



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105579068 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 11

(21) 申请号 201480052449. 0

(22) 申请日 2014. 09. 23

(30) 优先权数据

61/881, 072 2013. 09. 23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 03. 23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/057000 2014. 09. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/042585 EN 2015. 03. 26

(71) 申请人 伦斯勒理工学院

地址 美国纽约州

(72) 发明人 希瓦·普拉萨德·科塔

安德烈·罗纳德·沃森

瓦巴维·A·潘迪特

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112

代理人 王静 张珂珂

(51) Int. Cl.

A61K 48/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书11页

序列表11页 附图26页

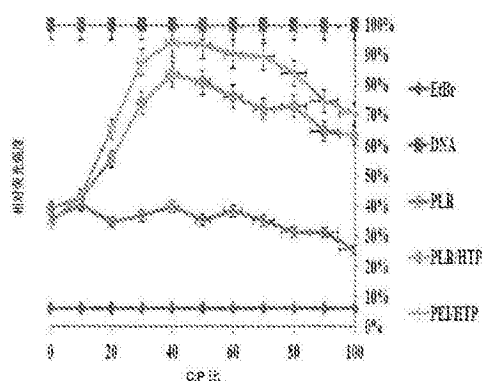
(54) 发明名称

在各种细胞群中纳米颗粒介导的基因传递、基因组编辑和靶向配体的修饰

(57) 摘要

本发明提供了一种用于转染细胞的改进的纳米颗粒。所述纳米颗粒包括核聚合复合物和核聚合复合物上的二氧化硅涂层,以及任选附着在二氧化硅涂层外表面的聚合物,其中该聚合复合物包含阴离子聚合物、阳离子聚合物、阳离子多肽和多核苷酸。本发明还提供了修饰细胞内的多核苷酸的改进的方法。该方法包括使细胞与纳米颗粒接触的步骤,该纳米颗粒包含核聚合复合物和核聚合复合物上的二氧化硅涂层,以及任选附着在二氧化硅涂层外表面的聚合物,其中该聚合复合物包含阴离子聚合物、阳离子聚合物的聚合物、阳离子多肽和多核苷酸。

图1 阳离子聚合物介导的基因传递



1. 一种纳米颗粒, 包括:
核聚合复合物和在所述核聚合复合物上的二氧化硅涂层;
其中所述核聚合复合物包含阴离子聚合物、阳离子聚合物、阳离子多肽和多核苷酸。
2. 权利要求1所述的纳米颗粒, 其中所述阴离子聚合物为聚(D-谷氨酸)。
3. 权利要求1所述的纳米颗粒, 其中所述阳离子聚合物选自自由聚(乙烯亚胺)和聚(L-精氨酸)构成的组。
4. 权利要求1所述的纳米颗粒, 其中所述阳离子多肽为组蛋白尾肽。
5. 权利要求4所述的纳米颗粒, 其中所述组蛋白尾肽为人H3组蛋白尾肽。
6. 权利要求1所述的纳米颗粒, 其中所述阴离子聚合物为聚(D-谷氨酸), 所述阳离子聚合物选自自由聚(乙烯亚胺)和聚(L-精氨酸)构成的组, 并且所述阳离子多肽为组蛋白尾肽。
7. 权利要求6所述的纳米颗粒, 其中所述多核苷酸包含编码核酸酶的核苷酸序列。
8. 权利要求7所述的纳米颗粒, 其中所述核酸酶为TALEN。
9. 权利要求8所述的纳米颗粒, 其中所述TALEN能够在DNA的位点特异性基因座诱导断裂, 其中所述断裂导致由基因编码的蛋白质表达的改变。
10. 权利要求9所述的纳米颗粒, 其中所述改变是降低并且所述基因编码硬化蛋白。
11. 权利要求6所述的纳米颗粒, 进一步包括附着在所述二氧化硅涂层外表面的聚合物。
12. 权利要求11所述的纳米颗粒, 其中附着在所述二氧化硅涂层外表面的所述聚合物包括聚(L-精氨酸)或血管内皮生长因子肽。
13. 一种修饰细胞内多核苷酸的方法, 包括
将细胞与纳米颗粒接触, 其中所述纳米颗粒包括核聚合复合物和在核聚合复合物上的二氧化硅涂层;
其中所述核聚合复合物包含阴离子聚合物、阳离子聚合物、阳离子多肽和多核苷酸。
14. 权利要求13所述的方法, 其中所述阴离子聚合物为聚(D-谷氨酸)。
15. 权利要求13所述的方法, 其中所述阳离子聚合物选自自由聚(乙烯亚胺)和聚(L-精氨酸)构成的组。
16. 权利要求13所述的方法, 其中所述阳离子多肽为组蛋白尾肽。
17. 权利要求16所述的方法, 其中所述组蛋白尾肽为人H3组蛋白尾肽。
18. 权利要求13所述的方法, 其中所述阴离子聚合物为聚(D-谷氨酸), 所述阳离子聚合物选自自由聚(乙烯亚胺)和聚(L-精氨酸)构成的组, 并且所述阳离子多肽为组蛋白尾肽。
19. 权利要求18所述的方法, 其中所述多核苷酸包含编码核酸酶的核苷酸序列。
20. 权利要求19所述的方法, 其中所述核酸酶为TALEN。
21. 权利要求20所述的方法, 其中所述TALEN能够在DNA的位点特异性基因座诱导断裂, 其中所述断裂导致由基因编码的蛋白质表达的改变。
22. 权利要求21所述的纳米颗粒, 其中所述改变是降低并且所述基因编码硬化蛋白。
23. 权利要求18所述的纳米颗粒, 进一步包括附着在所述二氧化硅涂层外表面的聚合物。
24. 权利要求23所述的纳米颗粒, 其中附着在所述二氧化硅涂层外表面的所述聚合物包括聚(L-精氨酸)或血管内皮生长因子肽。

在各种细胞群中纳米颗粒介导的基因传递、基因组编辑和靶向配体的修饰

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2013年9月23日提交的根据35U.S.C. §119的美国临时申请No. 61/881,072的优先权,其全部内容通过引用的方式并入本文。

[0003] 政府权利声明

[0004] 本发明是在美国政府支持的由国立卫生研究院所颁发的编号为R01AG030637的项目下作出的。美国政府对本发明拥有特定的权利。

技术领域

[0005] 本发明主要涉及使用纳米颗粒转染细胞。更具体而言,本发明涉及用聚合复合物核包被纳米颗粒以用于将多核苷酸传递至细胞内修饰基因表达。

背景技术

[0006] 将多核苷酸引入细胞中以改变基因表达,这需要在进入细胞之前将多核苷酸恰当地包装以避免其降解,从而允许其进入细胞和直接传递至适当的亚细胞小室。改变表达的有效性也取决于进入细胞后多核苷酸从包装中释放的时间期限(time-frame)。

[0007] 用于修饰基因表达的可利用的基于纳米颗粒的技术受低水平的细胞转染和在转染时有限的效果所限制,至少部分是由于其在满足前述需求时受到的限制。因此,期望获得满足所有这些要求以增强效果的基于纳米颗粒的转染剂及其使用方法。

发明内容

[0008] 一方面,本发明通过提供了纳米颗粒克服了现有技术的缺点并提供了额外的优点。所述纳米颗粒包括:核聚合复合物(polyplex)和在所述核聚合复合物上的二氧化硅涂层,并且所述聚合复合物包括阴离子聚合物、阳离子聚合物、阳离子多肽和多核苷酸。另一方面,纳米颗粒还可以包括附着在二氧化硅涂层外表面的聚合物。

[0009] 本发明也提供了修饰细胞内多核苷酸的方法。该方法包括将细胞与纳米颗粒接触,其中所述纳米颗粒包括核聚合复合物和在所述核聚合复合物上的二氧化硅涂层,其中聚合复合物包括阴离子聚合物、阳离子聚合物、阳离子多肽和多核苷酸。另一方面,纳米颗粒还可以包括附着在二氧化硅涂层外表面的聚合物。

[0010] 通过本发明的技术实现了额外的特征和优点。通过以下对本发明各个方面的详细描述以及随附的附图,本发明的这些以及其他目的、特征和优点将变得清晰。

附图说明

[0011] 本发明的一个或多个方面被特别指出,并且在对说明书进行总结的权利要求书中作为例子得到显著保护。通过以下对本发明的详细描述以及所附的附图,本发明的前述和其他目的、特征和优点将变得清晰,其中:

[0012] 图1A-1B为根据本发明的一个方面的纳米颗粒及其组分的一些实施方案的示意图；

[0013] 图2A为根据本发明的一个方面的如何制备纳米颗粒的示意图；

[0014] 图2B为这样的示意图，其示出了根据本发明的一个方面的细胞如何摄取和在细胞内处理纳米颗粒的方法；

[0015] 图3为这样的图示，其图解说明了根据本发明的一个方面的包含不同比例的各种带电聚合物和多核苷酸对聚合复合物络合的影响的图；

[0016] 图4为这样的图示，其图解说明了根据本发明的一个方面的在聚合复合物中包含或不包含阴离子聚合物的情况下，包含不同比例的各种带电聚合物和多核苷酸对聚合复合物络合的影响；

[0017] 图5为这样的图示，其图解说明了根据本发明的一个方面的在阳离子多肽存在或不存在的条件下，所包含的阴离子聚合物增加对聚合复合物的破坏作用；

[0018] 图6为示出了根据本发明的一个方面的具有不同层的纳米颗粒的尺寸的图示；

[0019] 图7为利用各种纳米颗粒转染的细胞的显微照片，其为根据本发明的一个方面的证明细胞摄取和转染后纳米颗粒亚细胞定位的显微照片；

[0020] 图8为利用纳米颗粒转染的细胞的显微照片，其示出了根据本发明的一个方面的转染后纳米颗粒在细胞内停留的持续时间；

[0021] 图9A-B为示出了根据本发明的一个方面的细胞如何摄取纳米颗粒的显微照片，所述纳米颗粒在聚合复合物的二氧化硅涂层外部附着有聚合物层；

[0022] 图10为这样的示意图，其示出了根据本发明的一个方面的包括在纳米颗粒中的由核酸编码的TALEN肽引起硬化蛋白(sclerostin)表达的沉默；

[0023] 图11A-11C为这样的图示，其解释说明了根据本发明的一个方面的用不同量的纳米颗粒转染细胞对硬化蛋白和 β 链蛋白表达的影响，所述纳米颗粒针对硬化蛋白的表达；

[0024] 图12A-12F为这样的图示，其解释说明了根据本发明的一个方面的用不同量的纳米颗粒转染细胞对各种细胞信号肽的表达水平的影响，所述纳米颗粒针对硬化蛋白的表达；

[0025] 图13为这样的显微照片，其证实了根据本发明的一个方面的用不同量的纳米颗粒转染细胞对共转染的报告基因的影响，所述报告基因响应于活性受到硬化蛋白介导的信号转导所抑制的转录因子，所述纳米颗粒针对硬化蛋白的表达；

[0026] 图14A-14C为这样的显微照片，其证实了根据本发明的一个方面的用不同量的纳米颗粒转染细胞对矿化作用的影响的图，所述纳米颗粒针对硬化蛋白的表达。

具体实施方式

[0027] 下面结合附图所示的非限制性实施方案，更充分地说明本发明的各方面及一些特征、优点和细节。省略了对已知材料、制造工具、处理技术等描述，从而避免在细节上模糊本发明。然而，应当理解，在示出本发明的实施方案的同时，详细的说明和具体的例子仅通过说明的方式给出，而不是以受到限制的方式给出。根据本发明公开的内容，在本发明根本观念的精神和/或范围内进行各种替换、改变、添加和/或排列对本领域技术人员来说都将是显而易见的。

[0028] 本发明公开部分提供了一种利用试剂转染细胞从而修饰基因表达的多层纳米颗粒。本发明提供了纳米颗粒及其使用方法,纳米颗粒设计用于提高血清稳定性、靶向传递至特定细胞类型、更高的核特异性和腔室特异性解包封(unpackaging)、提高在内化初始阶段保留显著有效负载水平的能力、以及在内化阶段之后保持有效负载释放不同时间的能力。

[0029] 在一个方面,多核苷酸与聚合物的复合物(或者聚合复合物)在阴离子聚合物的存在下,通过阳离子聚合物和多核苷酸缩合产生的,该复合物或聚合复合物介导的转染效率可高于多核苷酸-阳离子聚合物缀合物。通过该过程,可以制备更多的颗粒并增加用于细胞摄取的纳米颗粒的净表面积,通过该技术也可采用改进的静电相斥元件来释放核酸。基于现有文献,可以预测核苷酸从包含阴离子聚合物的纳米颗粒聚合复合物上快速解聚;然而令人惊讶的是,与之相反,在本发明的一个方面中,包含阴离子聚合物的纳米颗粒聚合复合物核可以延长纳米颗粒在细胞内停留的时间,以及影响基因表达或另外地调节细胞功能或有效负载的试剂的释放。

[0030] 在另一个方面中,纳米颗粒中阳离子多肽的存在可以介导稳定性、亚细胞区室化和有效负载释放。作为一个例子,在各种聚合复合物中,组蛋白肽N端的片段统称为组蛋白尾肽,其不仅能够通过各种组蛋白的修饰而去质子化(例如在组蛋白乙酰基转移酶介导的乙酰基化的情况中),还能够作为聚合复合物的组分介导有效的核特异性解包封。利用通过高尔基体和内质网的逆行转运,它们的转运可依赖替代的细胞内吞途径,并且核被膜内部存在的组蛋白的本质示出了组蛋白尾肽固有的定位序列。在本发明的一个方面中,包括组蛋白尾肽可促进纳米颗粒的核定位并导致其有效负载的多核苷酸的酶介导释放。

[0031] 在另一个方面中,聚合复合物的二氧化硅涂层可以在初始细胞摄取之前或期间密封其有效负载。通常使用的聚合复合物由聚(乙烯亚胺)和DNA构成,该聚合复合物具有在细胞内化作用期间排除大部分有效负载(~90%)的趋势,而剩余的有效负载通常保持结合在剩余的阳离子纳米载体聚合物上。通过暂时稳定二氧化硅的中间层,尽管细胞摄取的几率降低,仍然可以观察到更高的细胞内传递效率。在本发明的另一个方面中,用二氧化硅涂层包被纳米颗粒聚合复合物可密封聚合复合物,使其稳定直到其在目的亚细胞区室内加工时释放。

[0032] 在本发明的另一个方面中,可以通过增加另一层阳离子聚合物进一步提高转染效率,使传递效率比裸聚合复合物或二氧化硅包被的聚合复合物大两个数量级,这可能是由于寡聚二氧化硅涂层的阴离子性质是细胞排斥的。在另一个方面中,与其阳离子聚合物/核酸缀合物不同,二氧化硅包被的聚合复合物和它们进一步成层的衍生物在血清中是稳定的,并且适合体内试验。

[0033] 图1A-1B示出了根据本发明的纳米颗粒的组分的例子。根据本发明,纳米颗粒聚合复合物核可包含多核苷酸、阴离子聚合物、阳离子聚合物和阳离子多肽。然后向聚合复合物核涂覆二氧化硅涂层,然后可将聚合物附着到该二氧化硅涂层的外表面上。多核苷酸可以是用于驱动其所含的核酸序列的细胞内表达的DNA载体。然而,纳米颗粒也可包含其它类型的多核苷酸,如线性DNA或各种类型的RNA,包括dsDNA、ssDNA、mRNA、siRNA或CRISPR RNA序列、或其它序列、或是前述序列的任意组合。除了或替代多核苷酸的前述任意例子之外,纳米颗粒也可包括肽核酸、其它大小在50Da至1000Da之间或是大小在200至10kDa之间的带电或极性小分子,如环状核苷酸,例如cAMP、DNA origami模板、适体(aptamer)、带电多肽、在

2kDa至100kDa之间的蛋白质或蛋白质片段、类肽、磷酸化或硫酸化的组分、阴离子修饰的组分、以及前述物质的多聚或寡聚组合。本领域普通技术人员能够理解本发明包含前述任意一者或其组合。

[0034] 继续参见图1A,在本发明的一个方面中,聚合复合物内的阳离子聚合物可以是含有阳离子氨基酸的多肽,并且可以为(例如)聚(精氨酸)、聚(赖氨酸)、聚(组氨酸)、聚(鸟氨酸)、聚(瓜氨酸)、或含有多于一种前述物质的任意组合。除了或替代前述任意阳离子聚合物的例子,纳米颗粒也可包括聚(乙烯亚胺)、聚(天冬酰胺)、类多肽、带电官能化的聚酯、阳离子多糖、乙酰化的氨基糖、壳聚糖、或线性或支链形式的含有多于一种前述物质的任意组合的变体。

[0035] 在一个例子中,阳离子聚合物包括聚(精氨酸),如聚(L-精氨酸)。聚合复合物中的阳离子聚合物的分子量在1kDa至200kDa之间。聚合复合物中的阳离子聚合物的分子量也可在10kDa至100kDa之间。聚合复合物中的阳离子聚合物的分子量也可在15kDa至50kDa之间。在一个例子中,阳离子聚合物包括分子量约为29kDa的聚(L-精氨酸),如SEQ ID NO:1(PLR)所示。在另一个例子中,阳离子聚合物包括分子量约为25kDa的线性聚(乙烯亚胺)(PEI)。在另一个例子中,阳离子聚合物包括分子量约为10kDa的支链聚(乙烯亚胺)。在另一个例子中,阳离子聚合物包括分子量约为70kDa的支链聚(乙烯亚胺)。在另一个例子中,阳离子聚合物包括聚(精氨酸)或任意前述聚合物的D异构体,例如多肽,由于聚合物(例如包含D同分异构体的多肽)可能对细胞内的降解敏感性差,因而在影响有效负载释放及其随时间的释放速率方面具有较长的影响,因而是特别有利的。

[0036] 继续参见图1A,在本发明的另一个方面中,聚合复合物内的阴离子聚合物可以是含有阴离子氨基酸的多肽,并且可为(例如)聚谷氨酸或聚天冬氨酸、或含有前述的任意组合的多肽。除了或替代前述任意阴离子聚合物的例子,纳米颗粒也可包括粘多糖、糖蛋白、多糖、聚(甘露糖醛酸)、聚(古罗糖醛酸)、肝素、硫酸肝素、软骨素、硫酸软骨素、角质素、硫酸角质素、聚集蛋白聚糖、聚(葡萄糖胺)、或包含前述任意组合的阴离子聚合物。在一个例子中,阴离子聚合物可包括聚谷氨酸。聚合复合物中的阴离子聚合物的分子量可以在1kDa至200kDa之间。聚合复合物中的阴离子聚合物的分子量也可在10kDa至100kDa之间。聚合复合物中的阴离子聚合物的分子量也可在15kDa至50kDa之间。在一个例子中,阴离子聚合物包括分子量约为15kDa的聚(谷氨酸)。由谷氨酸的D同分异构体构成或包括谷氨酸的D同分异构体的聚合物是特别有利的,这是由于它们可能对细胞内的降解敏感性差,因而在影响有效负载释放及其随时间的释放速率方面具有长远的影响。例如,聚合复合物中的阴离子聚合物可具有SEQ ID NO:2(PDGA)所示的序列。在另一个例子中,阴离子聚合物可包括任意前述聚合物或多肽的D同分异构体,由于聚合物(例如包含D同分异构体的多肽)可能对细胞内的降解敏感性差,因而在影响有效负载释放及其随时间的释放速率方面具有长远的影响,因而是特别有利的。

[0037] 继续参见图1A,在本发明的另一个方面中,纳米颗粒的聚合复合物核内的阳离子肽可以是组蛋白肽的片段,如H1、H2、H3或H4蛋白质的片段。所述片段可包括对应于组蛋白的N端序列的氨基酸。例如,该片段可包括组蛋白的至多前5个(SEQ ID NO:9)、前10个(SEQ ID NO:10)、前15个(SEQ ID NO:11)、前20个(SEQ ID NO:12)、前25个(SEQ ID NO:13)或更多个N端氨基酸。该片段也可在其C端被酰胺化。该片段还可以被修饰从而使得一个或多个

赖氨酸残基甲基化、使得一个或多个组氨酸、赖氨酸、精氨酸或其它互补残基乙酰化或易于被组蛋白乙酰基转移酶或乙酰基CoA底物乙酰化、或前述的任意组合。例如,根据本发明,纳米颗粒聚合复合物核中的阳离子肽可具有由SEQ ID NO:3表示的序列,其包括人组蛋白3蛋白质的前25个氨基酸,在其C端酰胺化并在第4位赖氨酸三甲基化(HTP)。

[0038] 在另一个实施方案中,除了或替代前述任意阳离子多肽,纳米颗粒可包括或包含核定位序列。阳离子多肽可在其N端或C端包括核定位序列。核定位序列可包括输入蛋白(importin)或核转运蛋白(karyopherin)底物,或是可具有或包含对应于SEQ ID NO:8的序列。在另一个实施方案中,除了或替代前述任意阳离子多肽,纳米颗粒可包括线粒体定位信号或mtHSP70的肽片段。

[0039] 继续参见图1B,在本发明的另一个方面中,纳米颗粒可包括在细胞或区室内内化作用之前为聚合复合物核提供稳定性的可逆涂层,防止过早降解或不稳定。例如可在聚合复合物核上施加二氧化硅涂层。在另一个例子中,可在聚合复合物核上施加磷酸钙或羟磷灰石。在另一个例子中,可在聚合复合物核上施加具有过量阴离子电荷的支链阳离子聚合物、多肽或类肽。涂层(如二氧化硅涂层)可以在暴露于内体微环境之前保护聚合复合物免于降解。

[0040] 在另一个方面中,纳米颗粒可包括附着或静电结合在包被的聚合复合物外表面的聚合物层,如结合在二氧化硅涂层上或与二氧化硅涂层结合。这样的外部聚合物可用于防止包被的聚合物的细胞排斥作用,从而促进与细胞的接触和细胞的摄取。外部聚合物层可以用于促进特定细胞类型的内化作用,例如期望的是外部附着的聚合物是被转染的细胞类型所表达受体的配体、或模拟配体。附着在聚合复合物涂层外表面的聚合物层中的聚合物的大小可以在0.1kDa至20kDa,或是大小可至多为40kDa或50kDa。

[0041] 根据本发明,构成附着在包被的核聚合复合物外表面的聚合物层中的聚合物的例子包括:由SEQ ID NO:4表示的那些,其约为10kDa聚(精氨酸)聚合物;以及SEQ ID NO:5,其为人血管内皮生长因子蛋白质。在另一个例子中,构成附着在包被的核聚合复合物外表面的层中的聚合物可包括在聚合物、多肽或多核苷酸的N末端、C末端、5'端或3'端的约1至25个重复阴离子或阳离子基团的锚底物(anchor substrate),从而为包被聚合复合物核的聚合物、多肽或多核苷酸所含的靶基序提供静电共轭。在另一个例子中,构成附着在包被的核聚合复合物外表面的层中的聚合物可包括示出碱基对互补性或对氨基酸结合基序具有亲和性从而结合其余可以加入其上的层的聚合物、多肽或多核苷酸序列。

[0042] 如图2A所示,在本发明的另一个方面中,制备阳离子聚合复合物,然后用二氧化硅涂层包被。可通过导致缩合的静电作用制备纳米颗粒的聚合复合物核。制备两种相等体积的溶液,一种是未经pH调节的40mM HEPES(pH=5.5)与溶于水中的0.1%w/v阳离子聚合物和阳离子多肽组合,另一种是30mM Tris-HCl(pH~7.4)与溶于水中的0.1%w/v阴离子聚合物和多核苷酸组合。在一个实施方案中,阳离子聚合物包含SEQ ID NO:1,阴离子聚合物包含SEQ ID NO:2,并且阳离子多肽包含SEQ ID NO:3。可以通过向阴离子溶液中滴加阳离子溶液而不搅拌来合并这些溶液。在室温下孵育30分钟后,向溶于Tris-HCl(pH=7.4)的45mM硅酸钠(Sigma)溶液中滴加在聚合复合物中含有10μg的核酸的200μL溶液,并允许其在室温下孵育8小时至24小时。可利用300kDa Nanosep[®]过滤器(Pall, Port Washington, NY)以3000g离心分离二氧化硅包被的聚合复合物,从而从未结合的二氧化硅和聚合物中分离复

合物。

[0043] 可进一步将纳米颗粒再重悬于含有聚合物的溶液中,所述聚合物用于附着到二氧化硅涂层的外表面。例如,它们可重悬在含有0.1%w/v的由SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5表示的聚合物的溶液中1小时。然后在转染介质中重悬之前可以将纳米颗粒再次离心。该方法是根据本发明制备纳米颗粒的一个例子。

[0044] 图2B为这样的示意图,其示出了根据本发明的细胞与纳米颗粒接触导致纳米颗粒的细胞内化作用,如胞膜窖介导的胞吞作用或巨胞饮作用。纳米颗粒还可逆行通过高尔基体和内质网或由溶酶体途径加工,导致涂层(如二氧化硅涂层)遗失或聚合复合物核的暴露。根据本发明,聚合复合物核还可进一步移位进入细胞核,其中酶加工可降解阳离子聚合物,如通过精氨酸酶的活性;或者促进聚合复合物核的解包封,如通过聚合复合物内组蛋白尾肽的乙酰化,导致多核苷酸(如质粒DNA)从聚合复合物核上释放。

[0045] 根据本发明,也可发生其它修饰纳米颗粒和其聚合复合物核或涂层或附着在涂层上的聚合物层的细胞内加工步骤。

[0046] 在另一个方面,本发明包括优化阴离子和阳离子聚合物、阳离子多肽和多核苷酸的比例,该多核苷酸用于络合作为纳米颗粒一部分的聚合复合物核。在一个例子中,用溴化乙锭荧光标记质粒DNA(40ng EtBr/ μ g DNA),然后按照[胺(n)]:[磷酸(p)+羧酸盐(c)]的摩尔比[1(正电)]:[1(负电)]的比例,或者在加入聚(D-谷氨酸)(PDGA;SEQ ID NO:2)的情况下按照c:p比例添加各种聚合组分。将加入线性聚(乙烯亚胺)(PEI, 25kDa)与单独加入聚(L-精氨酸)(PLR, 29kDa;SEQ ID NO:1),以及H3K4(Me3)组蛋白尾肽(HTP;SEQ ID NO:3)联合加入的情况做比较,从而对作为二元复合物(例如PEI+DNA或PEI+DNA)或三元复合物(HTP+PEI+DNA或HTP+PLR+DNA)中的一部分的两个聚合物之间的类似的络合行为进行定量。当阳离子聚合物和阳离子多肽都存在时,各组分的相对摩尔比分别为60%:40%。使用蔡司滤镜(Zeiss filter)和分光光度计在595nm发射光处激发EtBr标记的DNA得到510nm的光,使用未结合的EtBr作为阴性对照比较各种配方的结果。

[0047] 图3为示出了改变阴离子聚合物或阳离子聚合物或多肽与多核苷酸的比例的影响的图示。X轴示出了带电聚合物与磷酸根的比例,并且Y轴示出了所示组分的如下组合的相对荧光。相对荧光值的减少表明来自DNA和聚合复合物的EtBr的位移。阳离子聚合物、或阳离子聚合物和阳离子多肽与DNA的比例大约5:1及更高,这表明荧光降低了大约40%,指示DNA和聚合物络合成聚合复合物。在没有阳离子聚合物或阳离子多肽的情况下添加PDGA不影响络合。

[0048] 为了确定过量阳离子和平衡电荷比例对纳米颗粒络合的影响,在PLR-HTP-DNA、PEI-HTP-DNA、PLR-DNA和PEI-DNA聚合复合物络合且确定PDGA不能引起多核苷酸的络合后,通过比较[胺(n)]:[磷酸根(p)]和[胺(n)]:[磷酸根(p)+羧酸根(c)]的摩尔比[5.5(正电)]:[1(负电)]和[10(正电)]:[1(负电)]的比例,获得PDGA对形成动力学的影响。与在DNA上包括磷酸基团相比,期望在PDGA上包括羧酸基团以对整体的形成动力学有影响。以DNA不存在的情况作为对照,在不添加聚合物或多肽或EtBr的情况下,相对荧光值与DNA比较。

[0049] 图4示出了向阳离子聚合物和阳离子多肽中添加PDGA对聚合复合物络合动力学的影响。在添加或不添加PDGA的情况下,DNA与HTP、PLR或PEI络合。示出了在添加或不添加HTP的情况下,使用阳离子聚合物(PLR或PEI)与多核苷酸的摩尔比为5.5:1(如标记了n/p=5.5

的棒所示)、以及阳离子聚合物(PLR或PEI)与多核苷酸和阴离子聚合物的摩尔比为5.5:1和10:1(如标记了 $n/(p+2c)=5.5$ 或10的棒所示)的试验。在所测试的任意摩尔比下,PDGA的添加不损害络合动力学。

[0050] 如图5所示,也确定了包括阳离子聚合物和阳离子多肽对聚合复合物去稳定作用的影响。按照如上所述络合以[(PDGA)羧酸根(c):(DNA)磷酸根(p)]的摩尔比0至100的DNA和阳离子多肽(具有或不具有HTP的PLR、或具有HTP的PEI)的聚合复合物纳米颗粒,与仅有DNA或EtBr作为对照相比,确定去稳定作用(如荧光值增加所示)的影响。在HTP不存在的情况下,添加PDGA不会导致聚合复合物去稳定。然而,在HTP的存在下,加入摩尔比为20及以上的PDGA与DNA导致聚合复合物的去稳定化。这些结果示出了阳离子多肽和阴离子聚合物对复合物去稳定作用的协同影响。

[0051] 在阳离子纳米颗粒聚合复合物核中阳离子多肽的掺入、和/或是不同分子量或大小的阳离子组分的包含可有利地增强阳离子聚合物促进多核苷酸有效负载从聚合复合物及其它组分上解离和释放的能力。

[0052] 使用动态光散射(BRAND)来确定纳米颗粒在形成的各个阶段的流体力学半径。含核聚合复合物及质粒DNA、PLR、PDGA和HTP([酰胺]:[(磷酸)]摩尔比5.5:1)的纳米颗粒按照如上所述络合。一些聚合复合物核进一步按照所述涂覆二氧化硅。一些二氧化硅包被的聚合复合物进一步按照所述用阳离子聚合物(SEQ ID NO:4)成层。在包括三元复合物、核的二氧化硅涂层和二氧化硅包被的核的阳离子聚合物涂层的初始核形成后,得到30分钟至60分钟的测量结果。图6示出了纳米颗粒的直径的图。未包被的聚合复合物核和二氧化硅包被的聚合复合物核平均直径大约为70nm至150nm。在其它实施方案中,聚合复合物核和二氧化硅包被的聚合复合物核的平均直径可以在100nm至150nm范围内。在二氧化硅涂层上添加阳离子聚合物涂层得到平均直径大约为170nm的纳米颗粒。在其它实施方案中,在二氧化硅外层附着有另外的阳离子聚合物层的二氧化硅包被的聚合复合物核的平均直径可以在80nm至200nm范围内。

[0053] 也确定了纳米颗粒的细胞摄取。将异硫氰酸荧光素(FITC)共价连接在PEI(25kDa线性)和PLR(29kDa)的胺上,从而使胺与FITC的摩尔比为100:1。在室温下,在暗处,在相同体积的水和DMSO中反应4小时。为了实现连接,在10kDa Nanosep[®]过滤器中离心0.05%w/v 500μL各荧光修饰的聚合物溶液,并且将洗脱液的荧光密度(485ex./520em.)与未过滤的聚合物以及水进行比较。在纳米颗粒中包含mCherry质粒(Addgene公司)以允许对质粒驱动的表达进行荧光检测。

[0054] 在聚苯乙烯T-75组织培养塑料瓶(Corning,CA,USA)中培养MC3T3小鼠成骨细胞。在DMEM培养液中添加10%的胎牛血清(Thermo Fisher Scientific,VA,USA)以及1%青霉素/链霉素(Invitrogen,NY,USA)用于成骨细胞。在开始细胞培养后的第15天至第25天加入二甲酚橙。在第25天固定细胞并检验矿化作用(mineralization)。使用FITC修饰的纳米颗粒递送mCherry质粒,以1000个细胞/孔的密度将成骨细胞接种在96孔板中,并使其在含有10%FBS的不含抗生素的DMEM中粘附12小时至16小时。即将转染前,用相同体积的OptiMEM悬浮的纳米颗粒和含有10%FBS的DMEM换掉培养基。

[0055] 所有复合物都是FITC标记的,并在转染前对荧光强度进行定性观察(488/520ex./em.)。用200ng的质粒转染96孔接种的成骨细胞(1000个细胞/孔),每个二元(质粒和阳离子

聚合物)、三元(质粒和阳离子聚合物,加上阴离子聚合物或阳离子多肽)和四元(质粒、阳离子聚合物、阴离子聚合物和阳离子多肽)复合物及其二氧化硅包被的配对物,1个对照以及总共8个实验组($n=3$),每个实验重复三次。为了研究血清对胞外聚集的特性的影响,使用了5%的血清。

[0056] 转染后30小时后,双峰荧光成像允许同时观察FITC标记的纳米颗粒(488ex./520em.)及其影响的mCherry基因的表达(633ex./680em.)。在每个孔的不同位置观察最少20个细胞并获得代表性图像。使用ImageJ处理重叠的图像并组合相位反差,488/520和633/680通道。

[0057] 图7示出了证明细胞摄取的显微照片。显而易见的是在图7中的圆圈示出了高水平的核定位位置。二氧化硅包被的二元纳米颗粒示出了爆发释放性能(即在DNA-PLR+二氧化硅样品中核定位不明显)。令人吃惊的是在聚合复合物核中包含PDGA使得细胞核内的质粒延长释放。PDGA的这种导致延长释放的效果是令人吃惊的,因为现有技术文献中给出了相反的启示:在纳米颗粒聚合复合物中包含阳离子聚合物将加速多核苷酸有效负载从其他聚合复合物成分中的分离时间并缩短多核苷酸有效负载在其他聚合复合物成分中的持续时间。加入HTP也会引起广泛的核定位。

[0058] 具有聚(精氨酸)(SEQ ID NO:4)的二氧化硅包被的纳米颗粒进一步涂层(DNA-HTP-PDGA-PLR+Si),使得纳米颗粒在血清中稳定并使得纳米颗粒有效负载在细胞内的停留时间延长。图8为这样的显微照片,其示出了根据本发明的一个方面,MC3T3小鼠成骨细胞对二氧化硅包被的FITC共轭的聚合复合物核的细胞摄取和停留时间,所述聚合复合物核中已经加入了另一层聚(L-精氨酸)(SEQ ID NO:4)。与图7所示的二氧化硅包被的纳米颗粒不同,在图8中没有观察到在二氧化硅涂层外含有另一层阳离子聚合物的纳米颗粒的聚集,表明这样的纳米颗粒在血清中保持稳定。此外,观察到这些纳米颗粒在细胞核内展示出延长的停留时间,从而荧光定性峰在约1.5天内并且可检测到的荧光持续14天。

[0059] 用聚合物分层堆积的二氧化硅包被的聚合复合物核能够进一步提高摄取,所述聚合物特异性地直接与特定细胞类型结合。将细胞受体的配体与纳米颗粒表面结合可以提高纳米颗粒对表达这样受体的细胞的亲和力,并提高这样的细胞的转染。作为根据本发明的一个例子,二氧化硅包被的聚合复合物用VEGF(SEQ ID NO:5)(VEGF受体的高亲和力配体)包被,其由人脐静脉内皮细胞(HUVEC)高水平表达。HUVEC与二氧化硅包被的FITC共轭的聚合复合物以及聚(L-精氨酸)(SEQ ID NO:4)或连接在二氧化硅涂层外表面的人VEGF(SEQ ID NO:5)一起孵育40分钟,之后用PBS洗涤两次,然后再重悬于DMEM(10%FBS)中。4小时后细胞成像。在短暂的孵育期后,仅观察到低水平转染的含有聚(L-精氨酸)层的附着在二氧化硅外表面的纳米颗粒(图9A),而用VEGF代替聚(L-精氨酸)包被导致在这4小时时间点更显著的细胞内化作用。本领域熟练技术人员将会认识到实际上任意其它的细胞类型也可以用根据本发明的纳米颗粒转染,并且可在二氧化硅包被的聚合复合物核的外层附着一层聚合物来促进或另外地影响该作用。本领域技术人员也能够理解,将细胞与纳米颗粒接触的其它方法来影响诸如对人或动物进行腹腔、静脉、肌肉或皮下注射或其他注射、或经皮给药、或通过栓剂,或摄取或吸入口腔或鼻腔、或与移植的组织或细胞或干细胞接触,也包括在本发明中。

[0060] 在本发明的另一个方面中,编码核酸酶的多核苷酸可包含于纳米颗粒聚合复合物

核中。作为一个非限制性的例子,编码和驱动TALEN(转录因子样效应核酸酶)表达的多核苷酸可包括在纳米颗粒中。与锌指核酸酶类似,TALEN利用模块化的DNA结合基序(TALE),该基序可被修饰从而引入新的DNA结合特异性甚至核酸酶(TALEN)。TALE由多个重复可变双氨基酸残基(RVD)构成,其每个特异性地结合单个核苷酸。TALE阵列是通过以特定顺序将RVD串在一起,从而为目的DNA序列提供特异性和亲和力而制造的。通常,这些基因组剪接工具是通过将非特异性剪切结构域融合而设计的,例如将FokI核酸酶与TALE融合。TALEN组装方案是可以得到的,其允许这些重复序列的组装,包括称为金门(Golden Gate)的开源组装方法。

[0061] 在本发明的另一个方面中,可以调节信号分子表达来改变细胞功能的方式来设计和使用纳米颗粒。例如,染色体DNA的序列可被删除或改变,以产生病态或用于治疗的细胞或动物模型,或治疗疾病状态或提高人类健康。根据本发明,表达可被修饰的蛋白质的一个非限制性的例子为硬化蛋白(SOST)。SOST与LRP5/6受体的结合可能通过Wnt3A、Wnt7B、Wnt10A、硬化蛋白、 β -链蛋白、LEF1和TCF1之间的反馈系统抑制Wnt信号转导。通过去除硬化蛋白这些级联解抑制可能导致矿化作用活性显著升高。

[0062] 也预期骨先质细胞(OPG)和RANKL起到响应SOST缺失的作用,其中RANKL表达本身作为通过破骨细胞连接RANK或ODF(破骨细胞分化因子)结合的受体促进破骨细胞生成,并且OPG与RANKL拮抗结合。因此,OPG和RANKL之间的比例是骨形成和再吸收之间关系的决定因素。然而,单一的成骨细胞培养将通过其他形式的旁分泌信号转导,这比与破骨细胞或体外共培养可以更好地反映细胞行为的改变。

[0063] 在本发明的另一个方面中,纳米颗粒可被设计为允许利用TALEN转染,TALEN可破坏SOST的表达并且因此产生高骨量表型。作为一个例子,TALEN可以设计特异性结合在SOST基因的位点并在基因组中产生双链断裂,从而干扰转录或翻译并降低SOST的表达。另一个例子,纳米颗粒可含有能编码两个TALEN的质粒,该TALEN在SOST的起始密码子的染色体位置的任一侧产生双链断裂。在编码起始密码子的序列切割后,内源性基因组DNA的修复可能导致硬化蛋白mRNA的转录缺乏起始密码子,从而不能适当地翻译为SOST蛋白,从而降低SOST的表达和活性。图10示出了该模型的示意图,其中“左”TALEN和“右”TALEN结合并切割SOST起始密码子位点的相对侧。作为一个例子,左TALEN可具有SEQ ID NO:6所示的序列,右TALEN可具有SEQ ID NO:7所示的序列。纳米颗粒可包括表达质粒,如pUC19(GenBank登录号L09137X02514),其中已经亚克隆了编码左TALEN或右TALEN的核苷酸序列(例如由SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7所示的序列)从而驱动编码的TALEN的细胞表达。纳米颗粒也可包括含有左和右TALEN的序列的表达质粒的组合。

[0064] 根据本发明,纳米颗粒也可包括其他TALEN序列,针对SOST或其他任意目的基因,并且也可包括其他的表达载体。根据本发明,纳米颗粒可包括其他类型的多核苷酸或其类似物,如RNA或DNA种类,包括mRNA、siRNA、miRNA、核酸适配体、shRN、AAV来源的核酸、吗啉代RNA(morpholino RNA)、类肽和肽核酸、cDNA、DNA折纸(DNA origami)、具有合成核苷酸的DNA和RNA、具有预定义的二级结构的DNA和RNA、CRISPR序列、多聚体和寡聚物、以及上述的任意组合。在另一个例子中,纳米颗粒可包括这样的多核苷酸,其序列可编码其它产物如期望表达的任意蛋白质或多肽。本领域熟练技术人员将能够认识到上述的例子是根据本发明的,并且也被本发明的权利要求所涵盖。

[0065] 用根据本发明,设计用于使SOST表达沉默的纳米颗粒转染MC3T3小鼠成骨细胞之后,对细胞裂解物和上清部分进行ELISA和实时定量PCR(qPCR)检验。图11A至11C图示了不同含量(800ng、1600ng或2500ng)的根据本发明的纳米颗粒(NP)在调控转染后至多超过20天的时期的SOST表达和 β -链蛋白表达中的不同效果,所述纳米颗粒含有包括编码左(SEQ ID NO:6)和右(SEQ ID NO:7)SOST TALEN的核苷酸序列的表达质粒。为了比较,利用脂转染胺试剂(Lipofectamine)(已知的细胞转染剂)通过编码相同TALEN的mRNA转染其它细胞。如图11A至11C所示,在用根据本发明的纳米颗粒转染后的至少几个星期内,细胞内和细胞外的SOST水平受到抑制,而 β -链蛋白的表达伴随地上调,示出了纳米颗粒在下调SOST表达和活性方面的有效性。

[0066] 也进行qPCR来确定利用根据本发明的纳米颗粒使SOST表达的下调是否可能对相关信号级联中的其它组分具有下游影响。如上所述转染细胞。图12A至12F示出了转染后第5天、第14天和第21天时信号通路中众多组分(SOST、 β -链蛋白、TCF1、LEF1、Wnt3A、Wnt7B、Wnt10b、OPG和RANKL)的表达。为了比较,利用脂转染胺试剂通过编码相同TALEN的mRNA转染其它细胞。实时PCR结果表明,作为对Wnt信号抑制剂硬化蛋白的基因沉默的反应,与用脂转染胺试剂递送的SOST TALENS相比,利用SOST TALENS的纳米颗粒转染的细胞系Wnt响应基因的上调高至多2至6倍。

[0067] 根据本发明使SOST表达沉默后,TCF/LEF-1介导的转录也可能上调。用TOPflash和对照FOPflash荧光素酶报告子质粒构建体转染(Addgene#12456和12457)MC3T3-E1细胞,该构建体含有TCF/LEF-1结合位点。以5000个细胞/孔的密度将细胞接种在8孔lab-tek腔室玻片中并分别用1 μ g的TOPflash和FOPflash质粒转染。为了对比转染的效率,使用对照质粒Renilla(Promega)。图13为示出了根据本发明,用含有编码SOST定向TALENS的质粒的纳米颗粒转染21天后,TCF/LEF-1介导的转录的上调,这与所发明的纳米颗粒转染后TCF/LEF-1表达和活性上调是一致的。

[0068] 根据本发明使SOST表达沉默也提高了骨髓基质细胞和成骨细胞的矿化作用。通过两种不同的方法量化矿化作用,第一种基于利用MATLAB(Mathworks,Natick,MA)的二甲酚橙标记重要的培养物的图像阈值法,第二种通过原子吸收光谱法(AAS)。对于二甲酚橙阈值,在5个相邻孔的区域获得相图和荧光图(利用Texas Red Filter Set),然后连接成较大的8位图像(4x,Nikon Ti-100)。从荧光图中减去相通道,并将阈值设置为背景和信号之间的一半水平(-6dB)。对上述阈值以上的像素的数目计数,并且用于表示各孔中矿化区域的百分比。相图和荧光图的组合允许区分未结合的二甲酚橙,而分贝的使用允许在各图像中校正不同的背景水平。

[0069] 也利用原子吸收光谱仪(AA-Perkin Elmer,MA)通过原子吸收法量化矿化作用。通过加入0.5mL的10%硝酸制备各孔,并且相对于标准曲线测量所得钙含量并在不同组之间进行比较。由于磷酸相使离子化的钙沉淀,所以要小心谨慎以使干扰最小化,因此向各孔中加入大量过量的钾和镧离子。

[0070] 图14A至14C示出了用根据本发明的纳米颗粒转染SOST沉默后矿化作用的影响。图14A是在SOST沉默25天后对形成的矿化基质染色的图片。显示板A至C示出了基质细胞,其中显示板A示出了对照细胞,显示板B示出了利用脂转染胺试剂转染的细胞,并且显示板C示出了利用如所描述并根据本发明的纳米颗粒转染的细胞,所述纳米颗粒包含编码SOST定向

TALEN的质粒。在显示板D至G示出了MC3T3-E1成骨细胞,其中显示板D示出了对照细胞,并且显示板E至G表示根据本发明,分别用800ng、1600ng和2500ng剂量的如本发明所述的纳米颗粒转染的细胞,所述纳米颗粒含有编码SOST定向的TALEN的质粒。图14B和14C是示出了矿化作用的量化的图片。图14A至14C示出了通过根据本发明的纳米颗粒用SOST靶向的TALENS转染之后,骨髓基质细胞和成骨细胞中钙浓度升高,进一步证实改变基因的细胞内表达和活性以及下游信号通路的技术的效果。

[0071] 虽然已经描述并描绘出了本发明的几个方面,本领域技术人员也能够实施本发明的替代方面以达到同样的目标。因此,随附的权利要求旨在涵盖包括在本发明真正的精神和范围内的这些替代方面。

序列表

<110> 伦斯勒理工学院

<120> 在各种细胞群中纳米颗粒介导的基因传递、基因组编辑和靶向配体的修饰

<130> 0094, 183W0

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 186

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 实验室合成序列。

<400> 1

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
35 40 45

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
50 55 60

[0001]

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
65 70 75 80

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
85 90 95

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
100 105 110

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
115 120 125

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
130 135 140

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
145 150 155 160

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
165 170 175

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
180 185

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 实验室构建序列.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(116)
<223> D同分异构体.

<400> 2

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
20 25 30

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
35 40 45

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
50 55 60

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
85 90 95

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
100 105 110

[0002]

Glu Glu Glu Glu
115

<210> 3
<211> 25
<212> PRT
<213> 人类

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 三甲基化.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> 酰胺化.

<400> 3

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro
1 5 10 15

Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala
20 25

<210> 4
<211> 64
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 实验室构建序列.

<400> 4

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
35 40 45

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
50 55 60

<210> 5

<211> 165

<212> PRT

<213> 人类

<400> 5

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1 5 10 15

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
20 25 30

Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
35 40 45

[0003]

Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
50 55 60

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
65 70 75 80

Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
85 90 95

Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
100 105 110

Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe
115 120 125

Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser
130 135 140

Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys
145 150 155 160

Asp Lys Pro Arg Arg
165

<210> 6

<211> 936

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 实验室构建序列.

<400> 6

Met Gly Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Asp Tyr Pro Tyr Asp
1 5 10 15

Val Pro Asp Tyr Ala Ile Asp Ile Ala Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr
20 25 30

Ser Gln Gln Gln Gln Glu Lys Ile Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val
35 40 45

Ala Gln His His Glu Ala Leu Val Gly His Gly Phe Thr His Ala His
50 55 60

Ile Val Ala Leu Ser Gln His Pro Ala Ala Leu Gly Thr Val Ala Val
65 70 75 80

Lys Tyr Gln Asp Met Ile Ala Ala Leu Pro Glu Ala Thr His Glu Ala
85 90 95

Ile Val Gly Val Gly Lys Gln Trp Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala
100 105 110

Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu Arg Gly Pro Pro Leu Gln Leu Asp
115 120 125

[0004]

Thr Gly Gln Leu Leu Lys Ile Ala Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Val
130 135 140

Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn Ala Leu Thr Gly Ala Pro Leu Asn
145 150 155 160

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
165 170 175

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
180 185 190

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
195 200 205

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
210 215 220

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
225 230 235 240

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
245 250 255

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
260 265 270

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

[illegible]

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 580 585 590
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 595 600 605
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 610 615 620
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 625 630 635 640
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 645 650 655
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 660 665 670
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
 675 680 685
 Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu Ser Arg Pro Asp Pro Ala Leu Ala
 690 695 700
 Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly Arg
 705 710 715 720
 [0006] Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu Gly Asp Pro Ile Ser Arg
 725 730 735
 Ser Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg
 740 745 750
 His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile
 755 760 765
 Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu
 770 775 780
 Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser
 785 790 795 800
 Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr
 805 810 815
 Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro
 820 825 830
 Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr
 835 840 845
 Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser
 850 855 860
 Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly
 865 870 875 880

Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn
885 890 895

Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile
900 905 910

Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn
915 920 925

Gly Glu Ile Asn Phe Ala Ala Asp
930 935

<210> 7
<211> 942
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 实验室构建序列.

<400> 7

Met Gly Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Asp Lys Glu Thr Ala
1 5 10 15

Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser Ile Asp Ile Ala Asp
20 25 30

Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gln Gln Gln Gln Glu Lys Ile Lys Pro
35 40 45

Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gln His His Glu Ala Leu Val Gly His
50 55 60

Gly Phe Thr His Ala His Ile Val Ala Leu Ser Gln His Pro Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gly Thr Val Ala Val Lys Tyr Gln Asp Met Ile Ala Ala Leu Pro
85 90 95

Glu Ala Thr His Glu Ala Ile Val Gly Val Gly Lys Gln Trp Ser Gly
100 105 110

Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu Arg Gly
115 120 125

Pro Pro Leu Gln Leu Asp Thr Gly Gln Leu Leu Lys Ile Ala Lys Arg
130 135 140

Gly Gly Val Thr Ala Val Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn Ala Leu
145 150 155 160

Thr Gly Ala Pro Leu Asn Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
165 170 175

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
180 185 190

[0007]

	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	
	195							200					205				
	Ile	Ala	Ser	Asn	Ile	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Ala	
	210					215						220					
	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val	
	225					230					235					240	
	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	Asn	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	
					245					250						255	
	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln	
					260				265						270		
	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	Asn	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	
					275				280				285				
	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	
		290					295						300				
	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	His	Asp	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	
	305					310					315					320	
	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	
					325					330						335	
[0008]	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	Ile	Gly	Gly	Lys	
					340				345						350		
	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Ala	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	
					355				360					365			
	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	His	Asp	Gly	
		370					375						380				
	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	
	385					390					395					400	
	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	
					405					410						415	
	Asn	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	
					420				425						430		
	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	
					435				440						445		
	Ser	Asn	Asn	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	
					450				455						460		
	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val	Val	Ala	
	465					470						475				480	
	Ile	Ala	Ser	Asn	Asn	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	
					485					490						495	

	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val	
				500					505					510			
	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	Asn	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	
			515					520					525				
	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	
			530				535					540					
	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	His	Asp	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	
	545				550					555						560	
	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	
					565					570						575	
	Pro	Gln	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	Gly	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	
				580					585					590			
	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	
			595				600						605				
	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	Ile	Gly	Gly	Lys	
		610				615						620					
	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Ala	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	
	625					630					635					640	
[0009]	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	Asn	Gly	
					645					650						655	
	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	
				660					665					670			
	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	
			675					680					685				
	Gly	Gly	Gly	Arg	Pro	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Val	Ala	Gln	Leu	Ser	Arg	
		690					695					700					
	Pro	Asp	Pro	Ala	Leu	Ala	Ala	Leu	Thr	Asn	Asp	His	Leu	Val	Ala	Leu	
	705				710					715						720	
	Ala	Cys	Leu	Gly	Gly	Arg	Pro	Ala	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	Lys	Gly	Leu	
				725					730						735		
	Gly	Asp	Pro	Ile	Ser	Arg	Ser	Gln	Leu	Val	Lys	Ser	Glu	Leu	Glu	Glu	
			740					745						750			
	Lys	Lys	Ser	Glu	Leu	Arg	His	Lys	Leu	Lys	Tyr	Val	Pro	His	Glu	Tyr	
			755					760					765				
	Ile	Glu	Leu	Ile	Glu	Ile	Ala	Arg	Asn	Ser	Thr	Gln	Asp	Arg	Ile	Leu	
			770				775						780				
	Glu	Met	Lys	Val	Met	Glu	Phe	Phe	Met	Lys	Val	Tyr	Gly	Tyr	Arg	Gly	
	785					790					795					800	

Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val
 805 810 815
 Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser
 820 825 830
 Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr
 835 840 845
 Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp
 850 855 860
 Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val
 865 870 875 880
 Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn
 885 890 895
 His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu
 900 905 910
 Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val
 915 920 925
 Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Ala Ala Asp
 930 935 940

[0010]

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 实验室构建序列。

<400> 8

Asp Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys
 1 5 10 15

Lys

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 9

Ala Arg Thr Lys Gln
 1 5

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 10

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser

	1	5	10
	<210> 11 <211> 15 <212> PRT <213> 人类 <400> 11 Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala 1 5 10 15		
	<210> 12 <211> 20 <212> PRT <213> 人类 <400> 12 Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro 1 5 10 15		
[0011]	Arg Lys Gln Leu 20 <210> 13 <211> 25 <212> PRT <213> 人类 <400> 13 Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro 1 5 10 15 Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala 20 25		

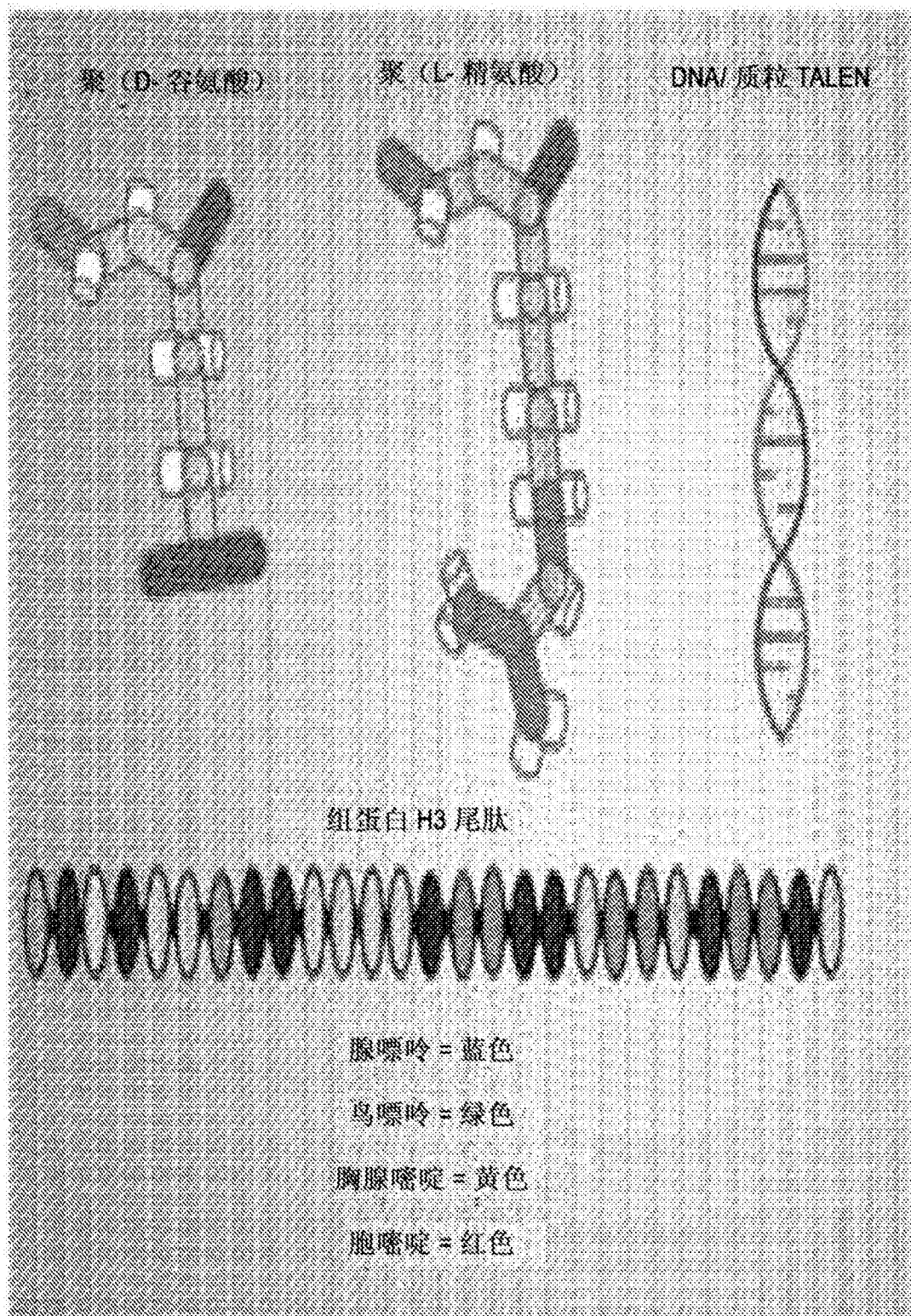


图1A

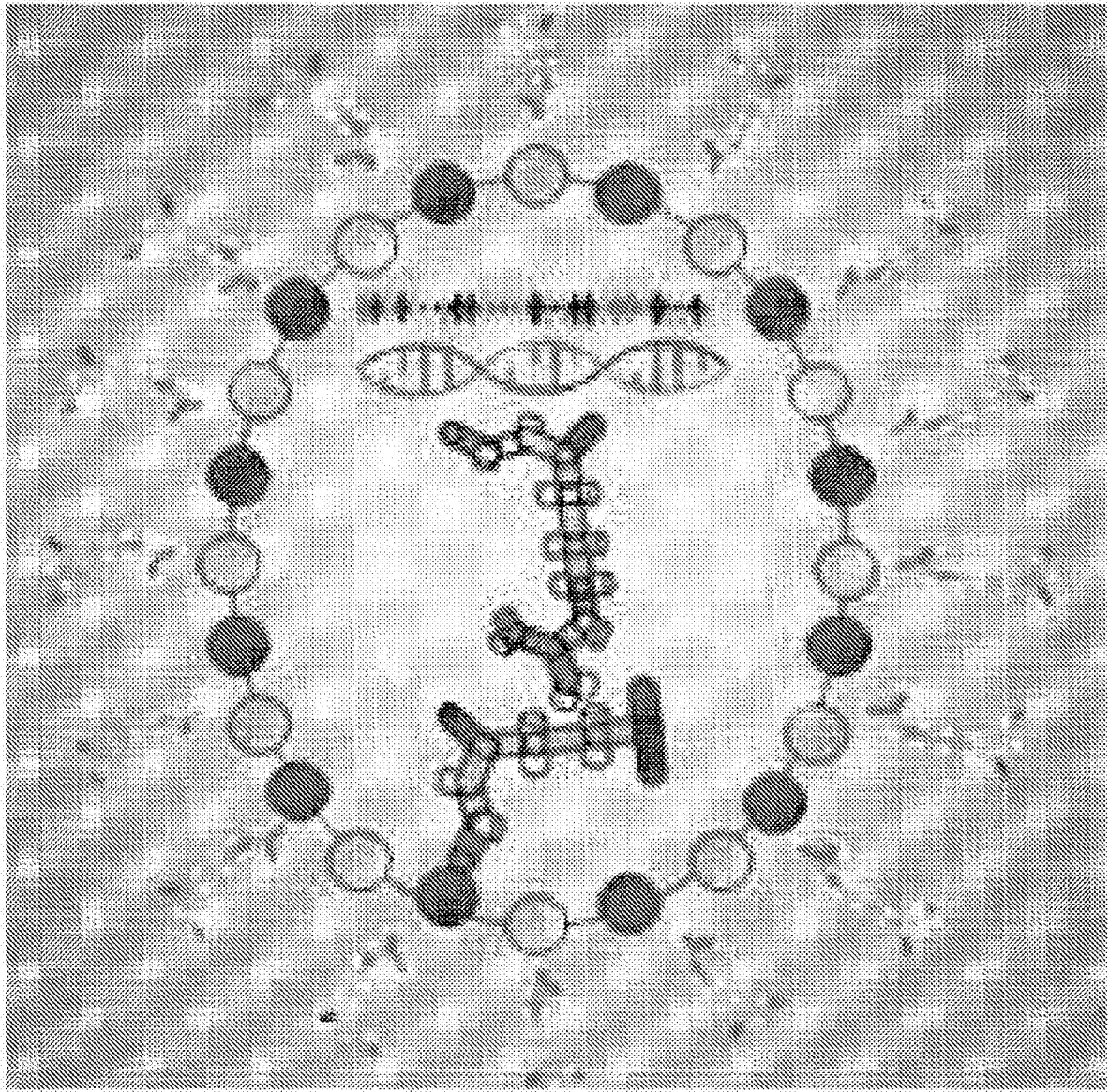


图1B

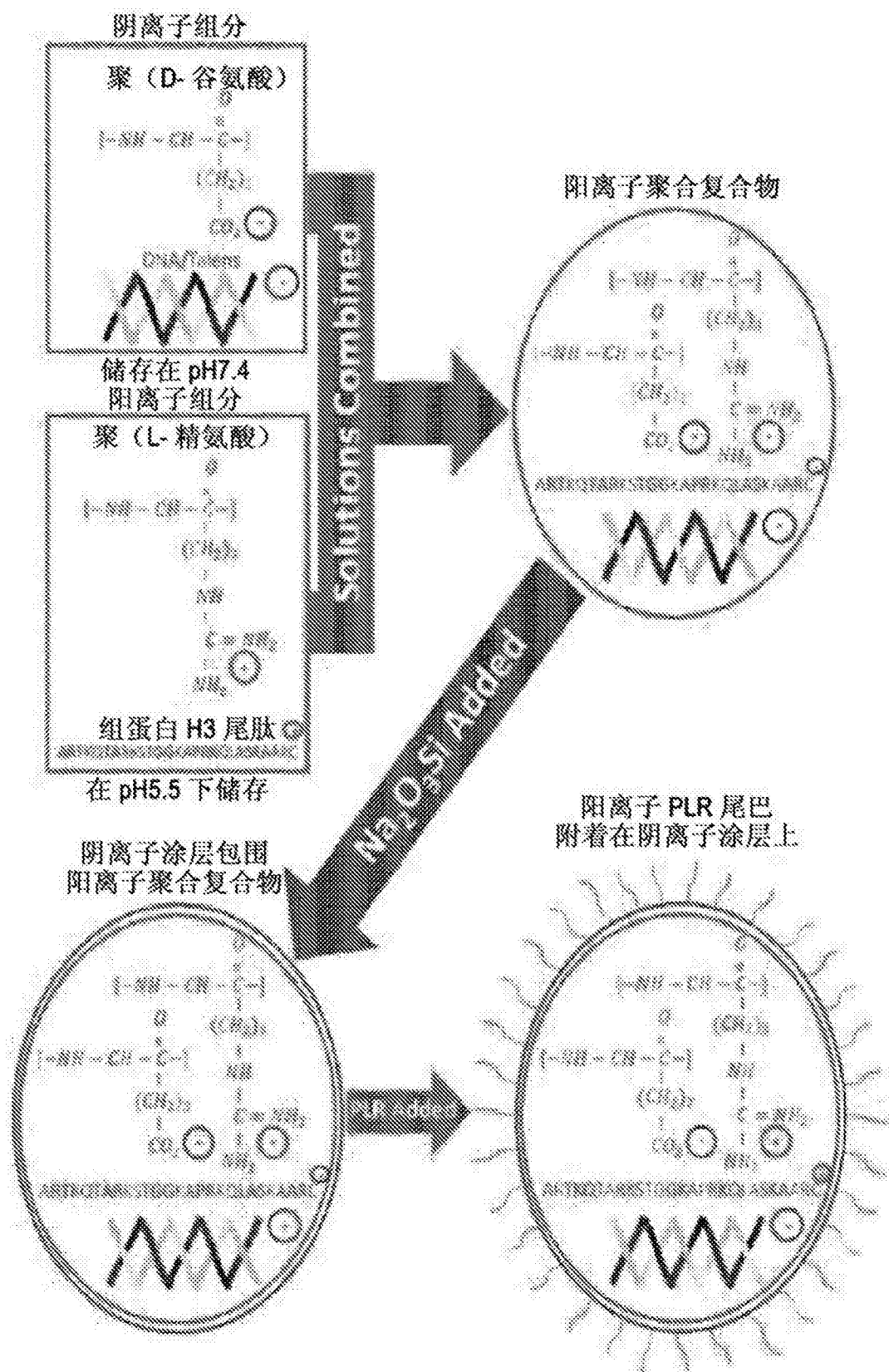


图2A

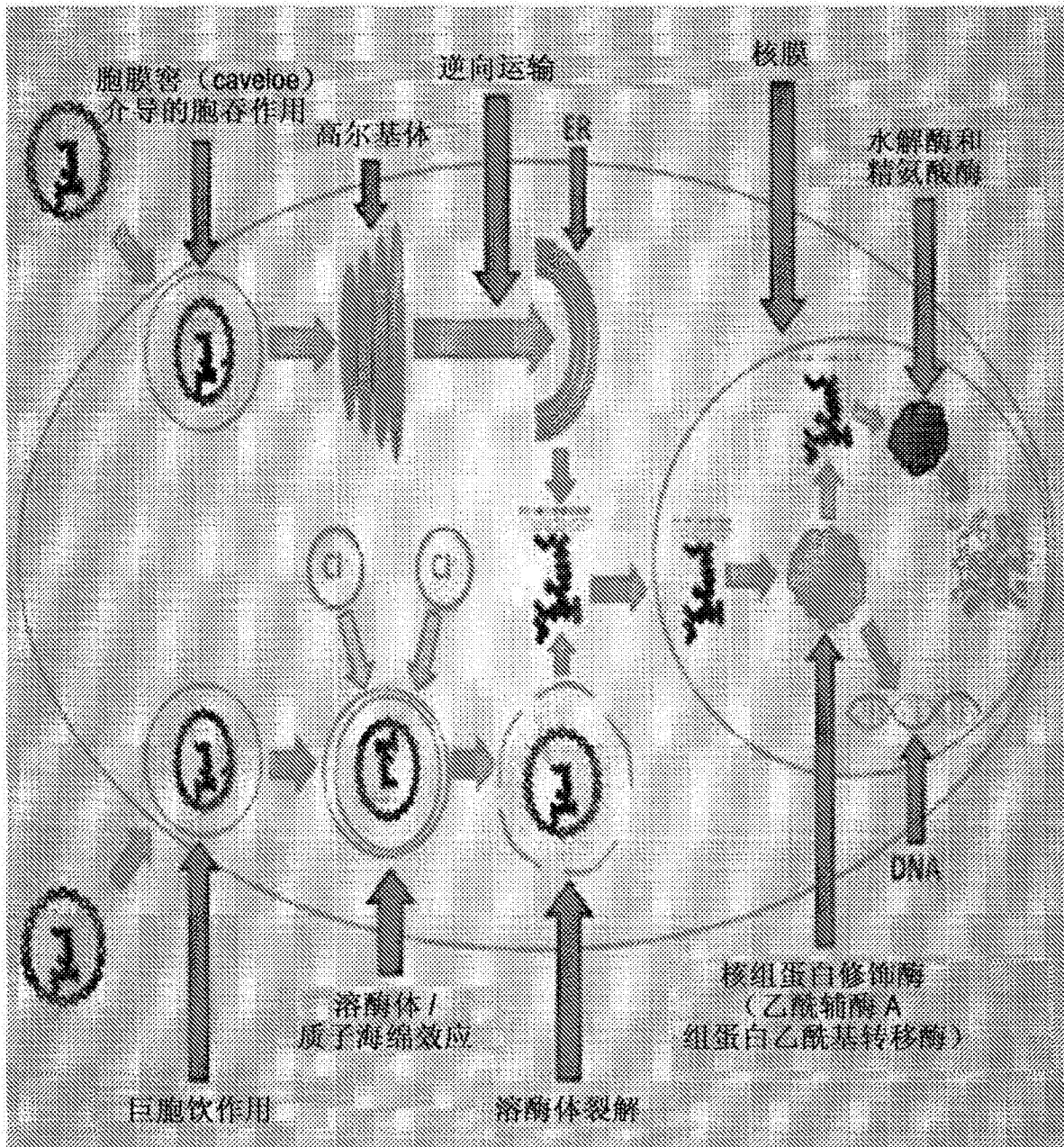


图2B

络合动力学

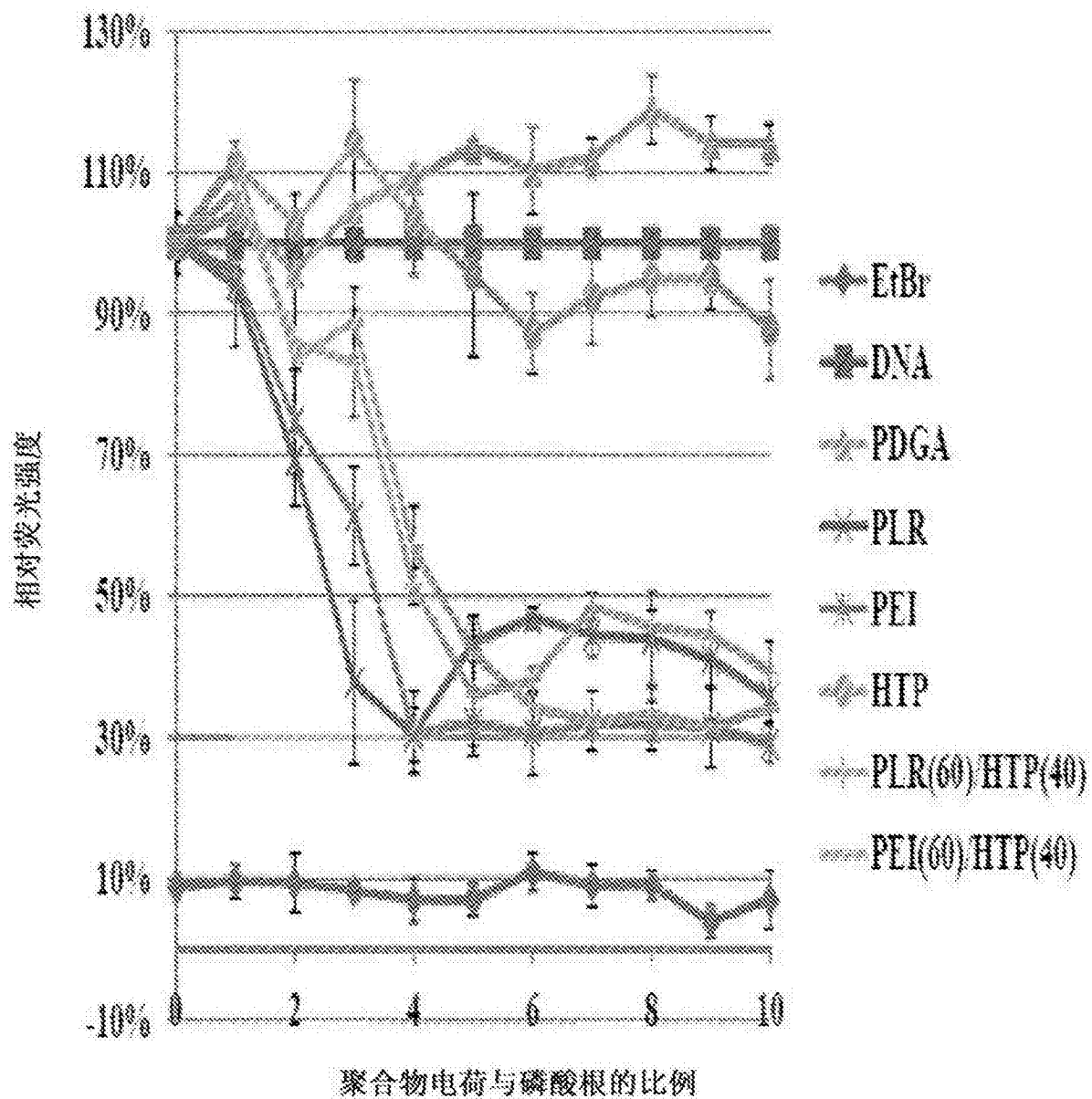


图3

优化的络合动力学

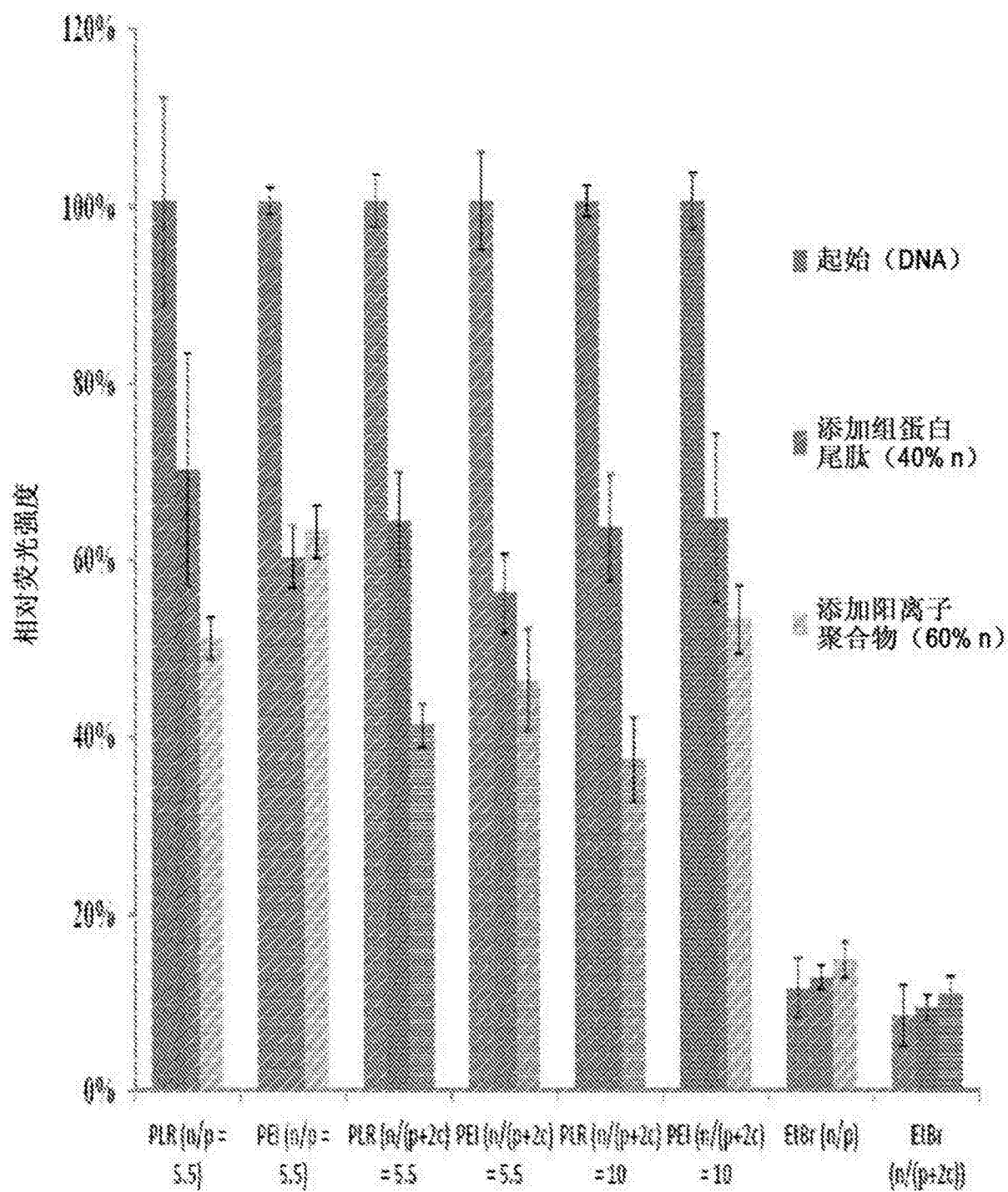


图4

过量阴离子电荷介导的去稳定作用

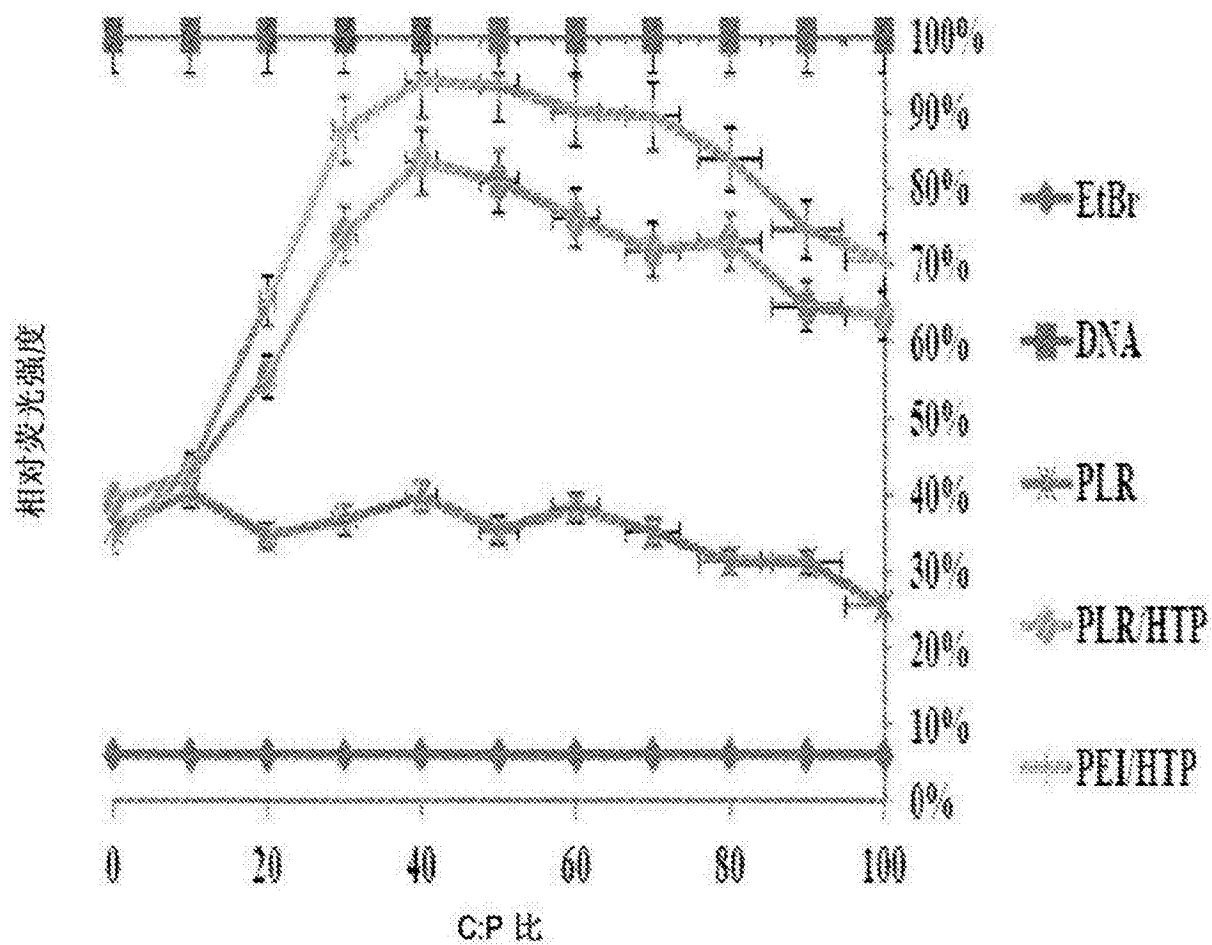


图5

渐进式分层的流体力学尺寸

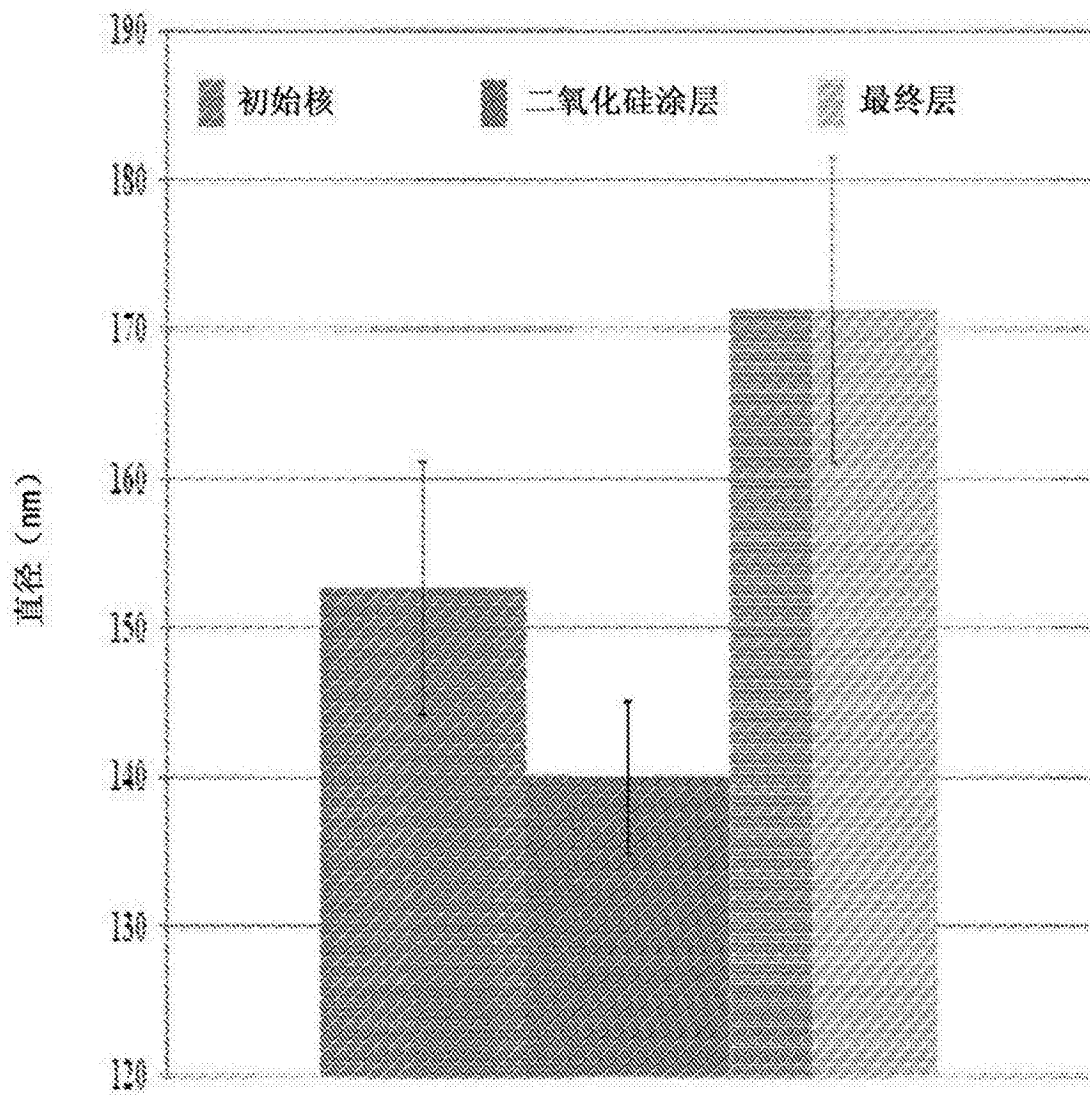


图6

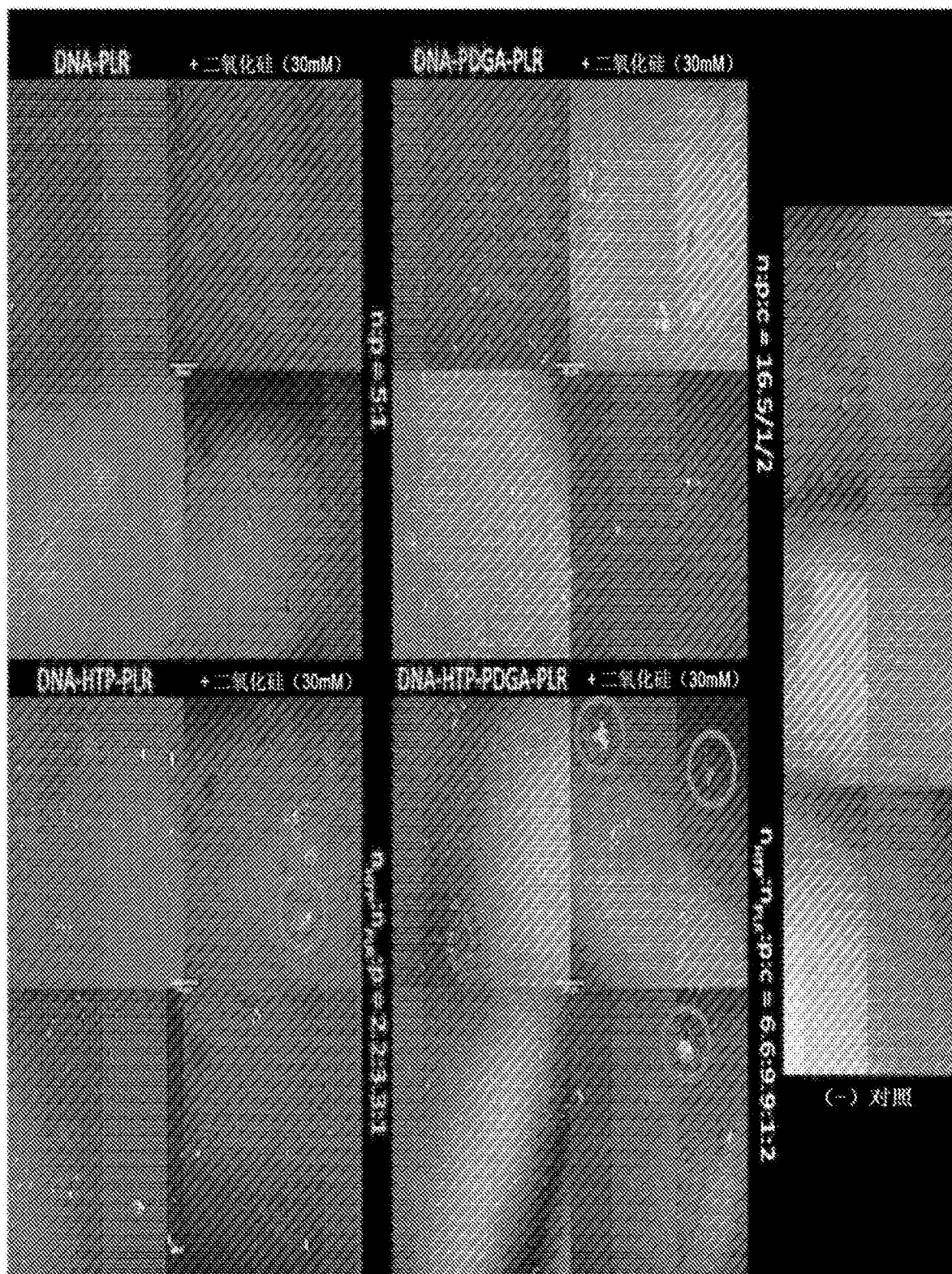


图7

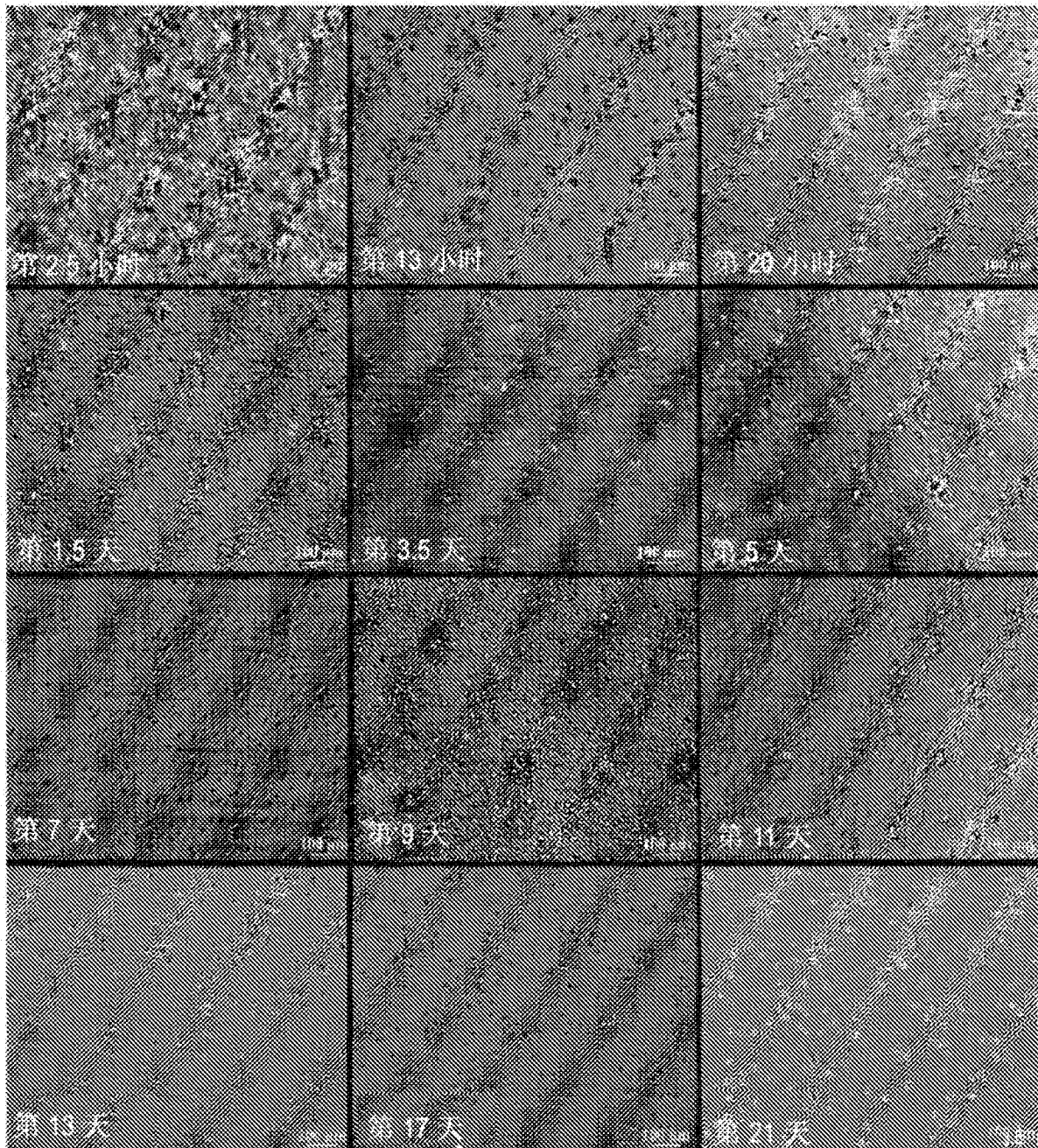


图8

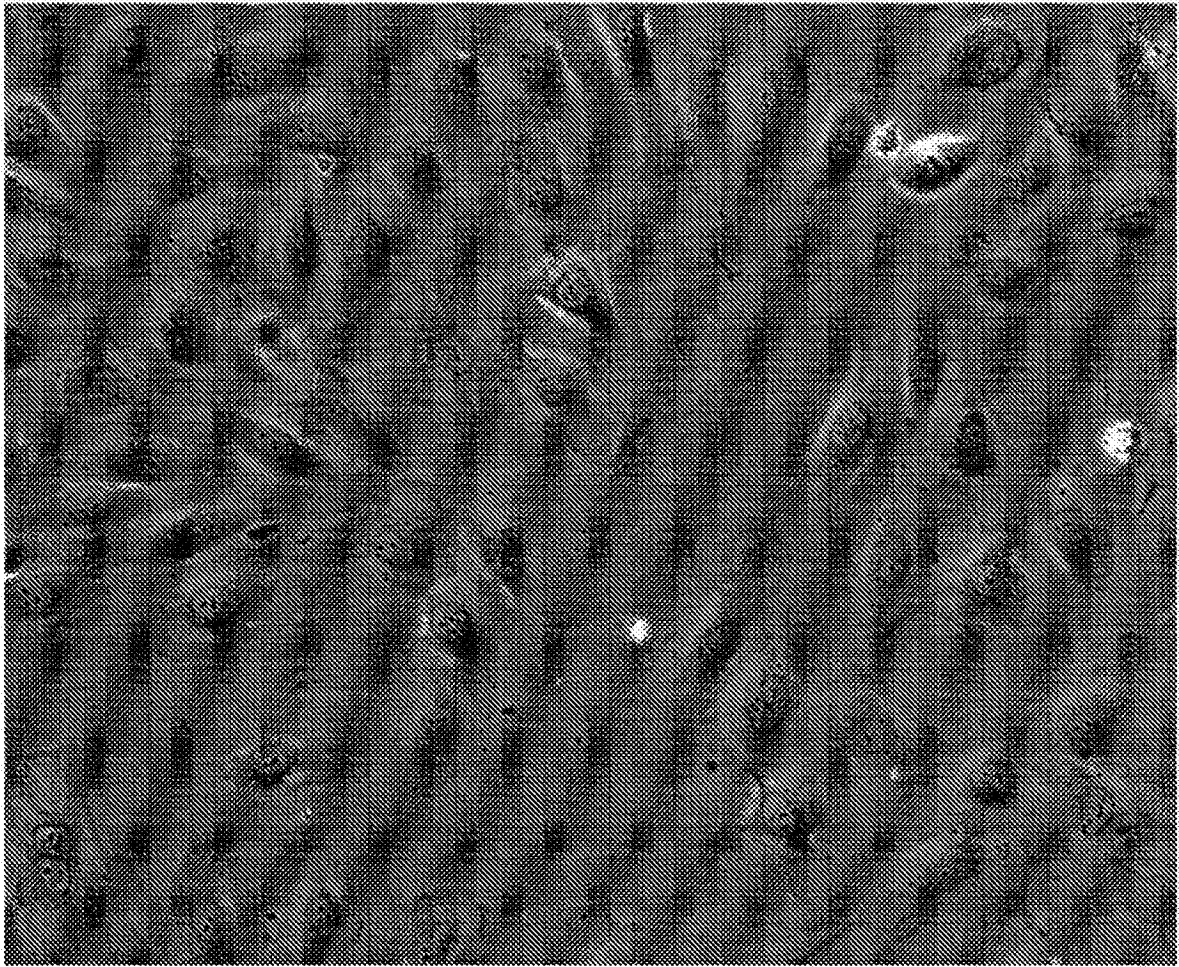


图9A

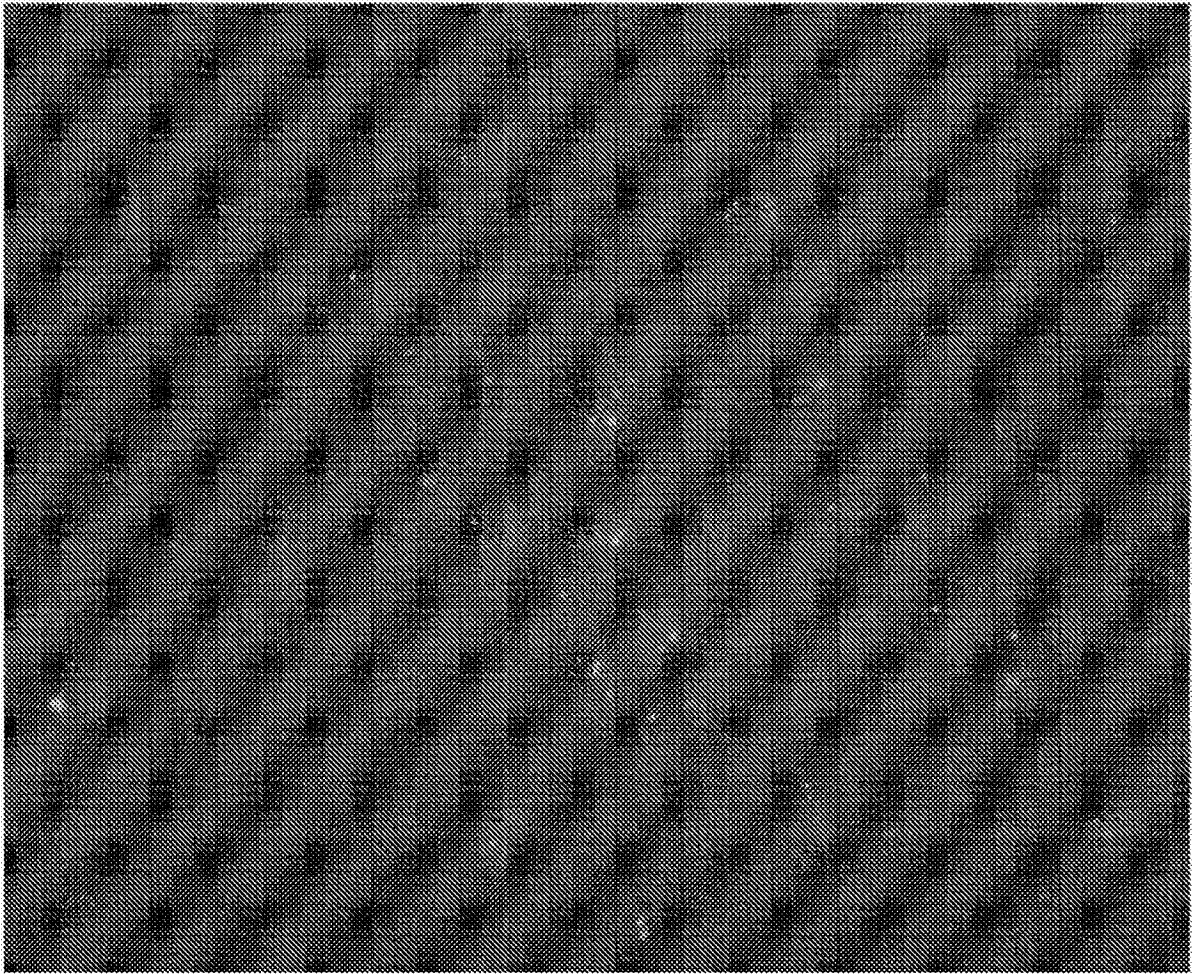


图9B

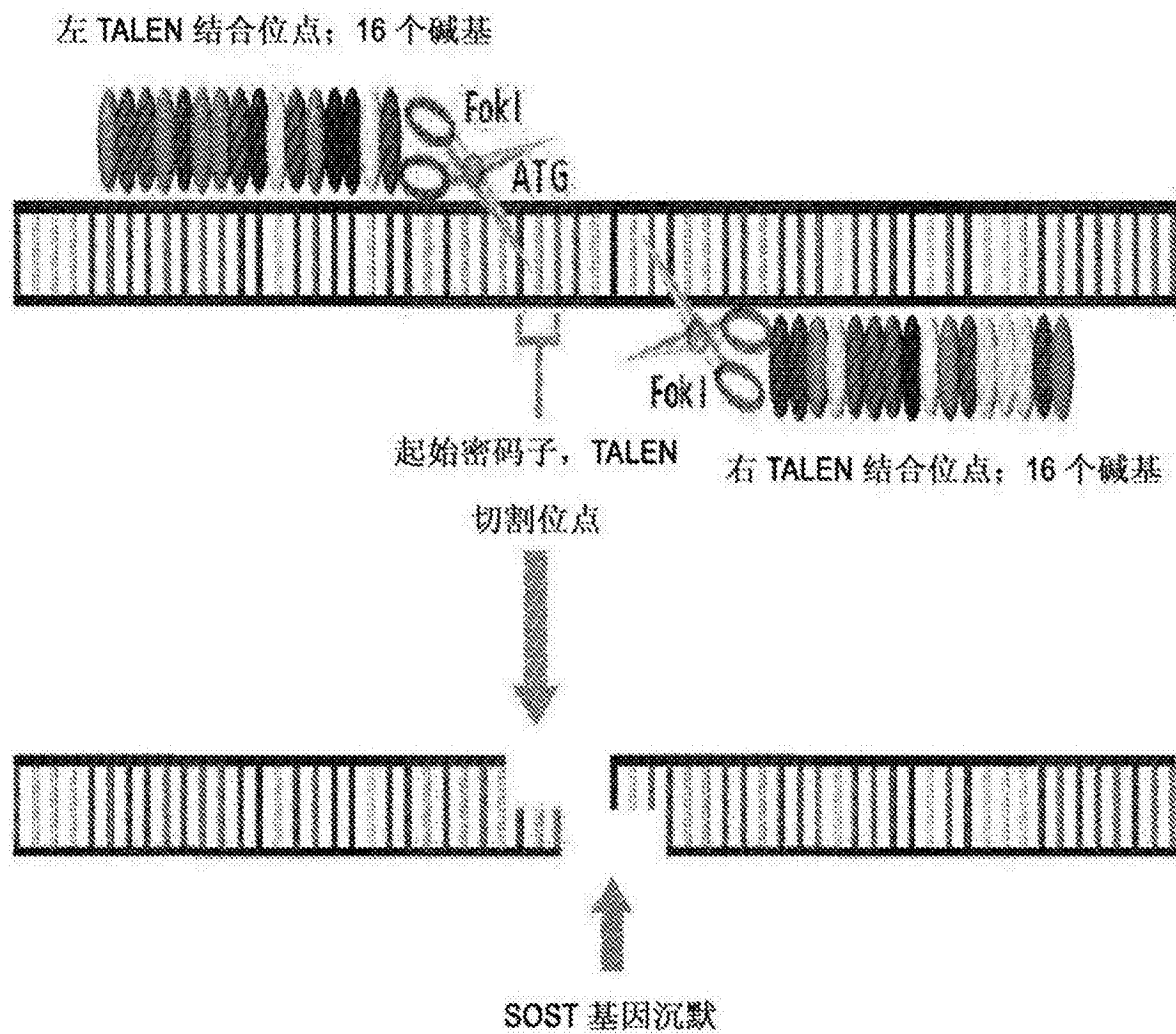


图10

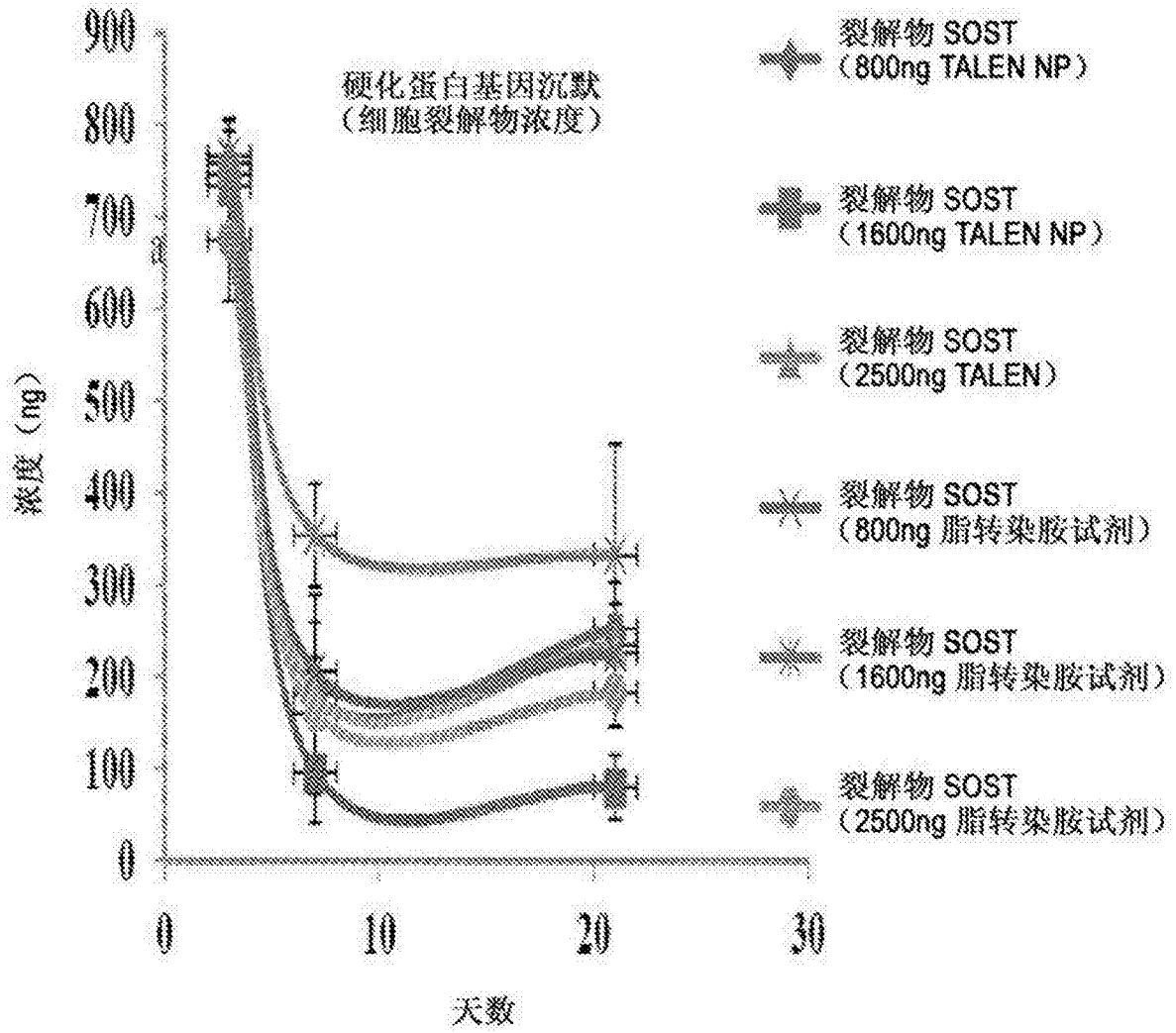


图11A

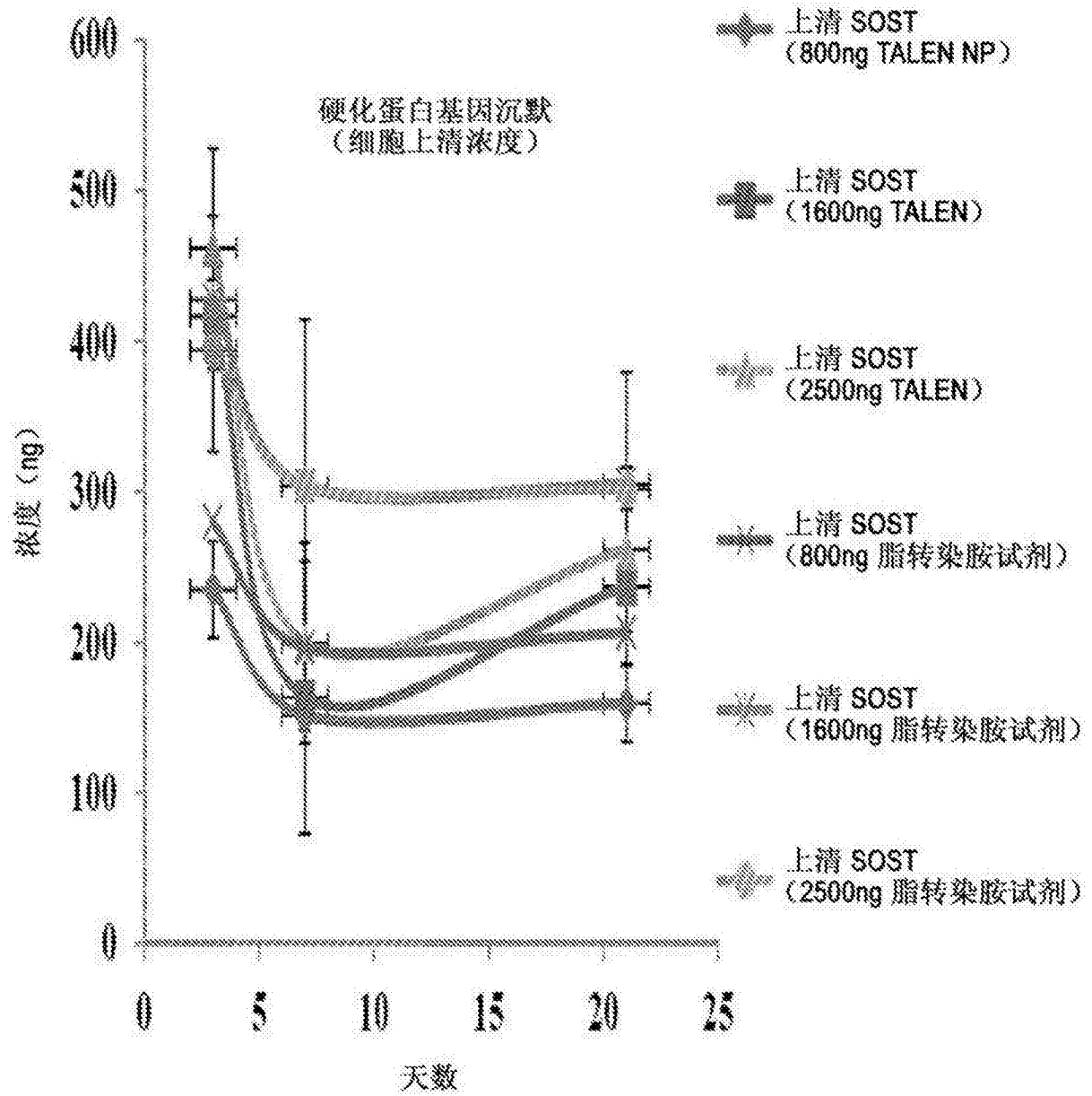


图11B

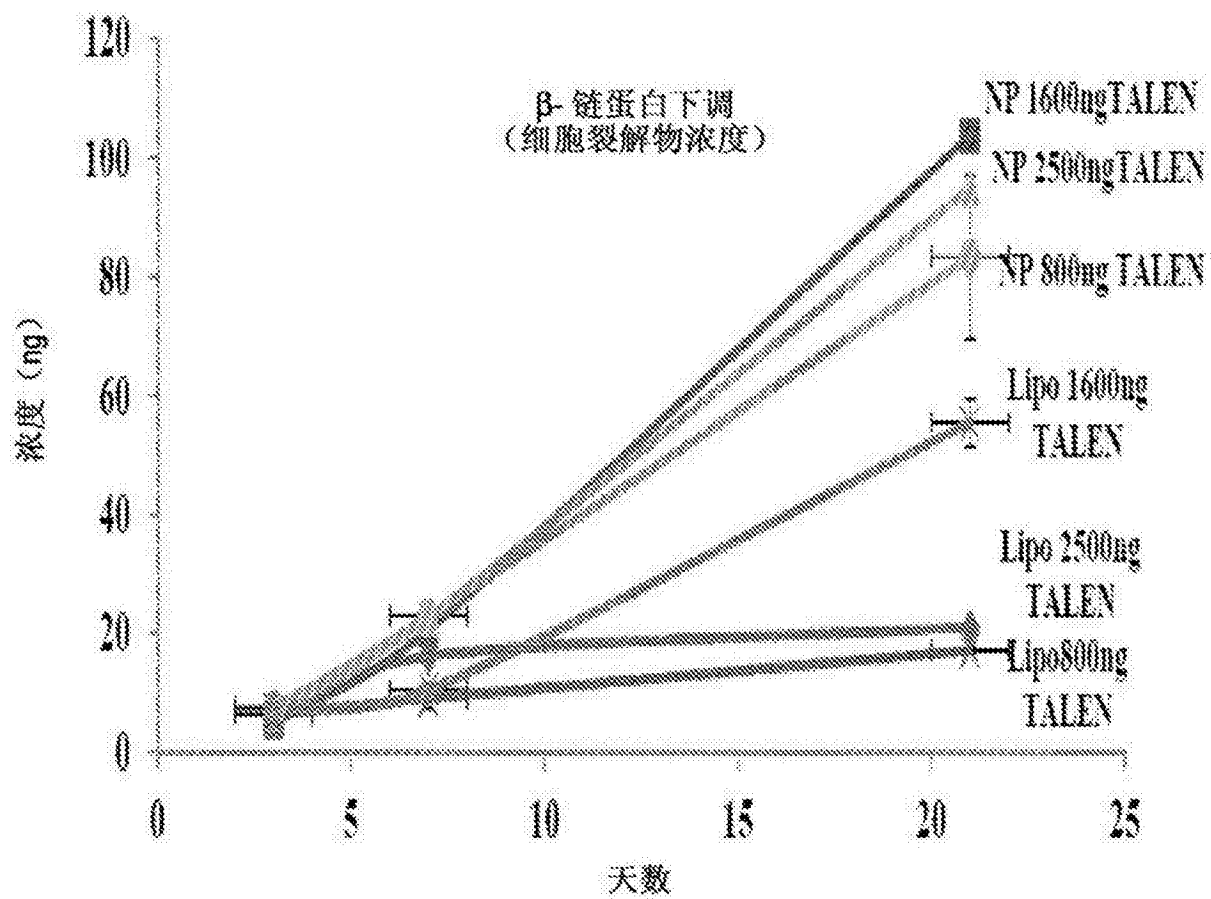


图11C

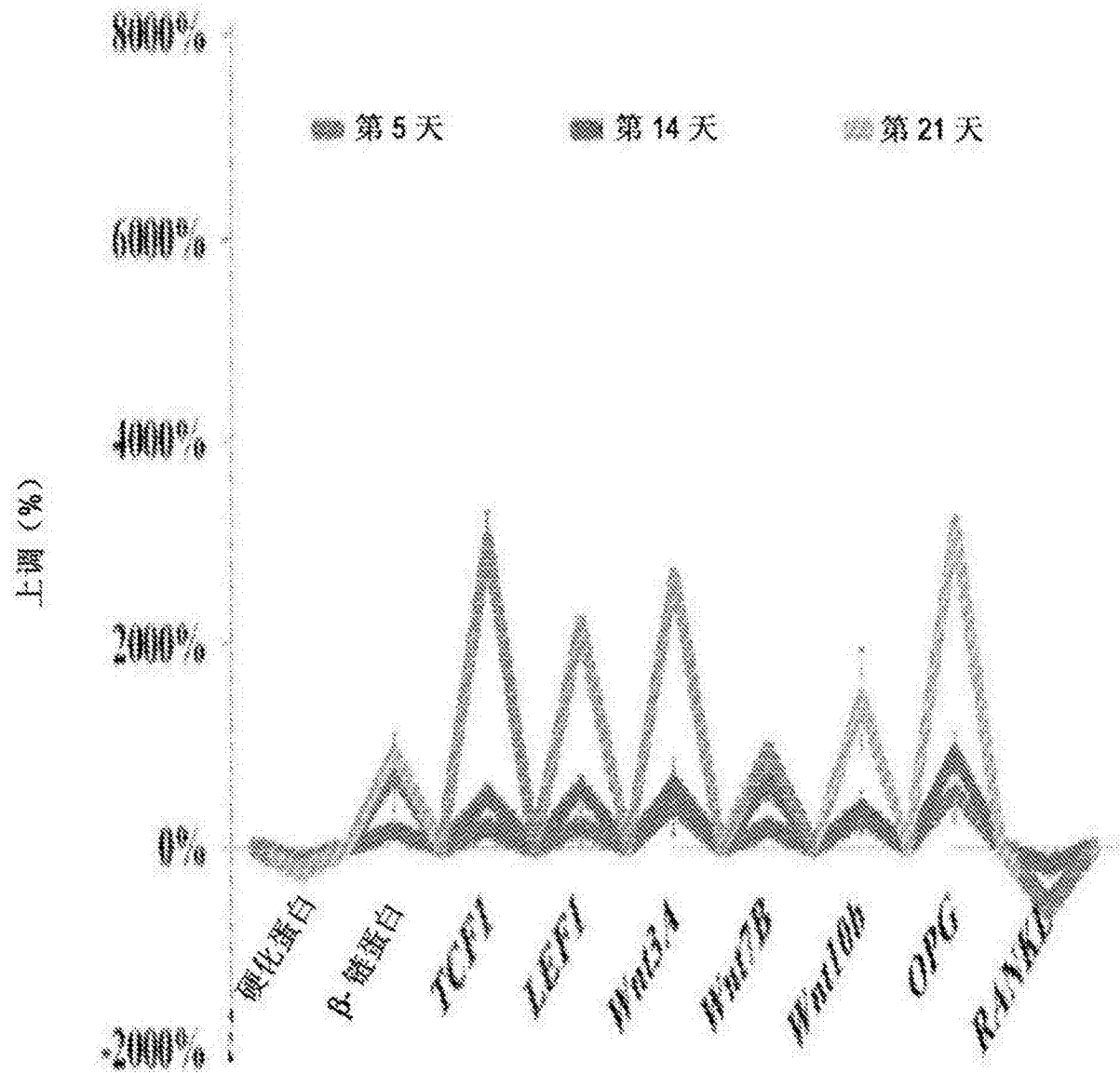
纳米颗粒介导的硬化蛋白沉默的下游效果
(qPCR) -800ng

图12A

脂转染胺试剂 (Lipofectamine) 介导的硬化蛋白沉默的下游效果
(qPCR) -800ng

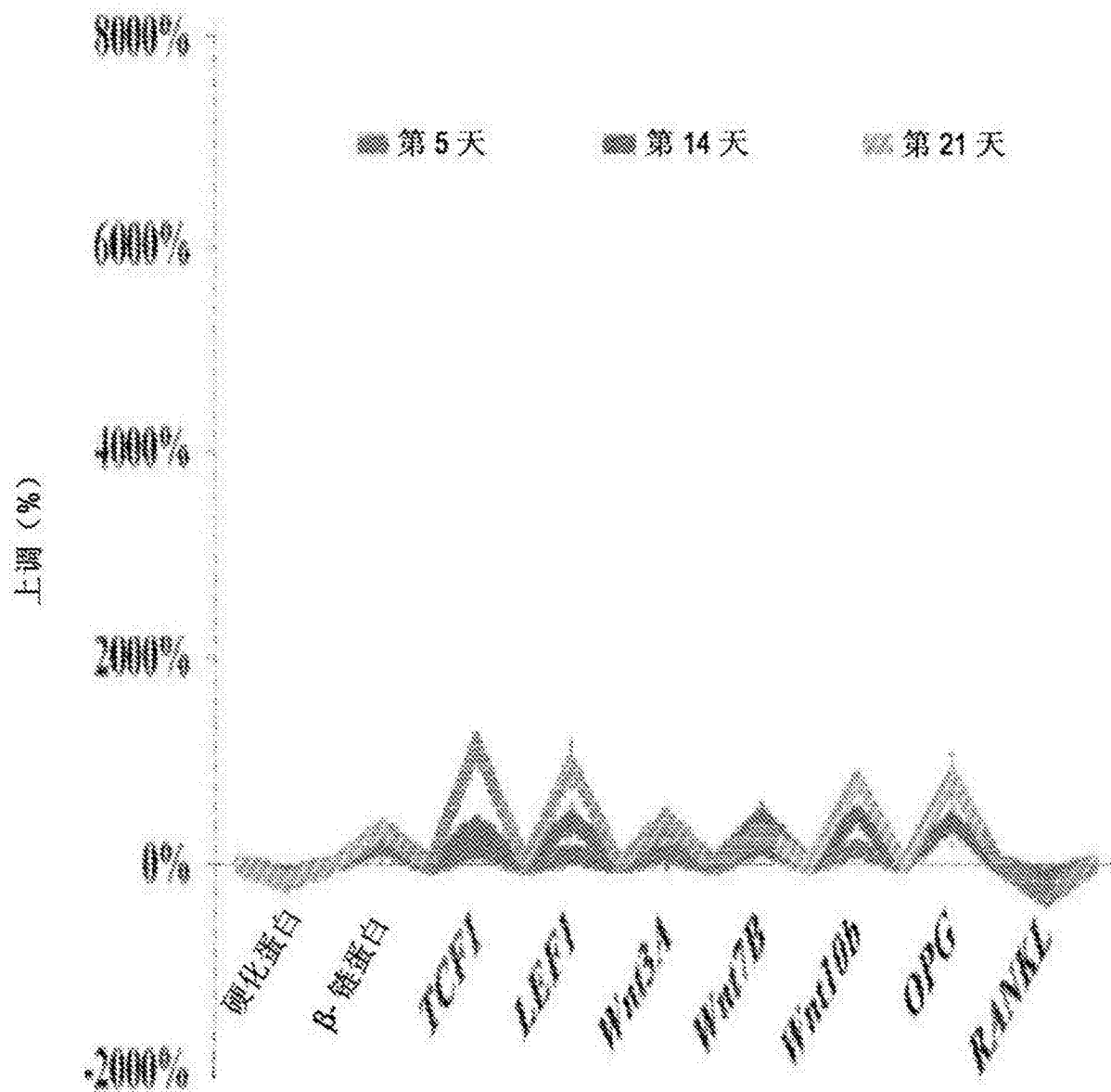


图12B

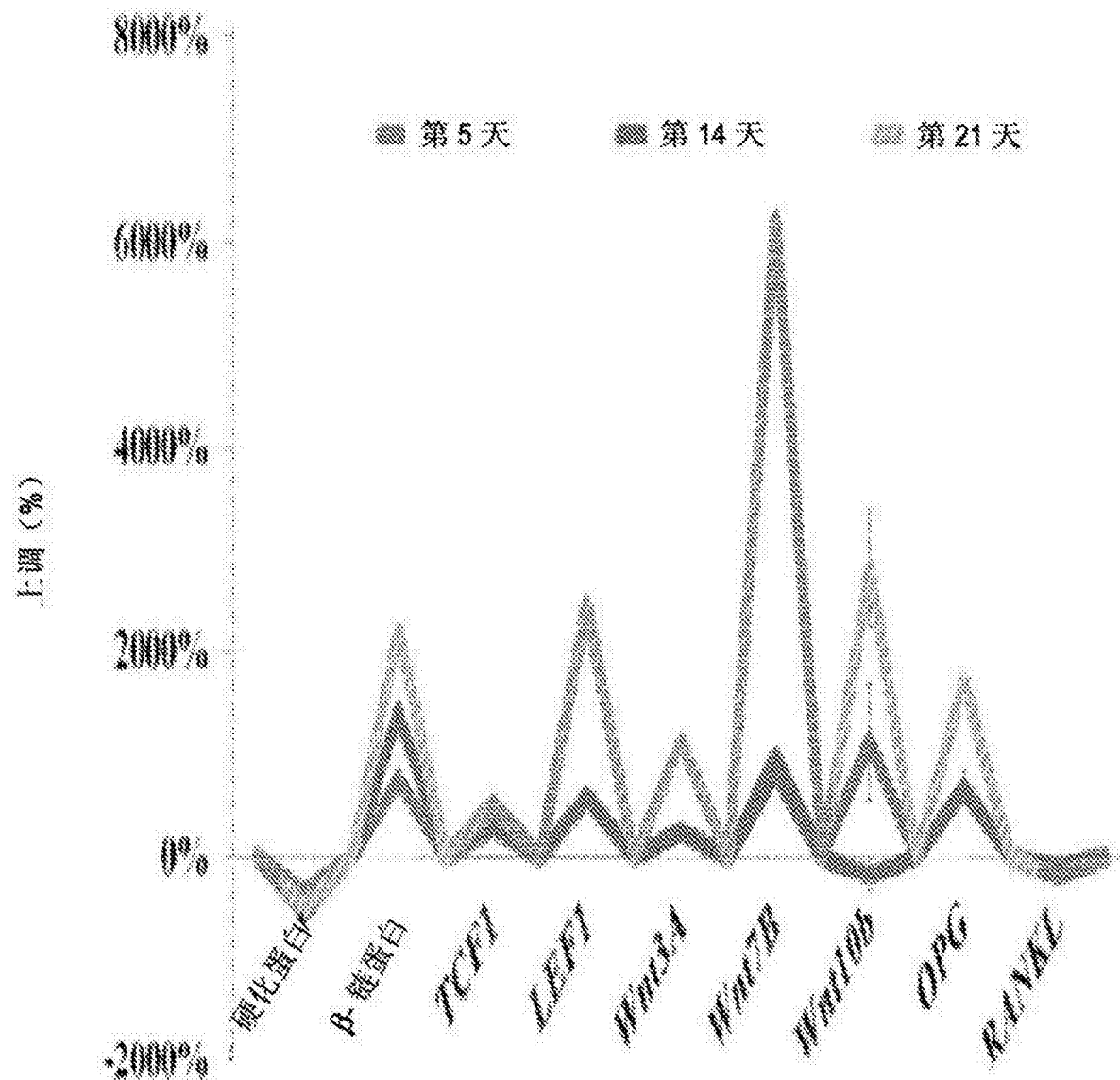
纳米颗粒介导的硬化蛋白沉默的下游效果
(qPCR) -1600ng

图12C

脂转染胺试剂 (Lipofectamine) 介导的硬化蛋白沉默的下游效果
(qPCR) -1600ng

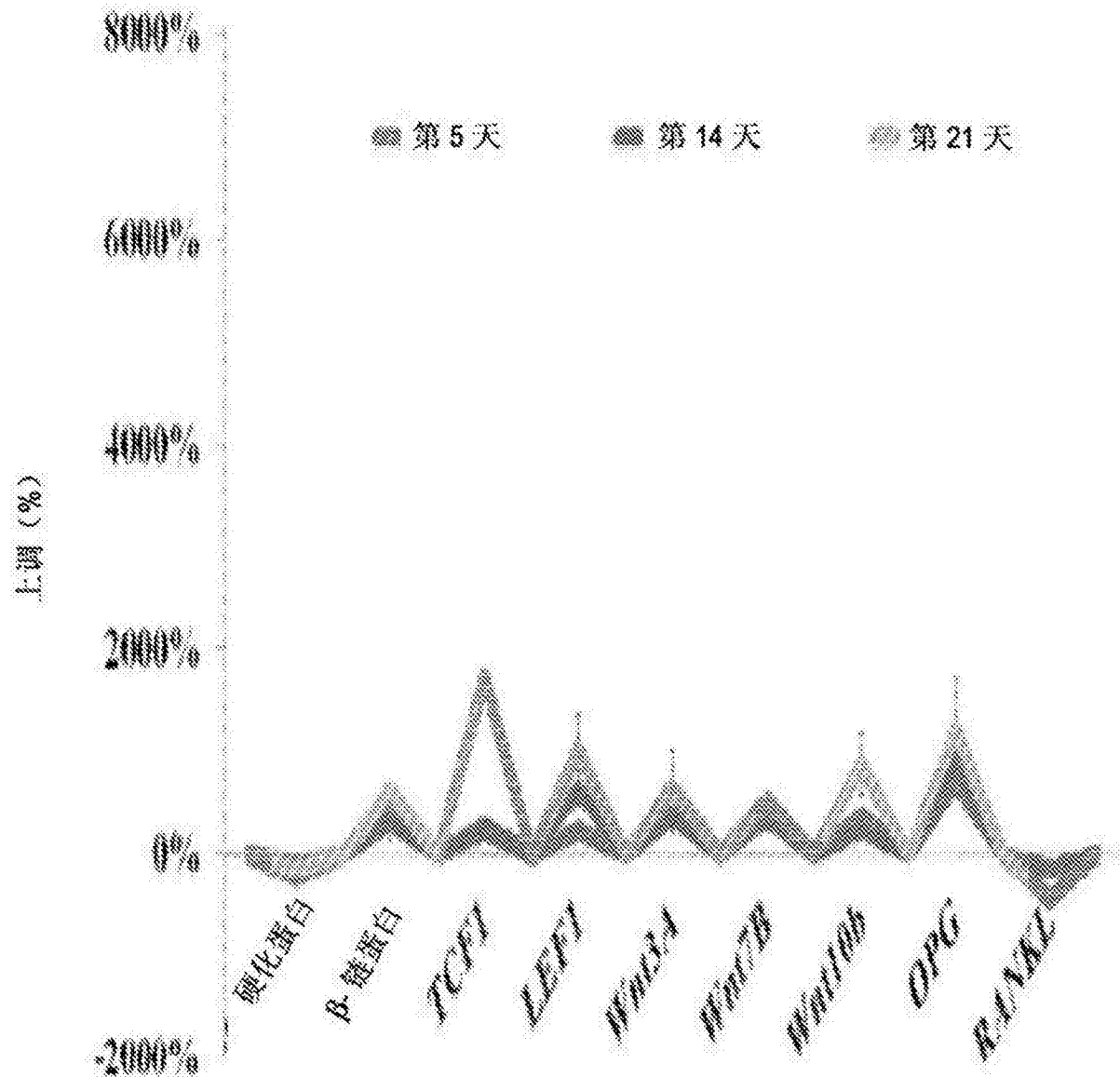


图12D

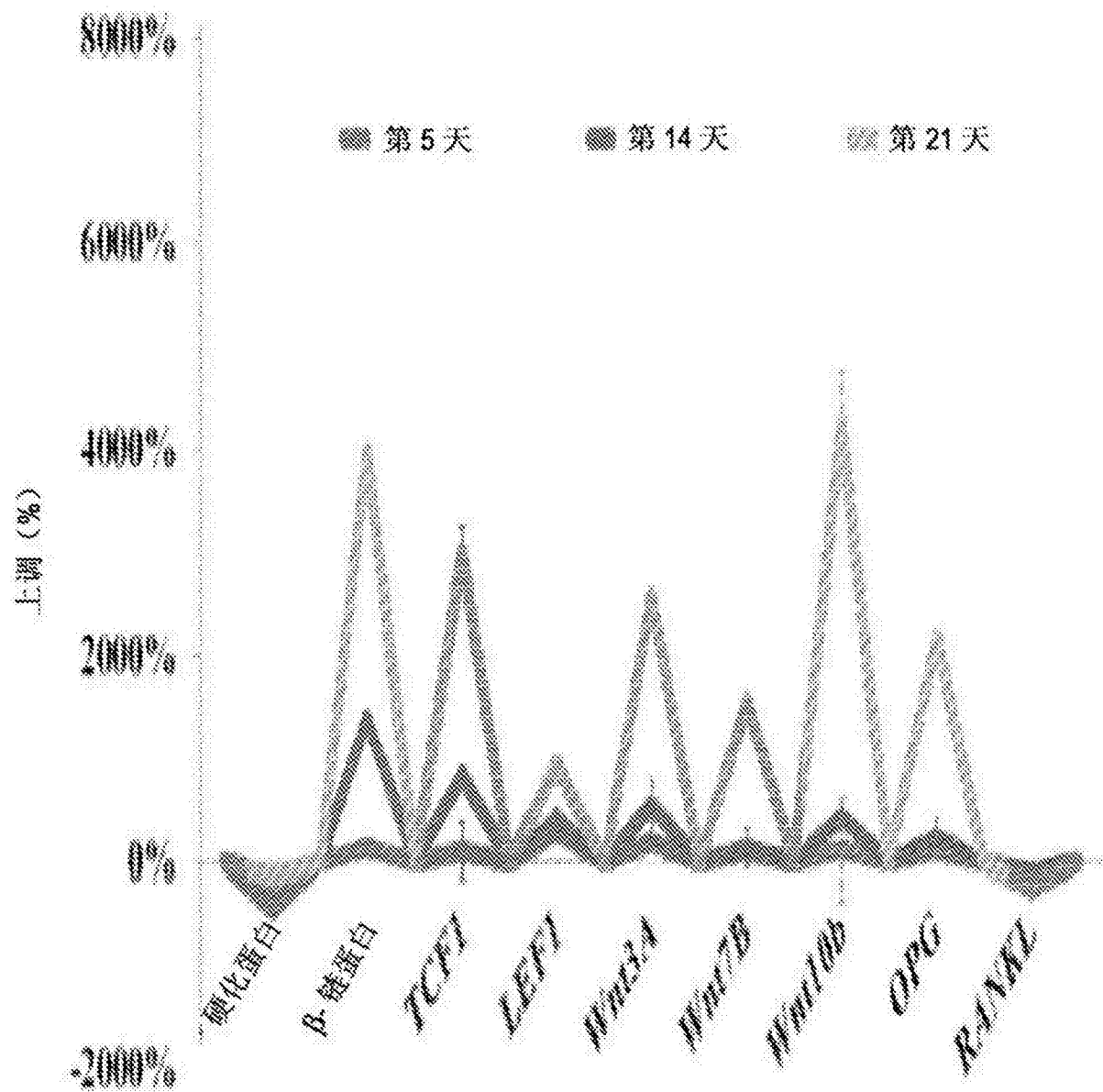
纳米颗粒介导的硬化蛋白沉默的下游效果
(qPCR) -2500ng

图12E

脂转染胺试剂 (Lipofectamine) 介导的硬化蛋白沉默的下游效果
(qPCR) -2500ng

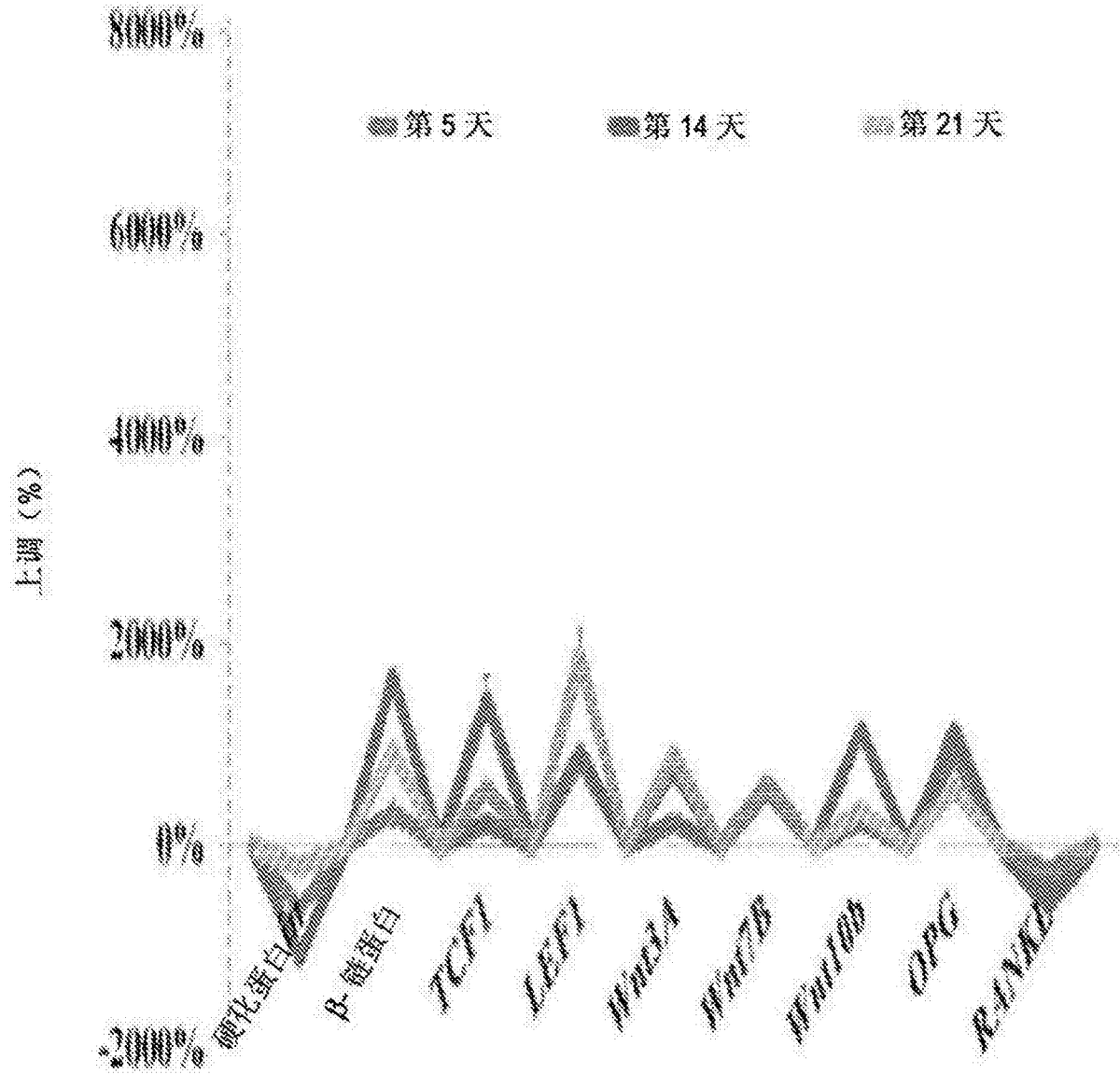


图12F

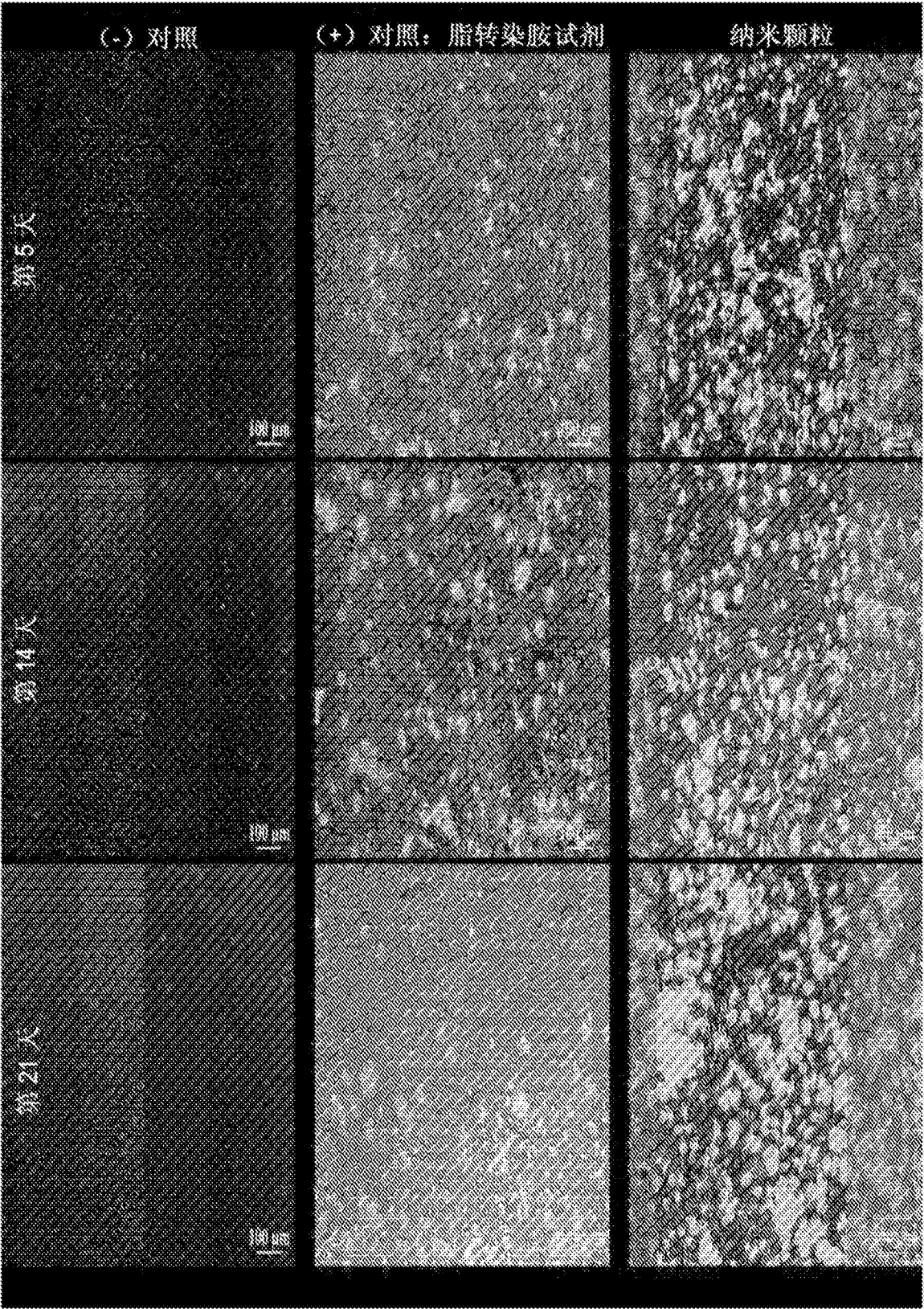


图13

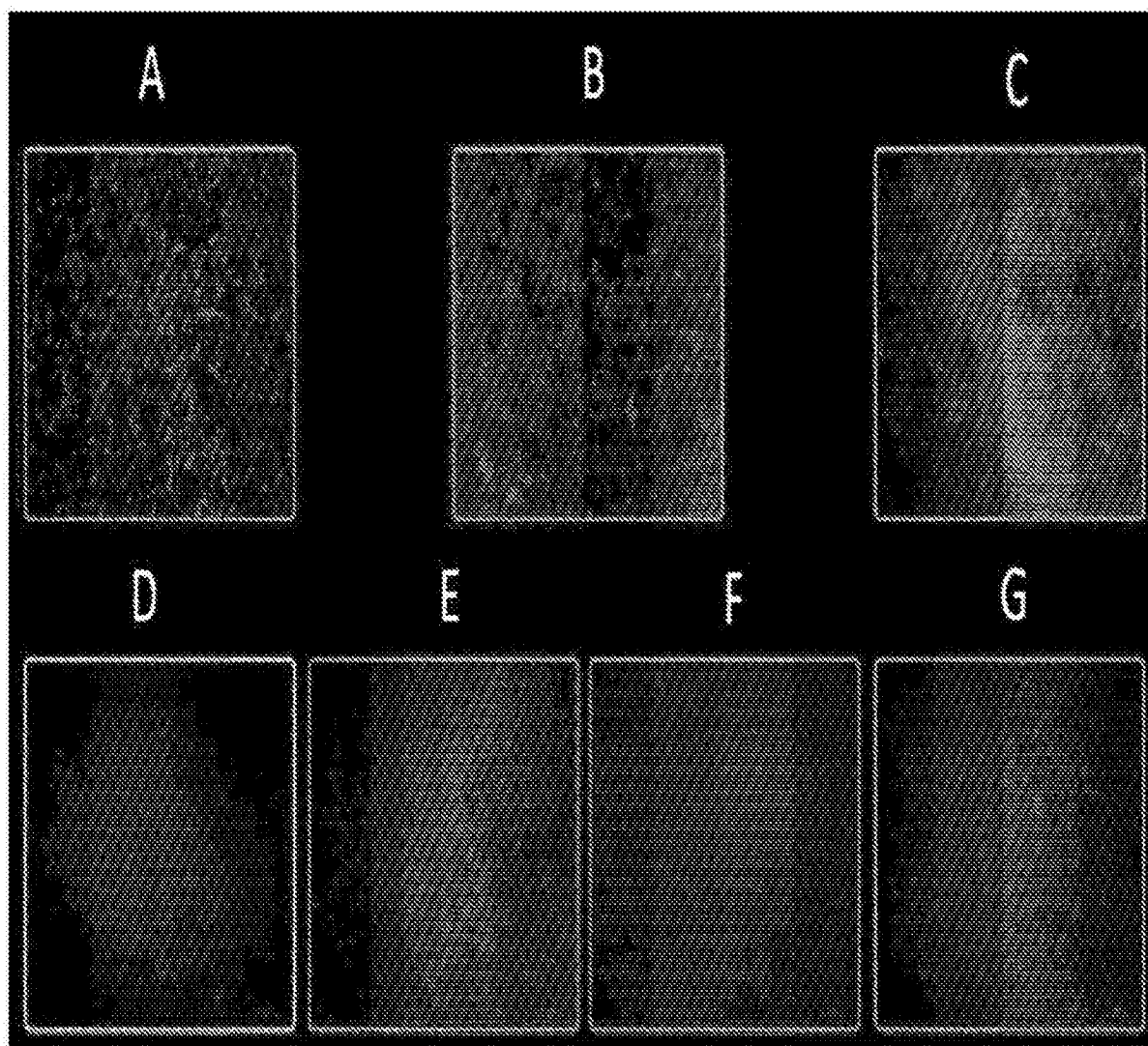


图14A

骨髓基质细胞矿化作用（钙定量）

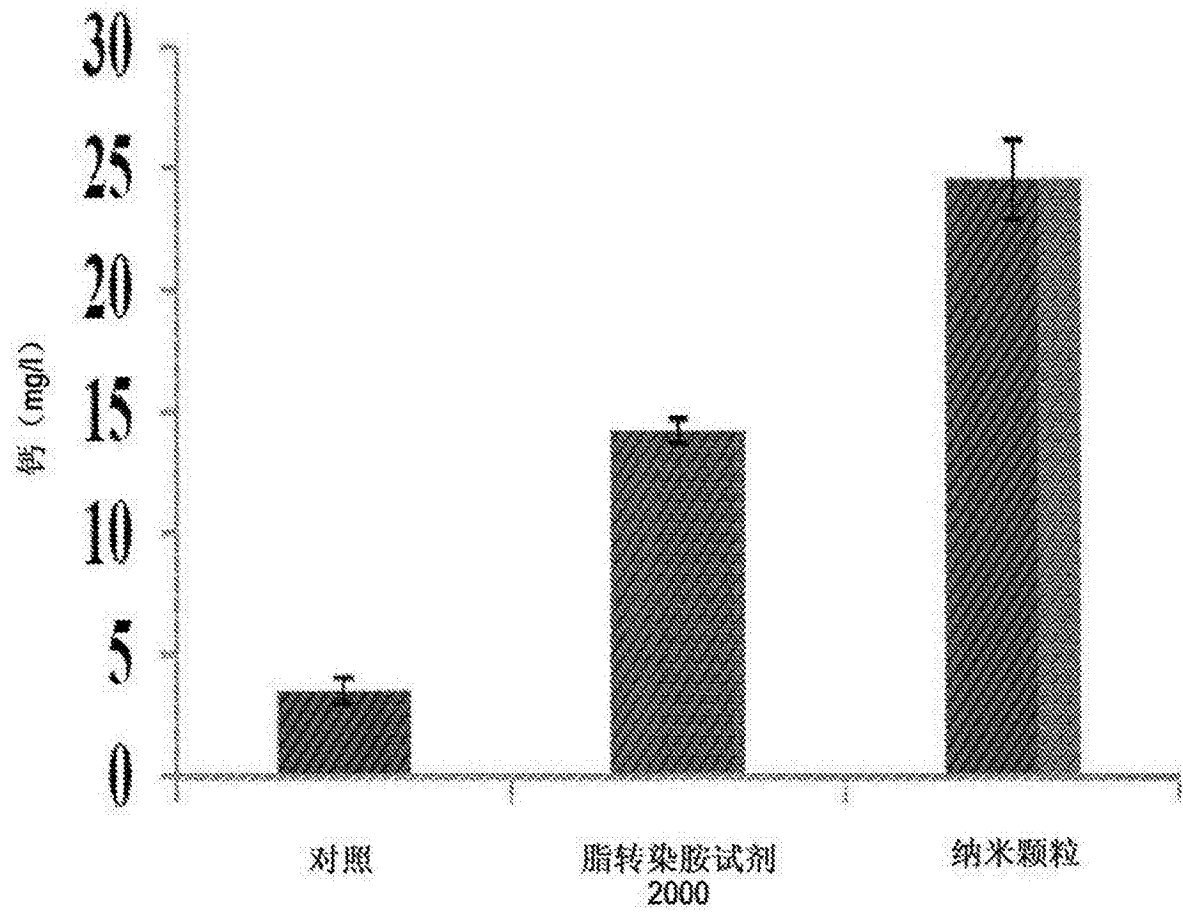


图14B

成骨细胞矿化作用定量（钙浓度）

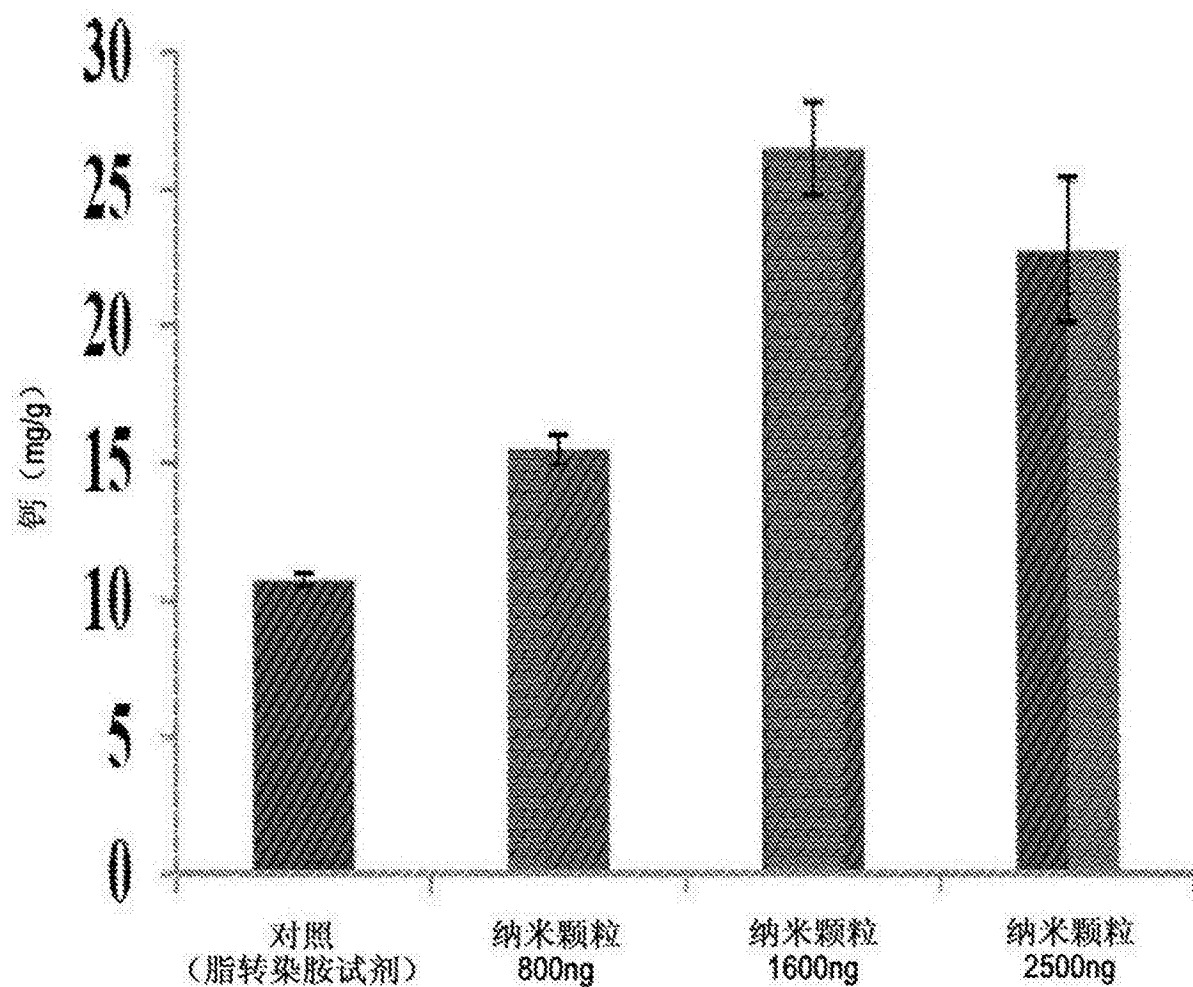


图14C