

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2019年11月28日(28.11.2019)



(10) 国际公布号  
**WO 2019/223728 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*A61K 47/26* (2006.01) *A61K 9/127* (2006.01)  
*A61K 47/34* (2017.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/088001

(22) 国际申请日: 2019年5月22日(22.05.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201810511368.2 2018年5月25日(25.05.2018) CN

(71) 申请人: 成都瑞博克医药科技有限公司(CHENGDU RIBOCURE PHARMATECH COMPANY LIMITED) [CN/CN]; 中国四川省成都市武侯区长华路19号万科汇智中心34楼, Sichuan 610000 (CN)。

(72) 发明人: 宋相容(SONG, Xiangrong); 中国四川省成都市武侯区长华路19号万科汇智中心34楼, Sichuan 610000 (CN)。 魏于全(WEI, Yuquan); 中国四川省成都市武侯区长华路19号万科汇智中心34楼, Sichuan 610000 (CN)。

(74) 代理人: 北京元本知识产权代理事务所等 (BEIJING YUANBEN INTELLECTUAL PROPERTY

LAW OFFICE et al.); 中国北京市海淀区学清路9号汇智大厦3层2单元312, Beijing 100085 (CN)。

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

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

(54) Title: TARGETED NANOPREPARATION OF MANNOSE, AND PREPARATION THEREFOR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 甘露糖靶向的纳米制剂及其制备和应用

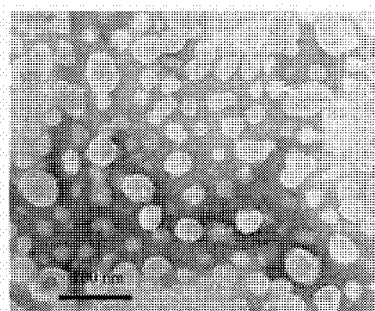


图4

(57) Abstract: A mannose-modified targeted nanopreparation, a composition for preparing the nanopreparation, a targeted element, a targeted carrier, a prepared targeted drug, and a preparation method therefor and an application thereof. The nanopreparation having the targeting function consists of a targeted ligand mannose and derivatives thereof, the nanopreparation, and main components. The targeted material is bonded to a spacer material, and then bonded to the material of the nanopreparation to prepare into the nanopreparation. The targeted nanopreparation has a good targetability of a mannose receptor, and can be efficiently combined with the mannose receptor on a targeted cell; moreover, the preparation method is universal, and can be used for synthesizing multiple targeted nanopreparations, which facilitates purification and representation.

(57) 摘要: 一种甘露糖修饰的靶向纳米制剂、制备纳米制剂的组合物、靶向元件、靶向载体和制备的靶向药物及其制备方法和应用。所述带有靶向功能的纳米制剂由靶向配体甘露糖及其衍生物、纳米制剂和主药成分组成, 所述靶向材料和间隔材料连接后再与所述纳米制剂的材料连接制成纳米制剂。所述靶向纳米制剂具较好的甘露糖受体的靶向性, 可以高效的与靶细胞上的甘露糖受体结合, 且制备方法具有通用性, 可以合成多种靶向纳米制剂, 并有利于纯化和表征。



WO 2019/223728 A1

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

## 甘露糖靶向的纳米制剂及其制备和应用

### 优先权申请

本申请要求 2018 年 5 月 25 提交的中国发明专利申请 201810511368.2 “一种甘露糖修饰的靶向纳米制剂”的优先权，该优先权发明专利申请以引用方式全文并入。

### 技术领域

本发明涉及医药领域，具体涉及一种甘露糖修饰的靶向纳米制剂、制备纳米制剂的组合物、靶向元件、靶向载体和制备的靶向药物及其制备方法和应用。

### 背景技术

近年来，基于药物受体介导的靶向药物传递系统已被广泛研究，靶向药物传递系统可提高其特异靶向性，克服药物体内分布广、毒副作用严重的问题。其中，凝集素受体是一类分布于细胞膜表面的糖蛋白、糖脂或糖复合物，能特异性识别并结合部分糖基。甘露糖受体是最重要的内吞凝集素受体，其功能包括清除内源性分子、促进抗原呈递、调节细胞激活和运输，其也与肿瘤的免疫逃逸和转移密切相关，主要表达于巨噬细胞，树突细胞和肿瘤细胞，可特异性识别甘露糖糖基分子。甘露糖基作为最有潜力的靶向基团，具有无毒、无免疫原性、生物相容性和生物可降解性良好等诸多优点，可广泛用于对药物传递系统的糖基化修饰。

脂质体、纳米粒作为最经典的纳米靶向给药载体，其靶向性的作用基础基于不同器官对微粒粒径大小摄取情况不同而选择性的聚集在肺等淋巴组织器官中，从而提高抗肿瘤药物的在各个器官的治疗效果。其制备简单

具有控释、无免疫原性，及提高疗效等特点。但是脂质体、纳米粒依赖巨噬细胞的吞噬作用实现靶向性后，在靶向性运输过程中的稳定性及病灶局部的摄入效率还相对较低，其靶向性还需要进一步的不断的提高。为此随着生物药剂学、材料科学、纳米技术的不断发展，提高纳米粒靶向性和新型的靶向载体开发逐渐成为抗肿瘤领域的研究热点，现阶段出现了多种不同形式的纳米靶向递药类型。

以脂质体作为药物的靶向载体为例，根据其靶向作用发挥的原理，目前研究得比较成熟的可分为物理靶向性和分子靶向性脂质体。其中物理靶向性脂质体包括 pH 敏感脂质体(PLP)、光敏感脂质体、磁性脂质体、热敏感脂质体等。以光敏感性脂质体为例，Yang 等利用光敏感细胞渗透肽 pcCPP 和含有天冬氨酸-甘氨酸-精氨酸残基(Asn-Gly-Arg, NGR)的短肽连接在脂质体表面，构建 pcCPP-NGR-LP，该光敏感性脂质体可促进细胞摄取，并有效的沉默 c-myc 基因，延缓人纤维肉瘤的生长。然而，以上不同形式的脂质体虽然在一定程度上加强了靶向作用，但仍有不足之处，pH 敏感脂质体未能解决脂质体的肝脾蓄积毒性问题。光敏和磁性脂质体生物体释放的可行性和长期存放稳定性等问题仍然亟待解决。热敏脂质体可直接杀伤肿瘤细胞，但加热时间过长也可造成正常组织损伤。分子靶向性脂质体也存在药物的定向输送和体内靶器官的吸收不好等问题。

综上，研究开发靶向药物，首要解决的问题就是纳米载体在运输过程中保持其稳定而不被破坏，普通的纳米粒或脂质体由于不具有主动靶向性(有些可能具有被动靶向性)，易被内皮系统清除，降低了利用率，还可能引起不必要的毒副作用。其次就是药物到达了靶细胞后，通过更有效的配体、更快速和直接的进入细胞发挥药效是研究的关键所在。

## 发明内容

本发明的目的之一是提供一种纳米制剂，通过甘露糖及其衍生物修饰，提高纳米制剂的靶向性。

本发明的目的之二是提供上述靶向纳米制剂的应用。

本发明提供的一种甘露糖及其衍生物修饰的靶向纳米制剂，其由靶向配体甘露糖及其衍生物、纳米制剂和主药成分组成，可用于疫苗递送、肿瘤靶向治疗、动脉硬化治疗及各种炎症性疾病等的治疗。

具体地，本发明提供的靶向纳米制剂，甘露糖衍生物为甘露糖苷、甘露糖胺、甘露聚糖等中的一种或几种。

具体地，本发明提供的靶向纳米制剂，甘露糖衍生物为甲基-D-甘露糖苷、1- $\alpha$  甲酰甲基-甘露吡喃糖苷、4-氨基苯基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、4-硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、4-甲基伞形酮基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、甘露糖-6-磷酸、氨基甲酰基-D-甘露糖、甘露糖胺、甘露聚糖等中的一种或几种。

具体地，本发明提供的靶向纳米制剂为脂质体、乳剂、纳米凝胶、核壳型纳米粒、HDL 纳米粒、固脂纳米粒、聚合物胶束等中的一种或几种。

具体地，本发明提供的靶向纳米制剂，所述主药成分为小分子药物、蛋白多肽类药物或基因药物等中的一种或几种。

具体地，本发明提供的靶向纳米制剂，所述主药成分小分子药物为可包裹于纳米制剂中用于肿瘤靶向治疗、动脉硬化治疗及各种炎症性疾病等的治疗的功效性小分子。比如抗肿瘤药物紫杉烷类（紫杉醇、多西紫杉醇、三尖杉宁碱、7-表向紫杉醇）、喜树碱类（喜树碱、SN38、伊立替康、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱等）、长春碱类（长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞宾、长春氟宁等）、阿霉素、表阿霉素、柔红霉素、表柔比星、两性霉素、甲氨蝶呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、米托蒽醌或其衍生物、吉非替尼、诺司卡品、顺铂、卡铂、奥沙利铂、卡莫司汀、槲皮素等。所述主药成分蛋白多肽类药物为白细胞介素（比如 IL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6 等），各种生长因子（比如成纤维细胞生长因子、肝生长因子、血管内皮生长因子、造血生长因子等），干扰素（比如 IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\gamma$ ），肿瘤坏死因子（比如 TNF $\alpha$ 、TNF $\beta$ ），整合素，单克隆抗体，酶，胰岛素

等。所述主药成分基因药物为DNA、质粒、mRNA、siRNA、shRNA、microRNA等。当靶向纳米制剂用于免疫治疗时，所述主药成分除用于免疫治疗的药物外，还可同时包裹免疫佐剂以增强免疫效果。

具体地，本发明提供的靶向纳米制剂，所述靶向配体甘露糖及其衍生物的含量为0.05%-40%。

优选地，本发明提供的靶向纳米制剂，所述靶向配体甘露糖及其衍生物的含量为1%-10%。

更优地，本发明提供的靶向纳米制剂，所述靶向配体甘露糖的含量为2%-5%。

具体地，本发明提供的靶向纳米制剂，所述靶向配体甘露糖及其衍生物的修饰方式为：制备纳米制剂之后再将其甘露糖及其衍生物吸附或偶联到纳米制剂表面；或先将甘露糖及其衍生物与制备纳米制剂的载体材料偶联之后再制备纳米制剂。

具体地，本发明提供的所述甘露糖及其衍生物吸附在纳米制剂表面的方式为：采用溶剂挥发法、高压均质法或微乳法制备纳米制剂的方式，使其吸附在纳米制剂表面。

具体地，本发明提供的靶向纳米制剂，修饰纳米制剂的甘露糖及其衍生物由单个甘露糖及其衍生物和/或2~10个甘露糖及其衍生物组成。

具体地，本发明提供的靶向纳米制剂，甘露糖及其衍生物吸附在纳米制剂表面的方式为：采用溶剂挥发法、高压均质法或微乳法。

具体地，本发明提供的靶向纳米制剂，甘露糖及其衍生物与纳米制剂或制备纳米制剂的载体材料偶联方式为：直接偶联或通过一个间隔基偶联。

具体地，本发明提供的靶向纳米制剂，甘露糖及其衍生物与纳米制剂或制备纳米制剂的载体材料通过间隔基偶联，所述间隔基为戊二醛、乙二胺、丙二酸、短链烷基链（比如-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-）、PEG、氨基酸、二肽、寡肽、多肽、硬脂酰、棕榈酰等中的一种或几种。具体地，间隔基PEG为分子量为100-5000，双端具有羟基或至少一端氨基化的PEG。较优地，间隔基PEG

的分子量为 100-2000。间隔基氨基酸为精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。二肽、寡肽、多肽的两端氨基酸选自以下的氨基酸组成：精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸；中间氨基酸选自 20 种任意氨基酸（比如 RGD）。

具体地，本发明提供的靶向纳米制剂，制备纳米制剂的材料为具有活性氨基和/或羟基的药学上可以接受的制备胶束、乳剂、纳米凝胶、核壳型纳米粒、HDL 纳米粒、固脂纳米粒、脂质体、聚合物胶束等的载体材料。具体地，载体材料为脂质、聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)、聚乳酸(PLA)、聚己内酯(PCL)、多聚赖氨酸(PLL)、聚乙烯亚胺(PEI)、透明质酸(HA)、壳聚糖、明胶、泊洛沙姆、硬脂醇等中的一种或几种。具体地，制备脂质体、核壳型纳米粒的脂质材料为胆固醇、蛋黄卵磷脂、大豆卵磷脂、脑磷脂、鞘磷脂、PC(磷脂酰胆碱)、EPG(卵磷脂酰甘油)、SPG(大豆磷脂酰甘油)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二亚油酰磷脂酰胆碱(DLPC)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二月桂酰磷脂酰甘油(DLPG)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、二甲基双十八烷基溴化铵(DDAB)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(氯化物盐)(DOTAP)等中的一种或多种。制备固脂纳米粒的固体脂质材料为硬脂酸、胆固醇、单硬脂酸甘油酯、双硬脂酸甘油酯、三硬脂酸甘油酯、三萣酸甘油酯、月桂酸甘油酯、甘油棕榈酸硬脂酸脂、二十二酸单甘油酯、二十二烷酸双甘油酯、二十二烷酸三甘油酯、三豆蔻酸甘油酯、枸橼酸甘油酯、十八醇、棕榈酸、豆蔻酸、三萣酸、月桂酸中的一种或几种。

本发明的目的之三在于提供用于制备带有特异性靶向载药载体的材料组合物，该组合物能够用于制备靶向性强的载药载体。

为实现上述目的，本发明的技术方案为：

用于制备带有靶向功能的纳米制剂的组合物，所述组合物包括靶向材料和基础纳米制剂材料，所述靶向材料为甘露糖和/或甘露糖衍生物。

进一步，所述甘露糖衍生物为甘露糖苷和/或甘露糖胺和/或甘露聚糖。

更进一步，所述甘露糖衍生物为甲基-D-甘露糖苷、1- $\alpha$  甲酰甲基-甘露吡喃糖苷、4-氨基苯基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、4-硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、4-甲基伞形酮基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、甘露糖-6-磷酸、氨基甲酰基-D-甘露糖。

进一步，所述靶向材料占所述组合物的重量百分比为 0.05-40%。

优选的，所述靶向材料占所述组合物的重量百分比为 1-10%。

进一步，所述组合物由所述靶向材料、所述基础纳米制剂材料、使所述靶向材料与所述基础纳米制剂材料产生距离的间隔材料组成，所述间隔材料为戊二醛、乙二胺、丙二酸、短链烷基链、PEG、氨基酸、二肽、寡肽、多肽、硬脂酰、棕榈酰中的一种或几种。

具体的，所述间隔基为戊二醛、乙二胺、丙二酸、短链烷基链（比如 -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-）、PEG、氨基酸、二肽、寡肽、多肽等中的一种或几种。具体地，间隔基氨基酸为精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。二肽、寡肽、多肽的两端氨基酸选自以下的氨基酸组成：精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸；中间氨基酸选自 20 种任意氨基酸（比如 RGD）。

进一步，所述基础纳米制剂材料为制备脂质体、乳剂、纳米凝胶、核壳型纳米粒、HDL 纳米粒、固脂纳米粒、聚合物胶束的材料组合物。

具体的，所述基础纳米制剂材料为制备纳米制剂材料的组合物，可以是《现代药物制剂技术》中提到的纳米制剂材料。

具体的，所述基础纳米制剂材料为脂质、聚乳酸-羟基乙酸共聚物（PLGA）、聚乳酸（PLA）、聚己内酯（PCL）、多聚赖氨酸（PLL）、聚乙烯亚胺（PEI）、透明质酸（HA）、壳聚糖、明胶、泊洛沙姆、硬脂

醇中的一种或几种。

具体地，制备脂质体、核壳型纳米粒的脂质材料为胆固醇、蛋黄卵磷脂、大豆卵磷脂、脑磷脂、鞘磷脂、PC（磷脂酰胆碱）、EPG（卵磷脂酰甘油）、SPG（大豆磷脂酰甘油）、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺（DSPE）、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺（DPPE）、二棕榈酰磷脂酰胆碱（DPPC）、二油酰磷脂酰胆碱（DOPC）、二硬脂酰磷脂酰胆碱（DSPC）、二豆蔻酰磷脂酰胆碱（DMPC）、二亚油酰磷脂酰胆碱（DLPC）、二油酰磷脂酰甘油（DOPG）、二棕榈酰磷脂酰甘油（DPPG）、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱（DMPC）、二月桂酰磷脂酰甘油（DLPG）、十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）、二甲基十八烷基溴化铵（DDAB）、1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷（氯化物盐）（DOTAP）中的一种或多种。

具体的，制备固脂纳米粒的固体脂质材料为硬脂酸、胆固醇、单硬脂酸甘油酯、双硬脂酸甘油酯、三硬脂酸甘油酯、三萆酸甘油酯、月桂酸甘油酯、甘油棕榈酸硬脂酸脂、二十二酸单甘油酯、二十二烷酸双甘油酯、二十二烷酸三甘油酯、三豆蔻酸甘油酯、枸橼酸甘油酯、十八醇、棕榈酸、豆蔻酸、三萆酸、月桂酸中的一种或几种。

进一步，所述间隔材料为 PEG<sub>n</sub>，其中  $n=100-5000$ 。

优选的，所述  $n$  为 200、400、1000 或 2000。

进一步，按照重量份计由以下组分组成：甘露糖 1 份；PEG 0.5-56 份，胆固醇 2-11 份。

优选的，按照重量份计由以下组分组成：甘露糖 1 份；PEG 10-25 份，胆固醇 4-8 份。

进一步，按照按照摩尔份计由以下组分组成：甘露糖 1 份；PEG 1-5 份，胆固醇 1-5 份。

优选的，按照摩尔份计由以下组分组成：甘露糖 1 份；PEG 1-3 份，胆固醇 1-3 份。

本发明的目的之四在于提供一种靶向载体及靶向药物，该靶向载体能

运送多种药效成分到达靶细胞，且靶向性强。

为实现上述目的，本发明采用以下方案：

所述的组合物制备的运载药物的靶向载体。

进一步，所述药物为小分子药物和/或蛋白多肽类药物和/或基因药物。

所述小分子药物为可包裹于纳米制剂中用于肿瘤靶向治疗、动脉硬化治疗及各种炎症性疾病等的治疗的功效性小分子。

某些实施例中，将编码特定肿瘤抗原的 mRNA 可包裹于靶向纳米制剂载体中，再导入体细胞内，并通过宿主细胞的表达系统合成抗原蛋白，诱导宿主免疫系统产生对该肿瘤抗原的免疫应答可实现防治肿瘤的功能，且载有 mRNA 的靶向纳米制剂具有更好的肿瘤靶向性，有利于肿瘤的治疗。同样将抗肿瘤的化药和生物药、治疗动脉硬化和炎症性疾病的药物也可包裹于靶向纳米制剂载体中，起到更精准的靶向治疗作用。

具体的，所述小分子药物包括但不限于 PTX、DOX、槲皮素，所述蛋白多肽类药物包括但不限于白蛋白，所述基因药物包括但不限于 mRNA、siRNA。

更具体的，所述小分子药物为可包裹于纳米制剂中用于肿瘤靶向治疗、动脉硬化治疗及各种炎症性疾病等的治疗的功效性小分子。比如抗肿瘤药物紫杉烷类（紫杉醇、多西紫杉醇、三尖杉宁碱、7-表向紫杉醇）、喜树碱类（喜树碱、SN38、伊立替康、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱等）、长春碱类（长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞宾、长春氟宁等）、阿霉素、表阿霉素、柔红霉素、表柔比星、两性霉素、甲氨蝶呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、米托蒽醌或其衍生物、吉非替尼、诺司卡品、顺铂、卡铂、奥沙利铂、卡莫司汀、槲皮素等。所述主药成分蛋白多肽类药物为白细胞介素（比如 IL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6 等），各种生长因子（比如成纤维细胞生长因子、肝生长因子、血管内皮生长因子、造血生长因子等），干扰素（比如 IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\gamma$ ），肿瘤坏死因子（比如 TNF $\alpha$ 、TNF $\beta$ ），整合素，单克隆抗体，酶，胰岛素等。所述主药成分基因药物为 DNA、质

粒、mRNA、siRNA、shRNA、microRNA 等。当靶向纳米制剂用于免疫治疗时，所述主药成分除用于免疫治疗的药物外，还可同时包裹免疫佐剂以增强免疫效果。

被所述的靶向载体包裹的药物。

进一步，所述药物为小分子药物和/或蛋白多肽类药物和/或基因药物。

具体的，所述小分子药物包括但不限于 PTX、DOX、槲皮素，所述蛋白多肽类药物包括但不限于白蛋白，所述基因药物包括但不限于 mRNA、siRNA。

进一步，所述药物可以为任意药学可接受剂型。

具体的，所述药学可接受剂型包一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂并在上述制备过程中合适的步骤加入。本发明所使用的术语“药学上可接受的”是指这样的化合物、原料、组合物和/或剂型，它们在合理医学判断的范围内，适用于与患者组织接触而无过度毒性、刺激性、变态反应或与合理的利益/风险比相对称的其他问题和并发症，并有效用于既定用途。

药物制剂适于通过任何合适的途径给药，例如通过口服（包括口腔或舌下）、直肠、鼻、局部（包括口腔、舌下或经皮）、阴道或胃肠外（包括皮下、皮内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内、静脉内或者真皮下注射或输注）途径。可按药剂学领域的任何已知方法制备这类制剂，例如通过将活性成分与载体或赋形剂混合。优选口服给药、局部给药或注射给药。适于口服给药的药物制剂按独立的单位提供，例如水性或非水性液体中的溶液剂或混悬剂；胶囊剂或片剂；散剂或颗粒剂；可食用泡沫制剂或起泡制剂等。

本发明的目的之五在于提供一种靶向载体的制备方法，该方法可以用于工业化的制备靶向载体。

为实现上述目的，本发明采用以下方案：

制备所述的靶向载体的方法为：将所述基础纳米制剂材料制备成纳米运药载体，再将所述靶向材料附于所述纳米运药载体表面。

将所述靶向材料附于所述纳米运药载体表面的方法包括但不限于采用溶剂挥发法、薄膜分散法、超声波分散法、注入法、逆向蒸发法、高压均质法和微乳法制备纳米药物载体后，再将靶向材料溶液与其混合，使靶向材料附于其表面。上述制备纳米药物载体方法可以参照《现代药物制剂技术》

具体的，所述溶剂挥发法是制备微球的一种方法，简单的过程就是，先配置合适浓度的高分子溶液，然后将高分子溶液在连续相乳化，逐渐挥发掉溶剂，制成微球制剂，再向该微球制剂中加入靶向材料，使其靶向材料吸附在微球制剂表面。

高压均质法是物料在高压下通过均质阀，以极高的流速喷出，撞击碰撞环，通过空穴、撞击、剪切效应使物料超微细化和分散乳化，形成纳米微粒，该过程中物料的表面积增大，向其中加入靶向材料后，所述靶向材料便可附于表面。

薄膜蒸发法是将磷脂类材料溶于有机溶剂中，然后在减压状态下，将有机溶剂蒸发，在瓶内壁上形成一薄膜后，再加入水或 PBS 溶液将反复搅拌，洗下薄膜经均质、超声处理，即得纳米微粒制剂，向其中加入靶向材料后，所述靶向材料便可附于表面。

本发明的目的之六在于提供一种提高靶向载体靶向性的方法，该方法显著的提升了靶向载体的靶向性。

为实现上述目的，本发明采用以下方案：

提高所述的靶向载体的靶向性的方法，包括以下步骤：

A 合成靶向元件

将所述靶向材料与所述间隔材料合成靶向元件；

B 制备靶向载体

将基础纳米制剂材料制备成纳米制剂，再将步骤 A 所得的靶向元件与所述纳米运药载体连接得靶向载体或先将所述间隔材料与基础纳米制剂材料合成，再与所述靶向材料进行进一步连接得靶向载体。。

进一步，所述靶向元件与所述纳米运药载体的距离为 0.2-100nm。

优选的，所述靶向元件与所述纳米运药载体的距离为 0.3-10nm。

本发明的目的之七在于提供一种运送药物的方法，该方法能高效的运载药物到目的地。

为实现上述目的，本发明采用以下方案：

运送药效成分到达靶细胞的方法为：将药效成分置于所述靶向载体内，并运送。

进一步，所述靶细胞为含有甘露糖受体的细胞。

更进一步，所述靶细胞包括但不限于巨噬细胞、树突细胞和肿瘤细胞。

本发明目的之八在于提供一种带有靶向元件的组合物，所述组合物能用于制备靶向性强的载药载体。

为实现上述目的，本发明的技术方案为：

带有靶向元件的组合物，由靶向材料和间隔材料组成，所述靶向材料为甘露糖和/或甘露糖衍生物。

进一步，所述甘露糖衍生物为甘露糖苷和/或甘露糖胺和/或甘露聚糖。

更进一步，所述甘露糖衍生物为甘露糖衍生物为甲基-D-甘露糖苷、1- $\alpha$  甲酰甲基-甘露吡喃糖苷、4-氨基苯基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、4-硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、4-甲基伞形酮基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、甘露糖-6-磷酸、氨基甲酰基-D-甘露糖。

进一步，所述间隔材料为戊二醛、乙二胺、丙二酸、短链烷基链、PEG、氨基酸、二肽、寡肽、多肽、硬脂酰、棕榈酰中的一种或几种。

具体的，所述间隔基为戊二醛、乙二胺、丙二酸、短链烷基链（比如 -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-）、PEG、氨基酸、二肽、寡肽、多肽等中的一种或几种。具体地，间隔基氨基酸为精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、

赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。二肽、寡肽、多肽的两端氨基酸选自以下的氨基酸组成：精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸；中间氨基酸选自 20 种任意氨基酸（比如 RGD）。

进一步，所述间隔材料与所述靶向材料的摩尔比为 10-1:1。

优选的，所述间隔材料与所述靶向材料的摩尔比为 5:1。

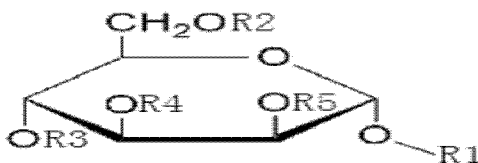
进一步，甘露糖与 PEG100 的摩尔比为 1:1。

本发明的目的之九在于提供一种靶向元件，所述靶向元件能用于制备靶向性强的载药载体。

为实现上述目的，本发明采用以下方案：

运用所述的组合物制备的靶向元件。

进一步，所述靶向元件如式 I 所示：其中 R1 为  $-C_3H_8O_2$ 、 $-C_2H_7N_2$ 、 $-C_3H_3O_4$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_nH$ 、 $-C_2H_3O_2NR'$  或  $-C_2H_3ONR'$ 、 $-C_4H_5O_3N_2R_1'$ 、 $R_2'$  或  $-C_4H_5O_2N_2R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $-C_{3n+1}H_{3n+2}O_n+2N_n+1R_1'$ 、 $R_2'$  或  $-C_{3n+1}H_{3n+2}O_n+1N_n+1R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $-C_{18}H_{35}O$ 、 $C_{16}H_{31}O$ 、 $-H$ 、 $-CHO$ 、 $-C_6H_4NH_2$ 、 $-C_6H_4NO_2$ 、 $-CONH_2$ 、 $-CH_2C_6CCHCO_2CH_3$ ，所述  $R_1'$  和  $R_2'$  均为任意天然氨基酸侧链  $R'$  基团， $R_2$  为  $-CH_3$  或  $-PO_3H_2$ 、 $R_3$  为  $-H$ ， $R_4$  为  $-H$ ， $R_5$  是  $-H$  或  $-NHC(=O)CH_3$ ，



I。

进一步，R1 为聚乙二醇，其结构如下所示：R1 为聚乙二醇，其结构为



，其中  $n=1\sim 5000$ ，其对应的分子量为： $40*n$ 。

本发明的目的之十在于提供一种靶向载体，所述靶向载体可以运送药

物到达靶细胞。

为实现上述目的，本发明采用以下方案：

含有所述的靶向元件的靶向载体。

进一步，由靶向元件和纳米制剂连接而成，所述纳米制剂为制备脂质体、乳剂、纳米凝胶、核壳型纳米粒、HDL 纳米粒、固脂纳米粒、聚合物胶束。

具体的，所述纳米制剂的材料可以是《现代药物制剂技术》中提到的纳米制剂材料。

具体的，所述纳米制剂的材料为脂质、聚乳酸-羟基乙酸共聚物（PLGA）、聚乳酸（PLA）、聚己内酯（PCL）、多聚赖氨酸（PLL）、聚乙烯亚胺（PEI）、透明质酸（HA）、壳聚糖、明胶、泊洛沙姆、硬脂醇中的一种或几种。

具体地，制备脂质体、核壳型纳米粒的脂质材料为胆固醇、蛋黄卵磷脂、大豆卵磷脂、脑磷脂、鞘磷脂、PC（磷脂酰胆碱）、EPG（卵磷脂酰甘油）、SPG（大豆磷脂酰甘油）、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺（DSPE）、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺（DPPE）、二棕榈酰磷脂酰胆碱（DPPC）、二油酰磷脂酰胆碱（DOPC）、二硬脂酰磷脂酰胆碱（DSPC）、二豆蔻酰磷脂酰胆碱（DMPC）、二亚油酰磷脂酰胆碱（DLPC）、二油酰磷脂酰甘油（DOPG）、二棕榈酰磷脂酰甘油（DPPG）、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱（DMPC）、二月桂酰磷脂酰甘油（DLPG）、十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）、二甲基十八烷基溴化铵（DDAB）、1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷（氯化物盐）（DOTAP）中的一种或多种。

具体的，制备固脂纳米粒的固体脂质材料为硬脂酸、胆固醇、单硬脂酸甘油酯、双硬脂酸甘油酯、三硬脂酸甘油酯、三萣酸甘油酯、月桂酸甘油酯、甘油棕榈酸硬脂酸脂、二十二酸单甘油酯、二十二烷酸双甘油酯、二十二烷酸三甘油酯、三豆蔻酸甘油酯、枸橼酸甘油酯、十八醇、棕榈酸、豆蔻酸、三萣酸、月桂酸中的一种或几种。

进一步，所述单个靶向载体上连接有 1-100000 个所述的靶向元件。

优选的，所述单个靶向载体上连接有 1-1000 个所述的靶向元件。

进一步，所述靶向元件的靶头与所述纳米制剂的距离为 0.2-100nm。

进一步，所述靶向元件的靶头与所述纳米制剂的距离为 0.3-10nm。

进一步，所述靶头为甘露糖苷和/或甘露糖胺和/或甘露聚糖。

本发明的目的之十一在于提供一种所述靶向元件连接至纳米制剂的方法，该方法具有通用性，可以合成多种靶向纳米制剂，并有利于纯化和表征。

为实现上述目的，本发明采用以下方案：

将所述的靶向元件连接至纳米制剂的方法，其特征在于，将所述靶向材料和间隔材料连接后再与所述纳米制剂的材料连接制成纳米制剂。

进一步，具体包括以下步骤：

1) 取二甘醇、对甲苯磺酰氯与三乙胺，溶于 DCM 中，室温反应，通过柱层析分离得化合物 1；

2) 取化合物 1 与五乙酰化甘露糖及其衍生物和三氟化硼乙醚溶于 DCM 中，室温反应，柱层析分离得化合物 2；

3) 取化合物 2 与叠氮钠，溶于 DMF 中，硅胶柱层析分离得固体化合物 3；

4) 取化合物 3 溶于甲醇钠的甲醇溶液中，室温反应，浓缩得化合物 4；

5) 取胆固醇、溴丙炔和钠氢溶于乙醚和 DMF 的混合溶液中，室温反应，硅胶柱层析分离得固体化合物 5；

6) 取化合物 4、化合物 5 和碘化亚铜溶于 DMF 中，室温反应 24 h，硅胶柱层析得到靶向载体固体化合物 6。

某些实施例中，取二甘醇、对甲苯磺酰氯与三乙胺，溶于 DCM 中，室温反应 24 h，通过柱层析分离得产物  $\text{TosOC}_2\text{H}_4\text{OC}_2\text{H}_4\text{OH}$ （化合物 1）。取化合物 1 与五乙酰化甘露糖及其衍生物和三氟化硼乙醚（ $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ）溶于 DCM 中，室温反应 24 h，柱层析分离得产物  $\text{Aco-M-OC}_2\text{H}_4\text{OC}_2\text{H}_4\text{OTos}$ （化

合物 2)，M 为甘露糖及其衍生物。取化合物 2 与叠氮钠，溶于 DMF 中，60℃ 反应 24 h，硅胶柱层析分离得固体产物 Aco-M-OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>3</sub>（化合物 3）。取化合物 3 溶于甲醇钠的甲醇溶液中，室温反应 3 h，浓缩得产物 M-OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>3</sub>（化合物 4）。取胆固醇、溴丙炔和钠氢溶于乙醚和 DMF 的混合溶液中，室温反应 24 h，硅胶柱层析分离得固体产物 Chol-CH<sub>2</sub>CCH（化合物 5）。取化合物 4、化合物 5 和碘化亚铜溶于 DMF 中，室温反应 24 h，硅胶柱层析得到固体产物 M-PEG<sub>n</sub>-Chol（化合物 6）。

本发明的目的之十二在于提供一种提高权利要求所述靶向载体运送药物能力的方法。

为实现上述目的，本发明采用以下方案：

提高权利要求所述靶向载体运送药物能力的方法为将药物包裹于所述靶向载体中运送。

进一步，所述药物为小分子药物和/或蛋白多肽类药物和/或基因药物。

具体的，所述小分子药物为可包裹于纳米制剂中用于肿瘤靶向治疗、动脉硬化治疗及各种炎症性疾病等的治疗的药效性小分子。

某些实施例中，可将编码特定肿瘤抗原的 mRNA 包裹于靶向纳米制剂载体中，再导入体细胞内，并通过宿主细胞的表达系统合成抗原蛋白，诱导宿主免疫系统产生对该肿瘤抗原的免疫应答可实现防治肿瘤的功能，且载有 mRNA 的靶向纳米制剂具有更好的肿瘤靶向性，有利于肿瘤的治疗。同样也可将抗肿瘤的化药和生物药、治疗动脉硬化和炎症性疾病的药物包裹于靶向纳米制剂载体中，起到更精准的靶向治疗作用。

具体的，所述小分子药物包括但不限于 PTX、DOX、槲皮素，所述蛋白多肽类药物包括但不限于白蛋白，所述基因药物包括但不限于 mRNA、siRNA。

更具体的，所述小分子药物为可包裹于纳米制剂中用于肿瘤靶向治疗、动脉硬化治疗及各种炎症性疾病等的治疗的药效性小分子。比如抗肿瘤药物紫杉烷类（紫杉醇、多西紫杉醇、三尖杉宁碱、7-表向紫杉醇）、喜树碱

类（喜树碱、SN38、伊立替康、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱等）、长春碱类（长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞宾、长春氟宁等）、阿霉素、表阿霉素、柔红霉素、表柔比星、两性霉素、甲氨蝶呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、米托蒽醌或其衍生物、吉非替尼、诺司卡品、顺铂、卡铂、奥沙利铂、卡莫司汀、槲皮素等。所述主药成分蛋白多肽类药物为白细胞介素（比如 IL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6 等），各种生长因子（比如成纤维细胞生长因子、肝生长因子、血管内皮生长因子、造血生长因子等），干扰素（比如 IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\gamma$ ），肿瘤坏死因子（比如 TNF $\alpha$ 、TNF $\beta$ ），整合素，单克隆抗体，酶，胰岛素等。所述主药成分基因药物为 DNA、质粒、mRNA、siRNA、shRNA、microRNA 等。当靶向纳米制剂用于免疫治疗时，所述主药成分除用于免疫治疗的药物外，还可同时包裹免疫佐剂以增强免疫效果。

进一步，所述药物可以为任意药学可接受剂型。

具体的，所述药学可接受剂型包括一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂并在上述制备过程中合适的步骤加入。本发明所使用的术语“药学上可接受的”是指这样的化合物、原料、组合物和/或剂型，它们在合理医学判断的范围内，适用于与患者组织接触而无过度毒性、刺激性、变态反应或与合理的利益/风险比相对称的其他问题和并发症，并有效用于既定用途。

药物制剂适于通过任何合适的途径给药，例如通过口服（包括口腔或舌下）、直肠、鼻、局部（包括口腔、舌下或经皮）、阴道或胃肠外（包括皮下、皮内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内、静脉内或者真皮下注射或输注）途径。可按药剂学领域的任何已知方法制备这类制剂，例如通过将活性成分与载体或赋形剂混合。优选口服给药、局部给药或注射给药。适于口服给药的药物制剂按独立的单位提供，例如水性或非水性液体中的溶液剂或混悬剂；胶囊剂或片剂；散剂或颗粒剂；可食用

泡沫制剂或起泡制剂等。

进一步，所述靶向载体可将药物运送到含有甘露糖受体靶点的靶细胞中。

本发明的目的之十三在于提供一种包含了所述靶向载体的复合物。

为实现上述目的，本发明采用以下方案：

所述复合物为所述靶向载体与受体形成的复合物。

进一步，所述靶向载体运载了药物。

进一步，所述受体为甘露糖受体。

本发明的目的之十四在于提供一种提高转染试剂转染效率的方法，该方法可显著的提高转染试剂的转染效率。

为实现上述目的，本发明采用以下方案：

提高转染试剂转染效率的方法为将所述的靶向元件与用于制备转染试剂的载体连接制备高转染效率的转染试剂。

转染(transfection)指真核细胞由于外源 DNA 掺入而获得新的遗传标志的过程。DNA 转染技术的发展对现代分子生物学产生了巨大的影响。基因转染技术不仅是研究转基因和基因表达的重要工具，而且是目前基因治疗的关键步骤。理想的基因转染试剂应该具有如下特点：高效转染；安全；低细胞毒性；方法简单；省时、经济。

本发明的目的之十五在于提供所述靶向元件的应用。

为实现上述目的，本发明采用以下方案：

所述靶向元件作为靶向油相的运用。

所述靶向元件作为靶向水相的运用。

具体的，根据相似相溶原理。不易溶于水的属于油相，易溶于水的属于水相。再简单一点则是把该物质与水混溶，结果能成透明溶液的属水相；分层或浑浊的属油相。

**本发明的有益效果在于：**

1) 本发明所提供的所述靶向纳米制剂、纳米制剂的组合物、靶向元件、

靶向载体、靶向药物均具较好的甘露糖受体的靶向性，可以高效的与靶细胞上的甘露糖受体结合；

2) 本发明所提供的所述靶向元件、靶向载体的制备成本低廉，易于合成，且具有通用性，可以合成多种靶向纳米制剂，并有利于纯化和表征；

3) 本发明提供的所述间隔材料可使所述靶向材料与所述基础纳米制剂材料产生一定距离，因此可使所述靶向材料暴露于靶向纳米制剂的表面，从而具有高效的甘露糖受体靶向能力；

4) 所制备的靶向纳米制剂显示出良好的廓形，尺寸小，接近球形，有着良好的血清稳定性，细胞毒性小，可适用于药物（化药和生物药）的靶向给药系统，且转染效率显著高于商品化的 Lipo 3K，可作为转染试剂使用，应用到科研以及商业中。

## 附图说明

图 1 为甘露糖-PEG<sub>1000</sub>-Chol 核磁验证结果图。

图 2 为处方 1 脂质体的粒径图。

图 3 为处方 1 脂质体的电位图。

图 4 为处方 1 脂质体的 TEM 图。

图 5 为脂质体转染结果。

图 6 为荧光显微镜观察 DC 细胞中 GFP 的表达情况。

图 7 为转染效率分析柱状图。

图 8 为甘露糖-PEG<sub>1000</sub>-Chol 的稳定性分析。

图 9 为 4℃ 存放下甘露糖-PEG<sub>1000</sub>-Chol 的转染效率。

图 10 为甘露糖-PEG<sub>1000</sub>-Chol 在血清中的稳定性分析。

图 11 流式细胞术检测甘露糖-PEG<sub>1000</sub>-Chol 和 Lipo 3K 对于 DC 细胞的毒性。

图 12 流式细胞术检测甘露糖-PEG<sub>1000</sub>-Chol 和 Lipo 3K 对于 DC 细胞的毒性的数据统计分析柱状图。

图 13 为 DC2.4 细胞摄取靶向纳米粒研究。

图 14 为荧光显微镜观察 BMDCs 细胞中 mRNA 靶向脂质体复合物的摄取情况。

图 15 为荧光显微镜观察 BMDCs 细胞中 mRNA 靶向脂质体复合物的摄取情况的数据分析。

图 16 为甘露糖聚乙二醇 400 胆固醇制备的脂质体载 mRNA 后制备的疫苗的体内抗肿瘤效果研究。

图 17 为甘露糖聚乙二醇 400 胆固醇制备的脂质体载 mRNA 后制备的疫苗的体内抗肿瘤研究的小鼠体重监测。

图 18 为甘露糖聚乙二醇 400 胆固醇制备的脂质体载 mRNA 后制备的疫苗的体内抗肿瘤研究的小鼠第 28 天的肿瘤体积。

图 19 为 m/MP400-LPX 各组体内抗肿瘤效果。

图 20 为 m/MP400-LPX 免疫后小鼠生存期。

图 21 为 DC2.4 细胞对载 mRNA 的不同配体链长靶向脂质体复合物的摄取。

图 22 为 DC2.4 细胞对载 mRNA 的不同配体链长靶向脂质体复合物的摄取的数据分析。

图 23 为 DC2.4 细胞对不同配体链长靶向脂质体复合物的转染效果。

图 24 为 DC2.4 细胞对不同配体链长靶向脂质体复合物的转染效果数据分析。

图 25 为 BMDCs 细胞对不同配体链长靶向脂质体复合物的转染效果。

图 26 为 BMDCs 细胞对不同配体链长靶向脂质体复合物的转染效果数据分析。

图 27 为不同配体链长靶向脂质体复合物体内抗肿瘤效果。

图 28 为不同配体链长靶向脂质体复合物体内抗肿瘤研究的小鼠体重监测。

图 29 为不同配体链长靶向脂质体复合物体内抗肿瘤研究的小鼠第 28

天的肿瘤体积。

图 30 为不同配体链长靶向脂质体复合物体内抗肿瘤效果数据分析。

图 31 为不同配体链长靶向脂质体复合物免疫后小鼠生存期。

## 具体实施方式

所举实施例是为了更好地对本发明进行说明，但并不是本发明的内容仅局限于所举实施例。所以熟悉本领域的技术人员根据上述发明内容对实施方案进行非本质的改进和调整，仍属于本发明的保护范围。

### 实施例 1

针对现有纳米制剂的不足，设计出一种甘露糖及其衍生物修饰的具有靶向性的纳米制剂。

本实施方式中，纳米制剂由靶向配体甘露糖及其衍生物、纳米制剂和主药成分组成。

本实施方式中，靶向配体为甘露糖。

在其他实施方式中，靶向配体可以是甘露糖衍生物，可以是上述的甘露糖苷、甘露糖胺、甘露聚糖等中的一种或几种。具体地，甘露糖衍生物为甲基-D-甘露糖苷、1- $\alpha$  甲酰甲基-甘露吡喃糖苷、4-氨基苯基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、4-硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、4-甲基伞形酮基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、甘露糖-6-磷酸、氨基甲酰基-D-甘露糖、甘露糖胺、甘露聚糖等中的一种或几种。

本实施方式中，纳米制剂为脂质体、HDL 纳米粒、固脂纳米粒、聚合物胶束。

在其他实施方式中，纳米制剂可以是乳剂、纳米凝胶、核壳型纳米粒等中的一种或几种。

本实施方式中，纳米制剂包载的主药成分为小分子药物、蛋白多肽类药物或基因药物等中的一种或几种。

本实施方式中，由单个甘露糖及其衍生物和/或 2~10 个甘露糖及其衍

生物修饰纳米制剂。

本实施方式中，靶向配体甘露糖及其衍生物与制备纳米制剂的载体材料偶联之后再制备纳米制剂。

在其他实施方式中，靶向配体甘露糖及其衍生物可以制备纳米制剂之后再将其甘露糖及其衍生物吸附或偶联到纳米制剂表面。

本实施方式中，甘露糖及其衍生物与纳米制剂或制备纳米制剂的载体材料通过间隔基 PEG 偶联。

在其他实施方式中，甘露糖及其衍生物与纳米制剂或制备纳米制剂的载体材料直接偶联或通过其他间隔基偶联，其他间隔基可以是上述的戊二醛、乙二胺、丙二酸、短链烷基链（比如-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-）、PEG、氨基酸、二肽、寡肽、多肽等中的一种或几种。具体地，间隔基氨基酸为精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。二肽、寡肽、多肽的两端氨基酸选自以下的氨基酸组成：精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸；中间氨基酸选自 20 种任意氨基酸（比如 RGD）。

在本实施方式中，PEG 可以是未修饰的双端均为羟基的普通 PEG，也可以是至少一端氨基化的 PEG，PEG 一端连接 DSPE、胆固醇、棕榈酸。

在其他实施方式中，PEG 一端也可以连接其他上述的具有活性氨基或羟基的，药学上可以接受的制备脂质体、HDL 纳米粒、固脂纳米粒、聚合物胶束等的载体材料。具体地，所述载体材料选自聚乳酸-羟基乙酸共聚物（PLGA）、聚己内酯（PCL）、多聚赖氨酸（PLL）、聚乙烯亚胺（PEI）、透明质酸（HA）、壳聚糖、明胶、泊洛沙姆、硬脂醇蛋黄卵磷脂、大豆卵磷脂、脑磷脂、鞘磷脂、PC（磷脂酰胆碱）、EPG（卵磷脂酰甘油）、SPG（大豆磷脂酰甘油）、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺（DPPE）、二棕榈酰磷脂酰胆碱（DPPC）、二油酰磷脂酰胆碱（DOPC）、二硬脂酰磷脂酰胆碱（DSPC）、二豆蔻酰磷脂酰胆碱（DMPC）、二亚油酰磷脂酰胆碱（DLPC）、二油酰磷脂酰甘油（DOPG）、二棕榈酰磷脂酰甘油（DPPG）、二肉豆蔻酰磷脂酰胆

碱 (DMPC)、二月桂酰磷脂酰甘油 (DLPG)、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、二甲基双十八烷基溴化铵 (DDAB)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷 (氯化物盐) (DOTAP)、硬脂酸、胆固醇、单硬脂酸甘油酯、双硬脂酸甘油酯、三硬脂酸甘油酯、三萣酸甘油酯、月桂酸甘油酯、甘油棕榈酸硬脂酸脂、二十二酸单甘油酯、二十二烷酸双甘油酯、二十二烷酸三甘油酯、三豆蔻酸甘油酯、枸橼酸甘油酯、十八醇、豆蔻酸、三萣酸、月桂酸等中的一种或几种。

在本实施方式中,制备的纳米制剂,采用静脉注射、皮下注射的方式送入体内。

在其他实施方式中,制备的纳米制剂,也可以采用腹腔注射、肌肉注射的方式送入体内。

在实施例中所涉及到的 mRNA 按照常规条件,例如分子克隆实验指南(第三版, J.萨姆布鲁克等著)中所述的条件,或购买或按照制造厂商所建议的条件实施得到。

以下为具体实施例。

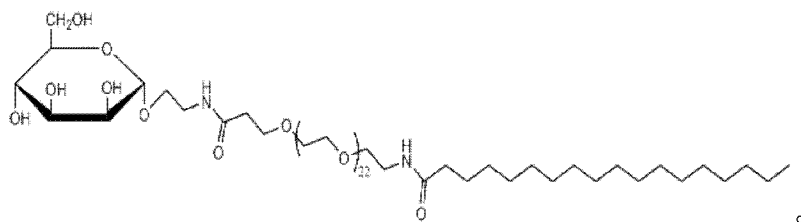
### 实施例 1 载体材料的合成

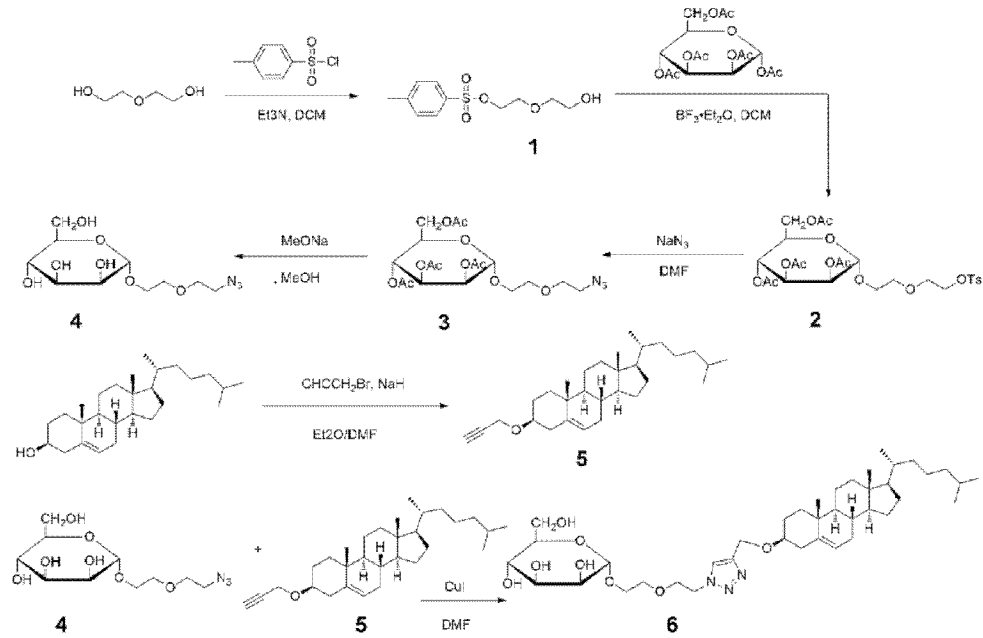
甘露糖-PEGn-Chol: 以甘露糖-PEG100-Chol 合成为例,其他不同长度 PEG 也按此合成路线合成。取二甘醇、对甲苯磺酰氯与三乙胺,溶于 DCM 中,室温反应 24 h,硅胶柱层析分离得产物 TosOC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH (化合物 1)。取化合物 1 与五乙酰化甘露糖和三氟化硼乙醚 (BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O),溶于 DCM 中,室温反应 24 h,硅胶柱层析分离得产物 Aco-Mannose-OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OTos (化合物 2)。取化合物 2 与叠氮钠,溶于 DMF 中,60°C 反应 24 h,硅胶柱层析分离得固体产物 Aco-Mannose-OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>3</sub> (化合物 3)。取化合物 3 溶于甲醇钠的甲醇溶液中,室温反应 3 h,浓缩得产物 Mannose-OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>3</sub> (化合物 4)。取胆固醇、溴丙炔和钠氢溶于乙醚和 DMF 的混合溶液中,室温反应 24 h,硅胶柱层析分离得固体产物 Chol-CH<sub>2</sub>CCH

(化合物 5)。取化合物 4、化合物 5 和碘化亚铜溶于 DMF 中，室温反应 24 h，硅胶柱层析得到固体产物 Mannose-Chol (化合物 6)，合成路线如反应式 I 所示 (甘露糖-PEG1000-Chol 的合成路线如反应式 II 所示)。分析附图 1 中各特征氢质子的化学位移  $\delta$  (ppm)：5.30-5.42 ppm (1 个) 分别为胆固醇中=CH-氢的位移；7.92ppm (1 个) 为 N-CH=C 中氢的位移，这些特征峰的存在，说明化合物 4 连接到化合物 5 片段上，通过  $^1\text{H-NMR}$  核磁结果可知甘露糖-PEG100-Chol 已经成功偶联。

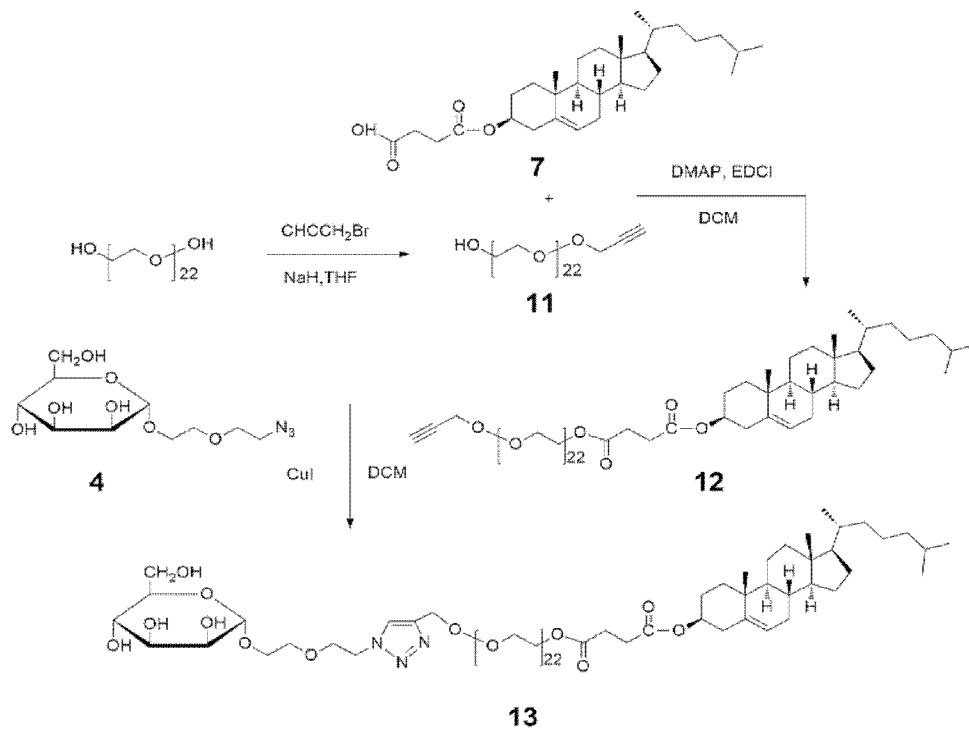
甘露糖-PEG2000-DSPE：DSPE-PEG200-NH<sub>2</sub> 可以直接购买，称取 5mg 甘露糖，加入 5ml 乙醇使溶解。称取 5mg DSPE-PEG-NH<sub>2</sub>，溶于 5ml 氯仿-乙醇的混合溶剂 (9:1, V/V)，在氮气保护条件下，滴加入 0.5ml 甘露糖的乙醇溶液，搅拌混匀后，加入 100 $\mu\text{l}$  三乙胺，于 40 $^\circ\text{C}$  搅拌反应 12h。反应结束后，减压旋蒸除去有机溶剂，加入去离子水使复溶，透析，除去未反应的甘露糖，冷冻干燥即得产物甘露糖-PEG2000-DSPE。

甘露糖-PEG2000-棕榈酸的合成：FmocNH-PEG-COOH 溶于水，加入 EDC $\cdot\text{HCl}$  和 sulfo-NHS，室温搅拌 10 分钟，2-氨基乙基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷水溶解后加入上述反应体系中，室温反应 48 h，硅胶柱层析分离得产物 (化合物 1)。将化合物 1 溶于 DCM，加入 1-辛二醇，反应数小时，硅胶柱层析分离得产物 (化合物 2)。将化合物 2 与棕榈酸加入乙醚和 DMF 的混合溶剂中，室温反应数小时，硅胶柱层析分离得固体产物甘露糖-PEG2000-棕榈酸，其结构式为





反应式 I



反应式 II

## 实施例 2 脂质体的制备

### 处方组成

处方	DOTAP	DOPC	Chol	甘露糖 -PEG100-Chol	甘露糖 -PEG1000-Chol	甘露糖 -PEG2000-Chol	甘露糖 -PEG5000-Chol
----	-------	------	------	---------------------	----------------------	----------------------	----------------------

处方1	50	10	40	0	0	0	0
处方2	50	10	35	5	0	0	0
处方3	50	10	35	0	5	0	0
处方4	50	10	35	0	0	5	0
处方5	50	10	35	0	0	0	5
处方6	DOTAP	DSPE-PEG2000	Chol	甘露糖-PEG2000-DSPE		主药	
处方7	50	10	35	5		pGFP	
处方8	50	10	35	2		PTX	
处方9	50	10	35	1		白蛋白	
处方10	50	10	35	0		PTX	
处方11	50	10	0	0		pGFP	

注：处方1~处方5的主药为GFP-mRNA。

制备方法1：按上述处方称取不同配比的磷脂（主药为PTX时，与磷脂一同加入），加入圆底烧瓶中，加入氯仿/乙醇=1:1(v/v)溶解后，减压旋

蒸去除有机溶剂，在瓶内壁形成一层薄膜，加入 PBS7.4 缓冲溶液水化，100W 超声 3min，得到脂质体。包裹 pGFP 时，可以将空白脂质体与 pGFP 在室温孵育得到。对得到的脂质体进行表征，结果见图 2-4。

制备方法 2（处方 8）：按上述处方称取不同配比的磷脂，加入氯仿/乙醚使溶解，再加入白蛋白的水溶液，超声得到乳浊液，旋蒸除尽有机溶剂，再加入 PBS7.4 缓冲液重新水化脂质体。

### 实施例 3 固脂纳米粒的制备

固体脂质纳米粒是以脂质为骨架材料制备而成的纳米结构载体，具有生理相容性、细胞亲和性、靶向性等特点。本实施例中，加入经甘露糖修饰的脂质，提高了固体脂质纳米粒的靶向性。

处方组成

处方	油相（10ml）				水相（35ml）		主药 (DOX)
	甘露糖-PEG2000- 棕榈酸	三硬脂酸 甘油酯	单硬脂酸 甘油酯	大豆 卵磷脂	泊洛沙 姆 188	Tween 80	
处方 11	0	0	40mg	60mg	0	2%	10mg
处方 12	0	0	40mg	60mg	3%	0	10mg
处方 13	20mg	0	80mg	0mg	3%	0	10mg
处方 14	20mg	80mg	0	0mg	2%	0	10mg
处方 15	50mg	50mg	0	0mg	2%	0	10mg
处方 16	50mg	50mg	0	0mg	4%	0	10mg

制备方法：精密称取处方量的药物、脂质材料溶于乙醇中，恒温水浴搅拌形成油相；称取处方量的表面活性剂溶于纯净水中，恒温水浴加热形成水相；在搅拌条件下，将油相注入水相中，恒温搅拌乳化浓缩，乳化液浓缩到一定体积后，将其倾入恒温 4 °C 冷水中搅拌固化，过 0.45 $\mu$ m 滤膜即得。

### 实施例 4 HDL 纳米粒的制备

HDL 是一类组成、密度、颗粒大小不均一的脂蛋白。HDL 中含量最多的

载脂蛋白是 ApoA-I，其疏水性的内核在体内运输胆固醇。重组高密度脂蛋白有内源性分离或体外合成的 ApoA-I 与磷脂、胆固醇等在体外重组形成，在生化特性和功能上与内源性 HDL 类似。高密度脂蛋白具有许多优良的特性：具有高度的安全性，高效的运载性（能够以三种方式载药：核心包埋，及亲脂性药物包埋与重组高密度脂蛋白的核心内；表面嵌入，及亲脂性药物插入到磷脂单层中；蛋白键和），靶向性。本实施例中，制备的 HDL 纳米粒中加入了甘露糖配体，进一步提高了纳米粒的靶向性。

### 处方组成

处方	DOTAP	DOPC	DSPE-PEG2000	甘露糖-PEG2000- DSPE	Chol	甘露糖-PEG1000-Chol	ApoA-I	主药
处方 17	60mg	15mg	45mg	0mg	0mg	0mg	1mg	DOX10mg
处方 18	0mg	120mg	0mg	0mg	0mg	0mg	1mg	DOX10mg
处方 19	0mg	100mg	0mg	20mg	0mg	0mg	1mg	DOX10mg
处方 20	0mg	100mg	0mg	20mg	0mg	0mg	1.5mg	DOX10mg
处方 21	50mg	10mg	0mg	0mg	20mg	20mg	1mg	DOX10mg
处方	DOTAP	DSPE-PEG2000	PLGA	Chol	甘露糖-PEG1000-Chol		ApoA-I	主药
处方 22	50	10	10	30	10		0.5mg	siRNA/PTX
处方 23	50	10	10	30	10		1mg	siRNA/PTX
处方 24	50	10	10	30	10		1.5mg	siRNA/PTX
处方 25	50	10	10	30	10		2mg	siRNA/PTX

制备方法：与脂质体的制备方法类似，适用于制备脂质体的方法均可以用于 HDL 纳米粒的制备。

制备方法 1：按上述处方称取不同配比的磷脂（脂溶性的主药 DOX 同时加入），加入圆底烧瓶中，加入氯仿溶解后，减压旋蒸去除有机溶剂，在瓶内壁形成一层薄膜，加入 PBS7.4 缓冲溶液水化，100W 超声 3min，得到脂质体。称取处方量 ApoA-I 缓慢加入脂质体混悬液中，4°C 静置孵育 24h，再透析即得。

制备方法 2：按上述处方称取不同配比的磷脂，加入圆底烧瓶中，加入

氯仿溶解后，减压旋蒸去除有机溶剂，在瓶内壁形成一层薄膜，加入 PLGA/PTX 的纳米粒混悬液，100W 超声 3min，得到脂质体。称取处方量 ApoA-I 缓慢加入脂质体混悬液中，4°C 静置孵育 24h，再透析即得。

### 实施例 5 聚合物胶束的制备

处方组成

处方	甘露糖-PEG-DSPE	DSPE	DOPC	DSPC	DMPC	主药
处方 26	20	60	20	0	0	槲皮素
处方 27	20	60	0	20	0	DOX
处方 28	20	60	35	0	20	PTX
处方 29	20	60	10	35	0	DOX
处方 30	50	0	50	0	0	DOX

制备方法：取载体材料和主药溶于氯仿（根据溶解情况可以选择其他溶剂，如乙醇，或乙醇与氯仿的混合溶剂），减压旋蒸去除有机溶剂，在瓶内壁形成一层薄膜，加入 PBS7.4 缓冲溶液水化，即得。

### 实施例 6 靶向纳米粒的摄取实验

转染前 12 小时，将平皿中 Raw264.7 细胞吹散，培养基重悬，计数，在 24 孔板的每个孔中接入 1mL 细胞悬液，密度为  $10 \times 10^4$  个/mL，于培养箱中孵育约 12 小时，备用。弃掉培养基，向各孔中分别加入终浓度为 100 ng/mL 的脂多糖（LPS），于 37°C 孵育约 12 小时刺激巨噬细胞。弃掉培养基，向各孔中分别加入终浓度为 25 ng/mL 的不同制剂（处方 1 和处方 3），于 37°C 避光孵育约 2 小时，考察巨噬细胞对不同制剂的摄取情况。到达孵育时间点后，弃去培养基，并以冷的 PBS 洗 2 次；PBS 收集 24 孔板中细胞，再以 PBS 洗细胞一次（1200 rpm、5 min），最后置于流式细胞仪中分析结果。结果见图 5，其从左到右分别为：Control，处方 3，处方 1。可见，加入了靶向配体甘露糖-PEG1000-Chol 后，能显著增加细胞的转染效率。

### 实施例 7 材料

编号	靶向材料 (摩尔)	间隔材料 (摩尔)	基础纳米制剂材料 (摩尔)
1	甘露糖 0.01mol	PEG <sub>100</sub> 0.1mol	脂质 0.1mol
2	甘露糖 0.01mol	PEG <sub>200</sub> 0.05mol	脂质 0.5mol
3	甘露糖 0.01mol	PEG <sub>400</sub> 0.02mol	脂质 0.3mol
4	甘露糖 0.01mol	PEG <sub>1000</sub> 0.01mol	脂质 0.06mol
5	甘露糖 0.01mol	PEG <sub>2000</sub> 0.1mol	脂质 0.1mol
6	甲基-D-甘露糖苷 0.01mol	戊二醛 0.01mol	PLGA0.1mol
7	1- $\alpha$ 甲酰甲基-甘露吡喃糖苷 0.01mol	乙二胺 0.06mol	PLA0.2mol
8	4-硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷 0.01mol	丙二酸 0.08mol	PCL0.5mol
9	4-甲基伞形酮基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷 0.01mol	氨基酸 0.04mol	PLL0.1mol
10	甘露糖-6-磷酸、氨基甲酰基-D-甘露糖 0.01mol	肽 0.02mol	PEI0.05mol
11	盐酸 D-甘露糖胺 0.01mol	PEG <sub>100</sub> 0.01mol	HA0.1mol
12	N-乙酰-D-甘露糖胺 0.01mol	PEG <sub>100</sub> 0.01mol	壳聚糖 0.3mol
13	甘露聚糖 0.01mol	PEG <sub>1000</sub> 0.05mol	明胶 0.5mol
14	甘露糖 0.01mol	PEG <sub>1000</sub> 0.08mol	泊洛沙姆 0.6mol
15	甘露糖 0.01mol	PEG <sub>1000</sub> 0.01mol	硬脂醇 0.1mol

在本实施例中脂质的材料为胆固醇、蛋黄卵磷脂、大豆卵磷脂、脑磷脂、鞘磷脂、PC（磷脂酰胆碱）、EPG（卵磷脂酰甘油）、SPG（大豆磷脂酰甘油）、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺（DSPE）、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺（DPPE）、二棕榈酰磷脂酰胆碱（DPPC）、二油酰磷脂酰胆碱（DOPC）、二硬脂酰磷脂酰胆碱（DSPC）、二豆蔻酰磷脂酰胆碱（DMPC）、二亚油酰磷脂酰胆碱（DLPC）、二油酰磷脂酰甘油（DOPG）、二棕榈酰磷脂酰甘油（DPPG）、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱（DMPC）、二月桂酰磷脂酰甘油（DLPG）、十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）、二甲基双十八烷基溴化铵（DDAB）、1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷（氯化物盐）（DOTAP）中的一

种或多种。

在本实施例中，所述间隔材料氨基酸为精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸中的一种或多种。肽为二肽、寡肽、多肽，肽的两端氨基酸选自以下的氨基酸组成：精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸；中间氨基酸选自 20 种任意氨基酸（比如 RGD）。

### 实施例 8 制备靶向载体

将实施例 7 的所述基础纳米制剂材料制备成纳米运药载体，再将实施例 7 的所述靶向材料附于制备成的所述纳米运药载体表面，即得靶向载体。

### 实施例 9 靶向元件的制备

将实施例 7 的靶向材料与间隔材料进行合成，此处以甘露糖与 PEGn 的合成作为例。

取二甘醇、对甲苯磺酰氯与三乙胺，溶于 DCM 中，室温反应 24 h，通过柱层析分离得产物  $\text{TosOC}_2\text{H}_4\text{OC}_2\text{H}_4\text{OH}$ （化合物 1）。取化合物 1 与五乙酰化甘露糖及其衍生物和三氟化硼乙醚（ $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ）溶于 DCM 中，室温反应 24 h，柱层析分离得产物  $\text{Aco-M-OC}_2\text{H}_4\text{OC}_2\text{H}_4\text{OTos}$ （化合物 2），M 为甘露糖及其衍生物。

### 实施例 10 制备靶向载体

将实施例 9 的靶向元件与基础纳米制剂材料进行进一步合成，此处以甘露糖、PEGn 和胆固醇的合成作为例。

取实施例 2 制得的化合物与叠氮钠，溶于 DMF 中， $60^\circ\text{C}$  反应 24 h，硅胶柱层析分离得固体产物  $\text{Aco-M-OC}_2\text{H}_4\text{OC}_2\text{H}_4\text{N}_3$ （化合物 3）。取化合物 3 溶于甲醇钠的甲醇溶液中，室温反应 3 h，浓缩得产物  $\text{M-OC}_2\text{H}_4\text{OC}_2\text{H}_4\text{N}_3$ （化合物 4）。取胆固醇、溴丙炔和钠氢溶于乙醚和 DMF 的混合溶液中，室温反应 24 h，硅胶柱层析分离得固体产物  $\text{Chol-CH}_2\text{CCH}$ （化合物 5）。取化合物 4、化合物 5 和碘化亚铜溶于 DMF 中，室温反应 24 h，硅胶柱层析得

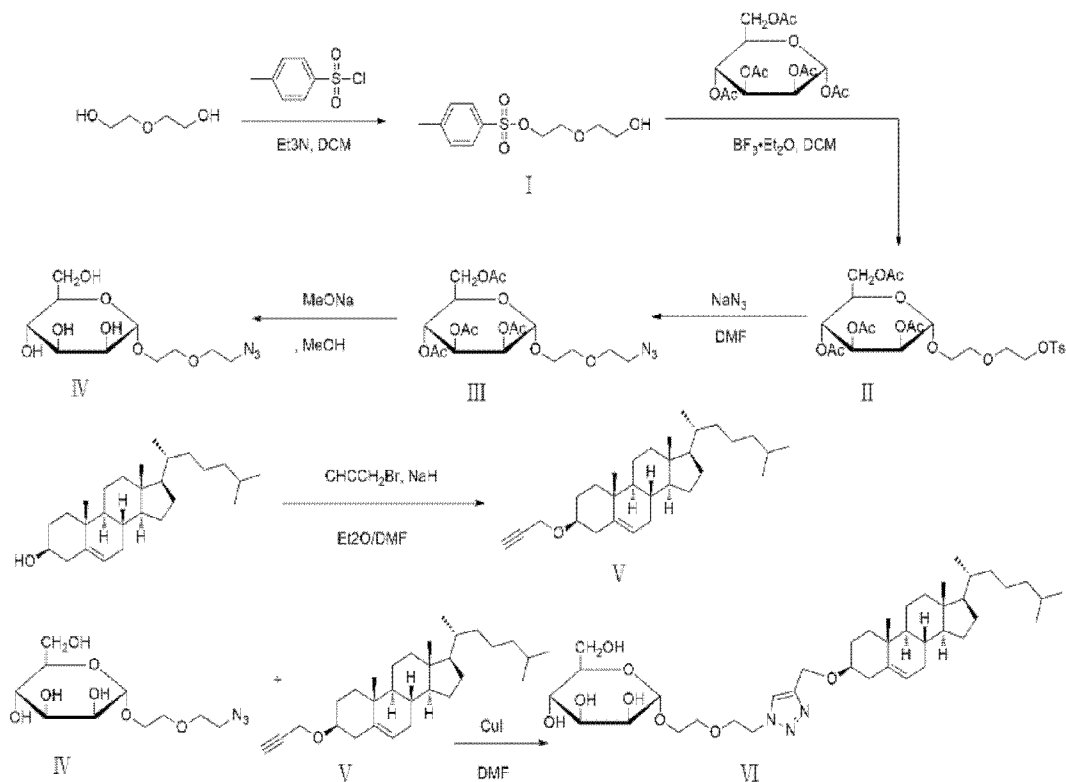
到固体产物 M-PEG<sub>n</sub>-Chol（化合物 6）。

### 实施例 11 提高靶向载体的靶向性

提高实施例 8 靶向载体的方法：A.将实施例 7 的靶向材料与间隔材料合成靶向元件；B.将实施例 7 的基础纳米制剂材料制备成纳米制剂，再将步骤 A 所得的靶向元件与实施例 8 的纳米运药载体连接。

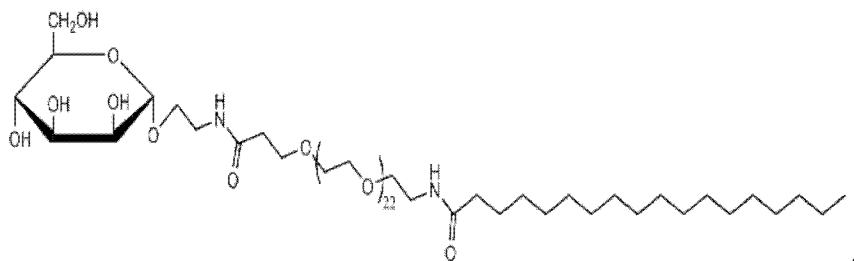
### 实施例 12 靶向载体的合成

甘露糖-PEG<sub>n</sub>-Chol：以甘露糖-PEG100-Chol 合成为例，其他不同长度 PEG 也按此合成路线合成。取二甘醇、对甲苯磺酰氯与三乙胺，溶于 DCM 中，室温反应 24 h，硅胶柱层析分离得产物 TosOC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH（式 I）。取式 I 的化合物与五乙酰化甘露糖和三氟化硼乙醚(BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O)，溶于 DCM 中，室温反应 24 h，硅胶柱层析分离得产物 Aco-Mannose-OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OTos（式 II）。取式 II 的化合物与叠氮钠，溶于 DMF 中，60℃反应 24 h，硅胶柱层析分离得固体产物 Aco-Mannose-OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>3</sub>（式 III）。取式 III 的化合物溶于甲醇钠的甲醇溶液中，室温反应 3 h，浓缩得产物 Mannose-OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>3</sub>（式 IV）。取胆固醇、溴丙炔和钠氢溶于乙醚和 DMF 的混合溶液中，室温反应 24 h，硅胶柱层析分离得固体产物 Chol-CH<sub>2</sub>CCH（式 V）。取式 IV 的化合物、式 V 的化合物和碘化亚铜溶于 DMF 中，室温反应 24 h，硅胶柱层析得到固体产物 Mannose-Chol（式 VI）。分析附图 1 中各特征氢质子的化学位移 δ（ppm）：5.30-5.42 ppm（1 个）分别为胆固醇中=CH-氢的位移；7.92ppm（1 个）为 N-CH=C 中氢的位移，这些特征峰的存在，说明化合物式 IV 连接到化合物式 V 片段上，通过 <sup>1</sup>H-NMR 核磁结果可知甘露糖-PEG100-Chol 已经成功偶联，具体见图 1，合成路线如下：



甘露糖-PEG2000-DSPE: DSPE-PEG200-NH<sub>2</sub> 可以直接购买, 称取 5mg 甘露糖, 加入 5ml 乙醇使溶解。称取 5mg DSPE-PEG-NH<sub>2</sub>, 溶于 5ml 氯仿-乙醇的混合溶剂 (9:1, V/V), 在氮气保护条件下, 滴加入 0.5ml 甘露糖的乙醇溶液, 搅拌混匀后, 加入 100 $\mu$ l 三乙胺, 于 40 $^{\circ}$ C 搅拌反应 12h。反应结束后, 减压旋蒸除去有机溶剂, 加入去离子水使复溶, 透析, 除去未反应的甘露糖, 冷冻干燥即得产物甘露糖-PEG2000-DSPE。

甘露糖-PEG2000-棕榈酸的合成: FmocNH-PEG-COOH 溶于水, 加入 EDC $\cdot$ HCl 和 sulfo-NHS, 室温搅拌 10 分钟, 2-氨基乙基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷水溶解后加入上述反应体系中, 室温反应 48 h, 硅胶柱层析分离得产物。将化合物 1 溶于 DCM, 加入 1-辛二醇, 反应数小时, 硅胶柱层析分离得产物。将化合物 2 与棕榈酸加入乙醚和 DMF 的混合溶剂中, 室温反应数小时, 硅胶柱层析分离得固体产物甘露糖-PEG2000-棕榈酸, 其结构式为



### 实施例 13 制备靶向药物

将药物包裹于实施例 8 所制备的靶向载体中。

本实施例中，药物为小分子药物和/或蛋白多肽类药物和/或基因药物。

所述小分子药物为抗肿瘤药物紫杉烷类（紫杉醇、多西紫杉醇、三尖杉宁碱、7-表向紫杉醇）、喜树碱类（喜树碱、SN38、伊立替康、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱等）、长春碱类（长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞宾、长春氟宁等）、阿霉素、表阿霉素、柔红霉素、表柔比星、两性霉素、甲氨蝶呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、米托蒽醌或其衍生物、吉非替尼、诺司卡品、顺铂、卡铂、奥沙利铂、卡莫司汀、槲皮素等。

所述主药成分蛋白多肽类药物为白细胞介素（比如 IL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6 等），各种生长因子（比如成纤维细胞生长因子、肝生长因子、血管内皮生长因子、造血生长因子等），干扰素（比如 IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\gamma$ ），肿瘤坏死因子（比如 TNF $\alpha$ 、TNF $\beta$ ），整合素，单克隆抗体，酶，胰岛素等。

所述主药成分基因药物为 DNA、质粒、mRNA、siRNA、shRNA、microRNA 等。当靶向纳米制剂用于免疫治疗时，所述主药成分除用于免疫治疗的药物外，还可同时包裹免疫佐剂以增强免疫效果。

### 实施例 14 制备靶向药物

处方	DOTA P (mg)	DOPC (mg)	Chol (mg)	甘露糖 -PEG100-Ch ol (mg)	甘露糖 -PEG1000-Ch ol (mg)	甘露糖 -PEG2000-Ch ol (mg)	甘露糖 -PEG5000-Ch ol (mg)
处方 1	50	10	40	0	0	0	0

处方 2	50	10	35	5	0	0	0
处方 3	50	10	35	0	5	0	0
处方 4	50	10	35	0	0	5	0
处方 5	50	10	35	0	0	0	5
处方	DOTA P (mg)	DSPE-PEG2000 (mg)	Chol (mg)	甘露糖-PEG2000-DSPE (mg)		主药	
处方 6	50	10	35	5		pGFP	2mg
处方 7	50	10	35	2		PTX	5mg
处方 8	50	10	35	1		白蛋白	4mg
处方 9	50	10	35	0		PTX	2mg
处方 10	50	10	0	0		pGFP	1mg

注：处方 1~处方 5 的主药为 GFP-mRNA，（购自 trilink 公司，批号为：WOTL6647）。

制备方法 1：按上述处方称取不同重量配比的磷脂（主药为 PTX 时，与磷脂一同加入），加入圆底烧瓶中，加入氯仿/乙醇=1:1(v/v)溶解后，减压旋蒸去除有机溶剂，在瓶内壁形成一层薄膜，加入 PBS7.4 缓冲溶液水化，100W 超声 3min，得到脂质体。包裹 pGFP 时，可以将空白脂质体与 pGFP 在室温孵育得到，由甘露糖-PEG1000-Chol 得到的纳米粒可记为 MP1000-LPX。对得到的脂质体进行表征，结果显示脂质体的粒径大小为  $132.93 \pm 4.93$  nm、zeta 电势为  $37.93 \pm 2.95$  mV，并观察到脂质体具有明显的脂膜结构，形状接近球形（图 2-4）。

制备方法 2（处方 8）：按上述处方称取不同配比的磷脂，加入氯仿/乙醚使溶解，再加入白蛋白的水溶液，超声得到乳浊液，旋蒸除尽有机溶剂，再加入 PBS7.4 缓冲液重新水化脂质体。

### 实施例 15 制备靶向药物

固体脂质纳米粒是以脂质为骨架材料制备而成的纳米结构载体，具有生理相容性、细胞亲和性、靶向性等特点。本实施例中，加入经甘露糖修

饰的脂质，提高了固体脂质纳米粒的靶向性。

处方	油相 (10ml)				水相 (35ml)		主药(DOX) (mg)
	甘露糖-PEG2000-棕榈酸 (mg)	三硬脂酸甘油酯 (mg)	单硬脂酸甘油酯 (mg)	大豆卵磷脂 (mg)	泊洛沙姆 188 (%)	Tween 80 (%)	
处方 11	0	0	40	60	0	2	10
处方 12	0	0	40	60	3	0	10
处方 13	20	0	80	0	3	0	10
处方 14	20	80	0	0	2	0	10
处方 15	50	50	0	0	2	0	10
处方 16	50	50	0	0	4	0	10

制备方法：精密称取处方量的药物、脂质材料溶于乙醇中，恒温水浴搅拌形成油相；称取处方量的表面活性剂溶于纯净水中，恒温水浴加热形成水相；在搅拌条件下，将油相注入水相中，恒温搅拌乳化浓缩，乳化液浓缩到一定体积后，将其倾入恒温 4 °C 冷水中搅拌固化，过 0.45 μm 滤膜即得。

### 实施例 16 制备靶向药物

HDL 是一类组成、密度、颗粒大小不均一的脂蛋白。HDL 中含量最多的载脂蛋白是 ApoA-I，其疏水性的内核在体内运输胆固醇。重组高密度脂蛋白有内源性分离或体外合成的 ApoA-I 与磷脂、胆固醇等在体外重组形成，在生化特性和功能上与内源性 HDL 类似。高密度脂蛋白具有许多优良的特性：具有高度的安全性，高效的运载性（能够以三种方式载药：核心包埋，及亲脂性药物包埋与重组高密度脂蛋白的核心内；表面嵌入，及亲脂性药物插入到磷脂单层中；蛋白键和），靶向性。本实施例中，制备的 HDL 纳米粒中加入了甘露糖配体，进一步提高了纳米粒的靶向性。

处方	DOTAP (mg)	DOPC (mg)	DSPE-PEG2000 (mg)	甘露糖-PEG2000-DSPE (mg)	Chol (mg)	甘露糖-PEG1000-Chol (mg)	ApoA-I (mg)	主药 (DOX)
处方 17	60	15	45	0	0	0	1	10mg
处方 18	0	120	0	0	0	0	1	10mg
处方 19	0	100	0	20	0	0	1	10mg
处方 20	0	100	0	20	0	0	1.5	10mg
处方 21	50	10	0	0	20	20	1	10mg
处方	DOTAP (mg)	DSPE-PEG2000 (mg)	PLGA (mg)	Chol (mg)	甘露糖-PEG1000-Chol (mg)	ApoA-I (mg)	主药 (siRNA/PTX)	
处方 22	50	10	10	30	10	0.5	2mg	
处方 23	50	10	10	30	10	1	2mg	
处方 24	50	10	10	30	10	1.5	2mg	
处方 25	50	10	10	30	10	2	2mg	

制备方法：与脂质体的制备方法类似，适用于制备脂质体的方法均可以用于 HDL 纳米粒的制备。

制备方法 1：按上述处方称取不同配比的磷脂（脂溶性的主药 DOX 同时加入），加入圆底烧瓶中，加入氯仿溶解后，减压旋蒸去除有机溶剂，在瓶内壁形成一层薄膜，加入 PBS7.4 缓冲溶液水化，100W 超声 3min，得到脂质体。称取处方量 ApoA-I 缓慢加入脂质体混悬液中，4℃ 静置孵育 24h，再透析即得。

制备方法 2：按上述处方称取不同配比的磷脂，加入圆底烧瓶中，加入氯仿溶解后，减压旋蒸去除有机溶剂，在瓶内壁形成一层薄膜，加入 PLGA/PTX 的纳米粒混悬液，100W 超声 3min，得到脂质体。称取处方量 ApoA-I 缓慢加入脂质体混悬液中，4℃ 静置孵育 24h，再透析即得。

### 实施例 17 制备靶向药物

处方	甘露糖-PEG-DSPE (mg)	DSPE (mg)	DOPC (mg)	DSPC (mg)	DMPC (mg)	主药
处方 26	20	60	20	0	0	槲皮素 (2mg)
处方 27	20	60	0	20	0	DOX (5mg)
处方	20	60	35	0	20	PTX

28						(2mg)
处方 29	20	60	10	35	0	DOX (5mg)
处方 30	50	0	50	0	0	DOX (5mg)

制备方法：取载体材料和主药溶于氯仿（根据溶解情况可以选择其他溶剂，如乙醇，或乙醇与氯仿的混合溶剂），减压旋蒸去除有机溶剂，在瓶内壁形成一层薄膜，加入 PBS 7.4 缓冲溶液水化，即得。

### 实施例 18 靶向纳米粒的摄取实验

转染前 12 小时，将平皿中 Raw264.7 细胞吹散，培养基重悬，计数，在 24 孔板的每个孔中接入 1mL 细胞悬液，密度为  $10 \times 10^4$  个/mL，于培养箱中孵育约 12 小时，备用。弃掉培养基，向各孔中分别加入终浓度为 100 ng/mL 的脂多糖（LPS），于 37°C 孵育约 12 小时刺激巨噬细胞。弃掉培养基，向各孔中分别加入终浓度为 25 ng/mL 的不同制剂（所有处方均已展开了实验，这里以处方 1 和处方 3 为例），于 37°C 避光孵育约 2 小时，考察巨噬细胞对不同制剂的摄取情况。到达孵育时间点后，弃去培养基，并以冷的 PBS 洗 2 次；PBS 收集 24 孔板中细胞，再以 PBS 洗细胞一次（1200 rpm、5 min），最后置于流式细胞仪中分析结果。结果见图 5，其从左到右分别为：Control，处方 3，处方 1。可见，加入了靶向配体甘露糖-PEG1000-Chol 后，能显著增加细胞的转染效率。

### 实施例 19 纳米靶向制剂的转染效率

将 DC2.4 细胞与制备好的纳米靶向制剂在 24 孔板中同共孵育，其中纳米靶向制剂的 N/P 比为 5。采用流式细胞术检测 GFP 阳性的 DC2.4 细胞的转染效率与平均荧光强度(MFI)。简而言之，DC2.4 细胞是通过正向散射(FSC)和侧散射(SSC) 捕获的。存活的 DC2.4 细胞显示在区域 1 (R1)，GFP 阳性细胞显示在区域 2(R2)。转染效率自动显示在 R2。获得 GFP 阳性细胞中 GFP 表达的 MFI 使用 FlowJo 软件。计算 MFI 需要扣除未处理 DC2.4 细胞的背

景值。进一步详细了解主药 mRNA 的体外转染动力学，所述甘露糖-PEG1000-Chol 在 DC2.4 细胞上的转染效率在 12 ~ 72 h 的表达也得到证实。

如图 6-7 结果显示，甘露糖-PEG1000-Chol 组诱导的 GFP 阳性细胞最多，比例高达 52%，明显高于任何其他组别，通过计算得出甘露糖-PEG1000-Chol 的转染效率为  $52.09 \pm 4.85\%$ ，远远超过商业使用的转染试剂 Lipo 3K ( $11.47 \pm 2.31\%$ )。

### 实施例 20 稳定性测试

对甘露糖-PEG1000-Chol 修饰的纳米靶向制剂进行了稳定性研究，其稳定性由粒径大小、zeta 电势和转染效率共同决定。结果显示，甘露糖-PEG1000-Chol 修饰的纳米靶向制剂储存与 4℃，甘露糖-PEG1000-Chol 修饰的纳米靶向制剂的颗粒尺寸略有减小，但 zeta 电位没有减小（图 8），在 4℃ 条件下保存 3 天，转染效率约为 50%（图 9），详见下表。同样在血清中，甘露糖-PEG1000-Chol 孵育的 mRNA 未解离（图 10），同样，甘露糖-PEG100-Chol 和甘露糖-PEG2000-Chol 修饰的纳米靶向制剂同样具有良好的稳定性。

甘露糖-PEG1000-Chol 修饰的纳米靶向制剂转染稳定性测试结果：

时间	转染效率
DAY 0	$52.4 \pm 3.6$
DAY 1	$61.7 \pm 3.8$
DAY 3	$53.5 \pm 3.2$

### 实施例 21 细胞毒性实验

采用指定配方孵育 24h 以后，采用流式细胞术进行细胞毒性分析。其结果如图 11-12 所示，对照组、甘露糖-PEG1000-Chol 组和 Lipo 3K 组的活细胞率分别为  $86.7 \pm 3.6\%$ 、 $86.7 \pm 1.7\%$  和  $90.1 \pm 1.2\%$ ，早期和晚期凋亡无明显差异，总体来说表现良好，无明显细胞毒性，详见下表：

	Living cells	Early apoptosis	Late apoptosis	Necrosis
Control	$86.7 \pm 3.6$	$2.5 \pm 1.3$	$6.2 \pm 2.2$	$6.7 \pm 3.1$

甘露糖 -PEG1000-Chol	86.7±1.7	2.3±0.2	9.9±1.5	4.0±1.4
Lipo 3K	90.1±1.2	1.3±0.1	7.0±0.9	3.7±0.7

### 实施例 22 DC2.4 摄取靶向纳米粒研究

转染前 12 小时，将平皿中 DC2.4 细胞吹散，培养基重悬，计数，在 24 孔板的每个孔中接入 1mL 细胞悬液，密度为  $10 \times 10^4$  个/mL，于培养箱中孵育约 12 小时，备用。弃掉培养基，向各孔中分别加入终浓度为 100 ng/mL 的脂多糖（LPS），分别于 37°C 和 4°C 孵育约 12 小时刺激 DC2.4 细胞。弃掉培养基，向各孔中分别加入终浓度为 25 ng/mL 的不同制剂（LPX 和 MP<sub>1000</sub>-LPX），分别于 37°C 和 4°C 避光孵育约 2 小时，考察 DC2.4 细胞在不同温度、不同制剂下的摄取情况。到达孵育时间点后，弃去培养基，并以冷的 PBS 洗 2 次；PBS 收集 24 孔板中细胞，再以 PBS 洗细胞一次（1200 rpm、5 min），最后置于流式细胞仪中分析结果。

结果如图 13 所示，不论是 mRNA 普通脂质体复合物还是 mRNA 靶向脂质体复合物，当摄取温度由 37°C 降低到 4°C 时，摄取均降低，提示 DC2.4 细胞对 mRNA 脂质体复合物的摄取存在能量依赖性，即随着温度降低，摄取降低。对比 37°C 的数据可以看出，DC2.4 细胞可以更多的摄取 mRNA 靶向脂质体复合物，对比是否加入甘露糖的摄取数据可以看出，加入甘露糖后细胞对 mRNA 普通脂质体复合物的摄取无明细变化，而加入甘露糖后细胞对 mRNA 靶向脂质体复合物的摄取显著降低，说明 DC2.4 细胞更多的摄取 mRNA 靶向脂质体复合物主要时因为甘露糖受体介导的，结果详见下表：

	37°	4°	37°+mannose
LPX	274.2±8.7	172.1±7.9	284.2±6.3
MP1000-L PX	448.4±16.6	268.4±17.4	307.9±15.8

### 实施例 22 BMDCs 细胞摄取靶向纳米粒研究

转染前 12 小时，将平皿中 BMDCs 细胞吹散，培养基重悬，计数，在

24 孔板的每个孔中接入 1mL 细胞悬液，密度为  $10 \times 10^4$  个/mL，于培养箱中孵育约 12 小时，备用。弃掉培养基，向各孔中分别加入终浓度为 100 ng/mL 的脂多糖（LPS），分别于 37°C 和 4°C 孵育约 12 小时刺激 BMDCs 细胞。弃掉培养基，37°C 培养的细胞分为对照组、细胞松弛素 D 组、菲律平组、渥曼青霉素组和氯丙嗪组，并向各组中分别加入终浓度为 25 ng/mL 的 MP<sub>1000</sub>-LPX；在 4°C 孵育的细胞中加入 MP<sub>1000</sub>-LPX，以上分组分别于 37°C 和 4°C 避光孵育约 2 小时，考察 BMDCs 细胞在不同温度、不同药物作用下的摄取情况。到达孵育时间点后，弃去培养基，并以冷的 PBS 洗 2 次；PBS 收集 24 孔板中细胞，再以 PBS 洗细胞一次（1200 rpm、5 min），最后置于流式细胞仪中分析结果。

如图 14-15 所示，当摄取温度由 37°C 降低到 4°C 时，摄取降低，提示 BMDCs 对 mRNA 靶向脂质体复合物的摄取存在能量依赖性，即随着温度降低，摄取降低，此数据与 DC2.4 结果吻合。对比是否加入内吞抑制剂的摄取数据可以看出，加入细胞松弛素 D 和菲律平后细胞对 mRNA 靶向脂质体复合物的摄取无明显变化，而加入渥曼青霉素和氯丙嗪后细胞对 mRNA 靶向脂质体复合物的摄取均显著降低，说明 BMDCs 摄取 mRNA 靶向脂质体复合物除了具有能量依赖性还受胞饮（渥曼青霉素）和网格蛋白（氯丙嗪）介导内吞的影响，相关结果详见下表：

试验条件	摄取结果 ( $\times 10^4$ )
Control	2.52 $\pm$ 0.16
Cytochalasin-D	2.73 $\pm$ 0.15
Filipin	2.61 $\pm$ 0.15
4°	1.29 $\pm$ 0.25
Wortmannin	1.47 $\pm$ 0.17
Chlorpromazine	0.42 $\pm$ 0.10

### 实施例 23 MP400-LPX 体内抗肿瘤结果

按照实施例 7 和实施例 9 的方法合成 MP400-LPX 和甲氧基聚乙二醇 400 胆固醇 (mP400-LPX)，包含主要成分 E6/E7-mRNA，形成甘露糖靶头的 E6/E7-mRNA 脂质体复合物。在第 0 天、第 3 天、第 10 天、第 17 天给小鼠注射 30ug 的复合物，结果如图 16-20 所示，与对照组和不相关 mRNA 组相比，甘露糖靶头的 E6/E7-mRNA 脂质体复合物治疗组小鼠的肿瘤生长数据显著降低。值得关注的是：与甲氧基聚乙二醇 400 胆固醇的对照材料相比，甘露糖聚乙二醇 400 胆固醇制备的脂质体载 mRNA 后制备的疫苗小鼠生存期延长，且有一只小鼠的肿瘤完全消退，靶向制剂制备的疫苗体现出较好的免疫治疗效果。

#### 实施例 24 DC2.4 细胞对 MP400-LPX 的摄取

转染前 12 小时，将平皿中 DC2.4 和 BMDCs 细胞分别吹散，培养基重悬，计数，在 24 孔板的每个孔中接入 1mL 细胞悬液，密度为  $10 \times 10^4$  个/mL，于培养箱中孵育约 12 小时，备用。弃掉培养基，向各孔中分别加入终浓度为 100 ng/mL 的脂多糖(LPS)，于 37°C 孵育约 12 小时刺激 DC2.4 和 BMDCs 细胞。弃掉培养基，向各孔分为六组，向中 DC2.4 细胞分别加入终浓度为 25 ng/mL 的不同载了 Cy5-H-mRNA 的制剂（对照、LPX、MP<sub>100</sub>-LPX、MP<sub>400</sub>-LPX、MP<sub>1000</sub>-LPX 和 MP<sub>2000</sub>-LPX），于 37°C 避光孵育约 2 小时，考察 DC2.4 细胞不同制剂下的摄取情况；同时向 DC2.4 和 BMDCs 细胞中分别加入终浓度为 25 ng/mL 的不同载了 GFP-mRNA 的制剂（LPX、MP<sub>100</sub>-LPX、MP<sub>400</sub>-LPX、MP<sub>1000</sub>-LPX、MP<sub>2000</sub>-LPX 和 Lipo 3K），于 37°C 避光孵育约 2 小时，考察 DC2.4 和 BMDCs 细胞不同制剂下的转染效果。到达孵育时间点后，弃去培养基，并以冷的 PBS 洗 2 次；PBS 收集 24 孔板中细胞，再以 PBS 洗细胞一次（1200 rpm、5 min），最后置于流式细胞仪中分析结果。

结果如图 21-22 所示，DC2.4 细胞对 MP400-LPX 的摄取最好。DC2.4 细胞对载 mRNA 的不同配体链长靶向脂质体复合物的摄取效率均为 100% 左右，但是 DC2.4 细胞对各制剂的摄取量不同，具体的表现在细胞内荧光

强度不同, MP100-LPX 与 LPX 相比在细胞内的蓄积显著增加, MP400-LPX 与 MP100-LPX 相比在细胞内的蓄积显著增加, MP1000-LPX 与 MP400-LPX 相比在细胞内的蓄积显著降低, MP1000-LPX 与 MP2000-LPX 在细胞内的蓄积程度类似。MP400-LPX 与 LPX, MP100-LPX, MP1000-LPX 和 MP2000-LPX 等其他制剂相比在细胞内的蓄积均显著增加。上述结果提示: DC2.4 细胞对载 mRNA 的不同配体链长靶向脂质体复合物的摄取受配体链长的影响, 存在一个合适的链长或者链长范围使得 DC2.4 细胞对其摄取更多。

如图 23-26 所示, DC2.4 细胞对 MP400-LPX 的转染最好。DC2.4 细胞对载 mRNA 的不同配体链长靶向脂质体复合物的转染效率不同, 具体的表现在 GFP 阳性细胞的百分比不同, MP400-LPX 与 LPX、MP100-LPX、MP1000-LPX 和 MP2000-LPX 相比在 GFP 阳性的细胞显著增加, MP2000-LPX 与其他制剂相比, 其 GFP 阳性的细胞显著降低。BMDCs 的转染结果与 DC2.4 基本类似, 但是与 DC2.4 不同的是, MP2000-LPX 与其他制剂一样的转染效率显著高于 Lipo 3K, BMDCs 为原代细胞, 这一转染结果说明靶向制剂具有较好的应用前景。

### **实施例 25 载 mRNA 的不同配体链长靶向脂质体复合物的体内抗肿瘤试验**

按照实施例 7 和实施例 9 的方法合成 MP100-LPX、MP400-LPX、MP1000-LPX 和 MP2000-LPX, 包含主要成分 E6/E7-mRNA, 形成甘露糖靶头的 E6/E7-mRNA 脂质体复合物。在第 0 天、第 3 天、第 10 天、第 17 天给小鼠注射 30ug 的复合物, 结果如图 27-31 所示, MP400-LPX 的效果最好。与其他链长的靶向配比相比, 聚乙二醇 400 的甘露糖胆固醇靶向配体表现出最好的体内抗肿瘤效果, 具体表现为: 小鼠的肿瘤治愈率最高, 高达 60%左右, 未治愈的小鼠肿瘤的生长速度较低, 同时能够延长荷瘤小鼠的生存期。

最后说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围，其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

## 权 利 要 求 书

1、一种甘露糖及其衍生物修饰的靶向纳米制剂，其特征在于，其由靶向配体甘露糖及其衍生物、纳米制剂和主药成分组成，可用于疫苗递送、肿瘤靶向治疗、动脉硬化治疗及各种炎症性疾病等的治疗。

2、根据权利要求 1 所述的靶向纳米制剂，其特征在于，甘露糖衍生物为甘露糖苷、甘露糖胺、甘露聚糖等中的一种或几种。

3、根据权利要求 1 所述的靶向纳米制剂，其特征在于，所述纳米制剂为脂质体、乳剂、纳米凝胶、核壳型纳米粒、HDL 纳米粒、固脂纳米粒、聚合物胶束等中的一种或几种。

4、根据权利要求 1 所述的靶向纳米制剂，其特征在于，所述主药成分为小分子药物、蛋白多肽类药物或基因药物等中的一种或几种。

5、根据权利要求 1 所述的靶向纳米制剂，其特征在于，所述靶向配体甘露糖及其衍生物的含量为 0.05%-40%。

6、根据权利要求 1 所述的靶向纳米制剂，其特征在于，所述靶向配体甘露糖及其衍生物的含量为 1%-10%。

7、根据权利要求 1 所述的靶向纳米制剂，其特征在于，所述靶向配体甘露糖修的含量为 2%-5%。

8、根据权利要求 1 所述的靶向纳米制剂，其特征在于，所述靶向配体甘露糖及其衍生物的修饰方式为：制备纳米制剂之后再将甘露糖及其衍生物吸附或偶联到纳米制剂表面；或先将甘露糖及其衍生物与制备纳米制剂的载体材料偶联之后再制备纳米制剂。

9、根据权利要求 8 所述的靶向纳米制剂，其特征在于，所述甘露糖及其衍生物吸附在纳米制剂表面的方式为：采用溶剂挥发法、高压均质法或微乳法。

10、根据权利要求 1 所述的靶向纳米制剂，其特征在于，所述修饰纳米制剂的甘露糖及其衍生物为单个甘露糖及其衍生物或 2~10 个甘露糖及其衍生物。

11、根据权利要求 8 所述的靶向纳米制剂，其特征在于，所述甘露糖及其

衍生物与纳米制剂或制备纳米制剂的载体材料偶联方式为：直接偶联或通过一个间隔基偶联。

12、根据权利要求 11 所述的靶向纳米制剂，其特征在于，所述间隔基为戊二醛、乙二胺、丙二酸、PEG、氨基酸、二肽、寡肽、多肽、硬脂酰、棕榈酰等中的一种或几种。

13、根据权利要求 1-12 所述的靶向纳米制剂，其特征在于，制备纳米制剂的材料为具有活性氨基或羟基中的至少一种，药学上可以接受的制备胶束、乳剂、纳米凝胶、核壳型纳米粒、HDL 纳米粒、固脂纳米粒、脂质体、聚合物胶束等的载体材料，采用药学上可以接受的纳米制剂制备方法制得。

14. 用于制备带有靶向功能的纳米制剂的组合物，其特征在于，所述组合物包括靶向材料和基础纳米制剂材料，所述靶向材料为甘露糖和/或甘露糖衍生物。

15. 根据权利要求 14 所述的组合物，其特征在于，所述甘露糖衍生物为甘露糖苷和/或甘露糖胺和/或甘露聚糖。

16. 根据权利要求 15 所述的组合物，其特征在于，所述甘露糖衍生物为甲基-D-甘露糖苷、1- $\alpha$  甲酰甲基-甘露吡喃糖苷、4-氨基苯基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、4-硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、4-甲基伞形酮基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、甘露糖-6-磷酸、氨基甲酰基-D-甘露糖。

17. 根据权利要求 14 或 15 或 16 所述的组合物，其特征在于，所述靶向材料占所述组合物的重量百分比为 0.05-40%。

18. 根据权利要求 14 或 15 或 16 所述的组合物，其特征在于，所述靶向材料占所述组合物的重量百分比为 1-10%。

19. 根据权利要求 14 所述的组合物，其特征在于，所述组合物由所述靶向材料、所述基础纳米制剂材料、使所述靶向材料与所述基础纳米制剂材料产生距离的间隔材料组成，所述间隔材料为戊二醛、乙二胺、丙二酸、短链烷基链、PEG、氨基酸、二肽、寡肽、多肽、硬脂酰、棕榈酰中的一种或几种。

20. 根据权利要求 14 所述的组合物，其特征在于，所述基础纳米制剂材料

为制备脂质体、乳剂、纳米凝胶、核壳型纳米粒、HDL 纳米粒、固脂纳米粒、聚合物胶束的材料组合物。

21. 根据权利要求 19 所述的组合物，其特征在于，所述间隔材料为 PEG<sub>n</sub>，其中  $n=100-5000$ 。

22. 根据权利要求 21 所述的组合物，其特征在于，所述  $n$  为 100、200、300、400、500、600、800、900、1000 或 2000。

23. 根据权利要求 19 所述的组合物，其特征在于，按照重量份计由以下组分组成：甘露糖 1 份；PEG 0.5-56 份，胆固醇 2-11 份。

24. 根据权利要求 19 所述的组合物，其特征在于，按照重量份计由以下组分组成：甘露糖 1 份；PEG 10-25 份，胆固醇 4-8 份。

25. 权利要求 14 所述的组合物制备的运载药物的靶向载体。

26. 根据权利要求 25 所述的靶向载体，其特征在于，所述药物为小分子药物和/或蛋白多肽类药物和/或基因药物。

27. 根据权利要求 26 所述的靶向载体，其特征在于，所述小分子药物为紫杉烷类、喜树碱类、长春碱类、阿霉素、表阿霉素、柔红霉素、表柔比星、两性霉素、甲氨蝶呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、米托蒽醌或其衍生物、吉非替尼、诺司卡品、顺铂、卡铂、奥沙利铂、卡莫司汀和槲皮素中的任一或多种。

28. 根据权利要求 26 所述的靶向载体，其特征在于，所述蛋白多肽类药物为白细胞介素、生长因子、干扰素、整合素，单克隆抗体，酶和胰岛素。

29. 根据权利要求 28 所述的靶向载体，其特征在于，所述白细胞介素包括但不限于 IL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6，所述生长因子包括但不限于成纤维细胞生长因子、肝生长因子、血管内皮生长因子、造血生长因子，所述干扰素包括但不限于 IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\gamma$ ，所述肿瘤坏死因子包括但不限于 TNF $\alpha$ 、TNF $\beta$ 。

30. 根据权利要求 26 所述的靶向载体，其特征在于，所述基因药物为 DNA、质粒、mRNA、siRNA、shRNA、microRNA 中的一种或几种。

31. 被权利要求 25 所述的靶向载体包裹的药物。

32.权利要求 31 所述的靶向载体的制备方法，其特征在于，将所述基础纳米制剂材料制备成纳米运药载体，再将所述靶向材料附于所述纳米运药载体表面。

33.提高权利要求 25 所述的靶向载体的靶向性的方法，其特征在于：

A 合成靶向元件

将所述靶向材料与所述间隔材料合成靶向元件；

B 制备靶向载体

将基础纳米制剂材料制备成纳米运药载体，再将步骤 A 所得的靶向元件与所述纳米运药载体连接得靶向载体；或先将所述间隔材料与基础纳米制剂材料合成，再与所述靶向材料进行进一步连接得靶向载体。

34.根据权利要求 33 所述的方法，其特征在于，所述靶向材料具体为甘露糖及其衍生物，所述间隔材料具体为 PEG。

35.根据权利要求 33 所述的方法，其特征在于，所述靶向元件与所述纳米运药载体的距离为 0.2-100nm。

36.根据权利要求 35 所述的方法，其特征在于，所述靶向元件与所述纳米运药载体的距离为 0.3-10nm。

37.运送药效成分到达靶细胞的方法，其特征在于，将药效成分置于权利要求 25 所述的靶向载体内，并运送。

38.根据权利要求 37 所述的方法，其特征在于，所述靶细胞为含有甘露糖受体的细胞。

39.根据权利要求 37 所述的方法，其特征在于，所述靶细胞包括但不限于巨噬细胞、树突细胞和肿瘤细胞。

40. 制备靶向元件的组合物，其特征在于，所述组合物由靶向材料和间隔材料组成，所述靶向材料为甘露糖和/或甘露糖衍生物。

41.根据权利要求 40 所述的组合物，其特征在于，所述甘露糖衍生物为甘露糖苷和/或甘露糖胺和/或甘露聚糖。

42.根据权利要求 40 所述的组合物，其特征在于，所述甘露糖衍生物为甲

基-D-甘露糖苷、1- $\alpha$  甲酰甲基-甘露吡喃糖苷、4-氨基苯基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、4-硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、4-甲基伞形酮基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷、甘露糖-6-磷酸、氨基甲酰基-D-甘露糖中的任一中或多种。

43. 根据权利要求 40 所述的组合物, 其特征在于, 所述间隔材料为戊二醛、乙二胺、丙二酸、短链烷基链、PEG、氨基酸、二肽、寡肽、多肽、硬脂酰、棕榈酰中的一种或几种。

44. 根据权利要求 40 所述的组合物, 其特征在于, 所述间隔材料与所述靶向材料的摩尔比为 1-10:1。

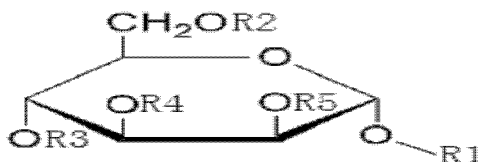
45. 根据权利要求 44 所述的组合物, 其特征在于, 所述间隔材料与所述靶向材料的摩尔比为 5:1。

46. 根据权利要求 40 所述的组合物, 其特征在于, 甘露糖与 PEG 的摩尔比为 1:5。


47. 根据权利要求 46 所述的组合物, 其特征在于, 甘露糖与 PEG 的摩尔比为 1:1。

48. 运用权利要求 40 所述的组合物制备的靶向元件。

49. 根据权利要求 48 所述的靶向元件, 其特征在于, 所述靶向元件如式 I 所示: 其中 R1 为  $-\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ 、 $-\text{C}_2\text{H}_7\text{N}_2$ 、 $-\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_4$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ 、 $-\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{NR}'$  或  $-\text{C}_2\text{H}_3\text{ONR}'$ 、 $-\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_3\text{N}_2\text{R}_1'$ 、 $\text{R}_2'$  或  $-\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_2\text{N}_2\text{R}_1'$ 、 $\text{R}_2'$ 、 $-\text{C}_{3n+1}\text{H}_{3n+2}\text{O}_n+2\text{N}_n+1\text{R}_1'$ 、 $\text{R}_2'$  或  $-\text{C}_{3n+1}\text{H}_{3n+2}\text{O}_n+1\text{N}_n+1\text{R}_1'$ 、 $\text{R}_2'$ 、 $-\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{O}$ 、 $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}$ 、 $-\text{H}$ 、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{CCHCO}_2\text{CH}_3$ , 所述  $\text{R}_1'$  和  $\text{R}_2'$  均为任意天然氨基酸侧链  $\text{R}'$  基团,  $\text{R}_2$  为  $-\text{CH}_3$  或  $-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $\text{R}_3$  为  $-\text{H}$ ,  $\text{R}_4$  为  $-\text{H}$ ,  $\text{R}_5$  是  $-\text{H}$  或  $-\text{NHCOCH}_3$ ,



50. 根据权利要求 49 所述的靶向元件，其特征在于，R1 为聚乙二醇，其

结构为 ，其中  $n=1\sim 5000$ ，其对应的分子量为： $40*n$ 。

51. 含有权利要求 48 所述的靶向元件的靶向载体。

52. 根据权利要求 51 所述的靶向载体，其特征在于，由靶向元件和纳米制剂连接而成，所述纳米制剂为脂质体、乳剂、纳米凝胶、核壳型纳米粒、HDL 纳米粒、固脂纳米粒、聚合物胶束。

53. 根据权利要求 51 所述的靶向载体，其特征在于，单个靶向载体上连接有  $1\sim 100000$  个所述的靶向元件。

54. 根据权利要求 53 所述的靶向载体，其特征在于，所述单个靶向载体上连接有  $20\sim 1000$  个所述的靶向元件。

55. 根据权利要求 52 所述的靶向载体，其特征在于，所述靶向元件的靶头与所述纳米制剂的距离为  $0.2\sim 100\text{nm}$ 。

56. 根据权利要求 55 所述的靶向载体，其特征在于，所述靶向元件的靶头与所述纳米制剂的距离为  $0.3\sim 10\text{nm}$ 。

57. 根据权利要求 55 或 56 所述的靶向载体，其特征在于，所述靶头为甘露糖苷和/或甘露糖胺和/或甘露聚糖。

58. 将权利要求 48 所述的靶向元件连接至纳米制剂的方法，其特征在于，将所述靶向材料和间隔材料连接后再与所述纳米制剂的材料连接制成纳米制剂。

59. 将权利要求 48 所述的靶向元件连接至纳米制剂的方法，其特征在于，具体包括以下步骤：

1) 取二甘醇、对甲苯磺酰氯与三乙胺，溶于 DCM 中，室温反应，通过柱层析分离得化合物 1；

2) 取化合物 1 与五乙酰化甘露糖及其衍生物和三氟化硼乙醚溶于 DCM 中，室温反应，柱层析分离得化合物 2；

- 3) 取化合物 2 与叠氮钠, 溶于 DMF 中, 硅胶柱层析分离得固体化合物 3;
- 4) 取化合物 3 溶于甲醇钠的甲醇溶液中, 室温反应, 浓缩得化合物 4;
- 5) 取胆固醇、溴丙炔和钠氢溶于乙醚和 DMF 的混合溶液中, 室温反应, 硅胶柱层析分离得固体化合物 5;
- 6) 取化合物 4、化合物 5 和碘化亚铜溶于 DMF 中, 室温反应 24 h, 硅胶柱层析得到靶向载体固体化合物 6。

60. 提高权利要求 51 所述靶向载体运送药物能力的方法, 其特征在于, 将药物包裹于所述靶向载体中运送。

61. 根据权利要求 60 所述的方法, 所述药物为小分子药物和/或蛋白多肽类药物和/或基因药物。

62. 根据权利要求 60 所述的方法, 所述靶向载体可将药物运送到含有甘露糖受体靶点的靶细胞中。

63. 一种包含了权利要求 51 所述靶向载体的复合物, 其特征在于, 所述复合物为所述靶向载体与受体形成的复合物, 所述靶向载体运载了药物, 所述受体为甘露糖受体。

64. 提高转染试剂转染效率的方法, 其特征在于, 将权利要求 40 所述的靶向元件的组合物与用于制备转染试剂的载体连接制备高转染效率的转染试剂。

65. 权利要求 48 所述靶向元件作为靶向油相的运用。

66. 权利要求 48 所述靶向元件作为靶向水相的运用。

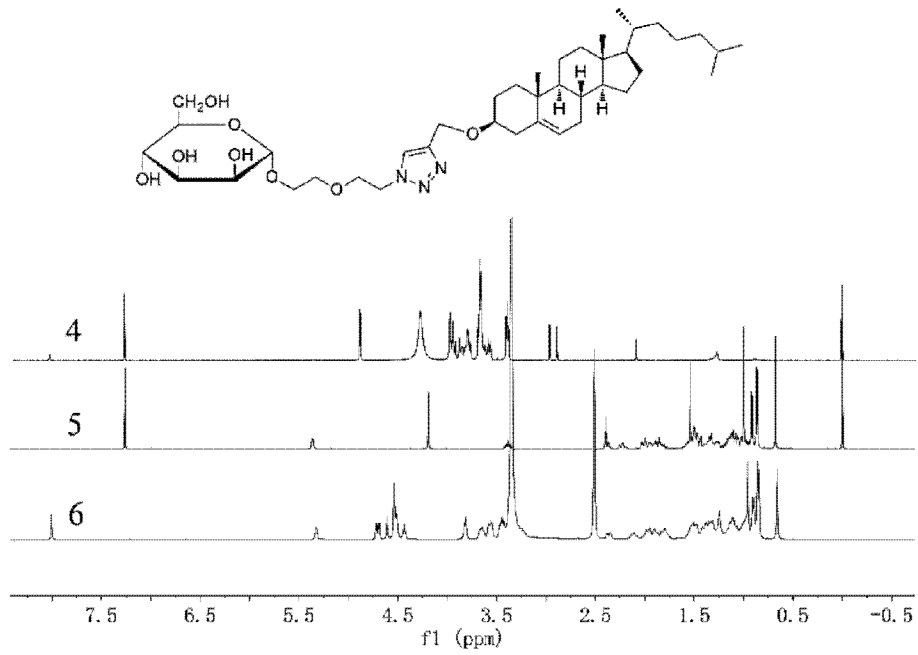


图 1

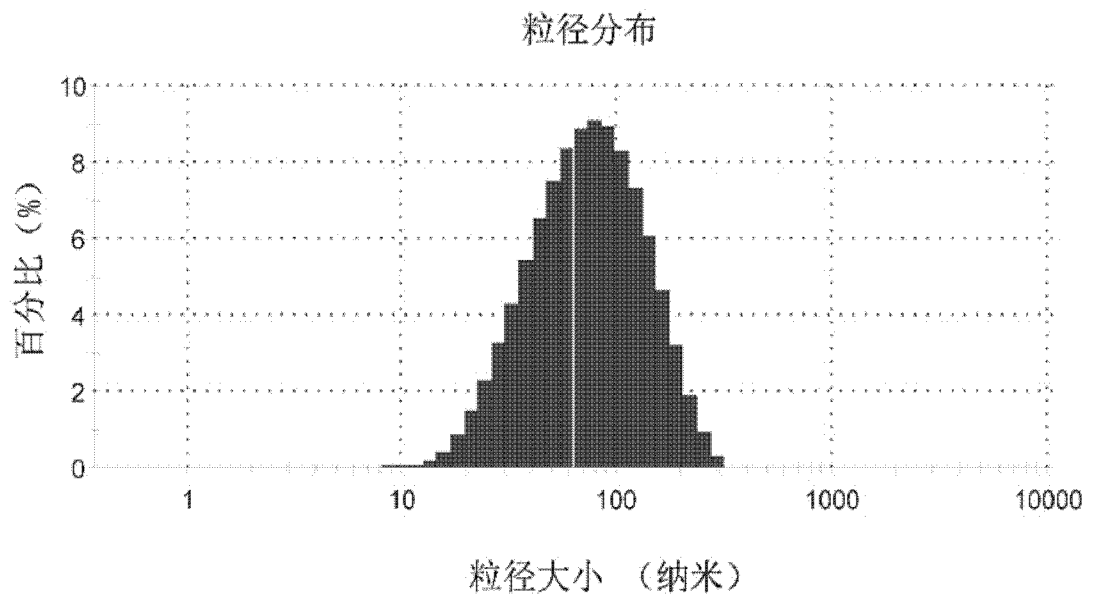


图 2

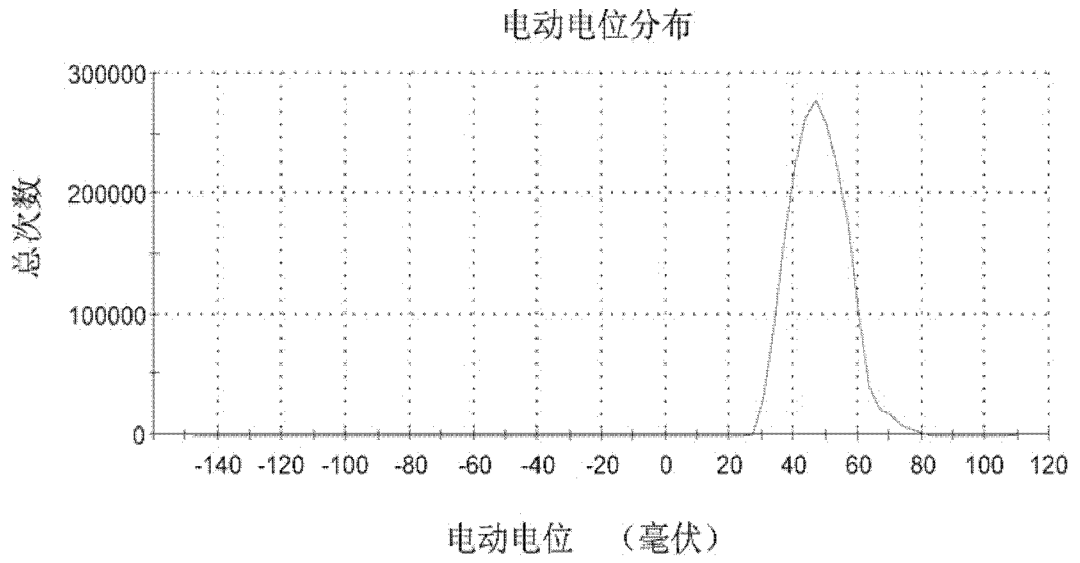


图 3

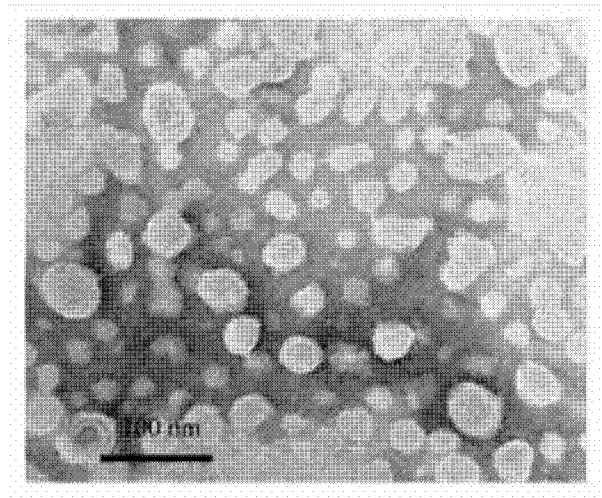


图 4

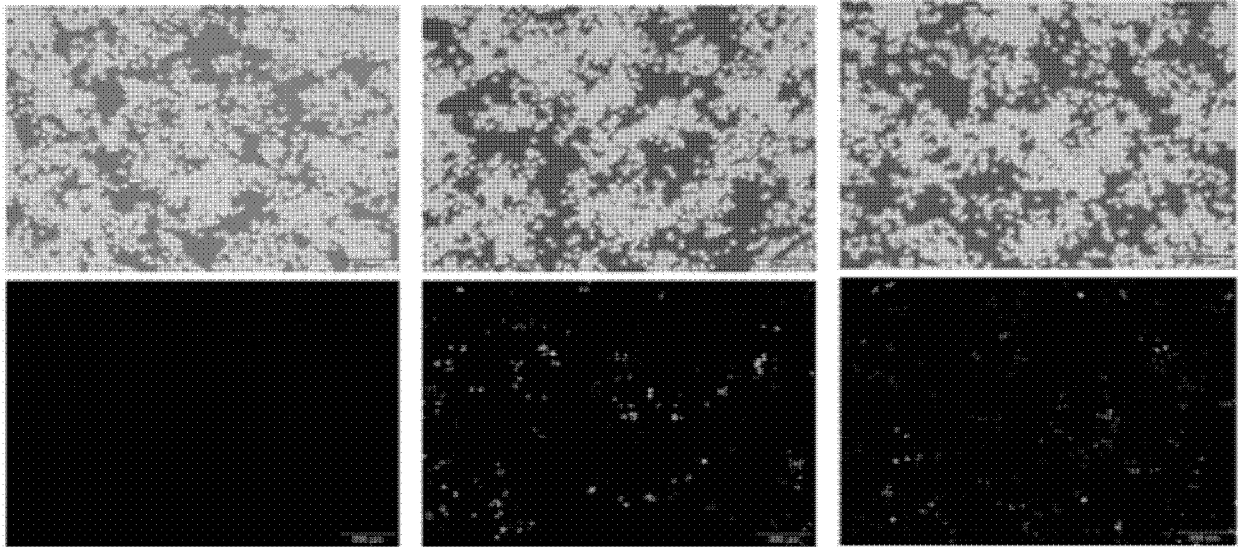


图 5

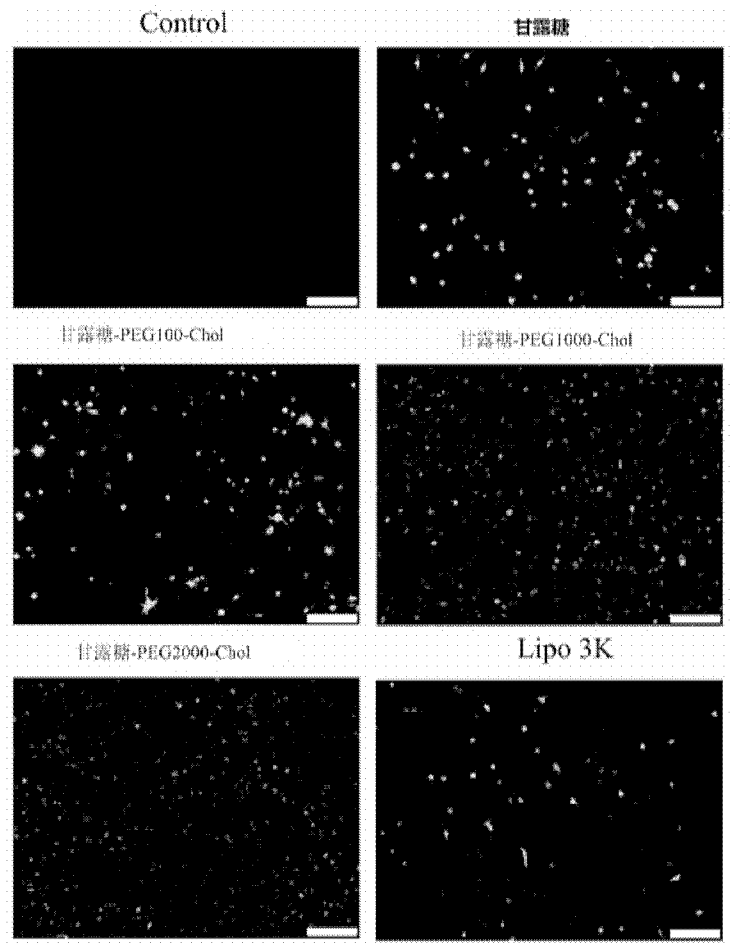


图 6

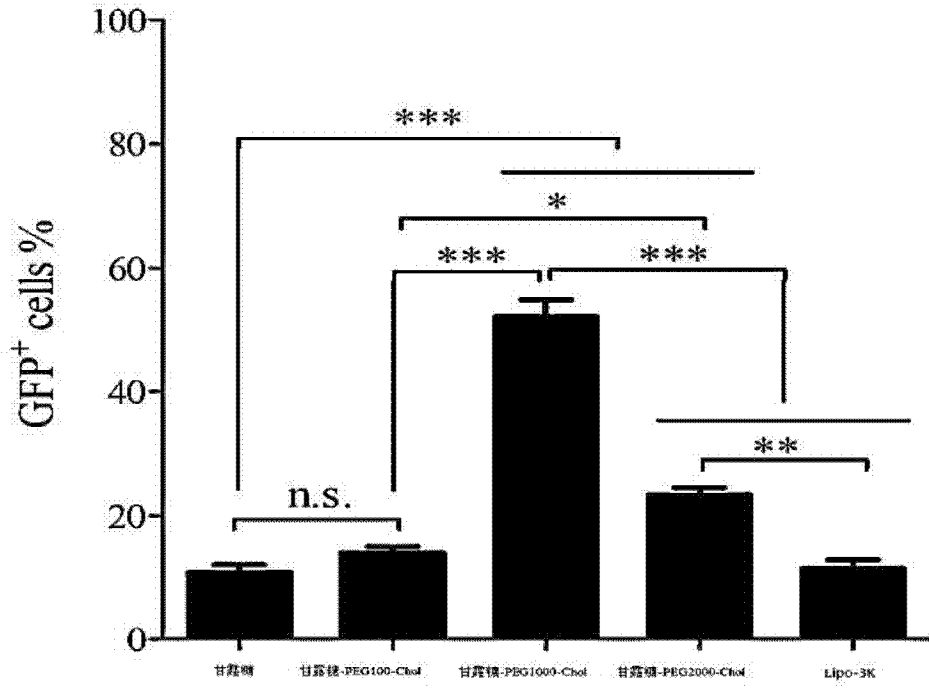


图 7

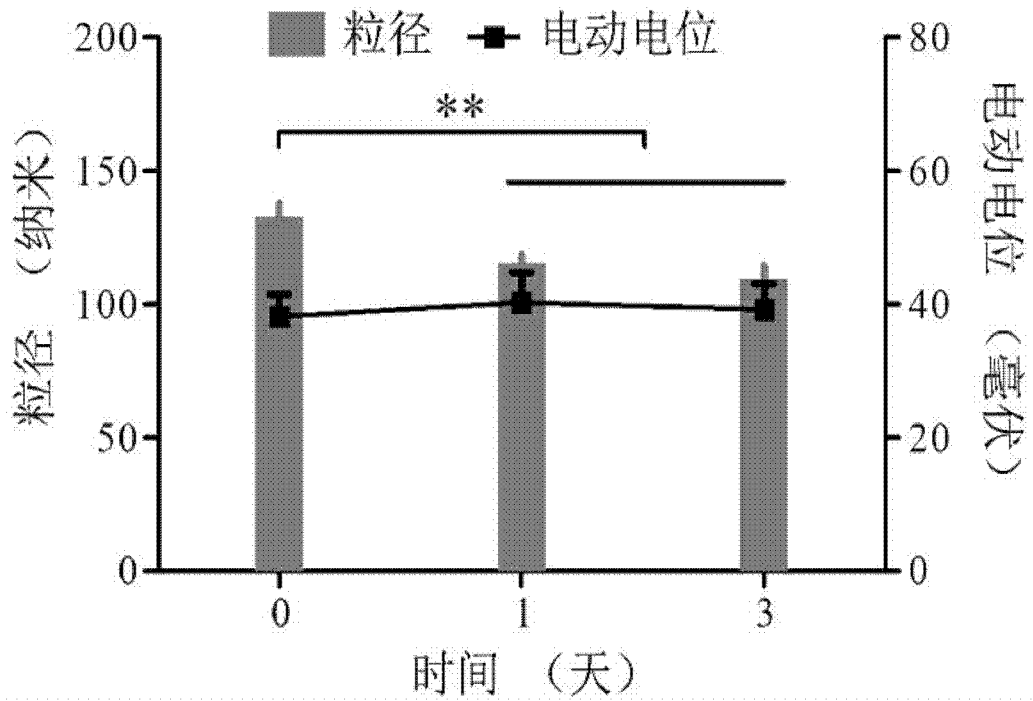


图 8

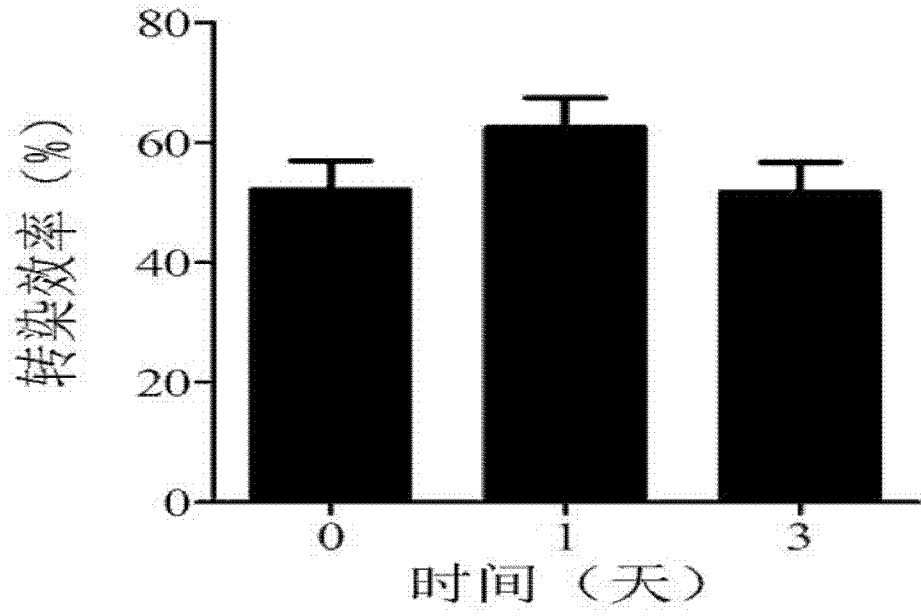


图9

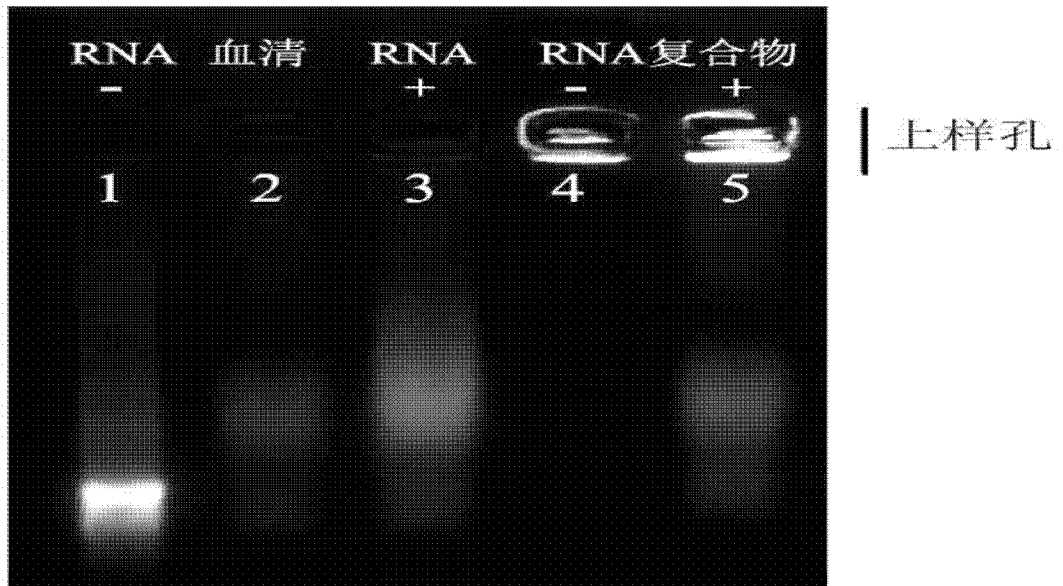


图10

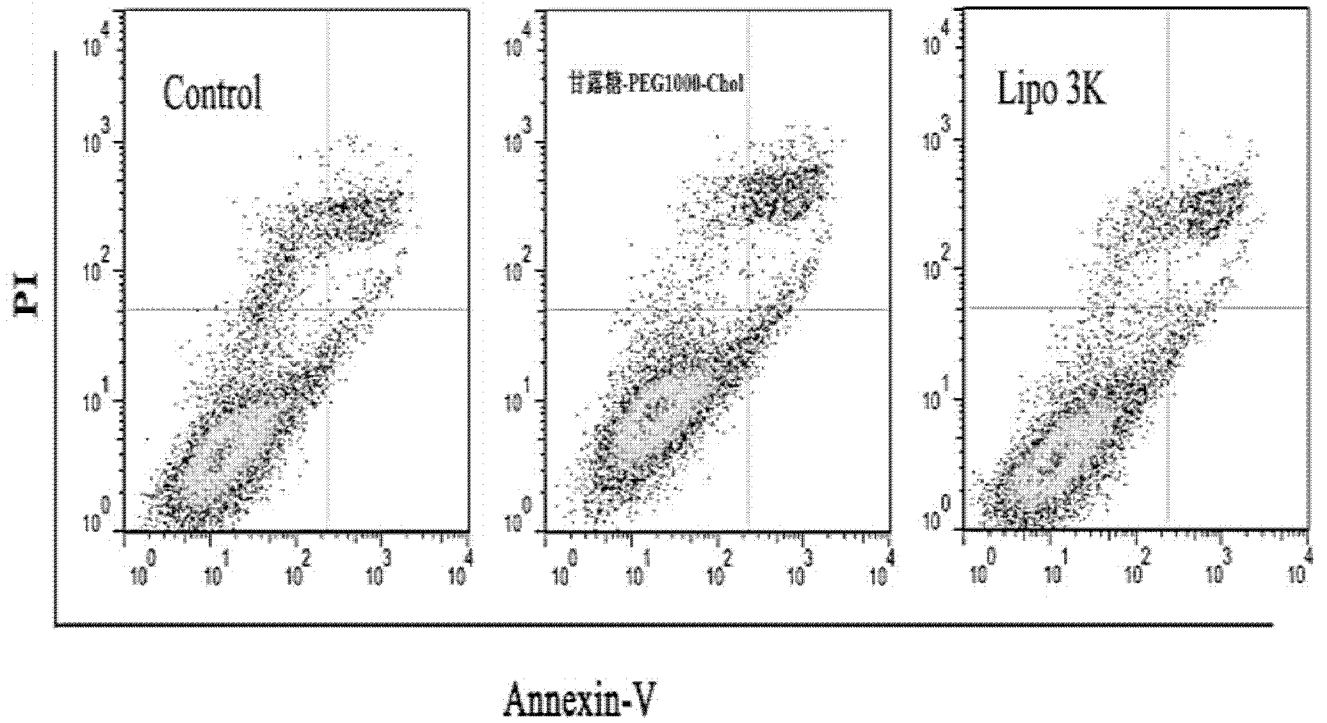


图 11

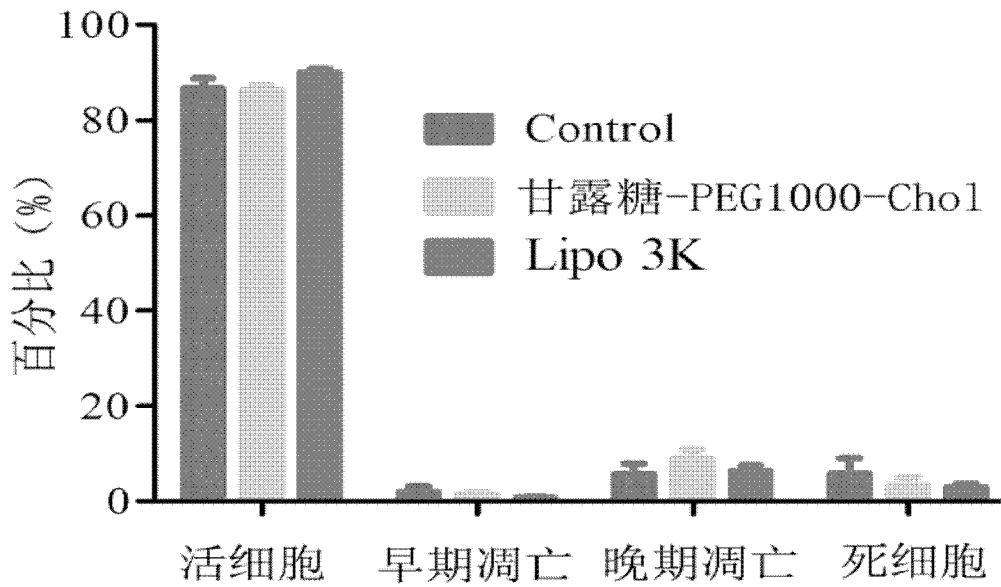


图 12

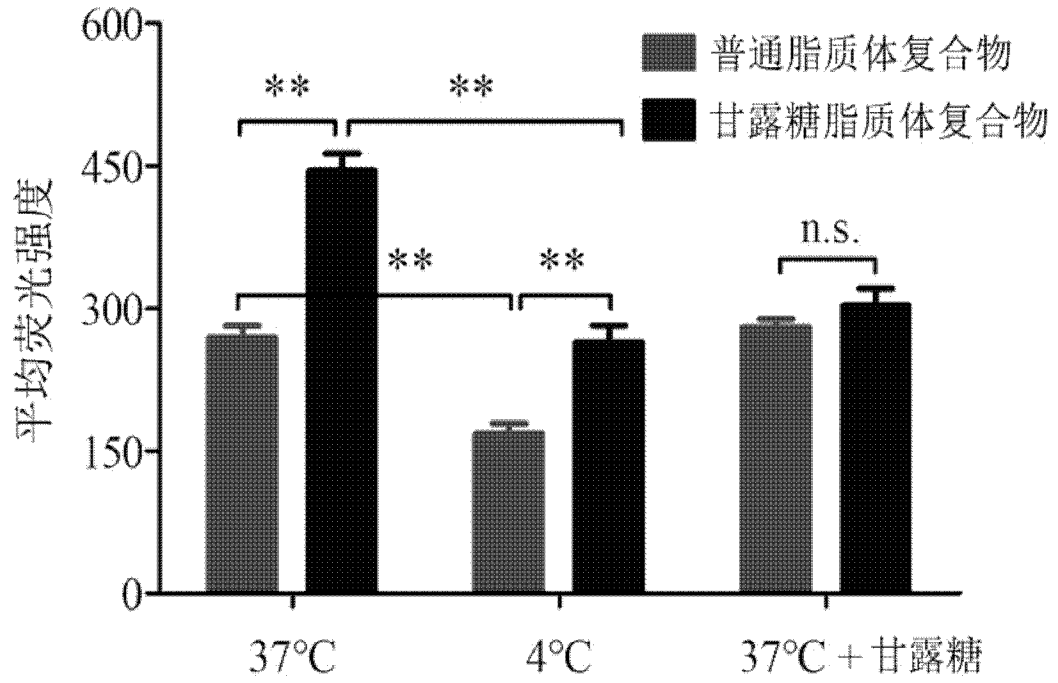


图 13

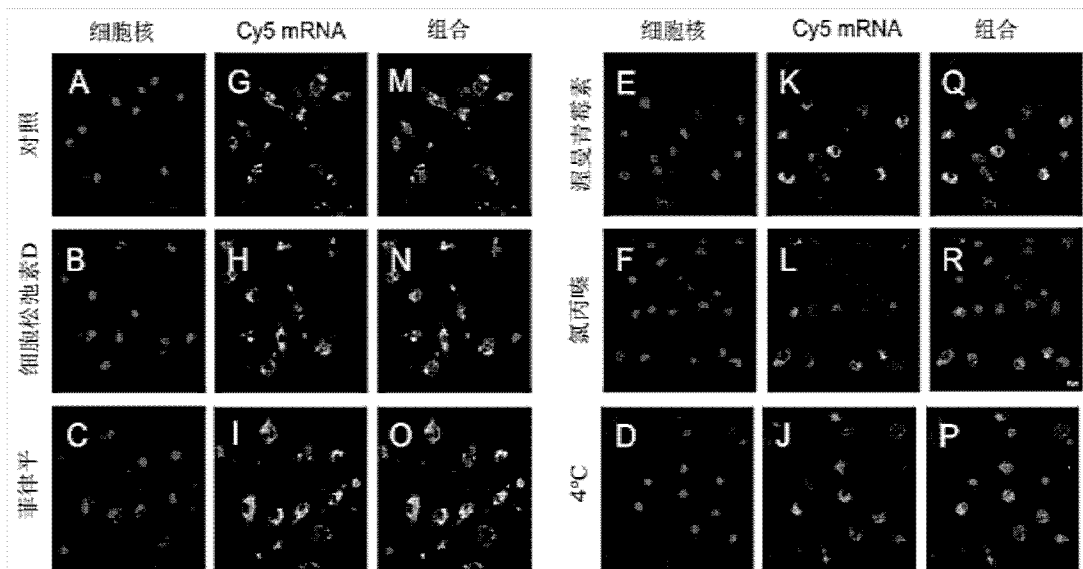


图 14

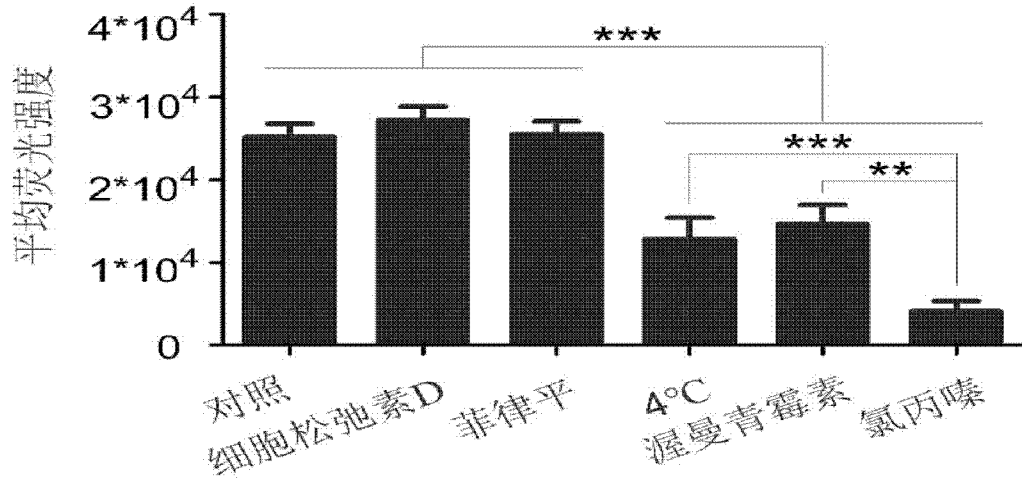


图 15

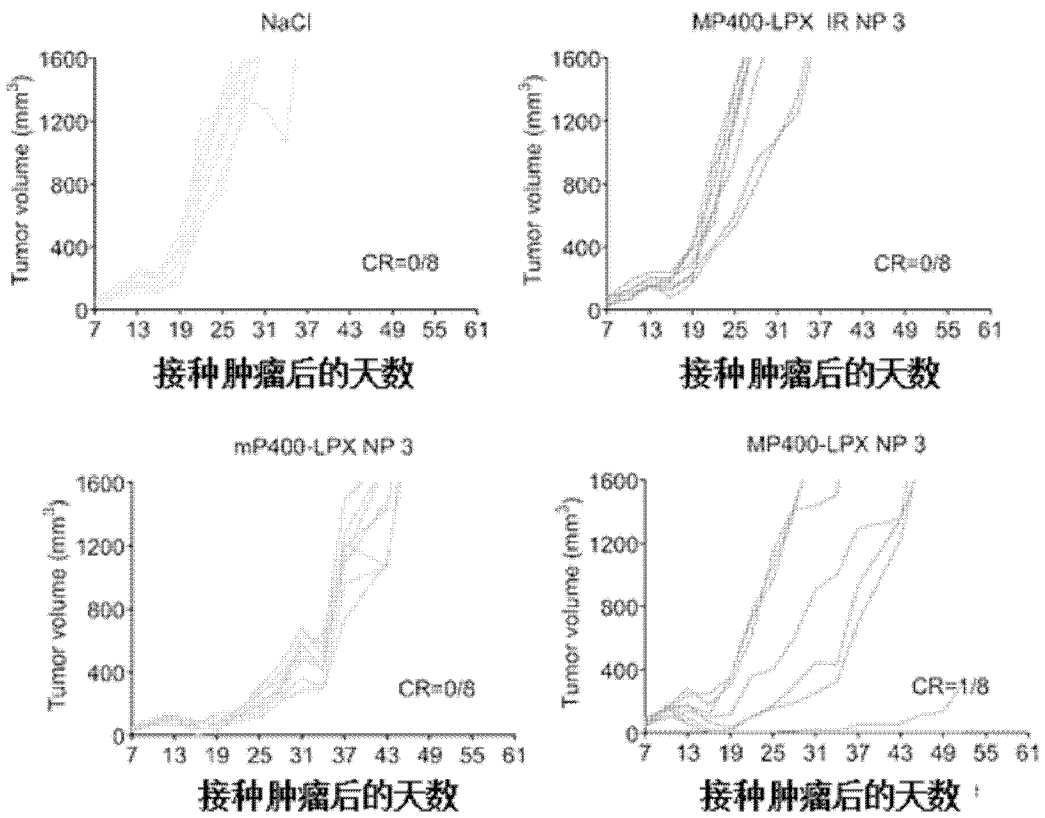


图 16

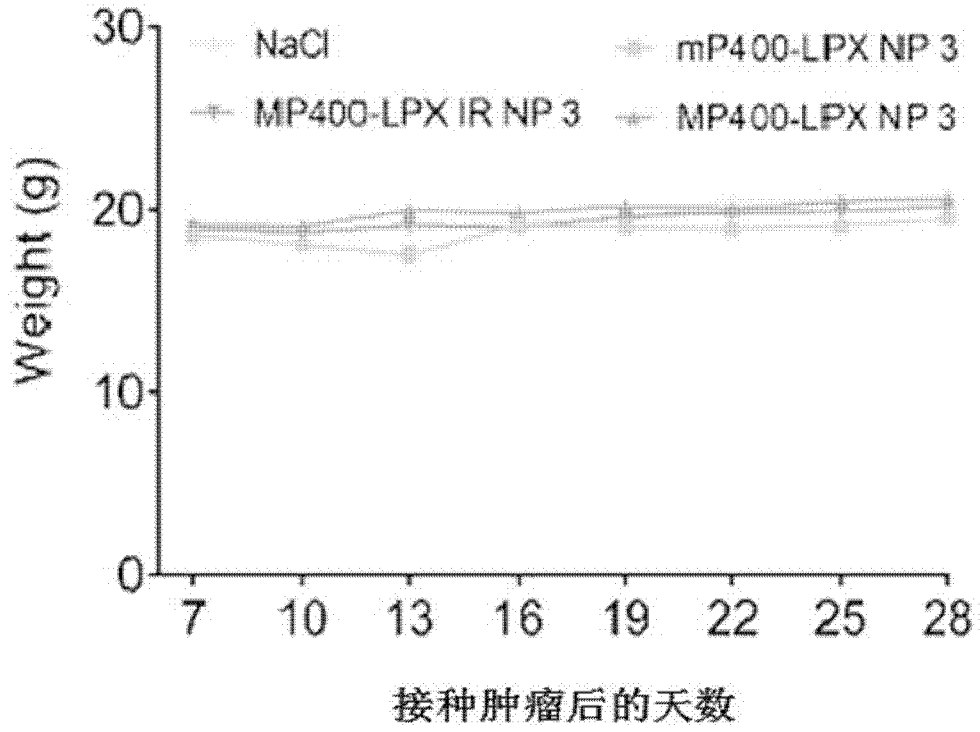


图 17

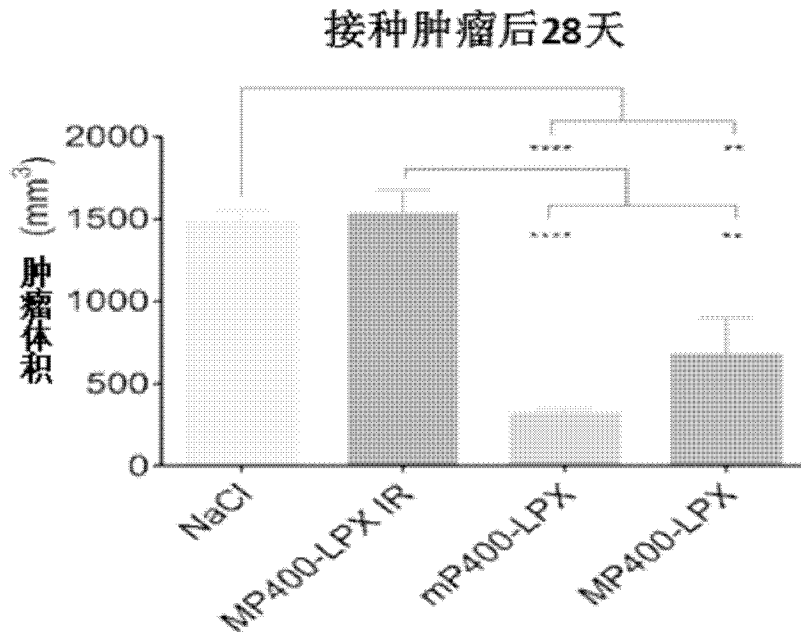


图 18

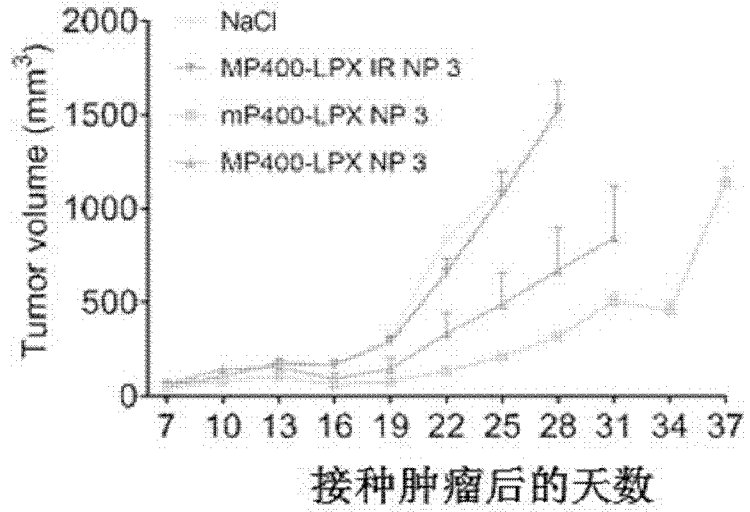


图 19

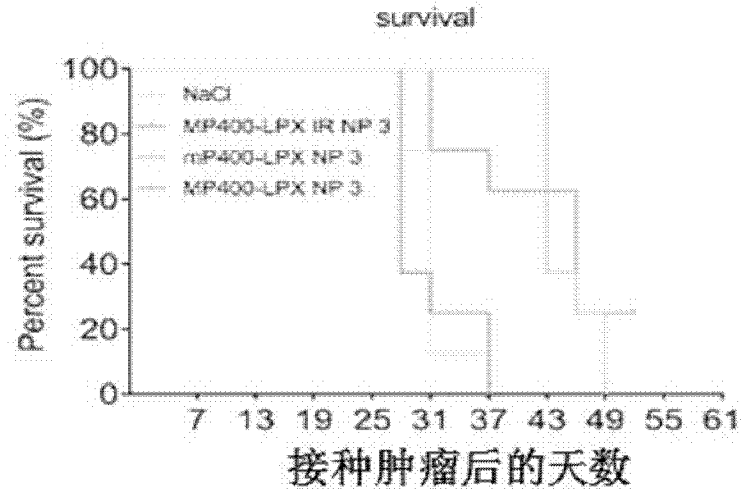


图 20

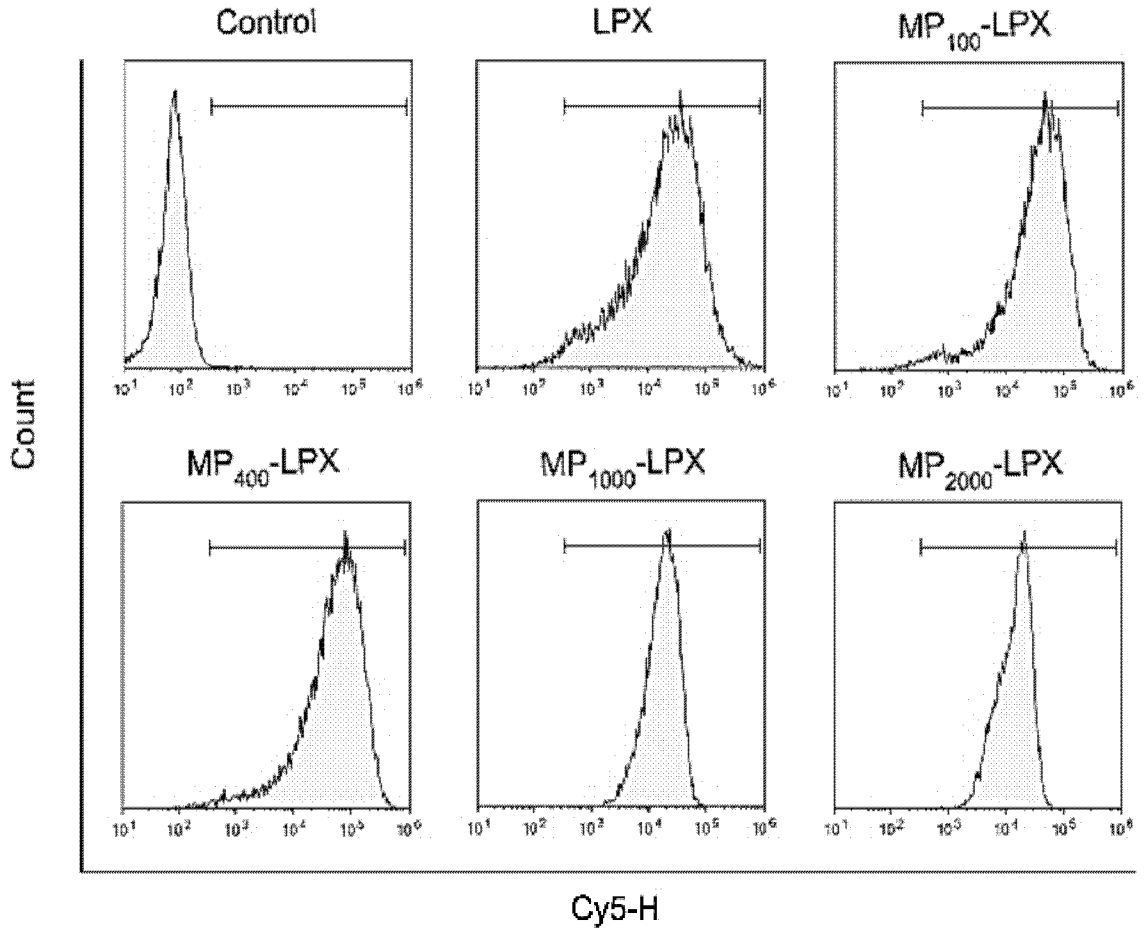


图 21

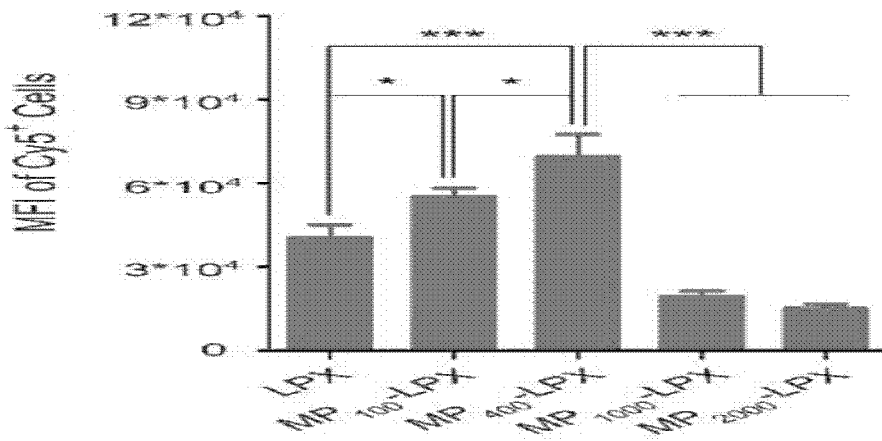


图 22

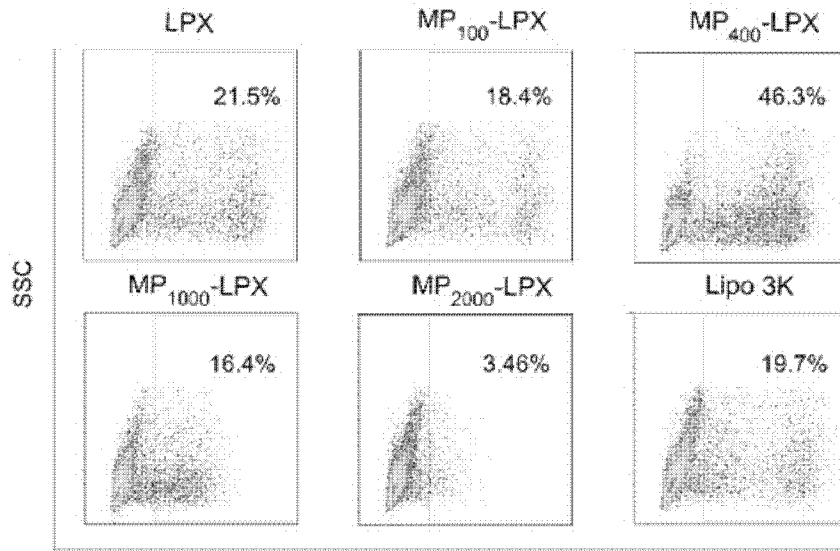


图 23

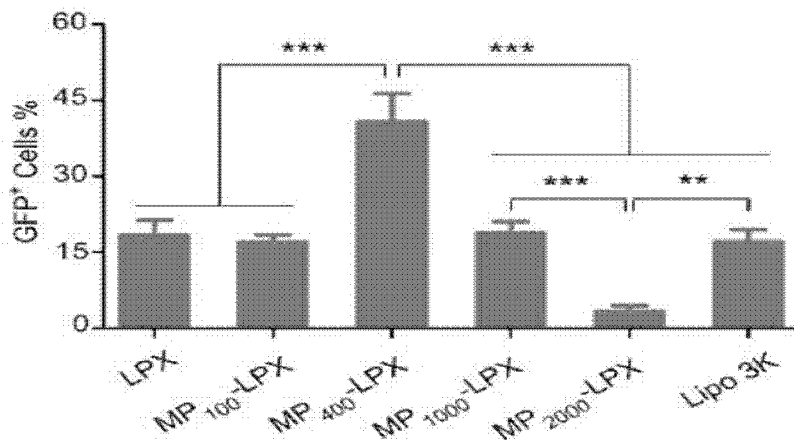


图 24

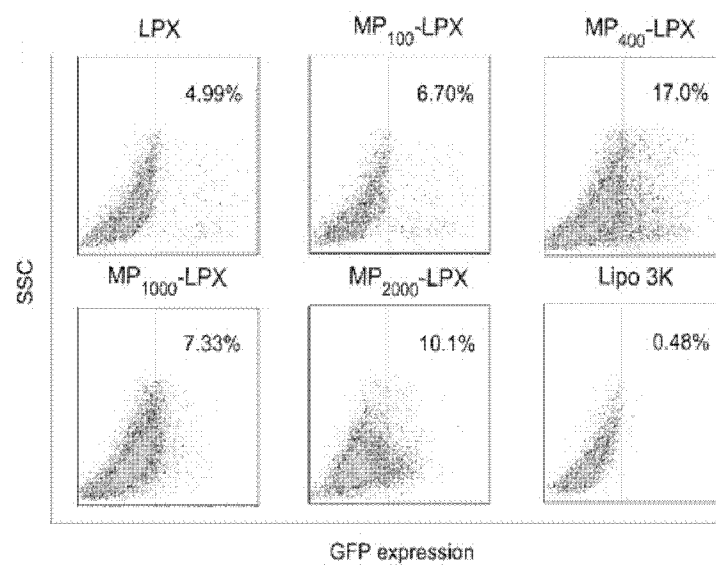


图 25

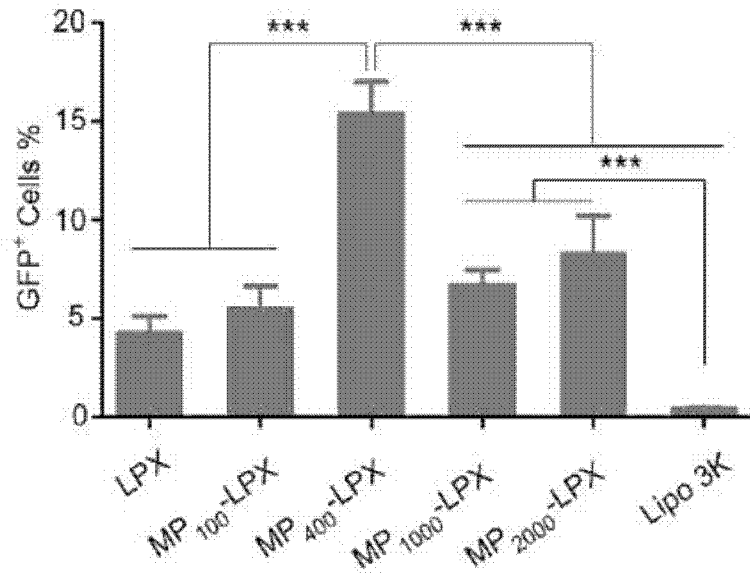


图 26

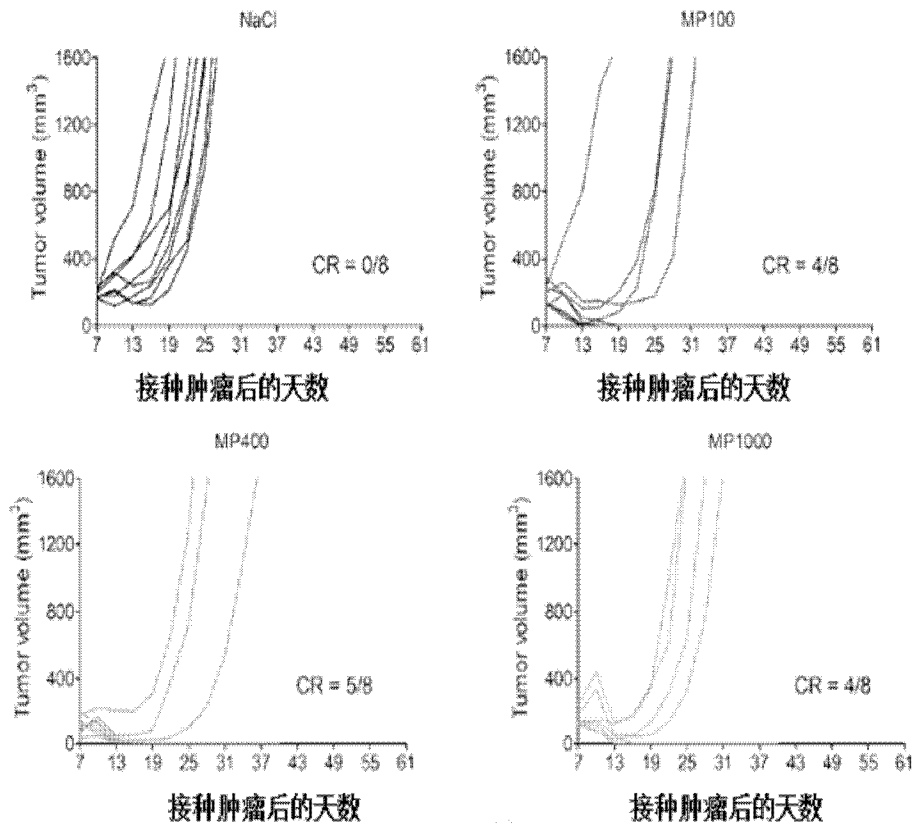


图 27

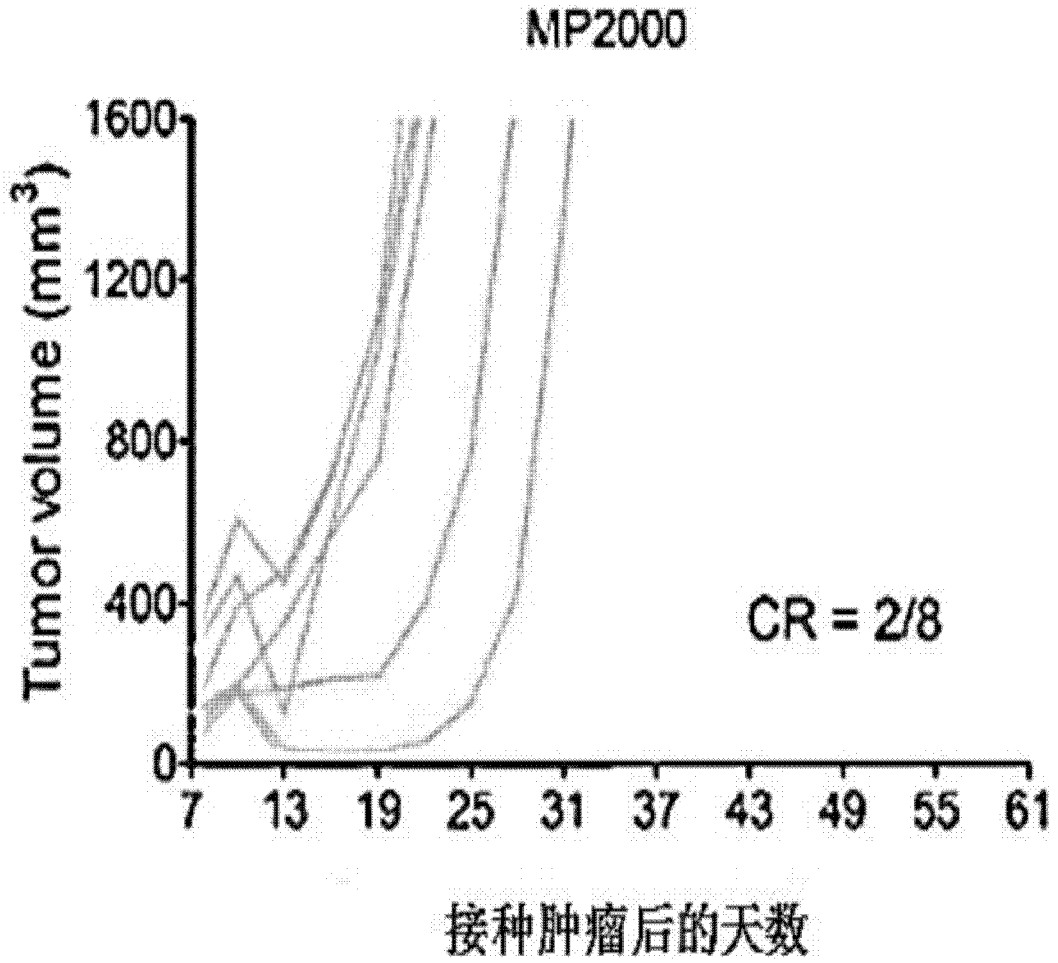


图 28

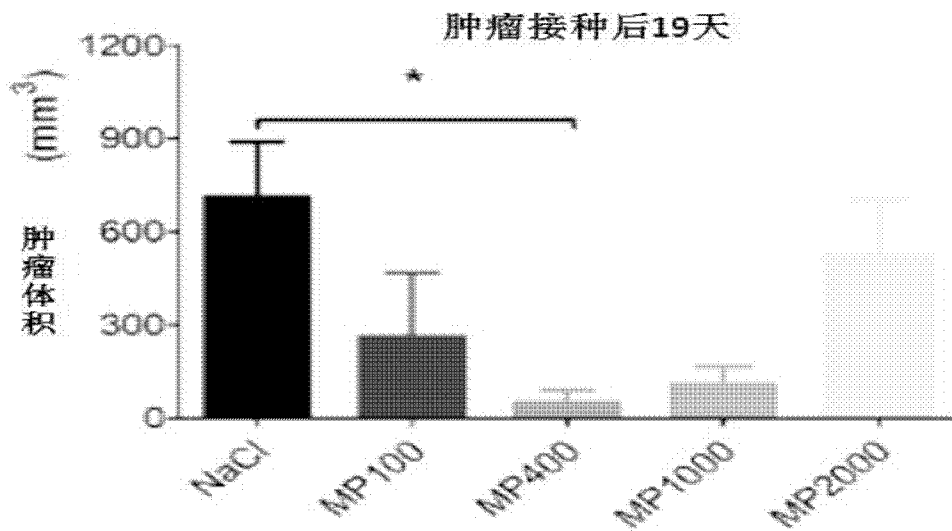


图 29

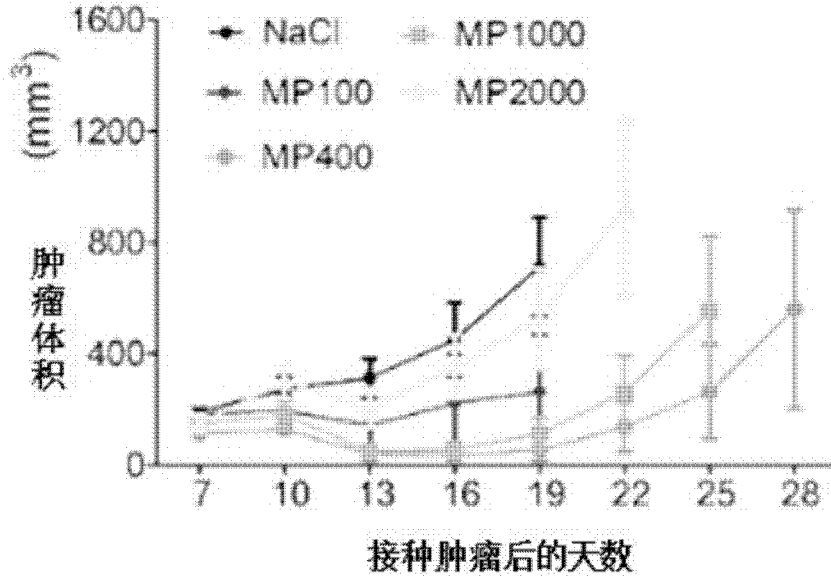


图 30

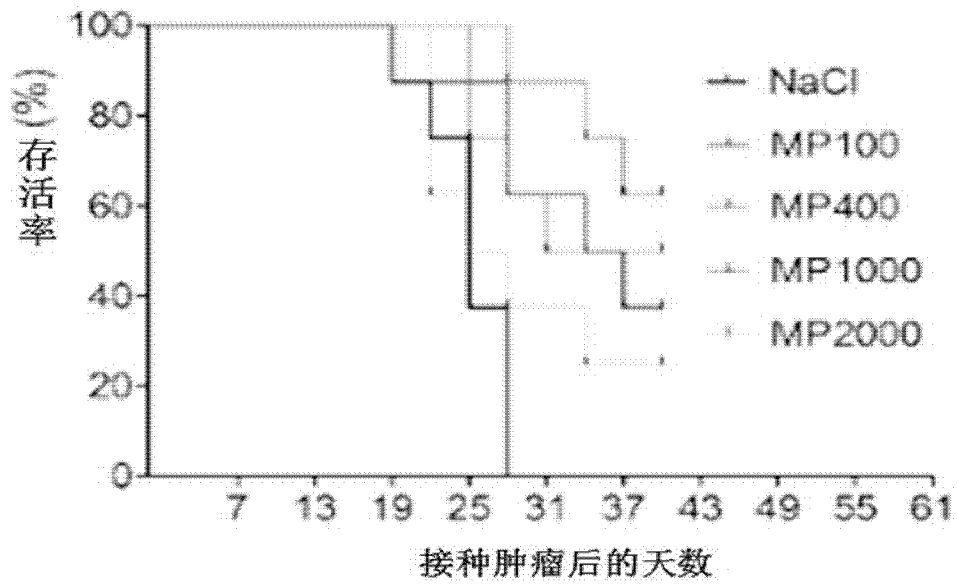


图 31

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/088001

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61K 47/26(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61K 9/127(2006.01)i

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

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

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

CNABS, CNTXT, DWPI, ISI Web of Knowledge, STN: 宋相容, 成都瑞博克医药科技, 聚乙二醇, 脂质体, 甘露糖, 偶联, PEG, liposome, mannose, conjugate

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102973506 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 20 March 2013 (2013-03-20) embodiments 1 and 5; claim 9, and description, paragraphs 0034-0035	1-66
X	US 2013330274 A1 (UNIV. VIRGINIA PATENT FOUNDATION) 12 December 2013 (2013-12-12) claims 1-24	1-66
X	CN 105585598 A (HUNAN NORMAL UNIVERSITY ET AL.) 18 May 2016 (2016-05-18) embodiments	1-66
X	WANG, N. et al. "Mannose Derivative and Lipid A Dually Decorated Cationic Liposomes as an Effective Cold Chain Free Oral Mucosal Vaccine Adjuvant-Delivery System" <i>European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics</i> , Vol. volume 88, 24 April 2014 (2014-04-24), 194-206	1-66
X	COSTA, A. et al. "Mannose-functionalized Solid Lipid Nanoparticles are Effective in Targeting Alveolar Macrophages" <i>European Journal of Pharmaceutical Sciences</i> , Vol. volume 114, 08 December 2017 (2017-12-08), 103-113	1-66

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

\* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 July 2019

Date of mailing of the international search report

25 July 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing  
100088  
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/088001

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM, N. et al. "Synthesis and Characterization of Mannosylated Pegylated Polyethylenimine as a Carrier for siRNA" <i>International Journal of Pharmaceutics</i> , Vol. volume 427, 12 August 2011 (2011-08-12), 123-133	1-66
<hr/>		



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2019/088001**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102973506	A	20 March 2013	CN	102973506	B	03 June 2015
US	2013330274	A1	12 December 2013	None			
CN	105585598	A	18 May 2016	CN	105585598	B	19 February 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/088001

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>A61K 47/26(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61K 9/127(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, CNTXT, DWPI, ISI Web of Knowledge, STN:宋相容, 成都瑞博克医药科技, 聚乙二醇, 脂质体, 甘露糖, 偶联, PEG, liposome, mannose, conjugate</p>																				
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 102973506 A (中国科学院深圳先进技术研究院) 2013年 3月 20日 (2013 - 03 - 20) 实施例1, 5; 权利要求9; 说明书第0034-0035段</td> <td>1-66</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 2013330274 A1 (UNIV. VIRGINIA PATENT FOUNDATION) 2013年 12月 12日 (2013 - 12 - 12) claims 1-24</td> <td>1-66</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 105585598 A (湖南师范大学等) 2016年 5月 18日 (2016 - 05 - 18) 实施例</td> <td>1-66</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WANG N. et al. "Mannose derivative and lipid A dually decorated cationic liposomes as an effective cold chain free oral mucosal vaccine adjuvant-delivery system" European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 第88卷, 2014年 4月 24日 (2014 - 04 - 24), 194-206</td> <td>1-66</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>COSTA A. et al. "Mannose-functionalized solid lipid nanoparticles are effective in targeting alveolar macrophages" European Journal of Pharmaceutical Sciences, 第114卷, 2017年 12月 8日 (2017 - 12 - 08), 103-113</td> <td>1-66</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 102973506 A (中国科学院深圳先进技术研究院) 2013年 3月 20日 (2013 - 03 - 20) 实施例1, 5; 权利要求9; 说明书第0034-0035段	1-66	X	US 2013330274 A1 (UNIV. VIRGINIA PATENT FOUNDATION) 2013年 12月 12日 (2013 - 12 - 12) claims 1-24	1-66	X	CN 105585598 A (湖南师范大学等) 2016年 5月 18日 (2016 - 05 - 18) 实施例	1-66	X	WANG N. et al. "Mannose derivative and lipid A dually decorated cationic liposomes as an effective cold chain free oral mucosal vaccine adjuvant-delivery system" European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 第88卷, 2014年 4月 24日 (2014 - 04 - 24), 194-206	1-66	X	COSTA A. et al. "Mannose-functionalized solid lipid nanoparticles are effective in targeting alveolar macrophages" European Journal of Pharmaceutical Sciences, 第114卷, 2017年 12月 8日 (2017 - 12 - 08), 103-113	1-66
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	CN 102973506 A (中国科学院深圳先进技术研究院) 2013年 3月 20日 (2013 - 03 - 20) 实施例1, 5; 权利要求9; 说明书第0034-0035段	1-66																		
X	US 2013330274 A1 (UNIV. VIRGINIA PATENT FOUNDATION) 2013年 12月 12日 (2013 - 12 - 12) claims 1-24	1-66																		
X	CN 105585598 A (湖南师范大学等) 2016年 5月 18日 (2016 - 05 - 18) 实施例	1-66																		
X	WANG N. et al. "Mannose derivative and lipid A dually decorated cationic liposomes as an effective cold chain free oral mucosal vaccine adjuvant-delivery system" European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 第88卷, 2014年 4月 24日 (2014 - 04 - 24), 194-206	1-66																		
X	COSTA A. et al. "Mannose-functionalized solid lipid nanoparticles are effective in targeting alveolar macrophages" European Journal of Pharmaceutical Sciences, 第114卷, 2017年 12月 8日 (2017 - 12 - 08), 103-113	1-66																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>																				
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																			
2019年 7月 4日	2019年 7月 25日																			
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员																			
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	吴铁生																			
传真号 (86-10)62019451	电话号码 010-53961870																			

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	KIM N. et al. "Synthesis and characterization of mannosylated pegylated polyethylenimine as a carrier for siRNA" International Journal of Pharmaceutics, 第427卷, 2011年 8月 12日 (2011 - 08 - 12), 123-133	1-66

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 37  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
[1] 权利要求37涉及一种运送药效成分到达靶细胞的方法，不符合PCT实施细则39.1(iv)的规定，  
基于主题名称为靶向载体在制备药物载体中的用途进行检索。
2.  权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
PCT/CN2019/088001

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	102973506	A	2013年 3月 20日	CN 102973506 B	2015年 6月 3日
US	2013330274	A1	2013年 12月 12日	无	
CN	105585598	A	2016年 5月 18日	CN 105585598 B	2019年 2月 19日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)