



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101970687 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 09

(21) 申请号 200880115447. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 11. 10

C12Q 1/68 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/551 (2006. 01)

61/002, 626 2007. 11. 09 US

G01N 33/553 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 05. 10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/012660 2008. 11. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02009/061515 EN 2009. 05. 14

(71) 申请人 东北大学

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 Y·T·高 A·凯勒 V·P·托奇林

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖

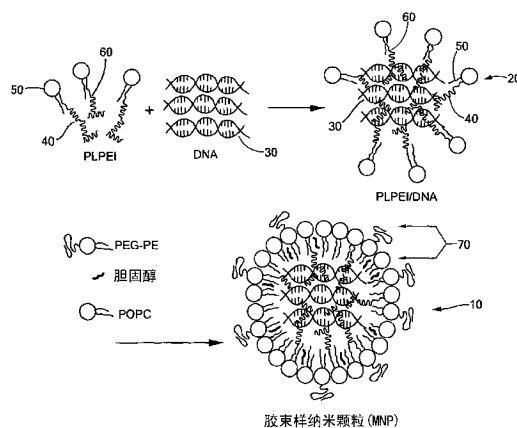
权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 7 页

(54) 发明名称

用于体内基因输送的自组装胶束样纳米颗粒

(57) 摘要

本发明提供了包含核酸并适合用作体内核酸输送剂的纳米颗粒。本发明纳米颗粒使用如聚乙烯和磷脂等聚阳离子共价缀合物。最终的包含DNA的纳米颗粒具有泡状结构,复合物核心被混合的脂质/PEI-脂质单层包裹,其制备简单,承载能力高,在体内稳定。本发明纳米颗粒有良好的体内稳定性和延长的血液循环时间,能够有效地将基因输送到生物靶位处,如肿瘤。



1. 一种纳米颗粒,包含为脂质单层所包裹的核心复合物,所述核心复合物包含与一个或多个阳离子聚合物分子静电结合的一个或多个核酸分子,所述阳离子聚合物与脂质单层内的第一脂质共价缀合。

2. 如权利要求 1 所述的纳米颗粒,其中的阳离子聚合物包含直链或分支聚乙烯亚胺、聚鸟氨酸、聚精氨酸、聚赖氨酸、聚丙烯胺、氨基葡聚糖、或它们的任意组合。

3. 如权利要求 1 所述的纳米颗粒,其中的第一脂质选自自由的天然的或合成的磷脂、糖脂、氨基脂、鞘脂、长链脂肪酸和甾醇组成的组。

4. 如权利要求 1 所述的纳米颗粒,其中的脂质单层还包含一种或多种非缀合的脂。

5. 如权利要求 4 所述的纳米颗粒,所述一种或多种非缀合磷脂分子选自自由的天然的或合成的磷脂、糖脂、氨基脂、鞘脂、长链脂肪酸和甾醇组成的组。

6. 如权利要求 4 所述的纳米颗粒,其中,一部分非缀合磷脂分子是 PEG 化的。

7. 如权利要求 6 所述的纳米颗粒,其中的脂质单层包含 PEG- 磷脂酰乙醇胺或 pNP-PEG-PE。

8. 如权利要求 1 所述的纳米颗粒,其中的脂质单层还包含胆固醇。

9. 如权利要求 8 所述的纳米颗粒,其中脂质单层包含摩尔比率为 4 : 3 : 3 的缀合的第一脂质、非缀合的脂和胆固醇。

10. 如权利要求 8 所述的纳米颗粒,还包含 PEG- 磷脂酰乙醇胺,其中脂质单层包含摩尔比为 4 : 3 : 3 : 0.3 的缀合的第一脂质、非缀合的脂、胆固醇和磷脂酰乙醇胺。

11. 如权利要求 1 所述的纳米颗粒,所述一个或多个核酸分子包括寡核苷酸、DNA 分子、RNA 分子或它们的任意组合。

12. 如权利要求 11 所述的纳米颗粒,所述一个或多个核酸分子包括质粒 DNA、RNAi、siRNA、反义寡核苷酸或核酶。

13. 如权利要求 11 所述的纳米颗粒,其中的一个或多个核酸分子包括治疗性基因。

14. 如权利要求 13 所述的纳米颗粒,其中的治疗性基因是细胞毒性基因或自杀基因。

15. 如权利要求 1 所述的纳米颗粒,其中的一个或多个核酸分子占所述颗粒重量的最多 40%。

16. 如权利要求 15 所述的纳米颗粒,其中的一个或多个核酸分子约占所述颗粒重量的 25%。

17. 如权利要求 1 所述的纳米颗粒,其中的阳离子聚合物共价连接到所述第一脂质的烷基链或酰基链的末端

18. 如权利要求 1 所述的纳米颗粒,所述颗粒直径约 50nm。

19. 包含权利要求 1 所述颗粒的非病毒载体。

20. 如权利要求 19 所述的载体,还包含靶向剂。

21. 如权利要求 20 所述的载体,其中的靶向剂选自抗体或其抗原结合片段、单链抗体、域抗体、细胞表面受体的配体、和生物素组成的组。

22. 如权利要求 21 所述的载体,其中的靶向剂通过可断裂的键与所述载体相连。

23. 如权利要求 22 所述的载体,其中可断裂的键在低 pH 下断裂。

24. 如权利要求 23 所述的载体,其中可断裂的键是腙键。

25. 如权利要求 22 所述的载体,其中可断裂的键是连接阳离子聚合物和第一脂质分子

的键。

26. 制备权利要求 1 所述纳米颗粒的方法,所述纳米颗粒包含为脂质单层所包裹的核心复合物,该方法包括:

(a) 提供核酸、阳离子聚合物-脂质共价缀合物和一种或多种非缀合脂质;

(b) 在适合形成核心复合物的条件下使核酸分子与阳离子聚合物-脂缀合物相接触,所述核心复合物包含与缀合物的阳离子聚合物部分静电结合的核酸;和

(c) 使核心复合物与非缀合脂质接触以形成脂质单分子层。

27. 如权利要求 26 所述的方法,在步骤 (b) 中,核酸和阳离子聚合物-脂缀合物在溶液中相接触以形成核心复合物。

28. 如权利要求 26 所述的方法,其中,提供的非缀合脂质呈干燥膜的形式,在步骤 (c) 前该干燥膜水合。

29. 如权利要求 27 所述的方法,其中,提供的非缀合脂质呈干燥膜的形式,在步骤 (c) 中用步骤 (b) 得到的水悬液使该干燥膜水合。

30. 如权利要求 26 所述的方法,还包括在步骤 (c) 前向非缀合脂质中加入一种选自由中性脂质、糖脂、PEG 化脂质、生物素化脂质、酰化蛋白质或糖蛋白、与脂质缀合的蛋白或糖蛋白、抗体或其抗原结合片段、单链抗体、域抗体、以及细胞表面受体的配体组成的组的成分。

31. 如权利要求 30 所述的方法,其中,加入了中性脂质,该中性脂质为胆固醇。

32. 如权利要求 30 所述的方法,其中,加入了 PEG 化的脂质,PEG 化的脂质是 PEG-磷酸乙醇胺或 pNP-PEG-PE。

33. 如权利要求 32 所述的方法,其中加入了中性脂质,所述中性脂质为胆固醇,聚合物-脂质缀合物、非缀合脂质、胆固醇和 PEG-磷酸乙醇胺的摩尔比为 4 : 3 : 3 : 0.3。

34. 转染细胞的方法,该方法包括将细胞与权利要求 19 所述的非病毒载体相接触,载体的核酸分子被转入细胞。

35. 抑制细胞中基因表达的方法,该方法包括使细胞与权利要求 1 所述的纳米颗粒相接触,所述纳米颗粒中包含 siRNA 或 RNAi,所述 siRNA 或 RNAi 被转入细胞并抑制基因表达。

36. 治疗有疾病或症状的对象的方法,该方法包括给予对象权利要求 19 所述的非病毒载体,其中的核酸被转入对象的细胞,以此治疗疾病或症状。

37. 如权利要求 36 所述的方法,其中的疾病是癌症。

38. 如权利要求 37 所述的方法,其中的载体被靶向肿瘤。

39. 一种化学缀合物,包含与脂质的酰基链或烷基链末端共价结合的阳离子聚合物。

40. 如权利要求 39 所述的化学缀合物,包含聚乙烯亚胺。

41. 如权利要求 40 所述的化学缀合物,其由 1-棕榈酰-2-壬二酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱与分支聚乙烯亚胺反应形成。

42. 权利要求 39 所述化学缀合物与核酸的复合物。

43. 一种胶束、脂质单层或脂质双层结构,包含权利要求 39 所述的缀合物。

用于体内基因输送的自组装胶束样纳米颗粒

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本发明要求 2007 年 11 月 9 日提交的,名为基因输送纳米颗粒的美国临时申请 No. 61/002,626 号的优先权,该申请整体纳入本文作为参考。

[0003] 关于联邦政府资助研究或开发的声明

[0004] 本发明的研究是使用国立卫生研究院 No. R01HL55519 号拨款,在美国政府支持下进行的。因此,美国政府拥有本发明的某些权利。

[0005] 发明背景

[0006] 体内基因治疗依赖于基于 DNA 的药物的输送,形式可以是将寡核苷酸(反义寡聚脱氧核苷酸(ODN)siRNA)或者整个基因(质粒 DNA)输送进入其在细胞内起作用的位置。除了少数可以局部施药的例外情况,基因治疗的广泛临床应用还需要发展非侵入性的输送方法。非病毒系统是一种理想的 DNA 载体,因为其操作安全、简单,而且费用低于病毒系统。

[0007] 在非病毒基因输送系统中,已经研究了基于聚合物的复合物和基于脂质的系统,脂质体复合物或包载 DNA 脂质体,但其在临床应用中显示出局限性。这主要是由于缺乏体内稳定性以致不能在治疗水平上输送基因治疗剂到达靶位置。结合了基于聚合物的系统和基于脂质的系统的三级脂质体系统也已经被研究。其中,包封了 PEI/DNA 复合物的脂质体纳米颗粒,如 bioPSL 或 pSPLP,已经被计划和测试在体内应用,得到结果是有希望的。然而,尽管在体内稳定而且达到靶位置的循环时间长,组合系统包括复杂耗时的制备步骤而且承载能力低。

[0008] 阳离子聚合物聚乙烯亚胺(聚乙烯亚胺,PEI)及其衍生物已经被广泛的研究应用于基因输送 [1-5]。PEI 具有独特的优势,其在合成的聚阳离子中有最高的正电荷密度,使其可以在静电作用下与 DNA 有效凝聚。PEI 还有一种内在机制,通过所谓的“质子海绵”机制 [1,2] 和核定位 [6] 调节“内体逃逸”,这使其具有高转染效率。在分子量从约 1 到 800kDa 的宽范围内,线性或分支状形式的,低分子量 PEI 已经被证明有良好的耐受性和低毒性 [7]。

[0009] 然而,由于在循环过程中的快速清除和 RES(网状内皮系统)中的积累,PEI/DNA 复合物形式的 PEI 在体内没有显示出显著的疗效。这主要归因于复合物整体的正电荷。尽管复合物的正电荷与细胞膜带负电的成分相互作用促进了复合物的吸收,它们也会与血液成分发生相互作用和调理作用,使复合物在血液循环中被快速清除。结果是,已有的 PEI/DNA 复合物几分钟内就会被从血液循环中清除,主要积累在 RES 器官中,例如肝和脾 [8]。当注入身体时,这些 PEI/DNA 复合物在生理环境中还会发生 DNA 解离和聚合,这些因素限制了已知的 PEI/DNA 复合物的体内应用。

[0010] 曾经尝试过几种方法以改进 PEI/DNA 复合物的体内稳定性 [3,5,9]。如在其他纳米颗粒系统 [10] 中一样,已经使用聚(乙二醇)(PEG)来提高此类复合物的体内稳定性并延长其循环时间。为此目的,已经将 PEG 共价连接到制备好的 PEI/DNA 复合物上 [11],或使用连接了 PEG 的 PEI 与 DNA 形成复合物 [12]。制备好的 PEI/DNA 复合物也可以使用阴离子肽和 PEG 的共聚物包被上 PEG [13]。在结合 PEI 和脂质体的技术中,连接了脂质的 PEI 如软质酸酯 PEI [14] 和胆固醇 PEI [15] 已经被用于制备装载 DNA 的聚阳离子脂质体 (PCL)。也

已将制备好的 PEI/DNA 复合物包封在 PEG 稳定化的脂质体中,制成所谓的“预浓缩稳定质粒脂质颗粒”(pSPLP) [16]。然而,很明显还需要其他的方式提高体内基因治疗的成功率。

[0011] 在非病毒基因输送系统中,已经研究了基于聚合物的复合物和基于脂质的系统,脂质体复合物或包载 DNA 脂质体,但其在临床应用中显示出局限性。这主要是由于缺乏体内稳定性以致不能在治疗水平上输送基因治疗剂到达靶位置。结合了基于聚合物的系统和基于脂质的系统的三级脂质体复合物也已经被研究。其中,包封了 PEI/DNA 复合物的脂质体纳米颗粒,如 bioPSL 或 pSPLP,已经被计划和测试在体内应用,得到结果是有希望的。然而,尽管在体内稳定而且达到靶位置的循环时间长,组合系统包括复杂耗时的制备步骤而且承载能力低。

[0012] 发明简述

[0013] 为满足这样的需求,开发了一种装载了核酸,如质粒 DNA 或 siRNA 的新型胶束状纳米颗粒 (MNP),以及一种构建输送基因的纳米颗粒的新方法。首先将阳离子聚合物,如聚乙烯亚胺 (PEI),结合到磷脂烷基或酰基链的末端,产生磷脂-聚乙烯亚胺 (PLPEI) 缀合物。随后将 PLPEI 与核酸,如质粒 DNA、寡核苷酸(如反义寡核苷酸)、RNA 或核酶混合,以形成大小在纳米尺度上并具有 PEI/核酸 (PEI/NA) 复合物核心和磷脂单层(即单分子层)外膜结构的复合物。PLPEI 的带阳离子的 PEI 基团和带阴离子的核酸之间的静电相互作用提供了形成纳米颗粒的驱动力。PLPEI 缀合物的磷脂基团在疏水相互作用下排列成单分子层。将非修饰的(即非缀合的)磷脂如 POPC,胆固醇添加到 PLPEI/核酸复合物中以补充环绕 PEI/核酸核心的脂质单分子层。还加入了 PEG-PE 以提供纳米颗粒立构稳化。非修饰的脂质和 PEG-PE 通过疏水相互作用被纳入单分子层中。最终的结构是空间稳定的胶束样纳米颗粒。

[0014] 在优选的实施方案中,本发明的纳米颗粒基于磷脂和聚乙烯亚胺 (PLPEI) 之间的共价缀合物,PEG-PE 以及脂质的组合。磷脂-聚乙烯亚胺缀合物在质粒 DNA、非修饰的脂质和 PEG-PE 存在的情况下会自组装成由脂质单层包裹硬核的胶束样纳米颗粒,所得到的纳米颗粒的结构、性质适于体内应用。

[0015] 本发明的纳米颗粒,一种新的基因输送结构,是无毒,可长期循环的,并且能够在体内有效的向 RES 位置和其他器官转染治疗核酸。本发明结合了基于聚合物的基因输送系统和基于脂质的基因输送系统,得到了一种磷脂和聚合物的化学缀合物的新用法。将聚乙烯亚胺 (PEI) 缀合在磷脂烷基链的末端 () 产生了一种新的化学物质,磷脂-聚乙烯亚胺 (PLPEI) 缀合物。PLPEI 的两个功能区域, i) DNA 结合区和 ii) 膜形成区,分别由 PEI 和 PL 基团形成。在 DNA 存在的情况下,PLPEI 通过聚阳离子 PEI 和聚阴离子 DNA 间的静电相互作用自组装成纳米颗粒。脂质基团间的疏水相互作用也促进了自组装过程。自组装的纳米颗粒具有独特的结构,其中 PEI/NA 复合物核心和脂质单层外膜由化学键连接。本发明纳米颗粒不同于脂质体纳米颗粒等,脂质体纳米颗粒中,脂质形成双分子层而非单分子层。本发明纳米颗粒也不同于胶束,胶束完全由疏水相互作用组装而成,并有“临界胶态粒子浓度”的限制。

[0016] 本发明的优点在于提供了简单的、可重复的一步制备方法以及相对于其他包封 PEI/DNA 复合物的脂质体纳米颗粒如 bioPSL 和 pSPLP,更高的承载能力。本发明的纳米颗粒还提供了约 25% (w/w) 的高 DNA 承载能力,大约是文献已经报道的其他系统值的 10 倍。

此处使用的“DNA 承载能力”或“核酸承载能力”是指能包含入本发明的纳米颗粒的 DNA 或其他核酸的量。

[0017] 附图简述

[0018] 本发明的其他特征和优点在下文结合附图的优选实施方案以及权利要求中展示。

[0019] 图 1 显示 PEI/DNA 核心为磷脂单层所包围的胶束样纳米颗粒 (MNP) 自组装过程的示意图。通过 DNA 和磷脂-聚乙烯亚胺缀合物 (PLPEI) 形成复合物, 随后用脂质单层包封该复合物, MNP 在水介质中自发形成。PLPEI 的 PEI 基团与 DNA 致密结合, 得到一个疏水核心, 而 PLPEI 的磷脂基团与非修饰的脂以及 PEG-PE 形成环绕 PEI/DNA 核心的脂质单层。结合了 PEG-PE 的脂质单层也提供了体内稳定性。

[0020] 图 2a-2b 显示对 MNP 形成的分析。(图 2a) 不同 N/P 比率下, PLPEI/DNA 复合物对比 PEI/DNA 复合物的琼脂糖凝胶电泳。没有 DNA 迁移到胶中说明复合物形成。在 $N/P \geq 6$ 时, DNA 完全与 PLPEI 结合。PLPEI 显示出的结合能力与非修饰 PEI 相当。(图 2b) MNP 的冷冻断裂电子显微镜 (ffTEM) 分析。MNP 显示为平均直径 50nm、大小分散范围窄、成型良好的球形颗粒。所有颗粒都显示出结构背后的阴影, 证实了胶束样“核”和“单分子层”的构造。比例尺表示 50nm。

[0021] 图 3a-3b 显示了 MNP 的稳定性分析。(图 3a) MNP 对抗盐诱导的聚集的胶体稳定性。监测了加入盐 (0.15M NaCl) 前后的流体力学直径 (hydrodynamic diameter)。加盐后, MNP 保持稳定而 PEI/DNA 迅速聚集。数据以平均 \pm s. e. m 表示 ($n = 3$)。(图 3b) 对 MNP 中所携带 DNA 的抗酶解保护。携带 DNA 的 MNP 和 PEI/DNA 复合物在经 DNAase I 处理后, 在 0.8% 的预制琼脂糖凝胶上进行分析, MNP 中的 DNA 完全被保护而未被酶解。泳道 1, DNA; 泳道 2, DNA, DNase; 泳道 3, PEI/DNA; 泳道 4, PEI/DNA, DNase; 泳道 5, MNP; 泳道 6, MNP, DNase; 泳道 7, 100 碱基对的标记物。

[0022] 图 4 显示了 MNP 对 NIH/3T3 细胞的毒性。成纤维细胞 NIH/3T3 用不同 PEI 浓度的携带了 DNA 的 MNP 或 PEI/DNA 复合物处理。相对细胞存活率表示为相对于以培养基处理的对照细胞的百分比。相比 PEI/DNA 复合物, 4 小时的处理后再经 24 小时温育, MNP 没有显示出毒性。

[0023] 图 5a-5b 显示了装载了 DNA 的 MNP 和 PEI/DNA 复合物在小鼠中的体内表现: 静脉 (i. v.) 注射携有 ^{111}In - 标记的 DNA 的药剂后, (a) 血液浓度-时间曲线 (注意对数尺度), 和 (b) DNA 在器官中的积累情况。注射后不同的时间采集血样, 在最后一次采血后采集主要器官。血液和器官样品的放射性使用伽玛计量器来测量, 并表示为相对于每毫升血液或每克器官注射剂量的百分比表示 (% ID/ml 或 % ID/g)。相比 PEI/DNA 复合物, MNP 显示出更长的血液循环时间和更低的 RES 吸收。p 值是先用双向方差分析 (ANOVA) 然后用 Bonferroni post-hoc 检验测定的。

[0024] 图 6a-6b 显示了携带 pGFP 的 MNP 在鼠异种移植物模型中的体内转染结果。患 LLC 肿瘤的鼠静脉注射携带 pGFP 的 MNP。注射后 48 小时, 检测 GFP 在肿瘤中的表达。图中显示了体内生长的 LLC 肿瘤冷冻切片的荧光显微镜图像。(a) 未经处理的动物的肿瘤切片 (背景图案); (b) 注射了携带 pGFP 的 MNP 的动物的肿瘤切片。静脉注射携带 pGFP 的 MNP 使末端的肿瘤出现明亮的荧光。由于注射相同 DNA 含量的 PEI/DNA 复合物后动物很快死亡, 没有检测接受 PEI/DNA 复合物注射的动物的肿瘤组织中的 GFP 表达。

[0025] 发明详述

[0026] 发明人开发了一种适合体内应用的新型基因输送载体。该载体可通过在烷基链末端化学缀合磷脂和聚阳离子,如聚乙烯亚胺 (PLPEI) 来构建。受聚阳离子 PEI 基团和 DNA 间的静电相互作用力驱动形成了致密的 PEI/DNA 复合物核心,同时,两亲性的磷脂基团与选择性加入的非修饰游离磷脂和连接了 PEG 的磷脂 (如 PEG-PE) 一起形成环绕复合物核心的脂质单层外膜,由此形成携带有 DNA 的胶束样纳米颗粒,该纳米颗粒具有 PEG 链的空间位阻和脂质单层外膜的膜样屏障提供的稳定性。

[0027] 与取得了巨大成功的空间稳化 (steric stabilization) 脂质体不同 [20], 聚乙二醇 (PEG) 赋予复合物的立构稳化没能提供足够的循环时间和体内稳定性 [8]。而本发明通过交联聚合物 /DNA 复合物 (polyplexes) 的表面 [9] 将空间稳定与“侧向稳定 (lateral stabilization)”相结合,取得了重大的改进。这表明立构稳化对聚合物 /DNA 复合物的体内稳定作用有限,需要其他稳定机制来加强复合物的体内稳定性。

[0028] 其他稳化作用可以通过用脂质屏障包封聚合物 /DNA 复合物来实现,因为盐不能透过脂质屏障,从而保护了复合物不会因受到盐的影响而不稳定。在血液循环中,由于复合物核心与生物环境相隔离,此类系统的体内表现主要取决于脂质屏障。脂质屏障的立构稳化作用延长了有载复合物的循环时间,并使复合物能够通过 EPR 机制被输送 RES 之外的其他靶器官。此外,被细胞吸收后,PEI 仍将发挥其良好的功能,例如渗透活性和抗胞质核酸酶保护,从而改进 DNA 分子的细胞内药代动力学特性。

[0029] 此外,胶束样纳米颗粒还受到来自脂质单层外膜的稳定化作用,该脂质单层受到 PLPEI 以及自由脂质和 PEG- 脂质中脂质基团之间疏水相互作用的驱动自动组装而成。MNP 对盐引起的聚集和酶消化的强抵抗力证实了这样的脂质单分子层屏障的存在。生理环境的高盐是引起 PEI/DNA 复合物在体内不稳定的机制之一 [8]。这些复合物通过聚阳离子 PEI 和聚阴离子 DNA 之间的强静电相互作用形成,并且由颗粒间的静电斥力稳定在胶态。然而,在生理环境中,升高的盐浓度会引起复合物颗粒聚集,原因在于聚合物 /DNA 复合物颗粒间的静电斥力被破坏,同时,由于聚阳离子和聚阴离子 DNA 之间的静电相互吸引被破坏,复合物颗粒发生解离 [21]。尽管 PEG 链的立构稳化作用降低了 PEG 接枝 PEI/DNA 复合物对盐引发的聚集的敏感度,复合物稳定性一般表明单纯的立构稳化作用有限,还需要其他稳定机制来防止复合物聚集 [12, 22-24]。不能盐不透性脂质屏障的存在提高了高盐环境中 MNP 的稳定性。脂质单层屏障,与脂质体一样,阻止了外环境中的盐进到复合物核心,由此提供了抗盐引起的聚集的保护,否则,聚合物 /DNA 复合物将是不稳定的。没有游离脂质的中间产物 PLPEI/DNA 复合物发生的中等程度聚集表明:仅靠 PLPEI 缀合物的磷脂基团提供的脂质屏障似乎不及补充了非缀合脂质的缀合磷脂所提供的那样完全。

[0030] 选择 PEG- 脂质如 PEG-PE 合适的量以促进游离脂质进入已制备好的复合物并提供对最终构造物的立构稳化作用。考虑到随着混合物中 PEG-PE 含量增加 (胶束形成始于约 5mol%), PEG-PE 与磷脂的混合物从胶束相转变为层状相 [25, 26], 游离脂质混合物水悬浮液的 PEG-PE 浓度为 10mol% 有利于胶束相转变为层状相。与已制备好的 PLPEI/DNA 复合物共同温育后,包括游离脂质和缀合脂质在内总脂质中的 PEG-PE 含量下降至 4.3mol%, 在此浓度倾向于形成层状相。本发明还发现,胶束相中的 PEG-PE 分子会通过所谓的“胶束转移” [27] 自发进入已制备好的磷脂囊泡表面。可以认为,游离脂质会与 PLPEI/DNA 复合物

的疏水脂质区相互作用,解离成单体后自发进入已制备好的复合物的脂质层,从而与 PLPEI 缀合物提供的磷脂基团一起形成环绕复合物核心的脂质单层外膜。最终结构是一种具有 PEI/DNA 复合物核心和脂质单层外膜的,经立构稳化的胶束样硬核颗粒。

[0031] Pluronic P123-接枝的 PEI/DNA 复合物系统被认为具有类似的基于疏水相互作用的稳定机制 [28,29],在该复合物系统中,Pluronic P123-接枝 PEI 的两亲 Pluronic P123 链形成环绕聚合物/DNA 复合物核心的胶束样结构,非修饰的 Pluronic P123 则通过与 Pluronic P123-接枝 PEI 缀合物的疏水相互作用填充到复合物中,从而优化胶束样结构的稳定性。

[0032] 胶束样纳米颗粒,在一定意义上,类似于将聚赖氨酸/DNA 包封在靶向叶酸的阴离子脂质体中的所谓的“脂质体包封的聚阳离子凝缩 DNA 颗粒”(LDP II) [30],或将 PEI/DNA 复合物包封在已制备好的阴离子脂质体中的“人造病毒样颗粒” [31-33],或将 PEI/DNA 复合物包封在由外部 PEG 层稳定的脂质双层(即双分子层)中构成的“预凝缩稳定质粒脂质颗粒”(pSPLP) [16]。特别是,pSPLP 表现出了将聚合物/DNA 复合物包封在稳定化脂质体中的优点,即由于循环时间延长得以实现 PEI/DNA 复合物向肿瘤全身性的有效输送,以及 PEI 溶内体(endosomolytic)活性带来的转染效力提高。然而,pSPLP 的制备包括将已制备好的聚合物/DNA 复合物与脂质在乙醇(有机溶剂)中进行温育,这一步具有潜在的破坏性,因而需要多个步骤的浓缩和透析。

[0033] 胶束样纳米颗粒的优点在于将脂质体和经立构稳化的脂质膜结合,尽管此处的脂质膜为单层膜。PLPEI 缀合物促成了由同时发生的 DNA 凝缩和脂质膜形成共同完成的携带 DNA 的 MNP 的自组装过程。与脂质体包封的 DNA-PEI 复合物相比,MNP 提供了效率 100% 的更方便的一步法 DNA 加载,还提供了高于各种将 DNA 包封入脂质体之类其他方法 [34] 的承载能力(高达 $530 \mu\text{gDNA}/\mu\text{mol}$ 总脂,或总颗粒质量的 30% 为核酸)。

[0034] 本发明的胶束样纳米颗粒 10 包括一个包封在脂质单层中的核心复合物(见图 1)。核心复合物 20 含有一个或多个核酸分子 30,核酸分子与一个或多个阳离子聚合物分子 40 如 PEI 静电结合。阳离子聚合物与脂质单层外膜上的脂分子 50 共价缀合。一方面,阳离子聚合物结合和包裹核酸从而形成纳米颗粒的核心复合物。另一方面,阳离子聚合物与脂质分子—优选磷脂—的疏水区域的共价连接 60 使得复合物核心被脂质单分子层 70 所包封,提高了稳定性以及与细胞膜融合的能力。

[0035] 胶束样纳米颗粒的平均直径可以从约 10nm 至约 1000nm,优选约 10nm 至约 500nm,更优选约 10nm 至约 200nm,再优选约 40nm 至约 100nm 或从约 50nm 至约 70nm。MNP 的大小适于其进入细胞并将其所带的核酸成分转移到细胞质中。

[0036] 阳离子聚合物可以是任何人造的或者天然的聚合物,每分子具有至少两个正电荷,并有足够的电荷密度和分子大小从而能够在生理条件下(即,体内或细胞内可能遇到的 pH 和盐环境)与核酸结合。适合的阳离子聚合物包括,例如,聚乙烯亚胺、聚鸟氨酸、聚精氨酸、聚赖氨酸、聚烯丙胺和氨基葡聚糖。阳离子聚合物可以是直链或分支的,可以是均聚物或共聚物,包含的氨基酸可以是 L 或 D 型,也可以是这些特征的任意组合。优选的,阳离子聚合物分子足够柔韧使其可以与一个或多个核酸分子形成紧密的复合物。

[0037] 与阳离子聚合物缀合的脂质分子在此处被称为“第一脂质”、“第一磷脂”、“缀合的脂质”或“缀合的磷脂”。适合的脂质包括任何如下所述天然的或合成的双亲(amphipathic)

脂（也被称为两亲（amphiphilic）脂）：能够与其他双亲脂一起稳定的形成或进入质脂单层或双层。脂质的疏水基团与脂质单层或双层的疏水区域相接触，其极性头部指向外部的的水相，脂质单层或双层的极性表面，并且，在此情况下，朝向纳米颗粒的外表面。双亲脂的亲水性源于极性或带电基团的存在，如碳水化合物、磷酸基、羧基、硫酸根、氨基、巯基、硝基，羟基之类。两亲脂的疏水部分可以来自其包含的非极性基团，包括长链饱和或不饱和脂族烃基以及被一个或多个芳烃、脂族环或杂环基取代的此类基团。两亲脂的例子包括但不限于，天然或合成的磷脂、糖脂、氨基脂、鞘脂、长链脂肪酸和甾醇。磷脂的代表性的例子包括，但不仅限于，卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷酸肌醇、磷脂酸、软质酰油酰、卵磷脂、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酸磷酸酯酰胆碱、二硬脂酰卵磷脂和二亚油酰磷脂酰胆碱。缺乏磷的其他化合物，如鞘脂、糖鞘脂、甘油二酯和 β - 酰基含氧酸也可以用作两亲脂。

[0038] 在某些实施方案中，本发明的纳米颗粒包含未与阳离子聚合物缀合的其他脂质（“非缀合的脂质”或“法缀合的磷脂”）。这些非缀合的其他脂质具有稳定和完美脂质单层外膜的作用，并看作为稳定基团（如 PEG）或靶向基团的连接位点。非缀合的脂可以是上面记载的两亲脂，如磷脂，也可以包含如甘油三酯和甾醇等其他脂（如胆固醇）。纳米颗粒中缀合的和非缀合的脂质中至少一种是形成脂质双层的脂质，如磷脂。在优选的实施方案中，纳米颗粒的脂质单层包含缀合脂质作为第一部分，非缀合脂质作为第二部分和胆固醇作为第三部分。每部分的相对含量可以不同，但优选每种缀合脂质和非缀合脂质占单层脂质的摩尔分数约为 10 到 70%，胆固醇占单层脂质的摩尔分数约为 1 到 30% 或 5% - 20%。例如，在一个实施方案中，脂质单层包含缀合的脂、非缀合的脂和胆固醇，比例为 4 : 3 : 3。

[0039] MNP 的脂质单层还可以包含多种其他分子组分，用于例如稳定或标记颗粒或使其具有靶向功能。这些组分包括肽、蛋白质、去垢剂、脂质衍生物，特别是 PEG- 脂质衍生物，如连接了二烷基氧丙基、甘油二酯、磷脂酰乙醇胺和神经酰胺结合的 PEG（见，如美国专利 No. 5, 885, 613, 通过引用将其纳入本文）。在某些实施方案中，纳米颗粒基本上不含去垢剂。脂质单层加有 PEG- 脂时，PEG- 脂的量优选占脂质单层重量的约 0.5 到 20%，更优约 1 到 10%，再优选约 2 到 5%。在一个优选的实施例中，纳米颗粒的脂质单层包含缀合的脂、非缀合的脂、胆固醇和 PEG-PE，摩尔比为 4 : 3 : 3 : 0.3。

[0040] 可用于将肽或蛋白质连接到纳米颗粒上的一种脂质衍生物为对硝基苯羰基 PEG-PE (pNP-PEG-PE)。游离氨基，如抗体或其它蛋白质分子上的游离氨基，可以与 pNP 基团反应，从而将靶向基团共价结合到纳米颗粒上。见，例如 *Liposomes: A Practical Approach*, V. P. Torchelin and V. Weissig, Oxford University Press, 2003, 通过引用将其纳入本文。

[0041] 纳米颗粒中央的核心复合物除阳离子聚合物，还包括一个或多个核酸分子。这些核酸分子用于转移入活细胞或组织内并在其中发挥其生物学作用。术语“核酸”指脱氧核苷酸或核苷酸以及它们单链或双链形式的聚合物（DNA 或 RNA）。该术语的核酸包括含有已知核苷酸类似物、修饰骨架残基或修饰连接的核酸，可以是合成的或天然存在的。类似物的例子包括但不限于：硫代磷酸酯、磷酰胺、甲基磷酸酯、手性甲基磷酸酯、2-O- 甲基核苷酸和肽-核酸（PNAs）。DNA 可以是反义 DNA、质粒 DNA、部分质粒 DNA、预凝缩 DNA、聚合酶链式反应（PCR）产物、载体（P1、PAC、BAC、YAC、人工染色体）、表达盒、嵌合序列、染色体 DNA、或

这些物质的衍生物。术语核酸可以与术语基因、cDNA、基因编码的 mRNA 和干扰 RNA 分子交换使用。术语“基因”指包括生产多肽或多肽前体所需的部分或全长编码序列的核酸（如 DNA 或 RNA）序列。

[0042] 术语“RNAi”指能够减少或抑制靶基因表达的双链 RNA，当干扰 RNA 与靶基因处于同一细胞中时，干扰 RNA 会引起与干扰 RNA 序列互补的 mRNA 的降解。因此 RNAi 指由两条互补链或一条自我互补的单链形成的双链 RNA。RNAi 与靶基因通常基本上或完全一致。干扰 RNA 的序列可以对应靶基因的全长序列或其子序列。RNAi 包括小干扰 RNA 或“siRNA”。siRNA 长度约 15-60、15-50、15-50、或 15-40 个碱基对，更常见的约 15-30、15-25 或 19-25 个碱基对，优选长约 20-24 或约 21-22 或 21-23 个碱基对。siRNA 双链体可能具有约 1 到 4 个核苷酸的 3' 端突出，优选约 2 到 3 个核苷酸，还可能具有 5' 磷酸末端。siRNA 可以是化学合成的或质粒编码的。siRNA 也可以由较长的 dsDNA 剪切而来。优选的，dsDNA 长度至少约 100、200、300、400 或 500 个核苷酸。dsDNA 可能长达 1000、1500、2000、5000 个核苷酸或更长。dsDNA 可以编码整个基因转录产物或部分基因转录产物。

[0043] 应调整组装本发明纳米颗粒的阳离子聚合物与核酸的比率以确保所有的核酸都形成复合物。下面的实施例中描述了使用凝胶电泳的方法实现这一目标。一般来说，胺和磷的比率 (N/P) 以约 1 到 20 为宜。优选约 10 的比率。单个 MNP 的核酸装载量范围较宽。组装完成后 MNP 的核酸含量以重量计可以高达 40%，这大大高于此前的含核酸纳米颗粒所能携带的量。对于某些技术，可能仅需要非常少量的核酸，甚至不需要核酸（如，对照颗粒），在这样的情况下，一部分阳离子聚合物可以与阴离子聚合物（如，羟甲基纤维素）复合形成稳定的核心。阳离子聚合物中带电基团和核酸的比例根据两者共处所在溶液的 pH 值而不同。可以设计聚合物以使预定比例的可离子化基团带电以与核酸结合。例如，在某些实施方案中，至少约 10% 的基团带电，而在优选的实施方案中，在形成过程中以及在完成后的核心复合物中，聚合物约 50 到 100% 的基团带电。

[0044] 通常，本发明的 MNPs 用于下调或消除目的基因产物的表达。或者，可以将治疗基因输送到特定细胞内替换有缺陷的基因，增加基因产物的表达，或调节其他基因的表达。许多适合本发明 MNPs 的靶基因产物是本领域技术人员公知的。这些产物包括但不限于：与病毒感染和恢复相关的基因、与代谢疾病和紊乱相关的基因、与肿瘤的发生和细胞转化相关的基因、血管新生基因、免疫调节基因如那些与炎症和自身免疫反应相关的基因、配体受体基因、以及与神经退行性疾病相关的基因。可由使用者来选择适合的目标，使用者可以按照常规选择适合的 RNAi 或治疗基因。

[0045] 本发明还提供了一种包括上述纳米颗粒的非病毒载体。该载体具有含核酸-阳离子聚合复合物的核心复合物以及含有第一磷脂且该第一磷脂在末端（疏水性）与阳离子聚合物缀合的脂质单层外膜，并且，该载体适合将核酸从核心复合物中转送到细胞内。这可以通过多种机制实现，例如，在脂质单层中加入促进膜融合的脂或蛋白，或加入能够结合靶细胞表面受体的一种或多种靶向物质，如配体或抗体。并且，本发明载体可以包括设计用于促进或调节该载体内其他核酸序列的表达或进入基因组的核酸序列。

[0046] 为将本发明纳米颗粒和非病毒载体送至靶细胞并将其所含核酸转移给靶细胞，可以在其形成过程中，向纳米颗粒表面加入靶向物质或靶向基团。这很容易做到，可以利用靶向基团的脂衍生物将靶向物质包含在非缀合脂质中来完成。例如，许多靶向物质是肽或蛋

白,它们可以通过化学侧链与脂质缀合(如,靶向物质上的氨基与 pNP-PEG-PE 反应)。适合的靶向物质是本领域公知的,包括但不限于自然存在或工程设计的抗体或其抗原结合片段、域抗体或单链抗体、细胞表面受体的配体、生物素等。

[0047] 本发明的另一项内容是一种制备胶束样纳米颗粒的方法,所述胶束样纳米颗粒包含被脂质单层包被的核心复合物。一个或多个核酸分子在适合形成纳米颗粒核心复合物的条件下与前文所述的阳离子聚合物-脂缀合物相接触。带负电荷的核酸与缀合物的阳离子聚合物部分静电结合,形成稳定的核心复合物。然后向所得核心复合物供给一种或多种非缀合脂质以形成包裹该核心复合物的脂质单层。

[0048] 本发明还包括一种用胶束装纳米颗粒转染细胞的方法。在适合载体内核酸分子向细胞内转移的条件下,使细胞与前文所述的非病毒载体相接触。

[0049] 本发明的纳米颗粒和非病毒载体可以单独使用,也可以与药用载体配制成药物组合物来使用,所述药物载体可按照给药途径和医药界标准实践来选择,例如生理盐水或磷酸缓冲液。药用载体通常在颗粒形成后加入。药物制剂中颗粒的浓度范围很宽,按重量计,可以小于约 0.05% 或约 2.5%,也可以高达 10% 至 30%。

[0050] 本发明的药物组合物可采用传统的、公知的消毒技术消毒。可将水溶液包装以供使用,或将水溶液在无菌条件下过滤后冻干,临用前将冻干制剂与无菌水混合。组合物可以包含接近生理条件所需的药学上可接受的辅料,例如 pH 调节剂和缓冲剂、张度 tonicity 调节剂等,例如醋酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾和氯化钙。此外,颗粒悬液可以包含在储存期间保护脂质免受自由基损害和脂质过氧化损害的脂质保护剂。例如,可以使用亲脂性自由基淬灭剂,如 α -生育酚。

[0051] 本发明的纳米颗粒和非病毒载体可以用于将核酸导入细胞,例如用于治疗或预防与靶基因表达相关的疾病或紊乱。因此,本发明还提供将核酸(如 RNAi 或治疗基因)导入细胞的方法。在治疗有疾病或医学症状的对象或预防对象的疾病或医学症状的方法中,本发明的非病毒载体在体内或体外与一个或多个细胞相接触。这些细胞可以是对象的细胞,也可以是捐赠者的细胞。将细胞与载体接触的结果是,载体携带的一个或多个核酸被转移到对象的细胞中,从而治疗或预防疾病或医学症状。在某些实施方案中,细胞与载体在体外接触,随后将细胞作为治疗剂或预防剂的一部分给予对象。如前文所述形成适合的胶束样颗粒。然后将颗粒与适当的靶细胞接触一段时间,接触时间需足以发生核酸转移。本发明的纳米颗粒可吸附到与之混合或接触的几乎所有类型的细胞上。一旦吸附,颗粒可以通过细胞内吞作用进入细胞,与细胞表面膜上的脂质交换,或者与靶细胞融合,从而使得颗粒内的核酸转移或进入到细胞内。核酸细胞内输送最常见的靶细胞类型中之一是赘生 neoplastic 细胞(肿瘤细胞)。其他还有造血前体细胞或干细胞、成纤维细胞、角质形成细胞、肝细胞、内皮细胞、骨骼和平滑肌细胞、成骨细胞、神经元、静态淋巴细胞、末端分化细胞、淋巴细胞,上皮细胞、骨细胞等等。

[0052] 对于体外应用,本发明纳米颗粒的核酸输送可以输送到任何源于植物或动物的、脊椎动物或无脊椎动物的、来自任何组织的在培养基中生长的细胞中。细胞和纳米颗粒的体外接触在生物相容的介质中进行。纳米颗粒的浓度可以依据特定的应用而变化。使用纳米颗粒的体外细胞治疗通常在生理温度下进行(约 37°C),时间约 1 到 48 小时,优选约 2 到 4 小时。

[0053] 本发明提供了抑制细胞内基因表达的方法。该方法包括使细胞与胶束样纳米颗粒接触,所述纳米颗粒的核心复合物含有 siRNA 或 RNAi 或者在靶细胞内产生 RNAi 或 siRNA 的核酸。通过已知的方法针对靶基因专门设计 siRNA 或 RNAi,将其转入细胞能抑制靶基因的表达。

[0054] 在某些实施方案中,纳米颗粒可以用于在体内向动物,如犬类动物、猫类动物、马类动物、牛类动物、绵羊类动物、山羊类动物、鼠类或灵长类动物,包括人类输送核酸,如 siRNA 或治疗基因。体内输送可以是局部的,即直接输送到靶位置,或全身的。已经用核酸-脂质颗粒系统实现了以体内基因治疗为目的全身性输送,即通过如血液循环等身体系统将治疗核酸输送到较远的靶细胞,这可以参照以下文献完成:PCT 申请 W096/40964,美国专利 Nos. 5,705,385、5,976,567、5,981,501 和 6,410,328,通过引用将这些文献纳入本文。

[0055] 本发明还提供了试剂盒形式的胶束样颗粒。试剂盒通常包括容器以及一种或多种本发明的组合物,附带它们的使用和给药说明。在某些实施方案中,纳米颗粒具有已经附着在其表面的靶向基团,而在其他实施方案中,试剂盒包括能够与使用者选择的靶向基团反应的纳米颗粒。使靶向基团(如抗体、蛋白质)附着到外膜单层的脂质上的方法是本领域技术人员所公知的,试剂盒可以提供这些方法的说明。

[0056] 本发明的还包括一种化学缀合物,其包含共价结合于脂质酰基链或烷基链末端的阳离子聚合物。这样的缀合物被用于制备 MNP 以及其他用途,例如制备用在药品、化妆品、食品、诊断工具、医疗设备及其外包物、以及生物传感器等商品上的含胶束样、单层或双层结构。化学缀合物包括一个或多个前文所述的阳离子聚合物,如聚乙烯亚胺,所述阳离子聚合物化学缀合到两亲脂质分子的疏水性末端部分。所述的化学缀合是共价键,在某些实施例中,这样的键在一定条件下,如酸性 pH 或酶作用下,可以被切断。例如,缀合物可以通过 1-棕榈酰-2-壬二酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱与聚乙烯亚胺反应制得。化学缀合物可以与一个或多个核酸分子结合以形成核酸-聚阳离子-脂质复合物。

[0057] 以下实施例是为了展示本发明的优点并帮助普通技术人员制造和使用本发明。这些实施例未计划以任何其他方式限制公开的范围。

[0058] 材料和方法

[0059] 材料

[0060] 除另有说明外,所有材料均购自 Sigma-Aldrich。编码绿色荧光蛋白(GFP)的质粒 DNA(pDNA) 终浓度 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$,从 Elim Biopharmaceuticals(Hayward,CA) 购买。罗丹明标记的 pGFP(pGeneGrip 罗丹明/GFP) 从 Genlantis(San Diego, CA) 购买。如有必要,根据已知方法 [17],用 ^{111}In (PerkinElmer Life and Analytical Sciences,MA) 放射性标记 DNA 至 $0.1 \mu\text{Ci}/\mu\text{gDNA}$ 。使用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检验浓度和纯度。1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](PEG-PE)、胆固醇和氧化的磷脂、1-棕榈酰-2-壬二酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(AzPC Ester) 从 Avanti Polar Lipids(Alabaster,AL) 购买。分子量 1.8kDa 的分支 PEI(bPEI) 从 Polysciences, Inc.(Warrington, PA) 购买并溶于水中至终浓度 $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

[0061] 磷脂-聚乙烯亚胺缀合物(PLPEI)的合成

[0062] 将 12 毫克分支 PEI ($7 \mu\text{mol}$) 溶解于 0.5ml 氯仿,并与溶解在 1ml 氯仿中的 5 毫克

氧化 PC (AzPC Ester $7 \mu\text{mol}$) 混合。推定 bPEI 的伯：仲：叔胺的比率为 1 : 2 : 1, 反应混合物的酸与伯氨之摩尔比为 1 : 10, 即包含过量反应胺。向上述溶液中加入半毫克 N,N-羰基二咪唑 (CDI, $3 \mu\text{mol}$) 以通过形成咪唑衍生物来活化酸。反应混合物同 $10 \mu\text{L}$ TEA (三乙胺) 一起在室温下搅拌温育 24 小时。随后用氮气流清除氯仿, 剩余物质悬浮在 2ml 蒸馏水中。用蒸馏水透析纯化 (MWC02, 000) 纯化产物, 冻干后通过 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) 确认结构。从 NMR 谱 (δ 0.9 : 2.7H, δ 1.3 : 17.6H, δ 1.6 : 5.4H, δ 2.4-2.8 : 96.0H, δ 3.3 : 12.8H, δ 3.6 : 1.58H, δ 4.0-4.6 : 5.43H) 上 PEI 主链的亚乙基 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$) 信号 (2.4-2.8ppm) 与磷脂头部的甲基 ($-\text{CH}_3$) 信号 (3.4ppm) 之比确定, 缀合程度为 : PEI 对脂质摩尔比, 1 : 1 ()。PLPEI 缀合物以 $1.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的浓度溶于水中 (PEI 为 $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)。

[0063] 质粒 DNA 与 PLPEI 的结合

[0064] 固定量的质粒 DNA ($100 \mu\text{g}$) 与不同量的 PLPEI 分别溶解在 HBG 中 (10mM HEPES, 5% d-葡萄糖, pH 7.4) 至终体积 $250 \mu\text{L}$ 。PLPEI 溶液随后在漩涡搅拌中被快速加入到 DNA 溶液中。得到的聚合物 /DNA 复合物在 E-凝胶电泳系统 (Invitrogen Life Technologies) 中使用琼脂糖凝胶电泳分析。预制的 0.8% 的 E-凝胶板在 60V , 500mA 下预电泳 2 分钟, 随后加入 $1 \mu\text{g}$ 的 pDNA。推定 PEI 每个含有一个氨基的重复单元为 $43.1\text{g}/\text{mol}$, DNA 每个含有一个磷酸的重复单元为 $330\text{g}/\text{mol}$, 计算所需氨基 / 磷酸比 (N/P)。

[0065] 包被 DNA 的胶束样纳米颗粒 (MNP) 的制备

[0066] 使用 PLPEI : POPC : 胆固醇 : PEG-PE ($4 : 3 : 3 : 0.3, \text{mol}/\text{mol}$) 和 pDNA 构建 MNP。首先, N/P 比为 10 的 PLPEI ($130 \mu\text{g}$) 和质粒 DNA ($100 \mu\text{g}$) 分别溶解在 HBG 中至终体积 $250 \mu\text{L}$ 。PLPEI 溶液随后在漩涡搅拌中被快速加入到 DNA 溶液中。另外由 POPC, 胆固醇和 PEG-PE ($42 \mu\text{g}$, $21 \mu\text{g}$, $15 \mu\text{g}$ $3 : 3 : 0.3\text{mol}/\text{mol}$) 的混合物制备干燥的脂质膜, 然后用 $500 \mu\text{L}$ HBG 水合。所得脂质悬液与制备好的 PLPEI/DNA 复合物在室温下温育 24 小时。也可将 PLPEI/DNA 复合物直接加入脂膜中。得到的 MNP 悬液 4°C 保存备用。

[0067] 大小和 zeta 电位

[0068] 将 MNP 溶解在 HBG 中至最佳的散射强度。流体力学直径和 zeta 电位使用 Zeta Plus Particle Analyzer (Brookhaven Instruments Corp, Santa Barbara, CA) 通过准电光散射法测定。散射光在 23°C 下以 90° 角测定。数据分析采用 0.933mPa 的粘度值和 1.333 的折射率。该仪器用乳胶微球悬浮液 ($0.09 \mu\text{m}$, $0.26 \mu\text{m}$; Duke Scientific Corp, Palo Alto, CA, USA) 进行常规校准。

[0069] 冷冻断裂电子显微镜

[0070] MNP 使用三明治技术和液氮冷却的丙烷冷激断裂。冷却速度为 $10,000\text{K}/\text{sec}$, 以避免冰晶形成和其他冷冻固定过程中的人工假象 (artifacts)。断裂过程在 JEOL JED-9000 冷冻蚀刻机上进行, 暴露的断裂面以 $25-35^\circ$ 角喷镀铂 30 秒, 喷镀碳 35 秒 [2kV , $60-70\text{mA}$, $1 \times 10^{-5}\text{torr}$ ($1\text{torr} = 133\text{Pa}$)]。复膜 (replicas) 用发烟硝酸清洗 24-36 小时, 然后与新鲜的氯仿 / 甲醇 [$1 : 1(\text{vol}/\text{vol})$] 重复搅拌至少 5 次, 使用 JEOL 100CX 电子显微镜观察。

[0071] 抗盐诱导的聚集的稳定性

[0072] 通过测定 MNP 的大小 (流体力学直径) 来研究 MNP 颗粒对抗盐诱导的聚集的胶体稳定性。按前文所述方法测定大小, 向 MNP 的 HBG 溶液中加入 NaCl (5M) 至终浓度 0.15M 。

[0073] 核酸酶耐受性

[0074] 通过在 37°C 下使用 50 单位的 DnaseI (Promega Corp., Madison, WI) 处理样品 30 分钟测定 MNP 颗粒中 DNA 分子的核酸酶耐受性。使用终浓度 5mM 的 EGTA 和 EDTA 来终止反应。使用肝素 (50 单位 / μ gDNA) 37°C 下解离 DNA, 30 分钟, 产物在 0.8% 的预制琼脂糖凝胶上进行分析。

[0075] 毒性检测

[0076] 成纤维细胞 NIH/3T3 在 96 孔板中用添加了 10% 胎牛血清的 DMEM 培养。通过换之以不含血清的、包含直至最高 100 μ g/ml PEI 的梯度稀释培养基替 (100 μ l) 来处理细胞。温育 4 小时后, 使用 PBS 清洗细胞两次并将细胞再置于完全培养基中 (100 μ l)。温育 24 小时后, 向每个孔中加入 20 μ l CellTiter 96 Aqueous One solution 溶液 (Promega, Madison, WI), 并将平板再温育 2 小时。使用 96 孔板读取器 (Multiscan MCC/340, Fisher Scientific Co) 读取 490nm 处每个孔的光吸收。将只用培养基处理的细胞作为对照计算相对细胞存活率。

[0077] 药代动力学特征和生物学分布

[0078] 根据东北大学 (Northeastern University) 的教研用动物护理和使用管理委员会 (the Institutional Animal Care and Use Committee) 批准的方案, 雄性 balb/c 小鼠 (20-30g) 使用氯胺酮 / 二甲苯胺噻嗪 (1mg/0.2mg/ 每只动物) 保持麻醉状态, 用 PE-10 通过右侧颈动脉逆行插管。通过尾静脉注入携带 ^{111}In -DNA ($\sim 2 \mu$ Ci ^{111}In , 20 μ gDNA) 的 MNP。通过颈总动脉插管, 在静脉推注后 1、2、5、10、30、60 分钟采集血液样品 (30 μ l)。根据取样量给动物回补同体积的含肝素的 PBS (10U/ml)。在第 60 分钟的最后一次采血后, 采用颈椎脱位法处死动物并进行器官 (肺、肝、脾、肾、肌肉、皮肤) 取样。使用 γ -计数器测量血液和器官样品的放射性。用相对于注射剂量的百分数来表示放射性 (器官 % ID/g, 血液 % ID/ml)。根据对应器官的血流量修正器官分布值。将血液“浓度对时间”数据拟合入双指数等式 ($c(t) = A * e^{-\alpha t} + B * e^{-\beta t}$) 测定药代动力学参数。

[0079] 体内基因表达

[0080] 根据东北大学教研用动物护理和使用管理委员会批准的方案, 实验前 14 天, 雄性 C57BL/6 小鼠 (Charles River Laboratories) 在左肋下皮下接种 1×10^6 LLC 肿瘤细胞。通过尾静脉注射 200 μ l 含 40 μ g 的 pGFP 的 MNP。将有同样大小肿瘤的未接受注射的小鼠作为阴性对照。被麻醉的小鼠在 48 小时后颈椎脱位处死, 切下的肿瘤马上冷冻在 Tissue-Tek OCT 4583 compound (Sakura Finetek, CA) 中, 不固定, 用恒冷切片机制成 8 μ m 厚的切片。使用荧光显微镜 (Olympus BX51) 观察 GFP 荧光。

[0081] 实施例 1

[0082] 胶束样纳米颗粒 (MNP) 的制备

[0083] 制备胶束样纳米颗粒 (MNP): 将质粒 DNA 和 PLPEI 形成复合物, 而后用包含 PEG-磷脂酰胆碱缀合物 (PEG-PE) 的脂质单层包裹以上已制备好的复合物 (图 1)。对于形成复合物的过程, 由于复合物的形成将阻止 DNA 的迁移, 将其保留在孔中, PLPEI 与 DNA 的最佳比率根据完全抑制 DNA 在琼脂糖凝胶上迁移所需的胺量来确定。一定量的质粒 DNA 与不同胺 / 磷比 (N/P) 的 PLPEI 混合, 并以琼脂糖凝胶电泳进行检测。被结合 DNA 的比率随着 N/P 比的升高而上升, N/P 比高于 6 时, 绝大多数 DNA 被结合。对比 PLPEI 的复合情况和非修饰 PEI 的可见, 与脂缀合没有降低 PEI 结合 DNA 的能力 (图 2a)。选择所有 DNA 都与复合物结

合的 N/P 比 10 用于下面的步骤。

[0084] 包被 PLPEI/DNA 复合物时,包括 POPC、胆固醇、PEG-PE(3 : 3 : 0.3mol/mol) 的游离脂质混合物单独制备成水悬液。该脂质悬液随后与制备好的 PLPEI/DNA 复合物一起温浴,在 PLPEI 脂质基团和游离脂质间的疏水相互作用的驱动下自发形成外膜,通常是单分子层。游离脂质的最佳量根据能为制备好的 PLPEI/DNA 复合物提供完整脂质单层外膜所需脂分子数量来估算。推定直径约 50nm 的双层脂质体包含约 25,000 个脂分子 [18,19], PLPEI/DNA 核心的质量 / 体积比为 1g/ml,计算出约需要总量 0.2 μ mol 的脂质来覆盖直径 50nm、总质量 230 μ g 的核心颗粒的整个表面,即需要总量 1 μ mol 的脂质来覆盖总质量 1 毫克的核心颗粒的整个表面。因此,除非另外说明,100 μ gDNA 与对应于 131 μ g(0.08 μ mol) PEI 和 49 μ g(0.08 μ mol) PL 的 180 μ gPLPEI 形成复合物,随后与 42 μ g(0.055 μ mol)POPC, 21 μ g(0.055 μ mol) 胆固醇和 15 μ g(0.005 μ mol)PEG-PE 一起温浴。

[0085] 在荧光显微镜下,荧光标记的 DNA(Rh-DNA) 和荧光标记的游离脂质(CF-PEG-PE) 同址定位证实游离脂质与 PLPEI/DNA 复合物相互作用并进入其中(未显示)。冷冻断裂透射电子显微镜(ffTEM)清楚地确认了特征性的硬核带单分子层外膜结构()。ffTEM 显示平均直径 50nm 的良好的球形颗粒(图 2b)。所有颗粒显示出含“硬核”颗粒胶束典型的结构后方阴影。这种表现与双分子层结构如脂质体的断裂表现不同,双分子层结构显示出凹凸断裂面(阴影分别在结构前方和后方)。

[0086] 实施例 2

[0087] MNP 的理化特征

[0088] 传统的 PEI/DNA 复合物在高盐生理条件下倾向于快速聚集 [8]。为展示脂质外膜对抗盐导致的聚集的稳定效果,向复合物制剂中加入 NaCl 至终浓度 0.15M,监测流体力学直径。一如所料,加入 NaCl 后 PEI/DNA 复合物迅速聚集,24 小时内流体力学直径持续增加至近 20 倍。不含游离脂质和 PEG-PE 的 PLPEI/DNA 复合物中间体在加入 NaCl 后,直径迅速增加 2 倍,然后在 24 小时内保持相对恒定。与之相比,加入盐后,MNP 保持稳定,24 小时内没有明显的聚集(图 3a)。

[0089] Zeta 电位测量显示,MNP 有一个 -2.1 ± 0.86 mV(平均 \pm s. e. m., $n = 5$) 的有利的中性表面电荷(),而 PEI/DNA 复合物有一个 20.2 ± 1.38 mV(平均 \pm s. e. m., $n = 5$) 的更有毒性的正表面电荷()。MNP 的中性表面电荷也表明了脂质层的存在,该脂质层为无该脂质层时呈正电的 PEI/DNA 核心提供了电荷屏蔽保护。

[0090] 所带 DNA 被完全保护而未受酶降解的作用进一步表明了脂质层的存在。游离 DNA 完全被酶处理降解,而 PEI/DNA 或 MNP 中的 DNA 保持完整。可能是由于酶的干扰,酶处理后,完整 DNA 的迁移被轻度阻滞。完整 DNA 的定量分析(Image,NIH)显示,从 MNP 回收了 93% 的所带 DNA,相比之下,从 PEI/DNA 中仅可以回收 70%,证明 DNA 被完全包封在脂质膜内(图 3b)。

[0091] 我们还评估了 MNP 对 NIH/3T3 细胞的毒性。PEI 浓度 100 μ g/ml 时,处理 4 小时后温育 24 小时,MNP 表现为无毒,与之对比鲜明的是,在 PEI 浓度 15 μ g/ml 时,PEI/DNA 复合物就表现为高毒性(图 4)。由于数据显示了相比 PEI/DNA 复合物表面的强正电荷,MNP 带中性表面电荷,这个结果看起来相当容易理解。

[0092] 实施例 3

[0093] 体内生物分布和基因表达

[0094] 为显示 MNP 在血液中延长的循环时间以及由此带来的将其输送到靶器官如肿瘤的更高的可行性, 在小鼠中用携带 ^{111}In -DNA 的 MNP 进行了药代动力学和生物分布的研究。静脉推注携带 ^{111}In -DNA 的 MNP 后, 测量了主要器官的放射性并与对照 PEI/ ^{111}In -DNA 进行对比。10 分钟后, 多达 30% ID/ml 的 MNP 仍在血液中, 相比之下, PEI/DNA 约 10% ID/ml。注射后 1 小时, 约 20% ID/ml 的 MNP 仍在血液中, 而在循环中仅能检测到约 5% ID/ml 的 PEI/DNA (图 5A)。

[0095] 相对于 PEI/DNA, MNP 包裹 DNA 较慢的清除以及由此带来的循环时间延长还得到了药代动力学参数的确认。通过将收集至 60 分钟的血液浓度数据导入二室模型计算半衰期 ($t_{1/2\beta}$), 发现半衰期约为 239 分钟, PEI/DNA 复合物则为 33 分钟。从“浓度对时间”曲线得到的曲线下面积 (AUC) 也说明了相比 PEI/DNA 复合物, MNP 包裹质粒 DNA 的全身性利用率增加 (1404% ID · min/ml 对 530% ID · min/ml)。循环时间延长的原因是 RES 吸收导致的清除减少。对照复合物中 DNA 主要积累在 RES 器官中 (肝 40% ID/g 和脾 30% ID/g), MNP 中的 DNA 绕过了 RES 器官, 在其中的积累明显减少 (肝和脾少于 5% ID/g) (图 5b)。两者合计, 长循环时间和 RES 位置的低积累使 MNP 适合体内应用。

[0096] 用 LLC 肿瘤小鼠表明了增强的基因输送以及转染体内目标 (如肿瘤) 的能力, 这是长循环药物纳米载体由通透性和保留增强 (EPR) 介导的被动积累的适宜特征。静脉注射携带编码绿色荧光蛋白 (GFP) 的质粒 DNA 的 MNP 后, 观察肿瘤组织中的基因表达。注射后 48 小时, 使用 MNP 处理过的动物的肿瘤中观察到明亮的荧光, 而对照小鼠的肿瘤中没有观察到荧光 (图 6)。由于动物存活时间短, 没有观察注射 PEI/DNA 复合物的动物的肿瘤组织中的基因表达。静脉注射可比剂量的 PEI/DNA 复合物后, 动物在 30 分钟内由于呼吸衰竭死亡, 进一步确认了 MNP 明显降低的毒性。

[0097] 综合来看, 血液循环时间延长和 RES 位置的低积累使得 MNP 在肿瘤部位显著积累, 引起报告基因的强表达。MNP 的这些特性使其适用于体内基因治疗。

[0098] 实施例 4

[0099] 携带 siRNA 的 MNP 的制备

[0100] 制备携带 siRNA 的 MNP 像制备含 DNA 的 MNP 一样, 与 DNA 相同, siRNA 首先以相同的 N/P 比 10 与 PLPEI 结合。选定量的 siRNA 与 N/P 比达 10 所需量的 PLPEI 混合。注意, 可以用等量的反义寡核苷酸替代 siRNA 以制备携带反义核酸的 MNP。由此形成的 siRNA/PLPEI 复合物被用于以下步骤。

[0101] 包括 POPC、胆固醇、PEG2000-DSPE (3 : 3 : 0.3mol/mol) 的游离脂质混合物被单独制备成水悬液。游离脂悬液随后与制备好的 PLPEI/DNA 复合物一起温浴。推定 siRNA/PEI 复合物核心的质量/体积比为 1g/ml, 约需要总量 0.2 μmol 的脂质以覆盖直径 50nm、总质量 230 μg 的核心颗粒的整个表面, 即需要总量 1 μmol 的脂质以覆盖总质量 1 毫克的核心颗粒的整个表面。

[0102] 选择 PEG-PE 的量, 即, 10mol% 游离脂质和 4.3mol% 磷脂, 以促进游离脂质进入制备好的复合物并为最终结构提供立构稳化作用。与制备好的 PLPEI/DNA 复合物共同温浴时, 包括游离脂和缀合脂的总脂中 PEG-PE 含量降至 4.3mol%, 此时以层状相为主。最终的结构是空间稳定的胶束样硬核颗粒, 具有一个 siRNA/PEI 复合物核心和脂质单层外膜。

[0103] 使用荧光显微镜,根据荧光标记游离脂(CF-PEG2000-DSPE)和荧光标记的siRNA(Cy5-siRNA)的同址定位确认游离脂与siRNA/PLPEI复合物相互作用并进入其中。通过冷冻断裂透射电子显微镜(ffTEM)确认了特征性的带脂质单层包被的硬核结构。

[0104] 参考文献

[0105] [1]O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr, A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine(在培养物和活体内转移基因和寡核苷酸的多功能载体:聚乙醇胺). Proc Natl Acad Sci U S(美国科学院院刊)A 92(16)(1995)7297-7301.

[0106] [2]A. Akinc, M. Thomas, A. M. Klibanov, R. Langer, Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis(研究聚乙醇胺介导的DNA转染和质子海绵机制). J Gene Med(基因医学期刊)7(5)(2005)657-663.

[0107] [3]R. Kircheis, L. Wightman, E. Wagner, Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines(修饰的聚乙醇胺的设计及其基因转移活性). Adv Drug Deliv Rev(先进药物输送系统评价)53(3)(2001)341-358.

[0108] [4]S. V. Vinogradov, E. V. Batrakova, A. V. Kabanov, Nanogels for oligonucleotide delivery to the brain(将寡核苷酸输送至脑部的纳米凝胶). Bioconjug Chem(生物结合化学)15(1)(2004)50-60.

[0109] [5]A. Kichler, Gene transfer with modified polyethylenimines(使用修饰的聚乙醇胺的基因转移). J Gene Med(基因医学期刊)6 Suppl1(2004)S3-I0.

[0110] [6]S. Brunner, E. Furtbauer, T. Sauer, M. Kursa, E. Wagner, Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation(克服核酸障碍:使用线性聚乙醇胺或电穿孔进行的独立于细胞周期的基因转移). Mol Ther(分子治疗)5(1)(2002)80-86.

[0111] [7]T. Merdan, J. Kopecek, T. Kissel, Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer(阳离子聚合物在基因和寡核苷酸抗癌治疗中的前景). Adv Drug Deliv Rev(先进药物输送系统评价)54(5)(2002)715-758.

[0112] [8]M. Neu, D. Fischer, T. Kissel, Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives(基于聚乙醇胺及其衍生物的基因转移载体设计进展). J Gene Med(基因医学期刊)7(8)(2005)992-1009.

[0113] [9]D. Oupicky, M. Ogris, L. W. Seymour, Development of long-circulating polyelectrolyte complexes for systemic delivery of genes(用于基因全身输送的长循环聚电解质复合物的发展). J Drug Target(药物靶向期刊)10(2)(2002)93-98.

[0114] [10]S. M. Moghimi, A. C. Hunter, J. C. Murray, Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice(长循环和靶特异性的纳米颗粒:从理论到实践). Pharmacol Rev(药理学评价)53(2)(2001)283-318.

[0115] [11]M. Ogris, S. Brunner, S. Schuller, R. Kircheis, E. Wagner, PEGylated DNA/

transferrin-PEI complexes:reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery(PEG化DNA/转铁蛋白复合物:减少与血液组分的相互作用,延长在血液中的循环时间并具有全身基因输送的潜力).Gene Ther(基因治疗)6(4)(1999)595-605.

[0116] [12]H. Petersen, P. M. Fechner, A. L. Martin, K. Kunath, S. Stolnik, C. J. Roberts, D. Fischer, M. C. Davies, T. Kissel, Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers:influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system(聚乙醇胺-接-聚(乙二醇)共聚物:共聚物阻塞DNA结合结构的影响以及作为基因输送系统的生物活性).Bioconjug Chem(生物结合化学)13(4)(2002)845-854.

[0117] [13]D. Finsinger, J. S. Remy, P. Erbacher, C. Koch, C. Plank, Protective copolymers for nonviral gene vectors:synthesis, vector characterization and application in gene delivery(用于非病毒基因载体的保护性共聚物:合成,载体特征和在基因传递中的应用).Gene Ther(基因治疗)7(14)(2000)1183-1192.

[0118] [14]Y. Yamazaki, M. Nango, M. Matsuura, Y. Hasegawa, M. Hasegawa, N. Oku, Polycation liposomes, a novel nonviral gene transfer system, constructed from cetylated polyethylenimine(聚阳离子脂质体:一种由软脂酸聚乙醇胺构建的新型非病毒基因转移系统).Gene Ther(基因治疗)7(13)(2000)1148-1155.

[0119] [15]D. A. Wang, A. S. Narang, M. Kotb, A. O. Gaber, D. D. Miller, S. W. Kim, R. I. Mahato, Novel branched poly(ethylenimine)-cholesterol water-soluble lipopolymers for gene delivery(用于基因转移的新型分枝状聚(乙醇胺)-胆固醇水溶性脂质聚合物).Biomacromolecules(生物大分子)3(6)(2002)1197-1207.

[0120] [16]J. Heyes, L. Palmer, K. Chan, C. Giesbrecht, L. Jeffs, I. MacLachlan, Lipid encapsulation enables the effective systemic delivery of polyPlex plasmid DNA(脂质包埋使质粒DNA多聚物有效的进行全身传递).Mol Ther(分子治疗)15(4)(2007)713-720.

[0121] [17]M. Nishikawa, T. Nakano, T. Okabe, N. Hamaguchi, Y. Yamasaki, Y. Takakura, F. Yamashita, M. Hashida, Residualizing indium-111-radiolabel for plasmid DNA and its application to tissue distribution study(剩余化质粒DNA¹¹¹-放射性标记.及其在组织分布中的应用).Bioconjug Chem(结合化学)14(5)(2003)955-961.

[0122] [18]F. J. Hutchinson, S. E. Francis, I. G. Lyle, M. N. Jones, The characterisation of liposomes with covalently attached proteins(共价连接蛋白的脂质体的特性).Biochim Biophys Acta(生物化学与生物物理学报)978(1)(1989)17-24.

[0123] [19]C. B. Hansen, G. Y. Kao, E. H. Moase, S. Zalipsky, T. M. Allen, Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes:evaluation, comparison and optimization of coupling procedures(将抗体连接到空间稳定化的脂质体上:评价、比较和连接过程的优化).Biochimica et biophysica Acta(生物化学与生物物理学报)1239(2)(1995)133-144.

[0124] [20]M. C. Woodle, D. D. Lasic, Sterically stabilized liposomes(空间稳定化的

脂质体). *Biochim Biophys Acta*(生物化学与生物物理学报)1113(2)(1992)171-199.

[0125] [21] T. Reschel, C. Konak, D. Oupicky, L. W. Seymour, K. Ulbrich, Physical properties and in vitro transfection efficiency of gene delivery vectors based on complexes of DNA with synthetic polycations(基于DNA和合成聚阳离子复合物的基因转移载体的物理特征以及体外转染效率). *J Control Release*(控释学期刊)81(1-2)(2002)201-217.

[0126] [22] D. Fischer, B. Osburg, H. Petersen, T. Kissel, U. Bickel, Effect of poly(ethylene imine)molecular weight and pegylation on organ distribution and pharmacokinetics of polyplexes with oligodeoxynucleotides in mice(聚(乙醇胺)分子量和PEG化在器官分布中的效果以及与寡聚脱氧核苷酸形成的多聚物在小鼠中的药物动力学). *Drug Metab Dispos*(药物代谢和处置)32(9)(2004)983-992.

[0127] [23] K. Kunath, A. von Harpe, H. Petersen, D. Fischer, K. Voigt, T. Kissel, U. Bickel, The structure of PEG-modified poly(ethylene imines) influences biodistribution and pharmacokinetics of their complexes with NF-kappaB decoy in mice(PEG修饰的聚(乙醇胺)的结构影响与NF-kappaB decoy形成的复合物在小鼠中的生物分布和药物动力学). *Pharm Res*(药物研究)19(6)(2002)810-817.

[0128] [24] M. Neu, O. Germershaus, M. Behe, T. Kissel, Bioreversibly crosslinked polyplexes of PEI and high molecular weight PEG show extended circulation times in vivo(和高分子量PEG生物可逆交联多聚物显示出延长的体内循环时间). *J Control Release*(控释学期刊)124(1-2)(2007)69-80.

[0129] [25] M. Johnsson, K. Edwards, Liposomes, disks, and spherical micelles: aggregate structure in mixtures of gel phase phosphatidylcholines and poly(ethylene glycol)-phospholipids(脂质体、盘和球状胶束:胶相软磷脂和聚(乙二醇)混合物中的聚集结构). *Biophys J*(生物物理学期刊)85(6)(2003)3839-3847.

[0130] [26] G. Montesano, R. Bartucci, S. Belsito, D. Marsh, L. Sportelli, Lipid membrane expansion and micelle formation by polymer-grafted lipids: scaling with polymer length studied by spin-label electron spin resonance(通过连接聚合物脂质的脂质膜扩展和胶束形成:通过旋转标记电子自旋共振研究测量聚合物长度). *Biophys J*(生物物理学期刊)80(3)(2001)1372-1383.

[0131] [27] K. Sou, T. Endo, S. Takeoka, E. Tsuchida, Poly(ethylene glycol)-modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of poly(ethylene glycol)-lipid into the vesicles(使用自发纳入聚(乙二醇)进行的磷脂质泡囊的聚(乙二醇)修饰). *Bioconjug Chem*(生物结合化学)11(3)(2000)372-379.

[0132] [28] C. L. Gebhart, S. Sriadibhatla, S. Vinogradov, P. Lemieux, V-Alakhov, A. V. Kabanov, Design and formulation of polyplexes based on pluronic-polyethyleneimine conjugates for gene transfer(基于普流尼克-聚乙烯亚胺结合物的用于基因转移的多聚物的设计和形成). *Bioconjug Chem*(生物结合化学)13(5)(2002)937-944.

[0133] [29]A. V. Kabanov, E. V. Batrakova, V. Y. Alakhov, Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery(作为新型药物和基因传递聚合物治疗载体的普流尼克阻滞共聚物). J Control Release(控释学期刊)82(2-3)(2002)189-212.

[0134] [30]R. J. Lee, L. Huang, Folate-targeted, Anionic Liposome-entrapped Polylysine-condensed DNA for Tumor Cell-specific Gene Transfer(用于肿瘤细胞特异性基因转移的叶酸靶向的阴离子脂质体包埋的聚赖氨酸-浓缩DNA). Journal of Biological Chemistry(生物化学期刊)271(14)(1996)8481-8487.

[0135] [31]K. Muller, T. Nahde, A. Fahr, R. Muller, S. Brusselbach, Highly efficient transduction of endothelial cells by targeted artificial virus-like particles(通过靶向人工病毒样颗粒的内皮细胞的高效转导). Cancer Gene Therapy(癌症基因治疗)8(2)(2001)107-117.

[0136] [32]P. Bandyopadhyay, X. Ma, C. L. Stieers, B. T. Kren, C. J. Steer, Nucleotide Exchange in Genomic DNA of Rat Hepatocytes Using RNA/DNA Oligonucleotides(使用RNA/DNA寡核苷酸的小鼠肝细胞染色体DNA核苷酸交换). Journal of Biological Chemistry(生物化学期刊)274(15)(1999)10163-10172.

[0137] [33]J. J. Wheeler, L. Palmer, M. Ossanlou, I. MacLachlan, R. W. Graham, Y. P. Zhang, M. J. Hope, P. Scherrer, P. R. Cullis, Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization(稳定的质粒-脂质颗粒:结构和特征). Gene Ther(基因治疗)6(2)(1999)271-281.

[0138] [34]I. MacLachlan, P. Cullis, R. W. Graham, Progress towards a synthetic virus for systemic gene therapy(用于全身基因治疗的合成病毒的进展). Curr Opin Mol Ther(分子治疗流行观点)1(2)(1999)252-259.

[0139] 尽管已经结合优选实施方案描述了本发明,本领域普通技术人员在阅读前面的说明后,能够对本文提出的组分和方法做出不同的改变、等同形式的替代以及其他变化。因此,此后专利证书许可的保护仅由附带的权利要求书和其等同形式来限定。

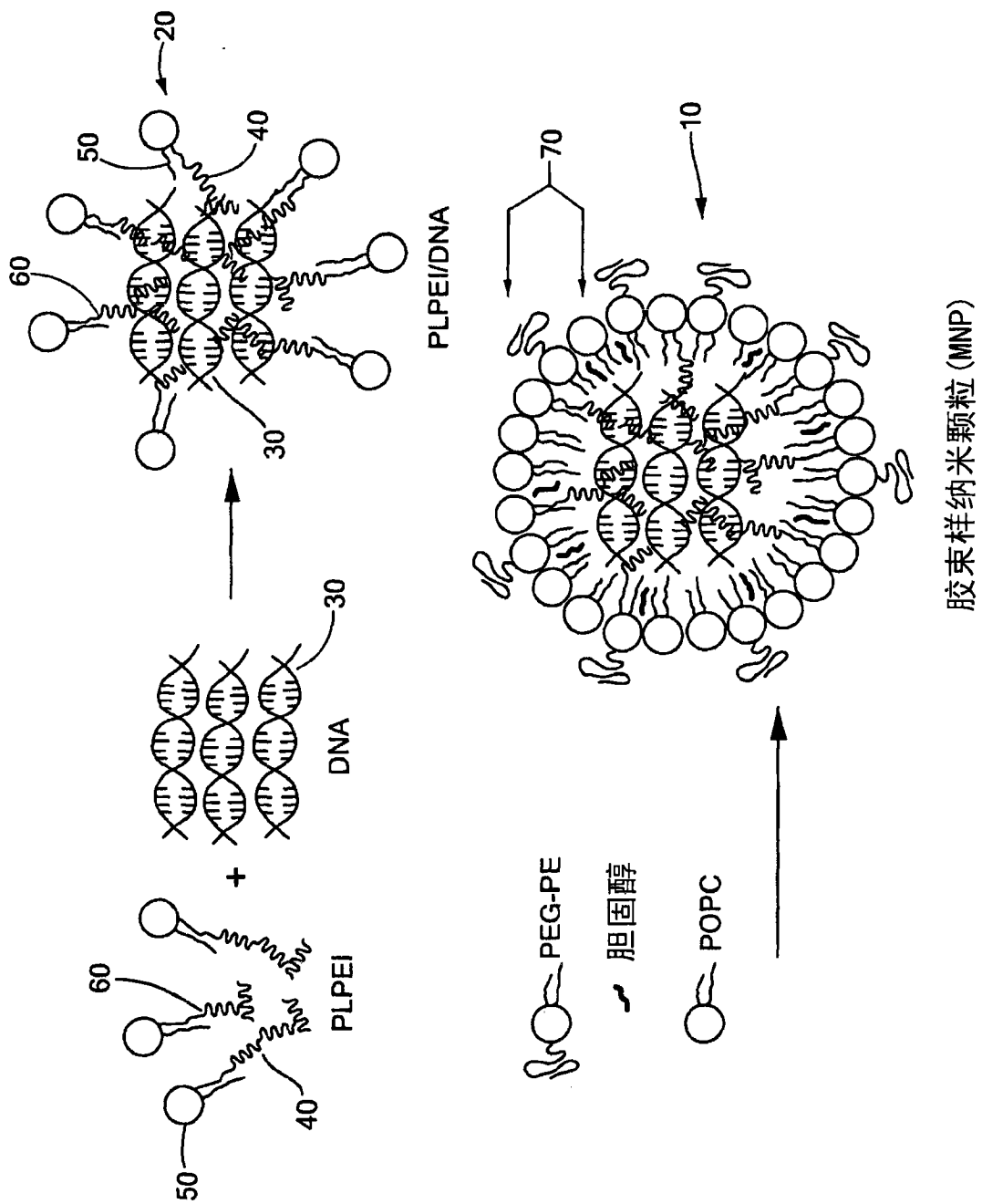


图 1

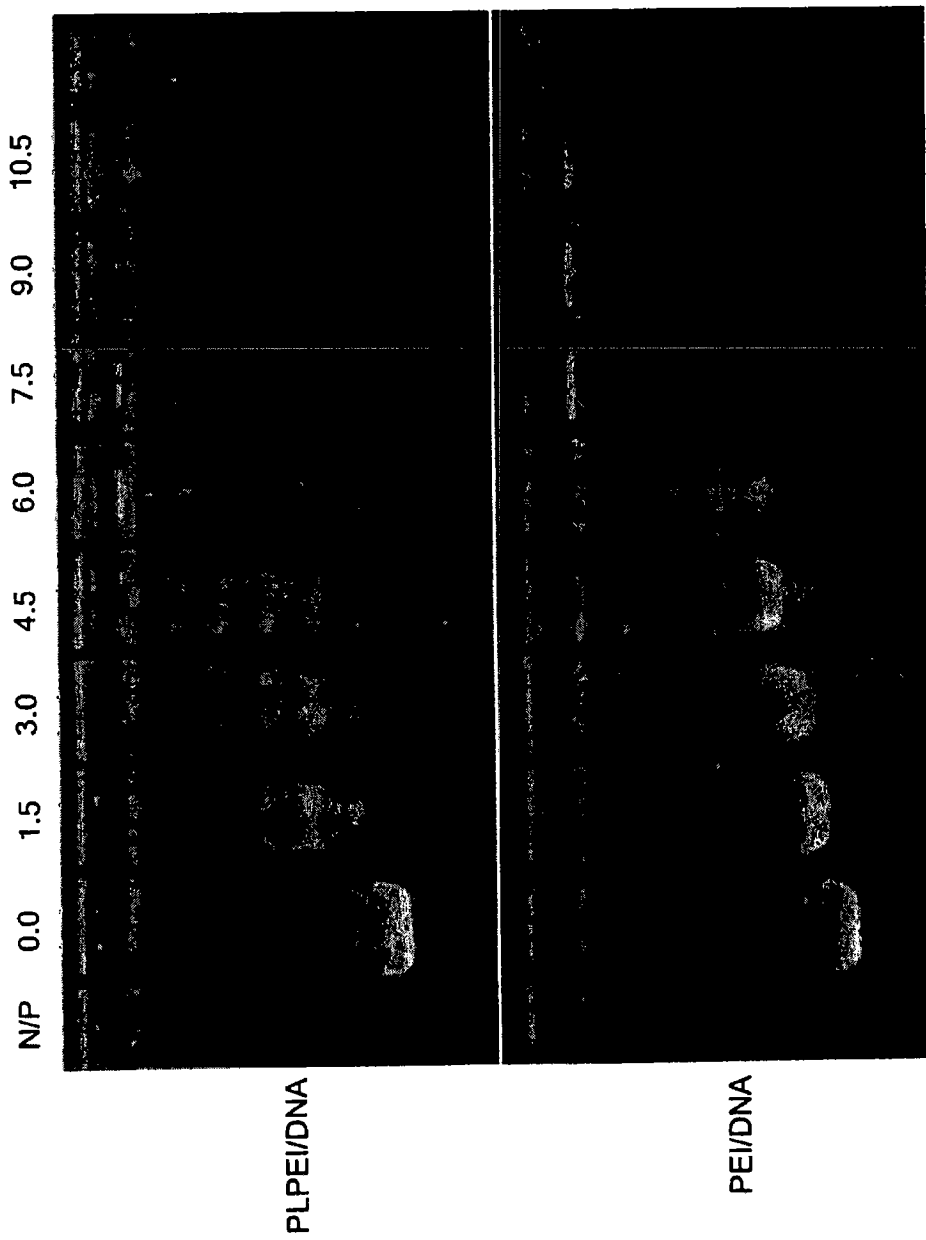


图 2a

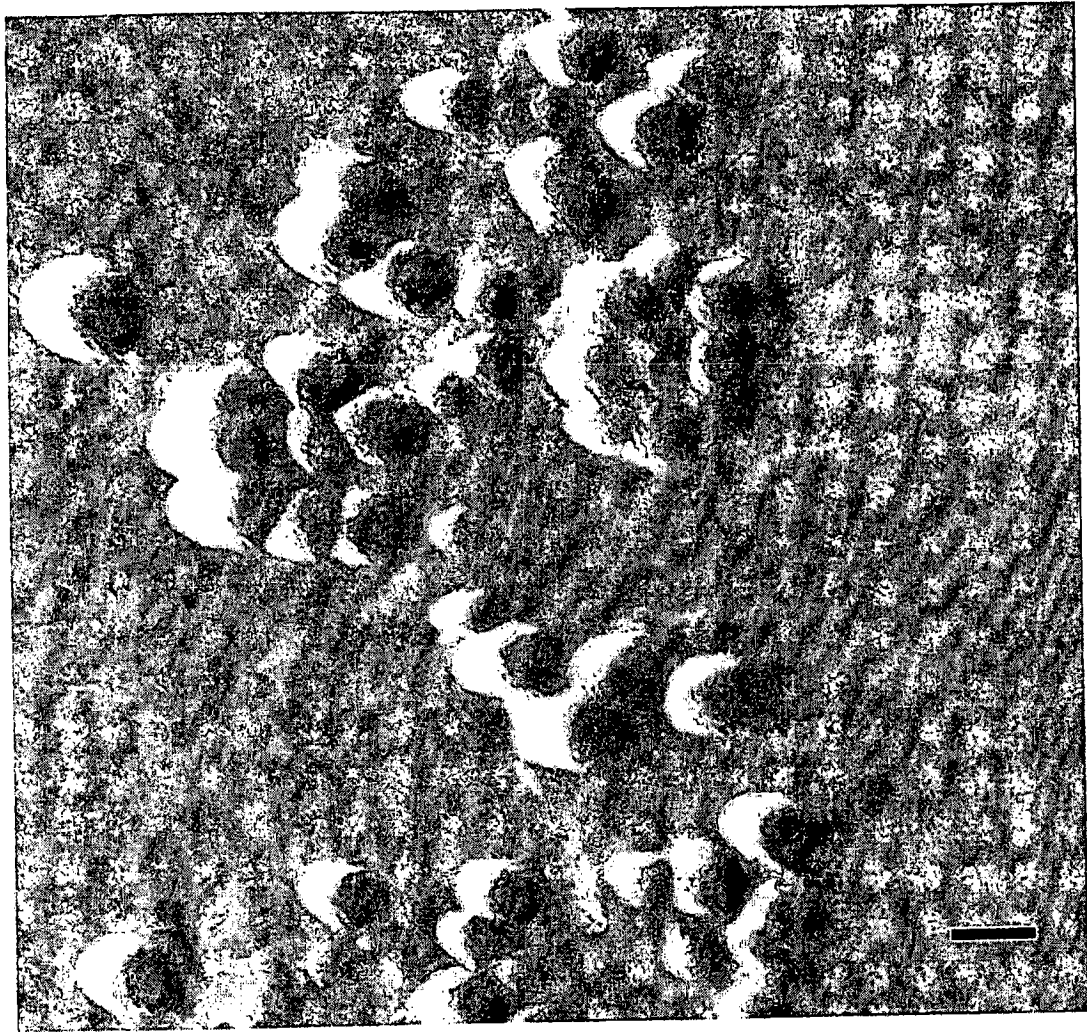


图 2b

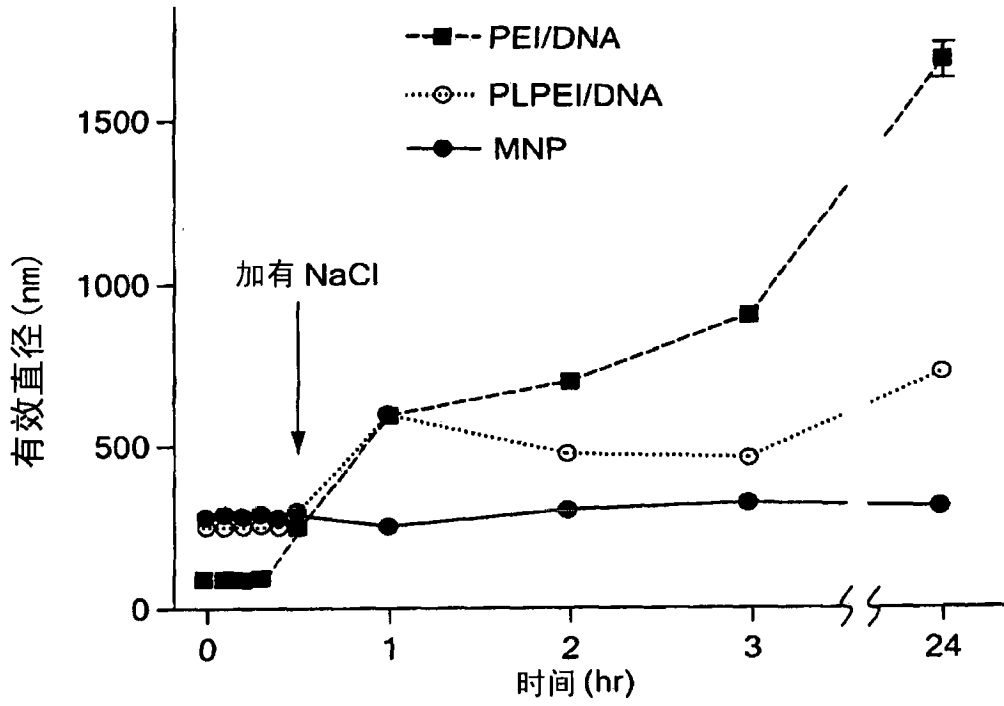


图 3a

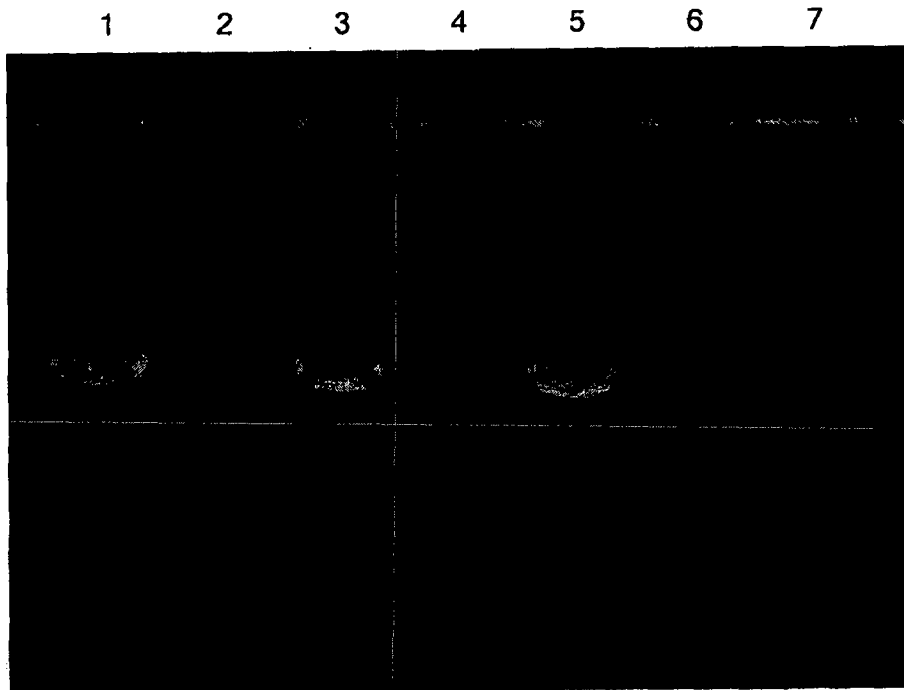


图 3b

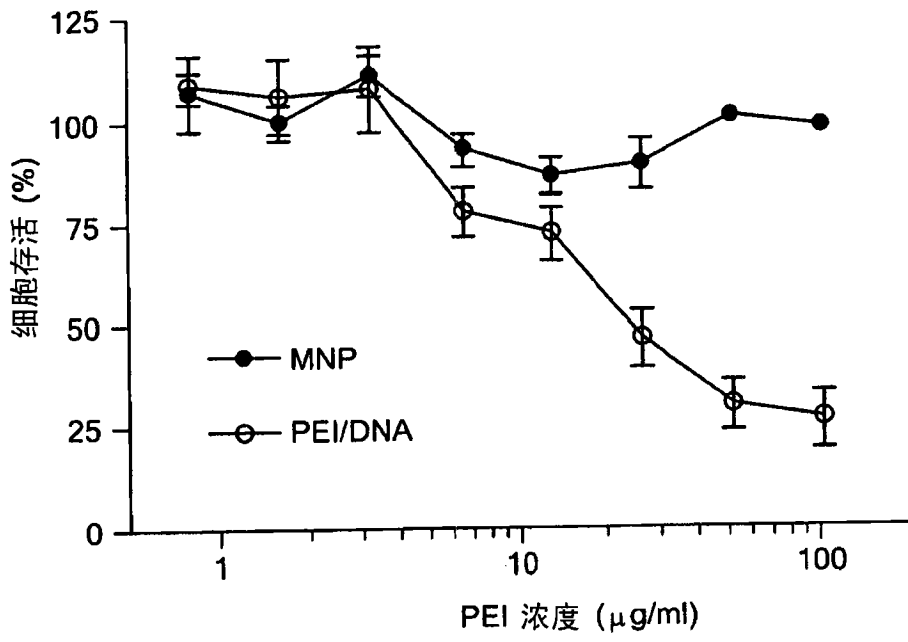


图 4

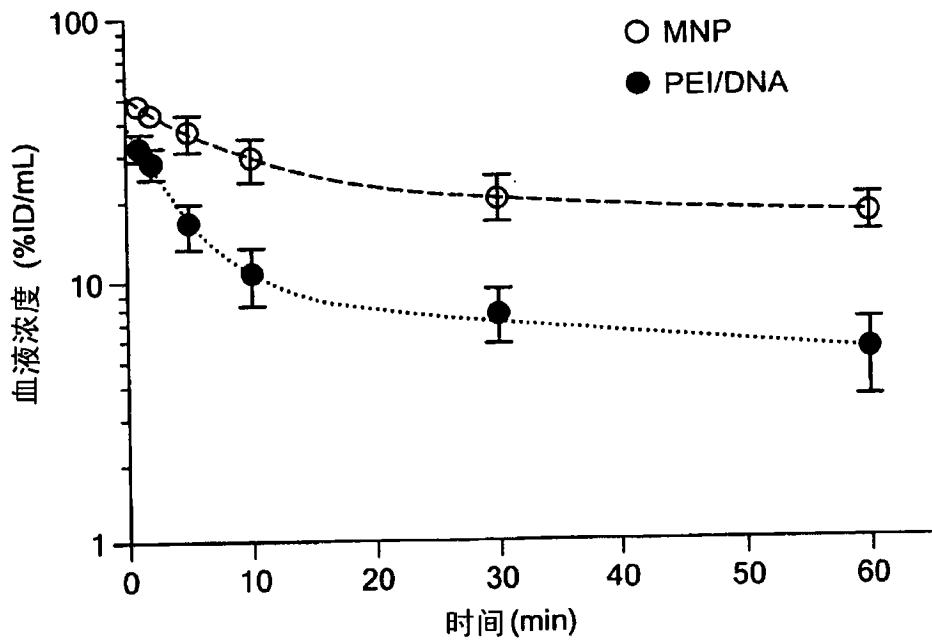


图 5a

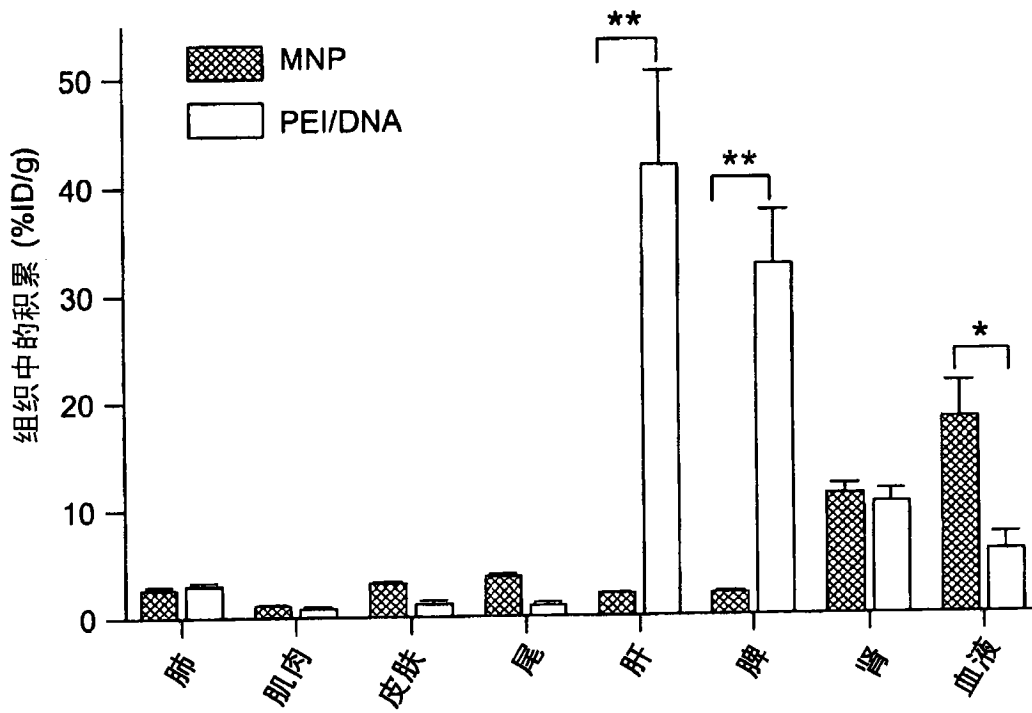


图 5b

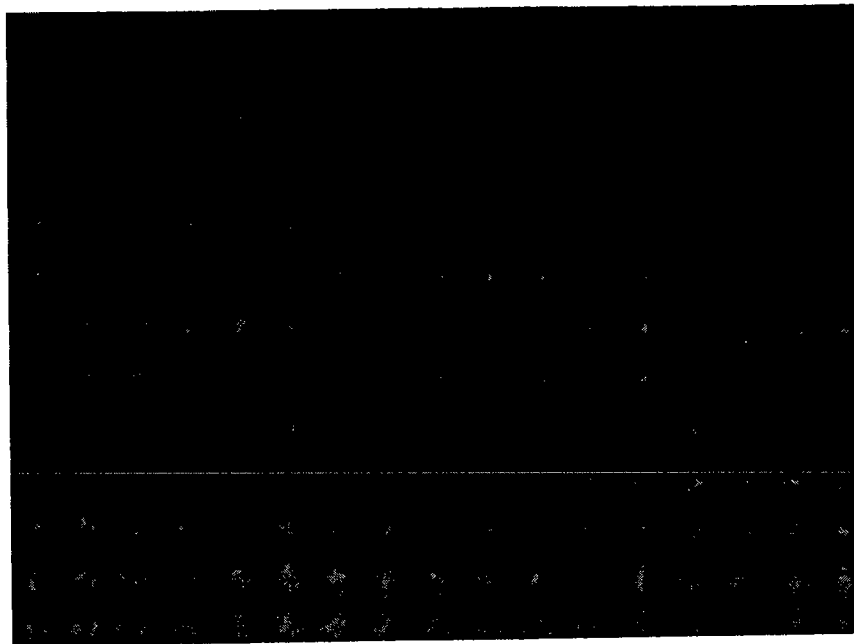


图 6a

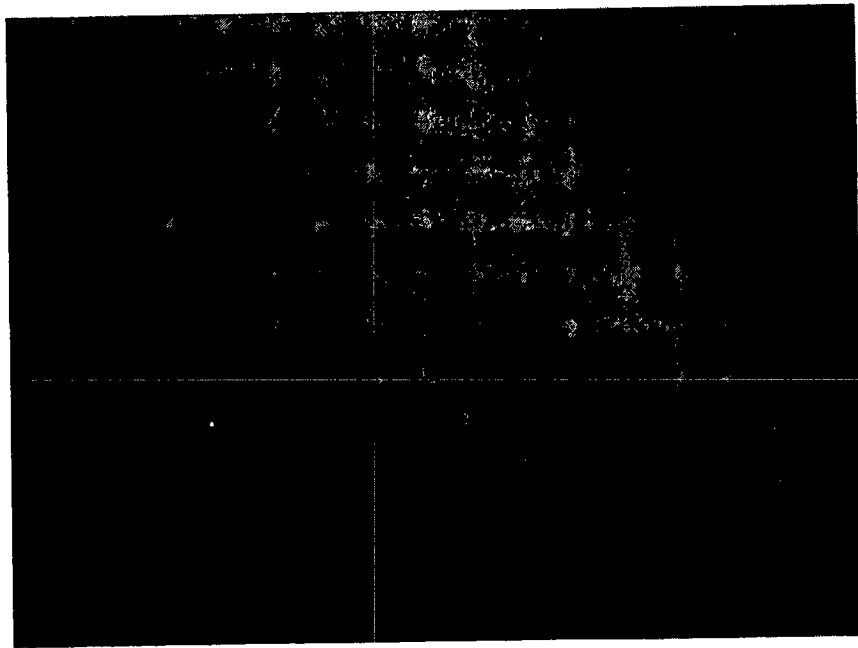


图 6b