

具有靶向功能的分子及应用

交叉引用

本申请要求2023年11月30日提交的专利名称为“脂质纳米颗粒及纳米颗粒药物”的第2023116272306号中国专利申请以及2024年7月10日提交的专利名称为“具有靶向功能的分子及应用”的第2024109186851号中国专利申请的优先权，其全部公开内容通过引用整体并入本文。

技术领域

本发明涉及医药技术领域，尤其涉及一种具有靶向功能的分子及应用。

背景技术

脂质纳米颗粒 (Lipid Nanoparticle, LNP) 的构成分为四部分：可离子化脂质化合物、胆固醇、磷脂和PEG脂质。LNP是目前比较成熟的递送系统技术平台，可用来递送RNA药物、疫苗或基因编辑工具。目前对LNP构成的研究已较为深入。

LNP的构成对其药物递送性能有较大影响，可离子化脂质化合物是LNP中的核心成份，其决定了mRNA递送和转染效率。实践中，核酸药物在递送过程中容易被非特异性细胞摄取，进而导致核酸药物的剂量较高，副作用明显。

有鉴于此，特提出本发明。

发明内容

为解决上述技术问题，本发明提供了一种具有靶向功能的分子及应用，其能靶向递送药效分子给机体内特定的细胞，减少药物被非特异性细胞摄取从而减少用药剂量和降低药物副作用，达到对疾病更有效的体内精准治疗效果。

具体地，本发明提供的技术方案如下：

第一方面，本发明提供了一种具有靶向功能的分子，包括：

(I) 一条或多条疏水链；

(II) 一个或多个连接体；

(III) 一个或多个纳米抗体。

优选地，所述纳米抗体的数量 ≤ 20 ；优选为1-7个。

优选地，所述纳米抗体与所述连接体中间连接1个包含反应位点的氨基酸，所述氨基酸包括但不限于半胱氨酸、赖氨酸。

优选地，所述纳米抗体通过连接序列连接，所述连接序列位于所述纳米抗体与所述氨基酸之间，所述连接序列包括(GS) n 和/或(GGGS) m ，其中， n 和 m 为相同或不同的数值， n 或 m 的数值选自0、1、2、3或4。

优选地，所述疏水链包括一条或多条取代或未取代的C12-C18烷基。

优选地，所述连接体包含一个或多个结构单元，所述结构单元选自-C(=O)O-、-O-C(=O)O-、-C(=O)NH-、-C(=O)S-、-S-、-S-S-、三氮唑基、胺键、SMCC、Sulfo-SMCC、SATA、作为结构单元的多肽、PEG或者PEG衍生物。

其中，所述PEG衍生物可选为马来酰亚胺官能化的聚乙二醇，如PEG-MAL。

优选地，所述PEG或者PEG衍生物的相对分子质量为500-5000，优选为1000、2000、3000、4000或5000。

优选地，所述的纳米抗体包括对抗原具有特异性的抗原结合结构域，所述抗原为膜蛋白分子。

优选地，所述膜蛋白分子为免疫细胞或免疫相关细胞膜蛋白分子，所述免疫细胞或免疫相关细胞膜蛋白分子包括但不限于CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD25、CD38、CD61、CD42a、CD105、CD90、CD15、CD127、CD56、CD68、CD19、CD11c、CD138、F4/80、CD62P、CD49f、CD31、RANK、ALPL、PDPN、CD34、FcεR1α、CD203c、CD63、CD193、CD66b、CD41、CD117、ASGPR中的一种或多种；

优选地，所述膜蛋白分子为中枢神经系统细胞膜蛋白分子，所述中枢神经系统细胞膜蛋白分子包

括但不限于GD2、GD3、MOG、TMEM119中的一种或多种；

优选地，所述膜蛋白分子为肿瘤相关抗原，所述肿瘤相关抗原包括但不限于CD133、PSMA、CLDN18.2、DLL3、TROP2、EGFRVIII、CA125、MUC1、MUC16、MSLN、CA9、HER2、HER3、TGM4、PSCA、CLDN6、STEAP2、GPC3、IL-13Ra2、EGFR、STEAP1、BCMA、FRa、VEGFR2、PDGFR-β、CEA、NCAM、FAP、SLC2A2、SEZ6L2、LRP11中的一种或多种；

优选地，所述膜蛋白分子为免疫调节分子，所述免疫调节分子包括但不限于B7-H1、B7-H3、B7-H4中的一种或多种；

优选地，所述膜蛋白分子包括但不限于以下靶点：CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD25、CD38、CD61、CD42a、CD105、CD90、CD15、CD127、CD56、CD68、CD19、CD11c、CD138、F4/80、CD62P、CD49f、CD31、RANK、ALPL、PDPN、CD34、FcεR1α、CD203c、CD63、CD193、CD66b、CD41、CD117、ASGPR、GD2、GD3、MOG、TMEM119、CD133、PSMA、CLDN18.2、DLL3、TROP2、EGFRVIII、CA125、MUC1、MUC16、MSLN、CA9、HER2、HER3、TGM4、PSCA、CLDN6、STEAP2、GPC3、IL-13Ra2、EGFR、STEAP1、BCMA、FRa、VEGFR2、PDGFR-β、CEA、NCAM、FAP、SLC2A2、SEZ6L2、LRP11、B7-H1、B7-H3、B7-H4中的一种或多种。

优选地，所述纳米抗体为靶向CD8的纳米抗体，所述纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1-3中任意一条所示；

和/或，所述纳米抗体为靶向CD19的纳米抗体，所述纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:79-81中任意一条所示；

和/或，所述纳米抗体为靶向CD56的纳米抗体；

和/或，所述纳米抗体为靶向CD5的纳米抗体，所述纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:4-78中任意一条所示；

和/或，所述纳米抗体为靶向PSMA的纳米抗体，所述纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:82-83中任意一条所示；

和/或，所述纳米抗体为靶向CD133的纳米抗体，所述纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:84-85中任意一条所示。

本发明中各序列具体如下：

Anti-human CD8 Nb seq（对应序列SEQ ID NO:1-3）

SEQ ID NO:1:

QVQLQESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSTINWNGGSAEYA
EPVKGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLKLEDTAVYYCAKDADLVWYNLSTGQGTQVTVSSAAAYPYD
VPDYGS

SEQ ID NO:2:

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSTINWNGGSAEYAE
PVKGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLKLEDTAVYYCAKDADLVWYNLRTGQGTQVTVSSAAAYPYD
VPDYGS

SEQ ID NO:3:

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQAPGKEREGVSCIRVSDGSTYYADP
VKGRFTISSDNKNTVYQLQMNSLKPEDAAVYYCAAGSLYTCVQSIVVPARPYDMDYWGKGTQVT
VSSAAAYPYDVPDYGS

Anti-human CD5 Nb seq（对应序列SEQ ID NO:4-78）

SEQ ID NO:4:

DVQLQESGGGLVQPGDSLRLSCAASGRTFSSYDMGWFRQAPGKEREFVAAISRSGRDTLHADS
VKGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLKPEDTAVYICAGTGFEYAGSTPYKYPYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:5:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGSIVSIISMGWYRQAPGKQRELIKITTDGTTNYADSVR
GRFTISRDIKKIMYLQMSSLTPEdTAVYFCNRDRLLYGLVKSDWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:6:

DVQLQESGGGFVRPGGSLRLSCAASGPTVSSYTVGWFRQAPGKEREYVATISWSDASTYYADF

VKGRFTISRDIYAKQVVYLQMNSLKPEDTAVYHCAAVFRRVPISATLYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:7:

DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSAFSGRIGVGWYRQAPGKEREFVAVITAGGNTNYADSV
KGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTGYYCNYPGRPWWGQGTQVTVSS

5 SEQ ID NO:8:

DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSAFSGRIGVGWYRQAPGKEREFVAVITAGGNTNYADSV
KGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTGYYCNYPGRPWWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:9:

DVQLQESGGGLVQPGGSLRLACAASGNIFEIHAMYWYRQAPGKQREWVAITTRGSTNVADS
10 VKGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAVYLCNADVFSALTGAGTEYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:10:

DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSAFSGRIGVGWYRQAPGKEREFVAEITAGGNTDYADSV
KGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTGYYCNYPGRPWWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:11:

15 DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGHTLSIYAMTWFRQDSGKDREFVAITWPDYSTYYADS
VKGRFTISGDRPKNTVYLEMNSVKPEDTAVYYCAADRYVNSVPTATPQEWRYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:12:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTISGMSVGWFRQAPGKEREFVAADNWAGAKTSYAD
SVKGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAVYYCAGRTSDGLSTYARIEDYYGWGQGTQVTVSS

20 SEQ ID NO:13:

DVQLQESGGGLAQAGGSLRLSCAASGGIFSIDAAWYRQAPGKERELVAHIFHGGSTTYEDSV
KGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAVYYCYGPPGMAIWGKGTQVTVSS

SEQ ID NO:14:

DVQLQESGGGLVQAGASLSLSCAASGRTVNYVFGMGWFRQALGKEREFVAITRSGGIPLYAD
25 SVKGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAVYYCAIDRQYYSGRNYPQSDPAEYDYWGQGTQVTV
SS

SEQ ID NO:15:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASVRTFSKYDIGWFRQAPGKEREFVATISSSGRSTYYADFA
KGRFGISRDIYAKNTVYLEMNSLKPEDTAVYACAVRLGYSGSETDPRQYAYWGQGTQVTVSS

30 SEQ ID NO:16:

DVQLQESGGGFVQPGGSLRLSCAASGPTVSSYTVGWFRQAPGKEREYVATISWSDASTYYADF
VKGRFTISRDIYAKQVVYLQMNSLKPEDTAVYHCAAVFRRVPISATLYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:17:

DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAPSGGIFSINAAWYRQAPGKERELVAHINHGGSTTYVGSV
35 KGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAVYYCYGPPGMAIWGKGTQVTVSS

SEQ ID NO:18:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGTIFNVMGWYRQAPGKQRELVAITITFGLTTNYADSVKG
RFAISRDNSEKTVYLMNSLKPEDTAVYYCNAGSRYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:19:

40 DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWGGSTTEADS
VKGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAARDLVSTVVAETSEYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:20:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTINDMSVGWFRQAPGKEREFVAADIWPGAHTSYADP
VKGRFTITRDNANTVYLMNSLKPEDTAVYYCAGRTSDGLRTYTRIEDYYGWGQGTQVTVSS

45 SEQ ID NO:21:

DVQLQESGGGLVQPGGSLRLACAASGSGFSINAMGWYRQAPGKQREWVAAINSVMGTNYRD
SVKGRFTISRDDAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNVKPLGTADYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:22:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTISGMSVGWFRQAPGKEREFAADSWAGAKTSYAD
SVKGRFTISRDNAMVYLMKGLKPEDTAVYYCAGRTSDGLFNRYARIEDYYGWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:23:

5 DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAVSGRTISGMSVGWFRQAPGKEREFAADSSAGAKTSYADS
VKGRFTISRDNAMVYLMNGLKPEDTAVYYCAGRTSYGLSTYARMEDYYGWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:24:

DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSNVMGWYRQAPGKQREWVSTIISDGRNTYAGSV
KGRFTISRDNAMNTVYLMNNLKPEDTALYYCKLSTLNRDYGWQGTQVTVSS

SEQ ID NO:25:

10 DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTSTIYTMGWFRQAPGKEREFAATSWSGGNTNYAA
SMKGRFTISRNNAMNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAANRGSYYLGPSPYEYDWWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:26:

DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRDVVAYIMSDGNTHYADS
VKGRFTISRDNAMNTVYLMNSLKPDDTAVYYCNADIQPPMPEATYVYWGQGTQVTVSS

15 SEQ ID NO:27:

DVQLQESGGGLVQTGGSLRVSCAASGRTFSSAYMGWFRQAPGKERVLVAEIVLSSGQTYADS
VKGRFTISRDNAMNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAQNRATGRYDYGWQGTQVTVSS

SEQ ID NO:28:

20 DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSNVMGWYRQAPGKQREWVSTIISDGRNTYAGSV
KGRFTISRDNAMNTVYLMNNLKPEDTALYYCKLSTLNRDYGWQGTQVTVSS

SEQ ID NO:29:

DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGIFSINAAAWYRQAPGKERELVAHIYHGGSTTYVGSV
KGRFTISRDNAMNTVYLMNSLKPEDTAVYYCYGGPPGMAIWGKGTQVTVSS

SEQ ID NO:30:

25 DVQLQESGGGFVQPGGSLRLSCAASGPTVSSYTVGWFRQAPGKEREYVATISWSDASTYYADF
VKGRFTISRDIYAKKVYLMNSLKPEDTAVYHCAAVFRRVPISATLYDYGWQGTQVTVSS

SEQ ID NO:31:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGIFSINAAAWYRQAPGKERELVAHITHGGSTTYEGSV
KGRFTISRDNAMNTVYLMNSLKPEDTAVYYCYGGPPGMAIWGKGTQVTVSS

30 SEQ ID NO:32:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIVSIISVGWYRQAPGKQRELVAKITTDGTTNYADSVR
GRFTISRDIYAKKMLYLMSSLTPEDTAVYFCNRDRLLVGLVKADWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:33:

35 DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTSTIYTMGWFRQAPGREREFAATSWSGGNTNYAG
SVKGRFTISRDNAMNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAANRGSYYLGPSPYEYDYGWQGTQVTVSS

SEQ ID NO:34:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGSIVSIISMGWYRQAPGKQRELIKITTDGTTNYADSVR
GRFTISRDIYKKIMYLMSSLTPEDTAVYFCNRDRLLYGLVKSDWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:35:

40 DVQLQESGGGLVQTGGSLRVSCAASGRTFSSSYMGWFRQAPGQERELVAEIVLSSGQTYADS
VKGRFTISRDNAMNTAYLMNSLTPEDTAVYYCAAQNRATGRYDYGWQGTQVTVSS

SEQ ID NO:36:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGSIVSIISMGWYRQAPGKQRELIKITTDGTTSYADSVR
GRFTISRDIYKKIMYLMSSLTPEDTAVYFCNRDRLLYGLVKSDWGQGTQVTVSS

45 SEQ ID NO:37:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGIFSINAAAWYRQAPGKERELVAHIYHGGSTTYVGSV
KGRFTISRDNAMNTVYLMNSLKPEDTAVYYCYGGPPGMAIWGKGTQVTVSS

SEQ ID NO:38:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSTGMGWFRQAPGKEREFVAAINWSGEDTYAD
SVKGRFTISGDNAKNVYVLQMNSLKPEDTAVYYCAASPYNPNYPGRLRTPSWYDYWGQGTQVTVS
S

SEQ ID NO:39:

5 DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSSGMGWYRQAPGKEREFVAAINWSGEDTLYAD
SVKGRFTISGDNAKNTVHLQMNSLKPEDTAVYYCAASPYNPNYPGRLRTPSWYDYWGQGTQVTVS
S

SEQ ID NO:40:

10 DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGTIFNVMGWYRQAPGKQRELVAITITFDLSTNYADSVKG
RFAISRDRVTEKTVYVLQMDSLKPEDTAVYYCNAGSRYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:41:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTSGYSFRFTMNWYRQSGSKQRELVAITITSSGITY
ADSVKGRFTVSRDNTKNTLYLQMNSLKPEDTATYYCNFPGNSWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:42:

15 DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAVSGRTISDMSVGWFRQAPGKEREFVAADSWAGAKTSYAD
SVKGRFTISRNNAMVYVLQMNLKPEDTAVYYCAGRTSDGLSTYEWIEDYYGWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:43:

20 DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCVASGGIFSINAAWYRQAPGKERELVAHIYHGGSTTYVGSV
KGRFTISRDNANTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCYGGPPGMAIWGKGTQVTVSS

SEQ ID NO:44:

DVQLQESGGGLVQPGGSLTLSCAASGSIFSRDVMGWYRQAPGKQRELVAITIGGYADYADSV
KGRFTISRDNANTVYLRMNSLKPEDTAVYFCKLGYGSGSWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:45:

25 DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSTFSIDIMAWYRQAPEKKRELVALITRRGTTNYADSVK
GRFTISRDNANTMYLQMNNLKPEDTAVYYCNSDDTETRWGLRQYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:46:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGHTLSIYAMTWFRQDSGKDREFVAAITWPDYSTYYADS
VKGRFTISGDRPKNTVHLEMNSVKPEDTAVYYCAADRYVNSVPTATPQEWRYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:47:

30 DVQLQESGGGLVQPGASLSLSCAASGRTVNYVFGMGWFRQALGKEREFVAAITRSGGIPLYAD
SVKGRFTISRDNANTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCAIDRQYYSGRNYPQSDPAEYDYWGQGTQVTV
SS

SEQ ID NO:48:

35 DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCSASGSIVSIISMGWYRQAPGKQRELIKITTDGTTNYADSVR
GRFTISRDIKKIMYLMSSSLTPEDTAVYFCNRDRLLYGLVKSDWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:49:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGIFSINAAWYRQAPGKERELVAHIFHGGSTTYEDSV
KGRFTISRDNANTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCYGGPPGMAIWGKGTQVTVSS

SEQ ID NO:50:

40 DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRDVVAYIMSDGNTHYADS
VKGRFTISRDKNTSYLQMNSLKPDDTAVYYCNADIQPPMPEATIYVYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:51:

45 DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGTIFNVMGWYRQAPGKQRELVAITITFGLATNYADSVKG
RFAISRDDSEKTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCNAGSRYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:52:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTSGYSFGFTMNWYRQSGSKQRELVAITITSSGITY
ADSVKGRFTVSRDNTKNTLYLQMNSLKPEDTATYYCNFPGNSWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:53:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGSIVSIISMGWYRQAPGKQRELIKVTDDGTTNYADSVR
GRFTISRDIKKIMYLMQSSSLTPEDTAVYFCNRDRLLYGLVKSDWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:54:

5 DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLVSGSIYSIPAMYWYRQAPGKQREFVADITNRGSTNYADSVK
GRFTISRDNKNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCNVLGTLGPRGSLQDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:55:

DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIVSIISMGWYRQAPGKQRELIKITDDGTTNYADSVR
GRFTISRDIKKIMYLMQSSSLTPEDTAVYFCNRDRLLYGLVKSDWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:56:

10 DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASVRTFSKYDIGWFRQAPGKEREVATISSSGRSTYYADFV
KGRFGISRDIKNTVYLEMNSLKPEDTAVYACAVRLGYSGSETDPRQYAYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:57:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGSIVSIISMGWYRQAPGKQRELIKITDDGTTNYADSVR
GRFTISRGIKKIMYLMQSSSLTPEDTAVYFCNRDRLLYGLVKSDWGQGTQVTVSS

15 SEQ ID NO:58:

DVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCAASGRTEHYTMGMGWFRQAPGKEREVAAISWSDGSTYY
EDSVKGRFTISRGNKTTVYLMNSLEPEDTGVIICAAKRIGSDYPATLLYEYDYWGQGTQVTVS
S

SEQ ID NO:59:

20 DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTISDMSVGWFRQAPGKEREVAAADTWAGAKTSYAD
SVKGRFTISRDTAKAMVYLMNGLKPEDTAVYYCAGRTSYGLSTYARIEDYYGWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:60:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTNTNAMGWFRQAPGKEREVAAIDWSDGSTFYAD
SVKGRFTISRDNKNTVYLMNLSLKPEDTAVYYCAADGLLYYSGSYYPDYWGQGTQVTVSS

25 SEQ ID NO:61:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTISDMSVGWFRQAPGKEREVAAADSWAGAKASYAD
SVKGRFTISRDNKAMVHLMNGLKPEDTAVYYCAGRTSDGLSTYARIEDYYGWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:62:

30 DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGTIFNVMGWYRQAPGKQRELVAITITFGLTTNYADSVKG
RFAISRDSSEKTVYLMNLSLKPEDTAVYYCNAGSRYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:63:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTISDMSVGWFRQAPGKEREVAAADTWAGAKTSYAD
SVKGRFTISRDNKAMVYLMNGLKPEDTAVYYCAGRTSYGLSTYARIEDYYGWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:64:

35 DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFAFRIGVGWYRQAPGKEREVAVITAGGNTNCADSV
KGRFTISRDNKNTVYLMNLSLKPEDTGVIYCNYPGRPWWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:65:

DVQLQESGGGLGQAGGSLRLSCAVSEIIFRFTTLNWYRQAPGKQRELVASISSGGSTNYDDSVK
GRFTISRDNKLVYLMNLSLKPEDTAVYYCNVPGNPWGQGTQVTVSS

40 SEQ ID NO:66:

DVQLQESGGGLVQPGGSLKLSCAVSGRTISGMSVGWFRQAPGKEREVAAADSWAGAKTSYAD
SVKGRFTISRDNKAMVYLMKGLKPEDTAVYYCAGRTSDGLFNYARIEDYYGWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:67:

45 DVQLQESGGGFVQAGDSLRLSCAASGRAVISYTLGWFRQAPGKEREVATISWTDGSTYYSDS
VKGRFTMSRDDAKKTVYLMNLSLKPEDTAVYYCAAVFRRVPTSATLYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:68:

DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAVSGRTISGMAVGWFRQAPGKEREVAAADSRAGAKTSYADS
VKGRFTLSRDNKAMVYLMNGLKPEDTAVYYCAGRTSDGLSTYARIQDYYGWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:69:

DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSAFSGRIGVGWYRQAPGKEHEFVAEINAGGNTNYADSV
KGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTGVIYCNYPGRPWWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:70:

5 DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFFSISAMGWYRQAPGKQRELVAIINGGGTHYADSV
KGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNADAQMESGTLFIVFWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:71:

DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAVSGRTISDMSVGWFRQAPGKEREFAADSWAGAKTSYAD
SVKGRFTISRDNKAMVYLMNGLKPEDTAVYYCAGRTSDGLSTYARIEDYYGWGQGTQVTVSS

10 SEQ ID NO:72:

DVQLQESGGGLVQPGDSLRLSCAASGRTFSSYDMGWFRQAPGKEREFAAISRSGRDTLHADS
VKGRFTISRDNKNTVYLMYSLKPEDTAVYICAGTGFEYAGSTPYKYPYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:73:

15 DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSAFSGRIGVGWYRQAPGKEREFAVIAAGGNTNYADSV
KGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTGVIYCNYPGRPWWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:74:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGIFSRDVMGWYRQAPGEQRELVAAITIGGSASYADSV
KGRFTISRDNKNTVYLRMNSLTPEDTAVYFCKLGYGSGSWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:75:

20 DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVVSGRTLSGMSVGWFRQAPGKEREFAADSWAGAKASYA
DSVKGRFTISRDNAAEIVYLMNGLKPEDTAVYYCAGRTSYGLSTYARIEDYYGWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:76:

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTISGMSVGWFRQAPGKEREFAADTWAGAKTSYAD
SVKGRFTISRDNKAMVYLMNGLKPEDTAVYYCAGRTSDGLSTYARIEDYYGWGQGTQVTVSS

25 SEQ ID NO:77:

DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAHITNIGTTNYADSVK
GRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYICNADLPSMVETDYYLVYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:78:

30 DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAVSGRTISDMSVGWFRQAPGKEREFAADSWAGAKTSYAD
SVKGRFTISRDNKAMVYLMNSGLKPEDTAVYYCAGRTSSGLSTYARIEDYYGWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:79:

QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAVSGITFRNCMGWFRQVPGKEREVATLDGASLTRYADS
VKGRFIISQDNAKNTLYLMNALKPEDTAMYYCAASPTRYGCGGADFDSWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:80:

35 QVQLVESGGGLVQAGDSVTLSTASGRTFSSYALAWFRQRPKGKEREFAVGLRWGGPTNYADSV
KDRFTISGDSAKHTMYLMNSLKPEDTAVYYCGYNPGGWAVPSQYEYDSWGQGTQVTVSSAHHSE
DPS

SEQ ID NO:81:

40 QLQLVESGGGAAQTGGSLRLSCAASGGDSNINIMGWNQVPGKQRELVAAITSDGNSNYGSSA
KGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTVWYTSYSGKYEGQGTQVTVSSSEPKTPKPQD

SEQ ID NO:82:

ESGGGSVQTGGSLRLSCTASEYTYMNNCMGWFRQTPGKEREGIAAISDGRRIEYDDSVKGRF
VLSRDNDRNALILEMNALKSEDSGRYYCAAVRWGYPSKSSYLGPDPGHRLL

SEQ ID NO:83:

45 ATGGCCAGGTGCAGCTCGTGGAGTCAGGCGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGCTCTCTG
AGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGACGCGCCTTTCGTAGATATAACCATGGGCTGGTTCCGCCAGGC
TCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCAACAATTAAGTGGAGTGGTCGTAATACAGCGTATGCC
GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAGCCGCAAAAACACCGCGTATCTCCAAA

TGAACAGCCTGAAACCTGAAGATACGCCGTTTATTATTGTGCACAATCGCGAGCGATTACAGGT
GGCACAGTTCCC GCCGTTATAACATCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGAAC
CCAAGACACCAAAACCACAAGCGGCCGC

SEQ ID NO:84:

5 QVQLVESGGGLVHSGGSLRLSCAASGFTFSSEWMYWVRDPLQWVSSINSPGSKTYADSVR
GRFTISRDNDKQNMVYLQMNSLKPEDTGIIYCVRGVAQSVTGGWEYKVDLGLDEEWGQGTQVTVS
S

SEQ ID NO:85:

10 EVQLVESGGDQVQPGGSLRLSCVSGSFGTYTMMWFRHSPGKRLEWVSTINS DGSNPRYLNS
VEDRFIISRDNAKNTLYLQMNNLKSED TGLYYCTNGGTRGRGTQVTVSS

第二方面, 本发明提供了一种具有靶向功能的纳米抗体, 其氨基酸序列如SEQ ID NO:4-78中任意一条所示; 或者, 所述纳米抗体的氨基酸序列与SEQ ID NO:4-78中任意一条所示氨基酸序列的同源性 $\geq 80\%$; 优选 $\geq 90\%$; 更优选 $\geq 95\%$ 。

第三方面, 本发明提供了一种脂质纳米颗粒, 其组成成分包括所述具有靶向功能的分子, 所述具有靶向功能的分子占脂质纳米颗粒总脂质的含量为: 0.01-1.0 mol%, 优选为0.01-0.5 mol%。

优选地, 所述脂质纳米颗粒的组成成分包括聚合物结合脂质和可离子化氨基脂质; 所述聚合物结合脂质选自PEG或其衍生物修饰的脂质;

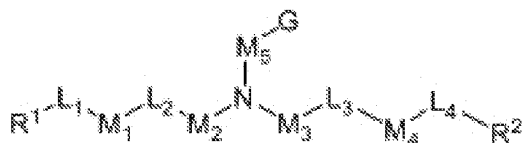
所述PEG或其衍生物修饰的脂质的相对分子质量为2000-5000, 优选为2000、3000、4000或5000;

优选地, 所述聚合物结合脂质占脂质纳米颗粒总脂质的含量为: 0.2-5 mol%, 优选为0.5-2 mol%。

20 优选地, 所述PEG衍生物包含马来酰亚胺官能化的聚乙二醇和非马来酰亚胺官能化的聚乙二醇; 其中, 聚乙二醇可选自DMG-PEG2000; 马来酰亚胺官能化的聚乙二醇可选自PEG-MAL; 马来酰亚胺官能化的聚乙二醇占脂质纳米颗粒总脂质的含量为: 0.01-1.0 mol%, 优选为0.01-0.5 mol%。

优选地, 所述可离子化氨基脂质占脂质纳米颗粒总脂质的含量为30-70 mol%, 优选为40-60 mol%;

25 更优选地, 所述可离子化氨基脂质具有通式(I)所示的结构, 或者是通式(I)所示结构的异构体、药学上可接受的盐、前药或溶剂合物;



(I)

其中, G选自H、OR、CN、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}'\text{C}(=\text{O})\text{R}''$ 、 $\text{NR}'\text{R}''$ 或至少含有一个杂原子的环状烷基结构; 其中杂原子为O或N;

30 其中, R、R'、R''彼此相同或不同, 并且各自独立地选自H、 C_1 - C_{10} 烷基、 C_3 - C_{10} 环烷基、 C_3 - C_{10} 烯基或 C_3 - C_{10} 环烯基、末端连接叔胺的 C_1 - C_{10} 烷基、末端连接叔胺的 C_3 - C_{10} 环烷基、末端连接叔胺的 C_3 - C_{10} 烯基或至少含有一个杂原子的环状烷基结构;

优选地, R、R'、R''彼此相同或不同, 并且各自独立地选自H、 C_1 - C_8 烷基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_3 - C_8 烯基、 C_3 - C_8 环烯基、末端连接叔胺的 C_1 - C_{10} 烷基、末端连接叔胺的 C_3 - C_{10} 环烷基、末端连接叔胺的 C_3 - C_{10} 烯基或至少含有一个杂原子的环状烷基结构;

35 其中, 所述环状烷基结构中可被取代的碳原子或杂原子未被取代或被一个或多个羟基、 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_3 - C_8 环烯基取代;

优选地, 所述环状烷基结构未被取代或被一个或多个 C_1 - C_4 烷基、 C_3 - C_8 环烷基或羟基取代;

40 更优选地, R'、R''彼此相同或不同, 并且各自独立地选自H、 C_1 - C_4 烷基、末端连接叔胺的 C_1 - C_{10} 烷基、末端连接叔胺的 C_3 - C_{10} 环烷基或至少含有一个杂原子的环状烷基结构; 所述环状烷基结构未被取代或被一个或多个 C_1 - C_4 烷基、 C_3 - C_8 环烷基取代。

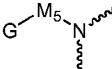
和/或, M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_4 彼此相同或不同, 并且各自独立地选自 C_1 - C_{24} 亚烷基、 C_3 - C_{24} 亚环烷基、

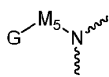
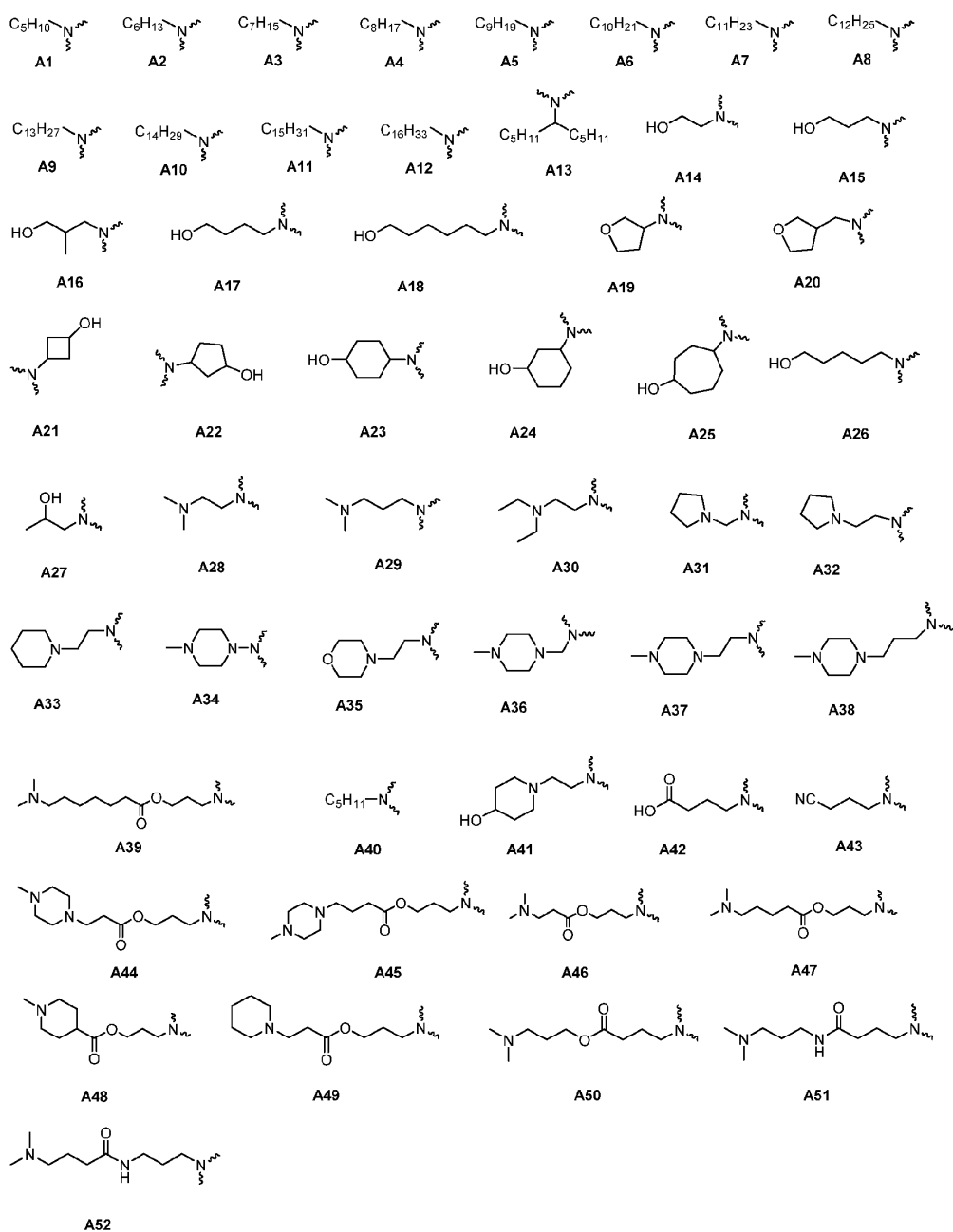
C₂-C₂₄亚烯基或C₃-C₂₄亚环烯基；优选地，M₁、M₂、M₃、M₄彼此相同或不同，并且M₁和M₄各自独立地选自含有支链的C₄-C₂₂亚烷基、含有支链的C₄-C₂₂亚环烷基、含有支链的C₄-C₂₂亚烯基或含有支链的C₄-C₂₂亚环烯基，M₂和M₃各自独立地选自C₄-C₂₂亚烷基、C₄-C₂₂亚环烷基、C₄-C₂₂亚烯基或C₄-C₂₂亚环烯基；优选地，M₂与M₃相同，且为C₄-C₂₂亚烷基；M₁与M₄相同，且为含有支链的C₄-C₂₂亚烷基；

- 5 和/或，R¹、R²彼此相同或不同，并且各自独立地选自H、C₁-C₂₄烷基、C₃-C₂₄环烷基、C₂-C₂₄烯基或C₃-C₂₄环烯基；优选地，R¹、R²彼此相同或不同，并且各自独立地选自C₄-C₂₂烷基或C₄-C₂₂烯基；

和/或，L₁、L₂、L₃、L₄彼此相同或不同，并且独立地选自-C(=O)O-、-OC(=O)-、-C(=O)S-、-SC(=O)-、-C(=O)NR-、-NRC(=O)-、-S(=O)-、-OS(=O)₂-、-S(=O)₂O-、-O-、-S-或-S-S-；优选地，L₁、L₂、L₃、L₄彼此相同或不同，并且独立地选自-C(=O)O-、-OC(=O)-、-C(=O)NR-、-NRC(=O)-或-S-S-；当L₁、L₂、L₃、L₄独立地选自-C(=O)NR-或-NRC(=O)-时，其中R独立地优选选自H或C₁-C₁₀烷基；优选地，L₁与L₄相同，且为-C(=O)O-或-OC(=O)-；

- 10 和/或，M₅选自单键、C₁-C₁₆亚烷基、C₂-C₁₆亚烯基、C₃-C₈亚环烷基或C₃-C₈亚环烯基。优选地，M₅选自单键、C₂-C₁₆亚烷基、C₂-C₁₆亚烯基、C₄-C₈亚环烷基或C₃-C₈亚环烯基；优选地，M₅选自单键、C₂-C₁₆亚烷基或C₄-C₆亚环烷基；

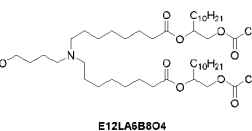
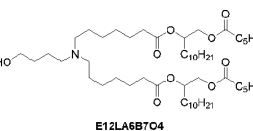
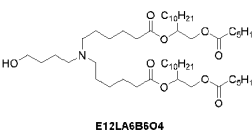
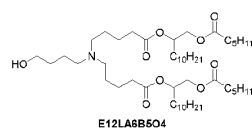
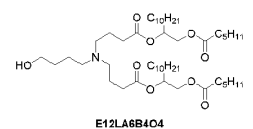
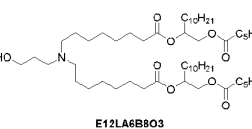
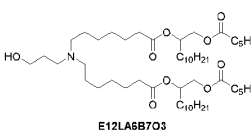
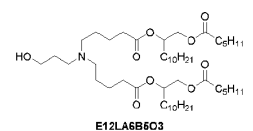
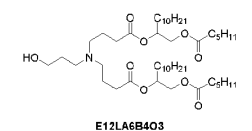
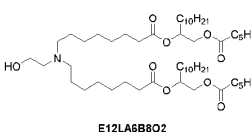
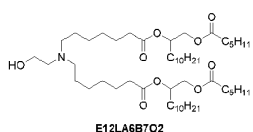
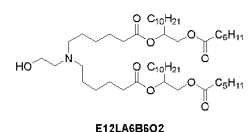
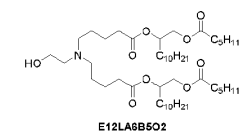
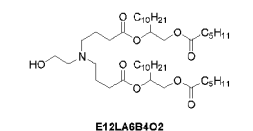
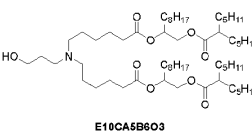
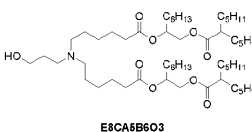
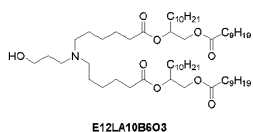
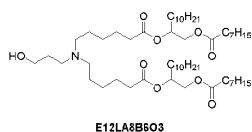
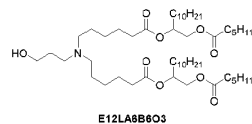
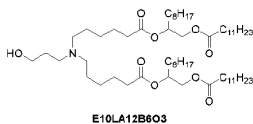
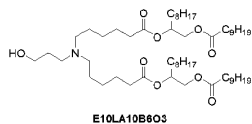
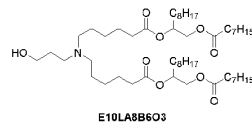
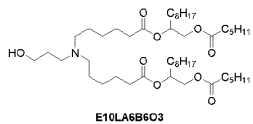
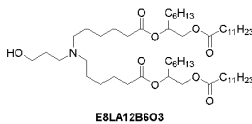
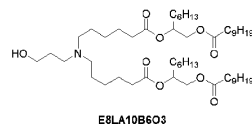
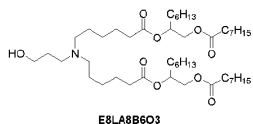
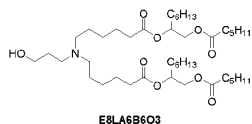
- 15 进一步优选地，M₅和G相连形成 ，具体可选自A1~A52中的一种：

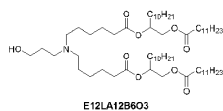


其中,所述 优选自A1-A18、A22-A24、A28-A52中的一种;进一步优选自A15、A23、A29、A33、A39-A52中的一种;

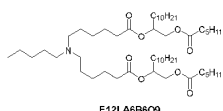
和/或, $R^1-L_1-M_1-L_2-M_2$ -片段为 $R^1-C(=O)O-M_1-OC(=O)-M_2$ -、 $R^1-C(=O)NR-M_1-OC(=O)-M_2$ -或 $R^1-C(=O)O-M_1-S-S-M_2$ -; $R^2-L_4-M_4-L_3-M_3$ -片段为 $R^2-C(=O)O-M_4-OC(=O)-M_3$ -、 $R^2-C(=O)NR-M_4-OC(=O)-M_3$ -或 $R^2-C(=O)O-M_4-S-S-M_3$ -;

更优选地,通式(I)结构选自以下结构中的一种:

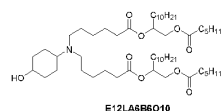




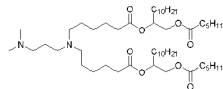
E12LA12B6O3



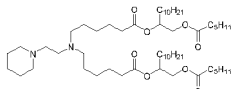
E12LA6B6O9



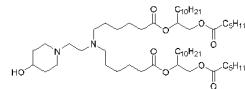
E12LA6B6O10



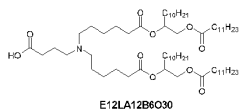
E12LA6B6O12



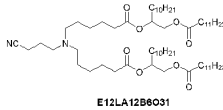
E12LA6B6O13



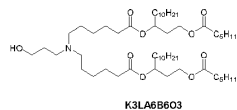
E12LA6B6O15



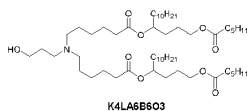
E12LA12B6O30



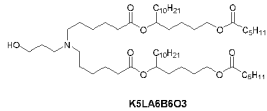
E12LA12B6O31



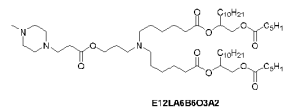
K3LA6B6O3



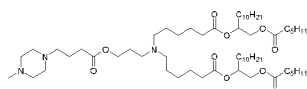
K4LA6B6O3



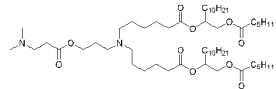
K5LA6B6O3



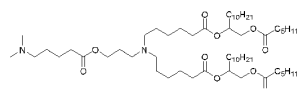
E12LA6B6O3A2



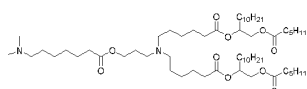
E12LA6B6O3A3



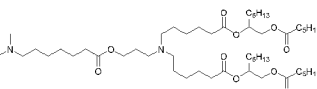
E12LA6B6O3A4



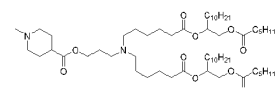
E12LA6B6O3A5



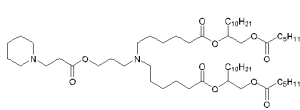
E12LA6B6O3A6



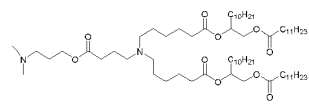
E8LA6B6O3A6



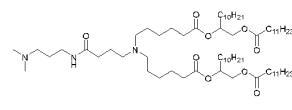
E12LA6B6O3A7



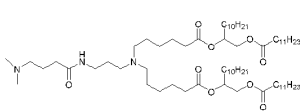
E12LA6B6O3A8



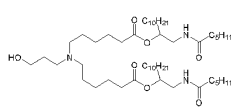
E12LA12B6O30A9



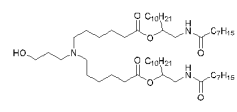
E12LA12B6O30A10



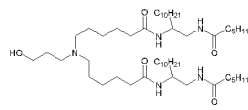
E12LA12B6O3A11



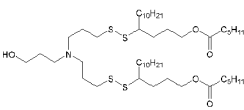
E12N1LA6B6O3



E12N1LA6B6O3



E12N2LA6B6O3



E12S1LA6B6O3

优选地, 所述脂质纳米颗粒的组成成分还包括类固醇和中性脂质中的至少一种;
优选地, 可离子化氨基脂质、类固醇、中性脂质和聚合物结合脂质的摩尔比为30-70:0-65:0-30:0.2-5; 进一步优选为40-60:35-60:0-20:0.5-2;
进一步优选地, 所述类固醇为胆固醇及其衍生物、胆固醇酯、固醇类激素、固醇类维生素、植物

甾醇中的一种或者多种, 优选为胆固醇; 和/或, 所述中性脂质为磷脂; 和/或, 所述聚合物结合的脂质为聚乙二醇化脂质, 所述聚乙二醇化脂质优选为DMG-PEG2000;

更优选地, 可离子化氨基脂质、胆固醇、磷脂和聚乙二醇化脂质的摩尔比为40:50:40:45:0:15:0.5-2。

5 优选地, 将所述脂质纳米颗粒靶向递送核酸至受试者目的细胞, 包括免疫细胞、中枢神经细胞、肿瘤细胞等, 使目的细胞与脂质纳米颗粒接触时, 所述脂质纳米颗粒提供以下益处中的至少一种:

(i)与参考LNP相比, 靶向递送至所述目的细胞的特异性增加;

(ii)与参考LNP相比, 所述核酸或由所述核酸编码的多肽在所述目的细胞中的半衰期增加;

(iii)与参考LNP相比, 转染率增加; 以及

10 (iv)低水平的染料可及mRNA(<15%)和高RNA囊封效率, 其中相对于在LNP批量制备中使用的总RNA, 在最终配制品中回收至少80%的mRNA。

第四方面, 本发明提供了所述脂质纳米颗粒的一种制备方法, 其包括如下步骤: 将聚合物结合脂质、可离子化氨基脂质、类固醇和辅助磷脂混合, 得到不具有靶向功能的脂质纳米颗粒, 然后将所述具有靶向功能的分子通过膜融合或化学键连接到所述不具有靶向功能的脂质纳米颗粒上, 得到具有靶向功能的脂质纳米颗粒。

第五方面, 本发明提供了所述脂质纳米颗粒的另一种制备方法, 其包括如下步骤: 将聚合物结合脂质、可离子化氨基脂质、类固醇和辅助磷脂混合, 得到不具有靶向功能的脂质纳米颗粒, 然后将纳米抗体通过化学键连接到所述不具有靶向功能的脂质纳米颗粒上, 得到具有靶向功能的脂质纳米颗粒;

20 优选地, 所述聚合物结合脂质包含马来酰亚胺官能化的聚乙二醇, 所述纳米抗体连接在所述马来酰亚胺官能化的聚乙二醇上。

第六方面, 本发明提供了所述脂质纳米颗粒的另一种制备方法, 其包括如下步骤: 将聚合物结合脂质、可离子化氨基脂质、类固醇、辅助磷脂和所述具有靶向功能的分子混合, 得到具有靶向功能的脂质纳米颗粒。

第七方面, 本发明提供了一种将药效分子靶向递送至受试者的特定细胞的方法, 所述方法包括: 25 使所述特定细胞与所述的脂质纳米颗粒接触; 优选的, 所述特定细胞包括但不限于免疫细胞、免疫相关细胞、中枢神经细胞、肿瘤细胞、体细胞、被病毒、细菌、真菌感染的细胞; 优选地, 所述靶向细胞为B细胞、T细胞或NK细胞。

第八方面, 本发明提供了一种在受试者的靶向细胞中表达目的蛋白或多肽的方法, 所述方法包括: 使所述靶向细胞与所述的脂质纳米颗粒接触; 优选的, 所述靶向细胞包括但不限于免疫细胞、免疫相关细胞、中枢神经细胞、肿瘤细胞、体细胞、被病毒、细菌、真菌感染的细胞; 优选地, 所述靶向细胞为B细胞、T细胞或NK细胞。

第九方面, 本发明提供了一种治疗、改善或预防有需要的受试者的疾病的症状的方法, 所述方法包括: 向所述受试者施用所述的脂质纳米颗粒以将药效分子递送至所述受试者的靶向细胞; 优选的, 所述靶向细胞包括但不限于免疫细胞、免疫相关细胞、中枢神经细胞、肿瘤细胞、体细胞、被病毒、细菌、真菌感染的细胞; 优选的, 所述疾病是免疫疾病、炎性疾病、中枢神经疾病、退行性疾病、骨相关疾病、病原体感染、代谢疾病、内分泌疾病、衰老或癌症; 优选的, 所述药效分子包括用于治疗或预防免疫疾病、炎性疾病、中枢神经疾病、退行性疾病、骨相关疾病、病原体感染、代谢疾病、内分泌疾病、衰老或癌症的治疗性或预防性疫苗中使用的抗原; 优选地, 所述靶向细胞为B细胞、T细胞或NK细胞。

40 第十方面, 本发明提供了前面所述脂质纳米颗粒作为药物递送载体的应用。

第十一方面, 本发明提供了一种药物组合物, 其包括所述脂质纳米颗粒, 所述脂质纳米颗粒含有药效分子;

优选地, 所述药效分子包括mRNA、DNA、siRNA、saRNA、shRNA、miRNA、circle RNA、lnc RNA、gRNA、多肽或者蛋白中的一种或者多种。

45 优选地, 所述药效分子包括mRNA, 所述mRNA用于编码CAR分子、TCR分子、免疫调节分子、功能性蛋白分子、或者基因编辑工具如碱基编辑器、Cas9蛋白。

优选地, 所述CAR分子包含能特异性识别肿瘤特异性抗原的序列、穿膜的连接序列和/或辅助T细胞的免疫功能的序列中的至少一种序列。

优选地,所述编码TCR分子的序列包含能识别NY-ESO-1、AFP、HBsAg、MAGEA1、Mesothelin、MART-1、CD19、CD28、PD-1、CD8、CT83、E6、E7、E8、GPC3、H3.3-K27M、HIV Gag polyprotein、HLA-A/AFP、KRASG12(V/D)、KRASG12D、KRASG12V、LMP1、LMP2、EBNA1、MAGEA10、MAGEA3、MAGEA4、MC2R、mHag HA-1、MYO1G、PRAME、WT1、gp100、CEA、p53、HLA-A2、EGFR、DR5、RAS、LAGE-1、CMV、HCV、MCPyv、HA-1H中至少一种分子的序列。

优选地,所述编码免疫调节分子的序列包括CD28、PD-1、CTLA-4、RGMB、ICOS、CD28H、NKp30、HVEM、OX40、Fas、4-1BB、CD27、CD30、APO-2、APO-3、BCMA、BAFFR、GITR、IL-2、IL-12A、IL-12B、IL-15、IL-23、IL-27、FLT3L、IL-36A、IL-36B、IL-36C、GM-CSF、CCL20、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CCR7、CXCR4、CCR5、CCL4、CCL5、CCL19、CXCR3、CCR6、B7-H1、B7-DC、B7-H3、B7-H4、PD-1H、IL-10、TGF- β 、HGF、B7-1、B7-2、B7-H2、B7-H3、CD40、FasL、CD70、CD30L、4-1BBL、OX40L、TRAIL、RANKL、TWEAK、APRIL、BAFF、LIGHT、GITRL、CD73、STAT1、IRF4、CCAR2、BCL6、iNOS、CD103中的至少一种分子的序列。

优选地,所述编码CAR分子的核酸包含能识别CD19、BMCA、CD22、CD20、CD123、GD2、CD30、GPC3、CLDN18.2、Mesothelin、CD33、CD38、EGFRvIII、CD138、CEA、HER2、PSMA、CLL1、CD56、EGFR、MUC-1、EpCAM、CD7、NKG2D、PD-L1、LewisY、FAP、c-MET、ROR1、IL13R α 2、AFP、CD133、CD4、BTK、ROBO1、CD5、CD70、LILRB4、FLT3、Sigle-6、CD229、SLAMF7中至少一种分子的序列。

第十二方面,本发明提供了一种药物制剂,其包含所述的药物组合物以及药学上可接受的载体;优选地,所述药物制剂为水针剂、冻干粉或喷雾剂。

有益效果:

本发明提供一种具有靶向功能的分子,这种具有靶向功能的分子可以特异性地将药物递送到特定的细胞,如T细胞、B细胞、NK细胞、NKT细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、调节性T细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、中性粒细胞、血小板、间充质干细胞、巨噬细胞、浆细胞、树突状细胞、小胶质细胞、神经元细胞、星状细胞、内皮细胞、破骨细胞、成骨细胞、滑膜细胞、肿瘤细胞等,如将CAR分子核酸序列特异性地递送到T细胞中,在体内直接产生具有针对特异肿瘤的杀伤性T细胞,杀伤肿瘤;如将TCR分子核酸序列特异性地递送到T细胞中,在体内直接产生针对特异性抗原序列的TCR-T细胞,杀伤病毒感染的细胞或者肿瘤;如将免疫功能性的分子或者阻断细胞功能失活的分子特异性地递送到免疫细胞中去,改变免疫细胞的功能,精准调控免疫反应;如将功能性调节分子特异性递送到其他类型的细胞,在体内精准编程目的细胞,使药效分子达到功能。特异性的细胞递送可以明显提高药物的药效,降低药物由于作用于其他的细胞带来的副作用,达到:一、药效分子直接进入目的作用细胞,甚至是传统药物无法进入的目的细胞中起作用,二、极低的给药剂量获得最大的治疗效果。

附图说明

为了更清楚地说明本发明或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图进行说明。

图1A和图1B为本发明实施例20中含偶联位点的LNP质控信息。

图2A、图2B、图2C和图2D为本发明实施例20中不同靶向分子结构的LNP体外转染情况。

图3为本发明实施例20中不同靶向分子结构的TLNP体内转染情况。

图4A和图4B为本发明实施例21中Pre-TLNP的具体表征数据。

图5A和图5B为本发明实施例21中TLNP的具体表征数据。

图6为本发明实施例21不同靶向分子比例的TLNP体内递送效率。

图7A、图7B、图7C、图7D和图7E为本发明实施例24中cLNP-1和TLNP-2在hPBMC中EGFP-mRNA表达效率的流式分析。

图8为本发明实施例24中不同给药剂量的TLNP-2体内转染情况。

图9A、图9B、图9C、图9D和图9E为本发明实施例25中不同配比的TLNP-2体内转染情况统计图。

图10A、图10B、图10C、图10D、图10E和图10F为本发明实施例27中传统LNP和靶向TLNP长期稳定性研究。

图11A、图11B、图11C和图11D为本发明实施例29中Cy5荧光、Luc成像和qPCR法研究Balb/c小鼠

体内的生物分布结果。

图12A和图12B为本发明实施例29中Luc成像和qPCR法研究NGC小鼠体内的生物分布结果。

图13为本发明实施例30中不同工作浓度的TLNP-2在hPBMC中的剂量安全性研究数据。

5 图14为本发明实施例31中不同剂量下传统cLNP与靶向TLNP在小鼠体内急毒实验的肝脏毒性指标检测结果。

图15为本发明实施例32中TLNP-2在NHP体内EGFP表达。

图16为本发明实施例32中TLNP-2在NHP体内EGFP靶向和脱靶结果。

图17为本发明实施例32中TLNP-2在NHP体内EGFP表达动态变化。

10 图18为本发明实施例33中TLNP-2 给药后NHP体重变化。

图19为本发明实施例33中TLNP-2 给药后NHP体温变化。

图20为本发明实施例33中TLNP-2 给药后NHP血常规变化。

图21为本发明实施例33中TLNP-2给药后NHP血清中细胞因子变化。

图22A、图22B、图22C、图22D、图22E、图22F、图22G、图22H、图22I和图22J为本发明实施例33中TLNP-2给药后NHP的血生化。

15 图23A、图23B、图23C和图23D为本发明实施例34中含不同靶向分子的CD5-TLNP体外转染结果。

图24A和图24B为本发明实施例35中含不同靶向分子比例的CD5-TLNP体外转染结果。

图25A和图25B为本发明实施例36中不同配比的L2-TLNP体内转染情况。

图26A和图26B为本发明实施例37中Luc成像和qPCR法研究hCD5人源化小鼠体内的生物分布实验结果。

20 具体实施方式

本发明提供了一些具有靶向功能的分子及应用，在其中较为具体的实施方式中，本发明提供了一些具有靶向功能的脂质纳米颗粒。这些具有靶向功能的脂质纳米颗粒包含可离子化氨基脂质、聚合物结合脂质和纳米抗体；可选的，这些具有靶向功能的脂质纳米颗粒还包括类固醇和/或磷脂。

25 为了更好地说明本发明所述具有靶向功能的脂质纳米颗粒的获得方式，下面以举例的方式进行说明。

(一) 五组分细胞靶向纳米颗粒(含可离子化氨基脂质、聚合物结合脂质、类固醇、磷脂和纳米抗体)的制备方法

方法1: 后插入化学偶联法

30 将可离子化氨基脂质E12LA6B6O3、磷脂、胆固醇、DMG-PEG₂₀₀₀和含有化学偶联位点的PEG脂质衍生物按照一定的摩尔比例溶解在乙醇中，mRNA溶解在酸性缓冲溶液中，保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA碱基的摩尔比(N/P)为6.5。

35 通过微流控设备将乙醇相与水相进行混合，控制其流速为乙醇相与水相的比例为1:3。所得的LNP粗品加入25 mM Tris缓冲液终止。然后在4℃，1200 rcf条件下超滤纯化一次后，补加25 mM Tris缓冲液继续超滤纯化两次，收集含有化学偶联位点的LNP(Pre-TLNP)。加入0.278倍体积浓度为400 mg/mL的蔗糖溶液后，于超净台中用PES材质孔径0.22 μm的滤头无菌过滤。

取一定量的上述的Pre TLNP，与相应的纳米抗体按照一定的摩尔比例进行混合，并于4℃下孵育过夜。往过夜孵育后的LNP混合液中加入浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液进行稀释，并且用100 KD的超滤管进行纯化。于超净台中用PES材质孔径0.22 μm的滤头无菌过滤后，即得到最终的纳米抗体修饰的细胞靶向纳米颗粒(TLNP)。

40 方法2: 靶向功能分子后插入孵育法

将含有化学偶联位点的PEG脂质衍生物与纳米抗体按照一定的摩尔比例在PBS缓冲溶液中混合，并于4℃下孵育过夜。反应液经柱纯化后即可得到具有靶向功能的PEG脂质与纳米抗体偶联物(PEG-Nb)。

45 将可离子化氨基脂质、磷脂、胆固醇和DMG-PEG₂₀₀₀按照一定的摩尔比例溶解在乙醇中，mRNA溶解在酸性缓冲溶液中，保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比(N/P)为6.5。LNP的制备流程参考方法一中的描述进行。

取一定量上述制备出来的LNP与靶向功能分子(PEG-Nb)按照一定的摩尔比例进行混合，并于4

°C下孵育过夜。后续LNP的纯化过程与质控方法均按照方法一中所描述的操作进行，最终获得纳米抗体修饰的细胞靶向纳米颗粒（TLNP）。

方法3：靶向功能分子一步插入法

5 将可离子化氨基脂质、磷脂、胆固醇和DMG-PEG₂₀₀₀按照一定的摩尔比例溶解在乙醇中，靶向功能分子（PEG脂质与纳米抗体偶联物）以及mRNA溶解在酸性缓冲溶液中，保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比（N/P）为6.5。后续LNP的制备、纯化和质控流程均参考方法一中的描述进行，即可得到纳米抗体修饰的细胞靶向纳米颗粒（TLNP）。

（二）四组分细胞靶向纳米颗粒（含可离子化氨基脂质、聚合物结合脂质、类固醇和纳米抗体）的制备方法

10 将可离子化氨基脂质、胆固醇、DMG-PEG₂₀₀₀和DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal脂质按照40: 58.5: 1.45: 0.05的摩尔比例溶解在乙醇中，mRNA溶解在酸性缓冲溶液中，保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比（N/P）为6.5。

后续LNP的具体制备流程参考（一）中的方法1进行，即可得到最终四组分的细胞靶向纳米颗粒（TLNP）。

15 （三）四组分细胞靶向纳米颗粒（含可离子化氨基脂质、聚合物结合脂质、磷脂和纳米抗体）的制备方法

将可离子化氨基脂质、磷脂DSPC、DMG-PEG₂₀₀₀和DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal脂质按照47.5: 51.0: 1.45: 0.05的摩尔比例溶解在乙醇中，mRNA溶解在酸性缓冲溶液中，保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比（N/P）为6.5。

20 后续LNP的具体制备流程参考（一）中的方法1进行，即可得到最终四组分的细胞靶向纳米颗粒（TLNP）。

下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细说明，但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。若未特别指明，实施例中所使用的实验方法均为常规方法；所用的材料、试剂等均可从商业途径得到。

25

实施例1：

本实施例采用靶向功能分子后插入孵育法制备五组分细胞靶向纳米颗粒（含有可离子化氨基脂质、聚合物结合脂质、类固醇、磷脂以及纳米抗体）。

30 将含有化学偶联位点的DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal脂质与CD8纳米抗体（末端含或不含GS-半胱氨酸）按照1:1的摩尔比例在PBS的反应媒介中进行混合，并于4°C下孵育过夜。反应液经过疏水相互作用色谱柱纯化后，获得CD8纳米抗体与DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal脂质的偶联产物，即CD8靶向功能分子。

将可离子化氨基脂质E12LA6B6O3、磷脂、胆固醇CHO和DMG-PEG₂₀₀₀按照表1中的比例摩尔比例溶解在乙醇中，mRNA溶解在酸性缓冲溶液中，保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比（N/P）为6.5。

35 通过微流控设备将乙醇相与水相进行混合，控制其流速为乙醇相与水相的体积比为1:3。两相的总流速为12 mL/min，乙醇相和水相的流速比为1:3，制得LNP粗品。LNP制备完成后立即加10倍体积的25 mM Tris buffer（用Tris/Tris-HCl配置，pH = 7.4-7.5）终止。

40 加终止液的LNP粗品在4 °C，1200 rcf条件下超滤纯化一次；接着，再加入25 mM Tris buffer超滤液在4 °C，1200 rcf条件下继续超滤浓缩两次。收集LNP成品后，加入0.278倍体积浓度为400 mg/mL的蔗糖溶液（用25 mM Tris buffer, pH = 7.4-7.5定容法配置），于超净台中用PES材质孔径0.22 μm的滤头无菌过滤。吸取30 μL样品用于检测粒径、分散系数和包封率，剩下样品于4 °C冰箱储存。

45 取一定量上述的LNP，按照表1中的配方加入CD8靶向功能分子进行混合，然后与4 °C下孵育过夜。往过夜孵育后的LNP混合液中加入浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液（用25 mM Tris buffer, pH = 7.4-7.5配置）进行稀释，并且用100 KD的超滤管进行纯化。于超净台中用PES材质孔径0.22 μm的滤头无菌过滤后，即得到CD8纳米抗体修饰的细胞靶向纳米颗粒（CD8-TLNP）。

表1: 后插入法制备CD8-TLNP的脂质及靶向分子的比例配方表

组别	脂质以及靶向分子的摩尔比例 (E12LA6B6O3: DSPC: CHO: DMG-PEG2000: CD8 靶向功能分子)
CD8-TLNP1	47.5: 10: 41: 1.5: 0.01
CD8-TLNP2	50: 10: 38.5: 1.5: 0.01
CD8-TLNP3	45: 10: 43.5: 1.5: 0.01
CD8-TLNP4	40: 20: 38.5: 1.5: 0.01
CD8-TLNP5	55: 15: 28.5: 1.5: 0.01
CD8-TLNP6	47.5: 15: 36: 1.0: 0.01

实施例2:

5 本实施例采用靶向功能分子一步插入法制备五组分细胞靶向纳米颗粒（含有可离子化氨基脂质、聚合物结合脂质、类固醇、磷脂以及靶向功能分子）

按照实施例1中所描述的方法制得CD8靶向功能分子。

将可离子化氨基脂质E12LA6B6O3、磷脂、胆固醇和DMG-PEG₂₀₀₀按照表2中的摩尔比例溶解在乙醇中，CD8靶向功能分子和mRNA溶解在酸性缓冲溶液中，保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比（N/P）为6.5。

10 通过微流控设备将乙醇相与水相进行混合，控制其流速为乙醇相与水相的体积比为1:3。两相的总流速为12 mL/min，乙醇相和水相的流速比为1:3，制得LNP粗品。LNP制备完成后立即加10倍体积的25 mM Tris buffer (用Tris/Tris-HCl配置，pH = 7.4-7.5)终止。

15 加终止液的LNP粗品在4 °C，1200 rcf条件下超滤纯化一次；接着，再加入25 mM Tris buffer超滤液在4 °C，1200 rcf条件下继续超滤浓缩两次。收集LNP成品后，加入0.278倍体积浓度为400 mg/mL的蔗糖溶液（用25 mM Tris buffer, pH = 7.4-7.5定容法配置），于超净台中用PES材质孔径0.22 μm的滤头无菌过滤，即可得到CD8纳米抗体修饰的细胞靶向纳米颗粒（CD8-TLNP）。

表2: 一步法制备CD8-TLNP的脂质及靶向分子的比例配方表

组别	脂质以及靶向分子的摩尔比例 (E12LA6B6O3: DSPC: CHO: DMG-PEG2000: CD8 靶向功能分子)
CD8-TLNP1	47.5: 10: 41: 1.5: 0.01
CD8-TLNP2	50: 10: 38.5: 1.5: 0.01
CD8-TLNP3	45: 10: 43.5: 1.5: 0.01
CD8-TLNP4	40: 20: 38.5: 1.5: 0.01
CD8-TLNP5	55: 15: 28.5: 1.5: 0.01
CD8-TLNP6	47.5: 15: 36: 1.0: 0.01

实施例3:

20 本实施例采用后插入化学偶联法制备五组分细胞靶向纳米颗粒（含可离子化氨基脂质、聚合物结合脂质、类固醇、磷脂和纳米抗体），具体步骤如下：

将可离子化氨基脂质E12LA6B6O3、磷脂、胆固醇、DMG-PEG₂₀₀₀和DSPE-PEG2000-Mal按照表3中的摩尔比例溶解在乙醇中，mRNA溶解在酸性缓冲溶液中，保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比（N/P）为6.5。

25 通过微流控设备将乙醇相与水相进行混合，控制其流速为乙醇相与水相的体积比为1:3。两相的总流速为12 mL/min，乙醇相和水相的流速比为1:3，制得LNP粗品。LNP制备完成后立即加10倍体积的25 mM Tris buffer (用Tris/Tris-HCl配置，pH = 7.4-7.5)终止。

30 加终止液的LNP粗品在4 °C，1200 rcf条件下超滤纯化一次；接着，再加入25 mM Tris buffer超滤液在4 °C，1200 rcf条件下继续超滤浓缩两次。收集含有化学偶联位点的LNP（Pre-TLNP）后，加入0.278倍体积浓度为400 mg/mL的蔗糖溶液（用25 mM Tris buffer, pH = 7.4-7.5定容法配置），于超净台中用PES材质孔径0.22 μm的滤头无菌过滤。吸取30 μL样品用于检测粒径、分散系数和包封率，剩下样品于4 °C冰箱储存。

取一定量的上述的Pre TLNP，将DSPE-PEG2000-Mal与相应的CD8纳米抗体（末端含或不含GS-半胱氨酸）按照1:1的摩尔比例进行混合，并于4℃下孵育过夜。往过夜孵育后的LNP混合液中加入浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液（用25 mM Tris buffer，pH = 7.4-7.5配置）进行稀释，并且用100 KD的超滤管进行纯化。于超净台中用PES材质孔径0.22 μm的滤头无菌过滤后，即得到最终的纳米抗体修饰的细胞靶向纳米颗粒（TLNP）。吸取30 μL样品用于检测粒径、分散系数和包封率，剩下的样品于4℃冰箱储存。包封率检测完后用87 mg/mL的蔗糖溶液（用25 mM Tris buffer，pH = 7.4-7.5配置）将样品稀释至所需浓度，存放备用。

表3: 后插入法制备CD8-TLNP的脂质比例配方表

组别	五种脂质的摩尔比例 (E12LA6B6O3: DSPC: CHO: DMG-PEG2000: DSPE-PEG2000-Mal)
CD8-TLNP1	47.5: 10: 41: 1.5: 0.01
CD8-TLNP2	50: 10: 38.5: 1.5: 0.01
CD8-TLNP3	45: 10: 43.5: 1.5: 0.01
CD8-TLNP4	40: 20: 38.5: 1.5: 0.01
CD8-TLNP5	55: 15: 28.5: 1.5: 0.01
CD8-TLNP6	47.5: 15: 36: 1.0: 0.01

实施例4:

（一）偶联anti-CD19纳米抗体的纳米颗粒制备

参考实施例3中的制备方法。将可离子化氨基脂质：DSPC：CHO：DMG-PEG2000：DSPE-PEG2000-Mal按照47.5: 10: 41: 1.49: 0.01的摩尔比例溶解在乙醇中；mRNA溶解在浓度为75 mM柠檬酸pH 4的酸性缓冲溶液中，保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比（N/P）为6.5。

通过微流控设备将乙醇相与水相进行混合，控制其流速为乙醇相与水相的体积比为1:3。两相的总流速为12 mL/min，乙醇相和水相的流速比为1:3，制得LNP粗品。LNP制备完成后立即加10倍体积的25 mM Tris buffer (用Tris/Tris-HCl配置，pH = 7.4-7.5)终止。

将LNP粗品在4℃，1200 rcf条件下超滤纯化三次后，收集得到含有化学偶联位点的LNP（Pre-TLNP）。然后将其与末端连接半胱氨酸的anti-CD19的纳米抗体以1:1的摩尔比例进行混合，并于4℃下孵育过夜。随后加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液超滤洗涤并且无菌过滤后，即得到最终的anti-CD19纳米抗体偶联的纳米颗粒（CD19-TLNP）。

（二）靶向人CD19细胞的纳米颗粒体外递送效率的评价

anti-CD3扣板：提前一天在24孔板中加入浓度1 μg/mL的anti-Human-CD3抗体，每孔加入200 μL，然后将其于4度存放，包被过夜。

细胞铺板前准备：吸弃24孔板中的液体，然后用1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）洗涤两次。

细胞铺板：用添加anti-CD28抗体（浓度1 μg/mL）和IL-2（工作浓度400 U/mL）的1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）将human PBMC稀释成1 million/mL。在24孔板中，每孔加入1 million的细胞。细胞铺板后，于37℃，5% CO₂的条件下稳定4 h后再加LNP。

加入包封eGFP-mRNA的CD19-TLNP，使得孔板中LNP的工作浓度是0.1 μg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。24h后通过流式细胞技术检测PBMC中CD19+细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率。

表4: CD19-TLNP体外转染结果

LNP编号	CD19+细胞的阳性率（%）
PBS	0.1
CD19-TLNP	70

实验结果表明：CD19-TLNP表现出明显的CD19+细胞的靶向效果，且具有较好的转染效率。

实施例5:

偶联anti-CD133纳米抗体的纳米颗粒制备

参考实施例3中的制备方法。将可离子化氨基脂质：DSPE：CHO：DMG-PEG4000：DSPE-PEG4000-Mal按照50.5: 5: 43: 1.47: 0.03的摩尔比例溶解在乙醇中；mRNA溶解在浓度为75 mM柠檬酸pH 4的酸性缓冲溶液中，保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比（N/P）为6.5。

通过微流控设备将乙醇相与水相进行混合，控制其流速为乙醇相与水相的体积比为1:3。两相的总流速为12 mL/min，乙醇相和水相的流速比为1:3，制得LNP粗品。LNP制备完成后立即加10倍体积的25 mM Tris buffer (用Tris/Tris-HCl配置，pH = 7.4-7.5)终止。

将LNP粗品在4 °C，1200 rcf条件下超滤纯化三次后，收集得到含有化学偶联位点的LNP（Pre-TLNP）。然后将其与末端连接半胱氨酸的anti-CD133的纳米抗体以1:1.2的摩尔比例进行混合，并于4°C下孵育过夜。随后加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液超滤洗涤并且无菌过滤后，即得到最终的anti-CD133纳米抗体偶联的纳米颗粒（CD133-TLNP）。

实施例6:

（一）偶联anti-PSMA纳米抗体的纳米颗粒制备

参考实施例3中的制备方法。将可离子化氨基脂质：DOPC：CHO：DMG-PEG2000：DSPE-PEG3000-Mal按照43.5: 12: 43: 1.2: 0.3的摩尔比例溶解在乙醇中；mRNA溶解在浓度为75 mM柠檬酸pH 4的酸性缓冲溶液中，保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比（N/P）为6.5。

通过微流控设备将乙醇相与水相进行混合，控制其流速为乙醇相与水相的体积比为1:3。两相的总流速为12 mL/min，乙醇相和水相的流速比为1:3，制得LNP粗品。LNP制备完成后立即加10倍体积的25 mM Tris buffer (用Tris/Tris-HCl配置，pH = 7.4-7.5)终止。

将LNP粗品在4 °C，1200 rcf条件下超滤纯化三次后，收集得到含有化学偶联位点的LNP（Pre-TLNP）。然后将其与末端连接半胱氨酸的anti-PSMA的纳米抗体以1.2:1的摩尔比例进行混合，并于4°C下孵育过夜。随后加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液超滤洗涤并且无菌过滤后，即得到最终的anti-PSMA纳米抗体偶联的纳米颗粒（PSMA-TLNP）。

（二）靶向人PSMA细胞的纳米颗粒体外递送效率的评价

复苏培养LNCaP，加入封装eGFP-mRNA的PSMA-TLNP，使得孔板中LNP的工作浓度是0.1 µg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。24h后通过流式细胞技术检测LNCaP中PSMA+的eGFP-mRNA的表达率。

表5: PSMA-TLNP体外转染结果

LNP编号	PSMA+细胞的阳性率（%）
PBS	0.13
PSMA-TLNP	76.5

实验结果表明：PSMA-TLNP表现出明显的PSMA+细胞的靶向效果，且具有较好的转染效率。

实施例7:

（一）偶联anti-TMEM119纳米抗体的纳米颗粒制备

参考实施例3中的制备方法。将可离子化氨基脂质：DOPE：胆固醇酯：DMG-PEG2000：DSPE-PEG2000-Mal按照55.5: 0: 43: 1.495: 0.005的摩尔比例溶解在乙醇中；mRNA溶解在浓度为75 mM柠檬酸pH 4的酸性缓冲溶液中，保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比（N/P）为6.5。

通过微流控设备将乙醇相与水相进行混合，控制其流速为乙醇相与水相的体积比为1:3。两相的总流速为12 mL/min，乙醇相和水相的流速比为1:3，制得LNP粗品。LNP制备完成后立即加10倍体积的25 mM Tris buffer (用Tris/Tris-HCl配置，pH = 7.4-7.5)终止。

将LNP粗品在4 °C，1200 rcf条件下超滤纯化三次后，收集得到含有化学偶联位点的LNP（Pre-TLNP）。然后将其与末端连接半胱氨酸的anti-TMEM119的纳米抗体以1:1的摩尔比例进行混合，并于4°C下孵育过夜。随后加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液超滤洗涤并且无菌过滤后，即得到最终的anti-TMEM119纳米抗体偶联的纳米颗粒（TMEM119-TLNP）。

(二) 靶向人TMEM119细胞的纳米颗粒体外递送效率的评价

复苏培养SH-SY5Y细胞，加入包封eGFP-mRNA的TMEM119-TLNP，使得孔板中LNP的工作浓度是0.1 μg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。24h后通过流式细胞技术检测SH-SY5Y中TMEM119+的eGFP-mRNA的表达率。

5 表6: TMEM119-TLNP体外转染结果

LNP编号	TMEM119+细胞的阳性率 (%)
PBS	0.11
TMEM119-TLNP	78.4

实验结果表明: TMEM119-TLNP表现出明显的TMEM119+细胞的靶向效果, 且具有较好的转染效率。

实施例8:

10 偶联anti-B7-H1纳米抗体的纳米颗粒制备

参考实施例3中的制备方法。将可离子化氨基脂质 : DSPC : CHO : DMG-PEG2000 : DSPE-PEG2000-Mal按照62.5: 5: 31: 1.49: 0.01的摩尔比例溶解在乙醇中; mRNA溶解在浓度为75 mM柠檬酸pH 4的酸性缓冲溶液中, 保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比(N/P)为6.5。

15 通过微流控设备将乙醇相与水相进行混合, 控制其流速为乙醇相与水相的体积比为1:3。两相的总流速为12 mL/min, 乙醇相和水相的流速比为1:3, 制得LNP粗品。LNP制备完成后立即加10倍体积的25 mM Tris buffer (用Tris/Tris-HCl配置, pH = 7.4-7.5)终止。

20 将LNP粗品在4 °C, 1200 rcf条件下超滤纯化三次后, 收集得到含有化学偶联位点的LNP (Pre-TLNP)。然后将其与末端连接半胱氨酸的anti-B7-H1的纳米抗体以1:1的摩尔比例进行混合, 并于4 °C下孵育过夜。随后加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液超滤洗涤并且无菌过滤后, 即得到最终的anti-B7-H1纳米抗体偶联的纳米颗粒 (B7-H1-TLNP)。

实施例9:

(一) 偶联anti-HER2纳米抗体的纳米颗粒制备

25 参考实施例3中的制备方法。将可离子化氨基脂质 : DOPC : CHO : DMG-PEG2000 : DSPE-PEG2000-Mal按照58.5: 10: 30: 1.49: 0.01的摩尔比例溶解在乙醇中; mRNA溶解在浓度为75 mM柠檬酸pH 4的酸性缓冲溶液中, 保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比(N/P)为6.5。

30 通过微流控设备将乙醇相与水相进行混合, 控制其流速为乙醇相与水相的体积比为1:3。两相的总流速为12 mL/min, 乙醇相和水相的流速比为1:3, 制得LNP粗品。LNP制备完成后立即加10倍体积的25 mM Tris buffer (用Tris/Tris-HCl配置, pH = 7.4-7.5)终止。

35 将LNP粗品在4 °C, 1200 rcf条件下超滤纯化三次后, 收集得到含有化学偶联位点的LNP (Pre-TLNP)。然后将其与末端连接半胱氨酸的anti-HER2的纳米抗体以1:1的摩尔比例进行混合, 并于4 °C下孵育过夜。随后加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液超滤洗涤并且无菌过滤后, 即得到最终的anti-HER2纳米抗体偶联的纳米颗粒 (HER2-TLNP)。

(二) 靶向人HER2细胞的纳米颗粒体外递送效率的评价

复苏培养人乳腺癌细胞SK-BR-3, 加入包封eGFP-mRNA的cLNP和HER2-TLNP, 使得孔板中LNP的工作浓度是0.1 μg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。24h后通过流式细胞技术检测PBMc中HER2+细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率。

40 表7: HER2-TLNP体外转染结果

LNP编号	HER2+细胞的阳性率 (%)
PBS	0.13
HER2-TLNP	77.3

实验结果表明: HER2-TLNP表现出明显的HER2+细胞的靶向效果, 且具有较好的转染效率。

实施例10:

偶联anti-EGFR纳米抗体的纳米颗粒制备

参考实施例3中的制备方法。将可离子化氨基脂质：DSPC：CHO：DMG-PEG2000：DSPE-PEG2000-Mal按照45.5: 15: 38: 1.49: 0.01的摩尔比例溶解在乙醇中；mRNA溶解在浓度为75 mM柠檬酸pH 4的酸性缓冲溶液中，保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比（N/P）为6.5。

通过微流控设备将乙醇相与水相进行混合，控制其流速为乙醇相与水相的体积比为1:3。两相的总流速为12 mL/min，乙醇相和水相的流速比为1:3，制得LNP粗品。LNP制备完成后立即加10倍体积的25 mM Tris buffer (用Tris/Tris-HCl配置，pH = 7.4-7.5)终止。

将LNP粗品在4 °C，1200 rcf条件下超滤纯化三次后，收集得到含有化学偶联位点的LNP（Pre-TLNP）。然后将其与末端连接半胱氨酸的anti-EGFR的纳米抗体以1:1的摩尔比例进行混合，并于4 °C下孵育过夜。随后加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液超滤洗涤并且无菌过滤后，即得到最终的anti-EGFR纳米抗体偶联的纳米颗粒（EGFR-TLNP）。

实施例11:

(一) 制备靶向人CD7细胞的纳米颗粒

参考实施例3中的制备方法。将Pre-TLNP与末端连接半胱氨酸的anti-CD7的纳米抗体以1:1的摩尔比例进行混合，并于4 °C下孵育过夜。随后加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液超滤洗涤并且无菌过滤后，即得到最终的anti-CD7纳米抗体偶联的纳米颗粒（CD7-TLNP）。

(二) 靶向人CD7细胞的纳米颗粒体外递送效率的评价

anti-CD3扣板：提前一天在24孔板中加入浓度1 µg/mL的anti-Human-CD3抗体，每孔加入200 µL，然后将其于4度存放，包被过夜。

细胞铺板前准备：吸弃24孔板中的液体，然后用1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）洗涤两次。

细胞铺板：用添加anti-CD28抗体（浓度1 µg/mL）和IL-2（工作浓度400 U/mL）的1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）将human PBMC稀释成1 million/mL。在24孔板中，每孔加入1 million的细胞。细胞铺板后，于37 °C, 5% CO₂的条件下稳定4 h后再加LNP。

加入包封eGFP-mRNA的CD7-TLNP，使得孔板中LNP的工作浓度是0.1 µg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。24h后通过流式细胞技术检测PBMC中CD7+细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率。

表8: CD7-TLNP体外转染结果

LNP编号	CD7+细胞的阳性率（%）
PBS	0.2
CD7-TLNP	75

实验结果表明：CD7-TLNP表现出明显的CD7+细胞的靶向效果，且具有较好的转染效率。

实施例12:

(一) 制备靶向人CD4细胞的纳米颗粒

参考实施例3中的制备方法。将Pre-TLNP与末端连接半胱氨酸的anti-CD4的纳米抗体以1:1的摩尔比例进行混合，并于4 °C下孵育过夜。随后加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液超滤洗涤并且无菌过滤后，即得到最终的anti-CD4纳米抗体偶联的纳米颗粒（CD4-TLNP）。

(二) 靶向人CD4细胞的纳米颗粒体外递送效率的评价

anti-CD3扣板：提前一天在24孔板中加入浓度1 µg/mL的anti-Human-CD3抗体，每孔加入200 µL，然后将其于4度存放，包被过夜。

细胞铺板前准备：吸弃24孔板中的液体，然后用1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）洗涤两次。

细胞铺板：用添加anti-CD28抗体（浓度1 µg/mL）和IL-2（工作浓度400 U/mL）的1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）将human PBMC稀释成1 million/mL。在24孔板中，每孔加入1 million的细胞。细胞铺板后，于37 °C, 5% CO₂的条件下稳定4 h后再加LNP。

加入包封eGFP-mRNA的CD4-TLNP，使得孔板中LNP的工作浓度是0.1 μg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。24h后通过流式细胞技术检测PBMC中CD4+细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率。

表9: CD4-TLNP体外转染结果

LNP编号	CD4+细胞的阳性率 (%)
PBS	0.11
CD4-TLNP	74.3

实验结果表明：CD4-TLNP表现出明显的CD4+细胞的靶向效果，且具有较好的转染效率。

实施例13:

(一) 制备靶向人CD38细胞的纳米颗粒

参考实施例3中的制备方法。将Pre-TLNP与anti-CD38的纳米抗体以1:1的摩尔比例进行混合，并于4℃下孵育过夜。随后加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液超滤洗涤并且无菌过滤后，即得到最终的anti-CD38纳米抗体偶联的纳米颗粒（CD38-TLNP）。

(二) 靶向人CD38细胞的纳米颗粒体外递送效率的评价

anti-CD3扣板：提前一天在24孔板中加入浓度1 μg/mL的anti-Human-CD3抗体，每孔加入200 μL，然后将其于4度存放，包被过夜。

细胞铺板前准备：吸弃24孔板中的液体，然后用1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）洗涤两次。

细胞铺板：用添加anti-CD28抗体（浓度1 μg/mL）和IL-2（工作浓度400 U/mL）的1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）将human PBMC稀释成1 million/mL。在24孔板中，每孔加入1 million的细胞。细胞铺板后，于37℃, 5% CO₂的条件下稳定4 h后再加LNP。

加入包封eGFP-mRNA的CD38-TLNP，使得孔板中LNP的工作浓度是0.1 μg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。24h后通过流式细胞技术检测PBMC中CD38+细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率。

表10: CD38-TLNP体外转染结果

LNP编号	CD38+细胞的阳性率 (%)
PBS	0.14
CD38-TLNP	78.2

实验结果表明：CD38-TLNP表现出明显的CD38+细胞的靶向效果，且具有较好的转染效率。

实施例14:

(一) 制备靶向人CD68细胞的纳米颗粒

参考实施例3中的制备方法。将Pre-TLNP与anti-CD68的纳米抗体以1:1的摩尔比例进行混合，并于4℃下孵育过夜。随后加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液超滤洗涤并且无菌过滤后，即得到最终的anti-CD68纳米抗体偶联的纳米颗粒（CD68-TLNP）。

(二) 靶向人CD68细胞的纳米颗粒体外递送效率的评价

anti-CD3扣板：提前一天在24孔板中加入浓度1 μg/mL的anti-Human-CD3抗体，每孔加入200 μL，然后将其于4度存放，包被过夜。

细胞铺板前准备：吸弃24孔板中的液体，然后用1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）洗涤两次。

细胞铺板：用添加anti-CD28抗体（浓度1 μg/mL）和IL-2（工作浓度400 U/mL）的1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）将human PBMC稀释成1 million/mL。在24孔板中，每孔加入1 million的细胞。细胞铺板后，于37℃, 5% CO₂的条件下稳定4 h后再加LNP。

加入包封eGFP-mRNA的CD68-TLNP，使得孔板中LNP的工作浓度是0.1 μg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。24h后通过流式细胞技术检测PBMC中CD68+细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率。

表11: CD68-TLNP体外转染结果

LNP编号	CD68+细胞的阳性率 (%)
PBS	0.1
CD68-TLNP	78.8

实验结果表明：CD68-TLNP表现出明显的CD68+细胞的靶向效果，且具有较好的转染效率。

实施例15:

(一) 制备靶向人CD117细胞的纳米颗粒

5 参考实施例3中的制备方法。将Pre-TLNP与anti-CD117的纳米抗体以1:1的摩尔比例进行混合，并于4℃下孵育过夜。随后加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液超滤洗涤并且无菌过滤后，即得到最终的anti-CD117纳米抗体偶联的纳米颗粒（CD117-TLNP）。

(二) 靶向人CD117细胞的纳米颗粒体外递送效率的评价

10 复苏培养HLF细胞，加入包封eGFP-mRNA的CD117-TLNP，使得孔板中LNP的工作浓度是0.1 μg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。24h后通过流式细胞技术检测HLF细胞中CD117+的eGFP-mRNA的表达率。

表12: CD117-TLNP体外转染结果

LNP编号	CD117+细胞的阳性率（%）
PBS	0.1
CD117-TLNP	75.9

实验结果表明：CD117-TLNP表现出明显的CD117+细胞的靶向效果，且具有较好的转染效率。

15 实施例16:

(一) 制备靶向人B7H3细胞的纳米颗粒

参考实施例3中的制备方法。将Pre-TLNP与anti- B7H3的纳米抗体以1:1的摩尔比例进行混合，并于4℃下孵育过夜。随后加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液超滤洗涤并且无菌过滤后，即得到最终的anti-B7H3纳米抗体偶联的纳米颗粒（B7H3-TLNP）。

20 (二) 靶向人B7H3细胞的纳米颗粒体外递送效率的评价

复苏培养A2780细胞，加入包封eGFP-mRNA的B7H3-TLNP，使得孔板中LNP的工作浓度是0.1 μg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。24h后通过流式细胞技术检测A2780细胞中B7H3+的eGFP-mRNA的表达率。

表13: B7H3-TLNP体外转染结果

LNP编号	B7H3+细胞的阳性率（%）
PBS	0.12
B7H3-TLNP	76.5

25 实验结果表明：B7H3-TLNP表现出明显的B7H3+细胞的靶向效果，且具有较好的转染效率。

实施例17:

(一) 制备靶向人GPC3细胞的纳米颗粒

30 参考实施例3中的制备方法。将Pre-TLNP与末端连接半胱氨酸的anti-GPC3的纳米抗体以1:1的摩尔比例进行混合，并于4℃下孵育过夜。随后加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液超滤洗涤并且无菌过滤后，即得到最终的anti- GPC3纳米抗体偶联的纳米颗粒（GPC3-TLNP）。

(二) 靶向人GPC3细胞的纳米颗粒体外递送效率的评价

35 复苏培养HepG2，加入包封eGFP-mRNA的GPC3-TLNP，使得孔板中LNP的工作浓度是0.1 μg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。24h后通过流式细胞技术检测HepG2中GPC3+的eGFP-mRNA的表达率。

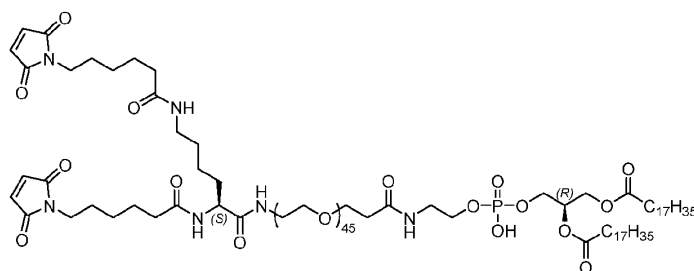
表14: GPC3-TLNP体外转染结果

LNP编号	GPC3+细胞的阳性率（%）
PBS	0.12
GPC3-TLNP	75.1

实验结果表明：GPC3-TLNP表现出明显的GPC3+细胞的靶向效果，且具有较好的转染效率。

实施例18:

由DSPE-PEG₂₀₀₀-Lys-Mal₂脂质偶联多个纳米抗体形成的靶向功能分子组装而成的靶向人CD8⁺ T细胞的纳米颗粒的制备



DSPE-PEG₂₀₀₀-Lys-Mal₂

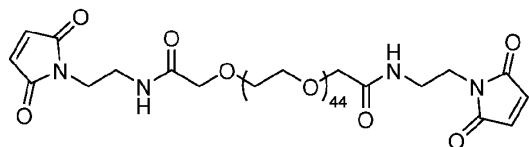
参考实施例3中的制备方法。将可离子化氨基脂质：DSPC：CHO：DMG-PEG₂₀₀₀：DSPE-PEG₂₀₀₀-Lys-Mal₂按照47.5：10：41：1.49：0.01比例的摩尔比例溶解在乙醇中；mRNA溶解在浓度为75 mM柠檬酸pH 4的酸性缓冲溶液中，保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比（N/P）为6.5。

通过微流控设备将乙醇相与水相进行混合，控制其流速为乙醇相与水相的体积比为1:3。两相的总流速为12 mL/min，乙醇相和水相的流速比为1:3，制得LNP粗品。LNP制备完成后立即加10倍体积的25 mM Tris buffer (用Tris/Tris-HCl配置，pH = 7.4-7.5)终止。

将LNP粗品在4 °C，1200 rcf条件下超滤纯化三次后，并加入0.278倍体积浓度为400 mg/mL的蔗糖溶液，得到含有化学偶联位点的LNP（Pre-TLNP）。然后将其与anti-CD8的纳米抗体以1:1的摩尔比例进行混合，并于4 °C下孵育过夜。随后加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液超滤洗涤并且无菌过滤后，即得到最终的anti-CD8纳米抗体偶联的纳米颗粒（CD8-TLNP）。

实施例19:

由Mal-PEG₂₀₀₀-Mal脂质偶联多个纳米抗体形成的靶向功能分子组装而成的靶向人CD8⁺ T细胞的纳米颗粒的制备



Mal-PEG₂₀₀₀-Mal

参考实施例3中的制备方法。将可离子化氨基脂质：DSPC：CHO：DMG-PEG₂₀₀₀：Mal-PEG₂₀₀₀-Mal按照47.5：10：41：1.49：0.01比例的摩尔比例溶解在乙醇中；mRNA溶解在浓度为75 mM柠檬酸pH 4的酸性缓冲溶液中，保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比（N/P）为6.5。

通过微流控设备将乙醇相与水相进行混合，控制其流速为乙醇相与水相的体积比为1:3。两相的总流速为12 mL/min，乙醇相和水相的流速比为1:3，制得LNP粗品。LNP制备完成后立即加10倍体积的25 mM Tris buffer (用Tris/Tris-HCl配置，pH = 7.4-7.5)终止。

将LNP粗品在4 °C，1200 rcf条件下超滤纯化三次后，并加入0.278倍体积浓度为400 mg/mL的蔗糖溶液，得到含有化学偶联位点的LNP（Pre-TLNP）。然后将其与anti-CD8的纳米抗体以1:1的摩尔比例进行混合，并于4 °C下孵育过夜。随后加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液超滤洗涤并且无菌过滤后，即得到最终的anti-CD8纳米抗体偶联的纳米颗粒（CD8-TLNP）。

实施例20:

本实施例为靶向人CD8⁺ T细胞的纳米颗粒中靶向功能分子的结构筛选

（一）制备靶向人CD8⁺ T细胞的纳米颗粒

表15: 具有不同靶向分子结构 (Lkx) 的LNP制备表

LNP编号	(E12LA6B6O3: DSPC : CHO : DMG-PEG ₂₀₀₀ : LKx) 47.5 : 10 : 41: 1.49 : 0.01
cLNP-1	/
TLNP-1	Lk1 (DSPE-PEG2000-Mal)
TLNP-2	Lk2 (DSPE-Mal)
TLNP-3	Lk3 (Chol-PEG2000-Mal)
TLNP-4	Lk4 (Chol-Mal)
TLNP-5	Lk5 (DOPE-Ala-Val-Mal)

1) 含偶联位点的LNP制备

将可离子化氨基脂质 : DSPC : CHO : DMG-PEG₂₀₀₀ : Lkx (其中Lk1和Lk3含有PEG片段, Lk2、Lk4和Lk5不含有PEG片段) 五组分脂质分子按照47.5 : 10 : 41: 1.49 : 0.01的摩尔比例溶解在乙醇中; eGFP-φ-mRNA溶解在浓度为75 mM柠檬酸pH 4的酸性缓冲溶液中, 保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比 (N/P) 为6.5。

通过微流控设备将乙醇相与水相进行混合, 控制其流速为乙醇相与水相的体积比为1:3。两相的总流速为12 mL/min, 乙醇相和水相的流速比为1:3, 制得LNP粗品。LNP制备完成后立即加10倍体积的25 mM Tris buffer (用Tris/Tris-HCl配置, pH = 7.4-7.5)终止。

加终止液的LNP在4 °C, 1200 rcf条件下超滤纯化一次; 接着, 再加入25 mM Tris buffer超滤液在4 °C, 1200 rcf条件下继续超滤浓缩两次。收集所制备的eGFP-φ-LNPs, 加入0.278倍体积浓度为400 mg/mL的蔗糖溶液 (用25 mM Tris buffer, pH = 7.4-7.5定容法配置), 于超净台中用PES材质孔径0.22 μm的滤头无菌过滤。吸取30 μL样品用于检测粒径、分散稀释和包封率, 剩下样品于4 °C冰箱储存。包封率检测完后用87 mg/mL的蔗糖溶液 (用25 mM Tris buffer, pH = 7.4-7.5配置) 将样品稀释至需要的浓度。

2) 纳米抗体修饰的TLNP制备

除cLNP-1外, 取一定量的上述含偶联位点的其他各组eGFP-φ-Pre TLNP, 根据LNP配方, 计算出每组eGFP-φ-Pre TLNP所对应的脂质纳米颗粒中DSPE-PEG2000-Mal的摩尔量。然后按照Lkx与末端连接GS-半胱氨酸的anti-human-CD8-nanobody (浓度2.3 mg/mL, 保存于pH = 8.0的20 mM Tris, 150 mM的NaCl和5%甘油组成的混合缓冲液中)摩尔比1:1的比例, 将Pre-TLNP与纳米抗体进行混合, 并且于4 °C下孵育过夜。

往过夜孵育后的TLNP中加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液 (用25 mM Tris buffer, pH = 7.4-7.5配置) 进行稀释, 并且用100 KD的超滤管进行纯化。于超净台中用PES材质孔径0.22 μm的滤头无菌过滤后, 吸取30 μL样品用于检测粒径、分散稀释和包封率, 剩下样品于4 °C冰箱储存。包封率检测完后用87 mg/mL的蔗糖溶液 (用25 mM Tris buffer, pH = 7.4-7.5配置) 将样品稀释至所需浓度。

表16: 纳米抗体修饰的含不同靶向分子结构的TLNP质控信息

LNP编号	粒径 (nm)	PDI	包封率 (%)
cLNP-1	97.64	0.093	96.97
Lk1-TLNP-1	87.27	0.063	96.38
Lk2-TLNP-2	88.02	0.098	95.91
Lk3-TLNP-3	87.69	0.091	95.47
Lk4-TLNP-4	87.49	0.067	96.09
Lk5-TLNP-5	89.35	0.016	96.02

实验结果表明: 通过不同结构的靶向分子所制备的CD8+ T细胞靶向的脂质纳米颗粒均呈现出较好的表征数据, 处于LNP领域公认的数值范围之内。说明本专利中靶向LNP的制备工艺是稳定的且具有普遍适用性。

LNP的具体表征数据统计图详见图1A和图1B。

(二) 靶向人CD8+T细胞的纳米颗粒体外递送效率的评价

anti-CD3扣板: 提前一天在24孔板中加入浓度1 μg/mL的anti-Human-CD3抗体, 每孔加入200 μL, 然后将其于4度存放, 包被过夜。

细胞铺板前准备：吸弃24孔板中的液体，然后用1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）洗涤两次。

细胞铺板：用添加anti-CD28抗体（浓度1 μg/mL）和IL-2（工作浓度400 U/mL）的1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）将human PBMC稀释成1 million/mL。在24孔板中，每孔加入1 million

5 的细胞。细胞铺板后，于37 °C, 5% CO₂的条件下稳定4 h后再加LNP。
加药：每孔各加入表16中制备的6种LNP，使得孔板中LNP的工作浓度是0.1 μg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。

培养：加完LNP后，PBMC细胞于37 °C, 5% CO₂的条件下转染24 h。

检测eGFP-mRNA的表达：收集各个孔板中的细胞，用市售流式抗体染色后，通过流式细胞技术

10 检测PBMC中CD4+ T与CD8+ T细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率和平均荧光强度MFI。
表17：含不同靶向分子结构的TLNP体外转染结果

LNP编号	CD4 T细胞		CD8 T细胞	
	阳性率（%）和MFI		的阳性率（%）和MFI	
PBS	0.12	2977	0.14	3067
cLNP-1	0.17	2630	0.18	2397
Lk1-TLNP-1	0.24	2190	81.1	5304
Lk2-TLNP-2	0.18	2776	79.8	4084
Lk3-TLNP-3	0.13	2558	9.98	2197
Lk4-TLNP-4	0.15	2423	73.15	3501
Lk5-TLNP-5	0.15	2544	2.92	2069

实验结果表明：通过Lk1，Lk2和Lk4制备而成的TLNP在极低的给药剂量下，表现出明显的CD8+ T细胞的靶向效果，且具有较好的转染效率。

不同靶向分子结构的LNP体外转染情况统计图详见图2A、图2B、图2C和图2D。

15 （三）靶向人CD8+T细胞的纳米颗粒体内递送效率的评价

选取检疫合格、体重达标符合SPF（无特定病原体）级别的6-8周龄NCG雌性小鼠12只，分为4组。每只NCG小鼠尾静脉注射20 M的hPBMC细胞，体积为200 μL。约30 min后，等小鼠静脉伤口愈合，再次通过尾静脉注射表16中所制备的TLNP（Lk1，Lk2和Lk4）。每只NCG小鼠给药剂量20 μg-mRNA-LNP，注射体积为200 μL。表达24小时后，取外周血和收集脾脏裂红后进行流式检测各个细胞亚群中eGFP-

20 mRNA的表达率。
表18：具有不同靶向分子结构的TLNP体内实验分组

实验组别编号	给药LNP名称
G1	PBS
G2	Lk1-TLNP-1
G3	Lk2-TLNP-2
G4	Lk4-TLNP-4

实验结果表明：通过Lk1制备的TLNP在NCG小鼠体内表现出最好的CD8+ T细胞靶向效果和最低的脱靶率。后续实验均基于Lk1-TLNP开展。

不同靶向分子结构的TLNP体内转染情况统计图详见图3。

25 实施例21：

本实施例为靶向人CD8+T细胞的纳米颗粒中靶向功能分子的比例筛选实验。

（一）制备靶向人CD8 T细胞的纳米颗粒

表19：具有不同靶向分子比例的Pre-LNP制备表

LNP编号	LNP五组分比例
	(可离子化氨基脂质：DSPC：CHO：DMG-PEG2000：DSPE-PEG2000-Mal)
cLNP-1	47.5: 10: 41: 1.5
Pre-TLNP-1	47.5: 10: 41: 1.5: 0.0001

Pre-TLNP-2	47.5: 10: 41: 1.5: 0.01
Pre-TLNP-3	47.5: 10: 41: 1.45 : 0.05
Pre-TLNP-4	47.5: 10: 41: 1.40 : 0.10
Pre-TLNP-5	47.5: 10: 41: 1.25 : 0.25
Pre-TLNP-6	47.5: 10: 41:1.0 :0.5

1) 含偶联位点的LNP制备

将可离子化氨基脂质 : DSPC : CHO : DMG-PEG₂₀₀₀ : DSPE-PEG2000-Mal按照表19中所描述的摩尔比例溶解在乙醇中; eGFP-φ-mRNA溶解在浓度为75 mM柠檬酸pH 4的酸性缓冲溶液中, 保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比 (N/P) 为6.5。

5 通过微流控设备将乙醇相与水相进行混合, 控制其流速为乙醇相与水相的体积比为1:3。两相的总流速为12 mL/min, 乙醇相和水相的流速比为1:3, 制得LNP粗品。LNP制备完成后立即加10倍体积的25 mM Tris buffer (用Tris/Tris-HCl配置, pH = 7.4-7.5)终止。

10 加终止液的LNP在4 °C, 1200 rcf条件下超滤纯化一次; 接着, 再加入25 mM Tris buffer超滤液在4 °C, 1200 rcf条件下继续超滤浓缩两次。收集所制备的eGFP-φ-LNPs, 加入0.278倍体积浓度为400 mg/mL的蔗糖溶液 (用25 mM Tris buffer, pH = 7.4-7.5定容法配置), 于超净台中用PES材质孔径0.22 μm的滤头无菌过滤。吸取30 μL样品用于检测粒径、分散稀释和包封率, 剩下样品于4 °C冰箱储存。包封率检测完后用87 mg/mL的蔗糖溶液 (用25 mM Tris buffer, pH = 7.4-7.5配置) 将样品稀释至需要的浓度。

15 实验结果表明: 通过对所制备的七组LNP的质控数据分析, 相比于原始四组分LNP, 当往LNP的配方中引入0.0001 mol%-0.50 mol%的DSPE-PEG2000-Mal脂质时, 会使得相应的LNP的粒径减小。

表20: 含偶联位点的Pre TLNP质控信息

LNP编号	粒径 (nm)	PDI	包封率 (%)
cLNP-1	105.7	0.11	94.79
Pre-TLNP-1	97.45	0.13	92.48
Pre-TLNP-2	88.24	0.09	93.64
Pre-TLNP-3	87.89	0.07	96.50
Pre-TLNP-4	84.57	0.06	95.57
Pre-TLNP-5	84.80	0.05	95.32
Pre-TLNP-6	86.87	0.06	93.04

Pre-TLNP的具体表征数据统计图详见图4A和图4B。

2) 纳米抗体修饰的TLNP制备

20 除cLNP-1外, 取一定量的上述含偶联位点的其他各组eGFP-φ-Pre TLNP, 根据LNP配方, 计算出每组eGFP-φ-Pre TLNP所对应的脂质纳米颗粒中DSPE-PEG2000-Mal的摩尔量。然后按照DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal脂质与末端连接半胱氨酸的anti-human-CD8-nanobody (浓度2.3 mg/mL, 保存于pH = 8.0的20 mM Tris, 150 mM的NaCl和5%甘油组成的混合缓冲液中)摩尔比1:1的比例, 将Pre-TLNP与纳米抗体进行混合, 并且于4 °C下孵育过夜。

25 往过夜孵育后的TLNP中加浓度为87 mg/mL的蔗糖溶液 (用25 mM Tris buffer, pH = 7.4-7.5配置) 进行稀释, 并且用100 KD的超滤管进行纯化。于超净台中用PES材质孔径0.22 μm的滤头无菌过滤后, 吸取30 μL样品用于检测粒径、分散稀释和包封率, 剩下样品于4 °C冰箱储存。包封率检测完后用87 mg/mL的蔗糖溶液 (用25 mM Tris buffer, pH = 7.4-7.5配置) 将样品稀释至所需浓度。

表21: 含不同靶向分子比例的TLNP质控信息

LNP编号	粒径 (nm)	PDI	包封率 (%)
cLNP-1	105.7	0.11	94.79
TLNP-1	96.55	0.13	91.18
TLNP-2	90.98	0.10	92.23
TLNP-3	96.55	0.11	91.16
TLNP-4	97.42	0.08	93.07
TLNP-5	101.00	0.14	92.46

TLNP-6	104.57	0.15	90.25
--------	--------	------	-------

实验结果表明：当含偶联位点的Pre TLNP连接上纳米抗体后，相应的TLNP-均呈现出较好的表征数据，处于LNP领域公认的数值范围之内，说明本专利中靶向LNP的制备工艺是稳定的，具有可行性。

TLNP的具体表征数据统计图详见图5A和图5B。

(二) 靶向人CD8+T细胞的纳米颗粒体外递送效率的评价

5 anti-CD3扣板：提前一天在24孔板中加入浓度1 μg/mL的anti-Human-CD3抗体，每孔加入200 μL，然后将其于4度存放，包被过夜。

细胞铺板前准备：吸弃24孔板中的液体，然后用1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）洗涤两次。

10 细胞铺板：用添加anti-CD28抗体（浓度1 μg/mL）和IL-2（工作浓度400 U/mL）的1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）将human PBMC稀释成1 million/mL。在24孔板中，每孔加入1 million的细胞。细胞铺板后，于37 °C, 5% CO₂的条件下稳定4 h后再加LNP。

加药：每孔各加入表21中的每组LNP，使得孔板中LNP的工作浓度是1.0 μg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。

培养：加完LNP后，PBMC细胞于37 °C, 5% CO₂的条件下转染24 h。

15 检测eGFP-mRNA表达：收集各个孔板中的细胞，用市售流式抗体染色后，通过流式细胞技术检测PBMC中所有细胞、CD4+ T与CD8+ T细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率。

表22: 含不同靶向分子比例的TLNP体外转染结果

LNP编号	PBMC中所有细胞的 阳性率 (%)	CD4+ T细胞 的阳性率 (%)	CD8+ T细胞 的阳性率 (%)
PBS	0.16	0.30	0.33
cLNP-1	24.1	51.4	24.9
TLNP-1	45.1	52.3	94.4
TLNP-2	47.2	53.7	93.4
TLNP-3	53.3	56.7	96.0
TLNP-4	47.4	47.1	94.4
TLNP-5	39.2	27.6	94.5
TLNP-6	36.6	25.8	90.5

(三) 靶向人CD8+T细胞的纳米颗粒体内递送效率的评价

20 选取检疫合格、体重达标符合SPF（无特定病原体）级别的6-8周龄NCG雌性小鼠9只，分为3组。每只NCG小鼠尾静脉注射20 M的hPBMC细胞，体积为200 μL。约30 min后，等小鼠静脉伤口愈合，再次通过尾静脉注射表20中所制备的TLNP-1和TLNP-2。每只NCG小鼠给药剂量20 μg-mRNA-LNP，注射体积为200 μL。表达24小时后，取外周血和收集脾脏裂红后进行流式检测各个细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率。

表23: 具有不同靶向分子比例的TLNP体内实验分组

实验组别编号	给药LNP名称
G1	PBS
G2	TLNP-1 (0.0001%)
G3	TLNP-2 (0.01%)

25 实验结果表明：含有0.01%靶向分子比例的TLNP-2在NCG小鼠体内表现出比0.0001%组的TLNP-1更好的CD8+ T细胞靶向递送效果。

不同靶向分子比例的TLNP体内转染情况统计图详见图6。

实施例22:

30 本实施例为靶向人CD8⁺ T细胞的纳米颗粒中DMG-PEG2000脂质的比例研究

(一) 制备靶向人CD8 T细胞的纳米颗粒

表24: 具有不同PEG脂质比例的CD8-TLNP制备表

LNP编号	LNP五组分比例 (可离子化氨基脂质 : DSPC : CHO : DMG-PEG2000: DSPE-PEG2000-Mal)
TLNP-1	47.5: 10: 41: 0.2: 0.01
TLNP-2	47.5: 10: 41: 0.5: 0.01
TLNP-3	47.5: 10: 41: 1.0: 0.01
TLNP-4	47.5: 10: 41: 1.5: 0.01
TLNP-5	47.5: 10: 41: 2.0: 0.01
TLNP-6	47.5: 10: 41: 5.0 :0.01

本实施例中所用到的脂质纳米颗粒按照实施例20中所描述的方法进行制备。

(二) 靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒体外递送效率的评价

5 anti-CD3扣板: 提前一天在24孔板中加入浓度1 μg/mL的anti-Human-CD3抗体, 每孔加入200 μL, 然后将其于4度存放, 包被过夜。

细胞铺板前准备: 吸弃24孔板中的液体, 然后用1640完全培养基(10%新西兰血清, 1%PS双抗)洗涤两次。

10 细胞铺板: 用添加anti-CD28抗体(浓度1 μg/mL)和IL-2(工作浓度400 U/mL)的1640完全培养基(10%新西兰血清, 1%PS双抗)将human PBMC稀释成1 million/mL。在24孔板中, 每孔加入1 million的细胞。细胞铺板后, 于37 °C, 5% CO₂的条件下稳定4 h后再加LNP。

加药: 每孔各加入表24中的每组LNP, 使得孔板中LNP的工作浓度是1.0 μg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。

培养: 加完LNP后, PBMC细胞于37 °C, 5% CO₂的条件下转染24 h。

15 检测eGFP-mRNA表达: 收集各个孔板中的细胞, 用市售流式抗体染色后, 通过流式细胞技术检测PBMC中所有细胞、CD4⁺ T与CD8⁺ T细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率。

表25: 含不同PEG脂质比例的TLNP体外转染结果

LNP编号	PBMC中所有细胞的 阳性率 (%)	CD4 ⁺ T细胞的 阳性率 (%)	CD8 ⁺ T细胞的 阳性率 (%)
PBS	0.16	0.30	0.33
TLNP-1	12.6	15.2	33.6
TLNP-2	27.2	36.4	76.3
TLNP-3	36.4	46.5	89.2
TLNP-4	47.2	53.7	93.4
TLNP-5	32.8	27.3	87.3
TLNP-6	14.2	15.4	39.7

实验结果表明: 含有1.0%和1.5%-DMG-PEG2000的TLNP相比于其他比例的PEG组表现出更好的CD8⁺ T细胞靶向递送效果。

20 实施例23:

本实施例为由不同结构的可离子化氨基脂质组成的靶向人CD8⁺ T细胞的纳米颗粒的递送效率研究

(一) 制备靶向人CD8 T细胞的纳米颗粒

表26: 由不同可离子化氨基脂质组成的TLNP制备表

LNP编号	可离子化氨基脂质名称
TLNP-1	E12LA6B6O3
TLNP-2	E10LA8B6O3
TLNP-3	SM-102
TLNP-4	Dlin-MC3-DMA

25 本实施例中所用到的脂质纳米颗粒按照可离子化氨基脂质 : DSPC : CHO : DMG-PEG2000: DSPE-

PEG2000-Mal = 47.5: 10: 41: 1.5: 0.01的比例以及参考实施例20中所描述的方法进行制备。

(二) 靶向人CD8+T细胞的纳米颗粒体外递送效率的评价

anti-CD3扣板: 提前一天在24孔板中加入浓度1 µg/mL的anti-Human-CD3抗体, 每孔加入200 µL, 然后将其于4度存放, 包被过夜。

细胞铺板前准备: 吸弃24孔板中的液体, 然后用1640完全培养基 (10%新西兰血清, 1%PS双抗) 洗涤两次。

细胞铺板: 用添加anti-CD28抗体 (浓度1 µg/mL) 和IL-2 (工作浓度400 U/mL) 的1640完全培养基 (10%新西兰血清, 1%PS双抗) 将human PBMC稀释成1 million/mL。在24孔板中, 每孔加入1 million的细胞。细胞铺板后, 于37 °C, 5% CO₂的条件下稳定4 h后再加LNP。

加药: 每孔各加入表26中的每组LNP, 使得孔板中LNP的工作浓度是1.0 µg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。

培养: 加完LNP后, PBMC细胞于37 °C, 5% CO₂的条件下转染24 h。

检测eGFP-mRNA表达: 收集各个孔板中的细胞, 用市售流式抗体染色后, 通过流式细胞技术检测PBMC中所有细胞、CD4+ T与CD8+ T细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率。

表27: 由不同可离子化氨基脂质组成的CD8-TLNP体外转染结果

LNP编号	PBMC中所有细胞的 阳性率 (%)	CD4+ T细胞的 阳性率 (%)	CD8+ T细胞的 阳性率 (%)
PBS	0.2	0.21	0.13
TLNP-1	34.9	17.3	97.3
TLNP-2	26.1	10.2	89.7
TLNP-3	73.2	80.4	91.5
TLNP-4	22.7	8.1	86.0

实验结果表明: E12LA6B6O3、E10LA8B6O3和市售的脂质SM-102组成的CD8-TLNP在CD8+ T细胞群中具有相当甚至略好的转染效率, 但是SM-102在其他非CD8+ T细胞群中表现出更强的脱靶率。综合分析, E12LA6B6O3和E10LA8B6O3具有更好的CD8+ T细胞亚群的靶向递送效果。

实施例24:

本实施例为靶向人CD8+ T细胞的纳米颗粒中体内外给药剂量依赖性研究

(一) 制备靶向人CD8+T细胞的纳米颗粒

本实施例中所用到的两个脂质纳米颗粒分别为实施例21中所制备的cLNP-1和TLNP-2 (0.01%靶向分子比例)。

(二) 靶向人CD8+T细胞的纳米颗粒体外递送剂量依赖性的考察

anti-CD3扣板: 提前一天在24孔板中加入浓度1 µg/mL的anti-Human-CD3抗体, 每孔加入200 µL, 然后将其于4度存放, 包被过夜。

细胞铺板前准备: 吸弃24孔板中的液体, 然后用1640完全培养基 (10%新西兰血清, 1%PS双抗) 洗涤两次。

细胞铺板: 用添加anti-CD28抗体 (浓度1 µg/mL) 和IL-2 (工作浓度400 U/mL) 的1640完全培养基 (10%新西兰血清, 1%PS双抗) 将human PBMC稀释成1 million/mL。在24孔板中, 每孔加入1 million的细胞。细胞铺板后, 于37 °C, 5% CO₂的条件下稳定4 h后再加LNP。

加药: 每孔各加入所对应的靶向分子修饰的TLNP-2, 使得孔板中LNP的工作浓度如下表所示, 加PBS作为阴性对照组, 加LNP-1作为阳性对照组。

表28: LNP加入孔板中信息

实验分组	孔编号	LNP工作浓度 (µg/ml)
阴性对照	1	0
0.01	2	0.01
0.025	3	0.025
0.05	4	0.05
0.1	5	0.1

0.25	6	0.25
0.5	7	0.5
常规剂量	8	1
2	9	2
4	10	4
8	11	8
cLNP-1 常规剂量	12	1

培养：加完LNP后，PBMC细胞于37℃, 5% CO₂的条件下转染24 h。

检测eGFP-mRNA表达：收集各个孔板中的细胞，用市售流式抗体染色后，通过流式细胞技术检测hPBMC中所有细胞、CD3+ T、CD4+ T与CD8+ T细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率。

表29：纳米抗体修饰的LNP体外对T细胞的靶向效果数据汇总

LNP工作浓度 (μg/mL)	EGFP在所有细 胞阳性率 (%)	EGFP在CD3 T 细胞阳性率(%)	EGFP在CD4 T细 胞阳性率 (%)	EGFP在CD8 T细 胞阳性率 (%)
阴性对照	0.47	0.36	0.38	0.36
0.01	24.9	23.6	4.58	81.5
0.025	28.1	26.8	6.52	99.0
0.05	30.1	28.7	9.78	99.0
0.1	31.4	30.0	10.4	94.5
0.25	27.1	25.8	10.0	96.8
0.5	29.3	27.8	15.7	89.4
常规剂量	41.6	40.0	27.2	99.6
2	60.2	58.0	50.9	99.8
4	71.8	71.6	71.3	100
8	69.1	68.5	69.0	99.4
cLNP-1 常规剂量	16.0	15.8	19.0	14.3

5 实验结果表明：在hPBMC的体外转染实验中，当TLNP-2的工作浓度低至0.025 μg/mL时，依然保持高比例的CD8 T细胞靶向效果，说明本专利中所开发的TLNP具有低剂量就可以实现高细胞靶向的能力。

cLNP-1和TLNP-2在hPBMC中EGFP-mRNA表达效率的流式分析图详见图7A、图7B、图7C、图7D和图7E。

10 (三) 靶向人CD8+T细胞的纳米颗粒体内递送剂量依赖性的考察

选取检疫合格、体重达标符合SPF（无特定病原体）级别的6-8周龄NCG雌性小鼠12只，分为4组。每只NCG小鼠尾静脉注射20 M的hPBMC细胞，体积为200 μL。约30 min后，等小鼠静脉伤口愈合，再次通过尾静脉注射不同剂量的TLNP-2，注射体积为200 μL。表达24小时后，取外周血和收集脾脏裂红后进行流式检测各个细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率。

15 表30： TLNP-2体内实验分组

实验组别编号	给药剂量
G1	PBS
G2	0.1 mpk (2 μg)
G3	0.5 mpk (10 μg)
G4	1 mpk (20 μg)

实验结果表明：含有0.01%靶向分子比例的TLNP-2在NCG小鼠体内0.5 mpk的给药剂量下就具有很好的CD8+ T细胞靶向递送效果。

不同给药剂量的TLNP-2体内转染情况统计图详见图8。

实施例25:

本实施例为靶向人CD8+ T细胞的纳米颗粒组分配方研究

(一) 制备靶向人CD8 T细胞的纳米颗粒

表31: 不同配比的TLNP制备表

LNP编号	LNP五组分比例 (可离子化氨基脂质 : DSPC : CHO : DMG-PEG2000: DSPE-PEG2000-Mal)
TLNP-2-F1	47.5: 10: 41: 1.5: 0.01
TLNP-2-F2	47.5: 15: 36: 1.0: 0.01

5 本实施例中所用到的两个脂质纳米颗粒TLNP-2-F1和TLNP-2-F2均按照实施例20中所描述的方法进行制备。

(二) 不同配方的靶向人CD8+T细胞的纳米颗粒体内递送效率的考察

10 选取检疫合格、体重达标符合SPF（无特定病原体）级别的6-8周龄NCG雌性小鼠9只，分为3组。每只NCG小鼠尾静脉注射20 M的hPBMC细胞，体积为200 μ L。约30 min后，等小鼠静脉伤口愈合，再次通过尾静脉注射所制备的TLNP-2-F1和TLNP-2-F2。每只NCG小鼠给药剂量10 μ g-mRNA-LNP，注射体积为200 μ L。表达24小时后，取外周血和收集脾脏裂红后进行流式检测各个细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率。

表32: 具有不同配比的TLNP体内实验分组

实验组别编号	给药LNP名称
G1	PBS
G2	TLNP-2-F1
G3	TLNP-2-F2

15 实验结果表明：由配方F2制备而成的含有0.01%靶向分子比例的TLNP-2-F2在0.5 mpk的给药剂量下，NCG小鼠体内表现出比F1组更好的CD8+ T细胞靶向递送效果。

不同配比的TLNP-2体内转染情况统计图详见图9A、图9B、图9C、图9D和图9E。

实施例26:

本实施例为靶向人CD8+ T细胞的纳米颗粒体外冻融稳定性评价

20 (一) 制备靶向人CD8+T细胞的纳米颗粒

本实施例中所用到的两个脂质纳米颗粒分别为实施例21中所制备的cLNP-1和TLNP-2。

(二) 靶向人CD8+T细胞的纳米颗粒冻融稳定性的考察

25 将制备好的LNP冻存于-80°冰箱中存放24小时以上，取出置于4°冰箱快速复溶，此样本为冻融一次情况；

再将复溶的样本再一次冻存于-80°冰箱中存放24小时以上，取出置于4°冰箱快速复溶，此样本为冻融两次情况；

再将复溶的样本再一次冻存于-80°冰箱中存放24小时以上，取出置于4°冰箱快速复溶，此样本为冻融三次情况；

对每次复溶后的LNP进行粒径、PDI以及包封率的检测，此为LNP冻融稳定性的考察。

30 表33: LNP冻融后的表征信息

分组	粒径 (nm)		PDI		包封率 (%)	
LNP名称	cLNP1	TLNP-2	cLNP1	TLNP-2	cLNP1	TLNP-2
未冻融	105.7	90.98	0.11	0.10	94.79	92.23
冻融1次	106.5	91.16	0.11	0.12	94.66	91.30
冻融2次	110.2	94.85	0.13	0.14	93.78	90.07
冻融3次	114.6	98.20	0.17	0.15	91.43	89.86

实施例27:

本实施例为靶向人CD8+T细胞的纳米颗粒长期稳定性的评价

(一) 制备靶向人CD8+T细胞的纳米颗粒

表34: 具有不同靶向分子比例的LNP制备配方表

组别	LNP五组分比例 (可离子化氨基脂质 : DSPC : CHO : DMG-PEG2000: DSPE-PEG2000-Mal)
cLNP-1	47.5: 10: 41: 1.5: 0.0
TLNP-2	47.5: 10: 41: 1.5: 0.01
TLNP-3	47.5: 10: 41: 1.5: 0.05

本实施例中, 含偶联位点的LNP与纳米抗体修饰的LNP的制备方法参考实施例21中所描述的工艺。

(二) 靶向人CD8+T细胞的纳米颗粒稳定性的考察

5 1. 纳米颗粒制备好第0天:

1) 对刚制备好的纳米抗体修饰的LNP进行表征的检测

表35: 纳米抗体修饰的LNP质控信息 (第0天)

LNP编号	粒径 (nm)	PDI	包封率 (%)
cLNP-1	105.7	0.11	94.79
TLNP-2	90.98	0.10	92.23
TLNP-3	96.55	0.11	91.16

2) 对刚制备好的纳米抗体修饰的LNP进行体外递送效率的检测

10 anti-CD3扣板: 提前一天在24孔板中加入浓度1 µg/mL的anti-Human-CD3抗体, 每孔加入200 µL, 然后将其于4度存放, 包被过夜。

细胞铺板前准备: 吸弃24孔板中的液体, 然后用1640完全培养基 (10%新西兰血清, 1%PS双抗) 洗涤两次。

细胞铺板: 用1640完全培养基 (10%新西兰血清, 1%PS双抗) 将PBMC稀释成1 million/mL。在24孔板中, 每孔加入1 million的细胞。细胞铺板后, 稳定4 h后再加LNP。

15 加药: 每孔各加入所对应的靶向分子修饰的LNP, 使得孔板中LNP的工作浓度是1 µg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。

培养: 加完LNP后, PBMC细胞于37 °C, 5% CO₂的条件下转染24 h。

eGFP-mRNA表达的检测: 收集各个孔板中的细胞, 用市售流式抗体染色后, 通过流式细胞技术检测PBMC中全部细胞、CD4 T和CD8 T细胞中eGFP-mRNA的表达率。

20 表36: 纳米抗体修饰的LNP体外对T细胞的靶向效果数据汇总 (第0天)

LNP编号	PBMC中所有细胞的阳性率 (%)	CD4 T细胞的阳性率 (%)	CD8 T细胞的阳性率 (%)
PBS组	0.11	0.36	0.28
LNP-1	31.33	36.82	32.37
LNP-2-Nb	58.63	47.99	96.78
LNP-3-Nb	69.29	53.71	99.10

2. 纳米颗粒制备好第3天:

1) 对制备好的纳米抗体修饰的LNP进行表征的检测 (第3天)

表37: 纳米抗体修饰的LNP质控信息 (第3天)

LNP编号	粒径 (nm)	PDI	包封率 (%)
cLNP-1	106.87	0.10	93.10
TLNP-2	91.73	0.10	92.18
TLNP-3	96.57	0.09	90.94

3) 对制备好的纳米抗体修饰的LNP进行体外递送效率的检测 (第3天)

25 步骤同上

表38: 纳米抗体修饰的LNP体外对T细胞的靶向效果数据汇总 (第3天)

LNP编号	PBMC中所有细胞的 阳性率 (%)	CD4 T细胞 的阳性率 (%)	CD8 T细胞 的阳性率 (%)
PBS组	0.16	0.33	0.25
cLNP-1	30.11	35.32	32.09
TLNP-2	54.53	47.23	95.87
TLNP-3	63.49	51.98	99.00

3.纳米颗粒制备好第7天:

1) 对制备好的纳米抗体修饰的LNP进行表征的检测 (第7天)

表39: 纳米抗体修饰的LNP质控信息 (第7天)

LNP编号	粒径 (nm)	PDI	包封率 (%)
cLNP-1	108.28	0.09	91.38
TLNP-2	94.50	0.09	91.45
TLNP-3	98.24	0.11	89.84

5 3) 对制备好的纳米抗体修饰的LNP进行体外递送效率的检测 (第7天)
步骤同上

表40: 纳米抗体修饰的LNP体外对T细胞的靶向效果数据汇总 (第7天)

LNP编号	PBMC中所有细胞的 阳性率 (%)	CD4 T细胞 的阳性率 (%)	CD8 T细胞 的阳性率 (%)
PBS组	0.18	0.35	0.29
cLNP-1	28.61	31.56	29.09
TLNP-2	51.80	46.84	94.36
TLNP-3	60.32	49.81	97.69

4.纳米颗粒制备好第14天:

1) 对制备好的纳米抗体修饰的LNP进行表征的检测 (第14天)

10 表41: 纳米抗体修饰的LNP质控信息 (第14天)

LNP编号	粒径 (nm)	PDI	包封率 (%)
LNP-1	112.70	0.11	90.47
TLNP-2	98.73	0.10	90.12
TLNP-3	101.97	0.11	87.04

3) 对制备好的纳米抗体修饰的LNP进行体外递送效率的检测 (第14天)
步骤同上

表42: 纳米抗体修饰的LNP体外对T细胞的靶向效果数据汇总 (第14天)

LNP编号	PBMC中所有细胞的 阳性率 (%)	CD4 T细胞 的阳性率 (%)	CD8 T细胞 的阳性率 (%)
PBS组	0.21	0.48	0.36
cLNP-1	25.75	27.77	25.52
TLNP-2	42.36	46.86	91.36
TLNP-3	50.28	48.26	93.59

5.纳米颗粒制备好第1个月:

15 1) 对制备好的纳米抗体修饰的LNP进行表征的检测 (第1个月)

表43: 纳米抗体修饰的LNP质控信息 (第1个月)

LNP编号	粒径 (nm)	PDI	包封率 (%)
cLNP-1	115.13	0.10	90.42
TLNP-2	104.30	0.10	88.89
TLNP-3	105.77	0.14	83.76

2) 对制备好的纳米抗体修饰的LNP进行体外递送效率的检测 (第1个月)

步骤同上

表44: 纳米抗体修饰的LNP体外对T细胞的靶向效果数据汇总 (第1个月)

LNP编号	PBMC中所有细胞的 阳性率 (%)	CD4 T细胞 的阳性率 (%)	CD8 T细胞 的阳性率 (%)
PBS组	0.25	0.39	0.31
cLNP-1	25.88	26.48	26.33
TLNP-2	36.23	44.85	85.39
TLNP-3	45.74	46.91	88.92

实验结果表明: 纳米抗体修饰的LNP在4 °C下保存一个月后, 虽然其理化性质的变化趋势和变化幅度与传统的四组分cLNP类似, 但是依然能够保持较好的CD8 T细胞的靶向效果, 说明本专利中所开发的TLNP具有较好的稳定性, 能够长期保持较高的细胞靶向的能力。

传统LNP和靶向TLNP长期稳定性研究数据统计图详见图10A、图10B、图10C、图10D、图10E和图10F。

实施例28:

本实施例为靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒递送药物后功能学的评价

(一) 制备靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒

本实施例中所用到的两个脂质纳米颗粒分别为实施例21中所制备的cLNP-1和TLNP-2。

(二) 靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒递送药物后功能学的评价

anti-CD3扣板: 提前一天在24孔板中加入浓度1 µg/mL的anti-Human-CD3抗体, 每孔加入200 µL, 然后将其于4度存放, 包被过夜。

细胞铺板前准备: 吸弃24孔板中的液体, 然后用1640完全培养基 (10%新西兰血清, 1%PS双抗) 洗涤两次。

细胞铺板: 用1640完全培养基 (10%新西兰血清, 1%PS双抗) 将PBMC稀释成1 million/mL。在24孔板中, 每孔加入1 million的细胞。细胞铺板后, 稳定4 h后再加LNP。

加药: 每孔各加入所对应的靶向分子修饰的LNP, 使得孔板中LNP的工作浓度是1 µg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。

培养: 加完LNP后, PBMC细胞于37 °C, 5% CO₂的条件下转染24 h。

杀伤实验: 收集各个孔板中的细胞并计数, 配成1million/ml, 准备好CD19⁺的B淋巴细胞瘤细胞系, 计数, 配成1million/ml,

复苏人PBMC, 做CD19 CAR-LNP转染后的细胞对照, 做不同的ET比, 按下表加入相应体系, 每个编号组做3复孔:

37 °C下孵育4-8小时;

准备死细胞染料7-AAD, 其储存浓度为2 mg/ml, 用水配成0.1 µg/10 µl;

加2.5 µL的7-AAD于流式管中, 马上上机检测, 其中7-AAD为PerCP-Cy5.5通道, Violet为BV421通道。

杀伤率为CFSE+7-AAD+/Total CFSE+。

表45: 靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒递送CAR后特异性杀伤效果的功能性评价的数据汇总 (3复孔均值)

cLNP-1	杀伤效率 (%)	TLNP-2	杀伤效率 (%)
1	17.0 %	1	31.6 %
2	15.2 %	2	34.4 %
3	18.8 %	3	26.5 %

实施例29:

本实施例为靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒在生物体内分布情况研究

(一) 制备靶向人CD8 T细胞的纳米颗粒

采用实施例21中所描述的制备方法, 本实施例中所用到的两个脂质纳米颗粒为分别为包封

Luciferase mRNA或者25% Cy5染料标记Luciferase mRNA的cLNP-1和TLNP-2。

(二) 靶向人CD8 T细胞的纳米颗粒在Balb/c小鼠体内的Cy5-mRNA生物分布

选取检疫合格、体重达标符合SPF(无特定病原体)级别的6-8周龄Balb/c雌性小鼠9只(每组3只)。G1组每只Balb/c小鼠尾静脉注射200 μL的PBS。G2和G3组每只Balb/c小鼠尾静脉注射5 μg的25%-Cy5-Luc-φ-mRNA LNP, 注射体积为200 μL。

给药2 h后, 利用异氟烷麻醉, 解剖小鼠, 取出脑、心、肝、脾、肺、肾脏、胸腺、淋巴结和骨髓, 进行离体器官成像。拍摄仪器采用深圳湾实验室的perkin Elmer公司的Living Imaging仪器, 采用系统默认的Cy5成像模式。

表46: Cy5荧光标记研究LNP体内分布实验分组

实验组别编号	给药LNP名称
G1	PBS
G2	cLNP (100%含量25%Cy5-Luc)
G3	TLNP-2 (100%含量25%Cy5-Luc)

实验结果表明: 传统LNP和细胞靶向TLNP在普通Balb/c小鼠中的生物分布情况基本类似。肝脏处Cy5-mRNA的富集量最高, 其次是脾脏、肾脏和肺器官。

(三) 靶向人CD8 T细胞的纳米颗粒在Balb/c小鼠体内的Luc-mRNA生物分布

选取检疫合格、体重达标符合SPF(无特定病原体)级别的6-8周龄Balb/c雌性小鼠9只(每组3只)。G1组每只Balb/c小鼠尾静脉注射200 μL的PBS。G2和G3组每只Balb/c小鼠尾静脉注射5 μg的Luc-φ-mRNA LNP, 注射体积为200 μL。

给药6 h后, 利用异氟烷麻醉并腹腔注射荧光素酶底物250 μL, 10分钟后解剖小鼠, 取出脑、心、肝、脾、肺、肾脏、胸腺、淋巴结和骨髓, 进行离体器官成像。拍摄仪器采用深圳湾实验室的perkin Elmer公司的Living Imaging仪器, 参数设置为F8模式, 曝光时间为2秒。成像结束后, 对所取的器官提取mRNA, 进行qPCR实验, 统计每个器官中mRNA的富集量。

表47: Luc成像研究LNP体内分布实验分组

实验组别编号	给药LNP名称
G1	PBS
G2	cLNP (100%含量Luc)
G3	TLNP-2 (100%含量Luc)

实验结果表明: 传统LNP和细胞靶向TLNP在普通Balb/c小鼠中的生物分布情况基本类似。脾脏处Luc蛋白的表达量和Luc-mRNA的富集量最高, 且TLNP-2组略高于cLNP组。

Cy5荧光、Luc成像和qPCR法研究Balb/c小鼠体内的生物分布实验结果统计图详见图11A、图11B、图11C和图11D。

(一) 靶向人CD8 T细胞的纳米颗粒在NCG小鼠体内的Luc-mRNA生物分布研究

选取检疫合格、体重达标符合SPF(无特定病原体)级别的6-8周龄NCG雌性小鼠9只, 分为3组。每只NCG小鼠尾静脉注射20 M的hPBMC细胞, 体积为200 μL。约30 min后, 等小鼠静脉伤口愈合, 通过尾静脉注射所制备的cLNP和TLNP-2。每只NCG小鼠给药剂量为5 μg-Luc-LNP, 注射体积为200 μL。

给药6 h后, 利用异氟烷麻醉并腹腔注射荧光素酶底物250 μL, 10分钟后解剖小鼠, 取出脑、心、肝、脾、肺、肾脏和骨髓, 进行离体器官成像。拍摄仪器采用深圳湾实验室的perkin Elmer公司的Living Imaging仪器, 参数设置为F8模式, 曝光时间为2秒。成像结束后, 对所取的脾脏、肝脏和外周血提取mRNA, 进行qPCR实验, 统计每个器官中mRNA的富集量。

表48: Luc成像研究LNP体内分布实验分组

实验组别编号	给药LNP名称
G1	PBS
G2	cLNP (100%含量Luc)
G3	TLNP-2 (100%含量Luc)

实验结果表明: 在NCG小鼠模型中, 相比于传统LNP, CD8+ T细胞靶向TLNP-2能够更有选择性地将Luc-mRNA递送至hPBMC丰富的器官, 且其表新出更高的脾肝荧光强度比值。

Luc成像和qPCR法研究NGC小鼠体内的生物分布实验结果统计图详见图12A和图12B。

实施例30:

本实施例为靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒体外剂量毒性的评价

(一) 制备靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒

本实施例中所用到的两个脂质纳米颗粒分别为实施例21中所制备的cLNP-1和TLNP-2。

(二) 靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒递送剂量毒性的考察

anti-CD3扣板: 提前一天在24孔板中加入浓度1 μg/mL的anti-Human-CD3抗体, 每孔加入200 μL, 然后将其于4度存放, 包被过夜。

细胞铺板前准备: 吸弃24孔板中的液体, 然后用1640完全培养基(10%新西兰血清, 1%PS双抗)洗涤两次。

细胞铺板: 用1640完全培养基(10%新西兰血清, 1%PS双抗)将PBMC稀释成1 million/mL。在96孔板中, 每孔加入0.05million的细胞, 六复孔。细胞铺板后, 稳定4 h后再加LNP。

加药: 每孔各加入所对应的靶向分子修饰的TLNP-2, 使得孔板中LNP的工作浓度如下表所示, 加PBS作为阴性对照组。

表49: LNP加入孔板中信息

分组	孔编号	LNP工作浓度 (μg/mL)
阴性对照	1	0
0.25	2	0.25
0.5	3	0.5
常规剂量	4	1
2	5	2
4	6	4
8	7	8

培养: 加完LNP后, PBMC细胞于37 °C, 5% CO₂的条件下转染24 h。

细胞毒性的检测: 加入20 μL的CCK8试剂进入96孔板中并在37°培养箱避光孵育, 检测OD值, 计算公式为: 细胞存活率= [(As-Ab) / (Ac-Ab)] × 100 %

其中, As为实验孔吸光度 (含细胞、培养基、CCK8溶液和药物溶液);

Ac为对照孔吸光度 (含细胞、培养基、CCK8 溶液, 不含药物);

Ab为空白孔吸光度 (含培养基、CCK8 溶液, 不含细胞、药物)。

分析检测数据, 确认LNP对细胞的毒性。

实验结果表明: 不同工作浓度的TLNP-2均未表现出细胞毒性, 说明纳米抗体修饰的TLNP是安全的, 细胞对该LNP具有非常高的剂量耐受性。

不同工作浓度的TLNP-2在hPBMC中的剂量安全性研究数据详见图13。

实施例31:

本实施例为靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒小鼠体内安全性的评价

(一) 制备靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒

本实施例中所用到的两个脂质纳米颗粒分别为实施例21中所制备的cLNP-1和TLNP-2。

(二) 靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒体内安全性的考察

将制备好的LNP分别给小鼠经尾静脉注射80 μg每只小鼠 (急毒), 或者20 μg每只小鼠, 连续注射6次, 每周一次 (长毒);

急毒组小鼠24小时后对小鼠进行采血分离血清, 检测肝肾功能和细胞因子水平, 解剖小鼠获得主要组织脏器, 进行组织病理学检测;

长毒组在最后一次注射一周后对小鼠进行采血分离血清, 检测肝肾功能和细胞因子水平, 解剖小鼠获得主要组织脏器, 进行组织病理学检测;

分析检测数据, 确认LNP的毒性。

实验结果表明: 无论是急毒组还是长毒组小鼠, 其肝肾功能、细胞因子水平以及组织切片均与未给药组基本一致, 说明TLNP未表现出明显的毒性, 是相对安全的。

不同剂量下传统cLNP与靶向TLNP在小鼠体内急毒实验的肝脏毒性指标检测结果详见图14。

实施例32:

本实施例为靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒在NHP体内递送效率的评价

(一) 制备靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒

本实施例中所用到的脂质纳米颗粒分别为实施例21中所制备的TLNP-2。

(二) 靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒递送效率的评价

选取检疫合格、体重达标的食蟹猴NHP 2只，分为2组，通过静脉推注所制备的TLNP-EGFP，药物浓度为100μg/mL，一组给药剂量0.2mpk作为高剂量组，另外一组给药剂量0.1mpk作为低剂量组。给药前和给药后第1-7天、第10天和第16天，取外周血进行流式检测各个细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率。

实验结果表明：和对照组相比，TLNP给药后NHP体内表现出CD8细胞中明显的靶向递送效果，高剂量组表现出比低剂量组更高的靶向递送效果。高剂量组和低剂量组都表现为较高的靶向作用和较低的脱靶。TLNP给药后体内EGFP表达动态变化结果表明eGFP-mRNA的表达在NHP体内可以维持一周的高水平表达。

TLNP-2在NHP体内EGFP表达情况详见图15。

TLNP-2在NHP体内EGFP靶向和脱靶情况详见图16。

TLNP-2 NHP体内EGFP表达动态变化详见图17。

实施例33:

本实施例为靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒NHP体内安全性评价

(一) 制备靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒

本实施例中所用到的脂质纳米颗粒分别为实施例21中所制备的TLNP-2。

(二) 靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒安全性的评价

NHP给药剂量同实施例32，靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒在NHP体内的安全性评价包括：给药前和给药后第25天、第37天、第39天、第43天、第46天对NHP进行体重测量；给药前和给药后第1-7天、第14天、第21天、第25天对NHP进行体温测量；给药前和给药后第1天进行血常规检测；给药前和给药后第1-6天收集血清进行固相芯片细胞因子检测；给药前和给药后第1-7天、第10天、第16天收集血浆进行血生化分析。

实验结果表明：持续的NHP体重和体温监测表明TLNP给药后NHP此两项的指标均维持给药前水平。血常规检测表明给药后粒细胞有轻微上升，其余血常规指标变化不大。持续的细胞因子检测表明给药后细胞因子轻微浮动。血生化分析表明给药后只有瞬时的CK和AST变化，并快速恢复到给药前水平。这些都表明靶向人CD8⁺T细胞的纳米颗粒在NHP体内具有很高的安全性。

TLNP-2给药后NHP体重变化情况详见图18。

TLNP-2给药后NHP体温变化情况详见图19。

TLNP-2给药后NHP血常规变化情况详见图20。

TLNP-2给药后NHP血清因子变化情况详见图21。

TLNP-2给药后NHP血生化情况详见图22A、图22B、图22C、图22D、图22E、图22F、图22G、图22H、图22I和图22J。

实施例34:

本实施例为靶向人CD5⁺T细胞的纳米颗粒中靶向分子的种类筛选

(一) 制备靶向人CD5⁺T细胞的纳米颗粒

表50: 具有不同靶向分子(Lx)的LNP制备表

LNP编号	靶向分子名称与对应序列
Iso-TLNP-1	同型抗体
L1-TLNP-1	L1 (EQ ID NO:31)
L2-TLNP-2	L2 (EQ ID NO:67)

L3-TLNP-3	L3 (EQ ID NO:70)
L4-TLNP-4	L4 (EQ ID NO:74)

本实施中所需要的五组TLNP参考实施例20中所描述的方法进行制备。其中可离子化氨基脂质：DSPC：CHO：DMG-PEG₂₀₀₀：DSPE-PEG2000-Mal五组分脂质分子按照47.5：10：41：1.49：0.01的摩尔比例溶解在乙醇中；eGFP-φ-mRNA溶解在浓度为75 mM柠檬酸pH 4的酸性缓冲溶液中，保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比（N/P）为6.5。

5 表51：纳米抗体修饰的含不同靶向分子Lx-TLNP质控信息

LNP编号	粒径（nm）	PDI	包封率（%）
Iso LNP-1	100.87	0.13	90.66%
L1-TLNP-1	98.57	0.10	92.54%
L2-TLNP-2	97.93	0.09	91.31%
L3-TLNP-3	95.79	0.09	92.30%
L4-TLNP-4	96.83	0.09	91.50%

（二）靶向人CD5⁺T细胞的纳米颗粒体外递送效率的评价

anti-CD3扣板：提前一天在24孔板中加入浓度1 μg/mL的anti-Human-CD3抗体，每孔加入200 μL，然后将其于4度存放，包被过夜。

10 细胞铺板前准备：吸弃24孔板中的液体，然后用1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）洗涤两次。

细胞铺板：用添加anti-CD28抗体（浓度1 μg/mL）和IL-2（工作浓度400 U/mL）的1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）将human PBMC稀释成1 million/mL。在24孔板中，每孔加入1 million的细胞。细胞铺板后，于37 °C, 5% CO₂的条件下稳定4 h后再加LNP。

15 加药：每孔各加入表50中所制备的五组LNP，使得孔板中LNP的工作浓度是0.5 μg/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。

培养：加完LNP后，PBMC细胞于37 °C, 5% CO₂的条件下转染24 h。

检测eGFP-mRNA的表达：收集各个孔板中的细胞，用市售流式抗体染色后，通过流式细胞技术检测PBMC中CD5⁺ T与CD3⁺ T细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率和平均荧光强度MFI。

表52：含不同靶向分子的TLNP体外转染结果

LNP编号	CD5 ⁺ T细胞 阳性率（%）和MFI		CD3 ⁺ T细胞 的阳性率（%）和MFI	
PBS	0.4	7043	0.5	1840
Iso LNP-1	26.3	2805	18.5	2880
L1-TLNP-1	71.9	14279	47.8	6878
L2-TLNP-2	90.2	6932	56.9	12589
L3-TLNP-3	71.4	2782	48.1	6763
L4-TLNP-4	27.4	2750	19.0	2899

20 实验结果表明：通过L1，L2和L3制备而成的TLNP在较低的给药剂量下，表现出明显的CD5⁺ T细胞的靶向效果，且具有较好的转染效率。

含不同靶向分子的CD5-TLNP体外转染结果详见图23A、图23B、图23C和图23D。

实施例35:

25 本实施例为靶向人CD5⁺T细胞的纳米颗粒中靶向分子的比例筛选

（一）制备靶向人CD5⁺T细胞的纳米颗粒

表53：具有不同靶向分子比例的TLNP制备表

LNP编号	靶向分子名称	DSPE-PEG2000-Mal脂质比例
R1-L1-TLNP-1	L1	R1 = 0.01%
R1-L2-TLNP-2	L2	R1 = 0.01%
R1-L3-TLNP-3	L3	R1 = 0.01%

R2-L1-TLNP-4	L1	R2 = 0.05%
R2-L2-TLNP-5	L2	R2 = 0.05%
R2-L3-TLNP-6	L3	R2 = 0.05%
R3-L1-TLNP-7	L1	R3 = 0.10%
R3-L2-TLNP-8	L2	R3 = 0.10%
R3-L3-TLNP-9	L3	R3 = 0.10%
R4-L1-TLNP-10	L1	R4 = 0.25%
R4-L2-TLNP-11	L2	R4 = 0.25%
R4-L3-TLNP-12	L3	R4 = 0.25%

本实施中所需要的十二组TLNP参考实施例20中所描述的方法进行制备。其中可离子化氨基脂质：DSPC：CHO：DMG-PEG₂₀₀₀：DSPE-PEG2000-Mal五组分脂质分子按照47.5：10：41：X：Y的摩尔比例（X和Y的总和为1.5）溶解在乙醇中；eGFP- φ -mRNA溶解在浓度为75 mM柠檬酸pH 4的酸性缓冲溶液中，保证水相中mRNA的浓度为0.33 mg/mL。可离子化氨基脂质与mRNA的摩尔比（N/P）为6.5。

5 表54：不同靶向分子比例TLNP质控信息

LNP编号	粒径（nm）	PDI	包封率（%）
R1-L1-TLNP-1	94.80	0.11	89.97%
R1-L2-TLNP-2	94.51	0.09	91.81%
R1-L3-TLNP-3	94.07	0.08	91.46%
R2-L1-TLNP-4	95.58	0.11	89.33%
R2-L2-TLNP-5	95.86	0.11	92.06%
R2-L3-TLNP-6	95.35	0.11	91.14%
R3-L1-TLNP-7	96.72	0.10	89.94%
R3-L2-TLNP-8	98.10	0.11	85.91%
R3-L3-TLNP-9	99.69	0.15	90.52%
R4-L1-TLNP-10	97.00	0.10	89.24%
R4-L2-TLNP-11	98.88	0.10	89.02%
R4-L3-TLNP-12	98.76	0.11	90.65%

（二）靶向人CD5⁺T细胞的纳米颗粒体外递送效率的评价

anti-CD3扣板：提前一天在24孔板中加入浓度1 μ g/mL的anti-Human-CD3抗体，每孔加入200 μ L，然后将其于4度存放，包被过夜。

10 细胞铺板前准备：吸弃24孔板中的液体，然后用1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）洗涤两次。

细胞铺板：用添加anti-CD28抗体（浓度1 μ g/mL）和IL-2（工作浓度400 U/mL）的1640完全培养基（10%新西兰血清，1%PS双抗）将human PBMC稀释成1 million/mL。在24孔板中，每孔加入1 million的细胞。细胞铺板后，于37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂的条件下稳定4 h后再加LNP。

15 加药：每孔各加入表53中所制备的12组LNP，使得孔板中LNP的工作浓度是0.5 μ g/mL。此外设置加PBS作为阴性对照组。

培养：加完LNP后，PBMC细胞于37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂的条件下转染24 h。

检测eGFP-mRNA的表达：收集各个孔板中的细胞，用市售流式抗体染色后，通过流式细胞技术检测PBMC中CD5⁺ T细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率和平均荧光强度MFI。

表55：含不同靶向分子比例的TLNP体外转染结果

LNP编号	阳性率（%）	MFI
PBS	0.4	1580
R1-L1-TLNP-1	66.8	6228
R1-L2-TLNP-2	84.7	10078
R1-L3-TLNP-3	64.0	6001
R2-L1-TLNP-4	72.8	7094

R2-L2-TLNP-5	91.5	12959
R2-L3-TLNP-6	67.7	6449
R3-L1-TLNP-7	76.3	7576
R3-L2-TLNP-8	92.7	13841
R3-L3-TLNP-9	68.0	6542
R4-L1-TLNP-10	67.4	5967
R4-L2-TLNP-11	89.0	11936
R4-L3-TLNP-12	61.7	5725

实验结果表明：通过L2所制备而成的L2-TLNP在较低的给药剂量下，表现出的最好的CD5+ T细胞的靶向效果和递送效率，且当靶向分子的比例高于0.05%时，各组不同比例的TLNP未表现出明显的递送效果的差异。考虑到LNP的理化性质和物料成本等因素，后续采用0.05%靶向分子比例进行后续的研究。

5 含不同靶向分子比例的CD5-TLNP体外转染结果详见图24A和图24B。

实施例36:

本实施例为靶向人CD5⁺T细胞的纳米颗粒组分配方筛选

(一) 制备靶向人CD5⁺T细胞的纳米颗粒

10 表56: 不同配比的CD5-TLNP制备表

LNP编号	LNP五组分比例 (可离子化氨基脂质 : DSPC : CHO : DMG-PEG2000: DSPE-PEG2000-Mal)
L2-TLNP-F1	47.5: 10: 41: 1.45: 0.05
L2-TLNP-F2	47.5: 15: 36: 1.0: 0.05

本实施例中所用到的两个脂质纳米颗粒L2-TLNP-F1和L2-TLNP-F2均参考实施例21中所描述的方法进行制备。

(二) 不同配方的靶向人CD5⁺T细胞的纳米颗粒体内递送效率的考察

15 选取检疫合格、体重达标符合SPF（无特定病原体）级别的6-8周龄hCD5人源化雌性小鼠9只，分为3组。小鼠尾静脉注射所制备的L2-TLNP-F1和L2-TLNP-F2。每只小鼠给药剂量20 μg-mRNA-LNP，注射体积为200 μL。表达24小时后，取外周血、脾脏、淋巴结和腿骨胫骨进行流式检测各个器官的细胞亚群中eGFP-mRNA的表达率。

表57: 具有不同配比的L2-TLNP体内实验分组

实验组别编号	给药LNP名称
G1	PBS
G2	L2-TLNP-F1
G3	L2-TLNP-F2

20 实验结果表明：由配方F2制备而成的含有0.05%靶向分子比例的L2-TLNP-F2在1.0 mpk的给药剂量下，hCD5人源化小鼠体内各个器官中均表现出比F1组更好的CD5⁺T细胞靶向递送效果。

不同配比的L2-TLNP体内转染情况统计图详见图25A和图25B。

实施例37:

本实施例为靶向人CD5⁺T细胞的纳米颗粒在生物体内分布情况研究

25 (一) 制备靶向人CD5 T细胞的纳米颗粒

采用实施例21中所描述的制备方法，本实施例中所用到的两个脂质纳米颗粒为分别为包封Luciferase mRNA的cLNP-1和L2-TLNP-F2。

(二) 靶向人CD5 T细胞的纳米颗粒在hCD5人源化小鼠体内的Luc-mRNA生物分布

30 选取检疫合格、体重达标符合SPF（无特定病原体）级别的6-8周龄hCD5人源化雌性小鼠9只（每组3只）。G1组每只小鼠尾静脉注射200 μL的PBS。G2和G3组每只小鼠尾静脉注射2 μg的Luc-φ-mRNA LNP，注射体积为200 μL。

给药6 h后，利用异氟烷麻醉并腹腔注射荧光素酶底物250 μL，10分钟后解剖小鼠，取出脑、心、肝、脾、肺、肾脏、胸腺、淋巴结和骨髓，进行离体器官成像。拍摄仪器采用深圳湾实验室的perkin Elmer公司的Living Imaging仪器，参数设置为F8模式，曝光时间为2秒。成像结束后，对所取的器官提取mRNA，进行qPCR实验，统计每个器官中mRNA的富集量。

5 表 58: Luc成像研究LNP体内分布实验分组

实验组别编号	给药LNP名称
G1	PBS
G2	cLNP
G3	L2-TLNP-F2

实验结果表明：在hCD5人源化小鼠模型中，相比于传统LNP，CD5+T细胞靶向L2-TLNP-F2能够更有选择性地Luc-mRNA递送至T细胞丰富的器官，其表新出更高的脾肝荧光强度比值。

Luc成像和qPCR法研究hCD5人源化小鼠体内的生物分布实验结果统计图详见图26A和图26B。

10 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，便于具体和详细地理解本发明的技术方案，但不能因此而理解为对本发明保护范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。

工业实用性

15 本发明提供一种具有靶向功能的分子，这种具有靶向功能的分子能特异性地递送药物到特定的细胞，有助于在体内精准编程特定的细胞，发挥药物的疗效，进而大大减少药物的给药剂量以及副作用，达到体内细胞精准治疗的效果，具有较好的经济价值和应用前景。

权 利 要 求 书

1. 一种具有靶向功能的分子，其特征在于，包括：

(I) 一条或多条疏水链；

(II) 一个或多个连接体；

5 (III) 一个或多个纳米抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的具有靶向功能的分子，其特征在于，所述纳米抗体的数量 ≤ 20 。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的具有靶向功能的分子，其特征在于，所述纳米抗体的数量为 1-7 个。

10 4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的具有靶向功能的分子，其特征在于，所述纳米抗体与所述连接体中间连接 1 个包含反应位点的氨基酸，所述氨基酸包括但不限于半胱氨酸、赖氨酸。

5. 根据权利要求 4 所述的具有靶向功能的分子，其特征在于，所述纳米抗体通过连接序列连接，所述连接序列位于所述纳米抗体与所述氨基酸之间，所述连接序列包括 (GS) n 和/或 (GGGS) m ，其中， n 和 m 为相同或不同的数值， n 或 m 的数值选自 0、1、2、3 或 4。

15 6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的具有靶向功能的分子，其特征在于，所述疏水链包括一条或多条取代或未取代的 C12-C18 烷基。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的具有靶向功能的分子，其特征在于，所述连接体包含一个或多个结构单元，所述结构单元选自 -C(=O)O-、-O-C(=O)O-、-C(=O)NH-、-C(=O)S-、-S-、-S-S-、三氮唑基、腺键、SMCC、Sulfo-SMCC、SATA、作为结构单元的多肽、PEG 或者 PEG 衍生物；

20 其中，所述 PEG 衍生物可选为马来酰亚胺官能化的聚乙二醇，包括但不限于 PEG-MAL。

8. 根据权利要求 7 所述的具有靶向功能的分子，其特征在于，所述 PEG 或者 PEG 衍生物的相对分子质量为 500-5000。

9. 根据权利要求 8 所述的具有靶向功能的分子，其特征在于，所述 PEG 或者 PEG 衍生物的相对分子质量为 1000、2000、3000、4000 或 5000。

25 10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的具有靶向功能的分子，其特征在于，所述纳米抗体包括对抗原具有特异性的抗原结合结构域，所述抗原为膜蛋白分子。

11. 根据权利要求 10 所述的具有靶向功能的分子，其特征在于，所述膜蛋白分子为免疫细胞或免疫相关细胞膜蛋白分子，所述免疫细胞或免疫相关细胞膜蛋白分子包括但不限于 CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD25、CD38、CD61、CD42a、CD105、CD90、CD15、CD127、CD56、
30 CD68、CD19、CD11c、CD138、F4/80、CD62P、CD49f、CD31、RANK、ALPL、PDPN、CD34、FcεR1α、CD203c、CD63、CD193、CD66b、CD41、CD117、ASGPR 中的一种或多种。

12. 根据权利要求 10 所述的具有靶向功能的分子，其特征在于，所述膜蛋白分子为中枢神经系统细胞膜蛋白分子，所述中枢神经系统细胞膜蛋白分子包括但不限于 GD2、GD3、MOG、TMEM119 中的一种或多种。

35 13. 根据权利要求 10 所述的具有靶向功能的分子，其特征在于，所述膜蛋白分子为肿瘤相关抗原，所述肿瘤相关抗原包括但不限于 CD133、PSMA、CLDN18.2、DLL3、TROP2、EGFRVIII、CA125、MUC1、MUC16、MSLN、CA9、HER2、HER3、TGM4、PSCA、CLDN6、STEAP2、GPC3、IL-13Ra2、EGFR、STEAP1、BCMA、FRa、VEGFR2、PDGFR-β、CEA、NCAM、FAP、SLC2A2、SEZ6L2、LRP11 中的一种或多种。

40 14. 根据权利要求 10 所述的具有靶向功能的分子，其特征在于，所述膜蛋白分子为免疫调节分子，所述免疫调节分子包括但不限于 B7-H1、B7-H3、B7-H4 中的一种或多种。

15. 根据权利要求 10 所述的具有靶向功能的分子，其特征在于，所述膜蛋白分子包括但不限于以下靶点：CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD25、CD38、CD61、CD42a、CD105、CD90、CD15、CD127、CD56、CD68、CD19、CD11c、CD138、F4/80、CD62P、CD49f、CD31、RANK、
45 ALPL、PDPN、CD34、FcεR1α、CD203c、CD63、CD193、CD66b、CD41、CD117、ASGPR、GD2、GD3、MOG、TMEM119、CD133、PSMA、CLDN18.2、DLL3、TROP2、EGFRVIII、CA125、

MUC1、MUC16、MSLN、CA9、HER2、HER3、TGM4、PSCA、CLDN6、STEAP2、GPC3、IL-13Ra2、EGFR、STEAP1、BCMA、FRA、VEGFR2、PDGFR-β、CEA、NCAM、FAP、SLC2A2、SEZ6L2、LRP11、B7-H1、B7-H3、B7-H4 中的一种或多种。

5 16. 根据权利要求 1-15 中任一项所述的具有靶向功能的分子，其特征在于，所述纳米抗体为靶向 CD8 的纳米抗体，所述纳米抗体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1-3 中任意一条所示；

和/或，所述纳米抗体为靶向 CD19 的纳米抗体，所述纳米抗体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:79-81 中任意一条所示；

和/或，所述纳米抗体为靶向 CD56 的纳米抗体；

10 和/或，所述纳米抗体为靶向 CD5 的纳米抗体，所述纳米抗体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4-78 中任意一条所示；

和/或，所述纳米抗体为靶向 PSMA 的纳米抗体，所述纳米抗体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:82-83 中任意一条所示；

和/或，所述纳米抗体为靶向 CD133 的纳米抗体，所述纳米抗体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:84-85 中任意一条所示。

15 17. 一种具有靶向功能的纳米抗体，其特征在于，所述纳米抗体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4-78 中任意一条所示；或者，所述纳米抗体的氨基酸序列与 SEQ ID NO:4-78 中任意一条所示氨基酸序列的同源性 ≥ 80%。

18. 脂质纳米颗粒，其特征在于，其组成成分包括权利要求 1-16 中任一项所述的具有靶向功能的分子，所述的具有靶向功能的分子占脂质纳米颗粒总脂质的含量为：0.0001-1.0 mol%。

20 19. 根据权利要求 18 所述的脂质纳米颗粒，其特征在于，所述的具有靶向功能的分子占脂质纳米颗粒总脂质的含量为 0.01-0.5 mol%。

20. 根据权利要求 18 或 19 所述的脂质纳米颗粒，其特征在于，所述脂质纳米颗粒的组成成分包括聚合物结合脂质和可离子化氨基脂质；所述聚合物结合脂质选自 PEG 或其衍生物修饰的脂质；

25 所述 PEG 或其衍生物修饰的脂质的相对分子质量为 2000-5000。

21. 根据权利要求 20 所述的脂质纳米颗粒，其特征在于，所述 PEG 或其衍生物修饰的脂质的相对分子质量为 2000、3000、4000 或 5000。

22. 根据权利要求 20 或 21 所述的脂质纳米颗粒，其特征在于，所述聚合物结合脂质占脂质纳米颗粒总脂质的含量为：0.2-5 mol%。

30 23. 根据权利要求 22 所述的脂质纳米颗粒，其特征在于，所述聚合物结合脂质占脂质纳米颗粒总脂质的含量为 0.5-2 mol%。

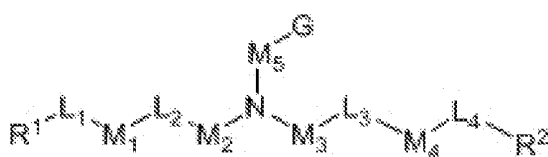
24. 根据权利要求 20-23 中任一项所述的脂质纳米颗粒，其特征在于，所述 PEG 衍生物包含马来酰亚胺官能化的聚乙二醇和非马来酰亚胺官能化的聚乙二醇；其中，马来酰亚胺官能化的聚乙二醇可选自 PEG-MAL；马来酰亚胺官能化的聚乙二醇占脂质纳米颗粒总脂质的含量为：
35 0.0001-1.0 mol%。

25. 根据权利要求 24 所述的脂质纳米颗粒，其特征在于，所述马来酰亚胺官能化的聚乙二醇占脂质纳米颗粒总脂质的含量为 0.01-0.5 mol%。

26. 根据权利要求 20-25 中任一项所述的脂质纳米颗粒，其特征在于，所述可离子化氨基脂质占脂质纳米颗粒总脂质的含量为 30-70 mol%。

40 27. 根据权利要求 26 所述的脂质纳米颗粒，其特征在于，所述可离子化氨基脂质占脂质纳米颗粒总脂质的含量为 40-60 mol%。

28. 根据权利要求 20-27 中任一项所述的脂质纳米颗粒，其特征在于，所述可离子化氨基脂质具有通式 (I) 所示的结构，或者是通式 (I) 所示结构的异构体、药学上可接受的盐、前药或溶剂合物；



(II)

其中, G 选自 H、OR、CN、-C(=O)OR'、-OC(=O)R'、-C(=O)NR'R''、-NR'C(=O)R''、NR'R'' 或至少含有一个杂原子的环状烷基结构;所述环状烷基结构中可被取代的碳原子或杂原子未被取代或被一个或多个羟基、C₁-C₄ 烷基、C₂-C₄ 烯基、C₃-C₈ 环烷基或 C₃-C₈ 环烯基取代;

- 5 M₁、M₂、M₃、M₄ 彼此相同或不同,并且各自独立地选自 C₁-C₂₄ 亚烷基、C₃-C₂₄ 亚环烷基、C₂-C₂₄ 亚烯基或 C₃-C₂₄ 亚环烯基;

R¹、R² 彼此相同或不同,并且各自独立地选自 H、C₁-C₂₄ 烷基、C₃-C₂₄ 环烷基、C₂-C₂₄ 烯基或 C₃-C₂₄ 环烯基;

- 10 L₁、L₂、L₃、L₄ 彼此相同或不同,并且独立地选自 -C(=O)O-、-OC(=O)-、-C(=O)S-、-SC(=O)-、-C(=O)NR-、-NRC(=O)-、-S(=O)-、-OS(=O)₂-、-S(=O)₂O-、-O-、-S-或-S-S-;

R、R'、R''彼此相同或不同,并且各自独立地选自 H、C₁-C₁₀ 烷基、C₃-C₁₀ 环烷基、C₃-C₁₀ 烯基或 C₃-C₁₀ 环烯基、末端连接叔胺的 C₁-C₁₀ 烷基、末端连接叔胺的 C₃-C₁₀ 环烷基、末端连接叔胺的 C₃-C₁₀ 烯基或至少含有一个杂原子的环状烷基结构;所述环状烷基结构未被取代或被一个或多个 C₁-C₄ 烷基、C₂-C₄ 烯基、C₃-C₈ 环烷基、C₃-C₈ 环烯基取代;

- 15 M₅ 选自单键、C₁-C₁₆ 亚烷基、C₂-C₁₆ 亚烯基、C₃-C₈ 亚环烷基或 C₃-C₈ 亚环烯基。

29. 根据权利要求 20-28 中任一项所述的脂质纳米颗粒,其特征在于,所述脂质纳米颗粒的组成成分还包括类固醇和中性脂质中的至少一种。

30. 根据权利要求 29 所述的脂质纳米颗粒,其特征在于,所述类固醇为胆固醇及其衍生物、胆固醇酯、固醇类激素、固醇类维生素、植物甾醇中的一种或者多种;和/或,所述中性脂质为磷脂;和/或,所述聚合物结合脂质为聚乙二醇化脂质。

31. 根据权利要求 30 所述的脂质纳米颗粒,其特征在于,所述类固醇为胆固醇。

32. 根据权利要求 30 所述的脂质纳米颗粒,其特征在于,所述聚乙二醇化脂质为 DMG-PEG2000。

33. 根据权利要求 29-32 中任一项所述的脂质纳米颗粒,其特征在于,可离子化氨基脂质、类固醇、中性脂质和聚合物结合脂质的摩尔比为 30-70:0-65:0-30:0.2-5。

34. 根据权利要求 33 所述的脂质纳米颗粒,其特征在于,可离子化氨基脂质、类固醇、中性脂质和聚合物结合脂质的摩尔比为 40-60:35-60:0-20:0.5-2。

35. 根据权利要求 34 所述的脂质纳米颗粒,其特征在于,可离子化氨基脂质、类固醇、中性脂质和聚合物结合脂质的摩尔比为 40-55:30-50: 0-20:0.5-2。

36. 根据权利要求 35 所述的脂质纳米颗粒,其特征在于,可离子化氨基脂质、类固醇、中性脂质和聚合物结合脂质的摩尔比为 40-50:30-45:0-15:0.5-2。

37. 根据权利要求 36 所述的脂质纳米颗粒,其特征在于,可离子化氨基脂质、类固醇、中性脂质和聚合物结合脂质的摩尔比为 47-50:34-36:13-16:1.0-1.1。

38. 根据权利要求 33 所述的脂质纳米颗粒,其特征在于,可离子化氨基脂质、类固醇、中性脂质和聚合物结合脂质的摩尔比为 47.5:36:15:1.0。

39 权利要求 18-38 中任一项所述脂质纳米颗粒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:将聚合物结合脂质、可离子化氨基脂质、类固醇和辅助磷脂混合,得到不具有靶向功能的脂质纳米颗粒,然后将权利要求 1-16 中任一项所述的具有靶向功能的分子通过膜融合或化学键连接到所述不具有靶向功能的脂质纳米颗粒上,得到具有靶向功能的脂质纳米颗粒。

40. 权利要求 18-38 中任一项所述脂质纳米颗粒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

将聚合物结合脂质、可离子化氨基脂质、类固醇和辅助磷脂混合，得到不具有靶向功能的脂质纳米颗粒，然后将纳米抗体通过化学键连接到所述不具有靶向功能的脂质纳米颗粒上，得到具有靶向功能的脂质纳米颗粒。

41. 根据权利要求 40 所述的方法，其特征在于，所述聚合物结合脂质包含马来酰亚胺官能化的聚乙二醇，所述纳米抗体连接在所述马来酰亚胺官能化的聚乙二醇上。

42. 权利要求 18-38 中任一项所述脂质纳米颗粒的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：将聚合物结合脂质、可离子化氨基脂质、类固醇、辅助磷脂和权利要求 1-16 中任一项所述的具有靶向功能的分子混合，得到具有靶向功能的脂质纳米颗粒。

43. 一种将药效分子靶向递送至受试者的特定细胞的方法，所述方法包括：使所述特定细胞与权利要求 18-38 中任一项所述的脂质纳米颗粒接触。

44. 根据权利要求 43 所述的方法，其特征在于，所述特定细胞包括但不限于免疫细胞、免疫相关细胞、中枢神经细胞、肿瘤细胞、体细胞、被病毒、细菌、真菌感染的细胞。

45. 根据权利要求 43 或 44 所述的方法，其特征在于，所述靶向细胞为 B 细胞、T 细胞或 NK 细胞。

46. 一种在受试者的靶向细胞中表达目的蛋白或多肽的方法，所述方法包括：使所述靶向细胞与权利要求 18-38 中任一项所述的脂质纳米颗粒接触。

47. 根据权利要求 46 所述的方法，其特征在于，所述靶向细胞包括但不限于免疫细胞、免疫相关细胞、中枢神经细胞、肿瘤细胞、体细胞、被病毒、细菌、真菌感染的细胞。

48. 根据权利要求 46 或 47 所述的方法，其特征在于，所述靶向细胞为 B 细胞、T 细胞或 NK 细胞。

49. 权利要求 18-38 中任一项所述脂质纳米颗粒作为药物递送载体的应用。

50. 药物组合物，其特征在于，包括权利要求 18-38 中任一项所述脂质纳米颗粒，所述脂质纳米颗粒含有药效分子。

51. 根据权利要求 50 所述的药物组合物，其特征在于，所述药效分子包括 mRNA、DNA、siRNA、saRNA、shRNA、miRNA、circle RNA、lnc RNA、gRNA、多肽或者蛋白中的一种或者多种。

52. 根据权利要求 50 或 51 所述的药物组合物，其特征在于，所述药效分子包括 mRNA，所述 mRNA 用于编码 CAR 分子、TCR 分子、免疫调节分子、功能性蛋白分子、或者基因编辑工具如碱基编辑器、Cas9 蛋白。

53. 根据权利要求 50-52 中任一项所述的药物组合物，其特征在于，所述 CAR 分子包含能特异性识别肿瘤特异性抗原的序列、穿膜的连接序列和/或辅助 T 细胞的免疫功能的序列中的至少一种序列。

54. 根据权利要求 50-53 中任一项所述的药物组合物，其特征在于，所述编码 TCR 分子的序列包含能识别 NY-ESO-1、AFP、HBsAg、MAGEA1、Mesothelin、MART-1、CD19、CD28、PD-1、CD8、CT83、E6、E7、E8、GPC3、H3.3-K27M、HIV Gag polypeptide、HLA-A/AFP、KRASG12(V/D)、KRASG12D、KRASG12V、LMP1、LMP2、EBNA1、MAGEA10、MAGEA3、MAGEA4、MC2R、mHag HA-1、MYO1G、PRAME、WT1、gp100、CEA、p53、HLA-A2、EGFR、DR5、RAS、LAGE-1、CMV、HCV、MCPyV、HA-1H 中至少一种分子的序列。

55. 根据权利要求 50-54 中任一项所述的药物组合物，其特征在于，所述编码免疫调节分子的序列包括 CD28、PD-1、CTLA-4、RGMB、ICOS、CD28H、Nkp30、HVEM、OX40、Fas、4-1BB、CD27、CD30、APO-2、APO-3、BCMA、BAFFR、GITR、IL-2、IL-12A、IL-12B、IL-15、IL-23、IL-27、FLT3L、IL-36A、IL-36B、IL-36C、GM-CSF、CCL20、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CCR7、CXCR4、CCR5、CCL4、CCL5、CCL19、CXCR3、CCR6、B7-H1、B7-DC、B7-H3、B7-H4、PD-1H、IL-10、TGF- β 、HGF、B7-1、B7-2、B7-H2、B7-H3、CD40、FasL、CD70、CD30L、4-1BBL、OX40L、TRAIL、RANKL、TWEAK、APRIL、BAFF、LIGHT、GITRL、CD73、STAT1、IRF4、CCR2、BCL6、iNOS、CD103 中的至少一种分子的序列。

56. 根据权利要求 50-55 中任一项所述的药物组合物，其特征在于，所述编码 CAR 分子的

- 核酸包含能识别 CD19、BMCA、CD22、CD20、CD123、GD2、CD30、GPC3、CLDN18.2、Mesothelin、CD33、CD38、EGFRvIII、CD138、CEA、HER2、PSMA、CLL1、CD56、EGFR、MUC-1、EpCAM、CD7、NKG2D、PD-L1、LewisY、FAP、c-MET、ROR1、IL13R α 2、AFP、CD133、CD4、BTK、ROBO1、CD5、CD70、LILRB4、FLT3、Sigle-6、CD229、SLAMF7 中
- 5 至少一种分子的序列。
57. 药物制剂，其包含权利要求 50 所述的药物组合物以及药学上可接受的载体。
58. 根据权利要求 57 所述的药物制剂，其特征在于，所述药物制剂为水针剂、冻干粉或喷雾剂。