(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117715612 A
(43)申请公布日 2024.03.15

(21)申请号 202280051843.7
(22)申请日 2022.07.22
(30)优先权数据
2110644.8 2021.07.23 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.01.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2022/051937 2022.07.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/002222 EN 2023.01.26
(71)申请人 SISAF有限公司
地址 英国萨里
(72)发明人 R·S·萨菲-西伯特 M·艾哈迈德 F·苏特拉
(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322
专利代理师 顾小曼
(51)Int.Cl.
A61K 8/25(2006.01)

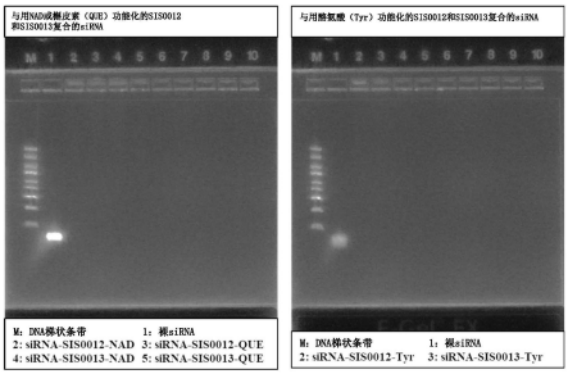
权利要求书2页 说明书31页 附图26页

(54)发明名称

包括掺杂硅颗粒的组合物以及相关方法

(57)摘要

一种药物组合物,其包括:包括可水解的掺杂硅的颗粒和一种或多种与活性药物成分复合的脂质,其中颗粒以至少$1x10^{16}$个掺杂剂原子/cm^3的水平掺杂。以及相关产品、方法和医疗用途。



CN 117715612 A

1.一种药物组合物,其包括:包括可水解掺杂硅的颗粒和一种或多种与活性药物成分复合的脂质,其中所述颗粒以至少1x 10^{16}个掺杂剂原子/cm^3的水平掺杂。

2.根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述可水解掺杂硅颗粒以至多1x10^{20}个掺杂剂原子/cm^3的水平掺杂。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的药物组合物,其中所述活性药物成分是核酸。

4.根据权利要求3所述的药物组合物,其中所述核酸是RNA。

5.根据权利要求4所述的药物组合物,其中所述核酸是小干扰RNA(siRNA)或小激活RNA(saRNA)或小发夹RNA(shRNA)。

6.根据权利要求4所述的药物组合物,其中所述核酸是信使RNA(mRNA)。

7.根据权利要求6所述的药物组合物,其中所述mRNA编码致病生物的蛋白质。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物是疫苗组合物。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物还包括氨基酸。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物还包括非还原性二糖,例如海藻糖。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的药物组合物,其中所述掺杂硅颗粒包括掺硼硅。

12.根据权利要求1至10中任一项所述的药物组合物,其中所述掺杂硅颗粒包括掺磷硅。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的药物组合物,其中所述掺杂硅颗粒已经掺杂成有意地引入杂质,以达到调节核酸结合性质的目的。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的药物组合物,其中所述掺杂硅颗粒已经掺杂成有意地引入杂质,以达到调节脂质结合性质的目的。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的药物组合物,其中所述一种或多种脂质包括可电离脂质。

16.根据权利要求1至14中任一项所述的药物组合物,其中所述一种或多种脂质包括阳离子脂质。

17.根据权利要求16所述的药物组合物,其中所述一种或多种脂质包括DOTAP。

18.根据权利要求16所述的药物组合物,其中所述一种或多种脂质包括外消旋混合物形式的DOTAP。

19.根据权利要求16所述的药物组合物,其中所述一种或多种脂质包括S对映异构体形式的DOTAP。

20.根据权利要求16所述的药物组合物,其中所述一种或多种脂质包括R对映异构体形式的DOTAP。

21.根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述一种或多种脂质包括一种或多种脂化寡肽,优选地其中所述一种或多种脂化寡肽各自含有具有3至20个氨基酸残基的寡肽部分和具有12至18个碳原子的脂肪酸链,并且优选地其中至少一个氨基酸残基在pH 7.4下带正电荷。

22.包括可水解的掺杂硅、任选地可水解的掺硼硅的颗粒用于增强包括活性药物成分的药物组合物的功效的用途,其中所述颗粒以至少$1x10^{16}$个掺杂剂原子/cm^3的水平掺杂。

23.根据权利要求22所述的用途,其中所述药物组合物如权利要求1至21中任一项所定义。

24.根据权利要求22或权利要求23所述的用途,其中所述活性药物成分如权利要求3至7中任一项所定义。

25.根据权利要求22至24中任一项所述的用途,其中所述药物组合物的功效通过所述颗粒增加所述活性药物成分在室温下的稳定性而增强。

26.根据权利要求22至25中任一项所述的用途,其中所述药物组合物的功效通过所述颗粒增加所述活性药物成分的细胞内稳定性而增强。

27.根据权利要求22至26中任一项所述的用途,其中所述药物组合物的功效通过所述颗粒保护所述活性药物成分免于降解,例如酶促降解,而增强。

28.根据权利要求22至27中任一项所述的用途,其中所述药物组合物的功效通过所述颗粒增强所述活性药物成分被靶细胞或组织摄取而增强。

29.根据权利要求1至21中任一项所述的药物组合物用作药物的用途。

30.根据权利要求29所述的药物组合物的用途,其中所述药物是疫苗。

31.根据权利要求1至21中任一项所述的药物组合物在制备药物例如疫苗中的用途。

32.一种治疗或预防疾病或病症的方法,其包括向有需要的受试者施用根据权利要求1至21中任一项所述的药物组合物。

33.一种向有需要的受试者提供疫苗的方法,其包括向所述受试者施用根据权利要求1至21中任一项所述的药物组合物。

34.一种增加活性药物成分,例如核酸,例如mRNA或siRNA,的存储稳定性的方法,所述方法包括使所述核酸与可水解的掺杂硅颗粒和一种或多种脂质接触,其中所述可水解的掺杂硅颗粒以至多$1x10^{16}$个掺杂剂原子/cm^3的水平掺杂。

35.根据权利要求34所述的方法,其中所述核酸如权利要求4至6中任一项所定义,和/或其中所述可水解的掺杂硅颗粒是可水解的掺硼硅颗粒。

36.根据权利要求34或权利要求35所述的方法,其中所述接触额外地在氨基酸的存在下和/或在非还原性二糖,例如海藻糖,的存在下发生。

37.根据权利要求1至21中任一项所述的药物组合物,其用于将活性药物成分靶向至细胞或组织。

38.根据权利要求1至21中任一项所述的药物组合物,其用于制造用于将活性药物成分靶向至细胞或组织的药物。

39.一种将活性药物成分靶向至细胞或组织的方法,其包括向有需要的受试者施用根据权利要求1至21中任一项所述的药物组合物。

包括掺杂硅颗粒的组合物以及相关方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于包括核酸和/或其它药物活性化合物的组合物中的改进的颗粒，以及相关产品和方法。这样的方法、产品和组合物尤其可用于但不限于在基因疗法和疫苗组合物中递送核酸。本发明的颗粒包括已掺杂有一种或多种其它元素的硅。本发明还涉及包括本发明的颗粒的药物组合物，以及相关的方法和用途。

背景技术

[0002] 人们对于活性药剂的递送载体和运载体(vehicle)的改进存在需求。这是将生物医学研究的进步完全转化为有效、安全和具有成本效益的治疗所需要的。

[0003] 作为说明性实例，已经提出核酸例如RNA作为治疗剂。已提出小干扰RNA(siRNA)用于基因疗法。用于疗法或其它目的的基因递送是众所周知的，特别是用于治疗疾病例如囊性纤维化和某些癌症，并且最近mRNA已用于针对SARS-CoV-2的有效疫苗。如本文所用，术语“基因疗法”是指将基因或基因的一部分递送至细胞中以纠正一些缺陷。在本说明书中，术语“核酸疗法”还用于指将核酸材料引入至靶细胞中的任何方式，并且包括基因疫苗接种。此外，术语“核酸递送”可以涵盖在所谓的细胞工厂中体外产生商业上有用的蛋白质。

[0004] 用于将核酸递送至细胞的递送系统分为三大类，即涉及直接注射裸核酸的递送系统；使用病毒或遗传修饰病毒的递送系统；和使用非病毒递送剂的递送系统。每个都有其优点和缺点。尽管病毒作为递送剂具有高效和高细胞选择性的优点，但其具有毒性、产生炎症应答以及难以递送大核酸片段的缺点。因此，mRNA疫苗可以包括可注射的裸mRNA或非病毒递送系统，例如脂质纳米颗粒载体。可惜的是，已注意到非病毒递送系统的转染效率较低。mRNA也存在众所周知的稳定性问题。

[0005] 非病毒基因递送系统基于通过带负电荷的核酸磷酸酯主链和阳离子脂质以及任选的肽或其它化合物之间的静电相互作用将遗传材料压缩入纳米颗粒(Erbacher,P.等人，Gene Therapy,1999,6,138-145)。认为脂质纳米颗粒非病毒载体的有效负载(payload)递送机制涉及完整复合物的内吞作用，其中核酸和脂质之间形成的复合物变为附着在细胞表面，然后通过内吞作用进入细胞。然后复合物在囊泡(vesicle)或内体(endosome)中保持定位一段时间，然后核酸成分释放到细胞质中。然后可以发生核酸编码的蛋白质的产生或另一种基因修饰的表达。

[0006] 非病毒递送系统的组分通过静电缔合形成载体复合物。脂质成分保护核酸以及在一定程度上保护任何肽成分免于降解、内体降解或其它降解。用于这种用途的阳离子脂质是由Felgner在20世纪80年代末开发的，并在Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84,7413-7417,1987中以及在US 5,264,618中报道。Felgner开发了现在市售的商标为“Lipofectin”的阳离子脂质体。“Lipofectin”脂质体是具有比率为1:1的阳离子脂质DOTMA(2,3-二油酰氧基丙基-1-三甲基铵)和中性磷脂脂质DOPE(磷脂酰乙醇胺或1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)的脂质双层的球形囊泡。此后设计了各种其它阳离子脂质体配方，其中大多数将合成阳离子脂质和中性脂质组合。除了DOTMA类似物之外，还可以提及复合烷基胺/烷基酰胺、胆

固醇衍生物如DC-Chol、以及二棕榈醇、磷脂酰乙醇胺、谷氨酸酯、咪唑和膦酸酯的合成衍生物。然而,在血清存在的情况下,阳离子载体系统的转染效率差异很大,这明显影响了其用于体内基因疗法和疫苗接种的潜在用途。可电离(ionizable)脂质,例如带正电荷的脂质,是有用的转染剂,因为它们的正电荷倾向于允许其与带负电荷的核酸复合。据了解,不同的脂质具有不同水平的正电荷。可惜的是,有许多脂质的正电荷不足以使核酸充分复合,从而足够保护核酸免于降解,例如在长期存储期间。相反,带非常高正电荷的脂质可以高效地结合核酸,因此可能是用于在长期存储期间保护核酸的有希望的候选物,但可能具有阻止其临床使用的毒性问题。例如,聚乙烯亚胺(PEI)具有高度阳离子性,并用作有效的体外转染脂质。然而,它们具有毒性,这妨碍了它们在临床治疗中的使用。脂质转染剂也可能在存储期间降解(或"老化"),这降低了它们保护与其复合的核酸的能力,并且可能需要使用过量的脂质以减轻随着时间的推移预期的活性损失。

[0007] 出人意料地,存在少量适合并批准用于临床使用的脂质转染剂,其既具有可接受的毒性特征又引起有效的转染。目前1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)是许多应用中受欢迎的转染试剂(包括Pfizer的SARS-CoV-2mRNA疫苗),但它存在供应问题,并且几乎没有可用的替代品。

[0008] 现转向非病毒递送系统的任选的肽组分,如上所述:在转染复合物中任选与脂质一起使用的肽通常具有两种功能性:含有细胞表面受体(例如整联蛋白)识别序列的"头基",以及可以非共价结合核酸(例如,mRNA)的"尾"。这样的肽组分可以在某种程度上设计成具有细胞类型特异性或细胞表面受体特异性。特异性来自于针对细胞表面受体的靶向。例如,一定程度的整联蛋白特异性可以赋予复合物一定程度的细胞特异性。可以实现与一些腺病毒载体相当的转染效率(Jenkins等人Gene Therapy 7,393-400,2000)。然而,对于能够在不依赖这种肽的情况下靶向特定细胞或特定组织的组合物仍然存在需求。

[0009] 本发明寻求增加药物组合物递送活性药物成分、特别是脂质转染剂的功效,以实现以下优点中的一项或多项:

[0010] 1)脂质保护核酸在存储期间免于降解的能力的功效增加;

[0011] 2)转染效率增加;

[0012] 3)用于保护核酸在存储期间免于降解的脂质的稳定性增加;

[0013] 4)在转染组合物中使用较低水平的脂质,并且特别是较低水平的阳离子脂质如DOTMA或DOTAP,同时仍保持足够的转染能力和/或良好的存储稳定性的能力;

[0014] 5)在转染组合物中使用更广泛的脂质,同时仍保持足够的转染能力和/或良好的存储稳定性的能力;和

[0015] 6)更有针对性地将活性药物成分例如核酸递送至特定类型的组织或特定类型的细胞。

[0016] 迄今为止,将信使RNA(mRNA)通过非病毒递送至细胞特别存在问题,并且由于缺乏有效的载体而受到限制。尝试使用已知的非病毒运载体递送mRNA会导致蛋白质表达水平不理想,例如由于mRNA对特定组织或对特定细胞的靶向性差。此外,已知的非病毒运载体在与mRNA一起包装时存储稳定性差。克服脂质双层将RNA递送至细胞中仍然是RNA疗法广泛发展的主要障碍。

[0017] 因此,需要针对mRNA递送而特异性定制的载体,其将高水平的mRNA递送至细胞,任

选地对特定类型的组织或对特定类型的细胞具有特异性,并导致良好的蛋白质表达水平。还需要针对mRNA递送而定制的组合物,其在存储时具有良好的稳定性,特别是在中等温度存储时保留其结构和功能性的mRNA递送复合物。类似的考虑也适用于siRNA疗法的递送。

[0018] 许多针对SARS-CoV-2的mRNA疫苗,包括Pfizer BioNTech疫苗BNT162b2("Comirnaty")和Moderna CX-024414疫苗,都需要超冷链存储和运输。这限制了低收入国家获得疫苗的机会,并在所有市场中增加成本和物流复杂性。如果疫苗可以在标准冰箱温度(约4℃)或室温(约20℃)下存储和运输,将是有利的。如果疫苗可以耐受更高的存储温度(例如30℃、40℃或50℃),或者至少可以在运输和配送期间在短期内耐受,也是有利的。具体地,如果现有的包括mRNA和脂质的mRNA疫苗制剂可以改良成增加其转染效率,则将是有用的。这样做的益处是允许使用较低的剂量,潜在地减少副作用并增加可用剂量的总数。如果现有的包括mRNA和脂质的mRNA疫苗制剂可以改良成改善其存储稳定性,从而允许在更高的温度和/或更长的时间内配送和存储,这也将是有用的。如果可以现有的mRNA疫苗制剂可以改良成需要较低水平的脂质(特别是较低水平的阳离子脂质,例如DOTAP)和/或与更广泛的脂质一起发挥作用,以减少对特定脂质、特别是阳离子脂质例如DOTAP的可用性压力,这也将是有用的。

[0019] 通过低温的方式保持可注射组合物例如mRNA疫苗组合物中mRNA的稳定性不仅带来物流上的挑战,还具有技术上的限制,即mRNA必须在注射前解冻,并且在注射后,它必须在体内较高温度下保持稳定足够长的时间,以显示足够的生物活性。这可能需要在围绕身体易位和/或从内体区室逃逸期间保持稳定性。体内稳定性还必须维持足够长的时间,以便充分翻译成蛋白质得以发生。

[0020] mRNA容易受到酶促和化学降解。能够降解RNA例如mRNA的酶存在于用于制造mRNA的生物培养系统中,并且难以完全去除。酶活性可以通过低温和/或通过RNA的冻干减慢,但这些解决方案都有缺点。

[0021] 现有技术中已使用脂质封装来保护RNA(例如用于基因疗法或疫苗接种的mRNA)免于降解。虽然这种方法可行,但它使用相对大量的特定脂质,这些脂质可能昂贵和/或供应短缺,并且存在脂质本身随着时间的推移而降解并因此失去其保护特点的问题。还需要改进的赋形剂以增加包括核酸和脂质的组合物的多种组分的稳定性。

[0022] 尽管目前认为本发明的组合物和方法在改进包括核酸和脂质的药物组合物方面是最有希望的,但它们也适用于稳定和保护非核酸活性成分包括有机小化合物和肽(例如肽抗原)免于降解。

发明内容

[0023] 本发明基于以下认识,即,已经掺杂的元素硅,特别是已经以至少1x 10^{15}、尤其是至少1x 10^{16}个掺杂剂原子/cm^3的水平掺杂(尤其是掺硼)的元素硅,可用于使包括一种或多种脂质的组合物例如转染组合物中的活性药物成分,特别是核酸稳定化。这种组合物显示出增强的转染效率、增强的组织或细胞靶向能力、降低的对阳离子脂质的依赖性和/或增强的存储稳定性。掺杂硅可以使活性药物成分(特别是核酸)本身稳定化,并且还使一种或多种脂质稳定化,使得一种或多种脂质可以在更长时间内保留允许其保护活性药物成分、特别是核酸的性质。脂质和/或核酸的稳定化可以使得组合物能够比起具有核酸作为活性药

物成分但不包括可水解的掺杂硅颗粒的常规组合物(例如,在室温下,或在4℃)存储更长时间和/或在更高的温度下存储,而不出现降解问题。它还可以允许组合物更有效地转染细胞,例如通过提供对特定组织类型和/或特定细胞类型的改进的靶向作用,以及随后通过活性药物成分、特别是核酸提供一种或多种治疗效果。尽管对于核酸(例如mRNA)疗法而言,稳定性和有效递送的一些挑战尤其严峻,但已进一步发现,包括可水解的掺杂硅颗粒和一种或多种脂质的组合物的稳定化和保护性质也适用于其他的非核酸活性药物成分,例如肽、蛋白质和小分子。可水解的硅的掺杂可以使具有不同功能性的不同两亲性分子组合在可水解的硅材料的基质晶体结构中;因此,可水解的掺杂硅不仅抵消有机分子例如脂质的不稳定性,而且还增强活性药物成分,特别是核酸(例如mRNA)分子的稳定性。据认为,本发明的优点不仅源自有机化合物的结合或负载,这例如可以发生在可水解的掺杂硅颗粒的孔内;而且还源自于有意地引入的杂质(掺杂剂),其可以用作有机材料例如一种或多种脂质的二次结合的结构支架的一部分。

[0024] 根据本发明的第一方面,提供一种药物组合物,其包括:包括可水解掺杂硅的颗粒和至少一种与活性药物成分复合的脂质。任选地,颗粒以至少$1x10^{16}$个掺杂剂原子/cm^3的水平掺杂。

[0025] 根据本发明的第二方面,提供包括可水解掺杂硅、任选可水解掺硼硅的颗粒用于增强包括活性药物成分的药物组合物的功效的用途。再次,任选地,颗粒以至少$1x10^{16}$个掺杂剂原子/cm^3的水平掺杂。

[0026] 根据本发明的第三方面,提供一种根据本发明的第一方面的药物组合物,其用作药物。

[0027] 根据本发明的第四方面,提供根据本发明的第一方面的药物组合物在制造药物例如疫苗中的用途。

[0028] 根据本发明的第五方面,提供一种治疗或预防受试者中的疾病或病症的方法,其包括向有需要的受试者施用根据本发明的第一方面的药物组合物。

[0029] 根据本发明的第六方面,提供一种向有需要的受试者提供疫苗的方法,其包括向所述受试者施用根据本发明的第一方面的药物组合物。

[0030] 根据本发明的第七方面,提供一种增加活性药物成分例如核酸例如mRNA或saRNA或shRNA或siRNA的存储稳定性的方法,该方法包括使核酸与可水解掺杂硅颗粒和一种或多种脂质接触。

[0031] 根据本发明的第八方面,提供一种根据本发明的第一方面的药物组合物,其用于将活性药物成分靶向至细胞或组织。

[0032] 根据本发明的第九方面,提供一种根据本发明的第一方面的药物组合物,其用于制造用于将活性药物成分靶向至细胞或组织的药物。

[0033] 根据本发明的第十方面,提供一种将活性药物成分靶向至细胞或组织的方法,其包括向有需要的受试者施用根据本发明的第一方面的药物组合物。

附图说明

[0034] 图1显示掺杂硼后的硅。

[0035] 图2显示研磨成粉末后的图1的掺硼硅。

[0036] 图3显示小鼠PMBC中ClCn7G213R的表达。

[0037] 图4显示ClCn7G213R的骨表达。

[0038] 图5显示CTX血液检验结果。

[0039] 图6显示负载有pDNA的Biocourier在制备后不久和在室温(RT)存储6小时后的凝胶电泳图像。

[0040] 图7显示负载有pDNA的Biocourier在室温(RT)存储24小时和48小时后的凝胶电泳图像。

[0041] 图8显示负载有pDNA的Biocourier在室温(RT)存储72小时和8天后的凝胶电泳图像。

[0042] 图9显示负载有pDNA的Biocourier在制备后不久和在4℃存储6小时后的凝胶电泳图像。

[0043] 图10显示负载有pDNA的Biocourier在4℃存储24小时和48小时后的凝胶电泳图像。

[0044] 图11显示负载有pDNA的Biocourier在4℃存储72小时和8天后的凝胶电泳图像。

[0045] 图12显示以不同浓度和体积比负载至SIS0012上的来自面包酵母(baker's yeast)的RNA的琼脂糖凝胶阻滞测定。使用裸RNA作为对照。在图像的前3列中,一些负载孔周围的框表示对照样品。在图像的最后一列中,泳道2、3、4含有X10稀释、V/V:2.5的SIS0113,泳道5、6、7含有X5稀释、V/V:2.5的SIS0113,泳道8、9、10含有X5稀释、V/V:5的SIS0113。

[0046] 图13显示在不同温度(室温(RT)、4℃和-20℃)存储后,在不同时间点(0-5小时)以选定的浓度和体积比负载至SIS0012上的鲱鱼睾丸DNA的琼脂糖凝胶阻滞测定。使用裸RNA作为对照。在左上图中,一些负载孔周围的框表示对照样品。在所有其它图像中,泳道2、3、4容纳室温下存储的样品,泳道5、6、7容纳在4℃存储的样品,泳道8、9、10容纳在20℃存储的样品。

[0047] 图14显示在不同温度(室温(RT)、4℃和-20℃)存储后,在不同时间点(24-72小时)以选定的浓度和体积比负载至SIS0012上的鲱鱼睾丸DNA的琼脂糖凝胶阻滞测定。使用裸RNA作为对照。在图像的左列和中列中,泳道2、3、4容纳室温下存储的样品,泳道5、6、7容纳在4℃存储的样品,泳道8、9、10容纳在20℃存储的样品。在最右边的两张图像中,泳道2、3、4容纳室温下存储的样品,泳道5、6、7容纳在4℃存储的样品,泳道8、9容纳在20℃存储的样品,泳道10容纳对照样品。

[0048] 图15显示在不同温度(室温(RT)、4℃和-20℃)存储后,在不同时间点(0-6小时)以选定的浓度和体积比负载至SIS0012上的ADO-siRNA的琼脂糖凝胶阻滞测定。使用裸RNA作为对照(所有图像中的泳道1)。在所有图像中,泳道2、3、4容纳室温下存储的样品,泳道5、6、7容纳在4℃存储的样品,泳道8、9、10容纳在20℃存储的样品。

[0049] 图16显示在不同温度(室温(RT)、4℃和-20℃)存储后,在不同时间点(24-120小时)以选定的浓度和体积比负载至SIS0012上的ADO-siRNA的琼脂糖凝胶阻滞测定。使用裸RNA作为对照(所有图像中的泳道1)。在所有图像中,泳道2、3、4容纳室温下存储的样品,泳道5、6、7容纳在4℃存储的样品,泳道8、9、10容纳在20℃存储的样品。

[0050] 图17显示在不同温度(室温(RT)和4℃)存储后,在不同时间点(0-6小时)以选定的

浓度和体积比负载至不含硅纳米颗粒的SIS0012上的ADO-siRNA的琼脂糖凝胶阻滞测定。使用裸RNA作为对照。最右边的6张图像中,泳道5、6、7容纳室温下存储的样品,泳道8、9、10容纳在4℃存储的样品。

[0051] 图18显示在室温(RT)或4℃存储后,在不同时间点(24-120小时)以选定的浓度和体积比负载至不含硅纳米颗粒的SIS0012上的ADO-siRNA的琼脂糖凝胶阻滞测定。使用裸RNA作为对照(所有图像中的泳道1)。在所有图像中,泳道5、6、7容纳室温下存储的样品,泳道8、9、10容纳在4℃存储的样品。

[0052] 图19显示在室温下存储后,在不同时间点(0-6小时)以选定的浓度和体积比负载至SIS0013上的ADO-siRNA的琼脂糖凝胶阻滞测定。使用裸RNA作为对照。

[0053] 图20显示在室温下存储后,在不同时间点(24-120小时)以选定的浓度和体积比负载至SIS0013上的ADO-siRNA的琼脂糖凝胶阻滞测定。使用裸RNA作为对照。

[0054] 图21显示在4℃存储后,在不同时间点(2-120小时)以选定的浓度和体积比负载至SIS0013上的ADO-siRNA的琼脂糖凝胶阻滞测定。使用裸RNA作为对照。在最右边的2张图像中,泳道2、3、4标记为“72h”。在紧邻这些图像左侧的图像中,泳道2、3、4标记为“24h”,并且泳道5、6、7标记为“48h”。

[0055] 图22显示不同浓度的碱性磷酸酶的作为酶活性度量的405nm处的UV-Vis吸光度的标准曲线。

[0056] 图23显示游离的碱性磷酸酶、负载至SIS0012上的碱性磷酸酶和负载至SIS0013上的碱性磷酸酶在50℃孵育后的作为酶活性度量的405nm处的UV-Vis吸光度的曲线。

[0057] 图24显示当负载siRNA时具有NAD、TYR和QUE的SIS0012和SIS0013的凝胶电泳图像。

[0058] 图25显示当负载siRNA时实施例6的DPPC/PAL-KTTKS-DOPE制剂的凝胶电泳图像。

[0059] 图26显示当负载siRNA时实施例6的DPPC/PAL-KTTKS-DOPE制剂的另一凝胶电泳图像。

[0060] 图27显示当负载mRNA时实施例6的DPPC/PAL-KTTKS-DOPE制剂的另一凝胶电泳图像。

具体实施方式

[0061] 本发明所有方面的组合物的颗粒包括可水解掺杂硅。硅为掺杂的;有利地,颗粒以至少$1x10^{15}$、尤其是至少$1x10^{16}$个掺杂剂原子/cm^3(例如,至少$1x10^{17}$、$1x10^{18}$、$1x10^{19}$或$1x10^{20}$个掺杂剂原子/cm^3)的水平掺杂。硅可以是n-掺杂的或p-掺杂的。本发明的所有方面均包括其中硅掺杂有选自Mg、P、Cu、Ga、Al、In、Bi、Ge、Li、Xe、N、Au、Pt的一种或多种元素的实施方式。

[0062] 最优选地,掺杂剂是p-掺杂剂;优选地,掺杂剂包括硼。因此,最优选地,掺杂剂是硼。P-掺杂硅可尤其适合于稳定带负电荷的核酸和其它带负电荷的药物活性成分。以此方式,任选地,与不包括可水解掺杂硅的常规转染组合物相比,根据本发明的所有方面的可水解硅颗粒的掺杂可以使得能够使用较少且可能不使用阳离子脂质,例如DOTMA或DOTAP,同时仍保持足够的转染能力(例如,良好的组织靶向能力或良好的细胞靶向能力)和/或良好的存储稳定性。

[0063] N-掺杂硅尤其可用于稳定带正电荷的药物活性成分,并且还可用于保护脂质例如带正电荷的脂质免于降解,这将间接增加活性药物成分例如核酸的稳定性和对其的保护。

[0064] 在本发明各个方面的实施方式中,其中活性药物成分是核酸,药物组合物任选地还包括聚阳离子核酸结合组分。术语"聚阳离子核酸结合组分"是本领域公知的,并且是指具有至少3个重复的阳离子氨基酸残基或其他的带有带正电荷的基团的阳离子单元的聚合物,这类聚合物能够在生理条件下与核酸复合。核酸结合聚阳离子分子的实例是包括一种或多种阳离子氨基酸的寡肽。这类寡肽可以例如是寡聚赖氨酸分子、寡聚组氨酸分子、寡聚精氨酸分子、寡聚鸟氨酸分子、寡聚二氨基丙酸分子、或寡聚二氨基丁酸分子、或包括组氨酸、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丙酸和二氨基丁酸残基的任意组合或由其组成的组合寡聚体。聚阳离子组分的其它实例包括树枝状聚合物和聚乙烯亚胺。

[0065] 包括可水解的硅的颗粒

[0066] 根据本发明的所有方面,掺杂硅颗粒可以是纯掺杂硅,或含有另一种可水解的掺杂硅的材料。如果它们不是纯掺杂硅,则它们含有至少50重量%的硅,即,基于颗粒中原子的总质量,它们包括至少50重量%的硅原子。例如,硅颗粒可以含有至少60%、70%、80%、90%或95%的硅。硅颗粒优选地显示出相同尺寸的纯硅颗粒的水解速率的至少10%的水解速率(例如在室温下在PBS缓冲液中)。用于含硅材料的水解的测定是本领域广泛已知的(参见,例如,WO2011/001456,将其并入本文以供参考)。尽管本发明的颗粒可以含有一些二氧化硅,但二氧化硅不是可水解的硅并且颗粒中至少一半的硅原子是元素硅(或掺杂的元素硅)的形式。

[0067] 根据本发明的所有方面,包括可水解的掺杂硅的颗粒可以是纳米颗粒。纳米颗粒具有5至400nm、例如50至350nm、例如80至310nm、例如100至250nm、例如120至240nm、例如150至220nm、例如约200nm的标称直径。它们可以由纯掺杂硅或含有可水解的掺杂硅的材料制成。它们优选是多孔的,更优选是中孔的。上文提到的标称直径可以指平均直径,并且颗粒样品中颗粒总质量的至少90%可以落入规定的尺寸范围内。包括可水解的掺杂硅的颗粒可以通过标准技术制成多孔的,例如使颗粒与氢氟酸(HF)/乙醇混合物接触并施加电流。通过改变HF浓度、电流密度和暴露时间,可以控制孔的密度及其尺寸,并且可以通过扫描电子显微照相和/或氮气吸附解吸体积等温测量来监测。

[0068] 在本发明的所有方面,优选颗粒是多孔的。如果颗粒是多孔的,它们的总表面积将由于它们的孔隙率而增加。例如,表面积可以比相应的无孔颗粒的表面积增加至少50%或至少100%。在许多情况下,根据本发明的所有方面的多孔颗粒实际上由于其孔隙率而在总表面积方面具有大得多的增加。优选地,颗粒是中孔的。

[0069] 根据某些实施方式,孔隙率为至少30%、40%、50%或60%。这意味着,分别有30%、40%、50%或60%的颗粒体积位于孔隙空间中。优选的孔径范围为1nm至50nm,例如5nm至25nm。

[0070] 掺杂

[0071] 本发明的所有方面涉及含有掺杂硅的材料。掺杂硅的制造在半导体工业中是众所周知的,并包括离子注入和扩散方法。因此,掺杂硅很容易获得。另外可选地,可以通过使用扩散方法来掺杂硅,以增加硅中存在的掺杂剂的量。作为扩散方法的实例,将硅粉和掺杂剂(例如用于掺杂硼的B_2O_3)放置在碗中,将其在N_2气氛下混合并放置,并经受1050℃至1175℃

的温度持续几分钟,以允许掺杂剂(例如硼)扩散至硅中。图1和图2显示通过这种方法产生的掺硼硅。

[0072] 在某些实施方式中,硅的掺杂是重度掺杂(heavy doping),其应理解为是指至少$1x10^{15}$个掺杂剂原子/cm^3的掺杂。在一些优选实施方式中,掺杂剂以至少$1x10^{16}$个掺杂剂原子/cm^3的水平存在。因此,在特别优选的实施方式中,硼以至少$1x10^{16}$个硼原子/cm^3的水平存在。

[0073] 例如,可以存在至少$1x10^{17}$个掺杂剂原子/cm^3、至少$1x10^{18}$个掺杂剂原子/cm^3、或至少$1x10^{19}$个掺杂剂原子/cm^3。

[0074] 任选地,可以存在至多$1x10^{20}$个掺杂剂原子/cm^3。例如,硼的存在水平可以是至少$1x10^{16}$个硼原子/cm^3且至多$1x10^{20}$个硼原子/cm^3。

[0075] 当使用硼作为掺杂剂时,优选地,$1x10^{15}$个掺杂剂原子/cm^3和$1x10^{20}$个掺杂剂原子/cm^3的掺杂水平分别对应于13.6ohm-cm和1.3ohm-cm的电阻率。其中硼是优选掺杂剂的本发明的各个方面不排除硅除了掺杂(例如重度掺杂)硼之外还掺杂有其它元素的硅。根据本发明所有方面的优选实施方式,主要掺杂剂是硼。

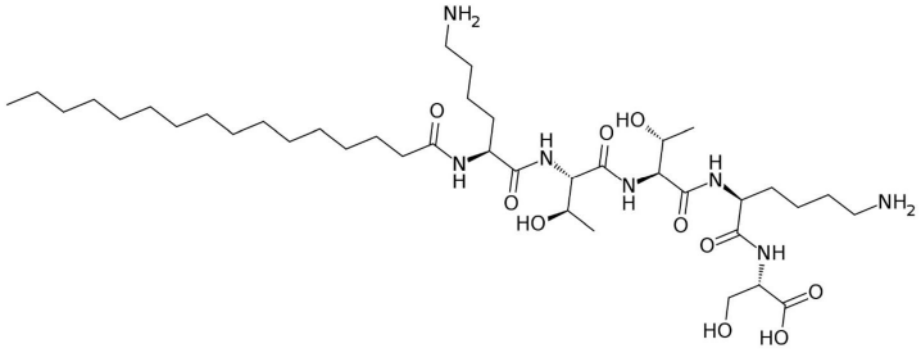
[0076] 脂质

[0077] 在本技术领域中,脂质通常应理解为包括脂肪酸和脂肪酸衍生物、甘油脂、甘油磷脂、鞘脂、糖脂(saccharolipids)和聚酮化合物(polyketides)。

[0078] 如本申请中所使用的,术语“脂质”还可以涵盖脂化寡肽(在本文中与术语脂肽可互换使用的术语),其中短肽序列(例如具有3至20个氨基酸残基,例如5至15个氨基酸残基,尤其是3、4或5个氨基酸残基,并且最尤其是5个氨基酸残基的肽序列)缀合至一个或多个脂肪酸链(尤其是具有10至24个碳链长度,优选12至18个碳链长度;例如14、15或16个碳链长度的脂肪酸链;例如,肽部分可以任选地被棕榈酰基、鲸蜡基或肉豆蔻酰基部分所脂化)。

[0079] 脂化寡肽可以任选地是脂化四肽、脂化五肽或脂化六肽。优选地,氨基酸残基包括至少一个在pH 7.4(生理pH)下为阳离子的氨基酸残基(例如2或3个氨基酸残基),例如赖氨酸或精氨酸。例如,脂化寡肽可以包括一个或多个(例如2个)赖氨酸残基。因此,一具体的实例是棕榈酰-五肽-4(CAS号214047-00-4;缩写为PAL-KTTKS):

[0080]



棕榈酰五肽-4

[0081] 因此,在根据本发明的所有方面的某些优选实施方式中,一种或多种脂质是或包括一种或多种脂化寡肽,特别是具有一个或多个在pH7.4(生理pH,实例包括赖氨酸和精氨酸)下为阳离子的氨基酸残基的那些寡肽。

[0082] 脂化寡肽可以与一种或多种磷脂例如DOPE或DPPC组合使用。据认为,脂肽的烷基

链可以有利地吸收(assimilated)在磷脂双层中,同时双层的表面用肽部分装饰。据认为,通过这种方式,肽可以提供组织和/或细胞靶向性;并且,例如当肽在生理pH下带有阳离子电荷时,可以稳定带负电荷的API,例如核酸,例如mRNA。

[0083] 根据本发明的所有方面,药物组合物中存在有一种或多种脂质。优选地,所述一种或多种脂质与本发明的可水解的掺杂硅颗粒缔合(association)而提供。

[0084] 根据某些实施方式,脂质是或包括至少一种阳离子脂质;辅助脂质,例如磷脂;结构脂质,例如胆固醇类脂质;和/或聚乙二醇(PEG)脂质。

[0085] 脂质可包括以下的一种或多种:磷脂酰胆碱(PC)、氢化PC、硬脂胺(SA)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、胆固醇3β-N-(二甲基氨基乙基)氨基甲酸酯盐酸盐(DC)-胆固醇、1,2-二油酰-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)及其衍生物。在某些实施方式中,脂质包括DOTAP或由其组成。已发现用脂质对颗粒进行表面处理有助于控制核酸或其它药物活性剂的释放速率。用于处理含硅颗粒表面的脂质的类型可以影响其释放速率。特别地,用脂质对可水解的掺杂硅颗粒进行表面处理对颗粒的表面电荷具有有益的影响,为它们提供必要的ζ电位,以允许改善短干扰RNA或短激活RNA或短发夹RNA或信使RNA的负载,并控制它们在靶位点的释放速率。至少一种脂质的存在还可以允许控制掺杂硅的水解速率,使得掺杂硅水解成生物可利用的原硅酸(OSA)降解产物,而不是不溶性聚合水解产物。控制掺杂硅的水解速率将影响与掺杂硅缔合的核酸或其它活性药物成分的释放速率。控制释放速率将影响活性药物成分的保护持续多久。

[0086] 然而,与包括活性药物成分但不含可水解的掺杂硅颗粒的常规组合物、特别是包括核酸的常规转染组合物相比,本文所用的掺杂硅提供使用更少脂质(特别是较低水平的阳离子脂质,例如DOTAP)的能力;和/或提供用更广泛的脂质配制这种组合物的能力,同时仍提供转染效率、存储稳定性和/或靶向递送至特定类型的组织或至特定类型的细胞。因此,提供一种减少对特定脂质、特别是阳离子脂质例如DOTAP的依赖的方法。因此,在本发明所有方面的某些实施方式中,一种或多种脂质选自:辅助脂质,例如磷脂;结构脂质,例如胆固醇类脂质;和/或聚乙二醇(PEG)脂质。在这类实施方式中,任选地,一种或多种脂质均不是阳离子脂质,例如DOTAP。

[0087] 在本发明所有方面的某些实施方式中,脂质是DOTAP,或者制剂中存在的脂质包括DOTAP。DOTAP以S和R对映异构体形式存在,并且根据本发明的所有方面可以作为S-、R-形式或作为外消旋体存在。根据本发明组合物中存在的总DOTAP的某些实施方式,R和S形式可以是大致相等的量(即任一形式不超过60%)。在其它实施方式中,总DOTAP的至少80%、90%、95%、98%或99%是R-形式。在其它实施方式中,总DOTAP的至少80%、90%、95%、98%或99%是S-形式。当一种或多种脂质是或包括阳离子脂质例如DOTAP时,与不包括可水解的掺杂硅颗粒的用于递送活性药物成分例如核酸的药物组合物相比,根据本发明所有方面的硅颗粒的掺杂优选使得能够使用更少的阳离子脂质例如DOTAP。

[0088] 根据本发明的所有方面,一种或多种脂质可以具有500至1000范围内的平均分子量。

[0089] 优选地,并且根据本发明的所有方面(例如,当脂质含有阳离子脂质、辅助脂质、结构脂质和PEG脂质中的一种或多种,或者选自PC、氢化PC、SA、DOPE、DOTAP、DC-胆固醇及其衍生物中的一种或多种)在任何进一步加工(即通过过滤或灭菌工艺)之前,脂质(即总脂质组

分)与掺杂硅的比率为1:1至45:1,例如1:1至20:1、1:1至16:1、1:1至12:1、1:1至11:1、1:1至10:1、1:1至9:1、1:1至8:1、1:1至13:1、2:1至12:1、2:1至11:1、2:1至10:1、2:1至9:1、2:1至8:1,例如1:1至7:1、2:1至7:1、3:1至6:1、4:1至5:1。已发现脂质组分与硅摩尔比为0.8:1至20:1是特别有利的,例如16:1、12:1、8:1或2.5:1。

[0090] 有利地,脂质与掺杂硅的这种比率可以提供多层囊泡系统,该系统能够控制与可水解的掺杂硅颗粒接触的活性药物成分(例如核酸)的释放并使其稳定,并且有利于硅的生物可利用降解产物OSA的受控释放。

[0091] 有利地,脂质化合物可以对掺杂硅纳米颗粒的表面电荷产生显著影响。当进行ζ电位分析时,用磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)和卵磷脂处理的包括可水解的纯硅的颗粒表现出负表面电荷(范围为-60至-20mV,使用各种优选的硅:脂质比率)。用硬脂胺或DOTAP处理的颗粒表面表现出正的ζ电位(范围从0至+40mV,使用各种优选的硅:脂质比率)。硅的掺杂改变表面电荷。使用p-掺杂剂,例如硼(其在本发明的许多实施方式中的所有各个方面是优选的)将使ζ电位更为正值(即,负值更小)。当硅被硼掺杂时,纯硅的典型的值-40mV将变成约-25mV。因此,当用阳离子脂质处理时,掺硼硅可以更容易地实现正的ζ电位。例如,用硬脂胺或DOTAP处理可以达到约+20mV至+60mV的值。这意味着可以使用较少量的阳离子脂质或更广泛的阳离子脂质(包括那些阳离子性低于硬脂胺和DOTAP的脂质)来实现正的表面ζ电位。这也意味着,即使阳离子脂质在存储期间降解("老化"),导致脂质正电荷部分丢失,颗粒的表面ζ电位仍将较长时间地更充裕地保持正值。

[0092] 已发现脂质组分与硅的摩尔比为0.8:1至20:1是特别有利的,例如16:1、12:1、8:1或2.5:1。

[0093] 在一些实施方式中,脂质或脂质组分可以是或包括磷脂。术语"磷脂"是指包括脂肪酸链和磷酸基团的脂质。磷脂通常是中性分子,因为它们不具有总电荷或可能携带负电荷,这与带正电荷的阳离子脂质不同。磷脂通常是两性离子化合物,其包括带正电荷和带负电荷的组分,但没有总电荷。因此,通常将磷脂归类为中性脂质。特别合适的磷脂是甘油磷脂。特别合适的磷脂是其中的极性头基与季铵部分连接的那些,例如磷脂酰胆碱(PC)或氢化磷脂酰胆碱。磷脂的另一个实例是DOPE(磷脂酰乙醇胺或1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)。脂质的类型可以根据制剂的性质来选择,对于非质子制剂优选中性或带负电荷的磷脂,而对于质子制剂则优选带正电荷的阳离子脂质和小CH_3链脂质。磷脂可以是或衍生自卵磷脂。

[0094] 优选地,磷脂的侧链是具有15个或更多个碳原子的脂族侧链,或者具有6个或更多个重复醚单元的醚侧链,例如聚乙二醇或聚丙二醇链。具有醚侧链的脂质可称为"PEG-脂质"或"PEG化的"脂质。因此,如本申请中所使用的,术语"脂质"因此可以涵盖PEG脂质。因此,根据某些实施方式,脂质是或包括一种或多种聚乙二醇(PEG)脂质。

[0095] 在一些实施方式中,脂质或脂质组分可以是或包括阳离子脂质。术语"阳离子脂质"是指具有通过一些间隔基(spacer)连接至疏水尾部的阳离子头基的带正电荷的分子。实例包括DTDTMA(双十四烷基三甲基铵)、DOTMA(2,3-二油酰氧基丙基-1-三甲基铵)、DHDTMA(双十六烷基三甲基铵)和硬脂胺(SA)。正电荷通常通过负抗衡离子稳定化。在优选的实施方式中,阳离子脂质是或包括DOTAP。如本文所述,与在没有可水解的掺杂硅的情况下配制的常规组合物例如转染组合物相比,根据本发明的所有方面的硅掺杂可以提供使用

较低水平的阳离子脂质例如DOTAP的能力;然而,本文提供的包括可水解的掺杂硅的组合物保持足够的转染能力(例如,良好的组织靶向能力或良好的细胞靶向能力)和/或良好的存储稳定性。

[0096] 在某些实施方式中,脂质选自磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰胆碱(PC)、硬脂胺(SA)或其任意组合。

[0097] 在某些实施方式中,脂质可以基本上由磷脂酰胆碱、氢化磷脂酰胆碱、硬脂胺或其组合组成。

[0098] 在某些实施方式中,脂质可以由基于颗粒总重量的至少5重量%的氢化磷脂酰胆碱例如至少20重量%、通常至少30重量%并且尤其是至少50重量%的氢化磷脂酰胆碱组成。已经发现,氢化磷脂酰胆碱与掺杂硅的摩尔比为0.8:1至5:1是特别有利的,例如1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1或4.5:1。

[0099] 在某些实施方式中,脂质可以由基于颗粒总重量的至少5重量%的磷脂酰胆碱例如至少20重量%、通常至少30重量%并且尤其是至少50重量%磷脂酰胆碱组成。已经发现,磷脂酰胆碱与掺杂硅的摩尔比为0.8:1至5:1是特别有利的,例如1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1或4.5:1。

[0100] 在某些实施方式中,脂质可以由基于颗粒总重量的至少5%的硬脂胺例如至少20重量%、通常至少30重量%并且尤其是至少50重量%硬脂胺组成。已经发现,硬脂胺与掺杂硅的摩尔比为0.8:1至5:1是特别有利的,例如1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1或4.5:1。

[0101] 在某些实施方式中,脂质可以由PC和SA组成,优选PC:SA的重量比为1:1至20:1,更优选7:1至10:1,例如PC:SA的重量比为72:8。

[0102] 在某些实施方式中,脂质可由DOPE、SA和DC-胆固醇组成。DOPE:SA的重量比可以在1:1至10:1的范围内,例如4:1至8:1。DOPE:DC-胆固醇的重量比可以在1:1至5:1的范围内,例如1:1至3:1。SA:DC-胆固醇的重量比可以在1:1至1:5的范围内,例如1:2至1:4。在一些实施方式中,DOPE:SA:DC-胆固醇的重量比可为48:8:24。

[0103] 在某些优选的实施方式中,脂质可以由DOTAP、DOPE和PEG-脂质(例如mPEG2000-DSPE)组成。DOTAP:DOPE的重量比可以为1:2至2:1,例如大约1:1。DOTAP:PEG-脂质和DOPE:PEG-脂质的比率可以为10:1至5:1,例如大约7:1。总脂质与硅的比率的总重量可以为20:1至10:1,例如大约16:1。

[0104] 氨基酸

[0105] 本发明的所有方面可以包括额外的任选的存在或使用一种或多种氨基酸。

[0106] 在其最广泛的意义上,术语“氨基酸”涵盖任何含有胺(-NH_2)和羧基(-COOH)官能团的人工或天然存在的有机化合物。它包括α、β、γ和δ氨基酸。它包括任何手性构型的氨基酸。根据一些实施方式(例如,当本发明的掺杂硅颗粒与PC、氢化PC、SA、DOPE、DC-胆固醇及其衍生物中的一种或多种配制时),氨基酸优选是天然存在的α氨基酸。它可以是蛋白氨基酸或非蛋白氨基酸(例如肉碱、左旋甲状腺素、羟脯氨酸、鸟氨酸或瓜氨酸)。在优选的实施方式中,氨基酸包括精氨酸、组氨酸或甘氨酸,或精氨酸和甘氨酸的混合物。在特别优选的实施方式中,氨基酸包括甘氨酸。这些氨基酸可以起到使掺杂硅颗粒稳定、并控制掺杂硅在存储时和在体内的水解的作用。

[0107] 除了上述氨基酸之外,所有方面可以包括含有细胞表面受体(例如整联蛋白)识别序列的肽,其赋予颗粒一定程度的细胞特异性。肽可以具有含有细胞表面受体识别序列的“头基”和另外的与活性药剂例如核酸非共价结合和/或与掺杂硅结合的“尾部”。

[0108] 活性药剂-颗粒的缔合

[0109] 根据优选的实施方式(例如,当包括可水解的掺硼硅的颗粒与一种或多种氨基酸例如精氨酸、甘氨酸和组氨酸和/或一种或多种脂质例如PC、氢化PC、SA、DOPE、DOTAP、DC-胆固醇及其衍生物、或其它可电离或阳离子脂质配制时),本发明所有方面的产品中存在的按重量计至少70%例如至少80%、例如至少90%的活性药剂(例如,核酸、saRNA、shRNA、siRNA或mRNA)与颗粒缔合。据此,这意味着活性药剂与掺杂硅非共价缔合。不希望受理论的束缚,假设当这种情况发生时,活性药剂例如核酸的随机布朗运动可以减少并且药物组合物的功效增强。例如,其被例如制剂中存在的降解酶所降解的机会降低。同样不希望受理论的束缚,据认为可用于与活性药剂(例如核酸,特别是mRNA)进行酶催化反应的水分子的数量可能减少。例如,水分子可以通过水与可水解的掺杂硅的反应来去除。

[0110] 颗粒的降解速率以及由降解导致的其与活性药剂的缔合结束通过颗粒中掺杂硅的水解来控制。由于可以控制该速率,因此也可以控制活性药剂变得生物可利用的速率,以避免剂量倾卸(dose-dumping)和/或确保在适当长的时间内逐渐释放。

[0111] 当活性药剂是核酸时,已经发现,将经脂质处理的掺硼硅颗粒(例如,用PC、氢化PC、SA、DOPE、DOTAP、DC-胆固醇及其衍生物中的一种或多种处理的纳米颗粒)用氨基酸(例如,甘氨酸、精氨酸和组氨酸中的一种或多种,优选甘氨酸)进行处理,对于核酸例如RNA(例如,mRNA、saRNA、shRNA或siRNA)提供了有益的稳定化作用。特别地,已经显示,将经脂质处理的颗粒用氨基酸进行处理,使得生物流体中例如眼组织或血浆中的核酸例如RNA得以稳定化。以这种方式与氨基酸一起配制的经脂质处理的颗粒可以特别适合于递送至身体,例如通过经皮注射递送。

[0112] 氨基酸与掺杂硅的比率

[0113] 优选地(例如,当本发明的颗粒与一种或多种氨基酸,例如精氨酸、组氨酸和甘氨酸中的一种或多种;和/或一种或多种脂质,例如PC、氢化PC、SA、DOTAP、DOPE、DC-胆固醇及其衍生物中的一种或多种一起配制时),氨基酸(例如甘氨酸、或甘氨酸和赖氨酸的混合物)任选地以至少500:1、至少50:1、至少5:1、至少2.5:1、至少1:1、或至少0.5:1或0.05:1的与硅的重量比存在。优选地,氨基酸是甘氨酸,其任选地以至少500:1、至少50:1、至少5:1、至少2.5:1、至少1:1、或至少0.5:1或0.05:1的与硅的重量比存在。

[0114] 有利地,氨基酸与掺杂硅的该比率进一步影响活性药剂例如与颗粒缔合的RNA分子的释放速率并使其稳定化。

[0115] 根据本发明的所有方面,颗粒可以用脂质(例如PC、氢化PC、SA、DOTAP、DOPE、DC-胆固醇及其衍生物中的一种或多种)和氨基酸(例如,甘氨酸、精氨酸和组氨酸中的一种或多种,例如甘氨酸、或甘氨酸和精氨酸的混合物)进行处理。氨基酸可以是任何氨基酸。优选地,氨基酸是精氨酸或甘氨酸,或甘氨酸和精氨酸的组合。脂质可以是任何脂质。优选地,脂质是磷脂。任选地,脂质还包括阳离子脂质。更优选地,脂质选自氢化PC、PC、DOTAP、DOPE、卵磷脂、硬脂胺及其衍生物中的一种或多种。任选地,脂质包括DOTAP和/或其衍生物。

[0116] 优选地,氨基酸与掺杂硅的比率为0.05:1至0.4:1,例如0.08:1至0.35:1,特别是

0.09:1至0.32:1。在一些实施方式中(例如,当脂质选自PC、氢化PC、SA、DOTAP、DOPE、DC-胆固醇及其衍生物中的一种或多种时),氨基酸是精氨酸和甘氨酸的组合,其中Arg:Gly的比率为1:0.6至3:1,例如1:0.8至2.5:1,例如1:1至2:1。

[0117] 根据本发明的所有方面的其它实施方式,颗粒与精氨酸一起配制。优选地,精氨酸与掺硼硅的比率为0.05:1至0.4:1,例如0.08:1至0.35:1,特别是0.09:1至0.32:1。

[0118] 根据本发明的所有方面的其它实施方式,颗粒与甘氨酸一起配制。优选地,甘氨酸与掺硼硅的比率为0.05:1至0.5:1,例如0.08:1至0.45:1,特别是0.09:1至0.42:1。

[0119] 用于本发明所有方面的优选的氨基酸包括精氨酸、甘氨酸和组氨酸及其两种或更多种的混合物。

[0120] 活性药剂

[0121] 根据本发明的所有方面,活性药剂(也称为活性药物成分)可以是任何药物活性化合物。在一些实施方式中,它可以是前药。在本发明所有方面的优选实施方式中,活性药剂是核酸。

[0122] 根据本发明使用的核酸例如RNA包括双链和单链DNA、RNA、DNA:RNA杂交体以及PNA(肽核酸)或RNA或DNA之间的杂交体。该术语还包括已知类型的修饰,例如本领域已知的标记,甲基化,“帽(cap)”,将一个或多个天然存在的核苷酸用类似物取代,核苷酸间修饰,例如具有不带电荷的键(例如,膦酸甲酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等)、具有带负电荷的键(例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)和具有带正电荷的键(例如,氨基烷基氨基磷酸酯、氨基烷基磷酸三酯)的修饰,含有侧基(pendant)部分例如,如蛋白质(包括核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等)的修饰,具有嵌入剂(例如吖啶、补骨脂素等)的修饰,含有螯合剂(例如金属、放射性金属、硼、氧化性金属等)的修饰、含有烷基化剂的修饰、具有修饰键(例如,α异头核酸等)的修饰,以及多核苷酸或寡核苷酸的未修饰形式。

[0123] 应当理解,如本文所用,术语“核苷”和“核苷酸”将包括那些不仅含有已知的嘌呤和嘧啶碱基而且还含有已修饰的其它杂环碱基的部分。这些修饰包括甲基化的嘌呤或嘧啶、酰化的嘌呤或嘧啶、或其它杂环。修饰的核苷或核苷酸还包括糖部分上的修饰,例如,其中一个或多个羟基被卤素、脂族基团取代,或者被官能化为醚、胺等。对核苷酸或多核苷酸的其它修饰涉及重排、附加(appending)、置换或以其它方式改变嘌呤或嘧啶碱基上的官能团,该嘌呤或嘧啶碱基与各自互补的嘧啶或嘌呤例如异鸟嘌呤、异半胱氨酸等形成氢键。在一些实施方式中,寡核苷酸和/或探针包括至少一种、两种、三种或四种修饰的核苷酸。

[0124] 在一些实施方式中,本文公开的核酸例如RNA包括一种或多种通用碱基。如本文所用,术语“通用碱基”是指可以与选自A、U/T、C和G的多于一种核苷酸杂交的核苷酸类似物。在一些实施方式中,通用碱基可以选自脱氧肌苷、3-硝基吡咯、4-硝基吲哚、6-硝基吲哚、5-硝基吲哚。

[0125] 根据本发明的所有方面的优选实施方式,核酸可以是DNA或RNA。在优选的实施方式中,核酸是RNA。在本发明的所有方面的各种实施方式中,RNA包括mRNA、saRNA、shRNA和siRNA。优选地,核酸是mRNA。在优选的实施方式中,它可以是mRNA疫苗的mRNA。

[0126] 在其最广泛的意义上,术语saRNA涵盖小激活RNA,包括长度为5至50个碱基对的双链RNA分子,其在RNA激活(RNAa)通路中发挥作用。例如,saRNA的长度可以是10至45个碱基对、15至40个碱基对、或20-30个碱基对,尤其是20至25个碱基对。

[0127] 在其最广泛的意义上,术语shRNA涵盖具有碱基配对且长度为10至100个碱基的单链RNA分子,其在RNA干扰(RNAi)通路中发挥作用。例如,shRNA的长度可以是15至95个碱基对、20至80个碱基对、或25至75个碱基对,尤其是30至70个碱基对。

[0128] 在其最广泛的意义上,术语"siRNA"涵盖小干扰RNA(siRNA),有时称为短干扰RNA或沉默RNA;包括长度为5至50个碱基对的双链RNA分子;并在RNA干扰(RNAi)通路中发挥作用。例如,siRNA的长度可以是10至45个碱基对、15至40个碱基对、或20-30个碱基对,特别是20至25个碱基对。

[0129] 术语"mRNA"涵盖信使RNA并且可以任选地包括包括5-引物帽和/或多聚腺苷酸化末端的mRNA。另外可选地,这些特征中的一个或两个可以不存在。在某些实施方式中,mRNA的长度可以是至少100、至少200、至少300、至少500或至少1000个碱基对。

[0130] 根据本发明的所有方面的优选实施方式的RNA(例如,当本发明的颗粒与精氨酸、组氨酸和甘氨酸中的一种或多种,和/或PC、氢化PC、SA、DOTAP、DOPE、DC-胆固醇及其衍生物中的一种或多种一起配制时)可以是天然存在的或化学修饰的以增强其治疗性质,例如增强活性、增加血清稳定性、减少脱靶和降低免疫激活。对RNA的化学修饰可以包括本领域公知的任何修饰。

[0131] 根据某些实施方式(例如,当本发明的颗粒与精氨酸、组氨酸和甘氨酸中的一种或多种,和/或PC、氢化PC、SA、DOPE、DOTAP、DC-胆固醇及其衍生物中的一种或多种一起配制时),RNA是siRNA。根据其它实施方式(例如,当本发明的颗粒与精氨酸、组氨酸和甘氨酸中的一种或多种,和/或PC、氢化PC、SA、DOTAP、DOPE、DC-胆固醇及其衍生物中的一种或多种一起配制时),RNA是mRNA。

[0132] 根据其它实施方式,mRNA编码抗原,从而提供作为疫苗的药物组合物。抗原可以是病毒抗原,例如SARS-CoV-2的抗原,例如源自SARS-CoV-2的刺突蛋白的抗原。

[0133] 在某些实施方式中,mRNA可以编码多种蛋白质。例如,mRNA可以编码病毒抗原和辅助蛋白(adjuvanting protein),或多种病毒抗原。在其它实施方式中,除了活性药剂之外,佐剂可以另外可选地或额外地作为药物组合物的额外组分提供。

[0134] 掺杂硅与活性药剂的比率

[0135] 优选地(例如,当本发明的颗粒与精氨酸、组氨酸和甘氨酸中的一种或多种,和/或PC、氢化PC、SA、DOTAP、DOPE、DC-胆固醇及其衍生物中的一种或多种一起配制时),掺杂(例如掺硼)硅与活性药剂例如核酸(例如siRNA或mRNA)的比率为1:1至8:1,例如1:1至6:1、1:1至5:1、1:1至4:1、或1:1至3:1。优选地,掺杂(例如掺硼)硅与活性药剂例如核酸的比率为1:1至3:1。有利地,掺杂(例如掺硼)硅与药剂例如核酸的该比率进一步影响通过颗粒传送的活性药剂例如核酸分子(例如siRNA、saRNA、shRNA或mRNA分子)的释放速率并使其稳定化。

[0136] 应注意的是,在所有这些比率中(以及在本说明书中的其它比率中),这些比率是重量比率,并且归因于"硅"的比率是含有可水解的掺杂硅的颗粒的总重量并且在任何额外的制备步骤例如灭菌或过滤工艺(其可能改变后续比率)之前测量。

[0137] 优选的组合

[0138] 根据本发明的所有方面,特别优选的实施方式涉及掺杂,其是硼掺杂(尤其是如上定义的重度硼掺杂),并且活性成分是核酸(尤其是mRNA,并且尤其是编码mRNA疫苗的抗原的mRNA)。任选地,脂质是或包括DOTAP。然而,已发现DOTAP对于本发明的制剂并不总是必需

的,如下文实施例,特别是实施例6所示。因此,根据实施例,在尤其优选的实施方式中,一种或多种脂质是或包括磷脂(例如DPPC和/或DOPE)和具有一个或多个在pH 7.4(生理pH;实例包括赖氨酸和精氨酸)下为阳离子的氨基酸残基的脂化寡肽中的一种或多种。任选地还存在一种或多种糖(特别是海藻糖)和/或一种或多种氨基酸(特别是甘氨酸)。

[0139] 另外可选地,在其它优选的实施方式中,一种或多种脂质是或包括一种或多种磷脂(例如DPPC和/或DOPE),并且与一种或多种辅酶(例如NAD);一种或多种黄烷醇(例如槲皮素)和/或一种或多种氨基酸(例如酪氨酸)一起配制。任选地还存在一种或多种糖(特别是海藻糖)和/或一种或多种氨基酸(特别是甘氨酸)。

[0140] 药物组合物功效的增强

[0141] 在一些方面,本发明涉及认识到包括可水解的掺杂(例如掺硼)硅的颗粒可以有效增强包括活性药物成分的药物组合物的功效。

[0142] 因此,本发明在第七方面提供包括可水解的掺杂硅、任选可水解的掺硼硅的颗粒用于增强包括活性药物成分的药物组合物的功效的用途,以及同样地提供一种通过将包括可水解的掺杂硅的颗粒掺入药物组合物中来增强包括活性药物成分的药物组合物的功效的方法。药物组合物的功效可以通过颗粒增加活性药物成分在室温(或4℃)下的稳定性来增强和/或通过颗粒增强活性药物成分被靶细胞或组织摄取来增强,因为包括可水解的掺杂硅的颗粒增强组织或细胞靶向能力。药物组合物的功效还可以或另外可选地通过颗粒增加活性药物成分的细胞内稳定性和/或通过颗粒保护活性药物成分免于降解例如酶促降解来增强。药物组合物任选地如本文参考本发明的所有方面所定义。以此方式,任选地,与常规转染组合物例如不包括可水解的掺杂硅的转染组合物相比,可以提供使用较低水平的阳离子脂质例如DOTMA或DOTAP的能力,同时仍保持足够的转染能力(例如,良好的组织靶向能力或良好的细胞靶向能力)和/或良好的存储稳定性。

[0143] 其它组分和特征

[0144] 根据本发明的所有方面的优选实施方式,其中活性药剂是核酸,可以额外地存在一种或多种其它的组分,包括额外的转染试剂。

[0145] 在其最广泛的意义上,“转染试剂”是促进将裸核酸或纯化核酸引入真核细胞的试剂。例如,一些转染试剂是促进将mRNA诱导入真核细胞的试剂。

[0146] 根据本发明的所有方面的其它实施方式(例如,当本发明的掺硼硅纳米颗粒与精氨酸、组氨酸和甘氨酸中的一种或多种,和/或PC、氢化PC、SA、DOTAP、DOPE、DC-胆固醇及其衍生物中的一种或多种一起配制时),转染试剂可以是脂转染(脂质体转染)试剂、树枝状聚合物、含有磷酸根离子的HEPES缓冲盐水溶液(HeBS)结合氯化钙溶液、或阳离子聚合物例如二乙基氨基乙基-葡聚糖(DEAE葡聚糖)或聚乙烯亚胺(PEI)。

[0147] 在优选的实施方式中(例如,当本发明的掺硼硅颗粒与精氨酸、组氨酸和甘氨酸中的一种或多种,和/或PC、氢化PC、SA、DOTAP、DOPE、DC-胆固醇及其衍生物中的一种或多种一起配制时),转染试剂是脂转染试剂,例如lipofectamine。

[0148] 根据本发明的所有方面的优选实施方式的核酸,例如用于本发明各个方面的RNA(例如siRNA、saRNA、shRNA或mRNA),可以以各种形式提供。例如,在一些实施方式中(例如,当本发明的颗粒与精氨酸、组氨酸和甘氨酸中的一种或多种,和/或PC、氢化PC、SA、DOPE、DOTAP、DC-胆固醇及其衍生物中的一种或多种一起配制时),核酸例如RNA以溶液(单独或与

各种其它核酸组合)例如缓冲液的形式提供。在一些实施方式中(例如,当本发明的掺硼硅纳米颗粒与精氨酸、组氨酸和甘氨酸中的一种或多种,和/或PC、氢化PC、SA、DOTAP、DOPE、DC-胆固醇及其衍生物中的一种或多种一起配制时),核酸例如RNA作为盐单独地或与其它分离的核酸组合提供。在一些实施方式中(例如,当本发明的掺硼硅纳米颗粒与精氨酸、组氨酸和甘氨酸中的一种或多种,和/或PC、氢化PC、SA、DOTAP、DOPE、DC-胆固醇及其衍生物中的一种或多种一起配制时),核酸例如RNA以可重构的冻干形式提供。例如,在一些实施方式中,核酸例如RNA可以单独地以冻干沉淀物(pellet)提供,或与其它分离的核酸一起以冻干沉淀物提供。在一些实施方式中(例如,当本发明的颗粒与精氨酸、组氨酸和甘氨酸中的一种或多种,和/或PC、氢化PC、SA、DOTAP、DOPE、DC-胆固醇及其衍生物中的一种或多种一起配制时),核酸例如RNA固定至固体物质例如珠子、膜等提供。在一些实施方式中(例如,当本发明的颗粒与精氨酸、组氨酸和甘氨酸中的一种或多种,和/或PC、氢化PC、SA、DOPE、DOTAP、DC-胆固醇及其衍生物中的一种或多种一起配制时),核酸例如RNA在宿主细胞中提供,例如携带质粒的细胞系的宿主细胞,或携带稳定整合的序列的细胞系的宿主细胞。

[0149] 本发明的药物组合物可以包括另外的赋形剂,包括但不限于:防腐剂、冷冻保护剂和佐剂。

[0150] 含有siRNA的本发明的药物组合物可以任选地包括通过生物系统外的化学合成来合成制造的siRNA。这类siRNA可以在不含核酸降解酶的情况下制造。

[0151] 然而,制造较长核酸例如mRNA(例如用于疫苗制剂)的优选方式涉及使用生物系统。通常从该生物系统中纯化mRNA,以降低降解酶(例如RNase)的水平。完全消除所有降解酶可能很困难。这通常需要在低温下存储以使酶活性最小化。此外,在身体周围易位和/或从内体区室逃逸期间,核酸暴露于生理和细胞内条件,通常包括与降解酶接触。

[0152] 然而,已经发现,将核酸(例如mRNA)与根据本发明的包括可水解的掺硼硅的颗粒和一种或多种脂质(和任选的非还原性二糖)一起配制,在其各个方面可以增加制剂中mRNA的存储期限,可以消除、减轻或减少低温存储的需要;和/或在身体周围易位和/或从内体区室逃逸期间使mRNA稳定化。

[0153] 因此,本发明的方法包括保护作为核酸(例如mRNA)的活性药物成分免于由于核酸制剂中存在的酶而降解的方法。本发明各方面的产品还可以使得保护核酸免于由于含有核酸的组合物中存在的酶而降解。

[0154] 优选地,与不含含有可水解的掺杂(例如,掺杂硼)硅的材料的颗粒的对应组合物相比,室温(20℃)下的酶促降解减少至少一半,更优选减少至少5、10、35、50、100、500或1000倍(factor)。优选地,组合物中的核酸(例如mRNA)在4℃下的半衰期为至少3个月、至少6个月或至少12个月。

[0155] 根据本发明的第一方面和其它方面的药物组合物的某些实施方式包括作为来自生物来源的活性药剂的核酸(例如mRNA)和水平低但可测量的源自该生物来源的降解酶。例如,可以存在一种或多种降解酶,其包括一种或多种在pH 7.4和温度25℃的条件下对核酸底物具有至少1μmol min^{-1}的活性的酶。

[0156] 提出的作用机制

[0157] 不希望受理论的束缚,提出“硅化(ensilication)”过程可以部分地解释为什么掺硼硅可以延长mRNA的保质期。

[0158] 硅化包括在mRNA周围形成保护性的且耐受性的二氧化硅“笼”,该二氧化硅笼是掺杂硅颗粒部分水解的产物。硅化可以赋予保护免于温度诱导的结构和功能损失,而不需要冷冻或冷藏。在硅化过程中,带负电荷的硅烷醇基团能够参与直接与药物活性剂的或与组合物中的脂质的非共价相互作用。

[0159] 所得组合能够物理地防止核酸或其它试剂的热变性。

[0160] 为了获得硅化过程的进一步和特异性的改善,可以根据要保护的化合物定制二氧化硅材料的一些特性。特别是,使用掺硼硅允许产生永久的阳离子位点,其能够与核酸形成静电相互作用,从而保护它们免于降解。

[0161] 硼与硅簇的相互作用是二氧化硅笼的形成的原因。随着硅原子数量的增加,三个硼原子倾向于形成封装在Si_n笼中的B_3三角形。

[0162] 在硅基质内部掺杂硼导致晶体结构内的正电荷,其允许核酸在硅本身的晶体结构内结合。这减轻了目前由脂质的降解或“老化”引起的问题,从而增加了核酸复合物递送系统的有效期。

[0163] 包括掺杂的可水解的硅的颗粒的制备

[0164] 本发明的颗粒可以通过本领域常规技术方便地制备,例如通过研磨法或通过其它已知的用于减小颗粒尺寸的技术。含有掺杂硅的颗粒可以由硅酸钠颗粒、胶态二氧化硅、镁还原二氧化硅或硅片材料制成。宏观或微观尺度的颗粒可以在球磨机、行星式球磨机或其它尺寸减小机制中研磨。可以对所得颗粒进行筛分或空气分级以回收颗粒。还可以使用等离子体法和激光消融法来产生颗粒。

[0165] 多孔颗粒可以通过本领域常规方法制备,包括本文所述的方法。

[0166] 根据本发明使用的掺硼硅的示例规格是:

[0167] 单侧抛光晶片,CZ

[0168] 直径:150±0.2mm

[0169] 取向:(100)±1°

[0170] 类型:p/硼

[0171] 电阻率:0.014±25% Ohm cm。接近$5x10^{18}$个原子/cm^3。

[0172] 主平面:57.50±2.5mm

[0173] 主平面1位置:D<100>至{110}

[0174] 厚度:675±15μm

[0175] 包装:Ultrapak装运箱

[0176] TTV:<=18μm

[0177] TIR:<=5μm

[0178] 这样的掺硼硅是市售的,例如,可购自德国耶拿的Nanografi或德国的Si-Mat。

[0179] 现在参考以下非限制性实施例描述本发明的各个方面和实施方式。当实施例使用非掺杂硅时,它们可落在本发明的一些方面的范围之外,但是被包括作为比较例。

[0180] 实施例

[0181] 实施例1-掺硼硅颗粒的制备

[0182] 单侧掺硼抛光硅片购自德国Si-Mat。所有清洁和蚀刻试剂均为洁净室级别。蚀刻硅片通过在纯乙醇和10% HF酸水溶液的1:1(v/v)混合物中以80mA/cm^2的阳极电流密度对

Si进行阳极蚀刻2-10分钟来制备。蚀刻后,样品使用纯乙醇冲洗,并在使用前在干燥的高纯度氮气流下干燥。蚀刻也可以在至多1:3溶剂与50％ HF的混合物中进行。通常溶剂是乙醇和异丙醇,但也可以使用其它非质子溶剂如DMSO或环戊酮,以实现所需的颗粒形态。

[0183] 蚀刻的硅片使用研磨球和/或研杵和研钵磨碎。使用规格为38μm的Retsch™筛分摇床AS200筛选细粉。通过筛子的孔径尺寸实现均匀的粒度选择(20-100μm)。颗粒尺寸通过来自Malvern Instruments的Quantachrome系统和PCS进行测量。样品保存在密闭容器中直至进一步使用。

[0184] 纳米硅粉还获得自Sigma和中国Hefei Kaier。在进行负载和蚀刻之前,通过PCS测量颗粒尺寸并记录颗粒的尺寸(尺寸范围在20-100nm之间)。

[0185] 将500mg直径为100nm的多孔硅纳米颗粒与250ml乙醇混合并使用磁棒搅拌30分钟。然后将溶液以3000rpm离心30分钟。弃去上清液并将纳米颗粒在5mL蒸馏水中洗涤并转移至圆底烧瓶中。将烧瓶中的内容物冷冻(-25℃下2小时)。使用冷冻干燥机将冷冻的纳米颗粒冷冻干燥过夜。所得干粉是活化的硅纳米颗粒。

[0186] 实施例2-掺硼硅颗粒的制备

[0187] 掺硼硅片获得自BS Silicon,按以下规格制备:

[0188] 单面抛光晶片,CZ

[0189] 直径:150±0.2mm

[0190] 晶向:(100)±1°

[0191] 类型:p/硼

[0192] 电阻率:0.014±25％ Ohm cm。接近$5x10^{18}$个硼原子/cm^3。

[0193] 主定位边:57.50±2.5mm

[0194] 主定位边1位置:D<100>至{110}

[0195] 厚度:675±15μm

[0196] 包装:Ultrapak装运盒

[0197] TTV:<=18μm

[0198] TIR:<=5μm

[0199] 未掺杂硅获自American Elements(英国曼彻斯特)

[0200] 对硅片进行电蚀刻(如实施例1中)以实现至少40％的孔隙率,然后使用研磨球和/或研杵和研钵磨碎。使用规格为38μm的Retsch™筛分摇床AS200筛选细粉。通过筛子选择尺寸从20μm至100μm的均匀颗粒。

[0201] 通过用甲醇处理粉末(50mg在5mL中)并置于通风橱下从而允许缓慢的蒸发过程,对粉末进行活化。在非还原性二糖(海藻糖)和氨基酸(甘氨酸)存在下,将所得粉末以1mg/mL的浓度分散不含无核酸酶的水中。

[0202] DOTAP溶液:将DOTAP以5mg/mL的浓度溶解在甲醇中。具体地,将50mg DOTAP溶解在10ml甲醇中并超声处理直至完全溶解。

[0203] DOPE溶液:将DOPE以5mg/mL的浓度溶解在甲醇中。具体地,将60mg DOPE溶解在12ml甲醇中并超声处理直至完全溶解。

[0204] mPEG2000-DSPE溶液:将mPEG2000-DSPE以5mg/ml的浓度溶解在甲醇中。具体地,将40mg mPEG2000-DSPE溶解在8mL甲醇中并超声处理直至完全溶解。

[0205] 使用Sigma Aldrich提供的海藻糖。

[0206] 使用Sigma Aldrich提供的甘氨酸。

[0207] 将活化的硅颗粒与甘氨酸和海藻糖一起悬浮在不含核酸酶的水中。具体地,将50mg活化硅颗粒、50mg海藻糖和25mg甘氨酸悬浮在50mL不含核酸酶的水中并超声处理60分钟。

[0208] 然后将ClCn7G213R特异性的siRNA(详细信息参见Capulli等人,2015,Clin.Molec.Therap.4,e248)负载至转染运载体上。

[0209] 体内研究-在用于基因疗法的制剂中使用实施例2中制备的掺杂硼的和未掺杂的硅颗粒进行头对头转染比较。

[0210] 2型骨硬化症是使用ADO2突变小鼠建模的,如果将对于ClCn7G213R特异性的siRNA成功转染至细胞中,则可以用该siRNA治疗所述小鼠。因此,该模型可用于评估转染效率。

[0211] 转染运载体使用根据本发明的掺杂硼颗粒或对照非掺杂颗粒、DOTAP、DOPE、mPEG2000-DSPE、甘氨酸、海藻糖和不含核酸酶的水制备。运载体或者是空的,或者具有ClCn7G213R特异性siRNA。

[0212] 样品编码为:

[0213] ADO2+SISO012-空-含有未掺杂Si的运载体

[0214] ADO2+SISO012-siRNA-含有未掺杂Si的运载体,具有ClCn7G213R特异性siRNA

[0215] ADO2+SISO013-空-含有掺硼Si的运载体

[0216] ADO2+SISO013-siRNA-含有掺硼Si的运载体,具有ClCn7G213R特异性siRNA

[0217] 10天龄的ADO2小鼠腹膜内注射这些构建体之一,每周3次,持续2周(n=每组5只小鼠)。

[0218] 结果

[0219] 对每个治疗组,测定小鼠PMBC中的ClCn7G213R表达,结果如图3所示。图4显示ClCn7G213R的骨表达,图5显示CTX血液检验结果(CTX是骨转换(bone turnover)标志物)。

[0220] 与其相关对照组(ADO2SISO012空,未施用SiRNA)相比,ADO2SISO012-siRNA复合物能够显著下调靶器官(股骨,$p<0.05$)中相关基因(ClCn7G213R)的表达。此外,观察到外周血单核细胞(PBMC,当将ADO2SISO012-siRNA复合物与无SiRNA的ADO2SISO012空进行比较时,$p<0.005$)中相同基因的显著下调。对于分析期间和提出的施用方案(仅2周治疗),骨吸收也略有升高,并且预计在更长的时间内,变化将更显著。

[0221] 将ADO2SISO012-siRNA复合物(由未掺杂的多孔硅颗粒制成)与ADO2SISO013-siRNA复合物(由掺硼硅颗粒制成)在靶器官ADO2SISO013上的性能进行比较时,两种组合物均提供明显的效果(图4,$p<0.02$)。与非掺杂多孔硅的性能相比,使用掺硼硅导致更快的骨转换(图5,CTX评估)。因此可以说,通过使用已掺杂硼的硅所提供的优异的存储特性不会降低siRNA制剂的转染效率或治疗效果。

[0222] 实施例3-含有生物pDNA的制剂的制备

[0223] 1型制剂(称为"Biocourier"制剂)根据表2的成分使用硅(多孔、活化、平均粒径<100nm、如实施例2中掺杂的和未掺杂的)制备。

[0224] 表2:1型Biocourier的组成

[0225]

脂质			活化的SiNP AE（≤100 nm）	甘氨酸	海藻糖	不含核酸酶的水
DOTAP	DOPE	mPEG2000-DSPE				
7.25 mg	7.30 mg	1.45 mg	1 mg	0.5 mg	1 mg	至 10 mL
1.45 mL	1.46mL	0.29 mL	1 mL			至 10 mL

[0226] 脂质膜的制备

[0227] 将如上表2中所列的脂质转移至干净的玻璃圆底烧瓶中并与溶剂混合,在40℃水浴中和真空下使用旋转蒸发器蒸发溶剂。

[0228] 脂质膜的再水化

[0229] 将溶液中的硅颗粒、甘氨酸和海藻糖添加至脂质膜中,并且如果需要,使用不含核酸酶的水将最终体积调节至10mL。将烧瓶用封口膜覆盖并在水浴(60℃)中搅拌5分钟。将1mL等分试样(aliquot)在无RNA的Eppendorf管中存储在冰箱中。使用前,在60℃下将悬浮液通过孔径为0.4μm和0.1μm的膜过滤器,通过0.4μm 10次,然后通过0.1μm 10次。

[0230] 用pDNA负载运载体

[0231] 将大小为6768bp的冷冻pDNA样品从-40℃解冻至室温。

[0232] 将运载体和pDNA一起置于无菌Eppendorf管中,并轻轻涡旋15秒,然后在室温下放置30分钟,然后保存在冰箱中直至使用。

[0233] 实施例4-使用pDNA的存储稳定性研究

[0234] 目的

[0235] 为了评估如实施例2中所述使用掺杂和未掺杂的硅制备的不同制剂的存储稳定性,通过琼脂糖凝胶电泳评估。

[0236] 使用的制剂

[0237] “Biocourier SIS0012”-含有待负载pDNA的未掺杂硅颗粒的组成物

[0238] “Biocourier SIS0013”-含有待负载pDNA的掺硼硅颗粒的组成物

[0239] “Biocourier MV10010”-与Biocourier SIS0012相同,但来自合同制造商生产的不同批次。

[0240] 方法

[0241] A.pDNA-Biocourier复合物的制备

[0242] pDNA-Biocourier制剂通过将pDNA溶液(2mg/mL)与Biocourier以7.2的脂质/DNA比率混合来制备。混合物中DNA的终浓度为0.275mg/mL。将混合物在室温下孵育30分钟以实现完全复合,然后在室温或4℃下存储。每个测量时间点将样品制备在20μL等分试样中,并单独存储,以尽量减少存储和分析时交叉污染的风险。

[0243] B.琼脂糖凝胶电泳

[0244] 在指定时间点(0小时、6小时、24小时、48小时、72小时和8天)通过琼脂糖凝胶电泳分析pDNA-Biocourier复合物。在所有情况下,使用相似条件下存储的裸pDNA作为对照。将样品负载至E-GelTMPower Snap电泳装置中的E-GelTM琼脂糖凝胶(1%)上。不同时间点负载至凝胶上的每个样品的量和pDNA的总含量如下表所提供。每个时间点负载至凝胶上的裸pDNA的总量也与pDNA-Biocourier复合物相同。使用E-GelTMPower Snap电泳相机对凝胶进

行透照并在3分钟和7分钟时成像。

[0245] 该表显示不同测量时间点琼脂糖凝胶上负载的pDNA-Biocourier复合物的量以及每孔pDNA的总量。

[0246]

时间(h)	样品的量(μL)	不含核酸酶的水的量(μL)	DNA的量(μg/孔)
0	20	0	5.5
6	20	0	5.5
24	20	0	5.5
48	10	10	2.25
72	10	10	2.25
192	10	10	2.25

[0247] 结果

[0248] 检验1.室温下pDNA-Biocourier复合物的稳定性。

[0249] pDNA-Biocourier制剂在制备后不久以及在室温下存储8天后的琼脂糖凝胶电泳图像如图6至图8所示。所有三种液体形式的Biocourier制剂都将pDNA完全保留在凝胶孔中,表明完全复合。然而,在冻干形式中,少量pDNA通过凝胶,表明存在一些未结合的DNA。与MVI0010相比,SIS0012和SIS0013的条带强度较高,表明未结合的DNA量较高。然而,将Biocourier制剂的条带强度与裸pDNA(其含有与负载至Biocourier上的DNA相同的总量)的条带进行比较,表明负载至Biocourier上的总DNA中只有很小一部分是未结合的,这表明高结合效率。在室温下保存6小时后,从冻干制剂释放到凝胶中的未结合pDNA量较少,可能是由于pDNA在室温下降解所致。用冻干制剂进行的未结合的pDNA通过凝胶的迁移持续直至24小时。然而,从48小时起,没有观察到pDNA的显著信号,表明缺乏通过凝胶的DNA迁移。从这些数据可以推断,尽管冻干制剂没有与负载的pDNA完全复合,但与负载至Biocourier上的大量DNA相比,通过凝胶的DNA量可以忽略不计,这表明它们的结合效率仍然非常高。此外,pDNA-Biocourier复合物在室温下稳定8天,因为在此期间没有表明解离发生的更多pDNA释放到凝胶中。

[0250] 检验2.在4℃下pDNA-Biocourier复合物的稳定性。

[0251] 图9至图11显示pDNA-Biocourier制剂在制备后不久以及在4℃下存储8天后的琼脂糖凝胶电泳图像。据观察,在4℃下存储6小时后,对于冻干形式的SIS0012和SIS0013,只有少量的pDNA通过凝胶。然而,与负载至Biocourier的pDNA总量相比,通过凝胶的未结合pDNA量较低,表明结合效率较高。液体形式的制剂以及冻干形式的MVI0010没有释放任何pDNA到凝胶中,表明负载的pDNA完全复合。对于冻干形式的SIS0012和SIS0013,通过凝胶的pDNA的量在24小时后减少,表明有一些次要水平的pDNA的降解。从48小时起,对于冻干的SIS0012,没有观察到pDNA的痕迹,而对于冻干的SIS0013,仍然有一些pDNA通过凝胶的痕迹,其持续直至8天。这可以是与实验开始时存在的相同的未结合pDNA,也可以是从复合物中解离的新pDNA。然而,由于DNA的量非常低,除了注意到绝大多数pDNA仍然与复合物缔合之外,很难对其来源做出确定的评论。液体形式的所有制剂均能够保留孔中所有负载的pDNA直至8天,表明在此存储条件下的完全结合和稳定性。

[0252] 结论

[0253] 液体形式的所有Biocourier制剂均与pDNA完全复合,并且在室温和4℃下稳定多

达8天。然而,冻干制剂尽管具有高的结合效率,但无法与所有负载的pDNA完全复合,并且在这些样品中发现有少量过量/未结合的pDNA。尽管与其液体对应物相比,冻干制剂的结合效率较低,但它们在室温和4℃下仍然稳定多达8天。

[0254] 实施例4使用DNA或RNA的存储稳定性研究

[0255] 目的

[0256] 通过琼脂糖凝胶电泳评估负载有DNA或siRNA的Biocourier制剂在不同温度下存储的稳定性。

[0257] 使用的制剂

[0258] 将以下制剂(如上文详述制备)如所述的负载以DNA、mRNA或siRNA

[0259] “Biocourier SIS0012”-含有未掺杂硅颗粒的组成物

[0260] “Biocourier SIS0013”-含有掺硼硅颗粒的组成物

[0261] 方法

[0262] A.核酸-Biocourier复合物的制备

[0263] 根据下表,通过将mRNA/siRNA/DNA粉末溶解在不含核酸酶的水中,制备核酸储液。

[0264]

核酸类型	粉末的量（mg）	不含核酸酶的水的体积（μl）	终浓度（mg/ml）
siRNA	3.33（250 nMol）	500	6.66
来自面包酵母的 mRNA	5	1000	5
来自鲱鱼睾丸的 DNA 类型 XIV	3	1000	3

[0265] 然后将储液使用不含核酸酶的水稀释,以达到根据下表所示的所需的浓度。

[0266]

溶液的类型	储液的体积（μl）	不含核酸酶的水的体积（μL）	终体积（μl）	终浓度（ng/μl）
来自面包酵母的 mRNA（WS1）	4	196	200	100
来自面包酵母的 mRNA（WS2）	8	192	200	200
来自鲱鱼睾丸的 DNA 类型 XIV	10	290	300	100
siRNA	2	198	200	66.5
SIS0012（WS1）	4	196	200	-
SIS0012（WS2）	10	190	200	
SIS0012（WS3）	20	180	200	
SIS0012（WS4）	40	160	200	-
SIS0012-不含硅纳米颗粒	40	160	200	-
SIS0013	40	160	200	-

[0267] 另外还将Biocourier储液用不含核酸酶的水稀释,以获得复合测定所需的浓度。通过将下表列出的所需量的核酸工作溶液和Biocourier工作溶液混合,制备核酸-Biocourier复合物,然后在室温下孵育40分钟,以确保完全复合。

[0268]

样品的类型	体积（μl/孔）				DNA/RNA的量（ng/孔）
	DNA/RNA工作溶液	SIS0012工作溶液	凝胶负载缓冲液	总计	
mRNA-SIS0012-1	2（WS2）	2.5（WS1）	15.5	20	100
mRNA-SIS0012-2	2（WS2）	5（WS2）	13	20	200
mRNA-SIS0012-3	2（WS2）	5（WS3）	13	20	200
mRNA-SIS0012-4	2（WS2）	5（WS4）	13	20	200
mRNA-SIS0012-5	2（WS2）	10（WS4）	13	20	200
DNA-SIS0012	2	5	13	20	200
siRNA-SIS0012	3	7.5	9.5	20	200
siRNA-SIS0013	3	7.5	9.5	20	200
siRNA 对照	3	-	16.5	20	200
mRNA 对照	2	-	18	20	200
DNA 对照	2	-	18	20	200
DNA 梯状条带标准品（DNA ladder）	2	-	18	20	200

[0269] 然后通过凝胶电泳对制备的核酸-Biocourier复合物进行分析。

[0270] B.琼脂糖凝胶电泳

[0271] 用于这些实验的凝胶电泳系统由凝胶电泳装置、预制琼脂糖凝胶(凝胶内嵌入电泳缓冲液和电极)和相机组成。在负载到凝胶上之前,根据上表将样品、对照(裸DNA或RNA)和DNA梯状条带标准品与所需量的负载缓冲液混合,使总体积为20μl。随后,将凝胶(1%)插入装置室中,负载样品、对照和DNA梯状条带标准品,并运行7分钟。使用相机在3分钟和7-8分钟对凝胶进行透照和成像(通过相机和装置上可用的对接端口将相机安装到装置上)。将DNA-SIS0012、siRNA-SIS0012和siRNA-SIS0013在不同存储条件(室温(20℃)、4℃和-20℃)存储后,在指定的时间点(在上表中给出)重复相同的程序。

[0272] 结果

[0273] 图12显示以不同浓度的RNA、不同浓度的SIS0012制剂和不同的体积比负载到SIS0012上的面包酵母RNA的凝胶阻滞测定结果。可以观察到,制造商推荐用于这种类型凝胶的100ng/孔的RNA导致RNA的发光非常弱,而当RNA的量增加至200ng/孔时,获得了更强的信号。因此,未来所有实验的核酸的量固定为200ng/孔。将SIS0012制剂与来自储液的不同稀释度的RNA和不同的混合比率(v/v)混合,以找出SIS0012溶液的最低浓度和可与RNA形成复合物并抑制其通过凝胶迁移的最低混合比率。可以观察到,混合比率为2.5的10X稀释度的S0012储液部分地阻断RNA通过凝胶的迁移,因为与用作对照的裸RNA相比,发光强度(条带的亮度)有所降低,并且当5X稀释的SIS0012溶液以2.5或4的比率与RNA混合时,获得RNA迁移的完全阻断。较低浓度的SIS0012制剂或较低的混合比率不能有效地与RNA结合,而且不能抑制其通过凝胶的迁移。基于这些发现,选择5X稀释的SIS0012溶液和2.5(V/V)的混合比率用于未来的实验。尽管用于这些实验的RNA可以提供复合测定的概念证明,但样品的纯度似乎较低,因为观察到的RNA条带不清晰且不如DNA梯状条带标准品强。此外,发现RNA片段的尺寸非常小(小于DNA梯状条带标准品的最小片段,即100bp),表明存在的是寡聚物,而不是全长mRNA。

[0274] 用于评估负载到SIS0012 Biocourier上的鲱鱼睾丸DNA的复合效率和稳定性的检验

[0275] 图13显示以基于先前检验选定的浓度和混合比率负载到SIS0012制剂上的来自鲱鱼睾丸的DNA在刚刚复合后以及直至5小时的琼脂糖凝胶阻滞测定图像。DNA-SIS0012复合物存储在三种不同的条件下:室温、4℃和-20℃。可以观察到,载体有效地捕获DNA并抑制其通过凝胶的迁移(图13A)。在任何凝胶中均未观察到来自DNA的信号,这表明三种制剂(在不同温度下存储)中的任何一种在前5小时内都没有释放DNA。因此,实验进一步继续,以研究DNA-SIS0012复合物在更长时间内的稳定性。值得注意的是,DNA对照(裸DNA)并未给出特定大小的可分辨的条带,而是显示不同大小的DNA片段的混合物。然而,由于这些实验仅旨在评估DNA与载体的复合以及相应复合物的稳定性,因此出于这些实验的目的,不需要完全分辨DNA片段或获得特定大小的单个条带(其可以通过在将DNA用于复合实验之前通过超声进一步对其处理来实现)。

[0276] 图14显示在不同温度下存储多达72小时的DNA-SIS0012复合物的凝胶阻滞测定结果。没有证据表明DNA从三种样品中任何一个释放。因此,从这些观察结果可以推断,DNA-SIS0012复合物在所有三种不同的存储条件下均可稳定保存72小时。

[0277] 评估ADO-siRNA负载至Biocourier-SIS0012上的复合效率和稳定性的检验

[0278] 根据DNA-SIS0012实验的有希望的结果,测试了通过相同方法(相同浓度和混合比率)产生并在相同条件(室温、4℃和-20℃)下存储的ADO-siRNA-SIS0012复合物的稳定性。结果如图15和图16所示。从这些图中可以明显看出,SIS0012制剂能够有效地捕获siRNA,并在所有测量的时间点阻断其通过凝胶迁移,而无论存储条件如何,这表明siRNA-SIS0012复合物在所有三种存储条件下均具有多达120小时的稳定性。

[0279] 评估ADO-siRNA负载至不含硅纳米颗粒的Biocourier-SIS0012上的复合效率和稳定性的检验

[0280] 图17和图18显示负载至不含硅纳米颗粒的SIS0012制剂上的ADO siRNA的凝胶阻滞测定结果。Biocourier能够与siRNA形成复合物并阻断其通过凝胶迁移。在室温下保存的样品和4℃保存的样品在任何测量时间点直至6小时都没有释放任何量的其缔合的siRNA,因为没有观察到siRNA条带。然而,24小时后,在凝胶中检测到一些siRNA的痕迹,产生非常微弱的信号(表明siRNA的含量低),该信号在120小时时增强。然而,应该注意的是,72小时和120小时的样品在没有任何凝胶负载缓冲液并且在负载至凝胶上之前仅用水稀释的情况下运行。因此,观察到的信号强度将小于使用凝胶负载缓冲液稀释样品时观察到的信号。另一个值得注意的观察结果是存在有两个对照siRNA的条带,表明siRNA降解。在这些实验中用作对照的siRNA溶液(66μg/ml)在-20℃下存储,并在每次开始实验前解冻。因此,提出siRNA降解可能是短时间内重复冻融循环的结果。

[0281] 评估ADO-siRNA负载至Biocourier-SIS0013上的复合效率和稳定性的检验

[0282] 图19和图20显示在复合后不久以及在室温下存储6小时后对负载至SIS0013制剂上的ADO-siRNA进行的凝胶阻滞测定。Biocourier能够捕获siRNA,尽管从实验开始就可以在整个凝胶中观察到一些siRNA痕迹,但信号在120小时之前并不显著。存储后120小时,信号更强,表明siRNA从复合物中的释放增加。然而,即使在这个时间点,该信号与裸siRNA的信号相比也明显较弱,表明siRNA通过凝胶的量非常低。还应该注意的是,72小时和120小时

的样品是在没有任何凝胶负载缓冲液并且在负载至凝胶上之前仅用水稀释的情况下运行的。因此,观察到的信号强度将小于使用凝胶负载缓冲液稀释样品时观察到的信号。与图16中所示的类似,裸siRNA表现出两个条带,表明由于多次冻融循环而导致的siRNA的降解。

[0283] 与在室温下存储不同,在4℃下存储的siRNA-SIS0013复合物保持稳定多达120小时,如siRNA没有通过凝胶迁移所指示(图21)。

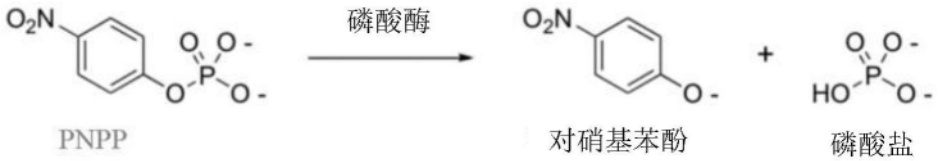
[0284] 结论

[0285] 在检测核酸与Biocourier的复合方面,以及在使用非常小的体积(2-3μl/孔)和低浓度(100ng/μl)的核酸检验形成的复合物随着时间推移的稳定性方面,使用报告的实验参数开发的凝胶阻滞测定是有效的,并且可以应用于不同类型的核酸(DNA、mRNA、siRNA)。发现核酸和Biocourier的最佳复合条件为5×稀释的Biocourier溶液和DNA/mRNA(100μg/ml)或siRNA(66.5μg/ml),2.5V/V的混合比率。Biocourier制剂SIS0012能够保留其缔合的siRNA多达120小时,而不含硅纳米颗粒的SIS0012配方在24小时后开始释放siRNA,在120小时后,释放的siRNA通过凝胶的量是显著的。SIS0013制剂即使在起始点也释放出少量的siRNA到凝胶中,表明与SIS0012相比捕获效率较低,在120小时后,释放的siRNA通过凝胶的量变得显著。然而,SIS0013-siRNA复合物在4℃下稳定多达120小时,表明当硅颗粒包括掺硼硅时,具有优异的存储稳定性。

[0286] 实施例5-SIS0012(未掺杂Si)和SIS0013(掺硼Si;$5x10^{18}$个硼原子/cm^3)的碱性磷酸酶稳定性

[0287] 碱性磷酸酶是一类以多种形式存在、催化多种蛋白质降解的酶,可存在于人体所有组织中。它主要集中在骨骼、肾脏、肝脏、肠和胎盘中。除其它外,它有助于:保护肠道免于细菌侵害;消化功能;脂肪和维生素B的降解;以及骨形成。在低pH值和高温下碱性磷酸酶表现出活性的丧失。

[0288] 通过在体外测定中测量碱性磷酸酶的一种或多种底物或产物的浓度(以UV-Vis吸光度为指标)的变化,可以监测碱性磷酸酶的活性。例如,可以监测结构如下所示的底物4-硝基苯基磷酸酶(PNPP)的浓度,以跟踪以下反应:

[0289] 

[0290] 材料、方法和结果

[0291] 碱性磷酸酶,从牛肠中分离并以56kD的重组酶供应,在酵母毕赤酵母(Pichia Pastoris)中表达,购自Sigma Aldrich/Merck(The Old Brickyard,New Rd,Gillingham,Dorset,SP8 4XT)。制备浓度为1U/ml的碱性磷酸酶(ALP)水性储液。1U(μmol/min)定义为在37℃、pH7.4下每分钟催化一微摩尔PNPP转化的ALP量。

[0292] 使用pH 7.4的Tris缓冲液(100mM/L)制备20mM 4-硝基苯基磷酸酶(PNPP)溶液。

[0293] 根据实施例2的方案提供SIS0012(未掺杂Si)和SIS0013(掺硼Si;$5x10^{18}$个硼原子/cm^3)样品。

[0294] ALP溶液按以下浓度制备:

[0295] 0.1、0.5、1、5、10、50和100mU/ml

[0296] 取1U/ml储液置于15ml试管中。

[0297] 然后将它们在Eppendorf管中与制备的20mM PNPP Tris缓冲液溶液混合。

[0298] 将管在37℃的水浴中孵育30分钟,然后在405nm处进行UV-Vis吸光度测量,如图22所示。

[0299] 如下将ALP负载至SIS0012和SIS0013上。

[0300] 1.准备3组Eppendorf管,每组8个:

[0301] A准备8个Eppendorf管,每管含有50μL ALP(50mU/ml)和500μL SIS0012(未掺杂Si)。将这些组分添加至管中后,将它们混合、涡旋并冷藏过夜。

[0302] B准备8个Eppendorf管,每管含有50μL ALP(50mU/ml)和500μL SIS0013(掺硼Si)。将这些组分添加至管中后,将它们混合、涡旋并冷藏过夜。

[0303] C准备8个Eppendorf管,每管含有50μL ALP(50mU/ml)和500μL Tris缓冲液。将这些组分添加至管中后,将它们混合、涡旋并冷藏过夜。

[0304] 2.准备好后,将所有Eppendorf管置于50℃的水浴中。1、2、5、10、20、40或60分钟后,将三组管A至C中的每组中的八个管中的每一个从水浴中取出。

[0305] 3.然后将300μL PNPP添加至所有组A至C中的所有Eppendorf管中。将管混合并涡旋。然后将它们置于37℃的水浴中30分钟,在此期间发生PNPP的去磷酸化。

[0306] 4.随后,对所有组A至C中的所有样品进行UV-Vis分析(在405nm)。结果如图23所示。

[0307] 讨论

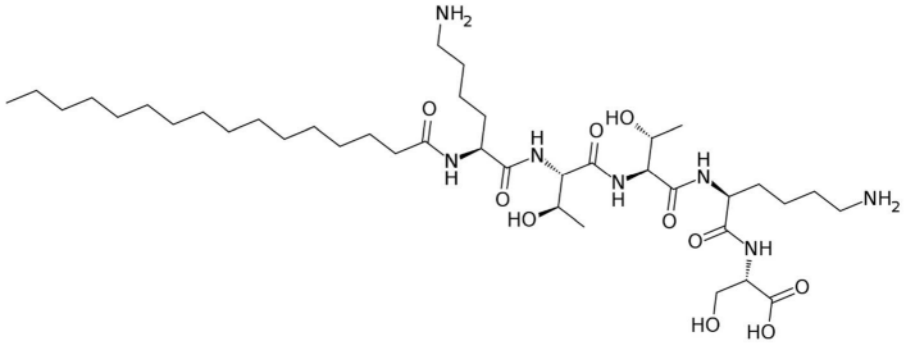
[0308] 令人惊讶地,负载在SIS0013(掺硼Si)上的ALP的活性比负载在SIS0012上的ALP的活性高大约20-30%。据认为这是由于掺杂Si改进了对ALP的保护。

[0309] 与SIS0012和SIS0013相比,游离ALP显示出显著的降解。在50℃下游离ALP的活性随着孵育时间的增加而降低。另一方面,无论孵育时间如何,负载至SIS0012和SIS0013上的ALP的活性均保持相对恒定。据认为,在50℃下游离ALP随着时间的推移而变性;而负载至SIS0012和SIS0013,特别是SIS0013上的ALP则受到保护免于变性并且保持稳定。

[0310] 实施例6-其它含硅制剂与mRNA或siRNA的复合

[0311] 研究替代方式(alternative)来代替SIS0012和SIS0013中使用的阳离子脂质,例如DOTAP。

[0312] 一类这样的替代方式是脂肽。这些是由与肽序列(通常为3-20个氨基酸残基)缀合的脂质链(通常为12-18个碳原子长)组成的两亲化合物。这类脂肽的一个具体实例是棕榈酰五肽-4(缩写为PAL-KTTKS):

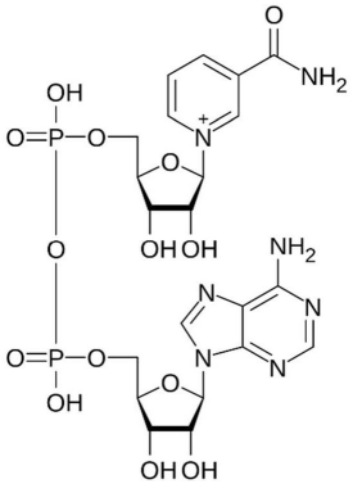
[0313] 

棕榈酰五肽-4

[0314] 据认为PAL-KTTKS是阳离子脂质替代品的良好候选物,因为它的阳离子赖氨酸残基有助于与带负电荷的RNA结合。

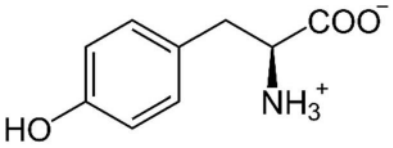
[0315] 用SIS0012和SIS0013研究的其它候选物包括NAD、酪氨酸(TYR)和槲皮素(QUE)。借助这些配体,据认为可以增强器官特异性的RNA摄取,并且可以改善细胞的内化和靶向。而且,它们可以有助于提供带正电荷的环境,用以与带负电荷的RNA结合。

[0316] 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)是一种辅酶。其氧化形式NAD+具有以下结构:

[0317] 

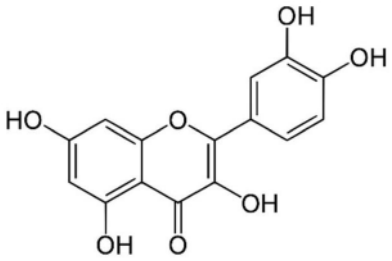
NAD+

[0318] 酪氨酸是一种天然存在的氨基酸,在生理pH(pH 7.4)下具有以下结构:

[0319] 

[0320] 生理pH 下的酪氨酸

[0321] 槲皮素是一种黄烷醇,具有以下结构:

[0322] 

槲皮素

[0323] NAD、TYR和QUE-对添加到或替换SIS0012和SIS0013中DOTAP的研究

[0324] 通过向如上所述的通常的组合物(即,除了DOTAP之外)添加0.2mg NAD、TYR和QUE,制备修饰的SIS0012和SIS0013组合物。然后评估与siRNA的复合。图24显示凝胶电泳结果,其表明siRNA成功地完全结合在这些制剂中。

[0325] 另外在形成siRNA复合物之前和之后,均使用Zetasizer(获自Malvern Instruments)进行动态光散射测量,以评估尺寸和电荷,如下表所示。如该表所表明,在siRNA复合后观察到尺寸的增加,同时表面电荷下降了10-15mV。

[0326]

样品编号	尺寸（nm）		PDI		ζ电位（mV）	
	复合之前	复合之后	复合之前	复合之后	复合之前	复合之后
SIS0012-空	119.0±5.5	216.9±1.5	0.22±0.04	0.12±0.01	58.3±1.1	47.1±0.5
SIS0012 – NAD	90.9±1.3	186.0±2.0	0.09±0.02	0.25±0.01	60.6±1.0	42.7±0.2
SIS0012 – QUE	91.6±0.3	217.4±2.5	0.07±0.02	0.39±0.01	63.2±4.5	41.6±0.2
SIS0012 – TYR	77.7±0.5	334.0±19.2	0.09±0.01	0.45±0.04	67.5±1.1	44.8±0.3
SIS0013-空	100.0±0.4	165.8±3.3	0.16±0.03	0.19±0.01	55.1±1.4	46.9±0.7
SIS0013 – NAD	104.8±1.7	178.3±1.5	0.09±0.01	0.18±0.01	58.5±2.2	41.8±0.3
SIS0013 – QUE	99.8±0.3	175.2±0.9	0.05±0.01	0.25±0.01	60.3±0.8	43.3±0.5
SIS0013 – TYR	94.2±0.9	160.7±1.1	0.09±0.01	0.22±0.01	64.6±0.4	48.6±0.4

[0327] 然后研究了用NAD、TYR或QUE替代DOTAP(而不是简单地将NAD、TYR或QUE添加到含有DOTAP的组合物中)。

[0328] 对于本研究,选择DPPC和DOPE与NAD、TYR或QUE一起使用,因为DPPC和DOPE是两性离子脂质,在中性pH下对表面电荷没有显著作用。

[0329] 因此,用(i)0.2mg和(ii)1mg NAD、TYR和QUE制备DPPC/DOPE制剂。制剂如下表所示。

[0330] 表-用β烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)功能化(functionalized)的Biocourier的组成。

[0331]

制剂	脂质相		水化溶液				
	DPPC	DOPE	活化的 SiNP（30 nm）	甘氨酸	海藻糖	NAD	NFW
DPPC/DOPE-NAD-0.2 mg	7.75 mg	8.25 mg	1 mg	0.5 mg	1 mg	0.2 mg	至 10 mL
DPPC/DOPE-NAD-1 mg	7.75 mg	8.25 mg	1 mg	0.5 mg	1 mg	1 mg	至 10 mL

[0332] 表-用槲皮素(QUE)功能化的DPPC/DOPE LNP Biocourier的组成。

[0333]

制剂	脂质相			水化溶液			
	DPPC	DOPE	槲皮素	活化的 SiNP（30 nm）	甘氨酸	海藻糖	NFW
DPPC/DOPE-QUE-0.2 mg	7.75 mg	8.25 mg	0.2 mg	1 mg	0.5 mg	1 mg	至 10 mL
DPPC/DOPE-QUE-1 mg	7.75 mg	8.25 mg	1 mg	1 mg	0.5 mg	1 mg	至 10 mL

[0334] 表-用酪氨酸(TYR)功能化的DPPC/DOPE LNP Biocourier SIS0012的组成

[0335]

制剂	脂质相		水化溶液				
	DOTAP	DOPE	活化的 SiNP（30 nm）	甘氨酸	海藻糖	酪氨酸	NFW
DPPC/DOPE-TYR-0.2 mg	7.75 mg	8.25 mg	1 mg	0.5 mg	1 mg	0.2/1 mg	至 10 mL
DPPC/DOPE-TYR-1 mg	7.75 mg	8.25 mg	1 mg	0.5 mg	1 mg	0.2/1 mg	至 10 mL

[0336] 获得Zetasizer测量结果,表明所有制剂均为负ζ电位,无论NAD、TYR或QUE的量如何;如下表所示。

[0337] 表-用0.2mg和1mg NAD、TYR和QUE功能化的DPPC/DOPE LNP。

[0338]

样品	尺寸	PDI	ζ-空
DPPC/DOPE-NAD-0.2mg	78.46±2.65	0.18±0.04	-20.76±0.68
DPPC/DOPE-NAD-1mg	88.46±1.22	0.16±0.05	-25.75±0.57
DPPC/DOPE-QUE-0.2mg	86.0±0.63	0.17±0.02	-25.81±0.82
DPPC/DOPE-QUE-1mg	78.35±2.19	0.18±0.02	-20.2±1.43
DPPC/DOPE-TYR-0.2mg	84.16±2.33	0.19±0.03	-24.99±0.44
DPPC/DOPE-TYR-1mg	83.21±2.57	0.16±0.03	-18.81±0.46

[0339] 脂肽-SIS0012和SIS0013中DOTAP替代品的研究

[0340] 脂肽也称为肽两亲化合物(PA),探讨其作为DOTAP的另一种替代品。

[0341] 据认为,脂肽可以为在转染组合物中替代阳离子脂质例如DOTAP或减少其量的问题提供解决方案。脂肽由与肽序列缀合的烷基链组成。据认为,它们的烷基链可以同化在脂质双层中,同时双层的表面用肽部分装饰。

[0342] 示例性的PA是分子棕榈酰五肽-4(缩写为PAL-KTTKS,见上文)。两个阳离子赖氨酸残基可以执行与阳离子脂质例如DOTAP类似的功能,表现出与带负电荷的RNA的静电相互作用。

[0343] 选择DPPC和DOPE作为中性脂质与PAL-KTTKS一起配制。使用不同的硅纳米颗粒或

者在根本不含硅的情况下制备各种制剂;使用pH 4缓冲液(以研究pH的影响)。

[0344] 下表提供含DPPC、DOPE和PAL-KTTKS的制剂的完整详细信息。

[0345] 表-DPPC、DOPE和Pal-KTTKS与硅纳米颗粒、掺硼硅和硼酸/硅纳米颗粒的各种制剂组成。另外配制不含硅纳米颗粒的制剂对应物作为对照。所有制剂均制备至终体积10ml。

[0346]

样品	脂质			硅-海藻糖-甘氨酸			总脂质量
样品	DPPC	脂肽	DOPE	硅	海藻糖	甘氨酸	
1-KTTKS-BC	7.75	8.25	8.25	1（典型AE Si）	1	0.5	24.25
2-KTTKS-BC	8.25	7.75	-	1（典型AE Si）	1	0.5	16
3-KTTKS-BC	3.875	3.875	8.25	1（典型AE Si）	1	0.5	16
4-KTTKS-BC	7.75	8.25	8.25	1（掺硼Si）	1	0.5	24.25
5-KTTKS-BC	7.75	8.25	8.25	1 （硼酸Si）	1	0.5	24.25
6-KTTKS-BC pH 4缓冲液	7.75	8.25	8.25	1 （典型AE Si）	1	0.5	24.25
7-KTTKS-BC pH4缓冲液	7.75	8.25	8.25	-	-	-	24.25
8-KTTKS-BC(不含核酸酶的水)	7.75	8.25	8.25	-	-	-	24.25

[0347]

[0348] 所有8种制剂均具有带正电荷的表面,其ζ电位(使用可获自Malvern Instruments的Zetasizer测量)提供在下表中。

[0349] 基于这些结果,据认为在脂质膜的组装期间,PAL-KTTKS将其自身排列在脂质双层中,肽部分暴露在纳米颗粒表面上。而且,该表面上的赖氨酸残基有助于形成带正电荷的制剂。

[0350] 表-所有8种DPPC/DOPE/PAL-KTTKS制剂的ζ电位测量值。

[0351]

样品	ζ-空
1-KTTKS-BC	60.09±0.84
2-KTTKS-BC	48.48±2.54
3-KTTKS-BC	37.24±0.63
4-KTTKS-BC	54.38±2.11
5-KTTKS-BC	55.43±1.11
6-KTTKS-BC pH 4缓冲液	59.44±0.81

7-KTTKS-BC pH4缓冲液	55.51±0.39
8-KTTKS-BC(不含核酸酶的水)	53.11±0.39

[0352] 评估所有制剂静电结合siRNA和mRNA的能力。

[0353] 进行凝胶电泳分析。没有观察到siRNA的完全复合。然而,观察到mRNA的完全复合。图25显示siRNA的凝胶电泳结果;图26显示mRNA的凝胶电泳结果。

[0354] 为了解决siRNA与DPPC/DOPE/PAL-KTTKS的部分复合,采用了替代的负载方法。图27显示使用替代的负载方法后复合物的凝胶电泳,表明siRNA成功地完全复合。(图27泳道3中的亮点是成像装置的伪影(artefact)。)

[0355] 在替代的负载方法中,与上述方案相比,采用了以下步骤:

[0356] 1.将DPPC、DOPE和Pal-KTTKS溶解在甲醇中并使用旋转蒸发器蒸发,制备脂质薄膜。

[0357] 2.将脂质膜用含有活化硅(SIS0012)或活化掺硼硅(SIS0013)与海藻糖和甘氨酸以及siRNA或mRNA的悬浮液再水化。在40℃下进行再水化10分钟,以确保圆底旋转蒸发瓶的壁上没有残留脂质-硅膜。

[0358] 脂肽是高度通用的分子;它们可以通过改变它们的烷基链和/或它们的肽序列来进行微调。据认为,肽的定制可以增强细胞和/或组织靶向性。在基因疗法领域,肽的定制可以增强与核酸,例如RNA,特别是mRNA的静电相互作用。作为实例,如通过ζ电位所证实,当PAL-KTTKS与DPPC和DOPE一起配制时,产生带正电荷的表面。

[0359] 脂肽是两亲性分子,与表面活性剂具有非常相似的性质,可以自组装形成胶束;据认为,这至少部分是由于烷基链易于疏水相互作用,而肽序列可以形成分子间氢键。磷脂,例如DPPC和DOPE,也能够自组装成脂质体。因此,当掺入PA时,其中PAL-KTTKS是一个代表性的实例(尽管可以使用其它脂肽),烷基链能够与DPPC和DOPE形成疏水相互作用,从而产生脂质体结构。

[0360] 同时,硅纳米颗粒为整个复合物提供结构稳定性,并且能够通过非共价(静电)相互作用与脂质和其它配体例如脂肽、NAD、QUE或TYR相互作用,从而促进核酸的长期稳定性和结合。



图1



图2

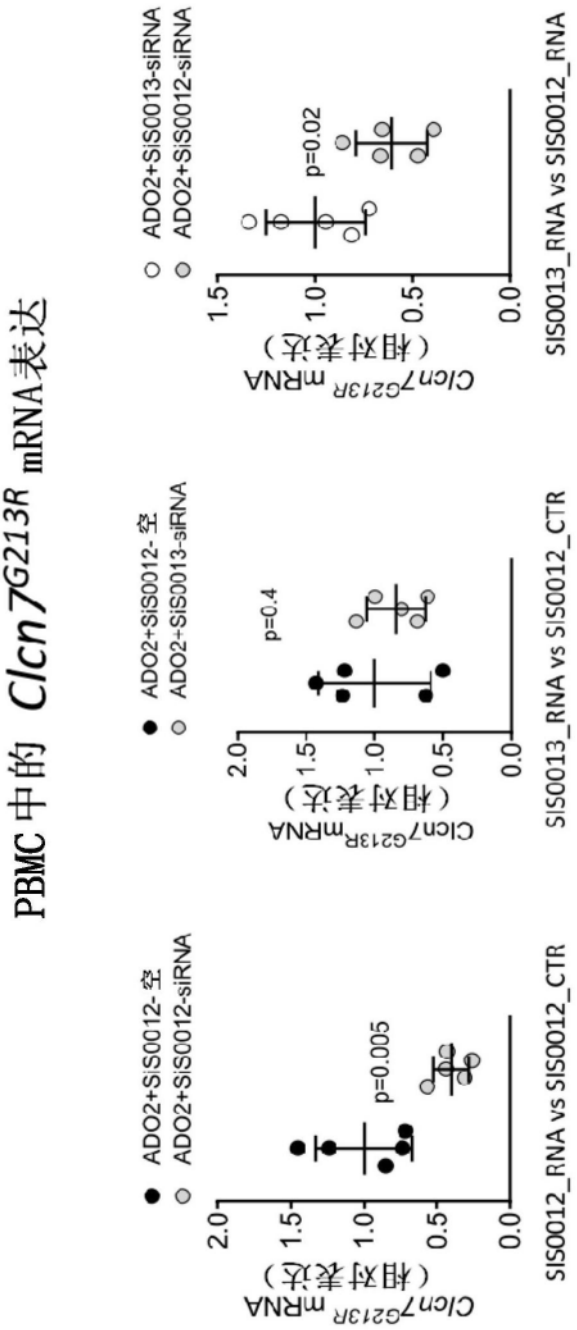

PBMC 中的 Clcn7G213R mRNA表达
ADO2+SiS0012-空
ADO2+SiS0012-siRNA
ADO2+SiS0013-siRNA
Clcn7G213R mRNA（相对表达）
p=0.005
p=0.4
p=0.02
SIS0012_RNA vs SIS0012_CTR
SIS0013_RNA vs SIS0012_CTR
SIS0013_RNA vs SIS0012_RNA

图3

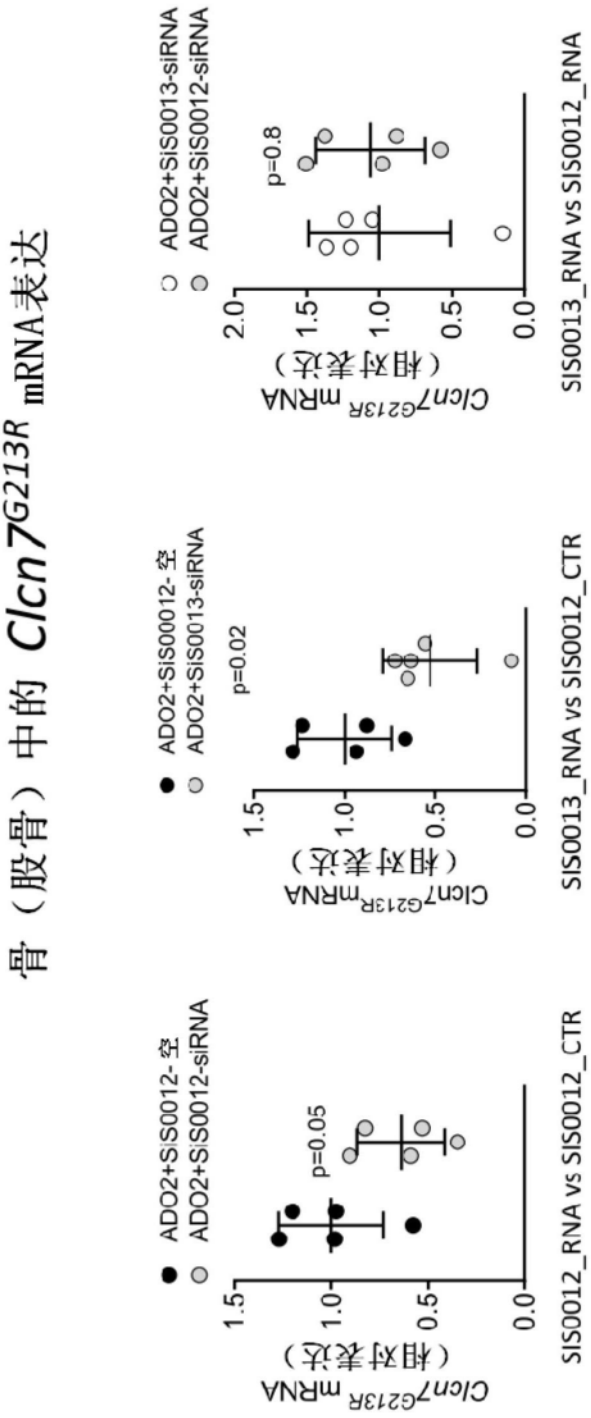

骨（股骨）中的 Clcn7G213R mRNA表达
ADO2+SiS0012-空
ADO2+SiS0012-siRNA
Clcn7G213R mRNA（相对表达）
p=0.05
SIS0012_RNA vs SIS0012_CTR
ADO2+SiS0012-空
ADO2+SiS0013-siRNA
Clcn7G213R mRNA（相对表达）
p=0.02
SIS0013_RNA vs SIS0012_CTR
ADO2+SiS0013-siRNA
ADO2+SiS0012-siRNA
Clcn7G213R mRNA（相对表达）
p=0.8
SIS0013_RNA vs SIS0012_RNA

图4

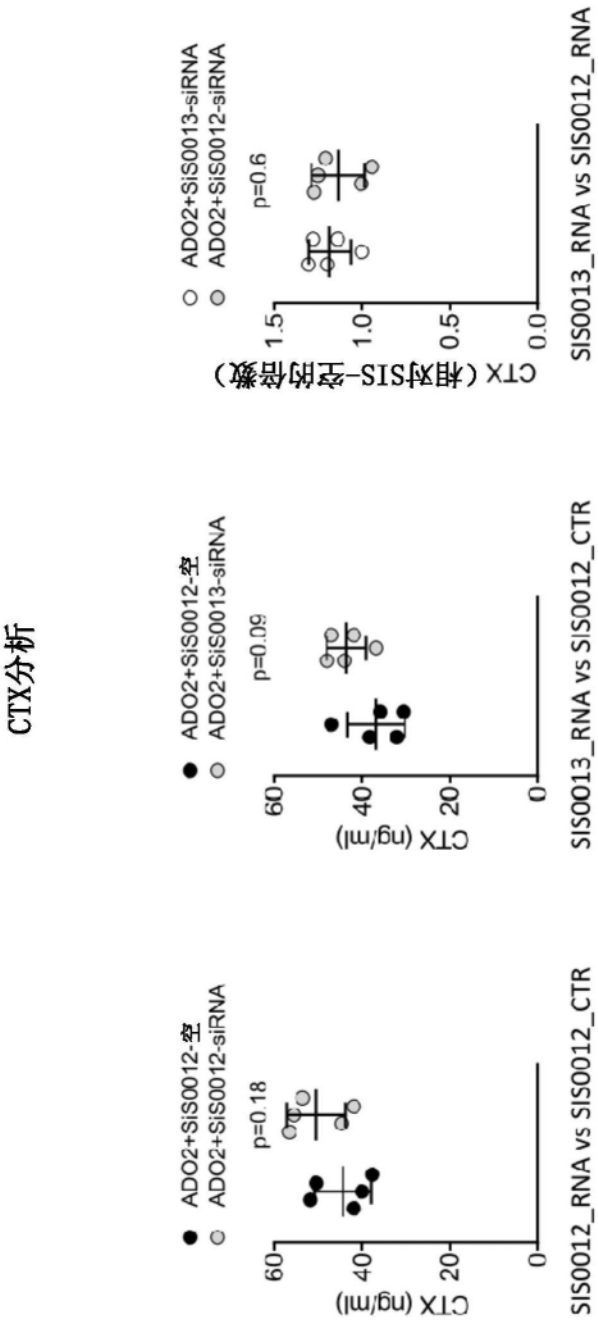

CTX分析
ADO2+SiS0012-空
ADO2+SiS0012-siRNA
p=0.18
CTX (ng/ml)
60
40
20
0
SIS0012_RNA vs SIS0012_CTR
ADO2+SiS0012-空
ADO2+SiS0013-siRNA
p=0.09
CTX (ng/ml)
60
40
20
0
SIS0013_RNA vs SIS0012_CTR
ADO2+SiS0013-siRNA
ADO2+SiS0012-siRNA
p=0.6
CTX (相对SIS-空的倍数)
1.5
1.0
0.5
0.0
SIS0013_RNA vs SIS0012_RNA

图5

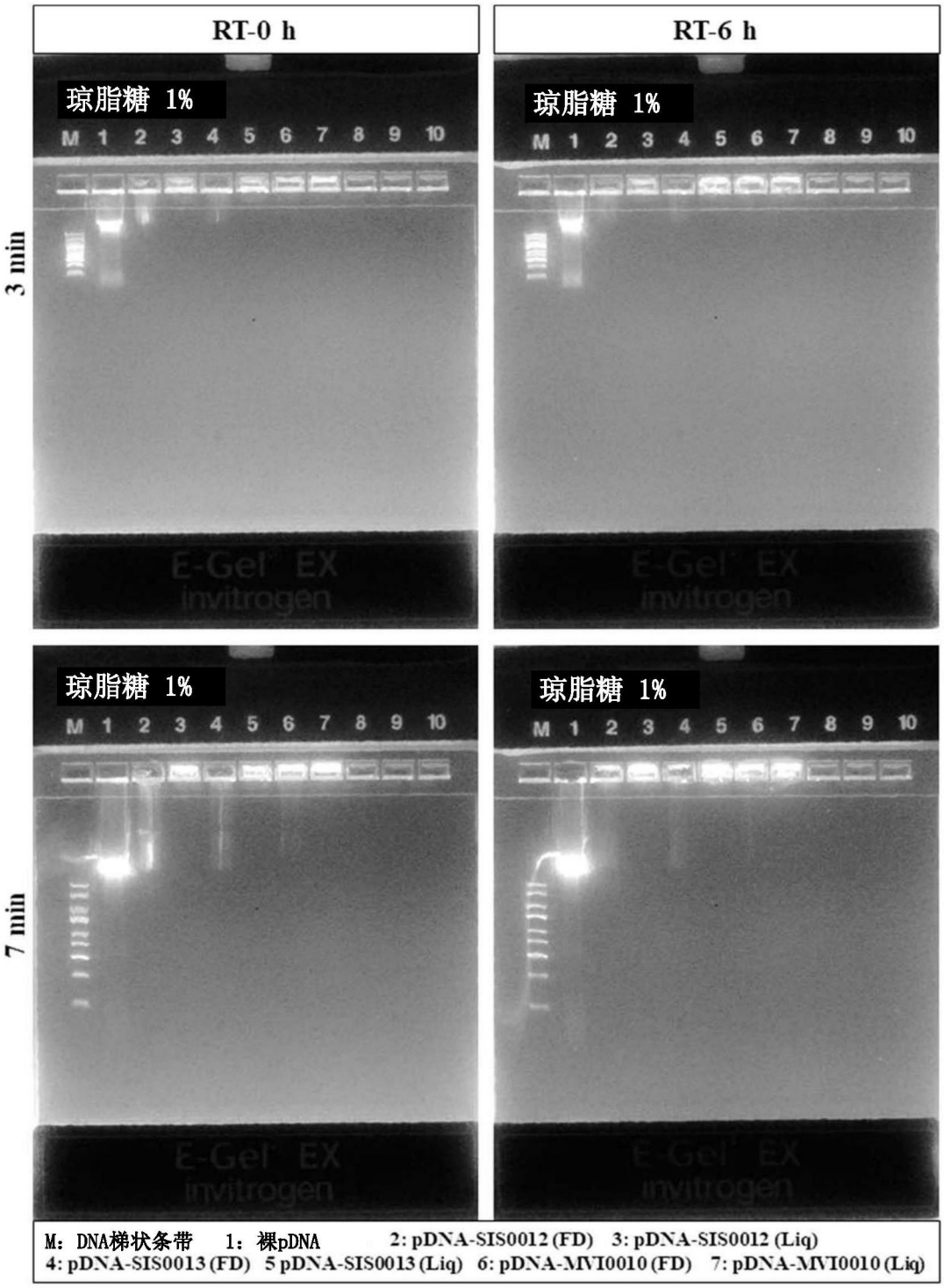

RT-0 h
RT-6 h
3 min
7 min
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
E-Gel EX
invitrogen
M：DNA梯状条带 1：裸pDNA 2: pDNA-SIS0012 (FD) 3: pDNA-SIS0012 (Liq)
4: pDNA-SIS0013 (FD) 5 pDNA-SIS0013 (Liq) 6: pDNA-MVI0010 (FD) 7: pDNA-MVI0010 (Liq)

图6

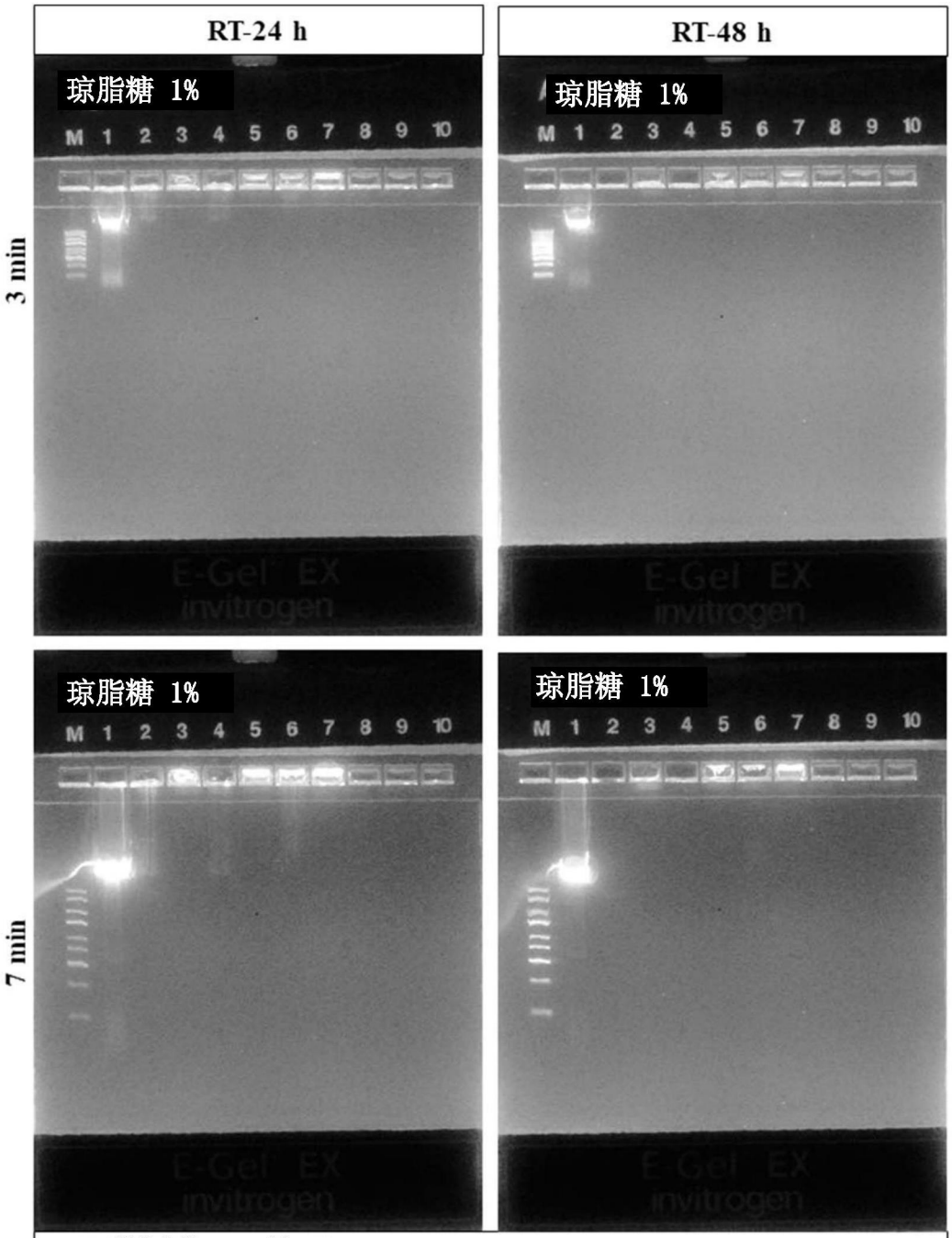

RT-24 h
RT-48 h
3 min
7 min
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
E-Gel EX
invitrogen
M：DNA梯状条带 1：裸pDNA 2: pDNA-SIS0012 (FD) 3: pDNA-SIS0012 (Liq)
4: pDNA-SIS0013 (FD) 5 pDNA-SIS0013 (Liq) 6: pDNA-MVI0010 (FD) 7: pDNA-MVI0010 (Liq)

图7

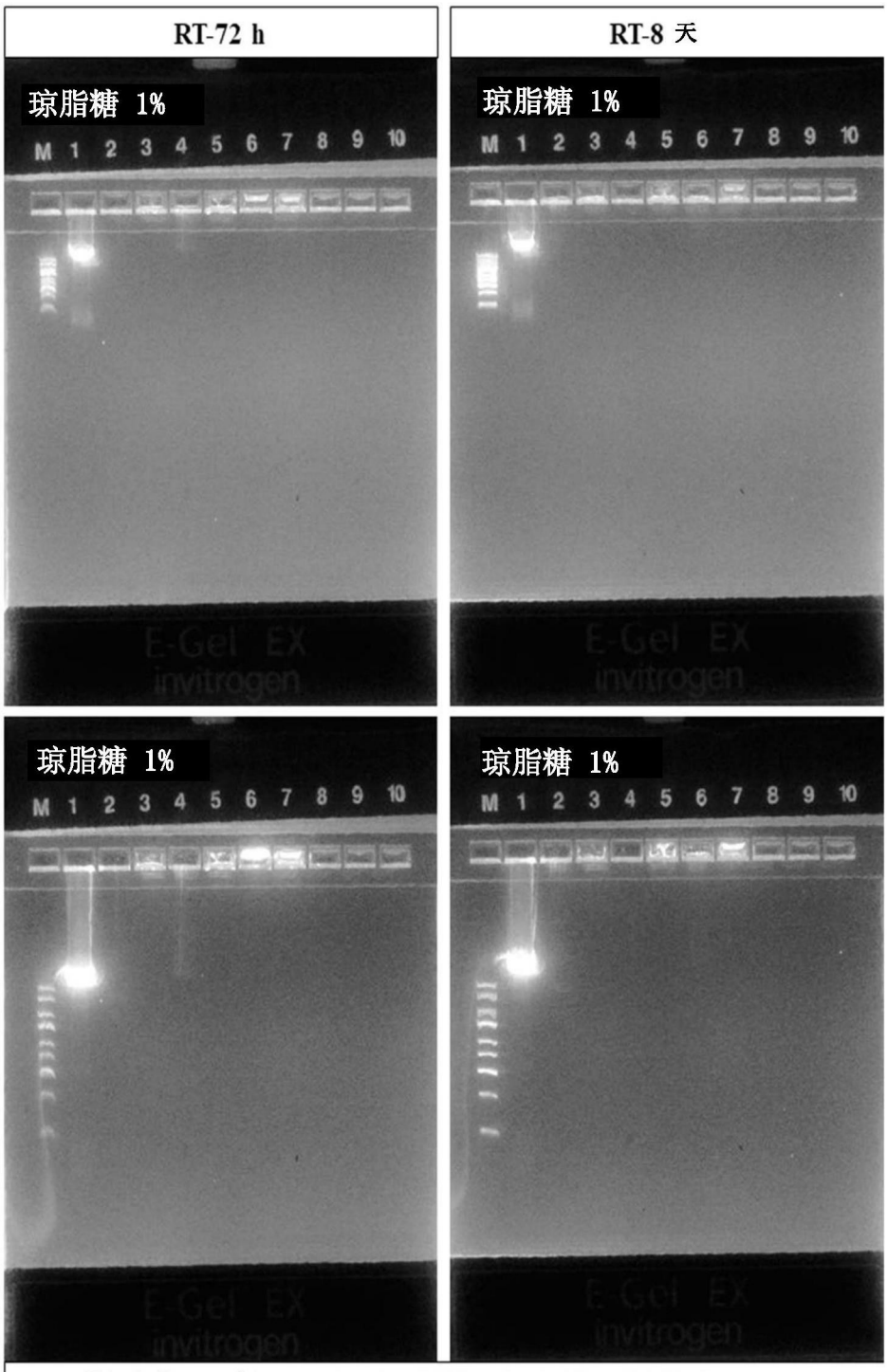

RT-72 h
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
E-Gel EX
invitrogen
RT-8 天
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
E-Gel EX
invitrogen
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
E-Gel EX
invitrogen
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
E-Gel EX
invitrogen
M：DNA梯状条带 1：裸pDNA 2: pDNA-SIS0012 (FD) 3: pDNA-SIS0012 (Liq)
4: pDNA-SIS0013 (FD) 5 pDNA-SIS0013 (Liq) 6: pDNA-MVI0010 (FD) 7: pDNA-MVI0010 (Liq)

图8

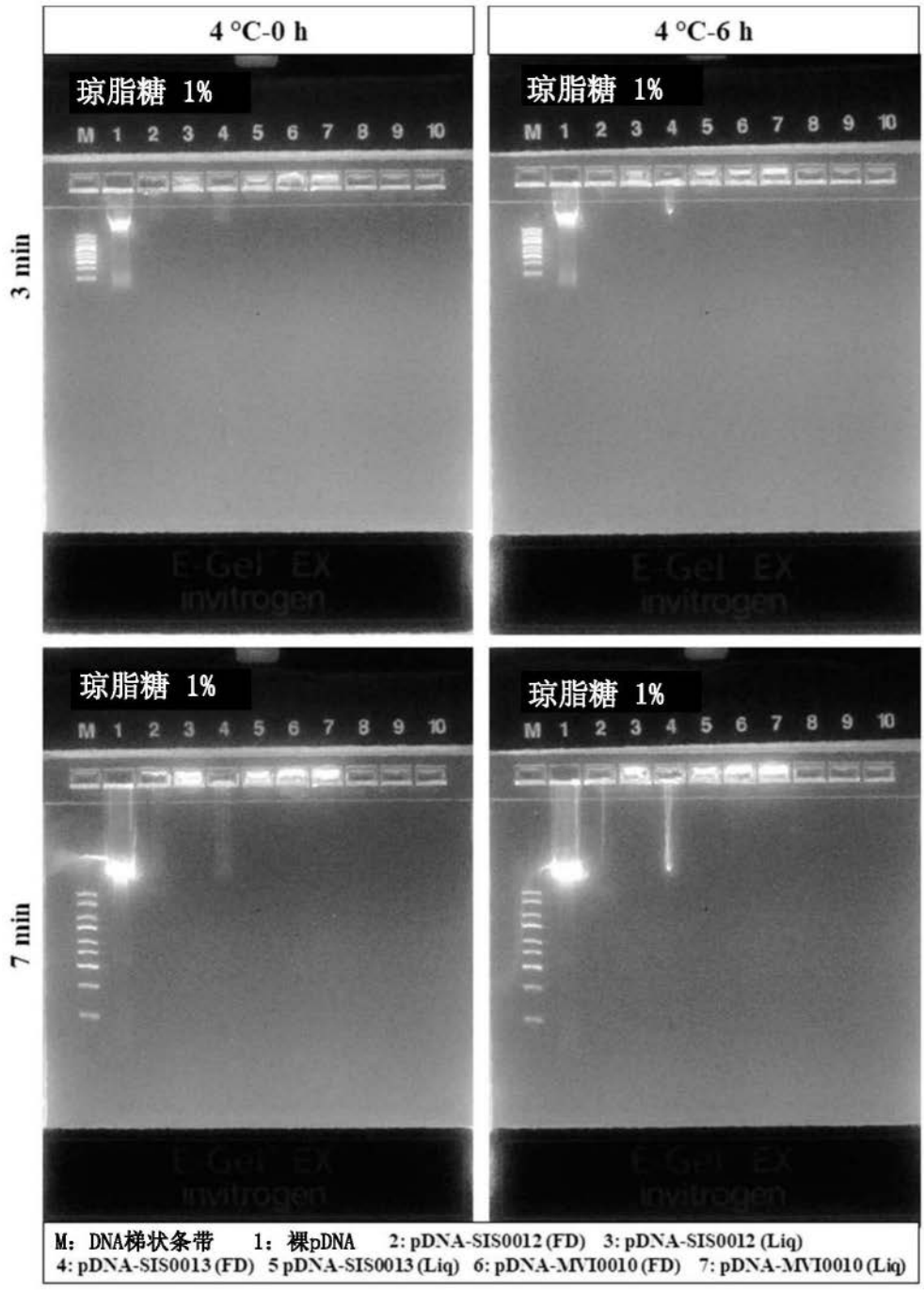

4 °C-0 h
4 °C-6 h
3 min
7 min
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
E-Gel EX
invitrogen
M：DNA梯状条带 1：裸pDNA 2: pDNA-SIS0012 (FD) 3: pDNA-SIS0012 (Liq)
4: pDNA-SIS0013 (FD) 5 pDNA-SIS0013 (Liq) 6: pDNA-MVI0010 (FD) 7: pDNA-MVI0010 (Liq)

图9

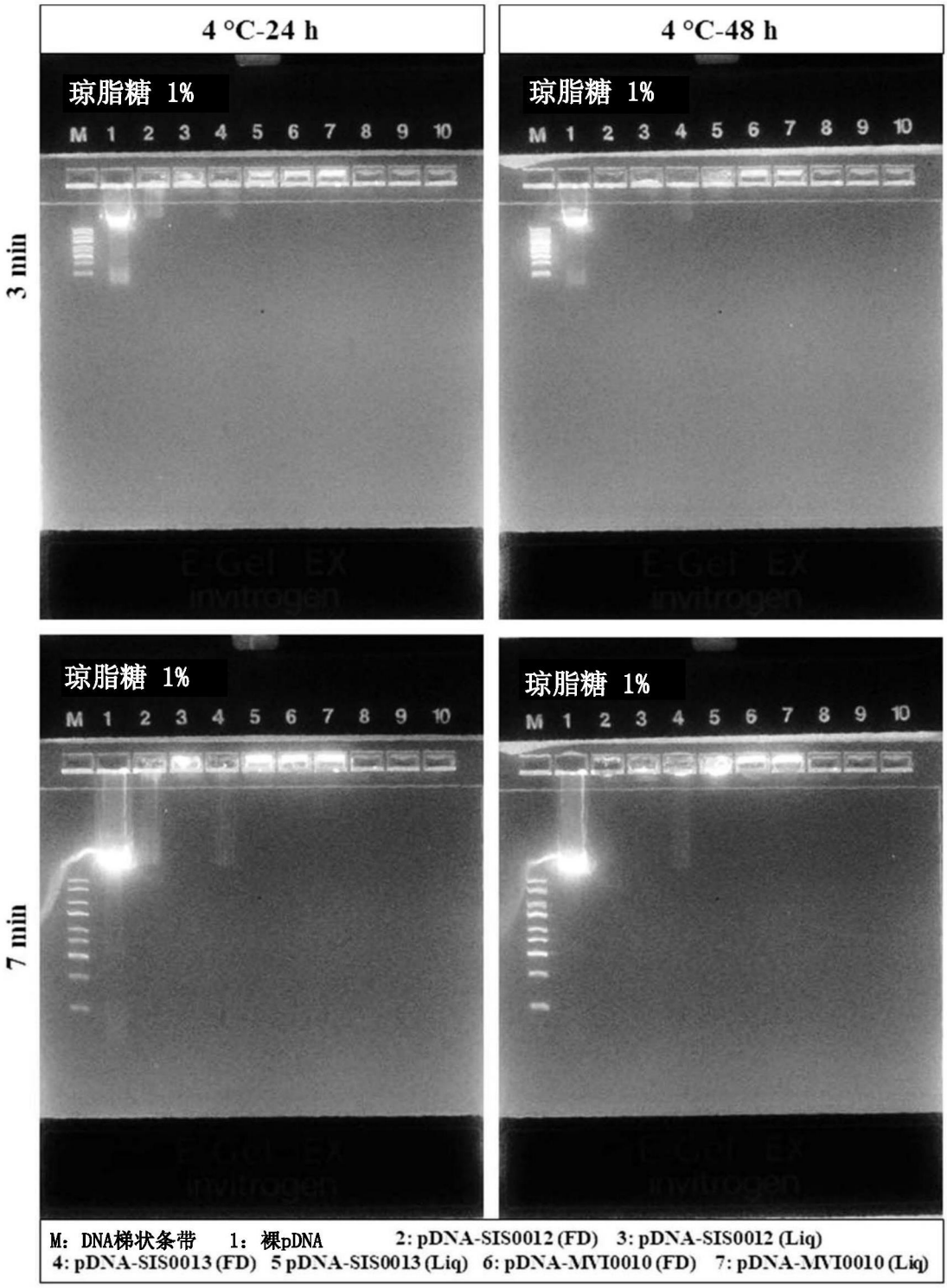

4 °C-24 h
4 °C-48 h
3 min
7 min
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
M：DNA梯状条带 1：裸pDNA 2: pDNA-SIS0012 (FD) 3: pDNA-SIS0012 (Liq)
4: pDNA-SIS0013 (FD) 5 pDNA-SIS0013 (Liq) 6: pDNA-MVI0010 (FD) 7: pDNA-MVI0010 (Liq)

图10

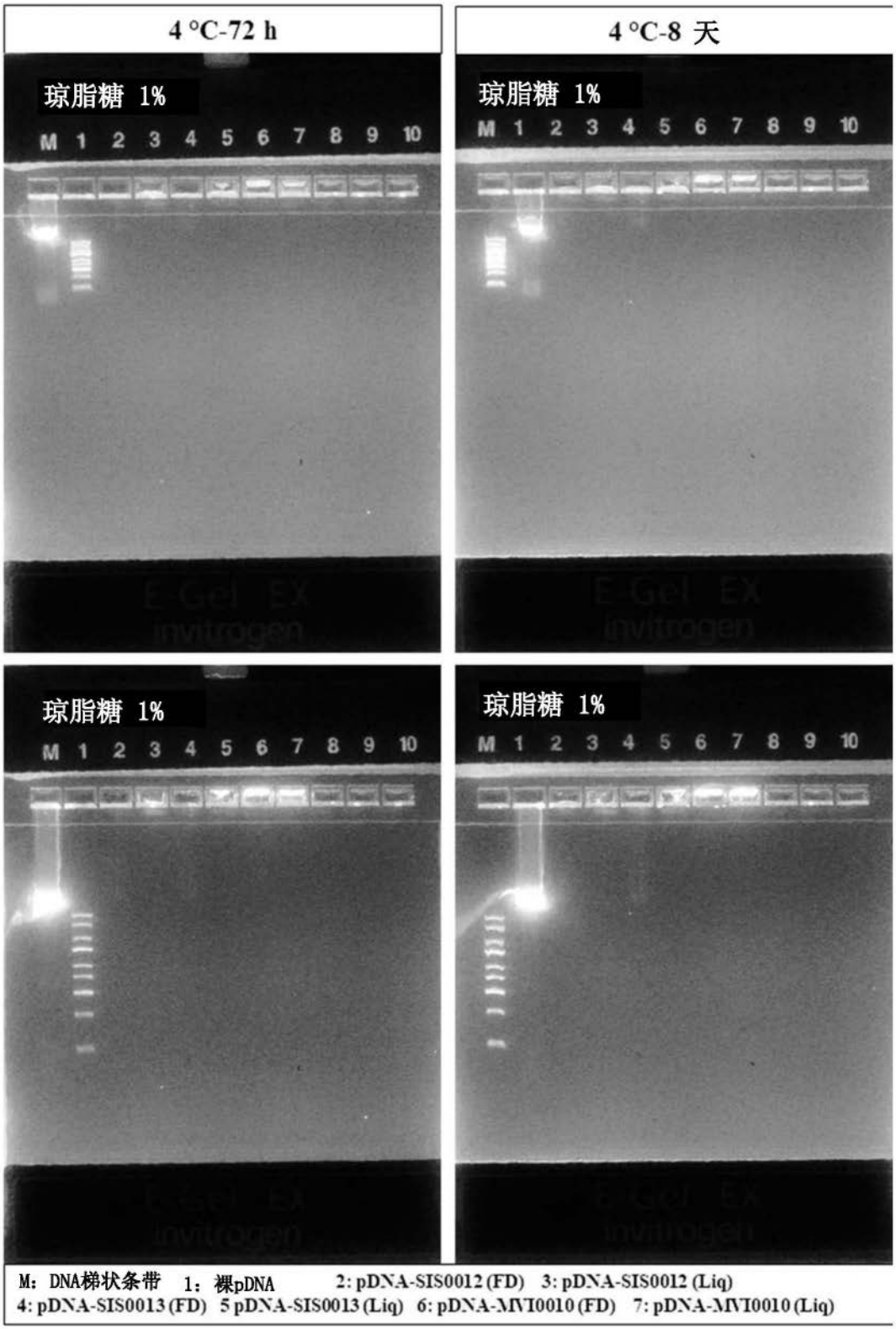

4 °C-72 h
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
4 °C-8 天
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
M：DNA梯状条带 1：裸pDNA 2: pDNA-SIS0012 (FD) 3: pDNA-SIS0012 (Liq)
4: pDNA-SIS0013 (FD) 5 pDNA-SIS0013 (Liq) 6: pDNA-MVI0010 (FD) 7: pDNA-MVI0010 (Liq)

图11

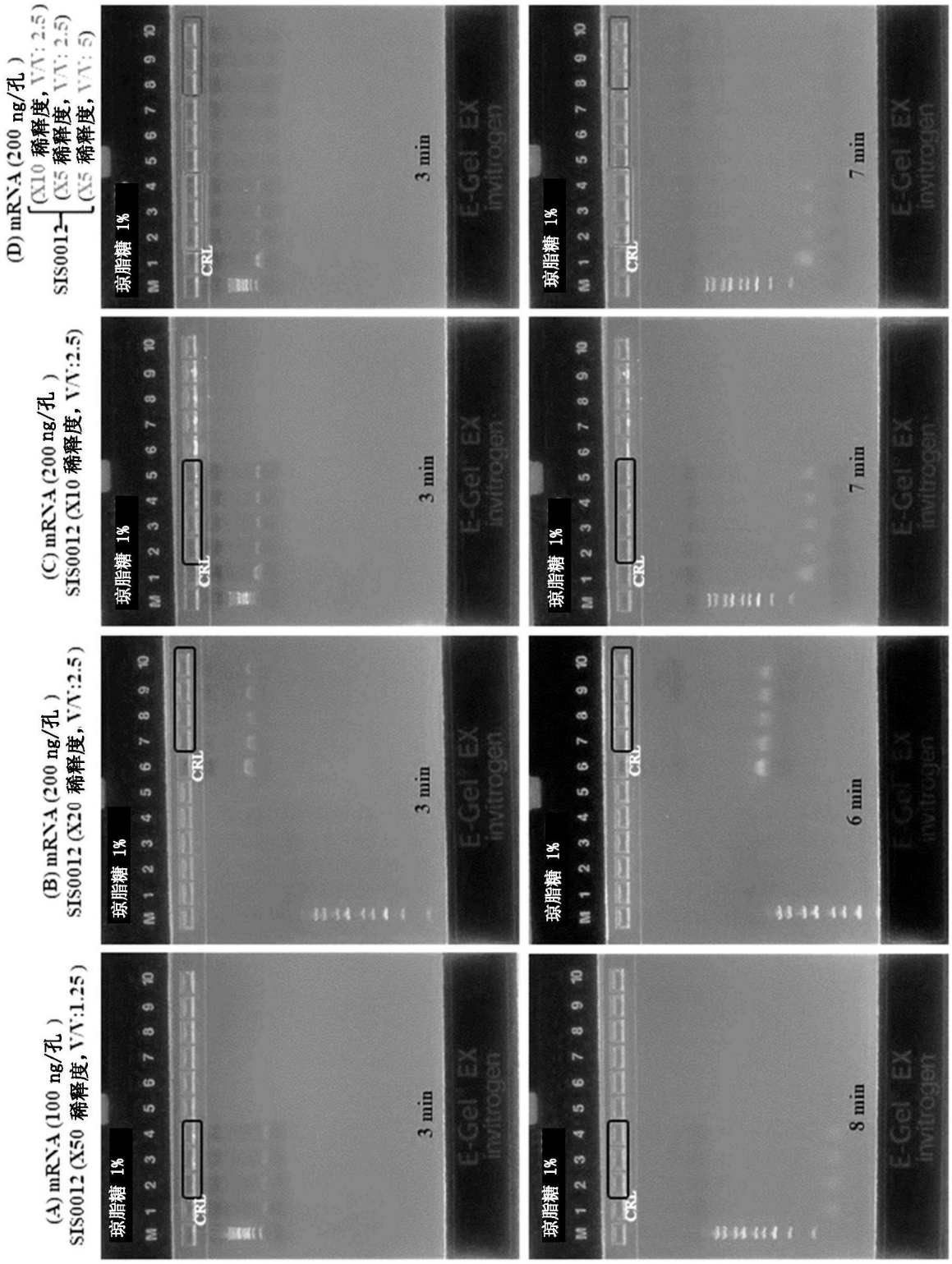

(A) mRNA (100 ng/孔)
SIS0012 (X50 稀释度, V/V:1.25)
(B) mRNA (200 ng/孔)
SIS0012 (X20 稀释度, V/V:2.5)
(C) mRNA (200 ng/孔)
SIS0012 (X10 稀释度, V/V:2.5)
(D) mRNA (200 ng/孔)
SIS0012
(X10 稀释度, V/V: 2.5)
(X5 稀释度, V/V: 2.5)
(X5 稀释度, V/V: 5)
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
CRL
3 min
6 min
7 min
8 min
E-Gel EX
invitrogen

图12

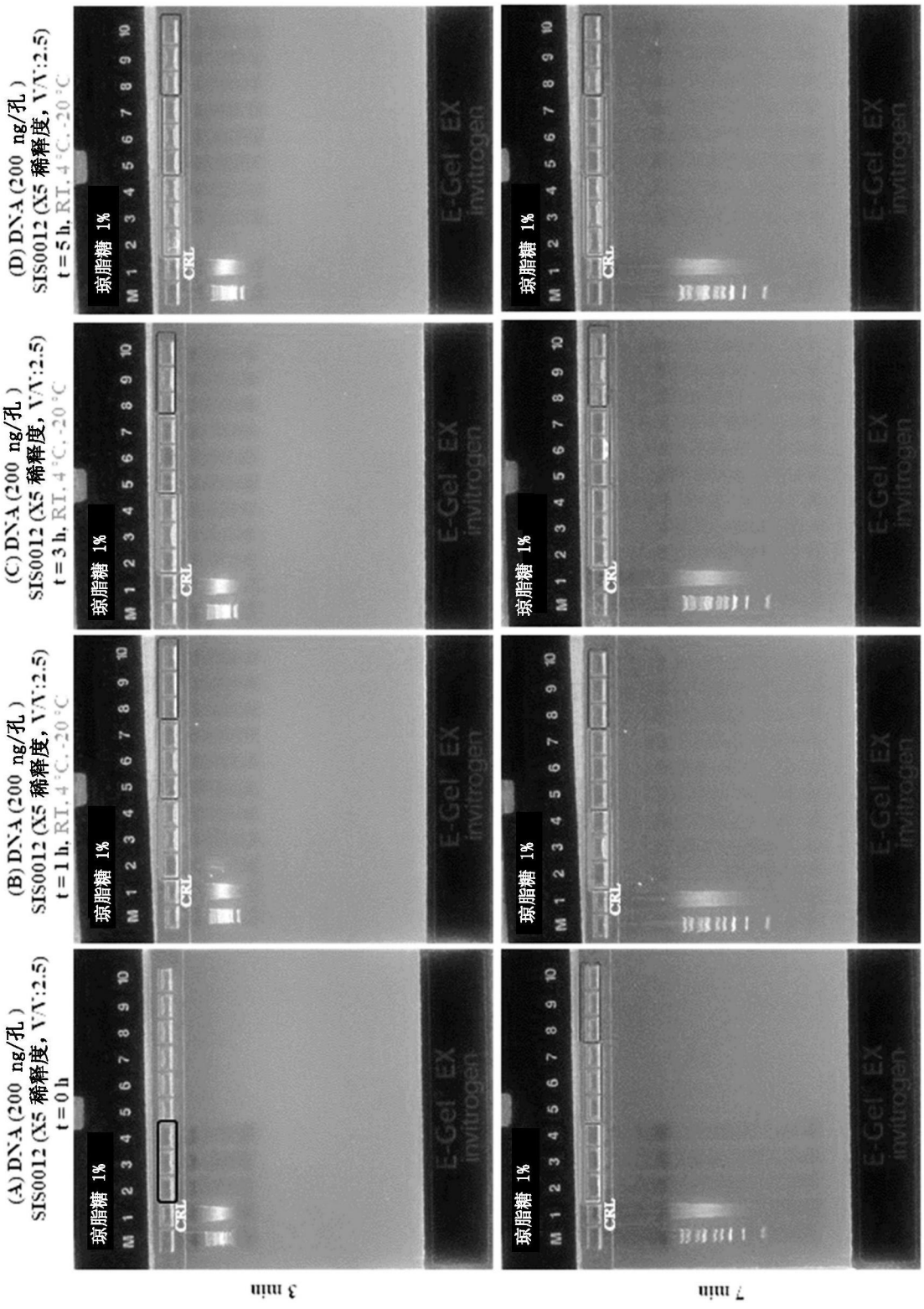

(A) DNA (200 ng/孔)
SIS0012 (X5 稀释度, V/V:2.5)
t = 0 h
(B) DNA (200 ng/孔)
SIS0012 (X5 稀释度, V/V:2.5)
t = 1 h, RT, 4 °C, -20 °C
(C) DNA (200 ng/孔)
SIS0012 (X5 稀释度, V/V:2.5)
t = 3 h, RT, 4 °C, -20 °C
(D) DNA (200 ng/孔)
SIS0012 (X5 稀释度, V/V:2.5)
t = 5 h, RT, 4 °C, -20 °C
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
CRL
E-Gel EX
invitrogen
3 min
7 min

图13

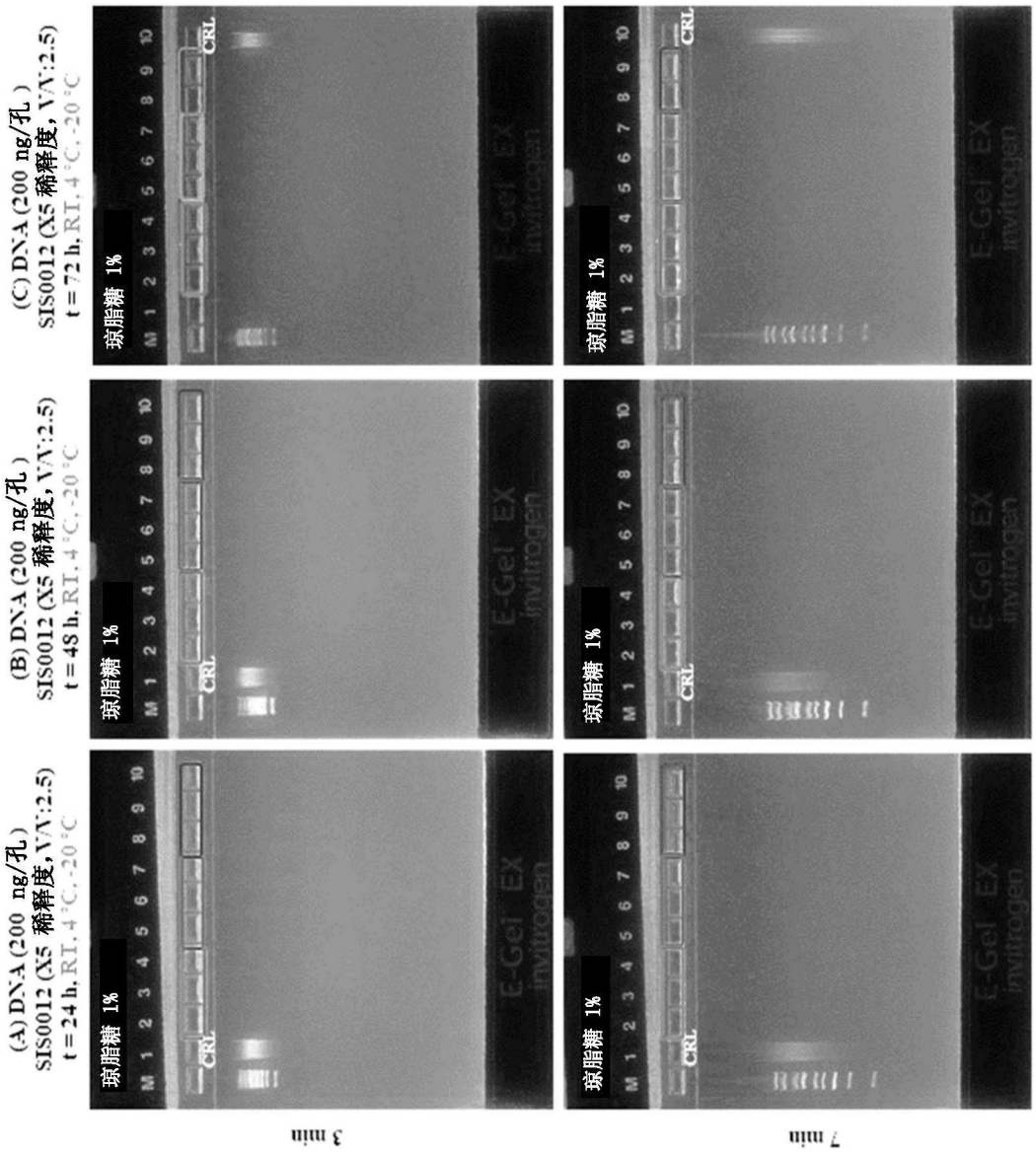

(A) DNA (200 ng/孔)
SIS0012 (X5 稀释度, V/V:2.5)
t = 24 h, RT, 4 °C, -20 °C
(B) DNA (200 ng/孔)
SIS0012 (X5 稀释度, V/V:2.5)
t = 48 h, RT, 4 °C, -20 °C
(C) DNA (200 ng/孔)
SIS0012 (X5 稀释度, V/V:2.5)
t = 72 h, RT, 4 °C, -20 °C
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
CRL
E-Gel EX
invitrogen
3 min
7 min

图14

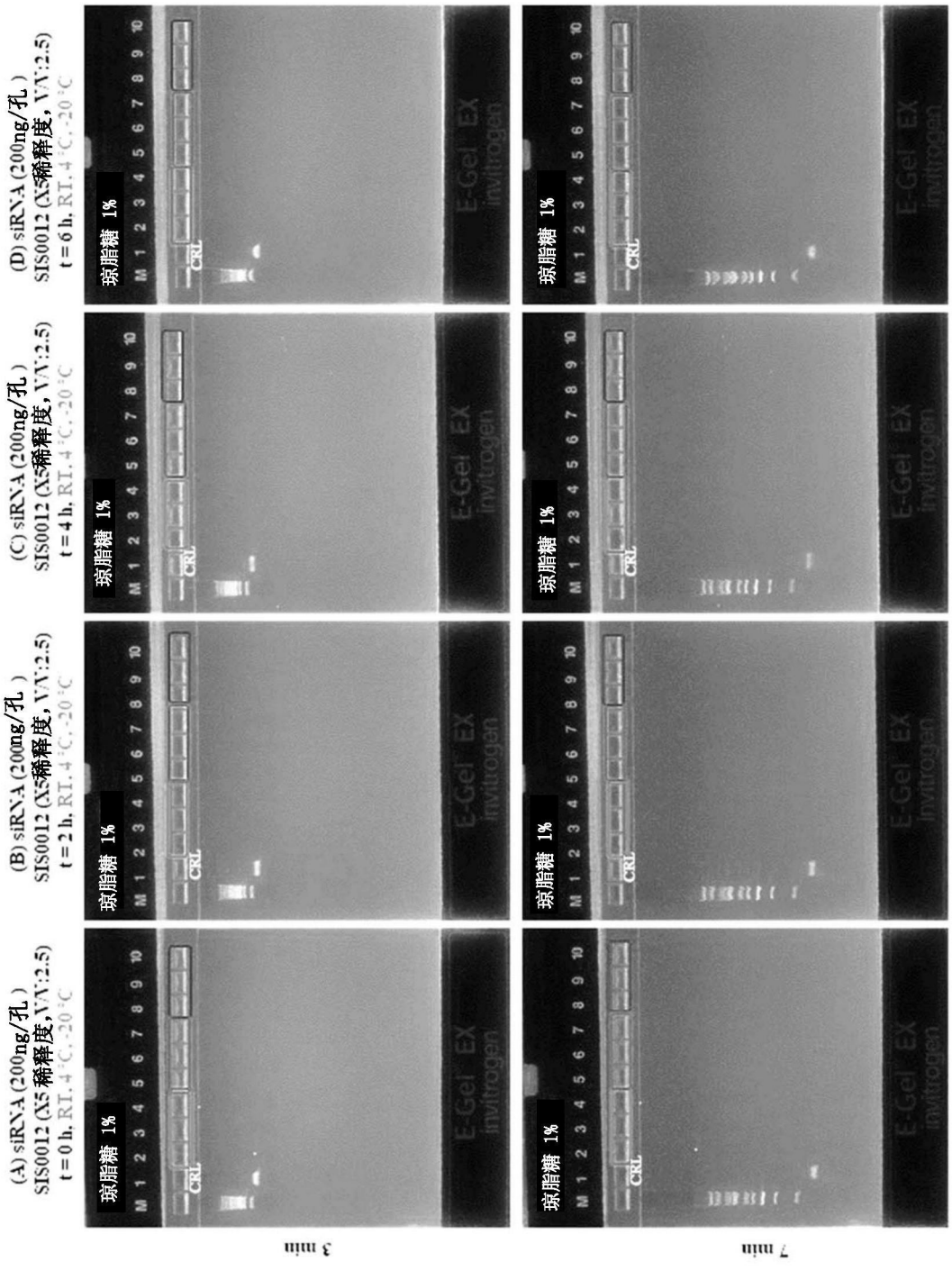

(A) siRNA (200ng/孔)
SIS0012 (X5 稀释度,VV:2.5)
t = 0 h, RT, 4 °C, -20 °C
(B) siRNA (200ng/孔)
SIS0012 (X5稀释度, VV:2.5)
t = 2 h, RT, 4 °C, -20 °C
(C) siRNA (200ng/孔)
SIS0012 (X5稀释度, VV:2.5)
t = 4 h, RT, 4 °C, -20 °C
(D) siRNA (200ng/孔)
SIS0012 (X5稀释度, VV:2.5)
t = 6 h, RT, 4 °C, -20 °C
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
CRL
E-Gel EX
invitrogen
3 min
7 min

图15

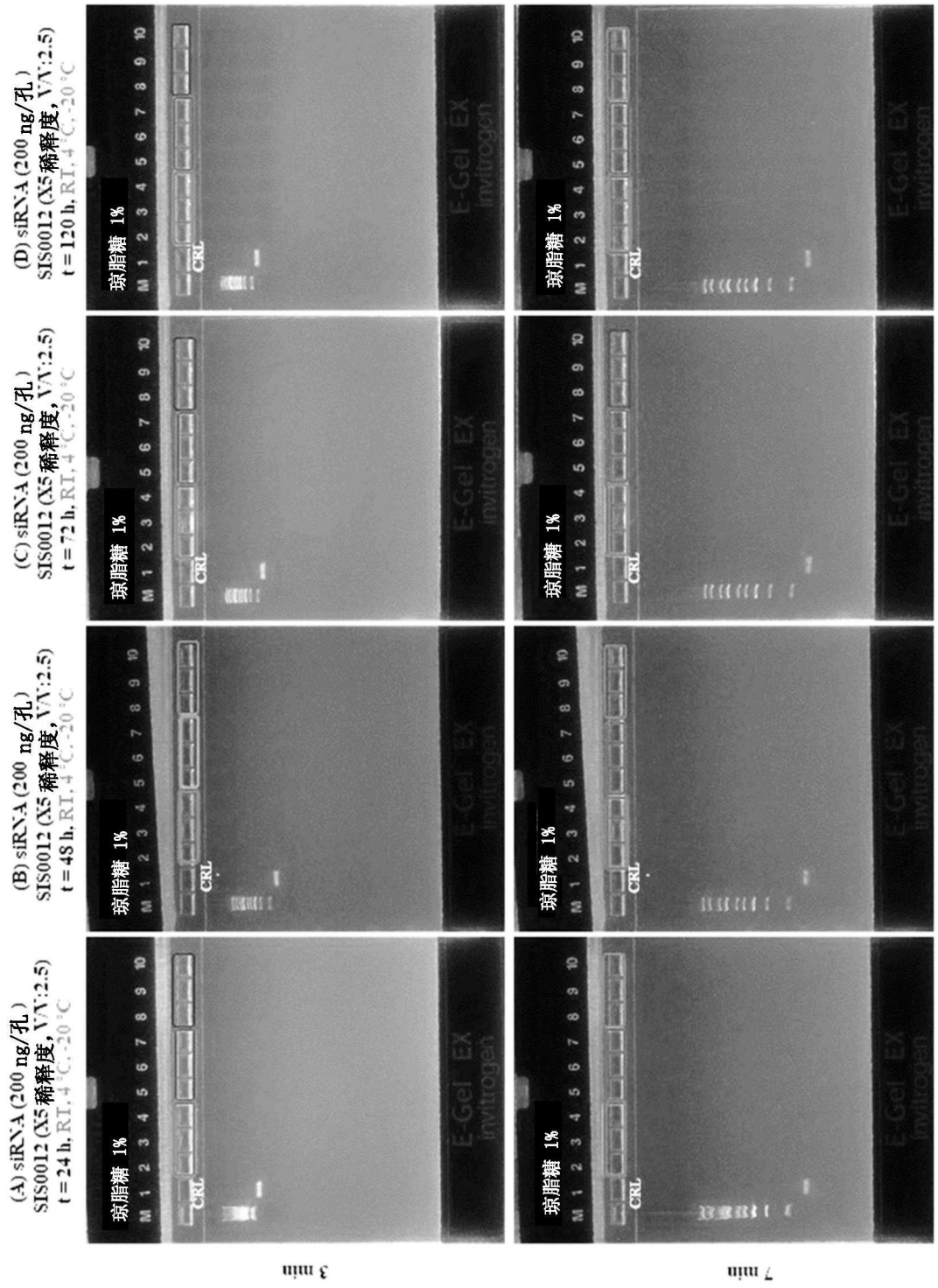

(A) siRNA (200 ng/孔)
SIS0012 (X5 稀释度, V:V:2.5)
t = 24 h, RT, 4 °C, -20 °C
(B) siRNA (200 ng/孔)
SIS0012 (X5 稀释度, V:V:2.5)
t = 48 h, RT, 4 °C, -20 °C
(C) siRNA (200 ng/孔)
SIS0012 (X5 稀释度, V:V:2.5)
t = 72 h, RT, 4 °C, -20 °C
(D) siRNA (200 ng/孔)
SIS0012 (X5 稀释度, V:V:2.5)
t = 120 h, RT, 4 °C, -20 °C
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
CRL
E-Gel EX
invitrogen
3 min
7 min

图16

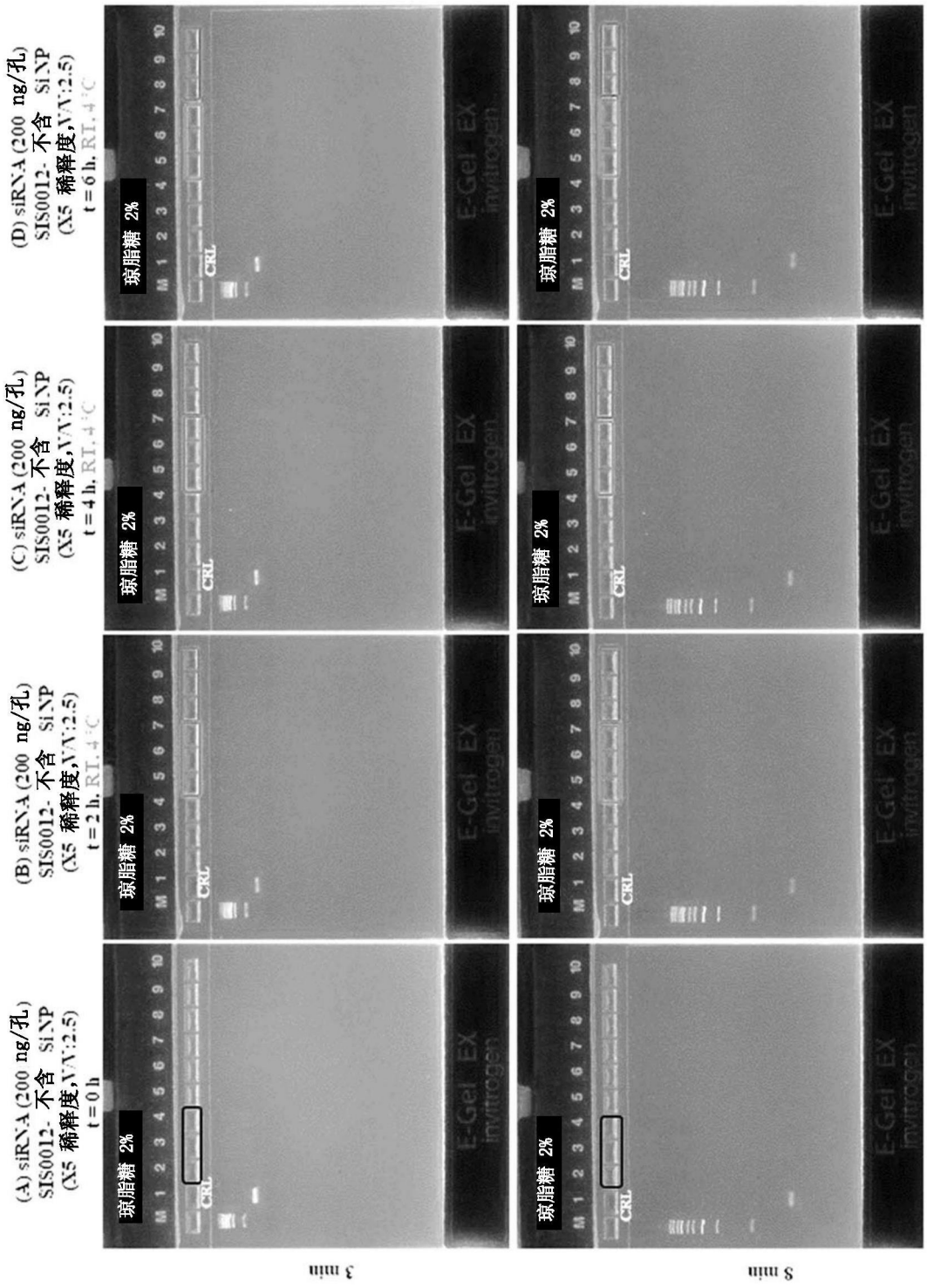

(A) siRNA (200 ng/孔)
SIS0012- 不含 SiNP
(X5 稀释度,V/V:2.5)
t = 0 h
(B) siRNA (200 ng/孔)
SIS0012- 不含 SiNP
(X5 稀释度,V/V:2.5)
t = 2 h, RT, 4 °C
(C) siRNA (200 ng/孔)
SIS0012- 不含 SiNP
(X5 稀释度,V/V:2.5)
t = 4 h, RT, 4 °C
(D) siRNA (200 ng/孔)
SIS0012- 不含 SiNP
(X5 稀释度,V/V:2.5)
t = 6 h, RT, 4 °C
琼脂糖 2%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
CRL
E-Gel EX
invitrogen
3 min
8 min

图17

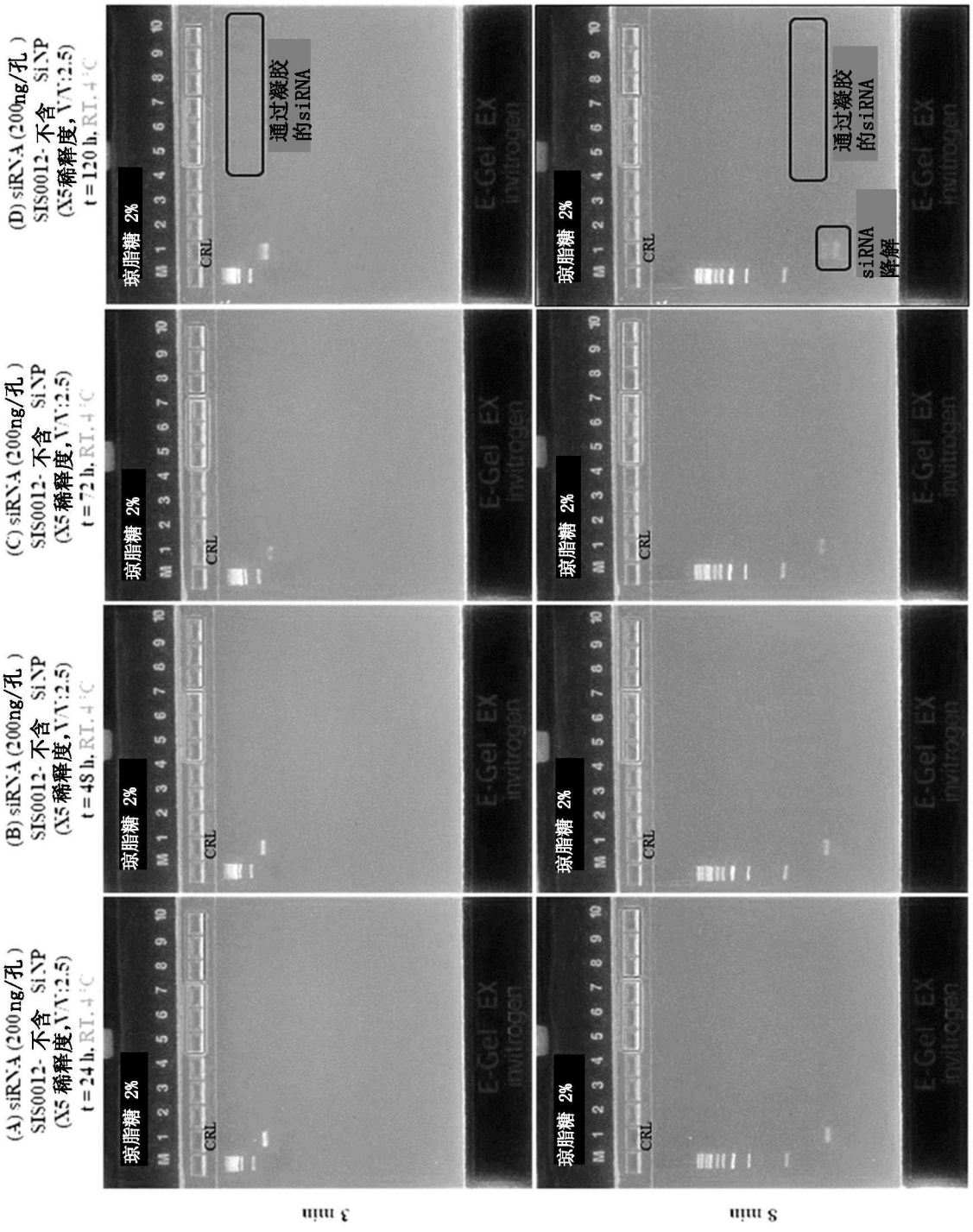

(A) siRNA (200 ng/孔) SIS0012- 不含 SiNP (X5 稀释度,V/V:2.5) t = 24 h, RT, 4 °C
(B) siRNA (200ng/孔) SIS0012- 不含 SiNP (X5稀释度,V/V:2.5) t = 48 h, RT, 4 °C
(C) siRNA (200ng/孔) SIS0012- 不含 SiNP (X5稀释度,V/V:2.5) t = 72 h, RT, 4 °C
(D) siRNA (200ng/孔) SIS0012- 不含 SiNP (X5稀释度,V/V:2.5) t = 120 h, RT, 4 °C
琼脂糖 2%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
CRL
E-Gel EX invitrogen
通过凝胶的siRNA
siRNA 降解
3 min
5 min

图18

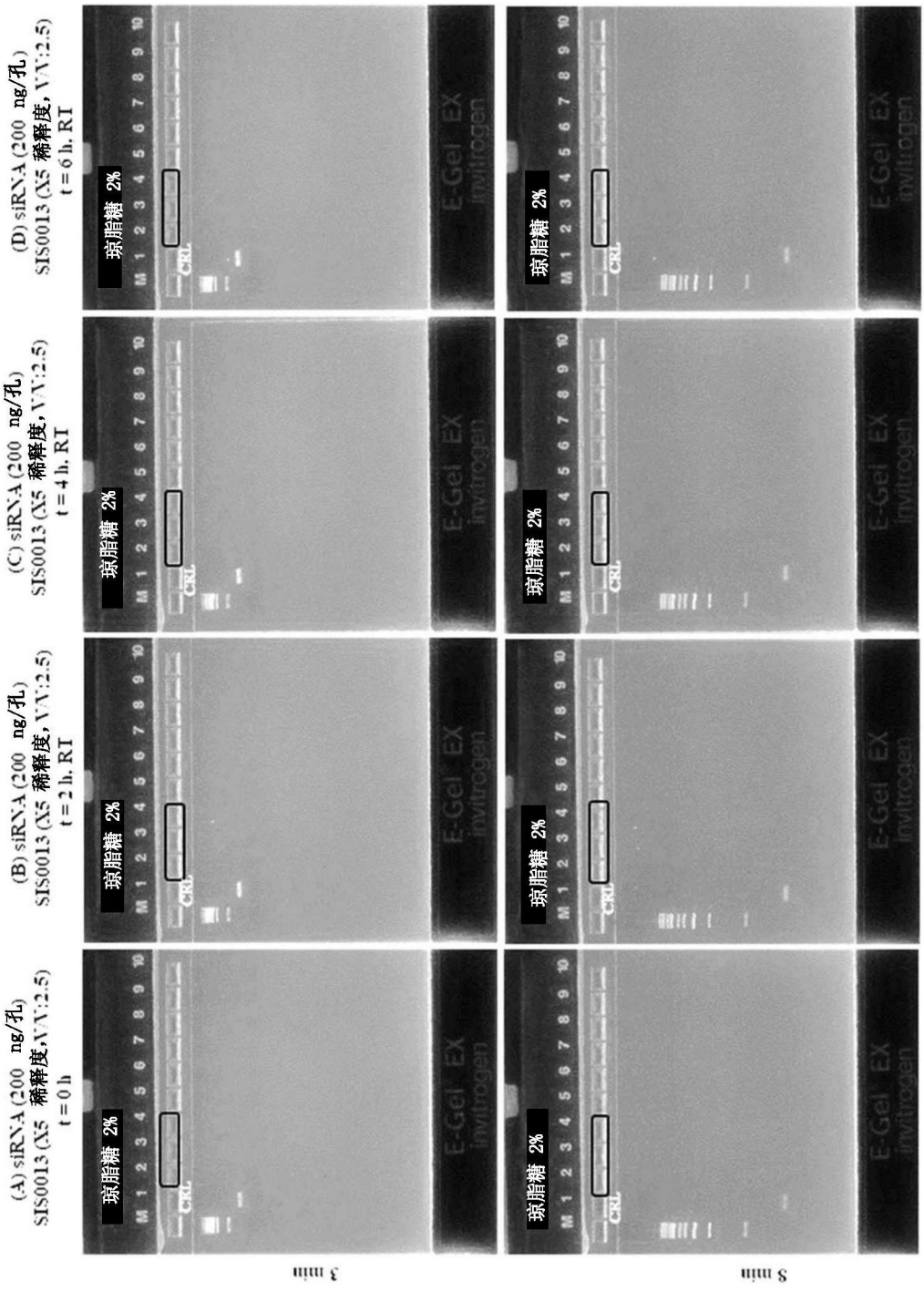

(A) siRNA (200 ng/孔)
SIS0013 (X5 稀释度,VV:2.5)
t = 0 h
(B) siRNA (200 ng/孔)
SIS0013 (X5 稀释度,VV:2.5)
t = 2 h, RT
(C) siRNA (200 ng/孔)
SIS0013 (X5 稀释度,VV:2.5)
t = 4 h, RT
(D) siRNA (200 ng/孔)
SIS0013 (X5 稀释度, VV:2.5)
t = 6 h, RT
琼脂糖 2%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
CRL
E-Gel EX
invitrogen
3 min
8 min

图19

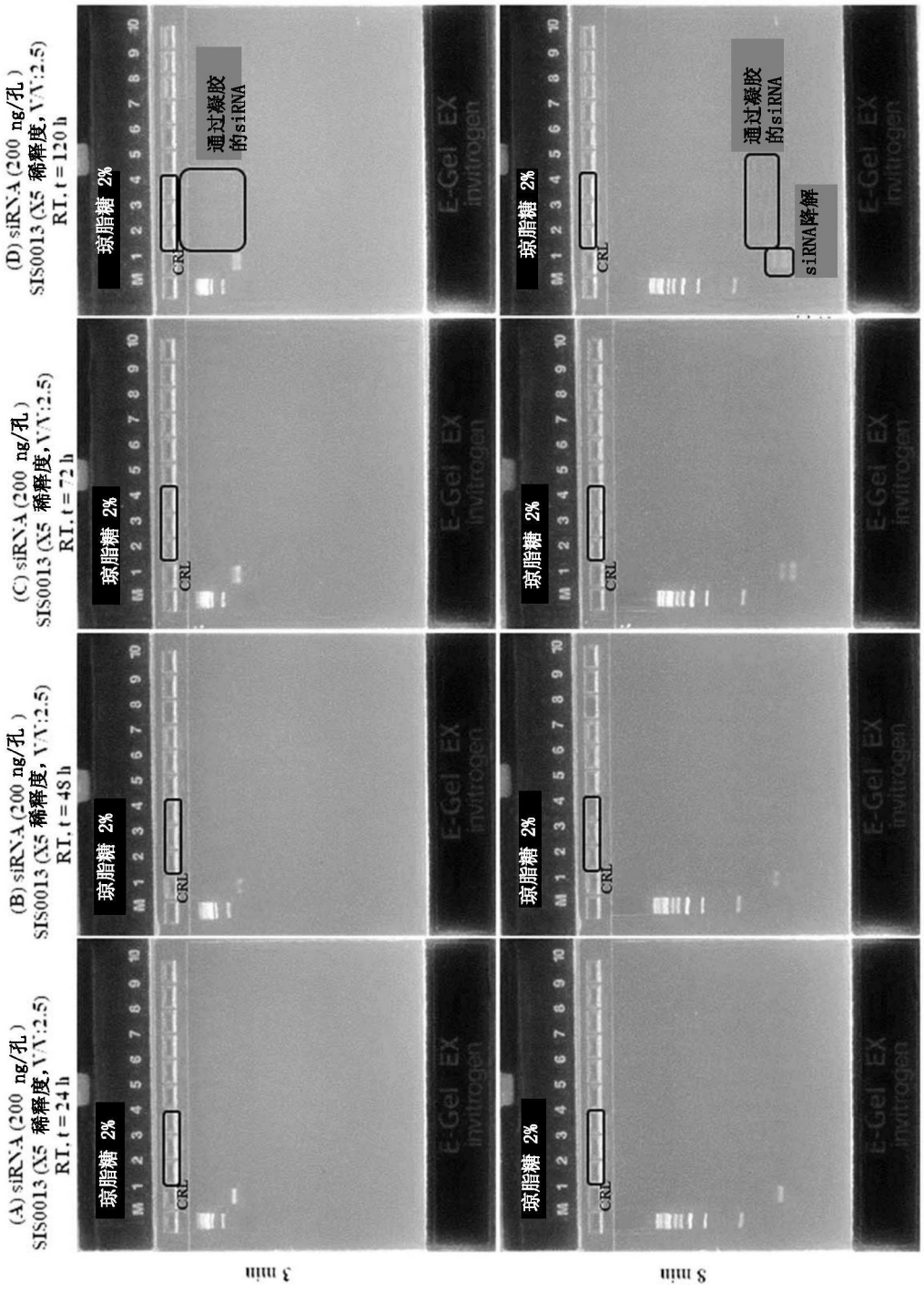

(A) siRNA (200 ng/孔)
SIS0013 (X5 稀释度, V:V:2.5)
RT. t = 24 h
(B) siRNA (200 ng/孔)
SIS0013 (X5 稀释度, V:V:2.5)
RT. t = 48 h
(C) siRNA (200 ng/孔)
SIS0013 (X5 稀释度, V:V:2.5)
RT. t = 72 h
(D) siRNA (200 ng/孔)
SIS0013 (X5 稀释度, V:V:2.5)
RT. t = 120 h
琼脂糖 2%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
CRL
E-Gel EX invitrogen
通过凝胶的siRNA
siRNA降解
3 min
5 min

图20

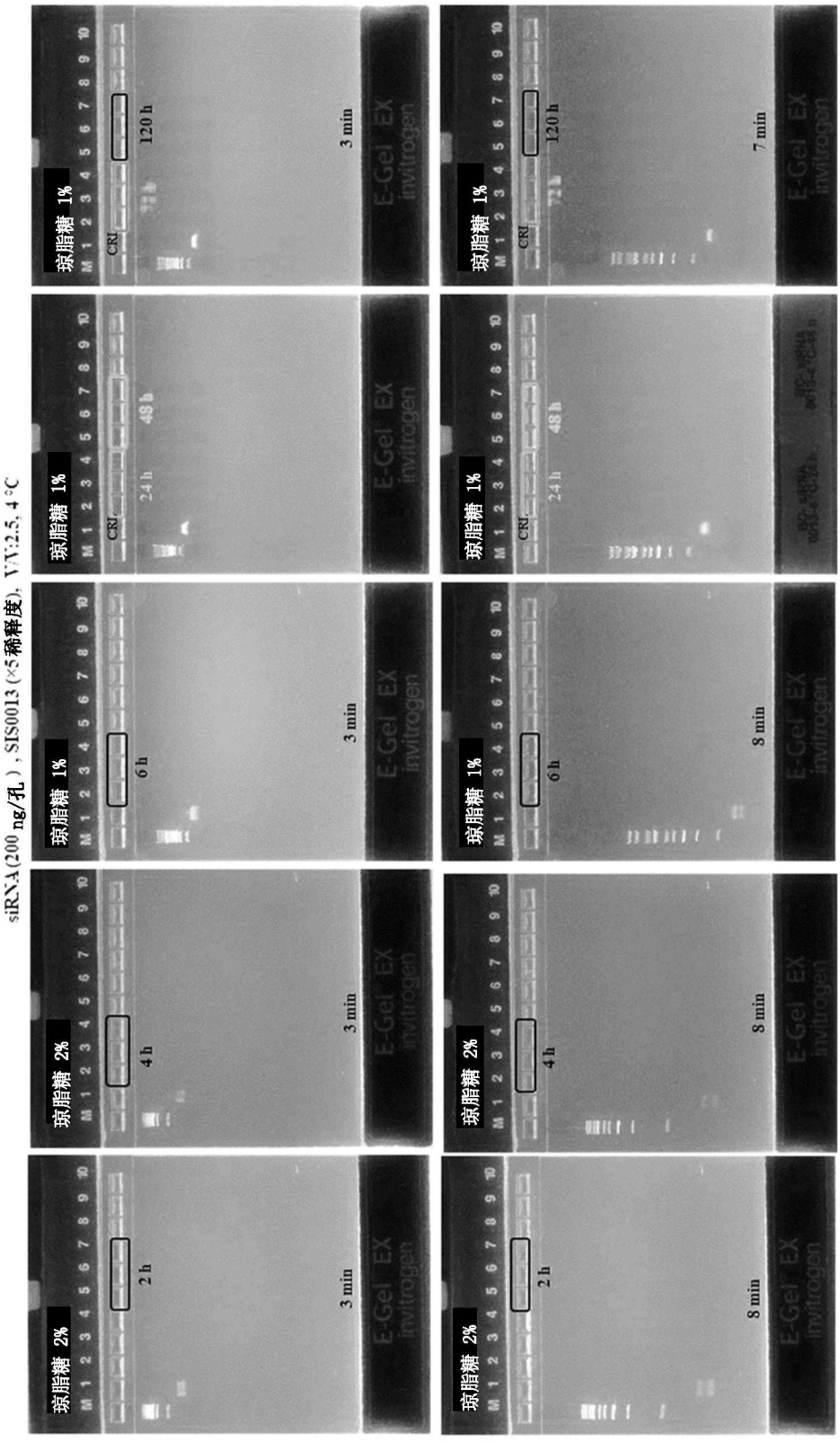

siRNA(200 ng/孔)，SIS0013 (×5稀释度)，V/V:2.5，4 ℃
琼脂糖 2%
琼脂糖 1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
CRI
2 h
4 h
6 h
24 h
48 h
72 h
120 h
3 min
7 min
8 min
E-Gel EX
invitrogen

图21

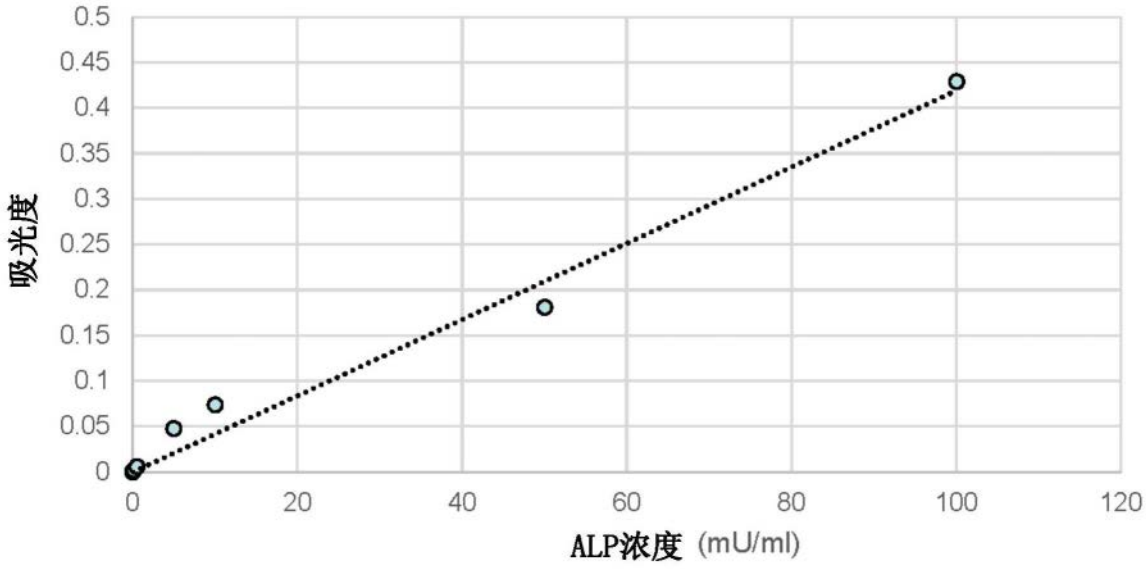

0.5
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
吸光度
0
20
40
60
80
100
120
ALP浓度 (mU/ml)

图22

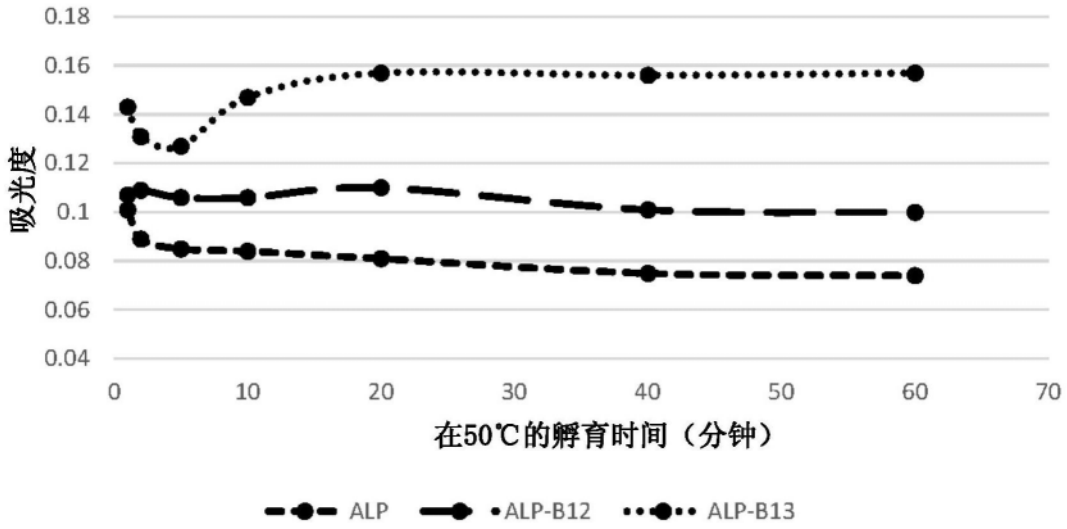

0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
吸光度
0
10
20
30
40
50
60
70
在50℃的孵育时间（分钟）
ALP
ALP-B12
ALP-B13

图23

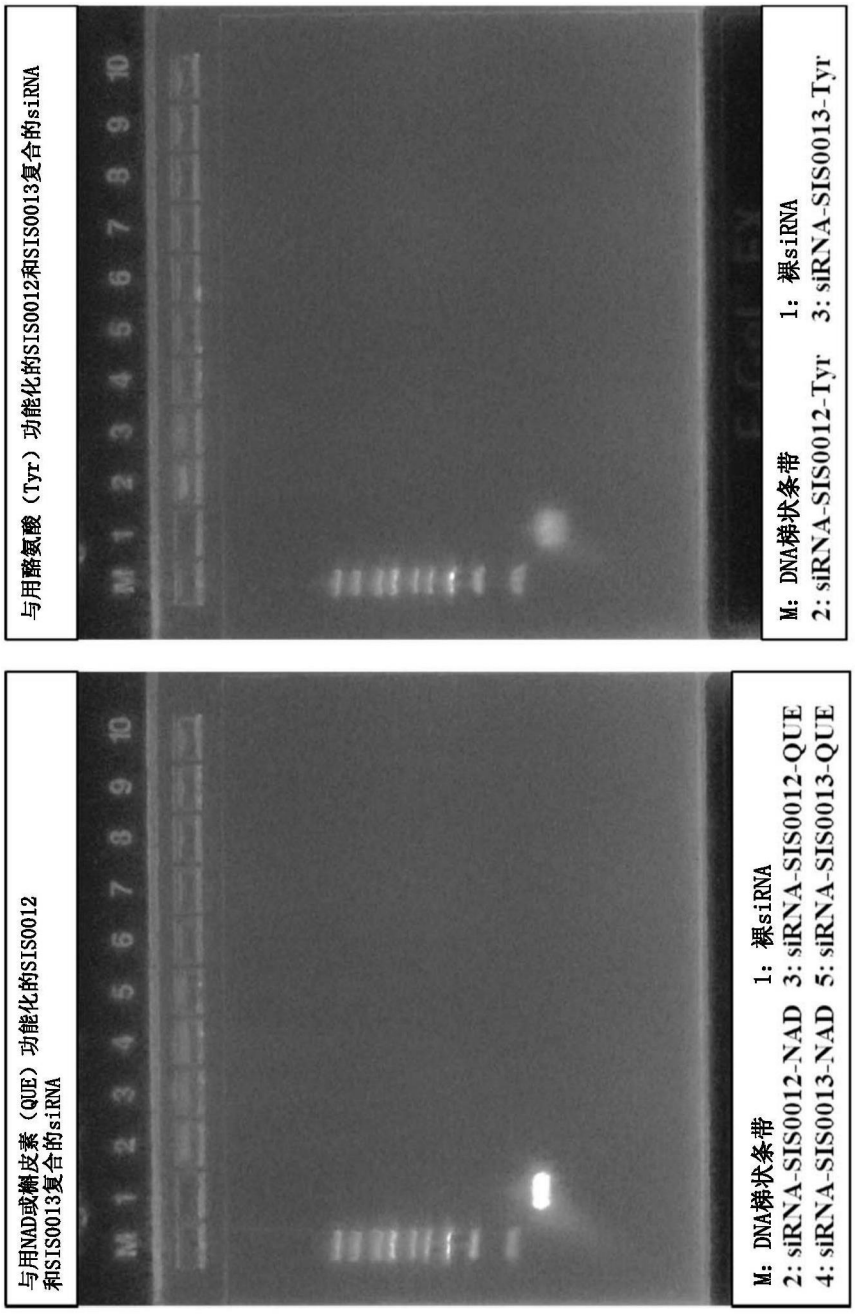

与用酪氨酸（Tyr）功能化的SIS0012和SIS0013复合的siRNA
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
M：DNA梯状条带
1：裸siRNA
2：siRNA-SIS0012-Tyr
3：siRNA-SIS0013-Tyr
与用NAD或槲皮素（QUE）功能化的SIS0012和SIS0013复合的siRNA
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
M：DNA梯状条带
1：裸siRNA
2：siRNA-SIS0012-NAD
3：siRNA-SIS0012-QUE
4：siRNA-SIS0013-NAD
5：siRNA-SIS0013-QUE

图24

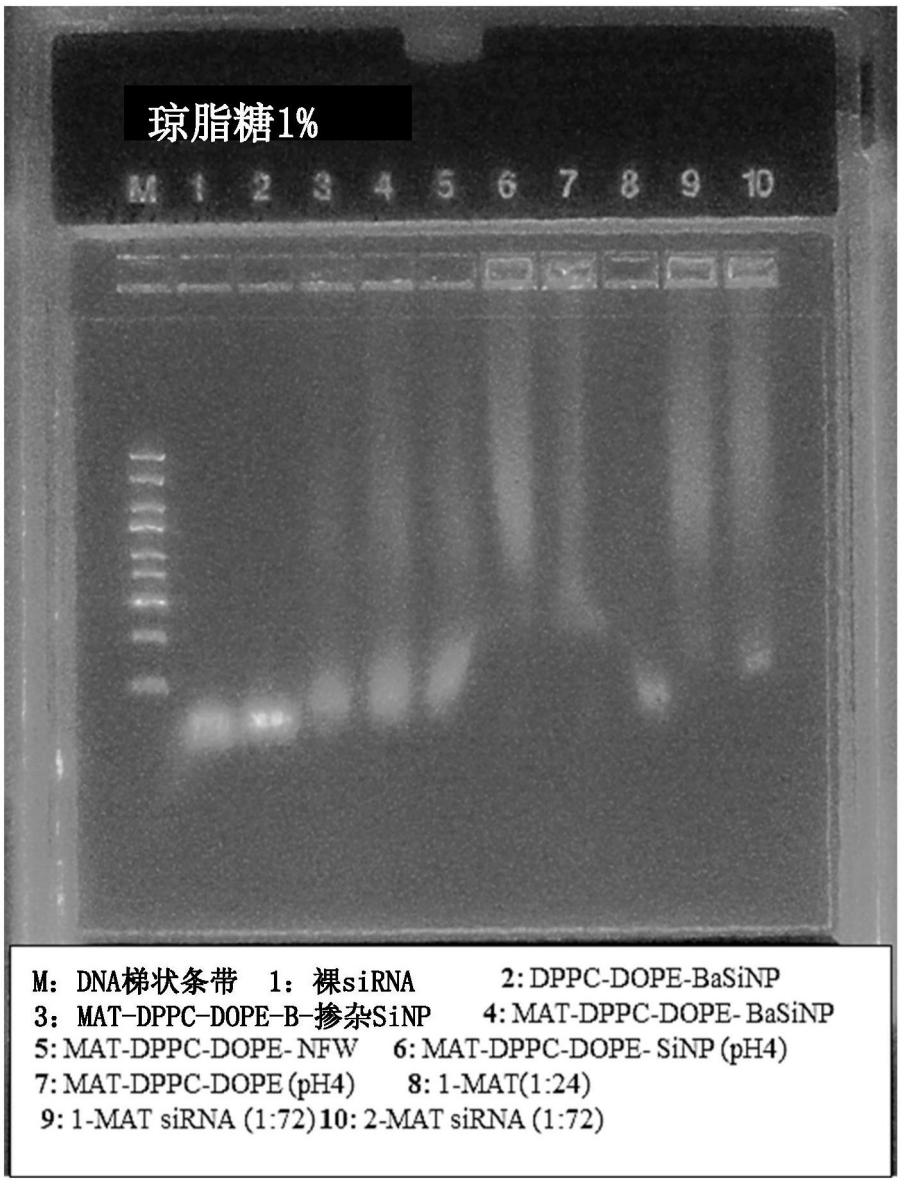

琼脂糖1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
M：DNA梯状条带 1：裸siRNA 2: DPPC-DOPE-BaSiNP
3：MAT-DPPC-DOPE-B-掺杂SiNP 4: MAT-DPPC-DOPE- BaSiNP
5: MAT-DPPC-DOPE- NFW 6: MAT-DPPC-DOPE- SiNP (pH4)
7: MAT-DPPC-DOPE (pH4) 8: 1-MAT(1:24)
9: 1-MAT siRNA (1:72) 10: 2-MAT siRNA (1:72)

图25

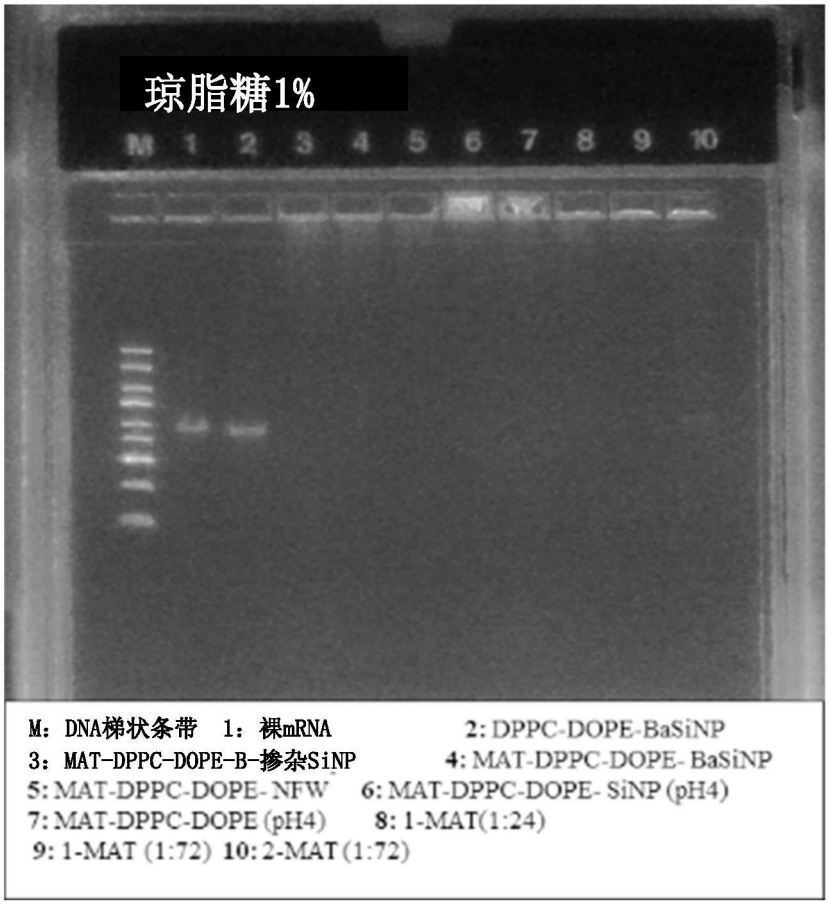
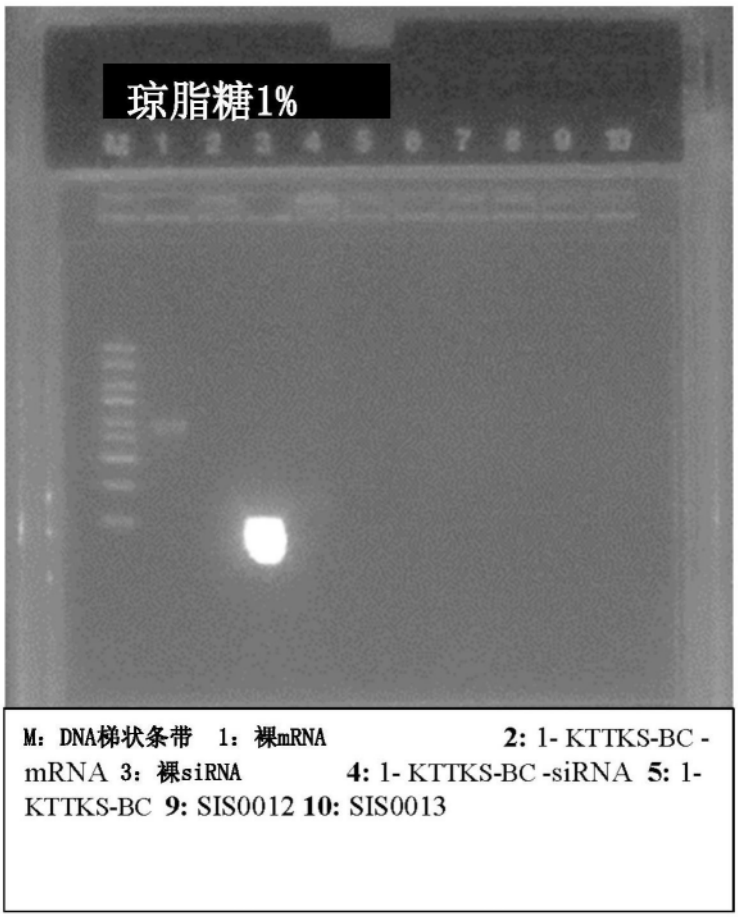

琼脂糖1%
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
M：DNA梯状条带 1：裸mRNA 2: DPPC-DOPE-BaSiNP
3：MAT-DPPC-DOPE-B-掺杂SiNP 4: MAT-DPPC-DOPE- BaSiNP
5: MAT-DPPC-DOPE- NFW 6: MAT-DPPC-DOPE- SiNP (pH4)
7: MAT-DPPC-DOPE (pH4) 8: 1-MAT(1:24)
9: 1-MAT (1:72) 10: 2-MAT (1:72)

图26



M：DNA梯状条带 1：裸mRNA 2：1-KTTKS-BC-mRNA 3：裸siRNA 4：1-KTTKS-BC-siRNA 5：1-KTTKS-BC 9：SIS0012 10：SIS0013

图27