



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109196103 A

(43)申请公布日 2019.01.11

(21)申请号 201780029100.9

E·海莎姆迪诺夫 徐聪聪

(22)申请日 2017.05.10

(74)专利代理机构 青岛联智专利商标事务所有
限公司 37101

(30)优先权数据

62/333890 2016.05.10 US

62/380238 2016.08.26 US

代理人 邵新华 迟承柏

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.11.09

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2010.01)

A61K 31/7088(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/032001 2017.05.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/197009 EN 2017.11.16

(71)申请人 俄亥俄州立创新基金会

地址 美国俄亥俄州

申请人 鲍尔州立大学

权利要求书1页 说明书61页

序列表8页 附图61页

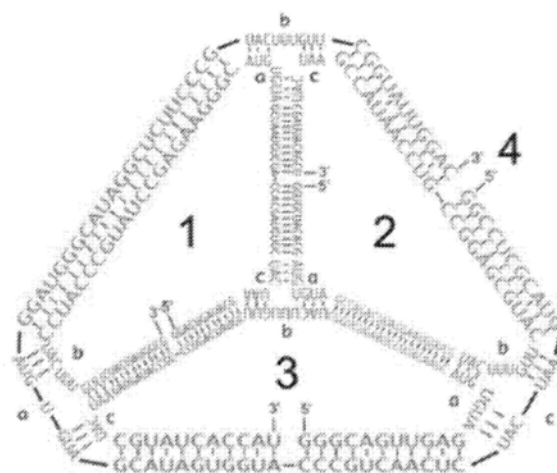
(72)发明人 郭培宣 D·亚辛斯基 李晖

(54)发明名称

自组装的3D RNA笼形纳米粒

(57)摘要

本文公开了三维笼形分子,其中所述笼形分子由RNA构成。还公开了包含所述三维笼形分子的组合物,以及含有所述三维笼形分子的药物组合物。本文还公开了施用笼形分子、其组合物或制剂至需要其的受试者的方法。



1. 一种三维笼形分子,其中所述笼形分子包含被配置成自组装成所述三维笼形分子的一条或多条RNA链和至少一个三向连接,其中所述三维笼形分子被配置为封装货物分子。
2. 根据权利要求1所述的三维笼形分子,其中所述三维笼形分子呈四面体形状。
3. 根据权利要求1所述的三维笼形分子,其中所述三向连接是pRNA-3WJ。
4. 根据权利要求3所述的三维笼形分子,其进一步包括货物化合物。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的三维笼形分子,其中所述三维笼形分子进一步包含至少一个功能部分。
6. 根据权利要求5所述的三维笼形分子,其中所述功能部分是治疗部分或诊断部分。
7. 根据权利要求5或6所述的三维笼形分子,其中所述功能部分是RNA适体、核酶、siRNA、结合蛋白质的RNA适体或小分子。
8. 根据权利要求5-7中任一项所述的三维笼形分子,其中所述三维笼形分子包含至少两个功能部分。
9. 根据权利要求8所述的三维笼形分子,其中所述至少两个功能部分是相同的。
10. 根据权利要求8所述的三维笼形分子,其中所述功能部分中的至少两个是不同的。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的三维笼形分子,其中所述三维笼形分子是可缩放的。
12. 根据权利要求4-11中任一项所述的三维笼形分子,其中所述货物分子可通过可切割接头附着到RNA纳米笼。
13. 根据权利要求12所述的三维笼形分子,其中所述可切割接头是光可切割接头。
14. 根据权利要求1-13中任一项所述的三维笼形分子,其中所述三维分子中的RNA链的至少一个核糖核苷酸被2' F修饰。
15. 一种组合物,其包含根据权利要求1-14中任一项所述的三维笼形分子。
16. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1-15中任一项所述的三维笼形分子。
17. 根据权利要求16所述的药物组合物,其进一步包含药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。
18. 根据权利要求16或17所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制用于治疗疾病。
19. 一种改变细胞中靶基因的表达的方法,其包括使所述细胞与治疗有效量的三维笼形分子接触,其中所述货物分子包括RNA。
20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述RNA是RNAi分子。
21. 根据权利要求19所述的方法,其中所述RNA是mRNA。
22. 一种治疗受试者中的疾病的方法,其包括向所述受试者施用根据权利要求15-21中任一项所述的药物组合物。
23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述疾病是感染。
24. 根据权利要求22所述的方法,其中所述疾病是癌症。
25. 一种使细胞成像的方法,所述方法包括将所述细胞暴露于根据权利要求1-14中任一项所述的三维笼形结构。
26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述细胞在受试者中。

自组装的3D RNA笼形纳米粒

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年8月26日提交的共同在审美国临时专利申请号62/380,238以及2016年5月10日提交的共同在审美国临时专利申请号62/333,890的权益和优先权,上述申请的内容通过引用整体并入本文。

[0003] 关于联邦资助的研究的声明

[0004] 基于政府支持,根据美国国立健康研究院授予的基金号R01EB003730;R01EB019036;R01EB012135;U01CA207946;和U01CA151648,进行了本发明。政府在本发明中享有特定权利。

[0005] 序列表

[0006] 本申请包含以ASCII.txt文件的电子形式提交的序列表,名为321501-2030_ST25.txt,其于2017年5月10日生成。该序列表的内容整体并入本文。

背景技术

[0007] 小分子药物、RNAi疗法和各种适体疗法发展中的显著进步显示了治疗从癌症到遗传疾病的各种疾病的前景。基于此,存在对改善的药物递送技术的需求。

发明内容

[0008] 根据所公开的材料、化合物、组合物、物品、装置和方法的目的,如在本文所体现和广泛说明,本公开的主题关于组合物,以及制备和使用所述组合物的方法。

[0009] 本文所公开的是三维笼形分子,其中所述笼形分子含有RNA。还公开了含有所述三维笼形分子的组合物,以及含有所述三维笼形分子的药物组合物。

[0010] 进一步公开的抑制或降低目标基因在细胞中表达的方法,包括使细胞与治疗有效量的三维笼形分子相接触的步骤,其中所述笼形分子含有RNA。

[0011] 公开了一种治疗受试者中疾病的方法,包括向受试者施用本文所公开的药物组合物的步骤。

[0012] 还公开了使细胞成像的方法,所述方法包括将细胞暴露于本文所公开的三维笼形结构的步骤。

[0013] 所公开主题的额外优点将部分在下文的说明书和附图中阐明,以及将部分地从所述说明书显而易见,或者能够由实践下文所说明的方面而被了解。下文所说明的优点将通过所附权利要求中特别指出的元素和组合而实现和获得。要理解前面的一般说明和下文的详细说明二者都是示例性和解释性的,和非限制性的。

附图说明

[0014] 本说明书所包含并构成本说明书一部分的附图阐明了数个方面,并且与本说明书一起用于解释本发明的原理。

[0015] 图1A-1F能够证明8nm RNA四面体的设计和组装。图1A展示pRNA单体的2D序列(SEQ

ID NO:1)的实施方式,显示中心pRNA-3WJ基序。pRNA-3WJ的22-核苷酸核心序列(红色)用于构建RNA四面体。图1B-1C显示RNA四面体的2D序列(图1B)和3D计算模型(图1C)。链1(SEQ ID NO:2);链2(SEQ ID NO:3);链3(SEQ ID NO:4);链4(SEQ ID NO:5)。图1D显示代表性7%非变性PAGE凝胶图,显示RNA四面体的逐步组装。“+”表示存在链。M:超低范围DNA分子量标准(DNA ladder)。图1E-1F显示8nm RNA四面体的代表性原子力显微技术(AFM)图像(图1E)和单颗粒冷冻EM 3D重构(图1F)。

[0016] 图2A-2D证明RNA四面体的物理化学表征。动态光散射(DLS)分析显示RNA四面体的(图2A)流体动力学尺寸和(图2B)ζ电位。图2C显示RNA四面体复合体和四个组分链的每一个的溶解曲线。图2D显示RNA、2'-F和DNA四面体的溶解曲线的比较。

[0017] 图3A-3E证明17nm RNA四面体的设计、组装和表征。图3A显示示意图,其显示RNA四面体的可调尺寸转换(从每边22bp至每边55bp)。图3B显示代表性6%非变性PAGE凝胶图像,显示较大RNA四面体的逐步组装。“+”表示存在链。M:100bp DNA分子量标准。图3C显示DLS分析的结果,显示较大RNA四面体的流体动力学尺寸。图3D-3E显示RNA四面体的AFM图像(图3D)和(图3E)冷冻EM图像以及3D重构。

[0018] 图4A-4F证明多功能RNA四面体的功能表征。图4A显示示意图,显示多功能RNA四面体携有HBV核酶、MG适体、Spinach适体和STV适体。图4B显示代表性7%非变性PAGE凝胶图像,显示多功能RNA四面体的逐步组装。“+”表示存在链。图4C显示核酶活性分析的结果,证实135nt底物的切割。荧光测定证实(图4D)MG适体和(图4E)Spinach适体的荧光发射。图4F显示使用STV亲和柱的链霉亲和素(STV)适体结合分析的结果。

[0019] 图5A-5C证明携有siRNA和癌症靶向适体的RNA四面体的体外评估和体内评估的结果。图5A显示代表性共聚焦图像,显示RNA四面体(有或无EGFR适体)结合至MDA-MB-231细胞。图5B证实荧光素酶siRNA沉默效果,如由双荧光素酶分析所检测。误差棒表示平均值±SD。图5C显示在原位MDA-MB-231肿瘤携带小鼠中,在系统尾静脉注射携有EGFR适体的RNA四面体之后,生物分布实验的结果。图5D显示异种移植小鼠模型中具有EGFR适体的四面体纳米颗粒的生物分布的结果。使用PBS盐水和无EGFR适体的四面体处理的小鼠用作对照。

[0020] 图6A-6B证明三角形纳米棱柱设计和3D模型结构。图6A显示由两个平面等边RNA三角形建造三角形纳米棱柱的实施方式。所述三角形棱柱纳米结构通过各三角形的柔性21nt ssRNA“臂”的杂交形成。全部的棱柱状结构含有pRNA 3WJ结构构件的保留的几何学。图6B显示三角形纳米棱柱的计算机模型结构,显示其在3D空间中的平均尺寸。

[0021] 图7A-7E证明RNA三角形纳米棱柱自组装和表征。图7A证实RNA三角形纳米棱柱复合体的组装效率,由6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)评估。在1×TMS缓冲液中使用一锅组装法进行8个RNA链(各0.5μM)至最终复合体的逐步缔合。图7B展示了典型动力学光散射(DLS)数据,其证实棱柱的平均流体动力学直径。图7C显示空气中获取的三角形纳米棱柱(5nM)的代表性AFM图像。图7D显示大(10nm)三角形RNA棱柱的代表性冷冻EM图像。各白色框指示各RNA复合体。如通过冷冻EM观察到的RNA纳米棱柱的类平均。2.5nm分辨率的重建的三维纳米棱柱。图7E显示小(5nm)三角形RNA棱柱的代表性冷冻EM图像。各白色框指示各RNA复合体。如通过冷冻EM观察到的RNA纳米棱柱的类平均。2.2nm分辨率的重建的三维纳米棱柱。

[0022] 图8A-8E展示RNA MGA封装以及荧光实验的结果。图8A显示用于RNA MGA封装的示意性设计方法的实施方式。所述RNA MGA序列被包埋在D和d'链的3'末端。杂交后,MGA折叠

成天然构象。图8B显示核糖核酸酶 (RNase) T1保护实验的示意图,证实核糖核酸酶T1和纳米棱柱的相对尺寸。图8F显示证实相同的RNA复合体在溶液中的荧光性质的图表。图8C显示三角形棱柱在非变性6%PAGE上的组装效率和相对移动。较小的RNA棱柱相对于常规棱柱迁移得更快,并且发射荧光信号,表明功能RNA复合体的适当折叠。泳道“L”是100bp DNA分子量标准(Thermo Scientific)。图8D证明在存在和不存在(对照) 500U核糖核酸酶T1情况下, 0.1 μ M RNA MGA适体的时间依赖荧光发射谱。图8E展示了在1小时核糖核酸酶T1处理之后,三角形棱柱的剩余荧光信号。图8F显示图表,所述图表能够证实在图8B中证实的复合体的荧光性质

[0023] 图9A-9B证明纳米棱柱在胎牛血清中的调节降解谱。图9A显示在组装中使用不同百分比的2'-F修饰的嘧啶的纳米棱柱的代表性凝胶图。在2%FBS溶液孵育200nM浓度的纳米棱柱,并且以3%琼脂糖凝胶分析。图9B证明相对于时间绘制的棱柱相关凝胶带强度。对各纳米棱柱,将各带的强度与零时间点比较。

[0024] 图10A-10B展示评估RNA三角形棱柱运载功能性部分的结果。图10A显示与用作为靶模块的5'-叶酸装饰的RNA纳米棱柱孵育的KB细胞的代表性共聚焦显微图像。图10B展示经由每纳米颗粒携有不同数目的CpG-ODN的RNA纳米棱柱的TNF- α 细胞因子诱导。使用巨噬细胞样的RAW264.7细胞进行的实验显示细胞因子随每纳米载体CpG有效载荷的数目而增多。通过三次独立实验获得的误差棒。

[0025] 图11A-11D展示用于靶向递送治疗剂至肿瘤的3D RNA纳米笼的构建。图11A展示所开发的调整多边形内角从60°→90°→108°的方法。图11B证实改变RNA正方形尺寸的简单方法。图11C-11D证实已构建的多种RNA纳米笼;插图(左侧)和AFM图像(右侧)。

[0026] 图12A-12B显示(图12A) pRNA-3WJ_EGFR-适体纳米颗粒的结构和(图12B)显示特定结合和进入A549肺癌细胞的一组共聚焦图像。a3WJ/EGFR适体(SEQ ID NO:6);b3WJ(SEQ ID NO:7);c3WJ(SEQ ID NO:8)。

[0027] 图13A-13B显示(图13A) 二价pRNA-3WJ_CD133-适体纳米颗粒的结构和(图13B)显示特定结合和进入乳腺癌干细胞的一组共聚焦图像。a3WJ/CD133适体(SEQ ID NO:9);b3WJ/CD133适体(SEQ ID NO:10);c3WJ(SEQ ID NO:8)。

[0028] 图14A-14F展示了能够光控释放货物(cargo)的RNA纳米笼的设计和表征。图14A显示由三条链构成的pRNA的3WJ的结晶结构。图14B显示棱锥形RNA纳米笼的三维结构,其在底部具有四个3WJ和在顶部具有一个四向连接。图14C显示代表性非变性PAGE组装凝胶,显示RNA棱锥的逐步组装。图14D显示特征为TGGE的RNA棱锥纳米颗粒的熔解温度曲线。图14E证明由动态光散射(DLS)测定的RNA五面体的尺寸。图14F证明RNA棱锥的Zeta电位。

[0029] 图15A-15C展示了RNA棱锥的冷冻EM分析的结果。图15A显示了原始冷冻EM(低温电子显微镜)图像。白色框指示各RNA棱锥。图15B展示了各原始颗粒与类似取向的3D模型的计算机生成的二维投影之间的比较。图15C显示从冷冻EM图像重构的五面体模型的四个视图。

[0030] 图16显示了展示RNA链上光控释放Cy5的一组图像。左图中,与Cy5缀合、无光可切割间隔区的RNA链在UV辐射下不显示释放Cy5,而右图中其具有光可切割间隔区的对应物显示在5min内快速释放Cy5。

[0031] 图17显示了一组图像,展示了RNA纳米笼上的光控释放Cy5。

[0032] 图18A和18B显示凝胶图像,展示了具有或不具有光可切割(PC)间隔区、与紫杉醇

或Cy5缀合的RNA纳米笼的建造。

[0033] 图19A显示代表性凝胶图像,展示了能够光控释放货物的RNA纳米笼的血清稳定性(图19)。

[0034] 图20A-20B能够展示了各种DNA-药物缀合物被RNA 3D纳米笼的封装。图20A示意性说明DNA-药物的封装机制,显示寡核苷酸-药物缀合物在三角形棱柱的内腔中的杂交。图20B显示代表性凝胶的图像,展示了DNA-药物封装复合物的非变性PAGE分析的结果。底部图显示使用Cy5通道扫描的凝胶,并且展示了来自DNA-缀合Cy5的阳性信号。泳道“L”是DNA分子量标准(Thermo Scientific GeneRuler Low Range)。图20C显示在非变性6%PAGE上进行的电迁移分析和荧光定位试验的代表性结果。泳道1上的最终封装复合物是通过在饱和量的Cy3-链霉亲和素存在下孵育封装的Cy5-DNA-生物素获得的。泳道“L”对应于DNA分子量标准(Thermo Scientific 0' GeneRuler 1kb)。

[0035] 图21A-21C显示(图21A) 8nm四面体的冷冻EM原始图,(图21B) 8nm四面体的无参照2D类平均,以及(图21C) 0.143傅里叶壳相关(Fourier shell correlation)。

[0036] 图22A-22C能够证明2' 修饰RNA纳米笼的血清稳定性。对于(图22A) 2' -F RNA四面体和(图22B) 非修饰RNA四面体,在10%FBS中分析血清稳定性。图22C显示的图表显示了使用Image J软件对图22A-22B的完整颗粒的定量。

[0037] 图23显示每边55bp的较大RNA四面体的2D序列。链1(SEQ ID NO:11);链2(SEQ ID NO:12);链3(SEQ ID NO:13);链4(SEQ ID NO:14)。

[0038] 图24A-24C显示(图24A) 原始17nm四面体的无参照2D类平均,(图24B) 0.143傅里叶壳相关,以及(图24C) 3D结构的倾斜对验证。

[0039] 图25显示证实来自7%非变性PAGE分析的结果的一组图像,所述结果针对结合、洗涤和从STV柱洗脱之后、有或无(w/o)链霉亲和素适体的多功能RNA四面体,通过溴化乙锭(EB)染色、Spinach适体荧光(spinach染色)和MG适体荧光(MG染色)可视化。

[0040] 图26显示携有荧光素酶siRNA的RNA四面体的2D序列。链1(SEQ ID NO:15);链2(SEQ ID NO:16);链3(SEQ ID NO:17);链4(SEQ ID NO:18);Luc siRNA反义(SEQ ID NO:19)。

[0041] 图27显示携有EGFR适体和Alexa647荧光探针的RNA四面体的2D序列。链1(SEQ ID NO:20);链2(SEQ ID NO:21);链3(SEQ ID NO:22);链4(SEQ ID NO:23);Alexa 647(SEQ ID NO:24)。

[0042] 图28显示的表格展示了使用17nm RNA四面体的最终3D模型的针对倾斜对图像计算的倾斜几何。

[0043] 图30显示可被并入本文所述的RNA纳米笼中的各种功能模块的RNA序列。

具体实施方式

[0044] 参照以下详细说明、附图和本文所包括的实施例能够更容易地理解本公开的主题。

[0045] 在更详细说明本公开之前,应理解该公开不限于所述的特定实施方式,并且因此当然可变化。应理解本文所使用的术语仅用于描述特定实施方式的目的,并且不意图限制。

[0046] 在提供值的范围的情况下,应理解该范围的上限和下限之间的每一个中间值,至

所述下限的单位的十分之一(除非上下文清楚表明其他情况),以及在所述范围内的任何其他所陈述的值或中间值,涵盖于本公开。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在所述较小范围内,并且也涵盖于本公开,受所述范围内的任何特别排除的限制。在所述范围包括一个或两个限值的情况下,排除那些包括的限值之一或两者的范围也包括在本公开中。

[0047] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的任何方法和材料也可用于本公开的实践或测试,但现在描述优选的方法和材料。

[0048] 本说明书中所引用的所有出版物和专利被引用来公开和描述与所引用的出版物相关的方法和/或材料。所有这些出版物和专利均通过引用并入本文,如同每个单独的出版物或专利被具体和单独地指出通过引用并入。这种通过引用的并入明确地限于所引用的出版物和专利中描述的方法和/或材料,并且不扩展到所引用的出版物和专利中的任何词典定义。在本申请中没有明确重复的所引用出版物和专利中的任何词典定义不应被视为这样,并且不应理解为定义所附权利要求中出现的任何术语。任何出版物的引用均针对申请日之前的公开内容,并且不应被解释为承认本公开无权凭借在先公开而先于此类出版物。此外,所提供的公开日期可能与实际公开日期不同,实际公开日期可能需要独立确认。如本领域技术人员在阅读本公开后将显而易见的是,本文描述和阐明的每个单独实施方式具有离散的组份和特征,其可以与任何其他几个实施方式的特征容易地分离或组合,而不脱离本公开的范围或精神。任何列举的方法可以所列举的事件的顺序或以逻辑上可能的任何其他顺序进行。

[0049] 应当理解,所公开的方法和系统不限于所描述的特定方法,方案和系统,因为这些可以变化。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不意图限制本发明的范围,本发明的范围仅受所附权利要求的限制。

[0050] 定义

[0051] 除非另有明确说明,否则决不意图将本文所述的任何方法或方面解释为要求以特定顺序执行其步骤。因此,当在权利要求书或说明书中,方法权利要求没有具体陈述将步骤限于特定顺序的情况下,在任何方面都不意图推断该顺序。这适用于针对解释的任何可能的非表达的基础,包括关于步骤或操作流程的安排的逻辑问题,从语法组织或标点符号导出的普通含义,或说明书中描述的方面的数量或类型。

[0052] 如说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式“a/an(一)”和“所述”包括复数指代,除非上下文明确指定其他。

[0053] 本文使用的词语“或”表示特定列表中的任何一个成员,并且还可以包括该列表的成员的任意组合。

[0054] 范围在本文中 can 表示为从“约”一个特定值,和/或到“约”另一个特定值。当表达这样的范围时,进一步的方面包括从一个特定值和/或到另一个特定值。类似地,当通过使用先行词“约”将值表示为近似值时,将理解特定值形成进一步的方面。将进一步理解,每个范围的端点相对于另一个端点都是重要的,并且独立于另一个端点。还应理解,本文公开了许多值,并且除了值本身之外,每个值在本文中也公开为“约”该特定值。例如,如果公开了值“10”,则还公开了“约10”。还应理解,还公开了两个特定单位之间的每个单位。例如,如果公开了10和15,则还公开了11、12、13和14。

[0055] 如本文所用,术语“任选的”或“任选地”是指随后描述的事件或情况可以发生或可以不发生,并且该描述包括所述事件或情况发生的实例和不发生的实例。

[0056] 如本文所用,术语“转化”和“转染”是指将核酸(例如表达载体)引入至受体细胞,包括将核酸引入所述细胞的染色体DNA。本领域熟悉用于实现将核酸引入受体细胞的各种组合物、方法、技术等。本领域熟悉用于真核细胞和原核细胞二者的这些组合物、方法、技术等。本领域熟悉用于优化将核酸引入受体细胞和优化核酸在细胞内表达的这样的组合物、方法、技术等。

[0057] 如本文所用,术语“受试者”是指施用的目标,例如动物。因此,本文公开方法的主题可以是脊椎动物,例如哺乳动物、鱼、鸟、爬行动物或两栖动物。或者,本文公开方法的主题可以是人、非人灵长类动物、马、猪、兔、狗、绵羊、山羊、牛、猫、豚鼠或啮齿动物。该术语不表示特定年龄或性别。因此,旨在涵盖成人和新生儿受试者以及胎儿,无论是男性还是女性。在一个方面,受试者是患者。患者是指患有疾病或病症的受试者,所述疾病或病症例如癌症和/或异常的细胞生长。术语“患者”包括人和兽医受试者。在一个方面,受试者已被诊断出需要治疗癌症和/或异常的细胞生长。

[0058] 本文所用的术语“治疗(treating或treatment)”、“疗法”和“治疗性处理”是指治愈性疗法、预防性治疗或防止性治疗。如本文所用,该术语是指旨在治愈、改善、稳定或预防疾病、病理状况或病症(例如癌症或肿瘤)的受试者或患者的医学管理。该术语包括积极治疗,即专门针对疾病、病理状况或病症的改善的治疗,并且还包括病因治疗,即针对消除相关疾病、病理状况或病症的原因的治疗。此外,该术语包括姑息治疗,即旨在缓解症状而不是治愈疾病、病理状况或病症的治疗;预防性治疗,即旨在最小化或者部分或完全抑制相关疾病、病理状况或病症发展的治疗;和支持性治疗,即用于补充旨在改善相关疾病、病理状况或病症的另一种特定疗法的治疗。在各个方面,该术语涵盖包括哺乳动物(例如人)的受试者的任何治疗,并且包括:(i)防止疾病发生在可易患该疾病但尚未被诊断患该疾病的受试者中;(ii)抑制疾病,即阻止其发展;或(iii)减轻疾病,即引起疾病消退。在一个方面,所述疾病、病理状况或病症是癌症,例如乳腺癌、肺癌、结肠直肠癌、肝癌或胰腺癌。在一个方面,癌症可以是本领域已知的任何癌症。

[0059] 如本文所使用,术语“防止”或“预防”是指排除、避免、消除、阻止、停止或阻碍某些事情发生,特别是通过提前行动。应当理解,当本文使用降低、抑制或防止时,除非明确说明其他情况,否则也明确公开了其他两个词的使用。例如,在一个方面,预防可以指防止癌细胞的复制或防止癌细胞的转移。

[0060] 如本文所用,术语“诊断的”意指已经由技术人员(例如,医师或研究人员)进行身体检查,并且发现其具有可通过本文公开的组合物或方法诊断或治疗的病症。例如,“被诊断患有癌症”意指已经由技术人员(例如,医生或研究人员)进行身体检查,并且发现其具有可以通过减轻或改善癌症和/或异常细胞生长的化合物或组合物来诊断或治疗的病症。

[0061] 如本文所用,术语“施用(administering和administration)”是指向受试者提供组合物的任何方法。这些方法是本领域技术人员公知的,包括但不限于心内给药、口服给药、透皮给药、吸入给药、鼻腔给药、局部给药、阴道内给药、眼科给药、耳内给药、脑内给药、直肠给药、舌下给药、口腔给药和肠胃外给药,包括可注射给药,例如静脉内给药、动脉内给药、肌肉内给药和皮下给药。给药可以是连续的或间歇的。在各个方面,可以治疗性地施用

制剂;即施用以治疗现有疾病或病症。在进一步的各个方面,可以预防性地施用制剂;即,施用用于预防疾病或病症。

[0062] 如本文所用的术语“接触”是指将公开的组合物或肽或药物制剂以及细胞、靶受体或其他生物实体以使得所述化合物可以影响靶标(例如受体、转录因子、细胞等)活性的方式结合,所述影响或者是直接的;即,通过与目标本身相互作用,或者是间接的;即,通过与靶标活性所依赖的另一分子、辅因子、因子或蛋白质相互作用。

[0063] 如本文所用,术语“确定/测定(determining)”可以指测量或查明表达和/或活性水平的数量或量或变化。

[0064] 如本文所用,术语“有效量”和“有效的量”是指足以实现所需结果或对不希望的病症产生影响的量。例如,在一个方面,有效量的聚合纳米颗粒是杀死和/或抑制细胞生长而不对周围的非癌细胞造成外来损伤的量。例如,“治疗有效量”是指足以实现所需治疗结果或对不希望的病症产生影响的量,但通常不足以引起不良副作用。针对任何特定患者的特定治疗有效剂量水平将取决于多种因素,包括所治疗的病症和所述病症的严重程度;所用的具体组合物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;施用时间;施用途径;所用特定化合物的排泄率;治疗的持续时间;与所用特定化合物组合或一致使用的药物和医学领域熟知的类似因素。

[0065] “调节”意味着通过增加或减少来改变。如本文所用,“调节剂”可以指可以增加或降低基因或基因产物(例如肽)的表达水平或活性水平的组合物。表达或活性的调节不必是完全的。例如,与其中基因或基因产物的表达或活性尚未被组合物调节的对照细胞相比,表达或活性可以调节约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、100%或之间的任何百分比。

[0066] 术语“药学上可接受的”描述了一种不是在生物学上或以其他方式不期望的材料,即,不引起不可接受水平的不希望的生物学效应或不以有害的方式相互作用。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”是指无菌水性或非水性溶液、分散体、悬浮液或乳液,以及用于在使用前即刻重建成无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。合适的水性和非水性载体(carrier)、稀释剂、溶剂或运载体(vehicle)的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、羧甲基纤维素及其合适的混合物、植物油(例如橄榄油)和可注射的有机酯例如油酸乙酯。例如,通过使用诸如卵磷脂的包衣材料、在分散体的情况下通过保持所需的粒度和通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。这些组合物还可含有佐剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等可以确保防止微生物的作用。还可能包括等渗剂,例如糖、氯化钠等。通过包含延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶,可以实现可注射药物形式的延长吸收。通过在可生物降解的聚合物例如聚丙交酯-聚乙交酯、聚(原酸酯)和聚(酸酐)中形成药物的微囊基质来制备可注射的储库形式。取决于药物与聚合物的比例和所用特定聚合物的性质,可以控制药物释放速率。还通过将药物包埋在与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备储库可注射制剂。可注射制剂可以灭菌,例如,通过细菌截留过滤器过滤或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂,其可以在使用前即刻溶解或分散在无菌水或其它无菌可注射介质中。合适的惰性载体可包括糖,例如乳糖。理想地,至少95%重量的活性成分颗粒具有范围为0.01至10微米的有效粒径。

[0067] 如本文所用,术语“癌症”是指由对正常生长控制失去敏感性的细胞增殖引起或表征的增殖性病症或疾病。术语“癌症”包括肿瘤和任何其他增殖性疾病。相同组织类型的癌症起源于相同的组织,并且可以基于它们的生物学特征分成不同的亚型。癌症包括但不限于黑素瘤、白血病、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、淋巴瘤、胶质瘤、霍奇金淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病。癌症还包括但不限于脑、骨、胰腺、肺、肝、乳腺、甲状腺、卵巢、子宫、睾丸、垂体、肾、胃、食道、肛门和直肠的癌症。

[0068] 如本文所用,术语“抗癌”或“抗肿瘤”药是指可用于治疗癌症和/或异常细胞生长的一种或多种药。抗癌药或抗肿瘤药的实例包括但不限于以下:阿西维辛;阿柔比星;盐酸阿考达唑;阿克罗宁(AcrQnine);阿多来新;阿地白介素(Aldesleukin)药物;六甲蜜胺;安波霉素;醋酸双羟胺蒽醌(Ametantrone Acetate);氨鲁米特;安吖啶;阿那曲唑;安曲霉素(Anthramycin);天冬酰胺酶;曲林霉素;阿扎胞苷;阿扎替派(Azetepa);阿佐霉素(Azotomycin);巴马司他;苯佐替派;比卡鲁胺;盐酸比生群;二甲磺酸双奈法德;比折来新(Bizelesin);博来霉素硫酸盐;布喹那钠;溴匹立明;白消安;放线菌素;卡普唑酮;卡醋胺;卡贝替姆;卡铂;卡莫司汀;盐酸卡柔比星;卡折来新;西地芬戈;苯丁酸氮芥;西罗霉素;顺铂;克拉屈滨;甲磺酸克立那托;环磷酰胺;阿糖胞苷;达卡巴嗪;更生霉素;盐酸柔红霉素;地西他滨;右奥马铂;地扎胍宁;甲磺酸地扎胍宁;地吖醌;多西他赛;多柔比星;盐酸多柔比星;屈洛昔芬;柠檬酸屈洛昔芬;丙酸屈他雄酮;达佐霉素;依达曲沙;盐酸依氟鸟氨酸;依沙芦星;恩洛铂;恩普氨酯;依匹哌啶;盐酸表柔比星;厄布洛唑;盐酸依索比星;雌莫司汀;雌莫司汀磷酸钠;依他硝唑;乙碘油I 131;依托泊苷;依托泊苷磷酸盐;氯苯乙嘧啶;盐酸法徕唑;法扎拉滨;芬维A胺;氟尿苷;磷酸氟达拉滨;氟尿嘧啶;氟西他滨;磷唑酮;福司曲星钠;吉西他滨;盐酸吉西他滨;金Au 198;羟基脲;盐酸伊达比星;异环磷酰胺;伊莫福新;干扰素 α -2a;干扰素 α -2b;干扰素 α -n1;干扰素 α -n3;干扰素 β -I a;干扰素 γ -I b;异丙铂;盐酸伊立替康;醋酸兰瑞肽;来曲唑;醋酸亮丙瑞林;盐酸利阿唑;洛美曲索钠;洛莫司汀;盐酸洛索蒽醌;马索罗酚;美登素;盐酸氮芥;醋酸甲地孕酮;醋酸美伦孕酮;美法仑;美诺立尔;巯嘌呤;甲氨蝶呤;甲氨蝶呤钠;氯苯氨啶;美妥替哌;米丁度胺;米托克星;丝裂红素(Mitocromin);米托洁林;米托马星;丝裂霉素;米托司培;米托坦;盐酸米托蒽醌;麦考酚酸;诺考达唑;诺加霉素;奥马铂;奥昔舒仑;紫杉醇;培门冬酶;培利霉素;溴新斯的明;硫酸培洛霉素;培磷酰胺;哌泊溴烷;哌泊舒凡;盐酸吡罗蒽醌;普卡霉素;普洛美坦;卟菲尔钠;泊非霉素;泼尼莫司汀;盐酸丙卡巴肼;嘌呤霉素;盐酸嘌呤霉素;吡唑霉素;利波腺苷;罗谷亚胺;沙芬戈(Safmgol);盐酸沙芬戈;司莫司汀;辛曲秦;磷乙酰天冬氨酸钠(Sparfosate Sodium);稀疏霉素;盐酸错螺胺;螺莫司汀;螺铂;链黑菌素;链脲佐菌素;氯化锶Sr 89;磺氯苯脲;他利霉素;紫杉烷(Taxane);紫杉烷(Taxoid);替可加兰钠;替加氟;盐酸替洛蒽醌;替莫泊芬;替尼泊苷;替罗昔隆;睾内酯;硫咪嘌呤;硫鸟嘌呤;噻替派;噻唑呋林;拉扎明;盐酸托泊替康;柠檬酸托瑞米芬;醋酸曲托龙;磷酸曲西瑞宾;三甲曲沙;葡萄糖醛酸三甲曲沙;曲普瑞林;盐酸妥布氯唑;尿嘧啶氮芥(Uracil Mustard);乌瑞替哌;伐普肽;维替泊芬;硫酸长春碱;硫酸长春新碱;长春地辛;硫酸长春地辛;硫酸长春匹定;硫酸长春甘酯;硫酸长春罗新;酒石酸长春瑞滨;硫酸长春罗定;硫酸长春利定;伏氯唑;折尼铂;净司他丁;盐酸佐柔比星。

[0069] 其他抗肿瘤化合物包括:20-epi-1,25二羟基维生素D3;5-乙炔基尿嘧啶;阿比特

龙;阿柔比星;酰基富烯;腺环戊醇;阿多来新;阿地白介素;ALL-TK拮抗剂;六甲蜜胺;氨莫司汀;2,4-二氯苯氧乙酸;氨磷汀;氨基乙酰丙酸;氨柔比星;阿托沙克碱(atrsacrine);阿那格雷;阿那曲唑;穿心莲内酯;血管生成抑制剂;拮抗剂D;拮抗剂G;安雷利克斯(antarelix);抗背部化形态发生蛋白-1;抗雄激素,前列腺癌;抗雌激素;抗瘤酮;反义寡核苷酸;甘氨酸阿非迪霉素;凋亡基因调节剂;细胞凋亡调节剂;脱嘌呤核酸;ara-CDP-DL-PTBA;精氨酸脱氨酶;苯胺丫啶(asulacrine);阿他美坦;阿莫司汀;阿西他汀(axinastatin)1;阿西他汀2;阿西他汀3;阿扎司琼;阿扎毒素(azatoxin);氮杂酪氨酸;浆果赤霉素III衍生物;巴兰醇(balanol);巴马司他;BCR/ABL拮抗剂;苯佐他明(benzochlorin);苯甲酰十字孢碱; β -内酰胺衍生物; β -阿立辛(β -alethine); β 克拉霉素B;桦木酸;bFGF抑制剂;比卡鲁胺;比生群;二吡丙啶基精胺(bisaziridinylspermine);双奈法德;bistratene A;比折来新;布来福林(breflate);溴匹立明;布度钛;丁硫氨酸亚砷胺;卡泊三醇;卡弗他丁C;喜树碱衍生物;金丝雀痘IL-2;卡培他滨;甲酰胺-氨基-三唑;羧胺三唑;CaRest M3;CARN 700;软骨衍生抑制剂;卡折来新;酪蛋白激酶抑制剂(ICOS);栗精胺;杀菌肽B;西曲瑞克;二氢卟吩;氯喹啉磺酰胺;西卡前列素;顺式卟啉;克拉屈滨;氯米芬类似物;克霉唑;克里霉素A(collismycin A);克里霉素B(collismycinB);康普瑞汀A4;康普瑞汀类似物;克纳宁(conagenin);科莱贝司丁(crambescidin)816;克雷斯托;念珠藻素8;念珠藻素A衍生物;库拉素(curacin)A;环戊萜醌;环铂(cycloplatam);赛普霉素(Cypemycin);阿糖胞苷烷磷酸酯;细胞溶解因子;磷酸己烷雌酚(cytostatin);达昔单抗;地西他滨;脱氢膜海鞘素B;德舍瑞林;dexifosfamide;右丙亚胺;右维拉帕米;亚丝醌;膜海鞘素B;乙酰唑胺(didox);二乙基去甲精胺(diethylnorspermine);二氢-5-氮杂胞苷;二氢紫杉酚,9-;dioxamycin;二苯基螺莫司汀;二十二烷醇;多拉司琼;脱氧氟尿苷;屈洛昔芬;屈大麻酚;多卡霉素SA(duocannycin SA);依布硒啉;依考莫司汀;依地福新;依决洛单抗;依氟鸟氨酸;榄香烯;乙嘧替氟;表柔比星;爱普列特;雌莫司汀类似物;雌激素激动剂;雌激素拮抗剂;依他硝唑;依托泊苷磷酸盐;依西美坦;法倔唑;法扎拉滨;芬维A;非格司亭;非那甾胺;夫拉平度;氟卓斯汀;氟拉斯通(fluasterone);氟达拉滨;氟代道诺霉素盐酸盐;福酚美克;福美坦;福司曲星;福莫司汀;莫特沙芬钆;硝酸镓;加洛他滨;加尼瑞克;明胶酶抑制剂;吉西他滨;谷胱甘肽抑制剂;庚二醇二氨基磺酸酯(hepsulfam);调蛋白(heregulin);六亚甲基二乙酰胺;金丝桃素;伊班膦酸;伊达比星;艾多昔芬;伊决孟酮;伊莫福新;伊洛马司他;咪唑并吡啶酮(imidazoacridone);咪喹莫特;免疫刺激肽;胰岛素样生长因子-1受体抑制剂;干扰素激动剂;干扰素;白细胞介素;碘苄胍;碘阿霉素;甘薯黑斑霉醇,4-;伊立替康;伊罗普拉;伊索拉定;异本加唑(isobengazole);异高分泌素B(isohomohalicondrin B);伊他司琼;jasplakinolide;卡哈拉立得F(kahalalide F);片螺素-N-三乙酸酯;兰瑞肽;雷拉霉素(leinamycin);来格司亭;香菇多糖硫酸盐;立托斯坦汀(leptolstatin);来曲唑;白血病抑制因子;白细胞 α 干扰素;亮丙瑞林+雌激素+孕酮;亮丙瑞林;左旋咪唑;利阿唑;线性多胺类似物;亲脂性二糖肽;亲脂性铂化合物;立索克林酰胺7(lissoclinamide);洛铂;蚯蚓磷脂;洛美曲索;氯尼达明;洛索萜醌;洛伐他汀;洛索立宾;勒托替康;德卟啉钆(lutetium texaphyrin);利索茶碱(lysofylline);裂解肽;美坦辛;甘露他汀A(mannostatin A);马马司他;马索罗酚;乳腺丝抑蛋白(maspin);基质溶解素抑制剂;基质金属蛋白酶抑制剂;美诺立尔;美巴龙;美替瑞林(meterelin);蛋氨酸酶;胃复安;MIF抑制剂;米非司酮;米替福新;

米立司亭;错配的双链RNA;米托胍脲;二溴卫矛醇;丝裂霉素类似物;米托蒽胺;丝裂霉素成纤维细胞生长因子-皂草素;米托蒽醌;莫法罗汀;莫拉司亭;单克隆抗体,人绒毛膜促性腺激素;单磷酸脂质A+分枝杆菌细胞壁sk;莫哌达醇;多重耐药精灵(genie)抑制剂;基于多肿瘤抑制基因1的治疗;芥末抗癌剂;印度洋海绵B(mycaperoxide B);分枝杆菌细胞壁提取物;美拉普龙(myriaporone);N-乙酰基地那林;N-取代苯甲酰胺;那法瑞林;那瑞替喷(nagrestip);纳洛酮+喷他佐辛;那帕维恩(napavin);萘萘二醇;那托司亭;奈达铂;奈莫柔比星;奈立膦酸;中性内肽酶;尼鲁米特;尼莎霉素(nisamycin);一氧化氮调节剂;硝基氧抗氧化剂;尼图仑(nitrullyn);06-苄基鸟嘌呤;奥曲肽;冲蒽酮(okicenone);寡核苷酸;奥那司酮;昂丹司琼;昂丹司琼;oracin;口服细胞因子诱导剂;奥马铂;奥沙特隆;奥沙利铂;奥克斯霉素(oxaunomycin);紫杉醇类似物;紫杉醇衍生物;帕拉胺(palauamine);棕榈酰基根霉;帕米膦酸;人参炔三醇;帕诺米芬;副细菌素(parabactin);帕折普汀;培门冬酶;培得星(peldesine);戊聚糖多硫酸钠;喷司他丁;泮托拉唑(pentrozole);全氟溴烷;培磷酰胺;紫苏醇;吩嗪霉素(phenazinomycin);苯乙酸;磷酸酶抑制剂;溶链菌制剂;盐酸毛果芸香碱;吡柔比星;吡曲克辛;placetin A;placetin B;纤溶酶原激活物抑制剂;铂金复合物;铂化合物;铂-三胺络合物;吡吩姆钠;泊非霉素;丙基双吡啶酮;前列腺素J2;蛋白酶体抑制剂;基于蛋白A的免疫调节剂;蛋白激酶C抑制剂;蛋白激酶C抑制剂,微藻;蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂;嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂;红紫素;甲氧基吡唑啉吡啶;吡哆醛基化血红蛋白聚氧乙炔共轭物(pyridoxylated hemoglobin polyoxyethylene conjugate);raf拮抗剂;雷替曲塞;雷莫司琼;ras法呢基蛋白转移酶抑制剂;ras抑制剂;ras-GAP抑制剂;去甲基化的瑞替普汀;铼Re 186依替膦酸盐;根霉素;核酶;维甲酰胺RII;罗谷亚胺;罗希吐碱;罗莫肽;罗喹美克;鲁必金酮B1(rubiginone B1);如波斯(ruboxyl);沙芬戈;塞恩托品(saintopin);SarCNU;肌肉叶绿醇A;沙格司亭;Sdi 1模拟物;司莫司汀;衰老衍生抑制剂1;有义寡核苷酸;信号转导抑制剂;信号转导调节剂;单链抗原结合蛋白;西佐糖;索布佐生;硼卡钠;苯乙酸钠;索尔醇(solverol);生长调节素结合蛋白;索纳明;斯帕磷酸;斯普卡霉素(spicamycin)D;螺莫司汀;斯耐潘定;海绵素(spongistatin)1;角鲨胺;干细胞抑制剂;干细胞分裂抑制剂;stipiamide;溶基质素抑制剂;硫密斯(sulfmosine);强效舒血管肠肽拮抗剂;suradista;苏拉明;苦马豆素;合成糖胺聚糖;他莫司汀;他莫昔芬甲碘化物;牛磺莫司汀;他扎罗汀;替可加兰钠;替加氟;tellurapyrylium;端粒酶抑制剂;替莫泊芬;替莫唑胺;替尼泊苷;四氯十氧化物;四佐胺(tetrazomine);厚果糖松草碱(thaliblastine);沙利度胺;噻可拉林(thiocoraline);血小板生成素;血小板生成素模拟物;胸腺法新;胸腺生成素受体激动剂;胸腺曲南;促甲状腺激素;锡乙基初紫红素;替拉扎明;二茂钛二氯化物;托泊替康;拓扑森汀(topsentin);托瑞米芬;全能干细胞因子;翻译抑制剂;维甲酸;三乙酰尿苷;曲西立滨;三甲曲沙;曲普瑞林;托烷司琼;妥罗雄脲;酪氨酸激酶抑制剂;酪氨酸磷酸化抑制剂;UBC抑制剂;乌苯美司;泌尿生殖窦源性生长抑制因子;尿激酶受体拮抗剂;伐普肽;瓦立奥林(Variolin)B;载体系统,红细胞基因治疗;维拉雷琐;藜芦胺;韦尔丁斯(verdins);维替泊芬;长春瑞滨;威科萨汀(vinxaltine);vitaxin;伏氯唑;扎诺特隆;折尼铂;亚苄维C;净司他丁斯酯。

[0070] 如本文所用,治疗剂可包括抗癌剂。大多数抗癌剂可分为:烷化剂(例如顺铂、卡铂、奥沙利铂、甲氯乙胺、环磷酰胺、苯丁酸氮芥)、抗代谢药(例如硫唑嘌呤、巯基嘌呤)、葱

环类、植物生物碱和萜类(例如长春花生物碱(例如长春新碱、长春碱、长春瑞滨、长春地辛和鬼臼毒素)和紫杉烷类(例如紫杉醇和多西紫杉醇)、拓扑异构酶抑制剂(例如伊立替康、拓扑替康、安吡啶、依托泊苷、磷酸依托泊苷和替尼泊苷)、单克隆抗体(例如曲妥珠单抗、西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐单抗),其他抗肿瘤药(例如放线菌素D)和激素疗法(例如,类固醇例如地塞米松、非那甾胺、芳香酶抑制剂和促性腺激素释放激素激动剂)。

[0071] 如本文所用,放射增敏剂使癌细胞更可能被损坏。放射增敏剂增强癌细胞和/或肿瘤对电离辐射的敏感性,从而增加放射疗法的功效。放射增敏剂的实例包括吉西他滨、5-氟尿嘧啶、己酮可可碱和长春瑞滨。

[0072] 如本文所用,术语“纳米颗粒”或“纳米笼”是指尺寸在10nm和200nm之间的颗粒。纳米笼可以在10nm和50nm之间、10nm和40nm之间、10nm和30nm之间、10nm和20nm之间、以及10nm和15nm之间。RNA可以从任何来源获得,例如噬菌体phi 29、HIV、果蝇、核糖体或者是合成的RNA。

[0073] 如本文所用,术语“纳米管”意指将纳米颗粒从RNA组装成二维或三维结构。纳米颗粒到纳米管中的组装可以通过自组装过程进行。自组装可以通过RNA的连接、化学缀合、共价连接和非共价相互作用发生,尤其是在RNA多聚体复合物的形成中。

[0074] 如本文所用,关于纳米颗粒或纳米笼的术语“基序”意指双链或单链核糖核酸或其类似物。各基序通过彼此连接而连接在一起成为更大的颗粒。附着可以通过非共价连接发生。

[0075] “自组装”可以指核酸(以及在一些情况下,预先形成的核酸纳米结构(例如,晶体))以序列特异性方式、以预测的方式彼此退火的能力,并且无需外部控制。在一些实施方案中,核酸纳米结构自组装方法包括在单个容器中组合核酸(例如,单链核酸或寡核苷酸)并允许核酸基于序列互补性彼此退火。在一些实施方案中,该退火过程包括将核酸置于升高的温度下,然后逐渐降低温度以有利于序列特异性结合。各种核酸纳米结构或自组装方法是已知的并且描述于本文。

[0076] 如本文所用,“活性剂”或“活性成分”是指组合物的全部或部分作用归因于其的、组合物的一种或多种组分。

[0077] 如本文所用,“抗感染剂”可包括但不限于抗生素、抗菌剂、抗真菌剂、抗病毒剂和抗原虫剂。

[0078] 如本文所用,“对照”是实验中用于比较目的而使用的替代性受试者或样品,并且其被包括以最小化或区分除自变量之外的变量的影响。“对照”可以是阳性或阴性的。

[0079] 如本文所用,“剂量”、“单位剂量”或“用量”是指适宜在受试者中使用的物理上离散的单位,每个单位含有经计算以产生与其施用相关的所需响应的预定量的纳米颗粒组合物或制剂。

[0080] 如本文所用,“免疫调节剂”是指能够调整或调节一种或多种免疫功能或反应的药剂,例如治疗剂。

[0081] 如本文所用,“药学上可接受的载体或赋形剂”是指可用于制备药物制剂的载体或赋形剂,其通常是安全的,无毒的,并且在生物学上或其它方面都不是不合需要的,并且包括对于兽用或人类药用都是可接受的载体或赋形剂。如本说明书和权利要求中使用的“药学上可接受的载体或赋形剂”包括一种和多于一种的这样的载体或赋形剂。

[0082] 如本文可互换使用的,“受试者”、“个体”或“患者”是指脊椎动物,优选哺乳动物,更优选人。哺乳动物包括但不限于鼠类、猿猴、人类、家畜、运动动物和宠物。术语“宠物”包括狗、猫、豚鼠、小鼠、大鼠、兔、雪貂等。术语家畜包括马、绵羊、山羊、鸡、猪、牛、驴、美洲驼、羊驼、火鸡等。

[0083] 如本文所用,“适体”可以指可以与包括蛋白质的预选靶标以高亲和力和特异性结合的单链DNA或RNA分子。它们的特异性和特征不是由它们的一级序列直接决定,而是由它们的三级结构决定。

[0084] 如本文所用,“附着的”、“附着”等可指在两个或更多个分子之间形成共价或非共价结合(例如键)或形成两个或更多个分子的结合。如本文所用,“附着的”、“附着”等可以指两个或更多个分子一起直接缔合而在附着在一起的分子之间没有中间分子,或者指通过一个或多个接头介导的、两个或更多个分子的间接附着在一起。当缔合是非共价时,这可以包括电荷相互作用、亲和相互作用、金属配位、物理吸附、主客体相互作用、疏水相互作用、TT堆积相互作用、氢键相互作用、范德华相互作用、磁相互作用、静电相互作用、偶极-偶极相互作用和/或其组合。在缔合是共价的情况下,这可以包括其中在所涉及的每个分子中的一个或多个原子之间共享一对电子的键。

[0085] 如本文所用,“脱氧核糖核酸(DNA)”和“核糖核酸(RNA)”通常可以指任何多聚核糖核苷酸或多聚脱氧核糖核苷酸,其可以是未修饰的RNA或DNA或修饰的RNA或DNA。RNA可以是tRNA(转移RNA)、snRNA(小核RNA)、rRNA(核糖体RNA)、mRNA(信使RNA)、反义RNA、RNAi(RNA干扰构建体)、siRNA(短干扰RNA)的形式,或核酶的形式。

[0086] 如本文所用,“DNA分子”可包括由DNA制成的核酸/多核苷酸。如本文所用,“表达”可指多核苷酸转录成RNA转录物的过程。在mRNA和其他翻译的RNA种类背景下,“表达”还指转录的RNA随后翻译成肽,多肽或蛋白质的过程或多个过程。适用于确定表达量的技术和方法将容易被本领域普通技术人员所理解,并且包括但不限于转录蛋白的蛋白质印迹、焦磷酸测序、基于聚合酶链反应(PCR)的方法(例如逆转录PCR和定量实时PCR)和基于质谱的分析。

[0087] 如本文所用,“基因”可以指生物体中对应于占据染色体上特定位置并包含针对特征或性状的遗传指令的DNA序列的遗传单位。术语基因可以指受试者基因组的翻译和非翻译区域二者。

[0088] 如本文所用,“同一性”,“与……同一”等可以指两个或更多个核苷酸或多肽序列之间的关系,如通过比较序列所确定的。在本领域中,“同一性”还指核苷酸或多肽之间的序列关联性程度,如通过这些序列的串之间的匹配所确定的。“同一性”可以通过已知方法容易地计算,包括但不限于在以下中所描述的那些:(Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., Ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., Ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., Eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 和 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., Eds., M Stockton Press, New York, 1991; 以及 Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math. 1988, 48:1073. 确定同一性的优选方法被设计成在测试序列之间给出最

大匹配。确定同一性的方法在公开可用的计算机程序中编码。两个序列之间的同一性百分比可以通过使用包括Needelman和Wunsch, (J.Mol.Biol., 1970, 48:443-453,) 的分析软件(例如Genetics Computer Group, Madison Wis.的序列分析软件包)算法(例如NBLAST和XBLAST)确定。除非另有说明, 否则默认参数用于确定本公开内容的多肽的同一性。

[0089] 如本文所用, “免疫调节剂”可以指能够调整或调节一种或多种免疫功能或反应的药剂, 例如治疗剂。

[0090] 如本文所用, “核酸”和“多核苷酸”通常是指至少两个碱-糖-磷酸盐组合的串, 并且尤其指单链和双链DNA、单链区和双链区混合物的DNA、单链和双链RNA、以及单链和双链区混合物的RNA、包含可以是单链的或者更典型地双链的或者单链区和双链区混合物的DNA和RNA的杂合分子。另外, 本文使用的多核苷酸指包含RNA或DNA或RNA和DNA两者的三链区。这些区域中的链可以来自相同分子或来自不同分子。这些区域可包括所有一种或多种分子, 但更典型地仅涉及一些分子的区域。三螺旋区域的分子之一通常是寡核苷酸。“多核苷酸”和“核酸”还包括这种化学地、酶促地或代谢地修饰形式的多核苷酸, 以及病毒和细胞(尤其包括简单和复杂细胞)特有的DNA和RNA的化学形式。例如, 术语多核苷酸包括如上所述的、含有一个或多个修饰碱基的DNA或RNA。因此, 包含不平常碱基的DNA或RNA是如术语在本文中使用的多核苷酸, 所述不平常碱基例如肌苷或修饰的碱基, 例如三苯甲基化碱基, 仅举两个例子。“多核苷酸”和“核酸”还包括PNA(肽核酸)、硫代磷酸酯和天然核酸的磷酸酯骨架的其他变体。天然核酸具有磷酸酯骨架, 人工核酸可含有其他类型的骨架, 但含有相同的碱基。因此, 具有为稳定性或其他原因而修饰的骨架的DNA或RNA是如术语在本文中所意图的“核酸”或“多核苷酸”。如本文所用, “核酸序列”和“寡核苷酸”还包括如上定义的核酸和多核苷酸。

[0091] 讨论

[0092] 公开了用于制备本文公开的组合物组分以及在本文公开的方法中使用的组合物本身。本文公开了这些和其他材料, 并且应当理解, 当公开这些材料的组合、子集、相互作用、组等时, 虽然不明确地公开对这些化合物的各种个体和集体组合和置换的特定引用, 但是每一个都是在本文具体考虑和期望的。例如, 如果公开和讨论了特定化合物并且讨论了可以对包括所讨论化合物的许多分子进行的许多修改, 则具体考虑了化合物的每一个以及每种组合和置换以及可能的修饰, 除非具体相反说明。因此, 如果公开了一类分子A、B和C, 一类分子D、E和F以及组合分子的实例A-D, 那么即使没有单独列举每一个, 每一个却是被单独和共同考虑的, 这意味着认为公开了组合A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E和C-F。同样, 还公开了这些的任何子集或组合。因此, 例如, 认为公开了A-E、B-F和C-E的子组。该理念适用于本申请的所有方面, 包括但不限于制备和使用本文公开的组合物方法中的步骤。因此, 如果存在可以实施的多种额外步骤, 则应理解, 这些额外步骤中的每一个都可以利用本文公开的方法的任何特定实施方案或实施方案的组合来进行。

[0093] 如本文所用, “分子量”通常可指材料的质量或平均质量。如果是聚合物或低聚物, 则分子量可以指本体聚合物的相对平均链长或相对链质量。在实践中, 聚合物和低聚物的分子量可以以各种方式估计或表征, 包括凝胶渗透色谱法(GPC)或毛细管粘度测定法。GPC分子量报告为重均分子量(Mw), 而不是数均分子量(Mn)。毛细管粘度测定法提供分子量的估计值, 作为从使用特定浓度、温度和溶剂条件的稀释聚合物溶液测定的固有粘度。

[0094] 本文任何地方提及的所有专利、专利申请和其他科学或技术著作均通过引用整体并入。所公开的主题可以在没有本文未具体公开的任何要素、限制的情况下实施。因此,例如,在本文的每种情况下,任何术语“包含/包括”,“基本上由.....组成”和“由...组成”可以用其他两个术语中的任一个替换,同时保留它们的普通含义。已经使用的术语和表达用作描述的术语而非限制,并且无意使用这些术语和表达来排除所示和所描述的特征的任何等同物或其部分,而是认识到在所要求保护的本发明的范围内可以进行各种修改。因此,应该理解,尽管已经通过实施方式具体公开了本发明,但是本领域技术人员可以采用本文公开的任选特征、修改和变化,并且这些修改和变化被认为是在由说明书和所附权利要求限定的本发明的范围内。

[0095] RNA纳米技术已逐步应用于通过模块化的构建块的自组装生成一维和二维结构。然而,1D和2D结构具有有限的用作货物递送化合物的能力。虽然已经产生了基于3D RNA的结构,但是重大挑战限制了它们的发展,由此目前没有一种抗降解,具有精确控制的形状,可以有效地包封货物分子,并且可以提供可调和受控的货物化合物输送。

[0096] 考虑到当前RNA纳米技术的缺陷,本文提供了RNA纳米笼,其是可以由RNA组成的三维(3D)结构,并且可以配置成包封货物化合物。RNA纳米笼可进一步包含功能部分。本文还提供了药物制剂,其可含有一种或多种本文提供的RNA纳米笼。本文还提供了使用RNA纳米笼及其药物制剂的方法。研究以下附图、详细说明和实施例后,本公开的其他组合物、化合物、方法、特征和优点对于本领域普通技术人员将是或将变得显而易见。旨在将所有这些另外的组合物、化合物、方法、特征和优点包括在本说明书中,并且包括在本公开的范围之内。

[0097] RNA纳米笼

[0098] RNA纳米笼

[0099] 本文提供三维核糖核酸纳米结构(本文中也称为RNA纳米笼),其是由多条RNA链(例如多核糖核苷酸)组成的3D结构。RNA纳米笼可以被配置成使得它们从形成RNA纳米笼的RNA链自组装。为了形成RNA纳米结构,每条RNA链可以仅与另一条RNA链互补。互补RNA链彼此特异性结合以形成双链RNA并引起RNA纳米结构自组装。因此,应当理解,RNA链可以是任何期望的序列,只要其被配置为允许特异性自组装为RNA纳米笼。因此,应当理解,本文提供的特定序列是用于举例,并且本领域技术人员鉴于本公开内容将能够使用本领域公知的工具和技术来设计任何所需RNA纳米笼的特定多核苷酸序列。这在本文其他地方更详细地讨论。RNA纳米结构可以包含一个或多个pRNA三向连接(3WJ)以连接RNA链并提供稳定的RNA纳米结构。在一些实施方案中,每条RNA链与至少一个pRNA 3WJ连接。RNA纳米笼的确切大小是RNA链和3WJ的大小的函数。在一些实施方案中,所有RNA链具有相同的长度。在一些实施方案中,形成RNA纳米笼的至少两条RNA链彼此具有不同的长度(具有不同数量的核糖核苷酸)。每条RNA链中核糖核苷酸的数量可以为约5个核糖核苷酸至约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000或更多以及它们之间的任何整数。

[0100] 可以沿x轴、y轴和z轴测量RNA纳米笼。RNA纳米笼可具有高度,宽度和长度。在一些方面,RNA纳米笼的最大尺寸(高度,宽度,长度,直径等,视情况而定)可以在约3nm至约100nm、约5nm至约30nm、10nm至约75nm、约10nm至约50nm、约10nm至约40nm、10nm至约30nm、10nm至约20nm、10nm至约15nm的范围。RNA纳米笼的大小(例如最大尺寸)可以使得它能够包

封货物分子并且当施用于受试者时还避免免疫检测。RNA纳米笼可以在高度、长度和/或宽度上是一致的或在高度、宽度和/或宽度上可能不一致。

[0101] 各RNA链的长度、3WJ的数目和链的数目的具体选择可以允许RNA纳米笼的精确设计。特定设计策略在本文其他地方描述。RNA纳米笼可以是任何期望的3D形状。本文特别考虑的是棱镜以及四面体、立方体和十二面体。鉴于本公开和本文提供的实施例，本领域普通技术人员将理解其他3D结构。

[0102] 在一些实施方案中，RNA纳米笼可以由多于一个的二维核酸纳米结构（例如，多于一层的核酸（例如核糖核酸）或多于一个的三维核酸纳米结构（例如，多于一个的“预组装的”核酸纳米结构，其与一个或多个其他“预组装的”核酸纳米结构连接）组装。

[0103] 形成RNA链的核糖核苷酸可以被2'修饰。在一些实施方案中，修饰可以改变RNA链和/或RNA纳米笼的稳定性，改变RNA链和/或RNA纳米笼对酶（例如核糖核酸酶（例如核糖核酸酶I））的敏感性。在一些实施方案中，形成RNA链的一个或多个核糖核苷酸含有2'-氟（2'F）修饰。在该修饰中，2'-氟取代核糖核苷酸中的2'-羟基。在其他实施方案中，RNA链可以是2'OME（2'-O-甲基）、LNA（锁核酸）和/或磷酸（phosphoroliate）修饰的。2'OME修饰是在2'位置被-O-甲基修饰的核糖核苷酸。2'OME修饰可以防止单链核酸内切酶的攻击。LNA，也称为难以接近的RNA，描述了用连接2'氧和4'碳的额外桥修饰的核糖核苷酸。所述桥可以将核糖“锁定”在3'-内构象中。

[0104] 任何核糖核苷酸（A/U/G/C）都可以进行2'修饰。通过改变RNA链中核糖核苷酸的量，可以调节降解曲线并因此调节其中包含和/或包封在其中的任何货物分子的释放。在一些实施方案中，更多的核糖核苷酸被2'修饰，RNA纳米笼的降解越快。在其他实施方案中，2'修饰的核糖核酸越多，RNA纳米笼的降解越慢。修饰是否使RNA纳米笼更耐降解或更易降解将取决于所进行的修饰。RNA纳米笼中2'F修饰的核糖核苷酸越多，RNA纳米笼对核糖核酸酶I降解的抗性越强。

[0105] 在RNA纳米笼中2'修饰的核糖核苷酸的百分比可以在以下范围：0%至约1、2、3、4、5、6、7、8、9、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、50、51、52、53、54、55、56、57、59、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%。

[0106] 复合RNA纳米笼

[0107] 两个或更多个RNA纳米笼可以彼此可操作地连接以形成复合RNA纳米笼。复合RNA纳米笼可以是同源的（例如含有相同类型的RNA纳米笼）或异源的（含有至少两种不同的RNA纳米笼类型）。形成复合RNA纳米笼的RNA纳米笼可以通过接头彼此可操作地连接。接头通常不是核酸纳米结构的组成部分，尽管它们可以通过合适的官能团连接到纳米结构上。将两个或更多个RNA纳米笼连接在一起的能力允许制造更大尺寸（例如微米尺寸）和/或复杂性的结构。根据本公开内容用以将两个或更多个RNA纳米笼可操作地偶联在一起的接头的实例包括但不限于化学交联剂（例如，戊二醛）、生物分子（例如抗生物素蛋白-生物素）和配体官能化的纳米颗粒/部分（例如单链核酸功能化的纳米颗粒）。在一些情况下，接头可涉及点击化学或协调相互作用（Ni²⁺/多组氨酸）。

[0108] 功能性部分

[0109] 如上所述, RNA纳米笼可包括一个或多个功能部分。功能模块可以促进将RNA纳米笼靶向受试者内的特定细胞类型、组织类型、器官或地点。功能部分可以促进货物分子在RNA纳米笼内的包封。功能部分可以促进将货物分子附着在RNA纳米笼内或附着到RNA纳米笼。功能部分可以是适体。功能部分可以是抗体。功能部分可以是可以在细胞内或细胞上表达的受体的配体。功能部分可以是多核苷酸。功能部分可以是RNA分子或DNA分子。功能部分可以直接附着或整合到形成RNA纳米笼的RNA链中。

[0110] 在一些实施方案中, 靶向部分特异性靶向癌细胞。在一些实施方案中, 在一些实施方案中, 靶向部分是EGFR、HER2和/或EP-CAM适体或PSM抗原、或叶酸。在一些实施方案中, 靶向部分是EGFR的配体。在其他实施方案中, 靶向部分靶向血液、肺、肾、脑组织、神经元、肌肉、心脏、肌腱、韧带、肝脏、胰腺或其他特定组织。

[0111] 在一些实施方案中, 功能部分可以是刺激响应性接头, 例如光可切割接头、pH响应性接头、或酶可切割的接头。光可切割接头是含有可被特定波长的光切割的光敏基团的分子。光可切割接头可以将货物分子或其他功能部分(例如靶向部分)可裂解地连接到RNA纳米笼。这是可以调节和控制从RNA纳米笼中释放货物分子的另一种机制。光可切割接头可以通过电磁辐射源激活(例如裂解), 包括但不限于可见光、红外辐射、紫外线辐射。使用光可切割接头可以允许时间控制和空间控制货物分子从RNA纳米笼中释放。示例性光可切割接头可包括但不限于亚磷酰胺(参见例如Olejnik等, *Nucleic Acids Res.* (1998); 26:3572-3576; Olejnik等, *Nucleic Acid Res.* (1999), 27:4626-4631; 和Tang等, *Nucleic Acid Res* (2002), 38:3848-3855, Gene Link目录号26-6888)、光可切割的生物素(参见例如Olejnik等, *Nucleic Acids Res.* (1998); 26:3572-3576; Olejnik等, *Nucleic Acid Res.* (1999), 27:4626-4631; 和Tang等, *Nucleic Acid Res* (2002), 38:3848-3855, Gene Link目录号26-6691); 可光裂解的氨基C6(参见例如Olejnik等, *Nucleic Acids Res.* (1998); 26:3572-3576; Olejnik等, *Nucleic Acid Res.* (1999), 27:4626-4631; 和Tang等, *Nucleic Acid Res* (2002), 38:3848-3855, Gene Link目录号26-6890), 可光裂解的间隔区(参见例如Olejnik等, *Nucleic Acids Res.* (1998); 26:3572-3576; Olejnik等, *Nucleic Acid Res.* (1999), 27:4626-4631; 和Tang等, *Nucleic Acid Res* (2002), 38:3848-3855, Gene Link目录号26-6889); 2-硝基苄基接头(参见例如Bai等, (2003) *PNAS*, 100:409-413)。本领域普通技术人员将知晓其他合适的光可切割接头。

[0112] pH响应性接头可以是在某一pH下可以降解(例如水解)的任何化合物。因此, pH响应性接头可以是酸性响应性的或碱性响应性的。pH响应性接头可以是聚合物。合适的pH响应性接头通常是本领域已知的, 包括但不限于以下中所述的那些: Choy等, *Bioconjugate.Chem.* (2016) 27:824-830; Schmaljohann (2008) *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2006) 58:1655-1670, Balamuralidhara et al. (2011) *Am. J. Drug Disc. Devel.* 1:24-48; *Biomedical Nanomaterials*, ed. Zhao and Shen (2016), Chapter 6; Masson等. (2004) *J. Control Release.* 99:423-434; Karimi等, *Nanomed. and Nanobiotech.* (2016) 8:696-716; 国际专利申请公开号W02016/028700; 和Patil等, 2012. *Int. J. Mol. Sci.* 13:11681-11693。

[0113] 酶可切割的接头是含有酶切割位点的接头。在一些实施方案中, 所述接头可以是含有内切核酸酶序列的核酸。本领域普通技术人员将理解核酸内切酶切割位点以及如何产

生含有它们的核酸分子。可以被包含的其他切割位点可以是核糖核酸酶或脱氧核糖核酸酶切割位点。在一些实施方案中,酶切割酶位点可以是对靶细胞特异的酶的切割位点。因此,以这种方式,可以控制释放,使得其仅通过与靶细胞特异性酶的相互作用而在靶细胞处发生。可以掺入酶可切割接头的其他切割位点将被本领域技术人员容易鉴别。

[0114] 货物化合物

[0115] RNA纳米笼可含有一种或多种货物化合物。货物化合物可以是任何生物分子、化学分子、合成分子或可以如本文所述被包封或连接到如本文所述的RNA纳米笼的任何其他分子。

[0116] 在一些方面,货物化合物可以是DNA、RNA、氨基酸、肽、多肽、抗体、适体、核酶、抑制必需肿瘤蛋白和基因翻译或转录的核酶的引导序列、激素、免疫调节剂、退热药、抗焦虑药、抗精神病药、镇痛药、止痉药、抗炎药、抗组胺药、抗感染药和化疗药(抗癌药)。其他合适的货物化合物包括致敏剂(例如放射增敏剂),其可使细胞或受试者对治疗或预防和成像或其他诊断剂更响应(或敏感)。RNA纳米笼可以用作单一疗法或与其他活性剂组合用于治疗或预防疾病或病症。

[0117] 合适的激素包括但不限于氨基酸衍生的激素(例如褪黑素和甲状腺素)、小肽激素和蛋白质激素(例如促甲状腺素释放激素、加压素、胰岛素、生长激素、促黄体激素、促卵泡激素、和促甲状腺激素)、类二十烷酸(例如花生四烯酸、脂氧素和前列腺素),和类固醇激素(例如雌二醇,睾酮,四氢睾酮皮质醇)。

[0118] 合适的免疫调节剂包括但不限于强的松、硫唑嘌呤、6-MP、环孢菌素、他克莫司、甲氨蝶呤、白细胞介素(例如IL-2、IL-7和IL-12)、细胞因子(例如干扰素(例如IFN- α 、IFN- β 、IFN- ϵ 、IFN- κ 、IFN- ω 和IFN- γ)、粒细胞集落刺激因子和咪喹莫特)、趋化因子(例如CCL3、CCL26和CXCL7)、磷酸胞嘧啶-鸟苷、寡脱氧核苷酸、葡聚糖、抗体和适体)。

[0119] 合适的退热药包括但不限于非甾体抗炎药(例如布洛芬、萘普生、酮洛芬和尼美舒利)、阿司匹林和相关的水杨酸盐(例如水杨酸胆碱、水杨酸镁和水杨酸钠)、对乙酰氨基酚/乙酰胺酚、安乃近、萘丁美酮、安替比林和奎宁。

[0120] 合适的抗焦虑药包括但不限于苯二氮卓类药物(例如阿普唑仑、溴西泮、氯氮卓、氯硝西泮、氯氮卓、地西泮、氟西泮、劳拉西泮、奥沙西泮、替马西泮、三唑仑和托非索泮)、血清素性抗抑郁药(例如选择性5-羟色胺再摄取抑制剂、三环抗抑郁药)和单胺氧化酶抑制剂)、梅比卡(mebicar)、afobazole、selank、布罗曼坦、emoxypine、氮哌酮(azapirones)、巴比妥盐、羟嗪、普瑞巴林、伐力多和 β 阻断剂。

[0121] 合适的抗精神病药包括但不限于苯哌利多、溴哌利多、氟哌利多、氟哌啶醇、莫哌隆、匹哌哌隆(pipaperone)、替米哌隆、氟司必林、五氟利多、匹莫齐特、乙酰丙嗪、氯丙嗪、氟美马嗪、地西拉嗪(dizyrazine)、羟哌氟丙嗪、左美丙嗪、美索达嗪、培拉嗪、哌氟嗪、奋乃静、哌泊噻嗪、丙氯拉嗪、丙嗪、异丙嗪、丙硫喷地、硫丙拉嗪、硫利达嗪、三氟拉嗪、三氟丙嗪、氯普噻吨、氯哌噻吨、氟哌噻吨、替沃噻吨、珠氯噻醇、氯噻平、洛沙平、丙硫喷地、卡匹帕明、氯卡帕明、吗茛酮、莫沙帕明、舒必利、维拉必利、氨磺必利、阿莫沙平、阿立哌唑、阿塞那平、氯氮平、布南色林、伊潘立酮、鲁拉西酮、美哌隆、奈莫必利、奥氮平(olanzaprine)、帕潘立酮、哌罗匹隆、喹硫平、瑞莫必利、利培酮、舍吲哌、曲米帕明、齐拉西酮、佐替平、alstonie、联苯芦诺(befeprunox)、生物蝶呤、依匹哌唑、大麻二酚、卡利拉嗪、匹莫范色林、

pomaglumetad methionil、戊卡色林、咕诺美林和齐洛那平(zicronapine)。

[0122] 合适的镇痛药包括但不限于对乙酰氨基酚/乙酰胺酚、非甾体抗炎药(例如布洛芬、萘普生、酮洛芬和尼美舒利)、COX-2抑制剂(例如罗非考昔、塞来昔布和依托考昔)、阿片类药物(例如吗啡、可待因、羟考酮、氢可酮、二氢吗啡、哌替啶、丁丙诺啡)、曲马多、去甲肾上腺素、氟吡汀、奈福泮、邻甲苯海明、普瑞巴林、加巴喷丁、环苯扎林、东莨菪碱、美沙酮、凯托米酮、哌替米特和阿司匹林及有关水杨酸盐(例如水杨酸胆碱、水杨酸镁和水杨酸钠)。

[0123] 合适的止痉药包括但不限于美贝维林、罂粟碱、环苯扎林、卡立普多、邻甲苯海明、替扎尼定、美他沙酮、美索巴莫、氯唑沙宗、巴氯芬、丹曲林、巴氯芬、替扎尼定和丹曲林。

[0124] 合适的抗炎药包括但不限于强的松、非甾体抗炎药(例如布洛芬、萘普生、酮洛芬和尼美舒利)、COX-2抑制剂(例如罗非考昔、塞来昔布和依托考昔)和免疫选择性抗炎衍生物(例如颌下腺肽-T及其衍生物)。

[0125] 合适的抗组胺药包括但不限于H₁-受体拮抗剂(例如阿伐斯汀、氮卓斯汀、比拉斯汀、溴苯那敏、布克利嗪、溴苯海拉明、卡比沙明、西替利嗪、氯丙嗪、苯甲嗪、氯苯吡胺、克立马丁、赛庚啶、地氯雷他定、右溴苯那敏、右旋氯苯吡胺、茶苯海明、二甲茛定、苯海拉明、多西拉敏、依巴斯汀(ebasine)、恩布拉敏、非索非那定、羟嗪、左西替利嗪、氯雷他定、美克洛嗪、米氮平、奥洛他定、邻甲苯海明、苯茛胺、非尼拉敏、苯托沙敏、异丙嗪、噻啶胺、奎硫平、卢帕他定、曲吡那敏和苯丙烯啶)、H₂-受体拮抗剂(例如西咪替丁、法莫替丁、拉呋替丁、尼扎替丁、雷尼替丁(rafitidine)和罗沙替丁)、曲托喹啉、儿茶素、色甘酸、奈多罗米和β₂-肾上腺素能激动剂。

[0126] 合适的抗感染药包括但不限于抗阿米巴药(例如硝唑尼特、巴龙霉素、甲硝唑、替硝唑、氯喹和双碘喹啉)、氨基糖苷类(例如巴龙霉素、妥布霉素、庆大霉素、阿米卡星、卡那霉素和新霉素)、驱肠虫剂(例如噻嘧啶、甲苯咪唑、伊维菌素、吡喹酮、阿苯达唑、米替福新、噻苯达唑、奥沙尼喹)、抗真菌药(例如唑类抗真菌药(例如伊曲康唑、氟康唑、泊沙康唑、酮康唑、克霉唑、咪康唑和伏立康唑)、棘白菌素类(例如卡泊芬净、阿尼芬净和米卡芬净)、灰黄霉素、特比萘芬、氟胞嘧啶和多烯(例如制霉菌素和两性霉素b)、抗疟药(例如乙胺嘧啶/磺胺多辛、蒿甲醚/苯茛醇、阿托伐醌/氯胍、奎宁、羟氯喹、甲氟喹、氯喹、强力霉素、乙胺嘧啶和卤泛群)、抗结核药物(例如氨基水杨酸盐(例如氨基水杨酸))、异烟肼/利福平、异烟肼/吡嗪酰胺/利福平、贝达喹啉、异烟肼、乙胺丁醇、利福平、利福布汀、利福喷汀、卷曲霉素和环丝氨酸)、抗病毒药物(例如金刚烷胺、金刚乙胺、阿巴卡韦/拉米夫定、恩曲他滨/替诺福韦、可比司他/埃替格韦/恩曲他滨/替诺福韦、依法韦仑/恩曲他滨/替诺福韦、阿巴卡韦/拉米夫定/齐多夫定、拉米夫定/齐多夫定、恩曲他滨/替诺福韦、恩曲他滨/洛匹那韦/利托那韦/替诺福韦、干扰素α-2v/利巴韦林、聚乙二醇干扰素α-2b、马拉韦罗、雷特格韦、度鲁特韦、恩夫韦地、膦甲酸、福米韦生、奥司他韦、扎那米韦、奈韦拉平、依法韦仑、依曲韦林、利匹韦林、地拉韦定、奈韦拉平、恩替卡韦、拉米夫定、阿德福韦、索非布韦、去羟肌苷、替诺福韦、avacivir、齐多夫定、司他夫定、恩曲他滨、扎西他滨、替比夫定、西美瑞韦、博赛泼维、特拉匹韦、洛匹那韦/利托那韦、福沙那韦、达芦那韦、利托那韦、替拉那韦、阿扎那韦、奈非那韦、安普那韦、茛地那韦、沙奎那韦、利巴韦林、伐昔洛韦、阿昔洛韦、泛昔洛韦、更昔洛韦、和缙更昔洛韦)、碳青霉烯类(例如多利培南、美罗培南、厄他培南和西司他丁/亚胺培南)、头孢菌素类(例如头孢羟氨苄、头孢拉定、头孢唑啉、头孢氨苄、头孢吡肟、头孢洛林、氯碳头孢、头

孢替坦、头孢呋辛、头孢丙烯、氯碳头孢、头孢噻吩、头孢克洛、头孢布烯、头孢曲松、头孢噻肟、头孢泊肟、头孢地尼、头孢克肟、头孢托仑、头孢唑肟和头孢他啶)、糖肽类抗生素(例如万古霉素、达巴万星、奥利万星、和替拉泛星)、甘氨酸环素类(例如替加环素)、抗麻风药(例如氯法齐明和沙利度胺)、林可霉素及其衍生物(例如克林霉素和林可霉素)、大环内酯类及其衍生物(例如泰利霉素、非达霉素、红霉素、阿奇霉素、克拉霉素、地红霉素和醋竹桃霉素)、利奈唑胺、磺胺甲恶唑/甲氧苄啶、利福昔明、氯霉素、磷霉素、甲硝唑、氨曲南、杆菌肽、 β 内酰胺抗生素(苄星青霉素(苄星(benzathine)和苄基青霉素)、苯氧基甲基青霉素、氯唑西林、氟氯西林、甲氧西林、替莫西林、美西林、阿洛西林、美洛西林、哌拉西林、阿莫西林、巴卡西林、羧苄青霉素、哌拉西林、替卡西林、阿莫西林/克拉维酸、氨苄青霉素/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、克拉维酸/替卡西林、青霉素、普鲁卡因青霉素、苯唑西林、双氯西林、萘夫西林、头孢唑啉、头孢氨苄、头孢菌素C、头孢噻吩、头孢克洛、头孢羟唑、头孢呋辛、头孢替坦、头孢西丁、头孢克肟、头孢噻肟、头孢泊肟、头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟、头孢匹罗、头孢洛林、比阿培南、多利培南、厄他培南、法罗培南、亚胺培南、美罗培南、帕尼培南、拉祖培南、泰比培南、硫霉素、aztreonam、替吉莫南、诺卡菌素A、taboxinine和 β -内酰胺)、喹诺酮类(例如洛美沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、加替沙星、莫西沙星、环丙沙星、左氧氟沙星、吉米沙星、莫西沙星、西诺沙星、萘啶酸、依诺沙星、格帕沙星、加替沙星、曲伐沙星、和司帕沙星)、磺胺类(例如磺胺甲恶唑/甲氧苄啶、柳氮磺吡啶、和磺胺异唑)、四环素类(例如强力霉素、去甲氯四环素、米诺环素、强力霉素/水杨酸、强力霉素/ ω -3多不饱和脂肪酸和四环素)和泌尿道抗感染剂(例如呋喃妥因、乌洛托品、磷霉素、西诺沙星、萘啶酸、甲氧苄啶和亚甲蓝)。

[0127] 合适的化疗药包括但不限于紫杉醇、布妥昔单抗、多柔比星、5-FU(氟尿嘧啶)、依维莫司、培美曲塞、美法仑、帕米膦酸钠、阿那曲唑、依西美坦、奈拉滨、奥法木单抗、贝伐单抗、贝利司他、托西莫单抗、卡莫司汀、博来霉素、伯舒替尼、白消安、阿仑单抗、伊立替康、凡德他尼、比卡鲁胺、洛莫司汀、柔红霉素、氯法拉滨、卡博替尼、放线菌素D、雷莫芦单抗、阿糖胞苷、癌得星、环磷酰胺、地西他滨、地塞米松、多西紫杉醇、羟基脲、氮烯咪胺、亮丙瑞林、表柔比星、奥沙利铂、天冬酰胺酶、雌莫司汀、西妥昔单抗、维莫德吉、天门冬酰胺酶菊欧氏杆菌(*asparaginase erwinia chrysanthemi*)、氨磷汀、依托泊苷、氟他胺、托瑞米芬、氟维司群、来曲唑、地盖瑞利、普拉曲沙、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶脱氧核苷、阿托珠单抗、吉西他滨、阿法替尼、甲磺酸伊马替尼、卡氮芥、艾日布林、曲妥珠单抗、六甲蜜胺、拓扑替康、帕纳替尼、依达比星、异环磷酰胺、依鲁替尼、阿西替尼、干扰素 α -2a、吉非替尼、罗米地辛、伊沙匹隆、卢佐替尼、卡巴他赛、曲妥珠单抗-美坦新偶联物(ado-trastuzumab emtansine)、卡非佐米、苯丁酸氮芥、沙格司亭、克拉屈滨、米托坦、长春新碱、丙卡巴肼、甲地孕酮、曲美替尼、美司钠、氯化铈89、氮芥、丝裂霉素、白消安、吉妥珠单抗奥佐米星、长春瑞滨、非格司亭、乙二醇化非格司亭、索拉非尼、尼鲁米特、喷司他丁、他莫昔芬、米托蒽醌、培门冬酶、地尼白介素、阿利维A酸、卡铂、帕妥珠单抗、顺铂、泊马多胺、强的松、阿地白介素、硫嘌呤、唑来膦酸、来那度胺、利妥昔单抗、奥曲肽、达沙替尼、瑞格非尼、组氨瑞林、舒尼替尼、司妥昔单抗、高三尖杉酯碱、硫鸟嘌呤(thioguanine)(硫鸟嘌呤(tioguanine))、达拉菲尼、埃罗替尼、蓓萨罗丁、替莫唑胺、噻替派、萨力多胺、BCG、替西罗莫司、盐酸苯达莫司汀、曲普瑞林、三氧化二砷、拉帕替尼、戊柔比星、帕尼单抗、长春碱、硼替佐米、维A酸、阿扎胞苷、帕唑帕尼、替尼泊

昔、甲酰四氢叶酸、克唑替尼、卡培他滨、恩杂鲁胺、伊匹单抗、戈舍瑞林、伏立诺他、艾代拉利司、色瑞替尼、阿比特龙、埃博霉素、他氟泊昔(tafluposide)、咪唑硫嘌呤、去氧氟尿苷、长春地辛、全反式维甲酸和本文其他地方列出的其他抗癌药物。

[0128] 合适的致敏剂可包括但不限于放射增敏剂、胰岛素致敏剂(例如二甲双胍、噻唑烷二酮)和用于光动力疗法的光敏剂(例如氨基乙酰丙酸(ALA)、硅酞菁Pc 4、间-四羟基苯基二氢卟吩(mTHPC)和单-L-天冬氨酸二氢卟吩e6(NPe6))。

[0129] 合适的成像剂包括但不限于荧光分子(例如Cy3、Cy5和其他可商购的荧光团)、顺磁离子、可包含顺磁离子的纳米颗粒、超顺磁性氧化铁分子及其纳米颗粒、18F-氟脱氧葡萄糖和a其他PET成像剂、含钆造影剂、放射性核素及其组合物。

[0130] RNA纳米笼的自组装。设计自组装核酸纳米结构的基本原理是编码核酸链中的序列互补性,使得通过配对互补区段,核酸链在适当的物理条件下自组织成预定义的纳米结构。根据该基本原理(参见,例如,Seeman N.C.J.Theor.Biol.99:237,1982,通过引用并入本文),研究人员已经创建了多种合成核酸纳米结构(参见,例如,Seeman N.C.Nature 421:427,2003;Shih W.M.et al.Curr.Opin.Struct.Biol.20:276,2010,其中每一篇均通过引用并入本文)。可以根据本公开使用的核酸(例如,DNA)纳米结构的实例和产生这种结构的方法是已知的,包括但不限于晶格(参见,例如,Winfrey E.et al.Nature 394:539,1998;Yan H.et al.Science 301:1882,2003;Yan H.et al.Proc.Natl.Acad.of Sci.USA 100:8103,2003;Liu D.et al.J.Am.Chem.Soc.126:2324,2004;Rothemund P.W.K.et al.PLoS Biology 2:2041,2004,其每一个通过引用并入本文)、带(参见,例如,Park S.H.et al.Nano Lett.5:729,2005;Yin P.et al.Science 321:824,2008,其中每一个通过引用并入本文)、管(参见,例如,Yan H.Science,2003;P.Yin,2008,其中每一个都通过引用并入这里参考文献)、具有确定形状的有限二维和三维物体(参见,例如,Chen J.et al.Nature 350:631,1991;Rothemund P.W.K.,Nature,2006;He Y.et al.Nature 452:198,2008;Ke Y.et al.Nano.Lett.9:2445,2009;Douglas S.M.et al.Nature 459:414,2009;Dietz H.et al.Science 325:725,2009;Andersen E.S.et al.Nature 459:73,2009;Liedl T.et al.Nature Nanotech.5:520,2010;Han D.et al.Science 332:342,2011,其中每一个都通过引用并入本文)和宏观晶体(参见,例如Meng J.P.et al.Nature 461:74,2009,通过引用并入本文)。RNA链可以是单链核酸、双链核酸、或单链和双链核酸的组合。

[0131] 制备RNA纳米笼的方法

[0132] RNA链、功能部分可以使用标准分子生物学和生物化学技术合成。换句话说,可以形成RNA纳米笼的各种核酸可以根据需要从头合成,或者从各种核酸表达载体产生,或在体外转录。这种合成技术将是本领域技术人员知道的。

[0133] RNA组分(RNA链和3WJ可以使用本文实施例中描述的计算机辅助设计方法设计。尽管使用特定的RNA纳米笼展示了计算机设计,但是将理解,其中教导的原理将能够由本领域技术人员外推至任何所需的RNA纳米笼。

[0134] 药物制剂

[0135] 本文还提供了药物制剂,所述药物制剂可包括一定量的本文所述的RNA纳米笼和适于施用给有需要的个体的药物载体。所述有需要的个体可患有或可怀疑患有癌症、遗传性疾病或病症、病毒、细菌、真菌和/或寄生虫感染、或需要治疗或预防的其他疾病或病症。

在一些实施方案中,有需要的受试者需要诊断程序,例如成像程序。所述药物制剂可包括一定量的本文所述的RNA纳米笼,例如可有效治疗或预防癌症、遗传性疾病或病症、病毒、细菌、真菌和/或寄生虫感染、或其他疾病或可有效成像受试者或其一部分的RNA纳米笼。(From Jane)

[0136] 制剂可以通过任何合适的施用途径给药。例如,制剂(和/或组合物)可以口服、静脉内、通过眼、眼内、肌肉内、阴道内、腹膜内、直肠、肠胃外、局部、鼻内或皮下施用至有需要的受试者。本文描述了其他合适的途径。在一些实施方案中, RNA纳米笼包含有效量的货物分子。

[0137] 肠胃外制剂

[0138] RNA纳米笼可以溶液或悬浮液的形式配制用于肠胃外递送,例如注射或输注。制剂可以通过任何途径给药,例如血流或直接施用至待治疗的器官或组织。

[0139] 可以使用本领域已知的技术将肠胃外制剂制备成含水组合物。通常,这种组合物可以被制备为可注射制剂,例如溶液或悬浮液;固体形式,适合用于在注射前加入重构基质制备溶液或悬浮液;乳液,例如油包水(w/o)乳液、水包油(o/w)乳液、及其微乳液、脂质体或乳脂体。

[0140] 载体可以是溶剂或分散介质,包含例如水、乙醇、一种或多种多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)、油,例如植物油(例如花生油、玉米油、芝麻油等)及其组合。例如,通过使用诸如卵磷脂的包衣,在分散体的情况下通过维持所需的粒度和/或通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。

[0141] 如本文所述的RNA纳米笼的溶液和分散体可以在与一种或多种药学上可接受的赋形剂适当混合的水或另外的溶剂或分散介质中制备,所述赋形剂包括但不限于表面活性剂、分散剂、乳化剂、pH调节剂及其组合。

[0142] 合适的表面活性剂可以是阴离子型、阳离子型、两性离子型或非离子型表面活性剂。合适的阴离子表面活性剂包括但不限于含有羧酸盐、磺酸盐和硫酸盐离子的那些。合适的阴离子表面活性剂包括长链烷基磺酸和烷基芳基磺酸的钠盐、钾盐、铵盐,例如十二烷基苯磺酸钠;二烷基磺基琥珀酸钠,例如十二烷基苯磺酸钠;二烷基磺基琥珀酸钠,例如双-(2-乙硫基)-磺基琥珀酸钠;和烷基硫酸盐,例如十二烷基硫酸钠。合适的阳离子表面活性剂包括但不限于季铵化合物,例如苯扎氯铵、苄索氯铵、西曲溴铵、硬脂酰二甲基苄基氯化铵、聚氧乙烯和椰子胺。合适的非离子表面活性剂包括乙二醇单硬脂酸酯、丙二醇肉豆蔻酸酯、单硬脂酸甘油酯、硬脂酸甘油酯、聚甘油-4-油酸酯、脱水山梨糖醇酐化物、蔗糖酐化物、PEG-150月桂酸酯、PEG-400单月桂酸酯、聚氧乙烯单月桂酸酯、聚山梨醇酯、聚氧乙烯辛基苯基醚、PEG-1000十六烷基醚、聚氧乙烯十三烷基醚、聚丙二醇丁醚、**Poloxamer®401**、硬脂酰单异丙醇酰胺和聚氧乙烯氢化牛脂酰胺。两性表面活性剂的实例包括N-十二烷基-β-丙氨酸钠、N-月桂基-β-亚氨基二丙酸钠、肉豆蔻酰两性乙酸盐、月桂基甜菜碱和月桂基硫代甜菜碱。

[0143] 该制剂可含有防腐剂以防止微生物的生长。合适的防腐剂包括但不限于对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸和硫柳汞。该制剂还可含有抗氧化剂以防止RNA纳米笼的降解。

[0144] 可以在重构时将制剂缓冲至pH为3-8用于肠胃外给药。合适的缓冲剂包括但不限

于磷酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液和柠檬酸盐缓冲液。

[0145] 水溶性聚合物可用于肠胃外给药的制剂中。合适的水溶性聚合物包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮、葡聚糖、羧甲基纤维素和聚乙二醇。无菌可注射溶液可以通过将所需量的RNA纳米笼与上文所列的一种或多种赋形剂一起混入适当的溶剂或分散介质中,如所需要,然后过滤灭菌。可以通过将各种灭菌的RNA纳米笼混入无菌载体中来制备分散体,所述载体含有基础分散介质和来自上文所列的所需的其它成分。用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末可通过真空干燥和冷冻干燥技术制备,其产生RNA纳米笼的粉末加上来自其先前无菌过滤溶液的任何其他所需成分。粉末可以以颗粒本质上是多孔的方式制备,这可以增加颗粒的溶解。制备多孔颗粒的方法是本领域熟知的。

[0146] 用于肠胃外给药的药物制剂可以是由一种或多种RNA纳米笼形成的颗粒的无菌水溶液或悬浮液的形式。可接受的溶剂包括例如水、林格氏溶液、磷酸盐缓冲盐水(PBS)和等渗氯化钠溶液。制剂还可以是无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂例如1,3-丁二醇中的无菌溶液、悬浮液或乳液。

[0147] 在某些情况下,制剂可以以液体形式分配或包装。在其他实施方案中,用于肠胃外给药的制剂可以作为固体包装,例如通过冻干合适的液体制剂获得。在施用之前,可以用合适的载体或稀释剂重构固体。

[0148] 用于肠胃外给药的溶液、悬浮液或乳液可以用有效量的缓冲剂缓冲,以维持适于眼部给药的pH。合适的缓冲剂包括但不限于乙酸盐、硼酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐缓冲剂。

[0149] 用于肠胃外给药的溶液、悬浮液或乳液还可含有一种或多种张力剂以调制剂剂的等渗范围。合适的张力剂包括但不限于甘油、甘露醇、山梨糖醇、氯化钠和其他电解质。

[0150] 用于肠胃外给药的溶液、悬浮液或乳液还可含有一种或多种防腐剂以防止眼科制剂的细菌污染。合适的防腐剂包括但不限于聚六亚甲基双胍(PHMB)、苯扎氯铵(BAK)、稳定的氯氧络合物(也称为Purite®)、醋酸苯汞、氯丁醇、山梨酸、氯己定、苯甲醇、对羟基苯甲酸酯、硫柳汞和其混合物。

[0151] 用于肠胃外给药的溶液、悬浮液或乳液、包括纳米制剂的纳米技术的应用也可含有一种或多种赋形剂,例如分散剂、润湿剂和悬浮剂。

[0152] 局部制剂

[0153] 如本文所述的RNA纳米笼可以配制用于局部施用。用于局部给药的合适剂型包括乳膏、软膏、油膏、喷雾剂、凝胶、洗剂、乳剂、液体和透皮贴剂。该制剂可被配制用于经粘膜、经上皮、经内皮或透皮施用。所述局部制剂可含有一种或多种化学渗透增强剂、膜渗透剂、膜转运剂、润肤剂、表面活性剂、稳定剂及其组合。

[0154] 在一些实施方案中, RNA纳米笼可以作为液体制剂例如溶液或悬浮液、半固体制剂例如洗剂或软膏、或固体制剂施用。在一些实施方案中, RNA纳米笼可被配制为液体,包括溶液和悬浮液,例如滴眼剂或配制为半固体制剂,例如软膏或洗剂,用于局部施用至皮肤、至粘膜例如眼睛、至阴道、或至直肠。

[0155] 所述制剂可含有一种或多种赋形剂,例如润肤剂、表面活性剂、乳化剂、渗透促进剂等。

[0156] 合适的润肤剂包括但不限于杏仁油、蓖麻油、长角豆(ceratonia)提取物、十六十

八醇、十六醇、十六烷基酯蜡、胆固醇、棉籽油、环聚二甲基硅氧烷、棕榈酸硬脂酸乙二醇酯、甘油、单硬脂酸甘油酯、单油酸甘油酯、肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、羊毛脂、卵磷脂、轻质矿物油、中链甘油三酯、矿物油和羊毛脂醇、凡士林、凡士林和羊毛脂醇、大豆油、淀粉、硬脂醇、向日葵油、木糖醇及其组合。在一些实施方案中，润肤剂可以是乙基己基硬脂酸酯和乙基己基棕榈酸酯。

[0157] 合适的表面活性剂包括但不限于乳化蜡、单油酸甘油酯、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、聚山梨醇酯、脱水山梨糖醇酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、环糊精、单硬脂酸甘油酯、泊洛沙姆、聚维酮及其组合。在一些实施方案中，所述表面活性剂可以是硬脂醇。

[0158] 合适的乳化剂包括但不限于阿拉伯胶、金属皂、某些动植物油和各种极性化合物、阴离子乳化蜡、硬脂酸钙、卡波姆、十六十八醇、十六烷醇、胆固醇、二乙醇胺、棕榈酸硬脂酸乙二醇酯、单硬脂酸甘油酯、单油酸甘油酯、羟丙基纤维素、羟丙甲纤维素、羊毛脂、含水、羊毛脂醇、卵磷脂、中链甘油三酯、甲基纤维素、矿物油和羊毛脂醇、磷酸二氢钠、单乙醇胺、非离子乳化蜡、油酸、泊洛沙姆、泊洛沙姆、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯硬脂酸酯、海藻酸丙二醇酯、自乳化单硬脂酸甘油酯、脱水柠檬酸钠、十二烷基硫酸钠、脱水山梨糖醇酯、硬脂酸、葵花籽油、黄耆胶、三乙醇胺、黄原胶及其组合。在一些实施方案中，乳化剂可以是硬脂酸甘油酯。

[0159] 合适类型的渗透增强剂包括但不限于脂肪醇、脂肪酸酯、脂肪酸、脂肪醇醚、氨基酸、磷脂、卵磷脂、胆酸盐、酶、胺和酰胺、络合剂(脂质体、环糊精、改性纤维素和二酰亚胺)、大环类例如大环内酯、酮和酸酐和环脲、表面活性剂、N-甲基吡咯烷酮及其衍生物、DMSO和相关化合物、离子化合物、氮酮和相关化合物、和溶剂，例如醇、酮、酰胺、多元醇(例如二醇)。

[0160] 合适的乳液包括但不限于水包油和油包水乳液。乳液的任一相或两相可包括表面活性剂、乳化剂和/或液体非挥发性非水性材料。在一些实施方案中，表面活性剂可以是非离子表面活性剂。在其他实施方案中，乳化剂是乳化蜡。在进一步的实施方案中，液体非挥发性非水性材料是二醇。在一些实施方案中，二醇是丙二醇。油相可含有其它合适的油性药学上可接受的赋形剂。合适的油性药学上可接受的赋形剂包括但不限于羟基化蓖麻油或芝麻油可以在油相中用作表面活性剂或乳化剂。

[0161] 还提供了含有如本文所述的RNA纳米笼的洗剂。在一些实施方案中，洗剂可以是乳液形式，其粘度在100和1000厘司之间。乳液的流动性可以允许在宽的表面区域上快速和均匀地施用。洗液可被配制成在皮肤上干燥，在皮肤表面留下薄层的它们的药用成分。

[0162] 还提供了含有如本文所述的RNA纳米笼的乳膏。乳膏可含有乳化剂和/或其他稳定剂。在一些实施方案中，乳膏为粘度大于1000司，通常在20,000-50,000厘司范围的乳膏形式。与软膏相比，乳膏更容易涂抹，更容易去除。

[0163] 乳膏和洗液之间的一个区别是粘度，其取决于各种油的量/用量和用于制备制剂的水的百分比。乳膏可以比洗液更厚，可以具有各种用途，并且可以具有更多不同的油/黄油，这取决于在皮肤上的所需效果。在乳膏制剂的一些实施方案中，水基百分比可为约60%至约75%，并且油基可为总量的约20%至约30%，其他百分比为乳化剂，防腐剂和添加剂总共100%。

[0164] 还提供了含有如本文所述的RNA纳米笼和合适的软膏基质的软膏。合适的软膏基

质包括烃基质(例如凡士林、白凡士林、黄色软膏和矿物油);吸收基质(亲水性凡士林、无水羊毛脂、羊毛脂和冷霜);水可除去的基质(例如亲水性软膏)和水溶性基质(例如聚乙二醇软膏)。糊剂通常与软膏的不同之处在于它们含有较大百分比的固体。与用相同组分制备的软膏相比,糊剂通常更具吸收性且更不油腻。

[0165] 本文还描述了含有如本文所述的RNA纳米笼,胶凝剂和液体载体的凝胶。合适的胶凝剂包括但不限于改性纤维素,例如羟丙基纤维素和羟乙基纤维素;卡波姆均聚物和共聚物;热致可逆凝胶及其组合。液体载体中合适的溶剂包括但不限于二甘醇单乙醚;烷撑二醇(alkylene glycol),例如丙二醇;二甲基异山梨醇;醇类,例如异丙醇和乙醇。可以根据溶解药物的能力选择溶剂。还可以加入能改善制剂的皮肤感觉和/或柔润性的其他添加剂。这些添加剂包括但不限于肉豆蔻酸异丙酯、乙酸乙酯、C12-C15烷基苯甲酸酯、矿物油、角鲨烷、环聚二甲基硅氧烷、癸酸/辛酸甘油三酯,及其组合。

[0166] 本文还描述了可包括如本文所述的RNA纳米笼的泡沫。泡沫可以是与气态推进剂组合的乳液。所述气态推进剂可包括氢氟烷烃(HFA)。合适的推进剂包括HFA,例如1,1,1,2-四氟乙烷(HFA 134a)和1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷(HFA 227),但这些和目前被批准或可成为批准用于医疗用途其他HFA的混合物和掺和物是适宜的。推进剂可以不含烃类推进剂气体,所述烃类推进剂气体在喷雾过程中可产生易燃或爆炸性蒸气。此外,泡沫可不含挥发性醇,所述挥发性醇在使用过程中可产生易燃或爆炸性蒸气。

[0167] 缓冲剂可用于控制组合物的pH。缓冲剂可以缓冲组合物从约4的pH至约7.5的pH,从约4的pH至约7的pH,或从约5的pH至约7的pH。在一些实施方案中,缓冲剂可以是三乙醇胺。

[0168] 可以包含防腐剂以防止真菌和微生物的生长。合适的防腐剂包括但不限于苯甲酸、对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠、丙酸钠、苯扎氯铵、苄索氯铵、苯甲醇、氯化十六烷基吡啶、氯丁醇、苯酚、苯乙醇和硫柳汞。

[0169] 在某些实施方案中,可以通过将一种或多种制剂连续递送至需要其的患者来提供制剂。对于局部应用,可以进行重复应用,或者可以使用贴剂以在延长的时间段内提供诺斯卡品类似物的连续施用。

[0170] 肠内制剂

[0171] 如本文所述的RNA纳米笼可以在肠内制剂中制备,例如用于口服给药。合适的口服剂型包括片剂、胶囊、溶液、悬浮液、糖浆和锭剂。片剂可以使用本领域熟知的压缩或模塑技术制备。明胶或非明胶胶囊可以制备成硬或软胶囊壳,其可以使用本领域熟知的技术包封液体、固体和半固体填充材料。

[0172] 可以使用药学上可接受的载体制备含有如本文所述的RNA纳米笼的制剂。如本文通常使用的,“载体”包括但不限于稀释剂、防腐剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、溶胀剂、填充剂、稳定剂及其组合。剂型中使用的聚合物包括但不限于合适的疏水或亲水聚合物和合适的pH依赖性或不依赖性聚合物。合适的疏水和亲水聚合物包括但不限于羟丙基甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、聚乙二醇、乙基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚乙酸乙烯酯和离子交换树脂。“载体”还包括包衣组合物的所有组分,其可包括增塑剂、颜料、着色剂、稳定剂和助流剂。

[0173] 含有如本文所述的RNA纳米笼的制剂可使用一种或多种药学上可接受的赋形剂制备,所述赋形剂包括稀释剂、防腐剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、溶胀剂、填充剂、稳定剂及其组合。

[0174] 含有如本文所述的RNA纳米笼的延迟释放剂制剂可以如标准参考文献中所述制备,所述标准参考文献例如“Pharmaceutical dosage form tablets (药物剂型片剂)”, eds.Liberman et.al. (New York,Marcel Dekker,Inc.,1989) ,“Remington-The science and practice of pharmacy (Remington-药学的科学与实践)”,20th ed.,Lippincott Williams&Wilkins,Baltimore,MD,2000,以及“Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems (药物剂型和药物递送系统)”,6th Edition,Ansel et al., (Media,PA: Williams and Wilkins,1995)。这些参考文献提供了关于制备片剂和胶囊的赋形剂,材料,设备和方法以及片剂,胶囊和颗粒的延迟释放剂型的信息。这些参考文献提供了关于制备片剂和胶囊的载体、材料、设备和方法以及片剂、胶囊和颗粒的延迟释放剂型的信息。

[0175] 含有如本文所述的RNA纳米笼的制剂可以用合适的包衣材料包衣,例如,以在颗粒一旦已通过胃的酸性环境后就延迟释放。合适的包衣材料包括但不限于纤维素聚合物,例如邻苯二甲酸乙酸纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯和羟丙基甲基纤维素乙酸琥珀酸酯;聚乙酸乙烯酯邻苯二甲酸酯、丙烯酸聚合物和共聚物,以及可以商品名EUDRAGIT® (Roth Pharma,Westerstadt,Germany) 商购的甲基丙烯酸树脂、玉米醇溶蛋白、虫胶和多糖。

[0176] 包衣可以用不同比例的水溶性聚合物、水不溶性聚合物和/或pH依赖性聚合物形成,有或没有水不溶性/水溶性非聚合物赋形剂,以产生所需的释放曲线。包衣可以在剂型(骨架或简单的(matrix or simple))上进行,所述剂型包括但不限于片剂(压制,有或无包衣丸)、胶囊(有或无包衣丸)、丸剂、颗粒组合物,“成分按原样”配制为但不限于悬浮液形式或为散剂(sprinkle dosage form)。

[0177] 另外,包衣材料可含有常规载体,例如增塑剂、颜料、着色剂、助流剂、稳定剂、成孔剂和表面活性剂。任选的药学上可接受的赋形剂包括但不限于稀释剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、着色剂、稳定剂和表面活性剂。

[0178] 稀释剂,也称为“填充剂”,可用于增加固体剂型的体积,从而提供用于压制片剂或形成丸和颗粒实际尺寸。合适的稀释剂包括但不限于二水合磷酸二钙、硫酸钙、乳糖、蔗糖、甘露醇、山梨糖醇、纤维素、微晶纤维素、高岭土、氯化钠、干淀粉、水解淀粉、预胶化淀粉、二氧化硅、氧化钛、硅酸镁铝和糖粉。通常的稀释剂包括惰性粉末物质,例如淀粉、粉状纤维素,特别是结晶和微晶纤维素、糖,例如果糖、甘露醇和蔗糖、谷物粉和类似的可食用粉末。典型的稀释剂包括,例如,各种类型的淀粉、乳糖、甘露醇、高岭土、磷酸钙或硫酸盐、无机盐,例如氯化钠和糖粉。粉末状纤维素衍生物也是有用的。

[0179] 粘合剂可以赋予固体剂制剂配方以凝聚性质,因此可以确保在形成剂型后片剂或丸或颗粒保持完整。合适的粘合剂材料包括但不限于淀粉、预胶化淀粉、明胶、糖(包括蔗糖、葡萄糖、右旋糖、乳糖和山梨糖醇)、聚乙二醇,蜡,天然和合成树胶例如阿拉伯树胶、黄蓍胶、海藻酸钠、纤维素,包括羟丙基甲基纤维素、羟丙基纤维素、乙基纤维素和硅酸镁铝,和合成聚合物例如丙烯酸和甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸甲酯共聚物、氨基烷基甲基丙烯酸酯共聚物、聚丙烯酸/聚甲基丙烯酸和聚乙烯吡咯烷酮。典型的片

剂粘合剂包括诸如淀粉、明胶和糖(例如乳糖、果糖和葡萄糖)的物质。也可使用天然和合成树胶,包括阿拉伯树胶、藻酸盐、甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。聚乙二醇、亲水聚合物、乙基纤维素和蜡也可用作粘合剂。

[0180] 可以包括润滑剂以促进片剂制造。合适的润滑剂包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、山嵛酸甘油酯、聚乙二醇、滑石和矿物油。可以在片剂配方中包含润滑剂以防止片剂和冲头粘在模具中。润滑剂可选自光滑的固体,例如滑石粉、硬脂酸镁和硬脂酸钙、硬脂酸和氢化植物油。

[0181] 崩解剂可用于促进给药后剂型崩解或“分解”,并且通常包括但不限于淀粉、淀粉羟乙酸钠、羧甲基淀粉钠、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、预胶化淀粉、粘土、纤维素、藻蛋白碱(alginate)、树胶或交联聚合物,例如交联PVP(来自GAF Chemical Corp的Polyplasdone®XL)。

[0182] 稳定剂可用于抑制或延迟药物分解反应,其包括例如氧化反应。合适的稳定剂包括但不限于抗氧化剂、丁羟甲苯(BHT);抗坏血酸,其盐和酯;维生素E、生育酚及其盐;亚硫酸盐,例如焦亚硫酸钠;半胱氨酸及其衍生物;柠檬酸;没食子酸丙酯和丁基羟基茴香醚(BHA)。

[0183] 额外活性剂

[0184] 在一些实施方案中,一种或多种另外的活性剂包含在含有RNA纳米笼的药物制剂中。合适的额外活性剂包括但不限于DNA、RNA、氨基酸、肽、多肽、抗体、适配体、核酶,抑制必需肿瘤蛋白和基因翻译或转录的核酶的引导序列、激素、免疫调节剂、退热药、抗焦虑药、抗精神病药、镇痛药、抗痉挛药、抗炎药、抗组胺药、抗感染药和化疗药(抗癌药)。其他合适的额外的活性剂包括致敏剂(例如放射增敏剂)。RNA纳米笼可以用作单一疗法或与其他活性剂组合用于治疗或预防疾病或病症。

[0185] 合适的激素包括但不限于氨基酸衍生的激素(例如褪黑激素和甲状腺素)、小肽激素和蛋白质激素(例如促甲状腺激素释放激素、加压素、胰岛素、生长激素、促黄体激素、促卵泡激素、和促甲状腺激素)、类二十烷酸(例如花生四烯酸、脂氧素和前列腺素),和类固醇激素(例如雌二醇、睾酮、四氢睾酮皮质醇)。

[0186] 合适的免疫调节剂包括但不限于强的松、硫唑嘌呤、6-MP、环孢菌素、他克莫司、甲氨蝶呤、白细胞介素(例如IL-2、IL-7和IL-12)、细胞因子(例如干扰素(例如IFN- α)、IFN- β 、IFN- ϵ 、IFN- κ 、IFN- ω 和IFN- γ)、粒细胞集落刺激因子和咪喹莫特)、趋化因子(如CCL3、CCL26和CXCL7)、胞嘧啶磷酸-鸟苷、寡脱氧核苷酸、葡聚糖、抗体和适配体)。

[0187] 合适的退热药包括但不限于非甾体抗炎药(例如布洛芬、萘普生、酮洛芬和尼美舒利)、阿司匹林和相关的水杨酸盐(例如水杨酸胆碱、水杨酸镁和水杨酸钠)、对乙酰氨基酚/乙酰胺酚、安乃近、萘丁美酮、安替比林和奎宁。

[0188] 合适的抗焦虑药包括但不限于苯二氮卓类药物(例如阿普唑仑、溴西泮、氯氮卓、氯硝西泮、氯氮卓、地西泮、氟西泮、劳拉西泮、奥沙西泮、替马西泮、三唑仑和托非索泮)、血清素性抗抑郁药(例如选择性5-羟色胺再摄取抑制剂、三环抗抑郁药)和单胺氧化酶抑制剂)、梅比卡(mebicar)、afobazole、selelank、布罗曼坦、emoxypine、氮哌酮(azapirone)、巴比妥盐、羟嗪、普瑞巴林、伐力多和 β 阻断剂。

[0189] 合适的抗精神病药包括但不限于苯哌利多、溴哌利多、氟哌利多、氟哌啶醇、莫哌

隆、匹泮哌隆 (pipaperone)、替米哌隆、氟司必林、五氟利多、匹莫齐特、乙酰丙嗪、氯丙嗪、氟美马嗪、地西拉嗪 (dizyrazine)、羟哌氟丙嗪、左美丙嗪、美索达嗪、培拉嗪、哌氟嗪、奋乃静、哌泊噻嗪、丙氯拉嗪、丙嗪、异丙嗪、丙硫喷地、硫丙拉嗪、硫利达嗪、三氟拉嗪、三氟丙嗪、氯普噻吨、氯哌噻吨、氟哌噻吨、替沃噻吨、珠氯噻醇、氯噻平、洛沙平、丙硫喷地、卡匹帕明、氯卡帕明、吗茛酮、莫沙帕明、舒必利、维拉必利、氨磺必利、阿莫沙平、阿立哌唑、阿塞那平、氯氮平、布南色林、伊潘立酮、鲁拉西酮、美哌隆、奈莫必利、奥氮平 (olanzaprine)、帕潘立酮、哌罗匹隆、喹硫平、瑞莫必利、利培酮、舍吡啶、曲米帕明、齐拉西酮、佐替平、alstonie、联苯芦诺、生物蝶呤、依匹哌唑、大麻二酚、卡利拉嗪、匹莫范色林、pomaglumetad methionil、戊卡色林、咕诺美林和齐洛那平 (zicronapine)。

[0190] 合适的镇痛药包括但不限于对乙酰氨基酚/乙酰胺酚、非甾体抗炎药 (例如布洛芬、萘普生、酮洛芬和尼美舒利)、COX-2抑制剂 (例如罗非考昔、塞来昔布和依托考昔)、阿片类药物 (例如吗啡、可待因、羟考酮、氢可酮、二氢吗啡、哌替啶、丁丙诺啡)、曲马多、去甲肾上腺素、氟吡汀、奈福泮、邻甲苯海明、普瑞巴林、加巴喷丁、环苯扎林、东莨菪碱、美沙酮、凯托米酮、哌替米特和阿司匹林及有关水杨酸盐 (例如水杨酸胆碱、水杨酸镁和水杨酸钠)。

[0191] 合适的止痉挛药包括但不限于美贝维林、罂粟碱、环苯扎林、卡立普多、邻甲苯海明、替扎尼定、美他沙酮、美索巴莫、氯唑沙宗、巴氯芬、丹曲林、巴氯芬、替扎尼定和丹曲林。

[0192] 合适的抗炎药包括但不限于强的松、非甾体抗炎药 (例如布洛芬、萘普生、酮洛芬和尼美舒利)、COX-2抑制剂 (例如罗非考昔、塞来昔布和依托考昔) 和免疫选择性抗炎衍生物 (例如颌下腺肽-T及其衍生物)。

[0193] 合适的抗组胺药包括但不限于H₁-受体拮抗剂 (例如阿伐斯汀、氮卓斯汀、比拉斯汀、溴苯那敏、布克利嗪、溴苯海拉明、卡比沙明、西替利嗪、氯丙嗪、苯甲嗪、氯苯吡胺、克立马丁、赛庚啶、地氯雷他定、右溴苯那敏、右旋氯苯吡胺、茶苯海明、二甲茛定、苯海拉明、多西拉敏、依巴斯汀 (ebasine)、恩布拉敏、非索非那定、羟嗪、左西替利嗪、氯雷他定、美克洛嗪、米氮平、奥洛他定、邻甲苯海明、苯茛胺、非尼拉敏、苯托沙敏、异丙嗪、噻啶胺、奎硫平、卢帕他定、曲吡那敏和苯丙烯啶)、H₂-受体拮抗剂 (例如西咪替丁、法莫替丁、拉呋替丁、尼扎替丁、雷尼替丁 (rafitidine) 和罗沙替丁)、曲托喹啉、儿茶素、色甘酸、奈多罗米和β₂-肾上腺素能激动剂。

[0194] 合适的抗感染药包括但不限于抗阿米巴药 (例如硝唑尼特、巴龙霉素、甲硝唑、替硝唑、氯喹和双碘喹啉)、氨基糖苷类 (例如巴龙霉素、妥布霉素、庆大霉素、阿米卡星、卡那霉素和新霉素)、驱肠虫剂 (例如噻嘧啶、甲苯咪唑、伊维菌素、吡喹酮、阿苯达唑、米替福新、噻苯达唑、奥沙尼喹)、抗真菌药 (例如唑类抗真菌药 (例如伊曲康唑、氟康唑、泊沙康唑、酮康唑、克霉唑、咪康唑和伏立康唑)、棘白菌素类 (例如卡泊芬净、阿尼芬净和米卡芬净)、灰黄霉素、特比萘芬、氟胞嘧啶和多烯 (例如制霉菌素和两性霉素b)、抗疟药 (例如乙胺嘧啶/磺胺多辛、蒿甲醚/苯茛醇、阿托伐醌/氯胍、奎宁、羟氯喹、甲氟喹、氯喹、强力霉素、乙胺嘧啶和卤泛群)、抗结核药物 (例如氨基水杨酸盐 (例如氨基水杨酸))、异烟肼/利福平、异烟肼/吡嗪酰胺/利福平、贝达喹啉、异烟肼、乙胺丁醇、利福平、利福布汀、利福喷汀、卷曲霉素和环丝氨酸)、抗病毒药物 (例如金刚烷胺、金刚乙胺、阿巴卡韦/拉米夫定、恩曲他滨/替诺福韦、可比司他/埃替格韦/恩曲他滨/替诺福韦、依法韦仑/恩曲他滨/替诺福韦、阿巴卡韦/拉米夫定/齐多夫定、拉米夫定/齐多夫定、恩曲他滨/替诺福韦、恩曲他滨/洛匹那韦/利托

那韦/替诺福韦、干扰素 α -2v/利巴韦林、聚乙二醇干扰素 α -2b、马拉韦罗、雷特格韦、度鲁特韦、恩夫韦地、膦甲酸、福米韦生、奥司他韦、扎那米韦、奈韦拉平、依法韦仑、依曲韦林、利匹韦林、地拉韦啉、奈韦拉平、恩替卡韦、拉米夫定、阿德福韦、索非布韦、去羟肌苷、替诺福韦、avacivir、齐多夫定、司他夫定、恩曲他滨、扎西他宾、替比夫定、西美瑞韦、博赛泼维、特拉匹韦、洛匹那韦/利托那韦、福沙那韦、达芦那韦、利托那韦、替拉那韦、阿扎那韦、奈非那韦、安普那韦、茚地那韦、沙奎那韦、利巴韦林、伐昔洛韦、阿昔洛韦、泛昔洛韦、更昔洛韦、和缙更昔洛韦)、碳青霉烯类(例如多利培南、美罗培南、厄他培南和西司他丁/亚胺培南)、头孢菌素类(例如头孢羟氨苄、头孢拉定、头孢唑啉、头孢氨苄、头孢吡肟、头孢洛林、氯碳头孢、头孢替坦、头孢呋辛、头孢丙烯、氯碳头孢、头孢噻吩、头孢克洛、头孢布烯、头孢曲松、头孢噻肟、头孢泊肟、头孢地尼、头孢克肟、头孢托仑、头孢唑肟和头孢他啶)、糖肽类抗生素(例如万古霉素、达巴万星、奥利万星、和替拉泛星)、甘氨酸环素类(例如替加环素)、抗麻风药(例如氯法齐明和沙利度胺)、林可霉素及其衍生物(例如克林霉素和林可霉素)、大环内酯类及其衍生物(例如泰利霉素、非达霉素、红霉素、阿奇霉素、克拉霉素、地红霉素和醋竹桃霉素)、利奈唑胺、磺胺甲恶唑/甲氧苄啉、利福昔明、氯霉素、磷霉素、甲硝唑、氨曲南、杆菌肽、 β 内酰胺抗生素(苄星青霉素(苄星(benzathine)和苄基青霉素)、苯氧基甲基青霉素、氯唑西林、氟氯西林、甲氧西林、替莫西林、美西林、阿洛西林、美洛西林、哌拉西林、阿莫西林、巴卡西林、羧苄青霉素、哌拉西林、替卡西林、阿莫西林/克拉维酸、氨苄青霉素/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、克拉维酸/替卡西林、青霉素、普鲁卡因青霉素、苯唑西林、双氯西林、萘夫西林、头孢唑啉、头孢氨苄、头孢菌素C、头孢噻吩、头孢克洛、头孢羟唑、头孢呋辛、头孢替坦、头孢西丁、头孢克肟、头孢噻肟、头孢泊肟、头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟、头孢匹罗、头孢洛林、比阿培南、多利培南、厄他培南、法罗培南、亚胺培南、美罗培南、帕尼培南、拉祖培南、泰比培南、硫霉素、aztreonam、替吉莫南、诺卡菌素A、taboxinine和 β -内酰胺)、喹诺酮类(例如洛美沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、加替沙星、莫西沙星、环丙沙星、左氧氟沙星、吉米沙星、莫西沙星、西诺沙星、萘啶酸、依诺沙星、格帕沙星、加替沙星、曲伐沙星、和司帕沙星)、磺胺类(例如磺胺甲恶唑/甲氧苄啉、柳氮磺吡啶、和磺胺异唑)、四环素类(例如强力霉素、去甲氯四环素、米诺环素、强力霉素/水杨酸、强力霉素/ ω -3多不饱和脂肪酸和四环素)和泌尿道抗感染剂(例如呋喃妥因、乌洛托品、磷霉素、西诺沙星、萘啶酸、甲氧苄啉和亚甲蓝)。

[0195] 合适的化疗药包括但不限于紫杉醇、布妥昔单抗、多柔比星、5-FU(氟尿嘧啶)、依维莫司、培美曲塞、美法仑、帕米膦酸钠、阿那曲唑、依西美坦、奈拉滨、奥法木单抗、贝伐单抗、贝利司他、托西莫单抗、卡莫司汀、博来霉素、伯舒替尼、白消安、阿仑单抗、伊立替康、凡德他尼、比卡鲁胺、洛莫司汀、柔红霉素、氯法拉滨、卡博替尼、放线菌素D、雷莫芦单抗、阿糖胞苷、癌得星、环磷酰胺、地西他滨、地塞米松、多西紫杉醇、羟基脲、氮烯咪胺、亮丙瑞林、表柔比星、奥沙利铂、天冬酰胺酶、雌莫司汀、西妥昔单抗、维莫德吉、天门冬酰胺酶、*Erwinia chrysanthemi*、氨磷汀、依托泊苷、氟他胺、托瑞米芬、氟维司群、来曲唑、地盖瑞利、普拉曲沙、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶脱氧核苷、阿托珠单抗、吉西他滨、阿法替尼、甲磺酸伊马替尼、卡氮芥、艾日布林、曲妥珠单抗、六甲蜜胺、拓扑替康、帕纳替尼、依达比星、异环磷酰胺、依鲁替尼、阿西替尼、干扰素 α -2a、吉非替尼、罗米地辛、伊沙匹隆、卢佐替尼、卡巴他赛、曲妥珠单抗-美坦新偶联物(ado-trastuzumab emtansine)、卡非

佐米、苯丁酸氮芥、沙格司亭、克拉屈滨、米托坦、长春新碱、丙卡巴肼、甲地孕酮、曲美替尼、美司钠、氯化锶89、氮芥、丝裂霉素、白消安、吉妥珠单抗奥佐米星、长春瑞滨、非格司亭、乙二醇化非格司亭、索拉非尼、尼鲁米特、喷司他丁、他莫昔芬、米托蒽醌、培门冬酶、地尼白介素、阿利维A酸、卡铂、帕妥珠单抗、顺铂、泊马多胺、强的松、阿地白介素、巯嘌呤、唑来膦酸、来那度胺、利妥昔单抗、奥曲肽、达沙替尼、瑞格非尼、组氨瑞林、舒尼替尼、司妥昔单抗、高三尖杉酯碱、硫鸟嘌呤(thioguanine)(硫鸟嘌呤(tioguanine))、达拉菲尼、埃罗替尼、蓓萨罗丁、替莫唑胺、噻替派、萨力多胺、BCG、替西罗莫司、盐酸苯达莫司汀、曲普瑞林、三氧化二砷、拉帕替尼、戊柔比星、帕尼单抗、长春碱、硼替佐米、维A酸、阿扎胞苷、帕唑帕尼、替尼泊苷、甲酰四氢叶酸、克唑替尼、卡培他滨、恩杂鲁胺、伊匹单抗、戈舍瑞林、伏立诺他、艾代拉利司、色瑞替尼、阿比特龙、埃博霉素、他氟泊苷(tafluposide)、咪唑硫嘌呤、去氧氟尿苷、长春地辛、全反式维甲酸和本文其他地方列出的其他抗癌药物。

[0196] 使用RNA纳米笼和其药物制剂的方法

[0197] RNA纳米笼和其制剂可用于将一种或多种货物化合物递送到有需要的受试者或细胞。在一些实施方案中，RNA纳米笼可用于递送用于替代基因/转录物疗法的RNA或DNA分子，将RNAi或类似RNA(例如微小RNA)递送到受试者以特异性地抑制RNA转录物以降低一种或多种特定基因的基因表达，递送成像剂，递送小分子药物，和/或递送可封装在本文所提供的RNA纳米笼中的任何其他货物化合物。因此，RNA纳米笼可用于向有需要的受试者递送治疗化合物、预防化合物和/或诊断化合物。

[0198] 在一些实施方案中，本文所述的RNA纳米笼可与细胞或其群体接触。在一些实施方案中，使细胞或其群体对通过RNA纳米笼递送的治疗或预防敏化。在一些实施方案中，RNA纳米笼递送致敏剂。在一些方面，递送的货物化合物不是致敏剂。在一个方面，在施用RNA纳米笼之后，可使受试者对治疗敏化。在一个方面，对治疗，例如治疗性治疗(例如由RNA纳米笼递送的货物化合物所提供的治疗)的增加的敏感性或降低的敏感性可根据如本领域已知的一种或多种针对该特定治疗的方法来测量。在一个方面，测量对治疗的敏感性的方法包括但不限于细胞增殖测定和细胞死亡测定。在一个方面，可通过比较施用所公开的治疗组合物后的细胞或受试者的敏感性与未施用所公开的治疗组合物的细胞或受试者的敏感性来测量或确定细胞或受试者对治疗的敏感性。

[0199] 例如，在一个方面，施用致敏剂和/或RNA纳米笼(例如携带致敏剂的RNA纳米笼)后的细胞对治疗的敏感性可以是未施用致敏剂的细胞对治疗的敏感性的2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍或更大。在一个方面，施用所公开的治疗组合物后的细胞对治疗的抗性可以是未施用致敏剂(例如通过本文所述的RNA纳米笼递送的致敏剂)的细胞对治疗的抗性的1/2、1/3、1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9、1/10、1/11、1/12、1/13、1/14、1/15、1/16、1/17、1/18、1/19、1/20或更小。细胞或受试者的敏感性或抗性的确定在本领域中并且在普通临床医生和/或研究人员的技术范围内是常规的。

[0200] 在一个方面，可监测细胞或受试者对治疗的敏感性或抗性的确定。例如，在一个方面，可对于受试者，例如，患有癌症和/或异常细胞生长的人受试者或患者的生命，周期性地，例如每周、每隔一周、每月、每隔一个月、每3个月、6个月、9个月或每年、每隔一年、每5年、每10年，获得关于敏感性或抗性的数据。在一个方面，可在各个时间而不是在周期性时

间获取关于敏感性或抗性的数据。在一个方面,可基于关于细胞或受试者对治疗的的敏感性或抗性的数据来改良用于受试者的治疗。例如,在一个方面,可通过改变所公开组合物的剂量、所公开组合物的施用途径、所公开组合物的施用频率等来改良治疗。

[0201] 在RNA纳米笼包含连接靶向部分和/或货物化合物的光可切割接头的一些实施方案中,可向受试者或细胞群体施用所述RNA纳米笼。在施用后,可将光施加到有需要的受试者中需要治疗或预防的区域和/或细胞群体以引起RNA纳米笼和/或货物分子的释放。

[0202] 可向有需要的受试者、细胞或其群体施用如本文所提供的RNA纳米笼。有需要的受试者可患有癌症、遗传疾病或病症、病毒感染、细菌感染、寄生虫感染和/或真菌感染,或将受益于被递送的有效药剂(例如本文所述的货物化合物)的任何其他疾病或病症。递送的量可以是本文所提供的RNA纳米笼的有效量。有需要的受试者可以是有症状的或无症状的。在一些实施方案中,本文所提供的RNA纳米笼可与另一活性剂共同施用。应当了解,共同施用可指包含在制剂中或以与RNA纳米笼或其制剂分开的剂型提供的另外的化合物。RNA纳米笼或其制剂(例如本文所述的那些)的有效量可在约0.1mg/kg到约500mg/kg范围。在一些实施方案中,有效量在约0.1mg/kg到10mg/kg范围。在另外的实施方案中,有效量在约100mg/kg范围。在另外的实施方案中,有效量在约0.1mg到约1000mg范围。在一些实施方案中,有效量可以是约500mg到约1000mg。

[0203] RNA纳米笼和其制剂的施用可以是全身的或局部的。可每日一次或多次向有需要的受试者施用本文所述的化合物和制剂。在一个实施方案中,化合物和/或其制剂可每日施用一次。在一些实施方案中,化合物和/或其制剂可每日施用一次。在另一实施方案中,化合物和/或其制剂可每日施用两次。在一些实施方案中,当施用,向有需要的受试者施用有效量的化合物和/或制剂。化合物和/或其制剂可每周施用一次或多次。在一些实施方案中,化合物和/或其制剂可每周施用1日。在其他实施方案中,化合物和/或其制剂可每周施用2到7日。

[0204] 在一些实施方案中,RNA纳米笼和/或其制剂可以剂型施用。化合物和/或其制剂的量或有效量可分为多种剂型。例如,有效量可分成两种剂型,一种剂型可例如在早晨施用,而第二种剂型可在晚上施用。尽管有效量经两个剂量给予,但在一天内,受试者会收到有效量。在一些实施方案中,有效量为每日约0.1到约1000mg。剂型中的有效量可在约0.1mg/kg到约1000mg/kg范围。剂型可经配制用于口服、阴道、静脉内、透皮、皮下、腹膜内或肌肉内施用。用于各种施用途径的剂型的制备描述于本文别处。

[0205] 实施例

[0206] 提出以下实施例以向本领域普通技术人员提供如何使用和评价本文要求保护的化合物、组合物和方法的完全公开和描述,并且意在纯粹是所公开主题的示例,且不意在限制本发明人所认为的其发明的范围。然而,本领域技术人员根据本公开应当了解,可在不脱离本发明精神和范围的情况下对所公开的具体方面作出许多改变,并且仍然获得相同或类似的结果。已做出努力以确保关于数字(例如,量、温度等)的精确性,但应当考虑一些误差和偏差。除非另有说明,否则份数是重量份,温度是℃或是环境温度,并且压力是大气压或接近大气压。

[0207] 实施例1:用于癌症靶向的具有精确形状和大小的RNA四面体的可控自组装

[0208] DNA和RNA的Watson-Crick碱基配对性质使其发展为通过自下而上自组装构建纳

米材料的优异构造块[1-6]。为了通过定向或角度延伸构建更大的架构,必须以限定的角度或取向延伸构造块。这对DNA具有挑战性,因为对于常规B-DNA,一个 360° 的螺旋转角是10.5个核苷酸。每个螺旋转角的非整数将导致延伸角的扭转或取向控制的限制。在RNA中,对于A型RNA,每个螺旋转角的核苷酸数是11的整数,A型RNA是多数RNA序列的常见结构。RNA的这种独特性质可使得能够通过精确的单向控制进行RNA结构生长,这可促进用于材料科学、计算机装置和生物医学应用的大尺寸架构的构建。

[0209] RNA纳米技术是一个新兴领域,其涉及应用于生物医学和材料科学的主要由RNA构成的纳米级粒子的设计、构建和功能化[1]。先前的报道已显示,可通过自下而上的自组装基于RNA内和RNA间的相互作用构建多种RNA纳米结构,其具有有限的大小、形状和化学计量,包括三角形[7]、正方形[8-10]、束[11,12]、2D阵列[7,13]、六聚体[14-16]和3D笼[17-19]。我们已广泛利用噬菌体phi29包装RNA[20]的结构特征,以通过环-环相互作用[11,14,21,22]、回文序列介导的足-足相互作用[11,21]和三向连接(3WJ)基序[7,21,23-25]构建各种RNA纳米粒子。最近,使用pRNA-3WJ作为顶点处的核心支架构建了2D多边形,例如三角形、正方形和五边形[25]。该2D工作扩展到设计和构建具有可控形状和大小的3D RNA纳米粒子。

[0210] 四面体几何形状因其固有的机械刚性和结构稳定性而有吸引力。它是具有四个三角形面和六个边的棱锥样结构。已使用几种方法来构建基于DNA的四面体,例如基于长单DNA链的折纸(origami)方法[26]、使用粘性末端的链的互补杂交[27,28]和片材(tile)的分级组装[29]。RNA是有吸引力的替代构造块,因为它高的热稳定性[30,31]和结构上的多功能性[1,32],远远超出DNA纳米结构中过分简单规范的Watson-Crick碱基配对。在本文中,将充分表征的超稳定3WJ基序[15,23]用作核心支架以构建四面体架构。RNA四面体具有确定的3D结构,如通过原子力显微镜(AFM)以及通过单粒子冷冻电子显微术(cryo-EM)所揭示的,人们早已发现这在使不与蛋白质形成复合物的纯RNA结构成像方面是非常具有挑战性的[33]。此外,为了RNA四面体的功能化,将适体、核酶和siRNA高精度地置于RNA四面体的边缘,而不破坏总体结构。重要的是,在组装RNA四面体之前掺入功能模块以确保以高产率产生均匀的纳米粒子。生物分布研究揭示,用靶向EGFR的RNA适体功能化的RNA四面体特异性地靶向原位乳腺肿瘤,而在健康的重要器官中没有可检测到的积累。设想RNA四面体在纳米技术领域具有广泛影响,例如用于高精度地组织纳米级材料,将功能材料封装在其中空腔内,针对患病细胞的靶向治疗,以及作为图像引导的递送载体。

[0211] 在该研究中,将pRNA-3WJ基序[15,23](图1A)用作核心模块并置于各四个顶点处以构造RNA四面体(图1B)。设计总共四条RNA链,其由四个pRNA 3WJ核心序列和六个连接RNA序列组成。然后使用计算建模软件UCSF Chimera[34]、Swiss PDB Viewer和PyMOL Molecular Graphics System生成RNA四面体的3D模型(图1B)。得到的计算模型展现出真实的四面体构象。为了组装RNA四面体,通过体外转录合成四条RNA链,然后将其以化学计量比混合,并以一锅(one-pot)方式在 $1\times$ Tris缓冲液中退火。通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)观察复合物的逐步组装(图1D)。图29-31显示了在该实施例中讨论的8nm和17nm RNA四面体中使用的各种链和功能模块的RNA序列。

[0212] 对于3D RNA四面体,其天然状态下最令人信服的结构表征来自单粒子cryo-EM研究。首先分析了每个边缘具有两个螺旋转角的8nm RNA四面体的3D结构(图1F)。通过分析从

cryo-EM图像收集的总共1254个粒子来应用单粒子3D重建并且实现19 Å的最终分辨率(金标准准则,0.143傅里叶壳相关)(图21A-21C)。3D重建数据揭示RNA四面体具有与计算的3D模型一致的清晰总体形状(图1C),这与8nm的预测大小一致。重建的RNA四面体3D模型的2D计算投影显示与原始粒子的2D类平均的明确匹配,表明重建的3D模型真实地代表了设计的RNA四面体的天然结构和构象。来自cryo-EM的图像符合通过AFM成像获得的全局图像(图1E)。然而,每个四面体的中心空腔太小而不能通过AFM分辨,并且得到 12.5 ± 0.6 nm的表现大小。观察到的大小差异是由于AFM尖端直径的限制。为了进一步表征RNA四面体的大小,进行动态光散射(DLS)。DLS假设粒子在溶液中具有平均球形几何形状。确定RNA四面体的表观流体动力学大小为 8.5 ± 2.4 nm(图2a)。

[0213] 也通过DLS评价了以 ζ 电位测量的RNA四面体的表面电荷。如所预计的,由于核苷酸的磷酸骨架,RNA四面体具有负表面电荷,在 -14.9 ± 1.0 mV处具有单峰。该负表面电荷有利于RNA纳米粒子的总体胶体稳定性并防止在溶液中形成聚集。此外,负表面电荷还可降低纳米粒子与网状内皮系统(RES)的非特异性相互作用,并使非特异性细胞进入最小化,这对于体内靶向药物递送和诊疗应用来说有吸引力[35]。

[0214] 为了评估RNA四面体的热力学稳定性,通过在实时PCR机器上测量它们在SYBR Green II染料存在下与温度变化的荧光强度来研究它们的解链温度(T_m)。解链实验揭示,组装的RNA四面体具有非常平滑、高斜率的温度依赖性熔解曲线, T_m 为 71.3 ± 1.8 °C。高斜率表明四面体由其四条组成链的协同组装。此外,比较了RNA、2'-F RNA和DNA四面体的解链曲线。结果显示,2'-F RNA四面体最稳定,其 T_m 为 77.7 ± 2.4 °C,其次是RNA四面体,其 T_m 为 71.3 ± 1.8 °C,最后DNA四面体,其 T_m 值低得多,为 58.3 ± 0.5 °C。这些结果与先前报道的具有以下稳定性顺序的核酸的热力学稳定性一致:2'-F RNA>RNA>DNA[30,31]。

[0215] 为了研究它们的酶稳定性,将未修饰的和2'-F修饰的(U和C核苷酸)RNA四面体在具有10%FBS(胎牛血清)的细胞培养基中培育。在特定时间点,提取等分试样并通过非变性PAGE加以评价。结果示于图22A-22C中。未修饰的RNA四面体在15min内降解,而2'-F对应物在远超过24h的延长时段内稳定。对血清介导的降解的抗性与高热力学稳定性的组合对于这些RNA纳米粒子的体内应用来说特别有吸引力。

[0216] 为了证实RNA四面体的精确可调大小,设计了一个更大的17nm RNA四面体,其中四面体的每个边缘延伸到55bp,等于五个螺旋转角(图23)。在该设计中,该更大的纳米粒子具有相同的总体四面体几何形状(图3A)。在一锅自组装中使四条组成链退火后,较大的RNA四面体以高效率组装,如通过非变性PAGE分析所揭示的(图3B)。DLS实验揭示较大的RNA四面体的流体动力学直径为 16.9 ± 1.6 nm,这与设计的尺寸一致(图3C)。此外,AFM成像明显能够分辨四面体形态以及内腔(图3D)。由于RNA四面体在空气中成像之前在APS改性的云母表面上干燥,因此观察到扁平的四面体形状。RNA纳米粒子在形状和结构上也是高度均匀的,证实了RNA四面体的自组装的稳健性。Cryo-EM图像进一步显示具有预计的大小和几何形状的非常清晰的RNA四面体纳米粒子(由红色圆圈指示)(图3E)。从131个cryo-EM图像收集的总共1582个粒子的单粒子3D重建实现23 Å的分辨率(金标准准则,0.143傅里叶壳相关)(图24A-24C)。图28显示了使用17nmRNA四面体的最终3D模型针对倾斜图像对计算的相关倾斜几何形状。

[0217] 为了评价四面体的应用,将四种不同的功能模块(包括乙型肝炎病毒(HBV)核酶、

用于孔雀绿(MG)或Spinach的荧光适体和链霉亲和素结合适体(图4A)掺入四面体结构中。将功能模块的序列简单地与3WJ核心的序列融合,然后通过体外转录合成。在使链退火后,通过非变性PAGE分析评价逐步自组装以确认RNA四面体的成功组装(图4B)。然后进行功能测定以确定所述模块在掺入RNA四面体中后是否保留它们真实的折叠和功能。

[0218] HBV核酶是可靶向并切割135nt HBV基因组RNA底物的锤头核酶[36]。该HBV核酶通过延伸纳米粒子的一条链而融合到RNA四面体。与携有HBV核酶的RNA四面体培育后,HBV底物被切割成具有更小分子量的片段,如通过PAGE分析所揭示的(图4C)。切割反应的产率与阳性对照(携有HBV核酶的pRNA)相当。相比之下,本身或携有失去效力的HBV核酶(催化位点中的G→A突变)的RNA四面体没有催化作用。结果确认设计的多功能RNA四面体成功地护送(escort)HBV核酶,并且在核酶序列融合到四面体后保留了催化活性。

[0219] MG[37,38]和Spinach[39]适体两者的荧光性质均得到充分表征,其在结合其各自的染料靶标(三苯甲烷和3,5-二氟-4-羟基亚苄基咪唑啉酮(DFHBI))后发射荧光。为了验证掺入多功能RNA四面体中的MG适体和Spinach适体仍然是功能性的并且正确折叠,使用荧光分光光度计进行荧光研究。荧光发射谱显示,两种适体均保留其结合各自染料的能力,并且以类似于阳性对照的水平发射强荧光,表明这些荧光适体保留了正确折叠和功能(图4D和4E)。与四面体纳米粒子融合的荧光模块可具有用于使这些纳米粒子在细胞中成像的潜在应用。

[0220] 在与STV琼脂糖树脂培育后,携有STV适体[40]的多功能RNA四面体以高亲和力成功地结合到树脂,并被生物素洗脱(图4F)。相比之下,阴性对照四面体不结合到树脂,并且也未在洗脱级分中显现。结果表明,与RNA四面体融合不会干扰STV适体的天然结构和功能。此外,在洗脱的携有MG适体和Spinach适体的多功能纳米粒子的PAGE分析中,它们仍保留其荧光性质,表明RNA四面体结构促进这两种适体在融合到RNA纳米粒子中后的正确折叠(图25)。结果证实融合的STV适体可被潜在地用作手柄(handle)以通过使用STV琼脂糖树脂特异性地纯化组装的多功能RNA四面体。

[0221] 利用双荧光素酶报道子测定来研究携有4个siRNA的RNA四面体的基因沉默效应,所述4个siRNA靶向萤火虫荧光素酶基因的相同区域(图26)。不是荧光素酶siRNA靶标的海肾荧光素酶可用作内部对照。萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶的表达水平的相对比率用于评价转染后MCF-7细胞中的靶向基因沉默效应。结果揭示,浓度为 1×10^{-9} m的携有4个荧光素酶siRNA的四面体实现了约90%的基因沉默,这类似于浓度为 4×10^{-9} m的仅荧光素酶siRNA的阳性对照。相比之下,仅四面体和乱序对照(scrambled control)没有显示出任何明显的基因沉默效应(图5B)。这些结果证实荧光素酶siRNA在掺入RNA四面体中后仍然保持其基因沉默能力,表明RNA四面体可用作用于细胞内siRNA递送的有效运载体。

[0222] 对于有效的癌症疗法,理想的是将治疗剂引导到特定的癌细胞。受体酪氨酸激酶(RTK)的表皮生长因子受体(EGFR)家族在原发性肿瘤和转移性乳腺癌细胞两者中均非常普遍,使它们成为靶向治疗法的理想候选物[41]。RNA适体已被开发为以高选择性和灵敏度结合到EGFR受体[42-45]。这里将靶向EGFR的RNA适体加入RNA四面体中(图27),并通过共聚焦显微术评价它们的细胞结合(图5a)。将Alexa647标记的RNA链掺入四面体中用于荧光成像。没有EGFR适体的四面体用作阴性对照。共聚焦成像显示具有EGFR适体的四面体纳米粒子与EGFR(+)MDA-MB-231细胞强烈结合(图5a),如通过Alexa647标记的RNA和细胞肌动蛋白的共

定位所揭示的(图5a)。相比之下,没有EGFR适体的阴性对照“裸”四面体显示出可忽略的细胞结合。结果表明EGFR适体可促进RNA四面体与表达EGFR的癌细胞的结合。

[0223] 为了研究RNA四面体的体内癌症靶向性质,通过将MDA-MB-231细胞直接注射到无胸腺裸小鼠[46]的乳腺脂肪垫中以生成异种移植物来原位生成乳腺癌小鼠模型。将携有EGFR适体和Alexa647的核酸酶抗性2'-FRNA四面体全身注射到小鼠中,并通过全身成像监测它们的生物分布。注射后8h处死小鼠并收集它们的器官用于离体成像(图5C)。在除乳腺肿瘤之外的任何其他器官中未检测到RNA四面体,表明纳米粒子在全身注射后从正常器官中快速清除并且不在肝、肺、脾或肾中积累。在通过使用表达EGFR的KB细胞异种移植物小鼠模型的另一确认性动物试验中,也观察到RNA四面体的类似癌症靶向能力(图5D)。RNA四面体的选择性癌症靶向能力将使该递送系统成为未来靶向癌症成像研究和/或癌症疗法的有吸引力的候选物。

[0224] 总之,基于超稳定的pRNA-3WJ基序公开了多功能3D RNA四面体的设计和自组装。构建的RNA四面体具有通过AFM和单粒子cryo-EM两者揭示的确定的3D结构。可通过改变每个边缘RNA碱基对的数目来容易地调节RNA四面体的大小。解链实验揭示其高热力学稳定性。适体、核酶和siRNA以其正确折叠和最佳功能被成功地掺入RNA四面体中。细胞结合和生物分布研究显示,用EGFR适体功能化的RNA四面体靶向原位乳腺肿瘤而在其他健康器官中没有可检测到的积累。这些结果表明3D RNA四面体纳米粒子具有护送用于体内癌症诊断和治疗的成像模块和治疗剂的潜力。

[0225] 参考文献

[0226] [1]P.Guo,Nat.Nanotechnol.2010,5,833.

[0227] [2]H.Li,T.Lee,T.Dziubla,F.Pi,S.Guo,J.Xu,C.Li,F.Haque,X.Liang,P.Guo,Nano Today 2015,10,631.

[0228] [3]Y.Shu,F.Pi,A.Sharma,M.Rajabi,F.Haque,D.Shu,M.Leggas,B.M.Evers,P.Guo,Adv.Drug Delivery Rev.2014,66C,74.

[0229] [4]N.C.Seeman,Annu.Rev.Biochem.2010,79,65.

[0230] [5]F.Zhang,J.Nangreave,Y.Liu,H.Yan,J.Am.Chem.Soc.2014,136,11198.

[0231] [6]M.R.Jones,N.C.Seeman,C.A.Mirkin,Science 2015,347,1260901.

[0232] [7]E.F.Khisamutdinov,D.L.Jasinski,P.Guo,ACS Nano 2014,8,4771.

[0233] [8]D.Jasinski,E.F.Khisamutdinov,Y.L.Lyubchenko,P.Guo,ACS Nano 2014,8,7620.

[0234] [9]I.Severcan,C.Geary,E.Verzemnieks,A.Chworos,L.Jaeger,Nano Lett.2009,9,1270.

[0235] [10]S.M.Dibrov,J.McLean,J.Parsons,T.Hermann,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2011,108,6405.

[0236] [11]D.Shu,W.D.Moll,Z.Deng,C.Mao,P.Guo,Nano Lett.2004,4,1717.

[0237] [12]L.Nasalean,S.Baudrey,N.B.Leontis,L.Jaeger,Nucl.Acids Res.2006,34,1381.

[0238] [13]A.Chworos,I.Severcan,A.Y.Koyfman,P.Weinkam,E.Oroudjev,H.G.Hansma,L.Jaeger,Science 2004,306,2068.

- [0239] [14] P. Guo, C. Zhang, C. Chen, M. Trottier, K. Garver, *Mol. Cell.* 1998, 2, 149.
- [0240] [15] H. Zhang, J. A. Endrizzi, Y. Shu, F. Haque, C. Sauter, L. S. Shlyakhtenko, Y. Lyubchenko, P. Guo, Y. I. Chi, *RNA* 2013, 19, 1226.
- [0241] [16] W. W. Grabow, P. Zakrevsky, K. A. Afonin, A. Chworos, B. A. Shapiro, L. Jaeger, *Nano Lett.* 2011, 11, 878.
- [0242] [17] C. Hao, X. Li, C. Tian, W. Jiang, G. Wang, C. Mao, *Nat. Commun.* 2014, 5, 3890.
- [0243] [18] I. Severcan, C. Geary, A. Chworos, N. Voss, E. Jacovetty, L. Jaeger, *Nat. Chem.* 2010, 2, 772.
- [0244] [19] K. A. Afonin, M. Viard, A. Y. Koyfman, A. N. Martins, W. K. Kasprzak, M. Panigaj, R. Desai, A. Santhanam, W. W. Grabow, L. Jaeger, E. Heldman, J. Reiser, W. Chiu, E. O. Freed, B. A. Shapiro, *Nano Lett.* 2014, 14, 5662.
- [0245] [20] P. Guo, S. Erickson, D. Anderson, *Science* 1987, 236, 690.
- [0246] [21] Y. Shu, F. Haque, D. Shu, W. Li, Z. Zhu, M. Kotb, Y. Lyubchenko, P. Guo, *RNA* 2013, 19, 766.
- [0247] [22] Y. Shu, D. Shu, F. Haque, P. Guo, *Nat. Protoc.* 2013, 8, 1635.
- [0248] [23] D. Shu, Y. Shu, F. Haque, S. Abdelmawla, P. Guo, *Nat. Nanotechnol.* 2011, 6, 658.
- [0249] [24] F. Haque, D. Shu, Y. Shu, L. Shlyakhtenko, P. Rychahou, M. Evers, P. Guo, *Nano Today* 2012, 7, 245.
- [0250] [25] E. F. Khisamutdinov, H. Li, D. Jasinski, J. Chen, J. Fu, P. Guo, *Nucl. Acids Res.* 2014, 42, 9996.
- [0251] [26] Z. Li, B. Wei, J. Nangreave, C. X. Lin, Y. Liu, Y. L. Mi, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 13093.
- [0252] [27] J. P. Sadowski, C. R. Calvert, D. Y. Zhang, N. A. Pierce, P. Yin, *ACS Nano* 2014, 8, 3251.
- [0253] [28] H. Lee, A. K. Lytton-Jean, Y. Chen, K. T. Love, A. I. Park, E. D. Karagiannis, A. Sehgal, W. Querbes, C. S. Zurenko, M. Jayaraman, C. G. Peng, K. Charisse, A. Borodovsky, M. Manoharan, J. S. Donahoe, J. Truelove, M. Nahrendorf, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat. Nanotechnol.* 2012, 7, 389.
- [0254] [29] R. Iinuma, Y. G. Ke, R. Jungmann, T. Schlichthaerle, J. B. Woehrstein, P. Yin, *Science* 2014, 344, 65.
- [0255] [30] D. W. Binzel, E. F. Khisamutdinov, P. Guo, *Biochemistry* 2014, 53, 2221.
- [0256] [31] N. Sugimoto, S. Nakano, M. Katoh, A. Matsumura, H. Nakamuta, T. Ohmichi, M. Yoneyama, M. Sasaki, *Biochemistry* 1995, 34, 11211.
- [0257] [32] N. B. Leontis, E. Westhof, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2003, 13, 300.
- [0258] [33] R. F. Garman, A. Gopal, S. S. Athavale, C. M. Knobler, W. M. Gelbart, S. C. Harvey, *RNA* 2015, 21, 877.
- [0259] [34] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* 2004, 25, 1605.

- [0260] [35] 先进药物递送评论:癌症纳米技术 (Advanced Drug Delivery Reviews: Cancer Nanotechnology), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands 2014.
- [0261] [36] S.Hoeprich, Q.Zhou, S.Guo, G.Qi, Y.Wang, P.Guo, Gene Ther. 2003, 10, 1258.
- [0262] [37] C.Baugh, D.Grate, C.Wilson, J.Mol.Biol. 2000, 301, 117.
- [0263] [38] J.Flinders, S.C.Defina, D.M.Brackett, C.Baugh, C.Wilson, T.Dieckmann, ChemBioChem 2004, 5, 62.
- [0264] [39] J.S.Paige, T.Nguyen-Duc, W.Song, S.R.Jaffrey, Science 2012, 335, 1194.
- [0265] [40] C.Srisawat, D.R.Engelke, RNA 2001, 7, 632.
- [0266] [41] N.E.Hynes, H.A.Lane, Nat.Rev.Cancer 2005, 5, 341.
- [0267] [42] C.L.Esposito, D.Passaro, I.Longobardo, G.Condorelli, P.Marotta, A.Affuso, V.de Franciscis, L.Cerchia, PLoS One 2011, 6, e24071.
- [0268] [43] K.W.Thiel, L.I.Hernandez, J.P.Dassie, W.H.Thiel, X.Liu, K.R.Stockdale, A.M.Rothman, F.J.Hernandez, J.O.McNamara, P.H.Giangrande, Nucleic Acids Res. 2012, 40, 6319.
- [0269] [44] M.Y.Kim, S.Jeong, Nucleic Acid Ther. 2011, 21, 173.
- [0270] [45] C.H.Chen, G.A.Chernis, V.Q.Hoang, R.Landgraf, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2003, 100, 9226.
- [0271] [46] D.Shu, H.Li, Y.Shu, G.Xiong, W.E.Carson, F.Haque, R.Xu, P.Guo, ACS Nano 2015, 9, 9731.
- [0272] 实施例2:用于加载和保护小RNA和模型药物的RNA 3D纳米棱柱的制作
- [0273] 结果和讨论
- [0274] 从平面pRNA 3WJ几何学计算机辅助合理设计和制作3D RNA纳米棱柱。
- [0275] 依照自下而上方法采用pRNA 3WJ的结构信息设计三角形纳米棱柱[1]。因此,三个相邻布置的3WJ的两个螺旋与双链体RNA连接以形成扁平三角形纳米粒子,这是先前设计的纳米粒子构建方法[12]。为了将2D三角形粒子延伸至3D RNA复合物,在每个顶点上含有21个核苷酸(nt)的单链(ss)互补接头(L)区域的两个三角形纳米粒子(T1和T2)被系连(图6A)。每个ssL区域被设计成与其互补链L1-L1'、L2-L2'、L3-L3'特异性相互作用,形成21bp的RNA-RNA双链体。为了提供结构柔性并允许接头弯曲成三棱柱复合物所需的90°角,将聚尿嘧啶(poly-Us)嵌入在ssL和三角形顶点之间。这导致形成具有总共8条RNA链的“面对面”二聚体。使用SwissPDB Viewer软件[34]手动计算总体几何形状,所述结构类似于在拐角处具有pRNA-3WJ基序的三棱柱几何形状。如通过建模软件所测量的,3D RNA模型展示从一个顶点到相邻顶点测量的约11nm的大小,以及从一个顶点到其最近边缘测量的约10nm的大小(图6B)。测量棱柱内腔的最大直径为约7nm,而高度为约6nm。基于这些尺寸,我们假设棱柱的中心腔可容纳直径大约为6nm的球形物体。
- [0276] 首先通过6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)测定RNA链的组装成期望构象的组装效率。在添加8条组成链中的每一条后,可明显看到电泳迁移的逐步减少,表明每个互补的ssRNA寡聚体缔合成复合RNA结构(图7A)。泳道7中的不同条带表明形成含有所有8条RNA链的稳定RNA复合物。凝胶带强度的积分产生 $43.0 \pm 3.1\%$ 的估计组装产率。大部分RNA聚集体位于泳道7的顶部。据推测,这归因于21nt RNA单链粘性末端之间的非特异性相互作用

用。有趣的是,没有D和d'链的RNA复合物具有高得多的组装效率,估计产率为90%(图7A泳道6)。

[0277] 利用DLS测量纯化的RNA棱柱的表观尺寸。如通过DLS测量的, RNA复合物的流体动力学直径为 11.5 ± 1.6 nm,与纳米棱柱的3D模型结构一致(图7B)。纯RNA复合物的AFM成像揭示所述粒子实际上确实展示出棱柱样架构(图7C)。AFM是3D RNA棱柱的2D观察且不能用于最终表明三棱柱几何形状的形成,然而,所述粒子在二维投影中确实类似于所设计的三棱柱。

[0278] Cryo-EM成像研究揭示三棱柱几何形状

[0279] 为了解决关于8条RNA链的折叠是否导致3D几何形状的问题,通过单粒子冷冻电子显微术(cryo-EM)显现纯化的RNA复合物(图7D、7E)。冷冻电子显微术是显示RNA纳米棱柱的真正3D特性的有用方法,因为AFM分析引起以2D成像的3D纳米粒子的失真[35]。使用如方法部分中所述的EMAN2方法实施单粒子重建来实现RNA纳米粒子的3D重建。以2.5nm(10nm RNA棱柱)和2.2nm(5nm RNA棱柱)的分辨率确定RNA复合物的3D结构的重建,并且证实RNA粒子分别具有10nm和5nm的平均大小,这与DLS和AFM结果一致。更重要的是,总体几何结构类似于计算机建模的3D RNA棱柱。值得注意的是,通过Cryo-EM对RNA棱柱的重建清楚证实内腔的存在。总之,来自非变性PAGE、DLS、AFM和Cryo-EM的数据明确表明封闭和紧凑的RNA纳米棱柱的形成。

[0280] RNA适体封装的纳米粒子的设计和构建。

[0281] MGA是生物化学中常用的结构功能验证工具[36-38]。这归因于其独特的性质,因为溶液中的游离MG染料展示很少到没有荧光信号,但当与MGA结合时,光电发射增加超过2000倍[39,40]。然而,只有当RNA MGA折叠成其真实的3D构象时才会发生荧光。使用2'-F修饰的RNA碱基实现荧光的先前尝试得到很少到没有荧光[26]。因此,为了使RNA MGA在细胞环境中仍然是有用的工具,必须将其置于保护RNA免受降解环境影响的容器中。这是许多具有治疗效用的小RNA和小分子药物中的常见问题。使用2'-F修饰的RNA构建棱柱框架(2'-氟尿苷(2'-F-U)和2'-氟胞嘧啶(2'-F-C),已知它们对降解环境展示出抗性)[41],假设当位于2'-F修饰的纳米笼内时, RNA MGA将受到保护。

[0282] 作为原理验证(proof-of-principle),MGA RNA序列通过将其嵌入"D"和"d'"链内的3'末端而被采用。示意性封装设计汇总于图8A中。在该实施例通篇中,参照由6条经2'-F修饰的RNA链形成的稳定RNA复合物,其中没有D链或d'链作为“框架”。有趣的是,发现该复合物高度稳定,表观解链温度(TM)为74℃,组装效率依赖于Mg²⁺。

[0283] 使用SwissPDB Viewer,首先通过将MGA的3D结构放置在由纳米棱柱形成的内腔内来模拟具有封装的MGA的RNA纳米笼的复杂结构。这允许估计将RNA MGA(从PDB ID:1F1T引出[24])安装到棱柱的内腔中所需的碱基对中的距离约束。在非变性PAGE上评价纳米笼内RNA MGA的复合。与泳道1(仅2'-F-RNA框架)相比,位于泳道4(具有MGA的2'-F-RNA框架)中的条带的表观凝胶移位显示MGA序列与通过用溴化乙锭(EB)进行总RNA染色检测的框架结构的复合。在MG染料存在下对相同凝胶的染色导致来自泳道4上的不同条带的强荧光发射,表明RNA MGA的正确折叠。基于封闭(紧凑)和开放(松弛)的3D RNA复合物的迁移性质进行另外的对照实验,因为通常认为更紧凑的RNA结构与松弛的RNA构象相比迁移得更快。为了制作开放的3D棱柱构象,通过序列设计有意破坏将两个RNA三角形连接在一起的一个互补

粘性末端的相互作用。比较开放RNA棱柱与封闭形式的迁移揭示了迁移距离的微小差异。这表明棱柱是封闭的,并且推测MGA位于纳米笼的内腔内。仅从迁移率变动测定获得的数据并不提供RNA MGA是否在封闭笼内部形成的具体结论;支持该假设的其他数据来自如下所述的核糖核酸酶T1切割实验。

[0284] 核糖核酸酶T1保护测定确认纳米笼对MG RNA适体的封装。

[0285] 由于RNA笼的内腔和RNA MGA两者的带负电磷酸二酯骨架引起的排斥力,RNA模块在带负电RNA纳米棱柱内的封装是有挑战性的。开发克服该挑战的方法将是特别有益的,因为功能性RNA模块的活性可通过保护它们免于体内酶促降解来保留。为了进一步确认RNA MGA定位于纳米笼的空腔内部,用特异性地切割未配对的鸟苷(Gs)核苷酸的核酸内切酶核糖核酸酶T1处理RNA复合物[42]。尽管单链Gs不存在于2'-F-RNA的棱柱构建体中,但在RNA MGA本身中存在几个对于MG结合必需的ss Gs。因此,假设核糖核酸酶T1将切割MGA序列的暴露的Gs,导致荧光损失。然而,如果所述笼限制核糖核酸酶T1接近纳米棱柱内的MG适体,则荧光发射将保留或以较慢的速率衰减。

[0286] 根据棱柱的模拟3D结构,棱柱的内腔的估计平均尺寸可容纳约6nm的球形物体。核糖核酸酶T1结构的平均大小测量(PDB ID:1YGW)为直径3.7nm[43],允许核糖核酸酶T1容易地进入内腔并猝灭MGA的荧光。为了解决这个障碍,通过将RNA棱柱螺旋区域的长度减少一半来设计具有3nm的较小空腔大小的纳米棱柱。实验的示意性设计汇总在图8B中。预计较小的棱柱使MGA免于核糖核酸酶T1切割,从而延长荧光活性。

[0287] 该小棱柱的组装是高效的,并且RNA MGA根据非变性PAGE分析是功能性的(图8C,泳道1和2)。接下来,在核糖核酸酶T1存在下进行时间依赖性MG荧光衰减,以测试嵌入大纳米棱柱和小纳米棱柱内部的MGA的活性。图8D显示了大(正方形)和小(圆形)纳米棱柱的荧光指数衰减曲线。发现对于大纳米棱柱和小纳米棱柱,计算的寿命(τ)分别为445.5秒和781.4秒。小棱柱展示半衰期几乎是大棱柱的两倍,表明核糖核酸酶T1对封装在小纳米棱柱内部的MGA的有限接近。推测由于两个三角形的相互作用接头臂的动态性质而尚未观察到针对核糖核酸酶T1的完全保护。AFM图像也支持这一点,其中大部分棱柱处于开放状态,这允许核糖核酸酶T1消化MGA。值得注意的是,在与核糖核酸酶T1培育1小时后仍然观察到小棱柱的荧光发射,而大棱柱中的荧光可忽略不计(图8E)。使用含有RNAMGA的各种其他RNA对照复合物进行另外的对照实验。 τ 的计算值汇总于表1中。小RNA棱柱与对照的平均寿命比较证实对照构建体的 τ 均小于小棱柱。因此,核糖核酸酶T1切割测定表明封装在小纳米笼和大纳米笼两者中的MGA的成功封装。更重要的是,我们已经证明,通过调节内腔的大小,可显著增加荧光半衰期。这与增加可潜在用于体内系统的药物的释放时间同义。

[0288]

表 1. 不同 RNA 构建体的荧光寿命

纳米粒子的类型和结构					
	三角棱柱	对照 1:	对照 2:	对照 3:	小棱柱
寿命 τ , 秒	445.5 $\pm$	352.3 $\pm$	273.2 $\pm$	386.5 $\pm$	781.4 $\pm$
^a	50.0	47.8	39.3	45.6	43.0
^a 从至少三次独立实验获得的平均值的标准误差					

[0289] 寡核苷酸-药物缀合物在纳米笼内的封装

[0290] 利用D和d'棱柱链的可编程性,接下来证实含有功能部分(例如荧光报道分子和药物)的单链寡脱氧核苷酸(ssODN)的封装。为此,设计一个长ssRNA以通过22nt接头连接D和d'链。所得到的RNA序列被称为“核心”RNA链。核心RNA链的5'末端和3'末端与棱柱的三角形边缘相互作用,而其单链中间区域被设计为定位在纳米笼内。棱柱内部的核心链部分用于通过碱基对杂交封装携带不同官能团的ssDNA或ssRNA。因此,预期功能性部分的封装将阻止它们酶促降解并增加它们的细胞寿命。或者,该原理可用作安全机制。例如,携带应当仅在到达其靶标时才被释放的高毒性化合物。

[0291] 由于RNA棱柱的可编程特性,因此纳米容器的大小可通过完全螺旋回转简单地增加或减少棱柱的边来调整,如先前所述[41, 44]。这是有利的,因为可控制RNA纳米容器的容量,使得能够封装不同大小的生物分子或无机纳米粒子,以及增加单个纳米容器的有效载荷,以增加检测灵敏度和增加疾病治疗中的功效。此外,从医学角度来看,纳米棱柱的大小变换赋予毒性、细胞结合和内化、肾清除、物理化学特征以及药物代谢动力学和药物效应动力学特征的差异。因此,棱柱形纳米容器提供了独特的系统来进一步利用这些因素。

[0292] 设计方案示于图20A中。化学药物封装背后的原理依赖于药物在DNA/RNA寡核苷酸的3'/5'-末端或两端的缀合,之后该缀合物在RNA纳米棱柱的空腔内的杂交。为了在实践中证实这一点,使用在5'末端用不同化学物质标记的短DNA序列(22nt),所述化学物质包括叶酸(FA)、环糊精、紫杉醇、Cy5荧光团和生物素。为了验证具有缀合的DNA序列的RNA纳米粒子的形成,通过以等摩尔浓度混合,在一锅中组装棱柱链和相应的DNA寡核苷酸,之后进行非变性PAGE分析。PAGE分析结果示于图20B中。存在对应于框架结构和含有核心RNA序列的框架的独特条带(图20B中所示的非变性PAGE上的泳道1和2)。另外的泳道对应于含有多种小分子的具有22nt DNA的加载纳米笼。基于所有五个加载货物与泳道1和2中的条带相比更慢的速率和几乎相同的距离,我们可以推断,缀合的ssDNA在纳米笼结构内成功杂交。另外,加载Cy5的纳米笼的Cy5和EB信号的共迁移表明正确组装。

[0293] 为了证实DNA-生物素缀合物在RNA 3D笼内的掺入和功能,利用生物素-链霉亲和素结合[45]。结果示于图20C中。为了分别显现生物素-纳米棱柱和链霉亲和素,用Cy5标记DNA-生物素缀合物,并用Cy3标记链霉亲和素。随后的凝胶移位测定证实了封装的生物素和链霉亲和素之间的复合,因为复合物比单独的生物素-纳米棱柱或链霉亲和素迁移慢得多。泳道1中不同条带中EB (RNA)、Cy3 (链霉亲和素) 和Cy5 (DNA生物素) 信号的共定位揭示了封装分子的功能性质。尽管PAGE结果不能直接确认功能性是否位于纳米笼内,但基于计算机建模和荧光功能测定的结果是封装机制的强烈指示。利用RNA D和d'链的可编程性以及ssDNA-药物缀合物的模块性,我们能够证实封装方法除了RNA MGA适体封装之外还用于笼蔽(caging)小分子的可行性。

[0294] 改变RNA化学修饰允许控制纳米棱柱血清稳定性和药物释放

[0295] RNA 3D纳米容器的一个潜在优点是安全地递送和以精细可调的方式释放封装的药物。控制释放的开发极具挑战性,但在RNA纳米技术中非常需要[1]。为了释放封装的药物,一种方法是使用天然存在的核酸酶的帮助来分解RNA 3D纳米支架。假设改变纳米棱柱支架中2'-F核苷酸的百分比将产生不同的降解特征。为了改变纳米棱柱中2'-F核苷酸的量,在体外转录反应期间将2'-F胞苷磷酸(CTP)和尿苷磷酸(UTP)核苷酸与未修饰的胞苷磷酸尿苷磷酸的比率分别调整为4:0、3:1、2:2、1:3和0:4。在转录和纯化后,用大约100%、75%、50%、25%和0%的2'-F-C/U修饰组装五种不同的纳米棱柱。在1小时内2%胎牛血清(FBS)溶液中以200nM的最终浓度观察每种纳米棱柱的降解特征,并在3%琼脂糖凝胶上分析(图4A)。使用ImageJ软件对凝胶条带强度进行积分,并针对每个单独纳米棱柱将每个时间点的强度与初始凝胶条带强度进行比较(图4B)。如通过时间进程图所示的,降低2'-F核苷酸的百分比增加纳米棱柱支架的消化速率。该方法显示通过部分2'-F修饰的纳米容器的降解来控制药物释放的可行性,这可被微调到分钟的规模。

[0296] 体外细胞结合研究揭示携带ssDNA-Cy5的RNA纳米笼对癌细胞的高结合亲和力。

[0297] RNA纳米容器成功地结合药物或报道分子并将其递送到癌细胞中的能力将极大地有益于纳米医学的进步。为了研究RNA纳米笼是否可用作递送小分子的容器,用5拷贝的DNA寡核苷酸-叶酸缀合物和1拷贝的DNA-Cy5修饰2'-F RNA框架结构,如图5A中所示。已知含叶酸的纳米构建体对上皮来源的癌细胞具有强亲和力,因为这些类型的癌细胞过表达结合叶酸的蛋白质受体[46]。在将叶酸功能化的RNA纳米棱柱与KB细胞培育后,与具有相同RNA 3D纳米结构但缺乏叶酸分子的对照复合物相比,观察到RNA复合物与细胞的强结合(图5A)。该结果证实3D RNA系统用于检测和递送报道分子的适用性。

[0298] 3D RNA三角形纳米棱柱在体外具有升高的免疫刺激活性。

[0299] CpG寡脱氧核苷酸(ODN)是含有未甲基化的C和G核苷酸的短合成DNA序列,最近在免疫学中受到关注,因为它已被证明可用作疫苗佐剂或免疫治疗试剂[37,47,48]。进一步研究RNA三角形纳米棱柱的独特3D构象是否可用于增强体外免疫调节作用特别重要。将6个CpG寡核苷酸掺入2'-F-RNA框架构建体上。通过测量添加到小鼠巨噬细胞样RAW264.7细胞后细胞因子TNF- α 的释放来评估纳米棱柱的免疫刺激功效(图5B),如先前所述[49,50]。结果证实增加CpG的数目诱导通过测量TNF- α 的诱导水平所观察到的更强的免疫应答。结果表明,与单独的CpG相比,CpG棱柱复合物释放的细胞因子显著增加免疫刺激活性(图5B)。有趣的是,通过使用RNA多边形纳米构建体的先前研究获得了相同的观察结果[37],因为每个纳

米粒子中CpG越多,可触发宿主免疫应答的水平越高。该数据与细胞结合研究组合证实,3D RNA纳米棱柱可容易地在细胞研究中用于有效携带功能部分。T

[0300] 实验部分

[0301] RNA序列设计和3D建模

[0302] 在合成之前使用RNA 2D折叠软件Mfold优化RNA序列。由两个先前构建的RNA三角形组装RNA棱柱的计算机模型[12]。通过使用Swiss-PDB Viewer (www.spdbv.vital-it.ch) 中的“自动调整 (autofit)”工具和手动调整使三角形“臂”的螺旋区域重叠,以将它们定位在正确的角度和距离来组装三角形的顶点。三角形设计的详细程序可见于我们先前的报告中[12]。每个三角形顶点含有使用聚尿嘧啶 (聚-U) 接头系连到3'末端的21ntssRNA。插入聚-U以提供铰链,所述铰链允许ssRNA在与其另一三角形的互补序列杂交时的柔性。所产生的21bp RNA双链体选择为具有类似的最低自由能二级结构 (计算的 $\Delta G = -39.0 \pm 2.0 \text{ kcal/mol}$)。RNA MGA模块的序列是从PDB数据库 (www.pdb.org) PDB ID:1F1T引出的[24]。

[0303] RNA合成、纯化和组装

[0304] 通过别处详细描述的标准方案来制备用于RNA转录的模板[51]。简单地说,使用PCR制备转录模板,使用用于扩增DNA引物 (IDT) 的PCR反应试剂盒 (Promega公司, GoTaq® FlexiDNA Polymerase)。在旋转柱 (QIAGEN) 上纯化DNA模板后,使用自制的T7RNA聚合酶转录RNA链或2'-F-U/C修饰的RNA链。用冷乙醇使RNA沉淀,然后将沉淀干燥并重悬于ddH₂O中。通过变性10%PAGE检查单个RNA链的同质性。对于组装测定,将等摩尔RNA链 (各0.5μM) 在1×TMS (40mM TRIS-HCl pH=8.0, 100mM NaCl和10mM MgCl₂) 缓冲液中混合。在PCR热循环仪中将RNA混合物加热到80℃并持续5分钟,并且以2℃/min的速率缓慢冷却到4℃。在1×TBM (89mM TRIS-硼酸盐pH=8.0, 5mM MgCl₂) 运行缓冲液中,在非变性6%或7%PAGE (29:1的丙烯酰胺:双丙烯酰胺比率) 上检查RNA组装产物。所有非变性PAGE实验均在4℃下在恒定的90V下运行2小时。将凝胶在用于总RNA链显现的溴化乙锭缓冲液中或在用于检测MG适体信号的MG结合缓冲液 (20μM MG染料, 10mM HEPES pH=7.4, 100mM KCl, 5mM MgCl₂) 中染色,如先前所报道的[37]。

[0305] 冷冻电子显微术

[0306] 将2μl RNA三棱柱纳米粒子溶液 (1mg/ml) 施加到辉光放电的200目R1.2/1.3Quantifoil网格上。将网格印迹3s并使用Vitrobot Mark IV (FEI) 在液体乙烷中快速冷冻。然后将网格转移到在200kV下操作的具有用于筛选的柱内过滤器 (in-column filter) 的JEM2200FS冷冻电子显微镜 (JEOL)。利用以视频模式操作的直接检测装置 (DDD) (DE-20 4k×5k照相机, Direct Electron, LP), 以每秒25原始帧的记录速率, 以25,000×显微镜放大倍数 (对应于每像素2.51 Å的校准取样) 和每Å²每秒约20个电子的剂量率与3s的总曝光时间记录10nm RNA棱柱的显微照片。利用4k×4k CCD (Gatan), 以80,000×显微镜放大倍数 (对应于每像素1.36Å的校准取样) 和每Å²每秒约20个电子的剂量率与3s的总曝光时间记录5nm RNA棱柱的显微照片。以2到4μm散焦范围收集总共52个10nm RNA棱柱图像和30个5nmRNA棱柱图像。

[0307] 单粒子图像处理 and 3D重建

[0308] 将图像处理软件包EMAN2用于显微照片评价、粒子拾取、CTF校正、无参照的2-D类平均、初始模型构造和冷冻电子显微术数据的3-D精化。我们框入总共2340个10nm的RNA棱

柱粒子和2206个5nm的RNA棱柱粒子,以生成用于构造初始模型的2D类平均。最后,将1514个10nm的RNA棱柱粒子和1648个5nm的RNA棱柱粒子应用D3对称性进行最终精化。在没有任何掩码(mask)的情况下通过FSC曲线的0.143准则估计最终图的分辨率。将25Å和22Å高斯低通滤波器(Gauss low-pass filter)应用于Chimera软件包中展示的最终3D图。

[0309] AFM图像

[0310] 对于所有样品,使用特殊改性的云母表面(APS云母)。按照先前报道的方案[52],通过在167nM 1-(3-氨基丙基)杂氮硅三环(silatrane)中培育新切割的云母来获得APS云母。用1×TMS缓冲液将RNA样品稀释到3-5nM的最终浓度。然后,立即将5-10μL沉积在APS云母上。在表面上培育2min后,用DEPC处理过的水洗涤过量样品并在氩气流下干燥。使用以轻敲模式操作的MultiMode AFM NanoScope IV系统(Veeco/Digital Instruments,Santa Barbara,CA)获取空气中的AFM图像。两种类型的AFM探针用于空气中的轻敲模式成像:(1)弹簧常数为约42N/m且共振频率为300到320kHz的定期轻敲模式硅探针(Olympus,来自Asylum Research,Santa Barbara,CA)。(2)弹簧常数为约5.5N/m且共振频率为120到150kHz的非接触式NSG01DLC探针(K-Tek Nanotechnology,Wilsonville,OR)。

[0311] 动态光散射

[0312] 使用Zetasizer nano-ZS(Malvern Instrument,LTD)在25℃在50μL TMS缓冲液中以10μM的浓度确定RNA纳米棱柱的流体动力学直径。

[0313] 棱柱_MG降解测定

[0314] 通过将浓度为0.1μM的RNA复合物与1μM MG染料在1×TMS缓冲液中混合来测定MGA在三棱柱纳米粒子内的功能。使溶液在室温下平衡10分钟。使用荧光分光光度计(Horiba Jobin Yvon)以位于615nm处的激发波长测量复合物的荧光发射光谱(从630到750nm记录)。将1μL的500U/μL核糖核酸酶T1(Thermo Scientific)直接在荧光计比色皿中添加到99μL上述RNA-MG复合物中。立即记录 $\lambda_{\max}=650\text{nm}$ 的荧光并每1秒监测一次,总时间为3600秒。通过集成在荧光计中的软件进行时间分辨荧光寿命测量。使用指数衰减函数 $I(t) = I_0 e^{(-t/\tau)}$ 拟合获得的数据,其中 I_0 是初始强度(在零时),且 τ 是平均寿命定义为强度下降1/e或下降到约37%的时间。所有荧光衰减实验一式三份进行,以±平均标准误差(SEM)指示。

[0315] RNA纳米粒子体外结合并进入靶细胞中。

[0316] 将KB细胞(ATCC)以每孔 1×10^4 个细胞接种到无叶酸的1640培养基中的有室玻璃盖片中过夜,并在相同培养基中用200nM Cy5标记的RNA纳米棱柱复合物处理。样品包括:携带5个DNA-叶酸缀合物的RNA纳米棱柱,ii)携带无叶酸的DNA的对照RNA纳米棱柱,和iii)仅在37℃保持4h、之后用预冷却PBS洗涤的细胞。然后将细胞用4%多聚甲醛固定20min,并在室温下与DAPI(Invitrogen)培育24h。然后使用Olympus FV1000共聚焦显微镜测定细胞的结合和细胞进入。

[0317] 来自RAW264.7细胞的细胞因子分泌。

[0318] 将RAW 264.7细胞在24孔板中培养过夜,细胞密度为每孔 2.5×10^5 个细胞。将携有不同数目的CpG ODN的RNA纳米棱柱在Opti-MEM培养基(Life Technologies公司,Carlsbad,CA)中稀释,并与细胞培育。将含有RNA复合物的细胞在37℃在含有5%CO₂的潮湿空气中连续培养8h。在培养期后,收集细胞培养上清液并且储存在-80℃直到使用。使用小鼠ELISA MAXTM Deluxe组(BioLegend公司,San Diego,CA),依照制造商提供的方案,通过酶

联免疫吸附测定(ELISA)确定上清液中TNF- α 的浓度。

[0319] 参考文献

- [0320] [1] P.Guo, *Nature Nanotechnology*, 2010, 5, 833.
- [0321] [2] A.Chworos, I.Severcan, A.Y.Koyfman, P.Weinkam, E.Oroudjev, H.G.Hansma, and L.Jaeger, *Science*, 2004, 306, 2068.
- [0322] [3] D.Shu, Y.Shu, F.Haque, S.Abdelmawla, and P.Guo, *Nature Nanotechnology*, 2011, 6, 658.
- [0323] [4] E.Bindewald, R.Hayes, Y.G.Yingling, W.Kasprzak, and B.A.Shapiro, *Nucleic Acids Res.*, 2008, 36, D392-D397.
- [0324] [5] N.B.Leontis and E.Westhof, *RNA*, 2001, 7, 499.
- [0325] [6] C.Chen, C.Zhang, and P.Guo, *RNA*, 1999, 5, 805.
- [0326] [7] Nagarajan Pattabiraman, Hugo M.Martinez, and Bruce A.Shapiro, *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2002, 20, 397.
- [0327] [8] P.Guo, C.Zhang, C.Chen, M.Trottier, and K.Garver, *Mol. Cell.*, 1998, 2, 149.
- [0328] [9] C.Chen, S.Sheng, Z.Shao, and P.Guo, *J Biol Chem*, 2000, 275 (23), 17510.
- [0329] [10] L.Jaeger and N.B.Leontis, *Angew.Chem Int.Ed Engl.*, 2000, 39, 2521.
- [0330] [11] E.Westhof, B.Masquida, and L.Jaeger, *Folding & Design*, 1996, 1, R78-R88.
- [0331] [12] E.F.Khisamutdinov, D.L.Jasinski, and P.Guo, *ACS Nano*, 2014, 8, 4771.
- [0332] [13] D.Shu, W.D.Moll, Z.Deng, C.Mao, and P.Guo, *Nano Lett.*, 2004, 4, 1717.
- [0333] [14] H.Li, T.Lee, T.Dziubla, F.Pi, S.Guo, J.Xu, C.Li, F.Haque, X.Liang, and P.Guo, *Nano Today*, 2015, 10, 631.
- [0334] [15] I.Severcan, C.Geary, A.Chworos, N.Voss, E.Jacovetty, and L.Jaeger, *Nat.Chem.*, 2010, 2, 772.
- [0335] [16] K.A.Afonin, E.Bindewald, A.J.Yaghoubian, N.Voss, E.Jacovetty, B.A.Shapiro, and L.Jaeger, *Nat.Nanotechnol.*, 2010, 5, 676.
- [0336] [17] C.Hao, X.Li, C.Tian, W.Jiang, G.Wang, and C.Mao, *Nat.Comm.*, 2014, 5, 3890.
- [0337] [18] J.W.Yu, Z.Y.Liu, W.Jiang, G.S.Wang, and C.D.Mao, *Nature Communications*, 2015, 6, 5724.
- [0338] [19] C.M.Erben, R.P.Goodman, and A.J.Turberfield, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006, 45, 7414.
- [0339] [20] S.Juul, F.Iacovelli, M.Falconi, S.L.Kragh, B.Christensen, R.Frohlich, O.Franch, E.L.Kristoffersen, M.Stougaard, K.W.Leong, Y.P.Ho, E.S.Sorensen, V.Birkedal, A.Desideri, and B.R.Knudsen, *ACS Nano*, 2013, 7, 9724.
- [0340] [21] P.K.Lo, P.Karam, F.A.Aldaye, C.K.McLaughlin, G.D.Hamblin, G.Cosa, and H.F.Sleiman, *Nature Chemistry*, 2010, 2, 319.
- [0341] [22] C.Zhang, X.Li, C.Tian, G.M.Yu, Y.L.Li, W.Jiang, and C.D.Mao, *ACS Nano*, 2014, 8, 1130.
- [0342] [23] T.G.W.Edwardson, K.M.M.Carneiro, C.K.McLaughlin, C.J.Serpell, and

H.F.Sleiman, *Nature Chemistry*, 2013, 5, 868.

[0343] [24] C. Baugh, D. Grate, and C. Wilson, *J. Mol. Biol.*, 2000, 301, 117.

[0344] [25] D. H. Nguyen, S. C. Defina, W. H. Fink, and T. Dieckmann, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 15081.

[0345] [26] R. Reif, F. Haque, and P. Guo, *Nucleic Acid Ther.*, 2013, 22 (6), 428.

[0346] [27] F. Haque, D. Shu, Y. Shu, L. Shlyakhtenko, P. Rychahou, M. Evers, and P. Guo, *Nano Today*, 2012, 7, 245.

[0347] [28] W. W. Grabow, P. Zakrevsky, K. A. Afonin, A. Chworos, B. A. Shapiro, and L. Jaeger, *Nano Lett.*, 2011, 11, 878.

[0348] [29] W. Xu and Y. Lu, *Anal. Chem.*, 2010, 82, 574.

[0349] [30] Y. Shu, D. Shu, Z. Diao, G. Shen, and P. Guo, *IEEE/NIH Life Science Systems and Applications Workshop*, 2009, 9.

[0350] [31] H. Zhang, J. A. Endrizzi, Y. Shu, F. Haque, C. Sauter, L. S. Shlyakhtenko, Y. Lyubchenko, P. Guo, and Y. I. Chi, *RNA*, 2013, 19, 1226.

[0351] [32] F. Haque, S. Wang, C. Stites, L. Chen, C. Wang, and P. Guo, *Biomaterials*, 2015, 53, 744.

[0352] [33] Y. Shu, M. Cinier, S. R. Fox, N. Ben-Johnathan, and P. Guo, *Molecular Therapy*, 2011, 19, 1304.

[0353] [34] N. Guex and M. C. Peitsch, *Electrophoresis*, 1997, 18, 2714.

[0354] [35] R. Veneziano, S. Ratanalert, K. Zhang, F. Zhang, H. Yan, W. Chiu, and M. Bathe, *Science*, 2016, 352, 1534.

[0355] [36] Y. Shu, F. Haque, D. Shu, W. Li, Z. Zhu, M. Kotb, Y. Lyubchenko, and P. Guo, *RNA*, 2013, 19, 766.

[0356] [37] E. Khisamutdinov, H. Li, D. Jasinski, J. Chen, J. Fu, and P. Guo, *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42, 9996.

[0357] [38] D. Shu, E. Khisamutdinov, L. Zhang, and P. Guo, *Nucleic Acids Res.*, 2013, 42, e10.

[0358] [39] D. M. Kolpashchikov, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 12442.

[0359] [40] J. R. Babendure, S. R. Adams, and R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 14716.

[0360] [41] D. Jasinski, E. F. Khisamutdinov, Y. L. Lyubchenko, and P. Guo, *ACS Nano*, 2014, 8, 7620.

[0361] [42] M. Ikehara, E. Ohtsuka, T. Tokunaga, S. Nishikawa, S. Uesugi, T. Tanaka, Y. Aoyama, S. Kikyodani, K. Fujimoto, K. Yanase, K. Fuchimura, and H. Morioka, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, 83, 4695.

[0362] [43] S. Pfeiffer, Y. KarimiNejad, and H. Ruterjans, *J Mol Biol*, 1997, 266, 400.

[0363] [44] H. Li, K. Zhang, F. Pi, S. Guo, L. Shlyakhtenko, W. Chiu, D. Shu, and P. Guo, *Adv. Mater.*, 2016, Accepted. In press.

- [0364] [45] N.M.Green and E.J.Toms, *Biochem.J.*, 1973, 133, 687.
- [0365] [46] C.P.Leamon and P.S.Low, *Drug Discovery Today*, 2001, 6, 44.
- [0366] [47] G.Hartmann, R.D.Weeratna, Z.K.Ballas, P.Payette, S.Blackwell, I.Suparto, W.L.Rasmussen, M.Waldschmidt, D.Sajuthi, R.H.Purcell, H.L.Davis, and A.M.Krieg, *J.Immunol*, 2000, 164, 1617.
- [0367] [48] G.J.Weiner, H.M.Liu, J.E.Wooldridge, C.E.Dahle, and A.M.Krieg, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94, 10833.
- [0368] [49] P.M.Winter, A.M.Morawski, S.D.Caruthers, R.W.Fuhrhop, H.Zhang, T.A.Williams, J.S.Allen, E.K.Lacy, J.D.Robertson, G.M.Lanza, and S.A.Wickline, *Circulation*, 2003, 108, 2270.
- [0369] [50] E.K.Lim, B.Kim, Y.Choi, Y.Ro, E.J.Cho, J.H.Lee, S.H.Ryu, J.S.Suh, S.Haam, and Y.M.Huh, *J Biomed.Mater.Res A*, 2013, 102 (1), 49.
- [0370] [51] Y.Shu, D.Shu, F.Haque, and P.Guo, *Nat Protoc.*, 2013, 8, 1635.
- [0371] [52] Y.L.Lyubchenko, A.A.Gall, L.S.Shlyakhtenko, R.E.Harrington, B.L.Jacobs, P.I.Oden, and S.M.Lindsay, *J Biomol Struct Dyn*, 1992, 10, 589
- [0372] 实施例3: 构建可编程的3D RNA纳米笼, 以将高剂量的多种化学治疗药物特异性地递送到肿瘤微环境
- [0373] 已探寻几种被动靶向脂质和聚合物纳米粒子用于封装化学治疗性有效载荷[1-3]。有两种经FDA批准(Abraxane4(白蛋白结合型紫杉醇)和Doxil5(阿霉素5)), 且少数正在进行临床试验[6-9]。已使用有机接头[10-13]和折纸法[14, 15]构建DNA 3D多边形以封装蛋白质和功能分子[16-20]。还报道了RNA笼[21, 22]。
- [0374] 许多药物并不到达肿瘤, 从血液中快速被清除, 并且通过在健康器官中积累而展现出显著的副作用。脂质/聚合物纳米粒子可增加循环时间, 改善PK/PD和肿瘤保留, 并减少副作用[23, 24]。然而, 仍然存在以下挑战[23, 24]: (1) 缺乏用于增强细胞内递送和靶向干细胞群体的靶向模块[25-28]。(2) 粒子异质性和聚集。(3) 使用千碱基长ssDNA作为支架、具有短订书钉链的DNA折纸相对较大(>100nm), 这增加了被库普弗细胞(Kupffer cell)和巨噬细胞吞噬的风险。(4) 需要繁琐的多步骤药物加载。
- [0375] 3WJ可用作构造块, 以构建精确控制大小、形状和化学计量的超稳定3D纳米笼[29-31] (图11)。RNA纳米笼组件通过规范和非规范的碱基配对或碱基堆积和三级相互作用来稳定[32]。RNA纳米笼可容易地用作为配体的靶向适体功能化, 或与前药缀合到RNA构造块的某些部分中, 所述RNA构造块可被置于纳米笼内或用作框架。由于3WJ组件中三个片段的高亲和力和异常高的热稳定性, 某些靶向和治疗性货物的存在不会破坏容器的折叠性质[33-35]。RNA纳米笼可在有机或含水溶剂中组装而不改变固有药物性质。RNA纳米笼(20-50nm)将通过EPR效应到达肿瘤脉管系统并保留在肿瘤微环境中, 在健康器官中具有最小的非特异性积累, 类似于我们的其他大小<50nm的RNA架构[33, 36-42]。通过调整稳定(2'-F U和C)和不稳定(正常)核苷酸的比率, 及时控制药物释放是可能的。
- [0376] 到目前为止, 肺癌具有最高的发病率和死亡率[43]。非小细胞肺癌(NSCLC)占有病例的>85%, 5年存活率很低[43]。对NSCLC的研究已取得进展, 但其应答率和存活改善缓

慢且需要改善[44]。

[0377] 3D RNA纳米笼的构建和功能化

[0378] 开发了一种计算策略来设计可编程的3D RNA纳米笼(图11)(棱柱、四面体、立方体和十二面体)。通过调节3WJ角度证实多边形大小和形状的精确控制[29]。RNA纳米笼使用刚性双螺旋用作边缘,由在每个顶点处的弹性pRNA-3WJ连接。可通过改变边缘序列的长度容易地控制纳米笼的大小(20-50nm)。整个复合物在一步中由一组合理设计的RNA链以非常高的产率自组装。顶点处的3WJ基序可携有不破坏纳米笼组件的靶向模块。

[0379] 成像标志物:用Alexa647对一条链进行末端标记,如先前所述[33,36,37]。在将标记链与其他链以等摩尔比混合后,纳米笼将有效组装(图11)。

[0380] 靶向RNA适体:EGFR(HER1/ErbB1)受体在原发性肿瘤和转移性NSCLC中非常普遍,使得它们对于靶向疗法来说有吸引力[83-85]。已使用靶向EGFR受体的RNA适体[86-89],导致体外与肺癌细胞(图12)和体内与乳腺癌细胞的强结合。利用肺肿瘤来源的细胞系(例如,HCC4017、H2087、A549、HCC15)评价RNA纳米笼。目标是使用适体用于通过受体介导的胞吞将RNA构建体内化到NSCLC细胞中,而不是在临床上令人失望的抑制EGFR信号传导途径[90,91]。

[0381] 靶标NSCLC干细胞:存在于主体癌细胞中的罕见干细胞在癌症的起始、进展、抗性和复发中起主要作用[92,93]。靶向CD133的RNA适体[94]特异性地结合并进入乳腺癌干细胞中(图13)。CD133对于靶向NSCLC干细胞来说具有吸引力,因为它们在低氧条件下被上调;由于DNA损伤蛋白质的活化而抵抗辐射;由于Akt/PKB和Bcl-2细胞存活应答的增加而抵抗化疗[95]。

[0382] 替代方法:(1) 2'-F二价Y-RNA NP,用以靶向在原发性和转移性NSCLC细胞(包括干细胞)上高表达的EpCAM受体[84,96];(2) 叶酸,用以靶向在上皮实体NSCLC肿瘤中过表达的叶酸受体。多叶酸用于显著增强体内结合亲合力和治疗递送功效,如通过树枝状聚合物所示[97]。

[0383] 化学治疗药物的封装:封装几种临床批准的NSCLC药物,例如(1) 甲氨蝶呤(抗代谢剂)[98,99];(2) 紫杉醇(有丝分裂抑制剂)[100-102];(3) 顺铂(烷基化剂)[103,104];(4) 克唑替尼(激酶抑制剂)[104,105];(5) 托泊替康(拓扑异构酶抑制剂)[106,107]。鉴于NSCLC的异质性,使用药物组合来同时靶向多种途径。

[0384] RNA分子在含水溶剂和有机溶剂两者中都是稳定的,因此适合封装甚至难溶的药物。在RNA纳米笼组装过程期间,将药物在退火缓冲液(含水溶剂或有机溶剂)中简单地混合。当纳米笼组装时,在一个步骤中封装药物。与传统的脂质/聚合物药物负载技术相比,所述程序简单且高效[108]。为了证实封装,使用约1nm纳米金(纳米探针),然后通过TEM使RNA纳米笼成像。进行光谱和动力学研究[18]以定量评价纳米金从RNA纳米笼的释放。所述方法是改变RNA序列中2'-F核苷酸的数目和位置,并在RNA笼降解(12-36小时时间范围)后触发药物释放。为了评价封装药物的释放,开发了等度HPLC测定[109]并使用其他方法,例如通常用于聚合物和脂质纳米粒子的连续流动和透析[108]。

[0385] 作为替代方案,使用酸不稳定键和“点击化学(click-chemistry)”方法在RNA构造块的某些位置缀合前药,所述RNA构造块可被置于纳米笼内或用作框架,因此笼的渗漏(如果有)不成为问题。

[0386] 携有RNA适体和化学治疗药物的RNA纳米笼的体内评价

[0387] 使用临床相关的患者来源样品(可在肯塔基大学马基癌症中心(University of Kentucky Markey Cancer Center)获得)评价三种NSCLC小鼠模型[53,110-113]:(1)皮下异种移植; (2)原位异种移植(通过胸内注射); (3)自发(来自原位肿瘤)和实验(通过静脉内注射)转移。肺癌在骨、脑、肝和肺中转移;所述器官均可使用RNA纳米粒子进行靶向。由于骨转移对于体内模型具有挑战性[14],因此检查了肿瘤细胞直接邻近长骨的骨膜注射[115,116](图6G)。系统地注射封装单一或多种药物的RNA纳米笼,并且对肿瘤细胞毒性作用进行测定以及用对照评价药理学和毒性特征。

[0388] 还开发了用于通过响应内源信号(例如在适体-受体结合后)或响应肿瘤缺氧条件而打开RNA纳米笼来时空释放封装药物的方法。

[0389] 参考文献

[0390] 1.Rivera E.转移性乳腺癌中的脂质体蒽环类:临床更新(Liposomal anthracyclines in metastatic breast cancer:clinical update).Oncologist.2003; 8Suppl 2:3-9

[0391] 2.Duncan R.聚合物治疗剂的黎明时分(The dawning era of polymer therapeutics).Nat Rev.Drug Discov.2003May;2(5):347-60

[0392] 3.Green JJ,Chiu E,Leshchiner ES,Shi J,Langer R,Anderson DG.纳米粒子的静电配体涂层使得能够将配体特异性基因递送到人原代细胞(Electrostatic ligand coatings of nanoparticles enable ligand-specific gene delivery to human primary cells).Nano Lett.2007 Apr;7(4):874-9

[0393] 4.Gradishar WJ.白蛋白结合的紫杉醇:下一代紫杉烷(Albumin-bound paclitaxel:a next-generation taxane).Expert Opin.Pharmacother.2006 Jun;7(8):1041-53

[0394] 5.Barenholz Y.Doxil(R)-FDA批准的第一种纳米药物:经验教训(Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug:lessons learned).J Control Release 2012 Jun 10; 160(2):117-34

[0395] 6.Babu A,Templeton AK,Munshi A,Ramesh R.纳米药物递送系统:用于检测、诊断和治疗癌症的有前途的技术(Nanodrug Delivery Systems:A Promising Technology for Detection,Diagnosis,and Treatment of Cancer).AAPS.PharmSciTech.2014 Jun; 15(3):709-21

[0396] 7.Batist G,Barton J,Chaikin P,Swenson C,Welles L.Myocet(脂质体封装的柠檬酸多柔比星):乳腺癌疗法中的新方法(Myocet(liposome-encapsulated doxorubicin citrate):a new approach in breast cancer therapy).Expert Opin.Pharmacother.2002Dec;3(12):1739-51

[0397] 8.Andreopoulou E,Gaiotti D,Kim E,Downey A,Mirchandani D,Hamilton A, Jacobs A,Curtin J,Muggia F.聚乙二醇化脂质体多柔比星HCL(PLD;Caelyx/Doxil):复发性上皮性卵巢癌的应答患者中的长期维持经验(Pegylated liposomal doxorubicin HCL (PLD;Caelyx/Doxil):experience with long-term maintenance in responding patients with recurrent epithelial ovarian cancer).Ann.Oncol.2007 Apr;18(4):

716-21

[0398] 9.Harries M,Ellis P,Harper P.用于转移性乳腺癌的纳米粒子白蛋白结合紫杉醇(Nanoparticle albumin-bound paclitaxel for metastatic breast cancer).Journal of Clinical Oncology 2005Nov 1;23(31):7768-71

[0399] 10.Aldaye FA,Palmer AL,Sleiman HF.以DNA为指导组装材料(Assembling materials with DNA as the guide).Science 2008;321:1795-9

[0400] 11.Lo PK,Metera KL,Sleiman HF.三维DNA纳米结构的自组装和潜在的生物学应用(Self-assembly of three-dimensional DNA nanostructures and potential biological applications).Current Opinion in Chemical Biology 2010 Oct;14(5):597-607

[0401] 12.McLaughlin CK,Hamblin GD,Aldaye FA,Yang H,Sleiman HF.组装三维DNA结构的简便、模块化和高产率的方法(A facile,modular and high yield method to assemble three-dimensional DNA structures).Chemical Communications 2011;47(31):8925-7

[0402] 13.Yang H,Metera KL,Sleiman HF.用金属络合物修饰的DNA:在构建更高级金属-DNA纳米结构中的应用(DNA modified with metal complexes:Applications in the construction of higher order metal-DNA nanostructures).Coordination Chemistry Reviews 2010 Oct;254(19-20):2403-15

[0403] 14.Andersen ES,Dong M,Nielsen MM,Jahn K,Subramani R,Mamdouh W,Golas MM,Sander B,Stark H,Oliveira CL,et al.具有可控盖的纳米级DNA盒的自组装(Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid).Nature 2009May 7;459(7243):73-6

[0404] 15.Douglas SM,Dietz H,Liedl T,Hogberg B,Graf F,Shih WM.DNA自组装成纳米级三维形状(Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes).Nature 2009May 21;459(7245):414-8

[0405] 16.Erben CM,Goodman RP,Turberfield AJ.刚性DNA笼子中的单分子蛋白质封装(Single-molecule protein encapsulation in a rigid DNA cage).Angewandte Chemie-International Edition 2006;45(44):7414-7

[0406] 17.Juul S,Iacovelli F,Falconi M,Kragh SL,Christensen B,Frohlich R,Franch O,Kristoffersen EL,Stougaard M,Leong KW,et al.自组装DNA纳米笼腔中活性酶的温度控制封装和释放(Temperature-Controlled Encapsulation and Release of an Active Enzyme in the Cavity of a Self-Assembled DNA Nanocage).ACS Nano 2013Nov;7(11):9724-34

[0407] 18.Lo PK,Karam P,Aldaye FA,McLaughlin CK,Hamblin GD,Cosa G,Sleiman HF.具有纵向变化的DNA纳米管中货物的加载和选择性释放>Loading and selective release of cargo in DNA nanotubes with longitudinal variation).Nature Chemistry 2010 Apr;2(4):319-28

[0408] 19.Banerjee A,Bhatia D,Saminathan A,Chakraborty S,Kar S,Krishnan Y.使用化学触发物从DNA二十面体控制释放封装的货物(Controlled Release of

Encapsulated Cargo from a DNA Icosahedron using a Chemical Trigger). *Angewandte Chemie-International Edition* 2013;52(27):6854-7

[0409] 20. Torelli E, Marini M, Palmano S, Piantanida L, Polano C, Scarpellini A, Lazzarino M, Firrao G. 通过核酸杂交控制的DNA折纸纳米机器人 (A DNA Origami Nanorobot Controlled by Nucleic Acid Hybridization). *Small* 2014 Jul 23;10(14):2918-26

[0410] 21. Afonin KA, Bindewald E, Yaghoubian AJ, Voss N, Jacovetty E, Shapiro BA, Jaeger L. 在计算机中设计的基于立方RNA的支架的体外组装 (In vitro assembly of cubic RNA-based scaffolds designed in silico). *Nat. Nanotechnol.* 2010 Sep;5(9):676-82. PMID: PMC2934861

[0411] 22. Severcan I, Geary C, Chworos A, Voss N, Jacovetty E, Jaeger L. 由tRNA制成的多面体 (A polyhedron made of tRNAs). *Nature Chemistry* 2010 Sep;2(9):772-9

[0412] 23. Grodzinski P, Torchilin V, (Editors). 先进药物递送评论: 癌症纳米技术 (Advanced Drug Delivery Reviews: Cancer Nanotechnology). Volume 66 ed. Elsevier; 2014. 1-116p.

[0413] 24. Grodzinski P, Farrell D. 癌症纳米技术的未来机遇——NCI战略研讨会报告 (Future opportunities in cancer nanotechnology--NCI strategic workshop report). *Cancer Res.* 2014 Mar 1;74(5):1307-10

[0414] 25. Mamot C, Ritschard R, Kung W, Park JW, Herrmann R, Rochlitz CF. 来源于单克隆抗体EMD72000的EGFR靶向免疫脂质体介导向各种结直肠癌细胞的特异性和有效的药物递送 (EGFR-targeted immunoliposomes derived from the monoclonal antibody EMD72000 mediate specific and efficient drug delivery to a variety of colorectal cancer cells). *Journal of Drug Targeting* 2006 May;14(4):215-23

[0415] 26. Mamot C, Drummond DC, Noble CO, Kallab V, Guo ZX, Hong KL, Kirpotin DB, Park JW. 表皮生长因子受体靶向免疫脂质体在体内显著增强多种抗癌药物的功效 (Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs in vivo). *Cancer Research* 2005 Dec 15;65(24):11631-8

[0416] 27. Mamot C, Drummond DC, Greiser U, Hong K, Kirpotin DB, Marks JD, Park JW. 表皮生长因子受体 (EGFR) 靶向免疫脂质体介导向过表达EGFR和EGFRvIII的肿瘤细胞的特异且有效的药物递送 (Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted immunoliposomes mediate specific and efficient drug delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing tumor cells). *Cancer Research* 2003 Jun 15;63(12):3154-61

[0417] 28. Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Colbern G, Shalaby R, Baselga J, Shao Y, Nielsen UB, Marks JD, Moore D, et al. 抗HER2免疫脂质体: 可归因于靶向递送的增强功效 (Anti-HER2 Immunoliposomes: Enhanced Efficacy Attributable to Targeted Delivery). *Clinical Cancer Research* 2002 Apr 1;8(4):1172-81

[0418] 29. Khisamutdinov E, Li H, Jasinski D, Chen J, Fu J, Guo P. 通过RNA三角形、正

方形和五边形纳米运载体之间的形状转变来增强对先天免疫的免疫调节 (Enhancing immunomodulation on innate immunity by shape transition among RNA triangle, square, and pentagon nanovehicles). *Nucleic Acids Res.* 2014; 42: 9996-10004

[0419] 30. Jasinski D, Khisamutdinov EF, Lyubchenko YL, Guo P. 具有荧光和核酶性质的物理化学可调节多功能化RNA方形架构 (Physicochemically Tunable Poly-Functionalized RNA Square Architecture with Fluorogenic and Ribozymatic Properties). *ACS Nano* 2014 Jun 27; 8: 7620-9

[0420] 31. Khisamutdinov EF, Jasinski DL, Guo P. RNA作为抗沸腾的阴离子聚合物材料, 以构建具有确定的形状和化学计量的稳健结构 (RNA as a boiling-resistant anionic polymer material to build robust structures with defined shape and stoichiometry). *ACS Nano*. 2014 Apr 3; 8: 4771-81. PMID: PMC4046798

[0421] 32. Guo P. RNA纳米技术的新兴领域 (The emerging field of RNA nanotechnology). *Nature Nanotechnology* 2010 Dec; 5(12): 833-42. PMID: PMC3149862

[0422] 33. Shu D, Shu Y, Haque F, Abdelmawla S, Guo P. 用于构建用于递送治疗剂的多功能纳米粒子的热力学稳定的RNA三向连接 (Thermodynamically stable RNA three-way junctions for constructing multifunctional nanoparticles for delivery of therapeutics). *Nature Nanotechnology* 2011; 6: 658-67. PMID: PMC3189281

[0423] 34. Liu J, Guo S, Cinier M, Shlyakhtenko LS, Shu Y, Chen C, Shen G, Guo P. 在传动用于病毒DNA包装的纳米马达方面有活性的稳定且抗核糖核酸酶的RNA纳米粒子的制作 (Fabrication of stable and RNase-resistant RNA nanoparticles active in gearing the nanomotors for viral DNA packaging). *ACS Nano* 2011 Jan 25; 5(1): 237-46. PMID: PMC3026857

[0424] 35. Shu D, Khisamutdinov E, Zhang L, Guo P. 由phi29马达pRNA的3WJ基序驱动的融合RNA复合物的可编程折叠 (Programmable folding of fusion RNA complex driven by the 3WJ motif of phi29 motor pRNA). *Nucleic Acids Res.* 2013 Sep 1; 42: e10. PMID: PMC3902900

[0425] 36. Haque F, Shu D, Shu Y, Shlyakhtenko L, Rychahou P, Evers M, Guo P. 用于靶向癌症的超稳定协同四价RNA纳米粒子 (Ultrastable synergistic tetravalent RNA nanoparticles for targeting to cancers). *Nano Today* 2012; 7: 245-57. PMID: PMC3458310

[0426] 37. Shu Y, Haque F, Shu D, Li W, Zhu Z, Kotb M, Lyubchenko Y, Guo P. 不在正常器官中积累的14种用于特异性肿瘤靶向的不同RNA纳米粒子的制作 (Fabrication of 14 Different RNA Nanoparticles for Specific Tumor Targeting without Accumulation in Normal Organs). *RNA* 2013; 19: 766-77. PMID: PMC3683911

[0427] 38. Abdelmawla S, Guo S, Zhang L, Pulukuri S, Patankar P, Conley P, Trebley J, Guo P, Li QX. 用于全身递送的化学合成的单体pRNA纳米粒子的药理学表征 (Pharmacological characterization of chemically synthesized monomeric pRNA nanoparticles for systemic delivery). *Molecular Therapy* 2011; 19: 1312-22. PMID: PMC3129564

- [0428] 39. Shu D, Li H, Shu Y, Xiong G, Carson WE, Haque F, Xu R, Guo P. 利用RNA纳米技术全身递送用于抑制三阴性乳腺癌的抗miRNA (Systemic delivery of anti-miRNA for suppression of triple negative breast cancer utilizing RNA nanotechnology). *ACS Nano* 2015;9:9731-40
- [0429] 40. Rychahou P, Haque F, Shu Y, Zaytseva Y, Weiss HL, Lee EY, Mustain W, Valentino J, Guo P, Evers BM. 在全身施用后将RNA纳米粒子递送到结直肠癌转移性病灶中 (Delivery of RNA nanoparticles into colorectal cancer metastases following systemic administration). *ACS Nano* 2015 Feb 24;9(2):1108-16. PMID:NIHMS685217
- [0430] 41. Lee TJ, Haque F, Shu D, Yoo JY, Li H, Yokel RA, Horbinski C, Kim TH, Kim S-H, Nakano I, et al. 作为用于将siRNA靶向递送到成胶质细胞瘤小鼠模型中的载体的RNA纳米粒子 (RNA nanoparticles as a vector for targeted siRNA delivery into glioblastoma mouse model). *Oncotarget* 2015;6:14766-76. PMID:PMC4558114
- [0431] 42. Cui D, Zhang C, Liu B, Shu Y, Du T, Shu D, Wang K, Dai F, Liu Y, Li C, et al. 通过全身注射携带配体和siRNA两者的RNA纳米粒子使胃癌消退 (Regression of gastric cancer by systemic injection of RNA nanoparticles carrying both ligand and siRNA). *Scientific reports* 2015;5:10726. PMID:PMC4490273
- [0432] 43. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. 肺癌 (Lung cancer). *N. Engl. J. Med.* 2008 Sep 25;359(13):1367-80
- [0433] 44. Farmer G. 靶向肺癌疗法 (Targeted lung cancer therapies). *Nat Rev. Drug Discov.* 2004 Jul;3(7):547-8
- [0434] 45. Kim HS, Mendiratta S, Kim J, Pecot CV, Larsen JE, Zubovych I, Seo BY, Kim J, Eskiocak B, Chung H, et al. 非小细胞肺癌中的分子亚型选择性易损性的系统鉴别 (Systematic identification of molecular subtype-selective vulnerabilities in non-small-cell lung cancer). *Cell* 2013 Oct 24;155(3):552-66. PMID:PMC3836195
- [0435] 46. Whitehurst AW, Bodemann BO, Cardenas J, Ferguson D, Girard L, Peyton M, Minna JD, Michnoff C, Hao W, Roth MG, et al. 癌细胞中化学致敏剂基因座的合成致死筛选鉴别 (Synthetic lethal screen identification of chemosensitizer loci in cancer cells). *Nature* 2007 Apr 12;446(7137):815-9
- [0436] 47. 癌症靶标发现和发展网络 (Cancer Target Discovery and Development Network), Schreiber SL, Shamji AF, Clemons PA, Hon C, Koehler AN, Munoz B, Palmer M, Stern AM, Wagner BK, et al. 针对基于患者的癌症治疗剂 (Towards patient-based cancer therapeutics). *Nat Biotechnol.* 2010 Sep;28(9):904-6. PMID:PMC2939009
- [0437] 48. Tang H, Xiao G, Behrens C, Schiller J, Allen J, Chow CW, Suraokar M, Corvalan A, Mao J, White MA, et al. 12-基因集预测非小细胞肺癌患者中的辅助化疗的存活益处 (A 12-gene set predicts survival benefits from adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer patients). *Clin. Cancer Res* 2013 Mar 15;19(6):1577-86. PMID:PMC3619002
- [0438] 49. Sunaga N, Miyajima K, Suzuki M, Sato M, White MA, Ramirez RD, Shay JW, Gazdar AF, Minna JD. 小窝蛋白-1在非小细胞肺癌相对于小细胞肺癌的发展中的不同作用

(Different roles for caveolin-1 in the development of non-small cell lung cancer versus small cell lung cancer). *Cancer Res* 2004 Jun 15;64(12):4277-85

[0439] 50. Fan TWM, Lane AN, Higashi RM, Farag MA, Gao H, Bousamra M, Miller DM. 通过C-13稳定同位素分辨代谢组学 (SIRM) 辨别的人肺癌中的代谢途径的改变调控 (Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by C-13 stable isotope-resolved metabolomics (SIRM)). *MOLECULAR CANCER* 2009 Jun 26;8:41

[0440] 51. Xie H, Hanai JI, Ren JG, Kats L, Burgess K, Bhargava P, Signoretti S, Billiard J, Duffy KJ, Grant A, et al. 靶向乳酸脱氢酶-A抑制肺癌小鼠模型中的肿瘤发生和肿瘤进展并影响肿瘤起始细胞 (Targeting Lactate Dehydrogenase-A Inhibits Tumorigenesis and Tumor Progression in Mouse Models of Lung Cancer and Impacts Tumor-Initiating Cells). *Cell Metabolism* 2014 May 6;19(5):795-809

[0441] 52. Shareef MM, Cui N, Burikhanov R, Gupta S, Satishkumar S, Shajahan S, Mohiuddin M, Rangnekar VM, Ahmed MM. 肿瘤坏死因子- α 和TRAIL在肺腺癌中的高剂量辐射诱导的旁观者信号传导中的作用 (Role of tumor necrosis factor- α and TRAIL in high-dose radiation-induced bystander signaling in lung adenocarcinoma). *Cancer Research* 2007 Dec 15;67(24):11811-20

[0442] 53. Wei QO, Jiang H, Xiao Z, Baker A, Young MR, Veenstra TD, Colburn NH. 硫氧还蛋白-过氧化物氧化蛋白IV轴通过调节特异性磷酸激酶信号传导促进人肺癌进展 (Sulfiredoxin-Peroxiredoxin IV axis promotes human lung cancer progression through modulation of specific phosphokinase signaling). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2011 Apr 26;108(17):7004-9

[0443] 54. Jiang H, Wu L, Mishra M, Chawsheen HA, Wei Q. 过氧化物氧化蛋白1和4的表达促进人肺癌恶性肿瘤 (Expression of peroxiredoxin 1 and 4 promotes human lung cancer malignancy). *Am. J. Cancer Res* 2014;4(5):445-60. PMID: PMC4163610

[0444] 55. Wei Q, Jiang H, Baker A, Dodge LK, Gerard M, Young MR, Toledano MB, Colburn NH. 硫氧还蛋白的损失使小鼠抵抗氧化偶氮甲烷/硫酸葡聚糖钠诱导的结肠致癌作用 (Loss of sulfiredoxin renders mice resistant to azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colon carcinogenesis). *Carcinogenesis* 2013 Jun;34(6):1403-10. PMID: PMC3670259

[0445] 56. Chen DH, Baker ML, Hryc CF, DiMaio F, Jakana J, Wu W, Dougherty M, Haase-Pettingell C, Schmid MF, Jiang W, et al. dsDNA病毒的由支架介导的组装和成熟的结构基础 (Structural basis for scaffolding-mediated assembly and maturation of a dsDNA virus). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2011 Jan 25;108(4):1355-60. PMID: PMC3029737

[0446] 57. Afonin KA, Viard M, Koyfman AY, Martins AN, Kasprzak WK, Panigaj M, Desai R, Santhanam A, Grabow WW, Jaeger L, et al. 多功能RNA纳米粒子 (Multifunctional RNA nanoparticles). *Nano Lett.* 2014 Oct 8;14(10):5662-71. PMID: PMC4189619

[0447] 58. Zhou ZH, Dougherty M, Jakana J, He J, Rixon FJ, Chiu W. 在8.5Å下看到疱疹

病毒衣壳 (Seeing the herpesvirus capsid at 8.5Å). *Science* 2000 May 5;288 (5467): 877-80

[0448] 59. Prasad BV, Rothnagel R, Zeng CQ, Jakana J, Lawton JA, Chiu W, Estes MK. 轮状病毒中有序基因组RNA的显现和转录复合物的定位 (Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus). *Nature* 1996 Aug 1;382 (6590):471-3

[0449] 60. Sheng J, Li L, Engelhart AE, Gan JH, Wang JW, Szostak JW. 2'-5' 连接对RNA双链体的作用的结构见解 (Structural insights into the effects of 2'-5' linkages on the RNA duplex). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2014 Feb 25;111 (8):3050-5

[0450] 61. Sheng J, Gan JH, Soares AS, Salon J, Huang Z. 利用Se原子探测的非规范U中心点U对和Hoogsteen相互作用的结构见解 (Structural insights of non-canonical U center dot U pair and Hoogsteen interaction probed with Se atom). *Nucleic Acids Res.* 2013 Dec;41 (22):10476-87

[0451] 62. Sheng J, Zhang W, Hassan AEA, Gan JH, Soares AS, Geng S, Ren Y, Huang Z. 天然修饰的核碱基和磷酸骨架之间的氢键形成 (Hydrogen bond formation between the naturally modified nucleobase and phosphate backbone). *Nucleic Acids Res.* 2012 Sep;40 (16):8111-8

[0452] 63. Sheng J, Hassan AEA, Zhang W, Zhou JF, Xu BQ, Soares AS, Huang Z. 具有碲-核碱基衍生化的寡脱氧核糖核苷酸的合成、结构和成像 (Synthesis, structure and imaging of oligodeoxyribonucleotides with tellurium-nucleobase derivatization). *Nucleic Acids Res.* 2011 May;39 (9):3962-71

[0453] 64. Sheng J, Jiang JS, Salon J, Huang Z. 2'-Se-胸苷亚磷酰胺的合成和其掺入寡核苷酸中用于晶体结构研究 (Synthesis of a 2'-Se-thymidine phosphoramidite and its incorporation into oligonucleotides for crystal structure study). *Organic Letters* 2007 Mar 1;9 (5):749-52

[0454] 65. Lyubchenko YL, Shlyakhtenko LS, Ando T. 利用原子力显微术使核酸成像 (Imaging of nucleic acids with atomic force microscopy). *Methods* 2011 Feb 15;54:274-83

[0455] 66. Shlyakhtenko LS, Lushnikov AY, Miyagi A, Li M, Harris RS, Lyubchenko YL. ABOBEC3G与单链DNA的复合物的纳米级结构和动力学 (Nanoscale structure and dynamics of ABOBEC3G complexes with single-stranded DNA). *Biochemistry* 2012 Aug 14;51 (32):6432-40. PMID:PMC3448016

[0456] 67. Lane AN, Chaires JB, Gray RD, Trent JO. G-四链体结构的稳定性和动力学 (Stability and kinetics of G-quadruplex structures). *Nucleic Acids Res.* 2008 Oct;36 (17):5482-515

[0457] 68. Dailey MM, Miller MC, Bates PJ, Lane AN, Trent JO. 单个四链体形成序列的结构多态性的分辨和表征 (Resolution and characterization of the structural polymorphism of a single quadruplex-forming sequence). *Nucleic Acids Res.* 2010 Aug;38 (14):4877-88

- [0458] 69. Miller MC, Buscaglia R, Chaires JB, Lane AN, Trent JO. 水合是d (AG (3) (TTAG (3)) (3)) 的人端粒3'序列的G-四链体稳定性和构象的主要决定因素 (Hydration Is a Major Determinant of the G-Quadruplex Stability and Conformation of the Human Telomere 3' Sequence of d (AG (3) (TTAG (3)) (3))). J. Am. Chem. Soc. 2010 Dec 8; 132 (48):17105-7
- [0459] 70. Richards CI, Luong K, Srinivasan R, Turner SW, Dougherty DA, Korlach J, Lester HA. 使用零模式波导纳米结构的单受体组合物的活细胞成像 (Live-cell imaging of single receptor composition using zero-mode waveguide nanostructures). Nano Lett. 2012 Jul 11; 12 (7):3690-4. PMID: PMC3397148
- [0460] 71. Das SK, Liu YY, Yeom S, Kim DY, Richards CI. 碳纳米点的单粒子荧光强度波动 (Single-Particle Fluorescence Intensity Fluctuations of Carbon Nanodots). Nano Letters 2014 Feb; 14 (2):620-5
- [0461] 72. Richards CI, Hsiang JC, Khalil AM, Hull NP, Dickson RM. 用于高灵敏度荧光成像的FRET使能的光学调节 (FRET-Enabled Optical Modulation for High Sensitivity Fluorescence Imaging). J. Am. Chem. Soc. 2010 May 12; 132 (18):6318-23
- [0462] 73. Zhang H, Endrizzi JA, Shu Y, Haque F, Sauter C, Shlyakhtenko LS, Lyubchenko Y, Guo P, Chi YI. 揭示Phi29六聚体马达pRNA的二价离子促进的热稳定性和组装的3WJ核心的晶体结构 (Crystal Structure of 3WJ Core Revealing Divalent Ion-promoted Thermostability and Assembly of the Phi29 Hexameric Motor pRNA). RNA 2013 Aug 20; 19:1226-37. PMID: PMC3753930
- [0463] 74. Zhang H, Shu D, Huang F, Guo P. 用于通过单分子双视角系统在生物复合物或纳米粒子中进行单RNA计数的仪器和计量法 (Instrumentation and metrology for single RNA counting in biological complexes or nanoparticles by a single molecule dual-view system). RNA 2007; 13:1793-802. PMID: PMC1986819
- [0464] 75. Zhang H, Guo P. 用于通过TIRF仪器对纳米粒子和生物复合物中的RNA、DNA、蛋白质和其他分子进行计数的单分子光漂白 (SMPB) 技术 (Single molecule photobleaching (SMPB) technology for counting of RNA, DNA, protein and other molecules in nanoparticles and biological complexes by TIRF instrumentation). Methods 2014 Jan 15; 67:169-76
- [0465] 76. Shu D, Zhang H, Petrenko R, Meller J, Guo P. 建立RNA纳米粒子的距离参数的双通道单分子荧光共振能量转移 (Dual-channel single-molecule fluorescence resonance energy transfer to establish distance parameters for RNA nanoparticles). ACS Nano 2010 Nov 23; 4 (11):6843-53. PMID: PMC2990273
- [0466] 77. Shu D, Zhang H, Jin J, Guo P. 利用定制的单分子双视角系统对phi29 DNA包装马达的6种pRNA进行计数 (Counting of six pRNAs of phi29 DNA-packaging motor with customized single molecule dual-view system). EMBO J. 2007; 26:527-37. PMID: PMC1783441
- [0467] 78. Tan ZJ, Chen SJ. 核酸发夹稳定性的盐依赖性 (Salt dependence of nucleic acid hairpin stability). Biophys J 2008 Jul; 95 (2):738-52. PMID: PMC2440479

- [0468] 79.Chen SJ.RNA折叠:构象统计学、折叠动力学和离子静电学(RNA folding: conformational statistics,folding kinetics,and ion electrostatics) .Annu.Rev.Biophys.2008;37:197-214.PMCID:PMC2473866
- [0469] 80.Zhao P,Zhang WB,Chen SJ.预测核酸的二级结构折叠动力学(Predicting secondary structural folding kinetics for nucleic acids).Biophys.J.2010 Apr 21;98(8):1617-25.PMCID:PMC2856163
- [0470] 81.Tan ZJ,Chen SJ.预测RNA三级结构的离子结合性质(Predicting ion binding properties for RNA tertiary structures).Biophys.J.2010 Sep 8;99(5):1565-76.PMCID:PMC2931721
- [0471] 82.Reif R,Haque F,Guo P.用于监测活细胞中RNA折叠和实时降解的荧光RNA纳米粒子(Fluorogenic RNA Nanoparticles for Monitoring RNA Folding and Degradation in Real Time in Living Cells).Nucleic Acid Ther.2013;22(6):428-37.PMCID:PMC3507523
- [0472] 83.Hynes NE,Lane HA.ERBB受体和癌症:靶向抑制剂的复杂性(ERBB receptors and cancer:the complexity of targeted inhibitors).Nat Rev.Cancer 2005 May;5(5):341-54
- [0473] 84.Pantel K,Brakenhoff RH,Brandt B.播散肿瘤细胞的检测、临床相关性和特定生物学性质(Detection,clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells).Nat Rev.Cancer 2008 May;8(5):329-40
- [0474] 85.Yarden Y,Sliwkowski MX.解开ErbB信号传导网络(Untangling the ErbB signalling network).Nature Reviews Molecular Cell Biology 2001 Feb;2(2):127-37
- [0475] 86.Esposito CL,Passaro D,Longobardo I,Condorelli G,Marotta P,Affuso A,de F,V,Cerchia L.针对EGFR的中和RNA适体引起选择性凋亡性细胞死亡(A neutralizing RNA aptamer against EGFR causes selective apoptotic cell death).PLoS.One.2011;6:e24071.PMCID:PMC3167817
- [0476] 87.Thiel KW,Hernandez LI,Dassie JP,Thiel WH,Liu X,Stockdale KR,Rothman AM,Hernandez FJ,McNamara JO,Giangrande PH.使用RNA适体将化学敏化siRNA递送到HER2+-乳腺癌细胞(Delivery of chemo-sensitizing siRNAs to HER2+-breast cancer cells using RNA aptamers).Nucleic Acids Res.2012 Jul 1;40:6319-37.PMCID:PMC3401474
- [0477] 88.Kim MY,Jeong S.RNA适体的体外选择和对乳腺癌细胞中ErbB2的特异性靶向(In vitro selection of RNA aptamer and specific targeting of ErbB2in breast cancer cells).Nucleic Acid Ther.2011 Jun;21:173-8
- [0478] 89.Chen CH,Chernis GA,Hoang VQ,Landgraf R.优先结合到人表皮生长因子受体-3的寡聚形式的适体对调蛋白信号传导的抑制(Inhibition of heregulin signaling by an aptamer that preferentially binds to the oligomeric form of human epidermal growth factor receptor-3).Proc Natl Acad Sci U S A 3A.D.Aug 5;100:9226-31

- [0479] 90. Rich JN, Reardon DA, Peery T, Dowell JM, Quinn JA, Penne KL, Wikstrand CJ, Van Duyn LB, Dancey JE, McLendon RE, et al. 吉非替尼在复发性胶质细胞瘤中的II期试验 (Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma). *J. Clin. Oncol.* 2004 Jan 1; 22(1):133-42
- [0480] 91. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Hegi ME, Stupp R. 神经肿瘤学中的表皮生长因子受体抑制剂:希望 and 失望 (Epidermal growth factor receptor inhibitors in neuro-oncology: hopes and disappointments). *Clin. Cancer Res.* 2008 Feb 15; 14(4):957-60
- [0481] 92. Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. 癌症干细胞:蜃景 or 现实 (Cancer stem cells: mirage or reality)? *Nat. Med.* 2009 Sep; 15(9):1010-2
- [0482] 93. Clarke MF, Fuller M. 干细胞和癌症:夏娃的两面 (Stem cells and cancer: two faces of eve). *Cell* 2006 Mar 24; 124(6):1111-5
- [0483] 94. Shigdar S, Qiao L, Zhou SF, Xiang D, Wang T, Li Y, Lim LY, Kong L, Li L, Duan W. 靶向癌症干细胞标志物CD133的RNA适体 (RNA aptamers targeting cancer stem cell marker CD133). *Cancer Lett.* 2013 Mar 1; 330(1):84-95
- [0484] 95. Bidlingmaier S, Zhu X, Liu B. 糖基化人CD133表位在定义癌症干细胞中的效用和局限性 (The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells). *J. Mol. Med. (Berl)* 2008 Sep; 86(9):1025-32. PMID: PMC2585385
- [0485] 96. Shigdar S, Lin J, Yu Y, Pastuovic M, Wei M, Duan W. 针对癌症干细胞标志物上皮细胞粘附分子的RNA适体 (RNA aptamer against a cancer stem cell marker epithelial cell adhesion molecule). *Cancer Sci.* 2011 Feb 1; 102:991-8
- [0486] 97. Hong S, Leroueil PR, Majoros IJ, Orr BG, Baker JR, Holl MMB. 基于纳米粒子的多价靶向药物递送平台的结合亲和力 (The binding avidity of a nanoparticle-based multivalent targeted drug delivery platform). *Chem. & Biol.* 2007 Jan; 14(1):107-15
- [0487] 98. Selawry O, Krant M, Scotto J, Kazam E, Schneiderman M, Olson K, Shnider B, Edmonson J, Holland J, Taylor S, III. 甲氨蝶呤与安慰剂在肺癌中的比较 (Methotrexate compared with placebo in lung cancer). *Cancer* 1977 Jul; 40(1):4-8
- [0488] 99. Buccheri G, Ferrigno D, Rosso A. 在晚期非小细胞肺癌中对甲氨蝶呤、多柔比星、环磷酰胺、洛莫司汀化疗和氯尼达明的II期临床研究 (A phase II study of methotrexate, doxorubicin, cyclophosphamide, and lomustine chemotherapy and lonidamine in advanced non-small cell lung cancer). *Cancer* 1993 Sep 1; 72(5):1564-72
- [0489] 100. Laurie SA, Solomon BJ, Seymour L, Ellis PM, Goss GD, Shepherd FA, Boyer MJ, Arnold AM, Clingan P, Laberge F, et al. 在晚期非小细胞肺癌患者中对卡铂和紫杉醇与每日口服的西地尼布或安慰剂的随机双盲试验:NCIC临床试验组研究BR29 (Randomised, double-blind trial of carboplatin and paclitaxel with daily oral cediranib or placebo in patients with advanced non-small cell lung cancer: NCIC Clinical

Trials Group study BR29). *Eur. J. Cancer* 2014 Mar;50 (4):706-12

[0490] 101.Oshita F,Saito H,Murakami S,Kondo T,Yamada K.在晚期非小细胞肺癌患者中对紫杉醇和伊立替康与插入的吉非替尼的II期研究(Phase II study of paclitaxel and irinotecan with intercalated gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer). *Am. J. Clin. Oncol.* 2010 Feb;33 (1):66-9

[0491] 102.Hirose T,Sugiyama T,Kusumoto S,Shirai T,Nakashima M,Yamaoka T,Okuda K,Ogura K,Ohnishi T,Ohmori T,et al.在晚期非小细胞肺癌患者中对奈达铂与每周紫杉醇的组合的II期研究(Phase II study of the combination of nedaplatin and weekly paclitaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer). *Anticancer Res.* 2009 May;29 (5):1733-8

[0492] 103.Boni C,Savoldi L,Bisagni G,Ceci G,Crino L,De L,V,Di CF,Lasagni L,Manenti AL,Moretti G,et al.推注相对于5天连续输注顺铂与丝裂霉素和长春地辛以治疗晚期非小细胞肺癌(NSCLC):意大利肿瘤学临床研究组(GOIRC)的III期前瞻性随机试验(Bolus versus 5-day continuous infusion of cisplatin with mitomycin and vindesine in the treatment of advanced non-small cell lung cancer(NSCLC):a phase III prospective randomised trial of the Italian Oncology Group for Clinical Research (GOIRC)). *Eur. J. Cancer* 1998 Nov;34 (12):1974-6

[0493] 104.Arrieta O,Gonzalez-De la Rosa CH,Rechaga-Ocampo E,Villanueva-Rodriguez G,Ceron-Lizarraga TL,Martinez-Barrera L,Vazquez-Manriquez ME,Rios-Trejo MA,varez-Avitia MA,Hernandez-PedroN,et al.全反式视黄酸与基于紫杉醇和顺铂的化疗作为晚期非小细胞肺癌患者的一线治疗的随机II期试验(Randomized phase II trial of All-trans-retinoic acid with chemotherapy based on paclitaxel and cisplatin as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer). *J. Clin. Oncol.* 2010 Jul 20;28 (21):3463-71

[0494] 105.Frampton JE.克唑替尼:关于其在治疗间变性淋巴瘤激酶阳性、晚期非小细胞肺癌中的用途的综述(Crizotinib:a review of its use in the treatment of anaplastic lymphoma kinase-positive,advanced non-small cell lung cancer). *Drugs* 2013 Dec;73 (18):2031-51

[0495] 106.Jones S,Thompson D,Barton J,Patton J,Shipley D,Greco FA,Spigel D,Infante J,Burris HA,III.在非小细胞肺癌的二线治疗中口服拓扑替康相对于多西紫杉醇的随机II期试验(A randomized phase II trial of oraltopotecan versus docetaxel in the second-line treatment of non-small-cell lung cancer). *Clin. Lung Cancer* 2008 May;9 (3):154-9

[0496] 107.White SC,Cheeseman S,Thatcher N,Anderson H,Carrington B,Hearn S,Ross G,Ranson M.在晚期非小细胞肺癌中口服托泊替康的II期研究(Phase II study of oral topotecan in advanced non-small cell lung cancer). *Clin. Cancer Res* 2000 Mar;6 (3):868-73

[0497] 108.D'Souza SS,Deluca PP.评估来自可注射聚合物微粒系统的体外药物释放的方法(Methods to assess in vitro drug release from injectable polymeric

particulate systems). *Pharm. Res.* 2006 Mar; 23 (3) :460-74

[0498] 109. Milane L, Duan ZF, Amiji M. 加载氯尼达明/紫杉醇的靶向EGFR的纳米粒子在多重抗药乳腺癌原位动物模型中的药物代谢动力学和生物分布 (Pharmacokinetics and biodistribution of lonidamine/paclitaxel loaded, EGFR-targeted nanoparticles in an orthotopic animal model of multi-drug resistant breast cancer). *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* 2011 Aug; 7 (4) :435-44

[0499] 110. Mordant P, Lorient Y, Lahon B, Castier Y, Leseche G, Soria JC, Vozenin MC, Decraene C, Deutsch E. 人局部非小细胞肺癌的生物发光原位小鼠模型: 循环肿瘤细胞的可行性和鉴别 (Bioluminescent Orthotopic Mouse Models of Human Localized Non-Small Cell Lung Cancer: Feasibility and Identification of Circulating Tumour Cells). *PLoS ONE* 2011 Oct 11; 6 (10)

[0500] 111. Onn A, Isobe T, Itasaka S, Wu W, O'Reilly MS, Ki HW, Fidler IJ, Herbst RS. 在裸小鼠中开发原位模型以研究原发性人肺癌的生物学和疗法 (Development of an orthotopic model to study the biology and therapy of primary human lung cancer in nude mice). *Clin. Cancer Res* 2003 Nov 15; 9 (15) :5532-9

[0501] 112. Liu J, Blackhall F, Seiden-Long I, Jurisica I, Navab R, Liu N, Radulovich N, Wigle D, Sultan M, Hu J, et al. 通过原位生长的H460SM变体细胞系对肺癌建模揭示了用于全身转移的新型候选基因 (Modeling of lung cancer by an orthotopically growing H460SM variant cell line reveals novel candidate genes for systemic metastasis). *Oncogene* 2004 Aug 19; 23 (37) :6316-24

[0502] 113. Rapp UR, Korn C, Ceteci F, Karreman C, Luetkenhaus K, Serafin V, Zanucco E, Castro I, Potapenko T. Myc是非小细胞肺癌的转移基因 (Myc Is a Metastasis Gene for Non-Small-Cell Lung Cancer). *PLoS ONE* 2009 Jun 24; 4 (6)

[0503] 114. Weilbaecher KN, Guise TA, McCauley LK. 癌症对骨骼: 致命的吸引力 (Cancer to bone: a fatal attraction). *Nat Rev. Cancer* 2011 Jun; 11 (6) :411-25. PMID: PMC3666847

[0504] 115. Kim IS, Baek SH. 用于乳腺癌转移的小鼠模型 (Mouse models for breast cancer metastasis). *Biochem. Biophys Res Commun.* 2010 Apr 9; 394 (3) :443-7

[0505] 116. Francia G, Cruz-Munoz W, Man S, Xu P, Kerbel RS. 用于实验治疗学的晚期自发转移的小鼠模型 (Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics). *Nat Rev. Cancer* 2011 Feb; 11 (2) :135-41

[0506] 117. Shi J, Wang Y, Zeng L, Wu Y, Deng J, Zhang Q, Lin Y, Li J, Kang T, Tao M, et al. 破坏BRD4与二乙酰化扭转的相互作用抑制基底细胞样乳腺癌中的肿瘤发生 (Disrupting the interaction of BRD4 with diacetylated Twist suppresses tumorigenesis in basal-like breast cancer). *Cancer Cell* 2014 Feb 10; 25 (2) :210-25. PMID: PMC4004960

[0507] 118. Wu Y, Wang Y, Yang XH, Kang T, Zhao Y, Wang C, Evers BM, Zhou BP. 去泛素化酶USP28使LSD1稳定并赋予乳腺癌细胞干细胞样特征 (The deubiquitinase USP28 stabilizes LSD1 and confers stem-cell-like traits to breast cancer cells)

.Cell Rep.2013 Oct 17;5(1):224-36.PMCID:PMC4004762

[0508] 119.Xiong G,Wang C,Evers BM,Zhou BP,Xu R.ROR α 通过诱导SEMA3F表达抑制乳腺肿瘤侵袭(ROR α suppresses breast tumor invasion by inducing SEMA3F expression).Cancer Res 2012 Apr 1;72(7):1728-39.PMCID:PMC3319846

[0509] 120.Xu X,Yu T,Shi J,Chen X,Zhang W,Lin T,Liu Z,Wang Y,Zeng Z,Wang C, et al.胸腺嘧啶DNA糖基化酶是结直肠癌中Wnt信号传导的正调控物(Thymine DNA glycosylase is a positive regulator of Wnt signaling in colorectal cancer).J Biol Chem.2014 Mar 28;289(13):8881-90.PMCID:PMC3979391

[0510] 121.Hensley PJ,Desiniotis A,Wang C,Stromberg A,Chen CS,Kyprianou N.前列腺癌细胞中的紧密连接和粘着斑的新型药理学靶向(Novel pharmacologic targeting of tight junctions and focal adhesions in prostate cancer cells).PLoS ONE 2014;9(1):e86238.PMCID:PMC3908921

[0511] 122.Chen L,Voronovich Z,Clark K,Hands I,Mannas J,Walsh M,Nikiforova MN,Durbin EB,Weiss H,Horbinski C.预测浸润性神经胶质瘤诊断中异柠檬酸脱氢酶1或2突变的可能性(Predicting the likelihood of an isocitrate dehydrogenase 1 or 2 mutation in diagnoses of infiltrative glioma).Neuro Oncol.2014 May 23;16:1478-83

[0512] 实施例4:能够光控释放货物的RNA纳米笼的制作。

[0513] RNA棱锥设计、制备和自组装:合成的DNA分子购自IDT DNA(www.idtdna.com),并使用含有T7RNA聚合酶启动子序列的引物进行扩增。通过体外转录扩增的DNA模板,之后使用8M尿素、8%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)进行纯化来制备所有RNA链。

[0514] 将等摩尔浓度的5条链(1 μ M)在1 $\times$ Tris缓冲液(100mM NaCl,50mM Tris,pH 8.0)中混合,用于RNA五面体的自下而上自组装。通过使用Eppendorf Mastercycle热循环仪将所述链在85 $^{\circ}$ C加热5分钟并缓慢冷却(经45分钟)到4 $^{\circ}$ C来实现“一锅”组装。然后在非变性PAGE(上文所述)上分析组装的纳米粒子。

[0515] 自组装RNA棱锥纳米粒子的表征:如上所述组装所有构建体,并将6 $\times$ 加载染料(80%蔗糖、0.01%溴酚蓝、0.01%二甲苯蓝(xylene cyanol))与各RNA样品混合,然后加载到非变性凝胶上。在4 $^{\circ}$ C、90V下在1 $\times$ TBM(89mM Tris、200mM硼酸和2.5mM MgCl₂)缓冲液中运行所有非变性凝胶。使用溴化乙锭(EB)溶液进行凝胶染色。使用Typhoon FLA 7000(GE Healthcare)使染色的凝胶成像。

[0516] 如先前所述,利用动态光散射(DLS),使用Zetasizer nano-ZS(Malvern Instrument,LTD)测量RNA棱锥的表观流体动力学大小和 ζ 电位(100到200nM,在1 $\times$ Tris缓冲液中,在25 $^{\circ}$ C下)。用于该测量中的激光波长是633nm。进行三次独立测量以获得数据。

[0517] Cryo-EM成像:将2 μ l RNA棱锥纳米粒子溶液(0.3mg/ml)施加到辉光放电的200目R1.2/1.3 Quantifoil网格上。将网格印迹1.5s并使用Vitrobot Mark IV(FEI)在液体乙烷中快速冷冻。然后将网格转移到在200kV下操作的具有用于筛选的带20eV狭缝的柱内能量过滤器的JEM2200FS冷冻电子显微镜(JEOL)。在4k $\times$ 4k CCD照相机(Gatan)上,以80,000 $\times$ 显微镜放大倍数(对应于每像素1.36 $\text{\AA}$ 的校准取样)和约30个电子/秒/ $\text{\AA}^2$ 的剂量率与1.5s的总曝光时间记录RNA棱柱纳米粒子的显微照片。以2到4 μ m的散焦范围收集总共27个图像。

[0518] 单粒子图像处理和3D重建:将图像处理软件包EMAN2.1用于显微照片评价、粒子拾取、对比度传递函数校正、无参照的2-D类平均、初始模型构造和cryo-EM数据的3-D精化。我们框入总共1522个粒子以生成用于构造初始模型的2D类平均。最后,使用1103个粒子,应用c4对称性进行最终精化。在没有任何掩码的情况下通过FSC曲线的0.143准则估计最终图的分辨率。将25Å高斯低通滤波器应用于Chimera软件包中展示的最终3D图。

[0519] 孔雀绿和spinach适体荧光测量:如先前所述,使用非变性6%PAGE检测荧光纳米粒子的荧光发射。同时使用5μM MG和5μM DFHBI染料将凝胶染色。然后在Typhoon FLA 7000上针对473nm处的MG荧光发射和473nm处激发的DFHBI荧光发射对凝胶进行扫描。在获得在不同波长下扫描的图像后,用EB对凝胶进行染色以进行成像。

[0520] 对于溶液中的荧光测量,将携有MG适体和spinach适体的多功能RNA棱锥在1×Tris缓冲液中与2μM MG和2μM DFHBI (Lucerna公司) 在室温下培育30min。具有MG适体和spinach适体的pRNA-3WJ用作阳性对照,并且没有功能化的RNA棱锥用作阴性对照。使用荧光分光光度计(Horiba Jobin Yvon)针对MG染料在615nm激发(625-750nm扫描用于发射)和针对DFHBI染料在450nm激发(465-750nm扫描用于发射)记录荧光光谱。

[0521] HBV核酶催化活性测定:类似于先前所报道的程序进行HBV核酶介导的对底物的切割。简单地说,通过Mirus Cy5标记试剂盒对HBV基因组RNA底物进行5'-Cy5标记,之后与多功能RNA棱锥以4:1的摩尔比在37℃培育1h。使用不含HBV核酶的多功能RNA棱锥作为阴性对照,并且将携有HBV核酶的pRNA-3WJ用作阳性对照。使用UREA PAGE分析切割的片段,并使用Typhoon荧光成像系统在Cy5通道下扫描凝胶。

[0522] 链霉亲和素(STV)适体结合测定:使用结合缓冲液(具有10mM Mg²⁺的PBS缓冲液)调节STV琼脂糖珠(Thermo Scientific)。将多功能RNA棱锥与STV琼脂糖珠在室温下培育30min。然后将珠粒以500×g旋转沉淀1min并收集上清液。使用50μl结合缓冲液来洗涤珠粒并收集级分。在洗脱步骤中,将结合缓冲液中的5mM生物素添加到混合物中,并收集级分三次。使用Nanodrop测量所有级分在260nm下的UV吸收。然后通过非变性6%PAGE分析级分。携有STV适体的pRNA-3WJ用作阴性对照。

[0523] ATP适体结合测定:使用PerkinElmer[γ-³²P]-ATP,通过虾碱性磷酸酶(rSAP, New England Biolabs公司)和T4多核苷酸激酶(T4PNK, New England Biolabs公司)对具有MG适体的链1和具有ATP适体的链5在5'-末端磷酸酯处进行³²P标记。将C-8ATP固定的琼脂糖树脂(Sigma-aldrich)浸泡在DEPC水和ATP结合缓冲液(300mM NaCl, 20mM Tris, pH 7.6, 5mM MgCl₂)中,然后与RNA培育。然后将多功能RNA棱锥纳米粒子与树脂在室温下培育30min,之后使用结合缓冲液洗涤三次。将树脂悬浮在闪烁液中以供使用闪烁计数器(Packard 1900TR液体闪烁分析仪)进行放射性测量。

[0524] 结果

[0525] 图14A-14F展示了能够光控释放货物的RNA纳米笼的设计和表征。图14A显示了由三条链构成的pRNA的3WJ的晶体结构。图14B显示了具有底部的四个3WJ和顶点的一个四向连接的棱锥形RNA纳米笼的三维结构。图14C显示了示出RNA棱锥的逐步组装的代表性的非变性PAGE组装凝胶。图14D显示了以TGGE为特征的RNA棱锥纳米粒子的解链温度曲线。图14E展示了通过动态光散射(DLS)确定的RNA五面体的大小。图14F展示了RNA棱锥的ζ电位。

[0526] 图15A-15C展示了RNA棱锥的CryoEM分析的结果。图15A显示了原始cryoEM(冷冻电

子显微术)图像。白框指示单个RNA棱锥。图15B示出了各个原始粒子与类似取向的3D模型的计算机生成的二维投影之间的比较。图15C示出了从cryoEM图像重建的五面体模型的四个视图。

[0527] 图16显示了一组展示RNA链上Cy5的光控释放的图像。在左图中,没有光可切割间隔区的与Cy5缀合的RNA链在UV辐照下未显示Cy5释放,而在右图中其具有光可切割间隔区的对应物显示Cy5在5min内的快速释放。

[0528] 图17显示了一组展示RNA纳米笼上Cy5的光控释放的图像。

[0529] 图18A和图18B显示了展示具有或不具有光可切割(PC)间隔区的与紫杉醇或Cy5缀合的RNA纳米笼的制作的凝胶图像。

[0530] 图19显示了展示能够光控释放货物的RNA纳米笼的血清稳定性的代表性凝胶图像(图19)。

序列表

<110>	俄亥俄州国家创新基金会	
<120>	自组装的3D RNA笼形纳米粒	
<130>	321501-2030	
<150>	US 62/380,238	
<151>	2016-08-26	
<150>	US 62/333,890	
<151>	2016-05-10	
<160>	30	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	120	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	RNA纳米笼的链的序列	
<400>	1	
	gcaaugguac gguacuucca uugucaugug uauguugggg auuaaacccu gauugaguuc	60
	agcccacaua cuuuguugau ugguugucaa ucauggcaaa agugcacgcu acuccgcuaa	120
<210>	2	
<211>	88	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	来自图1B&图29的RNA链1	
<400>	2	
	ggacugauac gaaucaucgu guagcaccag cuguaaucga uguguacggg aagagccuau	60
	gcccauccua cuuuguucua cuauggcg	88
<210>	3	
<211>	88	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	来自图1B&图29的的RNA链2	
<400>	3	
	ggugcuacac gauguguagc cagacuuagc ggaauguucg uacuuuguuc augcgaggcc	60
	guccaauacc gaaucaucga uuacagcu	88
<210>	4	

<211>	88	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	来自图1B&图29的的RNA链3	
<400>	4	
	gggcaguuga gauguguacg aacauuccgc uaagucuggc uacuuuguuc guaucagucc	60
	cgccauagua gaaucaucgu aucaccu	88
<210>	5	
<211>	88	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	来自图1B&图29的的RNA链4	
<400>	5	
	ggccucgcau gaaucaucuc aacugcccau ggugauacga uguguaggau gggcauaggc	60
	ucuucccgua cuuuguucgg uauuggac	88
<210>	6	
<211>	61	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	来自图12A的a3WJ/EGFR适体	
<400>	6	
	uugccaugug uauguggggc cuuaguaacg ugcuuugaug ucgauucgac aggaggcccc	60
	a	61
<210>	7	
<211>	16	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	来自图12A的b3WJ	
<400>	7	
	cauacuuugu ugaucc	16
<210>	8	
<211>	16	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 来自图12A和13A的c3WJ	
<400> 8	
ggaucaauca uggcaa	16
<210> 9	
<211> 38	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 来自图13A的a3WJ/CD133适体	
<400> 9	
uuggccaugu guauggggc ccuccuacau agggccca	38
<210> 10	
<211> 35	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 来自图13A的b3WJ/CD133适体	
<400> 10	
cauacuuugu ugaucccaga acguauacua uucug	35
<210> 11	
<211> 187	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 来自图23&图30的RNA链1	
<400> 11	
ggaugacagg ugucaaugca cugauacgaa ucaucgugua gcagauucga uuguacucgu	60
ccucagguuc uacagacgag cuguaaucga uguguacggg aagagaguca cuugcguggc	120
ucccccucuaac ugcaguagug uaugcccauc cuacuuuguu cuacuauggc ggcaaguaug	180
auccaug	187
<210> 12	
<211> 187	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 来自图23&图30的链2	
<400> 12	
ggacgaguac aaucgaaucu gcuacacgau guguagccag acuuaguguc gugaccguac	60
gaccgacucg agucgacgac ggaauguucg uacuuuguuc augcgagggc gauagcgccu	120

agcugccucu gacuggaccu aguguccaau accgaaucau cgauuacagc ucgucuguag	180
aaccuga	187
<210> 13	
<211> 187	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 来自图23&图30的RNA链3	
<400> 13	
ggagagcgua guccuguacg caguugagau guguaacgaac auuccgucgu cgacucgagu	60
cggucguacg gucacgacac uaagucuggc uacuuuguuc guaucagugc auugacaccu	120
gucaucccau ggaucauacu ugccgccaua guagaaucan cguaucacca ugaacaucan	180
cacagac	187
<210> 14	
<211> 187	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 来自图23&图30的RNA链4	
<400> 14	
ggcagcuagg cgcuaucgcc cucgcaugaa ucaucucaac ugcguacagg acuacgcucu	60
ccgucuguga ugauguucau ggugauacga uguguaggau gggcauacac uacugcagua	120
gaggggagcc acgcaaguga cucucuuccc guacuuuguu cgguaauugga cacuaggucc	180
agucaga	187
<210> 15	
<211> 111	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 来自图26的RNA链1	
<400> 15	
ggacugauac gaaucaucgu guagcaccag cuguaaucga uguguacggg aagagccuau	60
gcccuauccua cuuuguucua cuauggcgaa cuuacgcuga guacuucgau u	111
<210> 16	
<211> 111	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 来自图26的RNA链2	

<400> 16	
ggugcuacac gauguguagc cagacuuagc ggaauguucg uacuuuguuc augcgaggcc	60
guccaauacc gaaucaucga uuacagcuua cuuacgcuga guacuucgau u	111
<210> 17	
<211> 111	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 来自图26的RNA链3	
<400> 17	
gggcaguuga gauguguacg aacauuccgc uaagucuggc uacuuuguuc guaucagucc	60
cgccauagua gaaucaucgu aucaccuuaa cuuacgcuga guacuucgau u	111
<210> 18	
<211> 111	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 来自图26的RNA链4	
<400> 18	
ggccucgcau gaaucaucuc aacugcccau ggugauacga uguguaggau gggcauaggc	60
ucuucccgua cuuuguucgg uauuggacaa cuuacgcuga guacuucgau u	111
<210> 19	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 来自图26和31的Luc siRNA反义	
<400> 19	
ucgaaguacu cagcguaagu u	21
<210> 20	
<211> 127	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 来自图27的RNA链1	
<400> 20	
ggacugauac gaaucaucgu guagcaccag cuguaaucga uguguacggg aagagccuau	60
gccaauccua cuuuguucua cuauggcggc cuuaguaacg ugcuuugaug ucgauucgac	120
aggaggc	127

<210>	21	
<211>	127	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	来自图27的RNA链2	
<400>	21	
	ggugcuacac gauguguagc cagacuuagc ggaauguucg uacuuuguuc augcgaggcc	60
	guccaauacc gaaucaucga uuacagcugc cuuaguaacg ugcuuugaug ucgauucgac	120
	aggaggc	127
<210>	22	
<211>	104	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	来自图27的RNA链3	
<400>	22	
	gggcaguuga gauguguacg aacauuccgc uaagucuggc uacuuuguuc guaucagucc	60
	cgccauagua gaaucaucgu aucaccauuu gccaugauug aucc	104
<210>	23	
<211>	127	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	来自图27的RNA链4	
<400>	23	
	ggccucgcau gaaucaucuc aacugcccau ggugauacga uguguaggau gggcauaggc	60
	ucuucccgua cuuuguucgg uauuggacgc cuuaguaacg ugcuuugaug ucgauucgac	120
	aggaggc	127
<210>	24	
<211>	16	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	来自图27的Alexa647	
<400>	24	
	ggaucaauca uggcaa	16
<210>	25	
<211>	38	

<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 来自图31的MG适体	
<400> 25	
ggaucgccgac uggcgagagc cagguaacga auggaucc	38
<210> 26	
<211> 100	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 来自图31的Spinach适体	
<400> 26	
ggacgcaacu gaaugaaaug gugaaggacg gguccaggug uggcugcuuc ggcagugcag	60
cuuguugagu agagugugag cuccguaacu agucgcgucc	100
<210> 27	
<211> 68	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 来自图31的HBV核酶	
<400> 27	
gggacgaaaa aaaacaaaau cuuuacugau gaguccguga ggacgaaacg ggucaaaaaa	60
aacguccc	68
<210> 28	
<211> 64	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 来自图31的链霉亲和素适体	
<400> 28	
ggaugcggcc gccgaccaga aucaugcaag ugcguaagau agucgcgggu cggcggccgc	60
aucc	64
<210> 29	
<211> 39	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 来自图31的EGFR适体	

<400>	29	
gccuuaguaa cgugcuuuga ugucgauucg acaggaggc		39
<210>	30	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	来自图31的Luc siRNA有义	
<400>	30	
aacuuacgcu gaguacuucg auu		23

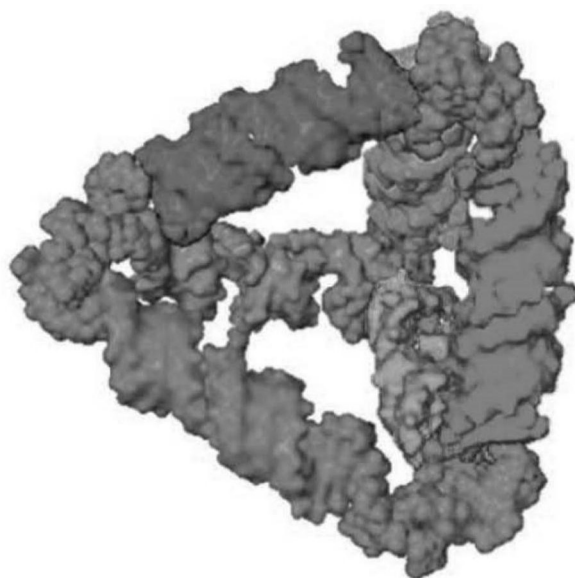


图1C

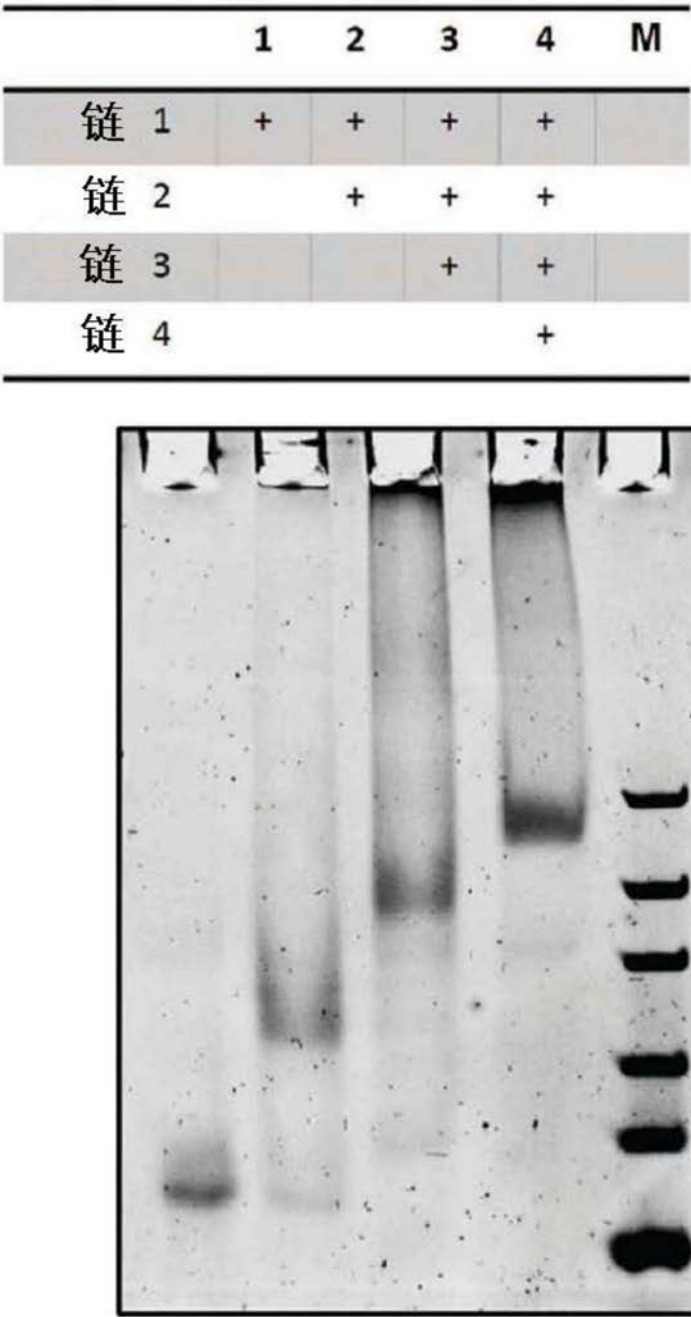


图1D

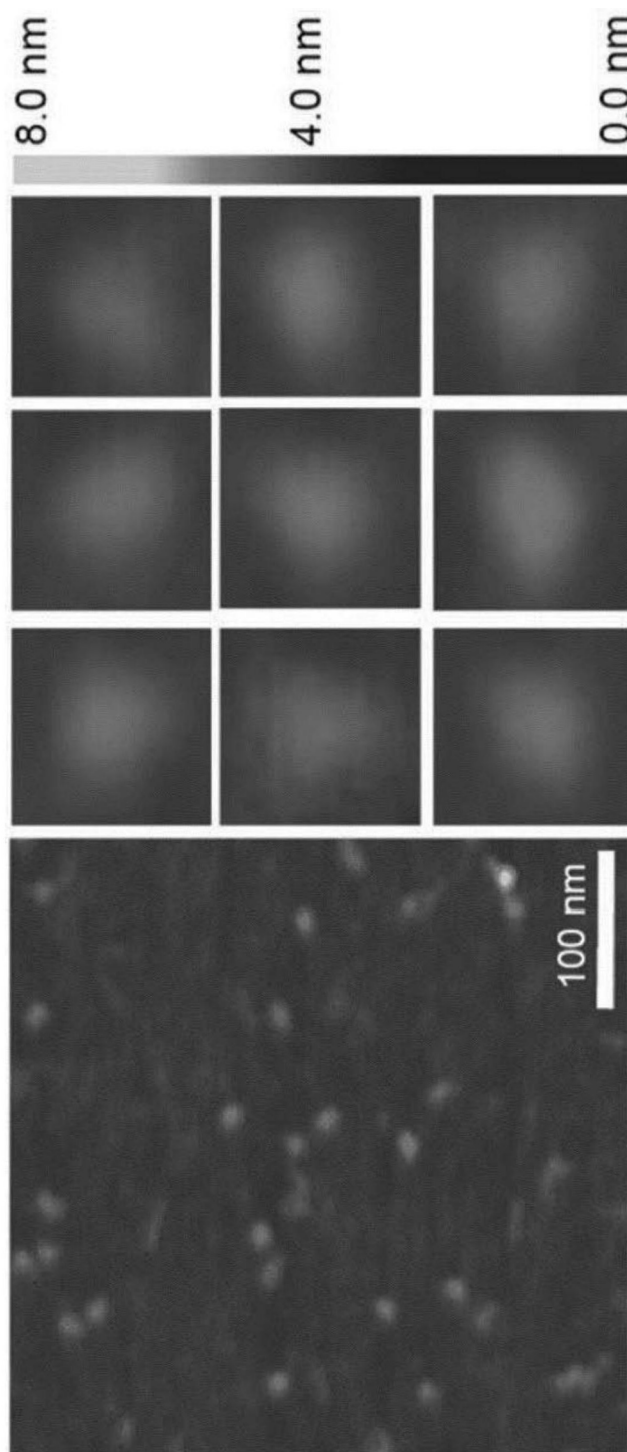


图1E

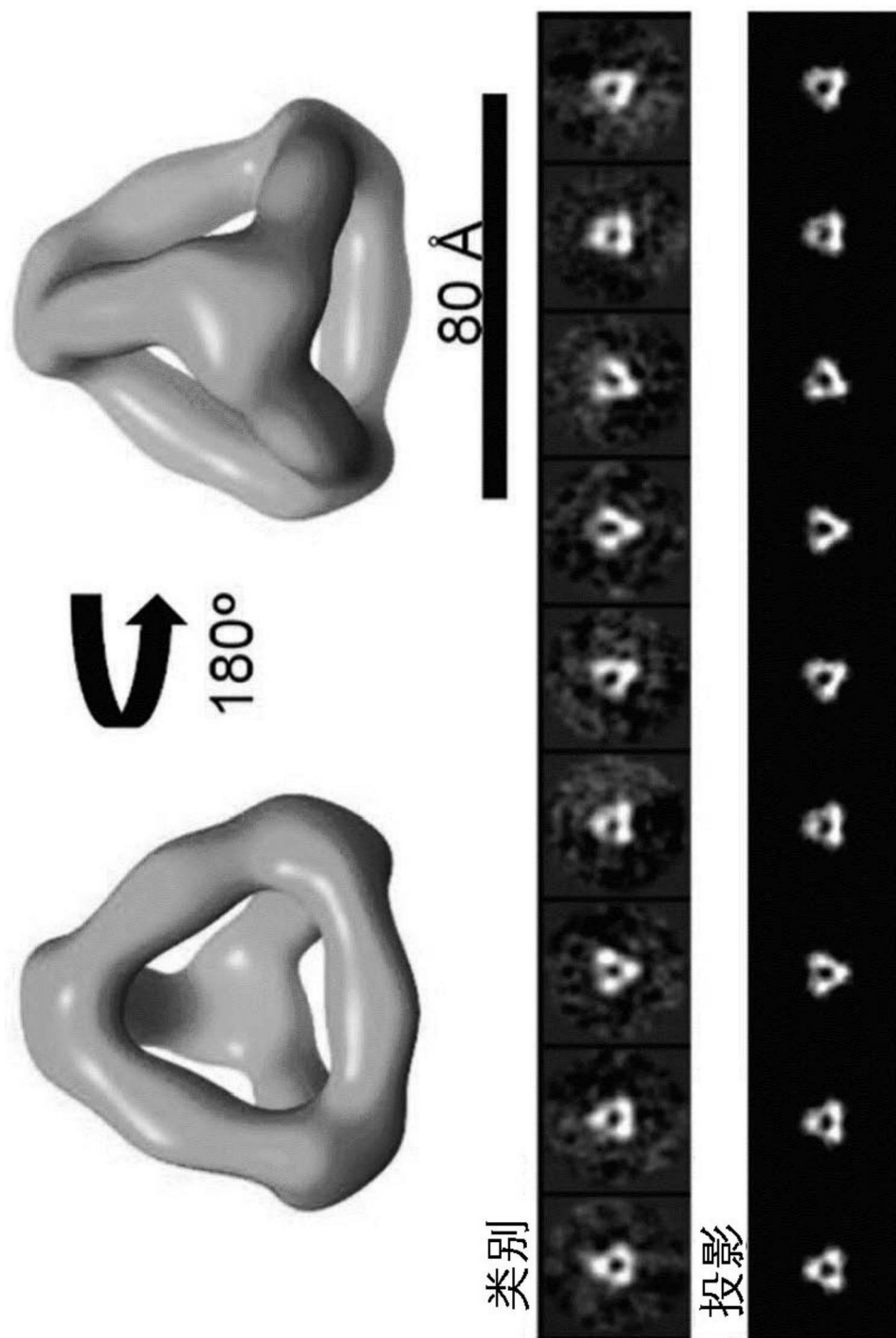


图1F

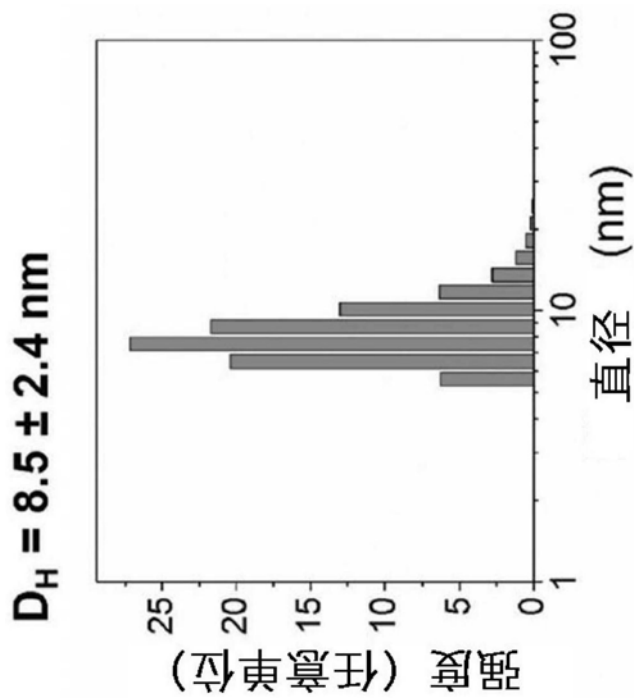


图2A

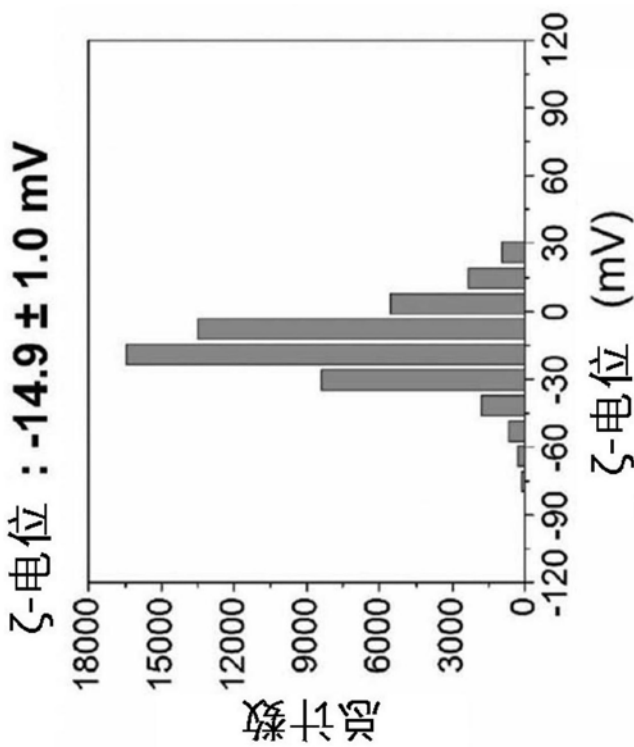


图2B

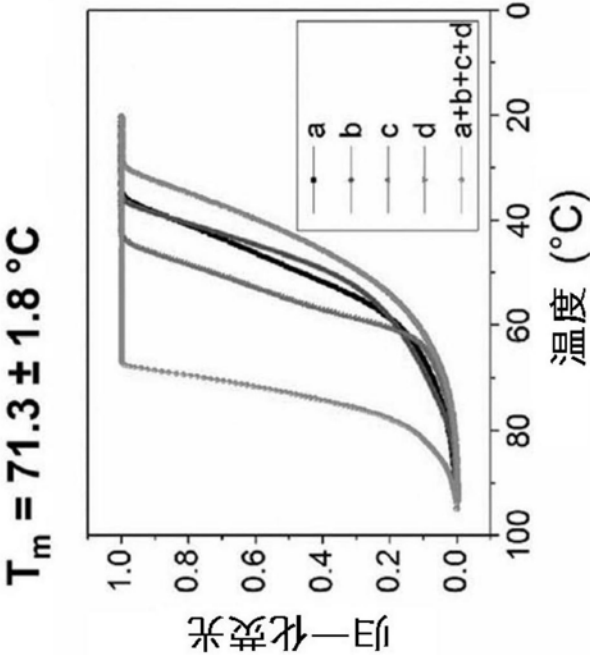


图2C

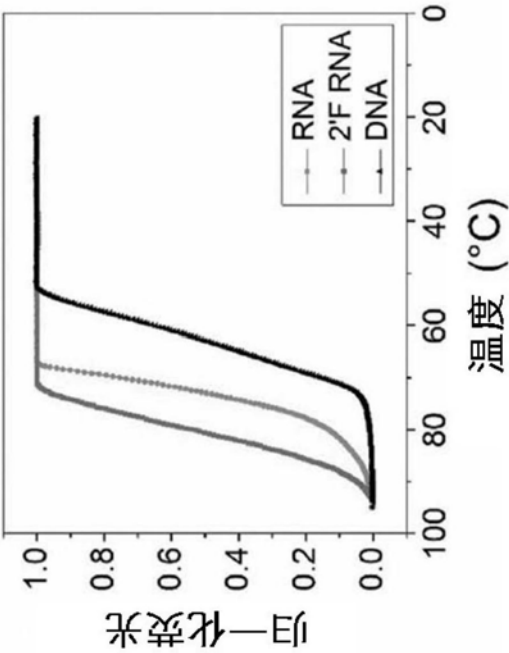


图2D

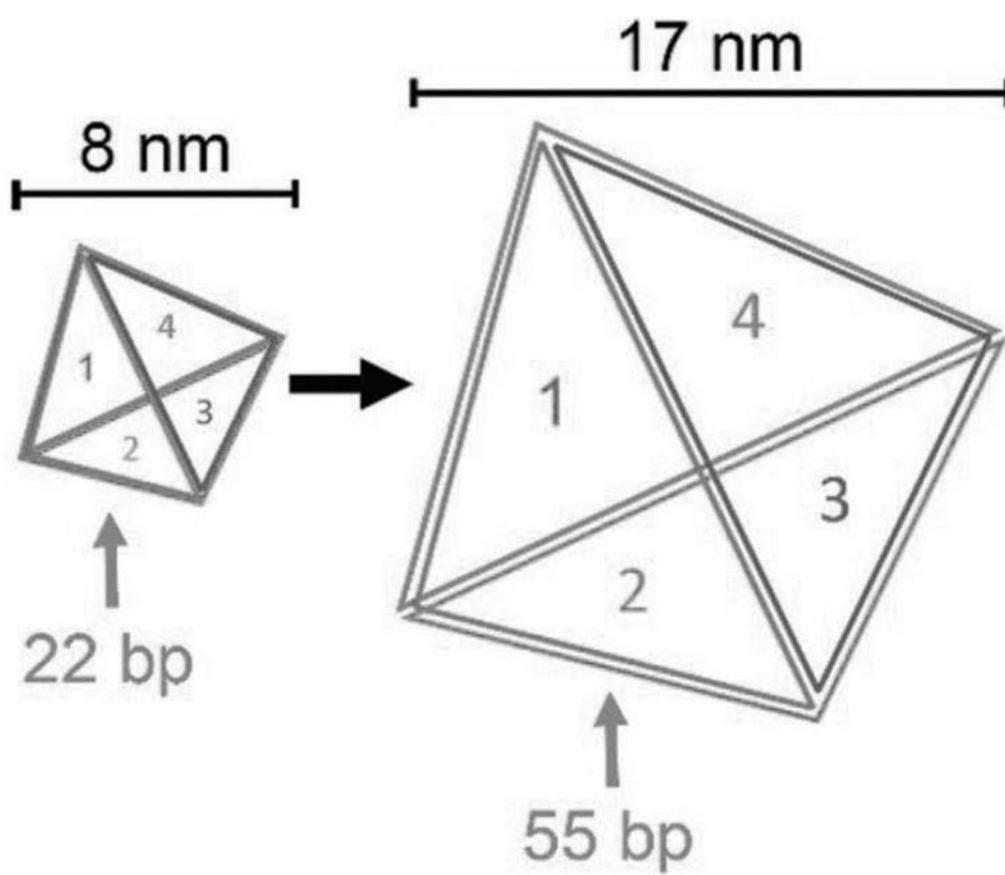


图3A

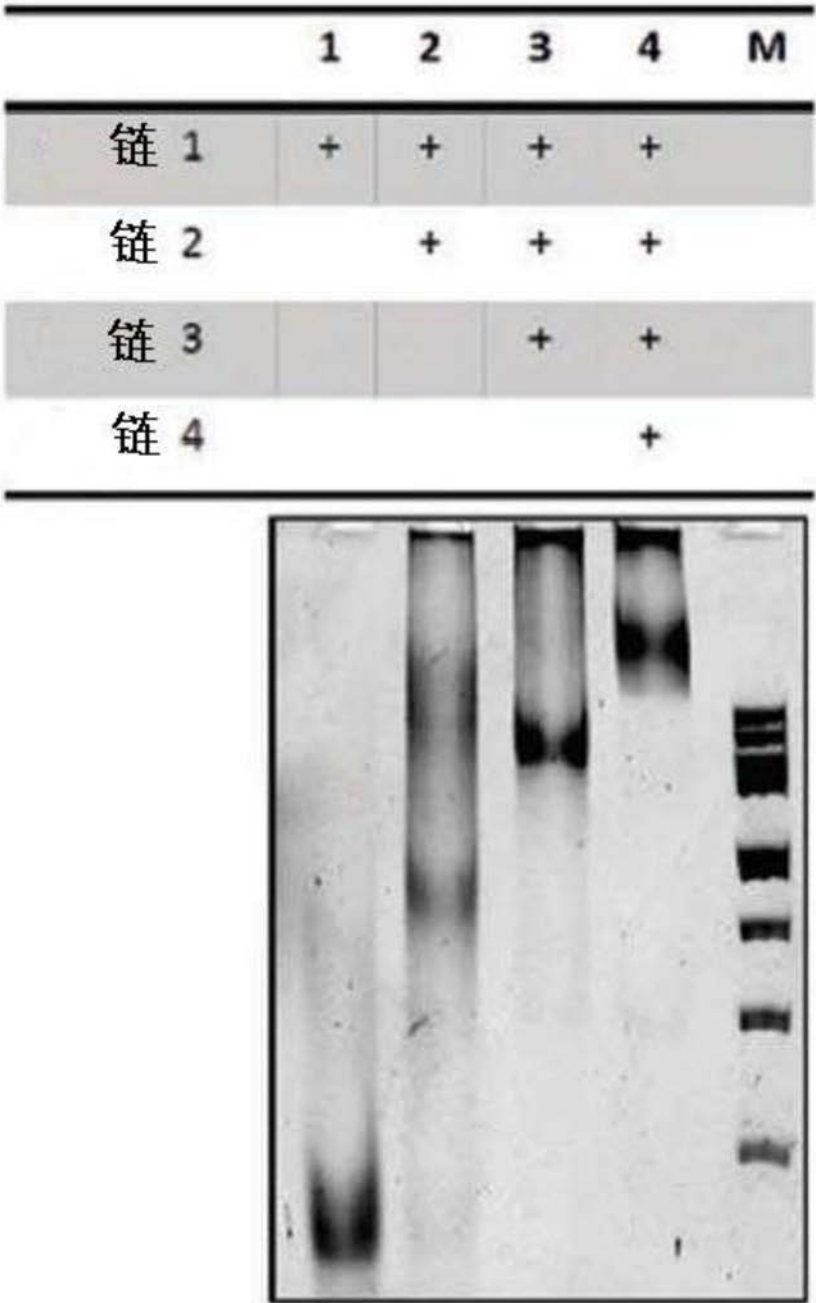


图3B

$$D_H = 16.9 \pm 1.6 \text{ nm}$$

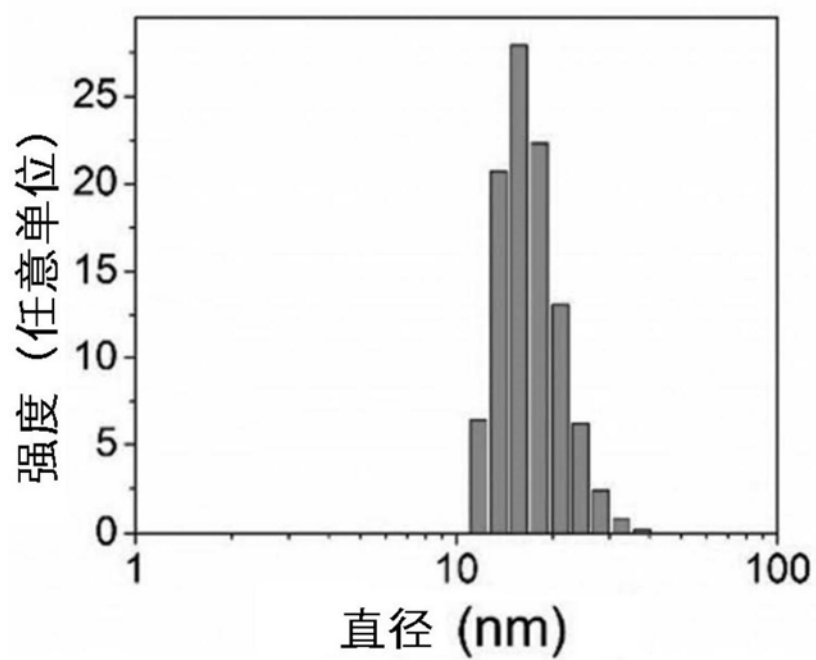


图3C

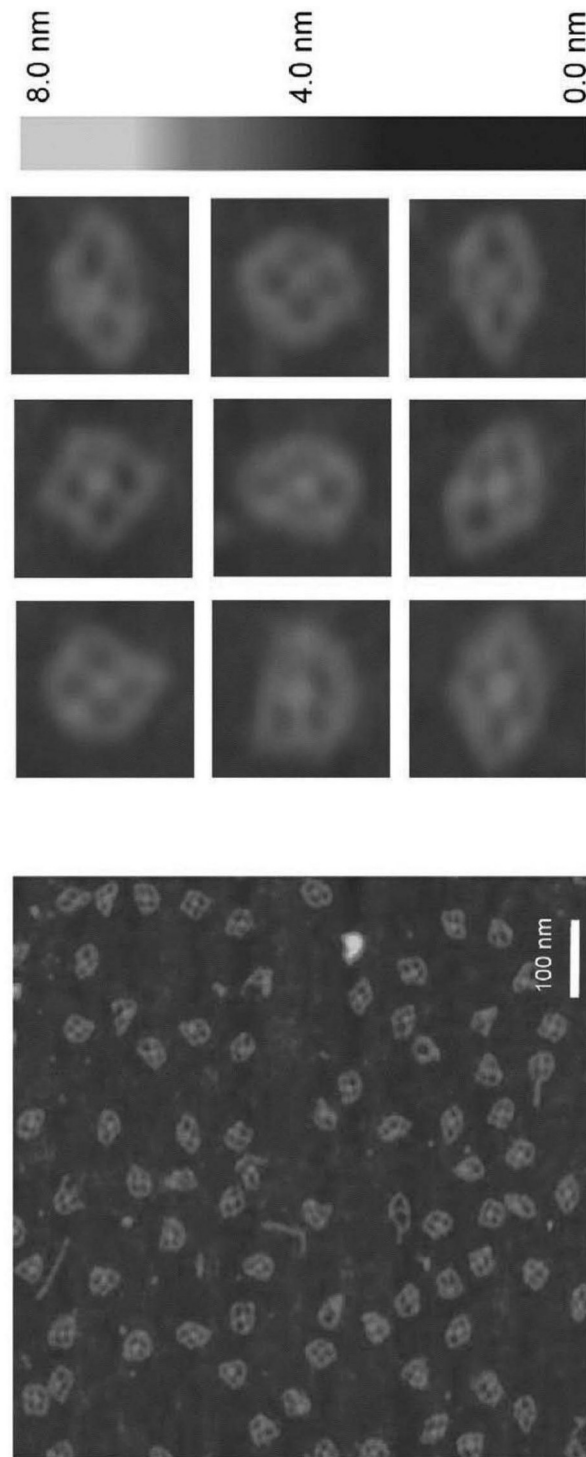


图3D

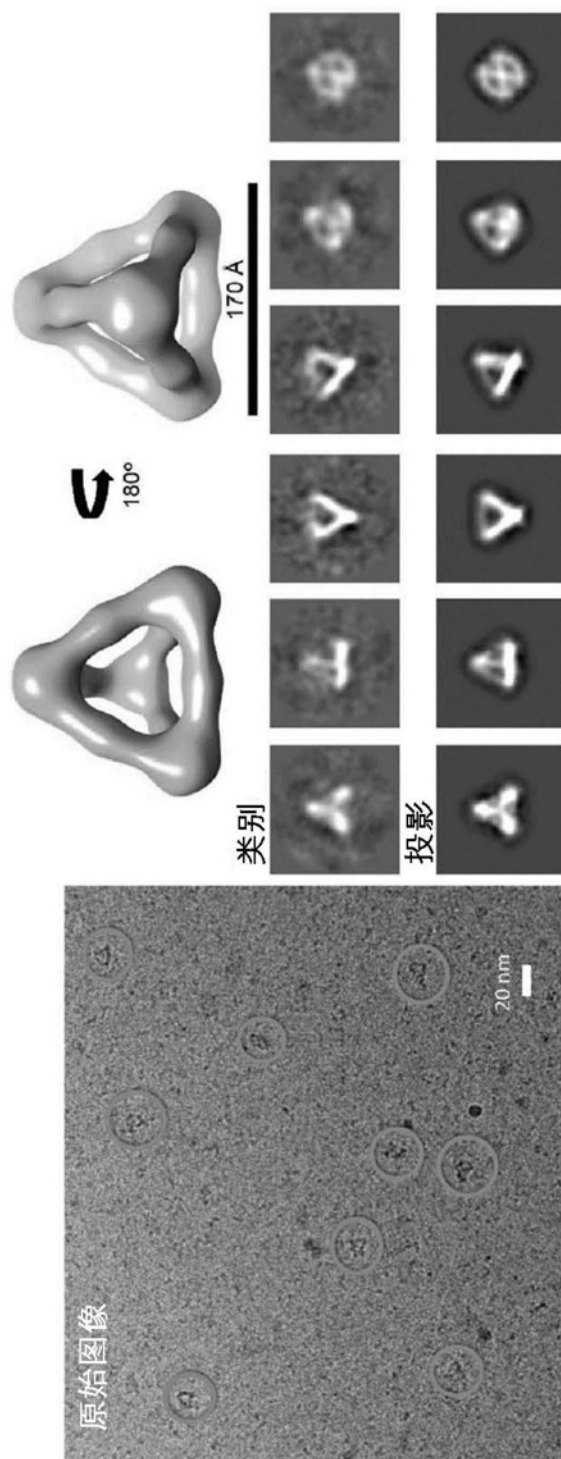


图3E

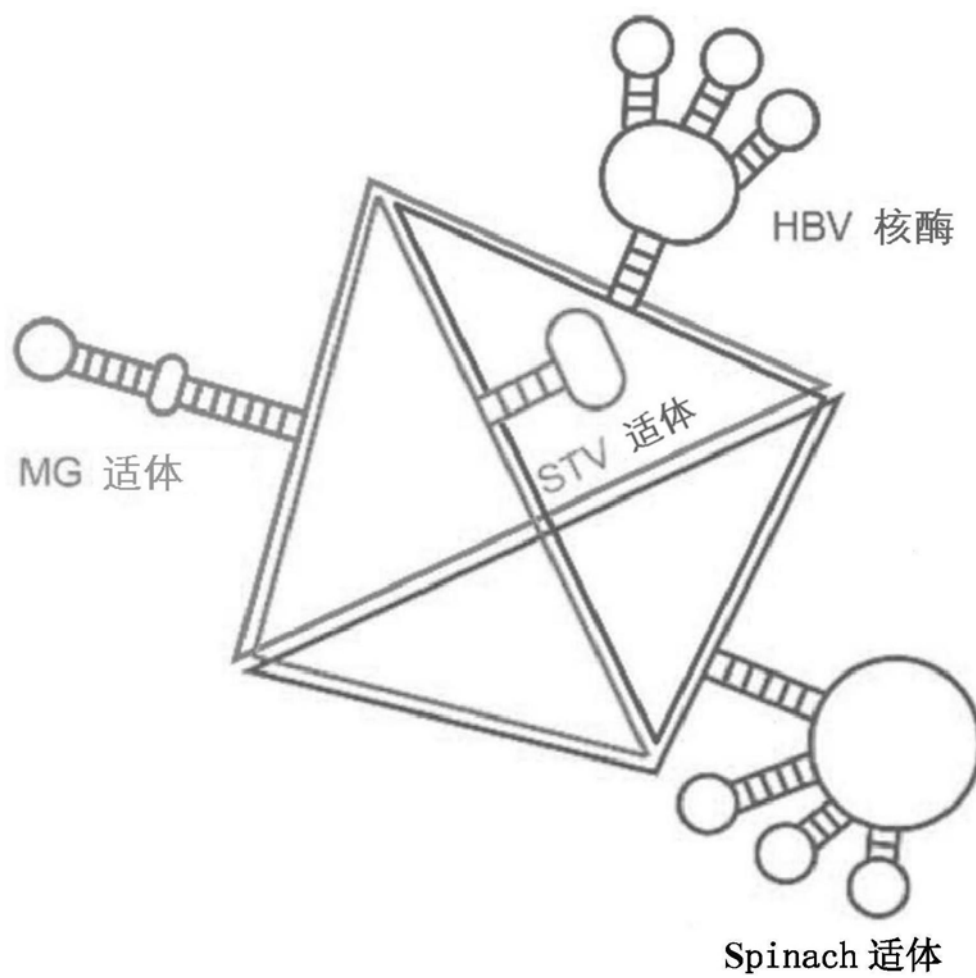


图4A

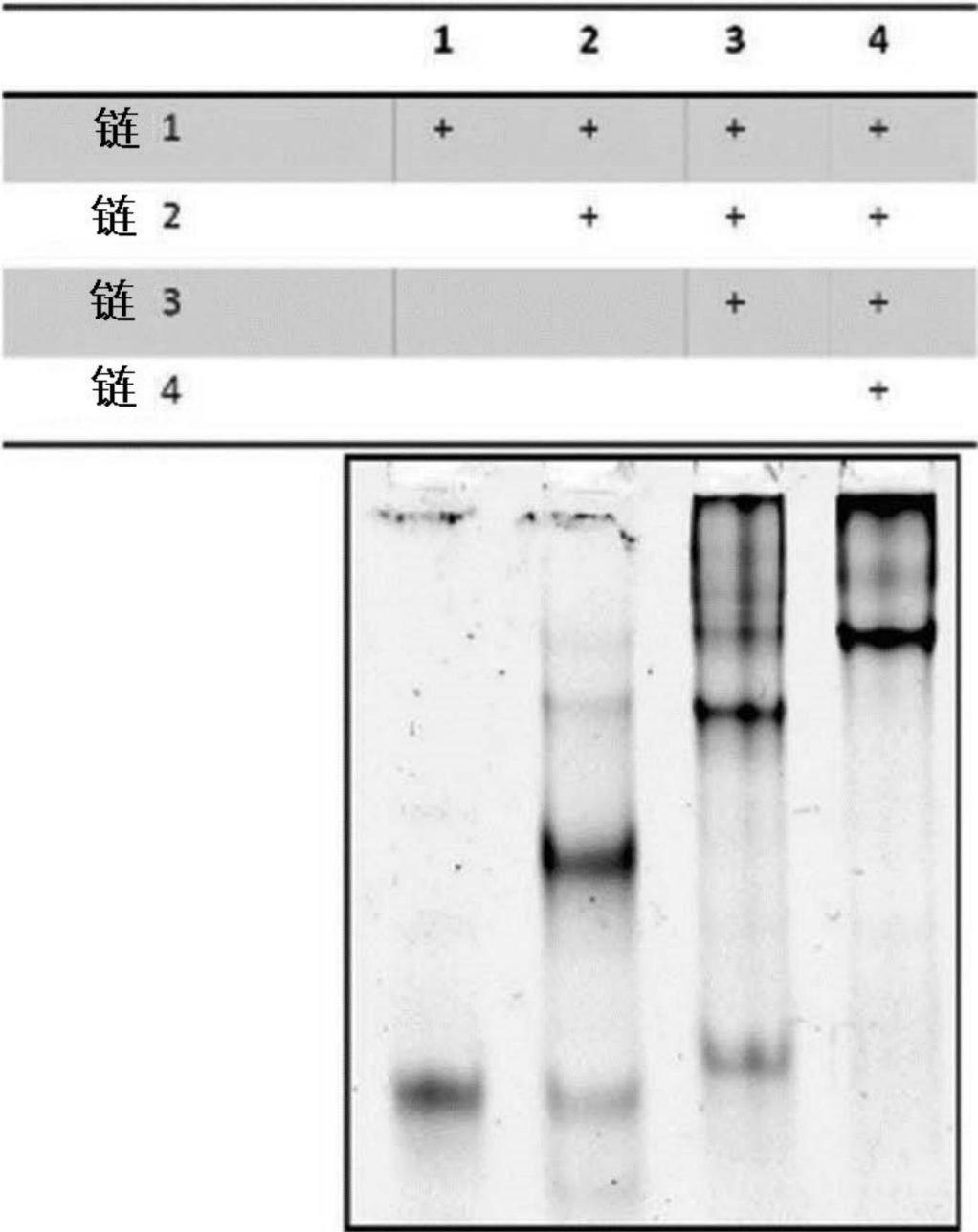


图4B

HBV 核酶切割分析

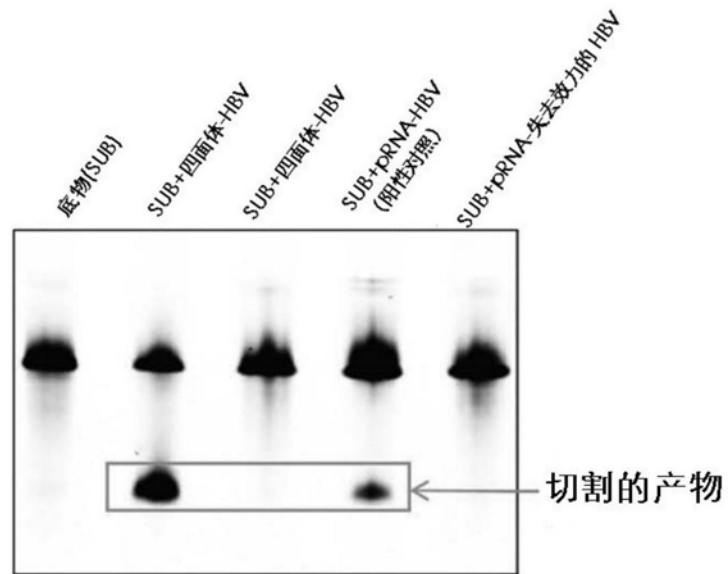


图4C

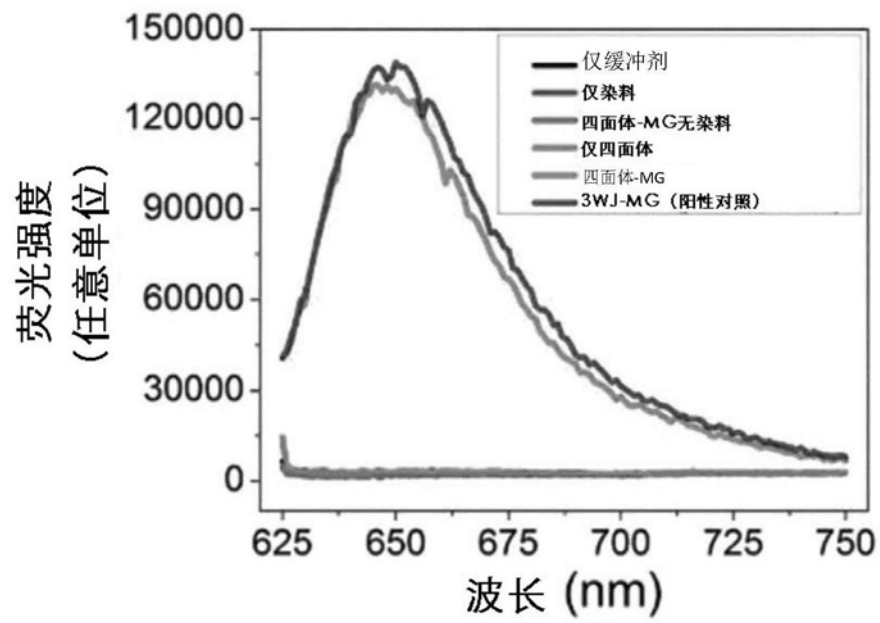


图4D

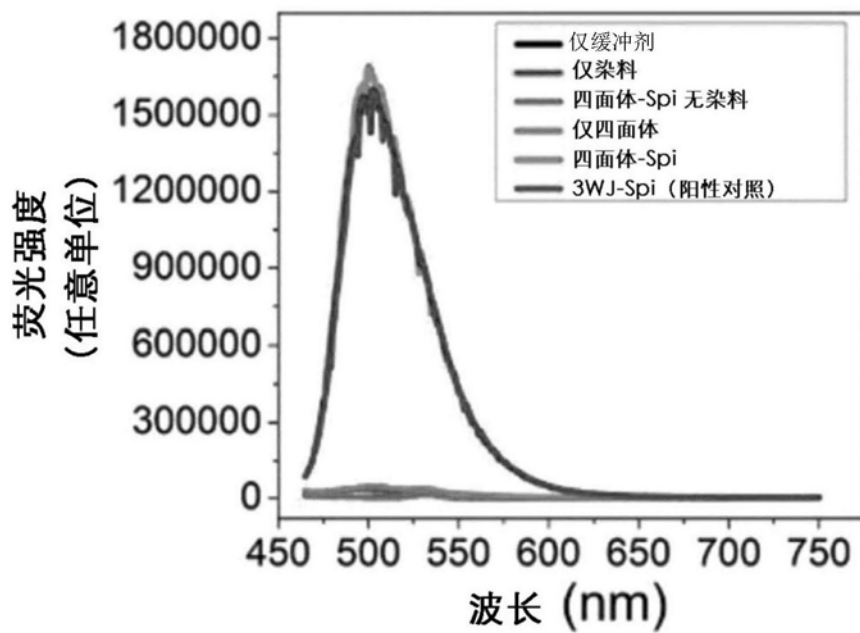


图4E

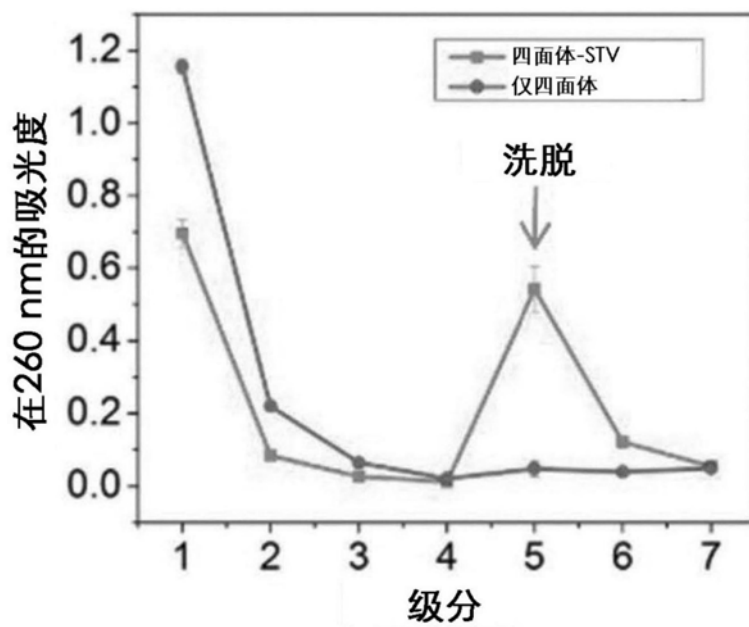


图4F

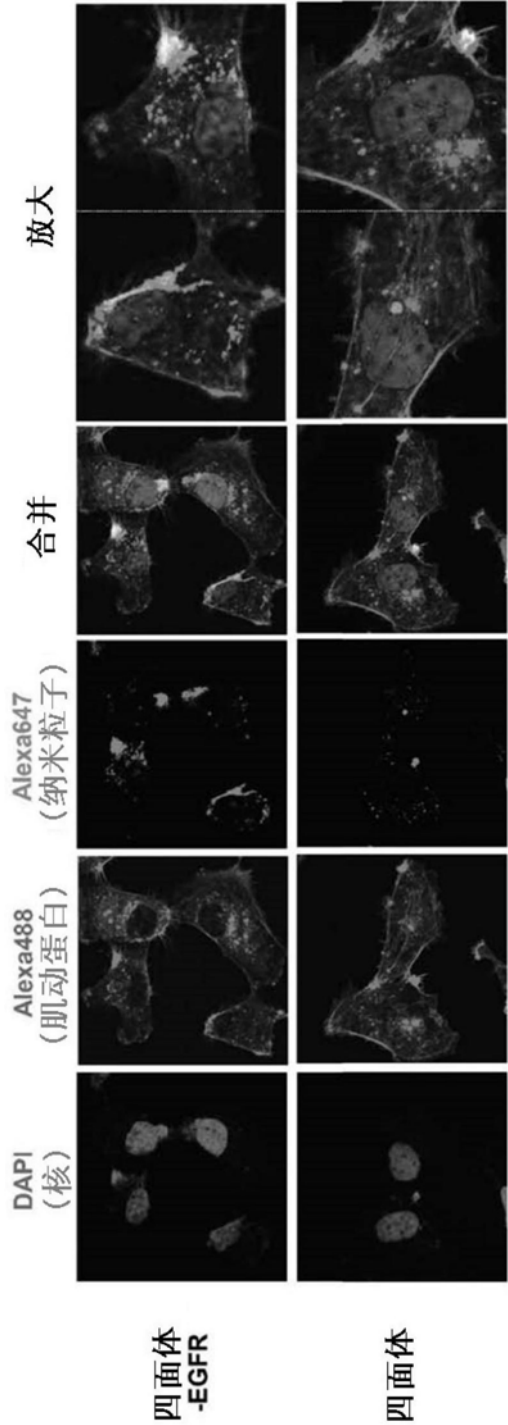


图5A

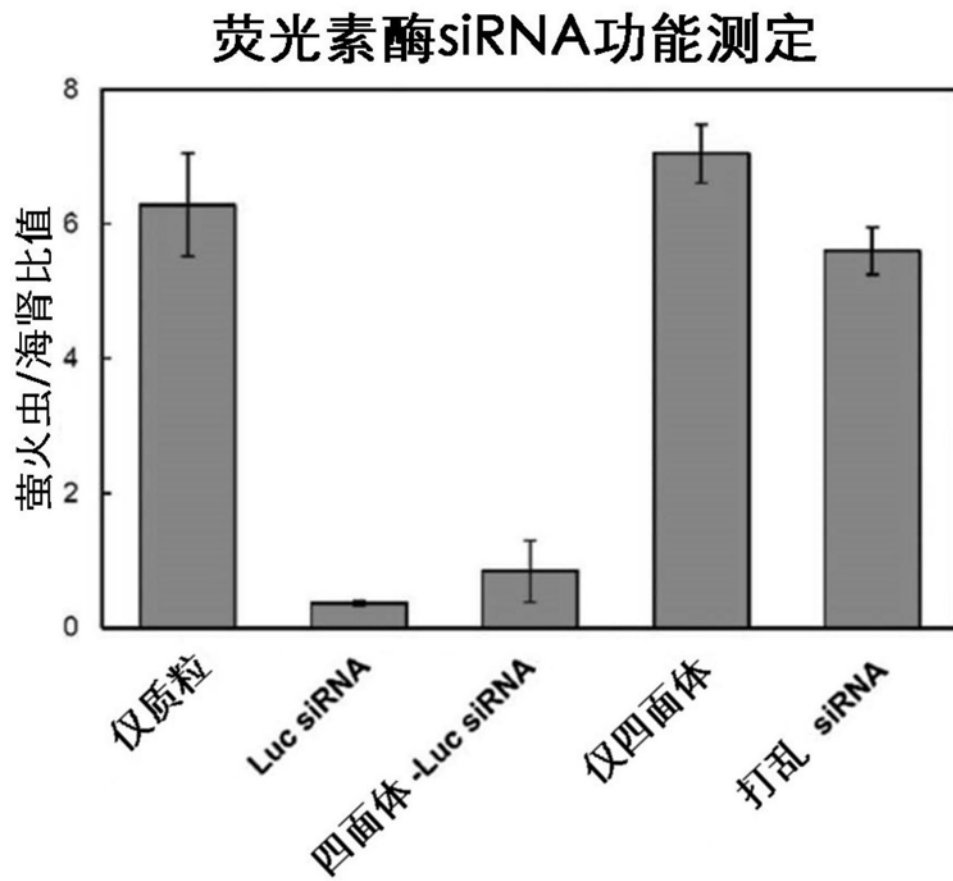


图5B

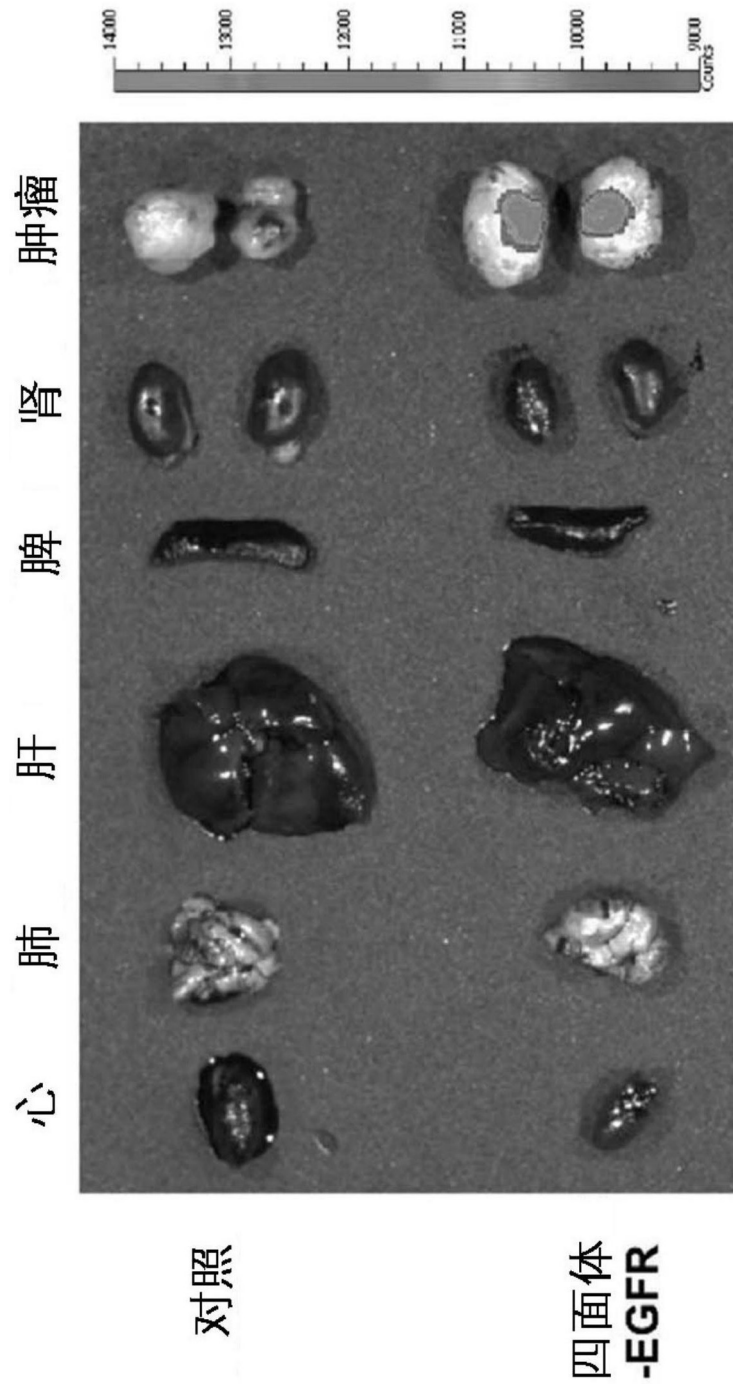


图5C

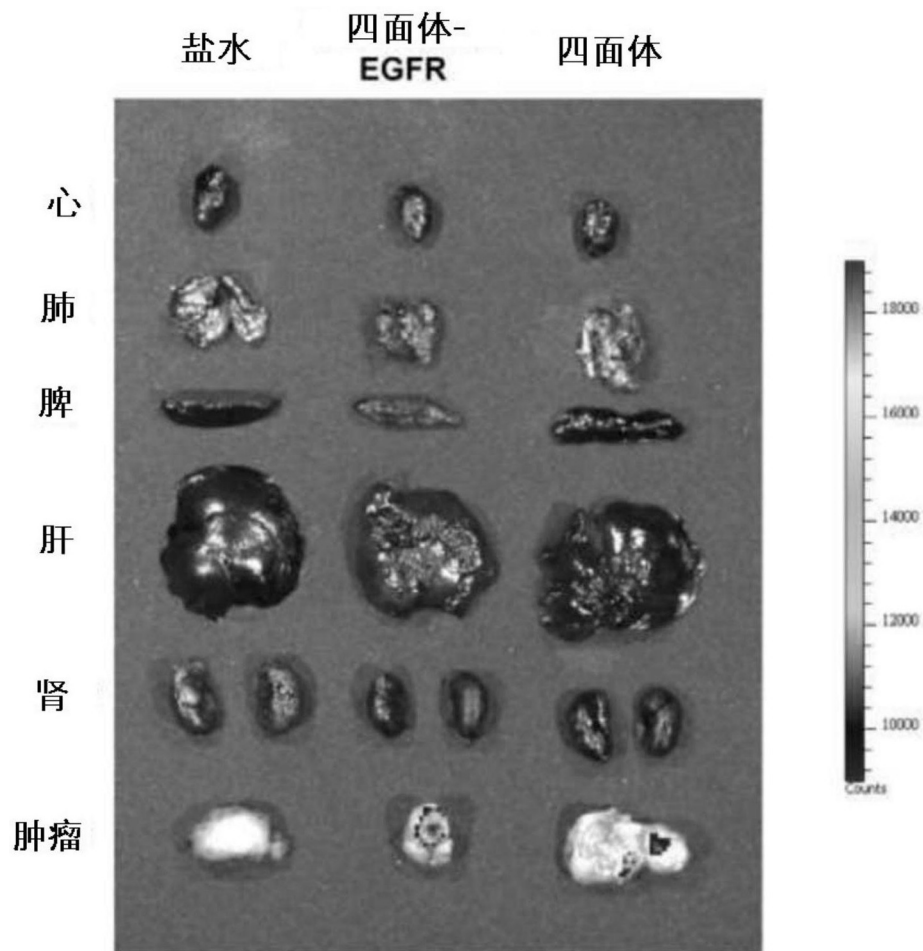


图5D

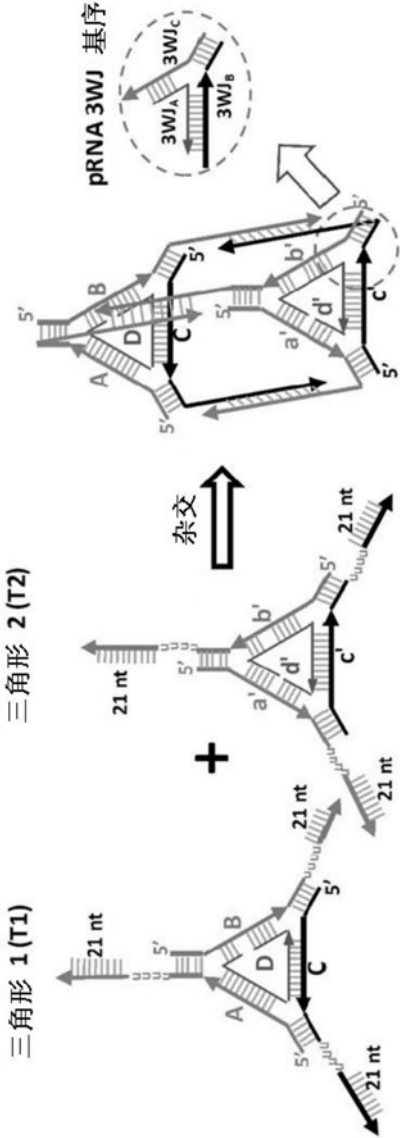


图6A

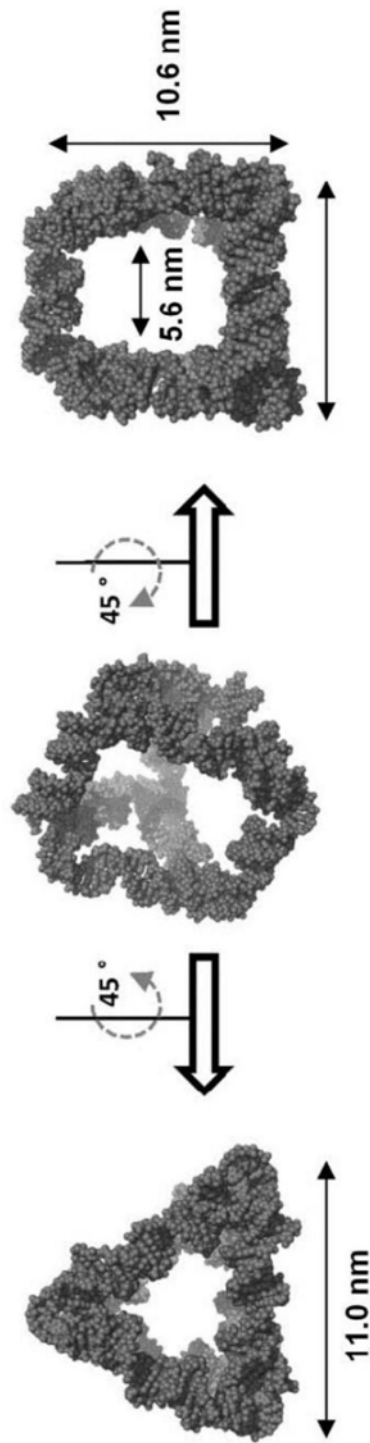


图6B

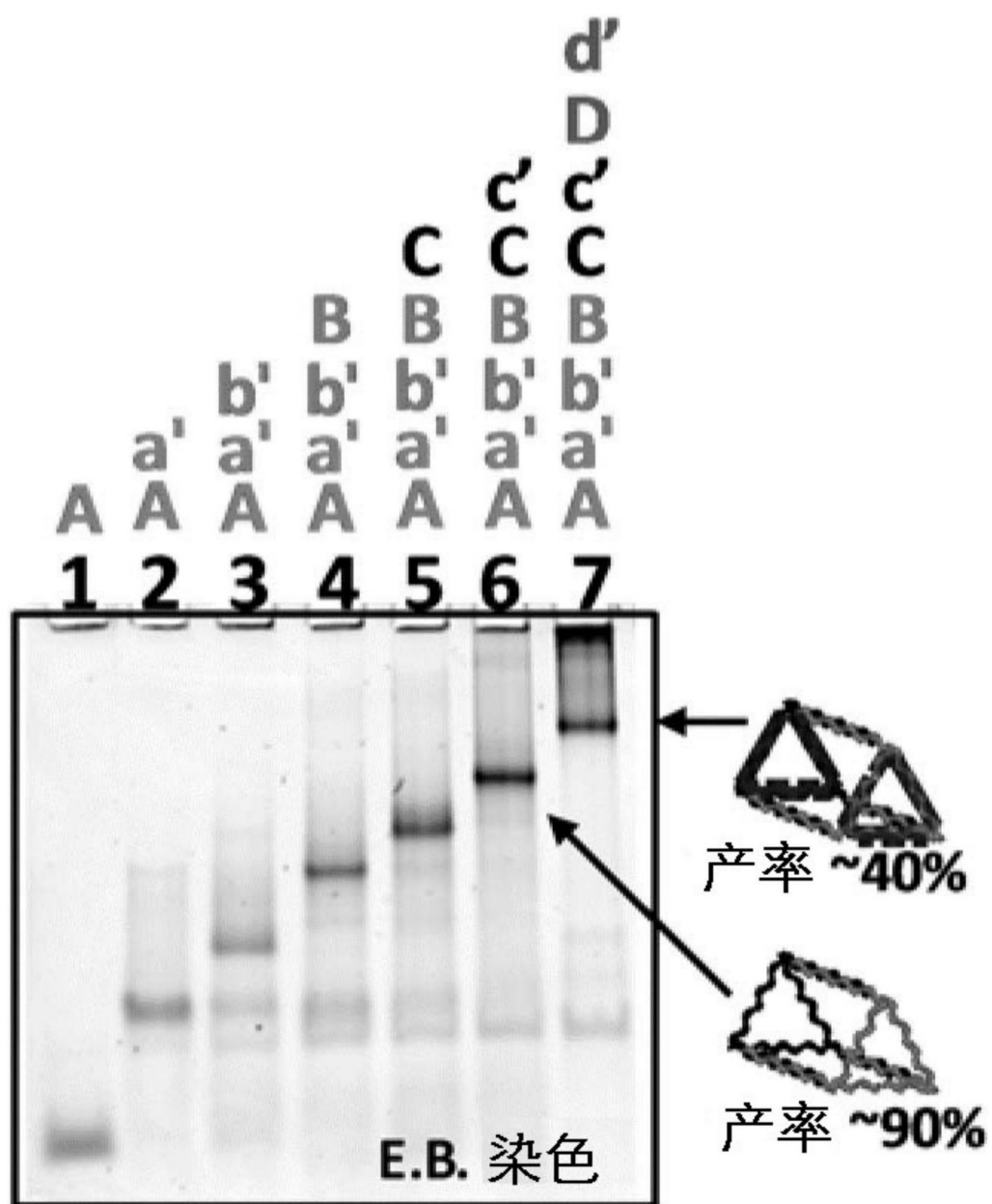


图7A

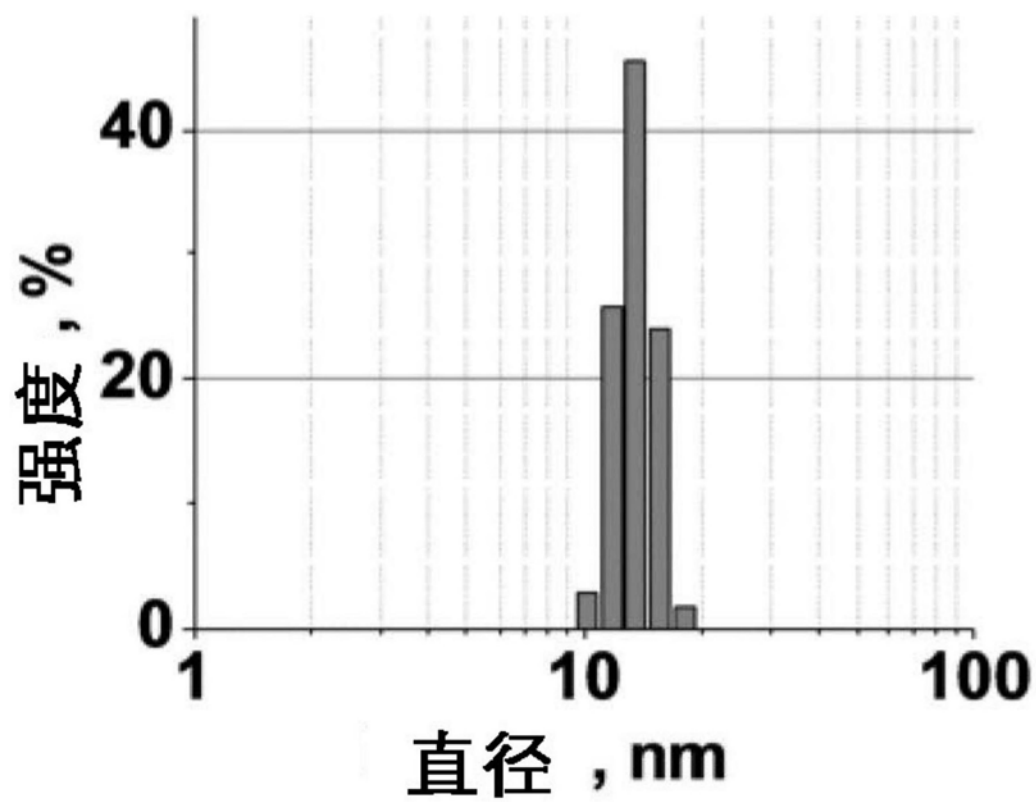


图7B

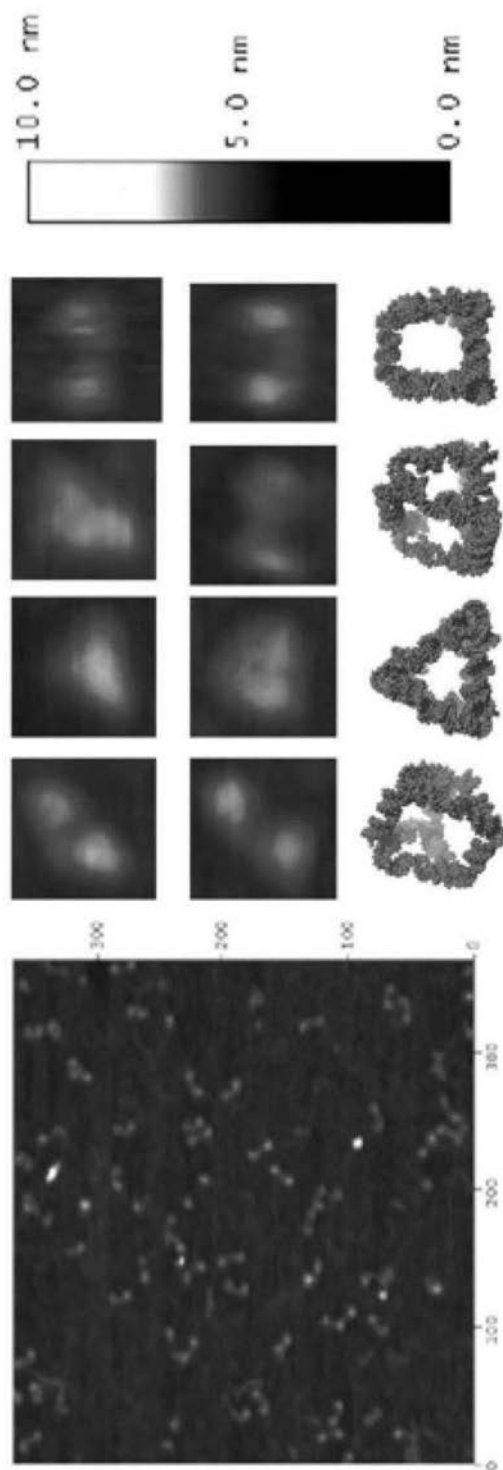


图7C

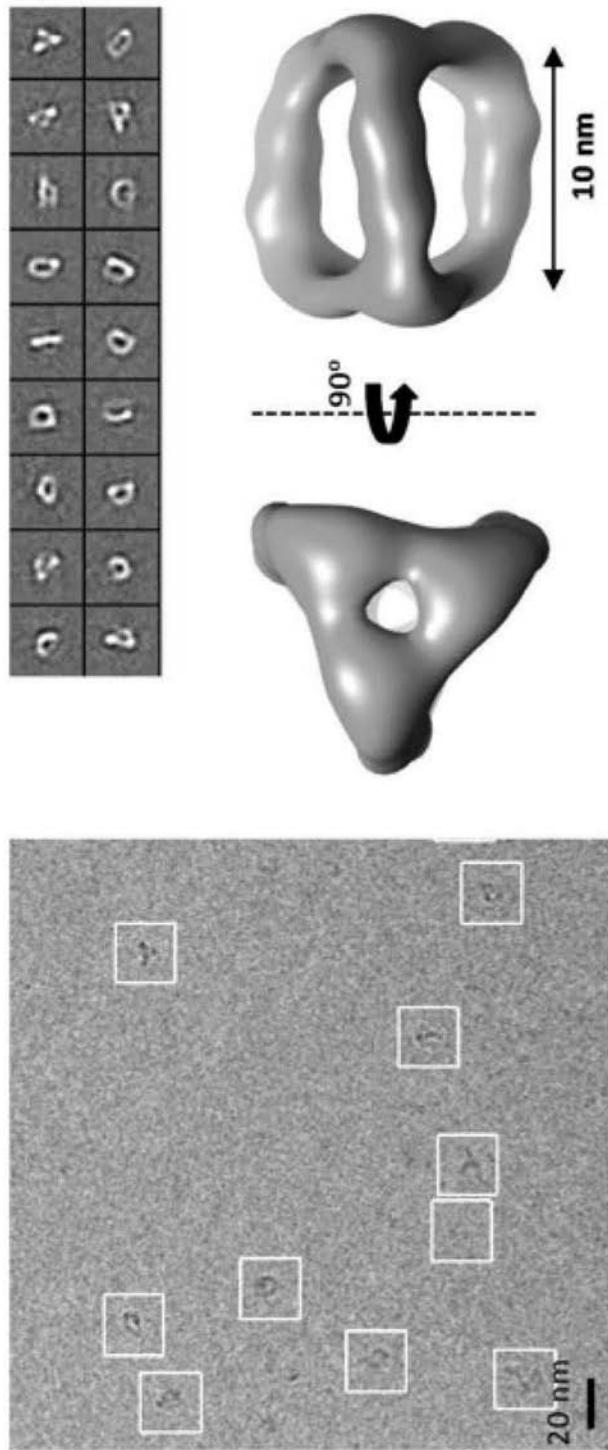


图7D

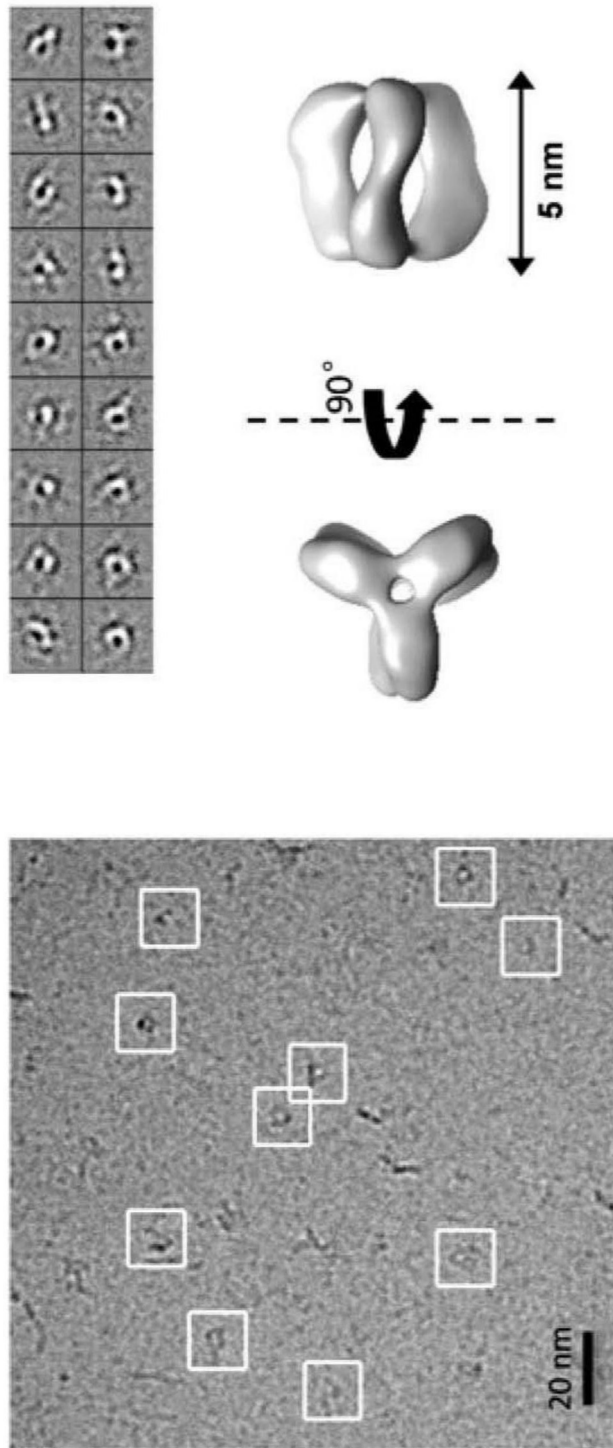


图7E

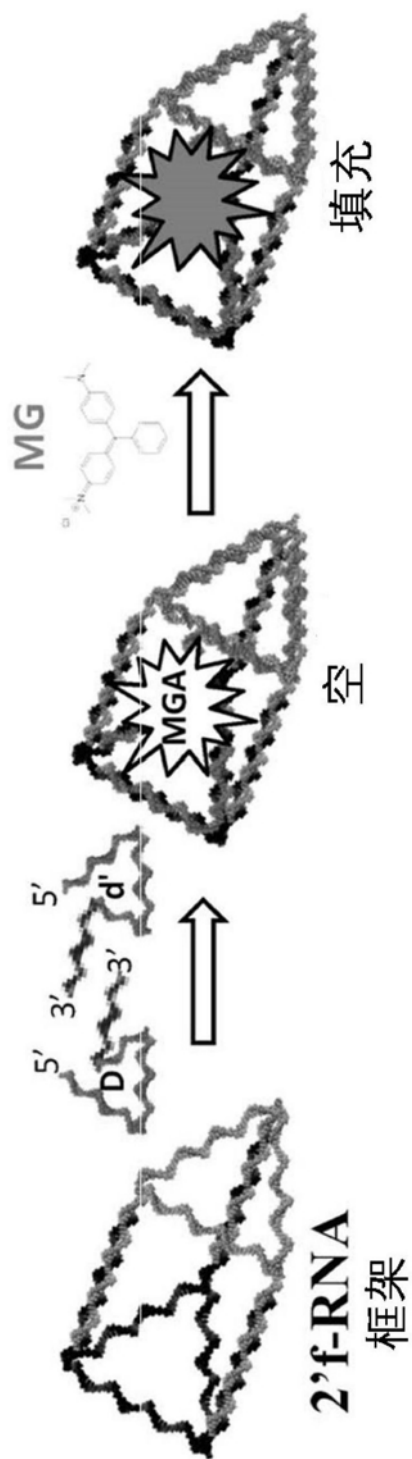


图8A

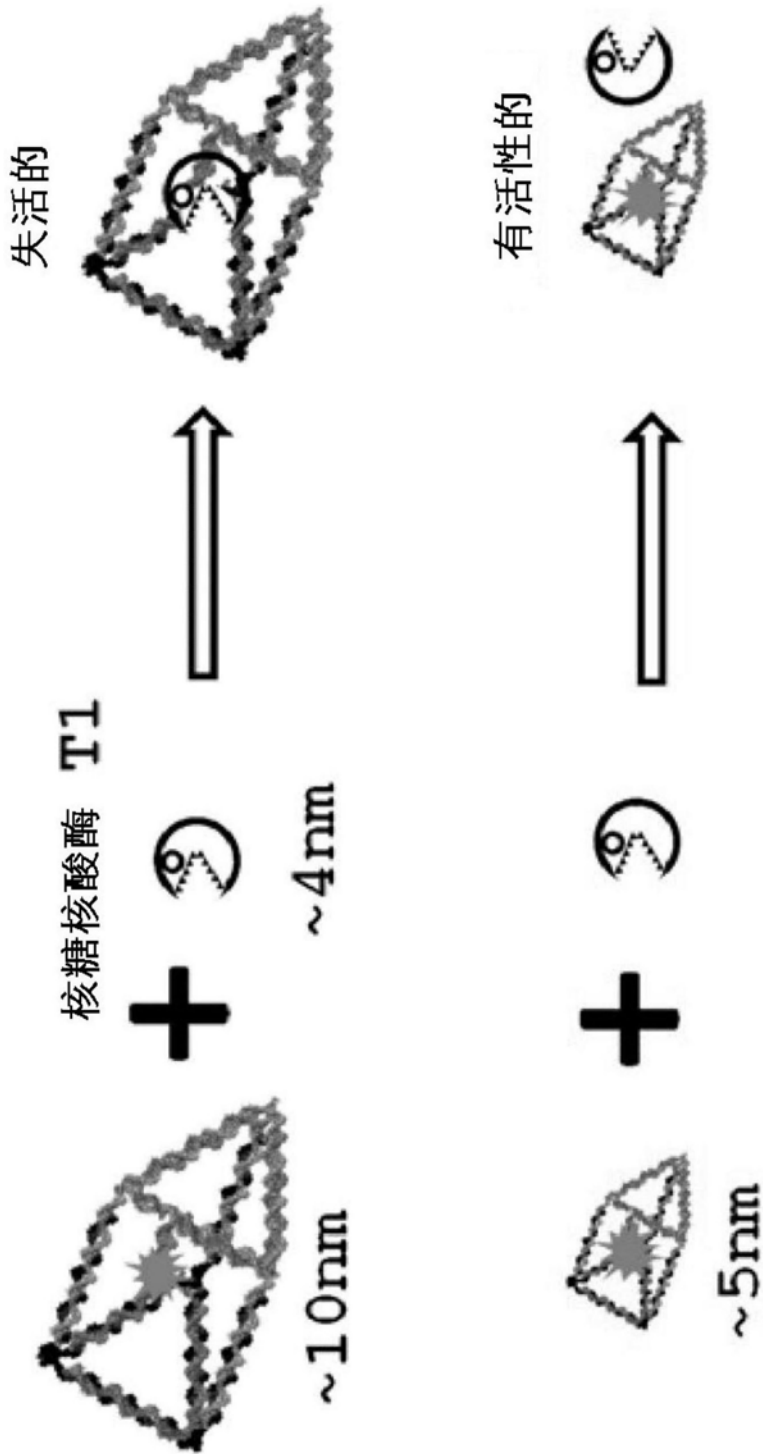


图8B

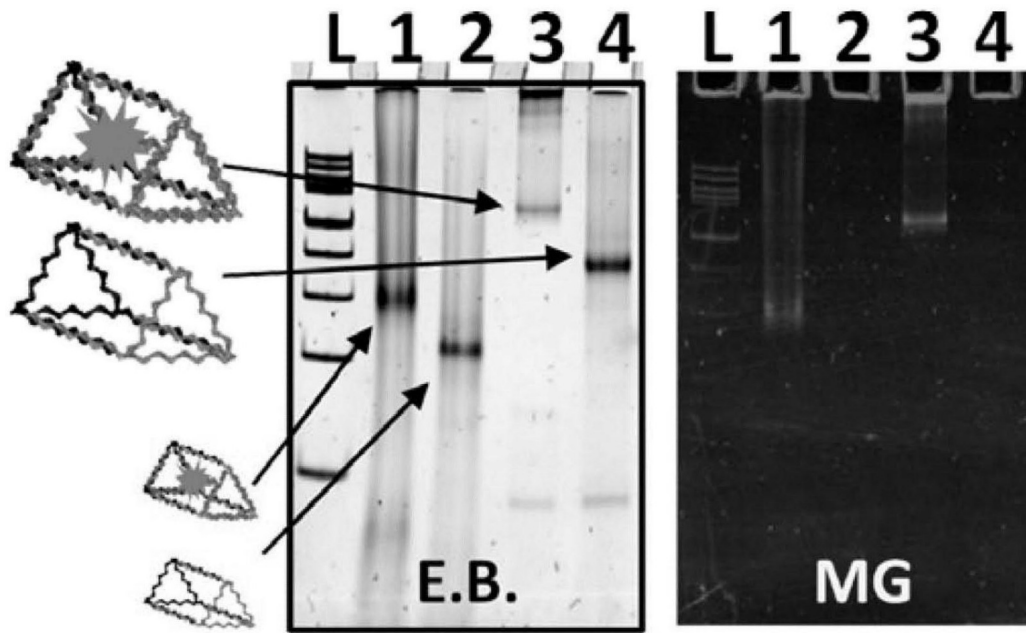


图8C

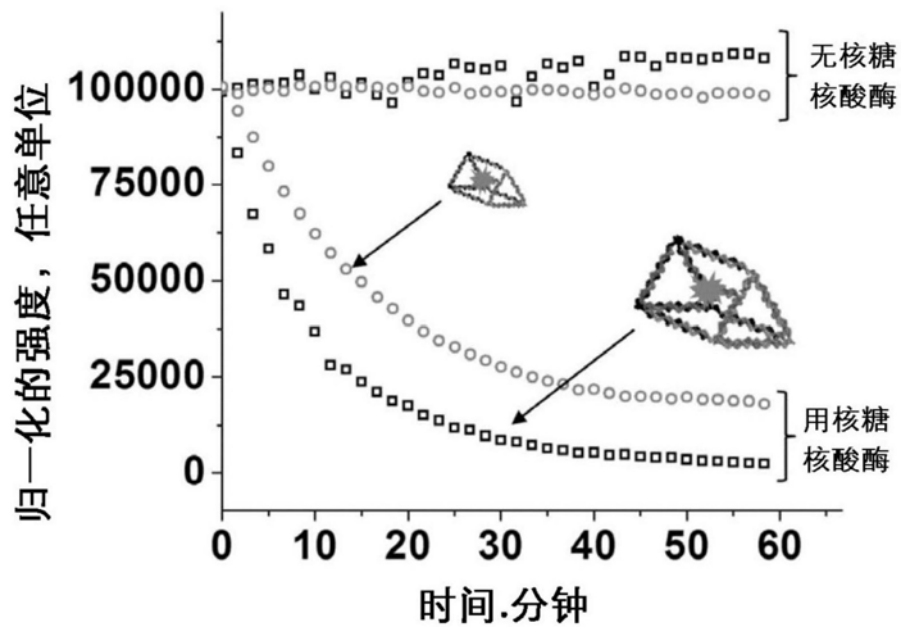


图8D

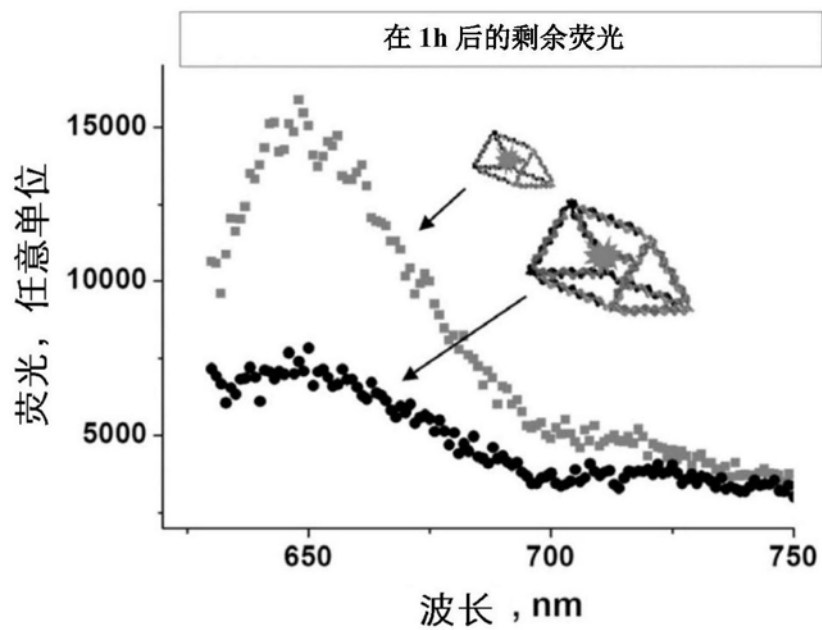


图8E

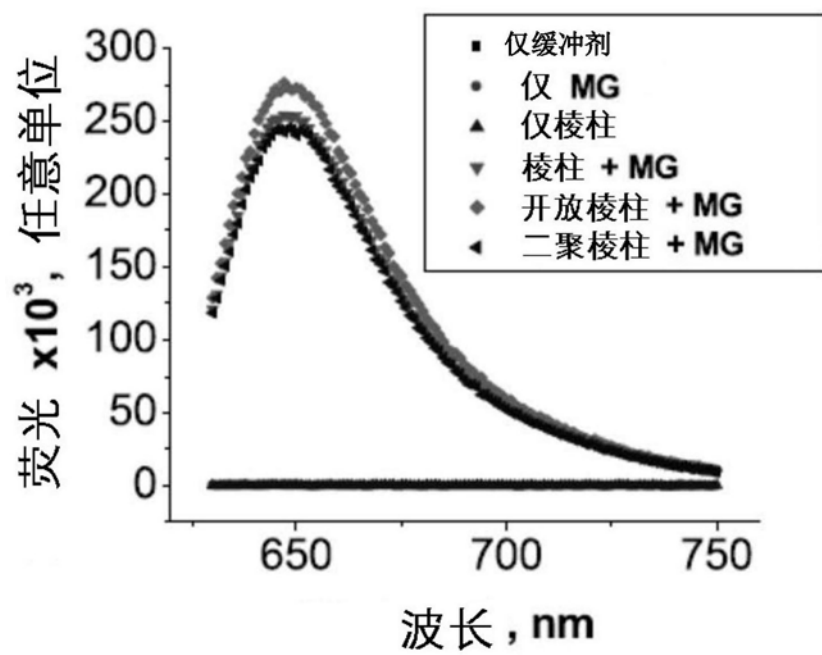


图8F

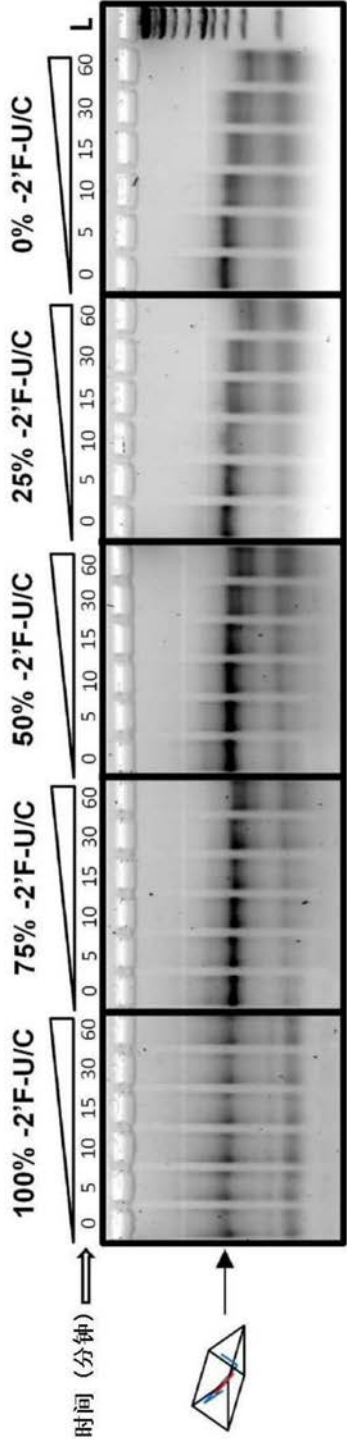


图9A

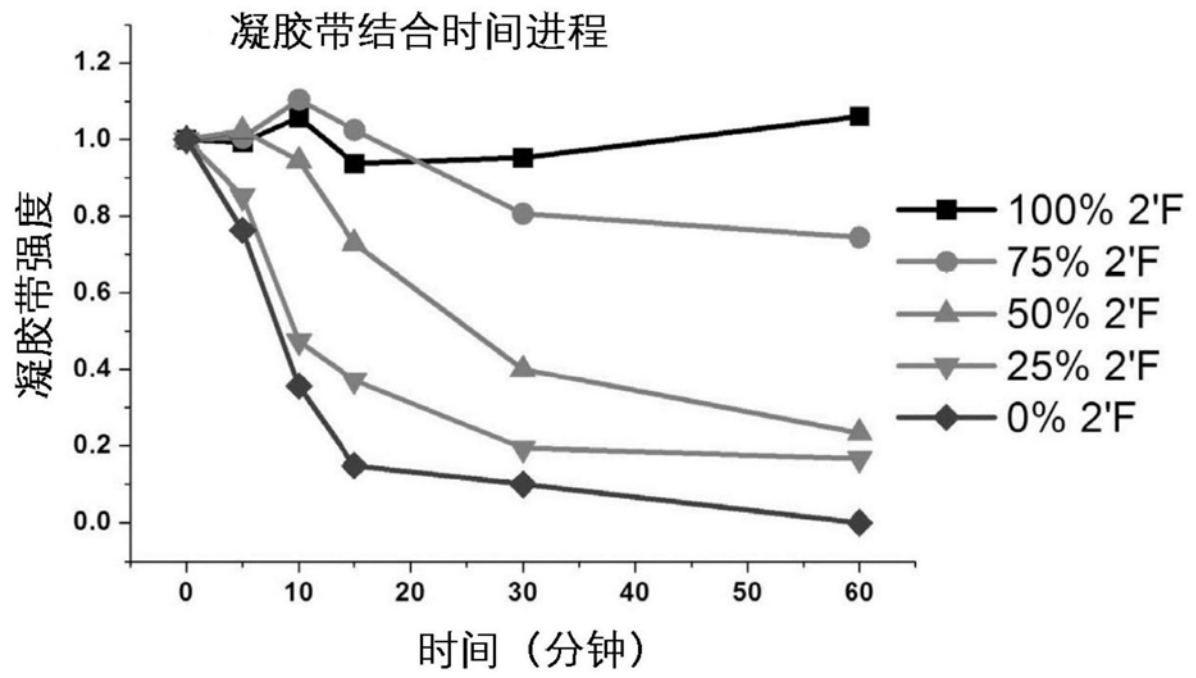


图9B

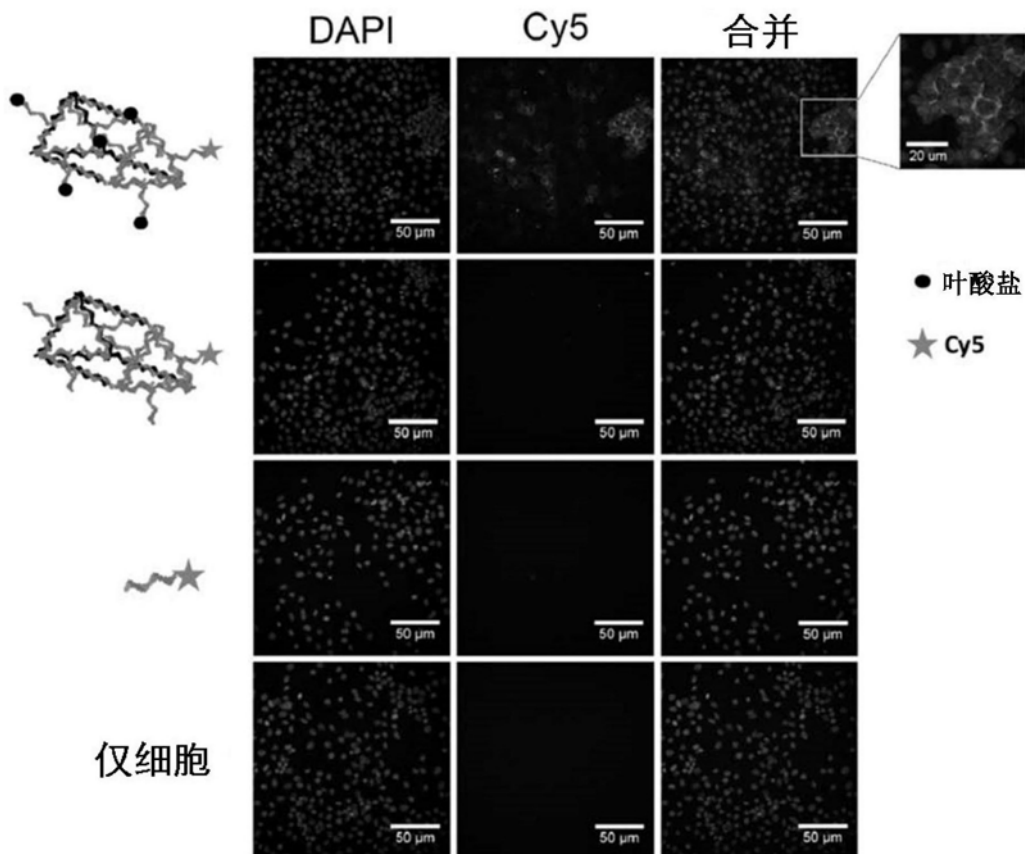


图10A

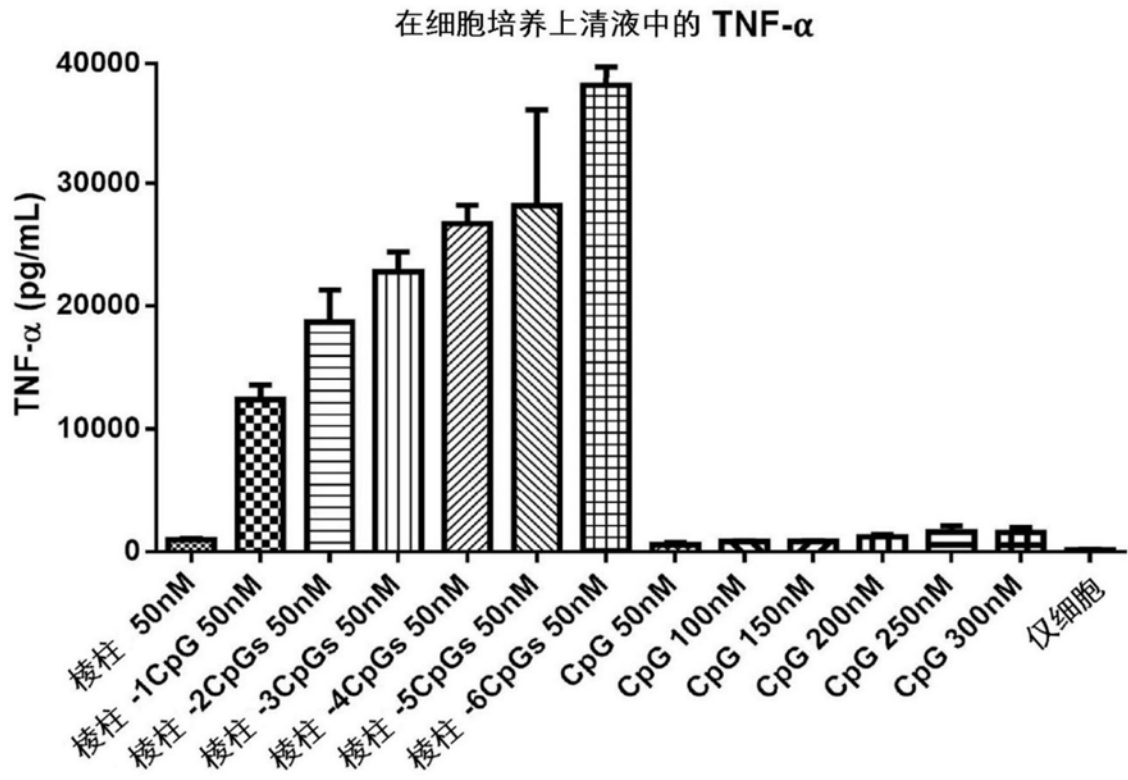


图10B

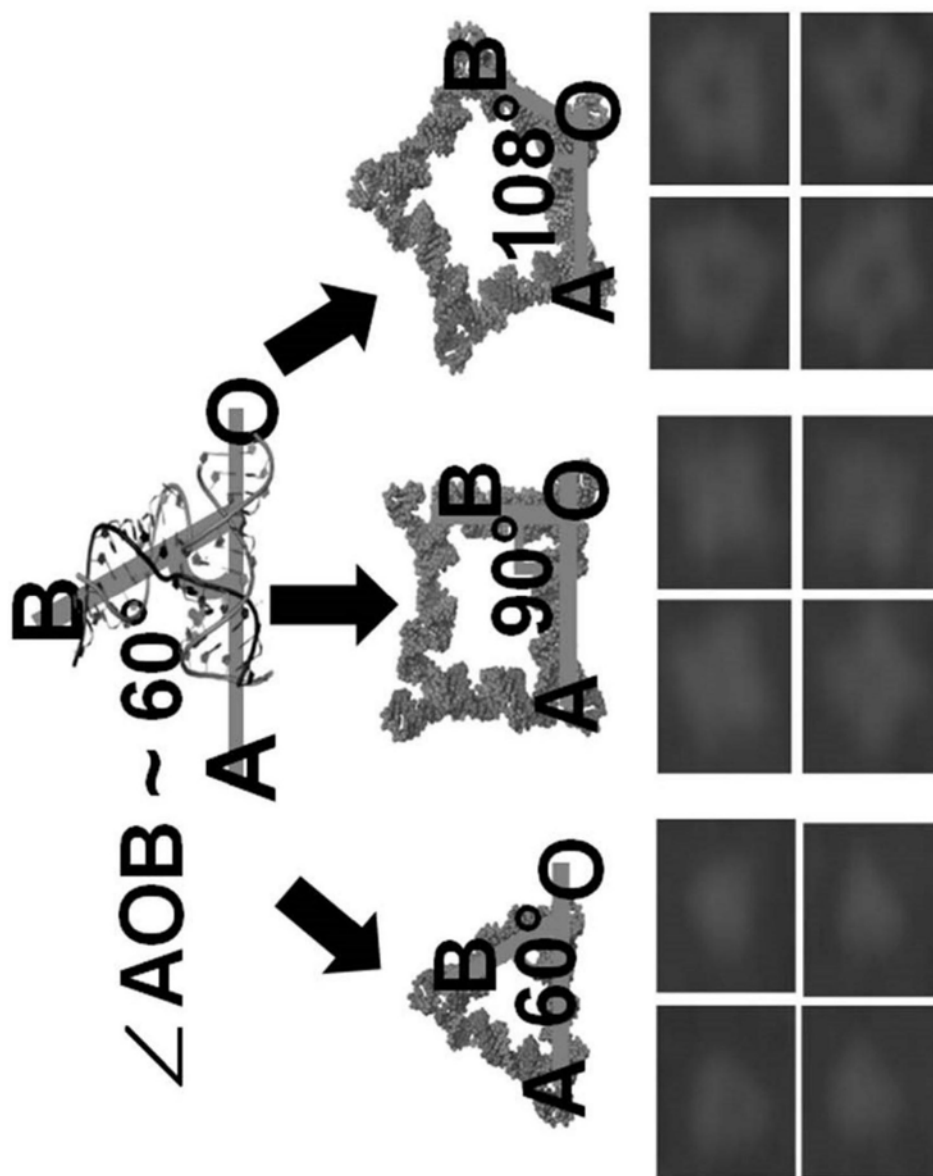


图11A

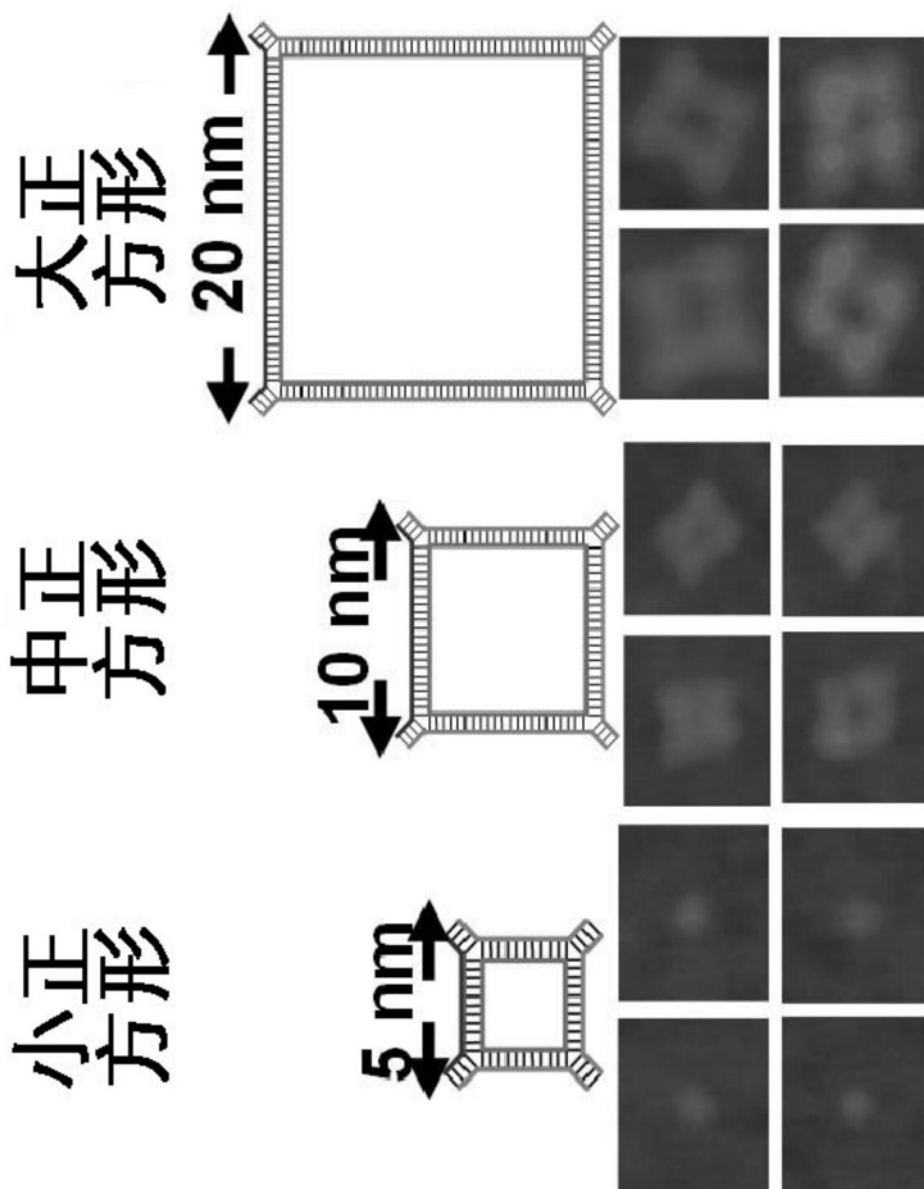


图11B

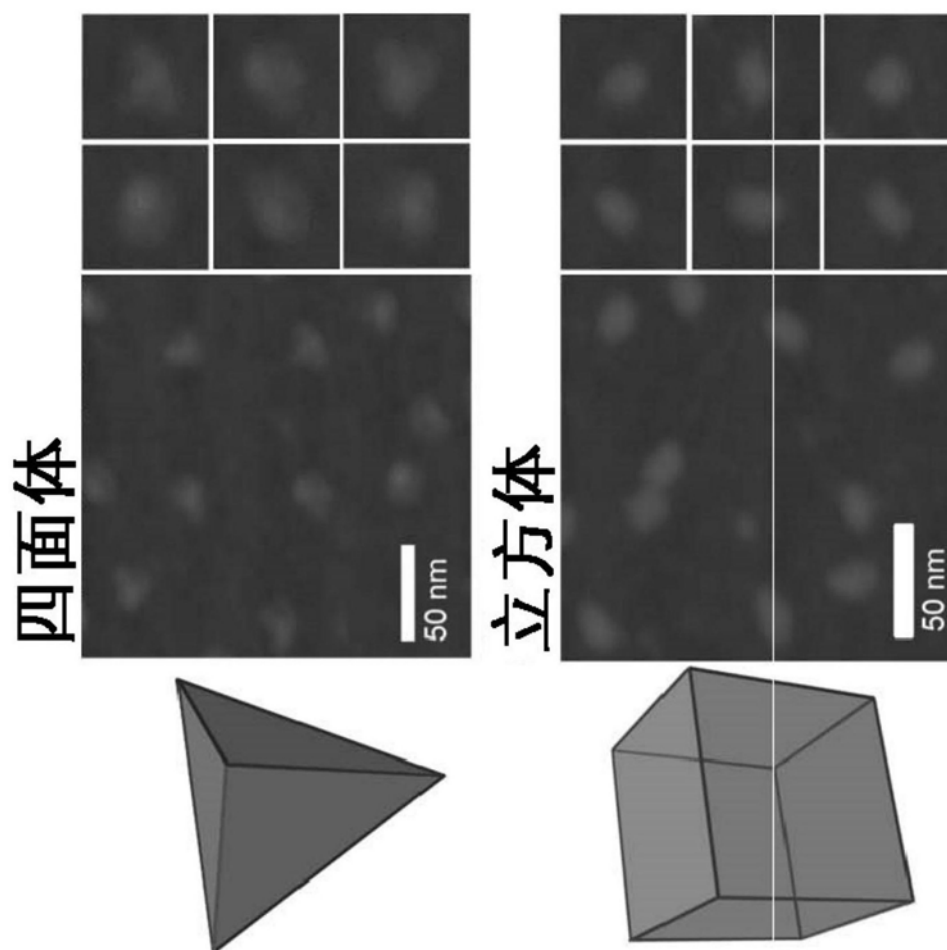


图11C

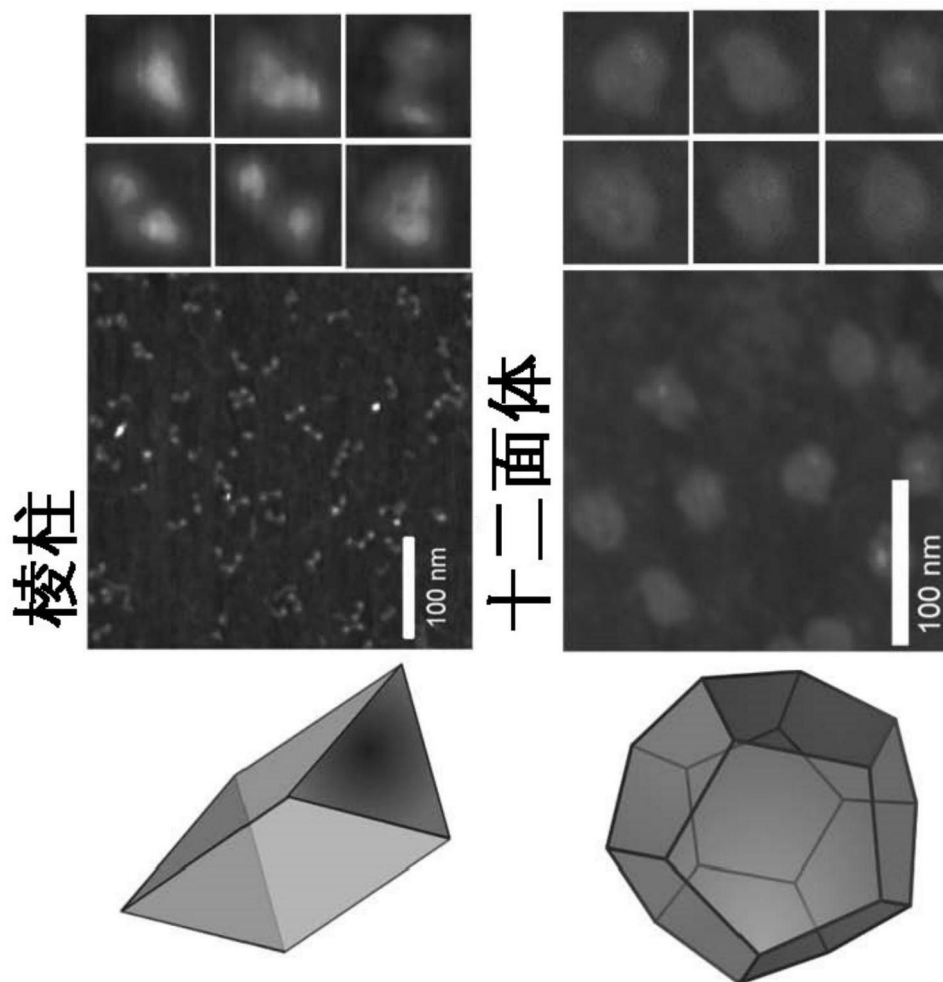


图11D

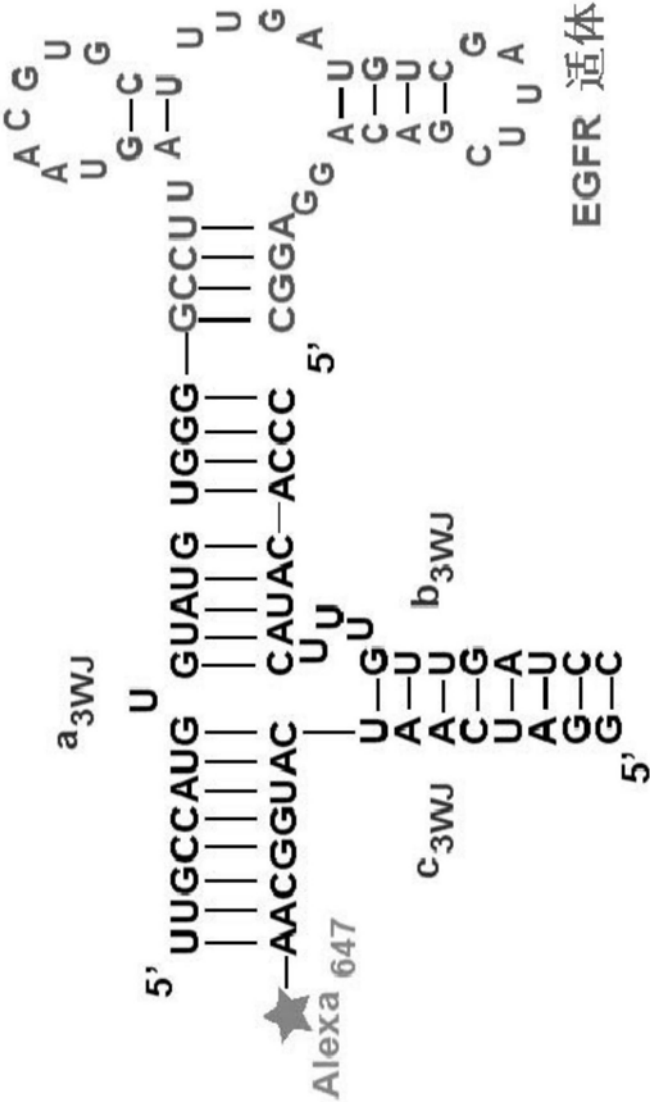


图12A

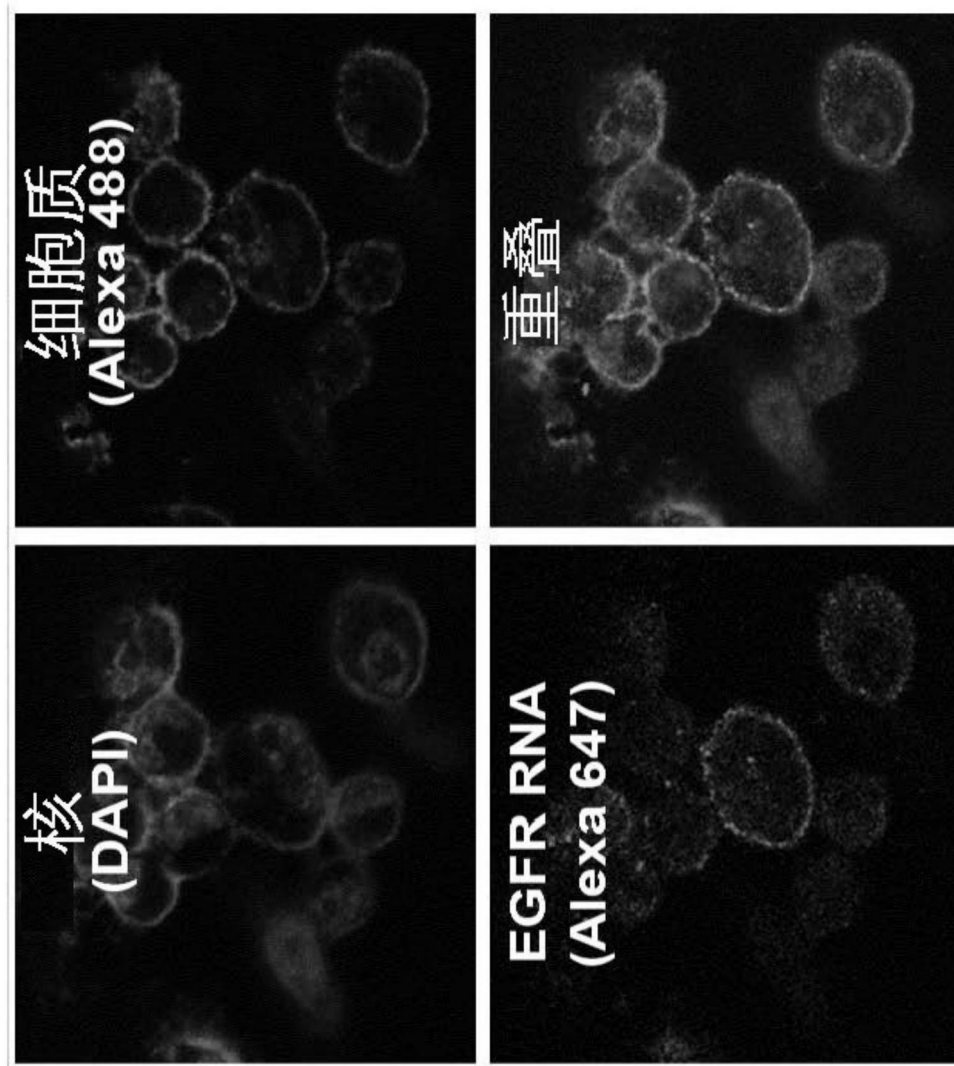


图12B

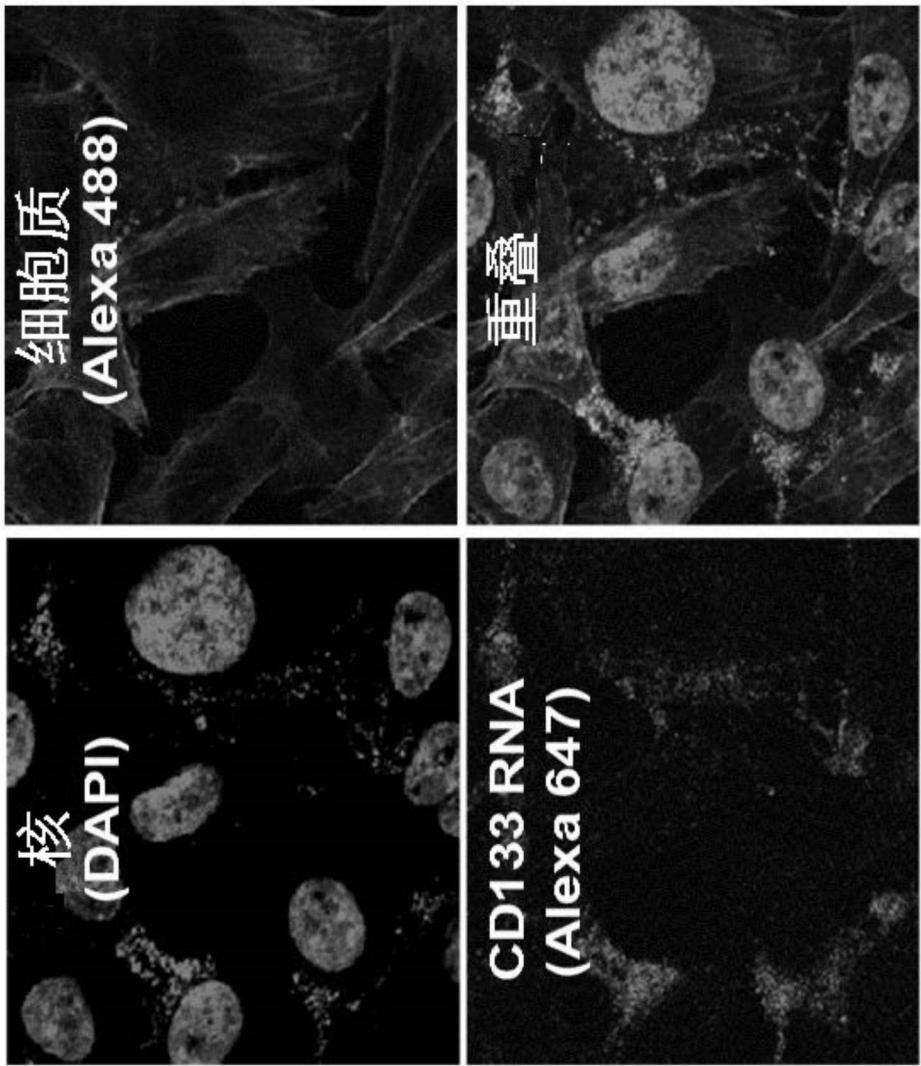


图13B

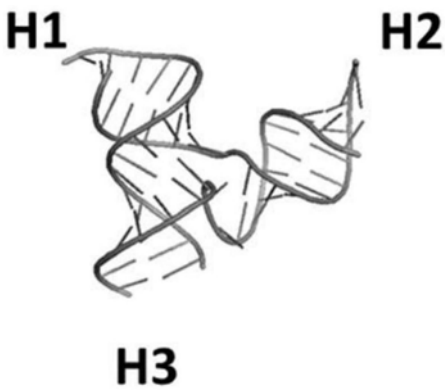


图14A

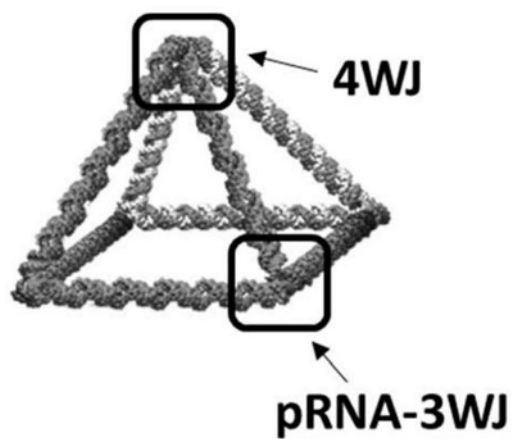


图14B

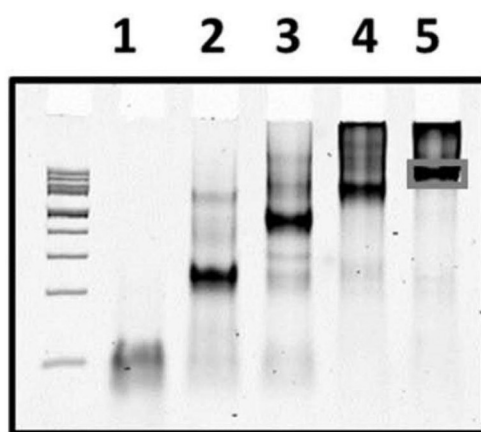


图14C

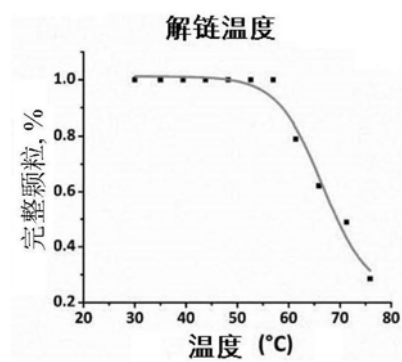


图14D

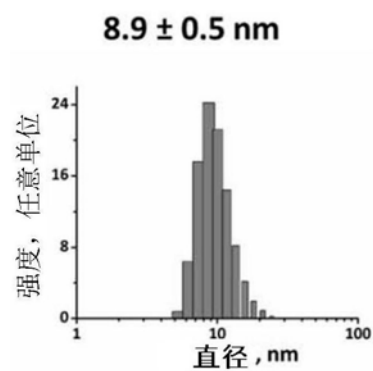


图14E

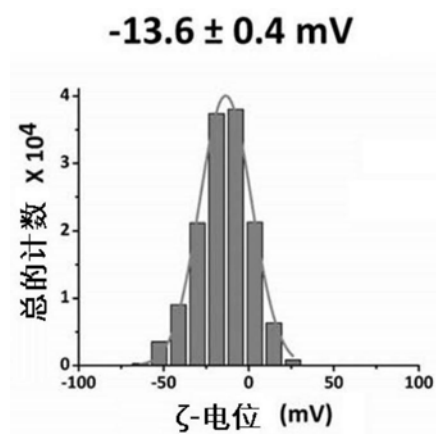


图14F

RNA 金字塔

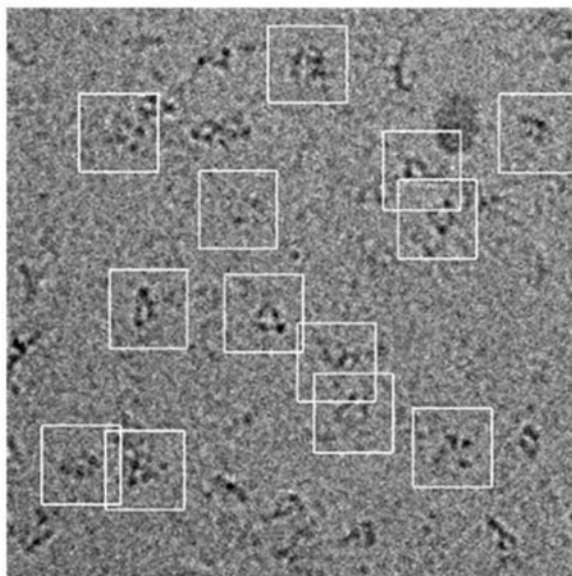


图15A

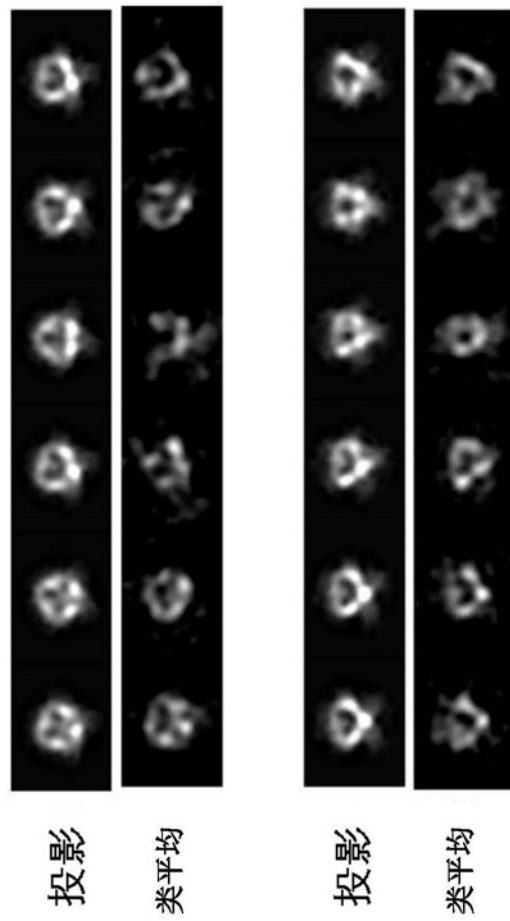


图15B

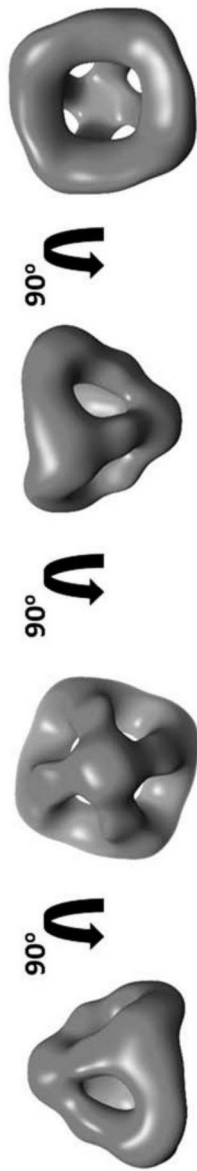


图15C

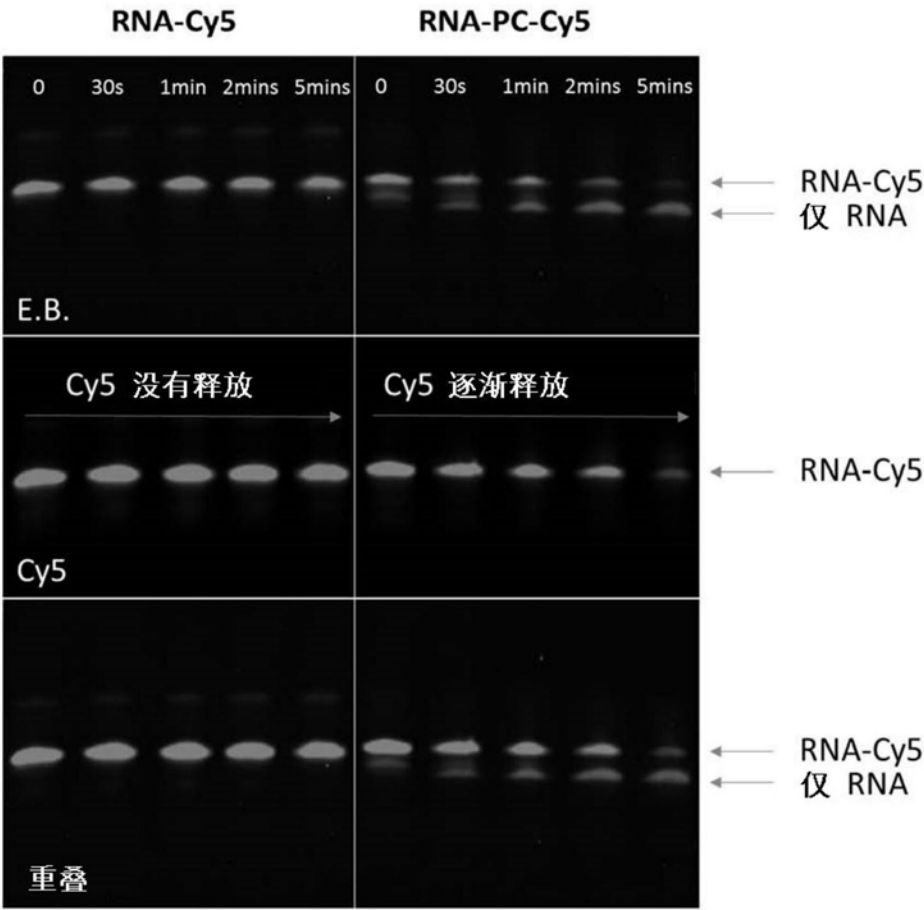


图16

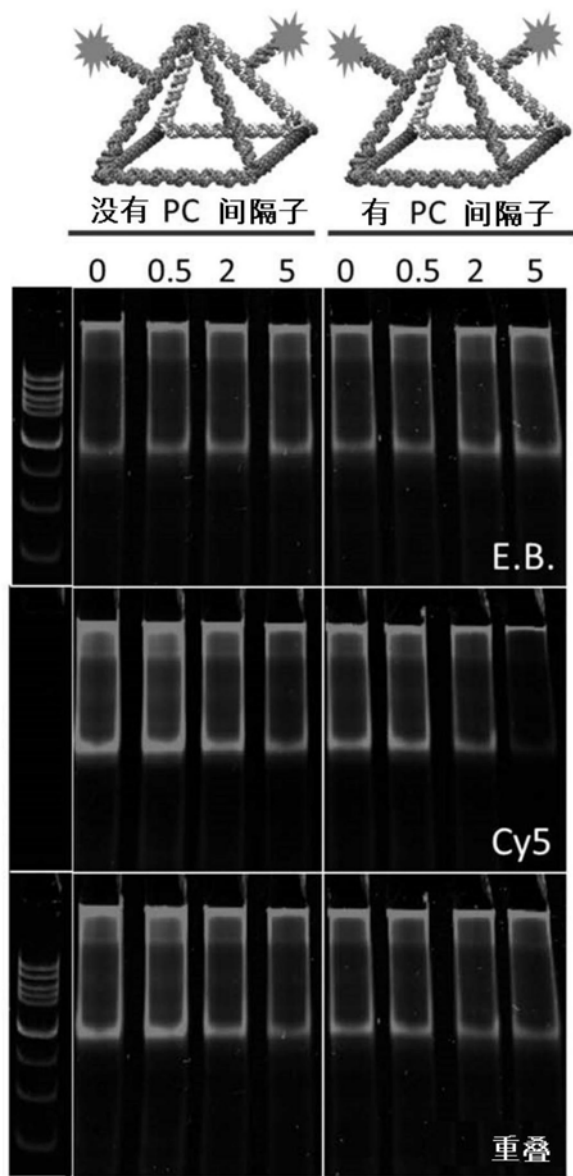


图17

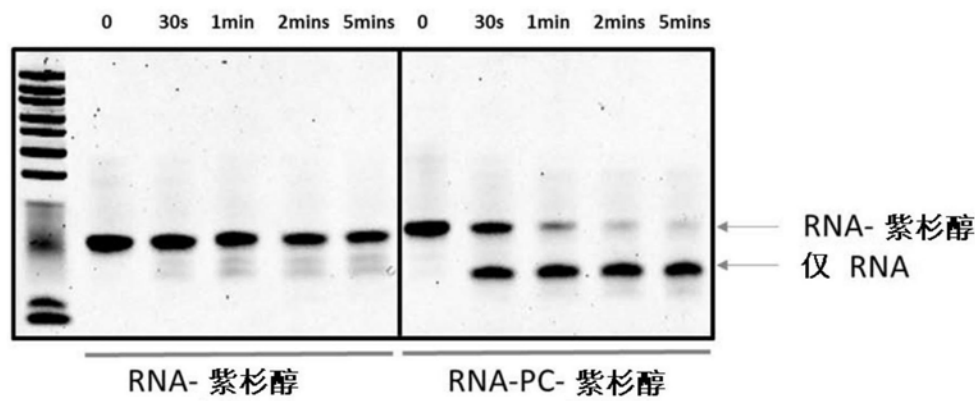


图18A

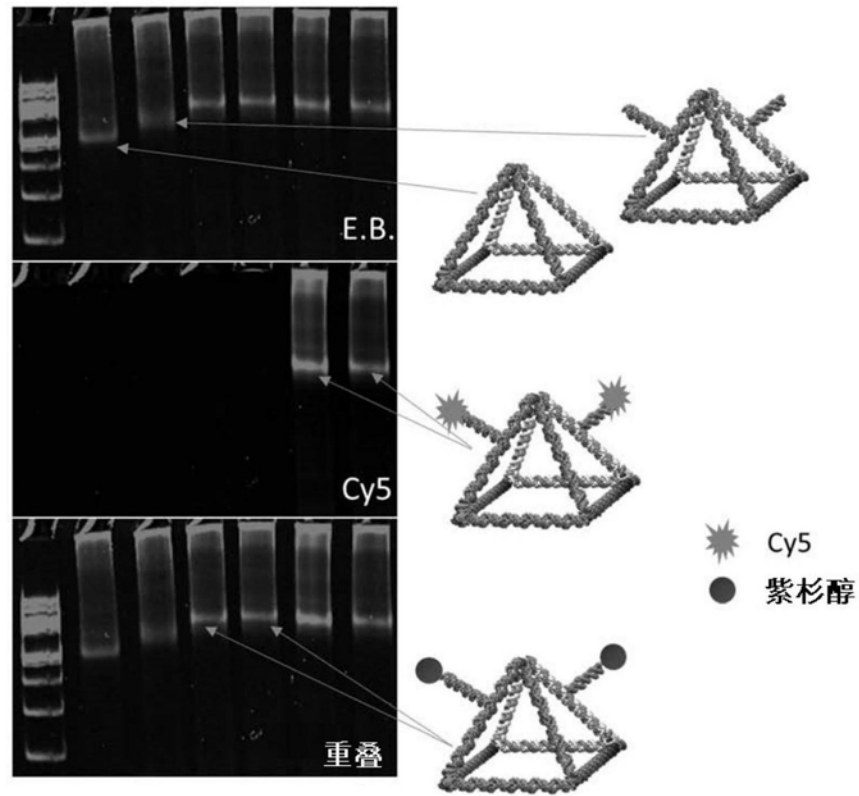


图18B

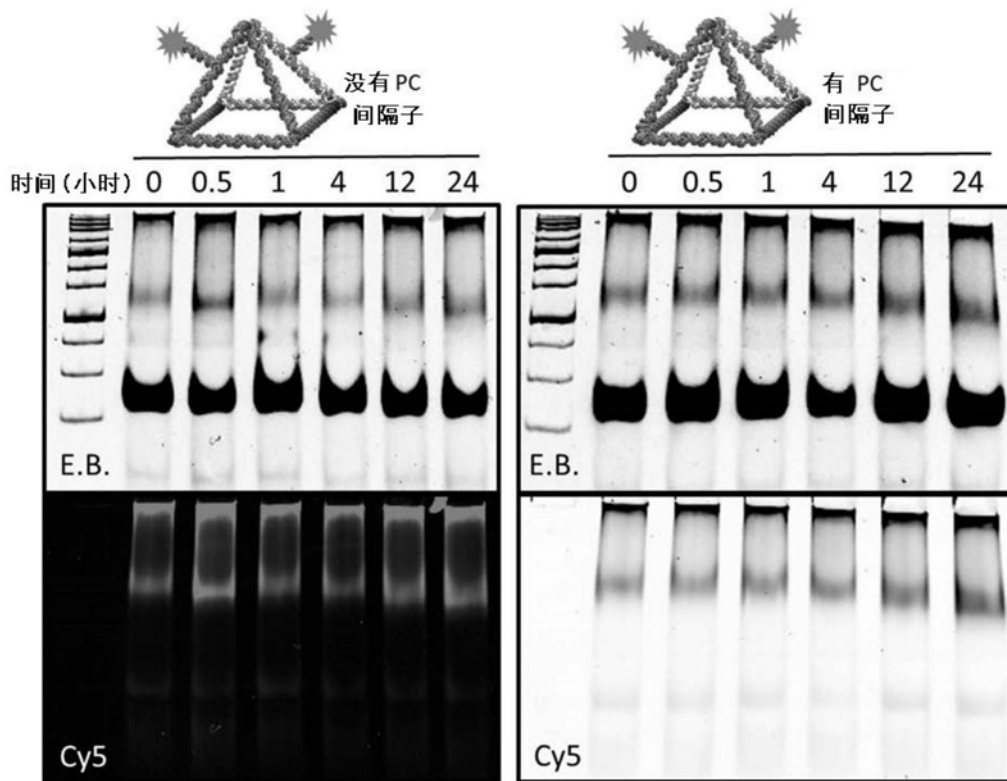


图19

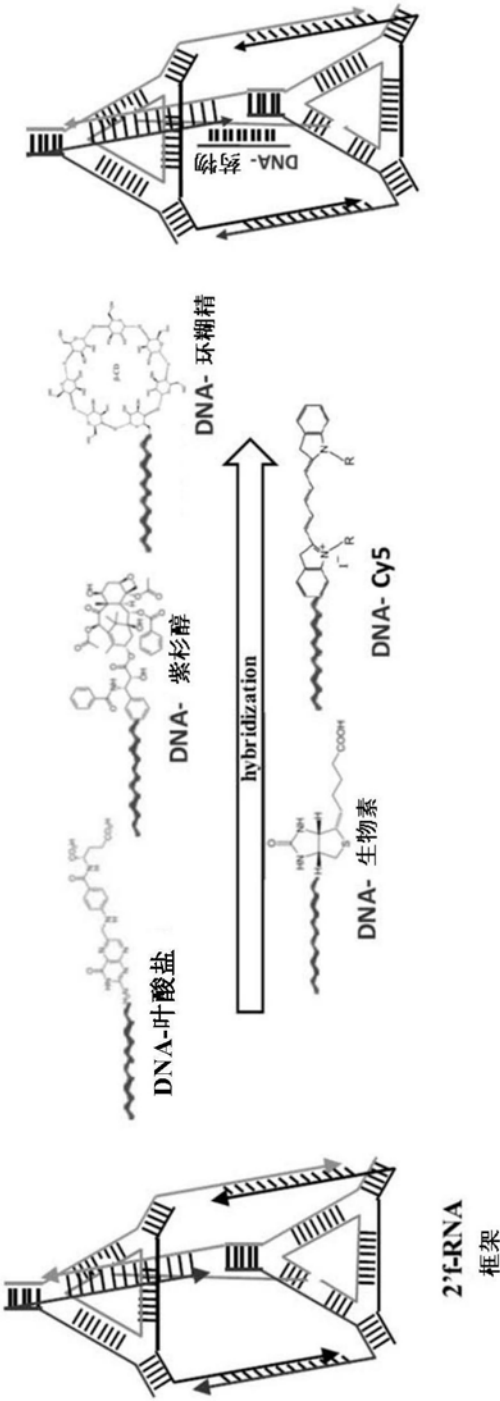


图20A

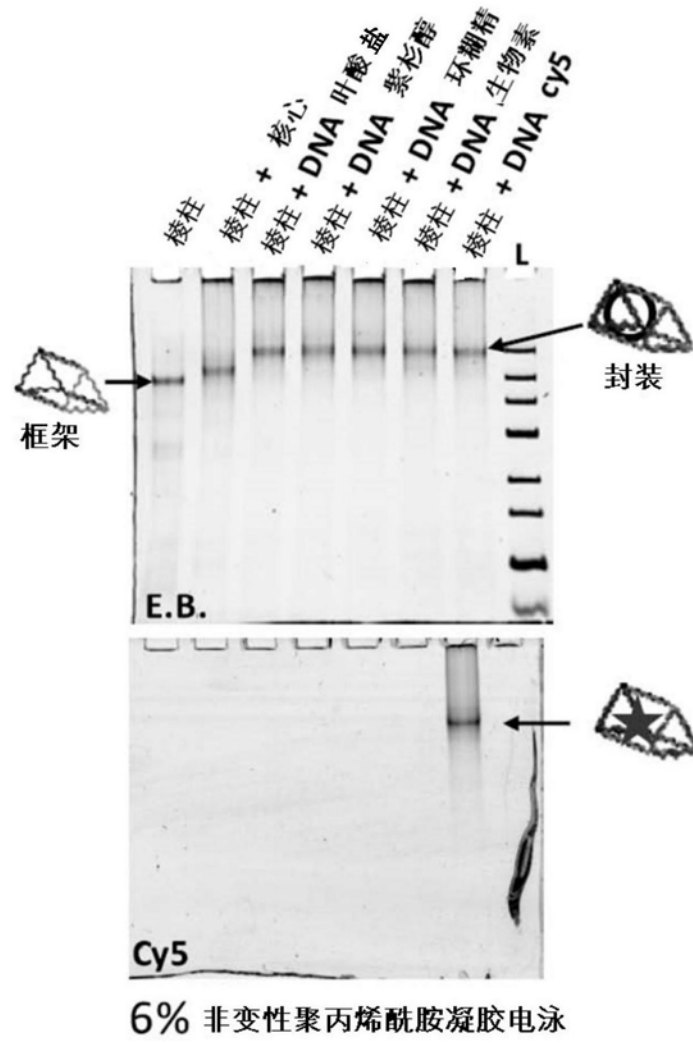


图20B

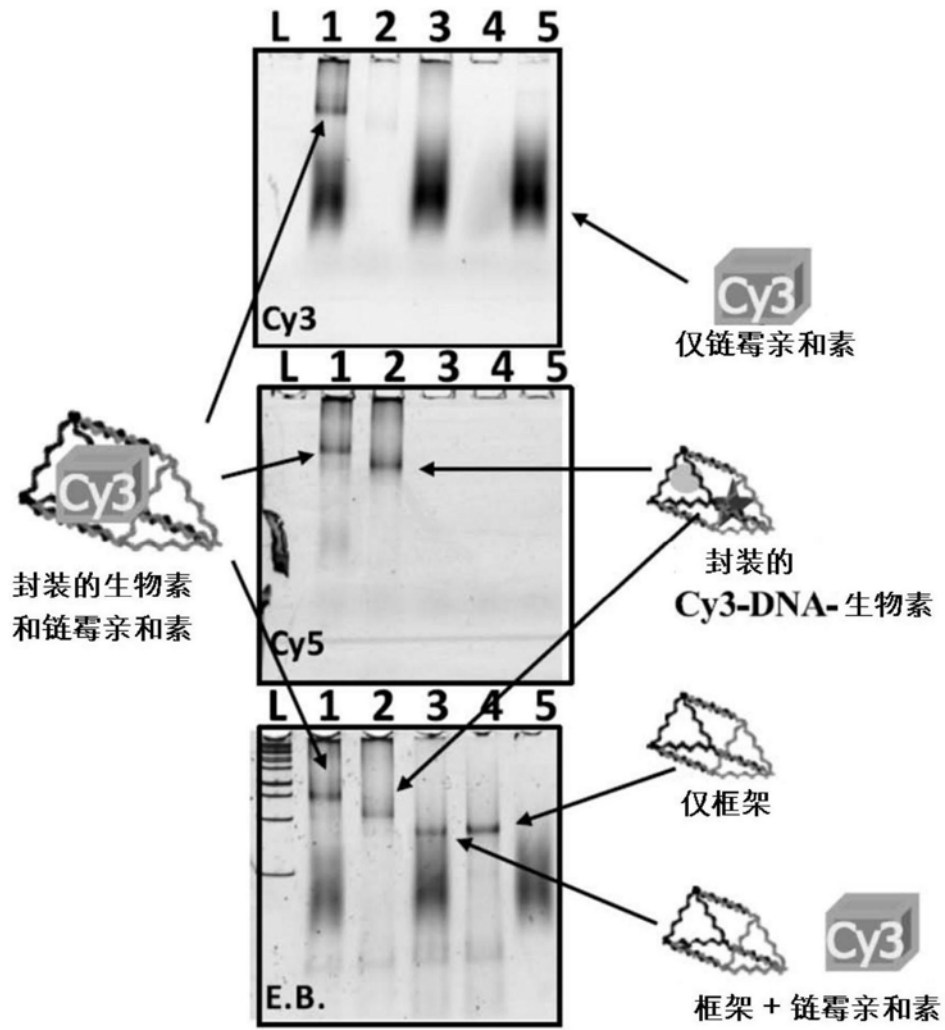


图20C

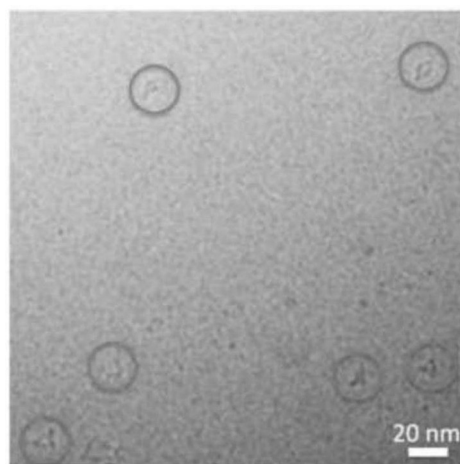


图21A

无参照 2D 类平均

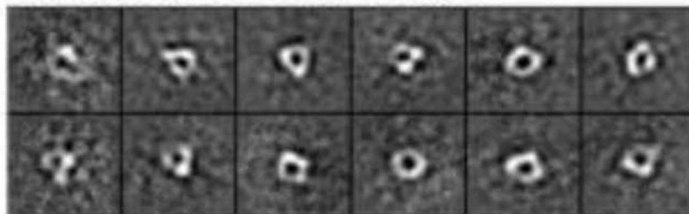


图21B

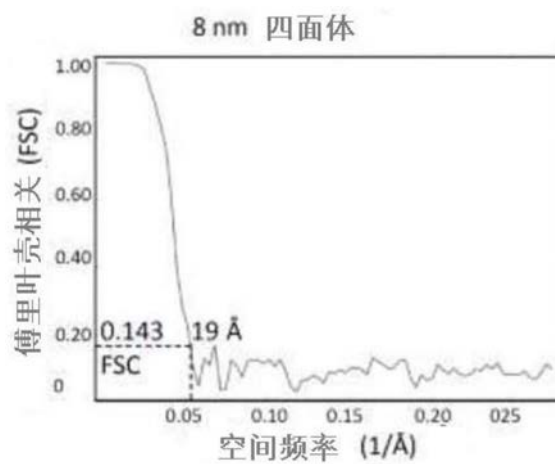


图21C

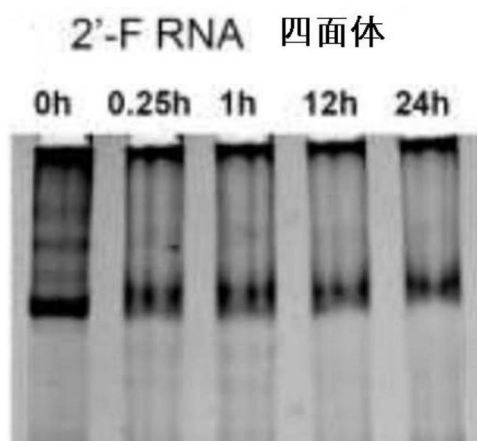


图22A

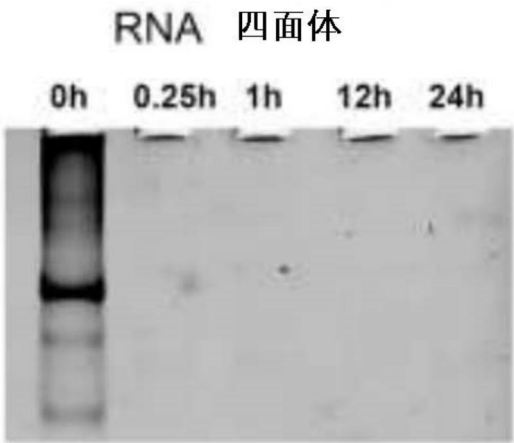


图22B

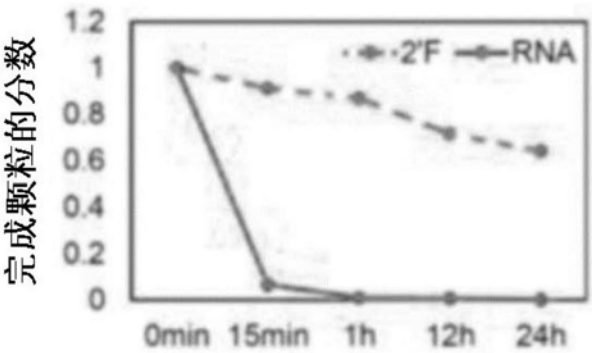


图22C

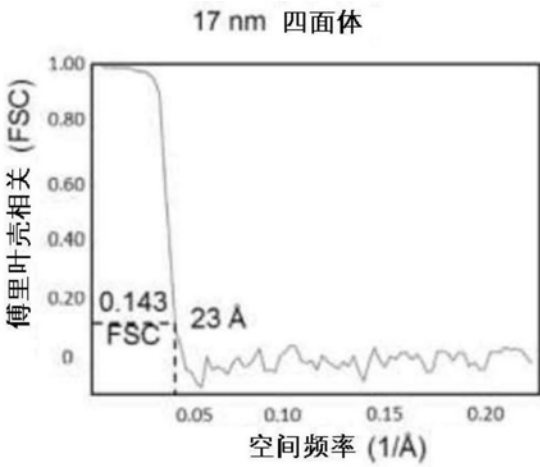


图24B

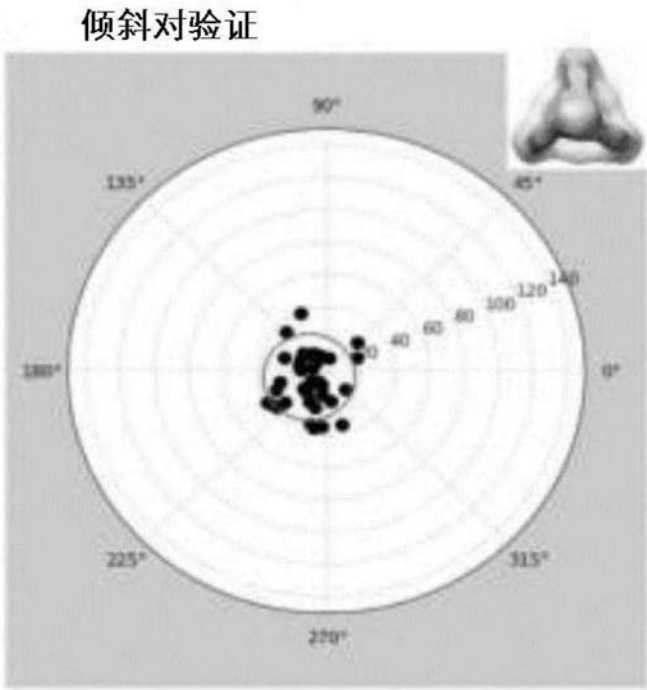


图24C

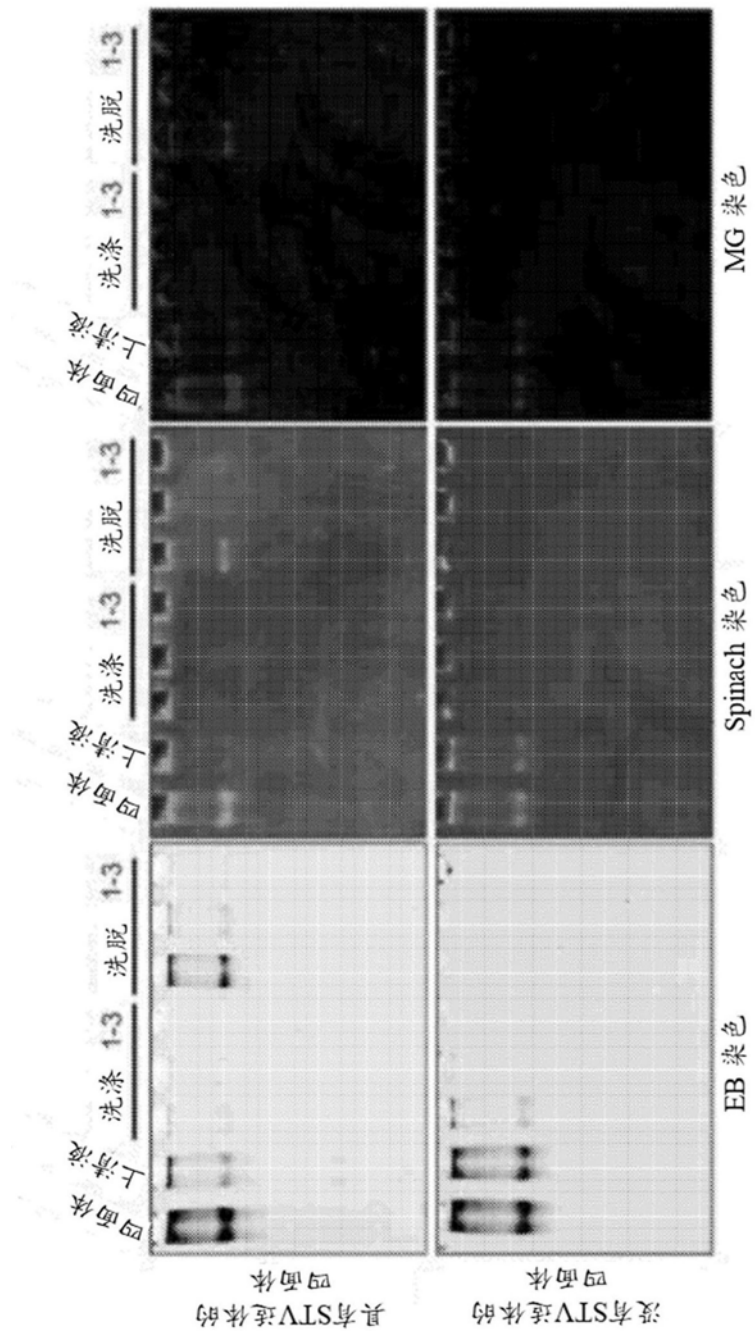


图25

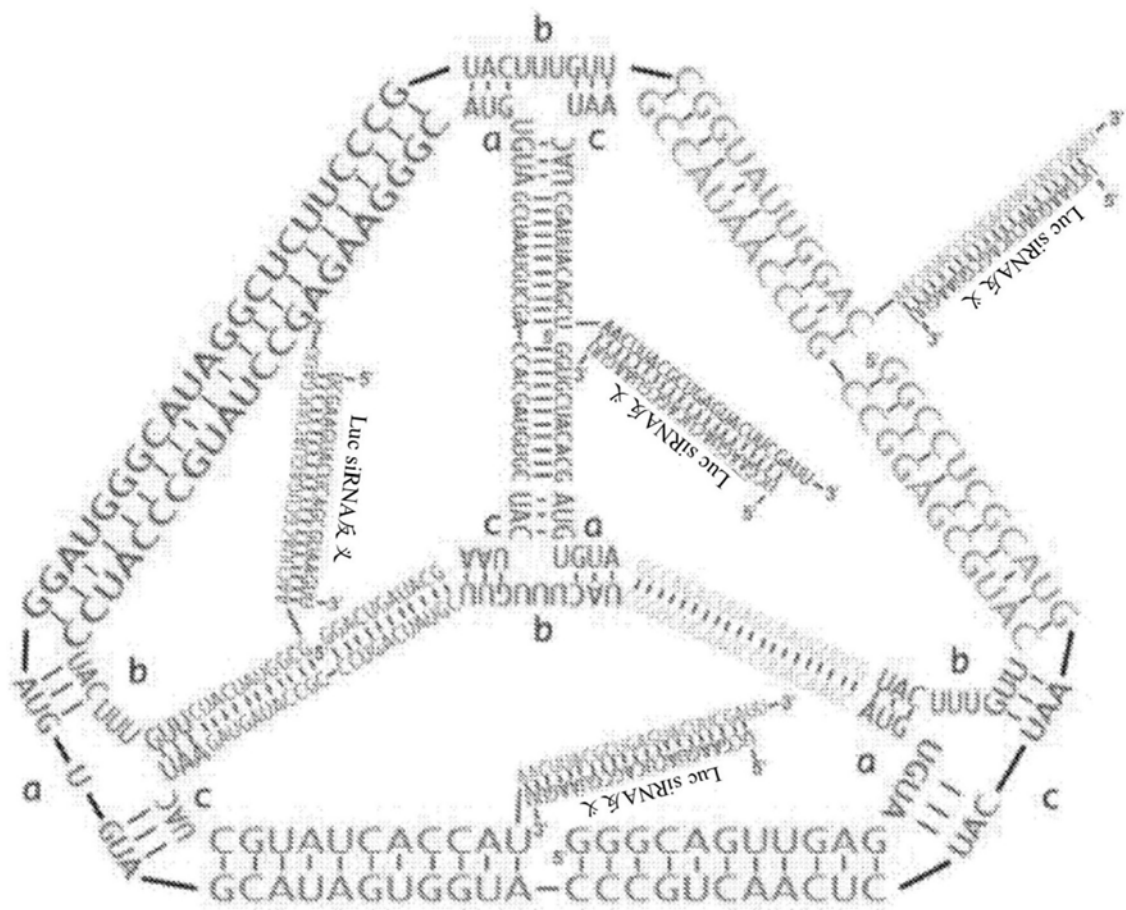


图26

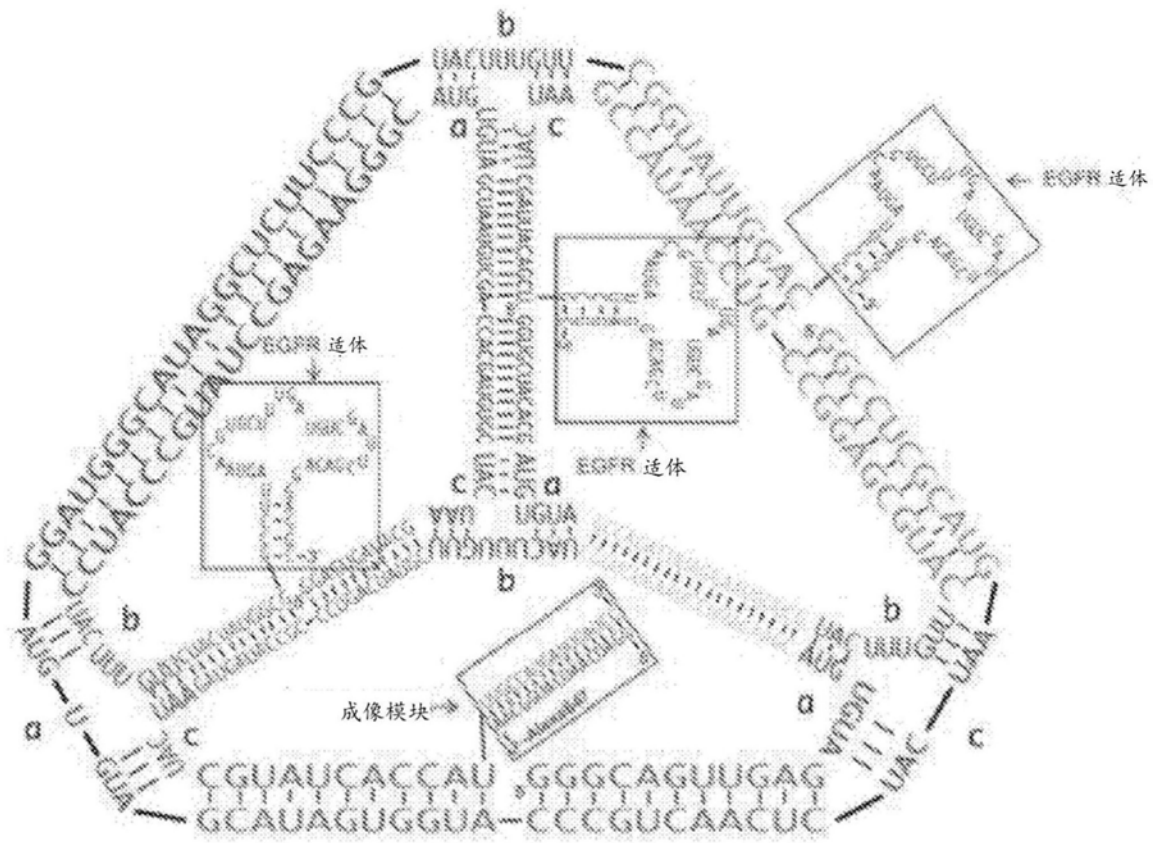


图27

	图像对
总粒子对	50
簇中的粒子对	24
簇中的分数	48%
平均倾斜角	14.8
RMSD 倾斜角	5.73
平均倾斜轴	-168.8
RMSD 倾斜轴	50.33
经显微镜测量的倾斜角	15

图28

MG 适体	5'- GGAUCCCGACUGGCGAGAGCCAGGUAACGAAUGGAUCC -3' (SEQ ID NO:25)
Spinach 适体	5'- GGACGCAACUGAAUGAAAUGGUGAAGGACGGGUCCAGGUG UGGCUGCUUCGGCAGUGCAGCUUGUUGAGUAGAGUGUGAGCU CCGUAAUCUAGUCGCGUCC -3' (SEQ ID NO:26)
HBV 核酶	5'- GGGACGAAAAAAAAACAAAUUCUUUACUGAUGAGUCCGUGA GGACGAAACGGGUCAAAAAAAAACGUCCC -3' (SEQ ID NO:27)
链霉亲和素 适体	5'- GGAUGCGGCCCGCCGACCAGAAUCAUGCAAGUGCGUAAGAUA GUCGCGGGUCGGCGGCCGCAUCC -3' (SEQ ID NO:28)
EGFR 适体	5'- GCCUUAGUAACGUGCUUUGAUGUCGAUUCGACAGGAGGC - 3' (SEQ ID NO:29)
荧光素酶 siRNA 有义链	5'- AACUUACGCUGAGUACUUCGAUU -3' (SEQ ID NO:30)
荧光素酶 siRNA 反义链	5'- UCGAAGUACUCAGCGUAAGUU -3' (SEQ ID NO:19)

图29