



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103687590 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 26

(21) 申请号 201280031496. 8

(22) 申请日 2012. 04. 27

(30) 优先权数据

61/479, 847 2011. 04. 28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 12. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/035529 2012. 04. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/149376 EN 2012. 11. 01

(71) 申请人 STC • UNM 公司

地址 美国新墨西哥州

申请人 桑迪亚公司

(72) 发明人 J • C • 布林克 E • C • 卡恩斯

C • E • 艾什莉

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有

限公司 44205

代理人 张海文

(51) Int. Cl.

A61K 9/16 (2006. 01)

A61K 47/48 (2006. 01)

A61K 47/30 (2006. 01)

A61K 38/17 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

权利要求书10页 说明书44页 附图20页

(54) 发明名称

用于靶向给药的多孔纳米颗粒支撑脂双层
(原始细胞) 及其使用方法

(57) 摘要

本发明指向用于特异性靶向肝癌细胞和其他癌症细胞的原始细胞, 包括一具有支撑脂双层的纳米多孔二氧化硅; 至少一种促进癌细胞死亡的试剂(例如传统的小分子、大分子货物(如 siRNA 或者蛋白毒素如蓖麻毒素 A 链或者白喉毒素 A 链) 和 / 或组蛋白包装的质粒 DNA, 该组蛋白包装的质粒 DNA 置于纳米多孔二氧化硅核心内(优选是超螺旋的, 以更有效地将 DNA 包装进原始细胞中), 该质粒 DNA 可选地用核定位序列修饰, 以便帮助在癌细胞核内定位原始细胞并促进表达多种包含于癌细胞治疗(细胞凋亡 / 细胞死亡)中的肽的能力, 或者作为报告子、靶向肽和融合肽, 该靶向肽在待治疗组织中靶向癌细胞使得原始细胞与靶标细胞的结合是特异性的并得到强化, 该融合肽促进原始细胞和封装的 DNA 的内体逃逸。本发明原始细胞可用于治疗癌症, 特别是使用新的结合肽(c-MET 肽)治疗包括肝细胞(肝脏)癌症, 该结合肽选择性结合到肝细胞组织上, 或者在癌症诊断, 包括癌症治疗和药物发现中发挥作用。

1. 一细胞靶向性多孔原始细胞, 包含:

具有支撑脂双层的纳米多孔二氧化硅或金属氧化物核心和选自以下物质组成的组的至少一种进一步的组分:

一细胞靶向种类物质;

一融合肽, 其促进原始细胞、封装的 DNA 和其他货物的内体逃逸, 该其他货物包括至少一种货物组分, 该货物组分选自双链线性 DNA;

质粒 DNA;

一药物;

一显像剂;

小干扰 RNA、小发夹 RNA、微 RNA, 或它们的混合物,

其中所述货物组分之一可选地进一步与一核定位序列缀合。

2. 根据权利要求 1 所述的原始细胞, 其中所述二氧化硅核心是球形的, 直径为约 10nm 至约 250nm。

3. 根据权利要求 2 所述的原始细胞, 其中所述二氧化硅核心平均直径为约 150nm。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的原始细胞, 其中所述二氧化硅核心的尺寸分布是单分散或多分散的。

5. 根据权利要求 2 或 3 所述的原始细胞, 其中所述二氧化硅核心是单分散的。

6. 根据权利要求 2 或 3 所述的原始细胞, 其中所述二氧化硅核心是多分散的。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的原始细胞, 其中所述脂双层由选自以下物质组成的组的脂质组成: 1, 2- 二油酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸胆碱(DOPC)、1, 2- 二棕榈酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸胆碱(DPPC)、1, 2- 二硬脂酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸胆碱(DSPC)、1, 2- 二油酰 -sn- 丙三基 -3- [磷酸 -L- 丝氨酸] (DOPS)、1, 2- 二油酰 -3- 三甲胺 - 丙烷(18:1DOTAP)、1, 2- 二油酰 -sn- 丙三基 -3- 二氧磷基 - (1'-rac- 甘油)(DOPG)、1, 2- 二油酰 -sn- 丙三基 -3- 磷脂酰乙醇胺(DOPE)、1, 2- 二棕榈酰 -sn- 丙三基 -3- 磷脂酰乙醇胺(DPPE)、1, 2- 二油酰 -sn- 丙三基 -3- 磷脂酰乙醇胺 -N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000] (18:1PEG-2000PE)、1, 2- 二棕榈酰 -sn- 丙三基 -3- 磷脂酰乙醇胺 -N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000] (16:0PEG-2000PE)、1- 油酰 -2-[12- [(7- 硝基 -2-1, 3- 苯并噻二唑 -4-y1) 氨基] 月桂酰] -sn- 丙三基 -3- 磷酸胆碱(18:1-12:0NBD PC)、1- 棕榈酰 -2- [12- [(7- 硝基 -2-1, 3- 苯并噻二唑 -4-y1) 氨基] 月桂酰] -sn- 丙三基 -3- 磷酸胆碱(16:0-12:0NBD PC)、胆固醇及它们的混合物。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的原始细胞, 其中所述脂双层包括结合有 DOPE 的 DOPC。

9. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的原始细胞, 其中所述脂双层包括 DOTAP、DOPG、DOPC 或它们的混合物。

10. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的原始细胞, 其中所述脂双层包括 DOPG 和 DOPC。

11. 根据权利要求 8-10 中任一项所述的原始细胞, 其中所述脂双层进一步包括胆固醇。

12. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的原始细胞, 其中所述脂双层包括结合了约 5wt%DOPE 的 DOPC、约 30wt% 胆固醇和约 10wt%PEG-2000PE (18:1)。

13. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的原始细胞,其中所述脂双层包括约 5% 重量的 DOPE、约 5% 重量的 PEG、约 30% 重量的胆固醇、约 60% 重量的 DOPC 和 / 或 DPPC。

14. 根据权利要求 13 所述的方法,其中所述 PEG 缀合到所述 DOPE。

15. 根据权利要求 1-14 中任一项所述的原始细胞,其中所述靶向种类物质是一靶向肽。

16. 根据权利要求 15 所述的原始细胞,其中所述靶向肽是一 SP94 肽。

17. 根据权利要求 16 所述的原始细胞,其中所述靶向肽是 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:8。

18. 根据权利要求 15 所述的原始细胞,其中所述靶向肽是一根据 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 的 MET 结合肽。

19. 根据权利要求 1-18 中任一项所述的原始细胞,其中所述融合蛋白是 H5WYG 肽 (SEQ ID NO:13) 或一 8mer 多聚精氨酸 (SEQ ID NO:14)。

20. 根据权利要求 19 所述的原始细胞,其中所述融合肽为 SEQ ID NO:13。

21. 根据权利要求 1-20 中任一项所述的原始细胞,包含质粒 DNA,其中所述质粒 DNA 可选地进行修饰以表达核定位序列。

22. 根据权利要求 21 所述的原始细胞,其中所述质粒 DNA 是超螺旋的,或者经包装的质粒 DNA。

23. 根据权利要求 22 所述的原始细胞,其中所述 DNA 是超螺旋的,并且是经包装的质粒 DNA。

24. 根据权利要求 20-23 中任一项所述的原始细胞,其中所述质粒 DNA 经修饰以表达核定位序列。

25. 根据权利要求 21-24 中任一项所述的原始细胞,其中所述 DNA 是组蛋白包装的超螺旋质粒 DNA,包含人组蛋白混合物。

26. 根据权利要求 25 所述的原始细胞,其中所述组蛋白混合物由 H1、H2A、H2B、H3 和 H4 组成。

27. 根据权利要求 25 所述的原始细胞,其中所述组蛋白混合物是 H1、H2A、H2B、H3 和 H4,其重量比为 1:2:2:2:2。

28. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的原始细胞,其中所述质粒 DNA 能够表达多肽毒素、小发夹 RNA (shRNA) 或小干扰 RNA (siRNA)。

29. 根据权利要求 28 所述的原始细胞,其中所述多肽毒素选自由以下物质组成的组:蓖麻毒素 A 链或者白喉毒素 A 链。

30. 根据权利要求 1 或 28 所述的原始细胞,其中所述 shRNA 或所述 siRNA 诱导细胞凋亡。

31. 根据权利要求 1-30 中任一项所述的原始细胞,其中所述 DNA 能够表达报告蛋白。

32. 根据权利要求 31 所述的原始细胞,其中所述报告蛋白是绿色荧光蛋白或红色荧光蛋白。

33. 根据权利要求 1-32 中任一项所述的原始细胞,其中所述核定位序列是根据 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 的肽。

34. 根据权利要求 1-33 中任一项所述的原始细胞,其中所述核定位序列是根据 SEQ ID

NO:9 的肽。

35. 根据权利要求 1-34 中任一项所述的原始细胞,进一步包含作为药物的抗癌剂。

36. 根据权利要求 35 所述的原始细胞,其中所述抗癌剂是依维莫司、曲贝替定、紫杉醇蛋白质结合颗粒注射悬液(abraxane)、TLK286、AV-299、DN-101、帕唑帕尼、GSK690693、RTA744、ON0910、Na、AZD6244 (ARRY-142886)、AMN-107、TKI-258、GSK461364、AZD1152、enzastaurin、凡德他尼(vandetanib)、ARQ-197、MK-0457、MLN8054、PHA-739358、R-763、AT-9263、FLT-3 抑制剂、VEGFR 抑制剂、EGFR TK 抑制剂、极光激酶抑制剂、PIK-1 调节剂、Bcl-2 抑制剂、HDAC 抑制剂、c-MET 抑制剂、PARP 抑制剂、Cdk 抑制剂、EGFR TK 抑制剂、IGFR-TK 抑制剂、抗-HGF 抗体、PI3 激酶抑制剂、AKT 抑制剂、JAK/STAT 抑制剂、检测点-1 或 2 抑制剂、粘附斑激酶抑制剂、Map 激酶激酶(mek)抑制剂、VEGF 捕获抗体、培美曲塞、埃罗替尼、达沙替尼(dasatinib)、尼罗替尼、德卡坦尼(decatanib)、帕尼单抗、氨柔比星、奥戈伏单抗、Lep-etu、洛拉曲克(nolatrexed)、azd2171、巴他布林(batabulin)、奥法木单抗、扎木单抗、伊朵堤卡林(edotecarin)、粉防己碱、鲁吡替康(rubitecan)、替米利芬、奥利默森(oblimersen)、ticilimumab、易普利姆玛(Ipilimumab)、棉酚、Bio111、131-I-TM-601、ALT-110、BI0140、CC8490、西仑吉肽、吉马替康、IL13-PE38QQR、INO1001、IPdR₁KRX-0402、硫蒽酮、LY317615、neuradiab、维特斯潘(vitespan)、Rta744、Sdx102、他仑帕奈、阿曲生坦、Xr311、罗咪酯肽、ADS-100380、舒尼替尼、5-氟尿嘧啶、伏立诺他(vorinostat)、依托泊苷、吉西他滨、阿霉素、5'-脱氧-5-氟尿苷、长春新碱、替莫唑胺、ZK-304709、塞利西利(seliciclib);PD0325901、AZD-6244、卡培他滨、L-谷氨酸、N-[4-[2-(2-氨基-4,7-二氢-4-氧-1H-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-基)乙基]苯甲酰]-二钠盐、七水合物、喜树碱、PEG 标记的伊立替康、三苯氧胺、枸橼酸托瑞米芬、阿那曲唑、依西美坦、来曲唑、DES (乙烯雌酚)、雌甾二醇、雌激素、雌激素缀合物、贝伐单抗、IMC-1C11、CHIR-258、3-[5-(甲基磺酰基哌啶基甲基)-吡啶-2-基]喹啉酮、瓦他拉尼(vatalanib)、AG-013736、AVE-0005、[D-Ser (But) 6, Azgly10] (pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser (But)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂ 的醋酸盐醋酸 [C₅₉H₈₄N₁₈Oi₄-(C₂H₄O₂)_x, 其中, x=1 ~ 2.4]、醋酸戈舍瑞林、醋酸亮丙瑞林、羟萘酸曲普瑞林、醋酸甲羟孕酮、己酸羟孕酮、醋酸甲地孕酮、雷洛昔芬、比卡鲁胺、氟他胺、尼鲁米特(nilutamide)、醋酸甲地孕酮、CP-724714;TAK-165、HKI-272、埃罗替尼、拉帕替尼、卡拉替尼(canertinib)、ABX-EGF 抗体、爱必妥、EKB-569、PKI-166、GW-572016、Itonafarnib、BMS-214662、替吡法尼;阿米福汀、NVP-LAQ824、辛二酰苯胺异羟肟酸、丙戊酸、曲古抑菌素 A、FK-228、SU11248、索拉非尼、KRN951、氨鲁米特、安吡啶、阿那格雷、L-天冬酰胺酸酶、卡介苗(BCG)、博来霉素、布舍瑞林、白消安、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐、环丙孕酮、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素 D、道诺霉素、乙烯雌酚、表柔比星、氟达拉滨、氟氢可的松、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、格列卫(gleevec)、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、亮丙瑞林、左旋四咪唑、洛莫司汀、氮芥、美法仑、6-巯基嘌呤、美司钠、氨甲蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特(nilutamide)、奥曲肽、奥沙利铂、帕米膦酸盐、喷司他丁、普卡霉素、卟吩姆钠(porfimer)、甲基苄肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链佐星、替尼泊苷、睾酮、沙利度胺、硫鸟嘌呤、噻替派、维甲酸、长春地辛、13-顺式视黄酸、苯丙氨酸氮芥、乌拉莫司汀、雌莫司汀、六甲蜜胺、氟尿苷、5-脱氧尿苷(5-deoxyuridine)、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、脱氧助间型霉素、骨化三醇、戊柔比

星、光神霉素、长春花碱、长春瑞滨、拓扑替康、razoxin、马立马司他、COL-3、新伐司他、BMS-275291、角鲨胺、内皮抑素、SU5416、SU6668、EMD121974、白介素-12、IM862、血管抑素、vitaxin、屈洛昔芬、idoxifene、螺内酯、非那雄胺、西咪替丁、曲妥单抗、白介素融合毒素(denileukin diftotox)、吉非替尼、硼替佐米(bortezomib)、紫杉醇、不含聚氧乙烯蓖麻油的紫杉醇、多西他奇、埃坡霉素 B、BMS-247550、BMS-310705、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、哌喷昔芬(pipendoxifene)、ERA-923、阿佐昔芬、氟维司群、阿考比芬、拉索昔芬、吲哚昔酚(idoxifene)、TSE-424、HMR-3339、ZK186619、托泊替康、PTK787/ZK222584、VX-745、PD184352、雷帕霉素、40-O- (2-羟乙基)-雷帕霉素、西罗莫司(temsirolimus)、AP-23573、RAD001、ABT-578、BC-210、LY294002、LY292223、LY292696、LY293684、LY293646、渥曼青霉素、ZM336372、L-779, 450、PEG-非格司亭、达贝泊汀(darbepoetin)、红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、唑来膦酸、强的松、西妥昔单抗、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、组氨瑞林、PEG化干扰素 α -2a、干扰素 α -2a、PEG化干扰素 α -2b、干扰素 α -2b、阿扎胞苷、PEG-L-天冬酰胺酶、来那度胺、吉妥单抗、氢化可的松、白介素-11、右雷佐生、阿仑单抗、全反式维甲酸、酮康唑、白介素-2、甲地孕酮、免疫球蛋白、氮芥、甲基强的松龙、替伊莫单抗(ibrutinib)、雄激素、地西他滨、六甲嘧啶、蓓萨罗丁、托西莫单抗、三氧化二砷、可的松、editronate、米托坦、环孢霉素、柔红霉素脂质体、Edwin-天冬酰胺酶、锇89、卡索匹坦、奈妥匹坦、NK-1受体拮抗剂、帕洛诺司琼、阿瑞吡坦、苯海拉明、羟嗪、甲氧氯普胺、劳拉西泮、阿普唑仑、氟哌啶醇、氟哌利多、屈大麻酚、地塞米松、甲基强的松龙、普鲁氯嗪、格拉司琼、昂丹司琼、多拉司琼、托烷司琼、ss非格司亭(pegfilgrastim)、红细胞生成素、依泊汀 α 、达贝泊汀 α 、或它们的混合物。

37. 根据权利要求1-36中任一项所述的原始细胞,其中所述药物包括一抗病毒剂。

38. 根据权利要求37所述的原始细胞,其中所述抗病毒剂是一抗HIV剂、抗HBV剂或抗HCV剂。

39. 一种原始细胞,包含具有支撑脂双层纳米多孔二氧化硅核心和根据SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的MET结合肽。

40. 根据权利要求31所述的原始细胞,其中所述MET结合肽是根据SEQ ID NO:1的肽。

41. 根据权利要求39或40所述的原始细胞,其中所述MET结合肽缀合到所述脂双层。

42. 根据权利要求39-41中任一项所述的原始细胞,其中所述原始细胞进一步包含至少一种选自由以下物质组成的组的组分:一促进原始细胞和封装的DNA的内体逃逸的融合肽;一质粒DNA;双链线性DNA,一药物;一显像剂,小干扰RNA,小发夹RNA和微RNA,其中所述质粒DNA、所述药物、所述显像剂和/或所述RNA进一步与核定位序列缀合。

43. 根据权利要求42所述的原始细胞,其中所述药物包括至少一种抗癌剂。

44. 根据权利要求43所述的原始细胞,其中所述抗癌剂选自由以下物质组成的组:依维莫司、曲贝替定、紫杉醇蛋白质结合颗粒注射悬液(abraxane)、TLK286、AV-299、DN-101、帕唑帕尼、GSK690693、RTA744、ON0910.Na、AZD6244 (ARRY-142886)、AMN-107、TKI-258、GSK461364、AZD1152、enzastaurin、凡德他尼(vandetanib)、ARQ-197、MK-0457、MLN8054、PHA-739358、R-763、AT-9263、FLT-3抑制剂、VEGFR抑制剂、EGFR TK抑制剂、极光激酶抑制剂、PIK-1调节剂、Bcl-2抑制剂、HDAC抑制剂、c-MET抑制剂、PARP抑制

剂、Cdk 抑制剂、EGFR TK 抑制剂、IGFR-TK 抑制剂、抗-HGF 抗体、PI3 激酶抑制剂、AKT 抑制剂、JAK/STAT 抑制剂、检测点-1 或 2 抑制剂、粘附斑激酶抑制剂、Map 激酶激酶(mek) 抑制剂、VEGF 捕获抗体、培美曲塞、埃罗替尼、达沙替尼(dasatinib)、尼罗替尼、德卡坦尼(decatanib)、帕尼单抗、氨柔比星、奥戈伏单抗、Lep-etu、洛拉曲克(nolatrexed)、azd2171、巴他布林(batabulin)、奥法木单抗、扎木单抗、伊朵堤卡林(edotecarin)、粉防己碱、鲁吡替康(rubitecan)、替米利芬、奥利默森(oblimersen)、ticilimumab、易普利姆玛(Ipilimumab)、棉酚、Bio111、131-I-TM-601、ALT-110、BI0140、CC8490、西仑吉肽、吉马替康、IL13-PE38QQR、INO1001、IPdR₁KRX-0402、硫蒽酮、LY317615、neuradiab、维特斯潘(vitespan)、Rta744、Sdx102、他仑帕奈、阿曲生坦、Xr311、罗咪酯肽、ADS-100380、舒尼替尼、5-氟尿嘧啶、伏立诺他(vorinostat)、依托泊苷、吉西他滨、阿霉素、5'-脱氧-5-氟尿苷、长春新碱、替莫唑胺、ZK-304709、塞利西利(seliciclib);PD0325901、AZD-6244、卡培他滨、L-谷氨酸、N-[4-[2-(2-氨基-4,7-二氢-4-氧-1H-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-基)乙基]苯甲酰]-、二钠盐、七水合物、喜树碱、PEG 标记的伊立替康、三苯氧胺、枸橼酸托瑞米芬、阿那曲唑、依西美坦、来曲唑、DES(乙烯雌酚)、雌甾二醇、雌激素、雌激素缀合物、贝伐单抗、IMC-1C11、CHIR-258、3-[5-(甲基磺酰基哌啶基甲基)-吡啶-2-基]喹啉酮、瓦他拉尼(vatalanib)、AG-013736、AVE-0005、[D-Ser(But)6, Azgly10](pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂ 醋酸盐 醋酸[C₅₉H₈₄N₁₈O₁₄-(C₂H₄O₂)_x, 其中, x=1 到 2.4]、醋酸戈舍瑞林、醋酸亮丙瑞林、羧基曲普瑞林、醋酸甲羟孕酮、己酸羟孕酮、醋酸甲地孕酮、雷洛昔芬、比卡鲁胺、氟他胺、尼鲁米特(nilutamide)、醋酸甲地孕酮、CP-724714;TAK-165、HKI-272、埃罗替尼、拉帕替尼、卡拉替尼(canertinib)、ABX-EGF 抗体、爱必妥、EKB-569、PKI-166、GW-572016、Ionafernib、BMS-214662、替吡法尼;阿米福汀、NVP-LAQ824、辛二酰苯胺异羟肟酸、丙戊酸、曲古抑菌素 A、FK-228、SU11248、索拉非尼、KRN951、氨鲁米特、安吡啶、阿那格雷、L-天冬酰胺酸酶、卡介苗(BCG)、博来霉素、布舍瑞林、白消安、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐、环丙孕酮、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素 D、道诺霉素、乙烯雌酚、表柔比星、氟达拉滨、氟氢可的松、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、格列卫(gleevac)、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、亮丙瑞林、左旋四咪唑、洛莫司汀、氮芥、美法仑、6-巯基嘌呤、美司钠、氨甲蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特(nilutamide)、奥曲肽、奥沙利铂、帕米膦酸盐、喷司他丁、普卡霉素、吡吩姆钠(porfimer)、甲基苄肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链佐星、替尼泊苷、睾酮、沙利度胺、硫鸟嘌呤、噻替派、维甲酸、长春地辛、13-顺式视黄酸、苯丙氨酸氮芥、乌拉莫司汀、雌莫司汀、六甲蜜胺、氟尿苷、5-脱氧尿苷(5-deoxyuridine)、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、脱氧助间型霉素、骨化三醇、戊柔比星、光神霉素、长春花碱、长春瑞滨、拓扑替康、razoxin、马立马司他、COL-3、新伐司他、BMS-275291、角鲨胺、内皮抑素、SU5416、SU6668、EMD121974、白介素-12、IM862、血管抑素、vitaxin、屈洛昔芬、idoxifene、螺内酯、非那雄胺、西咪替丁、曲妥单抗、白介素融合毒素(denileukin diftitox)、吉非替尼、硼替佐米(bortezomib)、紫杉醇、不含聚氧乙烯蓖麻油的紫杉醇、多西他奇、埃坡霉素 B、BMS-247550、BMS-310705、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、哌喷昔芬(pipendoxifene)、ERA-923、阿佐昔芬、氟维司群、阿考比芬、拉索昔芬、吡啶昔酚(idoxifene)、TSE-424、HMR-3339、ZK186619、托泊替康、PTK787/ZK222584、VX-745、PD184352、雷帕霉素、

40-0- (2- 羟乙基) - 雷帕霉素、西罗莫司(temsirolimus)、AP-23573、RAD001、ABT-578、BC-210、LY294002、LY292223、LY292696、LY293684、LY293646、渥曼青霉素、ZM336372、L-779, 450、PEG- 非格司亭、达贝泊汀(darbepoetin)、红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、唑来膦酸、强的松、西妥昔单抗、粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子、组氨瑞林、PEG 化干扰素 α -2a、干扰素 α -2a、PEG 化干扰素 α -2b、干扰素 α -2b、阿扎胞苷、PEG-L- 天冬酰胺酶、来那度胺、吉妥单抗、氢化可的松、白介素 -11、右雷佐生、阿仑单抗、全反式维甲酸、酮康唑、白介素 -2、甲地孕酮、免疫球蛋白、氮芥、甲基强的松龙、替伊莫单抗(ibrutinib)、雄激素、地西他滨、六甲嘧啶、替萨罗丁、托西莫单抗、三氧化二砷、可的松、editronate、米托坦、环孢霉素、柔红霉素脂质体、Edwin- 天冬酰胺酶、锗 89、卡索匹坦、奈妥匹坦、NK-1 受体拮抗剂、帕洛诺司琼、阿瑞吡坦、苯海拉明、羟嗪、甲氧氯普胺、劳拉西泮、阿普唑仑、氟哌啶醇、氟哌利多、屈大麻酚、地塞米松、甲基强的松龙、普鲁氯嗪、格拉司琼、昂丹司琼、多拉司琼、托烷司琼、ss 非格司亭(pegfilgrastim)、红细胞生成素、依泊汀 α 、达贝泊汀 α 和它们的混合物。

45. 根据权利要求 39-45 中任一项所述的原始细胞, 其中所述药物包括至少一种抗病毒剂。

46. 根据权利要求 45 所述的原始细胞, 其中所述抗病毒剂是一抗 HIV 剂、抗 HBV 剂、抗 HCV 剂或它们的混合物。

47. 根据权利要求 39-46 中任一项所述的原始细胞, 其中所述 DNA 能够表达至少一种报告分子。

48. 根据权利要求 39-47 中任一项所述的原始细胞, 包含质粒 DNA, 其中所述质粒 DNA 可选地进行修饰以表达核定位序列。

49. 根据权利要求 48 所述的原始细胞, 其中所述 DNA 是超螺旋的, 或者经包装的质粒 DNA。

50. 根据权利要求 49 所述的原始细胞, 其中所述 DNA 是超螺旋的并经包装的质粒 DNA。

51. 根据权利要求 48-51 中任一项所述的原始细胞, 其中所述质粒 DNA 经修饰以表达核定位序列。

52. 根据权利要求 47-51 中任一项所述的原始细胞, 其中所述 DNA 是组蛋白包装的超螺旋质粒 DNA, 包含人组蛋白混合物。

53. 根据权利要求 52 所述的原始细胞, 其中所述组蛋白混合物由 H1、H2A、H2B、H3 和 H4 组成。

54. 根据权利要求 53 所述的原始细胞, 其中所述组蛋白混合物是 H1、H2A、H2B、H3 和 H4, 其重量比为 1:2:2:2:2。

55. 根据权利要求 48-54 中任一项所述的原始细胞, 其中所述质粒 DNA 能够表达多肽毒素、小发夹 RNA (shRNA) 或小干扰 RNA (siRNA)。

56. 根据权利要求 55 所述的原始细胞, 其中所述多肽毒素选自以下物质组成的组: 蓖麻毒素 A 链或者白喉毒素 A 链。

57. 根据权利要求 55 所述的原始细胞, 其中所述 shRNA 或所述 siRNA 诱导细胞凋亡。

58. 根据权利要求 48-57 中任一项所述的原始细胞, 其中所述质粒 DNA 能够表达报告蛋白。

59. 根据权利要求 58 所述的原始细胞,其中所述报告蛋白是绿色荧光蛋白或红色荧光蛋白。

60. 根据权利要求 39-59 中任一项所述的原始细胞,其中所述核定位序列是根据 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 的肽。

61. 根据权利要求 60 所述的原始细胞,其中所述核定位序列是根据 SEQ ID NO:9 的肽。

62. 一种药物组合物,包含根据权利要求 1-61 中任一项所述的原始细胞的群,结合药学上可接受的载体、添加剂或赋形剂,该原始细胞的群的有效量能用于产生治疗效果。

63. 根据权利要求 62 所述的组合物,进一步包含一不作为货物放置在原始细胞内的药物。

64. 根据权利要求 63 所述的组合物,其中所述药物是一抗癌剂或抗病毒剂。

65. 根据权利要求 64 所述的组合物,其中所述抗病毒剂是一抗 HIV 剂、抗 HBV 剂、抗 HCV 剂或它们的混合物。

66. 根据权利要求 62-65 中任一项所述的组合物,所述组合物制成胃肠外剂量形式。

67. 根据权利要求 66 所述的组合物,其中所述剂量形式是皮内的、肌肉的、骨内的、腹膜内的、静脉内的、皮下的或鞘内的剂量形式。

68. 根据权利要求 62-65 中任一项所述的组合物,所述组合物是局部的或经皮给药的剂量形式。

69. 一根据 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 的 MET 结合肽。

70. 一根据权利要求 69 所述的根据 SEQ ID NO:1 的 MET 结合肽。

71. 一包含根据权利要求 69 或 70 所述的 MET 结合肽的药物组合物。

72. 一包含一原始细胞群的药物组合物,所述原始细胞包含靶向肽使得原始细胞与抗癌剂和抗 HBV 剂、抗 HCV 剂或它们的混合物,选择性结合到肝癌细胞。

73. 根据权利要求 72 所述的组合物,其中所述靶向肽选自以下物质组成的组: S94 肽、MET 结合肽或它们的混合物。

74. 根据权利要求 72 所述的组合物,其中所述的抗癌剂是多吉美(索拉非尼)、舒尼替尼、贝伐单抗、特罗凯(埃罗替尼)、泰克博(拉帕替尼)或它们的混合物。

75. 根据权利要求 72-74 中任一项所述的组合物,其中所述抗 HBV 剂是 Hepsera(阿德福韦酯)、拉米夫定、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦、恩曲他滨、克拉夫定、valtorecitabine、氨多索韦、普拉德福韦、racivir、BAM205、硝唑尼特、UT231-B、Bay41-4109、EHT899、日达仙(zadaxin)(胸腺素 α -1)或它们的混合物。

76. 根据权利要求 72-75 中任一项所述的组合物,其中所述抗 HCV 剂是波西普韦(boceprevir)、daclatasvir、asunapavir、INX-189、FV-100、NM283、VX-950(特拉普韦(telaprevir))、SCH50304、TMC435、VX-500、BX-813、SCH503034、R1626、ITMN-191(R7227)、R7128、PF-868554、TT033、CGH-759、GI5005、MK-7009、SIRNA-034、MK-0608、A-837093、GS-9190、GS9256、GS9451、GS5885、GS6620、GS9620、GS9669、ACH-1095、ACH-2928、GSK625433、TG4040(MVA-HCV)、A-831、F351、NS5A、NS4B、ANA598、A-689、GNI-104、IDX102、ADX184、ALS-2200、ALS-2158、BI-201335、BI207127、BIT-225、BIT-8020、GL59728、GL60667、PSI-938、PSI-7977、PSI-7851、SCY-635、病毒唑、聚乙二醇干扰素、PHX1766、SP-30 或它们

的混合物。

77. 一种治疗癌症的方法,包括给需要的患者施用有效量的包含根据权利要求 1-61 中任一项所述的原始细胞的群的组合物,所述原始细胞群经过调整以将抗癌剂运输到所述患者的癌细胞。

78. 一种治疗肝细胞癌的方法,包括给所述病人施用有效量的根据权利要求 72-76 中任一项所述的组合物。

79. 一种治疗癌症的方法,包括给需要的患者施用有效量的包含根据权利要求 1-61 中任一项所述的原始细胞的群,其中所述 DNA 质粒是超螺旋的并经过调整以表达抗癌多肽和/或 RNA,可选地与有效量的另外的抗癌剂结合,所述另外的抗癌剂制备成所述原始细胞内的货物。

80. 根据权利要求 79 所述的方法,其中所述抗癌多肽是蓖麻毒素 A 链或者白喉毒素 A 链。

81. 根据权利要求 79 或 80 所述的方法,其中所述 RNA 是诱导癌细胞凋亡的 shRNA 或 siRNA。

82. 根据权利要求 79-81 中任一项所述的方法,其中所述 siRNA 选自由 s565、s7824 或 s10234 组成的组。

83. 根据权利要求 81 所述的方法,其中所述 shRNA 是细胞周期蛋白 B1 特异性 shRNA,其诱导细胞死亡。

84. 根据权利要求 79-84 中任一项所述的方法,其中所述抗癌剂选自由以下物质组成的组:依维莫司、曲贝替定、紫杉醇蛋白质结合颗粒注射悬液(abraxane)、TLK286、AV-299、DN-101、帕唑帕尼、GSK690693、RTA744、ON0910、Na、AZD6244 (ARRY-142886)、AMN-107、TKI-258、GSK461364、AZD1152、enzastaurin、凡德他尼(vandetanib)、ARQ-197、MK-0457、MLN8054、PHA-739358、R-763、AT-9263、FLT-3 抑制剂、VEGFR 抑制剂、EGFR TK 抑制剂、极光激酶抑制剂、PIK-1 调节剂、Bcl-2 抑制剂、HDAC 抑制剂、c-MET 抑制剂、PARP 抑制剂、Cdk 抑制剂、EGFR TK 抑制剂、IGFR-TK 抑制剂、抗-HGF 抗体、PI3 激酶抑制剂、AKT 抑制剂、JAK/STAT 抑制剂、检测点-1 或 2 抑制剂、粘附斑激酶抑制剂、Map 激酶激酶(mek) 抑制剂、VEGF 捕获抗体、培美曲塞、埃罗替尼、达沙替尼(dasatinib)、尼罗替尼、德卡坦尼(decatanib)、帕尼单抗、氨柔比星、奥戈伏单抗、Lep-etu、洛拉曲克(nolatrexed)、azd2171、巴他布林(batabulin)、奥法木单抗、扎木单抗、伊朵堤卡林(edotecarin)、粉防己碱、鲁吡替康(rubitecan)、替米利芬、奥利默森(oblimersen)、ticilimumab、易普利姆玛(Ipilimumab)、棉酚、Bio111、131-I-TM-601、ALT-110、BI0140、CC8490、西仑吉肽、吉马替康、IL13-PE38QQR、INO1001、IPdR₁KRX-0402、硫蒽酮、LY317615、neuradiab、维特斯潘(vitespan)、Rta744、Sdx102、他仑帕奈、阿曲生坦、Xr311、罗咪酯肽、ADS-100380、舒尼替尼、5-氟尿嘧啶、伏立诺他(vorinostat)、依托泊苷、吉西他滨、阿霉素、阿霉素脂质体、5'-脱氧-5-氟尿苷、长春新碱、替莫唑胺、ZK-304709、塞利西利(seliciclib); PD0325901、AZD-6244、卡培他滨、L-谷氨酸、N-[4-[2-(2-氨基-4,7-二氢-4-氧-1H-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-基)乙基]苯甲酰]-、二钠盐、七水合物、喜树碱、PEG 标记的伊立替康、三苯氧胺、枸橼酸托瑞米芬、阿那曲唑、依西美坦、来曲唑、DES (乙烯雌酚)、雌甾二醇、雌激素、雌激素缀合物、贝伐单抗、IMC-1C11、CHIR-258、3-[5-(甲基磺酰基)哌啶

基甲基)-吡啶-喹诺酮、瓦他拉尼(batalanib)、AG-013736、AVE-0005、[D-Ser (But) 6, Azgly10] (pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser (But) -Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂ 的醋酸盐醋酸 [C₅₉H₈₄N₁₈O₁₄-(C₂H₄O₂)_x, 其中, x=1 到 2.4]、醋酸戈舍瑞林、醋酸亮丙瑞林、羟萘酸曲普瑞林、醋酸甲羟孕酮、己酸羟孕酮、醋酸甲地孕酮、雷洛昔芬、比卡鲁胺、氟他胺、尼鲁米特(nilutamide)、醋酸甲地孕酮、CP-724714; TAK-165、HKI-272、埃罗替尼、拉帕替尼、卡拉替尼(canertinib)、ABX-EGF 抗体、爱必妥、EKB-569、PKI-166、GW-572016、Ionafernib、BMS-214662、替吡法尼; 阿米福汀、NVP-LAQ824、辛二酰苯胺异羟肟酸、丙戊酸、曲古抑菌素 A、FK-228、SU11248、索拉非尼、KRN951、氨鲁米特、安吡啶、阿那格雷、L- 天冬酰胺酸酶、卡介苗(BCG)、博来霉素、布舍瑞林、白消安、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐、环丙孕酮、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素 D、道诺霉素、乙烯雌酚、表柔比星、氟达拉滨、氟氢可的松、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、格列卫(gleevec)、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、亮丙瑞林、左旋四咪唑、洛莫司汀、氮芥、美法仑、6- 巯基嘌呤、美司钠、氨甲蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特(nilutamide)、奥曲肽、奥沙利铂、帕米膦酸盐、喷司他丁、普卡霉素、卟吩姆钠(porfimer)、甲基苄肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链佐星、替尼泊苷、睾酮、沙利度胺、硫鸟嘌呤、噻替派、维甲酸、长春地辛、13- 顺式视黄酸、苯丙氨酸氮芥、乌拉莫司汀、雌莫司汀、六甲蜜胺、氟尿苷、5- 脱氧尿苷(5-deoxyuridine)、阿糖胞苷、6- 巯基嘌呤、脱氧助间型霉素、骨化三醇、戊柔比星、光神霉素、长春花碱、长春瑞滨、拓扑替康、razoxin、马立马司他、COL-3、新伐司他、BMS-275291、角鲨胺、内皮抑素、SU5416、SU6668、EMD121974、白介素 -12、IM862、血管抑素、vitaxin、屈洛昔芬、idoxifene、螺内酯、非那雄胺、西咪替丁、曲妥单抗、白介素融合毒素(denileukin diftotox)、吉非替尼、硼替佐米(bortezomib)、紫杉醇、不含聚氧乙烯蓖麻油的紫杉醇、多西他奇、埃坡霉素 B、BMS-247550、BMS-310705、屈洛昔芬、4- 羟基他莫昔芬、哌喷昔芬(pipendoxifene)、ERA-923、阿佐昔芬、氟维司群、阿考比芬、拉索昔芬、吡啶昔酚(idoxifene)、TSE-424、HMR-3339、ZK186619、托 泊 替 康、PTK787/ZK222584、VX-745、PD184352、雷 帕 霉 素、40-O- (2- 羟乙基)- 雷帕霉素、西罗莫司(temsirolimus)、AP-23573、RAD001、ABT-578、BC-210、LY294002、LY292223、LY292696、LY293684、LY293646、渥 曼 青 霉 素、ZM336372、L-779, 450、PEG- 非格司亭、达贝泊汀(darbepoetin)、红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、唑来膦酸、强的松、西妥昔单抗、粒细胞- 巨噬细胞集落刺激因子、组氨瑞林、PEG 化干扰素 α -2a、干扰素 α -2a、PEG 化干扰素 α -2b、干扰素 α -2b、阿扎胞苷、PEG-L- 天冬酰胺酸酶、来那度胺、吉妥单抗、氢化可的松、白介素 -11、右雷佐生、阿仑单抗、全反式维甲酸、酮康唑、白介素 -2、甲地孕酮、免疫球蛋白、氮芥、甲基强的松龙、替伊莫单抗(ibrigitumomab tiuxetan)、雄激素、地西他滨、六甲嘧胺、蓆萨罗丁、托西莫单抗、三氧化二砷、可的松、editronate、米托坦、环孢霉素、柔红霉素脂质体、Edwina- 天冬酰胺酶、锇 89、卡索匹坦、奈妥匹坦、NK-1 受体拮抗剂、帕洛诺司琼、阿瑞吡坦、苯海拉明、羟嗪、甲氧氯普胺、劳拉西泮、阿普唑仑、氟哌啶醇、氟哌利多、屈大麻酚、地塞米松、甲基强的松龙、普鲁氯嗪、格拉司琼、昂丹司琼、多拉司琼、托烷司琼、ss 非格司亭(pegfilgrastim)、红细胞生成素、依泊汀 α 、达贝泊汀 α 和它们的混合物。

85. 根据权利要求 79-84 中任一项所述的方法, 其中所述原始细胞或所述原始细胞外的所述组合物进一步包括一抗病毒剂。

86. 根据权利要求 85 所述的原始细胞,其中所述抗病毒剂是一抗 HBV 剂或抗 HCV 剂。

87. 一种治疗患者体内癌症的方法,包括给需要的病人施用有效量的根据权利要求 62-76 中任一项所述的组合物。

88. 一种根据权利要求 87 所述的方法,其中,所述癌症是鳞状细胞癌、腺癌、肝细胞癌、肾细胞癌,以及膀胱、骨、肠、乳房、宫颈、直肠(结直肠)、食道、头、肾脏、肝(肝细胞)、肺、鼻咽、颈、卵巢、睾丸、胰腺、前列腺和胃癌;白血病、伯基特淋巴瘤、非霍奇(Non Hodgkin's)金淋巴瘤、B-细胞淋巴瘤;恶性黑色素瘤;骨髓增殖性疾病;尤因氏肉瘤、血管内皮瘤、卡波济氏肉瘤、脂肪肉瘤、肌肉瘤、外周神经上皮瘤、滑膜肉瘤;神经胶质瘤、星型细胞瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤、胶质母细胞瘤、成神经细胞瘤、神经节细胞瘤、神经节神经胶质瘤、成神经管细胞瘤、松果体细胞瘤、脑膜瘤、脑膜肉瘤、神经纤维瘤、神经鞘瘤、肠癌、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌、子宫癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、小细胞和非小细胞癌混合、胸膜间皮瘤、胸膜间皮瘤、睾丸癌、甲状腺癌和星形细胞瘤。

89. 一种诊断具有患癌风险的患者体内癌症的方法,所述方法包括给所述患者施用一药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求 1-61 中任一项所述的原始细胞的群,所述原始细胞包含靶向肽,该靶向肽经过调整以选择性结合到癌细胞并将原始细胞运输到所述细胞,其中所述原始细胞包含一质粒 DNA,该质粒 DNA 经过调整以表达报告分子,并可选地包含一另外的报告分子,因此,原始细胞结合到所述患者体内的癌细胞会将所述报告分子释放到癌细胞,如果存在,并且报告分子将引发一信号,其可与标准值比较,以确定患者是否患癌,以及癌症的程度和 / 或恶性肿瘤的大小,如果存在。

90. 一种监测患者体内癌症治疗的方法,包括给所述患者施用一根据权利要求 1-61 中任一项所述的原始细胞的群,所述原始细胞的群包含靶向肽,该靶向肽经过调整以选择性结合到癌细胞并将原始细胞运输到所述细胞,其中所述原始细胞包含一质粒 DNA,该质粒 DNA 经过调整以表达报告分子,并可选地包含一另外的报告分子,因此,原始细胞结合到所述患者体内的癌细胞会将所述报告分子释放到癌细胞内,并且报告分子将引发一信号,其可在治疗开始时和治疗过程中的不同时期与标准值比较,以确定患者是否对治疗有响应,以及如果有响应,对治疗的响应程度。

用于靶向给药的多孔纳米颗粒支撑脂双层(原始细胞)及其使用方法

[0001] 相关申请及政府资助

[0002] 本发明要求了下列优先权:2011年4月28日提交的美国临时申请,序列号为US61/479847,名称为“The Selective Transfection of Hepatocellular Carcinoma Using Peptide-Targeted Silica Nanoparticle-Supported Lipid Bilayers (Protocells) (利用肽靶向二氧化硅纳米颗粒支撑脂双层(原始细胞)选择性转染肝癌细胞)”,该申请的整体内容通过引用并入本文中。

[0003] 本发明受到以下政府资助:资助号为 PHS2PN2EY016570B 国家卫生研究所资助;国家癌症研究所的 1U01CA151792-01 资助;资助号为 FA9550-07-1-0054/9550-10-1-0054 的空军科学研究办公室资助;国立环境卫生科学研究所的 1U19ES019528-01 资助;国家科学基金会的 NSF:EF-0820117 和 DGE-0504276 资助。政府拥有本发明的某些权利。

技术领域

[0004] 本发明具体是指用于患者体内的细胞特异性靶向(尤其包括肝癌细胞和其他癌症细胞)的原始细胞,包括 1) 一纳米多孔二氧化硅或金属氧化物核心;2) 一支撑的脂双层;3) 至少一种促进癌细胞死亡的试剂(例如传统的小分子、大分子货物(如 siRNA、shRNA 或其他微 RNA,或者蛋白毒素如蓖麻毒素 A 链或者白喉毒素 A 链)和 / 或 DNA,包括双链或线性 DNA、质粒 DNA,其可以是超螺旋和 / 或例如与组蛋白一起包装,并置于纳米多孔二氧化硅核心内(优选是超螺旋的,以更有效地将 DNA 包装进原始细胞中),该 DNA 可选地用核定位序列修饰,以便将原始细胞定位在癌细胞核内并促进表达多种肽的能力,该肽为癌细胞治疗(细胞凋亡 / 细胞死亡)中包括的肽,或者作为报告子、靶向肽和融合肽,靶向肽在组织中靶向待治疗癌细胞使得原始细胞与靶细胞的结合是特异性的并得到强化,,融合肽促进原始细胞和封装货物包括 DNA 的内体逃逸。本发明原始细胞可用于治疗癌症,特别是使用新的结合肽((c-MET 肽)治疗包括肝细胞(肝脏)癌症,该结合肽选择性结合到肝细胞组织上,或者用于进行癌症诊断,包括癌症治疗和药物发现。

背景技术

[0005] 封装在纳米载体中的药物的靶向给药可潜在地改进传统的“自由”药物表现出的许多问题,包括较差的溶解性、有限的稳定性、快速清除,以及尤其是缺乏选择性,缺乏选择性会造成对正常细胞的非特异性毒性并阻碍完全消除病态细胞必需的剂量增加。被动的靶向方案靠增强肿瘤血管的通透性并降低肿瘤淋巴管的排放效力,从而将纳米载体累积在肿瘤位点(所谓的增强通透性和滞留效应,或者称为 EPR 效应),该方案克服了许多问题,但是缺乏诱导纳米载体内化(internalization)所需要的细胞特异性相互作用,降低了治疗效力并可导致药物驱逐和诱导产生多种耐药性。

[0006] 纳米医药面临的一个挑战是设计纳米结构和材料,该纳米结构和材料能有效封装高浓度的货物(例如药物)穿过细胞膜,并在一指定时间段内,在目标位点可控地释放药物。

最近,无机纳米颗粒已成为纳米医药领域新一代的药物或治疗运载工具。更近的,人们开发了使用香豆素、偶氮苯、轮烷、聚合物或纳米颗粒的设门法(gating method),用于将货物密封到颗粒内,并根据光学或电化学刺激触发其释放。

[0007] 虽然脂质体由于其低免疫原性和低毒性而广泛用于药物运载中,但是其在几个方面仍需改进。第一,只能在脂质体已经制备的情况下才能实现货物的装载。因此,货物的浓度和类别可能受到限制。第二,脂质体的稳定性相对较低。脂质体的脂双层往往容易老化和融合,这改变了它们的尺寸和尺寸分布。第三,在脂质体破裂时,脂质体内的货物瞬间释放,这使得释放难以控制。

[0008] 通过将脂质体和纳米多孔二氧化硅颗粒融合而形成的多孔纳米颗粒支撑脂双层(原始细胞)是一种新型纳米载体,其解决了与癌症治疗和诊断的靶向运输有关的多个难题。像脂质体那样,原始细胞是生物相容的、可生物降解的以及非免疫原性的,但是与相似尺寸的脂质体运输剂相比,原始细胞的纳米多孔二氧化硅核心提供了一大幅增强的货物容量和延长的双层稳定性。而且,可调节核心的多孔性和表面化学性从而促进多种治疗剂,如药物、核酸和蛋白毒素的封装。货物的释放速率可以通过核心的孔尺寸、化学成分和整体二氧化硅浓缩(condensation)程度进行控制,使得原始细胞在需要爆裂(burst)释放或可控释放特征的应用中非常有用。最后,原始细胞的支撑脂双层(SLB)能够用配体进行各种修饰,从而促进选择性运输,以及用 PEG 修饰从而延长循环时间。

[0009] 还一直需要改进化疗剂的活性和加强癌症治疗。使用原始细胞结合选择性的方法进行定位、结合、加强侵入癌细胞以及使化疗剂沉积在它们的活性位点附近,这些是癌症治疗的重要方面。本发明是为了推动癌症治疗领域的发展和改善治疗剂的运输(这可影响治疗结果),通过增强癌症治疗剂的给药或者在诊断中,促进诊断癌症和监测癌症治疗的方法。

发明内容

[0010] 发明目标

[0011] 本发明的目标是提供改进的原始细胞技术、原始细胞本身、包含这些原始细胞的药物组合物以及使用本发明的原始细胞和药物组合物进行治疗和诊断(包括监测治疗)的方法。

[0012] 本发明实例的另外的目标涉及新的 MET 结合肽、它们在本发明其他实例的药物组合物和方法中的用途。

[0013] 本发明的这些和 / 或其他目标可容易地从说明书中给出的综述的描述中收集到。

[0014] 发明简述

[0015] 本发明的具体实施方式指向用于细胞(尤其是肝癌细胞和其他癌细胞)特异性靶向的原始细胞。

[0016] 在某些方面,本发明指向一细胞靶向性多孔原始细胞,包含具有支撑脂双层的纳米多孔二氧化硅或金属氧化物核心和选自以下物质组成的组的至少一种进一步的组分:

[0017] 细胞靶向种类物质(cell targeting species);

[0018] 融合肽,其促进原始细胞、封装的 DNA 和其他货物的内体逃逸(endosomal

escape), 所述其他货物包含至少一种选自双链线性 DNA 或质粒 DNA 的货物组分;

[0019] 药物;

[0020] 显像剂;

[0021] 小干扰 RNA、小发夹 RNA、微 RNA, 或它们的混合物,

[0022] 其中所述货物组分之一可选进一步与核定位序列结合。

[0023] 在某些实例中, 本发明实例的原始细胞包含一具有支撑脂双层的纳米多孔二氧化硅核心; 一包含至少一种治疗剂的货物, 其可选促进癌细胞死亡, 例如传统的小分子、大分子货物(例如 siRNA, 如 S565、S7824 和 / 或 s10234, 尤其是 shRNA, 或者蛋白毒素, 如蓖麻毒素 A 链或者白喉毒素 A 链) 和 / 或一包装的质粒 DNA (在某些实例中是组蛋白包装的), 其置于纳米多孔二氧化硅核心内(相对于本文描述的其他形式, 优选是超螺旋的, 以便更有效地将 DNA 包装进原始细胞中作为一货物元件), 该质粒 DNA 可选用核定位序列修饰, 以便将质粒定位 / 放置在癌细胞核内并促进表达多种肽的能力, 该肽为治疗(例如, 癌细胞的细胞凋亡 / 细胞死亡) 中包括的肽或者作为报告子(除了本文另有描述的其他类蛋白, 还包括荧光绿蛋白、荧光红蛋白), 用于诊断应用中。本发明的原始细胞包括一靶向肽和, 靶向肽靶向用于治疗的细胞(如组织中待治疗的癌细胞), 使得原始细胞与靶细胞的结合是特异性的并得到强化, 融合肽促进原始细胞和封装的 DNA 的内体逃逸。本发明的原始细胞可用于治疗或诊断, 更具体地说, 用于治疗癌症和其他疾病, 包括病毒性感染, 特别是包括肝细胞(肝脏)癌症。在本发明的其他方面, 原始细胞使用新的结合肽(MET 结合肽, 本文另有描述), 其选择性结合到癌组织(除其他组织外, 还包括肝癌、卵巢癌和宫颈癌组织)以进行治疗和 / 或诊断癌症, 包括监测癌症治疗和药物发现。

[0024] 在一个方面, 本发明实例的原始细胞包括一多孔纳米颗粒原始细胞, 其通常包括一具有支撑脂双层的纳米多孔二氧化硅核心。在本发明的这方面, 原始细胞包括一靶向肽, 其通常是一 MET 报告子结合肽(本文另有描述), 其通常在原始细胞的表面上与融合蛋白结合。原始细胞可装载有各种治疗和 / 或诊断货物, 包括例如小分子(用于治疗和 / 或诊断的小分子, 尤其包括抗癌和 / 或抗病毒试剂(用于治疗 HBV 和 / 或 HCV)), 还包括大分子, 其包括多肽和核酸, 核酸包括 RNA (shRNA 和 siRNA) 或质粒 DNA, 其可以是超螺旋的和组蛋白包装的并包括一核定位序列, 大分子可以是用于治疗和 / 或诊断的大分子(包括报告分子例如荧光多肽, 包括荧光绿蛋白 / FGP、荧光红蛋白 / FRP, 还包括其他蛋白)。

[0025] 本发明的实例的其他方面指向药物组合物。本发明的药物组合物包括一群相同或不同的原始细胞, 其通过结合药学上可接受载体、添加剂或赋形剂制备而成。原始细胞可单独制备或者与另外的生物活性剂(例如另外的抗癌剂或抗病毒剂)一起制备, 这取决于待治疗的疾病和给药途径(本文另有描述)。这些组合物包含原始细胞, 这些原始细胞经过修饰以用于特定目的(例如治疗目的, 包括癌症治疗, 或诊断, 包括监测癌症的治疗)。药物组合物包含一用于特定目的和给药途径的有效原始细胞群, 其结合药学上可接受的载体、添加剂或赋形剂。

[0026] 本发明的一实例也涉及使用本文所述的新的原始细胞的方法。因此, 在替代性实例中, 本发明涉及一种治疗疾病和 / 或病症的方法, 包括向患者或有需要的对象施与一有效量的药物组合物(本文另有描述)。本发明的药物组合物在治疗多种疾病状态, 尤其包括癌症, 以及癌症的继发性疾病状态或状况, 或导致癌症(尤其是 HBV 和 / 或 HCV 感染)的疾病

状态或状况中尤其有用。

[0027] 在进一步的替代方面,本发明涉及诊断癌症的方法,该方法包括施用包含原始细胞群的药物组合物,该原始细胞经过修饰,以选择性运输诊断试剂或报告子显像剂到癌细胞以确诊患者的癌症。在这种方法中,通过包含至少一种靶向肽,本发明的原始细胞可被调节以适合靶向癌细胞,该靶向肽结合到表达多肽的癌细胞上或更普遍地结合到表面受体或细胞膜组分上,这些多肽或表面受体或细胞膜组分是靶向肽的目标;通过包含靶向到癌细胞的原始细胞的报告子组分(包括显像剂),这些原始细胞也可用来通过比较来自报告子的信号和标准值,确定癌组织是否存在以及其尺寸。标准值可例如从健康患者或已确诊患一疾病的患者群体中获知。一旦确诊,可使用本发明的药物组合物进行合适的治疗或实施替代疗法。

[0028] 在本发明的其他方面,本发明的组合物可用于监测特定疾病状态和/或状况的治疗的进展,包括使用本发明的组合物的治疗。在本发明的这方面,对接受治疗的患者或对象施与包含原始细胞群的组合物,这些原始细胞可特异性结合癌细胞并包含一报告子组分,使得可监测疾病状态的治疗进展。

[0029] 本发明的其他方面涉及五(5)种新的 MET 结合肽(本文另有描述),在本发明某些具体实例中,其可用作原始细胞上的靶向肽,或者用在药物组合物中用于在多种癌细胞内结合 MET 蛋白,癌细胞包括肝癌、宫颈癌和卵巢癌细胞,以及癌症组织中的其他诸多细胞。本发明的一个实例涉及五(5)种不同的 7-mer 肽(7mer peptides),其显示了作为新结合肽的活性用于 MET 受体(又称为肝细胞生长因子受体,由 c-MET 基因表达)。这五(5)种 7-mer 肽如下所示:

[0030]

ASVHFPP (Ala-Ser-Val-His-Phe-Pro-Pro) SEQ ID NO:1

TATFWFQ (Thr-Ala-Thr-Phe-Trp-Phe-Gln) SEQ ID NO:2

TSPVALL (Thr-Ser-Pro-Val-Ala-Leu-Leu) SEQ ID NO:3

IPLKVHP (Ile-Pro-Leu-Lys-Val-His-Pro) SEQ ID NO:4

WPRLTNM (Trp-Pro-Arg-Leu-Thr-Asn-Met) SEQ ID NO:5

[0031] 这些肽中的每一种均可单独使用或与上述组中的其他 MET 结合肽或其他一系列靶向肽(如本文描述的 SP94 肽)一起使用,这些靶向肽有助于将本发明实例的原始细胞结合到癌细胞上,包括肝癌细胞、卵巢癌细胞、乳腺癌细胞和宫颈癌细胞,以及其他许多癌细胞。这些结合肽也可作为 MET 结合肽单独用于药物化合物中,以治疗癌症或抑制肝细胞生长因子结合受体。这些肽可单独制备或其他生物活性剂一起制备,以提供预期的效果。药物组合物包括有效量的上述五(5)种 MET 结合肽的至少一种,结合一药学上可接受的载体、添加剂或赋形剂,可选地,结合一附加的生物活性剂,包括抗癌剂、抗病毒剂或其他生物活性剂。

附图说明

[0032] 图 1 显示了用于本发明一个实例的纳米颗粒,其通过气溶胶辅助(aerosol-assisted)的 EISA 方法制备,该纳米颗粒能够被调整以控制颗粒尺寸和分布。

[0033] 图 2 显示了孔隙尺寸和框架, 根据一个实例, 其设计成可裁剪的, 用于多种类型的货物, 也显示了雾化辅助组分能够很容易地加入。

[0034] 图 2A 显示了图 2 的 a、b、c 和 e 被 CTAB、B58、P123 和 PS+B56 模板化。A、B、C、D 和 E 被 CTAP+NaCl、3%wt P123、3%wt P123+ 聚((丙二醇丙烯酸酯)、微乳液和 CTAB $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 模板化。

[0035] 图 3 显示了孔隙表面化学(即电荷和疏水性)、孔隙大小主要是通过有机硅烷和硅酸的共缩合(co-condensation)(根据一个实施例, 通过共同自组装或后自组装衍生)控制。见 Lin, et al., Chem. Mater. 15, 4247-562003; Liu, J. et al., J. Phys. Chem., 104, 8328-2339, 2000; Fan, H. et al., Nature, 405, 56-60, 2000 和 Lu, Y. et al., J. Am. Chem. Soc., 122, 5258-5261, 2000。

[0036] 图 4 描绘了用组蛋白包装 CB1。(A)是描绘用于使 CB1 质粒(pCB1)超螺旋、用组蛋白 H1、H2A、H2B、H3 和 H4 包装超螺旋的 pCB1 以及用核定位序列(NLS)对获得的 pCB1-组蛋白复合物进行修饰的方法的原理图, 该核定位序列能够促进物质移动通过核孔。(B)和(D)是 CB1 质粒(B)和组蛋白包装的 pCB1 (D)的原子力显微镜(AFM)图像。比例尺=100nm。(C)和(E)是分别与(B)和(D)中的红线相对应的高度的轮廓图。

[0037] 图 5 描绘了合成装载有组蛋白包装的 pCB1 的 MC40 靶向的介孔二氧化硅纳米颗粒支撑脂双层(原始细胞)的合成。(A)为原理图, 描绘了用于生成装载有 DNA 的肽靶向的原始细胞的方法。通过简单地将颗粒浸入 pCB1-组蛋白复合物溶液中, 将组蛋白包装的 pCB1 装载进介孔二氧化硅纳米颗粒内, 该二氧化硅纳米颗粒形成原始细胞的核心。然后, 将 PEG 化脂质体融合到装载有 DNA 的内核中, 形成一支撑脂双层(SLB), 其进一步用结合到 HCC 的靶向肽(MC40)和促进内化的原始细胞的内体逃逸(endosomal escape)的内体裂解肽(endosomolytic peptide)(H5WYG)修饰。使用巯基-氨基(sulfhydryl-to-amine)交联剂(间隔臂=9.5nm)将 C 末端半胱氨酸残基修饰的肽缀合到 SLB 的 DOPE 基团上。(B)是用作原始细胞核心的介孔二氧化硅纳米颗粒的透射电镜(TEM)图像。比例尺=200nm。插入=扫描电镜(SEM)图像, 其证明, 15-25nm 的孔是表面可进入的(surface-accessible)。插入比例尺=50nm。(C)介孔二氧化硅纳米颗粒的尺寸分布图, 通过动态光散射(DLS)确定。(D, 左轴)是介孔二氧化硅纳米颗粒的累积孔体积图, 通过使用 Barrett-Joyner-Halenda(BJH)模型, 用图 S-4A 中显示的氮吸附等温线的吸附分支来计算。(D, 右轴)是 pCB1-组蛋白复合物的尺寸分布, 由 DLS 确定。

[0038] 图 6 表明, 根据一个实例, 介孔二氧化硅纳米颗粒具有用于组蛋白包装的 pCB1 的高容量, 并且获得的原始细胞只有在模拟内体环境的条件下才会释放封装的 DNA。(A)能够被封装进未修饰的介孔二氧化硅纳米颗粒($\zeta=-38.5\text{mV}$)或者用 APTES(一种包含氨基(amine-containing)的硅烷)修饰的介孔二氧化硅纳米颗粒($\zeta=+11.5\text{mV}$)的 pCB1 或者组蛋白包装的 pCB1(“复合物”)的浓度。(B)在 37°C 下, 浓度为 1×10^6 个/mL 的细胞用 1×10^9 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞培养 24h 后, 对 ZsGreen(一种由 pCB1 编码的绿色荧光蛋白)呈阳性的 Hep3B 的百分比。X 轴详细说明原始细胞核心是否用 APTES 修饰和 pCB1 是否用组蛋白进行预包装。在(A)和(B)中, 用 DOTAP 和 DOPE(1:1w/w)混合物包装的 pCB1 作为对照。(C)和(D)在暴露于模拟体液(C)或 pH 为 5 的缓冲液(D)中时, 组蛋白包装的 pCB1 从未修饰的介孔二氧化硅纳米颗粒和相应的原始细胞进行的时间依赖性释

放。原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt% 胆固醇和 10wt%PEG-2000 构成,在(B)中,该原始细胞 SLB 用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。所有误差条代表 95% 置信区间 (1.96σ) ($n=3$)。

[0039] 图 7 提供了一原理图,描绘了 MC40 靶向的原始细胞运输组蛋白包装的 pCB1 到 HCC 的过程。[1] 由于靶向肽募集(recruitment)至 Met, MC40 靶向的原始细胞以高亲和性结合到 Hep3B 细胞,该 Met 由各种 HCC 细胞系过量表达。流动的 DPOC SLB 促进了肽的移动,因此使原始细胞能够用低密度 MC40 修饰,以保留对 Hep3B 的高特异亲和性(见图 8A)。[2] MC40 靶向的原始细胞通过受体介导的内吞作用,通过 Hep3B 内化。(参见图 8B 和图 15A)。[3] 内体条件使 SLB 不稳定 [插入《Nature Materials(自然材料)》文献] 并导致 H5WYG 内体裂解肽质子化,两者都使组蛋白包装的 pCB1 分散在 Hep3B 细胞的胞质溶胶中(见图 16B)。[4] pCB1-组蛋白复合物用核定位序列(NLS)修饰时,在 24 小时内会聚集在 Hep3B 细胞核内(见图 16C),这使得能够对分裂(dividing)和非分裂(non-dividing)的癌细胞进行有效转染(见图 17)。

[0040] 图 8 显示了,MC40 靶向的原始细胞以高亲和性结合到 HCC 并通过 Hep3B 但不通过正常的肝细胞内化。(A) 在暴露于 Hep3B 或肝细胞中时, MC40 靶向的原始细胞的表现离解常数(K_d); K_d 值与特异亲和性成负相关,并从饱和结合曲线中确定(见图 S-11)。误差条代表 95% 置信区间(1.96σ) ($n=5$)。(B)和(C)是 Hep3B (B)和肝细胞(C)的共聚焦荧光显微镜图, Hep3B 和肝细胞在 37°C 下,在超过 1000 倍的 MC40 靶向的原始细胞中暴露 1 小时。Met 用 Alexa Fluor[®] 488 标记的单克隆抗体(绿色)染色,原始细胞核心用 Alexa Fluor[®] 594 (红色)进行标记,细胞核用 Hoechst33342 (蓝色)染色。比例尺 =20 μ m。原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt% 胆固醇和 10wt%PEG-2000 (18:1) 组成,并用 0.015wt% (A-C) 或 0.500wt% (A) 的 MC40 靶向肽修饰。

[0041] 图 9 显示了 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞在皮摩尔浓度下诱导 HCC 凋亡,但对正常肝细胞活力影响最小。Hep3B 在 37°C 下持续暴露在 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞中,细胞周期蛋白(cyclin) B1mRNA 的表达和细胞周期蛋白 B1 蛋白随剂量(A)和时间(B)依赖性下降。在(A)中,使细胞在各种 pCB1 浓度下暴露 48 小时,在(B)中,使细胞在 5pM 的 pCB1 中暴露不同时间。肝细胞中细胞周期蛋白 B1 蛋白的表达和 Hep3B 中的 ZsGreen 的表达作为对照。使用实时 PCR 和免疫荧光法分别确定细胞周期蛋白 B1mRNA 和蛋白质的浓度。(C)在 37°C 下,在 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞([pCB1]=5pM)中持续暴露不同时间,在 G₂/M 期被捕获的 Hep3B 的百分率。将 G₂/M 期肝细胞和 S 期 Hep3B 的百分率用作对照。在细胞周期分析之前将细胞用 Hoechst33342 染色。(D)在 37°C 下,在 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞([pCB1]=5pM)中持续暴露不同时间,凋亡的 Hep3B 的百分率。将对凋亡标记呈阳性的肝细胞的百分率作为对照。对 Alexa Fluor[®] 647 标记的膜联蛋白(annexin)V 呈阳性的细胞被认为是处于凋亡早期,而膜联蛋白 V 和碘化丙啶都呈阳性则被认为是处于凋亡晚期。凋亡细胞的总数通过将单阳性和双阳性细胞的数目相加确定。在所有实验中,原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt% 胆固醇和 10wt%PEG-2000 (18:1) 构成,该原始细胞 SLB 用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。所有误差条代表 95% 置信区间 (1.96σ) ($n=3$)。

[0042] 图 10 显示了 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞诱导 HCC 选择性凋亡的效率比相应的脂质体复合物高 2500 倍。(A) DOPC 原始细胞、用 10wt%PEG-2000 (18:1) 修饰的 DOPC 原始细胞、由 DOTAP 和 DOPE (1:1w/w) 的混合物和 pCB1 构成的脂质体复合物、用 10wt%PEG-2000 修饰的 DOTAP/DOPE 脂质体复合物的 Zeta 电位值。所有 Zeta 电位测量在 0.5X PBS (pH7.4) 中进行。(B, 左轴) 在 37℃ 下, 在由 MC40 靶向的原始细胞或脂质体复合物运输的 5pM 的 pCB1 中持续暴露 48h 后, 凋亡的 Hep3B 和肝细胞的百分率。(B, 右轴) 在 37℃ 下, 在 48 小时内诱导 1×10^6 个 Hep3B 细胞中的 90% 发生凋亡所需要的 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞或脂质体复合物的数量。在 (B) 中, 细胞用 Alexa Fluor[®] 647 标记的膜联蛋白 V 和碘化丙啶染色; 单或双阳性细胞被认为是凋亡的。原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt% 胆固醇和 10wt%PEG-2000 (当有指出时) 构成, 该原始细胞 SLB 用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。DOTAP/DOPE 脂质体复合物用 10wt%PEG2000 (当有指出时)、0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。在所有实验中, pCB1 用 NLS 修饰。所有误差条代表 95% 置信区间 (1.96σ) ($n=3$)。

[0043] 图 11 显示了, MC40 靶向的原始细胞选择性运输高浓度的紫杉醇 (taxol)、Bcl-2 特异性 siRNA 和 pCB1 到 HCC, 而不影响肝细胞活力。(A) 能够使 Bcl-2 表达沉默的紫杉醇、siRNA 的浓度, 以及能够封装进 10^{12} 个原始细胞、脂质体或脂质体复合物中的 CB1 质粒的浓度。红色条表示当紫杉醇和 pCB1 两者都装载进原始细胞时, 它们的浓度如何变化。蓝色条表示紫杉醇、siRNA 和 pCB1 都装载进原始细胞时, 或者 siRNA 和 pCB1 装载进脂质体复合物中时, 它们的浓度如何变化。(B) 共聚焦荧光显微镜图, 显示了 Oregon Green[®] 488 标记的紫杉醇 (绿色)、Alexa Fluor[®] 594 标记的 siRNA (红色), 以及 Cy5 标记的 pDNA (白色) 在通过 MC40 靶向的原始细胞运输到 Hep3B 后在细胞内的分布。在固定和用 Hoechst33342 (蓝色) 染色前, 将细胞用超过其 1000 倍的 MC40 靶向的原始细胞在 37℃ 下培养 24 小时。比例尺 = 10 μ m。(C) 在 37℃ 下, 在 10nM 紫杉醇和 / 或 5pM 的 pCB1 中暴露 48 小时后, 在 G₂/M 期被捕获的 Hep3B、SNU-398 和肝细胞的分数。用 G₂/M 期的对数生长期细胞的百分率将分数进行归一化处理。(D) 在 37℃ 下, 在 10nM 紫杉醇、250pM 的 Bcl-2 特异性 siRNA 和 / 或 5pM 的 pCB1 中暴露 48 小时后, 对 Alexa Fluor[®] 647 标记的膜联蛋白 V 和碘化丙啶 (PI) 显阳性的 Hep3B、SNU-398 和肝细胞的百分率。在 (C) 和 (D) 中, “pCB1” 是指用 DOTAP 和 DOPE 混合物 (1:1w/w) 包装和非特异性运输到细胞中的 pCB1。在所有实验中, 原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt% 胆固醇和 10wt%PEG-2000 (18:1) 构成, 该原始细胞 SLB 用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。脂质体由含 5wt%DMPE 的 DSPC、30wt% 胆固醇和 10wt%PEG-2000 (16:0) 构成, 并用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。脂质体复合物由 DOTAP 和 DOPE (1:1w/w) 的混合物构成, 并用 10wt%PEG-2000、0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。在所有实验中, pCB1 用 NLS 修饰。所有误差条代表 95% 置信区间 (1.96σ) ($n=3$)。

[0044] 图 12 提供了一 CB1 质粒的载体图谱。该 CB1 质粒 (pCB1) 由 RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen 载体 (Clontech 实验设备有限公司; 山景城; 加州) 和 pNEB193 载体 (新英格兰生物实验室有限公司; 伊普斯威奇; 马萨诸塞州) 构建。pCB1 编码细胞周期蛋白 B1 特异性小发夹 RNA (shRNA) 和一海葵属 (*Zoanthus* sp.) 绿色荧光蛋白 (ZsGreen)。组成型 shRNA 的表达由 RNA Pol III 依赖的人 U6 启动子 (P_{U6}) 驱动, 而组成型 ZsGreen 的表

达由巨细胞病毒的立即早期启动子($P_{CMV\ IE}$)驱动。 ori 和 Amp^R 元件能够使质粒在大肠杆菌内增殖。编码细胞周期蛋白 B1 特异性 shRNA 的有义链和反义链的 DNA 序列带下划线并且侧边带有限制性酶切位点($BamHI$ 为红色, $EcoRI$ 为蓝色), 这些位点用于将 dsDNA 寡核苷酸引入到 pSIREN 载体上。

[0045] 图 13 描绘了组蛋白包装的 pCB1 的特征。(A) 暴露于浓度越来越高的组蛋白(H1、H2A、H2B、H3 和 H4 的摩尔比为 1:2:2:2:2)中的 pCB1 的电泳迁移率变动分析。给定 pCB1 与组蛋白的摩尔比用于第 3-6 道。第 1 道包含 DNA 梯状条带, 第 2 道包含不加组蛋白的 pCB1。(B) 组蛋白包装的 pCB1 (pCB1 与组蛋白的摩尔比为 1:50) 的 TEM 图。比例尺 = 50nm。

[0046] 图 14 显示了没有装载的以及装载了 pCB1 的介孔二氧化硅纳米颗粒的氮吸收分析。(A) 装载用组蛋白包装的 pCB1 前后, 介孔二氧化硅纳米颗粒的氮吸附等温线。(B) 装载用组蛋白包装的 pCB1 前后, 介孔二氧化硅纳米颗粒的 Brunauer-Emmett-Teller (BET) 比表面积。误差条代表 95% 置信区间(1.96σ) ($n=3$)。

[0047] 图 15 显示了 DOPC 原始细胞的小角中子散射(SANS)数据。使用用于具有恒定厚度共形外形(conformal shell)的多分散的多孔二氧化硅球体的模型获得拟合数据, 该数据显示了在二氧化硅颗粒的表面存在 36 Å 的双层, 其跨越了孔的开口。0、20 和 60 Å 的双层厚度的模拟 SANS 数据被用于对比。测得的 36 Å 的双层厚度与其他在平面支撑的脂双层进行的中子研究(33- 38 Å)一致, 并且在这些比照条件下, 该双层厚度主要代表了从脂双层的富含氢的碳氢化合物核心的散射。

[0048] 图 16 显示了原始细胞保护封装的 DNA, 使其不被核酸酶降解。 $DNase\ I$ 处理的 pCB1 的琼脂糖凝胶电泳(第 3 道), 组蛋白包装的 pCB1 的琼脂糖凝胶电泳(第 5 道), DOTAP 和 DOPE 混合物(1:1 (w/w)) 包装的 pCB1 的琼脂糖凝胶电泳(第 7 道), 装载进具有阳离子核心的原始细胞的 pCB1 的琼脂糖凝胶电泳(第 9 道), 和装载进具有阴离子核心的原始细胞的组蛋白包装的 pCB1 的琼脂糖凝胶电泳(第 11 道)。裸露的 pCB1 (第 2 道)、从组蛋白释放的 pCB1 (第 4 道), 从 DOTAP/DOPE 脂质体复合物释放的 pCB1 (第 6 道), 从具有阳离子核心的原始细胞释放的 pCB1 (第 8 道), 以及从具有阴离子核心的原始细胞释放的组蛋白包装的 pCB1 (第 10 道)被用作比较。第 1 道包含一 DNA 梯状条带。样本用 $DNase\ I$ (1 单位 / 50ng DNA) 在室温培养 30 分钟, 用 1%SDS 刺激 pCB1 的释放。

[0049] 图 17 显示了介孔二氧化硅纳米颗粒(未修饰的核心)、在室温下用 20%(v/v) APTES 浸泡 12 小时的介孔二氧化硅纳米颗粒(APTES 修饰的核心)、CB1 质粒(“pCB1”)、组蛋白包装的 pCB1 (“pCB1- 组蛋白复合物”), 以及用 DOTAP 和 DOPE 混合物(1:1 (w/w)) 包装的 pCB1 (“DOTAP/DOPE 脂质体复合物”) 的 zeta 电位(ζ) 值。Zeta 电位测量在 0.5X PBS (pH7.4) 中进行。误差条代表 95% 置信区间(1.96σ) ($n=3$)。

[0050] 图 18 显示了典型的正向散射-侧向散射(FSC-SSC)图以及 FL-1 柱状图, 用于确定图 6 和图 24 中对 ZsGreen 表达呈阳性的细胞百分率。(A)-(D) 对 ZsGreen 呈阴性的细胞的 FSC-SSC 图(A 和 C) 和相应的 FL-1 柱状图(分别为 B 和 D), 对这些细胞进行设门(A) 或者不进行设门(B) 以排除细胞碎片。FL-1 通道的平均荧光强度(MFI) 值在(B) 和(D) 中给出。(E)-(H) 对 ZsGreen 呈阳性的细胞的 FSC-SSC 图(E 和 G) 和相应的 FL-1 柱状图(分别为 F 和 H), 对这些细胞进行设门(E) 或者不进行设门(G) 以排除细胞碎片。在(F) 和(H)

上的门对应于 $MFI \leq 282$, 即 ZsGreen 阴性细胞的 MFI 的 100 倍的细胞百分率(见版面 D)。

[0051] 图 19 显示了 MC40 靶向肽的鉴别(identification)。在图中提出的原理图描述了用于选择 MC40 靶向肽的过程。 1×10^{11} pfu/mL 的肽用融合到人 IgG 的 Fc 域的 100nM 重组人 Met (rhMet) 在室温下温育 1 小时。蛋白 A 或蛋白 G 包被的磁性颗粒用于亲和捕捉 Met-噬菌体复合物, 并随后用 TBS (含 150mM NaCl 的 50mM Tris-HCl, pH7.4) 冲洗 10 次以除去未结合的噬菌体。结合的噬菌体克隆用低 pH 缓冲液(含 1mg/mL BSA 的 0.2M 甘氨酸, pH2.2) 洗脱, 洗脱产物通过感染宿主细菌(*E. coli* ER2738) 进行扩增。

[0052] 图 20 显示了 MC40 靶向肽的鉴定。(A) 在第 5 轮选择后的肽序列比对; 主要序列 ASVHFPP 类似于先前确定的 Met 特异性的 12-mer, YLFSVHWPPLKA (SEQ ID NO:18, 参见 Zhao, et al. ClinCancerRes2007;13 (206049-6055) 中的加粗部分。展示靶向不相关的 HAIYPRH 肽(约 10%) (SEQ ID NO:19, Brammer, et al., Anal. Biochem. 373 (2008)88-98) 的噬菌体克隆在序列比对中省略。(B) 和 (C) 亲和选择的噬菌体克隆结合到 rhMet 的程度通过酶联免疫吸附试验(ELISA) 进行确定。(B) 中描述的 ELISA 方案在材料和方法部分进行描述。ELISA 的结果显示在 (C) 中。(D) 在移除没有结合 Met 的肽后的序列比对。描述在图 S-9 中的一致序列由该比对确定。(E) 和 (F) Hep3B (E) 和肝细胞 (F) 的流式细胞仪散点图, 该 Hep3B 和肝细胞暴露在以下两类物质的一类中: (1) 抗 Met 和一不相关的噬菌体克隆 (TPDWLFP) (SEQ ID NO:20) 的 Alexa Fluor[®] 488 标记的单克隆抗体, 和一抗 M13 噬菌体的 Alexa Fluor[®] 546 标记的单克隆抗体(蓝点) 或 (2) 抗 Met 和 MC40 克隆的 Alexa Fluor[®] 488 标记的单克隆抗体, 和抗 M13 噬菌体的 Alexa Fluor[®] 546 标记的单克隆抗体(橙色点)。未经处理细胞(红点) 用于设置 FL-1 (Alexa Fluor[®] 488 荧光) 和 FL-2 (Alexa Fluor[®] 546 荧光) 通道的电压参数。

[0053] 图 21 显示了暴露于 Hep3B 的 MC40 靶向的原始细胞的样品结合曲线。为了确定图 5A 中的解离常数, 用细胞松弛素 D 对 1×10^6 个 Hep3B 或肝细胞进行预处理, 以抑制内吞作用, 并用各种浓度的 Alexa Fluor[®] 647 标记的 MC40 靶向的原始细胞在 37°C 下培养 1 小时。使用流式细胞仪确定获得的细胞群的平均荧光强度, 并用其相对于原始细胞浓度作图以获得总结合曲线。在饱和浓度的未标记肝细胞生长因子存在时, 通过用 Alexa Fluor[®] 647 标记的 MC40 靶向的原始细胞培养细胞来确定非特异性结合。通过用总结合曲线减去非特异性结合曲线获得特异性结合曲线; 通过特异性结合曲线计算 K_d 值。在此图描述的实验中, 原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt% 胆固醇和 10wt%PEG-2000 (18:1) 构成, 并用 0.015wt%MC40 靶向肽(约 6 个肽 / 颗粒) 修饰; 相应的 K_d 值为 1050 ± 142 pM。所有误差条代表 95% 置信区间 (1.96σ) ($n=5$)。

[0054] 图 22 显示了 MC40 靶向的原始细胞通过受体介导的内吞作用内化, 并在不存在 H5WYG 肽时定位到溶酶体。(A) 在 37°C 下, 一小时之内, 被每个 Hep3B 或肝细胞内化的 MC40 靶向的原始细胞的平均数量。在不存在(-) 或存在(+) 饱和浓度 ($100 \mu g/mL$) 的人肝细胞生长因子(HGF) 时, 将 1×10^6 个细胞用各种浓度的原始细胞进行培养, 使用流式细胞仪确定与每个细胞相关的颗粒的平均数量。原始细胞用 NBD 和 pHrodo[™] 进行标记, 以分别区分表面结合的颗粒和内化到酸性细胞内隔间(compartment) 的颗粒。误差条代表 95% 置信区间

(1.96σ) ($n=3$)。(B) 原始细胞和以下物质之间的皮尔逊相关系数(r 值): (1) Rab5, (2) Rab7, (3) 溶酶体相关膜蛋白 1 (LAMP-1), 或(4) Rab11a。在固定、透化和用 Alexa Fluor[®] 488 标记的抗 Rab5、Rab7、LAMP-1 或 Rab11a 的抗体培养之前, Hep3B 细胞用超过其 1000 倍的 Alexa Fluor[®] 594 标记的原始细胞在 37°C 下培养 1 小时。用 SlideBook 软件确定 r 值, r 值表示为平均值 $\pm$ 标准差, $n=3\times 50$ 个细胞。用微分干涉差(DIC)图限定 Hep3B 的边界, 使得在计算 r 值时能忽略细胞边界外的像素。原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt% 胆固醇和 10wt%PEG-2000 (18:1) 构成, 并用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。

[0055] 图 23 显示了用 NLS 修饰并通过 MC40 靶向的原始细胞运输时, 组蛋白包装的 pCB1 以时间依赖方式在 HCC 细胞核中聚集。(A)–(C)Hep3B 细胞的共聚焦荧光显微镜图, Hep3B 细胞在 37°C 下, 在超过 1000 倍的 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞中暴露 15 分钟(A)、12 小时(B)或 24 小时(C)。对于(B)来说, 在约 2 小时后, 原始细胞的内体逃逸和 pCB1 的胞质分散是很明显的, 但是直到 12–16 小时后, 才能检测到 ZsGreen 表达。在 24 小时时, Cy5 标记的 pCB1 仍然分布在整個细胞中; 但是, (C)中胞质染色不明显, 因为 Cy5 通道的获得被减少以避免集中在细胞核中的像素饱和。二氧化硅核心用 Alexa Fluor[®] 594 (红色) 标记, pCB1 用 Cy5 (白色) 标记, 细胞核用 Hoechst33342 (蓝色) 复染。比例尺 = 20 μ m。(D) Cy5 标记的 pCB1 和 Hoechst33342 标记的 Hep3B 细胞核的皮尔逊相关系数(r 值) 对时间作图。用 SlideBook 软件确定 r 值, r 值表示为平均值 $\pm$ 标准差, $n=3\times 50$ 个细胞。用微分干涉差(DIC)图限定 Hep3B 的边界, 使得在计算 r 值时能忽略细胞边界外的像素。原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt% 胆固醇和 10wt%PEG-2000 (18:1) 构成, 并用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。

[0056] 图 24 显示了用 NLS 修饰并通过 MC40 靶向的原始细胞运输时, 组蛋白包装的 pCB1 以接近 100% 的效力选择性转染分裂和非分裂的 HCC 细胞。(A)、(C) 和 (E) Hep3B 细胞的共聚焦荧光显微镜图, Hep3B 细胞在 37°C 下, 在超过 1000 倍的 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞中暴露 24 小时。Hep3B 细胞在(A)中的处于分裂中, 在(C) 和 (E) 中约 95% 汇合 (confluent); 在所有图中, 用组蛋白预包装 pCB1, 并且在(E) 中, pCB1– 组蛋白复合物进一步用 NLS 修饰。二氧化硅核心用 Alexa Fluor[®] 594 (红色) 标记, pCB1 用 Cy5 (白色) 标记, 细胞核用 Hoechst33342 (蓝色) 复染。比例尺 = 20 μ m。(B)、(D) 和 (F) 在 37°C 下, 在 1×10^9 个 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞 (“PC”) 中持续暴露 24 小时后, 1×10^6 个 Hep3B 和肝细胞中变得对 ZsGreen 表达呈阳性的细胞的百分率。细胞在(B) 中是处于分裂中的, 在(D) 和 (F) 中约 95% 汇合; X 轴表明 CB1 质粒 (“pCB1”) 和 pCB1– 组蛋白复合物 (“复合物”) 是否用 NLS 修饰。使用单独的 pCB1, 以及用 DOTAP 和 DOPE 混合物 (1:1 (w/w)) 包装的 pCB1 作为对照。细胞暴露在 20mg/mL 麦胚凝集素 (WGA) 中, 以阻断 NLS 修饰的 pCB1 易位通过核孔复合物。误差条代表 95% 置信区间 (1.96σ) ($n=3$)。(G) – (I) 分别为(A)、(C) 和 (E) 中使用的细胞的细胞周期柱状图。在 G_0/G_1 期的细胞的百分率在每个柱状图中给出。在所有实验中, 原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt% 胆固醇和 10wt%PEG-2000 (18:1) 构成, 并用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。

[0057] 图 25 显示了 Hep3B (A) 和肝细胞 (B) 的共聚焦荧光显微镜图, Hep3B 和肝细胞在 37°C 下, 在 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞中暴露 1 小时或者 72 小时; 在所有实验中,

pCB1 浓度保持在 5pM。(B) 中的箭头表明是有丝分裂细胞。用 Alexa Fluor[®] 594 标记的单克隆抗体(红色)标记细胞周期蛋白 B1,细胞核用 Hoechst33342(蓝色)染色。原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt%胆固醇和 10wt%PEG-2000(18:1)构成,并用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。所有比例尺 =20 μ m。

[0058] 图 26 显示了 Hep3B (A) 和肝细胞(B) 的共聚焦荧光显微镜图, Hep3B 和肝细胞在 37℃下,在 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞中暴露 1 小时或者 72 小时;在所有实验中 pCB1 浓度保持在 5pM。细胞用 Alexa Fluor[®] 647 标记的膜联蛋白 V(白色)和碘化丙啶(红色)染色来分别分析早期和晚期细胞凋亡,细胞核用 Hoechst33342(蓝色)复染。原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt%胆固醇和 10wt%PEG-2000(18:1)构成,并用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。所有比例尺 =20 μ m。

[0059] 图 27 显示了,具有由两性脂质构成的 SLB 的原始细胞引起最小化的非特异性细胞毒性。在 37℃下,在 1×10^9 个 APTES 修饰的介孔二氧化硅纳米颗粒、具有 APTES 修饰的核心的 DOPC 原始细胞、装载有编码错配(scrambled)shRNA 序列的质粒(“错配 pCB1”)的 DOPC 原始细胞,或者装载有错配 pCB1 的 DOTAP/DOPE(1:1w/w)脂质体复合物中暴露 48 小时, 1×10^6 个 Hep3B 的凋亡百分率。原始细胞和脂质体复合物用 10wt%PEG-2000、0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。带有正电荷或负电荷的聚苯乙烯纳米颗粒(分别为“氨基-PS”和“羧基-PS”)用作阳性对照,而暴露在 10mM 抗氧化剂, N-乙酰半胱氨酸(NAC)或者暴露在 1pmol 游离的(free)pCB1 中的 Hep3B 用作阴性对照。所有误差条代表 95%置信区间 (1.96σ) ($n=3$)。

具体实施方式

[0060] 在整个说明书中使用下列术语来描述本发明。在术语没有特别定义的情况下,该术语将取其本领域普通技术人员所理解的意思。

[0061] 当给出一数值范围时,应当理解的是,除非文中明确规定,在这个范围的上限和下限之间的每个居间值(intervening value),取到下限的单位的十分位,以及在这规定的范围中的任意其他规定的值或居间值,都包括在本发明中。这些较小范围的上限和下限可独立地包括在较小范围中,这也包括在本发明中,其受到任何在所规定的范围中明确排除的限值制约。当所规定的范围包括一个或两个限值时,排除那些已包括的限值的范围同样也包括在本发明中。当取代基是一个或多个马库什组中的可能物质的情况下,应当理解为只采用那些能形成稳定键的取代基。

[0062] 除非另有说明,本文使用的所有技术术语和科技术语具有本领域技术人员所理解的一般含义。尽管任何与本文描述相似或相等的方法和材料也可以用于本发明的实施或测试中,现在还是对优选的方法和材料进行描述。

[0063] 必须注意的是,本文及附带的权利要求中使用的单数形式“一(a)”、“一(an)”和“所述(the)”包括复数形式,除另有明确说明外。

[0064] 此外,以下术语应具有下面给出的含义。

[0065] 在整个说明书中使用的术语“患者”或“对象”是指动物,通常为哺乳动物,特别地,包括家养动物,优选地指使用本发明的化合物或组合物治疗(包括预防性治疗(预防))的人

类。当治疗针对某种具体动物如人类患者的那些感染、状况或疾病状态时，术语“患者”是指该特定动物。在大多数的情况下，本发明所述的患者或对象是任一性别或两种性别的人类患者。

[0066] 除另有说明，本文使用的术语“有效量”是在其使用的背景下，化合物或成分产生或引起预期的结果的量，不论该结果是关于感染和 / 或疾病状态的预防和 / 或治疗，还是另有描述。把所有其他有效量或有效浓度术语(包括术语“治疗有效量的”)纳入到这个术语中，这些术语在本发明申请中的其它地方描述或使用。

[0067] 本文使用的术语“化合物”指任何在本文中公开的具体化合物或生物活性剂，包括任何或所有的立体异构体(包括非对称异构体)、单独的旋光异构体(对映异构物)或外消旋混合物、药学上可接受的盐和前体药物形式。本文的术语化合物指的是稳定的化合物。在其使用的背景中，如本文另有说明，术语化合物可以指单个化合物或化合物的混合物。

[0068] 术语“生物活性剂”指的是在本发明实例中可以配制使用的任何生物活性化合物或药物。示例性生物活性剂包括本发明用于治疗癌症或癌症的继发性疾病状态或状况的化合物，也可包括抗病毒剂尤其是抗 HIV、抗 HBV 和 / 或抗 HCV 剂(尤其是治疗肝癌时)和本文另有描述的其他化合物或试剂。

[0069] 术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”同义使用，指的是使处于疾病威胁或折磨的病人受益的任何措施，包括通过减轻、抑制、压制或消除至少一种症状、延迟疾病的发展、预防或延迟或抑制疾病发作的可能性等来改善身体状况。在病毒感染的情况下，这些术语也适用于病毒感染，在某些特定优选实例中，优选包括根除或消除(如诊断极限提供的)病毒，该病毒是引起感染的病原体。

[0070] 本文使用的治疗，包括预防性和治疗性治疗，主要是治疗癌症，但还治疗其他疾病状态，包括病毒性感染，尤其是包括 HBV 和 / 或 HCV。例如，本发明的化合物可以在疾病发生前预防地对哺乳动物给药，以降低这种疾病的可能性。预防性的给药对降低或减少哺乳动物中疾病的后续发生可能性，或对减轻后续发生的疾病的严重性(抑制)，特别包括癌转移是有效的。或者，本发明的化合物可以，例如，治疗性地对已经被疾病折磨的哺乳动物给药。在治疗性给药的一个实施例中，用本发明的化合物给药对消除疾病，和产生缓解或基本上消除癌转移的可能性是有效的。在癌症的例子中，用本发明的化合物给药对减轻疾病的严重性或延长受折磨的哺乳动物的寿命是有效的，或者在乙型肝炎病毒(HBV)和 / 或丙型肝炎病毒(HCV)感染的例子中，用本发明的化合物给药对抑制甚至消除疾病病原体是有效的。

[0071] 本文使用的术语“药学上可接受的”，意思是根据疾病的严重性和治疗的必要性，该化合物或组合物适于给药对象，包括病人，以获得本文描述的治疗，而没有不适当的有害的副作用。

[0072] 本文使用的术语“抑制”指的是，当抑制剂是具有抑制能力的化合物 / 组合物时，其能部分或全部消除潜在的影响。

[0073] 在本文背景下使用的术语“预防”应当指作为使用本发明的一种或多种化合物或组合物给药或共同给药(单独或与另一种试剂联合给药)的结果，“降低可能性”或防止疾病、状况或疾病状态的发生。人们注意到，几乎没有 100% 有效的预防；所以，术语预防和降低可能性用于表示这样的事实：在给定的患者或对象的群体中，用本发明的化合物进行给

药将抑制或降低特定的病症或病状(特别地,病状的恶化,例如癌细胞生长或转移)或疾病发展的其他可接受的指标发生的可能性。

[0074] 术语“原始细胞”是用来描述一多孔纳米颗粒,其由包含二氧化硅、聚苯乙烯、氧化铝、二氧化钛、氧化锆或一般的金属氧化物、有机金属酸盐(organometallate)、有机硅酸盐或其混合物的材料制成。多孔球形二氧化硅纳米颗粒用于优选的原始细胞,并被一支撑脂质或聚合物双层或多层包围。本发明的各种实例提供了纳米结构和用于制造和使用纳米结构的方法,以及提供本发明原始细胞的方法。许多原始细胞的最基本的形式是本领域已知的。不同大小的多孔二氧化硅颗粒的尺寸(直径)从小于 5nm 至 200nm 或 500nm 或更大,这些颗粒在本领域中是现成的,或者使用本领域已知的方法容易地制备(见实例部分)或者可替代地,能够从纽约罗彻斯特的 Meliorum Technologies、美国德州休斯顿的 SkySpring 纳米材料有限公司或英属哥伦比亚的温哥华的 Discovery Scientific 有限公司购买到。多峰(multimodal)二氧化硅纳米颗粒可以使用 Carroll, et al., Langmuir, 25, 13540-13544 (2009) 中的步骤很容易地制备。原始细胞可使用本领域已知的方法很容易地获得。本发明实例部分提供了用于获得在本发明中有用的原始细胞的某些方法。本发明的原始细胞可以很容易地制备,包括包含脂质的原始细胞,这些脂质融合到二氧化硅纳米颗粒表面。例如,见 Liu, et al., Chem. Comm., 5100-5102 (2009), Liu, et al., J. Amer. Chem. Soc., 131, 1354-1355 (2009), Liu, et al., J. Amer. Chem. Soc., 131, 7567-7569 (2009) Lu, et al., Nature, 398, 223-226 (1999), 用于本发明的优选的原始细胞根据以下文献中提供的步骤制备: Ashley, et al., Nature Materials, 2011, May; 10 (5): 389-97, Lu, et al., Nature, 398, 223-226 (1999), Carroll, et al., Langmuir, 25, 13540-13544 (2009), 或者另外表述在随后的实验部分。

[0075] 在本发明一个实例中,纳米结构包括一核-壳结构,该结构包括一多孔颗粒核心,该核心由脂质外壳,优选是双层,但可能是单层或多层包围(见 Liu, et al., JACS, 2009, Id)。例如,多孔颗粒核心可包括一多孔纳米颗粒,该纳米颗粒由无机和/或有机材料制成,如上所述,其被一脂双层包围。在本发明中,这些脂双层包围的纳米结构是指“原始细胞”或“功能性原始细胞”,因为它们具有一支撑脂双层膜结构。在本发明实例中,原始细胞的多孔颗粒核心能够装载各种所需种类物质(“货物”),包括小分子(例如本文另有描述的抗癌剂)、大分子(例如包括巨大分子如 RNA,包括小干扰 RNA 或 siRNA 或小发夹 RNA 或 shRNA,或多肽,包括多肽毒素如蓖麻毒素 A 链或其他毒素多肽如白喉毒素 A 链 DTx,或其他大分子)或者一报告多肽(例如荧光绿色蛋白等)或者半导体量子点,或者金属纳米颗粒,或者金属氧化物纳米颗粒或它们的组合物。在本发明的某些优选方面,原始细胞装载有超螺旋质粒 DNA,其可用于运输治疗性和/或诊断肽或小发夹 RNA/shRNA 或小干扰 RNA/siRNA,这些物质可用于抑制蛋白表达(例如,负责或有助于细胞尤其是癌细胞生长的生长因子受体或其他受体,包上皮生长因子/EGFR、血管内皮生长因子受体/VEGFR-2 或血小板衍化生长因子受体/PDGFR- α 等等,还诱导癌细胞的生长停滞和凋亡)。

[0076] 在某些实例中,货物组分包括但不限于,化学小分子(尤其是抗癌剂和抗病毒剂,包括抗 HIV、抗 HBV 和/或抗 HCV 试剂)、核酸(DNA 和 RNA,包括 siRNA 和 shRNA 和质粒,其在运输到细胞后表达一种或多种多肽或 RNA 分子),例如用于特殊目的,例如本文另有描述的治疗应用或诊断应用。

[0077] 在实例中,原始细胞的脂双层能提供生物相容性并能够进行修饰以拥有靶向种类物质,例如靶向肽包括抗体、核酸适配子和 PEG (聚乙二醇) 以使例如原始细胞具有进一步的稳定性和 / 或使其能靶向运输到具有生物活性细胞中。

[0078] 本发明的原始细胞颗粒尺寸分布可以是单分散的或多分散的,取决于具体的应用。二氧化硅核心可以是单分散的(即,直径差异不大于约 5% 的统一尺寸的群体,例如,对于 200nm 直径的原始细胞,差异不大于 $\pm 10\text{nm}$,尤其是如果它们使用溶液技术制备时)或者是多分散的(即多分散的群体,如果通过喷雾制备,可以与平均直径或中位直径差异很大,例如差异高达 $\pm 200\text{nm}$ 或更大)。见图 1。多分散群可以调整大小成单分散群。所有这些都适合形成原始细胞。在本发明中,优选的原始细胞直径优选不大于约 500nm,优选直径不大于约 200nm,以能够运输到患者或对象中并产生预期的治疗效果。

[0079] 本发明的原始细胞一般的尺寸范围,从直径大于约 8-10nm 到约 5 μm ,优选直径约 20nm-3 μm ,约 10nm-约 500nm,更优选约 20-200nm (包括约 150nm,这可以是一平均或中位直径)。如上文所述,基于原始细胞群的平均或中位直径,原始细胞群可认为是单分散或多分散的。在本发明的治疗和诊断方面,尺寸非常重要,因为直径小于约 8nm 的颗粒通过肾脏排出,而那些大于约 200nm 的颗粒则会被肝脏和脾脏捕获。因此,本发明的一实例把重点放在小尺寸的原始细胞,用于患者或对象体内的药物运输和诊断。

[0080] 本发明的原始细胞的特征在于包含介孔,优选是存在于纳米结构材料中的孔。这些孔(至少有一个,但往往有很多个)可以贯穿纳米颗粒表面(通过孔的一个或两个末端出现在纳米颗粒的表面)或者在纳米结构内部,其至少一个或多个介孔与纳米颗粒的表面介孔相互连接。较小尺寸的相互连接的孔往往在表面介孔的内部。介孔的孔尺寸的整体范围可以是直径为 0.03-50nm。优选的介孔的孔尺寸为约 2-30nm;它们可以是单一尺寸的或双尺寸的或具有尺寸梯度,它们可以是有序的或无序的(基本上是随机布置的或蠕虫状的)。见附图 2。

[0081] 介孔(IUPAC 定义,直径为 2-50nm)通过模板剂“模制”,模板剂包括表面活性剂、嵌段共聚物、分子、巨大分子、乳液、乳胶小珠,或纳米颗粒。此外,工艺也可导致形成小至约 0.03nm 的微孔(IUPAC 定义,直径小于 2nm),例如如果在喷雾工艺中不使用模板部分。它们也可以被扩大为大分子,即直径为 50nm。

[0082] 纳米颗粒材料的孔表面化学可以是非常不同的——产生阳离子、阴离子、亲水、疏水、活性基团的所有有机硅烷——孔表面化学,尤其是电荷和疏水性,影响装载能力。见附图 3。有吸引力的静电相互作用或疏水相互作用控制 / 提高装载能力和控制释放率。更大的表面面积可以通过有吸引力的相互作用装载更多的药物 / 货物。参见如下。

[0083] 纳米颗粒的表面积,通过 N₂BET 方法测试,为约 100m²/g 至 > 约 1200m²/g。通常,孔尺寸越大,比表面积越小。见图 2A 的表。如果不去除模板剂,或者如果孔在 0.5nm 以下从而由于动力学效应在 77K 下通过 N₂ 吸附检测不到,理论上表面积可减少到基本为零。然而,在这种情况下,它们可以通过 CO₂ 或水吸附测得,但也很可能被认为是没有孔的。这可应用于如果生物分子直接封装进不用模板制备的二氧化硅核心中,在这种情况下,在运输到细胞后,颗粒(内部货物)可通过二氧化硅基质的溶解而释放。

[0084] 通常本发明的原始细胞装载高达约 50wt% 货物的能力:定义为(货物重量 / 装载后的原始细胞重量) × 100。最佳的装载货物重量通常为约 0.01-10%,但这取决于作为货

物进入到原始细胞内的药物或药物组合。这通常用 $\mu\text{M}/10^{10}$ 颗粒表示,其中数值范围为 2000–100 $\mu\text{M}/10^{10}$ 颗粒。本发明优选的原始细胞在 pH 为约 5.5 时显示释放货物,其为内体货物,但在生理 pH 为 7 或更高(7.4)时达到稳定状态。

[0085] 用于装载的内部空间的表面区域是孔体积,其优选值范围为约 1.1–0.5 立方厘米每克(cc/g)。请注意,在本发明一个实例的原始细胞中,表面区域主要是内部的而不是纳米颗粒的外部几何表面区域。

[0086] 根据本发明的一个实例,支撑在多孔颗粒上的脂双层具有较低的熔融转变温度,即比支撑在非多孔支撑物上的脂双层或脂质体中的脂双层流动性更强。在低肽密度下实现靶向配体的高亲和力结合时,这点有时是非常重要的,因为是双层的流动性允许了通过靶细胞表面受体进行多肽的横向扩散和补充。一个实例提供了肽聚集,其有利于结合到一互补靶标。

[0087] 在本发明中,脂双层可以在组成上有很大不同。一般情况下,任何可用于脂质体的脂质或聚合物也可用于原始细胞中。优选的脂质在本文中另有描述。尤其优选的用于本发明原始细胞的脂双层包括脂质混合物(本文另有描述),其重量比为 5%DOPE、5%PEG、30%胆固醇、60%DOPC 或 DPPC(按重量计)。

[0088] 介孔二氧化硅 NP 核心的电荷通过 Zeta 电位测量,通过用氨基硅烷(amine silane)、2-(氨乙基)丙基三甲氧基硅烷(AEPTMS)或其他有机硅烷修饰,其可以从 -50 至 +50mV 单调变化。这种电荷修饰,反过来,使得原始细胞货物内药物的装载发生变化。一般来说,在支撑脂双层融合后,zeta 电位减少至约 -10mV 至 +5mV 之间,这对于使其在血液中循环时间最大化和避免非特异性相互作用是非常重要的。

[0089] 取决于表面活性剂模板移除方式,例如在高温(500℃)下煅烧对比用酸性乙醇提取,以及取决于纳入到二氧化硅框架内的 AEPTMS 的量,二氧化硅溶解速率可差别很大。这种情况又反过来控制内部货物的释放速率。这种情况出现的原因是强烈吸附到孔的内部表面区域的分子缓慢地扩散出颗粒核心,因此颗粒核心的溶解在某种程度上控制释放率。

[0090] 根据本发明一个实例,原始细胞的进一步特征是它们在 pH 为 7 时稳定,即,它们不会漏出它们的货物,但在 pH 为 5.5 时,内体脂质或聚合物覆层变得不稳定,引发货物释放。这种 pH 触发的释放对于维持原始细胞的稳定性,直到其通过内吞作用内化到细胞内是重要的,于是一些 pH 触发事件导致释放到内体中并因此释放到胞质溶胶中。定量实验证据已表明,靶向原始细胞仅引起微弱的免疫反应,因为它们不支持更高亲和性 IgG 所需的 T 细胞帮助,这是一个有利的结果。

[0091] 本发明的原始细胞展示出许多特征中的至少一个或多个(取决于具体实例),这些特征使它们有别于现有的原始细胞:

[0092] 1) 与现有技术相比,本发明一个实例指定了平均尺寸(直径)小于约 200nm 的纳米颗粒,设计这个尺寸能够通过受体介导的内吞作用进行有效的细胞摄入。

[0093] 2) 本发明的一个实例指定单分散的和 / 或多分散尺寸,使得能够控制生物分布。

[0094] 3) 本发明的一实例指向诱导受体介导的内吞作用的靶向纳米颗粒。

[0095] 4) 本发明的一实例通过包含融合肽或内体裂解肽,诱导货物分散进细胞质。

[0096] 5) 本发明的一实例提供了颗粒,能够通过 pH 触发释放货物。

[0097] 6) 本发明的一实例展示了受控的时间依赖性释放货物(通过热诱导二氧化硅纳米

颗粒基质交联的程度)。

[0098] 7) 本发明一实例能展示具有时间依赖性的 pH 触发的释放。

[0099] 8) 本发明的一实例能够包含和提供复合的多种货物的细胞运输。

[0100] 9) 本发明一实例显示了靶标癌细胞的杀灭。

[0101] 10) 本发明一实例显示了靶标癌细胞的诊断。

[0102] 11) 本发明一实例显示了选择性进入靶细胞。

[0103] 12) 本发明一实例显示了选择性排除非靶细胞(选择性)。

[0104] 13) 本发明一实例显示了支撑脂双层的增强的流动性。

[0105] 14) 本发明一实例展示了对靶细胞的亚纳摩尔级的受控的结合亲和力。

[0106] 15) 本发明一实例展示了亚纳摩尔级结合亲和力, 靶向配体密度低于现有技术中的浓度。

[0107] 16) 本发明一实例用现有技术没有的更出色的细节水平来区分本发明和现有技术。

[0108] 术语“脂质”是用来描述用于形成纳米颗粒表面的脂双层的组分, 这些纳米颗粒用于本发明。各种实例提供了由纳米颗粒构建的纳米结构, 这些纳米颗粒支撑脂质双层。在本发明的实例中, 纳米结构优选包括例如核-壳结构, 其包括一由脂双层的外壳包围的多孔颗粒核心。纳米结构, 优选是上述的多孔二氧化硅纳米结构, 支撑脂双层膜结构。在本发明实例中, 原始细胞的脂双层能提供生物相容性并能够进行修饰以拥有靶向种类的物质, 包括例如靶向肽、融合肽、抗体、核酸适配子和 PEG (聚乙二醇) 以允许例如原始细胞具有进一步的稳定性和 / 或靶向运输到生物活性细胞, 尤其是癌细胞中。当 PEG 包括在脂双层中时, 其摩尔质量可差异很大(但可以使用含约 10- 约 100 单位乙二醇、约 15- 约 50 单位、约 15- 约 20 单位、约 15- 约 25 单位、约 16- 约 18 单位乙二醇的 PEG 等, PEG 组分通常通过氨基缀合到磷脂上, 该组分包含约 1%- 约 20%, 优选约 5%- 约 50%、约 10% 重量的包括在脂双层中的脂质。

[0109] 用于脂质体运输系统的许多脂质可用于形成纳米颗粒上的脂双层, 以提供本发明的原始细胞。几乎任何用于形成脂质体的脂质可用于脂双层, 该脂双层包围纳米颗粒以形成本发明一实例中的原始细胞。优选的用于本发明的脂质包括, 例如, 1, 2- 二油酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸胆碱(DOPC)、1, 2- 二棕榈酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸胆碱(DPPC)、1, 2- 二硬脂酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸胆碱(DSPC)、1, 2- 二油酰 -sn- 丙三基 -3- [磷酸-L- 丝氨酸] (DOPS)、1, 2- 二油酰 -3- 三甲胺 - 丙烷(18:1DOTAP)、1, 2- 二油酰 -sn- 丙三基 -3- 二氧磷基 -(1'-rac- 甘油)(1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol))(DOPG)、1, 2- 二油酰 -sn- 丙三基 -3- 磷脂酰乙醇胺(DOPE)、1, 2- 二棕榈酰 -sn- 丙三基 -3- 磷脂酰乙醇胺(DPPE)、1, 2- 二油酰 -sn- 丙三基 -3- 磷脂酰乙醇胺 -N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000] (18:1PEG-2000PE)、1, 2- 二棕榈酰 -sn- 丙三基 -3- 磷脂酰乙醇胺 -N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000] (16:0PEG-2000PE)、1- 油酰 -2-[12-[(7- 硝基 -2-1, 3- 苯并噻二唑 -4-y1) 氨基] 月桂酰] -sn- 丙三基 -3- 磷酸胆碱(18:1-12:0NBD PC)、1- 棕榈酰 -2-[12-[(7- 硝基 -2-1, 3- 苯并噻二唑 -4-y1) 氨基] 月桂酰] -sn- 丙三基 -3- 磷酸胆碱(16:0-12:0NBD PC)、胆固醇及它们的混合物 / 组合物。胆固醇, 在技术上不是脂质, 但是鉴于胆固醇可以是本发明一实例的原始细胞的脂双层的重要组分, 因此在本发明一实例中作为脂质提出。通

常胆固醇被纳入到原始细胞的脂双层中是为了加强双层的结构完整性。这些脂质全部都很容易从 Avanti Polar lipids 有限公司(阿拉巴斯特,阿拉巴马州,美国)购买。DOPE 和 DPPE 通过脂质上的氨基,在缀合(通过合适的交联剂)肽、多肽,包括抗体、RNA 和 DNA 中特别有用。

[0110] 术语“报告子”用于描述一显像剂或部分(moiety),其结合到本发明一实例的原始细胞的磷脂双层或货物上并提供可测量的信号。所述部分可提供一荧光信号或是一能够进行辐射检测的放射性同位素,等等。用于原始细胞的示例性荧光标记(优选通过缀合或吸收到脂双层或二氧化硅核心,但是这些标签也可纳入到通过原始细胞运输到细胞内的货物元件中,例如 DNA、RNA、多肽和小分子,包括 Hoechst33342 (350/461)、4',6-二脒基 2-苯基吡啶(DAPI, 356/451)、Alexa Fluor[®] 405 羧酸、琥珀酰亚胺酯(401/421)、CellTracker[™] Violet BMQC (415/516)、CellTracker[™]GreenCMFDA (492/517)、钙黄绿素(495/515)、Alexa Fluor[®] 488 结合膜联蛋白 V (495/519)、Alexa Fluor[®] 488 山羊抗鼠 IgG (H+L) (495/519)、Click-iT[®] AHA Alexa Fluor[®] 488 蛋白合成 HCS 分析(495/519)、LIVE/DEAD[®] 可固定的绿色死细胞染色试剂盒(495/519)、SYTOX[®]绿色核酸染色(504/523)、MitoSOX[™]红色线粒体超氧化指示剂(510/580)。Alexa Fluor[®] 532 羧酸、琥珀酰亚胺酯(532/554)、pHrodo[™]琥珀酰亚胺酯(558/576)、CellTracker[™]红色 CMTX (577/602)、Texas Red[®] 1,2-二十六酰-sn-丙三基-3-磷脂酰乙醇胺(Texas Red[®] DHPE, 583/608)、Alexa Fluor[®] 647 酰肼(649/666)、Alexa Fluor[®] 647 羧酸、琥珀酰亚胺酯(650/668)、Ulysis[™] Alexa Fluor[®] 647 核酸标记试剂盒(650/670)和 Alexa Fluor[®] 647 缀合膜联蛋白 V (650/665)。增强荧光信号或放慢荧光衰弱的部分也可以被纳入,包括 Slow Fade[®] Gold 系列抗淬灭剂(含有或不含 DAPI)以及 Image-iT[®] FX 信号增强剂。所有这些都是本领域已知的。另外的报告子包括通过质粒(如组蛋白包装的超螺旋 DNA 质粒)表达的多肽报告子,和包括例如荧光绿色蛋白和荧光红色蛋白的多肽报告子。根据本发明,报告子主要用于诊断应用中,包括诊断癌症(癌组织)的在患者体内的存在或发展和/或在患者或对象体内的治疗进展。

[0111] 术语“组蛋白包装的超螺旋质粒 DNA”用于描述本发明原始细胞的优选组分,该原始细胞利用优选的“超螺旋”的质粒 DNA (即,使用导致质粒自身折叠和超螺旋的过饱和盐溶液或其他离子溶液使其自身折叠,以变得更密集,从而有效地包装进原始细胞中)。质粒可以是表达任意数量多肽或编码 RNA,包括小发夹 RNA/shRNA 或小干扰 RNA/siRNA (本文另有描述)的几乎任意质粒。一旦发生超螺旋(使用浓缩的盐或其他阴离子溶液),该超螺旋的质粒 DNA 随后与组蛋白复合,以产生一组蛋白包装的“复合的”超螺旋质粒 DNA。

[0112] “包装的”DNA 此处指装载进原始细胞的 DNA (吸收进孔或自身直接限定在纳米多孔二氧化硅核心内部)。为了在空间上使 DNA 最小化,其通常被包装,这可通过几种不同方式实现,从调整周围介质的电荷到用例如脂质、蛋白或其他纳米颗粒(通常但不全是阳离子型)形成 DNA 小复合物。包装的 DNA 通常通过脂质体复合物(即 DNA 和阳离子脂质混合物复合)获得。此外, DNA 也用阳离子型蛋白(包括除了组蛋白以外的蛋白),以及金纳米颗粒(例

如 NanoFlares- 一种经设计的 DNA 和金属复合物, 其中纳米颗粒的核心是金) 进行包装。

[0113] 可以使用任何数量的组蛋白, 以及将 DNA 包装成较小体积例如通常的阳离子型纳米颗粒、脂质或蛋白的其他方式, 以包装超螺旋质粒 DNA “组蛋白包装的超螺旋质粒 DNA”, 但在涉及治疗病人的治疗方面, 优选使用人组蛋白。在本发明某些方面, 人组蛋白 H1、H2A、H2B、H3 和 H4 组合的优选比例为 1:2:2:2:2, 尽管其他组蛋白可以以相似比例组合, 如本领域已知的或根据本发明的教导容易实践的。DNA 也可是双链线性 DNA, 而不是质粒 DNA, 也可以可选地进行超螺旋和 / 或用组蛋白或其他包装组分进行包装。

[0114] 用于本发明这个方面的其他组蛋白包括, 例如 H1F、H1F0、H1FNT、H1F00、H1FX H1H1HIST1H1A、HIST1H1B、HIST1H1C、HIST1H1D、HIST1H1E、HIST1H1T ; H2AF、H2AFB1、H2AFB2、H2AFB3、H2AFJ、H2AFV、H2AFX、H2AFY、H2AFY2、H2AFZ、H2A1、HIST1H2AA、HIST1H2AB、HIST1H2AC、HIST1H2AD、HIST1H2AE、HIST1H2AG、HIST1H2AI、HIST1H2AJ、HIST1H2AK、HIST1H2AL、HIST1H2AM、H2A2、HIST2H2AA3、HIST2H2AC、H2BF、H2BFM、HSBFS、HSBFWT、H2B1、HIST1H2BA、HIST1HSBB、HIST1HSBC、HIST1HSBD、HIST1H2BE、HIST1H2BF、HIST1H2BG、HIST1H2BH、HIST1H2BI、HIST1H2BJ、HIST1H2BK、HIST1H2BL、HIST1H2BM、HIST1H2BN、HIST1H2BO、H2B2、HIST2H2BE、H3A1、HIST1H3A、HIST1H3B、HIST1H3C、HIST1H3D、HIST1H3E、HIST1H3F、HIST1H3G、HIST1H3H、HIST1H3I、HIST1H3J、H3A2、HIST2H3C、H3A3、HIST3H3、H41、HIST1H4A、HIST1H4B、HIST1H4C、HIST1H4D、HIST1H4E、HIST1H4F、HIST1H4G、HIST1H4H、HIST1H4I、HIST1H4J、HIST1H4K、HIST1H4L、H44 和 HIST4H4。

[0115] 术语“核定位序列”是指纳入或以其他方式交联到组蛋白中的多肽序列, 该组蛋白包含组蛋白包装的超螺旋的质粒 DNA。在某些实例中, 本发明原始细胞可进一步包括质粒 (通常是组蛋白包装的超螺旋质粒 DNA), 其用核定位序列修饰 (交联) (注意, 组蛋白可与核定位序列交联, 或者质粒自身可进行修饰以表达核定位序列), 增强了组蛋白包装的质粒穿透细胞核并在此放置其内含物 (以促进表达并最终促进细胞死亡) 的能力。这些肽序列有助于将组蛋白包装的质粒 DNA 和相关组蛋白运输到靶细胞核内, 因此, 质粒将表达运输治疗和 / 或诊断分子 (多肽和 / 或核苷酸) 到靶细胞核内所需的肽和 / 或核苷酸。本领域已知的任意数量的交联剂可用于将核定位序列共价连接到组蛋白上 (通常在暴露在多肽上的氨基酸侧链的赖氨酸基团或其他具有具有亲核或亲电子基团的基团处), 其用于将组蛋白包装的质粒引入细胞核。或者, 表达核定位序列的核苷酸序列可定位在接近表达组蛋白的序列的质粒中, 使缀合到核定位序列的组蛋白得以表达, 从而便于质粒转移到靶细胞核中。

[0116] 蛋白通过核膜进入细胞核。核膜由同心膜, 外膜和内膜组成。这些是细胞核的门。核膜由多个孔或大型细胞核复合物组成。翻译成带有 NLS 的蛋白将强有力地结合到输入蛋白 (aka 核转运蛋白 (aka karyopherin)), 并且复合物一起移动通过核孔。可使用任何数量的核定位序列以将组蛋白包装的质粒 DNA 引入到细胞核中。优选的核定位序列包括 H₂N-GNQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGYGGC-COOH, SEQ ID NO:9, RRMKWKK (SEQ ID NO:10)、PKKKRKV (SEQ ID NO:11) 和 KR[PAATKKAGQA]KKKK (SEQ ID NO:12)、核质蛋白的 NLS、包含两簇碱性氨基酸的通过约 10 个氨基酸的间距子分隔开的典型双组分信号。众多的其他核定位序列在本领域是众所周知。例如, 见 LaCasse, et al., Nuclear localization signals overlap NA-or RNA-binding domains in nucleic acid-binding proteins (《核定位信号与核酸结合蛋白中的 DNA 或 RNA 结合域重叠》)。

Nucl. Acids Res., 23, 1647-1656 (1995); Weis, K. Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus (《输入蛋白和输出蛋白: 如何进出细胞核》) [勘误发表于 Trends Biochem Sci 1998 Jul; 23 (7): 235]. TIBS, 23, 185-9 (1998); 以及 Murat Cokol, Raj Nair & Burkhard Rost, "Finding nuclear localization signals (《寻找核定位信号》)", 见网站 ubic.bioc.columbia.edu/papers/2000nls/paper.html#tab2。

[0117] 术语“癌症”用于描述具有独特的失去正常控制的特征的肿瘤细胞(赘生物)增殖, 导致不受控的生长, 缺失分化, 局部组织侵袭和/或转移。如本文中使用的赘生物(neoplasms), 包括但不限于, 与相同类型组织中的正常增殖比较, 对象或宿主组织中的形态不规则细胞, 以及对象组织中病理性增殖的细胞。此外, 赘生物包括侵袭性或非侵袭性的良性肿瘤和恶性肿瘤(如, 结肠肿瘤)。恶性赘生物与良性赘生物的区别在于前者显示更大程度的发育异常, 或缺乏细胞分化和定向, 以及具有侵袭性和转移的特点。在本文背景下, 术语癌症也包括耐药癌症, 包括多重耐药性的癌症。衍生本发明的靶细胞的赘生物或瘤的实例, 包括但不限于, 癌(例如, 鳞状细胞癌、腺癌、肝细胞癌和肾细胞癌), 特别是, 膀胱、骨、肠、乳房、宫颈、直肠(结直肠)、食道、头、肾脏、肝(肝细胞)、肺、鼻咽、颈、胰腺、前列腺和胃的那些癌; 白血病, 如急性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、急性早幼粒细胞白血病(APL)、急性T-细胞淋巴性白血病、成人T细胞白血病、嗜碱性粒细胞白血病、嗜酸性粒细胞白血病、粒细胞性白血病、毛细胞白血病、白细胞减少性白血病、淋巴细胞性白血病、成淋巴细胞性白血病、淋巴球性白血病、巨核细胞白血病、小原粒细胞性白血病、单核细胞性白血病、中性粒细胞白血病、干细胞性白血病; 良性和恶性淋巴瘤, 特别是, 伯基特淋巴瘤、非霍奇金(Non-Hodgkin's)淋巴瘤和B-细胞淋巴瘤; 良性和恶性的黑素瘤; 骨髓增生性疾病; 肉瘤, 特别是, 尤因氏肉瘤、血管肉瘤、卡波济氏肉瘤、脂肪肉瘤(Liposarcomas)、肌肉瘤、外周神经上皮瘤和滑膜肉瘤; 中枢神经系统的肿瘤(例如, 神经胶质瘤、星型细胞瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤、胶质母细胞瘤、成神经细胞瘤、神经节细胞瘤、神经节神经胶质瘤、成神经管细胞瘤、松果体细胞瘤、脑膜瘤、脑膜肉瘤、神经纤维瘤和神经鞘瘤); 生殖种系肿瘤(例如, 肠癌、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌、子宫癌、肺癌(如小细胞肺癌、混合的小细胞和非小细胞癌)、胸膜间皮瘤, 包括转移的胸膜间皮瘤、小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、卵巢癌、睾丸癌、甲状腺癌、星型细胞瘤、食道癌、胰腺癌、胃癌、肝癌、结肠癌和黑素瘤; 混合类型的瘤, 特别是, 癌肉瘤和霍奇金氏病; 以及混合起源(origin)的肿瘤, 例如维尔姆斯瘤和畸胎瘤等。注意, 某些肿瘤包括肝细胞和子宫癌等展示了特别在癌细胞上的MET受体的增强水平, 这些肿瘤是本发明实例的组合物和治疗方法的主要目标, 这些组合物和治疗方法包括复合到原始细胞的MET结合肽。

[0118] 术语“组合给药”(coadminister)和“组合给药”(coadministration)是同义词, 描述的是本发明至少一种原始细胞组合物与至少一种其他试剂, 通常至少一种其他的抗癌剂(本文另有描述)组合性给药, 在此公开在相同时间或大约相同时间被认为是有效量的量或者浓度。虽然优选同时进行组合物/试剂的组合给药, 试剂还可分次(at times)进行给药, 使得有效浓度的两种(或更多)组合物/试剂同时在患者体内出现至少一小段时间。或者, 在本发明某些方面, 每种组合给药的组合物/试剂可在不同时间在患者体内展示出其抑制效果, 最终结果是抑制和治疗癌症, 尤其包括肝细胞癌或细胞癌, 以及减少或抑制其他疾病状态、病症或并发症。当然, 如果不仅仅出现疾病状态、感染或其他病症, 本发明化合物

可根据需要结合其他试剂以治疗其他感染或疾病或病症。

[0119] 术语“抗癌剂”是用于描述一化合物,其可与一种或多种包含本发明原始细胞的组合物一起配制,且可选地,治疗任何类型癌症,尤其是肝癌或宫颈癌等。能与本发明化合物配制的抗癌化合物包括,例如用于本发明的典型的抗癌剂包括,依维莫司、曲贝替定、紫杉醇蛋白质结合颗粒注射悬液(abraxane)、TLK286、AV-299、DN-101、帕唑帕尼、GSK690693、RTA744、ON0910、Na、AZD6244 (ARRY-142886)、AMN-107、TKI-258、GSK461364、AZD1152、enzastaurin、凡德他尼(vandetanib)、ARQ-197、MK-0457、MLN8054、PHA-739358、R-763、AT-9263、FLT-3 抑制剂、VEGFR 抑制剂、EGFR TK 抑制剂、极光激酶抑制剂、PIK-1 调节剂、Bcl-2 抑制剂、HDAC 抑制剂、c-MET 抑制剂、PARP 抑制剂、Cdk 抑制剂、EGFR TK 抑制剂、IGFR-TK 抑制剂、抗-HGF 抗体、PI3 激酶抑制剂、AKT 抑制剂、JAK/STAT 抑制剂、检测点-1 或 2 抑制剂、粘附斑激酶抑制剂、Map 激酶激酶(mek) 抑制剂、VEGF 捕获抗体、培美曲塞、埃罗替尼、达沙替尼(dasatinib)、尼罗替尼、德卡坦尼(decatanib)、帕尼单抗、氨柔比星、奥戈伏单抗、Lep-etu、洛拉曲克(nolatrexed)、azd2171、巴他布林(batabulin)、奥法木单抗、扎木单抗、伊朵堤卡林(edotecarin)、粉防己碱、鲁吡替康(rubitecan)、替米利芬、奥利默森(oblimersen)、ticilimumab、易普利姆玛(Ipilimumab)、棉酚、Bio111、131-I-TM-601、ALT-110、BI0140、CC8490、西仑吉肽、吉马替康、IL13-PE38QQR、IN01001、IPdR₁KRX-0402、硫蒽酮、LY317615、neuradiab、维特斯潘(vitespan)、Rta744、Sdx102、他仑帕奈、阿曲生坦、Xr311、罗咪酯肽、ADS-100380、舒尼替尼、5-氟尿嘧啶、伏立诺他(vorinostat)、依托泊苷、吉西他滨、阿霉素、阿霉素脂质体、5'-脱氧-5-氟尿苷、长春新碱、替莫唑胺、ZK-304709、塞利西利(seliciclib);PD0325901、AZD-6244、卡培他滨、L-谷氨酸、N-[4-[2-(2-氨基-4,7-二氢-4-氧-1H-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-基)乙基]苯甲酰]-、二钠盐、七水合物、喜树碱、PEG 标记的伊立替康、三苯氧胺、枸橼酸托瑞米芬、阿那曲唑、依西美坦、来曲唑、DES(乙烯雌酚)、雌甾二醇、雌激素、雌激素缀合物、贝伐单抗、IMC-1C11、CHIR-258、3-[5-(甲基磺酰基哌啶基甲基)-吡啶-2-基]喹诺酮、瓦他拉尼(vatalanib)、AG-013736、AVE-0005、[D-Ser(But)6,Azgly10]的醋酸盐(pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂醋酸盐[C₅₉H₈₄N₁₈O₁₄-(C₂H₄O₂)_x,其中,x=1到2.4]、醋酸戈舍瑞林、醋酸亮丙瑞林、羟萘酸曲普瑞林、醋酸甲羟孕酮、己酸羟孕酮、醋酸甲地孕酮、雷洛昔芬、比卡鲁胺、氟他胺、尼鲁米特(nilutamide)、醋酸甲地孕酮、CP-724714;TAK-165、HKI-272、埃罗替尼、拉帕替尼、卡拉替尼(canertinib)、ABX-EGF 抗体、爱必妥、EKB-569、PKI-166、GW-572016、Ionafernib、BMS-214662、替吡法尼;阿米福汀、NVP-LAQ824、辛二酰苯胺异羟肟酸、丙戊酸、曲古抑菌素A、FK-228、SU11248、索拉非尼、KRN951、氨鲁米特、安吡啶、阿那格雷、L-天冬酰胺酸酶、卡介苗(BCG)、博来霉素、布舍瑞林、白消安、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐、环丙孕酮、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素D、道诺霉素、乙烯雌酚、表柔比星、氟达拉滨、氟氢可的松、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、格列卫(gleevac)、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、亮丙瑞林、左旋四咪唑、洛莫司汀、氮芥、美法仑、6-巯基嘌呤、美司钠、氨甲蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特(nilutamide)、奥曲肽、奥沙利铂、帕米膦酸盐、喷司他丁、普卡霉素、卟吩姆钠(porfimer)、甲基苄肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链佐星、替尼泊苷、睾酮、沙利度胺、硫鸟嘌呤、噻替派、维甲酸、长春地辛、13-顺式视黄酸、苯丙氨酸氮芥、乌拉莫司汀、雌莫司汀、六甲蜜胺、氟

尿苷、5-脱氧尿苷(5-deoxyuridine)、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、脱氧助间型霉素、骨化三醇、戊柔比星、光神霉素、长春花碱、长春瑞滨、拓扑替康、razoxin、马立马司他、COL-3、新伐司他、BMS-275291、角鲨胺、内皮抑素、SU5416、SU6668、EMD121974、白介素-12、IM862、血管抑素、vitaxin、屈洛昔芬、idoxifene、螺内酯、非那雄胺、西咪替丁、曲妥单抗、白介素融合毒素(denileukin diftitox)、吉非替尼、硼替佐米(bortezomib)、紫杉醇、不含聚氧乙烯蓖麻油的紫杉醇、埃坡霉素 B、BMS-247550、BMS-310705、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、哌喷昔芬(pipendoxifene)、ERA-923、阿佐昔芬、氟维司群、阿考比芬、拉索昔芬、吡哌昔酚(idoxifene)、TSE-424、HMR-3339、ZK186619、托泊替康、PTK787/ZK222584、VX-745、PD184352、雷帕霉素、40-O- (2-羟乙基)-雷帕霉素、西罗莫司(temsirolimus)、AP-23573、RAD001、ABT-578、BC-210、LY294002、LY292223、LY292696、LY293684、LY293646、渥曼青霉素、ZM336372、L-779、450、PEG-非格司亭、达贝泊汀(darbepoetin)、红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、唑来膦酸、强的松、西妥昔单抗、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、组氨瑞林、PEG化干扰素 α -2a、干扰素 α -2a、PEG化干扰素 α -2b、干扰素 α -2b、阿扎胞苷、PEG-L-天冬酰胺酶、来那度胺、吉妥单抗、氢化可的松、白介素-11、右雷佐生、阿仑单抗、全反式维甲酸、酮康唑、白介素-2、甲地孕酮、免疫球蛋白、氮芥、甲基强的松龙、替伊莫单抗(ibrigitumomab tiuxetan)、雄激素、地西他滨、六甲嘧啶、蓓萨罗丁、托西莫单抗、三氧化二砷、可的松、editronate、米托坦、环孢霉素、柔红霉素脂质体、Edwina-天冬酰胺酶、锇89、卡索匹坦、奈妥匹坦、NK-1受体拮抗剂、帕洛诺司琼、阿瑞吡坦、苯海拉明、羟嗪、甲氧氯普胺、劳拉西泮、阿普唑仑、氟哌啶醇、氟哌利多、屈大麻酚、地塞米松、甲基强的松龙、普鲁氯嗪、格拉司琼、昂丹司琼、多拉司琼、托烷司琼、ss非格司亭(pegfilgrastim)、红细胞生成素、依泊汀 α 、达贝泊汀 α 和它们的混合物。

[0120] 术语“抗肝细胞癌剂”在整个说明书中用来描述一种抗癌剂，其可用于抑制、治疗或减少肝细胞癌或该癌症转移的可能性。用于本发明的抗癌剂包括例如，多吉美(索拉非尼)、舒尼替尼、贝伐单抗、特罗凯(埃罗替尼)、泰克泊(拉帕替尼)或它们的混合物。另外，其它抗癌剂也可以用于本发明，这类试剂能抑制癌症转移，特别是肝细胞癌的转移。

[0121] 术语“抗病毒剂”是用于描述生物活性剂/药物，其抑制病毒生长和/或加工，病毒包括突变株如耐药性病毒菌株。优选的抗病毒剂包括抗HIV剂、抗HBV剂和抗HCV剂。在本发明某些方面，尤其是以治疗肝癌为治疗对象中，考虑到乙型肝炎B病毒(HBV)和/或乙型肝炎C病毒(HCV)经常作为与肝细胞癌相关的原发或继发感染或疾病状态被发现，包含抗乙型肝炎C剂或抗乙型肝炎B剂时可结合其他传统的抗癌剂以有效治疗。抗HBV剂可用于本发明中，作为原始细胞中的货物组分或者在包括原始细胞群的药物组合中作为另外的生物活性剂，该抗HBV剂包括试剂例如贺维力(阿德福韦酯)、拉米夫定、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦、恩曲他滨、克拉夫定、伐托他滨、氨多索韦、帕拉德福韦、racivir、BAM205、硝唑尼特、UT231-B、Bay41-4109、EHT899、日达仙(胸腺素 α -1)和它们的混合物。用于本发明的典型的抗HCV剂包括试剂，例如，波西普韦(boceprevir)、daclatasvir、asunapavir、INX-189、FV-100、NM283、VX-950(特拉普韦(telaprevir))、SCH50304、TMC435、VX-500、BX-813、SCH503034、R1626、ITMN-191(R7227)、R7128、PF-868554、TT033、CGH-759、GI5005、MK-7009、SIRNA-034、MK-0608、A-837093、GS-9190、GS9256、GS9451、GS5885、GS6620、GS9620、GS9669、ACH-1095、ACH-2928、GSK625433、TG4040(MVA-HCV)、A-831、F351、NS5A、

NS4B、ANA598、A-689、GNI-104、IDX102、ADX184、ALS-2200、ALS-2158、BI201335、BI207127、BIT-225、BIT-8020、GL59728、GL60667、PSI-938、PSI-7977、PSI-7851、SCY-635、病毒唑、聚乙二醇化干扰素、PHX1766、SP-30 和它们的混合物。

[0122] 术语“抗 HIV 剂”是指一化合物，其抑制 HIV 病毒(I 和 / 或 II) 或其突变株的生长和 / 或加工。可作为本发明原始细胞中的货物的用于本发明的典型的抗 HIV 剂包括，例如，包括核苷酸逆转录酶抑制剂(NRTI)、其他非核苷酸逆转录酶抑制剂(即并非本发明代表性的那些)、蛋白酶抑制剂和融合抑制剂等，其示例性化合物可包括例如，3TC(拉米夫定)、AZT (齐多夫定)、(-)-FTC、ddI (地达诺新)、ddC (扎西他滨)、阿巴卡韦(ABC)、替诺福韦(PMPA)、D-D4FC (Reverset)、D4T (司他夫定)、Racivir、L-FddC、L-FD4C、NVP (奈韦拉平)、DLV (地拉夫定)、EFV (依法韦仑)、SQVM (甲磺酸沙奎那韦)、RTV (利托那韦)、IDV (茚地那韦)、SQV (沙奎那韦)、NFV (奈非那韦)、APV (安瑞那韦)、LPV (洛匹那韦)，融合抑制剂如 T20 等等，fuseon 以及它们的混合物。

[0123] 术语“靶向活性种类物质”用于描述化合物或部分，其复合或优选共价结合到本发明的原始细胞表面，其结合到待靶向细胞表面部分，使得原始细胞可选择性结合到靶细胞表面并将其内含物放置到细胞内。在本发明中使用的靶向活性种类物质优选是结合到靶细胞的靶向肽(在本文另有描述)、包括抗体或抗体片段的多肽、核酸配体或碳水化合物等。

[0124] 术语“靶向肽”是用于描述优选的靶向活性种类物质，其是结合到癌细胞的受体或其他多肽的特定序列的肽，其能使本发明原始细胞靶向到特定细胞，该特定细胞表达与靶向肽结合的肽(其是受体或其他功能性多肽)。在本发明中，示例性靶向肽包括例如 SP94 游离肽(H_2N -SFSIILTPILPL-COOH, SEQ ID NO:6)、用于与交联剂缀合的 C 末端半胱氨酸修饰的 SP94 肽(H_2N -SFSIILTPILPLGGC-COOH, SEQ ID NO:7)、修饰的 SP94 肽(H_2N -SFSIILTPILPLEEGGC-COOH, SEQ ID NO:8)或 MET 结合肽，本文另有描述。其他靶向肽在本领域内是众所周知的。靶向肽可复合或优选地通过使用交联剂共价结合到脂双层，本文另有描述。

[0125] 术语“MET 结合肽”或“MET 受体结合肽”是五(5)种 7-mer 肽，其在癌细胞表面结合 MET 受体，具有增强的结合效率。根据本发明，确定了具有不同氨基酸序列的几种小肽，其以不同特异性水平结合 MET 受体(又称为肝细胞生长因子受体，由 c-MET 基因表达)，并以不同的能力激活 MET 受体信号通路。用噬菌体展示生物淘选技术确定了 7-mer 肽，用获得的序列的实例证明了与 MET 受体从而与细胞如癌细胞的增强的结合性，该癌细胞(例如肝癌、卵巢癌和宫颈癌)表达高水平的 MET 受体，如下所示。在生物淘选过程中，几种最常观察到的序列的结合数据也呈现在本发明的实例部分。这些肽作为靶向配体用于细胞特异性治疗是特别有用的。但是，能够激活受体通路的肽本身或与其他治疗方法结合可具有另外的治疗价值。发现很多肽不仅结合肝细胞癌(其为原定靶标)，也可以结合到大量其他癌症包括卵巢癌和宫颈癌。在靶向或治疗各种与 MET 和相关受体表达相关的癌症和其他生理问题中，这些肽被认为具有广泛的适用性。

[0126] 以下五种 7mer 肽序列显示了与 MET 受体的实质性结合，在作为靶向肽用于本发明的原始细胞时尤其有用。

[0127]

ASVHFPP (Ala-Ser-Val-His-Phe-Pro-Pro)	SEQ ID NO:1
TATFWFQ (Thr-Ala-Thr-Phe-Trp-Phe-Gln)	SEQ ID NO:2
TSPVALL (Thr-Ser-Pro-Val-Ala-Leu-Leu)	SEQ ID NO:3
IPLKVHP (Ile-Pro-Leu-Lys-Val-His-Pro)	SEQ ID NO:4
WPRLTNM (Trp-Pro-Arg-Leu-Thr-Asn-Met)	SEQ ID NO:5。

[0128] 这些肽中的每一个可单独使用或与上述组中的其他 MET 肽或其他靶向肽一起使用,这些靶向肽有助于将本发明实例的原始细胞结合到癌细胞上,癌细胞包括肝癌细胞、卵巢癌细胞和宫颈癌细胞,以及其他许多癌细胞。这些结合肽也可作为 MET 结合肽单独用于药物化合物中,以治疗癌症或抑制肝细胞生长因子结合。

[0129] 术语“融合肽”和“内体裂解肽”同义用于描述肽,该肽可选并优选交联到本发明原始细胞的脂双层表面。融合肽纳入到原始细胞上以便于或有助于从内体本体(endosomal bodies)逃逸并便于将原始细胞引入到靶向细胞中以产生预期结果(治疗和/或诊断,本文另有描述)。用于本发明原始细胞的代表性和优选的融合肽包括 H5WYG 肽、H2N-GLFHAI AHFI HGGWHGLIHGWYGGC-COOH (SEQ ID NO:13) 或 8mer 多聚精氨酸(H₂N-RRRRRRRR-COOH, SEQ ID NO:14),以及其它本领域中的已知肽。

[0130] 术语“交联剂”是用于描述包含两个不同功能基团的不同长度的双功能化合物,其可用于将本发明的各种组分相互共价连接。本发明交联剂可包括两个亲电基团(以与寡核苷酸肽上的亲核基团反应,一个亲电基团和一亲核基团或者两个亲核基团)。交联剂长度可以不同,取决于待连接的组分和所需的相对灵活性。交联剂用于将靶向肽和/或融合肽锚定到磷脂双层上,用于将核定位序列连接到组蛋白来用于包装超螺旋质粒 DNA,在某些实例中,用于交联原始细胞脂双层中的脂质。有大量交联剂可用于本发明,许多可以在市场上买到或者在文献中找到。用于本发明的优选的交联剂包括,例如 1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳化二亚胺盐酸盐(EDC)、琥珀酰亚胺 4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸盐(SMCC)、N-[β-马来酰亚胺基丙酸]酰肼(BMPH)、NHS-(PEG)_n-马来酰亚胺、琥珀酰亚胺-[N-马来酰亚胺基丙酰氨基]-二十四乙二醇酯(SM (PEG)₂₄),以及琥珀酰亚胺 6-[3'-(2-吡啶二硫代)-丙酰胺基]己酸盐(LC-SPDP)等等。

[0131] 如上详述的,本发明的多孔纳米颗粒核心可包括至少具有一种尺寸的多孔纳米颗粒,例如宽度或直径为约 3000nm 或更小、约 1000nm 或更小、约 500nm 或更小、约 200nm 或更小。优选地,纳米颗粒核心是球形的,优选直径为约 500nm 或更小,更优选为约 8-10nm 至约 200nm。在实例中,多孔颗粒核心可具有各种不同的横截面,包括圆形、矩形、正方形或任何其他形状。在某些实例中,多孔颗粒核心具有的孔的平均孔径为约 2nm-约 30nm,但是根据本发明教导的各种实例,平均孔径和其他属性(例如多孔颗粒核心的孔隙度)并不受限。

[0132] 一般而言,本发明的原始细胞是生物相容的。药物和其他货物组分的装载通常是通过吸附和/或毛细管灌注(capillary filling)到颗粒核心的孔中,其重量可高达最终原始细胞(包含所有组分)的约 50%。在本发明的某些实例中,装载好的货物可从颗粒核心的多孔表面(介孔)释放,其中释放规律可通过例如孔尺寸、多孔颗粒核心的表面化学、系统 pH 值和/或多孔颗粒核心和本文通常描述的周围脂双层的相互作用来确定或调节。

[0133] 在本发明中,用于制备原始细胞的多孔纳米颗粒核心可调整为亲水的或者越来越疏水的(本文另有描述),并可进一步处理成提供更亲水的表面。例如,介孔二氧化硅颗粒可进一步用氢氧化铵和过氧化氢处理,以提供更高的亲水性。在本发明优选方面,脂双层融合到多孔颗粒核心上以形成原始细胞。本发明的原始细胞可包括各种重量比的各种脂质,优选包括 1,2-二油酰-sn-丙三基-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰-sn-丙三基-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二硬脂酰-sn-丙三基-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二油酰-sn-丙三基-3-[磷酸-L-丝氨酸](DOPS)、1,2-二油酰-3-三甲胺-丙烷(18:1DOTAP)、1,2-二油酰-sn-丙三基-3-二氧磷基-(1'-rac-甘油)(DOPG)、1,2-二油酰-sn-丙三基-3-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、1,2-二棕榈酰-sn-丙三基-3-磷脂酰乙醇胺(DPPE)、1,2-二油酰-sn-丙三基-3-磷脂酰乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](18:1PEG-2000PE)、1,2-二棕榈酰-sn-丙三基-3-磷脂酰乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](16:0PEG-2000PE)、1-油酰-2-[12-[(7-硝基-2-1,3-苯并噻二唑-4-yl)氨基]月桂酰]-sn-丙三基-3-磷酸胆碱(18:1-12:0NBD PC)、1-棕榈酰-2-[12-[(7-硝基-2-1,3-苯并噻二唑-4-yl)氨基]月桂酰]-sn-丙三基-3-磷酸胆碱(16:0-12:0NBD PC)、胆固醇及它们的混合物/组合。

[0134] 用于制备本发明原始细胞的脂双层可通过使用孔径为例如约 100nm 的过滤器挤出水化脂质膜制备,其使用本领域已知的标准方案或本文另有描述。然后,过滤后的脂双层膜与多孔颗粒核心融合,例如,通过吸管混合。在某些实例中,可使用过量的脂双层或脂双层膜形成原始细胞,以改善原始细胞的胶体稳定性。

[0135] 在某些诊断实例中,各种染料或荧光(报告子)分子可包括在原始细胞货物中(或者通过质粒 DNA 表达)或附到多孔颗粒核心和/或脂双层上,用于诊断目的。例如,多孔颗粒核心可以是二氧化硅核心或脂双层,并能够用 FITC (绿色荧光)共价标记,而脂双层或颗粒核心能够用 FITC 德克萨斯红(红色荧光)共价标记。然后,多孔颗粒核心、脂双层和形成的原始细胞能够通过例如共聚焦荧光技术观测到,用于诊断应用。另外,如本文讨论的,质粒 DNA 能用作本发明原始细胞中的货物,使得质粒可表达一种或多种荧光蛋白,如荧光绿蛋白或荧光红蛋白,其可用于诊断应用。

[0136] 在多种实例中,原始细胞用在协同系统中,其中装载有脂双层融合物或脂质体融合物(即多孔颗粒核心上),并用各种具有颗粒核心孔(介孔)的货物组分密封,因而形成一装载的原始细胞,可用于货物运输跨过脂双层的细胞膜,或者如果适用,可通过溶解多孔纳米颗粒运输货物。在某些实例中,除了融合单个脂双层(例如磷脂双层),具有相反电荷的多个双层能够相继融合到多孔颗粒核心上以进一步影响货物装载和/或密封以及最终的原始细胞的释放特性。

[0137] 融合或协同装载机制可用于货物运输。例如,通过多孔颗粒上的脂质体融合,货物可协同装载、封装或密封。货物可包括例如,小分子药物(例如,尤其包括抗癌药物和/或抗病毒药物如抗 HBV 或抗 HCV 药物)、肽、蛋白、抗体、DNA (尤其是质粒 DNA,包括优选的组蛋白包装的超螺旋质粒 DNA)、RNA (包括 shRNA 和 siRNA (其也可通过作为货物进入到原始细胞内的质粒 DNA 表达)、荧光染料,包括荧光染色肽,其可通过进入到原始细胞内的质粒 DNA 表达。

[0138] 根据本发明实例,货物可装载进多孔颗粒核心的孔(介孔)中,以形成装载的原始细胞。在各种实例中,任何开发用于基于脂质体药物运输的传统技术,能够转移和应用到本

发明原始细胞上,例如使用 PEG 修饰的靶向运输。

[0139] 如上所讨论的,静电和孔径在货物装载中发挥作用。例如,多孔二氧化硅纳米颗粒可携带负电荷,而孔径能够在约 2nm 至约 10nm 之间调节。带有负电荷的纳米颗粒具有吸附带正电荷的分子的自然倾向,而带正电荷的纳米颗粒具有吸附带负电荷的分子的自然倾向。在各个实例中,其他属性例如表面可湿润性(例如疏水性)也能影响具有不同疏水性的货物的装载。

[0140] 在多个实例中,通过调整脂质的组成,货物装载可以是脂质辅助的协同装载。例如,如果货物组分是一带负电荷分子,可通过脂质辅助装载,将货物装载进带负电荷的二氧化硅中。例如,在某些实例中,当脂双层融合到二氧化硅表面上,带负电的物质能够作为货物装载进带负电二氧化硅颗粒的孔中,显示出融合和协同装载机制。用这种方式,带非负电荷(即带正电荷或不带电)的脂双层或脂质体在带负电荷的介孔颗粒上的融合能够用于将带负电荷的货物组分装载到颗粒核心。带负电荷的货物组分能够在已装载的原始细胞中浓缩,与在溶液中的带电的货物组分相比,其浓度超过约 100 倍。在其他实例中,通过改变介孔颗粒的电荷和脂双层,带正电荷的货物组分可较容易地装载进原始细胞中。

[0141] 一旦生成,装载后的原始细胞能进行细胞摄取,用于在给药后将货物运输进所需位点内。例如,可用装载货物的原始细胞对患者或对象进行给药,包含靶向肽的原始细胞能结合到靶细胞,并被靶细胞例如对象或患者体内的癌细胞内化或摄入。由于装载货物的原始细胞在靶细胞内的内化作用,货物组分接着能运输到靶细胞内。在某些实例中,货物是小分子,其可直接运输到靶细胞中用于治疗。在其他实例中,带负电的 DNA 或 RNA(包括 shRNA 或 siRNA),尤其包括 DNA 质粒,能够直接运输到靶细胞并被其内化,该 DNA 质粒优选是组蛋白包装的超螺旋质粒 DNA,并优选核定位序列修饰。因此, DNA 或 RNA 能首先装载进原始细胞中,然后进入靶细胞,然后通过装载后的原始细胞的内化通过靶细胞。

[0142] 如前所述,装载进原始细胞,并通过其运输到靶细胞的货物包括小分子或药物(尤其是抗癌剂或抗 HBV 和 / 或抗 HCV 剂)、生物活性大分子(生物活性多肽例如蓖麻毒素 A 链或者白喉毒素 A 链或 RNA 分子如 shRNA 和 / 或 siRNA,本文另有描述)或组蛋白包装的超螺旋质粒 DNA,其能表达治疗性或诊断性肽,或治疗性 RNA 分子如 shRNA 或 siRNA,其中组蛋白包装的超螺旋质粒 DNA 可选并优选核定位序列修饰,该序列能够定位并使运输到靶细胞核内的质粒 DNA 浓缩。像这样,装载后的原始细胞能将其货物运输进靶细胞内用于治疗或诊断。

[0143] 在本发明多种实例中,原始细胞和 / 或装载后的原始细胞能提供一靶向运输方法,用于将原始细胞或货物组分选择性运输到靶细胞(如癌细胞)内。例如,一脂双层表面能通过与靶细胞相应的靶向活性种类物质修饰。靶向活性种类物质可以是一靶向肽(在本文另有描述)、一包括抗体或抗体片段的多肽、一核酸配体或碳水化合物或结合到靶细胞的其他部分。在本发明优选方面,靶向活性种类物质是一本文另有描述的靶向肽。在某些实例中,优选的肽靶向活性种类物质包括 MET 结合肽,在本文另有描述。

[0144] 例如,通过在装载后的原始细胞的表面上提供靶向活性种类物质(优选为靶向肽),按照本发明教导,原始细胞选择性结合到靶细胞上。在一个实例中,通过将靶向癌细胞(包括肝癌细胞)的示范性靶向肽 SP94 或类似物或 MET 结合肽(本文另有描述)与脂双层结合,由于示范性 SP94 或 MET 结合肽对癌(包括肝癌)细胞的特异性靶向,大量装载货物的原

始细胞能被这种特异性癌细胞识别和内化。在大多数情况下,如果原始细胞与靶向肽结合,该原始细胞将选择性结合到癌细胞,并且没有明显的结合到非癌细胞。

[0145] 一旦被靶细胞结合和摄入,装载后的原始细胞能从多孔颗粒释放货物组分并将释放的货物组分运输到靶细胞。例如,被多孔颗粒核心上脂质体融合双层密封在原始细胞内的货物组分能够从脂双层的孔中释放,运输跨过脂双层的原始细胞膜,并运输到靶细胞内。在本发明实例中,与只是用本领域已知的脂质体相比,货物组分在原始细胞中的释放规律更加可控。货物释放可通过例如多孔核心和脂双层之间的相互作用,和/或其他参数例如系统 pH 值确定。例如,货物的释放可通过脂双层,可通过多孔二氧化硅的溶解实现;而货物从原始细胞的释放可以是 pH 依赖的。

[0146] 在某些实例中,货物 pH 值通常小于 7,优选约 4.5 至约 6.0,但可以是约 pH14 或更少。与高 pH 相比,较低的 pH 往往明显有利于货物组分的释放。较低的 pH 往往是有利的,这是因为大多数细胞内的内体隔间的 pH 较低(约 5.5),但是货物在细胞内的运输速率可被货物 pH 影响。取决于货物和货物从原始细胞释放的 pH,货物可释放较短时间(几小时到大约一天)或在从几天到约 20-30 天或更长的时间跨度内释放。因此,本发明可从原始细胞本身提供立即释放和/或持续释放的应用。

[0147] 在某些实例中,可包括表面活性剂以快速使脂双层破裂,将货物组分运输通过原始细胞脂双层以及靶细胞。在某些实例中,能够通过应用/释放表面活性剂如十二烷基硫酸钠(SDS)等,使原始细胞的磷脂双层破裂,以促进货物从原始细胞快速释放到靶细胞内。在某些实例中,脂双层的破裂能反过来引起货物组分从原始细胞颗粒核心的孔中立即和完全释放。在这种方式中,与本领域其他运输系统相比,原始细胞平台可提供多功能的运输系统。例如,与只使用纳米颗粒的运输系统相比,本发明公开的原始细胞平台能提供一简单系统并利用了脂质体或脂双层的低毒性和免疫原性,以及它们能够进行 PEG 修饰或结合以延长循环时间并产生靶向作用的能力。在另一实例中,与只使用脂质体的运输系统相比,原始细胞平台能提供一更稳定系的统并能利用介孔控制装载和/或释放规律。

[0148] 另外,脂双层和其在多孔颗粒核心上的融合能够进行微调以控制装载、释放和靶向规律,并能进一步包含融合肽和相关肽以促进原始细胞的运输,用于获得更好的治疗和/或诊断效果。进一步,原始细胞的脂双层能提供一流动界面,用于配体展示和多价靶向,由于在流动脂质界面上的配体识别能力,其能够在相对较低表面配体密度下进行特异性靶向。而且,本发明公开的原始细胞可容易地进入靶细胞,而没有多孔颗粒支撑的空脂质体不能被细胞内化。

[0149] 本发明的药物组合物包含有效的原始细胞群(本文另有描述),制备该细胞群以产生预期的结果(例如,治疗结果和/或诊断分析,包括治疗监测),并结合药学上可接受的载体、添加剂或赋形剂。在组合物群中的原始细胞可以是相同或不同的,这取决于想要获得的结果。本发明的药物组合物也可包含另外的生物活性剂或药物,例如抗癌剂或抗病毒剂,例如,抗 HIV、抗 HBV 或抗 HCV 剂。

[0150] 一般地,复合物(compound)的给药剂量和方式是根据标准药学操作,按照对象的大小和状况来确定的。采用的剂量水平可以很广泛,并且本领域技术人员可容易地确定。通常,采用毫克到克的量。可以通过多种方式来对患者给药组合物,例如,口服、经皮、神经外膜下(perineurally)或胃肠外给药,即静脉注射、皮下注射、腹腔注射、鞘内注射或肌肉注

射等,包括口腔给药、直肠给药和经皮给药。本发明的方法可治疗的设想的对象包括人类、宠物、实验动物等。本发明设想立即和 / 或持续性 / 可控释放组合物,包括同时包含立即和持续释放制剂的组合物。当不同原始细胞群用于该药物组合物时或当生物活性剂结合一种或更多原始细胞群(本文另有描述)时尤其如此。

[0151] 本发明的包含复合物的配方可以是液体、固体、半固体或冻干粉形式,例如,溶液、悬浮液、乳液、持续释放制剂、药丸、胶囊、粉末、栓剂、乳剂、软膏、洗剂、气雾剂、贴剂等等,最好是以适合精确剂量的简单给药的单位剂量形式。

[0152] 本发明药物成分通常包括一传统药物载体或赋形剂,并可另外包括其他药剂、载体、佐剂、添加剂等。最好是,组合物占本发明复合物重量的约 0.1% 至约 85%、大约 0.5% 至约 75%,剩下的主要是合适的药物赋形剂。

[0153] 用于肠胃外给药(例如静脉、肌肉、鞘内)的可注射组合物通常包括在合适的 i. v. 溶液例如无菌生理盐水中的复合物。组合物也可作为水乳浊液的悬浮液制备。

[0154] 可将原始细胞群(约 0.5% 至约 20% 重量或更多)和可选的药物佐剂溶解或分散在载体例如盐溶液、葡萄糖溶液、甘油或乙醇中从而形成溶液或悬浮液来制备液体组合物。用于口服液体制剂,组合物可制备成溶液、悬浮液、乳液或糖浆,通过液体形式或适合在水或生理盐水中水化的干物质形式提供。

[0155] 用于口服时,这类赋形剂包括药品级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、明胶、蔗糖、碳酸镁等。如果需要,组合物还可包含少量非毒性辅助物质,如湿润剂、乳化剂或缓冲液。

[0156] 当组合物使用固体制剂形成进行口服给药时,制剂可以是药片、颗粒、粉末、胶囊等。在药片制剂中,组合物通常用添加剂制备,添加剂例如赋形剂如糖类或纤维素制剂、粘合剂如淀粉糊或甲基纤维素、填充剂、崩解剂或其他通常用于医药制剂制备的添加剂。

[0157] 用于制备这些剂量形式的方法是已知的,或对于本领域技术人员是显而易见的;例如,见 Remington's Pharmaceutical Sciences (《雷明登氏药理学全书》)(17th Ed., Mack Pub. Co., 1985)。待给药的组合物含药学上有效量的定量的选定复合物,用于在生物系统包括本发明的患者或对象中进行治疗。

[0158] 治疗有需要的患者或对象的特定疾病状态或感染(特别是包括癌症和 / 或 HBV、HCV 或 HIV 感染)的方法,包括给予一有效量的药物组合物,根据本发明,该组合物包含治疗性原始细胞和可选的至少一种另外的生物活性(如抗病毒)剂。

[0159] 本发明的诊断方法包括给予需要的患者(疑似患有癌症的患者)一有效量的诊断性原始细胞群(如包含靶向种类物质例如选择性结合到癌细胞的靶向肽和指示原始细胞结合到癌细胞(癌细胞存在时)的报告子组分的原始细胞),因此,原始细胞结合到癌细胞,如由报告子组分(部分)证实的,其能够诊断患者体内癌症的存在。

[0160] 本发明诊断方法的替代法可用于监测患者体内癌症或其他疾病状态的治疗,该方法包括在治疗前给予患者或对象一有效量的诊断性原始细胞群(例如,包含靶向种类物质例如选择性结合到癌细胞或其他靶细胞的靶向肽和指示原始细胞结合到癌细胞(癌细胞存在时)的报告子组分的原始细胞),确定诊断性原始细胞结合到所述患者体内靶细胞的水平,在治疗过程中和 / 或之后,确定诊断性原始细胞结合到所述患者体内靶细胞的水平,因此,在开始治疗之前和治疗过程中和 / 或之后的结合差异能证实在患者体内治疗的有效

性,包括患者是否完全治愈或者疾病状态是否被抑制或消除(包括缓解癌症)。

[0161] 以下的非限制性实例用于阐明本发明及其优势,在任何情况下不应看做对本公开内容或权利要求的限制。在该实例中,以及本申请的其他地方,所有部分和百分率都按重量计,除非另有说明。

[0162] 实例

[0163] 如下面实例所提供的,通过将脂质体和纳米多孔二氧化硅颗粒融合而形成的多孔纳米颗粒支撑脂双层(原始细胞)是一种新型纳米载体,其解决了与癌症治疗和诊断的靶向运输有关的多个难题。像脂质体那样,原始细胞是生物相容的、可生物降解的以及非免疫原性的,但是与相似尺寸的脂质体运输剂相比,原始细胞的纳米多孔二氧化硅核心提供了大幅增强的货物容量和延长的脂双层稳定性。而且,核心的多孔性和表面化学能够被调节从而促进多种治疗剂,如药物、核酸和蛋白毒素的封装。货物的释放速率可以通过孔尺寸和二氧化硅浓缩(condensation)的整体程度进行控制,使得原始细胞在需要突发或可控的药物释放特征的应用中非常有用。最后,原始细胞的支撑脂双层(SLB)能够用配体进行修饰,从而促进选择性运输,以及用 PEG 修饰从而延长循环时间。在实例中,发明人报告了多肽靶向原始细胞的使用以实现高特异性运输质粒,该质粒编码小发夹 RNA (shRNA),其通过使细胞周期蛋白 B1 表达沉默,从而诱导被转染细胞的生长停滞和凋亡。如下述实例部分所陈述的,发明人已使用双表面活性剂方法制备合成的二氧化硅纳米颗粒,其具有足够大的孔来容纳组蛋白包装的质粒。非离子表面活性剂(Pluronic® F-127)在与膨胀剂(1, 3, 5- 三甲基苯)结合使用时,其作为大孔的模板,而氟碳表面活性剂(FC-4)促进了二氧化硅核心的生长。获得的颗粒直径为约 100nm-300nm,并包含具有 17.3nm 孔入口的 20nm 孔的有序网络。超螺旋质粒 DNA 用组蛋白包装,获得的复合物(直径约 15nm)在装载进二氧化硅核心之前用核定位序列(NLS)修饰。在 37°C 下,封装的 DNA 暴露在模拟体液中时,脂质体与纳米多孔核心的融合促进了封装的 DNA 的长期保留(>1 个月)。利用噬菌体展示,发明人确定了对肝细胞生长因子受体(c-Met)具有纳摩尔亲和力的靶向肽,已知肝细胞生长因子受体被各种类型肝细胞癌(HCC)过度表达。装载有 DNA- 组蛋白-NLS 复合物并用每种 240 拷贝(“240copies”)的靶向肽和融合肽修饰的原始细胞能够转染分裂和非分裂的 HCC;该融合肽促进原始细胞和封装的 DNA 的内体逃逸。此外,靶向原始细胞有效诱导 HCC 的 GJM 期生长停滞和凋亡(LC, =25nM)而不会影响非癌细胞,包括肝细胞、内皮细胞和免疫细胞(PBMCs、B 细胞和 T 细胞)的活力。

[0164] 方法

[0165] 使用气溶胶辅助挥发诱导自组装方法(EISA)或在油包水(water-in-oil)乳滴中使用溶剂抽提驱动自组装法¹,由水溶性二氧化硅前体和两性表面活性剂的均质混合物制备出形成原始细胞核心的纳米二氧化硅颗粒,如前文所述^{1,2}(也见 Ashley, et al., Nature Materials, 2011, May;10 (5):389-97)。溶剂蒸发或抽提浓缩了表面活性剂中的气溶胶或乳滴,该气溶胶或乳滴引导了周期性的有序的结构形成,二氧化硅在该结构周围聚集和浓缩。表面活性剂通过加热锻烧去除,获得具有明确的、统一孔径和拓扑结构的多孔纳米颗粒。通过气溶胶辅助的 EISA 形成的颗粒(“单峰”颗粒)具有约 120nm 的平均直径(在基于尺寸排除的分离之后),其 Brunauer-Emmer-Teller (BET) 比表面积超过 1200m²/g,孔体积分数(fraction)为约 50%,以及具有一直径为 2.5nm 的单峰孔。在乳滴中形成的颗粒(“多

峰”颗粒)具有约 150nm 的平均直径(在基于尺寸排除的分离之后), $>600\text{m}^2/\text{g}$ 的 BET 比表面积,约 65% 的孔体积分率,和多峰孔结构,该多峰孔结构由大的(20-30nm)、表面可进入的孔(通过 6-12nm 孔互连)构成。与气溶胶或乳液处理(分别)相关的液体-蒸气或液-液界面张力使得球面具有最小的表面粗糙度。此外,这两种类型的颗粒,具有完全可以进入的三维孔隙网络,通过氮吸附等温线分析证明了这一点。

[0166] 大的孔体积、表面积和二氧化硅核心的可进入性赋予了一大的货物容量并能够快速装载多种类型的治疗和诊断剂。单峰纳米多孔核心容纳低分子量化学治疗剂的容量大;而多峰核心拥有大的表面可进入的孔,其在封装 siRNA、蛋白质毒素和其它高分子量货物(例如质粒 DNA)时是必需的。通过二氧化硅核心的浓缩程度可精确控制货物释放速率。将各种数量的 AEPTMS、一含氨基的硅烷纳入到用于形成纳米多孔二氧化硅核心的溶胶中,降低了可实现的浓缩水平并促进了核心在中性 pH、高离子强度(即细胞质基质的)条件下更快速的溶解。不包含 AEPTMS 的颗粒在模拟体液中超过两周之后溶解,而包含 30mol%AEPTMS 的颗粒在 24 小时之内溶解。因此,原始细胞可被调整用于需要持续性或突发性释放特征的应用中。

[0167] 将 AEPTMS 纳入到用于形成纳米二氧化硅颗粒的前体溶胶中,在细胞质条件下加速了颗粒溶解并促进了封装货物更快速的释放(与通过简单溶解实现的释放相比)。AEPTMS 修饰的颗粒还对于弱碱性化学治疗药物(如阿霉素)容量减小。因此,为了最大程度地提高容量和细胞内释放,我们描述了 zeta 电位、货物(例如药物(阿霉素/DOX)/化疗)容量、硅溶解速率和货物释放率作为 AEPTMS 浓度的函数。如先前所表明的那样,没有修饰的单峰颗粒($\zeta = -104.5 \pm 5.6$)货物容量大(在 DOX 的情况下,约 $1.8\text{mM}/10^{10}$ 颗粒),但在 24h 内(即典型的 HCC 翻倍时间)只释放封装货物(药物)的 20%。相反,用 30wt%AEPTMS ($\zeta = 88.9 \pm 5.5$)修饰的单峰颗粒在 6 小时内释放所有的封装货物(药物),但具有减少的药物(DOX)容量(约 $0.15\text{mM}/10^{10}$ 颗粒)。含 15wt%AEPTMS ($\zeta = -21.3 \pm 5.1$)的单峰颗粒保留了较高的药物(DOX)容量(约 $1.1\text{mM}/10^{10}$ 颗粒)并在暴露于模拟体液中时在 24h 内几乎释放了所有的封装货物(药物);因此,这些颗粒被选择用于涉及货物运输的所有实验中。重要的是要注意到,尽管单峰二氧化硅颗粒的 zeta 电位作为 AEPTMS 浓度的函数增加,AEPTMS 修饰的颗粒的孔体积分率(包含 30wt%AEPTMS 的颗粒约为 45%)并没有与未修饰颗粒(约 50%)有实质不同。因此,我们将 AEPTMS 修饰的单峰颗粒的货物容量减少归因于静电排斥而不是孔体积减少。多峰颗粒用于对照,以阐明孔径对货物容量和货物释放动力学的影响。

[0168] 常用试剂

[0169] 纯乙醇、盐酸(37%)、正硅酸乙酯(TEOS,98%)、3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES, $\geq 98\%$)、3-[2-(2-氨基乙基氨基)乙基氨基]丙基三甲氧基硅烷(AEPTMS,工业级)、2-氰乙基三乙氧基硅烷(CETES, $\geq 97\%$)、十六烷基三甲铵溴(CTAB, $\geq 99\%$)、Brij[®]-56、十二烷基磺酸钠(SDS, $\geq 98.5\%$)、Triton[®] X-100、十六烷($\geq 99\%$)、阿霉素盐酸盐($\geq 98\%$)、5-氟尿嘧啶($\geq 99\%$)、顺糖氨铂(II)二氯化物(顺铂, $\geq 99.9\%$)、来自白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)的白喉毒素、来自多孔木霉(*Tolypocladium inflatum*)的环孢霉素 A (CsA, $\geq 95\%$)、N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC, $\geq 99\%$)、人表皮生长因子、L- α -磷脂酰乙醇胺、胸苷($\geq 99\%$)、次黄嘌呤($\geq 99\%$)、牛纤维连接蛋白、牛胶原蛋白 I 型、明胶、大豆胰蛋白酶抑制

剂($\geq 98\%$)、2- 巯基乙醇($\geq 99\%$)、DL- 二硫苏糖醇($\geq 99.5\%$)、二甲亚砜($\geq 99.9\%$)、pH5 柠檬酸缓冲液、乙二胺四乙酸(EDTA, (99.995%)、4- (2- 羟乙基) 哌嗪-1- 乙磺酸(HEPES, $\geq 99.5\%$)、磷酸氢二铵($\geq 99.99\%$)和 Sepharose[®] CL-4B 从 Sigma-Aldrich 购买(圣路易斯, 密苏里州)。ABIL[®] EM90 (十六基 PEG/PPG-10/1 二甲聚硅氧烷)购自 Evonik Industries (德国埃森)。超纯、EM 级甲醛(16%, 不含甲醇)从 Polysciences Inc. (沃灵顿, 宾夕法尼亚州)购买。Hellmanex[®] II 购自 Hellma (米尔海姆、德国)。

[0170] 脂质

[0171] 1, 2- 二油酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸胆碱(DOPC)、1, 2- 二棕榈酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸胆碱(DPPC)、1, 2- 二硬脂酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸胆碱(DSPC)、1, 2- 二油酰 -3- 三甲胺 - 丙烷(18:1DOTAP)、1, 2- 二油酰 -sn- 丙三基 -3- 二氧磷基 - (1'-rac- 甘油)(DOPG)、1, 2- 二油酰 -sn- 丙三基 -3- 磷脂酰乙醇胺(DOPE)、1, 2- 二棕榈酰 -sn- 丙三基 -3- 磷脂酰乙醇胺(DPPE)、1, 2- 二油酰 -sn- 丙三基 -3- 磷脂酰乙醇胺 -N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000] (18:1PEG-2000PE)、1, 2- 二棕榈酰 -sn- 丙三基 -3- 磷脂酰乙醇胺 -N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000] (16:0PEG-2000PE)、1- 油酰 -2-[12-[(7- 硝基 -2-1, 3- 苯并噻二唑 -4-yl) 氨基] 月桂酰] -sn- 丙三基 -3- 磷酸胆碱(18:1-12:0NBD PC)、1- 棕榈酰 -2-[12-[(7- 硝基 -2-1, 3- 苯并噻二唑 -4-yl) 氨基] 月桂酰] -sn- 丙三基 -3- 磷酸胆碱(16:0-12:0NBD PC) 和胆固醇购自 Avanti Polar Lipids, Inc. (阿拉巴斯特, 阿拉巴马州)。

[0172] 细胞系和生长培养基

[0173] 人 Hep3B (HB-8064)、人类肝细胞(CRL-11233)、人外周血单核细胞(CRL-9855)、人类脐带静脉内皮细胞(CRL-2873)、T 淋巴细胞(CRL-8293)、B 淋巴细胞(CCL-156)、伊格尔氏最低必需培养基(EMEM)、达尔贝可氏改良伊格尔氏培养基(DMEM)、伊斯考夫氏改良达尔贝可氏培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (IMDM)、RPMI1640 培养基、胎牛血清(FBS) 和 1x 胰蛋白酶-EDTA 溶液(0.25% 胰蛋白酶与 0.53mM EDTA) 从美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection) 购买(ATCC; 马纳萨斯、弗吉尼亚州)。BEGM Bullet 试剂盒购自 Lonza Group Limited (Clonetics; 沃克斯维尔, 马里兰州)。不含酚红的 DMEM 购自 Sigma-Aldrich (圣路易斯, 密苏里州)。

[0174] 荧光染料和显微镜用试剂

[0175] Hoechst33342 (350/461)、4', 6- 二甲脒基 -2- 苯基 吡 啶 (DAPI, 356/451)、Alexa Fluor[®] 405 羧酸、琥珀酰亚胺酯(401/421)、CellTracker[™] Violet BMQC (415/516)、CellTracker[™] Green CMFDA (492/517)、钙黄绿素(495/515)、Alexa Fluor[®] 488 结合膜联蛋白 V(495/519)、Alexa Fluor[®] 488 山羊抗小鼠 IgG(H+L)(495/519)、Click-iT[®] AHA Alexa Fluor[®] 488 蛋白合成 HCS 分析(495/519)、LIVE/DEAD[®] 可修复绿色死细胞染色试剂盒(495/519)、SYTOX[®] 绿色核酸染色剂(504/523)、MitoSOX[™] 红色线粒体超氧化指示剂(510/580)、Alexa Fluor[®] 532 羧酸、琥珀酰亚胺酯(532/554)、碘化丙啶(535/617)、pHrodo[™] 琥珀酰亚胺酯(558/576)、CellTracker[™] Red CMTPX (577/602)、Texas Red[®] 1, 2- 二十六酰 -sn- 丙

三基-3- 磷脂酰乙醇胺(Texas Red[®] DHPE, 583/608)、Alexa Fluor[®] 647 酰肼(649/666)、Alexa Fluor[®] 647 羧酸、琥珀酰亚胺酯(650/668)、Ulysis[™] Alexa Fluor[®] 647 核酸标记试剂盒(650/670)、Alexa Fluor[®] 647 结合膜联蛋白 V (650/665)、Slow Fade[®] Gold 系列抗荧光淬灭剂(含有或不含 DAPI)、Image-iT[®] FX 信号增强剂、1X 达尔贝可氏磷酸盐缓冲盐水(D-PBS)、牛白蛋白组份 V (BSA, 7.5%)和转铁蛋白购自 Invitrogen Life Sciences (卡尔斯巴德, 加州)。红色荧光蛋白(RFP, 557/585)、CaspGLOW[™] 荧光活性的半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶 3 染色试剂盒(485/535)和 CaspGLOW[™] 红色活性半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶 8 染色试剂盒(540/570)购自 BioVision, Inc. (加州的山景城)。水溶性 CdSe/ZnS 量子点、CZWD640 (640/660) 购自 NN-Labs (费耶特维尔, 阿肯色州)。

[0176] 交联剂

[0177] 1- 乙基-3-[3- 二甲基氨基丙基] 碳化二亚胺盐酸盐(EDC)、琥珀酰亚胺 4-[N- 马来酰亚胺基甲基] 环己烷-1- 羧酸盐(SMCC)、N-[β - 马来酰亚胺基丙酸] 酰肼(BMPH)、琥珀酰亚胺-[N- 马来酰亚胺基丙酰氨基]- 二十四乙二醇] 酯(SM (PEG)₂₄)、琥珀酰亚胺 6-[3'- (2- 吡啶二硫代)- 丙酰胺基] 己酸盐(LC-SPDP)以及巯基添加试剂盒购自 Pierce Protein Research Products (Thermo Fisher Scientific LSR ;罗克福德, 伊利诺伊州)。

[0178] 其他硅纳米微粒

[0179] 5nm 以下硅纳米颗粒从 Meliorum Technologies, Inc. 购买(罗切斯特, 纽约)。10-20nm 二氧化硅纳米颗粒从 SkySpring Nanomaterials, Inc. 购买(得克萨斯州的休斯顿)。30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、150nm、200nm 和 10 μ m 二氧化硅颗粒从 Discovery Scientific, Inc. 购买(不列颠哥伦比亚省的温哥华)。

[0180] 合成的 siRNA 和肽

[0181] 沉默子(Silencer) 选择 siRNAs (EGFR、VEGFR-2 和 PDGFR- α 的 siRNA 标识部分分别为 s565、s7824 和 s10234) 购自 Ambion, Inc. (德克萨斯州奥斯汀)。具有 5' 氨基修饰剂 C12 的双链 DNA 寡核苷酸(5' -AAACATGTGGATTACCCATGTC-3') 购自 Integrated DNATechnologies (IDT ;科勒尔维尔, 爱荷华州)。“游离”的 SP94 肽(H₂N-SFSIILTPILPL-COOH, SEQ ID NO:6)、C 末端半胱氨酸修饰的用于缀合的 SP94 肽(H₂N-SFSIILTPILPLGGC-COOH, SEQ ID NO:7)、图 2d 补充实验中使用的 SP94 肽(H₂N-SFSIILTPILPLEEGGC-COOH, SEQ ID NO:8)由 New England Peptide (加德纳, 马萨诸塞州)合成。H5WYG 肽(H₂N-GLFHAIAHFIHGGWHGLIHGWYGGGC-COOH)和核定位序列(H₂N-NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGYGGC-COOH)由 Biopeptide Co. Inc. 合成(圣地亚哥, 加州)。肽的加粗部分是原始序列 ;加入另外的氨基酸残基是为了结合或标记目的。所有抗体(CHALV-1、抗 Rab11a、抗 LAMP-1、抗 EGFR、抗 VEGFR-2、抗 PDGFR- α)购自 Abcam, Inc. (马塞诸塞州剑桥市)。

[0182] 细胞培养条件

[0183] HEP3b、肝细胞、PBMCs、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞都是从 ATCC 获得并根据制造商的指示进行培养。简而言之, Hep3B 维持在含 10%FBS 的 EMEM 中。肝细胞生长在锥形瓶中, 覆盖有 BSA、纤连蛋白和牛胶原蛋白 I 型 ;使用的培养基是含有 5ng/mL 表皮生长因子、70ng/mL 磷脂酰乙醇胺和 10%FBS 的 BEGM(从 BEGM Bullet 试剂盒中除去庆大霉素、两性霉素和肾

上腺素)。HUVEC 生长在含有 20%FBS 的 DMEM 中;明胶覆盖的锥形瓶用于促进粘附性。PBMC、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞都维持在悬浮锥形瓶中(Greiner Bio-One;北卡罗来纳州门罗)。PBMC 生长在补充了 0.02mM 胸苷、1mM 次黄嘌呤、0.05mM 2-巯基乙醇和 10%FBS 的 IMDM 中。T 和 B 淋巴细胞分别生长在含有 20%FBS 的 IMDM 中和含有 20%FBS 的 RPMI 中。所有细胞都维持在 37℃ 的加湿环境中(空气补充 5%CO₂)。黏附细胞用 0.05% 胰蛋白酶以 1:3 的传代培养比例进行传代培养,非粘附细胞在 2×10^5 细胞/mL 的密度下接种,并维持在 $1-5 \times 10^6$ 细胞/mL。

[0184] 纳米二氧化硅颗粒的合成和鉴定

[0185] 单峰二氧化硅纳米颗粒的合成

[0186] Lu 等人已经描述了使用气溶胶辅助挥发诱导自组装方法来制备具有单峰孔隙度的纳米多孔二氧化硅颗粒²。简而言之,一同质溶胶含有二氧化硅前体(TEOS)、结构导向的表面活性剂(CTAB,其起始浓度远小于临界胶团浓度,或 CMC)以及溶解在水和乙醇溶液中的 HCl,使用改良的商用气雾剂(Model 9302A;TSI, Inc.;明尼苏达州圣保罗)使其气雾化。使用氮气作为载气,所有加热区保持在 400℃,使溶剂蒸发掉,提高表面活性剂有效浓度。小孔压降是 20psi。颗粒收集在维持于 80℃ 的 Durapore 膜过滤器上(Millipore;马塞诸塞州比勒利卡)。一典型反应混合物包含 55.9mL 的去离子 H₂O、43mL 的无水乙醇(200-proof ethanol)、1.10mL 的 1.0N HCl、4.0g CTAB 和 10.32g TEOS。为了制备在细胞内条件下(中性 pH、盐浓度相对较高)更快溶解的纳米多孔二氧化硅颗粒,将各种量的 TEOS 和 AEPTMS、一含氨基硅烷纳入到前体溶胶中,用浓盐酸将系统 pH 值调节至 2.0。例如,为制备含 15wt%AEPTMS 的颗粒,使用 9.36g TEOS 和 1.33g AEPTMS。

[0187] 多峰二氧化硅纳米颗粒的合成

[0188] Carroll 等人已经描述了使用乳液处理来合成具有多峰孔隙度的纳米多孔二氧化硅颗粒¹。简而言之,在 20g 去离子水中加入 1.82g CTAB (可溶于水相),在 40℃ 搅拌直至溶解,并待其冷却至 25℃。向 CTAB 溶液中加入 0.57g 1.0N HCl、5.2g TEOS 和 0.22g NaCl,将获得的溶胶搅拌 1 小时。制备由具有 3wt%Abil EM90 (可溶于油相的非离子乳化剂)的十六烷组成的油相。前体溶胶在 1000mL 圆底锥形瓶中与油相(溶胶与油的体积比为 1:3)结合,剧烈搅拌 2 分钟以促进形成油包水乳液,使其粘附到一旋转蒸发仪上(R-205;Buchi Laboratory Equipment;瑞士),将其放置在 80℃ 水浴 30 分钟。然后将该混合物在 120mbar 的减压下煮沸(35rpm, 3 小时)以除去溶剂。颗粒在 3000rpm 下离心 20 分钟(型号 Centra MP4R;国际设备公司;查特努加市,田纳西州),回收上清液。最后,将颗粒在 500℃ 下煅烧 5 小时,以除去表面活性剂和其他过量的有机物。如 Carroll 等人所述的,溶剂抽提富集了 CTAB (>CMC)中的水相,并且获得的微胶粒在二氧化硅颗粒浓缩时模制 6-12nm 的孔(在水相中)。此外,两种表面活性剂(CTAB 和 Abil EM90)在水-油界面的吸附协同降低了界面张力,导致自发形成 20-30nm 的微乳液滴,其模制大的表面可进入的孔。

[0189] 二氧化硅纳米颗粒的鉴定

[0190] 使用 Zetasizer Nano (莫尔文,乌斯特郡,英国)进行纳米多孔二氧化硅颗粒的动态光散射。通过在 2.4mL 1X D-PBS 中稀释 48 μ L 二氧化硅颗粒(25mg/mL),制备样品。将溶液转移到 1mL 聚苯乙烯小管中(Sarstedt;Nümbrecht,德国)用于分析。使用 ASAP2020 表面积和孔隙度分析仪进行氮吸附(Micromeritics 仪器公司;佐治亚州)。使用 Zetasizer

Nano (莫尔文, 乌斯特郡, 英国) 进行 zeta 电位测量。在一典型实验中, 二氧化硅颗粒、脂质体、或原始细胞在模拟体液 (pH7.4) 或柠檬酸缓冲液 (pH5.0) 中按 1:50 稀释, 这两种溶液都调整成含 150mM NaCl, 并转移至 1ml 折叠毛细血管细胞 (folded capillary cell) 中 (莫尔文, 乌斯特郡, 英国) 用于分析。请参阅补充的图 1 中的 DLS 和氮吸附数据以及补充的图 12 的二氧化硅纳米颗粒、脂质体和原始细胞的 zeta 电位值。

[0191] 原始细胞的合成、装载和表面功能化

[0192] 脂质体融合到纳米多孔二氧化硅颗粒上

[0193] Liu 等人已经描述了用于合成原始细胞的程序²⁵⁻²⁷, 因此只简单提及。脂质是从 Avanti Polar Lipids 订购, 预先溶于氯仿中并存储在 -20°C。就在原始细胞合成之前, 将 2.5mg 脂质在氮气流下干燥并放置在真空炉 (型号 1450M, VWR International, 美国宾夕法尼亚州西切斯特) 中过夜以除去残余溶剂。脂质在 0.5X D-PBS 中重新水化成浓度为 2.5mg/mL, 并用 Mini-Extruder 装置 (Avanti Polar Lipids, Inc.; 阿拉巴斯特, 阿拉巴马州) 使其通过 100nm 过滤器至少 10 次。将 DPPC 和 DSPC 溶解在预热到它们各自的转化温度 (41°C 和 55°C) 的 0.5XD-PBS 中, 并在挤出过程中保持在 60°C。获得的脂质体 (直径约 120nm) 储存在 4°C, 不超过一周。纳米多孔二氧化硅核心溶解在 0.5X D-PBS (25mg/mL) 中并在室温下, 在过量的脂质体中 (脂质与二氧化硅的体积比为 1:2-1:4) 暴露 30-90 分钟。在 4°C 下, 在过量脂质存在的情况下, 原始细胞可保存长达 3 个月。为去除多余脂质, 将原始细胞在 10,000rpm 离心 5 分钟, 冲洗两次并重悬于 0.5X D-PBS 中。

[0194] 支撑脂双层组合物的优化

[0195] 对 SLB 的组合物进行优化以最大限度地减少对对照细胞的非特异性结合和毒性; 见补充图 4 的各种使用的脂质的结构。用在所有表面结合、内化和运输实验中的原始细胞具有 SLB, 其由含 5wt%DOPE (或 DPPE) 的 DOPC (或 DPPC)、30wt% 胆固醇和 5wt%18:1 (或 16:0) PEG-2000PE 构成。如有必要, 将荧光脂质 (18:1-12:0NBD-PC、16:0-12:0NBD-PC 或 Texas Red[®] DHPE) 以 1-5wt% 结合到 SLB 中。各种脂质在重新水化和挤出前一起冻干; 例如将 75 μ L DOPC (25mg/mL)、5 μ L DOPE (25mg/mL)、10 μ L 胆固醇 (75mg/mL)、5 μ L 18:1PEG-2000PE (25mg/mL) 和 5 μ L 18:1-12:0NBD-PC (5mg/mL) 结合 (combine) 并冻干以形成脂质体, 该脂质体由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt% 胆固醇、5wt%PEG-2000 和 1wt%NBD-PC 组成。

[0196] 用各种类型靶向配体修饰支撑脂双层

[0197] 原始细胞对 HCC 的特异性亲和力通过将各种类型的靶向配体以各种密度缀合到 SLB 上进行优化。异双功能交联剂, NHS-(PEG)_n-马来酰亚胺, 对巯基和氨基部分具有活性并拥有一 PEG 间隔臂, 该臂长度可改变以优化特异亲和性, 通过该异双功能交联剂, SP94 和 H5WYG 肽 (合成有 C 末端半胱氨酸残基) 被缀合到 PE 头基中存在的伯胺上。在大多数研究中使用 SM (PEG)₂₄ (间隔臂 =9.52nm)。使用 Sulfhydryl Addition 试剂盒 (按生产商说明) 将转铁蛋白、抗 EGFR 和 CHALV-1 中的氨基部分转化成自由的巯基。使用 SM (PEG)₂₄ 将功能化的转铁蛋白和抗体缀合到 SLB 中的 PE 上。通过反应化学计量学和培养时间控制配体密度。例如, 原始细胞在室温下用超过 10 倍摩尔量的 SP94 培养 2 小时, 以获得 0.015wt% (约 6 个肽 / 原始细胞) 的肽密度, 而原始细胞在 4°C 用超过 5000 倍摩尔量的 SP94 培养过夜以获得 5.00wt% (约 2048 个肽 / 原始细胞) 的肽密度。平均配体密度由 Tricine-SDS-PAGE

(SP94 和 H5WYG 肽) 或 Laemmli-SDS-PAGE (转铁蛋白、抗 EGFR 和 CHALV-1) 确定²⁸。简而言之, 可使用 LC-SPDP (间隔臂 = 1.57nm) 用各种密度的配体修饰原始细胞, LC-SPDP 是一种与伯胺和巯基部分反应的异双功能交联剂, 并可通过还原清除。原始细胞在 10mM 的二硫苏糖醇 (DTT) 中暴露 30min, 并在 10,000rpm 离心 5min; 获得的上清液包含游离配体, 使用 SDS-PAGE 并通过使用 Image J Image 处理分析软件 (NIH, 美国马里兰州贝塞斯达) 比较每个样品相对于标准曲线的条带强度, 来确定游离配体浓度。使用 20% 凝胶 (含 6% 甲叉双丙烯酰胺和 6M 尿素) 分析 SP94 和 H5WYG 肽密度。用 10% 凝胶分析抗体 (抗 EGFR 和 CHALV-1) 密度, 而 15% 凝胶被用于分析转铁蛋白的密度。

[0198] 制备荧光标记的纳米多孔核心

[0199] 将 100 μ L 颗粒 (25mg/mL) 加到 900 μ L 溶于 0.5X D-PBS 的 20%APTES 中, 使纳米多孔核心进行荧光标记; 颗粒在 APTES 中常温孵化过夜, 离心 (10,000rpm, 5min) 以去除未反应的 APTES, 并重悬于 1mL 0.5X D-PBS 中。添加一氨基反应荧光团 (如 Alexa Fluor[®] 647 羧酸、琥珀酰亚胺酯; 1mg/mL, 溶于 DMSO 中) (5 μ L 染料 / mL 颗粒), 这些颗粒在离心去除未反应染料之前在室温下放置 2 小时。荧光标记颗粒在 4°C 下储存在 0.5X D-PBS 中。

[0200] 单峰核心和脂质体装载化学治疗药物

[0201] 在脂质体融合前, 修饰成含 15wt%AEPTMS (25mg/mL) 的单峰纳米核心在阿霉素 (5mM) 或阿霉素、顺铂和 5-氟尿嘧啶的混合物中 (每种药物 5mM) 室温浸泡 1 小时。通过将颗粒在 10,000rpm 下离心 5 分钟去除多余的药物。120nm 的脂质体用基于磷酸铵梯度的方法装载 DOX, 该方法之前已有描述²⁹。简而言之, 脂质膜用 300mM (NH₄)₂HPO₄ 重新水化, 使脂质体溶液挤出通过 100nm 膜至少 10 次。脂质体用等渗缓冲液 (140mM NaCl, 10mMHEPES, pH7.4) 通过渗析 (Float-A-Lyzer G2 渗析单位, 3.5-5kDa MWC0; Spectrum Laboratories, Inc.; 加州 Rancho Dominguez) 平衡, 并用阿霉素 HCl (药物: 脂质摩尔比为 1:3) 在 4°C 孵化过夜。通过尺寸排阻色谱法, 在 0.7cm $\times$ 10cm Sepharose[®] CL-4B 柱上去除多余的 DOX。脂质体装载 5-FU 或顺铂, 如前所述^{30, 31}。

[0202] 多峰核心装载多组分混合物、siRNA 和白喉毒素 A 链

[0203] 将修饰成含 20wt%AEPTMS (25mg/mL) 的多峰纳米多孔核心在钙黄绿素溶液 (5mM)、Alexa Fluor[®] 647 标记的 dsDNA 寡核苷酸 (100 μ M)、RFP (100 μ M) 和 CdSe/ZnS 量子点 (10 μ M) 中浸泡 4 小时; 改变每种货物的浓度以获得最佳的用于高光谱成像的荧光密度。通过将 1mg 钙黄绿素和 1mgNLS 溶解在 850 μ L 1X D-PBS 中, 钙黄绿素被 NLS (合成有 C 末端半胱氨酸残基) 修饰; 加入 100 μ L EDC (在去离子水中浓度为 10mg/mL) 和 50 μ L LBMPH (在 DMSO 中浓度 10mg/mL), 将混合物在室温下孵化 2 小时。通过渗析 (Slide-A-Lyzer 迷你渗析单位, 2kDa MWC0; Thermo Fisher Scientific LSR; 罗克福德, 伊利诺伊州) 去除多余钙黄绿素。dsDNA 寡核苷酸用 Ulysis[™] Alexa Fluor[®] 647 核苷酸标记试剂盒 (按制造商指示) 标记并通过合并 50 μ L dsDNA (在去离子水中浓度 2mM) 和 50 μ L NLS (在 DMSO 中浓度 1mM) 以及 10 μ L SMCC (在 DMSO 中浓度 10mg/mL), 将其用 NLS 修饰; 混合物在室温下孵化 2 小时, 多余的 NLS 通过渗析 (Slide-A-Lyzer 迷你渗析单位, 7kDa MWC0; Thermo Fisher Scientific LSR; 罗克福德, 伊利诺伊州) 去除。在补充图 13-16 描述的运输实验中, 多峰纳米多孔核心用 20wt%AEPTMS (25mg/mL), 在 4°C 下在 siRNA (100 μ M) 或白喉毒素 A 链 (100 μ M) 中浸泡

2 小时。未封装的货物通过在 10000rpm 离心 5 分钟去除,并且立即将脂质体融合到装载有货物的核心。

[0204] 用组蛋白包装 CB1 质粒。

[0205] 用于将 CB1 质粒(pCB1)超螺旋的方法如图 4 所示。该原理图描述了使用高饱和盐溶液使 CB1 质粒(pCB1)超螺旋(该 CB1 质粒载体在下面和附图 12 中展示),用组蛋白 H1、H2A、H2B、H3 和 H4 包装超螺旋的 pCB1 以及用核定位序列(NLS)对获得的 pCB1-组蛋白复合物进行修饰的方法,该核定位序列通过缀合到组蛋白上能够促进物质易位通过核孔。图 4 (B)和(D)显示了 CB1 质粒(B)和组蛋白包装的 pCB1 (D)的原子力显微镜(AFM)图像。比例尺=100nm。(C)和(E)分别是与(B)和(D)中的红线相对应的高度的轮廓图。

[0206] 合成装载有组蛋白包装的 pCB1 的 MC40 靶向的介孔二氧化硅纳米颗粒支撑脂双层(原始细胞)。

[0207] 如图 5 所示,5 (A)提供了一原理图,描述了用于生成装载有 DNA 的肽靶向的原始细胞的方法。根据这种方法,通过简单地将颗粒浸入 pCB1-组蛋白复合物溶液中,可将组蛋白包装的 pCB1 装载进介孔二氧化硅纳米颗粒中,该二氧化硅纳米颗粒形成原始细胞的核心。然后,将 PEG 化的脂质体融合到装载有 DNA 的核心中,形成一支撑脂双层(SLB),其进一步用结合到 HCC 的靶向肽(MC40)和促进内化的原始细胞的内体逃逸的内体裂解肽(endosomolytic peptide)修饰。一巯基-氨基交联剂(间隔臂=9.5nm)用于将 C 末端半胱氨酸残基修饰的肽结合到 SLB 中的 DOPE 部分上。图 5 (B)显示了用作原始细胞核心的介孔二氧化硅纳米颗粒的传输电子显微镜(TEM)图像。比例尺=200nm。插入=扫描电子显微镜(SEM)图像,其证明,15-25nm 的孔是表面可进入的。插入比例尺=50nm。图 5 (C)显示了介孔二氧化硅纳米颗粒的尺寸分布图,通过动态光散射(DLS)确定。(5D,左轴)是介孔二氧化硅纳米颗粒的累积孔体积图,通过使用 Barrett-Joyner-Halenda (BJH)模型,用图 S-4A 中显示的氮吸附等温线的吸附分支来计算。(5D,右轴)是 pCB1-组蛋白复合物的尺寸分布,由 DLS 确定。

[0208] 介孔二氧化硅纳米颗粒具有很大的容量用于组蛋白包装的 pCB1,并且获得的原始细胞只有在模拟内体环境的条件下才会释放封装的 DNA。

[0209] 如图 6 (A)所示,能够被封装进未修饰的介孔二氧化硅纳米颗粒($\zeta=-38.5\text{mV}$)或者用 APTES (一种含氨基的硅烷)修饰的介孔二氧化硅纳米颗粒($\zeta=+11.5\text{mV}$)内的 pCB1 或者组蛋白包装的 pCB1 (“复合物”)的浓度。图 6 (B)显示了在 37°C 下,浓度为 1×10^6 个/mL 的细胞与 1×10^9 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞培养 24h 后,对 ZsGreen (一种由 pCB1 编码的绿色荧光蛋白)呈阳性的 Hep3B 的百分比。X 轴详细说明了原始细胞核心是否用 APTES 修饰和 pCB1 是否用组蛋白进行预包装。在(A)和(B)中,用 DOTAP 和 DOPE (1:1w/w)混合物包装的 pCB1 作为对照组。图 6 (C)和(D)显示了在暴露于模拟体液(C)或 pH 为 5 的缓冲液(D)中时,组蛋白包装的 pCB1 从未修饰的介孔二氧化硅纳米颗粒和相应的原始细胞进行的时间依赖性释放。原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt%胆固醇和 10wt%PEG-2000 构成,在(B)中,该原始细胞 SLB 用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。所有误差条代表 95% 置信区间(1.96σ) ($n=3$)。

[0210] MC40 靶向的原始细胞运输组蛋白包装的 pCB1 到 HCC 的过程

[0211] 如附图 7 中的原理图所示,[1] 由于靶向肽募集至 Met,MC40 靶向的原始细胞以高

亲和性结合到 Hep3B 细胞,该 Met 由各种 HCC 细胞系过量表达。流动的 DPOC SLB 促进了肽的移动性,因此使原始细胞能够用低密度 MC40 修饰,以保留对 Hep3B 的高特异性亲和力(见图 8A)。^[2]MC40 靶向的原始细胞通过受体介导的内吞作用,被 Hep3B 内化(参见图 8B 和图 15A)。^[3]内体条件使 SLB 不稳定(插入 Nature Materials (《自然材料》)文献)并导致 H5WYG 内体裂解肽质子化,两者都能使组蛋白包装的 pCB1 在 Hep3B 细胞的胞质溶胶中分散(见图 15B)。^[4]pCB1- 组蛋白复合物用核定位序列(NLS)修饰时,在 24 小时内会在 Hep3B 细胞核内聚集(见图 16C),这使得能够对分裂和非分裂的癌细胞进行有效转染(见图 17)。

[0212] MC40 靶向的原始细胞以高亲和性结合到 HCC 并被 Hep3B 但不被正常的肝细胞内化。

[0213] 图 8 (A) 显示了在暴露于 Hep3B 或肝细胞中时,MC40 靶向的原始细胞的表现离解常数(K_d); K_d 值与特异性亲和性成反比,并从饱和结合曲线中确定(见图 S-11)。误差条代表 95% 置信区间(1.96σ) ($n=5$)。图 8 (B) 和 (C) 显示了 Hep3B (B) 和肝细胞(C) 的共聚焦荧光显微镜图,Hep3B 和肝细胞在 37°C 下,在超过 1000 倍的 MC40 靶向的原始细胞中暴露 1 小时。Met 用 Alexa Fluor[®] 标记的单克隆抗体(绿色)染色,原始细胞核心用 Alexa Fluor[®] 594 (红色)进行标记,细胞核用 Hoechst33342 (蓝色)染色。比例尺 =20 μ m。原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt% 胆固醇和 10wt%PEG-2000 (18:1)构成,并用 0.015wt% (A-C) 或 0.500wt% (A) 的 MC40 靶向肽修饰。

[0214] MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞在皮摩尔浓度下诱导 HCC 凋亡但对正常肝细胞活力影响最小。

[0215] 图 9 (A)和(B)显示了 Hep3B 在 37°C 下持续暴露在 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞中,表达细胞周期蛋白 B1mRNA 和细胞周期蛋白 B1 蛋白的剂量(A)和时间(B)依赖性下降。细胞在各种 pCB1 浓度下暴露 48 小时(A)和在 5pM 的 pCB1 中暴露不同时间(B)。肝细胞中细胞周期蛋白 B1 蛋白的表达和 Hep3B 中的 ZsGreen 的表达作为对照。使用实时 PCR 和免疫荧光法分别确定细胞周期蛋白 B1mRNA 和蛋白质浓度。图 9 (C)显示了在 37°C 下,在 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞([pCB1]=5pM)中持续暴露不同时间,在 G₂/M 期被捕获的 Hep3B 的百分率。肝细胞在 G₂/M 期的百分率和 Hep3B 在 S 期的百分率用作对比。在细胞周期分析之前将细胞用 Hoechst33342 染色。图 9 (D) 显示了在 37°C 下,在 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞([pCB1]=5pM)中持续暴露不同时间,凋亡的 Hep3B 的百分率。将对凋亡标记呈阳性的肝细胞的百分率作为对照。对 Alexa Fluor[®] 647 标记的膜联蛋白 V 呈阳性的细胞被认为是处于凋亡早期,而对膜联蛋白 V 和碘化丙啶两者都呈阳性的细胞则被认为是处于凋亡晚期。凋亡细胞的总数通过将单阳性或双阳性细胞的数目相加来确定。在所有实验中,原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt% 胆固醇和 10wt%PEG-2000 (18:1)构成,该原始细胞 SLB 用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。所有误差条代表 95% 置信区间(1.96σ) ($n=3$)。

[0216] MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞诱导 HCC 选择性凋亡的效率比相应的脂质体复合物高 2500 倍。

[0217] 图 10 (A) 显示了 DOPC 原始细胞的 zeta 电位, DOPC 原始细胞用 10wt%PEG-2000 (18:1) 修饰,脂质体复合物由 DOTAP 和 DOPE (1:1w/w) 的混合物和 pCB1 构成,DOTAP/DOPE

脂质体复合物用 10wt%PEG-2000 修饰。所有 zeta 电位测量都在 0.5X PBS (pH7.4) 中进行。图 10 (B, 左轴) 显示了在 37℃ 下, 在由 MC40 靶向的原始细胞或脂质体复合物运输的 5pM 的 pCB1 中持续暴露 48h 后, 凋亡的 Hep3B 和肝细胞的百分率。图 10 (B, 右轴) 显示了 37℃ 下, 在 48 小时内诱导 1×10^6 个 Hep3B 中的 90% 发生凋亡所需要的 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞或脂质体复合物的数量。在 (B) 中, 细胞用 Alexa Fluor[®] 647 标记的膜联蛋白 V 和碘化丙啶染色; 单或双阳性细胞被认为是凋亡的。原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt% 胆固醇和 10wt%PEG-2000 (当有指出时) 构成, 该原始细胞 SLB 用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。DOTAP/DOPE 脂质体复合物用 10wt%PEG2000 (当有指出时)、0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。在所有实验中, pCB1 用 NLS 修饰。所有误差条代表 95% 置信区间 (1.96σ) ($n=3$)。

[0218] MC40 靶向的原始细胞选择性将高浓度的紫杉醇、Bcl-2 特异性 siRNA 和 pCB1 运输到 HCC, 而不影响肝细胞活力。

[0219] 图 11 (A) 显示了能够使 Bcl-2 表达沉默的紫杉醇、siRNA 的浓度, 以及能够封装进 10^{12} 个原始细胞、脂质体或脂质体复合物中的 CB1 质粒的浓度。在图 11A 中红色条表示当紫杉醇和 pCB1 都装载进原始细胞时, 它们的浓度如何变化。蓝色条表示紫杉醇、siRNA 和 pCB1 都装载进原始细胞时, 或者 siRNA 和 pCB1 装载进脂质体复合物中时, 它们的浓度如何变化。图 11 (B) 提供了共聚焦荧光显微镜图, 显示了 Oregon Green[®] 488 标记的紫杉醇 (绿色)、Alexa Fluor[®] 594 标记的 siRNA (红色) 以及 Cy5 标记的 pDNA (白色) 在通过 MC40 靶向原始细胞运输到 Hep3B 后在细胞内的分布。在固定和用 Hoechst33342 (蓝色) 染色前, 细胞用超过其 1000 倍的 MC40 靶向的原始细胞在 37℃ 下培养 24 小时。比例尺 = $10 \mu m$ 。图 11 (C) 显示了在 37℃ 下, 在 10nM 紫杉醇和 / 或 5pM 的 pCB1 中暴露 48 小时后, 在 G₂/M 期被捕获的 Hep3B、SNU-398 和肝细胞的分数。用 G₂/M 期的对数生长期细胞的百分率对分数进行归一化处理。图 11 (D) 显示了在 37℃ 下, 在 10nM 紫杉醇、250pM 的 Bcl-2 特异性 siRNA 和 / 或 5pM 的 pCB1 中暴露 48 小时后, 对 Alexa Fluor[®] 647 标记的膜联蛋白 V 和碘化丙啶 (PI) 显阳性的 Hep3B、SNU-398 和肝细胞的百分率。在 (C) 和 (D) 中, “pCB1” 是指用 DOTAP 和 DOPE 混合物 (1:1w/w) 包装和非特异性运输到细胞中的 pCB1。在所有实验中, 原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt% 胆固醇和 10wt%PEG-2000 (18:1) 构成, 该原始细胞 SLB 用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。脂质体由含 5wt%DMPE 的 DSPC、30wt% 胆固醇和 10wt%PEG-2000 (16:0) 构成, 并用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。脂质体复合物由 DOTAP 和 DOPE (1:1w/w) 的混合物构成, 并用 10wt%PEG-2000、0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。在所有实验中, pCB1 用 NLS 修饰。所有误差条代表 95% 置信区间 (1.96σ) ($n=3$)。

[0220] CB1 质粒载体图谱

[0221] 如图 12 所示, 该 CB1 质粒 (pCB1) 由 RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen 载体 (Clontech 实验设备有限公司; 山景城; 加州) 和 pNEB193 载体 (新英格兰生物实验室有限公司; 伊普斯威奇; 马萨诸塞州) 构建。pCB1 编码细胞周期蛋白 B1 特异性小发夹 RNA (shRNA) [Yuan, et al., Oncogene (2006) 25, 1753 - 1762] 和海葵属绿色荧光蛋白 (ZsGreen)。组成型 shRNA 的表达由 RNA Pol III 依赖的人 U6 启动子 (P_{U6}) 驱动, 而组成型 ZsGreen 的表达

由巨细胞病毒的立即早期启动子($P_{CMV\ IE}$)驱动。 ori 和 Amp^R 元件能够使质粒在大肠杆菌内增殖。编码细胞周期蛋白 B1 特异性 shRNA 的有义链和反义链的 DNA 序列带下划线并且侧边带有限制性酶切位点($BamHI$ 为红色, $EcoRI$ 为蓝色), 这些位点用于将 dsDNA 寡核苷酸引入到 pSIREN 载体上。

[0222] 组蛋白包装的 pCB1 的鉴定。

[0223] 图 13 (A) 显示了暴露于浓度越来越高的组蛋白(H1、H2A、H2B、H3 和 H4 组的摩尔比为 1:2:2:2:2)中的 pCB1 的电泳迁移率变动分析。给定 pCB1: 组蛋白的摩尔比用于第 3-6 道。第 1 道包含 DNA 梯状条带, 第 2 道包含不加组蛋白的 pCB1。图 13 (B) 显示了组蛋白包装的 pCB1 (pCB1: 组蛋白摩尔比为 1:50) 的 TEM 图。比例尺 = 50nm。

[0224] 没有装载以及装载有 pCB1 的介孔二氧化硅纳米颗粒的氮吸附分析。

[0225] 图 14 (A) 装载用组蛋白包装的 pCB1 前后, 介孔二氧化硅纳米颗粒的氮吸附等温线。图 14 (B) 显示了装载用组蛋白包装的 pCB1 前后, 介孔二氧化硅纳米颗粒的 Brunauer-Emmett-Teller (BET) 比表面积。误差条代表 95% 置信区间(1.96σ) ($n=3$)。

[0226] DOPC 原始细胞的小角中子散射(SANS)数据。

[0227] 图 15 显示了 DOPC 原始细胞的 SANS 数据。使用用于具有恒定厚度共形外形的多分散的多孔二氧化硅球体的模型获得拟合数据, 该数据拟合显示了在二氧化硅颗粒的表面存在 $36\text{ \AA}$ 的双层, 其跨越了孔的开口。 0 、 20 和 $60\text{ \AA}$ 的双层厚度的模拟 SANS 数据用作对比。测得的 $36\text{ \AA}$ 的双层厚度与其他在平面支撑的脂双层上进行的中子研究(33 – $38\text{ \AA}$) [见, Ferrari, M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges (《癌症纳米技术: 机遇和挑战》). Nature Reviews Cancer 5, 161–171 (2005)] 一致, 并且在这些比照条件下, 该双层厚度主要代表了从脂双层的富含氢的碳氢化合物核心的散射。实验数据也表明了存在 $299.2\text{-\AA}$ 孔, 通过将 $0.0315\text{ \AA}^{-1}$ (即实验数据峰值的 q 值, 由孔散射导致) 分(dividing)成 2π 确定。通过使用在 $100\%D_2O$ PBS 缓冲液中的 5% (v/v) 原始细胞悬液, 在 LANSCE (洛斯阿拉莫斯国家实验室) 的 LQD 光束线上获得 SANS 数据。使用 NCNR SANS 数据分析软件包 (NIST) 进行数据拟合。

[0228] 原始细胞保护封装的 DNA, 使其不被核酸酶降解。

[0229] 图 16 显示了 DNase I 处理的 pCB1 的琼脂糖凝胶电泳(第 3 道)、组蛋白包装的 pCB1 的琼脂糖凝胶电泳(第 5 道)、DOTAP 和 DOPE 混合物(1:1 (w/w))包装的 pCB1 的琼脂糖凝胶电泳(第 7 道), 装载进具有阳离子核心的原始细胞的 pCB1 的琼脂糖凝胶电泳(第 9 道), 和装载进具有阴离子核心的原始细胞的组蛋白包装的 pCB1 的琼脂糖凝胶电泳(第 11 道)的结果。裸露的 pCB1 (第 2 道)、从组蛋白释放的 pCB1 (第 4 道)、从 DOTAP/DOPE 脂质体复合物释放的 pCB1 (第 6 道)、从具有阳离子核心的原始细胞释放的 pCB1 (第 8 道), 以及从具有阴离子核心的原始细胞释放的组蛋白包装的 pCB1 (第 10 道)用于比较。第 1 道包含一 DNA 梯状条带。样本用 Dnase I (1 单位 / 50ng DNA) 在室温培养 30 分钟, 用 1% SDS 刺激 pCB1 的释放。

[0230] 图 17 显示了介孔二氧化硅纳米颗粒(“未修饰的核心”)、在室温下在 20% (v/v) APTES 中浸泡 12 小时的介孔二氧化硅纳米颗粒(“APTES 修饰的核心”)、CB1 质粒(“pCB1”)、组蛋白包装的 pCB1 (“pCB1- 组蛋白复合物”), 以及用 DOTAP 和 DOPE 混合物(1:1 (w/w))

包装的 pCB1 (“DOTAP/DOPE 脂质体复合物”) 的 Zeta 电位 (ζ) 值。Zeta 电位测量在 0.5X PBS (pH7.4) 中进行。误差条代表 95% 置信区间 (1.96σ) ($n=3$)。

[0231] 典型的正向散射 - 侧向散射 (FSC-SSC) 图以及 FL-1 柱状图, 用于确定图 6 和 S-16 (A) - (D) 中对 ZsGreen 表达呈阳性的细胞百分率。

[0232] 图 18 显示了对 ZsGreen 呈阴性的细胞的 FSC-SSC 图 (A 和 C) 和相应的 FL-1 柱状图 (分别为 B 和 D), 对这些细胞进行设门 (A) 或者不进行设门 (B) 以排除细胞碎片。FL-1 通道的平均荧光强度 (MFI) 值在 (B) 和 (D) 中给出。(E) - (H) 对 ZsGreen 呈阳性的细胞的 FSC-SSC 图 (E 和 G) 和相应的 FL-1 柱状图 (分别为 F 和 H), 对这些细胞进行设门 (E) 或者不进行设门 (G) 以排除细胞碎片。在 (F) 和 (H) 上的门对应于 $MFI \leq 282$ (即 ZsGreen 阴性细胞的 MFI 的 100 倍) 的细胞百分率 (见版面 D)。

[0233] MC40 靶向肽的鉴别。

[0234] 图 19 提供了一原理图, 描述了用于从 Ph. D.TM-7 噬菌体展示库 (新英格兰生物实验室有限公司; 伊普斯威奇; 马萨诸塞州) 中选择 MC40 靶向肽的方法。 1×10^{11} pfu/mL 用融合到人 IgG 的 Fc 域的 100nM 重组人 Met (rhMet) 在室温下孵化 1 小时。使用蛋白 A 或蛋白 G 包被的磁性颗粒亲和捕捉 Met-噬菌体复合物, 并随后用 TBS (含 150mM NaCl 的 50mM Tris-HCl, pH7.4) 冲洗 10 次。结合的噬菌体克隆体用低 pH 缓冲液 (含 1mg/mL BSA 的 0.2M 甘氨酸, pH2.2) 洗脱, 洗脱产物通过感染宿主细菌 (E. coli ER2738) 进行扩增。根据原理图, 使用越来越严格的条件进行五轮亲和性选择, 条件为: Met 浓度从 100nM 降至 50nM、10nM, 孵化时间从 1 小时减少至 30min、15min, 加入到冲洗缓冲液中的吐温 20 的浓度从 0% (v/v) 增加至 0.1%、0.5%。通过改变在蛋白 A 包被的磁性颗粒和蛋白 G 包被的磁性颗粒之间的选择轮数, 避免了对蛋白 A 和蛋白 G 特异的多肽。在五轮选择之后, 从 40 个独立的克隆中回收 DNA, 并使用 Ph. D.TM-7 试剂盒提供的 -96gIII 引物进行测序。具有最大结合 MET 受体活性的序列如下所示:

[0235]

ASVHFPP (Ala-Ser-Val-His-Phe-Pro-Pro)	SEQ ID NO:1
TATFWFQ (Thr-Ala-Thr-Phe-Trp-Phe-Gln)	SEQ ID NO:2
TSPVALL (Thr-Ser-Pro-Val-Ala-Leu-Leu)	SEQ ID NO:3
IPLKVHP (Ile-Pro-Leu-Lys-Val-His-Pro)	SEQ ID NO:4
WPRLTNM (Trp-Pro-Arg-Leu-Thr-Asn-Met)	SEQ ID NO:5.

[0236] MC40 靶向肽的鉴定。

[0237] 图 20 (A) 显示了在第 5 轮选择后的多肽序列比对; 主要序列 ASVHFPP 类似于先前确定的 Met 特异性的 12-mer, YLFSVHWPPLKA (SEQ ID NO:18) 中的加粗部分。展示了靶向不相关的 HAIYPRH 肽 (约 10%) (SEQ ID NO:19) 的噬菌体克隆在序列对比中被省略。图 20 (B) 和 (C) 显示了亲和选择的噬菌体克隆结合到 rhMet 的程度通过酶联免疫吸附试验 (ELISA) 进行确定。在 (B) 中描述的 ELISA 方案在材料和方法部分进行了描述。ELISA 的结果显示在 (C) 中。图 20 (D) 显示了在移除没有结合到 Met 的肽后的序列比对。描绘在图 20 中的一致序列由该序列比对确定。图 20 (E) 和 (F) 显示了 Hep3B (E) 和肝细胞 (F) 的流式细胞仪散点图, 该 Hep3B 和肝细胞暴露在以下两类物质的一类中: (1) 抗 Met 和

不相关噬菌体克隆(TPDWLF)的 Alexa Fluor[®] 488 标记的单克隆抗体,和一抗 M13 噬菌体的 Alexa Fluor[®] 546 标记的单克隆抗体(蓝点)或(2)抗 Met 和 MC40 克隆的 Alexa Fluor[®] 488 标记的单克隆抗体,和抗 M13 噬菌体的 Alexa Fluor[®] 546 标记的单克隆抗体(橙色点)。未经处理细胞(红点)用于设置 FL-1 (Alexa Fluor[®] 488 荧光)和 FL-2 (Alexa Fluor[®] 546 荧光)通道的电压参数。

[0238] 暴露于 Hep3B 的 MC40 靶向的原始细胞的样品结合曲线。

[0239] 为了确定图 8A 中的解离常数,用细胞松弛素 D 对 1×10^6 个 Hep3B 或肝细胞进行预处理,以抑制内吞作用,并用各种浓度的 Alexa Fluor[®] 647 标记的 MC40 靶向的原始细胞在 37°C 下培养 1 小时。使用流式细胞仪确定获得的细胞群的平均荧光强度,并用其相对于原始细胞浓度作图以获得总结合曲线。在饱和浓度的未标记的肝细胞生长因子存在时,通过用 Alexa Fluor[®] 647 标记的 MC40 靶向的原始细胞培养细胞来确定非特异性结合。通过用总结合曲线减去非特异性结合曲线获得特异性结合曲线;通过特异性结合曲线计算 K_d 值。在图 21 描述的实验中,原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt% 胆固醇和 10wt%PEG-2000 (18:1)构成,并用 0.015wt%MC40 靶向肽(约 6 个肽 / 颗粒)修饰;相应 K_d 值为 1050 ± 142 pM。所有误差条代表 95% 置信区间 (1.96σ) ($n=5$)。

[0240] MC40 靶向的原始细胞通过受体介导的内吞作用内化,并在不存在 H5WYG 肽时定位到溶酶体。

[0241] 图 22 (A)显示了在 37°C 下,一小时之内,被每个 Hep3B 或肝细胞进行内化的 MC40 靶向的原始细胞的平均数量。在不存在(-)或存在(+)饱和浓度($100 \mu\text{g/mL}$)的人肝细胞生长因子(HGF)时,将 1×10^6 个细胞与各种浓度的原始细胞进行培养,使用流式细胞仪确定与每个细胞相关的颗粒的平均数量,如 Ashley et al. Nature Materials, 2011, May; 10 (5):389-97 所描述的。原始细胞用 NBD 和 pHrodo[™] 进行标记,以(分别)区分表面结合的颗粒和内化到酸性细胞内隔间的颗粒。误差条代表 95% 置信区间 (1.96σ) ($n=3$)。(B)原始细胞和以下物质之间的皮尔逊相关系数(r 值): (1) Rab5, (2) Rab7, (3) 溶酶体相关膜蛋白 1 (LAMP-1),或(4) Rab11a。在固定、透化和用 Alexa Fluor[®] 488 标记的抗 Rab5、Rab7、LAMP-1 或 Rab11a 的抗体培养之前, Hep3B 细胞用超过其 1000 倍的 Alexa Fluor[®] 594 标记的原始细胞在 37°C 下培养 1 小时。用 SlideBook 软件确定 r 值,它们表示为数值的平均值 $\pm$ 标准差, $n=3 \times 50$ 个细胞。用微分干涉差(DIC)图限定 Hep3B 细胞的边界,使得在计算 r 值时能忽略细胞边界外的像素点。原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt% 胆固醇和 10wt%PEG-2000 (18:1) 构成,该原始细胞 SLB 用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。

[0242] 用 NLS 修饰并通过 MC40 靶向的原始细胞运输时,组蛋白包装的 pCB1 以时间依赖方式在 HCC 细胞核中聚集。

[0243] 图 23 (A)-(C)描述了 Hep3B 细胞的共聚焦荧光显微镜图, Hep3B 细胞在 37°C 下,在超过 1000 倍的 MC40 靶向的装载 pCB1 的原始细胞中暴露 15 分钟(A)、12 小时(B)或 24 小时(C)。对于(B)来说,在约 2 小时后,原始细胞的内体逃逸和 pCB1 的胞质分散是很明显的;但是直到 12-16 小时,才能检测到 ZsGreen 表达。在第 24 小时, Cy5 标记的 pCB1 仍然分

布在整个细胞中;但是,由于 Cy5 通道的获得减少以避免位于细胞核中的像素饱和,胞质染色在(C)中不明显。二氧化硅核心用 Alexa Fluor[®] 594 (红色)标记, pCB1 用 Cy5 (白色), 细胞核用 Hoechst33342 (蓝色)复染。比例尺 =20 μ m。图 23 (D) 显示了 Cy5 标记的 pCB1 和 Hoechst33342 标记的 Hep3B 细胞核的皮尔逊相关系数(r 值)对时间的图。用 SlideBook 软件确定 r 值,它们表示为平均值 $\pm$ 标准差, n=3x50 个细胞。微分干涉差(DIC)图用于限定 Hep3B 的边界,使得在计算 r 值时能忽略细胞边界外的像素点。原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt%胆固醇和 10wt%PEG-2000 (18:1)构成,该原始细胞用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。

[0244] 用 NLS 修饰并通过 MC40 靶向的原始细胞运输时,组蛋白包装的 pCB1 以接近 100% 的效力选择性转染分裂和非分裂的 HCC 细胞。

[0245] 图 24 (A)、(C) 和 (E) 显示了 Hep3B 细胞的共聚焦荧光显微镜图, Hep3B 细胞在 37°C 下,在超过 1000 倍的 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞中暴露 24 小时。Hep3B 细胞在(A)中是分裂的,在(C)和(E)中约 95% 是汇合的(confluent);在所有图中, pCB1 用组蛋白预包装,并且在(E)中, pCB1- 组蛋白复合物进一步用 NLS 修饰。二氧化硅核心用 Alexa Fluor[®] 594 (红色)标记, pCB1 用 Cy5 标记(白色),细胞核用 Hoechst33342 (蓝色)复染。比例尺 =20 μ m。图 24 (B)、(D) 和 (F) 显示了在 37°C 下,在 1×10^9 个 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞(“PC”)中持续暴露 24 小时后, 1×10^6 个 Hep3B 和肝细胞中变得对 ZsGreen 表达呈阳性的细胞的百分率。细胞在(B)中是分裂的,在(D)和(F)中约 95% 是汇合的;X 轴表明 CB1 质粒(“pCB1”)和 pCB1- 组蛋白复合物(“复合物”)是否用 NLS 修饰。使用单独的 pCB1,以及用 DOTAP 和 DOPE 混合物(1:1 (w/w))包装的 pCB1 作为对照。细胞暴露在 20mg/mL 麦胚凝集素(WGA)中,以阻断 NLS 修饰的 pCB1 易位通过核孔复合物。误差条代表 95% 置信区间(1.96σ) (n=3)。图 24 (G) - (I) 分别为图(A)、(C) 和 (E) 中使用的细胞的细胞周期柱状图。在 G_0/G_1 期的细胞的百分率在每个柱状图中给出。在所有实验中,原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt%胆固醇和 10wt%PEG-2000 (18:1)构成,该原始细胞 SLB 用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。

[0246] 图 25 显示了 Hep3B (A) 和肝细胞(B) 的共聚焦荧光显微镜图, Hep3B 和肝细胞在 37°C 下,在 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞中暴露 1 小时或者 72 小时;在所有实验中, pCB1 浓度保持在 5pM。(B)中的箭头指示有丝分裂细胞。用 Alexa Fluor[®] 594 标记的单克隆抗体(红色)标记细胞周期蛋白 B1,细胞核用 Hoechst33342 (蓝色)染色。原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt%胆固醇和 10wt%PEG-2000 (18:1)构成,该原始细胞 SLB 用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。所有比例尺 =20 μ m。

[0247] 图 26 显示了 Hep3B (A) 和肝细胞(B) 的共聚焦荧光显微镜图, Hep3B 和肝细胞在 37°C 下,在 MC40 靶向的装载有 pCB1 的原始细胞中暴露 1 小时或者 72 小时;在所有实验中 pCB1 浓度保持在 5pM。细胞用 Alexa Fluor[®] 647 标记的膜联蛋白 V (白色)和碘化丙啶(红色)染色来分别分析早期和晚期细胞凋亡,细胞核用 Hoechst33342 (蓝色)复染。原始细胞 SLB 由含 5wt%DOPE 的 DOPC、30wt%胆固醇和 10wt%PEG-2000 (18:1)构成,该原始细胞 SLB 用 0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。所有比例尺 =20 μ m。

[0248] 具有由两性脂质构成的 SLB 的原始细胞引起最小化的非特异性细胞毒性。

[0249] 如附图 27 所描绘的,在 37℃下,在 1×10^9 个 APTES 修饰的介孔二氧化硅纳米颗粒、具有 APTES 修饰的核心的 DOPC 原始细胞、装载有编码错配的 shRNA 序列的质粒(“错配 pCB1”)的 DOPC 原始细胞,或者装载有错配 pCB1 的 DOTAP/DOPE (1:1w/w) 脂质体复合物中暴露 48 小时, 1×10^6 个 Hep3B 的凋亡百分率。原始细胞和脂质体复合物用 10wt%PEG-2000、0.015wt%MC40 和 0.500wt%H5WYG 修饰。带有正电荷和带负电荷的聚苯乙烯纳米颗粒(分别为“氨基-PS”和“羧基-PS”)用作阳性对照,而暴露在 10mM 抗氧化剂、N-乙酰半胱氨酸(NAC)或者暴露在 1pmol 游离的 pCB1 中的 Hep3B 用作阴性对照。所有误差条代表 95% 置信区间(1.96σ) ($n=3$)。

[0250] 在此公开的所有参考文献都通过相关引用并入本文中。

[0251] 参考文献

[0252] 1Carroll, N. J., Pylypenko, S., Atanasov, P. B. & Petsev, D. N. Microparticles with Bimodal Nanoporosity Derived by Microemulsion Templating. *Langmuir*, doi:10.1021/la900988j (2009).

[0253] 2Lu, Y. F. et al. Aerosol-assisted self-assembly of mesostructured spherical nanoparticles. *Nature* 398, 223-226 (1999).

[0254] 3Iler, R. K. The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry. (John Wiley and Sons, 1979).

[0255] 4Doshi, D. A. et al. Neutron Reflectivity Study of Lipid Membranes Assembled on Ordered Nanocomposite and Nanoporous Silica Thin Films. *Langmuir* 21, 2865-2870, doi:10.1021/la0471240 (2005).

[0256] 5Bernhard, M. I. et al. Guinea Pig Line10 Hepatocarcinoma Model: Characterization of Monoclonal Antibody and in Vivo Effect of Unconjugated Antibody and Antibody Conjugated to Diphtheria Toxin A Chain. *Cancer Research* 43, 4420-4428 (1983).

[0257] 6Lo, A., Lin, C. T. & Wu, H. C. Hepatocellular carcinoma cell-specific peptide ligand for targeted drug delivery. *Molecular Cancer Therapeutics* 7, 579-589, doi:10.1158/1535-7163.mct-07-2359 (2008).

[0258] 7Sciot, R. et al. Transferrin receptor expression in human hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study of 34 cases. *Histopathology* 12, 53-63 (1988).

[0259] 8Kannangai, R., Sahin, F. & Torbenson, M. S. EGFR is phosphorylated at Ty845 in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 19, 1456-1461 (2006).

[0260] 9Behr, J. P. The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit. *CHIMIA International Journal for Chemistry* 51, 34-36 (1997).

[0261] 10Jiang, W., Kim Betty, Y. S., Rutka, J. T. & Chan Warren, C. W. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nano* 3, 145-150 (2008).

[0262] 11Zimmermann, R. et al. Charging and structure of zwitterionic supported bilayer lipid membranes studied by streaming current measurements, fluorescence microscopy, and attenuated total reflection Fourier transform infrared

spectroscopy. *Biointerphases*4, 1-6 (2009).

[0263] 12Ashihara, E., Kawata, E. & Maekawa, T. Future Prospect of RNA Interference for Cancer Therapies. *Current Drug Targets*11, 345-360 (2010).

[0264] 13Pawitan, J. A. The possible use of RNA interference in diagnosis and treatment of various diseases. *International Journal of Clinical Practice*63, 1378-1385 (2009).

[0265] 14Elbashir, S. M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*411, 494-498 (2001).

[0266] 15Davis, M. E. et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature advance online publication* (2010).

[0267] 16Oh, Y. -K. & Park, T. G. siRNA delivery systems for cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews*61, 850-862 (2009).

[0268] 17Sou, K., Endo, T., Takeoka, S. & Tsuchida, E. Poly (ethylene glycol)-Modification of the Phospholipid Vesicles by Using the Spontaneous Incorporation of Poly (ethylene glycol)-Lipid into the Vesicles. *Bioconjugate Chemistry*11, 372-379, doi:10.1021/bc990135y (2000).

[0269] 18Klein, E. et al. "HFP" Fluorinated Cationic Lipids for Enhanced Lipoplex Stability and Gene Delivery. *Bioconjugate Chemistry*21, 360-371, doi:10.1021/bc900469z (2010).

[0270] 19Mínguez, B., Tovar, V., Chiang, D., Villanueva, A. & Llovet, J. M. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma and molecular therapies. *Current Opinion in Gastroenterology*25, 186-194. doi:10.1097/MOG.1090b1013e32832962a32832961 (2009).

[0271] 20Li, S. -D., Chen, Y. -C., Hackett, M. J. & Huang, L. Tumor-targeted Delivery of siRNA by Self-assembled Nanoparticles. *Mol Ther*16, 163-169, doi:<http://www.nature.com/mt/journal/v16/n1/supinfo/6300323s1.html> (2007).

[0272] 21Landen, C. N. et al. Therapeutic EphA2 Gene Targeting In vivo Using Neutral Liposomal Small Interfering RNA Delivery. *Cancer Research*65, 6910-6918 (2005).

[0273] 22Honjo, T., Nishizuka, Y., Hayaishi, O. & Kato, I. Diphtheria Toxin-dependent Adenosine Diphosphate Ribosylation of Aminoacyl Transferase II and Inhibition of Protein Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*243, 3553-3555 (1968).

[0274] 23Uchida, T., Kim, J. H., Yamaizumi, M., Miyake, Y. & Okada, Y. Reconstitution of lipid vesicles associated with HVJ (Sendai virus) spikes. Purification and some properties of vesicles containing non-toxic fragment A of diphtheria toxin.. *Journal of Cell Biology*80, 10-20 (1979).

[0275] 24Mizuguchi, H. et al. Application of fusogenic liposomes containing fragment A of diphtheria toxin to cancer therapy. *British Journal of Cancer*73, 472-476 (1997).

- [0276] 25Liu, J. W. , Jiang, X. M. , Ashley, C. &Brinker, C. J. Electrostatically Mediated Liposome Fusion and Lipid Exchange with a Nanoparticle-Supported Bilayer for Control of Surface Charge, Drug Containment, and Delivery. *Journal of the American Chemical Society*131, 7567–+, doi:10. 1021/ja902039y (2009).
- [0277] 26Liu, J. W. , Stace-Naughton, A. &Brinker, C. J. Silica nanoparticle supported lipid bilayers for gene delivery. *Chemical Communications*, 5100–5102, doi:10. 1039/b911472f (2009).
- [0278] 27Liu, J. W. , Stace-Naughton, A. , Jiang, X. M. &Brinker, C. J. Porous Nanoparticle Supported Lipid Bilayers (Protocells) as Delivery Vehicles. *Journal of the American Chemical Society*131, 1354–+, doi:10. 1021/ja808018y (2009).
- [0279] 28Schagger, H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protocols*1, 16–22 (2006).
- [0280] 29Fritze, A. , Hens, F. , Kimpfler, A. , Schubert, R. &Peschka-Süss, R. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*1758, 1633–1640 (2006).
- [0281] 30Elorza, B. , Elorza, M. A. , Frutos, G. &Chantres, J. R. Characterization of 5-fluorouracil loaded liposomes prepared by reverse-phase evaporation or freezing-thawing extrusion methods: study of drug release. *Biochimica et Biophysica Acta*1153, 135–142 (1993).
- [0282] 31Peleg-Shulman, T. , Gibson, D. , Cohen, R. , Abra, R. &Barenholz, Y. Characterization of sterically stabilized cisplatin liposomes by nuclear magnetic resonance. *Biochimica et Biophysica Acta*1510, 278–291 (2001).
- [0283] 32Bogush, T. , Smirnova, G. , Shubina, L. , Syrkin, A. &Robert, J. Direct evaluation of intracellular accumulation of free and polymer-bound anthracyclines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*35, 501–505, doi:10. 1007/BF00686835 (1995).
- [0284] 33Tong, A. W. et al. Chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells with cyclosporin A in post-liver transplant patient plasma. *Clin. Cancer Res.* 2, 531–539 (1996).
- [0285] 34Minko, T. , Kopecková, P. &Kopecek, J. Chronic exposure to HEMA copolymer-bound adriamycin does not induce multidrug resistance in a human ovarian carcinoma cell line. *Journal of Controlled Release*59, 133–148 (1999).

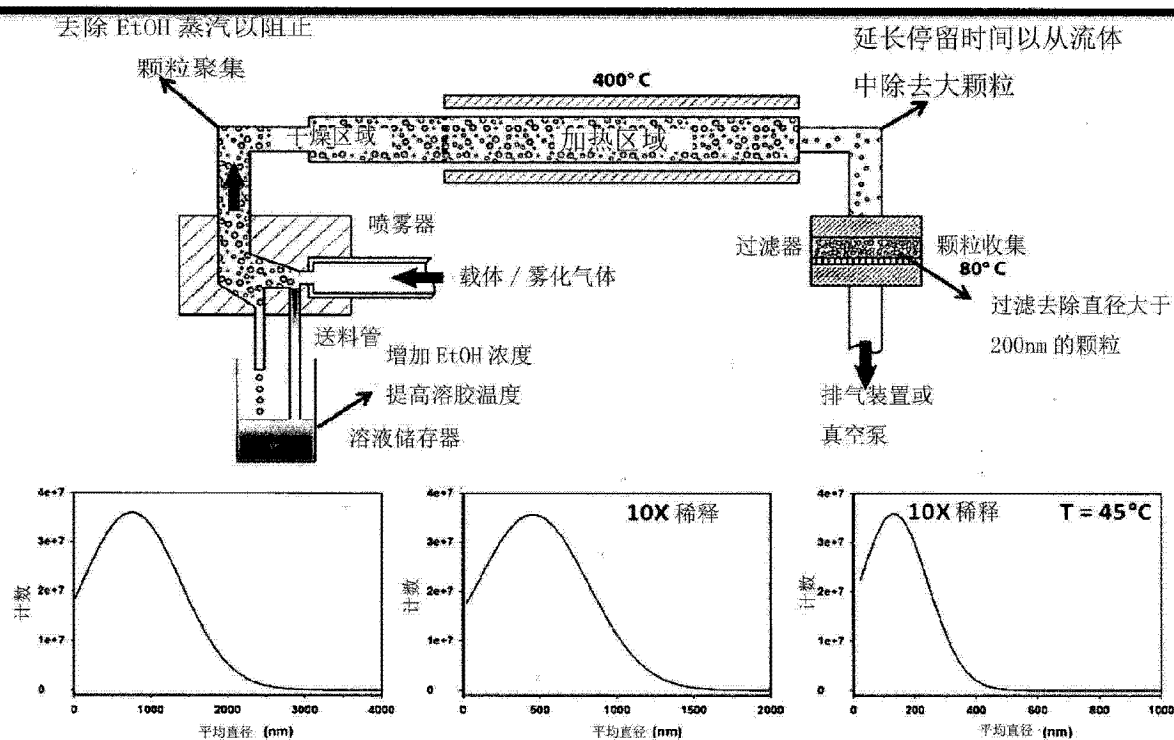


图 1

可裁剪的孔尺寸和框架设计，用于容易结合的多类型的货物 - 气溶胶辅助组分 (NPs)

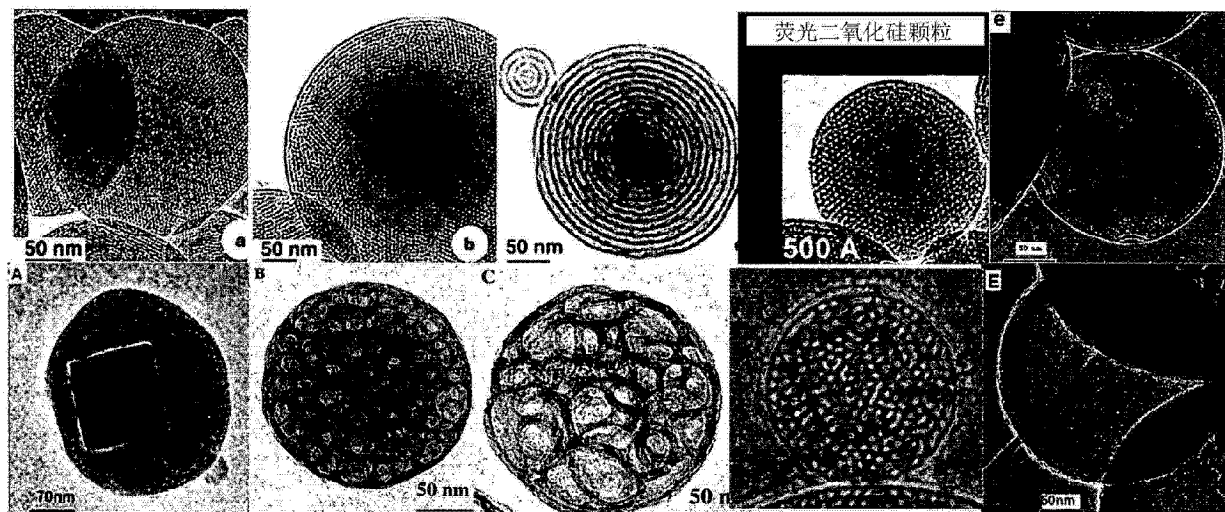


图 2

纳米孔模板	BET比表面积, m ² /g	BJH孔直径, nm	孔体积, cc/g
CTAB	1256	1.8	0.588
Brij 56	514	4.1	0.557
F108+尿素 (55%wt)	1177	4.41	0.943
F108+尿素 (40%wt)	506	5.39	0.48
P123 + PPO(MW425)	323	6.5	0.53
F108	505	6.53	0.7
F108 + 19 nm PS	333	10.93	0.676
P123 +3.4% PPGA	190	12.7	0.60
F108 + 甘油 单油酸+尿素	262	14.63	0.649
微乳液	100	双峰, 5, 10-30nm	1.1

图 2A

$(\text{RO})_{4-x}\text{Si-OH}_x$ (硅酸)

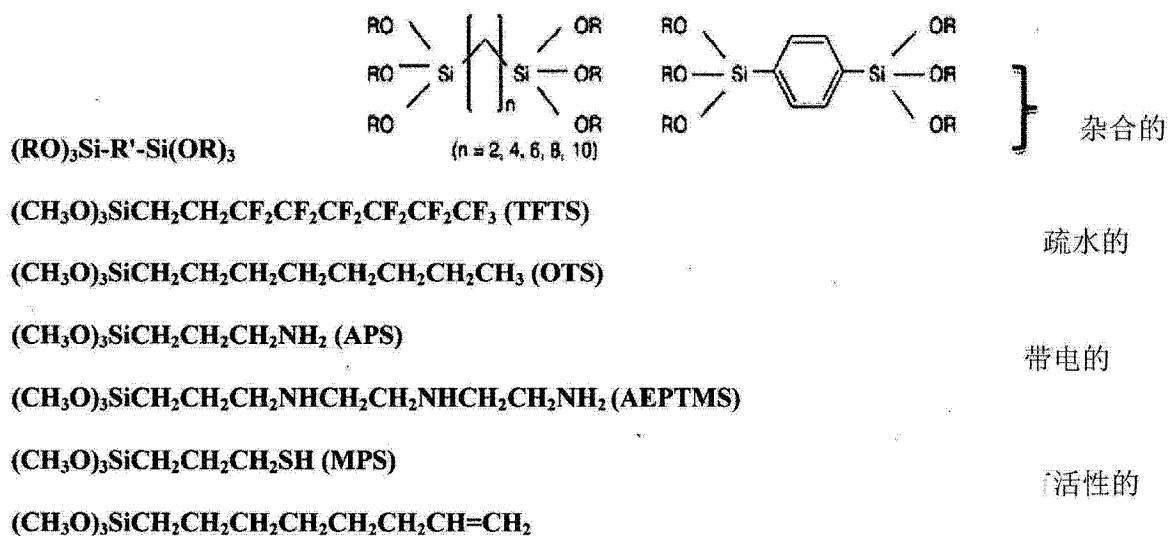


图 3

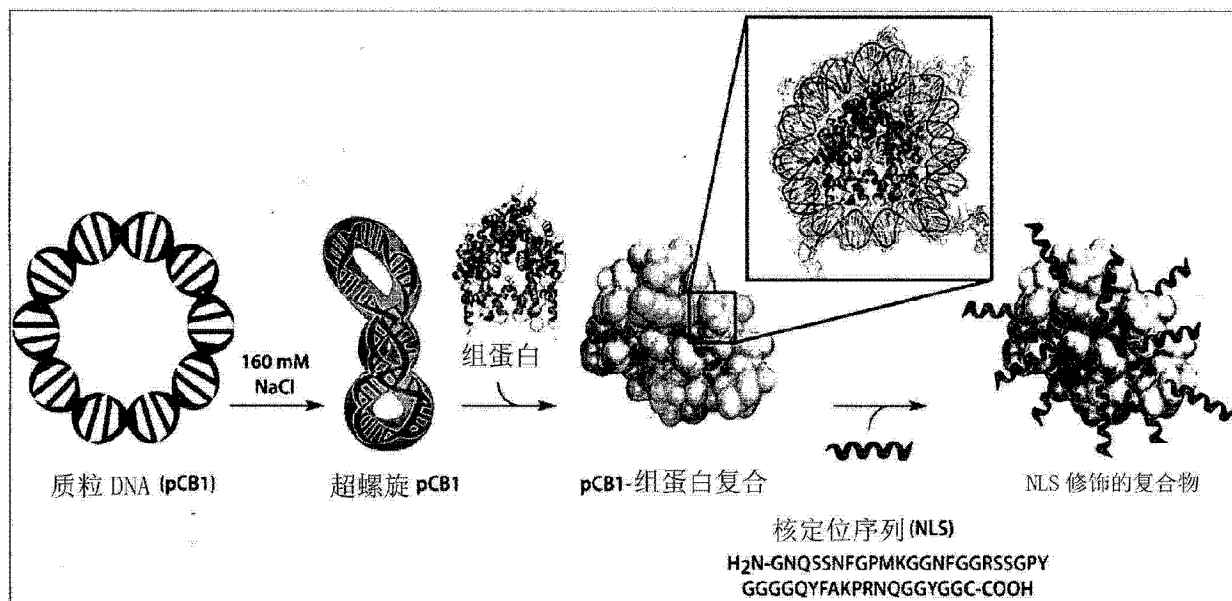
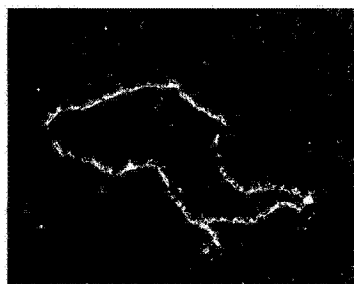
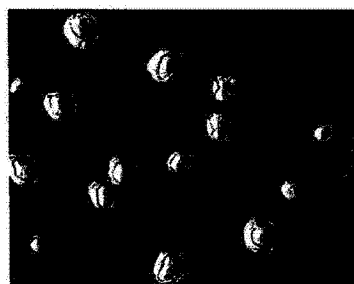


图 4

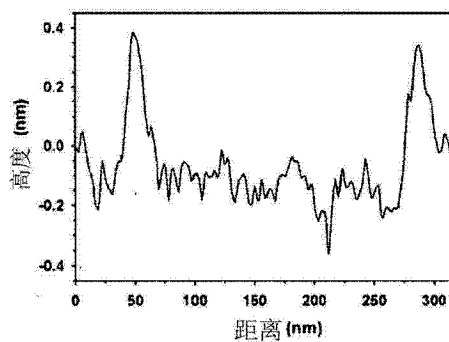
B



D



C



E

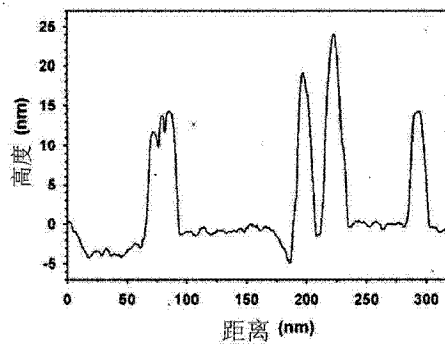


图 4 续

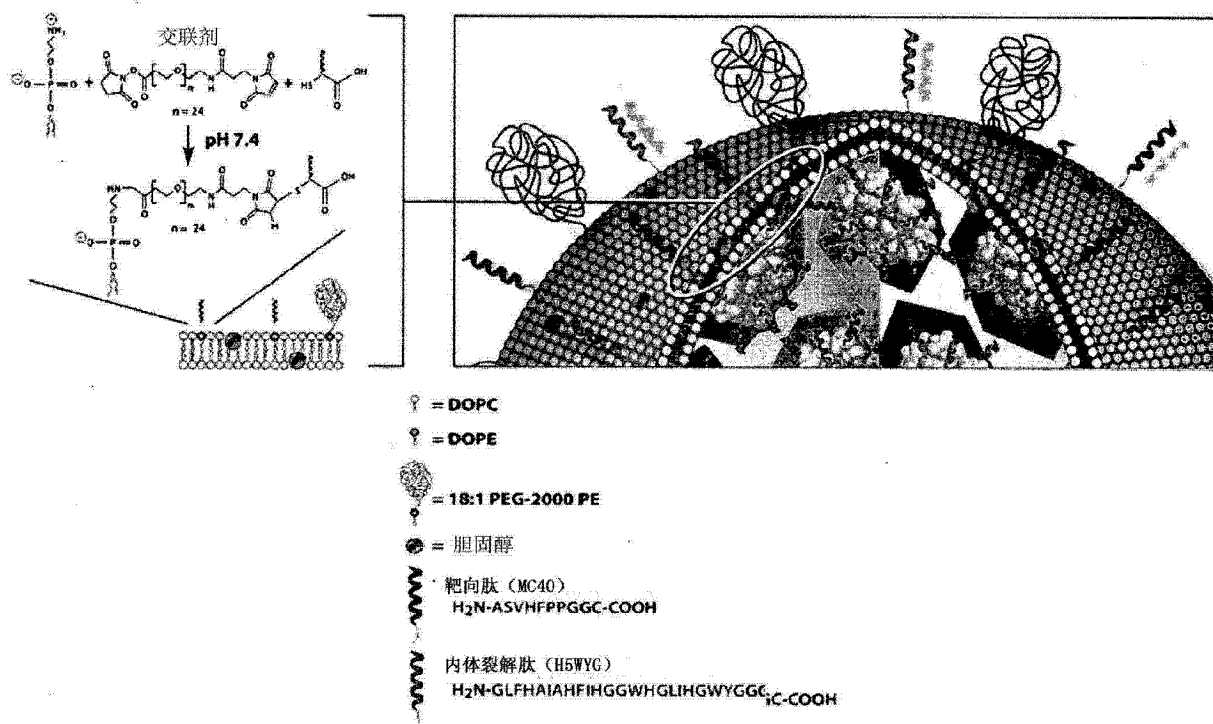


图 5

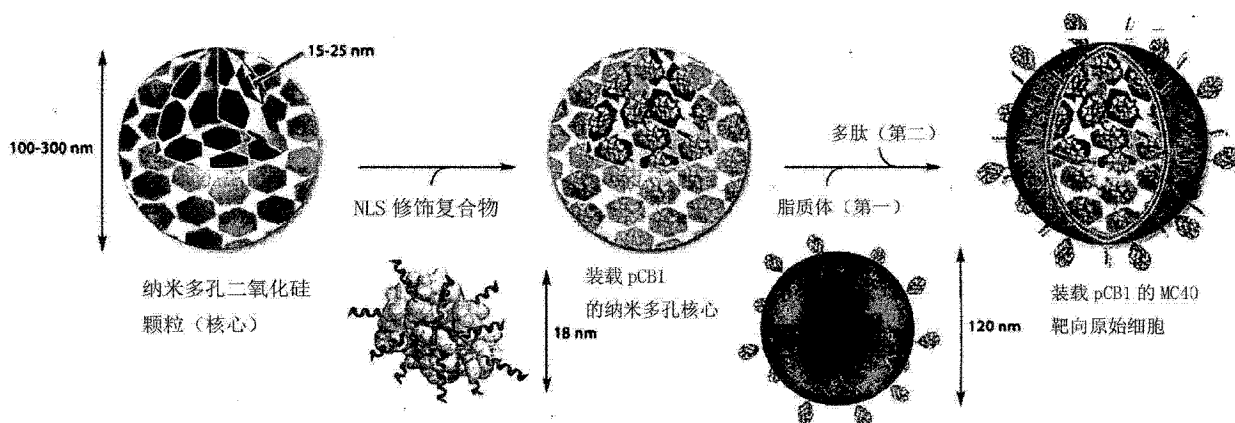


图 5 续 1

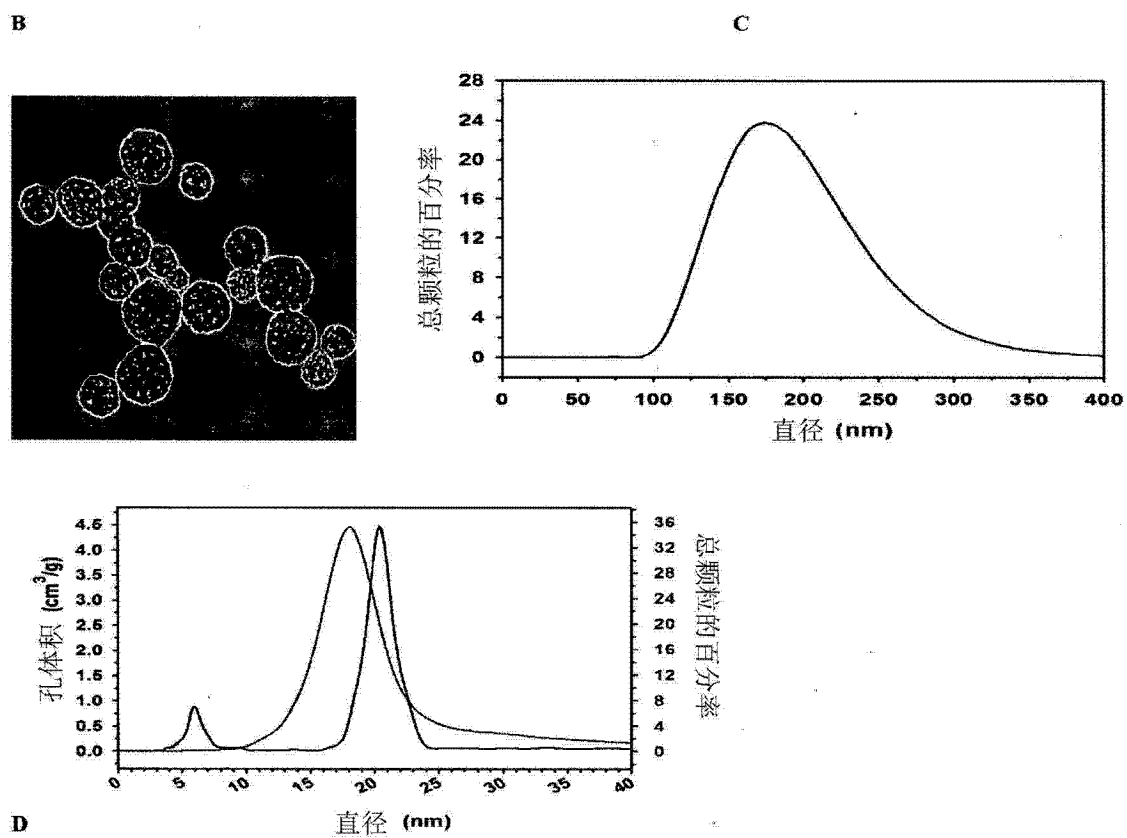


图 5 续 2

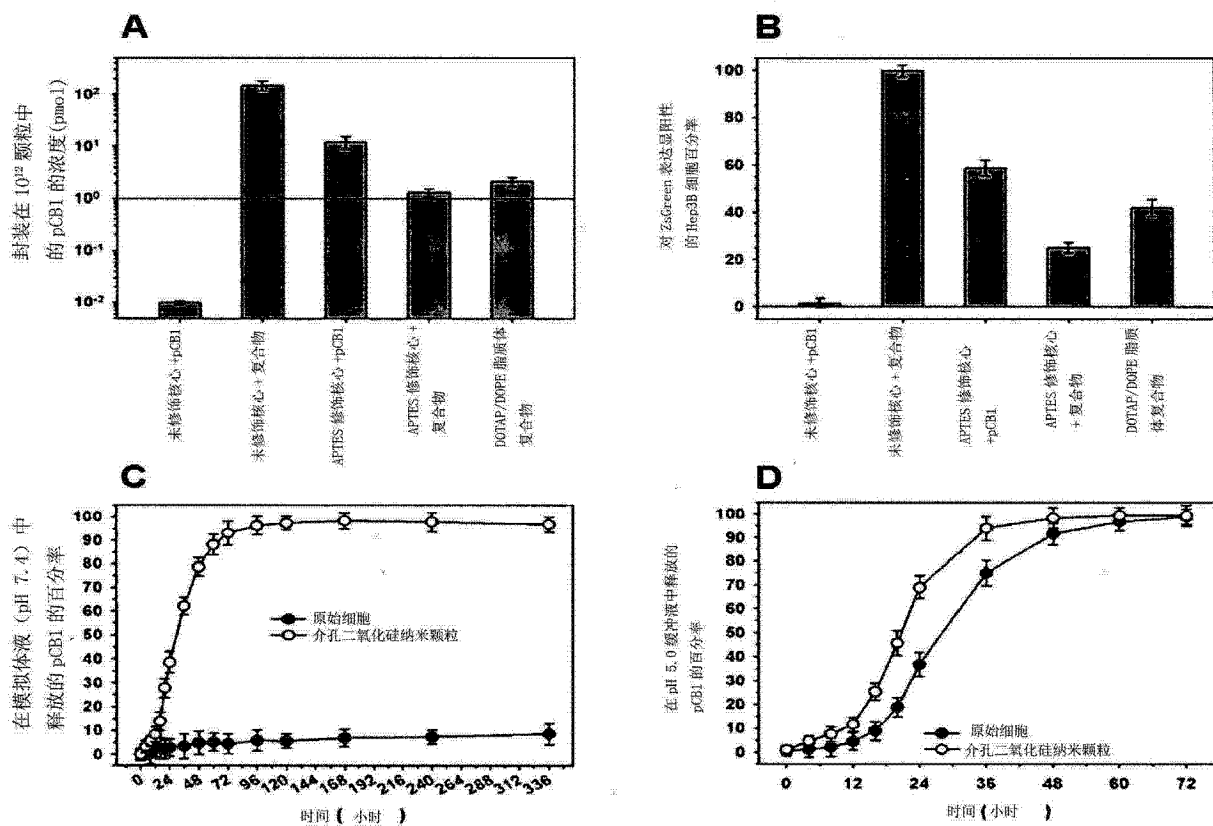


图 6

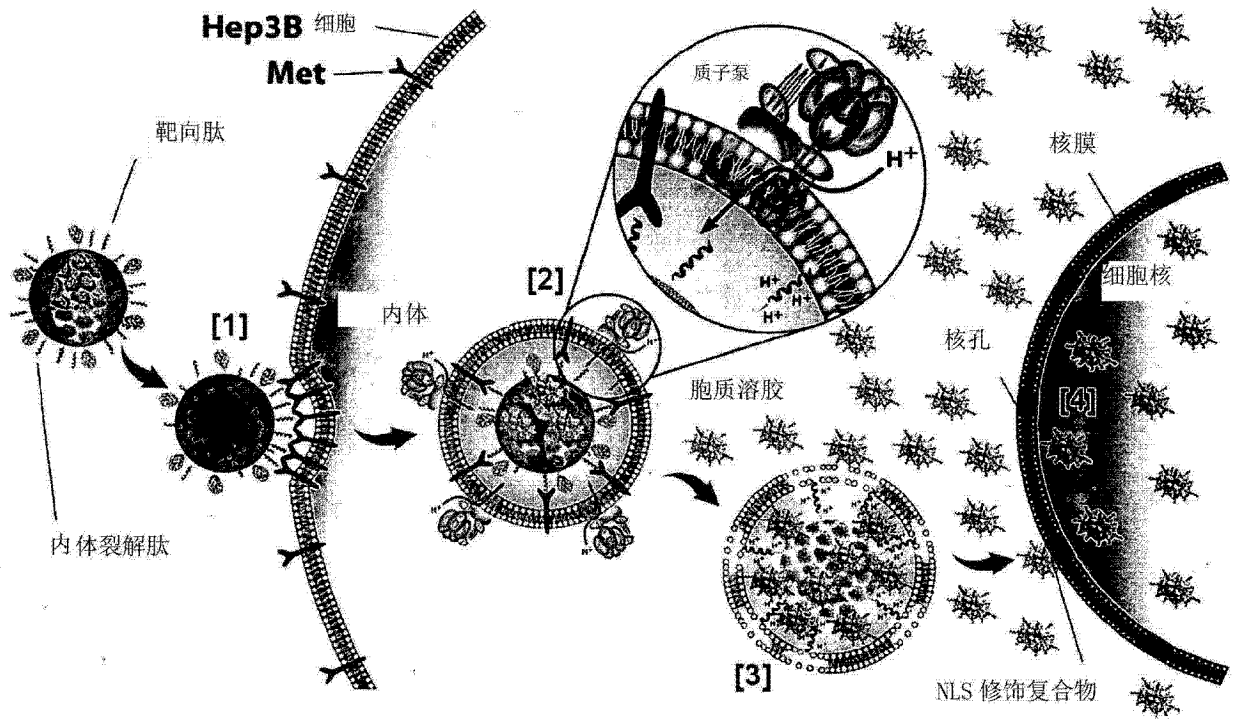


图 7

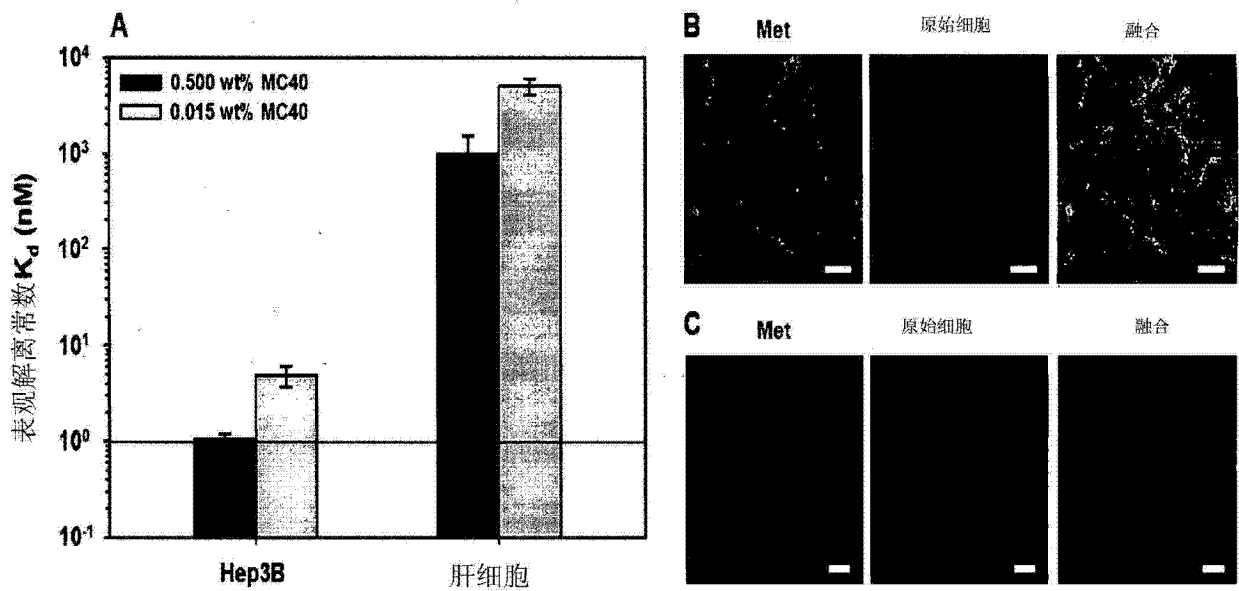


图 8

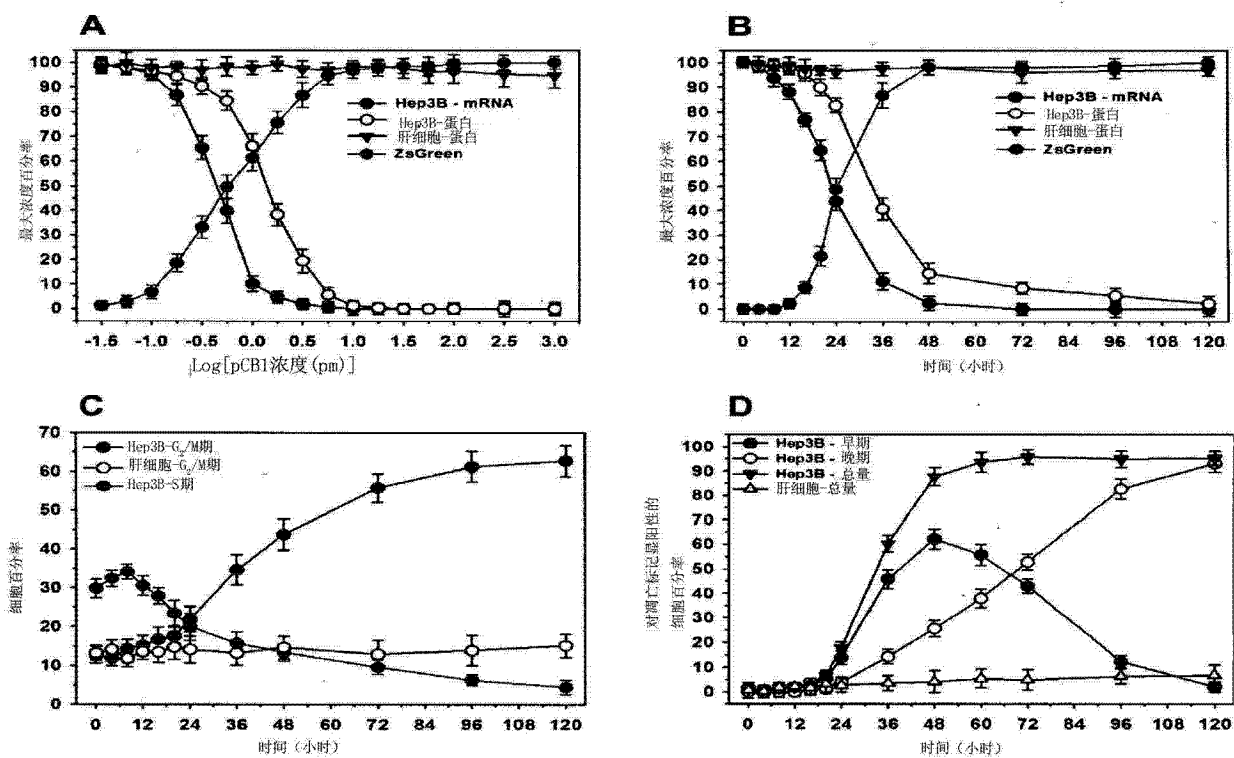


图 9

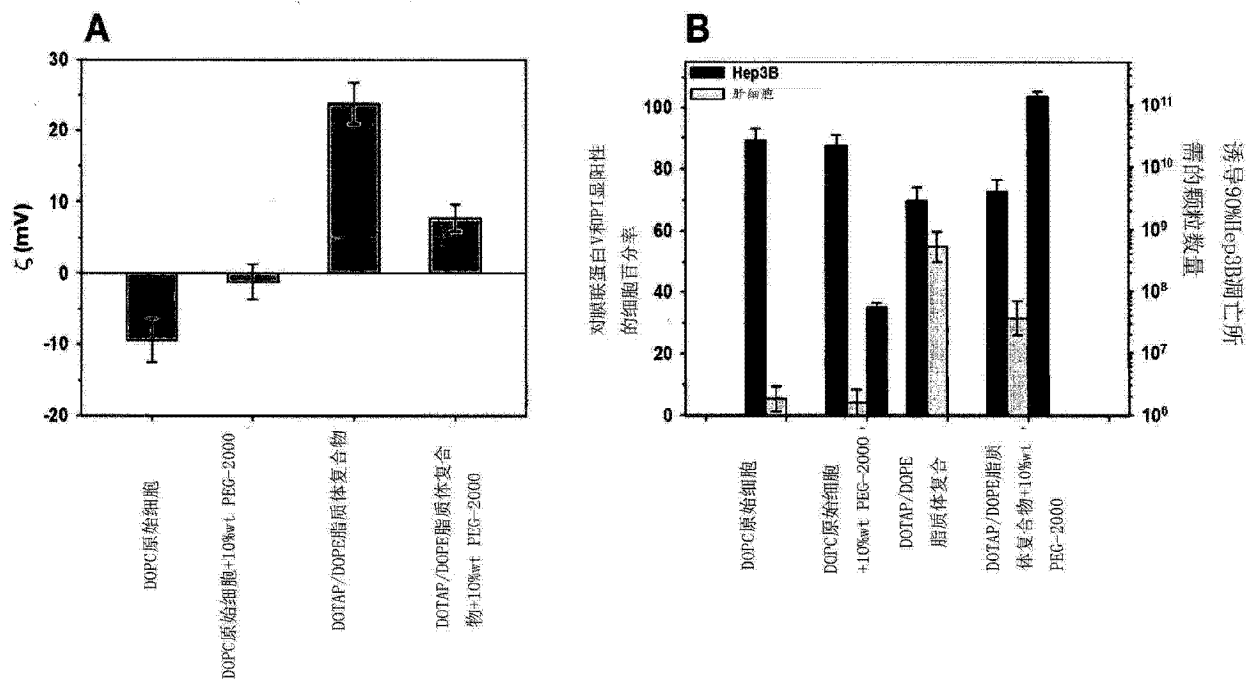


图 10

A

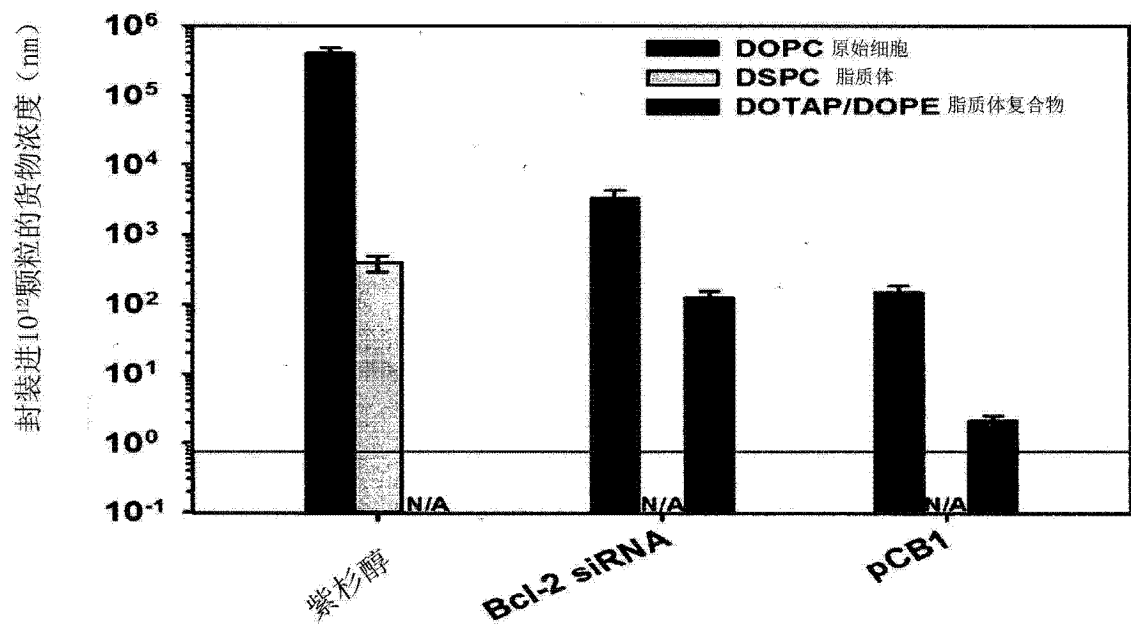


图 11

B

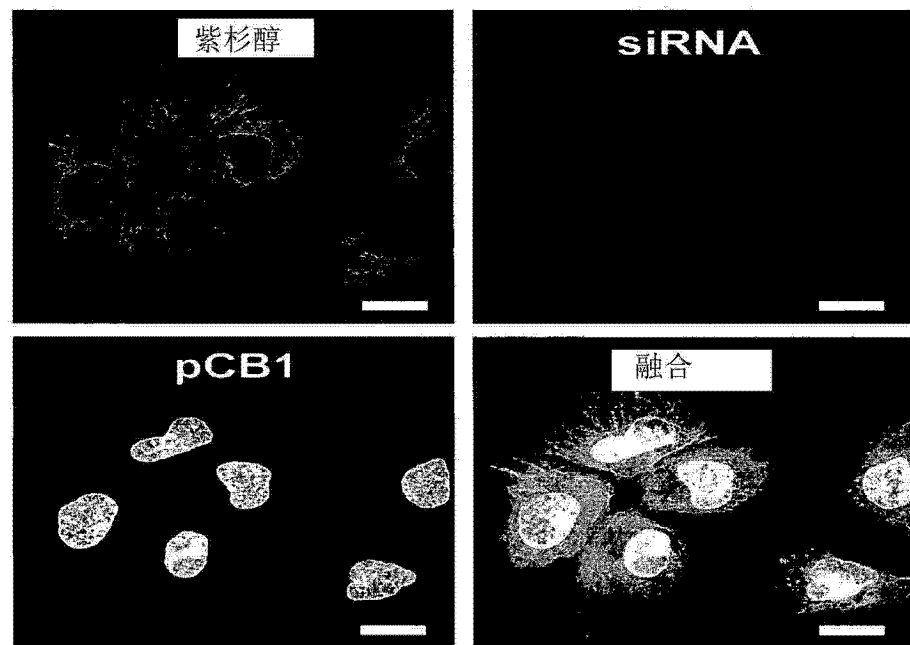


图 11 续 1

C

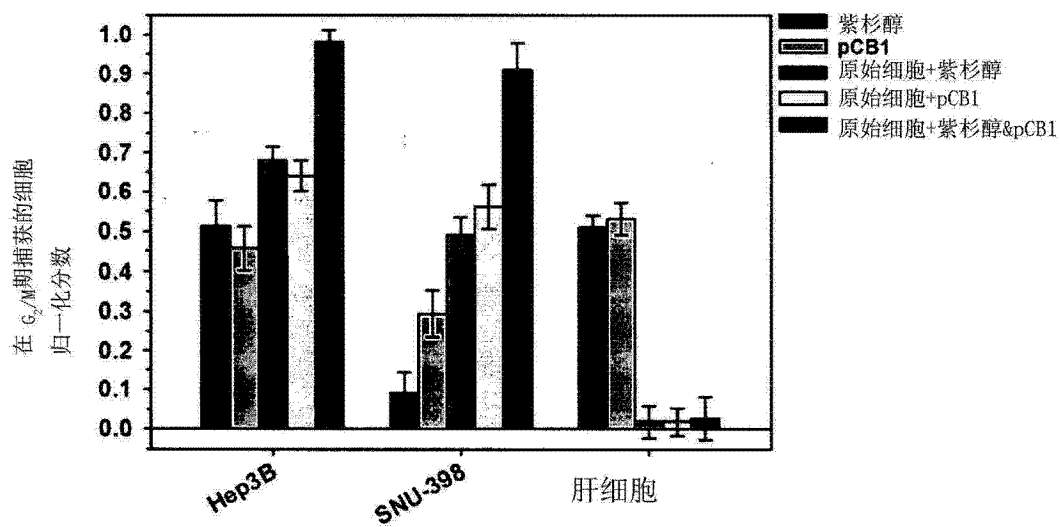


图 11 续 2

D

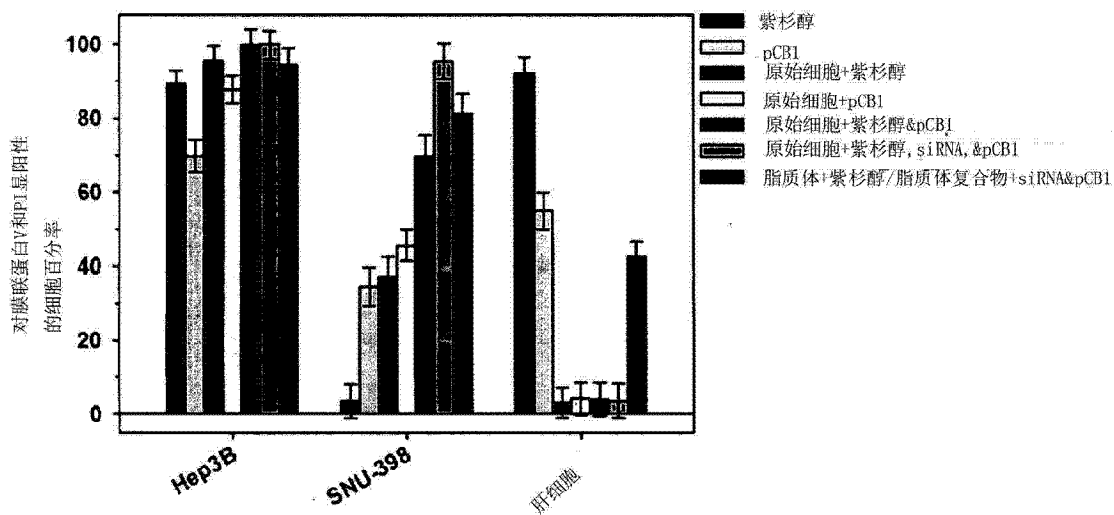


图 11 续 3

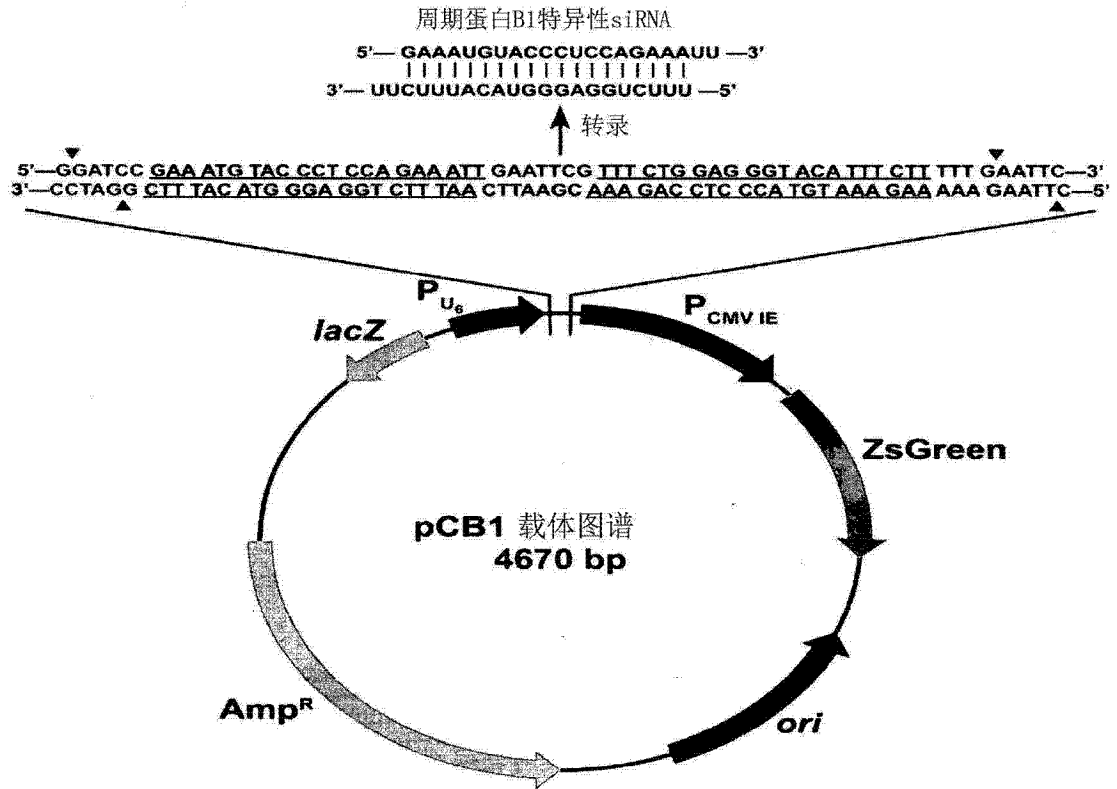


图 12

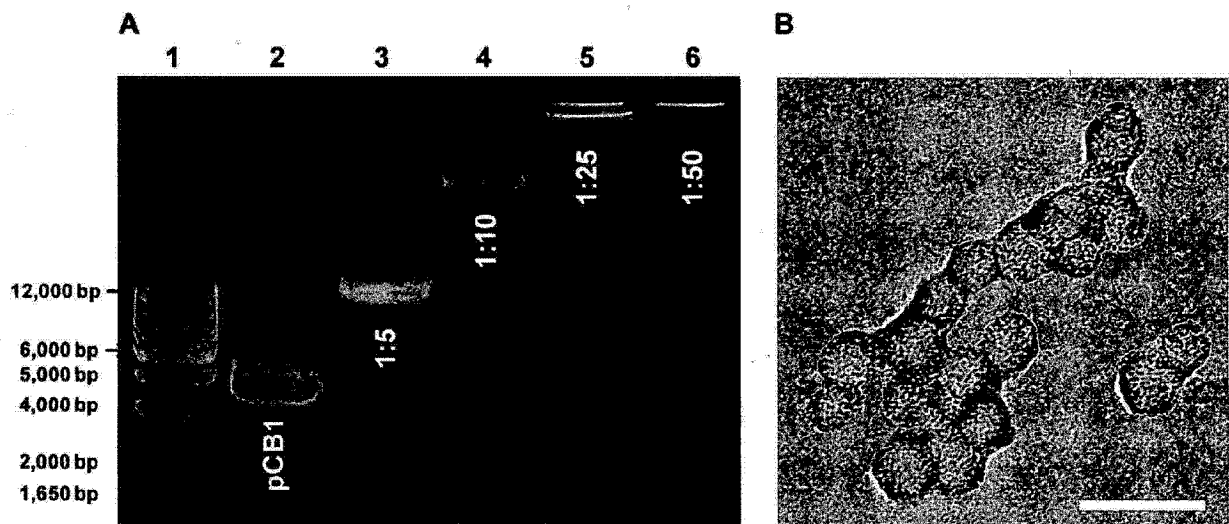


图 13

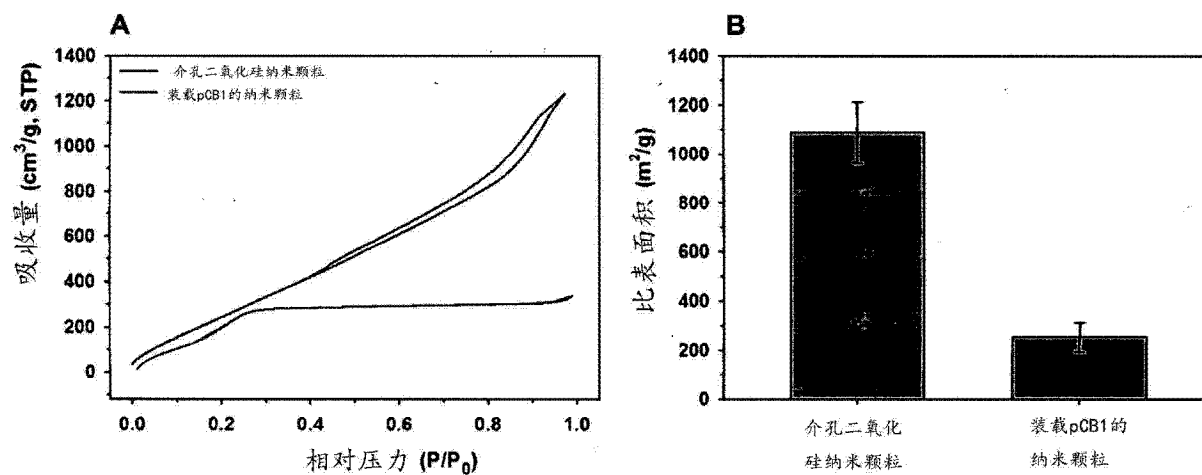


图 14

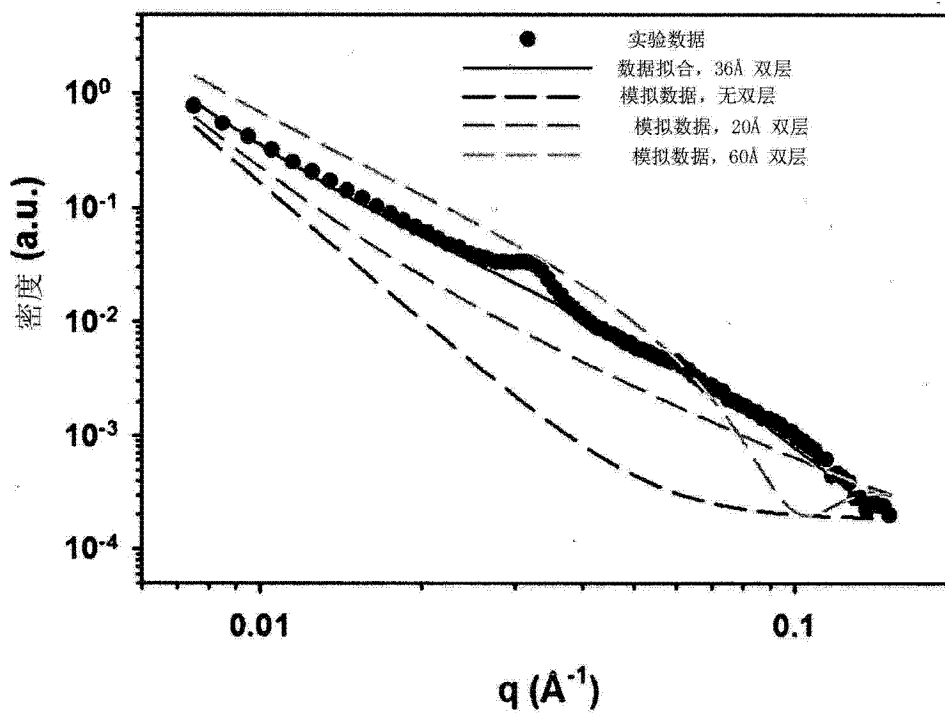


图 15

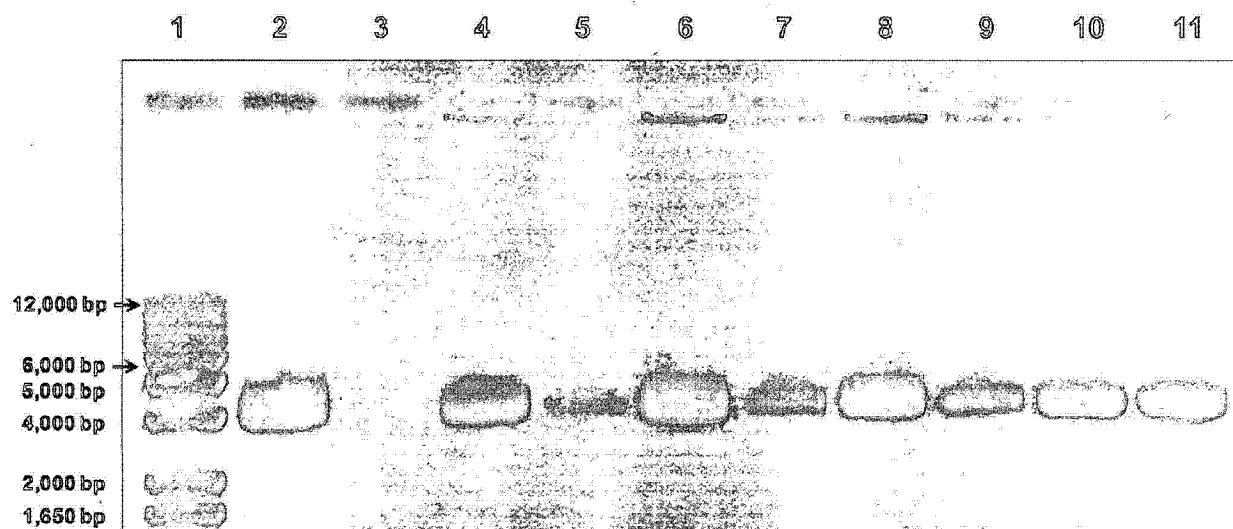


图 16

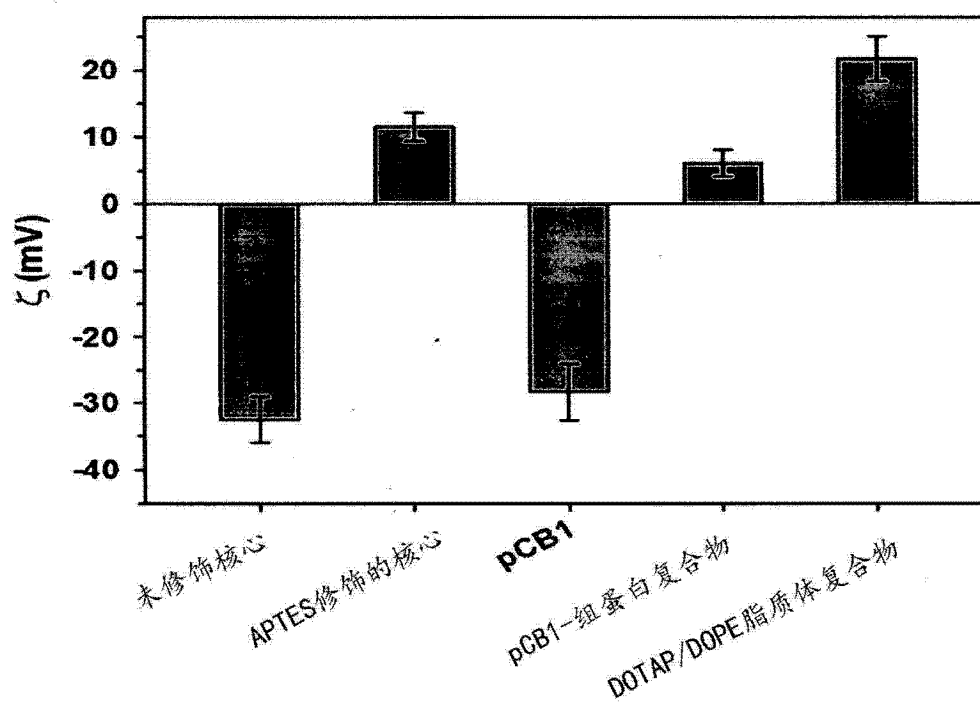


图 17

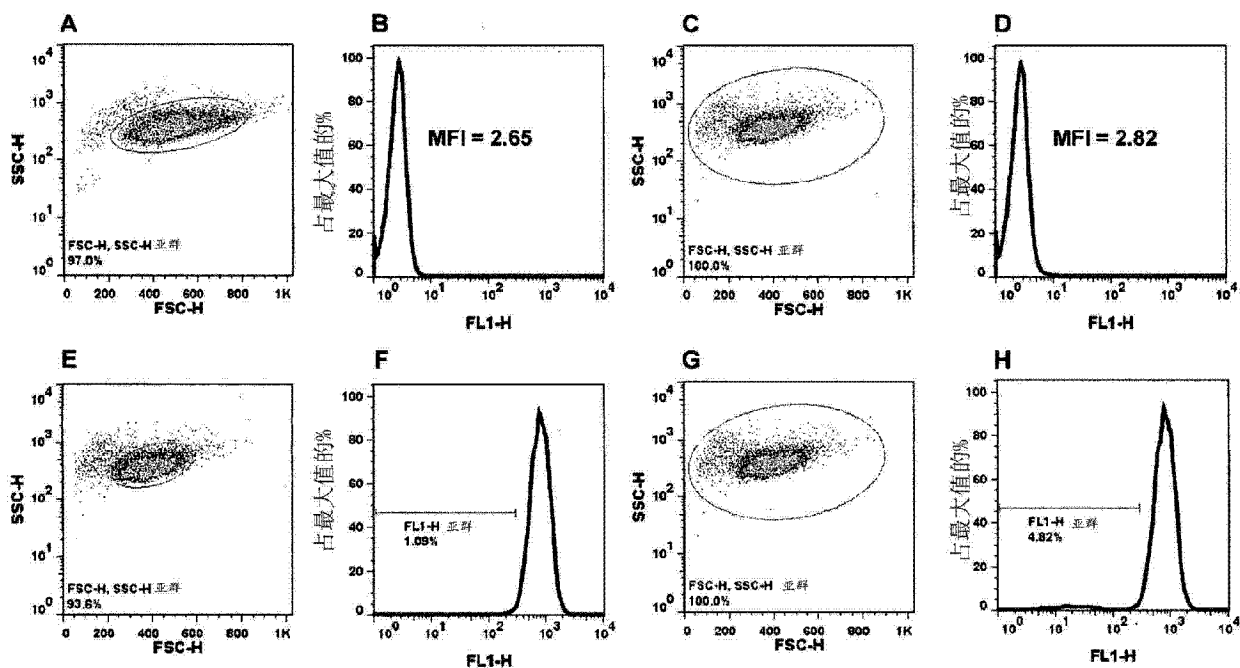


图 18

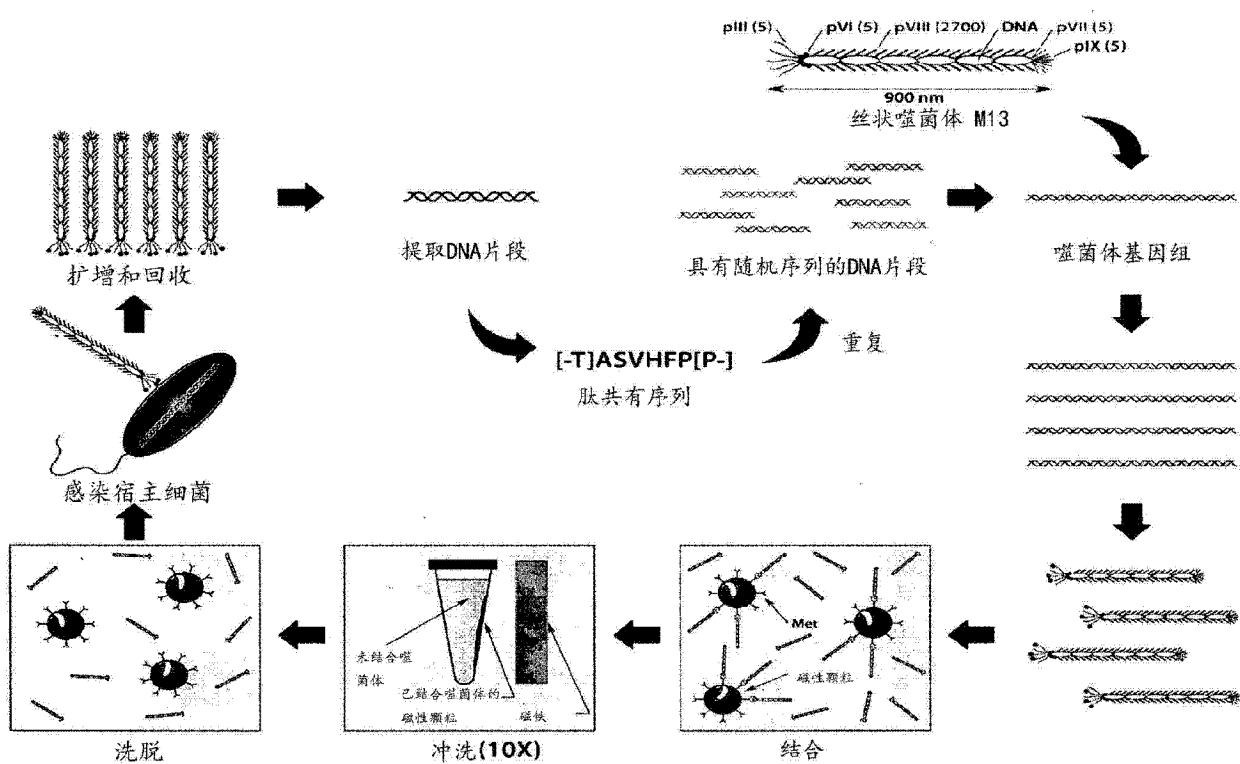


图 19

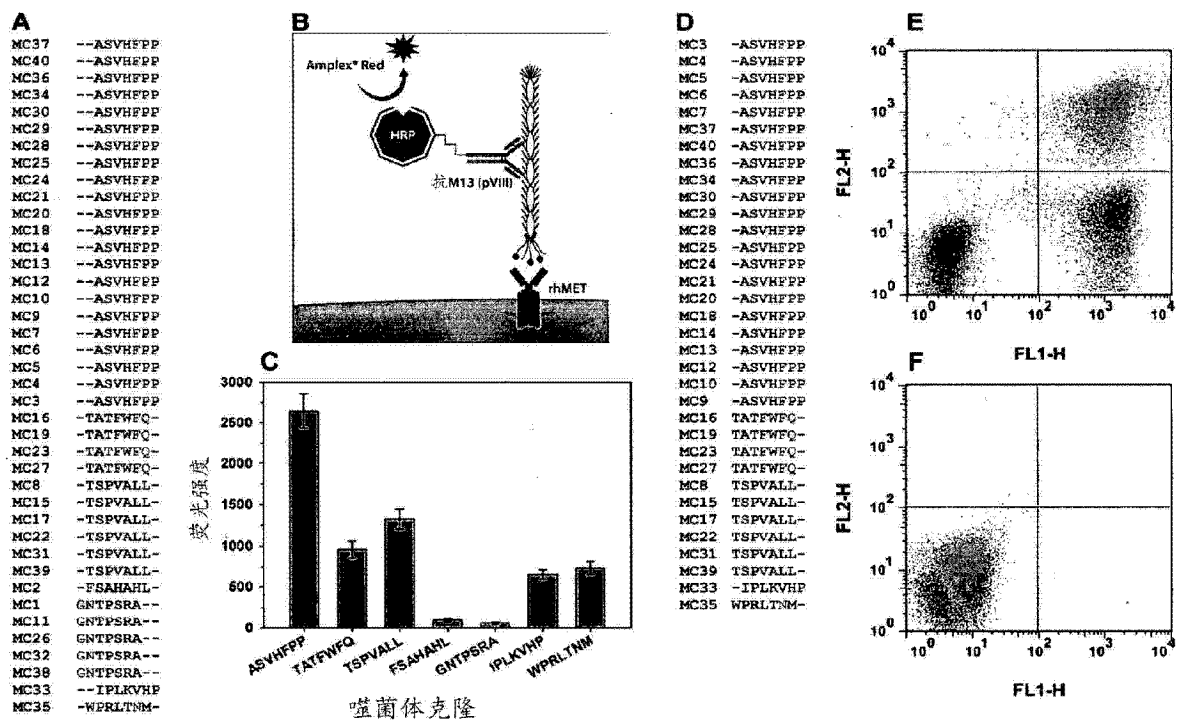


图 20

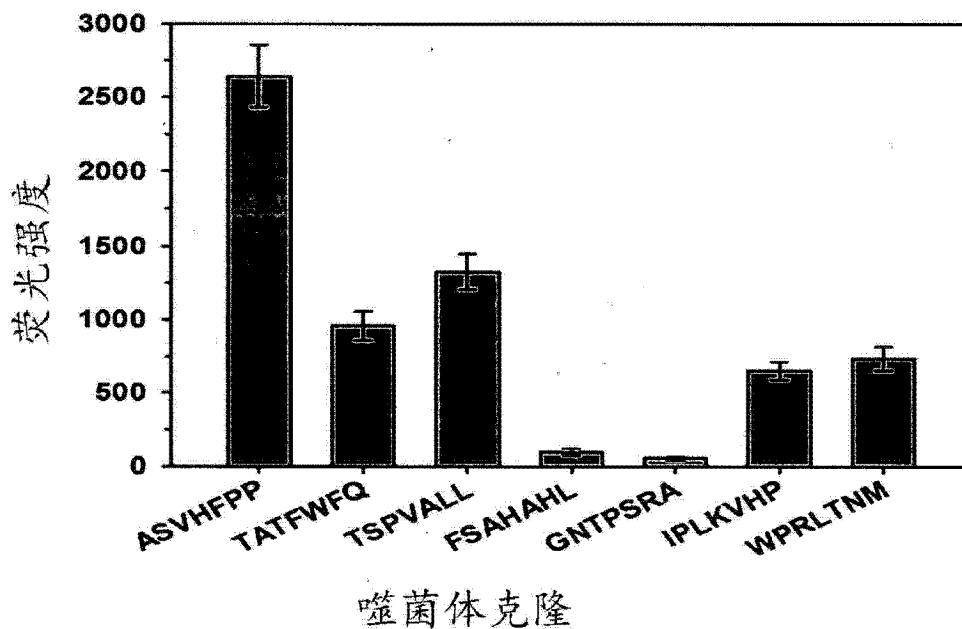


图 20 续

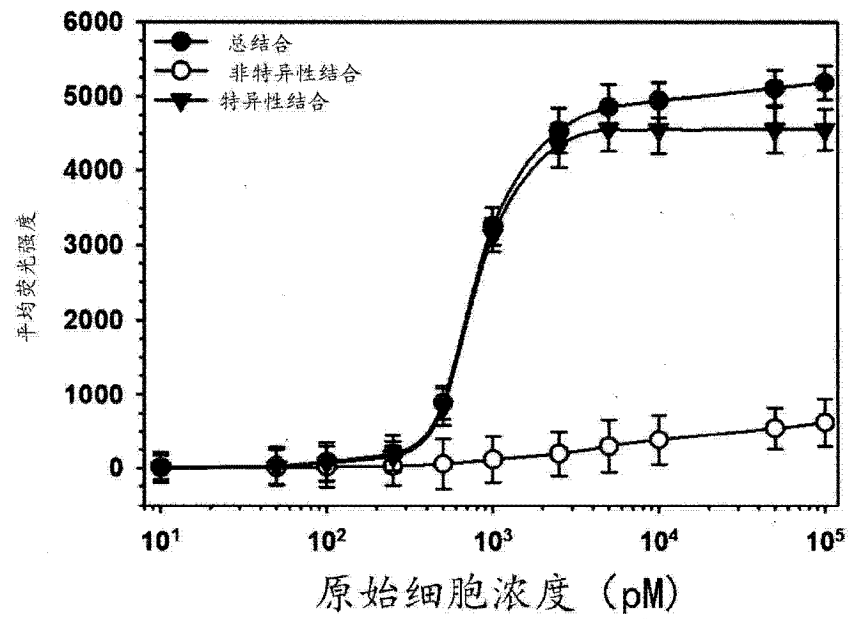


图 21

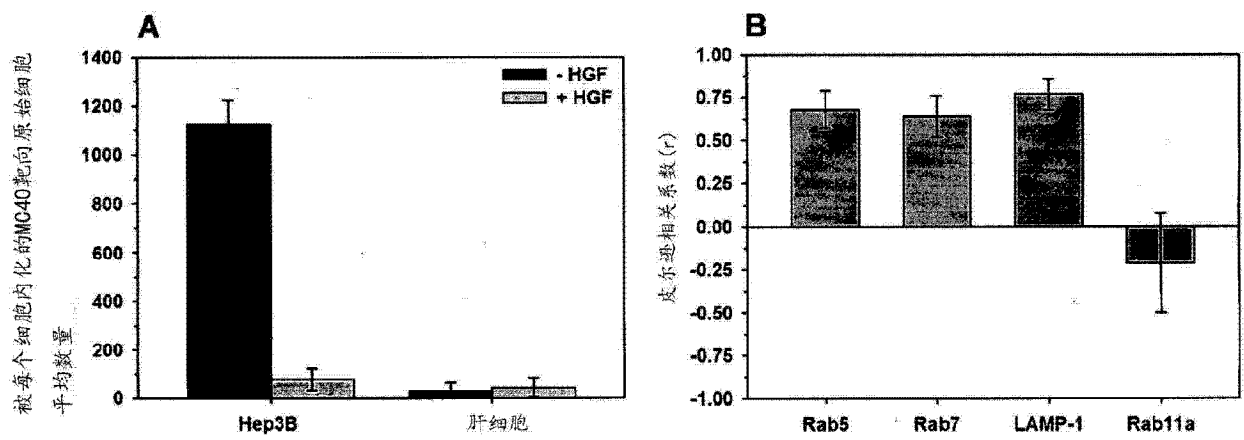


图 22

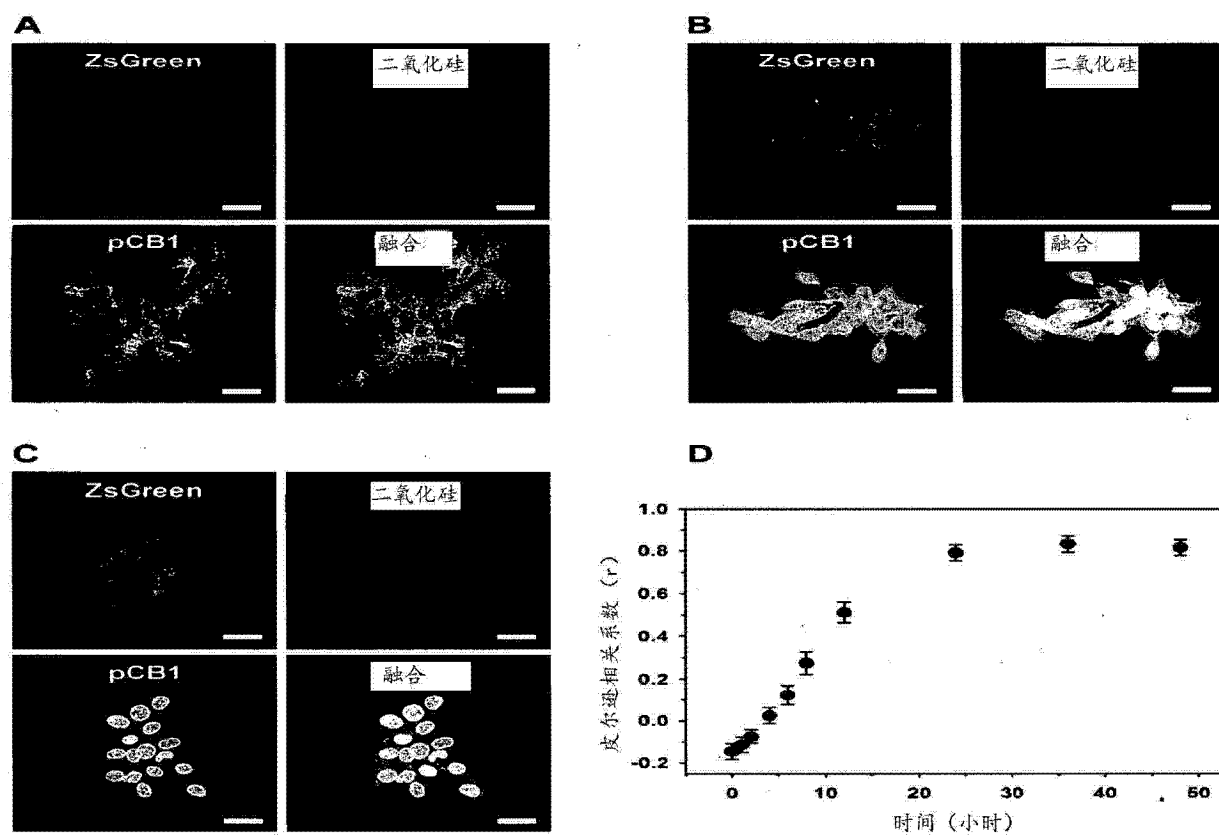


图 23

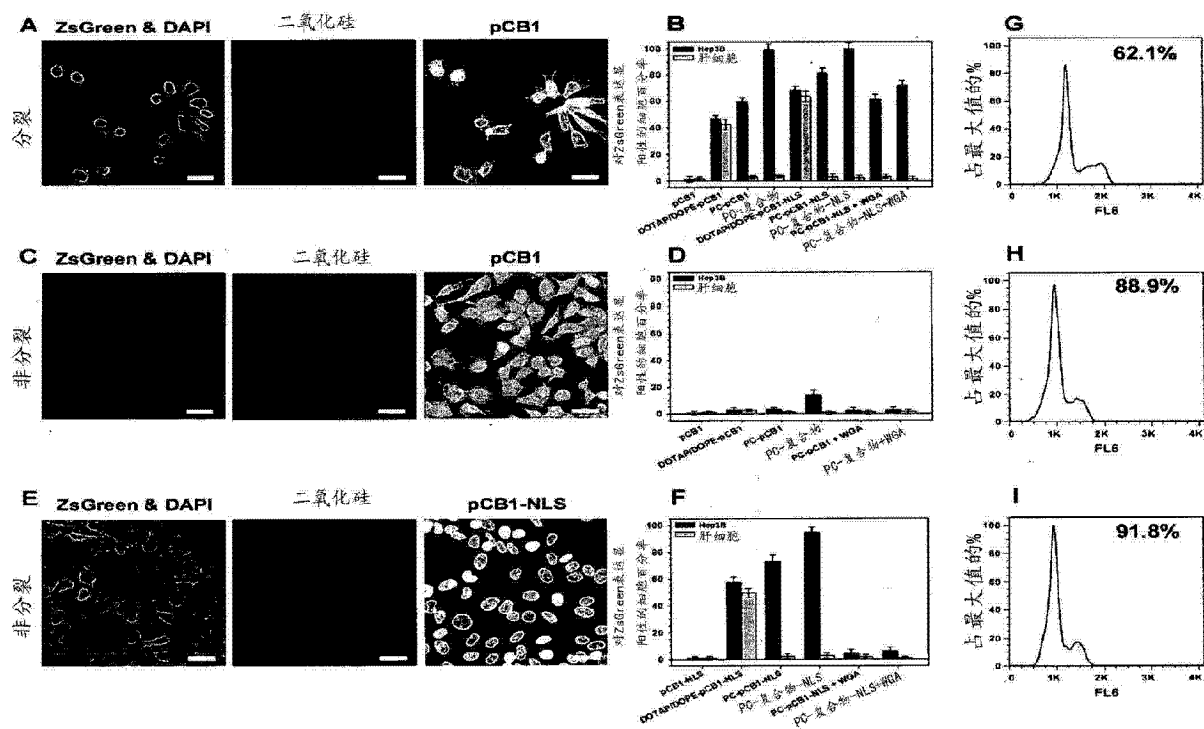


图 24

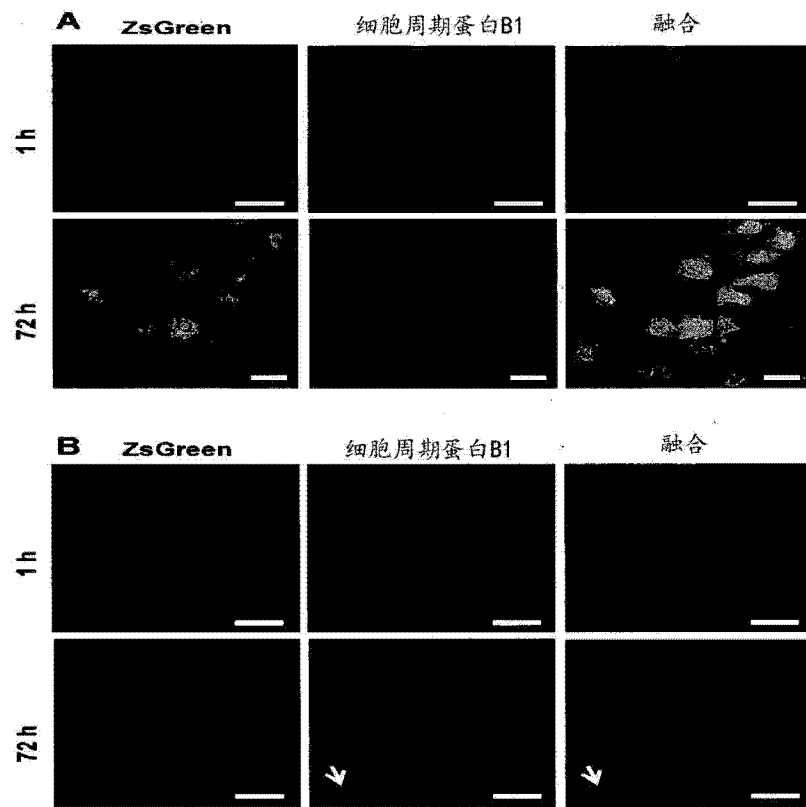


图 25

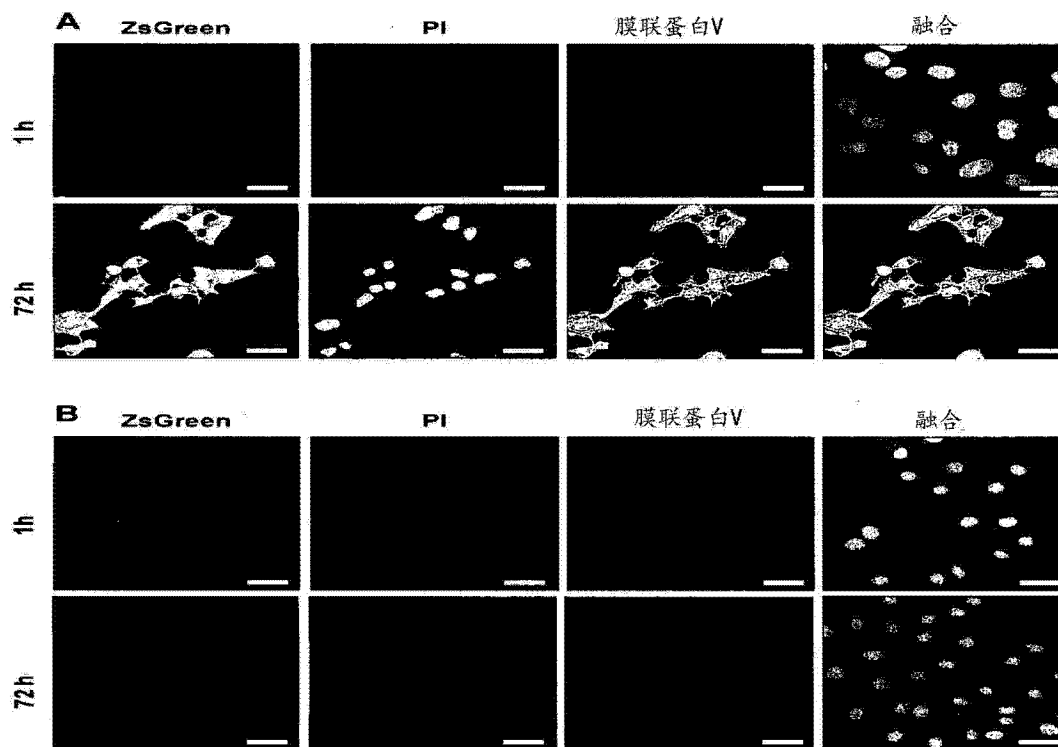


图 26

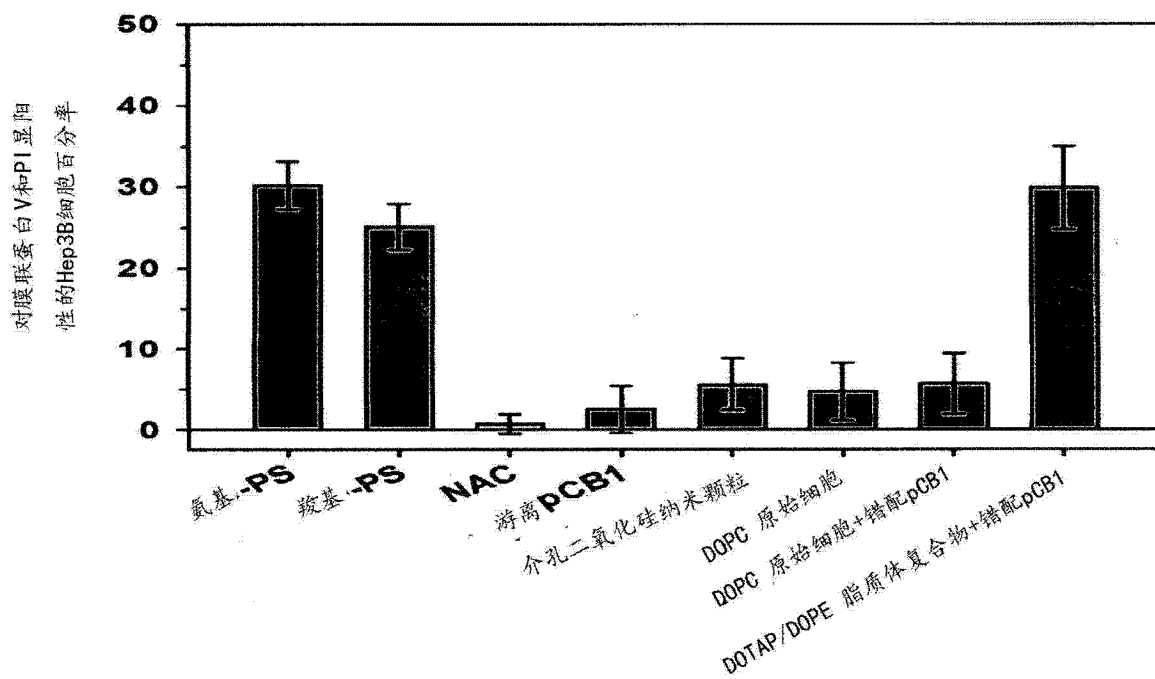


图 27