



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116509818 A

(43) 申请公布日 2023. 08. 01

(21) 申请号 202310416659.4

A61K 47/14 (2017.01)

(22) 申请日 2023.04.18

A61K 47/06 (2006.01)

(71) 申请人 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院

A61K 47/12 (2006.01)

地址 100850 北京市海淀区太平路27号

A61K 48/00 (2006.01)

(72) 发明人 申辽 全东琴 王永安 杨军  
骆媛 隋昕

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

(74) 专利代理机构 北京预立生科知识产权代理有限公司 11736

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

专利代理师 高倩倩

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

(51) Int. Cl.

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 47/44 (2017.01)

A61K 47/42 (2017.01)

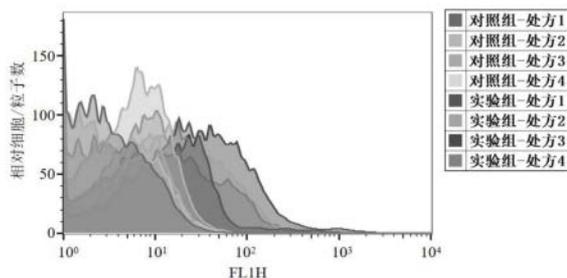
权利要求书4页 说明书16页 附图2页

## (54) 发明名称

一种低毒性的脂溶性纳米粒组合物及其制备方法和应用

## (57) 摘要

本发明公开了一种低毒性的脂溶性纳米粒组合物及其制备方法和应用。本发明使用磷脂和胆固醇-PEG2k-转铁蛋白制备了一种可负载基因药物的脂溶性纳米粒组合物,该脂溶性纳米粒组合物基因药物携带量大、包封率高、稳定性好、安全性强,且具有良好的通用性,可递送多种基因药物;载体材料生产工艺简单,易于针对性研发;可用于治疗血液肿瘤和实体肿瘤。



1. 一种脂溶性纳米颗粒,其特征在于,所述脂溶性纳米颗粒包括表面活性剂和/或功能性分子修饰材料;

优选地,所述表面活性剂包括磷脂;

优选地,所述磷脂包括天然磷脂、半合成磷脂或合成磷脂中的一种或多种;

优选地,所述天然磷脂包括大豆磷脂、蛋黄磷脂、二山嵛酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二反式油酰磷脂酰胆碱、二月桂酰磷脂酰胆碱、1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰胆碱、单棕榈酰磷脂酰胆碱、单硬脂酰胆碱、蛋黄脂酰磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二油酰磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺、蛋黄磷脂酰甘油、大豆磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油、二油酰磷脂酰甘油、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油、大豆磷脂酰丝氨酸、二硬脂酰磷脂酰丝氨酸、二棕榈酰磷脂酰丝氨酸、二油酰磷脂酰丝氨酸、二肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸、蛋黄鞘磷脂、二硬脂酰鞘磷脂、二棕榈酰鞘磷脂、大豆磷脂酰肌醇、二棕榈酰磷脂酰肌醇、二油酰磷脂酰肌醇、大豆磷脂酸、蛋黄磷脂酸、二肉豆蔻酰磷脂酸或二棕榈酰磷脂酸;

优选地,所述半合成磷脂包括氢化磷脂;

优选地,所述合成磷脂包括DEPC、DOPC、DPPC、DSPC或DMPC;

优选地,所述磷脂的用量选自70%~99%;

优选地,所述磷脂的用量选自80%~90%;

优选地,所述功能性分子修饰材料包括蛋白、核酸、化合物中的一种或多种;

优选地,所述蛋白包括胆固醇-PEG-转铁蛋白、DSPE-PEG-转铁蛋白、植物凝集素、穿膜肽中的一种或多种;

优选地,所述蛋白为胆固醇-PEG-转铁蛋白;

优选地,所述胆固醇-PEG-转铁蛋白包括胆固醇-PEG2k-转铁蛋白、胆固醇-PEG3k-转铁蛋白、胆固醇-PEG4k-转铁蛋白、胆固醇-PEG5k-转铁蛋白中的一种或多种;

优选地,所述胆固醇-PEG-转铁蛋白为胆固醇-PEG2k-转铁蛋白;

优选地,所述胆固醇-PEG2k-转铁蛋白的用量选自1%~30%;

优选地,所述胆固醇-PEG2k-转铁蛋白的用量选自10%~20%;

优选地,所述核酸包括转铁蛋白核酸适配体;

优选地,所述脂溶性纳米颗粒还包括有机溶剂和水;

优选地,所述有机溶剂包括甲醇、乙醇、己二醇、丙二醇、二丙二醇、丙三醇、乙腈、丁酮、1,1,1-三氟乙烷、六氟异丙醇、乙酸乙酯、四氯化碳、丁醇、二丁基醚、二乙基醚、环己胺、二氯甲烷、己烷、乙酸丁酯、二异丙基醚、苯、二戊醚、氯仿、庚烷、四氯乙烯、甲苯、十六烷、二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮、二甲基乙酰胺、四氢呋喃、甘油、二氧杂环乙烷中的一种或多种;

优选地,所述有机溶剂为乙醇。

2. 一种脂溶性纳米粒组合物,其特征在于,所述脂溶性纳米粒组合物包括权利要求1所述的脂溶性纳米颗粒和药物;

优选地,所述药物包括基因药物、化学药物;

优选地,所述药物为基因药物;

优选地,所述基因药物包括DNA、RNA药物;

优选地,所述DNA药物包括双链DNA、单链DNA药物;所述RNA药物包括双链RNA、单链RNA药物;

优选地,所述双链DNA包括质粒;

优选地,所述单链DNA包括DNA核酸适配体;

优选地,所述单链RNA包括RNA核酸适配体、mRNA、ncRNA或反义寡核苷酸ASO;

优选地,所述ncRNA包括miRNA、siRNA、shRNA、saRNA、sgRNA、piRNA、lncRNA、circRNA或其他调控性RNA;

优选地,所述基因药物包括质粒药物或mRNA药物;

优选地,所述质粒药物包括质粒、编码标签蛋白的基因序列和/或目的基因;

优选地,所述mRNA药物包括mRNA和/或编码标签蛋白的基因序列;

优选地,所述质粒包括pQE-12、pUC-系列、pBluescript、pET-系列表达载体、pCRTOP0、pJOE、pBACKBONE、pBBR1-MCS系列、pJB861、pBSMuL、pBC2、pUCPKS、pTACT1、pTRE、pCAL-n-EK、pESP-1、pOP13CAT、E-027pCAG Kosak-Cherry载体系统、pREP、pCEP4、pMC1neo、pXT1、pSG5、EBO-pSV2neo、pBPV-1、pdBPVMMTneo、pRSVgpt、pRSVneo、pSV2-dhfr、pIZD35、Okayama-Berg cDNA表达载体pcDV1、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3、pSPORT1、pGEMHE、pLXIN、pSIR、pIRES-EGFP、pEAK-10、pTriEx-Hygro、pCINeo、pUC19、pMB1、pSC101、pBEU1、pBEU2、pDF41、pDF42、pBR322、ptdTomato-N1或pcDNA3.1;

优选地,所述质粒为ptdTomato-N1或pcDNA3.1;

优选地,所述标签包括荧光蛋白;

优选地,所述荧光蛋白包括GFP、EGFP、mFruit蛋白、DsRed系列荧光蛋白、OFP、YFP中的一种或多种;

优选地,所述荧光蛋白包括GFP或EGFP;

优选地,所述目的基因包括WT1、MUC1、LMP2、EGFRvIII、Her2、p53、NY-ESO-1、PSMA、GD2、CEA、gp100、PR1、PSA、hTERT、EphA2、PAP、ML-IAP、AFP、EpCAM、ERG、NA17、PAX3、MYCN、RhoC、TRP-2、GD3、间皮素、PSCA、CYP1B1、PLAC1、GM3、BORIS、GloboH、ETV6-AML、NY-BR-1、RGS5、SART3、STn、PAX5、OY-TE51、LCK、HMWMAA、AKAP-4、SSX2、XAGE1、B7H3、Legumain、Tie2、Page4、VEGFR2、MAD-CT-1、FAP、PDGFR-b或MAD-CT-2;

优选地,所述质粒药物为pcDNA3.1-EGFP或ptdTomato-N1;

优选地,所述mRNA药物为mRNA-GFP;

优选地,所述脂溶性纳米粒组合物还包括液态非水溶剂;

优选地,所述液态非水溶剂包括植物油、动物油、烷烃类液态溶剂中的一种或多种;

优选地,所述植物油包括坚果油、茴香油、大豆油、杏仁油、玉米油、橄榄油、花生油、扁桃仁油、核桃油、腰果油、米糠油、罂粟籽油、棉籽油、芥花油、芝麻油、椰子油、亚麻籽油、肉桂油、丁香油、肉豆蔻油、芫荽油、柠檬油、橙油、红花油、可可脂、棕榈油、棕榈仁油、向日葵油、油菜籽油或蓖麻油;

优选地,所述动物油包括鲸油、鱼油、麝香油或貂油;

优选地,所述烷烃类液态溶剂包括二油酸甘油酯、三丙酸甘油酯、三丁酸甘油酯、聚氧乙烯油衍生物、中链甘油三酯、油酸、花生四烯酸、氢化油、角鲨烯或单油酸甘油酯;

优选地,所述液态非水溶剂包括中链甘油三酯、大豆油、玉米油、角鲨烯、油酸或花生四烯酸。

3. 一种制备脂溶性纳米粒组合物的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

1) 制备权利要求1所述的脂溶性纳米颗粒;

2) 使用所述的脂溶性纳米颗粒和权利要求2中所述的药物制备冻干粉末;

3) 使用所述的冻干粉末和权利要求2中所述的液态非水溶剂制备脂溶性纳米粒组合物。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述步骤1) 制备脂溶性纳米颗粒的方法包括挤出法、逆向蒸发法、二氧化碳超临界法、乙醇注入法、高压均质法、微流控法和/或薄膜分散法;

优选地,所述乙醇注入法通过将权利要求1中所述的表面活性剂和/或功能性分子修饰材料制成粗混悬液,使用超声设备处理粗混悬液进而获得脂溶性纳米颗粒;

优选地,所述超声设备为探头式超声设备;

优选地,所述高压均质法通过将权利要求1中所述的表面活性剂和/或功能性分子修饰材料制成粗混悬液,使用高压均质机处理粗混悬液进而获得脂溶性纳米颗粒;

优选地,所述粗混悬液的制备方法包括将权利要求1中所述的表面活性剂和/或功能性分子修饰材料溶解于权利要求2中所述的有机溶剂,随后加入纯化水进行分散获得粗混悬液;

优选地,所述微流控法通过将权利要求1中所述的表面活性剂和/或功能性分子修饰材料使用微流控设备处理进而获得脂溶性纳米颗粒;

优选地,所述微流控法通过将所述的权利要求1中所述的表面活性剂和/或功能性分子修饰材料溶解于权利要求2中所述的有机溶剂中获得有机溶液,随后将获得的有机溶液灌装至注射器中,另一注射器灌装水,使用微流控设备处理进而获得脂溶性纳米颗粒;

优选地,所述水为无酶水;

优选地,所述微流控法的有机溶剂与水的流速比选自1:9~3:7;

优选地,所述脂溶性纳米颗粒的Zeta电位选自-5~-30mV;

优选地,所述脂溶性纳米颗粒的Zeta电位选自-7.54~-29.27mV;

优选地,所述薄膜分散法通过将权利要求1中所述的表面活性剂和/或功能性分子修饰材料使用旋转蒸发器、超声波细胞破碎机处理进而获得脂溶性纳米颗粒;

优选地,所述薄膜分散法通过将权利要求1中所述的表面活性剂和/或功能性分子修饰材料溶解于所述的有机溶剂,使用旋转蒸发器旋干有机溶剂并成膜,随后加入纯化水重新分散材料,使用超声波细胞破碎机处理所述的分散材料进而获得脂溶性纳米颗粒;

优选地,所述脂溶性纳米颗粒的粒径范围选自50~1000nm;

优选地,所述脂溶性纳米颗粒的粒径范围选自80~1000nm;

优选地,脂溶性纳米颗粒的平均粒径范围为122.1nm。

5. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述步骤2) 制备冻干粉末的方法包括将所述的脂溶性纳米颗粒和所述的药物混合获得混合溶液,混合溶液干燥后获得冻干粉末;

优选地,所述药物与所述脂溶性纳米颗粒重量比选自1:10~1:50000;

优选地,所述药物与所述脂溶性纳米颗粒重量比选自1:500~1:50000;

优选地,所述干燥的方法包括冷冻干燥法、常压干燥法、减压干燥法、真空干燥法、微波干燥法中的一种或多种;

优选地,所述干燥的方法为冷冻干燥法;

优选地,所述冷冻干燥的程序包括预冻程序、升华干燥和解析干燥;

优选地,所述混合溶液的包材包括西林瓶、冻干安瓶、冻干泡罩;

优选地,所述冻干粉末的保存方法为充氮保护并密封、低温避光保存。

6. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述步骤3) 制备脂溶性纳米粒组合物的方法包括使用所述的液态非水溶剂溶解所述的冻干粉末进而获得脂溶性纳米粒组合物;

优选地,所述脂溶性纳米粒组合物的使用方法为与缓冲液混合均匀后进行局部注射或细胞转染;

优选地,所述液态非水溶剂与所述冻干粉末重量比选自5:1~1000:1。

7. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包括1) 权利要求1所述的脂溶性纳米颗粒、权利要求2所述的脂溶性纳米粒组合物或权利要求3-6任一项所述的方法制备的脂溶性纳米粒组合物和/或2) 药学上可接受的载体。

8. 权利要求1所述的脂溶性纳米颗粒、权利要求2所述的脂溶性纳米粒组合物、权利要求3-6任一项所述的方法制备的脂溶性纳米粒组合物或权利要求7所述的药物组合物在制备治疗肿瘤的产品中的应用。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述肿瘤选自血液肿瘤、实体肿瘤;

优选地,所述实体肿瘤包括前列腺癌、膀胱癌、肝癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、肺癌、软骨肉瘤、甲状腺癌、肾癌、间皮瘤、骨肉瘤、胆管癌、卵巢癌、胃癌、脑膜瘤、胰腺癌、多发性鳞状细胞瘤、口腔癌、食管癌、结直肠癌、乳腺癌、成神经管细胞瘤、鼻咽癌、胸腺癌、淋巴恶性肿瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤或黑色素瘤;

优选地,所述血液肿瘤包括急性白血病、慢性白血病、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金氏疾病、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、重链疾病、骨髓增生异常综合征、多毛细胞白血病或脊髓发育不良。

10. 一种根据权利要求1所述的脂溶性纳米颗粒、权利要求2所述的脂溶性纳米粒组合物或权利要求3-6任一项所述的方法制备的脂溶性纳米粒组合物的处方工艺优化方法,其特征在于,所述处方优化方法包括:采用包封率、脂溶性纳米粒组合物粒径、药物递送能力、脂溶性纳米粒组合物放置稳定性为指标,改变脂溶性纳米粒组合物的表面活性剂种类、功能性分子修饰材料种类、液态非水溶剂种类、有机溶剂的种类、各组分比例、制备方法中的一种或多种。

## 一种低毒性的脂溶性纳米粒组合物及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及一种低毒性的脂溶性纳米粒组合物及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 基因疗法是通过基因转移技术将外源基因导入受体细胞以治疗由基因缺陷引起的疾病。由于外源基因易被细胞内的生物酶消化降解,导致其编码蛋白的表达水平降低,影响基因治疗的效果。基因载体在基因治疗过程中可以有效地保护基因药物,是基因治疗的关键。基因载体主要分为病毒载体和非病毒载体两大类。病毒载体的转染效率高,但是由于其载体是活病毒,存在免疫原性高、毒性大、限制携带基因数量等缺陷,生产其可控性差、安全性存疑,导致其在生物领域中的应用受到一定的限制。患者接受以病毒为载体的基因药物治疗后,尽管疾病症状有所缓解,但数年后罹患癌症的情况多有发生。因此,非病毒类载体成为了研究重点。

[0003] 脂溶性纳米粒作为非病毒载体,可以弥补病毒载体的上述缺陷。不仅如此,脂溶性纳米粒还具有制备简单、易于表面修饰、易于大量生产等优势,是构建基因载体的理想材料。纳米技术在基因药物递送领域中具有广泛应用,引起人们的高度重视。纳米材料作为基因载体具有以下优势:1) 制备简单,易于合成;2) 尺寸较小,易穿过生物体的组织间隙;3) 易于多功能修饰,提高生物相容性,降低机体免疫反应,达到更高的表达效率。

[0004] 尽管非病毒类的载体种类较多,但总结起来其本质主要为不同类型的纳米颗粒。目前针对纳米颗粒仍存在一系列的问题:1) 需要特殊的材料,且价格昂贵,仅有少数材料能够实现稳定的基因递送,且多数材料被国外专利限制;2) 基因药物的携载量不高,且递送效果不稳定;3) 针对不同分子量及类型的基因药物需要重新进行复杂设计及验证,不具备良好的通用性;4) 目前多数递送载体为阳离子递送载体,细胞毒性大、安全性存疑。

[0005] 因此,如何提高脂溶性纳米颗粒的药物携载量、包封率、稳定性、通用性及安全性成为亟待解决的问题。

### 发明内容

[0006] 为了弥补现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种负载基因药物的脂溶性纳米粒组合物及其制备方法。

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0008] 本发明第一方面提供了一种脂溶性纳米颗粒,所述脂溶性纳米颗粒包括表面活性剂和/或功能性分子修饰材料。

[0009] 进一步,所述表面活性剂包括磷脂。

[0010] 进一步,所述磷脂包括天然磷脂、半合成磷脂或合成磷脂中的一种或多种。

[0011] 进一步,所述天然磷脂包括大豆磷脂、蛋黄磷脂、二山嵛酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二反式油

酰磷脂酰胆碱、二月桂酰磷脂酰胆碱、1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰胆碱、单棕榈酰磷脂酰胆碱、单硬脂酰胆碱、蛋黄脂酰磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二油酰磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺、蛋黄磷脂酰甘油、大豆磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油、二油酰磷脂酰甘油、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油、大豆磷脂酰丝氨酸、二硬脂酰磷脂酰丝氨酸、二棕榈酰磷脂酰丝氨酸、二油酰磷脂酰丝氨酸、二肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸、蛋黄鞘磷脂、二硬脂酰鞘磷脂、二棕榈酰鞘磷脂、大豆磷脂酰肌醇、二棕榈酰磷脂酰肌醇、二油酰磷脂酰肌醇、大豆磷脂酸、蛋黄磷脂酸、二肉豆蔻酰磷脂酸或二棕榈酰磷脂酸。

[0012] 进一步,所述半合成磷脂包括氢化磷脂。

[0013] 进一步,所述合成磷脂包括DEPC、DOPC、DPPC、DSPC或DMPC。

[0014] 进一步,所述磷脂的用量选自70%~99%。

[0015] 进一步,所述磷脂的用量选自80%~90%。

[0016] 进一步,所述功能性分子修饰材料包括蛋白、核酸、化合物中的一种或多种。

[0017] 进一步,所述蛋白包括胆固醇-PEG-转铁蛋白、DSPE-PEG-转铁蛋白、植物凝集素、穿膜肽中的一种或多种。

[0018] 进一步,所述蛋白为胆固醇-PEG-转铁蛋白。

[0019] 进一步,所述胆固醇-PEG-转铁蛋白包括胆固醇-PEG2k-转铁蛋白、胆固醇-PEG3k-转铁蛋白、胆固醇-PEG4k-转铁蛋白、胆固醇-PEG5k-转铁蛋白中的一种或多种。

[0020] 进一步,所述胆固醇-PEG-转铁蛋白为胆固醇-PEG2k-转铁蛋白。

[0021] 进一步,所述胆固醇-PEG2k-转铁蛋白的用量选自1%~30%。

[0022] 进一步,所述胆固醇-PEG2k-转铁蛋白的用量选自10%~20%。

[0023] 进一步,所述核酸包括转铁蛋白核酸适配体。

[0024] 进一步,所述脂溶性纳米颗粒还包括有机溶剂和水。

[0025] 进一步,所述有机溶剂包括甲醇、乙醇、己二醇、丙二醇、二丙二醇、丙三醇、乙腈、丁酮、1,1,1-三氟乙烷、六氟异丙醇、乙酸乙酯、四氯化碳、丁醇、二丁基醚、二乙基醚、环己胺、二氯甲烷、己烷、乙酸丁酯、二异丙基醚、苯、二戊醚、氯仿、庚烷、四氯乙烯、甲苯、十六烷、二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮、二甲基乙酰胺、四氢呋喃、甘油、二氧杂环乙烷中的一种或多种。

[0026] 进一步,所述有机溶剂为乙醇。

[0027] 本发明的第二方面提供了一种脂溶性纳米粒组合物,所述脂溶性纳米粒组合物包括本发明的第一方面所述的脂溶性纳米颗粒和药物。

[0028] 进一步,所述药物包括基因药物、化学药物。

[0029] 进一步,所述药物为基因药物。

[0030] 进一步,所述基因药物包括DNA、RNA药物。

[0031] 进一步,所述DNA药物包括双链DNA、单链DNA药物;所述RNA药物包括双链RNA、单链RNA药物。

[0032] 进一步,所述双链DNA包括质粒。

[0033] 进一步,所述单链DNA包括DNA核酸适配体。

[0034] 进一步,所述单链RNA包括RNA核酸适配体、mRNA、ncRNA或反义寡核苷酸ASO。

[0035] 进一步,所述ncRNA包括miRNA、siRNA、shRNA、saRNA、sgRNA、piRNA、lncRNA、circRNA或其他调控性RNA。

[0036] 进一步,所述基因药物包括质粒药物或mRNA药物。

[0037] 进一步,所述质粒药物包括质粒、编码标签蛋白的基因序列和/或目的基因。

[0038] 进一步,所述mRNA药物包括mRNA和/或编码标签蛋白的基因序列。

[0039] 进一步,所述质粒包括pQE-12、pUC-系列、pBluescript、pET-系列表达载体、pCRTOP0、pJOE、pBACKBONE、pBBR1-MCS系列、pJB861、pBSMuL、pBC2、pUCPKS、pTACT1、pTRE、pCAL-n-EK、pESP-1、pOP13CAT、E-027pCAG Kosak-Cherry载体系统、pREP、pCEP4、pMC1neo、pXT1、pSG5、EBO-pSV2neo、pBPV-1、pdBPVMMTneo、pRSVgpt、pRSVneo、pSV2-dhfr、pIZD35、Okayama-Berg cDNA表达载体pcDV1、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3、pSPORT1、pGEMHE、pLXIN、pSIR、pIRES-EGFP、pEAK-10、pTriEx-Hygro、pCINeo、pUC19、pMB1、pSC101、pBEU1、pBEU2、pDF41、pDF42、pBR322、ptdTomato-N1或pcDNA3.1。

[0040] 进一步,所述质粒为ptdTomato-N1或pcDNA3.1。

[0041] 进一步,所述标签包括荧光蛋白。

[0042] 进一步,所述荧光蛋白包括GFP、EGFP、mFruit蛋白、DsRed系列荧光蛋白、OFP、YFP中的一种或多种。

[0043] 进一步,所述荧光蛋白包括GFP或EGFP。

[0044] 进一步,所述目的基因包括WT1、MUC1、LMP2、EGFRvIII、Her2、p53、NY-ESO-1、PSMA、GD2、CEA、gp100、PR1、PSA、hTERT、EphA2、PAP、ML-IAP、AFP、EpCAM、ERG、NA17、PAX3、MYCN、RhoC、TRP-2、GD3、间皮素、PSCA、CYP1B1、PLAC1、GM3、BORIS、GloboH、ETV6-AML、NY-BR-1、RGS5、SART3、STn、PAX5、OY-TES1、LCK、HMWMAA、AKAP-4、SSX2、XAGE1、B7H3、Legumain、Tie 2、Page4、VEGFR2、MAD-CT-1、FAP、PDGFR-b或MAD-CT-2。

[0045] 进一步,所述质粒药物为pcDNA3.1-EGFP或ptdTomato-N1。

[0046] 进一步,所述mRNA药物为mRNA-GFP。

[0047] 进一步,所述脂溶性纳米粒组合物还包括液态非水溶剂。

[0048] 进一步,所述液态非水溶剂包括植物油、动物油、烷烃类液态溶剂中的一种或多种。

[0049] 进一步,所述植物油包括坚果油、茴香油、大豆油、杏仁油、玉米油、橄榄油、花生油、扁桃仁油、核桃油、腰果油、米糠油、罂粟籽油、棉籽油、芥花油、芝麻油、椰子油、亚麻籽油、肉桂油、丁香油、肉豆蔻油、芫荽油、柠檬油、橙油、红花油、可可脂、棕榈油、棕榈仁油、向日葵油、油菜籽油或蓖麻油。

[0050] 进一步,所述动物油包括鲸油、鱼油、麝香油或貂油。

[0051] 进一步,所述烷烃类液态溶剂包括二油酸甘油酯、三丙酸甘油酯、三丁酸甘油酯、聚氧乙烯油衍生物、中链甘油三酯、油酸、花生四烯酸、氢化油、角鲨烯或单油酸甘油酯。

[0052] 进一步,所述液态非水溶剂包括中链甘油三酯、大豆油、玉米油、角鲨烯、油酸或花生四烯酸。

[0053] 本发明的第三方面提供了一种制备脂溶性纳米粒组合物的方法,所述方法包括如下步骤:

[0054] 1) 制备本发明的第一方面所述的脂溶性纳米颗粒;

- [0055] 2) 使用所述的脂溶性纳米颗粒和本发明的第二方面中所述的药物制备冻干粉末；
- [0056] 3) 使用所述的冻干粉末和本发明的第二方面中所述的液态非水溶剂制备脂溶性纳米粒组合物。
- [0057] 进一步,所述步骤1) 制备脂溶性纳米粒组合物的方法包括挤出法、逆向蒸发法、二氧化碳超临界法、乙醇注入法、高压均质法、微流控法和/或薄膜分散法。
- [0058] 进一步,所述乙醇注入法通过将本发明的第一方面中所述的表面活性剂和/或功能性分子修饰材料制成粗混悬液,使用超声设备处理粗混悬液进而获得脂溶性纳米颗粒。
- [0059] 进一步,所述超声设备为探头式超声设备。
- [0060] 进一步,所述高压均质法通过将本发明的第一方面中所述的表面活性剂和/或功能性分子修饰材料制成粗混悬液,使用高压均质机处理粗混悬液进而获得脂溶性纳米颗粒。
- [0061] 进一步,所述粗混悬液的制备方法包括将本发明的第一方面中所述的表面活性剂和/或功能性分子修饰材料溶解于本发明的第二方面中所述的有机溶剂,随后加入纯化水进行分散获得粗混悬液。
- [0062] 进一步,所述微流控法通过将本发明的第一方面中所述的表面活性剂和/或功能性分子修饰材料使用微流控设备处理进而获得脂溶性纳米颗粒。
- [0063] 进一步,所述微流控法通过将本发明的第一方面中所述的表面活性剂和/或功能性分子修饰材料溶解于本发明的第二方面中所述的有机溶剂中获得有机溶液,随后将获得的有机溶液填装至注射器中,另一注射器填装水,使用微流控设备处理进而获得脂溶性纳米颗粒。
- [0064] 进一步,所述水为无酶水。
- [0065] 进一步,所述微流控法的有机溶剂与水的流速比选自1:9~3:7。
- [0066] 进一步,所述脂溶性纳米颗粒的Zeta电位选自-5~-30mV。
- [0067] 进一步,所述脂溶性纳米颗粒的Zeta电位选自-7.54~-29.27mV。
- [0068] 进一步,所述薄膜分散法通过将本发明的第一方面中所述的表面活性剂和/或功能性分子修饰材料使用旋转蒸发仪、超声波细胞破碎机处理进而获得脂溶性纳米颗粒。
- [0069] 进一步,所述薄膜分散法通过将本发明的第一方面中所述的表面活性剂和/或功能性分子修饰材料溶解于所述的有机溶剂,使用旋转蒸发仪旋干有机溶剂并成膜,随后加入纯化水重新分散材料,使用超声波细胞破碎机处理所述的分散材料进而获得脂溶性纳米颗粒。
- [0070] 进一步,所述脂溶性纳米颗粒的粒径范围选自50~1000nm。
- [0071] 进一步,所述脂溶性纳米颗粒的粒径范围选自80~1000nm。
- [0072] 进一步,脂溶性纳米颗粒的平均粒径为122.1nm。
- [0073] 进一步,所述步骤2) 制备冻干粉末的方法包括将所述的脂溶性纳米颗粒和所述的药物混合获得混合溶液,混合溶液干燥后获得冻干粉末。
- [0074] 进一步,所述药物与所述脂溶性纳米颗粒重量比选自1:10~1:50000。
- [0075] 进一步,所述药物与所述脂溶性纳米颗粒重量比选自1:500~1:50000。
- [0076] 进一步,所述干燥的方法包括冷冻干燥法、常压干燥法、减压干燥法、真空干燥法、微波干燥法中的一种或多种。

- [0077] 进一步,所述干燥的方法为冷冻干燥法。
- [0078] 进一步,所述冷冻干燥的程序包括预冻程序、升华干燥和解析干燥。
- [0079] 进一步,所述混合溶液的包材包括西林瓶、冻干安瓶、冻干泡罩。
- [0080] 进一步,所述冻干粉末的保存方法为充氮保护并密封、低温避光保存。
- [0081] 进一步,所述步骤3)制备脂溶性纳米粒组合物的方法包括使用所述的液态非水溶剂溶解所述的冻干粉末进而获得脂溶性纳米粒组合物。
- [0082] 进一步,所述脂溶性纳米粒组合物的使用方法为与缓冲液混合均匀后进行局部注射或细胞转染。
- [0083] 进一步,所述液态非水溶剂与所述冻干粉末重量比选自5:1~1000:1。
- [0084] 本发明的第四方面提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括1)本发明的第一方面所述的脂溶性纳米颗粒、本发明的第二方面所述的脂溶性纳米粒组合物或本发明的第三方面所述的方法制备的脂溶性纳米粒组合物和/或2)药学上可接受的载体。
- [0085] 本发明的第五方面提供了本发明的第一方面所述的脂溶性纳米颗粒、本发明的第二方面所述的脂溶性纳米粒组合物、本发明的第三方面所述的方法制备的脂溶性纳米粒组合物或本发明的第四方面所述的药物组合物在制备治疗肿瘤的产品中的应用。
- [0086] 进一步,所述肿瘤选自血液肿瘤、实体肿瘤。
- [0087] 进一步,所述实体肿瘤包括前列腺癌、膀胱癌、肝癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、肺癌、软骨肉瘤、甲状腺癌、肾癌、间皮瘤、骨肉瘤、胆管癌、卵巢癌、胃癌、脑膜瘤、胰腺癌、多发性鳞状细胞瘤、口腔癌、食管癌、结直肠癌、乳腺癌、成神经管细胞瘤、鼻咽癌、胸腺癌、淋巴恶性肿瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤或黑色素瘤。
- [0088] 进一步,所述血液肿瘤包括急性白血病、慢性白血病、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金氏疾病、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、重链疾病、骨髓增生异常综合征、多毛细胞白血病或脊髓发育不良。
- [0089] 本发明的第六方面提供了一种根据本发明的第一方面所述的脂溶性纳米颗粒、本发明的第二方面所述的脂溶性纳米粒组合物、本发明的第三方面所述的方法制备的脂溶性纳米粒组合物的处方工艺优化方法,其特征在于,所述处方优化方法包括:采用包封率、脂溶性纳米粒组合物粒径、药物递送能力、脂溶性纳米粒组合物放置稳定性为指标,改变脂溶性纳米粒组合物的表面活性剂种类、功能性分子修饰材料种类、液态非水溶剂种类、有机溶剂的种类、各组分比例、制备方法中的一种或多种。
- [0090] 本发明的优点和有益效果:
- [0091] 本发明提供了一种低毒性的脂溶性纳米粒组合物,是一种非病毒基因递送载体,该脂溶性纳米粒组合物的载体材料为常规性材料,生产工艺简单,易于针对性研发;该脂溶性纳米粒组合物基因药物携带量大、包封率高、稳定性好、安全性强,且具有良好的通用性,可递送多种基因药物。该脂溶性纳米粒组合物均可治疗血液肿瘤和实体肿瘤。

## 附图说明

- [0092] 图1为乙醇注入法制备的脂溶性纳米粒组合物的粒径分布统计图;
- [0093] 图2为红色荧光蛋白表达效果图,其中1A是明场照片,1B是红色荧光照片;
- [0094] 图3为CCK-8检测细胞生长抑制率的结果图;

[0095] 图4为流式细胞检测微流控法制备的脂溶性纳米粒组合物转染细胞的效果图；

[0096] 图5为流式细胞验证基因药物递送效率的效果图。

### 具体实施方式

[0097] 本发明通过广泛而深入的研究,通过使用磷脂和胆固醇-PEG2k-转铁蛋白制备了一种低毒性的脂溶性纳米粒组合物,制得的脂溶性纳米粒组合物为油性溶液,可与一定的缓冲液混合均匀后进行局部注射或细胞转染操作。

[0098] 在本发明中,术语“脂溶性纳米颗粒”是指包含通过分子间力彼此物理结合的多个(即多于一个)脂溶性分子的颗粒。术语“脂溶性纳米粒组合物”指使用“脂溶性纳米颗粒”与需要递送的药物(例如基因药物)通过自组装方式形成的复合载药颗粒。本发明的脂溶性纳米颗粒和脂溶性纳米粒组合物可以用于各种目的,包括在体外和体内将封装的或缔合的(例如,复合的)诸如核酸的治疗剂递送至细胞,从而诱导期望蛋白质的表达或者抑制靶基因的表达。因此,本发明的实施方案提供通过使有此需要的对象接触封装适合的治疗剂或与适合的治疗剂缔合的脂溶性纳米粒组合物,来治疗或预防所述对象的疾病和病症的方法,其中所述脂溶性纳米粒组合物包含一种或多种本发明描述的脂溶性纳米颗粒。

[0099] 在本发明中,术语“表面活性剂”是指降低液体的表面张力和两种液体之间的界面张力,以使它们更容易扩散的材料。合适的表面活性剂的实例包括但不限于非离子型、离子型(阴离子型或阳离子型)或两性离子型(或其中表面活性剂的头部含有两个带相反电荷的基团的两性型)表面活性剂。阴离子型表面活性剂的实例包括但不限于基于硫酸根、磺酸根或羧酸根阴离子的那些,如全氟辛酸盐(PFOA或PFO)、烷基苯磺酸盐、皂类、脂肪酸盐或烷基硫酸盐,如全氟辛烷磺酸盐(PFOS)、十二烷基硫酸钠(SDS)、月桂基硫酸铵或十二烷基醚硫酸钠(SLES)。阳离子型表面活性剂的实例包括但不限于基于季铵阳离子的那些,如烷基三甲基铵,包括鲸蜡基三甲基溴化铵(CTAB,也称为十六烷基三甲基溴化铵),鲸蜡基氯化吡啶鎓(CPC)、聚乙氧基化牛脂胺(POEA)、苯扎氯铵(BAC)或苜蓿素氯铵(BZT)。两性离子型表面活性剂的实例包括但不限于十二烷基甜菜碱、椰油酰胺丙基甜菜碱或椰油两性甘氨酸盐。非离子型表面活性剂的实例包括但不限于烷基聚(环氧乙烷)、烷基酚聚(环氧乙烷)、聚(环氧乙烷)和聚(环氧丙烷)的共聚物(商业上称为泊洛沙姆或泊洛沙胺)、烷基多聚葡萄糖苷(包括辛基葡萄糖苷和癸基麦芽糖苷)、脂肪醇(包括鲸蜡醇和油醇)、椰油酰胺MEA、椰油酰胺DEA、或聚山梨醇酯(包括吐温20、吐温80)、十二烷基二甲基氧化胺或磷脂。在本发明的具体实施例中,所述表面活性剂为磷脂。

[0100] 在本发明中,术语“磷脂”是指包含甘油二酯、磷酸基团和简单有机分子例如胆碱的众多脂质中的任一种。磷脂的实例包括但不限于天然磷脂、半合成磷脂或合成磷脂中的一种或多种;优选地,所述天然磷脂包括大豆磷脂、蛋黄磷脂、二山萮酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二反式油酰磷脂酰胆碱、二月桂酰磷脂酰胆碱、1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰胆碱、单棕榈酰磷脂酰胆碱、单硬脂酰胆碱、蛋黄脂酰磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二油酰磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺、蛋黄磷脂酰甘油、大豆磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油、二油酰磷脂酰甘油、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油、大豆磷脂酰丝氨酸、二硬脂酰磷脂酰丝氨酸、二棕榈酰磷脂酰丝氨酸、二油酰磷脂酰丝氨酸、

二肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸、蛋黄鞘磷脂、二硬脂酰鞘磷脂、二棕榈酰鞘磷脂、大豆磷脂酰肌醇、二棕榈酰磷脂酰肌醇、二油酰磷脂酰肌醇、大豆磷脂酸、蛋黄磷脂酸、二肉豆蔻酰磷脂酸或二棕榈酰磷脂酸；优选地，所述半合成磷脂包括氢化磷脂；优选地，所述合成磷脂包括DDPC、DEPC、DOPC、DPPC、DRPC、DLPC、DMPC、DSPC、POPC或DMPC。

[0101] 在本发明中，术语“功能性分子修饰材料”包括具有生物学上所需的特性的任何分子修饰材料。功能性分子修饰材料的实例包括但不限于蛋白、核酸或化合物中的一种或多种；优选地，所述蛋白包括但不限于胆固醇-PEG-转铁蛋白、DSPE-PEG-转铁蛋白、抗原、抗体、植物凝集素或穿膜肽；优选地，所述核酸包括但不限于DNA、RNA、转铁蛋白核酸适配体；优选地，所述化合物包括但不限于碳水化合物；在本发明的具体实施例中，所述功能性分子修饰材料为胆固醇-PEG-转铁蛋白；优选地，所述胆固醇-PEG-转铁蛋白包括但不限于胆固醇-PEG2k-转铁蛋白、胆固醇-PEG3K-转铁蛋白、胆固醇-PEG4K-转铁蛋白或胆固醇-PEG5K-转铁蛋白；更优选地，所述胆固醇-PEG-转铁蛋白为胆固醇-PEG2k-转铁蛋白。

[0102] 在本发明中，术语“非水溶剂”或“液态非水溶剂”涉及不在水的基础上的溶剂。术语“非水溶剂”包括但不限于无水的溶剂。换句话说，非水溶剂可包含微量的水。优选地，水的量少于5vol.-%，然后是2%vol.-%、1%vol.-%，更优选的少于0.5vol.-%，少于0.1vol.-%、少于0.01vol.-%或少于0.001vol.-%。具体的是非极性的溶剂、具有比水小的偶极矩的溶剂和疏水的溶剂，例如，几乎不与水混合或一点也不与水混合的溶剂。本发明所使用的术语“非水溶剂”包括但不限于植物油、动物油或烷烃类液态溶剂；优选地，所述植物油包括坚果油、茴香油、大豆油、杏仁油、玉米油、橄榄油、花生油、扁桃仁油、核桃油、腰果油、米糠油、罂粟籽油、棉籽油、芥花油、芝麻油、椰子油、亚麻籽油、肉桂油、丁香油、肉豆蔻油、莞荑油、柠檬油、橙油、红花油、可可脂、棕榈油、棕榈仁油、向日葵油、油菜籽油、蓖麻油；优选的，所述动物油包括鲸油、鱼油、麝香油、貂油；优选地，所述烷烃类液态溶剂包括二油酸甘油酯、三丙酸甘油酯、三丁酸甘油酯、聚氧乙烯油衍生物、中链甘油三酯(MCT)、油酸、花生四烯酸、氢化油、角鲨烯、单油酸甘油酯(40型)及其混合物；在本发明的具体实施例中，所述液态非水溶剂为中链甘油三酯、大豆油、玉米油、角鲨烯、油酸或花生四烯酸。

[0103] 术语“有机溶剂”是本领域已知的，和涉及通常用于化学工业中的碳基础的物质，能够溶解或分散一个或多个物质。一般而言，有机溶剂是比水更亲脂性的或疏水性的。因而，它们的logP值通常大于零。依照本发明，有机溶剂涉及未取代的烃类溶剂如石蜡族的、脂肪族的和芳香族的烃和它们的含有杂原子的衍生物，如氧(醇、酮、乙二醇酯)、卤素(例如四氯化碳)、氮(例如，DMF、二甲基甲酰胺和乙腈)或硫(例如，DMSO、二甲基亚砷)。通常地使用的有机溶剂包括但不限于甲醇、乙醇、己二醇、丙二醇(PG)、丙三醇、乙腈、丁酮、1,1,1-三氟乙烷(TFE)、六氟异丙醇(HFIP)、乙酸乙酯、四氯化碳、丁醇、二丁基醚、二乙基醚、环己胺、甲叉二氯(二氯甲烷)、己烷、乙酸丁酯、二异丙基醚、苯、二戊醚(dipentyl ether)、氯仿、庚烷、四氯乙烯、甲苯、十六烷、二甲基甲酰胺(DMF)、N-甲基吡咯烷酮(N-methylpyrrolidone)(NMP)、二甲基乙酰胺(DMA)、四氢呋喃(THF)、甘油、二氧杂环乙烷及其混合物。在本发明的具体实施例中，所述有机溶剂为乙醇。

[0104] 在本发明中，术语“药物”是指向受试者施用的化合物、肽、核酸或其它实体，以引发期望的生物应答。药物的实例包括但不限于基因药物、化学药物；优选地，药物还包括盐、溶剂化物、异构体、活性代谢物或药物的组合。术语“基因药物”涉及能够用于治疗或预防受

试者的疾病或病症的任何DNA或RNA结构或核酸序列。化学药物的实例包括但不限于抗生素、抗癌剂、麻醉剂、镇痛剂、激素、抗糖尿病药和代谢病症药物，例如头孢唑林、甲硝唑、布比卡因、利多卡因、丁丙诺啡、紫杉醇和多西他赛。

[0105] 本发明中所使用的基因药物包括但不限于DNA、RNA药物。优选地，所述DNA药物包括双链DNA、单链DNA药物；优选地，所述RNA药物包括双链RNA、单链RNA药物。优选地，所述双链DNA包括质粒；所述单链DNA包括DNA核酸适配体；优选地，所述单链RNA包括RNA核酸适配体、mRNA、ncRNA、或反义寡核苷酸ASO；优选地，所述ncRNA包括miRNA、siRNA、shRNA、saRNA、sgRNA、piRNA、lncRNA、circRNA或其他调控性RNA；在本发明的具体实施例中，所述基因药物包括质粒药物或mRNA药物；进一步，所述质粒药物包括质粒、编码标签蛋白的基因序列和/或目的基因；所述mRNA药物包括mRNA和/或编码标签蛋白的基因序列。

[0106] 在本发明中，术语“质粒”是指可存在于微生物中（天然地或通过引入微生物）、与微生物的染色体（一个或多个）物理上分开并且独立于染色体（一个或多个）复制的核酸分子。如上所述，质粒通常是双链环状DNA分子，但也可以是线性DNA分子和/或RNA分子。质粒以约1kb至大于2Mb的尺寸范围存在。质粒还以从低拷贝数至高拷贝数范围的拷贝数/细胞存在。质粒可以被修饰以包括目标基因、标签。

[0107] 质粒的非限制性实例包括pQE-12、pUC-系列、pBluescript (Stratagene)、pET-系列表达载体(Novagen)、pCRTOP0 (Invitrogen)、pJOE、pBACKBONE、pBBR1-MCS系列、pJB861、pBSMuL、pBC2、pUCPKS、pTACT1、pTRE、pCAL-n-EK、pESP-1、pOP13CAT、E-027pCAG Kosak-Cherry (L45a) 载体系统、pREP (Invitrogen)、pCEP4 (Invitrogen)、pMC1neo (Stratagene)、pXT1 (Stratagene)、pSG5 (Stratagene)、EBO-pSV2neo、pBPV-1、pDBPVMNTneo、pRSVgpt、pRSVneo、pSV2-dhfr、pIZD35、Okayama-Berg cDNA表达载体pcDV1 (Pharmacia)、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3 (Invitrogen)、pSPORT1 (GIBCO BRL)、pGEMHE (Promega)、pLXIN、pSIR (Clontech)、pIRES-EGFP (Clontech)、pEAK-10 (EdgeBiosystems)、pTriEx-Hygro、pCINeo (Promega)、pUC19、pMB1、pSC101、pBEU1、pBEU2、pDF41、pDF42、pBR322、ptdTomato-N1或pcDNA3.1。在本发明的具体实施例中，所述质粒为ptdTomato-N1或pcDNA3.1。

[0108] 在本发明中，目的基因包括但不限于MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2 (MAGE-B2)、MAGE-Xp3 (MAGE-B3)、MAGE-Xp4 (MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-05、WT1 (威尔姆氏瘤抗原1)、MUC1、LMP2 (来自厄泼斯坦-巴尔病毒的潜伏膜蛋白2)、EGFRvIII、Her2、非-突变体p53、NY-ESO-1、PSMA (前列腺特异性膜抗原)、GD2、CEA (癌胚抗原)、MelanA/MART1、Ras突变体、gp100、突变体p53、蛋白酶3 (PR1)、BCR-Ab1断裂点、酪氨酸酶、存活蛋白、PSA (前列腺-特异性抗原)、hTERT (人端粒酶)、肉瘤易位断裂点、EphA2、PAP (前列腺酸性磷酸酶)、ML-IAP (ML-细胞凋亡抑制剂)、AFP (甲胎蛋白)、EpCAM (上皮细胞粘附分子)、ERG (TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3 (配对框3)、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、多聚唾液酸、MYCN (N-myc)、RhoC、TRP-2 (酪氨酸酶-相关蛋白2)、GD3、岩藻糖基GM1、间皮素、PSCA (前列腺干细胞抗原)、CYP1B1 (细胞色素P4501B1)、PLAC1 (胎盘-特异性1)、GM3、BORIS (印记位点调节因子样蛋白)、Tn (通过糖苷键连接于丝氨酸或苏氨酸的N-乙酰半乳糖胺)、GloboH、ETV6-AML、NY-BR-1、RGS5 (G蛋白信号转导调节因子5)、SART3 (T细胞3识别的鳞状上皮细胞癌抗原)、STn (唾液酸化Tn抗原)、碳酸酐酶IX、PAX5 (配对框5)、OY- TES1、精子蛋白

17、LCK (p56形式)、HMWMAA (高分子量黑素瘤相关抗原)、AKAP-4 (A-激酶锚定蛋白4)、SSX2 (滑膜肉瘤断裂点基因2)、XAGE1 (x抗原1)、B7H3、Legumain、Tie 2、Page4、VEGFR2 (血管内皮生长因子受体2)、MAD-CT-1 (黑素瘤癌睾丸抗原-1)、FAP (成纤维细胞活化蛋白)、PDGFR-b (血小板-衍生生长因子受体-b)、MAD-CT-2 (黑素瘤癌睾丸抗原-2), 和Fos-相关抗原1。优选地, 所述可插入质粒的基因包括WT1、MUC1、LMP2、EGFRvIII、Her2、p53、NY-ESO-1、PSMA、GD2、CEA、gp100、PR1、PSA、hTERT、EphA2、PAP、ML-IAP、AFP、EpCAM、ERG、NA17、PAX3、MYCN、RhoC、TRP-2、GD3、间皮素、PSCA、CYP1B1、PLAC1、GM3、BORIS、GloboH、ETV6-AML、NY-BR-1、RGS5、SART3、STn、PAX5、OY- TES1、LCK、HMWMAA、AKAP-4、SSX2、XAGE1、B7H3、Legumain、Tie 2、Page4、VEGFR2、MAD-CT-1、FAP、PDGFR-b或MAD-CT-2。

[0109] 在本发明中, 术语“标签”是指化学部分, 其是核苷酸、寡核苷酸或多核苷酸, 当其取代另一个序列或添加至另一个序列时, 为该序列提供了额外的用途, 或赋予了有用的性质, 特别是在对其检测或分离方面。本发明中所使用的标签包括但不限于GFP、EGFP、mFruit蛋白、DsRed系列荧光蛋白、OFP或YFP; 优选地, 所述标签为GFP或EGFP。

[0110] 在本发明的具体实施例中, 所述质粒药物为pCDNA3.1-EGFP或ptdTomato-N1; 所述mRNA药物为mRNA-GFP。

[0111] 在本发明中, 术语“脂溶性纳米颗粒”是指具有通过连续包封脂质层与外部环境隔离的内部环境的复合物或结构。在本公开的环境(reverse micelle)中, 表述“包封脂质层”可以表示单层脂质膜(例如在胶团(micelle)或反胶团上发现)、双层脂质膜(例如在脂质体上发现)或由单和/或双层脂质膜形成的任何多层膜。包封脂质层通常在其整个圆周上是单层、双层或多层, 但是考虑其它构象可以是可能的, 使得该层其圆周上具有不同的构型。脂溶性纳米颗粒可以在其内部环境中包含其它囊泡结构(即, 其可以是多囊的)。术语“脂溶性纳米颗粒”包括多种不同类型的结构, 包括但不限于胶团、反胶团、单层脂质体, 多层脂质体和多囊脂质体, 只要满足本发明所述的颗粒大小限制。

[0112] 脂溶性纳米颗粒可以呈现各种不同的形状, 并且该形状可以在任何给定时间(例如, 在干燥后)改变。通常, 脂溶性纳米颗粒是球形或基本上球形的结构。“基本上球形”是指脂溶性纳米颗粒接近球形, 但可以不是完美球形。脂溶性纳米颗粒的其它形状包括但不限于椭圆形、长方椭圆形(oblong)、正方形、矩形、三角形、长方体、新月形、菱形、圆柱体或半球形状。可以形成任何规则或不规则形状。此外, 如果单个脂溶性纳米颗粒是多囊的, 则其可以包括不同的形状。例如, 外部形状可以是长方椭圆形或矩形的, 而内部形状可以是球形的。

[0113] 脂溶性纳米颗粒由单层脂质膜、双层脂质膜和/或多层脂质膜形成。脂质膜主要由脂质构成和形成, 但也可以包含其它组分。例如但非限制, 脂质膜可包括稳定化分子以帮助维持脂溶性纳米颗粒的大小和/或形状。可以使用本领域已知的任何稳定化分子, 只要其不负面影响脂溶性纳米颗粒用于本公开方法的能力。

[0114] 在本发明中, 术语“混悬液”是指固体微粒分散于液体分散介质中形成的液态分散体系, 所述液体分散介质包括但不限于水。

[0115] 在本发明中, 术语“分散”是指在连续液体相内分布或悬浮不连续固体相, 使得不连续固体相在超过可用时间段(例如分钟、小时或天数)不聚结。

[0116] 在本发明中, 术语“冷冻干燥法”是指将磷脂等膜材高度分散在水溶液中, 冷冻干

燥,然后再分散到水性介质(任选地含有药物)中,形成脂质体。

[0117] 在本发明中,术语“缓冲液”表示药学上可接受的缓冲液。术语“缓冲液”包括保持溶液的pH值例如在可接受的范围中的那些试剂,和包括但不限于组氨酸、TRIS®(三(羟基甲基)氨基甲烷)、柠檬酸盐、琥珀酸盐、乙醇酸盐等,如本发明所述。通常,本发明使用的“缓冲液”具有适合于约5-7、优选地约5.5-6.5的pH范围例如约pH 6的pKa和缓冲能力。

[0118] 在本发明中,术语“转染”用于表示能够将本发明中所述的脂溶性纳米粒组合体插入细胞的任意方法。转染技术包括但不限于:转化、电穿孔、显微注射、脂质体转染、吸附、感染或原生质体融合。

[0119] 在本发明中,术语“药物组合物”是指本发明中所述的一种或多种活性成分与其他化学组分如药学上可接受的载体和赋形剂的制剂。药物组合物的目的是促进活性成分(例如,根据本发明所述的任何相应实施方案的有或没有脂溶性纳米粒组合物的治疗活性剂)施用于受试者。

[0120] 在本发明中,术语“药学上可接受的载体”是指在以预期方式施用时不会对受试者造成显著刺激,且不会消除组合物中脂质体的活性和性质(例如,它们降低表面的摩擦系数的能力,如本发明在相应实施方案中的任一个中所述)的载体或稀释剂。载体的非限制性实例是:丙二醇、盐水、乳液和有机溶剂与水的混合物,以及固体(例如粉末)和气体载体。在本发明所述任何实施方案的一些实施方案中,组合物包含水性载体,其是药学上可接受的载体,例如,其中组合物是溶液。在本发明中,术语“赋形剂”是指添加到药物组合物中以进一步促进本发明的活性成分的施用或增加货架期稳定性的惰性物质。赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、各种糖和盐和各种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油、EDTA、EGTA、聚-L-赖氨酸、聚乙烯亚胺、海美溴铵、聚乙二醇和其他聚阴离子或单阴离子。药物组合物可有利地采用泡沫、气溶胶或凝胶的形式。在本发明所述的任何相应实施方案的一些实施方案中,药物组合物还包含水溶性生物聚合物,例如多肽和/或多糖。聚合物可以是离子的或非离子的。

[0121] 本发明的药物组合物还可与其他治疗肿瘤的药物联用,其他治疗性化合物可以与主要的活性成分同时给药,甚至在同一组合物中同时给药。还可以以单独的组合物或与主要的活性成分不同的剂量形式单独给予其它治疗性化合物。

[0122] 在本发明中,术语“肿瘤”或“癌症”是指动物中任何异常细胞或组织的生长或增殖。如本发明所用,术语“癌症”或“肿瘤”涵盖实体肿瘤和血液肿瘤,并且还涵盖恶性、恶性前和良性生长,诸如发育异常。

[0123] 实体肿瘤非限制性实例包括前列腺癌、膀胱癌、肝癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、肺癌、软骨肉瘤、甲状腺癌、肾癌、间皮瘤、骨肉瘤、胆管癌、卵巢癌、胃癌、脑膜瘤、胰腺癌、多发性鳞状细胞瘤、口腔癌、食管癌、结直肠癌、乳腺癌、成神经管细胞瘤、鼻咽癌、胸腺癌、淋巴恶性肿瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤或黑色素瘤。

[0124] 血液肿瘤非限制性实例包括急性白血病、慢性白血病、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金氏疾病、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、重链疾病、骨髓增生异常综合征、多毛细胞白血病或脊髓发育不良。

[0125] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。以下实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。根据本发明的实质对本发明进行的简单改进都属于本发

明要求保护的范围。

[0126] 实施例1乙醇注入法制备脂溶性纳米粒组合物

[0127] 1、实验材料

[0128] 1) 试剂:磷脂(注射级,生产厂家沈阳天峰生物制药有限公司)、胆固醇-PEG2k-转铁蛋白(电泳纯,生产厂家西安昊然生物科技有限公司)、纯化水(自制)、中链甘油三酯(药用级,生产厂家铁岭北亚药用油有限公司)、ptdTomato-N1质粒(注射级,生产厂家北京庄盟国际生物基因科技有限公司)、无水乙醇(分析纯,生产厂家北京市通广精细化工公司);

[0129] 2) 仪器:超声波细胞破碎机(JY92-IID,生产厂家南京新辰生物科技有限公司)、荧光显微镜(CKX53FL,生产厂家奥林巴斯);

[0130] 3) 培养基:DMEM高糖培养基、10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素(双抗);

[0131] 4) 细胞株:HepG2细胞株。

[0132] 2、实验方法

[0133] 1) 制备脂溶性纳米颗粒:称量磷脂0.9g,胆固醇-PEG2k-转铁蛋白0.1g,充分溶解于5ml无水乙醇中,随后加入至45ml纯化水中,得到粗混悬液。使用探头式超声设备处理上述混悬液,得到半透明的脂溶性纳米颗粒分散液。

[0134] 2) 取脂溶性纳米颗粒分散液0.1g与2 $\mu$ g ptdTomato-N1质粒均匀混合后,立即冷冻干燥除去水分,所得产品充氮保护并密封、低温避光保存。

[0135] 3) 使用中链甘油三酯充分溶解上述冻干粉末(中链甘油三酯:冻干粉末=20:1,w/w),既得脂溶性纳米粒组合物,避光密封保存。测量脂溶性纳米粒组合物的平均粒径。

[0136] 4) 取1ml脂溶性纳米粒组合物,使用1ml PBS充分混合,涡旋分散5min,得乳液再与9ml DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清及1%双抗)混合备用。

[0137] 5) 培养HepG2细胞并将其接种至无菌6孔板中,待其完全贴壁后添加适量4)中制得的乳液,于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>细胞专用培养箱中继续培养48h后,使用荧光显微镜观察蛋白表达结果。

[0138] 3、实验结果

[0139] 脂溶性纳米粒组合物平均粒径的测量结果如图1所示,结果表明脂溶性纳米粒组合物的平均粒径为122.1nm,粒径分布指数(PDI)为0.10。

[0140] 荧光显微镜观察蛋白表达结果如图2所示,结果显示HepG2细胞的生长状态良好,表明成功将携带有红色荧光蛋白序列的质粒转染至HepG2细胞内并成功表达。

[0141] 实施例2高压均质法制备脂溶性纳米粒组合物

[0142] 1、实验材料

[0143] 1) 试剂:磷脂(注射级,生产厂家沈阳天峰生物制药有限公司)、胆固醇-PEG2k-转铁蛋白(电泳纯,生产厂家西安昊然生物科技有限公司)、纯化水(自制)、大豆油(分析纯,生产厂家上海麦克林生化科技股份有限公司)、ptdTomato-N1质粒(注射级,生产厂家北京庄盟国际生物基因科技有限公司)、无水乙醇(分析纯,生产厂家北京市通广精细化工公司);

[0144] 2) 仪器:CCK-8试剂盒(500T,生产厂家翌圣生物科技(上海)股份有限公司)、超声波细胞破碎机(JY92-IID,生产厂家南京新辰生物科技有限公司)、酶标仪(iMark,生产厂家伯乐生命医学产品(上海)有限公司);

[0145] 3) 培养基:DMEM高糖培养基、10%胎牛血清,1%青霉素-链霉素(双抗);

[0146] 4) 细胞株:HepG2细胞株。

[0147] 2、实验方法

[0148] 1) 制备脂溶性纳米颗粒:称量磷脂0.7g,胆固醇-PEG2k-转铁蛋白0.3g,充分溶解于5ml无水乙醇中,随后加入至45ml纯化水中,得到粗混悬液。使用高压均质机处理上述混悬液,得到半透明的脂溶性纳米颗粒分散液。

[0149] 2) 取脂溶性纳米颗粒分散液0.25g与0.5mg ptdTomato-N1质粒均匀混合后,立即冷冻干燥除去水分,所得产品充氮保护并密封、低温避光保存。

[0150] 3) 使用大豆油充分溶解上述冻干粉末(大豆油:冻干粉末=1000:1,w/w),既得脂溶性纳米粒组合物,避光密封保存。

[0151] 4) 取1ml上述脂溶性纳米粒组合物,使用1ml DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清及1%双抗)充分混合,涡旋分散5min,得乳液备用。

[0152] 5) 培养HepG2细胞并将其接种至无菌96孔板中,待其完全贴壁后首孔添加4)中所得乳液0.2ml,并以2倍浓度梯度逐级稀释,于37℃,5%CO<sub>2</sub>细胞专用培养箱中继续培养24、48、72h后,使用CCK-8试剂盒测定细胞活性,计算细胞生长抑制率,平行4次实验。

[0153] 3、实验结果

[0154] 实验结果如图3所示,结果显示实验组的细胞生长抑制率大部分为负值,与未处理组细胞相比,使用脂溶性纳米粒组合物处理细胞后,细胞的数量有一定增长,表明本发明所用材料均为无毒性材料,即使高剂量添加也不存在细胞毒性,反而能够加速细胞的生长;因此,本发明的安全性非常高。

[0155] 实施例3微流控法制备脂溶性纳米粒组合物

[0156] 1、实验材料

[0157] 1) 试剂:磷脂(注射级,生产厂家沈阳天峰生物制药有限公司)、胆固醇-PEG2k-转铁蛋白(电泳纯,生产厂家西安昊然生物科技有限公司)、纯化水(自制)、中链甘油三酯(药用级,生产厂家铁岭北亚药用油有限公司)、mRNA-GFP(注射级,生产厂家研锦生物技术(北京)有限公司)、无水乙醇(分析纯,生产厂家北京市通广精细化工公司);

[0158] 2) 仪器:高精度双通道注射泵(Fusion 4000-X,美国Chemyx公司)、微流控纳米制备芯片(Y型,苏州汶颢微流控技术股份有限公司)、激光粒径粒度分析仪(Nano-ZS90,英国马尔文仪器有限公司)、流式细胞仪(FACSAria,美国BD公司);

[0159] 3) 培养基:DMEM高糖培养基、10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素(双抗);

[0160] 4) 细胞株:HEK293T细胞株。

[0161] 2、实验方法

[0162] 1) 制备脂溶性纳米颗粒:称量一定量的磷脂以及胆固醇-PEG2k-转铁蛋白,充分溶解于一定量无水乙醇中,观察溶液性状。随后所得溶液填装至医用注射器中,领取一无菌无酶注射器填装无酶水,使用微流控法制备脂溶性纳米颗粒分散液,其中二者流速使用不同比例进行工艺摸索,所得脂溶性纳米颗粒使用激光粒径粒度分析仪测定粒径分布及zeta电位。

[0163] 2) 取脂溶性纳米颗粒分散液4g与100μg mRNA-GFP均匀混合后,立即冷冻干燥除去水分,所得产品低充氮保护并密封、低温避光保存。

[0164] 3) 使用中链甘油三酯充分溶解上述冻干粉末(中链甘油三酯:冻干粉末=5:1,w/

w), 既得脂溶性纳米粒组合物, 避光密封保存。

[0165] 4) 取1ml上述脂溶性纳米粒组合物, 使用1ml DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清及1%双抗)充分混合, 涡旋分散5min, 得乳液备用。

[0166] 5) 培养HEK293T细胞并将其接种至无菌6孔板中, 待其完全贴壁后添加适量4)中所得乳液, 于37℃, 5%CO<sub>2</sub>细胞专用培养箱中继续培养48h后, 使用流式细胞仪测定绿色荧光表达情况。在流式细胞检测图中, FL1H代表染剂A-V所染到的细胞。

[0167] 3、实验结果

[0168] 结果如表1、表2、表3、表4、图4所示, 结果表明当胆固醇-PEG2k-转铁蛋白用量大于30% (w/w)时, 乙醇溶液浑浊程度高, 形成混悬液, 不适宜继续进行制备, 因此其用量应在1~30%之间; 微流控技术可成功制备本发明所需的脂溶性纳米颗粒, 所得脂溶性纳米颗粒粒径范围约在80~1000nm范围, 均携带负电; 胆固醇-PEG2k-转铁蛋白用量在1~30%范围内, 乙醇及水的流速比在1:9~3:7范围内均可实现含有GFP片段标记的mRNA递送, 并成功表达蛋白。胆固醇-PEG2k-转铁蛋白用量不同, 转染效率有一定差异, 较优范围为10~20%。

[0169] 表1处方配比以及乙醇溶液性状

[0170]

胆固醇-PEG2k-转铁蛋白用量/g	磷脂用量/g	乙醇溶液性状
0.01	0.99	澄清溶液
0.1	0.9	澄清溶液
0.2	0.8	半透明溶液
0.3	0.7	半透明溶液
0.4	0.6	浑浊, 静置后明显沉淀
0.5	0.5	浑浊, 静置后明显沉淀

[0171] 表2不同流速比制备所得脂溶性纳米颗粒平均粒径

[0172]

胆固醇-PEG2k-转铁蛋白用量/g	磷脂用量/g	不同乙醇: 水流速比所得粒径/d.nm		
		1:9	2:8	3:7
0.01	0.99	120.36±28.13	101.92±34.75	80.55±32
0.1	0.9	376.43±55.52	540.37±223.40	1035.5±83.57
0.2	0.8	118.87±30.75	139.10±8.77	110.60±1.68
0.3	0.7	127.83±5.42	181.73±16.03	299.97±33.11

[0173] 表3不同流速比制备所得脂溶性纳米颗粒Zeta电位

[0174]

胆固醇-PEG2k-转铁蛋白用量/g	磷脂用量/g	不同乙醇: 水流速比所得电位/mv		
		1:9	2:8	3:7
0.01	0.99	-13.45±0.82	-8.64±1.10	-10.12±0.97
0.1	0.9	-22.83±1.22	-28.27±1.21	-27.97±1.30
0.2	0.8	-20.97±0.80	-20.67±1.37	-22.47±0.71
0.3	0.7	-21.80±0.60	-22.40±0.10	-27.53±1.37

[0175] 表4流式细胞检测不同比例所得脂溶性纳米粒组合物转染表达效果

[0176]

胆固醇-PEG2k-转铁蛋白用量	乙醇:水流速比	平均荧光强度
------------------	---------	--------

1%	3:7	38.03±12.19
10%	3:7	82.76±23.75
20%	2:8	95.16±18.08
30%	1:9	69.45±25.66

[0177] 实施例4薄膜分散法制备脂溶性纳米粒组合物

[0178] 1、实验材料

[0179] 1) 试剂:磷脂(注射级,生产厂家沈阳天峰生物制药有限公司)、胆固醇-PEG2k-转铁蛋白(电泳纯,生产厂家西安昊然生物科技有限公司)、纯化水(自制)、二油酸甘油酯、中链甘油三酯(药用级,生产厂家铁岭北亚药用油有限公司)、大豆油(分析纯,生产厂家上海麦克林生化科技股份有限公司)、玉米油(分析纯,生产厂家上海麦克林生化科技股份有限公司)、角鲨烯(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、油酸(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、花生四烯酸(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、pCDNA3.1-EGFP质粒(注射级,生产厂家北京庄盟国际生物基因科技有限公司)、无水乙醇(分析纯,生产厂家北京市通广精细化工公司);

[0180] 2) 仪器:旋转蒸发仪(RE-2002,生产厂家上海勒茗生物科技有限公司)、超声波细胞破碎仪(JY92-IIID,生产厂家南京新辰生物科技有限公司)。

[0181] 2、实验方法

[0182] 1) 制备脂溶性纳米颗粒:称量磷脂0.9g,胆固醇-PEG2k-转铁蛋白0.1g,充分溶解于5ml无水乙醇中,使用旋转蒸发仪旋干乙醇成膜,加入纯化水后重分散材料,使用超声波细胞破碎仪制备脂溶性纳米颗粒分散液。

[0183] 2) 取脂溶性纳米颗粒分散液40g与2mgpCDNA3.1-EGFP质粒均匀混合后,立即冷冻干燥除去水分,所得产品充氮保护并密封、低温避光保存。

[0184] 3) 使用一定量的溶剂充分溶解上述冻干粉末(溶剂:冻干粉末=20:1,w/w),观察溶解效果。

[0185] 3、实验结果

[0186] 结果如表5所示,结果表明,随着胆固醇-PEG2k-转铁蛋白用量增大,脂质纳米粒分散液的浊度也增大,表明其分散性有所降低。其中,当胆固醇-PEG2k-转铁蛋白添加量为1~30%时,可选择中链甘油三酯,大豆油,玉米油,角鲨烯及花生四烯酸作为分散溶剂;当胆固醇-PEG2k-转铁蛋白添加量为1~20%时,可选择二油酸甘油酯以及油酸作为分散溶剂;当胆固醇-PEG2k-转铁蛋白添加量大于20%时,二油酸甘油酯以及油酸无法良好分散脂质纳米粒,不适宜作为分散溶剂使用。

[0187] 表5不同非水溶剂的浊度评分表

	胆固醇-PEG2k-转铁蛋白用量	二油酸甘油酯	中链甘油三酯	大豆油	玉米油	角鲨烯	油酸	花生四烯酸
[0188]	1%	1	1	1	1	1	2	1
	10%	3	2	2	2	2	2	2
	20%	3	2	2	2	2	4	3
	30%	5	4	4	4	4	5	4

[0189] 浊度评分:由1-5浊度递增,1为澄清透明,5为浑浊不透明。

[0190] 实施例5不同方法制备的脂溶性纳米粒组合物的比较

[0191] 1、对照组制备方法：

[0192] 1) 油相制备：试管中加入一定量的中链甘油三酯、大豆磷脂、胆固醇、DSPE-PEG2k-转铁蛋白，80℃水浴溶解；

[0193] 2) 水相制备：取mRNA及甘油溶于水中；

[0194] 3) 混合挤压：将油相加入水相，10000r/min剪切30min，探头超声破碎；通过挤压法反复挤压过0.45μm和0.22μm滤膜，即得纳米乳剂。

[0195] 2、实验组制备方法

[0196] 1) 制备脂溶性纳米颗粒：按照表6中所示称量一定量的磷脂以及胆固醇-PEG2k-转铁蛋白，通过不同方法制备得到脂溶性纳米颗粒分散液。

[0197] 2) 将脂溶性纳米颗粒分散液10g与2mg GFP-mRNA质粒均匀混合后，立即冷冻干燥除去水分，所得产品充氮保护并密封、低温避光保存。

[0198] 3) 使用一定量的溶剂充分溶解上述冻干粉末（溶剂：冻干粉末=20:1, w/w），备用。

[0199] 表6处方设计及工艺选择

分组	磷脂/g	胆固醇-PEG2k-转铁蛋白/g	mRNA/mg	分散溶剂	制备方法
[0200] 处方1	0.99	0.01	1.00	玉米油	乙醇注入法
处方2	0.90	0.10	1.00	花生四烯酸	微流控法
处方3	0.80	0.20	1.00	大豆油	薄膜分散法
处方4	0.70	0.30	1.00	中链甘油三酯	高压均质法

[0201] 3、包封率实验：

[0202] 1) 对照组：使用30kd超滤离心管处理样品，分离游离mRNA及脂质体，测定滤液中的mRNA浓度，并计算含量。

[0203] 2) 实验组：PBS=1:9混合并涡旋处理后，使用30kd超滤离心管处理样品，分离游离mRNA及脂质体，测定滤液中的mRNA浓度，并计算含量。

$$[0204] \quad \text{包封率} = \frac{\text{实际测定量}}{\text{理论添加量}} \times 100\%$$

[0205] 4、递送能力验证实验

[0206] 体外培养HUH-7细胞，待其生长至对数生长期，接种至6孔板中。接种密度20万个/孔。待其完全贴壁后添加适量脂溶性纳米粒组合物，于37℃，5%CO<sub>2</sub>细胞专用培养箱中继续培养48h后，使用流式细胞仪测定平均荧光强度。

[0207] 5、稳定性实验

[0208] 按照上述方法制备包载mRNA的对照组及实验组样品放置于4℃及20℃恒温环境中，于24h后使用30kd超滤离心管处理样品，分离游离mRNA，测定滤液中的mRNA浓度，并计算含量。

[0209] 6、实验结果

[0210] 包封率实验结果如表7所示，结果显示实验组的药物包封率范围为80.62±2.35%~94.80±2.30%，对照组的药物包封率范围为4.71±0.59%~11.98±1.43%，表明实验组的药物包封率远高于对照组的药物包封率。

[0211] 递送能力验证实验结果如图5、表8所示,结果显示实验组的平均荧光强度在 $22.3 \pm 2.47 \sim 57.63 \pm 11.47$ 之间,对照组的平均荧光强度在 $5.28 \pm 0.88 \sim 5.28 \pm 0.88$ 之间,表明实验组的基因递送效率远高于对照组。

[0212] 稳定性实验结果如表9所示,结果表明实验组的药物稳定性显著高于对照组。

[0213] 表7包封率对比结果

分组	对照组 (Mean $\pm$ SD, n=3)	实验组 (Mean $\pm$ SD, n=3)
处方1	$11.98 \pm 1.43\%$	$94.80 \pm 2.30\%$
处方2	$8.65 \pm 0.89\%$	$91.61 \pm 1.32\%$
处方3	$7.20 \pm 0.89\%$	$90.50 \pm 1.22\%$
处方4	$6.52 \pm 0.69\%$	$85.88 \pm 3.17\%$

[0215] 表8递送能力对比结果

分组	对照组	实验组
	平均荧光强度 (Mean $\pm$ SD, n=3)	平均荧光强度 (Mean $\pm$ SD, n=3)
处方1	$5.28 \pm 0.88$	$22.3 \pm 2.47$
处方2	$6.94 \pm 0.52$	$39.36 \pm 2.91$
处方3	$6.72 \pm 0.6$	$57.63 \pm 11.47$
处方4	$6.24 \pm 1.03$	$28.16 \pm 4.48$

[0217] 表924h含量稳定性对比结果

分组	对照组 (Mean $\pm$ SD, n=3)		实验组 (Mean $\pm$ SD, n=3)	
	4°C	20°C	4°C	20°C
处方1	$42.12 \pm 9.70\%$	$1.40 \pm 0.47\%$	$95.92 \pm 4.59\%$	$96.27 \pm 4.66\%$
处方2	$39.87 \pm 7.91\%$	$2.34 \pm 0.62\%$	$95.46 \pm 5.25\%$	$102.83 \pm 1.47\%$
处方3	$33.08 \pm 4.50\%$	$3.69 \pm 1.44\%$	$102.60 \pm 2.48\%$	$95.34 \pm 4.23\%$
处方4	$42.26 \pm 2.51\%$	$2.90 \pm 2.48\%$	$100.43 \pm 3.04\%$	$99.20 \pm 5.23\%$

[0219] 上述实施例的说明只是用于理解本发明的方法及其核心思想。应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也将落入本发明权利要求的保护范围内。

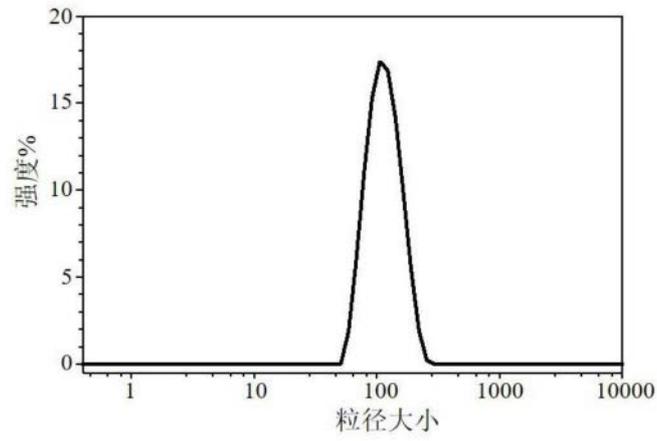


图1

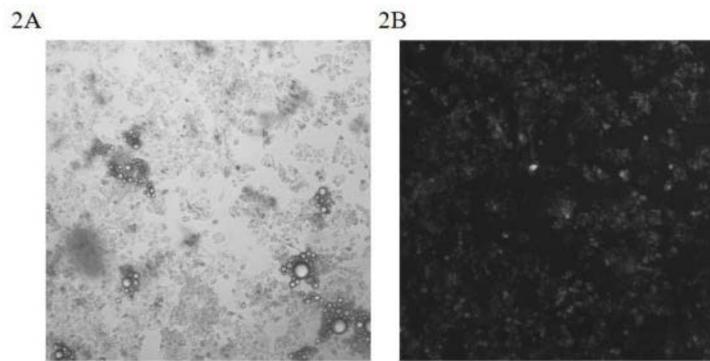


图2

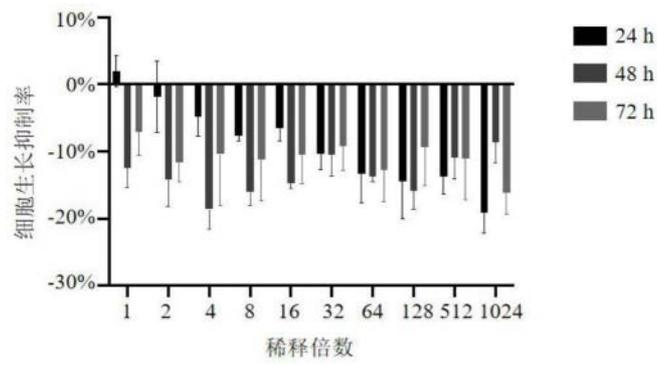


图3

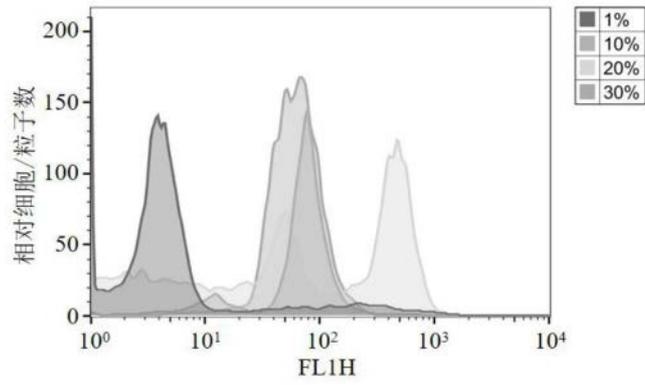


图4

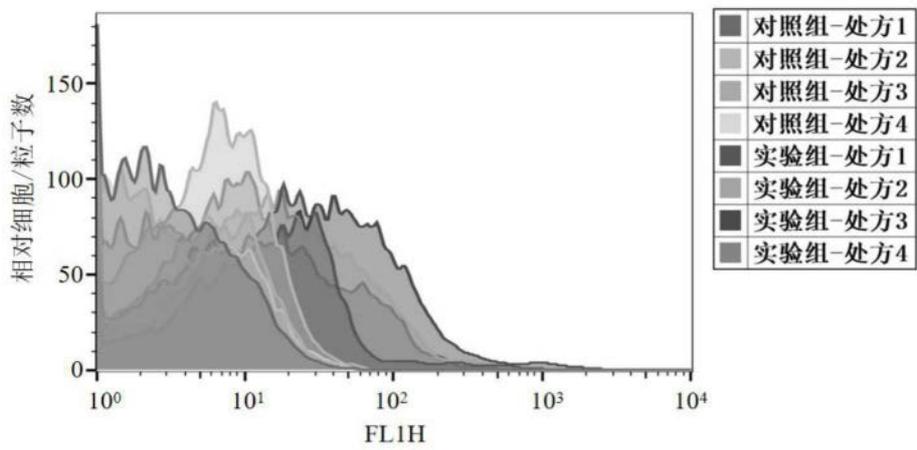


图5