



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103342789 B

(45)授权公告日 2016.11.23

(21)申请号 201310232498.X

专利权人 菲泽尔克斯公司

(22)申请日 2009.05.13

(72)发明人 P·S·斯泰顿 A·S·霍夫曼

(65)同一申请的已公布的文献号

A·J·康弗汀 D·贝诺伊特

申请公布号 CN 103342789 A

C·L·杜瓦尔 P·约翰逊

A·加尔

(43)申请公布日 2013.10.09

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

(30)优先权数据

代理人 刘晓东

61/052,908 2008.05.13 US

61/052,914 2008.05.13 US

61/091,294 2008.08.22 US

61/112,048 2008.11.06 US

61/112,054 2008.11.06 US

61/120,769 2008.12.08 US

61/140,774 2008.12.24 US

61/140,779 2008.12.24 US

61/171,377 2009.04.21 US

(62)分案原申请数据

(51)Int.Cl.

200980122888.3 2009.05.13

C08F 293/00(2006.01)

A61K 47/48(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

C12N 15/87(2006.01)

(73)专利权人 华盛顿大学

(56)对比文件

地址 美国华盛顿

US 20070224241 A1, 2007.09.27,

WO 2006016166 A1, 2006.02.16,

审查员 安娜

权利要求书4页 说明书48页 附图22页

(54)发明名称

用于向细胞内递送的二嵌段共聚物和其多核苷酸复合物

(57)摘要

本文中描述了共聚物以及制备和利用此类共聚物的方法。此类共聚物具有至少两个嵌段：具有在生理pH下是亲水的至少一个单元的第一嵌段，和具有疏水性基团的第二嵌段。该第二嵌段还具有在大约生理pH下是阴离子性的基团的至少一个单元。所述共聚物可破裂细胞膜，包括细胞外膜、细胞内膜、囊泡、细胞器、内体、脂质体或红细胞。优选地，在某些情况下，共聚物破裂膜并且进入细胞内环境。在特定的实例中，共聚物是内体裂解性的。

聚合物	结构 [D] _{100x} [B ₁ -P ₁ -D] _{100y}	Mn Kda	嵌段比例 MW ₂ /MW ₁
P7v1	[D] _{10.1K} [B ₄₈ -P ₂₉ -D ₂₃] _{11.37K}	19	1.2
P7v2	[D] _{10K} [B ₄₈ -P ₁₈ -D ₃₇] _{3.8K}	19	0.9
P7v3	[D] _{6.5K} [B ₄₁ -P ₃₉ -D ₂₀] _{9.5K}	16	1.5
P7v6	[D] _{18.1K} [B ₅₇ -P ₂₆ -D ₂₂] _{7.8K}	31	2.4

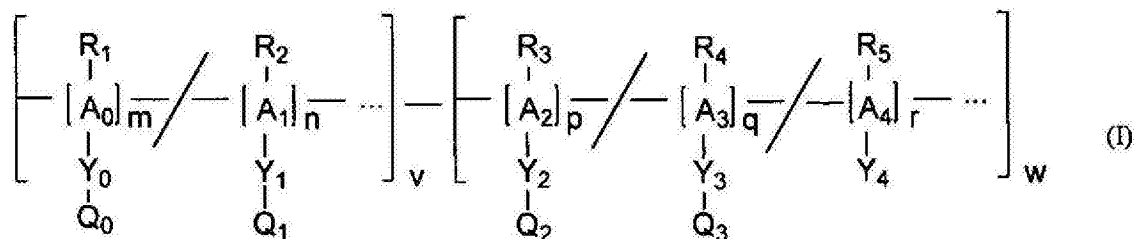
x, y和z是摩尔数。分子量是使用PMMA标准通过凝胶渗透色谱法测定的。组成是通过NMR光谱法测定的。

A

聚合物	结构 [D] _{100x} [B ₁ -P ₁ -D] _{100y}	嵌段比例 MW ₂ /MW ₁	粒度 (nm)
PRX-1	[D] _{11.3K} [B ₅₀ -P ₃₀ -D ₂₀] _{20.3K}	1.83	41
PRX-2	[D] _{14.5K} [B ₅₇ -P ₂₃ -D ₂₀] _{26.4K}	1.82	49
PRX-3	[D] _{11.9K} [B ₅₅ -P ₂₇ -D ₁₈] _{23.4K}	2.92	60
PRX-4	[D] _{10.7K} [B ₅₀ -P ₃₇ -D ₁₃] _{13.8K}	3.16	50
PRX-5	[D] _{10.3K} [B ₄₀ -P ₃₁ -D ₂₉] _{22.7K}	3.00	59
PRX-6	[D] _{14.4K} [B ₅₇ -P ₃₁ -D ₁₆] _{27.9K}	4.62	115

B

1. 具有式I的共聚物:



其中

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

a 是1-4;

b 是2-4;

Y_4 选自氢、 C_{1-10} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 $O-C_{1-10}$ 烷基、 $-C(O)OC_{1-10}$ 烷基和苯基,其中任意个任选地被一个或多个氟基取代;

Y_0 、 Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、 $-C_{1-10}$ 烷基、 $-C(O)OC_{2-10}$ 烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、 $-OC_{2-10}$ 烷基、 $-SC_{2-10}$ 烷基和 $-C(O)NR_6C_{2-10}$ 烷基;

Y_3 选自共价键、 $-C_{1-10}$ 烷基和 $-C_{6-10}$ 芳基;其中

用适当数目的氢原子完成未完全被 R_1 - R_5 和 Y_0 - Y_4 取代的 A_0 - A_4 四价碳原子;

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 和 R_6 独立地选自氢、 $-CN$ 、烷基、炔基、杂烷基、芳基和杂芳基,其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代;

Q_0 是选自在生理pH下为亲水性的残基、可缀合或可官能化的残基和氢中的残基;

Q_1 是在正常生理pH下为亲水性的残基;

Q_2 是在正常生理pH下带正电荷的残基;

Q_3 是在正常生理pH下带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基;

m 是0至小于1.0,

n 大于0至1.0,其中

$m+n=1$;

p 是0.1至0.9,

q 是0.1至0.9,其中

p 和 q 相同,或者 p 和 q 彼此相异 $\pm 10\%$;

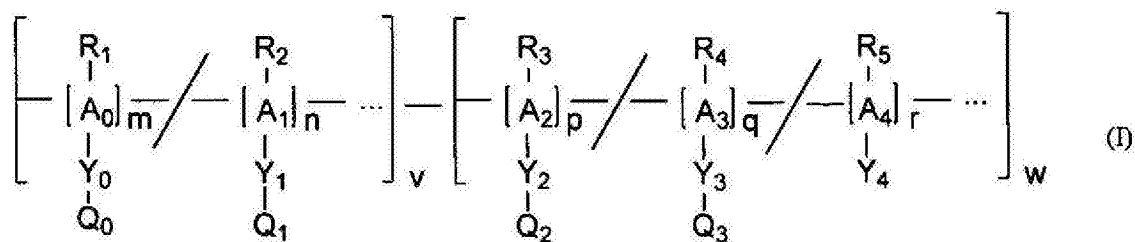
r 是0至0.8;其中

$p+q+r=1$;

v 是1至25kDa;以及,

w 是1至50kDa。

2. 具有式I的共聚物:



其中

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

a 是1-4；

b 是2-4；

Y_4 选自氢、 C_{1-10} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 $O-C_{1-10}$ 烷基、 $-C(O)OC_{1-10}$ 烷基和苯基，其中任意个任选地被一个或多个氟基取代；

Y_0 、 Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、 $-C_{1-10}$ 烷基、 $-C(O)OC_{2-10}$ 烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、 $-OC_{2-10}$ 烷基、 $-SC_{2-10}$ 烷基和 $-C(O)NR_6C_{2-10}$ 烷基；

Y_3 选自共价键、 $-C_{1-10}$ 烷基和 $-C_{6-10}$ 芳基；其中

用适当数目的氢原子完成未完全被 R_1 - R_5 和 Y_0 - Y_4 取代的 A_0 - A_4 四价碳原子；

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 和 R_6 独立地选自氢、 $-CN$ 、炔基、杂烷基、环烷基、芳基和杂芳基，其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代；

Q_0 是选自在生理pH下为亲水性的残基、可缀合或可官能化的残基和氢中的残基；

Q_1 是在正常生理pH下为亲水性的残基；

Q_2 是在正常生理pH下带正电荷的残基；

Q_3 是在正常生理pH下带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基；

m 是0至小于1.0，

n 大于0至1.0，其中

$m+n=1$ ；

p 是0.1至0.9，

q 是0.1至0.9，其中

p 和 q 相同，或者 p 和 q 彼此相异 $\pm 10\%$ ；

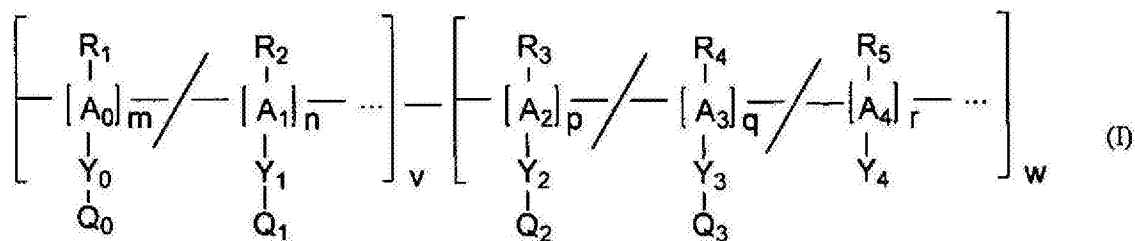
r 是0至0.8；其中

$p+q+r=1$ ；

v 是1至25kDa；以及，

w 是1至50kDa。

3. 具有式I的共聚物：



其中

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

a 是1-4；

b 是2-4；

Y_4 选自氢、 C_{1-10} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 $O-C_{1-10}$ 烷基、 $-C(O)OC_{1-10}$ 烷基和苯基，其中任意个任选地被一个或多个氟基取代；

Y_0 、 Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、 $-C_{1-10}$ 烷基、 $-C(O)OC_{2-10}$ 烷基、 $-OC(O)C_{1-10}$ 烷基、 $-OC_{2-10}$

烷基-、-SC₂₋₁₀烷基-和-C(O)NR₆C₂₋₁₀烷基-;

Y₃选自共价键、-C₁₋₁₀烷基-和-C₆₋₁₀芳基-;其中

用适当数目的氢原子完成未完全被R₁-R₅和Y₀-Y₄取代的A₀-A₄四价碳原子;

R₁、R₂、R₃、R₄、R₅和R₆独立地选自氢、-CN、烷基、炔基、杂环烷基、芳基和杂芳基,其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代;

Q₀是选自在生理pH下为亲水性的残基、可缀合或可官能化的残基和氢中的残基;

Q₁是在正常生理pH下为亲水性的残基;

Q₂是在正常生理pH下带正电荷的残基;

Q₃是在正常生理pH下带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基;

m是0至小于1.0,

n大于0至1.0,其中

m+n=1;

p是0.1至0.9,

q是0.1至0.9,其中

p和q相同,或者p和q彼此相异±10%;

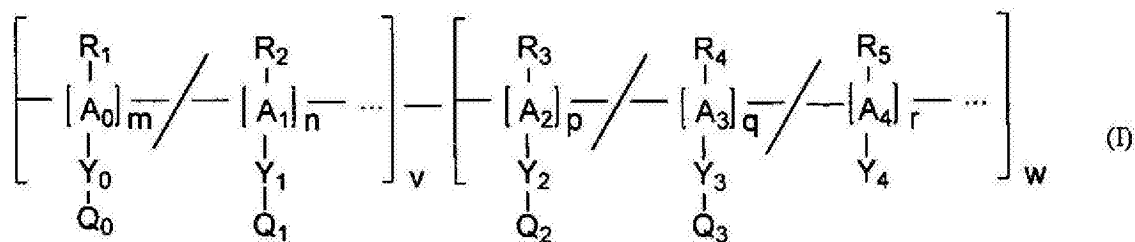
r是0至0.8;其中

p+q+r=1;

v是1至25kDa;以及,

w是1至50kDa。

4.具有式I的共聚物:



其中

A₀、A₁、A₂、A₃和A₄选自-C-、-C-C-、-C(O)(C)_aC(O)O-、-O(C)_aC(O)-和-O(C)_bO-;其中,

a是1-4;

b是2-4;

Y₄选自氢、C₁₋₁₀烷基、C₃₋₆环烷基、O-C₁₋₁₀烷基、-C(O)OC₁₋₁₀烷基和苯基,其中任意个任选地被一个或多个氟基取代;

Y₀、Y₁和Y₂独立地选自共价键、-C₁₋₁₀烷基-、-C(O)OC₂₋₁₀烷基-、-OC(O)C₁₋₁₀烷基-、-OC₂₋₁₀烷基-、-SC₂₋₁₀烷基-和-C(O)NR₆C₂₋₁₀烷基-;

Y₃选自共价键、-C₁₋₁₀烷基-和-C₆₋₁₀芳基-;其中

用适当数目的氢原子完成未完全被R₁-R₅和Y₀-Y₄取代的A₀-A₄四价碳原子;

R₁、R₂、R₃、R₄、R₅和R₆独立地选自氢、-CN、炔基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基,其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代;

Q₀是选自在生理pH下为亲水性的残基、可缀合或可官能化的残基和氢中的残基;

Q₁是在正常生理pH下为亲水性的残基;

Q₂是在正常生理pH下带正电荷的残基；

Q₃是在正常生理pH下带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基；

m是0至小于1.0，

n大于0至1.0，其中

$m+n=1$ ；

p是0.1至0.9，

q是0.1至0.9，其中

p和q相同，或者p和q彼此相异 $\pm 10\%$ ；

r是0至0.8；其中

$p+q+r=1$ ；

v是1至25kDa；以及，

w是1至50kDa。

5. 权利要求1—4中任一项的共聚物，其中Q₁是在正常生理pH下带正电荷的残基；在正常生理pH下带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基；在正常生理pH下为中性的残基；或在正常生理pH下为两性离子性的残基。

6. 权利要求1—4中任一项的共聚物，其中v:w的比率为1:1至1:3。

7. 权利要求1—4中任一项的共聚物，其中还包含治疗剂。

8. 权利要求7的共聚物，其中所述治疗剂与所述共聚物缔合。

9. 权利要求8的共聚物，其中所述治疗剂是siRNA。

10. 权利要求9的共聚物，其中所述治疗剂共价地连接至所述共聚物。

11. 权利要求9的共聚物，其中所述治疗剂通过离子相互作用与所述共聚物缔合。

12. 权利要求1—4中任一项的共聚物，其中Q₀是选自下述的残基：氨基残基、烷基氨基残基、铵残基、烷基铵残基、胍残基、咪唑基残基、吡啶基残基、叠氮化物残基、炔残基、琥珀酰亚胺酯残基、四氟苯酯残基、五氟苯酯残基、对硝基苯酯残基和含有吡啶基二硫化物的残基。

13. 权利要求1—4中任一项的共聚物，其中Q₁是选自下述的残基：羟基残基、聚氧化烷基残基和硫醇残基。

14. 权利要求1—4中任一项的共聚物，其中Q₁是选自下述的残基：聚乙二醇残基和聚丙二醇残基。

15. 权利要求1—4中任一项的共聚物，其中Q₂是选自下述的残基：氨基残基、烷基氨基残基、铵残基、烷基铵残基、胍残基、咪唑基残基和吡啶基残基。

16. 权利要求1—4中任一项的共聚物，其中Q₃是选自下述的残基：羧基残基、磺酰胺残基、硼酸根残基、膦酸根残基和磷酸根残基。

17. 权利要求1—16中任一项的共聚物在制备用于抑制基因表达的药物中的用途。

18. 权利要求1—16中任一项的共聚物在制备用于细胞内递送多核苷酸的药物中的用途。

用于向细胞内递送的二嵌段共聚物和其多核苷酸复合物

[0001] 本申请是申请号为200980122888.3、申请日为2009年5月13日、发明名称为“用于向细胞内递送的二嵌段共聚物和其多核苷酸复合物”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 交叉参考

[0003] 本申请要求2008年5月13日提交的美国临时申请案61/052,908、2008年5月13日提交的美国临时申请案61/052,914、2008年8月22日提交的美国临时申请案61/091,294、2008年11月6日提交的美国临时申请案61/112,054、2008年11月6日提交的美国临时申请案61/112,048、2008年12月12日提交的美国临时申请案61/120,769、2008年12月24日提交的美国临时申请案61/140,779、2008年12月24日提交的美国临时申请案61/140,774和2009年4月21日提交的美国临时申请案61/171,377(所有这些文献的内容以其全文通过引用合并入本文)的权益。

[0004] 关于联邦政府资助的研究的声明

[0005] 本发明是在由国立卫生研究院给予的合同号5R01 EB 2991-03下的政府资助下进行的。政府具有本发明的某些权利。

[0006] 领域

[0007] 本发明涉及有机化学、高分子化学、生物化学、分子生物学和医学领域。具体地其涉及共聚物(例如,二嵌段共聚物)和其与多核苷酸的复合物,待用作将多核苷酸递送入活细胞的载体(vehicle)。

[0008] 发明背景

[0009] 在某些情况下,给活细胞提供治疗剂(例如,寡核苷酸)是有益的。在一些情况下,此类多核苷酸至活细胞的递送提供了治疗益处。

[0010] 概述

[0011] 在一些实施方案中,本文中提供了包含至少两个嵌段的共聚物,其中第一嵌段包含至少一个亲水性(例如,在大约生理pH下)的结构单元,第二嵌段包含多个疏水性部分。在某些实施方案中,第二嵌段还包含以带电荷或不带电荷状态存在的可带电荷的种类,其在生理pH是阴离子性的。然而,当pH处于该可带电荷种类的大约pKa时,将存在以两种形式存在的可带电荷种类的平衡分布,即大约50%将是阴离子性的,并且大约50%将不带电荷。pH离该可带电荷种类的pKa越远,则该平衡中将存在相应的偏移,从而在更高的pH值下,阴离子形式将占优势,而在更低的pH值下,未带电荷的形式将占优势。本文中描述的实施方案包括在任何pH值下的共聚物的形式。在内体的pH值(内体pH)下,可带电荷的种类将主要以未带电荷的形式存在。

[0012] 优选地,在某些情况(其中将本文中描述的聚合物与细胞膜接触)下,其将破裂膜或使膜失去稳定并且进入细胞内环境。在特定的实施方案中,本文中提供的聚合物是内体裂解性的或使内体膜失去稳定的。

[0013] 在某些实施方案中,本文中提供了细胞膜去稳定化(例如,内体裂解性或内体膜去稳定化)的共聚物,其包含:

[0014] (a)第一嵌段,该第一嵌段为亲水性嵌段,和

- [0015] (b)第二嵌段,该第二嵌段为膜去稳定化的疏水性嵌段,其包含
- [0016] (i)在大约生理pH下为阴离子性的第一可带电荷种类
- [0017] (ii)在大约生理pH下为阳离子性的第二可带电荷种类。
- [0018] 在一些实施方案中,本文中提供了细胞膜去稳定化(例如,内体裂解性或内体膜去稳定化)的共聚物,其包含:
- [0019] (a)第一嵌段,该第一嵌段是包含在大约生理pH下为阳离子性的第一可带电荷种类的亲水性嵌段,
- [0020] (b)第二嵌段,该第二嵌段为膜去稳定化的疏水性嵌段,其包含
- [0021] (i)在大约中性pH下为阴离子性的第二可带电荷种类;和
- [0022] (ii)在大约生理pH下为阳离子性的第三可带电荷种类;和
- [0023] (c)与第一嵌段缔合的寡核苷酸。
- [0024] 在某些实施方案中,本文中提供了细胞膜去稳定化(例如,内体裂解性或内体膜去稳定化)的共聚物,其包含:
- [0025] (a)第一嵌段,该第一嵌段为亲水性嵌段,
- [0026] (b)第二嵌段,该第二嵌段是包含丙烯酸残基或烷基丙烯酸残基的膜去稳定化疏水性嵌段。
- [0027] 在一个方面,本发明涉及共聚物(例如,二嵌段共聚物),其包含:
- [0028] 第一嵌段,其包含在正常生理pH下为亲水性的第一结构单元;
- [0029] 第二嵌段,其包含:
- [0030] 在正常生理pH下为阳离子性的并且可以与第一结构单元相同或不同的第二结构单元;
- [0031] 在正常生理pH下为阴离子性的第三结构单元;
- [0032] 疏水性增强部分,其中:
- [0033] 该疏水性增强部分共价连接至第二结构单元;或
- [0034] 该疏水性增强部分共价连接至第三结构单元;或
- [0035] 该疏水性增强部分包含在第二嵌段的第四结构单元中;或
- [0036] 上述结构的任何组合;和
- [0037] 第二嵌段在总电荷上基本上是中性的。
- [0038] 在不同实施方案中,第一结构单元在正常生理pH(即,大约生理pH)下为阳离子性的,在正常生理pH下为阴离子性的,在正常生理pH下为中性的,或在正常生理pH下为两性离子性的。在一些实施方案中,共聚物的第一嵌段在正常生理pH下为聚阳离子性的,在正常生理pH下为聚阴离子性的,在正常生理pH下为中性的,或在正常生理pH下为多两性离子性的。在另外的实施方案中,共聚物的第一嵌段在内体pH下具有与在正常生理pH下大体相同的离子性质,例如,在内体pH下为聚阳离子性的,在内体pH下为聚阴离子性的,在内体pH下为中性的,或在内体pH下为聚两性离子性的。
- [0039] 在一个方面,本发明涉及共聚物(例如,二嵌段共聚物),其包含:
- [0040] 第一嵌段,其包含在正常生理pH下为阳离子性的第一结构单元;
- [0041] 第二嵌段,其包含:
- [0042] 在正常生理pH下为阳离子性的并且可以与第一结构单元相同或不同的第二结构

单元;

[0043] 在正常生理pH下为阴离子性的第三结构单元;

[0044] 疏水性增强部分,其中:

[0045] 该疏水性增强部分共价连接至第二结构单元;或,

[0046] 该增强疏水性增强部分共价连接至第三结构单元;或,

[0047] 该疏水性增强部分包含在第二嵌段的第四结构单元中;或,

[0048] 上述结构的任何组合;和

[0049] 第二嵌段在总电荷上基本上是中性的。

[0050] 在本发明的一个方面,第一结构单元包含阳离子氮种类(即,在正常生理pH下为阳离子性的氮种类)。在本发明的一个方面,所述阳离子氮种类是铵种类。在本发明的一个方面,第二结构单元与第一结构单元相同。在本发明的一个方面,所述阴离子种类包括羧酸阴离子。在本发明的一个方面,第一嵌段还包括随机散布在第一结构单元之间的电荷中性的结构单元。在本发明的一个方面,第一和/或第二嵌段包含至少一个反应性或易于修饰的基团。在本发明的一个方面,如果存在的话,则第四结构单元包括按重量计算占第二嵌段的大约10%至大约60%。

[0051] 在某些实施方案中,第一聚合物嵌段大小为大约10,000道尔顿,或大约2,000道尔顿至大约30,000道尔顿,或大约8,500道尔顿至大约13,000道尔顿。在一些实施方案中,第一聚合物嵌段在绝对值上具有与待递送的siRNA分子上的净负电荷相似的净正电荷。

[0052] 在一些实施方案中,第二聚合物嵌段在分子量上与第一聚合物嵌段大致相等,或是第一聚合物嵌段的大小的约0.2-5倍或大约1-3倍,并且在许多优选实施方案中,第二聚合物嵌段是第一聚合物嵌段的大小的约2-3倍。

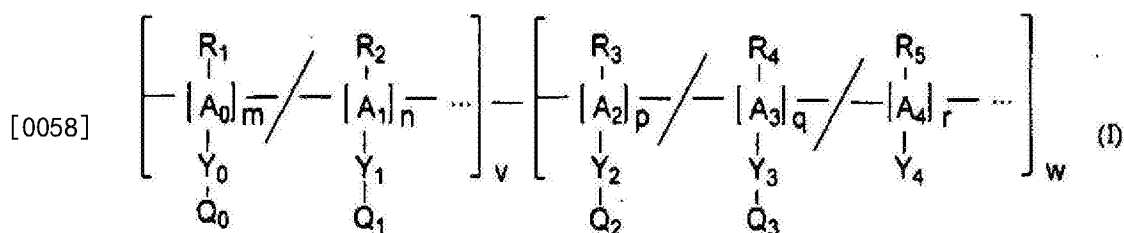
[0053] 在一些实施方案中,亲水性的带电荷的嵌段与至少一个核苷酸(包括多核苷酸,例如siRNA)复合(在本文中可与例如通过一个或多个共价键、一个或多个离子相互作用、其组合等与之“缔合”或“连接”互换使用)。

[0054] 在本发明的一个方面,将多核苷酸嵌段通过任选地可切割的共价键连接至一个聚合物嵌段。在本发明的一个方面,多核苷酸选自DNA、RNA和其天然及合成类似物。在本发明的一个方面,多核苷酸是反义的。在本发明的一个方面,多核苷酸是RNA。在本发明的一个方面,RNA选自mRNA、piRNA、miRNA和siRNA。在本发明的一个方面,RNA是siRNA。

[0055] 在本发明的一个方面,每一个结构单元独立地从乙烯型单体(ethylenic monomer)衍生而来,共聚物的合成包括活性聚合。

[0056] 在本发明的一个方面,乙烯型单体是丙烯酸单体。

[0057] 在本文中在某些实施方案中提供了二嵌段共聚物,其具有化学式I:



[0059] 在一些实施方案中:

[0060] A_0 、 A_1 、 A_2 、 A_3 和 A_4 选自 $-C-C-$ 、 $-C-$ 、 $-C(O)(C)_aC(O)O-$ 、 $-O(C)_aC(O)-$ 和 $-O(C)_bO-$;其中,

[0061] a是1-4;

[0062] b是2-4;

[0063] Y₄选自氢、(1C-10C)烷基、(3C-6C)环烷基、0-(1C-10C)烷基、-C(O)O(1C-10C)烷基、C(O)NR₆(1C-10C)和芳基,其中任意个可任选地被一个或多个氟基取代;

[0064] Y₀,Y₁和Y₂独立地选自共价键、(1C-10C)烷基-、-C(O)O(2C-10C)烷基-、-OC(O)(1C-10C)烷基-、-O(2C-10C)烷基-和-S(2C-10C)烷基-、-C(O)NR₆(2C-10C)烷基-;

[0065] Y₃选自共价键、(1C-10C)烷基和(6C-10C)芳基;其中

[0066] 用适当数目的氢原子完成未完全被R₁-R₅和Y₀-Y₄取代的A₀-A₄四价碳原子;

[0067] 各R₁、R₂、R₃、R₄、R₅和R₆独立地选自氢、-CN、烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基,其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代;

[0068] Q₀是选自下述的残基:在生理pH下为亲水性的并且在生理pH下至少部分带正电荷的残基(例如,氨基、烷基氨基、铵、烷基铵、胍、咪唑基、吡啶基等)、在生理pH下至少部分带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基(例如,羧基、磺酰胺、硼酸根、膦酸根、磷酸根等)、在生理pH下基本上为中性(或不带电荷)的残基(例如,羟基、聚氧化烷基、聚乙二醇、聚丙二醇、硫醇等)、在生理pH下为至少部分两性离子性的残基(例如,在生理pH下包含磷酸根和铵基的单体残基)、可缀合的或可官能化的残基(例如,包含反应性基团的残基,例如叠氮化物、炔、琥珀酰亚胺酯、四氟苯酯、五氟苯酯、对硝基苯酯、吡啶基二硫化物等);或氢;

[0069] Q₁是下述的残基,所述残基在生理pH下为亲水性的并且在生理pH下至少部分带正电荷(例如,氨基、烷基氨基、铵、烷基铵、胍、咪唑基、吡啶基等);在生理pH下至少部分带负电荷但在更低的pH下经历质子化(例如,羧基、磺酰胺、硼酸根、膦酸根、磷酸根等)、在生理pH下基本为中性(例如,羟基、聚氧化烷基、聚乙二醇、聚丙二醇、硫醇等)、或在生理pH下为至少部分两性离子性的(例如,在生理pH下包含磷酸根和铵基的单体残基);

[0070] Q₂是在生理pH下带正电荷的残基,包括但不限于氨基、烷基氨基、铵、烷基铵、胍、咪唑基、吡啶基;

[0071] Q₃在生理pH下带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基,包括但不限于羧基、磺酰胺、硼酸根、膦酸根和磷酸根;

[0072] m是0至小于1.0(例如,0至大约0.49);

[0073] n为大于0至1.0(例如,大约0.51至大约1.0);其中

[0074] m+n=1

[0075] p是大约0.1至大约0.9(例如,大约0.2至大约0.5);

[0076] q是大约0.1至大约0.9(例如,大约0.2至大约0.5);其中

[0077] r是0至大约0.8(例如,0至大约0.6);其中

[0078] p+q+r=1

[0079] v是大约1至大约25kDa;以及,

[0080] w是大约1至大约50kDa。

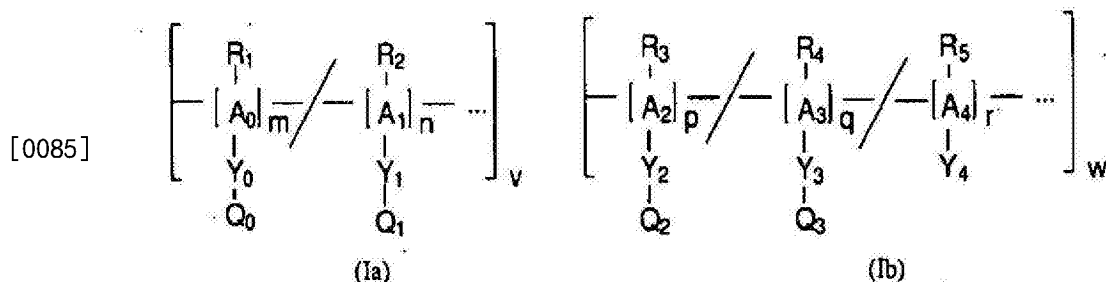
[0081] 在特定的实施方案中,v是大约5至大约25kDa。在另外的或可选择的特定实施方案中,w是大约1至大约50kDa。

[0082] 在一些实施方案中,由p和q代表的单体残基的数目或比率在彼此的大约30%,彼此的大约20%,彼此的大约10%等内。在特定的实施方案中,p大体上与q相同。在某些实施方案

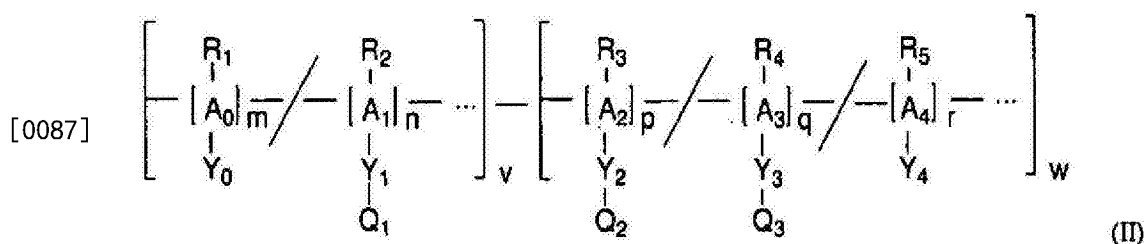
中,至少部分带电荷通常包括痕量以上的带电荷种类,包括例如至少20%的残基带电荷,至少30%的残基带电荷,至少40%的残基带电荷,至少50%的残基带电荷,至少60%的残基带电荷,至少70%的残基带电荷等。

[0083] 在某些实施方案中,m是0并且Q₁是在生理pH下为亲水性的并且基本上为中性(或不带电荷)的残基。即,在生理pH下,Q₁上任何可带电荷的种类主要以中性形式存在。在一些实施方案中,基本上不带电荷包括例如,低于5%带电荷,低于3%带电荷,低于1%带电荷等。在某些实施方案中,m是0并且Q₁是在生理pH下为亲水性的并且至少部分为阳离子性的残基。在某些实施方案中,m是0并且Q₁是在生理pH下为亲水性的并且至少部分为阴离子性的残基。在某些实施方案中,m大于0并且n大于0,并且Q₀或Q₁中的一个是在生理pH下为亲水性的并且至少部分为阳离子性的残基,而Q₀或Q₁中的另一个是在生理pH下为亲水性的并且基本上为中性的残基。在某些实施方案中,m大于0并且n大于0,并且Q₀或Q₁中的一个是在生理pH下为亲水性的并且至少部分为阴离子性的残基,而Q₀或Q₁中的另一个是在生理pH下为亲水性的并且基本上为中性的残基。在某些实施方案中,m大于0并且n大于0,并且Q₁是在生理pH下为亲水性的并且至少部分为阳离子性的残基,并且Q₀是可缀合的或可官能化的残基。在某些实施方案中,m大于0并且n大于0,并且Q₁是在生理pH下为亲水性的并且基本上为中性的残基,并且Q₀是可缀合的或可官能化的残基。

[0084] 在本文某些实施方案中提供了具有至少两个嵌段的共聚物,其中第一嵌段具有化学式Ia,第二嵌段具有化学式Ib,其中本文中描述的每一个术语是如上所述的。



[0086] 在某些实施方案中,本文中提供了式II的化合物:



[0088] 在一些实施方案中:

[0089] A₀、A₁、A₂、A₃和A₄选自-C-C-、-C(O)(C)_aC(O)O-、-O(C)_aC(O)-和-O(C)_bO-;其中,

[0090] a是1-4;

[0091] b是2-4;

[0092] Y₀和Y₄独立地选自氢、(1C-10C)烷基、(3C-6C)环烷基、O-(1C-10C)烷基、-C(O)O(1C-10C)烷基、C(O)NR₆(1C-10C)和芳基,其中任意个任选地被一个或多个氟基取代;

[0093] Y₁和Y₂独立地选自共价键、(1C-10C)烷基-、-C(O)O(2C-10C)烷基-、-OC(O)(1C-10C)烷基-、-O(2C-10C)烷基-和-S(2C-10C)烷基-、-C(O)NR₆(2C-10C)烷基-;

[0094] Y₃选自共价键、(1C-10C)烷基和(6C-10C)芳基；其中

[0095] 用适当数目的氢原子完成未完全被R₁-R₅₁和Y₀-Y₄取代的A₀-A₄四价碳原子；

[0096] 各R₁、R₂、R₃、R₄、R₅和R₆独立地选自氢、-CN、烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基，其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代；

[0097] Q₁和Q₂是在生理pH下带正电荷的残基，包括但不限于氨基、烷基氨基、铵、烷基铵、胍、咪唑基和吡啶基；

[0098] Q₃是在生理pH下带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基，包括但不限于羧基、磺酰胺、硼酸根、膦酸根和磷酸根；

[0099] m是0至大约0.49；

[0100] n是大约0.51至大约1.0；其中

[0101] m+n=1

[0102] p是大约0.2至大约0.5；

[0103] q是大约0.2至大约0.5；其中：

[0104] p大体上与q相同；

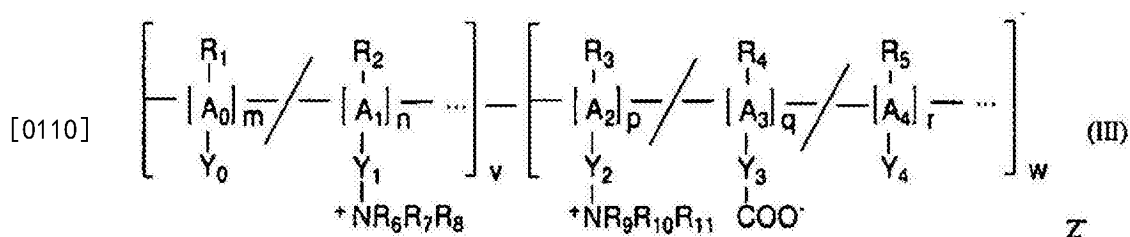
[0105] r是0至大约0.6；其中

[0106] p+q+r=1

[0107] v是大约5至大约25kDa；以及，

[0108] w是大约5至大约50kDa。

[0109] 在本文中的一些实施方案中提供了二嵌段共聚物，其具有(在正常生理pH下)化学式III：



[0111] 在一些实施方案中：

[0112] A₀、A₁、A₂、A₃和A₄选自-C-C-、-C(O)(C)_aC(O)O-、-O(C)_aC(O)-和-O(C)_bO-；其中，

[0113] a是1-4；

[0114] b是2-4；

[0115] R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₀和R₁₁独立地选自氢、(1C-5C)烷基、(3C-6C)环烷基和苯基，其中任意个任选地被一个或多个氟原子取代；

[0116] Y₀和Y₄独立地选自氢、(1C-10C)烷基、(3C-6C)环烷基、O-(1C-10C)烷基、-C(O)O(1C-10C)烷基和苯基，其中任意个可任选地被一个或多个氟基取代；

[0117] Y₁和Y₂独立地选自共价键、(1C-10C)烷基-、-C(O)O(2C-10C)烷基-、-OC(O)(1C-10C)烷基-、-O(2C-10C)烷基-和-S(2C-10C)烷基-；

[0118] Y₃选自共价键、(1C-5C)烷基和苯基；其中

[0119] 用适当数目的氢原子完成未完全被R₇-R₁₁和Y₀-Y₄取代的A₀-A₄四价碳原子；

[0120] Z是生理上可接受的抗衡离子，

[0121] m是0至大约0.49；

- [0122] n是大约0.51至大约1.0;其中
- [0123] $m+n=1$
- [0124] p是大约0.2至大约0.5;
- [0125] q是大约0.2至大约0.5;其中:
- [0126] p大体上与q相同;
- [0127] r是0至大约0.6;其中
- [0128] $p+q+r=1$
- [0129] v是大约5至大约25kDa;以及,
- [0130] w是大约5至大约50kDa。
- [0131] 在本发明的一个方面,
- [0132] A_1 是 $-C-C-$
- [0133] Y_1 是 $-C(O)OCH_2CH_2-$,
- [0134] R_6 是氢,
- [0135] R_7 和 R_8 各自是 $-CH_3$;以及,
- [0136] R_2 是 $-CH_3$ 。
- [0137] 在本发明的一个方面,
- [0138] A_2 是 $-C-C-$;
- [0139] Y_2 是 $-C(O)OCH_2CH_2-$;
- [0140] R_9 是氢;
- [0141] R_{10} 和 R_{11} 各自是 $-CH_3$;以及,
- [0142] R_3 是 $-CH_3$ 。
- [0143] 在本发明的一个方面,
- [0144] A_3 是 $-C-C-$;
- [0145] R_3 是 $CH_3CH_2CH_2-$;
- [0146] Y_3 是共价键;以及
- [0147] Z是生理上可接受的阴离子(例如,聚阳离子或多个阳离子)。
- [0148] 在某些实施方案中:
- [0149] A_4 是 $-C-C-$;
- [0150] R_5 选自氢和 $-CH_3$;以及,
- [0151] Y_4 是 $-C(O)O(CH_2)_3CH_3$ 。
- [0152] 在一些实施方案中:
- [0153] A_0 是 $C-C-$
- [0154] R_1 选自氢和(1C-3C)烷基;以及
- [0155] Y_0 选自 $-C(O)O(1C-3C)$ 烷基。
- [0156] 在一些实施方案中,m是0。在某些实施方案中,r是0。在一些实施方案中,m和r都是0。
- [0157] 在某些实施方案中,本文中提供了将多核苷酸递送入细胞的方法,其包括将细胞与本文中的聚合物:多核苷酸复合物接触。在特定的实施方案中,以任何适当的方式,包括但不限于例如离子性和非离子性相互作用(例如一个或多个共价键)、其组合等连接所述聚

合物：多核苷酸复合物。在特定的实施方案中，本文中提供了将多核苷酸递送入细胞的方法，其包括将细胞与聚合物和多核苷酸的共价缀合物接触。

[0158] 在本发明的一个方面，所述多核苷酸选自DNA、RNA以及其天然和合成类似物。

[0159] 在本发明的一个方面，DNA、RNA或者其天然或合成类似物是反义的。在本发明的一个方面，多核苷酸是RNA。在本发明的一个方面，RNA是siRNA。在本发明的一个方面，将siRNA体内递送至细胞。在本发明的一个方面，将本发明的聚合物连接至或复合至靶向部分。在本发明的一个方面，将靶向部分共价地连接至共聚物（例如，二嵌段共聚物）的 α -末端。在本发明的一个方面，将靶向部分共价连接至共聚物的 ω 末端，或共价连接至共聚物（例如，二嵌段共聚物）的侧基（pendant group）。在本发明的一个方面，靶向部分选自但不限于抗体、抗体片段、抗体样分子、肽、环肽和小分子。

[0160] 通过引用合并

[0161] 本说明书中提及的所有出版物和专利申请就引述的目的通过引用合并入本文，其引用程度就如同每一个个别出版物或专利申请被明确和个别地指定通过引用合并一样。

[0162] 附图概述

[0163] 本发明的新特征特别地示于所附权利要求中。通过参考下列详细描述和附图将获得对本发明的特征和有利方面的更好理解，所述描述提供了其中利用本发明的原理的举例说明性实施方案，所述附图是：

[0164] 图1是本文中描述的各种聚合物的举例说明性概述

[0165] 图2是[PEGMAw]-[B-P-D]的举例说明性合成。

[0166] 图3是P7-PEGMA 100-40kDa的举例说明性表征。

[0167] 图4是PEGMA-DMAEMA共聚物的组成和性质的举例说明性描述。

[0168] 图5是[PEGMAw-MAA(NHS)]-[B-P-D]的举例说明性合成。

[0169] 图6是PEGMA与MAA-NHS的举例说明性RAFT共聚反应。

[0170] 图7是DMAEMA与MAA-NHS的举例说明性RAFT共聚反应。

[0171] 图8是PDSMA的举例说明性合成。

[0172] 图9是用于siRNA缀合的HPMA-PDSMA共聚物的举例说明性合成。

[0173] 图10举例说明(A)聚合物和(B)聚合物/siRNA构建体的溶血作用。

[0174] 图11举例说明FAM-标记的siRNA和聚合物/siRNA复合物的HeLa细胞内化作用。

[0175] 图12举例说明作为siRNA聚合物载体的函数的非特异性HeLa细胞毒性(A)和GAPDH敲低(knockdown)(B)。

[0176] 图13举例说明HeLas中的GAPDH敲低。

[0177] 图14举例说明用于聚[HPMA]-b-[(PAA)(BMA)(DMAEMA)]的聚合物设计。

[0178] 图15举例说明吡啶基二硫化物-CTA的合成。

[0179] 图16举例说明吡啶基二硫化物聚合物末端基团与肽半胱氨酸的反应。

[0180] 图17举例说明用于表征肽-聚合物缀合物的SDS PAGE凝胶。

[0181] 图18举例说明用于测量聚合物触发脂双层膜的pH依赖性破裂的能力的膜破裂测定。

[0182] 图19举例说明在聚合物缀合后肽的细胞内定位。

[0183] 图20举例说明缺乏pH响应型嵌段的缀合物与两个对照组相似并且不导致显著的

毒性。

[0184] 图21举例说明肽缀合物的生物活性。

[0185] 发明详述

[0186] 虽然在本文中已显示并且描述了本发明的优选实施方案,但对于本领域技术人员将很显然的是,此类实施方案仅以举例说明的方式提供。对于本领域技术人员来说可作许多变型、变化和置换而不背离本发明。应当理解,对本文中描述的本发明实施方案的各种改变可用于实施本发明。在本文中意图由下列权利要求确定本发明的范围,并且涵盖这些权利要求范围内的方法和结构以及它们的等价物。

[0187] 聚合物

[0188] 在某些实施方案中,本发明提供了载体聚合物和聚合物:多核苷酸构建体。在某些情况下,此类聚合物和聚合物:多核苷酸构建体满足了对于用于将治疗性多核苷酸递送入细胞的安全、强效系统的需要。

[0189] 在某些实施方案中,本文中提供了细胞膜去稳定化(例如,内体裂解性或内体膜去稳定化)的共聚物,其包含

[0190] (a)第一嵌段,该第一嵌段是亲水性嵌段,和

[0191] (b)第二嵌段,该第二嵌段是膜去稳定化的疏水性嵌段,其包含:

[0192] (i)在大约生理pH下为阴离子性的第一可带电荷种类

[0193] (ii)在大约生理pH下为阳离子性的第二可带电荷种类。

[0194] 在一些实施方案中,本文中提供了细胞膜去稳定化(例如内体裂解性或内体膜去稳定化)的共聚物,其包含

[0195] (a)第一嵌段,该第一嵌段是包含在大约生理pH下为阳离子性的第一可带电荷种类的亲水性嵌段:

[0196] (b)第二嵌段,该第二嵌段是膜去稳定化的疏水性嵌段,其包含:

[0197] (i)在大约中性pH下为阴离子性的第二可带电荷种类;和

[0198] (ii)在大约生理pH下为阳离子性的第三可带电荷种类;和

[0199] (c)与第一嵌段缔合的寡核苷酸。

[0200] 在本文中描述的聚合物的一些特定实施方案中,各可带电荷的种类存在于不同结构单元上。在一些实施方案中,第一结构单元包含第一可带电荷种类。在另外的或可选择的实施方案中,第二结构单元包含第二可带电荷种类。在另外的或可选择的实施方案中,第三结构单元包含第三可带电荷的种类。

[0201] 本发明的一些结构单元据称在正常生理pH下为阳离子性的或阴离子性的。因此,在某些情况下,在正常生理pH下,所述种类具有导致其被质子化(阳离子性的,带正电荷)或去质子化(阴离子性的,带负电荷)的pKa。目前优选生理pH下的阳离子种类是氮种类,例如铵、 $-NRR'R''$ 、胍[$(-NRC(=NR'H)^+NR''R')$ 忽略对于本领域技术人员来说是已知的规范形式),其中R基团独立地是氢、烷基、环烷基或芳基,或连接至相同或相邻的氮源子的两个R基团还可以彼此连接以形成杂环种类例如吡咯、咪唑、吡啶等。在正常生理pH下为阳离子性的本文中描述的单体残基或结构单元包括带阳离子电荷或可带阳离子电荷的种类,包括可去质子化的阳离子种类。

[0202] 在本文中描述的各种实施方案中,本文中描述的在生理pH下为阳离子性的或带正

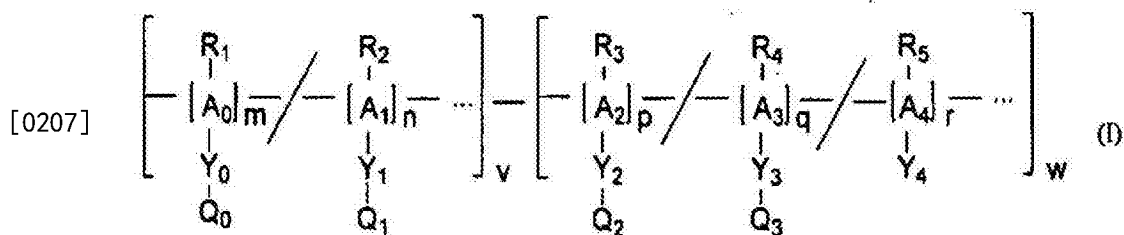
电荷的结构单元(包括,例如,某些亲水性结构单元)包含一个或多个氨基、烷基氨基、胍基、咪唑基、吡啶基等或其质子化、烷基化或其它带电荷的形式。在一些实施方案中,本文中使用的在正常生理pH下为阳离子性的结构单元包括但不限于例如甲基丙烯酸二烷基氨基烷基酯(例如,DMAEMA)的单体残基。在本文中描述的不同实施方案中,本文中描述的在生理pH下为阴离子或带负电荷的结构单元(包括,例如,某些亲水性结构单元)包含一个或多个酸基团或其共轭碱,包括但不限于例如,羧酸根、磺酰胺、硼酸根、膦酸根、磷酸根等。在一些实施方案中,本文中使用的在正常生理pH下为阴离子性的或带负电荷的结构单元包括但不限于例如丙烯酸、烷基丙烯酸(例如,甲基丙烯酸、乙基丙烯酸、丙基丙烯酸等)等的单体残基。在本文中描述的不同实施方案中,在正常生理pH下为中性的亲水性结构单元包含一个或多个亲水性基团,例如羟基、聚氧化烷基、聚乙二醇、聚丙二醇、硫醇等。在一些实施方案中,本文中许多变型、变化和置换使用的在生理pH下为中性的亲水性结构单元包括但不限于例如PEG化的丙烯酸、PEG化的甲基丙烯酸、羟基烷基丙烯酸、羟基烷基烷基丙烯酸(hydroxyalkylalkacrylic acid)(例如,HPMA)等的单体残基。在本文中描述的不同实施方案中,在生理pH下为两性离子性的亲水性结构单元包括在生理pH下为阴离子或带负电荷的基团和在生理pH下为阳离子或带电荷的基团。在一些实施方案中,本文中使用的在正常生理pH下为两性离子性的亲水性结构单元包括但不限于例如在生理pH下包含磷酸根和铵基的单体残基,例如US 7,300,990(以其公开内容通过引用合并入本文)中所示。

[0203] 在某些实施方案中,本文中提供的聚合物还包含含有可缀合的或可官能化的侧链(例如单体残基的侧基)的一个或多个结构单元。在一些情况下,可缀合的或可官能化的侧链是具有一个或多个反应性基团的基团,所述反应性基团可用于通过本领域内已知的化学法例如“click”化学法(例如“click”反应,参见Wu, P.; Fokin, V.V. *Catalytic Azide-Alkyne Cycloaddition: Reactivity and Applications*. *Aldrichim. Acta*, 2007, 40, 7-17)聚合后引入额外的功能性。在某些实施方案中,本文中提供的可缀合的或可官能化的侧链包含一个或多个任何适当的活化基团,例如但不限于N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯、HOBT(1-羟基苯并三唑)酯、对硝基苯酯、四氟苯酯、五氟苯酯、吡啶二硫基等。

[0204] 在一些实施方案中,在正常生理pH下为阴离子性的结构单元包括羧酸例如但不限于2-丙基丙烯酸的单体残基(即,来源于其的结构单元,2-丙基丙酸, $-\text{CH}_2\text{C}((\text{CH}_2)_2\text{CH}_3)(\text{COOH})-(\text{PAA})$),虽然可作为被保护的种类例如酯或作为游离酸存在于选择的聚合过程中的任何有机或无机酸也在本发明的考虑内。本文中描述的阴离子性单体残基或结构单元包括带电荷或可带电荷成阴离子的种类,包括可质子化的阴离子性种类。在某些情况下,阴离子性单体残基在中性pH7.0下可以是阴离子性的。

[0205] 单体例如马来酸酐,(Scott M. Henry, Mohamed E.H. El-Sayed, Christopher M. Pirie, Allan S. Hoffman, 和 Patrick S. Stayton "pH-Responsive poly(styrene-alt-maleic anhydride) Alkylamide Copolymers for Intracellular Drug Delivery" *Biomacromolecules* 7:2407-2414, 2006)也可用于将带负电荷的单元(例如,第三结构单元)引入第二嵌段。在此类实施方案中,带负电荷的结构单元是马来酸酐单体残基。

[0206] 本发明的一个实施方案是具有下列式I的聚合物:



[0208] 在一些实施方案中：

[0209] A_0 、 A_1 、 A_2 、 A_3 和 A_4 选自 $-C-$ 、 $-C-C-$ 、 $-C(O)(C)_aC(O)O-$ 、 $-O(C)_aC(O)-$ 和 $-O(C)_bO-$ ；其中，

[0210] a 是1-4；

[0211] b 是2-4；

[0212] Y_4 选自氢、(1C-10C)烷基、(3C-6C)环烷基、0-(1C-10C)烷基、 $-C(O)O(1C-10C)$ 烷基、 $C(O)NR_6(1C-10C)$ 、(4C-10C)杂芳基和(6C-10C)芳基，其中任意个可任选地被一个或多个氟基团取代；

[0213] Y_0 、 Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、(1C-10C)烷基-、 $-C(O)O(2C-10C)$ 烷基-、 $-OC(O)(1C-10C)$ 烷基-、 $-O(2C-10C)$ 烷基-和 $-S(2C-10C)$ 烷基-、 $-C(O)NR_6(2C-10C)$ 烷基-、(4C-10C)杂芳基-和(6C-10C)芳基-；

[0214] Y_3 选自共价键-、(1C-10C)烷基-、(4C-10C)杂芳基-和(6C-10C)芳基-，其中

[0215] 用适当数目的氢原子完成未完全被 R_1 - R_5 和 Y_0 - Y_4 取代 A_1 - A_4 四价碳原子；

[0216] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 和 R_6 独立地选自氢、 $-CN$ 、烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基，其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代；

[0217] Q_0 是选自下述的残基：在生理pH下为亲水性的并且在生理pH下至少部分带正电荷的残基(例如，氨基、烷基氨基、铵、烷基铵、胍、咪唑基、吡啶基等)、在生理pH下至少部分带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基(例如，羧基、磺酰胺、硼酸根、膦酸根、磷酸根等)、在生理pH下基本为中性(或不带电荷)的残基(例如，羟基、聚氧化烷基、聚乙二醇、聚丙二醇、硫醇等)、在生理pH下至少为部分两性离子性的残基(例如，在生理pH下包含磷酸根和铵基的单体残基)、可缀合的或可官能化的残基(例如，包含反应性基团的残基，例如叠氮化物、炔烃、琥珀酰亚胺酯、四氟苯酯、五氟苯酯、对硝基苯酯、吡啶基二硫化物等)或氢。

[0218] Q_1 是在生理pH下是亲水性的并且在生理pH下至少部分带正电荷的残基(例如，氨基、烷基氨基、铵、烷基铵、胍、咪唑基、吡啶基等)；在生理pH下至少部分带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基(例如，羧基、磺酰胺、硼酸根、膦酸根、磷酸根等)、在生理pH下基本为中性的残基(例如，羟基、聚环氧烷、聚乙二醇、聚丙二醇、硫醇等)或在生理pH下是至少为部分两性离子性(例如，在生理pH下包含磷酸根和铵基)的残基；

[0219] Q_2 是在生理pH下带正电荷的残基，包括但不限于氨基、烷基氨基、铵、烷基铵、胍、咪唑基和吡啶基；

[0220] Q_3 在生理pH下带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基，包括但不限于羧基、磺酰胺、硼酸根、膦酸根和磷酸根；

[0221] m 是0至小于1.0(例如，0至大约0.49)；

[0222] n 大于0至大约1.0(例如，大约0.51至大约1.0)；其中

[0223] $m+n=1$

[0224] p是大约0.1至大约0.9(例如,大约0.2至大约0.5);

[0225] q是大约0.1至大约0.9(例如,大约0.2至大约0.5);其中

[0226] r是0至大约0.8(例如,0至大约0.6);其中

[0227] $p+q+r=1$

[0228] v是大约1至大约25kDa;或大约5至大约25kDa;以及,

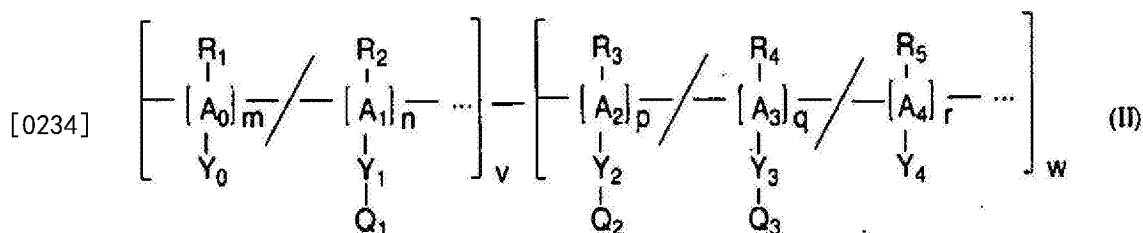
[0229] w是大约1至大约50kDa;或大约5至大约25kDa。

[0230] 在一些实施方案中,由p和q代表的单体残基的数目或比率在彼此的大约30%,彼此的大约20%,彼此的大约10%等内。在特定的实施方案中,p大体上与q相等。在某些实施方案中,至少部分带电荷通常包括痕量以上的带电荷种类,包括,例如至少20%的残基带电荷,至少30%的残基带电荷,至少40%的残基带电荷,至少50%的残基带电荷,至少60%的残基带电荷,至少70%的残基带电荷等。

[0231] 在某些实施方案中,m是0并且 Q_1 是在生理pH下为亲水性的并且基本上为中性(或不带电荷)的残基。在一些实施方案中,基本上不带电荷包括例如,低于5%带电荷,低于3%带电荷,低于1%带电荷等。在某些实施方案中,m是0并且 Q_1 是在生理pH下为亲水性的并且至少部分为阳离子性的残基。在某些实施方案中,m是0并且 Q_1 是在生理pH下为亲水性的并且至少部分为阴离子性的残基。在某些实施方案中,m大于0并且n大于0,并且 Q_0 或 Q_1 中的一个是在生理pH下为亲水性的并且至少部分为阳离子性的残基,而 Q_0 或 Q_1 中的另一个是在生理pH下为亲水性的并且基本上为中性的残基。在某些实施方案中,m大于0并且n大于0,并且 Q_0 或 Q_1 中的一个是在生理pH下为亲水性的并且至少部分为阴离子性的残基,而 Q_0 或 Q_1 中的另一个是在生理pH下为亲水性的并且基本上为中性的残基。在某些实施方案中,m大于0并且n大于0,并且 Q_1 是在生理pH下为亲水性的并且至少部分为阳离子性的残基,并且 Q_0 是可缀合的或可官能化的残基。在某些实施方案中,m大于0并且n大于0,并且 Q_1 是在生理pH下为亲水性的并且基本上为中性的残基, Q_0 是可缀合的或可官能化的残基。

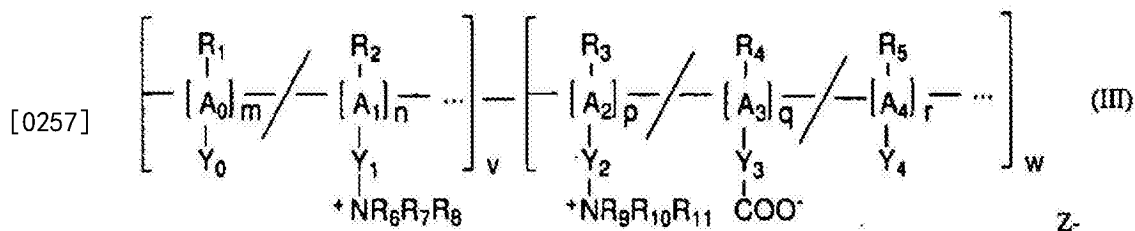
[0232] 在一些实施方案中,在生理pH下带正电荷或至少部分带正电荷的基团是 $-NR'R''$ 基团,其中 R' 和 R'' 独立地选自氢、烷基、环烷基或杂烷基,其可任选地被一个或多个卤素、氨基、羟基取代和/或包含一个或多个不饱和键。在一些实施方案中,将 R' 和 R'' 一起形成取代的或未取代的杂芳基或脂环杂环。在一些实施方案中,本文中描述为在生理pH下带正电荷或至少部分带正电荷的基团可包括但不限于例如氨基、烷基氨基、二烷基氨基、环氨基(例如,哌啶或N-烷基化哌啶)、脂环亚胺基(例如,二氢-吡啶基、2,3,4,5-四氢-吡啶基等)、杂芳基亚胺基(例如,吡啶基)等。在一些实施方案中,本文中描述为在生理pH下带负电荷或至少部分带负电荷但在更低pH下经历质子化的基团是例如但不限于例如,羧酸($COOH$)、磺酰胺、硼酸、磺酸、亚磺酸、硫酸、磷酸、次磷酸、亚磷酸、碳酸、其去质子化的共轭碱等。

[0233] 在某些实施方案中,本文中提供了式II的化合物:



[0235] 在一些实施方案中:

- [0236] A_0 、 A_1 、 A_2 、 A_3 和 A_4 选自 $-C-C-$ 、 $-C(O)(C)_aC(O)O-$ 、 $-O(C)_aC(O)-$ 和 $-O(C)_bO-$ ，其中：
- [0237] a 是1-4，
- [0238] b 是2-4，
- [0239] Y_0 和 Y_4 独立地选自氢、(1C-10C)烷基、(3C-6C)环烷基、0-(1C-10C)烷基、 $-C(O)O$ (1C-10C)烷基、 $C(O)NR_6$ (1C-10C)和芳基，其中任意个任选地被一个或多个氟基取代；
- [0240] Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、(1C-10C)烷基-、 $-C(O)O$ (2C-10C)烷基-、 $-OC(O)$ (1C-10C)烷基-、 $-O$ (2C-10C)烷基-和 $-S$ (2C-10C)烷基-、 $-C(O)NR_6$ (2C-10C)烷基-；
- [0241] Y_3 选自共价键、(1C-10C)烷基和(6C-10C)芳基；其中
- [0242] 用适当数目的氢原子完成未完全被 R_1 - R_5 和 Y_0 - Y_4 取代的 A_0 - A_4 四价碳原子；
- [0243] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 和 R_6 独立地选自氢、-CN、烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基，其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代；
- [0244] Q_1 和 Q_2 是在生理pH下带正电荷的残基，包括但不限于氨基、烷基氨基、铵、烷基铵、胍、咪唑基和吡啶基
- [0245] Q_3 是在生理pH下带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基，包括但不限于羧基、磺酰胺、硼酸根、膦酸根和磷酸根；
- [0246] m 是0至大约0.49；
- [0247] n 是大约0.51至大约1.0；其中
- [0248] $m+n=1$
- [0249] p 是大约0.2至大约0.5；
- [0250] q 是大约0.2至大约0.5；其中：
- [0251] p 大体上与 q 相等；
- [0252] r 是0至大约0.6；其中
- [0253] $p+q+r=1$
- [0254] v 是大约1至大约25kDa，或大约5至大约25kDa；以及，
- [0255] w 是大约1至大约50kDa，或大约5至大约50kDa。
- [0256] 在某些实施方案中，所述嵌段共聚物是二嵌段共聚物，其具有式III的化学式(在正常生理或大约中性pH下)：



- [0258] 在某些实施方案中，如所指示取代的 A_0 、 A_1 、 A_2 、 A_3 和 A_4 包括式III的聚合物的结构单元(在本文中可与“单体单元”和“单体残基”互换使用)。在一些特定的实施方案中，构成式III的A基团的单体单元在适当的条件下是聚合上相容的。在某些情况下，乙烯型主链或结构单元 $-(C-C)-$ 聚合物(其中各C被H和/或任何其他适当的基团进行二取代)使用含有碳-碳双键($>C=C<$)的单体进行聚合。在某些实施方案中，各A基团(例如， A_0 、 A_1 、 A_2 、 A_3 和 A_4 中的每一个)可以是(即，独立地选自) $-C-C-$ (即，乙烯型单体单元或聚合物主链)、 $-C(O)(C)_aC(O)O-$ (即，聚酐单体单元或聚合物主链)、 $-O(C)_aC(O)-$ (即，聚酯单体单元或聚合物主链)、-

O(C)_bO-(即,聚亚烷基二醇单体单元或聚合物主链)等(其中各C被H和/或任何其他适当的基团例如本文中描述的基团(包括上述R₁₂和/或R₁₃)二取代)。在一些特定的实施方案中,术语“a”是从1至4的整数,并且“b”是从2至4的整数。在某些情况下,连接至式III主链的各“Y”和“R”基团(即,Y₀、Y₁、Y₂、Y₃、Y₄、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅的任意个)连接至该特定单体单元的任何“C”(包括任何(C)_a或(C)_b)上。在特定的实施方案中,特定单体单元的Y和R连接至同一“C”上。在某些特定的实施方案中,特定单体单元的Y和R都连接至同一“C”上,并且该“C”针对于该单体单元的羰基而言为α碳位(如果存在的话)。

[0259] 在特定的实施方案中,R₁-R₁₁独立地选自氢、烷基(例如,1C-5C烷基)、环烷基(例如,3C-6C环烷基)或苯基,其中R₁-R₁₁的任意个任选地被一个或多氟、环烷基或苯基(其可被一个或多个烷基进一步取代)取代。

[0260] 在某些特定的实施方案中,Y₀和Y₄独立地选自氢、烷基(例如,1C-10C烷基)、环烷基(例如,3C-6C环烷基)、O-烷基(例如,O-(2C-10C)烷基、-C(O)O-烷基(例如-C(O)O-(2C-10C)烷基)或苯基,其中任意个任选地被一个或多个氟取代。

[0261] 在一些实施方案中,Y₁和Y₂独立地选自共价键、烷基(目前优选是(1C-10C)烷基)、-C(O)O-烷基(目前优选是-C(O)O-(2C-10C)烷基)、-OC(O)烷基(目前优选是-OC(O)-(2C-10C)烷基)、O-烷基(目前优选是-O(2C-10C)烷基)和-S-烷基(目前优选是-S-(2C-10C)烷基)。在某些实施方案中,Y₃选自共价键、烷基(目前优选是(1C-5C)烷基)和苯基。

[0262] 在一些实施方案中,Z-存在或不存在。在某些实施方案中,其中R₁和/或R₄是氢,Z-是OH-。在某些实施方案中,Z是任何抗衡离子(例如,一种或多种抗衡离子),优选是生物相容性的抗衡离子,例如但不限于例如氯化物、无机或有机磷酸根、硫酸根、磺酸根、乙酸根、丙酸根、丁酸根、戊酸根、己酸根、辛酸根、癸酸根、月桂酸根、肉豆蔻酸根、软脂酸根、硬脂酸根、棕榈油酸根、油酸根、亚油酸根、廿酸根(arachidate)、顺9-二十碳烯酸根(gadoleate)、vaccinate、乳酸根、羟乙酸根、水杨酸根、脱氨基苯基丙氨酸(desamionphenylalanine),脱氨基丝氨酸(desaminoserine)、脱氨基苏氨酸(desaminothreonine)、ε-羟基己酸根、3-羟基丁酸根、4-羟基丁酸根或3-羟基戊酸根。在一些实施方案中,当各Y、R和任选的氟共价连接至选定主链的碳时,用适当数目的氢原子完成未完全取代的任何碳。数字m、n、p、q和r代表了各结构单元在其嵌段中的摩尔分数,v和w提供了各嵌段的分子量。

[0263] 在某些实施方案中,

[0264] A₀、A₁、A₂、A₃和A₄选自-C-、-C-C-、-C(O)(CR₁₂R₁₃)_aC(O)O-、-O(CR₁₂R₁₃)_aC(O)-和O(CR₁₂R₁₃)_bO;其中,

[0265] a是1-4;

[0266] b是2-4;

[0267] R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₀、R₁₁、R₁₂和R₁₃独立地选自氢、(1C-5C)烷基、(3C-6C)环烷基、(5C-10C)芳基、(4C-10C)杂芳基,其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代;

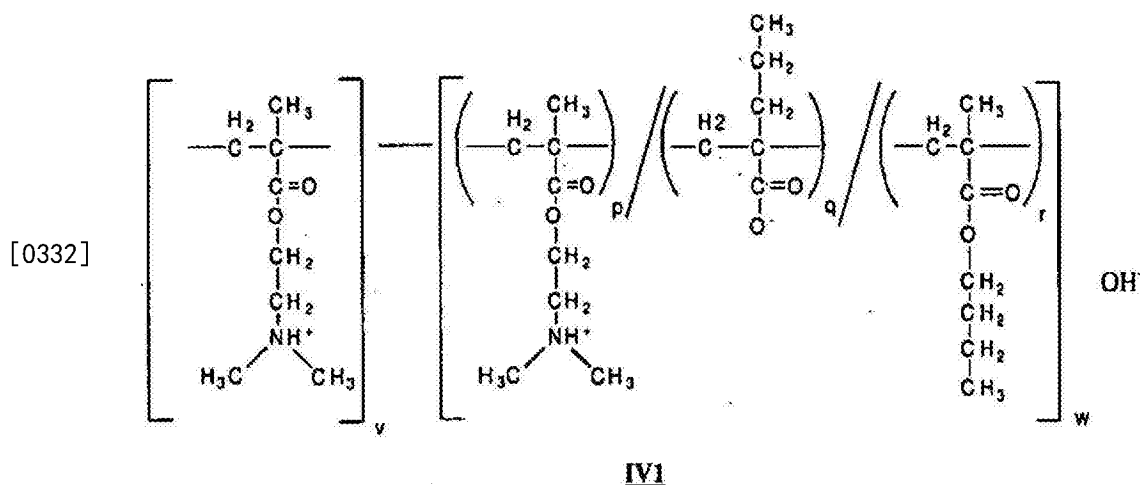
[0268] Y₀和Y₄独立地选自氢、(1C-10C)烷基、(3C-6C)环烷基、O-(1C-10C)烷基、-C(O)O(1C-10C)烷基和苯基,其任何一个任选地可用一个或多个氟基取代;

[0269] Y₁和Y₂独立地选自共价键、(1C-10C)烷基-、-C(O)O(2C-10C)烷基-、-OC(O)(1C-10C)烷基-、-O(2C-10C)烷基-和-S(2C-10C)烷基-;

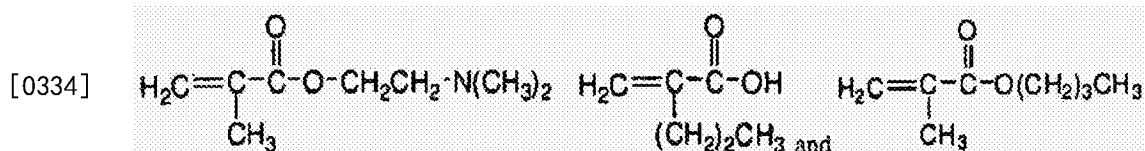
[0270] Y₃选自共价键、(1C-5C)烷基和苯基;其中

- [0271] 用适当数目的氢原子完成未完全被 R_1-R_5 和 Y_0-Y_4 取代的 A_0-A_4 四价碳原子；
- [0272] Z 是一种或多种生理上可接受的抗衡离子，
- [0273] m 是0至大约0.49；
- [0274] n 是大约0.51至大约1.0；其中
- [0275] $m+n=1$
- [0276] p 是大约0.2至大约0.5；
- [0277] q 是大约0.2至大约0.5；其中：
- [0278] p 大体上与 q 相同；
- [0279] r 是0至大约0.6；其中
- [0280] $p+q+r=1$
- [0281] v 是大约1至大约25kDa，或大约5至大约25kDa；以及，
- [0282] w 是大约1至大约50kDa，或大约5至大约50kDa。
- [0283] 在一个特定的实施方案中，
- [0284] A_0, A_1, A_2, A_3 和 A_4 独立地选自 $-C-C-$ 、 $-C(O)(C)_aC(O)O-$ 、 $-O(C)_aC(O)-$ 和 $O(C)_bO$ ；其中，
- [0285] a 是1-4；
- [0286] b 是2-4；
- [0287] $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}$ 和 R_{11} 独立地选自氢、(1C-5C)烷基、(3C-6C)环烷基和苯基，其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代；
- [0288] Y_0 和 Y_4 独立地选自氢、(1C-10C)烷基、(3C-6C)环烷基、 $O-(1C-10C)$ 烷基、 $-C(O)O$ (1C-10C)烷基和苯基，其中任意个任选地被一个或多个氟基取代；
- [0289] Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、(1C-10C)烷基-、 $-C(O)O(2C-10C)$ 烷基-、 $-OC(O)(1C-10C)$ 烷基-、 $-O(2C-10C)$ 烷基-和 $-S(2C-10C)$ 烷基-；
- [0290] Y_3 选自共价键、(1C-5C)烷基和苯基；其中
- [0291] 用适当数目的氢原子完成未完全被 R_1-R_5 和 Y_0-Y_4 取代的 A_0-A_4 四价碳原子；
- [0292] Z 是生理上可接受的抗衡离子，
- [0293] m 是0至大约0.49；
- [0294] n 是大约0.51至大约1.0；其中
- [0295] $m+n=1$
- [0296] p 是大约0.2至大约0.5；
- [0297] q 是大约0.2至大约0.5；其中：
- [0298] p 大体上与 q 相同；
- [0299] r 是0至大约0.6；其中
- [0300] $p+q+r=1$
- [0301] v 是大约1至大约25kDa；以及，
- [0302] w 是大约5至大约50kDa。
- [0303] 在一些实施方案中，
- [0304] A_1 是 $-C-C-$ ，
- [0305] Y_1 是 $-C(O)OCH_2CH_2-$ ；
- [0306] R_6 是氢；

- [0307] R_7 和 R_8 各自是 $-\text{CH}_3$;以及,
- [0308] R_2 是 $-\text{CH}_3$ 。
- [0309] 在一些实施方案中,
- [0310] A_2 是 $-\text{C}-\text{C}-$;
- [0311] Y_2 是 $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2-$;
- [0312] R_9 是氢;
- [0313] R_{10} 和 R_{11} 各自是 $-\text{CH}_3$;以及,
- [0314] R_3 是 $-\text{CH}_3$ 。
- [0315] 在一些实施方案中,
- [0316] A_3 是 $-\text{C}-\text{C}-$;
- [0317] R_4 是 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$;
- [0318] Y_3 是共价键;
- [0319] 以及 Z^- 是生理上可接受的阴离子。
- [0320] 在一些实施方案中,
- [0321] A_4 是 $-\text{C}-\text{C}-$;
- [0322] R_5 选自氢和 $-\text{CH}_3$;以及,
- [0323] Y_4 是 $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ 。
- [0324] 在一些实施方案中,
- [0325] A_0 是 $\text{C}-\text{C}-$,
- [0326] R_1 选自氢和(1C-3C)烷基;以及,
- [0327] Y_0 选自 $-\text{C}(\text{O})\text{O}(1\text{C}-3\text{C})$ 烷基。
- [0328] 在一些实施方案中, m 是0。
- [0329] 在一些实施方案中, r 是0。
- [0330] 在一些实施方案中, m 和 r 都是0。
- [0331] 在一些实施方案中提供了示例性的但非限定性的本发明的聚合物:

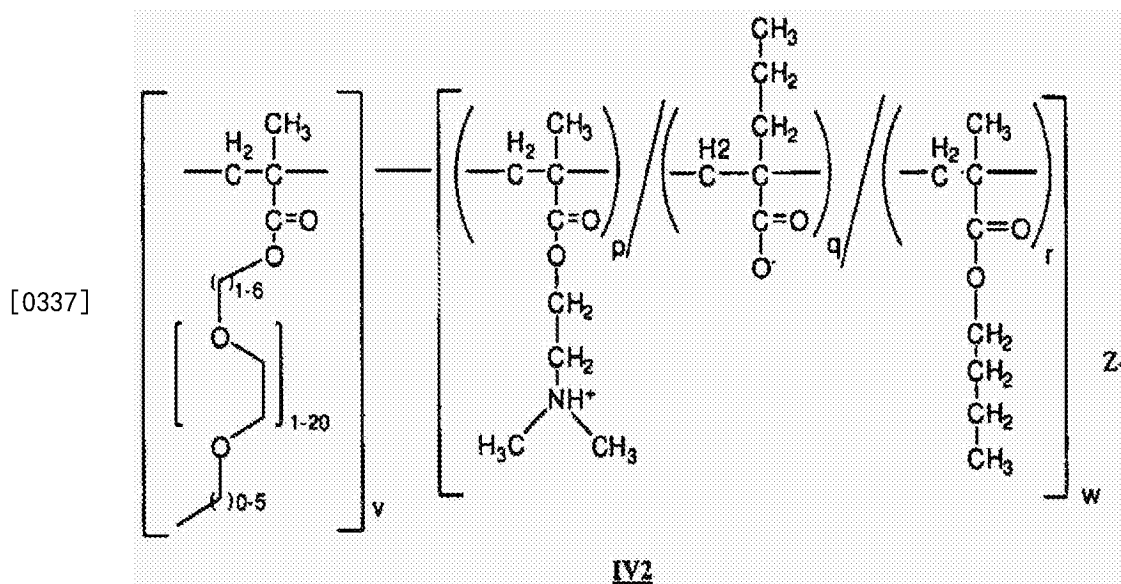


- [0333] 在某些情况下,化合物1的结构单元如左边的方括号和右边圆括号中显示的,并且它们衍生自以下单体:



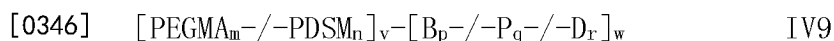
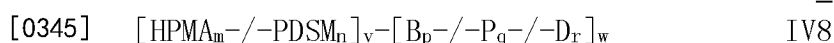
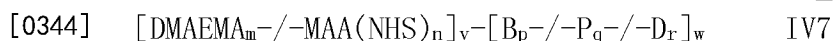
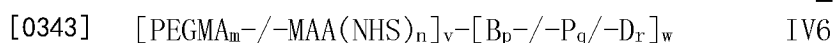
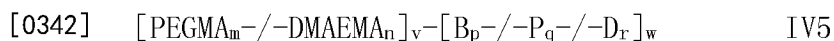
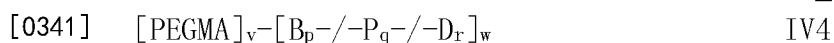
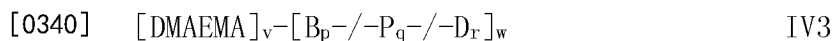
[0335] 字母p、q和r代表其嵌段内的各结构单元的摩尔分数。字母v和w代表二嵌段共聚物中各嵌段的分子量(数均分子量)。

[0336] 在一些实施方案中,本文中提供的一种化合物是具有下列结构的化合物:



[0338] 如上所述,字母p、q和r代表其嵌段内的各结构单元的摩尔分数。字母v和w代表二嵌段共聚物中各嵌段的分子量(数均分子量)。

[0339] 在一些实施方案中,本文中提供了下列聚合物:



[0347] 在一些实施方案中,B是甲基丙烯酸丁酯残基;P是丙基丙烯酸残基;D和DMAEMA是甲基丙烯酸二甲氨基乙酯残基;PEGMA是甲基丙烯酸聚乙二醇酯(polyethyleneglycol methacrylate)残基(例如,具有1-20个环氧乙烷单元,例如化合物IV-2中举例说明的,或4-5个环氧乙烷单元或7-8个环氧乙烷单元);MAA(NHS)是甲基丙烯酸-N-羟基琥珀酰亚胺(methylacrylic acid-N-hydroxy succinimide)残基;HPMA是N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺残基;以及PDSM是吡啶二硫基甲基丙烯酸酯(pyridyl disulfide methacrylate)残基。在某些实施方案中,术语m、n、p、q、r、w和v是如本文中所描述的。在一些特定的实施方案中,w是v的大约0.1倍至大约5倍,或是v的大约1倍至大约5倍。

[0348] 聚合物IV1-IV9是本文中提供的包含组成聚合物第一嵌段的许多种结构单元的聚合物实例。此外,本文中特别地提供了各附图和表中所示的聚合物以及结构相关聚合物

(例如MW和/或单体残基比率有变化)。在一些实施方案中,改变或化学处理第一嵌段的结构单元以产生这样的聚合物,其中第一嵌段是或包含为中性(例如,PEGMA)、阳离子性(例如,DMAEMA)、阴离子性(例如,PEGMA-NHS,其中NHS被水解成酸或丙烯酸)、两性(例如,DMAEMA-NHS,其中NHS被水解成酸)或两性离子(例如,聚[2-甲基丙烯酰氧-2'三甲基铵乙基磷酸])的结构单元。在一些实施方案中,聚合物在第一嵌段例如[PEGMA-PDSM]-[B-P-D]中包含吡啶基二硫化物功能性,其可以与和任选地与硫代siRNA反应以形成聚合物-siRNA缀合物。

[0349] 在一些实施方案中,本发明的聚合物是“二嵌段共聚物”。术语“共聚物”表示聚合物是两个或更多个不同单体的聚合的结果。在一些情况下,“嵌段”共聚物是指其中将结构单元的不同亚组合(sub-combination)连接在一起的结构。在某些情况下,“嵌段”是指具有特定特征的聚合物的区段或部分(例如,梯度共聚物的亲水性区段或疏水性区段)。在一些情况下,二嵌段共聚物只包括两个嵌段,这样的聚合物的示意性概括可看似: $[A_a B_b C_c \cdots]_m - [X_x Y_y Z_z \cdots]_n$,其中各字母代表结构单元,结构单元的各下标代表该单元在该特定嵌段中的摩尔分数,3个点表示各嵌段中可能存在更多(但当然也可能存在更少)的结构单元,m和n表示二嵌段共聚物中各嵌段的分子量。如由示意图所表明的,对于各嵌段单独地控制各结构单元的数目和性质。应理解示意图无意表示并且不应当解释为暗示每一个嵌段中结构单元的数目或结构单元的不同类型的数目之间的任何关系。示意图也无意描述结构单元在特定嵌段内的任何特定排列。即,除非另外明确地指出,否则在各嵌段中,可以以完全随机、交替随机(alternating random)、规整交替(regular alternating)、规整嵌段(regular block)或随机嵌段的构型排列结构单元。完全随机构型可以例如是x-x-y-z-x-y-y-z-y-z-z-z $\cdots$ 或y-z-x-y-z-y-z-x-x $\cdots$ 。交替随机构型可以是x-y-x-z-y-x-y-z-y-x-z $\cdots$,以及规整交替构型可以是x-y-z-x-y-z-x-y-z $\cdots$ 。规整嵌段构型具有下列一般构型: $\cdots x-x-x-y-y-y-z-z-z-x-x-x\cdots$,而随机嵌段构型具有一般构型: $\cdots x-x-x-z-z-x-x-y-y-y-y-z-z-z-x-x-z-z-z\cdots$ 。上述一般性实例中没有一个是单个结构单元或嵌段的特定排列或嵌段中结构单元的数目或嵌段的数目意味着或应当被解释为以任何方式影响或限制本发明的二嵌段共聚物的实际结构。

[0350] 还应理解,包括结构单元的圆括号不表示并且不应被解释为表示结构单元本身形成嵌段。即方括号内的结构单元可以以任何方式与嵌段内的其他结构单元组合,即完全随机、交替随机、规整交替的、规整嵌段或随机嵌段构型。因此在二嵌段共聚物1中,p、q和r代表嵌段中该结构单元的摩尔分数,其无意并且也不得解释为表示或暗示括号内的结构单元在嵌段内包含嵌段。

[0351] 因此,当在本文中提及电荷中性的结构单元可在本发明二嵌段共聚物的第一嵌段的第一结构单元之间“随机散布”时,其是指第一嵌段可具有在属类上与上文针对完全随机构型所描述的结构类似的结构。

[0352] 在一些实施方案中,本文中描述的任何嵌段共聚物在大约中性pH下的水溶液或介质中的溶解度为1mg/mL以上,5mg/mL以上,10mg/mL以上,25mg/mL以上,50mg/mL以上,100mg/mL以上和500mg/mL以上。在一些实施方案中,特别是对于具有亲水性(例如,阳离子性亲水性)第一嵌段的二嵌段聚合物,存在于疏水嵌段中的3个种类(阴离子性的、阳离子性的和疏水性的)以随机共聚物嵌段的形式存在,或以散布的顺序存在而使嵌段在其整个长度上是大致净中性电荷的。在一些情况下,该定位提供了增加的嵌段共聚物的溶解度。

[0353] 在某些实施方案中,本文中提供了表1中所示的二嵌段共聚物;在某些情况下,此类共聚物用作多核苷酸复合剂(complexing agent)和载体。应理解,可将表1和本文中其它部分描述的二嵌段共聚物的特征转移至本文中的其他二嵌段共聚物,从而基于本文中的公开内容,本领域技术人员将能够制备此类共聚物,其因而将在本发明的范围内。

[0354] 示例性二嵌段共聚物的第一嵌段由甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯(DMAEMA)的单体残基组成,所述甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯在生理pH下高效地结合至核酸并且使核酸缩合。本文中描述的示例性聚合物的第二嵌段包含DMAEMA的单体残基(作为阳离子性结构单元);丙基丙烯酸(PAA)的单体残基(作为阴离子性结构单元的),其由于有疏水性的丙基取代基,因此也作为疏水性增强部分的贡献者;和甲基丙烯酸丁酯(butyl methylacrylate)(BMA)的单体残基(作为分开的结构单元),其构成或包含疏水性增强部分。在某些情况下,第二嵌段使得结合的核酸能够通过pH诱导的构象变化(所述构象变化在一些情况下导致膜失去稳定)逃离内体。在一些情况下,在生理条件下,第二或疏水核心嵌段以相似的量具有带正电荷(例如,质子化的DMAEMA)残基和负电荷(例如,去质子化的PAA)的残基,从而通过离子对的形成导致核心的大致电荷中性和电荷稳定化。在某些情况下,在本文中描述的聚合物-核酸组合物被摄入细胞的内体区室后,内体环境的更低的pH使第三结构单元(例如,PAA羧酸根)的阴离子性残基质子化,从而具有膜破裂性。在一些情况下,一些或所有阴离子性残基的质子化或中和导致PAA酸性残基的电中和以及在某些情况下导致聚合物的构象变化成为疏水性的膜去稳定化形式。

[0355] 表1. 聚(DMAEMA)macroCTA、所得的二嵌段共聚物的分子量、多分散性和单体组成以及它们相应的命名。

[0356]

聚合物	Mn ^a 第一嵌段 (g/mol)	Mn ^a 第二嵌段 (g/mol)	PDI ^a	第二嵌段的 理论 %BMA	第二嵌段的 理论 %PAA	第二嵌段的 理论 % DMAEMA	第二嵌段的 实验 %BMA ^b	第二嵌段的 实验 %PAA ^b	第二嵌段的 实验 %DMAEMA ^b
mCTA	9 100	-	1.16	-	-	-	-	-	-
P1	9 100	6 900	1.58	0	50	50	-	47	53
P2	9 100	8 900	1.56	5	47.5	47.5	1	48	51
P3	9 100	8 300	1.54	10	45	45	12	40	48
P4	9 100	9 300	1.46	15	42.5	42.5	19	44	37
P5	9 100	10 100	1.51	20	40	40	24	40	36
P6	9 100	10 000	1.48	30	35	35	27	37	36
P7	9 100	11 300	1.45	40	30	30	48	29	23

[0357] ^a如通过串联至Viscotek GPCmax VE2001和折射计(refractometer)VE3580(Viscotek,Houston,TX)的SEC Tosoh TSK-GEL R-3000和R-4000 柱(Tosoh Bioscience,Mongomeryville,PA)测定的。含有0.1wt%LiBr的HPLC级DMF用作流动相。使用一系列聚(甲基丙烯酸甲酯)标准测定合成的共聚物的分子量。

[0358] ^b如通过¹H NMR光谱法(3wt%于CDCl₃中;Bruker DRX 499)测定的。

[0359] 以任何适当的方式制备本文中使用的聚(DMAEMA)和其他聚合物实体(例如,BMA、DMAEMA和PAA的共取物或共聚物嵌段)。在一种情况下,通过在RAFT CTA、ECT和自由基引发剂存在的情况下聚合DMAEMA来制备聚(DMAEMA)。在一些情况下,将嵌段聚(DMAEMA)(9,

100g/mol, DP58)用于制备一系列二嵌段共聚物,其中增加BMA的含量并且保持等摩尔量的DMAEMA和PAA。所得聚合物的特征示于表1中。对于所有7种二嵌段(假定聚合物的总分子量为大约20,000g/mol)观察到相似的嵌段大小。在某些实施方案中,选择更低的分子量。在一些情况下,更低分子量的聚合物可使得聚合物毒性降至最低并且使得能够肾清除聚合物以确保能够转换成体内检测。表1中还显示了理论和实验推断的第二嵌段的单体组成。所列的各聚合物是一类相关聚合物的实例。例如,P7类的聚合物具有几种形式,其中一种在表1中进行了表征。虽然所有聚合物相对接近理论组成,但在所有情况下均观察到一定的偏差,所述偏差可能是由于单体反应性比率(reactivity ratio)的差异造成的。

[0360] 可选择地,反转二嵌段聚合物上嵌段的方向,以使聚合物的 ω 末端是亲水性嵌段。在不同实施方案中,这可用任何适当的方式,包括许多合成方法来实现。例如,本发明的嵌段共聚物的合成始于PAA/BMA/DMAEMA疏水性嵌段的制备,然后在第二合成步骤中通过将所得的PAA/BMA/DMAEMA macroCTA经历第二RAFT聚合步骤来加入亲水性带电荷的嵌段。一些变通方法包括还原PAA/BMA/DMAEMA macroCTA以形成巯基末端,然后将预先形成的亲水性带电荷的聚合物共价连接至形成的巯基。该合成方法提供了在聚合链的亲水性末端的 ω -末端上引入反应性基团的方法,从而提供了化学缀合至聚合物的可选择的方法。

[0361] 二嵌段共聚物P7,本发明的聚合物的一个实例,由两个嵌段组成,一个是聚(DMAEMA),其在生理pH下是亲水性的并且带电荷,另一个嵌段是单体单元:疏水性(BMA)和离子化的/疏水性的或可离子化的/疏水性单元(PAA,DMAEMA)的随机共聚物。

[0362] 定义和实施方案

[0363] 应理解,关于本申请,除非另外明确地指出,否则单数的使用包括复数并且反之亦然。即,“a”和“the”是指一个或多个所述单词修饰的名词。例如,“所述聚合物”或“一种核苷酸”可以指一个/种聚合物或核苷酸或指多个/种聚合物或核苷酸。出于同样的原因,除非明确地指出或根据上下文很显然地看出其含义确非如此,否则“聚合物”和“核苷酸”可指一个/种聚合物或一个/种核苷酸并且也可指多个/种聚合物或核苷酸。

[0364] 如本文中所使用的,近似的单词例如但不限于“大约”、“大体上”、“基本上”和“大致”是指所修饰的限制成分不必正好是写出的形式,而是其可在一定程度上与该书面描述不同。描述可变化的程度将取决于本领域技术人员可接受并且仍然认为该要素具有该要素或限定的特征和能力的变化有多大。通常,但是视之前的论述而定,由近似的词语修饰的本文中的许多数值可与所述数值相异至少 $\pm 15\%$ 、大约 $\pm 15\%$ 、大约 $\pm 10\%$ 、大约 $\pm 5\%$ 、大约 $\pm 3\%$ 、大约 $\pm 2\%$ 或大约 $\pm 1\%$ 。作为本发明的一个特定的非限定性实例,本发明的二嵌段共聚物的第二嵌段(其在正常生理pH下包含阳离子和阴离子种类)描述为是“总电荷基本上是中性的”和基本上是疏水性的。然而,在实验上,极难获得真正的中性,而是阳离子性种类或阴离子性种类可在一定程度上占优势,如表1中举例说明的。然而,本领域技术人员可接受具有稍微过量的一种或另一种带电荷种类的第二嵌段仍然为“基本上中性的”。

[0365] 如本文中所使用的,“聚合物”是指由一个或多个更小的称为“单体”的分子组成的分子。单体可与其本身反应,从而产生均聚物,或其可与一个或多个其他单体反应,从而产生共聚物。可将成组的单体反应以形成“预聚物(prepolymer)”,然后它们组合在一起形成聚合物。单体包括聚合物的‘结构单元’。

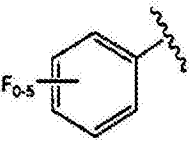
[0366] “电荷中性”或“不带电荷”的结构单元是指其中在生理pH下没有原子具有完全正

电荷或负电荷的结构单元,即偶极分子仍然被认为是“电荷中性的”或“不带电荷的”。电荷中性结构单元的一个非限定性实例可以是从甲基丙烯酸丁酯 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ 单体衍生的结构单元。

[0367] 如本文中所使用的,“烷基”是指完全饱和(无双键或三键)的直链或支链烃(只有碳和氢)基。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基和己基。如本文中所使用的,“烷基”包括“亚烷基”,其是指具有2个而非1个开放化合价(以与其他基团结合)的直链或支链完全饱和的烃基。亚烷基的实例包括但不限于亚甲基 $-\text{CH}_2-$ 、亚乙基 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、亚丙基 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、亚正丁基 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、亚仲丁基 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 等。本发明的烷基可任选地用一个或多个氟基取代。

[0368] 如本文中所使用的,“mC至nC”(其中m和n是整数)表示指定基团中可能的碳原子的数目。即,基团可包含“m”至“n”个(包括上下限)碳原子。本发明的烷基可包含1至10个碳原子,即,m是1以及n是10。当然,特定的烷基可能更受限。例如但不限于此,本发明的烷基可由3至8个碳原子组成,在该情况下其可表示为(3C-8C)烷基。这些数字被包括在内,并且包括具有指定碳原子数目的所有直链或支链结构。例如但不限于此,“C₁至C₄烷基”基团是指具有1至4个碳原子的所有烷基基团,即 CH_3- 、 CH_3CH_2- 、 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2-$ 和 $(\text{CH}_3)_3\text{CH}-$ 。

[0369] 如本文中所使用的,环烷基是指其中烷基链的末端碳原子彼此共价连接的烷基。数字“m”和“n”是指所形成的环中的碳原子数目。因此例如,(3C-8C)环烷基是指3、4、5、6、7或8元环,即环丙烷、环丁烷、环戊烷、环己烷、环庚烷和环辛烷。本发明的环烷基可任选地用一个或多个氟基和/或一个或多个烷基取代。

[0370] 如本文中所使用的,“苯基”仅指  基,如所显示的,其可任选地用一个

或多个氟基取代。

[0371] 如本文中所使用的,“疏水性增强部分”在本文中可与“疏水性种类”互换使用,并且是指共价连接至二嵌段共聚物的结构单元的取代基,此类结构单元具有所述疏水性增强部分的后将导致二嵌段共聚物比在不加入该部分的情况下更具膜破裂性或以其它方式更能使膜去稳定。此类部分的实例包括但不限于烷基、环烷基和苯基,其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代。在一些实施方案中,疏水性增强部分具有大约1或更高的 π 值。化合物的 π 值是其相对亲水-亲脂性值的量度(参见,例如,Cates, L A, "Calculation of Drug Solubilities by Pharmacy Students" Am J Pharm Educ 45:11-13(1981))。本文中描述的疏水性单体残基或结构单元包括一个或多个疏水性种类。此外,亲水性单体残基包括一个或多个亲水性种类。

[0372] 关于上文显示的本发明的非限定性示例性聚合物IV1,这样的聚合物可表征为“乙烯型的(ethylenic)”,因为结构单元是从乙烯 $-\text{C}=\text{C}-$ (每一个单体的官能团)的反应衍生的。上述实例的特定的乙烯型单体可进一步描述为是“丙烯酸的”,因为它们都是丙烯酸 $\text{CH}_2=\text{CHC}(\text{O})\text{OH}$ 的衍生物,上述第一单体是甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯,第二单体是2-丙基丙烯酸以及第三单体是甲基丙烯酸丁酯。

[0373] 如本文中所使用的,“正常生理pH”是指哺乳动物身体主要流体例如血液、血清、正

常细胞的细胞溶胶等的pH。此外,如本文中所使用的,可与“大致生理pH”或“大致中性的pH”互换使用的“正常生理pH”,通常是指大致中性的pH(即,大约pH7),包括例如,为大约7.2至大约7.4的pH。在特定的情况下,“正常生理pH”是指水性介质例如血液、血清等中大致中性的pH。

[0374] 如本文中所使用的, RNA是指包含A、C、G或U核苷酸的多核苷酸, DNA是指包含dA、dC、dG和dT的多核苷酸, 其中“d”表示糖是脱氧核糖。

[0375] 如本文中所使用的, “天然DNA类似物”或“天然RNA类似物”是其中用一个或多个天然核苷酸取代特定DNA或RNA的天然核苷酸但仍然展示原始DNA或RNA的功能性的多核苷酸。这包括在非天然环境中天然发生的核苷酸, 例如, 核糖核苷酸替代DNA分子中的脱氧核糖核苷酸, 或脱氧核糖核苷酸替代RNA分子中的核糖核苷酸。

[0376] 如本文中所使用的, “合成DNA类似物”或“合成RNA类似物”是指由一个或多个经修饰的核苷酸组成的多核苷酸。“经修饰的核苷酸”是指包含化学改变(chemically altered)的碱基、糖和/或磷酸二酯键的非天然发生的核苷酸。化学改变可包括天然核苷酸的单个原子的添加、缺失或置换或者该核苷酸的整个官能团的添加、缺失或置换。为了本发明的目的, 经修饰的核苷酸确实可包含与天然核苷酸相似度极低(如果真有的话)、但仍然能够被整合入上述一般性结构的多核苷酸内的分子。合成DNA或RNA类似物通常得到保持的一个性质是该分子通常带负电荷(如同所有天然多核苷酸), 从而其可与本发明的二嵌段共聚物复合。

[0377] 不受权利要求中未明确引用的理论束缚, 膜去稳定化聚合物可直接或间接地引发细胞膜结构(例如, 内体膜)的变化(例如, 通透性变化), 从而允许试剂(例如, 多核苷酸)与聚合物缔合地或独立于聚合物地穿过这样的膜结构—例如进入细胞或离开细胞小泡(例如, 内体)。膜去稳定化聚合物可以是(但不必是)膜破裂性聚合物。膜破裂性聚合物可直接或间接地引起细胞小泡的裂解或细胞膜的破裂(例如, 如对于大部分细胞膜群体观察到的)。

[0378] 通常, 聚合物的膜去稳定化或膜破裂性性质可通过不同方法来估量。在一个非限定性方法中, 细胞膜结构的变化可通过在测定中估量来观察, 所述测定测量(直接或间接)试剂(例如, 多核苷酸)从细胞膜(例如, 内体膜)的释放—例如, 通过测定此类试剂或此类试剂的活性在对于该膜而言属外部的环境中的存在或不存在来测量。另一个非限定性方法包括测量红细胞裂解(溶血作用)—例如, 作为用于目的细胞膜的替代测定。此类测定可在单个pH值下或在一系列pH值下进行。

[0379] 优选地本文中提供的二嵌段共聚物是生物相容性的。如本文中所使用的, “生物相容性”是指聚合物的性质, 其特征在于其或其体内降解产物对活组织是无害的或是至少最低限度和/或可修复的损害; 和/或不会或至少最低限度地和可控地在活组织中引起免疫反应。关于盐, 在本说明书中优选地阳离子性和阴离子性种类都是生物相容性的。如本文中所使用的, “生理上可接受的”可与生物相容性互换。

[0380] 在某些方面, 本文中描述的组合物和/或试剂用作体内治疗剂。“体内”是指意欲将它们给需要此类治疗的受试者施用。“受试者”是指可能受益于使用本发明复合物的治疗的任何活的实体。如本文中所使用的, “受试者”和“患者”可互换使用。受试者或患者特别地是指哺乳动物例如但不限于猫、狗、马、牛、绵羊、兔子等, 优选在本发明中是人类。

[0381] 如本文中所使用的, “治疗剂”是指本文中的复合物, 当其以治疗有效量给患病受

试者施用时对受试者的健康和状况具有治疗性有益效果。对受试者的健康和状况的治疗性有益效果包括但不限于(1)治愈疾病,(2)减缓疾病的进展,(3)使疾病消退,或(4)减轻疾病的一个或多个症状。如本文中所使用的,治疗剂还包括本文中的任何复合物当其给已知患有疾病(在本文中特别是遗传病)或怀疑对所述疾病特别易感的患者施用,对患者的健康和状况具有预防性的有益效果。对患者的健康和状况的预防性有益效果包括但不限于(1)首先预防或延迟疾病的发作,(2)当已通过治疗有效量的复合物实现疾病的消退水平时,将疾病维持在该水平,或(3)在使用治疗有效量的复合物的疗程结束后预防或延迟疾病的复发。在一些情况下,治疗剂是治疗上有效的多核苷酸(例如, RNAi 多核苷酸)、治疗上有效的肽、治疗上有效的多肽或一些其他治疗上有效的生物分子。在特定的实施方案中, RNAi 多核苷酸是可通过 RNAi 机制介导基因表达的抑制的多核苷酸,包括但不限于信使 RNA(mRNA)、siRNA、microRNA(miRNA)、短发夹 RNA(shRNA)、不对称干扰 RNA(aiRNA)、dicer 底物和其前体。

[0382] 如本文中所使用的,“活性聚合”是指使用熟知的加成聚合(即, 其中将单体一个一个地加至生长中的聚合物链上的活性部位的聚合但其中除了有意以外从不完全消除用于另一个单体的继续加成的活性部位)的概念合成聚合物的方法。即,除非已给聚合物加帽(这可以是可逆的从而允许聚合继续进行,或可以被淬灭,这通常是永久性的),否则聚合物链实际上总是能够通过向反应混合物中加入更多单体来进一步延长。虽然已知许多活性聚合种类,但目前主要类型是阴离子、阳离子和自由基活性聚合。此类聚合当中,就本发明而言,目前自由基聚合是特别吸引人的。自由基聚合包括游离的自由基引发剂,其取走乙烯型单体的双键中的一个 π 电子,从而在前述双键中引发剂与其反应的末端相对的另一末端碳原子上产生反应性的未配对电子。然后该未配对电子与另一个单体的双键反应,从而产生稳定的 σ 键和另一个自由基,然后依此类推。对于常规引发剂,最终通过终止反应终止序列,所述终止反应通常是其中两个增长链的未配对电子组合以形成稳定的 σ 键的组合反应,或其中活性链上的自由基从另一个活性链或从反应混合物中的杂质夺走氢原子以产生稳定的非反应性分子和包含双键的分子的歧化反应。在活性聚合中,生长链进入终止反应的能力被消除,从而只通过存在的单体的量有效地限制聚合,即,聚合继续进行直至单体的供应已耗尽。在这一点上,剩下的自由基种类由于用这样的实体如(但不限于)硝酰基自由基、卤素分子、氧种类例如过氧化物和金属对自由基末端基团加帽或仅通过与溶剂相互作用等而变得活性大大降低。然而,如果向溶液中加入更多单体,那么聚合反应可重新开始,除了如上指出的外。

[0383] 合成

[0384] 可以以任何合适的方式制备本文中描述的聚合物。例如,在某些实施方案中,其中本发明的聚合物,虽然绝不限定于乙烯型种类,但对于此类聚合物,目前特别优选的是通过“活性聚合”制备它们。

[0385] 通过使用活性聚合,可获得在链长度上存在极低多分散性或差异的聚合物。多分散性通常通过将聚合物链的重均分子量除以它们的数均分子量来测量。数均分子量是单个链分子量的和除以链的数目。重均分子量与分子量的平方除以该分子量的分子数成正比。因为重均分子量总是 大于数均分子量,因此多分散性总是大于或等1。当数目越来越趋于相同,即,当多分散性接近为1的值时,聚合物将越来越接近单分散性(monodisperse),即其

中每一条链具有完全相同数目的结构单元。接近1的多分散性值可使用自由基活性聚合来获得。测定多分散性的方法例如但不限于大小排阻层析、动态光散射、基质辅助激光解吸/电离色谱和电喷雾质谱色谱在本领域内是熟知的并且将不在本文中进一步描述。

[0386] 可逆加成断裂链转移(Reversible addition-fragmentation chain transfer)或RAFT是目前用于合成本发明的乙烯型主链聚合物的优选活性聚合技术。RAFT对于本领域技术人员来说是熟知的并且在本文中只进行简要描述。RAFT包括自由基简并性链转移过程(free radical degenerative chain transfer process)。大多数RAFT方法使用硫羰基硫基化合物,例如但不限于双硫酯、二硫代甲氨酸酯、三硫代碳酸酯和黄原酸酯(xanthate)来通过可逆链转移机制介导聚合。聚合物自由基与任何前述化合物的C=S基团的反应导致稳定的自由基中间体形成。此类稳定的自由基中间体不经历标准自由基聚合的典型的终止反应,相反,其再引入能够利用单体再次引发或增长的自由基,从而在该过程中形成C=S键。至C=S键的加成,然后随后发生的自由基的断裂的该循环继续进行直至所有单体都被消耗或反应被淬灭。在任何特定时间上活性自由基的低浓度限制正常终止反应。在其他实施方案中,通过黄原酸/酯的可逆加成断裂链转移(MADIX)(*Direct Synthesis of Double Hydrophilic Statistical Di- and Triblock Copolymers Comprised of Acrylamide and Acrylic Acid Units via the MADIX Process*", Daniel Taton, 等人, *Macromolecular Rapid Communications*, 22, No. 18, 1497-1503 (2001).)通过大分子设计合成聚合物。

[0387] 聚合物:生物分子结构

[0388] 在本文中的某些实施方案中提供了聚合物:多核苷酸构建体或其他构建体,包括例如,聚合物:肽构建体、聚合物:多肽构建体或其他类型的聚合物:生物分子构建体。在某些实施方案中,将一个或多个多核苷酸(例如, siRNA)与本文中描述的任何聚合物缔合。在不同实施方案中,以任何方式(例如,通过共价和/或非共价相互作用)将多核苷酸、肽、多肽或其他生物分子缀合至聚合物,并且此类缀合可在任何适当的位置,包括例如在聚合物的 α 末端、聚合物的 ω 末端、聚合物的亲水末端、聚合物的疏水末端或连接至聚合物的单体侧链的侧基。

[0389] 如本文中所使用的,多核苷酸是指由在链中共价连接的核苷酸单体的线性链组成的有机聚合物分子的成员,这对于本领域技术人员来说是熟知的。简而言之,核苷酸包含连接至单个磷酸基团的核苷(或,按照惯例,当提及其整合至多核苷酸内时,是作为实际上在聚合酶存在的情况下经历聚合的种类的核苷三磷酸的简称)。核苷相应地包含连接至糖部分的碱基。对于天然发生的多核苷酸,即,由未修饰的活性实体产生的多核苷酸,糖部分是核糖(其产生核糖核酸或RNA)或脱氧核糖(其产生脱氧核糖核酸或DNA)。天然发生的碱基是腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)或其天然替代物肌苷(I)、胞嘧啶(C)或胸腺嘧啶(T)或其天然替代物尿嘧啶(U)。因此,多核苷酸包含通过一个核苷的糖部分的3'羟基与第二核苷的糖部分(其继而通过其3'羟基与另一个核苷的5'羟基连接,然后依此类推)的5'羟基之间的磷酸二酯键连接的多个核苷。

[0390] 本发明的DNA或RNA可以有义或反义的。DNA是双链的,一条链是有义链并且另一条链是其互补链或反义链。有义链的特征在于相同序列的RNA形式可被翻译成蛋白质。反义链不能参与相同序列。其后果是通过特定DNA或其信使RNA进行的蛋白质的产生可通过在蛋

白质产生的适当阶段引入互补或反义多核苷酸来中断。

[0391] 简而言之,蛋白质的产生在两个阶段(转录和翻译)发生。在转录中,DNA用作模板产生信使RNA或mRNA。在翻译阶段,mRNA转移至细胞的区域,在所述区域中其与DNA提供至核糖体的遗传信息交流,所述核糖体是实际上组装由DNA编码的蛋白质的细胞机器。包含与mRNA的序列互补的核酸序列的反义多核苷酸可结合mRNA或与之杂交,随后杂交的mRNA通过一个或多个生物化学机制降解,从而阻止mRNA的指令到达核糖体。目前本发明的多核苷酸优选是RNA。

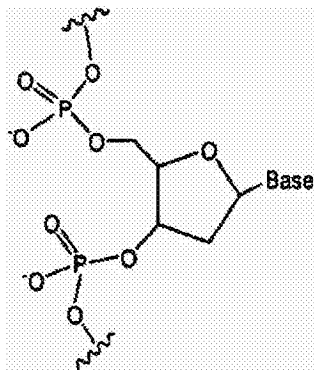
[0392] 本发明的RNA可以是有义或反义mRNA、microRNA或miRNA或短干扰RNA、siRNA。上文中描述了mRNA。miRNA是长度为大约21至23个核苷酸的单链RNA分子。它们的功能是调控基因表达。miRNA由从DNA转录但不被翻译成蛋白质的基因编码。相反地,它们是从称为初级miRNA(pri-miRNA)的初级转录物加工成称为miRNA前体(pre-miRNA)的短茎-环结构,最后加工成功能性miRNA。功能性miRNA与一个或多个mRNA部分互补。这样,它们表现与上述反义多核苷酸相似的性能并且阻止mRNA指令到达核糖体。因此它们能够下调基因表达。

[0393] 虽然miRNA本身从基因组转录,但siRNA、小干扰或短一干扰RNA并不从基因组转录。siRNA,自其在1999年被发现以来,已成为分子生物学家研究最多的多核苷酸之一,并且目前被认为是下一代药物的首要候选物,因为它们潜在地能够沉默事实上任何基因的表达。为了本发明的目的,目前已知的或在将来可知的任何siRNA均可用于与本文中的二嵌段共聚物形成本发明的复合物,从而可被转运入活细胞的内部,以用于但不限于治疗、预防或诊断目的。最初有人认为外源加入的siRNA要象siRNA一样有活性必须具有特定长度(21-23bp)并拥有非常特别的2碱基突出,但现在很清楚,在哺乳动物细胞中更长或更短的平端以及27+bp RNA在基因沉默上同样有效。更短的siRNA可被直接载入RNA诱导的沉默复合体(RISC),而更长的双链RNA可被细胞质多结构域内切核酸酶Dicer在细胞质中切成更短的siRNA。简而言之,长的双链RNA进入细胞的细胞质。长的双链RNA被称为Dicer的RNA酶III样酶加工成20至25个核苷酸的siRNA。然后siRNA组装至称为RNA诱导的沉默复合体或RISC的含有内切核糖核酸酶的复合物。在整合入RISC后,双链siRNA的有义链解开和/或被切割,留下siRNA反义链,其引导RISC至互补mRNA分子。然后siRNA与互补mRNA结合,并且一旦结合,RISC将切割靶mRNA,从而有效地沉默与该RNA结合的基因。可与本发明的二嵌段共聚物形成复合物从而被转运入活细胞的多核苷酸的另一个亚类是所谓的“被锁核酸”或LNA多核苷酸。被锁核酸多核苷酸可通过许多机制(所述机制中的一个核苷的糖部分中2'-氧至4'-碳亚甲基连接的形成)来制备;然而,任何被锁核酸多核苷酸的用途在本发明的范围内。LNA的一个特征是,当与互补DNA或RNA杂交时,与未修饰的DNA:DNA或DNA:RNA双链体相比,它们具有增强的热稳定性以及增强的核酸识别。这些性质使LNA多核苷酸在众多分子应用中潜在有用。例如,LNA-DNA-LNA构建体与siRNA、硫代磷酸酯和2'-O-甲基RNA-DNA构建体在Cos-7细胞中抗辣椒素受体亚型I(VR1)的表达的比较显示,虽然siRNA是最有效力的抗VR1表达的反义试剂,但LNA-DNA-LNA构建体抑制VR1的效力是同序列的硫代磷酸酯和2'-O-甲基寡核苷酸的175和550倍。Grunweller,A,等人,2003,NAR,31 2185-3193。

[0394] 本发明的一个方面是连接至文中描述的任何聚合物或与之缔合(例如,以共价和/或非共价方式,包括离子相互作用、氢键相互作用和/或范德瓦尔斯相互作用)的多核苷酸或多个多核苷酸。在某些实施方案中,聚合物与多核苷酸之间的缔合可通过共价键、非共价

相互作用或其组合实现。在特定的实施方案中,使用聚合物(例如,其第一嵌段的)与多核苷酸的非共价缔合。非共价相互作用包括但不限于离子相互作用、氢键和范德瓦尔斯力,但为了本发明的目的,非共价相互作用包括离子相互作用。离子相互作用在聚合物的阳离子结构单元(例如,其第一嵌段的)与多核苷酸(由于磷酸二酯键的原因其天然带负电荷)之间产生:

[0395]



[0396] 非共价缔合可通过几个另外的方法来实现。可用导致它们具有对于彼此的亲和力的化学部分(例如连接(linkage)、芳基硼酸-水杨羟肟酸、亮氨酸拉链或其他肽基序、聚合物与多核苷酸上的正电荷与负电荷之间的离子相互作用或其他类型的非共价化学亲和连接)修饰多核苷酸和/或聚合物。此外,可通过与共价连接至聚合物的小沟结合试剂或嵌入试剂形成聚合物来将双链多核苷酸复合本发明的聚合物。

[0397] 在一些实施方案中,可通过任何标准化学缀合技术将多核苷酸化学缀合至聚合物。聚合物与多核苷酸之间的共价键可以是不可切割的,或可使用可切割的键。特别优选的可切割键是在细胞质的还原环境中离解的二硫键。共价结合通过化学缀合法来实现,包括但不限于胺-羧基连接体、胺-巯基连接体、胺-碳水化合物连接体、胺-羟基连接体、胺-胺连接体、羧基-巯基连接体、羧基-碳水化合物连接体、羧基-羟基连接体、羧基-羧基连接体、巯基-碳水化合物连接体、巯基-羟基连接体、巯基-巯基连接体、碳水化合物-羟基连接体、碳水化合物-碳水化合物连接体和羟基-羟基连接体。可使用pH敏感型键和连接体(包括但不限于脘和乙缩醛键合)来进行缀合。在本领域内建立了众多的缀合化学法(参见,例如, Bwconjugatwn, Aslam和Dent, Eds, Macmillan, 1998和本文中的其他章节)。可将多核苷酸缀合至聚合物的 α 或 ω 末端,或缀合至聚合物单体上的侧基团。

[0398] 就大小和表面电荷表征一系列聚合物和它们各自的siRNA缩合颗粒(siRNA-condensed particle),所得数据示于表2中。

[0399] 在某些情况下,聚合物在溶液中出现单一聚形式($<10\text{nm}$)。以4:1的理论电荷比从聚合物和siRNA形成的复合物大小范围在85至236nm内。复合物的大小针对BMA含量似乎不存在确定的趋势。然而,在内体裂解性嵌段中具有48%的BMA含量的聚合物P7展示 $85\text{nm} \pm 0.20$ 的最小颗粒大小。其余颗粒具有144至236nm的大小,其中最大尺寸的颗粒由在内体裂解性嵌段中具有27%的BMA含量的聚合物6形成。进一步检查具有范围在1:1至8:1之间的电荷比的聚合物P7/siRNA颗粒大小,数据示于表3中。随着电荷比增加,聚合物/siRNA颗粒大小急剧减小,从1:1时的 $643\text{nm} \pm 0.09$ 的值降至8:1时的 $54\text{nm} \pm 0.27$ 的值。

[0400] 表2:作为甲基丙烯酸丁酯含量函数的以4:1理论电荷比使用siRNA配制的颗粒的大小和 ζ 电位测量。

[0401]

聚合物 #	直径 (nm)	PDI	ζ 电位 (mV)	标准差
P1	166	0.14	1.1	1.32
P2	189	0.09	0.13	0.69
P3	197	0.06	0.47	0.59
P4	144	0.11	0.41	1.2
P5	193	0.32	0.52	0.77
P6	236	0.06	0.67	0.95
P7	85	0.20	0.18	1.0

[0402] 表3:使用聚合物7(具有最大丁基含量的组成)和siRNA配制的颗粒的大小和 ζ 电位测量作为电荷比的函数。

[0403]

理论电荷比 (+/-)	直径 (nm)	PDI	ζ 电位 (mV)	标准差
1:1	643	0.09	0.27	1.1
2:1	530	0.16	0.99	0.91
4:1	85	0.2	0.18	1.01
8:1	54	0.27	0.41	0.81

[0404] 在某些情况下,基于 ζ 电位测量,发现siRNA/聚合物复合物的表面电荷对于所有聚合物都相似并且带微弱正电($\sim 0.5\text{mV}$,范围在 $0.13\text{--}1.1\text{mV}$ 内)。此外,在一些情况下,使用聚合物7以1:1、2:1、4:1和8:1的+/-形成的复合物在表面电荷上未显示差异,同样具有微弱的正值($0.18\text{--}0.99\text{mV}$),针对电荷比没有趋势。在一些情况下,在1:1的电荷比下,预期颗粒具有非常少的表面电荷,因为第二嵌段中的PAA和DMAEMA电荷彼此抗衡。在不同情况下,随着电荷比增加至2:1、4:1和8:1,可能会预期看到正表面电荷的增加,但有趣的是,这并未被观察到。在一些情况下,随着聚合物的量不断增加,颗粒改变形状,变得更致密。随着电荷比不断增加,可能由于DMAEMA正电荷的有效屏蔽而表面电荷不受影响,因为许多聚合物链和siRNA变得包埋在颗粒的核心中了。

[0405] 在某些实施方案中,颗粒大小和表面电荷的改变可能是关于细胞的复合物摄取的相关设计标准。在一些情况下,具有正表面电荷的纳米颗粒通过与带负电荷的细胞膜的静电相互作用促进摄取。

[0406] 就它们在与内体/溶酶体运输途径相关的pH值下诱导红细胞溶血的能力来评估聚合物和siRNA/聚合物复合物。对于聚合物1-3未发生显著的溶血作用。然而,对于聚合物4,相关的pH依赖性溶血活性很明显,并且发现随着内体裂解性嵌段的BMA含量增加而反应性增强。聚合物7展示最大的pH依赖性溶血作用,在 $\text{pH}=7.4$ 时基本上无活性,在 $\text{pH}=6.6$ 时大约25%的溶血,而在 $\text{pH}=5.8$ 时85%的溶血。随后就溶血活性以它们的siRNA复合的形式评估聚合

物5-7。发现与聚合物5-7形成的复合物在所测试的所有电荷比上以相关的pH依赖性方式溶血。此外,与游离聚合物比较而言,由复合物展示的溶血增加,并且相对于1:1而言,在4:1的电荷比下更大。聚合物7在4:1的电荷比下显示最大的溶血活性,在pH=7.4时基本上无溶血作用,在pH=6.8时60%的溶血作用以及在pH5.8下100%的溶血作用。这些数据表明此类聚合物的pH响应型溶血活性与疏水性增强部分甲基丙烯酸丁酯的引入有关联。该发现确证了之前关于pH响应型膜去稳定化聚合物的报导,所述聚合物已整合疏水性部分例如烷基胺或芳香基团以增强羧酸根官能化聚合物的pH依赖性疏水性转换(hydrophobic transition)。

[0407] 膜的破裂和/或膜的去稳定化

[0408] 在某些实施方案中,聚合物或聚合物:多核苷酸构建体(例如,包括与一个或多个多核苷酸结合的本文中描述的任何聚合物)是细胞膜去稳定化或破裂性的聚合物(即,使细胞膜失去稳定或破裂细胞膜)。在某些实施方案中,细胞膜是但不限于例如细胞外膜、细胞内膜、小泡、细胞器、内体、脂质体或红细胞。在一些实施方案中,当给细胞施用,将膜破裂性聚合物或聚合物:多核苷酸递送入细胞。在某些实施方案中,siRNA是待与本发明的聚合物缔合并随后与聚合物一起被内吞入活细胞的内部的优选多核苷酸。

[0409] 内吞作用是物质(例如,本发明的聚合物或核酸)颗粒籍以进入细胞而不必穿过质膜的过程。物质被细胞膜的一部分包被,然后所述细胞膜的部分脱出(pinched off),从而形成细胞内小泡。当物质已被内吞并且内体已酸化时,聚合物的化学组成被改变,因为聚合物的pKa经选择使得在成熟内体中的pH(大约5至6.5)下,酸性单元即本发明聚合物的阴离子性结构单元的未离子化与离子化形式之间的平衡移向未离子化形式。与聚合物的离子化形式(其相对亲水)相反,未离子化形式基本上是疏水性的,并且能够作用于(即破裂)内体膜,这导致物质至细胞溶胶内的释放。

[0410] 使用流式细胞术,基于它们的相关pH响应型内体裂解性特征就聚合物P4-P7研究电荷比为4:1的siRNA复合物的细胞内化作用。在对25nM的聚合物复合的siRNA暴露4小时后,发现细胞摄取与第二嵌段的BMA含量正相关,聚合物P7在该时帧期间显示最高水平的摄取(23%siRNA阳性细胞)。之前已证明带正电荷的复合物影响阳离子聚合物/核酸复合物的内化,其中带正电荷的复合物达到更高的内化速率和转基因表达。这些结果不可能是表面电荷或大小的函数,因为所有颗粒都展示相同的微弱净正电荷和大小(85-236nm)(均在非特异性内吞作用的界限内)(表2)。相反地,对摄取的影响可以是含有BMA的嵌段的内体裂解效率的函数。基于溶血结果,随着BMA含量增加,内体逃逸的程度增加,从而从细胞的再循环减少并且细胞内siRNA的净积累增加,与含有丙基丙烯酸的生物缀合物相似。基于siRNA与细胞膜之间的静电排斥,所有聚合物制剂都显示比未与载体复合的siRNA(裸露的siRNA)大得多的细胞摄取(达到25倍)。仅在4小时后达到23%的细胞对复合siRNA的内化对于治疗效果是极具前景的,因为累积的摄取可能在完全48小时的治疗后要高得多。此外,siRNA活性被认为是催化性的,其可在细胞质中再循环以破坏多个mRNA转录物,从而具有长期多世代作用。

[0411] 通过在电荷比为4:1的复合物存在的情况下温育HeLa细胞进行24小时来检查聚合物载体的非特异性细胞毒性。对于所有受试聚合物观察到高的相对存活率(在24小时后>90%)。可将合成聚合物,特别是阳离子聚合物与可觉察的细胞毒性相关联。例如,已显示PEI在许多种细胞系中触发细胞凋亡和/或坏死。该毒性可通过用亲水区段修饰聚阳离子区段

来降低,然而,在功效与毒性之间通常存在折衷。在该方法中,聚合物递送载体的电荷中和的第二嵌段的使用很可能维持体外培养HeLa细胞的高存活性。

[0412] 使用从理论电荷比为4:1的所有聚合物形成的复合物,利用抗GAPDH的敲低实验研究载体有效地递送siRNA的能力。在用复合物处理后48小时估计GAPDH蛋白的水平。聚合物载体1至3在引发蛋白质水平的降低中无效,这可能是由它们不能介导内体逃逸造成的。然而,当使用聚合物4作为siRNA载体时,GAPDH蛋白的减少变得明显。当载体的BMA含量增加至内体裂解性嵌段的48%(聚合物P7)时,蛋白质的敲低进一步增加。聚合物P7显示最大的介导蛋白质的siRNA敲低的能力,其中GAPDH降至对照的32%。此外,对照siRNA显示可忽略的GAPDH蛋白水平的下降。

[0413] 为了进一步表征载体效能,就它们敲低GAPDH mRNA水平的能力分析聚合物。与蛋白质测量相似,聚合物1-3引发极低的mRNA信号的减少,如通过RT-PCR估计的。再次地,随着内体裂解性嵌段的BMA含量增加,聚合物P4-P7显示增加的GAPDH的敲低。具体地,对于聚合物P4、P5、P6和P7而言,电荷比为4:1时,GAPDH敲低分别下降至对照的39%、30%、31%和21%。总体上,这些结果与探索DNA的递送策略的其他研究组的发现(已发现疏水结构域,特别是N-油醇基(oley1)部分、苯丙氨酸残基和甲基丙烯酸丁酯(如此处所使用的)的加入会增强转染)相符。

[0414] 就电荷比和siRNA剂量对P7(其包括表2的聚合物和相似结构(包括P7的不同形式,例如在本文中可与PRx0729v6互换使用的P7v6))介导基因敲低的能力进行进一步调查。发现理论电荷的改变极大地影响基因敲低。对于1:1、2:1、4:1和8:1的电荷比,GAPDH分别降低至对照水平的51%、42%、21%和14%。特别是在4:1和8:1的电荷比下,基因敲低与可商购获得的载体HiPerFect(其中GAPDH水平降低80%以上)相似。重要的是,对GAPDH水平的影响对于被递送的siRNA是特异性的,因为当以8:1的电荷比使用对照siRNA时,对GAPDH水平没有显著影响。改变电荷比可能会导致在纳米颗粒内siRNA凝缩的水平不同。DLS实验显示,增加复合物中共聚物的含量将导致更致密的颗粒(表3),并且这些功能性研究表明更致密的颗粒可更有效地被内化或具有增加的siRNA生物利用度。这些发现与之前的报导(表明更致密的DNA/聚乙烯亚胺和DNA/多聚赖氨酸复合物以更高的速率内化并且获得更高的转染效率)相符。进行使用电荷比为4:1的P7进行的剂量反应研究。虽然在1nM或5nM siRNA上在GAPDH基因表达上几乎无反应,但当使用聚合物7递送10nM、25nM或50nM的siRNA时,表达降低至对照的77%、21%和12%。这一敲低水平接近使用50nM HiPerFect一种可商购获得的阳性对照看到的水平。然而,所有聚合物(包括聚合物7)都显示与HiPerFect相比较增强的生物相容性,如通过非特异性细胞毒性测量的。虽然利用更高剂量的siRNA(25-50nM)获得显著水平的基因敲低,但为了转化成体内应用,可能更期望使用更低剂量的siRNA来获得显著的降低以避免靶外影响。在一些实施方案中,这通过聚合物/siRNA颗粒的更高效的摄取(可能最好地通过靶向配体完成)来实现。

[0415] 用途

[0416] 在某些实施方案中,施用至受试者并且最终递送入受试者细胞内的本发明的多核苷酸优选是DNA、RNA或其天然或合成类似物。关于能够抑制靶基因表达的DNA/RNA和其类似物,它们包括这样的种类,例如但不限于反义多核苷酸、miRNA和siRNA。

[0417] 任选地使用本发明的聚合物和/或聚合物:多核苷酸复合物治疗的疾病包括,但不

限于,病原性病症、癌症、炎性疾病、酶缺陷、先天性代谢紊乱、感染、自身免疫病、心血管疾病、神经病(neurological disease)、神经变性疾病(neurodegenerative disease)、神经肌肉疾病、血液病(blood disorder)和凝血功能障碍(clotting disorder)。

[0418] 下列实施例用于举例说明目的并且不被解释为限定本发明。本文中引用的所有出版物就对其引用的信息通过引用合并入本文。

实施例

[0419] 在整个本发明的说明书中,各种已知的首字母缩写和缩写用于描述单体或来源于此类单体的聚合的单体残基。不受限制,除非另外指出,否则“BMA”(或字母“B”作为等同的速记符号)代表甲基丙烯酸丁酯或来源于其的单体残基,“DMAEMA”(或字母“D”作为等同的速记符号)代表甲基丙烯酸N,N-二甲基氨基乙酯或来源于其的单体残基,“Gal”是指半乳糖或半乳糖残基,任选地包括羟基保护性部分(例如,乙酰基)或指其PEG化衍生物(如下所述),HPMA代表甲基丙烯酸2-羟丙酯或来源于其的单体残基,“MAA”代表甲基丙烯酸或来源于其的单体残基;“MAA(NHS)”代表甲基丙烯酸的N-羟基-琥珀酰亚胺酯或来源于其的单体残基,“PAA”(或字母“P”作为等同的速记符号)代表2-丙基丙烯酸或来源于其的单体残基,“PEGMA”是指PEG化的甲基丙烯酸单体, $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{O})_{7-8}\text{OC}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ 或来源于其的单体残基。在各情况下,任何此类名称表示单体(包括其所有盐或离子类似物)或来源于该单体的聚合的单体残基(包括其所有盐或离子型类似物),通过上下文明确指出的形式对于本领域技术人员来说是显然的。

[0420] 实施例1:二嵌段聚合物和共聚物的制备

[0421] 制备下列通式的二嵌段聚合物和共聚物:

[0422] $[\text{A1}_x\text{-/-A2}_y]_n\text{-}[\text{B1}_x\text{-/-B2}_y\text{-/-B3}_z]_{1-5n}$

[0423] 其中 $[\text{A1-A2}]$ 是第一嵌段共聚物,由单体A1和A2的残基组成, $[\text{B1-B2-B3}]$ 是第二嵌段共聚物,由单体B1、B2、B3的残基组成,

[0424] x、y、z是以摩尔%单体残基表示的聚合物组成

[0425] n是分子量

[0426] 示例性的二嵌段共聚物:

[0427] $[\text{DMAEMA}]\text{-}[\text{B-/-P-/-D}]$

[0428] $[\text{PEGMA}_w]\text{-}[\text{B-/-P-/-D}]$

[0429] $[\text{PEGMA}_w\text{-DMAEMA}]\text{-}[\text{B-/-P-/-D}]$

[0430] $[\text{PEGMA}_w\text{-MAA(NHS)}]\text{-}[\text{B-/-P-/-D}]$

[0431] $[\text{DMAEMA-/-MAA(NHS)}]\text{-}[\text{B-/-P-/-D}]$

[0432] $[\text{HPMA-/-PDMS}]\text{-}[\text{B-/-P-/-D}]$

[0433] 其中:

[0434] B是甲基丙烯酸丁酯

[0435] P是丙基丙烯酸

[0436] D是DMAEMA,其为甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯

[0437] PEGMA是甲基丙烯酸聚乙二醇酯,其中,例如,w=4至5个或7至8个环氧乙烷单元)

[0438] MAA(NHS)是甲基丙烯酸-N-羟基琥珀酰亚胺

[0439] HPMA是N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺

[0440] PDSM是甲基丙烯酸吡啶基二硫化物

[0441] 此类聚合物代表其中改变或化学处理聚合物或共聚物的第一嵌段的组成以产生聚合物(其中第一嵌段是中性的(例如,PEGMA)、阳离子性的(DMAEMA)、阴离子性的(PEGMA-NHS,其中NHS被水解成酸)、两性的(DMAEMA-NHS,其中NHS被水解成酸)或两性离子性的(例如,聚[2-甲基丙烯酰氧基-2'三甲基铵甲基磷酸]))的结构。此外,[PEGMA-PDSM]-[B-P-D]聚合物在第一嵌段中包含吡啶二硫基功能性,其可与硫醇化siRNA反应以形成聚合物-siRNA缀合物。

[0442] 实施例1.1:通过RAFT制备嵌段共聚物的一般合成方法

[0443] A.RAFT链转移剂

[0444] 用于下列RAFT聚合的链转移剂(CTA):4-氰基-4-(乙基巯基硫代羰基)巯基戊酸(ECT)的合成采用Moad等人,Polymer,2005,46(19):8458-68的方法。简而言之,在10分钟内将乙硫醇(4.72g,76mmol)在0℃下加至搅拌的氢化钠(60%于油中)(3.15g,79mmol)的乙醚(150ml)悬浮液中。然后在加入二硫化碳(6.0g,79mmol)之前搅拌溶液进行10分钟。通过过滤收集粗制S-乙基三硫代碳酸钠(7.85g,0.049mol),重悬浮于乙醚(100mL)中,然后将其与碘(6.3g,0.025mol)反应。在过滤溶液1小时后,用硫代硫酸钠水溶液洗涤,然后在硫酸钠上进行干燥。然后通过旋转蒸发分离粗制的双(乙基巯基硫代羰基)二硫化物。在回流的情况下将双(乙基巯基硫代羰基)二硫化物(1.37g,0.005mol)和4,4'-偶氮双(4-氰基戊酸)(210g,0.0075mol)在乙酸乙酯(50mL)中的溶液加热18小时。在旋转蒸发溶剂后,使用硅胶作为固定相和50:50乙酸乙酯己烷作为洗脱剂,通过柱层析分离粗制4-氰基-4(乙基巯基硫代羰基)巯基戊酸(ECT)。

[0445] B.聚(甲基丙烯酸N,N-二甲基氨基乙酯)大分子链转移剂(聚DMAEMA macroCTA)。

[0446] 使用ECT和2,2'-偶氮双(4-甲氧基-2,4-二甲基戊腈)(V-70)(Wako chemicals)作为自由基引发剂,在氮气氛下于30℃下在DMF中进行DMAEMA的RAFT聚合,进行18小时。初始单体对CTA的比率([CTA]₀/[M]₀)是使得在100%转化率下理论M_n为10,000(g/mol)的值。初始CTA对引发剂的比率([CTA]₀/[I]₀)是10:1。通过沉淀入50:50v:v乙醚/戊烷中来分离所得的聚DMAEMA大分子链转移剂。将所得的聚合物重新溶解在丙酮中,然后沉淀入戊烷(x3),然后于真空中干燥过夜。

[0447] C.通过聚(DMAEMA)macroCTA进行的DMAEMA、PAA和BMA的嵌段共聚

[0448] 将期望的化学计量的DMAEMA、PAA和BMA加入至溶解于N,N-二甲基甲酰胺中的聚(DMAEMA)macroCTA(25wt%单体和macroCTA对溶剂)。对于所有聚合,[M]₀/[CTA]₀和[CTA]₀/[I]₀分别是250:1和10:1。在加入V70后,用氮清洁溶液进行30分钟,让其在30℃下反应18小时。通过沉淀入50:50v:v乙醚/戊烷中分离所得的二嵌段共聚物。然后将沉淀的聚合物重新溶解在丙酮中,然后沉淀入戊烷(x3),然后于真空中干燥过夜。针对于聚甲基丙烯酸甲酯标准(与Viscotek GPCmax VE2001和折射计VE3580(Viscotek,Houston,TX)串连的SEC Tosoh TSK-GEL R-3000和R-4000柱(Tosoh Bioscience,Montgomeryville,PA)),通过凝胶渗透色谱法(GPC)测定DMF中的聚(DMAEMA)macroCTA和二嵌段共聚物样品的分子量和多分散性(PDI,M_w/M_n)。将含有1.0wt% LiBr的HPLC级DMF用作流动相。图1A概述了一些RAFT合成聚合物(PRx0729v6在本申请中和在不同的优先权申请中可与P7v6互换使用)的分子量和组成。

图1B概述了一些RAFT合成聚合物的分子量、粒度和组成。

[0449] 实施例1.2.通过聚(PEGMA)macroCTA进行的DMAEMA、PAA和BMA的第二嵌段(B1-B2-B3)共聚合的制备。

[0450] 将期望的化学计量的DMAEMA、PAA和BMA加至溶解在N,N-二甲基甲酰胺中的聚(PEGMA)macroCTA(25wt%单体和macroCTA对溶剂)中。对于所有聚合, $[M]_0/[CTA]_0$ 和 $[CTA]_0/[I]_0$ 分别是250:1和10:1。在加入AIBN后,用氮气洗涤溶液进行30分钟,然后让其在68℃下反应6至12小时(图2)。通过沉淀入50:50v:v乙醚/戊烷中分离所得的二嵌段共聚物。然后将沉淀的聚合物重新溶解在丙酮中,然后沉淀入戊烷(x3),然后于真空中干燥过夜。使用Viscotek GPCmax VE2001和折射计VE3580(Viscotek,Houston,TX),将凝胶渗透色谱法(GPC)用于测定DMF中的聚(DMAEMA)macroCTA和二嵌段共聚物样品的分子量和多分散性(PDI, M_w/M_n)。将含有1.0wt%LiBr的HPLC级DMF用作流动相。将于CDCl₃中进行的NMR光谱分析用于确认聚合物结构和计算第二嵌段的组成。图2概述了[PEGMA_w]-[B-P-D]聚合物的合成,其中w=7至8。图3A、3B和3C概述了[PEGMA_w]-[B-P-D]聚合物的表征,其中w=7至8。

[0451] 实施例1.3.PEGMA-DMAEMA共聚物的制备和表征

[0452] 使用与实施例1.1和1.2中描述的方法相似的方法进行聚合物合成。使用不同投料比的各单体改变第一嵌段中PEGMA与DMAEMA的比率,由此产生图4中描述的共聚物。

[0453] 实施例1.4.PEGMA-MAA(NHS)共聚物的制备和表征。

[0454] 使用获得第一嵌段共聚物的期望组成的单体投料比,如实施例1.1和1.2中所述进行聚合物合成(并且概述于图5中)。图6A、6B和6C概述了[PEGMA_w-MAA(NHS)]-[B-P-D]聚合物的合成和表征,其中第一嵌段中单体的共聚物比率为70:30。将包含NHS的聚合物在室温下于pH为7.4至8.5的缓冲水溶液(磷酸盐或碳酸氢盐)中温育1至4小时,以产生水解的(酸性)形式。

[0455] 实施例1.5.DMAEMA-MAA(NHS)共聚物的制备和表征。

[0456] 使用获得第一嵌段共聚物的期望组成的单体投料比,如实施例1.1和1.2中所述进行聚合物合成。图7A、7B和7C概述了[DMAEMA-MAA(NHS)]-[B-P-D]聚合物的合成和表征,其中第一嵌段中单体的共聚物比率为70:30。可以将包含NHS的聚合物在室温或37℃下于pH为7.4至8.5的缓冲水溶液(磷酸盐或碳酸氢盐)中温育1至4小时,以产生水解的(酸性)形式。

[0457] 实施例2.用于siRNA药物递送的HPMA-PDS(RNA)共聚物缀合物的制备和表征。

[0458] A.吡啶基二巯基甲基丙烯酸酯单体(PDSMA)的合成。

[0459] PDSMA的合成方案概述于图8中。将Aldrithiol-2™(5g,22.59mmol)溶解于40ml甲醇和1.8ml AcOH中。在30分钟内将溶液作为2-氨基乙硫醇盐酸盐(1.28g,11.30mmol)(于20ml甲醇中)的溶液加入。在N₂下于室温下搅拌反应物,进行48小时。在溶剂蒸发后,用40ml乙醚洗涤残留的油2次。将粗制化合物溶解于10ml甲醇中,用50ml的乙醚沉淀产物2次以获得期望的化合物1(作为淡黄色固体)。产率:95%。

[0460] 将吡啶二巯基乙胺(1,6.7g,30.07mmol)和三乙胺(4.23ml,30.37mmol)溶解于DMF(25ml)和吡啶(25ml)中,然后通过注射器在0℃下缓慢加入甲基丙烯酰氯(3.33ml,33.08mmol)。在室温下搅拌反应混合物进行2小时。在反应后,利用饱和NaHCO₃(350ml)淬灭反应,然后利用乙酸乙酯(350ml)进行萃取。用10%HCl(100ml,1次)和纯水(100ml,2次)进一步洗涤合并的有机层,然后利用MgSO₄进行干燥。通过柱层析(EA/Hex:1/10至2/1)将纯产

物纯化,为黄色糖浆剂(syrup)。Rf=0.28(EA/Hex=1/1)。产率:55%。

[0461] B. HPMA-PDSMA共聚物的合成

[0462] 使用2,2'-偶氮-双-异丁腈(AIBN)作为自由基引发剂,在氮气氛下于68℃下在DMF(50wt%单体:溶剂)中进行N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA)和吡啶二硫基甲基丙烯酸酯(通常以70:30的单体比)的RAFT聚合,进行8小时(图9)。CTA对AIBN的摩尔比是10:1并且单体对CTA的比率被设置成当在100%转化率下时可获得25,000g/mol的分子量。通过重复沉淀入乙醚将聚(HPMA-PDS)macro-CTA与甲醇分离。

[0463] 在真空下干燥macro-CTA,进行24小时,然后将其用于甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯(DMAEMA)、丙基丙烯酸(PAA)和甲基丙烯酸丁酯(BMA)的嵌段共聚合。将等摩尔量的DMAEMA、PAA和BMA($[M]_0/[CTA]_0=250$)加入至溶解于N,N-二甲基甲酰胺(25wt%单体和macroCTA对溶剂)中的HPMA-PDS macroCTA。以10:1的CTA对引发剂比率加入自由基引发剂AIBN。让聚合在氮气氛下于68℃下进行8小时。之后,通过4次沉淀入50:50乙醚/戊烷来分离所得的二嵌段聚合物,在沉淀之间将其重新溶解于乙醇。然后用二乙醚洗涤产物1次,在真空中干燥过夜。

[0464] C. siRNA至HPMA-PDSMA共聚物的缀合

[0465] 硫醇化siRNA可作为具有二硫化物修饰的5'-有义链商购获得(Agilent, Boulder, CO)。通过将冷冻干燥的化合物溶解在水中并且用二硫化物还原剂TCEP(固定在琼脂糖凝胶中的)处理1小时来制备用于缀合的游离巯基形式。然后将还原的RNA(400μM)与吡啶基二硫化物官能化的聚合物在含有5mM乙二胺四乙酸(EDTA)的磷酸盐缓冲液(pH7)中反应24小时(EDTA)(图9)。

[0466] 吡啶基二硫化物聚合物与RNA巯基的反应产生2-吡啶硫醇,可通过分光光度法测量其来表征缀合效率。为了进一步验证二硫化物交换,将缀合物在SDS-PAGE 16.5%的三(羟甲基)甲基甘氨酸凝胶上进行电泳。平行地,在进行SDS-PAGE之前,用固定的TCEP处理缀合反应物的等分以验证在还原性环境中RNA从聚合物释放。以1、2和5的聚合物/RNA化学计量进行缀合反应。将针对2-吡啶硫醇释放的343nm处的UV分光光度法吸光度测量值用于衡量缀合效率。

[0467] 实施例3:siRNA/聚合物复合物的表征

[0468] 在通过琼脂糖凝胶阻滞验证完全的血清稳定的siRNA复合后,使用ZetaPALS检测器(Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, 15mW激光,入射束=676nm)就大小和ζ电位表征siRNA/聚合物复合物。简而言之,以0.1mg/ml的浓度在磷酸缓冲盐溶液(PBS, Gibco)中配制聚合物,通过以指定的理论电荷比(基于带正电荷的DMAEMA(其在pH=7.4时50%被质子化)和带负电荷的siRNA的)将聚合物加入至GAPDH siRNA(Ambion)来形成复合物。在90°的散射角处收集相关函数,并且使用25℃下水的粘度系数和折射率来计算粒度。粒度表示为假定对数正态分布的有效直径。使用ZetaPALSζ电位分析软件在25℃下测量平均电泳迁移率,并且使用用于水混悬液的Smoluchowsky模型计算ζ电位。

[0469] 实施例4:HeLa细胞培养

[0470] 将HeLa细胞即人宫颈癌细胞(ATCC CCL-2)于37℃和5%CO₂下维持在含有L谷氨酰胺(Gibco)、1%青霉素-链霉素(Gibco)和10%胎牛血清(FBS, Invitrogen)的极限必需培养基(minimum essential media)(MEM)中。

[0471] 实施例5:载体和siRNA/聚合物复合物的pH依赖性膜破裂作用。

[0472] 使用溶血作用测定游离聚合物和siRNA/聚合物缀合物在模拟内体运输的pH值下(细胞外pH=7.4, 早期内体pH=6.6, 和次级内体pH=5.8)的潜在内体裂解性活性。简而言之, 在含有EDTA的真空容器中收集人全血。将血液离心, 吸出血浆, 然后在150mM NaCl中洗涤3次以分离红细胞(RBC)。然后将RBC重悬浮于pH7.4、pH6.6或pH5.8的磷酸盐缓冲液(PB)中。然后在这3个pH值下于37℃下将聚合物(10μg/ml)或聚合物/siRNA复合物与RBC一起温育1小时。然后离心完整的RBC, 通过在541nm的吸光度测量释放入上清液的血红蛋白, 作为pH依赖性RBC膜裂解的指标。图10A显示浓度为10μg/ml的聚合物的溶血作用, 图10B显示理论电荷比为1:1和4:1的的聚合物5-7的聚合物/siRNA复合物。将溶血活性针对阳性对照1%v/v Triton X-100进行标准化, 其为来自一式三份重复进行的单个实验的代表性数据±标准差。

[0473] 实施例6: 载体介导的siRNA摄取的测量

[0474] 使用流式细胞术(Becton Dickinson LSR台式分析仪)测量siRNA/聚合物复合物的细胞内摄取。以15,000个细胞/cm²的密度接种HeLa并且让其贴壁过夜。以4:1的理论电荷比将FAM(5-羧基荧光素)标记的siRNA(Ambion)与聚合物在室温下复合30分钟, 然后将其以25nM的终siRNA浓度加入至铺板的HeLa细胞。在与复合物一起温育4小时后, 用胰蛋白酶处理细胞, 然后将其重悬浮于具有0.5%BSA和0.01%台盼蓝的PBS中。如之前针对细胞外荧光的猝灭和已被细胞内吞的复合物的辨别所描述的一样利用台盼蓝。每样品分析10,000个细胞, 使用未接受处理的样品和未用FAM标记的siRNA复合的聚合物测定荧光门控。图11显示FAM标记的siRNA和使用聚合物4-7形成的聚合物/siRNA复合物递送4小时后的HeLa细胞内化。数据来自一式三份进行的3个独立实验的数据, 误差棒表示平均值的标准差(SEM)。

[0475] 实施例7: siRNA/聚合物复合物的细胞毒性

[0476] 使用乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒(Roche)测定siRNA/聚合物复合物的细胞毒性。将HeLa细胞以每孔12,000个细胞的密度接种在96孔板中, 让其贴壁过夜。通过向以4:1的理论电荷比向GAPDH siRNA中加入聚合物(0.1mg/ml原液)并且获得25nM siRNA/孔的浓度来形成复合物。以一式三份向孔中加入复合物(电荷比=4:1)。在已将细胞与聚合物复合物温育24小时后, 除去培养基, 然后用PBS洗涤细胞2次。然后用裂解缓冲液(100μL/孔, 20mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 1mM Na₂EDTA, 1mM EGTA, 1%Triton, 25mM焦磷酸钠, 1mM β-甘油磷酸酯, 1mM原钒酸钠)在4℃下裂解细胞, 进行1小时。在通过移液器抽吸混合后, 将20μL的细胞裂解物1:5稀释于PBS中, 然后通过100μL LDH底物溶液混合就乳酸脱氢酶(LDH)对其进行定量。在温育10至20分钟以进行颜色形成之后, 测量490nm处的吸光度, 参照设置在650nm。

[0477] 图12A显示非特异性HeLa细胞毒性, 图12B显示作为siRNA聚合物载体的函数的GAPDH敲低效果。使用以4:1的理论电荷比配制的聚合物/siRNA复合物用浓度为25nM的抗GAPDH的siRNA转染HeLa细胞。(A)24小时后, 收集细胞裂解物, 就乳酸脱氢酶(细胞活力的量度)对其进行测定, 数据表示为相对于未处理细胞的水平。(B)48小时后, 分别使用GAPDH酶活性测定和RT-PCR检查蛋白质(黑色)和mRNA水平(白色), 并且显示相对于未接受处理的细胞的数据。数据来自一式三份进行的3个独立实验, 误差棒代表标准差。

[0478] 实施例8: 由siRNA/聚合物复合物导致的GAPDH蛋白和基因敲低的评估

[0479] 使用GAPDH活性测定(Ambion)筛查一系列聚合物用于siRNA递送的效力。将HeLa

(12,000个细胞/cm²)铺板在96孔板中。24小时后,在10%血清存在的情况下,以25nM的终siRNA浓度将复合物(电荷比=4:1)加至细胞。转染后48小时估量siRNA-介导的GAPDH蛋白减少的程度。作为阳性对照,按照制造商的条件使用HiPerFect(Qiagen)进行平行敲低实验。按照制造商所描述的,使用动力学荧光增敏法(kinetic fluorescence increase method)在5分钟内测量剩余的GAPDH活性,按照下列公式计算所述活性:剩余表达百分比=荧光_{GAPDH}/荧光_{未处理的},其中荧光=荧光_{5分钟}-荧光_{1分钟}。当使用siRNA的非靶向序列时,转染方法对GAPDH表达没有显著作用。图13A显示在用复合物处理后48小时通过实时RT-PCR测量的HeLa中的GAPDH敲低(作为电荷比(1:1-8:1)的函数),图13B显示在用复合物处理后48小时通过实时RT-PCR测量的HeLa中的GAPDH敲低(作为使用聚合物7作为载体的siRNA剂量(1-50nM)的函数)。将阴性对照siRNA#1(Ambion)和可商购获得的转染剂HiPerFect(Qiagen)分别用作阴性和阳性对照。

[0480] 在初步筛查以鉴定产生最强的siRNA介导的GAPDH敲低的载体后,使用实时逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)直接估计siRNA的递送。在与如上形成的复合物一起温育48小时后,用PBS漂洗细胞。使用Qiagen's Qias shredder和RNeasy mini试剂盒分离总RNA。消化(RNase-Free DNase Set, Qiagen)样品中的任何残留基因组DNA,然后基于制造商的说明书使用RiboGreen测定(Molecular Probes)定量RNA。

[0481] 使用Omniscript RT试剂盒(Qiagen)进行逆转录。将25ng总RNA样品用于cDNA合成,使用针对GAPDH和β肌动蛋白(作为持家基因)的预先设计的引物和探针组(Assays on Demand, Applied Biosystems),利用ABI Sequence Detection System 7000进行PCR。反应物(总共20μl)由10μl的2X Taqman Universal PCR Mastermix、1μl引物/探针和2μl cDNA(使用不含核酸酶的水(Ambion)调整至20μl)组成。使用下列PCR参数:95℃进行90秒,然后进行45个循环:在95℃下进行30秒和在55℃下进行60秒。将阈值循环(CT)分析用于定量GAPDH,将其针对β肌动蛋白和相对于未处理HeLa的表达进行标准化。

[0482] 实施例9. 聚[HPMA]-b-[(PAA)(BMA)(DMAEMA)]的功能设计。

[0483] 图14显示聚[HPMA]-b-[(PAA)(BMA)(DMAEMA)]的聚合物设计。通过RAFT聚合物合成策略,使用吡啶基二硫化物末端官能化的CTA形成经设计具有水溶性和pH依赖性膜去稳定化性质的二嵌段结构来整合多功能性质。选择图14中突显的单体化学功能性以为各聚合物嵌段产生期望的性质。重要的是,模块(module)3被设计为在生理pH下接近电中性(预计大约50%的DMAEMA质子化和50%的PAA去质子化)并且在更低的pH环境下经历向更具有疏水性和带正电荷的状态的转换。

[0484] 实施例10. 吡啶二硫化物-CTA的合成。

[0485] 如图15中所示合成4-氰基-4-(乙基巯基硫代羰基)巯基戊酸(ECT)前体。通过首先将ECT转变成NHS酯,然后与吡啶二巯基-乙胺反应来合成吡啶基二硫化物官能化的RAFT链转移剂(CTA)。将ECT(1.05g, 4mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(0.460g, 4mmol)溶解于100mL的氯仿中。然后将混合物冷却至0℃,此时加入N,N'-二环己基碳二亚胺(0.865mg, 4.2mmol)。将溶液在0℃下保持1小时,然后让其在室温下反应22小时。然后过滤溶液以除去二环己基尿素,通过旋转蒸发浓缩溶液。然后在真空下干燥所得的固体,并且在不进行任何进一步纯化的情况下使用其。然后分开地将NHS ECT(1.80g, 5.0mmol)和吡啶二巯基-乙胺(0.90g, 5.0mmol)分别溶解于200和300mL氯仿中。然后以3个级分(相隔20分钟)逐滴加入吡啶二硫

基-乙胺的溶液。然后让混合物在室温下反应2小时。在除去溶剂后,进行2个连续的柱层析(Silica gel 60,Merk)(乙酸乙酯:己烷50:50;乙酸乙酯:己烷70:30v/v),产生粘稠的橙色固体。¹H NMR200MHz(CDC13,RT,ppm)1.29-1.41[t,CH₃CH₂S:3H],1.85-1.93[s,(CH₃)C(CN):3H],2.33-2.59[m,C(CH₃)(CN)(CH₂CH₂):4H],2.86-2.97[t,CH₂SS:2H],3.50-3.61[t,NHCH₂:2H],7.11-7.22[m,Ar Para CH:1H],7.46-7.52[m,Ar CH Ortho:1H],7.53-7.62[br,NH:1H],7.53-7.68[m,Ar meta CH:1H],8.47-8.60[m,meta CHN1,1H].[00164]硫醇反应性聚合物的制备:吡啶二硫化物官能化的聚[HPMA]-b-[(PAA)(BMA)(DMAEMA)]的RAFT聚合。在70℃下在氮气氛下使用2,2'-偶氮-双-异丁腈(AIBN)作为自由基引发剂,在甲醇(50wt%单体:溶剂)中进行N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA)的RAFT聚合。CTA对AIBN的摩尔比为10:1,并且将单体对CTA的比率设置成在100%转化率下将获得25,000g/mol的分子量。通过重复沉淀入乙醚来将聚(HPMA)macro-CTA与甲醇分离。[00165]在真空下干燥macro-CTA进行24小时,然后将其用于甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯(DMAEMA)、丙基丙烯酸(PAA)和甲基丙烯酸丁酯(BMA)的嵌段共聚。将等摩尔量的DMAEMA、PAA和BMA([M]₀/[CTA]₀=250)加入至溶解于N,N-二甲基甲酰胺中的HPMA macroCTA(25wt%单体和macroCTA对溶剂)。以10:1的CTA对引发剂比率加入自由基引发剂V70。让聚合在30℃下于氮气氛中进行18小时。之后,通过至50:50v:v乙醚/戊烷中沉淀4次分离所得的二嵌段共聚物,在沉淀之间将其重新溶解于乙醇中。然后用乙醚洗涤产物一次,在真空中干燥过夜。

[0486] 将凝胶渗透色谱法(GPC)用于测定DMF中聚(HPMA)macroCTA和二嵌段共聚物的分子量和多分散性(M_w/M_n,PDI)。分子量计算基于相对于聚甲基丙烯酸甲酯标准(在60℃下使用含有0.1wt%LiBr的HPLC-级DMF作为流动相)的柱洗脱时间。将Tris(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)用于还原聚合物末端吡啶基二硫化物,从而释放2-吡啶硫醇。基于实验测定的聚合物分子量和2-吡啶硫醇在343nm处于水性溶剂中的摩尔消光系数(8080M⁻¹cm⁻¹),就聚(HPMA)macroCTA和二嵌段共聚物测定末端基团保护百分比。

[0487] 实施例11.聚合物-肽缀合物。

[0488] 将与肽转导结构域肽转运子(transportin)(也称为触角足肽(Antennapedia peptide,Antp))序列的融合体用于合成含有羧基末端半胱氨酸残基的Bak-BH3肽(Antp-BH3)(NH₂-RQIKIWFQNRRMKWKKMGQVGRQLAIIGDDINRRYDSC-COOH)的细胞内化形式。为了确保用于缀合的游离巯基,在水中重建肽,然后用固定在琼脂糖凝胶内的二硫化物还原剂TCEP处理1小时。然后将还原的肽(400μM)与吡啶基二硫化物末端官能化的聚合物在含有5mM乙二胺四乙酸(EDTA)的磷酸盐缓冲液(pH7)中反应24小时。

[0489] 如图16中所显示的,吡啶基二硫化物聚合物末端基团与肽半胱氨酸的反应产生2-吡啶硫醇,可通过分光光度计测量其来表征缀合效率。为了进一步验证二硫化物交换,将缀合物在SDS-PAGE 16.5%三(羟甲基)甲基甘氨酸凝胶上进行电泳。平行地,在进行SDS-PAGE之前用固定的TCEP处理缀合反应物的等分以验证在还原环境中肽从聚合物的释放。

[0490] 以聚合物/肽化学计量比1、2和5进行缀合反应。关于2-吡啶硫醇释放的在343nm处的UV分光光度计测量的吸光度测量值分别显示40%、75%和80%的缀合效率(2-吡啶硫醇摩尔数/肽摩尔数)。利用SDS PAGE凝胶进一步表征肽-聚合物缀合物(图17)。在聚合物/肽摩尔比为1时,可检测量的肽通过二硫桥接(通过末端半胱氨酸)形成二聚体。然而,至吡啶基二硫化物的硫醇反应是有利的,在聚合物/肽比率等于或大于2时不再看到游离肽条带(图

17A)。通过用还原剂TCEP处理缀合物,有可能切割聚合物-肽二硫键,如由此类样品中肽条带的出现所表明的(图17B)。

[0491] 实施例12. 聚[HPMA]-B-[(PAA)(BMA)(DMAEMA)]的pH依赖性膜去稳定化性质。

[0492] 为了估量聚合物的内体裂解性活性的潜能,将膜破裂性测定用于测量聚合物触发脂双层膜的pH依赖性破裂的能力(如图18中显示的)。抽取人全血,然后离心以除去血浆。用150mM NaCl洗涤剩下的红细胞3次,然后重悬浮于相应于生理(pH7.4)、初级内体(pH6.6)和次级内体(pH5.8)环境的磷酸盐缓冲液中。向红细胞悬浮液中加入聚合物(1-40 μ g/mL)或1% Triton X-100并且于37 $^{\circ}$ C下温育1小时。通过离心沉淀完整的红细胞,通过541nm处的吸光度测量上清液中的血红蛋白含量。测定相对于Triton X-100的百分比溶血作用。相对于1% v/v Triton X-100,聚合物的溶血作用经定量在1至40 μ g/mL的浓度范围内。以一式三份完成该实验2次,产生相似的结果。显示的数据代表以一式三份进行的单个实验 $\pm$ 标准差。

[0493] 红细胞溶血作用衡影在模拟生理(7.4)、初级内体(6.6)和次级内体(5.8)环境的pH值下二嵌段共聚物的pH依赖性膜破裂性质。在生理pH下,在甚至高达40 μ g/mL的聚合物浓度下未观察到显著的红细胞膜破裂(图18)。然而,当pH下降至内体值时,检测到溶血作用的显著增加,与pH6.6相比较而言,在pH5.8下膜破裂更大。聚合物的溶血行为与聚合物浓度相关,于pH5.8的缓冲液中在40 μ g/mL的聚合物下发生 将近70%的红细胞裂解。在内体pH下向膜去稳定化构象的这种急剧“转换”与在生理pH范围内可忽略的膜活性一起表明,该聚合物具有作为无毒细胞内递送载体的潜能。

[0494] 实施例13. HELA细胞中的细胞内递送的表征

[0495] 将HeLa,一种人宫颈癌细胞(ATCC CCL-2),维持在含有L谷氨酰胺(Gibco)、1%青霉素-链霉素(Gibco)和10%胎牛血清的极限必需培养基(MEM)中。在实验之前,让HeLa在8孔培养腔室玻片(20,000个细胞/孔)(用于显微观察)或96孔板(10,000个细胞/孔)(用于其他测定)中贴壁过夜。将聚合物-肽缀合物和对照加入含有1%FBS的MEM中。

[0496] 在向Bak-BH3肽(与Antp(转运子)细胞穿膜肽融合的)的生物缀合后评估聚合物细胞内递送潜能。BH3与Antp的融合物已经作为细胞转运结构域(cell translocation domain)得到详尽地研究并且之前已发现其触发细胞凋亡信号转导(Li等人Neoplasia(New York,N.Y.2007;9(10):801-811)。然而,据信通过肽转导结构域递送的治疗剂可由于在细胞内小泡内的隔离(sequestration)而效力遭受阻碍(Sugita等人.British Journal of Pharmacology.2008,153(6):1143-1152)。下列体内研究证明与二嵌段聚合物的缀合可增强组合的Antp-BH3肽细胞质递送和促细胞凋亡功能性。

[0497] 缀合物内体逃逸的显微镜分析。将胺反应性Alexa-488琥珀酰亚胺酯以1:1的摩尔比与Antp-BH3肽在无水二甲基甲酰胺(DMF)中混合。使用PD10脱盐柱除去未反应的荧光基团和有机溶剂,然后冷冻干燥荧光标记的肽。如上所述将Alexa-488标记的Antp-BH3缀合至聚合物。将游离肽或聚合物-肽缀合物以25 μ M Antp-BH3的浓度用于培养在分室的显微镜载玻片上的HeLa。处理细胞15分钟,用PBS洗涤2次,然后在新鲜培养基中温育另外30分钟。再次洗涤样品,然后在37 $^{\circ}$ C下用4%多聚甲醛固定10分钟。用含有DAPI的ProLong Gold Antifade试剂封片,使用荧光显微镜成像。

[0498] 为了研究聚合物缀合对肽内体逃逸的作用,利用荧光显微镜分析 Alexa-488标记的肽。单独地或作为聚合物生物缀合物递送荧光标记的肽。显微镜分析显示在聚合物缀合

后肽的细胞内定位表现显著差异(图19)。单独的肽展示小斑点染色,表明内体的区室化。以聚合物-肽缀合物递送的样品展示弥散的荧光模式,与肽扩散至整个细胞质相符。代表性图像举例说明了(图19A)以单独的肽递送的样品的小斑点肽染色(绿色)和(图19B)在肽-聚合物缀合物递送后细胞溶胶内的弥散性肽荧光。用25 μ M肽处理样品15分钟,在DAPI细胞核染色(蓝色)后制备用于显微镜检查。

[0499] 缀合物细胞毒性的测量。使用乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性测定法测定生物缀合物触发肿瘤细胞死亡的效能。在各时间点结束时,用PBS洗涤细胞2次,然后用细胞裂解缓冲液(100 μ L/孔,20mM Tris-HCl,pH7.5,150mM NaCl,1mM Na₂EDTA,1mM EGTA,1% Triton,2.5mM 焦磷酸钠,1mM β -甘油磷酸,1mM原钒酸钠)在4 $^{\circ}$ C下裂解细胞,进行1小时。将各样品的20 μ L裂解物稀释入80 μ L PBS中,通过与100 μ L LDH底物溶液混合来定量LDH。在10分钟的温育后,通过测量490nm处的吸光度来测定LDH。相对于未接受处理的样品来表示百分比活力。

[0500] 为了估量聚合物-肽缀合物的生物活性,在HeLa宫颈癌细胞中进行细胞毒性研究。发现Antp-BH3聚合物缀合物以剂量依赖性方式有效地触发HeLa细胞死亡。在用10 μ M肽缀合物处理6小时后检测到低于50%的HeLa活力(图20A),并且接受25 μ M肽缀合物的样品(图20B)在少至4小时的暴露后显示极少的(如果有的话)活细胞。单独地接受肽或聚合物的对照样品展示可忽略的处理效果,并且在对照处理组之间不存在差异。重要的是,缺乏pH反应型嵌段的Antp-BH3聚(HPMA)缀合物与两个对照组相似并且不导致显著的细胞毒性,这进一步验证了内体裂解性嵌段的功能性(图20)。

[0501] 线粒体膜电位的流式细胞术估计。使用JC-1染料估量线粒体膜电位的消失(已知的细胞凋亡的指标)。当在细胞溶胶中扩散时JC-1展示绿色荧光,并且在健康细胞中,其在线粒体膜上形成红色荧光聚集体(Cossarizza等人.Biochemical and biophysical research communications.1993;197(1):40-45)。将HeLa与10 μ M肽或等量的缀合物或单独的聚合物一起温育2小时。以5 μ g/mL的终浓度加入JC-1,并且温育15分钟。用PBS洗涤细胞2次,用胰蛋白酶进行处理,然后重悬浮于0.5%BSA中以用于流式细胞术分析。基于对于红色荧光是阴性的绿色荧光细胞的数目定量展示线粒体去极化的细胞的百分比。此处,在用Antp-BH3肽和聚合物肽缀合物处理后,检测到红色荧光JC-1聚焦体的显著消失,从而检测到线粒体极化的消失(图21A)。聚合物对照与未接受处理的细胞相似,然而单独的和在聚合物缀合物中的Antp-BH3分别导致展示线粒体极化消失的细胞的百分比有大约4倍和10倍的增加。

[0502] Caspase3/7活性测定。使用可商购获得的测定试剂盒测量Caspase3/7的激活。该测定使用促荧光caspase3/7底物,该底物一旦被酶促切割将产生荧光,从而允许使用荧光酶标仪(fluorescent plate reader)测定相对酶活性。此处,除了等于缀合物样品的量的单独聚合物外,将HeLa与25 μ M肽(单独的或作为聚合物缀合物)一起温育30分钟。之后,将caspase3/7荧光发生指示剂(fluorigenic indicator)直接加入各样品的培养基。将板摇动1小时,然后使用荧光酶标仪进行测定。数据表示为相对于未接受处理的样品的caspase活性百分比。

[0503] 指示促细胞凋亡信号转导的caspases3和7的激活可使用特异于此类蛋白酶的促荧光底物来测量。图21B显示含有单独的聚合物的对照相对于未接受处理的阴性对照展示相当量的caspase活性。然而,在用Antp-BH3肽本身或以聚合物缀合物形式处理后检测到快

速的caspase激活(大约2.5倍)。Antp-BH3单独地或作为聚合物缀合物的相似作用可能表明caspase信号转导被使用单独的肽的处理饱和,或存在用于放大caspase激活状态中的扰动的其他正反馈机制。在最低限度上,这些结果表明不存在因缀合至聚合物而导致的位阻或肽诱导的caspase活性的其他降低。

[0504] 本发明涉及以下实施方式:

[0505] 实施方式1.一种共聚物,其包含:

[0506] (a)第一嵌段,其包含在正常生理pH下为亲水性的第一结构单元;

[0507] (b)第二嵌段,其包含:

[0508] (i)在正常生理pH下为阳离子性的并且可以与第一结构单元相同或不同的第二结构单元;

[0509] (ii)在正常生理pH下为阴离子性的第三结构单元;

[0510] (iii)疏水性增强部分,其中:

[0511] 该疏水性增强部分共价连接第二结构单元;

[0512] 该疏水性增强部分共价连接第三结构单元;

[0513] 该疏水性增强部分包含在第二嵌段的第四结构单元中;或其任何组合。

[0514] 实施方式2.实施方式1的共聚物,其中第二嵌段在总电荷上基本为中性的。

[0515] 实施方式3.实施方式1至2中任一项的共聚物,其中共聚物是二嵌段共聚物。

[0516] 实施方式4.实施方式1至3中任一项的共聚物,其中第一结构单元是阳离子性的、阴离子性的、中性的或两性离子的。

[0517] 实施方式5.实施方式4的共聚物,其中第一结构单元是阳离子性的。

[0518] 实施方式6.实施方式1至5中任一项的共聚物,其中第一嵌段包含多个第一结构单元。

[0519] 实施方式7.实施方式1至6中任一项的共聚物,其中第二嵌段包含多个第二结构单元、多个第三结构单元和多个疏水性增强部分。

[0520] 实施方式8.实施方式1至7中任一项的共聚物,其中所述正常生理pH是大约7.2至大约7.4。

[0521] 实施方式9.一种共聚物,其包含:

[0522] (a)第一嵌段,其包含在正常生理pH下为阳离子性的第一结构单元;

[0523] (b)第二嵌段,其包含:

[0524] (i)在正常生理pH下为阳离子性的并且可以与第一结构单元相同或不同的第二结构单元;

[0525] (ii)在正常生理pH下为阴离子性的第三结构单元;

[0526] (iii)疏水性增强部分,其中:

[0527] 该疏水性增强部分共价连接第二结构单元;或

[0528] 该疏水性增强部分共价连接至第三结构单元;或

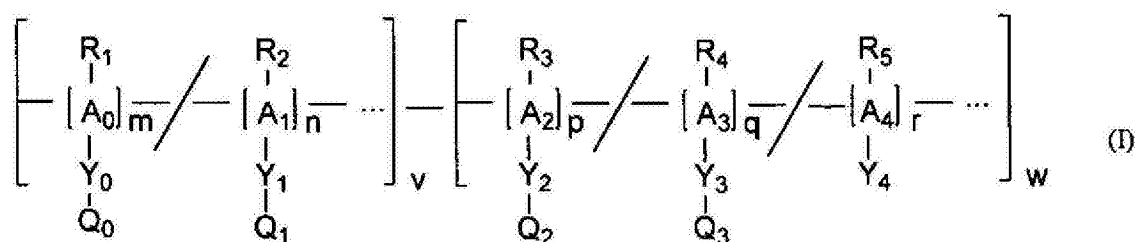
[0529] 该疏水性增强部分包含在第二嵌段的第四结构单元中;或

[0530] 其任何组合;和

[0531] 第二嵌段在总电荷上基本上是中性的。

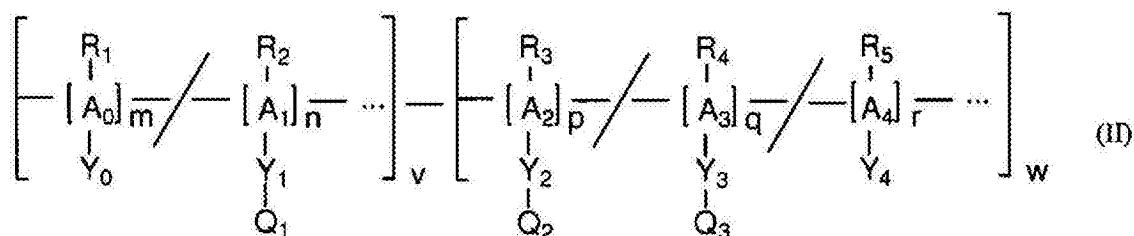
[0532] 实施方式10.一种内体裂解性共聚物,其包含:

- [0533] (a)第一嵌段,该第一嵌段为亲水性嵌段;和
- [0534] 第二嵌段,该第二嵌段为膜去稳定化疏水性嵌段,其包含:
- [0535] (i)在大约中性pH下为阴离子性的第一可带电荷种类
- [0536] (ii)在大约中性pH下为阳离子性的第二可带电荷种类。
- [0537] 实施方式11.一种内体裂解性共聚物,其包含:
- [0538] (a)第一嵌段,该第一嵌段是包含在大约中性pH下为阳离子性的第一可带电荷种类的亲水性嵌段;
- [0539] (b)第二嵌段,该第二嵌段为膜去稳定化的疏水性嵌段,其包含:
- [0540] (i)在大约中性pH下为阴离子性的第二可带电荷种类;和
- [0541] (ii)在大约中性pH下为阳离子性的第三可带电荷种类;和
- [0542] (c)与第一嵌段缔合的寡核苷酸。
- [0543] 实施方式12.一种内体裂解性共聚物,其包含:
- [0544] (a)第一嵌段,该第一嵌段为亲水性嵌段,
- [0545] (b)第二嵌段,该第二嵌段是包含丙烯酸残基或烷基丙烯酸残基的膜去稳定化疏水性嵌段。
- [0546] 实施方式13.实施方式1至12的任一项的聚合物,其中第一聚合物嵌段为大约10,000道尔顿。
- [0547] 实施方式14.实施方式1至12的任一项的聚合物,其中第一聚合物嵌段为大约2,000道尔顿至大约30,000道尔顿。
- [0548] 实施方式15.实施方式1至12的任一项的聚合物,其中第一聚合物嵌段为大约8,500道尔顿至大约13,000道尔顿。
- [0549] 实施方式16.实施方式1至15的任一项的聚合物,其中第二聚合物嵌段的分子量是第一聚合物嵌段的分子量的大约1至3倍。
- [0550] 实施方式17.实施方式1、9、10、11或12至16中任一项的共聚物,其包含化学式I:
- [0551]



- [0552] A_0 、 A_1 、 A_2 、 A_3 和 A_4 选自 $-C-$ 、 $-C-C-$ 、 $-C(O)(C)_aC(O)O-$ 、 $-O(C)_aC(O)-$ 和 $-O(C)_bO-$;其中,
- [0553] a 是1-4;
- [0554] b 是2-4;
- [0555] Y_4 选自氢、(1C-10C)烷基、(3C-6C)环烷基、0-(1C-10C)烷基、 $-C(O)O(1C-10C)$ 烷基、 $C(O)NR_6(1C-10C)$ 、(4C-10C)杂芳基和(6C-10C)芳基,其中任意个任选地被一个或多个氟基取代;
- [0556] Y_0 、 Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、(1C-10C)烷基、 $-C(O)O(2C-10C)$ 烷基、 $-OC(O)(1C-10C)$ 烷基、 $-O(2C-10C)$ 烷基和 $-S(2C-10C)$ 烷基、 $-C(O)NR_6(2C-10C)$ 烷基、(4C-10C)杂芳基和(6C-10C)芳基;

- [0557] Y_3 选自共价键、(1C-10C)烷基、(4C-10C)杂芳基和(6C-10C)芳基；其中
- [0558] 用适当数目的氢原子完成未完全被 R_1 - R_5 和 Y_0 - Y_4 取代的 A_0 - A_4 四价碳原子；
- [0559] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 和 R_6 独立地选自氢、-CN、烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基，其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代；
- [0560] Q_0 是选自在生理pH下为亲水性的残基、可缀合或可官能化残基的残基或氢；
- [0561] Q_1 是在正常生理pH下为亲水性的残基；
- [0562] Q_2 是在正常生理pH下带正电荷的残基；
- [0563] Q_3 是在正常生理pH下带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基；
- [0564] m 是约0至小于1.0(例如，0至大约0.49)；
- [0565] n 大于0至约1.0(例如，大约0.51至大约1.0)；其中
- [0566] $m+n=1$
- [0567] p 是大约0.2至大约0.5；
- [0568] q 是大约0.2至大约0.5；其中
- [0569] p 大体上与 q 相同；
- [0570] r 是0至大约0.6；其中
- [0571] $p+q+r=1$
- [0572] v 是大约5至大约25kDa；以及，
- [0573] w 是大约5至大约50kDa。
- [0574] 实施方式18.实施方式13的共聚物，其中 Q_1 是在正常生理pH下带正电荷的残基；在正常生理pH下带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基；在正常生理pH下为中性的残基；或在正常生理pH下为两性离子性的残基。
- [0575] 19.实施方式1、9、10、11或12中任一项的共聚物，其包括化学式II：
- [0576]



- [0577] A_0 、 A_1 、 A_2 、 A_3 和 A_4 选自- $C-C$ -、- $C(O)(C)_aC(O)O$ -、- $O(C)_aC(O)$ -和- $O(C)_bO$ -；其中，
- [0578] a 是1-4；
- [0579] b 是2-4；
- [0580] Y_0 和 Y_4 独立地选自氢、(1C-10C)烷基、(3C-6C)环烷基、0-(1C-10C)烷基、- $C(O)O$ (1C-10C)烷基、 $C(O)NR_6$ (1C-10C)、(4C-10C)杂芳基和(6C-10C)芳基，其中任意个任选地被一个或多个氟基取代；
- [0581] Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、(1C-10C)烷基-、- $C(O)O$ (2C-10C)烷基-、- $OC(O)$ (1C-10C)烷基-、- O (2C-10C)烷基-和-S(2C-10C)烷基-、- $C(O)NR_6$ (2C-10C)烷基-、(4C-10C)杂芳基和(6C-10C)芳基；
- [0582] Y_3 选自共价键、(1C-10C)烷基、(4C-10C)杂芳基和(6C-10C)芳基；其中
- [0583] 用适当数目的氢原子完成未完全被 R_1 - R_5 和 Y_0 - Y_4 取代的 A_0 - A_4 四价碳原子；

[0584] 各 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 和 R_6 独立地选自氢、-CN、烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基,其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代;

[0585] Q_1 和 Q_2 是在正常生理pH下带正电荷的残基;

[0586] Q_3 是在正常生理pH下带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基;

[0587] m 是0至大约0.49;

[0588] n 是大约0.51至大约1.0;其中

[0589] $m+n=1$

[0590] p 是大约0.2至大约0.5;

[0591] q 是大约0.2至大约0.5;其中:

[0592] p 大体上与 q 相同;

[0593] r 是0至大约0.6;其中

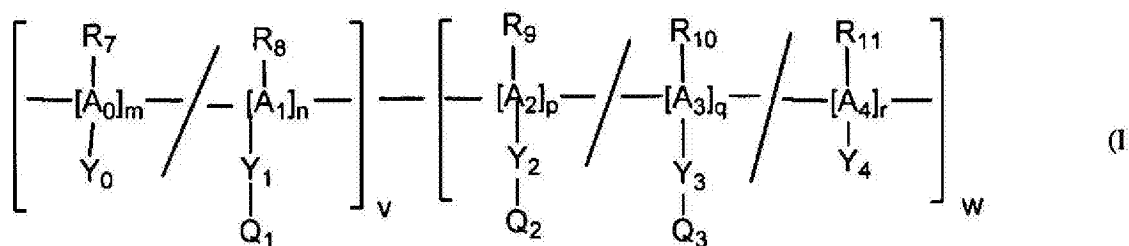
[0594] $p+q+r=1$

[0595] v 是大约5至大约25kDa;以及

[0596] w 是大约5至大约50kDa。

[0597] 实施方式20.实施方式1、9、10、11或12中任一项的共聚物,其包括化学式I:

[0598]



[0599] A_0 、 A_1 、 A_2 、 A_3 和 A_4 选自 $-C-C-$ 、 $-C(O)(C)_aC(O)O-$ 、 $-O(C)_aC(O)-$ 和 $-O(C)_bO-$;其中,

[0600] a 是1-4;

[0601] b 是2-4;

[0602] Y_0 和 Y_4 独立地选自氢、(1C-10C)烷基、(3C-6C)环烷基、0-(1C-10C)烷基、 $-C(O)O$ (1C-10C)烷基、 $C(O)NR_6$ (1C-10C)、(4C-10C)杂芳基和(6C-10C)芳基,其中任意个任选地被一个或多个氟基取代;

[0603] Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、(1C-10C)烷基-、 $-C(O)O$ (2C-10C)烷基-、 $-OC(O)$ (1C-10C)烷基-、 $-O$ (2C-10C)烷基-和 $-S$ (2C-10C)烷基-、 $-C(O)NR_6$ (2C-10C)烷基-、(4C-10C)杂芳基和(6C-10C)芳基;

[0604] Y_3 选自共价键、(1C-10C)烷基和(6C-10C)芳基;其中

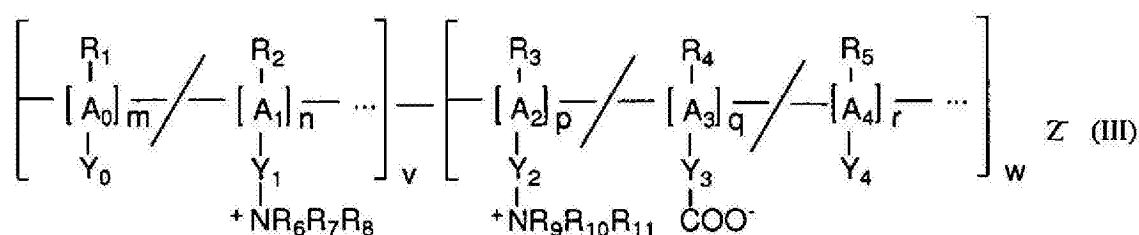
[0605] 用适当数目的氢原子完成未完全被 R_7 - R_{11} 和 Y_0 - Y_4 取代的 A_0 - A_4 四价碳原子;

[0606] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 和 R_{11} 独立地选自氢、-CN、烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基,其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代;

[0607] Q_1 和 Q_2 是在正常生理pH下带正电荷的残基,包括但不限于氨基、烷基氨基、铵、烷基铵、胍、咪唑基和吡啶基;

[0608] Q_3 是在正常生理pH下带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基,包括但不限于羧基、磺酰胺、硼酸根、膦酸根和磷酸根;

- [0609] m是0至大约0.49;
 [0610] n是大约0.51至大约1.0;其中
 [0611] $m+n=1$
 [0612] p是大约0.2至大约0.5;
 [0613] q是大约0.2至大约0.5;其中:
 [0614] p大体上与q相同;
 [0615] r是0至大约0.6;其中
 [0616] $p+q+r=1$
 [0617] v是大约5至大约25kDa;以及
 [0618] w是大约5至大约50kDa。
 [0619] 实施方式21.实施方式1、9、10、11或12中任一项的共聚物,其包括化学式II:
 [0620]

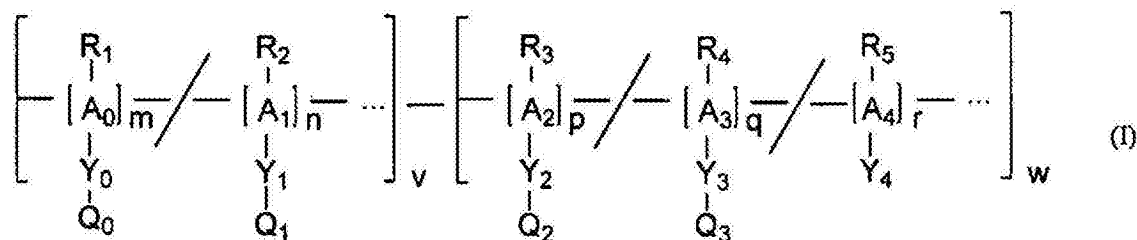


- [0621] A_0 、 A_1 、 A_2 、 A_3 和 A_4 独立地选自 $-C-C-$ 、 $-C(O)(C)_aC(O)O-$ 、 $-O(C)_aC(O)-$ 和 $-O(C)_bO-$;其中,
 [0622] a是1-4;
 [0623] b是2-4;
 [0624] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 和 R_{11} 独立地选自氢、(1C-5C)烷基、(3C-6C)环烷基和苯基,其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代;
 [0625] Y_0 和 Y_4 独立地选自氢、(1C-10C)烷基、(3C-6C)环烷基、0-(1C-10C)烷基、 $-C(O)O$ (1C-10C)烷基和苯基,其任意个任选地被一个或多个氟基取代;
 [0626] Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、(1C-10C)烷基-、 $-C(O)O$ (2C-10C)烷基-、 $-OC(O)$ (1C-10C)烷基-、 $-O$ (2C-10C)烷基-和 $-S$ (2C-10C)烷基-;
 [0627] Y_3 选自共价键、(1C-5C)烷基和苯基;其中
 [0628] 用适当数目的氢原子完成未完全被 R_1 - R_5 和 Y_0 - Y_4 取代的 A_0 - A_4 四价碳原子;
 [0629] Z是生理上可接受的抗衡离子,
 [0630] m是0至大约0.49;
 [0631] n是大约0.51至大约1.0;其中
 [0632] $m+n=1$
 [0633] p是大约0.2至大约0.5;
 [0634] q是大约0.2至大约0.5;其中:
 [0635] p大体上与q相同;
 [0636] r是0至大约0.6;其中
 [0637] $p+q+r=1$
 [0638] v是大约5至大约25kDa;以及

[0639] w是大约5至大约50kDa。

[0640] 实施方式22. 包含化学式I的共聚物：

[0641]



[0642] A_0 、 A_1 、 A_2 、 A_3 和 A_4 选自 $-C-$ 、 $-C-C-$ 、 $-C(O)(C)_aC(O)O-$ 、 $-O(C)_aC(O)-$ 和 $-O(C)_bO-$ ；其中，

[0643] a是1-4；

[0644] b是2-4；

[0645] Y_4 选自氢、(1C-10C)烷基、(3C-6C)环烷基、0-(1C-10C)烷基、 $-C(O)O(1C-10C)$ 烷基、 $C(O)NR_6(1C-10C)$ 和芳基，其中任意个可任选地被一个或多个氟基团取代；

[0646] Y_0 、 Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、(1C-10C)烷基、 $-C(O)O(2C-10C)$ 烷基、 $-OC(O)(1C-10C)$ 烷基、 $-O(2C-10C)$ 烷基和 $-S(2C-10C)$ 烷基、 $-C(O)NR_6(2C-10C)$ 烷基；

[0647] Y_3 选自共价键、(1C-10C)烷基、和(6C-10C)芳基，其中

[0648] 用适当数目的氢原子完成未完全被 R_1 - R_5 和 Y_0 - Y_4 取代的 A_1 - A_4 四价碳原子；

[0649] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 和 R_6 独立地选自氢、 $-CN$ 、烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基，其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代；

[0650] Q_0 是选自在生理pH下为亲水性的残基、可缀合或可官能化残基的残基或氢；

[0651] Q_1 是在正常生理pH下为亲水性的残基；

[0652] Q_2 是在正常生理pH下带正电荷的残基；

[0653] Q_3 在正常生理pH下带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基；

[0654] m是0至小于1.0(例如0至大约0.49)；

[0655] n大于0至大约1.0(例如大约0.51至大约1.0)；其中

[0656] $m+n=1$

[0657] p是大约0.2至大约0.5；

[0658] q是大约0.2至大约0.5；其中

[0659] p大体上与q相同；

[0660] r是0至大约0.6；其中

[0661] $p+q+r=1$

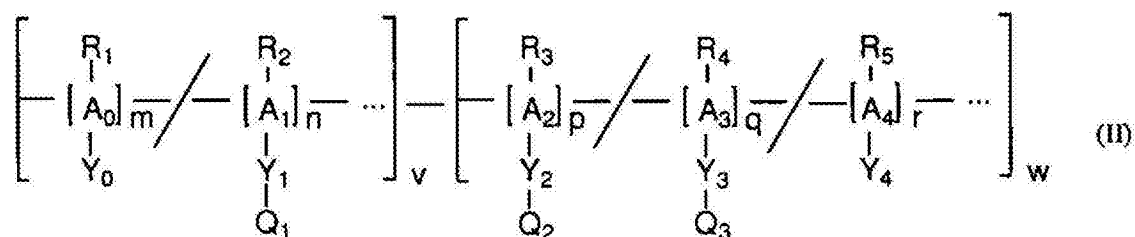
[0662] v是大约5至大约25kDa；以及

[0663] w是大约5至大约50kDa。

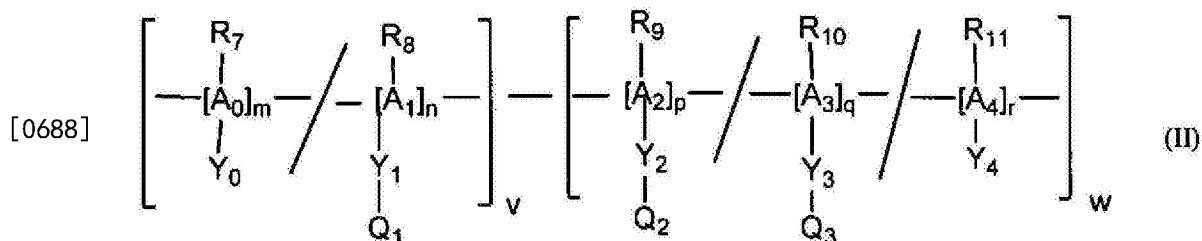
[0664] 实施方式23. 实施方式18的共聚物，其中 Q_1 是在正常生理pH下带正电荷的残基；在正常生理pH下带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基；在正常生理pH下为中性的残基；或在正常生理pH下为两性离子性的残基。

[0665] 实施方式24. 包括化学式II的共聚物：

[0666]

[0667] A_0, A_1, A_2, A_3 和 A_4 选自 $-C-C-$ 、 $-C(O)(C)_aC(O)O-$ 、 $-O(C)_aC(O)-$ 和 $-O(C)_bO-$ ，其中：[0668] a 是1-4，[0669] b 是2-4，[0670] Y_0 和 Y_4 独立地选自氢、(1C-10C)烷基、(3C-6C)环烷基、0-(1C-10C)烷基、 $-C(O)O$ (1C-10C)烷基、 $C(O)NR_6$ (1C-10C)和芳基，其中任意个可任选地被一个或多个氟基取代；[0671] Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、(1C-10C)烷基-、 $-C(O)O$ (2C-10C)烷基-、 $-OC(O)$ (1C-10C)烷基-、 $-O$ (2C-10C)烷基-和 $-S$ (2C-10C)烷基-、 $-C(O)NR_6$ (2C-10C)烷基-；[0672] Y_3 选自共价键、(1C-10C)烷基和(6C-10C)芳基；其中[0673] 用适当数目的氢原子完成未完全被 R_1-R_5 和 Y_0-Y_4 取代的 A_0-A_4 四价碳原子；[0674] 各 R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 和 R_6 独立地选自氢、 $-CN$ 、烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基，其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代；[0675] Q_1 和 Q_2 是在正常生理pH下带正电荷的残基；[0676] Q_3 是在正常生理pH下带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基；[0677] m 是0至大约0.49；[0678] n 是大约0.51至大约1.0；其中[0679] $m+n=1$ [0680] p 是大约0.2至大约0.5；[0681] q 是大约0.2至大约0.5；其中：[0682] p 大体上与 q 相等；[0683] r 是0至大约0.6；其中[0684] $p+q+r=1$ [0685] v 是大约5至大约25kDa；以及，[0686] w 是大约5至大约50kDa。

[0687] 实施方式25. 包括化学式II的共聚物：

[0689] A_0, A_1, A_2, A_3 和 A_4 选自 $-C-C-$ 、 $-C(O)(C)_aC(O)O-$ 、 $-O(C)_aC(O)-$ 和 $O(C)_bO-$ ；其中，[0690] a 是1-4；[0691] b 是2-4；

[0692] Y_0 和 Y_4 独立地选自氢、(1C-10C)烷基、(3C-6C)环烷基、O-(1C-10C)烷基、-C(O)O(1C-10C)烷基、-C(O)NR₆(1C-10C)和芳基,其任何一个任选地可用一个或多个氟基取代;

[0693] Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、(1C-10C)烷基-、-C(O)O(2C-10C)烷基-、-OC(O)(1C-10C)烷基-、-O(2C-10C)烷基-和-S(2C-10C)烷基-、-C(O)NR₆(2C-10C)烷基;

[0694] Y_3 选自共价键、(1C-10C)烷基和(6C-10C)芳基;其中

[0695] 用适当数目的氢原子完成未完全被 R_7 - R_{11} 和 Y_0 - Y_4 取代的 A_0 - A_4 四价碳原子;

[0696] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 和 R_{11} 独立地选自氢、-CN、烷基、炔基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基,其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代;

[0697] Q_1 和 Q_2 是在正常生理pH下带正电荷的残基,包括但不限于氨基、烷基氨基、铵、烷基铵、胍、咪唑基和吡啶基;

[0698] Q_3 是在正常生理pH下带负电荷但在更低的pH下经历质子化的残基,包括但不限于羧基、磺酰胺、硼酸根、膦酸根和磷酸根;

[0699] m 是0至大约0.49;

[0700] n 是大约0.51至大约1.0;其中

[0701] $m+n=1$

[0702] p 是大约0.2至大约0.5;

[0703] q 是大约0.2至大约0.5;其中:

[0704] p 大体上与 q 相同;

[0705] r 是0至大约0.6;其中

[0706] $p+q+r=1$

[0707] v 是大约5至大约25kDa;以及,

[0708] w 是大约5至大约50kDa。

[0709] 实施方式26.实施方式17至19或21至24中任一项的共聚物,其中 R_2 - A_1 - Y_1 - Q_1 是甲基丙烯酸C1-6二烷基氨基(C1-6)烷基酯,甲基丙烯酸C1-6烷基氨基C1-6烷基酯,丙烯酸氨基C1-6烷基酯、乙基丙烯酸[ethacrylate]C1-6二烷基氨基(C1-6)烷基酯、乙基丙烯酸C1-6烷基氨基C1-6烷基酯、乙基丙烯酸氨基C1-6烷基酯、丙烯酸C1-6二烷基氨基(C1-6)烷基酯、丙烯酸C1-6烷基氨基(C1-6)烷基酯或丙烯酸氨基(C1-6)烷基酯的残基。

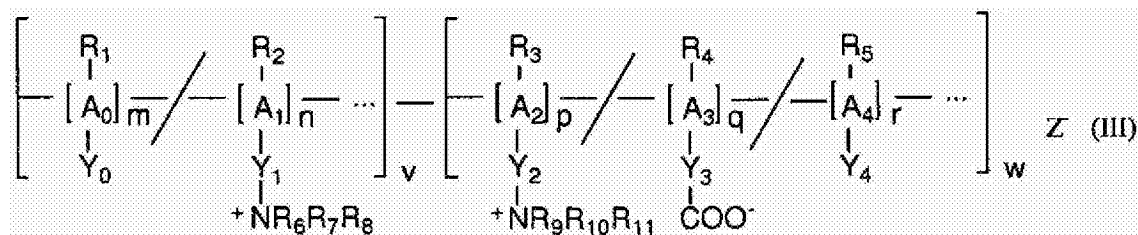
[0710] 实施方式27.实施方式17至19、21至24或26中任一项的共聚物,其中 R_3 - A_2 - Y_2 - Q_2 是甲基丙烯酸C1-6二烷基氨基(C1-6)烷基酯、甲基丙烯酸C1-6烷基氨基(C1-6)烷基酯、丙烯酸氨基(C1-6)烷基酯、乙基丙烯酸C1-6二烷基氨基(C1-6)烷基酯、乙基丙烯酸C1-6烷基氨基(C1-6)烷基酯、乙基丙烯酸氨基(C1-6)烷基酯、丙烯酸C1-6二烷基氨基(C1-6)烷基酯、丙烯酸C1-6烷基氨基(C1-6)烷基酯或丙烯酸氨基(C1-6)烷基酯的残基。

[0711] 实施方式28.实施方式17至19、21至24或26至27中任一项的共聚物,其中 R_4 - A_3 - Y_3 - Q_3 是C1-6烷基丙烯酸的残基。

[0712] 实施方式29.实施方式17至19、21至24或26至28中任一项的共聚物,其中 R_5 - A_4 - Y_4 - Q_4 是丙烯酸C1-6烷基酯、甲基丙烯酸C1-6烷基酯或乙基丙烯酸C1-6烷基酯的残基。

[0713] 实施方式30.包括化学式III的共聚物:

[0714]

[0715] A_0, A_1, A_2, A_3 和 A_4 选自 $-C-C-$ 、 $-C(O)(C)_aC(O)O-$ 、 $-O(C)_aC(O)-$ 和 $-O(C)_bO-$ ；其中，[0716] a 是1-4；[0717] b 是2-4；[0718] $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}$ 和 R_{11} 独立地选自氢、(1C-5C)烷基、(3C-6C)环烷基和苯基，其中任意个可任选地被一个或多个氟原子取代；[0719] Y_0 和 Y_4 独立地选自氢、(1C-10C)烷基、(3C-6C)环烷基、 $O-(1C-10C)$ 烷基、 $-C(O)O(1C-10C)$ 烷基和苯基，其中任意个任选地被一个或多个氟基取代；[0720] Y_1 和 Y_2 独立地选自共价键、(1C-10C)烷基-、 $-C(O)O(2C-10C)$ 烷基-、 $-OC(O)(1C-10C)$ 烷基-、 $-O(2C-10C)$ 烷基-和 $-S(2C-10C)$ 烷基-；[0721] Y_3 选自共价键、(1C-5C)烷基和苯基；其中[0722] 其中用适当数目的氢原子完成未完全被 R_1-R_5 和 Y_0-Y_4 取代的 A_0-A_4 四价碳原子；[0723] Z 是生理上可接受的抗衡离子，[0724] m 是0至大约0.49；[0725] n 是大约0.51至大约1.0；其中[0726] $m+n=1$ [0727] p 是大约0.2至大约0.5；[0728] q 是大约0.2至大约0.5；其中：[0729] p 大体上与 q 相同；[0730] r 是0至大约0.6；其中[0731] $p+q+r=1$ [0732] v 是大约5至大约25kDa；以及[0733] w 是大约5至大约50kDa。[0734] 实施方式31.实施方式17至30中任一项的共聚物，其中 $v:w$ 的比率为大约1:1至大约1:3。

[0735] 实施方式32.实施方式1至31中任一项的共聚物，其中还包含治疗剂。

[0736] 实施方式33.实施方式32的共聚物，其中所述治疗剂与所述共聚物缔合。

[0737] 实施方式34.实施方式33的共聚物，其中所述治疗剂是siRNA。

[0738] 实施方式35.实施方式33的共聚物，其中所述治疗剂是多肽。

[0739] 实施方式36.实施方式34或35中任一项的共聚物，其中所述治疗剂共价地连接至所述共聚物。

[0740] 实施方式37.实施方式34或35中任一项的共聚物，其中所述治疗剂通过离子相互作用与所述共聚物缔合。

[0741] 实施方式38.包含多种实施方式1至37中任一项的共聚物的组合物。

[0742] 实施方式39.实施方式38的组合物,其中所述多种共聚物具有大约1.2的多分散性指数(PDI)。

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

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

图1A

聚合物	结构 $[D]_{MW_1}-[B-P-D_{mole\%}]_{MW_2}$	嵌段比例 MW_2/MW_1	粒度 (nm)
PRX-1	$[D]_{11.3K}-[B_{50}-P_{30}-D_{20}]_{20.7K}$	1.83	41
PRX-2	$[D]_{14.5K}-[B_{57}-P_{23}-D_{20}]_{26.4K}$	1.82	49
PRX-3	$[D]_{11.5K}-[B_{35}-P_{27}-D_{38}]_{33.4K}$	2.92	60
PRX-4	$[D]_{10.7K}-[B_{50}-P_{27}-D_{23}]_{33.8K}$	3.16	50
PRX-5	$[D]_{10.7K}-[B_{40}-P_{31}-D_{29}]_{32.2K}$	3.00	59
PRX-6	$[D]_{14.5K}-[B_{53}-P_{31}-D_{16}]_{67.0K}$	4.62	115

图1B

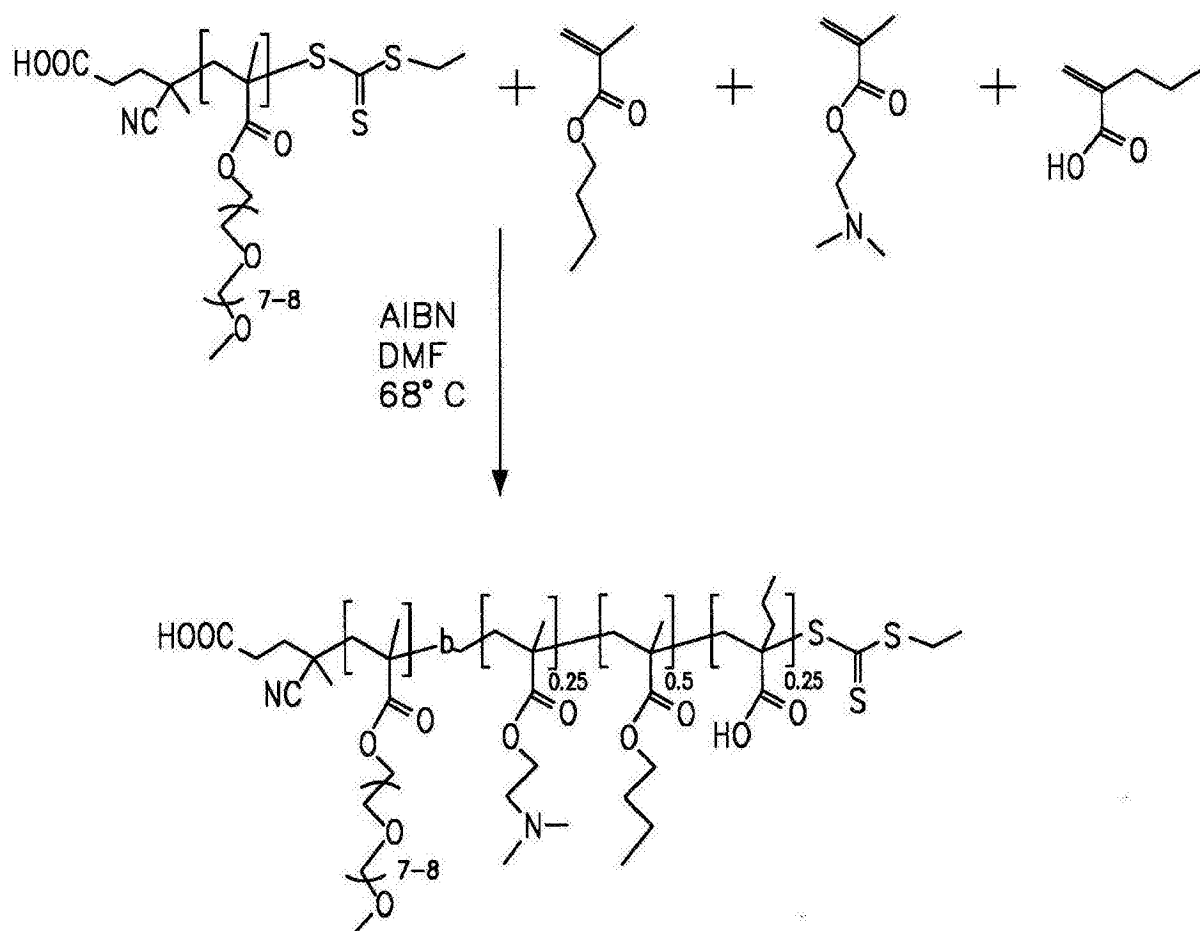
[PEGMA_w]-[B-P-D]的合成

图2

P7-PEGMA100-40 kDa 的表征

第一嵌段			第二嵌段			
聚合物	Mn (kDa)	PDI	Mn (kDa)	PDMA (mol)	PDMAEMA (mol)	PDAA (mol)
P7-PEGMA100 40kDa	40.12	1.34	59.3	53	26	21

图3A

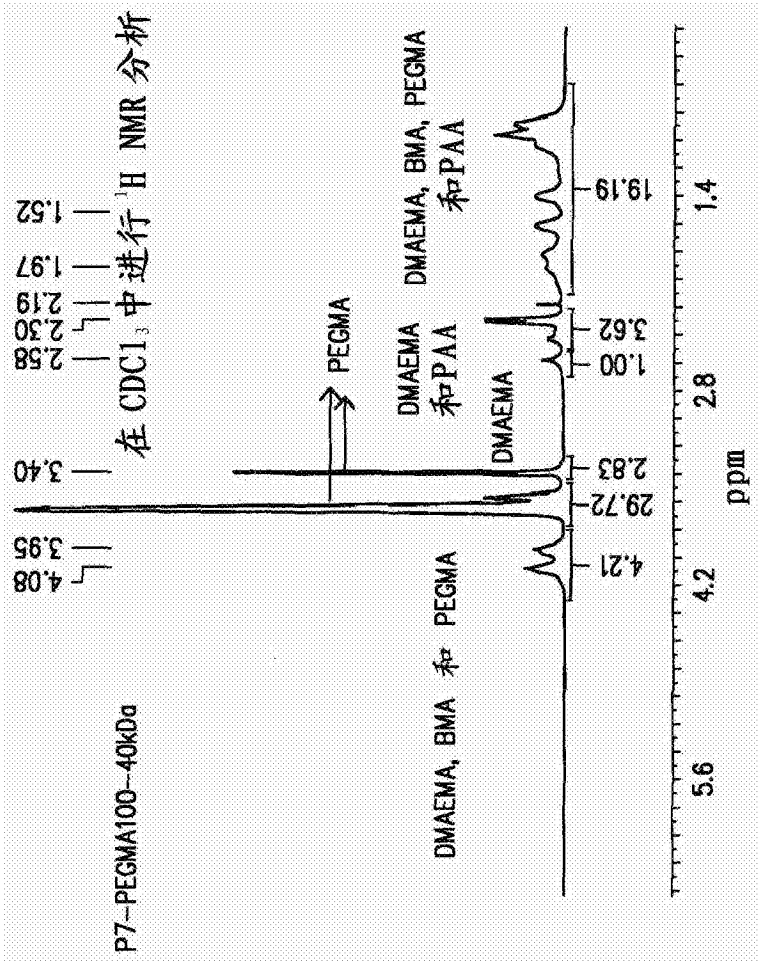


图3B

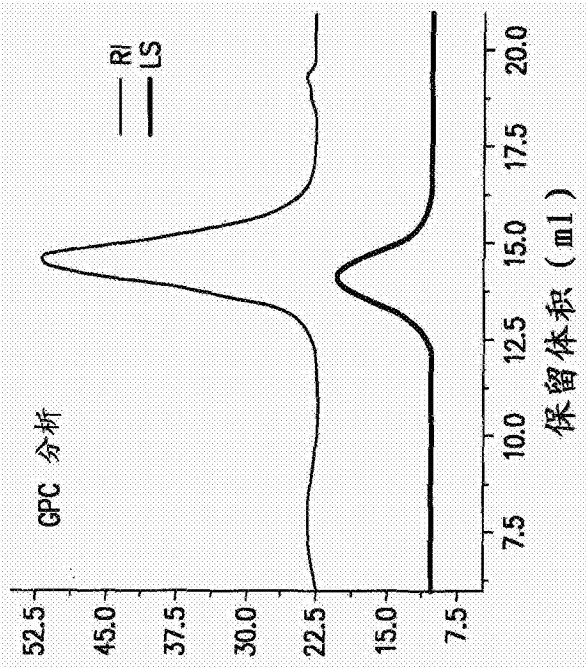


图3C

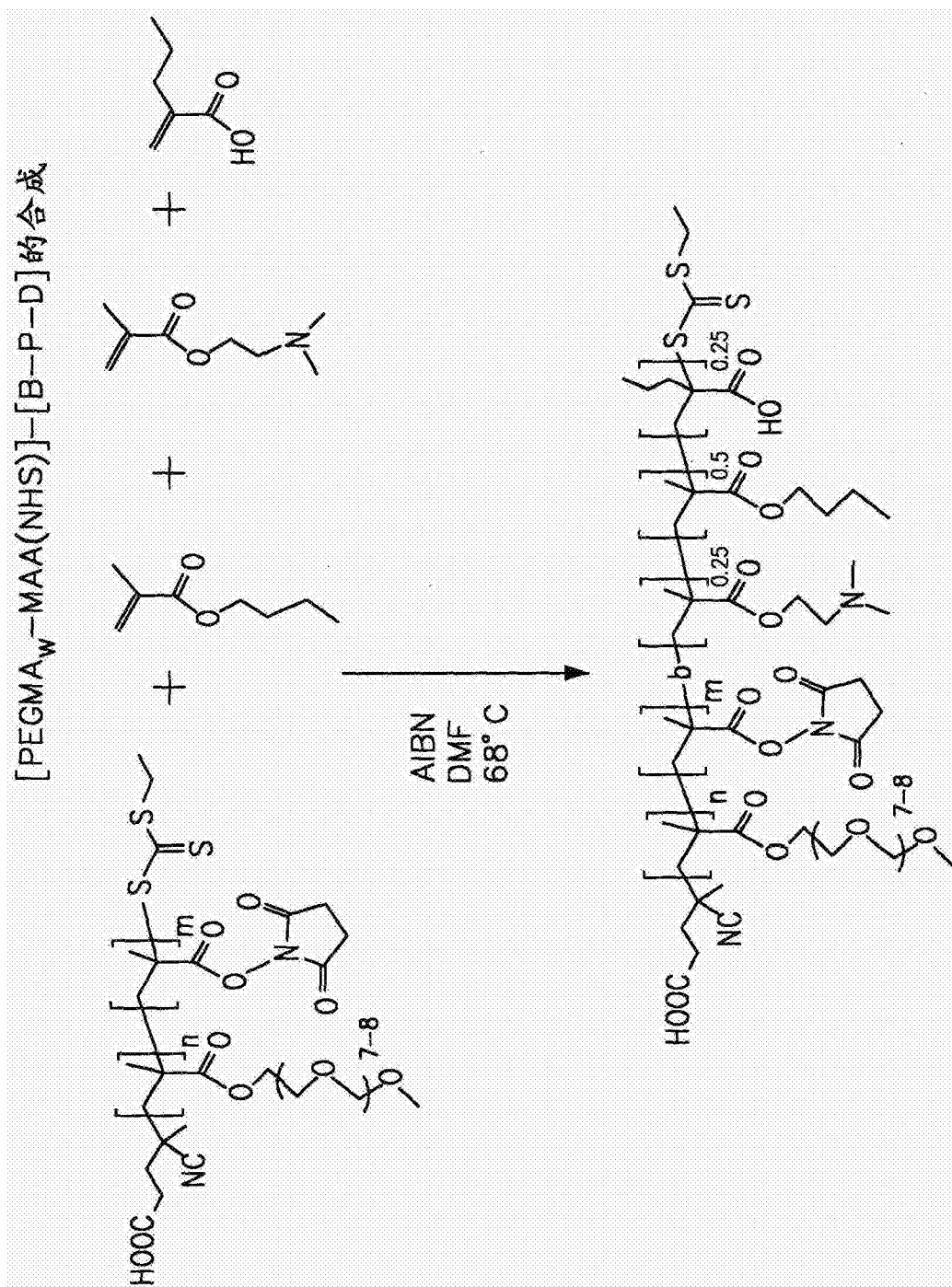


图5

PEGMA和MAA-NHS的RAFT共聚合

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

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

图 6A

DMF=3.0g; N₂净化: 30min; 在 68℃进行聚合, 聚合时间 2h 5m
使用分子量截留膜 2K, 将共聚物对甲醇(1L×8)透析 50 小时; 在通风橱内除去甲醇,
真空干燥 3 小时, 最后冻干 3 小时

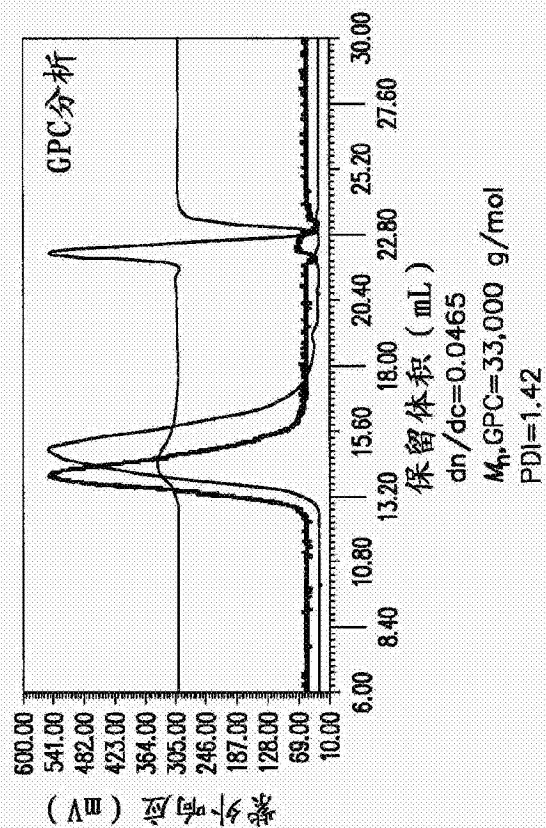


图 6B

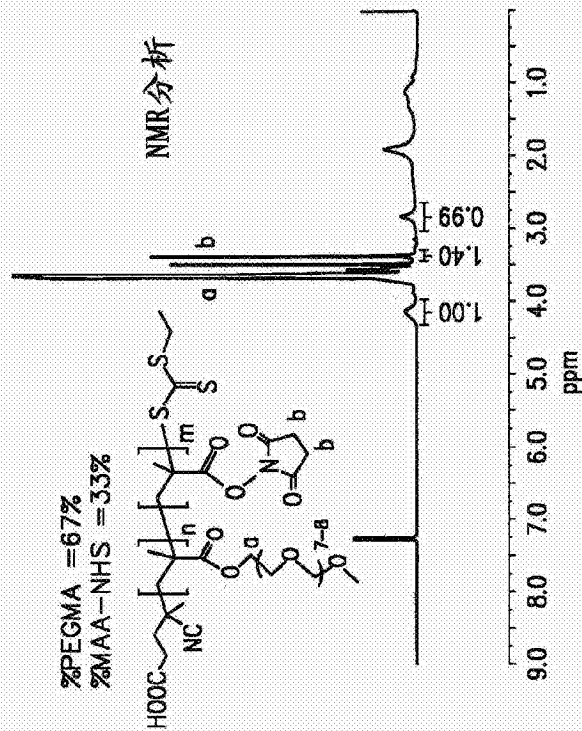


图 6C

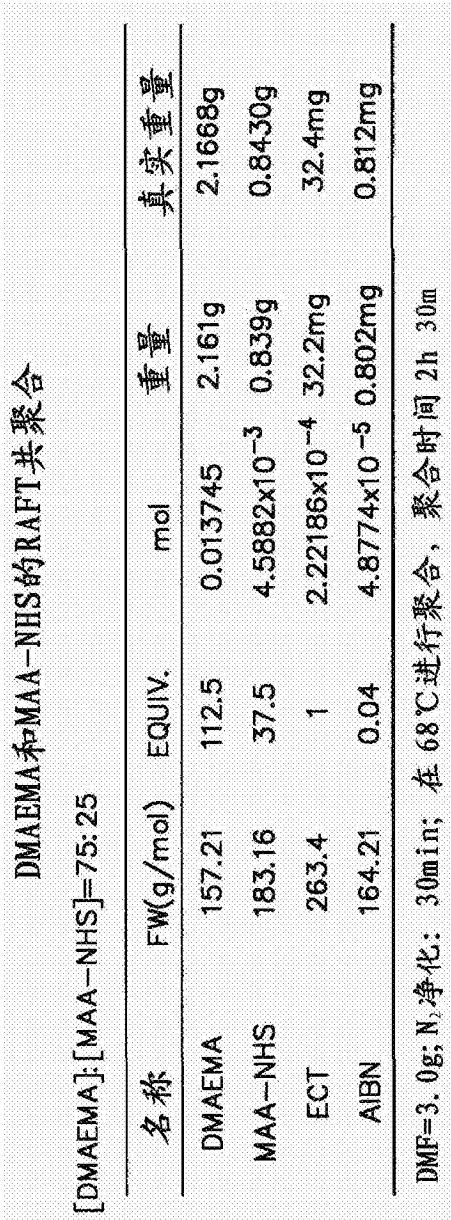


图7A

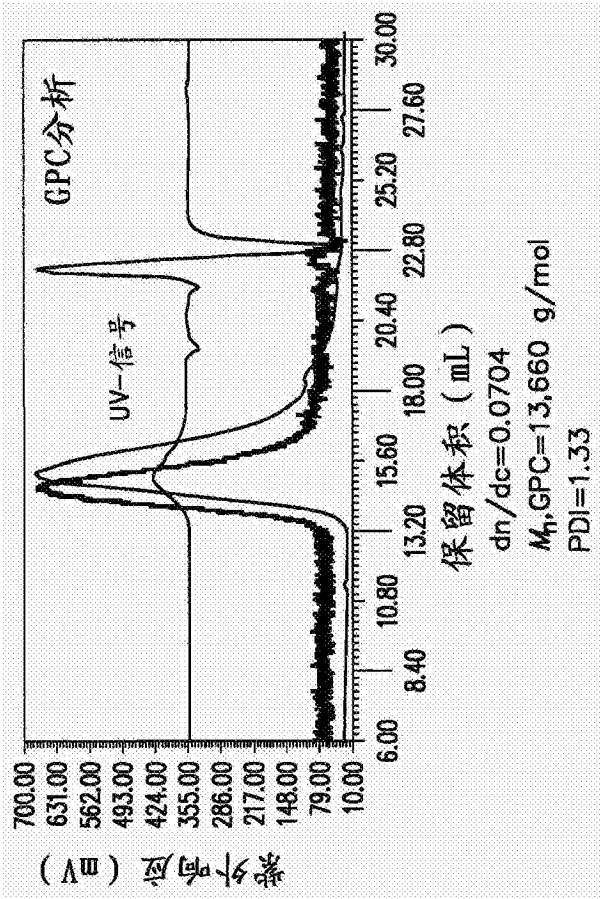


图7B

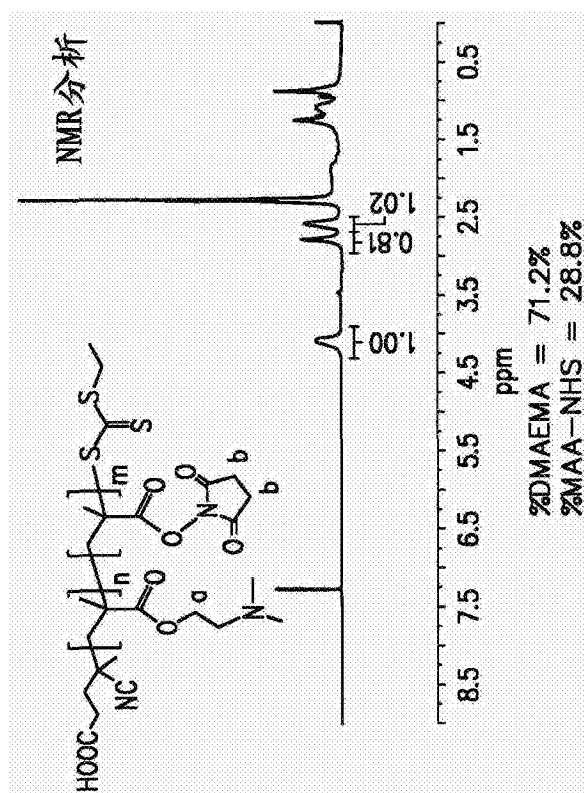


图7C

PDSMA的合成

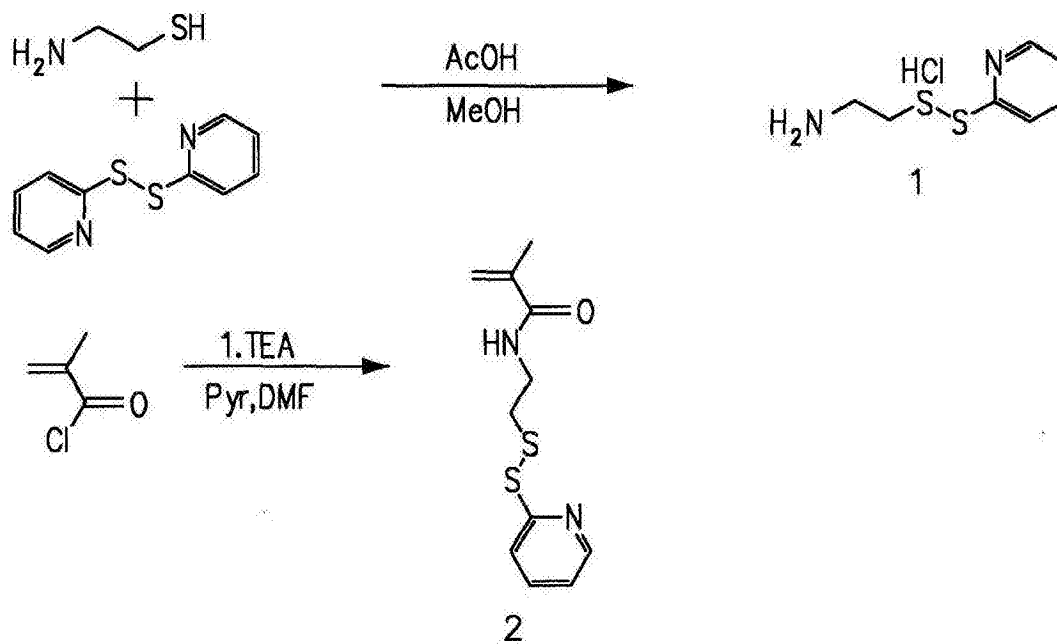


图8

合成HPMA-PDSMA共聚物用于siRNA缀合

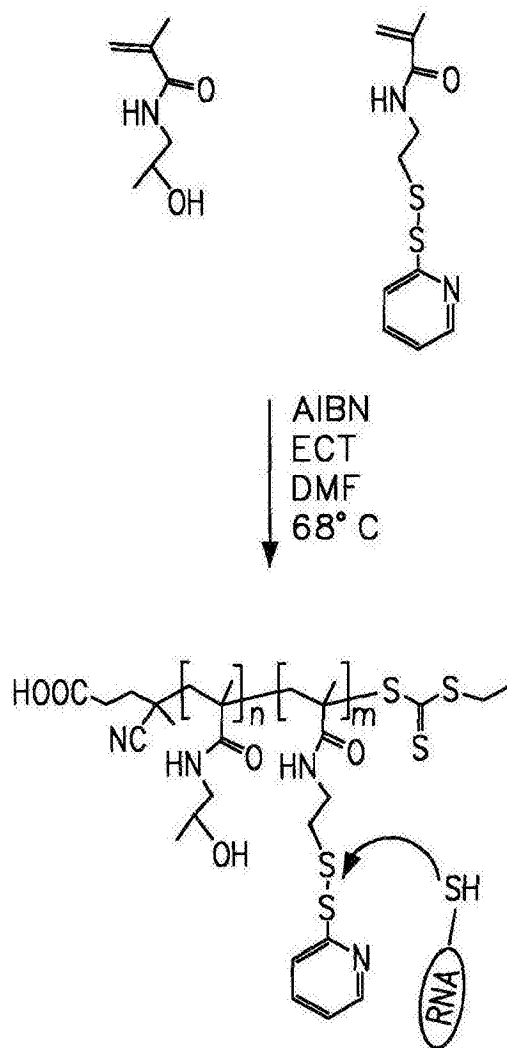


图9

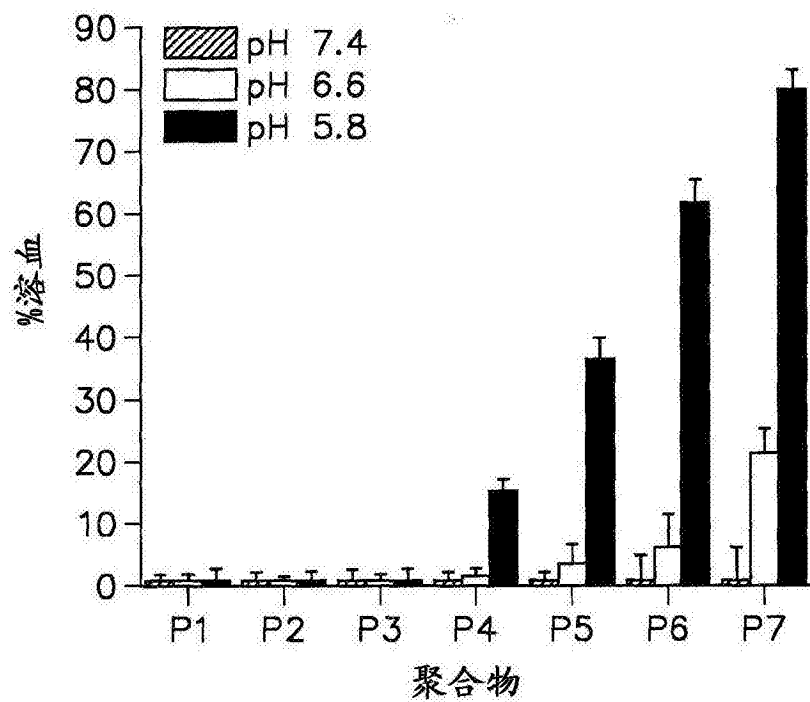


图10A

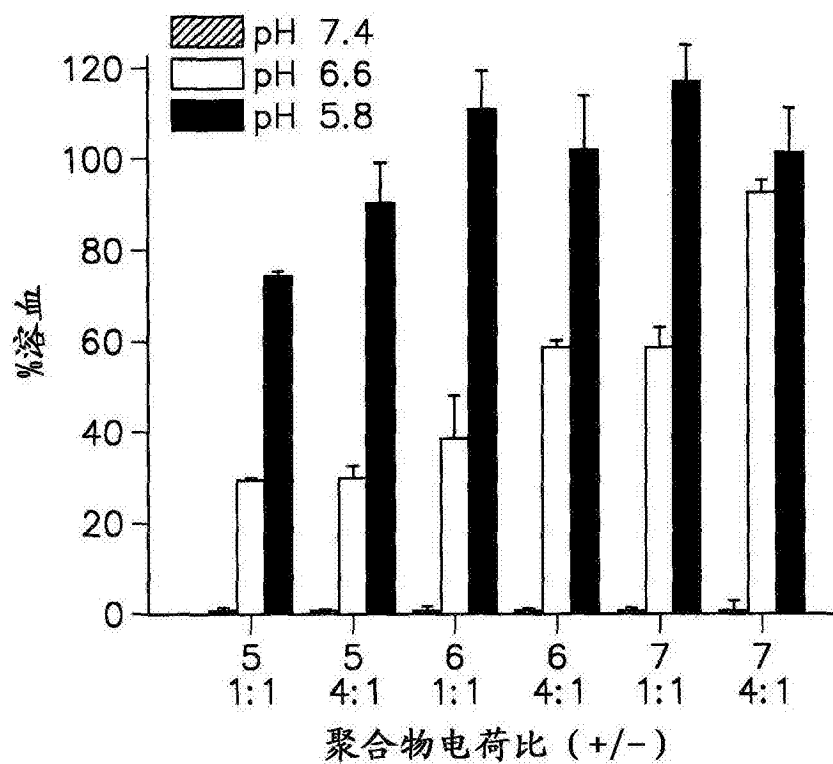


图10B

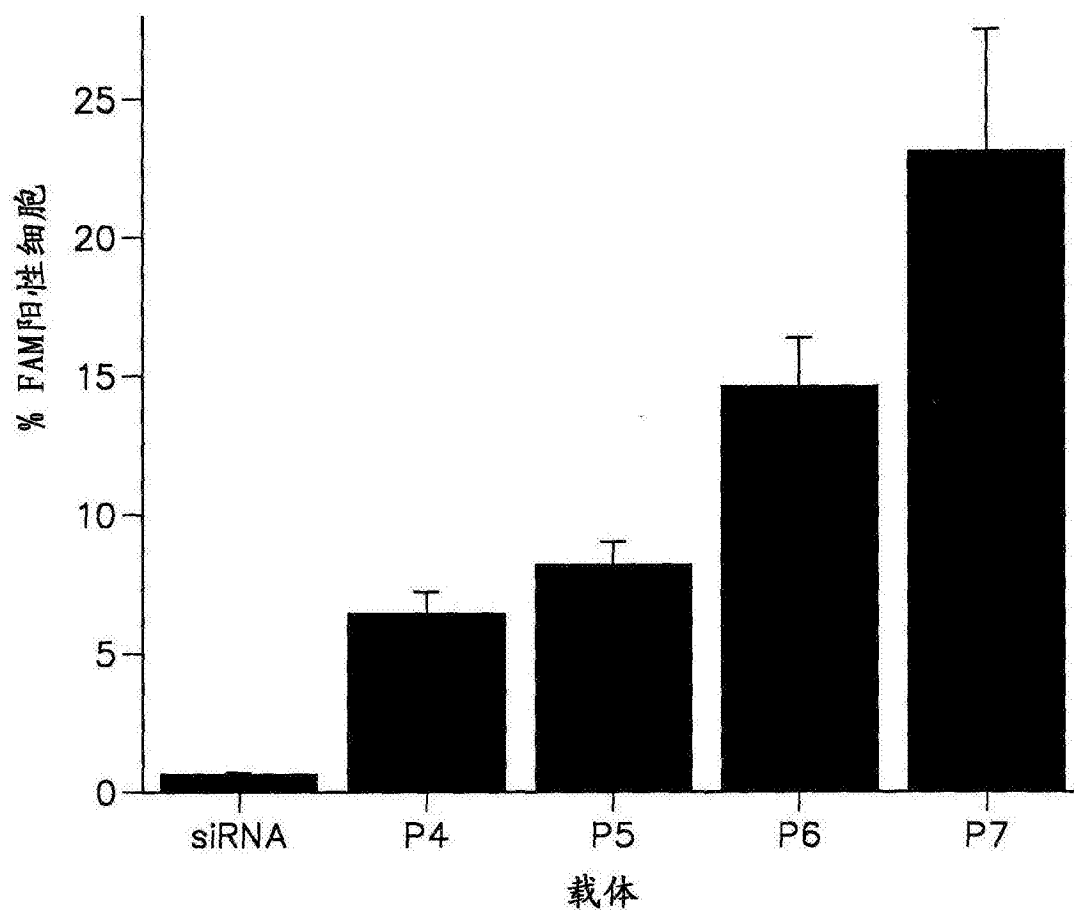


图11

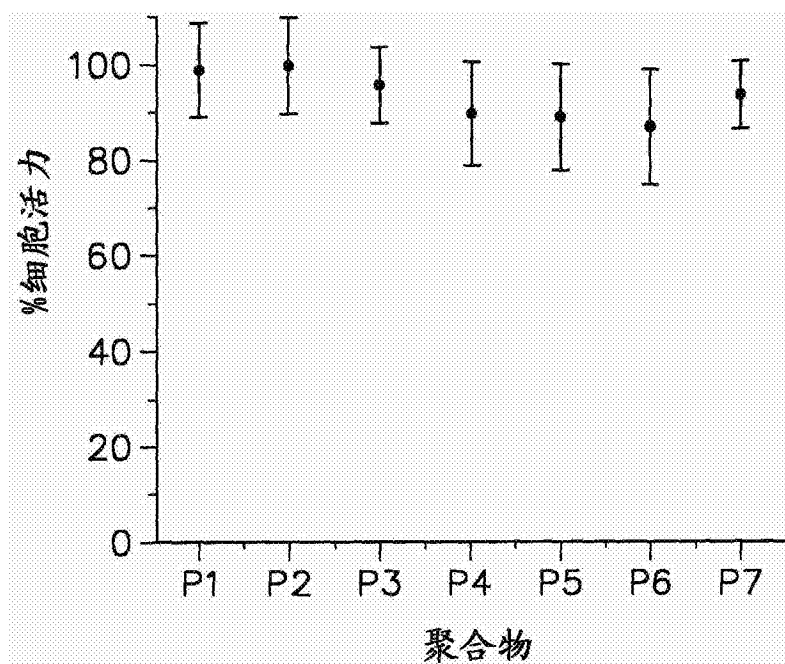


图12A

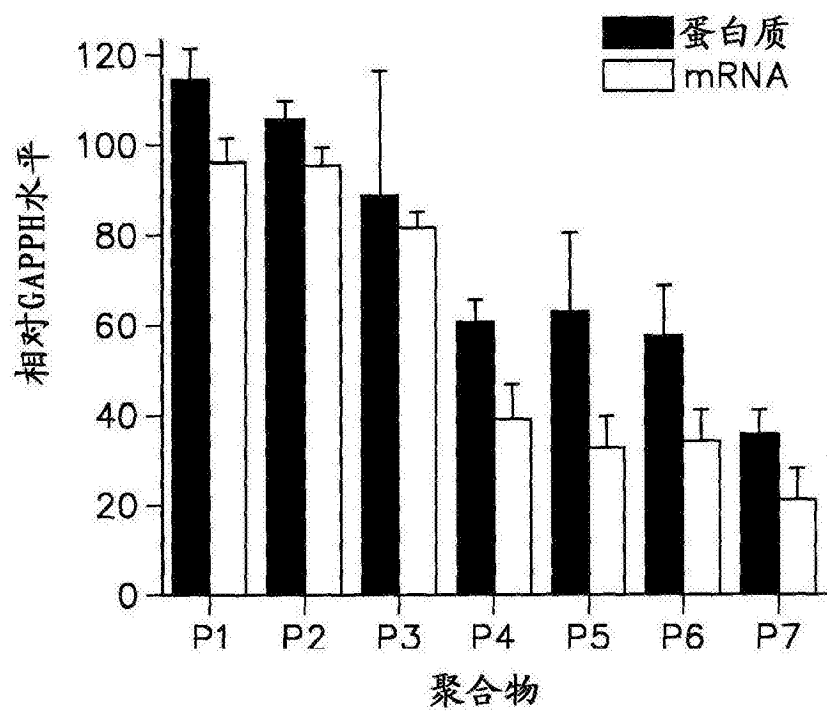


图12B

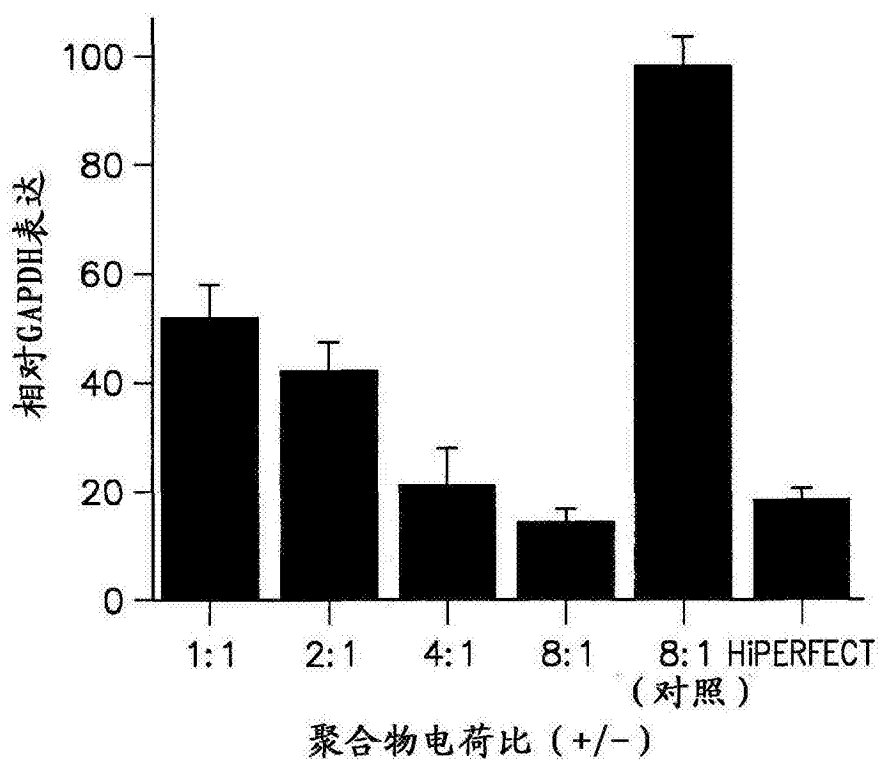


图13A

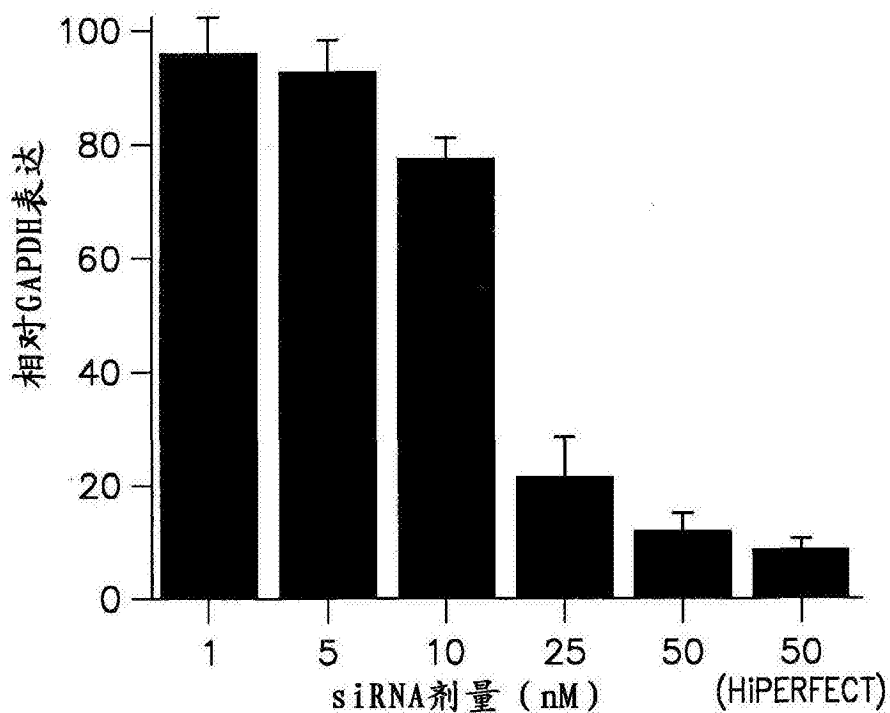


图13B

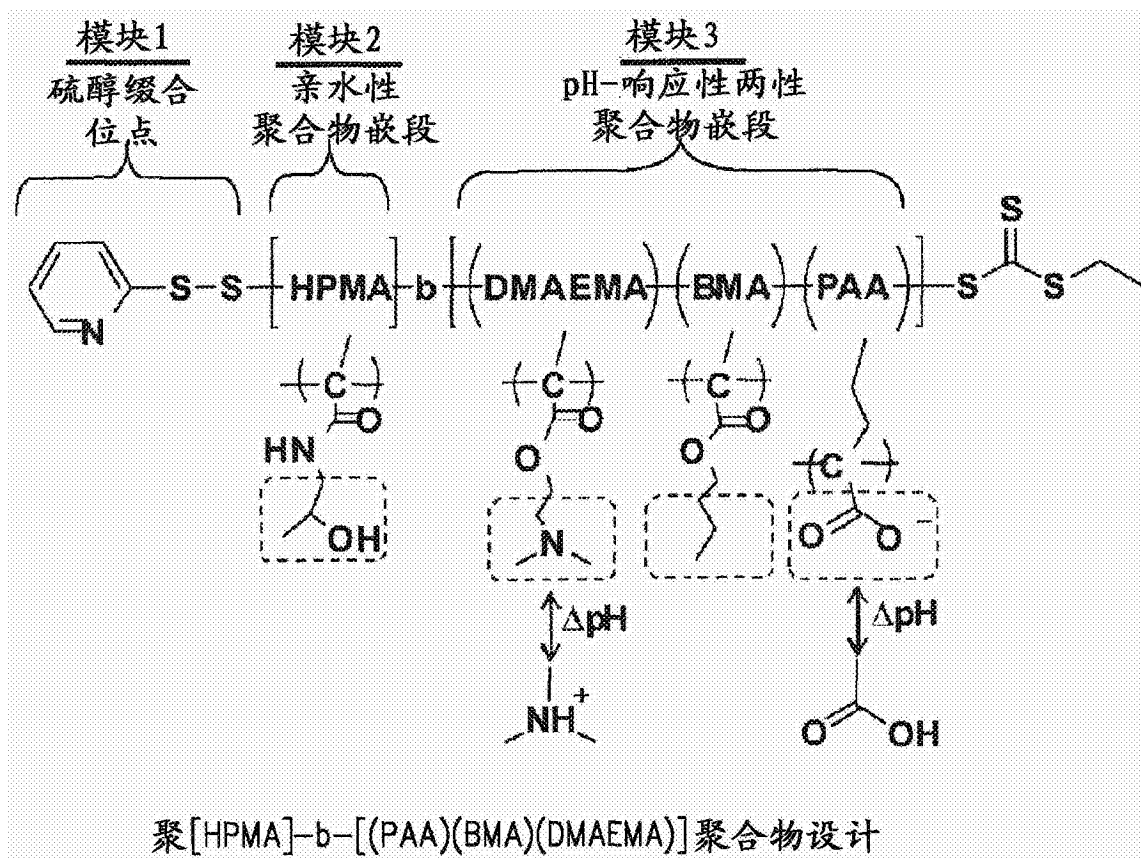


图14

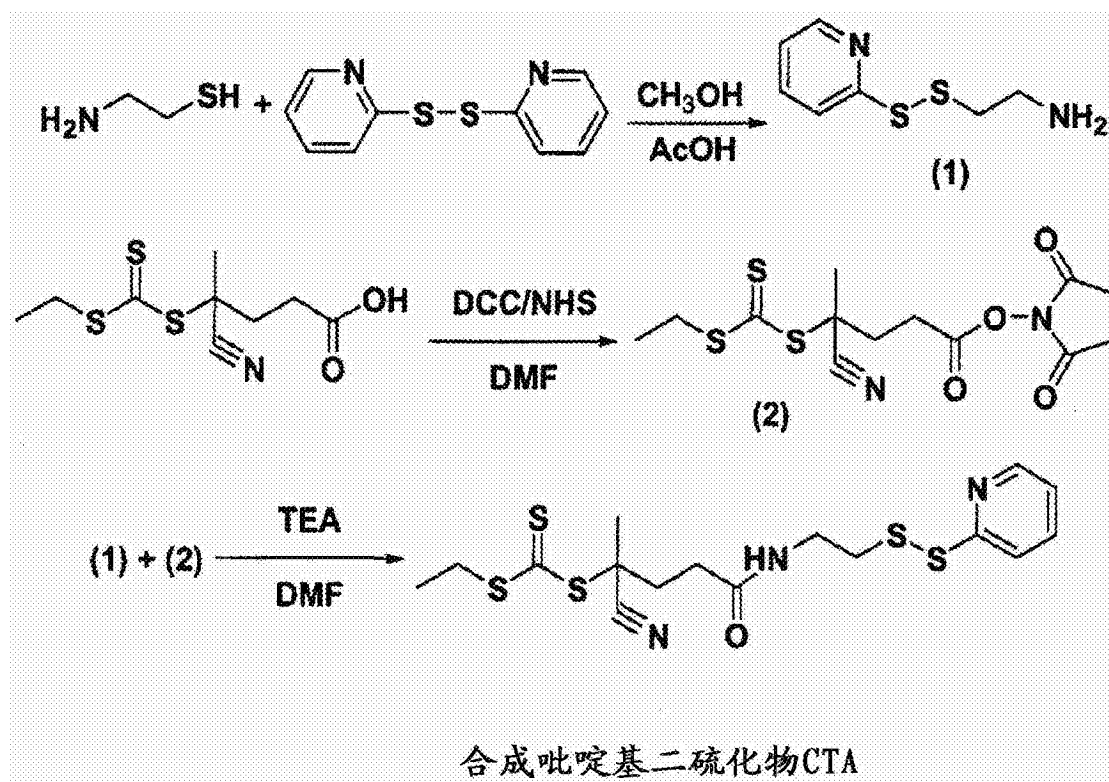


图15

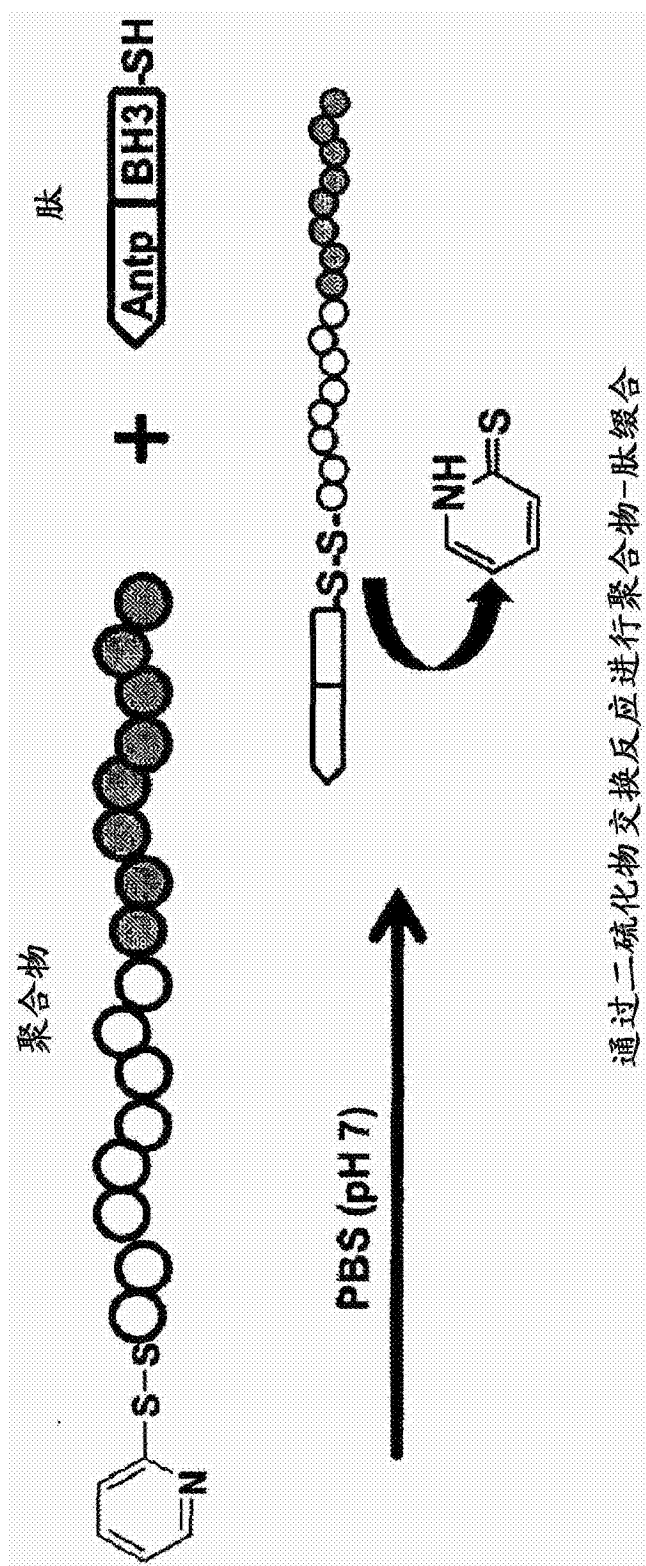
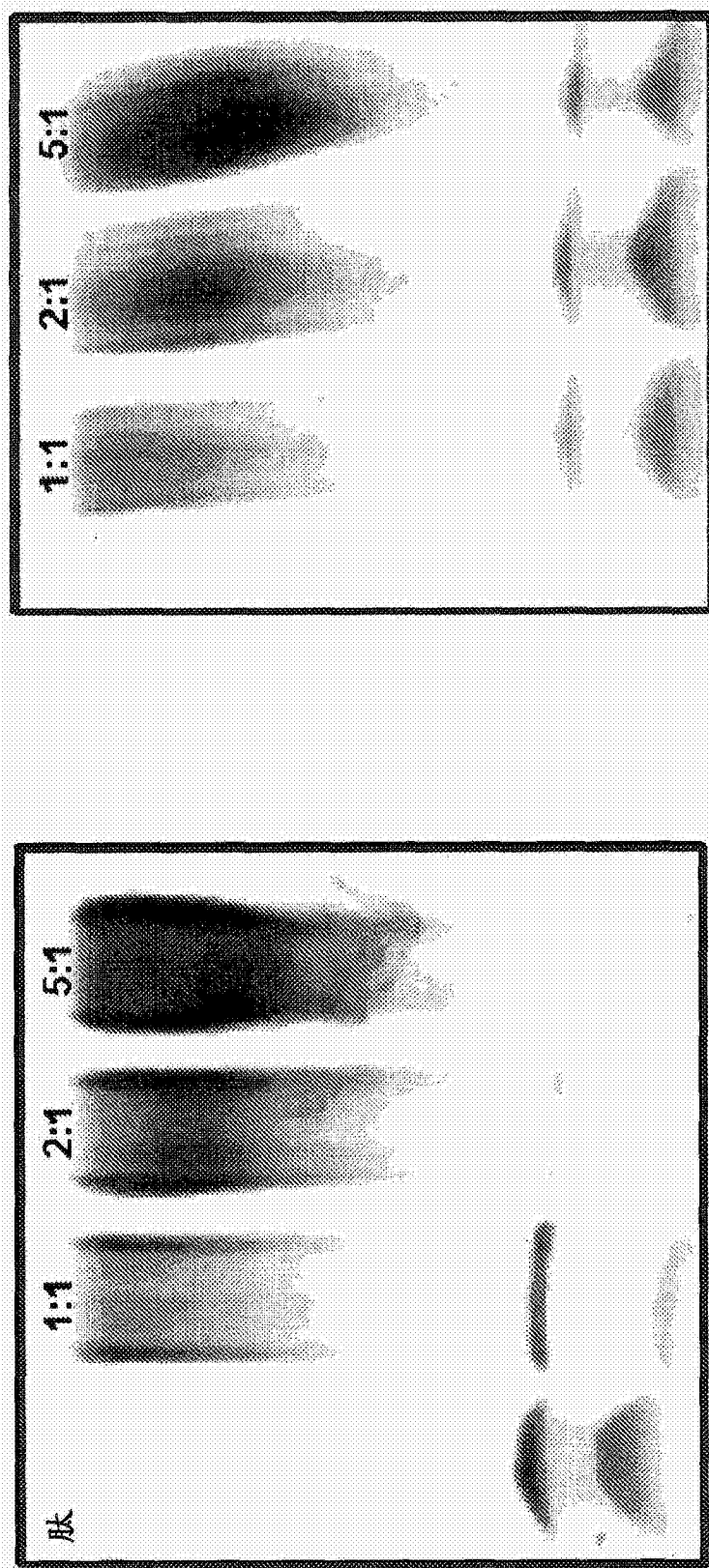


图16



SDS PAGE二凝胶证实经过可还原的二硫键进行聚合物-肽缓合

图17A

图17B

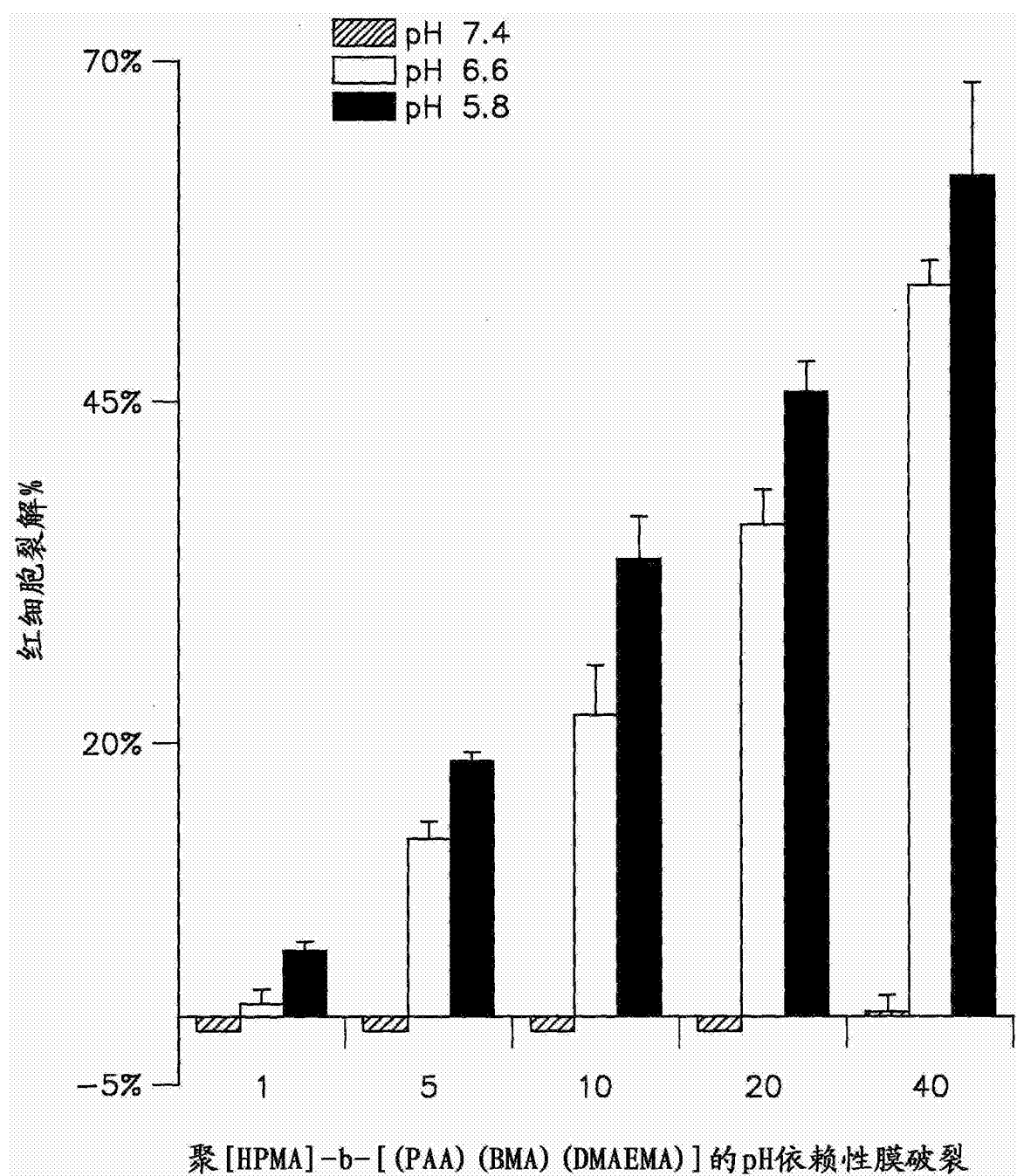
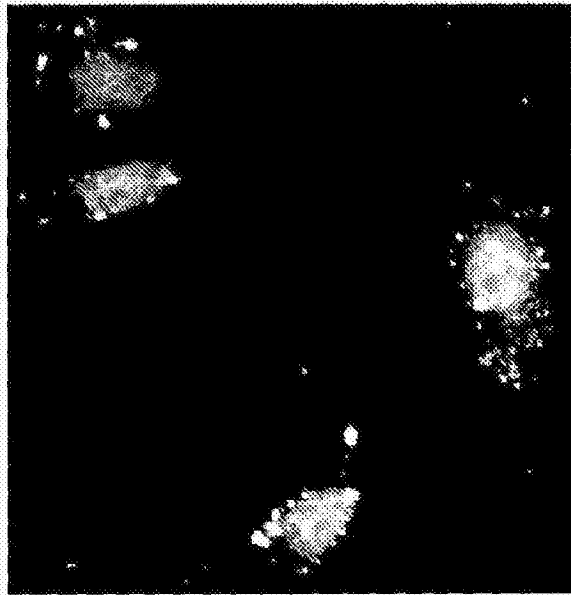
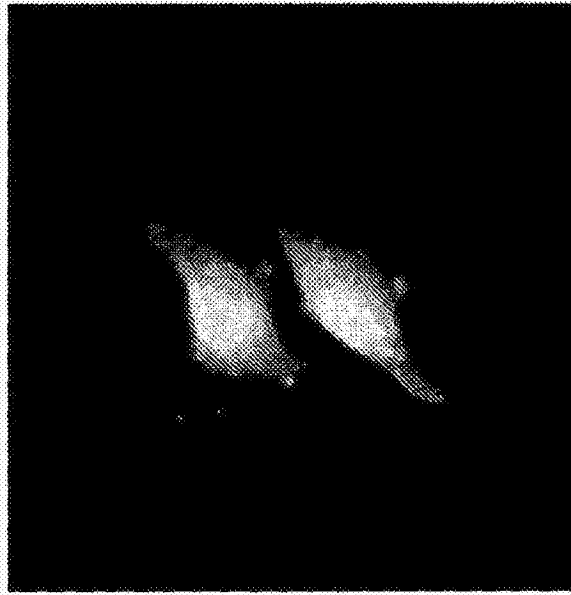


图18



肽

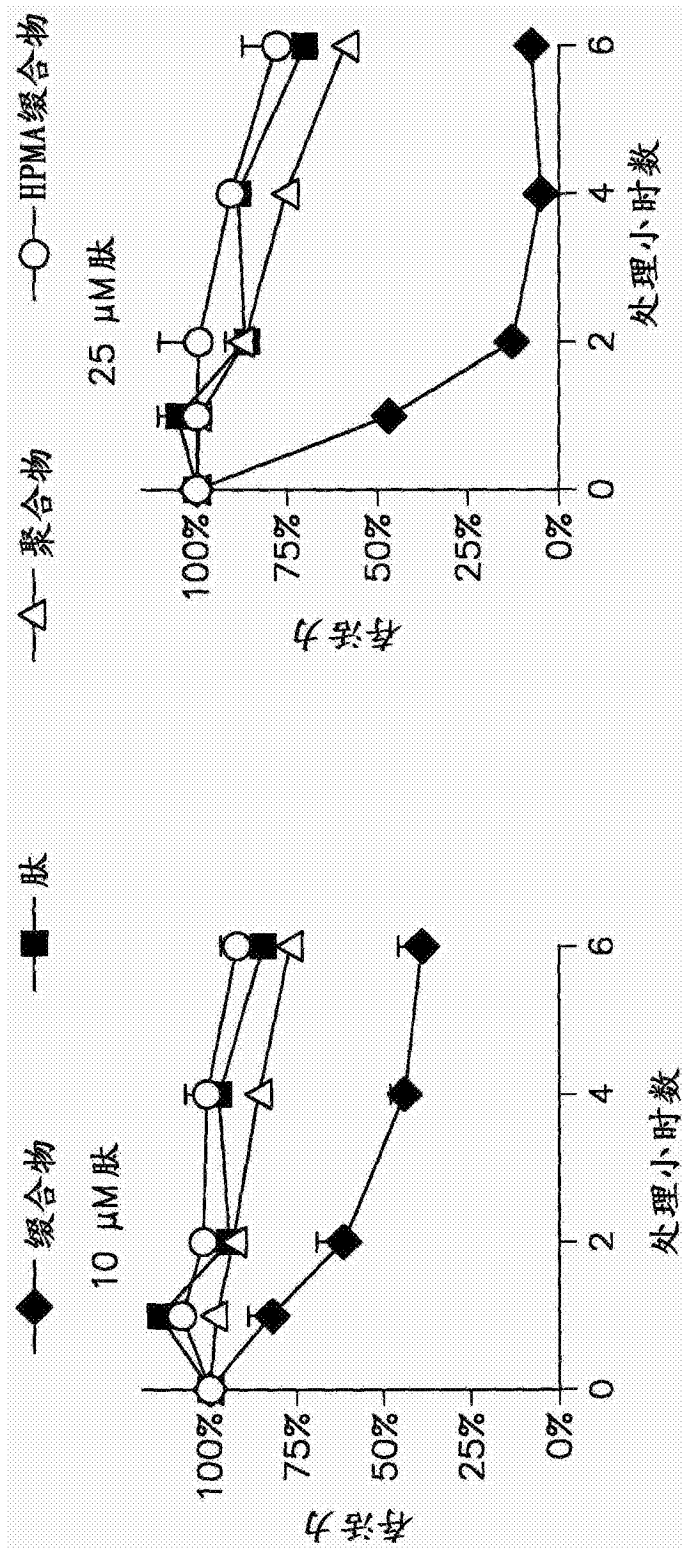


缓合物

聚合物增强胞内肽递送

图19A

图19B



聚[HPMA]-b-[(PAA)(BMA)(DMAEMA)]-Anpt-BH3 缓合物诱导HeLa细胞死亡

图 20A

图 20B

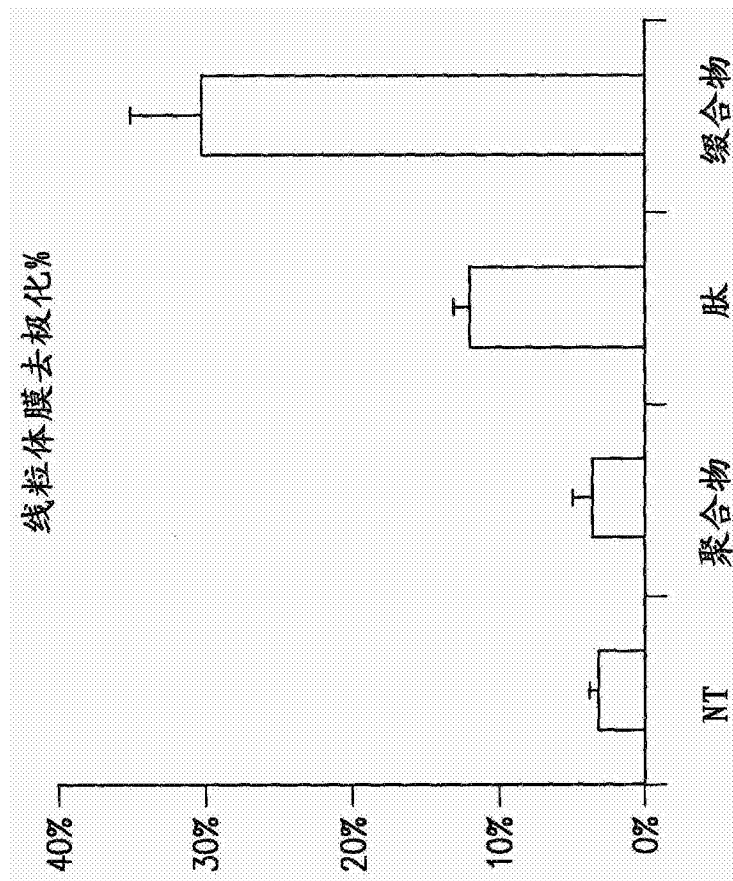


图21A

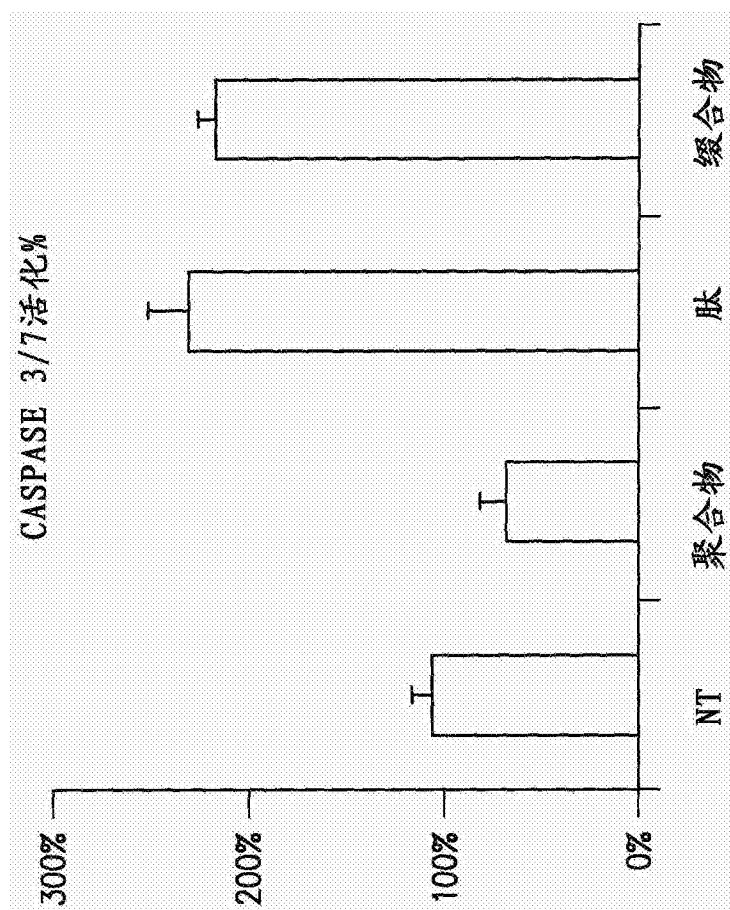


图21B