(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117715659 A
(43)申请公布日 2024.03.15

(21)申请号 202280051838.6
(22)申请日 2022.07.22
(30)优先权数据
2110646.3 2021.07.23 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.01.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2022/051938 2022.07.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/002223 EN 2023.01.26
(71)申请人 SISAF有限公司
地址 英国萨里
(72)发明人 R·S·萨菲-西伯特 M·韦尔什 N·托拉比-保尔
(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322
专利代理师 顾小曼 叶占洋
(51)Int.Cl.
A61K 47/02(2006.01)

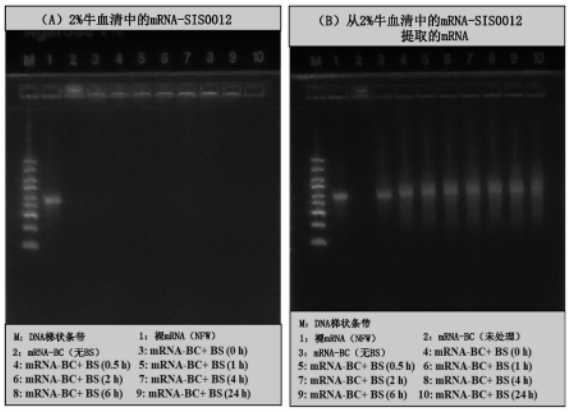
权利要求书2页 说明书42页 附图22页

(54)发明名称

核酸载体组合物

(57)摘要

一种核酸载体组合物,其包含:一种或多种酶和/或其一种或多种片段;核酸;一种或多种包含可水解硅的颗粒;和一种或多种脂质。以及相关产品、医疗用途和方法。



CN 117715659 A

1.一种核酸载体组合物,其包含:

-一种或多种酶和/或其一种或多种片段;

-核酸;

-一种或多种包含可水解硅的颗粒;和

-一种或多种脂质。

2.根据权利要求1所述的核酸载体组合物,其中所述一种或多种酶包括一种或多种用于与核酸形成酶-底物复合物的酶。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的核酸载体组合物,其中所述一种或多种酶包括一种或多种核酸酶和/或一种或多种聚合酶。

4.根据前述权利要求中任一项所述的核酸载体组合物,其中酶和/或其片段与核酸的重量比在1:1×10^{12}至1:1的范围内。

5.根据前述权利要求中任一项所述的核酸载体组合物,其中所述一种或多种酶包括一种或多种在pH为7.4和温度为25℃下对核酸底物具有至少1μmol min^{-1}的活性的酶。

6.根据前述权利要求中任一项所述的核酸载体组合物,其为脂质纳米颗粒的形式,任选地具有被外壳封装的内核,其中所述外壳包含一种或多种脂质并且所述内核包含所述核酸和所述一种或多种包含可水解硅的颗粒。

7.根据前述权利要求中任一项所述的核酸载体,其中所述核酸是mRNA,例如体外转录的mRNA。

8.根据权利要求1至6中任一项所述的核酸载体,其中所述核酸是DNA,例如质粒DNA。

9.根据权利要求7所述的核酸载体组合物,其中所述mRNA包含编码蛋白质的开放阅读框和任选地以下一种或多种:

-5'帽;

-多聚(A)尾;和

-一个或多个非翻译区。

10.根据权利要求9所述的核酸载体组合物,其中所述mRNA的所述开放阅读框编码:

-病原体的抗原,任选其中所述mRNA的所述开放阅读框编码SARS-CoV-2的刺突蛋白抗原;

-肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原;

-过敏原;或者

-免疫性疾病、自身免疫性疾病或炎性疾病的调节剂。

11.根据前述权利要求中任一项所述的核酸载体组合物,其还包含氨基酸,比如甘氨酸;和/或还包含一种或多种二糖,比如海藻糖。

12.一种制备根据前述权利要求中任一项所述的核酸载体组合物的方法,所述方法包括:

-通过从DNA模板体外转录或从生物来源纯化获得所述核酸;和

-将所述核酸与所述一种或多种颗粒和所述一种或多种脂质组合。

13.根据权利要求12所述的制备核酸载体组合物的方法,其中所述核酸是mRNA并且其中它通过从DNA模板体外转录获得。

14.一种核酸载体组合物,其通过根据权利要求12或权利要求13所述的方法产生。

15.一种药物组合物,其包含根据权利要求1至11中任一项所述的核酸载体组合物,其中所述药物组合物是预防性或治疗性疫苗组合物。

16.根据权利要求15所述的药物组合物,其中在4℃下所述核酸在所述药物组合物中的半衰期为至少3个月。

17.根据权利要求15所述的药物组合物,其中在4℃下所述核酸在所述药物组合物中的半衰期为至少6个月。

18.根据权利要求15至17中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物还包含佐剂。

19.根据权利要求15至19中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物是适合于肌内注射的形式。

20.根据权利要求15至19中任一项所述的药物组合物,其用作药物。

21.一种治疗或预防疾病或病症的方法,其包括:向有需要的受试者施用根据权利要求15至19中任一项所述的药物组合物。

22.一种向受试者提供疫苗接种的方法,其包括口服、皮下或肌内施用根据权利要求15至19中任一项所述的药物组合物。

23.根据权利要求15至19中任一项所述的药物组合物作为脂质多聚复合物转染载体的用途。

24.根据权利要求23所述的药物组合物的用途,其中所述脂质多聚复合物转染载体用于将核酸、优选mRNA靶向至细胞。

25.根据权利要求15至19中任一项所述的药物组合物在制备药物例如疫苗中的用途。

核酸载体组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及核酸载体组合物以及相关方法和产品。核酸载体组合物尤其可用于药物领域,尽管不限于该领域。本发明的组合物尤其可用于保护核酸免受酶促降解。

背景技术

[0002] 需要改善用于生物活性剂的赋形剂。生物医学研究的进步需要提供合适的赋形剂才能完全转化为有效、安全和具有成本效益的治疗。

[0003] 作为说明性实例,已经提出核酸比如RNA作为治疗剂。用于疗法或其它目的的核酸递送是众所周知的,特别是用于治疗疾病比如囊性纤维化和某些癌症,并且mRNA最近已用于针对SARS-CoV-2的有效疫苗。术语“基因疗法”可用于指将基因或基因的一部分递送至细胞中以产生治疗效果,比如通过修复、重建或补偿有缺陷的遗传材料来产生治疗效果。更广泛地,术语“核酸递送”可用于指将核酸材料任意引入靶细胞中。作为非限制性实例,核酸递送包括mRNA疫苗接种和在所谓的细胞工厂中产生商业上有用的蛋白质。

[0004] 用于将核酸递送至细胞的递送系统分为三大类,即:

[0005] (i)涉及直接注射裸核酸的递送系统,

[0006] (ii)使用病毒或遗传修饰病毒的递送系统,以及

[0007] (iii)使用非病毒递送剂的递送系统。

[0008] 每个都有其优点和缺点。尽管病毒作为递送剂具有高效和高细胞选择性的优点,但其具有毒性、引发炎症应答以及不太适合递送大DNA片段的缺点。因此,mRNA疫苗可以有利地包含可注射的裸mRNA或非病毒递送系统,比如多聚复合物(polyplex)载体或脂质纳米颗粒载体。

[0009] 可惜的是,已经注意到,非病毒核酸递送系统的转染效率较低。非病毒核酸递送系统基于通过核酸的带负电荷的磷酸酯主链与带电聚合物(通常是阳离子脂质和/或肽)之间的静电相互作用将核酸压缩入纳米颗粒(Erbacher,P.等人,Gene Therapy,1999,6,138-145)。认为将这些物种引入细胞的机制涉及完整复合物的内吞作用,其中核酸和脂质之间形成的复合物变为附着在细胞表面,然后通过内吞作用进入细胞。然后复合物在泡状体(vesicle)或内体(endosome)中保持定位一段时间,并且核酸成分释放到细胞质中。

[0010] 非病毒递送系统的聚合物组分通过静电结合形成载体复合物。脂质成分保护核酸以及在一定程度上保护任何肽成分免受内体或其他方面的降解;例如,脂质组分可以形成脂质双层外壳,其封装递送系统的其它组分,包括核酸分子。用于这种用途的阳离子脂质是由Felgner在20世纪80年代末开发的,并在Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84,7413-7417,1987中以及在US 5,264,618中报道。Felgner开发了现商业上可购的阳离子脂质体,以商标为“Lipofectin”知名。“Lipofectin”脂质体是具有阳离子脂质DOTMA(2,3-二油酰氧基丙基-1-三甲基铵)和中性磷脂脂质DOPE(磷脂酰乙醇胺或1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)以1:1比率的脂质双层的球形泡状体。此后设计了各种其它阳离子脂质体制剂,其中大多数将合成阳离子脂质和中性脂质组合。除了DOTMA类似物之外,还可以提及复合烷基胺/烷基

酰胺、胆固醇衍生物如DC-Chol、以及二棕榈醇、磷脂酰乙醇胺、谷氨酸酯、咪唑和膦酸酯的合成衍生物。然而,在血清存在的情况下,阳离子载体系统的转染效率差异很大,这明显影响了其在体内基因疗法和/或核酸递送的潜在用途。

[0011] 用于这种复合物中的肽组分通常具有两种功能性:含有细胞表面受体(例如整联蛋白)识别序列的"头基",以及可以非共价结合核酸的"尾"。肽组分可设计为细胞类型特异性或细胞表面受体特异性的。例如,一定程度的整联蛋白特异性可以赋予一定程度的细胞对复合物的特异性。靶向至细胞表面受体(例如整联蛋白受体)产生特异性,并且可以实现与一些腺病毒载体相当的转染效率(Jenkins等人.Gene Therapy 7,393-400,2000)。

[0012] 迄今为止,将信使RNA(mRNA)通过非病毒递送至细胞尤其存在问题,并且由于缺乏有效的载体而受到限制。使用已成功用于DNA或siRNA的已知非病毒运载体(vehicle)递送mRNA的尝试导致蛋白质表达水平不理想。此外,已知的非病毒运载体在与mRNA包装时储存稳定性较差。克服脂质双层将RNA递送至细胞中仍然是RNA疗法广泛发展的主要障碍。

[0013] 因此,需要针对mRNA递送而特异性定制的载体,将高水平的mRNA递送至细胞并导致良好水平的蛋白质表达。还需要针对mRNA递送而定制的组合物,其在储存时具有良好的稳定性,特别是在中等温度储存时保留其结构和功能性的mRNA递送复合物。类似的考虑适用于其它核酸治疗剂(例如质粒衍生的DNA)的递送,因为在维持良好的储存稳定性方面存在挑战,尤其是在中等温度下,比如约-5℃至约25℃的温度。

[0014] 许多针对SARS-CoV-2的mRNA疫苗,包括Pfizer和BioNTech疫苗BNT162b2("Comirnaty")和Moderna CX-024414疫苗,需要冷链储存和运输。这限制了低收入国家获得疫苗的机会,并增加了所有市场的成本和物流复杂性。如果疫苗能够在标准冰箱温度(约-5℃)或室温(约20℃)下储存和运输,将是有利的。如果疫苗能够耐受更高的储存温度(例如30℃、40℃或50℃),或者至少在短期内用于运输和配送,也是有利的。

[0015] 通过低温维持可注射组合物例如疫苗组合物中核酸(例如mRNA或DNA)的稳定性以及带来物流挑战,也还具有技术限制,即核酸必须在注射前解冻,并且在注射后,它必须在体内保持稳定足够长的时间,以显示足够的生物活性。这可能需要在围绕身体易位和/或从内体区室逃逸期间保持稳定性。体内稳定性还必须维持足够长的时间,以便充分翻译成蛋白质得以发生。

[0016] 核酸(尤其是mRNA)很容易被降解,尤其是酶促降解。低温和/或核酸(例如mRNA)冻干可以减缓降解,但这些选择都有缺点。短长度的核酸可以在完全合成的生产环境中制备,该环境可以不含降解酶。这种短长度的核酸可用于某些治疗应用,例如siRNA。较长的核酸不能在完全合成的生产环境中以成本有效的方式制备,因此通常在包含生物来源材料的生产环境中制备。例如,mRNA可以通过体外转录来制备,其中转录酶衍生自生物来源的材料(生物来源的材料是指在基于细胞培养的系统中产生或者在体外使用合成酶(例如在基于细胞培养的系统中产生的酶)产生的材料,特别是核酸)。DNA(例如质粒DNA或pDNA)可以从细胞培养物中提取。生物来源材料的使用增加了生物来源降解酶无意中出现在核酸制剂中的机会。这可能需要大量的纯化过程(成本高昂并导致产量损失),并且从生物来源的核酸制剂(例如体外转录的(IVT)mRNA制剂或DNA(例如pDNA)制剂)中完全去除所有降解酶可能是不可能的或不是成本有效的。此外,在围绕身体易位和/或从内体区室逃逸期间,核酸暴露于生理和细胞内条件,通常包括与降解酶接触。

[0017] 现有技术中已使用脂质封装或与肽或阳离子聚合物(例如鱼精蛋白)缩合来保护核酸(例如,用于基因疗法或疫苗接种的mRNA)免受降解。与肽或其它聚合物的缩合依赖于肽或聚合物保持完整并保留其电荷。需要改善的赋形剂以增加核酸(例如mRNA)的稳定性并改善其对酶促降解的抗性,特别是如果无需冷冻核酸制剂即可实现对酶促降解的抗性。还需要改善的赋形剂以增加包含生物来源的核酸和脂质和/或肽或其它聚合物的组合物的多种组分的稳定性。

发明内容

[0018] 本发明基于以下认识:在脂质存在下可水解硅(hydrolysable silicon)可用于通过保护核酸免受酶促降解来稳定核酸比如mRNA或DNA(例如体外转录的mRNA或质粒DNA)。

[0019] 这可以包括在储存期间稳定药物组合物(例如疫苗)中的核酸,例如在将药物组合物施用于有需要的受试者之前。它可以包括核酸在围绕身体易位和/或从内体区室逃逸(当核酸暴露于生理条件,通常包括与降解酶接触)期间的稳定性。

[0020] 因此,根据本发明的第一方面,提供一种核酸载体组合物,其包含:

[0021] -一种或多种酶和/或其一种或多种片段;

[0022] -核酸;

[0023] -一种或多种包含可水解硅的颗粒;和

[0024] -一种或多种脂质。

[0025] 基于酶需要水性环境以便它们催化核酸的降解,一种或多种包含可水解硅的颗粒可以去除或隔离水分子,从而防止一种或多种酶降解核酸。任选地,一种或多种颗粒通过一种或多种颗粒表面上的硅或含硅部分与水分子的反应来去除水分子。任选地,一种或多种颗粒通过在一种或多种颗粒表面上存在的孔中捕获水分子来隔离水分子。任选地,一种或多种颗粒以这两种方式隔离水分子。因此,可减少或消除在酶催化反应中可与核酸反应的水分子。因此,总体上,与不含一种或多种颗粒的组合物相比,一种或多种包含可水解硅的颗粒增加了核酸的稳定性。

[0026] 一种或多种酶可包含一种或多种用于与核酸形成酶-底物复合物的酶。在本发明的第一方面的组合物中,酶-底物复合物可能能够形成,但酶催化反应所需的步骤不能发生,或者只能以降低的速率发生,因为水分子的可用性降低。

[0027] 一种或多种酶任选地包含一种或多种核酸酶。一种或多种酶任选地包含一种或多种聚合酶;因此,在某些实施方式中,一种或多种酶任选地包含一种或多种RNA聚合酶,其可以选自T7、SP6和T3 RNA聚合酶中的一种或多种。一种或多种酶任选地包含一种或多种核酸酶和一种或多种聚合酶。

[0028] 如本文所用,术语核酸酶是指能够裂解核酸分子中的核苷酸之间的磷酸二酯键的酶。核酸酶可能能够引起靶分子中的单链断裂。核酸酶可能能够引起靶分子中的双链断裂。如本文所用,术语核酸外切酶是指能够通过从多核苷酸链的末端(exo)一次切割一个核苷酸来消化核酸分子的酶。如本文所用,术语核酸内切酶是指能够通过从多核苷酸链的中部(endo)开始一次切割一个核苷酸来消化核酸分子的酶。核酸酶可以是脱氧核糖核酸酶,也称为DNase,其作用于DNA。核酸酶可以是核糖核酸酶,也称为RNase,其作用于RNA。

[0029] 一般地,聚合酶是催化聚合物形成的酶。因此,本文所用的术语DNA聚合酶是指催

化DNA聚合物形成的酶。本文所用的RNA聚合酶是催化RNA聚合物形成的酶。核酸分子具有糖-磷酸主链,其通常暴露在分子的亲水表面上,因此是特别容易被水解的分子的一部分。主链中磷酸二酯键的亲核裂解可以例如经由分子间反应(与溶液中存在的亲核试剂,例如H_2O)和/或分子内攻击(例如通过RNA中的2'-OH基团或其它亲核基团)发生。其它降解模式,例如经由一种或多种核碱基和/或一种或多种糖部分的氧化,也是可以想到的。

[0030] 在根据本发明的第一方面的核酸载体组合物中,酶和/或其片段与核酸的重量比任选地在1:1×10^{12}至1:1的范围内,例如在1:1×10^{11}至1:1、1:1×10^{10}至1:1、1:1×10^{9}至1:1、1:1×10^{7}至1:1、1:1×10^{6}至1:1、1:1×10^{5}至1:1、1:1×10^{4}至1:1、1:1000至1:1、或1:100至1:1的范围内。

[0031] 如本文所用,术语酶活性是指由所讨论的酶催化的反应速率。本发明的第一方面的组合物中存在的一种或多种酶任选地在pH为7.4和温度为25℃下对核酸(例如mRNA)底物具有至少1nmol min^{-1}的活性,例如在这些条件下至少10nmol min^{-1}、至少100nmol min^{-1}、至少1μmol min^{-1}、至少2μmol min^{-1}、至少5μmol min^{-1}、至少10μmol min^{-1},或至少50μmol min^{-1}的活性。

[0032] 一种或多种酶片段可在pH为7.4和25℃的温度下对核酸(例如,mRNA)底物具有相应完整酶分子在相同的pH和温度条件下的活性的至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、以及特别是至少80%的活性。因此,一种或多种酶片段可以保留相应完整酶分子的一个或多个完整活性位点。一种或多种酶片段可以保留相应完整酶分子的一个或多个完整二级结构,例如一个或多个完整β片层和/或α螺旋。

[0033] 任选地,核酸载体组合物是脂质纳米颗粒的形式,任选地具有被外壳封装的内核,其中外壳包含一种或多种脂质,例如在脂双层中,并且内核包含核酸和一种或多种包含可水解硅的颗粒。

[0034] 不希望受理论的束缚,据认为,用一种或多种脂质和用核酸(但不含可水解硅)配制的常规脂质纳米颗粒通常具有被外壳封装的内核。外壳通常是脂质双层(例如,包含DSPC、PEG_{2000}等)。内核通常是无定形的,被外壳封装,并且包含核酸、水和其它组分比如阳离子脂质和/或胆固醇,这取决于所采用的配方。尽管这可以保护核酸(例如mRNA)免受外部介质的影响,但内核中的核酸分子仍然可以与水分子接触。例如,已经提出,内核中存在被反向阳离子脂质包围的水孔(Viger-Gravel等人,J.Phys.Chem.B 122(7),2073-2081(2018))。已经提出,内核可具有10-40体积%的水含量,比如20-30体积%,例如23-25体积%。正如Areta等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,115(15),E3351-E3360(2018)报道的,mRNA可能以无序的反六角相而位于水柱内部。

[0035] 因此,本发明的组合物可以与常规脂质纳米颗粒具有一些相似性,因为它可以是脂质纳米颗粒的形式,任选地具有被外壳封装的内核,其中外壳包含一种或多种脂质,例如在脂质双层中,并且任选地为无定形的内核包含核酸和一种或多种包含可水解硅的颗粒。然而,与常规的脂质纳米颗粒相比,在根据本发明的第一方面的组合物中,包含可水解硅的颗粒可以将水分子与核酸隔离,从而延迟或防止核酸与水在酶催化反应(例如糖-磷酸主链与水的反应)下的反应;从而稳定脂质纳米颗粒中的核酸。

[0036] 任选地,递送系统的组分,例如脂质和/或肽分子,可以与一种或多种硅颗粒结合,产生稳定的复合物,其中可水解硅和递送系统的其它组分,例如脂质和/或肽,二者均是稳

定的。带正电荷的种类例如阳离子脂质(以及带有正电荷的其它脂质组分,包括但不限于磷脂)可以结合至一种或多种包含可水解硅的颗粒,从而稳定这些带正电荷的组分。

[0037] 因此,优选地,在室温(20℃)下,与不含硅颗粒的等同组合物相比,核酸(例如mRNA或pDNA)的降解减少至少一半,更优选减少至少5、10、35、50、100、500或1000倍。

[0038] 核酸可以是或包含RNA,例如mRNA。核酸可以是或包含DNA。当核酸是或包含mRNA时,mRNA可以是体外转录的mRNA。当核酸是或包含DNA时,DNA可以是质粒DNA。当核酸是或包含mRNA时,mRNA可包含编码蛋白质的开放阅读框和任选地以下一种或多种:

[0039] -5'帽;

[0040] -多聚(A)尾;和

[0041] -一个或多个非翻译区。

[0042] 任选地,mRNA的开放阅读框编码病原体的抗原。任选地,mRNA的开放阅读框编码SARS-CoV-2的刺突蛋白抗原。

[0043] 任选地,在本发明所有方面的某些优选实施方式中,mRNA的开放阅读框编码肿瘤特异性抗原。如本文所用,术语肿瘤特异性抗原可以指在一种或多种恶性癌细胞中由非同义体细胞突变(导致新抗原)或病毒整合突变(导致癌病毒抗原)产生的抗原。因此,肿瘤特异性抗原可以指非癌性(健康、正常)细胞完全不存在(不表达)的抗原。

[0044] 任选地,mRNA的开放阅读框编码肿瘤相关抗原。如本文所用,术语肿瘤相关抗原可以指与非癌性(健康、正常)细胞相比,例如由于基因扩增或翻译后修饰而在恶性癌细胞中过表达的抗原。术语"肿瘤相关抗原"可涵盖过表达的抗原(该术语可指在非癌性(健康、正常)细胞中适度表达,但在恶性癌细胞中大量表达的蛋白质);分化抗原(该术语可以指由恶性细胞进化而来的细胞谱系选择性表达的蛋白质,例如前列腺特异性抗原);和癌种系抗原(该术语可以指通常仅限于生殖组织但在恶性癌细胞中异常表达的抗原;例如,黑素瘤抗原家族A3(MAGE-A3);纽约食管鳞状细胞癌-1抗原(NY-ESO-1);和黑素瘤中优先表达的抗原(PRAME))。

[0045] 当mRNA的开放阅读框编码癌症相关抗原或癌症特异性抗原时,核酸载体组合物可适用于预防性或治疗性疫苗组合物。

[0046] 任选地,mRNA的开放阅读框编码过敏原(包括但不限于一种或多种坚果过敏原;其又包括但不限于:一种或多种种子储存蛋白,比如豌豆球蛋白、豆球蛋白、白蛋白;一种或多种植物防御相关蛋白;以及一种或多种前纤维蛋白(profilin))。

[0047] 任选地,mRNA的开放阅读框编码调节免疫性疾病、自身免疫性疾病或炎性疾病(包括但不限于狼疮、动脉粥样硬化、慢性阻塞性肺病、炎性肠病、多发性硬化症、银屑病、风湿病、葡萄膜炎、特应性皮炎和肺纤维化)的蛋白质。

[0048] 任选地,根据本发明的第一方面的核酸载体组合物还包含氨基酸,比如甘氨酸。另外或替代地,组合物还包含一种或多种二糖,比如海藻糖。

[0049] 根据本发明的替代的方面,提供一种核酸载体组合物,其包含:

[0050] -一种或多种酶;

[0051] -核酸;

[0052] -一种或多种包含可水解硅的颗粒;和

[0053] -一种或多种脂质。

[0054] 根据本发明的第二方面,提供一种制备根据本发明的第一方面的核酸载体组合物的方法,该方法包括:

[0055] -通过从DNA模板体外转录或从生物来源纯化获得核酸;和

[0056] -将核酸与一种或多种包含可水解硅的颗粒和一种或多种脂质组合。

[0057] 根据本发明的第三方面,提供一种药物组合物,其包含本发明的核酸载体组合物,其中该药物组合物是疫苗组合物。

[0058] 优选地,根据本发明的第三方面的包含本发明的第一方面的核酸载体组合物的药物组合物中的核酸(例如mRNA或pDNA)在4℃下的半衰期为至少3个月、至少6个月或至少12个月。

[0059] 根据本发明的第四方面,提供一种根据本发明的第三方面的药物组合物,其用作药物。

[0060] 根据本发明的第五方面,提供一种治疗或预防疾病或病症的方法,其包括:向有需要的受试者施用根据本发明的第三方面的药物组合物。

[0061] 根据本发明的第六方面,提供一种向受试者提供疫苗接种的方法,其包括皮下或肌内施用根据本发明的第三方面的药物组合物(当其为适合肌内注射的形式时)。

[0062] 根据本发明的第七方面,提供根据本发明的第三方面的药物组合物作为脂质多聚复合物(lipopolyplex)转染载体的用途。

[0063] 根据本发明的第八方面,提供根据本发明的第三方面的药物组合物在制备药物中的用途。

附图说明

[0064] 图1比较siRNA负载和未负载组合物的ζ电位。每个制剂标记为F1至F5;

[0065] 图2显示siRNA负载(具有较浅点状填充的柱)和未负载(具有较暗散列填充的柱)组合物的ζ电位的比较,其中硅纳米颗粒用硬脂胺(图2);PC(图3);或卵磷脂(图4)进行表面处理,并且胺为精氨酸;

[0066] 图5显示测定HCES细胞中组合物的转染效率的实验结果。第一列的细胞用DAPI染色并发出蓝色荧光(原始),显示细胞核。第二列的细胞发出绿色荧光(原始),表明用本发明的制剂F2至F5成功转染;

[0067] 图6显示凝胶电泳实验的结果,表明根据本发明制备的硅纳米颗粒成功地捕获mRNA,特别是在硅纳米颗粒与mRNA的比率为2:1或更高时;

[0068] 图7显示分光光度实验的结果,确认根据本发明制备的硅纳米颗粒成功地捕获mRNA,特别是在硅纳米颗粒与mRNA的比率为2:1或更高时;

[0069] 图8显示测定负载有siRNA的硅纳米颗粒递送系统的转染效率的实验结果;

[0070] 图9显示测定用负载有siRNA的硅纳米颗粒递送系统处理的细胞的转染后活力的实验结果;

[0071] 图10显示当使用硅纳米颗粒递送系统将siRNA递送至细胞时测定siRNA-诱导的基因沉默程度的实验结果;

[0072] 图11显示评估局部硅纳米颗粒制剂的体内眼部siRNA递送的实验结果;

[0073] 图12和13显示在用负载有siRNA的硅纳米颗粒递送系统处理期间,通过活体动物

成像测定体内鼠角膜荧光素酶表达的实验结果;和

[0074] 图14显示测定含有Si纳米颗粒的制剂和不含Si纳米颗粒的脂质体制剂的hsDNA的核酸结合效率的实验结果。

[0075] 图15显示硅片研磨成粉末之前和之后的外观。

[0076] 图16显示手工研磨硅颗粒的SEM图像,用于评估其尺寸。

[0077] 图17显示手工研磨的硅颗粒的TEM图像。

[0078] 图18显示图17的硅颗粒在与包含RNA的本发明组分复合(complexation)之后的TEM图像。

[0079] 图19显示与包含RNA的本发明组分复合后的硅颗粒的TEM图像。它与图18中所示的颗粒类似,不同之处在于它是由掺硼硅制成的。

[0080] 图20和21显示对于含有“Biocourier”硅颗粒的本发明制剂(实心条)和不存在硅颗粒的相应“脂质体”制剂(空心条)所测定的核酸结合效率(分别为mRNA或hsDNA)。

[0081] 图22显示(A)与牛血清(BS)孵育不同持续时间的mRNA-SIS0012和(B)在与牛血清孵育之前和之后从mRNA-SIS0012提取的mRNA的凝胶阻滞测定的结果。使用无核酸酶水中的裸mRNA作为对照。DNA梯状条带用作尺寸指导。

[0082] 图23显示(A)与牛血清(BS)孵育不同持续时间的mRNA-SIS0013和(B)在与牛血清孵育之前和之后从mRNA-SIS0013提取的mRNA的凝胶阻滞测定的结果。使用无核酸酶水中的裸mRNA作为对照。DNA梯状条带用作尺寸指导。

[0083] 图24显示(A)配制时不含硅并与牛血清(BS)孵育不同持续时间的mRNA-LNP和(B)在与牛血清孵育之前和之后从LNP提取的mRNA的凝胶阻滞测定的结果。使用无核酸酶水中的裸mRNA作为对照。DNA梯状条带用作尺寸指导。

[0084] 图25显示与牛血清(BS)孵育不同持续时间的裸mRNA的凝胶阻滞测定的结果。使用无核酸酶水中的裸mRNA作为对照。DNA梯状条带用作尺寸指导。

具体实施方式

[0085] 生物来源的核酸

[0086] 任选地,根据某些实施方式,本发明涉及生物来源的核酸。这指在基于细胞培养的系统中产生的核酸,或者在体外使用在基于细胞培养的系统中产生的酶所产生的核酸。生物来源的核酸可以包括从细胞材料中提取或体外转录(包括随后进行化学修饰的情况)的RNA(比如mRNA)和DNA(比如pDNA)。它不包括通过全化学合成途径比如亚磷酰胺化学合成制备的核酸。

[0087] 体外转录的mRNA

[0088] 在本发明所有方面的某些优选实施方式中,本发明的核酸载体组合物包含体外转录的(IVT)mRNA的制剂。

[0089] 本文所用的术语“mRNA”是指信使RNA。该术语涵盖未修饰的mRNA和修饰的mRNA。在这一点上,应当理解,根据本发明所有方面的某些实施方式的mRNA可以经化学修饰以增强其治疗特性,比如增强的活性、增加的血清稳定性、减少的脱靶和较低的免疫活化。

[0090] 对RNA的化学修饰可以包括本领域公知的任何修饰,例如:用本领域公知的标记进行的修饰;甲基化;帽,比如5’帽(例如,Cap 0,其需要通过三磷酸桥将7-甲基鸟苷连接至第

一个核苷酸;Cap 1,其需要对第一个帽-近端核苷酸的2'-羟基进行甲基化;或Cap 2,其具有第二个核苷酸的额外2'-O-甲基化;或修饰的Cap 0、Cap 1或Cap 2结构,比如修饰的Cap 1结构$m^7G^+m^{3'}$-5'-ppp-5'-Am);多聚(A)尾;用类似物替换一个或多个天然存在的核苷,例如用N1-甲基-假尿苷替换尿苷;和核苷间键的修饰。

[0091] 在一些实施方式中,mRNA的长度可以是至少100、至少200、至少300、至少500、或至少1000或2000个碱基对。

[0092] 质粒DNA(pDNA)

[0093] 在其它实施方式中,核酸载体组合物包含DNA制剂。优选地,这是质粒DNA,其包括从质粒(例如通过从质粒切下)获得的质粒形式的任何DNA。

[0094] 体外mRNA转录

[0095] 在某些优选的实施方式中,本发明的第二方面的制备核酸载体组合物的方法需要通过体外转录(IVT)从线性DNA模板合成mRNA。

[0096] 线性DNA模板可以预先产生。例如,在一些实施方式中,DNA模板可以通过纯化的质粒的线性化或通过使用PCR扩增目的区域来预先产生。

[0097] 转录可以使用RNA聚合酶进行。例如,在一些实施方式中,转录可以使用T7、SP6或T3 RNA聚合酶进行。在某些优选的实施方式中,例如当mRNA的开放阅读框编码SARS-CoV-2的刺突蛋白抗原时,可以使用T7 RNA聚合酶。

[0098] 因此,转录中使用的反应物可以包括:线性DNA模板;RNA聚合酶(例如T7、SP6或T3 RNA聚合酶);和三磷酸核苷底物。三磷酸核苷底物可包括修饰的三磷酸核苷底物,例如N1-甲基-假尿苷。在一些实施方式中,可以包括聚合酶辅因子$MgCl_2$。在一些实施方式中,可以包括pH缓冲溶液(例如含有多胺和抗氧化剂的pH缓冲溶液)。

[0099] mRNA的5'加帽可以选择在IVT反应期间进行,即5'加帽可以是共转录的。这可以通过用三磷酸鸟苷底物的一部分替换帽类似物来实现。任选地,可以使用CleanCap™试剂进行共转录加帽。

[0100] 作为共转录加帽的替代方式,在一些实施方式中,mRNA可以在与甲基供体一起由牛痘病毒加帽酶(VCC)催化的第二反应(转录后)中加帽。在某些优选的实施方式中,例如当mRNA的开放阅读框编码SARS-CoV-2的刺突蛋白抗原时,使用牛痘病毒加帽酶和牛痘病毒2'O-甲基转移酶进行5'加帽。

[0101] 在一些实施方式中,5'帽可以选自Cap 0、Cap 1或Cap 2,或修饰的Cap 0、修饰的Cap 1(例如,$m^7G^+m^{3'}$-5'-ppp-5'-Am帽)或修饰的Cap 2。

[0102] mRNA和pDNA纯化

[0103] 制备本发明的核酸载体组合物需要纯化核酸(例如mRNA或pDNA)。在核酸是mRNA的实施方式中,这可能需要从转录反应混合物(其含有杂质,在一些实施方式中,包括以下的一种或多种:酶、残留的三磷酸核苷、DNA模板和在IVT期间形成的异常mRNA)中纯化mRNA,以形成体外转录的mRNA制剂。

[0104] 任选地,纯化可以包括但不限于以下的一种或多种:尺寸排阻色谱(SEC);离子对反相色谱(IPC);离子交换色谱(IEC);基于亲和力的分离;切向流过滤(TFF);核心珠色谱;羟基磷灰石色谱;与TFF组合的mRNA沉淀(在TFF期间,膜捕获沉淀的mRNA产物,同时通过渗滤去除其它杂质);通过固定化DNase进行消化去除DNA模板;以及使用可在IVT后使用亲和

层析去除的带标签的DNA模板。在某些优选的实施方式中,例如当mRNA的开放阅读框编码SARS-CoV-2的刺突蛋白抗原时,纯化可以涉及寡聚-dT亲和纯化、通过切向流过滤将缓冲液更换为乙酸钠(pH 5.0)和无菌过滤。

[0105] 应当理解,即使纯化完成,体外转录的mRNA制剂仍可包含至少痕量的以下一种或多种:线性DNA;一种或多种RNA聚合酶;和一种或多种三磷酸核苷。例如,体外转录的mRNA制剂可包含至少0.01%v/v线性DNA。体外转录的mRNA制剂可包含至少0.01%v/v RNA聚合酶。体外转录的mRNA制剂可包含至少0.01%v/v三磷酸核苷。

[0106] pDNA可以通过类似的方法从细胞来源的(包括微生物细胞来源的,例如细菌或酵母细胞来源的)提取物中纯化。

[0107] 制备核酸载体组合物

[0108] 在根据本发明的第二方面的制备核酸载体组合物的方法中,然后将核酸制剂(例如pDNA或体外转录的mRNA)与水、包含可水解硅的颗粒和一种或多种脂质组合。组合物还可任选地包含一种或多种氨基酸(例如甘氨酸或包括甘氨酸的核酸混合物)和任选的一种或多种非还原性二糖比如海藻糖。合适的制备方法可包括将脂质组分分散在溶剂比如甲醇中;通过例如在旋转蒸发器中蒸发溶剂来产生脂质薄膜;用含有活化的可水解硅颗粒(例如平均颗粒尺寸小于100nm的颗粒)、非还原性二糖(比如海藻糖)和一种或多种氨基酸(比如甘氨酸)的水溶液水合脂质。组合物可以任选地通过过滤器,例如0.4和0.1μm过滤器,以实现颗粒的复合和分散。如果需要允许进一步复合发生,组合物可以任选地储存在4℃。然后可以将由此制备的载体与核酸(比如质粒DNA或mRNA,比率范围为1:6至1:16,其中1代表核酸)的水溶液复合。优选的比率为1:8-1:12,其中1:8通常允许生物物质(biological)稍微过量,并且1:12允许载体稍微过量。

[0109] mRNA结构

[0110] 在其中核酸是mRNA的本发明所有方面的一些实施方式中,除了编码蛋白质的开放阅读框之外,mRNA分子可任选地包含以下的一种或多种:5'帽;多聚(A)尾;以及一个或多个非翻译区。

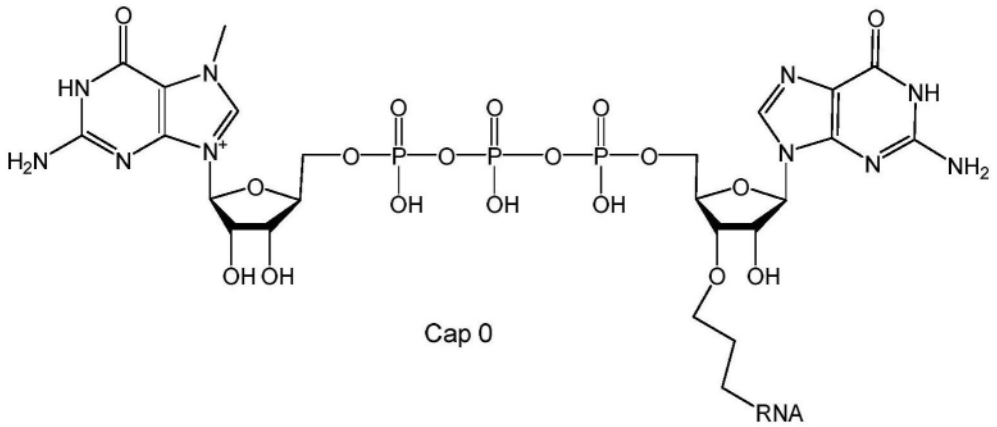
[0111] 在一些实施方式中,mRNA的编码蛋白质的开放阅读框编码抗原,从而提供作为疫苗的制剂。抗原可以是病毒抗原,例如SARS-CoV-2的抗原,例如是或衍生自SARS-CoV-2的刺突蛋白或其部分的抗原。因此,在一些实施方式中,mRNA的开放阅读框可以编码SARS-CoV-2的刺突蛋白抗原。在一些实施方式中,开放阅读框可以编码天然存在的蛋白质的突变版本。例如,在一些实施方式中,当开放阅读框编码SARS-CoV-2的刺突蛋白或其一部分时,可以包括两个突变,其中原始氨基酸被脯氨酸取代。不希望受理论的束缚,据认为这可以确保所得的S糖蛋白保持抗原最佳的融合前构象。

[0112] 在一些实施方式中,mRNA的编码蛋白质的开放阅读框可以编码多种蛋白质。例如,mRNA的编码蛋白质的开放阅读框可以编码病毒抗原和佐剂蛋白,或多种病毒抗原。在某些优选的实施方式中,例如当mRNA的开放阅读框编码SARS-CoV-2的刺突蛋白抗原时,该开放阅读框可以额外编码信号肽,例如S糖蛋白信号肽。

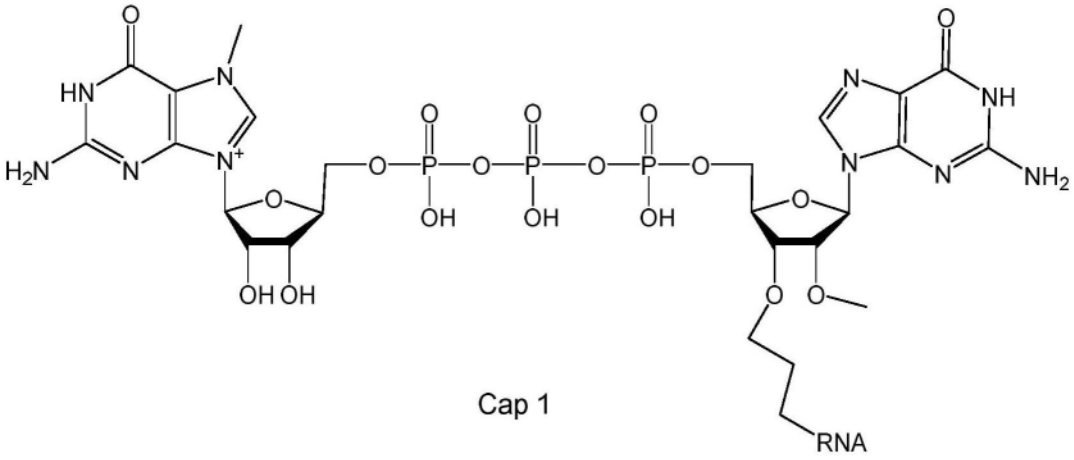
[0113] 5'帽

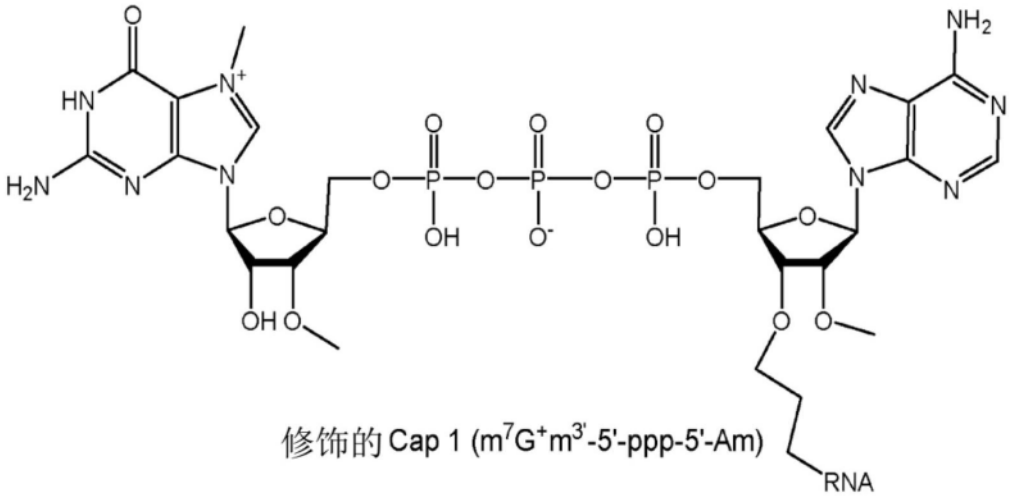
[0114] 如上所述,mRNA可以通过具有5'帽进行修饰。5'帽可具有Cap 0(m^7GpppN)结构,其需要通过三磷酸桥将7-甲基鸟苷连接至第一个核苷酸。5'帽可具有Cap 1(m^7GpppNm)结构,

其需要对第一个帽-近端核苷酸的2'-羟基进行甲基化。5'帽可具有Cap 2($m^7GpppNm\ pN^m$)结构,其具有第二个核苷酸的额外2'-O-甲基化。帽可以具有修饰的Cap 0、修饰的Cap 1或修饰的Cap 2结构。在某些优选的实施方式中,例如当mRNA的开放阅读框编码SARS-CoV-2的刺突蛋白抗原时,5'帽是Cap 1,或者5'帽是修饰的Cap1,其具有$m^7G^+m^{3'}$-5'-ppp-5'-Am帽结构。

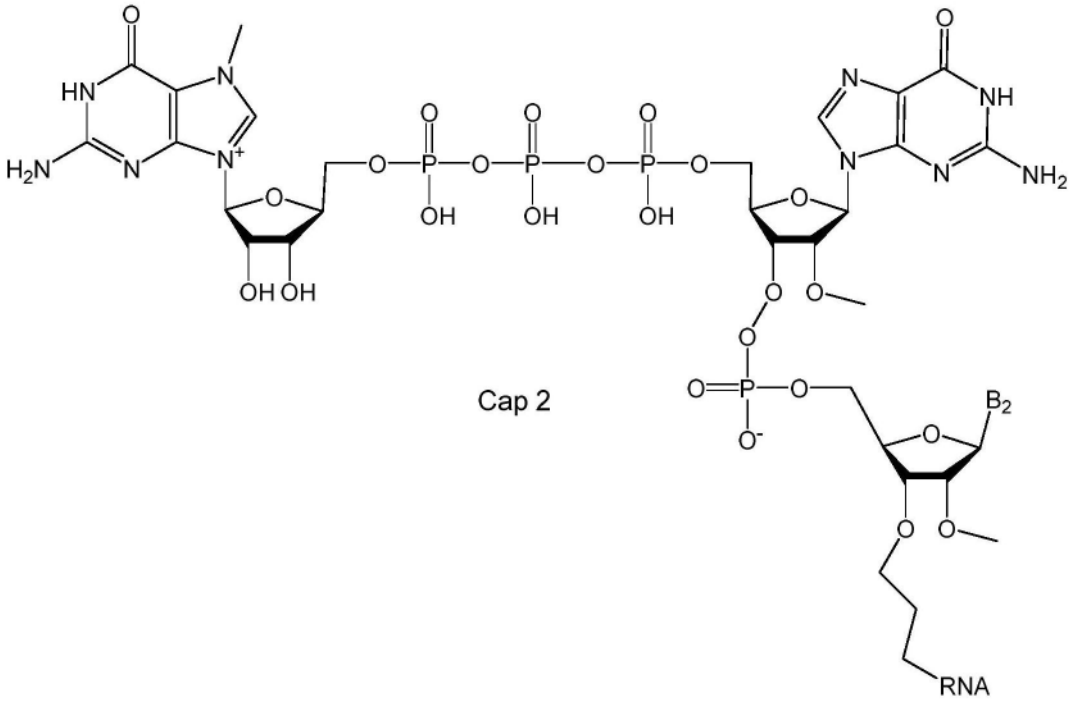


[0115]





[0116]



[0117] 不希望受理论的束缚,据认为5'帽通过保护mRNA免受5'核酸外切酶降解来增加mRNA稳定性;5'帽允许核糖体识别mRNA的开头;并且5'帽可以通过与真核翻译起始因子4E(eIF4E)结合来改善翻译效率。

[0118] 3'多聚(A)尾

[0119] 不希望受理论的束缚,还认为通过添加3'多聚(A)尾来修饰mRNA可以改善翻译活性和mRNA稳定性,包括保护mRNA免受核酸酶降解。在优选的实施方式中(例如当mRNA的开放阅读框编码SARS-CoV-2的刺突蛋白抗原时),可以在mRNA的体外转录期间通过在DNA模板中的序列包含多聚(A)尾,将多聚(A)尾添加至mRNA中。可以选择尾尺寸以优化mRNA的稳定性和表达。有利地,来自DNA模板的mRNA的体外转录可以产生具有限定的多聚(A)尾长度的mRNA。在一些实施方式中,多聚(A)尾可以具有100至200个核苷酸、例如120至150个核苷酸的长度。在某些优选的实施方式中,例如当mRNA的开放阅读框编码SARS-CoV-2的刺突蛋白抗原时,提供110个核苷酸的多聚(A)尾,其具有30个腺苷残基由10个核苷酸接头序列与另

外70个腺苷残基分隔。

[0120] 非翻译区(UTR)

[0121] 非翻译区是mRNA序列的非编码区,位于mRNA编码区的上游(5'UTR)和下游(3'UTR)结构域。不希望受理论的束缚,据认为UTR可以协助转录调节以及mRNA稳定性,并且UTR通过参与翻译装置识别、募集和mRNA运输来影响翻译效率。据认为UTR可以通过与RNA结合蛋白的反应来改变mRNA的衰减和翻译效率。

[0122] 在某些优选的实施方式中,例如当mRNA的开放阅读框编码SARS-CoV-2的刺突蛋白抗原时,提供衍生自具有优化的Kozak序列的人α-珠蛋白RNA的5'UTR,和/或提供包含衍生自分裂的氨基末端增强子(amino-terminal enhancer of split,AES)mRNA和线粒体编码的12S核糖体RNA的两个序列元件的3'UTR。不希望受理论的束缚,据认为这种UTR赋予RNA稳定性和高的总蛋白表达。

[0123] 开放阅读框(ORF)

[0124] 如本文所用的术语,开放阅读框(ORF)是指核酸(例如mRNA或pDNA)的蛋白质编码区或其中之一。在一些实施方式中,ORF序列可包括同义常见密码子(和/或具有较高tRNA丰度的密码子)作为较稀有密码子的替代物。据认为,通过这种方式,高表达的基因可以使用与宿主相同的密码子来翻译,和/或保证在核酸表达期间相关tRNA的丰度。然而,具有较高的核酸翻译率可能不总是优选的,因为一些蛋白质需要较低的翻译率才能正确折叠。在这些情况下,使用ORF中频率较低的密码子可能产生更高质量的蛋白质产物。

[0125] 修饰的核苷和核苷酸

[0126] 应当理解,如本文所用,术语"核苷"和"核苷酸"将包括那些不仅含有已知的嘌呤和嘧啶碱基而且还含有已修饰的其它杂环碱基的部分。这种修饰包括甲基化的嘌呤或嘧啶、酰化的嘌呤或嘧啶、或其它杂环。修饰的核苷或核苷酸还包括糖部分上的修饰,例如,其中一个或多个羟基被卤素、脂族基团取代,或者被官能化为醚、胺等。对核苷酸或多核苷酸的其它修饰涉及重排、附加、替换或以其它方式改变嘌呤或嘧啶碱基上的官能团,该嘌呤或嘧啶碱基与各自互补的嘧啶或嘌呤例如异鸟嘌呤、异半胱氨酸等形成氢键。在一些实施方式中,mRNA包含至少一种、两种、三种或四种修饰的核苷酸。例如,在一些实施方式中,mRNA可包含至少一个N1-甲基-假尿苷核苷,例如至少两个、三个、四个、五个、十个、十五个或二十个N1-甲基-假尿苷核苷。

[0127] 在一些实施方式中,核酸(例如mRNA)包含一种或多种通用碱基。如本文所用,术语"通用碱基"是指可以与选自A、U/T、C和G的多于一种核苷酸杂交的核苷酸类似物。在一些实施方式中,通用碱基可以选自脱氧肌苷、3-硝基吡咯、4-硝基吲哚、6-硝基吲哚、5-硝基吲哚。

[0128] 不希望受理论的束缚,据认为引入修饰的核苷可以帮助调节先天免疫应答和/或增加核酸稳定性。例如,在一些实施方式中,mRNA的尿苷含量可以部分或全部被N1-甲基-假尿苷取代。在某些优选的实施方式中,例如当mRNA的开放阅读框编码SARS-CoV-2的刺突蛋白抗原时,mRNA的尿苷含量可以完全被N1-甲基-假尿苷取代。

[0129] 酶及其一种或多种片段

[0130] 根据本发明涉及核酸载体组合物的所有方面,该组合物可以包含一种或多种酶和/或其一种或多种片段。该组合物可以包含至少痕量的以下一种或多种:线性DNA;一种或

多种RNA聚合酶和/或其一种或多种片段;和一种或多种三磷酸核苷。因此,特别地,该组合物可以包含一种或多种RNA聚合酶,和/或其一种或多种片段。任选地,一种或多种RNA聚合酶可以选自T7、SP6和T3 RNA聚合酶中的一种或多种。如果核酸是或包含DNA,该组合物可包含至少痕量的线性DNA。

[0131] 该组合物可以包含至少痕量的能够降解核酸的酶和/或其一种或多种片段。然而,基于酶需要水性环境以便它们催化核酸的降解,一种或多种包含可水解硅的颗粒可以去除或隔离水分子,从而防止一种或多种酶和/或其一种或多种片段降解核酸。

[0132] 一种或多种包含可水解硅的颗粒

[0133] 根据本发明的所有方面,一种或多种包含可水解硅的颗粒可以是纯硅或另一种包含可水解硅的材料。如果它们不是纯硅,它们包含至少50重量%的硅,即,基于颗粒中原子的总质量,它们包含至少50重量%的硅原子。例如,硅颗粒可包含至少60%、70%、80%、90%或95%的硅。硅颗粒优选地显示水解速率(例如在室温下在PBS缓冲液中)为相同尺寸的纯硅颗粒的水解速率的至少10%。用于含硅材料的水解的测定是本领域广泛已知的(参见,例如,WO2011/001456,将其并入本文以供参考)。尽管本发明的颗粒可以包含一些二氧化硅,但是二氧化硅不是可水解硅并且颗粒中至少一半的硅原子是元素硅(或掺杂的元素硅)的形式。

[0134] 根据本发明的所有方面,包含可水解硅的颗粒可以是纳米颗粒。纳米颗粒具有5至400nm、例如50至350nm、例如80至310nm、例如100至250nm、例如120至240nm、例如150至220nm、例如约200nm的标称直径。它们可以由纯硅或含可水解硅的材料制成。它们优选是多孔的。上文提到的标称直径可以指平均直径,并且颗粒样品中颗粒总质量的至少90%可以落入指定的尺寸范围内。颗粒尺寸可以通过透射电子显微镜(TEM)测定或确认,例如使用NIST-NCL联合测定协议,PCC-X,版本1.1,"Measuring the size of nanoparticles using TEM",2010年2月修订:https://tsapps.nist.gov/publication/get_pdf.cfm?pub_id=854083。

[0135] 在一些优选的实施方式中,标称直径可以低于100nm,或低于80nm,或低于70、50或30nm。在一些实施方式中,标称直径可为约30nm(例如20nm至40nm)。包含可水解硅的颗粒可通过标准技术制成多孔的,比如使颗粒与氢氟酸(HF)/乙醇混合物接触并施加电流。通过改变HF浓度、电流密度和暴露时间,可以控制孔的密度及其尺寸,并且可以通过扫描电子显微照相和/或氮气吸附解吸体积等温测量来监测。

[0136] 如果颗粒是多孔的,它们的总表面积将由于它们的孔隙率而增加。例如,表面积可以比相应的无孔颗粒的表面积增加至少50%或至少100%。在许多情况下,根据本发明所有方面的多孔颗粒实际上由于其孔隙率而在总表面积方面具有大得多的增加。根据某些实施方式,孔隙率为至少30%、40%、50%或60%。这意味着,分别有30%、40%、50%或60%的颗粒体积位于孔隙空间中。优选的孔径范围为1nm至50nm,例如5nm至25nm。

[0137] 任选硅的掺杂

[0138] 本发明的所有方面任选地涉及含掺杂硅的材料。硅可以任选地是n-掺杂的或p-掺杂的。本发明包括所有方面的实施方式,其中硅掺杂有选自Mg、P、Cu、Ga、Al、In、Bi、Ge、Li、Xe、N、Au、Pt的一种或多种元素。最优选地,掺杂剂是p-掺杂剂。最优选地,掺杂剂是硼。P-掺杂硅特别适合稳定带负电荷的核酸。N-掺杂硅还可用于间接稳定带负电荷的核酸,因为它

们可以保护脂质免受降解,这可以间接增加核酸的稳定性并保护核酸。

[0139] 掺杂硅的制造在半导体工业中是众所周知的,并包括离子注入和扩散方法。因此,掺杂硅很容易获得。任选地,可以通过使用扩散方法来掺杂硅以增加硅中存在的掺杂剂的量。作为扩散方法的实例,将硅粉和掺杂剂(例如用于硼掺杂的B_2O_3)放置在碗中,将其在N_2气氛下混合并放置并经受1050℃至1175℃的温度持续几分钟,以允许掺杂剂(例如硼)扩散至硅中。图1和图2显示通过这种方法产生的掺硼硅。

[0140] 根据某些实施方式,硅的掺杂是重度的。特别优选重硼掺杂。重掺杂应理解为是指每cm^3掺杂至少1×10^{15}个掺杂剂原子。在一些实施方式中,掺杂剂以每cm^3至少1×10^{16}个掺杂剂原子、每cm^3至少1×10^{17}个掺杂剂原子、每cm^3至少1×10^{18}个掺杂剂原子、每cm^3至少1×10^{19}个掺杂剂原子、或每cm^3至少1×10^{20}个掺杂剂原子的水平存在。

[0141] 当硼用作掺杂剂时,优选地,每cm^3 1×10^{15}个掺杂剂原子和每cm^3 1×10^{20}个掺杂剂原子的掺杂水平分别对应于20mohm-cm和1mohm-cm的电阻率。其中硼是优选掺杂剂的本发明的各个方面不排除硅除了用硼掺杂(例如重度掺杂)之外还掺杂有其它元素。根据本发明所有方面的优选实施方式,主要掺杂剂是硼。

[0142] 硅与核酸的比率

[0143] 优选地,硅与核酸(例如mRNA或pDNA)的比率为0.01:1至1:8,例如1:1至1:6、1:1至1:5、1:1至1:4,或1:1至1:3。优选地,硅与核酸的比率为1:1至1:3。有利地,硅与核酸的该比率进一步稳定由颗粒输送的核酸,因此任选地还影响核酸的释放速率。

[0144] 任选的核酸与硅结合

[0145] 在本发明所有方面的一些实施方式中,至少70重量%、例如至少80重量%、例如至少90重量%的存在的核酸(例如mRNA或pDNA)与一种或多种包含可水解硅的颗粒结合。这意味着核酸与一种或多种包含可水解硅的颗粒非共价结合。不希望受理论的束缚,假设当这种情况发生时,在一些实施方式中,核酸的随机运动(也称为布朗运动)可能减少;使得核酸被降解的机会进一步减少。

[0146] 核酸与一种或多种包含可水解硅的颗粒的任选结合可以与硅的水解相关和/或受其控制。因此,核酸变为生物可利用的速率也可以与硅的水解相关,从而避免剂量倾卸和/或确保核酸在适当长的时间段内逐渐释放。在一些实施方式中,核酸与一种或多种颗粒之间的结合可以进一步稳定核酸。例如,它可以导致核酸的电荷稳定。

[0147] 脂质

[0148] 根据本发明的所有方面,至少一种脂质可以包括阳离子脂质;辅助脂质,例如磷脂;结构脂质,例如以胆固醇为基础的脂质;和/或聚乙二醇(PEG)脂质。

[0149] 所使用的一种或多种脂质的类型可以影响一种或多种硅颗粒在体内的降解速率。例如,一种或多种脂质分子可以与一种或多种硅颗粒的一个或多个表面非共价结合;这可以表示为用脂质对一种或多种硅颗粒进行表面处理。例如,已发现至少一种脂质的存在允许控制硅的水解速率,使得硅水解成生物可利用的原硅酸(OSA)降解产物而不是不溶性聚合水解产物。具体地,已经发现用脂质对硅颗粒进行表面处理对硅颗粒的表面电荷具有有益的影响,为它们提供必要的ζ电位以允许改善核酸(例如mRNA)的稳定性,并且任选地控制核酸在靶位点的释放速率。

[0150] 脂质可包含以下的一种或多种:磷脂酰胆碱(PC)、氢化PC、硬脂胺(SA)、二油酰磷

脂酰乙醇胺(DOPE)、胆固醇3β-N-(二甲基氨基乙基)氨基甲酸酯盐酸盐(DC)-胆固醇、1,2-二油酰-3-三甲基丙烷铵(DOTAP)及其任何衍生物。在某些实施方式中,脂质包含DOTAP或由其组成。用于处理纳米颗粒表面的脂质类型可以影响核酸(例如mRNA或pDNA)的稳定性,任选地影响释放速率。具体地,当脂质分子和一种或多种硅颗粒之间存在结合时,对硅颗粒的表面电荷存在有益的影响,为它们提供必要的ζ电位以允许改善核酸的稳定性,并且任选地控制核酸(例如mRNA或pDNA)在靶位点的释放速率。至少一种脂质的存在可以允许控制硅的水解速率,使得硅水解成生物可利用的原硅酸(OSA)降解产物而不是不溶性聚合水解产物。控制硅的水解速率将影响核酸保护的持续时间。

[0151] 根据本发明的所有方面,一种或多种脂质可具有500至1000范围内的平均分子量(例如,当脂质含有一种或多种阳离子脂质(例如,DTDTMA(双十四烷基三甲基铵)、DOTMA(2,3-二油酰氧基丙基-1-三甲基铵)、DHDTMA(双十六烷基三甲基铵))DOTAP、辅助脂质、结构脂质和PEG脂质,或选自PC、氢化PC、SA、DOPE、DOTAP、DTDTMA、DHDTMA、DC-胆固醇、及其衍生物的一种或多种),在任何挤出或过滤过程发生之前,脂质(即总脂质组分)与硅的比率为1:1至20:1,例如1:1至18:1、1:1至16:1、1:1至11:1、1:1至10:1、1:1至9:1、1:1至8:1、1:1至13:1、2:1至12:1、2:1至11:1、2:1至10:1、2:1至9:1、2:1至8:1,例如1:1至7:1、2:1至7:1、3:1至6:1、4:1至5:1。不希望受理论的束缚,脂质与硅的这种比率可以任选地提供泡状体系统,其能够控制与可水解硅颗粒接触的核酸(比如mRNA或pDNA)的释放和稳定,并促进硅的生物可利用降解产物OSA的受控释放。

[0152] 有利地,脂质化合物对硅颗粒的表面电荷产生显著影响。当进行ζ电位分析时,用磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)DOTAP和卵磷脂处理的包含可水解硅的颗粒表现出负表面电荷(范围为-60至-20mV,硅:脂质的比率范围为1:1至1:3)。用硬脂胺处理的颗粒表面表现出正的ζ电位(范围为0至40mV,硅:脂质的比率范围为1:1至1:3)。使用掺杂硅(例如p-掺杂硅,例如如本文别处所述的掺硼硅)可以有助于使ζ电位更为负值。以这种方式控制硅颗粒的表面电荷可以控制它们去除或隔离水分子的能力,从而保护核酸免受降解。

[0153] 在一些实施方式中,脂质或脂质组分可以是或包含磷脂。术语“磷脂”是指包含脂肪酸链和磷酸基团的脂质。磷脂通常是中性分子,因为它们不具有总电荷或可能携带负电荷,这与带正电荷的阳离子脂质不同。磷脂通常是两性离子化合物,其包含带正电荷和带负电荷的组分,但没有总电荷。因此,通常将磷脂归类为中性脂质。特别合适的磷脂是甘油磷脂。特别合适的磷脂是其中的极性头基与季铵部分连接的那些,比如磷脂酰胆碱(PC)或氢化磷脂酰胆碱。磷脂的另一个实例是DOPE(磷脂酰乙醇胺或1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)。脂质的类型可以根据制剂的性质来选择,对于非质子制剂优选中性或带负电荷的磷脂,而对于质子制剂优选带正电荷的阳离子脂质和小CH_3链脂质。磷脂可以是或衍生自卵磷脂。

[0154] 优选地,磷脂的侧链是具有15个或更多个碳原子的脂族侧链,或者具有6个或更多个重复醚单元的醚侧链,比如聚乙二醇或聚丙二醇链。具有醚侧链的脂质可称为“PEG-脂质”或“PEG化的”脂质。PEG-脂质可以是磷脂,比如具有PEG侧链的1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE),例如DSPE-mPEG2000。

[0155] 脂质组分可包括磷脂酰胆碱(PC)、氢化PC、硬脂胺(SA)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、DOTAP、胆固醇3β-N-(二甲基氨基乙基)氨基甲酸酯盐酸盐(DC)-胆固醇、及其衍生

物中的一种或多种。在某些实施方式中,脂质组分可基本上由磷脂酰胆碱、氢化磷脂酰胆碱、硬脂胺、或其组合组成。

[0156] 硅的掺杂改变了表面电荷。根据某些优选实施方式,使用p-掺杂剂,比如硼(其在本发明的许多实施方式的所有各个方面中是优选的)将使ζ电位更为正值(即,负值更小)。当硅掺杂有硼时,纯硅的通常值-40mV将变成约-25mV。因此可以理解,当用阳离子脂质处理时,掺硼硅可以更容易地实现正的ζ电位。例如,用硬脂胺或DOTAP处理可以达到约+20mV至+60mV的值。这意味着可以使用较少量的阳离子脂质或更广泛的阳离子脂质(包括那些阳离子性低于硬脂胺和DOTAP的脂质)来实现正的表面ζ电位。这也意味着,即使阳离子脂质在储存期间降解("老化"),导致脂质正电荷部分丢失,颗粒的表面ζ电位仍将较长时间地保持在足够的正值范围内。

[0157] 已经发现,脂质与掺硼硅摩尔比为0.8:1至20:1是特别有利的,例如1:1、6:1、8:1、或10:1、或12:1或16:1。

[0158] 在一些实施方式中,脂质或脂质组分可以是或包含磷脂。术语"磷脂"是指包含脂肪酸链和磷酸基团的脂质。磷脂通常是中性分子,因为它们不具有总电荷或可能携带负电荷,这与带正电荷的阳离子脂质不同。磷脂通常是两性离子化合物,其包含带正电荷和带负电荷的组分,但没有总电荷。因此,通常将磷脂归类为中性脂质。特别合适的磷脂是甘油磷脂。特别合适的磷脂是其中的极性头基与季铵部分连接的那些,比如磷脂酰胆碱(PC)或氢化磷脂酰胆碱。磷脂的另一个实例是DOPE(磷脂酰乙醇胺或1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)。脂质的类型可以根据制剂的性质来选择,对于非质子制剂优选中性或带负电荷的磷脂,而对于质子制剂优选带正电荷的阳离子脂质和小CH_3链脂质。磷脂可以是或衍生自卵磷脂。

[0159] 优选地,磷脂的侧链是具有15个或更多个碳原子的脂族侧链,或者具有6个或更多个重复醚单元的醚侧链,比如聚乙二醇或聚丙二醇链。具有醚侧链的脂质可称为"PEG-脂质"或"PEG化的"脂质。

[0160] 在一些实施方式中,脂质或脂质组分可以是或包含阳离子脂质。术语"阳离子脂质"是指具有阳离子头部基团通过合适的间隔基(spacer)连接至疏水尾的带正电荷的分子。实例包括DTDTMA(双十四烷基三甲基铵)、DOTMA(2,3-二油酰氧基丙基-1-三甲基铵)、DOTAP、DHDTMA(双十六烷基三甲基铵)和硬脂胺(SA)。正电荷通常由负抗衡离子稳定。在优选的实施方式中,特别是关于疫苗组合物,阳离子脂质是或包含DOTAP。

[0161] 在某些实施方式中,脂质选自磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰胆碱(PC)、硬脂胺(SA)、或其任何组合。

[0162] 在某些实施方式中,脂质可基本上由磷脂酰胆碱、氢化磷脂酰胆碱、硬脂胺、或其组合组成。

[0163] 在某些实施方式中,脂质可以由基于颗粒总重量的至少5重量%的氢化磷脂酰胆碱、例如至少20重量%、通常至少30重量%并且尤其是至少50重量%氢化磷脂酰胆碱组成。已发现氢化磷脂酰胆碱与硅的摩尔比为0.8:1至5:1是特别有利的,例如1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1或4.5:1。

[0164] 在某些实施方式中,脂质可以由基于颗粒总重量的至少5重量%的磷脂酰胆碱、例如至少20重量%、通常至少30重量%并且尤其是至少50重量%磷脂酰胆碱组成。已发现磷

脂酰胆碱与硅的摩尔比为0.8:1至5:1是特别有利的,例如1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1或4.5:1。

[0165] 在某些实施方式中,脂质可以由基于颗粒总重量的至少5%的硬脂胺、例如至少20重量%、通常至少30重量%并且尤其是至少50重量%硬脂胺组成。已经发现硬脂胺与硅的摩尔比为0.8:1至5:1是特别有利的,例如1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1或4.5:1。

[0166] 在某些实施方式中,脂质可以由PC和SA组成,优选PC:SA的重量比为1:1至20:1,更优选7:1至10:1,比如PC:SA的重量比为72:8。

[0167] 在某些实施方式中,脂质可由DOPE、SA和DC-胆固醇组成。DOPE:SA的重量比可以在1:1至10:1的范围内,例如4:1至8:1。DOPE:DC-胆固醇的重量比可以在1:1至5:1的范围内,例如1:1至3:1。SA:DC-胆固醇的重量比可以在1:1至1:5的范围内,例如1:2至1:4。在一些实施方式中,DOPE:SA:DC-胆固醇的重量比可为48:8:24。

[0168] 在某些优选的实施方式中,脂质可以由DOTAP、DOPE和PEG-脂质(比如mPEG2000-DSPE)组成。DOTAP:DOPE的重量比可以为1:2至2:1,例如大约1:1。DOTAP:PEG-脂质和DOPE:PEG-脂质的比率可以为10:1至5:1,例如大约7:1。总脂质的总重量与硅的比率可以为20:1至10:1,例如大约16:1。

[0169] 脂质组分可以是或包含可电离的脂质。术语“可电离的脂质”是指具有能够变为带正电荷的基团的脂质,该基团通常具有路易斯碱(氢受体)头部基团,例如,经由一些间隔基,连接至疏水尾。可电离的脂质通常包括含有叔胺部分的头部。可电离的脂质在生理pH值下可以是中性的,但在较低pH下变成阳离子,例如pH低于6.5,比如作为内体逃逸一部分的液泡内的pH。例如,可电离的脂质描述于Nano Lett.2020Mar 11;20(3):1578-1589。许多疫苗平台使用在生理pH下呈中性的脂质系统,然后仅当被内吞到内体中并且pH降低至pH 6.2左右时才变成阳离子,然后变成阳离子的脂质允许内体逃逸。包含中性脂质的递送系统允许更多的颗粒从肌肉迁移到淋巴结并变为被树突状细胞吞噬。可电离的脂质可以通过与固体生物相容性颗粒的材料结合、例如通过与可水解硅结合来稳定。

[0170] 在某些实施方式中,脂质选自磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰胆碱(PC)、硬脂胺(SA)、或其任何组合。

[0171] 在某些实施方式中,脂质可基本上由磷脂酰胆碱、氢化磷脂酰胆碱、硬脂胺、或其组合组成。

[0172] 在某些实施方式中,脂质可以由基于颗粒总重量的至少5重量%的氢化磷脂酰胆碱、例如至少20重量%、通常至少30重量%并且尤其是至少50重量%氢化磷脂酰胆碱组成。已发现氢化磷脂酰胆碱与硅的摩尔比为0.8:1至5:1是特别有利的,例如1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1或4.5:1。

[0173] 在某些实施方式中,脂质可以由基于颗粒总重量的至少5重量%的磷脂酰胆碱、例如至少20重量%、通常至少30重量%并且尤其是至少50重量%磷脂酰胆碱组成。已发现磷脂酰胆碱与硅的摩尔比为0.8:1至5:1是特别有利的,例如1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1或4.5:1。

[0174] 在某些实施方式中,脂质可以由基于颗粒总重量的至少5%的硬脂胺、例如至少20重量%、通常至少30重量%并且尤其是至少50重量%硬脂胺组成。已经发现硬脂胺与硅的摩尔比为0.8:1至5:1是特别有利的,例如1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1或4.5:1。

[0175] 在某些实施方式中,脂质可以由PC和SA组成,优选PC:SA的重量比为1:1至20:1,更优选7:1至10:1,比如PC:SA的重量比为72:8。

[0176] 在某些实施方式中,脂质可由DOPE、SA和DC-胆固醇组成。DOPE:SA的重量比可以在1:1至10:1的范围内,例如4:1至8:1。DOPE:DC-胆固醇的重量比可以在1:1至5:1的范围内,例如1:1至3:1。SA:DC-胆固醇的重量比可以在1:1至1:5的范围内,例如1:2至1:4。在一些实施方式中,DOPE:SA:DC-胆固醇的重量比可为48:8:24。

[0177] 聚阳离子核酸结合组分

[0178] 本发明的组合物任选还包含聚阳离子核酸结合组分。术语"聚阳离子核酸结合组分"是本领域公知的并且是指具有至少3个重复的阳离子氨基酸残基或其它阳离子单元(带有带正电荷基团)的聚合物,这种聚合物能够在生理条件下与核酸复合。核酸结合聚阳离子分子的实例是包含一种或多种阳离子氨基酸的寡肽。这种寡肽可以例如是寡聚赖氨酸分子、寡聚组氨酸分子、寡聚精氨酸分子、寡聚鸟氨酸分子、寡聚二氨基丙酸分子、或寡聚二氨基丁酸分子、或包含组氨酸、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丙酸和二氨基丁酸残基的任意组合或由其组成的组合寡聚物。聚阳离子组分的其它实例包括树状聚合物和聚乙烯亚胺。

[0179] 氨基酸

[0180] 本发明的所有方面可以包括额外任选存在的一种或多种氨基酸。

[0181] 在其最广泛的意义上,术语"氨基酸"涵盖含有胺基(-NH_2)和羧基(-COOH)官能团的任何人工或天然存在的有机化合物。它包括α、β、γ和δ氨基酸。它包括任何手性构型的氨基酸。根据一些实施方式(例如,当本发明的含硅颗粒与PC、氢化PC、SA、DOPE、DOTAP、DC-胆固醇、及其衍生物中的一种或多种配制时),氨基酸优选是天然存在的α氨基酸。它可以是蛋白氨基酸或非蛋白氨基酸(比如肉碱、左旋甲状腺素、羟脯氨酸、鸟氨酸或瓜氨酸)。在优选的实施方式中,氨基酸包含精氨酸、组氨酸或甘氨酸,或精氨酸和甘氨酸的混合物。在特别优选的实施方式中,氨基酸包括甘氨酸。这种氨基酸可起到稳定硅颗粒并控制硅在储存和体内的水解的作用。

[0182] 用氨基酸处理经脂质处理的硅颗粒还可以对核酸提供有益的稳定作用。已证明用氨基酸处理经脂质处理的硅颗粒可以稳定生物液体中的核酸,例如眼组织以及血浆和组织液中的核酸。以这种方式用氨基酸配制的经脂质处理的颗粒可以特别适合于递送至身体,例如通过经皮注射递送。

[0183] 肽

[0184] 除了上述氨基酸之外,在本发明的所有方面中,可以包括含有细胞表面受体(例如整联蛋白)识别序列的肽,其赋予颗粒一定程度的细胞特异性。肽可以具有含有细胞表面受体识别序列的"头基"和额外的可以与核酸(例如mRNA或pDNA)非共价结合和/或与硅结合的"尾"。

[0185] 氨基酸与硅的比率

[0186] 优选地,当存在氨基酸时,氨基酸与硅的比率为0.05:1至2:1,例如0.05:1至1.8:1、0.05:1至1.6:1、0.05:1至1.4:1、0.05:1至1.2:1、0.05:1至1:1、0.05:1至0.9:1、0.05:1至0.8:1、0.05:1至0.6:1、0.05:1至0.5:1、0.05:1至0.4:1、0.05:1至0.3:1、0.05:1至0.2:1,优选0.2:1至0.8:1,特别是0.3:1至0.7:1。氨基酸与硅的比率可以为0.05:1至0.4:1,例如0.08:1至0.35:1,特别是0.09:1至0.32:1。有利地,调节氨基酸与硅的比率进一步稳定核

酸(例如mRNA或pDNA)。

[0187] 在一些实施方式中,氨基酸是精氨酸和甘氨酸的组合,其中Arg:Gly的比率为1:0.6至3:1,例如1:0.8至2.5:1,例如1:1至2:1。

[0188] 根据本发明所有方面的其它实施方式,颗粒用精氨酸配制。优选地,精氨酸与硅的比率为0.05:1至0.4:1,例如0.08:1至0.35:1,特别是0.09:1至0.32:1。

[0189] 根据本发明所有方面的其它实施方式,颗粒用甘氨酸配制。优选地,甘氨酸与硅的比率为0.05:1至0.5:1,例如0.08:1至0.45:1,特别是0.09:1至0.42:1。

[0190] 用于本发明所有方面的优选氨基酸包括精氨酸、甘氨酸、脯氨酸、赖氨酸和组氨酸及其两种或更多种的混合物。

[0191] 非还原性二糖

[0192] 根据本发明的所有方面,任选地包括至少一种非还原性二糖的组合物和相关产物及方法。非还原性二糖可以任选地选自蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖和毛蕊花糖或其任何混合物,最优选地,非还原性二糖是海藻糖或包含海藻糖的混合物。

[0193] 非还原性二糖(例如,海藻糖或包含海藻糖的混合物)任选地以与硅的重量比为至少1:1000、至少1:100、至少1:50、至少1:10、至少1:1、或至少1:0.5存在。优选地,非还原性二糖是海藻糖,其任选地以与硅的重量比为至少1:1000、至少1:100、至少1:50、至少1:10、至少1:1、或至少1:0.5存在。

[0194] 据推测,非还原性二糖,尤其是海藻糖,可以充当干燥保护剂。非还原性二糖可以充当茧,其将核酸分子捕获在玻璃状糖基质内,从而使运动受到糖基质的限制。海藻糖可以特别有效,由于其能够在一种晶型和另一种晶型之间转换,而不放松其结构完整性,和/或由于与其它二糖(比如蔗糖)相比,其玻璃化转变温度特别高。此外,在无定形海藻糖中,存在结晶二水合物的局部口袋,其捕获残留的水分子,将其固定,这对于防止核酸降解具有价值,尤其是在水相对匮乏的情况下。因此,可以增强硅颗粒的水隔离效果。包含非还原性二糖比如海藻糖的另一个优点是非还原性二糖的存在促进粉末状材料的药物组合物的再悬浮。

[0195] 特别优选的组合

[0196] 根据本发明的所有方面,特别优选的实施方式涉及掺杂,其是硼掺杂(特别是如上定义的重硼掺杂),其中核酸是RNA,特别是编码mRNA疫苗的抗原的mRNA,并且脂质是或者包含可电离的脂质,例如一种或多种阳离子脂质,比如DOTAP,和/或一种或多种两性离子脂质,比如一种或多种磷脂,比如DOPE;或两者(例如,其中脂质包含DOTAP或其中脂质包含可电离的脂质和DOTAP两者)。

[0197] 其它的组分和特征

[0198] 根据本发明所有方面的优选实施方式,可以另外存在一种或多种其它的组分,包括转染试剂。

[0199] 在其最广泛的意义上,“转染试剂”是促进将裸或纯化的核酸引入真核细胞的试剂。例如,一些转染试剂是促进将mRNA诱导入真核细胞的试剂。

[0200] 根据本发明所有方面的其它实施方式,转染试剂可以是脂转染(脂质体转染)试剂、树状聚合物、含有磷酸根离子与氯化钙溶液组合的HEPES缓冲盐水溶液(HeBS)、或阳离子聚合物比如二乙基氨基乙基-葡聚糖(DEAE葡聚糖)或聚乙烯亚胺(PEI)。

[0201] 在优选的实施方式中,转染试剂是脂转染试剂,比如lipofectamine。

[0202] 药物组合物

[0203] 根据本发明的第三方面,提供一种药物组合物,其包含本发明的第一方面的核酸载体组合物,其中该药物组合物是疫苗组合物。

[0204] 在一些实施方式中,在4℃下核酸(例如体外转录的mRNA或pDNA)在药物组合物中的半衰期为至少3个月,例如至少4、5或6个月。

[0205] 在一些实施方式中,本发明的药物和载体组合物是适合于肌内注射的形式。本发明的药物和载体组合物可以包含赋形剂,包括但不限于:防腐剂、冷冻保护剂和免疫佐剂。如本文所用,术语佐剂可以指调节(例如增加)受试者对疫苗组合物的免疫应答的物质。作为非限制性实例,佐剂可以是或可以包含一种或多种脂质、蛋白质、CpG寡脱氧核苷酸和/或其它分子佐剂。在一些实施方式中,药物和载体组合物可以包含一种或多种缓冲液组分。在一些实施方式中,药物和载体组合物可以包含氨基丁三醇。在一些实施方式中,药物和载体组合物可以包含氨基丁三醇盐酸盐。在一些实施方式中,药物和载体组合物可以包含乙酸。在一些实施方式中,药物和载体组合物可以包含乙酸钠三水合物。在一些实施方式中,药物和载体组合物可以包含氯化钾。在一些实施方式中,药物和载体组合物可以包含磷酸二氢钾。在一些实施方式中,药物和载体组合物可以包含氯化钠。在一些实施方式中,药物和载体组合物可以包含脱水磷酸氢二钠。在一些实施方式中,药物和载体组合物可以包含蔗糖。应当理解,本发明的药物载体组合物可以任选地在通过肌内注射施用之前用盐水稀释。在一些实施方式中,药物载体组合物可以是粉末。在一些实施方式中,药物和载体组合物可以包含液体。

[0206] 在本发明的药物和载体组合物中,可以通过一种或多种包含可水解硅的颗粒来保护核酸(例如体外转录的mRNA或pDNA)免受酶促降解,该颗粒如本文所述隔离或去除水。

[0207] 包含可水解硅的颗粒的制备

[0208] 用于本发明的颗粒可以通过本领域常规技术方便地制备,例如通过研磨工艺或通过其它已知的用于减小颗粒尺寸的技术。含硅颗粒可以由硅酸钠颗粒、胶体二氧化硅或硅片材料制成。宏观、微观或纳米级颗粒在球磨机、行星式球磨机或其它尺寸减小机械装置中研磨。可以对所得颗粒进行空气分级或筛分以回收具有均匀所需尺寸的颗粒。还可以使用等离子体方法和激光消融法来产生颗粒。多孔颗粒可以通过本领域常规方法制备,包括本文所述的方法。

[0209] 包含掺杂的可水解硅的颗粒的制备

[0210] 根据本发明使用的掺硼硅的示例性规格为:单侧抛光晶片,CZ直径:150±0.2mm晶向:(100)±1°类型:p/硼电阻率:0.014±25% Ohmcm。接近5×1018个原子/^{cm3}主定位边:57.50±2.5mm主定位边1位置:D<100>至{110}厚度:675±15μm包装:Ultrapak装运盒TTV:<=18μm TIR:<=5μm。这种掺硼硅可以从例如德国耶拿的Nanografi或德国的Si-Mat商购获得。

[0211] 药物和载体组合物的制备

[0212] 本发明的药物和载体组合物可以通过将各组分集中在一起来产生。在一些实施方式中,这种集中在一起可以仅涉及混合各组分的溶液,例如在导致它们复合的条件下。集中在一起可以涉及在添加脂质组分之前使核酸与含硅材料的颗粒接触。在核酸与含硅颗粒接

触后添加脂质组分可以促进如本文所述的脂质外壳的形成,从而封装内核,该内核包含一种或多种颗粒和核酸两者。

[0213] 已经发现,在与本发明的其它组分接触之前将本发明的含硅颗粒活化是有利的,并且因此在一些实施方式中是优选的。活化可以通过将颗粒(例如多孔掺杂硅纳米颗粒)分散在挥发性醇或其它挥发性溶剂(比如氯仿、甲醇、乙醇或丙醇,例如甲醇)中、然后使它们与本发明的其它组分接触来进行。

[0214] 通常,硅颗粒与非还原性二糖(如果存在)、核酸和任选的氨基酸混合,然后与脂质组分接触以形成脂质-硅颗粒,其中核酸与脂质区室内的颗粒结合。

[0215] 据推测,包含含硅颗粒、尤其是包含多孔可水解的掺杂硅的颗粒的递送系统通过在组合物中存在的酶催化的水解反应中隔离水分子(否则其将与核酸反应)来增加核酸的稳定性。

[0216] 冻干

[0217] 在某些实施方式中,将药物或载体组合物任选地冻干,任选地与冷冻保护剂和/或冻干保护剂比如一种或多种糖,比如蔗糖和/或海藻糖一起冻干;例如以形成粉末。冻干去除水,并能够产生干粉。这种干粉可以任选地分散在例如水凝胶中。本发明组合物的其它物理形式包括液体形式和冷冻形式。在一些实施方式中,组合物提供在递送装置中,例如注射装置比如注射器或多根微针中。

[0218] 实施例

[0219] 现在参考以下非限制性实施例描述本发明的各个方面和实施例。

[0220] 实施例1:硅纳米颗粒(SiNP)的制备

[0221] 单面抛光硅片购自德国Si-Mat。所有清洁和蚀刻试剂均为洁净室级别。蚀刻硅片通过在纯乙醇和10% HF酸水溶液的1:1(v/v)混合物中以80mA/cm^2的阳极电流密度对Si进行阳极蚀刻2-10分钟来制备。蚀刻后,样品使用纯乙醇冲洗,并在使用前在干燥的高纯度氮气流下干燥。

[0222] P+型或N-型蚀刻硅片使用研磨球和/或研杵和研钵磨碎。

[0223] 硅片的规格

[0224] -单面抛光晶片,CZ

[0225] -直径:150±0.2mm

[0226] -晶向:(100)±1°

[0227] -类型:p/硼

[0228] -电阻率:0.014±25% Ohm cm。接近5x10^{18}个原子/cm^3。

[0229] -主定位边:57.50±2.5mm

[0230] -主定位边1位置:D<100>至{110}

[0231] -厚度:675±15μm

[0232] -包装:Ultrapak装运盒

[0233] -TTV:<=18μm

[0234] -TIR:<=5μm

[0235] 晶片的孔隙率为约40%,并且厚度至多50μm。

[0236] 对它们使用球磨机或研杵和研钵手动研磨。研磨前后的外观如图15所示。图16显

示硅颗粒的SEM图像,用于评估其尺寸。图17、18和19是颗粒的TEM图像(图17,单独的硅;图18,硅颗粒加上脂质和其它组分作为“Biocourier”(定义见下文)以及siRNA(SIS0012);图18,如图17但用掺硼硅产生,作为SIS0013)。

[0237] 使用规格为38μm的Retsch™筛分摇床AS200筛选细粉。通过筛子的孔径尺寸实现均匀且选定的粒度选择(20-100μm)。颗粒尺寸通过来自Malvern Instruments的quantachrome系统和PCS进行测量。样品保存在密闭容器中直至进一步使用。

[0238] 纳米硅粉还获得自Sigma Aldrich和中国合肥Kaier。在进行负载和蚀刻之前,通过PCS测量颗粒尺寸并记录颗粒的尺寸(尺寸范围在20-100nm之间)。

[0239] 将500mg直径为100nm的多孔硅纳米颗粒与250ml乙醇混合并使用磁棒搅拌30分钟。然后将溶液以3000rpm离心30分钟。弃去上清液并将纳米颗粒在5ml蒸馏水中洗涤并转移至圆底烧瓶中。将烧瓶中的内容物冷冻(-25℃下2小时)。使用冷冻干燥机将冷冻的纳米颗粒冷冻干燥过夜。所得干粉是活化的硅纳米颗粒。

[0240] 实施例2:脂质官能化的siRNA-SiNP配方的制备

[0241] 材料

[0242] 根据实施例1制备的活化的硅纳米颗粒(SiNP)。

[0243] 无核酸酶水。

[0244] 氯仿。

[0245] 脂质:硬脂胺(SA),目录号305391(Sigma-Aldrich);

[0246] 来自蛋黄的L-α-磷脂酰胆碱(PC),目录号61755(Sigma-Aldrich);

[0247] 二油酰L-α-磷脂酰乙醇胺(DOPE),目录号P1223(Sigma-Aldrich);

[0248] N-(2-二甲基氨基乙基)氨基甲酸酯胆固醇(DC-Chol),目录号92243(Sigma-Aldrich)。

[0249] siRNA:非特异性NSC4(定做siRNA双链体,Eurogentec);靶向siLUC(定做siRNA寡核苷酸双链体,Eurogentec);带FAM标签的siRNA(绿色siGlo,Dharmacon)。

[0250] 设备

[0251] 旋转蒸发系统、涡旋、超声仪、水浴、圆底烧瓶、通用试管、Eppendorf管、微量移液器、冷冻干燥系统、ZetaSizer、高速离心机、NanoDrop分光光度计、荧光读数仪。

[0252] 流程(procedure)

[0253] 注意:对于荧光siRNA(siGlo),在流程期间避免光照(例如用铝箔覆盖烧瓶和试管)。

[0254] 组分1:siRNA-SiNP混合物的制备

[0255] 1.在无核酸酶水中制备SiNP(0.2mg/ml)的过滤溶液。

[0256] 2.将700μl上述溶液等分到8个Eppendorf微管中,使每个管中含有140μg SiNP。

[0257] 3.向每个等分试样中添加siRNA和甘氨酸,并用无核酸酶水将体积调节至1.4ml:

[0258] 表1

[0259]

等分试样 ID	SiNP 0.2mg/ml	siRNA			甘氨酸 1mg/ml	无核酸酶水（至 1.4ml）
		非特异性 100μM NSC4	靶向 100μM siLUC	荧光 100μM siGlo		
1st	700 μl	52.5μl	–	–	70μl	577.5μl
2nd	700 μl	–	52.5μl	–	70μl	577.5μl
3rd	700 μl	–	–	52.5μl	70μl	577.5μl
4th	700 μl	–	–	–	70μl	630μl

[0260] 4.将管充分混合,并在室温搅拌下孵育样品1小时。

[0261] 组分2:脂质膜的制备

[0262] 1.将每种脂质组分(SA、PC、DOPE、DC-Chol)溶解在氯仿中至浓度为0.2mg/ml。

[0263] 2.将所需量的每种脂质转移至小圆底烧瓶中并充分混合。将每种脂质混合物制备为8个重复(在8个烧瓶中):

[0264] a.脂质基底DS61

[0265] 68μg DOPE(340μl)

[0266] 12μg SA(60μl)

[0267] b.脂质基底PS91

[0268] 72μg PC(360μl)

[0269] 8μg SA(40μl)

[0270] c.脂质基底DSC613

[0271] 48μg DOPE(240μl)

[0272] 8μg SA(40μl)

[0273] 24μg DC-Chol(120μl)

[0274] d.脂质基底PDS1051

[0275] 50μg PC(250μl)

[0276] 25μg DOPE(125μl)

[0277] 5μg SA(25μl)

[0278] e.脂质基底PDS1052

[0279] 48μg PC(240μl)

[0280] 23μg DOPE(115μl)

[0281] 9μg SA(45μl)

[0282] f.脂质基底PDSC10514

[0283] 40μg PC(200μl)

[0284] 20μg DOPE(100μl)

[0285] 4μg SA(20μl)

[0286] 16μg DC-Chol(80μl)

[0287] 3.使用旋转蒸发系统小心地蒸发溶剂,形成薄的脂质膜。将干燥的脂质置于真空下以去除残留溶剂。

[0288] siRNA-SiNP(组分1)与脂质(组分2)的官能化

[0289] 1.用负载siRNA的或空的Si纳米颗粒样品(组分1)溶解薄的脂质膜(组分2)。向每个含有脂质膜(a、b、c、d、e、f)的烧瓶中添加200μl 1^{st}、2^{nd}、3^{rd}或4^{th}硅纳米颗粒/siRNA混合物。

[0290] 表2

[0291]

SIS005-DS61G	SIS005-PS91G	SIS005-DSC613G	SIS005-PDS1051G	SIS005-PDS1052G	SIS005-PDSC10514G
a-1^{st}	b-1^{st}	c-1^{st}	d-1^{st}	e-1^{st}	f-1^{st}
a-2^{nd}	b-2^{nd}	c-2^{nd}	d-2^{nd}	e-2^{nd}	f-2^{nd}
a-3^{rd}	b-3^{rd}	c-3^{rd}	d-3^{rd}	e-3^{rd}	f-3^{rd}
a-4^{th}	b-4^{th}	c-4^{th}	d-4^{th}	e-4^{th}	f-4^{th}

[0292] 2.通过向每个烧瓶中添加200μl无核酸酶水,将溶液体积调节至400μl。

[0293] 3.用封口膜覆盖每个烧瓶,将内容物充分混合并在室温下孵育1小时。

[0294] 4.涡旋以完全溶解脂质膜。将烧瓶置于超声浴中15秒,以帮助溶解脂质。

[0295] 5.将每个烧瓶中的所有内容物分别转移至Eppendorf微管中。

[0296] 6.将所有管置于冰箱(-20℃)并将其保存至少3小时(或过夜)。

[0297] 7.从冰箱中取出样品并将其置于30℃水浴中10分钟。在室温下冷却并充分涡旋。

[0298] 8.重复冻融(步骤5和6)两次以上。

[0299] 9.将所有样品在冰箱(-20℃)中保存直至进行分析。

[0300] 10.每个负载的样品在400μl体积中含有[10μg siRNA:20μg SiNP(硅纳米颗粒):80μg脂质基底:10μg甘氨酸]。

[0301] 所得制剂的组分如下表3所示。

[0302] 表3

[0303]

制剂	siRNA siLUC/NSC4/siGlo	SiNP	脂质	甘氨酸
SIS005-DS61G	10μl	20μl	80μl [68μl DOPE + 12μl SA]	10μl
SIS005-PS91G	10μl	20μl	80μl [72μl PC + 8μl SA]	10μl
SIS005-PDS1051G	10μl	20μl	80μl [50μl PC + 25μl DOPE + 5μl SA]	10μl
SIS005-PDS1052G	10μl	20μl	80μl [48μl PC + 23μl DOPE + 9μl SA]	10μl
SIS005-PDSC10514G	10μl	20μl	80μl [40μl PC + 20μl DOPE + 4μl SA+ 16 DC-Chol]	10μl
SIS005-DSC613G	10μl	20μl	80μl [48μl DOPE + 8μl SA + 24μl DC-Chol]	10μl

[0304] 氨基酸、脂质、lipofectamine负载的siRNA纳米颗粒的制备

[0305] 制剂SIS005-PS91和SIS005-DS61(含有甘氨酸)各自通过将脂质体形成材料的薄膜溶解在含有siRNA的硅纳米颗粒的水悬浮液中来制备。然后将混合物三次冻融,并在体外

测试对HCES细胞的转染效率。并行地,在进一步修饰后测试了SIS005-PDS1051制剂,修饰旨在引入更多正电荷(因为它显示出具有负ζ电位),认为其适合角膜的siRNA递送系统。为此目的,增加了制剂中阳离子脂质的比率。

[0306] 对于未负载和负载的制剂,胶体稳定性通过动态光散射法与ζ电位测量并行来评估。此外,siRNA的封装效率通过分光光度法测定。转染效率(内化至细胞)将在人角膜上皮细胞中通过流式细胞术来评估,然后进行双荧光素酶测定,其用以测定用负载siRNA的制剂处理后体外的敲低情况。

[0307] 硅纳米颗粒/脂质制剂的表征

[0308] 封装效率

[0309] siRNA封装效率通过高速离心将负载颗粒与游离(未结合)siRNA分离后测定封装效率来研究。

[0310] 1.将每个样品收集50μl至离心微管中。

[0311] 2.将所有样品以21,000g离心30分钟。

[0312] 3.将每个样品中的25μl(上半部分)上清液转移至单独的管(表示为S1)中,并保存在4℃下直至进行测定(如果是负载siGlo的样品,应避免光照)。

[0313] 4.将25μl 2% SDS添加至沉淀样品(以及剩余的上清液)中,以破坏脂质双层并释放结合的siRNA。

[0314] 5.将管再次以21,000g离心30分钟,并收集上清液(表示为S2)。

[0315] 6.使用NanoDrop分光光度计测量所有上清液S1和S2样品在260nm处的吸光度(OD)。对于负载siGlo的样品,测量S1和S2上清液样品两者中的荧光强度(FI)。

[0316] 7.计算封装效率(EE%):

[0317] $$EE\,\% = \left(1 - \left(\frac{2 \times OD_{S1}}{OD_{S1} + 2 \times OD_{S2}}\right)\right) \times 100\%$$

[0318] 其中OD_{S1}-上清液S1的吸光度(260nm)(第1次离心后)

[0319] OD_{S2}-上清液S2的吸光度(260nm)(第2次离心后)

[0320] 对于负载siGlo的样品,分别使用FI_{S1}和FI_{S2}代替OD_{S1}和OD_{S2}。

[0321] 8.上清液样品中siRNA的浓度和由硅纳米颗粒制剂捕获的siRNA的量可以使用siRNA校准曲线(如前所述)测定。

[0322] ZetaSizer测量

[0323] 胶体稳定性通过动态光散射法与ζ电位测量并行来评估。对未负载(空)的制剂样品以及负载有siLUC/NSC4的样品进行了测量。

[0324] 1.将每个样品收集200μl,并用无核酸酶超纯水稀释至总体积为1ml。

[0325] 2.将样品负载至折叠的毛细管单元中。

[0326] 3.使用ZetaSizer读取样品:颗粒尺寸、多分散指数和ζ电位。每次测量运行一式三份。数据如图1、2、3和4所示。

[0327] HCES细胞的转染效率

[0328] 转染效率(内化至细胞)在人角膜上皮细胞中通过流式细胞术评估。出于本研究的目的,我们使用负载有荧光标签的siRNA探针(siGlo)的制剂样品。

[0329] 1.将每孔2×10^5个HCES细胞(在12孔板上)接种到1ml富含10% FBS的DMEM中,并

在标准条件下生长24小时(直至80％汇合)。

[0330] 2.将培养基更换为每孔950μl富含10％ FBS的新鲜DMEM。

[0331] 3.将负载siGlo的硅纳米颗粒/脂质样品调节至室温。

[0332] 4.通过将6μl Lipofectamine RNAiMAX试剂与3μl siGlo储液(100μM)在151μl OptiMEM中混合,用Lipofectamine转染试剂制备对照样品,并在室温下孵育15分钟。

[0333] 5.通过每孔添加53.3μl负载siGlo的制剂或LPF-对照以获得0.1μM siGlo浓度来处理细胞,重复3次。

[0334] 6.在标准条件(37℃,5％ CO_2)下培养细胞24小时。

[0335] 7.弃去培养基并用500μl PBS清洗孔。

[0336] 8.添加300μl胰蛋白酶-EDTA,并在37℃下将板孵育10分钟。

[0337] 9.立即添加300μl富含10％ FBS的DMEM以停止胰蛋白酶消化。

[0338] 10.将细胞转移至单独的微管中,并以1000-2000rpm离心5分钟。

[0339] 11.弃去上清液,并小心地将细胞悬浮于500μl PBS中。

[0340] 12.将样品以1000-2000rpm离心5分钟。

[0341] 13.弃去上清液,并小心地将细胞重悬于600μl含有PI染料的FACS缓冲液中。

[0342] 14.使用流式细胞仪分析样品。

[0343] 敲低效率

[0344] 为了测定敲低诱导的效率,对负载有特异性(siLUC)、非特异性(NSC4)和未负载制剂的测试制剂样品进行双荧光素酶测定。

[0345] 1.将每孔6.5×10^3个HCES细胞(在96孔板上)接种至100μl富含10％ FBS的DMEM中,并在标准条件下生长24小时。制备2个板以研究所有制剂样品,每个板重复5次。

[0346] 2.按照制造商的方案,使用Lipofectamine 2000用Renilla和Luc2p质粒转染细胞。向每个孔中添加50μl试剂混合物,其含有0.3μlLipofectamine 2000、1ng Renilla质粒和5ng Luc2p质粒,并在OptiMEM培养基中稀释至总体积为50μl。

[0347] 3.在37℃、5％ CO_2下培养细胞24小时。

[0348] 4.将培养基更换为每孔90μl新鲜DMEM。

[0349] 5.将制剂样品调节至室温。将32μl的每个样品与28μl OptiMEM混合。

[0350] 6.用Lipofectamine转染试剂制备对照样品:

[0351] •将1.2μl Lipofectamine RNAiMAX试剂与55.8μl OptiMEM混合并在室温下孵育5分钟,然后加入3μl siLUC储液并继续孵育10分钟。

[0352] •将1.2μl Lipofectamine RNAiMAX试剂与55.8μl OptiMEM混合并在室温下孵育5分钟,然后添加3μl NSC4储液并继续孵育10分钟。

[0353] •将1.2μl Lipofectamine RNAiMAX试剂与58.8μl OptiMEM混合并在室温下孵育15分钟。

[0354] 7.通过每孔添加10μl负载的或空的制剂或LPF-对照来处理细胞,重复5次。

[0355] 8.在标准条件下(37℃,5％ CO_2)培养细胞。

[0356] 9.48小时后,弃去培养基并用PBS清洗孔。

[0357] 10.每孔添加20μl被动裂解缓冲液。

[0358] 11.在室温下将板在定轨摇床(900rpm)上孵育15分钟。

[0359] 12.按照制造商的方案,使用双荧光素酶报告基因测定试剂盒和LUMIstar OPTIMA读板仪来读取发光水平。

[0360] 结果如图5所示。

[0361] 实施例3:将负载siRNA的硅纳米颗粒与Lipofectamine组合(SIS005-LPF)

[0362] 1.将硅纳米颗粒悬浮液等分到6个Eppendorf微管中,使每个微管含有20μg SiNP。

[0363] 2.向上述SiNP等分试样中添加10μg siRNA:

[0364] a.向2个微管中添加37μl 20μM siLuc2p=靶向siRNA

[0365] b.向2个微管中添加37μl 20μM NSC4=非特异性siRNA

[0366] c.未负载对照:留下其余2个含有SiNP但不含siRNA的微管,用于制备空对照。

[0367] 3.在室温搅拌下孵育样品1小时,然后将管涡旋并置于冰箱(-20℃)中,并将其保存2-3小时。

[0368] 4.将样品连接至冷冻干燥系统,进行过夜自由干燥。

[0369] 5.在进一步分析之前,将上述负载siRNA(或未负载对照)的SiNP样品溶解在Lipofectamine溶液(Lipofectamine RNAiMAX试剂,目录号13778075,ThermoFisher Scientific)中,并用无核酸酶水稀释至总体积为150μl,涡旋并在室温下孵育1小时。

[0370] 表4

[0371]

制剂		siRNA	SiNP	Lipofectamine
靶向的	SIS005-**LPF1**	10 μg siLuc2p	20 μg SiNP	15 μl Lipofectamine
非特异性的		10 μg NSC4	20 μg SiNP	15 μl Lipofectamine
空的		—	20 μg SiNP	15 μl Lipofectamine
靶向的	SIS005-**LPF2**	10 μg siLuc2p	20 μg SiNP	30 μl Lipofectamine
非特异性的		10 μg NSC4	20 μg SiNP	30 μl Lipofectamine
空的		—	20 μg SiNP	30 μl Lipofectamine

[0372] SIS005-LPF1和SIS005-LPF2以2种不同的比率使用Lipofectamine(作为脂质)与硅纳米颗粒组合。LFP1使用15μL 20μM lipofectamine溶液与20μg硅纳米颗粒组合。LPF2使用双倍量的lipofectamine。本实验的目的是证明lipofectamine与硅颗粒的组合可以增强lipofectamine所促进的转染。结果显示硅纳米颗粒改善用lipofectamine的转染。

[0373] siRNA负载对经硬脂胺表面处理的硅纳米颗粒的表面电荷影响最大,诱导高负电荷。正如之前的分析表明,负载有SA和SA+精氨酸的空Si-NP具有正电荷或接近中性的表面电荷,因此它们有效地吸引阴离子siRNA分子。

[0374] 实施例4:负载比率对mRNA捕获效率的影响

[0375] 根据上述对于SIS005-DSC613G的方案制备样品(实施例2)。每个样品包含的硅纳米颗粒:二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE):硬脂胺:胆固醇3β-N-(二甲基氨基乙基)氨基甲酸酯盐酸盐(DC-胆固醇):甘氨酸的重量比为10:24:4:12:5。样品以不同比率的核酸与硅纳米颗粒制备,如下表5所示。

[0376] 表5:具有不同mRNA负载比率的ProSilic-DSC613G制剂样品

[0377]

样品	测试的负载比率（wt/wt）		电荷比** N/P
	硅纳米颗粒与mRNA	所有其它组分与mRNA*	
未负载的 U_0（对照）	0:1	0:1	0
负载的 $L_{0.5}$	0.5:1	2.75:1	~0.625
负载的 L_1	1:1	5.5:1	~1.25
负载的 L_2	2:1	11:1	~2.5
负载的 L_3	3:1	16.5:1	~3.75
负载的 L_4	4:1	22:1	~5

[0378] *这是所有其它组分(硅纳米颗粒、脂质和氨基酸)与mRNA的重量比。

[0379] **近似电荷比(称为N/P比)根据mRNA的长度、RNA的平均分子质量(约325Da)和阳离子脂质的分子量(硬脂胺:269.5Da;DC-胆固醇:500.8Da)计算。

[0380] 实施例5:使用凝胶电泳评估硅纳米颗粒制剂对mRNA的捕获

[0381] 硅纳米颗粒与mRNA的负载比率对mRNA捕获效率的影响通过凝胶电泳研究。使用1% E-Gel EX预制琼脂糖凝胶。使用Gel Logic 100成像系统(Kodak)对凝胶进行可视化。结果如图6所示。

[0382] 图6在第1行中显示未负载的mRNA(U0)。负载有mRNA的硅纳米颗粒(L0.5、L1、L2、L3、L4、L5、L6、L8)位于从左到右的第2至9行中,按硅纳米颗粒与mRNA比率增加的顺序。将等量的mRNA(100ng)负载至第1至9行中的每一行中。将Invitrogen E-Gel 1Kb Plus Express DNA Ladder(80ng)负载至M行中作为标志物。第10行留空(作为水空白)。

[0383] 电泳证明本发明的SIS005-DSC613G制剂成功地捕获mRNA,并且在硅纳米颗粒与mRNA的较高比率(比如高于2:1的比率)下尤其好。图6中的对照泳道(未负载的mRNA,U0)显示预期的单个快速移动条带。该条带在第2行(负载L0.5)和第3行(负载L1)中也可见。该可见条带对应于未结合的mRNA。与对照(U0)相比,第2行和第3行(尤其是第3行)中的条带强度较低。这表明,即使在硅纳米颗粒与mRNA比率非常低的样品中,一些mRNA仍然被硅纳米颗粒捕获,因此在该条带中不可见。

[0384] 有效捕获的mRNA无法穿过凝胶孔并保留在孔中(因此不会出现条带,与U0、L0.5和L1不同)。图6显示,与第1至3行相比,样品L2至L8的硅纳米颗粒含量有所增加,成功捕获了mRNA。不存在对于U0、L0.5和L1所看到的条带就证明了这一点。这表明本发明的硅纳米颗粒制剂能够成功地捕获mRNA。结果表明,最佳负载比率(具有mRNA的最大捕获同时最大限度地减少纳米颗粒使用量的比率)是L2,对应于2:1(硅纳米颗粒:mRNA)和11:1(递送系统的所有其它组分:mRNA)的比率。已发现相同的负载比率对于siRNA负载是有效的。该比率对应于大约2.5的N/P电荷比。

[0385] 实施例6:使用分光光度法评估捕获效率

[0386] 为了评估mRNA捕获的捕获效率(EE,表示为百分比),还将SIS005-DSC613G样品(U0至L8)离心以分离未结合的mRNA。通过分光光度法测量上清液中的核酸含量,并使用以下公式计算捕获效率:

[0387] $$EE\,\% = \frac{OD_{未负载} - OD_{负载}}{OD_{未负载}} \times 100\%$$

[0388] $OD_{未负载}$是未负载mRNA对照(U0)的吸光度。$OD_{负载}$是每个样品L0.5至L8的吸光度。

[0389] 结果如图7所示,其确认了凝胶电泳实验的结果。随着硅纳米颗粒与mRNA的比率增加,捕获效率增加,直至其达到稳定水平,在硅与mRNA的比率大于2:1时趋于稳定。

[0390] 实施例7:评估硅纳米颗粒制剂的体内活性

[0391] 根据以上实施例2中对于SIS005-PS91G和SIS005-DSC613G的方案制备样品。这些样品包含siRNA、硅纳米颗粒、脂质和甘氨酸,重量比如下。

[0392] 表6

[0393]

样品	siRNA siLUC/NSC4/siGlo	硅纳米颗粒	脂质	甘氨酸
SIS005-PS91G	10	20	80（72 PC + 8 SA）	10
SIS005-DSC613G	10	20	80（48 DOPE + 8 SA + 24 DC-Chol）	10

[0394]

[0395] SA是硬脂胺,DOPE是二油酰磷脂酰乙醇胺,PC是磷脂酰胆碱并且DC-Chol是胆固醇3β-N-(二甲基氨基乙基)氨基甲酸酯盐酸盐。

[0396] 制备包含特异性siRNA(siLUC)和非特异性siRNA(NSC4)的样品。两种siRNA(siLUC和NSC4)均设计为21-聚体,具有中央19bp双链体区和每个3'端的对称dTdT二核苷酸突出端。siRNA由Eurogentec(比利时)提供。

[0397] 为了制备样品,将溶解在无核酸酶水中的siRNA添加至纳米颗粒的水溶液中并在室温下孵育60分钟。使用的硅纳米颗粒与mRNA的比率为2:1(因为已发现这是凝胶电泳和分光光度实验中的最佳比率,见上文)。

[0398] 活体动物成像

[0399] 根据英国动物福利法,将动物用于以下实验,获得了内政部(苏格兰)和卫生、社会服务和公共安全部(北爱尔兰)的伦理批准。评估将荧光siRNA(DY-547标记的siGL0,Dharmacon,英国)向角膜递送的实验在野生型C57BL/6小鼠上进行。为了评估制剂的siRNA生物利用度和沉默活性,使用报告基因敲入小鼠系(Krt12+/luc2),其中萤火虫荧光素酶特异性地在角膜上皮中表达(在内源性Krt12启动子的控制下)。该动物模型是在先前报道的C57BL/6背景上开发的,并为使用报告基因表达监测的siRNA递送方法的体内评估提供了可靠的模型。对于体内成像,使用1.5-2%异氟烷(Abbott Laboratories Ltd.,英国)以约1.5L/min的氧气流量麻醉小鼠。siGlo的荧光通过Xenogen IVIS光谱仪与LivingImage 3.2软件(均为Perkin Elmer,英国)使用DsRed滤光片组合(激发535nm,发射570nm)在局部应用后的测定时间点进行检测。为了测量荧光素酶报告基因表达,将荧光素(30mg/mL D-荧光素钾盐;Gold Biotechnology,美国)与Viscotears凝胶(Novartis,英国)以1:1w/w混合,然后在麻醉小鼠的眼睛上滴下,立即成像。通过IVIS光谱仪在大约10分钟内读取生物发光读数,并在确保信号在采集时间内保持稳定后使用LivingImage软件进行定量。对于信号强度定量,为每只眼睛单独选择感兴趣的区域(ROI),在整个实验中保持ROI参数(尺寸和形状)恒定。使用分体对照测量方案将值表示为右眼/左眼比率(RE/LE)。

[0400] 体内siRNA处理

[0401] 使用分体对照,通过将同一动物一只眼睛中的测试处理与另一只眼睛的阴性对照进行比较,来进行实验。在处理期间,如上所述对小鼠进行麻醉。制备含有25μM siRNA的硅纳米颗粒制剂,SiNP与mRNA以2:1的重量比复合,并将该制剂以滴剂局部应用于完整角膜,每只眼睛总体积为4μL。应用后,将小鼠进一步麻醉15分钟,以允许吸收并最大限度地摄入。处理后,如下所述进行荧光和发光实验。

[0402] siRNA穿透角膜的评估

[0403] 为了研究siRNA向角膜的递送,使用含有siGlo的滴眼剂对野生型小鼠进行体内荧光研究。将荧光siRNA-硅纳米颗粒配方应用于每只小鼠的右眼,而将相同量的裸siGlo局部应用于左眼作为对照。使用IVIS光谱仪在siGlo应用后15分钟(即处理流程后立即)以及3、6和24小时获取荧光实时成像,并将信号强度标准化为处理前测量的背景荧光(即未处理的眼睛)并如上文所述定量。在3小时或24小时进行测量后,处死小鼠,并摘除眼睛,在室温下在PBS中的4%多聚甲醛中固定30分钟,浸入PolyFreeze(Sigma-Aldrich,英国)中,并立即冷冻在-80℃。使用低温恒温器(CM 1850,Leica)切割五微米切片,用含有DAPI的封固剂(DAPI I,Vysis,美国)封固在APES-包被的载玻片(3-氨基丙基三乙氧基硅烷,Sigma Aldrich,英国)上,并使用在AxioCam MRc相机(Carl Zeiss,德国)上配备有20x/40x N Archoplan镜头的AxioScope A1显微镜观察荧光。

[0404] siRNA介导的基因沉默的评估

[0405] 使用荧光素酶报告基因小鼠(n=7)来测定局部递送本发明的硅纳米颗粒后siRNA在角膜中的生物利用度。在分体对照实验中,将靶向siLuc的荧光素酶与硅纳米颗粒制剂复合,以滴剂局部应用于麻醉小鼠右眼(RE)的完整角膜,而左眼(LE)则相应地使用与硅纳米颗粒制剂复合的NSC4进行处理,作为阴性对照。连续8天每天重复处理,大约4-5小时后进行体内眼部发光测量。通过在整个处理方案中每天测量荧光素酶生物发光活性(如上所述)来确定处理对荧光素酶报告基因表达的影响,并在停止处理后进一步持续8天以监测清除期。通过在处理前4天每隔24小时监测眼部荧光素酶活性来定义每只实验动物的基线发光。使用IVIS LivingImage软件对相对RE/LE荧光素酶生物发光活性进行定量,并绘制为平均值±标准偏差。

[0406] 统计分析

[0407] 除非另有说明,数据以平均值±一个标准偏差表示,并且代表至少3次独立测量。通过单因素或双因素方差分析评估统计显著性,然后在95%置信水平下进行Tukey's HSD事后检验。对于体外双荧光素酶测定,分别对每种制剂进行双尾Student's t检验以分析敲低水平(siLuc相比NSC4对照)。对于体内荧光素酶实验,通过比较处理开始前的前4天所有七只小鼠的平均右/左比率(设为基线)与在后续天数中测量的R/L比率来进行统计分析。统计分析使用GraphPad Prism软件(GraphPad Software,美国)进行。

[0408] 结果

[0409] 基于硅的siRNA递送系统的特点

[0410] 本发明的硅纳米颗粒递送系统的两个重复(SIS005-PS91G和SIS005-DSC613G)是通过用通常用于核酸递送的阳离子脂质、硬脂胺和DC-胆固醇对硅进行表面官能化来配制的,其产生具有大约350nm的相似流体动力学尺寸和相对的正ζ电位值的杂化颗粒。通过凝

胶电泳研究的阳离子硅纳米颗粒制剂与siRNA的复合显示,核酸被完全捕获,其中最小SiNP-siRNAw/w比率为2:1。不同w/w比率的复合siRNA的百分比通过分光光度法测定,并根据添加至载体的siRNA量和颗粒分离后溶液中siRNA浓度的差异计算。与用硬脂胺官能化的颗粒相比,与含有阳离子胆固醇衍生物的纳米颗粒复合时观察到更高的siRNA捕获效率。然而,两种变体显示siRNA负载能力均在每1mg硅纳米颗粒13-48nmol范围内。在上述siRNA负载研究之后,为所有进一步的实验选择2:1的固定SiNP/siRNA比率。

[0411] 由于纳米颗粒的物理化学性质在药物递送中发挥重要作用,因此测定负载siRNA的复合物的粒径和表面电荷。在比较空载体和负载载体时,SIS005-DSC613G在尺寸或ζ电位方面没有显示出显著差异,而SIS005-PS91G在与siRNA复合时显示出增加的平均粒径和负的表面电荷,表明除了内部siRNA捕获外,还在杂化颗粒的表面上吸收了核酸分子(见下表)。将本研究中考虑的制剂与基因沉默的黄金标准Lipofectamine™RNAiMAX进行比较,后者是一种专为siRNA递送而设计的可商购脂质载体。对空的和负载siRNA的RNAiMAX的ZetaSizer分析也显示,与核酸复合后,颗粒尺寸增加,并且表面电荷从正值反转为负值。

[0412] 表7:颗粒特性表征

[0413]

	样品	粒径 [nm]	ζ电位 [mV]
SIS005-PS91G	空的	351 ± 32	+36.6 ± 1.0
	具有 siRNA	462 ± 57	−39.7 ± 0.6
SIS005-DSC613G	空的	361 ± 39	+40.9 ± 0.9
	具有 siRNA	397 ± 44	+34.9 ± 0.7
RNAiMAX	空的	133 ± 3	+23.2 ± 12.0
	具有 siRNA	212 ± 32	−57.0 ± 7.1

[0414] 测量在无核酸酶水中进行。数据代表平均值±标准偏差(n=3)。

[0415] 实施例8:体外siRNA递送至角膜细胞的评估

[0416] 对于初始体外筛选,使用人角膜上皮细胞系(HCE-S)来评估本发明的硅纳米颗粒递送系统在细胞转染中的功效及其潜在的细胞毒性。转染效率通过在用负载至硅载体系统的荧光寡核苷酸双链体处理后24小时进行的流式细胞术分析来定量,参见图8。SIS005-DSC613G显示55±2%,并且SIS005-PS91G显示65±6% FAM-阳性细胞,相比之下,RNAiMAX试剂观察到的为84±1%。

[0417] 转染后细胞的活力根据碘化丙啶(PI)的活/死染色评估,碘化丙啶是膜崩解的常见指标。这表明,与Lipofectamine相比,硅纳米颗粒制剂对角膜上皮细胞具有良好的耐受性,参见图9。尽管在体外Lipofectamine将外源核酸递送至细胞非常有效,但并不适合临床应用。超过50%的用Lipofectamine RNAiMAX转染的细胞显示具有膜损伤,如通过用膜不可渗透的染料PI进行内部染色所证明,而在用硅纳米颗粒制剂处理后观察到大于86%和98%的完整细胞。

[0418] siRNA的生物利用度在基因表达研究中使用双荧光素酶报告基因测定来评估。用与基于硅的递送系统复合的0.1μM siLuc处理HCE-S细胞后,对于SIS005-PS91G和SIS005-DCS613G分别实现46±5%($p<0.01$,siLuc相比NSC4对照)和38±8%($p<0.01$)的敲低,而用

RNAiMAX转染的siLuc使荧光素酶报告基因表达降低了66±9%(p<0.001)。参见图10。因此,硅纳米颗粒递送系统证明了商业siRNA转染试剂的高达70%的效力,同时更安全且细胞耐受性更好。

[0419] 实施例9:通过局部硅纳米颗粒制剂进行体内眼部siRNA递送的评估

[0420] 在证明体外成功的siRNA递送和基因敲低后,通过对前眼局部施用,对两种硅纳米颗粒制剂(SIS005-PS91G和SIS005-DCS613G)进行体内评估。首先,将SIS005-PS91G和SIS005-DCS613G与荧光siGlo复合,并将其作为滴眼剂遵循单侧操作应用于野生型小鼠,并将裸siGlo对照滴注至另一只眼睛中。使用体内成像系统监测眼部荧光长达24小时。第一次测量在施用后15分钟进行,此时小鼠在处理后仍处于麻醉状态,并且后续测量在施用后3、6和24小时进行重复。尽管将等量的siGlo局部应用至每只眼睛,但在用SIS005-DSC613G的处理中观察到15分钟后测量到的最高荧光强度,SIS005-PS91G略低,并且裸siGlo的荧光强度低两倍(p<0.05),参见图11。这表明与裸寡核苷酸相比,配制的药物的眼表面粘附力增加,并且两种硅纳米颗粒制剂的停留时间改善。三小时后,siGlo-SIS005-DSC613G处理的眼睛的体内荧光信号减少3倍,而siGlo-SIS005-PS91G和未配制的siGlo滴眼剂由于主动眼部清除机制,体内荧光信号已恢复到基线水平。尽管观察到体内信号强度进一步逐渐降低,但用siGlo-SIS005-DSC613G处理的眼睛中的荧光持续长达24小时,并且在所有时间点均显著高于用未配制的裸siGlo处理的眼睛(在3h和6h时p<0.01,并且在24h时p<0.05)。这表明用本发明的硅纳米颗粒配制的局部施用的siRNA药物的有效摄入。为了验证纳米颗粒渗透到组织中,通过处理后角膜切片的荧光显微镜研究了siRNA在整个角膜层的分布。在滴眼剂应用后3小时收集的所有处理过的眼睛切片中的所有角膜层中均检测到红色siGlo荧光,而在裸siGlo对照中未观察到高于背景的荧光。施用siRNA制剂24小时后,仅在用SIS005-DSC613G处理的角膜切片中观察到荧光。

[0421] 在体内摄入研究之后,SIS005-DSC613G的siRNA递送在功能测定中使用荧光素酶表达仅局限于角膜上皮的小鼠报告基因模型进行进一步研究。在体内处理之前,连续4天每24小时对报告基因小鼠的基础角膜荧光素酶活性进行定量,以确认分体对照实验的一致的左右比率。将与siLuc或对照siRNA复合的SIS005-DSC613G作为滴眼剂局部应用至同一动物的对侧眼睛,每天8次,并在整个处理方案和接下来的8天中每天通过活体动物成像评估角膜荧光素酶表达。在处理开始后24小时内观察到荧光素酶表达降低,并在第11天达到最大抑制(41%±13,p<0.001)。显著的基因沉默作用在整个处理方案中持续存在,并在终止处理后持续4天。正如预期的那样,减少的眼部生物发光水平在停止处理后逐渐恢复到基线,这表明基因抑制成功恢复。这些结果见图12和13。重要的是,对处理眼睛的粗略检查和对局部处理后的动物的日常视力检查显示,滴眼剂没有副作用,表明硅纳米颗粒制剂在体内具有良好的耐受性。

[0422] 与已知的脂质体相比,含硅制剂的核酸结合效率提高

[0423] 根据上述方案制备包含硅纳米颗粒的样品制剂。还制备了不含硅纳米颗粒的制剂。该制剂具有下表所示的组成。

[0424] 表8:含有Si纳米颗粒的制剂的组成和不含Si纳米颗粒的脂质体制剂的组成*

[0425]

	未负载的 mRNA（对照）	DSC613G		DS61G		DS64G		D6G	
		LBC	LL	LBC	LL	LBC	LL	LBC	LL
mRNA/ hsDNA	50	50	50	50	50	50	50	50	50
SiNP	-	100	-	100	-	100	-	100	-
DOPE	-	240	240	240	240	240	240	240	240
SA	-	40	40	40	40	160	160	-	-
DC-Chol	-	120	120	-	-	-	-	-	-
Gly	-	50	50	50	50	50	50	50	50

[0426] *SiNP是指Si纳米颗粒;DOPE是指二油酰磷脂酰乙醇胺;SA是指硬脂胺;DC-Chol是指胆固醇3β-N-(二甲基氨基乙基)氨基甲酸酯盐酸盐;Gly是指甘氨酸。LBC是指含Si制剂,而LL是指不含Si的脂质体制剂。

[0427] 研究了每种组成对hsDNA的核酸结合效率。结果显示在图14中。如图14所示,观察到的含有Si纳米颗粒的制剂的结合效率显示出相对于不包含硅纳米颗粒的脂质体制剂的改善。

[0428] 实施例10:使用Biocourier制剂的进一步研究

[0429] 这些实施例中使用的"Biocourier"是指根据本发明的载体组合物,其包含硅、脂质和根据本发明的任选的其它成分,核酸可以负载到其上。

[0430] 起始原料的制备

[0431] a)非活化掺硼硅片:从BS Silicon获得并手动研磨。

[0432] b)非活化AE硅:由American Elements提供,平均直径30nm,多孔。

[0433] c)活化AE硅:American Elements,平均直径30nm,多孔。将1g材料悬浮于50mL MeOH中,然后在通风橱下进行缓慢蒸发过程。

[0434] d)活化BS硅:多孔。将1g材料悬浮于50mL MeOH中,然后在通风橱下进行缓慢蒸发过程。

[0435] e)DOTAP-Cl溶液:将DOTAP以5mg/mL的浓度溶解在甲醇中。具体地,将50mg DOTAP溶解在10ml甲醇中并超声处理直至完全溶解。

[0436] f)DOPE溶液:将DOPE以5mg/mL的浓度溶解在甲醇中。具体地,将60mg DOPE溶解在12ml甲醇中并超声处理直至完全溶解。

[0437] g)mPEG2000-DSPE溶液:将mPEG2000-DSPE以5mg/ml的浓度溶解在甲醇中。具体地,将40mg mPEG2000-DSPE溶解在8ml甲醇中并超声处理直至完全溶解。

[0438] h)海藻糖(THR):由Sigma Aldrich提供,粉末。

[0439] i)甘氨酸(GLY):由Sigma Aldrich提供,粉末。

[0440] j)SiNP AE+GLY+THR溶液:将活化的SiNP(AE)、甘氨酸和海藻糖悬浮于无核酸酶水中。具体地,将50mg活化的SiNP、50mg海藻糖和25mg甘氨酸悬浮于50mL无核酸酶水中,并超声处理60分钟。

[0441] k)SiNP BS+GLY+THR溶液:将活化的SiNP(BS)、甘氨酸和海藻糖悬浮于无核酸酶水中。具体地,将50mg活化的SiNP、50mg海藻糖和25mg甘氨酸悬浮于50mL无核酸酶水中,并超

声处理60分钟。

[0442] 制备pDNA-Biocourier等分试样用于免疫研究

[0443] 选择Biocourier类型并计算最佳pDNA复合比率

[0444] Biocourier制剂类型1,使用American Elements(AE)硅(多孔、活化的、平均粒径<100nm)制备一成分和比率:

[0445] 表9:Biocourier类型1的组成

[0446]

脂质			活化的SiNP AE (≤100 nm)	甘氨酸	海藻糖	无核酸酶水
DOTAP	DOPE	mPEG2000-DSPE				
7.25 mg	7.30 mg	1.45 mg	1 mg	0.5 mg	1 mg	至 10 mL
1.45 mL	1.46mL	0.29 mL	1 mL			至 10 mL

[0447] 脂质:Si比率(挤出前)=16:1

[0448] 16mg总脂质/10mL Biocourier,1.6mg/mL脂质和0.1mg/mL硅,相当于:

[0449] Biocourier储液=1.6μg/μL

[0450] pDNA储液=2μg/μL

[0451] 每个小瓶必须含有:

[0452] 80μg pDNA

[0453] 总体积400μL

[0454] 80μg pDNA相当于40μL-剩余体积=400μL(总体积)-40μL(pDNA体积)=360μL

[0455] 360μL可容纳至多1.6μg/μL x 360μL=576μg Biocourier

[0456] Biocourier:pDNA比率=576:80=7.2:1

[0457] 使用这种形式,50μL(单剂量/小鼠)SiSaf Biocourier/pDNA复合物将包含:

[0458] 10μg pDNA和72μg Biocourier

[0459] 所有样品均以挤压样品提供,悬浮于无核酸酶水中。认为挤出是制备可注射样品的黄金标准做法,并且是指使悬浮颗粒多次通过滤膜,以确保颗粒不会出现不可接受的结块。

[0460] Biocourier注射剂i.d./i.m.通过400nm和100nm聚碳酸酯膜挤出,准备与相关量的pDNA复合。

[0461] 制备所述Biocourier制剂类型1:液体形式

[0462] A)脂质膜制备

[0463] 1)将上表9中给出的脂质量从储液中转移至干净的玻璃圆底烧瓶中并混合。

[0464] 2)在40℃水浴和真空下使用旋转蒸发仪小心蒸发溶剂。

[0465] B)膜的再水合

[0466] 3)将Si-NP+GLY+THR溶液添加至膜,并且如有必要,使用无核酸酶水将最终体积调整至10mL。

[0467] 4)用封口膜覆盖烧瓶并将膜再水合,在水浴(60℃)中搅拌烧瓶5分钟。

[0468] 5)将1mL样品分装至不含RNA的Eppendorf管中,共10个Eppendorf。将悬浮液储存在冰箱中。

[0469] C)挤出工艺

[0470] 6)悬浮液应通过孔径为0.4μm和0.1μm的膜过滤器,在60℃下通过0.4μm循环10次,然后通过0.1μm循环10次。挤出完成后将悬浮液储存在冰箱中。

[0471] D)用pDNA负载Biocourier

[0472] 7)将储存在-40℃的pDNA样品解冻,并将管置于通风橱下,直至达到室温(预计时间10分钟)。

[0473] 8)在室温下将样品从冰箱转移至通风橱下以平衡挤出的Biocourier样品(预计时间6分钟)。

[0474] 9)将相关量的Biocourier和pDNA负载至无菌Eppendorf管中。特别地,将360μL Biocourier与40μL pDNA溶液混合。密封Eppendorf。

[0475] 10)轻轻涡旋Eppendorf 15秒,并在室温下将密封样品平衡30分钟。将样品转移至冰箱直至使用。注射前请遵循提供的说明。

[0476] 如上所述制备4个等分试样。

[0477] 制备所述Biocourier制剂类型1:冻干形式

[0478] A)脂质膜制备

[0479] 1)将上表9中给出的脂质量从储液中转移至干净的玻璃圆底烧瓶中并混合。

[0480] 2)在40℃水浴和真空下使用旋转蒸发仪小心蒸发溶剂。

[0481] B)膜的再水合

[0482] 3)将Si-NP+GLY+THR溶液添加至膜,并且如有必要,使用无核酸酶水将最终体积调整至10mL。

[0483] 4)用封口膜覆盖烧瓶并将膜再水合,在水浴(60℃)中搅拌烧瓶5分钟。

[0484] 5)将1mL样品分装至不含RNA的Eppendorf管中,共10个Eppendorf。将悬浮液储存在冰箱中。

[0485] C)挤出工艺

[0486] 6)悬浮液应通过孔径为0.4μm和0.1μm的膜过滤器,在60℃下通过0.4μm循环10次,然后通过0.1μm循环10次。挤出完成后将悬浮液储存在冰箱中。

[0487] D)用pDNA负载Biocourier

[0488] 7)将储存在-40℃的pDNA样品解冻,并将管置于通风橱下,直至达到室温(预计时间10分钟)。

[0489] 8)在室温下将样品从冰箱转移至通风橱以平衡挤出的Biocourier样品(预计时间6分钟)。

[0490] 9)将相关量的Biocourier和pDNA负载至无菌Eppendorf中。特别地,将360μL Biocourier与40μL pDNA溶液混合。密封Eppendorf。

[0491] 10)轻轻涡旋Eppendorf 15秒,并在室温下将密封样品平衡30分钟。将样品转移至冰箱3小时。

[0492] 11)将样品移至-40℃使其冷冻(5小时)。

[0493] 12)启动冷冻干燥机并使恒温室达到-40℃。将样品移至冷冻干燥机并启动真空。

[0494] 13)将样品冷冻干燥过夜。

[0495] 14)将获得的样品密封并将其移至冰箱中。

[0496] 如上所述制备4个等分试样。

[0497] Biocourier制剂类型2,使用掺硼硅(多孔,活化的)制备—成分和比率:

[0498] 表10:Biocourier类型2的组成

[0499]

脂质			活化的 SiNP BS (≤100 nm)	甘氨酸	海藻糖	无核酸酶水
DOTAP	DOPE	mPEG2000-DSPE				
7.25 mg	7.30 mg	1.45 mg	1 mg	0.5 mg	1 mg	至 10 mL
1.45 mL	1.46mL	0.29 mL	1 mL			至 10 mL

[0500]

[0501] 脂质:Si比率(挤出前)=16:1

[0502] 16mg总脂质/10mL Biocourier,1.6mg/mL脂质和0.1mg/mL硅,相当于:

[0503] Biocourier储液=1.6μg/μL

[0504] pDNA储液=2μg/μL

[0505] 每个小瓶必须含有:

[0506] 80μg pDNA

[0507] 总体积400μL

[0508] 80μg pDNA相当于40μL-剩余体积=400μL(总体积)-40μL(pDNA体积)=360μL

[0509] 360μL可容纳至多1.6μg/μL x 360μL=576μg Biocourier

[0510] Biocourier:pDNA比率=576:80=7.2:1

[0511] 使用这种形式,50μL(单剂量/小鼠)Biocourier/pDNA复合物将包含:

[0512] 10μg pDNA和72μg Biocourier

[0513] 所有样品均以挤出样品提供,悬浮于无核酸酶水中。认为挤出是制备可注射样品的黄金标准做法。

[0514] Biocourier注射剂i.d./i.m.通过400nm和100nm聚碳酸酯膜挤出。然后将Biocourier挤出样品与相关量的pDNA复合。

[0515] 制备所述Biocourier制剂类型2:液体形式

[0516] A)脂质膜制备

[0517] 1)将上表10中给出的脂质量从储液中转移至干净的玻璃圆底烧瓶中并混合。

[0518] 2)在40℃水浴和真空下使用旋转蒸发仪小心蒸发溶剂。

[0519] B)膜的再水合

[0520] 3)将Si-NP+GLY+THR溶液添加至膜,并且如有必要,使用无核酸酶水将最终体积调整至10mL。

[0521] 4)用封口膜覆盖烧瓶并将膜再水合,在水浴(60℃)中搅拌烧瓶5分钟。

[0522] 5)将1mL样品分装至不含RNA的Eppendorf管中,共10个Eppendorf。将悬浮液储存在冰箱中。

[0523] C)挤出工艺

[0524] 6)悬浮液应通过孔径为0.4μm和0.1μm的膜过滤器,在60℃下通过0.4μm循环10次,然后通过0.1μm循环10次。挤出完成后将悬浮液储存在冰箱中。

[0525] D)用pDNA负载Biocourier

[0526] 7)将储存在-40℃的pDNA样品解冻,并将管置于通风橱下,直至达到室温(预计时间10分钟)。

[0527] 8)在室温下将样品从冰箱转移至通风橱以平衡挤出的Biocourier样品(预计时间6分钟)。

[0528] 9)将相关量的Biocourier和pDNA负载至无菌Eppendorf中。特别地,将360μL Biocourier与40μL pDNA溶液混合。密封Eppendorf。

[0529] 10)轻轻涡旋Eppendorf 15秒,并在室温下将密封样品平衡30分钟。将样品转移至冰箱直至使用。注射前请遵循提供的说明。

[0530] 如上所述制备4个等分试样。

[0531] 制备所述Bio-courier制剂类型2:冻干形式

[0532] A)膜制备

[0533] 1)将如上表3所述的脂质量从储液中转移至干净的玻璃圆底烧瓶中并混合。

[0534] 2)使用旋转蒸发器并使用40℃水浴在真空下小心蒸发溶剂。

[0535] B)膜的再水合

[0536] 3)将Si-NP+GLY+THR溶液添加至膜上,并且如有必要,使用无核酸酶水将最终体积调整至10mL。

[0537] 4)用封口膜覆盖烧瓶并将膜再水合,在水浴(60℃)中搅拌烧瓶5分钟。

[0538] 5)将1mL样品分装至不含RNA的Eppendorf中,共10个Eppendorf。将悬浮液储存在冰箱中。

[0539] C)挤出工艺

[0540] 6)悬浮液应通过孔径为0.4μm和0.1μm的膜过滤器:在60℃下通过0.4μm循环10次;然后通过0.1μm循环10次。挤出完成后将悬浮液储存在冰箱中。

[0541] D)用pDNA负载Biocourier

[0542] 7)将储存在-40℃的pDNA样品解冻;将管置于通风橱下,直至达到室温(预计时间10分钟)。

[0543] 8)在室温下将样品从冰箱转移至通风橱下以平衡挤出的Biocourier样品(预计时间6分钟)。

[0544] 9)将相关量的Biocourier和pDNA负载至无菌Eppendorf中。特别地,将360μL Biocourier与40μL pDNA溶液混合。密封Eppendorf。

[0545] 10)轻轻涡旋Eppendorf 15秒,并在室温下将密封样品平衡30分钟。将样品转移至冰箱3小时。

[0546] 11)将样品移至-40℃使其冷冻(5小时)。

[0547] 12)启动冷冻干燥机并使恒温室达到-40℃。将样品移至冷冻干燥机并启动真空。

[0548] 13)将样品冷冻干燥过夜。

[0549] 14)将获得的样品密封并将其移至冰箱中。

[0550] 如上所述制备4个等分试样。

[0551] 样品的重构和一般处置建议

[0552] 冻干粉样品重构说明

[0553] 将Eppendorf管转移至通风橱,并使用400μL无核酸酶水重悬Eppendorf的内容物。

[0554] 重悬旨在室温下在通风橱下进行,并使用适当的无菌防护设备,从而避免内容物的任何交叉污染。

[0555] 重悬后,关闭Eppendorf管;轻轻涡旋15秒;并在室温下将密封样品平衡30分钟。

[0556] 将样品转移至冷藏容器中,并在施用前几分钟将其恢复至室温。取样前,轻轻翻转Eppendorf两次。

[0557] 仅对旨在当天使用/施用的小瓶进行再水合。

[0558] 对于液体样品的说明

[0559] 将Eppendorf转移至通风橱。室温下平衡3分钟,并轻轻涡旋15秒;在室温下将密封样品平衡30分钟。

[0560] 将样品转移至冷藏容器中,并在施用前几分钟将其恢复至室温。取样前,轻轻翻转Eppendorf两次。

[0561] 实施例11:关于挤出的考虑,以及该工艺步骤如何改变成分的最佳起始比率。

[0562] 相对于初始使用量,挤出可以产生硅颗粒的损失。对于目前的目的,挤出后的最终硅含量为约2mg/L,相当于2μg/mL。

[0563] 一般地,为了产生满足该要求的1mL成品载体组合物,建议从1.6mg脂质组分、0.1mg海藻糖(如果存在)、0.05mg甘氨酸(如果存在)和2μg硅开始。

[0564] 为了简单起见,当本文提及Biocourier:核酸的比率时,这是Biocourier的脂质组分与核酸之间的摩尔比。

[0565] 因此,示例性组成在下表11中给出。

[0566] 表11:示例组成

[0567]

No	ID	Si-NP的样品	组分的比率	每个样品负载的siRNA
1	F1	75μg Si	3.75:0:0	150μg siLuc2p
2	F2	75μg Si:200μg PC	3.75:10:0	150μg siLuc2p
3	F3	75μg Si:200μg PC:20μg Gly	3.75:10:1	150μg siLuc2p
4	F4	75μg Si:200μg PC:20μg Arg	3.75:10:1	150μg siLuc2p
5	F5	75μg Si:200μg PC:20μg His	3.75:10:1	150μg siLuc2p

[0568] 实施例12:ζ电位的评估

[0569] 所产生的制剂具有如表12中所示的成分。这些制剂的测得的ζ电位如表13所示。可以评估成分对ζ电位的影响,并且可以将RNA负载时ζ电位的变化用作简单质量控制标志物作为成功复合的证据。

[0570] 表12:测试的组成

[0571]

制剂样品			每个样品负载的siRNA	Si与siRNA比率
No	ID	比率		
1	F01	75μg Si : 200μg PC	150μg siLuc2p	1 : 2
2	F02	150μg Si : 200μg PC	150μg siLuc2p	1 : 1
3	F04	75μg Si : 200μg PC : 20μg Arg	150μg siLuc2p	1 : 2
4	F05	150μg Si : 200μg PC : 20μg Arg	150μg siLuc2p	1 : 1
5	F07	75μg Si : 200μg PC : 40μg Arg	150μg siLuc2p	1 : 2
6	F08	150μg Si : 200μg PC : 40μg Arg	150μg siLuc2p	1 : 1

[0572]

7	F11	75μg Si : 200μg SA	150μg siLuc2p	1 : 2
8	F12	150μg Si : 200μg SA	150μg siLuc2p	1 : 1
9	F14	75μg Si : 200μg SA : 20μg Arg	150μg siLuc2p	1 : 2
10	F15	150μg Si : 200μg SA : 20μg Arg	150μg siLuc2p	1 : 1
11	F17	75μg Si : 200μg SA : 40μg Arg	150μg siLuc2p	1 : 2
12	F18	150μg Si : 200μg SA : 40μg Arg	150μg siLuc2p	1 : 1
13	F21	75μg Si : 200μg PE	150μg siLuc2p	1 : 2
14	F22	150μg Si : 200μg PE	150μg siLuc2p	1 : 1
15	F24	75μg Si : 200μg PE : 20μg Arg	150μg siLuc2p	1 : 2
16	F25	150μg Si : 200μg PE : 20μg Arg	150μg siLuc2p	1 : 1
17	F27	75μg Si : 200μg PE : 40μg Arg	150μg siLuc2p	1 : 2
18	F28	150μg Si : 200μg PE : 40μg Arg	150μg siLuc2p	1 : 1
19	F31	75μg Si : 200μg 卵磷脂	150μg siLuc2p	1 : 2
20	F32	150μg Si : 200μg 卵磷脂	150μg siLuc2p	1 : 1
21	F34	75μg Si : 200μg Lec : 20μg Arg	150μg siLuc2p	1 : 2
22	F35	150μg Si : 200μg Lec : 20μg Arg	150μg siLuc2p	1 : 1
23	F37	75μg Si : 200μg Lec : 40μg Arg	150μg siLuc2p	1 : 2
24	F38	150μg Si : 200μg Lec : 40μg Arg	150μg siLuc2p	1 : 1

[0573] 表13:未负载和负载siRNA的制剂的ζ电位测量结果

[0574]

制剂样品			ζ 电位	
No.	**ID**	**比率**	**未负载**	**负载有 siRNA**
1	F01	75μg Si : 200μg PC	−30.4 mV ± 7.7	−50.1 mV ± 9.4
2	F02	150μg Si : 200μg PC	−25.4 mV ± 8.0	−41.7 mV ± 6.6
3	F04	75μg Si : 200μg PC : 20μg Arg	−31.4 mV ± 8.2	−49.6 mV ± 18.6
4	F05	150μg Si : 200μg PC : 20μg Arg	−28.8 mV ± 7.8	−35.3 mV ± 10.0
5	F07	75μg Si : 200μg PC : 40μg Arg	−34.6 mV ± 5.7	−45.8 mV ± 13.9
6	F08	150μg Si : 200μg PC : 40μg Arg	−31.4 mV ± 7.0	−34.3 mV ± 11.3
7	F11	75μg Si : 200μg SA	+23.0 mV ± 8.9	−34.4 mV ± 11.2
8	F12	150μg Si : 200μg SA	+13.5 mV ± 7.9	−35.9 mV ± 14.4
9	F14	75μg Si : 200μg SA : 20μg Arg	+14.8 mV ± 7.6	−31.3 mV ± 9.1
10	F15	150μg Si : 200μg SA : 20μg Arg	+1.65 mV ± 4.9	−30.3 mV ± 7.4
11	F17	75μg Si : 200μg SA : 40μg Arg	+11.6 mV ± 6.3	−30.2 mV ± 8.1
12	F18	150μg Si : 200μg SA : 40μg Arg	−4.33 mV ± 6.1	−35.4 mV ± 8.3
13	F21	75μg Si : 200μg PE	−34.8 mV ± 8.2	−37.3 mV ± 6.5
14	F22	150μg Si : 200μg PE	−31.5 mV ± 9.6	−30.8 mV ± 10.1
15	F24	75μg Si : 200μg PE : 20μg Arg	−43.5 mV ± 9.1	−38.8 mV ± 9.9
16	F25	150μg Si : 200μg PE : 20μg Arg	−38.7 mV ± 8.5	−38.3 mV ± 7.8
17	F27	75μg Si : 200μg PE : 40μg Arg	−45.7 mV ± 8.3	−46.9 mV ± 8.9

[0575]

18	F28	150μg Si : 200μg PE : 40μg Arg	−36.7 mV ± 9.6	−41.7 mV ± 11.2
19	F31	75μg Si : 200μg 卵磷脂	−48.7 mV ± 7.7	−68.2 mV ± 7.7
20	F32	150μg Si : 200μg 卵磷脂	−40.7 mV ± 10.4	−45.0 mV ± 30.3
21	F34	75μg Si : 200μg Lec : 20μg Arg	−42.9 mV ± 11.8	−49.2 mV ± 12.1
22	F35	150μg Si : 200μg Lec : 20μg Arg	−38.2 mV ± 7.0	−44.4 mV ± 13.7
23	F37	75μg Si : 200μg Lec : 40μg Arg	−40.8 mV ± 8.8	−47.3 mV ± 21.5
24	F38	150μg Si : 200μg Lec : 40μg Arg	−40.4 mV ± 8.1	−47.7 mV ± 13.2

[0576] 实施例13:证明硅对核酸结合效率和对复合物稳定性的益处

[0577] 筛选一系列Biocourier制剂(如前述实施例中所述产生)以评估与以相同组分和以相同方式配制的脂质纳米颗粒组合物(作为相应的Biocourier组合物,但没有含硅颗粒)相比,硅的存在是否对核酸结合效率和稳定性产生有益影响。

[0578] 特别是,使用Biocourier制剂DSC613G、DS61G、DS6G和D6G进行了研究,以鲱鱼精子的粗提物(hsDNA)作为DNA的实例,以酵母mRNA作为mRNA的实例,以评估硅颗粒对核酸结合效率和稳定性的影响。

[0579] 表14:样品中组分的浓度(μg/mL):以固定L2比率负载有mRNA(或重复研究中的hsDNA)的各种Biocourier和相应的脂质体制剂

[0580]

	未负载 mRNA (对照)	DSC613G		DS61G		DS64G		D6G	
		负载的 **Biocourier**	负载的 **脂质体**	负载的 **Biocourier**	负载的 **脂质体**	负载的 **Biocourier**	负载的 **脂质体**	负载的 **Biocourier**	负载的 **脂质体**
mRNA 或 hsDNA	50	50	50	50	50	50	50	50	50
SiNP	-	100	-	100	-	100	-	100	-
DOPE	-	240	240	240	240	240	240	240	240
SA	-	40	40	40	40	160	160	-	-
DC-Chol	-	120	120	-	-	-	-	-	-
Gly	-	50	50	50	50	50	50	50	50

[0581]

	标准脂质基底	不含 DC-Chol (DOPE 和 SA 的量不变)	不含 DC-Chol (增加 SA 的量以补偿电荷)	不含 DC-Chol 和 SA (仅 DOPE)

[0582] 结果显示在图20和21中。当存在硅颗粒时,核酸(hsDNA或mRNA)的结合效率(并且因此推断稳定性)明显改善。因此,如这些图中所证明的,发现含有硅颗粒的制剂的核酸结合和稳定性优于不含硅颗粒制备的对应制剂。

[0583] 实施例14-与Si复合的Dasher GFP mRNA的稳定性

[0584] 材料

[0585] mRNA

[0586] 200μg(200μL)Dasher GFP mRNA的无核酸酶水溶液(1mg/mL)从Aldevron(4055 41st Avenue South Fargo,North Dakota 58104,USA)获得。mRNA用200μL无核酸酶水进一步稀释,以达到0.5mg/mL的终浓度,然后等分成50μL等分试样到0.2mL PCR管中。

[0587] 牛血清

[0588] 牛血清以冷冻液体形式从Merck(The Old Brickyard,New Rd,Gillingham,Dorset,SP8 4XT)获得。收到后,将血清解冻,并在无菌的15mL和50mL falcon管中制备等分试样,然后将其储存在-20℃下。将1mL血清与4mL无核酸酶水混合,得到5mL 20%血清。从此样品中,通过将1mL 20%血清与4mL无核酸酶水混合,制备4%血清。然后将20%和4%血清样品等分成1mL等分试样,放入2mL PCR管(不含核酸酶和蛋白酶)中,并储存在-20℃直至用于测定。

[0589] SIS0012、SIS0013和脂质纳米颗粒

[0590] 根据上述方案提供SIS0012(未掺杂的Si)和SIS0013(掺硼Si;5×10^{18}个硼原子/cm^3)样品。

[0591] 还提供了含有SIS0012和SIS0013的除硅之外的所有组分的脂质纳米颗粒样品。

[0592] 根据上述方案将mRNA负载到SIS0012、SIS0013和脂质纳米颗粒样品上。mRNA与SIS0012、SIS0013和LNP各自的重量比为1:12。

[0593] 实验流程

[0594] 将以下每个样品添加至8个0.2mL PCR管中(每管30μL):

[0595] • mRNA-SIS0012复合物

[0596] • mRNA-SIS0013复合物

[0597] • mRNA-脂质纳米颗粒(不含硅)复合物(“mRNA-X”)

[0598] • 无核酸酶水中的mRNA对照样品

[0599] 所有样品均与牛血清混合,在37℃下孵育,然后根据以下程序进行凝胶电泳分析:

[0600] 每管中加入30μL牛血清(4%),然后上下吹打4-5次,充分混匀。盖子盖紧。将管用封口膜过度密封,并放置在37℃水浴中的微管架内。作为无血清对照,一个管仅与20μL无核酸酶水混合。

[0601] 在0小时、0.5小时、1小时、2小时、4小时、6小时和24小时时取出等分试样用于凝胶电泳分析(参见图22至25,在下文讨论)。

[0602] 为了进行凝胶电泳分析,还在每个时间点收集从SIS0012、SIS0013和脂质纳米颗粒制剂中提取的mRNA样品。为了提取mRNA,将样品与十二烷基硫酸钠(1%的无核酸酶水溶液)混合;通过涡旋充分混合;并在室温下孵育20分钟。孵育结束时,将KCl(0.1M无核酸酶水溶液)添加至混合物中,通过涡旋充分混合,然后在冰上孵育10分钟。然后在4℃下将混合物以19000×g(14224rpm)离心15分钟。小心地去除上清液而不扰动沉淀,并将其转移至新的PCR管中。

[0603] 凝胶电泳分析使用E-Gel™Power Snap电泳装置和E-Gel™琼脂糖凝胶(1%)进行,两者均购自ThermoFisher Scientific,168Third Avenue,Waltham,MA USA 02451。

[0604] 结果讨论

[0605] mRNA-SIS0012、mRNA-SIS0013、mRNA-X(不含硅的LNP)和裸mRNA与2%牛血清孵育0小时、0.5小时、1小时、2小时、4小时、6小时和24小时后的凝胶电泳结果在图22至25中提供。

[0606] 图22A和23A显示,在所研究的任何时间点,在与血清一起孵育之前或之后,没有mRNA从mRNA-SIS0012和mRNA-SIS0013孔迁移离开。

[0607] 在mRNA-SIS0012和mRNA-SIS0013孔内,在用血清进行任何处理之前存在强烈的mRNA信号;暴露于血清后,每个mRNA-SIS0012和mRNA-SIS0013孔内的信号随着时间的推移逐渐减弱。最终(即,对于孵育6小时和24小时的样品)在mRNA-SIS0012和mRNA-SIS0013孔中观察到相对较弱的信号。没有mRNA迁移离开SIS0012和SIS0013孔,表明SIS0012和SIS0013与mRNA的结合令人满意。随着时间的推移,在37℃的血清环境中(模拟向受试者施用后mRNA可能暴露于其中的体内环境,其中存在核酸酶),认为mRNA可能逐渐降解,导致较弱的孔内信号。因此,mRNA与SIS0012和SIS0013的结合是令人满意的;并且即使在存在核酸酶且温度保持在37℃的类似体内环境中,mRNA也能免受随着时间推移的降解。

[0608] 为了确认上述结果,对在研究的所有时间点从mRNA-SIS0012和mRNA-SIS0013提取的mRNA进行凝胶电泳分析。观察到该mRNA迁移通过凝胶,如图22B和23B所示。在与血清一起孵育之前(无血清对照),从SIS0012和SIS0013解离的mRNA存在强且尖锐的条带,该条带与对于裸mRNA对照样品观察到的条带一样强,并且移动相同的距离,表明了SIS0012结合的mRNA和SIS0013结合的mRNA的完整性。在从与血清混合的mRNA-SIS0012和mRNA-SIS0013样品中回收的mRNA的情况下,对于0小时至6小时的时间点,存在提取的mRNA的强条带;但此后,条带的强度开始随着时间的推移而减弱,并且从4小时起观察到拖尾现象。

[0609] 配制时不含硅的LNP对应物(称为mRNA-X)的凝胶电泳结果显示在图24中。图24B(提取的mRNA)显示比SIS0012和SIS0013更明显的拖尾。这表明LNP-结合mRNA在暴露于血清时比SIS0012-结合或SIS0013-结合mRNA更容易降解。LNP样品的条带早在0.5小时就有微弱信号,表明存在在凝胶中移动的mRNA小片段。

[0610] 因此,通过凝胶阻滞测定确认了mRNA与SIS0012和SIS0013的成功复合。

[0611] 总之,这些凝胶电泳结果证明了SIS0012和SIS0013对mRNA的保护作用,其防止牛血清中存在的核酸酶的降解。相比之下,在与不含硅的LNP结合的mRNA的情况下(图24),凝胶电泳结果显示mRNA的严重拖尾。至于裸的mRNA,图25显示在与血清孵育(0.5小时)后不久就开始断裂,并且几乎立即观察到降解。

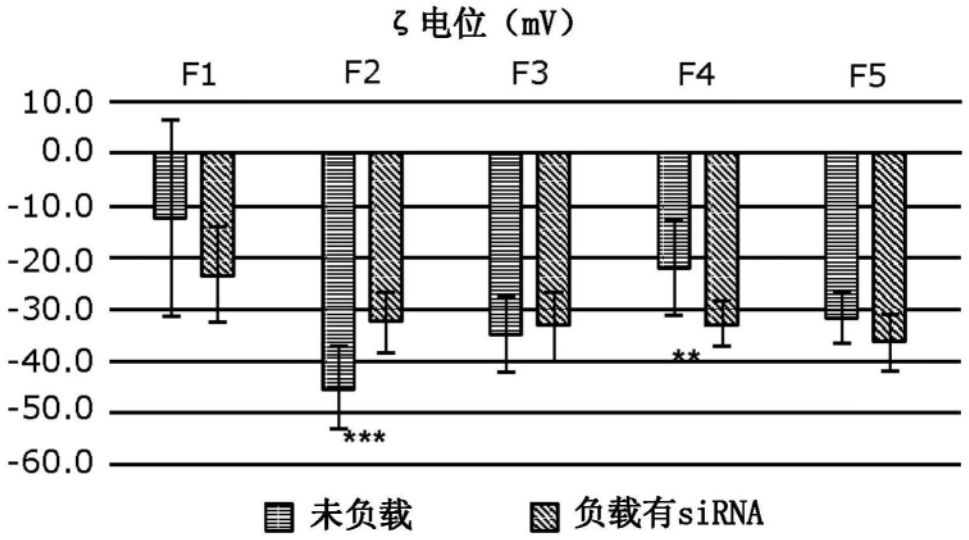

ζ电位（mV）
F1
F2
F3
F4
F5
10.0
0.0
-10.0
-20.0
-30.0
-40.0
-50.0
-60.0
***
**
未负载
负载有siRNA

图1

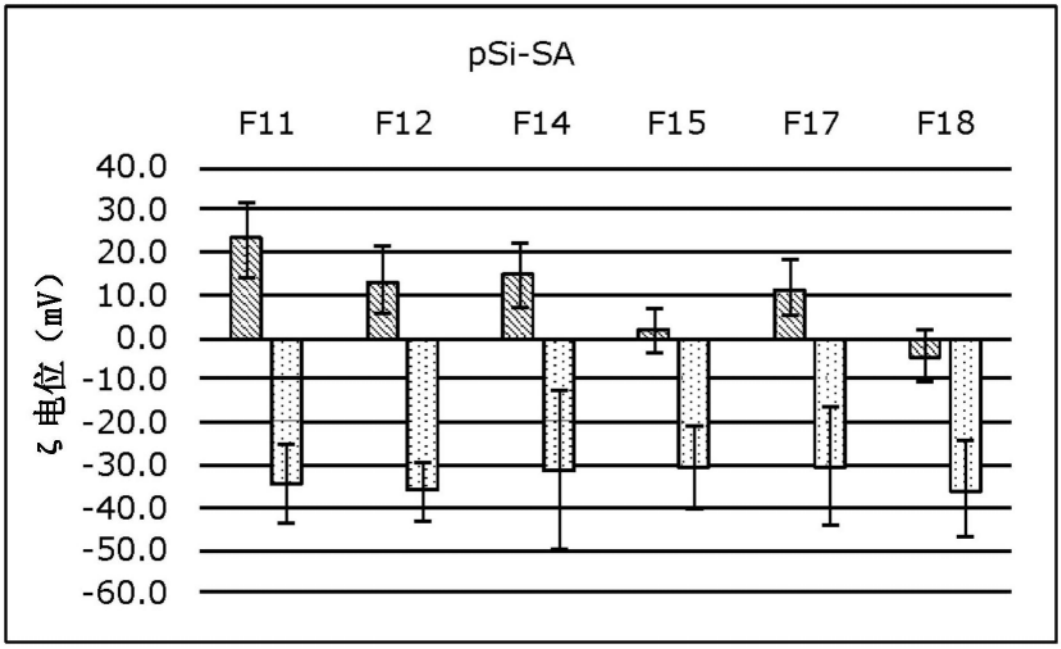

pSi-SA
F11
F12
F14
F15
F17
F18
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
-10.0
-20.0
-30.0
-40.0
-50.0
-60.0
ζ电位（mV）

图2

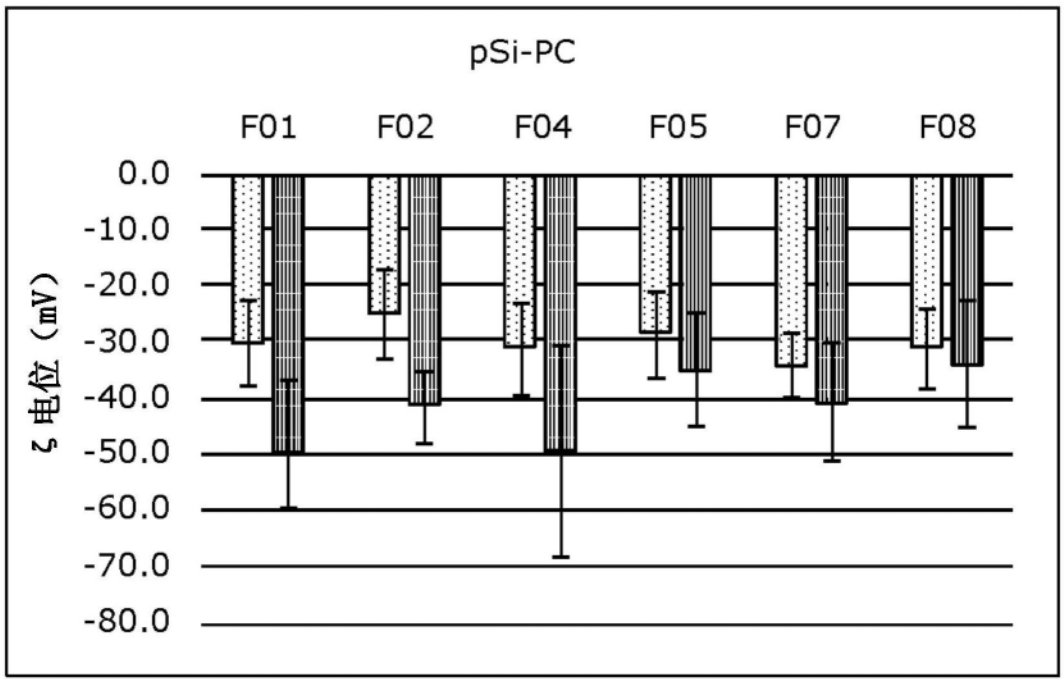

pSi-PC
F01
F02
F04
F05
F07
F08
0.0
-10.0
-20.0
-30.0
-40.0
-50.0
-60.0
-70.0
-80.0
ζ电位（mV）

图3

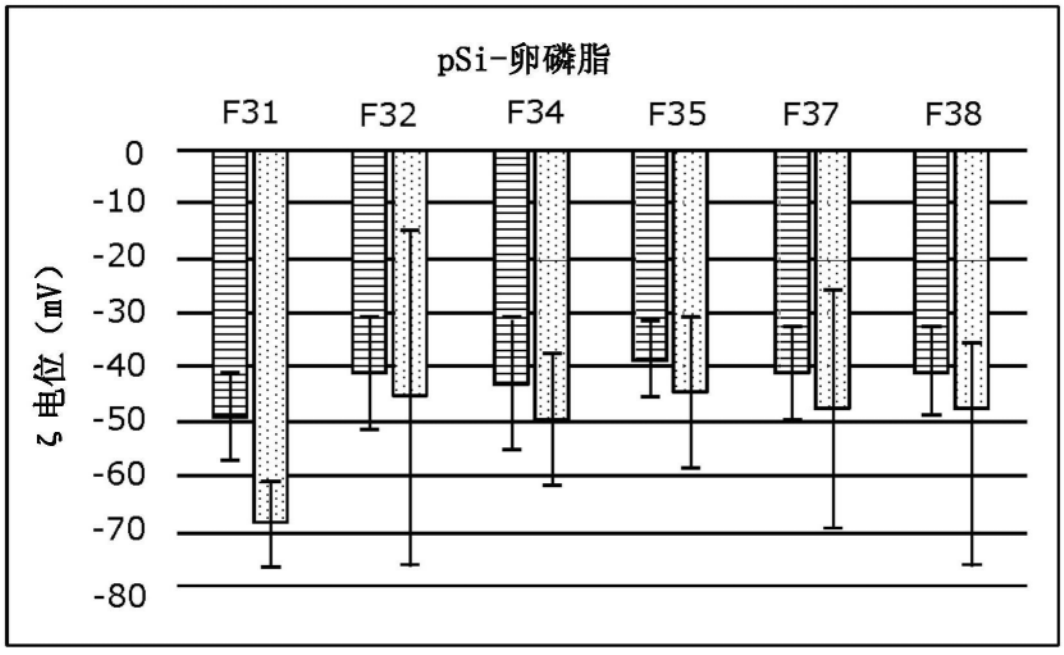

pSi-卵磷脂
F31
F32
F34
F35
F37
F38
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
ζ电位（mV）

图4

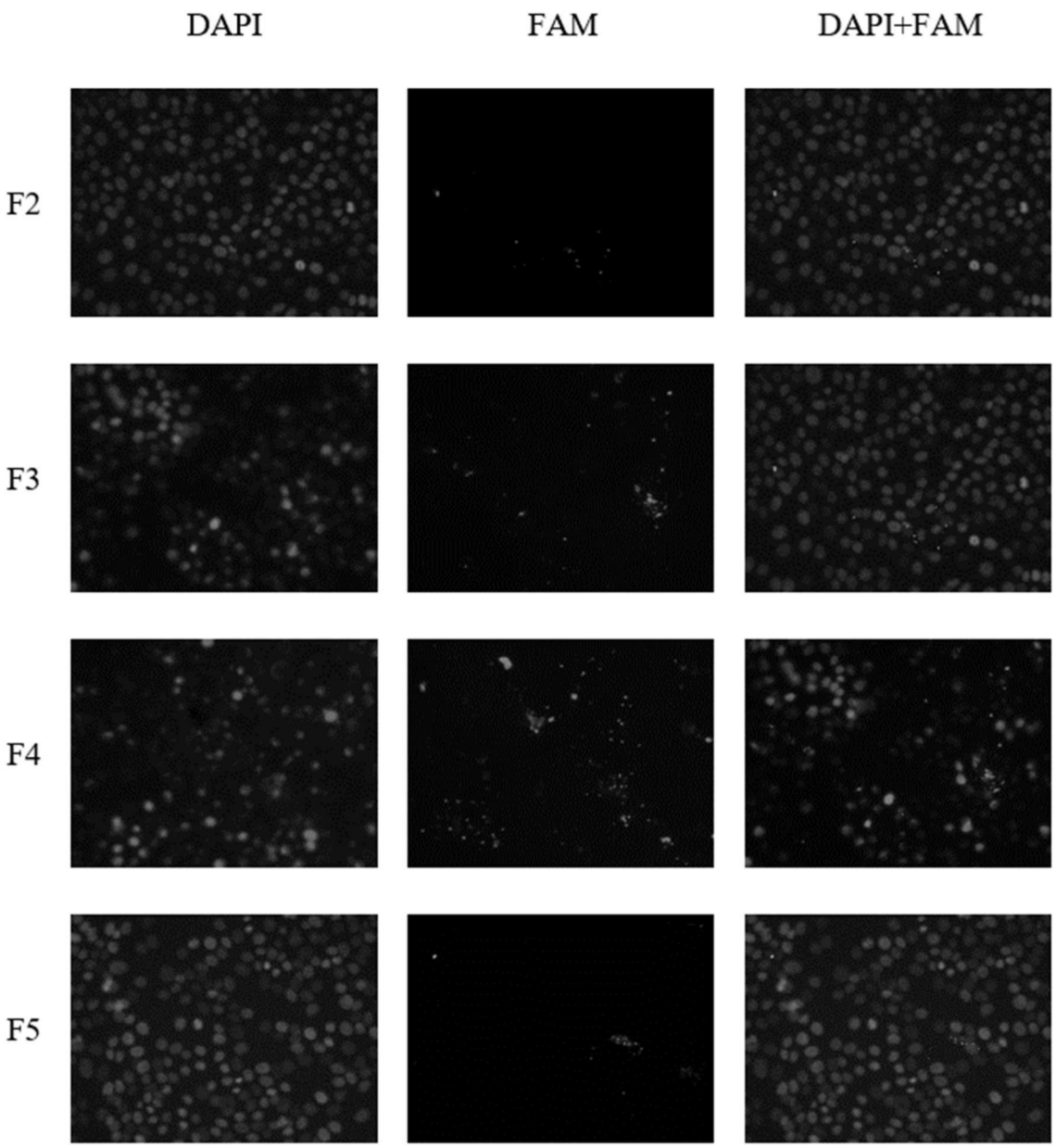


图5

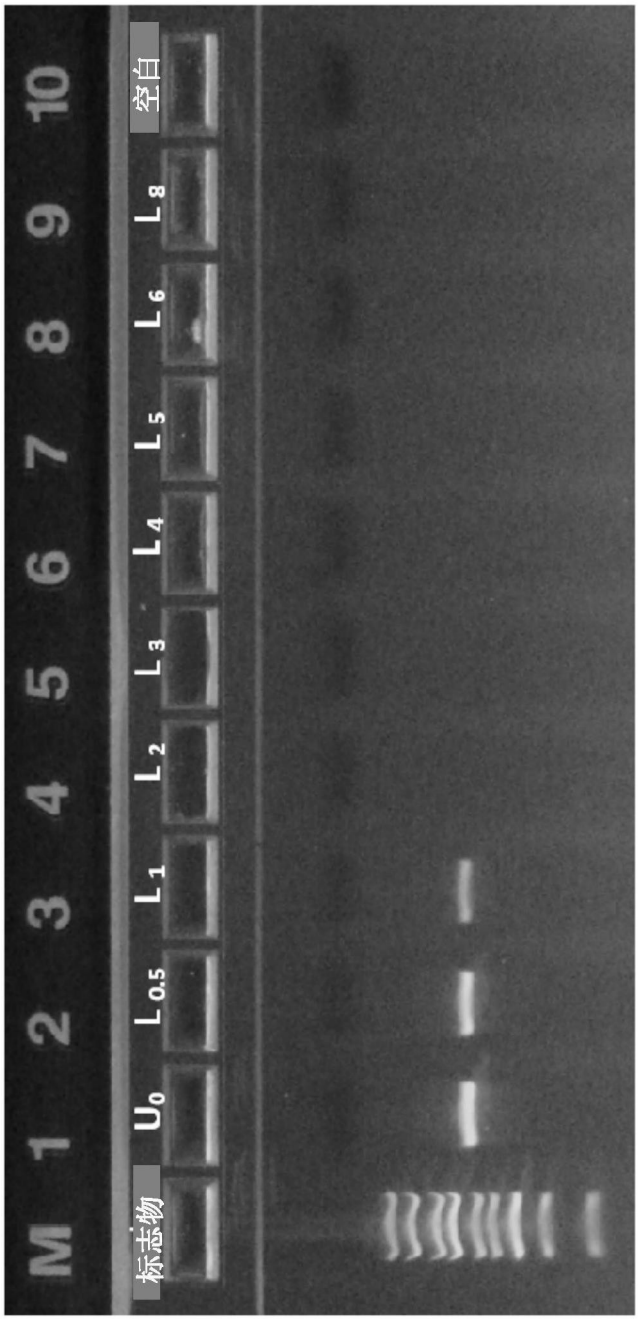


图6

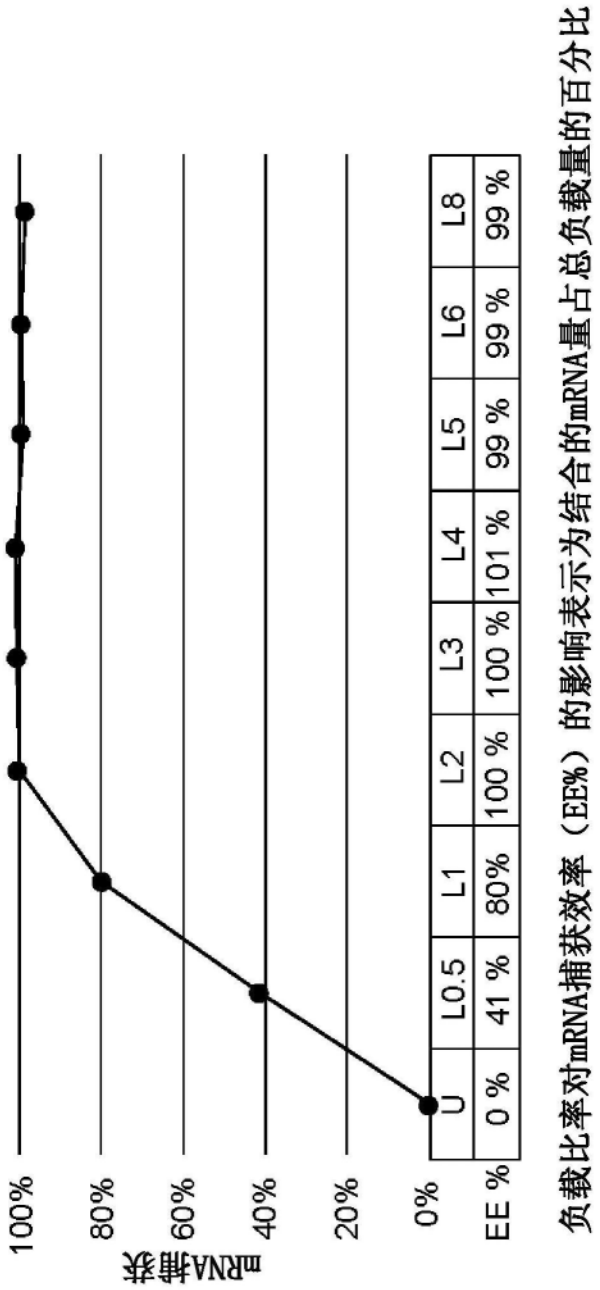

mRNA捕获
100%
80%
60%
40%
20%
0%
负载比率对mRNA捕获效率（EE%）的影响表示为结合的mRNA量占总负载量的百分比
U L0.5 L1 L2 L3 L4 L5 L6 L8
EE % 0 % 41 % 80% 100 % 100 % 101 % 99 % 99 % 99 %

图7

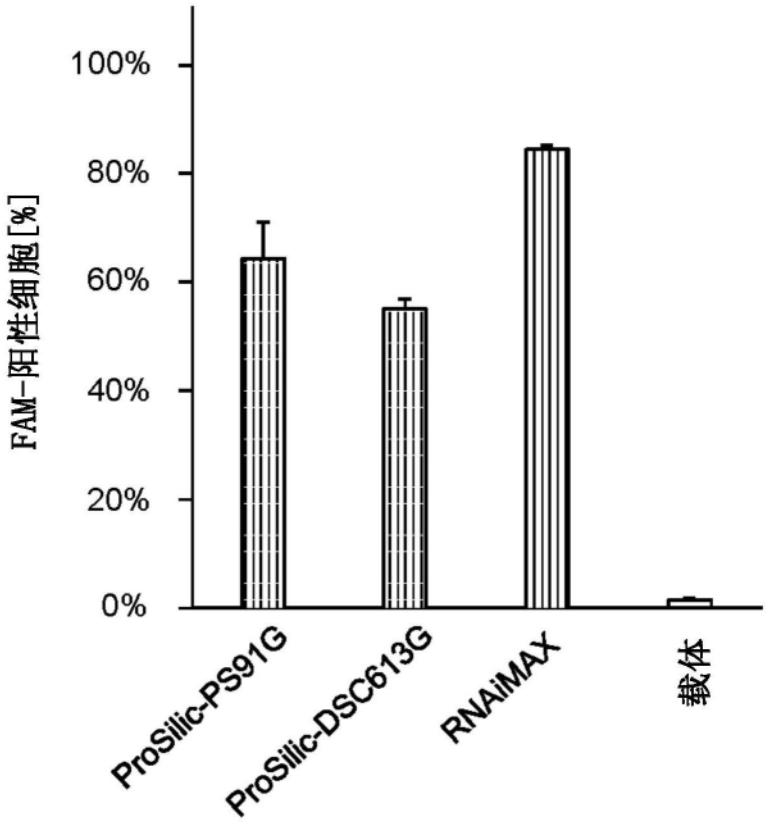

100%
80%
60%
40%
20%
0%
FAM-阳性细胞[%]
ProSilic-PS91G
ProSilic-DSC613G
RNAiMAX
载体

图8

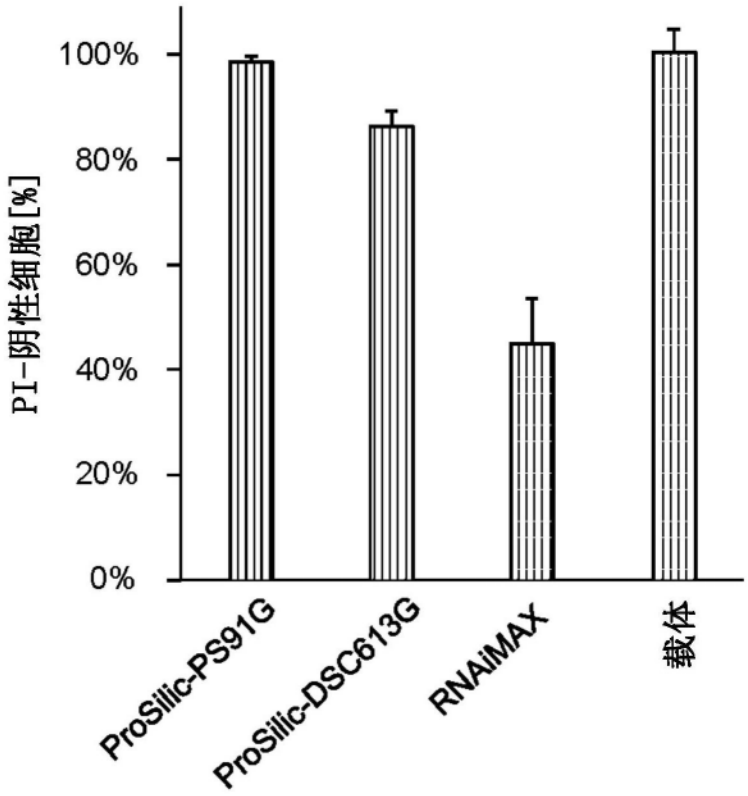

PI-阴性细胞[%]
100%
80%
60%
40%
20%
0%
ProSilic-PS91G
ProSilic-DSC613G
RNAiMAX
载体

图9

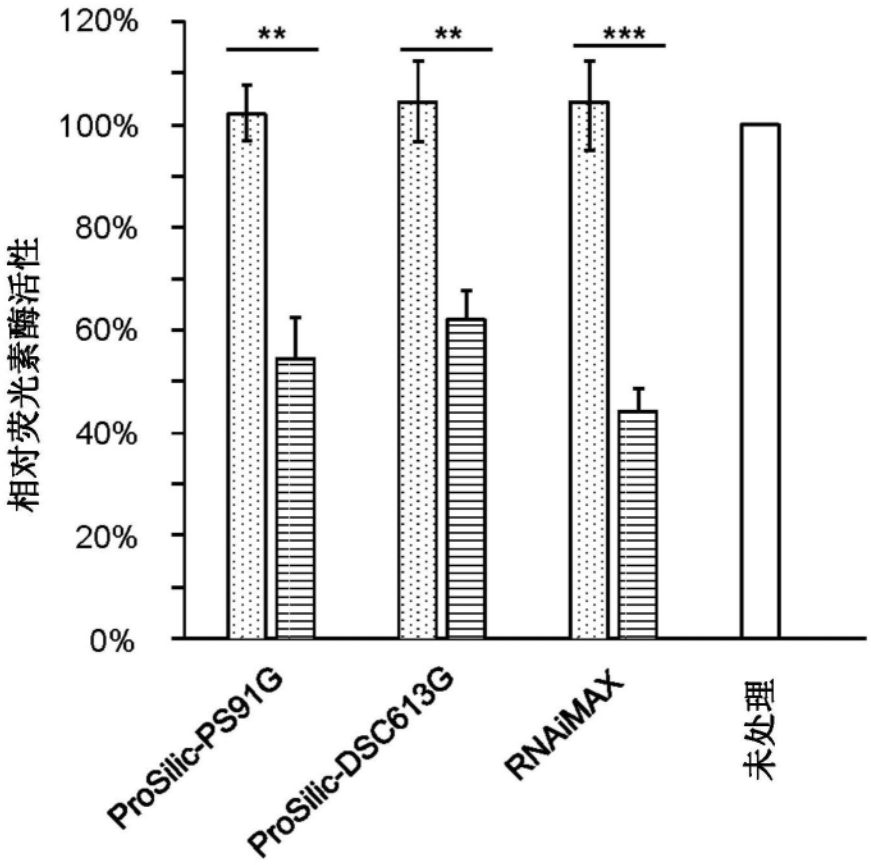

120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
相对荧光素酶活性
**
**
***
ProSilic-PS91G
ProSilic-DSC613G
RNAiMAX
未处理

图10

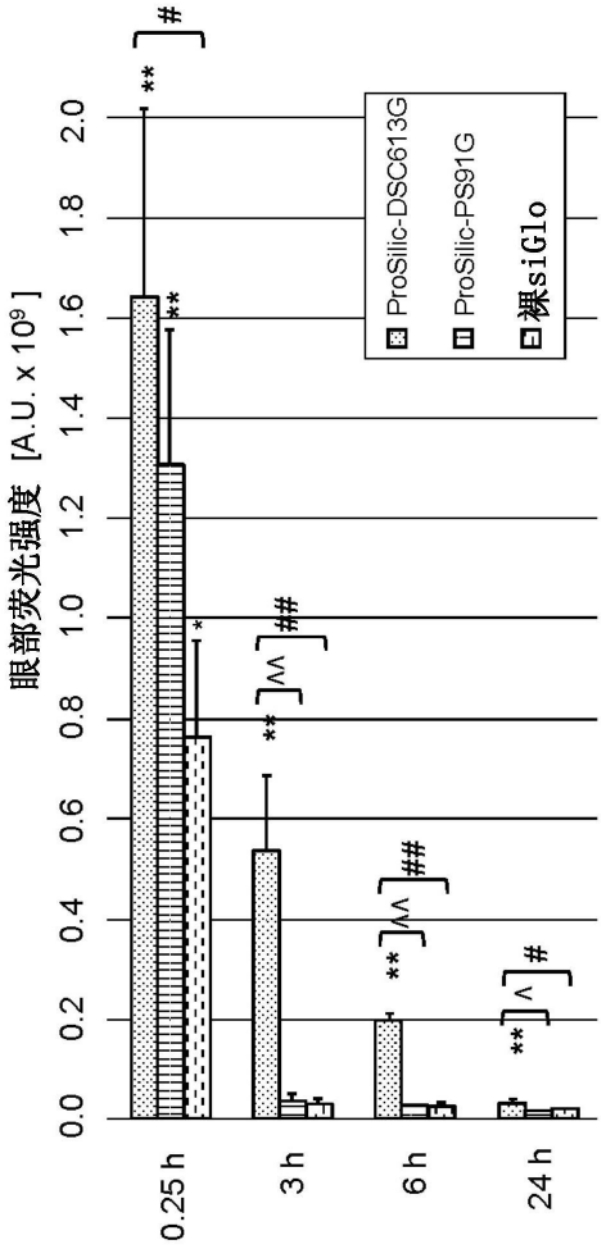

眼部荧光强度 [A.U. x 10⁹]
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
ProSilic-DSC613G
ProSilic-PS91G
裸siGlo
0.25 h
3 h
6 h
24 h

图11

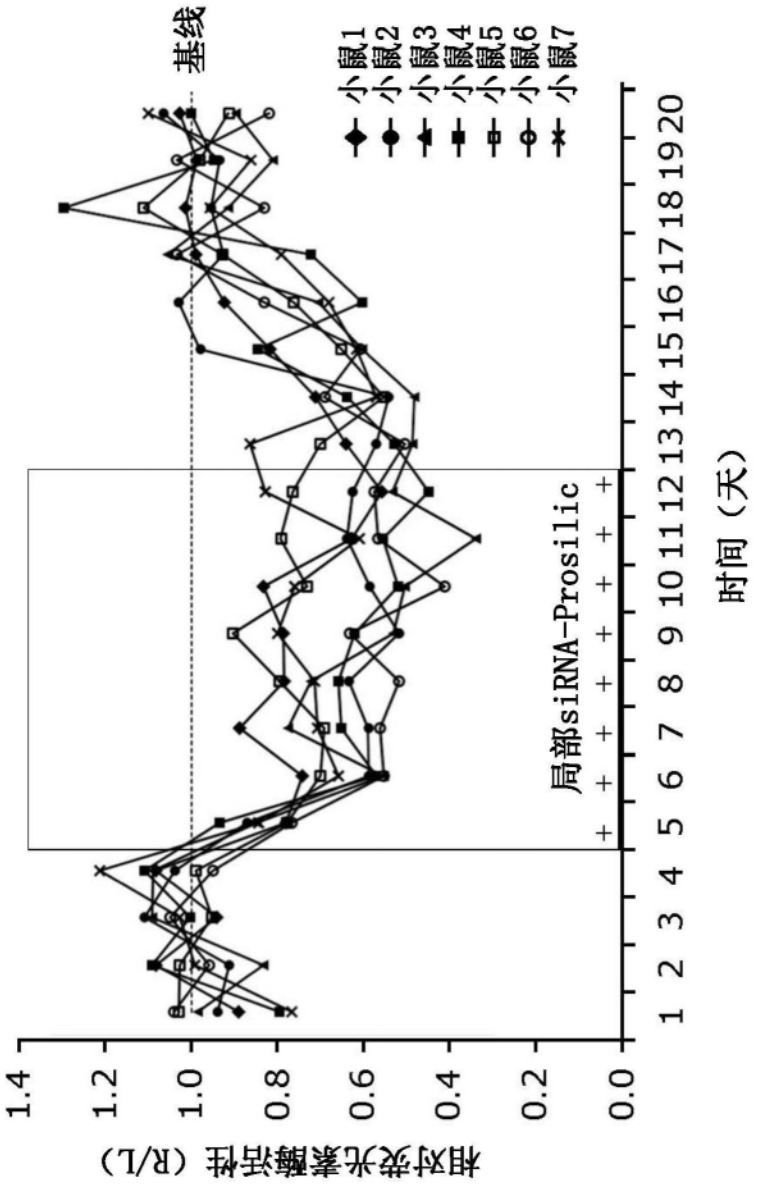

基线
小鼠1
小鼠2
小鼠3
小鼠4
小鼠5
小鼠6
小鼠7
局部siRNA-Prosilic
相对荧光素酶活性（R/L）
时间（天）
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

图12

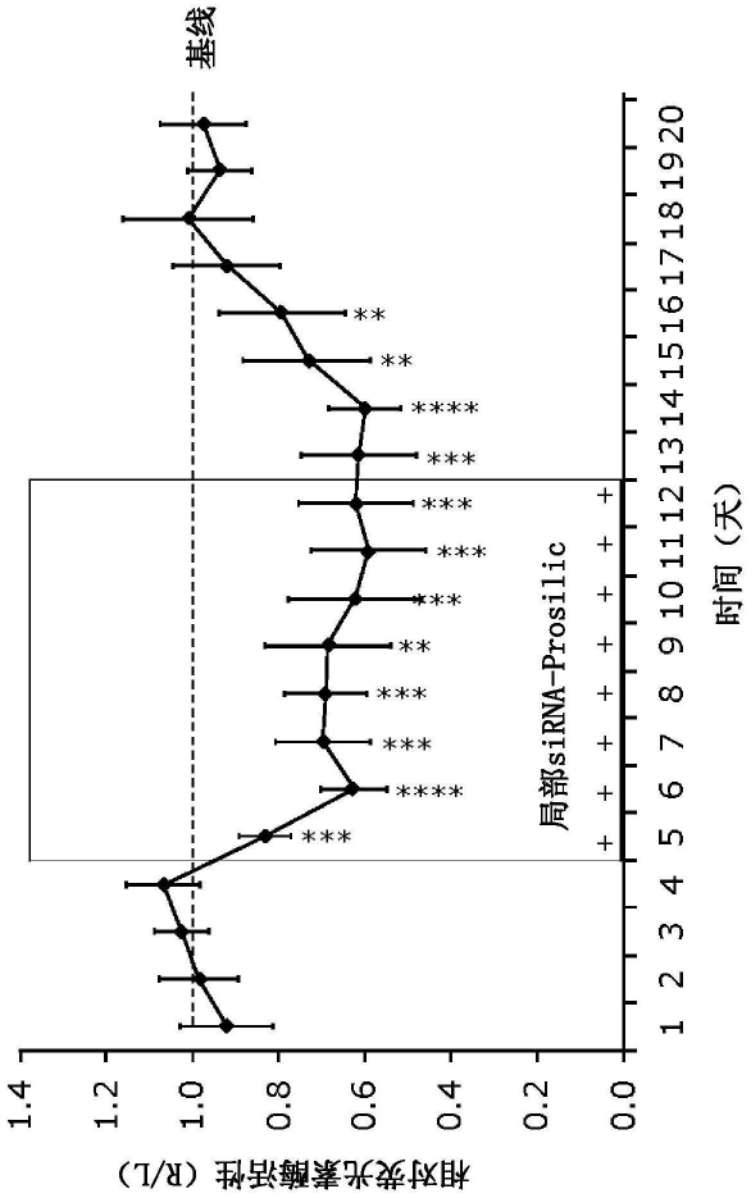

基线
局部siRNA-Prosilic
相对荧光素酶活性（R/L）
时间（天）
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
**
**
****
***
***
***
**
***
***
****
***

图13

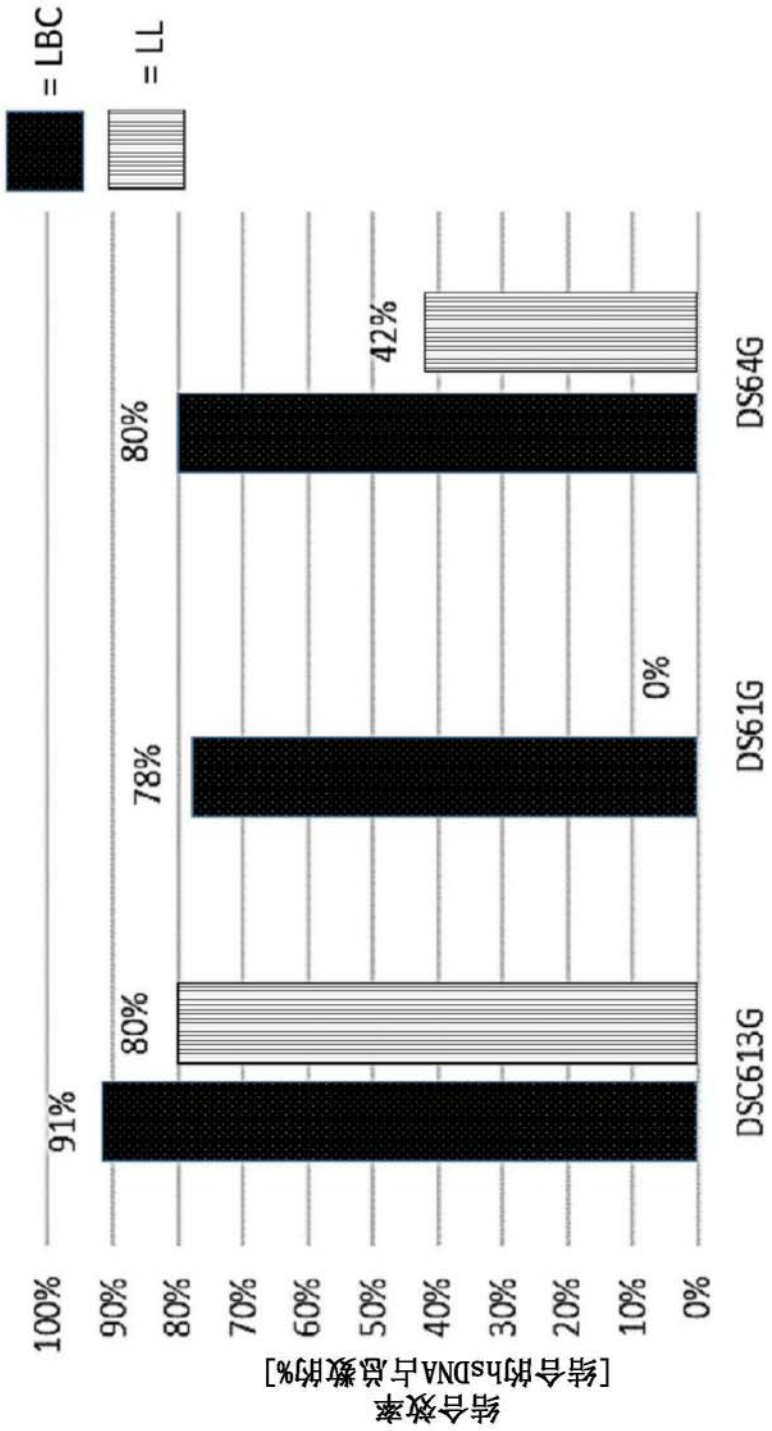

= LBC
= LL
结合效率
[结合的hsDNA占总数的%]
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
91%
80%
78%
0%
80%
42%
DSC613G
DS61G
DS64G

图14





图15

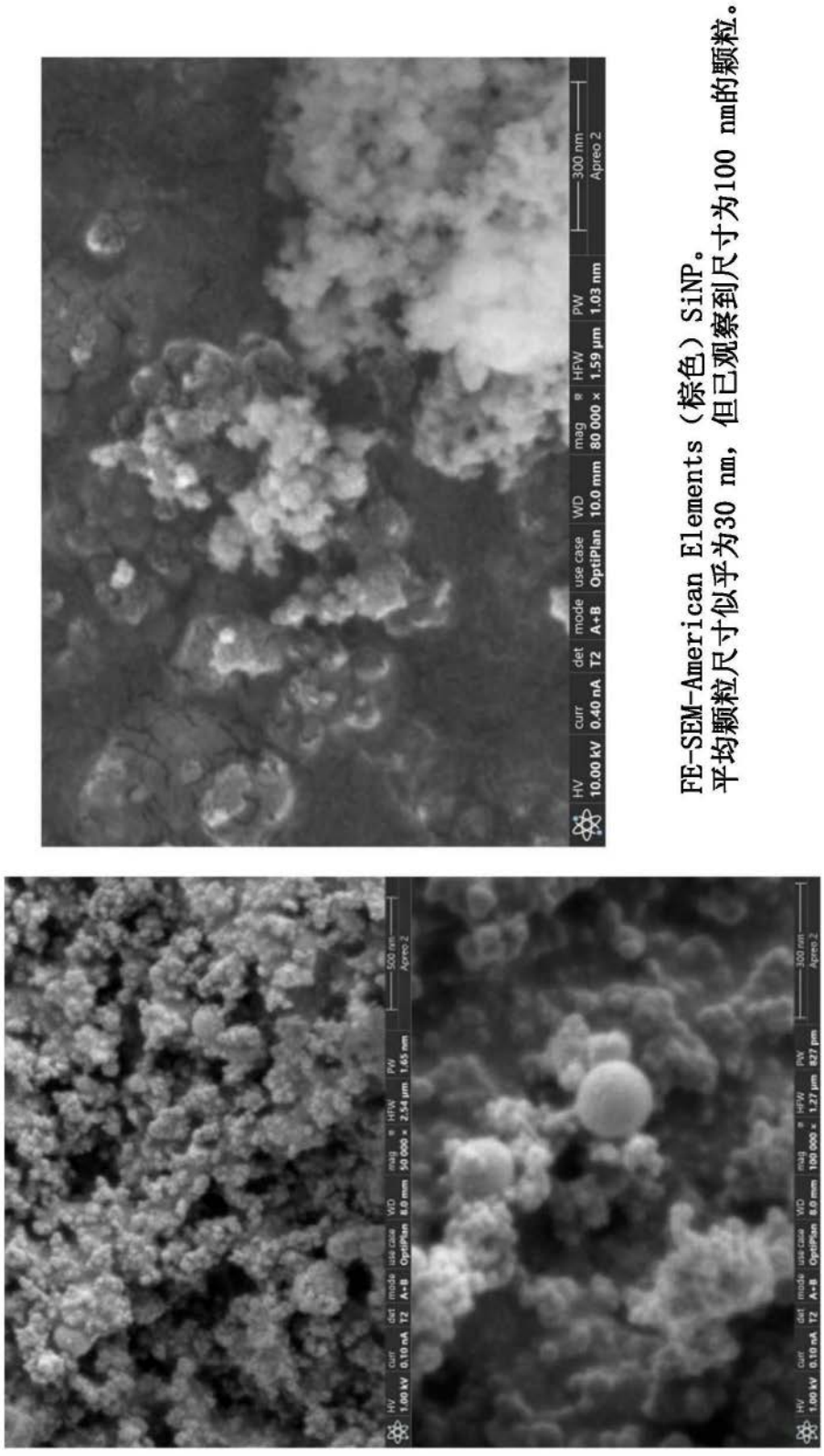
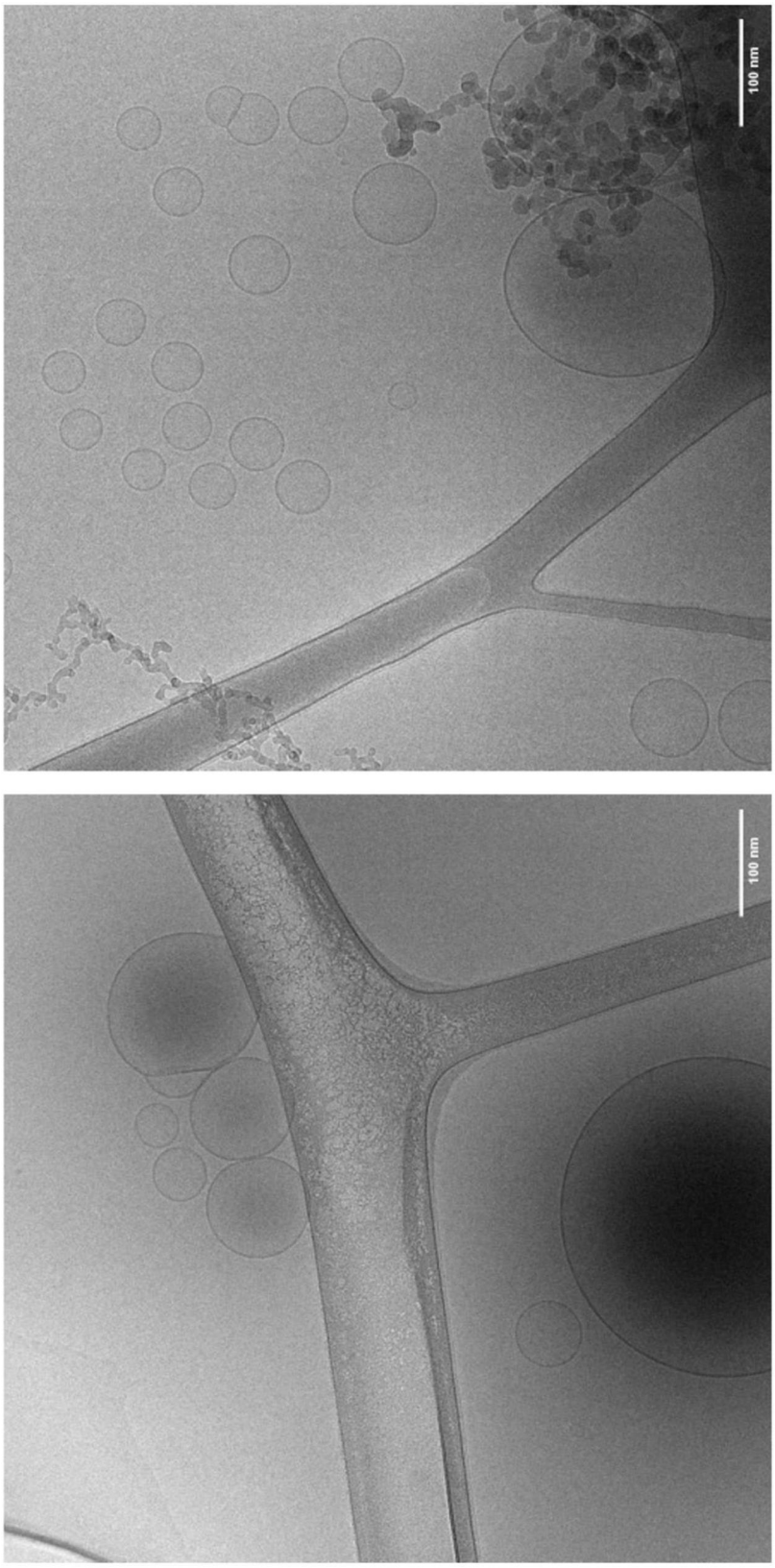
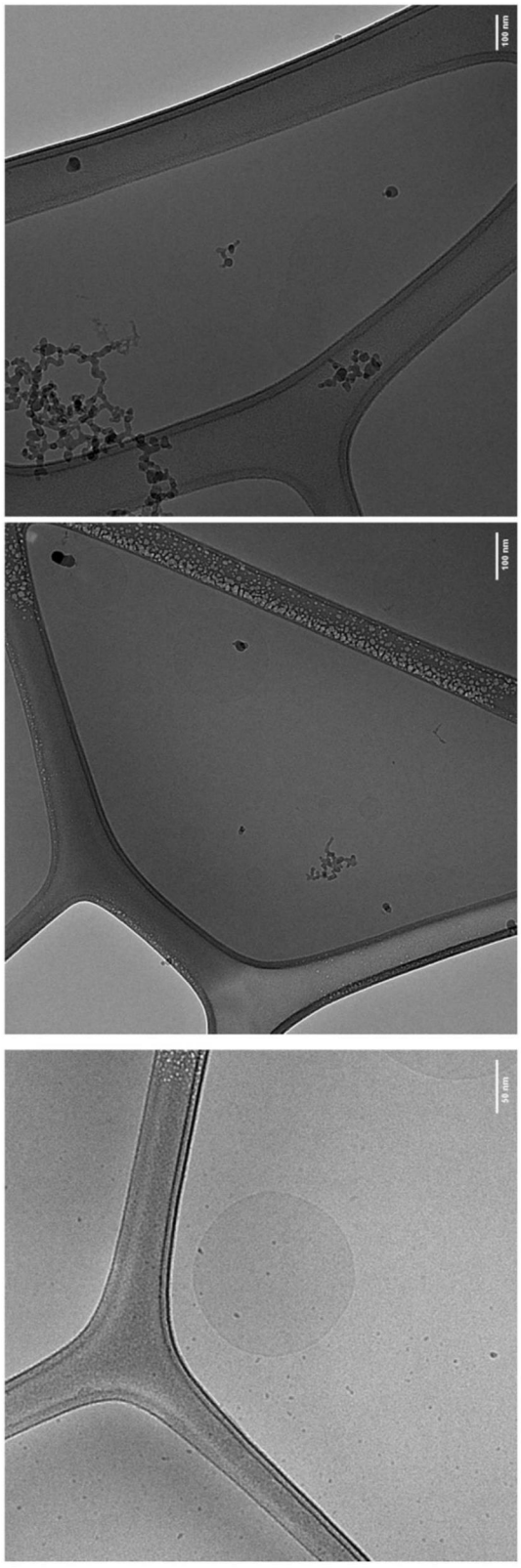

FE-SEM-American Elements（棕色）SiNP。
平均颗粒尺寸似乎为30 nm，但已观察到尺寸为100 nm的颗粒。

图16



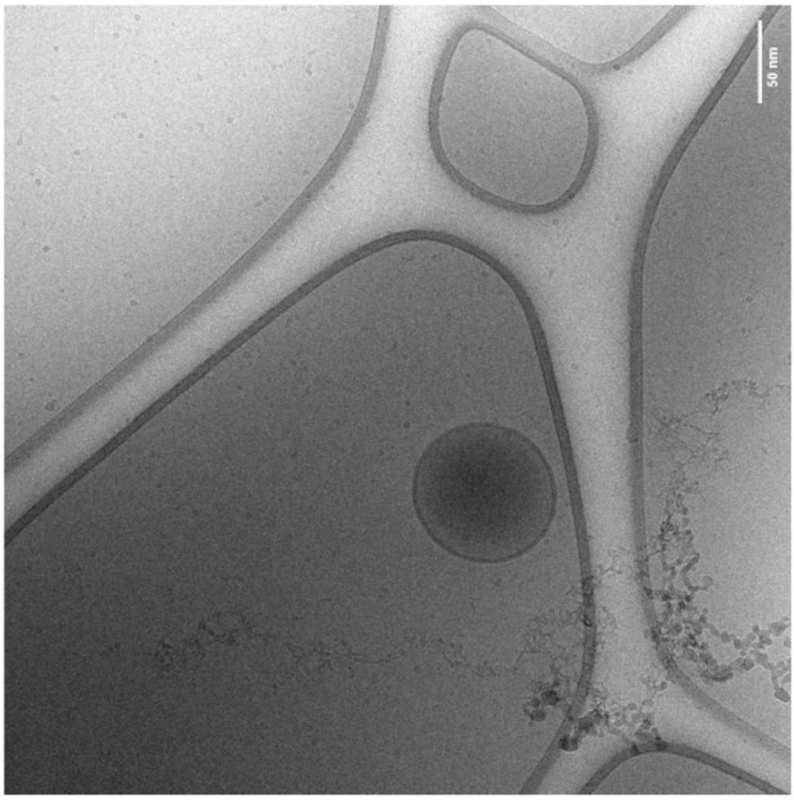
SIS0012（空）。颗粒尺寸在50-150 nm范围内，平均尺寸为100 nm。

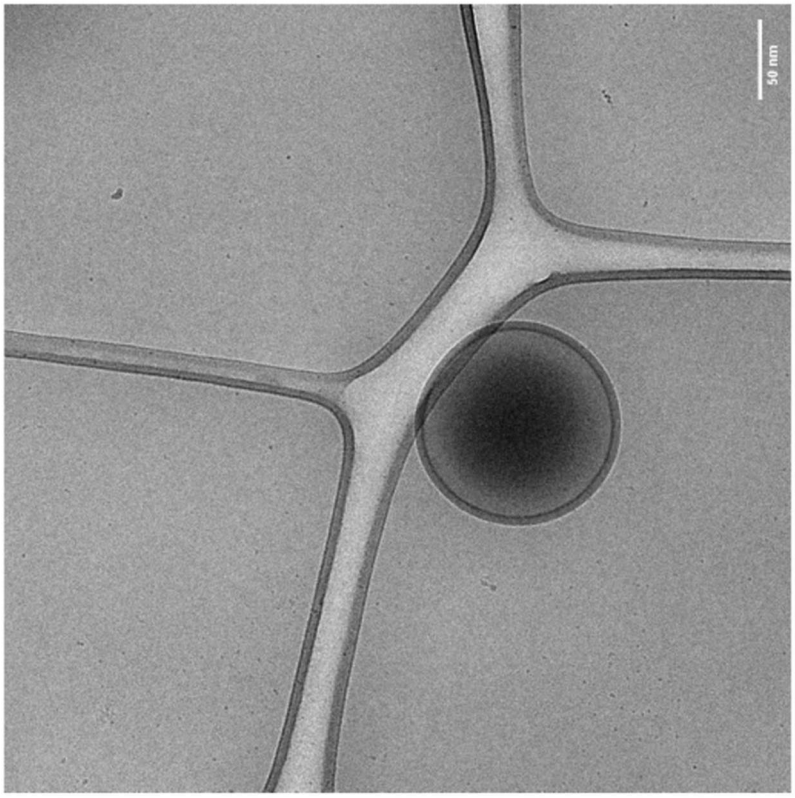
图17



与siRNA复合的SIS0012。与平均尺寸为100 nm的空Biocourier的尺寸相似。还可以观察到硅纳米颗粒的存在，二聚体平均尺寸为30 nm。

图18





与siRNA复合的SIS0013。平均尺寸为100 nm。有趣的是，与SIS0012制剂相比，脂质双层似乎更明显。

图19

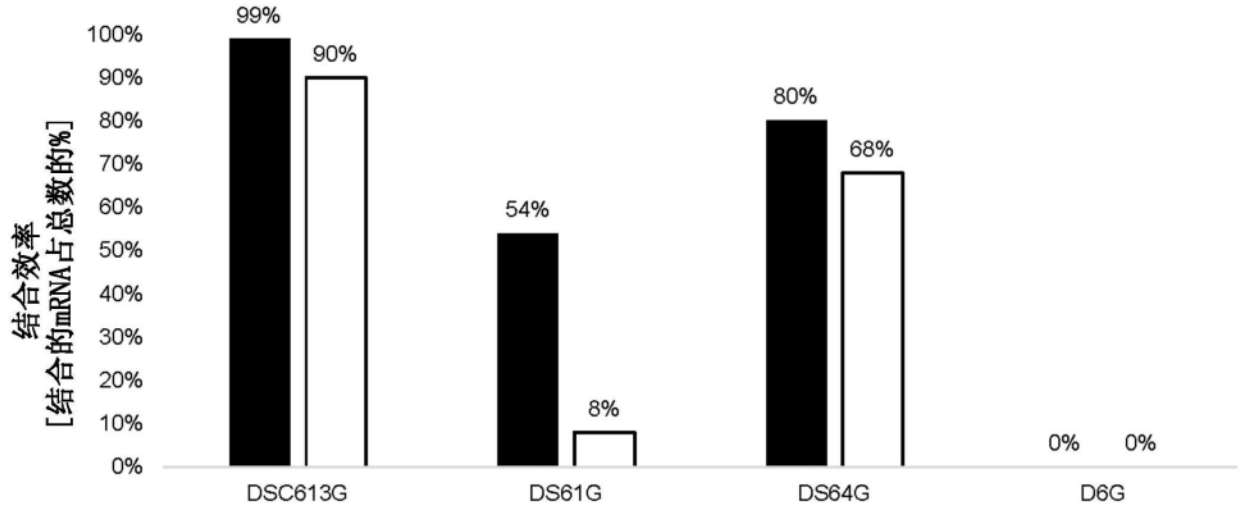

结合效率
[结合的mRNA占总数的%]
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
99%
90%
54%
8%
80%
68%
0%
0%
DSC613G
DS61G
DS64G
D6G

图20

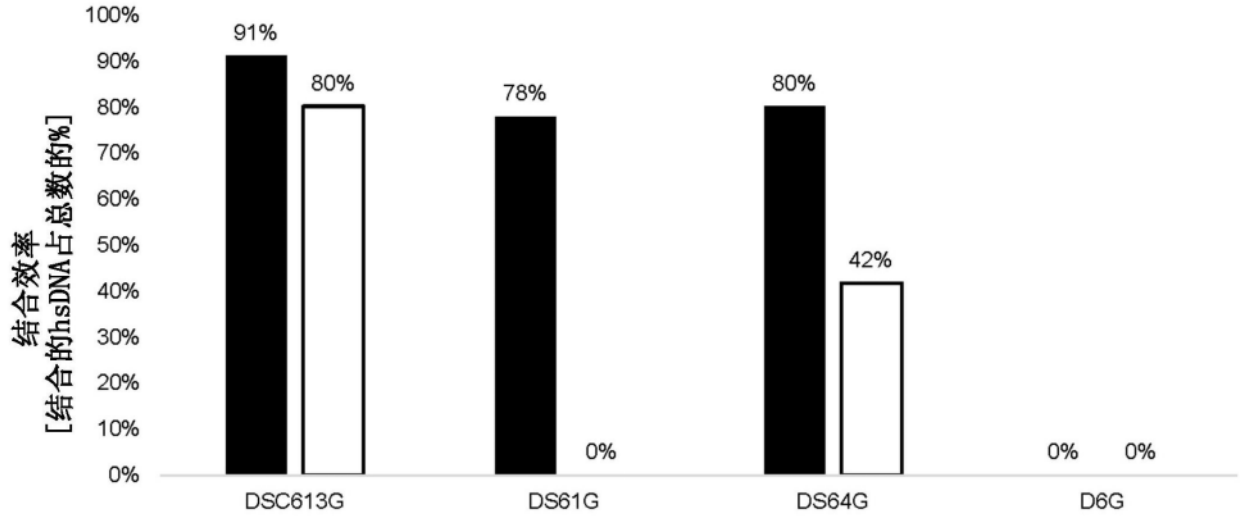

结合效率
[结合的hsDNA占总数的%]
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
91%
80%
78%
0%
80%
42%
0%
0%
DSC613G
DS61G
DS64G
D6G

图21

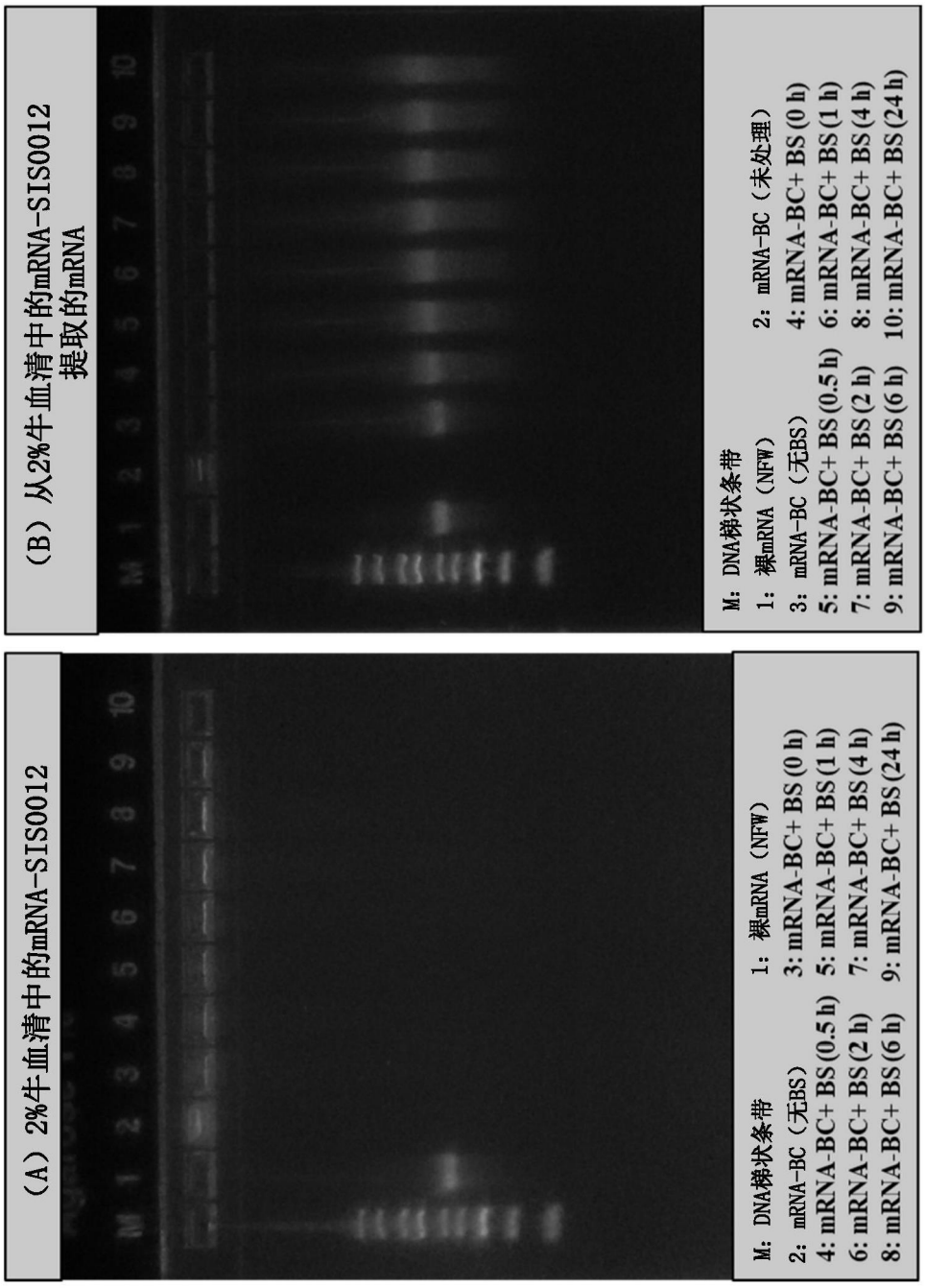

（A）2%牛血清中的mRNA-SIS0012
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
M：DNA梯状条带
1：裸mRNA（NFW）
2：mRNA-BC（无BS）
3：mRNA-BC+ BS (0 h)
4：mRNA-BC+ BS (0.5 h)
5：mRNA-BC+ BS (1 h)
6：mRNA-BC+ BS (2 h)
7：mRNA-BC+ BS (4 h)
8：mRNA-BC+ BS (6 h)
9：mRNA-BC+ BS (24 h)
（B）从2%牛血清中的mRNA-SIS0012提取的mRNA
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
M：DNA梯状条带
1：裸mRNA（NFW）
2：mRNA-BC（未处理）
3：mRNA-BC（无BS）
4：mRNA-BC+ BS (0 h)
5：mRNA-BC+ BS (0.5 h)
6：mRNA-BC+ BS (1 h)
7：mRNA-BC+ BS (2 h)
8：mRNA-BC+ BS (4 h)
9：mRNA-BC+ BS (6 h)
10：mRNA-BC+ BS (24 h)

图22

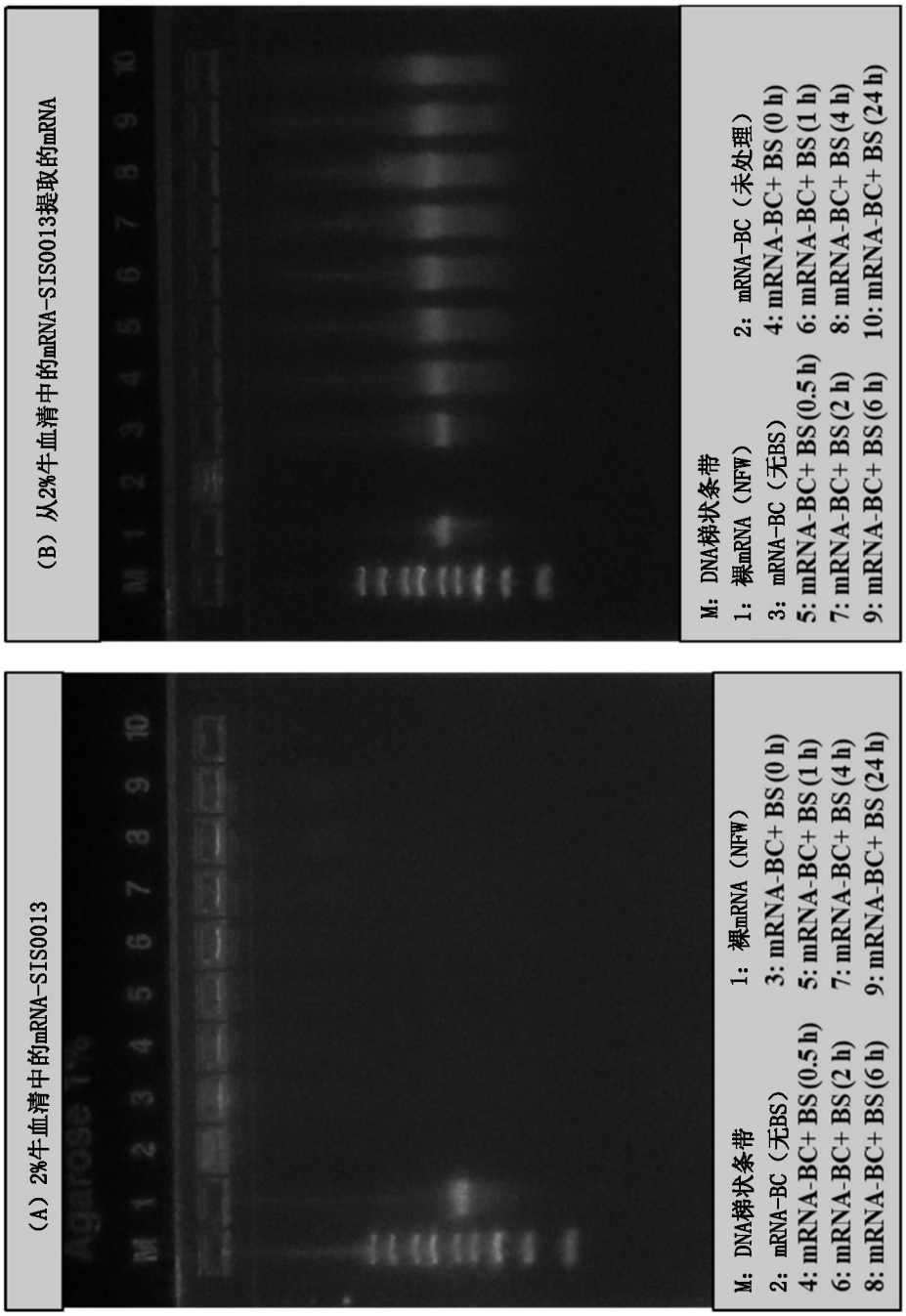

（A）2%牛血清中的mRNA-SIS0013
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
M：DNA梯状条带
1：裸mRNA（NFW）
2：mRNA-BC（无BS）
3：mRNA-BC+ BS (0 h)
4：mRNA-BC+ BS (0.5 h)
5：mRNA-BC+ BS (1 h)
6：mRNA-BC+ BS (2 h)
7：mRNA-BC+ BS (4 h)
8：mRNA-BC+ BS (6 h)
9：mRNA-BC+ BS (24 h)
（B）从2%牛血清中的mRNA-SIS0013提取的mRNA
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
M：DNA梯状条带
1：裸mRNA（NFW）
2：mRNA-BC（未处理）
3：mRNA-BC（无BS）
4：mRNA-BC+ BS (0 h)
5：mRNA-BC+ BS (0.5 h)
6：mRNA-BC+ BS (1 h)
7：mRNA-BC+ BS (2 h)
8：mRNA-BC+ BS (4 h)
9：mRNA-BC+ BS (6 h)
10：mRNA-BC+ BS (24 h)

图23

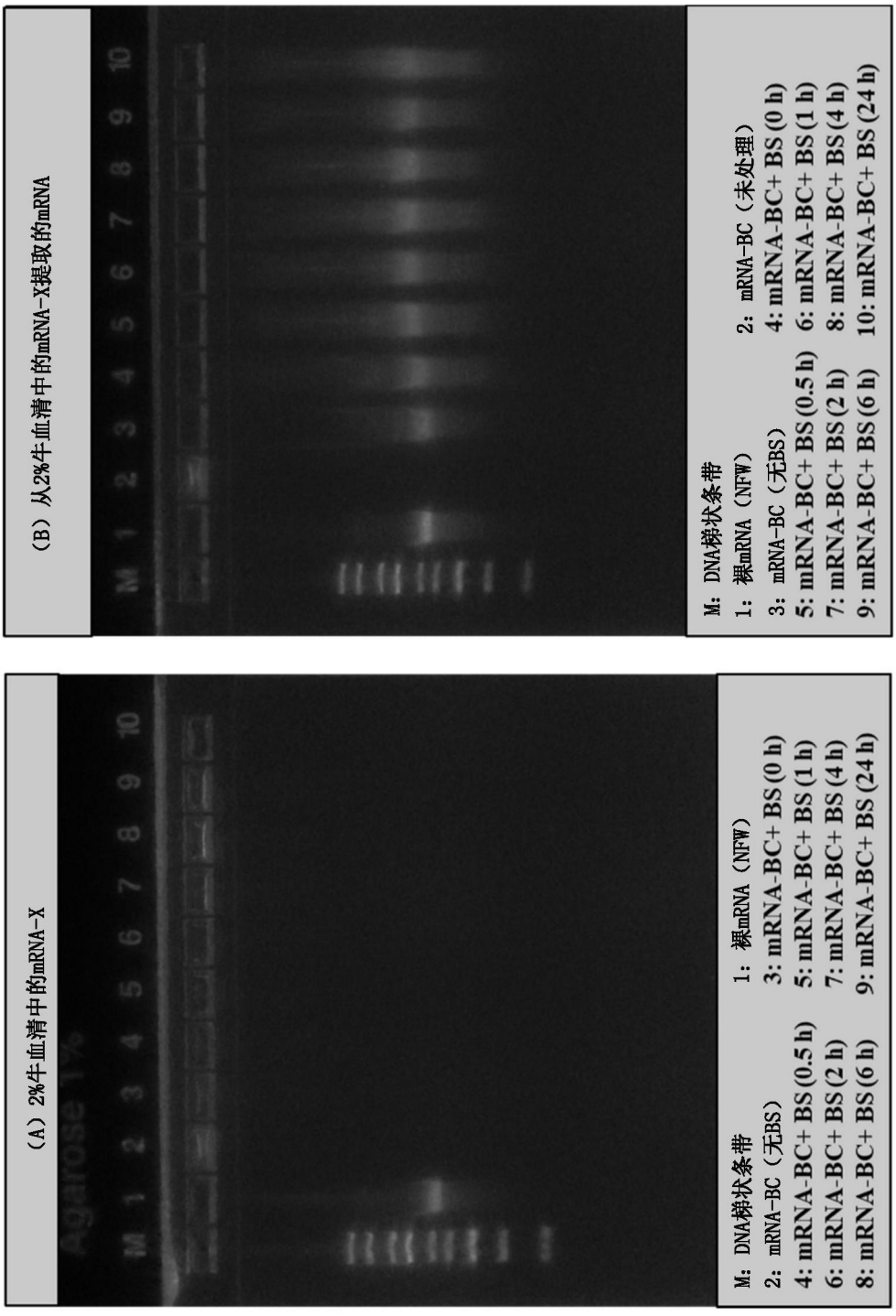

（A）2%牛血清中的mRNA-X
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
M：DNA梯状条带
1：裸mRNA（NFW）
2：mRNA-BC（无BS）
3：mRNA-BC+ BS (0 h)
4: mRNA-BC+ BS (0.5 h)
5: mRNA-BC+ BS (1 h)
6: mRNA-BC+ BS (2 h)
7: mRNA-BC+ BS (4 h)
8: mRNA-BC+ BS (6 h)
9: mRNA-BC+ BS (24 h)
（B）从2%牛血清中的mRNA-X提取的mRNA
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
M：DNA梯状条带
1：裸mRNA（NFW）
2：mRNA-BC（未处理）
3：mRNA-BC（无BS）
4: mRNA-BC+ BS (0 h)
5: mRNA-BC+ BS (0.5 h)
6: mRNA-BC+ BS (1 h)
7: mRNA-BC+ BS (2 h)
8: mRNA-BC+ BS (4 h)
9: mRNA-BC+ BS (6 h)
10: mRNA-BC+ BS (24 h)

图24

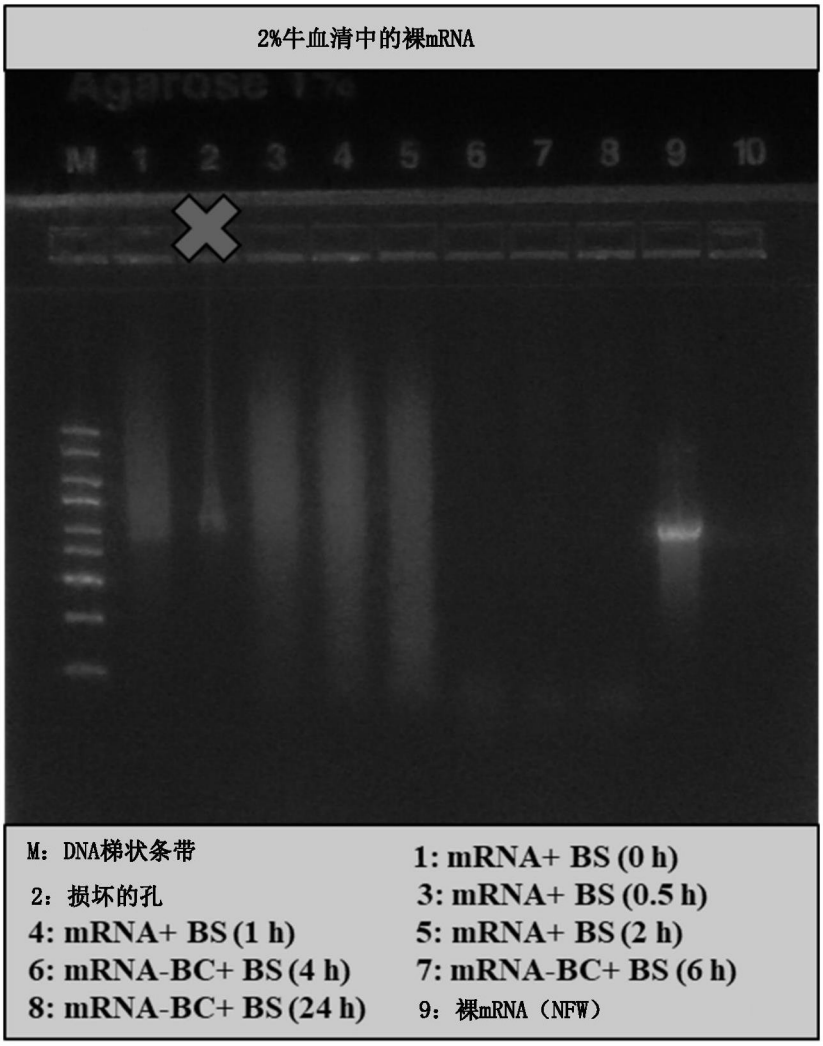

2%牛血清中的裸mRNA
Agarose 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
M：DNA梯状条带
1: mRNA+ BS (0 h)
2：损坏的孔
3: mRNA+ BS (0.5 h)
4: mRNA+ BS (1 h)
5: mRNA+ BS (2 h)
6: mRNA-BC+ BS (4 h)
7: mRNA-BC+ BS (6 h)
8: mRNA-BC+ BS (24 h)
9：裸mRNA（NFW）

图25