

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 11 月 12 日 (12.11.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/224475 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 47/64 (2017.01) *A61K 45/00* (2006.01)

A61K 47/60 (2017.01) *C07K 7/08* (2006.01)

A61K 47/54 (2017.01) *A61P 11/02* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/087279

(22) 国际申请日: 2020 年 4 月 27 日 (27.04.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201910367665.9 2019年5月5日 (05.05.2019) CN

(71) 申请人: 复旦大学 (FUDAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。 JSR 株式会社 (JSR CORPORATION) [JP/JP]; 日本东京港区东新桥一丁目9番2号, Tokyo 105-8640 (JP)。

(72) 发明人: 魏刚 (WEI, Gang); 中国上海市浦东新区张衡路 826 号, Shanghai 201203 (CN)。 胡杨 (HU, Yang); 中国上海市浦东新区张衡路 826 号, Shanghai 201203 (CN)。 江宽 (JIANG, Kuan); 中国上海市浦东新区张衡路 826 号, Shanghai 201203 (CN)。 王勇 (WANG, Yong); 日本东京港区东新桥一丁目9番2号, Tokyo 105-8640 (JP)。 越俣良树 (KOSHIKARI, Yoshiki); 日本东京港区东新桥一丁目9番2号, Tokyo 105-8640 (JP)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所 (ZHONGZI LAW OFFICE); 中国北京市西城区平安里西大街 26 号新时代大厦 7 层, Beijing 100034 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,

(54) Title: DRUG DELIVERY VECTOR AND PHARMACEUTICAL FORMULATION USING SAME

(54) 发明名称: 药物递送载体以及使用其的药物制剂

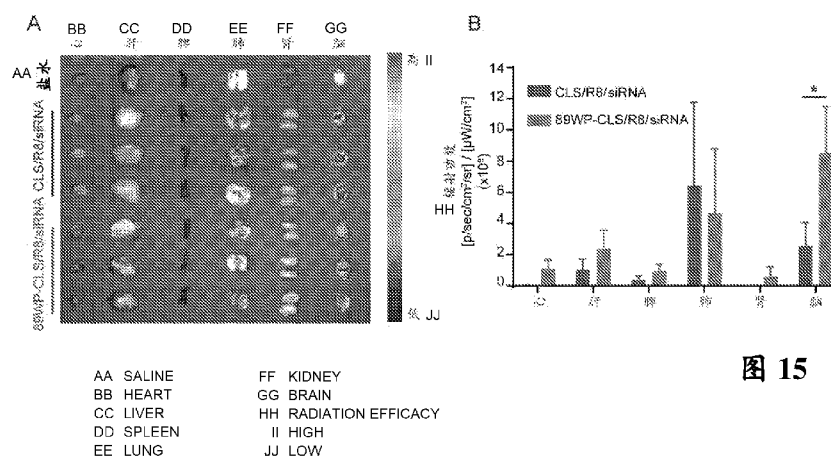


图 15

(57) Abstract: A drug delivery vector, containing cell-penetrating peptide-modified liposomes and a polymer, the polymer being a positively charged polyamino acid. A pharmaceutical formulation in the form of a liposome complex is prepared using the drug delivery vector, the particle size being between 50 nm and 300 nm, being prepared by mixing a physical complex formed of the positively charged polyamino acid and one or more drug molecules with a liposome surface-modified with a cell-penetrating peptide, the pharmaceutical formulation being capable of effectively transfecting cells, particularly promoting the absorption of the drug into the brain via the nasal cavity, and thereby increasing the efficacy of the drug.

(57) 摘要: 一种药物递送载体, 其包含穿膜肽修饰的脂质体和聚合物, 其中所述聚合物是带正电的多聚氨基酸。通过使用所述药物递送载体制备了脂质体复合物形式的药物制剂, 粒径介于 50nm 至 300nm, 其是将带正电的多聚氨基酸和一种或多种药物分子形成的物理复合物与表面修饰有穿膜肽的脂质体混合而制备的, 所述药物制剂能够有效地转染细胞, 尤其是促进药物经鼻腔吸收入脑, 提高药物的疗效。

JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

药物递送载体以及使用其的药物制剂

技术领域

本发明涉及药物递送载体、使用所述药物递送载体来制备药物制剂的方法、以及由此制备的药物制剂。具体地，本发明的药物递送载体包含穿膜肽修饰的脂质体和聚合物，其中所述聚合物是带正电的多聚氨基酸。使用本发明的药物递送载体制备的药物制剂为脂质体复合物，其是将带正电的多聚氨基酸和一种或多种药物分子形成的物理复合物与穿膜肽修饰的脂质体混合而制备的，所述药物制剂能够有效地转染细胞，尤其是促进药物经鼻腔吸入脑，提高药物的疗效。

背景技术

穿膜肽(cell-penetrating peptide, CPP)是一种生理条件下带正电荷的短肽，能够共价或非共价连接基因、多肽和蛋白质等药物分子，并将药物分子递送至细胞内或携带药物分子穿透生物膜屏障。但是，单个穿膜肽携带药物分子的能力非常有限，这导致穿膜肽与药物分子所形成的复合物粒径较大且稳定性差。

此外，现有技术中递送药物分子(如，基因、多肽和蛋白质等药物分子)的载体如脂质体存在递送效率低而且易产生组织毒性等问题。在脂质体的研究领域，如何利用脂质体更高效地递送药物分子，使得疾病的治疗和/或预防更具有特异性、高效性仍然是一个巨大的挑战。研究人员主要通过对脂质体添加各种辅助性成分、研制并使用新型脂质材料、对脂质体表面进行结构修饰、设计并使用新的制备工艺等措施来提高脂质体的稳定性、靶向性和药物递送效率。

因此，本领域仍需要新的利用穿膜肽的药物递送载体，当药物分子(如基因、多肽、蛋白质等)与所述药物递送载体复合后具有提高的稳定性、且所制备的药物制剂粒径可控制和稳定性好，以及借助制剂表面修饰的穿膜肽

能够实现更有效的药物递送、且有助于药物从细胞的内涵体中逃逸出来而发挥药物的功效。

发明概述

本发明人通过锐意研究，开发了一种新的利用穿膜肽的药物递送载体，其包含穿膜肽修饰的脂质体和聚合物，其中所述聚合物是带正电的多聚氨基酸，所述聚合物用于与一种或多种药物混合形成聚合物-药物的复合物，所述穿膜肽修饰的脂质体用于与聚合物-药物的复合物混合形成包含聚合物-药物的复合物的脂质体复合物。

在一个实施方案中，本发明的药物递送载体中的穿膜肽是具有下述氨基酸序列的 penetratin 或 penetratin 的亲脂性衍生物：



其中， X_1 、 X_2 和 X_3 独立地选自天然来源的氨基酸谷氨酰胺 (glutamine, Q)、天冬酰胺 (asparagine, N)、丙氨酸 (alanine, A)、缬氨酸 (valine, V)、亮氨酸 (leucine, L)、异亮氨酸 (isoleucine, I)、脯氨酸 (proline, P)、苯丙氨酸 (phenylalanine, F)、色氨酸 (tryptophan, W)、甲硫氨酸 (methionine, M) 和非天然来源的氨基酸 α -氨基丁酸 (α -aminobutyric acid)、 α -氨基戊酸 (α -aminopentanoic acid)、 α -氨基己酸 (α -aminohexanoic acid)、 α -氨基庚酸 (α -aminoheptanoic acid)。例如，本发明的药物递送载体中的一些穿膜肽是将 Penetratin 第 2 位谷氨酰胺(Q) 和 / 或第 8 位谷氨酰胺(Q)和 / 或第 9 位天冬酰胺(N)突变为疏水性氨基酸的 Penetratin 衍生物。

在一个实施方案中，本发明的药物递送载体中的所述带正电的多聚氨基酸是例如聚合度为 2-50 的带正电的多聚氨基酸，所述带正电的多聚氨基酸的空间结构包括线性和环形，氨基酸残基的构型包括 L 型和 D 型；例如聚合度为 6-12 的精氨酸和 / 或赖氨酸。在所述带正电的多聚氨基酸中，任选地在带正电的氨基酸残基之间，间插有 1-20 个（例如 1—6 个）生理条件下不带电荷的氨基酸残基，优选地，所述带正电的多聚氨基酸是聚合度为 6-12 的多聚

精氨酸，其中所述多聚精氨酸的空间结构包括线性和环形，多聚精氨酸的构型包括 L 型和 D 型。

在一个实施方案中，本发明的药物递送载体中的穿膜肽修饰的脂质体包含如下膜材料：

(i) 阳离子脂质，包括但不限于：1,2-二-O-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)；二甲基双十八烷基铵(DDAB)；1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)；1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)；1,2-二酰氧基-3-二甲基铵丙烷；1,2-二烷氧基-3-二甲基铵丙烷；双十八烷基二甲基氯化铵(DODAC)、1,2-二肉豆蔻酰氧基丙基-1,3-二甲基羟乙基铵(DMRIE)和 2,3-二油酰氧基-N-[2(精胺甲酰胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙烷三氟乙酸铵(DOSPA)及其组合。优选为 DOTMA、DOTAP、DODAC 和 DOSPA。最优选为 DOTAP；

(ii) 非阳离子脂质，包括但不限于：1,2-二-(9Z-十八酰基)-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DPPE)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DMPE)、2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸-(1'-rac-甘油)(DOPG)及其组合。优选为 DOPE 和/或 DOPC。最优选为 DOPE；

(iii) 胆固醇；和

(iv) 聚乙二醇化(PEG 化)的磷脂和与 CPP 共轭的聚乙二醇磷脂，所述磷脂例如是磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇和鞘磷脂，优选地，所述 PEG 化磷脂是例如聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(PEG-DSPE)和其衍生物甲氧基-聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(mPEG-DSPE))，所述与 CPP 共轭的聚乙二醇磷脂是例如 Penetratin/Penetratin 衍生物-PEG-DSPE。

在一些实施方案中，膜材料(i) : (ii) : (iii) : (iv)的摩尔比为约 20—40: 20—40: 20—40: 1—20，且与 CPP 共轭的聚乙二醇磷脂占膜材料(iv)中的约 20%—80%摩尔比。在一些具体的实施方案中，膜材料(i) : (ii) : (iii) : (iv)的摩尔比为约 27.0—31.6: 27.0—31.6: 31.6—39.6: 1—10，且与 CPP 共轭的聚乙二醇

磷脂占膜材料(iv)中的约 20%—80%摩尔比。

在一些具体的实施方案中,本发明的药物递送载体中的阳离子脂质体包含如下膜材料:(i) DOTAP; (ii) DOPE; (iii) 胆固醇; (iv) mPEG₂₀₀₀-DSPE 和 ⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE, 且膜材料(i):(ii):(iii):(iv)的摩尔比为约 20—40: 20—40: 20—40: 1—20, 且 ⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE 占膜材料(iv)中的约 20%—80%摩尔比。在一些实施方案中,膜材料(i):(ii):(iii):(iv)的摩尔比为约 27.0—31.6: 27.0—31.6: 31.6—39.6: 1—10, 且 ⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE 占膜材料(iv)中的约 20%—80%摩尔比。在一些实施方案中,本发明的药物递送载体中的阳离子脂质体由如下膜材料组成:(i) DOTAP; (ii) DOPE; (iii) 胆固醇; (iv) mPEG₂₀₀₀-DSPE 和 ⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE, 且膜材料(i):(ii):(iii):(iv)的摩尔比为约 28.5: 28.5: 38: 5, ⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE 占膜材料(iv)中的约 20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%摩尔比。

在另一个方面,本发明提供了一种药物制剂,其是使用本发明的药物递送载体制备的药物制剂,其中将药物递送载体中包含的带正电的多聚氨基酸和欲递送的一种或多种药物分子形成物理复合物,并将所述物理复合物与所述的表面修饰有穿膜肽的阳离子脂质体混合形成脂质体复合物形式的药物制剂。

对欲递送的一种或多种药物分子没有特别的限定,包括但不限于:肽类药物(例如奥曲肽(octreotide))、抗体(例如,依那西普(etanercept)、阿达木单抗(adalimumab)、利妥昔单抗(rituximab)、派姆单抗(pembrolizumab)、兰尼单抗(ranibizumab)和纳武单抗(nivolumab))、细胞因子、激素、抗生素(例如,化疗药阿霉素(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、表阿霉素(epirubicin)、放线菌素(actinomycin)和万古霉素(vancomycin))、核酸、以及它们的组合等。在一个实施方案中,所述药物制剂递送的药物分子是质粒 DNA、RNA 如小干扰 RNA (siRNA)、有义 RNA、反义寡核苷酸(ASO)、适配体(aptamers)、核酶等的核酸。在一个实施方案中,所述药物制剂递

送的药物分子是核酸和能够嵌入到生物体基因组中的药物（如阿霉素）的组合。

在一个实施方案中，所述药物制剂中药物分子（例如，化疗药）与阳离子脂质（例如，DOTAP）的摩尔比为约 0.1-10，优选约 0.1-5，进一步优选约 0.1-2。在一个实施方案中，所述药物制剂对药物分子（例如，化疗药）的载药量为：药物分子（例如，化疗药）占药物制剂的约 1%-30% (w/w)，优选约 1%-25% (w/w)，进一步优选约 3%-20% (w/w)。

在一个实施方案中，所述药物制剂中带正电的多聚氨基酸（例如，寡聚精氨酸）和欲递送的药物分子的电荷比介于 1:1 至 30:1，优选 5:1；且阳离子脂质体与药物分子的电荷比介于 1:1 至 30:1，优选 4:1。

在一个实施方案中，本发明的药物制剂的粒径介于 50 nm 至 300 nm，优选 80 nm 至 150 nm，且稳定性好。

在又一个方面，提供了本发明的药物制剂的制备方法，包括(a) 制备表面修饰有穿膜肽的脂质体；(b) 制备带正电的多聚氨基酸和欲递送的药物分子的物理复合物；(c) 按一定的摩尔比或电荷比混合步骤(a)获得的表面修饰有穿膜肽的脂质体和步骤(b)获得的物理复合物。

在一个实施方案中，本发明的药物制剂的制备方法包括(a) 混合脂质体的膜材料(i)、(ii)和(iii)，制备空白脂质体；(b) 制备带正电的多聚氨基酸和欲递送的药物分子的物理复合物；(c) 按一定的摩尔比或电荷比混合步骤(a)获得的空白脂质体和步骤(b)获得的物理复合物；(d) 将步骤(c)获得的脂质体与膜材料(iv)混合并孵育，获得本发明的药物制剂。

使用本发明的药物递送载体制备的药物制剂能够例如通过口腔、鼻腔、眼、呼吸道、消化道、生殖道、局部植入、注射或输注(经由硬膜外、动脉内、关节内、囊内、心内、脑室内、颅内、皮内、肌内、眶内、眼内、腹膜内、脊柱内、胸骨内、鞘内、静脉内、蛛网膜下、被膜下、皮下、气管、直肠、舌下等途径)施用，用于治疗和 / 或预防疾病。

除非另外限定，否则本文中所用的全部技术与科学术语具有如本发明所

属领域的普通技术人员通常理解相同含义。本文所提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用的方式完整地并入本文作为参考。此外，本文中所述的材料、方法和例子仅是说明性的并且不意在是限制性的。本发明的其他特征、目的和优点将从本说明书及附图并且从后附的权利要求书中显而易见。

附图简述：

图 1：显示了 R8（8 聚精氨酸）与 siRNA 不同电荷比（表示为正电荷/负电荷的比例）和 / 或 CLS 与 siRNA 不同电荷比的各复合物的琼脂糖凝胶电泳结果和粒径结果。图 1 中的小图 A 和 B 分别显示了 R8 / siRNA 不同电荷比的 R8 / siRNA 复合物的琼脂糖凝胶电泳结果和粒径结果；小图 C 和 D 分别显示了 CLS / siRNA 不同电荷比的 CLS / siRNA 复合物的琼脂糖凝胶电泳结果和粒径结果；小图 E 和 F 分别显示了 R8 / siRNA 电荷比为 1:1 时，CLS / siRNA 不同电荷比的 CLS/R8/siRNA 脂质体复合物的琼脂糖凝胶电泳结果和粒径结果。

图 2：显示了 R8 与 siRNA 电荷比为 1:1 的情况下，细胞对 CLS 与 siRNA 不同电荷比制备的 CLS/R8/siRNA 脂质体复合物的摄取。

图 3：显示了 CLS/siRNA/R8 复合物的电泳、粒径和稳定性研究结果。图 3 中的小图 A 和 B 分别显示了在 CLS 与 siRNA 电荷比为 4:1 的情况下，R8 与 siRNA 不同电荷比的脂质体复合物的琼脂糖凝胶电泳结果和粒径结果；小图 C 和 D 分别显示了在 CLS 与 siRNA 电荷比为 4:1 的情况下，R8 与 siRNA 不同电荷比的脂质体复合物高速离心后的沉淀情况和离心后上清液的琼脂糖凝胶电泳结果。

图 4：显示了表面修饰有不同比例穿膜肽的药物制剂的细胞摄取定量评价结果，其中，Lipo2000 组为市售基因转染试剂阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 与 siRNA 的非共价复合物。

图 5：显示了细胞对使用实施例 8 表 2 中所示的不同配方脂质体膜材料

制备的药物制剂的摄取情况。

图 6: 显示了组分(iv)占脂质体膜材料的 1%、5%、8%、10% 摩尔份数的脂质体药物制剂的粒径。

图 7: 显示了使用 35mm Dimple NanoCulture Dish 培养不同细胞球的形态学结果, 其中, 35mm Dimple NanoCulture Dish 为日本 JSR Corporation 的细胞球培养板。

图 8: 显示了修饰于脂质体表面的穿膜肽对细胞球穿透能力的评价结果。

图 9: 显示了包载 GFP-siRNA 的药物制剂对 293T 细胞球的转染效果。

图 10: 显示了包载 GFP-siRNA 的药物制剂对 U87 细胞球的转染效果。

图 11: 显示了使用不同寡聚精氨酸的药物制剂对 LUC-U87 细胞的转染效果的定性评价和定量评价结果。

图 12: 显示了包载 siRNA 的药物制剂的粒径。

图 13: 显示了包载 siRNA 的药物制剂的电势。

图 14: 显示了包载 siRNA 的药物制剂对 bEnd.3 细胞和 U87 细胞的促凋亡效果评价和细胞毒性评价结果。

图 15: 显示了细胞膜荧光探针 DiD 标记的药物制剂经鼻给药后的体内分布情况。

图 16: 显示了细胞膜荧光探针 DiD 标记的载体递送 FAM-siRNA 入胞的流式细胞术检测结果。

图 17: 显示了 DiD 细胞膜荧光探针标记的基因递送载体在 U87 原位脑瘤模型鼠中经鼻给药后的体内分布情况。

图 18: 显示了包载 siRNA 的递送载体的抗 U87 脑原位瘤的药效学评价结果, 其中, Lipo2000/siRNA 组为市售基因转染试剂阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 与 siRNA 的非共价复合物。

图 19: 显示了包载 siRNA 的递送载体在 U87 原位脑瘤模型鼠中的体内促凋亡能力评价结果, 其中, Lipo2000/siRNA 组为市售基因转染试剂阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 与 siRNA 的非共价复合物。

图 20: 显示了包载 siRNA 的递送载体的体内鼻粘膜毒性评价结果, 其中 Lipo2000/siRNA 组为市售基因转染试剂阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 与 siRNA 的非共价复合物, 脱氧胆酸钠组的脱氧胆酸钠为大连美仑生物技术有限公司的市售产品。

发明详述:

本发明提供了一种新型的药物递送载体, 其包含穿膜肽修饰的脂质体和聚合物, 其中所述聚合物是带正电的多聚氨基酸。本发明的药物递送载体能够与药物分子组装形成复合物, 可压缩(compact)药物分子并包载药物分子于脂质体中, 由此利用脂质体表面修饰的具有穿膜功能的穿膜肽帮助药物穿透受试者体内的生物膜屏障。

本发明的药物递送载体具有很强的携载药物、递送药物以及组织穿透能力, 且组织毒性低, 可通过多种施用途径将药物分子高效递送至受试者体内的目标部位, 克服因受试者的生物膜屏障导致的药物难以到达目标部位的技术问题, 增强药物治疗疾病的有效性且具有良好的生物安全性。本发明还提供了使用所述药物递送载体制备的药物制剂。

如本文中所用, 术语“受试者”是指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如, 牛、羊、猫、犬和马)、灵长类(例如, 人和非人灵长类如猴)、兔和啮齿类(例如, 小鼠和大鼠)。特别地, 受试者是人。

本发明的药物递送载体的各种特征在下面进行了讨论。

如本文中所用, 术语“约”旨在是指定值的 $\pm 10\%$ 的调整。例如, 术语“约 5%”旨在包含 4.5%至 5.5%的范围。

如本文中所用, 术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤, 但是不排除任意其他要素、整数或步骤。

I. 表面修饰有穿膜肽的脂质体的膜材料:

如本文所用的术语“脂质体”是指由脂质双层组成的人工制备的囊泡。不限制本发明中被穿膜肽修饰的脂质体的类型, 可以是能够形成脂质囊泡并

包载药物的任何脂质体。

在一些实施方案中，本发明的表面修饰有穿膜肽的脂质体包含如下膜材料：

(i) 阳离子脂质：

脂质体包含一种或多种阳离子脂质。如本文中所用，术语“阳离子脂质”是在选择的 pH(例如生理 pH)下具有净正电荷的脂质。许多阳离子脂质是商业可获得的。用于脂质体中的特别合适的阳离子脂质包括国际专利公开 WO 2010/053572 和 WO 2012/170930 中描述的那些阳离子脂质，所述两篇专利文献均以引用的方式并入本文作为参考。

对脂质体中包含的阳离子脂质没有特别的限制，只要是在选择的 pH(例如生理 pH)下具有净正电荷的脂质均可使用，例如但不限于：1,2-二-O-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)；二甲基双十八烷基铵(DDAB)；1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)；1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)；1,2-二酰氧基-3-二甲基铵丙烷；1,2-二烷氧基-3-二甲基铵丙烷；双十八烷基二甲基氯化铵(DODAC)、1,2-二肉豆蔻酰氧基丙基-1,3-二甲基羟乙基铵(DMRIE)和 2,3-二油酰氧基-N-[2(精胺甲酰胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙烷三氟乙酸铵(DOSPA)及其组合。优选的阳离子脂质为 DOTMA、DOTAP、DODAC 和 DOSPA。最优选的阳离子脂质为 DOTAP。

(ii) 非阳离子脂质：

脂质体包含一种或多种非阳离子脂质。如本文中所用，术语“非阳离子脂质”指任何中性、两性离子或阴离子脂质。如本文中所用，术语“阴离子脂质”指在选择的 pH，例如生理 pH 下携带净负电荷的许多脂质物质中的一种。

对脂质体中包含的非阳离子脂质没有特别的限制，可使用任何中性、两性离子或阴离子脂质，例如但不限于：1,2-二-(9Z-十八酰基)-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPPC)、

1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPPE)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DMPE)、2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-(1'-rac-甘油)(DOPG)及其组合。优选的非阳离子脂质为 DOPE 和/或 DOPC。最优选的非阳离子脂质为 DOPE。

(iii) 胆固醇:

胆固醇是构成哺乳动物细胞膜的一种重要组成成分,占细胞膜脂类的 20% 以上。术语“胆固醇”在本文中以最广意义使用并且涵盖胆固醇衍生物。研究表明,温度高时,胆固醇能阻止细胞膜双分子层的无序化;温度低时,胆固醇又可干扰细胞膜双分子层的有序化,阻止液晶的形成,保持细胞膜双分子层的流动性。

考虑到胆固醇在膜双分子层中的重要性,本发明的阳离子脂质体也包含胆固醇。

(iv) PEG 化磷脂和与 CPP 共轭的聚乙二醇磷脂

脂质体包含 PEG 化磷脂和与 CPP 共轭的聚乙二醇磷脂。在本文中,PEG 化磷脂不包含连接有 CPP 的聚乙二醇磷脂。

PEG 化磷脂是将磷脂共价键合一个或多个聚乙二醇分子(PEG)而形成。PEG 化磷脂包括但不限于长度高达 10kDa 的聚乙二醇链,例如,1kDa、2kDa、3kDa、4kDa、5kDa、6kDa、7kDa、8kDa、9kDa、10kDa、以及它们之间的任何值的聚乙二醇链,其与磷脂共价键合。所述磷脂可以是合成的、半合成的或天然的磷脂,例如是磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇和鞘磷脂。在一些实施方案中,所述 PEG 化磷脂是例如聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(PEG-DSPE)和其衍生物甲氧基-聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(mPEG-DSPE),其中 PEG 的分子量为 1kDa—10kDa 之间的任何值。

与 CPP 共轭的聚乙二醇磷脂是将 CPP 共价键合至聚乙二醇磷脂而形成。

本发明中使用的 CPP 不仅包括野生型多肽 penetratin (氨基酸序列: RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 2)), 还包括其一系列亲脂性衍生物,例如,将 Penetratin 第 2 位谷氨酰胺(Q)和 / 或第 8 位谷氨酰胺(Q)和 / 或

第 9 位天冬酰胺(N)突变为疏水性氨基酸的 Penetratin 衍生物。在一些实施方案中, Penetratin 亲脂性衍生物是中国发明专利申请 CN201710414334.7 中公开的那些衍生物, 所述衍生物已被证明经结膜囊内滴眼给药后, 可促进药物穿过诸多眼部吸收屏障(角膜、结膜、巩膜等)进入眼内, 甚至将其携带的基因、多肽和蛋白质等生物大分子药物递送至眼后段的视网膜部位。中国发明专利申请 CN201710414334.7 中公开的 Penetratin 亲脂性衍生物的氨基酸序列此处引述如下:

表 1: Penetratin 衍生物的氨基酸序列

缩写	氨基酸序列	序列号 (SEQ ID NO:)	缩写	氨基酸序列	序列号 (SEQ ID NO:)
2-A	RAIKIWFQNRRMKWKK	3	2-V	RVIKIWFQNRRMKWKK	41
8-A	RQIKIWFANRRMKWKK	4	8-V	RQIKIWFVNRRMKWKK	42
9-A	RQIKIWFQARRMKWKK	5	9-V	RQIKIWFQVRRMKWKK	43
28-A	RAIKIWFANRRMKWKK	6	28-V	RVIKIWFVNRRMKWKK	44
29-A	RAIKIWFQARRMKWKK	7	29-V	RVIKIWFQVRRMKWKK	45
89-A	RQIKIWF AARRMKWKK	8	89-V	RQIKIWFVRRMKWKK	46
289-A	RAIKIWF AARRMKWKK	9	289-V	RVIKIWFVRRMKWKK	47
2-L	RLIKIWFQNRRMKWKK	10	2-I	RIIKIWFQNRRMKWKK	48
8-L	RQIKIWFLNRRMKWKK	11	8-I	RQIKIWFINRRMKWKK	49
9-L	RQIKIWFQLRRMKWKK	12	9-I	RQIKIWFQIRRMKWKK	50
28-L	RLIKIWFLNRRMKWKK	13	28-I	RIIKIWFINRRMKWKK	51
29-L	RLIKIWFQLRRMKWKK	14	29-I	RIIKIWFQIRRMKWKK	52
89-L	RQIKIWFLLRMKWKK	15	89-I	RQIKIWFIIRRMKWKK	53
289-L	RLIKIWFLLRMKWKK	16	289-I	RIIKIWFIIRRMKWKK	54
2-P	RPIKIWFQNRRMKWKK	17	2-F	RFIKIWFQNRRMKWKK	55
8-P	RQIKIWFNRRMKWKK	18	8-F	RQIKIWFNRRMKWKK	56
9-P	RQIKIWFQPRRMKWKK	19	9-F	RQIKIWFQFRRMKWKK	57
28-P	RPIKIWFNRRMKWKK	20	28-F	RFIKIWFNRRMKWKK	58
29-P	RPIKIWFQPRRMKWKK	21	29-F	RFIKIWFQFRRMKWKK	59
89-P	RQIKIWFPPRRMKWKK	22	89-F	RQIKIWF FRRMKWKK	60
289-P	RPIKIWFPPRRMKWKK	23	289-F	RFIKIWF FRRMKWKK	61
2-W	RWIKIWFQNRRMKWKK	24	2-M	RMIKIWFQNRRMKWKK	62
8-W	RQIKIWFNRRMKWKK	25	8-M	RQIKIWFNRRMKWKK	63
9-W	RQIKIWFQWRRMKWKK	26	9-M	RQIKIWFQMRRMKWKK	64
28-W	RWIKIWFNRRMKWKK	27	28-M	RMIKIWFNRRMKWKK	65
29-W	RWIKIWFQWRRMKWKK	28	29-M	RMIKIWFQMRRMKWKK	66
89-W	RQIKIWFWRMRMKWKK	29	89-M	RQIKIWFMMRRMKWKK	67
289-W	RWIKIWFWRMRMKWKK	30	289-M	RMIKIWFMMRRMKWKK	68

2-A,8-V	RAIKIWFVNRRMKWKK	31	2-F,9-W	RFIKIWFQWRRMKWKK	69
2-V,8-A	RVIKIWFANRRMKWKK	32	2-W,9-F	RWIKIWFQFRRMKWKK	70
2-V,9-L	RVIKIWFQLRRMKWKK	33	2-W,9-M	RWIKIWFQMRRMKWKK	71
2-L,9-V	RLIKIWFQVRRMKWKK	34	2-M,9-W	RMIKIWFQWRRMKWKK	72
2-L,9-I	RLIKIWFQIRRMKWKK	35	2-M,8-W,9-Y	RMIKIWFYRRMKWKK	73
2-I,9-L	RIIKIWFQLRRMKWKK	36	2-W,8-Y,9-P	RWIKIWFYPRRMKWKK	74
2-I,8-P	RIIKIWFNRRMKWKK	37	2-Y,8-P,9-I	RYIKIWFPIRRMKWKK	75
2-P,8-I	RPIKIWFNRRMKWKK	38	2-P,8-I,9-L	RPIKIWFILRRMKWKK	76
2-P,8-F	RPIKIWFNRRMKWKK	39	2-I,8-L,9-V	RIIKIWFVRRMKWKK	77
2-F,8-P	RFIKIWFNRRMKWKK	40	2-L,8-V,9-A	RLIKIWFVARRMKWKK	78

根据本发明, CPP 是通过与聚乙二醇磷脂共价键合而被连接至作为脂质体的脂质双层的一部分的化合物。在本文中, 术语“作为脂质体的脂质双层的一部分”旨在表明 CPP-PEG-磷脂中的所述磷脂被整合到脂质双层中的事实。所述磷脂可以是合成的、半合成的或天然的磷脂, 例如是磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇和鞘磷脂。

CPP-PEG-磷脂中的聚乙二醇链包括但不限于长度高达 10kDa 的聚乙二醇链, 例如, 1kDa、2kDa、3kDa、4kDa、5kDa、6kDa、7kDa、8kDa、9kDa、10kDa、以及它们之间的任何值的聚乙二醇链, 其两端分别与磷脂和与 CPP 共价键合。在一些实施方案中, 所述与 CPP 共轭的聚乙二醇磷脂是例如 Penetratin/Penetratin 衍生物-PEG-DSPE, 其中 PEG 的分子量为 1kDa—10kDa 之间的任何值。

本发明将 CPP 修饰在阳离子脂质体的表面, 旨在增强药物递送载体在组织中的穿透能力, 由此帮助携带更多药物分子的脂质体到达目标部位, 从而发挥疾病的治疗和 / 或预防效果。

在一些实施方案中, 脂质体膜材料(iv)中 PEG 化磷脂和与 CPP 共轭的聚乙二醇磷脂中的聚乙二醇链长不相等, 且与 CPP 共轭的聚乙二醇磷脂中的聚乙二醇链较 PEG 化磷脂中的聚乙二醇链更长, 例如, 更长 0.5kDa—5kDa 之间, 优选地更长 0.75kDa—4kDa 之间, 更优选地更长 1kDa—2kDa 之间的任何值。在一个实施方案中, 脂质体膜材料(iv)中 PEG 化磷脂的聚乙二醇链长分别是约 1kDa、2kDa、3kDa, 与 CPP 共轭的聚乙二醇磷脂的聚乙二醇链长分别是约 2.5kDa、3.5kDa、4.5kDa。

在一些实施方案中，本发明的表面修饰有穿膜肽的阳离子脂质体的膜材料(i) : (ii) : (iii) : (iv)的摩尔比为约 20—40: 20—40: 20—40: 1—20，且与 CPP 共轭的聚乙二醇磷脂占膜材料(iv)中的约 20%—80%摩尔比，对应于占总的脂质体膜材料中的约 2%—8%摩尔比。在一些实施方案中，膜材料(i) : (ii) : (iii) : (iv)的摩尔比为约 27.0—31.6: 27.0—31.6: 31.6—39.6: 1—10，且与 CPP 共轭的聚乙二醇磷脂占膜材料(iv)中的约 20%—80%摩尔比，对应于占总的脂质体膜材料中的约 2%—8%摩尔比。

在一些具体的实施方案中，本发明的药物递送载体中的阳离子脂质体包含如下膜材料：(i) DOTAP；(ii) DOPE；(iii) 胆固醇；(iv) PEG-DSPE（例如，mPEG₂₀₀₀-DSPE）和 Penetratin/Penetratin 衍生物-PEG-DSPE（例如，⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE），且膜材料(i) : (ii) : (iii) : (iv)的摩尔比为约 20—40: 20—40: 20—40: 1—20，且 Penetratin/Penetratin 衍生物-PEG-DSPE（例如，⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE）占膜材料(iv)中的约 20%—80%摩尔比。在一些实施方案中，膜材料(i) : (ii) : (iii) : (iv)的摩尔比为约 27.0—31.6: 27.0—31.6: 31.6—39.6: 1—10，且 Penetratin/Penetratin 衍生物-PEG-DSPE（例如，⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE）占膜材料(iv)中的约 20%—80%摩尔比。在一些实施方案中，本发明的药物递送载体中的阳离子脂质体由如下膜材料组成：(i) DOTAP；(ii) DOPE；(iii) 胆固醇；(iv) mPEG₂₀₀₀-DSPE 和 ⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE，且膜材料(i) : (ii) : (iii) : (iv)的摩尔比为约 28.5: 28.5: 38: 5，⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE 占膜材料(iv)中的约 20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%摩尔比。

II. 带正电的多聚氨基酸

本发明的药物递送载体中包含的带正电的多聚氨基酸用于压缩药物分子。

所述带正电的多聚氨基酸是在选择的 pH(例如生理 pH)下具有净正电荷的多聚氨基酸。对多聚氨基酸中氨基酸残基的聚合度没有特别的限制，例如聚合度为 2-50 的带正电的多聚氨基酸（即，带正电的多聚氨基酸具有 2-50

个氨基酸残基)，例如聚合度为 6-12 的精氨酸和 / 或赖氨酸，任选地在所述聚合度为 2-50 的带正电的多聚氨基酸中间插有 1-20 个（例如 1—6 个）生理条件下不带电荷的氨基酸残基。带正电的多聚氨基酸可以是线性或环形，且氨基酸残基的构型包括 L 型和 D 型。优选地，所述带正电的多聚氨基酸是聚合度为 6-12 的多聚精氨酸，其中所述多聚精氨酸的空间结构包括线性和环形，多聚精氨酸的构型包括 L 型和 D 型。

在一些实施方案中，带正电的多聚氨基酸是寡聚精氨酸(oligo-arginine)，包括线性的多肽，例如 6 聚精氨酸（氨基酸序列为 RRRRRR，R6 (SEQ ID NO: 85)）、8 聚精氨酸（氨基酸序列为 RRRRRRRR，R8 (SEQ ID NO: 86)）、10 聚精氨酸（氨基酸序列为 RRRRRRRRRR，R10 (SEQ ID NO: 87)）、12 聚精氨酸（氨基酸序列为 RRRRRRRRRRRR，R12 (SEQ ID NO: 88)），以及环化的多肽，例如环化的 6 聚精氨酸(c-R6)、环化的 8 聚精氨酸(c-R8)、环化的 10 聚精氨酸(c-R10)、环化的 12 聚精氨酸(c-R12)，以及不同构型的多肽，例如 L 型寡聚精氨酸和 D 型寡聚精氨酸如 6 聚 D-精氨酸（氨基酸序列为 rrrrrr，D-R6）、8 聚 D-精氨酸（氨基酸序列为 rrrrrrrr，D-R8）、10 聚 D-精氨酸（氨基酸序列为 rrrrrrrrrr，D-R10）、12 聚 D-精氨酸（氨基酸序列为 rrrrrrrrrrrr，D-R12）。

以下描述了使用本发明的药物递送载体来制备药物制剂的方法，并描述了药物制剂的特征。

通过使用本发明的药物递送载体，能够制备出 CPP 修饰在阳离子脂质体的表面、在组织中的穿透能力强的药物制剂。

在一个实施方案中，本发明的药物制剂的制备方法为：

(1) 称取上述本发明的脂质体的膜材料，其中膜材料(i) : (ii) : (iii) : (iv) 摩尔比为约 20—40: 20—40: 20—40: 1—20，且与 CPP 共轭的聚乙二醇磷脂占膜材料(iv)中的约 20%—80%摩尔比，对应于占总的脂质体膜材料中的约 2%—8%摩尔比。

(2) 将膜材料(i) : (ii) : (iii) : (iv)加入有机溶剂中溶解，然后蒸发除去有机

溶剂，获得均匀的干燥脂质膜。

(3) 将所得的干燥脂质膜用含水溶液水化完全后，使用微型挤出器挤出脂质体（过核孔膜的顺序依次是 200 nm、100 nm 和 50 nm）。

(4) 将带正电的多聚氨基酸与药物分子在合适的溶液中混合并孵育，获得带正电的多聚氨基酸与药物分子的物理复合物。

(5) 以一定的摩尔比或电荷比混合上述(3)获得的脂质体和上述(4)获得的复合物，得到脂质体复合物形式的药物制剂。

又在一个实施方案中，本发明的药物制剂的制备方法为：

(1) 称取上述本发明的脂质体的膜材料，其中膜材料(i) : (ii) : (iii) : (iv) 摩尔比为约 20—40: 20—40: 20—40: 1—20，且与 CPP 共轭的聚乙二醇磷脂占膜材料(iv)中的约 20%—80%摩尔比，对应于占总的脂质体膜材料中的约 2%—8%摩尔比。

(2) 将膜材料(i) : (ii) : (iii)加入有机溶剂中溶解，然后蒸发除去有机溶剂，获得均匀的干燥脂质膜。

(3) 将所得的干燥脂质膜用含水溶液水化完全后，使用微型挤出器挤出脂质体（过核孔膜的顺序依次是 200 nm、100 nm 和 50 nm）。

(4) 将带正电的多聚氨基酸与药物分子在合适的溶液中混合并孵育，获得带正电的多聚氨基酸与药物分子的物理复合物。

(5) 以一定的摩尔比或电荷比混合上述(3)获得的脂质体和上述(4)获得的复合物，然后与膜材料(iv)混合并孵育，获得本发明的药物制剂。

对欲递送的药物分子没有特别地限定，所述药物分子包括广泛类型的递送至受试者的化合物，包括但不限于：核酸；抗感染药如抗生素和抗病毒药；镇痛药和镇痛药组合；食欲抑制药；驱蠕虫药；抗关节炎药；平喘药；抗惊厥药；抗抑郁药；抗糖尿病药；止泻药；抗组胺药；抗炎药；抗偏头痛制剂；止恶心药；抗肿瘤药；抗震颤麻痹药；止痒药；抗精神药；退热药；解痉药；抗胆碱能药；拟交感神经药；黄嘌呤衍生物；心血管制剂包括钾通道阻滞剂、钙通道阻滞剂、 β -阻滞剂、 α -阻滞剂和抗心律失常药；抗高血压药；利尿

药和抗利尿药；血管舒张药包括全身神经、心神经、周围神经和脑神经、中枢神经系统的兴奋剂、血管抑制药；咳嗽和感冒制剂，包括减充血药；激素，如雌二醇和其它固醇类，包括皮质类固醇；催眠药；免疫抑制药；肌肉松弛药；副交感神经阻滞药；精神兴奋剂；镇静药和安定药。本发明的药物递送载体可以递送例如处于离子化的、非离子化的、游离碱、酸加成盐等所有形式的药物，可以递送高分子量或低分子量药物。

在一些实施方案中，本发明的药物制剂递送的药物分子是例如肽类药物（例如奥曲肽(octreotide)）、抗体（例如，依那西普(etanercept)、阿达木单抗(adalimumab)、利妥昔单抗(rituximab)、派姆单抗(pembrolizumab)、兰尼单抗(ranibizumab)和纳武单抗(nivolumab)）、细胞因子、激素、抗生素（例如，化疗药阿霉素(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、表阿霉素(epirubicin)、放线菌素(actinomycin)和万古霉素(vancomycin)）、核酸等。

在一些实施方案中，所述药物制剂递送的药物分子是质粒 DNA、RNA 如小干扰RNA(siRNA)、有义 RNA、反义寡核苷酸(ASO)、适配体(aptamers)、核酶等的核酸。质粒 DNA 是含有这样的 DNA 序列的基因表达系统，所述 DNA 序列编码例如选自白细胞介素-2、白细胞介素-4、白细胞介素-7、白细胞介素-12、白细胞介素-15、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、集落刺激因子、粒细胞-巨噬细胞刺激因子、抗血管生成剂、肿瘤抑制基因、胸苷激酶、eNOS、iNOS、p53、p16、TNF- α 、Fas-配体、突变的癌基因、肿瘤抗原、病毒抗原或细菌抗原。质粒 DNA 还可以编码 shRNA 分子，所述 shRNA 分子设计为旨在抑制参与肿瘤细胞或其它过度增生性细胞生长或维持的蛋白质。质粒 DNA 可以同时编码治疗性蛋白质和一种或多种 shRNA。此外，本发明药物制剂中的核酸还可以是质粒 DNA 与包含有义 RNA、反义寡核苷酸或核酶的人工合成 RNA 的混合物。

在一个实施方案中，本发明药物制剂中药物分子（例如，化疗药）与阳离子脂质（例如，DOTAP）的摩尔比为约 0.1-10，例如，约 0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10，

优选约 0.1-5，进一步优选约 0.1-2。在一个实施方案中，所述药物制剂对药物分子（例如，化疗药）的载药量为：药物分子（例如，化疗药）占药物制剂的约 1%-30% (w/w)，例如，约 1%、2.5%、5%、7.5%、10%、12.5%、15%、17.5%、20%、22.5%、25%、27.5%、30% (w/w)，优选约 1%-25% (w/w)，进一步优选约 3%-20% (w/w)。

本发明的药物制剂可通过口腔、鼻腔、眼、呼吸道、消化道、生殖道、局部植入、注射或输注(经由硬膜外、动脉内、关节内、囊内、心内、脑室内、颅内、皮内、肌内、眶内、眼内、腹膜内、脊柱内、胸骨内、鞘内、静脉内、蛛网膜下、被膜下、皮下、气管、直肠、舌下等途径)施用。

可使用本领域已知的医学设备来施用本发明的药物制剂。例如，在一个实施方案中，可用无针头皮下注射设备，例如美国专利号 5,399,163 中公开的设备来施用本发明的药物制剂。

在一个实施方案中，使用本发明的药物递送载体制备了递送核酸的药物制剂，由此发挥基因治疗的作用。

与传统的手术、放疗、化疗等治疗方法相比，基因治疗作为一种具有突破性意义的治疗方法，优点在于针对性强、副作用低，对正常细胞损伤小，治疗过程中痛苦少，因此在免疫缺陷病、代谢性疾病、癌症、心脏病等疾病领域显示出良好前景。目前全球有 2597 种核酸药物进入或完成临床试验，其中 65%是用于癌症治疗，有 181 项临床试验的基因药物是通过抑制肿瘤生长发挥治疗作用 (Ginn SL 等人, Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update, Journal of Gene Medicine, 2018, 20(5):e3015)。基于此，本领域希望能够通过递送核酸的药物制剂来实现对疾病（例如，肿瘤疾病）的治疗。

递送核酸的载体是基因治疗的关键技术之一，可保护所递送的核酸不被内源性核酸酶降解，从而使基因治疗的体内应用成为可能。目前基因治疗所使用的核酸载体主要是病毒载体和非病毒载体两类。病毒载体的转染效率很高，但同时病毒载体也存在诱导免疫反应、致癌等临床问题。非病毒载体主要包括聚乙烯亚胺 (PEI)、聚酰胺-胺 (PAMAM)、阳离子脂质体等。相

比较 PEI 和 PAMAM, 阳离子脂质体作为药物载体, 具有靶向、长效、低毒、保护药物等优点 (Wang J 等人, c-Myc is required for maintenance of glioma cancer stem cells, PLoS ONE, 2008, 3(11):e3769)。阳离子脂质体通常由带正电荷的脂类和中性辅助脂类混合形成, 当阳离子脂质体与带负电荷的核酸靠近时, 聚集的阳离子脂质可发挥“双面粘胶带”的作用, 自发形成核酸/阳离子脂质体复合物。对脂质体的表面基团进行特殊修饰后, 阳离子脂质体能很好地包封核酸, 促进核酸/阳离子脂质体复合物与细胞膜的融合, 提高细胞对核酸的摄取 (Huang L 等人, In vivo delivery of RNAi with lipid-based nanoparticles, Annual Review of Biomedical Engineering, 2011 年 8 月 15 日, 13:507-530)。

在制备递送核酸的药物制剂时, 使用本发明的药物递送载体中的人工合成的带正电的多聚氨基酸 (例如寡聚精氨酸) 来压缩核酸, 其中所述寡聚精氨酸和核酸这两者通过静电作用形成物理复合物, 然后借助带有正电荷的阳离子脂质体进一步压缩核酸, 形成脂质体复合物, 进一步地由于穿膜肽修饰在阳离子脂质体的表面, 可以提高所制得的核酸脂质体复合物对细胞和组织的穿透能力, 由此构建的核酸脂质体制剂能够通过多种途径给药, 并将核酸分子高效递送至目标身体部位, 且具有良好的生物安全性。

在一个实施方案中, 本发明的核酸脂质体制剂的制备方法为:

(1) 称取上述本发明的脂质体的膜材料, 其中膜材料(i):(ii):(iii):(iv) 摩尔比为约 20—40: 20—40: 20—40: 1—20, 且与 CPP 共轭的聚乙二醇磷脂占膜材料(iv)中的约 20%—80%摩尔比, 对应于占总的脂质体膜材料中的约 2%—8%摩尔比。

(2) 将膜材料(i):(ii):(iii) 加入有机溶剂中溶解, 然后蒸发除去有机溶剂, 获得均匀的干燥脂质膜。

(3) 将所得的干燥脂质膜用含水溶液水化完全后, 使用微型挤出器挤出脂质体 (过核孔膜的顺序依次是 200 nm、100 nm 和 50 nm)。

(4) 将带正电的多聚氨基酸 (例如寡聚精氨酸) 与核酸分子按照一定的

电荷比在合适的溶液中混合并孵育，获得带正电的多聚氨基酸（例如寡聚精氨酸）与核酸分子的复合物。

(5) 按照一定的摩尔比或电荷比混合上述(3)获得的脂质体和上述(4)获得的复合物，获得脂质体复合物。

(6) 将上述(5)获得的脂质体与膜材料(iv)混合并孵育，获得本发明的核酸脂质体制剂。

在一个实施方案中，本发明的核酸脂质体制剂的制备方法为：

(1) 称取上述本发明的脂质体的膜材料，其中膜材料(i) : (ii) : (iii) : (iv) 摩尔比为约约 20—40: 20—40: 20—40: 1—20，且与 CPP 共轭的聚乙二醇磷脂占膜材料(iv)中的约 20%—80%摩尔比，对应于占总的脂质体膜材料中的约 2%—8%摩尔比。

(2) 将膜材料(i) : (ii) : (iii) 加入有机溶剂中溶解，然后蒸发除去有机溶剂，获得均匀的干燥脂质膜。

(3) 将所得的干燥脂质膜用含水溶液水化完全后，使用微型挤出器挤出脂质体（过核孔膜的顺序依次是 200 nm、100 nm 和 50 nm）。

(4) 将上述(3)获得的脂质体与膜材料(iv)混合并孵育，获得穿膜肽修饰的阳离子脂质体。

(5) 将带正电的多聚氨基酸（例如寡聚精氨酸）与核酸分子按照一定的电荷比在合适的溶液中混合并孵育，获得寡聚精氨酸与核酸分子的复合物。

(6) 按照一定的摩尔比或电荷比混合上述(4)获得的脂质体和上述(5)获得的复合物，获得脂质体复合物形式的本发明的核酸脂质体制剂。

在一个实施方案中，本发明的核酸脂质体制剂的制备方法为：

(1) 称取上述本发明的脂质体的膜材料，其中膜材料(i) : (ii) : (iii) : (iv) 摩尔比为约约 20—40: 20—40: 20—40: 1—20，且与 CPP 共轭的聚乙二醇磷脂占膜材料(iv)中的约 20%—80%摩尔比，对应于占总的脂质体膜材料中的约 2%—8%摩尔比。

(2) 将膜材料(i) : (ii) : (iii) : (iv)加入有机溶剂中溶解，然后蒸发除去有机

溶剂，获得均匀的干燥脂质膜。

(3) 将所得的干燥脂质膜用含水溶液水化完全后，使用微型挤出器挤出脂质体（过核孔膜的顺序依次是 200 nm、100 nm 和 50 nm）。

(4) 将带正电的多聚氨基酸（例如寡聚精氨酸）与核酸分子按照一定的电荷比在合适的溶液中混合并孵育，获得寡聚精氨酸与核酸分子的复合物。

(5) 按照一定的电荷比混合上述(3)获得的脂质体和上述(4)获得的复合物，获得脂质体复合物形式的本发明的核酸脂质体制剂。

在一个实施方案中，所述核酸分子是 siRNA，本发明的 siRNA 脂质体制剂的制备方法为：DOTAP、DOPE、胆固醇、mPEG₂₀₀₀-DSPE 与 Penetratin/Penetratin 衍生物-PEG₃₄₀₀-DSPE 的摩尔比为约 28.5: 28.5: 38: 5，称取 DOTAP、DOPE、胆固醇置于圆底烧瓶中，加入氯仿溶解，通过旋转蒸发仪除去氯仿得均匀的干燥脂质膜。将脂质膜用 5 % 的葡萄糖水溶液通过水浴超声水化，待脂质膜水化完全后，再使用微型挤出器挤压脂质体（过核孔膜的顺序依次是 200 nm、100 nm 和 50 nm），完成空白脂质体 CLS 的制备。然后将寡聚精氨酸 R_n（R 为精氨酸的单字母代码，n 为例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10 等整数）与 siRNA 按照一定电荷比混合，涡旋 30 s，置于 37°C 条件下孵育 30 分钟后得到复合物 R_n/siRNA，再将复合物 R_n/siRNA 与空白阳离子脂质体按照一定电荷比（阳离子脂质体与 siRNA 的电荷比）混合，涡旋 30 s，置于 37°C 条件下孵育 30 分钟后得到复合物 CLS/R_n/siRNA，最后将 CLS/R_n/siRNA 和 mPEG₂₀₀₀-DSPE 与 Penetratin/Penetratin 衍生物-PEG₃₄₀₀-DSPE 混合后置于 55°C 孵育半小时，完成 siRNA 脂质体制剂的制备。

在一个实施方案中，将本发明的核酸脂质体制剂经鼻给药，由鼻脑通路将核酸高效递送进入脑部，核酸脂质体制剂被脑部肿瘤细胞摄取后能够借助穿膜肽和阳离子脂质体的表面正电荷实现内涵体逃逸，将核酸分子释放到细胞质中，发挥基因治疗脑部肿瘤（例如，脑胶质瘤）的作用。

本领域技术人员公知，脑部特殊的生理结构及功能上的复杂性，特别是血脑屏障的存在以及某些药物自身的理化性质，使治疗药物通常难以达到脑组织。然而，经鼻入脑的给药途径为脑部疾病的治疗提供了可行性的思路，药物经鼻腔入脑的直接通路有两条，一条是嗅神经通路，这是经鼻入脑绕过血脑屏障最直接的方法，药物经鼻黏膜吸收，经嗅神经摄取后，通过轴突运输至嗅球，进一步抵达嗅脑的过程。第二条是鼻黏膜上皮通路，药物穿过基膜进入固有层，进一步到达周围嗅神经，进而转运至中枢神经系统，最终实现在脑部的蓄积。由于经鼻入脑给药具有无创伤性，因此患者的顺应性良好（Agrawal M 等人，Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs, *Journal of Controlled Release*, 2018, 281:139-177）。另一方面，脑部肿瘤例如脑胶质瘤是一种中枢神经系统恶性肿瘤，发病率高，生存率低，对人类健康的危害极大，但临床预后并不乐观，主要体现在手术复发、化疗耐药等，且由于存在血脑屏障、血脑肿瘤屏障，全身给药后药物入脑量非常少，因此，一直以来人们都在致力寻找一种有效的药物治疗方式。

本发明的药物脂质体制剂经鼻给药后，能够将药物递送至脑部，进而促进药物发挥治疗作用。

在本发明的实施例中，发明人以 8 聚精氨酸 R8 为例，以 siRNA 为药物分子模型，构建了携载 siRNA 的阳离子脂质体递送载体。通过一系列体外和体内实验，考察了由穿膜肽修饰的脂质体和带正电的多聚氨基酸共同构建的递送载体的细胞摄取能力以及细胞球穿透能力。结果表明，与商品化的递送核酸的阳离子脂质体相比，本发明的药物递送载体能够显著提高核酸的入胞量，具备较高的递送效率。

本发明构建的药物递送载体的优势在于高效、低毒，且易释放药物。高效体现在本发明的递送载体具备较高的细胞摄取能力和较强的细胞球穿透能力；低毒体现在本发明所用的穿膜肽无致病性，且易于在体内降解，相比于 PEI 和 PAMMA 等其他药物递送载体具备更好的生物安全性；易释放药物

体现在多聚氨基酸和表面修饰的穿膜肽均带有正电荷，阳离子脂质体带有的正电荷能够帮助药物的内涵体逃逸，从而使药物能够成功释放到细胞质中，发挥治疗作用。此外，使用本发明的药物递送载体制备的药物制剂可通过多种途径施用至受试者，尤其可通过经鼻给药途径实现药物的脑内递送，有利于提高患者的顺应性。

描述以下实施例以辅助对本发明的理解。不意在且不当以任何方式将实施例解释成限制本发明的保护范围。

实施例

实施例 1

阳离子脂质体的制备：

称取摩尔比为 28.5 : 28.5 : 38 : 5 的膜材，即 3.5 mg 的 DOTAP（上海艾韦特医药科技有限公司, 132172-61-3）、3.72 mg 的 DOPE（上海艾韦特医药科技有限公司, 4004-05-1）、2.59 mg 的胆固醇（Sigma-Aldrich, C8667）和 2.46 mg 的 mPEG₂₀₀₀-DSPE（上海艾韦特医药科技有限公司, 147867-65-0）。

将所述量的 DOTAP、DOPE、胆固醇置于 50 mL 圆底烧瓶中，加入 1 mL 氯仿，溶解作为脂质膜材料的所述 DOTAP、DOPE、胆固醇，即 16.67 μ M 的 CLS 含有 5 μ M 的 DOTAP，5 μ M 的 DOPE，6.67 μ M 的 DOPE。将所得溶液通过旋转蒸发仪（上海申生科技有限公司，R201L）除去氯仿，获得均匀的干燥脂质膜。

将所得的干燥脂质膜用 1 mL 5% 的葡萄糖水溶液通过 37℃ 水浴超声水化约 10 分钟。待脂质膜水化完全后，使用微型挤出器（Hamilton, 81320）挤出脂质体（过核孔膜的顺序依次是 200 nm、100 nm 和 50 nm），获得了阳离子脂质体（文中也称为 CLS）。

将所制得的阳离子脂质体与 2.46 mg 的 mPEG₂₀₀₀-DSPE（溶于水）混合后置于 55℃ 孵育半小时，获得了包含 mPEG₂₀₀₀-DSPE 的阳离子脂质体。

实施例 2

阳离子脂质体和带正电的多聚氨基酸对药物的压缩 (compact) 作用:

琼脂糖凝胶电泳实验常用于测定药物载体对药物如核酸的包载能力。在本实施例中, 制备了 R8/siRNA 复合物、CLS/siRNA 复合物和 CLS/R8/siRNA 复合物, 通过琼脂糖凝胶电泳实验分别测定了单独的 CLS、单独的 R8、以及 CLS 和 R8 的组合对核酸的包载能力。

将 4 mg 的寡聚精氨酸 R8 (上海昕浩生物科技有限公司) 作为带正电的多聚氨基酸溶于 DEPC 处理水 (大连美仑生物技术有限公司, MA0018) 中制备 4 mg/mL 寡聚精氨酸 R8 溶液, 将 33 μ g 的 siRNA (在本实施例中, 使用的是针对 c-myc 的小干扰 RNA, 下文中也缩写为 siRNA, 其有义链 (5'-3') 为 AACGUUAGCUUCACCAACAdTdT (SEQ ID NO: 79), 反义链 (5'-3') 为 UGUUGGUGAAGCUAACGUUdTdT (SEQ ID NO: 80)) 溶于 125 μ L 的 DEPC 处理水中制备 20 μ M 的 siRNA 溶液。

将寡聚精氨酸 R8 溶液与 siRNA 溶液按照电荷比为 0、1、5、10、15、20、25、30 的比例等体积混合 (由于 R8 的一个氨基氮带一个正电荷, siRNA 的一个磷酸根带一个负电荷, 1 μ M 的 R8 含 8 μ M 的氨基氮, 即 1 μ M 的 R8 含 8 μ M 的正电荷, 1 μ M 的 siRNA 含有 42 μ M 的磷酸根, 即 1 μ M 的 siRNA 含 42 μ M 的负电荷, R8 与 siRNA 的电荷比 = (R8 的 μ M 值 $\times$ 8) / (siRNA 的 μ M 值 $\times$ 42) = $0.19 \times \text{R8}(\mu\text{M})/\text{siRNA}(\mu\text{M})$), 涡旋 30 s, 置于 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 30 分钟得到不同电荷比的 R8/siRNA 复合物。

使用上述不同电荷比的 R8/siRNA 复合物和 CLS 制备脂质体复合物。具体而言, 取 8 μ L 不同电荷比的 R8/siRNA 复合物 (即, 4 μ L siRNA 溶液和 4 μ L R8 溶液制备而得) 与 2.67 μ L 的实施例 1 制备的 16.67 μ M 阳离子脂质体 CLS 混合, 涡旋 30 s, 置于 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 30 分钟, 得到 R8/siRNA 不同电荷比的脂质复合物 CLS/R8/siRNA。在所述脂质复合物 CLS/R8/siRNA 中, 以 siRNA 的电荷数为基准, 阳离子脂质体 CLS 与 siRNA 的电荷比固定为 4 (由于 DOTAP 的一个氨基氮带一个正电荷, siRNA 的一个磷酸根带一个负

电荷, 16.67 μM 的 CLS 含 5 μM 的 DOTAP, 即 1 μM 的 CLS 含 0.3 μM 的正电荷, 1 μM 的 siRNA 含 42 μM 的负电荷, CLS 与 siRNA 的电荷比 = (CLS 的 μM 值 $\times 0.3$) / (siRNA 的 μM 值 $\times 42$) = $0.007 \times \text{CLS} (\mu\text{M}) / \text{siRNA} (\mu\text{M})$)。琼脂糖凝胶电泳结果表明, 使用不同 R8/siRNA 电荷比的 R8/siRNA 复合物均能够与 CLS 混合制备脂质体复合物。

接下来, 使用 R8/siRNA 电荷比为 1:1 的 R8/siRNA 复合物和 CLS 制备脂质体复合物。具体而言, 将实施例 1 制备的 CLS 与 8 μL 如上制备的 R8/siRNA 电荷比为 1:1 的 R8/siRNA 复合物按照 CLS/siRNA 电荷比为 2、4、6、8、10、12 的比例混合, 涡旋 30 s, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 分钟得到 CLS 与 siRNA 不同电荷比的 CLS/R8/siRNA 复合物。

为了比较的目的, 还制备了 CLS/siRNA 复合物, 其中将实施例 1 制备的 CLS 与本实施例制备的 20 μL siRNA 溶液按照 CLS/siRNA 电荷比为 2、4、6、8、10、12 的比例等体积混合, 涡旋 30 s, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 分钟得到不同 CLS/siRNA 电荷比的 CLS/siRNA 复合物。如下实施 CLS/siRNA 电荷比的计算: 由于 DOTAP 的一个氨基氮带一个正电荷, siRNA 的一个磷酸根带一个负电荷, 16.67 μM 的 CLS 含 5 μM 的 DOTAP, 即 1 μM 的 CLS 含 0.3 μM 的正电荷, 1 μM 的 siRNA 含 42 μM 的负电荷, 因此, CLS 与 siRNA 的电荷比 = (CLS 的 μM 值 $\times 0.3$) / (siRNA 的 μM 值 $\times 42$) = $0.007 \times \text{CLS} (\mu\text{M}) / \text{siRNA} (\mu\text{M})$)。

将上述制备的 R8/siRNA 复合物、CLS/siRNA 复合物和 CLS/R8/siRNA 复合物分别小心加入琼脂糖凝胶加样孔中, 并设置游离 siRNA 对照组, 进行电泳。电泳结束后, 用 GelRed 工作液 (Biotium Inc.) 避光泡染 30 分钟, 在紫外 302 nm 条件下进行凝胶成像。结果如图 1 所示。

图 1 中小图 A 的结果表明, 单独的寡聚精氨酸 R8 无法完全压缩基因; 图 1 中小图 C 和 D 的结果表明, 单独的阳离子脂质体 CLS 虽然能够一定程度地压缩基因, 但是 CLS/siRNA 复合物的粒径较大; 图 1 中小图 E 和 F 的结果表明, 阳离子脂质体和寡聚精氨酸 R8 的组合能够有效地共同压缩基因。

实施例 3

阳离子脂质体和带正电的多聚氨基酸压缩药物后含有药物的脂质体复合物的粒径和电势表征:

根据实施例 2 中所述方法分别制备 R8/siRNA 复合物、CLS/siRNA 复合物和 CLS/R8/siRNA 复合物, 并进行粒径与电势测定。

采用动态光散射技术直接测量粒径。粒径测定结果如图 1、图 3 和图 12 所示。在图 12 中, 来自动态光散射测量的结果以横坐标为粒径, 纵坐标为光强度显示, 由各粒子所贡献的光强度计算而得。

由图 3 中的小图 B 可见, 当寡聚精氨酸 R8/siRNA 的电荷比为 5、10、20 时, 物理复合物 R8/siRNA 的粒径约为 200nm。当寡聚精氨酸 R8/siRNA 的电荷比为 5, 阳离子脂质体 CLS 与 siRNA 的电荷比为 4 时, 使用阳离子脂质体和寡聚精氨酸的组合压缩 siRNA 后, 含有 siRNA 的脂质体复合物 (CLS/R8/siRNA) 的粒径测定结果如图 12 所示, 粒径减小至 108 nm。当寡聚精氨酸 R8/siRNA 的电荷比为 5 时, ⁸⁹W Penetratin 修饰的阳离子脂质体 89W-CLS 与 siRNA 的电荷比为 4 时, 使用阳离子脂质体和寡聚精氨酸的组合压缩 siRNA 后, ⁸⁹W Penetratin 修饰的含有 siRNA 的脂质体复合物 (89W-CLS/R8/siRNA) 的粒径与 CLS/R8/siRNA 相近, 为 105 nm。⁸⁹W Penetratin 修饰的含有 siRNA 的脂质体复合物的最高光强度相对于 CLS/R8/siRNA 的最高光强度变低, 这是因为前者的粒径分布范围变宽所致。

当寡聚精氨酸 R8/siRNA 的电荷比为 5, 阳离子脂质体 CLS 或 ⁸⁹W Penetratin 修饰的阳离子脂质体 89W-CLS 与 siRNA 的电荷比为 4 时, 分别制备了 R8/siRNA 复合物、CLS/siRNA/R8 复合物和 89W CLS/siRNA/R8 复合物, 采用 ζ 电势分析仪, 在 23℃ 使用 5V/cm 的电场强度、0.4cm 的电极间距在水中测量 ζ 电势。ζ 电势测定结果如图 13 所示。

由图 13 可见, 物理复合物 R8/siRNA、脂质体复合物 CLS/R8/siRNA 和 ⁸⁹W Penetratin 修饰的脂质体复合物的 ζ 电势分别为 22 mV、43 mV 和 38 mV。

实施例 4

含有药物的脂质体复合物的稳定性表征之一：

根据实施例 2 中所述方法制备 DEPC 处理水中的各 CLS/R8/siRNA 复合物，高速离心后观察各含有药物的脂质体复合物（即，脂质体制剂）的稳定性。

具体而言，将根据实施例 2 中所述方法制备的各 CLS/R8/siRNA 复合物在 $12000\times g$ 的速度下离心 20 分钟，观察各脂质体制剂的沉淀情况。

结果如图 3 中的小图 C 所示。由图 3 中的小图 C 可见，当寡聚精氨酸 R8/siRNA 的电荷比大于 5，且当阳离子脂质体 CLS 与 siRNA 的电荷比为 4 时，CLS/R8/siRNA 复合物经高速离心后没有明显的沉淀析出，这表明阳离子脂质体和寡聚精氨酸共同压缩 siRNA，能够形成稳定的脂质体制剂。

实施例 5

含有药物的脂质体复合物的稳定性表征之二：

将根据实施例 2 中所述方法制备的 DEPC 处理水中的各 CLS/R8/siRNA 复合物在 $12000\times g$ 的速度下离心 20 分钟，小心地将各上清加入琼脂糖凝胶加样孔中，并设置游离 siRNA 对照组，进行电泳。电泳结束后，用 GelRed 工作液避光泡染 30 分钟，在紫外 302 nm 条件下进行凝胶成像。结果如图 3 中的小图 D 所示。

由图 3 中的小图 D 可见，当寡聚精氨酸 R8/siRNA 的电荷比大于 5，且当阳离子脂质体 CLS 与 siRNA 的电荷比为 4 时，CLS/R8/siRNA 复合物经高速离心后，CLS/R8/siRNA 仍保留在上清溶液中，而且没有游离的 siRNA 电泳出来。这表明阳离子脂质体和寡聚精氨酸共同压缩 siRNA，能够形成稳定的脂质体制剂。

实施例 6

表面修饰的脂质体药物制剂的配制:

对脂质体药物制剂使用穿膜肽进行表面修饰, 获得表面修饰的药物制剂。

i. 穿膜肽-PEG-磷脂的制备:

由 DSPE-聚乙二醇马来酰亚胺(DSPE-PEG₃₄₀₀-马来酰亚胺)(Laysan Bio, 146-123)与末端修饰有半胱氨酸的 penetratin 衍生物(⁸⁹W Penetratin-Cys)经一步反应制备得到穿膜肽-PEG-DSPE。

具体而言, 将 20 mg DSPE-PEG₃₄₀₀-马来酰亚胺溶于 1 mL N,N-二甲基甲酰胺中, 在搅拌状态下向其中加入溶于 10 mL 磷酸缓冲溶液(10 mM, pH7.2)介质中的 18 mg ⁸⁹W Penetratin-Cys, 在 25℃的条件下继续搅拌过夜使反应完全。反应结束后, 将所得混合物在冰浴条件下置于纯水中透析 2 天, 冷冻干燥得到白色絮状物, 为 ⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE。

其中, 所述多肽 ⁸⁹W Penetratin 是 penetratin 的一种衍生物, 具体氨基酸序列为 RQIKIWFWRRMKWKK(SEQ ID NO: 29)。穿膜肽-PEG-DSPE 中的穿膜肽也可以使用其他 penetratin 衍生物, 例如, 使用表 1 中所示的其他 penetratin 衍生物, 例如, 对 penetratin 第 2 位谷氨酰胺和/或第 8 位谷氨酰胺和/或第 9 位天冬酰胺进行了疏水性氨基酸突变的产物(也可参见中国发明专利申请 CN201710414334.7)。

为了便于与聚乙二醇末端基团反应, 穿膜肽 ⁸⁹W Penetratin 或其他 penetratin 衍生物的 N-端或 C-端可以额外添加一个半胱氨酸残基(cysteine, C)。

ii. 表面修饰的脂质体药物制剂的配制:

在总的脂质体膜材料中, DOTAP:DOPE:胆固醇:(mPEG₂₀₀₀-DSPE 和 ⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE)的摩尔比为约 28.5:28.5:38:5。

称取 3.5 mg 的 DOTAP(上海艾韦特医药科技有限公司, 132172-61-3)、3.72 mg 的 DOPE(上海艾韦特医药科技有限公司, 4004-05-1)、2.59 mg 的胆固醇(Sigma-Aldrich, C8667)。将所述量的 DOTAP、DOPE、胆固醇置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 1 mL 氯仿, 溶解作为脂质膜材料的所述 DOTAP、DOPE、胆固醇, 即 16.67 μM 的 CLS 含有 5 μM 的 DOTAP, 5 μM 的 DOPE,

6.67 μM 的 DOPE。将所得溶液通过旋转蒸发仪（上海申生科技有限公司，R201L）除去氯仿，获得均匀的干燥脂质膜。

将所得的干燥脂质膜用 1 mL 5% 的葡萄糖水溶液通过 37℃ 水浴超声水化 10 分钟。待脂质膜水化完全后，使用微型挤出器（Hamilton, 81320）挤出脂质体（过核孔膜的顺序依次是 200 nm、100 nm 和 50 nm），获得了阳离子脂质体（文中也称为 CLS）。

将 4mg 的寡聚精氨酸 R8（上海昕浩生物科技有限公司）溶于 DEPC 处理水（大连美仑生物技术有限公司，MA0018）中制备 4 mg/mL 寡聚精氨酸 R8 溶液，将 33 μg 的 FAM 标记的 siRNA（在本实施例中，使用的是针对 c-myc 的 siRNA，其有义链（5'-3'）为 FAM-AACGUUAGCUUCACCAACAdTdT（SEQ ID NO: 79），即，5' 修饰有 FAM；反义链（5'-3'）为 UGUUGGUGAAGCUAACGUUdTdT（SEQ ID NO: 80））溶于 125 μL 的 DEPC 处理水中制备 20 μM 的 FAM-siRNA 溶液。

将寡聚精氨酸 R8 溶液与 20 μM 的 FAM-siRNA 溶液按照电荷比为 5 的比例等体积混合，涡旋 30 s，置于 37℃ 条件下孵育 30 分钟得到复合物 R8/FAM-siRNA。取 8 μL R8/FAM-siRNA 复合物，与上述制备的阳离子脂质体 CLS 按照脂质体与 FAM-siRNA 的电荷比为 4 的比例混合，涡旋 30s，得 CLS/R8/FAM-siRNA 复合物。

对于占脂质体总摩尔数为 5% 的 mPEG₂₀₀₀-DSPE 和 ⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE，分别配制了 ⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE 的摩尔数占 mPEG₂₀₀₀-DSPE 和 ⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE 的摩尔数为 0%、20%、40%、60%、80%、100% 的混合物。即，⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE 摩尔数分别占总的脂质体膜材料摩尔数的 0%、1%、2%、3%、4%、5%。

将所制得的 CLS/R8/FAM-siRNA 复合物分别与 ⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE 的摩尔数占 mPEG₂₀₀₀-DSPE 和 ⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE 的摩尔数为 0%、20%、40%、60%、80%、100% 的混合物混合后置于 55℃ 孵育半小时，获得表面修饰有 0%、1%、2%、3%、

4 %、5 % 比例的穿膜肽的脂质体药物制剂，即 89W-CLS/R8/FAM-siRNA。

实施例 7

定量评价细胞对表面修饰有不同比例穿膜肽的药物制剂的摄取：

将 U87 细胞（人恶性胶质母细胞瘤细胞，购自 ATCC）培养于 DMEM 完全培养基（添加 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素）中。取生长状态良好的 U87 细胞重悬于 DMEM 完全培养基中，按 5×10^5 个细胞/孔接种到 6 孔板中，每孔 1 mL，接种后每天更换新鲜培养液一次，培养 2 ~ 3 天后进行实验。

弃去培养液后，无菌 PBS 洗 U87 细胞三次，加入 1 mL 实施例 6 制备的表面修饰有不同比例的穿膜肽的脂质体药物制剂（包载 FAM 标记的 siRNA）的无血清 DMEM 培养基，37℃、5 % CO₂ 条件下孵育 4 h。孵育结束后弃去培养液，用含 0.02 mg/mL 肝素钠的 PBS 缓冲溶液洗去吸附在孔上或细胞表面的正电性物质。用胰酶将细胞消化下来，重悬于 200 μL 无菌 PBS 缓冲溶液中，吹打均匀后对每个样品计数细胞，取 10^4 个细胞进行流式细胞术检测。使用无血清 DMEM 培养基孵育的细胞作为阴性对照组。所有实验均一式三份实施，结果如图 4 所示（平均值 ± SD，n = 3，* p < 0.05，* 表示两组之间在统计学上有显著性差异；** p < 0.01，*** p < 0.001，** 和 *** 表示两组之间在统计学上有非常显著的差异）。图 4 横坐标上的“0 %、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %” 分别表示表面修饰有 0 %、1 %、2 %、3 %、4 %、5 % 比例的穿膜肽的脂质体药物制剂，即 89W-CLS/R8/siRNA。

由图 4 可见，⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE 摩尔数占总的脂质体膜材料摩尔数的 2 %、3 %、4 % 时，细胞对表面修饰有所述比例穿膜肽的药物制剂的摄取效果优于市售的基因转染试剂 Lipo2000。

实施例 8

定量评价细胞对使用不同配比的脂质体膜材料制备的药物制剂的摄取：

将 U87 细胞（人恶性胶质母细胞瘤细胞，购自 ATCC）培养于 DMEM

完全培养基(添加 10% FBS 和 1%青霉素-链霉素)中。取生长状态良好的 U87 细胞重悬于 DMEM 完全培养基中,按 5×10^5 个细胞/孔接种到 6 孔板中,每孔 1 mL,接种后每天更换新鲜培养液一次,培养 2~3 天后进行实验。

按照实施例 6 所述方法制备脂质体膜材料配比如表 2 所示的脂质体药物制剂(包载 FAM 标记的 siRNA)。

表 2. 脂质体膜材料的不同配比(以摩尔份数表示, %)

名称	作为组分 (i)的 DOTAP	作为组分 (ii)的 DOPE	作为组分 (iii)的胆 固醇	作为组分(iv)的 40 % mPEG ₂₀₀₀ -DSPE 和 60 % ⁸⁹ W Penetratin-PEG ₃₄₀₀ -DSPE
配方 1	31.6	31.6	31.6	5
配方 2	28.5	28.5	38	5
配方 3	28.5	38	28.5	5

将培养的 U87 细胞弃去培养液后,无菌 PBS 洗三次。每孔分别加入含有配方 1、配方 2、配方 3 制备的脂质体药物制剂的 1ml 无血清 DMEM 培养基中,37℃、5 % CO₂ 条件下孵育 4 h。孵育结束后弃去培养液,用含 0.02 mg/mL 肝素钠的 PBS 缓冲溶液洗去吸附在孔上或细胞表面的正电性物质。用胰酶将细胞消化下来,重悬于 200 μ L 无菌 PBS 缓冲溶液中,吹打均匀后对每个样品计数细胞,取 10^4 个细胞进行流式细胞术检测。使用无血清 DMEM 培养基孵育的细胞作为阴性对照组。所有实验均一式三份实施,结果如图 5 所示(平均值 $\pm$ SD, n = 3, * p < 0.05, *表示两组之间在统计学上有显著性差异; ** p < 0.01, *** p < 0.001, **和***表示两组之间在统计学上有非常显著的差异)。

由图 5 可见,使用配方 1、配方 2、配方 3 制备的脂质体药物制剂均能够被细胞摄取,与对照组比较存在显著性差异,并且其中细胞对使用配方 2 制备的脂质体药物制剂的摄取效果最佳。

实施例 9

使用组分(iv)不同配比的脂质体膜材料制备的药物制剂的粒径:

按照实施例 6 所述方法, 在脂质体膜材料的组分(i): 组分(ii): 组分(iii)的摩尔比为 3: 3: 4 时, 制备组分(iv)的配比如表 3 所示的脂质体药物制剂(包载 FAM 标记的 siRNA)。

表 3. 组分(iv)的不同配比(以摩尔份数表示, %)

名称	作为组分(i)的 DOTAP	作为组分(ii)的 DOPE	作为组分(iii)的胆 固醇	作为组分(iv)的 40 % mPEG ₂₀₀₀ -DSPE 和 60 % ⁸⁹ W Penetratin-PEG ₃₄₀₀ -DSPE
配方 4	29.7	29.7	39.6	1
配方 2	28.5	28.5	38	5
配方 5	27.6	27.6	36.8	8
配方 6	27	27	36	10

获得了组分(iv)占脂质体膜材料的 1%、5%、8%、10% 摩尔份数的脂质体药物制剂。对所述脂质体药物制剂进行粒径测定。粒径测定结果如图 6 所示。图 6 横坐标上的“1%、5%、8%、10%”分别表示组分(iv)占脂质体膜材料的 1%、5%、8%、10% 摩尔份数的脂质体药物制剂。

由图 6 可见, 当组分(iv)占脂质体膜材料的 1% - 10% 摩尔份数时, 脂质体药物制剂的粒径在 100nm - 200nm 之间; 且随着组分(iv)占脂质体膜材料的摩尔份数的提高, 粒径呈现增大的趋势。

实施例 10

定量评价细胞对使用阳离子脂质体 / siRNA 的不同电荷比制备的药物制剂的摄取:

将 U87 细胞(人恶性胶质母细胞瘤细胞, 购自 ATCC)培养于 DMEM 完全培养基(添加 10% FBS 和 1%青霉素-链霉素)中。取生长状态良好的 U87 细胞重悬于 DMEM 完全培养基中, 按 5×10^5 个细胞/孔接种到 6 孔板中, 每孔 1 mL, 接种后每天更换新鲜培养液一次, 培养 2~3 天后进行实验。

按照实施例 6 所述方法, 将寡聚精氨酸 R8 溶液与 20 μ M 的 FAM-siRNA 溶液按照电荷比为 5 的比例等体积混合, 涡旋 30 s, 置于 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 30 分钟得到复合物 R8/FAM-siRNA。取 8 μ L R8/ FAM-siRNA 复合物, 与制备的阳离子脂质体 CLS 按照脂质体与 FAM-siRNA 的电荷比为 2、4、6、8、10、12 的比例混合, 涡旋 30s, 获得阳离子脂质体 / siRNA 的不同电荷比的 CLS/R8/FAM-siRNA 复合物。

进一步地, 按照实施例 6 所述方法, 获得表面修饰有 3% 穿膜肽的脂质体药物制剂, 即 89W-CLS/R8/FAM-siRNA 复合物。

将培养的 U87 细胞弃去培养液后, 无菌 PBS 洗三次。每孔分别加入含有阳离子脂质体 / siRNA 的电荷比为 2、4、6、8、10、12 的药物制剂的 1ml 无血清 DMEM 培养基, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下孵育 4 h。孵育结束后弃去培养液, 用含 0.02 mg/mL 肝素钠的 PBS 缓冲溶液洗去吸附在孔上或细胞表面的正电性物质。用胰酶将细胞消化下来, 重悬于 200 μ L 无菌 PBS 缓冲溶液中, 吹打均匀后对每个样品计数细胞, 取 10⁴ 个细胞进行流式细胞术检测。使用无血清 DMEM 培养基孵育的细胞作为阴性对照组。所有实验均一式三份实施, 结果如图 2 所示 (平均值 $\pm$ SD, n = 3, * p < 0.05, * 表示两组之间在统计学上有显著性差异; ** p < 0.01, *** p < 0.001, ** 和 *** 表示两组之间在统计学上有非常显著的差异)。

由图 2 可见, 使用阳离子脂质体 / siRNA 的电荷比为 2、4、6、8、10、12 制备的药物制剂均能够被细胞摄取, 与对照组比较存在显著性差异, 并且其中细胞对使用阳离子脂质体 / siRNA 的电荷比为 4 时制备的脂质体药物制剂的摄取效果最佳。

实施例 11

表面修饰有不同比例穿膜肽的药物制剂对细胞的转染效果评价:

首先, 使用 35mm Dimple NanoCulture Dish 培养细胞, 观察细胞的成球能力和形态, 建立细胞球模型。

具体而言，取 1.5 mL 的 DMEM 完全培养基加入 35mm Dimple NanoCulture Dish（JSR Corporation 提供的细胞球培养板）中，然后将 Dish 放置在冷冻离心机内离心（Dish 里只有培养基，没有细胞），离心速度为 $1000\times g$ ，离心时间为 5 分钟。离心结束后，将 Dish 放在超净台上静置 30 分钟。

取生长状态良好的各种细胞，消化离心后，加入培养基调整细胞浓度为 5×10^5 个/mL，用移液枪吹打使细胞分散均匀，缓慢小心向 Dish 中加入 1.5 mL 细胞悬液，然后放操作台上静置 20 分钟，放到 37℃ 的孵箱内培育。隔天换液，取出 Dish，小心吸出 1.5 mL 的培养基（悬浮细胞与贴壁细胞的操作相同，因为换液时细胞已经初步形成细胞球，沉在 Dish 的底部），加入新鲜的 1.5 mL DMEM 完全培养基。在倒置显微镜下观察相应细胞球的形态，其中 A549 细胞是人非小细胞肺癌细胞，Caco-2 是人克隆结肠腺癌细胞，Rb-1 是人视网膜神经胶质瘤细胞，U87 是人恶性胶质母细胞瘤细胞，293T 是人肾上皮细胞，所述细胞均购自 ATCC。A549 和 Caco-2 是贴壁细胞，且贴壁性较强，而 U87 和 293T 贴壁性较弱的贴壁细胞，Rb-1 则是悬浮细胞。结果如图 7 所示。在图 7 中，样品 1 和样品 2 分别是同一种细胞的不同放大倍数，且样品 3 和样品 4 是样品 2 的重复实验孔。

由图 7 可见，A549 和 Caco-2 由于贴壁性较好，容易贴在壁上生长不易成球，Rb-1 虽然是悬浮细胞，但细胞容易聚集成球，且处理过程中非常容易松散。相比较而言，U87 和 293T 的成球能力最好，形态大致为球型，且大小均一，适合作为建立的细胞球模型进一步的探索。

由图 8 的结果可见，不同多肽对细胞球的渗透能力有显著差异，而且利用 35mm Dimple NanoCulture Dish 建立的细胞球模型能够对不同多肽的渗透能力进行区分。注：图 8 中的“S8”为 8 聚丝氨酸，作为阴性对照；“PE”为野生型 Penetratin；89W 为对 penetratin 第 8 位谷氨酰胺和第 9 位天冬酰胺进行了色氨酸突变的产物；289W 为对 penetratin 第 2 位谷氨酰胺、第 8 位谷氨酰胺和第 9 位天冬酰胺进行了色氨酸突变的产物。野生型 Penetratin 的衍生物对细胞球的渗透能力显著提高。

接下来,使用 293T 细胞球来评估包载有 GFP-siRNA 的表面修饰有不同比例穿膜肽的药物制剂对细胞的转染效果。

与上述实施例 6 类似地,制备表面修饰有不同比例穿膜肽的 GFP-siRNA 脂质体药物制剂,其中使用的 GFP-siRNA 有义链(5'-3')为 GCAUGUACCACGAGUCCAATT (SEQ ID NO: 81);反义链(5'-3')为 UUGGACUCGUGGUACAUGCTT (SEQ ID NO: 82)。具体而言,将寡聚精氨酸 R8 溶液与 20 μ M 的 GFP-siRNA 溶液按照电荷比为 5 的比例等体积混合,涡旋 30 s,置于 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 30 分钟得到复合物 R8/GFP-siRNA。取 8 μ L R8/GFP-siRNA 复合物,与制备的阳离子脂质体 CLS 按照脂质体与 FAM-siRNA 的电荷比为 4 的比例混合,涡旋 30s,获得 CLS/R8/GFP-siRNA 复合物。

进一步地,按照实施例 6 所述方法,获得表面修饰有 1%、3%、5% 穿膜肽的脂质体药物制剂,即 89W-CLS/R8/GFP-siRNA 复合物。

向 293T 细胞球模型中加入包载有 400nM GFP-siRNA 的脂质体药物制剂的无血清 DMEM 溶液,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下孵育 4 h,然后弃去药液,加入新鲜的 DMEM 完全培养基继续孵育 24 小时,用 PBS 缓冲溶液洗 3 次,在激光共聚焦显微镜下观察 GFP 荧光情况(文中也称为 GFP-293T 细胞球)。使用无血清 DMEM 培养基孵育的细胞作为阴性对照组。所有实验均一式三份实施,结果如图 9 所示(平均值 $\pm$ SD, n = 3, * p < 0.05, *表示两组之间在统计学上有显著性差异; ** p < 0.01, *** p < 0.001, **和***表示两组之间在统计学上有非常显著的差异)。

类似地,进行了包载有 400nM GFP-siRNA 的脂质体药物制剂对 U87 细胞球的转染效果评价(文中也称为 GFP- U87 细胞球)。结果如图 10 所示。

图 9 和图 10 中的“1%、3%、5%”分别表示表面修饰有 1%、3%、5% 比例的穿膜肽的脂质体药物制剂,即 89W-CLS/R8/ siRNA。

图 9 中,使用 35mm Dimple NanoCulture Dish 建立 GFP-293T 细胞球,293T 细胞不是肿瘤细胞,⁸⁹W Penetratin -PEG-DSPE 在脂质体膜材料中所占摩

尔比例越高,脂质体药物对细胞球的渗透程度越高。图 10 中,使用 35mm Dimple NanoCulture Dish 建立 GFP-U87 细胞球,U87 细胞是脑胶质瘤细胞,⁸⁹W Penetratin -PEG-DSPE 在脂质体膜材料中所占摩尔比例达到 3% - 5% 时,脂质体药物对细胞球具有较高的渗透能力。

实施例 12

包含不同结构类型带正电的多聚氨基酸的药物制剂对 LUC-U87 细胞的转染效果的定性和定量评价:

选用 R8、R10、R12、c-R8、c-R10 和 c-R12 等寡聚精氨酸作为不同结构类型带正电的多聚氨基酸,以所述寡聚精氨酸分别与 siRNA 的电荷比为 5,CLS 与 LUC-siRNA 的电荷比为 4,按照实施例 6 制备含有不同寡聚精氨酸的表面修饰有 3% 比例穿膜肽的脂质体药物制剂,其中使用的 LUC-siRNA 有义链 (5'-3') 为 GCUGCACUCUGGCGACAUUTT (SEQ ID NO: 83); 反义链 (5'-3') 为 AAUGUCGCCAGAGUGCAGCTT (SEQ ID NO: 84)。

取生长状态良好的 U87 细胞 (购自 ATCC) 按 5×10^4 个细胞/孔分别接种到 48 孔板中,接种后每天换液一次,培养 2~3 天后进行实验。弃去 DMEM 完全培养基后,无菌 PBS 洗三次,分别加入包载 400 nM LUC-siRNA 的脂质体药物制剂的无血清 DMEM 培养基,37℃、5% CO₂ 条件下孵育 4 h,然后弃去药液,加入 DMEM 完全培养基继续孵育 24 小时 (文中也称为 LUC-U87 细胞),用含 0.02 mg/mL 肝素钠的 PBS 缓冲溶液洗去正电性吸附物质,加入萤火虫萤光光素酶底物,在小动物活体荧光/生物发光成像系统 (IVIS Spectrum) 内测定荧光强度。利用小动物活体光学成像系统的目的区域 (Region of interest, ROI) 定量圈选功能进行定性分析。结果见图 11 所示。

此实施例是为了探究不同结构类型带正电的多聚氨基酸的基因沉默效果,由图 11 可以发现,改变脂质体药物制剂中的寡聚精氨酸的聚合度和结构对基因的沉默作用没有显著影响。

实施例 13

包载 siRNA 的递送载体对 bEnd.3 细胞和 U87 细胞的促凋亡能力评价：

取 DMEM 培养基中对数期生长状态良好的 bEnd.3 细胞和 U87 细胞（均购自 ATCC）按 5×10^4 /孔的浓度分别铺于 12 孔板中，在 37℃、5% CO₂ 条件下培养至细胞单层铺满板底。

弃去培养液，无菌 PBS 缓冲液洗 3 次后，加入 400 μL 含 400 nmol/L siRNA 的实施例 6 制备的脂质体制剂（89W-CLS/R8/siRNA），即，寡聚精氨酸与 siRNA 的电荷比为 5，CLS 与 siRNA 的电荷比为 4，表面修饰有 3% 比例 ⁸⁹W-Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE 的脂质体药物制剂，细胞培养箱中孵育 6 h 后，弃去药液，无菌 PBS 缓冲液洗 3 次后，加入完全培养基 1 mL 继续培养 18 h，之后收集细胞，先用 PBS 清洗，无 EDTA 的胰酶消化 1 分钟，DMEM 培养液终止消化后收集细胞至离心管中，按照细胞凋亡检测试剂盒（南京凯基生物科技发展有限公司，KGA108）的步骤对细胞进行双染，然后用流式细胞分析仪检测。使用无血清 DMEM 培养基孵育的细胞作为阴性对照组。所有实验均一式三份实施，结果如图 14 中的小图 A 和 B 所示（平均值 ± SD，n = 3，* p < 0.05，* 表示两组之间在统计学上有显著性差异；** p < 0.01，*** p < 0.001，** 和 *** 表示两组之间在统计学上有非常显著的差异）。

结果表明，本发明设计的递送载体能够特异性促进肿瘤细胞 U87 的凋亡，而对正常细胞 bEnd.3 细胞的生长没有较大的影响。

实施例 14

包载 siRNA 的递送载体对 bEnd.3 细胞和 U87 细胞的细胞毒性评价：

取对数期生长状态良好的 bEnd.3（购自 ATCC）和 U87 细胞，用 DMEM 完全培养基培养，按 5×10^3 个细胞/cm² 浓度分别铺于 96 孔平底板的中间 60 孔中，边缘孔用无菌 PBS 缓冲溶液填充，在 37℃、5% CO₂ 条件下培养至细胞单层铺满板底，弃去培养液，无菌 PBS 缓冲液洗 3 次后，加入 200 μL 含 400 nM siRNA 的递送载体的培养液，细胞培养箱中孵育 6 h 后，弃去药液，

无菌 PBS 缓冲液洗 3 次后, 加入完全培养基继续培养 12 h。之后每孔加入 20 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL), 继续培养 4 h 后, 小心弃去液体, PBS 缓冲液洗三次后每孔加入 150 μ L DMSO, 在摇床上低速振荡 (50 转/分钟) 20 分钟后, 于酶标仪 (BioTek, PowerWave XS) OD 490 nm 处测定各孔吸光度值。同时设置空白调零孔 (孔中仅添加 DMEM 完全培养基、MTT 和 DMSO) 和阴性对照孔 (孔中仅添加细胞、DMEM 完全培养基、MTT 和 DMSO)。所有实验均一式三份实施, 结果如图 14 中的小图 C 和 D 所示 (平均值 $\pm$ SD, $n=3$, * $p<0.05$, *表示两组之间在统计学上有显著性差异; ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **和***表示两组之间在统计学上有非常显著的差异)。

结果表明, 相比商品化的阳离子基因递送载体 Lipofectamine 2000 (Lipo2000, Invitrogen), 本发明设计的递送载体对 bEnd.3 细胞和 U87 细胞生长状态影响较小, 在所考察的浓度条件下未见细胞毒性。

实施例 15

DiD 细胞膜荧光探针标记的基因递送载体经鼻给药后的体内分布情况:

首先制备了亲脂性荧光染料 DiD 标记的脂质体, 用于对脂质体进行示踪。DiD 细胞膜红色荧光探针购自大连美仑生物技术有限公司, MB6190。如实施例 1 所述类似地, 称取膜材, 按试剂盒说明书所述加入 DiD 染料, 一同溶解在氯仿中, 制备 DiD 标记的 CLS/R8/siRNA。另外, 如实施例 6 所述类似地, 制备寡聚精氨酸与 siRNA 的电荷比为 5, CLS 与 siRNA 的电荷比为 4, 表面修饰有 3% 比例 ^{89}W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE 的 DiD 标记的脂质体药物制剂 89W-CLS/R8/siRNA。

将 12 只 ICR 小鼠 (20g, 雄性, 6 周龄) 分为 3 个组 (89W-CLS/R8/siRNA 组、CLS/R8/siRNA 组和生理盐水 (N.S.) 组), 每只小鼠以鼻腔给药的方式给予 DiD 标记的核酸递送载体 30 μ L 左右 (DiD 浓度为 0.01 μ M), 2.5 h 后将动物安乐死, 经灌流、固定后, 收集动物的主要脏器, 使用小动物活体成像系统检测各脏器荧光分布。结果如图 15 所示。

结果表明, 相比 CLS/R8/siRNA 组, 89W-CLS/R8/siRNA 组在脑部的荧光强度更大, 穿膜肽的修饰能够显著增强递送载体的组织穿透能力, 进而增强其入脑能力, 提高基因在脑部的蓄积量。

实施例 16

探究 DiD 细胞膜荧光探针标记的载体递送 FAM-siRNA 的入胞机制:

如实施例 1 所述类似地, 称取膜材, 按试剂盒说明书所述加入 DiD 细胞膜荧光探针 (大连美仑生物技术有限公司, MB6190), 制备 DiD 细胞膜荧光探针标记的 CLS, 即 CLS/DiD。按照实施例 6 所述方法类似地, 制备 DiD 和 / 或 FAM 荧光标记的各药物制剂。

将 U87 细胞 (购自 ATCC) 培养于 DMEM 完全培养基 (添加 10% FBS 和 1% 青-链霉素) 中。取生长状态良好的 U87 细胞重悬于 DMEM 完全培养基中, 按 5×10^5 个细胞/孔接种到 6 孔板中, 每孔 1 mL, 接种后每天更换新鲜培养液一次, 培养 2~3 天后进行实验。

将培养的 U87 细胞弃去培养液后, 无菌 PBS 洗三次。每孔分别加入含有 1 μ M siRNA 的不同荧光标记的药物制剂的 1 mL 无血清 DMEM 培养基, 37°C、5 % CO₂ 条件下孵育 4 h。孵育结束后弃去培养液, 用含 0.02 mg/mL 肝素钠的 PBS 缓冲溶液洗去吸附在孔上或细胞表面的正电性物质。用胰酶将细胞消化下来, 重悬于 200 μ L 无菌 PBS 缓冲溶液中, 吹打均匀后对每个样品计数细胞, 取 10^4 个细胞进行流式细胞术检测。实验中设置与空白的无血清 DMEM 培养基孵育的细胞作为阴性对照组; 另外, 设置了两组阳性对照组, 分别为只含有 FAM 的 89W-CLS/R8/FAM-siRNA, 以及只含有 DiD 的 89W-CLS/DiD/R8/siRNA; 还设置了如下制剂组: R8/FAM-siRNA 组、CLS/DiD 组、CLS/DiD/R8/FAM-siRNA 组、89W-CLS/DiD/R8/FAM-siRNA 组。所有实验均一式三份进行。结果如图 16 所示。

由图 16 中的小图 D 可见, 单独的 R8 压缩 siRNA 形成的药物制剂入胞量很少, 然而 CLS 和 R8 共同压缩 siRNA 形成的药物制剂能够成功入胞 (见

小图 F)，且 89W 修饰的 CLS 和 R8 共同压缩 siRNA 形成的药物制剂能够显著提高细胞对基因载体的摄取量（见小图 G）。通过图 16 的小图 B 和 C 以及小图 G 可见，细胞对 89W-CLS/R8/FAM-siRNA 药物制剂的摄取呈现 DiD 和 FAM 双荧光阳性结果，由此可以推测 CLS 和 siRNA 是以复合物的形式共同入胞的，并非以游离的形式被摄取。

实施例 17

DiD 细胞膜荧光探针标记的基因递送载体在 U87 原位脑瘤模型鼠中经鼻给药后的体内分布情况：

首先制备亲脂性荧光染料 DiD 标记的脂质体，用于对脂质体进行示踪。DiD 细胞膜红色荧光探针购自大连美仑生物技术有限公司，MB6190。如实施例 15 所述类似地，称取膜材，按试剂盒说明书所述加入 DiD 染料，一同溶解在氯仿中，制备 DiD 标记的 CLS/R8/siRNA。另外，如实施例 6 所述，制备寡聚精氨酸与 siRNA 的电荷比为 5，CLS 与 siRNA 的电荷比为 4，表面修饰有 3 %比例 ^{89}W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE 的 DiD 标记的脂质体药物制剂 89W-CLS/R8/siRNA。

取对数生长期的 U87 细胞，计数，用 PBS 缓冲液重悬细胞。每只 BALB/c 裸鼠（上海西普尔-必凯试验动物有限公司，中国）接种 6×10^5 个 U87 细胞（分散于 5 μL PBS 缓冲液中）。将裸鼠用 7 %水合氯醛麻醉，脑立体定位仪固定，采用微量注射器将细胞接种于纹状体部位（前囟向前 0.6 mm，向右 1.8 mm，纵深 3 mm），构建 U87 原位脑瘤模型。

将 9 只接种 U87 肿瘤细胞 18 天的荷 U87 脑原位瘤小鼠随机分为 3 组（89W-CLS/R8/siRNA 组、CLS/R8/siRNA 组和生理盐水组），每只小鼠以鼻腔给药的方式给予 DiD 标记的核酸递送载体 30 μL （DiD 浓度为 0.01 μM ），2.5 h 后将动物安乐死，经灌流、固定后，收集动物的脑部组织及肿瘤，进行冷冻切片处理，并在荧光显微镜（德国 Leica）上观察 DiD 荧光信号的分布，结果如图 17 所示，标尺=100 μm 。

结果表明,相比 CLS/R8/siRNA 组,89W-CLS/R8/siRNA 组在肿瘤部位的荧光强度更高,穿膜肽的修饰能够显著增强递送载体的组织穿透能力,进而增强其入脑能力,提高基因在肿瘤部位的蓄积量。

实施例 18

包载 siRNA 的递送载体的抗 U87 脑原位瘤的药效学评价:

按照实施例 6 所述方法,制备脂质体药物制剂,即 CLS/R8/siRNA 和 89W-CLS/R8/siRNA 复合物,按照商品化的阳离子基因递送载体 Lipofectamine 2000 (Lipo2000, Invitrogen) 说明书制备 Lipo2000/siRNA 复合物。

按照实施例 17 所述方法构建 U87 原位脑瘤模型,U87 脑原位瘤接种后将小鼠随机分为 5 组($n=10$):生理盐水组、siRNA 组、Lipo2000/siRNA 组、CLS/R8/siRNA 组和 89W-CLS/R8/siRNA 组。接种 U87 肿瘤细胞后第 5 天开始鼻腔给药($47 \mu\text{g/kg}$ siRNA),每天给药一次,共给药 22 次,记录小鼠体重及生存期,绘制体重变化曲线及生存曲线,结果如图 18 所示(* $p < 0.05$, *表示两组之间在统计学上有显著性差异; ** $p < 0.01$, **表示两组之间在统计学上有非常显著的差异)。

结果表明,生理盐水组、siRNA 组、Lipo2000/siRNA 组、CLS/R8/siRNA 组的中位生存期分别为 23.5 天、21.5 天、24.5 天和 26 天,89WP-CLS/R8/siRNA 组则成功将中位生存时间延长到 29 天,并且生存曲线与其他各组均没有交叉,实现了最显著的抗脑胶质瘤效果,这些数据证实了 89WP-CLS/R8/siRNA 能够将药物递送至脑部肿瘤,发挥抗肿瘤效果,其独特递送优势可以转化为更高的治疗功效。

实施例 19

包载 siRNA 的递送载体在 U87 原位脑瘤模型鼠中的体内促凋亡能力评价:

按照实施例 18 所述方法制备脂质体药物制剂,构建 U87 原位脑瘤模型,并进行鼻腔给药。最后一次给药后 2 天(第 28 天),随机选择每组 3 只小鼠并对其实施安乐死,取脑部肿瘤进行免疫荧光组化分析。用 4 %多聚甲醛固定肿瘤,包埋在石蜡中并切成薄片。通过 TUNEL 染色检测凋亡细胞,通过 CaseViewer 软件分析肿瘤部位的 TUNEL 荧光强度,结果如图 19 所示,标尺=20 μm 。

结果表明,在 TUNEL 染色切片中,绿色荧光的强度表示发生凋亡的肿瘤细胞的数量,Lipo2000/siRNA 组,CLS/R8/siRNA 组和 89WP-CLS/R8/siRNA 组均能引起肿瘤细胞发生凋亡,其中,89WP-CLS/R8/siRNA 组的荧光强度最高,即细胞凋亡比例最高,表明本发明设计的递送载体能够在体内通过诱发肿瘤细胞的凋亡发挥抗肿瘤效果。

实施例 20

包载 siRNA 的递送载体的体内鼻粘膜毒性评价:

将 18 只 SD 大鼠(上海灵畅生物科技有限公司,中国)随机分为 6 组($n=3$),生理盐水组(阴性对照),1% 脱氧胆酸钠组(阳性对照),siRNA 组,CLS/R8/siRNA 组,89WP-CLS/R8/siRNA 组和 Lipo2000/siRNA 组。按照实施例 6 所述方法,制备脂质体药物制剂,即 CLS/R8/siRNA 和 89W-CLS/R8/siRNA 复合物,按照商品化的阳离子基因递送载体 Lipofectamine 2000 (Lipo2000, Invitrogen)说明书制备 Lipo2000/siRNA 复合物。连续 7 天向 SD 大鼠左侧鼻腔进行鼻腔给药 50 μL 制剂(包含或不包含 160 nM siRNA),最后一次给药后 24 h,处死大鼠,分离左鼻腔鼻粘膜并用生理盐水洗涤。样品用 4 %多聚甲醛固定,并切片以进行苏木精-伊红(HE)染色,结果如图 20 所示,标尺=50 μm 。

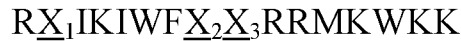
结果表明,阳性对照组(脱氧胆酸钠组和 Lipo2000/siRNA 组)的鼻粘膜上皮细胞出现较为明显的形态变化,并伴有鼻纤毛脱落(红色箭头),但是在生理盐水组,siRNA 组,CLS/R8/siRNA 组和 89WP-CLS/R8/siRNA 组中,

鼻粘膜上皮细胞形态完整且排列整齐，表明本发明设计的递送载体对鼻粘膜上皮细胞没有明显的毒性，可以认为是经鼻入脑递送的安全载体。

尽管已经出于说明本发明的目的显示了某些代表性实施方案和细节，但是本领域技术人员显而易见的是可以对它们进行多种变化和修改而不脱离主题发明的范围。在这个方面，本发明范围仅由以下权利要求限定。

权 利 要 求

1. 一种药物制剂，其是使用药物递送载体制备的药物制剂，其中所述药物递送载体包含穿膜肽修饰的脂质体和聚合物，其中所述聚合物是带正电的多聚氨基酸，其中所述穿膜肽是具有下述氨基酸序列的 penetratin 或 penetratin 的衍生物：



其中，X₁、X₂和X₃独立地选自天然来源的氨基酸谷氨酰胺（Q）、天冬酰胺（N）、丙氨酸（A）、缬氨酸（V）、亮氨酸（L）、异亮氨酸（I）、脯氨酸（P）、苯丙氨酸（F）、色氨酸（W）、甲硫氨酸（M）和非天然来源的氨基酸 α-氨基丁酸、α-氨基戊酸、α-氨基己酸、α-氨基庚酸，例如，X₁、X₂和X₃独立地选自疏水性氨基酸；

所述药物制剂是通过将药物递送载体中包含的带正电的多聚氨基酸和药物分子混合形成聚合物-药物的物理复合物，并将所述物理复合物与所述穿膜肽修饰的脂质体混合形成的包含聚合物-药物的物理复合物的脂质体复合物，其粒径介于 50 nm 至 300 nm 之间，优选地 80 nm 至 150 nm 之间。

2. 根据权利要求 1 所述的药物制剂，其中药物分子选自肽类药物(例如奥曲肽(octreotide))、抗体(例如，依那西普(etanercept)、阿达木单抗(adalimumab)、利妥昔单抗(rituximab)、派姆单抗(pembrolizumab)、兰尼单抗(ranibizumab)和纳武单抗(nivolumab))、细胞因子、激素、抗生素(例如，化疗药阿霉素(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、表阿霉素(epirubicin)、放线菌素(actinomycin)和万古霉素(vancomycin))、核酸、以及它们的组合等，例如，所述药物分子是选自质粒 DNA、RNA 如小干扰 RNA (siRNA)、有义 RNA、反义寡核苷酸(ASO)、适配体(aptamers)、核酶等的核酸，例如，所述药物分子是针对脑部疾病例如脑部肿瘤(例如，脑胶质瘤)的药物分子，如，针对 c-myc 的 siRNA。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的药物制剂，所述药物制剂中药物分子(例

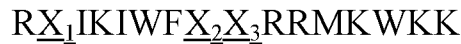
如，化疗药）与阳离子脂质（例如，DOTAP）的摩尔比为约 0.1-10，例如，约 0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10，优选约 0.1-5，进一步优选约 0.1-2；或者，所述药物制剂对药物分子（例如，化疗药）的载药量为：药物分子（例如，化疗药）占药物制剂的约 1%-30% (w/w)，例如，约 1%、2.5%、5%、7.5%、10%、12.5%、15%、17.5%、20%、22.5%、25%、27.5%、30% (w/w)，优选约 1%-25% (w/w)，进一步优选约 3%-20% (w/w)；或者，所述药物制剂中带正电的多聚氨基酸（例如，寡聚精氨酸）和药物分子的电荷比介于 1:1 至 30:1，例如，1:1、5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1；且阳离子脂质体与药物分子的电荷比介于 1:1 至 30:1，例如，2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、8:1、10:1、12:1。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的药物制剂，其中阳离子脂质体包含如下膜材料：(i) DOTAP；(ii) DOPE；(iii) 胆固醇；(iv) mPEG₂₀₀₀-DSPE 和 ⁸⁹W Penetratin-PEG₃₄₀₀-DSPE，且膜材料(i) : (ii) : (iii) : (iv)的摩尔比为约 20 - 40: 20 - 40: 20 - 40: 1 - 20，且 ⁸⁹W Penetratin -PEG₃₄₀₀-DSPE 占膜材料(iv)中的约 20% - 80% 摩尔比；例如，所述膜材料(i) : (ii) : (iii) : (iv)的摩尔比为约 27.0 - 31.6: 27.0 - 31.6: 31.6 - 39.6: 1 - 10，且 ⁸⁹W Penetratin -PEG₃₄₀₀-DSPE 占膜材料(iv)中的约 20% - 80% 摩尔比；例如为约 28.5: 28.5: 38: 5，⁸⁹W Penetratin -PEG₃₄₀₀-DSPE 占膜材料(iv)中的约 20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80% 摩尔比；带正电的多聚氨基酸（例如寡聚精氨酸）和药物分子（例如，核酸，如 siRNA）的电荷比介于 1:1 至 30:1，例如，1:1、5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1；且阳离子脂质体与药物分子的电荷比介于 1:1 至 30:1，例如，2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、8:1、10:1、12:1。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的药物制剂，其为经鼻腔施用的药物制剂，例如，其为经鼻腔施用的核酸脂质体制剂（例如，siRNA 脂质体制剂），优选地，用于治疗脑部疾病，例如脑部肿瘤（例如，脑胶质瘤）。

6. 一种药物递送载体，其包含穿膜肽修饰的脂质体和聚合物，其中所述

聚合物是带正电的多聚氨基酸,所述聚合物用于与药物混合形成聚合物-药物的复合物,所述穿膜肽修饰的脂质体用于与聚合物-药物的复合物混合形成包含聚合物-药物的复合物的脂质体复合物,其中所述穿膜肽是具有下述氨基酸序列的 penetratin 或 penetratin 的衍生物:



其中, X_1 、 X_2 和 X_3 独立地选自天然来源的氨基酸谷氨酰胺 (glutamine, Q)、天冬酰胺 (asparagine, N)、丙氨酸 (alanine, A)、缬氨酸 (valine, V)、亮氨酸 (leucine, L)、异亮氨酸 (isoleucine, I)、脯氨酸 (proline, P)、苯丙氨酸 (phenylalanine, F)、色氨酸 (tryptophan, W)、甲硫氨酸 (methionine, M) 和非天然来源的氨基酸 α -氨基丁酸 (α -aminobutyric acid)、 α -氨基戊酸 (α -aminopentanoic acid)、 α -氨基己酸 (α -aminohexanoic acid)、 α -氨基庚酸 (α -aminoheptanoic acid), 例如, X_1 、 X_2 和 X_3 独立地选自疏水性氨基酸。

7. 根据权利要求 6 所述的药物递送载体,其特征在于,所述穿膜肽是 penetratin 的具有下述氨基酸序列的亲脂性衍生物:RWIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 24), RQIKIWFWNRRMKWKK (SEQ ID NO: 25), RQIKIWFQWRRMKWKK (SEQ ID NO: 26), RWIKIWFWNRRMKWKK (SEQ ID NO: 27), RWIKIWFQWRRMKWKK (SEQ ID NO: 28), RQIKIWFWWRRMKWKK (SEQ ID NO: 29), RWIKIWFWWRRMKWKK (SEQ ID NO: 30)。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的药物递送载体,其中所述带正电的多聚氨基酸是例如聚合度为 2-50 的带正电的多聚氨基酸,所述带正电的多聚氨基酸的空间结构包括线性和环形,氨基酸残基的构型包括 L 型和 D 型;例如聚合度为 6-12 的精氨酸和 / 或赖氨酸,任选地间插有 1-20 个 (例如 1-6 个) 生理条件下不带电荷的氨基酸残基,优选地,所述带正电的多聚氨基酸是聚合度为 6-12 的多聚精氨酸,其中所述多聚精氨酸的空间结构包括线性和环形,多聚精氨酸的构型包括 L 型和 D 型。

9. 根据权利要求 6-8 中任一项所述的药物递送载体, 其中所述穿膜肽修饰的脂质体包含如下膜材料:

(i) 阳离子脂质, 例如但不限于: 1,2-二-O-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA); 二甲基双十八烷基铵(DDAB); 1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP); 1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP); 1,2-二酰氧基-3-二甲基铵丙烷; 1,2-二烷氧基-3-二甲基铵丙烷; 双十八烷基二甲基氯化铵(DODAC); 1,2-二肉豆蔻酰氧基丙基-1,3-二甲基羟乙基铵(DMRIE)和 2,3-二油酰氧基-N-[2(精胺甲酰胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙烷三氟乙酸铵(DOSPA)和它们的任意组合; 优选地为 DOTMA、DOTAP、DODAC 和 DOSPA; 最优选地为 DOTAP;

(ii) 非阳离子脂质, 例如但不限于: 1,2-二-(9Z-十八酰基)-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DPPE)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DMPE)、2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸-(1'-rac-甘油)(DOPG)及其组合; 优选地为 DOPE 和/或 DOPC; 最优选地为 DOPE;

(iii) 胆固醇;

(iv) 聚乙二醇化(PEG 化)的磷脂和与穿膜肽共轭的聚乙二醇磷脂, 所述磷脂例如是磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇和鞘磷脂, 所述聚乙二醇(PEG)是长度高达 10kDa 的聚乙二醇链, 例如, 1kDa、2kDa、3kDa、4kDa、5kDa、6kDa、7kDa、8kDa、9kDa、10kDa、以及它们之间的任何值的聚乙二醇链; 优选地, 所述 PEG 化磷脂是聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(PEG-DSPE)和其衍生物甲氧基-聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(mPEG-DSPE)), 所述与穿膜肽共轭的聚乙二醇磷脂是例如 Penetratin/Penetratin 衍生物-PEG-DSPE; 且所述 PEG 化磷脂和与穿膜肽共轭的聚乙二醇磷脂中的聚乙二醇链长不相等, 其中与穿膜肽共轭的聚乙二醇磷脂中的聚乙二醇链较 PEG 化磷脂中的聚乙二醇链更长, 例如, 更长 0.5kDa - 5kDa 之间, 优选地更长 0.75kDa - 4kDa 之间, 更优选地更长 1kDa - 2kDa

之间的任何值。

10. 根据权利要求9所述的药物递送载体,其中所述膜材料(i):(ii):(iii):(iv)的摩尔比为约20-40:20-40:20-40:1-20,且与穿膜肽共轭的聚乙二醇磷脂占膜材料(iv)中的约20%-80%摩尔比;例如,所述膜材料(i):(ii):(iii):(iv)的摩尔比为约27.0-31.6:27.0-31.6:31.6-39.6:1-10,且与穿膜肽共轭的聚乙二醇磷脂占膜材料(iv)中的约20%-80%摩尔比;例如,所述膜材料(i):(ii):(iii):(iv)的摩尔比为约28.5:28.5:38:5,且与穿膜肽共轭的聚乙二醇磷脂占膜材料(iv)中的约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%摩尔比。

11. 根据权利要求6-10中任一项所述的药物递送载体,其中阳离子脂质体包含如下膜材料:(i) DOTAP;(ii) DOPE;(iii) 胆固醇;(iv) mPEG₂₀₀₀-DSPE和穿膜肽-PEG₃₄₀₀-DSPE,且膜材料(i):(ii):(iii):(iv)的摩尔比为约20-40:20-40:20-40:1-20,且穿膜肽-PEG₃₄₀₀-DSPE占膜材料(iv)中的约20%-80%摩尔比;例如,所述膜材料(i):(ii):(iii):(iv)的摩尔比为约27.0-31.6:27.0-31.6:31.6-39.6:1-10,且穿膜肽-PEG₃₄₀₀-DSPE占膜材料(iv)中的约20%-80%摩尔比;

例如,膜材料(i):(ii):(iii):(iv)的摩尔比为约28.5:28.5:38:5,穿膜肽-PEG₃₄₀₀-DSPE占膜材料(iv)中的约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%摩尔比。

12. 制备权利要求1-4中任一项所述的药物制剂的方法,包括(a)制备表面修饰有穿膜肽的阳离子脂质体;(b)制备带正电的多聚氨基酸(例如寡聚精氨酸)和药物分子的物理复合物;(c)按一定的电荷比混合步骤(a)获得的表面修饰有穿膜肽的阳离子脂质体和步骤(b)获得的物理复合物。

13. 制备权利要求1-4中任一项所述的药物制剂的方法,包括(a)混合脂质体的膜材料(i)、(ii)和(iii),制备空白脂质体;(b)制备带正电的多聚氨基酸(例如寡聚精氨酸)和药物分子的物理复合物;(c)按一定的电荷比混合

步骤(a)获得的空白脂质体和步骤(b)获得的物理复合物; (d) 将步骤(c)获得的脂质体与膜材料(iv)混合并孵育。

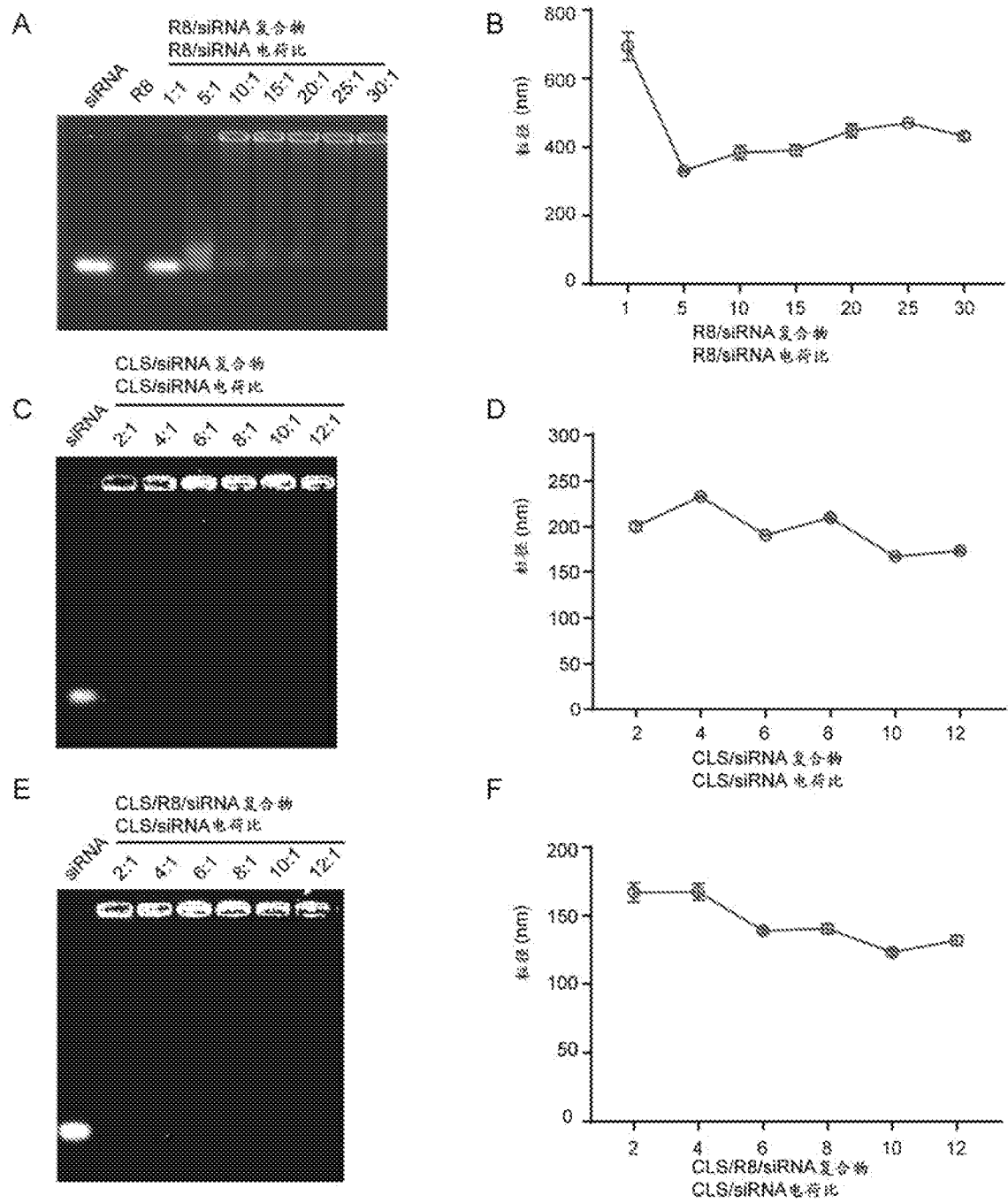


图 1

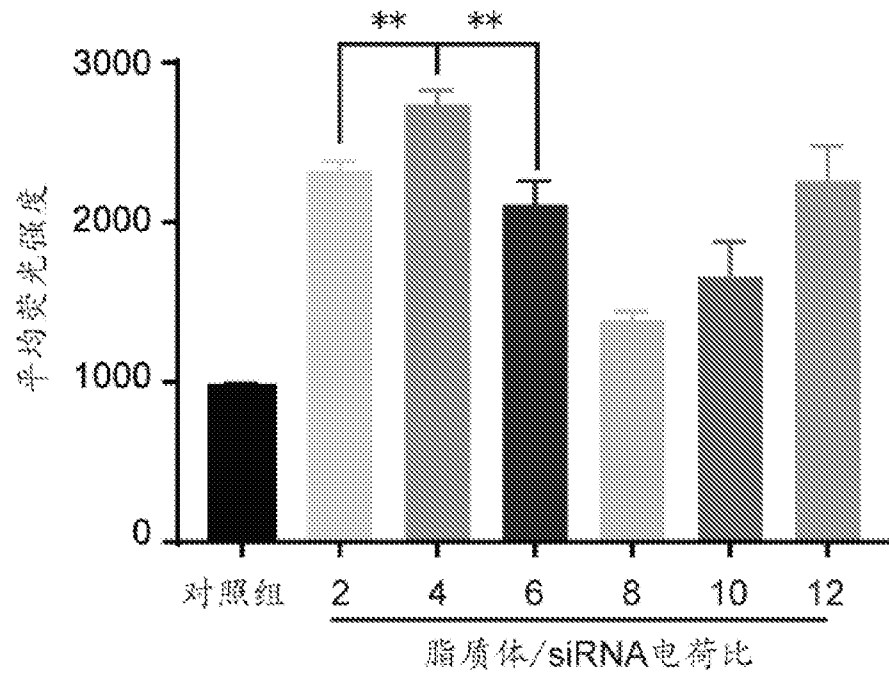


图 2

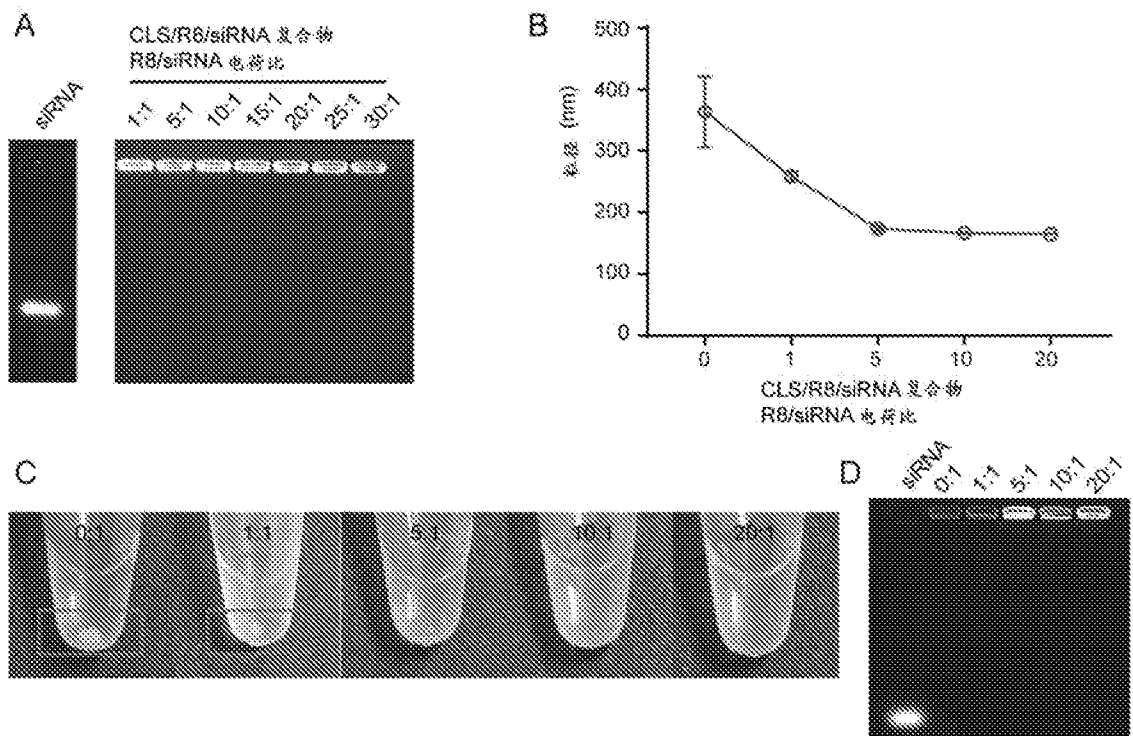


图 3

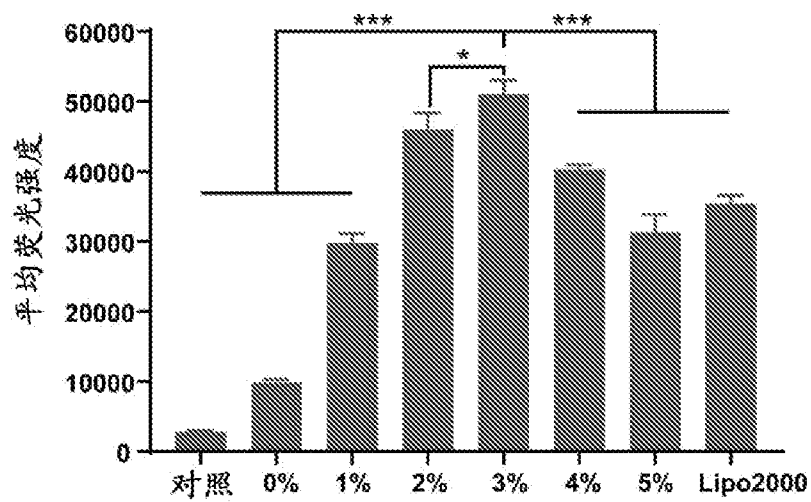


图 4

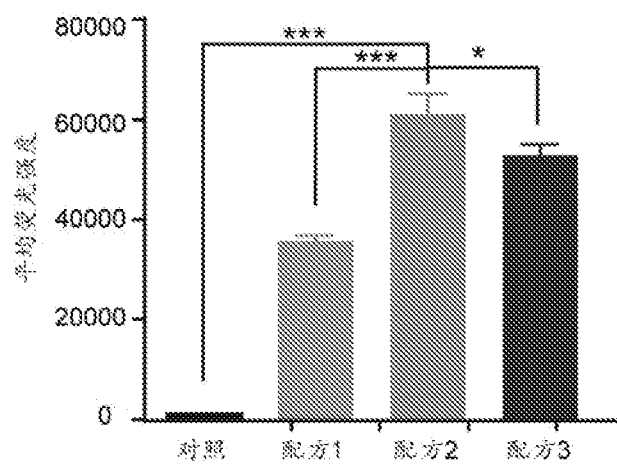


图 5

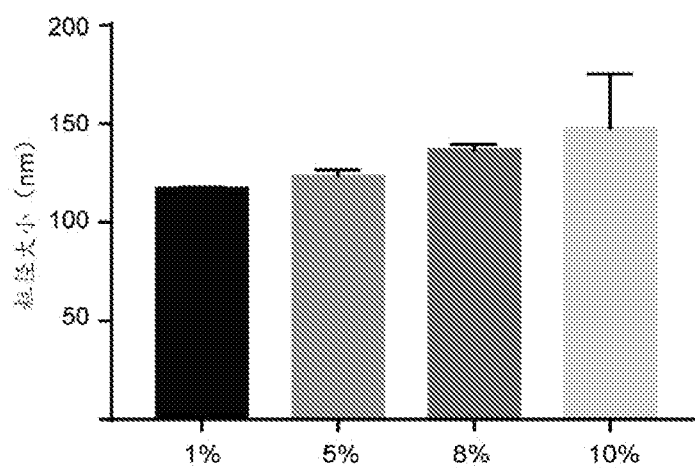


图 6

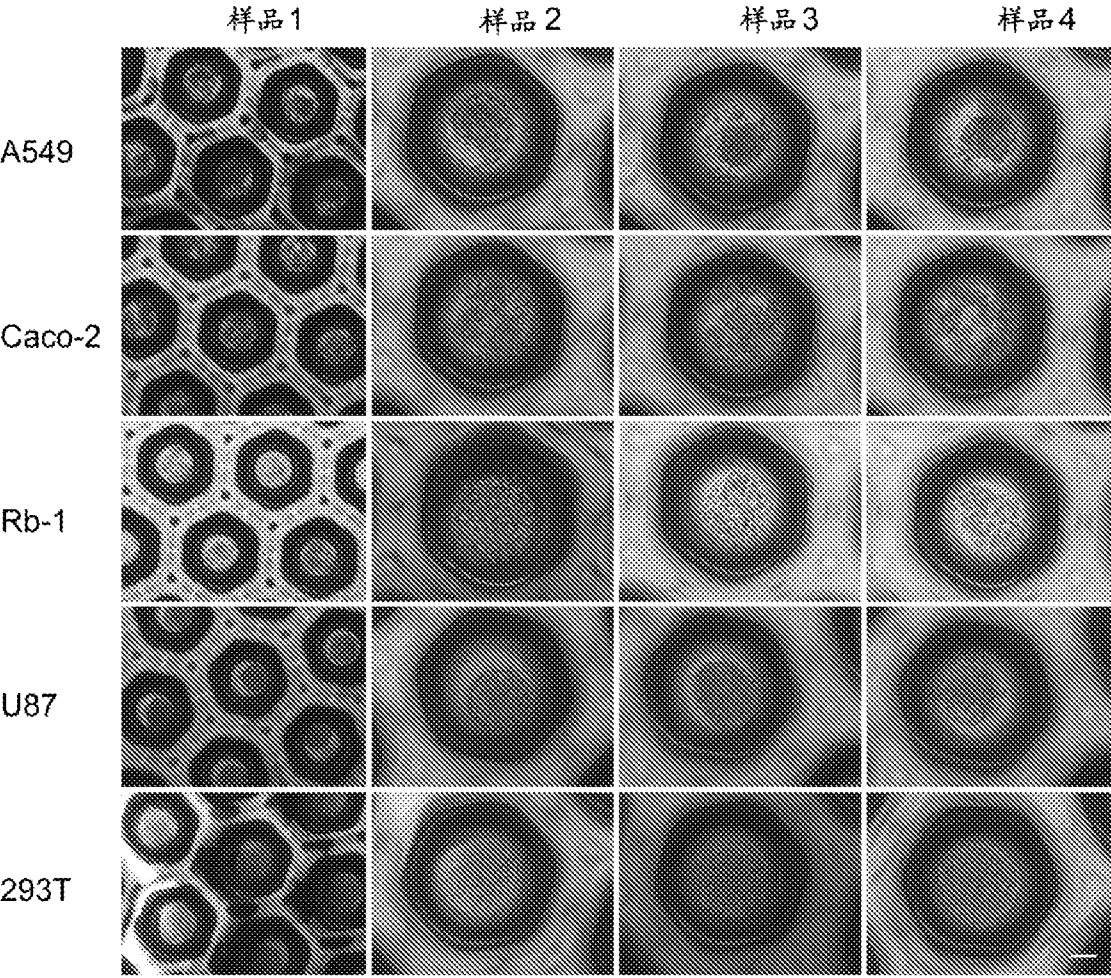


图 7

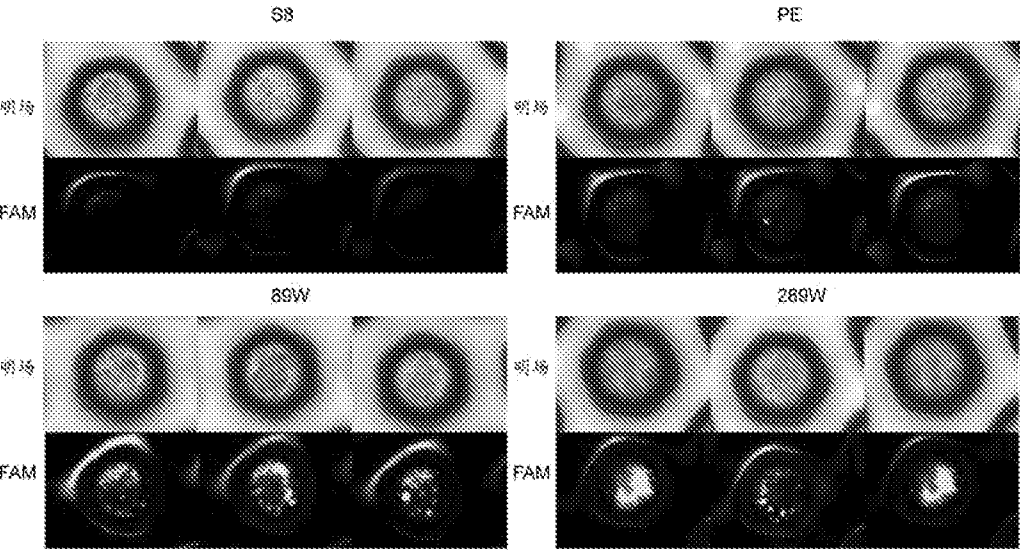


图 8

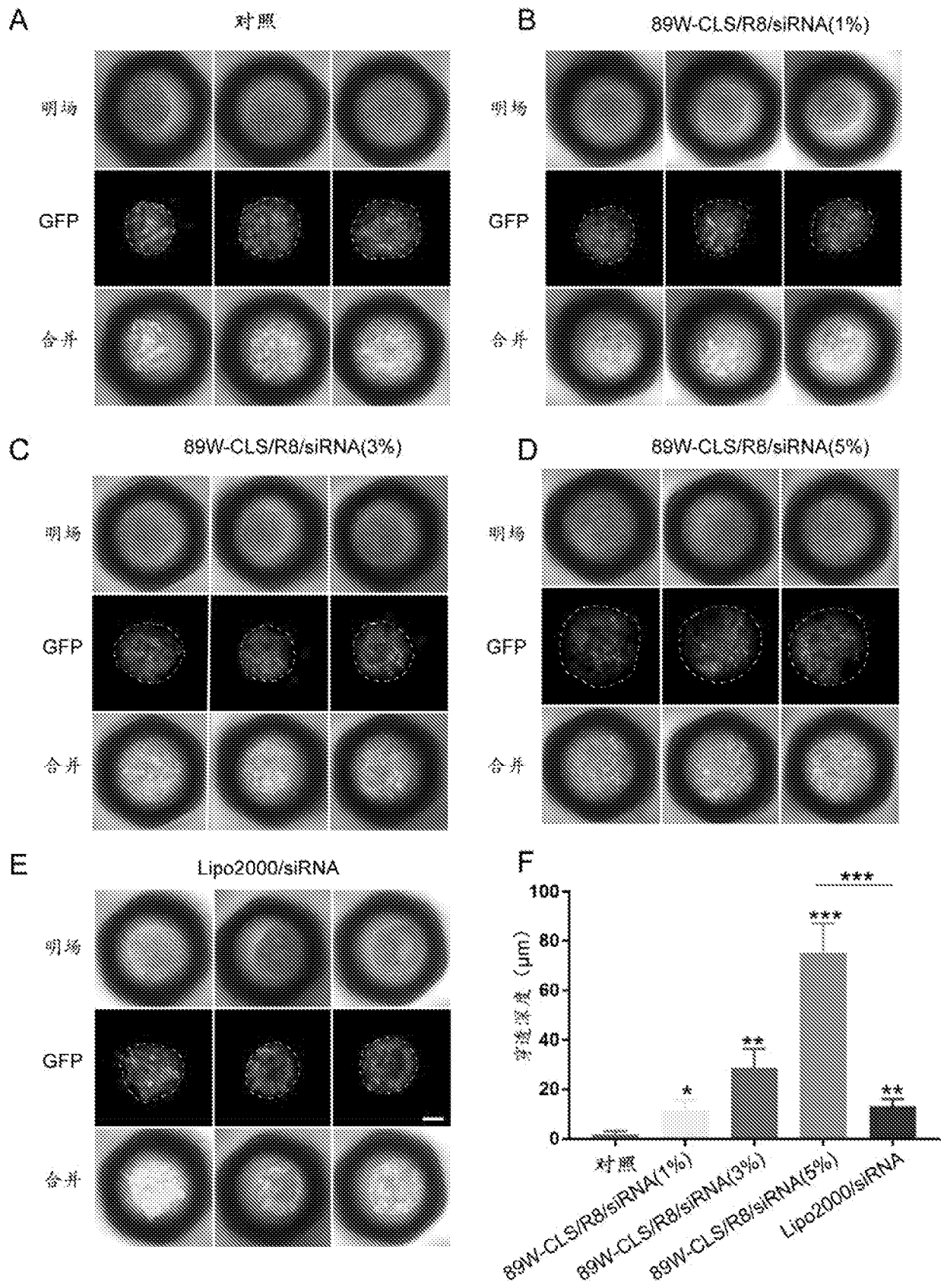


图 9

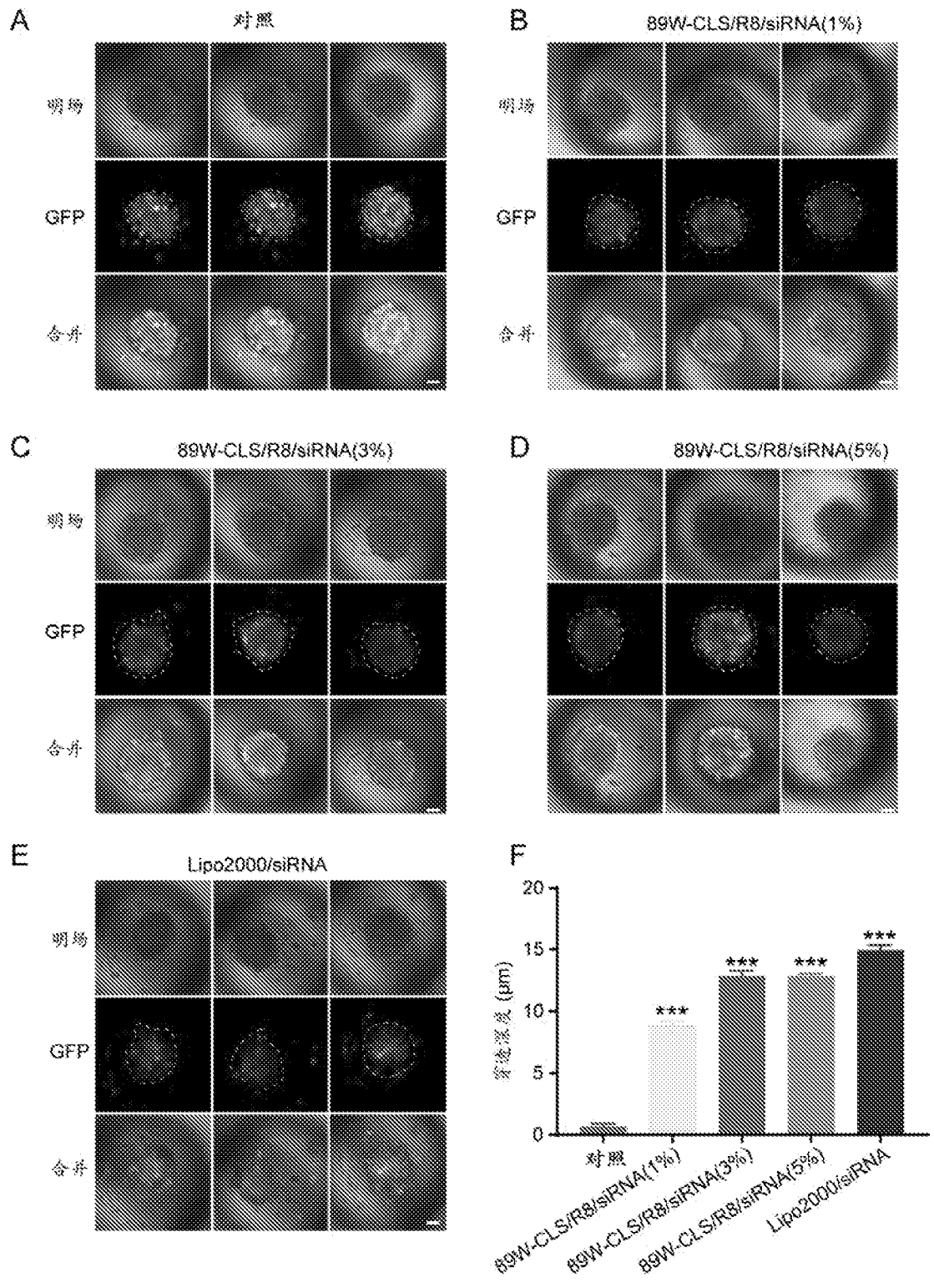


图 10

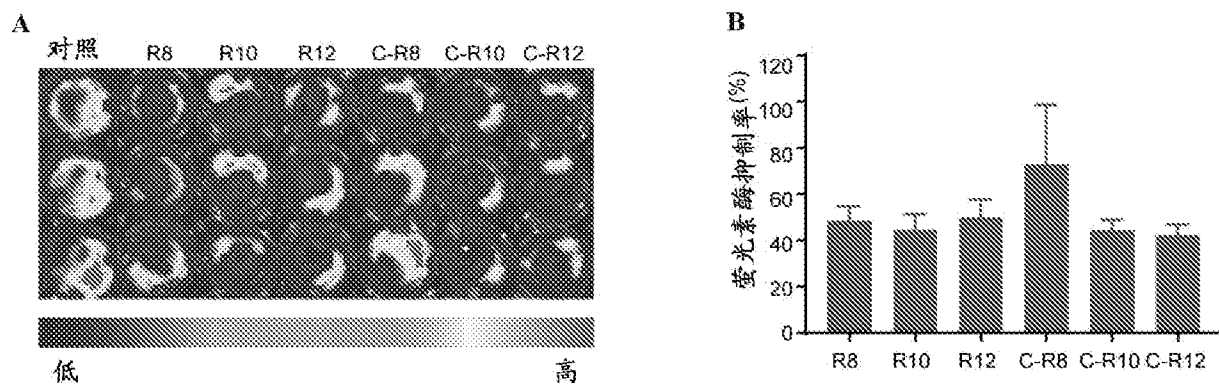


图 11

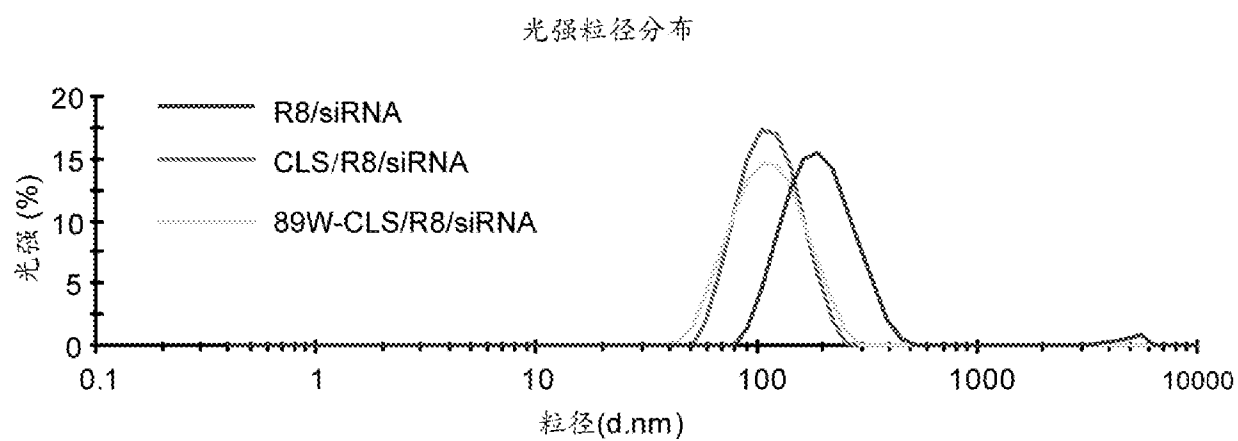


图 12

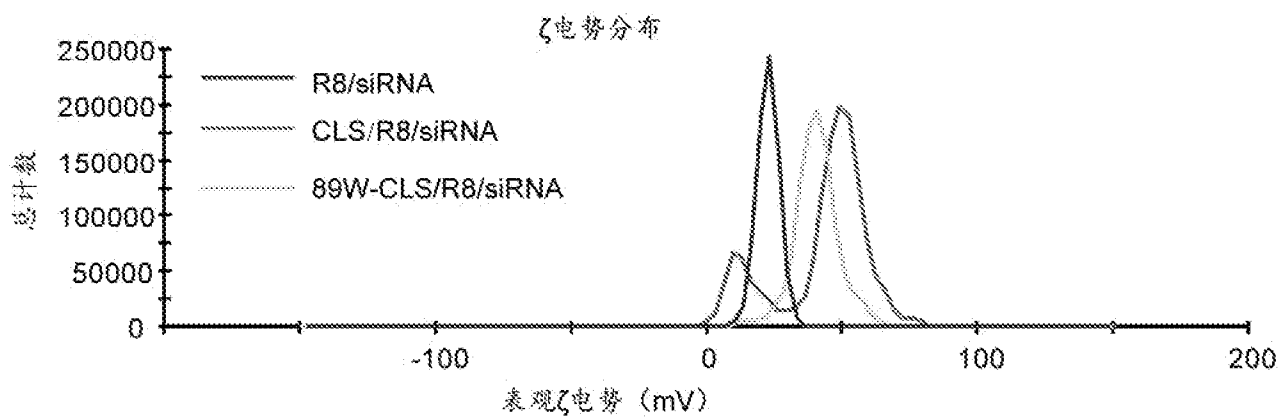


图 13

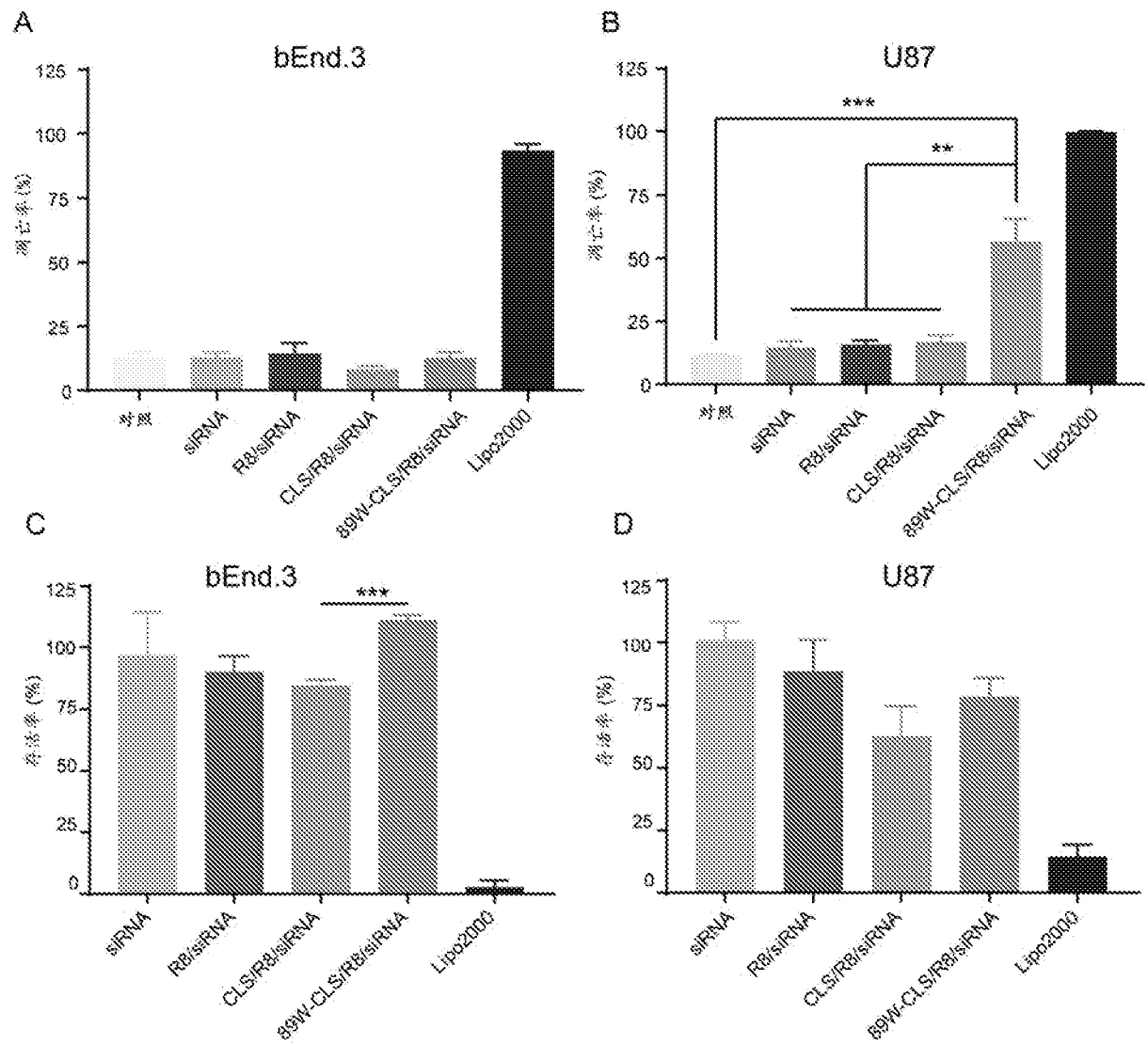


图 14

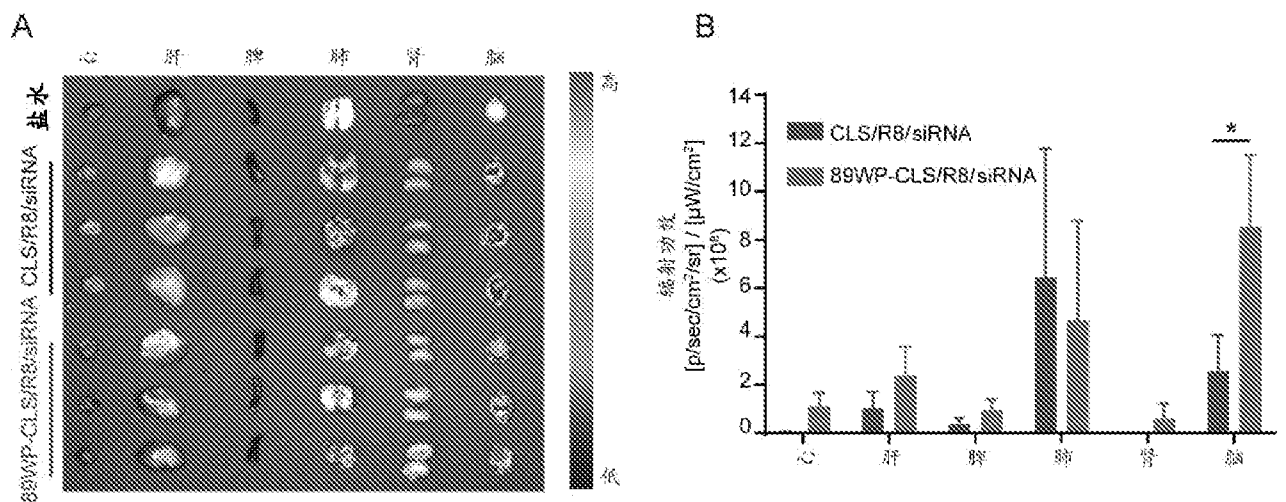


图 15

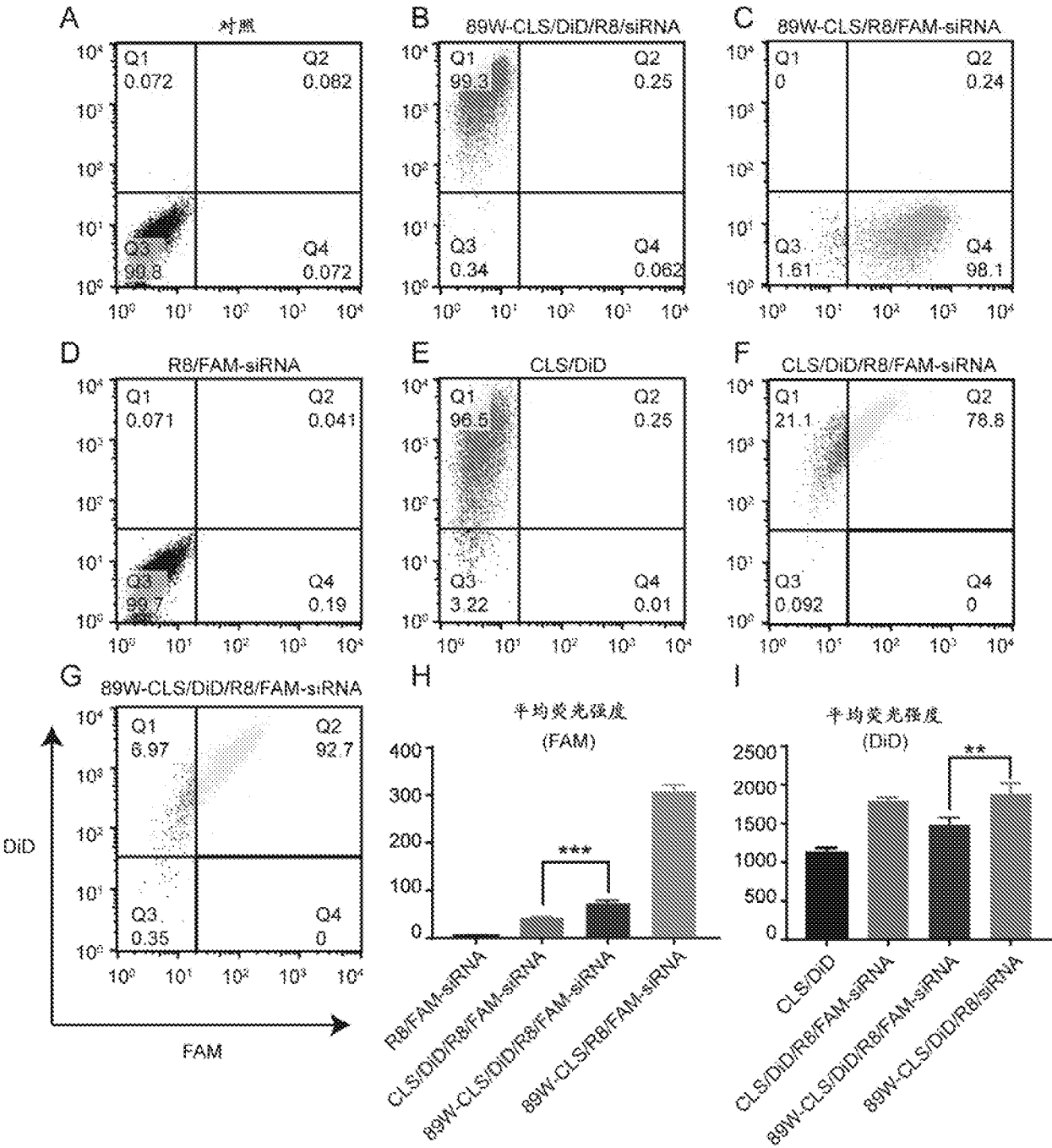


图 16

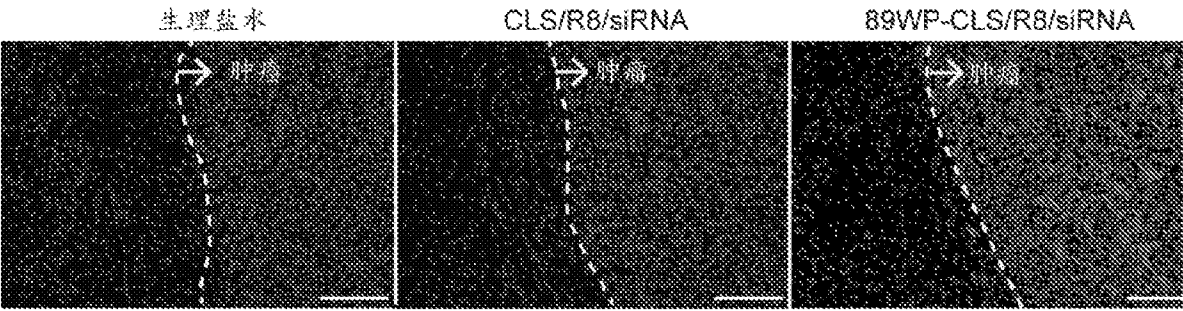


图 17

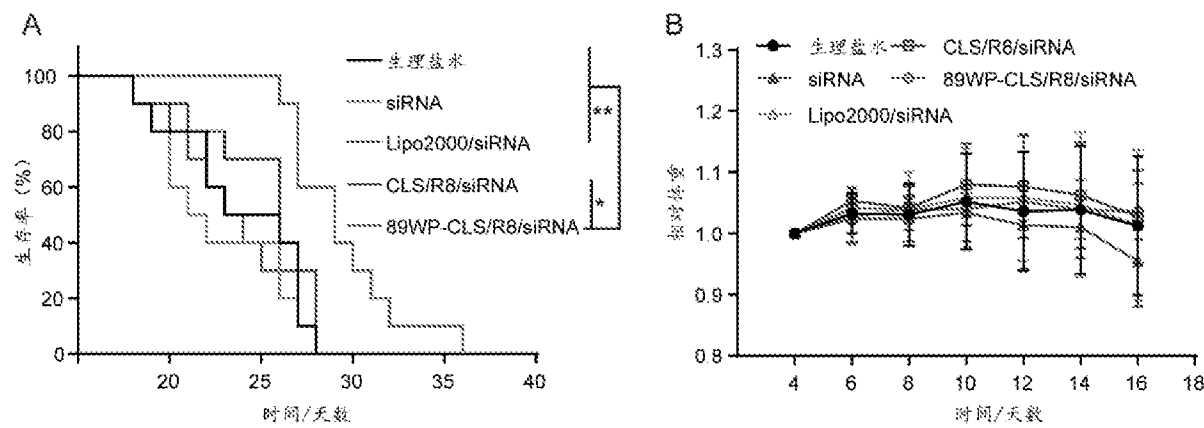


图 18

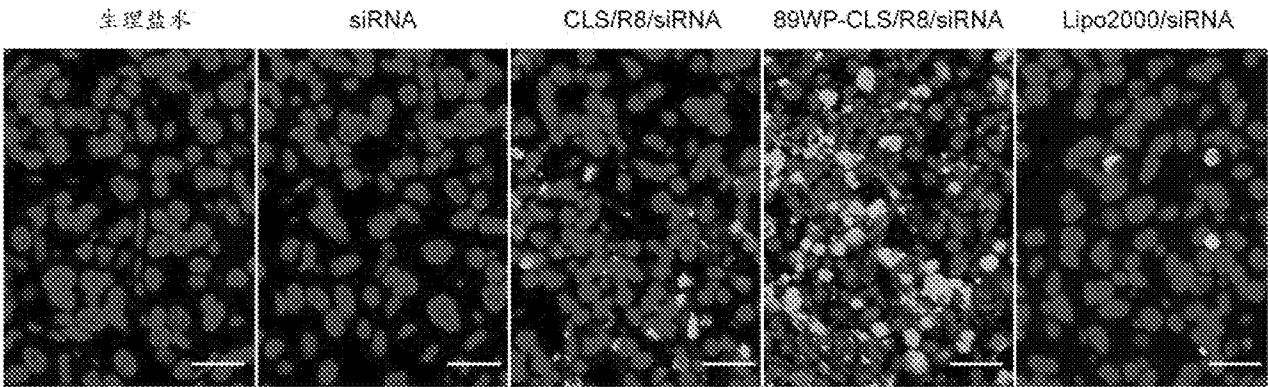


图 19

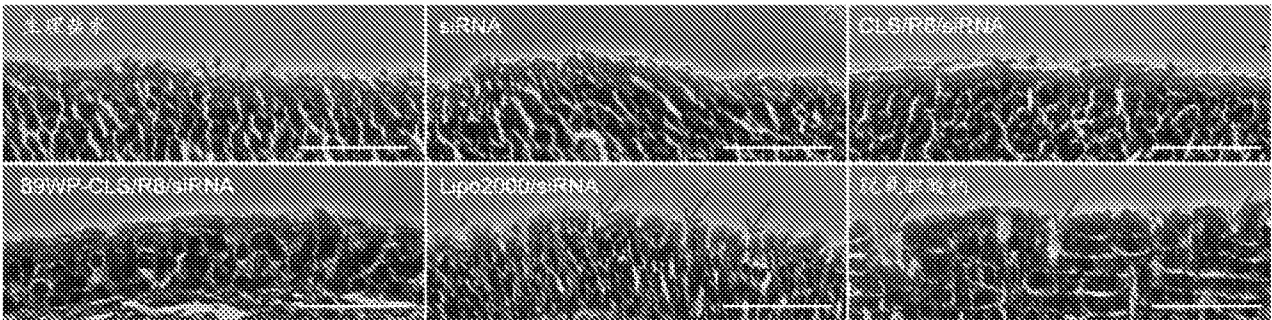


图 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/087279

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/64(2017.01)i; A61K 47/60(2017.01)i; A61K 47/54(2017.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; C07K 7/08(2006.01)i; A61P 11/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; C07K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, WOTXT, CNABS, PubMed, CNKI, WANFANG DATE, ISI Web of Knowledge, ScienceDirect, STN: 药物, 递送, 载体, 穿膜肽, 修饰, 脂质体, 多聚氨基酸, 聚合物, 衍生物, 疏水, drug, delivery, carrier, penetratin, polyamino acids, poly-aa, cell-penetrating peptide, CPP, liposomes, modified, hydrophobic, RX1IKIWFX2X3RRMKWKK

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 108976288 A (FUDAN UNIVERSITY) 11 December 2018 (2018-12-11) description, paragraphs [0008]-[0037], table 1, and embodiment 1	1-13
Y	CN 107875400 A (NANTONG UNIVERSITY) 06 April 2018 (2018-04-06) description, paragraphs [0006]-[0022]	1-13
Y	US 2018303956 A1 (UNIVERSITÄT HEIDELBERG) 25 October 2018 (2018-10-25) claims 1-15	1-3
PY	CN 110772645 A (FUDAN UNIVERSITY et al.) 11 February 2020 (2020-02-11) description, paragraphs [0006]-[0030]	1-13
PY	WO 2020023311 A1 (UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION) 30 January 2020 (2020-01-30) claims 1-31	1-13
Y	LETOHA, T. et al. "Membrane Translocation of Penetratin and Its Derivatives in Different Cell Lines" <i>Journal of Molecular Recognition</i> , Vol. 16, 31 December 2003 (2003-12-31), pp. 272-279	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 July 2020

Date of mailing of the international search report

17 August 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China**

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/087279

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHANG, C. L. et al. "siRNA-Containing Liposomes Modified with Polyarginine Effectively Silence the Targeted Gene" <i>Journal of Controlled Release</i> , Vol. 112, 20 March 2006 (2006-03-20), pp. 229-239	1-13
A	CN 104497147 A (SICHUAN UNIVERSITY) 08 April 2015 (2015-04-08) entire document	1-13
A	CN 102552929 A (PEKING UNIVERSITY) 11 July 2012 (2012-07-11) entire document	1-13
A	CN 107129521 A (SHANGHAI GENERAL HOSPITAL) 05 September 2017 (2017-09-05) entire document	1-13
A	范博等 (FAN, Bo et al.). "细胞穿膜肽在药物递送系统中的研究进展 (The Development of Cell-Penetrating Peptides in Drug Delivery System)" <i>药学报 (Acta Pharmaceutica Sinica)</i> , Vol. 51, No. 2, 31 December 2016 (2016-12-31), pp. 264-271	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/087279

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	108976288	A	11 December 2018	WO	2018224053	A1	13 December 2018
CN	107875400	A	06 April 2018	None			
US	2018303956	A1	25 October 2018	ZA	201801514	B	31 July 2019
				EP	3158992	A1	26 April 2017
				JP	6689378	B2	28 April 2020
				WO	2017067642	A1	27 April 2017
				CN	108135846	A	08 June 2018
				EP	3364952	A1	29 August 2018
				JP	2018532740	A	08 November 2018
				RU	2018118176	A	21 November 2019
				RU	2018118176	A3	26 February 2020
				US	10653796	B2	19 May 2020
CN	110772645	A	11 February 2020	None			
WO	2020023311	A1	30 January 2020	None			
CN	104497147	A	08 April 2015	CN	104497147	B	03 July 2018
CN	102552929	A	11 July 2012	None			
CN	107129521	A	05 September 2017	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/087279

A. 主题的分类 A61K 47/64(2017.01)i; A61K 47/60(2017.01)i; A61K 47/54(2017.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; C07K 7/08(2006.01)i; A61P 11/02(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) A61K; C07K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) DWPI, WOTXT, CNABS, PubMed, CNKI, WANFANG DATE, ISI Web of Knowledge, ScienceDirect, STN: 药物, 递送, 载体, 穿膜肽, 修饰, 脂质体, 多聚氨基酸, 聚合物, 衍生物, 疏水, drug, delivery, carrier, penetratin, polyamino acids, poly-aa, cell-penetrating peptide, CPP, liposomes, modified, hydrophobic, RX1IKIWF2X3RRMKWK		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 108976288 A (复旦大学) 2018年 12月 11日 (2018 - 12 - 11) 说明书第8-37段, 表1, 实施例1	1-13
Y	CN 107875400 A (南通大学) 2018年 4月 6日 (2018 - 04 - 06) 说明书第6-22段	1-13
Y	US 2018303956 A1 (UNIVERSITÄT HEIDELBERG) 2018年 10月 25日 (2018 - 10 - 25) 权利要求1-15	1-3
PY	CN 110772645 A (复旦大学等) 2020年 2月 11日 (2020 - 02 - 11) 说明书第6-30段	1-13
PY	WO 2020023311 A1 (UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION) 2020年 1月 30日 (2020 - 01 - 30) 权利要求1-31	1-13
Y	LETOHA, T. 等. "Membrane translocation of penetratin and its derivatives in different cell lines" JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, 第16卷, 2003年 12月 31日 (2003 - 12 - 31), 第272 - 279页	1-13
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2020年 7月 8日		国际检索报告邮寄日期 2020年 8月 17日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 代月函 电话号码 86-(10)-53962039

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	ZHANG, C.L. 等. "siRNA-containing liposomes modified with polyarginine effectively silence the targeted gene" Journal of Controlled Release, 第112卷, 2006年 3月 20日 (2006 - 03 - 20), 第229-239页	1-13
A	CN 104497147 A (四川大学) 2015年 4月 8日 (2015 - 04 - 08) 全文	1-13
A	CN 102552929 A (北京大学) 2012年 7月 11日 (2012 - 07 - 11) 全文	1-13
A	CN 107129521 A (上海市第一人民医院) 2017年 9月 5日 (2017 - 09 - 05) 全文	1-13
A	范博等. "细胞穿膜肽在药物递送系统中的研究进展" 药学报, 第51卷, 第2期, 2016年 12月 31日 (2016 - 12 - 31), 第264-271页	1-13

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/087279

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	108976288	A	2018年 12月 11日	WO	2018224053	A1	2018年 12月 13日
CN	107875400	A	2018年 4月 6日	无			
US	2018303956	A1	2018年 10月 25日	ZA	201801514	B	2019年 7月 31日
				EP	3158992	A1	2017年 4月 26日
				JP	6689378	B2	2020年 4月 28日
				WO	2017067642	A1	2017年 4月 27日
				CN	108135846	A	2018年 6月 8日
				EP	3364952	A1	2018年 8月 29日
				JP	2018532740	A	2018年 11月 8日
				RU	2018118176	A	2019年 11月 21日
				RU	2018118176	A3	2020年 2月 26日
				US	10653796	B2	2020年 5月 19日
CN	110772645	A	2020年 2月 11日	无			
WO	2020023311	A1	2020年 1月 30日	无			
CN	104497147	A	2015年 4月 8日	CN	104497147	B	2018年 7月 3日
CN	102552929	A	2012年 7月 11日	无			
CN	107129521	A	2017年 9月 5日	无			