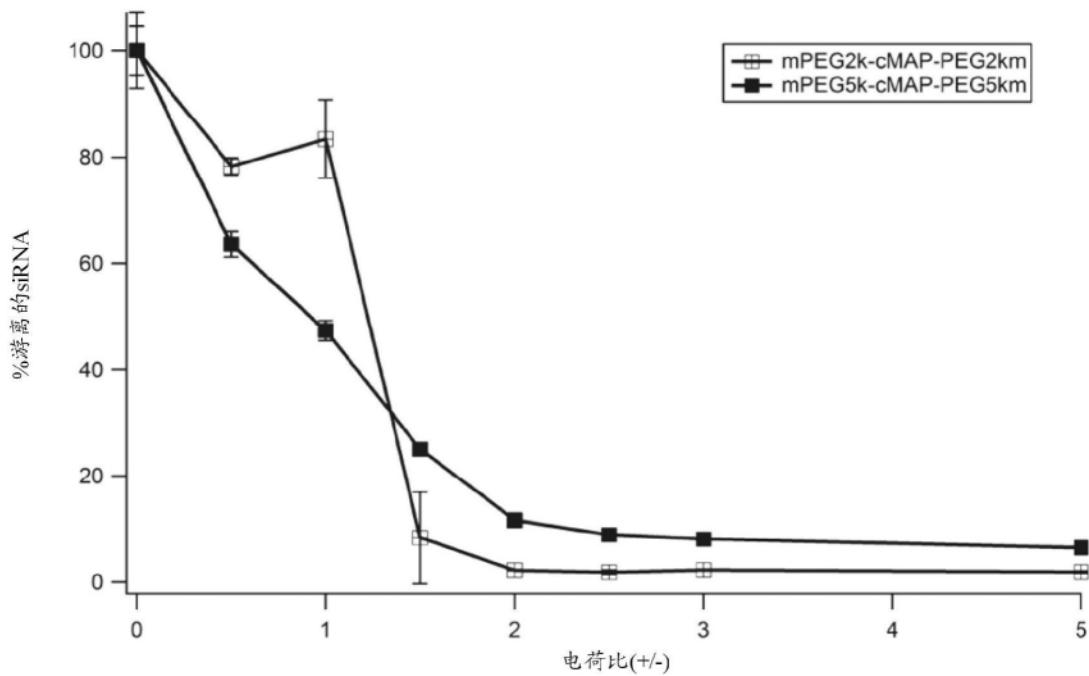


图14

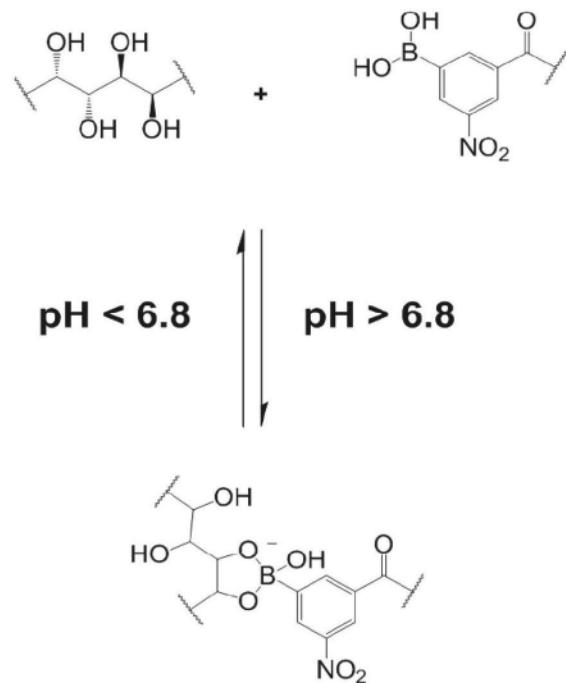


图15

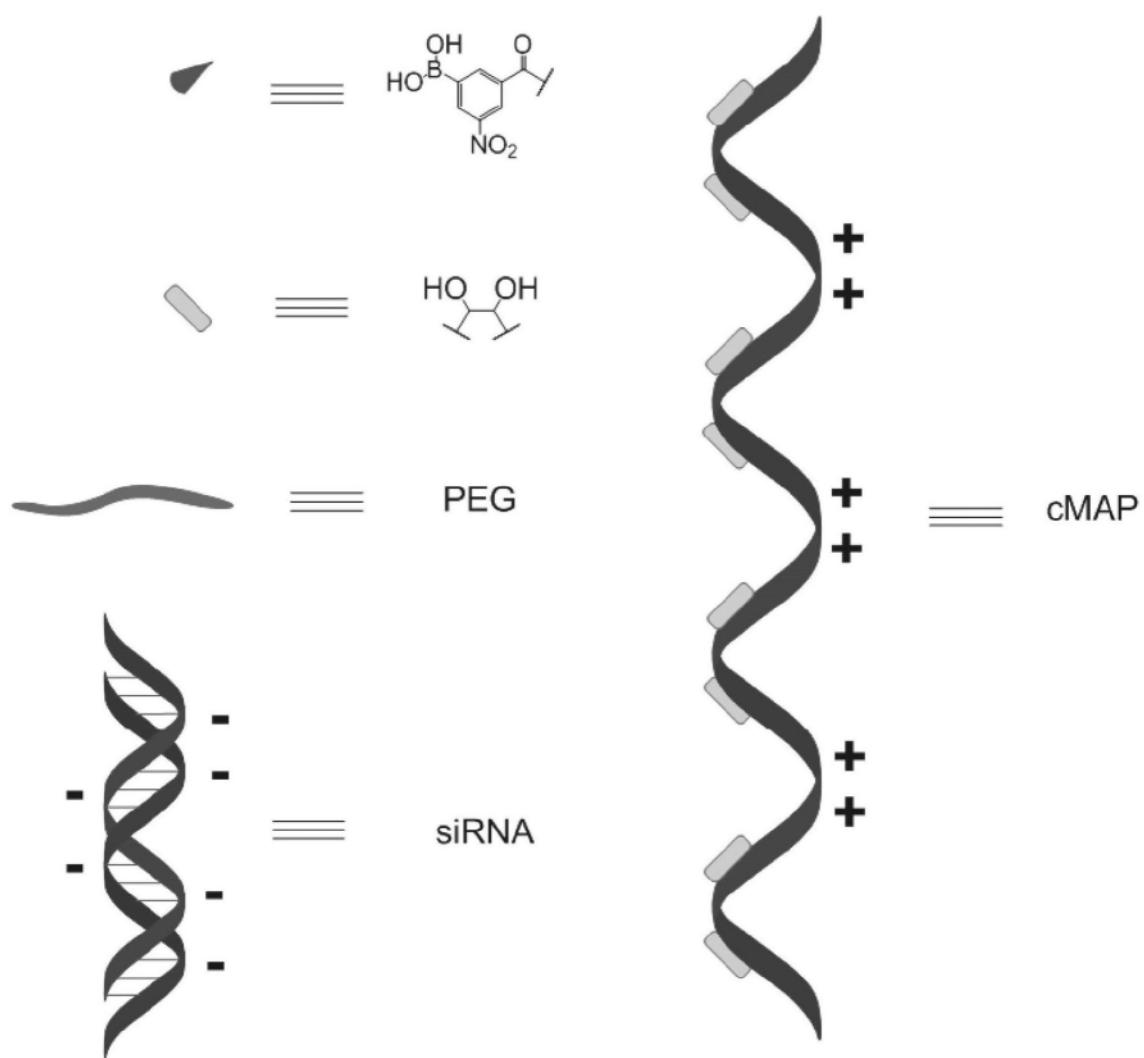


图16A

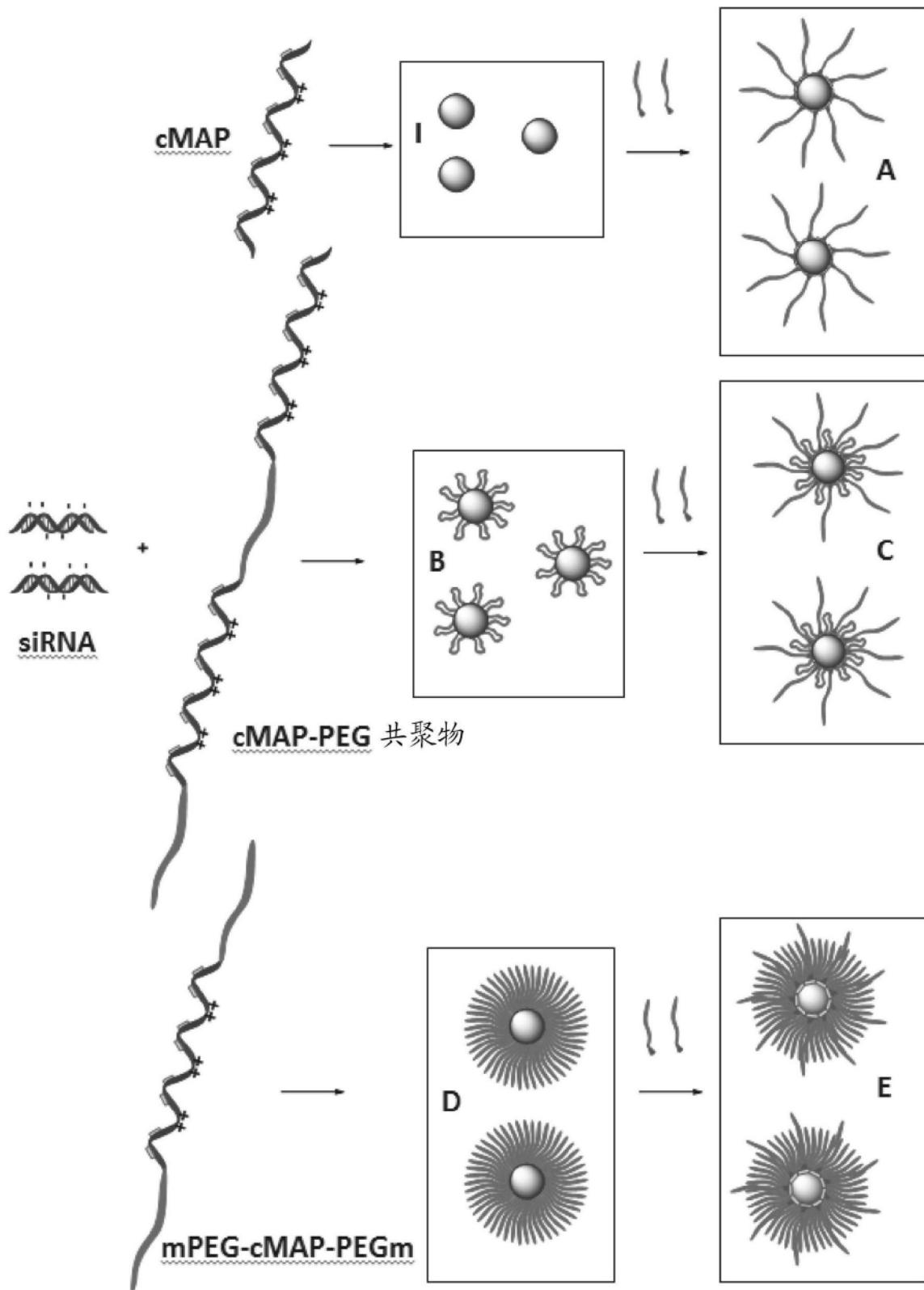


图16B

### cMAP-siRNA纳米颗粒盐稳定性

◆ 无PEG ■ PEG-硝基PBA

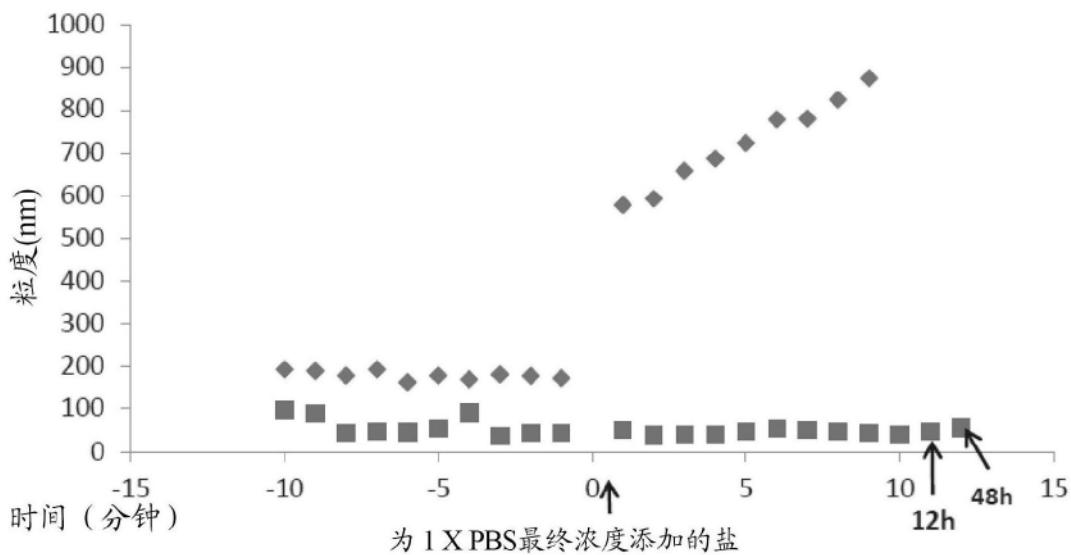


图17

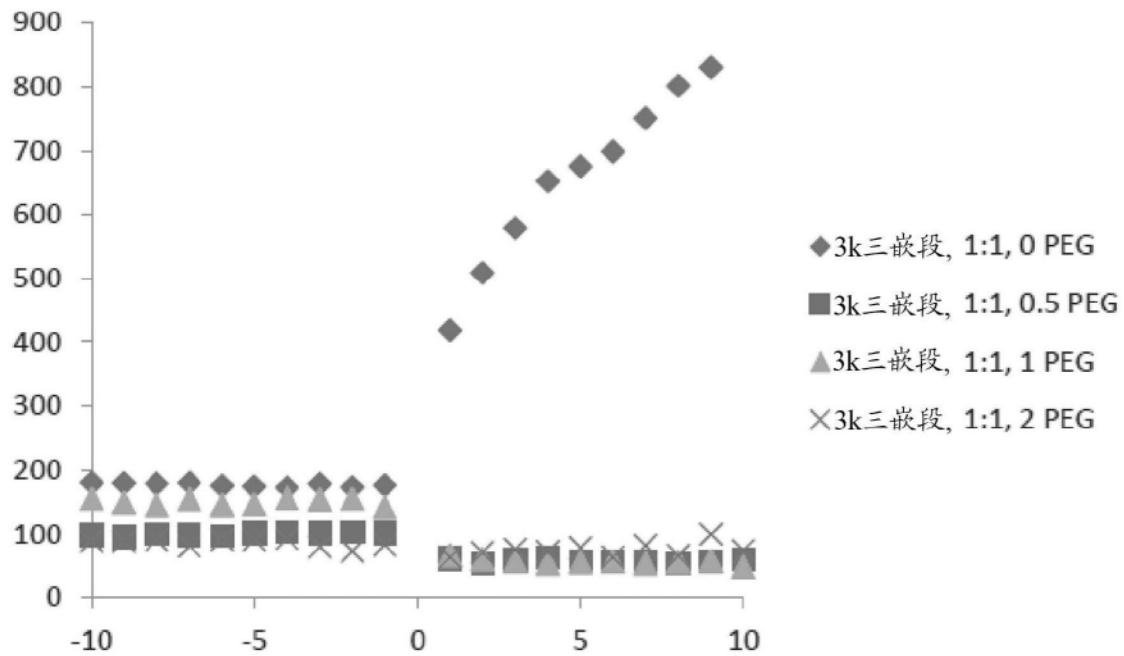


图18

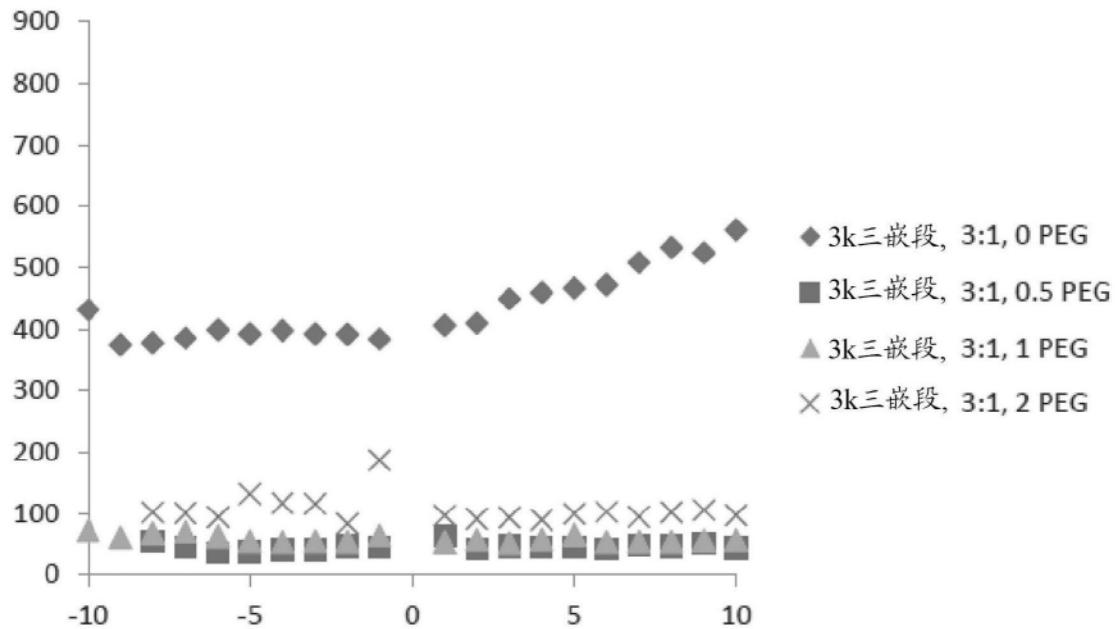


图19

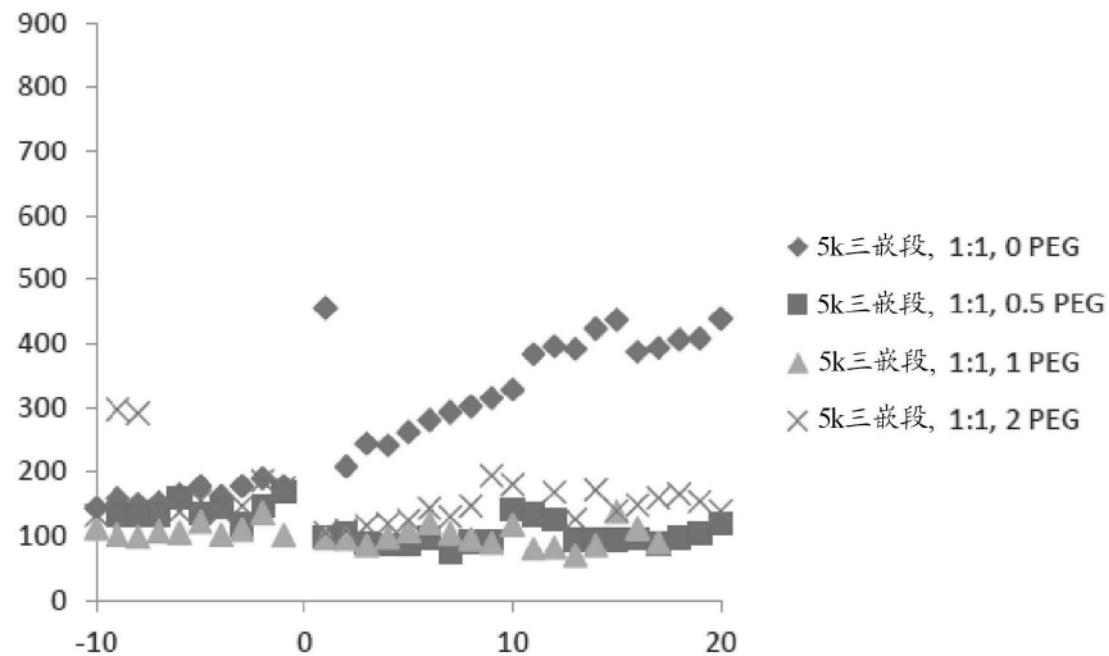


图20

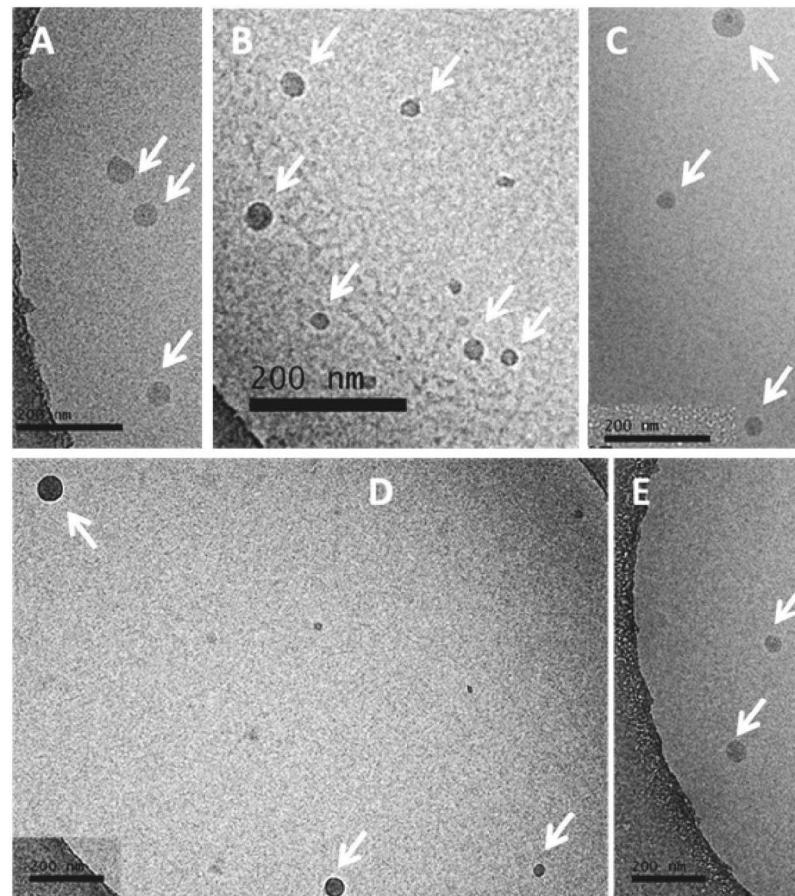


图21

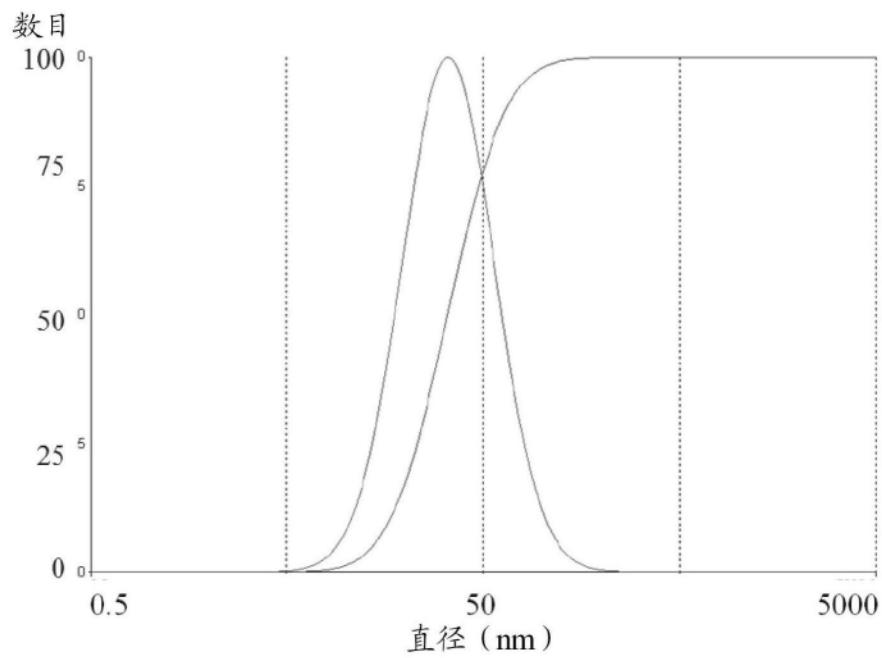


图22A

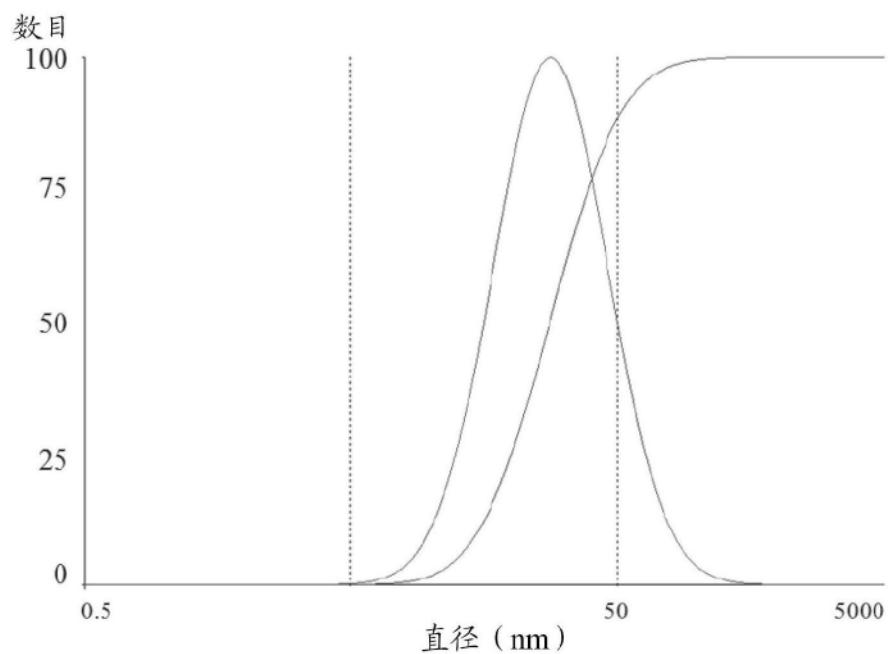


图22B

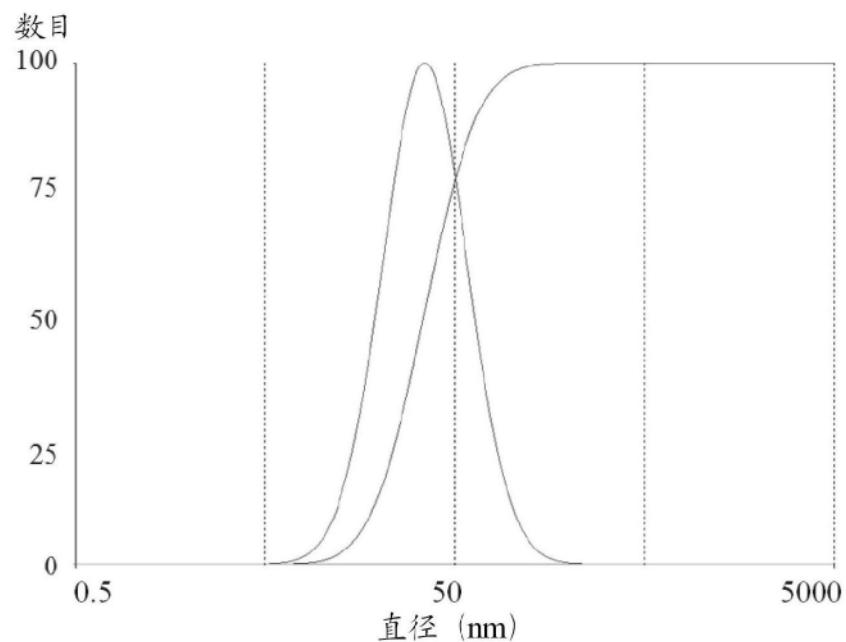


图22C

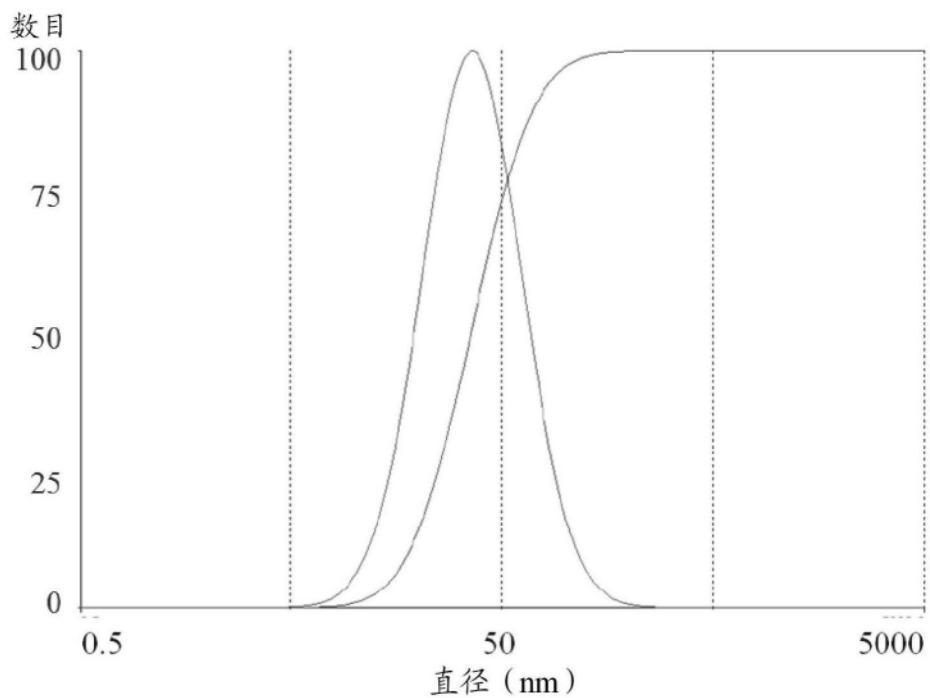


图22D

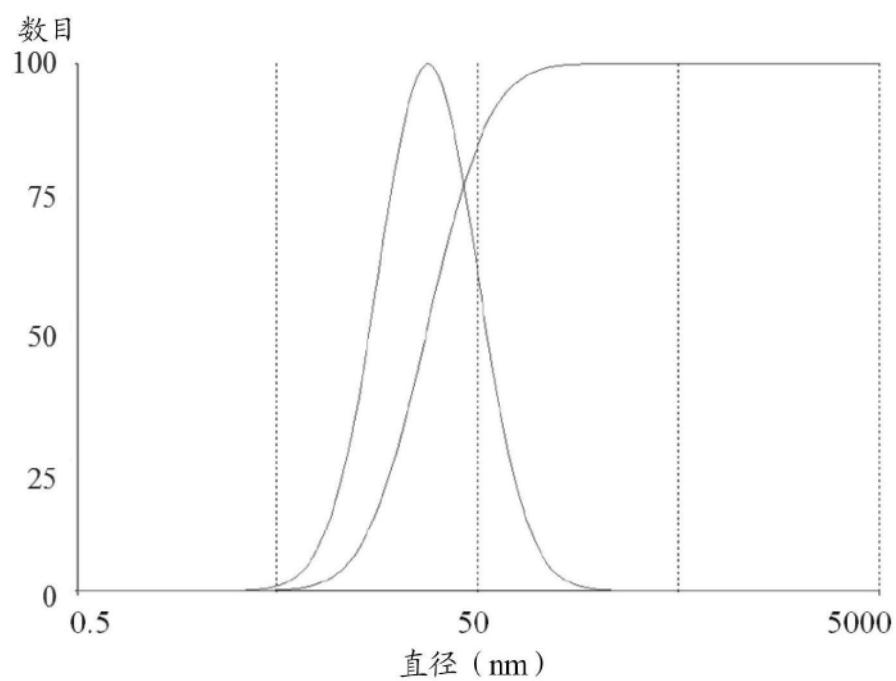


图22E

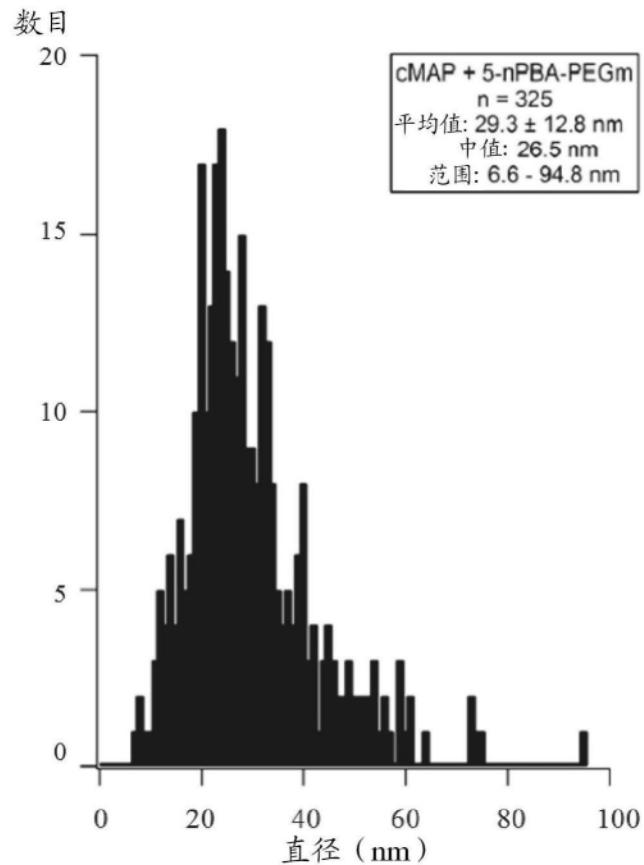


图23A

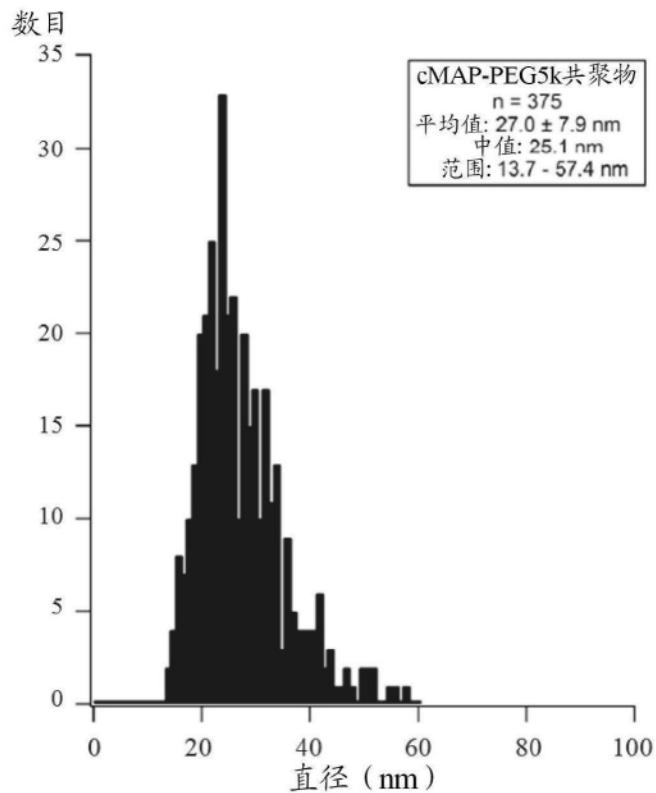


图23B

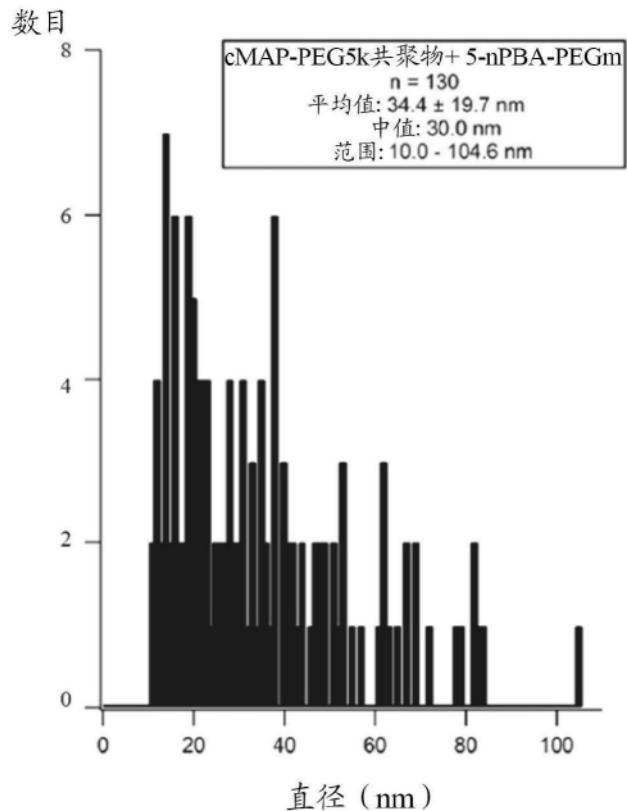


图23C

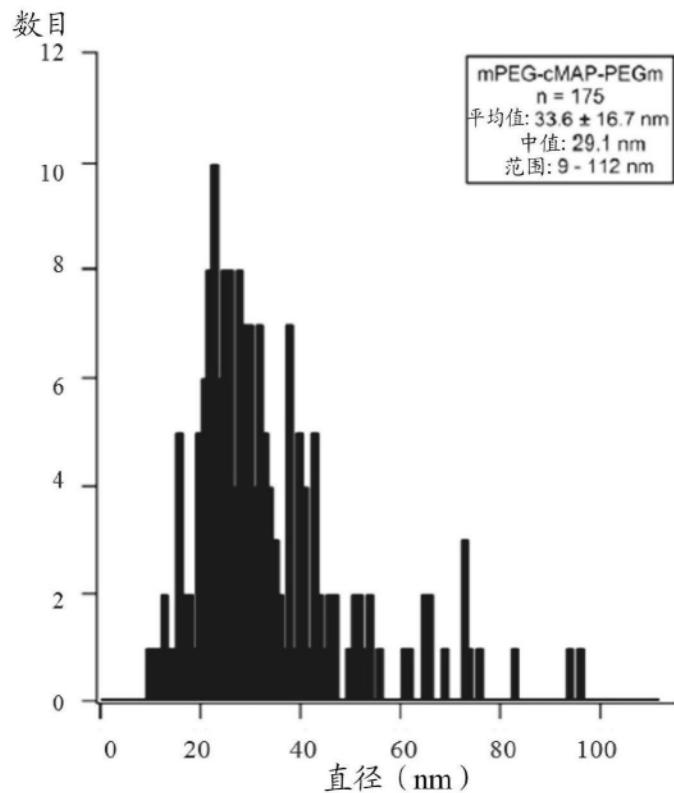


图23D

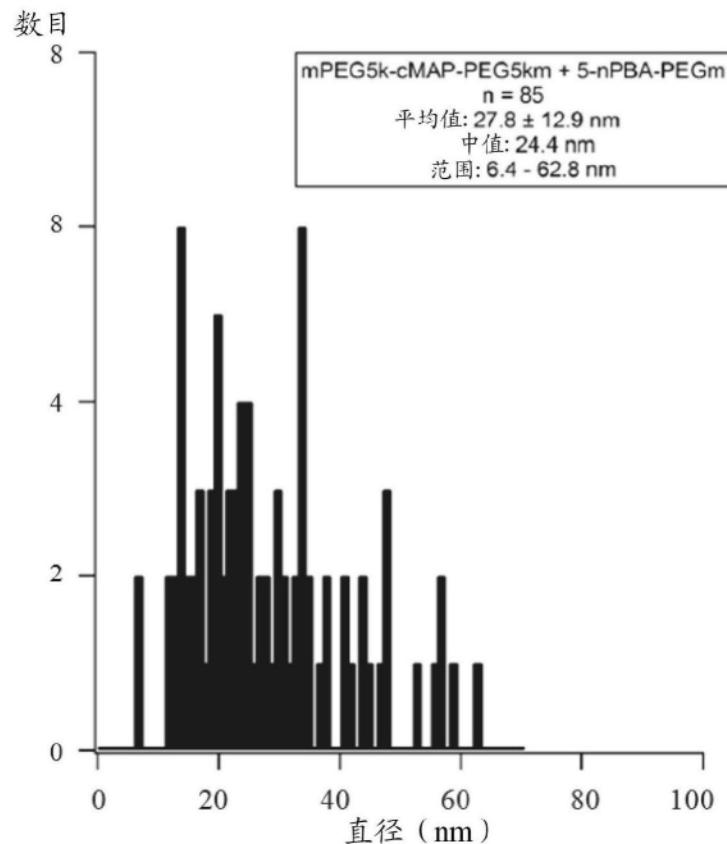


图23E

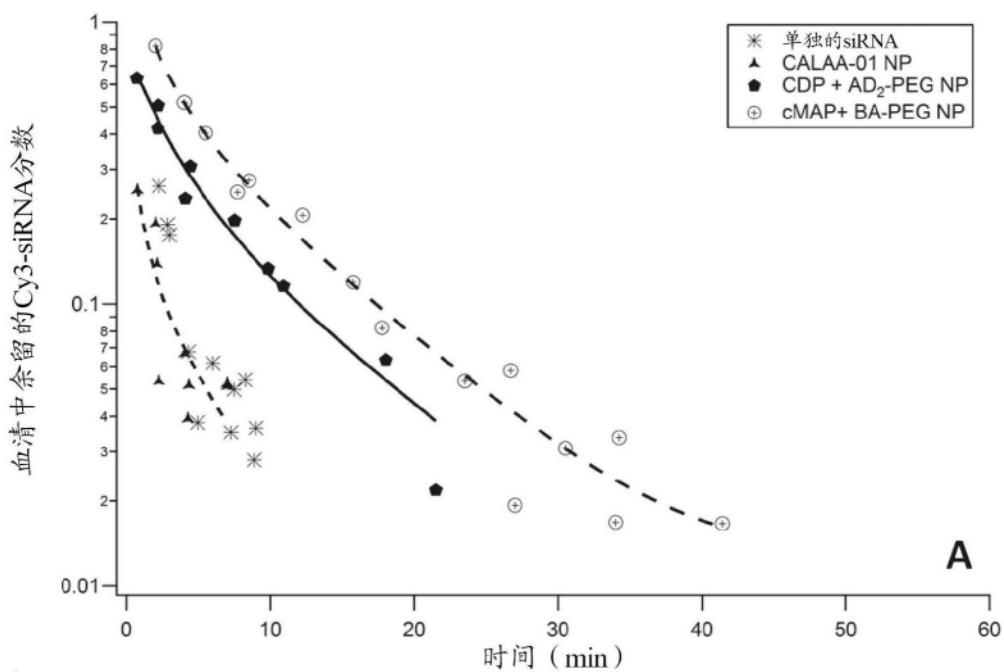


图24A

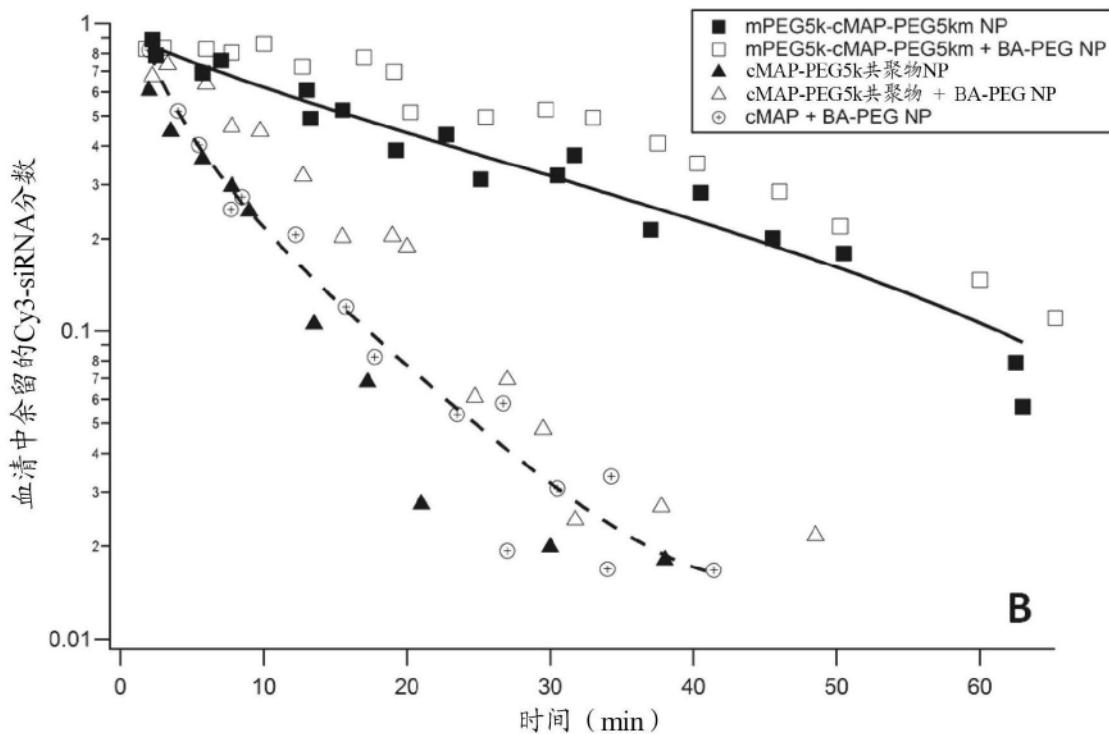


图24B

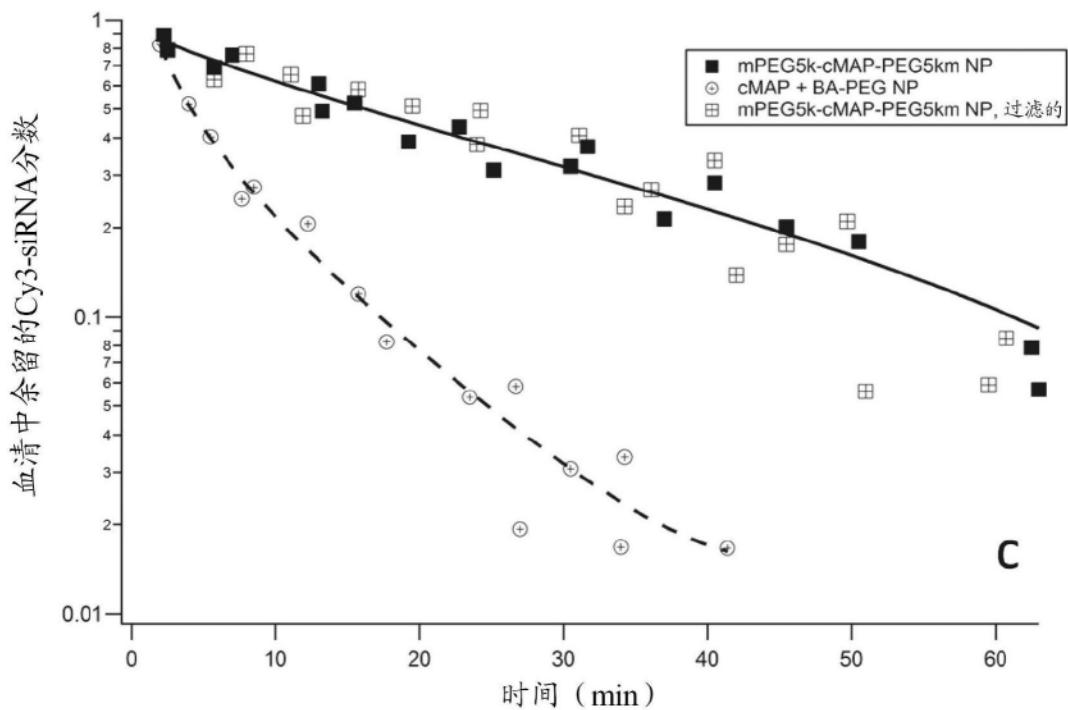


图24C

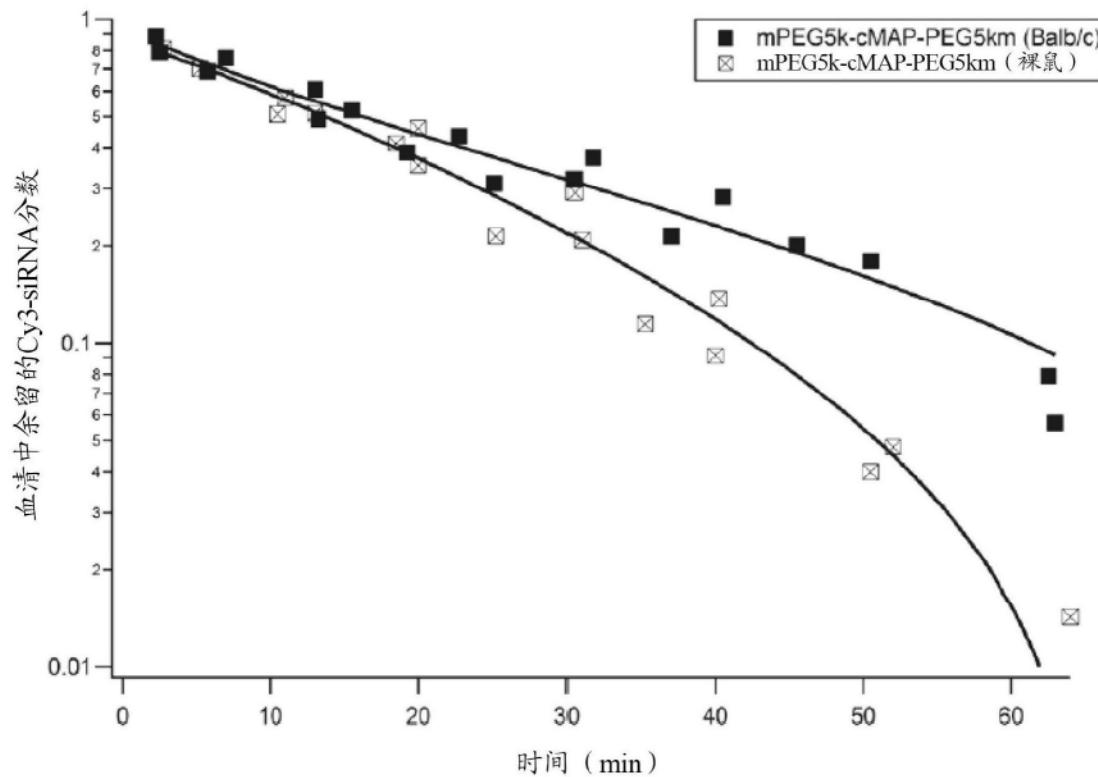


图25