权 利 要 求

1.一种用于构建基于结合N-乙酰半乳糖胺多肽的mRNA靶向分子的DNA片段，其特征在于：所述DNA片段包括依次连接的启动子、目的基因、特异性蛋白酶剪切序列、能结合N-乙酰半乳糖胺的多肽GBD序列。

2.根据权利要求1所述的用于构建基于结合N-乙酰半乳糖胺多肽的mRNA靶向分子的DNA片段，其特征在于：所述能结合N-乙酰半乳糖胺的多肽GBD序列为SEQ ID No.1~5中的一种或几种的组合。

3.根据权利要求2所述的用于构建基于结合N-乙酰半乳糖胺多肽的mRNA靶向分子的DNA片段，其特征在于：所述目的基因的序列如SEQ ID No.6或SEQ ID No.7所示。

4.根据权利要求1~3任意一项所述的用于构建基于结合N-乙酰半乳糖胺多肽的mRNA靶向分子的DNA片段，其特征在于：所述特异性蛋白酶剪切序列为带有GBD序列的T2A、P2A、E2A、F2A、TEV、VLP1和SUMO特异性蛋白酶酶切序列中的一种或几种。

5.根据权利要求4所述的用于构建基于结合N-乙酰半乳糖胺多肽的mRNA靶向分子的DNA片段，其特征在于：所述特异性蛋白酶剪切序列如SEQ ID No.9或SEQ ID No.10所示。

6.根据权利要求1~4任意一项所述的用于构建基于结合N-乙酰半乳糖胺多肽的mRNA靶向分子的DNA片段，其特征在于：所述启动子为T3、T7或SP6启动子。

7.一种结合N-乙酰半乳糖胺多肽的mRNA靶向分子，其特征在于：其包括mRNA分子，所述mRNA分子采用包含如权利要求1~5任意一项所述的DNA片段的质粒通过体外转录得到；

所述mRNA分子的序列依次包含5'帽子、目的基因序列、特异性蛋白酶剪切序列和多肽GBD蛋白；

所述多肽GBD蛋白为所述GBD序列通过核糖体翻译得到；

所述 mRNA 分子的 GBD 序列端通过噁唑霉素连接 GBD 蛋白，所述 GBD 蛋白通过酶催化反应连接 N-乙酰半乳糖胺。

8.一种如权利要求 7 所述的基于结合 N-乙酰半乳糖胺多肽的 mRNA 靶向分子的制备方法，其特征在于：包括以下步骤：

步骤 S1，根据所递送的组织、器官或细胞选取特异性细胞表面受体，设计能结合 N-乙酰半乳糖胺的多肽 GBD 序列，并将启动子序列、目的基因序列、特异性蛋白酶剪切序列、GBD 序列组合克隆到质粒载体中，得到质粒 DNA；

步骤 S2，以步骤 S1 的质粒 DNA 为模板进行体外转录，得到含有 5’帽子、目的基因序列、特异性蛋白酶剪切序列、GBD 序列的 mRNA 序列。

9.一种如权利要求 7 所述的基于结合 N-乙酰半乳糖胺多肽的 mRNA 靶向分子的应用，其特征在于：用于制备特异性药物递送的 mRNA 药物中，3’端连接有 N-乙酰半乳糖胺，通过 N-乙酰半乳糖胺与肝脏细胞表面唾液酸糖蛋白受体特异性结合引物细胞内吞，从而使 mRNA 进入细胞进行表达。

10.一种 mRNA-噁唑霉素-GBD-GalNAc 复合物的制备方法，其特征在于：包括以下步骤：

步骤 S1，根据所递送的组织、器官或细胞选取特异性细胞表面受体，设计能结合 N-乙酰半乳糖胺的多肽 GBD 序列，并将启动子序列、目的基因序列、特异性蛋白酶剪切序列、GBD 序列组合克隆到质粒载体中，得到质粒 DNA；

步骤 S2，以步骤 S1 的质粒 DNA 为模板进行体外转录，得到含有 5’帽子、目的基因序列、特异性蛋白酶剪切序列、GBD 序列的 mRNA 序列；

步骤 S3，在 T4 连接酶的作用下，所述 mRNA 分子与 DNA-噁唑霉素连接体结合，形成 mRNA-噁唑霉素复合体；

步骤 S4，将步骤 S3 得到的 mRNA-噁唑霉素复合体进行体外翻译，所述 mRNA-噁唑霉素复合体被核糖体翻译出基因功能蛋白-特异性蛋白

酶剪切序列-GBD 的融合蛋白序列；

步骤 S5，翻译结束时，嘌呤霉素通过核糖体 A 位连接到抗体的尾部，形成 mRNA-嘌呤霉素-GBD-特异性蛋白酶剪切序列-基因功能蛋白复合物；

步骤 S6，对步骤 S5 得到的产物采用特异性蛋白酶进行剪切，mRNA-嘌呤霉素- GBD -特异性蛋白酶剪切序列-基因功能蛋白复合物中特异性蛋白酶剪切序列-基因功能蛋白部分被剪切，得到 mRNA-嘌呤霉素-GBD 复合物；

步骤 S7，在 N-乙酰半乳糖胺转移酶作用下，N-乙酰半乳糖胺特异性地与 GBD 蛋白序列结合，形成 mRNA-嘌呤霉素-GBD-GalNAc 复合物。

11.根据权利要求 10 所述的 mRNA-嘌呤霉素-GBD-GalNAc 复合物的制备方法，其特征在于：所述 DNA-嘌呤霉素连接体的序列如 SEQ ID No.8 所示；所述 GBD 序列如 SEQ IDNo.1~5 任一所示。

12.根据权利要求 10 所述的 mRNA-嘌呤霉素-GBD-GalNAc 复合物的制备方法，其特征在于：步骤 S1 中，所述质粒载体改造自 pCDNA3.1。

13.根据权利要求 10 所述的 mRNA-嘌呤霉素-GBD-GalNAc 复合物的制备方法，其特征在于，步骤 S7 中，GBD 蛋白序列结合 1 个 N-乙酰半乳糖胺、结合 2 个 N-乙酰半乳糖胺、结合 3 个 N-乙酰半乳糖胺或结合 n 个 N-乙酰半乳糖胺。

14.一种 GalNAc-mRNA 递送系统，其特征在于，包括权利要求 10~13 任意一项所述的制备方法制备获得的 mRNA-嘌呤霉素-GBD-GalNAc 复合物。

15.权利要求 14 所述的 GalNAc-mRNA 递送系统在靶向治疗肝脏疾病中的应用。

16.根据权利要求 15 所述的应用，其特征在于，将所述 GalNAc-mRNA 递送系统导入体内。