



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112972703 A

(43) 申请公布日 2021.06.18

(21) 申请号 202110260752.1

(22) 申请日 2021.03.10

(71) 申请人 河南大学

地址 475000 河南省开封市顺河回族区明
伦街85号

(72) 发明人 邹艳 师冰洋 孙新红 郑蒙

(74) 专利代理机构 北京超凡宏宇专利代理事务
所(特殊普通合伙) 11463

代理人 张丽

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C08F 283/06 (2006.01)

C08F 222/38 (2006.01)

C08F 220/60 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

B82Y 30/00 (2011.01)

B82Y 40/00 (2011.01)

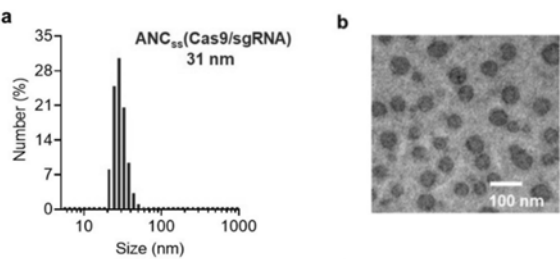
权利要求书2页 说明书11页
序列表1页 附图8页

(54) 发明名称

基因编辑纳米胶囊及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明提供一种基因编辑纳米胶囊及其制备方法与应用。所述基因编辑纳米胶囊具有核壳结构,内核包括Cas/sgRNA核糖核蛋白复合物,外壳包括聚合物,所述Cas/sgRNA核糖核蛋白复合物具备基因编辑功能,所述聚合物作为Cas/sgRNA核糖核蛋白复合物的载体并对其进行保护,由于聚合物中包含肿瘤微环境敏感性分子,因此纳米胶囊能够在肿瘤细胞中高效释放。进一步的,外壳表面可以修饰靶向剂,使纳米胶囊能够特异性靶向肿瘤细胞,提高纳米胶囊的内吞效率。所述基因编辑纳米胶囊具有良好的生物相容性和生物安全性,有望成为针对肿瘤的安全高效的基因治疗药物。



1. 一种基因编辑纳米胶囊,其特征在于,包括内核以及包封内核的外壳;所述内核包括由Cas核酸酶和sgRNA复合得到的Cas/sgRNA核糖核蛋白复合物;所述外壳包括由单体材料聚合而成的聚合物,所述单体材料包括能够相互聚合的第一单体与第二单体,所述第一单体为能够与所述Cas/sgRNA核糖核蛋白复合物通过静电结合的分子,所述第二单体为肿瘤微环境敏感性分子。

2. 如权利要求1所述的基因编辑纳米胶囊,其特征在于,所述第一单体包括胍基丙烯酸酯、丙烯酸精胺和N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺中的至少一种;

所述肿瘤微环境敏感性分子包括还原敏感性分子、酸敏感性分子和ROS响应分子中的至少一种;优选的,所述第二单体为还原敏感性分子;

可选的,所述还原敏感性分子为包含二硫键的分子;优选的,所述还原敏感性分子为N,N'-双(丙稀酰)胱胺。

3. 如权利要求1所述的基因编辑纳米胶囊,其特征在于,所述基因编辑纳米胶囊还包括修饰于所述外壳外表面的靶向剂;所述单体材料还包括能够与所述第一单体和/或第二单体相互聚合的第三单体,所述第三单体为能够与所述靶向剂通过化学键连接的分子;

可选的,所述第三单体包括丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰羧甲酯和丙烯酸酯聚乙二醇马来酰亚胺中的至少一种;

可选的,所述靶向剂包括Angiopep-2、RGD肽、apolipoprotein E和transferrin中的至少一种;优选的,所述靶向剂为Angiopep-2。

4. 如权利要求1所述的基因编辑纳米胶囊,其特征在于,所述sgRNA的靶向基因为肿瘤靶向治疗基因;可选的,所述肿瘤靶向治疗基因包括MTH1基因与PLK1基因中的至少一种;可选的,所述sgRNA在PLK1基因上的靶位点的序列如SEQ ID NO:1所示;

可选的,所述Cas核酸酶为Cas9核酸酶。

5. 如权利要求3所述的基因编辑纳米胶囊,其特征在于,所述Cas核酸酶和所述sgRNA的摩尔比为1:1~1.5,优选为1:1.2;

所述单体材料包括丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰羧甲酯、胍基丙烯酸酯、N,N'-双(丙稀酰)胱胺,所述丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰羧甲酯、所述胍基丙烯酸酯、所述N,N'-双(丙稀酰)胱胺的摩尔比为1~3:1~3:1~3,优选为1:1:1;

所述Cas核酸酶和所述胍基丙烯酸酯的摩尔比为1:200~250,优选为1:220;

所述靶向剂为Angiopep-2,所述Angiopep-2与所述丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰羧甲酯的摩尔比为1~5:1,优选为3:1。

6. 如权利要求1-5任一项所述的基因编辑纳米胶囊在制备治疗肿瘤的药物中的应用;

可选的,所述肿瘤为脑胶质瘤、非小细胞肺癌或宫颈癌;优选的,所述肿瘤为脑胶质瘤,更优选为胶质母细胞瘤。

7. 一种治疗肿瘤的药物,其特征在于,包括如权利要求1-5任一项所述的基因编辑纳米胶囊;

可选的,所述肿瘤为脑胶质瘤、非小细胞肺癌或宫颈癌;优选的,所述肿瘤为脑胶质瘤,更优选为胶质母细胞瘤。

8. 如权利要求1-5任一项所述的基因编辑纳米胶囊的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤1、将Cas核酸酶和sgRNA在缓冲液中孵育,形成Cas/sgRNA核糖核蛋白复合物;

步骤2、在步骤1得到的体系中添加所述单体材料与引发剂,使所述单体材料发生聚合反应,形成包裹于所述Cas/sgRNA核糖核蛋白复合物外表面的聚合物。

9. 如权利要求8所述的基因编辑纳米胶囊的制备方法,其特征在于,所述制备方法还包括:步骤3、在步骤2得到的体系中添加靶向剂,所述靶向剂与所述聚合物通过化学键连接;可选的,所述靶向剂包括Angiopep-2、RGD肽、apolipoprotein E和transferrin中的至少一种;优选的,所述靶向剂为Angiopep-2;可选的,所述步骤3中,添加靶向剂后,搅拌1~3小时;

所述步骤2中添加的单体材料还包括能够与所述第一单体和/或第二单体相互聚合的第三单体,所述第三单体为能够与所述靶向剂通过化学键连接的分子;可选的,所述第三单体包括丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰甲酯和丙烯酸酯聚乙二醇马来酰亚胺中的至少一种。

10. 如权利要求8所述的基因编辑纳米胶囊的制备方法,其特征在于,可选的,所述引发剂包括过硫酸铵和N,N,N',N'-四甲基乙二胺,所述过硫酸铵与反应体系的比例为1~5mg:500μL,所述N,N,N',N'-四甲基乙二胺溶液与反应体系的比例为1~5μL:500μL,所述N,N,N',N'-四甲基乙二胺溶液的浓度为0.2%-0.8%w/v;

可选的,所述步骤1在10℃~30℃条件下进行,孵育时间为3~8分钟;所述步骤2在0℃~5℃,无氧环境中,伴随搅拌作用进行,反应时间为60~120分钟;

可选的,所述基因编辑纳米胶囊的制备方法还包括:在制得所述基因编辑纳米胶囊后进行除杂的步骤;可选的,使用截留分子量10kDa的超滤离心管进行除杂。

基因编辑纳米胶囊及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因编辑技术领域,尤其涉及一种基因编辑纳米胶囊及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤是威胁人类生命健康的首要疾病。大多数肿瘤起病隐匿,早期症状不明显,诊断时已是中晚期,失去了手术切除的机会。目前,化疗仍是肿瘤治疗的主要手段之一。然而,传统化疗药物毒副作用强、靶向性差、容易产生抗药性。基因治疗因其能特异性改变遗传物质,从而达到治疗的目的,具有靶向性强,毒副作用小的以及治疗具有永久性的特征,在肿瘤治疗中发挥越来越重要的作用,但是也面临着操作复杂、效率低、应用范围不足等缺陷。

[0003] 近年来,基因编辑技术给基因治疗领域的不足提供了新的途径。其中CRISPR-Cas9基因组编辑系统效率高,能同时编辑多个基因,操作简单,适用范围广,在基因治疗领域发挥着举足轻重的作用。该系统是古细菌和细菌中适应性免疫系统的一部分,防御噬菌体和质粒的侵入性。两个关键成分Cas9核酸酶和sgRNA对CRISPR/Cas9活性发挥至关重要。其中sgRNA识别基因组中的靶序列,并将Cas9核酸酶引导至该靶序列,系统中的Cas9核酸酶则充当剪刀去切割DNA的双链,然后通过体内双链断裂修复系统:非同源末端连接(NHEJ)或同源重组修复(HDR),致使靶序列发生变化,从而实现基因编辑。自发现以来,CRISPR-Cas9已成为最强大的真核细胞基因编辑工程,引起了人们肿瘤治疗的极大兴趣。目前,该系统已经被广泛应用于肿瘤研究中。

[0004] 尽管CRISPR-Cas9技术前景光明,但一些挑战仍需要解决。最大的挑战是如何安全高效地将CRISPR-Cas9基因组编辑系统靶向递送到肿瘤细胞内。其中一种递送方式是将Cas9和sgRNA以质粒的形式被封装到病毒载体中。但是,这种方式质粒DNA可以随机整合到基因组,引起癌症或其他遗传疾病。此外,基因的模板驱动性表达限制了对Cas9总量的控制,该系统的脱靶主要源于过量给药。

[0005] 一种替代的递送方法是递送Cas9/sgRNA核糖核蛋白复合物,这样可以更好地控制其细胞内浓度,并限制了可以进行基因编辑的时间范围。但是,药物输送方面仍然面临巨大的挑战。大多数蛋白质例如酶、抗体或转录因子等,由于其脆弱的三级结构和大的分子尺寸,面临着稳定性低、细胞膜通透性差的问题。RNA带有强烈负电荷,不易透过细胞膜,并且对核酸酶敏感,通常需要进行化学修饰以防止降解。因此需要设计合适的载体来防止有害生理环境对蛋白质和RNA的破坏,将二者同时递送到靶细胞内。

[0006] 近年来纳米技术在医疗领域的飞速发展给肿瘤治疗带来了新的契机。纳米粒子的尺寸范围为几十至几百纳米,纳米粒子可以设计用于封装和传递遗传物质等。高表面积比、小体积、可装载各种药物、可修饰等性质赋予纳米材料在肿瘤治疗方面具有其它材料无法比拟的优势,例如可以增强生物相容性、肿瘤靶向性、延长药物在血液中的循环时间、控制药物释放、携带多种药物进行联合治疗等。通过增强渗透和保留(enhanced permeability

and retention effect, EPR) 效应 (即肿瘤部位血管通透性比正常血管大, 纳米药物不易透过正常血管却可通过肿瘤血管) 更多的靶向聚集于肿瘤组织减少了对正常组织的损伤。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种基因编辑纳米胶囊及其制备方法和应用,所述基因编辑纳米胶囊中包含Cas/sgrRNA核糖核蛋白复合物并采用聚合物对其进行承载和保护,所述基因编辑纳米胶囊能够在肿瘤细胞中高效释放,有望成为针对肿瘤的安全高效的基因治疗药物。

[0008] 为实现以上目的,本发明首先提供一种基因编辑纳米胶囊,包括内核以及包封内核的外壳;所述内核包括由Cas核酸酶和sgRNA复合得到的Cas/sgRNA核糖核蛋白复合物;所述外壳包括由单体材料聚合而成的聚合物,所述单体材料包括能够相互聚合的第一单体与第二单体,所述第一单体为能够与所述Cas/sgRNA核糖核蛋白复合物通过静电结合的分子,所述第二单体为肿瘤微环境敏感性分子。

[0009] 具体的,所述基因编辑纳米胶囊的粒径为30-50nm,粒径较小,从而具有较高的细胞内吞效率。

[0010] 本发明一些实施例中,所述第一单体包括胍基丙烯酸酯、丙烯酸精胺和N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺中的至少一种:

[0011] 所述肿瘤微环境敏感性分子包括还原敏感性分子、酸敏感性分子和ROS (活性氧) 响应分子中的至少一种; 优选的, 所述第二单体为还原敏感性分子;

[0012] 可选的,所述还原敏感性分子为包含二硫键的分子;优选的,所述还原敏感性分子为N,N'-双(丙稀酰)脒胺。

[0013] 具体的,所述N,N'-双(丙稀酰)胱胺的结构式为

C=CC(=O)NCCSCCNC(=O)C=C

[0014] 具体的,所述丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰羧甲酯中的丙烯酸酯分子含有双键,能够参与聚合反应,所述丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰羧甲酯中包含聚乙二醇分子,而聚乙二醇(Polyethylene glycol,PEG)是低毒性的水溶性分子,可以屏蔽纳米颗粒的表面电荷,而且还提供了空间位阻,可以减少非特异性吸附和聚集;还可显著增强纳米颗粒的稳定性,并增加纳米颗粒体循环的半衰期。所述丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰羧甲酯中的琥珀酰羧甲酯分子能够与经过氨基化处理的靶向剂通过化学键连接,实现聚合物与靶向剂的连接。

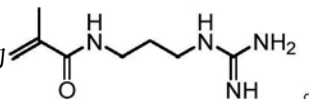
[0015] 具体的,所述丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰羧甲酯的结构式为

其中 $n=22-120$ 。

[0016] 具体的,N,N'-双(丙稀酰)胱胺由于含有二硫键,而GSH可以打断二硫键,且肿瘤组织中的GSH含量远高于正常组织中的GSH含量,因此本发明制得的基因纳米胶囊进入肿瘤细胞后,其中的聚合物能够被GSH高效率的降解,使基因纳米胶囊中的有效成分(Cas/sgrNA核糖核蛋白复合物)在肿瘤细胞中的释放效率远远高于其在正常细胞中的释放效率,实现肿瘤细胞定向释放的效果,当sgRNA靶向的基因为肿瘤治疗靶点时,能够实现肿瘤细胞死亡而

正常细胞存活的效果。

[0017] 具体的,胍基丙烯酸酯由于带正电,因此能够与带负电的Cas/sgrNA核糖核蛋白复合物通过静电结合,使聚合物形成于所述Cas/sgrNA核糖核蛋白复合物的外表面,并且所述胍基丙烯酸酯还能够提高整个纳米胶囊的正电荷含量,由于细胞膜外表面带负电荷,因此在纳米胶囊中添加胍基丙烯酸酯能够提高纳米胶囊的细胞内吞效率。

[0018] 具体的,所述胍基丙烯酸酯的结构式为.

[0019] 本发明一些实施例中,所述基因编辑纳米胶囊还包括修饰于所述外壳外表面的靶向剂;所述单体材料还包括能够与所述第一单体和/或第二单体相互聚合的第三单体,所述第三单体为能够与所述靶向剂通过化学键连接的分子;

[0020] 可选的,所述第三单体包括丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰羧甲酯和丙烯酸酯聚乙二醇马来酰亚胺中的至少一种;

[0021] 可选的,所述靶向剂包括Angiopep-2、RGD肽、apolipoprotein E和transferrin中的至少一种;优选的,所述靶向剂为Angiopep-2。

[0022] 具体的,Angiopep-2不仅能够作为靶向剂,特异性靶向肿瘤细胞,提高纳米胶囊的内吞效率,而且具有介导作用,能够介导纳米胶囊跨越BBB,使纳米胶囊被人脑胶质瘤细胞高效吞噬。

[0023] 血脑屏障(blood brain barrier, BBB)的存在使得人脑胶质瘤成为癌症治疗中最棘手的肿瘤之一。BBB为脑部的自我平衡防御机制,一方面,它保证中枢神经系统免受外来物质侵扰,维持高效的稳态,同时为脑内输入营养物质;另一方面, BBB的致密结构也阻碍了治疗药物通过非入侵性给药方式进入脑内。由于BBB内皮细胞和GBM(多形性胶质母细胞瘤)组织均高表达受体相关蛋白1(LRP-1),当应用本发明提供的基因编辑纳米胶囊治疗GBM时,靶向剂优选为Angiopep-2, Angiopep-2(NH₂)修饰的基因编辑纳米胶囊可与脑内皮细胞及脑胶质瘤细胞上过度表达的低密度脂蛋白(LRP)受体特异性结合,靶向脑胶质瘤细胞的同时,可显著增强Cas/sgrNA核糖核蛋白复合物的BBB渗透性。

[0024] 可选的,所述sgRNA的靶向基因为肿瘤靶向治疗基因;可选的,所述肿瘤靶向治疗基因包括MTH1基因与PLK1基因中的至少一种;可选的,所述sgRNA在PLK1基因上的靶位点的序列如SEQ ID NO:1所示;

[0025] 可选的,所述Cas核酸酶为Cas9核酸酶。

[0026] 本发明一些实施例中,所述Cas核酸酶和所述sgRNA的摩尔比为1:1~1.5,优选为1:1.2;

[0027] 所述单体材料包括丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰羧甲酯、胍基丙烯酸酯、N,N'-双(丙稀酰)脒胺,所述丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰羧甲酯、所述胍基丙烯酸酯、所述N,N'-双(丙稀酰)脒胺的摩尔比为1~3:1~3:1~3,优选为1:1:1;

[0028] 所述Cas核酸酶和所述胍基丙烯酸酯的摩尔比为1:200~250,优选为1:220;

[0029] 所述靶向剂为Angiopep-2,所述Angiopep-2与所述丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰羧甲酯的摩尔比为1~5:1,优选为3:1。

[0030] 本发明还提供一种所述基因编辑纳米胶囊在制备治疗肿瘤的药物中的应用;

[0031] 可选的,所述肿瘤为脑胶质瘤、非小细胞肺癌或宫颈癌;优选的,所述肿瘤为脑胶质瘤,更优选为胶质母细胞瘤。

[0032] 本发明还提供一种治疗肿瘤的药物,包括所述基因编辑纳米胶囊;

[0033] 可选的,所述肿瘤为脑胶质瘤、非小细胞肺癌或宫颈癌;优选的,所述肿瘤为脑胶质瘤,更优选为胶质母细胞瘤。

[0034] 本发明还提供一种所述基因编辑纳米胶囊的制备方法,包括以下步骤:

[0035] 步骤1、将Cas核酸酶和sgRNA在缓冲液中孵育,形成Cas/sgrNA核糖核蛋白复合物;

[0036] 步骤2、在步骤1得到的体系中添加所述单体材料与引发剂,使所述单体材料发生聚合反应,形成包裹于所述Cas/sgrNA核糖核蛋白复合物外表面的聚合物。

[0037] 本发明一些实施例中,所述制备方法还包括:步骤3、在步骤2得到的体系中添加靶向剂,所述靶向剂与所述聚合物通过化学键连接;

[0038] 可选的,所述靶向剂包括Angiopep-2、RGD肽、apolipoprotein E和transferrin中的至少一种;优选的,所述靶向剂为Angiopep-2;

[0039] 可选的,所述步骤3中,添加靶向剂后,搅拌1~3小时;

[0040] 所述步骤2中添加的单体材料还包括能够与所述第一单体和/或第二单体相互聚合的第三单体,所述第三单体为能够与所述靶向剂通过化学键连接的分子;

[0041] 可选的,所述第三单体包括丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰羧甲酯和丙烯酸酯聚乙二醇马来酰亚胺中的至少一种;

[0042] 可选的,所述引发剂包括过硫酸铵和N,N,N',N'-四甲基乙二胺,所述过硫酸铵与反应体系的比例为1~5mg:500μL,所述N,N,N',N'-四甲基乙二胺溶液与反应体系的比例为1~5μL:500μL,所述N,N,N',N'-四甲基乙二胺溶液的浓度为0.2%-0.8%w/v;

[0043] 可选的,所述步骤1在10℃~30℃条件下进行,孵育时间为3~8分钟;所述步骤2在0℃~5℃,无氧环境中,伴随搅拌作用进行,反应时间为60~120分钟;

[0044] 可选的,所述基因编辑纳米胶囊的制备方法还包括:在制得所述基因编辑纳米胶囊后进行除杂的步骤;可选的,使用截留分子量10kDa的超滤离心管进行除杂。

[0045] 可以理解的是,所述步骤2在0℃~5℃条件下进行的原因在于避免聚合反应放热导致体系温度过高进而导致Cas核酸酶失活。

[0046] 可选的中,所述步骤2在4℃条件下进行。

[0047] 可选的,所述步骤2中的搅拌转速为250-350rpm。

[0048] 可以理解的是,由于氧气会阻碍聚合反应进程,导致聚合效果变差,因此将步骤2置于无氧环境中进行。

[0049] 可选的,所述无氧环境为氮气环境或者惰性气体(氢气、氦气、氩气、氖气、氙气)环境。

[0050] 本发明的有益效果:

[0051] 本发明的基因编辑纳米胶囊具有核壳结构,内核包括Cas/sgrNA核糖核蛋白复合物,外壳包括聚合物,所述Cas/sgrNA核糖核蛋白复合物具备基因编辑功能,所述聚合物作为Cas/sgrNA核糖核蛋白复合物的载体并对其进行保护,由于聚合物中包含肿瘤微环境敏感性分子,因此纳米胶囊能够在肿瘤细胞中高效释放。

[0052] 进一步的,外壳表面可以修饰靶向剂,使纳米胶囊能够特异性靶向肿瘤细胞,提高

纳米胶囊的内吞效率。

[0053] 本发明的基因编辑纳米胶囊具有良好的生物相容性和生物安全性,有望成为针对肿瘤的安全高效的基因治疗药物。

[0054] 本发明提供的基因编辑纳米胶囊的制备方法,制备过程简单,封装效率高,制得的纳米胶囊的粒径小,细胞内吞效率高。

附图说明

[0055] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,应当理解,以下附图仅示出了本发明的某些实施例,因此不应被看作是对本发明范围的限定。

[0056] 图1示出了ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊的粒径分布与形貌特征,其中,a为ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊的粒径分布图,b为ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊的扫描电镜照片。

[0057] 图2为一部分体外细胞实验结果,其中:

[0058] (d) ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、ANC (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、NC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、Free Cas9/sgRNA在U87MG-luc细胞中孵育4h后的流式细胞图;

[0059] (e) ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、ANC (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、NC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、Free Cas9/sgRNA在U87MG-luc细胞中孵育4h后的激光共聚焦显微镜照片;

[0060] (i) T7E1实验分析U87MG-luc细胞内的编辑效率,数值通过imageJ分析得到;

[0061] (j) WB分析PLK1在U87MG-luc细胞中的表达;

[0062] (h) 用ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊处理的U87MG-luc细胞中PLK1基因编辑的测序结果。

[0063] 图3为另一部分体外细胞实验结果,其中:

[0064] (a) T7E1实验分析CSC2-luc细胞内的编辑效率,数值通过imageJ分析得到;

[0065] (b) WB分析PLK1在CSC2-luc细胞中的表达。

[0066] 图4A、图4B及图4C为体内实验研究结果,其中:

[0067] 图4A为ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、ANC (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、NC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、Free Cas9/sgRNA的药代循环动力学研究;

[0068] 图4B为ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、ANC (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、NC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、Free Cas9/sgRNA在心、肝、脾、肺、肾中的定性分布;右侧的放大图表示通过激光扫描共聚焦显微镜 (CLSM) 观察ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 和对照组的肿瘤渗透情况;

[0069] 图4C为ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、ANC (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、NC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、Free Cas9/sgRNA在心、肝、脾、肺、肾中的定量分布。

[0070] 图5为ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊对于U87MG-luc荷瘤小鼠的体内治疗效果,其中:

[0071] (a) 显示原位肿瘤研究时间表的示意图;

[0072] (b) U87MG-luc的生物荧光;

[0073] (c) H&E全脑扫描表征肿瘤大小;

[0074] (d) 不同纳米粒子的相对光子量;

[0075] (e) 小鼠治疗过程的体重变化;

- [0076] (f) 小鼠治疗过程的存活率；
- [0077] (g) T7E1实验分析U87MG-luc肿瘤组织的编辑效率,数值通过imageJ分析得到；
- [0078] (h) WB分析PLK1在U87MG-luc肿瘤组织中的表达；
- [0079] (i) WB定量结果；
- [0080] (j) U87MG-luc肿瘤组织的基因编辑测序结果。
- [0081] 图6为ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊对于CSC2-luc荷瘤小鼠的体内治疗效果,其中：
- [0082] (a) PDX起源的GBM GSC原位模型建立的示意图；
- [0083] (b) CSC2-luc细胞的生物荧光；
- [0084] (c) H&E全脑扫描表征肿瘤大小；
- [0085] (d) 不同纳米粒子的相对光子量；
- [0086] (e) 小鼠治疗过程的体重变化；
- [0087] (f) 小鼠治疗过程的存活率；
- [0088] (g) T7E1实验分析CSC2-Luc肿瘤组织的编辑效率,数值通过imageJ分析得到；
- [0089] (h) WB分析PLK1在CSC2-Luc肿瘤组织中的表达；
- [0090] (i) WB定量结果；
- [0091] (j) CSC2-Luc肿瘤组织的基因编辑测序结果。
- [0092] 图7为ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、ANC (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、NC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、Free Cas9/sgRNA注入小鼠体内后在不同时间点的荧光强度。

具体实施方式

[0093] 如本文所用之术语：

[0094] “由……制备”与“包含”同义。本文中所用的术语“包含”、“包括”、“具有”、“含有”或其任何其它变形,意在覆盖非排它性的包括。例如,包含所列要素的组合物、步骤、方法、制品或装置不必仅限于那些要素,而是可以包括未明确列出的其它要素或此种组合物、步骤、方法、制品或装置所固有的要素。

[0095] 连接词“由……组成”排除任何未指出的要素、步骤或组分。如果用于权利要求中,此短语将使权利要求为封闭式,使其不包含除那些描述的材料以外的材料,但与其相关的常规杂质除外。当短语“由……组成”出现在权利要求主体的子句中而不是紧接在主题之后时,其仅限定在该子句中描述的要素；其它要素并不被排除在作为整体的所述权利要求之外。

[0096] 当量、浓度、或者其它值或参数以范围、优选范围、或一系列上限优选值和下限优选值限定的范围表示时,这应当被理解为具体公开了由任何范围上限或优选值与任何范围下限或优选值的任一配对所形成的所有范围,而不论该范围是否单独公开了。例如,当公开了范围“1~5”时,所描述的范围应被解释为包括范围“1~4”、“1~3”、“1~2”、“1~2和4~5”、“1~3和5”等。当数值范围在本文中被描述时,除非另外说明,否则该范围意图包括其端值和在该范围内的所有整数和分数。

[0097] 在这些实施例中,除非另有指明,所述的份和百分比均按质量计。

[0098] “质量份”指表示多个组分的质量比例关系的基本计量单位,1份可表示任意的单位质量,如可以表示为1g,也可表示2.689g等。假如我们说A组分的质量份为a份,B组分的质

量份为b份,则表示A组分的质量和B组分的质量之比a:b。或者,表示A组分的质量为aK,B组分的质量为bK(K为任意数,表示倍数因子)。不可误解的是,与质量份数不同的是,所有组分的质量份之和并不受限于100份之限制。

[0099] “和/或”用于表示所说明的情况的一者或两者均可能发生,例如,A和/或B包括(A和B)和(A或B)。

[0100] 下面将结合具体实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0101] 本发明实施例中用到的部分试剂的来源如下:

[0102] 胍基丙烯酸酯利用文献ROS-Responsive Polymeric siRNA Nanomedicine Stabilized by Triple Interactions for the Robust Glioblastoma Combinational RNAi Therapy记载的方法合成;

[0103] 双丙烯酰胺(sigma);

[0104] 丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰羧甲酯(键凯);

[0105] Angiopep-2(强耀)。

[0106] 本申请实施例中,室温指的是10℃~30℃的温度条件。

[0107] (一)合成纳米胶囊

[0108] 实施例1 ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊的制备方法

[0109] 步骤1、Cas9和sgRNA以1:1.2的摩尔比加入到500 μ l 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸(HEPES缓冲液)(10mM PH7.4)中,室温下孵育5分钟。

[0110] 具体的,所述sgRNA的靶向基因为PLK1基因,所述sgRNA在PLK1基因上的靶位点的序列如SEQ ID NO:1所示。

[0111] 步骤2、将上述体系转移到4℃环境中,加入丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰羧甲酯搅拌10分钟,然后加入胍基丙烯酸酯搅拌5分钟,再加入可降解的N,N'-双(丙稀酰)酰胺,其中,丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰羧甲酯、胍基丙烯酸酯、N,N'-双(丙稀酰)酰胺的摩尔比为1:1:1。加入3mg过硫酸铵和3 μ LN,N',N'-四甲基乙二胺溶液,立即引发聚合反应,聚合反应在4℃及氮气保护下进行90分钟,聚合反应过程始终伴随着机械搅拌。

[0112] 具体的,所述Cas核酸酶和所述胍基丙烯酸酯的摩尔比为1:220。

[0113] 步骤3、在上述体系中加入经过氨基化处理的Angiopep-2,室温搅拌2h,最终形成纳米胶囊。

[0114] 具体的,步骤2与步骤3中均采用磁力搅拌器进行搅拌,搅拌转速为250-350rpm。

[0115] 步骤4、使用截留分子量10kDa的离心过滤管进行除杂,以除去未反应的单体和引发剂,采用PBS缓冲液(PH 7.4)对浓缩液进行稀释。

[0116] 图1为实施例1制备的 ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊的DLS测试结果图。如图1所示,实施例1制备的纳米胶囊的平均粒径大小为31nm,粒径分布相对均一。

[0117] 实施例2 ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊的制备方法

[0118] 与上述实施例1的区别之处仅在于:所述Cas核酸酶和所述胍基丙烯酸酯的摩尔比为1:200。

[0119] 实施例3 ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊的制备方法

[0120] 与上述实施例1的区别之处仅在于:所述Cas核酸酶和所述胍基丙烯酸酯的摩尔比为1:250。

[0121] 对比例1 ANC (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊的制备方法

[0122] 与上述实施例1的区别仅在于:所述步骤2中采用不可被GSH降解的六亚甲基二丙烯酸酯代替可以被GSH降解的N,N'-双(丙稀酰)胱胺,因此制得的ANC (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊中的聚合物不能被肿瘤细胞特异性的降解,从而所述ANC (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊中的基因编辑系统(Cas9RNP)不能在肿瘤细胞中高效率的释放,因此基因编辑效率较低。

[0123] 对比例2 NC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊的制备方法

[0124] 与上述实施例1的区别在于:不包含步骤3(即不添加Angiopep-2),同时丙烯酸酯聚乙二醇琥珀酰羧甲酯替换成甲氧基聚乙二醇胺(mPEG-NH₂) MW:2000(购买自芩硕),制得的NC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊不具有跨越BBB的能力,不能被人脑胶质瘤细胞高效吞噬。

[0125] 对比例3 ANC_{SS} (Cas9/sgScr) 纳米胶囊的制备方法

[0126] 与上述实施例1的区别仅在于:对比例3采用的sgRNA为无效sgRNA,不具有靶向功能。

[0127] 对比例4 Free Cas9/sgRNA的制备方法

[0128] Cas9和sgRNA以1:1.2的摩尔比添加到500μl HEPES缓冲液,室温下孵育5分钟。

[0129] 值得一提的是,下述(二)细胞实验与(三)动物实验中所使用的ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊均为实施例1制备的纳米胶囊,ANC (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊由对比例1制备而成,NC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊由对比例2制备而成,ANC_{SS} (Cas9/sgScr) 纳米胶囊由对比例3制备而成,Free Cas9/sgRNA由对比例4制备而成。

[0130] (二) 细胞实验

[0131] ①流式细胞仪及共聚焦显微镜表征细胞内吞和细胞内释放

[0132] 在流式细胞仪测试中,将U87MG-luc细胞种在6孔细胞培养板内(1×10⁶细胞/孔)在37℃培养24小时后,加入150μL的ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、ANC (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、NC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、Free Cas9/sgRNA的PBS溶液(Cas9浓度为20nM)孵育4小时,吸走样品,用500μL胰酶消化细胞。得到的细胞悬浮液在1000×g离心3分钟,用PBS缓冲液洗两次,再次分散在500μL PBS缓冲液中,1小时内进行流式细胞仪(BD FACS Calibur, Becton Dickinson, USA)测试,用Cell Quest软件圈取10000个细胞获得。

[0133] 细胞内吞及细胞内药物释放行为通过CLSM(Confocal laser scanning microscope, 激光扫描共聚焦显微镜)照片观察得到。将U87MG-luc细胞铺于含显微镜载玻片的24孔细胞培养板里(1×10⁵细胞/孔)培养24小时后,加入50μL的ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、ANC (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、NC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、Free Cas9/sgRNA的PBS缓冲液(Cas9浓度为20nM)。孵育4小时后,将培养基移除用PBS缓冲液清洗两遍。用Phalloidin染细胞骨架30分钟清洗两次,然后用DAPI染细胞核15分钟后清洗两次。荧光图片由CLSM(TCS SP5)拍摄获得。

[0134] ②体外基因编辑表征细胞的编辑效率

[0135] 将U87MG-luc/CSC2-luc细胞接种在24孔板中(5×10⁴个细胞/孔),并培养24小时。加入50μL的ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊、ANC_{SS} (Cas9/sgScr) 纳米胶囊、ANC (Cas9/sgRNA)

纳米胶囊、NC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊、Free Cas9/sgrNA的PBS溶液 (Cas9浓度为20nM) 孵育过夜, 然后更换培养基, 将细胞在37℃下再孵育48h。使用通用基因组DNA试剂盒 (中国, CWBIO) 提取基因组DNA。然后, 用高保真酶Kod-Plus-Neo (日本, TOYOBO) 扩增包含sgRNA靶向位点DNA片段, 凝胶回收试剂盒 (CWBIO, 中国) 纯化PCR产物。最后, T7E1酶 (美国, NEB) 检测插入缺失效率。对具有T7E1分析指示突变的PCR产物进行DNA测序, 然后亚克隆到T克隆载体 (Vazyme Biotech, 中国) 中。随机选择菌落, 并使用M13F作为引物 (Sangon Biotech) 通过DNA Sanger测序进一步分析, 部分克隆的测序结果见图2, h。Sanger测序结果显示, 21个克隆中有12个在靶序列处产生突变, 其中5个克隆的突变类型为T单碱基插入, 7个克隆的突变类型为碱基缺失。

[0136] ③体外WB实验表征细胞中蛋白水平表达量

[0137] 将U87MG-luc/CSC2-luc细胞接种在6孔板中 (1×10^5 个细胞/孔), 并培养24小时。加入150μL的ANC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊、ANC_{SS} (Cas9/sgScr) 纳米胶囊、ANC (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊、NC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊、Free Cas9/sgrNA的PBS溶液 (Cas9浓度为20nM) 孵育过夜, 然后更换培养基, 将细胞在37℃下再孵育72h。用裂解缓冲液 (Beyotime, 中国) 处理细胞, BCA试剂盒 (Beyotime, 中国) 对所得蛋白质的浓度进行定量。通过电泳 (SDS聚丙烯酰胺凝胶) 分离裂解物, 并将其转移到PDVF膜上 (Beyotime, 中国)。将PDVF膜与抗PLK1的一抗 (小鼠mAb 35-206, Abcam) 以1:1000的稀释, 4℃孵育过夜。ECL二抗孵育1h, 显示蛋白条带 (Licor, USA)。使用Image J软件分析蛋白质条带。

[0138] (三) 动物实验

[0139] ①药代动力学研究

[0140] 在体内药代动力学研究中, 6-8周BALB/c小鼠随机分组 (每组平行3只), 由尾静脉注射200μL的ANC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊、ANC (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊、NC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊、Free Cas9/sgrNA (Cas9剂量为30μg), 在预定时间点眼眶取血。血样经有机溶剂萃取分离出药物, 并通过多功能酶标仪定量。由软件拟合可计算得到药物在体内的消除半衰期 ($t_{1/2}$)、药物浓度-时间曲线下面积 (AUC)、清除率 (CL) 等药代动力参数。

[0141] ②抗肿瘤效果

[0142] U87MG-Luc或CSC2-Luc脑胶质肿瘤原位模型的建立是在BALB/c裸鼠 (18-20g, 6-8周龄) 脑部移植肿瘤组织。当肿瘤体积为20-30mm³时用于治疗实验; 肿瘤体积为100-150mm³时用于生物分布实验。

[0143] 以荧光素酶标记的人脑胶质瘤细胞U87MG-Luc或人脑胶质瘤干细胞CSC2-Luc建立原位模型, 通过尾静脉注射方式单剂量或多剂量给药, 由IVIS III定性及定量跟踪肿瘤生长情况。在治疗过程中, 通过小鼠体重变化及生存率来评估纳米药物的系统毒副作用及抗肿瘤活性。治疗结束后, 由H&E和TUNEL等组织学染色方法分析纳米药物治疗后小鼠各正常器官健康状况及肿瘤组织凋亡情况。通过治疗实验, 我们可以判断定纳米药物对U87MG-Luc或CSC2-Luc荷瘤裸鼠的系统毒性及抗肿瘤活性。

[0144] ③生物分布

[0145] 尾静脉注射纳米药物至荷原位U87MG-luc/CSC2-Luc裸鼠体内, 在不同时间点收取小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑和肿瘤等主要组织, 用IVIS III离体成像。随后, 将各组织匀浆、有机溶剂萃取、离心分离得上清液后, 荧光分光光度计定量分析药物在不同时间点的体内生

物分布。通过此实验我们可以推断纳米药物体内稳定性、主动靶向性能及释放出的Cas9药物在肿瘤部位富集、滞留及渗透的影响。

[0146] ④BBB跨越作用及靶向性

[0147] 通过尾静脉注射纳米药物至荷原位人脑胶质瘤U87MG-luc裸鼠体内,由小动物成像仪 (IVIS III) 跟踪纳米药物在体内不同时间点的分布情况,并重点考察在脑肿瘤部位的积累及滞留,通过与无靶向对照组 (NC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊) 及无敏感对照组 (ANC (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊) 进行定性及定量比较,考察BBB跨越效率及纳米药物肿瘤靶向能力。

[0148] (四) 结果与讨论

[0149] (1) 体外细胞实验

[0150] 流式细胞实验 (图2, d) 证明ANC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊具有很高的细胞内吞效率,其细胞内吞效率是非靶向对照组NC_{SS} (Cas9/sgrNA) 的2.5倍,是对照组ANC (Cas9/sgrNA) 的10.3倍。

[0151] CLSM (激光扫描共聚焦显微镜) (图2, e) 观察到ANC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊孵育4小时后,U87MG-luc细胞核内有很强的Cas9的荧光,这证实了ANC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊能在细胞内快速降解,释放出Cas9,并转运至细胞核发挥功能。

[0152] 体外基因编辑实验 (图2, i) 证明ANC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊对U87MG-luc细胞具有很高的基因编辑效率,达到36.6%。

[0153] WB实验 (图2, j) 证明了ANC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊能明显降低对U87MG-luc细胞中PLK1的表达,从而达到抑制肿瘤生长的作用。

[0154] (2) 体内实验研究靶向纳米药物ANC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊的药代动力学与生物分布

[0155] 体内药代动力学 (图4A) 研究结果表明,靶向纳米药物ANC_{SS} (Cas9/sgrNA) 在体内的循环时间较长,与ANC (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊、NC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊相当,明显长于Free Cas9/sgrNA。说明纳米胶囊的生物相容性较好。

[0156] 荷U87MG-luc脑胶质瘤的BALB/c小鼠的体内生物分布实验 (图4B, 图4C) 结果显示,ANC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊在肿瘤部位的富集量和Free Cas9/sgrNA相比有显著提高,注射4小时后,Cas9的富集量为12% (每克组织中的Cas9含量占注射总量的质量百分比)。

[0157] (3) ANC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊的抑瘤实验及组织学分析

[0158] ANC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊在U87MG-luc荷瘤BALB/c裸鼠中的治疗实验结果如图5所示:

[0159] 图5中,ANC_{SS} (Cas9/sgrPLK1) 表示sgRNA的靶向基因为PLK1,ANC_{SS} (Cas9/sgrScr) 表示阴性对照试验,PBS表示PBS缓冲液 (对照试验);

[0160] 从图5中可以看出,ANC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊能有效抑制肿瘤增长。ANC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊治疗的小鼠体重变化微小,相比较下,PBS组8天内体重下降20%,说明ANC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊的毒副作用小,另外,本领域技术人员已知脑瘤增长会引起体重下降,因此本申请的实验数据侧面反映ANC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊具有较好的疗效,能够对脑瘤起到抑制作用。

[0161] ANC_{SS} (Cas9/sgrNA) 纳米胶囊在CSC2-luc荷瘤BALB/c裸鼠中的治疗实验结果如图6

所示：

[0162] 图6中，ANC_{SS} (Cas9/sgPLK1) 表示sgRNA的靶向基因为PLK1，ANC_{SS} (Cas9/sgScr) 表示阴性对照试验，PBS表示PBS缓冲液 (对照试验)；

[0163] 从图6中可以看出，ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊能有效抑制肿瘤增长。ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊治疗的小鼠体重变化微小，说明ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊的毒副作用小，另外，本领域技术人员已知脑瘤增长会引起体重下降，因此本申请的实验数据侧面反映ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊具有较好的疗效，能够对脑瘤起到抑制作用。

[0164] 引人注目的是，小鼠在ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊剂量为30μg治疗后，明显延长了存活周期。由H&E染色的组织学分析结果证明，在ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊剂量为30μg治疗后，对心、肝、脾、肺、肾在内的主要器官危害很小。结果再次说明ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊具有极低的系统毒性。

[0165] (4) ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊的肿瘤靶向性实验

[0166] 由小动物成像仪 (IVIS III) 跟踪纳米药物在体内不同时间点的分布情况 (图7) 的结果表明，ANC_{SS} (Cas9/sgRNA) 纳米胶囊的荧光强度明显高于对照组，说明其具有很好的靶向肿瘤的能力。

[0167] 最后应说明的是：以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案，而非对其限制；尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

[0168] 此外，本领域的技术人员能够理解，尽管在此的一些实施例包括其它实施例中所包括的某些特征而不是其它特征，但是不同实施例的特征的组合意味着处于本发明的范围之内并且形成不同的实施例。例如，在上面的权利要求书中，所要求保护的实施例的任意之一都可以以任意的组合方式来使用。公开于该背景技术部分的信息仅仅旨在加深对本发明的总体背景技术的理解，而不应当被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已为本领域技术人员所公知的现有技术。

序列表

<110> 河南大学

<120> 基因编辑纳米胶囊及其制备方法与应用

<160> 1

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

tacctacggc aaattgtgct 20

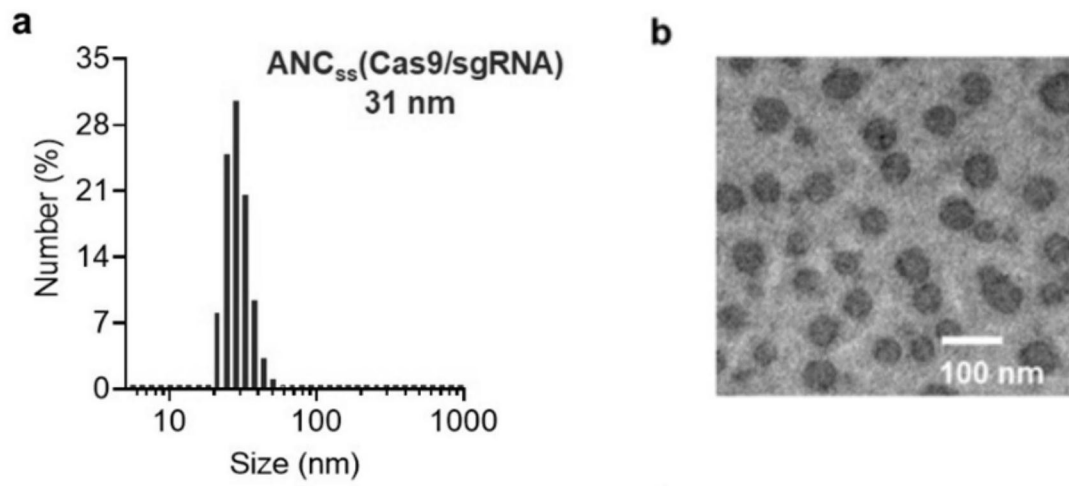


图1

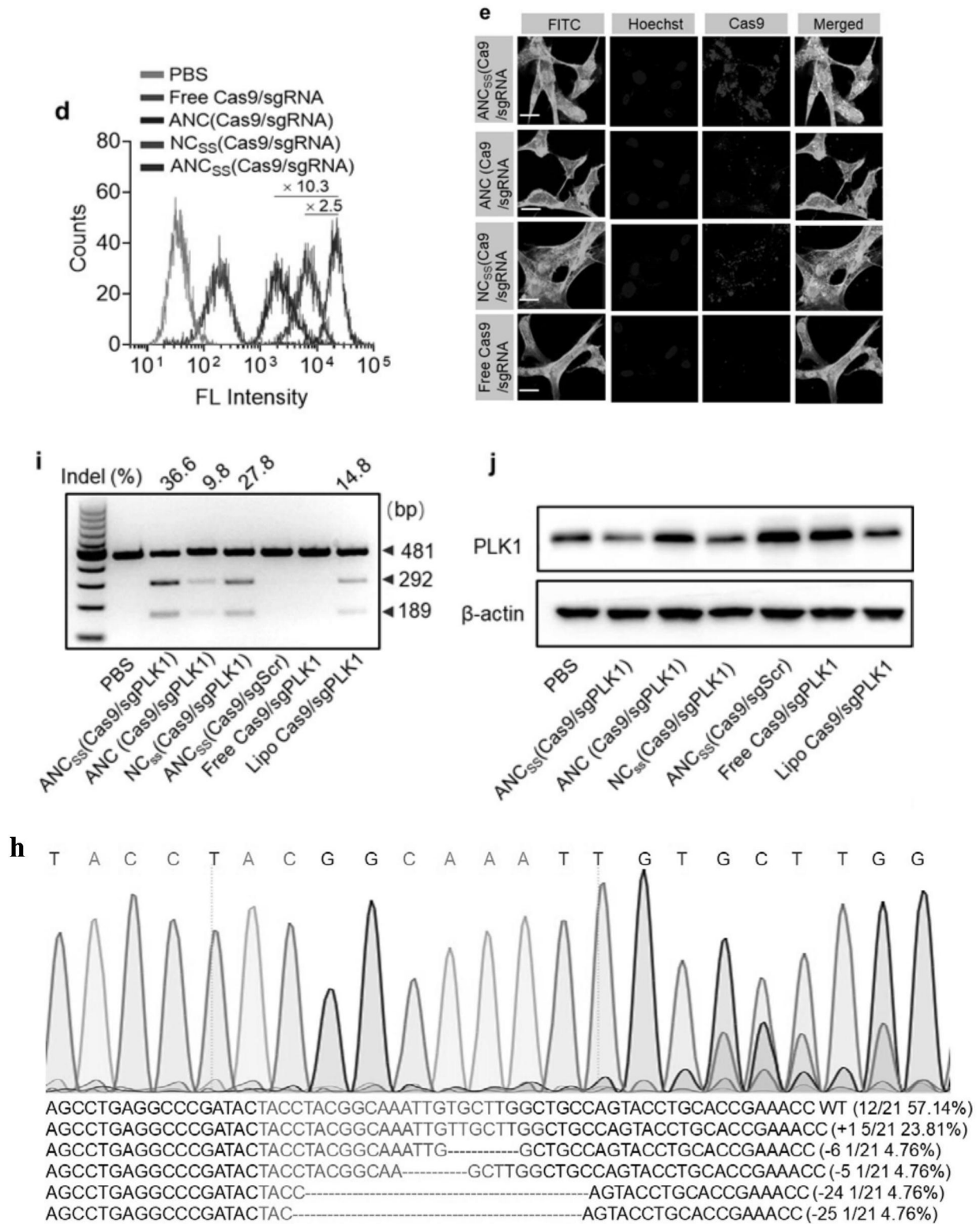


图2

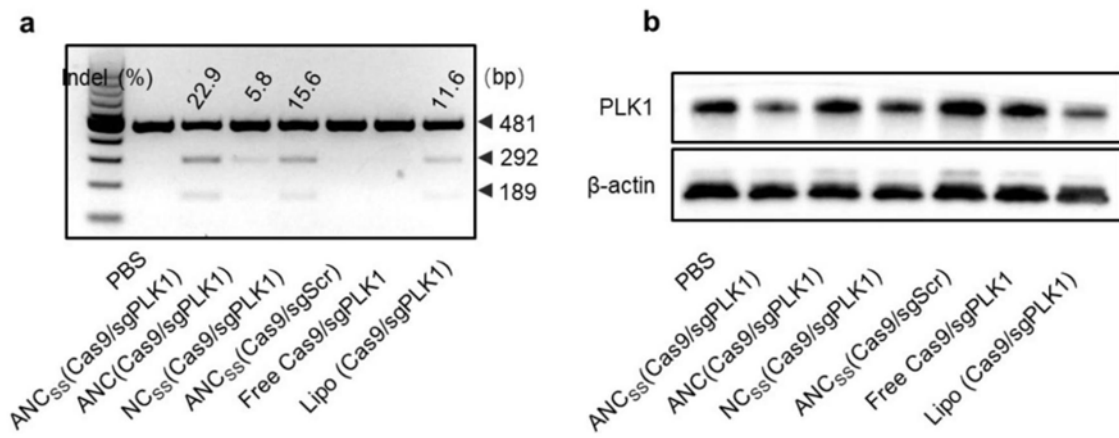


图3

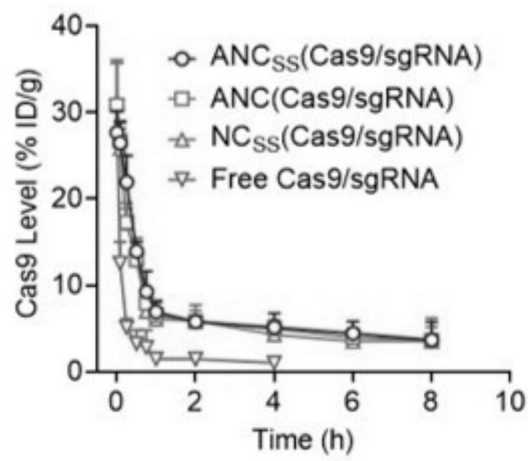


图4A

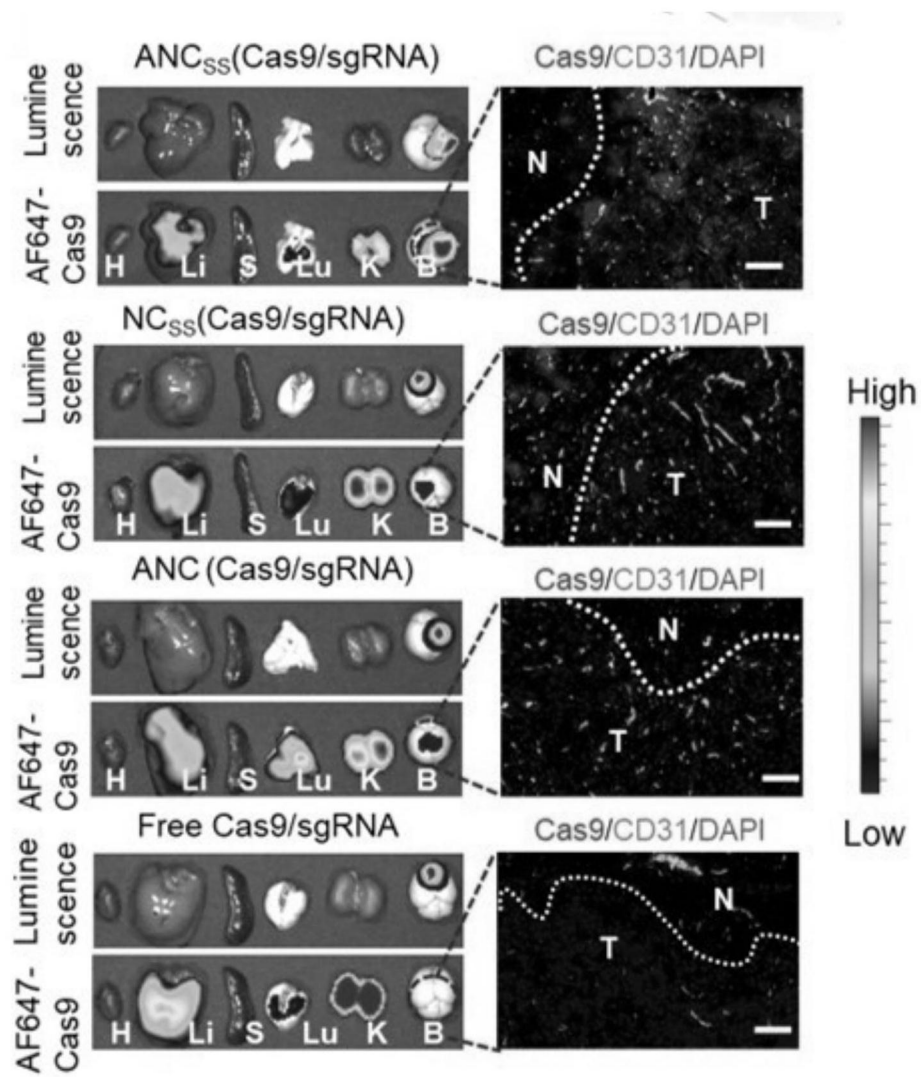


图4B

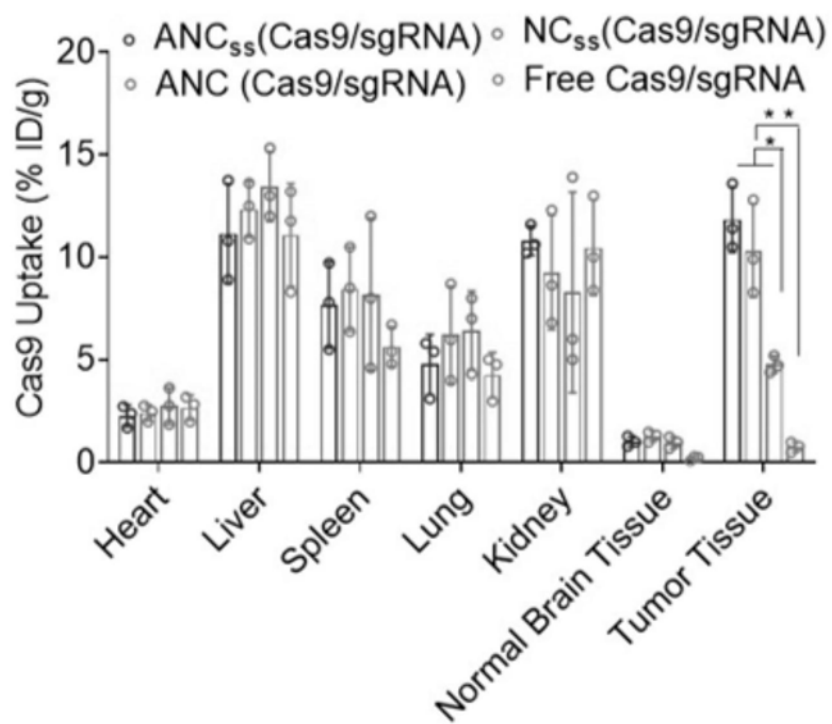


图4C

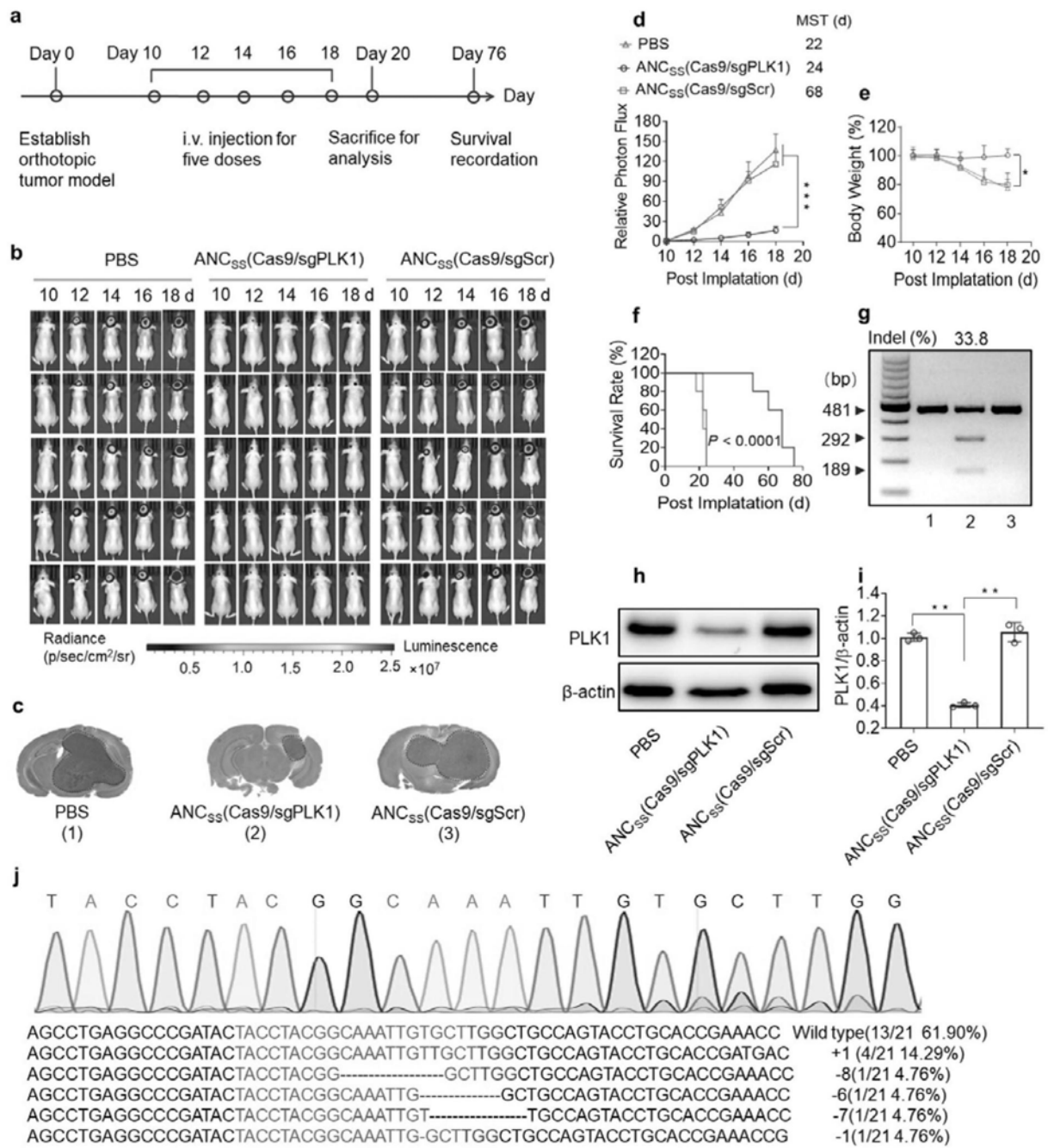


图5

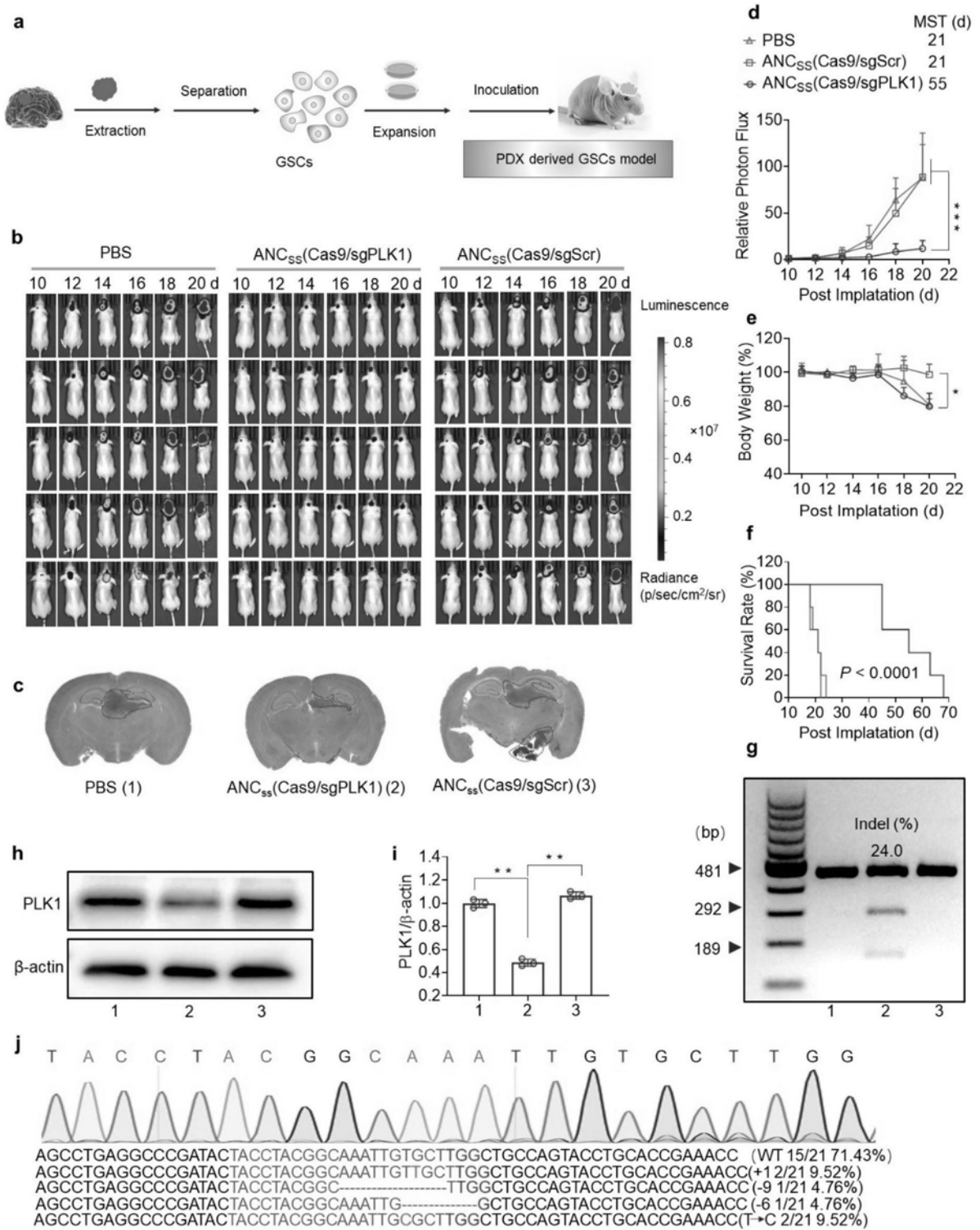


图6

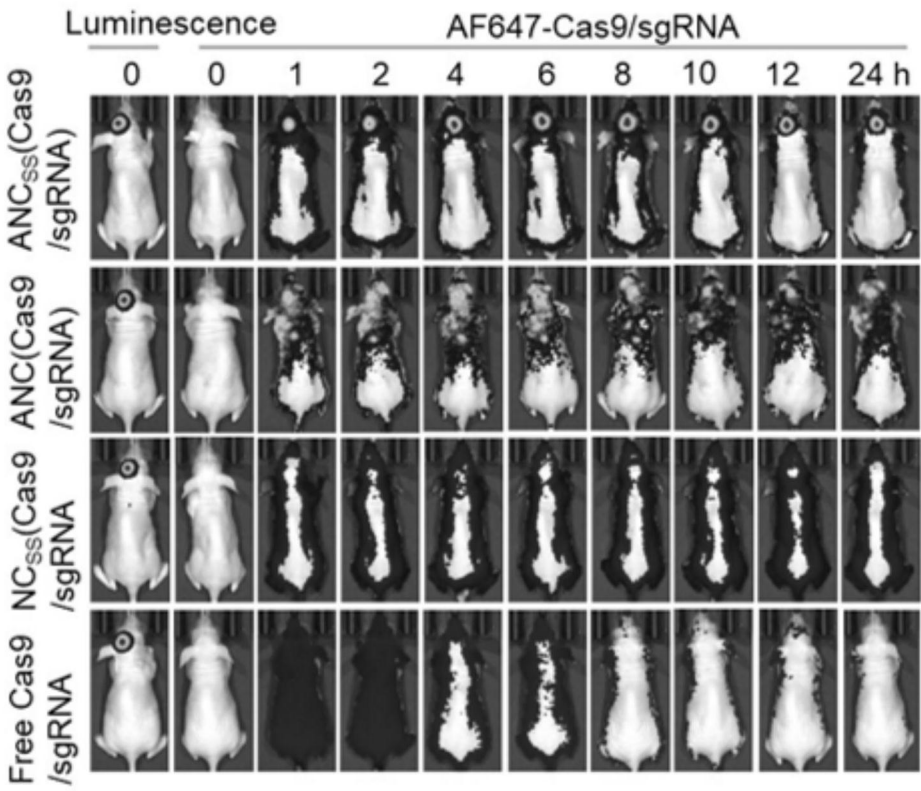


图7