



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117500923 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 02

(21) 申请号 202280040638.0

(22) 申请日 2022.04.07

(30) 优先权数据

63/172069 2021.04.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/023902 2022.04.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/216977 EN 2022.10.13

(71) 申请人 巴特尔纪念研究院

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 A·D·董 D·J·胡克

C·古普塔 K·R·小西姆斯

M·S·科里斯 Z·R·尚克

A·J·科尔伯特 A·D·麦库

E·K·施密茨 C·T·希尔里奇

S·D·米勒 J·L·霍伊

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 段菊兰 彭昶

(51) Int.Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

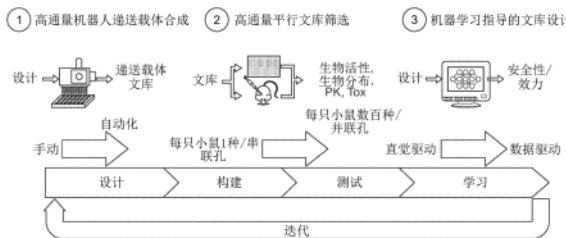
权利要求书4页 说明书53页 附图18页

(54) 发明名称

用于鉴定和使用非病毒载体的快速设计、构建、测试和学习技术

(57) 摘要

本公开涉及用于体内筛选以及用于体内治疗性递送的条形码化聚合物纳米颗粒及用于其的方法。更特别地,本发明涉及聚合物纳米颗粒,例如可逆加成-断裂链转移(RAFT)聚合物组合物,其与多核苷酸条形码缔合,用于治疗性递送以及用于药物递送纳米颗粒的高通量体内筛选。



用于非病毒基因递送开发的DBTL循环基于三大支柱:
自动化合成、高通量测试和机器学习设计。

1. 一种组合物,其包含:
 - a. 包含一种或多种纳米颗粒形成聚合物的非病毒递送载体,和
 - b. 核酸构建体。
2. 权利要求1所述的组合物,其中所述非病毒递送载体包含聚合物纳米颗粒。
3. 权利要求1所述的组合物,其中所述核酸构建体经由静电相互作用与所述非病毒递送载体缔合。
4. 权利要求1所述的组合物,其中所述核酸构建体通过所述一种或多种纳米颗粒形成聚合物的带正电荷的聚合物片段和所述核酸构建体的带负电荷的多核苷酸片段的静电相互作用与所述非病毒递送载体缔合。
5. 权利要求1所述的组合物,其中所述核酸构建体通过所述核酸构建体的5'端和/或3'端上的生物素分子和与所述一种或多种纳米颗粒形成聚合物上的生物素结合的分子之间的高亲和力、非共价键相互作用与所述非病毒递送载体缔合。
6. 权利要求1所述的组合物,其中所述核酸构建体通过羧基封端的聚合物片段和所述核酸构建体之间的共价键与所述非病毒递送载体缔合,其中所述核酸构建体在5'端和/或3'端上包含伯胺。
7. 权利要求1所述的组合物,其中所述核酸构建体包含:
 - a. 两个引物结合片段;和
 - b. 在所述两个引物结合片段之间的一个或多个独特的多核苷酸条形码。
8. 权利要求7所述的组合物,其中所述引物结合片段的长度范围为约15个碱基对至约30个碱基对。
9. 权利要求7所述的组合物,其中所述引物结合片段是通用引物结合集。
10. 权利要求7所述的组合物,其中所述一个或多个多核苷酸条形码包含6-20个核苷酸的长度的独特序列。
11. 权利要求10所述的组合物,其中所述多核苷酸条形码进一步包含在任意两个独特的多核苷酸条形码序列之间至少2-6个碱基的汉明距离。
12. 权利要求1所述的组合物,其中所述核酸构建体进一步包含在所述多核苷酸条形码的3'端处的约6个至约12个随机碱基。
13. 权利要求12所述的组合物,其中在所述多核苷酸条形码的3'端处的约6个至约12个随机碱基用于PCR重复的生物信息学去除。
14. 权利要求1所述的组合物,其中所述核酸构建体的长度范围为约42个核苷酸至约210个核苷酸。
15. 权利要求1所述的组合物,其中所述一种或多种纳米颗粒形成聚合物包含与受控的活性/自由基聚合相容的单体单元。
16. 权利要求1所述的组合物,其中所述一种或多种纳米颗粒形成聚合物通过可逆失活自由基聚合、原子转移自由基聚合(ATRP)、可逆加成断裂链转移聚合(RAFT)、碘转移聚合(ITP)、硒中心的自由基介导的聚合、碲化物介导的聚合(TEP)、铋化氢介导的聚合、或开环聚合而制备。
17. 权利要求1所述的组合物,其中所述一种或多种纳米颗粒形成聚合物由含有乙烯基基团的单体制备。

18. 权利要求1所述的组合物, 其中所述一种或多种纳米颗粒形成聚合物使用链转移剂, 例如在可逆加成-断裂链转移(RAFT)中使用的那些制备。

19. 权利要求1所述的组合物, 其中所述一种或多种纳米颗粒形成聚合物是RAFT嵌段共聚物, 其包含

- a. 第一末端, 其包含衍生自RAFT共聚过程中的第一链转移剂的第一封端单元;
 - b. 第一嵌段, 其由共价连接至第一反应性官能单元的一个或多个单体单元制备, 并且其具有在约1kDa至约200kDa的范围中的分子量(M_n)和在约10至约2500的范围中的聚合度;
 - c. 任选的第二嵌段, 其由共价连接至所述第一嵌段的一个或多个单体单元制备, 并且其具有在约1kDa至约200kDa的范围中的分子量(M_n)和在约20至约2000的范围中的聚合度;
- 和

- d. 第二末端, 其包含衍生自第一或第二链转移剂的第二封端单元。

20. 权利要求19所述的组合物, 其中所述非病毒递送载体具有以下的一个或多个: 在约25kDa至约60kDa的范围中的总分子量(M_n)、在约700至约900的范围中的总聚合度、在约10至约60nm的范围中的目标尺寸和约1.5至约3.5的最大冠核比(CCR)。

21. 权利要求19所述的组合物, 其中所述第一嵌段由选自以下的一种或多种单体单元制备: 丙烯酸2-二甲基氨基乙酯、甲基丙烯酸2-(二乙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸2-(二异丙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸丁酯、乙基丙烯酸、丙基丙烯酸、甲基丙烯酸(羟基乙基)酯和甲基丙烯酸甲酯。

22. 权利要求19所述的组合物, 其中所述第一嵌段由以下之一制备: 丙烯酸2-二甲基氨基乙酯、甲基丙烯酸2-(二乙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸2-(二异丙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸丁酯、乙基丙烯酸、丙基丙烯酸、甲基丙烯酸(羟基乙基)酯或甲基丙烯酸甲酯。

23. 权利要求19所述的组合物, 其中所述第二嵌段由选自以下的一种或多种单体单元制备: 丙烯酸2-二甲基氨基乙酯、甲基丙烯酸2-(二乙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸2-(二异丙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸丁酯、乙基丙烯酸、丙基丙烯酸、甲基丙烯酸(羟基乙基)酯和甲基丙烯酸甲酯。

24. 权利要求19所述的组合物, 其中所述第二嵌段是由独立地选自以下的两种不同单体单元制备的无规共聚物: 丙烯酸2-二甲基氨基乙酯、甲基丙烯酸2-(二乙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸2-(二异丙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸丁酯、乙基丙烯酸、丙基丙烯酸、甲基丙烯酸(羟基乙基)酯和甲基丙烯酸甲酯。

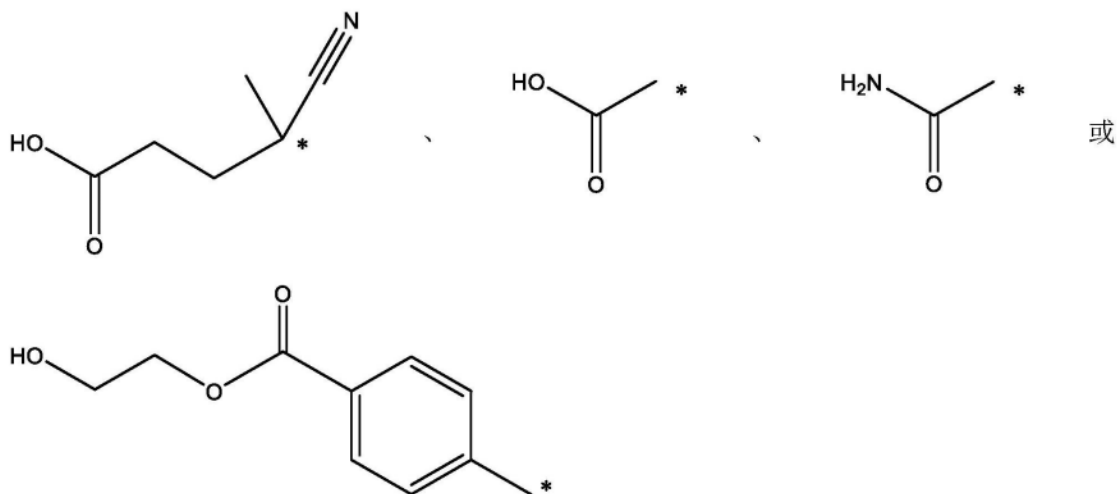
25. 权利要求19所述的组合物, 其中所述第二嵌段是由独立地选自以下的三种不同单体单元制备的无规共聚物: 丙烯酸2-二甲基氨基乙酯、甲基丙烯酸2-(二乙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸2-(二异丙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸丁酯、乙基丙烯酸、丙基丙烯酸、甲基丙烯酸(羟基乙基)酯和甲基丙烯酸甲酯。

26. 权利要求19所述的组合物, 其中所述第二嵌段是由丙烯酸2-二甲基氨基乙酯、甲基丙烯酸丁酯和丙基丙烯酸; 或丙烯酸2-二甲基氨基乙酯和甲基丙烯酸丁酯; 或丙烯酸2-二甲基氨基乙酯、甲基丙烯酸丁酯和乙基丙烯酸制备的无规共聚物。

27. 权利要求19所述的组合物, 其中每种链转移剂独立地选自三硫代碳酸双(羧基甲基)酯、三硫代碳酸双(2-氨基-2-氧代乙基)酯、三硫代碳酸双[4-(2-羟基乙氧基羰基)苄基]酯、4-氰基-4-(乙基硫基硫代羰基)硫基戊酸、4-氰基-4-((苯基硫代甲酰)硫基)戊酸和

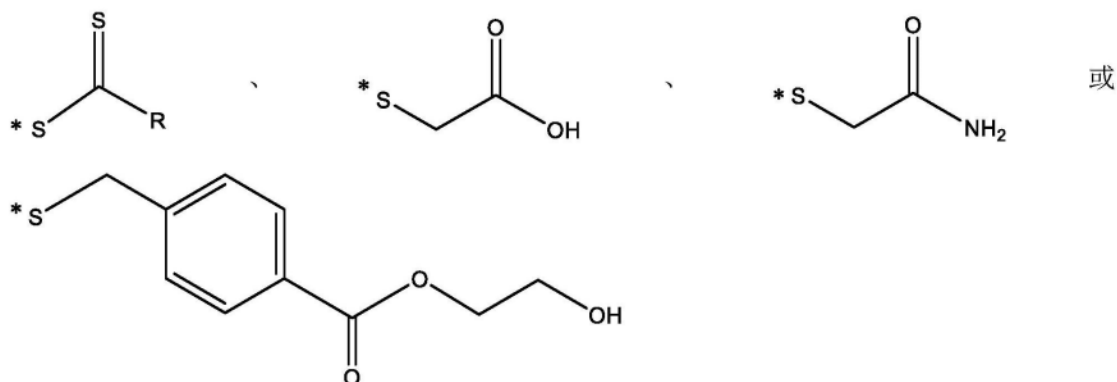
4-氰基-4-[(十二烷基硫基硫代羰基)硫基]戊酸。

28. 权利要求19所述的组合物,其中所述第一封端单元具有下式



其中,*代表与所述第一嵌段的共价连接的点。

29. 权利要求19所述的组合物,其中所述第二封端单元具有下式



其中,*代表与所述第二嵌段的共价连接的点,并且R是-SC₂-C₁₂烷基或C₆H₅。

30. 一种体内筛选所需的用作递送载体的聚合物纳米颗粒的方法,所述方法包括 (a) 制备包含两种或更多种类型的聚合物纳米颗粒的文库,其中每种聚合物纳米颗粒与包含不同多核苷酸条形码的核酸构建体缔合, (b) 向动物施用所述文库, (c) 从所述动物中移除细胞或组织, (d) 从所述动物的所述细胞或组织中分离所述核酸构建体, (e) 检测所述动物的所述细胞或组织中的所述核酸构建体,和 (f) 鉴定所需的用作递送载体的聚合物纳米颗粒。

31. 权利要求30所述的方法,其中与所述核酸构建体缔合的所述聚合物纳米颗粒是根据权利要求1至29中任一项所述的。

32. 权利要求30所述的方法,其中通过选自聚合酶链式反应 (PCR)、等温扩增、测序、或其组合的方法检测所述核酸构建体,以获得核苷酸序列数据。

33. 权利要求30所述的方法,其中所述聚合物纳米颗粒负载有有效载荷。

34. 权利要求33所述的方法,其中所述有效载荷为发光分子。

35. 权利要求34所述的方法,其中所述发光用于经由成像来追踪生物分布或细胞摄取。

36. 权利要求30所述的方法,其中对所述动物的所述施用经由肌内、静脉内、腹膜内、口服或肺途径。

37. 权利要求30所述的方法,其中所述核酸构建体通过以下从所述细胞和组织中分离:

与第一有机化合物混合并将有机相与细胞或组织样品的水相温育,将所述有机相与所述水相分离,将所述有机相与第二有机化合物混合,温育混合物,从所述混合物中沉淀所述核酸构建体,通过蒸发去除所述有机相,和将所述核酸构建体重悬浮在水性组合物中。

38. 权利要求37所述的方法,其中所述有机相包含苯酚氯仿。

39. 权利要求37所述的方法,其中通过将所述核酸构建体的水性组合物滴定至大于7.4的pH,而将所述核酸构建体与所述细胞或组织中的阳离子材料分离。

40. 权利要求30所述的方法,其中通过使所述核酸构建体与分子结合,而将所述核酸构建体与所述细胞或组织中的材料分离,所述分子具有比对所述细胞或组织材料的结合亲和力更大的对所述核酸构建体的结合亲和力。

41. 权利要求30所述的方法,其中所述核酸构建体经由尺寸排阻色谱法来与所述细胞或组织中的材料分离。

42. 权利要求30所述的方法,其中所述核酸构建体经由透析或渗滤来与所述细胞或组织中的材料分离。

43. 权利要求30所述的方法,其中所述核酸构建体经由过滤来与所述细胞或组织中的材料分离。

44. 权利要求30所述的方法,其中所述核酸构建体通过使用酶消化蛋白来与所述细胞或组织中的材料分离。

45. 权利要求44所述的方法,其中所述酶是蛋白酶K。

46. 权利要求30所述的方法,其中通过首先将分离的核酸构建体稀释至少1000倍,并然后使用引物通过PCR扩增所述核酸构建体来检测与所述聚合物纳米颗粒缔合的所述核酸构建体。

47. 权利要求46所述的方法,其中所述来自PCR步骤的引物在检测扩增子之前被酶促消化。

48. 权利要求32所述的方法,其中所述核苷酸序列数据被转换成fast Q文件;并且将所述fast Q文件映射到已知的多核苷酸条形码,并对所述多核苷酸条形码进行枚举。

49. 一种治疗患有疾病的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用权利要求30所述的体内筛选方法中所鉴定的聚合物纳米颗粒,其中所述聚合物纳米颗粒进一步包含有效载荷,以及治疗所述患者中的所述疾病。

用于鉴定和使用非病毒载体的快速设计、构建、测试和学习 技术

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请依据35 U.S.C. §119(e) 要求在2021年4月7日提交的美国临时申请系列号63/172,069的优先权,其全部公开通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本公开涉及用于体内筛选以及用于体内治疗性递送的条形码化聚合物纳米颗粒及用于其的方法。更特别地,本发明涉及聚合物纳米颗粒,例如可逆加成-断裂链转移(RAFT)聚合物组合物,其与多核苷酸条形码缔合,用于治疗性递送以及用于药物递送纳米颗粒的高通量体内筛选。

背景技术

[0003] 基因药物(包括基因疗法、基因沉默、剪接调节因子和基于核酸酶的基因编辑器)有望产生革命性治疗,包括疫苗、传染性疾病治疗、抗微生物治疗、抗病毒治疗、以及最值得注意的遗传疾病治疗。然而,将这些基因药物有效载荷体内递送到需要治疗的特定组织和细胞,同时避免可能降低基因药物的效力或安全性的组织和细胞构成了重大挑战。另外的挑战包括递送大的基因有效载荷或多个有效载荷的能力。腺相关病毒(AAV)是用于基因药物递送的最广泛使用的工具,但AAV不能递送大的基因有效载荷或多个有效载荷(例如规律间隔成簇短回文重复(CRISPR)/Cas9系统),并且它们有时触发不需要的免疫反应,包括抗AAV抗体的产生,其为一种细胞介导的反应。患者中由AAV引起的一些免疫反应为潜在地致命的免疫反应。

[0004] 基于CRISPR/Cas9系统的治疗由于该系统的用于精确和可编程的基因编辑的能力而具有治疗许多遗传疾病的非凡潜力。使用CRISPR/Cas9系统的基因编辑和修复具有两种主要机制,包括非同源末端连接(NHEJ),其通过诱导随机indel突变修复切割位点,以及同源定向修复(HDR),其基于预先存在的模板修复切割位点。由于预先设计的模板可用于HDR定向的修复,因此可定制基于该机制的疗法以治愈大量不同的遗传疾病。然而,主要挑战是HDR修复需要将CRISPR/Cas9、小引导RNA (sgRNA)和供体DNA链同时递送到特定位置。这一要求对于体内应用变得特别有限,因为确保多个大的分子共同递送到同一靶向位置目前是不可行的。例如,Cas9酶序列和A复合物太大而不适合AAV。

[0005] 因此,需要有效的非病毒递送系统,包括基因递送系统。目前最先进的非病毒基因递送系统(例如脂质体)有许多缺点,例如差的生物相容性和不能容易地对其进行工程化或功能化。另外令人担忧的是,此类非病毒基因递送系统在它们通过细胞内或细胞间的区室时容易被各种酶降解,并且这些系统不能包装多个大的有效载荷。

[0006] 本发明人设计了条形码化聚合物纳米颗粒(例如衍生自受控的活性/自由基聚合的聚合物,例如RAFT聚合物)递送组合物。这些组合物具有生物相容、无毒的优点,并且可以以许多方式编程。例如,可将条形码化聚合物纳米颗粒递送组合物编程为具有使得它们能

够逃避早期降解、使得它们能够逃避免疫反应、以及使得治疗性基因和其他治疗性分子能够细胞内成像和受控递送的官能团。因此,这些非病毒递送组合物可通过提供免疫逃避、组织定向的细胞内递送和递送大的基因有效载荷或多个有效载荷的能力来增强基因药物有效载荷和其他有效载荷的稳定性、安全性和/或效力。

[0007] 本公开将这些非病毒递送组合物与快速设计、构建、测试和学习 (DBTL) 技术组合,所述技术将极大地加速基因递送并解决在受限的基因递送载体中存在的缺点。除了加速现今的编辑疗法向临床过渡之外,预期这些技术将使得能够一般地递送更大的更分子多样的基因有效载荷和其他有效载荷,这将进而继续改善遗传疾病和其他疾病的治疗。

发明内容

[0008] 在一些方面中,本公开提供了包含非病毒递送载体和核酸构建体的组合物,所述非病毒递送载体包含一种或多种纳米颗粒形成聚合物。

[0009] 在一些方面中,本公开提供了体内筛选所需的用作递送载体的聚合物纳米颗粒的方法,该方法包括 (a) 制备包含两种或更多种类型的聚合物纳米颗粒的文库,其中每种聚合物纳米颗粒与包含不同多核苷酸条形码的核酸构建体缔合, (b) 向动物施用文库, (c) 从动物中移除细胞或组织, (d) 从动物的细胞或组织中分离核酸构建体, (e) 检测动物的细胞或组织中的核酸构建体,和 (f) 鉴定所需的用作递送载体的聚合物纳米颗粒。

[0010] 在一些方面中,本公开提供了治疗患有疾病的患者的方法,该方法包括向患者施用本文中所述的体内筛选方法中鉴定的聚合物纳米颗粒,其中聚合物纳米颗粒进一步包含药物有效载荷,例如多核苷酸或蛋白有效载荷或小分子治疗性有效载荷,以及治疗患者中的疾病。

[0011] 以下条款及其组合提供了本文中所述的本发明的各种另外的说明性方面。在本专利申请的任何其他部分中描述的各种实施方案,包括标题为“具体实施方式”和“实施例”的部分,其适用于在以下编号的条款中描述的本发明的任何以下实施方案。

[0012] 1. 一种组合物,其包含:

- a. 包含一种或多种纳米颗粒形成聚合物的非病毒递送载体,和
- b. 核酸构建体。

[0013] 2. 条款1的组合物,其中非病毒递送载体包含聚合物纳米颗粒。

[0014] 3. 条款1或2的组合物,其中核酸构建体经由静电相互作用与非病毒递送载体缔合。

[0015] 4. 条款1至3中任一项的组合物,其中核酸构建体通过一种或多种纳米颗粒形成聚合物的带正电荷的聚合物片段和核酸构建体的带负电荷的多核苷酸片段的静电相互作用与非病毒递送载体缔合。

[0016] 5. 条款1至3中任一项的组合物,其中核酸构建体通过核酸构建体的5'端和/或3'端上的生物素分子和与一种或多种纳米颗粒形成聚合物上的生物素结合的分子之间的高亲和力、非共价键相互作用与非病毒递送载体缔合。

[0017] 6. 条款1至3中任一项的组合物,其中核酸构建体通过羧基封端的聚合物片段和核酸构建体之间的共价键与非病毒递送载体缔合,其中核酸构建体在5'端和/或3'端上包含伯胺。

- [0018] 7. 前述条款中任一项的组合物,其中核酸构建体包含:
- a. 两个引物结合片段;和
 - b. 在两个引物结合片段之间的一个或多个独特的多核苷酸条形码。
- [0019] 8. 条款7的组合物,其中引物结合片段的长度范围为约15个碱基对至约30个碱基对。
- [0020] 9. 条款7或8的组合物,其中引物结合片段是通用引物结合集。
- [0021] 10. 条款7至9中任一项的组合物,其中一个或多个多核苷酸条形码包含6-20个核苷酸的长度的独特序列。
- [0022] 11. 条款10的组合物,其中多核苷酸条形码进一步包含在任意两个独特的多核苷酸条形码序列之间至少2-6个碱基的汉明距离。
- [0023] 12. 前述条款中任一项的组合物,其中核酸构建体进一步包含在多核苷酸条形码的3'端处的约6个至约12个随机碱基。
- [0024] 13. 条款12的组合物,其中多核苷酸条形码的3'端处的约6个至约12个随机碱基用于PCR重复的生物信息学去除。
- [0025] 14. 前述条款中任一项所述的组合物,其中核酸构建体的长度范围为约42个核苷酸至约210个核苷酸。
- [0026] 15. 前述条款中任一项的组合物,其中一种或多种纳米颗粒形成聚合物包含与受控的活性/自由基聚合相容的单体单元。
- [0027] 16. 前述条款中任一项的组合物,其中一种或多种纳米颗粒形成聚合物通过可逆失活自由基聚合、原子转移自由基聚合(ATRP)、可逆加成断裂链转移聚合(RAFT)、碘转移聚合(ITP)、硒中心的自由基介导的聚合、碲化物介导的聚合(TEP)、铋化氢介导的聚合、或开环聚合而制备。
- [0028] 17. 前述条款中任一项的组合物,其中一种或多种纳米颗粒形成聚合物由含有乙烯基基团的单体制备。
- [0029] 18. 前述条款中任一项的组合物,其中一种或多种纳米颗粒形成聚合物使用链转移剂,例如在可逆加成-断裂链转移(RAFT)中使用的那些制备。
- [0030] 19. 前述条款中任一项的组合物,其中一种或多种纳米颗粒形成聚合物是RAFT嵌段共聚物,其包含
- a. 第一末端,其包含衍生自RAFT共聚过程中的第一链转移剂的第一封端单元;
 - b. 第一嵌段,其由共价连接至第一反应性官能单元的一个或多个单体单元制备,并且其具有在约1kDa至约500kDa的范围中的分子量(M_n)和在约10至约2500的范围中的聚合度;
 - c. 任选的第二嵌段,其由共价连接至第一嵌段的一个或多个单体单元制备,并且其具有在约1kDa至约500kDa的范围中的分子量(M_n)和在约20至约2000的范围中的聚合度;和
 - d. 第二末端,其包含衍生自第一或第二链转移剂的第二封端单元。
- [0031] 20. 条款19的组合物,其中非病毒递送载体具有以下的一个或多个:在约25kDa至约60kDa的范围中的总分子量(M_n)、在约700至约900的范围中的总聚合度、在约10至约60nm的范围中的目标尺寸和约1.5至约3.5的最大冠核比(corona-to-core ratio,CCR)。
- [0032] 21. 条款19或20的组合物,其中第一嵌段由选自以下的一种或多种单体单元制备:丙烯酸2-二甲基氨基乙酯、甲基丙烯酸2-(二乙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸2-(二异丙基氨

基)乙酯、甲基丙烯酸丁酯、乙基丙烯酸、丙基丙烯酸、甲基丙烯酸(羟基乙基)酯和甲基丙烯酸甲酯。

[0033] 22. 条款19或20的组合物,其中第一嵌段由以下之一制备:丙烯酸2-二甲基氨基乙酯、甲基丙烯酸2-(二乙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸2-(二异丙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸丁酯、乙基丙烯酸、丙基丙烯酸、甲基丙烯酸(羟基乙基)酯或甲基丙烯酸甲酯。

[0034] 23. 条款19至22中任一项的组合物,其中第二嵌段由选自以下的一种或多种单体单元制备:丙烯酸2-二甲基氨基乙酯、甲基丙烯酸2-(二乙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸2-(二异丙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸丁酯、乙基丙烯酸、丙基丙烯酸、甲基丙烯酸(羟基乙基)酯和甲基丙烯酸甲酯。

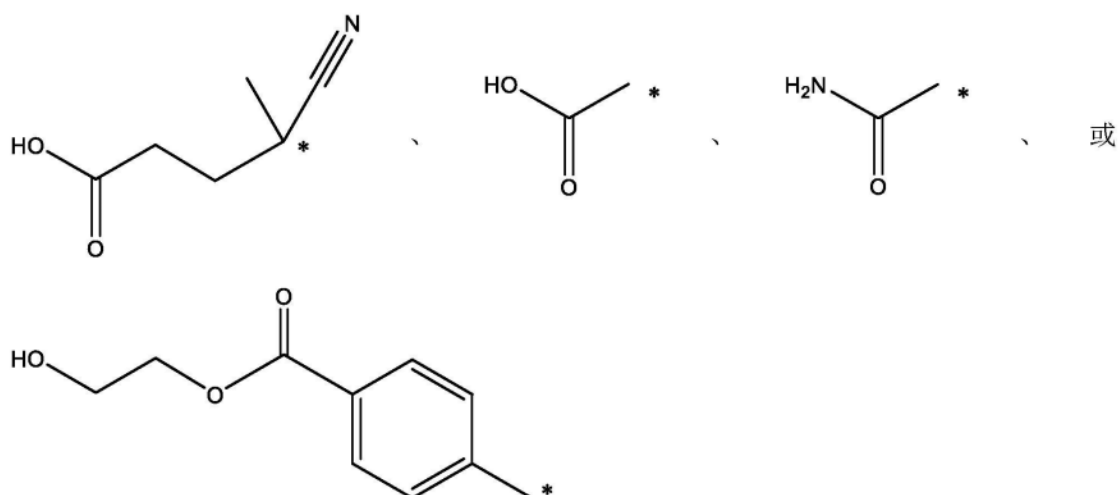
[0035] 24. 条款19至23中任一项的组合物,其中第二嵌段是由独立地选自以下的两种不同单体单元制备的无规共聚物:丙烯酸2-二甲基氨基乙酯、甲基丙烯酸2-(二乙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸2-(二异丙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸丁酯、乙基丙烯酸、丙基丙烯酸、甲基丙烯酸(羟基乙基)酯和甲基丙烯酸甲酯。

[0036] 25. 条款19至23中任一项的组合物,其中第二嵌段是由独立地选自以下的三种不同单体单元制备的无规共聚物:丙烯酸2-二甲基氨基乙酯、甲基丙烯酸2-(二乙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸2-(二异丙基氨基)乙酯、甲基丙烯酸丁酯、乙基丙烯酸、丙基丙烯酸、甲基丙烯酸(羟基乙基)酯和甲基丙烯酸甲酯。

[0037] 26. 条款19至25中任一项的组合物,其中第二嵌段是由丙烯酸2-二甲基氨基乙酯、甲基丙烯酸丁酯和丙基丙烯酸;或丙烯酸2-二甲基氨基乙酯和甲基丙烯酸丁酯;或丙烯酸2-二甲基氨基乙酯、甲基丙烯酸丁酯和乙基丙烯酸制备的无规共聚物。

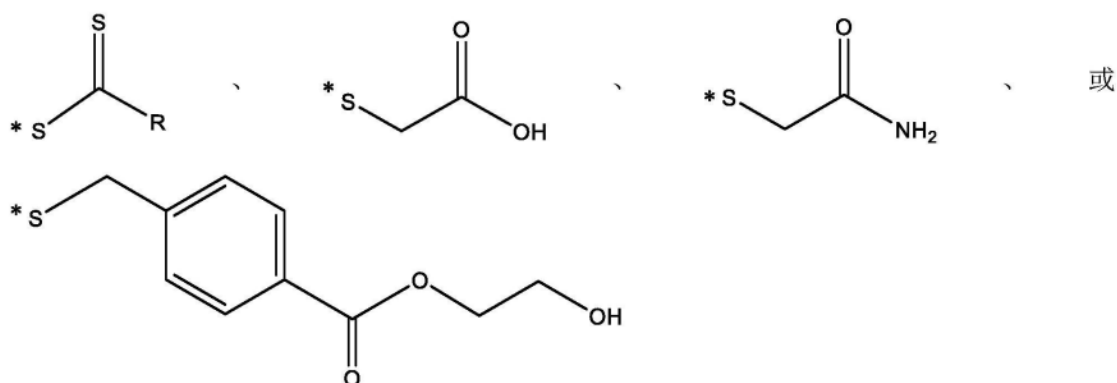
[0038] 27. 条款19至26中任一项的组合物,其中每种链转移剂独立地选自三硫代碳酸双(羧基甲基)酯、三硫代碳酸双(2-氨基-2-氧代乙基)酯、三硫代碳酸双[4-(2-羟基乙氧基羰基)苄基]酯、4-氰基-4-(乙基硫基硫代羰基)硫基戊酸、4-氰基-4-((苯基硫代甲酰)硫基)戊酸和4-氰基-4-[(十二烷基硫基硫代羰基)硫基]戊酸。

[0039] 28. 条款19至27中任一项的组合物,其中第一封端单元具有下式



其中,*代表与第一嵌段的共价连接的点。

[0040] 29. 条款19至28中任一项的组合物,其中第二封端单元具有下式



其中,*代表与第二嵌段的共价连接的点,并且R是 $-SC_2-C_{12}$ 烷基或 C_6H_5 。

[0041] 30.一种体内筛选所需的用作递送载体的聚合物纳米颗粒的方法,该方法包括(a)制备包含两种或更多种类型的聚合物纳米颗粒的文库,其中每种聚合物纳米颗粒与包含不同多核苷酸条形码的核酸构建体缔合,(b)向动物施用文库,(c)从动物中移除细胞或组织,(d)从动物的细胞或组织中分离核酸构建体,(e)检测动物的细胞或组织中的核酸构建体,和(f)鉴定所需的用作递送载体的聚合物纳米颗粒。

[0042] 31.条款30的方法,其中与核酸构建体缔合的聚合物纳米颗粒是根据条款1至29中任一项的。

[0043] 32.条款30或31的方法,其中通过选自聚合酶链式反应(PCR)、等温扩增、测序、或其组合的方法检测核酸构建体,以获得核苷酸序列数据。

[0044] 33.条款30至32中任一项的方法,其中聚合物纳米颗粒负载有有效载荷。

[0045] 34.条款33的方法,其中有效载荷为发光分子。

[0046] 35.条款34的方法,其中发光用于经由成像来追踪生物分布或细胞摄取。

[0047] 36.条款30至35中任一项的方法,其中对动物的施用经由肌内、静脉内、腹膜内、口服或肺途径。

[0048] 37.条款30至36任一项的方法,其中核酸构建体通过以下从细胞和组织中分离:与第一有机化合物混合并将有机相与细胞或组织样品的水相温育,将有机相与水相分离,将有机相与第二有机化合物混合,温育混合物,从混合物中沉淀核酸构建体,通过蒸发去除有机相,和将核酸构建体重悬浮在水性组合物中。

[0049] 38.条款37的方法,其中有机相包含苯酚氯仿。

[0050] 39.条款37的方法,其中通过将核酸构建体的水性组合物滴定至大于7.4的pH,将核酸构建体与细胞或组织中的阳离子材料分离。

[0051] 40.条款30的方法,其中通过使核酸构建体与分子结合,将核酸构建体与细胞或组织中的材料分离,所述分子具有比对细胞或组织材料的结合亲和力更大的对核酸构建体的结合亲和力。

[0052] 41.条款30的方法,其中核酸构建体经由尺寸排阻色谱法来与细胞或组织中的材料分离。

[0053] 42.条款30的方法,其中核酸构建体经由透析或渗滤来与细胞或组织中的材料分离。

[0054] 43.条款30的方法,其中核酸构建体经由过滤来与细胞或组织中的材料分离。

[0055] 44.条款30的方法,其中核酸构建体通过使用酶消化蛋白来与细胞或组织中的材

料分离。

[0056] 45. 条款44的方法,其中酶是蛋白酶K。

[0057] 46. 条款30的方法,其中通过首先将分离的核酸构建体稀释至少1000倍,并然后使用引物通过PCR扩增核酸构建体来检测与聚合物纳米颗粒缔合的核酸构建体。

[0058] 47. 条款46的方法,其中来自PCR步骤的引物在检测扩增子之前被酶促消化。

[0059] 48. 条款32的方法,其中核苷酸序列数据被转换成fast Q文件;并且将fast Q文件映射到已知的多核苷酸条形码,并对多核苷酸条形码进行枚举。

[0060] 49. 一种治疗患有疾病的患者的方法,该方法包括向患者施用在条款30至48中任一项的体内筛选方法中所鉴定的聚合物纳米颗粒,其中聚合物纳米颗粒进一步包含有效载荷,以及治疗患者中的疾病。

附图说明

[0061] 图1是显示简化的流程图的示意图,该流程图示出了基于自动合成、高通量测试和机器学习设计的非病毒基因递送开发的DBTL循环。

[0062] 图2是显示大的、多样的PNP文库的自动化多重合成的示意图,所述PNP具有各种尺寸、电荷和疏水性,以生成用于基因编辑、细胞毒性和炎症的数据。

[0063] 图3(a)-3(b)是显示图形神经网络结构(3(a))和来自SMILES输入的 ζ 电位预测(3(b))的示意图。

[0064] 图4是本公开的核酸构建体的一个代表性实例的图示,其显示本公开的以下的长度(以碱基对(bp)计):引物结合片段(在所示的构建体中为20bp和21bp)、多核苷酸条形码(在所示的构建体中为8bp)和随机序列片段(在所示的构建体中为7bp)。

[0065] 图5(a)-5(c)是使用静电负载反应(图5(a))、亲和素-链霉亲和素缀合(图5(b))和直接酰胺化(图5(c))的核酸构建体标记反应方法的示意图。

[0066] 图6是显示静电结合到聚合物纳米颗粒的核酸构建体的扩增的e-gel。在具有核酸构建体的样品中存在双带证实条形码与PNP连接。在非测试对照(NTC)中不存在双带验证了阳性结果。

[0067] 图7是显示从96个独特条形码的合并样品扩增DNA条形码的一系列e-gel,每个所述独特条形码与原型PNP连接。图中的每个框是48通道凝胶电泳的一排。每个凝胶的第一列是DNA ladder,其底部带为约100个碱基。每列中接近100bp标记的亮带指示来自条形码的扩增子。

[0068] 图8是显示从96个独特条形码的合并样品扩增DNA条形码的e-gel,所述独特条形码与原型PNP连接,在掺入到HEK-293细胞的培养物中后提取。图中的每个框是48通道凝胶电泳的一排。每个凝胶的第一列是DNA ladder,其底部带为约100个碱基。每列中接近100bp标记的亮带指示来自条形码的扩增子。

[0069] 图9是显示掺入到HEK-293细胞后从具有独特条形码的10个独特PNP扩增DNA条形码的e-gel。双带的存在是条形码扩增的证据,其存在于已知具有条形码的阳性对照样品中,并且在仅为磷酸盐缓冲盐水的非测试对照(NTC)样品中未观察到。

[0070] 图10是显示负载有表达荧光Tdtomato蛋白的质粒的来自图7的10个独特条形码化PNP的每一种的一系列图像。将负载的PNP各自给药到HEK-293细胞中。48小时后,经由带

Texas Red滤光片的荧光显微镜对细胞进行成像,且图像如上所示。

[0071] 图11(a)-图11(e)显示了描绘用携带td-tomato编码荧光负荷质粒的代表性PNP处理的HEK293T细胞的细胞事件分布的流式细胞术散点图(图11(a)-11(c)),和描绘88个不同PNP的文库的转染效率和活力的热图(PNP文库转染效率(图11(d)) and PNP文库活力(图11(e)))。在图11(a)中,图中由条形表示的曲线下面积占细胞的84.17%。

[0072] 图12(a)-12(d)显示了PCR扩增的从所指示的小鼠组织中提取的条形码的凝胶图像(图12(a)和12(b));证明检测来自单个小鼠器官的所有96个单独的条形码的能力的测序数据,其中(a)表示低剂量和(b)表示高剂量(图12(c));以及描绘单个器官中的每个条形码的相对丰度的图(图12(d))。

[0073] 图13是显示对应于条形码(BC)扩增子的带的电泳凝胶,所述条形码扩增子由对条形码以各种PNP与BC的摩尔比(即聚合物的摩尔数除以条形码的摩尔数)连接的PNP样品进行的PCR产生。所有条形码化PNP样品的带的存在证实,可以在用条形码以20:1至10,000:1(PNP摩尔数:BC摩尔数)的任何比例标记的PNP上经由PCR检测条形码。

具体实施方式

[0074] 本发明涉及用于体内筛选以及用于体内治疗性递送的条形码化聚合物纳米颗粒及用于其的方法。更特别地,本发明涉及聚合物纳米颗粒,例如受控的活性/自由基聚合产物,例如可逆加成-断裂链转移(RAFT)聚合物组合物,其与多核苷酸条形码缔合,用于治疗性递送以及用于药物递送纳米颗粒的高通量体内筛选。在一个实施方案中,有效载荷可以是3kB或更大的核酸,或任何其他合适的有效载荷,例如另一多核苷酸或蛋白或小分子治疗性分子或发光分子。

[0075] 本发明涉及条形码化聚合物纳米颗粒组合物(例如衍生自受控的活性/自由基聚合过程的聚合物纳米颗粒,例如RAFT共聚物)作为平台的用途,所述平台具有结构和功能上的高度可调性、保护有效载荷免受免疫系统的不利反应或降解的机会、和经由表面电荷或粒度的被动细胞靶向。这些递送系统还使其自身适于计算机辅助设计,并且它们具有适合的途径以进行稳健的、商业规模的制造过程,该制造过程具有比病毒递送组合物制造过程更高的产率和更少的纯化步骤。

[0076] 在一个实施方案中,提供了包含与核酸构建体缔合的聚合物纳米颗粒(例如衍生自受控的活性/自由基聚合过程的聚合物纳米颗粒,例如RAFT聚合物)的组合物。在另一个实施方案中,提供了体内筛选以鉴定所需的用作递送载体的与核酸构建体缔合的聚合物纳米颗粒(例如衍生自受控的活性/自由基聚合过程的聚合物纳米颗粒,例如RAFT聚合物)的方法。在另一个实施方案中,提供了治疗患有疾病的患者的方法,该方法包括向患者施用在筛选方法中鉴定的聚合物纳米颗粒。

[0077] 在一个实施方案中,体内筛选所需的用作递送载体的聚合物纳米颗粒的方法,该方法包括(a)制备包含两种或更多种类型的聚合物纳米颗粒的文库,其中每种聚合物纳米颗粒与包含不同多核苷酸条形码的核酸构建体缔合,(b)向动物施用文库,(c)从动物中移除细胞或组织,(d)从动物的细胞或组织中分离核酸构建体,(e)检测动物的细胞或组织中的核酸构建体,和(f)鉴定所需的用作递送载体的聚合物纳米颗粒。在各种实施方案中,可以通过例如对动物的细胞或组织中的核酸进行聚合酶链式反应(PCR)、等温扩增或测序来

检测核酸构建体。

[0078] 在另一个实施方案中,提供了治疗患有疾病的患者的方法,该方法包括向患者施用在体内筛选方法中鉴定的聚合物纳米颗粒,其中聚合物纳米颗粒进一步包含药物有效载荷,例如多核苷酸或蛋白有效载荷、或小分子治疗性分子或发光分子有效载荷,以及治疗患者中的疾病。

[0079] 在各种实施方案中,可以使用用于体内筛选与核酸构建体缔合的聚合物纳米颗粒的方法,或用于治疗的方法的任何合适的施用与核酸构建体缔合的聚合物纳米颗粒文库的途径,包括肠胃外施用。此类肠胃外施用的合适途径包括静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内、硬膜外、脑室内、尿道内、胸骨内、颅内、瘤内、肌内和皮下递送。在一个实施方案中,用于肠胃外施用的手段包括针(包括微针)注射器、无针注射器和输注技术。在其他实施方案中,可以使用口服或肺施途径。

[0080] 在一个方面中,可以在向动物施用与聚合物纳米颗粒缔合的核酸构建体之前,合并并浓缩条形码化聚合物纳米颗粒的文库。用于文库制备和用于测序的方法描述于Green和Sambrook,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2012) (其通过引入并入本文)中。

[0081] 在各种实施方案中,可以就本文所述的与核酸构建体缔合的聚合物纳米颗粒的存在对细胞或组织样品进行分析。样品可以是来自动物的任何组织、细胞或液体样品,例如选自尿、鼻分泌物、鼻洗液、内耳液、支气管灌洗液、支气管洗液、肺泡灌洗液、脊髓液、骨髓抽吸物、痰、胸膜液、滑液、心包液、腹膜液、唾液、泪液、胃分泌物、粪便、生殖道分泌物、淋巴液、全血、血清、血浆、或来自动物的任何组织或细胞样品。示例性的组织或细胞样品包括脑组织或细胞、肌肉组织或细胞、皮肤组织或细胞、心脏组织或细胞、肾组织或细胞、胃组织或细胞、肝组织或细胞、泌尿道组织或细胞、胃肠道组织或细胞、头或颈组织或细胞、肺组织或细胞、生殖道组织或细胞、胰腺组织或细胞、或来自动物的任何其他组织或细胞类型。

[0082] 在从动物中移除细胞或组织以及从动物的细胞或组织中分离核酸构建体的一个说明性方面中,从动物的细胞或组织中移除核酸构建体。在各种实施方案中,从动物的组织或细胞中获得的核酸构建体(例如DNA或RNA)可通过使细胞破裂并从裂解物中分离核酸构建体而移除。使细胞破裂和分离核酸的技术是本领域中公知的,并且移除技术包括均质化,例如通过使用珠磨技术(bead-beating technique)。在其他实施方案中,核酸构建体可以通过使用去污剂或溶剂(例如苯酚-氯仿)使细胞破裂来分离。另一方面中,核酸构建体可以通过物理方法,包括但不限于离心、透析、渗滤、过滤、尺寸排阻、压力技术、用蛋白酶K消化蛋白或通过使用具有对核酸的亲合力的物质,例如结合核酸的珠粒从裂解物中分离。

[0083] 在一个说明性实施方案中,通过用有机相(例如苯酚氯仿)和水相(例如水)的混合物处理而从细胞或组织中移除核酸构建体。分离有机相(例如苯酚氯仿),并可通过升高pH,例如升高至pH7.4,沉淀核酸构建体。可以蒸发有机相(例如苯酚氯仿),并可将核酸构建体悬浮于水中并稀释至适当浓度用于PCR和/或测序。在一个实施方案中,在充分洗涤后,将分离的核酸构建体悬浮于水或缓冲液中。

[0084] 在其他实施方案中,商业试剂盒可用于核酸构建体的分离,例如Qiagen™、Nuclisens™、Wizard™ (Promega)、QiaAmp 96DNA提取试剂盒™和QiaCube HT™仪器,以及Promega™。制备用于PCR和/或测序的核酸的方法也描述于Green和Sambrook,“Molecular

Cloning:A Laboratory Manual”,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,(2012)(其通过引入并入本文)中。

[0085] 可以通过使用例如聚合酶链式反应(PCR)、等温扩增、测序和/或成像来检测多核苷酸条形码。已经开发了聚合酶链式反应(PCR)以在实验室中分析核酸。PCR在过去十年演变为新一代的装置和方法,被称为下一代测序(NGS)。NGS以较便宜的价格提供了较快的核酸的检测和扩增。NGS装置和方法允许快速测序,因为核酸在大规模平行、高通量平台中扩增。

[0086] 在一个说明性方面中,可以使用任何合适的测序方法对核酸构建体进行测序,以检测多核苷酸条形码,所述测序方法包括下一代测序(例如使用Illumina、ThermoFisher或PacBio或Oxford Nanopore Technologies测序平台)、边合成边测序、焦磷酸测序、纳米孔测序,或者可以使用其变型或组合。在一个实施方案中,测序可以是扩增子测序。在另一个实施方案中,测序可以是全基因组测序。在另一个实施方案中,测序可以是外显子组/靶向杂交测序。用于对核酸进行测序的方法也是本领域中公知的,并描述于Sambrook等人,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,Cold Spring Harbor Laboratory Press(其通过引入并入本文)中。

[0087] 在一个方面中,核酸构建体可以包含多核苷酸条形码,并且条形码包含不存在于任何已知的基因组中的独特序列,用于多核苷酸条形码的鉴定。在另一个实施方案中,具有不同多核苷酸条形码(例如88或96个不同的多核苷酸条形码)的不同核酸构建体的集合可用于允许在一个测序运行上对样品进行多重检测(multiplexing)。

[0088] 在各种实施方案中,多核苷酸条形码的长度可为约5个至约35个碱基对、约5个至约34个碱基对、约5个至约33个碱基对、约5个至约32个碱基对、约5个至约31个碱基对、约5个至约30个碱基对、约5个至约29个碱基对、约5个至约28个碱基对、约5个至约27个碱基对、约5个至约26个碱基对、约5个至约25个碱基对、约5个至约24个碱基对、约5个至约23个碱基对、约5个至约22个碱基对、约5个至约21个碱基对、约5个至约20个碱基对、约5个至约19个碱基对、约5个至约18个碱基对、约5个至约17个碱基对、约5个至约16个碱基对、约5个至约15个碱基对、约5个至约14个碱基对、约5个至约13个碱基对、约5个至约12个碱基对、约5个至约11个碱基对、约5个至约10个碱基对、约5个至约9个碱基对、约5个至约8个碱基对、约6个至约10个碱基对、约7个至约10个碱基对、约8个至约10个碱基对、或约6个至约20个碱基对。

[0089] 多核苷酸条形码的各种实施方案在下表1中示出(标记为“多核苷酸条形码”)。这些多核苷酸条形码可以单独地用于核酸构建体中,或以例如两个或更多个多核苷酸条形码、三个或更多个多核苷酸条形码、四个或更多个多核苷酸条形码等的组合用于核酸构建体中。在使用多于一个多核苷酸条形码的实施方案中,多核苷酸条形码之间的汉明距离可以是约2个至约6个核苷酸,或可以形成汉明距离的任何合适数量的核苷酸,或者在多核苷酸条形码之间不存在核苷酸。

表1

多核苷酸条形码	多核苷酸条形码	多核苷酸条形码
GCTACATAAT	AGCAGTCCCG	CAAAATAGCG
ATGTTACACA	TTTGGGCTGT	GAAGAAGAAG
TGGGGCCCAA	CTCACGATCT	CACCCGCACG
TAGTTTATCC	TGGCGCATAC	ACGATGCCCG
ACCCCGTCTT	GCAATTGAAA	CCTACTACAC
CCGGCCATCA	TCGGGAGACG	ATTGAAACAA
GAGCTTGCTC	CCCGGCGAAA	GACCGAAGAT
ACGTTCTATA	TGATGCGGAA	ACGGCCTGAA
TACAGCAAAA	AACTGAGGCG	AGGGGAGGTC
GTTAGGTGGT	CATATTATTT	CAATCAACTT
GGAGACCGAC	AAAAGTCATT	GGACAACCGA
TGGCCCCTTG	AAGCGGTGAG	TCCCTAAGGC
TGGCCGTAAG	AAGGTAATCA	GTTCTACACG
CGTTCGTCAA	CTGACACTTA	ACTAACCAGT
CGGACGTGGA	CTGTTTTCTA	GAAGCTGGAT
AGAGGGGGCA	CACATGGCAG	GGAACCATGG
G TTCAGGTCG	TTCAATCCGG	CTCTACCTGG
CTCGCAAGAG	TGTCCGGCAT	TAATGCCTGC
GCAACGACTT	TGGTACCGTG	TAAAGGCAAT
GCCATCCATC	AAGAGATATT	CGCCTGGGAA
TTCCGAGCAG	GATGTACTAC	TCTTGGGGAA
CTTCTGGACA	GAAATGGAAT	AGAGAGAGAG
AACATTAGAC	TTAAAATACT	GCGTTGGCGC
AAGCAATAGT	TGACCGGAAC	TTACGACAGA
AGGGTAAGAC	GTCGCCGCAA	GGAACTCTTA
CGTTGTCTTG	TAGGATACCG	GATTGTGGAG
TTTCCCCGCC	AGTCCAATTG	GGGCACTGAT
CGAATGGATC	GGGGGCTATA	AGACGCACCA
CATCACTTGC	ACCTTCAGTT	CCAATTATAA

CTCTCGCACT	ATGGCAAGTA	TAGAGACGCA
GTTCACGTGC	AGAATGTTTT	CCTCTTGTCG
AATAAGCCTG	AGTTCGTTTG	GAGGAAGCTC
GTAAACAATT	CACTACTGAC	AGTCCCGAGT
ATTCAGATCC	GATCAAGAGC	TGCTTGCAGT
CCTGCTGATT	ATTTATCGAG	CCCACTTCCC
CTTGGTCATA	CCTTTTCCCA	CGTTGCCGCG
TCTTCCTGTT	GCACAGAGGT	CCCCTGGTTC
ACTGCCATGG	TGATCTGAAT	ACGACCAATA
CATGTATAGT	GTTGGAGGGA	CTTAGGGTTC
GGTAGCGGCA	TTTTGAAGGT	AAACATATCA
TCACTCTAAC	TAAGTCCTAA	GGGTCGTAGA
AAGGTGCACC	GGTGTTAGGG	CTCCGTAGCG
AATGCTCGTT	TGTATGCACC	CTGGTCATAA
TGCTAGAAA	CCGTGCCATT	TTGACAGATC
CTGCCTGCCT	GAAATCACCC	GAGTAAAGTC
ACTATAAAG	TTTGCACGTG	ATATGGGCTT
TAGTATCGAG	CGTCTGTTTT	TACAACTACT
ATCGCAGTCC	CTACACCACA	AATTCAGCCG
TCATCAGAAC	TGCTACAGGG	GATTGTACTA
TCCTAGACGC	GGGAATATAT	TCGTAATGCG
GCCGGGCGGG	TCATGTATTT	CGATAACTGC
GCCCAGAAGA	TCTCCGTTTA	AACTTGCGGG
CTTAGAGCTG	TACCTCTCGC	CGTGGATGTA
GTCTGCGCTT	GCTTCAACCG	CCTTCCCGAA
CGCCGTCCCT	ATGAAGCTAC	CTAAACCCGT
TTTATCTGCT	CGGTACAAC	CAACATTCCC
TGCTTCGGAG	GTGTGGTCGT	CTTACCCTCT
GGGGAGAATG	GGGGTCATGT	GGAAAGTTCT
GTGGTAAGTG	AGGCAGCCCA	CGGATTGGCT
GAAATTAGTA	CAAGCACGAT	AATGTAGGGC
GCTATCCTAA	TCAAATGGAT	AATGAATCGC
ATCTGTACGA	GGACTGAATA	ATCATACACC
AGTTCGGGGC	CCGTAGACGT	AGTTGGGCAG
CGAGTCTGTC	CGGCGTACCG	AGAAGAAGGG
ATCCTACGCA	GGCGGCGCCC	GCGTGCGCTA
ATGGTGGATA	AGACTTGATC	CCCCGATAAA
CCTCTAACTA	ACCTTGACACA	TACCAAGTGC
ATAGCTGCAC	TAAGGTGAGT	TGTGTTTTCG
GACAGAATTT	TTGTTGTTTC	CCCAGATGTC
CAATTGGCAT	GAGGGAATAC	GCGAGCTTCC
TCTAGTAGAC	CTCGTACGCG	GTGTCACGTA
TTATTCATGG	CCGCGGTTTA	ATAGGCCGAG
TTGGCAACCG	TTAAAGTTAA	GAGCTACCAG
CATAATACAT	GCATATGGGT	CGCGGCGGAG

ACAGACTCAC	AGTCTGAGCC	TCTTGACGGA
GCGATGCTGC	TGTCGGTTCG	TGCCCTAAAG
CATCTTTGCC	GGTCTCAACC	TTGCGCTTTG
GTGACTCCAG	GTAACGGCAT	CATATAAAGG
GGACGAGTCT	ACACTGAGAA	AATAGCGAAT
TAGTGGCGTG	CCCAACGTCG	TACGCTAAGG
AACGCAGCTT	AAGAAACTGC	ACTTAGTTCG
AGAACAGGTG	ACCAGCCCAC	CGTGCGGAAC
AGGCTATGTT	TGTAGTTACT	ACCCGATTCTG
CCTGGATCTT	GGCTAGAGGC	TGCAGAGTTT
CTAGCCGGCC	GTTGCGGCAGA	GAATCATTAG
ACCAGTTATC	CCAAAATAGA	AGTACACTGG
ACGTTATAGC	CCCATATAAC	TTGTGCGGTT
TCGAGTTTGA	GTCAC TACCG	ATGACATGCA
TGAAGCGAGC	GTAGTGTGGC	TTCTCGGACG
GACTGGCGAA	CAATCTCATA	AGATTGAAGA
GATGGACCTA	CCATGTTATA	GGCGGACTGT
GTCCACAACG	TAAGCAGTGG	TTTATGGTAA
CCTCCCCAGA	TCGGCGGCTA	CAGTAGGGTG
TTATGACGCC	TATTAAATGC	GACAGGCAAG
CTTGATCCGT	GTCGCCATTA	GATGTGTCGT
AATGCGCAAT	GGCGTCGTTT	ACTTGACGGA
GTACCCCTCA	CTAGTAGATA	AAGTCCGAAA
CGACAGCTCG	TCGTCAGTAT	TGGGTGTAGG
TGACCTGGCT	GGGGTATCGG	ACTTACCGCG
TTCATAGCCC	TGCTCTGCCA	CTGTGCACCC
CCCAAGAGAA	TGCCGTAACCT	ATTGCTCTCT
AAACGAAGTA	CGGTACAGGC	CAGAAGACAA
GACGTTTACA	TCCTAATTTG	TTACGCTATA
GATCGATTTG	TCTTTCTGGA	ACGTGGAAAT
CACTGTCACC	CCGCGACTTG	TGAGGCTGGT
TGTGAGAGTT	ACCTATAGCG	ATTATGAGAT
GACGTAACCT	GCCGGCACCT	GACTTGTAGT
CAGACTCTGC	TTTGATAGGC	TCGCTGAGGA
TATGCCAATA	ACTGTGAGCT	CCCAACTCTA
ACAGGTGATG	TTATCGTTCA	GATAGGGAGG
GTCATCGCGT	ACTAGTGGCC	TAGAAATCAG
TCTTATAAAC	CCTCCGTGGT	GTCGCTAGAA
GTGTAGACTG	TTAGGGTATG	AAAATAGAAA
AAACAACCGG	GAATCAGGCG	GCTCCTGGGT
ATCCTGTACC	GGCTGACCAA	CGCGCTCGCG
TTATAAGAAT	TGCCAGACCG	GGCAAACGCA
ATAAGTAGGC	TCCCTACGCG	TTTACTACCT
TCTCGTAAGG	TCCGCTGGAG	ATCCTAAACT
GATCCGCCGC	GGATCAAAAC	CTCCGTATGT

TGTCAGGTTT	TTCACCTCAC	TATCGTCCAG
TCCGAAGCCC	GACACACGGC	GCCGGCGGTA
TCCATGTCCA	TGGGCGATTA	TGCTCCATT
GTGATGGTAC	TAAGATCTTC	TGGCTGTTGT
CTCCACATAC	CTCCGACTAC	TACTGCGCAA
TTCGGATGAG	GGGCCATCAT	TATACGGCTT
ACGACATCGC	TCAGGCCAGA	GGTTATTACC
GAGATGCACA	CTTGTGGGGC	ATCAGGAGGA
TTTGTATGGC	AGATAGTCTG	CTATTGCCAG
CTTTTCTAGA	GCGTCAAAGT	ACGTACACAC
AGTCTAATCA	ACGAAAATTT	CAGCCTAGCT
GACTTAGCCA	GAGTCTGGTG	GAAAAACAAC
TATCACAGTA	ATCGAGCGAC	CGTTCAGTTA
AAGCTCGAGT	GGTCCTCAGA	CAATCAGAAT
TGTTACGACA	TGATTTTGTC	GGGCTACTCT
AAGGATAGTC	GCATTTCTCA	CCCCATTGGG
GCACTTAGCC	GCATGCCAGT	TAGGGAACGG
GAGGGATCCG	ATTAGACGAC	CAGCTGATAC
ATTCTAGAAG	AAAGCCCAT	ATTCCTGTGA
GATAACTGAT	CACTACATTC	TCAGAGCCGT
ATCTGACTGT	CACGGTTTCT	CATGAAAAGC
CAAAGCGAAC	CCCACCAGTG	TGACCTGTGA
GAAATTGCGA	CTCACTTGTC	GCATTAGCAG
GGGTCCAGTC	GATAGACTCT	GACAGAACCA
ATCAGGTAGC	ATTTCCATT	TCCAGTATAT
GAAAGGTCCT	ATATGTGGCC	TGTTCCGCTA
GGCTACCACA	CGGGACGAAC	GATATCCATT
TTATTGCTGA	AGAACCGTGA	CATATGGACC
CGCCGCGTTT	TAGTGTACTG	GATATAGTAA
TTTTCAAAAG	AACTAATCGA	CACCTTTTTT
CTGGGCTAAA	CGAAGTGACG	AGCTTGCGGG
CCCGATGAGA	CGGAGCCTCG	CGCACAGGGA
TGGGAAATAT	ATCACACGAG	TCTGGGTGCT
GTACGAGCGG	CGACGAGTTC	TGAGTCGTTT
GCGTGACGCT	GCTTCCCGTG	TTACAATGTG
AGTCTGCGGA	GATTCATACC	CTTGCAAACA
TAACATTTTA	GAGAGAAGCG	TGTCGAGCTG
GAGTTGCCGG	GAAGTGCCCT	ACTTTAACCT
CAGCCCGGCG	GGACGACGCC	ATATAAGTGC
TCACCTACAT	TAGGGTCTCA	GGAAGGGCGT
AGTGGCTAAC	AACTACAGGT	TTTGAATTGA
AGAATGTGAG	GTGGCCTGTG	GTATAAACGG
TAGTTTCGCA	CTTTACCAGC	TAACCGGATG
CTTCATTTCT	CGCGTTACTG	TTCTCATCAG
GCCATGATAT	TTGCTCCCGT	CTCGGTTACG

ACGGCAAATC	CATCAAACAA	ATATGGTTCT
ATCGATAGTA	GCTTTATGAT	CGCCCCCGAA
CCTAAAGGCA	CTGCATACTG	ACCTCGATCG
TACGAGCGGT	GGTGGCTCAG	CTCGAATAAT
TTTGTCGTCG	GGACGATCAA	GCCCCGAGCTT
TACAAGCTTG	CCGACTGGTG	AACAGTCAAC
GACCAACACG	GGAACAACCG	CTGGAACCTC
GAACGACGAA	GAACGAGACC	AATAACGGGG
TCGGAACGCA	CACCAAGAAA	ACGCCCCACT
ATCCGGTGGT	ATGCATTACC	GGCAACATGA
TAAAACGTAG	GTATCATGCC	GCTATTTTCG
TATGTGAGCC	AGTAGATGTT	TTCCACTTTA
GAGGCATCGA	CTCTAGATGT	GCCGATGGAT
GAATGGGTGG	GCTACTTGTG	AAGTTGGTAA
AACGACACAA	TATGAAACGT	CACTAGCTAG
GTACGATGCA	CCTCGTTGAT	ACATGCCCCCT
AGAAGGCGCC	CTAGAGCCAT	TTCATTACTC
CCGCAATGGA	TAGAGTTATA	GGTTTAAATAT
TACGGATTTT	AACGAGAGGC	CCTGCAGTGA
GTCGTTAGCT	GGTCTACCGT	TCTTTAAGTT
GGACTAGGGC	GCCCCCTCAC	TGGCGATCGA
ATTGGTATTC	CATAGGAATT	CTTTTTAGCT
ATCCCAGAGA	TCCGGCTCGT	CCCAGTCTCT
GTCCCAGCTC	TGAGAGTCGG	AAATGTTTCG
CACGAGGAAT	CGTAGAAATA	ATATAAGACG
TACAATTGCA	CTTTACATGA	TCACTTTACA
ATTCCTGAAT	GAGCGCCGTC	CCTGGCGCCC
TAGCGAGGCG	GGCTCTCGGC	GGATTACTGG
CTGGATGGGC	AGAGCTTGTT	GAATGATCTT
GCGACGGCCA	AATCAGCCAC	GCTCGGATCG
ACCTGCACAA	AGAAGAGCCA	CAGCTGCGAG
CATGACAGAC	TCGTATGAGT	ACCCTTACTA
TTACCAACGT	TTCTTCCTCG	AGGTGAAACT
CAGGTGTGTG	ACACAAAAGC	CGAATTTGAT
CGAGGGACGG	CGCGGGACCC	CGCTGTGCGG
CGTCTCGGTA	GTCGCGACAC	TTACCGCACC
TAAGCTATCT	CCGGAGGAAA	GGAATCTTAA
TACTCCCCTA	CGGCGTATGA	CTCAACACCC
TTATATTCAT	TAGGCATTCT	CGTGCCCTTG
AGCGATCTGC	AAAGGAGGGA	GCAGGCTCGA
TCTTCTGATC	ACCTTTACGG	ACCAACGAAG
ATAGTTCCCA	CTACCGTTAA	CCTGTAATTT
TTTACGGGTG	GAGCTTCGCC	GGGTGGGATG
GTGTCCCCTG	GCCATAGAAG	TTGCTCACCG
GCGGGGGTCG	TTTAGCGTAT	TTACGACCAC

CATTGATCTA	GCAAACAGAT	TTTTCTAACC
AGGGACGGTG	TAGGTCATGG	GCTTTAGATA
CAGTTACTTT	CTCTAACAGA	CACGTATTGG
CCATACTTCC	GGCTCATGAA	AAATATCTCC
ATCAGAATTA	CAATGTCTCA	GCTGGAAAAC
AAACTAGGCA	TGATCGTATT	GAGCGCATT
AATGTCGTTG	GCGCTTTTCA	GTGGAGGGGT
CACATGGGTC	AAGATTATAT	TCCACTGGGA
GGTCGCTGGT	ACTAGCTGAC	CAATAGCGGA
ACTGTATTAC	GGTGAGCTCA	CATCTAGTTT
CCGAGACGCG	CGCTTTCGCT	GAAGTTCCGG
ACTCCAACCC	TGATTCAAAA	AGCGAGATTC
ATATTACAAG	ACTGAACAGG	TTAAGGTCGG
CCATGGATAG	ATTCGAGCTA	AATGGTTAGG
CCGTCTCAAT	TGTAGGCTAA	CGTTATTATA
GATCGTCGGG	ACAAAGCTTT	ACGGAAAGGA
TCTTGTTTTG	GCCCGAGGGA	CCTTGTCCTG
AATATTGCTC	GCCCGCTGGG	ATACTTTTTT
AACGTCGTCT	ACCCCGCTGA	CTGGGTCTGG
AATATTTTTG	CTTATGCCCT	AACCATTGCG
CGTAACGTGC	CCGCCATAGC	AGACCGGGCC
GCGTGTTAT	CTTAATGATT	TGGGACACAC
CAAAACATTA	CAGTCCACAA	TGCGCAGTTG
CGTATCCTGA	ATGGACGGAC	CGTTCGCCTT
TCGCTTACAA	CGGCCTCTCG	TCTCACTCGT
TCCATTGTGT	TAGTCGCCAT	ACACCGACGT
GCCCCCATTC	GTTGATCTTC	TTCAGCCCCT
TGACGTCTAT	ACTTGCCAAG	AGGCGACTAA
TGGGCCGAGG	ATGACTGGTT	TGCTATCAAG
AAGTGTC AAG	TGTCGTAGGA	GTCCAGTAGC
GACAGTAGAG	AGCAAACACG	CGTGTGGGCG
CGCAGCCATC	TACTGATGAA	GTGGTTCTCC
GAGGCAGAAC	GTATCCCATA	GCAGCCGACG
GTTGAAATTG	TAGCCAGGTT	GCTGTCCACG
ATCTGATAAA	CGTGTGGCGA	CGACACTCAT
AGCTGTCTCT	ATCGAATTGC	CATGGCACCT
TTTLAGGTIA	CCCCAATATT	TGTGACGTGT
TATCTGTCCG	CCCGTTTCTC	TTTGGACTAA
AAAACATATG	TCCGCATCTA	TTCATGCCCG
GTAAAGAAGA	CAAGCCTCAT	TTGATCGTGG
TCGACGTGCA	TTTCAATCCC	TAGCATAGGA
TAGATCTTAA	CCTTCCCATC	GTAGTTGCAA
CACTGGTCAC	AGGTACAAGA	GGGACAGCTA
ATTCTGATGT	GTGTAATGGA	AAACCCCCAA
ATGGCCCTGA	AAACTGAGCT	ACTCTCACAA

GGTGATGAGA	ATCTCTGCCC	ATCATTGCCA
CACCGTGGGG	CGACATTTGC	CCAGTTTGCG
GCTTGCTCGG	TGTGAACCCG	ACATTAGTCA
CCAGTTGAAC	TGACACCCCA	CTCCAGGGTA
CGTCTGTACC	TAGGCCAAAG	GAAGGGCCAA
CCAACGCGGC	GAAATTGTAG	CAGTCTCCCC
ACGTGATCGA	GCGTCTGATT	GAGACATTCC
CCATCGAATC	TCTCATTGTT	AACGGTGTTG
CGGTGTCTGC	CTGACATCTC	AGCATTATCA
AAACCACCTC	GTATCCAGTG	CTATACCGAG
TCAATGTTCC	GATGGCCGTT	AACTGGATCA
TTCGACATGT	TCACCCTCTC	GTCTTGTCGG
AGGCACGATA	GGCACTATTC	GACGAGCCGC
CACGAGATCA	AAATAACTGT	GGAACACTGT
CATGCTGGGG	CAGCTCCATT	TAAATGCGTT
TACCATGGTT	CTCTTGACTC	GCGAACACAG
TTGCCCATAT	TTTCCTATAC	TTCTCTCAAC
TGCACATTCTG	CCATACCCGA	GTCGTAATGA
GTTATGTTGG	TCGCCGAGCG	TGTGGCGTAA
TGAGTTATGA	CGCTGAAGCC	TGAGCGGCGT
GATGGCCCCC	TCTGGCCCCA	CCTCGTGAAC
GATGGGTTAC	GCTACATTGA	GAGCAATGAA
AGCTACGTTG	CGCATCATAA	CGAGACCTAA
ACCCCATGCA	GCAAAGGGCC	AACTGAGCGC
TACTACCGTT	AACGGCGCAG	TAAAGCTCGT
TCGCTTCTAC	CGACTGACAT	CTCTTTACGT
CTGGCAGTGC	ATGACAGGGC	CCCCGTGGAA
TCTATATATA	CAAGTTCTCC	TCGGTTCGTC
GGATTAGTTC	TCGCCGCTTT	CTGCTTACAC
GTGTTACGCT	ATGCCGGAAG	ACACCGTAAT
TCGACTCCGT	GCGGTTACTA	CCTGGTCGGC
GGTAGCAGGC	GACATTACAA	GGTTATTTGG
TATTGGATTG	CAGAGAGGGC	GCAACTGAGT
GTTCGATCGA	GCACCGCCTC	ATAAGGCCTC
ATATTAAATAT	CGGTCCGAGC	CGTGCGAAGG
AGAACGATTG	TGTCCGGTGC	GTCACACACT
GTAAAGTGTA	GGTCGGTTGC	CATACGGCAA
CCCATGTGCC	GCTCAGCTAA	GAACTGCCCA
GTGGCCTCGC	AGCAGTTCGT	AATATGTGAA
GACACTAGGA	AAATCGATGA	CCGATCCTGT
ATATTCTGAC	GCTCGGTATG	CAAAGAGCCT
TAAGTAGACG	CCC GCCCGG	TAACTTAGAG
TAACGGTCTA	GTGTGATAGG	CAGCATGTAG
TAGTTTCATT	TTGGACTCCA	CCCCATGCAG
TTGGATCCGA	TGCTTATCTA	TCTGAACCAC

CGTGACAACC	CAAAAGGCGT	GCGTGCAAAA
CGCGCTCAGA	TAGGGGGCCT	GCTAGTACCG
CGTTCTTAAT	AAGTATTAAT	TTCCCCGCGC
ACAAGAGTTT	GTTTAGCCCG	CCTTAGTAGG
AGGGTTATAG	CGCTAATATG	TTGTGTCTTG
ACCACGACTC	ACAACACGTT	GCAACGAAGC
GTACTCGGGG	AGAGATGCTC	TGAAACCCTT
ACAAATATCT	TGCCTGATAT	TTCTACGATC
GATCGGGGTG	CTTGTAAGTA	ATTAAAGGTG
ATGTAACTCC	CATATTGCCG	TATCTAACGG
ATGAAGAAGC	CTTAGAAAGT	AGTGCTCCTG
ATGTATTGTC	ATGTTGTATT	CCGTCCCTCT
TGCATTGGAA	CGCATTGAAG	CTAACGAGCG
GCGGACGATC	TTATGTTGGT	AAGTCCGGCT
CCGTACTTGA	TCGCCTCAGA	GGCGTATAAG
TTTGCCCCCG	TTCGTTGAGG	AGATATTAGG
ACCTCACGCG	GGTGCCGGGC	TCCTAACAGC
ATTAAGGGGC	ACCATTGTAA	GAGGATACGC
CGTGGACATG	TTGATTGTCA	CGCTCTTTAA
TTAGCCCTTC	CGGCTCACCT	ACCGGCAGGC
CGAGAGTTTG	CTATCACATG	GCTAAAATCT
TGCATCCTCT	GTAGACAGAA	GCCGTTGACG
TGCGATTCCG	CCTTTACCAA	GGAGTTGTTG
TTATTACGTT	GCACATCGAC	TACTTGAGAA
TGATGTGGTT	TCTCACTTTC	CGGGTGCGCT
GGGCGTCAAT	TTCGAGTACT	AAAAGCGTCT
CCCTTGAAAT	TAGAAGAGCA	GTAAAGATAG
TCTTTGGGGC	AACCCACCA	GCCTGGTCAG
ACCGGCAGGC	CTGTATCAGT	GGCAAAAAGG
GCTAAAATCT	ACATAATGAG	ACCCTTCTCT
GCCGTTGACG	AGCCTTCCGC	TCACATAGTG
GGAGTTGTTG	CAGTGCTTTT	TCGTCTGTGC
TACTTGAGAA	TAGTCCGTGT	TGCTCGGATC
CGGGTGCGCT	CGGAATCGGT	GGCGTATAAG
AAAAGCGTCT	CTTGCGGAGA	AGATATTAGG
GTAAAGATAG	AAAAATTTGG	TCCTAACAGC
GCCTGGTCAG	TGTTTTCCGC	GAGGATACGC
GGCAAAAAGG	ATGCTAGGCG	CGCTCTTTAA
ACCCTTCTCT	GACTAATTTT	GGCGTATAAG
TCACATAGTG	CTGTAGTAAC	AGATATTAGG
TCGTCTGTGC	CGGATGACTT	TCCTAACAGC
TGCTCGGATC	TCAGAGTGGA	GAGGATACGC

[0090] 在另一个实施方案中,随机序列片段可连接至多核苷酸条形码的5'端和/或3'端,并且随机序列片段可以例如用于PCR重复的生物信息学去除。随机序列片段也可用于增加核酸构建体的长度,并且可用作生物信息学分析的标记物,以在测序后鉴定多核苷酸条形

码的开端或末端。在另一个实施方案中,核酸构建体包含至少第一和第二随机序列片段,并且第一随机序列片段可连接至多核苷酸条形码的5'端,且第二随机序列片段可连接至多核苷酸条形码的3'端。在另一个实施方案中,一个或至少一个随机序列片段连接至多核苷酸条形码的5'端和/或3'端。在一个方面中,随机序列片段可以根据需要延伸,以使核酸构建体更长以用于不同的应用,例如其中短插入物可能丢失的全基因组测序。

[0091] 在各种实施方案中,随机序列片段的长度可以是约5个至约20个碱基对、约5个至约19个碱基对、约5个至约18个碱基对、约5个至约17个碱基对、约5个至约16个碱基对、约5个至约15个碱基对、约5个至约14个碱基对、约5个至约13个碱基对、约5个至约12个碱基对、约5个至约11个碱基对、约5个至约10个碱基对、约5个至约9个碱基对、约5个至约8个碱基对、约6个至约10个碱基对、约7个至约10个碱基对、或约8个至约10个碱基对。

[0092] 在另一个说明性方面中,多核苷酸条形码可以以引物结合片段为侧翼(即直接或间接连接至多核苷酸条形码),使得包含多核苷酸条形码的核酸构建体可以在聚合酶链式反应(PCR)和/或测序方案期间扩增。在一个方面中,引物结合片段可以用于与一个或多个通用引物或通用引物集结合。在一个说明性实施方案中,通用引物可以含有悬突序列(overhang sequence),其使得能够连接用于测序的索引接头(index adapter)。在该方面中,引物可以是任何所感兴趣的引物。在该实施方案中,第一引物结合片段可在其3'端连接至第一随机序列片段的5'端,并且第二引物结合片段可在其5'端连接至第二随机序列片段的3'端,其中多核苷酸条形码在随机序列片段之间。在另一个实施方案中,第一引物结合片段可在其3'端连接至多核苷酸条形码的5'端,并且第二引物结合片段可在其5'端连接至随机序列片段的3'端(参见图1的实例),所述随机序列片段连接至多核苷酸条形码的3'端。在另一个实施方案中,第一引物结合片段可在其3'端连接至随机序列片段的5'端,并且第二引物结合片段可在其5'端连接至多核苷酸条形码的3'端,其中多核苷酸条形码在其5'端连接至随机序列片段的3'端。在又一个实施方案中,第一引物结合片段可在其3'端连接至多核苷酸条形码的5'端,并且第二引物结合片段可在其5'端连接至多核苷酸条形码的3'端。

[0093] 在核酸构建体中包含引物结合片段的实施方案中,引物结合片段的长度范围可以为约15个碱基对至约30个、约15个碱基对至约29个碱基对、约15个碱基对至约28个碱基对、约15个碱基对至约26个碱基对、约15个碱基对至约24个碱基对、约15个碱基对至约22个碱基对、约15个碱基对至约20个碱基对、16个碱基对至约28个碱基对、约16个碱基对至约26个碱基对、约16个碱基对至约24个碱基对、约16个碱基对至约22个碱基对、约16个碱基对至约20个碱基对、17个碱基对至约28个碱基对、约17个碱基对至约26个碱基对、约17个碱基对至约24个碱基对、约17个碱基对至约22个碱基对、约17个碱基对至约20个碱基对、18个碱基对至约28个碱基对、约18个碱基对至约26个碱基对、约18个碱基对至约24个碱基对、约18个碱基对至约22个碱基对、或约18个碱基对至约20个碱基对。

[0094] 核酸构建体的示例性序列在下文显示。/5AmMC6/是用于连接至聚合物纳米颗粒的5'胺修饰。*是用于稳定性的硫代磷酸酯键修饰。A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCT序列为5'引物结合片段序列。GCTACATAAT是示例性条形码多核苷酸序列。N代表随机序列片段。AGATCGGAAGAGCGTCG*T*G*T是3'引物结合片段序列。

[0095] /5AmMC6/A*G*A*CGTGTGCTCTTCCGATCTGCTACATAATNNNNNNNNNAGATCGGAA

GAGCGTCG*T*G*T

[0096] 在上述所有各种实施方案中,整个核酸构建体的长度范围可以为约30个碱基对至约240个碱基对、约30个碱基对至约230个碱基对、约30个碱基对至约220个碱基对、约30个碱基对至约210个碱基对、约30个碱基对至约200个碱基对、约30个碱基对至约190个碱基对、约30个碱基对至约180个碱基对、约30个碱基对至约170个碱基对、约30个碱基对至约160个碱基对、约30个碱基对至约150个碱基对、约30个碱基对至约140个碱基对、约30个碱基对至约130个碱基对、约30个碱基对至约120个碱基对、约30个碱基对至约110个碱基对、约30个碱基对至约100个碱基对、约30个碱基对至约90个碱基对、约30个碱基对至约80个碱基对、约30个碱基对至约70个碱基对、约30个碱基对至约60个碱基对、约30个碱基对至约50个碱基对、约30个碱基对至约40个碱基对、40个碱基对至约120个碱基对、约40个碱基对至约110个碱基对、约40个碱基对至约100个碱基对、约40个碱基对至约90个碱基对、约40个碱基对至约80个碱基对、约40个碱基对至约70个碱基对、约40个碱基对至约60个碱基对、约40个碱基对至约50个碱基对、50个碱基对至约120个碱基对、约50个碱基对至约110个碱基对、约50个碱基对至约100个碱基对、约50个碱基对至约90个碱基对、约50个碱基对至约80个碱基对、约50个碱基对至约70个碱基对、约50个碱基对至约60个碱基对、或约42个碱基对至约210个碱基对。

[0097] 核酸构建体与聚合物纳米颗粒缔合,并且示例性聚合物纳米颗粒与核酸构建体的比范围为约20:1至约10000:1、约20:1至约9000:1、约20:1至约8000:1、约20:1至约7000:1、约20:1至约6000:1、约20:1至约5000:1、约20:1至约4000:1、约20:1至约3000:1、约20:1至约2000:1、约20:1至约1000:1、约20:1至约900:1、约20:1至约800:1、约20:1至约700:1、约20:1至约600:1、约20:1至约500:1、约20:1至约400:1、约20:1至约300:1、约20:1至约200:1、或约20:1至约100:1。

[0098] 在一个说明性方面中,根据本公开,条形码化聚合物纳米颗粒可用作递送载体。在一些实施方案中,非病毒递送载体包含一种或多种纳米颗粒形成聚合物。在一些实施方案中,非病毒递送载体包含聚合物纳米颗粒。在一些实施方案中,非病毒递送载体不是基于脂质的系统。在一些实施方案中,非病毒递送载体包含由受控的活性/自由基聚合过程制备的聚合物纳米颗粒。应当理解,单体单元的身份不受特别限制,只要所使用的单体单元与受控的活性/自由基聚合相容即可,所述受控的活性/自由基聚合例如可逆失活自由基聚合、原子转移自由基聚合(ATRP)、可逆加成断裂链转移聚合(RAFT)、碘转移聚合(ITP)、硒中心自由基介导的聚合、碲化物介导的聚合(TEP)、铈化氢介导的聚合、开环聚合、或类似的聚合过程。在一些实施方案中,聚合物纳米颗粒可以通过RAFT共聚来制备,以合成嵌段共聚物的不同集合,并筛选它们与有效载荷形成复合物的能力。在一个方面中,可以通过将有效载荷化学键合至组成聚合物,例如通过使用链转移剂将有效载荷接枝到RAFT共聚物上,并随后将聚合物组装成递送载体来产生聚合物纳米颗粒(例如RAFT共聚物)。

[0099] 在各种实施方案中,有效载荷可以使用共价键、静电相互作用和配体亲和相互作用中的任何或全部与聚合物纳米颗粒组合物组合。在一个方面中,共价键合方法包括使用EDC/NHS在有效载荷和聚合物纳米颗粒之间形成稳定的酰胺键,以改善(“在货架上”和体内二者)稳定性、易于分离和提取、以及灵敏检测。在另一个说明性方面中,静电键合方法包括使用与有效载荷静电复合的阳离子聚合物纳米颗粒。在另一个实施方案中,配体亲和键合

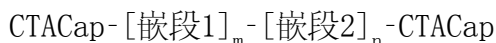
包括使用配体,例如亲和素和生物素,二者都经由EDC/NHS化学共价键合至聚合物纳米颗粒和有效载荷,以产生有效载荷和聚合物纳米颗粒的稳定组合。

[0100] 应当理解,RAFT聚合通常是本领域中已知的。先前研究的用于RAFT聚合的合适的试剂、单体和条件可以用于本文中所述的共聚物、方法和组合物中,例如美国专利第9,006,193、9,464,300和9,476,063号中所述的那些,其每一个的公开通过引用以其全部并入。

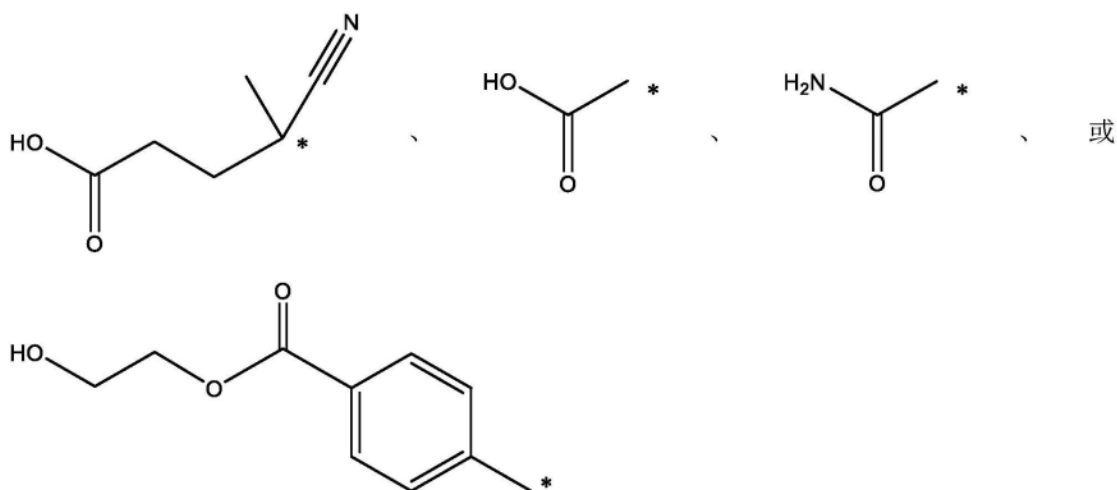
[0101] 可用于与本公开结合的链转移剂(CTA)是本领域中已知的。CTA的身份不受特别限制。应当理解,形成RAFT聚合的基础的链转移步骤涉及链和增长基团之间的官能链端基(通常为硫代羰基硫基, $Z-C(=S)S-R$)的可逆转移。整个过程包括在RAFT试剂(CTA)的R-和 $Z-C(=S)S-$ 基团之间插入单体,其形成大部分所得聚合物链的 α 端基和 ω 端基。用于与本公开结合的合适的CTA包括但不限于三硫代碳酸酯($Z=S-$ 烷基)、二硫代苯甲酸酯($Z=Ph$)、二硫代氨基甲酸酯($Z=N-$ 烷基)、黄原酸酯($Z=O-$ 烷基)等等。(参见,Sébastien Perrier, *Macromolecules* 2017 50(19), 7433-7447)。在一些实施方案中,RAFT共聚可以使用含有一个或多个末端羧基基团的链转移剂(CTA)来实现,以获得具有可用于经由上述方法键合至有效载荷的末端的羧基封端的聚合物。在该实施方案中,当所得单羧基或二羧基封端的聚合物分散在低pH(例如小于6的pH)缓冲液中时,聚合物的两个末端都暴露并可用于经由EDC/NHS化学进行标记。在该实施方案中,当聚合物转移至生理pH(约pH 7)时,核嵌段自组装,将有效载荷包封在疏水核中,以在细胞的内体区室中酸化后释放并暴露。在一些实施方案中,第一或第二链转移剂可以选自三硫代碳酸双(羧基甲基)酯、三硫代碳酸双(2-氨基-2-氧代乙基)酯、三硫代碳酸双[4-(2-羟基乙氧基羰基)苄基]酯、4-氰基-4-(乙基硫基硫代羰基)硫基戊酸、4-氰基-4-((苯基硫代甲酰)硫基)戊酸、和4-氰基-4-[(十二烷基硫基硫代羰基)硫基]戊酸、4-氰基-4-(硫代苯甲酰基硫基)戊酸、苯并二硫代甲酸2-氰基-2-丙酯、甲基(苯基)氨基二硫代甲酸氰基甲酯、三硫代碳酸2-氰基-2-丙基十二烷基酯、2-(十二烷基硫基硫代羰基硫基)-2-甲基丙酸、三硫代碳酸氰基甲基十二烷基酯、4-氰基苯并二硫代甲酸2-氰基-2-丙酯等等。

[0102] 应当理解,可用于与本公开结合的RAFT可以是各种聚合物组合物。例如,可用于与本公开结合的RAFT聚合物可以是包含单一聚合物嵌段的无规嵌段聚合物,或包含两种聚合物嵌段的二嵌段RAFT共聚物,或包含三种聚合物嵌段的三嵌段RAFT共聚物,或者可以使用另外的数量的嵌段。本领域技术人员将容易地理解,通过RAFT聚合制备嵌段聚合物是本领域中已知的,并且此类聚合过程可以应用于本公开。(参见Goby等人, *Nat. Commun.* 4: 2505doi:10.1038/ncomms3505(2013))

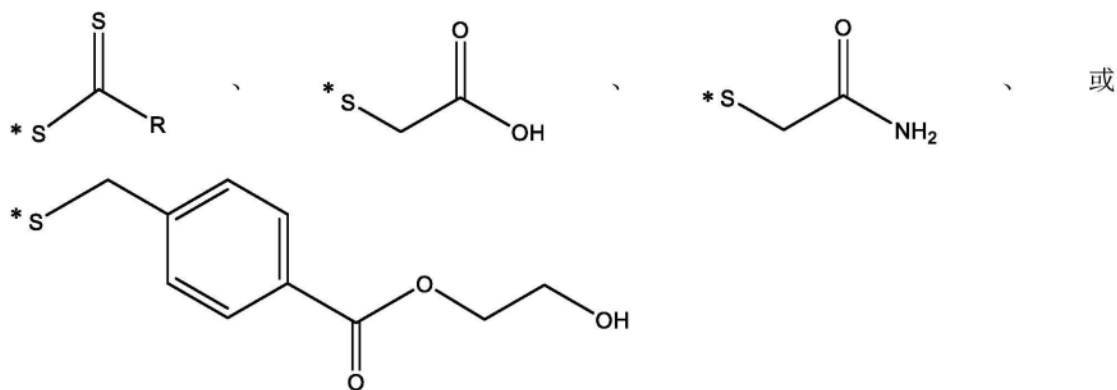
[0103] 在一些实施方案中,如本文中所制备的RAFT共聚物可以由以下结构描述:



其中每个CTACap是衍生自在用于制备RAFT共聚物的过程中使用的链转移剂的封端单元。用于制备嵌段1和嵌段2中的每一种的CTA可以相同或不同。在一些实施方案中,用于制备嵌段1和嵌段2中的每一种的CTA是相同的(例如大分子CTA)。在一些实施方案中,用于制备嵌段1和嵌段2中的每一种的CTA是不同的。在一些实施方案中,用于制备嵌段1和嵌段2中的一种或两种的CTA包含用于将生物分子、药物或标记物共价连接至RAFT共聚物的官能团。在一些实施方案中,共价连接可以经由酯键或酰胺键。在一些实施方案中,共价连接可以经由EDC-NHS化学进行。在一些实施方案中,第一封端单元具有下式



其中,*代表与第一嵌段的共价连接的点。在一些实施方案中,第二封端单元具有下式



其中,*代表与第二嵌段的共价连接的点,并且R是 $-\text{SC}_2-\text{C}_{12}$ 烷基或 C_6H_5 。

[0104] 在一些实施方案中,RAFT共聚物可以经由几种方法与DNA分子,特别是本公开的核酸构建体缔合,所述方法包括静电相互作用、高亲和力、非共价键、亲和素-链霉亲和素缀合,或通过经由例如酰胺键的直接共价连接。在一些实施方案中,RAFT共聚物可以经由与生物分子复合的静电相互作用与DNA分子,特别是本公开的核酸构建体缔合。在一些实施方案中,RAFT共聚物可以经由与生物分子复合的静电相互作用与DNA分子,特别是本公开的核酸构建体缔合。在一些实施方案中,RAFT共聚物可以经由高亲和力、非共价键、亲和素-链霉亲和素缀合与DNA分子,特别是本公开的核酸构建体缔合。在一些实施方案中,RAFT共聚物可以通过经由例如酰胺键的直接共价连接与DNA分子,特别是本公开的核酸构建体缔合。

[0105] 如图5(a) - 5(e)中所示的,本文中所述的PNP可以经由静电相互作用、亲和素-链霉亲和素缀合或通过直接共价连接与本公开的核酸构建体缔合。简而言之,如图5(a) - 5(e)中所示,图中提供的标记如下:001. 在静电负载的情况下具有带正电荷的冠的聚合物纳米颗粒(PNP)。002. 由于磷酸基团而具有负电荷的核酸构建体。003. 静电负载的PNP-核酸构建体复合物。004. PNP的冠中的聚合物链的末端上的羧酸基团。005. 胺封端的核酸构建体的5'端上的伯胺基团。006. 核酸构建体的3'端上的磷酸基团。007. 在胺末端核酸构建体和羧酸封端的PNP之间的直接酰胺化反应中形成的酰胺键。008. 生物素结合蛋白(例如亲和素)上的伯胺。010. 在PNP的冠中的聚合物链的末端上的羧酸基团和生物素结合蛋白(例如亲和素)上的伯胺之间形成的酰胺键。011. 在5'末端上具有生物素官能团的核酸构建体。012. 当带

正电荷的PNP与带负电荷的核酸构建体混合时发生的静电耦合反应。013.经由PNP的冠中的聚合物链的末端上的羧酸基团和胺封端的核酸构建体上的伯胺之间的EDA-NHC反应而进行的直接酰胺化反应。014经由在PNP的冠中的聚合物链的末端上的羧酸基团和生物素结合蛋白(例如亲和素)上的伯胺之间的EDA-NHC反应而进行的直接酰胺化反应。015.核酸构建体的5'端上的生物素和缀合到PNP的冠上的羧酸末端的亲和素的偶联。

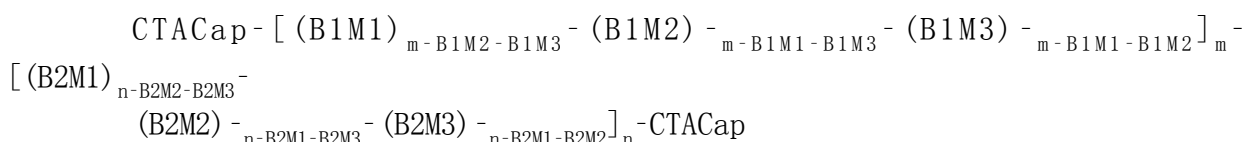
[0106] 在一些实施方案中,嵌段1和嵌段2中的每一种可以包含一种或多种使用RAFT聚合过程聚合的单体单元。应当理解,单体单元的身份不受特别限制,只要所使用的单体单元与受控的活性/自由基聚合相容即可,所述受控的活性/自由基聚合例如可逆失活自由基聚合、原子转移自由基聚合(ATRP)、可逆加成断裂链转移聚合(RAFT)、碘转移聚合(ITP)、硒中心自由基介导的聚合、碲化物介导的聚合(TERP)、铈化氢介导的聚合、开环聚合、或类似的聚合过程。合适的单体单元包括但不限于,丙烯酸2-二甲基氨基乙酯(DMAEMA)、甲基丙烯酸2-(二乙基氨基)乙酯(DEAEMA)、甲基丙烯酸2-(二异丙基氨基)乙酯(DPAEMA)、甲基丙烯酸丁酯(BMA)、乙基丙烯酸(EAA)、丙基丙烯酸(PAA)、甲基丙烯酸(羟基乙基)酯(HEMA)、甲基丙烯酸甲酯(MMA)、丙烯酸(AA)、乙酰乙酰苯胺(AAA)、4-氨基苄腈(ABN)、丙烯酸9-蒎甲酯(ACMA)、甲基丙烯酸9-蒎甲酯(ACMMA)、甲基丙烯酸氨基乙酯(AEM)、甲基丙烯酸2-(2-氨基乙基氨基)乙酯(AEAEMA)、4-(2-丙烯酰氧基乙氧基)-2-羟基二苯甲酮(AEHBP)、甲基丙烯酸2-氨基乙酯(AEMA)、N-(2-氨基乙基)甲基丙烯酰胺(AEMAA)、甲基丙烯酸3-氨基-2-羟基丙酯(AEAHPMA)、3-氨基丙基甲基丙烯酰胺(AHPMA)、甲基丙烯酸烯丙酯(ALMA)、丙烯酰胺(AM)、酰胺胺(AMA)、3-甲基丙烯酰胺-3-甲基丁酸(AMBA)、2-烯丙基氧基苯甲醛(AOBA)、[2-(丙烯酰基氧基)乙基]三甲基氯化铵(AOETMA)、甲基丙烯酸3-(丙烯酰基氧基)-2-羟基丙酯(AOHOPMA)、4-氨基苯乙醇(APA)、N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺(APMA)、甲基丙烯酸5-(3-(氨基)-丙氧基)-2-硝基苄基酯(APNBMA)、N-[N'-(2-氨基乙基)-2-氨基乙基]天冬酰胺(Asp(DET))、甲基丙烯酸2-叠氮乙酯(AzEMA)、2,2'-联噻吩(2-2-BTP)、丙烯酸叔丁酯(BA)、溴代乙醛缩二乙醇(BAADA)、N-(t-BOC-氨基丙基)甲基丙烯酰胺(BAPMAA)、2-溴代丙烯酸叔丁酯(BBA)、4-丁基苯甲酰氯(BBC)、1,3-丁二烯(BD)、2-丁基-2-乙基-1,3-丙二醇(BEPD)、二叔丁基亚氨基二乙酸酯(BIDA)、3-(溴代甲基)-5-((三甲基甲硅烷基)乙炔基)苯磺酰氟(BMTMSEBS)、2-(苄基氧基)乙醇(BOE)、4-叔丁氧基苯乙烯(BOS)、支化聚乙烯亚胺(BPEI)、3-溴代-5-((三甲基甲硅烷基)乙炔基)苯磺酰氟(BTMSEBS)、ε-己内酯(CAP)、甲基丙烯酸羧基甜菜碱酯(CBMA)、2-氰基乙基N,N-二异丙基氯代亚磷酰胺(CEDPCPP)、N-环己基马来酰亚胺(CHMI)、甲基丙烯酸3-氯代-2-羟基丙酯(CHPMA)、丙烯酸十二烷基酯(DA)、N,N-二烯丙基丙烯酰胺(DAA)、二烯丙基甲胺(DAMA)、二烯丙基二甲基氯化铵(DADMAC)、2,5-二氨基吡啶(DAP)、5,5'-二溴代-4,4'-双十二烷基-2,2'-联噻吩(DBDDBT)、5,5'-二溴代-4,4'-双十四烷基-2,2'-联噻吩(DBDTBT)、2,5-二溴代-3-己基噻吩(DBHTP)、二氯代甲基乙烯基硅烷(DCMVS)、2-(二乙基氨基)乙硫醇盐酸盐(DEAET)、甲基丙烯酸2-(二乙基氨基)乙酯(DEAEMA)、草酰丙酸二乙酯(DEOP)、DL-丙交酯(DLL)、甲基丙烯酸N,N-二甲基氨基-2-乙酯(DMA)、N-[3-(N,N-二甲基氨基)丙基]-甲基丙烯酰胺(DMAPMA)、[2-(甲基丙烯酰基氧基)乙基]二甲基-(3-磺丙基)氢氧化铵(DMAPS)、N,N'-二甲基丁胺(DMBA)、N,N'-二甲基乙醇胺(DMEA)、丙烯酸N,N-二甲基氨基-2-乙酯或丙烯酸2-(二甲基氨基)乙酯(DMAEA)、1-(二甲基氨基)吡咯(DMAP)、4,5-二甲氧基-2-硝基苄醇(DMONBA)、3,4-二甲氧基噻吩(DMOT)、1,2-二

肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DMPC)、2-脱氧-2-甲基丙烯酰胺吡喃葡萄糖(DOMAAG)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPyPE)、3-十二烷基噻吩(3-DT)、N-[2-(2-吡啶基二硫代)]乙基甲基丙烯酰胺(DTEMA)、乙基丙烯酸(EAA)、2-(溴代甲基)丙烯酸乙酯(EBMA)、1-氰基-1-环丙烷甲酸乙酯(ECCPC)、3,4-亚乙二氧基噻吩(EDOT)、二甲基丙烯酸乙二醇酯(EGDMA)、乙二醇苯基醚丙烯酸酯(EGPEA)、甲基丙烯酸乙酯(EMA)、3-(氟代磺酰基)-5-((三甲基甲硅烷基)乙炔基)苯甲酸(3FTMSEBA)、3-甲酰基-5-((三甲基甲硅烷基)乙炔基)苯磺酰氟(3FTMSEBS)、4-甲酰基-2-((三甲基甲硅烷基)乙炔基)苯磺酰氟(4FTMSEBS)、5-氟代-2,3-噻吩二甲醛(5FTPDCA)、N-乙酰基-D-半乳糖(GalNAc)、N-乙酰基-D-葡萄糖(GlcNAc)、甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)、糖基磷脂酰肌醇(GPI)、5,7-十六碳二炔酸(HDDA)、甲基丙烯酸2-羟基乙酯(HEMA)、丙烯酸1,1,1,3,3,3-六氟代异丙酯(HFIPA)、1,1,4,7,10,10-六甲基三亚乙基四胺(HMTETA)、丙烯酸4-羟基丁酯(HOBA)、2-(4-羟基苯基偶氮)苯甲酸(HPABA)、丙烯酸2,2,3,3,4,4,4-七氟代丁酯(HPFBA)、N-(2-羟基丙基)-甲基丙烯酰胺(HPMA)、丙烯酸2,2,3,4,4,4-六氟代丁酯(HXFBA)、丙烯酸异冰片酯(IBA)、4-碘代苯甲酰氯(IBC)、甲基丙烯酸异冰片酯(IBMA)、N-(异丁氧基甲基)丙烯酰胺(IBMAA)、丙烯酸异癸酯(IDA)、马来酸酐(MA)、[2-(甲基丙烯酰基氧基)乙基]三甲基氯化铵(MAETMA)、甲基丙烯酰基-L-赖氨酸(MAL)、甲基丙烯酰氧基琥珀酰亚胺(MAS)、甲基丙烯酰胺海藻糖(MAT)、十七烷酸甲酯(MHD)、1-甲基-1H-吡啶-3-甲醛(MICA)、2-N-甲基马来酰亚胺(MMI)、甲基-5-降冰片烯-2,3-二甲酸酐(MNDCA)、甲基丙烯酸甲氧基乙酯(MOEMA)、甲基丙烯酸2-(2-甲氧基乙氧基)乙酯(MOEOEMA)、3-甲基-3-氧杂环丁烷甲醇(MOM)、2-甲基丙烯酰基氧基乙基磷酸胆碱(MPC)、4-乙烯基苯甲酸甲酯(MVB)、丙烯酸2-萘酯(NA)、N-(丙烯酰氧基)琥珀酰亚胺(NAS)、甲基丙烯酸邻硝基苄基酯(NBMA)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、甲基丙烯酸N-(甲基丙烯酰氧基)琥珀酰亚胺酯(NHSMA)、N-异丙基丙烯酰胺(NIPAM)、甲基丙烯酸2-萘基酯(NMA)、N-(甲基丙烯酰基氧基)琥珀酰亚胺(NMS)、N-(正十八烷基)丙烯酰胺(NODAA)、4-硝基-N-丙基苄胺盐酸盐(NPBAHC)、甲基丙烯酸低聚乙二醇酯(OEGMA)、低聚乙烯亚胺(OEI)、3-苯基噻吩(3-PTP)、聚(N-甲基4-乙烯基吡啶碘)(P4VPQ)、聚(2-氨基乙基甲基丙烯酰胺)(PAEMA)、N-(N'-{N''-[N''']-(2-氨基乙基)-2-氨基乙基}-2-氨基乙基)-2-氨基乙基)-天冬酰胺(Asp(TEP))、4-戊烯酸酐(PAN)、丙烯酸五溴代苄基酯(PBBA)、甲基丙烯酸五溴代苄基酯(PBBMA)、丙烯酸五溴代苯基酯(PBPA)、甲基丙烯酸五溴代苯基酯(PBPMA)、聚(ϵ -己内酯)(PCL)、反式-2-苯基环丙基异氰酸酯(PCPI)、1,5-戊二醇(PD)、2-苯基-1,3-二噁烷-5-醇(PDO)、甲基丙烯酸吡啶基二硫化乙酯(PDSEMA)、聚(乙二醇)(PEG)、丙烯酸聚(乙二醇)酯(PEGA)、聚(乙二醇)甲基醚甲基丙烯酸酯(PEGMEMA)、聚(乙二醇)乙基醚甲基丙烯酸酯(PEGEEMA)、甲基丙烯酸聚(乙二醇)酯(PEGMA)、五亚乙基六胺(PEHA)、聚(乙烯亚胺)(PEI)、季戊四醇四丙烯酸酯(PETA)、五氟代苯基(PFP)、丙烯酸五氟代苯基酯(PFPA)、甲基丙烯酸五氟代苯基酯(PFPMA)、聚(谷氨酸)(PGA)、聚(乙酰胺基胺)(Poly-(glycoamidoamine), PGAA)、聚(缩水甘油基丁胺)(PGBA)、用乙醇胺官能化的聚(甲基丙烯酸缩水甘油酯)(PGEA)、聚(甲基丙烯酸缩水甘油酯)(PGMA)、聚(N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺)(PHPMA)、聚(乳酸)(PLA)、聚(L-谷氨酸)(PLG)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、聚(L-赖氨酸)(PLL)、聚

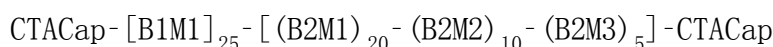
(L-乳酸) (PLLA)、聚(甲基丙烯酸月桂酯) (PLMA)、聚(甲基丙烯酸) (PMAA)、聚(2-脱氧-2-甲基丙烯酸酰胺吡喃葡萄糖) (PMAG)、聚(甲基丙烯酸甲酯) (PMMA)、聚(2-甲基丙烯酰基氧基乙基磷酸胆碱) (PMPC)、聚[N-(3)-(甲基丙烯酰胺)丙基]-N,N-二甲基-N-(3-磺丙基)氢氧化铵] (PMPD)、聚(丙烯酸正丁酯) (PnBA)、聚(甲基丙烯酸正丁酯) (PnBMA)、聚(N-异丙基丙烯酰胺) (PNIPAM)、聚(甲基丙烯酸低聚乙二醇酯) (POEGMA)、聚(丙二醇) (PPG)、聚(丙亚胺) (PPI)、3,4-亚丙基二氧基噻吩 (ProDOT)、聚(苯乙烯) (PS)、聚(4-苯乙烯磺酸钠) (PSS)、聚(三丁基-(4-乙基苄基)氯化磷) (PTBP)、聚(三乙基-(4-乙基苄基)氯化磷) (PTEP)、聚(甲基丙烯酸(2-三甲基氨基)乙酯氯化物) (PTMAEMA)、聚((乙基苄基)三甲基铵) (PVBtMA)、聚(2-乙基-4,4-二甲基吡内酯) (PVDMA)、聚(N-乙基-4-乙基溴化吡啶鎓) (PVP)、季铵化聚DMAEMA (QPDMAEMA)、甲基丙烯酸磺基甜菜碱酯 (SBMA)、甲基丙烯酸3-磺丙酯钾盐 (SPMAP)、巯基胆固醇 (TC)、噻吩-2,5-二硼酸双(频哪醇)酯 (TDABP)、二甲基丙烯酸三甘醇酯 (TEGDMA)、三氟代乙烯 (TFE)、丙烯酸2,2,2-三氟代乙酯 (TFEA)、甲基丙烯酸2,2,2-三氟代乙酯 (TFEMA)、丙烯酸四氢糠酯 (THFA)、三烯丙基异氰脲酸酯 (TIC)、三亚甲基碳酸酯 (TMC)、4,4'-三亚甲基二哌啶 (TMDP)、三羟甲基丙烷三(3-巯基丙酸酯) (TMPTMP)、甲基丙烯酸(三甲基甲硅烷基)酯 (TMSMA)、三苯基碳鎓五氯代锡酸 (TPPCCS)、3-乙基苯甲醛 (3VBA)、4-乙基氯化吡啶鎓 (4VP)、丙烯酸乙酯 (VA)、乙酸乙酯 (VAT)、4-乙基苯甲酸 (VBA)、(乙基苄基)三甲基氯化铵 (VBTAC)、1-乙基咪唑 (VI)、1-乙基-2-吡咯烷酮 (VP)、间苯二甲胺 (XDA)、硬脂酸锌 (ZS) 等等。

[0107] 在一些实施方案中,用于制备如本文中所述的RAFT共聚物的嵌段1和/或嵌段2的单体单元选自丙烯酸2-(二甲基氨基)乙酯 (DMAEEA)、甲基丙烯酸2-(二乙基氨基)乙酯 (DEAEEA)、甲基丙烯酸2-(二异丙基氨基)乙酯 (DIEAMA)、甲基丙烯酸丁酯 (BMA)、乙基丙烯酸 (EAA)、丙基丙烯酸 (PAA)、甲基丙烯酸(羟基乙基)酯和甲基丙烯酸甲酯 (MMA)。

[0108] 在一些实施方案中,本文中提供的RAFT共聚物可通过下式描述:



[0109] 例如,具有嵌段1中的25个单元的单一单体和嵌段2中的平均单体单元比为20:10:5,总n为35的3种不同单体的如本文中所述的RAFT共聚物可通过以下通式描述



[0110] 还应进一步理解,使用RAFT聚合制备的聚合物是具有单元分布并因此具有分子量分布的无规聚合物。因此,以上实例中嵌段2的卡通表示(cartoon representation)为包含上述比的B2M1、B2M2和B2M3的35个单体单元的无规共聚物。

[0111] 在另一个说明性实施方案中,聚合物纳米颗粒组合物可用一种或多种聚合物涂覆,以保护组合物免受免疫反应或增强内体逃逸。在一个实施方案中,一种或多种聚合物包含聚乙二醇。在另一个实施方案中,一种或多种聚合物包括聚乙二醇聚-L-赖氨酸。在又一个实施方案中,一种或多种聚合物包含聚乙烯亚胺。在另外的实施方案中,一种或多种聚合物包括聚乙二醇聚-L-赖氨酸和聚乙烯亚胺。

[0112] 应当理解,调整本文中所述的RAFT共聚物的参数和性质可有利于其在如本文中所述的组合物和方法中的用途。因此,如本文中所述的用于以单独或文库形式制备RAFT共聚

物的方法能够提供RAFT共聚物的特定参数和性质。

[0113] 在一些实施方案中,如本文中所述的RAFT嵌段聚合物具有以下的一个或多个:在约1kDa至约1000kDa、或约2kDa至约500kDa、或约2kDa至约160kDa的范围中的总分子量(M_n) (即所有嵌段的总和)和在约10至约3500、或约20至约2500、或约30至约900的范围中的总聚合度,在约10nm至约10000nm的范围中的尺寸,和约1至约4的最大冠核比(CCR)。在一些实施方案中,总分子量(M_n) 在约30kDa至约120kDa、约40kDa至约110kDa、约50kDa至约100kDa、约60kDa至约90kDa、约40kDa至约80kDa和约40kDa至约60kDa的范围中。在一些实施方案中,总聚合度在约40至约850、约60至约800、约100至约700、约200至约600、或约300至约500的范围中。在一些实施方案中,尺寸在约10nm至约10000nm、或约20nm至约5000nm、或约50nm至约3000nm、或约20nm至约1000nm、或约50nm至约1000nm、或约30nm至约500nm、或约200nm至约2000nm、或约100nm至约5000nm、或约100nm至约500nm、或约10nm至约50nm、约15nm至约45nm、约20nm至约40nm、或约25nm至约35nm的范围中。在一些实施方案中,最大冠核比(CCR)为小于4、或小于3、约1至约3.8、约1.2至约3.5、约1.5至约3、约1.5至约2.5、或约1至约2。

[0114] 在一些实施方案中,第一嵌段可由一个或多个单体单元制备,并且具有在约1kDa至约500kDa、或约10kDa至约200kDa、或约10kDa至约160kDa、或约1kDa至约80kDa的范围中的分子量(M_n),和在约10至约3500、或约10至约2500、或约20至约2000、或约50至约1200、或约50至约1000的范围中的聚合度。在一些实施方案中,第一嵌段分子量(M_n) 可以在约1kDa至约500kDa、或约2kDa至约400kDa、或约5kDa至约200kDa、或约10kDa至约160kDa、或约15kDa至约100kDa、或约25kDa至约60kDa、或约30kDa至约55kDa、约30kDa至约50kDa、或约30kDa至约40kDa等的范围中。在一些实施方案中,第一嵌段聚合度在约30至约350、约50至约300、约70至约250、约80至约240、约100至约200等的范围中。

[0115] 在一些实施方案中,第二嵌段可由一个或多个单体单元制备,并且可具有在约1kDa至约500kDa、或约10kDa至约200kDa、或约10kDa至约160kDa、或约1kDa至约80kDa的范围中的分子量(M_n),和在约10至约3500、或约10至约2500、或约20至约2000、或约50至约1200、或约50至约1000的范围中的聚合度。在一些实施方案中,第二嵌段分子量(M_n) 在约10kDa至约70kDa、约15kDa至约65kDa、约20kDa至约60kDa、约25kDa至约55kDa、约30kDa至约50kDa、约35kDa至约45kDa、约5kDa至约15kDa等的范围中。在一些实施方案中,第二嵌段聚合度在约3至约2500、或约20至约2000、或约30至约1500、或约40至约1200、或约10至约500、或约12至约450、或约20至约400、或约25至约350、或约50至约300、或约100至约250、或约150至约200、或约5个至约50、或约5至约20等的范围中。

[0116] 在一些实施方案中,第三、第四或随后的嵌段可由一个或多个单体单元制备,并且各自可具有在约1kDa至约500kDa、或约10kDa至约200kDa、或约10kDa至约160kDa、或约1kDa至约80kDa的范围中的分子量(M_n),和在约10至约3500、或约10至约2500、或约20至约2000、或约50至约1200、或约50至约1000的范围中的聚合度。在一些实施方案中,第三、第四或随后的嵌段分子量(M_n) 在约10kDa至约70kDa、约15kDa至约65kDa、约20kDa至约60kDa、约25kDa至约55kDa、约30kDa至约50kDa、约35kDa至约45kDa、约5kDa至约15kDa等的范围中。在一些实施方案中,第三、第四或随后的嵌段聚合度在约3至约2500、或约20至约2000、或约30至约1500、或约40至约1200、或约10至约500、或约12至约450、或约20至约400、或约25至约350、或约50至约300、或约100至约250、或约150至约200、或约5个至约50、或约5至约20等的

范围中。

[0117] 在一些实施方案中,单一的链转移剂可以用于与本公开结合的RAFT聚合过程中。在一些实施方案中,对于具有多于一种嵌段的嵌段聚合物,一种或多种单一的链转移剂可以用于与本公开结合的RAFT聚合过程中。在一些实施方案中,对于具有两种嵌段的嵌段聚合物,第一链转移剂和第二链转移剂(其可以相同或不同)可以用于与本公开结合的RAFT聚合过程的每个步骤。在一些实施方案中,对于具有三种嵌段的嵌段聚合物,第一链转移剂、第二链转移剂和第三链转移剂(其可以相同或不同)可以用于与本公开结合的RAFT聚合过程的每个步骤。

[0118] 应当理解,在本文中所述的RAFT聚合方法步骤和纯化步骤中可使用各种溶剂。合适的溶剂包括但不限于2-氯乙醇、乙酸(冰乙酸)、丙酮、乙腈、苯乙酮、苯胺、苯甲醛、乙酸苄基酯、二硫化碳、环己烷、环己醇、二(乙二醇)、二(丙二醇)、双丙酮醇、二乙醚、二甲基亚砜、乙醇、乙酸乙酯、乙二醇、甲醛(37%溶液)、甲酰胺、甲酸、甲酸(96%)、己烷、异丁醇、异丙醇、乙酸异丙酯、异丙醚、间甲酚、甲醇、乙酸甲酯、甲基乙基酮、矿物油、N,N-二甲基甲酰胺、正丁醇、正辛烷、正丙醇、丙二醇、吡啶、叔丁醇、四氢呋喃、三氟乙酸、水等、及其组合。

[0119] 在一些实施方案中,一种或多种纳米颗粒形成聚合物是RAFT嵌段共聚物,其包含

[0120] a. 第一末端,其包含衍生自RAFT共聚过程中的第一链转移剂的第一封端单元;

[0121] b. 第一嵌段,其由共价连接至第一反应性官能单元的一个或多个单体单元制备,并且其具有在约1kDa至约500kDa的范围中的分子量(M_n)和在约10至约2500的范围中的聚合度;

[0122] c. 任选的第二嵌段,其由共价连接至第一嵌段的一个或多个单体单元制备,并且其具有在约1kDa至约500kDa的范围中的分子量(M_n)和在约10至约2500的范围中的聚合度;

[0123] d. 任选的第三嵌段,其由共价连接至第一和/或第二嵌段的一个或多个单体单元制备,并且其具有在约1kDa至约500kDa的范围中的分子量(M_n)和在约10至约2500的范围中的聚合度;

[0124] e. 任选的第四嵌段,其由共价连接至第一、第二和/或第三嵌段的一个或多个单体单元制备,并且其具有在约1kDa至约500kDa的范围中的分子量(M_n)和在约10至约2500的范围中的聚合度;

[0125] f. 任选的第五嵌段,其由共价连接至第一、第二、第三和/或第四嵌段的一个或多个单体单元制备,并且其具有在约1kDa至约500kDa的范围中的分子量(M_n)和在约10至约2500的范围中的聚合度;和

[0126] g. 第二末端,其包含衍生自第一、第二、第三或第四链转移剂的第二封端单元。

[0127] 本文中所述的聚合物纳米颗粒的说明性有效载荷可包括选自以下的组合物的任一种或组合:核酸(例如DNA或RNA)、pDNA、寡脱氧核糖核酸(ODN)、dsDNA、ssDNA、反义寡核苷酸、反义RNA、siRNA、信使RNA、引导RNA(例如小引导RNA)、核糖核蛋白、CRISPR/Cas9系统中使用的供体DNA链,以及酶,例如CRISPR相关酶(例如Cas9)、其他基因编辑系统中使用的酶(例如ZFN)、定制设计的归巢核酸内切酶、TALENs系统、其他基因编辑核酸内切酶和逆转录酶。

[0128] 在另一方面中,本公开使用机器学习模型来快速鉴定最佳候选。在说明性实施方案中,图形神经网络(GNN)用于该过程。聚合物可以在三个尺度上表征:单体、嵌段和完整聚

合物。单体结合以形成嵌段,且嵌段结合以形成完整聚合物。聚合物性质取决于聚合物在所有三个尺度上的表征。可以用有向图捕获单体、嵌段和聚合物之间的关系。然后,可以在图中的节点之间共享信息,以产生所有以下三个尺度上的完整聚合物的数值表示:单体、嵌段和聚合物。然后,这些数值表示可用于神经网络中以预测聚合物的性质。在说明性实施方案中用于聚合物性质预测的GNN的使用提供了两个主要益处:首先,图可以在所有三个尺度上对聚合物特性进行建模,这对于准确预测是重要的;第二,图提供了可以适应若干聚合物结构的灵活建模结构。

[0129] 首先,在补充有上文所述的大数据集的公共数据和初步测试数据的组合上对机器学习模型进行训练。说明性实施方案涉及三循环深度学习循环,以加速对PNP的高通量表征和筛选。三个深度学习循环分别表征PNP的物理性质、体外生物活性和体内生物活性。每个循环利用GNN深度学习模型(参见图3a)来表征候选PNP。GNN采用定义单体的简化分子线性输入系统(SMILES)字符串作为输入(图的节点),并且图的边定义单体之间的关系以及它们如何结合以形成PNP。图的边还允许将关于聚合物的另外的信息(例如单体的比和聚合度)并入GNN中。

[0130] 目前公开的结构提供了至少三个不同的优点。首先,深度学习模型不依赖于聚合物指纹。相反,深度学习模型将从SMILES字符串中学习适当的数值嵌入。其次,图允许模型具有容易地表示各种PNP家族的灵活性。第三,使用SMILES字符串作为输入允许有限的训练数据集用枚举的SMILES字符串来扩充,增加可得的训练数据的量并改善模型性能。对该GNN结构的测试已经显示出预测 ζ 电势的令人印象深刻的能力(参见图3b), ζ 电势是非病毒基因递送载体的关键特性。一旦被训练,这些深度学习模型将用于在高通量系统中按优先顺序列出候选PNP的合成和特性以满足生物活性的要求。迭代数据可用于在主动学习循环中微调模型以改善未来的性能。

[0131] 在一些实施方案中,可以执行数据扩充以人为地增加用于训练机器学习模型的数据的大小和多样性(并且因此提高模型性能)。深度学习模型需要相对大的数据集用于训练,并且可以过度拟合为小的数据集。如上所述,GNN采用定义单体的SMILES字符串作为输入。单体(聚合物的构建单元)具有单一的标准SMILES字符串,但它也具有多个替代SMILES字符串表示。可以执行SMILES枚举以从标准SMILES字符串中生成这些替代形式,并且因此将训练数据集的大小增加至若干倍。然后,神经网络模型能够对数据大小和表示的多样性的这种增加发挥杠杆作用,以改善性能。

[0132] 在其他实施方案中,修改的Transformer模型(而不是GNN)可以用于预测聚合物性质(并且,因此,除其他应用外,快速确认用于递送碱基编辑蛋白的非病毒载体的最佳候选)。修改的Transformer模型利用输入的相对位置信息来产生单体字符串输入的数值嵌入。然后,这些数字嵌入可以用于聚合物性质预测的深度学习和统计模型。另外,与可处理顺序数据的许多其他深度学习体系结构相比,Transformer模型更为计算高效。原始的Transformer体系结构由编码和解码体系结构组成。编码器采用输入数据的序列并输出高维嵌入,而解码器采用高维嵌入作为输入并尝试预测原始或与输入到编码器中的序列相似的序列。本公开不需要预测顺序输出,因此它仅使用Transformer的编码部分来预测聚合物性质,物理性质和体外/体内性质二者。

[0133] 在又另一方面中,本公开的示例性实施方案允许在ALS的小鼠模型中选择用于PNP

介导的SOD1-靶向CBE的递送的最佳候选。然后,可以使用这些最佳候选在稳定表达EGFP或SOD1的小胶质细胞系中进行功能基因编辑测试。此外,可以在ALS的G93A-SOD1小鼠模型中评估PNP介导的CBE递送的效力和安全性。CBE碱基编辑器在小鼠中减缓ALS进展的先前成功显示了它们也可导致新的ALS基因编辑疗法的临床转化的可能性。

[0134] 尽管在附图和前述描述中已详细描述了某些说明性实施方案,但在特性方面这样的说明和描述应视为示例性而非限制性的,应当理解,仅显示和描述了说明性实施方案,并且期望保护在本公开精神之内的所有变化和修改。本公开存在由本文中所述装置、系统和方法的各种特征产生的多个优点。值得注意的是,本公开的装置、系统和方法的替代实施方案可以不包括所描述的所有特征,但仍受益于此类特征的至少一些优点。本领域的普通技术人员可容易地设计合并本公开的一个或多个特征的他们自己的装置、系统和方法的实施。

实施例

[0135] 实施例1

[0136] 条形码设计

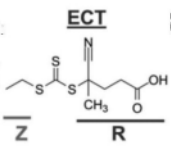
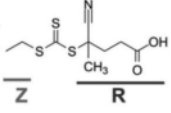
[0137] 用于该实施例中的核酸构建体包含在多核苷酸的中心包含8-10个核苷酸的独特的部分,所述独特的部分进一步受到来自待合并的任何其他条形码的至少3个碱基的汉明距离的要求的约束。直接在条形码的3'端上,包含7-10个随机碱基用于PCR重复的生物信息学去除。该中心序列以通用引物退火位点为侧翼,所述通用引物退火位点包含悬突以用于在测序文库制备期间添加索引接头。图4显示了这些条形码的代表性图示。这些核酸构建体设计为在5'端上具有生物素官能团或胺官能团。

[0138] 实施例2

[0139] 聚合物纳米颗粒合成

[0140] 如PCTapp349529 (21477779.1) 中所述,使用可逆加成-断裂链转移(RAFT)聚合,用表2中所列出的试剂和量合成二嵌段共聚物。将嵌段1试剂在圆底烧瓶中合并,用氩气吹扫,并使用加热套加热至60°C 6小时。使用四次80:20戊烷:醚沉淀洗涤和离心循环纯化反应产物并在真空中干燥。将嵌段1产物用作嵌段2的大分子RAFT试剂,并将计算的试剂体积(如基于嵌段1的理论分子量信息计算的)在圆底中合并用于嵌段2反应。在60°C下加热24小时之前,对反应混合物进行氩气吹扫。使用相同的纯化过程纯化反应产物并在真空中干燥。将所得聚合物在去离子水中透析4天,每天换水多次。最后,将透析后的材料冻干4天,并在室温下储存以供实验使用。

表2. 用于合成条形码化PNP的试剂和量

嵌段 1			
试剂	目的	Lot 0001 量	Lot 0002 量
丙烯酸 2-二甲基氨基乙酯(DMAEMA)	单体	15999.6 mg	32000.0 mg
(4-氰基-4-(((乙基硫基)硫代羰基)硫基)戊酸) (ECT)	链转移剂	76.9 mg	153.7 mg
偶氮双异丁腈(AIBN)	引发剂	9.5 mg	19.05 mg
二甲基甲酰胺(DMF)	溶剂	24131.1 mg	48229.8 mg
嵌段 1 反应产率	%产率	31.75%	39.55%
嵌段 2			
试剂	目的	Lot 0001 量	Lot 0002 量
丙烯酸 2-二甲基氨基乙酯(DMAEMA)	单体	713.0 mg	2110.6 mg
甲基丙烯酸丁酯(BMA)	单体	1934.4 mg	5727.6 mg
丙基丙烯酸(PAA)	单体	518.2 mg	1540.1 mg
嵌段 1 大分子 RAFT 试剂, 是指 ECT+DMAEMA。ECT 端基(R&Z)仍然存在以执行其功能, 但它们位于作为嵌段 1 合成的 p(DMAEMA)聚合物的末端上。作为参考, 此处是  基基团的任一侧上的 R&Z 基团  的 ECT。	大分子链转移剂	1528.4 mg	4526.2 mg
偶氮双异丁腈(AIBN)	引发剂	1.7 mg	4.93 mg
二甲基甲酰胺(DMF)	溶剂	7045.0 mg	20828.8 mg
嵌段 2 反应产率	%产率	73.33%	70.99%

[0141] 实施例3

[0142] 组合物实施例1 (CE1): 核酸构建体 (含有DNA条形码) 与聚合物纳米颗粒的静电连接

[0143] 根据以上方法和表2中所列出的试剂合成RAFT共聚物。将聚合物以约5mg/ml的浓度分散在磷酸盐缓冲盐水中。为了静电负载 (图5a), 将核酸构建体 (根据图4中所示的设计, 包含多核苷酸条形码) 以约100 μ M (约1.9mg/mL) 的浓度溶解在tris EDTA缓冲液中。将这些储备溶液与PBS混合在一起, 以产生具有0.05mg/mL聚合物和0.00389mg/mL核酸构建体的终浓度的溶液。将它们在室温下温育至少30分钟, 以允许带正电荷的聚合物与带负电荷的核

酸构建体缔合。将样品转移至amicon ultra-4离心管(MWCO 30kDa)。(最大3.5mL/管)并以 $4,000\times g$ 离心15分钟以除去任何未结合的核酸构建体。弃去滤液(其含有未结合的核酸构建体),并向保留物中添加无菌PBS,至0.05mg/mL聚合物和0.00389mg/mL核酸构建体的终浓度。使用设计为结合核酸构建体上的通用引物结合片段的引物,经由PCR扩增静电结合的核酸构建体。经由在琼脂糖凝胶上的凝胶电泳检测扩增子。泳道中双带的存在(图6)指示扩增子的存在,显示核酸构建体与PNP结合。

[0144] 实施例4

[0145] 组合物实施例2(CE2):经由亲和素-生物素连接与PNP缀合的核酸构建体

[0146] 使用含有至少一个羧基端基的CTA制备的RAFT共聚物进一步用亲和素官能化(图5b)。将RAFT共聚物以约12mg/mL转移到MES缓冲液中。将样品超声处理30分钟。将EDC试剂和磺基-NHS试剂分别以10:1和25:1的试剂与PNP的摩尔比加入聚合物。将样品在室温下温育至少10分钟以允许反应发生。通过具有30kDa的截留分子量的膜,经由以约 $3000\times g$ 离心约15分钟过滤反应体积。弃去滤液,并向保留物中添加无菌PBS以重构为10mg/mL聚合物。将亲和素(36.9mg)加入反应并在室温下温育15分钟。将样品转移至amicon ultra-4离心管(MWCO 30kDa)。(最大3.5mL/管)并以 $4,000\times g$ 离心15分钟。弃去滤液,并向保留物中添加无菌PBS,至8mg/mL聚合物的终浓度。以10摩尔的聚合物与1摩尔的核酸构建体的摩尔比将具有连接至5'端的生物素的核酸构建体加入亲和素官能化聚合物。将样品温育至少15分钟。将样品转移到amicon ultra-4离心管(MWCO 30kDa,最大3.5mL/管)并以 $4,000\times g$ 离心15分钟以除去任何未结合的核酸构建体。弃去滤液(其含有未结合的核酸构建体),并向保留物中添加无菌PBS,至8mg/mL聚合物的终浓度。使用设计为结合核酸构建体上的通用引物结合片段的引物,经由PCR扩增缀合的核酸构建体。经由在琼脂糖凝胶上的凝胶电泳检测扩增子。泳道中双带的存在(图6和7)指示扩增子的存在,显示核酸构建体与PNP结合。

[0147] 为了测试可用于核酸构建体标记的PNP的付诸实施中的PNP与条形码的比的范围,使用上述方法来使用亲和素-生物素连接将核酸构建体连接至PNP(图5a),改变PNP与核酸构建体的比,从低至20:1至高达10,000:1(聚合物摩尔数与核酸构建体摩尔数)。图13显示了具有对应于来自核酸构建体的扩增子的带的凝胶电泳图,所述扩增子从对具有这些各种PNP与核酸构建体的比的核酸构建体的PCR反应中产生,所述凝胶电泳图指示这些比在用于核酸构建体PNP组合物的付诸实施的可用范围中。

[0148] 亲和素-生物素缀合方法用来将96个独特条形码连接至表2中所述的聚合物的96个等分,这产生其中每个等分中的纳米颗粒群体具有所连接的独特条形码的相同聚合物的96个等分。通过将体积等量的等分合并到单个小瓶中而将这96个等分合并,这产生96个不同的条形码化PNP群体的分散体,其中所有群体均包含由表2中所述的聚合物形成的聚合物胶束和来自96个独特条形码群体的独特条形码。

[0149] 将亲和素-生物素缀合的核酸构建体-PNP的合并样品掺入到HEK-293T细胞中。将细胞以每孔20,000个细胞接种于96孔板中的100 μ L培养基中,并将其放置以粘附过夜。接种后二十四小时,将具有96个独特条形码的PNP的合并样品以约0.024mg/mL PNP的剂量添加于每个孔中,并在37 $^{\circ}$ C的培养箱中放置过夜。第二天,使用QIAamp 96DNA提取试剂盒和Qiacube HT仪器,根据制造商的方案,从样品中提取条形码。使用设计为结合条形码上的通用引物结合序列的引物,经由PCR扩增缀合的条形码。经由在琼脂糖凝胶上的凝胶电泳检测

扩增子。泳道中双带的存在(图8)指示扩增子的存在,显示核酸构建体与PNP结合。

[0150] 向小鼠施用具有经由亲和素-生物素连接缀合的96个独特条形码的PNP的合并样品(使用下述的体内筛选方案)。给药后二十四小时,处死小鼠,并就条形码化PNP的存在对组织进行分析。PCR用于扩增来自组织样品的条形码,并且安捷伦片段分析用于检测核酸构建体-PNP的存在,以与阳性对照匹配的暗带作为核酸构建体-PNP的存在的指示物(图12a)。该实验付诸实施了用独特核酸构建体标记PNP、将它们向小鼠施用、并然后经由PCR检测它们的生物分布的能力。我们进一步使用深度测序技术来区分肝组织中的所有96个独特条形码。如下所述进行文库制备、测序和序列分析。所有96个独特条形码以可计数且可与其他条形码区分的方式进行检测(图12c和图12d)。这显示我们的组合物不仅允许在给药后24小时在小鼠组织中检测独特条形码化PNP,而且允许我们在动物组织中定量地区分每个独特条形码化PNP与所有其他独特条形码化PNP。

[0151] 实施例5

[0152] 用于聚合物纳米颗粒文库的RAFT共聚物的制备

[0153] 简而言之,将嵌段1试剂(单体、链转移剂、引发剂和溶剂)在聚丙烯96孔u形底微量培养板(Greiner Bio-One)的孔中、聚丙烯96孔簇管(Corning)中、聚丙烯Eppendorf微量离心管(Sigma-Aldrich)中或聚丙烯50mL或15mL锥形管(VWR)中合并,并置于VWR 1400E Sheldon真空烘箱中。将20mL玻璃小瓶用约10-15mL溶剂(例如二甲基甲酰胺)填充,并将小瓶置于烘箱中以提供用于大气饱和的来源。用氩气以约3L/min吹扫烘箱约45分钟,并加热至60°C和75°C之间6-24小时。反应完成后,向孔或管中加入丙酮以防止聚合物固化,并将孔或管密封并在室温下放置过夜。第二天,将反应产物溶液转移到1.5mL Eppendorf管(如果需要的话)中,并经由使用适当的纯化溶剂溶液(例如80:20戊烷:醚、异丙醇、甲醇等)的至少三次沉淀洗涤和离心循环来进行纯化,并在真空中干燥。将嵌段1产物用作嵌段2的大分子RAFT试剂,并将计算的试剂体积(如基于嵌段1的理论或实际分子量信息计算的)在聚丙烯96孔u形底微量培养板(Greiner Bio-one)中、聚丙烯96孔簇管(Corning)中、聚丙烯Eppendorf微量离心管(Sigma-Aldrich)中或聚丙烯50mL或15mL锥形管(VWR)中合并以用于嵌段2反应。将反应混合物置于VWR 1400E Sheldon真空烘箱中,该烘箱以约3L/min进行氩气吹扫约45分钟,然后加热至60°C和75°C之间6-24小时。反应产物使用与嵌段1文库材料所用的相同的纯化过程纯化并在真空中干燥。将所得聚合物重悬于丙酮或氯仿中,并根据实验使用的需要等分(这些转移溶剂在材料使用之前蒸发),在实验使用之前,在室温下以干燥状态储存,或溶解于去离子水中,冷冻并冻干。使用Wyatt Technology DynaPro Plate Reader III测量尺寸。使用DynaPro Plate Reader III测量嵌段1材料的分子量。高于DynaPro Plate Reader III摩尔质量能力阈值的纳米颗粒尺寸妨碍了对这些聚合物文库的嵌段2分子量的测量。高通量聚合物文库的所有分子量均报道为重均分子量(Mw)。

[0154] 用于合成96种PNP的试验PNP文库的嵌段1和嵌段2的试剂、量和反应条件的总结分别显示于下表3和4中。PNP 22,61和89-96用作用于HEK细胞研究的10个独特PNP。PNP 1-88用作用于流式细胞术研究的独特PNP。表3缩写:ACVA,4,4'-偶氮双(4-氰基戊酸);AIBN,偶氮双异丁腈;BMA,甲基丙烯酸丁酯;CTP,4-氰基-4-(硫代苯甲酰基硫基)戊酸;DMAEMA,甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯;DMF,N,N-二甲基甲酰胺;ECT,4-氰基-4-[(乙基硫基硫代羰基)硫基]戊酸;MMA,甲基丙烯酸甲酯。表4缩写:ACVA,4,4'-偶氮双(4-氰基戊酸);AIBN,偶氮双异

丁腈;BMA,甲基丙烯酸丁酯;CTP,4-氰基-4-(硫代苯甲酰基硫基)戊酸;DMAEMA,甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯;DMF,N,N-二甲基甲酰胺;ECT,4-氰基-4-[(乙基硫基硫代羰基)硫基]戊酸;HEMA,甲基丙烯酸2-羟基乙酯;MMA,甲基丙烯酸甲酯。表5缩写:PDI,多分散指数。

[0155] 使用Wyatt Technology的DynaPro Plate Reader III测定静态光散射(SLS)和动态光散射(DLS)测量以测定嵌段1摩尔质量和PNP尺寸(例如直径)。用DYNAMICS软件进行数据采集和处理。SLS和DLS数据在以下条件下获得:

[0156] 溶剂:水

[0157] 温度:25℃

[0158] 样品体积:200μL

[0159] 数据采集设置:每次采集5秒的5次采集

表3. 试验PNP文库中使用的嵌段1试剂和反应条件的总结

PNP	嵌段1试剂、目的、量和反应条件										
	单体和量(mol)		链转移剂(CTA)和量(mol)		引发剂和量(mol)		溶剂量(mol)		时间(min)	温度(℃)	嵌段1 Rxn %产 率
1	DMAE MA	2.49E -04	CTP	2.49E- 06	ACVA	2.49E -06	DMF	2.04E -03	363	75	56.4
2	DMAE MA	2.49E -04	CTP	1.09E- 06	ACVA	1.09E -06	DMF	2.04E -03	363	75	62.1
3	DMAE MA	2.49E -04	CTP	8.54E- 07	ACVA	8.55E -07	DMF	2.04E -03	363	75	59.2
4	DMAE MA	2.49E -04	CTP	7.00E- 07	ACVA	7.01E -07	DMF	2.04E -03	363	75	57.9
5	DMAE MA	2.49E -04	CTP	5.18E- 07	ACVA	5.16E -07	DMF	2.04E -03	363	75	66.7
6	DMAE MA	2.49E -04	CTP	4.61E- 07	ACVA	4.57E -07	DMF	2.04E -03	363	75	66.6
7	DMAE MA	2.49E -04	CTP	4.13E- 07	ACVA	4.08E -07	DMF	2.04E -03	363	75	61.5
8	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.65E- 07	ACVA	3.68E -07	DMF	2.04E -03	363	75	50.6
9	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.36E- 07	ACVA	3.37E -07	DMF	2.04E -03	363	75	57.2
10	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.07E- 07	ACVA	3.12E -07	DMF	2.04E -03	363	75	56.7
11	DMAE	2.49E	CTP	1.52E-	ACVA	1.52E	DMF	2.04E	363	75	74.3

	MA	-04		06		-06		-03			
12	DMAE MA	2.49E -04	CTP	1.09E- 06	ACVA	1.09E -06	DMF	2.04E -03	363	75	73.0
13	DMAE MA	2.49E -04	CTP	8.54E- 07	ACVA	8.55E -07	DMF	2.04E -03	363	75	68.1
14	DMAE MA	2.49E -04	CTP	7.00E- 07	ACVA	7.01E -07	DMF	2.04E -03	363	75	64.6
15	DMAE MA	2.49E -04	CTP	5.18E- 07	ACVA	5.16E -07	DMF	2.04E -03	363	75	69.5
16	DMAE MA	2.49E -04	CTP	4.61E- 07	ACVA	4.57E -07	DMF	2.04E -03	363	75	57.0
17	DMAE MA	2.49E -04	CTP	4.13E- 07	ACVA	4.08E -07	DMF	2.04E -03	363	75	53.4
18	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.65E- 07	ACVA	3.68E -07	DMF	2.04E -03	363	75	66.4
19	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.36E- 07	ACVA	3.37E -07	DMF	2.04E -03	363	75	55.0
20	DMAE MA	2.49E -04	CTP	2.49E- 06	ACVA	2.49E -06	DMF	2.04E -03	363	75	66.6
21	DMAE MA	2.49E -04	CTP	1.52E- 06	ACVA	1.52E -06	DMF	2.04E -03	363	75	75.4
22	DMAE MA	2.49E -04	CTP	1.09E- 06	ACVA	1.09E -06	DMF	2.04E -03	363	75	73.6
23	DMAE MA	2.49E -04	CTP	8.54E- 07	ACVA	8.55E -07	DMF	2.04E -03	363	75	65.1
24	DMAE MA	2.49E -04	CTP	7.00E- 07	ACVA	7.01E -07	DMF	2.04E -03	363	75	71.4
25	DMAE MA	2.49E -04	CTP	5.95E- 07	ACVA	5.94E -07	DMF	2.04E -03	363	75	60.7
26	DMAE MA	2.49E -04	CTP	5.18E- 07	ACVA	5.16E -07	DMF	2.04E -03	363	75	66.6
27	DMAE MA	2.49E -04	CTP	4.61E- 07	ACVA	4.57E -07	DMF	2.04E -03	363	75	55.2
28	DMAE MA	2.49E -04	CTP	4.13E- 07	ACVA	4.08E -07	DMF	2.04E -03	363	75	55.7
29	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.65E- 07	ACVA	3.68E -07	DMF	2.04E -03	363	75	51.4
30	DMAE	2.49E	CTP	3.36E-	ACVA	3.37E	DMF	2.04E	363	75	53.3

	MA	-04		07		-07		-03			
31	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.07E- 07	ACVA	3.12E -07	DMF	2.04E -03	363	75	47.2
32	DMAE MA	2.49E -04	CTP	1.52E- 06	ACVA	1.52E -06	DMF	2.04E -03	363	75	88.7
33	DMAE MA	2.49E -04	CTP	1.09E- 06	ACVA	1.09E -06	DMF	2.04E -03	363	75	72.0
34	DMAE MA	2.49E -04	CTP	8.54E- 07	ACVA	8.55E -07	DMF	2.04E -03	363	75	65.0
35	DMAE MA	2.49E -04	CTP	5.95E- 07	ACVA	5.94E -07	DMF	2.04E -03	363	75	69.4
36	DMAE MA	2.49E -04	CTP	4.61E- 07	ACVA	4.57E -07	DMF	2.04E -03	363	75	46.1
37	DMAE MA	2.49E -04	CTP	4.13E- 07	ACVA	4.08E -07	DMF	2.04E -03	363	75	47.5
38	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.36E- 07	ACVA	3.37E -07	DMF	2.04E -03	363	75	52.3
39	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.07E- 07	ACVA	3.12E -07	DMF	2.04E -03	363	75	55.9
40	DMAE MA	2.49E -04	CTP	2.49E- 06	ACVA	2.49E -06	DMF	2.04E -03	363	75	82.3
41	DMAE MA	2.49E -04	CTP	8.54E- 07	ACVA	8.55E -07	DMF	2.04E -03	363	75	76.5
42	DMAE MA	2.49E -04	CTP	7.00E- 07	ACVA	7.01E -07	DMF	2.04E -03	363	75	71.7
43	DMAE MA	2.49E -04	CTP	4.13E- 07	ACVA	4.08E -07	DMF	2.04E -03	363	75	54.9
44	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.65E- 07	ACVA	3.68E -07	DMF	2.04E -03	363	75	54.3
45	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.36E- 07	ACVA	3.37E -07	DMF	2.04E -03	363	75	54.6
46	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.07E- 07	ACVA	3.12E -07	DMF	2.04E -03	363	75	55.0
47	DMAE MA	2.49E -04	CTP	1.09E- 06	ACVA	1.09E -06	DMF	2.04E -03	363	75	93.5
48	DMAE MA	2.49E -04	CTP	8.54E- 07	ACVA	8.55E -07	DMF	2.04E -03	363	75	79.7
49	DMAE	2.49E	CTP	5.18E-	ACVA	5.16E	DMF	2.04E	363	75	56.9

	MA	-04		07		-07		-03			
50	DMAE MA	2.49E -04	CTP	4.61E- 07	ACVA	4.57E -07	DMF	2.04E -03	363	75	52.0
51	DMAE MA	2.49E -04	CTP	4.13E- 07	ACVA	4.08E -07	DMF	2.04E -03	363	75	55.8
52	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.36E- 07	ACVA	3.37E -07	DMF	2.04E -03	363	75	51.8
53	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.07E- 07	ACVA	3.12E -07	DMF	2.04E -03	363	75	53.1
54	DMAE MA	2.49E -04	CTP	1.52E- 06	ACVA	1.52E -06	DMF	2.04E -03	363	75	86.5
55	DMAE MA	2.49E -04	CTP	8.54E- 07	ACVA	8.55E -07	DMF	2.04E -03	363	75	72.9
56	DMAE MA	2.49E -04	CTP	7.00E- 07	ACVA	7.01E -07	DMF	2.04E -03	363	75	71.5
57	DMAE MA	2.49E -04	CTP	5.95E- 07	ACVA	5.94E -07	DMF	2.04E -03	363	75	59.9
58	DMAE MA	2.49E -04	CTP	5.18E- 07	ACVA	5.16E -07	DMF	2.04E -03	363	75	63.7
59	DMAE MA	2.49E -04	CTP	4.13E- 07	ACVA	4.08E -07	DMF	2.04E -03	363	75	52.0
60	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.65E- 07	ACVA	3.68E -07	DMF	2.04E -03	363	75	54.9
61	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.36E- 07	ACVA	3.37E -07	DMF	2.04E -03	363	75	55.3
62	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.07E- 07	ACVA	3.12E -07	DMF	2.04E -03	363	75	42.2
63	DMAE MA	2.49E -04	CTP	1.52E- 06	ACVA	1.52E -06	DMF	2.04E -03	363	75	82.9
64	DMAE MA	2.49E -04	CTP	1.09E- 06	ACVA	1.09E -06	DMF	2.04E -03	363	75	71.2
65	DMAE MA	2.49E -04	CTP	5.95E- 07	ACVA	5.94E -07	DMF	2.04E -03	363	75	60.4
66	DMAE MA	2.49E -04	CTP	5.18E- 07	ACVA	5.16E -07	DMF	2.04E -03	363	75	64.9
67	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.65E- 07	ACVA	3.68E -07	DMF	2.04E -03	363	75	54.0
68	DMAE	2.49E	CTP	3.36E-	ACVA	3.37E	DMF	2.04E	363	75	44.2

	MA	-04		07		-07		-03			
69	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.07E- 07	ACVA	3.12E -07	DMF	2.04E -03	363	75	52.4
70	DMAE MA	2.49E -04	CTP	2.49E- 06	ACVA	4.97E -07	DMF	2.04E -03	363	75	52.5
71	DMAE MA	2.49E -04	CTP	1.52E- 06	ACVA	3.03E -07	DMF	2.04E -03	363	75	46.6
72	DMAE MA	2.49E -04	CTP	1.09E- 06	ACVA	2.19E -07	DMF	2.04E -03	363	75	40.2
73	DMAE MA	2.49E -04	CTP	8.54E- 07	ACVA	1.71E -07	DMF	2.04E -03	363	75	37.7
74	DMAE MA	2.49E -04	CTP	5.18E- 07	ACVA	1.03E -07	DMF	2.04E -03	363	75	27.3
75	DMAE MA	2.49E -04	CTP	4.61E- 07	ACVA	9.05E -08	DMF	2.04E -03	363	75	26.7
76	DMAE MA	2.49E -04	CTP	4.13E- 07	ACVA	8.21E -08	DMF	2.04E -03	363	75	25.1
77	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.65E- 07	ACVA	7.37E -08	DMF	2.04E -03	363	75	23.0
78	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.36E- 07	ACVA	6.74E -08	DMF	2.04E -03	363	75	22.8
79	DMAE MA	2.49E -04	CTP	2.49E- 06	ACVA	4.97E -07	DMF	2.04E -03	363	75	52.7
80	DMAE MA	2.49E -04	CTP	1.52E- 06	ACVA	3.03E -07	DMF	2.04E -03	363	75	47.6
81	DMAE MA	2.49E -04	CTP	1.09E- 06	ACVA	2.19E -07	DMF	2.04E -03	363	75	39.3
82	DMAE MA	2.49E -04	CTP	8.54E- 07	ACVA	1.71E -07	DMF	2.04E -03	363	75	37.1
83	DMAE MA	2.49E -04	CTP	7.00E- 07	ACVA	1.41E -07	DMF	2.04E -03	363	75	34.0
84	DMAE MA	2.49E -04	CTP	5.95E- 07	ACVA	1.18E -07	DMF	2.04E -03	363	75	31.8
85	DMAE MA	2.49E -04	CTP	5.18E- 07	ACVA	1.03E -07	DMF	2.04E -03	363	75	25.1
86	DMAE MA	2.49E -04	CTP	4.61E- 07	ACVA	9.05E -08	DMF	2.04E -03	363	75	25.7
87	DMAE	2.49E	CTP	4.13E-	ACVA	8.21E	DMF	2.04E	363	75	23.9

	MA	-04		07		-08		-03			
88	DMAE MA	2.49E -04	CTP	7.00E- 07	ACVA	1.41E -07	DMF	2.04E -03	363	75	27.7
89	DMAE MA	2.49E -04	CTP	8.54E- 07	ACVA	1.71E -07	DMF	2.04E -03	363	75	32.8
90	DMAE MA	2.49E -04	CTP	3.65E- 07	ACVA	7.37E -08	DMF	2.04E -03	363	75	21.0
91	DMAE MA	2.53E -04	CTP	8.42E- 07	ACVA	8.44E -07	DMF	2.03E -03	360	70	103.4
92	MMA	3.95E -04	CTP	1.32E- 06	AIBN	2.63E -07	DMF	2.04E -03	360	70	61.2
93	BMA	2.80E -04	ECT	9.32E- 07	AIBN	1.86E -07	DMF	2.01E -03	360	70	32.4
94	DMAE MA	2.53E -04	ECT	8.43E- 07	AIBN	8.44E -07	DMF	2.03E -03	360	65	101.0
95	MMA	3.96E -04	ECT	1.32E- 06	ACVA	1.32E -07	DMF	2.04E -03	360	65	13.7
96	BMA	2.80E -04	CTP	9.31E- 07	AIBN	9.32E -07	DMF	2.01E -03	360	65	32.1

表4. 试验PNP文库中使用的嵌段2试剂和反应条件的总结

PNP	嵌段 2 试剂、目的、量和反应条件										
	单体和量(mol)		大分子链转移剂 (mCTA)和量 (mol)		引发剂和量 (mol)		溶剂和量 (mol)		时间 (min)	温度 (C)	二嵌段 冻干 后%产 率
1	HEMA	2.54 E-05	p(DMAE MA), (006-A1 嵌段 1)	1.27 E-06	ACVA	1.27E -06	DMF	8.00E -04	1440	64	65.3
2	HEMA	2.70 E-05	p(DMAE MA), (006-A3 嵌段 1)	1.33 E-06	ACVA	1.33E -06	DMF	8.33E -04	1440	64	85.7
3	HEMA	2.38 E-05	p(DMAE MA), (006-A4)	1.19 E-06	ACVA	1.19E -06	DMF	7.25E -04	1440	64	77.4

			嵌段 1)								
4	HEMA	1.91 E-05	p(DMAE MA), (006-A5 嵌段 1)	9.60 E-07	ACVA	9.60E -07	DMF	5.36E -04	1440	64	56.6
5	HEMA	2.15 E-05	p(DMAE MA), (006-A7 嵌段 1)	1.08 E-06	ACVA	1.08E -06	DMF	5.92E -04	1440	64	83.8
6	HEMA	2.07 E-05	p(DMAE MA), (006-A8 嵌段 1)	1.03 E-06	ACVA	1.03E -06	DMF	5.54E -04	1440	64	87.4
7	HEMA	1.99 E-05	p(DMAE MA), (006-A9 嵌段 1)	9.78 E-07	ACVA	9.78E -07	DMF	5.32E -04	1440	64	85.5
8	HEMA	1.51 E-05	p(DMAE MA), (006-A10 嵌段 1)	7.57 E-07	ACVA	7.56E -07	DMF	3.99E -04	1440	64	95.6
9	HEMA	1.75 E-05	p(DMAE MA), (006-A11 嵌段 1)	8.71 E-07	ACVA	8.71E -07	DMF	4.56E -04	1440	64	87.4
10	HEMA	1.51 E-05	p(DMAE MA), (006-A12 嵌段 1)	7.48 E-07	ACVA	7.49E -07	DMF	3.62E -04	1440	64	90.2
11	HEMA	7.07 E-05	p(DMAE MA), (006-B2 嵌段 1)	1.55 E-06	ACVA	1.56E -06	DMF	2.67E -03	1440	64	73.3
12	HEMA	4.53 E-05	p(DMAE MA), (006-B3 嵌段 1)	9.94 E-07	ACVA	9.95E -07	DMF	1.58E -03	1440	64	71.6

13	HEMA	5.96 E-05	p(DMAE MA), (006-B4 嵌段 1)	1.31 E-06	ACVA	1.31E -06	DMF	2.22E -03	1440	64	70.3
14	HEMA	5.16 E-05	p(DMAE MA), (006-B5 嵌段 1)	1.12 E-06	ACVA	1.12E -06	DMF	1.87E -03	1440	64	87.8
15	HEMA	5.24 E-05	p(DMAE MA), (006-B7 嵌段 1)	1.15 E-06	ACVA	1.15E -06	DMF	1.90E -03	1440	64	85.3
16	HEMA	3.02 E-05	p(DMAE MA), (006-B8 嵌段 1)	6.62 E-07	ACVA	6.60E -07	DMF	1.01E -03	1440	64	86.3
17	HEMA	2.94 E-05	p(DMAE MA), (006-B9 嵌段 1)	6.35 E-07	ACVA	6.35E -07	DMF	9.77E -04	1440	64	90.9
18	HEMA	3.18 E-05	p(DMAE MA), (006-B10 嵌段 1)	6.93 E-07	ACVA	6.92E -07	DMF	1.02E -03	1440	64	84.3
19	HEMA	2.94 E-05	p(DMAE MA), (006-B11 嵌段 1)	6.50 E-07	ACVA	6.49E -07	DMF	9.96E -04	1440	64	86.3
20	HEMA	1.45 E-04	p(DMAE MA), (006-C1 嵌段 1)	2.03 E-06	ACVA	2.03E -06	DMF	5.86E -03	1440	64	74.8
21	HEMA	1.12 E-04	p(DMAE MA), (006-C2 嵌段 1)	1.57 E-06	ACVA	1.57E -06	DMF	4.41E -03	1440	64	79.8
22	HEMA	1.02	p(DMAE	1.44	ACVA	1.44E	DMF	4.03E	1440	64	82.6

		E-04	MA), (006-C3 嵌段 1)	E-06		-06		-03			
23	HEMA	9.06 E-05	p(DMAE MA), (006-C4 嵌段 1)	1.27 E-06	ACVA	1.27E -06	DMF	3.55E -03	1440	64	82.9
24	HEMA	6.83 E-05	p(DMAE MA), (006-C5 嵌段 1)	9.54 E-07	ACVA	9.53E -07	DMF	2.56E -03	1440	64	86.9
25	HEMA	6.52 E-05	p(DMAE MA), (006-C6 嵌段 1)	9.16 E-07	ACVA	9.17E -07	DMF	2.50E -03	1440	64	94.4
26	HEMA	6.91 E-05	p(DMAE MA), (006-C7 嵌段 1)	9.62 E-07	ACVA	9.63E -07	DMF	2.61E -03	1440	64	89.5
27	HEMA	6.36 E-05	p(DMAE MA), (006-C8 嵌段 1)	8.91 E-07	ACVA	8.92E -07	DMF	2.44E -03	1440	64	97.0
28	HEMA	5.01 E-05	p(DMAE MA), (006-C9 嵌段 1)	6.99 E-07	ACVA	6.99E -07	DMF	1.86E -03	1440	64	90.0
29	HEMA	4.93 E-05	p(DMAE MA), (006-C10 嵌段 1)	6.95 E-07	ACVA	6.96E -07	DMF	1.86E -03	1440	64	90.1
30	HEMA	5.40 E-05	p(DMAE MA), (006-C11 嵌段 1)	7.51 E-07	ACVA	7.53E -07	DMF	2.02E -03	1440	64	90.4
31	HEMA	1.99 E-05	p(DMAE MA),	2.83 E-07	ACVA	2.82E -07	DMF	6.23E -04	1440	64	82.4

			(006-C12 嵌段 1)								
32	HEMA	1.87 E-04	p(DMAE MA), (006-D2 嵌段 1)	1.92 E-06	ACVA	1.92E -06	DMF	7.52E -03	1440	64	73.9
33	HEMA	9.69 E-05	p(DMAE MA), (006-D3 嵌段 1)	9.94 E-07	ACVA	9.95E -07	DMF	3.77E -03	1440	64	83.0
34	HEMA	1.12 E-04	p(DMAE MA), (006-D4 嵌段 1)	1.15 E-06	ACVA	1.15E -06	DMF	4.45E -03	1440	64	81.5
35	HEMA	1.09 E-04	p(DMAE MA), (006-D6 嵌段 1)	1.12 E-06	ACVA	1.12E -06	DMF	4.31E -03	1440	64	85.9
36	HEMA	6.28 E-05	p(DMAE MA), (006-D8 嵌段 1)	6.48 E-07	ACVA	6.46E -07	DMF	2.45E -03	1440	64	94.7
37	HEMA	5.56 E-05	p(DMAE MA), (006-D9 嵌段 1)	5.74 E-07	ACVA	5.74E -07	DMF	2.15E -03	1440	64	96.7
38	HEMA	3.42 E-05	p(DMAE MA), (006-D11 嵌段 1)	3.54 E-07	ACVA	3.53E -07	DMF	1.21E -03	1440	64	90.7
39	HEMA	3.73 E-05	p(DMAE MA), (006-D12 嵌段 1)	3.88 E-07	ACVA	3.89E -07	DMF	1.33E -03	1440	64	76.5
40	HEMA	1.80 E-04	p(DMAE MA), (006-E1)	1.46 E-06	ACVA	1.47E -06	DMF	7.27E -03	1440	64	81.5

			嵌段 1)								
41	HEMA	1.08 E-04	p(DMAE MA), (006-E4 嵌段 1)	8.80 E-07	ACVA	8.81E -07	DMF	4.23E -03	1440	64	80.6
42	HEMA	1.32 E-04	p(DMAE MA), (006-E5 嵌段 1)	1.07 E-06	ACVA	1.07E -06	DMF	5.28E -03	1440	64	81.7
43	HEMA	6.04 E-05	p(DMAE MA), (006-E9 嵌段 1)	4.94 E-07	ACVA	4.92E -07	DMF	2.32E -03	1440	64	92.0
44	HEMA	4.29 E-05	p(DMAE MA), (006-E10 嵌段 1)	3.52 E-07	ACVA	3.53E -07	DMF	1.58E -03	1440	64	82.2
45	HEMA	6.52 E-05	p(DMAE MA), (006-E11 嵌段 1)	5.32 E-07	ACVA	5.32E -07	DMF	2.52E -03	1440	64	81.3
46	HEMA	5.72 E-05	p(DMAE MA), (006-E12 嵌段 1)	4.66 E-07	ACVA	4.67E -07	DMF	2.17E -03	1440	64	70.6
47	HEMA	3.47 E-04	p(DMAE MA), (006-F3 嵌段 1)	2.34 E-06	ACVA	2.34E -06	DMF	1.44E -02	1440	64	76.5
48	HEMA	1.83 E-04	p(DMAE MA), (006-F4 嵌段 1)	1.23 E-06	ACVA	1.23E -06	DMF	7.42E -03	1440	64	77.4
49	HEMA	1.29 E-04	p(DMAE MA), (006-F7 嵌段 1)	8.68 E-07	ACVA	8.67E -07	DMF	5.22E -03	1440	64	80.4

50	HEMA	1.20 E-04	p(DMAE MA), (006-F8 嵌段 1)	8.09 E-07	ACVA	8.10E -07	DMF	4.87E -03	1440	64	81.1
51	HEMA	1.06 E-04	p(DMAE MA), (006-F9 嵌段 1)	7.13 E-07	ACVA	7.14E -07	DMF	4.24E -03	1440	64	75.3
52	HEMA	2.62 E-05	p(DMAE MA), (006-F11 嵌段 1)	1.79 E-07	ACVA	1.78E -07	DMF	8.80E -04	1440	64	83.2
53	HEMA	9.45 E-05	p(DMAE MA), (006-F12 嵌段 1)	6.36 E-07	ACVA	6.35E -07	DMF	3.77E -03	1440	64	77.4
54	HEMA	3.09 E-04	p(DMAE MA), (006-G2 嵌段 1)	1.77 E-06	ACVA	1.77E -06	DMF	1.28E -02	1440	64	78.8
55	HEMA	2.27 E-04	p(DMAE MA), (006-G4 嵌段 1)	1.30 E-06	ACVA	1.30E -06	DMF	9.33E -03	1440	64	77.3
56	HEMA	2.40 E-04	p(DMAE MA), (006-G5 嵌段 1)	1.38 E-06	ACVA	1.38E -06	DMF	9.90E -03	1440	64	75.0
57	HEMA	1.54 E-04	p(DMAE MA), (006-G6 嵌段 1)	8.86 E-07	ACVA	8.85E -07	DMF	6.30E -03	1440	64	82.7
58	HEMA	1.17 E-04	p(DMAE MA), (006-G7 嵌段 1)	6.72 E-07	ACVA	6.71E -07	DMF	4.68E -03	1440	64	83.9
59	HEMA	9.14	p(DMAE	5.26	ACVA	5.24E	DMF	3.66E	1440	64	74.6

		E-05	MA), (006-G9 嵌段 1)	E-07		-07		-03			
60	HEMA	9.93 E-05	p(DMAE MA), (006-G10 嵌段 1)	5.70 E-07	ACVA	5.71E -07	DMF	3.97E -03	1440	64	N/A
61	HEMA	8.66 E-05	p(DMAE MA), (006-G11 嵌段 1)	4.97 E-07	ACVA	4.96E -07	DMF	3.43E -03	1440	64	72.8
62	HEMA	6.36 E-05	p(DMAE MA), (006-G12 嵌段 1)	3.65 E-07	ACVA	3.64E -07	DMF	2.51E -03	1440	64	65.1
63	HEMA	3.78 E-04	p(DMAE MA), (006-H2 嵌段 1)	1.89 E-06	ACVA	1.89E -06	DMF	1.57E -02	1440	64	70.6
64	HEMA	3.50 E-04	p(DMAE MA), (006-H3 嵌段 1)	1.75 E-06	ACVA	1.75E -06	DMF	1.46E -02	1440	64	74.1
65	HEMA	1.87 E-04	p(DMAE MA), (006-H6 嵌段 1)	9.35 E-07	ACVA	9.35E -07	DMF	7.69E -03	1440	64	70.8
66	HEMA	1.78 E-04	p(DMAE MA), (006-H7 嵌段 1)	8.90 E-07	ACVA	8.92E -07	DMF	7.28E -03	1440	64	81.8
67	HEMA	1.16 E-04	p(DMAE MA), (006-H10 嵌段 1)	5.78 E-07	ACVA	5.78E -07	DMF	4.67E -03	1440	64	81.9
68	HEMA	7.23 E-05	p(DMAE MA),	3.60 E-07	ACVA	3.60E -07	DMF	2.86E -03	1440	64	83.0

			(006-H11 嵌段 1)								
69	HEMA	8.50 E-05	p(DMAE MA), (006-H12 嵌段 1)	4.23 E-07	ACVA	4.25E -07	DMF	3.35E -03	1440	64	70.6
70	HEMA	3.75 E-05	p(DMAE MA), (007-A1 嵌段 1)	1.88 E-06	ACVA	3.75E -07	DMF	1.92E -03	1440	64	55.7
71	HEMA	1.72 E-05	p(DMAE MA), (007-A2 嵌段 1)	8.63 E-07	ACVA	1.72E -07	DMF	7.77E -04	1440	64	71.1
72	HEMA	1.99 E-05	p(DMAE MA), (007-A3 嵌段 1)	9.99 E-07	ACVA	2.00E -07	DMF	9.65E -04	1440	64	76.6
73	HEMA	1.30 E-05	p(DMAE MA), (007-A4 嵌段 1)	6.51 E-07	ACVA	1.30E -07	DMF	5.74E -04	1440	64	80.3
74	HEMA	6.12 E-06	p(DMAE MA), (007-A7 嵌段 1)	3.07 E-07	ACVA	6.14E -08	DMF	2.28E -04	1440	64	73.5
75	HEMA	3.34 E-06	p(DMAE MA), (007-A8 嵌段 1)	1.68 E-07	ACVA	3.35E -08	DMF	7.03E -05	1440	64	72.3
76	HEMA	5.40 E-06	p(DMAE MA), (007-A9 嵌段 1)	2.71 E-07	ACVA	5.42E -08	DMF	1.97E -04	1440	64	66.6
77	HEMA	5.01 E-06	p(DMAE MA), (007-A10 嵌段 1)	2.52 E-07	ACVA	5.03E -08	DMF	1.86E -04	1440	64	73.6

			嵌段 1)								
78	HEMA	5.24 E-06	p(DMAE MA), (007-A11 嵌段 1)	2.61 E-07	ACVA	5.21E -08	DMF	1.96E -04	1440	64	77.6
79	HEMA	7.27 E-05	p(DMAE MA), (007-B1 嵌段 1)	1.59 E-06	ACVA	3.18E -07	DMF	3.94E -03	1440	64	45.1
80	HEMA	3.45 E-05	p(DMAE MA), (007-B2 嵌段 1)	7.54 E-07	ACVA	1.51E -07	DMF	1.76E -03	1440	64	67.5
81	HEMA	2.10 E-05	p(DMAE MA), (007-B3 嵌段 1)	4.58 E-07	ACVA	9.17E -08	DMF	1.02E -03	1440	64	66.6
82	HEMA	3.26 E-05	p(DMAE MA), (007-B4 嵌段 1)	7.13 E-07	ACVA	1.43E -07	DMF	1.71E -03	1440	64	52.8
83	HEMA	1.84 E-05	p(DMAE MA), (007-B5 嵌段 1)	4.02 E-07	ACVA	8.06E -08	DMF	9.00E -04	1440	64	76.9
84	HEMA	2.63 E-05	p(DMAE MA), (007-B6 嵌段 1)	5.76 E-07	ACVA	1.15E -07	DMF	1.37E -03	1440	64	60.8
85	HEMA	1.81 E-05	p(DMAE MA), (007-B7 嵌段 1)	3.96 E-07	ACVA	7.92E -08	DMF	9.29E -04	1440	64	70.2
86	HEMA	2.14 E-05	p(DMAE MA), (007-B8 嵌段 1)	4.67 E-07	ACVA	9.35E -08	DMF	1.11E -03	1440	64	69.4

87	HEMA	1.64 E-05	p(DMAE MA), (007-B9 嵌段 1)	3.58 E-07	ACVA	7.17E -08	DMF	8.34E -04	1440	64	79.0
88	HEMA	8.48 E-05	p(DMAE MA), (007-E5 嵌段 1)	6.90 E-07	ACVA	1.38E -07	DMF	4.76E -03	1440	64	62.9
89	HEMA	1.45 E-04	p(DMAE MA), (007-F4 嵌段 1)	9.74 E-07	ACVA	1.95E -07	DMF	8.18E -03	1440	64	49.4
90	HEMA	5.07 E-05	p(DMAE MA), (007-E10 嵌段 1)	4.12 E-07	ACVA	8.24E -08	DMF	2.82E -03	1440	64	46.5
91	MMA	3.17 E-04	p(DMAE MA), (009-A10 嵌段 1)	1.06 E-06	ACVA	1.06E -06	DMF	9.27E -04	1440	60	30.5
92	DMAE MA	8.08 E-04	p(MMA), (009-E8 嵌段 1)	2.69 E-06	AIBN	5.39E -07	DMF	1.72E -03	1440	60	61.9
93	DMAE MA	9.92 E-04	p(BMA), (009-G2 嵌段 1)	3.31 E-06	AIBN	6.61E -07	DMF	2.11E -03	1440	60	74.4
94	BMA	7.75 E-04	p(DMAE MA), (011-B1 嵌段 1)	2.58 E-06	AIBN	2.58E -06	DMF	1.74E -03	1440	60	17.3
95	DMAE MA	1.25 E-04	p(MMA), (011-E6 嵌段 1)	4.16 E-07	ACVA	4.17E -08	DMF	2.66E -04	1440	60	21.2
96	DMAE MA	2.71 E-04	p(BMA), (011-G7 嵌段 1)	9.04 E-07	AIBN	9.04E -07	DMF	5.78E -04	1440	60	53.6

表5. 试验PNP文库表征数据的总结

PNP	嵌段 I DynaPro 结果 (摩尔质量, kDa)	DynaPro DLS Z-平均结果 (尺寸, nm)	尺寸 PDI (目标<0.3)
1	16.3	386.9	多模型
2	16.8	574.3	多模型
3	17.9	331.8	0.121
4	21.6	345.1	0.152
5	22.3	355.8	0.483
6	23.3	379.7	0.268
7	22.7	365.7	0.219
8	23.9	317.8	0.040
9	24.1	296.2	0.137
10	27.2	323.9	0.254
11	17.4	1017.8	0.166
12	26.9	1368.9	多模型
13	18.7	450.2	0.087
14	20.9	389.2	0.152
15	21.9	291.5	0.111
16	31.2	361	0.243
17	30.3	317.7	0.201
18	35.0	345.3	0.114
19	30.7	267.1	0.137
20	12.1	1383	0.238
21	17.7	459	0.301
22	18.8	436.7	0.314
23	18.6	448	0.492
24	26.7	422.8	0.368
25	24.1	333	0.214
26	25.1	275.6	多模型
27	22.8	318.3	0.219
28	28.9	342	0.557
29	27.0	222.5	多模型
30	26.5	251.3	0.48
31	62.1	207.3	0.548
32	17.0	522.5	0.435
33	26.4	477.6	多模型
34	20.8	369.9	0.237
35	22.9	321.4	0.276
36	26.4	282.4	0.229
37	30.4	319.1	0.351
38	54.2	262.3	0.202
39	53.1	315.5	0.171
40	20.8	730.2	多模型
41	31.9	379.8	0.332
42	24.3	309.2	0.237
43	40.9	317.8	0.338
44	56.5	1186.1	0.271

45	37.7	386.4	0.153
46	43.2	279.6	0.138
47	14.7	413.3	0.29
48	23.6	351	0.218
49	24.2	266.7	0.524
50	24.0	249.3	0.401
51	29.0	269.9	0.371
52	105.1	271.2	0.074
53	30.4	302.5	0.145
54	18.0	375.2	多模型
55	20.5	440.4	0.496
56	19.0	296.3	0.109
57	24.8	277.1	0.475
58	34.7	299.6	0.393
59	36.0	269	0.351
60	34.9	264.8	0.181
61	40.5	353.1	0.138
62	41.3	230.5	0.151
63	16.2	354.5	多模型
64	15.0	355.5	0.334
65	23.7	332.6	0.231
66	26.6	253.4	0.217
67	34.6	294.3	0.151
68	44.3	275.2	0.207
69	45.6	404.8	0.287
70	9.4	2023.5	0.020
71	18.3	473.2	0.521
72	13.5	549.2	0.153
73	19.7	568	多模型
74	30.0	262	0.353
75	53.7	229.4	多模型
76	31.3	230.7	0.444
77	30.3	387.4	多模型
78	29.5	266.7	多模型
79	11.4	1155.7	多模型
80	21.3	619.2	0.198
81	28.9	337.7	0.053
82	17.5	336	0.13
83	28.8	90.5	多模型
84	19.0	251.3	0.164
85	21.1	360.6	多模型
86	18.8	225.3	多模型
87	22.4	168	多模型
88	13.1	298.6	0.217
89	11.0	281	0.314
90	16.3	300	0.503
91	29.0	214	0.293

92	9.1	14.2	0.412
93	3.9	21.2	多模型
94	15.6	432.8	多模型
95	13.2	268.9	多模型
96	14.2	657.2	0.356

[0160] 实施例6:

[0161] 组合物实施例3(CE3):与胺末端核酸构建体直接酰胺化与PNP缀合的核酸构建体

[0162] 使用含有至少一个羧基端基的CTA制备的RAFT共聚物进一步用胺末端DNA条形码官能化。将RAFT共聚物以约12mg/mL转移到MES缓冲液中。将样品超声处理30分钟。将EDC试剂和磺基-NHS试剂分别以10:1和25:1的试剂与PNP的摩尔比加入聚合物。将样品在室温下温育至少10分钟以允许反应发生。通过具有30kDa的截留分子量的膜,经由以约3000×g离心约15分钟,过滤反应体积。弃去滤液,并向保留物中添加无菌PBS以重构为10mg/mL聚合物。将具有连接至5'端的伯胺基团的核酸构建体加入聚合物,并将样品温育至少15分钟。将样品转移到amicon ultra-4离心管(MWCO 30kDa,最大3.5mL/管)并以4,000×g离心15分钟以除去任何未结合的核酸构建体。弃去滤液(其含有未结合的核酸构建体),并向保留物中添加无菌PBS,至8mg/mL聚合物的终浓度。使用设计为结合核酸构建体上的引物结合片段的引物,经由PCR扩增缀合的条形码。经由在琼脂糖凝胶上的凝胶电泳检测扩增子。泳道中双带的存在(图9)指示扩增子的存在,显示核酸构建体与PNP结合。

[0163] 将直接酰胺化方法用于将10个独特条形码连接至10个独特PNP。按照实施例5中所示的试剂制备10个独特的PNP。

[0164] 随后,将直接酰胺化方法用于将10个独特DNA条形码连接至各个PNP,给予其每个独特的标记。核酸构建体-PNP负载有编码tdTomato红色荧光蛋白的表达的pDNA,并然后将其用于以约0.024mg/mL PNP处理HEK-293T细胞(在以每孔20,000个细胞接种于96孔板中后24小时)。将它们放置以温育另外的48小时,此时,经由使用Texas Red滤光片组的荧光显微镜观察有效载荷的表达(图10)。这提供了核酸构建体-PNP能够被哺乳动物细胞摄取并递送有效载荷的证据,如红色荧光图像所示。

[0165] 然后,将直接酰胺化方法用于将88个独特条形码连接至88个独特PNP。按照实施例5中所示的试剂制备88个独特的PNP。然后,将酰胺化方法用于将88个独特的DAN条形码连接至各个PNP,给予其每个独特的标记。核酸构建体-PNP负载有编码tdTomato红色荧光蛋白的表达的pDNA,并然后将其用于以约0.024mg/mL PNP处理HEK-293T细胞(在以每孔20,000个细胞接种于96孔板中后24小时)。将它们放置以温育另外的48小时,此时,使用Cytotoflex经由流式细胞术测量有效载荷的表达(图11(a)-(c))。这提供了一些核酸构建体-PNP能够被哺乳动物细胞摄取的证据。还使用zombie染料对细胞进行活/死染色,并经由流式细胞术测量细胞活力(图11(d)-(e)),显示PNP具有相对低的细胞毒性,对于绝大多数PNP而言具有大于75%的细胞活力数量。

[0166] 实施例7

[0167] 用于体外和体内筛选核酸构建体-PNP的方法。

[0168] 将由表2中的配方产生的聚合物纳米颗粒(其具有经由亲和素-生物素连接而连接的96个独特条形码)的合并样品用于测量HEK293T细胞中的体外细胞摄取和细胞毒性,并用于测量小鼠中体内施用的生物分布。核酸构建体-PNP在无菌盐溶液中配制,并在体内给药

前在4℃下储存最长达1个月。使用HEK293T细胞,用0.024mg/mL PNP,以250ng或150ng/孔pDNA处理浓度体外评估细胞摄取效率和细胞毒性。细胞摄取由荧光显微镜证明。使用分层随机程序将动物分配到剂量组,所述分层随机程序设计为根据性别维持类似组平均体重。经由单次推注静脉内尾静脉注射向动物施用对照或测试制品。测试剂量范围为0-150mg/kg,其中在35%的150mg/kg的动物中观察到不良临床事件。从所有动物中收集血液和组织,并在液氮中速冻。

[0169] 实施例8:

[0170] 从体外生物样品中提取核酸构建体-PNP。

[0171] 将10-20mg的组织置于Tris-EDTA裂解缓冲液中,并使用TissueLyser珠磨系统和5mm不锈钢珠粒进行均质化。在25Hz以5-7分钟的间隔进行均质化,直到溶液在外观上均匀。然后将蛋白酶K加入裂解物用于蛋白消化,并在Thermomixer中在55℃下温育2-4小时。使用QIAamp 96DNA提取试剂盒和Qiacube HT仪器,根据制造商的方案,从组织裂解物中提取DNA。使用NanoDrop测定分离的样品的浓度和纯度。

[0172] 实施例9:

[0173] 核酸构建体中的多核苷酸条形码的PCR扩增。

[0174] 聚合酶链式反应用于由提取的核酸构建体产生扩增子。使用单个通用引物集进行PCR,所述通用引物与条形码上的通用扩增位点退火,从而在单个反应中扩增样品内的所有独特条形码。使用电泳(琼脂糖凝胶或生物分析仪)测定样品内的条形码的阳性扩增,其由在约120bp处的带的存在指示。

[0175] 实施例10:

[0176] 文库制备和核酸构建体的测序。

[0177] 由在第一阶段PCR扩增期间生成的扩增子制备测序文库。我们的通用引物还含有悬突序列,其使得能够连接用于测序的索引接头。通过PCR将Illumina双端唯一索引(Unique Dual Index)与扩增子上的悬突退火。然后将单独的索引文库(indexed library)等量合并,并使用NucleoSpin凝胶和PCR Clean-up试剂盒,根据制造商的方案纯化。使用Qubit dsDNA高灵敏度测定试剂盒和Qubit荧光计测定最终测序文库的摩尔浓度。文库掺有2% PhiX,稀释至1.8pM,并加载到高通量300次循环NextSeq测序盒(High Output 300cycle NextSeq sequencing cartridge)上。使用NextSeq550仪器进行双端测序。

[0178] 实施例11:

[0179] 序列分析和生物信息学

[0180] 从各个样品ID合并的读段被解复用成PE FASTQ文件,并合并成单个文件。对合并的读段进行处理以鉴定含有5'和3'侧翼接头二者的那些。然后,针对含有正确条形码长度的序列,向下选择修剪的读段。由这些向下选择的序列生成条形码计数,并根据它们是被掺入的还是随机的来进行标记。然后将条形码计数相对于样品中FASTQ读段的数量进行归一化。

[0181] 假设的实施例:

[0182] 作为示例,在一个说明性实施方案中,本公开的快速DBTL技术可用于开发用于由超氧化物歧化酶1(SOD1)中的毒性、功能获得性突变而引起的肌萎缩性侧索硬化(ALS)形式的基因疗法。该基因疗法可涉及经由非病毒基因递送载体递送CRISPR碱基编辑蛋白,以使

小胶质细胞中的突变SOD1蛋白的产生失活,所述小胶质细胞是调节疾病的进展但对有效的病毒转导仍然是难治性的细胞类型。这将使得能够实现对于ALS的安全且有效的治疗性“hit-and-run”编辑。

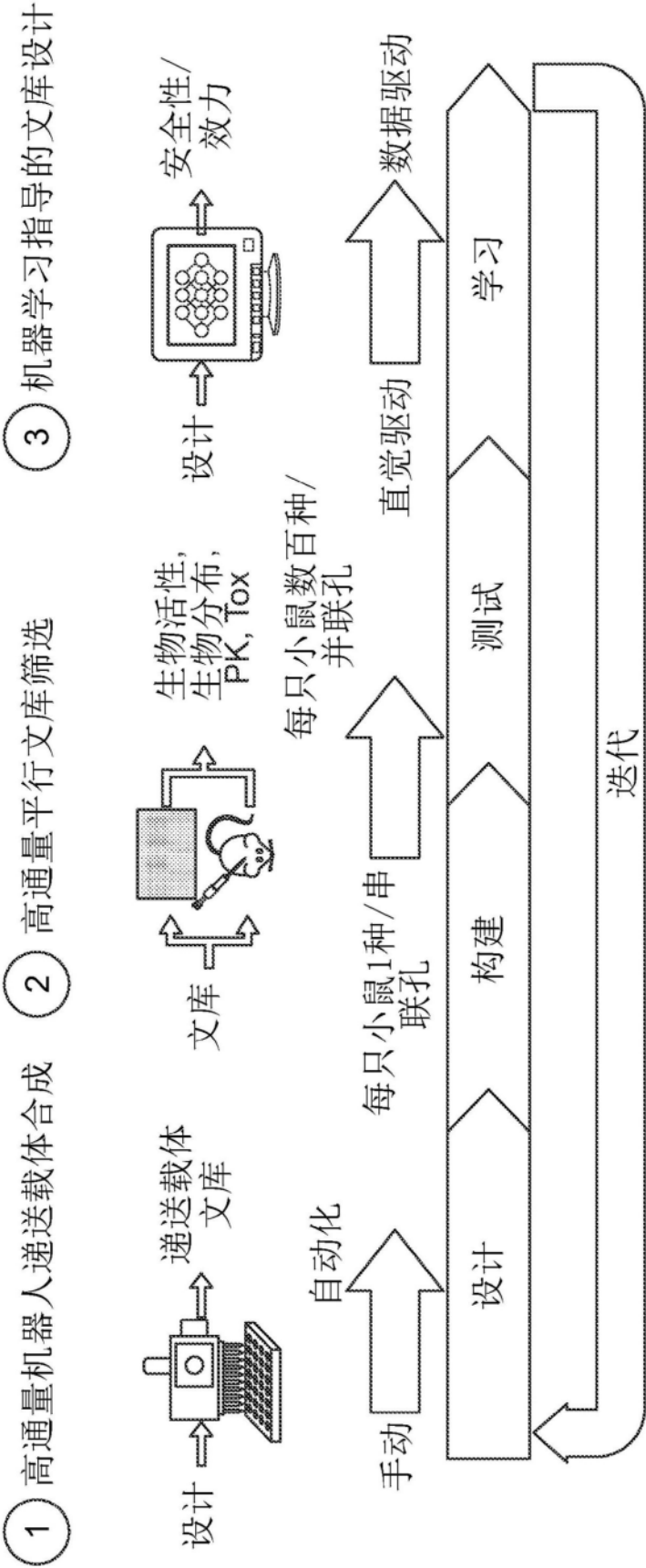
[0183] 可用本文中所述的方法治疗的一个示例性疾病是ALS。ALS是一种快速进行性的、麻痹性的、并且不变地致命的病症,其特征在于脊髓和脑中运动神经元的选择性丧失。尽管ALS的大多数病例是散发性的,但SOD1(一种通常将超氧阴离子转化成氧和过氧化氢的普遍表达的金属酶)中显性遗传的突变占有所有遗传或家族性形式的ALS的最多达20%。碱基编辑器是最近出现的基因编辑模式,其能够在DNA中引入靶向的单碱基取代而不需要双链断裂(DSB)。碱基编辑器由催化受损的Cas9核酸酶变体(称为Cas9切口酶)以及核碱基脱氨酶的融合物组成。该实施例将依赖于碱基编辑器,尤其是胞苷碱基编辑器(CBE)催化靶基因序列中CGA、CAG或CAA三联体处的C>T碱基转变的能力,其产生触发通过无义介导的衰变降解靶mRNA(其为细胞用于防止截短的蛋白形成的监视机制)的框内终止密码子。使用该方法,SOD1将以不需要DSB且不依赖于随机和诱变的NHEJ修复途径的方式被灭活,因此克服对于ALS而言CRISPR-Cas9的临床实施所面临的两个主要限制。因此,尽管第一代CRISPR被认为是基因编辑的“剪切和粘贴”,但碱基编辑器被认为是“橡皮擦和铅笔”功能,其允许对基因组进行精确的单碱基编辑,为革命性的ALS治疗开启了新机制。然而,基因递送的创新已显著滞后于基因编辑技术本身的创新。因此,将碱基编辑系统有效递送至参与驱动ALS的进展的特定细胞类型代表了阻碍其安全和有效地实施该病症的治疗的关键限制。非病毒递送载体将用于解决这些限制中的许多。

[0184] 在该说明性的实施例中,快速DBTL技术可以通过数百种不同的聚合物纳米颗粒候选来迭代,其使用不同的聚合物纳米颗粒文库的自动化高通量合成、条形码化文库的平行体外和体内筛选和机器学习算法来分析大数据集和预测用于快速迭代的新文库。图1呈现了简化流程图,其示出了基于自动合成、高通量测试和机器学习设计的非病毒基因递送开发的DBTL循环。

[0185] 假设的实施例:

[0186] 在一个方面中,可以在高通量体外和体内平台中筛选数百种的包封CBE mRNA的聚合物纳米颗粒(PNP)的文库。在说明性实施方案中,合成超过500种PNP,并经由DNA条形码进行独特标记和追踪。高度通用的基于可逆加成-断裂链转移(RAFT)聚合的PNP平台由于其灵活性、再现性和可扩展性而将被使用。参见K.Sims等人,“Rigor and reproducibility in polymer nanoparticle synthesis and characterization,”*Rsc Advances* 2020,10(5), 2513-2518(其通过引用并入本文)。如图2中所示,RAFT聚合平台可以用于生成具有各种不同尺寸、电荷和化学组成的高度单分散的PNP。可以将PNP功能化以连接细胞穿透肽,以使得能够实现更高级的功能性和对载体和负荷二者的保护。在一些实施方案中,PNP可以用量子点和其他生物标记物经由亲和素-生物素缀合来标记。参见A.Duong等人,“Scalable, Semicontinuous Production of Micelles Encapsulating Nanoparticles via Electrospray,”*Langmuir* 2014,30(14),3939-3948.(其通过引用并入本文)。小胶质细胞非病毒递送载体与碱基编辑有效载荷的这种组合是高度创新的,因为它具有导致ALS的新疗法的潜力。此外,本公开的DBTL技术可推广至使得能够产生能够进入ALS中涉及的其他细胞类型的先进非病毒递送载体。

[0187] 如上所述,文库合成后,然后可在小胶质细胞系中体外快速测试这些PNP的毒性、炎症和mRNA递送效率(经由GFP表达)。平行地,可使用经由鞘内注射递送至ALS的G93A-SOD1小鼠模型的脑脊液(CSF)的负载的纳米颗粒,使用编码生物发光荧光素酶的mRNA来评估整个文库的生物分布和毒性,所述生物发光荧光素酶可经由体外成像系统(IVIS)来追踪。该筛选应产生三个大数据集,其包括颗粒物理特性、体外生物活性和体内生物分布和毒性,它们一起将为将在第二次迭代中合成的新的非病毒递送载体文库的明智设计(informed design)提供基础。然后可以在经修饰以表达突变SOD1蛋白的小胶质细胞系中测试该新文库的功能基因编辑测试。PNP可以负载有编码设计为灭活GFP和SOD1(其通过荧光测量和测序来检测)的CBE的mRNA。



用于非病毒基因递送开发的DBTL循环基于三大支柱：
自动化合成、高通量测试和机器学习设计。

图1

59

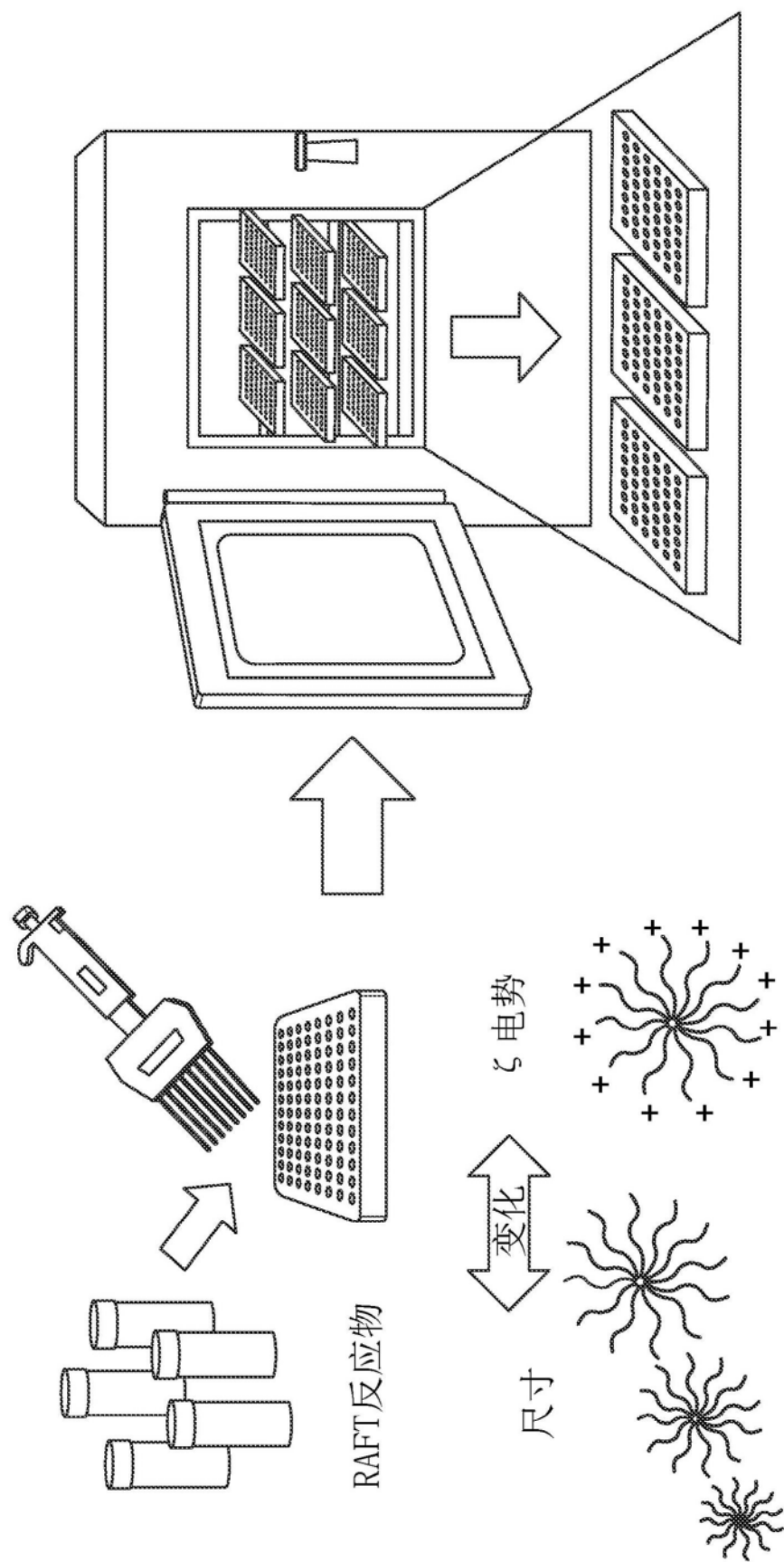


图2

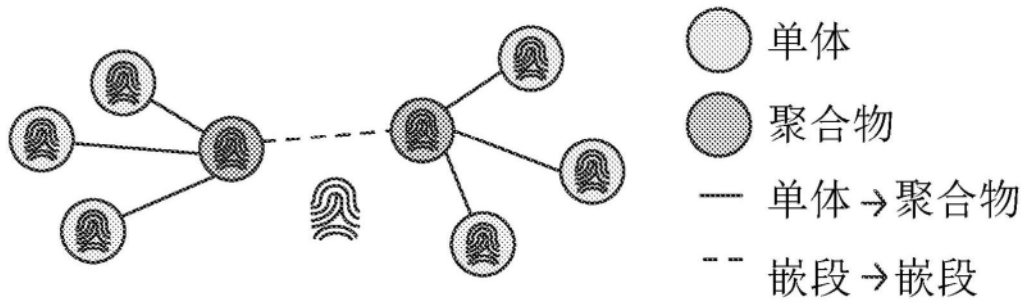


图3A

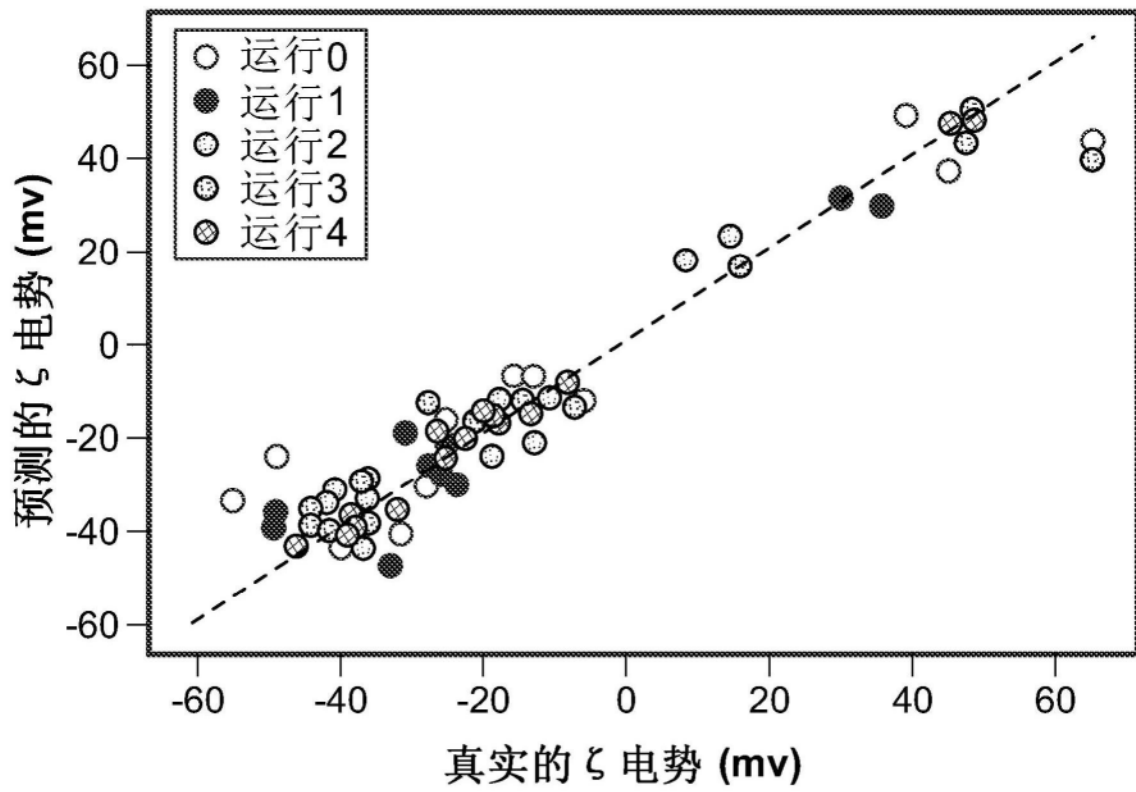


图3B



图4

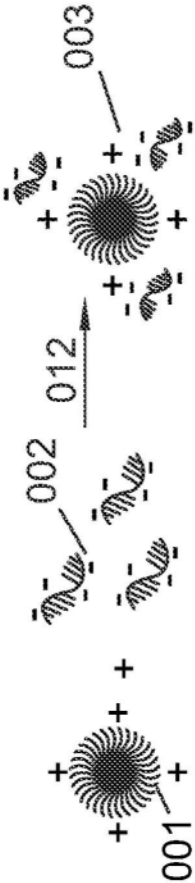


图5A

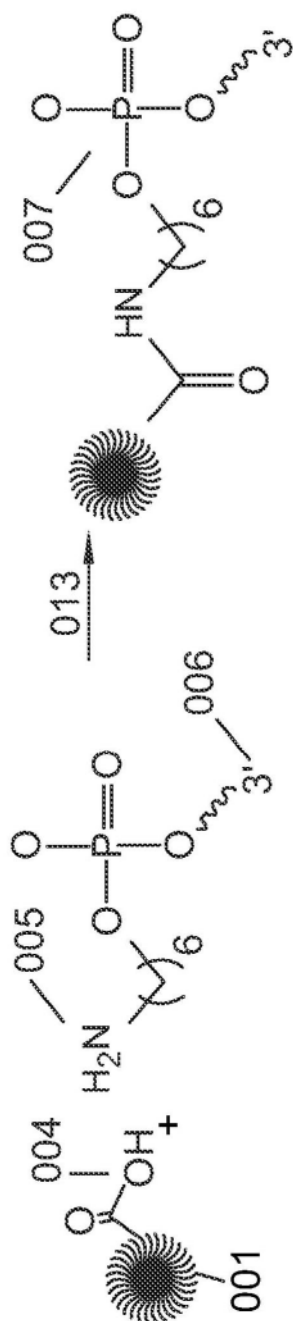


图5B

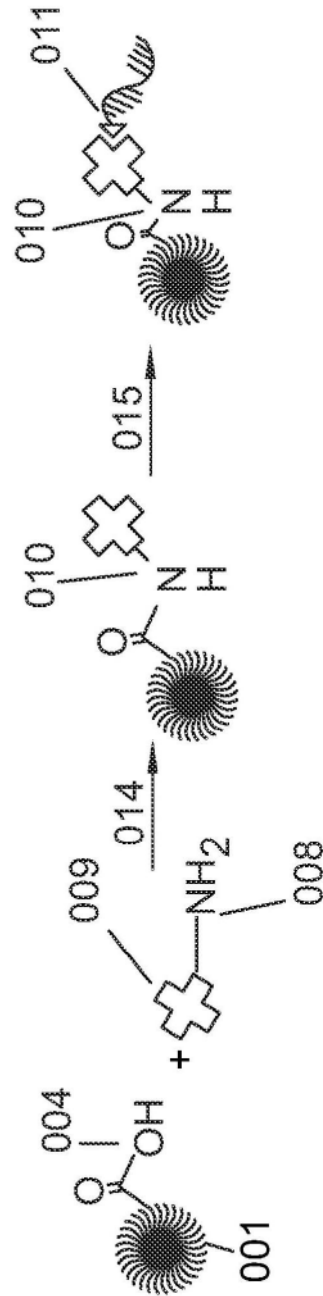


图5C

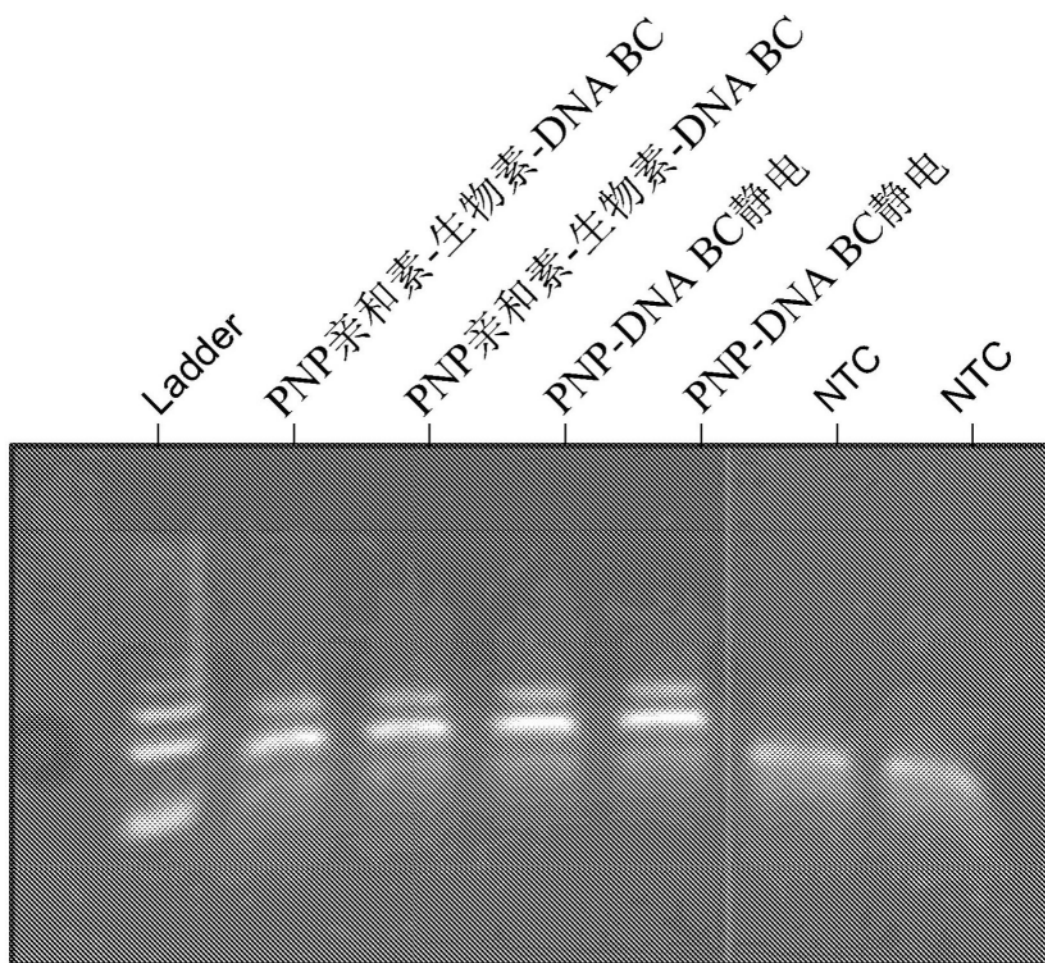


图6

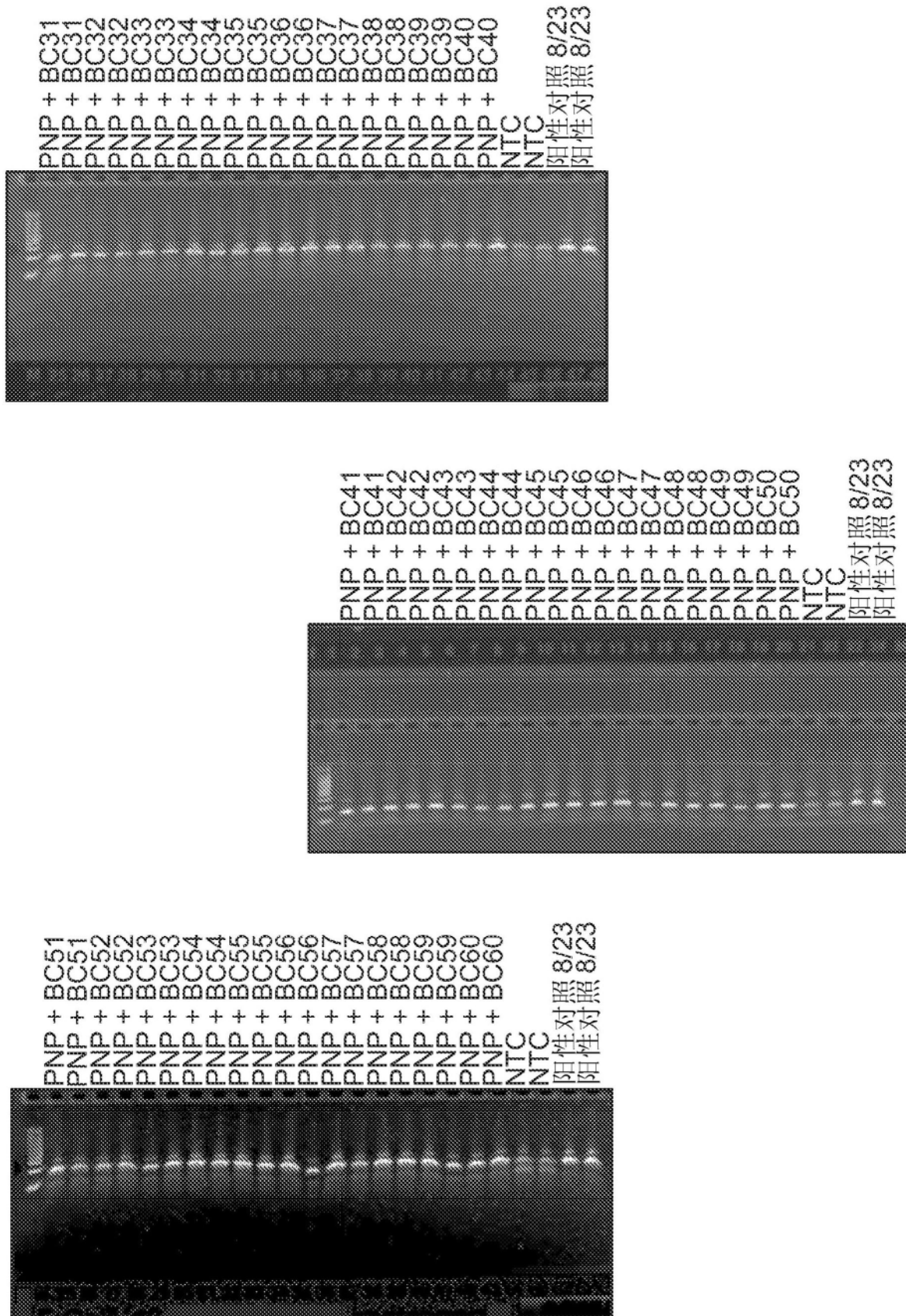


图7(续)

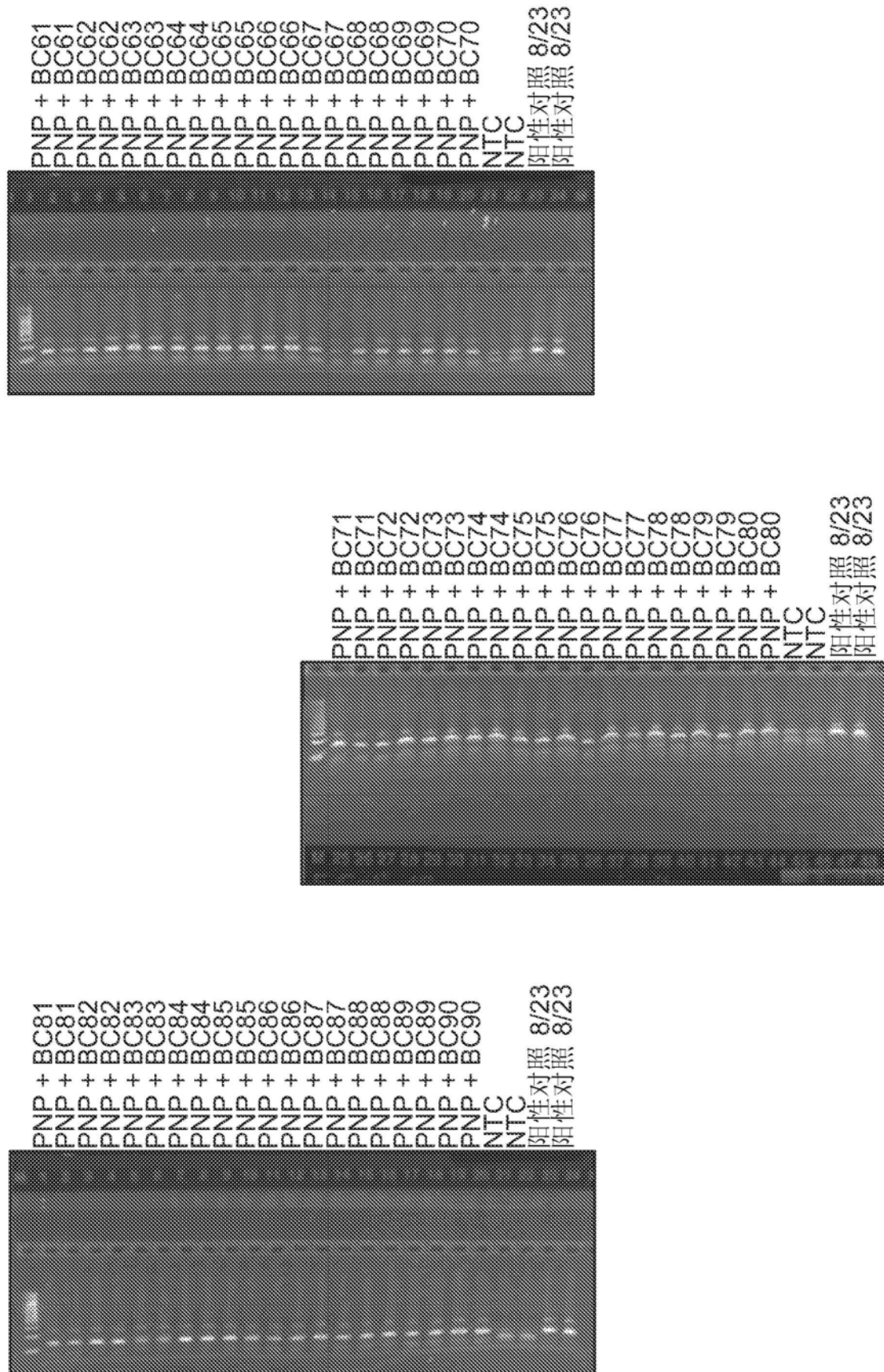


图7(续)

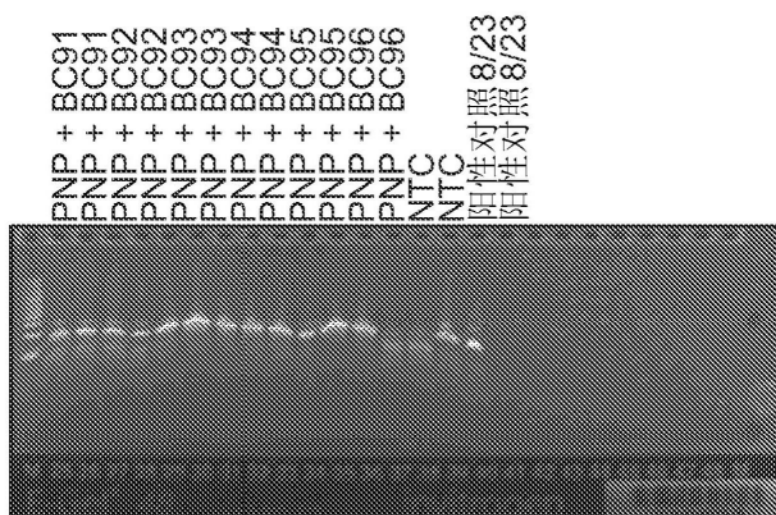


图7 (续)

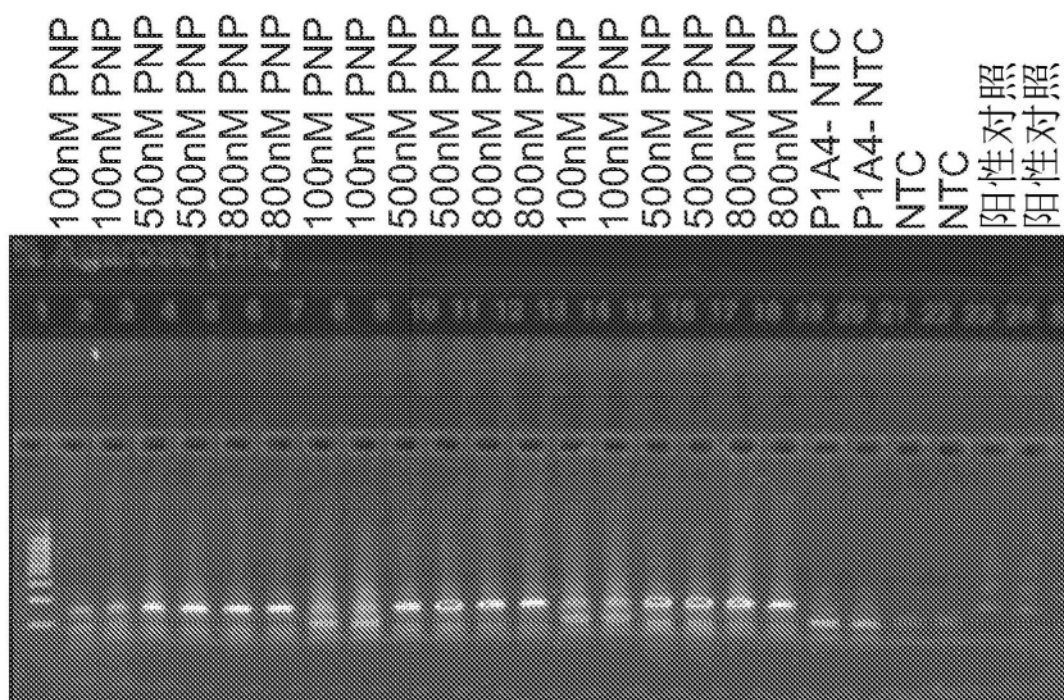


图8

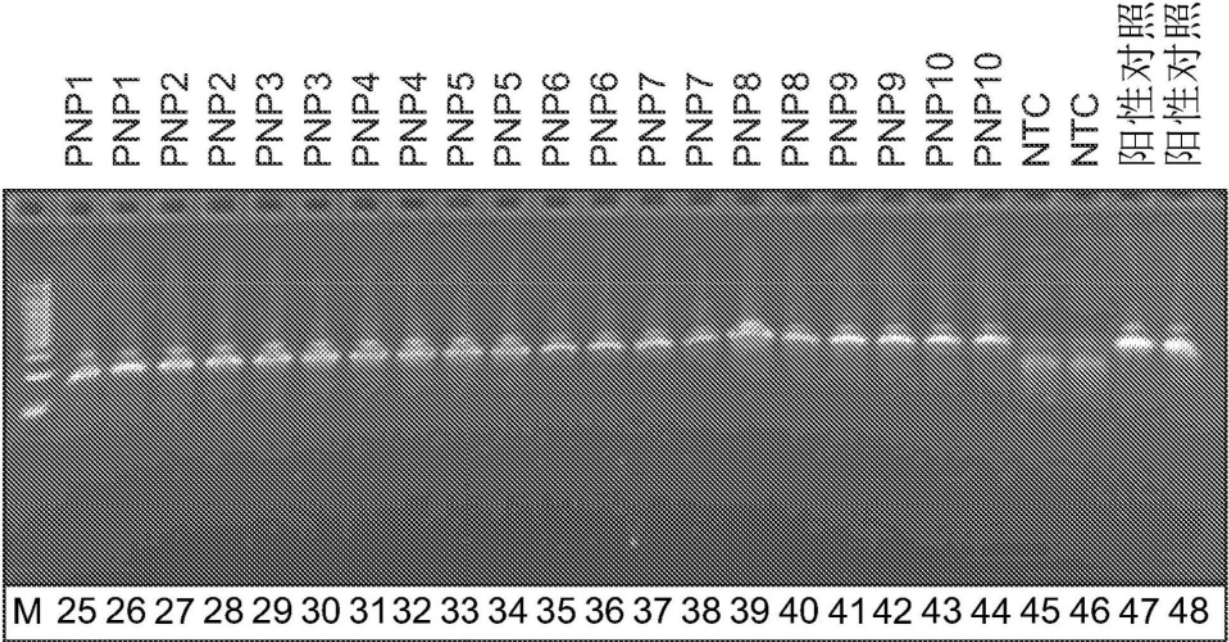


图9

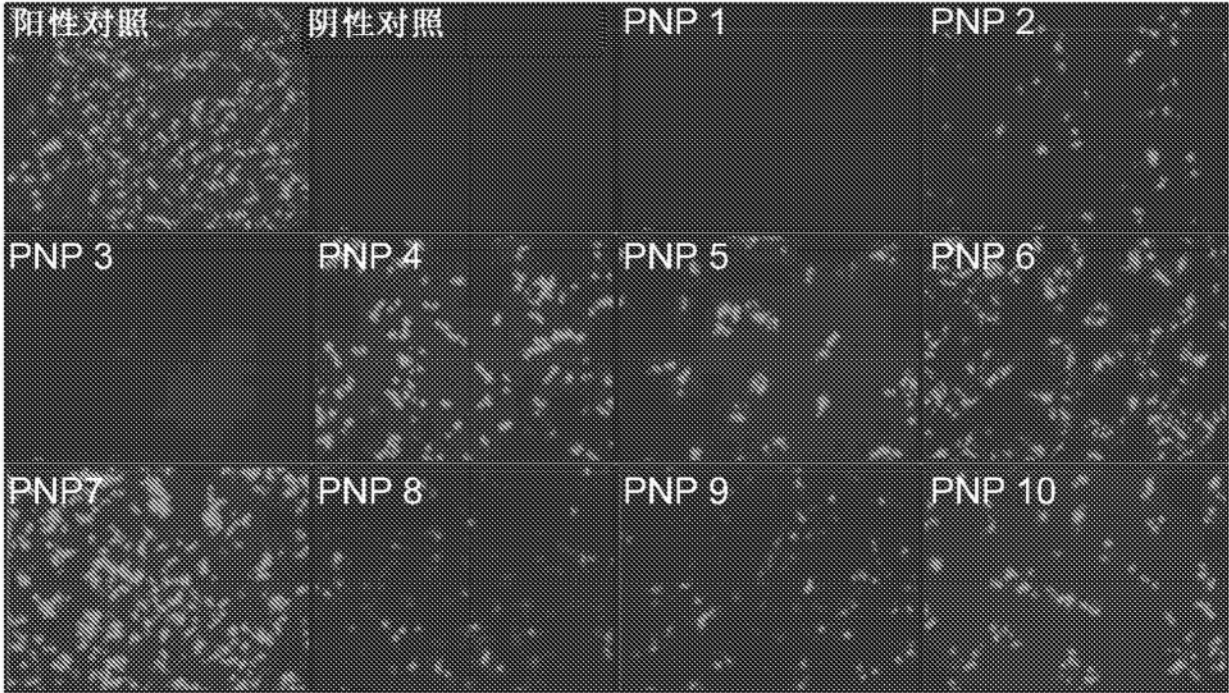


图10

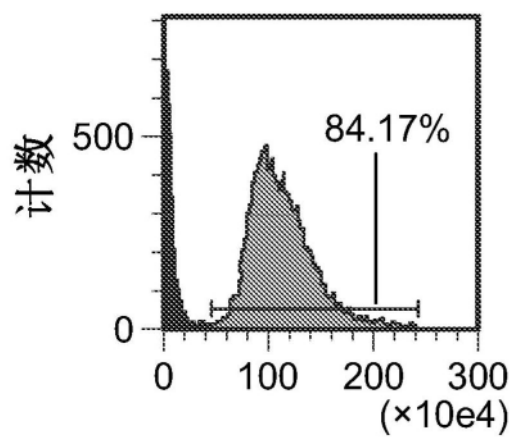


图11A

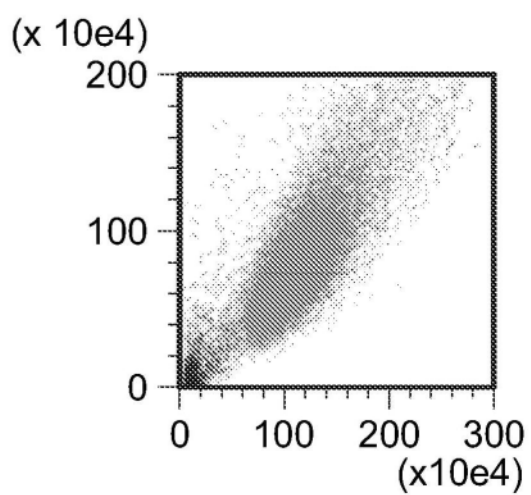


图11B

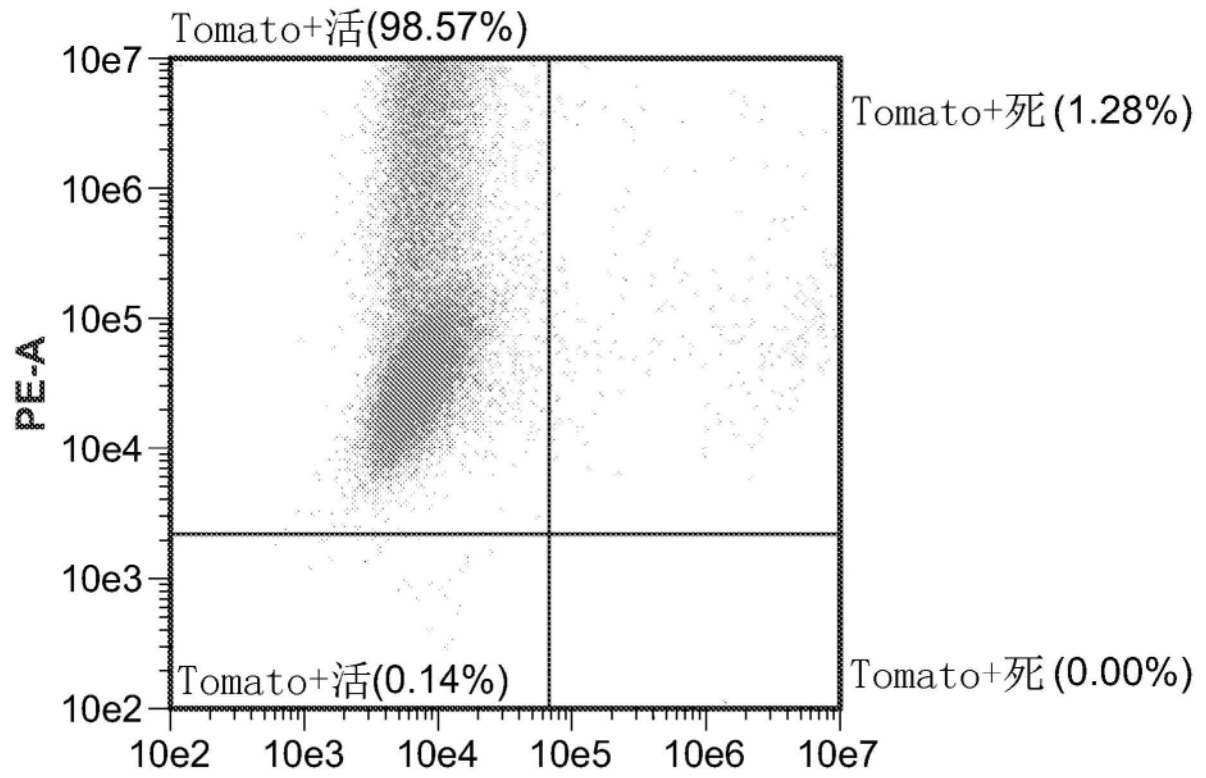


图11C

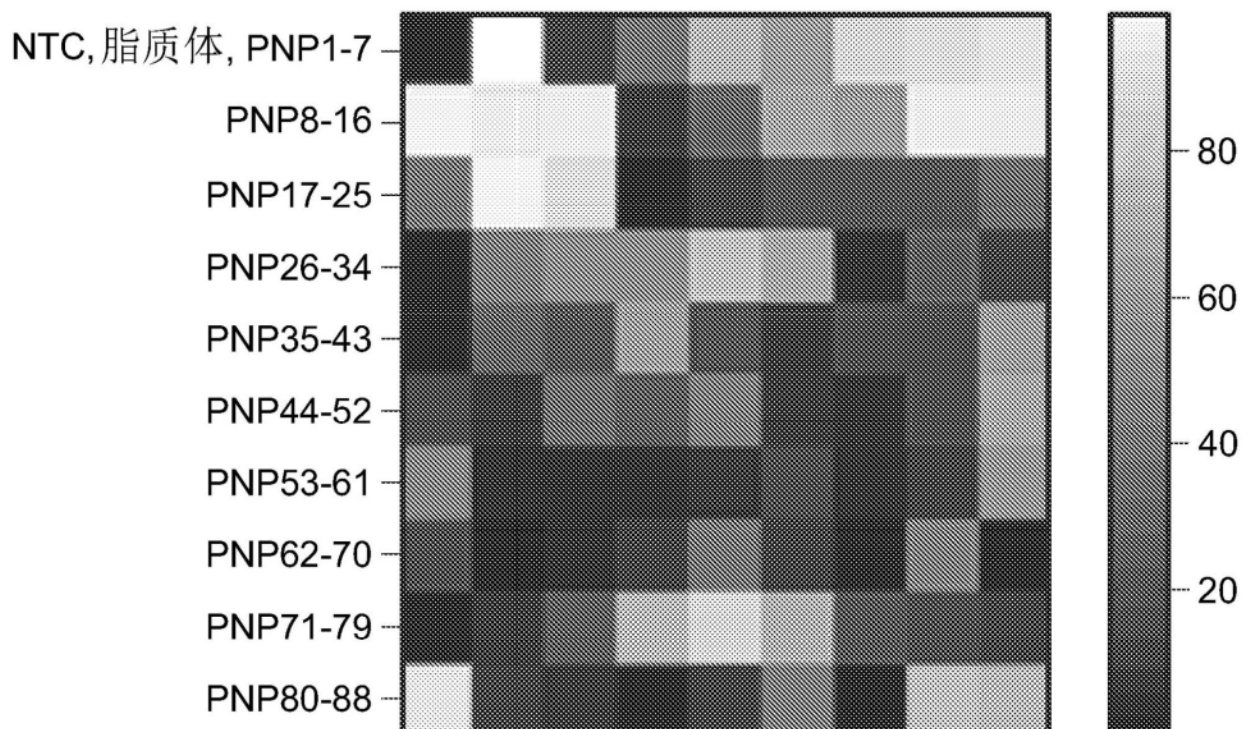


图11D

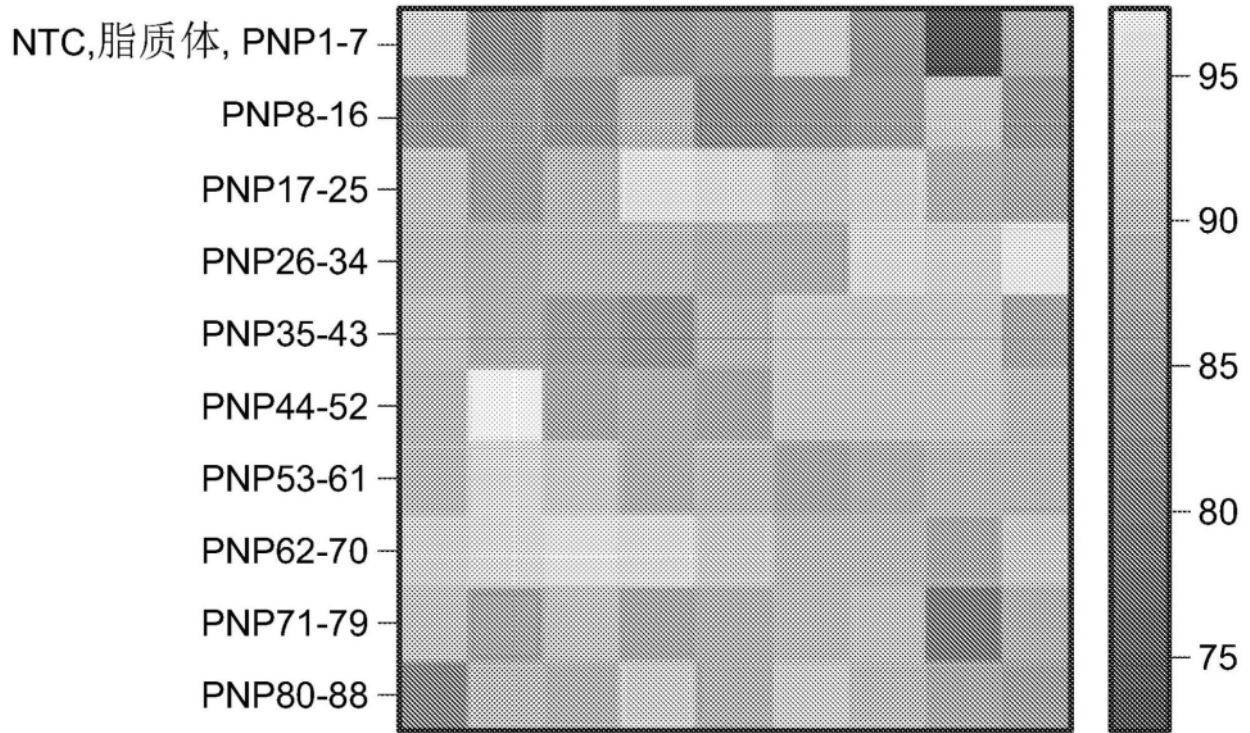


图11E

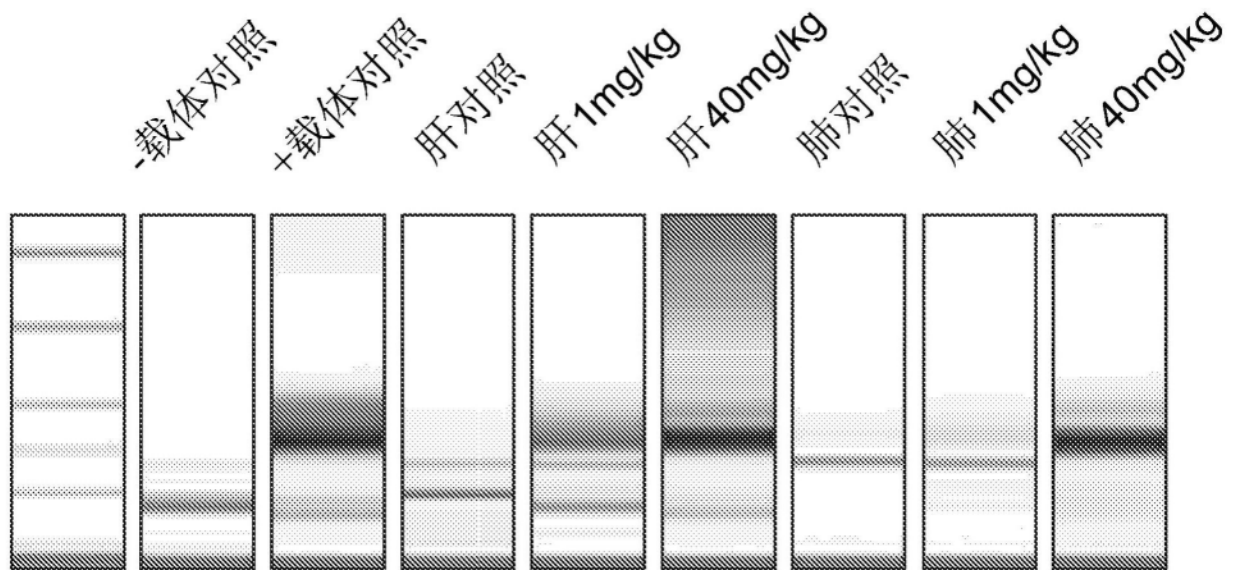


图12A

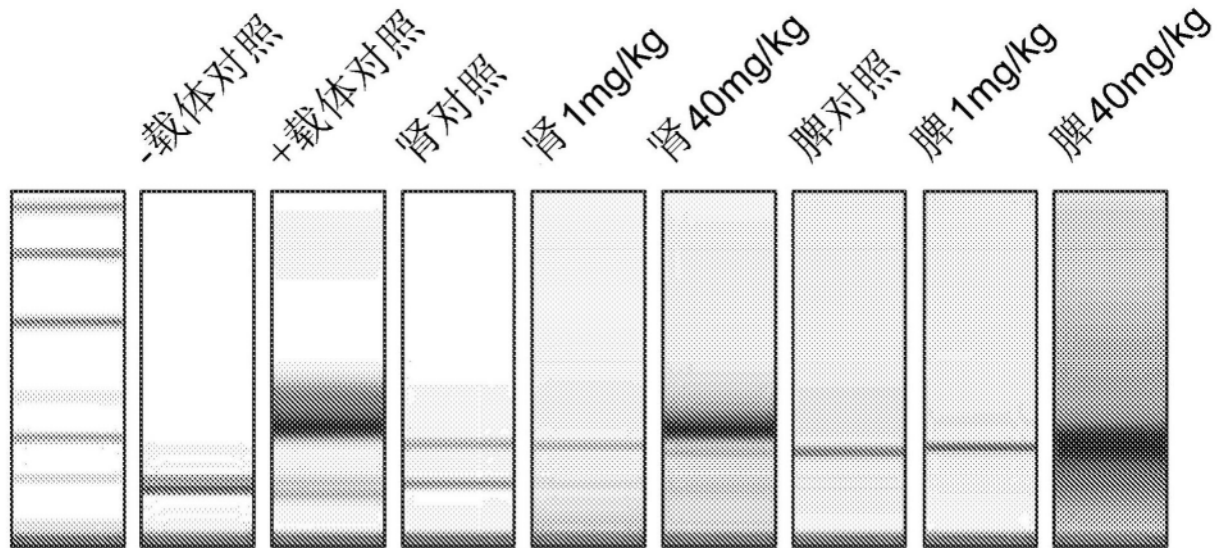


图12B

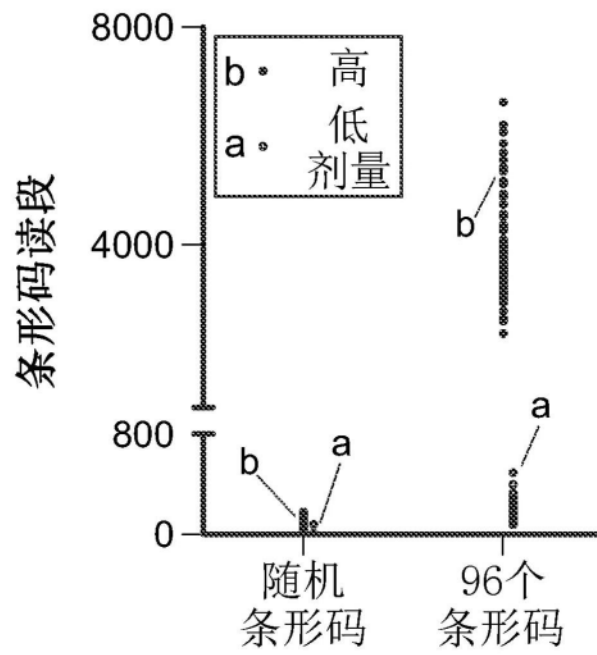


图12C

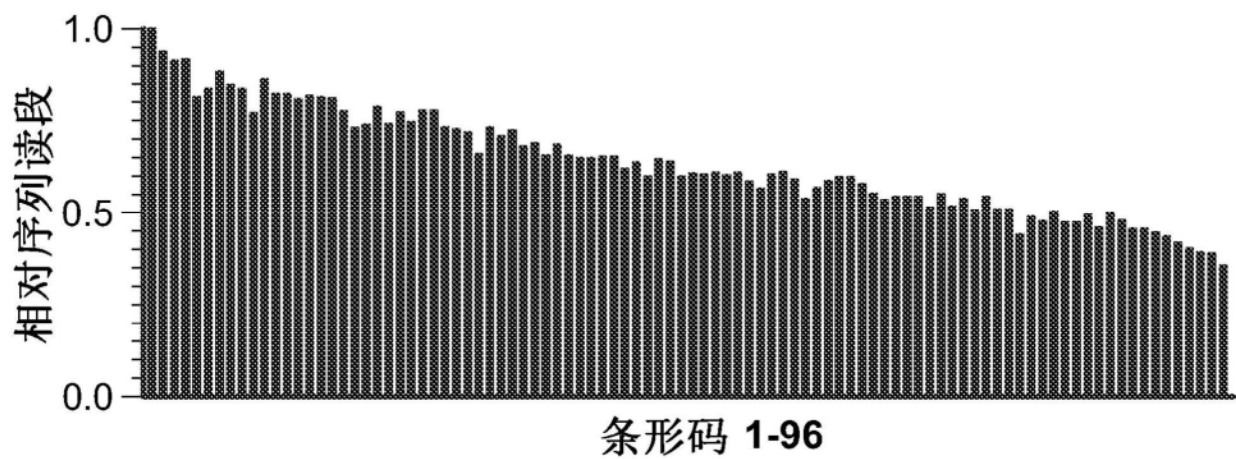


图12D

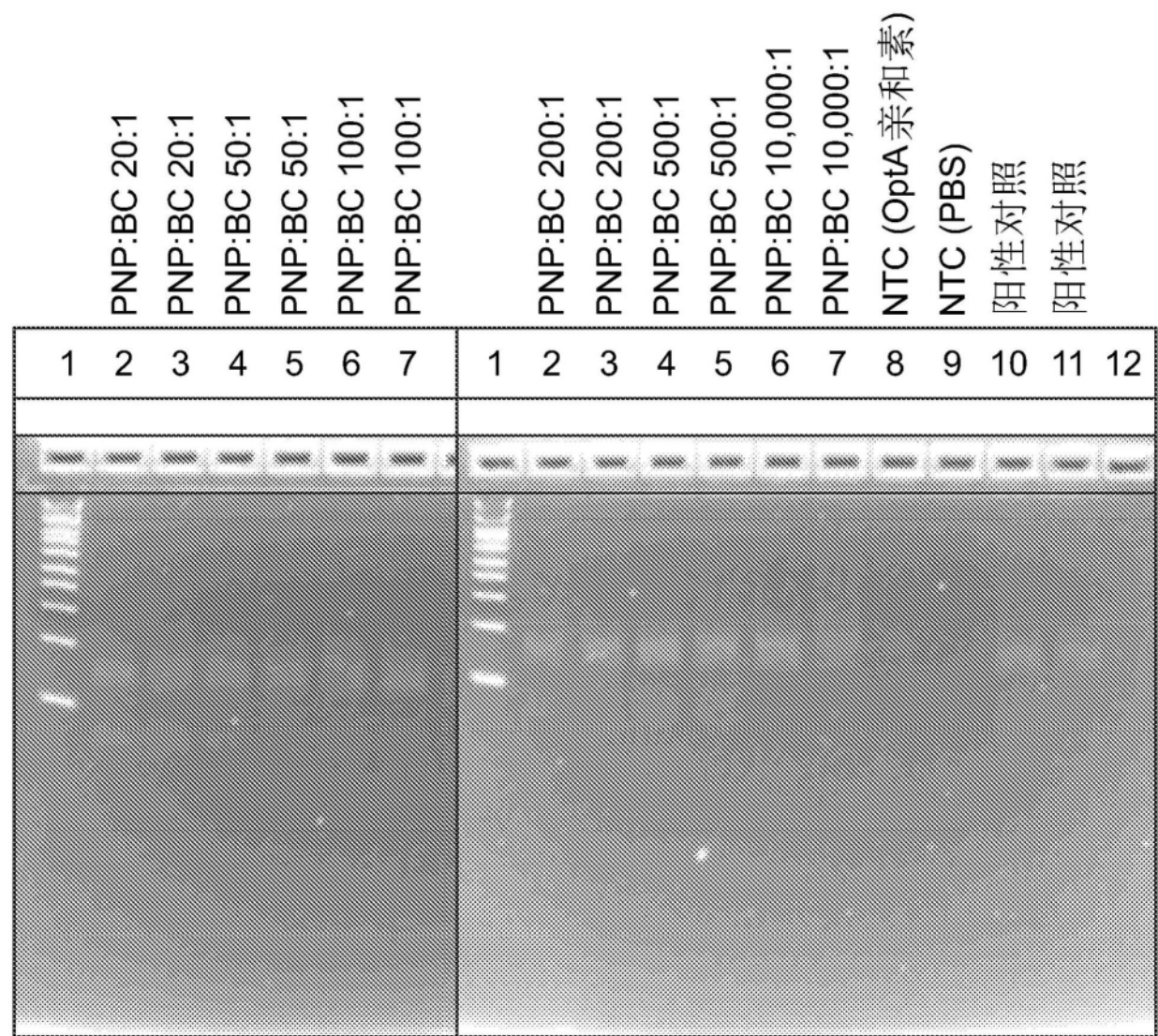


图13