

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2014 年 1 月 9 日 (09.01.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/005314 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01) A61K 47/34 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01) A61P 19/08 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2012/078243

(22) 国际申请日: 2012 年 7 月 5 日 (05.07.2012)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 香港中文大学
(THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG)
[CN/CN]; 中国香港特别行政区新界沙田香港中文
大学, Hong Kong (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 张戈 (ZHANG, Ge)
[CN/CN]; 中国香港特别行政区新界沙田香港中文
大学, Hong Kong (CN)。 秦岭 (QIN, Ling) [CN/CN];
中国香港特别行政区新界沙田香港中文大学, Hong
Kong (CN)。 吴衡 (WU, Heng) [CN/CN]; 中国香港
特别行政区新界沙田香港中文大学, Hong Kong
(CN)。 熊良俭 (HUNG, Leungkim) [CN/CN]; 中国

香港特别行政区新界沙田香港中文大学, Hong
Kong (CN)。

(74) 代理人: 广州三环专利代理有限公司 (GUANG-
ZHOU SCIHEAD PATENT AGENT CO., LTD.); 中国
广东省广州市越秀区先烈中路 80 号汇华商贸大厦
1508 室, Guangdong 510070 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保
护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO,
RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY,
TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保
护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA,
RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,

[见续页]

(54) Title: BONE-TARGETED DELIVERY SYSTEM FOR OSTEOGENESIS TREATMENT BASED ON SMALL NUCLEIC ACID MEDICINE AND PREPARATION METHOD THEREOF

(54) 发明名称: 基于小核酸药物成骨治疗的骨靶向递送系统及其制备方法

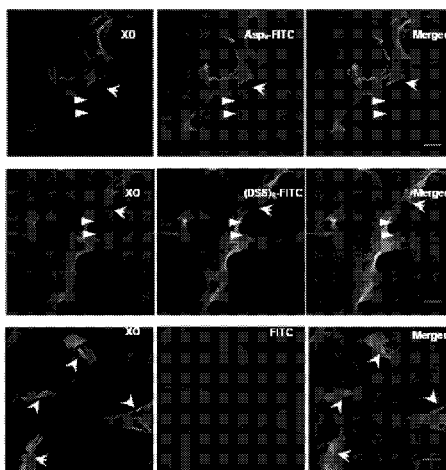


图 1 / Fig. 1

(57) Abstract: A bone-targeted delivery system for osteogenesis treatment based on small nucleic acid medicine and a preparation method thereof. The bone-targeted delivery system comprises liposome, bone-targeted molecules, and small nucleic acid medicine. The bone-targeted molecules are selected from one or more of diphosphonate, eight aspartic acid polypeptide repetitive sequences, six aspartic acid-serine-serine polypeptide repetitive sequences, and aptamers screened out for osteoblastlike cells. The small nucleic acid medicine is selected from one or more of small interfering ribonucleic acid with a function for promoting bone formation, mimics of micro ribonucleic acid, and blocking agents of micro ribonucleic acid.

(57) 摘要: 一种基于小核酸药物成骨治疗的骨靶向递送系统及其制备方法。该骨靶向递送系统包括脂质体、骨靶向分子和小核酸药物, 所述骨靶向分子选自双磷酸盐、8 个天门冬氨酸多肽重复序列、6 个天门冬氨酸-丝氨酸-丝氨酸多肽重复序列和针对成骨样细胞筛选出的适配子中的一种或几种, 所述小核酸药物选自具有促进骨形成功能的小干扰核糖核酸、微小核糖核酸的模拟物和微小核糖核酸的阻断剂中的一种或几种。



WO 2014/005314 A1



IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

基于小核酸药物成骨治疗的骨靶向递送系统及其制备方法

技术领域

本发明属于分子生物学领域，涉及一种基于小核酸药物成骨治疗的骨靶向递送系统及其制备方法。

背景技术

骨组织发生的基本过程包括骨组织形成和骨组织吸收两个方面。成骨细胞和破骨细胞分别负责骨形成和骨吸收，两者之间的平衡保证了成年动物及人类骨量的恒定。

目前，骨靶向药物递送系统主要运用于小分子药物的递送，通常由骨靶向分子和小分子药物/高分子化合物组成。常见的骨靶向分子包括四环素类，双磷酸盐类，以及含有天门冬氨酸重复序列的多肽。这些靶向分子可直接与小分子药物如雌二醇，布洛芬等共价连接，也可以与高分子化合物如聚乳酸-羟基乙酸共聚物，聚乙二醇等连接形成载体系统携带药物。这些骨靶向分子介导的骨组织分布情况有所不同。据报道，双磷酸盐类既靶向骨形成表面又靶向骨吸收表面，而天门冬氨酸重复序列主要靶向骨吸收表面。然而，能够特异性靶向骨形成表面的药物递送系统还未见报道。

过去的几年里，骨生物学得到了快速的发展，一系列负调控骨形成且不激活骨吸收的基因被鉴定出来，这包括酪蛋白激酶相互作用蛋白 1 (CKIP-1)、WIF-1 和 Hoxc8 等。这使得通过核糖核酸干扰 (RNAi) 等技术手段利用小核酸药物沉默上述负调控骨形成的基因，从而进行骨治疗成为可能。然而，成骨样细胞主要分布在骨形成表面，而且在使用小核酸药物进行成骨治疗时，成骨样细胞是主要的作用靶点，所以特异性靶向骨形成表面以及成骨样细胞尤为重要。

另外，由于小核酸药物需要在细胞浆里释放并与 mRNA 作用，普通的高分子材料很难确保有较高的转染效率，所以递送小分子药物的骨靶向递送系统并不适用于小核酸药物。

发明内容

为解决上述问题，本发明通过采用针对骨形成表面以及成骨样细胞的骨靶向分子、抑制负调控骨形成的小核酸药物和有助于小核酸药物转染的脂质体连接，提供了一种基于小核酸药物成骨治疗的骨靶向递送系统及其制备方法。本发明相比传统的骨靶向递送系统具有更强的专属性和特异性，小核酸药物转染效率高，能够达到较高的沉默效率。

一方面，本发明提供了一种基于小核酸药物成骨治疗的骨靶向递送系统，包括脂质体、

骨靶向分子和小核酸药物,其中,骨靶向分子选自双磷酸盐、SEQ ID NO: 1 (8个天门冬氨酸多肽重复序列(Asp)₈)、SEQ ID NO: 2 (6个天门冬氨酸-丝氨酸-丝氨酸多肽重复序列(Asp-Ser-Ser)₆,即(DSS)₆)和针对成骨样细胞筛选出的适配子中的一种或几种,小核酸药物选自具有促进骨形成功能的小干扰核糖核酸(siRNA)、微小核糖核酸(miRNA)的模拟物(microRNA mimic)和微小核糖核酸的阻断剂(Antagomir)中的一种或几种。

其中,脂质体含有非阳离子脂质,或者含有非阳离子脂质和阳离子脂质的混合物。优选地,所述脂质体中阳离子脂质占总脂质含量的0%~50%,非阳离子脂质占总脂质含量的50%~100%。

阳离子脂质为一类带正电荷的磷脂,通常与一种或几种中性脂质组成阳离子脂质体。阳离子脂质体中使用中性脂质成分上与常规脂质体相似,如胆固醇(chol)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)等。优选地,阳离子脂质选自1,2-二油烯氧基-3-三甲氨基丙烷(DOTAP)、N-[1-(2,3-二油基氧)丙基]-N,N,N-氯化三甲铵(DOTMA)、和DC-胆固醇(DC-Chol)的一种或几种。

非阳离子脂质包括不带电荷和带负电荷的脂质。优选地,非阳离子脂质选自二油酰二甲基铵丙烷(DODAP)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)和DLin-KC2-DMA中的一种或几种。

脂质体中可含有中性脂质胆固醇等辅助脂质和/或聚乙二醇(PEG)等修饰剂。PEG修饰脂质体具有良好的水溶性、毒性低、无免疫原性等优势。因为PEG末端可以进行羧酸、胺或马来酰亚胺基团等活性基团修饰,便于进一步与骨靶向分子连接,所以PEG修饰脂质适合用作于连接反应的起始剂。优选地,PEG修饰脂质带有甲氧基末端,例如DSPE-mPEG。

优选地,骨靶向递送系统含有二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-马来酰亚胺。优选地,脂质体(PEG修饰脂质)含有二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-马来酰亚胺(DSPE-PEG-MAL),末端的活性马来酰亚胺基团有利于在脂质体表面进行修饰。也优选地,当脂质体中不含有二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-马来酰亚胺(DSPE-PEG-MAL)时,骨靶向分子可预先与二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-马来酰亚胺(DSPE-PEG-MAL)进行共价键连接,然后以胶束的形式插入脂质双分子层中。

骨靶向分子可以选自双磷酸盐、天门冬氨酸多肽重复序列或针对成骨样细胞筛选出的适配子中的一种或几种。天门冬氨酸多肽重复序列可以选自SEQ ID NO: 1 (8个天门冬氨酸多肽重复序列(Asp)₈)和SEQ ID NO: 2 (6个天门冬氨酸-丝氨酸-丝氨酸多肽重复序列(DSS)₆)中的一种或几种。

优选地,骨靶向递送系统含有二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-马来酰亚胺以及所

述骨靶向分子末端进行巯基修饰。此时,优选地,骨靶向分子直接连接于所述脂质体表面:骨靶向分子末端的巯基可以与二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺中的马来酰亚胺基团直接反应。以及优选地,骨靶向分子与其它分子连接后以胶束的形式插入所述脂质体双分子层:骨靶向分子末端的巯基可以与二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺残端的顺丁烯二酰亚胺反应,形成硫醚键,骨靶向分子与二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺的共价键连接化合物以胶束的形式插入脂质体双分子层(二硬脂酰磷脂酰乙醇胺部分插入脂质双分子层中),从而使脂质体具有骨靶向性。

优选地,骨靶向分子为SEQ ID NO: 2(6个天门冬氨酸-丝氨酸-丝氨酸多肽重复序列(DSS)₆)。

优选地,骨靶向分子占脂质体浓度的2~10mol%。

适配子(aptamer)是针对成骨样细胞进行筛选获得的与其具有特异性结合的单链DNA或者RNA。优选地,和成骨样细胞具有特异性结合地适配子选自:SEQ ID NO: 4(5'-GTACTTCCGGCGGGTTCTATGGGCCCTGTCTCCCTTCCC AAAAGTGCACGCTAC-3'),以及SEQ ID NO: 5(5'-GTACTTCCGACTTGGGGC GGGTTTGTGCTGGCTGTCGGC AAAAGTGCA-3')。

小核酸药物选自具有促进骨形成功能的小干扰核糖核酸(siRNA)、微小核糖核酸(miRNA)的模拟物(microRNA mimic)或微小核糖核酸的阻断剂(Antagomir)。小核酸药物被包封在递送系统中,可作用于靶向目标,抑制负调控骨形成的基因表达。优选地,小核酸药物与脂质体的脂质质量比为2%~20%。

优选地,小干扰核糖核酸为针对成骨的负调控基因的小干扰核糖核酸。更优选地,小干扰核糖核酸为针对酪蛋白激酶相互作用蛋白1(CKIP-1)、WIF-1或Hoxc8的小干扰核糖核酸。以及优选地,小干扰核糖核酸为针对酪蛋白激酶相互作用蛋白1(CKIP-1)的小干扰核糖核酸。再优选地,针对CKIP-1的小干扰核糖核酸包含SEQ ID NO: 3(5-CCUGAGUGACUAUGAGAAG-3)。

由于微小核糖核酸的模拟物和微小核糖核酸的阻断剂是较短的碱基序列,与小干扰核糖核酸在化学性质上具有较高的相似性,所以携带小干扰核糖核酸的骨靶向载体同样适用于微小核糖核酸的模拟物和微小核糖核酸的阻断剂。

第二方面,本发明提供了一种基于小核酸药物成骨治疗的骨靶向递送系统的制备方法,包括以下步骤:

(1)制备含有小核酸药物的脂质体:取脂质溶解在乙醇中,在搅拌状态下缓慢加至含有小核酸药物的缓冲液溶液中,采用挤出仪对脂质体进行挤出,透析去除乙醇,小核酸药物选

自具有促进骨形成功能的小干扰核糖核酸、微小核糖核酸的模拟物和微小核糖核酸的阻断剂中的一种或几种；

(2) 连接骨靶向分子和含有小核酸药物的脂质体：将骨靶向分子与含有小核酸药物的脂质体混合连接，制得骨靶向小核酸药物脂质体，骨靶向分子选自双磷酸盐、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和针对成骨样细胞筛选出的适配子中的一种或几种；

(3) 纯化骨靶向小核酸药物脂质体。

其中，步骤(1)为制备含有小核酸药物的脂质体。优选地，将脂质按一定比例溶解在乙醇中，缓慢加入快速搅拌状态下的含有小核酸药物的枸橼酸盐缓冲液溶液(10~50 mM, pH 值为 3.5~5.5)中；搅拌10~30分钟后，采用挤出仪对脂质体进行挤出，室温下在pH值为6.8~7.5的磷酸盐缓冲溶液中透析2~4小时去除乙醇，即得含有小核酸药物的脂质体。优选地，在制备含有小核酸药物的脂质体时乙醇在总体积中所占比例为30%~40%。高含量的乙醇使得脂质体具有变形能力，降低脂质体的界面张力，从而使其流动性增加。

优选地，所述脂质体含有非阳离子脂质，或者含有非阳离子脂质和阳离子脂质的混合物。更优选地，所述脂质体中阳离子脂质占总脂质含量的0%~50%，非阳离子脂质占总脂质含量的50%~100%。

阳离子脂质为一类带正电荷的磷脂，通常与一种或几种中性脂质组成阳离子脂质体。阳离子脂质体中使用中性磷脂成分上与常规脂质体相似，如胆固醇(chol)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)等。优选地，阳离子脂质选自1,2-二油烯氧基-3-三甲氨基丙烷(DOTAP)、N-[1-(2,3-二油基氧)丙基]-N,N,N-氯化三甲铵(DOTMA)和DC-胆固醇(DC-Chol)的一种或几种。

非阳离子脂质包括不带电荷和带负电荷的脂质。优选地，非阳离子脂质选自二油酰二甲基铵丙烷(DODAP)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)和DLin-KC2-DMA中的一种或几种。

脂质体中可含有中性脂质胆固醇等辅助脂质和/或聚乙二醇(PEG)等修饰剂。优选地，PEG修饰脂质体含有二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-马来酰亚胺(DSPE-PEG-MAL)，末端的马来酰亚胺基团有利于脂质体的表面修饰。

优选地，小核酸药物与含有小核酸药物的脂质体中脂质的质量比为2%~20%。小核酸药物选自具有促进骨形成功能的小干扰核糖核酸、微小核糖核酸的模拟物和微小核糖核酸的阻断剂中的一种或几种。

优选地，小干扰核糖核酸为针对成骨的负调控基因的小干扰核糖核酸。更优选地，小干扰核糖核酸为针对酪蛋白激酶相互作用蛋白1(CKIP-1)、WIF-1或Hoxc8的小干扰核糖核酸。

以及优选地，小干扰核糖核酸为针对酪蛋白激酶相互作用蛋白 1 (CKIP-1) 的小干扰核糖核酸。再优选地，针对 CKIP-1 的小干扰核糖核酸包含 SEQ ID NO: 3 (5-CCUGAGUGACUAUGAGAAG-3)。

将含有小核酸药物的脂质体通过双层聚碳酸酯膜挤出，从而控制粒径在 50~150nm。

步骤 (2) 中，骨靶向分子选自双磷酸盐、天门冬氨酸多肽重复序列和针对成骨样细胞筛选出的适配子中的一种或几种。天门冬氨酸多肽重复序列可以选自 SEQ ID NO: 1 (8 个天门冬氨酸多肽重复序列(Asp)₈) 或 SEQ ID NO: 2 (6 个天门冬氨酸-丝氨酸-丝氨酸多肽重复序列(DSS)₆)。

优选地，骨靶向分子末端进行巯基修饰。

优选地，当含有小核酸药物的脂质体中含有聚乙二醇 (PEG) 修饰脂质体-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺 (DSPE-PEG-MAL) 时，骨靶向分子直接连接于所述脂质体表面。

优选地，当脂质体中不含有聚乙二醇 (PEG) 修饰脂质体-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺 (DSPE-PEG-MAL) 时，步骤 (2) 所述混合进一步包括加入二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺，预先将骨靶向分子与 DSPE-PEG-MAL 进行化学反应，生成骨靶向分子与 DSPE-PEG-MAL 的共价键连接化合物，该化合物可在水溶液中形成胶束，与含有小核酸药物的脂质体孵育 4~12 小时后插入脂质双分子层，使得骨靶向分子连接于所述脂质体表面。

优选地，骨靶向分子为 SEQ ID NO: 2 (6 个天门冬氨酸-丝氨酸-丝氨酸多肽重复序列(DSS)₆)。

优选地，骨靶向分子占脂质体浓度的 2~10mol%。

适配子 (aptamer) 是针对成骨样细胞进行筛选获得的与其具有特异性结合的单链 DNA 或者 RNA。优选地，和成骨样细胞具有特异性结合地适配子选自：SEQ ID NO: 4 (5'-GTACTTCCGGCGGGTTCTATGGGCCCTGTCTCCCTTCCC AAAAGTGACGCTAC-3')，以及 SEQ ID NO: 5 (5'-GTACTTCCGACTTGGGGC GGGTTTGTGCTGGCTGTCCGC AAAAGTGCA-3')。

步骤 (3) 为除去未反应的骨靶向分子以及未插入脂质体的胶束分子。纯化方法可以为通过 Sepharose CL-4B 柱进行分子大小排除层析。优选地，步骤 (3) 中的纯化的骨靶向脂质体可进一步进行冻干，制成冻干粉末保存。更优选地，冻干时加入冻干保护剂，选自蔗糖，甘露醇，乳糖，海藻糖，白蛋白，葡萄糖，右旋糖酐中的一种或几种。

第三方面，本发明提供了另外一种基于小核酸药物成骨治疗的骨靶向递送系统的制备方

法，与本发明第二方面的区别在于，在步骤（1）中先制备空白脂质体，连接骨靶向分子后冻干，加入小核酸药物磷酸盐缓冲溶液进行水化。具体包括以下步骤：

（1）制备空白脂质体：将脂质溶解在氯仿中，旋转蒸发除去有机溶剂后，加缓冲液进行水化，采用挤出仪对多层脂质体进行挤出，制得空白脂质体；

（2）连接骨靶向分子和空白脂质体：取骨靶向分子与空白脂质体混合连接，反应生成骨靶向空白脂质体，骨靶向分子选自双磷酸盐、SEQ ID NO: 1（8个天门冬氨酸多肽重复序列 $(\text{Asp})_8$ ）、SEQ ID NO: 2（6个天门冬氨酸-丝氨酸-丝氨酸多肽重复序列 $(\text{DSS})_6$ ）和针对成骨样细胞筛选出的适配子中的一种或几种；

（3）纯化骨靶向空白脂质体以及冻干；

（4）包封小核酸药物：将小核酸药物溶于经 DEPC 处理的蒸馏水中，加入冻干骨靶向空白脂质体进行水化，制得骨靶向小核酸药物脂质体递送系统，小核酸药物选自具有促进骨形成功能的小干扰核糖核酸、微小核糖核酸的模拟物和微小核糖核酸的阻断剂中的一种或几种。

步骤（2）中，优选地，骨靶向分子末端进行巯基修饰。优选地，空白脂质体含有二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺，骨靶向分子直接与空白脂质体孵化连接于所述空白脂质体表面。

也优选地，当步骤（2）所述空白脂质体不含有二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺时，步骤（2）所述混合进一步包括加入二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺，预先将骨靶向分子与二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺进行化学反应，生成骨靶向分子与二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺的共价键连接化合物，所述化合物在水溶液中形成胶束，与空白脂质体孵育 4~12 小时后插入脂质双分子层。

优选地，步骤（2）骨靶向分子为 SEQ ID NO: 2。

优选地，步骤（2）骨靶向分子占所述空白脂质体中脂质浓度的 2~10mol%。

步骤（3）中，先制备小核酸药物缓冲盐溶液，水化所述冻干粉末，孵育 20~40 分钟后，制得骨靶向小核酸药物脂质体系统。优选地，小核酸药物缓冲盐溶液为 10~50 mM 磷酸盐缓冲液，pH 值为 6.8~7.5。

优选地，小核酸药物与所述空白脂质中脂质质量比为 2%~20%。小核酸药物选自具有促进骨形成功能的小干扰核糖核酸、微小核糖核酸的模拟物和微小核糖核酸的阻断剂中的一种或几种。

优选地，小干扰核糖核酸为针对成骨的负调控基因的小干扰核糖核酸。更优选地，小干扰核糖核酸为针对酪蛋白激酶相互作用蛋白 1 (CKIP-1)、WIF-1 或 Hoxc8 的小干扰核糖核酸。以及优选地，小干扰核糖核酸为针对酪蛋白激酶相互作用蛋白 1 (CKIP-1) 的小干扰核糖核酸。

酸。再优选地，针对 CKIP-1 的小干扰核糖核酸包含 SEQ ID NO：3 (5-CCUGAGUGACUAUGAGAAG-3)。

其它物质组分、含量和连接过程均同前文所述。

本发明通过采用针对骨形成表面以及成骨样细胞的骨靶向分子、抑制负调控骨形成的小核酸药物和有助于小核酸药物转染的脂质体连接，提供了一种基于小核酸药物成骨治疗的骨靶向递送系统及其制备方法，具有以下有益效果：主要针对骨形成表面以及成骨样细胞进行靶向，具有较强的专属性；可防止小核酸药物被体内物质降解，可将其特异性传递到靶细胞中，转染效率高，有利于小核酸药物达到较高的沉默效率。

附图说明

图1为标记FITC的(DSS)₆和Asp₈以及对照组在骨形成表面的荧光分布图；

图2为携带FAM荧光标记的本发明骨靶向小核酸药物脂质体递送系统以及对照组在体内骨靶向性验证实验中各器官的荧光强度图；

图3~图7为FAM荧光标记的siRNA和相应抗体（anti-RUNX2、COL1A1、anti-ALP、anti-osteocalcin和OSCAR）标记各种细胞的免疫组化分析结果图。

具体实施方式

以下所述是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也视为本发明的保护范围。下列具体实施方式中如果未注明具体条件的实验方法，通常按照本领域技术内的分子生物学的常规方法和条件，这种技术和条件在文献中有完整解释。参见例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验手册中所述的技术和条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例一 (DSS)₆能够选择性靶向骨形成表面

选用 18 只 6 月龄雌性大鼠 (Sprague-dawley)，分成FITC组（异硫氰酸荧光素，n=6）、Asp₈组（n=6）和(DSS)₆组（n=6）。Asp₈和(DSS)₆均分别标记上FITC。提前 3 天对大鼠进行皮下注射，注射Xylenol Orange (XO, 30mg/kg) 标记骨形成表面。使用氯胺酮（75mg/kg）和二甲苯胺噻嗪（10mg/kg）麻醉大鼠后，将FITC、Asp₈-FITC和(DSS)₆-FITC 分别通过尾部静脉注射给药，27 μM/kg/0.2ml生理盐水。24 小时后杀死大鼠观察未钙化组织部分。用梯度浓度的乙醇将股骨和胫骨脱水，用改性甲基丙烯酸甲酯包埋（不脱钙）。使用Leica SM2500E microtome (Leica Microsystems) 将股骨切片成 15 μm 的厚度。然后，通过共聚焦显微镜 (LSM510, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 观察FITC的荧光分布。

结果如图 1 所示, FITC自身在切片中没有显示出绿色荧光, 表明没有骨靶向性, 然而 (DSS)₆-FITC的绿色荧光带与标记骨形成表面的红色荧光带有很好的重合, 表明(DSS)₆主要到达骨形成表面。Asp₈-FITC的绿色荧光带没有与红色荧光带重合, 主要分布在表面呈蚕食状和坑状凹陷的骨吸收表面。

实施例二 制备骨靶向小核酸药物脂质体递送系统

(1) 制备含有小核酸药物的脂质体: 取二油酰二甲基铵丙烷 (DODAP), 二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、胆固醇 (Chol)、DSPE-mPEG2000 (甲氧基为末端的 PEG) 按 40:10:45:5 的摩尔比溶解在乙醇中, 缓慢加入快速搅拌中的 1mg/mL 的小干扰核糖核酸随机序列的柠檬酸盐缓冲液 (pH 值为 4), 乙醇占总体积的 35%, siRNA 与脂质的质量比为 10%。在室温下搅拌 20 分钟后采用挤出仪对脂质体进行挤出, 通过孔径为 0.08 μm 的双层聚碳酸酯膜, 控制粒径在 50~100nm。在室温下将该脂质体在 pH7.4 的缓冲盐溶液中透析 3 小时去除乙醇和未包封的小干扰核糖核酸。

(2) 连接骨靶向分子和含有小核酸药物的脂质体: 将二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺 (DSPE-PEG-MAL) 溶于氯仿中, 在氮气环境中蒸发除去有机溶剂后, 取末端带有巯基基团 (-SH) 的骨靶向分子 8 个天门冬氨酸多肽重复序列 (Asp)₈, 按摩尔比为 4:1 与 DSPE-PEG-MAL 混合, 在 10 mM 磷酸盐缓冲液中 4℃ 孵育过夜。采用高效液相色谱法和 Ellman 试剂监测反应的进行。通过磷酸盐分析检测脂质体的脂质浓度, 然后取 2mol% (相对总脂质浓度) 的 DSPE-PEG2000-(Asp)₈ 以胶束的形式插入到脂质体表面, 37℃ 水浴孵育 6 小时后, 制得骨靶向小核酸药物脂质体递送系统。

(3) 纯化骨靶向小核酸药物脂质体递送系统

通过 Sepharose CL-4B 柱进行分子大小排除层析, 采用磷酸盐缓冲液进行洗脱, 除去未插入脂质体的胶束以未连接的骨靶向分子。

(4) 冷冻干燥: 取骨靶向小核酸药物脂质体 0.5ml, 用 0.5ml 含有乳糖的蒸馏水稀释 (乳糖: 脂质体摩尔比为 10) 后, 使用冷冻干燥机 (Labconco, Freezone 6, USA) 冻干 48 小时, 制得骨靶向小核酸药物脂质体冻干粉。

实施例三 制备骨靶向小核酸药物脂质体递送系统

(1) 制备空白脂质体: 将 N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTAP)、二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、胆固醇 (Chol)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-mPEG2000) 和二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺 (DSPE-PEG-MAL) 按摩尔比 42:15:38:3:2 溶解于氯仿中, 采用薄膜分散法, 旋转蒸发除去氯仿后, 加入 10 mM 磷酸盐缓冲液进行水化形成多层脂质体, 采用挤出仪对多层脂质体进行挤出, 制得大单室空

白脂质体；

(2) 连接骨靶向分子和空白脂质体：取末端带有巯基的骨靶向分子(DSS)₆-SH(相对于空白脂质体中DSPE-PEG-MAL摩尔比为 3:1)与空白脂质体混合，在室温条件下孵化 3 小时，形成骨靶向空白脂质体。

(3) 纯化骨靶向空白脂质体以及冻干：采用Sephacrose CL-4B柱进行分子大小排除层析或者在磷酸盐缓冲液(pH 7.4)透析除去游离的(DSS)₆。取经纯化后的骨靶向空白脂质体 0.5ml，脂质浓度约 20umol/ml，采用 0.5ml含有蔗糖的蒸馏水稀释(蔗糖：脂质体摩尔比为 8)后，使用冷冻干燥机(Labconco, Freezone 6, USA)冻干 48 小时，制得骨靶向空白脂质体冻干粉。

(4) 包封小核酸药物：

加入 0.75 mg/ml 的 SEQ ID NO: 3 DEPC 水溶液 0.5 ml 水化冻干脂质体，室温下孵育 20 分钟，制得骨靶向小核酸药物脂质体递送系统。

实施例四 制备骨靶向小核酸药物脂质体递送系统

(1) 制备含有小核酸药物的脂质体：取 Dlin-KC2-DMA, 二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、胆固醇(Chol)、DSPE-mPEG2000(甲氧基为末端的 PEG)按 42:10:44:4 的摩尔比溶解在乙醇中，缓慢加入快速搅拌中的 0.5 mg/mL SEQ ID NO: 3 的磷酸盐缓冲液(pH 值为 4)，乙醇占总体积的 35%，siRNA 与脂质的质量比为 8%。在室温下搅拌 20 分钟后采用挤出仪对脂质体进行挤出，通过孔径为 0.08 μm 的双层聚碳酸酯膜，控制粒径在 50~100nm。在室温下将该脂质体在 pH7.4 的缓冲盐溶液中透析 3 小时去除乙醇和未包封的小干扰核糖核酸。

(2) 连接骨靶向分子和含有小核酸药物的脂质体：将二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺(DSPE-PEG-MAL)溶于氯仿中，在氮气环境中蒸发除去有机溶剂后，取末端带有巯基基团(-SH)的骨靶向分子适配子序列 SEQ ID 4,按摩尔比为 2:1 与 DSPE-PEG-MAL 混合，在 10 mM 磷酸盐缓冲液中 4℃孵育过夜。通过磷酸盐分析检测脂质体的脂质浓度，然后取 2mol% (相对总脂质浓度)的 DSPE-PEG2000-适配子以胶束的形式插入到脂质体表面，37℃水浴孵育 6 小时后，制得骨靶向小核酸药物脂质体递送系统。

(3) 纯化骨靶向小核酸药物脂质体递送系统

通过 Sepharose CL-4B 柱进行分子大小排除层析，采用磷酸盐缓冲液进行洗脱，除去未插入脂质体的胶束以及未连接的骨靶向分子。

实施例五 对骨靶向小核酸药物脂质体递送系统的体内验证

将该骨靶向小核酸药物脂质体递送系统进行体内骨靶向性的验证。将该载体携带 FAM 荧光标记的 SEQ ID NO: 3 尾静脉注射于大鼠体内，分别与没有载体携带的 siRNA，市售载体

系统(in vivo jetPEI) 以及自制的不含有骨靶向分子的载体系统脂质体 (liposome) 进行比较。静脉注射 2 小时后, 处死大鼠, 收集主要器官 (心, 肝, 脾, 肺, 肾和股骨), 采用荧光成像系统(Xenogen Imaging Technologies, Alameda, CA)观察每个器官中的荧光强度。

由图 2 可见, 该发明中的骨靶向小核酸药物脂质体递送系统能显著提高小核酸药物在骨组织中的累积, 同时降低在肝脏器官中的暴露, 减少副作用。

实施例六 评价骨靶向载体系统的在体细胞选择性

将(DSS)₆-脂质体 (liposome) 以及脂质体携带FAM荧光标记的SEQ ID NO: 3 和没有载体携带的FAM荧光标记的SEQ ID NO: 3 尾静脉注射于大鼠体内, 4 小时后取出远端股骨和近端胫骨, 进行冰冻切片和免疫组化分析。采用anti-RUNX2 和 anti-type I collagen $\alpha 1$ (COL1A1) 抗体对骨源细胞分化早期阶段的未成熟和成熟骨前体细胞进行标记, anti-ALP和anti-osteocalcin抗体对分化后期的前成骨细胞和成骨细胞进行标记, 以及OSCAR抗体对破骨样细胞 (前破骨细胞和成熟的破骨细胞) 进行标记。观察FAM荧光标记的siRNA和相应抗体标记各种细胞的重合情况以说明骨靶向载体的细胞选择性。

由图 3~图 7 可见, (DSS)₆-脂质体携带的siRNA的绿色荧光与成骨样细胞的红色荧光有很好的重合, 重合机率大于脂质体携带的siRNA, 但与破骨样细胞的红色荧光没有重合, 而脂质体携带的siRNA绿色荧光与成骨样细胞和破骨样细胞的红色荧光都有一定的重合, 表明(DSS)₆-脂质体具有细胞选择性, 有利于小核酸靶向对成骨样细胞。DAPI 荧光和H&E染色指示被成功转染的成骨样细胞主要分布于骨形成表面及其周边骨髓区域, 进一步证实(DSS)₆-脂质体可以特异靶向骨形成表面, 并具有一定的细胞选择性。综上所述, 本发明主要针对骨形成表面以及成骨样细胞进行靶向, 具有较强的专属性; 可防止小核酸药物被体内物质降解, 可将其特异性传递到靶细胞中, 转染效率高, 有利于小核酸药物达到较高的沉默效率。

权 利 要 求

1、一种基于小核酸药物成骨治疗的骨靶向递送系统，包括脂质体、骨靶向分子和小核酸药物，其特征在于，骨靶向分子选自双磷酸盐、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和针对成骨样细胞筛选出的适配子中的一种或几种，小核酸药物选自具有促进骨形成功能的小干扰核糖核酸、微小核糖核酸的模拟物和微小核糖核酸的阻断剂中的一种或几种。

2、如权利要求 1 所述的骨靶向递送系统，其特征在于，所述脂质体中阳离子脂质占总脂质含量的 0%~50%，非阳离子脂质占总脂质含量的 50%~100%。

3、如权利要求 2 所述的骨靶向递送系统，其特征在于，所述阳离子脂质选自 1,2-二油烯氧基-3-三甲氨基丙烷、N-[1-(2, 3-二油基氧)丙基]-N, N, N, -氯化三甲铵和 DC-胆固醇中的一种或几种。

4、如权利要求 2 所述的骨靶向递送系统，其特征在于，所述非阳离子脂质选自二油酰二甲基铵丙烷、二油酰磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱和 DLin-KC2-DMA 中的一种或几种。

5、如权利要求 1 所述的骨靶向递送系统，其特征在于，所述骨靶向递送系统含有二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺以及所述骨靶向分子末端进行巯基修饰。

6、如权利要求 1 所述的骨靶向递送系统，其特征在于，所述骨靶向分子以胶束的形式插入所述脂质体双分子层。

7、如权利要求 1 所述的骨靶向递送系统，其特征在于，所述骨靶向分子占所述脂质体脂质浓度的 2~10mol%。

8、如权利要求 1 所述的骨靶向递送系统，其特征在于，所述小核酸药物与所述脂质体脂质质量比为 2%~20%。

9、如权利要求 1 所述的骨靶向递送系统，其特征在于，所述小干扰核糖核酸为针对成骨

的负调控基因的小干扰核糖核酸。

10、如权利要求 9 所述的骨靶向递送系统，其特征在于，所述针对成骨的负调控基因的小干扰核糖核酸为针对 CKIP-1、WIF-1 或 Hoxc8 的小干扰核糖核酸。

11、如权利要求 10 所述的骨靶向递送系统，其特征在于，所述针对 CKIP-1 的小干扰核糖核酸包含 SEQ ID NO: 3。

12、一种基于小核酸药物成骨治疗的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 制备含有小核酸药物的脂质体：取脂质溶解在乙醇中，在搅拌状态下缓慢加至含有小核酸药物的缓冲液溶液中，采用挤出仪对脂质体进行挤出，透析去除乙醇，小核酸药物选自具有促进骨形成功能的小干扰核糖核酸、微小核糖核酸的模拟物和微小核糖核酸的阻断剂中的一种或几种；

(2) 连接骨靶向分子和含有小核酸药物的脂质体：将骨靶向分子与含有小核酸药物的脂质体混合连接，制得骨靶向小核酸药物脂质体，骨靶向分子选自双磷酸盐、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和针对成骨样细胞筛选出的适配子中的一种或几种；

(3) 纯化骨靶向小核酸药物脂质体。

13、如权利要求 12 所述的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，步骤 (1) 中所述脂质体中阳离子脂质占总脂质含量的 0%~50%，非阳离子脂质占总脂质含量的 50%~100%。

14、如权利要求 12 所述的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，步骤 (1) 中所述乙醇在总体积中所占比例为 30%~40%。

15、如权利要求 12 所述的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，步骤 (1) 中所述缓冲液溶液为枸橼酸盐缓冲液溶液，10~50 mM，pH 值为 3.5~5.5。

16、如权利要求 12 所述的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，步骤 (1) 中所述小核酸药物与所述脂质体脂质质量比为 2%~20%。

17、如权利要求 12 所述的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，步骤 (1) 中所述

小干扰核糖核酸为针对成骨的负调控基因的小干扰核糖核酸。

18、如权利要求 12 所述的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，步骤（2）中所述骨靶向分子末端进行巯基修饰。

19、如权利要求 12 所述的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，步骤（2）中所述含有小核酸药物的脂质体含有二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺，骨靶向分子直接连接于所述脂质体表面。

20、如权利要求 12 所述的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，步骤（2）所述含有小核酸药物的脂质体不含有二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺，步骤（2）所述混合进一步包括加入二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺，预先将骨靶向分子与二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺进行化学反应，生成骨靶向分子与二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺的共价键连接化合物，所述化合物在水溶液中形成胶束，与含有小核酸药物的脂质体孵育 4~12 小时后插入脂质双分子层。

21、如权利要求 12 所述的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，步骤（2）所述骨靶向分子占所述含有小核酸药物的脂质体脂质浓度的 2~10mol%。

22、如权利要求 12 所述的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，步骤（3）进一步包括冻干。

23、一种基于小核酸药物成骨治疗的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

（1）制备空白脂质体：将脂质溶解在氯仿中，旋转蒸发除去有机溶剂后，加缓冲液进行水化，采用挤出仪对多层脂质体进行挤出，制得空白脂质体；

（2）连接骨靶向分子和空白脂质体：取骨靶向分子与空白脂质体混合连接，反应生成骨靶向空白脂质体，骨靶向分子选自双磷酸盐、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和针对成骨样细胞筛选出的适配子中的一种或几种；

（3）纯化骨靶向空白脂质体以及冻干；

（4）包封小核酸药物：将小核酸药物溶于 DEPC 处理过的蒸馏水中，加入冻干骨靶向空白脂质体进行水化，制得骨靶向小核酸药物脂质体递送系统，小核酸药物选自具有促进骨形

成功能的小干扰核糖核酸、微小核糖核酸的模拟物或微小核糖核酸的阻断剂中的一种或几种。

24、如权利要求 23 所述的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，步骤（1）中所述空白脂质体中阳离子脂质占总脂质含量的 0%~50%，非阳离子脂质占总脂质含量的 50%~100%。

25、如权利要求 23 所述的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，步骤（2）中所述骨靶向分子末端进行巯基修饰。

26、如权利要求 23 所述的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，步骤（2）中所述空白脂质体含有二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺，骨靶向分子直接连接于所述空白脂质体表面。

27、如权利要求 23 所述的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，步骤（2）所述空白脂质体不含有二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺，步骤（2）所述混合进一步包括加入二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺，预先将骨靶向分子与二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺进行化学反应，生成骨靶向分子与二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺的共价键连接化合物，所述化合物在水溶液中形成胶束，与空白脂质体孵育 4~12 小时后插入脂质双分子层。

28、如权利要求 23 所述的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，步骤（2）所述骨靶向分子占所述空白脂质体脂质浓度的 2~10mol%。

29、如权利要求 23 所述的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，步骤（4）中所述小核酸药物与所述空白脂质体脂质质量比为 2%~20%。

30、如权利要求 23 所述的骨靶向递送系统的制备方法，其特征在于，步骤（4）中所述小干扰核糖核酸为针对成骨的负调控基因的小干扰核糖核酸。

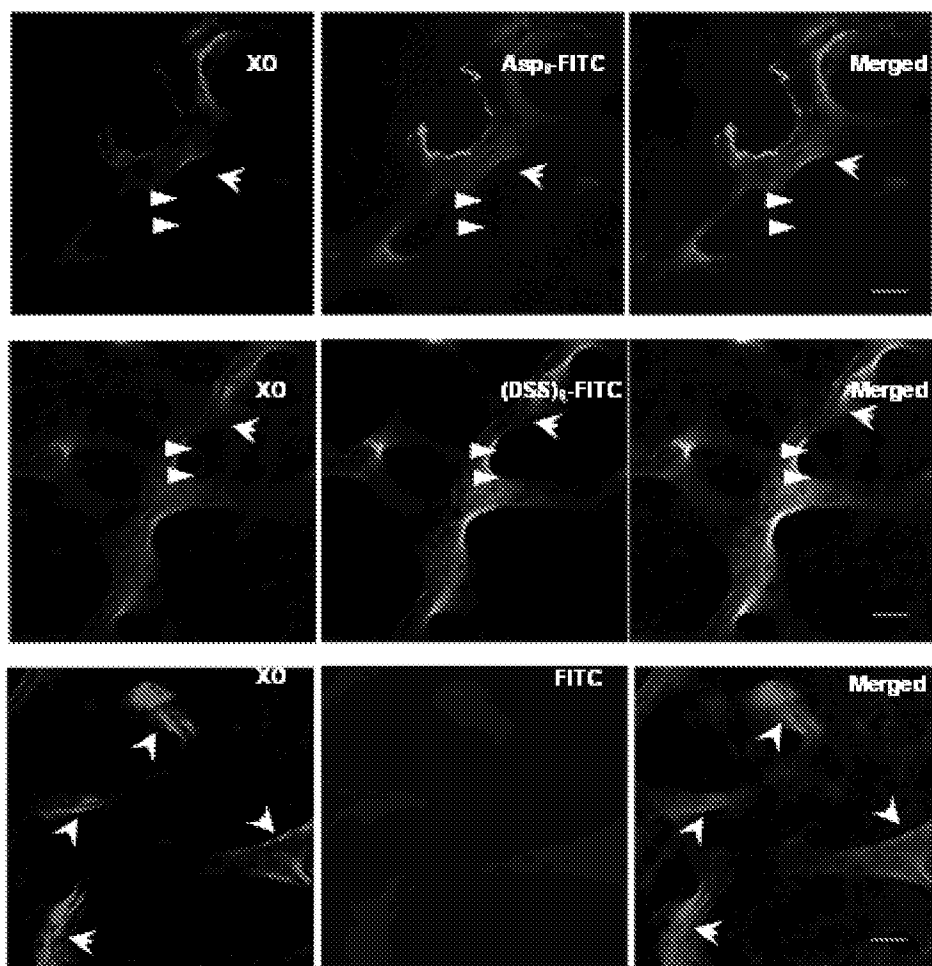


图 1

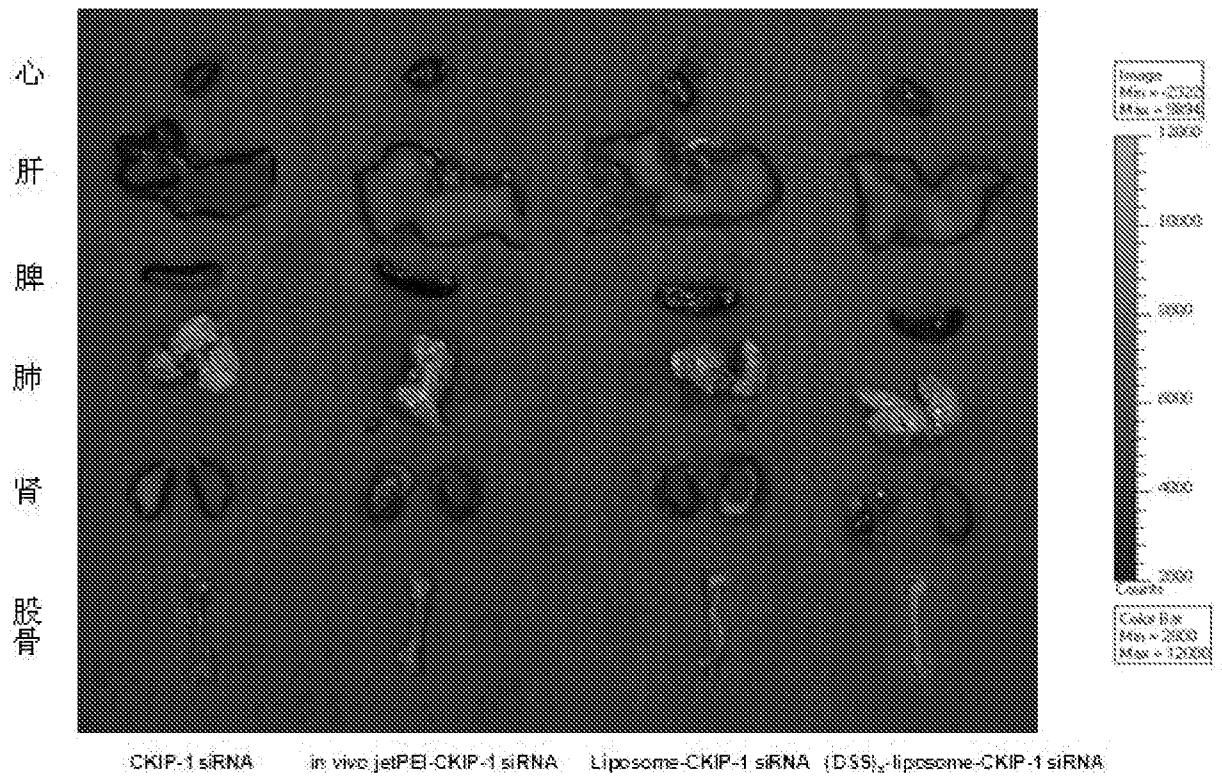


图 2

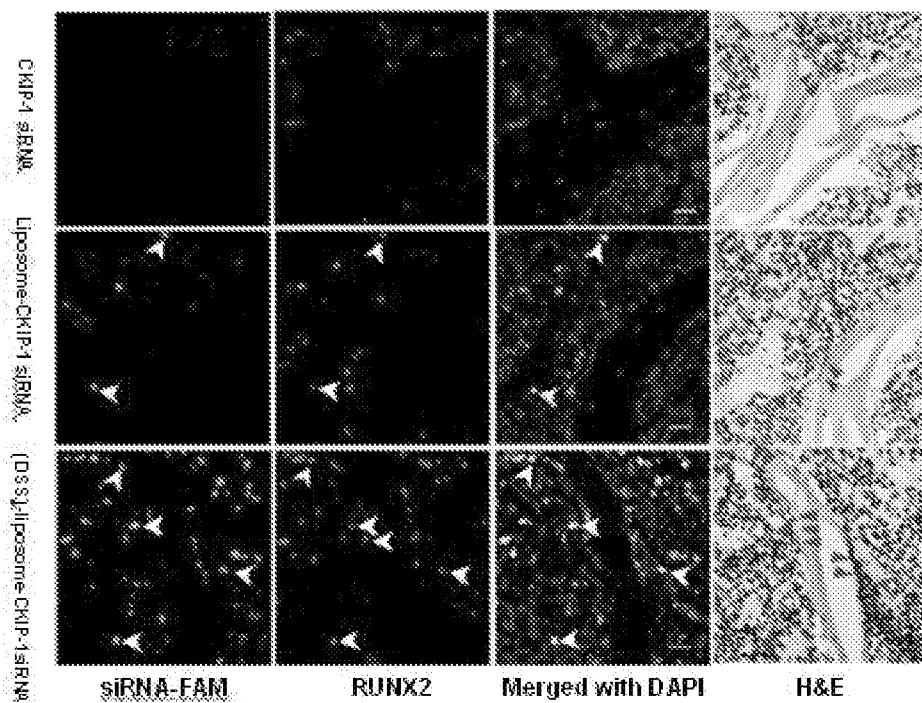


图 3

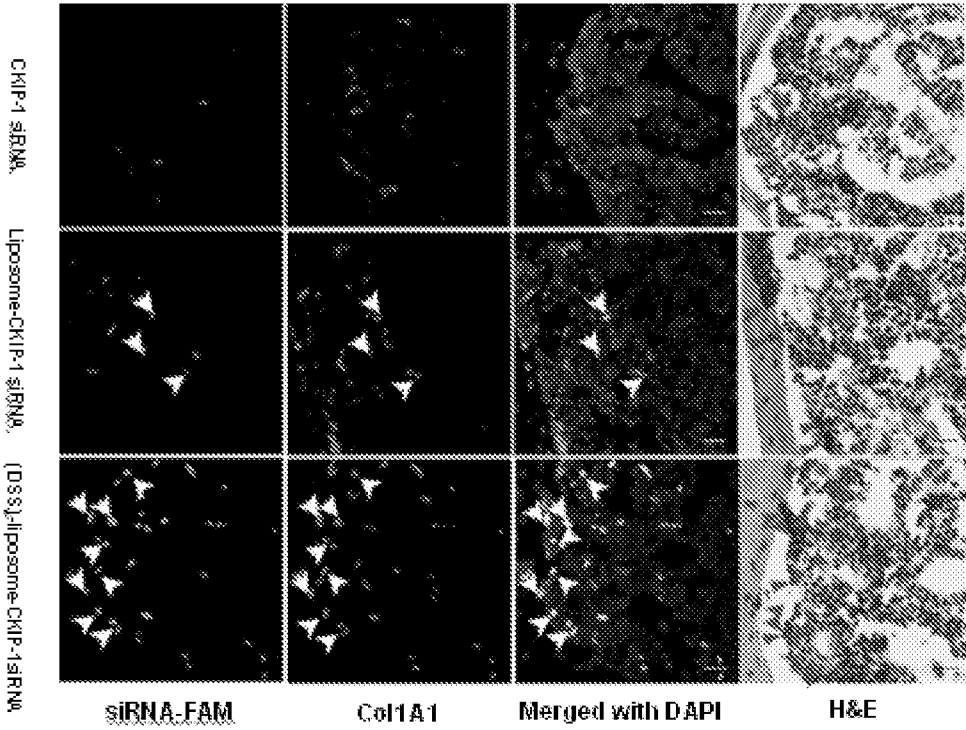


图 4

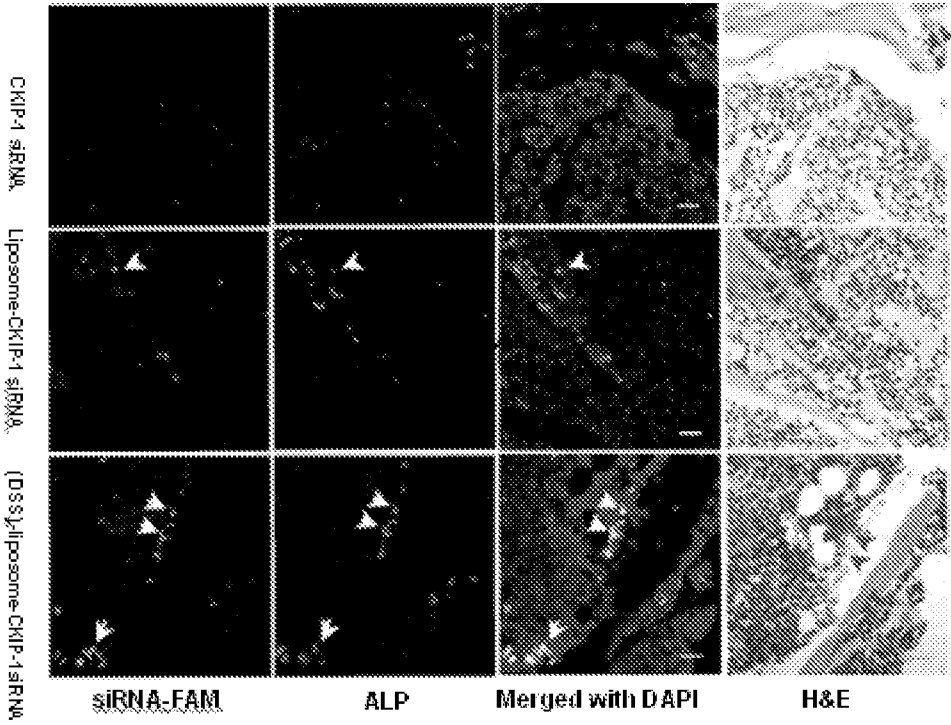


图 5

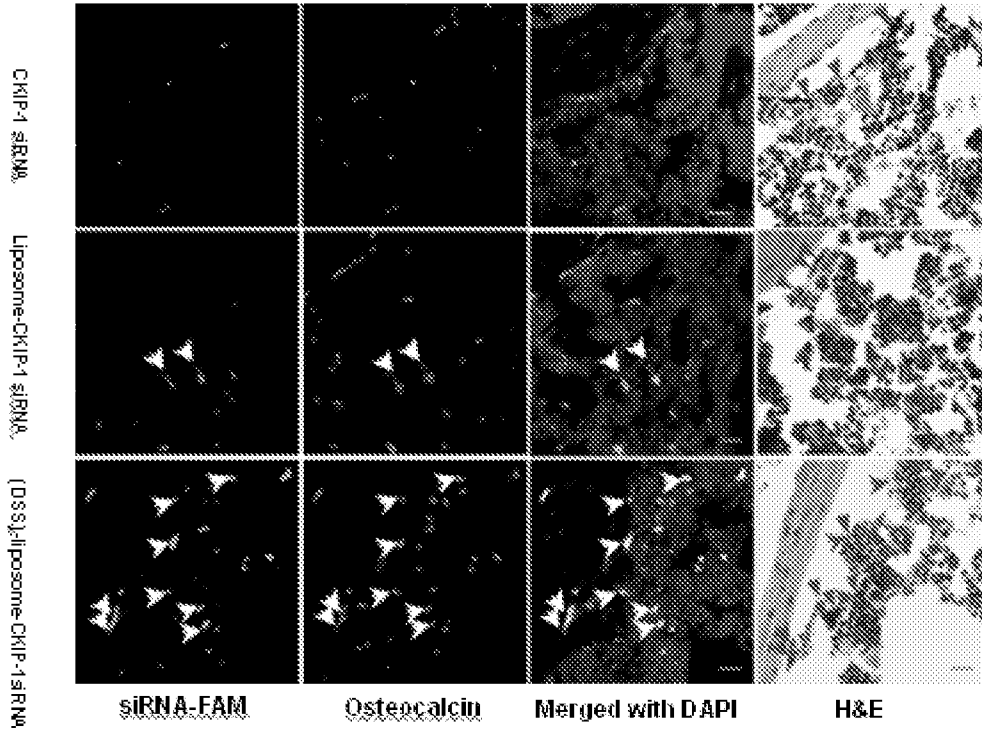


图 6

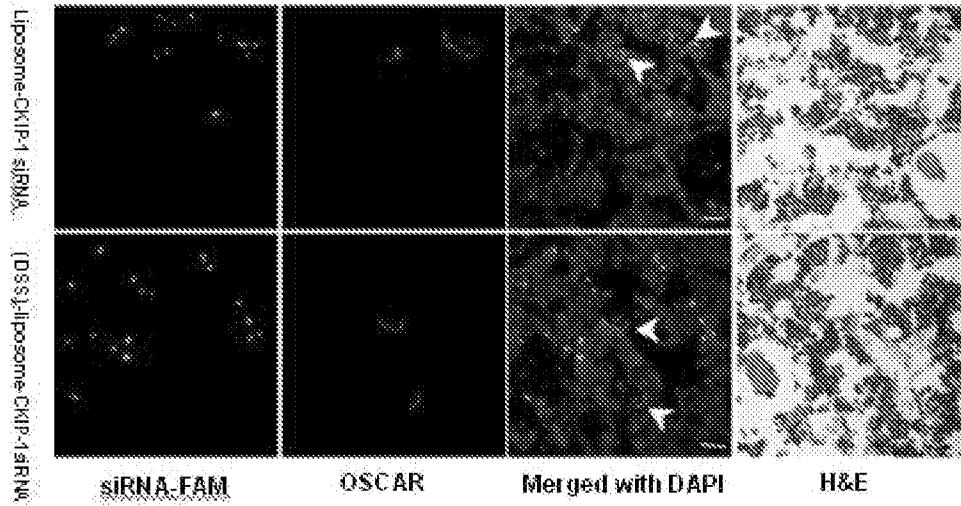


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/078243

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, NCBI, CNKI, CNPAT: delivery, carrier?, targeted, targeting, lipid?, liposome?, bone?, skeleton, hydroxyapatite, HA, bisphosphonate, BP, Asp, siRNA, DNA, nucleic acid?, encapsulate, encapsulating, PEG, preparation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/0203038 A1 (SOUTHWEST RES INST) 30 October 2003 (30.10.2003) description, paragraphs [0020], [0021], [0030] and [0106] to [0123], embodiments 1 to 4, compound 3, figures 3 and 5 and claims 20 to 22	1-11
Y		12-30
X	WANG, Guilin et al. Bisphosphonate-decorated lipid nanoparticles designed as drug carriers for bone diseases, Journal of Biomedical Materials Research, March 2012, no. 3, vol. 100A, pages 684-693	1-11
E	CN 102824647 A (THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG) 19 December 2012 (19.12.2012) the whole description and claims	1-30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 18 March 2013 (18.03.2013)	Date of mailing of the international search report 11 April 2013 (11.04.2013)
---	--

Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer YANG, Yingyue Telephone No. (86-10) 62412184
---	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/078243

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HUANG, Jian et al. Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery, International Journal of Pharmaceutical Research, April 2008, no. 2, vol. 35, pages 145-147 and 150	12-22
Y	LIU, Ke et al. Preparation of gene-loaded cationic liposomes and the study of its characteristic, Journal of Luzhou Medical College, no. 3, vol. 30, pages 228 to 230	23-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/078243

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2003/0203038 A1	30.10.2003	US 7381426 B	03.06.2008
CN 102824624 A	19.12.2012	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/078243

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/127 (2006.01) i

A61K 47/24 (2003.01) i

A61K 47/42 (2006.01) i

A61K 47/02 (2006.01) i

A61K 47/34 (2006.01) i

A61P 19/08 (2006.01) i

A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI; EPODOC; NCBI; CNKI; CNPAT; 骨靶向, 骨骼, 脂质体, 脂质, 脂肪, 小核酸, 小核糖核酸, 核酸, 递送, 载体, 双磷酸, 二膦酸盐, 羟基磷石灰, 聚乙二醇, 制备, 包裹, 包被, delivery, carrier?, targeted, targeting, lipid?, liposome?, bone?, skeleton, hydroxyapatite, HA, bisphosphonate, BP, Asp, siRNA, DNA, nucleic acid?, encapsulate, encapsulating, PEG, preparation

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	US 2003/0203038 A1 (SOUTHWEST RES INST) 30.10 月 2003 (30.10.2003), 说明书第[0020], [0021]段, 第[0030]段, [0106]-[0123] 段, 实施例 1-4, 化合物 3, 图 3, 图 5, 权利要求 20-22	1-11
Y		12-30
X	Guilin Wang 等: "Bisphosphonate-decorated lipid nanoparticles designed as drug carriers for bone diseases", Journal of Biomedical Materials Research, 3 月 2012, 第 3 期, 第 100A 卷, 684-693 页	1-11
E	CN 102824647 A (香港中文大学) 19.12 月 2012 (19.12.2012), 说明书 全文, 权利要求书	1-30

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇
引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引
用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了
理解发明之理论或原理的在后文件“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的
发明不是新颖的或不具有创造性“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件
结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时,
要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

18.03 月 2013 (18.03.2013)

国际检索报告邮寄日期

11.4 月 2013 (11.04.2013)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

杨莹跃

电话号码: (86-10) 62412184

类 型	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	黄健 等：“脂质纳米微粒载体在核酸药物递送中的应用”，国际药学研究杂志，4 月 2008，第 2 期，第 35 卷，第 145-147，150 页	12-22
Y	刘可 等：“载基因阴离子脂质体的制备及特征研究”，泸州医学院学报，2007，第 3 期，第 30 卷，第 228-230 页	23-30

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/078243

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
US 2003/0203038 A1	30.10.2003	US7381426B	03.06.2008
CN 102824647 A	19.12.2012	无	

A. 主题的分类

A61K 9/127 (2006.01) i

A61K 47/24 (2006.01) i

A61K 47/42 (2006.01) i

A61K 47/02 (2006.01) i

A61K 47/34 (2006.01) i

A61P 19/08 (2006.01) i