基于结合 N-乙酰半乳糖胺多肽的 mRNA 靶向分子及其制备方法

本申请要求于 2019 年 12 月 17 日提交中国专利局、申请号为 201911300610.2、发明名称为“基于结合 N-乙酰半乳糖胺多肽的 mRNA 靶向分子及其制备方法”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本发明属于生物技术领域，尤其涉及基于结合 N-乙酰半乳糖胺多肽的 mRNA 靶向分子及其制备方法。

背景技术

去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor，ASGPR)是数量丰富的一种异源低聚物的内吞型受体，主要存在于肝脏实质细胞朝向窦状隙一侧的细胞膜表面，具有对糖的特异性，是肝细胞特异性表达的一种内吞型受体。近年来，利用 ASGPR 的高亲和性配体 N-乙酰半乳糖胺（GalNAc）作为靶向分子，在核酸药物，如小干扰 RNA（Small interfering RNA，siRNA）的肝靶向递送方面取得了突破性进展。尽管该受体已被发现多年，但基于该受体及其配体的信使 RNA(Messenger RNA, mRNA)递送系统未能取得突破，原因在于，现有技术手段无法实现 mRNA 与 GalNAc 的有效耦合。

目前，mRNA 向细胞内的递送可以通过不同的方法实现，例如电穿孔，声孔效应，显微注射或基于高分子化合物的细胞转染，但这些方法对细胞是相对有毒的，临床转化具有一定难度。

发明内容

针对以上技术问题，本发明公开了基于结合 N-乙酰半乳糖胺多肽的 mRNA 靶向分子及其制备方法，通过全新的 mRNA 合成与修饰策略，实现对成熟 mRNA 分子的 GalNAc 修饰，从而实现 mRNA 肝脏靶向性药物递送，对创新基础研究、新型药物设计与开发均具有十分重要的意义。

为了实现上述发明目的，本发明提供了以下技术方案：

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，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和能结合 N-乙酰半乳糖胺的多肽 GBD（GlaNAc Binding Domain, GBD）序列。

采用此技术方案，该 DNA 片段可以用于构建基于结合 N-乙酰半乳糖胺多肽的 mRNA 靶向分子。

作为本发明的进一步改进，所述 GBD 序列为 SEQ ID No.1~5 中的一种或几种的组合。

作为本发明的进一步改进，所述目的基因的序列如 SEQ ID No.6 或 7 所示。其中，所述的目的基因可以替换为其他的基因，可以根据治疗不同的疾病选择相应的目的基因。

作为本发明的进一步改进，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。

作为本发明的进一步改进，所述启动子为 T3、T7 或 SP6 启动子。

本发明还公开了一种基于结合 N-乙酰半乳糖胺多肽的 mRNA 靶向分子，其包括 mRNA 分子，所述 mRNA 分子为采用包含如上所述的 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、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 序列端通过嘌呤霉素连接 GBD 蛋白，所述 GBD 蛋白通过酶催化反应连接 N-乙酰半乳糖胺。

采用此技术方案，以上述 DNA 片段为模板在体外转录合成含有 5'帽子、目的基因序列、特异性蛋白酶剪切序列、GBD 序列的 mRNA 分子；在 T4 连接酶的作用下，mRNA 分子与 DNA-嘌呤霉素连接体结合，并形成 mRNA-嘌呤霉素复合体；通过体外翻译系统，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；对此产物进行特异性蛋白酶剪切，得到 mRNA-嘌呤霉素-GBD 复合物。

嘌呤霉素(Puromycin)是转运 RNA（tRNA, transfer RNA）的类似物，在转录过程中能够结合到核糖体的 A 位并与正在合成的多肽片段形成肽

键并阻止肽段的延伸。此外嘌呤霉素还可以结合到 RNA 或 DNA 的 3’端，利用这些性质，通过将带有嘌呤霉素的特殊肽段结合到 RNA 分子 3’端，可以形成一个肽段-RNA 的融合分子（peptide-RNA fusion product）。本发明的技术方案，基于这一原理，设计并合成 mRNA-肽段融合分子，通过在特殊肽段上进行 GalNAc 修饰实现 mRNA 分子与 GalNAc 的耦合，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，使得 mRNA 分子能靶向肝脏细胞，从而实现 mRNA 药物分子的特异性递送。

本发明还公开了一种如上所述的基于结合 N-乙酰半乳糖胺多肽的 mRNA 靶向分子的制备方法，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，并设计能结合 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-嘌呤霉素连接体结合，并形成 mRNA-嘌呤霉素复合体；

步骤 S4，将步骤 S3 得到的 mRNA-嘌呤霉素复合体进行体外翻译，所述 mRNA-嘌呤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。

作为本发明的进一步改进，所述 GBD 序列如 SEQ ID No.1~5 所示。

SEQ ID No.1

GGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGC

SEQ ID No.2

GGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGC

SEQ ID No.3

GGCGGCAGCGGCGGCAGCGGCGGCAGC

SEQ ID No.4

GGCAGCGGCAGCGGCAGC

SEQ ID No.5

AGCAGCAGC

作为本发明的进一步改进，所述 DNA-嘌呤霉素连接体的 DNA 的序列如 SEQ ID No.8 所示；

SEQ ID No.8

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACC

作为本发明的进一步改进，步骤 S1 中，所述质粒载体改造自 pCDNA3.1。

本发明还公开了一种如上所述的基于结合 N-乙酰半乳糖胺多肽的 mRNA 靶向分子的应用，所述基于 N-乙酰半乳糖胺的 mRNA 组织特异性递送物质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。

与现有技术相比，本发明的有益效果为：

采用本发明的技术方案，通过将 mRNA 药物分子 3’端连接一段能耦合 GalNAc 的多肽序列，将 GalNAc 连接到 mRNA-多肽复合物中，实现对成熟 mRNA 分子的 GalNAc 修饰；解决了现有的 GalNAc 缀合技术只能实现 GalNAc 直接与短片段 RNA 耦合的难题。进一步的，利用肝脏细胞上 N-乙酰半乳糖胺形成连接有能特异性结合特定的目标细胞，从而增加 mRNA 药物分子的药效，解决了核酸药物在药物递送过程中的靶向递

送的技术难题，实现了不依赖于物理方法和化学转染试剂的方式，通过对mRNA进行GalNAc修饰达到组织特异性递送的目的。

附图说明

图1是本发明一种基于结合N-乙酰半乳糖胺多肽的mRNA靶向分子的制备方法的流程示意图；其中a）为质粒DNA中DNA片段的示意图；b）为以质粒DNA为模板进行体外转录得到的mRNA与DNA-嘌呤霉素连接体待结合的示意图；c）为mRNA-嘌呤霉素复合体的示意图；d）mRNA-嘌呤霉素复合体进行体外翻译的示意图；e）为翻译结束后得到的mRNA-嘌呤霉素-GBD-特异性蛋白酶剪切得到mRNA-嘌呤霉素-GBD复合物的示意图；f）为mRNA-嘌呤霉素-GBD复合物与GalNAc耦合的示意图；g）为最终得到的mRNA-嘌呤霉素-GBD-GalNAc复合物的示意图；

图2是本发明的GalNAc介导的mRNA肝脏细胞递送系统的原理示意图，其中，GalNAc-mRNA耦合物通过结合肝脏细胞表面ASGPR引起细胞内吞，从而使得mRNA进入细胞；

图3是本发明的GalNAc-mRNA肝脏细胞递送系统的优化的示意图。其中，三联GalNAc-mRNA耦合物对肝脏细胞的转染效率最高；

图4是本发明的GalNAc-mRNA肝脏细胞递送系统与对比例在肝脏细胞中表达绿色荧光蛋白（GFP）的对比示意图；

图5是本发明的GalNAc-mRNA肝脏细胞递送系统与对比例在体内递送荧光素酶（Luc）到肝脏组织的结果示意图。

具体实施方式

为了本发明更容易理解，下面对本发明的具体实施方式结合附图作进一步的详细说明。

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，所述DNA片段包括启动子、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序列依次连接而成。

进一步的，所述GBD序列为SEQ ID No.1~5中的一种或几种的组合。

所述目的基因的序列如SEQ ID No.6或7所示。

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。

所述启动子为 T3、T7 或 SP6 启动子。

基于上述构建的 DNA 片段，本发明公开了基于结合 N-乙酰半乳糖胺多肽的 mRNA 靶向分子，其包括 mRNA 分子，所述 mRNA 分子为采用包含如上所述的 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 序列端通过嘌呤霉素连接 GBD 蛋白，所述 GBD 蛋白通过酶催化反应连接 N-乙酰半乳糖胺。

所述基于 N-乙酰半乳糖胺的 mRNA 组织特异性递送物质采用以下步骤制备得到：

步骤 S1，如图 1 所示，根据所递送的组织、器官或细胞选取特异性细胞表面受体，并设计一段能结合 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)的多肽序列（GBD），并将相关克隆元件组合克隆到 pCDNA3.1 质粒载体中；

步骤 S2，以步骤 S1 的质粒 DNA 为模板进行体外转录，体外转录后生成的 mRNA 序列含有 5'帽子、目的基因序列、带有 GBD 序列的特异性蛋白酶酶切序列；

所述特异性蛋白酶酶切序列为 T2A、P2A、E2A、F2A、TEV、VLP1 和 SUMO 中的一种或几种；

步骤 S3，在 T4 连接酶的作用下 mRNA 分子与 DNA-嘌呤霉素连接体（DNA Puromycine Linker）结合，形成 mRNA-嘌呤霉素复合体；

步骤 S4，将步骤 S3 得到的 mRNA-嘌呤霉素复合体进行体外翻译，所述 mRNA-嘌呤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，在 2A 肽自我剪切作用下或 TEV、VLP1、SUMO 特异性蛋白酶作用下，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-噁唑霉素-GBD-GalNAc 复合物。

其中，所述 DNA-噁唑霉素连接体的序列如 SEQ ID No.8 所示；所述 GBD 序列如 SEQ ID No.1~5 所示。

进一步的，步骤 S1 中，所述质粒载体改造自 pCDNA3.1。

上述基于结合 N-乙酰半乳糖胺多肽的 mRNA 靶向分子用于制备特异性药物递送的 mRNA 药物中，形成 GalNAc 介导的 mRNA 肝脏细胞递送系统，该系统中，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，如图 2 所示。

GBD-GalNAc 序列中的 GBD 有多种设计方案，基于不同的设计，可以根据需要只结合 1 个 GalNAc 的 GBD，结合 2 个 GalNAc 的 GBD，结合 3 个 GalNAc 的 GBD，或结合 n 个 GalNAc 的 GBD；进一步优选的，采用三联 GalNAc-mRNA 耦合物对肝脏细胞的转染效率最高，对比结果如图 3 所示。

具体操作步骤：

细胞转染

接种完293T细胞（购自中国科学院细胞库）后约24h，观察6孔板内的细胞状态，汇合度在88%~92%。在生物安全柜内，配制90%（体积百分含量）DMEM+10%（体积百分含量）FBS培养基。转染前30min弃掉孔板的培养基，每孔加入1ml新鲜培养基，即90%（体积百分含量）DMEM+10%（体积百分含量）FBS培养基。

准备转染体系：取200μl opti-MEM，加入10μg供试品（包括mRNA-GalNAc1、mRNA-GalNAc2、mRNA-GalNAc3、mRNA/lipo2000、mRNA/lipo3000、mRNA/LNP、mRNA/TransIT、mRNA/lipo RNAiMAX、mRNA/In vivo-jetPEI，浓度2μg/μl，5μl）或阴性对照无载体GFP-mRNA。将配制好的转染体系，直接均匀滴加进入培养的细胞中，再前后左右摇匀，使得转染体系均匀分布于细胞上。转染后6h换液，吸掉旧的培养基，每孔换为2ml新鲜培养基（90%DMEM+10%FBS）。转染后36h荧光显微镜下

测定荧光强度。实验结果如图3所示，mRNA-GalNAc组的mRNA表达强度明显高于其他载体组，并且三联GalNAc-mRNA耦合物的转染效率最高。

下面通过具体的实施例进行进一步的举例说明,所举实例只用于解释本发明，并非用于限定本发明的范围。

实施例 1

一种基于结合 N-乙酰半乳糖胺多肽的 mRNA 靶向分子，其为具有肝脏细胞特异性结合能力的新型 mRNA 药物。其中，mRNA 分子的 GalNAc 修饰通过 N-乙酰半乳糖胺转移酶结合到 mRNA-嘌呤霉素- GBD 分子的 GBD 蛋白序列上，形成 mRNA-嘌呤霉素-GBD-GalNAc 分子。嘌呤霉素连接 GBD 多肽序列；所述 mRNA 分子为采用包含上述 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、能结合 N-乙酰半乳糖胺的多肽 GBD 序列，所述 GBD 多肽为所述 GBD 序列通过核糖体翻译得到，其采用如下步骤制备得到：

步骤 S1，根据递送组织为在肝脏细胞，选取目的基因为绿色荧光蛋白 mWasabi，并设计一段能结合 N-乙酰半乳糖胺（GalNAc）的多肽序列（GBD）。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 pCDNA3.1 质粒载体中，得到质粒 DNA。

本实施例中，所述 GBD 序列为 SEQ ID No.1-5 中的一种或几种的组合。

SEQ ID No.1

GGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCGGCAGC

SEQ ID No.2

GGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGC

SEQ ID No.3

GGCGGCAGCGGCGGCAGCGGCGGCAGC

SEQ ID No.4

GGCAGCGGCAGCGGCAGC

SEQ ID No.5

AGCAGCAGC

本实施例采用如 SEQ ID No.2 序列所示的 GBD。

所述目的基因的序列如 SEQ ID No.6 所示。

SEQ ID No.6

GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATC
CTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTG
TCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTG
AAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCC
TCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCC
CGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA
GGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACT
ACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGA
ACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACA
TCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTA
TATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAG
ATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACT
ACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCG
ACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCA
ACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGC
CGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGAAGCTTAGCCAT
GGCTTCCCGCCGGCGGTGGCGGCGCAGGATGATGGCACGCTGCCCA
TGTCTTGTGCCCAGGAGAGCGGGATGGACCGTCACCCTGCAGCCTG
TGCTTCTGCTAGGATCAATGTG

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。本实施例中，采用的特异性蛋白酶剪切序列为 Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-(Gly/Ser)，如 SEQ ID No.9、SEQ ID No.10 所示。

所述启动子为 T3、T7 或 SP6 启动子。本实施例采用 T7 启动子，序列如 SEQ ID No.11 所示：

SEQ ID No.11：TAATACGACTCACTATAGG

所述 DNA-嘌呤霉素连接体的 DNA 的序列如 SEQ ID No.8 所示；

SEQ ID No.8：AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACC

步骤 S2，以步骤 S1 的质粒 DNA 为模板进行体外转录，体外转录后生成的 mRNA 序列含有 5’帽子、基因序列、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序列。

步骤 S3，在 T4 连接酶的作用下，mRNA 分子与 DNA-嘌呤霉素连接体（DNAPuromycine Linker）结合，形成 mRNA-嘌呤霉素复合体；

步骤 S4，将步骤 S3 得到的 mRNA-嘌呤霉素复合体进行体外翻译，所述 mRNA-嘌呤霉素复合体被核糖体翻译出基因功能蛋白-特异性蛋白酶剪切多肽序列-GBD 多肽的融合蛋白序列；

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，在 2A 肽自我剪切作用下或 TEV、VLP1、SUMO 特异性蛋白酶作用下，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 多肽复合物；

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的与 GBD 蛋白序列结合，形成 mRNA-嘌呤霉素-GBD-GalNAc 复合物。

采用 mRNA-嘌呤霉素-GBD-GalNAc 复合物，能与肝脏细胞表面 ASGPR 受体特异性结合，实现 mRNA 的特异性肝脏递送。

采用上述基于结合 N-乙酰半乳糖胺多肽的 mRNA 靶向分子用于制备特异性药物递送的 mRNA 药物，形成 GalNAc 介导的 mRNA 肝脏细胞递送系统，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。通过对比实验显示，如图 4 所示，采用包含该基于结合 N-乙酰半乳糖胺多肽的 mRNA 靶向分子的递送系统与现有 mRNA、

mRNA/LNP 递送系统相比，在肝脏细胞中能更加高效的表达绿色荧光蛋白（GFP）。

具体操作步骤：

细胞转染

接种完293T细胞（购自中国科学院细胞库）后约24h，观察6孔板内的细胞状态，汇合度在88%~92%。在生物安全柜内，配制90%（体积百分含量）DMEM+10%（体积百分含量）FBS培养基。转染前30min弃掉孔板的培养基，每孔加入1ml新鲜培养基，即90%（体积百分含量）DMEM+10%（体积百分含量）FBS培养基。

准备转染体系：取200μl opti-MEM，加入10μg供试品（GFP mRNA-GalNAc，GFP mRNA/LNP，浓度2μg/μl，5μl）或阴性对照无载体GFP-mRNA(浓度2μg/μl，5μl)。将配制好的转染体系，直接均匀滴加进入培养的细胞中，再前后左右摇匀，使得转染体系均匀分布于细胞上。转染后6h换液，吸掉旧的培养基，每孔换为2ml新鲜培养基（90%DMEM+10%FBS）。转染后36h荧光显微镜下测定荧光强度。实验结果如图4所示，mRNA-GalNAc组的mRNA表达强度明显高于LNP载体组。

实施例 2

一种基于结合 N-乙酰半乳糖胺多肽的 mRNA 靶向分子，其采用如下步骤制备得到：

步骤 S1，根据递送组织为在肝脏细胞，选取目的基因为荧光素酶（Luc），并设计一段能结合 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)的多肽序列（GBD），并将相关克隆元件组合克隆到 pCDNA3.1 质粒载体中。其中，质粒 DNA 中 DNA 片段包括启动子、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 序列依次连接而成。

本实施例中，所述 GBD 序列采用如 SEQ ID No.2 序列所示的 GBD。

所述目的基因的序列如 SEQ ID No.7 所示。

SEQ ID No.7

GTGAGCAAGGGCGAGGAGACCACAATGGGCGTAATCAAGCCC
GACATGAAGATCAAGCTGAAGATGGAGGGCAACGTGAATGGCCAC

GCCTTCGTGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCAAGCCCTACGACGGC
ACCAACACCATCAACCTGGAGGTGAAGGAGGGAGCCCCCCTGCCC
TTCTCCTACGACATTCTGACCACCGCGTTCAGTTACGGCAACAGGG
CCTTCACCAAGTACCCCGACGACATCCCCAACTACTTCAAGCAGTC
CTTCCCCGAGGGCTACTCTTGGGAGCGCACCATGACCTTCGAGGAC
AAGGGCATCGTGAAGGTGAAGTCCGACATCTCCATGGAGGAGGAC
TCCTTCATCTACGAGATACACCTCAAGGGCGAGAACTTCCCCCCCA
ACGGCCCCGTGATGCAGAAGGAGACCACCGGCTGGGACGCCTCCA
CCGAGAGGATGTACGTGCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGACGTCA
AGATGAAGCTGCTGCTGGAGGGCGGCGGCCACCACCGCGTTGACT
TCAAGACCATCTACAGGGCCAAGAAGGCGGTGAAGCTGCCCGACTA
TCACTTTGTGGACCACCGCATCGAGATCCTGAACCACGACAAGGAC
TACAACAAGGTGACCGTTTACGAGATCGCCGTGGCCCGCAACTCCA
CCGACGGCATGGACGAGCTGTACAAG

本实施例中，采用的特异性蛋白酶剪切序列为Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-(Gly/Ser)，如SEQ ID No.9和SEQ ID No.10所示。所述启动子为T3、T7或SP6启动子。

本实施例采用T7启动子，序列如SEQ ID No.11所示：

SEQ ID No.11：TAATACGACTCACTATAGG

所述DNA-嘌呤霉素连接体中的DNA的序列如SEQ ID No.8所示；

SEQ ID No.8

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACC

步骤S2，以步骤S1的质粒DNA为模板进行体外转录，体外转录后生成的mRNA序列含有5’帽子，基因序列，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序列。

步骤S3，在T4连接酶的作用下mRNA分子与DNA-嘌呤霉素连接体（DNAPuromycine Linker）结合，形成mRNA-嘌呤霉素复合体；

步骤S4，将步骤S3得到的mRNA-嘌呤霉素复合体进行体外翻译，所述mRNA-嘌呤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，在 2A 肽自我剪切作用下或 TEV、VLP1、SUMO 特异性蛋白酶作用下，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的与 GBD 蛋白序列结合，形成 mRNA-嘌呤霉素-GBD-GalNAc 复合物。

采用上述基于结合 N-乙酰半乳糖胺多肽的 mRNA 靶向分子用于制备特异性药物递送的 mRNA 药物，形成 GalNAc-mRNA 递送系统。

具体操作步骤：

将上述实施例中制备的修饰荧光素酶 Luc mRNA-GalNAc、Luc mRNA/LNP 和 Luc mRNA，通过尾静脉给药方式直接引入小鼠体循环，体内生物荧光信号表征修饰 mRNA 在体内的表达强度。

尾静脉注射

将 Balb/c 小鼠固定在尾静脉注射平台上，分别注射 200μg 的以上三种 mRNA 药物（1μg/μg，200μl）。24 小时后进行荧光成像观察。

小动物成像

将 D-荧光素底物溶解于生理盐水，浓度为 15mg/ml，将 100μl 该溶液经尾静脉注射进入小鼠体内。10min 后，使用 IVIS 小动物成像系统定量分析肺部信号强弱。

通过对比实验显示，如图 5 所示，该 GalNAc-mRNA 递送系统与现有 mRNA、mRNA/LNP 递送系统相比，能更加高效的递送荧光素酶（Luc）到肝脏组织。

以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。