



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105873569 B

(45)授权公告日 2020.07.28

(21)申请号 201480072258.0

(22)申请日 2014.11.06

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105873569 A

(43)申请公布日 2016.08.17

(30)优先权数据  
61/900,698 2013.11.06 US(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.07.04(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2014/064388 2014.11.06(87)PCT国际申请的公布数据  
W02015/069926 EN 2015.05.14(73)专利权人 芝加哥大学  
地址 美国伊利诺伊州  
专利权人 北卡罗来纳大学查珀尔希尔分校

(72)发明人 林文斌 何春柏 刘德敏

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司  
11240

代理人 张英 宫传芝

(51)Int.Cl.

A61K 47/50(2017.01)

A61K 9/14(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

(56)对比文件

WO 2013009701 A2, 2013.01.17,

WO 2013009701 A2, 2013.01.17,

US 2013171228 A1, 2013.07.04,

US 2011053862 A1, 2011.03.03,

US 2008045699 A1, 2008.02.21,

CN 102573914 A, 2012.07.11,

WO 2013009701 A2, 2013.01.17,

Rachel C. Huxford-Philips et

al..Lipid-coated nanoscale coordination  
polymers for targeted cisplatin delivery.  
《RSC Advances》.2013,第3卷(第34期),第  
14438-14443页.Andres Schaate et al..Modulated  
Synthesis of Zr-Based Metal-Organic  
Frameworks:From Nano to Single Crystals.  
《Chem. Eur. J.》.2011,第17卷6643-6651.

审查员 李友

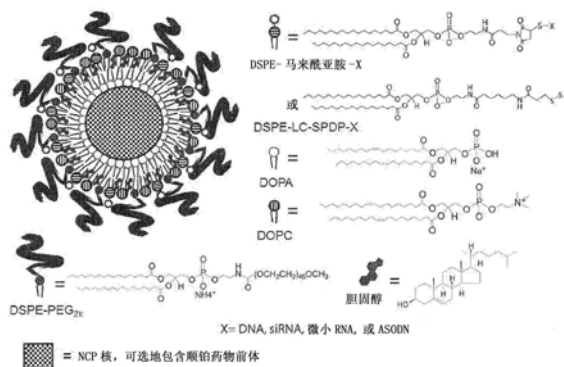
权利要求书2页 说明书49页 附图11页

## (54)发明名称

用于化疗剂、核酸和光敏剂的递送或共递送的  
纳米级载体

## (57)摘要

描述了用于多种治疗剂的共递送的纳米级配位聚合物纳米颗粒。多种治疗剂可以包括不同化疗剂的组合,一种或多种化疗剂和一种或多种核酸诸如小干扰RNA(siRNA)或微小RNA的组合,一种或多种化疗剂和光敏剂(即,用于光动力疗法)的组合,或多种不同的siRNA。也描述了包括纳米颗粒的药物制剂、使用纳米颗粒治疗癌症的方法,和制造纳米颗粒的方法。



1. 一种用于多种治疗剂的共递送的纳米级颗粒,所述纳米级颗粒包括:  
核,包含金属有机基质材料,其中所述金属有机基质材料包含含有多价金属离子和二磷酸酯的金属二磷酸酯配位聚合物;以及  
多种治疗剂,其中多种所述治疗剂包含至少一种非核酸化疗剂和至少一种核酸治疗剂,其中所述纳米级颗粒进一步包括覆盖金属有机基质材料核的外表面的至少一部分的脂质双层,其中所述脂质双层包括(i)阳离子脂质或(ii)硫醇-或二硫醇-官能化脂质,其中至少一种所述核酸静电附接至所述阳离子脂质或共价附接至所述硫醇-或二硫醇-官能化脂质;且其中所述二磷酸酯包含所述至少一种非核酸化疗剂,且其中所述至少一种非核酸化疗剂是顺铂或奥沙利铂药物前体。
2. 根据权利要求1所述的纳米级颗粒,包含结合于所述金属有机基质材料核的至少两种化疗剂。
3. 根据权利要求1所述的纳米级颗粒,其中至少一种所述核酸治疗剂是siRNA、miRNA或AS ODN。
4. 根据权利要求1所述的纳米级颗粒,其中所述脂质双层包含含有一种或多种以下各项的混合物:硫醇-或二硫醇-官能化的1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺DSPE、1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷DOTAP和1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱DOPC。
5. 根据权利要求1所述的纳米级颗粒,其中所述纳米级颗粒进一步包含附接至所述脂质双层的钝化剂、靶向剂、和/或显像剂。
6. 根据权利要求1所述的纳米级颗粒,其中所述脂质双层进一步包含1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸钠盐DOPA、胆固醇和聚乙二醇化-DSPE的一种或多种。
7. 根据权利要求1所述的纳米级颗粒,其中所述多价金属离子选自由以下各项组成的组: $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 和它们的组合。
8. 根据权利要求1所述的纳米级颗粒,其中所述二磷酸酯是顺,顺-反-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>]顺铂药物前体或顺,反-[Pt(dach)Cl<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>]的二磷酸酯。
9. 根据权利要求1所述的纳米级颗粒,其中所述多价金属离子是 $\text{Zn}^{2+}$ 。
10. 根据权利要求1所述的纳米级颗粒,其中所述金属有机基质材料核包含40至50重量%的二磷酸酯。
11. 根据权利要求1所述的纳米级颗粒,其中生存素siRNA、P-gp siRNA和Bcl-2siRNA的一种或多种附接至所述脂质双层的涂层。
12. 根据权利要求1所述的纳米级颗粒,其中所述纳米级颗粒具有20nm至180nm的直径。
13. 根据权利要求5所述的纳米级颗粒,其中所述钝化剂是亲水聚合物。
14. 根据权利要求5所述的纳米级颗粒,其中所述靶向剂是RGD肽。
15. 根据权利要求5所述的纳米级颗粒,其中所述显像剂是荧光部分。
16. 包含权利要求1所述的纳米级颗粒的组合物在制备用于治疗需要其的受试者的癌症的药物中的用途。
17. 根据权利要求16所述的用途,其中至少一种所述核酸选自生存素siRNA、ERCC-1siRNA、P-gp siRNA、Bcl-2siRNA和它们的组合。
18. 根据权利要求17所述的用途,其中至少一种所述核酸是生存素siRNA、ERCC-1siRNA、P-gp siRNA和Bcl-2siRNA的混合物。

19. 根据权利要求16所述的用途,其中所述癌症选自肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌和结肠癌。

20. 根据权利要求16所述的用途,其中所述癌症是卵巢癌。

21. 根据权利要求20所述的用途,其中所述卵巢癌是耐受顺铂的卵巢癌。

22. 一种制备权利要求1所述的纳米级颗粒的方法,所述方法包含:

(a) 使包含金属离子的微乳液与包含二膦酸酯的微乳液接触,从而形成金属二膦酸酯配位聚合物纳米颗粒,其中所述二膦酸酯是顺铂或奥沙利铂药物前体;

(b) 将来自(a)的所述纳米颗粒分散于包含阳离子脂质和/或官能化脂质的溶液中以形成阳离子脂质涂覆的纳米颗粒和/或官能化脂质涂覆的纳米颗粒;以及

(c) 使所述脂质涂覆的纳米颗粒与包含至少一种核酸的溶液接触。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述二膦酸酯微乳液进一步包含脂质。

24. 根据权利要求22所述的方法,其中至少一种所述核酸选自生存素siRNA、P-gp siRNA、Bcl-2siRNA和它们的组合。

25. 根据权利要求23所述的方法,其中所述脂质是DOPA。

26. 一种药物制剂,包含权利要求1所述的纳米级颗粒和药学上可接受的载体。

## 用于化疗剂、核酸和光敏剂的递送或共递送的纳米级载体

[0001] 相关申请

[0002] 本公开的主题要求于2013年11月6日提交的美国临时专利申请序列号61/900,698的优先权;其公开的全部内容通过引证以其整体结合于此。

[0003] 政府权益

[0004] 本发明在政府支持下在由美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的拨款号U01-CA151455下进行的。政府在本发明中具有一定权利。

### 技术领域

[0005] 本公开的主题提供了基于金属有机基质材料的纳米载体平台,如纳米级配位聚合物(coordination polymer) (NCP) (包含金属有机框架(骨架, frameworks) (MOF)或纳米级金属有机框架(NMOF)),用于两种或更多种治疗剂的共递送(co-delivery)。在一些实施方式中,平台用于化疗剂(例如,小分子和/或非核酸化疗剂)和核酸,如小干扰RNA、微小RNA、反义寡核苷酸和DNA的共递送,用于增强抗癌治疗。在一些实施方式中,平台用于化疗剂和光敏剂(光敏物质, photosensitizer)的共递送,用于组合化疗和光动力疗法(PDT)。在一些实施方式中,平台用于递送一种或多种siRNA以治疗疾病,如癌症。

[0006] 缩写

[0007] °C=摄氏度

[0008] %=百分比

[0009]  $\mu$ l=微升

[0010]  $\mu$ M=微摩尔

[0011] AS ODN=反义寡核苷酸

[0012] BSA=牛血清白蛋白

[0013] cisPt=顺铂(cisplatin)

[0014] cm=厘米

[0015] DLS=动态光散射

[0016] DMF=二甲基甲酰胺

[0017] DMSO=二甲基亚砷

[0018] DOPA=1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸钠盐

[0019] DOPC=1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱

[0020] DOPE=二油酰基L- $\alpha$ -磷脂酰乙醇胺

[0021] DOTAP=1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷

[0022] DSPE-PEG<sub>2k</sub>=1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[胺基(聚乙二醇)2000]

[0023] EDS=能量分散X射线谱

[0024] EtOH=乙醇

[0025] g=克

[0026] h=小时

- [0027] IC<sub>50</sub>=百分之五十抑制浓度
- [0028] ICP-MS=电感耦合等离子-质谱
- [0029] kg=千克
- [0030] mg=毫克
- [0031] min=分钟
- [0032] miRNA=微小核糖核酸
- [0033] mL=毫升
- [0034] mM=毫克分子(毫摩尔浓度,millimolar)
- [0035] mmol=毫摩尔
- [0036] Mn=锰
- [0037] MOF=金属有机框架
- [0038] MRI=磁共振成像
- [0039] NCP=纳米级配位聚合物
- [0040] nm=纳米
- [0041] NMOF=纳米级金属有机框架
- [0042] NMR=核磁共振
- [0043] MW=分子量
- [0044] PBS=磷酸盐缓冲盐水
- [0045] PDI=多分散指数
- [0046] PDT=光动力疗法
- [0047] PEG=聚乙二醇
- [0048] PET=正电子发射断层显像
- [0049] PS=光敏剂
- [0050] Pt=铂
- [0051] PVP=聚乙烯吡咯烷酮
- [0052] r=半径
- [0053] RES=网状内皮系统
- [0054] RGD=精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸
- [0055] RNAi=核糖核酸干扰
- [0056] rpm=转每分钟
- [0057] SBU=次级构造单元(building unit)
- [0058] siRNA=小干扰核糖核酸
- [0059] SPECT=单光子发射计算机断层显像
- [0060] TEM=透射电子显微镜
- [0061] Zn=锌

## 背景技术

[0062] 在治疗疾病,如癌症的用途中核酸引起了极大的关注。尽管它们在癌症治疗中具有潜能,但是核酸,如小干扰RNA(siRNA)和微小RNA(miRNA)可能具有局限性。首先,这些核

酸可能容易受到环境中普遍存在的酶的攻击而降解,其次,核酸(如siRNA和miRNA)的效果通常是短暂的。第三,核酸自身不能进入细胞,并且现有递送系统是低递送效率的或不能在全身给予(全身给药,systemic administration)之后在体内延长循环。

[0063] 光动力疗法(PDT)也可以是一种有效的抗癌治疗选择。PDT包括给予肿瘤-定位光敏剂(PS),然后光激活以产生高细胞毒性活性氧(反应性氧,reactive oxygen)物质(ROS),特别是单态氧( $^1O_2$ ),其引发细胞凋亡和坏死。通过将PS和曝光两者定位至肿瘤区域,PDT可以选择性杀死肿瘤细胞同时保护局部组织。PDT已经用于治疗患有多种不同类型癌症的患者,包含头颈肿瘤(head and neck tumor)、乳腺癌(breast cancer)、妇科癌(gynecological tumor)、脑肿瘤、结肠癌、间皮瘤(mesothelioma)和胰腺癌。与传统治疗模式,例如手术和放射相比,PDT在治疗头和颈中的癌的用途是特别有利的,这是由于PDT导致了周围组织的较少破坏并且减少了美学和功能损伤。卟啉分子,如PHOTOFRIN®、VERTEPORFIN®、FOSCAN®、PHOTOCHLOR®和

TALAPORFIN®是用于PDT的最常使用的PS之一。然而,尽管它们对ROS产生具有光化学有效性,但是在全身给予之后它们未达最佳(suboptimal)的肿瘤聚集,这可能限制PDT在临床中的功效。

[0064] 因此,仍需要用于改善核酸和PS治疗剂的两者的递送(例如,靶向递送)的另外的递送载体。具体地,为了增加治疗功效,例如通过克服药物抗性(通过经由活性的多重机制治疗癌症),需要可以递送与其他治疗剂(例如,非核酸/非PS化疗剂)结合的核酸或PS的递送载体。

## 发明内容

[0065] 在一些实施方式中,本公开的主题提供了用于多种治疗剂的共递送的纳米级颗粒,该纳米级颗粒包括:包含金属有机基质材料的核,可选地,其中金属有机基质材料包含配位聚合物;以及多种治疗剂,可选地,其中多种治疗剂包含:(i)至少两种化疗剂(chemotherapeutic agent),如至少两种非核酸化疗剂;(ii)至少两种核酸治疗剂,如小干扰核糖核酸(siRNA),微小RNA(miRNA)、反义寡核苷酸(ASODN)或它们的组合;(iii)至少一种非核酸化疗剂和至少一种核酸治疗剂;或(iv)至少一种化疗剂(如至少一种非核酸化疗剂)和至少一种光敏剂。

[0066] 在一些实施方式中,多种治疗剂包含与金属有机基质材料核结合的至少一种非核酸化疗剂,可选地,其中至少一种非核酸化疗剂通过共价键或配位键与金属有机基质材料结合。在一些实施方式中,至少一种非核酸化疗剂选自包含以下各项的组:顺铂或奥沙利铂(草酸铂)药物前体(前体药物,prodrug)、吉西他滨、甲氨蝶呤、亚叶酸(甲酰四氢叶酸,leucovorin)、培美曲塞二钠、阿霉素(亚德里亚霉素,doxorubicin)、长春花碱、长春新碱、长春地辛、阿糖胞苷、硫唑嘌呤、美法伦(melphalan)(左旋溶肉瘤素)、伊马替尼、阿那曲唑、来曲唑、卡铂、吉西他滨、紫杉醇、多西他赛(多西紫杉醇,docetaxel)、依托泊苷和长春瑞宾。在一些实施方式中,其中多种治疗剂包含与金属有机基质材料核结合的至少两种化疗剂。

[0067] 在一些实施方式中,多种治疗剂包含至少一种核酸,可选地,其中至少一种核酸是siRNA、miRNA或AS ODN。在一些实施方式中,至少一种核酸通过核酸上的磷酸基团与核的外

表面上的金属离子之间的配位键附接至金属有机基质材料核。

[0068] 在一些实施方式中,金属有机基质材料核是包含 $Zr_6(\mu_3-O)_4(\mu_3-OH)_4$ 和二羧酸桥接配体(桥连配体,bridging ligand)的材料,可选地,其中二羧酸桥接配体包含氨基取代基。在一些实施方式中,二羧酸桥接配体是氨基-三苯基二羧酸。在一些实施方式中,至少一种非核酸化疗剂共价附接至二羧酸桥接单元上的取代基。

[0069] 在一些实施方式中,至少一种核酸治疗剂通过配位键附接至金属有机基质材料核的外表面上的金属离子。在一些实施方式中,至少一种非核酸化疗剂通过至二羧酸桥接配体的共价键结合于金属有机基质材料核中的孔中,并且至少一种核酸通过与金属有机基质材料核的外表面上的金属离子的配位键附接至金属有机基质材料核的外表面。

[0070] 在一些实施方式中,至少一种核酸选自生存素(存活素,survivin) siRNA、ERCC-1siRNA、P-糖蛋白siRNA(P-gp siRNA)、Bcl-2siRNA或它们的混合物组成的组。在一些实施方式中,至少一种非核酸化疗剂是顺铂或奥沙利铂药物前体。在一些实施方式中,非核酸化疗剂是顺,顺,反- $Pt(NH_3)_2Cl_2(OEt)(O_2CCH_2CH_2COOH)$ ,可选地,其中核包含约10重量%至约50重量%的非核酸化疗剂。在一些实施方式中,至少一种核酸是生存素siRNA、ERCC-1siRNA和Bcl-2siRNA的混合物。

[0071] 在一些实施方式中,纳米级颗粒具有约20nm至约140nm的平均直径。

[0072] 在一些实施方式中,纳米级颗粒进一步包含覆盖金属有机基质材料核的外表面的至少一部分的一种或多种涂覆试剂(涂层剂,coating agent)或层,其中一种或多种涂覆试剂或层选自金属氧化物、聚合物、单脂质层、脂质双层和它们的组合,并且进一步地,其中至少一种核酸共价或非共价附接至涂覆试剂或层。在一些实施方式中,使用包含阳离子脂质和/或官能化脂质的脂质双层涂覆金属有机基质材料核,其中使用可以键合至核酸的基团脂质官能化该官能化脂质,并且其中至少一种核酸共价键合至官能化的脂质和/或通过静电相互作用附接至阳离子脂质。

[0073] 在一些实施方式中,脂质双层包含包含硫醇-或二硫醇-官能化的1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)和1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)的一种或多种的混合物。在一些实施方式中,一种或多种涂覆试剂或层进一步包含钝化剂(passivating agent),如亲水聚合物;靶向剂,如RGD肽;和/或显像剂(imaging agent),如荧光部分。在一些实施方式中,脂质双层进一步包含1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸钠盐(DOPA)、胆固醇和聚乙二醇化-DSPA的一种或多种。

[0074] 在一些实施方式中,金属有机基质材料核包含金属二膦酸酯配位聚合物,其包含多价金属离子和二膦酸酯。在一些实施方式中,多价金属离子选自包含 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 和它们的组合的组。

[0075] 在一些实施方式中,二膦酸酯是化疗剂药物前体,如顺铂或奥沙利铂。在一些实施方式中,二膦酸酯是顺,顺-反- $[Pt(NH_3)_2Cl_2(OH)_2]$ (顺铂药物前体)或顺,反- $[Pt(dach)Cl_2(OH)_2]$ 的二膦酸酯。在一些实施方式中,金属离子是 $Zn^{2+}$ 。在一些实施方式中,金属有机基质材料核包含约40至约50重量%的二膦酸酯。在一些实施方式中,颗粒进一步包含脂质单层或脂质双层涂层,可选地,其中生存素siRNA、P-gp siRNA和Bcl-2siRNA的一种或多种附接至该涂层。在一些实施方式中,纳米级颗粒具有约20nm至约180nm的直径。

[0076] 在一些实施方式中,本发明的主题提供了一种治疗需要其的受试者的癌症的方

法,该方法包含将包含纳米级颗粒的组合物给予受试者,纳米级颗粒包含金属有机基质材料,可选地,其中金属有机基质材料包含配位聚合物;以及多种治疗剂,可选地,其中多种所述治疗剂包含:(i)至少两种化疗剂,如至少两种非核酸化疗剂;(ii)至少两种核酸治疗剂,如小干扰核糖核酸(siRNA)、微小RNA(miRNA)、反义寡核苷酸(AS ODN)或它们的组合;(iii)至少一种给非核酸化疗剂和至少一种核酸治疗剂;或(iv)至少一种化疗剂,如至少一种非核酸化疗剂,和至少一种光敏剂。在一些实施方式中,纳米级颗粒包含至少一种非核酸化疗剂和至少一种核酸。

[0077] 在一种实施方式中,核包含:(i)包含 $Zr_6(\mu_3-O)_4(\mu_3-OH)_4$ 和二羧酸桥接配体的材料,可选地,其中二羧酸桥接配体包含氨基取代基,或(ii)金属二膦酸酯配位聚合物。

[0078] 在一些实施方式中,至少一种非核酸化疗剂是顺铂或奥沙利铂药物前体,且至少一种核酸选自生存素siRNA、ERCC-1siRNA、P-gp siRNA、Bcl-2siRNA和它们的组合。在一些实施方式中,至少一种核酸是生存素 siRNA、ERCC-1siRNA、P-gp siRNA和Bcl-2siRNA的混合物。

[0079] 在一些实施方式中,癌症选自肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌和结肠癌。在一些实施方式中,癌症是卵巢癌,可选地为耐受顺铂的卵巢癌。

[0080] 在一些实施方式中,本公开的主题提供了一种制备权利要求1的纳米级颗粒的方法,该方法包含:(a)使包含金属离子的微乳液(microemulsion)与包含二膦酸酯的微乳液接触,可选地,其中二膦酸酯是顺铂或奥沙利铂药物前体,从而形成金属二膦酸酯配位聚合物纳米颗粒;(b)将来自(a)的纳米颗粒分散于包含阳离子脂质和/或官能化的脂质的溶液中以形成阳离子脂质涂覆的和/或官能化的脂质涂覆的纳米颗粒;以及(c)使脂质涂覆的纳米颗粒与包含至少一种核酸的溶液接触。

[0081] 在一些实施方式中,二膦酸酯微乳液进一步包含脂质,可选地,其中脂质是DOPA。在一些实施方式中,至少一种核酸选自生存素siRNA、P-gp siRNA、Bcl-2siRNA和它们的组合。

[0082] 在一些实施方式中,本公开的主题提供了制备权利要求1的纳米颗粒的方法,该方法包含(a)使Zr化合物,可选的 $ZrCl_4$ 的溶液与包含二羧酸,可选的氨基-三苯基二羧酸的溶液接触,从而形成金属有机基质材料纳米颗粒核;(b)使纳米颗粒核与包含非核酸化疗剂的溶液接触,其中所述非核酸化疗剂包含羧酸取代基,并且可选地,其中包含非核酸化疗剂的溶液进一步包含二咪唑,从而形成化疗剂官能化的金属有机基质材料纳米颗粒;以及(c)使化疗剂官能化的金属有机基质材料与包含一种或多种核酸的溶液接触。

[0083] 在一些实施方式中,至少一种核酸选自生存素siRNA、P-gp siRNA、Bcl-2siRNA和它们的组合。在一些实施方式中,非核酸化疗剂是顺铂或奥沙利铂药物前体,可选地为顺,顺,反  $-Pt(NH_3)_2Cl_2(OEt)(O_2CCH_2CH_2COOH)$ 。

[0084] 在一些实施方式中,本公开的主题提供了药物制剂,包含药学上可接受的载体和包含核的纳米级颗粒,核包含金属有机基质材料,可选地,其中金属有机基质材料包含配位聚合物,以及多种治疗药剂,可选地,其中多种所述治疗药剂包含:(i)至少两种化疗剂,如至少两种非核酸化疗剂;(ii)至少两种核酸治疗剂,如小干扰核糖核酸(siRNA)、微小RNA(miRNA)、反义寡核苷酸(AS ODN)或它们的组合;(iii)至少一种给非核酸化疗剂和至少一种核酸治疗剂;或(iv)至少一种化疗剂,如至少一种非核酸化疗剂和至少一种光敏剂。



[0085] 在一些实施方式中,本公开的主题提供了用于多种治疗剂的共递送的纳米颗粒,所述纳米颗粒包括:包含金属有机基质材料的核,可选地,其中金属有机基质材料包含配位聚合物;以及多种治疗剂,其中多种所述治疗剂包含至少一种化疗剂和至少一种光敏剂。

[0086] 在一些实施方式中,至少一种化疗剂是结合于金属有机基质材料核中的非核酸化疗剂,可选地,其中非核酸化疗剂通过共价键或配位键结合于金属有机基质材料核中。在一些实施方式中,化疗剂选自包含以下各项的组:顺铂或奥沙利铂药物前体、吉西他滨、甲氨蝶呤、亚叶酸、培美曲塞二钠、阿霉素、长春花碱、长春新碱、长春地辛、阿糖胞苷、硫唑嘌呤、美法伦(左旋溶肉瘤素)、伊马替尼、阿那曲唑、来曲唑、卡铂、吉西他滨、紫杉醇、多西他赛、依托泊苷和长春瑞宾。

[0087] 在一些实施方式中,化疗剂是二膦酸酯顺铂或奥沙利铂药物前体,且金属有机基质材料核包含包含多价金属离子和所述二膦酸酯顺铂或奥沙利铂药物前体的金属二膦酸酯配位聚合物。在一些实施方式中,多价金属离子选自包含 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 和它们的组合的组。在一些实施方式中,二膦酸酯顺铂或奥沙利铂药物前体是顺,顺-反-[Pt (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>]的二膦酸酯和/或金属离子是 $\text{Zn}^{2+}$ 。

[0088] 在一些实施方式中,纳米级颗粒包含覆盖金属有机基质材料核的外表面的至少部分的一种或多种涂覆层(coating layer),其中一种或多种涂覆试剂或层选自金属氧化物、聚合物、单脂质层、脂质双层和它们的组合。在一些实施方式中,光敏剂共价附接至涂覆的层或多层。

[0089] 在一些实施方式中,使用包含卟啉脂质(焦脂质,pyrolipid)的脂质双层或脂质单层涂覆金属有机基质材料核,其中所述卟啉脂质是脂质共价附接至卟啉或其衍生物或其类似物。在一些实施方式中,脂质双层或脂质单层进一步包含胆固醇、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸钠盐(DOPA)和聚乙二醇化-DSPE的一种或多种。

[0090] 在一些实施方式中,纳米级颗粒具有约90nm至约180nm的直径。

[0091] 在一些实施方式中,本公开的主题提供了一种药物制剂,包含用于多种治疗剂的共递送的药学上可接受的载体和纳米级颗粒,所述纳米级颗粒包含:包含金属有机基质材料的核,可选地,其中金属有机基质材料包含配位聚合物;以及多种治疗剂,其中多种所述治疗剂包含至少一种化疗剂和至少一种光敏剂。

[0092] 在一些实施方式中,本公开的主题提供了治疗需要其的受试者的癌症的方法,该方法包括将包含用于多种治疗剂的共递送的纳米级颗粒的组合物给予受试者,所述纳米级颗粒包括:包含金属有机基质材料的核,可选地,其中金属有机基质材料包含配位聚合物;以及多种治疗剂,其中所述多种治疗剂包含至少一种化疗剂和至少一种光敏剂;并且使用具有合适波长的辐射辐照受试者或受试者的治疗区域,以激活光敏剂。

[0093] 在一些实施方式中,至少一种化疗剂是顺铂或奥沙利铂药物前体。在一些实施方式中,癌症是头颈癌(head and neck cancer),可选地,其中头颈癌是耐受顺铂的头颈癌。

[0094] 在一些实施方式中,本公开的主题提供了一种制备纳米级颗粒的方法,其中该方法包括:(a)使包含金属离子的微乳液与包含二膦酸酯的微乳液接触,可选地,其中二膦酸酯是顺铂或奥沙利铂药物前体,从而形成金属二膦酸酯配位聚合物纳米颗粒;以及(b)将来

自(a)的纳米颗粒分散在包含卟啉脂质的溶液中,以形成卟啉脂质涂覆的纳米颗粒。在一些实施方式中,包含卟啉脂质的溶液进一步包含一种或多种另外的脂质涂覆组分,可选地,其中包含卟啉脂质的溶液进一步包含胆固醇、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)和聚乙二醇化的1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)。

[0095] 因此,本公开的主题的目的是提供用于多种治疗剂(例如,抗癌治疗剂)的共递送的递送试剂、包含递送试剂的药物组合物、递送试剂的用途和制备递送试剂的方法。

[0096] 已经在前文中陈述了本公开的主题的目的,并且完全或部分通过本公开的主题实现了该目的,当与附图和下文中描述的最佳实施例结合时,随着描述的进行其他目的将变得显而易见。

## 附图说明

[0097] 图1是示出了根据本公开的主题的用于多种治疗剂的共递送的纳米颗粒的示意图,多种治疗剂包含共价附接至脂质双层中的脂质的至少一种治疗核酸(例如,DNA、小干扰RNA(siRNA)、微小RNA或反义寡核苷酸(AS ODN)),其中,脂质双层涂覆围绕纳米级配位聚合物(NCP)纳米颗粒核上。另外的治疗剂,如小分子化疗剂可以嵌入到NCP核中。

[0098] 图2是示出了根据本公开的主题的实施方式的用于多种治疗剂的共递送的纳米颗粒的示意图。多种治疗剂包含非共价附接至涂覆层的脂质中的带电基团的至少一种治疗核酸(例如,DNA、小干扰RNA(siRNA)、微小RNA或反义寡核苷酸(AS ODN)),其中涂覆的层围绕纳米级配位聚合物(NCP)纳米颗粒核。另外的治疗剂,如小分子化疗剂可以嵌入到NCP核中。

[0099] 图3示出了(a)示出了颗粒形态的TEM图像、(b)示出了细胞siRNA摄取的图和(c)示出了载有顺铂的纳米级配位聚合物纳米颗粒的细胞Pt摄取的图,并且siRNA的池包含人类卵巢癌细胞中的siRNA靶向Bcl-2、P-gp和生存素。通过TEM,纳米颗粒是具有约20nm的直径的球形并且是单分散的。在于纳米颗粒结合之后,显著地促进了siRNA和顺铂的摄取。

[0100] 图4是示出了在通过瘤内注射的SKOV-3的皮下移植瘤小鼠模型,以1mg/kg的顺铂剂量和0.25mg/kg的siRNA剂量,对于全部三次注射一周一次的情况下,载有顺铂和包含siRNA靶向Bcl-2、P-gp和生存素的三种siRNA的组合物纳米级配位聚合物纳米颗粒的体内抗癌有效性的图。(a)肿瘤生长曲线。(b)通过蛋白水平表明的在肿瘤组织中基因的表达。(c)通过定量TUNEL实验的肿瘤部位中凋亡细胞百分比。

[0101] 图5是示出了以下的组图,(a)通过谷胱甘肽(GSH)的添加在还原性环境中siRNA的释放,以及(b)-(d)通过载有顺铂和硫醇siRNA靶向的Bcl-2和生存素的纳米级配位聚合物纳米颗粒介导的基因沉默。

[0102] 图6是示出了以下的组图,在x轴表明的多至5天各个时间周期内,在siRNA浓度为0.75纳克分子(nM)的情况下,在纳米级配位聚合物纳米颗粒转染的人类卵巢癌(SKOV-3)细胞中的生存素(底部右侧)、Bcl-2(顶部)和P-糖蛋白(P-gp,底部左侧)的相关表达水平,所述纳米级配位聚合物纳米颗粒嵌入有顺铂药物前体并且包含汇集的小干扰RNA(siRNA),该小干扰RNA与围绕颗粒核(NCP-1/汇集的siRNA,方形(square))的脂质双层非共价结合,或与LIPOFECTAMINE®RNAiMAX(圆)非共价结合。每个数据点表示三个测量值的平均,误差条表示±标准偏差。

[0103] 图7是示出了具有A2780/CDDP卵巢癌的腹膜内的(i.p.)原位小鼠模型的小鼠生存曲线,原位小鼠模型接收磷酸盐缓冲盐水的i.p.注射(PBS;对照,实线),脂质双层覆盖包含顺铂药物前体的纳米级配位聚合物颗粒的i.p.注射(NCP-1,长虚线),或相同颗粒单也包含共价附接至脂质双层中的脂质的小干扰RNA的注射(NCP-1/硫醇-siRNA,短虚线)。数据表示每组的三个小鼠。

[0104] 图8示出了(a)颗粒形态的TEM图像(柱=100nm)、(b)示出了顺铂释放的图以及(c)示出了吉西他滨从载有顺铂加吉西他滨和siRNA靶向Bcl-2和生存素的纳米级配位聚合物纳米颗粒释放的图。通过TEM,纳米颗粒是球形并且是单分散的,具有约20nm的直径。在还原试剂半胱氨酸存在下促进了吉西他滨的释放。吉西他滨(GMP)可以从纳米颗粒中释放。

[0105] 图9示出了(a)颗粒形态的TEM图像,(b)示出了内体(内含体,内涵体,endosomal)逃逸效率的图,以及(c)示出了载有无毒Pten化合物和硫醇siRNA靶向生存素的Pten-NCP纳米颗粒的二氧化碳产生机制。通过TEM,Pten-NCP是球形的并且是单分散的,具有约15nm的直径。在结合至Pten-NCP之后,siRNA可以根据进入的细胞由内体逃逸作用有效地逃逸。图9(b)示出了通过共聚焦激光扫描显微术获得的来自siRNA和内体的荧光的共区域化的百分比。当释放一个Pt(en)<sub>2</sub>时,细胞内Pten释放两个二氧化碳分子以帮助有效的内体逃逸。

[0106] 图10是一组图,示出了(a)H460细胞中的毒性和(b)载有无毒Pten和硫醇siRNA靶向Bcl-2和生存素的Pten-NCP颗粒的人类卵巢A2780/CDDP细胞中的基因沉默效率。

[0107] 图11是示出了根据本发明的主题的实施方案的用于多种治疗剂的共递送的纳米颗粒的示意图。多种治疗剂包含用于光动力疗法的共价附接至围绕纳米级配位聚合物(NCP)颗粒核的涂覆层中的脂质的光敏剂部分。另外的治疗剂,如小分子化疗剂可以嵌入NCP核中。

## 具体实施方式

[0108] 现在,下文将参考所附实施例更完整地描述本公开的主题,其中示出了相应的实施方式。然而,本公开的主题可以以不同的形式实施并且不能解释为限定为本文中提出的实施方式。相反,提供了这些实施方式使得本公开变得更透彻和完整,并且将完全将实施方式的范围传达给本领域技术人员。

[0109] 除非其他定义,本文中使用的全部的技术和科学术语具有本文描述的主题所属的技术领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管可以在本公开的主题的实践或测试中使用类似或等同于本文描述的那些的任何方法、装置和材料,但是现在描述代表性的方法、装置和材料。通过参考的形式将本文中提及的全部的出版物、专利申请、专利和其他参考的全部内容结合于此。

[0110] 贯穿说明书和权利要求书,给出的化学式或名称将包括全部的光学和立体异构体,以及这些异构体和混合物存在的外消旋混合物。

[0111] I. 定义

[0112] 据信本领域普通技术人员将能够很好的理解下列术语,陈述了下列定义以助于解释本公开的主题。

[0113] 根据长期存在的专利法惯例,当在本申请包含权利要求中使用时,术语“一个”、“一种”和“该”是指“一个或多个”。因此,例如参考“一种金属离子”包含多种该金属离子等。

[0114] 除非另有指出,在说明书和权利要求书中使用的表达尺寸的量、反应条件等的全部是数字应被理解为在全部情况下均通过术语“约”修饰。因此,除非有相反的表明,在说明书和所附权利要求书中陈述的数值参数是接近值,其可以根据将通过本公开的主题获得的期望的性能进行改变。

[0115] 当表示尺寸(即直径)、重量、浓度或百分数的数值或量时,在本文中使用的术语“约”意指在一个实例中包含特定的量的 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 的变化,在另一实例中包含 $\pm 5\%$ 的变化,在另一实例中包含 $\pm 1\%$ 的变化,且在又一实例中包含 $\pm 0.1\%$ 的变化,同样的变化适合于实施公开的方法。

[0116] 当在列出的实体的情况中使用,在本文中使用的术语“和/或”表示单独或组合存在的实体。因此,例如短语“A、B、C和/或D”包含单独的A、B、C和D,但是也包含A、B、C和D的任何和全部的组合和子组合(subcombination)。

[0117] 术语“包含”(与“包含”、“含有”或“其特征在于”是同义词)是包含的或开放式的,并且不排除另外的、未陈述的元素或方法步骤。“包含”是权利要求语言中使用的专业术语,其表示存在提及的元素,但是也可以添加其他元素,并且仍形成权利要求的范围内的结构或方法。

[0118] 本文中所使用的短语“由…组成”排除了权利要求中未规定的任何元素、步骤或组成部分。当术语“由…组成”出现在权利要求的条款的主体中,而不是紧接着前序部分时,其仅限定了条款中陈述的元素;其他元素未排除在作为整体的权利要求之外。

[0119] 如本文中使用的术语“主要由…组成”将权利要求的范围限定为特定的材料或步骤,加上没有实质影响要求保护的主题的基本和新颖的特征的那些。

[0120] 对于术语“包含”“由…组成”和“主要由…组成”,当在本文中使用的这三个术语中的一个时,本公开的和要求保护的主体可以包括使用其他两个术语。

[0121] 在本文中使用的术语“烷基”可以表示包含 $C_{1-20}$ 、线性(即“直链”)、支链或环状、饱和或至少部分饱和,且在一些情况中为完全不饱和(即烯基和炔基)的烃链,包括,例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、辛基、乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基、庚炔基和丙二烯基团。“支链”表示这样的烷基基团,其中,低级烷基基团,如甲基、乙基或丙基附接至线性烷基链。“低级烷基”表示具有1至约8个碳原子的烷基基团(即 $C_{1-8}$ 烷基),例如1、2、3、4、5、6、7或8个碳原子。“高级烷基”表示具有约10至约20个碳原子的烷基基团,例如10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个碳原子。在特定的实施方式中,“烷基”特定地表示为 $C_{1-8}$ 直链烷基。在其他实施方式中,“烷基”特别地表示 $C_{1-8}$ 支链烷基。

[0122] 可以使用一个或多个烷基取代基团(其可以是相同或不同的),可选地,取代烷基基团。术语“烷基基团取代基团”包括,但不限于烷基、取代的烷基、卤素、芳基氨基、芳基、羟基、芳氧基、烷氧基、烷硫基(alkylthio)、芳硫基、芳基烷氧基、芳基烷硫基、羧基、烷氧基羰基、氧基和环烷基。在一些实施方式中,可选地沿着烷基链插入一个或多个氧、硫或取代或未取代的氮原子,其中氮取代基是氢、低级烷基(在本文中也称为“烷基氨基烷基”)或芳基。

[0123] 因此,本文中使用的术语“取代的烷基”包含如本文中的定义的其中烷基基团的一个或多个原子或官能基团替换为另一个原子或官能基团的烷基基团,另一原子或官能基团包含,例如烷基、取代的烷基、卤素、芳基、取代的芳基、烷氧基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、

二烷基氨基、硫酸酯和巯基。

[0124] 本文中使用的术语“芳基”表示芳香族取代基,其可以是单芳香族环或融合的多芳香族环,共价连接的,或连接至共同的基团,例如,但不限于亚甲基或亚乙基部分。共同的连接基团也可以是羰基,如苯甲酮,或氧,如二苯醚,或氮,如二苯胺。术语“芳基”特别地包含杂环芳香族化合物。芳香族环可以包含苯基、萘基、联苯基、二苯醚、二苯胺和苯甲酮等。在特定实施方式中,术语“芳基”意指包含约5至约10个碳原子;例如5、6、7、8、9或10个碳原子的环状芳香烃,并且包含5-和6-元羟基和杂环芳香环。

[0125] 可以使用一个或多个芳基取代基(其可以是相同或不同的)可选地取代芳基基团(“取代的芳基”),其中“芳基基团取代基”包括烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、芳基烷基、羟基、烷氧基、芳氧基、芳基烷氧基、羧基、酰基、卤素、硝基、烷氧基羰基、芳氧基羰基、芳基烷氧基羰基、酰氧基、酰胺基、芳酰基氨基、氨基甲酰基(carbomoyl)、烷基氨基甲酰基、二烷基氨基甲酰基、芳硫基、烷硫基、亚烷基和 $-NR'R''$ ,其中 $R'$ 和 $R''$ 的每个可以独立地是氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基和芳基烷基。

[0126] 因此,在本文中使用的术语“取代的芳基”包含如本文定义的芳基基团的一个或多个原子或官能基团替换为另一原子或官能基团的芳基基团,另一原子或官能基团包含,例如烷基、取代的烷基、卤素、芳基、取代的芳基、烷氧基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、硫酸酯和巯基。

[0127] 烷基基团的特定实例包括,但不限于环戊二烯基、苯基、呋喃、噻吩、吡咯、吡喃、吡啶、咪唑、苯并咪唑、异噻唑、异恶唑、吡唑、吡嗪、三嗪、嘧啶、喹啉、异喹啉、吲哚、吡啶等。

[0128] 本文中使用的“杂芳基”表示环结构的主链中含有一个或多个非碳原子(例如O、N、S、Se等)的芳基基团。含氮杂芳基部分包括,但不限于吡啶、咪唑、苯并咪唑、吡唑、吡嗪、三嗪、嘧啶等。

[0129] “芳基烷基”表示-烷基-芳基基团,可选地,其中烷基和/或芳基部分是可取代的。

[0130] “亚烷基”表示具有1至约20个碳原子,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个碳原子的直链或支链的二价脂肪族烃基基团。亚烷基基团可以是直链、支链或环形。亚烷基基团也可以是可选地,不饱和的或饱和的或使用一个或多个“烷基取代基团”取代的。其可以沿着亚烷基基团可选地插入一个或多个氧、硫或取代的或未取代的氮原子(在本文中也称为“烷基氨基烷基”),其中氮取代基是前文描述的烷基。示例性亚烷基基团包含亚甲基( $-\text{CH}_2-$ );亚乙基( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ );亚丙基( $-(\text{CH}_2)_3-$ );亚环己基( $-\text{C}_6\text{H}_{10}-$ ); $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ ;  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ ;  $-(\text{CH}_2)_q-\text{N}(\text{R})-(\text{CH}_2)_r-$ ,其中每个 $q$ 和 $r$ 是从0至约20的独立的整数,例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20,并且 $\text{R}$ 是氢或低级烷基;甲二氧基( $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$ );和乙二氧基( $-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-$ )。亚烷基基团可以具有约2至约3个碳原子,并且可以进一步具有6-20个碳。

[0131] 术语“亚芳基”表示二价芳香族基团,例如二价苯基或萘基基团。亚芳基基团可以可选地通过一个或多个芳基取代基团取代和/或包含一个或多个杂原子。

[0132] 术语“氨基”表示基团 $-\text{N}(\text{R})_2$ ,其中每个 $\text{R}$ 是独立的H、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、芳基烷基或取代的芳基烷基。术语“氨基烷基”和“烷基氨基”可以表示基团 $-\text{N}(\text{R})_2$ ,其中每个 $\text{R}$ 是H、烷基或取代的烷基,并且其中至少一个 $\text{R}$ 是烷基或取代的烷基。“芳基氨基”和“氨基芳基”表示基团 $-\text{N}(\text{R})_2$ ,其中每个 $\text{R}$ 是H、芳基或取代的芳基,并且其中至少一个 $\text{R}$ 是

芳基或取代的芳基,例如苯胺(即 $\text{-NHC}_6\text{H}_5$ )。

[0133] 术语“硫烷基”可以表示基团 $\text{-SR}$ ,其中R选自H、烷基、取代的烷基、芳基烷基、取代的芳基烷基、芳基和取代的芳基。相似地,术语“硫芳基烷基”和“硫芳基”表示 $\text{-SR}$ 基团,其中R分别表示芳基烷基和芳基。

[0134] 本文中使用过的术语“卤”、“卤化物”或“卤素”表示氟基、氯基、溴基和碘基基团。

[0135] 术语“羟基”表示 $\text{-OH}$ 基团。

[0136] 术语“巯基”或“硫醇”表示 $\text{-SH}$ 基团。

[0137] 术语“羧酸酯”和“羧酸”可以分别表示基团 $\text{-C(=O)O}^-$ 和 $\text{-C(=O)OH}$ 。在一些实施方式中,“羧酸酯”可以表示 $\text{-C(=O)O}^-$ 或 $\text{-C(=O)OH}$ 基团。

[0138] 术语“磷酸酯”表示 $\text{-P(=O)(OR)}_2$ 基团,其中每个R可以是独立的 H、烷基、芳基烷基、芳基或负电荷(即,其中将没有有效的R基团存在于氧原子,在氧原子上产生未共用的电子对的存在)。因此,换一种方式,可以存在或缺少R,并且当存在时其选自H、烷基、芳基烷基或芳基。

[0139] 术语“甲硅烷基”表示包含硅原子(Si)的基团。

[0140] 术语“硅氧烷”表示包含 $\text{-Si-O-Si-}$ 连接的化合物。本文中使用的术语“聚(硅氧烷)”表示式 $\text{R}_2\text{SiO}$ 的聚合的基团或化合物,其中R是H、烷基、芳基烷基或芳基。

[0141] 术语“聚(倍半硅氧烷)”表示式 $\text{RSiO}_{1.5}$ 的聚合的基团或化合物,其中 R是H、烷基、芳基烷基或芳基。

[0142] 术语“脂质”可以表示疏水或两性小分子,例如,但不限于脂肪酸、磷脂、甘油酯、甘油磷脂、鞘脂、糖脂或聚酮化合物(polyketide)。

[0143] 术语“纳米级颗粒”、“纳米材料”和纳米颗粒表示具有小于约1,000 nm的尺寸(例如,长、宽、直径等)的至少一个区域的结构。在一些实施方式中,尺寸较小(例如,小于约500nm,小于约250nm,小于约200 nm,小于约150nm,小于约125nm,小于约100nm,小于约80nm,小于约70nm,小于约60nm,小于约50nm,小于约40nm,小于约30nm,或甚至小于约20nm)。在一些实施方式中,尺寸在约20nm至约250nm 之间(例如,约20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240或250nm)。

[0144] 在一些实施方式中,纳米颗粒约是球形。当纳米颗粒约是球形时,特性尺寸可以对应于球的直径。除了球形形状外,纳米材料可以是盘形、板形(例如,六边板形)、椭圆形、多边形、棒形、立方体或不规则形状。

[0145] 纳米颗粒可以包含核区域(即,在颗粒的外部尺寸之间的空间)和外表面(即,定义颗粒的外部尺寸的表面)。在一些实施方式中,纳米颗粒可以具有围绕或部分围绕纳米颗粒核的一个或多个涂覆层。因此,例如,球形纳米颗粒可以具有一个或多个同心涂覆层,每个连续的层分布在更接近颗粒的中心的较小的层的外表面上方。本公开的纳米颗粒可以包含固态金属有机框架基质,其可以包含一个或多个孔或洞内部区域。基质可以是无定型的或结晶的。在一些实施方式中,纳米颗粒核进一步包含一个或多个光学显像剂和/或治疗剂(例如,抗癌试剂),其可以是物理靶向基质内的,配位至基质的金属离子,或通过共价键或离子键化学结合(例如至基质中的二磷酸酯或其他有机桥接配体)。在一些实施方式中,化疗剂或其药物前体可以是形成纳米颗粒的核的金属有机基质材料内的有机桥接配体。例如,当基质材料是金属二磷酸酯配合聚合物时,二磷酸酯可以是化疗剂或其药物前体。

[0146] 当核包含非基质治疗剂和/或显像剂时,所述试剂可以被称为“嵌入”在纳米颗粒中。“嵌入”可以表示为治疗剂或显像剂结合(例如共价结合或通过配位键结合)至颗粒的核内(例如至二膦酸酯、二碳酸酯或基质材料的金属离子)。可替换地,复合物或试剂可以是“螯合(封闭,掩蔽, sequester)”(即,非共价包封的)到核中的孔内,或通过氢键、伦敦分散力(London dispersion force)或任何其他非共价相互作用与核材料相互作用。

[0147] 术语“聚合物”和“聚合的”表示具有重复单元的化学结构(即,给定的化学子结构的多个副本)。聚合物可以可聚合的单体形成。可聚合的单体是包含一个或多个部分的分子,一个或多个部分可以与可聚合的单体的其他分子的部分反应以形成键(例如,共价键或配位键)。通常,每个可聚合的单体分子可以结合至两个或更多个其他单体。在一些情况下,可聚合的单体将仅结合至一个其他分子,形成聚合物材料的末端。

[0148] 聚合物可以有机的或无机的或它们的组合。如在本文中使用过的术语“无机的”表示含有除碳、氢、氮、氧、硫、磷或一种卤素外的至少一些原子的化合物或组合物。因此,例如无机化合物或自何物可以含有一个或多个硅原子和/或一个或多个金属原子。

[0149] 本文中使用的“有机聚合物”是在它们的重复单元中不包含二氧化硅或金属原子的那些。示例性有机聚合物包含聚乙烯基吡咯烷酮(PVO)、聚酯、聚酰胺、聚醚、聚二烯等。一些有机聚合物含有可生物降解的连接,如酯和酰胺,因此它们可以在生物条件下按时间降解。

[0150] 本文中使用的术语“亲水聚合物”通常表示亲水有机聚合物,例如,但不限于聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙烯基甲基醚、聚甲基恶唑啉、聚乙基恶唑啉、聚羟基丙基恶唑啉、聚羟基丙基甲基丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚二甲基丙烯酸酯、聚羟基丙基甲基丙烯酸酯、聚羟基乙基丙烯酸酯、羟基甲基纤维素、羟基乙基纤维素、聚乙烯亚胺(PEI)、聚乙二醇(即,PEG)或另一亲水聚(氧化亚烷基)、聚甘油和聚天冬酰胺。术语“亲水的”表示分子或化学物种与水相互作用的能力。因此,亲水聚合物是典型的极性的或具有可以与水氢键结合的基团。

[0151] 术语“显像剂”表示帮助样本的可视化(显像,visualization)的化学部分。例如,显像剂可以是“造影剂”并且可以表示增加生物组织或检测的结构的对比的部分(特定部分的或全部的分子、大分子、配位复合物或纳米颗粒)。造影剂可以增加使用,例如磁共振成像(MRI)、光学成像、正电子发射断层显像(PET)成像、单光子发射计算机断层显像(SPECT)或它们的结合(即,造影剂可以是多峰的)所检测的结构的对比。

[0152] 术语“MRI造影剂(contrast agent)”表示影响样本中水质子(water proton)的诱导的弛豫速率(relaxation rate)的变化的部分。

[0153] 术语“光学成像剂”或“光学造影剂”是指可以通过吸收、反射或发光(例如,紫外线、可见光或红外线)的能力而被检测的基团。可以根据吸收、反射或荧光的量的改变,或吸收峰或它们的波长最大值的数值的改变检测光学成像剂。因此,光学成像剂包含可以基于荧光或发光检测的包含有机或无机染料的那些。

[0154] 术语“荧光团”和“荧光部分”表示可以通过可见光或不可见光(例如,UV光)激发的物种。荧光团的实例包括,但不限于量子点和掺杂的量子点(例如,半导体CdSe量子点或Mn-掺杂的CdSe量子点)、荧光素、荧光素衍生物或类似物、吖啶菁绿、若丹明、三苯代次甲基(triphenylmethines)、聚甲炔、花青、酞菁、萘并花青、部花青(merocyanines)、镧系元素复合物或穴状化合物、富勒烯、氧杂碲杂唑(oxatellurazoles)、拉荷亚蓝(LaJolla

blue)、卟啉和卟啉类似物,以及天然发色团/荧光团,如叶绿素、类胡萝卜素、类黄酮、后胆色素类(bilins)、光敏色素、藻胆色素、藻红蛋白、藻青蛋白、视黄酸和类似物,如维A酸类(retinoids)和维甲酸酯(retinates)。

[0155] 术语“光敏剂(PS)”表示可以通过特定波长的光(典型地是可见光和近红外光)激发并且产生活性氧(ROS)的化学化合物或部分。例如,在其激发态中,光敏剂可以经历系统间交叉和转移能量至氧( $O_2$ ) (例如在组织中通过PDT处理)以产生ROS,如单态氧(singlet oxygen)。根据本公开的主题可以使用任何已知类型的光敏剂。在一些实施方式中,光敏剂是卟啉、叶绿素、染料或它们的衍生物或类似物。在一些实施方式中,可以使用卟啉、绿素(二氢卟吩, chlorins)、细菌叶绿素或卟吩。在一些实施方式中,光敏剂可以具有官能化基团,如羧酸、胺或异硫氰酸酯,例如用于使光敏剂与另一分子如脂质接触。所在一些实施方式中,光敏剂是卟啉或其衍生物或类似物。示例性卟啉包括,但不限于血卟啉、原卟啉和四苯基卟啉。示例性卟啉衍生物包括,但不限于鲍光过敏素、细菌叶绿素、叶绿素、苯并卟啉衍生物、四羟基苯基绿素、红紫素(紫色素, purpurin) (羟基茜草素)、苯并绿素、萘并绿素、维尔丁(verdin)、玫红素(罗丁, rhodin)、氧杂绿素、氮杂绿素、细菌绿素(bacteriochlorin)、甲基卟啉和苯并细菌绿素。卟啉类似物包括,但不限于扩展的卟啉家族成员(如,德克萨卟啉(texaphyrin)、噻吩卟啉(sapphyrin)和六元卟啉(hexaphyrin)),和卟啉异构体(如,卟吩、反向卟啉、酞菁染料和萘并花青)。

[0156] 术语“卟啉脂质”表示脂质和卟啉、卟啉衍生物或卟啉相似物的偶合物,在一些实施方式中,卟啉脂质可以包含脂质偶合物,其中卟啉或其衍生物或类似物共价附接至脂质侧链。例如在美国专利申请公开号 2014/0127763中描述了卟啉脂质和卟啉脂质合成,其全部内容通过引证结合到本文中。

[0157] 术语“结合(bonding)”或“结合的”以及它们的变化可以表示共价或非共价结合。在一些情况中,术语“结合”表示通过配位键结合。术语“偶合(conjugation)”可以表示结合过程,以及如共价连接或配位键的形成。

[0158] “配位复合物”是在金属离子与电子对供体、配体或螯合基团之间的存在配位键的化合物。因此,配体或螯合基团通常是具有可用于供给至金属离子的不共享的电子对的电子对供体、分子或分子离子。

[0159] 术语“配位键”表示电子对供体和金属离子上的配位点之间的相互作用,在电子对供体和金属离子之间产生的吸引力。这个术语的使用不旨在进行限制,甚至根据金属离子和电子对供体的特征,某些配位键也可以归类于具有或多或少的共价特性(如果不是完全的共价特性)。

[0160] 在本文中使用的术语“配体”通常表示为物种(物质, speies),如分子或离子例如通过一些方式结合至另一物种。更具体地,在本文中使用的“配体”可以表示分子或离子结合溶液中的金属离子以形成“配位复合物”。参见Martell, A.E., and Hancock, R.D., Metal Complexes in Aqueous Solutions, Plenum: New York (1996), 其全部内容通过引证结合于本文中。术语“配体”和“螯合基团”可以可交换地使用。术语“桥接配体”可以表示基团结合至多于一个金属离子或复合物,因此在金属离子或复合物之间提供“桥接”。有机桥接配体可以具有通过,例如亚烷基或亚芳基基团分隔开的不同共享的电子对的两个或更多个基团。具有不共享的电子对的基团包括,但不限于 $-CO_2H$ 、 $-NO_2$ 、氨基、羟基、硫基、硫代烷基、-B



(OH)<sub>2</sub>、-SO<sub>3</sub>H、PO<sub>3</sub>H、磷酸酯和杂环中的杂原子(例如,氮、氧或硫)。

[0161] 在本文中使用的术语“金属有机基质材料”是指包含金属和有机物化合物的固态材料,其中有机化合物包含至少一个,或典型的多于一个碳原子。在一些实施方式中,基质材料是多孔的。在一些实施方式中,金属有机基质材料是配位聚合物,其包含包含金属离子并且桥接多配位基(即,二配位基)有机物配体的配位复合物的重复单元。在一些实施方式中,基质材料包含多于一种类型的金属离子。在一些实施方式中,基质材料可以包含金属簇(cluster)。在一些实施方式中,基质材料是包含配位复合物网络(包含桥接有机物配体)的金属有机框架。

[0162] 在本文中使用的术语“癌症”是指由不受控的细胞分裂和细胞迁移能力,或在另外的位置建立新的生长引起的疾病。术语“恶性的”、“恶性肿瘤”、“赘生物”、“肿瘤”、“癌症”和它们的变体(variation)是指癌症细胞或癌症细胞的组。

[0163] 特定类型的癌症包括,但不限于皮肤癌(例如,黑色素瘤)、结缔组织癌(例如,肉瘤)、脂肪癌、乳腺癌、头颈癌、肺癌(例如间皮瘤)、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、生殖器官癌(例如,睾丸癌)、肾癌、膀胱癌、结肠癌、前列腺癌、中枢神经系统(CNS)癌、视网膜癌、血液、成神经细胞瘤、多发性骨髓瘤和淋巴癌(例如,霍奇金(Hodgkin) 和非霍奇金淋巴瘤)。

[0164] 术语“抗癌药物”、“化疗剂”和“抗癌药物前体”是指已知的或疑似能够治疗癌症(即,用于杀死癌症细胞、阻止癌细胞的增殖或治疗癌症相关症状)的药物(即,化学化合物)或药物前体。在一些实施方式中,本文中使用的术语“化疗剂”是指非核酸或非PS分子,其用于治疗癌症和/ 或其具有细胞毒性能力。可以通过活性机理或通过化学化合物分类描述这些更多的传统或常见的化疗剂,并且其可以包括,但不限于烷化剂(例如,美法伦)、蒽环菌素(例如,阿霉素)、细胞骨架干扰剂(cytoskeletal disruptor)(例如,紫杉醇)、埃博菌素、组蛋白脱乙酰酶抑制剂(例如,伏立诺他)、拓扑异构酶I或II的抑制剂(例如伊立替康或依托泊苷)、激酶抑制剂(例如,硼替佐米)、核苷酸类似物或它们的前提(例如,甲氨蝶呤)、肽抗体(例如,伯来霉素)、铂类试剂(例如,顺铂或奥沙利铂)、类维生素A(retinoid)(例如,维甲素)和长春花生物碱(vinka alkaloids)(例如,长春花碱)。

[0165] II. 用于化疗剂和核酸的共递送的纳米级配位聚合物颗粒

[0166] RNA干扰(RNAi)是通过染色质重构(remodeling)、蛋白翻译的抑制或直接的mRNA降解的基因沉默的转录后机制,其在癌症治疗的领域中带来了较大的前景。RNAi调节了确定细胞命运和分化的关键基因的表达,其可以通过引入外源(foreign)双链RNA(dsRNA)以引发内源mRNA 的序列特异的降解的有效的级联(其与dsRNA引发具有同源性)来实现。这些RNA双重结构被称为小干扰(siRNA)。对致癌物质重要的分子通路的理解已经创造了用于采用RNAi技术以靶向这些通路内的关键分子的癌症治疗的机会。也已经研究了靶向对化学疗法或放射疗法具有抗性的 RNAi。通过RNAi技术的关键基因的沉默已经在细胞培养系统中或临床前动物模型中产生了抗增殖和/或促进细胞凋亡效果。

[0167] RNAi技术的一个优势是其可以用于靶向包括多个不同的细胞通路路的多种不同基因。这对于如癌症复杂的疾病是重要的。在癌症中改变的主要的细胞通路包含:(1)肿瘤(oncogenesis)形成通路:受体蛋白络氨酸激酶(PTK)通路(例如,EGFR/ErbB1、ErbB2/HER2/Neu、IGF-1R、K-ras、R-ras、BRAF、ABL和c-Src)、结肠腺瘤样息肉蛋白(APC)通路(例如 Met

和c-Myc)、胶质瘤相关致癌基因(GL1)通路(例如,N-Myc和 Cyclin-D1)、磷酸肌醇3-激酶(PIK3)通路(例如,PI3K、AKT和NF- $\kappa$ B)、SMAD通路(例如,EWS/FLI-1)、低氧诱导转录因子(HIF)通路;(2) 细胞循环调节剂:成视网膜细胞瘤(Rb)通路(例如,HPV E7和E2F4)、p53通路(例如,HPV E6、Hdmx、Notch-1和 $\delta$ -样-1(Delta-like-1));和(3)凋亡(APOP)通路(例如,FLIP、BCL-2、BCL-XL、生存素和XIAP)。大多数RNAi候选癌症基因靶标(target)涉及与肿瘤生长相关的通路。RNAi也可以用于靶向或沉默负向调节内源肿瘤抑制基因的基因,如涉及细胞衰老(例如,端粒酶和ID1)以及蛋白稳定性和降解(例如,Cks-1、Skp-2和组织蛋白酶L)的基因。

[0168] 赘生性细胞(肿瘤细胞,Neoplastic cell)在宿主环境的环境内生长,并且必须对多种物理、化学和细胞挑战做出反应。因此,这些细胞建立了复合策略以控制肿瘤-宿主的相互作用。为了生长和传播赘生物(neoplasm),需要获得充足的氧和营养物以分解细胞外的基质(ECM),从而侵入周围的组织并迁移,并且以避免宿主免疫响应。RNAi技术可以被用于靶向涉及血管生成、入侵/迁移和免疫逃避的分子,以用于癌症治疗。这些靶标基因包括:(1)生长因子(例如,VEGF、EGF、FGF、PDGF、IL-8和IGF-1);(2)蛋白酶和蛋白酶抑制剂(例如,组织蛋白酶、MMP2、溶基质素和uPA);(3)致癌基因(例如,c-myc、ras、c-src、v-raf、c-jun 和VEGFR);(4)信号传导(例如,胸苷和磷酸化酶);(5)酶(例如,RAS-法尼基、转移酶(transferase)、香叶基(Geranyl)和转移酶(Transferase));(6)细胞因子(例如,IL-1、IL-6和IL-8)和(7)内源刺激物(例如,Ang-1、血管抑素II、内皮素、iNOS、PAF和Cox-2)。

[0169] 通过癌症细胞的抗凋亡蛋白的表达是重要的机制,其通过癌症细胞建立对化学疗法或辐射的抗性。使用靶向抗细胞凋亡蛋白的RNAi表现出与化学治疗和辐射治疗结合用于癌症治疗的的前景的策略。也有一些对化学抗性或辐射抗性具有贡献的另外的机制,和与这些机制相关的分子可以提供用于RNAi干预(intervention)。例如,靶向多抗药性(MDR)基因(例如,ABCB1、ABCB4和ABCB5)的RNAi可以是用于MDR基因介导的药物抗性的治疗的途径。DNA修复机制对于基因组稳定性的保持是重要的,并且因此其是靶向癌症的潜在治疗剂。在化学治疗或辐射治疗的压力下,癌症细胞将过表达(overexpress)与DNA修复相关的蛋白,从而恢复治疗诱导的DNA损伤。这种靶标基因包括切除修复的交叉补体1(ERCC1)、X-射线修复交叉补体蛋白1(XRCC1)、核糖核苷酸还原酶、双链断裂信号/修复蛋白ATM,和DNA依赖蛋白激酶催化亚基。

[0170] 微小RNA(miRNA)是一类小的、非编码RNA,其转录后控制mRNA的翻译和稳定性。miRNA负责保持各种生物过程(包括增殖、分化和细胞死亡)的适当的平衡。在癌症中,抑制肿瘤的miRNA的减少增加了靶标致癌基因的表达,然而增加致癌基因的miRNA的表达可以抑制靶标肿瘤抑制基因。与癌症相关的miRNA已经被归类于癌基因(如miR-155、miR-21和miR-17至29)、肿瘤抑制基因(如miR-15、miR-16、LIN28、DICER)和环境依赖基因(如miR-146和miR-29)。递送抑制肿瘤miRNA和沉默致癌miRNA已经在各种小鼠模型中成功。

[0171] 由于miRNA靶向信号通路的能力在癌症中通常是混乱的,miRNA也具有使抗性细胞(耐受细胞,resistant cell)敏感的潜能。MDR通常涉及通过ATP-结合基因盒(ATP-binding cassette)(ABC)转运蛋白的增加了的药物分泌。这些ABC转运蛋白的两种,ABCC3和ABCC6通过SOX2直接诱导。miR-9被识别为SOX2的负调节物(negative regulator)。化学治疗耐受的胶质瘤干细胞系中的miR-9的强制表达抑制了SOX2的表达,导致了减少的ABC转运蛋白表达以

及由此导致的药物保留。

[0172] 寡核苷酸是未修饰的或化学修饰的单链DNA分子。通常,它们相对较短(13-25个核苷酸)并且与细胞中存在的靶标的总池(total pool)中的单一序列杂交。反义寡核苷酸(AS ODN)被发现为能够抑制mRNA翻译的单链DNA片段。抗肿瘤AS ODN在细胞凋亡信号存在下靶向涉及细胞分裂、血管生成、迁移和细胞存活的基因,细胞凋亡信号包括Bcl-2、生存素、MDM2、Bcl-XL、RelA、RAS、RAF、BCR-ABL、JNK1,2、TERT、c-myc和c-myb。由于多数癌症细胞在基因表达谱中不同于正常细胞,因此AS ODN可以用于在对正常细胞最小后果的情况下,特异性抑制肿瘤的生长。例如,Genta Inc. (Berkeley Heights, New Jersey, 美国)已经开发了一种18-mer的硫代磷酸酯(phosphothioate) AS ODN,其是Bcl-2的补体,已知为Genasense<sup>TM</sup>。此外,靶向MDM2的AS ODN已经表现出通过多种化疗剂增强生长抑制、p53激活和p21诱导的效果。

[0173] 纳米颗粒配位聚合物(NCP)是新兴类型的自组装、混合纳米材料,它的性能可以通过改变分子构建块来改变。根据本公开的主题的一些实施方式,NCP可以设计为包含化疗剂并且包含siRNA、微小RNA和反义寡核苷酸(DNA)的核酸药物的两者。在某些实施方式中,NCP仅包含核酸药物,如siRNA。将多种化疗剂(如顺铂、奥沙利铂、培美曲塞、吉西他滨、紫杉醇、阿霉素)或多种这些化疗剂和RNA的组合物同时且有效递送至癌症细胞可以实现通过运用抗增殖和/或细胞凋亡效果,例如通过阻断多细胞信号通路增加抗癌效力。在某些实施方式中,可以使用这些药物的衍生物或类似物。可以使用,例如美国专利6,384,019、7,803,785和7,704,972、美国专利申请13/121,660、11/908,364,和14/347,504,以及国际专利申请PCT/2013/068965中描述的那些吉西他滨类似物。经由利用肿瘤中泄漏的血管系统和减少的淋巴排出,NCP也可以通过增加的渗透性和保留(EPR)效果增加小分子药物和生物制剂至肿瘤部位的递送。

[0174] 因此,根据本公开的主题的一些实施方式,传统化疗剂和核酸可以结合在纳米载体平台中,例如,为了引起癌症治疗中的协同效应。此外,包含化疗剂和核酸的颗粒可以与,例如X-射线辐射治疗结合以增强化学治疗的效力。

[0175] 因此,在一些实施方式中,本公开的主题提供了一种纳米颗粒,包含金属有机基质材料,如纳米级配位聚合物、MOF和/或NMOF,以用于多种治疗剂的共递送,如但不限于传统化疗剂和核酸(例如,siRNA、miRNA、AS ODN等)的共递送。在一些实施方式中,本发明的主题提供了一种纳米级颗粒平台,其用于多种传统化疗剂的共递送,并且用于使用该纳米级颗粒治疗癌症。

[0176] 因此,在一些实施方式中,多种化疗剂(即,多种相同的化疗剂或多种不同的化疗剂)可以负载于NCP中。多种化疗剂可以通过配位键、共价键、静电相互作用等结合到NCP的孔中,以用于各种癌症的治疗。例如,在用于肺癌治疗的一些实施方式中,可以使用顺铂和卡铂加吉西他滨、紫杉醇、多西他赛、培美曲塞、依托泊苷和长春瑞宾(vinorelbine)的组合。在用于胰腺癌的治疗的一些实施方式中,可以使用奥沙利铂和吉西他滨的组合。在用于卵巢癌治疗的一些实施方式中,可以使用顺铂/卡铂和紫杉醇(紫杉醇/多西他赛)和顺铂/卡铂以及吉西他滨的组合。在用于结肠癌治疗的一些实施方式中,可以使用奥沙利铂和5-FU/亚叶酸的组合。

[0177] 在一些实施方式中,本发明公开的NCP颗粒可以用作用于多种核酸(如siRNA和

miRNA)的递送平台。颗粒可以包含,例如单独的siRNA或汇集的siRNA(包含靶向不同抗癌通路的多种siRNA)。这些siRNA可以包括,但不限于下列各项:EGFR/ErbB1siRNA、ErbB2/HER2/Neu siRNA、IGF-1R siRNA、K-ras siRNA、R-ras siRNA、BRAF siRNA、ABL siRNA、c-Src siRNA、Met siRNA、c-Myc siRNA、N-Myc siRNA、Cyclin-D1 siRNA、PI3K siRNA、AKT siRNA、NF- $\kappa$ B siRNA、EWS/FLI-1 siRNA、HIF siRNA、HPV E7 siRNA、E2F4 siRNA、HPV E6 siRNA、Hdmx siRNA、Notch-1 siRNA、 $\delta$ -样-1 siRNA、FLIP siRNA、BCL-2 siRNA、BCL-XL siRNA、生存素 siRNA、XIAP siRNA、端粒酶 siRNA、ID1 siRNA、Cks-1 siRNA、Skp-2 siRNA、组织蛋白酶L siRNA、VEGF siRNA、EGF siRNA、FGF siRNA、PDGF siRNA、IL-8 siRNA、IGF-1 siRNA、组织蛋白酶 siRNA、MMP2 siRNA、溶基质素 siRNA、uPA siRNA、c-myc siRNA、ras siRNA、c-src siRNA、v-raf siRNA、c-jun siRNA、VEGFR siRNA、胸苷 siRNA、磷酸化酶 siRNA、RAS-法尼基 siRNA、转移酶 siRNA (transferase siRNA)、香叶基 siRNA、转移酶 siRNA (Transferase siRNA)、IL-1 siRNA、IL-6 siRNA、IL-8 siRNA、Ang-1 siRNA、血管抑素 II siRNA、内皮素 siRNA、iNOS siRNA、PAF siRNA、Cox-2 siRNA、ABCB1 siRNA、ABCB4 siRNA、ABCB5 siRNA、P-糖蛋白 siRNA、ERCC1 siRNA 和 ATM siRNA。miRNA 可以包括,但不限于以下各项:miR-9、miR-15、miR-16、miR-34、miR-181、miR-200、miR 200c、miR-342、miR-630、let-7、LIN28 和 DICER。颗粒也可以包含一种或多种反义寡核苷酸 (AS ODN)。使用 AS ODN 的基因靶标可以包括,但不限于以下各项:Bcl-2、生存素、MDM2、Bcl-XL、RelA、RAS、RAF、BCR-ABL、JNK1、2、TERT、c-myc 和 c-myb。在一些实施方式中,使用一种核酸。在其他实施方式中,使用例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多不同的核酸。

[0178] 在一些实施方式中,颗粒可以用于 siRNA 和传统化疗剂的共递送。在一些实施方式中,颗粒可以用于 miRNA 和传统化疗剂的共递送。在一些实施方式中,颗粒可以用于 AS ODN 和传统化疗剂的共递送。颗粒可以在传统化学治疗设定中和/或传统放化疗设定中使用。在一些实施方式中,仅递送核酸。

[0179] 图1和2示出了用于化疗剂和核酸的共递送的示例性实施方式。根据这些实施方式,AS ODN (DNA)、siRNA 和/或微小RNA可以共价附接至脂质分子(图1)和/或通过静电相互作用附接至脂质分子(图2),其中所述脂质分子形成涂覆在纳米颗粒核(例如,化疗剂负载的NCP核)周围的脂质双层的部分。脂质分子也可以附接至钝化剂(即,该试剂可以抑制血浆蛋白至纳米颗粒的吸收和/或减少通过人体防御系统,如网状内皮组织系统(RES)对纳米颗粒的辨识)、靶向部分和显像剂。此外,通过NCP外表面上的金属离子和核酸上的磷酸基团之间的配位键,核酸,如 siRNA、miRNA 和 AS ODN 可以直接负载至 NCP 的表面。

[0180] 在一些实施方式中,本公开的主题提供了一种用于多种治疗剂的共递送的纳米级颗粒。在一些实施方式中,纳米级颗粒包括:包含金属有机基质材料的核,可选地,其中金属有机基质材料包含配位聚合物;以及多种治疗剂。在一些实施方式中,多种治疗剂包含:(i)至少两种化疗剂(即,两种不同的化疗剂),如至少两种非核酸或传统化疗剂;(ii)至少两种核酸治疗剂,如小干扰RNA(siRNA),微小RNA(miRNA)、反义寡核苷酸(AS ODN)或它们的组合;(iii)至少一种非核酸化疗剂和至少一种核酸治疗剂;或(iv)至少一种化疗剂,(例如,一种常规的/非核酸化疗剂)和至少一种光敏剂,或(v)至少一种化疗剂、至少一种核酸和至少一种光敏剂。

[0181] 在一些实施方式中,多种治疗剂包含结合至金属有机基质材料核的至少一种非核

酸治疗剂。例如,至少一种非核酸化疗剂可以经由共价键(例如,结合于基质材料中的有机化合物)或通过配位键(例如,结合于金属有机基质材料中的金属)结合于金属有机基质材料核。可以使用任何适合的非核酸化疗剂。在一些实施方式中,至少一种非核酸化疗剂选自以下项的组,包括,但不限于:顺铂或奥沙利铂药物前体、甲氨蝶呤、亚叶酸、培美曲塞二钠、阿霉素、长春花碱、长春新碱、长春地辛、阿糖胞苷、硫唑嘌呤、美法伦、伊马替尼、阿那曲唑、来曲唑、卡铂、吉西他滨、紫杉醇、多西他赛、依托泊苷、5-氟尿嘧啶和长春瑞宾。在一些实施方式中,至少两种化疗剂(例如,至少两种不同的非核酸化疗剂,如顺铂和卡铂或它们的药物前体)结合到金属有机基质材料核中。

[0182] 在一些实施方式中,多种治疗剂包含至少一种核酸。在一些实施方式中,至少一种核酸是siRNA、miRNA或AS ODN。核酸可以通过核酸分子上的磷酸基团和与核外表面上的金属离子之间的配位键附接至金属有机基质材料和/或附接到核的孔中。可替换地,核酸可以与核上的涂覆层结合(共价或非共价)。例如,核酸可以结合至覆盖纳米颗粒核的外表面的脂质双层或脂质单层。

[0183] 在一些实施方式中,金属有机基质材料核包含金属有机框架(MOF)或纳米金属有机框架(NMOF),其包含含金属的簇或配位至有机分子的离子,其中材料包含重复配位单元。有机分子可以包含,例如羧酸酯、磷酸酯、氨基、巯基或羟基基团,以与金属离子形成配位键。

[0184] 在一些实施方式中,MOF或NMOF包含包含 $Zr_6(\mu_3-O)_4(\mu_3-OH)_4$ (即,作为含金属簇)和二羧酸桥接配体(即,作为有机分子)的材料。在一些实施方式中,二羧酸桥接配体包含桥接配体主链中的亚芳基部分。在一些实施方式中,二羧酸桥接配体进一步包含可以与化疗剂形成共价键的基团,如氨基、羟基或巯基。在一些实施方式中,二羧酸桥接配体包含氨基取代基。在一些实施方式中,二羧酸桥接配体是氨基-三苯基二羧酸(氨基-TPDC)。

[0185] 在一些实施方式中,至少一种非核酸化疗剂共价附接至二羧酸桥接单元上的取代基。例如,非核酸化疗剂可以包含羧酸基团,其可以与二羧酸桥接单元上的氨基取代基形成酰胺键。

[0186] 在一些实施方式中,至少一种非核酸化疗剂是顺铂或奥沙利铂药物前体。例如,非核酸化疗剂可以是包含羧酸基团的顺铂或奥沙利铂药物前体,例如顺,顺,反- $Pt(NH_3)_2Cl_2(OEt)(O_2CCH_2CH_2COOH)$ (顺铂药物前体)或顺,反- $[Pt(dach)Cl_2(O_2CCH_2CH_2COOH)_2]$ (奥沙利铂药物前体),其可以通过羧酸基团与纳米颗粒核中的桥接配体上的氨基取代基形成酰胺键。

[0187] 在一些实施方式中,至少一种非核酸化疗剂通过至二羧酸桥连配体的共价键结合到金属有机基质材料核中的孔中,并且其中至少一种核酸通过与金属有机基质材料核的外表面上的金属离子的配位键附接至金属有机基质材料核的外表面。在一些实施方式中,至少一种核酸选自包含生存素 siRNA、P-糖蛋白siRNA(P-gp siRNA)、Bcl-2siRNA或它们的两种或更多种的混合物组成的组。在一些实施方式中,至少一种核酸是生存素 siRNA、P-糖蛋白siRNA(P-gp siRNA)和Bcl-2siRNA的混合物。

[0188] 在一些实施方式中,纳米颗粒核可以包含约10重量%至约50重量%的非核酸化疗剂(例如,10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或约50重量%的二磷酸酯

重量%的非核酸化疗剂)。

[0189] 在一些实施方式中,纳米级颗粒可以具有小于约250nm的平均直径。在一些实施方式中,平均直径在约50至约200nm之间。在一些实施方式中,纳米级颗粒具有在约20nm至约180nm的平均直径(例如约20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175或约180nm)。在一些实施方式中,纳米级颗粒具有在约90nm至约140nm的平均直径。

[0190] 在一些实施方式中,纳米级颗粒包括覆盖金属有机基质材料核的外表面的至少一部分外表面的一种或多种涂覆试剂或层。涂覆层可以提供稳定性和/或功能性。这种涂覆试剂或层可以包括,但不限于金属氧化物、聚合物(例如,二氧化硅类聚合物,如二氧化硅、聚(硅氧烷)或聚(倍半硅氧烷),或有机物或亲水有机聚合物)、单脂质层、脂质双层和它们的组合。在一些实施方式中,钝化剂(如,亲水聚合物,例如PEG或PVP)和/或靶向剂(如,RGD)肽、适配体、寡核苷酸、多肽、抗体或多糖)和/或显像剂(如荧光部分)可以附接(共价或非共价)至涂覆试剂或层。在一些实施方式中,治疗剂可以共价或非共价附接至涂覆层。在一些实施方式中,至少一种核酸共价或非共价附接至涂覆层。

[0191] 在一些实施方式中,涂覆试剂或层是脂质双层。例如,在一些实施方式中,金属有机基质材料核涂覆有包含阳离子脂质和/或官能化脂质的脂质双层,其中所述官能化的脂质是使用可以结合至核酸的基团脂质官能化的,并且其中至少一种核酸共价结合至官能化的脂质和/或通过静电相互作用附接至阳离子脂质。在一些实施方式中,脂质双层包含包含硫醇-或二硫醇-官能化的1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)和1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)的一种或多种的混合物。在一些实施方式中,脂质双层包含或进一步包含1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸钠盐(DOPA)、胆固醇和聚乙二醇化-DSPE的一种或多种。

[0192] 在一些实施方式中,金属有机基质材料核包含含有多价金属离子和二膦酸酯的金属二膦酸酯配位聚合物。可以使用任何适合的多价金属离子。在一些实施方式中,多价金属离子是二价的。在一些实施方式中,多价金属离子是 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 或它们的组合。在一些实施方式中,金属是 $\text{Zn}^{2+}$ 。在一些实施方式中,二膦酸酯是含有金属离子(例如,Pt、Ir或Ru离子)的配位复合物。在一些实施方式中,二膦酸酯是化疗剂药物前体。因此,在一些实施方式中,化疗剂以纳米颗粒核的金属有机材料中的桥接配体的形式存在。在一些实施方式中,二膦酸酯是顺铂或奥沙利铂药物前体。例如,二膦酸酯可以是顺,顺-反-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>]或顺,反-[Pt(dach)Cl<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>]的二膦酸酯。

[0193] 在一些实施方式中,金属有机基质材料核包含多至约50重量%的二膦酸酯。在一些实施方式中,金属有机基质材料核包含约10重量%至约50重量%的二膦酸酯(例如,约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或约50重量%的二膦酸酯)。

[0194] 在一些实施方式中,包含金属二膦酸酯核的纳米级颗粒进一步包含脂质单层或脂质双层涂覆(涂层,coating)。在一些实施方式中,涂覆包含附接至涂覆(例如共价或非共价)的生存素siRNA、P-gp siRNA和Bcl-2 siRNA中的一种或多种。在一些实施方式中,涂覆包含生存素siRNA、P-gp siRNA和Bcl-2 siRNA的混合物。

[0195] 在一些实施方式中,包含金属二膦酸酯核的纳米级颗粒具有约20nm至约180nm的

直径(例如,约20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170或约180nm)。

[0196] 在一些实施方式中,本公开的主题包含一种药物制剂,包含本文描述的一种纳米级颗粒和药学上可接受的载体。在一些实施方式中,药学上可接受的载体是在人体中药学上可接受的。

[0197] 在一些实施方式中,本公开的主题提供了使用本文描述的一种纳米级颗粒治疗需要其的受试者的癌症的方法。从而,在一些实施方式中,本公开的主题提供了一种治疗受试者的癌症的方法,其中该方法包括给予受试者纳米级颗粒或其制剂。在一些实施方式中,纳米级颗粒包括至少一种非核酸化疗剂和至少一种核酸。

[0198] 在一些实施方式中,纳米颗粒包含核,核包含MOF,MOF包含  $Zr_6(\mu_3-O)_4(\mu_3-OH)_4$  和二羧酸桥接配体,可选地,其中二羧酸桥接配体包含氨基取代基(例如,用于共价附接至非核酸化疗剂)。在一些实施方式中,核包含金属二膦酸酯配位聚合物,例如,其中二膦酸酯包含化疗剂药物前体。

[0199] 在一些实施例中,纳米颗粒的至少一种非核酸化疗剂是顺铂或奥沙利铂药物前体,且纳米颗粒的至少一种核酸选自生存素 siRNA、P-gp siRNA、Bcl-2 siRNA 和它们的组合。在一些实施方式中,至少一种核酸是生存素 siRNA、P-gp siRNA 和 Bcl-2 siRNA 的混合物。

[0200] 本发明的方法可以用于治疗任何适合的癌症。在一些实施方式中,癌症是肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌或结肠癌。在一些实施方式中,癌症是卵巢癌。在一些实施方式中,癌症是耐药性癌症,如耐顺铂的癌症(例如,耐顺铂的卵巢癌)。

[0201] 在一些实施方式中,本公开主题提供了制备包含金属有机基质材料核核多种治疗剂的纳米级颗粒的方法。在一些实施方式中,可以使用微乳液方法制备纳米级颗粒。例如在美国专利申请公开号2014/0234210和国际公开号W0 2013/0971中描述了微乳液方法,它们的每个通过引证以其整体结合到本文中。在一些实施方式中,可以通过包含:(a)使包含金属离子的微乳液与包含二膦酸酯的微乳液接触,从而形成金属二膦酸酯配位聚合物纳米颗粒;(b)将来自(a)的纳米颗粒分散到包含阳离子脂质和/或官能化的脂质的溶液(例如,水性溶液)中以形成阳离子脂质涂覆的和/或官能化的脂质涂覆的纳米颗粒;以及(c)使脂质涂覆的纳米颗粒与包含至少一种核酸的溶液接触的方法来制备纳米级颗粒。在一些实施方式中,二膦酸酯是顺铂或奥沙利铂药物前体。在一些实施方式中,二膦酸酯微乳液可以进一步包含脂质,如DOPA、DOTAP、DOPC、POPE、油酸、硬脂酸等,使得可以形成在核的外表面的至少一部分上方已经包含脂质层(例如,单脂质层)的纳米颗粒核。在一些实施方式中,核酸溶液包含生存素 siRNA、P-gp siRNA、Bcl-2 siRNA 和它们的组合的至少一种或多种。

[0202] 可以通过在微乳液中溶解金属化合物来提供金属离子。金属化合物可以是式  $ML_x$  的化合物,其中  $x$  是对应于金属离子的化合价的整数, $M$  是多价金属离子,并且每个  $L$  均是配体。用于金属化合物的适合的配体包括,但不限于卤素、羟基、磷酸酯、硝酸酯和氨基。在一些实施方式中,金属化合物是式  $ML_x$  的化合物的水合物或溶剂化物。在一些实施方式中,金属化合物是金属卤化物(例如  $CaCl_2$  或  $MnCl_2$ ) 或它们的水合物或溶剂化物。在一些实施方式中,金属化合物是硝酸锌(即,  $Zn(NO_3)_2$ )。

[0203] 可替代地,可以通过包含使金属化合物,如金属卤化物的溶液与包含二羧酸的溶



液接触来制备金属有机基质材料核的方法,制备纳米级颗粒。在一些实施方式中,二羧酸和金属化合物位于极性有机溶剂,如二甲基甲酰胺(DMF)的溶液中。二羧酸可以包含另外的取代基,例如羟基或氨基基团。然后,纳米颗粒核可以与包含非核酸化疗剂的溶液接触,其中非核酸化疗剂包含在非核酸化疗剂结合至二羧酸的情况下可以与二羧酸的另外的取代基形成键的基团。溶液可以包含有机溶剂和/或偶联剂(例如,二咪唑)。然后,包含非核酸化疗剂的纳米颗粒核可以与包含一种或多种核酸的溶液(例如,水性溶液)接触。核酸可以通过非共价键与纳米颗粒核的外表面上的金属离子结合。可替换地,核酸可以提供与一种或多种脂质以溶液(例如,水性溶液)提供,其中核酸可以,可选地共价或非共价结合至脂质。因此,脂质/核酸溶液可以在纳米颗粒核的表面上方形成脂质层或脂质双层。在一些实施方式中,至少一种核酸选自生存素siRNA、P-gp siRNA、Bcl-2siRNA和它们的组合。

[0204] 在一些实施方式中,金属化合物是Zr化合物,如 $ZrCl_4$ ,并且二羧酸是氨基取代的二羧酸,如氨基-三苯基二羧酸。在一些实施方式中,非核酸化疗剂包含羧酸取代基,并且其在进一步包含二咪唑的溶液中与纳米颗粒核接触。在一些实施方式中,非核酸化疗剂是顺铂或奥沙利铂药物前体,可选顺,顺,反- $Pt(NH_3)_2Cl_2(OEt)(O_2CCH_2CH_2COOH)$ (顺铂药物前体)或顺,反- $[Pt(dach)Cl_2(O_2CCH_2CH_2COOH)_2]$ (奥沙利铂药物前体),其包含羧酸取代基。

[0205] III. 用于化疗剂和光敏剂的共递送的纳米级配位聚合物颗粒

[0206] 如前文的描述,通过利用肿瘤中渗漏的血管系统和减少的淋巴排出,纳米颗粒系统可以经由增加渗透性和保留(EPR)效果增加小分子药物和生物制剂至肿瘤部位的递送。纳米颗粒也可以用于在不过度依赖高精度光递送的情况下,增加肿瘤部位的PS聚集以增加PDT功效。用于PS的期望的纳米载体特征包括高有效负荷、在光激活的典型的短时间周期(例如,约30分钟)内PS试剂以控制的方式释放以提供高PS浓度、以及适合的分子特性以在癌症细胞内定位并且最小化光化学激发态和其他过程的自猝灭(self-quenching),从而有效的产生用于选择性杀死癌症细胞的ROS。本发明公开了可以用于提供这些特征的NCP颗粒平台。在一些实施方式中,本公开主题提供了用于构建多官能核-壳杂合纳米颗粒的基础,该纳米颗粒可以将传统化疗剂和PDT试剂选择性的递送并触发释放到癌症细胞内,从而确保化疗和PDT的組合的协同性和有效性。

[0207] 图11示出了根据本发明的主题的用于结合的化疗和PDT的示例性颗粒的示意图。图11中示出的颗粒包含具有嵌入在NCP核中的化疗剂(例如,顺铂药物前体)和壳中的卟啉脂质的NCP-卟啉脂质核-壳纳米颗粒,从而提供了具有单递送系统的PDT和化疗的組合。NCP-卟啉脂质颗粒在细胞外保持了结构完整性,但是可以以细胞内触发的方式释放化疗剂和卟啉脂质,从而实现了时间和位点特异性的细胞毒性。如下文的描述,当与自由疗法(free therapeutics)和单一疗法(monotherapy)颗粒比较时,使用NCP-卟啉脂质颗粒的化疗剂的化疗和卟啉脂质和光激活的PDT的协同作用可以在癌细胞(例如,头颈癌细胞)中以及在静脉给予之后的癌的异种移植鼠模型中提供增强的抗癌效果。

[0208] 因此,在一些实施方式中,本公开的主题提供了用于多种治疗剂的共递送的纳米级颗粒,所述纳米级颗粒包括:包含金属有机基质材料的核,可选地,其中金属有机基质材料包含配位聚合物;以及多种治疗剂,其中所述多种治疗剂包含至少一种化疗剂(即,一种非PS化疗剂)和至少一种光敏剂。

[0209] 在一些实施方式中,多种治疗剂包含结合到金属有机基质材料核中的至少一种非



核酸化疗剂。例如,至少一种非核酸化疗剂可以通过共价键(例如,结合至基质材料中的有机物组分)或通过配位键(例如,结合至金属有机基质材料中的金属)结合到金属有机基质材料核中。可以使用任何适合的非核酸化疗剂。在一些实施方式中,至少一种非核酸化疗剂选自以下项的组,包括,但不限于:顺铂或奥沙利铂药物前体、甲氨蝶呤、亚叶酸、培美曲塞二钠、阿霉素、长春花碱、长春新碱、长春地辛、阿糖胞苷、硫唑嘌呤、美法伦、伊马替尼、阿那曲唑、来曲唑、卡铂、吉西他滨、紫杉醇、多西他赛、依托泊苷、长春瑞宾和5-氟尿嘧啶。在一些实施方式中,至少两种化疗剂(例如,至少两种不同的非核酸化疗剂,如顺铂和卡铂或它们的药物前体)结合到金属有机基质材料核中。

[0210] 在一些实施方式中,非核酸化疗剂是二膦酸酯顺铂或奥沙利铂药物前体,并且金属有机基质材料核包含金属二膦酸酯配位聚合物,其包含多价金属离子和所述二膦酸酯顺铂或奥沙利铂药物前体。可以使用任何适合的多价金属离子。在一些实施方式中,多价金属离子是二价金属离子。在一些实施方式中,多价金属离子是 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 或它们的组合。在一些实施方式中,二膦酸酯顺铂或奥沙利铂药物前体是顺,顺-反-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>]的二膦酸酯和/或金属离子是 $\text{Zn}^{2+}$ 。

[0211] 在一些实施方式中,光敏剂共价附接至围绕纳米颗粒核的外表面的部分的涂覆的层或多层。例如,纳米颗粒可以包含一种或多种涂覆的层,如金属氧化物、聚合物、单脂质层、脂质双层和它们的组合,并且光敏剂共价或非共价附接至涂覆层中的脂质。可以使用任何适合的光敏剂,例如,但不限于卟啉、叶绿素染料或它们的衍生物或类似物。在一些实施方式中,涂覆层或多层包含含有卟啉脂质(即,脂质共价附接至卟啉或其衍生物或类似物)的脂质单层或脂质双层。

[0212] 脂质层或双层也可以包含其他脂质和/或钝化或靶向剂,如亲水聚合物和或RGD肽。在一些实施方式中,脂质双层或脂质单层进一步包含胆固醇、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸钠盐(DOPA)和聚乙二醇化-DSPE中的一种或多种。

[0213] 在一些实施方式中,纳米级颗粒可以具有小于约250nm的平均直径。在一些实施方式中,平均直径在约20至约200nm之间。在一些实施方式中,纳米颗粒具有在约20nm至约180nm(例如,约20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或约180nm)之间的平均直径。在一些实施方式中,纳米级颗粒具有在约90nm至约140nm的平均直径。在一些实施方式中,直径是约108nm。

[0214] 在一些实施方式中,本公开的主题提供了一种包含本公开主题的纳米级颗粒的药物制剂,该纳米级颗粒包括作为多种治疗剂中的一种的光敏剂(例如,在围绕金属有机核的脂质单层或脂质双层中)和药学上可接受载体。

[0215] 在一些实施方式中,本公开的主题提供了治疗需要其的受试者的癌症的方法,其中该方法包括将包含作为多种治疗剂的一种的光敏剂的本公开主题的主题纳米级颗粒给予受试者,并且使用具有适合于激活光敏剂的波长的辐射辐照受试者或受试者的治疗区域。辐照激活光敏剂,其产生活性氧,如单态氧(singlet oxygen)。用于辐照的波长可以取决于光敏剂。在一些实施方式中,光敏剂是卟啉脂质,且在从630nm至740nm(例如,630、640、

650、660、670、680、690、700、710、720、730或约740nm)的波长范围内进行辐照。

[0216] 可以治疗任何适合的癌症,例如,但不限于头颈癌、乳腺癌、妇科癌、脑癌、结肠直肠癌(大肠癌,colorectal cancer)、间皮癌和胰腺癌。在一些实施方式中,癌症是头颈癌。在一些实施方式中,头颈癌是耐受顺铂的头颈癌。

[0217] 在一些实施方式中,纳米级颗粒的至少一种化疗剂是顺铂或奥沙利铂药物前体。在一些实施方式中,药物前体是顺铂或奥沙利铂的二膦酸酯。在一些实施方式中,纳米颗粒核包含金属二膦酸酯配位聚合物。在一些实施方式中,金属是Zn。在一些实施方式中,纳米颗粒可以以约1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9或1:10的摩尔比例包含顺铂药物前体与卟啉脂质。在一些实施方式中,纳米颗粒包含约10-50重量%的顺铂药物前体(例如,嵌入到纳米颗粒核中)和约10-50重量%的卟啉脂质(在涂覆层中)。

[0218] 在一些实施方式中,本公开的主题提供了通过微乳液方法制备包含化疗剂和光敏剂的纳米级颗粒的方法。在一些实施方式中,该方法包括:(a)使包含金属离子的微乳液与包含二膦酸酯的微乳液接触,从而形成金属二膦酸酯配位聚合物纳米颗粒;以及(b)将来自(a)的纳米颗粒分散到包含卟啉脂质的溶液中以形成卟啉脂质涂覆的纳米颗粒。在一些实施方式中,二膦酸酯是顺铂或奥沙利铂药物前体。在一些实施方式中,溶液包含进一步包含一种或多种另外的脂质涂覆组分,如胆固醇、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)。

#### [0219] IV.siDNA递送

[0220] 虽然通过经由增强的渗透性和保留(EPR)效果改善递送并减少了毒性,纳米颗粒递送系统已经示出了增强了化疗剂的抗癌效力,但是靶向体内肿瘤细胞的siRNA的有效递送仍是未解决的问题。内体逃逸(内含体逃逸,内涵体逃逸,Endosomal escape)是引发细胞内siRNA-介导的基因沉默的关键步骤。用于内体逃逸的通常利用的质子海绵效应依赖于阳离子组分,如阳离子磷脂和聚合物,导致带正电的递送载体,其不利于实现延长的系统循环和最小化非特异性单核吞噬细胞系统(MPS)摄取。因此,对于通过经由全身注射(systemic injection)利用EPR效果,发展具有有效内体逃逸的携带siRNA的高负载的有效的纳米平台,而不损害用于高的肿瘤累积的中性表面电荷,存在需要。纳米级配位聚合物可以用于递送单独的或汇集的siRNA以用于癌症治疗。NCP提供基础新型引发释放和独特的内体逃逸机制以用于将siRNA有效地递送至体内肿瘤。本文描述的模块化且可扩展的NCP合成确保了靶向多种基因的siRNA的结合,从而实现了“混合式(鸡尾酒式,cocktail)”siRNA治疗并且促进了用于癌症治疗的NCP技术的临床转化。

[0221] 尽管集中进行了数十年研究工作,但是在临床中最后阶段的癌症治疗仅实现了有限的成就,并且仍具有大量令人困惑的问题。通过肿瘤复杂的、负反馈(negative feedback)机制限制了免疫系统,其涉及针对自身免疫保护宿主并且预防抗肿瘤免疫。肿瘤细胞利用多种策略逃避免疫系统的检测和清除(elimination)。siRNA介导的RNAi可以用于在肿瘤细胞和肿瘤基质细胞的两者中通过阻断多个免疫抑制的通路激活免疫系统。本文描述的具有高效性和内体逃逸能力的强健的(robust)NCP平台可以将siRNA混合物递送至肿瘤位置,从而在抗性癌(resistant cancer)(如,抗性卵巢癌(OCa))中引起有效的免疫治疗。

[0222] 程序性死亡1(PD-1)是通过活性T细胞、B细胞、单核细胞、树突细胞(DC)等表达的关键的免疫检测点(检查点,checkpoint)受体。PD-1主要在周围组织中作用,其中这些免

疫细胞可以遭遇抑制免疫力的PD-1 配体,如PD-L1,其不仅在活性免疫细胞中过表达,而且在肿瘤细胞和基质细胞中也过表达。PD-L1表达与OCa的不良预后(unfavorable prognosis) 相关。在T辅助1型( $T_H1$ )细胞上阻断PD1的表达可以在PD-L1攻击(激发, challenge)过程中稳定 $T_H1$ 细胞分化,并且防止 $T_H1$ 细胞转变为严重削弱细胞介导的免疫的调节T( $T_{reg}$ )细胞。早先的临床研究证明了PD-L1 的抗体介导的阻滞诱导了持久的肿瘤退化(目标有效率为6至17%)并且延长了具有多种晚期癌症的患者的疾病的稳定性(在24周中的比率为12 至41%)。通过siRNA的肿瘤中PD-L1表达的下调可以抑制PD-1和PD-L1 之间的相互作用,并且因此增强了T细胞对介导的有效抗癌活性的响应。

[0223] 趋化因子CC基序配体21(chemokine CC motif ligand 21)通过肿瘤细胞的分泌已经识别为免疫耐受性淋巴样基质发生的核心事件,其特征为受损的细胞因子微环境和抑制免疫性细胞群的累积。这种现象表现为通过在基质上而不是在肿瘤细胞上的趋化因子CC基序受体7(chemokine CC motif receptor 7,CCR7)的介导,以及在 $Ccr7^{-/-}$ 小鼠中免疫能力恢复至正常水平或随后通过特异性抗体的CCR7的阻滞。通过siRNA的在肿瘤基质细胞中CCR7表达的下调可以调节用于刺激抗肿瘤免疫力的肿瘤的微环境。

[0224] 随着耗尽肿瘤微环境的必需营养素并且导致免疫抑制的代谢物的加速产生,肿瘤细胞新陈代谢中的改变也诱导了免疫抑制。在人类肿瘤细胞中上调的吡啶胺-2,3-双加氧酶(IDO)将促进 $T_{reg}$ 和髓样抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell,MDSC)活性,抑制肿瘤渗透T-细胞的增殖,并且诱导效应T细胞的细胞凋亡。在通过siRNA在肿瘤细胞中IDO表达的下调可以导致免疫抑制的减少。

[0225] 肿瘤细胞微环境的细胞组分和体液组分的两者均是免疫治疗策略的靶标,因此NCP/siRNA可以用于将靶向D-L1、CCR7和IDO的siRNA的混合物(cocktail)递送至OCa。在一些实施方式中,NCP/siRNA可以是核-壳纳米颗粒,其在固体核中具有负载双(乙二胺)铂双膦酸(Pten)的配位聚合物,并且在壳中具有负载siRNA的脂质双层。将在下文中描述将siRNA结合到负载Pten的Pten-NCP的颗粒的壳中的Pten-NCP/siRNA。

#### [0226] V. 制剂(配方, formulation)

[0227] 本公开主题的组合物包含,在一些实施方式中包含药学上可接受的载的组合物。任何适合的药物配方均可以用于制备用作给予受试者的组合物。在一些实施方式中,组合物和/或载体可以是在人体中药学上可接受的。

[0228] 例如,适合的制剂可以包含水性或非水性无菌注射溶液,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、细菌抗体和使得制剂与受试者的体液等渗透的溶质;并且水性和非水性无菌悬浮液可以包含悬浮剂和增稠剂。制剂可以存在于单元剂型或多剂型容器中,例如密封的安瓿瓶和药水瓶,并且可以储存在冷冻或冷冻干燥(冻干)条件中,在立即使用之前仅需要添加无菌液体载体,例如用于注射的水。一些示例性成分是十二烷基硫酸钠(SDS),在一个实例中,在0.1至10mg/ml的范围内,在另一个实例中为约2.0mg/ml;和/或甘露醇或另一种糖,例如在10至100mg/ml的范围内,在另一个实例中为约30mg/ml;和/或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0229] 应该理解除了前文中提及的具体的成分,本公开主题的制剂可以包含具有关于讨论的制剂类型的本领域中的其他常规试剂。例如,可以使用无菌无热源水性或非水性溶液。

#### [0230] VI. 受试者

[0231] 可以在受试者(即,活体,如患者)的体外(例如,在分离细胞或组织上)或体内的样本上使用前文公开的方法和组合物。在一些实施方式中,受试者是人类受试者,但是应该理解本公开主题的原理表明了本公开主题对于全部的脊椎动物(包含哺乳动物)均是有效的,其意指包含术语“受试者”和“患者”。此外,哺乳动物用理解为包含任何哺乳类物种,对于这些哺乳类物种期望的采用本文公开的组合物和方法,特别是农业和驯养的哺乳类物种。

[0232] 正因如此本公开主题的方法在温血脊椎动物中特别有用。因此,本公开主题关注哺乳动物和鸟类。更具体地,提供了用于哺乳动物如人类的方法和组合物,以及由于是濒临灭绝的重要的那些哺乳动物(如,西伯利亚虎),经济上重要的那些哺乳动物(用于人类消费的农场中的饲养的动物),和/或对社会重要的那些哺乳动物(作为宠物或在动物园中的动物),例如不同于人类的食肉动物(如,猫和狗)、猪(swine)(猪(pig)、生猪(hog)和野猪(wild boar))、反刍动物(如牛(cattle)、公牛(oxen)、绵羊、长颈鹿、鹿、山羊、北美野牛和骆驼)以及马。也提供了鸟类的治疗,包含濒临灭绝的那些种类的鸟类的治疗,保护于动物园中或作为宠物(例如鹦鹉)的鸟类的治疗,以及家禽(fowl)和更具体的驯养的家禽(domesticated fowl),例如家禽(poultry),如火鸡、鸡、鸭、鹅、珍珠鸡(guinea fowl)等,它们也是最人类经济重要的。因此,也提供了家畜的治疗,包括,但不限于驯养的猪(swine)(猪(pig)和生猪(hog))、反刍动物、马、家禽等。

#### [0233] VII. 给予(给药,administration)

[0234] 本公开主题的组合物的给予的适合的方法包括,但不限于静脉内和瘤内注射、口服给予、皮下给予、腹膜内注射、颅内注射和直肠给予。可替换地,组合物可以通过任何其他方法沉积在需要治疗的位置,例如通过在肺途径内喷涂组合物。本公开主题的给予组合物的特定方式依赖各种因素,包含将治疗的细胞的分布和丰度,以及新陈代谢的机制或从给予的位点的组合物的去除。例如,相对表面的肿瘤可以进行瘤内注射。相反,内部肿瘤可以进行静脉内注射的治疗。

[0235] 在一种实施方式中,给予的方法包括分区域递送或在将治疗的位点累积的特征。在一些实施方式中,组合物是肿瘤内递送的。在一些实施方式中,将组合物选择性递送至靶标通过组合物的静脉内注射然后进行靶标的光学处理(光辐照)完成。

[0236] 对于组合物至肺的递送途径,本公开的主题的组合物可以制成气雾剂或喷雾剂。可以在,例如美国专利号5,858,784;6,013,638;6,022,737;和 6,136,295中发现用于气雾剂和喷雾剂的制备和给予的方法。

#### [0237] VIII. 剂量

[0238] 将有效剂量的本公开的主题的组合物给予受试者。“有效量”是足够产生可检测的治疗的组合物的量。可以改变本公开主题的组合物成分的实际剂量水平,从而对特定受试者和/或靶标给予满足以实现期望的效果的剂量的组合物。选择的剂量水平可以依赖于组合物的活性(例如,MRI弛豫效能或二磷酸酯药物负载)和给予途径。

[0239] 在本公开主题的本文公开的综述之后,考虑特定的制剂,结合组合物的使用的给予方法(administration method)以及待治疗的靶标的性质,本领域普通技术人员可以对单独的受试者调节剂量。这种调节或改变,以及评估何时且如何进行这种调节或改变是本领域普通技术人员公知的。

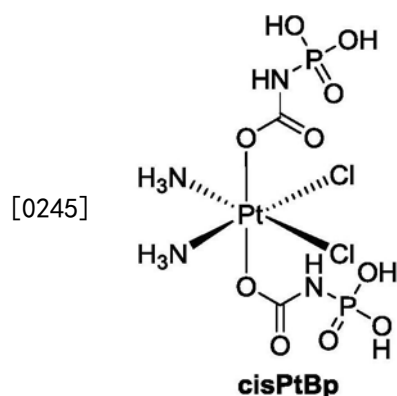
#### [0240] 实施例

[0241] 下列实施例已经包含了向本领域普通技术人员提供指导以实践本公开主题的典型的实施例。根据本公开和本领域技术的通常水平,本领域技术人员可以理解下列实施例旨在仅是示例性的,并且在不违背本公开主题的范围的情况下可以采用多种改变、修改和替换。

[0242] 实施例1

[0243] 纳米级配位聚合物,具有顺铂或奥沙利铂并且具有通过静电相互作用在颗粒表面上吸附的RNA

[0244] 1.1.顺铂药物前体(cisPtBp)的合成:



[0246] 方案1.二磷酸酯顺铂药物前体的结构。

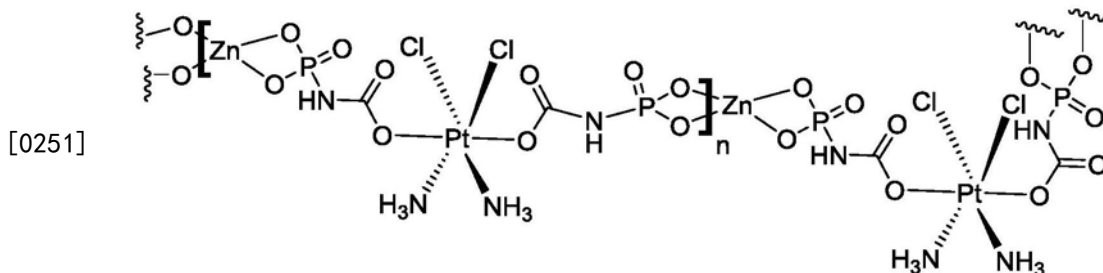
[0247] 在国际申请号W0 2013/009701中描述了二磷酸酯顺铂药物前体,cisPtBp(方案1)的制备。更具体地,向顺,顺,反-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>](0.5 g,1.5mmol)的2mL的二甲基甲酰胺(DMF)的悬浮液中添加含4当量的二乙氧基氧磷基(diethoxyphosphinyl)异氰酸酯(0.92mL,6.0mmol)的1mL的DMF溶液。在室温下在黑暗中搅拌产生的混合物12h。过滤溶液,并且通过添加二乙醚沉淀产生的二磷酸酯复合物,并且使用二乙醚清洗至少两次以去除残留的DMF。产率:80%。DMSO-d<sub>6</sub>中的<sup>1</sup>H NMR:δ 8.61(d,2H);6.58(br,6H);3.97(q,8H);1.20(t,12H)。

[0248] 在用于随后的反应之前,在真空下干燥二磷酸酯复合物4h。在0℃下在向3mL的干DMF中的二磷酸酯复合物(250mg,0.36mmol)的溶液添加475μL的三甲基甲硅烷基溴化物(3.6mmol),并且在氮气保护下使得混合物自黑暗在室温下反应18h。在浓缩溶液之后,通过添加二氯甲烷沉淀中间物并且进一步使用二氯甲烷(DCM)清洗至少两次。将固体溶解于甲醇(MeOH)并且在室温下搅拌8h以水解甲硅烷基酯。在浓缩溶液之后,将DCM倒入反应混合物中以沉淀期望的cisPtBp产物,并且使用DCM清洗固体两次。产率:60%。D<sub>2</sub>O中的<sup>1</sup>H NMR.δ 6.62(m,6H)。用于[M+H]<sup>+</sup>的ESI-MS:计算值578.9;确定值579.0。

[0249] 1.2.负载siRNA的NCP-1(NCP-1/siRNA)的制备

[0250] 将200微升的25mg/mL的cisPtBp钠盐水溶液和0.2mL的100mg/mL Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>水溶液分别添加至0.3M的Triton X-100/1.5M的1-己醇的5mL 的环己烷混合物中,以形成w=7.4的微乳液。将200微升的DOPA(氯仿(CHCl<sub>3</sub>)中的200mg/mL)添加到cisPtBp钠盐微乳液,并且;连续搅拌15分钟直至形成其清澈溶液。组合两种微乳液,并且搅拌生成的10mL 的微乳液另外的30分钟,以产生纳米级配位聚合物(NCP)。参见下文中方案2。然后使用环己烷和乙醇清洗NCP以去除另外的DOPA,并且分散在THF中。通过在50℃下将DOTAP、胆固醇(DOTAP/胆

固醇摩尔比率=2:1)的THF溶液、20mol%的DSPE-PEG2K和NCP添加至30% (v/v) 乙醇/水,从而获得阳离子脂质涂覆的NCP-1。在使用之前,使THF和乙烷完全蒸发,并且使得NCP-1溶液冷却至室温。使用相同的方法制备对照纳米颗粒 (Zn对照),区别仅在于使用10水合焦磷酸钠代替顺铂钠盐以形成NCP。



[0252] 方案2. 锌-顺铂二膦酸酯配位聚合物的结构。

[0253] 以1:1:1的重量比将生存素siRNA、Bcl-2siRNA和P-糖蛋白 (P-gp) siRNA溶解于DEPC-处理的水中以实现2mg/mL汇集的siRNA溶液。使阳离子脂质涂覆的NCP-1 (2mg/mL) 与siRNA溶液 (2mg/mL) 以4:1 的顺铂:siRNA的重量比混合,并且保持在800rpm和室温下搅拌30分钟以实现在带正电荷的NCP-1表面上的带负电荷的siRNA的吸附。

[0254] ICP-MS用于分析NCP的Pt浓度以计算顺铂负载。确定的NCP-1的顺铂负载为40-50wt%。

[0255] 通过Zetasizer (Nano ZS, Malvern, UK) 确定磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中NCP-1和NCP-1/siRNA的颗粒尺寸、多分散性指数 (PDI) 和 $\zeta$ 电势。NCP-1和NCP-1/siRNA的颗粒尺寸、多分散性指数 (PDI) 和 $\zeta$ 电势分别为 $134.2 \pm 3.4$ nm,  $0.076 \pm 0.013$ 和 $16.3 \pm 2.6$ mV;  $156.3 \pm 6.7$ nm,  $0.087 \pm 0.021$ 和 $-3.1 \pm 0.5$ mV。略微升高的颗粒尺寸和NCP-1/siRNA的负电荷证实了成功的siRNA吸附。也制备负载siRNA的Zn对照颗粒 (Zn对照 /siRNA), 并且其尺寸、PDI和表面电荷分别为 $144.2 \pm 2.4$ nm,  $0.102 \pm 0.022$  和 $-2.9 \pm 0.4$ mV。

[0256] 透射电子的显微镜 (TEM, JEM 100CX-II, JOEL Ltd, 东京, 日本) 用于观察NCP-1/siRNA的形态。NCP-1/siRNA的形态为球形、单分散并且界限清楚。参见图3 (a)。

[0257] 首先使用在含有0.25 $\mu$ g/mL的溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 的 4% (w/v) 的琼脂糖凝胶电泳上进行凝胶阻滞实验, 确定siRNA与NCP-1 的关联。与对照裸siRNA相比, 负载在NCP-1内的siRNA的移动完全阻滞, 表明了NCP-1可以以4的顺铂/siRNA重量比率有效地与siRNA复合。

[0258] 通过荧光测定法 (fluorimetry) 定量确定NCP-1内siRNA的负载效率 (LE)。在13,000rpm下离心分离包封在NCP-1和纳米颗粒悬浮液内的 TAMRA-标签 (tag) 的siRNA 30分钟。使用基于标准曲线 (TAMRA,  $\lambda_{ex} = 565$ nm,  $\lambda_{em} = 580$ nm) 的荧光测定法确定上清液中的游离 TAMRA-siRNA的量。通过下列方程式计算LE:

[0259] 
$$LE(\%) = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100$$

[0260] 其中 $W_0$ 和 $W_1$ 分别是指上清液中的总siRNA和游离siRNA的含量。确定的siRNA负载效率高达 $91.2 \pm 4.9\%$ 。

[0261] 1.3. 血清中siRNA的完整性:

[0262] 使含有1 $\mu$ g的siRNA的NCP-1/siRNA与等量的胎牛血清 (FBS) 混合。在37 $^{\circ}$ C下孵育预

定的时间,在80℃下加热混合物5分钟以灭活核酸酶并且破坏NCP-1结构。因此,siRNA从NCP-1/siRNA解离,并且随后在4% (w/v) 的琼脂糖凝胶电泳上评估其完整性。将含有1μg的siRNA 的裸siRNA溶液作为对照。在使用血清培育多至4h的情况下, NCP-1/siRNA展现出更好的能力以保护siRNA免于受到核酸酶的降解。

#### [0263] 1.4. 体外siRNA释放

[0264] 为了评估来自NCP-1/siRNA的siRNA的释放曲线 (release profiles),将含有1μg的TAMRA-siRNA的纳米颗粒在振荡条件下,在37℃使用1 mL的PBS培育。在每个预定时间间隔处,在13,000rpm下离心分离悬浮液10分钟并且通过荧光测定法对TAMRA-siRNA含量定量0.5mL的上清液。添加等量的释放介质 (release medium),并且在进一步的培育之前再悬浮沉淀物。在2h内NCP-1/siRNA能够在PBS中释放约40%的siRNA,并且在24h之后完全释放。siRNA从NCP缓慢地释放。

#### [0265] 1.5. siRNA的细胞摄取

[0266] 将包含ES-2、OVCAR-3和SKOV-3细胞的三种类型的卵巢癌细胞系以 $1 \times 10^5$ 细胞每孔接种在24孔板上,并且培养24h。添加含有TAMRA-siRNA的NCP-1/siRNA和裸TAMRA-siRNA溶液 (2mg/mL) (0.4 μg siRNA/孔)。然后培育4小时,使用PBS清洗细胞三次并且然后使用0.5% (w/v) 的十二烷基硫酸钠 (SDS, pH 8.0) 进行细胞溶解。通过荧光测定法对TAMRA-siRNA定量溶解产物,并且通过BCA试剂盒 (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, 美国) 定量蛋白含量。摄取水平表达为与1mg的细胞蛋白相关的TAMRA-siRNA的量。与裸siRNA溶液相比, NCP-1/siRNA的siRNA摄取量显著地增加,这表明NCP-1/siRNA可以帮助siRNA的内化 (internalization)。参见图3 (b)。也通过NCP-1/siRNA 促进了顺铂的内化,这可能是由于P-gp的下调,其降低了纳米颗粒/顺铂的流出。参见图3 (c)。

[0267] 为了直接观察ES-2、OVCAR-3和SKOV-3细胞内的NCP-1/siRNA的内化,在37℃下使用含有TAMRA-siRNA的NCP-1/siRNA培育细胞4h。使用PBS清洗细胞三次,使用4%的多聚甲醛固定,使用4',6-二氨基-2- 苯茚二酮 (DAPI, 10μg/mL) 染色,并且在共聚焦激光扫描显微镜 (CLMS) 下观察。大量的siRNA位于全部三种类型的卵巢癌细胞的细胞质中。

[0268] 为了使内化的NCP-1/siRNA与内体/溶酶体间隔的共定位成像,在 37℃下使用含有TAMRA-siRNA的NCP-1/siRNA培育细胞2h。使用PBS 清洗细胞三次,使用4%的多聚甲醛固定,并且在通过CLSM观察之前使用DAPI (10μg/mL) 和Lysotracker Green (100nM) 染色。在培育2-h 之后,在NCP-1/siRNA中包封的多数siRNA从内体/溶酶体包埋中逃逸。

#### [0269] 1.6. NCP-1/siRNA的体外转染效率:

[0270] 将ES-2、OVCAR-3和SKOV-3细胞以 $2 \times 10^5$ 细胞每孔接种在24孔板上,并且进一步培育24h。在实验之前,通过1mL的预温的 (pre-warmed) 且新鲜的含10% FBS的培养基 (culture media) 更换培养基。以0.4μg每孔 (对应于1.6μg每孔的顺铂剂量) 的siRNA剂量将含有汇集的siRNA 的NCP-1/siRNA、含有单一种类siRNA的NCP-1/siRNA、含有汇集的 siRNA的Zn对照/siRNA以及NCP-1加入至细胞。之后培育4h,通过预温的且新鲜的含10% FBS的培养基替换培养基,并且进行另外的20-h的培育。收集培养介质的上清液以用于按照生产商的指示通过酶连免疫吸附测定 (ELISA; R&D系统, Minneapolis, Minnesota, United States of America; MyBiosource, San Diego, California, United States of America) 确定细胞外生存素和P-gp的产生。溶解细胞,并且通过ELISA (R&D系统, Minneapolis, Minnesota,

United States of America) 定量溶解产物中的Bcl-2的量。在卵巢癌细胞中沉默NCP-1/siRNA有效诱发的基因。Zn对照/siRNA也能够下调基因表达。轻微地降低NCP-1组中生存素和Bcl-2表达水平可以归结于通过结合到纳米颗粒中的顺铂诱导的细胞毒性,其影响了与包含生存素和 Bcl-2的基因相关的肿瘤生长的表达水平。

[0271] 表1a Bcl-2蛋白水平

	对照	NCP-1	NCP-1/siRNA	NCP-1/siP-gp	Zn 对照 /siRNA
[0272] ES-2	1.00±0.07	0.79±0.04	0.48±0.10	0.47±0.06	0.58±0.03
OVCAR-3	1.00±0.06	0.73±0.07	0.26±0.06	0.24±0.07	0.52±0.06
SKOV-3	1.00±0.16	0.82±0.08	0.16±0.02	0.20±0.03	0.42±0.04

[0273] 表1b P-gp蛋白水平

	对照	NCP-1	NCP-1/siRNA	NCP-1/siP-gp	Zn对照/siRNA
[0274] ES-2	1.00±0.04	0.70±0.13	0.16±0.01	0.16±0.02	0.23±0.06
OVCAR-3	1.00±0.14	0.63±0.03	0.41±0.05	0.36±0.04	0.37±0.04
SKOV-3	1.00±0.17	0.72±0.11	0.54±0.09	0.61±0.09	0.61±0.08

[0275] 表1c生存素蛋白水平

	对照	NCP-1	NCP-1/siRNA	NCP-1/siP-gp	Zn 对照 /siRNA
[0276] ES-2	1.00±0.06	0.87±0.05	0.14±0.03	0.12±0.01	0.38±0.01
OVCAR-3	1.00±0.32	0.76±0.03	0.14±0.02	0.15±0.01	0.36±0.03
SKOV-3	1.00±0.08	0.77±0.06	0.27±0.04	0.26±0.04	0.43±0.02

[0277] 通过NCP-1/汇集的siRNA介导的转染效率也与可商购的转染试剂 **LIPOFECTAMINE® RNAiMAX** (Life Technologies, Carlsbad, California, United States of America) 进行比较。将SKOV-3细胞以 $2 \times 10^5$ 细胞酶孔接种在24孔板上,并且进一步培育24h。在实验之前,通过1mL的预温的且新鲜的含10%FBS的培养基代替培养基。在改变的siRNA剂量下,添加NCP-1/汇集的siRNA和**LIPOFECTAMINE® RNAiMAX**/siRNA复合物。然后培育4h,通过预温的且新鲜的含10%FBS的培养基代替培养基,并且进行进一步的20-h的培育。收集培养介质的上清液以用于按照生产商的指示通过ELISA (R&D系统, Minneapolis, Minnesota, United States of America; MyBiosource, San Diego, California, United States of America) 确定细胞外生存素和P-gp的产生。在3nM的剂量下(表2a、2b和2c),对于 NCP-1/汇集的siRNA和Lipo/汇集的siRNA观察到相似的基因敲落效率。在siRNA剂量进一步降低至0.75nM之后,通过NCP-1/汇集的siRNA介导的转染效率比Lipo/汇集的siRNA具有更显著的效力。在0.3nM的 siRNA下(对于**LIPOFECTAMINE® RNAiMAX**而言,这低于最佳siRNA 剂量的10倍),NCP-1/汇集的siRNA仍诱发了有效的基因沉默,其转染效率为约60-70%。

[0278] 表2a Bcl-2蛋白水平

	对照	NCP-1/siRNA	Lipo/siRNA
[0279] siRNA30nM		0.17±0.06	
siRNA7.5nM		0.12±0.03	



siRNA 3nM		0.25±0.01	0.21±0.02
siRNA 0.75nM		0.26±0.06	0.77±0.10
siRNA0.3nM		0.61±0.04	
siRNA0nM	1.00±0.29		

[0280] 表2b P-gp蛋白水平

	对照	NCP-1/siRNA	Lipo/siRNA
siRNA 30nM		0.30±0.05	
siRNA7.5nM		0.29±0.02	
siRNA3nM		0.44±0.06	0.35±0.02
siRNA 0.75nM		0.52±0.04	0.80±0.06
siRNA 0.3nM		0.69±0.02	
siRNA0nM	1.00±0.05		

[0282] 表2c生存素蛋白水平

	对照	NCP-1/siRNA	Lipo/siRNA
siRNA 30nM		0.12±0.05	
siRNA 7.5nM		0.18±0.03	
siRNA 3nM		0.37±0.05	0.28±0.03
siRNA 0.75nM		0.42±0.02	0.80±0.04
siRNA0.3nM		0.61±0.05	
siRNA 0nM	1.00±0.03		

[0284] 在SKOV-3中评估通过NCP-1/汇集的siRNA介导的转染效率的时间进程。首先评估SKOV-3中的NCP-1/汇集的siRNA的长效细胞毒性。将 SKOV-3细胞以 $4 \times 10^3$ 细胞每孔接种在96孔板中,并且进一步培养24h。以0.75nM的siRNA剂量将NCP-1/汇集的siRNA纳米颗粒添加至细胞。然后培育4h,通过预温的且新鲜的含10%FBS的培养基代替培养基,并且培育细胞5天。细胞每2天以1:3传代。通过NCP-1/汇集的siRNA转染的SKOV-3的5天的细胞活性为 $92.5 \pm 5.8\%$ ,这表明了没有诱导的细胞毒性。然后确定NCP-1/汇集的siRNA的时间依赖的转染效率。将 SKOV-3细胞以 $2 \times 10^5$ 细胞每孔接种在96孔板中,并且进一步培养24h。在实验之前,通过1mL的预温的且新鲜的含10%FBS的培养基代替培养基。在0.75nM的siRNA剂量下,添加NCP-1/汇集的siRNA和LIPOFECTAMINE® RNAiMAX/siRNA复合物。然后培育4h,通过预温的且新鲜的含10%FBS的培养基代替培养基,并且培育细胞变化的时间周期。细胞每2天以1:3传代。收集培养介质的上清液以用于按照生产商的指示通过ELISA (R&D系统, Minneapolis, Minnesota, United States of America; MyBiosource, San Diego, California, United States of America) 确定细胞外生存素和P-gp的产生。溶解细胞,并且通过ELISA (R&D系统, Minneapolis, Minnesota, United States of America) 定量溶解产物中的Bcl-2 的量。如图6所示,在1天之后,对于LIPOFECTAMINE® RNAiMAX/siRNA没有观察到基因沉默效果。然而,NCP-1/汇集的siRNA介导的有效基因敲落多至4天,这在不结合操作的任何特定理论的情况下,可以归结于 siRNA保护和NCP-1/siRNA的释放之间的更好的平衡。

## [0285] 1.7. 体外细胞毒性

[0286] 将ES-2、OVCAR-3、SKOV-3、A2780和A2780/CDDP细胞以5000 细胞每孔接种在96孔板上,并且进一步培育24h。通过100 $\mu$ L的新鲜的含10%FBS的培养基代替培养基。以不同的顺铂或siRNA剂量将顺铂溶液、NCP-1、含有汇集的siRNA的NCP-1/siRNA、含有单种siRNA的NCP-1/siRNA以及含有汇集的siRNA的Zn对照/siRNA加入至细胞。之后培育24h,按照生产商的指示通过(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑)(MTS)实验(Promega Corporation, Madison, Wisconsin, United States of America)确定细胞生存能力。计算需要用于50%抑制细胞生长的顺铂和siRNA的浓度(IC<sub>50</sub>值)。通过靶向多MDR 基因生物汇集的siRNA和顺铂的共递送,可以重激活全部三种卵巢癌细胞对顺铂的耐受,如与游离顺铂或NCP-1比较的显著降低的顺铂的IC<sub>50</sub>(表3)。在ES-2、OVCAR-3、SKOV-3和A2780/CDDP细胞中,NCP-1/汇集的siRNA分别示出了与NCP-1比较的102-、7-、140-和16-倍的减少。在除了在SKOV-3细胞上的NCP-1/si生存素(sisurvivin)外,NCP-1/单独的siRNA处理比NCP-1仅更轻微地有效(当与NCP-1比较时IC<sub>50</sub>降低了21 倍);NCP-1/单独的siRNA样本的IC<sub>50</sub>值仅最多低于NCP-12.6倍。甚至 SKOV-3细胞上的NCP-1/si生存素的IC<sub>50</sub>值高于NCP-1/siRNA6.5倍。这些结果表明了NCP-1/siRNA是比NCP-1/单独的siRNA更加有效的,与之前讨论的更有效的基因敲除(knockdown)一致。在顺铂敏感的A2780细胞中,游离顺铂、NCP-1和NCP-1/siRNA诱发了相似的细胞毒性(表3)。也评估了对应于顺铂IC<sub>50</sub>值的siRNA剂量下的Zn对照/siRNA的细胞毒性。在Zn对照/siRNA和控制的细胞活性之间没有观察到明显的差异(分别对于ES-2、OVCAR-3、SKOV-3、A2780和A2780/CDDP的88.3 $\pm$ 2.1%, 89.4 $\pm$ 3.1%, 94.2 $\pm$ 5.6%, 102.9 $\pm$ 4.5%和89.4 $\pm$ 10.2%),这表明了NCP-1/siRNA 的急剧升高的抗癌效力产生自通过汇集的siRNA的基因调节和顺铂的化疗效果之间的协同作用。

[0287] 表3. 在72小时培养之后ES-2、OVCAR-3、SKOV-3、A2780和 A2780/CDDP中的顺铂IC<sub>50</sub>( $\mu$ M)。

	ES-2	OVCAR-3	SKOV-3	A2780	A2780/CDDP
游离顺铂	37.6 $\pm$ 1.9	44.4 $\pm$ 3.2	59.5 $\pm$ 1.2	4.4 $\pm$ 1.0	24.0 $\pm$ 3.1
NCP-1	37.9 $\pm$ 0.4	50.7 $\pm$ 0.9	56.0 $\pm$ 2.2	3.3 $\pm$ 0.4	23.7 $\pm$ 5.6
[0288] NCP-1/si <i>Bcl-2</i>	25.4 $\pm$ 1.2	28.8 $\pm$ 2.1	25.9 $\pm$ 0.6	—	—
NCP-1/si <i>P-gp</i>	14.6 $\pm$ 1.1	39.2 $\pm$ 1.1	44.4 $\pm$ 3.4	—	—
NCP-1/si 生存素	31.8 $\pm$ 2.6	45.6 $\pm$ 2.1	2.6 $\pm$ 0.6	—	—
NCP-1/siRNA	0.4 $\pm$ 0.1	6.8 $\pm$ 1.1	0.4 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.4

## [0289] 1.8. DNA梯带 (DNA ladder)

[0290] 将ES-2、OVCAR-3和SKOV-3细胞以1 $\times$ 10<sup>6</sup>细胞每孔接种在6孔板上,并且进一步培育24h。通过2mL的新鲜的含10%FBS的培养基代替培养基。以IC<sub>80</sub>的顺铂浓度将NCP-1和含有汇集的siRNA的NCP-1/siRNA 添加至细胞。之后培育24h,按照生产商的指示使用DNA梯带分离试剂盒 (DNA ladder isolation kit), (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, United States of America) 摄取癌症细胞的全部DNA,并且在35V 下在2% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳上检测DNA片段,进行5h。与NCP-1 组不同,NCP-1/汇集的siRNA组中的特征DNA梯带表明出顺铂和汇集的 siRNA的共递送可以通过沉默MDR基因的表达,从而在耐受顺铂细胞中诱导细胞凋亡。

## [0291] 1.9. 通过膜联蛋白V染色的细胞凋亡

[0292] 将盖玻片(玻片, coverslip) 放置在以 $1 \times 10^6$ 细胞每孔的密度接种ES-2、OVCAR-3和SKOV-3细胞的6孔板中。在纳米颗粒处理前, 在37℃和5%CO<sub>2</sub>下培育细胞24h。在37℃和5%CO<sub>2</sub>下, 使用TAMRA-siRNA负载的NCP-1/siRNA培育细胞。然后, 按照生产商的指示, 使用PBS清洗细胞, 使用冷冻的4%的多聚甲醛固定, 并且使用10μg/mL的DAPI和偶合膜联蛋白V的Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, California, United States of America) 染色。使用共聚焦激光扫描显微镜 (CLMS, Zeiss LSM710, Jena, Germany) 在405nm、488nm和546nm的激发波长下观察细胞以分别成像细胞核(蓝色荧光)、细胞凋亡(绿色荧光)和纳米颗粒内化(红色荧光)。使用NCP-1/汇集的siRNA处理24h的全部三种卵巢癌细胞能够有效地摄取siRNA, 这表明了纳米颗粒成功地引导了增强的癌症细胞凋亡。

[0293] 1.10. 体内抗癌效力

[0294] 通过将SKOV-3细胞悬浮液( $5 \times 10^6$ 细胞每鼠)皮下注射到8周大的无胸腺(athymic)母裸鼠的右侧部区域以构建荷瘤小鼠(Tumor bearing mice)。在肿瘤体积接近约100mm<sup>3</sup>时, 将小鼠随机分为5组(n=6), 并且以1mg/kg的等量顺铂剂量和0.25mg/kg的siRNA剂量一周一次(总共三次注射)的瘤内注射PBS、游离顺铂加游离汇集的siRNA溶液、NCP-1、Zn对照/siRNA和NCP-1/siRNA。每周三次的监测肿瘤体积和体重。通过下式计算肿瘤体积: (宽度<sup>2</sup>×长度)/2(表4)。也参见图4(a)。

[0295] 表4肿瘤生长曲线(cm<sup>3</sup>)

[0296]

	PBS	游离 cis+siRNA	NCP-1	Zn 对照/siRNA	NCP-1/siRNA
0 天	0.12±0.02	0.11±0.01	0.10±0.01	0.11±0.01	0.10±0.01
2 天	0.14±0.03	0.10±0.02	0.10±0.01	0.11±0.01	0.08±0.01
5 天	0.19±0.03	0.11±0.02	0.12±0.03	0.13±0.01	0.06±0.10
7 天	0.20±0.02	0.12±0.02	0.13±0.02	0.14±0.03	0.05±0.01
9 天	0.21±0.03	0.13±0.02	0.16±0.02	0.17±0.01	0.06±0.01
12 天	0.25±0.04	0.14±0.02	0.17±0.02	0.19±0.03	0.05±0.01
14 天	0.28±0.06	0.18±0.03	0.17±0.04	0.22±0.04	0.05±0.01
16 天	0.36±0.07	0.18±0.02	0.18±0.04	0.26±0.03	0.05±0.01
19 天	0.41±0.11	0.23±0.04	0.22±0.06	0.32±0.07	0.04±0.01
21 天	0.45±0.13	0.25±0.05	0.22±0.04	0.34±0.08	0.03±0.01
23 天	0.56±0.19	0.26±0.03	0.25±0.07	0.43±0.13	0.03±0.01
26 天	0.72±0.16	0.36±0.12	0.36±0.10	0.58±0.15	0.03±0.01
28 天	0.85±0.21	0.54±0.17	0.58±0.18	0.77±0.12	0.03±0.02
30 天	1.24±0.46	0.86±0.40	0.83±0.13	1.11±0.27	0.03±0.02
33 天	1.66±0.87	1.57±0.59	1.10±0.14	1.73±0.46	0.03±0.02

[0297] 对于游离顺铂(1mg/kg剂量)加游离汇集的siRNA(0.25mg/kg剂量)、NCP-1(1mg/kg剂量)和Zn对照/siRNA(0.25mg/kg剂量)没有观察到抗肿瘤效力, 分别与对照的两组T实现相比, 它们的P值为0.8311、0.1502、0.8594(表5)。

[0298] 表5肿瘤重量(g)

[0299]

对照	566.3±226.3
顺铂+siRNA	581.6±262.6
NCP-1	350.4±85.7

Zn对照/siRNA	639.1±305.9
NCP-1/siRNA	16.5±10.6

[0300] 使用放射免疫沉淀实验缓冲剂(RIPA缓冲剂)均化100微克的肿瘤,并且然后在12,000rpm下在4℃下离心分离15分钟。通过ELISA测量上清液中Bcl-2、P-gp和生存素的量,并且归一化(normalize)使用BCA试剂盒确定的总蛋白含量。在液氮中均化另外100μg的肿瘤,并且使用Trizol 试剂提取肿瘤组织中的RNA,并且其后通过实时-PCR(Realtime-PCR) 监测细胞内Bcl-2、生存素和P-gp mRNA水平。与对照相比,使用 NCP-1/siRNA处理的肿瘤的Bcl-2、P-gp和生存素蛋白产物分别下调了 74%、48%和84%。参见图4(b)。肿瘤位点(site)中的Bcl-2、P-gp和生存素的显著敲除(knockdown)推测激活了肿瘤细胞朝向顺铂处理,导致了由顺铂和siRNA的共递送带来的更加增强的抗肿瘤效果。

[0301] 按照生产商的指示,使用DNA片段测试试剂盒(Life Technologies, Carlsbad, California, United States of America)在5-μm的冷冻肿瘤部分上进行TdT介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)反应,并且观察CLSM。使用荧光素偶合的脱氧核苷酸(绿)染色凋亡细胞中的DNA片段,并且使用DAPI(10μg/mL)染色细胞核。通过来自Image J的TUNEL-阳性细胞/总细胞的数量比确定凋亡细胞的百分比。TUNEL实验示出了DNA片段的荧光强度以及NCP-1/siRNA组中的凋亡细胞的相对百分比高于其他组的百分比,这表明了它们的优异的抗癌效力(表6)。也参见图4(c)。

[0302] 表6TUNEL阳性细胞%

PBS	0
顺铂+siRNA	13.5±5.1
NCP-1	18.5±5.3
Zn对照/siRNA	0
NCP-1/siRNA	75.8±4.0

[0304] 1.11.NCP/1-巯基化的siRNA

[0305] 将巯基化的siRNA(Bcl-2siRNA和生存素siRNA)偶合至DSPE-琥珀酰亚胺基-3(2-吡啶基二巯基)丙酸酯(SPDP)以给予DSPE-siRNA偶合物。DOPA封端的NCP-1纳米颗粒以顺铂与siRNA的4:1的重量比涂覆有 DOPC、胆固醇、20mol%的DSPE-PEG2k和DSPE-siRNA。

[0306] NCP-1/巯基化的siRNA的Z均尺寸、PDI和ζ电势分别为105.3±6.2 nm、0.112±0.004和-4.8±1.3mV,其通过DLS测量。通过Quant-iT RiboGreen RNA试剂盒,siRNA的包封效率和负载分别确定为77.84%和4.86wt%。TEM用于观察NCP-1/siRNA的形态,其为球形并且在PBS中是单分散的。

[0307] 在补加4.5μM GSH(细胞外环境)或10mM GSH(细胞内环境)的 PBS中评价NCP-1/siRNA释放的siRNA。在没有GSH的PBS中, siRNAming释放缓慢,但是在含10mM GSH的PBS中则显著促进了 SiRNA的释放。参见图5(a)。根据进入的细胞,DSPE-siRNA的二硫键通过还原试剂迅速断裂,这导致了存进siRNA释放。

[0308] 在24-h转染之后,在A2780/CDDP细胞中测量由以6nM的siRNA 剂量NCP/siRNA转染的Bcl-2与生存素的mRNA表达和蛋白质制造。分别通过实时-PCR和ELISA测量Bcl-2和生存素的mRNA表达和蛋白质制造。NCP-1处理在mRNA表达上带来不可预期的影响。参见图5(b)。SKOV-3细胞中Bcl-2和生存素的蛋白质制造在图5(c)中示出, A2780/CDDP细胞中Bcl-2和

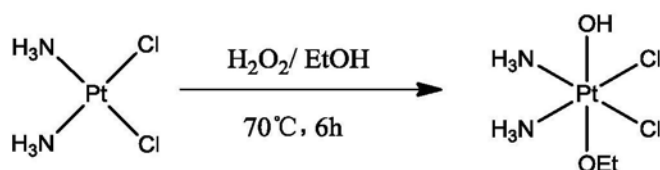
生存素的蛋白质制造在图5(d)中示出。Zn 对照/siRNA不能介导有效的基因沉默,这可能是由于缺少有效的内体逃逸。NCP-1/siRNA显著地下调Bcl-2和生存素的表达。

[0309] A2780/CDDP是以107细胞每ml (200 $\mu$ L每次注射) i.p.注射到无胸腺雌性裸鼠(6周)。使用PBS、NCP-1 (0.5mg的顺铂/kg) 和NCP-1/疏醇化的siRNA (0.5mg的顺铂/kg, 0.125mg的siRNA/kg), 在第6天开始每三天通过i.p.注射然后肿瘤细胞注射, 总计三次注射处理小鼠。在第0 天测量小鼠体重且在第一次给予之后每天监测。当注意到严重的健康问题处死小鼠。

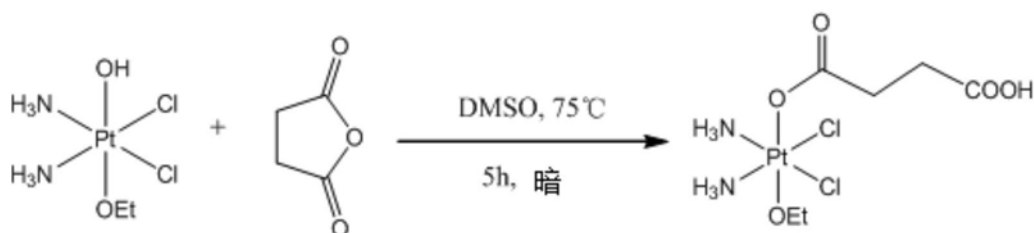
[0310] 与PBS (对照) 和NCP-1 (通过单因素方差分析, NCP-1/siRNA相对于对照,  $P=0.01472$ ) 相比, NCP-1/siRNA显著地增加了存活时间。NCP-1 示出了与PBS相比的无存活益处(通过单因素方差分析, NCP-1比对照,  $P=0.3739$ )。参见图7。

#### [0311] 实施例2

#### [0312] 顺序负载在多孔纳米颗粒配位聚合物中的化疗剂

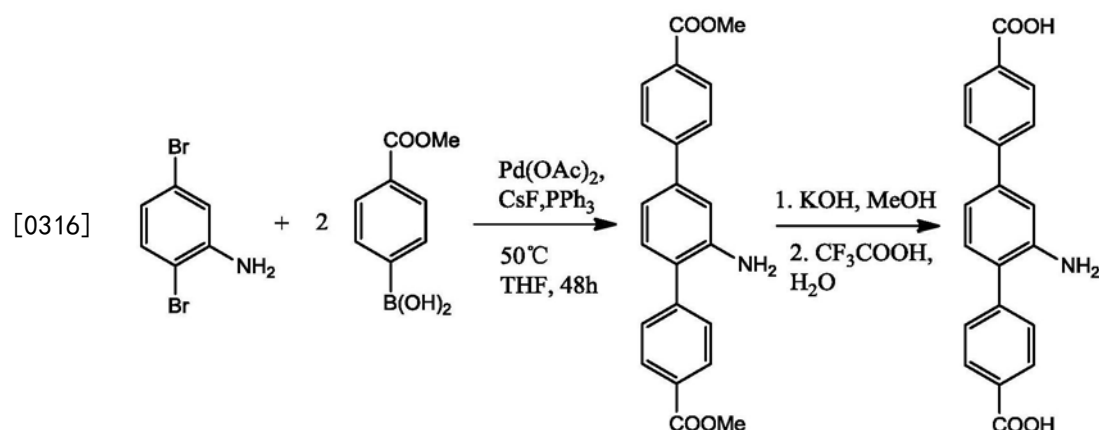


[0313]



[0314] 方案3. 顺铂药物前体顺, 顺, 反-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(OEt)(OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)] 的合成。

[0315] 如方案3中所示制备顺铂药物前体顺, 顺, 反-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(OEt)(OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)]。更具体地, 在乙醇中使顺铂与过氧化氢反应以提供具有羟基和一个乙氧基配体的中间产物。然后, 使中间产物与琥珀酸酐反应以提供药物前体。



[0317] 方案4. 氨基-三苯基二羧酸(氨基-TPDC)配体的合成。

[0318] 由于SBU的高连通性和锆与氧之间的强的相互作用, 基于  $\text{Zr}_6(\mu_3\text{-O})_4(\mu_3\text{-OH})_4$  次级构造单元(secondary building unit, SBU) 和二羧酸桥接配体的NCP是高多孔性的且在水

性环境中是稳定的。这种材料被称作UiO,如Lillerud与其同事在University of Oslo (UiO)发现的原始家族(original family)。通过在80℃下加热ZrCl<sub>4</sub>和氨基-TPDC的DMF溶液5天来合成具有氨基-三苯基二羧酸(氨基-TPDC)桥接配体的UiO NCP (如上文方案4中示出的制备)。因此合成的UiO材料通过粉末X-射线衍射(PXRD)是晶体,并且通过透射电子显微镜(TEM)图像表现出六边形板形形态。高分辨率TEM图像示出了对应于1.85nm的预测的d(111)值,晶格条纹之间的距离是1.83nm。快速傅里叶(Fourier)变换图像(FFT)证明了沿着观察方向的3倍对称。顺铂药物前体,顺,顺,反-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(OEt)(OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)](前文的方案3)通过胺键负载在UiO的孔内以形成UiO-Cis。NMR图谱确认了顺铂药物前体的共价附接,相反,PXRD表明出UiO-Cis与UiO-68是同构性的。负载在UiO-Cis中的顺铂通过ICP-MS确定为12.3±1.2wt%。

[0319] 通过UiO-Cis和siRNA水中以4.5:1的顺铂:siRNA的质量比(mass ratio)的简单混合使siRNA负载在UiO-Cis上。不期望受到理论的限制,据信 siRNA通过在磷酸酯残基和siRNA骨架之间的多个配位键结合至NCP表面以及NMOF表面上的空缺Zr位。通过TEM所示,siRNA负载并未改变NMOF的形态。动态光学扫描(DLS)测量给出的UiO、UiO-Cis和 siRNA/UiO-Cis平均直径分别为98±11nm(PDI=0.070)、103±17nm(PDI=0.124)和128±3nm(PDI=0.116)。siRNA/UiO-Cis的DLS直径的增加与UiO表面上siRNA的存在一致。通过凝胶电泳确认NMOF的siRNA结合能力(容量, capabilities),其示出了通过siRNA/UiO-Cis的siRNA的键迁移的完全阻滞证明了NMOF可以有效地“捕获”表面上的siRNA。也通过荧光测定法定量地检测siRNA负载效率(LE)。荧光标记siRNA(TAMRA-siRNA)用于形成siRNA/UiO-Cis,并且LE被检测为高达81.6±0.6%。不期望受到理论的限制,其被认为是表面上空间位阻的结果, NMOF保护siRNA不受RNase降解的影响:在血清中培育siRNA/UiO-Cis多至4h之后siRNA带是清晰可见的,而裸siRNA在相同的条件下完全降解。有趣的是,“涂覆”在NMOF表面上的siRNA显著阻滞了蛋白质吸收,其表明了通过siRNA结合可以稳定NMOF。

[0320] 对于有效的siRNA-介导的基因沉默,高siRNA摄取水平和成功的内体逃逸是两个先决条件。与裸siRNA溶液相比,siRNA/UiO-Cis的siRNA摄取量显著地增加,这表明了通过内吞作用途径,NCP帮助siRNA的内化。也通过共聚焦激光扫描显微术(CLSM)直接观察siRNA摄取。大量的siRNA负载在SKOV-3细胞的细胞质中。此外,磷酸锆具有极其低的溶解度( $K_{sp}=10^{-134}$ ),这证明了Zr(IV)与磷酸盐离子的高亲和力。含有相对高磷酸盐基团浓度(2mM)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)与水相比显著促进了siRNA的释放。合理的预期是siRNA可以从UiO-Cis分离,并且UiO-Cis可以在内体中内化和诱捕之后分解,这是由于在内体中含有比细胞外环境中更高的内源磷酸盐离子浓度。分离的Zr离子可以结合至带负电荷的且富含磷酸盐基团的内体膜(endosome membrane)以破坏内体结构并且促进诱捕的siRNA的释放。通过CLSM研究支持这种假设。在2小时的培育之后,siRNA/UiO-Cis中的siRNA能够从内体/溶酶体诱捕中逃逸,如通过染色siRNA的同区域化的缺少以及细胞质中荧光标记的溶酶体证实。

[0321] 评估通过SKOV-3细胞中的siRNA/UiO-Cis介导的转染效率。通过ELISA确定在0.4 μg/mL(30nM)的siRNA浓度下,在SKOV-3细胞中 siRNA/UiO-Cis诱发的潜在基因沉默。有趣的是,与单种siRNA/UiO-Cis相比,通过使用1/3的siRNA剂量的汇集的siRNA/UiO-Cis实现了等量的基因沉默效果,这可以是归因于汇集的siRNA的协同沉默效果。作为比较,游离siRNA的溶液,UiO-Cis和UiO都不能下调基因表达。

[0322] 为了检验包含生存素、Bcl-2和P-gp的三种MDR相关的基因的有效且同时敲除(knockdown)是否可以有效地逆转卵巢癌细胞中的顺铂耐受性,通过(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺基苯基)-2H-四唑)(MTS)实验评估游离顺铂、UiO-Cis和siRNA/UiO-Cis的细胞毒性。游离顺铂、UiO-Cis和siRNA/UiO-Cis的IC<sub>50</sub>值分别计算为 $48.5 \pm 4.3$ 、 $47.8 \pm 5.2$ 和 $4.2 \pm 2.0 \mu\text{M}$ 。当使用siRNA/UiO在高于siRNA剂量下处理12次时,SKOV-3细胞中没有观察到细胞毒性( $96.2 \pm 3.4\%$ 的细胞存活率)。通过利用NMOF共递送汇集的siRNA和顺铂,与顺铂和UiO-Cis相比,IC<sub>50</sub>值显著地降低(接近12倍)。这种结果表明了在使用 siRNA/UiO-Cis转染之后,耐受顺铂卵巢癌细胞可以是再敏化的(re-sensitized),并且siRNA和顺铂的协同效果显著地增强了体外化疗效力。也在0.5mg/mL的UiO剂量下评估空白UiO的细胞毒性(在高于IC<sub>50</sub>的siRNA/UiO-Cis的UiO剂量下的50倍)。细胞存活率确定为 $98.1 \pm 5.4\%$ ,这表明对于UiO缺少毒性。

[0323] 进行DNA梯带和膜联蛋白V偶合物染色实验,以证明siRNA/UiO-Cis的增强的细胞毒性是因为细胞细胞凋亡而不是细胞坏死。在对照、UiO-Cis和游离顺铂组中没有可检测的DNA片段。使用siRNA/UiO-Cis处理的细胞显示特征DNA片段或梯带(形成条带,laddering),这证明了通过 siRNA/UiO-Cis引导的细胞毒性与细胞凋亡相关。膜联蛋白V偶合物染色提供了针对通过siRNA/UiO-Cis引导的细胞凋亡的进一步的证据。在24-h 培育之后,在NMOF中负载的siRNA有效地内在化细胞质内以引发MDR-相关的基因沉默。在使用siRNA/UiO-Cis处理的细胞中清楚地可见膜联蛋白V偶合物,但在使用siRNA/UiO(单独的汇集的siRNA)或UiO-Cis(单独的顺铂)处理的细胞中不能清楚地可见膜联蛋白V偶合物。这样的结果表明顺铂和汇集的siRNA的共递送可以在耐受顺铂细胞中通过结合下调MDR相关基因的表达和化疗剂的协同效应诱导细胞凋亡。

### [0324] 实施例3

#### [0325] 用于具有光敏剂和化疗剂的纳米颗粒配位聚合物的材料和方法

##### [0326] 3.1.材料、细胞系和动物:

[0327] 除非另有说明,全部的起始材料均购买自Sigma-Aldrich公司(St.Louis, Missouri, United States of America)和Fisher(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States of America),并且使用不经过进一步的纯化。1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸钠盐(DOPA)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、胆固醇和1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[胺基(聚乙二醇)2000](DSPE-PEG2k)均购买自Avanti Polar Lipids (labaster, Alabama, United States of America)。

[0328] 人类头颈癌细胞系HNSCC135(顺铂敏感)、SCC61(顺铂敏感)、JSQ3(耐受顺铂)和SQ20B(耐受顺铂)由Dr.Stephen J.Kron(Department of Molecular Genetics and Cell Biology, The University of Chicago, Chicago, United States of America)友情提供。在含20%胎牛血清(FBS, Hyclone, Logan, Utah, United States of America)的DME/F12(1:1)培养基(Gibco, Grand Island, New York, United States of America)中培养这些细胞系。鼠克隆胰腺癌细胞CT26购买自American Type Culture Collection(Rockville, Maryland, United States of America),且在补充有10%的FBS的RPMI 1640培养基(Gibco, Grand Island, New York, United States of America)中培养。无胸腺雌性裸鼠(6周, 20-22g)提供自Harlan Laboratories, Inc. (Indianapolis, Indiana, United States

of America)。

[0329] 3.2. 头颈癌症细胞中NCP-1-卟啉脂质的细胞内摄取动力学:

[0330] 通过ICP-MS量化SQ20B细胞中的NCP-1颗粒的细胞内摄取。将 SQ20B细胞以 $5 \times 10^5$ 细胞/孔接种在6孔板上,并且培育24h。以 $5 \mu\text{M}$ 的顺铂剂量或 $1.5 \mu\text{M}$ 的卟啉脂质剂量分别将NCP-1-卟啉脂质、NCP-1、游离顺铂或卟啉小体(卟啉囊泡, porphysome)添加至细胞。在培育1、2、4和24h之后,收集SQ20B细胞,使用PBS清洗三次,并且使用血细胞计(hemocytometer)计数。在3,000rpm下离心分离细胞5分钟,并且使用 500 $\mu\text{L}$ 的浓缩的硝酸消化细胞小球。在24h之后,使用水稀释硝化并且经历ICP-MS以确定Pt浓度。结果是指为每 $10^5$ 细胞的铂的量(ng)。通过使用荧光分光光度计(RF-5301PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)量化的细胞摄取卟啉脂质的量。在使用NCP-1-卟啉脂质培养1、2、4和24h之后,使用PBS清洗SQ20B细胞三次,使用血球计计数,并且使用0.5%SD (pH 8.0)裂解。通过荧光测定法确定的卟啉脂质的荧光强度( $\lambda_{\text{ex}}=427\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=675\text{nm}$ )。结果表示为每 $10^5$ 细胞的卟啉脂质的量(ng)。

[0331] SQ20B细胞中顺铂和卟啉脂质的流出物定量如下。将SQ20B细胞以  $5 \times 10^5$ 细胞/孔接种在6孔板上,并且培育24h。以 $5 \mu\text{M}$ 的顺铂剂量或 $1.5 \mu\text{M}$ 的卟啉脂质剂量分别将NCP-1-卟啉脂质、NCP-1、游离顺铂或卟啉小体(porphysome)添加至细胞。在培育4h之后,丢弃培养培养基,并且使用PBS清洗三次。将2毫升的新鲜培养培养基添加至每个井,并且在 5%的 $\text{CO}_2$ 和 $37^\circ\text{C}$ 下进一步培养细胞。在培养1、2、4和24h之后,收集培养培养基,并且经历ICP-MS以确定对于铂流出(efflux)的量的Pt浓度。在添加0.5%的Triton X-100之后,通过荧光测定法量化培养培养基中的卟啉脂质的量以确定卟啉脂质的流出( $\lambda_{\text{ex}}=427\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=675\text{nm}$ )。结果b表示为与4-h细胞内摄取量相比,存在流出的顺铂或卟啉脂质的量。

[0332] 直接通过CLSM观察卟啉脂质的内化和细胞内分布。使用SQ20B细胞分别培育NCP-1-卟啉脂质纳米颗粒1h、2h、4h和24h。使用PBS清洗细胞三次,使用4%的多聚甲醛固定,并且通过使用405nm激光的CLSM (Olympus FV1000) 观察。

[0333] 3.3. 头颈癌细胞中的NCP-1-卟啉脂质的细胞毒性

[0334] 在包含耐受顺铂SQ20B和JSQ3细胞以及顺铂敏感HNSCC135和 SCC61细胞的四种头颈癌症细胞系中测试NCP-1-卟啉脂质的细胞毒性。将细胞以2500细胞/孔接种在96孔板上。在培育24h之后,使用NCP-1- 卟啉脂质、卟啉小体(porphysome)、NCP-1和游离顺铂以不同铂浓度或卟啉脂质浓度处理细胞。在培育24h之后,使用LED灯(670nm)在 $60 \text{ mW}/\text{cm}^2$ 下辐照细胞15分钟(等于 $54 \text{ J}/\text{cm}^2$ )。将未辐照处理的细胞作为对照。进一步培育细胞48h。通过(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑)(MTS)实验(Promega公司, Madison, Wisconsin, United States of America)检测的细胞存活率并且由此计算 $\text{IC}_{50}$ 值。

[0335] 3.4. 流式细胞术:

[0336] 将SQ20B细胞以 $1 \times 10^6$ 细胞每孔接种在6孔板上,并且进一步培养 24h。通过2mL的新鲜的含有10%FBS的培养基更换培养基。以 $5 \mu\text{M}$  的铂浓度或等量的 $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的卟啉脂质浓度,分别将游离顺铂、NCP-1、 NCP-1-卟啉脂质、Zn对照-卟啉脂质、卟啉小体(porphysome)添加至细胞。使用PBS培育的细胞作为对照。在24h ( $60 \text{ mW}/\text{cm}^2$ , 15分钟)培育之后,使用发光二极管(LED)灯(670nm)在 $60 \text{ mW}/\text{cm}^2$ 下辐照细胞 15分钟(等于 $54 \text{ J}/\text{cm}^2$ )。然后进一步培育48h,收集漂浮的细胞(floating cell)和附着细胞,按照生产商的指示并且使用



Alexa Fluor 488膜联蛋白 V/具有Alexa Fluor 488膜联蛋白V和PI的死细胞凋亡试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, California, United States of America) 染色。在流式细胞分析仪 (LSRII Blue, Becton, Dickinson, and Company, Franklin Lakes, New Jersey, United States of America) 上检测细胞凋亡和细胞死亡。

### [0337] 3.5. 药物代谢动力学和组织分布

[0338] 使用1百万个CT26细胞在右侧部皮下注射小鼠,并且在它们以3 mg/kg的顺铂剂量接收静脉给予的NCP-1-卟啉脂质之前,允许肿瘤生长至100mm<sup>3</sup>。在药物剂量5min、1h、3h、8h、24h和48h后时处死(每时间点3只)动物。收集血液之后,收集(harvest)肝、肺、脾、肾和膀胱。在浓硝酸中消化器官和血液24h,并且通过ICP-MS分析Pt浓度。在5min、1h、3h、8h、24h和48h时确定收集的血液中的卟啉脂质的量。简略地,在3,000rpm下离心分离血液10分钟以分离血浆。将甲醇和0.25%的Triton X-100添加至血浆,以分别用于提取卟啉脂质和防止凝结。通过UV-vis确定卟啉脂质的浓度。

### [0339] 3.6. 体内抗癌效力

[0340] 使用SQ20B皮下异种移植小鼠模型研究NCP-1-卟啉脂质的PDT效力。通过将SQ20B细胞悬浮液(5×10<sup>6</sup>细胞每鼠)皮下注射至6周的无胸腺雌性裸鼠的右侧部区域内建立荷瘤小鼠。用于比较的5个组包含:使用辐照的PBS作为对照;使用辐照的NCP-1;使用辐照的卟啉小体;使用辐照的NCP-1-卟啉脂质;不使用辐照的NCP-1-卟啉脂质。当肿瘤达到100mm<sup>3</sup>时,NCP-1、NCP-1-卟啉脂质和卟啉小体以0.5mg/kg(对应于0.5mg/kg的卟啉脂质剂量)的顺铂剂量i.v.注射到动物内。在注射后24h时,使用2%(v/v)的异氟烷麻醉小鼠,并且使用670nm的LED辐照30分钟。能量辐照度测量为100mW/cm<sup>2</sup>,并且总光剂量为180 J/cm<sup>2</sup>。进行一周一次的注射和PDT的两者,并且总计进行2次。

[0341] 为评估治疗剂效力,监测肿瘤生长和体重发展。使用数显卡尺每天测量肿瘤尺寸。按照下式计算肿瘤体积:(宽度<sup>2</sup>×长度)/2。在第12天处死全部的小鼠,并且拍照并称重离体的肿瘤。将肿瘤嵌入最佳切割温度(OCT)培养基中,切割为5-μm的厚度,并且经历苏木精和曙红(H&E)染色,以用于组织病理学分析和TdT-介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL, Carlsbad, California, United States of America)实验,从而用于定量体内细胞凋亡。在处死小鼠之后,也切离肝、肺、脾和肾,并且然后嵌入到OCT培养基中,切割为5-μm的厚度,使用H&E染色,并且使用光学显微镜(Pannoramic Scan Whole Slide Scanner, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, United States of America)观察毒性。在端点(时间点)收集血液,并且通过ELISA(R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, United States of America)确定血清TNF-α、IFN-γ和IL-6产生。

### [0342] 实施例4

#### [0343] 具有光敏剂和化疗剂的纳米颗粒配位共聚物

### [0344] 4.4. NCP-1-卟啉脂质的制备和表征

[0345] 在室温下使Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>和顺铂药物前体的混合物、顺,顺,反-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(OCONHP(O)(OH)<sub>2</sub>)]与1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸钠盐(DOPA)在Triton X-100/1-己醇/环己烷/水反向微乳液中剧烈地搅拌30分钟,以提供球形DOPA涂覆的NCP-1颗粒,其具有通过透射电子显微镜测量的20nm的直径和通过动态光散射测量的54.1nm的直径。NCP-1具有通过电感耦合等离子体-质谱(ICP-MS)确定的25±2wt%的顺铂负载。

[0346] NCP-1涂覆有卟啉脂质并且是聚乙二醇化,以提供通过在500 $\mu$ L的 30% (v/v) 乙醇/水中,在60 $^{\circ}$ C下搅拌卟啉脂质、胆固醇、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC, 卟啉脂质/胆固醇/DSPC的摩尔比=1:1:2)、20 mol%的DSPE-PEG2k和DOPA涂覆的NCP-1的四氢呋喃(THF)溶液(80  $\mu$ L) 1分钟获得的NCP-1-卟啉脂质。更具体地,通过在60 $^{\circ}$ C将卟啉脂质、胆固醇、DSPC(卟啉脂质/胆固醇/DSPC的摩尔比=1:1:2)、20mol%的 DSPE-PEG2k和DOPA涂覆的NCP-1的THF溶液(80 $\mu$ L)添加至500 $\mu$ L 的30% (v/v) 乙醇/水制备卟啉脂质涂覆的NCP-1(NCP-1-卟啉脂质)。THF 和乙醇完全蒸发,并且允许NCP-1-卟啉脂质溶液冷却至室温。在13000rpm 下离心NCP-1-卟啉脂质30分钟,然后取出上清液并且将颗粒再悬浮在磷酸盐缓冲溶液(PBS)中。

[0347] NCP-1-卟啉脂质含有自组装且非对称的脂质双层,其中卟啉脂质作为用于PDT的PS,DSPC作为用于形成脂质双层的脂质组分,胆固醇作为脂质赋形剂以用于整理(order)、浓缩且稳定脂质双层结构,以及 DSPE-PEG2k以赋予“隐身(隐蔽,stealth)”和长循环特性。在随后的体外或体内实验之前,完全蒸发纳米颗粒悬浮液中的THF和乙醇。利用 ICP-MS (Agilent 7700X,Agilent Technologies,Santa Clara,California,United States of America)以分析NCP-1的Pt浓度,从而计算顺铂负载。通过 Zetasizer (Nano ZS,Malvern, UK) 确定PBS中的NCP-1-卟啉脂质的颗粒尺寸和 $\zeta$ 电势。透射电子显微镜(TEM,Tecnai Spirit,FEI,Hillsboro, Oregon,United States of America)用于观察NCP-1-卟啉脂质的形态。通过记录经由DLS在37 $^{\circ}$ C下在含有5mg/mL的BSA的PBS中多至24h的培育的纳米颗粒的颗粒尺寸和PDI,评估NCP-1-卟啉脂质的结构稳定性。

[0348] 在不凝结情况下,NCP-1-卟啉脂质证明了均匀球形纳米颗粒的形状。DLS测量给出了分散在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的NCP-1-卟啉脂质的分别为 $108.0 \pm 0.2$  nm、 $0.136 \pm 0.012$ 和-2.3mV的Z平均直径、多分散性指数(PDI)和 $\zeta$ 电势。NCP-1-卟啉脂质的小尺寸和接近中性的表面电荷表明它们在体内应用的潜能。NCP-1-卟啉脂质也表现出有利的生理环境中的结构稳定性,证据为通过在含有5mg/mL的BSA的PBS中培育多至24h,颗粒观察到的未改变的颗粒尺寸和PDI。

[0349] 当溶解在THF中时,卟啉脂质表现出400nm左右的宽Soret带遗迹在669nm的明显的Q-带。DOPA封端的NCP-1颗粒在669nm处不具有吸收。在涂覆在NCP-1的表面上之后,卟啉脂质保护Q-带,利用其以量化卟啉脂质涂覆量。在脂质涂覆之后,离心分离NCP-1-卟啉脂质并且通过 UV-vis光谱确定上清液和沉淀物的两者中的卟啉脂质的量。约265.6 $\mu$ g 的卟啉脂质涂覆在每mg的NCP-1的表面上,对应于对于NCP-1-卟啉脂质,卟啉脂质与顺铂的重量比为约1:1(摩尔比为约1:3)。

[0350] 通过下列报道的规程制备卟啉小体:Zheng和其同事(Jin,C.S.,et al., Adv Healthcare Mater.3(8),1240-1249(2014);和Lovell,J.F.et al.,Nat Mater.10,324-332(2011))。通过DLS,确定的卟啉小体的Z均直径和PDI 分别为152.7nm和0.150。在本研究中,卟啉小体用作单一治疗对照。

[0351] 4.2.光化学

[0352] 采用单态氧传感绿色(SOSG,singlet oxygen sensor green)试剂(Life Technologies,Carlsbad,California,United States of America)以检测通过 NCP-1-卟啉脂质产生的单态氧。在脂质涂覆之后,在13000rpm下离心 NCP-1-卟啉脂质30分钟。丢弃

含有游离脂质、脂质体和卟啉小体的上清液,并且使用PBS再悬浮小球。5微升的甲醇中的新鲜制备的SOSG溶液 (5mM) 与2mL的完整的在PBS中或使用0.5%Triton X-100的破坏的NCP-1-卟啉脂质混合。在与NCP-1-卟啉脂质具有相同卟啉脂质浓度下,具有另外的0.5% Triton X-100的卟啉小体作为对照。使用具有670nm波长和120mW/cm<sup>2</sup>的能量辐照的LED处理样本10s、20s、30s、40s、50 s、100s、250s、500s和1000s,并且通过504nm处的激活且在525nm 处的发射测量SOSG荧光。在该发射窗口内没有卟啉脂质荧光贡献。

[0353] 卟啉脂质结合到NCP-1-卟啉脂质的表面上的高取向且非对称的脂质双层中。在合适的高卟啉脂质负载下,卟啉脂质荧光将自猝灭(self-quench) 以其光化学性。事实上,当其脂质层是完整的时,NCP-1-卟啉脂质中的卟啉脂质的荧光有效地猝灭(>96%的猝灭效率)。在添加Triton X-100之后,清洁剂可以破坏脂质双层,来自破坏的NCP-1-卟啉脂质的卟啉脂质重新获得其荧光。由于完整的NCP-1-卟啉脂质中的卟啉脂质的激活态是高猝灭的,并且由于通过单态氧传感绿色(SOSG) 试剂确定的产生了可忽略的<sup>1</sup>O<sub>2</sub>,因此观察到没有转运蛋白至三线态氧(表7)。与此相反,在使用 Triton X-100破坏脂质层之后,NCP-1-卟啉脂质有效地产生<sup>1</sup>O<sub>2</sub>(表7)。具有破坏的脂质层的NCP-1-卟啉脂质的<sup>1</sup>O<sub>2</sub>生成效率与在以相同卟啉脂质浓度添加Triton X-100之后的卟啉小体相似(表7)。脂质层时是否完整可以因此开发为“开关”以控制根据辐照的<sup>1</sup>O<sub>2</sub>生成。

[0354] 表7通过SOSG检测的单线态氧生成。示出的结果是相对荧光单位(RFU)。

[0355]		NCP-1-卟啉脂质	NCP-1-卟啉脂质+Triton X-100	卟啉小体+Triton X-100
	0 s	10.1621	10.1621	10.1621
	10 s	10.1621	10.4621	11.4321
	20 s	10.1621	18.25335	20.3214
	30 s	10.1621	22.4721	24.2214
	40 s	10.1621	28.0411	29.4232
	50 s	10.1621	33.2011	34.2131
	100 s	10.1621	64.1358	66.0921
	250 s	10.1621	152.33076	155.2412
	500 s	10.1621	302.11055	309.234
	1000 s	10.1621	612.33028	622.821

[0356] 4.3. 细胞摄取动力学和细胞内脂质分解

[0357] 首先在人类头颈癌细胞SQ20B中探索NCP-1-卟啉脂质的内吞作用路径。使用一系列摄取抑制剂与培育细胞以阻断特异性内化路径,并且然后使用NCP-1-卟啉脂质进行培育。在使用NaN<sub>3</sub>、氯丙嗪、染料木素和 Me-β-CD处理的细胞中,NCP-1-卟啉脂质的摄取显著减少(分别为 81.2±6.0%、69.3±1.8%、59.3±1.7和68.4±1.1%),但是使用渥曼青霉素处理的细胞(为8.4±4.3%)没有显著减少,这表明细胞摄取是能量依赖的、网格蛋白/小窝/脂质筏(clathrin/caveolae/lipid raft),介导而不是微胞饮(micropinocytosis)介导的内吞。

[0358] 在SQ20B细胞中使用高达24h的培育时间评估NCP-1-卟啉脂质的时间依赖的细胞摄取。游离的顺铂、卟啉小体和原始NCP-1(负载顺铂药物前体并且涂覆有1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、胆固醇和 DSPE-PEG2k) 作为比较。NCP-1-卟啉脂质的细胞摄取在1h内是快速且完全的,证据为在超过高达24h的时间内,顺铂和卟啉脂质的两者的稳定

的摄取量。此外,对于NCP-1-卟啉脂质和卟啉脂质的顺铂的摄取量几乎在24-h的实验中从始至终是相同的(表8)。考虑到NCP-1-卟啉脂质中卟啉脂质和顺铂的重量比为约1:1,在不期望受到理论的约束的情况下,认为NCP-1-卟啉脂质以其完整的形式进入细胞。除了游离顺铂,顺铂和卟啉脂质的细胞摄取在24-h的实验中自始至终保持恒定。NCP-1-卟啉脂质的顺铂和卟啉脂质的摄取量高于NCP-1和卟啉小体的那些。

[0359] 表8.细胞摄取

[0360]	顺铂摄取 (ng/10 <sup>5</sup> 细胞)		1 h	2 h	4 h	24 h
		NCP-1-卟啉脂质	62.8±4.9	61.6±2.4	61.0±1.3	60.8±1.6
		NCP-1	54.6±4.5	54.4±1.8	51.5±1.1	49.8±2.0
		游离顺铂	51.7±4.5	43.5±1.4	38.1±0.8	38.5±1.3
	卟啉脂质摄取 (ng/10 <sup>5</sup> 细胞)	NCP-1-卟啉脂质	63.6±0.9	64.4±1.3	65.4±2.2	66.2±2.7
		卟啉小体	46.8±0.6	47.3±0.9	48.1±1.6	48.3±2.0

[0361] 为了理解NCP-1-卟啉脂质的细胞摄取动力学,确定不同制剂中的顺铂和卟啉脂质的流出物(流出,efflux)。使用NCP-1-卟啉脂质、NCP-1、游离顺铂和卟啉小体培育SQ20B细胞4h,并且通过新鲜培养基更换培养培养基,且进一步培育1、2、4和24h。使在培养培养基中检测的顺铂或卟啉脂质的量与4-h摄取的量比较以给出流出物百分比(表9)。NCP-1-卟啉脂质示出了在24-h培养的过程中顺铂和卟啉脂质的可忽略的流出物(<1.5%)。卟啉小体示出了与NCP-1-卟啉脂质一样低的卟啉脂质流出物。游离顺铂的流出物随着时间增加(在24h时为20.0%)并且显著高于NCP-1-卟啉脂质和NCP-1,这导致了随着时间的减少的细胞顺铂浓度。用于NCP-1的顺铂流出物随着时间保持在约8%,并且高于NCP-1-卟啉脂质的那些(<1.5%)。

[0362] 表9.制剂流出物

[0363]	顺铂流出物(%)		1 h	2 h	4 h	24 h
		NCP-1-卟啉脂质	1.1±0.01	0.9±0.1	1.0±0.3	1.1±0.3
		NCP-1	8.2±0.1	9.0±1.2	7.5±2.0	8.5±2.4
		游离顺铂	12.0±1.5	13.5±0.2	18.2±5.1	20.0±5.4
	卟啉脂质流出物(%)	NCP-1-卟啉脂质	1.0±0.1	1.1±0.1	1.1±0.1	1.0±0.1
		卟啉小体	1.2±0.2	1.2±0.1	1.2±0.2	1.2±0.1

[0364] 也利用共聚焦激光扫描显微术(CLSM)成像和活细胞成像以直接观察NCP-1-卟啉脂质的细胞内化和脂质分解。405nm激光用于肉眼观察卟啉脂质。有趣的是,通过CLSM和活细胞成像在开始的2-h培养中观察到没有卟啉脂质荧光。荧光在培育约2h之后出现并且随着时间增加。CLSM图像也显示出一些卟啉脂质结合到细胞膜中,而剩下的分布在细胞质中。如较早的证明,具有完整脂质层的NCP-1-卟啉脂质展现出接近完整的荧光猝灭。结合这些结果表明NCP-1-卟啉脂质以其完整的形式进入细胞并且在开始的2h中保持结构完整性,随后脂质层分解且细胞内脂质分布至细胞膜和细胞质。在结合至细胞膜之后,卟啉脂质可以改变细胞膜的动力学、多孔性和渗透性,这可以导致在高达24h的情况下顺铂和卟啉脂质的两者的流出物减少。这个发现表明NCP-1-卟啉脂质作为有效的递送载体用于顺铂和卟啉脂质的两者,使得NCP-1-卟啉脂质成为用于结合的化疗和PDT的有用的组合物。

[0365] 为了进一步研究核-壳纳米结构的细胞内命运,在标记有二氢卟吩 (Chlorin) e6 的NCP-1 (NCP-1') 的脂质涂覆过程中,掺杂1mol%的FITC- 标记的1,2-二-(9Z-十八酰基)-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺 (FITC-DOPE),以形成NCP-1'-FITC-DOPE,用于观察根据通过细胞的内化的固体核(来自二氢卟吩e6的红色荧光,405nm激光)和脂质(来自FITC-DOPE的绿色荧光,488nm)的细胞内分布。ImageJ用于量化红色和绿色荧光的共定位以显示脂质分解动力学。结果进一步证实了NCP吸附在细胞膜上并且做为完整的核-壳纳米结构进入细胞,证据为 $97.5 \pm 5.8\%$ 的共定位。根据进入的细胞,脂质层逐渐地从核分解并且部分脂质结合到细胞膜上,而剩下的分散到细胞质中。

[0366] 4.4. 通过组合化疗和PDT的NCP-1-卟啉脂质的细胞毒性

[0367] 顺铂主要通过诱导细胞凋亡导致细胞毒性,而PDT通过细胞凋亡和细胞坏死路径两者导致细胞毒性。通过将化疗和PDT形式结合到单独的纳米颗粒中,NCP-1-卟啉脂质可以在辐照下引起有效的细胞凋亡和细胞坏死。NCP-1-卟啉脂质的核中的顺铂药物前体在生理学条件下是稳定的,但是在较还原性的细胞内环境中,其可以容易还原(reduce),以在内吞作用之后触发的方式释放顺铂。释放的顺铂经历水合作用并且结合至DNA以诱导细胞凋亡,从而导致有效的化疗。NCP-1-卟啉脂质以其完整形式通过细胞内化,并且其自脂质层逐渐从固体核分解且移位至细胞膜或分布在细胞质中。由于可以忽略的流出物,在结合至DNA的情况下,顺铂有效地诱导细胞凋亡,相反在辐照的情况下卟啉脂质以高浓度在细胞中累积以有效的生成 $^1O_2$ 以通过细胞凋亡和细胞坏死导致细胞死亡。

[0368] 针对包含顺铂-敏感的HNSCC135和SCC61以及顺铂-抗性的JSQ3和 SQ20B的四种人类头颈癌症细胞评估NCP-1-卟啉脂质的细胞毒性,并且与通过NCP-1(单化疗剂)和卟啉小体(单PDT)引导的细胞毒性比较。NCP-1和游离顺铂的顺铂 $IC_{50}$ 示出了在进行或不进行辐照的情况下,在细胞中没有明显的差异,这表明光剂量不影响使用不具有PS的制剂处理的细胞的存活率(表10)。在不进行辐照的情况下,细胞中的NCP-1-卟啉脂质的细胞毒性与NCP-1和顺铂的那些相似,并且在不进行辐照的情况下,单独的卟啉小体在细胞中不引导细胞毒性。结果表明在不进行光激活的情况下,卟啉脂质未展现出细胞毒性。在辐照之后,NCP-1-卟啉脂质展现出比单化疗剂(NCP-1)和单PDT(卟啉小体)更高的细胞毒性,证据为在全部四种癌症细胞系中显著降低的顺铂和卟啉脂质的 $IC_{50}$ 值(表10)。在抗性SQ20B和JSQ3细胞系中,与不进行辐照的游离顺铂、NCP-1和NCP-1-卟啉脂质相比,在进行辐照的情况下NCP-1-卟啉脂质的顺铂 $IC_{50}$ 值以大约数量级降低。在进行辐照的情况下,与SQ20B和JSQ3细胞中的卟啉小体相比,NCP-1-卟啉脂质的卟啉脂质 $IC_{50}$ 值分别减少8.0-和6.2-倍。在光激活的情况下,NCP-1-卟啉脂质的增强的细胞毒性可以归因于化疗剂和 PDT的协同效应。进一步通过流式细胞术结果支持这些发现(表11)。

[0369] 表10. 在使用各种制剂处理的4种头颈癌症细胞系中的顺铂和卟啉脂质的  $IC_{50}$ 。括号中的数字是指卟啉脂质浓度。

	辐照 <sup>a</sup>	NCP-1- 卟 啉	NCP-1	游离顺铂	卟啉小体 <sup>b</sup>
		脂质			
[0370]	是	1.30±0.05 (0.42±0.02)	2.71±0.13	2.65±0.13	(0.63±0.02)
		3.25±0.46 (1.05±0.15) <sup>c</sup>	2.71±0.16	3.37±0.73	N/A
	否	1.21±0.03 (0.39±0.01)	14.51±1.40	13.33±2.03	(2.42±0.68)
		11.39±0.22 (3.67±0.07) <sup>c</sup>	12.42±0.40	11.31±1.20	N/A
	是	0.77±0.03 (0.25±0.01)	3.11±0.32	3.69±0.28	(0.50±0.02)
		3.48±0.64 (1.12±0.21) <sup>c</sup>	3.10±0.53	3.46±0.08	N/A
	否	0.41±0.02 (0.13±0.01)	4.22±0.11	4.18±0.11	(1.04±0.02)
		3.97±0.38 (1.28±0.12) <sup>c</sup>	3.93±0.38	3.92±0.15	N/A
	是	0.77±0.03 (0.25±0.01)	3.11±0.32	3.69±0.28	(0.50±0.02)
		3.48±0.64 (1.12±0.21) <sup>c</sup>	3.10±0.53	3.46±0.08	N/A
	否	0.41±0.02 (0.13±0.01)	4.22±0.11	4.18±0.11	(1.04±0.02)
		3.97±0.38 (1.28±0.12) <sup>c</sup>	3.93±0.38	3.92±0.15	N/A

[0371] <sup>a</sup>使用LED灯 (670nm) 在60mW/cm<sup>2</sup>下辐照细胞15分钟(等于54 J/cm<sup>2</sup>)

[0372] <sup>b</sup>不含有顺铂的卟啉小体作为对照。卟啉小体中的卟啉脂质的量与在研究浓度下的NCP-1-卟啉脂质相同。

[0373] <sup>c</sup>暗细胞毒性 (dark cytotoxicity) 完全来自这些制剂中的顺铂的活性。

[0374] 表11. 在进行或不进行辐照的情况下使用NCP-1-卟啉脂质处理的 SQ20B细胞的细胞凋亡和细胞坏死水平。

	进行辐照		不进行辐照	
	凋亡% <sup>a</sup>	坏死% <sup>b</sup>	凋亡% <sup>a</sup>	坏死% <sup>b</sup>
[0375]	PBS	0.1	0.1	0.7
	游离顺铂	38.1	37.9	0.2
	NCP-1	25.4	31.5	0.6
	卟啉小体	11.4	1.0	1.6
	NCP-1-卟啉脂质	26.0	31.7	0.7

[0376] <sup>a</sup>右上和右下象限中百分比的和。

[0377] <sup>b</sup>左上象限中的百分比。

[0378] 4.5. 体内药物代谢动力学和生物分布研究：

[0379] 在CT26荷瘤小鼠上进行NCP-1-卟啉脂质的药物代谢动力学(PK) 研究以确定血液循环时间和生物分布概况。在通过甲醇提取之后,通过 ICP-MS量化Pt分布,并且通过UV-vis光谱量化血液中的卟啉脂质的量。通过从甲醇摄取的血液中示出的接近完全恢复的卟啉脂质首先验证了卟啉脂质量化方法。血液中Pt和卟啉脂质浓度与时间最好地拟合为具有非线性消除(non linear elimination)的单室模型(one-compartment model)。血液中的顺铂和卟啉脂质浓度在高达静脉内注射48h之后是相似的,这示出了NCP-1-卟啉脂质的脂质双层在系统性循环中保持完整。Pt和卟啉脂质的血液循环半衰期分别确定为(9.0±1.8)和(6.7±2.2)h,并且没有表现出统计学上显著的差异(表13)。

[0380] 表12.Pt (%剂量/g)

[0381]

	5min	1h	3h	8h	24h	48h
肝	2.2±0.9	3.7±1.9	6.0±1.4	9.2±0.1	7.5±2.0	3.5±0.8
肺	5.7±3.0	3.0±0.8	5.5±1.2	4.8±0.5	3.6±0.1	1.2±0.3
脾	6.5±4.7	5.8±4.3	12.6±5.6	7.6±7.0	16.7±3.5	13.0±3.7
肾	2.3±2.5	3.7±2.9	3.5±0.8	4.4±0.1	5.6±1.0	2.9±0.4
膀胱	3.8±1.2	1.4±2.4	1.8±0.6	0.7±1.1	1.6±0.2	0.9±0.2
肿瘤	1.5±0.4	3.3±1.3	3.1±0.4	3.8±0.5	23.2±2.4	9.1±1.7
血浆	51.6±7.3	48.0±3.7	39.5±1.2	28.8±0.9	9.9±2.1	0.4±0.1

[0382] 表13. 血液中卟啉脂质和顺铂的浓度 (μg/g)

[0383]

	卟啉脂质	顺铂
5min	35.4±2.1	31.0±4.4
1h	29.4±8.7	28.6±7.5
3h	23.0±3.0	23.7±0.7
8h	12.9±4.9	13.5±3.7
24h	6.1±1.7	5.9±1.3
48h	0.9±0.3	0.3±0.1

[0384] 除了延长的血液循环时间外, NCP-1-卟啉脂质的组织分布概况示出了其能够避免用过单核吞噬细胞系统 (MPS) 摄取, 证据为肝脏 ( $<9.2 \pm 0.1\%$ )、胰脏 ( $<16.7 \pm 3.5\%$ ) 和肾脏 ( $<5.6 \pm 0.9\%$ ) 中的低 % ID/g (存在注射剂量/ 克组织)。慢血液清除和慢MPS摄取导致药物的高肿瘤积累, 峰肿瘤摄取为给予后24h的  $23.2 \pm 2.4\%$  ID/g。对于NCP-1-卟啉脂质的异常高的顺铂肿瘤摄取可以部分归因于减少的顺铂流出, 这是由于卟啉脂质结合到了细胞膜内。

[0385] 测试具有不同脂质组合物的其他NCP-1-卟啉脂质制剂。例如, 具有卟啉脂质、胆固醇 (卟啉脂质/胆固醇摩尔比=1:1) 和在外层脂质层中的 20mol% 的DSPE-PEG的NCP-1-卟啉脂质制剂表现出在静脉内注射之后的 1.55h的血液循环半衰期。

[0386] 4.6. SQ20B异种移植小鼠模型中的抗肿瘤活性

[0387] 采用顺铂-抗性SQ20B人类头颈癌皮下异种移植小鼠模型以评估 NCP-1-卟啉脂质的体内抗癌活性。全部剂量均基于游离顺铂或卟啉脂质等同物。通过皮下注射以下项处理SQ20B荷瘤小鼠: (1) PBS、(2) 0.5mg/kg 的顺铂剂量的NCP-1、(3) 0.5mg/kg的卟啉脂质剂量下的卟啉小体或(4) 和(5) 0.5mg/kg的顺铂或卟啉脂质剂量的NCP-1-卟啉脂质, 一周一次进行两次, 其中进行(5)或不进行(4)辐照。在注射之后的24小时, 使用2% (v/v) 的异氟烷麻醉组(1)-(3)和(5)中的小鼠, 并且使用670 nm的LED (100mW/cm<sup>2</sup>) 辐照肿瘤30分钟。仅NCP-1-卟啉脂质加辐照 (组5) 示出了在耐受顺铂SQ20B肿瘤中的显著的肿瘤抑制, 其中肿瘤减小的体积为约83% (表14)。其他四组中的小鼠具有相似的肿瘤生长模式, 这表明单化疗剂或单PDT不能够抑制顺铂-抗性SQ20B肿瘤模型中肿瘤的生长或衰退。使用NCP-1-卟啉脂质处理但不进行辐照的小鼠 (组4) 没有表现出肿瘤生长抑制, 这表明NCP-1-卟啉脂质在光触发方法中实现了抗癌效果。进行辐照的NCP-1-卟啉脂质的肿瘤重量为进行辐照的对照组的那些小约62倍, 通过单因素ANOVA测试, P值为0.001815 (表15)。结合的治疗并没有导致体重的减少或辐照区域中的皮肤损伤, 这表明药物和光的剂量是安全的。

[0388] 表14.肿瘤生长曲线 (cm<sup>3</sup>)

	PBS (+)	NCP-1 (+)	卟啉小体(+)	NCP-1-卟啉脂质(-)	NCP-1-卟啉脂质(+)
第 0 天	0.13±0.01	0.13±0.01	0.13±0.01	0.14±0.01	0.13±0.01
第 1 天	0.18±0.01	0.15±0.01	0.14±0.01	0.17±0.03	0.15±0.01
第 2 天	0.21±0.03	0.17±0.05	0.16±0.02	0.21±0.05	0.12±0.01
第 3 天	0.26±0.06	0.23±0.03	0.18±0.06	0.27±0.04	0.04±0.01
第 4 天	0.38±0.12	0.32±0.04	0.22±0.10	0.40±0.05	0.02±0.01
第 5 天	0.44±0.15	0.39±0.10	0.37±0.06	0.49±0.08	0.02±0.01
第 6 天	0.55±0.17	0.53±0.17	0.41±0.08	0.65±0.11	0.02±0.01
第 7 天	0.61±0.13	0.63±0.17	0.61±0.14	0.73±0.06	0.02±0.01
第 8 天	0.82±0.25	0.75±0.27	0.80±0.13	0.85±0.15	0.02±0.01
第 9 天	1.13±0.36	1.05±0.15	1.01±0.14	0.97±0.26	0.02±0.01
第 10 天	1.24±0.26	1.25±0.15	1.18±0.42	1.26±0.35	0.02±0.01
第 11 天	1.40±0.20	1.39±0.16	1.50±0.50	1.53±0.33	0.02±0.01
第 12 天	1.60±0.37	1.47±0.07	1.77±0.58	1.64±0.54	0.02±0.01

[0390] (+) = 进行辐照, (-) = 不进行辐照

[0391] 表15.肿瘤重量 (g)

PBS (+)	1.3 ± 0.6
NCP-1 (+)	0.9 ± 0.1
卟啉小体 (+)	0.8 ± 0.3
NCP-1-卟啉脂质 (-)	1.4 ± 0.4
NCP-1-卟啉脂质 (+)	0.02 ± 0.01

[0393] 4.7. 组织病理学分析、体内细胞凋亡和免疫相应:

[0394] NCP-1-卟啉脂质表现出针对顺铂-抗性人类头颈癌症SQ20B异种移植小鼠模型的异常的肿瘤抑制活性。切除的肿瘤的组织病理学分析进一步证实了NCP-1-卟啉脂质的抗肿瘤潜力。使用NCP-1-卟啉脂质和辐照处理的小鼠的肿瘤表现出大面积的细胞凋亡和细胞坏死,而接收其他处理的小鼠具有可见癌症细胞和大量血管(脉管系统,vasturelature)结构的大区域的肿瘤。PDT根除肿瘤通过三个主要的机制:诱导细胞凋亡/细胞坏死、激活针对肿瘤细胞的免疫响应和破坏肿瘤血管结构以使肿瘤丧失氧和营养物。在接收NCP-1-卟啉脂质和光处理的小鼠的肿瘤中观察到了巨噬细胞(使用暗蓝色染色的较小的细胞核)、渗透和破坏的血管。在切除的肿瘤上进行TUNEL实验以进一步证实和量化体内细胞凋亡。如表16中的量化, DNA片段的荧光强度和进行辐照的NCP-1-卟啉脂质中的凋亡细胞的相对百分比显著高于其他组中的那些。进行辐照的NCP-1-卟啉脂质诱导了  $74.8 \pm 4.9\%$  的肿瘤细胞凋亡,而其他四组导致了 $<3.5\%$ 的细胞凋亡。此外,与对照组相比,在接收NCP-1-卟啉脂质和辐照的小鼠的肝、肾、肺和膀胱中观察到没有组织学上的变化,这表明其对生命器官是低毒性的。

[0395] 表16. TUNEL阳性细胞 (%)

PBS (+)	0.6 ± 0.2
NCP-1 (+)	1.9 ± 1.3
卟啉小体 (+)	1.0 ± 0.4



NCP-1-卟啉脂质 (-)	3.4±1.7
NCP-1-卟啉脂质 (+)	74.8±4.9

[0397] 为了评估通过化疗剂和PDT的结合诱发的免疫响应,在端点处收集小鼠血液,并且分离血清用于通过酶联免疫吸附实验 (ELISA) 确定TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和IL-6产物。对于对照和单治疗组,观察到对于三个促炎性细胞因子水平 (proinflammatory cytokine level) 没有显著的差异,而对于进行辐照的NCP-1-卟啉脂质发现TNF- $\alpha$  ( $P=0.047288$ , 相对于对照) 和IL-6 ( $P=0.031826$ , 相对于对照) 轻微升高,这可以是由于通过PDT诱发的免疫响应 (表17)。

[0398] 表17. 血清中的细胞激素浓度 (ng/L)

	PBS (+)	NCP-1 (+)	卟啉小体 (+)	NCP-1-卟啉脂质 (-)	NCP-1-卟啉脂质 (+)
[0399] IL-6	19.6±2.0	19.9±1.9	20.3±0.9	18.0±1.0	24.9±2.0
TNF- $\alpha$	5.8±1.9	7.2±1.8	7.7±1.6	7.2±1.6	12.5±3.6
IFN- $\gamma$	9.0±3.4	9.4±0.5	10.7±2.0	10.3±2.1	11.7±1.1

[0400] 4.8. 总结:

[0401] 在某些实施方式中,NCP-1-卟啉脂质纳米颗粒在核中负载25wt%的顺铂并且在壳上负载25wt%的卟啉脂质,并且能够递送大量的化疗剂和 PS两者。此外,NCP-1-卟啉脂质在活性位置中,以触发方式释放其载荷。在细胞外环境中,NCP-1-卟啉脂质保持其结构完整性。在进入细胞的情况下,脂质层在2h内逐渐从NCP-1-卟啉脂质的固体核分解,而一些卟啉脂质融合到细胞膜内且剩下的保留在细胞质中。在细胞内脱落脂质层之后, NCP-1核变得对高浓度的内源还原试剂,如半胱氨酸和谷胱甘肽具有高渗透性,以通过NCP-1核中金属-配体键的还原性断裂触发顺铂的释放。

[0402] 在静脉内注射荷瘤小鼠之后,NCP-1-卟啉脂质表现出对有效治疗载荷的以下两者的延长的血液循环半衰期:顺铂的 $t_{1/2}$ 为 $9.0 \pm 1.8$ h且卟啉脂质的 $t_{1/2}$ 为 $6.7 \pm 2.2$ h。这种PK可以归因于细胞外环境中NCP-1-卟啉脂质的小颗粒尺寸 (约100nm)、高PEG涂覆 (约20mol%) 和有利的结构稳定性。因此NCP-1-卟啉脂质实现了在i.v.注射之后的24h的肿瘤内高达约 23ID%/g的顺铂积累,通过MPS系统的低摄取和最小非特异性器官分布。

[0403] NCP-1-卟啉脂质不仅表现出有效且高特异性的肿瘤沉积,而且也示出了在癌症细胞中的高摄取和积累。使用SQ20B细胞培育的NCP-1-卟啉脂质的顺铂和卟啉脂质的细胞摄取量时相似的且在24-h的实验之后是稳定的。同时,在24-h的培育时间的自始至终,对于SQ20B细胞中的NCP-1-卟啉脂质观察到顺铂和卟啉脂质的可忽略的流出。也提供了CLMS图像证明了卟啉脂质部分结合到细胞膜内且部分保留在细胞质中,而不是在从 NCP-1-卟啉脂质的固体核分解之后循环到细胞外。在不通过任何理论限制的情况下,卟啉脂质到细胞膜内的结合部分导致对于来自癌症细胞的可忽略的顺铂流出。

[0404] 结合治疗提供了通过不同活性基质治疗癌症的机会,因此导致了通过协同效应增强的抗癌效力。NCP-1-卟啉脂质在单一平台中结合了顺铂的良好的化疗效力和卟啉脂质的有效的PDT效力,并且增强了在体内和体外的两者中顺铂-抗性的头颈癌症的抗癌效力。通过以下结果证实了这种协同效应: (1) 在4种人类头颈癌症细胞系测试中,与游离顺铂、NCP-1、进行或不进行辐照的卟啉小体和不进行辐照的NCP-1-卟啉脂质比较时,进行辐照的NCP-1-卟啉脂质的显著减少了顺铂IC<sub>50</sub>; (2) 在使用进行辐照的PBS、进行辐照的NCP-1、进行辐照

的卟啉小体和不进行辐照的NCP-1-卟啉脂质处理的SQ20B荷瘤小鼠中没有观察到肿瘤抑制性,而接受 NCP-1-卟啉脂质和辐照的小鼠的肿瘤收缩了约83%的体积。

[0405] 对于本发明的体内抗癌效力研究,使用0.5mg/kg的顺铂剂量和0.5 mg/kg的卟啉脂质剂量的NCP-1-卟啉脂质静脉内注射小鼠,一周一次进行两次。组织病理学分析结果表明,这种非常低的药物剂量不能导致体内毒性或严重不利的系统免疫响应(经常出现在PDT中)。

#### [0406] 实施例5

#### [0407] 具有siRNA的纳米颗粒配位聚合物颗粒

#### [0408] 5.1.Pten-NCP/siRNA的制备和表征

[0409] 基于先前报道的规程(参见Liu et al., Nature Communications 2014;5: 4128)将Pten合成为顺铂药物前体PtBp的无毒的类似物。简要地,通过在水性溶液中使用乙二醇(en)处理 $K_2PtCl_4$ 制备 $[Pt(en)_2]Cl_2$ 。然后,通过过氧化氢氧化 $[Pt(en)_2]Cl_2$ 以提供 $[Pt(en)_2(OH)_2]Cl_2$ ,其使用二乙氧基异氰酸磷脂处理,之后使用溴三甲基硅烷去保护磷酸酯以提供Pten。Pten-NCP 的固体核是在反向微乳液中由Pten和 $Zn^{2+}$ 离子构建的1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸钠盐(DOPA)-封端的NCP。Liu et al. (Nature Communications 2014;5:4128)中描述了脂质涂覆策略,并且在本文的其他位置用于在 Pten-NCP的表面上形成高取向和非对称的脂质双层,其由1,2-二油酰基 -sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、胆固醇和20mol%的1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)<sub>2000</sub>](DSPE-PEG2k)组成。siRNA 结合到使用PEG层遮蔽(shield)以保护核酸酶不在生理环境中降解的核中。N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酰基-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE-SPDP)合成自琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯和1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺,并且进一步偶合硫醇 siRNA(Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, United States of America)以提供DSPE-siRNA偶合物。二硫键位于siRNA双链体的正义链的5'端,以避免在反义链上潜在的抑制。以Pt与siRNA的摩尔比为160:1,通过非共价自组装将siRNA结合到脂质层内以获得 Pten-NCP/siRNA。因此Pten-NCP/siRNA提供了对细胞外siRNA的充分的保护,而可以通过二硫键的裂解在还原性细胞内环境中触发siRNA释放。

[0410] 动力学光散射(DLS)测量分别给出了Pten-NCP的直径和PDI为 $31.4 \pm 2.4$ nm和0.19,以及Pten-NCP/siRNA的直径和PDI为 $80.7 \pm 2.9$ nm 和0.15。通过电感耦合等离子-质谱测得的Pt负载为15.7wt%。通过QuantiT RiboGreen RNA试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, California, United States of America)确定的Pten-NCP/siRNA中的siRNA负载为1.5wt%,并且可以基于先前的经验增加至高达6%。TEM图像示出了Pten-NCP是球形的且是单分散的。参见图9(a)。

[0411] 在通过内吞作用进入细胞的情况下,用于触发siRNA介导的基因沉默的有效的内体逃逸是优选的。质子海绵效应(proton sponge effect)已经广泛地利用用于siRNA纳米载体的内体逃逸机制,但是这种效应的实现通常采用阳离子组成,其通过全身给予倾向于不利地影响血液循环和纳米载体的生物性分布。在不包含阳离子赋形剂的情况下。Pten-NCP/siRNA具有新颖的嵌入式内体逃逸机制。对于Pten-NCP/siRNA,来自Pten-NCP的每个 $Pt(en)_2^{2+}$ 的细胞内释放也生成两个 $CO_2$ 分子。参见图9(c)。不期望通过理论的限制,由NCP生成

的CO<sub>2</sub>的设想可以通过改变渗透压破坏内体膜,促进siRNA从内体诱捕中逃逸并且在细胞质中诱导RNA-引导的沉默复合物(RISC)的形成以介导基因沉默。

[0412] Alexa Fluor 647标记的siRNA用于制备Pten-NCP/Alexa-siRNA。使用 Pten-NCP/Alexa-siRNA培育SKOV-3细胞不同的时间周期,使用 Lysotracker Green和DAPI固定和染色,并且通过CLSM观察。通过ImageJ 计算绿色荧光(Lysotracker Green染色的内体)和红色荧光(Alexa Fluor 647 标记的siRNA)的共定位。迅速地通过细胞内化Pten-NCP/Alexa-siRNA,并且siRNA在2h内从内体诱捕中逃脱(entrapment),证据为siRNA和内体/溶酶体荧光的逐渐减少的共定位。参见图9(b)。

[0413] Pten-NCP的颗粒构建自Pten和Zn离子与生物相容性的脂质单层。确定了针对H460细胞的Pten和Pten-NCP的毒性。在Pt浓度高达50 $\mu$ M的情况下,Pten或Pten-NCP诱导无细胞毒性,而顺铂具有4.8 $\mu$ M的IC<sub>50</sub>。参见图10(a)结果表明单独的Pten或Pten-NCP是无细胞毒性且安全地用作纳米载体。

[0414] 5.2.Pten-NCP/siRNA的体外转染效力:

[0415] A2780/CDDP是Bcl-2和生存素的过表达的顺铂-抗性的OCa细胞系。靶向Bcl-2和生存素的siRNA负载在Pten-NCP的颗粒内以形成ten-NCP /siRNA。使用Pten-NCP/siRNA在30nM的siRNA剂量下培育A2780/CDDP 细胞24h,并且通过酶联免疫吸附实验(ELISA)的定量Bcl-2和生存素的蛋白产物评估通过Pten-NCP/siRNA介导的基因沉默的有效性。与PBS 对照相比,Bcl-2和生存素蛋白产生下调了约60%。参见图10(b)。这个结果表明Pten-NCP siRNA可以介导OCa细胞中的有效的基因沉默。

[0416] 由于Pten-NCP/siRNA得合成是高度模块化的,任何siRNA的组合或单独的siRNA均可以通过使用DSPE-siRNA偶合物的混合物(cocktail) 有效地结合到颗粒内。负载有单独的或汇集的PD-L1siRNA、CCR-7siRNA 和IDO siRNA的Pten-NCP/siRNA可以介导有效地体外基因沉默。靶向 PD-L1、CCR7和/或IDO的汇集的siRNA可以通过与前文描述的那些相似的负载策略结合到Pten-NCP的颗粒内。

[0417] 实施例6

[0418] 负载顺铂加与吉西他滨和siRNA的NCP/siRNA

[0419] 使用与用于DOPA涂覆的负载顺铂的NCP相似的规程合成DOPA涂覆的负载顺铂和吉西他滨单磷酸盐(GMP)的NCP颗粒,区别在于顺铂药物前体和GMP的两者均在反向微乳液反应中使用。通过ICP-MS和TGA 的确定,NCP的颗粒分别具有15wt%和27wt%的顺铂和吉西他滨。NCP 的Z均直径和PDI分别为42.4 $\pm$ 0.1nm和0.116。DOPA涂覆的NCP颗粒以顺铂:GMP:siRNA的重量比为2:4:1涂覆有DOPC、胆固醇、25mol%的 DSPE-PEG2k和DSPE-siRNA。NCP/siRNA的Z均尺寸、PDI和 $\zeta$ 电势分别为101.3 $\pm$ 1.4nm、0.206和-3.4 $\pm$ 0.1mV。TEM图像表明NCP/siRNA是球形且在PBS中是单分散的纳米结构。参见图8(a)。评估来自NCP/siRNA 的顺铂和吉西他滨的释放,并且在半胱氨酸存在下,顺铂的释放显著增强。参见图8(b)和图8(c)。

[0420] 针对人体卵巢癌症细胞A2780、A2780/CDDP、SKOV-3和人类非小细胞肺癌细胞H460,通过MTS实验评估靶向生存素、Bcl-2和ERCC-1 的负载顺铂、GMP和硫醇siRNA的NCP颗粒的细胞毒性。参见表 18。

[0421] 表 18.针对A2780、A2780R、SKOV-3和H460细胞的顺铂、GMP 和NCP的顺铂的IC<sub>50</sub>值

(括号中的数字是指GMP浓度)。

		顺铂( $\mu\text{M}$ )	GMP ( $\mu\text{M}$ )	Zn 对照* ( $\mu\text{M}$ )	NCP ( $\mu\text{M}$ )	NCP/siRNA ( $\mu\text{M}$ )
[0422]	A2780	0.764 $\pm$ 0.183	(0.032 $\pm$ 0.0.004)	>5000 (>5000)	0.107 $\pm$ 0.015 (0.210 $\pm$ 0.029)	0.25 $\pm$ 0.02 (0.47 $\pm$ 0.05)
	A2780R	13.6 $\pm$ 3.2	(0.12 $\pm$ 0.01)	>25 (>10)	0.17 $\pm$ 0.01 (0.26 $\pm$ 0.01)	0.051 $\pm$ 0.005 (0.16 $\pm$ 0.01)
	SKOV-3	4.6 $\pm$ 0.7	(2.8 $\pm$ 0.8)	>50 (>50)	0.84 $\pm$ 0.15 (1.8 $\pm$ 0.4)	
	H460	4.6 $\pm$ 0.6	(3.3 $\pm$ 1.3)	>50 >50	1.7 $\pm$ 0.6 (3.3 $\pm$ 1.2)	

[0423] \*Zn对照不含有奥沙利铂或GMP。Zn对照颗粒的量与在研究浓度下的NCP-5相同。数据表示为平均值 $\pm$ SD。

[0424] 应该理解,在不违背本公开的主题的范围的情况下可以改变本公开主题的各种细节。此外,前述说明书仅用于示出的目的,且不用于限制的目的。

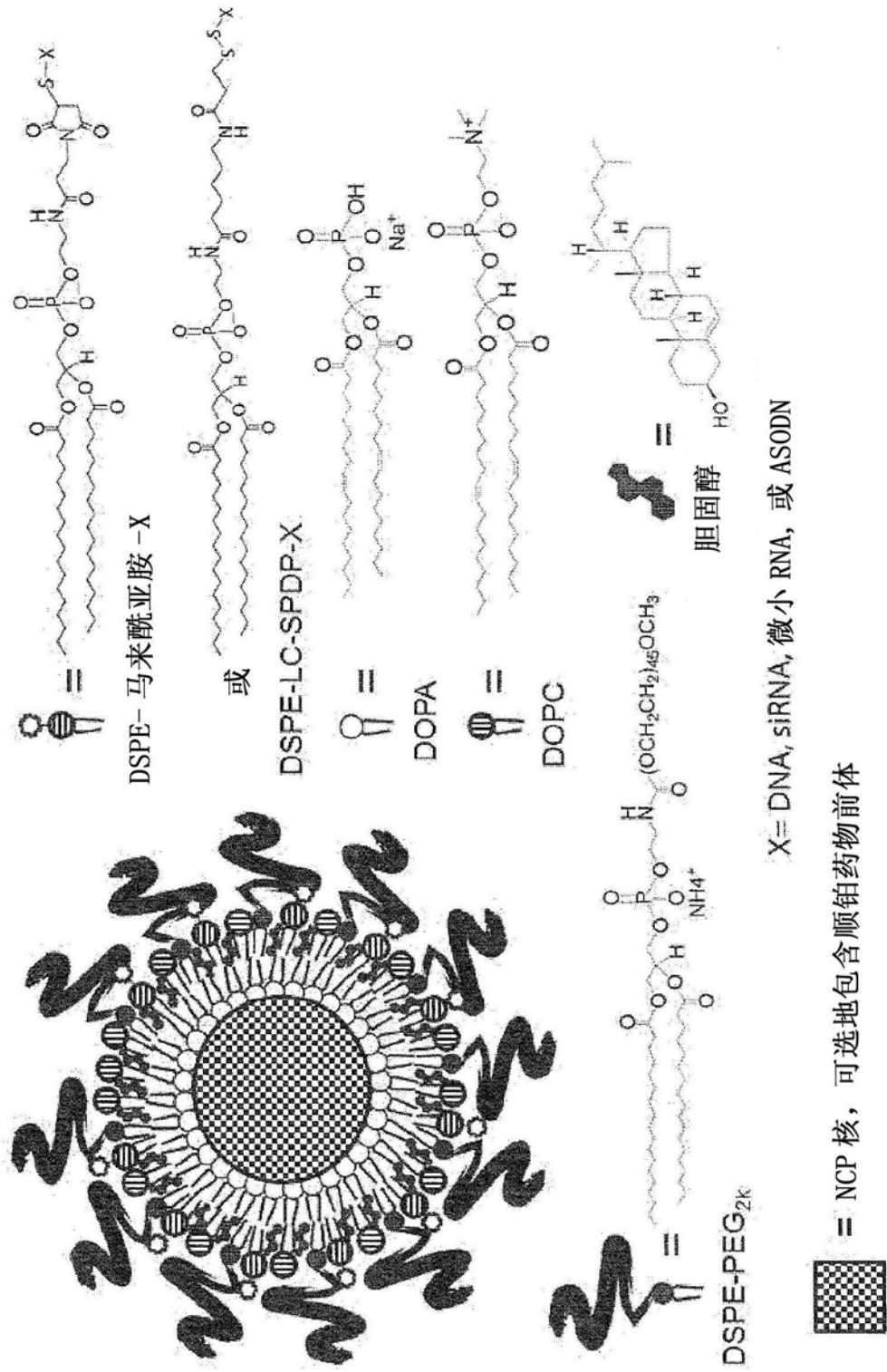


图1

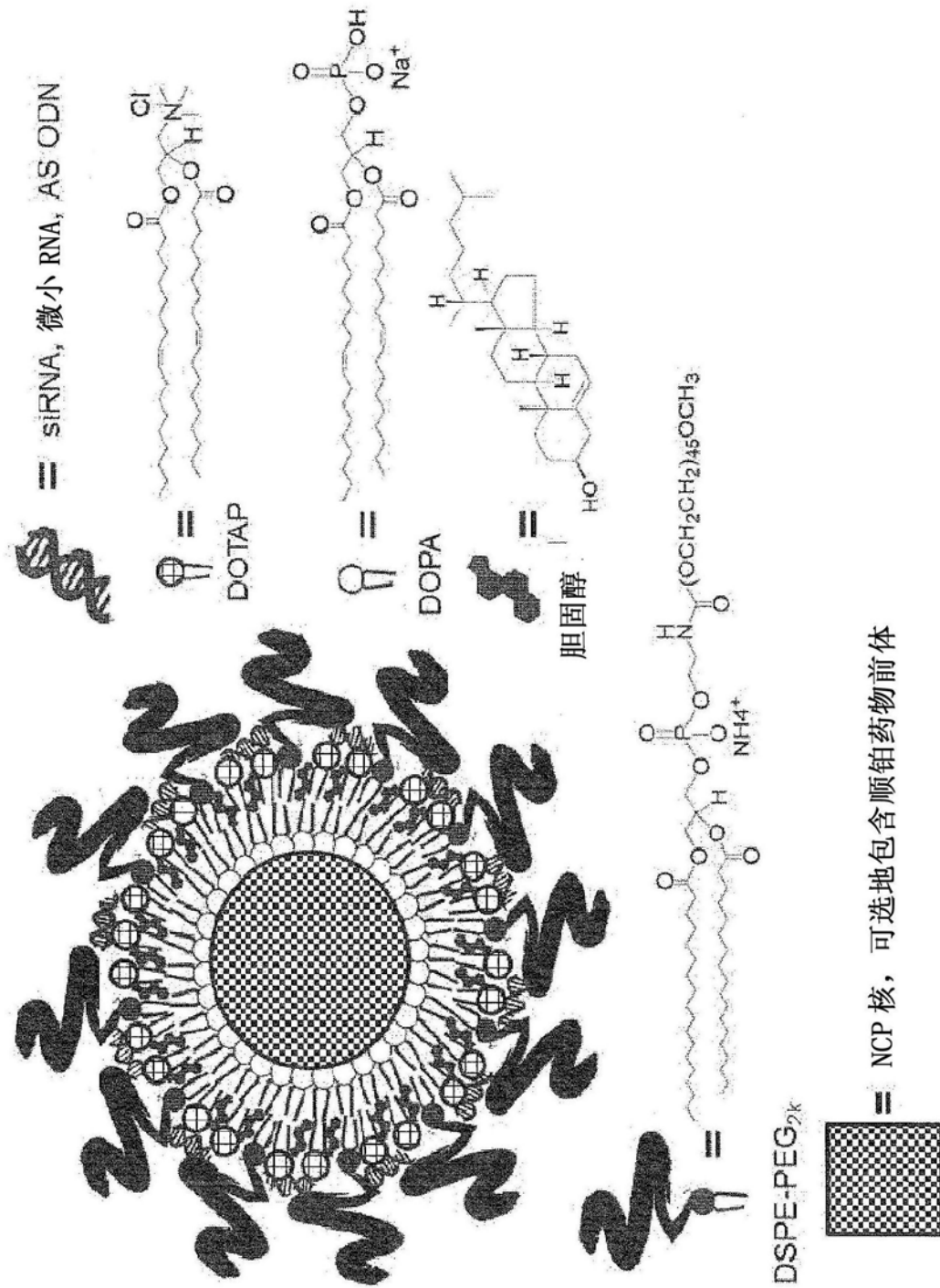


图2

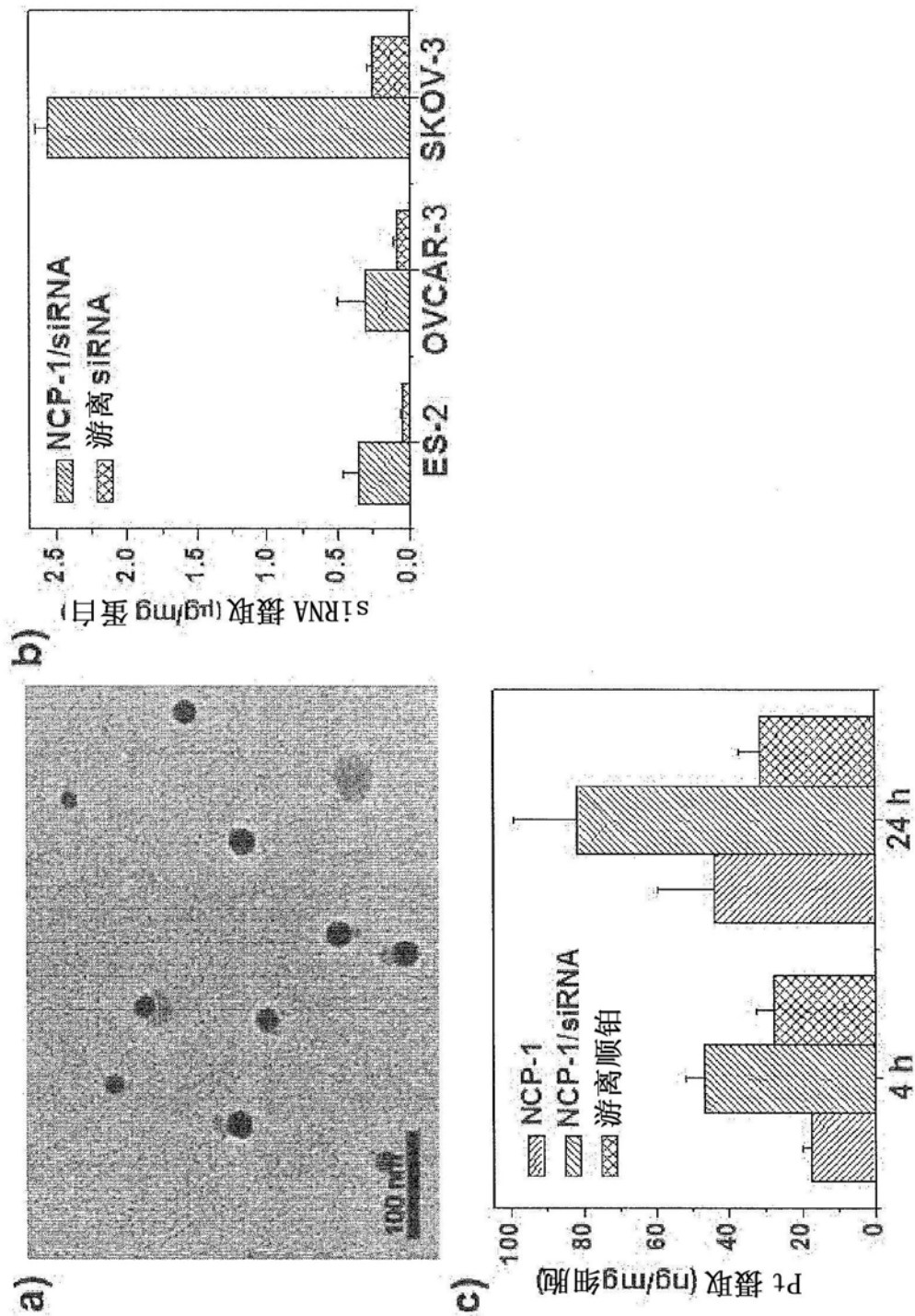


图3

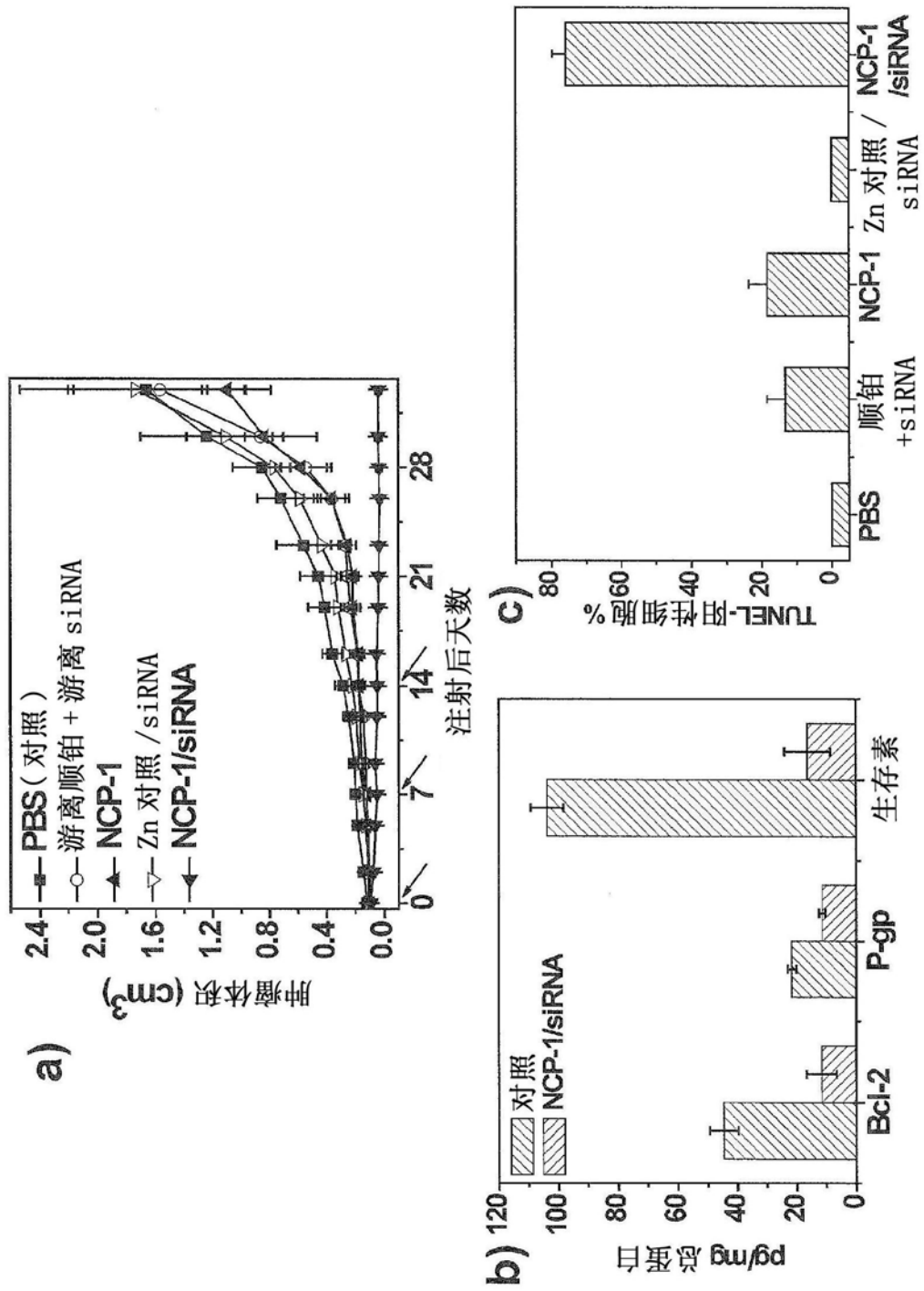


图4



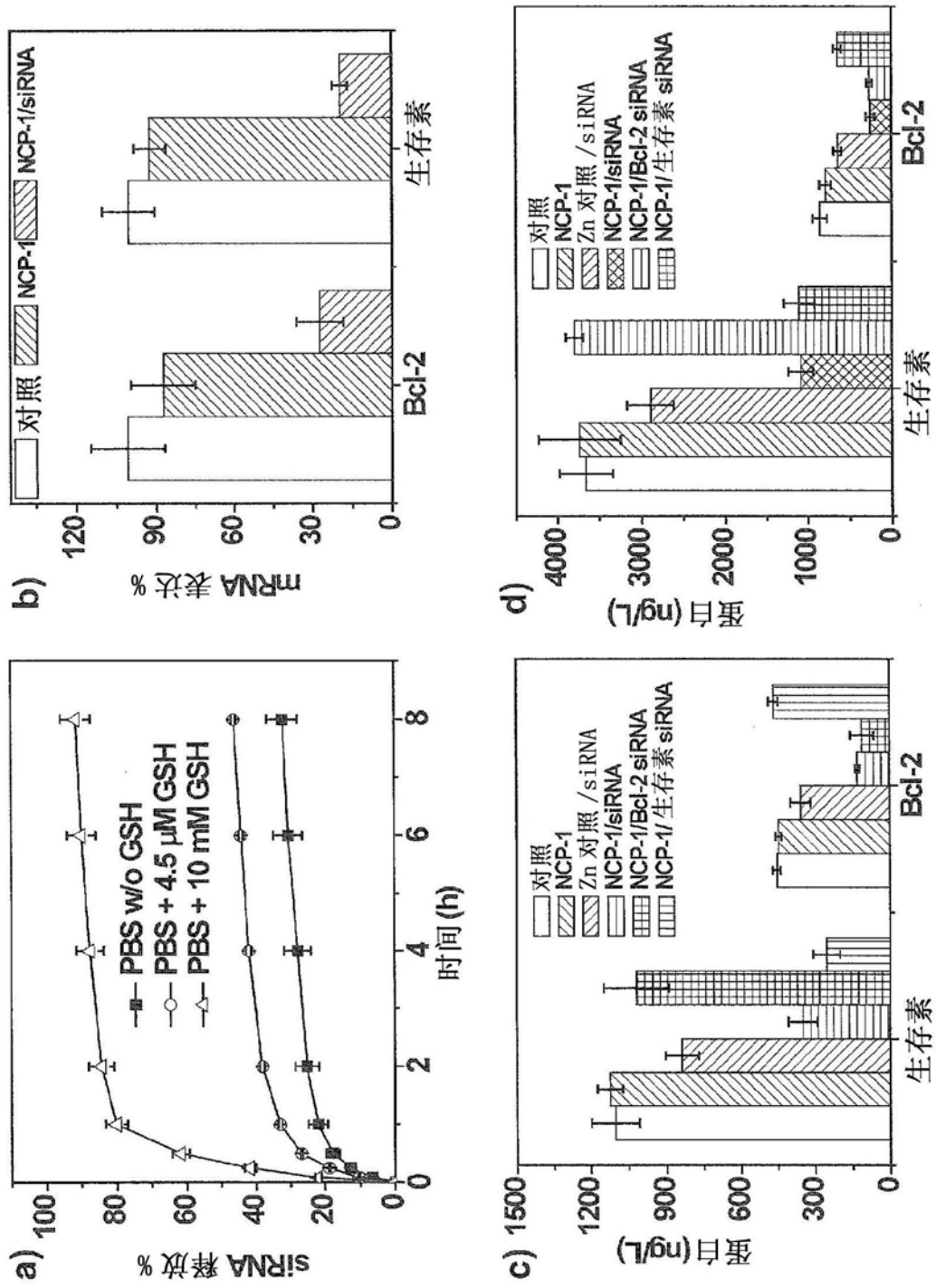


图5

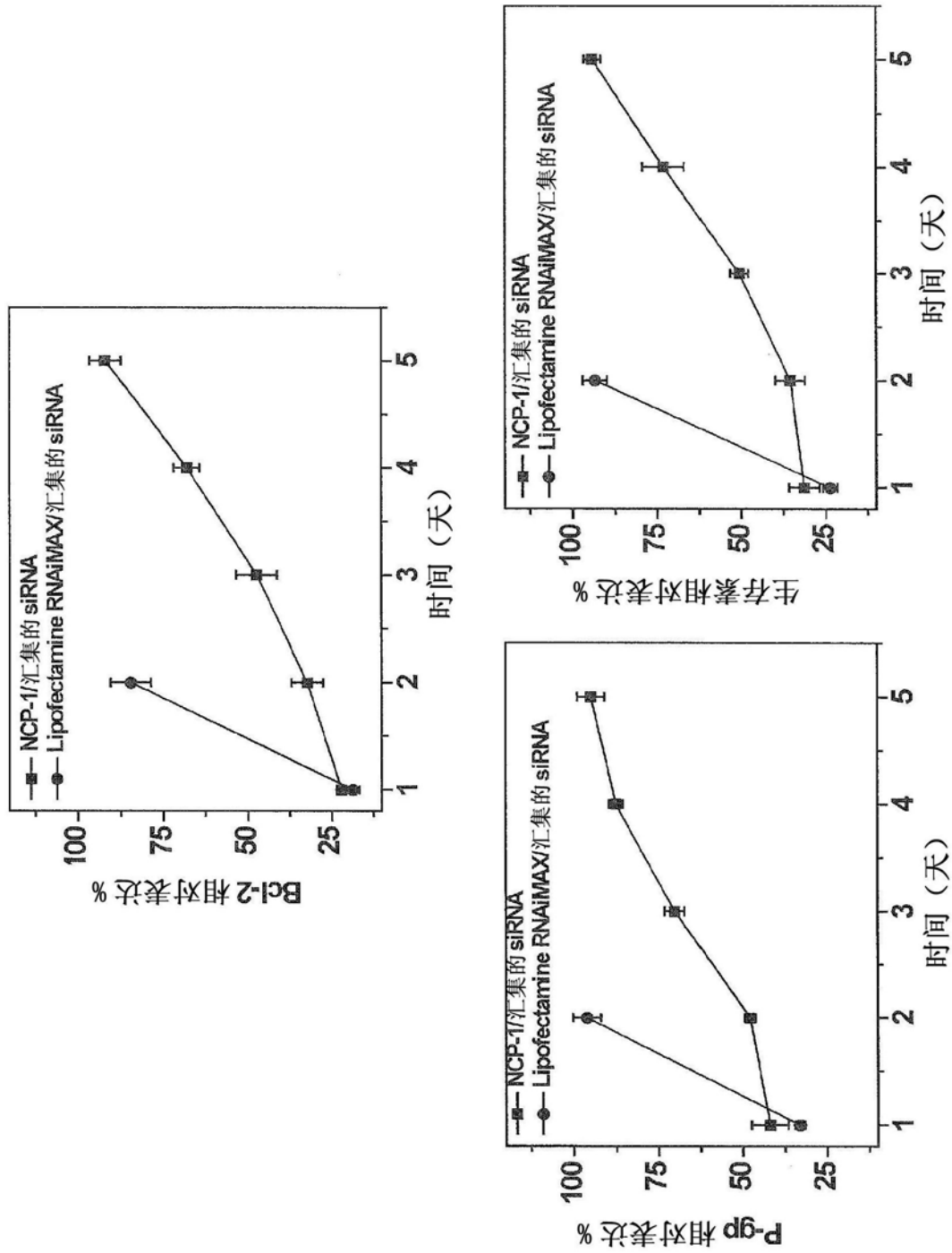


图6

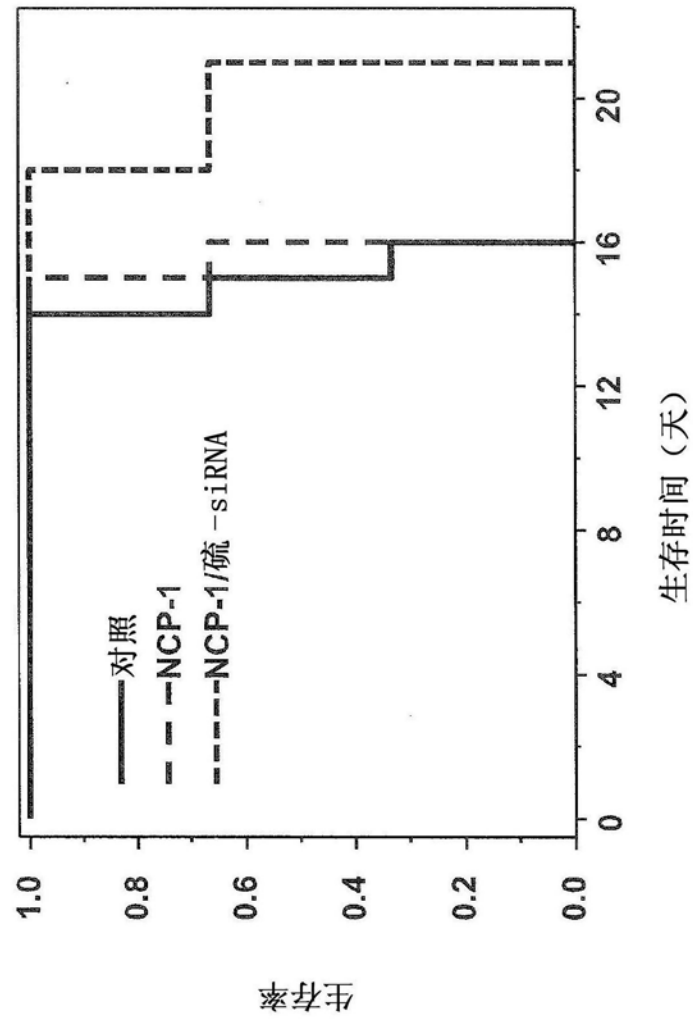


图7

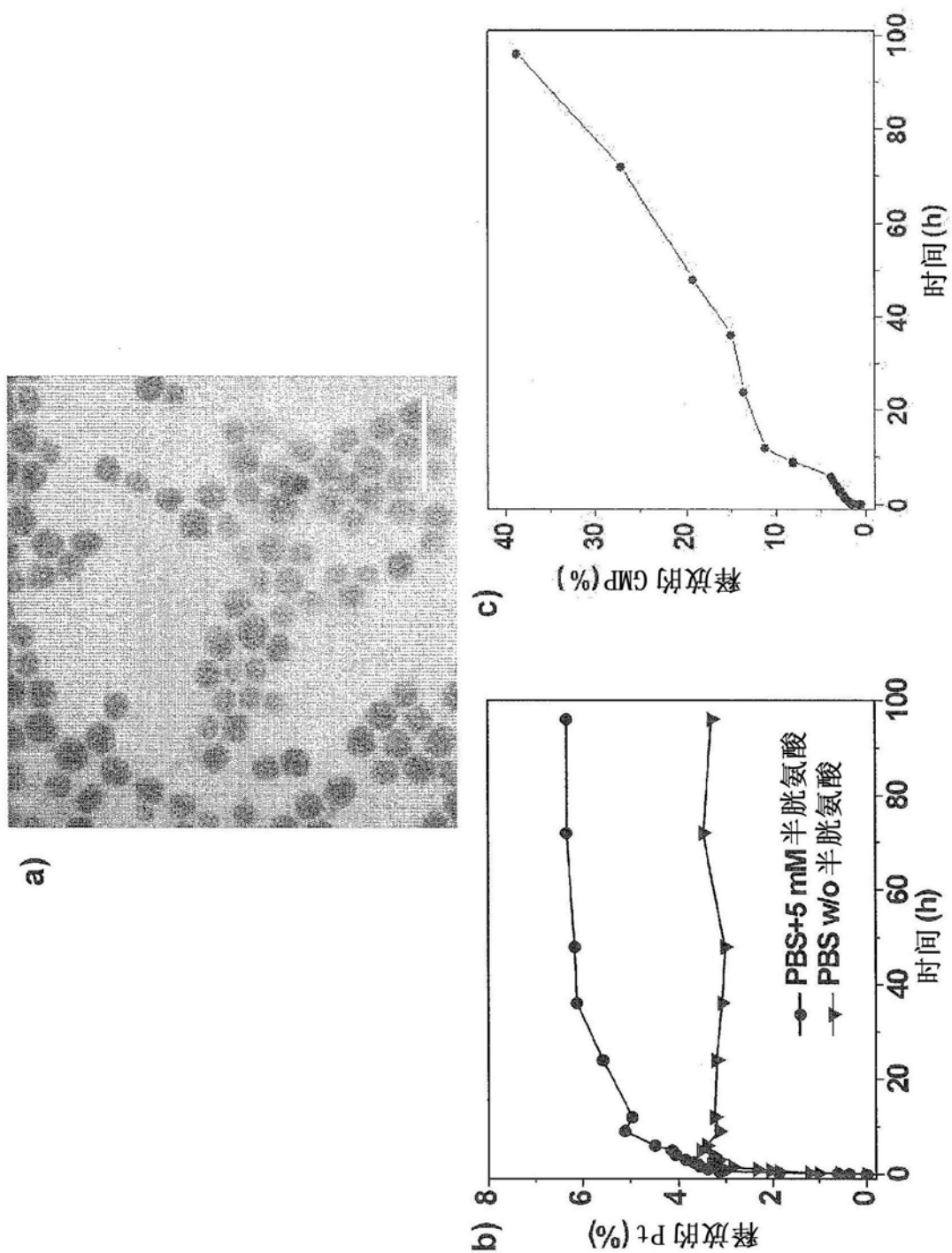


图8

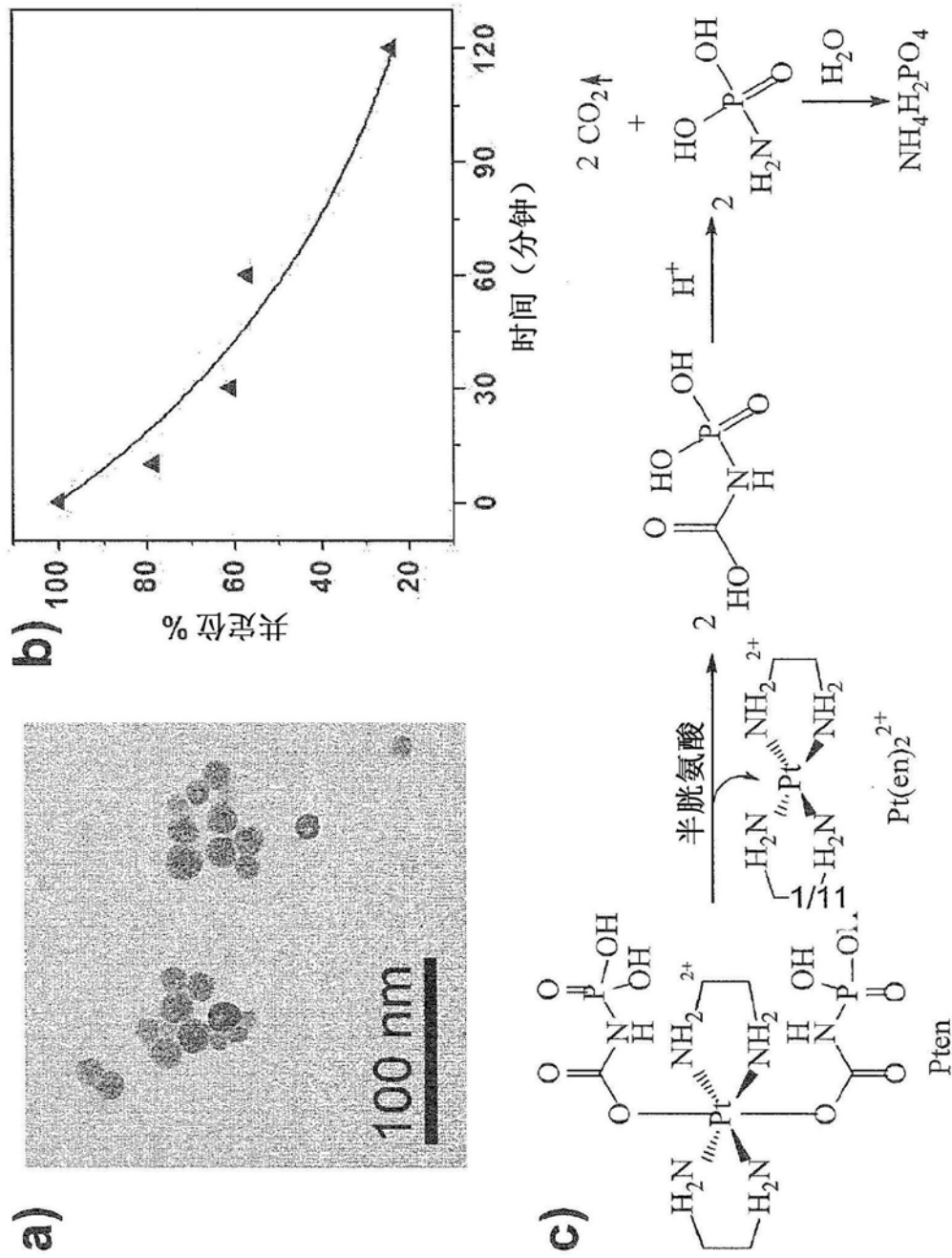


图9

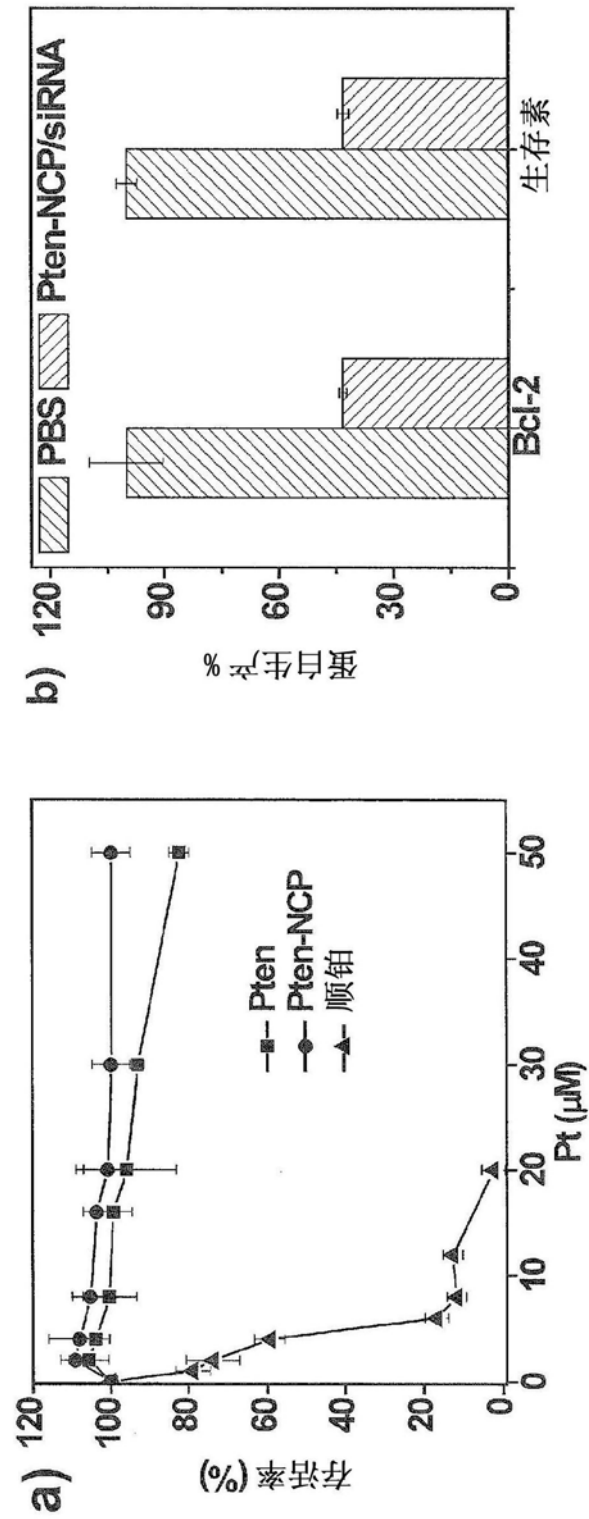


图10

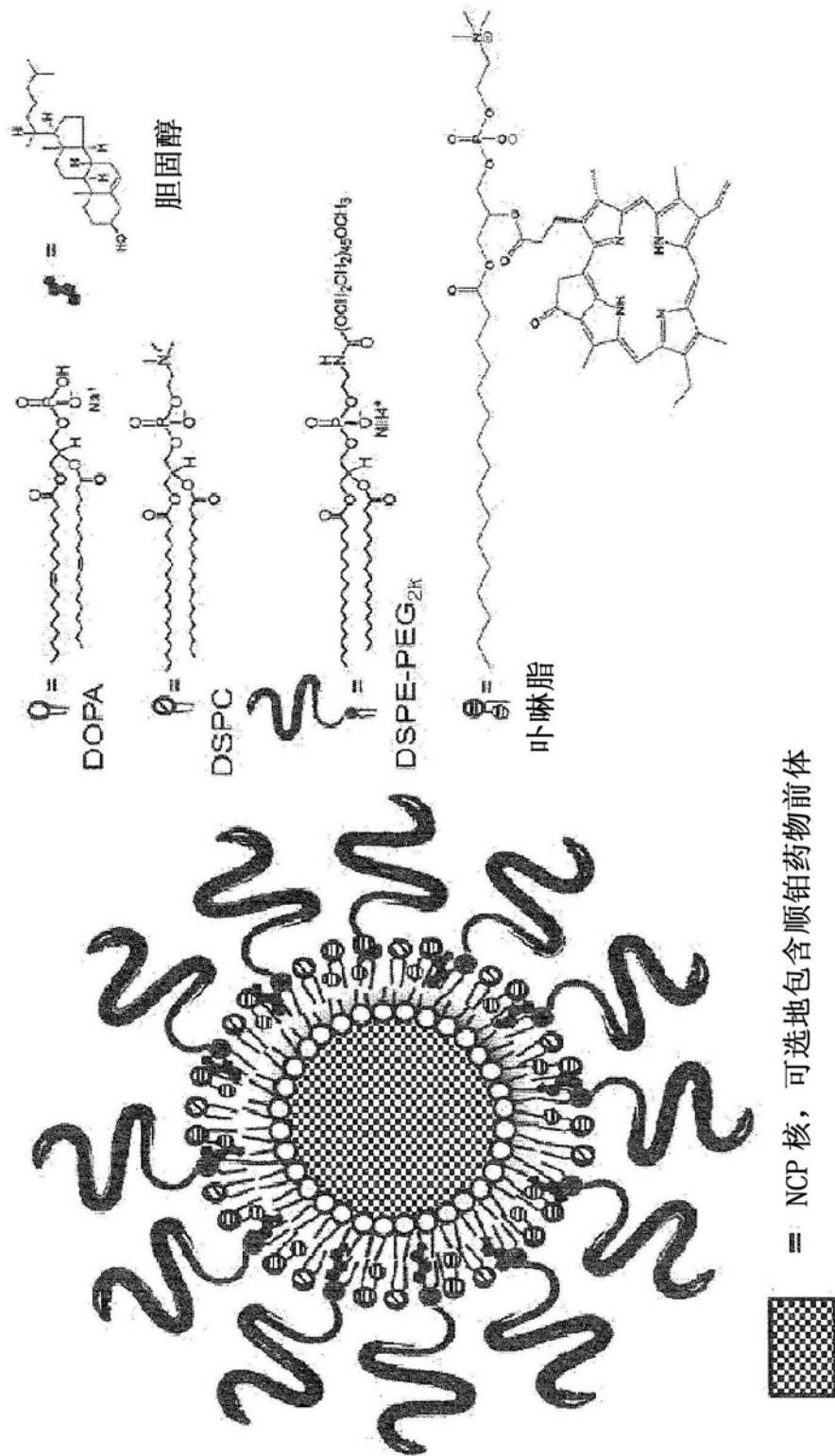


图11