

金属-磷脂复合物、金属-磷脂复合物颗粒和药物-脂质颗粒及其制备方法与应用

5

相关申请的交叉引用

[0001]本公开要求于 2022 年 08 月 09 日提交中国专利局的申请号为 202210951941.8、名称为“药物-脂质颗粒及其制备方法和应用”，2022 年 08 月 09 日提交中国专利局的申请号为 202210950392.2、名称为“金属-磷脂复合物颗粒及其制备方法和应用”，2022 年 08 月 09 日提交中国专利局的申请号为 202210950391.8、名称为“金属-磷脂复合物及其制备方法和应用”，3 件中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本公开中。

技术领域

[0002]本公开涉及生物技术领域，具体涉及一种金属-磷脂复合物、金属-磷脂复合物颗粒和药物-脂质颗粒及其制备方法与应用。

背景技术

[0003]随着分子生物学技术的不断发展，基因与疾病之间的关联性认识也越来越深入。核酸药物是指人工合成的具有疾病治疗功能的 DNA 或 RNA 片段，因其在疾病诊断和治疗过程中显示出巨大的应用潜力而备受关注。此类药物能够直接作用于致病靶基因或 mRNA，在基因水平上发挥治疗作用。与传统小分子药物和抗体药物相比，核酸药物不受靶点蛋白成药性的限制，可治疗的疾病更广泛，并可从根源上调控致病基因的表达。核酸药物还具有高效性、低毒性和高特异性等明显优势，有望成为继小分子药物和抗体药物之后的第三大类型药物。

[0004]然而，核酸药物在体内易被核酸酶降解，并且由于其分子量较大以及其带负电荷的特性，导致其难以穿过细胞膜发挥作用。因此，寻找安全、有效的核酸药物递送系统是核酸药物开发亟待解决的瓶颈问题。目前，能递送核酸药物的载体主要可以分为病毒载体和非病毒载体。病毒载体进入人体后会引发免疫反应，现使用较少；非病毒载体中较为常用的主要是纳米颗粒和小分子缀合物，与直接与核酸药物缀合的小分子缀合物相比，纳米颗粒能更有效地将核酸药物包裹起来，防止其在体内被核酸酶快速降解，从而提高其体内循环时间。纳米颗粒包裹核酸的机制是靠带有正电荷的阳离子脂质吸附带负电荷的核酸。然而，阳离子脂质的细胞毒性较大，其毒性作用机制为：①使细胞萎缩、有丝分裂数量减少和细胞质空泡化；②与蛋白激酶 C 等生物蛋白质相互作用从而会破坏其活性；③通过激活 p38 丝裂原活化蛋白激酶和核因子 κ B 转录因子触发多种促炎细胞因子和趋化因子的分泌。此外，可电离脂质是一种含有带正电荷的可电离胺基团的脂质，其在生理条件下（pH=7.4）不带电，但在较低 pH 值时会被质子化而带上正电荷。因此，可电离的脂质可被用来部分或完全替代阳离子脂质作为纳米颗粒的主要成分，负责吸附核酸。当包含可电离脂质的纳米颗粒进入生物细胞溶酶体后，在溶酶体内的低 pH 值（pH=4.0-6.5）环境中，可电离的脂质变为带正电的脂质。虽然可电离脂质降低了一些永久带正电荷的阳离子脂质的细胞毒性作用和高致炎症作用，但其细胞毒性及免疫原性依然较高。基于阳离子脂质和/或可电离脂质的脂质纳米粒（Lipid Nanoparticle, LNP）是目前可用于临床的纳米颗粒核酸药物递送系统，其中，阳离子脂质和/或可电离脂质作为 LNP 的主要成分，负责吸附核酸，同

时阳离子脂质和/或可电离脂质介导的细胞毒性及免疫原性依然是 LNP 毒性较大的重要原因之一。

[0005]因此，用递送系统递送带负电荷的药物（例如核酸药物、蛋白药物、多肽药物、小分子药物等）时，依赖阳离子脂质和/或可电离脂质开发的纳米颗粒递送系统均不能从根本上解决纳米颗粒递送系统的毒性问题，急需一种不使用阳离子脂质和/或可电离脂质的、毒性低的脂质体递送系统。

发明内容

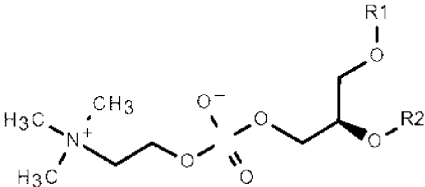
[0006]本公开的目的在于提供一种金属-磷脂复合物及其制备方法，以至少缓解一个现有技术中存在的技术问题。

[0007]为了实现上述目的，本公开特采用如下技术方案：

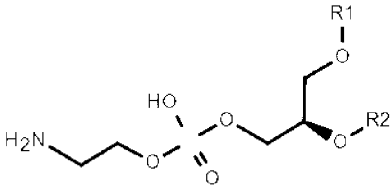
[0008]本公开提供的金属-磷脂复合物由磷脂分子部分、连接物分子部分和金属离子部分反应组成，该磷脂分子部分与该连接物分子部分相连接，该连接物分子部分与该金属离子部分通过配位键连接，且该金属-磷脂复合物不是阳离子脂质或可电离脂质。

[0009]进一步地，该磷脂分子部分选自卵磷脂（PC）、磷脂酰乙醇胺（PE）、磷脂酰丝氨酸（PS）、磷脂酸（PA）、磷脂酰甘油（PG）、1-磷酸神经酰胺（SP）、磷脂酰肌醇（PI）、磷脂酰苏氨酸（PT）、鞘磷脂（SM）、溶血卵磷脂（LPC）、溶血磷脂酰乙醇胺（LPE）、溶血磷脂酰丝氨酸（LPS）、溶血磷脂酸（LPA）、溶血磷脂酰甘油（LPG）、溶血磷脂酰肌醇（LPI）、溶血磷脂酰苏氨酸（LPT）、溶血鞘磷脂（LSM）、1-磷酸鞘氨醇（SIP），及其衍生物中一种或多种的组合。其中，“及其衍生物”中“其”是指“卵磷脂（PC）、磷脂酰乙醇胺（PE）、磷脂酰丝氨酸（PS）、磷脂酸（PA）、磷脂酰甘油（PG）、1-磷酸神经酰胺（SP）、磷脂酰肌醇（PI）、磷脂酰苏氨酸（PT）、鞘磷脂（SM）、溶血卵磷脂（LPC）、溶血磷脂酰乙醇胺（LPE）、溶血磷脂酰丝氨酸（LPS）、溶血磷脂酸（LPA）、溶血磷脂酰甘油（LPG）、溶血磷脂酰肌醇（LPI）、溶血磷脂酰苏氨酸（LPT）、溶血鞘磷脂（LSM）、1-磷酸鞘氨醇（SIP）”。本公开中，“及其衍生物”均为类似的含义。该磷脂分子部分，例如可以但不限于为卵磷脂（PC），卵磷脂（PC）衍生物，磷脂酰乙醇胺（PE），磷脂酰乙醇胺（PE）衍生物，磷脂酰甘油（PG），磷脂酰甘油（PG）衍生物，磷脂酰甘油（PG）和卵磷脂（PC），卵磷脂（PC）和卵磷脂（PC）衍生物，等。

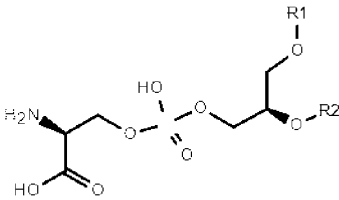
[0010]进一步地，该磷脂分子部分选自



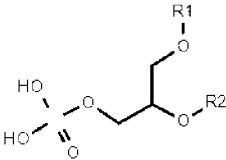
卵磷脂（PC）（式 1）



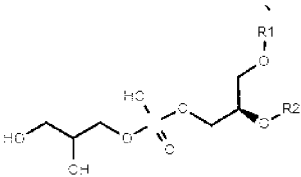
磷脂酰乙醇胺（PE）（式 2）



磷脂酰丝氨酸 (PS) (式 3)

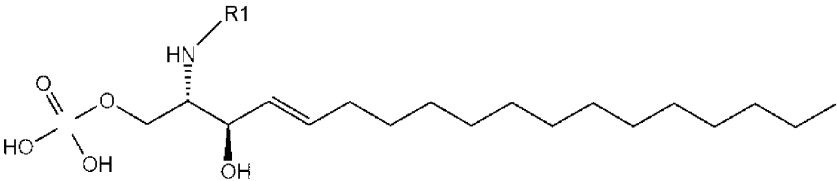


磷脂酸 (PA) (式 4)

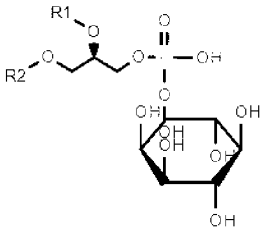


磷脂酰甘油 (PG) (式 5)

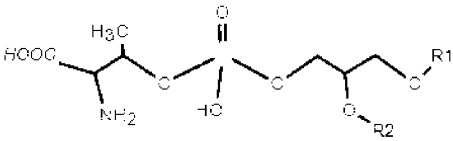
1-磷酸神经酰胺 (SP) (式 6)



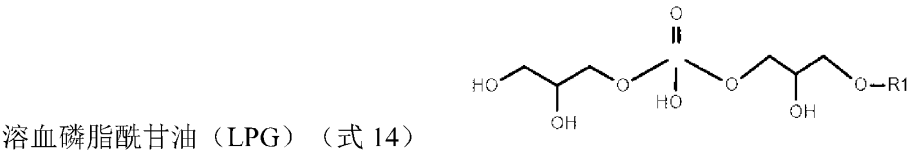
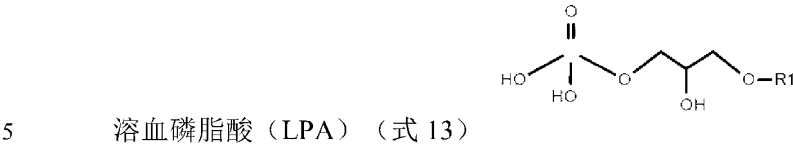
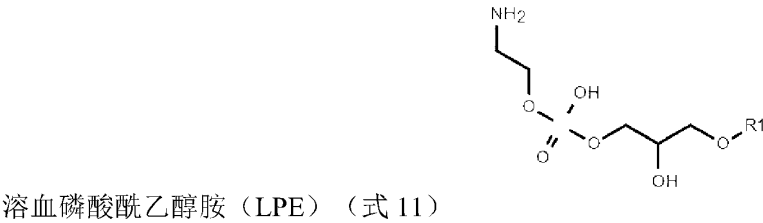
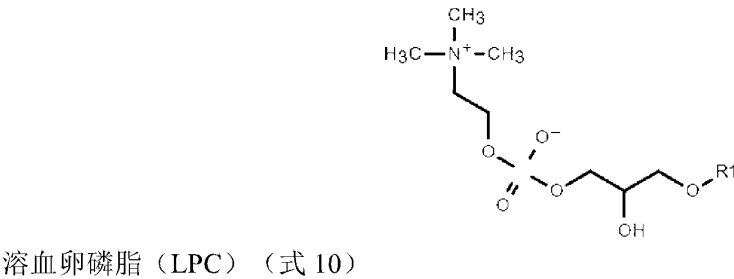
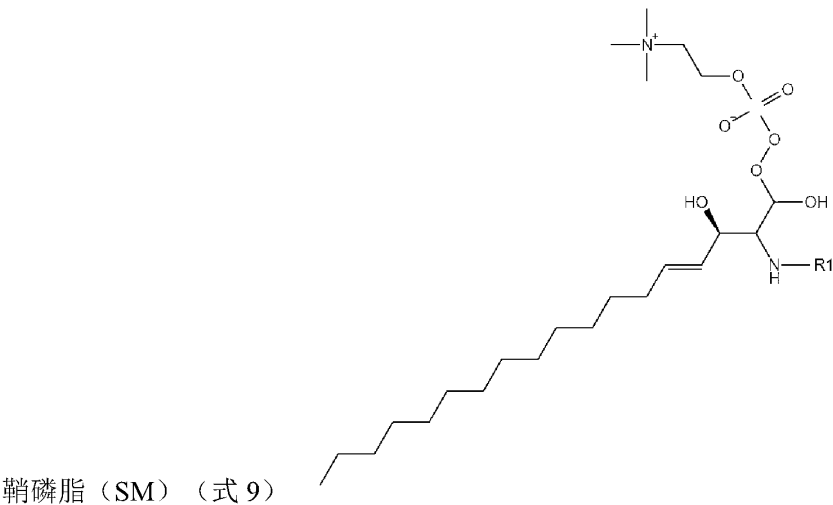
5

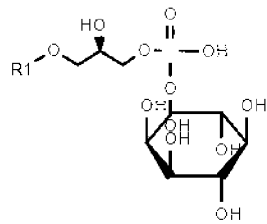


磷脂酰肌醇 (PI) (式 7)

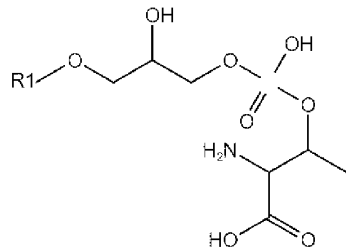


磷脂酰苏氨酸 (PT) (式 8)

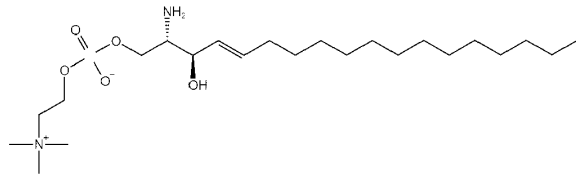




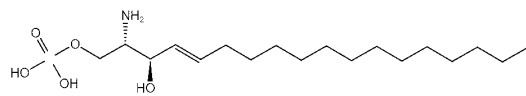
溶血磷脂酰肌醇（LPI）（式 15）



溶血磷脂酰苏氨酸（LPT）（式 16）

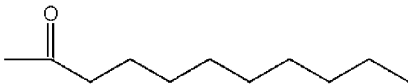


溶血鞘磷脂（LSM）（式 17）

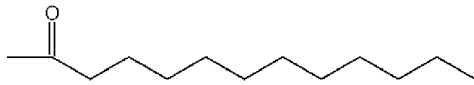


1-磷酸鞘氨醇（SIP）（式 18）

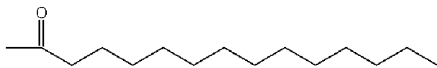
5 衍生物中一种或多种的组合；
其中，R1，R2 均独立地为：



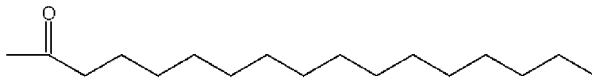
葵酰基



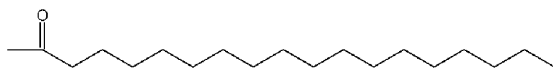
月桂酰基



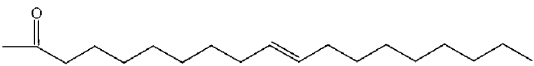
肉豆蔻酰基



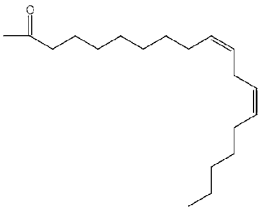
棕榈酰基



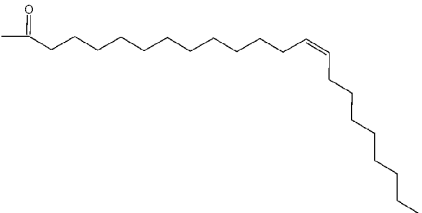
硬脂酰基



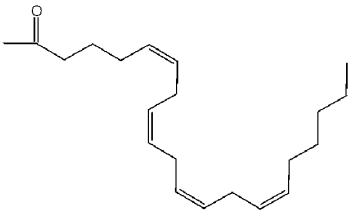
油酰基



亚油酰基

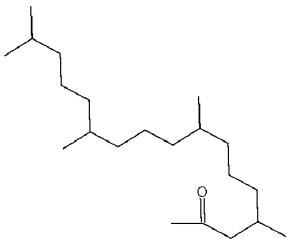


芥酰基



花生酰基

或

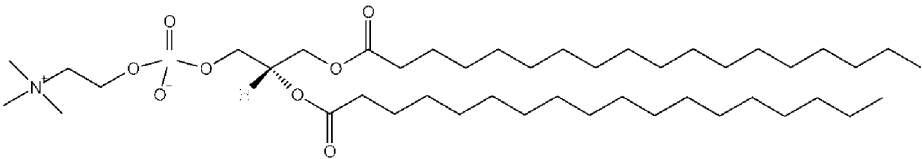


植烷酰基

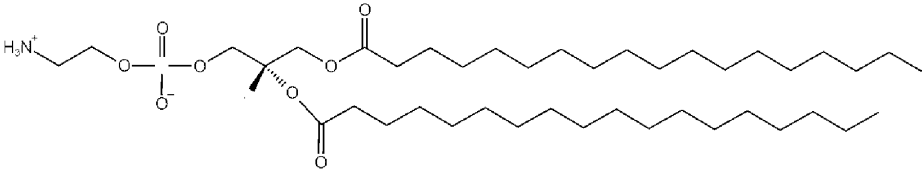
[0011]进一步地，该磷脂分子部分选自卵磷脂（PC）（式 1）、磷脂酰乙醇胺（PE）（式 2）、磷脂酸（PA）（式 4）、磷脂酰甘油（PG）（式 5），及其衍生物中一种或多种的组合。

[0012]进一步地，该磷脂分子部分选自二硬脂酰基磷脂酰胆碱（DSPC）、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺（DSPE）、二硬脂酰基磷脂酸（DSPA）、二硬脂酰基磷脂酰甘油（DSPG），及其衍生物中一种或多种的组合。

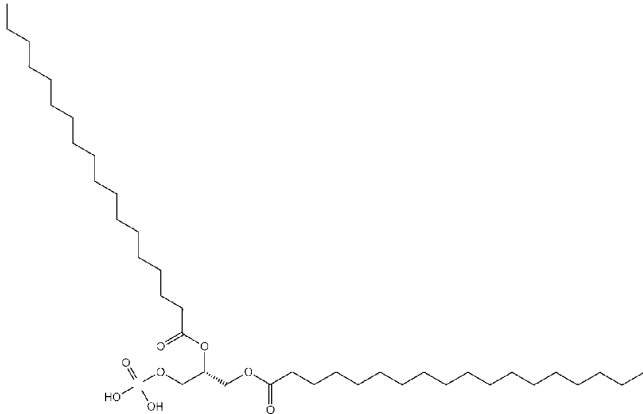
[0013]进一步地，该磷脂分子部分选自二硬脂酰基磷脂酰胆碱（DSPC）（式 46）



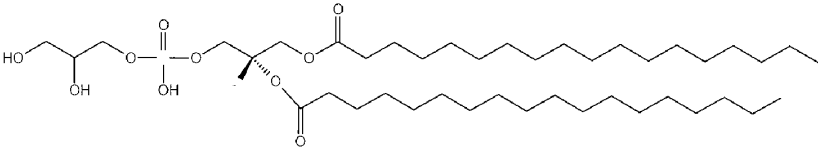
二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE) (式 47)



硬脂酰基磷脂酸 (DSPA) (式 48)



、二硬脂酰磷脂酰甘油 (DSPG)

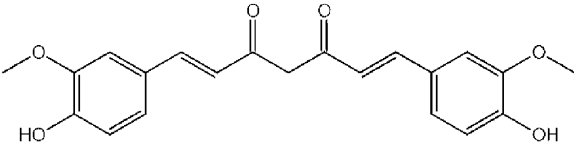


5 (式 49) 及其
衍生物中一种或多种的组合。

[0014]进一步地, 该磷脂分子部分选自 DSPC (式 46)、DSPE (式 47) 或 DSPA (式 48) 或 DSPG (式 49)。

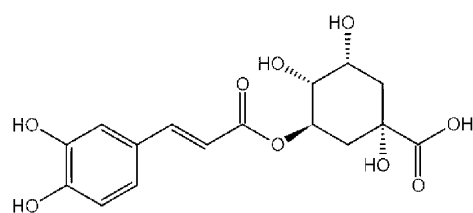
10 [0015]进一步地, 该连接物分子部分选自姜黄素、绿原酸、花青素、槲皮素、二氢杨梅素、橙皮素、柚皮素、芹菜素、儿茶素、茶多酚、表没食子儿茶素没食子酸酯、鞣花酸、桑色素、表儿茶素没食子酸酯、儿茶素没食子酸酯、没食子儿茶素没食子酸酯或平贝碱 C, 及其衍生物中一种或多种的组合。

[0016]进一步地, 该连接物分子部分选自



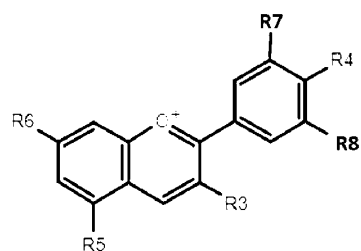
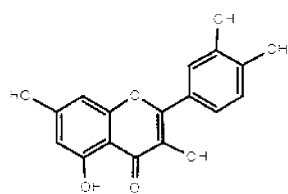
姜黄素 (式 19)

;



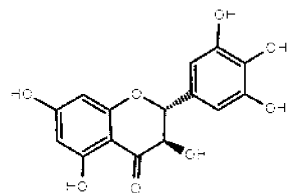
绿原酸（式 20）

;

花青素（式 21）
是 H 或糖基，R4、R5 和 R6 是 OH 或糖基；, R7 和 R8 是 H、OH 或 OCH₃, R3

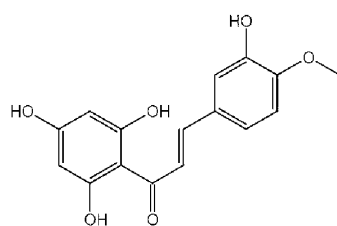
槲皮素（式 22）

;



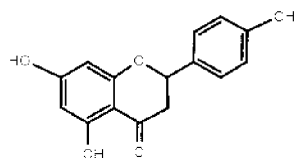
5 二氢杨梅素（式 23）

;



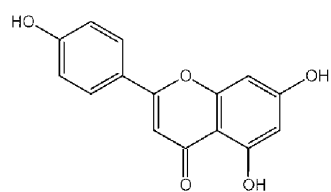
橙皮素（式 24）

;



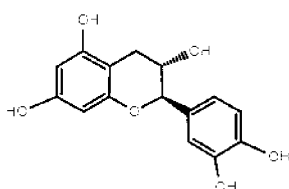
柚皮素（式 25）

;



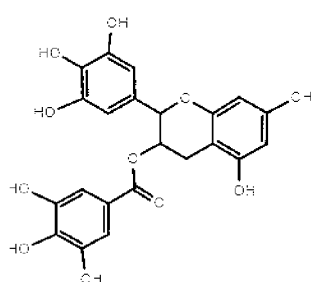
芹菜素 (式 26)

;



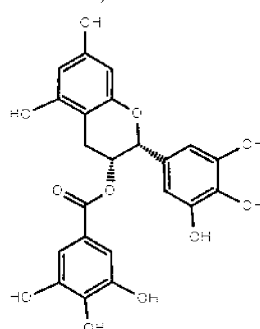
儿茶素 (式 27)

;



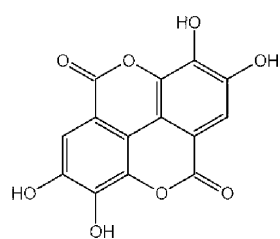
茶多酚 (式 28)

;



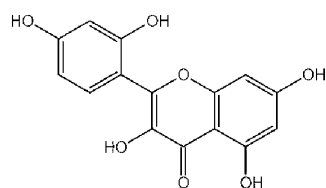
表没食子儿茶素没食子酸酯 (式 29)

;



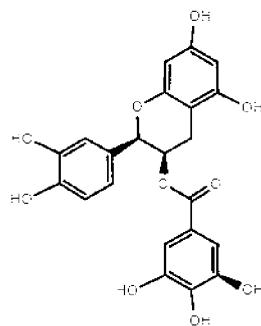
5 鞣花酸 (式 30)

;



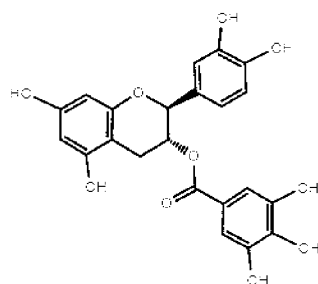
桑色素 (式 31)

;



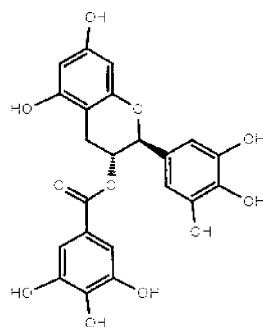
表儿茶素没食子酸酯 (式 32)

;



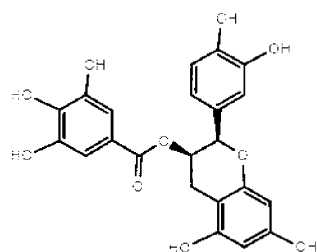
儿茶素没食子酸酯 (式 33)

;



没食子儿茶素没食子酸酯 (式 34)

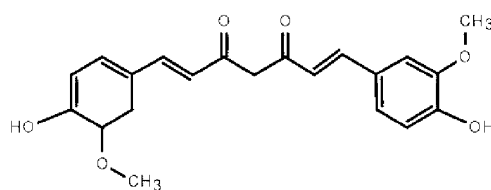
;



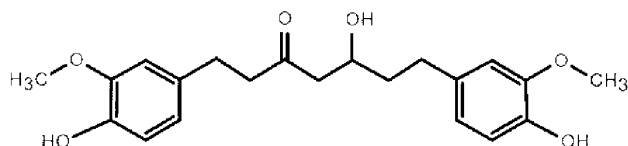
5 平贝碱 C (式 35)

, 及其衍生物中一种或多种的组合。

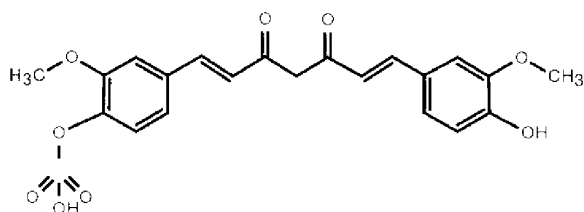
[0017]进一步地, 连接物分子部分选自姜黄素 (式 19)、



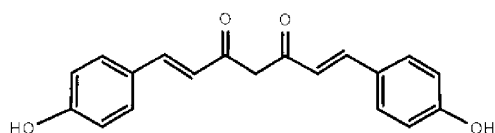
二氢姜黄素 (式 36)



六氢姜黄素 (式 37)



硫酸姜黄素 (式 38)



双去甲氧基姜黄素 (式 39)

中一种或多种

5

的组合。

[0018]进一步地, 该连接物分子部分选自姜黄素 (式 19)、橙皮素 (式 24)、茶多酚 (式 28), 及其衍生物中一种或多种的组合。

[0019]进一步地, 该连接物分子部分选自姜黄素 (式 19)、橙皮素 (式 24) 或茶多酚 (式 28)。

10

[0020]进一步地, 该金属离子部分选自 Fe^{3+} 、 Ag^+ 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mo^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pt^{2+} 、 Au^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ce^{3+} 、 Co^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Gd^{3+} 、 Ni^{3+} 、 W^{3+} 、 V^{3+} 、 Zr^{3+} 中一种或多种的组合。

[0021]进一步地, 该金属离子部分选自 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 中一种或多种的组合。

[0022]进一步地, 该金属离子部分选自 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 或 Al^{3+} 。

15

[0023]进一步地, 该金属-磷脂复合物由磷脂分子部分、连接物分子部分和金属离子部分制成, 该磷脂分子部分选自 DSPC、DSPE 或 DSPA, 该连接物分子部分选自姜黄素、橙皮素或茶多酚, 该金属离子部分选自 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 或 Al^{3+} 。

[0024]进一步地, 所述金属-磷脂复合物由磷脂分子部分、连接物分子部分和金属离子部分制成, 该磷脂分子部分选自 DSPC (式 46)、DSPE (式 47) 或 DSPA (式 48), 该连接物分子部分选自姜黄素 (式 19)、橙皮素 (式 24) 或茶多酚 (式 28), 该金属离子部分选自 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 或 Al^{3+} 。

20

[0025]进一步地, 该磷脂分子部分、该连接物分子部分和该金属离子部分的摩尔比为 1:1: (0.5~2)。

[0026]进一步地, 该磷脂分子部分为 DSPC (式 46), 该连接物分子部分选自姜黄素 (式 19), 该金属离子部分选自 Fe^{3+} 。

25

[0027]进一步地, 该磷脂分子部分、该连接物分子部分和该金属离子部分的摩尔比为 1:1:1。

[0028]进一步地, DSPC、姜黄素和 $\text{Fe}^{3+}/\text{Al}^{3+}$ 的摩尔比为 1:1:1。

[0029]进一步地, DSPC、橙皮素和 $\text{Fe}^{3+}/\text{Al}^{3+}$ 的摩尔比为 1:1:1。

[0030]进一步地, DSPC、茶多酚和 $\text{Fe}^{3+}/\text{Al}^{3+}$ 的摩尔比为 1:1:2。

[0031]进一步地, Fe^{3+} 选自 FeCl_3 , Al^{3+} 选自 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 。

5 [0032]本公开提供金属-磷脂复合物的制备方法, 包括以下步骤:

[0033]步骤一: 将磷脂分子与连接物分子反应连接形成磷脂复合物;

[0034]步骤二: 将步骤一中制备的所述磷脂复合物与金属离子通过配位键反应形成金属-磷脂复合物。

10 [0035]进一步地, 该步骤一中, 将该磷脂分子与该连接物分子溶于乙醇中反应, 之后加入正己烷, 沉淀得到该磷脂复合物。进一步地, 反应的条件包括 65°C 反应 2 小时。

[0036]进一步地, 该磷脂分子与该连接物分子的摩尔比为 1:1。

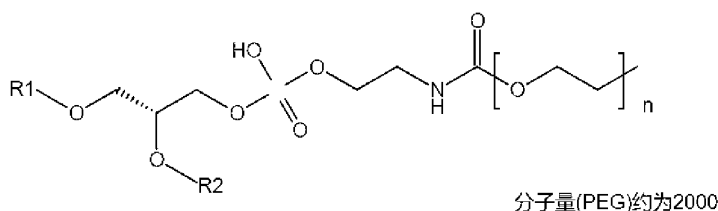
[0037]进一步地, 该步骤二中, 该磷脂复合物与该金属离子溶于乙醇反应后, 得到该金属-磷脂复合物。进一步地, 反应的条件包括 60°C 反应 2 小时。

15 [0038]进一步地, 该磷脂复合物与该金属离子的摩尔比为 1: (1~2)。

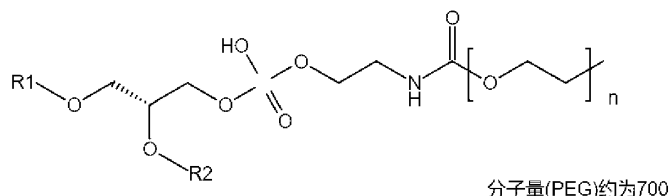
[0039]本公开提供一种金属-磷脂复合物颗粒 (Metal-chelated phospholipid complex nanoparticles, MPP), 其含有 (i) 上述金属-磷脂复合物、(ii) 抑制颗粒聚集的缀合的脂质, 其中该抑制颗粒聚集的缀合的脂质不是阳离子脂质或可电离脂质; 以及 (iii) 除该金属-磷脂复合物和该抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的非阳离子脂质或非可电离脂质。其中, “(iii) 除该金属-磷脂复合物和该抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的非阳离子脂质或非可电离脂质” 可简称为 “非阳离子脂质或非可电离脂质”。

[0040]进一步地, 该抑制颗粒聚集的缀合的脂质包括聚乙二醇 (PEG)-脂质缀合物和/或 PEG-二烷氧基丙基 (DAA)。

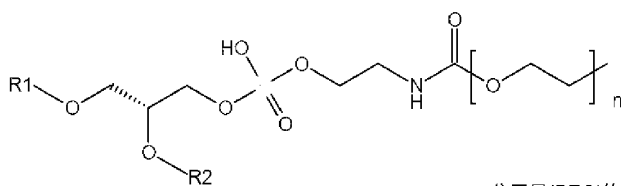
25 [0041]进一步地, 该 PEG-脂质缀合物选自磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (PE-PEG2000) (式 42)



磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 700 (PE-PEG700) (式 43)

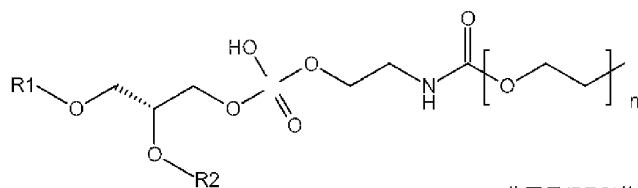


磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 1000 (PE-PEG1000) (式 44)



分子量(PEG)约为1000 ;

磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 5000 (PE-PEG5000) (式 45)



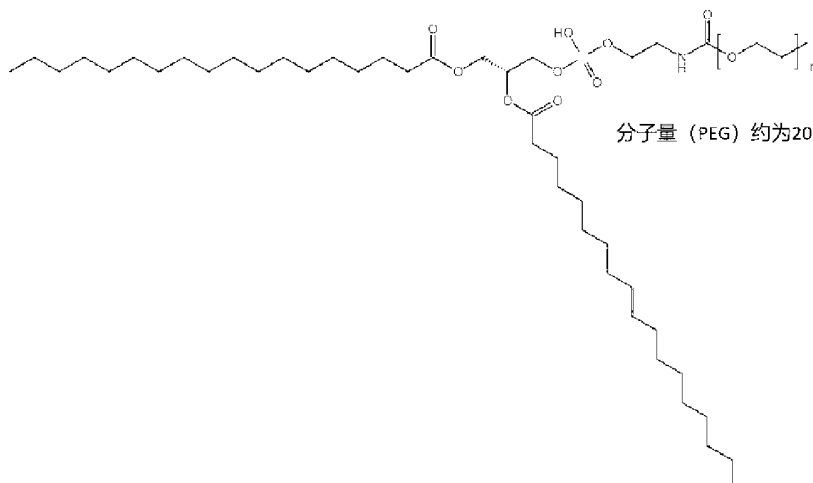
分子量(PEG)约为5000

，及其衍生物中一种或多种的组合；

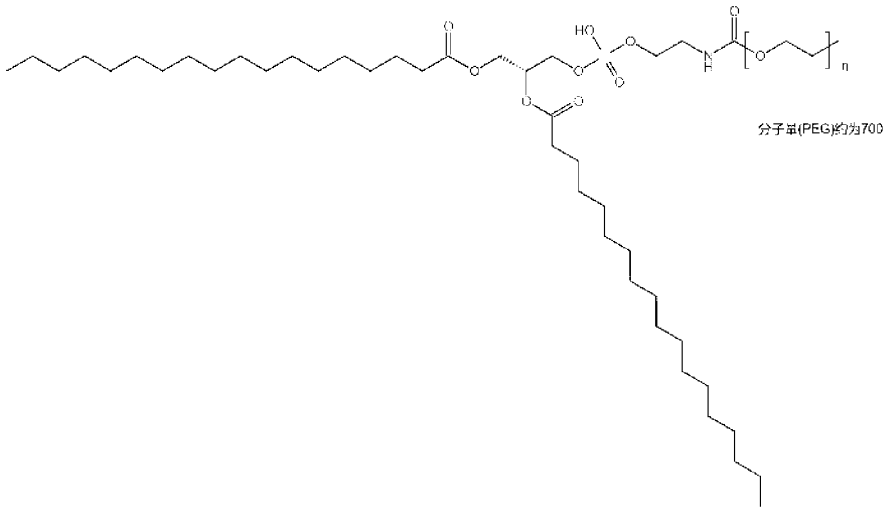
- 5 R1, R2 均独立地为：葵酰基、月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基、油酰基、亚油酰基、芥酰基、花生酰基或植烷酰基。

[0042]进一步地，该 PEG-脂质缀合物选自 DSPE-PEG2000、DSPE-PEG700、DSPE-PEG1000 或 DSPE-PEG5000 中一种或多种的组合。

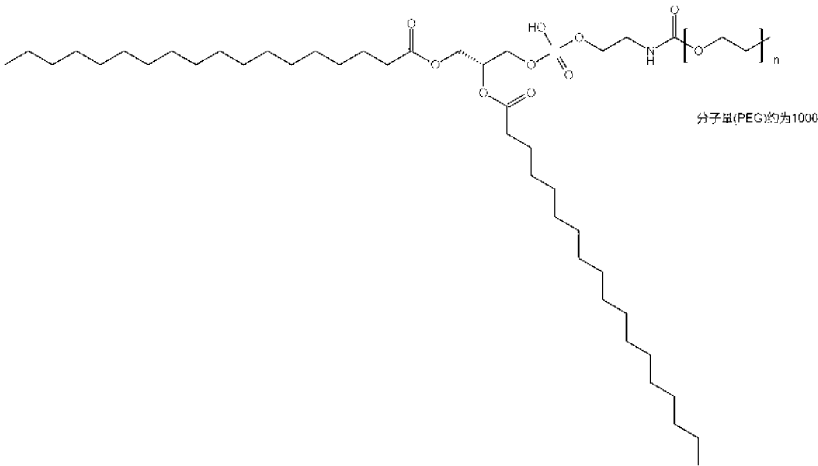
[0043]进一步地，该 PEG-脂质缀合物选自 DSPE-PEG2000 (式 53)



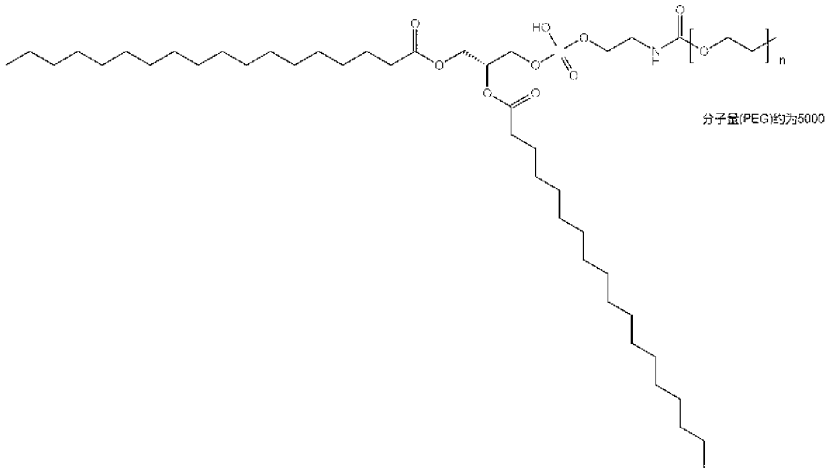
分子量 (PEG) 约为2000



(式 50)
DSPE-PEG1000 (式 51)



或 DSPE-PEG5000



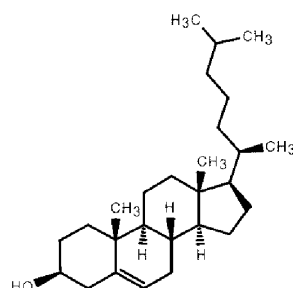
(式 52)
5 多种的组合。
[0044]进一步地，PEG-脂质缀合物选自 DSPE-PEG2000 (式 53)、DSPE-PEG700

中一种或

(式 50)、DSPE-PEG1000 (式 51) 或 DSPE-PEG5000 (式 52)。

[0045]进一步地, (iii) 中除该金属-磷脂复合物和该抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的非阳离子脂质或非可电离脂质为胆固醇及其衍生物中一种或多种的组合。

[0046]进一步地, (iii) 中除该金属-磷脂复合物和该抑制颗粒聚集的缀合的脂质

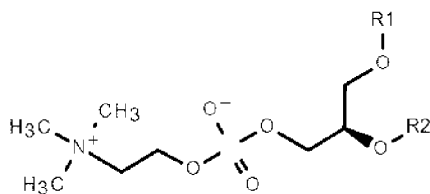


- 5 以外的非阳离子脂质或非可电离脂质为胆固醇 (式 40) 及其衍生物中一种或多种的组合。

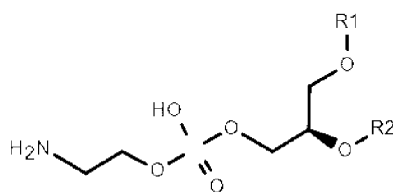
[0047]进一步地, (iii) 中的非阳离子脂质或非可电离脂质为胆固醇 (式 40)。

- 10 [0048]进一步地, (iii) 中除该金属-磷脂复合物和该抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的非阳离子脂质或非可电离脂质, 除胆固醇还包括选自卵磷脂 PC、磷脂酰乙醇胺 PE、磷脂酰丝氨酸 PS、磷脂酸 PA、磷脂酰甘油 PG、1-磷酸神经酰胺 SP、磷脂酰肌醇 PI、磷脂酰苏氨酸 PT、鞘磷脂 SM、溶血卵磷脂 LPC、溶血磷脂酰乙醇胺 LPE、溶血磷脂酰丝氨酸 LPS、溶血磷脂酸 LPA、溶血磷脂酰甘油 LPG、溶血磷脂酰肌醇 LPI、溶血磷脂酰苏氨酸 LPT、溶血鞘磷脂 LSM、1-磷酸鞘氨醇 S1P、胆固醇硫酸酯, 及其衍生物中一种或多种的组合。

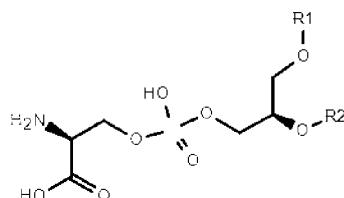
- 15 [0049]进一步地, (iii) 中除该金属-磷脂复合物和该抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的非阳离子脂质或非可电离脂质, 除胆固醇还包括选自: 卵磷脂 (PC) (式 1)

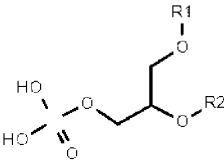


磷脂酰乙醇胺 (PE) (式 2)

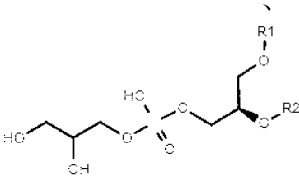


磷脂酰丝氨酸 (PS) (式 3)



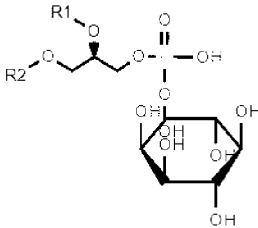
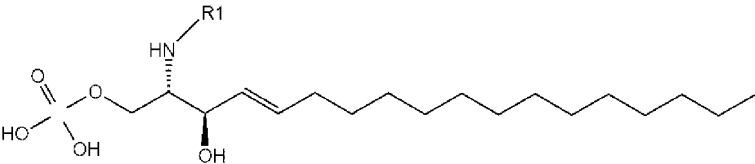


磷脂酸 (PA) (式 4)

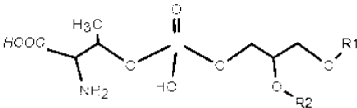


磷脂酰甘油 (PG) (式 5)

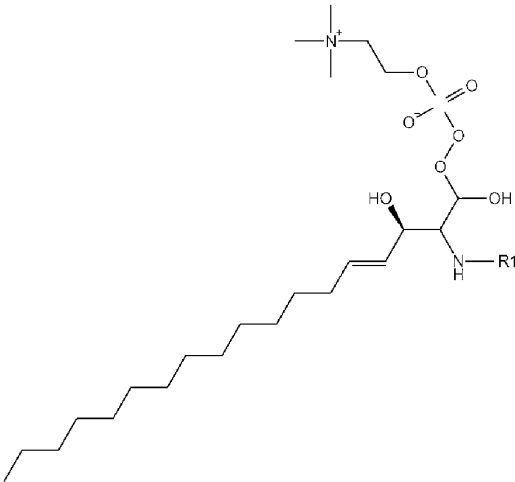
1-磷酸神经酰胺 (SP) (式 6)



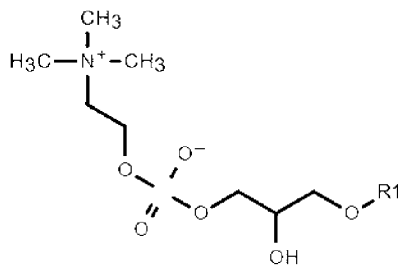
5 磷脂酰肌醇 (PI) (式 7)



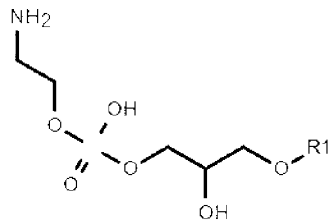
磷脂酰苏氨酸 (PT) (式 8)



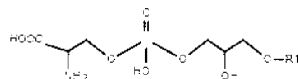
鞘磷脂 (SM) (式 9)



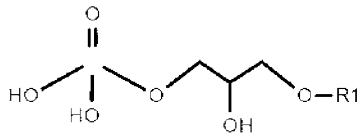
溶血卵磷脂 (LPC) (式 10)



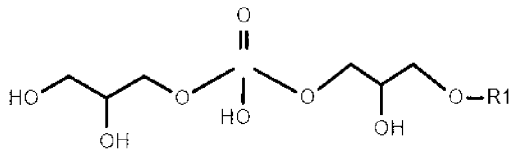
溶血磷酸酰乙醇胺 (LPE) (式 11)



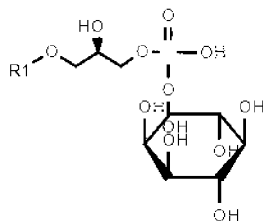
溶血磷脂酰丝氨酸 (LPS) (式 12)



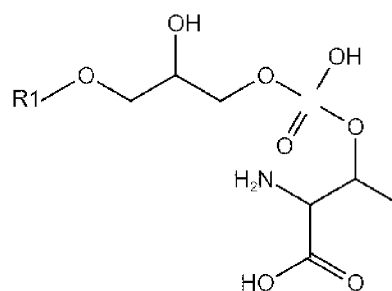
溶血磷脂酸 (LPA) (式 13)



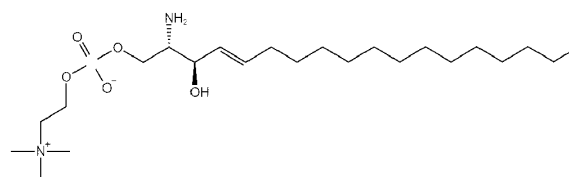
5 溶血磷脂酰甘油 (LPG) (式 14)



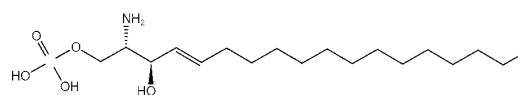
溶血磷脂酰肌醇 (LPI) (式 15)



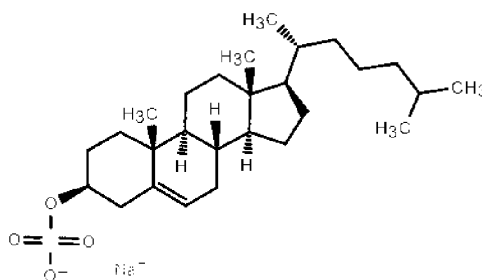
溶血磷脂酰苏氨酸 (LPT) (式 16)



溶血鞘磷脂 (LSM) (式 17)



1-磷酸鞘氨醇 (SIP) (式 18)



胆固醇硫酸酯 (式 41)

, 及其衍生物

5 中一种或多种的组合;

其中, R1, R2 为: 葵酰基、月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基、油酰基、亚油酰基、芥酰基、花生酰基或植烷酰基。

10 [0050]进一步地, (iii) 中除该金属-磷脂复合物和该抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的非阳离子脂质或非可电离脂质, 包括胆固醇, 以及选自 DSPC、DSPE、DSPA 或 DSPG 中一种或多种的组合。

[0051]进一步地, (iii) 中除该金属-磷脂复合物和该抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的非阳离子脂质或非可电离脂质, 包括胆固醇 (式 40), 以及选自 DSPC (式 46)、DSPE (式 47)、DSPA (式 48) 或 DSPG (式 49) 中一种或多种的组合。

15 [0052]进一步地, (iii) 中所述的非阳离子脂质或非可电离脂质包括胆固醇 (式 40) 和 DSPC (式 46)。

[0053]进一步地, 金属-磷脂复合物颗粒由 (i) 金属-磷脂复合物、(ii) 抑制颗粒聚集的缀合的脂质和 (iii) 除该金属-磷脂复合物和该抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的非阳离子脂质或非可电离脂质制成, 该金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 10%~40%, 该抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 2%~10%, 该胆固醇在原料中摩尔占比为 35%~75%, 该除胆固醇以外的非阳离子脂质或非可电离脂质在原料中摩尔占比为 0%~40%。

[0054]进一步地, 其中, 该金属-磷脂复合物颗粒由 (i) 金属-磷脂复合物、(ii)

抑制颗粒聚集的缀合的脂质和 (iii) 非阳离子脂质或非可电离脂质制成, 该金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 5%~小于 10%, 该抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 2%~10%, 该胆固醇在原料中摩尔占比为 15%~小于 35%、35%~75%或大于 75%~80%, 该除胆固醇以外的非阳离子脂质或非可电离脂质在原料中摩尔占比为

5 0%~40%或大于 40%~51%。或

[0055]该金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为大于 40%~50%, 该抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 2%~10%, 该胆固醇在原料中摩尔占比为 15%~小于 35%、35%~75%或大于 75%~80%, 该除胆固醇以外的非阳离子脂质或非可电离脂质在原料中摩尔占比为 0%~40%或大于 40%~51%。或

10 [0056]该金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 10%~40%, 该抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 2%~10%, 该胆固醇在原料中摩尔占比为 15%~小于 35%或大于 75%~80%, 该除胆固醇以外的非阳离子脂质或非可电离脂质在原料中摩尔占比为 0%~40%或大于 40%~51%。

[0057]进一步地, 金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 7%~小于 10%、10%~30%
15 或 20%~30%, 优选为 25%。

[0058]进一步地, 抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 3%~10%或 5%~10%, 优选为 10%。

[0059]进一步地, 胆固醇在原料中摩尔占比为 15%~小于 35%、35%~56%或 35%~55%, 优选为 40%。

20 [0060]进一步地, 除胆固醇以外的非阳离子脂质或非可电离脂质在原料中摩尔占比为 5%~30%、25%~40%、大于 40%~45%或 20%~25%。

[0061]进一步地, 该金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 15%~25%, 该抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 4%~10%, 该胆固醇在原料中摩尔占比为 40%~46%, 该 DSPC 在原料中摩尔占比为 25%~35%, 该金属-磷脂复合物中金属离子
25 部分选自 Fe^{3+} 。

[0062]进一步地, 该金属-磷脂复合物 (金属离子部分为 Fe^{3+}) 在原料中摩尔占比为 15%, 该抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 4%, 该胆固醇在原料中摩尔占比为 46%, 该 DSPC 在原料中摩尔占比为 35%; 或所述金属-磷脂复合物 (金属离子部分为 Fe^{3+}) 在原料中摩尔占比为 25%, 所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 10%, 所述胆固醇在原料中摩尔占比为 40%, 所述 DSPC 在原料中摩
30 尔占比为 25%。

[0063]进一步地, 该金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 10%~30%, 该抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 3%~10%, 该胆固醇在原料中摩尔占比为 35%~56%, 该 DSPC 在原料中摩尔占比为 34%~40%; 该金属-磷脂复合物中金属离子
35 部分选自 Al^{3+} 。

[0064]进一步地, 该金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 10%~30%, 该抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 3%~10%, 该胆固醇在原料中摩尔占比为 35%~56%, 该 DSPC 在原料中摩尔占比为 40%~45%, 该金属-磷脂复合物中金属离子部分选自 Al^{3+} ; 或

40 [0065]该金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 10%~30%, 该抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 3%~10%, 该胆固醇在原料中摩尔占比为 15%~35%, 该 DSPC 在原料中摩尔占比为 34%~40%或大于 40%~45%, 该金属-磷脂复合物中金属离子部分选自 Al^{3+} ; 或

[0066]该金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 7%~小于 10%, 该抑制颗粒聚集
45 的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 3%~10%, 该胆固醇在原料中摩尔占比为 15%~小

于 35%或 35%~56%，该 DSPC 在原料中摩尔占比为 34%~40%或大于 40%~45%，该金属-磷脂复合物中金属离子部分选自 Al^{3+} 。

5 [0067]进一步地，该金属-磷脂复合物（金属离子部分为 Al^{3+} ）在原料中摩尔占比为 7%，该抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 3%，该胆固醇在原料中摩尔占比为 56%，该 DSPC 在原料中摩尔占比为 34%。

[0068]进一步地，金属-磷脂复合物为 DSPC、姜黄素和 Fe^{3+} 的摩尔比为 1:1:1 制成，抑制颗粒聚集的缀合的脂质为 DSPE-PEG2000，非阳离子脂质或非可电离脂质为胆固醇和 DSPC，金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 15%，DSPE-PEG2000 在原料中摩尔占比为 4%，胆固醇在原料中摩尔占比为 46%，DSPC 在原料中摩尔占比为 35%。

10 [0069]进一步地，金属-磷脂复合物为 DSPC、姜黄素和 Fe^{3+} 的摩尔比为 1:1:1 制成，抑制颗粒聚集的缀合的脂质为 DSPE-PEG2000，非阳离子脂质或非可电离脂质为胆固醇和 DSPC，金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 25%，DSPE-PEG2000 在原料中摩尔占比为 10%，胆固醇在原料中摩尔占比为 40%，DSPC 在原料中摩尔占比为 25%。

15 [0070]进一步地，金属-磷脂复合物为 DSPC、姜黄素和 Al^{3+} 的摩尔比为 1:1:1 制成，抑制颗粒聚集的缀合的脂质为 DSPE-PEG2000，非阳离子脂质或非可电离脂质为胆固醇和 DSPC，金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 7%，DSPE-PEG2000 在原料中摩尔占比为 3%，胆固醇在原料中摩尔占比为 56%，DSPC 在原料中摩尔占比为 34%。

[0071]本公开提供上述金属-磷脂复合物颗粒的制备方法，包括将（i）金属-磷脂复合物、（ii）抑制颗粒聚集的缀合的脂质和（iii）除该金属-磷脂复合物和该抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的非阳离子脂质或非可电离脂质混合，得到该金属-磷脂复合物颗粒。

[0072]本公开提供一种药物-脂质颗粒，其中含有：

[0073]（a）药物，其中该药物为带有负电荷的分子；和

25 [0074]（b）金属-磷脂复合物颗粒（Metal-chelated phospholipid complex nanoparticles, MPP），此金属-磷脂复合物颗粒为本公开的金属-磷脂复合物颗粒。

[0075]进一步地，该药物包封在该金属-磷脂复合物颗粒中。

[0076]进一步地，该药物选自核酸、蛋白、多肽、小分子、核酸类似物、蛋白类似物和多肽类似物中一种或多种的组合。

30 [0077]进一步地，该核酸选自 mRNA、siRNA、sgRNA、ASO、circRNA、microRNA、DNA、ccDNA、人工核酸中一种或多种的组合。

[0078]进一步地，该核酸为 SEQ ID No.1 所示的编码 eGFP（增强绿色荧光蛋白，Enhanced Green Fluorescent Protein）的 mRNA 序列、SEQ ID No.2 所示的编码新型冠状病毒 S1 亚基的受体结合域 RBD 的 mRNA 序列、SEQ ID No.3 所示的编码 NY-ESO-1（纽约食管鳞状细胞 1，New York esophageal squamous cell carcinoma 1）的 mRNA 序列、反义链为 SEQ ID No.4 和正义链为 SEQ ID No.21 所示的 Bcl-2 基因（B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因，B-cell lymphoma/Leukemia-2）的 siRNA 序列、反义链为 SEQ ID No.6 和正义链为 SEQ ID No.23 所示的 PLK1 基因（polo 样激酶 1，Polo-like Kinase 1）的 siRNA 序列、SEQ ID No.8 所示的 Gal-1 基因的 siRNA 序列、SEQ ID No.10 所示的 STAT-3 基因的 ASO 序列、SEQ ID No.12 所示的 α -syn 基因（ α -突触核蛋白， α -synuclein）的 ASO 序列、SEQ ID No.14 所示的 Bcl-2 基因的 ASO 序列、SEQ ID No.16 所示的编码野生型新型冠状病毒 S 蛋白的 mRNA 序列、反义链为 SEQ ID No.17 和正义链为 SEQ ID No.25 所示的双链 DNA 序列、SEQ ID No.18 所示的单链 DNA、或正义链为 SEQ ID No.19 和反义链为 SEQ ID No.26 所示的 B7-H4 基因的 siRNA 序列。

45 [0079]本公开提供上述药物-脂质颗粒的制备方法，将药物包载于金属-磷脂复合物颗粒中，得到该药物-脂质颗粒。

[0080]进一步地,金属-磷脂复合物、抑制颗粒聚集的缀合的脂质,以及非阳离子脂质或非可电离脂质溶于有机化合物中形成有机相,药物溶于缓冲液中形成水相,将有机相与水相混匀得到药物-脂质颗粒。

[0081]进一步地,有机化合物为乙醇。

5 [0082]进一步地,缓冲液为无酶 PBS 缓冲液。

[0083]进一步地,有机相与水相的混匀方式包含微流控芯片或超声。

[0084]进一步地,将 (a) 药物、(i) 金属-磷脂复合物、(ii) 抑制颗粒聚集的缀合的脂质和 (iii) 非阳离子脂质或非可电离脂质混合,得到该药物-脂质颗粒。

10 [0085]本公开提供上述金属-磷脂复合物在核酸递送系统中的应用。进一步地,该核酸递送系统用于将核酸引入细胞。进一步地,该核酸用于在哺乳动物受试者中使靶序列的表达沉默、用于在哺乳动物体内传递药物、用于将药物从体内传递到哺乳动物细胞或用于治疗哺乳动物的疾病或病症。

15 [0086]本公开提供上述金属-磷脂复合物颗粒或上述药物-脂质颗粒在组合物中的应用,该组合物用于药物的递送。进一步地,该组合物用于将药物引入细胞。该组合物为药剂。进一步地,该药剂用于在哺乳动物受试者中使靶序列的表达沉默、用于在哺乳动物体内传递药物、用于将药物从体内传递到哺乳动物细胞或用于治疗哺乳动物的疾病或病症。

[0087]本公开提供上述金属-磷脂复合物或金属-磷脂复合物颗粒或药物-脂质颗粒或药剂在预防/治疗哺乳动物的疾病或病症中的应用。

20 [0088]在上述技术方案中,进一步地,哺乳动物为人。进一步地,该疾病或病症与基因的表达相关,该基因包含药物的靶序列。进一步地,该疾病或病症包括癌症、病毒感染、自身免疫性疾病、糖尿病或阿尔兹海默症。进一步地,该病毒感染包括甲肝、乙肝、丙肝、SARS-Cov-2 (2019 新型冠状病毒)、HIV (艾滋病病毒)、HPV (人乳头瘤病毒)、流感、天花或梅毒。进一步地,该癌症包括肝癌、胶质瘤、黑色素瘤、肺癌、胰腺癌或乳腺癌。

25 [0089]进一步地,该药剂为疫苗。进一步地,该药剂的给药途径包括鞘内注射、肌肉给药、颅内注射、静脉注射或瘤内注射。

[0090]一种含有本公开金属-磷脂复合物或金属-磷脂复合物颗粒或药物-脂质颗粒的药剂。

30 [0091]进一步地,药剂为疫苗。

[0092]进一步地,疫苗为新型冠状病毒疫苗。

[0093]与现有技术相比,本公开的有益效果如下:

35 [0094]本公开提供的金属-磷脂复合物主要作用在于吸附带有负电荷的药物,其与其他脂质共同自组装成金属-磷脂复合物颗粒 (MPP),在保证不低于基于阳离子脂质和/或可电离脂质的 LNP 的有效性情况下,未使用阳离子脂质和可电离脂质,因此较 LNP,毒性大幅度降低,生物安全性显著提升,更利于在生物体内进行负电荷药物的运载。

附图说明

40 [0095]为了更清楚地说明本公开具体实施方案或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方案或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本公开的一些实施方案,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

45 [0096]图 1-1 为本公开实施例 3.5.1 提供的 eGFP-mRNA@MPP (Fe³⁺) 转染 293T 所致 eGFP 阳性细胞百分比;

[0097]图 1-2 为本公开实施例 3.5.1 提供的 RBD-mRNA@MPP (Fe^{3+}) 转染 293T 所致 RBD 的表达水平;

[0098]图 1-3 为本公开实施例 3.5.1 提供的 RBD-mRNA@MPP (Fe^{3+}) 诱导体液免疫的能力;

5 [0099]图 1-4 为本公开实施例 3.5.1 提供的 NY-ESO-1-mRNA @MPP (Fe^{3+}) 诱导体液免疫的能力;

[0100]图 1-5 为本公开实施例 3.5.1 提供的 RBD-mRNA@MPP (Fe^{3+}) 诱导细胞免疫的能力;

10 [0101]图 1-6 为本公开实施例 3.5.1 提供的 NY-ESO-1-mRNA @MPP (Fe^{3+}) 诱导细胞免疫的能力;

[0102]图 1-7 为本公开实施例 3.5.2 提供的 eGFP-mRNA@MPP (Al^{3+}) 转染 293T 所致 eGFP 阳性细胞百分比;

[0103]图 1-8 为本公开实施例 3.5.2 提供的 RBD-mRNA@MPP (Al^{3+}) 转染 293T 所致 RBD 的表达水平;

15 [0104]图 1-9 为本公开实施例 3.5.2 提供的 RBD-mRNA@MPP (Al^{3+}) 诱导体液免疫的能力;

[0105]图 1-10 为本公开实施例 3.5.2 提供的 NY-ESO-1-mRNA @MPP (Al^{3+}) 诱导体液免疫的能力;

20 [0106]图 1-11 为本公开实施例 3.5.2 提供的 RBD-mRNA@MPP (Al^{3+}) 诱导细胞免疫的能力;

[0107]图 1-12 为本公开实施例 3.5.2 提供的 NY-ESO-1-mRNA @MPP (Al^{3+}) 诱导细胞免疫的能力;

[0108]图 1-13 为本公开实施例 3.6.1 提供的 Bcl-2-siRNA@MPP (Fe^{3+}) 沉默靶基因的能力;

25 [0109]图 1-14 为本公开实施例 3.6.1 提供的 PLK1-siRNA@MPP (Fe^{3+}) 沉默靶基因的能力;

[0110]图 1-15 为本公开实施例 3.6.1 提供的 Gal-1-siRNA@MPP (Fe^{3+}) 沉默靶基因的能力;

30 [0111]图 1-16 为本公开实施例 3.6.2 提供的 Bcl-2-siRNA@MPP (Al^{3+}) 沉默靶基因的能力;

[0112]图 1-17 为本公开实施例 3.6.2 提供的 PLK1-siRNA@MPP (Al^{3+}) 沉默靶基因的能力;

[0113]图 1-18 为本公开实施例 3.6.2 提供的 Gal-1-siRNA@MPP (Al^{3+}) 沉默靶基因的能力;

35 [0114]图 1-19 为本公开实施例 3.7.1 提供的 STAT3-ASO@MPP (Fe^{3+}) 沉默细胞靶基因的能力;

[0115]图 1-20 为本公开实施例 3.7.1 提供的 α -syn-ASO@MPP (Fe^{3+}) 沉默细胞靶基因的能力;

40 [0116]图 1-21 为本公开实施例 3.7.1 提供的 Bcl-2-ASO@MPP (Fe^{3+}) 沉默细胞靶基因的能力;

[0117]图 1-22 为本公开实施例 3.7.2 提供的 STAT3-ASO@MPP (Al^{3+}) 沉默细胞靶基因的能力;

[0118]图 1-23 为本公开实施例 3.7.2 提供的 α -syn-ASO@MPP (Al^{3+}) 沉默细胞靶基因的能力;

45 [0119]图 1-24 为本公开实施例 3.7.2 提供的 Bcl-2-ASO@MPP (Al^{3+}) 沉默细胞靶

基因的能力；

[0120]图 1-25 为本公开实施例 3.8.1 提供的 S-mRNA@MPP (Fe³⁺) 转染 293T 所致 S 蛋白的表达水平；

5 [0121]图 1-26 为本公开实施例 3.8.1 提供的药物 (dsDNA 及 ssDNA) -脂质颗粒 (Fe³⁺) 的功能；

[0122]图 1-27 为本公开实施例 3.8.2 提供的 S-mRNA@MPP (Al³⁺) 转染 293T 所致 S 蛋白的表达水平；

[0123]图 1-28 为本公开实施例 3.8.2 提供的药物 (dsDNA 及 ssDNA) -脂质颗粒 (Al³⁺) 的功能；

10 [0124]图 2-1 为本公开实施例 4.1 提供的磷脂复合物的差示扫描量热图；

[0125]图 2-2 为本公开实施例 4.1 提供的金属-磷脂复合物 (Fe³⁺) 的紫外吸收图；

[0126]图 2-3 为本公开实施例 4.2 提供的金属-磷脂复合物 (Al³⁺) 的紫外吸收图；

[0127]图 2-4 为本公开实施例 5 提供的在低 pH 值 (pH = 5.0) 条件下 Fe³⁺从金属-磷脂复合物中脱落的表征；

15 [0128]图 2-5 为本公开实施例 6.1 提供的药物-金属-磷脂复合物颗粒 (Fe³⁺) 的元素分析；

[0129]图 2-6 为本公开实施例 6.2 提供的药物-金属-磷脂复合物颗粒 (Al³⁺) 中 MPP 的电镜分析；

20 [0130]图 2-7 为本公开实施例 7 提供的药物-脂质颗粒包载核酸 (mRNA 及 siRNA) 的效率；

[0131]图 2-8 为本公开实施例 8 提供的 siRNA/mRNA@MPP 和 siRNA/mRNA@LNP 的核酸溶酶体逃逸能力；

[0132]图 2-9 为本公开实施例 9 提供的 MPP 与 LNP 的 eGFP 阳性细胞率；

25 [0133]图 2-10 为本公开实施例 10 提供的 MPP 与 LNP 的促 mRNA 表达的能力对比；

[0134]图 2-11 为本公开实施例 10 提供的 MPP 与 LNP 的促体液免疫的能力对比；

[0135]图 2-12 为本公开实施例 10 提供的 MPP 与 LNP 的促细胞免疫的能力对比；

[0136]图 3-1 为本公开实施例 13 提供的药物-金属-磷脂复合物颗粒瘤内注射治疗肝癌的作用。

30

具体实施方式

[0137]定义

35 [0138]为了便于说明，此处统整性地说明本说明书、实施例以及后附的申请专利范围中所记载的特定术语。除非本说明书另有定义，此处所用的科学与技术词汇的含义与本公开所属技术领域中具有通常知识者所理解与惯用的意义相同。另外，除非上下文另外要求，否则应理解，单数术语应包括相同的复数形式，而复数术语应包括单数。具体来说，除非上下文另有明确说明，本文和后附的申请专利范围所使用的术语“至少一个 (种)”和“一个 (种) 或多个”包括一个 (种)，两个 (种)，三个 (种) 或更多个 (种)。

40 [0139]虽然用以界定本公开较广范围的数值范围与参数皆是约略的数值，此处已尽可能精确地呈现具体实施例中的相关数值。然而，任何数值本质上不可避免地含有因个别测试方法所致的标准偏差。在此处，“约”通常是指实际数值在一特定数值或范围的正负 10%、5%、1%或 0.5%之内。或者是，“约”一词代表实际数值落在平均值的可接受标准误差之内，视本公开所属技术领域中具有通常知识者的考虑而定。除了实验例之外，或除非另有明确的说明，当可理解此处所用的所有范围、数量、数值与百

45

分比（例如用以描述材料用量、时间长短、温度、操作条件、数量比例及其他相似者）均经过“约”的修饰。因此，除非另有相反的说明，本说明书与附随申请专利范围所公开的数值参数皆为约略的数值，且可视需求而更动。至少应将这些数值参数理解为所指出的有效位数与套用一般进位法所得到的数值。

5 [0140]术语“脂质”指一组有机化合物，其包括，但不限于脂肪酸的脂。通常将它们分成三类：“简单的脂质”、“化合物脂质”、“衍生的脂质”。“简单的脂质”其包括脂肪和油以及蜡；“化合物脂质”其包括磷脂和糖脂；“衍生的脂质”诸如类固醇。

[0141]术语“脂质小泡”指可用于传递化合物的任何脂质组合物，其包括，但不限于，脂质体，其中水体积被两亲性脂双层所包封；或其中脂质包被包括大分子组分的内部，诸如包括 mRNA，伴随减少的水性内部；或脂质聚集体或胶团，其中被包封的成分包含在相对混乱的脂质混合物中。本文中，金属-磷脂复合物颗粒（MPP）即为“脂质小泡”，药物，例如核酸 mRNA，作为被包封的成分包封于 MPP 中，该“包封”可为充分包封和/或部分包封。

10 [0142]术语中“磷脂”是指含有磷酸基团的脂类，属于复合脂，也称磷脂类、磷脂质。磷脂是组成生物膜的主要成分，分为甘油磷脂与鞘磷脂两大类，分别由甘油和鞘氨醇构成。磷脂为两性分子，一端为亲水的含氮或磷的头，另一端为疏水（亲油）的长烃基链。由于此原因，磷脂分子亲水端相互靠近，疏水端相互靠近，常与蛋白质、糖脂、胆固醇等其它分子共同构成磷脂双分子层，即细胞膜的结构。

15 [0143]本文中短语“磷脂分子部分”指磷脂分子与其他物质反应后原属于磷脂分子的结构。

[0144]本文中短语“连接物分子部分”指连接物分子与其他物质反应后原属于连接物分子的结构。

[0145]本文中短语“金属离子部分”指金属离子部分与其他物质反应后原属于金属离子的结构。

20 [0146]本文中短语“磷脂复合物”指通过具有磷酸基团的上述磷脂分子部分与上述连接物分子部分反应连接形成的复合物。

[0147]本文中短语“金属-磷脂复合物”指具有由具有磷酸基团的上述磷脂分子部分、上述连接物分子部分、上述金属离子部分反应组成，上述磷脂分子部分与上述连接物分子部分相连接，上述连接物部分与上述金属离子部分通过配位键连接，且所述金属-磷脂复合物既不是阳离子脂质也不是可电离脂质。

25 [0148]术语“可电离脂质”指一种含有正电荷可电离胺基团的脂质，可以在较低 pH 值时质子化带上正电荷而在生理 pH 值条件下不带电。

[0149]术语“中性脂质”指在选定的 pH 以未带电荷或中性两性离子形式存在的许多脂质种类中的任何一种。在生理 pH，这样的脂质包括，例如，二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、神经鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂和二酰基甘油。

30 [0150]术语“阴离子脂质”指在生理 pH 带负电荷的任何脂质。这些脂质包括，但不限于，磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二烷酰磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰磷脂酰乙醇胺，赖氨酰磷脂酰甘油、棕榈酰油酰磷脂酰甘油(POPG)，和其它与中性脂质连接的阴离子基团。

[0151]术语“阳离子脂质”指许多脂质种类中的任何一种，其在选定的 pH，诸如生理 pH 携带净正电荷。这些脂质包括，但不限于，N，N-二油基-N，N-二甲基氯化铵（“DODAC”）；N-(2，3-二油基氧基)丙基)-N，N，N-三甲基氯化铵（“DOTMA”）；N，N-二硬脂基-N，N-二甲基溴化铵（“DDAB”）；N-(2，3-二油酰氧基)丙基)-N，N，N-三甲基氯化铵（“DOTAP”）；3-(N-(N’，N’-二甲基氨基乙烷)氨基甲酰基)胆固醇（“DC-Chol”）

和 N-(1, 2 二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N, N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(“DMRIE”)。如下的脂质是阳离子的并且在低于生理 pH 时具有正电荷: DODAP, DODMA, DMDMA 等。

5 [0152]术语“疏水脂质”指具有非极性基团的化合物,其包括,但不限于,长链饱和和不饱和脂族烃基团并且这些基团任选地被一个或多个芳香族、脂环族或杂环族基团所取代。合适的实例包括,但不限于,二酰基甘油、二烷基甘油、N-N-二烷基氨基、1, 2-二酰氧基-3-氨基丙烷和 1, 2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0153]术语“非阳离子脂质或非可电离脂质”是指既不是阳离子脂质也不是非可电离脂质的脂质,例如可以为阴离子脂质、中性脂质。

10 [0154]在金属-磷脂复合物颗粒的组分中,(iii)中“除金属-磷脂复合物和抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的非阳离子脂质或非可电离脂质”是指,排除金属-磷脂复合物同时排除抑制颗粒聚集的缀合的脂质后,金属-磷脂复合物颗粒中剩余的脂质。

[0155]术语“融合性”指脂质体,药物-脂质颗粒或其它药物传递系统与细胞膜融合的能力。该膜可以是质膜或围绕细胞器,例如内体、核等的膜。

15 [0156]在金属-磷脂复合物颗粒中,除金属-磷脂复合物和抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的非阳离子脂质或非可电离脂质主要作为形成小泡的脂质存在,术语“形成小泡的脂质”倾向于包括任何具有疏水部分和极性头部基团的两亲性脂质并且其本身可以在水中自发形成双层小泡,示例为大多数磷脂。

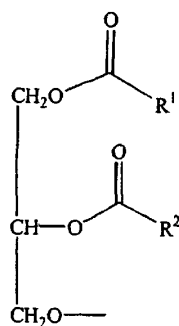
[0157]在金属-磷脂复合物颗粒中,抑制颗粒聚集的缀合的脂质主要作为采用小泡的脂质存在,术语“采用小泡的脂质”倾向于包括稳定与脂双层结合的任何两亲性脂质,以及其它的两亲性脂质,其疏水部分与内部,双层膜的疏水区域接触,并且其极性头部基团部分朝向外部分,膜的极性表面。采用小泡的脂质包括这样的脂质,其能够独立地适宜于采用非层状的相,还能够在存在双层稳定组分时,采取双层结构。抑制药物-脂质颗粒聚集的缀合的脂质包括,但不限于,聚酰胺低聚物(例如,ATTA-脂质衍生物)、肽、蛋白质、去污剂、脂质衍生物、PEG-脂质衍生物诸如与二烷氧基丙基偶联的 PEG、与二酰基甘油偶联的 PEG、与磷脂酰乙醇胺偶联的 PEG,和与神经酰胺缀合的 PEG(见,美国专利号 5,885,613,将其并入本文作为参考)。

25

[0158]术语“两亲性脂质”指任何适合的材料,其中脂质材料的疏水部分朝向疏水相,而亲水部分朝向水相。两亲性脂质通常是脂质小泡的主要成分。亲水性质来自极性或带电基团诸如碳水化合物,磷酸盐(酯),羧基、硫酸根合、氨基、巯基、硝基、羟基和其它类似基团的存在。疏水性可以通过非极性基团的包含来赋予,所述基团包括,但不限于,长链饱和和不饱和脂族烃基团和由一个或多个芳香族、脂环族或杂环基团取代的这样的基团。两亲性化合物的实例包括,但不限于,磷脂、氨脂质和神经鞘脂类。磷脂的代表性实例包括,但不限于,磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱或二亚油酰磷脂酰胆碱。缺乏磷的其它化合物,诸如鞘磷脂、鞘糖脂家族、二酰基甘油和 β -酰氧基酸也在被称为两亲性脂质的组中。另外,上述的两亲性脂质可与其它脂质混和,该脂质包括甘油三酯和固醇。

35

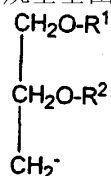
40 [0159]术语“二酰基甘油”指具有 2-脂肪酰基链的化合物,其 R1 和 R2 都独立地具有通过酯键与甘油的 1-和 2-位置键合的 2-30 个碳原子。该酰基基团可以是饱和的或具有不同程度的不饱和。二酰基甘油具有如下的式 54:



(式 54)。

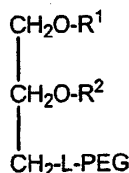
[0160]术语“二酰基甘油偶联的聚乙二醇”，本公开中抑制颗粒聚集的缀合的脂质可以为二酰基甘油偶联的聚乙二醇，即二酰基甘油-聚乙二醇缀合物（DAG-PEG 缀合物或 PEG-DAG 缀合物）。在一个优选的实施方案中，DAG-PEG 缀合物是二月桂基甘油 (C12)-PEG 缀合物、双十四烷基甘油(C14)-PEG 缀合物(DMG)，二棕榈酰甘油(C16)-PEG 缀合物或二硬脂基甘油(C18)-PEG 缀合物(DSG)。本领域技术人员将容易地理解其它二酰基甘油可以用在本公开的 DAG-PEG 缀合物中。用在本公开中的合适的 DAG-PEG 缀合物和制备及使用它们的方法公开于被公布作 U.S.P.A 2003/0077829 的美国申请号 10/136,707，和 PCT 专利申请号 CA 02/00669 中，将其每个的全部内容并入作为参考。

[0161]术语“二烷氧基丙基”指具有 2-烷基链的化合物，其 R1 和 R2 都独立地具有 2-30 个碳。烷基基团可以是饱和的或具有不同程度的不饱和。二烷氧基丙基具有如下的式 55：



(式 55)。

[0162]术语“二烷氧基丙基偶联的 PEG”，本公开中抑制颗粒聚集的缀合的脂质可以为二烷氧基丙基偶联的 PEG，即二烷氧基丙基缀合物（PEG-DAA 缀合物）。在一个优选



的实施方案中，PEG-DAA 缀合物具有下式 56： (式 56)。

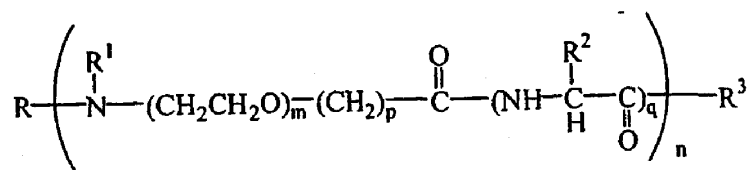
[0163]在式 56 中，R1 和 R2 被独立地进行选择并且是具有约 10 至约 22 个碳原子的长链烷基基团。长链烷基基团可以是饱和的或不饱和的。合适的烷基基团包括，但不限于，月桂基(C12)、十四烷基(C14)、十六烷基(C16)、十八烷基(C18)和 icosyl(C20)。在优选的实施方案中，R1 和 R2 是相同的，即 R1 和 R2 都是十四烷基(即双十四烷基)，R1 和 R2 都是十八烷基(即双十八烷基)等。在式 56 中，PEG 是具有约 550 到约 10000 道尔顿的平均分子量的聚乙二醇并且在末端羟基位置任选地被烷基，烷氧基，酰基，或芳基取代。在一个优选的实施方案中，PEG 具有约 1000-约 5000 道尔顿的平均分子量，更优选地，约 1,000 至约 3,000 道尔顿的平均分子量并且甚至更优选地，约 2000 道尔顿的平均分子量。PEG 可以任选地被烷基、烷氧基、酰基或芳基基团所取代。在式 56 中，L 是接头部分。可以使用任何适合于将 PEG 偶联到二烷氧基丙基主链的接头部分。合适的接头部分包括，但不限于，酰氨基(-C(O)NH-)、氨基(-NR-)、羰基(-C(O)-)、碳酸酯(O-C(O)O-)，氨基甲酸酯(-NHC(O)O-)，尿素(-NHC(O)NH-)，琥珀酰(-(O)CCH₂CH₂C(O)-)，醚，二硫化物和其组

合。其它合适的接头是本领域众所周知的。

[0164]可以将磷脂酰乙醇胺与聚乙二醇缀合从而作为本公开中抑制颗粒聚集的缀合的脂质，形成双层稳定组分，所述磷脂酰乙醇胺具有不同链长度和饱和程度的各种酰基链基团。这些磷脂酰乙醇胺是可商购的，或可以使用那些本领域技术人员已知的常规技术来分离或合成。包含饱和的或不饱和的脂肪酸的磷脂酰乙醇胺是优选的，其具有在 C10-C20 范围内的碳链长度。还可以使用这样的磷脂酰乙醇胺，其具有单或双不饱和脂肪酸及饱和和不饱和脂肪酸的混合物。合适的磷脂酰乙醇胺包括，但不限于，如下：双肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺(DMPE)，二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)，二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)和二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)。

[0165]如磷脂酰乙醇胺，神经酰胺可以与聚乙二醇偶联从而作为本公开中抑制颗粒聚集的缀合的脂质，形成双层稳定组分，所述神经酰胺具有不同链长度和饱和程度的多个酰基链基团。本领域技术人员需清楚的是，与磷脂酰乙醇胺比较，神经酰胺仅具有一个酰基基团，所述酰基基团可以根据其链长度和饱和程度来容易地进行变化。适合于按照本公开应用的神经酰胺是可以商购的。此外，使用众所周知的分离技术可以例如从卵和脑中分离神经酰胺，或使用在美国专利号 5,820,873 中公开的方法和技术来合成它们，将美国专利号 5,820,873 并入本文作为参考。使用在前述申请中提出的合成途径，可以制备具有饱和或不饱和脂肪酸的神经酰胺，所述脂肪酸具有在 C2-C31 范围内的碳链长度。

[0166]术语“ATTA”或“聚酰胺”指，但不限于，在美国专利号 6,320,017 和 6,586,559 中公开的化合物，将它们都并入本文作为参考。这些化合物包括具有如下式 57 的化合物：



(式 57)；

[0167]其中：R 是选自自由氢、烷基和酰基组成的组中的成员；R1 是选自自由氢和烷基组成的组中的成员；或任选地，R 和 R1 和它们所结合的氮原子形成叠氮基部分；R2 是选自氢、任选地取代的烷基、任选地取代的芳基和氨基酸侧链的组的成员；R3 是选自自由氢、卤素、羟基、烷氧基、巯基、胍基、氨基和 NR4R5 组成的组的成员，其中 R4 和 R5 独立地是氢或烷基；n 是 4-80；m 是 2-6；p 是 1-4；并且 q 是 0 或 1。那些本领域技术人员将清楚的是其它聚酰胺可用在本公开的化合物中。

[0168]术语“同类物”指起到相同或相似作用的类似物，或起到相同或相似作用的相关母核的衍生物。

[0169]如本文中使用的，术语“mRNA”或“信使多核糖核苷酸”或“信使 RNA”或“messenger RNA”可互换使用，并且意指以 DNA 的一条链作为模板转录而来、携带有遗传信息、可以指导蛋白质合成的单链多核糖核苷酸。

[0170]如本文中使用的，术语“sgRNA”或“small guide RNA”或“向导 RNA”或“gRNA”可互换使用，在 RNA 编辑的过程中引导尿苷残基插入或缺失到动质体(kinetoplastid)中，属于一种小型非编码 RNA，可与 pre-mRNA 配对。gRNA 编辑 RNA 分子，长度大约 60-80 个核苷酸，由单独的基因转录。

[0171]如本文中使用的，术语“circRNA”或“circular RNA”或“环状多核糖核苷酸”或“环状 RNA”可互换使用，并且意指具有无游离端(即，没有游离 3'和/或 5'端)结构的多核糖核苷酸分子，例如通过共价或非共价键形成环状或环形结构的多核糖核苷酸。

[0172]如本文中使用的，术语“microRNA”或“miRNA”或“微小 RNA”可互换使用，并且意指长度约为 22 个核苷酸、有游离 3'和 5'端的非编码单链多核糖核苷酸，能与靶基因的 mRNA 3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)结合，抑制靶基因蛋白

翻译进而调控细胞的生物学功能。

[0173]如本文中使用的,术语“ASO”或“antisense oligonucleotide”或“反义寡核苷酸”可互换使用,并且意指人工合成的,与靶基因或 mRNA 某一区段互补的核酸片断,可以通过碱基互补原则结合于靶基因/mRNA 上,从而封闭基因的表达的单链多(脱氧)核糖核苷酸,包括反义 DNA 和反义 RNA。

[0174]如本文中使用的,术语“siRNA”或“small interfering”或“short interfering”或“silencing RNA”或“小干扰 RNA”或“短干扰 RNA”或“沉默 RNA”可互换使用,并且意指为一类长度为 20 到 25 个核苷酸,并能诱导靶基因 mRNA 降解的双链 RNA 分子。

[0175]如本文中使用的,术语“ecDNA”或“染色体外环状 DNA”可互换使用,并且意指从染色体上脱落,脱离染色体以环状结构存在的 DNA。

[0176]术语“核酸衍生物”指对核酸序列的修饰或替代,包括但不限于对残基的化学修饰、对核苷酸或脱氧核苷酸的替代、对序列提高半衰期或稳定性的修饰、标记修饰。例如,化学修饰包括但不限于磷酸化、甲基化、氨基化、巯基化、用硫取代氧、用硒取代氧或同位素化任一或多个碱基。对核苷酸或脱氧核苷酸的替代包括但不限于以多肽或其它骨架取代糖磷酸主链的核酸类似物(将 DNA 或 RNA 替换为 PNA)。对序列提高半衰期或稳定性的修饰包括但不限于与 PEG 连接修饰、氟修饰。标记修饰包括但不限于连接荧光基团、氨基、生物素、地高辛、小肽等。

[0177]术语“人工核酸”:经过人工修饰的核酸分子,包括但不限于碱基修饰,核糖修饰, PNA 等。

[0178]术语“核酸”指包含至少两个脱氧核苷酸或核苷酸的以单或双链形式存在的聚合物。除非具体限制,该术语涵盖包含天然核苷酸的已知类似物的核酸,其具有与参照核酸相似的结合特性并且以与天然存在的核苷酸相似的方式进行代谢。除非另外指出,具体的核酸序列还暗含涵盖其保守性修饰的变体(例如,简并密码子取代),等位基因,直向同源物, SNPs 和互补序列以及明显指出的序列。具体地,可通过产生序列来获得简并密码子取代,在所述序列中一个或多个选定(或所有)的密码子的第三个位置由混和的碱基和/或脱氧肌苷残基所取代(Batzer et al., Nucleic Acid Res.19: 5081(1991); Ohtsuka et al., J. Biol.Chem.260: 2605-2608(1985); 和 Cassol et al.(1992); Rossolini et al., Mol.Cell.Probes 8: 91-98(1994))。“核苷酸”包含糖脱氧核糖(DNA)或核糖(RNA),碱基,和磷酸基团。核苷酸通过磷酸基团进行连接。“碱基”包括嘌呤和嘧啶,其进一步包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷,和天然类似物,以及嘌呤和嘧啶的合成衍生物,其包括,但不限于取代新的反应基的修饰,所述反应基诸如,但不限于,胺、醇、硫醇、羧酸盐(酯)和卤代烷。DNA 可以以反义、质粒 DNA、质粒 DNA 的部分、预压缩的 DNA、聚合酶链反应(PCR)的产物、载体(P1, PAC, BAC, YAC, 人工染色体)、表达盒、嵌合序列、染色体 DNA 或这些组的衍生物存在。术语核酸与基因、cDNA、由基因编码的 mRNA 和干扰 RNA 分子可替交地使用。

[0179]术语“基因”指包括部分长度或全长的编码序列的核酸(例如, DNA 或 RNA)序列,所述编码序列是产生多肽或多肽前体(例如,来自 A, B, C, D, E, G 型肝炎病毒;或单纯疱疹病毒的多肽或多肽前体)所必需的。

[0180]用于本文时,“基因产物”指基因的产物诸如包括,例如 DNA 的转录物, mRNA。

[0181]短语“靶基因的表达沉默”指本公开的 siRNA 启动使靶基因沉默的能力。为了确定基因沉默的程度,将目标生物或培养物中的细胞的样品或测定与对照样品进行比较,所述目标生物或培养物的细胞表达具体构建体,所述对照不表达所述构建体。将对照样品(缺乏构建体的表达)设定为 100%的相对值。当相对于对照的测试值是约 90%,优选地 50%,更优选地 25%-0%时,成功获得对靶基因的表达的抑制。合适的测定包括,例如,使用本领域技术人员已知的技术诸如点渍法、RNA 印迹法、原位杂交、ELISA、免疫沉淀法、酶

作用、以及本领域技术人员已知的表型测定来检测蛋白质或 mRNA 水平。

[0182]siRNA 的“治疗有效量”或“有效量”是足以产生理想效果的量，所述理想效果是例如与在缺乏 siRNA 时检测到的正常表达水平比较靶序列表达的减少。

[0183]用于本文时，术语“水溶液”指全部或部分包含水的组合物。

5 [0184]用于本文时，术语“有机脂质溶液”指全部或部分包含具有脂质的有机溶剂的组合物。

[0185]用于本文时，“全身传递”指导致化合物在生物体广泛生物分布的传递。一些施用的技术可以导致某些化合物的全身传递，但是不能导致其它化合物的全身传递。全身传递指有效的，优选地，治疗量的化合物与身体的大部分接触。为了获得广泛的生物分布，
10 通常需要血液生存期从而使化合物在到达施用位点远端的疾病位点前，不被迅速降解或清除(诸如通过初次通过器官(肝、肺等))或通过迅速、非特异性的细胞结合)。药物-脂质颗粒的全身传递可以以本领域已知的任何方式进行，所述方式包括，例如，静脉内、皮下、腹膜内，在一个优选的实施方案中，药物-脂质颗粒的全身传递是通过静脉内的传递。

[0186]用于本文时，“局部传递”指在生物体内，化合物直接向靶位点的传递。例如，
15 化合物可以通过直接注射到疾病位点诸如肿瘤或其它靶位点诸如炎症位点或靶器官诸如肝、心脏、胰腺、肾等来进行局部传递。

[0187]金属-磷脂复合物

[0188]在本公开中，金属-磷脂复合物由磷脂分子部分、连接物分子部分和金属离子部分构成。

20 [0189]对于磷脂分子部分，需要说明的是，本公开的磷脂分子的顺反异构体不会对本公开保护内容所要达到的效果产生影响。

[0190]对于连接物分子部分，其主要来源于天然植物提取物，例如姜黄素，具有广泛的生物作用，包括抗菌、抗病毒、抗真菌、抗氧化和抗炎活性。此外，它还是一种有效的免疫调节剂，能调节 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、自然杀伤细胞以及树突细胞等多种免疫细胞的活性，促进免疫力的平衡，增强机体的免疫力。基于姜黄素分子潜在的免疫增强、抗炎症、抗氧化及抗 sars - cov -2 作用，其有望成为一种潜在的抗 COVID-19 的辅助治疗手段。并且，姜黄素分子的安全性极高，已被列举到食品添加剂和药用辅料的目录中，其安全性利于药物-脂质整体的临床药物注册，缩短了临床药物注册的时间长度。

25 [0191]对于金属离子部分，金属-磷脂复合物中连接物分子部分和金属离子部分之间的配位键在例如溶酶体的低 pH 值 (pH=5.0) 条件下会发生断裂，金属离子从金属-磷脂复合物中脱落。

[0192]金属-磷脂复合物中各组分的投放比例可根据具体金属-磷脂复合物组分的结构进行调整。投放比例可以调整的依据是：因为磷脂分子与连接物分子靠氢键相连，只要磷脂分子含有多个磷酸基团，那么合成磷脂复合物时，磷脂分子和连接物分子的投放比例可以依据磷脂分子所含磷酸基团的个数进行调整，即当磷脂分子含两个磷酸基团时，磷脂分子和连接物分子的投放比例可调整为 1：2；当磷脂分子含三个磷酸基团时，磷脂分子和连接物分子的投放比例可调整为 1：3；因为连接物分子的羟基与金属离子靠配位键连接，只要连接物分子含有多个结合位点，那么连接物分子和金属离子的投放比例可以依据连接物所含结合位点的数量进行调整。

40 [0193]先将具有磷酸基团的磷脂分子与连接物分子连接得到磷脂复合物，然后在与金属离子连接得到金属-磷脂复合物。具体地，磷脂分子与连接物分子按照摩尔比在适量的乙醇中溶解，在 65℃左右的条件下进行反应，之后加入正己烷可以沉淀得到磷脂复合物；磷脂复合物再与金属离子（例如 FeCl₃ 等）按照摩尔比在适量的乙醇中溶解，在 60℃左右的条件下进行反应，可以得到金属-磷脂复合物。

45 [0194]金属-磷脂复合物颗粒 (Metal-chelated phospholipid complex nanoparticles,

MPP)

[0195]由金属-磷脂复合物组装的金属-磷脂复合物颗粒装载核酸的原理是：连接物分子与磷脂分子通过氢键结合在一起，同时连接物分子通过配位键与金属离子相连，形成了金属-磷脂复合物，该金属-磷脂复合物的金属离子通过配位键与带有负电荷的药物连接，从而确保金属-磷脂复合物与其他组分（抑制颗粒聚集的缀合的脂质，以及除金属-磷脂复合物和抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的非阳离子脂质或非可电离脂质）自组装成 MPP 同时将带有负电荷的药物载入纳米颗粒 MPP 中。在本文中，所述的“除金属-磷脂复合物和抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的非阳离子脂质或非可电离脂质”即是指金属-磷脂复合物颗粒中的组分（iii）。

[0196]在一些实施方案中，抑制颗粒聚集的缀合的脂质是指抑制药物-脂质颗粒聚集的缀合的脂质，主要功能在于防止药物-脂质颗粒的聚集，例如与二烷氧基丙基偶联的 PEG、与二酰基甘油偶联的 PEG、与磷脂酰乙醇胺偶联的 PEG，和与神经酰胺缀合的 PEG，优选为 PEG-脂质缀合物。其中，脂质的顺反异构体不会对本公开保护内容所要达到得效果产生影响。

[0197]在一些实施方案中，金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 5%~小于 10%、10%~40%或大于 40%~50%，例如 5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%或 50%。

[0198]在优选的实施方式中，金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 7%~40%，例如可以为 10%~40%、7%~30%、15%~25%、20%~30%，进一步优选为 15%、25%、7%或 30%。

[0199]在一些实施方案中，抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 2%~10%，例如 2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或 10%。例如可以为 3%~10%、4%~10%、5%~10%，进一步优选为 3%、4%或 10%。

[0200]在一些实施方案中，非阳离子脂质或非可电离脂质为胆固醇，胆固醇在原料中摩尔占比为 15%~小于 35%、35%~75%或大于 75%~80%，例如 15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%或 80%。例如可以为 35%~75%、15%~56%、40%~46%和 35%~55%，优选为 15%、40%、46%或 56%。

[0201]在一些实施方案中，除胆固醇外，金属-磷脂复合物颗粒还可任选地含有其他非阳离子脂质或非可电离脂质，其在原料中摩尔占比为 0%~40%或大于 40%~51%，例如 0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%或 51%。例如为 5%~30%、25%~35%、34%~45%、20%~25%，优选为 25%、35%、34%或 45%。

[0202]药物-脂质颗粒

[0203]本文描述的药物-脂质颗粒典型地包括药物(其为带有负电荷的分子，所述分子可以选自核酸、蛋白、多肽、小分子、核酸类似物、蛋白类似物、多肽类似物中的一种或多种组合的组中的成员，核酸是选自 mRNA、siRNA、环状 RNA、microRNA、DNA、ecDNA、人工核酸中一种或多种组合的组中的成员)、金属-磷脂复合物、非阳离子脂质或非可电离

脂质、以及双层稳定组分，例如抑制颗粒聚集的缀合的脂质。此外，包封在本公开的药物-脂质颗粒中的核酸在水溶液中对于用核酸酶进行的降解是具有抗性的。

[0204]在一些实施方案中，药物被充分包封在金属-磷脂复合物颗粒的内部从而避免药物的降解，实现药物被递送进入细胞。

5 [0205]在一些实施方案中，本公开提供的药物-脂质颗粒具有适合于全身传递的小直径，粒径在 30~400nm；表面电势为-10~10mV；稳定性至少在 3 天，较优可达 7 天以上；细胞递送效率至少 40%，例如至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%。

10 [0206]在一些实施方案中，药物-脂质颗粒的药物优选为核酸，核酸组分典型地包括可以以数种形式提供的 mRNA、干扰 RNA(即，siRNA)，所述形式包括，例如，一个或多个分离的小干扰 RNA(siRNA)双链体，更长的双链 RNA(dsRNA)或翻译自 DNA 质粒中转录盒的 siRNA 或 dsRNA。

15 [0207]RNA 群可以用于提供长的前体 RNAs，或与可用于制备 siRNA 的选定靶序列具有基本或完全同一性的长前体 RNAs。所述 RNAs 可以按照本领域技术人员中众所周知的方法从细胞或组织中分离，合成，和/或克隆。所述 RNA 可以是混和的群(获自细胞或组织，转录自 cDNA 等)，或可以代表单一靶序列。RNA 可以是天然存在的，例如分离自组织或细胞样品，例如使用 T7 或 SP6 聚合酶和 PCR 产物或克隆的 cDNA 在体外合成的；或以化学方法合成的。

20 [0208]为了形成长 dsRNA，对于合成性 RNAs，互补体还可以在体外转录并杂交以形成 dsRNA。如果使用天然存在的 RNA 群，例如通过转录相应于 RNA 群的 cDNAs，或通过使用 RNA 聚合酶，还提供了 RNA 互补体(例如，形成 dsRNA，其通过大肠杆菌(E.coli)RNase III 或切酶进行消化)。接着前体 RNA 杂交以形成双链 RNAs 从而消化。所述 dsRNAs 可直接被包封在 SNALPs 中或可在包封前被体外消化。

25 [0209]或者，可以将一个或多个编码一个或多个 siRNA 模板的 DNA 质粒包封在核酸-脂质颗粒中。例如，基于小核 RNAU6 或人 RNase P RNA H1 的天然存在转录单位，可以从质粒中的 DNA 模板将 siRNA 转录为自动折叠为具有发夹环的双链体的序列，所述质粒具有 RNA 聚合酶 III 转录单位(见，Brummelkamp, et al., Science 296: 550(2002); Donzé, et al., Nucleic Acids Res.30: e46(2002); Paddison, et al., Genes Dev.16: 948(2002); Yu, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.99: 6047(2002); Lee, et al., Nat.Biotech.20: 500(2002); Miyagishi, et al., Nat.Biotech.20: 497(2002); Paul, et al., Nat.Biotech.20: 505(2002); 和 Sui, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.99: 5515(2002))。典型地，转录单位或盒将包含 RNA 转录启动子序列，诸如 H1-RNA 或 U6 启动子和终止序列，所述启动子序列可操作地与转录所需 siRNA 序列的模板连接，所述终止序列包括 2-3 个尿苷残基和聚胸苷(T5)序列(多腺苷酸化信号)(Brummelkamp, Science, 同上)。选定的启动子可以提供组成性或可诱导的转录。将组合物和 DNA-指导的 RNA 干扰分子的转录的方法详细描述于美国专利号 6,573,099，将其并入本文作为参考。优选地，所述合成性或转录的 siRNA 具有约 1-4 个，优选地约 2-3 个核苷酸的 3'突出端以及 5'磷酸末端(Elbashir, et al., Genes Dev.15: 188(2001); Nykänen, et al., Cell 107: 309(2001))。将转录单位结合到质粒或 DNA 载体中，干扰 RNA 转录自所述质粒或 DNA 载体。将适合于体内传递遗传物质用于治疗目的的质粒详细描述于美国专利号 5,962,428 和 5,910,488 中，它们两者都结合到本文作为参考。选定的质粒可以提供靶细胞的瞬时或稳定的传递。本领域那些技术人员将清楚的是起初被设计用于表达所需基因序列的质粒可以被进行修饰从而包含转录 siRNA 的转录单位盒。

35

40

[0210]分离 RNA，合成 RNA，杂交核酸，制备和筛选 cDNA 文库以及进行 PCR 的方法是本领域众所周知的(见，例如，Gubler&Hoffman, Gene25: 263-269(1983); Sambrook et al., 同上; Ausubel et al., 同上)，PCR 方法也是这样(见美国专利 4,683,195 和 4,683,202；

45

PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds, 1990)). 表达文库也是本领域技术人员众所周知的。公开用在本公开中的一般方法的另外的基本书籍包括 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed.1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); 和

5 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994))。

[0211]金属-磷脂复合物、金属-磷脂复合物颗粒、药物-脂质颗粒的应用

[0212]在一些实施方案中，当药物为核酸时，金属-磷脂复合物、金属-磷脂复合物颗粒均可用于促药物溶酶体逃逸中，以及促进核酸表达中。金属-磷脂复合物、金属-磷脂复合物颗粒也可用于递送药物，将药物引入细胞中，从而实现药物对适用疾病或病症的预防
10 与治疗。

[0213]在一些实施方案中，本公开提供该药物-脂质颗粒的应用，例如用于组合物，该组合物可实现药物的递送或将药物引入细胞。组合物例如为药剂，该药剂可实现：在哺乳动物受试者中使靶序列的表达沉默、在哺乳动物体内传递药物（药物例如为治疗肿瘤、显影剂等）、将药物从体内传递到哺乳动物细胞或治疗哺乳动物的疾病或病症等。药剂中，药物-脂质颗粒为主要有效成分，可根据实际需求，通过不同药学上可接受的辅料或制备工艺，制备成不同的剂型，例如固体剂型（散剂、颗粒剂、丸剂、片剂、胶剂）、半固体剂型（外用膏剂、糊剂）、液体剂型（汤剂、合剂、糖浆剂、酒剂、注射剂）、气体剂型（气雾剂、烟剂）等；例如经胃肠道给药的剂型、经直肠给药的剂型、不经胃肠给药的剂型等。

20 [0214]在一些实施方案中，本公开提供上述金属-磷脂复合物、金属-磷脂复合物颗粒，以及药物-脂质颗粒制备的产品，该产品具有金属-磷脂复合物、金属-磷脂复合物颗粒，以及药物-脂质颗粒的上述功能与用途，具体类型例如可以但不限于为试剂盒、药剂等，该产品可选地还含有其他辅料。

[0215]对于药物-脂质颗粒作用的靶基因：通常，传递药物-脂质颗粒从而使目标基因产物的翻译(即，表达)下调或沉默是理想的。基因产物的合适的分类包括，但不限于，与病毒感染和存活相关的基因，与代谢疾病和病症(例如，其中肝作为靶目标的疾病和病症，和肝疾病和病症)相关的基因，与肿瘤发生和细胞转化相关的基因，生血管基因，免疫调节剂基因诸如与炎症和自身免疫应答相关的那些，配体受体基因和与神经变性病症相关的基因。

30 [0216]与病毒感染和存活相关的基因包括通过病毒表达从而结合，进入并在细胞中复制的那些。特别是与慢性病毒疾病相关的病毒序列。例如病毒序列包括肝炎病毒的序列 (Hamasaki, et al., FEBS Lett.543: 51(2003); Yokota, et al, EMBO Rep.4: 602(2003); Schlomai, et al., Hepatology 37: 764(2003); Wilson, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.100: 2783(2003); Kapadia, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.100: 2014(2003); 和

35 FIELDSVIROLOGY(Knipe et al.eds.2001)), 人免疫缺陷病毒(HIV)(Banerjee, et al., Mol Ther.8: 62(2003); Song, et al., J.Virol.77: 7174(2003); StephensonJAMA 289: 1494(2003); Qin, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.100: 183(2003)), 疱疹病毒(Jia, et al., J.Virol.77: 3301(2003)), 和人乳头状瘤病毒(HPV)(Hall, et al., J.Virol.77: 6066(2003); Jiang, et al., Oncogene 21: 6041(2002))。可以被沉默的示例性肝炎病毒核酸序列包括，但不限于：涉及转录和翻译的核酸序列(例如，En1, En2, X, P)，编码结构蛋白质的核酸序列(例如，包括 C 和 C 相关的蛋白质的核心蛋白；包括 S, M, 和/或 L 蛋白质的衣壳和包膜蛋白质，或其片段)(见，例如，FIELDS VIROLOGY, 2001, 同上)。可以被沉默的丙型肝炎核酸序列包括但不限于：丝氨酸蛋白酶(例如，NS3/NS4)，解旋酶(例如，NS3)，聚合酶(例如，NS5B)和包膜蛋白(例如，E1, E2, 和 p7)。甲型肝炎核酸序列在例如 Genbank 登记号 NC_001489 中提及；乙
45 型肝炎核酸序列在例如 Genbank 登记号 NC_003977 中提及；丙型肝炎核酸序列在例如

Genbank 登记号 NC_004102 中提及;丁型肝炎核酸序列在例如 Genbank 登记号 NC_001653 中提及;戊型肝炎核酸序列在例如 Genbank 登记号 NC_001434 中提及;并且 G 型肝炎核酸序列在例如 Genbank 登记号 NC_001710 中提及。使编码与病毒感染和存活相关的基因的序列沉默可以方便地与用于治疗病毒疾病的常规药剂的施用结合来进行使用。

- 5 [0217]与代谢疾病和病症(例如,其中肝被靶向的病症和肝疾病以及病症)相关的基因包括,例如,在血脂异常(例如,肝 X 受体(例如,LXR α 和 LXR β Genback 登记号 NM_007121)),类法尼醇 X 受体(FXR)(Genbank 登记号 NM_005123),固醇调节元件结合蛋白质(SREBP),位点-1 蛋白酶(S1P),3-羟基-3-甲基戊二酰基辅酶-A 还原酶(HMG 辅酶-A 还原酶),载脂蛋白(ApoB),和载脂蛋白(ApoE))和糖尿病(例如,葡萄糖-6-磷酸)中表达的基因(见,例如,
- 10 Forman et al., Cell 81: 687(1995); Seol et al., Mol.Endocrinol.9: 72(1995), Zavacki et al., PNAS USA 94: 7909(1997); Sakai, et al., Cell85: 1037-1046(1996); Duncan, et al., J.Biol.Chem.272: 12778-12785(1997); Willy, et al., Genes Dev.9(9): 1033-45(1995); Lehmann, et al., J.Biol.Chem.272(6): 3137-3140(1997); Janowski, et al., Nature 383: 728-731(199); Peet, et al., Cell93: 693-704(1998))。本领域技术人员将理解与代谢疾病和病症(例如其中
- 15 肝被靶向的疾病和病症以及肝疾病和病症)相关的基因包括在肝本身中表达的基因以及在其它器官和组织中表达的基因。使编码与代谢疾病和病症相关的基因的序列沉默可以方便地与用于治疗所述疾病或病症的常规药剂的施用结合来进行使用。

- [0218]与肿瘤发生和细胞转化相关的基因的实例包括易位序列诸如 MLL 融合基因,BCR-ABL(Wilda, et al., Oncogene, 21: 5716(2002); Scherr, et al, Blood 101: 1566),
- 20 TEL-AML1, EWS-FLI1, TLS-FUS, PAX3-FKHR, BCL-2, AML1-ETO 和 AML1-MTG8(Heidenreich, et al., Blood 101: 3157(2003)); 过度表达的序列诸如多药物抗性基因(Nieth, et al., FEBS Lett.545: 144(2003); Wu, et al, Cancer Res.63: 1515(2003)),细胞周期蛋白(Li, et al., CancerRes.63: 3593(2003); Zou, et al., Genes Dev.16: 2923(2002)), β -联蛋白(Verma, et al., Clin Cancer Res.9: 1291(2003)),端粒末端转移酶基因(Kosciulek, et al., Mol Cancer Ther.2: 209(2003)), c-MYC, N-MYC, BCL-2, ERBB1 和 ERBB2(Nagy, et al.Exp.Cell Res.285: 39(2003)); 和突变序列诸如 RAS(综述于 Tuschl 和 Borkhardt, Mol.Interventions, 2: 158(2002))。使编码 DNA 修复酶的序列沉默与化疗剂的施用结合使用(Collis, et al., CancerRes.63: 1550(2003))。编码与肿瘤迁移相关的蛋白质的基因也是
- 25 目标靶序列,所述蛋白质,例如整合蛋白、选择蛋白和金属蛋白水解酶。可以将有利于或促进肿瘤发生或细胞转化,肿瘤生长或肿瘤迁移的任何完整或部分基因序列包括进来作为模板序列。
- 30

[0219]生血管基因能够促进新血管的形成。血管内皮生长因子(VEGF)是重点研究方向(Reich, et al., Mol.Vis.9: 210(2003))。

- [0220]免疫调节剂基因是调节一个或多个免疫应答的基因。免疫调节剂基因的实例包
- 35 括细胞因子诸如生长因子(例如, TGF- α , TGF- β , EGF, FGF, IGF, NGF, PDGF, CGF, GM-CSF, SCF, 等),白细胞介素(例如, IL-2, IL-4, IL-12(Hill, et al., J.Immunol.171: 691(2003)), IL-15, IL-18, IL-20, 等),干扰素(例如, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , 等)和 TNF。Fas 和 Fas 配体基因也是目标免疫调节剂靶序列(Song, et al., Nat.Med.9: 347(2003))。在造血和淋巴样细胞中编码次级信号分子的基因也包括在本公开中,例如, Tec 家族激酶,
- 40 诸如 Bruton's 酪氨酸激酶(Btk)(Heinonen, et al., FEBS Lett.527: 274(2002))。

- [0221]细胞受体配体包括这样的配体,其能结合细胞表面受体(例如,胰岛素受体、EPO 受体、G-蛋白质偶联受体、具有酪氨酸激酶活性的受体、细胞因子受体、生长因子受体等)以调节(例如,抑制,激活等)受体涉及的生理途径(例如,葡萄糖水平调节、血液细胞发展、有丝分裂发生等)。细胞受体配体的实例包括细胞因子、生长因子、白细胞介素、
- 45 干扰素、促红细胞生成素(EPO)、胰岛素、胰高血糖素、G-蛋白质偶联受体配体等)。编码

三核苷酸重复序列(例如, CAG 重复序列)扩张的模板发现用于使在神经变性疾病中的病原序列沉默, 所述疾病由三核苷酸重复序列的扩张所引起, 诸如脊髓延髓肌肉萎缩和亨廷顿病(Caplen, et al., Hum.Mol.Genet.11: 175(2002))。

[0222]可注射的传递: 在某些情形中, 如美国专利 5,543,158; 美国专利 5,641,515 和
5 美国专利 5,399,363 所述, 通过肠胃外, 静脉内, 肌内, 皮下, 皮内或腹膜内来传递本文公开的
药物-脂质颗粒是理想的。可以将所述药物-脂质颗粒局部注射到目标位点(例如, 疾
病位点诸如炎症或肿瘤形成或到靶器官或组织)或全身注射以广泛分布到生物体。可以在
水中制备所述药物-脂质颗粒的溶液, 所述水合适地混和以表面活性剂。还可以在甘油,
液体聚乙二醇及其混合物中以及在油中制备分散体。可选的, 这些制剂包含防腐剂以阻止
10 微生物的生长。通常, 当被静脉内施用时, 将药物-脂质颗粒制剂与合适的药用载体一起
进行配制。通常, 普通缓冲盐溶液(135-150mM NaCl)将被用作药用载体, 但是其它合适的
载体将足够满足需求。另外的合适载体描述在例如

REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia,
PA, 17th ed. (1985)。用于本文时, “载体”包括任何和所有的溶剂, 分散介质, 媒介, 包
15 衣, 稀释剂, 抗菌剂和抗真菌剂, 等渗和吸收延缓剂, 缓冲剂, 载体溶液, 混悬液, 胶体
等。短语“药用”指分子实体和组合物, 所述分子实体和组合物被施用给人时, 不产生变态
或相似的不良反应。水性组合物的制剂是本领域的常规理解, 所述组合物包含作为活性成
分的蛋白质。可选地, 将这些组合物制备为注射液, 液体溶液或混悬液; 还可以制备在注
射前适合于在液体中的溶液或混悬液的固体形式。还可以将所述制剂进行乳化。

[0223]可以通过常规脂质体灭菌技术, 诸如过滤来对药物-脂质颗粒进行灭菌。所述药
物-脂质颗粒可以包含药用辅助物质, 所述药用辅助物质是合适的生理条件, 诸如 pH 调
节剂和缓冲剂, 毒性调节剂, 润湿剂等。使用上文所指的技术可以对这些组合物进行灭菌,
或者替代地, 它们可以在无菌条件下产生。可以对得到的水溶液包装以进行使用或在无菌
条件下进行过滤并进行冷冻干燥, 在施用前将冷冻干燥的制剂与无菌水溶液结合在一起。

[0224]预防性和治疗性的处理: 在一些实施方案中, 可以将药物-脂质颗粒用于对患
25 有疾病或病症的受试者(例如, 哺乳动物受试者)的预防性或治疗性的处理, 所述疾病或病
症与靶序列的表达或过表达相关。将所述药物-脂质颗粒以足够激发患者的治疗性应答的
量施用给受试者。将足以完成此的量定义为“治疗上有效的剂量或量”或“有效剂量或量”。
在确定待施用于疾病的治疗或预防中的药物-脂质颗粒的有效量中, 所述疾病由于靶基因
30 的表达或过表达导致, 所述内科医师评价药物-脂质颗粒的循环血浆水平, 药物-脂质颗粒
毒性和与靶基因的表达或过表达相关的疾病的进展。施用可以通过单一或分剂量来完成。

[0225]例如, 可以将所述药物-脂质颗粒施用给受试者, 所述受试者被病原微生物感染
或有被病原微生物感染的风险。所述药物应该优选地对应于序列, 并还应该对于微生物是
唯一的(或至少在经历治疗的患者的天然基因组中是缺乏的), 所述序列在微生物的生活史
35 中具有关键作用。通过来自体内(ex vivo)或静脉内注射以治疗上有效的剂量将所述药物-
脂质颗粒引入靶细胞, 组织或器官。使编码与病原感染相关的基因的序列沉默可以方便地
与用于治疗病原疾病的常规试剂的施用结合进行使用。所述治疗可以被预防性地施用给有
风险被病原微生物感染或已经被病原微生物感染的人。

[0226]在一个优选的实施方案中, 本公开药物-脂质颗粒可以方便地用于治疗癌症、病
40 毒感染、自身免疫性疾病、糖尿病、阿尔兹海默症。病毒感染包括甲肝、乙肝、丙肝、
SARS-Cov-2、HIV、HPV、流感、天花、梅毒。例如, 对于抑制乙型肝炎病毒的合适位点
包括编码 S, C, P 和 X 蛋白质, PRE, EnI, 和 EnII 的核酸序列(见, 例如, FIELDS VIROLOGY,
2001, 同上)。本领域的技术人员将理解与肝炎感染相关的基因沉默可以与对于肝炎的常
规治疗, 诸如, 例如免疫球蛋白、干扰素(例如, PEG 化和未 PEG 化的干扰素 a)(见, 例如,
45 Medina et al., Antiviral Res.60(2): 135-143(2003); 利巴韦林(见, 例如, Hugle 和 Cerny,

Rev.Med.Virol.13(6): 361-71(2003); 阿德福韦和拉米夫定(见, 例如, Kock et al., Hepatology 38(6): 1410-8(2003); 异戊二烯化抑制剂(见, 例如 Bordier et al., J.Clin.Invest.112(3): 407-414(2003)); 泛昔洛韦(见, 例如, Yurdaydin et al., J Hepatol.37(2): 266-71(2002); 和柴胡皂苷 c 和 d(见, 例如, Chiang et al., Planta Med.69(8): 705-9(2003)。

- 5 [0227]在另一个实施方案中, 本公开药物-脂质颗粒可以便利地用于治疗特征在于基因的或基因群的表达或过表达的疾病和病症。在一些方面中, 本公开的药物-脂质颗粒可以用于治疗代谢性疾病和病症(例如, 其中肝是靶目标的疾病和病症以及肝疾病和病症)诸如, 例如, 血脂异常和糖尿病。本领域技术人员将理解与代谢疾病和病症相关的基因的沉默可以与这些疾病的常规治疗结合。例如, 涉及血脂异常的基因的沉默可以与用抑制素、胆汁酸螯合剂/树脂和胆固醇吸收抑制剂诸如依泽替米贝, 植物甾烷醇/甾醇, 多元酚, 以及营养制品诸如燕麦糠, 亚麻籽和大豆蛋白, 植物甾烷醇(phytostanol)类似物, 角鲨烯合成酶抑制剂, 胆汁酸转运抑制剂 SREBP 裂解激活蛋白质(SCAP)激活配体, 烟酸(烟酸), 阿西莫司, 高剂量鱼油, 抗氧化剂和甘蔗脂肪醇, 微粒体三酰甘油转运蛋白(MTP)抑制剂, 脂酰辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶(ACAT)抑制剂, gemcabene, 利非贝罗, 泛酸类似物, 烟酸-受体激动剂, 抗炎剂(诸如 Lp-PLA(2)拮抗剂和 AGI1067)功能油, PPAR- α , γ , δ 激动剂, 以及双重 PPAR- α , γ 和‘pan’PPAR- α/γ , δ 激动剂, 胆甾醇酯转移蛋白(CETP)抑制剂(诸如 torcetrapib), CETP 疫苗, ATP-结合盒式转运蛋白(ABC)A1 的上调剂, 卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)和清除剂受体类 B 类型 1(SRB1), 以及合成性载脂蛋白(Apo)E-相关肽, 延缓释放的烟酸/洛伐他汀, 阿托伐他汀/氨氯地平, 依泽替米贝/辛伐他汀, 阿托伐他汀/CETP 抑制剂, statin/PPAR 激动剂, 在开发中的延缓释放的烟酸/辛伐他汀和普伐他汀/阿司匹林, 20 以及抗-肥胖症试剂进行的治疗结合(见, 例如, Bays 和 Stein, Expert Opin.Pharmacother.4(11): 1901-38(2003))。同样地, 涉及糖尿病的基因的沉默可以与用胰岛素进行的治疗以及饮食修改和锻炼结合。

- 25 [0228]类似的方法用于抑制内源受体细胞基因的表达, 所述内源受体基因与肿瘤发生和细胞转化, 肿瘤生长和肿瘤迁移相关; 抑制生血管基因的表达; 抑制免疫调节剂基因, 诸如那些与炎症和自身免疫应答相关基因的表达; 抑制配体受体基因的表达; 抑制与神经变性病症相关的基因的表达; 和抑制另外的与病毒感染和存活相关的另外的基因的表达。具体目标的靶基因序列同上描述。

- [0229]检测所述颗粒: 使用本领域已知的任何方法检测本文的药物-脂质颗粒。例如, 30 使用本领域众所周知的方法将标记直接或间接与药物-脂质颗粒的成分或其它基于脂质的载体系统偶联。可以使用广泛种类的标记, 其中基于需要的敏感性, 与药物-脂质颗粒成分的缀合的容易性, 稳定性要求和可获得的工具和处理的准备来进行选择。合适的标记包括, 但不限于, 光谱标记, 诸如荧光染料(例如, (例如, 荧光素和衍生物, 诸如异硫氰酸荧光素(FITC)和 Oregon GreenTM; 若丹明和衍生物, 诸如德克萨斯红, 35 tetrarhodimine isothiocyanate(TRITC), 等, 洋地黄毒苷, 生物素, 藻红蛋白, AMCA, CyDyesTM 等; 放射性标记, 诸如 ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P, 等; 酶诸如辣根过氧化物酶, 碱性磷酸酶等; 光谱比色标记诸如胶态金或有色玻璃或塑料珠, 诸如聚苯乙烯, 聚丙烯, 胶乳等)。使用本领域已知的任何方式来对标记进行检测。

- [0230]核酸的检测: 通过本领域那些技术人员众所周知的许多方式的任何一种来对本文的核酸进行检测和定量。通过本领域众所周知的方法诸如 DNA 印迹分析, RNA 印迹分析, 凝胶电泳, PCR, 放射性标记, 闪烁计数和亲和性层析法来进行核酸的检测。还可以应用另外的分析生化方法诸如分光光度测定法, X 光线照相术, 电泳, 毛细管电泳, 高效液相层析(HPLC), 薄层层析法(TLC), hyperdiffusion 层析法。

- 45 [0231]通过应用核酸扩增系统可以提高杂交测定的敏感性, 所述核酸扩增系统使被检测的靶核酸成倍增加。已知适合于扩增用作分子探针的序列或产生核酸片段以进行随后的

亚克隆的体外扩增技术。通过这些体外扩增方法,包括聚合酶链反应(PCR),连接酶链反应(LCR),Q β -复制酶扩增和其它的RNA聚合酶介导技术(例如,NASBATM)足以指导技术人员的技术实例见于 Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ColdSpring Harbor Laboratory Press, 2000, 和 Ausubel et al.,

- 5 SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (2002), 以及 Mullis et al. (1987), 美国专利号 4,683,202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (October 1, 1990), C&EN 36;
- 10 The Journal Of NIH Research, 3: 81 (1991); (Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1173 (1989); Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 1874 (1990); Lomell et al., J. Clin. Chem., 35: 1826 (1989); Landegren et al., Science, 241: 1077 (1988); Van Brunt, Biotechnology, 8: 291 (1990); Wu 和 Wallace, Gene, 4: 560 (1989); Barringer et al., Gene, 89: 117 (1990), 和 Sooknanan 和 Malek, Biotechnology, 13: 563 (1995)。克隆体外扩增核
- 15 酸的改善的方法描述于 Wallace et al., 美国专利号 5,426,039。本领域描述的其它方法是基于核酸序列的扩增(NASBATM, Cangene, Mississauga, Ontario)和 Q β 复制酶系统。

[0232]如 Needham VanDevanter et al., Nucleic Acids Res., 12: 6159 (1984)所述,典型地按照 Beaucage 和 Caruthers, Tetrahedron Letts., 22(20): 1859-1862 (1981)所述的固相亚磷酰胺三酯方法,例如使用自动合成仪来化学合成寡核苷酸,所述寡核苷酸用作例如在

20 体外扩增方法的探针,用作基因探针,或作为抑制剂成分。如果必要,如 Pearson 和 Regnier, J. Chrom., 255: 1371-149 (1983)所述,通过天然聚丙烯酰胺凝胶电泳或通过阴离子交换 HPLC 来典型地进行寡核苷酸的纯化。使用 Maxam 和 Gilbert (1980)在 Grossman 和 Moldave (eds.) Academic Press, New York, Methods in Enzymology, 65: 499 中的化学降解方法可以证实合成性寡核苷酸的序列。

25 [0233]随后的实施例提供举例说明,但不限定被要求的本公开。本领域技术人员将容易地识别各种非关键性的参数,其可以在实质上产生相同的结果。

[0234]本公开要保护的药物-脂质颗粒是指除含阳离子/可电离脂质以外的药物-脂质颗粒,即药物-金属-磷脂复合物颗粒 (drug-loaded metal-chelated phospholipid complex

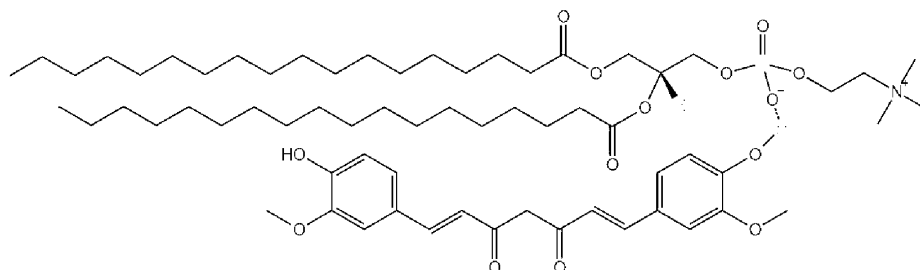
30 nanoparticles, drug@MPP)。

[0235]实验例一、制备药物-金属-磷脂复合物颗粒

[0236]实施例 1、制备磷脂复合物

[0237]将具有磷酸基团的磷脂分子与连接物分子连接:将二硬脂酰基磷脂酰胆碱 (DSPC, 式 46) 和姜黄素 (式 19) 按照摩尔比 1:1 加入反应瓶中,加入适量乙醇溶解,

35 于 65 $^{\circ}$ C 反应 2 h 后,浓缩,加入正己烷。沉淀出来磷脂复合物,过滤,真空干燥得到磷脂复合物。磷脂复合物结构如下所示:

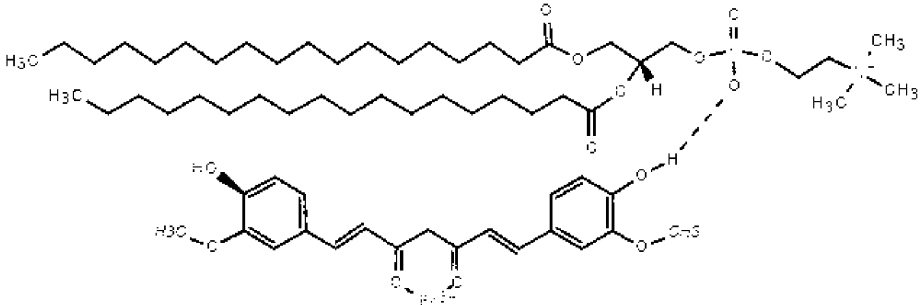


[0238]结果分析：姜黄素与 DSPC 在 65℃ 的条件下反应 2 小时获得的目标产物的产率为 94%。

[0239]实施例 2、制备金属-磷脂复合物

5 [0240]实施例 2.1 制备金属离子为 Fe^{3+} 时的金属-磷脂复合物

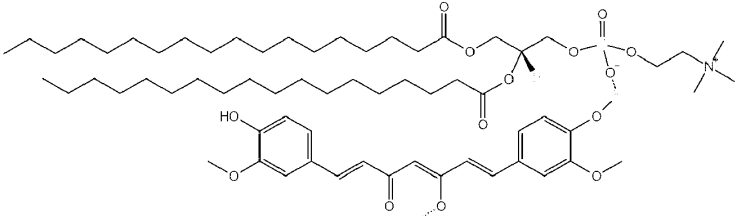
[0241]实施例 1 中制备的磷脂复合物与金属离子部分连接：将磷脂复合物和 FeCl_3 按照摩尔比 1: 1 加入反应瓶中，加入乙醇溶解，于 60℃ 反应 2h 后，将反应液悬干，随后用超纯水洗涤，真空干燥得到金属-磷脂复合物。金属-磷脂复合物结构如下所示。



10 [0242]结果分析：磷脂复合物与 FeCl_3 在 60℃ 的条件下反应 2 小时，磷脂复合物投料浓度为 4.5mg/mL 以及磷脂复合物与 FeCl_3 的投料比为 1: 1 时获得的目标产物的产率为 95%。

[0243]实施例 2.2 制备金属离子为 Al^{3+} 时的金属-磷脂复合物

15 [0244]本实施例与实施例 2.1 的区别在于， FeCl_3 替换为 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 。制备得到的金属-磷脂复合物结构如下所示。



[0245]结果分析：磷脂复合物与 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 在 60℃ 的条件下反应 2 小时，磷脂复合物投料浓度为 4.5mg/mL 以及磷脂复合物与 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 的投料比为 1: 1 时获得的目标产物的产率为 95%。

20 [0246]实施例 3、制备 mRNA-金属-磷脂复合物颗粒 (mRNA-loaded metal-chelated phospholipid complex nanoparticles, mRNA@MPP)

[0247]制备金属离子为 Fe^{3+} 时的 mRNA-金属-磷脂复合物颗粒

25 [0248]按照实施例 2.1 中的方法制备金属-磷脂复合物，其中 DSPC、姜黄素、 FeCl_3 按照 1: 1: 1 的投料比投入，并将金属-磷脂复合物和二硬脂酰基磷脂酰胆碱 (DSPC，式 46，作为非阳离子脂质或非可电离脂质)、胆固醇 (CHOL，式 40，作为非阳离子脂质或非可电离脂质)、DSPE-PEG2000 (式 53，作为抑制颗粒聚集的缀合的脂质) 按不同的摩尔占比溶于乙醇中作为有机相。其中金属-磷脂复合物、DSPC、CHOL 及 DSPE-PEG2000 的占比分别为 15%、35%、46%、4%。mRNA 按 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度溶于无酶 PBS 缓冲液中作为水相 (PBS 的组分为 0.137M 的氯化钠、0.0027M 的氯化钾、0.01M 的磷酸氢二钠和 0.0018M

30

的磷酸二氢钾)。以金属-磷脂复合物质量与 mRNA 质量按 40:1 的质量比在微流控芯片中混合。水相与有机相的体积比为 3:1。有机相和水相在微流控芯片中的流速为 12 ml/min。其中, 药物 mRNA 为编码荧光蛋白 eGFP 的 mRNA, 其序列为 SEQ ID NO.1 (720nt)。制备得到 eGFP-mRNA@MPP。将 eGFP-mRNA@MPP 按 2 μ g/mL 的浓度(所含 mRNA 的浓度)与 293T 细胞孵育, 对照组用未进行载药的 MPP 孵育, 48h 后收取细胞悬液, 通过流式细胞术检测 eGFP 阳性细胞百分比。

[0249]对实施例 3 中制备的 eGFP-mRNA@MPP 进行粒径、表面电势及稳定性的检测, 并计算 eGFP-mRNA@MPP 包载核酸的效率。

[0250]检测粒径的方法及结果判断标准: 使用马尔文激光粒度仪 Zetasizer 测试纳米粒子粒径, 粒径在 30~400 nm 范围内视为可接受。

[0251]检测表面电势的方法及结果判断标准: 使用马尔文激光粒度仪 Zetasizer 测试纳米粒子表面电势, 电势在 -10~10 mV 范围视为可接受。

[0252]检测稳定性的方法及结果判断标准: 将纳米粒子在 4℃ 放置 7 天, 使用马尔文激光粒度仪 Zetasizer 测试纳米粒子粒径以及表面电势, 当其粒径以及表面电势在 3-7 天内无明显变化视为稳定性较好。

[0253]计算核酸包载效率的方法: 具体采用琼脂糖凝胶电泳法。首先将每组脂质纳米颗粒的核酸投料量均定为 10 μ g/mL, 金属离子为 Fe³⁺ 时的金属-磷脂复合物质量与 mRNA 质量比为 40:1, 将等浓度的核酸溶于 PBS 缓冲溶液作为阳性对照, 阴性对照为 PBS 缓冲溶液。琼脂糖凝胶的浓度为 1.5%, 此时胶的空隙只允许游离核酸通过而不允许脂质纳米颗粒通过, 当游离核酸条带电泳至可清晰分辨时停止电泳。用 Image J 软件统计不同组别游离核酸的灰度值, 阳性对照组定为 100%, 每组的游离核酸相对于阳性对照的比值为游离核酸相对量, 则每组包载率为 (100-游离核酸相对量)%。核酸包载率在 50% 以上视为可接受范围。

[0254]细胞培养方法: 人胚胎肾细胞系 293T 用含 10% FBS 和 1% 青霉素—链霉素的 DMEM 培养基在 37℃, 5% CO₂ 的条件下培养。

[0255]流式细胞术方法分析 eGFP 阳性细胞百分比的方法: 将 293T 细胞接种于 24 孔板上, 接种密度为 5 $\times$ 10⁵ 个细胞/孔, 当细胞密度达到 80% 时, 加入 1 mL MPP 或 eGFP-mRNA@MPP 孵育细胞, 其中 eGFP-mRNA@MPP 浓度为 2 μ g/mL。48h 后收集细胞悬液, 用流式细胞仪 FITC 通道收集 20000 个细胞, 并分析 eGFP 阳性细胞百分比, 其计算公式为: eGFP 阳性细胞率计算公式 = 表达 eGFP 细胞数/细胞总数 $\times$ 100%。eGFP 阳性细胞百分比达 40% 以上视为可接受范围。

[0256]制备金属离子为 Al³⁺ 时的 mRNA-金属-磷脂复合物颗粒

[0257]按照实施例 2.2 中的方法制备金属-磷脂复合物, 其中 DSPC、姜黄素、Al(NO₃)₃·9H₂O 按照 1:1:1 的投料比投入, 并将金属-磷脂复合物和二硬脂酰基磷脂酰胆碱 (DSPC, 式 46, 作为非阳离子脂质或非可电离脂质)、胆固醇 (CHOL, 式 40, 作为非阳离子脂质或非可电离脂质)、DSPE-PEG2000 (式 53, 作为抑制颗粒聚集的缀合的脂质) 按不同的摩尔占比溶于乙醇中作为有机相。其中金属-磷脂复合物、DSPC、CHOL 及 DSPE-PEG2000 的占比分别为 7%、34%、56%、3%。mRNA 按 20 μ g/mL 的浓度溶于无酶 PBS 缓冲液中作为水相 (PBS 的组分为 0.137M 的氯化钠、0.0027M 的氯化钾、0.01M 的磷酸氢二钠和 0.0018M 的磷酸二氢钾)。以金属磷脂复合物质量与 mRNA 质量按 13.3:1 的质量比在微流控芯片中混合。水相与有机相的体积比为 3:1。有机相和水相在微流控芯片中的流速为 12 ml/min。其中, 药物 mRNA 为编码荧光蛋白 eGFP 的 mRNA, 其序列为 SEQ ID NO.1 (720nt)。制备得到的 eGFP-mRNA@MPP。将 eGFP-mRNA@MPP 按 2 μ g/mL 的浓度(所含 mRNA 的浓度)与 293T 细胞孵育, 对照组用未进行载药的 MPP 孵育, 48h 后收取细胞悬液, 通过流式细胞术检测 eGFP 阳性细胞百分比。

[0258]对实施例 3 中制备的 eGFP-mRNA@MPP 进行粒径、表面电势及稳定性的检测，并计算 eGFP-mRNA@MPP 包载核酸的效率。

[0259]检测粒径的方法及结果判断标准：使用马尔文激光粒度仪 Zetasizer 测试纳米粒子粒径，粒径在 30~400 nm 范围内视为可接受。

5 [0260]检测表面电势的方法及结果判断标准：使用马尔文激光粒度仪 Zetasizer 测试纳米粒子表面电势，电势在 -10~10 mV 范围视为可接受。

[0261]检测稳定性的方法及结果判断标准：将纳米粒子在 4℃ 放置 7 天，使用马尔文激光粒度仪 Zetasizer 测试纳米粒子粒径以及表面电势，当其粒径以及表面电势在 3-7 天内无明显变化视为稳定性较好。

10 [0262]计算核酸包载效率的方法：具体采用琼脂糖凝胶电泳法。首先将每组脂质纳米颗粒的核酸投料量均定为 10μg/mL，金属离子为 Al^{3+} 时的金属-磷脂复合物质量与 mRNA 质量比为 13.3:1，将等浓度的核酸溶于 PBS 缓冲溶液作为阳性对照，阴性对照为 PBS 缓冲溶液。琼脂糖凝胶的浓度为 1.5%，此时胶的空隙只允许游离核酸通过而不允许脂质纳米颗粒通过，当游离核酸条带电泳至可清晰分辨时停止电泳。用 Image J 软件统计不同组
15 别游离核酸的灰度值，阳性对照组定为 100%，每组的游离核酸相对于阳性对照的比值为游离核酸相对量，则每组包载率为 $(100 - \text{游离核酸相对量})\%$ 。核酸包载率在 50% 以上视为可接受范围。

[0263]细胞培养方法：人胚胎肾细胞系 293T 用含 10% FBS 和 1% 青霉素—链霉素的 DMEM 培养基在 37℃，5% CO_2 的条件下培养。

20 [0264]流式细胞术方法分析 eGFP 阳性细胞百分比的方法：将 293T 细胞接种于 24 孔板上，接种密度为 5×10^5 个细胞/孔，当细胞密度达到 80% 时，加入 1mL MPP 或 eGFP-mRNA@MPP 孵育细胞，其中 eGFP-mRNA@MPP 浓度为 2μg/mL。48h 后收集细胞悬液，用流式细胞仪 FITC 通道收集 20000 个细胞，并分析 eGFP 阳性细胞百分比，其计算公式为：eGFP 阳性细胞率计算公式 = $\frac{\text{表达 eGFP 细胞数}}{\text{细胞总数}} \times 100\%$ 。eGFP 阳性细胞百分比达 40% 以上视为可接受范围。
25

[0265]由金属-磷脂复合物组装的金属-磷脂复合物颗粒 (Metal-chelated phospholipid complex nanoparticles, MPP) 装载核酸的原理是：姜黄素与 DSPC 通过氢键结合在一起，同时姜黄素通过配位键与 Fe^{3+} 或 Al^{3+} 相连，形成了金属-磷脂复合物，该金属-磷脂复合物的 Fe^{3+} 或 Al^{3+} 通过配位键与核酸连接，从而确保金属-磷脂复合物与其他脂质组分自组装成 MPP 同时将核酸载入纳米颗粒中。姜黄素在 MMP 装载核酸中的贡献有两种可能性：①姜
30 黄素与核酸相互作用，协助 MPP 装载核酸，例如姜黄素通过插入核酸的小沟中协助装载核酸；②姜黄素也可能不直接与核酸相互作用。

[0266]实施例 3.1、金属-磷脂复合物的组分的投放比例

[0267]将实施例 3 中的 DSPC、姜黄素、 $FeCl_3$ 按照不同的投放比例 (1: 1: 1、3: 3: 2、
35 2: 2: 1) 投放，其他步骤同实施例 3，制备得到不同的 eGFP-mRNA@MPP，分别检测其核酸包载率。

[0268]结果分析：如结果表 1-1 所示，当 DSPC、姜黄素、 $FeCl_3$ 的投放比例为 1: 1: 1 时，制备得到的药物-脂质颗粒的 eGFP-mRNA 包载效率为 97%；当 DSPC、姜黄素、 $FeCl_3$ 的投放比例为 3: 3: 2 时，制备得到的药物-脂质颗粒的 eGFP-mRNA 包载效率为 70%；当
40 DSPC、姜黄素、 $FeCl_3$ 的投放比例为 2: 2: 1 时，制备得到的药物-脂质颗粒的 eGFP-mRNA 包载效率为 60%。在药物-脂质颗粒中 Fe^{3+} 的功能是连接磷脂复合物与核酸，每个 Fe^{3+} 最多有三个络合位点，所以 DSPC、姜黄素、 $FeCl_3$ 在药物-脂质颗粒中的投放比例应该为 1: 1: 1，才能保证药物-脂质颗粒能尽可能多地包载核酸。实验的结果也证实当 DSPC、姜黄素、 $FeCl_3$ 的投放比例为 1:1:1 时，用其制备的药物-脂质颗粒的 eGFP-mRNA 包载率最高。
45 当 DSPC、姜黄素、 $FeCl_3$ 的投放比例从 1: 1: 1 到 2: 2: 1 范围为内，其药物-脂质颗粒的核

酸包载率均在 60%以上。

[0269]表 1-1 金属-磷脂复合物的组分投放比例及其制备的药物-脂质颗粒的功能

DSPC、姜黄素、FeCl ₃ 的投放比例	药物-脂质颗粒的 mRNA 包载率
1: 1: 1	87%
3: 3: 2	70%
2: 2: 1	60%

[0270]将实施例 3 中的 DSPC、姜黄素、Al(NO₃)₃ · 9H₂O 按照不同的投放比例 (1: 1: 1、3: 3: 2、2: 2: 1) 投放, 其他步骤同实施例 3, 制备得到不同的 eGFP-mRNA@MPP, 分别检测其核酸包载率。

[0271]结果分析: 如结果表 1-2 所示, 当 DSPC、姜黄素、Al(NO₃)₃ · 9H₂O 的投放比例为 1: 1: 1 时, 制备得到的金属-磷脂复合物颗粒的 eGFP-mRNA 包载效率为 98%; 当 DSPC、姜黄素、Al(NO₃)₃ · 9H₂O 的投放比例为 3: 3: 2 时, 制备得到的金属-磷脂复合物颗粒的 eGFP-mRNA 包载效率为 72%; 当 DSPC、姜黄素、Al(NO₃)₃ · 9H₂O 的投放比例为 2: 2: 1 时, 制备得到的金属-磷脂复合物颗粒的 eGFP-mRNA 包载效率为 58%。在金属-磷脂复合物颗粒中 Al³⁺的功能是连接磷脂复合物与核酸, 每个 Al³⁺最多有三个络合位点, 所以 DSPC、姜黄素、Al(NO₃)₃ · 9H₂O 在药物-脂质颗粒中的投放比例应该为 1: 1: 1, 才能保证金属-磷脂复合物颗粒能尽可能多地包载核酸。实验的结果也证实当 DSPC、姜黄素、Al(NO₃)₃ · 9H₂O 的投放比例为 1:1:1 时, 用其制备的金属-磷脂复合物颗粒的 eGFP-mRNA 包载率最高。当 DSPC、姜黄素、Al(NO₃)₃ · 9H₂O 的投放比例从 1: 1: 1 到 2: 2: 1 范围为内, 其金属-磷脂复合物颗粒的核酸包载率均在 58%以上。

[0272]表 1-2 金属-磷脂复合物的组分投放比例及其制备的金属-磷脂复合物颗粒的功能

DSPC、姜黄素、Al(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O 的投放比例	金属-磷脂复合物颗粒的 mRNA 包载率
1: 1: 1	92%
3: 3: 2	72%
2: 2: 1	58%

[0273]实施例 3.2、制备药物-脂质颗粒中金属-磷脂复合物、二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)、DSPE-PEG2000 及胆固醇 (CHOL) 的比例

[0274]与实施例 3 相比, 以金属-磷脂复合物、二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)、DSPE-PEG2000、胆固醇 (CHOL) 的比例如表 1-3 (金属离子为 Fe³⁺) 和表 1-4 (金属离子为 Al³⁺) 所示, 其余条件相同。

[0275]结果分析: 如结果表 1-3 所示, 当金属-磷脂复合物 (金属离子为 Fe³⁺) 占比在 (10-40) % 范围时、DSPC 占比在 (0-40) % 范围时、CHOL 占比在 (35-75) % 范围时, DSPE-PEG2000 占比在 (2-10) % 范围时, 药物-脂质颗粒的粒径在 50~400nm 范围、表面电势在 -10~10 mV 范围、体外稳定性 3 天以上、mRNA 包载率 50%以上, eGFP 蛋白的阳性表达率 70%以上。其中, 当金属-磷脂复合物占比 15%、二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC) 占比 35%、胆固醇 (CHOL) 占比 46%及 DSPE-PEG2000 占比 4%时, 药物-脂质颗粒的性能最优, 即粒径在 110 nm 范围、表面电势在 -2.04 mV 范围、体外稳定性>7 天、mRNA 包载率为 87%, eGFP 蛋白的阳性表达率 97%。因为 mRNA@MPP 主要靠金属-磷脂复合物吸附核酸, 所以金属-磷脂复合物的占比不能太低; DSPC 的含量在 0-40%范围内时, 其纳米颗粒的稳定性在可接受范围内, 当 DSPC 的含量为 0%时, 因为金属-磷脂复合物中含有 DSPC, 使其纳米颗粒的稳定性能得以维持; DSPE-PEG2000 的作用是防止纳米颗粒聚集以及增长体内循环时间, 其含量在 2-10%范围性能会较优; CHOL 的作用是增强纳米颗粒

的流动性，其维持一定的含量利于纳米颗粒的稳定性。

[0276]上述结果提示，金属-磷脂复合物（金属离子为Fe³⁺）占比在（10-40）% 范围时、DSPC 占比在（0-40）% 范围时、CHOL 占比在（35-75）% 范围时，DSPE-PEG2000 占比在（2-10）% 范围时，mRNA@MPP 具备较好的载药性能。

5 [0277]表 1-3 不同组分比例的 eGFP-mRNA@MPP（Fe³⁺）性能检测

因素	金属-磷脂复合物	DSPC	CHOL	DSPE-PEG2000	粒径（nm）	表面电势（mV）	稳定性（days）	mRNA 包载率	eGFP 阳性细胞率
1	25%	25%	40%	10%	120	-1.70	>7	84%	97%
2	40%	0	55%	5%	300	-0.51	3	80%	91%
3	20%	20%	50%	10%	110	-4.03	>7	65%	78%
4	10%	30%	58%	2%	100	-0.41	3	60%	73%
5	30%	0	60%	10%	180	-4.27	5	81%	90%
6	30%	15%	50%	5%	150	-0.57	5	77%	82%
7	30%	5%	55%	10%	160	-3.81	>7	78%	81%
8	20%	0	75%	5%	150	-1.18	5	68%	75%
9	20%	30%	40%	10%	98	-1.55	5	75%	79%
10	15%	40%	43%	2%	120	-1.05	3	70%	75%
11	20%	40%	35%	5%	130	-1.96	5	72%	74%
12	15%	35%	46%	4%	110	-2.04	>7	87%	97%

[0278]结果分析：如结果表 1-4 所示，当金属-磷脂复合物（金属离子为Al³⁺）占比在（5-50）% 范围时、DSPC 占比在（0-51）% 范围时、CHOL 占比在（15-80）% 范围时，DSPE-PEG2000 占比在（2-10）% 范围时，药物-脂质颗粒的粒径在 50~400nm 范围、表面电势在-10~10 mV 范围、体外稳定性 3 天以上、mRNA 包载率 50%以上，eGFP 蛋白的阳性表达率 70%以上。其中，当金属-磷脂复合物占比 7%、二硬脂酰磷脂酰胆碱（DSPC）占比 34%、胆固醇（CHOL）占比 56%及 DSPE-PEG2000 占比 3%时，药物-脂质颗粒的性能最优，即粒径为 100 nm、表面电势为-1.57 mV、体外稳定性>7 天、mRNA 包载率为 92%，eGFP 蛋白的阳性表达率 98%。因为 mRNA@MPP 主要靠金属-磷脂复合物吸附核酸，所以金属-磷脂复合物的占比不能太低；DSPC 的含量在 0-51%范围内时，其纳米颗粒的稳定性在可接受范围内，当 DSPC 的含量为 0%时，因为金属-磷脂复合物中含有 DSPC，使其纳米颗粒的稳定性能得以维持；DSPE-PEG2000 的作用是防止纳米颗粒聚集以及增长体内循环时间，其含量在 2-10%范围性能会较优；CHOL 的作用是增强纳米颗粒的流动性，其维持一定的含量利于纳米颗粒的稳定性。

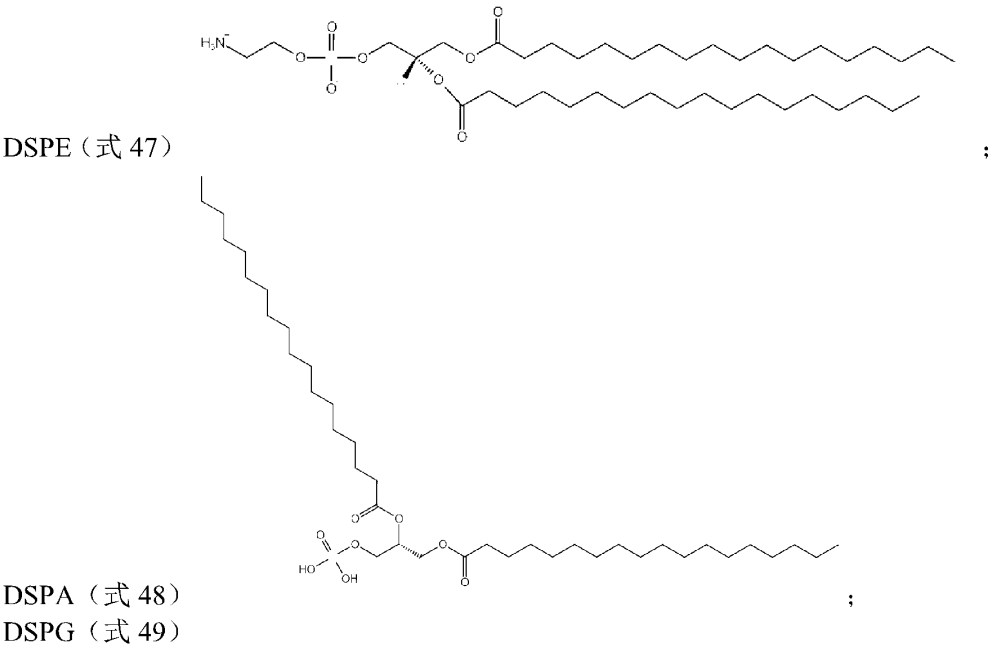
20 [0279]上述结果提示，金属-磷脂复合物（金属离子为Al³⁺）占比在（5-50）% 范围时、DSPC 占比在（0-51）% 范围时、CHOL 占比在（15-80）% 范围时，DSPE-PEG2000 占比在（2-10）% 范围时，mRNA@MPP 具备较好的载药性能。

[0280]表 1-4 不同组分比例的 eGFP-mRNA@MPP（Al³⁺）性能检测

因素	金属-磷脂复合物	DSPC	CHOL	DSPE-PEG2000	粒径（nm）	表面电势（mV）	稳定性（days）	mRNA 包载率	eGFP 阳性细胞率
1	20%	0%	74%	6%	130	-1.76	3	84%	77%
2	13%	0%	80%	7%	85	-3.69	5	80%	72%

3	50%	0%	40%	10%	87	-4.17	3	88%	78%
4	5%	47%	44%	4%	160	-0.97	5	75%	73%
5	30%	45%	15%	10%	245	-4.27	5	81%	90%
6	7%	34%	56%	3%	100	-1.57	>7	92%	98%
7	8%	50%	55%	4%	200	-3.44	3	70%	81%
8	5%	50%	43%	2%	140	-1.01	3	70%	75%
9	25%	25%	40%	10%	268	-4.57	>7	75%	70%
10	25%	51%	15%	9%	220	-1.55	>7	72%	76%
11	20%	40%	35%	5%	190	-3.75	5	74%	73%

- [0281]实施例 3.3、制备 eGFP-mRNA@MPP 中非阳离子脂质或非可电离脂质种类
- [0282]与实施例 3 相比，二硬脂酰磷脂酰胆碱（DSPC）的替代如表 1-5 和表 1-6 所示，其余条件相同。
- 5 [0283]结果分析：为探索 eGFP-mRNA@MPP 中 DSPC 可以被其他非阳离子脂质或非可电离脂质替代，我们分别选用另外三种非阳离子脂质或非可电离脂质，即 DSPE、DSPA 及 DSPG 分别替代 DSPC，并通过检测粒径、表面电势、稳定性及 mRNA 包载率，证明 eGFP-mRNA@MPP 中 DSPC 可以被其他非阳离子脂质或非可电离脂质所替代，替代后其功能等同于包含 DSPC 的 eGFP-mRNA@MPP 的功效（表 1-5（金属离子为 Fe³⁺）和表 1-6（金属离子为 Al³⁺））。因为非阳离子脂质或非可电离脂质 DSPC 在 eGFP-mRNA@MPP 中的主要作用是使脂质体膜融合更好、稳定性更高以及毒性更小，而其他非阳离子脂质或非可电离脂质也具有使脂质体膜融合更好、稳定性更高以及毒性更小的功能，所以，药物-脂质颗粒中的 DSPC 可以被除金属-磷脂复合物和抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的其他非阳离子脂质或非可电离脂质替代，且其功效不被影响。
- 10 [0284]三种非阳离子脂质或非可电离脂质（DSPE、DSPA 及 DSPG）的结构式如下所示。
- 15



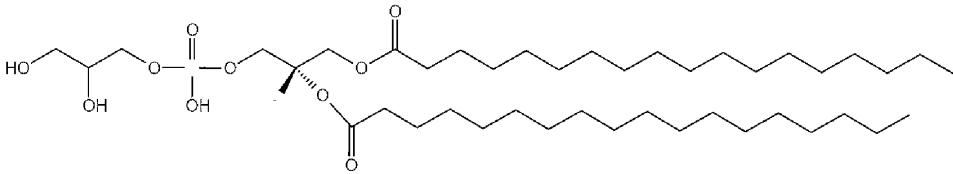


表 1-5 含有不同种类除金属-磷脂复合物和抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的其他非阳离子脂质或非可电离脂质的 eGFP-mRNA@MPP (Fe³⁺) 的性能

非阳离子脂质或非可电离脂质	DSPC	DSPE	DSPA	DSPG
粒径 (nm)	110	130	125	140
表面电势 (mV)	-2.04	-1.81	-2.05	-1.77
稳定性 (days)	>7	>7	>7	>7
mRNA 包载率 (%)	87	75	78	76
eGFP 阳性细胞百分比 (%)	97	92	94	85

表 1-6 含有不同种类除金属-磷脂复合物和抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的其他非阳离子脂质或非可电离脂质的 eGFP-mRNA@MPP (Al³⁺) 的性能

非阳离子脂质或非可电离脂质	DSPC	DSPE	DSPA	DSPG
粒径 (nm)	100	110	105	120
表面电势 (mV)	-1.57	-2.80	-1.07	-1.93
稳定性 (days)	>7	>7	>7	>7
mRNA 包载率 (%)	92	79	78	81
eGFP 阳性细胞百分比 (%)	98	91	92	90

[0285]实施例 3.4、制备 eGFP-mRNA@MPP 中抑制颗粒聚集的缀合的脂质种类

[0286]与实施例 3 相比，DSPE-PEG2000 (式 53) 的替代如表 1-7 (金属离子为 Fe³⁺) 和表 1-8 (金属离子为 Al³⁺) 所示，其余条件相同。三种其他抑制颗粒聚集的缀合的脂质 DSPE-PEG700 (式 50) 及 DSPE-PEG5000 (式 52) 及 DSPE-PEG1000 (式 51)。

[0287]结果分析：为探索 eGFP-mRNA@MPP 中 DSPE-PEG2000 可以被其他抑制颗粒聚集的缀合的脂质替代，我们分别选用三种其他抑制颗粒聚集的缀合的脂质，即 DSPE-PEG700、DSPE-PEG5000 及 DSPE-PEG1000 分别替代 DSPE-PEG2000，并通过检测粒径、表面电势、稳定性及 mRNA 包载率，证明 eGFP-mRNA@MPP 中 DSPE-PEG2000 可以被其他抑制颗粒聚集的缀合的脂质所替代，替代后其功能等同于包含 DSPE-PEG2000 的 eGFP-mRNA@MPP 的功效(表 1-7 和表 1-8)。因为 DSPE-PEG2000 在 eGFP-mRNA@MPP 中的主要作用是抑制聚集，而其他抑制颗粒聚集的缀合的脂质也具有抑制聚集的功能，所以，eGFP-mRNA@MPP 中的 DSPE-PEG2000 可以被其他抑制颗粒聚集的缀合的脂质替代，且其功效不被影响。

表 1-7 含有不同种类抑制颗粒聚集的缀合的脂质的 eGFP-mRNA@MPP (Fe³⁺) 的性能

抑制颗粒聚集的缀合的脂质	DSPE-PEG2000	DSPE-PEG700	DSPE-PEG1000	DSPE-PEG5000
粒径 (nm)	110	110	128	124

表面电势 (mV)	-2.04	-1.66	-2.01	-1.97
稳定性 (days)	>7	>7	>7	>7
mRNA 包载率 (%)	87	80	76	78
eGFP 阳性细胞百分比 (%)	97	92	95	80

表 1-8 含有不同种类抑制颗粒聚集的缀合的脂质的 eGFP-mRNA@MPP (Al³⁺) 的性能

抑制颗粒聚集的缀合的脂质	DSPE-PEG2000	DSPE-PEG700	DSPE-PEG1000	DSPE-PEG500
粒径 (nm)	100	95	90	120
表面电势 (mV)	-1.57	-1.50	-1.98	-1.80
稳定性 (days)	>7	>7	>7	>7
mRNA 包载率 (%)	92	86	85	88
eGFP 阳性细胞百分比 (%)	98	95	95	90

- [0288]实施例 3.5、mRNA@MPP 的制备及效果表征
- [0289]实施例 3.5.1、金属离子为 Fe³⁺的 mRNA@MPP 的制备及效果表征
- [0290]将实施例 3 中的 mRNA 替换为其他两种 mRNA, 参照实施例 3 的方法分别制备三种含不同目的蛋白 mRNA 序列的 mRNA@MPP。三种不同的 mRNA 序列分别为: ①编码荧光蛋白 eGFP 的 mRNA 序列为 SEQ ID NO.1 (720nt); ②编码新型冠状病毒 S1 亚基的受体结合域 (receptor binding domain, RBD) 的 mRNA 序列为 SEQ ID NO.2 (669nt); ③编码肿瘤抗原 NY-ESO-1 的 mRNA 序列为 SEQ ID NO.3 (543nt)。其余药物 (mRNA)-脂质颗粒的制备过程与实施例 3 相同, 分别得到 eGFP-mRNA@MPP、RBD-mRNA@MPP、NY-ESO-1-mRNA@MPP。
- [0291]将 eGFP-mRNA@MPP 按 2μg/mL 的浓度 (所含 mRNA 的浓度) 与 293T 细胞孵育, 对照组用 MPP 孵育, 48h 后收取细胞悬液, 通过流式细胞术检测 eGFP 阳性细胞百分比, 结果见图 1-1; 将 RBD-mRNA @MPP 按 2μg/mL 的浓度 (所含 mRNA 的浓度) 与 293T 细胞孵育, 对照组用 MPP 孵育, 24h 后, 离心后上清液-20℃冻存备用, 利用市售新冠抗原 RBD ELISA 检测试剂盒检测细胞上清新冠抗原 RBD 蛋白的表达水平, 结果见图 1-2。
- [0292]ELISA 检测 RBD 表达水平的方法:
- [0293]1. 样品收集: 细胞上清液室温放置 2 小时, 于 1000×g 离心 20min, 取上清;
- [0294]2. 加样: 包被板上分别设空白孔、标准品孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100μL, 标准品孔分别加入依次梯度稀释标准品, 待测样品孔加待测样品 100μL, 37℃孵育 60min;
- [0295]3. 弃去孔内液体, 洗板 3 次, 每次浸泡 1-2min。每孔分别加入配好的生物素标记的抗 RBD 抗体工作液 100μL, 混匀, 37℃孵育 60min;
- [0296]4. 弃去孔内液体, 洗板 3 次, 每次浸泡 1-2min;
- [0297]5. 每孔加入配好的链霉亲和素 HRP 工作液 100μL, 混匀, 37℃孵育 45min;
- [0298]6. 弃去孔内液体, 洗板 3 次, 每次浸泡 1-2min;
- [0299]7. 每孔加 TMB 底物溶液 (TMB) 100μL, 37℃避光孵育 15min;
- [0300]8. 每孔加终止液 100μL, 终止反应;

[0301]9. 在 450nm 波长测量各孔的光密度 (OD 值)。

[0302]数据分析: 以标准品的浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘制标准曲线。

[0303]将实验动物被随机分成 2 组 (实验组和对照组), 每组 5 只。其中, RBD-mRNA@MPP 动物模型为 BALB/c 小鼠, 每只小鼠在第 1 天进行第一次肌肉给药, 5 在第 14 天进行第二次肌肉给药, 实验组注射 RBD-mRNA@MPP, 对照组注射未装载 mRNA 的金属-磷脂复合物颗粒 (MPP)。每次给药的剂量为 100 μ L, 其中实验组中 RBD-mRNA@MPP 制剂含 30mg 的 mRNA。距第一次给药后第 28 天收集小鼠血液, 分离血清梯度稀释, 通过市售 ELISA 试剂盒检测小鼠体内所产生的抗新型冠状病毒 S1 亚基的 RBD 总 IgG 抗体, 结果如图 1-3 所示。

10 [0304]NY-ESO-1-mRNA@MPP 的动物模型为 C57BL/6 小鼠, 每只小鼠在第 1, 7, 14, 21 天进行四次肌肉给药, 实验组注射 NY-ESO-1-mRNA@MPP, 对照组注射未装载 mRNA 的金属-磷脂复合物颗粒 (MPP)。每次给药的剂量为 100 μ L, 其中实验组中 NY-ESO-1-mRNA@MPP 制剂含 30mg 的 mRNA。距第一次给药后第 28 天收集小鼠血液, 分离血清梯度稀释, 用 ELISA 法检测小鼠体内所产生的抗 NY-ESO-1 总 IgG 抗体, 结果 15 如图 1-4 所示。

[0305]检测小鼠体内抗 NY-ESO-1 总 IgG 抗体的方法:

[0306]ELISA 法所用试剂配制:

[0307]1. 包被液: 精密称取 8.4g NaHCO₃ 溶于 1L 蒸馏水 (DDW) 中, 待固体全部溶解后, 使用 1M 的 NaOH 溶液将整个溶液 pH 调至 9.6, 将配制好的包被液存放于 4℃ 待用。

20 [0308]2. 洗液: 向 1L 0.01M PBS 溶液中加入 0.5mL Tween-20, 混合均匀后于室温放置。

[0309]3. 封闭液: 精密称取 20g BSA 加入 1L 0.01M PBS 溶液中, 对溶液中未溶解的 BSA 粉末进行超声处理, 待溶液中固体全部溶解且溶液呈淡黄色时, 放置于 4℃ 冰箱中保存待用。

25 [0310]4. 抗体稀释液: 精密称取 2.5g BSA 溶于 250mL 0.01M PBS 溶液中, 待固体完全溶解后, 向其中加入 1.25mL Tween-20, 混合均匀后于 4℃ 保存待用。

[0311]5. 显色液: 0.1M 柠檬酸: 19.2g 柠檬酸加入 DDW 水至 1000mL (A) 0.2M 磷酸氢二钠: 28.4g 无水磷酸氢二钠加入 DDW 水至 1000mL (B) 0.1M 柠檬酸溶液 (A) 24.3mL, 0.2M 的磷酸盐缓冲液 (B) 25.7mL, 加 DDW 水 50mL。现用现加 OPD (邻苯二胺) 50mg, 30 加入 30% H₂O₂ 0.15 mL。

[0312]6. 终止液: 2M H₂SO₄: 浓硫酸 55.5mL, 加 DDW 至 500mL。

[0313]ELISA 法测定小鼠血清中抗体的滴度:

[0314]1. 包被: NY-ESO-1 抗原用包被液稀释至 1 μ g/mL, 加入 96 孔板中, 50 μ L/孔, 4℃ 包被过夜。

35 [0315]2. 封闭: 甩干孔板内的包被液, 用封闭液洗涤 3 次, 5min 一次并甩干, 每孔加入 150 μ L 封闭液, 37℃ 孵育 2h。

[0316]3. 干燥: 甩干封闭液, 37℃ 孵育 1~2h, 待孔板底部液体全部干燥为止。

[0317]4. 免疫: 将血清样品用抗体稀释液初始稀释 1: 1000, 再按 1: 2 依次进行系列稀释, 将稀释后的血清样品加入封闭的 96 孔板中, 100 μ L/孔, 于 37℃ 孵育 2h; 甩干孔板内液体, 加入洗液, 300 μ L/孔, 缓慢振荡 40s, 重复此步骤三次; 向孔板中加入 1: 1000 稀释的生物素化的羊抗鼠 IgG 抗体, 100 μ L/孔, 37℃ 孵育 1h; 甩干孔板内液体, 加入洗液, 40 重复上述洗板步骤; 加入新鲜配制的链酶亲和素标记的辣根过氧化物酶 HRP 工作液, 100 μ L/孔, 37℃ 孵育 1h; 甩干孔板内液体, 加入洗液, 重复上述洗板步骤; 于避光条件下加入显色液, 100 μ L/孔, 室温反应 5min 后, 加入终止液终止显色, 50 μ L/孔; 使用酶标仪

测定 450nm 下的吸光度。

[0318]在给 RBD-mRNA@MPP 后第 28 天采集正常小鼠脾脏，在无菌条件下制备成单细胞悬液，按照 100000 脾细胞/孔铺板于细胞孔板中，加入终浓度为 10mg/mL 的 RBD 蛋白培养 48h，离心去上清，通过 ELISA 试剂盒测定 IFN- γ 、IL-2、IL-4 的表达水平，结果如图 1-5 所示。

[0319]在给 NY-ESO-1-mRNA@MPP 后第 28 天采集正常小鼠脾脏，在无菌条件下制备成单细胞悬液，按照 100000 脾细胞/孔铺板于细胞孔板中，加入终浓度为 10mg/mL 的 NY-ESO-1 蛋白培养 48h，离心去上清，通过 ELISA 试剂盒测定 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 的表达水平，结果如图 1-6 所示。

[0320]结果分析：如图 1-1 所示，eGFP-mRNA@MPP 实验组 eGFP 阳性细胞率为 97%，而 MPP 对照组未检测到 eGFP 信号；如图 1-2 所示，MPP 包载的 RBD-mRNA 所编码的 RBD 蛋白在 293T 细胞上清中为 193.3ng/mL，而转染了空载体 MPP 的 293T 细胞上清 RBD 蛋白含量为 0。结果提示，mRNA-MPP 可以包载、递送任意 mRNA，并在细胞内直接编码多肽。如图 1-3，1-4 结果所示，RBD-mRNA@MPP 和 NY-ESO-1-mRNA@MPP 均能有效诱导小鼠的体液免疫，产生高水平的抗原特异性结合抗体。其中 RBD-mRNA@MPP 处理组小鼠体内 IgG 抗体滴度达 117268.8；NY-ESO-1-mRNA@MPP 处理组小鼠 IgG 抗体滴度达 5319.52。如图 1-5，1-6 所示，RBD-mRNA@MPP 和 NY-ESO-1-mRNA @MPP 均能有效诱导小鼠的细胞免疫，即激活免疫细胞并产生大量的细胞因子。其中 RBD-mRNA@MPP 使细胞因子 IFN- γ 、IL-2、IL-4 的表达量分别达 252.8 pg/mL、207.6 pg/mL、56.6 pg/mL；NY-ESO-1-mRNA @MPP 使细胞因子 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 的表达量分别达 70.79 pg/mL、75.29 pg/mL、75.27 pg/mL。结果提示，mRNA@MPP 可以包载、递送任意 mRNA，从而促进目标蛋白（抗原）的表达，进而有效诱导小鼠的体液免疫和细胞免疫，产生高水平的抗原特异性结合抗体和细胞因子，发挥抗新冠病毒 mRNA 疫苗及抗肿瘤 mRNA 疫苗的作用。

[0321]实施例 3.5.2、金属离子为 Al³⁺的 mRNA@MPP 的制备及效果表征

[0322]本实施例与实施例 3.5.1 的区别在于，将实施例 3.5.1 中的金属离子 Fe³⁺替换为 Al³⁺。

[0323]结果分析：如图 1-7 所示，eGFP-mRNA@MPP 实验组 eGFP 阳性细胞率为 98.02%，而 MPP 对照组未检测到 eGFP 信号；如图 1-8 所示，MPP 包载的 RBD-mRNA 所编码的 RBD 蛋白在 293T 细胞上清中为 212.6ng/mL，而转染了空载体 MPP 的 293T 细胞上清 RBD 蛋白含量为 0。结果提示，mRNA-MPP 可以包载、递送任意 mRNA，并在细胞内直接编码多肽。如图 1-9，1-10 结果所示，RBD-mRNA@MPP 和 NY-ESO-1-mRNA@MPP 均能有效诱导小鼠的体液免疫，产生高水平的抗原特异性结合抗体。其中 RBD-mRNA@MPP 处理组小鼠体内 IgG 抗体滴度达 129113；NY-ESO-1-mRNA@MPP 处理组小鼠 IgG 抗体滴度达 6507.4。如图 1-11，1-12 所示，RBD-mRNA@MPP 和 NY-ESO-1-mRNA @MPP 均能有效诱导小鼠的细胞免疫，即激活免疫细胞并产生大量的细胞因子。其中 RBD-mRNA@MPP 使细胞因子 IFN- γ 、IL-2、IL-4 的表达量分别达 271.8 pg/mL、234.6 pg/mL、68.4 pg/mL；NY-ESO-1-mRNA @MPP 使细胞因子 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 的表达量分别达 83.8 pg/mL、98 pg/mL、97.8 pg/mL。结果提示，mRNA@MPP 可以包载、递送任意 mRNA，从而促进目标蛋白（抗原）的表达，进而有效诱导小鼠的体液免疫和细胞免疫，产生高水平的抗原特异性结合抗体和细胞因子，发挥抗新冠病毒 mRNA 疫苗及抗肿瘤 mRNA 疫苗的作用。

[0324]实施例 3.6、siRNA-金属-磷脂复合物颗粒（siRNA-loaded metal-chelated phospholipid complex nanoparticles, siRNA@MPP）的制备及效果

[0325]实施例 3.6.1、金属离子为 Fe^{3+} 时的 siRNA-金属-磷脂复合物颗粒(siRNA-loaded metal-chelated phospholipid complex nanoparticles, siRNA@MPP) 的制备及效果

[0326]将实施例 3 中的 mRNA 替换为 siRNA, 参照实施例 3 的方法分别制备三种含不同 siRNA 的 siRNA@MPP。三种不同 siRNA 靶向的基因、序列及其对应的随机对照序列分别为: ①靶向 Bcl-2 基因的 siRNA (Bcl-2-siRNA) 的序列为 SEQ ID No.4 (反义链) 和 SEQ ID No.21 (正义链) (19bp), 其随机对照序列为 SEQ ID No.5 (反义链) 和 SEQ ID No.22 (正义链) (19 bp); ②靶向 PLK1 基因的 siRNA (PLK1-siRNA) 的序列为 SEQ ID NO.6 (反义链) 和 SEQ ID No.23 (正义链) (21 bp), 其随机对照序列为 SEQ ID NO.7 (反义链) 和 SEQ ID No.24 (正义链) (19bp); ③靶向 Gal-1 基因的 siRNA (Gal-1-siRNA) 的序列为 SEQ ID NO.8 (19bp); 其随机对照序列为 SEQ ID NO.9 (19bp)。其余 siRNA@MPP 的制备过程与实施例 3 相同。

[0327]Bcl-2-siRNA 的序列如下:

[0328]Antisense: 5' -CAGCUUAUAAUGGAUGUAC-3' (SEQ ID No.4);

[0329]Sense: 5' -GUACAUCCAUAUAAGCUG-3' (SEQ ID No.21) (19bp)。

[0330]Bcl-2-siRNA 的随机对照序列如下:

[0331]Antisense: 5' -ACGUGACACGUUCGGAGAA-3' (SEQ ID No.5);

[0332]Sense: 5' -UUCUCCGAACGUGUCACGU-3' (SEQ ID No.22) (19bp)。

[0333]PLK1-siRNA 的序列如下:

[0334]Antisense: 5' -UAAGGAGGGUGAUCUUCUUA-3' (SEQ ID No.6);

[0335]Sense: 5' -UGAAGAAGAUACCCUCCUUA-3' (SEQ ID No.23) (21bp)。

[0336]PLK1-siRNA 的随机对照序列如下:

[0337]Antisense: 5' -CUUACGCUGAGUACUUCGA-3' (SEQ ID No.7);

[0338]Sense: 5' -UCGAAGUACUCAGCGUAAG-3' (SEQ ID No.24) (19bp)。

[0339]Gal-1-siRNA 的序列如下:

[0340]5' -GCUGCCAGAUGGAUACGAA-3' (SEQ ID No.8) (19bp)。

[0341]Gal-1-siRNA 的随机对照序列如下:

[0342]5' -GGAAAUCCCCCAACAGUGA-3' (SEQ ID No.9) (19bp)。

[0343]细胞培养方法: U251 人脑胶质母细胞瘤细胞在高糖 (4.5g/L) DMEM + 10% 胎牛血清 (FBS)、1%青霉素/链霉素和 2mml-谷氨酰胺 (Bio Industries) 培养基中单层生长, 且在 37°C、5%CO₂ 条件下培养, 每周传代 2 次。

[0344]U251 细胞以每孔 1×10^6 细胞密度接种于 6 孔板中约 24h 后, 每孔细胞与含上述 siRNA 的 siRNA@MPP (其中 siRNA 的浓度为 2 μ g/mL) 分别孵育 72 小时后, 收集细胞, 提取细胞总 RNA, 用 RT-PCR 技术分别检测目标基因 (Bcl-2、PLK1、Gal-1) 的 mRNA 表达量, 统计 siRNA@MPP 沉默细胞靶基因的能力。

[0345]RT-PCR 具体流程:

[0346]总 RNA 的提取: 将六孔板弃去培养基, PBS 缓冲液漂洗 3 遍, 每孔加入 1mL Trizol 对细胞进行裂解处理。加入 200 μ L 氯仿, 充分摇匀, 室温静置 10min, 13000 rpm 4°C 离心 15 min, 得到分层的三相液体, 其中 RNA 溶解在上层的水相中。吸取上层水相置于新的无酶 1.5ml 离心管中, 加入 500 μ L 异丙醇, 室温静置 10 min, 13000 rpm 4°C 离心 15min, 得到 RNA 沉淀。去上清, 每管加入 1mL 以无 RNA 酶水新配置的 75% (v/v) 乙醇, 小心吹打, 吹起管底 RNA 白色沉淀, 7500 rpm 4°C 离心 10 min, 去上清, 尽量吸干管底的液体。开盖室温晾干管底的 RNA 沉淀, 加入 50 μ L 无酶水溶解, 使用超微量紫外可见分光光度计检测 RNA 的纯度及浓度。

[0347]cDNA 逆转录: 使用 Ta Ka Ra Prime Script™ RT reagent Kit with g DNA Eraser 试剂盒分别将 RNA 反转录成 cDNA, 在反转录步骤之前去除基因组 DNA (gDNA) 使得

结果更加准确可信。在冰上配制总 RNA 反转录反应体系：1 μ L Prime Script RT Enzyme MixI, 1 μ L RT Primer Mix, 4 μ L 5 $\times$ Prime Script Buffer2, 4 μ L RNase Free dH₂O。配制好反应混合液后，置于 37 $^{\circ}$ C 反应 15min，之后置入 85 $^{\circ}$ C 5 sec 终止反应，随后于 4 $^{\circ}$ C 保存待用。

[0348]RT-PCR 操作：该检测方法为 SYBR Green 染料法，无需探针。具体如下，根据
5 不同样品的 cDNA 为模板进行 Real-time PCR 反应。在冰上配制反应液：5 μ L SYBR Premix Dimer Eraser (2 $\times$), 0.3 μ L PCR Forward 引物 (10 μ M), 0.3 μ L PCR Reverse 引物 (10 μ M), 0.2 μ L ROX Reference DyeII(50 $\times$), 1 μ L 上一步得到的 cDNA 模板和 3.2 μ L dH₂O。在孔板中进行加样，每孔 10 μ L，加样完成后进行离心(1000 rpm, 5min)消除液体挂壁及反应液中的
10 气泡。使用 ABI ViiA7 实时荧光定量 PCR 仪进行 Real-time PCR 反应检测，反应程序为 95 $^{\circ}$ C, 30 sec (1 cycle) $\rightarrow$ 95 $^{\circ}$ C, 5 sec; 55 $^{\circ}$ C, 30 sec; 72 $^{\circ}$ C, 30 sec(40 cycles) $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C-95 $^{\circ}$ C, 2min (1cycle)。实验重复三次，取平均值得到每组 Ct 值，计算实验组与对照组的表达差异倍数。对照基因为 GAPDH。RT-PCR 引物如下：①Bcl-2 引物：forward:
5'-AGGATTGTGGCCTTCTTTGAG-3', reverse: 5'-AGACAGCCAGGAGAAATC
AAAC-3'; ②PLK1 引物：forward: 5'-ACCAGCACGTCGTAGGATTC-3', reverse:
15 5'-CAAGCAATTTGCCGTAGG-3'; ③Gal-1 引物：forward: 5'-CAATCAT
GGCCTGTGGTCTG-3', reverse: 5'-GTG TAGGCACAGGTTGTTGCTG-3'。④GAPDH
引物：forward: 5'-TCAGGGGTTTCACATTTGGCA-3', reverse: 5'-GG AGCGGAA
AACCA-3'。各目的基因表达水平用 RQ 值 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 来表示。公式如下：

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

20 其中， $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$ ， $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$

[0349]基因沉默效率的计算方法：基因沉默效率的计算方法：100% - 实验组基因表达水平/对照组基因表达水平。

[0350]结果分析：如图 1-13, 1-14, 1-15 所示（其中，scr siRNA 为随机对照序列），
25 三种 siRNA@MPP 均能明显干扰其对应的靶基因。Bcl-2-siRNA@MPP 对靶基因 Bcl-2 的抑制率达到 76%；PLK1-siRNA@MPP 对靶基因 PLK1 的抑制率达到 86%；Gal-1-siRNA@MPP 对靶基因 Gal-1 的抑制率达到 73%。结果提示，siRNA@MPP 可以携带任意 siRNA 进行靶基因的干预治疗，发挥载 siRNA 药物、疫苗或其他产品的作用。

[0351]实施例 3.6.2、金属离子为 Al³⁺时的 siRNA-金属-磷脂复合物颗粒(siRNA-loaded metal-chelated phospholipid complex nanoparticles, siRNA@MPP)的制备及效果

30 [0352]本实施例与实施例 3.6.1 的区别在于，将实施例 3.6.1 中的金属离子 Fe³⁺替换为 Al³⁺。

[0353]结果分析：如图 1-16, 1-17, 1-18 所示，三种 siRNA@MPP 均能明显干扰其
对应的靶基因。Bcl-2-siRNA@MPP 对靶基因 Bcl-2 的抑制率达到 81%；PLK1-siRNA@MPP
对靶基因 PLK1 的抑制率达到 90%；Gal-1-siRNA@MPP 对靶基因 Gal-1 的抑制率达到 79%。
35 结果提示，siRNA@MPP 可以携带任意 siRNA 进行靶基因的干预治疗，发挥载 siRNA 药物、疫苗或其他产品的作用。

[0354]实施例 3.7、ASO-金属-磷脂复合物颗粒 (ASO-loaded metal-chelated phospholipid complex nanoparticles, ASO@MPP) 的制备及效果

40 [0355]实施例 3.7.1、金属离子为 Fe³⁺时的 ASO-金属-磷脂复合物颗粒 (ASO-loaded metal-chelated phospholipid complex nanoparticles, ASO@MPP) 的制备及效果

[0356]将实施例 3 中的 mRNA 替换为 ASO，参照实施例 3 的方法分别制备三种含不同 ASO 的 ASO@MPP。三种不同 ASO 靶向的基因、序列及其对应的随机对照序列分别为：

① 靶向 STAT3 基因的 ASO (STAT3-ASO) 序列为 SEQ ID No.10 (17nt)，其随机对照
45 序列为 SEQ ID NO.11(18nt)；② 靶向 α -syn 基因的 ASO(α -syn-ASO)序列为 SEQ ID NO.12

(16nt),其随机对照序列为 SEQ ID NO.13(16nt);③ 靶向 Bcl-2 基因的 ASO(Bcl-2-ASO) 序列为 SEQ ID NO.14 (18nt),其随机对照序列为 SEQ ID NO.15 (20nt)。其余 ASO-金属-磷脂复合物颗粒的制备过程与实施例 3 相同。将不同的 ASO@MPP 孵育不同的细胞: 靶向 STAT3 基因的 ASO@MPP 孵育 U251 人脑胶质母细胞瘤细胞; 靶向 α -syn 基因的 ASO@MPP 孵育 SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞; 靶向 Bcl-2 基因的 ASO@MPP 孵育 Daudi 人淋巴瘤细胞。以每孔 1×10^6 细胞密度接种于 6 孔板中约 24h 后,每孔细胞与含上述 ASO 的 ASO@MPP (其中 ASO 的浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$) 分别孵育 48 小时后,收集细胞,提取细胞总 RNA,用 RT-PCR 技术分别检测目标基因 (STAT3、 α -syn、Bcl-2) 的 mRNA 表达量,计算 ASO@MPP 沉默细胞靶基因的能力。

- 10 [0357]SEQ ID No.10 序列 (STAT3-ASO 的序列) 如下:
[0358]5' -GCTCCAGCATCTGCTTC-3' (17nt)。
[0359]SEQ ID No.11 序列 (STAT3-ASO 的随机对照序列) 如下:
[0360]5' -GAAGCAGCAGATGCTGGA-3' (18nt)。
[0361]SEQ ID No.12 序列 (α -syn-ASO 的序列) 如下:
15 [0362]5' -GCTCCCTCCACTGTCT-3' (16nt)。
[0363]SEQ ID No.13 序列 (α -syn-ASO 的随机对照序列) 如下:
[0364]5' -ACTCCCGAACCTGTCT-3' (16nt)。
[0365]SEQ ID No.14 序列 (Bcl-2-ASO 的序列) 如下:
[0366]5' -TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3' (18nt)。
20 [0367]SEQ ID No.15 序列 (Bcl-2-ASO 的随机对照序列) 如下:
[0368]5' -CAGCGTGCGCCATCCTTCCC-3' (20nt)。

[0369]细胞培养: ① U251 人脑胶质母细胞瘤细胞在高糖 (4.5g/L) DMEM+10%胎牛血清 (FBS)、1%青霉素/链霉素和 2mml-谷氨酰胺 (Bio Industries) 的培养基中单层生长,且在 37°C 、5% CO_2 条件下培养,每周传代 2 次; ② SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞在高糖 (4.5g/L) DMEM + 10%胎牛血清 (FBS)、1%青霉素/链霉素和 2mml-谷氨酰胺 (Bio Industries) 的培养基中单层生长,且在 37°C 、5% CO_2 条件下培养,每周传代 2 次; ③ Daudi 人淋巴瘤细胞在 RPMI 1640+10%胎牛血清 (FBS)、1%青霉素/链霉素和 2mml-谷氨酰胺 (Bio Industries) 的培养基中生长,且在 37°C 、5% CO_2 条件下培养,每周传代 2 次。

[0370]RT-PCR 具体流程:

- 30 [0371]总 RNA 的提取: 将六孔板弃去培养基, PBS 缓冲液漂洗 3 遍, 每孔加入 1mL Trizol 对细胞进行裂解处理。加入 200 μL 氯仿,充分摇匀,室温静置 10min, 13000 rpm 4°C 离心 15 min, 得到分层的三相液体, 其中 RNA 溶解在上层的水相中。吸取上层水相置于新的无酶 1.5ml 离心管中,加入 500 μL 异丙醇,室温静置 10 min, 13000 rpm 4°C 离心 15min, 得到 RNA 沉淀。去上清, 每管加入 1mL 以无 RNA 酶水新配置的 75% (v/v) 乙醇, 小心吹打, 吹起管底 RNA 白色沉淀, 7500 rpm 4°C 离心 10 min, 去上清, 尽量吸干管底的液体。开盖室温晾干管底的 RNA 沉淀, 加入 50 μL 无酶水溶解, 使用超微量紫外可见分光光度计检测 RNA 的纯度及浓度。

- 40 [0372]cDNA 逆转录: 使用 Ta Ka Ra Prime ScriptTM RT reagent Kit with g DNA Eraser 试剂盒分别将 RNA 反转录成 cDNA, 在反转录步骤之前去除基因组 DNA (gDNA) 使得结果更加准确可信。在冰上配制总 RNA 反转录反应体系: 1 μL Prime Script RT Enzyme MixI, 1 μL RT Primer Mix, 4 μL 5 $\times$ Prime Script Buffer 2, 4 μL RNase Free dH₂O。配制好反应混合液后, 置于 37°C 反应 15min, 之后置入 85°C 5 sec 终止反应, 随后于 4°C 保存待用。

- 45 [0373]RT-PCR 操作: 该检测方法为 SYBR Green 染料法, 无需探针。具体如下, 根据不一样品的 cDNA 为模板进行 Real-time PCR 反应。在冰上配制反应液: 5 μL SYBR Premix Dimer Eraser (2 $\times$), 0.3 μL PCR Forward 引物 (10 μM), 0.3 μL PCR Reverse 引物 (10 μM),

0.2μL ROX Reference DyeII(50×), 1μL 上一步得到的 cDNA 模板和 3.2μL dH₂O。在孔板中进行加样, 每孔 10μL, 加样完成后进行离心(1000 rpm, 5min)消除液体挂壁及反应液中的气泡。使用 ABI ViiA7 实时荧光定量 PCR 仪进行 Real-time PCR 反应检测, 反应程序为 95°C, 30 sec (1 cycle) → 95°C, 5 sec; 55°C, 30 sec; 72°C, 30 sec(40 cycles) → 60 °C-95°C, 2min (1cycle)。实验重复三次, 取平均值得到每组 Ct 值, 计算实验组与对照组的表达差异倍数。对照基因为 GAPDH。RT-PCR 引物序列如下: ①STAT3 引物: forward: 5' -TGATCACCTTTGAGACCGAGG-3', reverse: 5' -GATCACCACAACCTGG CAA GG-3'; ②α-syn 引物: forward: 5'-TGACGGGTGTGACAGCAGTAG -3', reverse: 5'-CAGTGGCTGCTGCAATG -3'; ③Bcl-2 引物: forward: 5' -AGGATT GTG GCCTTCTTTGAG-3', reverse: 5' -AGACAGCCAGGAGAAATCAAAC-3' ④GAPDH 引物: forward: 5' -TCAGGGG TTTCACATTTGGCA-3', reverse: 5' -GGAGCGGAA AACCA-3'。各目的基因表达水平用 RQ 值 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 来表示。公式如下:

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

其中, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$, $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$

[0374]基因沉默效率的计算方法: $100\% - \text{实验组基因表达水平} / \text{对照组基因表达水平}$ 。

[0375]结果分析: 如图 1-19, 1-20, 1-21 所示 (其中, scr ASO 为随机对照序列), 三种 ASO@MPP 均能明显干扰其对应的靶基因, 其中 STAT3-ASO@MPP 对靶基因 STAT3 的抑制率达到 75%; α-syn-ASO@MPP 对靶基因 α-syn 的抑制率达到 71%; Bcl-2-ASO@MPP 对靶基因 Bcl-2 的抑制率达到 66%。结果提示, ASO@MPP 可以携带任意 ASO 进行靶基因的干预治疗, 发挥载 ASO 药物、疫苗或其他产品的作用。

[0376]实施例 3.7.2、金属离子为 Al³⁺时的 ASO-金属-磷脂复合物颗粒 (ASO-loaded metal-chelated phospholipid complex nanoparticles, ASO@MPP) 的制备及效果

[0377]本实施例与实施例 3.7.1 的区别在于, 将实施例 3.7.2 中的金属离子 Fe³⁺替换为 Al³⁺。

[0378]结果分析: 如图 1-22, 1-23, 1-24 所示, 三种 ASO@MPP 均能明显干扰其对应的靶基因, 其中 STAT3-ASO@MPP 对靶基因 STAT3 的抑制率达到 79%; α-syn-ASO@MPP 对靶基因 α-syn 的抑制率达到 80%; Bcl-2-ASO@MPP 对靶基因 Bcl-2 的抑制率达到 74%。结果提示, ASO@MPP 可以携带任意 ASO 进行靶基因的干预治疗, 发挥载 ASO 药物、疫苗或其他产品的作用。

[0379]实施例 3.8、制备药物 (不同种类核酸)-金属-磷脂复合物颗粒及其效果

[0380]实施例 3.8.1、制备金属离子为 Fe³⁺时的药物 (不同种类核酸)-金属-磷脂复合物颗粒及其效果

[0381]将实施例 3 中的 mRNA 分别替换为双链的 RNA (siRNA)、单链的 DNA (ASO)、单链的 RNA (mRNA)、双链 DNA、单链 DNA。不同种类的核酸序列为: ① 双链的 RNA (Bcl-2- siRNA) 的序列为 SEQ ID NO.4 (反义链) 和 SEQ ID No.21 (正义链) (19bp), 其随机对照序列为 SEQ ID NO.5 (反义链) 和 SEQ ID No.22 (正义链) (19bp); ② 单链的 DNA (STAT3-ASO) 的序列为 SEQ ID NO.10 (17nt), 其随机对照序列为 SEQ ID NO.11 (18nt); ③ 单链的 RNA (编码野生型新冠病毒 S 蛋白的 mRNA) 序列为 SEQ ID No.16 (3822nt); ④ 双链 DNA (dsDNA) 的序列为 SEQ ID NO.17 (反义链) 和 SEQ ID NO.25 (正义链) (22bp) (其序列 3'端用荧光探针 Cy3 标记); ⑤ 单链 DNA (ssDNA) 的序列为 SEQ ID NO.18 (22nt) (其序列 3'端用荧光探针 Cy3 标记)。参照实施例 3 的方法分别制备包载上述不同种类核酸的药物-金属-磷脂复合物颗粒 (Bcl-2-siRNA@MPP、STAT3-ASO@MPP、S-mRNA@MPP、dsDNA@MPP、ssDNA@MPP), 其余药物-脂质颗粒的制备过程与实施例 3 相同。

[0382]双链 DNA 的序列如下:

[0383]Antisense: 5' -TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3' (SEQ ID No.17);

[0384]Sense: 5' -TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3' (SEQ ID No.25) (22bp)。

[0385]SEQ ID No.18 序列 (单链 DNA 的序列) 如下:

[0386]5' -TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3' (22nt)。

5 [0387]U251 细胞以每孔 1×10^5 细胞密度接种于 12 孔板中约 24h 后, 每孔细胞与 siRNA@MPP (其中 siRNA 的浓度为 $2 \mu\text{g/mL}$) 或 ASO@MPP (其中 ASO 的浓度为 $2 \mu\text{g/mL}$) 分别孵育 72 小时后, 收集细胞, 提取细胞总 RNA, 用 RT-PCR 技术分别检测目标基因 (Bcl-2、STAT3) 的 mRNA 表达量, 计算 siRNA@MPP 或 ASO@MPP 沉默细胞靶基因的能力, 结果如实施例 3.6 中图 1-13 及实施例 3.7 中图 1-19 所示。

10 [0388]将 S-mRNA @MPP 按 $2 \mu\text{g/mL}$ 的浓度 (所含 mRNA 的浓度) 与 293T 细胞孵育, 对照组用 MPP 孵育, 24h 后, 离心后上清液 -20°C 冻存备用; 细胞沉淀加 $100 \mu\text{L}$ PBS 缓冲溶液重悬后冻融 2 次并超声 10 min 后离心取上清液, 利用市售新冠病毒 S 蛋白 ELISA 检测试剂盒检测细胞上清和细胞裂解液两者 S 蛋白的表达水平, 结果如图 1-25 所示。

[0389]将 ds-DNA@MPP 按 100 nM 的浓度 (所含 DNA 的浓度) 孵育 A549 肺癌细胞
15 2 小时后去掉剩余的 药物-脂质颗粒, 用 PBS 洗涤细胞两次后, 用 Hoechst33342 染料染细胞核 3 分钟后去染料, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 用高内涵成像系统观察细胞, 并计算 药物-脂质颗粒转染 DNA 的效率, 结果见图 1-26。

[0390]ss-DNA@MPP 按 200 nM 的浓度 (所含 DNA 的浓度) 孵育 HT22 小鼠海马神
20 经元 2 小时后去掉剩余的 药物-脂质颗粒, 用 PBS 洗涤细胞两次后, 用高内涵成像系统观
察细胞, 并计算 药物-脂质颗粒转染 DNA 的效率, 结果见图 1-26。

[0391]人脑胶质母细胞瘤 U251 细胞的培养方法同实施例 3.6。

[0392]293T 细胞的培养方法同实施例 3。

[0393]HT22 小鼠海马神经元的培养方法: 用含 10% FBS 和 1% 青霉素—链霉素的
DMEM 培养基培养在 37°C , 5% CO_2 的条件下。

25 [0394]RT-PCR 的方法同实施例 3.6。

[0395]ELISA 检测 S 蛋白的表达水平: 将实施例 3.5 中 ELISA 检测 RBD 的方法中的
“抗 RBD 抗体工作液”换成“抗 S 蛋白抗体工作液”, 其余步骤同实施例 3.5。

[0396]基因沉默效率的计算方法同实施例 3.6。

[0397]转染效率的计算方法: 用高内涵成像系统随机选取 3-5 个视野, 获得普通光源
30 下的细胞形态、同视野下激发/发射光为 550nm/570nm (标记的 DNA 的荧光染料 Cy3 的激
发光) 时的荧光信号、激发/发射光为 352nm/461nm (标记细胞核的荧光染 Hoechst33342
的激发光) 时的荧光信号, 计算随机选取的视野内细胞内有 Cy3 荧光信号的细胞数占相同
视野内细胞内有 Hoechst33342 荧光信号的细胞数的比例, 即为转染效率。

[0398]结果分析: 如实施例 3.6.1 中图 1-13 所示, 药物 (双链 RNA)-金属-磷脂复合
35 物颗粒 (Bcl-2-siRNA@MPP) 对靶基因 Bcl-2 的抑制率达到 76%; 如实施例 3.7.1 中图 1-19
药物 (单链 DNA)-金属-磷脂复合物颗粒 (STAT3-ASO@MPP) 对靶基因 STAT3 的抑制
率达到 75%; 如图 1-25 所示, 转染了 药物 (单链 RNA)-金属-磷脂复合物颗粒
(S-mRNA@MPP) 的 293T 细胞的上清中 S 蛋白表达水平为 161.3 ng/mL , 而转染了空载
体 MPP 的 293T 细胞上清中 S 蛋白含量为 0; 药物 (双链 DNA)-金属-磷脂复合物颗粒
40 (dsDNA@MPP) 转染双链 DNA 入细胞的效率为 100 % (图 1-26); 药物 (单链 DNA)
-金属-磷脂复合物颗粒 (ssDNA@MPP) 转染单链 DNA 入细胞的效率为 100 % (图 1-26)。
结果提示, 药物-金属-磷脂复合物颗粒可以包载任意核酸 (双链的 RNA、单链的 RNA、
双链 DNA、单链 DNA) 并实现其功能, 其中核酸的长度变化范围从 16-3822 nt。

[0399]实施例 3.8.2、制备金属离子为 Al^{3+} 时的 药物 (不同种类核酸)-金属-磷脂复合
45 物颗粒及其效果

[0400]本实施例与实施例 3.8.1 的区别在于, 将实施例 3.8.1 中的金属离子 Fe^{3+} 替换为 Al^{3+} 。

[0401]结果分析: 如实施例 3.6.2 中图 1-16 所示, 药物 (双链 RNA)-金属-磷脂复合物颗粒 (Bcl-2-siRNA@MPP) 对靶基因 Bcl-2 的抑制率达到 81%; 如实施例 3.7.2 中图 1-22 药物 (单链 DNA)-金属-磷脂复合物颗粒 (STAT3-ASO@MPP) 对靶基因 STAT3 的抑制率达到 79%; 如图 1-27 所示, 转染了药物 (单链 RNA)-金属-磷脂复合物颗粒

(S-mRNA@MPP) 的 293T 细胞的上清中 S 蛋白表达水平为 178.7 ng/mL, 而转染了空载体 MPP 的 293T 细胞上清中 S 蛋白含量为 0; 药物 (双链 DNA)-金属-磷脂复合物颗粒 (dsDNA@MPP) 转染双链 DNA 入细胞的效率为 100 % (图 1-28); 药物 (单链 DNA)-金属-磷脂复合物颗粒 (ssDNA@MPP) 转染单链 DNA 入细胞的效率为 100 % (图 1-28)。结果提示, 药物-金属-磷脂复合物颗粒可以包载任意核酸 (双链的 RNA、单链的 RNA、双链 DNA、单链 DNA) 并实现其功能, 其中核酸的长度变化范围从 16-3822 nt。

[0402]实验例二、药物-金属-磷脂复合物颗粒的性能表征

[0403]实施例 4、金属-磷脂复合物的合成表征

[0404]实施例 4.1、金属离子为 Fe^{3+} 时的金属-磷脂复合物的合成表征

[0405]DSPC 与姜黄素连接表征方法为差示扫描量热法, 测定条件为: 称取 3~5 mg 的检测物, 升温速率为 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 升温范围 $30\sim 300\text{ }^{\circ}\text{C}$, 分别对姜黄素、DSPC、磷脂复合物进行扫描, 根据得到的数据绘制曲线, 结果见图 2-1。从图谱中可以看出, 姜黄素具有晶格结构, 在 $185\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时有明显的熔融峰出现; DSPC 是一种混合物, 曲线上有多个凹陷, 可能是不同组分在不同温度条件下表现出热量变化; 磷脂复合物中姜黄素熔变峰附近没有峰出现, 基本上为一条直线, 说明姜黄素与 DSPC 发生结合, 以无定型形式存在, 证明磷脂复合物制备成功。

[0406]磷脂复合物与 Fe^{3+} 连接表征为分光光度法: 如图 2-2 所示, 磷脂复合物 (CUR-HSPC) 与 Fe^{3+} 结合后, 其最大吸收波长从 420nm 偏移至 375nm, 磷脂复合物的共轭结构发生改变, 证明 Fe^{3+} 成功与姜黄素络合。

[0407]实施例 4.2、金属离子为 Al^{3+} 时的金属-磷脂复合物的合成表征

[0408]本实施例与实施例 4.1 的区别在于, 磷脂复合物与 Al^{3+} 连接表征为分光光度法: 如图 2-3 所示, 磷脂复合物 (CUR-HSPC) 与 Al^{3+} 结合后, 其最大吸收波长从 420nm 偏移至 433nm, 磷脂复合物的共轭结构发生改变, 证明 Al^{3+} 成功与姜黄素络合。

[0409]实施例 5、金属离子为 Fe^{3+} 时的在低 pH 值条件下 Fe^{3+} 从金属-磷脂复合物中脱落的表征

[0410]金属-磷脂复合物中的磷脂复合物通过配位键结合 Fe^{3+} , 在溶酶体的低 pH 值条件下, 磷脂复合物与 Fe^{3+} 之间的配位键会发生质子化 (吸收氢离子) 而断裂。为证明金属-磷脂复合物中的 Fe^{3+} 确实是通过上述机制从脂复合物中脱落, 我们设计了以下实验: 分别在生理 pH 值 ($\text{pH} = 7.4$) 及溶酶体低 pH 值 ($\text{pH} = 5.0$) 条件下, 观察金属-磷脂复合物的颜色。如图 2-4 所示, 金属-磷脂复合物在溶酶体低 pH 值 ($\text{pH} = 5.0$) 条件下从棕红色变成了亮黄色, 提示 Fe^{3+} 已从复合物上脱落。结果提示: 在溶酶体的低 pH 值条件下, Fe^{3+} 可从金属-磷脂复合物中脱落。

[0411]在低 pH 值条件下 Fe^{3+} 从金属-磷脂复合物中脱落的原理是: 姜黄素与 Fe^{3+} 之间的配位键在低 pH 值条件下 ($\text{pH} = 5.0$) 发生质子化, 即姜黄素会从溶液中结合大量质子 (H^+), 导致 Fe^{3+} 与姜黄素之间的配位键断裂, 从而使得 Fe^{3+} 与姜黄素分离, 最终导致 Fe^{3+} 从金属-磷脂复合物中分离出来 (图 2-4)。

[0412]实施例 6、药物-金属-磷脂复合物颗粒中 MPP 的元素分析

[0413]实施例 6.1、金属离子为 Fe^{3+} 时的药物-金属-磷脂复合物颗粒中 MPP 的元素分

析

[0414]将实施例 3 中的 mRNA 替换为巯基修饰的 siRNA, 参照实施例 3 的方法制备药物-金属-磷脂复合物颗粒 siRNA@MPP。用透射电镜仪器进行元素分析。结果如图 2-5 所示: C、N、O、P 为共有元素, Fe 元素分析图显示 Fe^{3+} 均匀地分布在脂质纳米颗粒上, 因 siRNA 上修饰了巯基, 所以 S 元素分析图可以特异性表示 siRNA 的位置, 由图可知 siRNA 很好地络合在 Fe^{3+} 的附近, 证明药物-脂质纳米颗粒成功包载了 siRNA。

[0415]实施例 6.2、金属离子为 Al^{3+} 时的药物-金属-磷脂复合物颗粒中 MPP 的电镜分析

[0416]参照实施例 3 的方法制备药物-金属-磷脂复合物颗粒 MPP。用透射电镜仪器进行形态学分析。结果如图 2-6 所示: 药物-金属-磷脂复合物颗粒中 MPP 的形态为标准球状, 粒径均一, 大小在 100 nm 左右。

[0417]实施例 7、金属离子为 Fe^{3+} 或为 Al^{3+} 时的金属-磷脂复合物颗粒 MPP 包载核酸 (siRNA 及 mRNA) 的效率及其与 LNP 的对比。

[0418]将实施例 3 中的 mRNA 分别替换为靶向 Bcl-2 基因的 siRNA (SEQ ID No.4, 19bp), 及编码新型冠状病毒 S1 亚基的受体结合域 (receptor binding domain, RBD) 的 mRNA (SEQ ID No.2, 669nt), 分别制备包载核酸的药物-金属-磷脂复合物颗粒 siRNA@MPP 和 mRNA@MPP, 其余药物-金属-磷脂复合物颗粒的制备过程与实施例 3 相同。

[0419]按实施例 3.6 中 siRNA@MPP 及实施例 3.5 中 mRNA@MPP 相同的载药量制备 siRNA@LNP 及 mRNA@LNP, 具体方法为: 根据 Onpattro 脂质纳米颗粒配方配制有机相溶液, 即将可电离脂质 ALC0315、DSPE-PEG2000、DSPC 和胆固醇按照 50%: 1.5%: 10%: 38.5% 的摩尔比例溶于乙醇中。将 Bcl-siRNA 或 RBD-mRNA 加入水相 (0.1M、pH=4.0 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液) 中。其中, 氨基脂与含磷酸核苷酸的比例 (N/P) 为 6: 1, 同时确保核酸载药量与上述 siRNA@MPP 和 mRNA@MPP 的核酸载药量相同, 将水相与有机相按 3:1 的体积比在 14mL/min 的流速下快速混合。混合后, 用无酶 PBS 缓冲溶液稀释十倍, 并使用 100kDa 超滤管将混合液浓缩至十分之一, 反复稀释、浓缩操作 3 次后, 使混合液中乙醇浓度减少至 0.0005% 以下, 溶液 pH 值升高至 PBS 缓冲溶液的正常 pH 值 (7.2~7.4), 即分别制得 siRNA@LNP 及 mRNA@LNP。

[0420]使用琼脂糖凝胶电泳法分别检测 siRNA@MPP、mRNA@MPP、siRNA@LNP 及 mRNA@LNP 对核酸 (siRNA 及 mRNA) 的包载率。包载率的测定方法为: 每组脂质纳米颗粒的核酸 (siRNA 及 mRNA) 投料量均定为 10 $\mu\text{g/mL}$, 脂质与核酸的质量比为 40:1, 将核酸溶于 PBS 缓冲溶液中, 作为阳性对照组, 阴性对照为无核酸的 PBS 缓冲溶液。琼脂糖凝胶的浓度为 1.5%, 此时胶的空隙只允许游离核酸通过而不允许脂质纳米颗粒通过, 当游离核酸条带电泳至可清晰分辨时停止电泳, 防止电泳时间过长核酸降解。用 Image J 软件统计不同组别游离核酸的灰度值, 阳性对照组定为 100%, 每组的游离核酸相对于阳性对照的比值为游离核酸相对量, 则每组包载率为 (100-游离核酸相对量) %。

[0421]结果分析: 如图 2-7 所示, MPP(Fe^{3+}) 包载 siRNA 及 mRNA 的效率分别为 85.86% 及 87.11%; MPP(Al^{3+}) 包载 siRNA 及 mRNA 的效率分别为 89.73% 及 92.23%; LNP 包载 siRNA 及 mRNA 的效率分别为 84.98% 及 79.12%。结果提示 MPP 与 LNP 包载核酸的效率无明显差异。

[0422]实施例 8、金属离子为 Fe^{3+} 或为 Al^{3+} 时的金属-磷脂复合物颗粒 MPP 的核酸溶酶体逃逸能力及其与 LNP 的对比

[0423]将实施例 3.6 的 Bcl-2-siRNA (SEQ ID No.4) 替换为 Cy5 标记的 Bcl-2-siRNA, 制备 Cy5-siRNA@MPP (所含 siRNA 的浓度为 100 nM), 将实施例 7 的 Bcl-2-siRNA (SEQ

ID No.4) 替换为 Cy5 标记的 Bcl-2-siRNA, 制备 Cy5-siRNA@LNP (所含 siRNA 的浓度为 100 nM); 将实施例 3.5 的 eGFP-mRNA (SEQ ID No.1) 替换为 Cy5 标记的 eGFP-mRNA, 制备 Cy5-mRNA@MPP (所含 mRNA 的浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$), 将实施例 7 的 RBD-mRNA 替换为 Cy5 标记的 RBD-mRNA, 制备 Cy5-mRNA@LNP (所含 mRNA 的浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$), 将它们分别与细胞溶酶体探针 Lysotracker Green 共同孵育 A549 细胞 3 小时后使用高内涵成像系统观察 Cy5 的荧光信号 (红色) 与 Lysotracker Green 荧光信号 (绿色) 重叠的情况, 判断探讨所述药物-脂质颗粒促核酸溶酶体逃逸的能力。

[0424]药物-金属-磷脂复合物颗粒促核酸溶酶体逃逸能力的判定标准: 药物-脂质纳米颗粒孵育细胞 3 小时后, 使用高内涵成像系统观察 Cy5 的荧光信号 (红色) 与 Lysotracker Green 荧光信号 (绿色) 重叠的情况, 并使用 imageJ 软件统计红色荧光信号与绿色荧光信号的重叠率。当药物-金属-磷脂复合物颗粒孵育细胞 3 小时后, 红色荧光信号与绿色荧光信号的重叠率低于 50%提示核酸能较快地从细胞溶酶体中逃逸出来, 其脂质纳米颗粒具有较好的促核酸溶酶体逃逸能力。

[0425]结果分析: 如图 2-8 所示, 当 Cy5-siRNA@MPP (Fe^{3+}) 和 Cy5-mRNA@MPP (Fe^{3+}) 孵育 A549 细胞 3 小时后, 红色荧光信号与绿色荧光信号的重叠率分别为 36.05% 和 43.07%, 即溶酶体逃逸率分别为 63.95%和 56.93%; 当 Cy5-siRNA@MPP (Al^{3+}) 和 Cy5-mRNA@MPP (Al^{3+}) 孵育 A549 细胞 3 小时后, 红色荧光信号与绿色荧光信号的重叠率分别为 32.39%和 40.17%, 即溶酶体逃逸率分别为 67.61%和 59.83%; 而 Cy5-siRNA@LNP 和 Cy5-mRNA@LNP 孵育 A549 细胞 3 小时后, 红色荧光信号与绿色荧光信号的重叠率分别为 76.89%和 86.87%, 即溶酶体逃逸能力分别为 23.11%和 13.13%。提示所述药物-脂质纳米颗粒 MPP 具有较好的促核酸溶酶体逃逸能力, 且 MPP 促溶酶体逃逸的能力明显强于 LNP。

[0426]实施例 9、金属离子为 Fe^{3+} 或为 Al^{3+} 时的金属-磷脂复合物颗粒 MPP 促进核酸表达的能力及其与 LNP 的对比

[0427]将实施例 7 中的 RBD-mRNA 替换为编码荧光蛋白 eGFP 的 mRNA, 其余制备方法同实施例 7, 获得 eGFP-mRNA@LNP。

[0428]将实施例 3 制备的 eGFP-mRNA@MPP 和上述 eGFP-mRNA@LNP (所含 mRNA 的浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$) 分别与 293T 细胞孵育, 对照组用 MPP 或 LNP 孵育, 48h 后收取细胞悬液, 通过流式细胞术检测 eGFP 阳性细胞百分比。

[0429]流式细胞术方法分析 eGFP 阳性细胞率的方法如实施例 3 所述。

[0430]结果分析: 如图 2-9 所示, MPP (Fe^{3+})、MPP (Al^{3+}) 与 LNP 处理 293T 细胞后其 eGFP 阳性细胞百分比分别为 97.2%、98.1%和 63.03%。结果提示: MPP 促进核酸表达的功能优于 LNP。其可能的原因是: 如实施例 8 所述 MPP 的促核酸发生溶酶体逃逸的能力强于 LNP, 所以 MPP 装载的更多的核酸能被有效释放到胞质中, 从而被翻译为蛋白质。

[0431]实施例 10、金属离子为 Fe^{3+} 或为 Al^{3+} 时的药物-金属-磷脂复合物颗粒 MPP 促体液免疫及细胞免疫的能力及其与 LNP 的对比

[0432]将实施例 3.5 的 RBD-mRNA@MPP 和实施例 7 的 RBD-mRNA@LNP 按 2 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度 (所含 mRNA 的浓度) 与 293T 细胞孵育, 对照组用 MPP 孵育, 24h 后, 离心后取上清液于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用; 细胞沉淀加 100 μL PBS 缓冲溶液重悬后冻融 2 次并超声 10min 后离心取上清液, 利用市售新冠病毒抗原 RBD ELISA 检测试剂盒检测细胞上清和细胞裂解液两者 RBD 蛋白的表达水平, 结果见图 2-10。

[0433]ELISA 检测 RBD 表达水平的方法如实施例 3.5 所述。

[0434]将实验动物被随机分成 3 组 (实验组和对照组), 每组 5 只。动物模型为 BALB/c 小鼠, 每只小鼠在第 1 天进行第一次肌肉给药, 在第 14 天进行第二次肌肉给药, 实验组

分别注射 RBD-mRNA@MPP (Fe^{3+})、RBD-mRNA@MPP(Al^{3+})或 RBD-mRNA@LNP, 对照组注射未装载 mRNA 的 MPP 和 LNP。每次给药的剂量为 100 μL , 其中实验组中 RBD-mRNA@MPP (Fe^{3+})、RBD-mRNA@MPP(Al^{3+})和 RBD-mRNA@LNP 制剂各含 30mg 的 mRNA。距第一次给药后第 28 天收集小鼠血液, 分离血清梯度稀释, 通过市售 ELISA 试剂盒检测小鼠体内所产生的抗新型冠状病毒 S1 亚基的 RBD 总 IgG 抗体的滴度, 结果如图 2-11 所示。

[0435]ELISA 检测抗新型冠状病毒 S1 亚基的 RBD 总 IgG 抗体的滴度的方法如实施例 3.5 所述。

[0436]在给 RBD-mRNA@MPP (Fe^{3+})、RBD-mRNA@MPP(Al^{3+})和 RBD-mRNA@LNP 后第 28 天采集正常小鼠脾脏, 在无菌条件下制备成单细胞悬液, 按照 100000 脾细胞/孔铺板于细胞孔板中, 加入终浓度为 10mg/mL 的 RBD 蛋白培养 48h, 离心去上清, 通过 ELISA 试剂盒测定 IFN- γ 、IL-2、IL-4 的表达水平, 结果如图 2-12 所示。

[0437]ELISA 检测 IFN- γ 、IL-2、IL-4 表达水平的方法如实施例 3.5 所述。

结果分析: 如图 2-10 所示, RBD-mRNA@MPP(Fe^{3+})、RBD-mRNA@MPP(Al^{3+})和 RBD-mRNA@LNP 均能诱导 293T 细胞表达一定量的 RBD, 但 RBD-mRNA@MPP(Al^{3+})诱导细胞表达 RBD 的能力明显强于 RBD-mRNA@MPP(Fe^{3+})、RBD-mRNA@MPP(Fe^{3+})诱导细胞表达 RBD 的能力明显强于 RBD-mRNA@LNP: RBD-mRNA@MPP (Fe^{3+}) 处理组细胞上清中 RBD 的表达量为 205 ng/mL, RBD-mRNA@MPP (Al^{3+}) 处理组细胞上清中 RBD 的表达量为 230 ng/mL, RBD-mRNA@LNP 处理组细胞上清中 RBD 的表达量为 115.7 ng/mL。如图 2-11 结果所示, RBD-mRNA@MPP 有效诱导小鼠的体液免疫, 产生高水平的抗原特异性结合抗体, 且 RBD-mRNA@MPP(Al^{3+})诱导小鼠的体液免疫的能力明确优于 RBD-mRNA@MPP(Fe^{3+}), RBD-mRNA@MPP(Fe^{3+})诱导小鼠的体液免疫的能力明确优于 RBD-mRNA@LNP: RBD-mRNA@MPP (Fe^{3+}) 处理组小鼠体内 IgG 抗体滴度达 117233.8; RBD-mRNA@MPP(Al^{3+})处理组小鼠体内 IgG 抗体滴度达 133116; 而 RBD-mRNA@LNP 处理组小鼠体内 IgG 抗体滴度达仅为 67476。如图 2-12 所示, RBD-mRNA@MPP(Al^{3+})能有效诱导小鼠的细胞免疫, 即激活免疫细胞并产生大量的细胞因子, 且 mRNA@MPP(Al^{3+})诱导小鼠的细胞免疫的能力明确优于 RBD-mRNA@MPP(Fe^{3+}), RBD-mRNA@MPP(Fe^{3+})诱导小鼠的细胞免疫的能力明确优于 RBD-mRNA@LNP: RBD-mRNA@MPP(Fe^{3+})使细胞因子 IFN- γ 、IL-2、IL-4 的表达量分别达 256.8 pg/mL、207.6 pg/mL、61.8 pg/mL;

RBD-mRNA@MPP(Al^{3+})使细胞因子 IFN- γ 、IL-2、IL-4 的表达量分别达 298 pg/mL、249 pg/mL、74.6 pg/mL; 而 RBD-mRNA@LNP 使细胞因子 IFN- γ 、IL-2、IL-4 的表达量仅为 104.2 pg/mL、79.2 pg/mL、27 pg/mL。结果提示, mRNA@MPP(Al^{3+})递送任意 mRNA 并实现其功能的能力明显优于 RBD-mRNA@MPP(Fe^{3+}), RBD-mRNA@MPP(Fe^{3+})诱导小鼠的细胞免疫的能力明确优于 RBD-mRNA@LNP: RBD-mRNA@MPP 能更有效的促进细胞表达目的蛋白, 能更有效的激活体内体液免疫和细胞免疫, 因此所述药物 (mRNA)-脂质颗粒在载 mRNA 的药物、疫苗或其他产品作用方面明显优于现有技术 LNP。其可能的原因是: 1) 与 LNP 比, MPP 具有更强的促核酸溶酶体逃逸能力; 2) 与 LNP 比, MPP 具有更强的促核酸表达成蛋白 (抗原) 的能力; 3) 与 LNP 比, MPP 中的姜黄素在体内与 DSPC 分离后, 作为一个免疫佐剂 (又称免疫调节剂), 即能激活体液免疫和细胞免疫从而增强 MPP 递送 mRNA 疫苗的效果, 又能抑制免疫因子风暴从而抑制过度的、对机体有害的免疫反应。

[0438] 实施例 11、金属离子为 Fe^{3+} 或为 Al^{3+} 时的金属-磷脂复合物颗粒

(Metal-chelated phospholipid complex nanoparticles, MPP) 的体内安全性评价

[0439]以 SD 大鼠为研究对象, 对 MPP 进行了为期 20 天的亚慢性毒性研究, 并设立了为期 20 天的恢复期。具体实验方法如下:

[0440]SPF 级 SD 大鼠 ($220 \pm 20\text{g}$) 56 只, 雌雄各半, 饲养于温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 湿度为 45%

- 55%，光照 12h 的环境中。适应性饲养 3~5 天后按性别随机分组：实验组 32 只，恢复组 24 只。空白对照组（Control）14 只（含实验组 8 只和恢复组 6 只），雌雄各半；低剂量 MPP 组（8 mg/kg）14 只（含实验组 8 只和恢复组 6 只），雌雄各半；中等剂量 MPP 组（16 mg/kg）14 只（含实验组 8 只和恢复组 6 只），雌雄各半；高剂量组（32 mg/kg）14 只（含实验组 8 只和恢复组 6 只），雌雄各半。实验组（共 32 只）在给药结束后解剖取材，恢复组（共 24 只）在给药结束后，继续正常饲养 20 天后解剖取材。

[0441]给药方法：实验动物通过尾静脉注射给药，每 2 天给药一次，共给药 20 天，每周记录一次 SD 大鼠体重。将制备的 MPP 溶于 DPBS，对照组注射等量 DPBS，低剂量 MPP 组、中剂量 MPP 组、高剂量 MPP 组分别注射 8 mg/kg、16 mg/kg、32 mg/kg 的 MPP。

[0442]设置上述 MPP 给药剂量的依据：包载 200 μ g/kg mRNA（mRNA 动物实验的实际需要量）时，空载体 MPP 的需要量为 8 mg/kg。为充分证明 MPP 的安全性，我们选取了 MPP 动物实验实际需要量的 1、2 及 4 倍给药，即 8 mg/kg、16 mg/kg 及 32 mg/kg。

[0443]一般指标检测方法：每次给药后观察各组动物的一般状态，包括存活情况、饮食情况、外观特征、行为活动、体重以及是否有给药局部反应。解剖时进行大体尸检，包括及时称量主要脏器湿重，如脑、心、肝、脾、肺、肾，计算脏体比并记录各脏器的病理改变。其中脏体比=大鼠脏器湿重/大鼠体重 $\times$ 100%。

[0444]SD 大鼠全血及血清的获取及保存：在给药 20 天后以及 20 天恢复期后解剖大鼠，腹主动脉采血，即异氟烷麻醉 SD 大鼠并固定于解剖板上，75%乙醇消毒腹部，无菌眼科剪剪开大鼠腹部，用棉球轻轻拨开内脏暴露出腹主动脉，采用 500 μ L 负压 EDTAK2 抗凝采血管收集全血，4 $^{\circ}$ C 保存，用于血常规检测。采用 5mL 负压普通采血管收集全血于常温静置 30min，于 4 $^{\circ}$ C，1500rpm 离心 15min，取上清于 1.5mL 离心管中，-20 $^{\circ}$ C 保存，用于血液生化指标及免疫学相关指标的检测。

[0445]血常规检测的方法：血常规指标包括：白细胞数目、淋巴细胞数目、单核细胞数目、中性粒细胞数目、淋巴细胞百分比、单核细胞百分比、中性粒细胞百分比、红细胞数目、血红蛋白、红细胞积压、平均红细胞体积、平均红细胞血红蛋白含量、平均红细胞血红蛋白浓度、红细胞分布宽度变异系数、血小板数目、平均血小板体积、血小板分布宽度、血小板压积。全血标本轻轻颠倒混匀，取少量全血，采用全自动血液细胞分析仪自动分析结果。

[0446]血液生化指标检测的方法：血液生化指标包括无机离子（Fe²⁺，Na⁺，K⁺，Cl⁻，Ca²⁺）、肝功能指标（ALT，AST， γ -GT，T-BIL，D-BIL，ALP，ALB）、肾功能指标（BUN，UA，CR）、心脏功能指标（LDH，CK）、糖代谢指标（GSP，GLU，INS）、脂代谢指标（CHO，TG，LDL-C，HDL-C）。解冻血清样品 3000rpm 离心 15min 取上清分装好待用，在全自动生化仪上设置好相应参数，加入配置好的工作液，再加入待测血清，全自动生化仪自动测定结果。

[0447]免疫学相关指标的检测方法：免疫学相关指标包括甲状腺功能指标（TT3，TT4，TSH）、细胞因子（IL-1，IL-2，IL-4，IFN- γ ，IFN- α ，TNF- α ）、免疫球蛋白（IgG，IgA，IgM）、血清补体（C3，CH50）。用 ELISA 方法检测上述指标。

[0448]SD 大鼠的主要脏器病理学检查方法：在给药期末和恢复期末，将各组大鼠麻醉后，眼科剪取下大鼠主要脏器，包括全脑、心、肝、脾、肺、肾，用 0.9%生理盐水轻轻漂洗，置于 4%多聚甲醛固定液中固定，常规石蜡包埋，H&E 染色，光学显微镜观察对照组及实验组大鼠各个器官的组织病理学变化。

[0449]结果分析：如表 2-1 所示，在给药期末和恢复期末，与对照组相比，低、中、高剂量 MPP(Fe³⁺)或 MPP(Al³⁺)组大鼠存活良好，饮食情况正常，外观、行为活动正常，给药后未见明显不良反应；与对照组相比，低、中、高剂量 MPP 组雄性 SD 大鼠及雌性 SD 大鼠的体重增长值均无显著性差异；对照组相比，低、中、高剂量 MPP 组的脏体比均

- 无显著性差异。
- [0450]在给药期末和恢复期末，与对照组相比，低、中、高剂量 MPP(Fe^{3+})或 MPP(Al^{3+})组的血常规指标（白细胞数目、淋巴细胞数目、单核细胞数目、中性粒细胞数目、淋巴细胞百分比、单核细胞百分比、中性粒细胞百分比、红细胞数目、血红蛋白、红细胞积压、平均红细胞体积、平均红细胞血红蛋白含量、平均红细胞血红蛋白浓度、红细胞分布宽度变异系数、血小板数目、平均血小板体积、血小板分布宽度、血小板压积）未见异常；与对照组相比，低、中、高剂量 MPP 组的血液生化指标，包括无机离子（ Fe^{2+} ， Na^+ ， K^+ ， Cl^- ， Ca^{2+} ）、肝功能指标（ALT，AST， γ -GT，T-BIL，D-BIL，ALP，ALB）、肾功能指标（BUN，UA，CR）、心脏功能指标（LDH，CK）、糖代谢指标（GSP，GLU，INS）、脂代谢指标（CHO，TG，LDL-C，HDL-C），均未见异常；与对照组相比，低、中、高剂量 MPP 组的免疫学相关指标包括甲状腺功能指标（TT3，TT4，TSH）、细胞因子（IL-1，IL-2，IL-4，IFN- γ ，IFN- α ，TNF- α ）、免疫球蛋白（IgG，IgA，IgM）、血清补体（C3，CH50），均未见异常。
- [0451]在给药期末和恢复期末，与对照组相比，低、中、高剂量 MPP(Fe^{3+})或 MPP(Al^{3+})组大鼠脑组织结构完整，组织染色正常，细胞形态结构完整，无核固缩现象及炎性细胞浸润；心肌组织结构完整，心肌细胞排列整齐、连续、紧密，细胞核清晰可见，未见明显细胞充血，水肿或坏死；肝细胞形态正常，无炎性细胞聚集及坏死；脾脏结构正常，红白髓界限清楚；肺组织结构完整，肺泡大小一致，无明显炎症细胞聚集、浸润；肾脏结构正常。
- [0452]以上结果提示，长期、大量给 SD 大鼠注射 MPP(Fe^{3+})或 MPP(Al^{3+})未发现明显的慢性毒性反应，提示 MPP 的安全性较高。

表 2-1 MPP 的体内安全性评价

	低、中、高剂量 MPP (Fe^{3+})	低、中、高剂量 MPP (Al^{3+})
一般情况（存活情况、饮食情况、外观特征、行为活动、体重以及是否有给药局部反应）	无异常	无异常
血常规（白细胞数目、淋巴细胞数目、单核细胞数目、中性粒细胞数目、淋巴细胞百分比、单核细胞百分比、中性粒细胞百分比、红细胞数目、血红蛋白、红细胞积压、平均红细胞体积、平均红细胞血红蛋白含量、平均红细胞血红蛋白浓度、红细胞分布宽度变异系数、血小板数目、平均血小板体积、血小板分布宽度、血小板压积）	无异常	无异常
无机离子（ Fe^{2+} ， Na^+ ， K^+ ， Cl^- ， Ca^{2+} ）	无异常	无异常
肝功能指标（ALT，AST， γ -GT，T-BIL，D-BIL，ALP，ALB）	无异常	无异常
肾功能指标（BUN，UA，CR）	无异常	无异常
心脏功能指标（LDH，CK）	无异常	无异常
糖代谢指标（GSP，GLU，INS）	无异常	无异常
脂代谢指标（CHO，TG，LDL-C，HDL-C）	无异常	无异常
甲状腺功能指标（TT3，TT4，TSH）	无异常	无异常
细胞因子（IL-1，IL-2，IL-4，IFN- γ ，IFN- α ，TNF- α ）	无异常	无异常
免疫球蛋白（IgG，IgA，IgM）	无异常	无异常

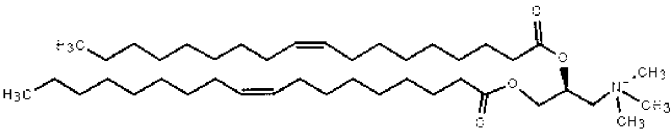
血清补体（C3, CH50）	无异常	无异常
脏器系数（心，肝，脾，肺，肾，脑）	无异常	无异常
脏器的组织结构（心，肝，脾，肺，肾，脑）	无异常	无异常

注：ALT，谷丙转氨酶；AST，谷草转氨酶；γ-GT，谷氨酰转肽酶；T-BIL，总胆红素；D-BIL，直接胆红素；ALP，碱性磷酸酶；ALB，白蛋白；BUN，尿素氮；UA，尿酸；CR，肌酐；LDH，乳酸脱氢酶；CK，肌酸磷酸激酶；GSP，果糖胺；GLU，葡萄糖；INS，胰岛素；CHO，胆固醇；TG，甘油三酯；LDL-C，低密度脂蛋白；HDL-C，高密度脂蛋白；TT3，三碘甲状腺原氨酸；TT4，四碘甲状腺原氨酸；TSH，促甲状腺激素；IL-1，白介素 1；IL-2，白介素 2；IL-4，白介素 4；IFN-γ，干扰素γ；IFN-α，干扰素α；TNF-α，肿瘤坏死因子α；IgG，免疫球蛋白 G；IgA，免疫球蛋白 A；IgM，免疫球蛋白 M；C3，补体 C3；CH50 总补体 CH50

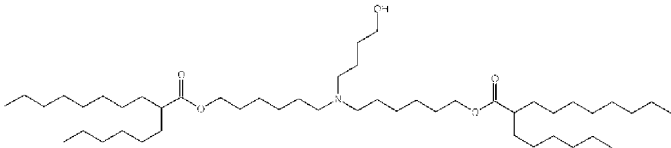
10 [0453]实施例 12、金属离子为 Fe³⁺或为 Al³⁺时的金属-磷脂复合物颗粒（MPP）与 LNP 的体内安全性对比

[0454]LNP 的主要毒性来自于其主要成分——阳离子脂质和/或可电离脂质。当 LNP 在体内代谢过程中，游离的阳离子脂质和/或可电离脂质会对机体产生明显的毒性。阳离子脂质和/或可电离脂质对生物细胞的半数致死量（IC₅₀）是评估 LNP 对机体毒性大小的重要参数。金属-磷脂复合物颗粒（Metal-chelated phospholipid complex nanoparticles, MPP）用金属-磷脂复合物代替了 LNP 中的阳离子脂质/可电离脂质，因此，我们通过研究金属-磷脂复合物与阳离子脂质/可电离脂质对生物细胞的半数致死量（IC₅₀），比较 LNP 与 MPP(Fe³⁺)或 MPP(Al³⁺)的毒性的差异。

[0455]将不同浓度的所述金属-磷脂复合物（0、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1、24.3、72.9、218.7 μM）、阳离子脂质（DOTAP，0、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1、24.3、72.9、218.7 μM，结构式如下）及可电离脂质（ALC0315，0、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1、24.3、72.9、218.7 μM，结构式如下）均分别孵育 293T 细胞 48 小时后，用 CCK8 活性检测试剂盒检测细胞活性，分别计算所述金属-磷脂复合物、阳离子脂质（DOTAP）及可电离脂质（ALC0315）对 293T 细胞的半数致死量 IC₅₀。



25 [0456]DOTAP



[0457]ALC0315

[0458]CCK8 的检测方法：

[0459]1.细胞培养：用含 10% FBS，1%双抗 的 DMEM 培养液培养细胞，待细胞密度至培养瓶的 80%-90%待用；

30 [0460]2.用 PBS 洗净培养瓶中剩余培养基，加入胰酶，迅速将培养瓶转移至 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中。注意观察，待细胞稍稍变圆后，加入培养液终止消化。转移至离心管中，1500RPM 离心 5min，用新鲜培养基重悬细胞；

[0461]3.计数：按照目的将细胞悬液稀释成每 1mL 10,0000 个细胞，96 孔板中每孔 100 μL，每组至少 5 个复孔。37℃，5%CO₂ 培养 24h 后加药；

- [0462]4.药物孵育 48h 后，加入含 10% CCK8，孵育 1-3h，酶标仪 450nm 测吸光度；
- [0463]5.存活率(%)= [A（加药）- A（空白）] / [A（0 加药）-A（空白）] ×100%。
- [0464]IC50 的计算方法：以存活率为纵坐标，药物浓度为横坐标，运用 Graphpad 采用 [Inhibitor] vs. normalized response -- Variable slope 分析方法计算 IC₅₀。
- 5 [0465]为比较 MPP 及 LNP 的体内安全性，取能载等量核酸（200 μg/kg mRNA）的 MPP（8 mg/kg）及 LNP（3.24 mg/kg），按照实施例 11 方法进行体内实验，评估、对比 MPP 与 LNP 的体内毒性。
- [0466]结果分析：如表 2-2 所示，金属-磷脂复合物的 IC₅₀ 明显大于阳离子脂质（DOTAP）及可电离脂质（ALC0315）。结果表明，金属-磷脂复合物的毒性明显小于阳
- 10 离子脂质及可电离脂质。
- [0467]如表结果 2-3 所示，在给药期末和恢复期末，与对照组相比，MPP(Fe³⁺)或 MPP(Al³⁺)组的肝功能（ALT，AST，ALP）及细胞因子（IL-6，IL-1β）均未见明显异常。但与对照组相比，LNP 组的肝功能（ALT，AST，ALP）及细胞因子（IL-6，IL-1β）均明显升高。结果提示，MPP(Fe³⁺)或 MPP(Al³⁺)的体内安全性高于 LNP，其原因是：LNP 的
- 15 核心成分为人工合成的“阳离子脂质/可电离脂质”，其细胞毒性及免疫原性较高，且其结构较为稳定，在体内难以分解代谢；而 MPP(Fe³⁺)或 MPP(Al³⁺)的核心成分为金属-磷脂复合物，其金属-磷脂复合物是由磷脂分子、安全性高的天然小分子物质姜黄素（为 FDA 批准的食品添加剂及药用辅料）及安全的金属离子组成，且其在完成药物递送后已在体内分解为天然分子。综上，因为 MPP(Fe³⁺)或 MPP(Al³⁺)组成成分中无阳离子脂质/可电离脂
- 20 质，不会引起阳离子脂质/可电离脂质相关的毒副反应，所以 MPP(Fe³⁺)或 MPP(Al³⁺)的安全性高于 LNP。

表 2-2 金属离子为 Fe³⁺或为 Al³⁺时的金属-磷脂复合物与阳离子脂质（DOTAP）及可电离脂质（ALC0315）的 IC₅₀ 与对比

	金属离子为 Fe ³⁺ 时的金属-磷脂复合物	金属离子为 Al ³⁺ 时的金属-磷脂复合物	DOTAP	ALC0315
IC ₅₀ （μM）	640.9	501.6	40.7	145.1

25 表 2-3 MPP 及 LNP 的慢性毒性实验指标对比

	金属离子为 Fe ³⁺ 时的 MPP	金属离子为 Al ³⁺ 时的 MPP	LNP
肝功能指标（ALT, AST, ALP）	无异常	无异常	异常
细胞因子（IL-6，IL-1 β）	无异常	无异常	异常

- [0468]实施例三、药物-金属-磷脂复合物颗粒的临床应用及给药途径
- [0469]实施例 13、金属离子为 Fe³⁺或 Al³⁺时的药物-金属-磷脂复合物颗粒的临床应用及给药途径
- 30 [0470]将实施例 3 中的 mRNA 分别替换为靶向 B7-H4 基因的 siRNA（B7-H4-siRNA）及其对照（scr-siRNA）、编码新型冠状病毒 S1 亚基的受体结合域（receptor binding domain, RBD）的 mRNA（RBD-mRNA）。
- [0471]上述不同核酸的序列为：① B7-H4-siRNA 的序列为 SEQ ID No.19（正义链）和 SEQ ID No.26（反义链）（25bp），其随机对照序列为 SEQ ID No.20（正义链）和 SEQ
- 35 ID No.27（反义链）（19bp）；② 编码新型冠状病毒 S1 亚基的受体结合域（receptor binding domain, RBD）的 mRNA 序列为 SEQ ID No.2（669nt）。参照实施例 3 的方法分别制备包载上述不同种类核酸的药物-金属-磷脂复合物颗粒（B7-H4-siRNA @MPP(Fe³⁺)、

RBD-mRNA@MPP(Fe^{3+})、B7-H4-siRNA @MPP (Al^{3+})、RBD-mRNA@MPP(Al^{3+})，其余药物-金属-磷脂复合物颗粒的制备过程与实施例 3 相同。上述 2 种不同的药物-金属-磷脂复合物颗粒 (B7-H4-siRNA @MPP、RBD-mRNA@MPP) 分别用于治疗肝癌作为 mRNA 疫苗用于预防新型冠状病毒。

- 5 [0472]B7-H4-siRNA 的序列如下：
[0473]sense 5' -GGG AGA CAC UCC AUC ACA GUC ACU A -3' (SEQ ID No.19)。
[0474]antisense 5' -UAG UGA CUG UGA UGG AGU GUC UCC C-3' (SEQ ID No.26) (25bp)。

- [0475]B7-H4-siRNA 的随机对照序列如下：
10 [0476]sense 5' -UUCUCCGAACGUGUCACGU-3' (SEQ ID No.20)。
[0477]antisense 5' -ACGUGACACGUUCGGAGAA-3' (SEQ ID No.27) (19bp)。

- [0478]为评价 B7-H4-siRNA@MPP (Fe^{3+}) 和 B7-H4-siRNA@MPP (Al^{3+}) 治疗肝癌的作用，用 HepG2 细胞制作肝癌动物模型，待肿瘤大小增加到约 100mm³，将肝癌小鼠随机分为 7 组 (每组 5 只)：PBS 对照组、空白载体 MPP(Fe^{3+})组、空白载体 MPP(Al^{3+})组、
15 Scr-siRNA@MPP(Fe^{3+})对照组、B7-H4-siRNA@MPP(Fe^{3+})治疗组、Scr-siRNA@MPP(Al^{3+})对照组、B7-H4-siRNA@MPP(Al^{3+})治疗组。每组小鼠每 3 天分别瘤内注射 PBS、MPP(Fe^{3+})、MPP(Al^{3+})、Scr-siRNA@MPP(Fe^{3+})、B7-H4 siRNA@MPP(Fe^{3+})、Scr-siRNA@MPP(Al^{3+})、B7-H4 siRNA@MPP(Al^{3+})一次，剂量为 200μg siRNA/kg，进行 8 次注射。每隔 3 天测量并记录肿瘤体积。结果如图 3-1 所示。

- 20 [0479]为评价 RBD-mRNA@MPP 作为 mRNA 疫苗预防新冠病毒的作用，实验过程及实验方法如前实施例 3.5 所示。

[0480]ELISA 检测方法如实施例 3.5 所述。

- [0481]肝癌小鼠模型的建立：收集将 HepG2 细胞，以 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 的密度在 PBS 中重新悬浮，接种前置于冰上保存。然后将 100μL 的细胞悬液注射皮下注射到雌 Balb/c 裸鼠
25 后腿附近的背部区域，建立肝癌小鼠模型。

[0482]结果分析：

- [0483]如图 3-1 所示，Scr-siRNA@MPP(Fe^{3+})、Scr-siRNA@MPP(Al^{3+})对肝癌 HepG2 细胞的生长几乎没有抑制效果，而 B7-H4-siRNA@MPP(Fe^{3+})和 B7-H4 siRNA@MPP(Al^{3+})则显示出高效的治疗效果，能有效抑制肝癌肿瘤的生长。结果提示，药物-金属-磷脂复合物颗粒可以包载、递送 B7-H4 siRNA，通过抑制目标基因的表达，从而抑制肝癌发展。
30

- [0484]如前实施例 3.5 图 1-3、图 1-5 所示，RBD-mRNA@MPP(Fe^{3+})使小鼠 IgG 抗体的表达水平达 117268.8 (图 1-3)，使细胞因子 IFN- γ 、IL-2、IL-4 的表达量分别达 252.8pg/mL、207.6pg/mL、56.6pg/mL (图 1-5)。RBD-mRNA@MPP(Al^{3+})使小鼠 IgG 抗体的表达水平达 129113 (图 1-9)，使细胞因子 IFN- γ 、IL-2、IL-4 的表达量分别达 271.8 pg/mL、234.6
35 pg/mL、68.4 pg/mL (图 1-11)。结果提示，RBD-mRNA@MPP 能有效诱导小鼠的体液免疫，产生高水平的抗原特异性结合抗体；同时能有效诱导小鼠的细胞免疫，即激活免疫细胞并产生大量的细胞因子。因此，RBD-mRNA@MPP 能有效的预防新型冠状病毒的感染。

- [0485]如图 3-1 所示，B7-H4-siRNA@MPP 采用瘤内注射给药途径能有效治疗肝癌；如实施例 3.5 图 1-3、图 1-5、图 1-9 和图 1-11 所示，RBD-mRNA@MPP 采用肌肉注射给药途径能激活体液免疫及细胞免疫，从而发挥预防新型冠状病毒感染。结果提示：药物-金属-磷脂复合物颗粒可通过多种途径给药。
40

[0486]实施例四：DSPC、姜黄素、 Fe^{3+} 或 Al^{3+} 被同类物替换后的功能

[0487]实施例 15、DSPC、姜黄素、 Fe^{3+} 或 Al^{3+} 被同类物替换后的功能

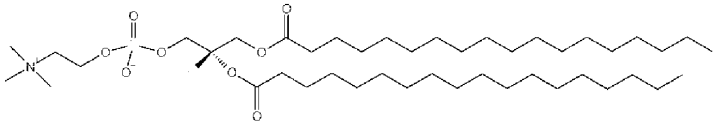
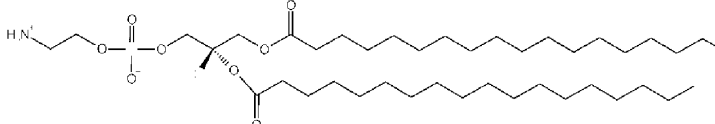
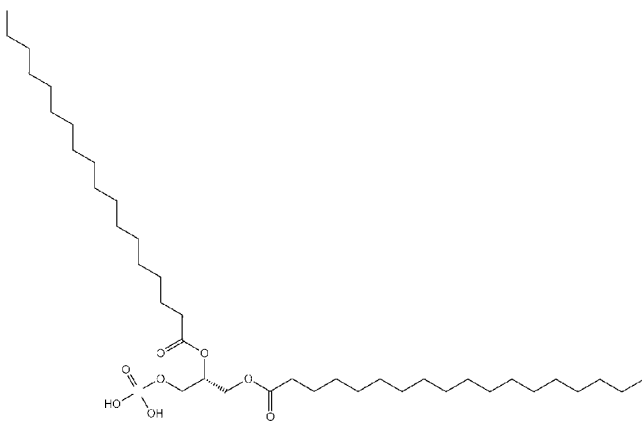
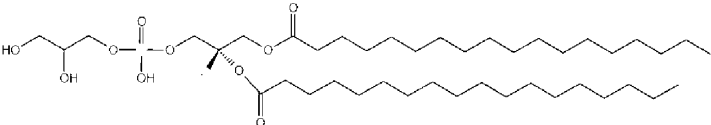
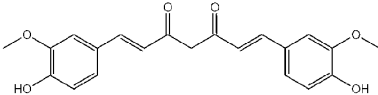
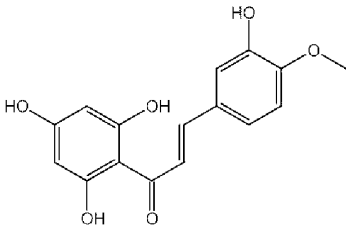
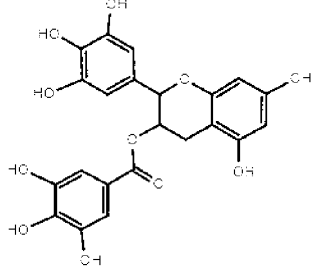
- [0488]参照实施例 1、实施例 2 及实施例 3 用 DSPC、姜黄素、 Fe^{3+} 的同类物分别对
45 DSPC、姜黄素、 Fe^{3+} 进行替代，通过不同的组合分别制备 28 种不同的 eGFP-mRNA@MPP，

其中每种 eGFP-mRNA@MPP 所含 mRNA 的浓度均为 2μg/mL。DSPC、姜黄素、Fe³⁺及其同类物的名称及结构如表 4-1 所示，28 种 mRNA@MPP 中 DSPC、姜黄素、Fe³⁺及其同类物的组合方式如表 4-2 所示。其中，实施例 1 中的反应温度为 65℃、反应时间为 2 h，实施例 2 中的反应温度为 60℃、反应时间为 2 h，其他条件不变。

- 5
- [0489]为对比所述 28 种不同的 eGFP-mRNA@MPP 与 eGFP-mRNA@LNP 的效果，我们参照实施例 9 制备了包载等量 eGFP-mRNA 的 LNP，得到 eGFP-mRNA@LNP。
- [0490]将上述 28 种不同的 eGFP-mRNA@MPP 和上述 eGFP-mRNA@LNP(所含 mRNA 的浓度均为 2 μg/mL) 分别与 293T 细胞孵育，对照组用 MPP 或 LNP 孵育，48 h 后收取细胞悬液，通过流式细胞术检测 eGFP 阳性细胞百分比。
- 10
- [0491]流式细胞术方法分析 eGFP 阳性细胞率的方法如实施例 3 所述。
- [0492]LNP 的主要毒性来自于其主要成分——阳离子脂质/可电离脂质。当 LNP 在体内代谢过程中，游离的阳离子脂质/可电离脂质会对机体产生明显的毒性。阳离子脂质/可电离脂质对生物细胞的半数致死量 (IC₅₀) 是评估 LNP 对机体毒性大小的重要参数。金属-磷脂复合物颗粒 (Metal-chelated phospholipid complex nanoparticles, MPP) 用金属-磷脂
- 15
- 复合物代替了 LNP 中的阳离子脂质/可电离脂质，因此，我们通过研究表 4-2 种 28 种金属-磷脂复合物与阳离子脂质 (DOTAP) /可电离脂质 (ALC0315) 对生物细胞的半数致死量 (IC₅₀)，比较 LNP 与 28 种 MPP 的毒性的差异。
- [0493]IC₅₀ 的计算方法如实施例 12 所述。
- [0494]结果分析：如表 4-3 所示，28 种不同的 eGFP-mRNA@MPP 处理 293T 细胞后
- 20
- 其 eGFP 阳性细胞百分比均明显高于 eGFP-mRNA@LNP，其中由 DSPC、姜黄素、Fe³⁺组成的 mRNA@MPP 的 eGFP 阳性细胞百分比最高。结果提示：DSPC、姜黄素、Fe³⁺被其同类物替代后形成的 mRNA@MPP 的功能不及由 DSPC、姜黄素、Fe³⁺组成的 mRNA@MPP，但优于 mRNA@LNP 的功能，其可能的原因是：如实施例 8 所述 MPP 的促核酸发生溶酶体逃逸的能力强于 LNP，所以 MPP 装载的更多的核酸能被有效释放到胞质中，从而被翻译为蛋白质。
- 25
- [0495]上述结果提示，只要满足以下条件，则 DSPC、姜黄素、Fe³⁺被其同类物替代后组成的药物-金属-磷脂复合物颗粒的功能不受影响：① DSPC 的同类物为两亲性磷脂分子；② Fe³⁺的同类物为金属离子；③ 姜黄素的同类物与 DSPC 的同类物形成磷脂复合物的同时，又能与金属离子络合；④ 姜黄素与 Fe³⁺之间的配位键能响应溶酶体的低 pH 环境而发生断裂。
- 30
- [0496]如表 4-3 所示，28 种金属-磷脂复合物的 IC₅₀ 均明显大于阳离子脂质 (DOTAP) 及可电离脂质 (ALC0315)。提示，金属-磷脂复合物的毒性明确小于阳离子脂质及可电离脂质，即由 DSPC、姜黄素、Fe³⁺及其同类物组成的脂质纳米颗粒 (MPP) 的安全性高于 LNP，其原因是：LNP 的核心成分为人工合成的“阳离子脂质/可电离脂质”，其细胞毒性及免疫原性较高，且其结构较为稳定，在体内难以分解代谢；而 MPP 的核心成分为金属-磷脂复合物，其金属-磷脂复合物是由磷脂分子、安全性高的天然小分子物质 (其中姜黄素为 FDA 批准的食品添加剂及药用辅料) 及安全的金属离子组成，且其在完成药物递送后已经在体内分解为天然分子。综上，由 DSPC、姜黄素、Fe³⁺及其同类物组成的脂质颗粒 (MPP) 的组成成分中无阳离子脂质/可电离脂质，不会引起阳离子脂质/可电离脂质相关的毒副反应，所以 MPP 的安全性高于 LNP。
- 35
-
- 40

表 4-1 DSPC、姜黄素、Fe³⁺及其同类物的名称及结构

	名称	结构
--	----	----

DSPC 及其同类物	DSPC	
	DSPE	
	DSPA	
	DSPG	
姜黄素及其同类物	姜黄素	
	橙皮素	
	茶多酚	

Fe ³⁺ 及其同类物	Fe ³⁺	
	Ca ²⁺	
	Al ³⁺	

表 4-2 DSPC、姜黄素、Fe³⁺及其同类物制备的药物-脂质颗粒中金属-磷脂复合物的成组
合方式列表及功能

药物-脂质纳米颗粒	核心成分	eGFP 阳性细胞百分比 (%)
mRNA@LNP	ALC0315 (可电离脂质)	43.1
mRNA@MPP1	DSPC、姜黄素、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	98.2
mRNA@ MPP2	DSPC、姜黄素、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	98.4
mRNA@MPP3	DSPC、姜黄素、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	80.1
mRNA@MPP4	DSPC、橙皮素、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	73.0
mRNA@MPP5	DSPC、橙皮素、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	82.9
mRNA@MPP6	DSPC、橙皮素、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	80.8
mRNA@MPP7	DSPC、茶多酚、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	91.5
mRNA@MPP8	DSPC、茶多酚、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	77.3
mRNA@MPP9	DSPC、茶多酚、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	69.3
mRNA@MPP10	DSPE、姜黄素、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	58.4
mRNA@MPP11	DSPE、姜黄素、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	82.4
mRNA@MPP12	DSPE、姜黄素、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	77.5
mRNA@MPP13	DSPE、橙皮素、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	86.1
mRNA@MPP14	DSPE、橙皮素、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	79.3
mRNA@MPP15	DSPE、橙皮素、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	59.0
mRNA@MPP16	DSPE、茶多酚、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	63.1
mRNA@MPP17	DSPE、茶多酚、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合	69.5

	物	
mRNA@MPP18	DSPE、茶多酚、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	70.2
mRNA@MPP19	DSPA、姜黄素、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	72.3
mRNA@MPP20	DSPA、姜黄素、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	77.2
mRNA@MPP21	DSPA、姜黄素、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	65.1
mRNA@MPP22	DSPA、橙皮素、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	70.1
mRNA@MPP23	DSPA、橙皮素、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	81.7
mRNA@MPP24	DSPA、橙皮素、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	56.1
mRNA@MPP25	DSPA、茶多酚、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	70.4
mRNA@MPP26	DSPA、茶多酚、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	75.9
mRNA@MPP27	DSPA、茶多酚、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	54.9
mRNA@MPP28	DSPG、姜黄素、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	53.0

表 4-3 DSPC、姜黄素、Fe³⁺及其同类物制备的金属-磷脂复合物的 IC₅₀

种类	名称	IC ₅₀ (μM)
可电离脂质	ALC0315	145.1
阳离子脂质	DOTAP	40.7
金属-磷脂复合物	DSPC、姜黄素、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	646.9
	DSPC、姜黄素、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	704.3
	DSPC、姜黄素、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	642.1
	DSPC、橙皮素、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	190.8
	DSPC、橙皮素、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	219.0
	DSPC、橙皮素、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	209.3
	DSPC、茶多酚、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	1573.7
	DSPC、茶多酚、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	1257.1

	DSPC、茶多酚、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	1679.5
	DSPE、姜黄素、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	590.7
	DSPE、姜黄素、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	582.9
	DSPE、姜黄素、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	657.3
	DSPE、橙皮素、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	342.9
	DSPE、橙皮素、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	322.4
	DSPE、橙皮素、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	219.1
	DSPE、茶多酚、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	2163.5
	DSPE、茶多酚、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	1726.3
	DSPE、茶多酚、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	1369.8
	DSPA、姜黄素、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	477.3
	DSPA、姜黄素、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	443.9
	DSPA、姜黄素、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	516.5
	DSPA、橙皮素、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	127.8
	DSPA、橙皮素、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	216.4
	DSPA、橙皮素、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	195.1
	DSPA、茶多酚、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	1154.5
	DSPA、茶多酚、Al ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	1229.0
	DSPA、茶多酚、Ca ²⁺ 组成的金属-磷脂复合物	1363.7
	DSPG、姜黄素、Fe ³⁺ 组成的金属-磷脂复合物	989.6

[0497]实施例 16、不同金属-磷脂复合物的 DSPC、姜黄素及其同类物、Fe³⁺组分投放比例及其制备的药物-金属-磷脂复合物颗粒的功能

[0498]按照实施例 3，制备金属-磷脂复合物，并将姜黄素分别替换为其同类物橙皮素

（1分子橙皮素含4个羟基），茶多酚（1分子茶多酚含8个羟基），制备得到三种金属-磷脂复合物（mRNA@MPP1、mRNA@MPP4、mRNA@MPP29）。制备这三种金属-磷脂复合物时 DSPC、姜黄素或其同类物、FeCl₃ 的投放比例分别为：1:1:1，1:1:1，1:1:2。并用这三种金属-磷脂复合物（mRNA@MPP1、mRNA@MPP4、mRNA@MPP29）制备的对应的药物-金属-磷脂复合物纳米颗粒。其中 mRNA 为编码 eGFP 荧光蛋白的 mRNA，其序列为 SEQ ID No.1（720nt）。按照实施例 3.5 所述的实验过程及实验方法检测这 4 种药物-脂质纳米颗粒的 mRNA 包载率及其处理 293T 细胞后促进 eGFP 荧光蛋白表达的能力。

[0499]结果分析：如表 4-4 显示，依据金属-磷脂复合物组分的化学结构使用不同的投放比例制备的药物-金属-磷脂复合物颗粒的 mRNA 包载效率及促目的蛋白表达的能力相当。结果提示，金属-磷脂复合物组分的投放比例可根据具体金属-磷脂复合物组分的结构进行调整。投放比例可以调整的依据是：因为 DSPC 的同类物与姜黄素的同类物靠氢键相连，只要 DSPC 的同类物含有多个磷酸基团，那么合成磷脂复合物时，DSPC 的同类物和姜黄素的同类物的投放比例可以依据 DSPC 的同类物所含磷酸基团的个数进行调整，即当 DSPC 的同类物含两个磷酸基团时，DSPC 的同类物和姜黄素的同类物的投放比例可调整为 1：2；当 DSPC 的同类物含三个磷酸基团时，DSPC 的同类物和姜黄素的同类物的投放比例可调整为 1：3；因为姜黄素的同类物的羟基与 Fe³⁺ 的同类物靠配位键连接，只要姜黄素的同类物含有多个结合位点，那么姜黄素的同类物和 Fe³⁺ 的同类物的投放比例可以依据姜黄素的同类物所含结合位点的数量进行调整。

表 4-4 不同金属-磷脂复合物的组分投放比例及其制备的药物-脂质颗粒的功能

药物-脂质颗粒	金属-磷脂复合物的组分及其投放比例	药物-脂质颗粒的 mRNA 包载率(%)	eGFP 阳性细胞百分比 (%)
mRNA@MPP1	DSPC、姜黄素、Fe ³⁺ 按 1:1:1 投放	87	97
mRNA@MPP4	DSPC、橙皮素、Fe ³⁺ 按 1:1:1 投放	85	72
mRNA@MPP29	DSPC、茶多酚、Fe ³⁺ 按 1:1:2 投放	85	92

[0500]实施例 17、不同金属-磷脂复合物的 DSPC、姜黄素及其同类物、Al³⁺组分投放比例及其制备的药物-金属-磷脂复合物颗粒的功能

[0501]按照实施例 3，制备金属-磷脂复合物，并将姜黄素分别替换为其同类物橙皮素（1分子橙皮素含4个羟基），茶多酚（1分子茶多酚含8个羟基），制备得到三种金属-磷脂复合物（mRNA@MPP2、mRNA@MPP5、mRNA@MPP30）。制备这三种金属-磷脂复合物时 DSPC、姜黄素或其同类物、Al(NO₃)₃·9H₂O 的投放比例分别为：1:1:1，1:1:1，1:1:2。并用这三种金属-磷脂复合物（mRNA@MPP1、mRNA@MPP4、mRNA@MPP29）制备的对应的药物-金属-磷脂复合物纳米颗粒。其中 mRNA 为编码 eGFP 荧光蛋白的 mRNA，其序列为 SEQ ID No.1（720nt）。按照实施例 3.5 所述的实验过程及实验方法检测这 4 种药物-脂质纳米颗粒的 mRNA 包载率及其处理 293T 细胞后促进 eGFP 荧光蛋白表达的能力。

[0502]结果分析：如表 4-5 显示，依据金属-磷脂复合物组分的化学结构使用不同的投放比例制备的药物-金属-磷脂复合物颗粒的 mRNA 包载效率及促目的蛋白表达的能力相当。结果提示，金属-磷脂复合物组分的投放比例可根据具体金属-磷脂复合物组分的结构进行调整。投放比例可以调整的依据是：因为 DSPC 的同类物与姜黄素的同类物靠氢键相连，只要 DSPC 的同类物含有多个磷酸基团，那么合成磷脂复合物时，DSPC 的同类物和

姜黄素的同类物的投放比例可以依据 DSPC 的同类物所含磷酸基团的个数进行调整，即当 DSPC 的同类物含两个磷酸基团时，DSPC 的同类物和姜黄素的同类物的投放比例可调整为 1: 2；当 DSPC 的同类物含三个磷酸基团时，DSPC 的同类物和姜黄素的同类物的投放比例可调整为 1: 3；因为姜黄素的同类物的羟基与 Al^{3+} 的同类物靠配位键连接，只要姜黄素的同类物含有多个结合位点，那么姜黄素的同类物和 Al^{3+} 的同类物的投放比例可以依据姜黄素的同类物所含结合位点的数量进行调整。

表 4-5 不同金属-磷脂复合物的组分投放比例及其制备的药物-脂质颗粒的功能

药物-脂质颗粒	金属-磷脂复合物的组分及其投放比例	药物-脂质颗粒的 mRNA 包载率(%)	eGFP 阳性细胞百分比 (%)
mRNA@MPP 2	DSPC、姜黄素、 Al^{3+} 按 1:1:1 投放	92	98
mRNA@MPP 5	DSPC、橙皮素、 Al^{3+} 按 1:1:1 投放	86	78
mRNA@MPP 30	DSPC、茶多酚、 Al^{3+} 按 1:1:2 投放	85	92

[0503]实施例 3 中 mRNA@MPP 制备为中南大学化学化工学院制药工程系王珊教授课题组完成。

[0504]除非另有定义，本公开全文所使用的所有技术和科学术语与本公开所属技术领域的技术人员通常理解的含义相同。如有不一致，以本公开全文中所说明的含义或者根据本公开全文中记载的内容得出的含义为准。另外，本说明中所使用的术语只是为了描述本公开实施例的目的，不是旨在限制本公开。

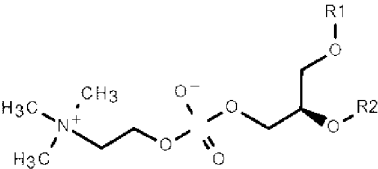
[0505]注意，上述仅为本公开的较佳实施例及所运用的技术原理。本领域技术人员会理解，本公开不限于这里所述的特定实施例，对本领域技术人员来说能够进行各种明显的变化、重新调整和替代而不会脱离本公开的保护范围。因此，虽然通过以上实施例对本公开进行了较为详细的说明，但是本公开不仅仅限于以上实施例，在不脱离本公开的技术构思的情况下，还可以包括更多其他等效实施例，均属于本公开的保护范畴。

权 利 要 求 书

1. 一种金属-磷脂复合物，其中，所述金属-磷脂复合物由磷脂分子部分、连接物分子部分和金属离子部分反应组成，所述磷脂分子部分与所述连接物分子部分相连接，所述连接物分子部分与所述金属离子部分通过配位键连接，且所述金属-磷脂复合物不是阳离子脂质或可电离脂质。
2. 根据权利要求 1 所述的金属-磷脂复合物，其中，所述磷脂分子部分选自卵磷脂（PC）、磷脂酰乙醇胺（PE）、磷脂酰丝氨酸（PS）、磷脂酸（PA）、磷脂酰甘油（PG）、1-磷酸神经酰胺（SP）、磷脂酰肌醇（PI）、磷脂酰苏氨酸（PT）、鞘磷脂（SM）、溶血卵磷脂（LPC）、溶血磷脂酰乙醇胺（LPE）、溶血磷脂酰丝氨酸（LPS）、溶血磷脂酸（LPA）、溶血磷脂酰甘油（LPG）、溶血磷脂酰肌醇（LPI）、溶血磷脂酰苏氨酸（LPT）、溶血鞘磷脂（LSM）、1-磷酸鞘氨醇（SIP），及其衍生物中一种或多种的组合。
3. 根据权利要求 2 所述的金属-磷脂复合物，其中，所述磷脂分子部分选自

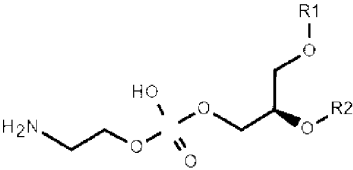
15

卵磷脂（PC）



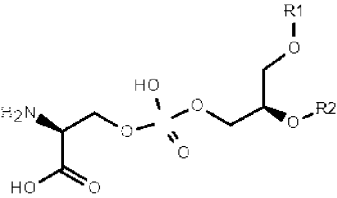
式 1、

磷脂酰乙醇胺（PE）



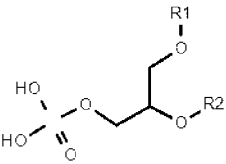
式 2、

磷脂酰丝氨酸（PS）



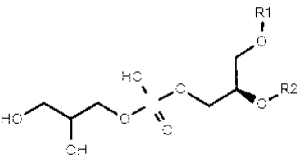
式 3、

磷脂酸（PA）

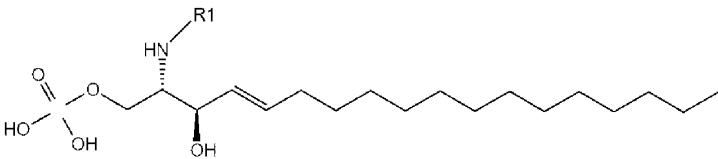


式 4、

磷脂酰甘油（PG）



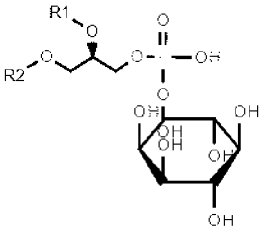
式 5、



1-磷酸神经酰胺(SP)

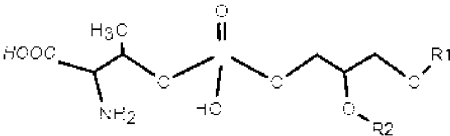
式

6、



磷脂酰肌醇 (PI)

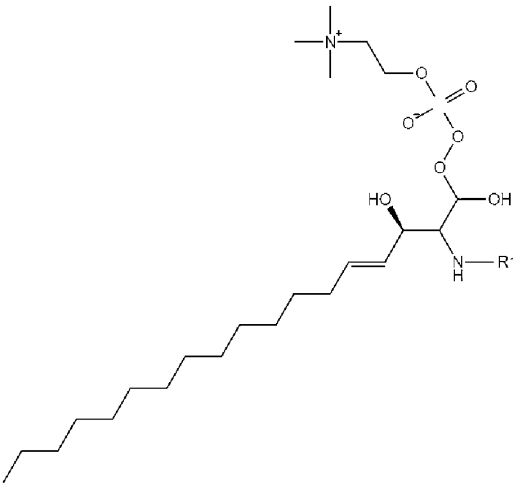
式 7、



磷脂酰苏氨酸 (PT)

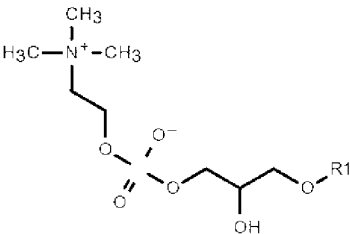
式 8、

5



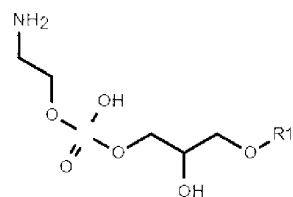
鞘磷脂 (SM)

式 9、



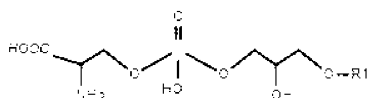
溶血卵磷脂 (LPC)

式 10、



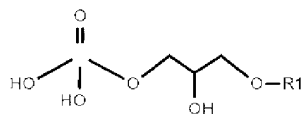
溶血磷酸酰乙醇胺 (LPE)

式 11、



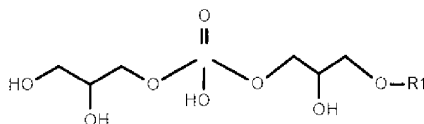
溶血磷脂酰丝氨酸 (LPS)

式 12、



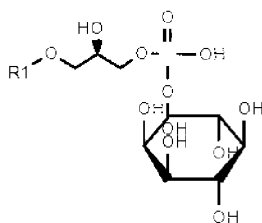
溶血磷脂酸 (LPA)

式 13、



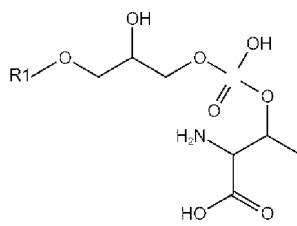
溶血磷脂酰甘油 (LPG)

式 14、



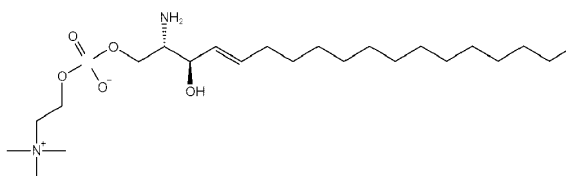
溶血磷脂酰肌醇 (LPI)

式 15、



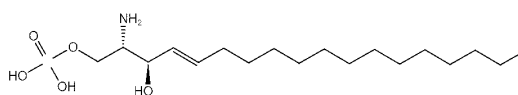
溶血磷脂酰苏氨酸 (LPT)

式 16、



溶血鞘磷脂 (LSM)

式 17、

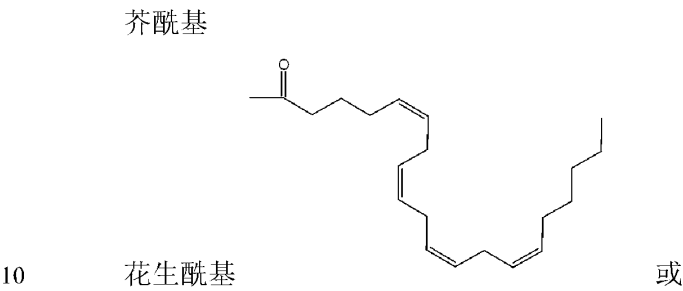
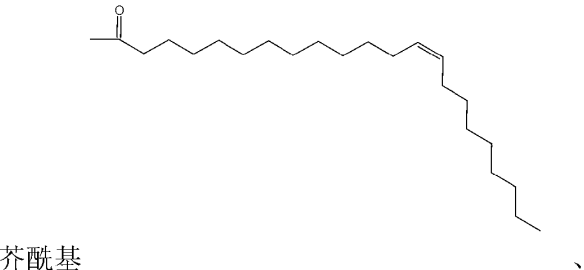
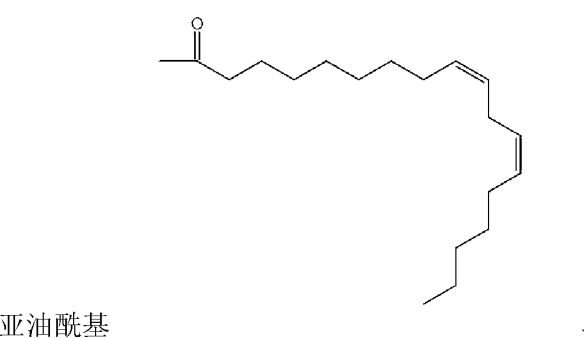
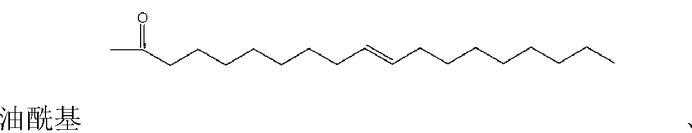
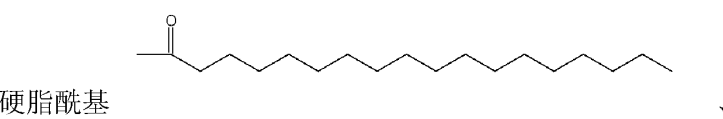
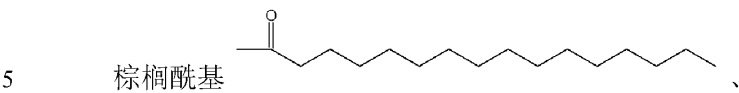
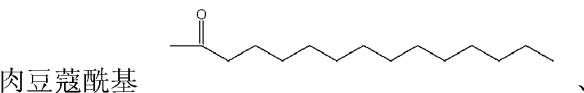
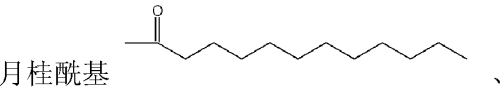
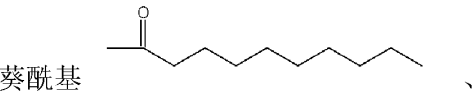


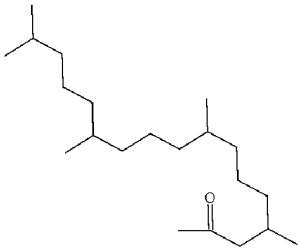
1-磷酸鞘氨醇 (S1P)

式 18, 及其衍生

物中一种或多种的组合;

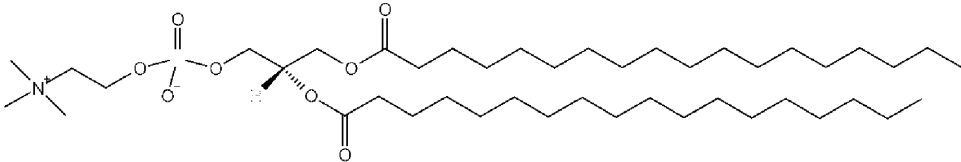
其中，R1，R2 均独立地为：



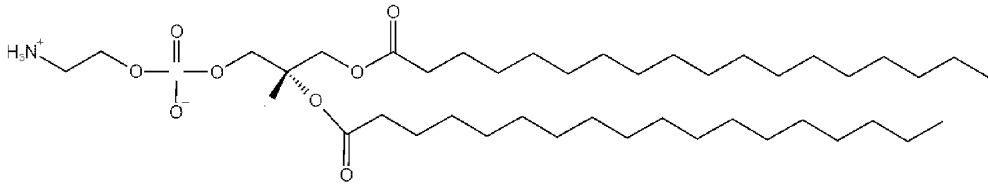


植烷酰基

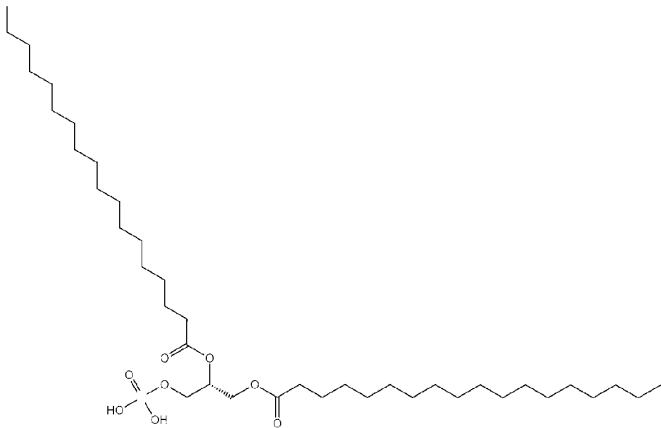
4. 根据权利要求 3 所述的金属-磷脂复合物，其中，所述磷脂分子部分选自卵磷脂（PC，式 1）、磷脂酰乙醇胺（PE，式 2）、磷脂酸（PA，式 4）、磷脂酰甘油（PG，式 5），及其衍生物中一种或多种的组合。
5. 根据权利要求 4 所述的金属-磷脂复合物，其中，所述磷脂分子部分选自 DSPC、DSPE、DSPA、DSPG，及其衍生物中一种或多种的组合。
6. 根据权利要求 5 所述的金属-磷脂复合物，其中，所述磷脂分子部分选自 DSPC（式 46）



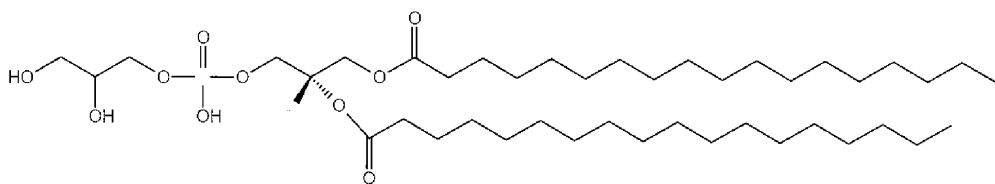
10 DSPE（式 47）



DSPA（式 48）



、DSPG（式 49）



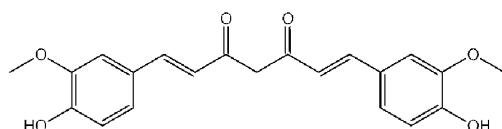
, 及其

衍生物中一种或多种的组合。

7. 根据权利要求6所述的金属-磷脂复合物, 其中, 所述磷脂分子部分选自 DSPC (式46)、DSPE (式47) 或 DSPA (式48)。

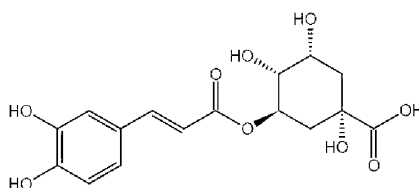
5 8. 根据权利要求1至7任一项所述的金属-磷脂复合物, 其中, 所述连接物分子部分选自姜黄素、绿原酸、花青素、槲皮素、二氢杨梅素、橙皮素、柚皮素、芹菜素、儿茶素、茶多酚、表没食子儿茶素没食子酸酯、鞣花酸、桑色素、表儿茶素没食子酸酯、儿茶素没食子酸酯、没食子儿茶素没食子酸酯或平贝碱 C, 及其衍生物中一种或多种的组合。

9. 根据权利要求8所述的金属-磷脂复合物, 其中, 所述连接物分子部分选自



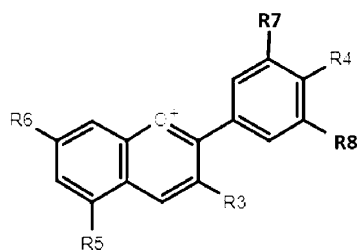
10 姜黄素

式 19、



绿原酸

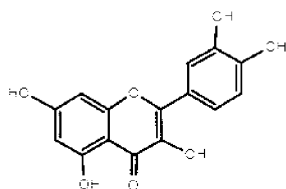
式 20、



花青素

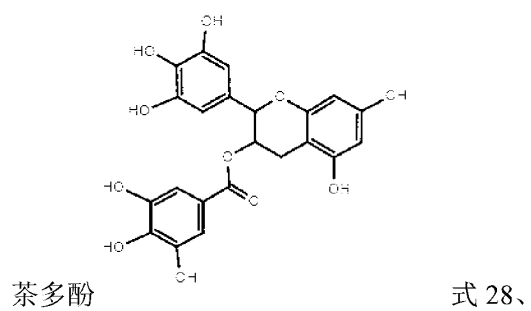
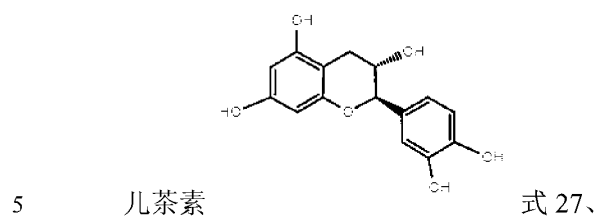
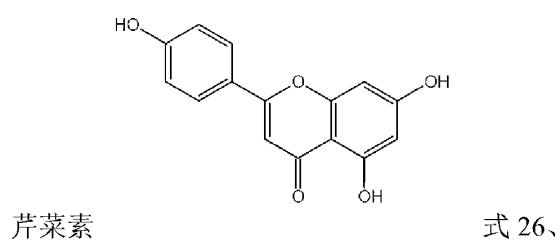
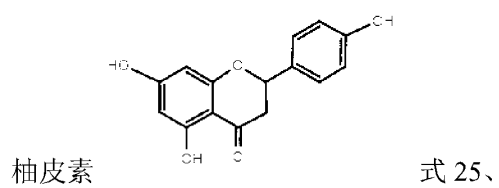
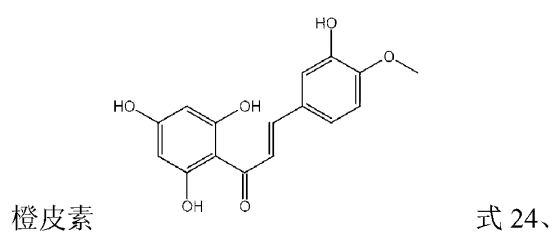
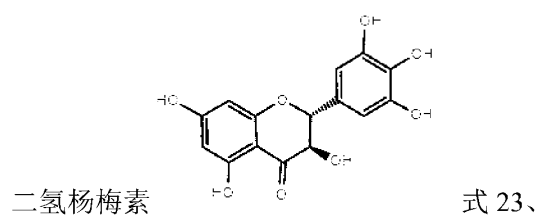
式 21, 其中, R7 和 R8 是 H、OH 或 OCH₃,

R3 是 H 或糖基, R4、R5 和 R6 是 OH 或糖基、

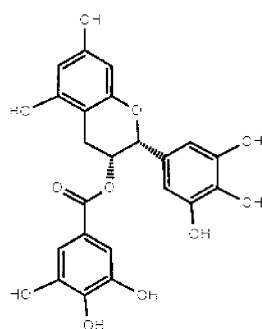


槲皮素

式 22、

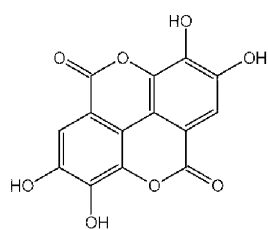


75



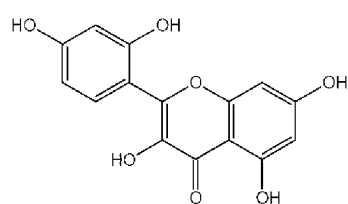
表没食子儿茶素没食子酸酯

式 29、



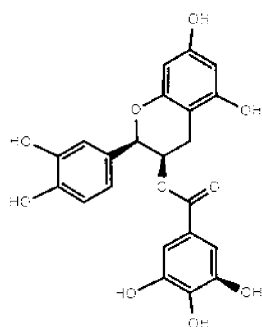
鞣花酸

式 30、



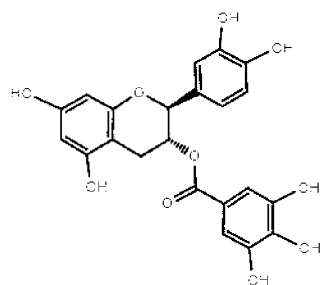
桑色素

式 31、



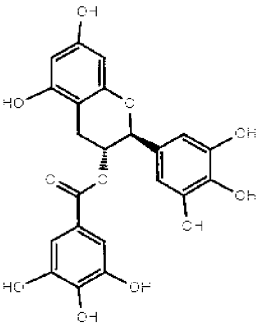
表儿茶素没食子酸酯

式 32、

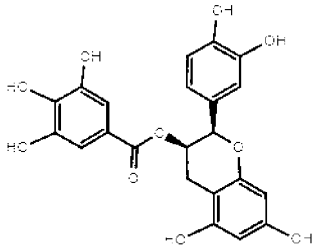


儿茶素没食子酸酯

式 33、

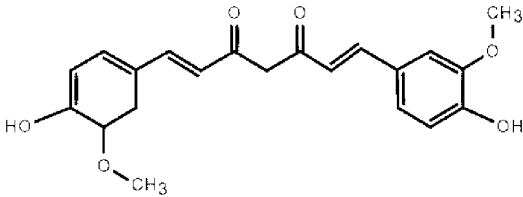


没食子儿茶素没食子酸酯 式 34、

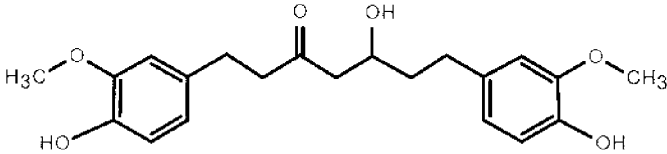


平贝碱 C 式 35，及其衍生物中一种或多种的组合。

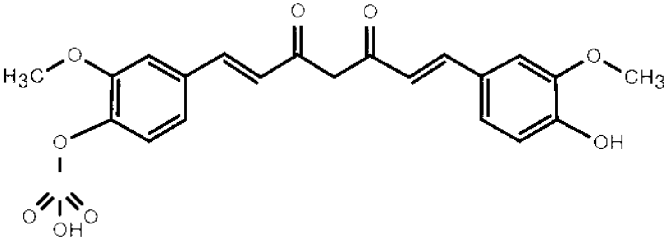
10. 根据权利要求 9 所述的金属-磷脂复合物，其中，所述连接物分子部分选自姜黄



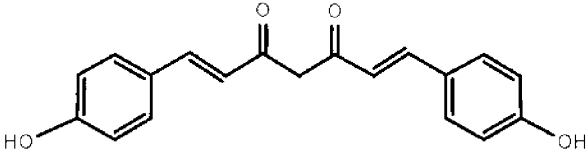
素 (式 19)、二氢姜黄素 (式 36) 、六氢



5 姜黄素 (式 37) 、硫酸姜黄素



(式 38) 、双去甲氧基姜黄素



(式 39) 中一种或多种的组合。

11. 根据权利要求 9 所述的金属-磷脂复合物，其中，所述连接物分子部分选自姜黄素 (式 19)、橙皮素 (式 24)、茶多酚 (式 28)，及其衍生物中一种或多种的组合。

12. 根据权利要求 11 所述的金属-磷脂复合物, 其中, 所述连接物分子部分选自姜黄素(式 19)、橙皮素(式 24)或茶多酚(式 28)。

13. 根据权利要求 1 至 12 任一项所述的金属-磷脂复合物, 其中, 所述金属离子部分选自 Fe^{3+} 、 Ag^+ 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mo^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pt^{2+} 、
5 Au^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ce^{3+} 、 Co^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Gd^{3+} 、 Ni^{3+} 、 W^{3+} 、 V^{3+} 、 Zr^{3+} 中一种或多种的组合。

14. 根据权利要求 13 所述的金属-磷脂复合物, 其中, 所述金属离子部分选自 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 中一种或多种的组合。

15. 根据权利要求 14 所述的金属-磷脂复合物, 其中, 所述金属离子部分选自 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 或 Al^{3+} 。

16. 根据权利要求 1 至 15 任一项所述的金属-磷脂复合物, 其中, 所述金属-磷脂复合物由磷脂分子部分、连接物分子部分和金属离子部分制成, 所述磷脂分子部分选自 DSPC、DSPE 或 DSPA, 所述连接物分子部分选自姜黄素、橙皮素或茶多酚, 所述金属离子部分选自 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 或 Al^{3+} 。

17. 根据权利要求 16 所述的金属-磷脂复合物, 其中, 所述金属-磷脂复合物由磷脂分子部分、连接物分子部分和金属离子部分制成, 所述磷脂分子部分选自 DSPC(式 46)、DSPE(式 47)或 DSPA(式 48), 所述连接物分子部分选自姜黄素(式 19)、橙皮素(式 24)或茶多酚(式 28), 所述金属离子部分选自 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 或 Al^{3+} 。

18. 根据权利要求 16 或 17 所述的金属-磷脂复合物, 其中, 所述磷脂分子部分、所述连接物分子部分和所述金属离子部分的摩尔比为 1:1: (0.5~2)。

19. 根据权利要求 18 所述的金属-磷脂复合物, 所述磷脂分子部分、所述连接物分子部分和所述金属离子部分的摩尔比为 1:1:1。

20. 权利要求 1 至 19 任一项所述金属-磷脂复合物的制备方法, 其中, 所述制备方法包括以下步骤:

步骤一: 将磷脂分子与连接物分子反应连接形成磷脂复合物;

25 步骤二: 将步骤一中制备的所述磷脂复合物与金属离子通过配位键反应形成金属-磷脂复合物。

21. 根据权利要求 20 所述的制备方法, 其中, 步骤一中, 将所述磷脂分子与所述连接物分子溶于乙醇中反应, 之后加入正己烷, 沉淀得到所述磷脂复合物。

22. 根据权利要求 21 所述的制备方法, 其中, 所述磷脂分子与所述连接物分子的摩尔比为 1:1。

23. 根据权利要求 21 或 22 所述的制备方法, 其中, 所述反应的条件包括 65℃ 反应 2 小时。

24. 根据权利要求 20 至 23 任一项所述的制备方法, 其中, 步骤二中, 磷脂复合物与金属离子溶于乙醇反应后, 得到所述金属-磷脂复合物。

25. 根据权利要求 24 所述的制备方法, 其中, 所述磷脂复合物与所述金属离子的摩尔比为 1: (1~2)。

26. 根据权利要求 24 或 25 所述的制备方法, 其中, 所述反应的条件包括 60℃ 反应 2 小时。

27. 一种金属-磷脂复合物颗粒, 其中, 所述金属-磷脂复合物颗粒含有:

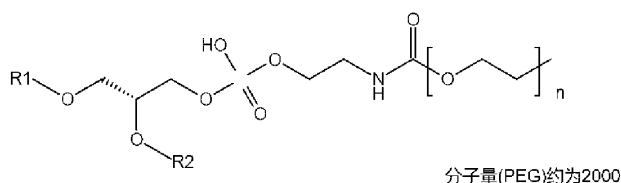
40 (i) 金属-磷脂复合物, 其中所述金属-磷脂复合物为权利要求 1 至 19 任一项所述的金属-磷脂复合物;

(ii) 抑制颗粒聚集的缀合的脂质, 其中所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质不是阳离子脂质或可电离脂质; 以及

45 (iii) 除所述金属-磷脂复合物和所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的非阳离子脂质或非可电离脂质。

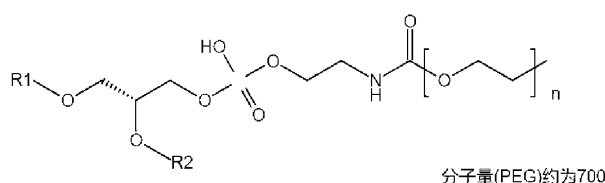
28. 根据权利要求 27 所述的金属-磷脂复合物颗粒, 其中, 所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质包括 PEG-脂质缀合物和/或 PEG-DAA。

29. 根据权利要求 28 所述的金属-磷脂复合物颗粒, 其中, 所述 PEG-脂质缀合物选自磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (式 42)

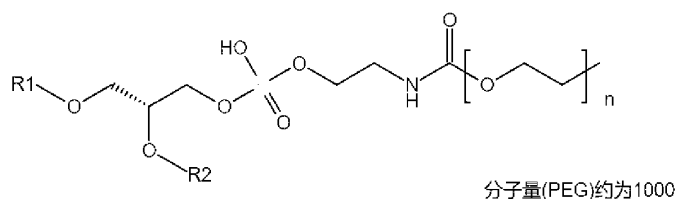


5

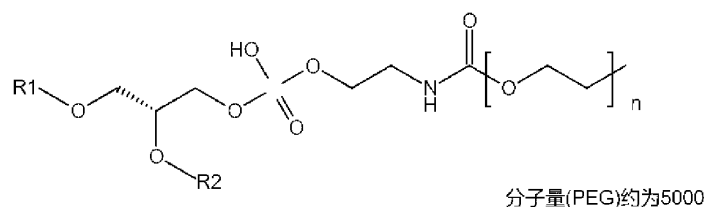
磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 700 (式 43)



磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 1000 (式 44)



10 磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 5000 (式 45)

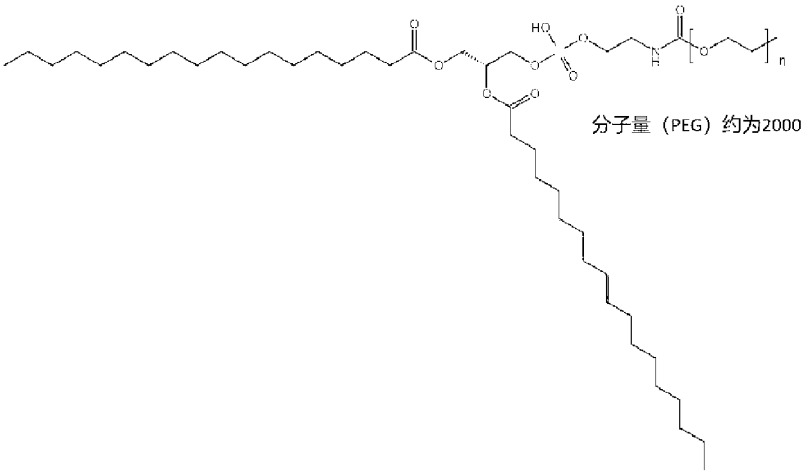


, 及其衍生物中一种或多种的组合;

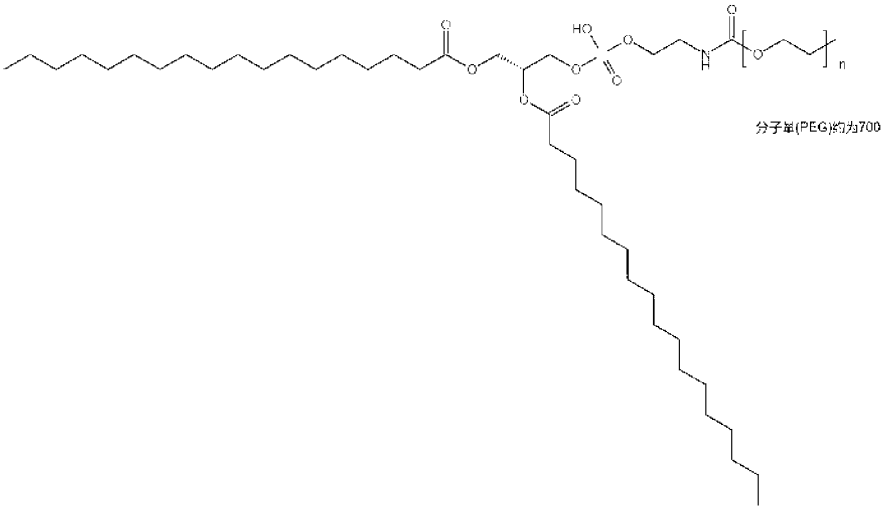
R1, R2 均独立地为: 葵酰基、月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基、油酰基、亚油酰基、芥酰基、花生酰基或植烷酰基。

15 30. 根据权利要求 29 所述的金属-磷脂复合物颗粒, 其中, 所述 PEG-脂质缀合物选自 DSPE-PEG2000、DSPE-PEG700、DSPE-PEG1000 或 DSPE-PEG5000 中一种或多种的组合。

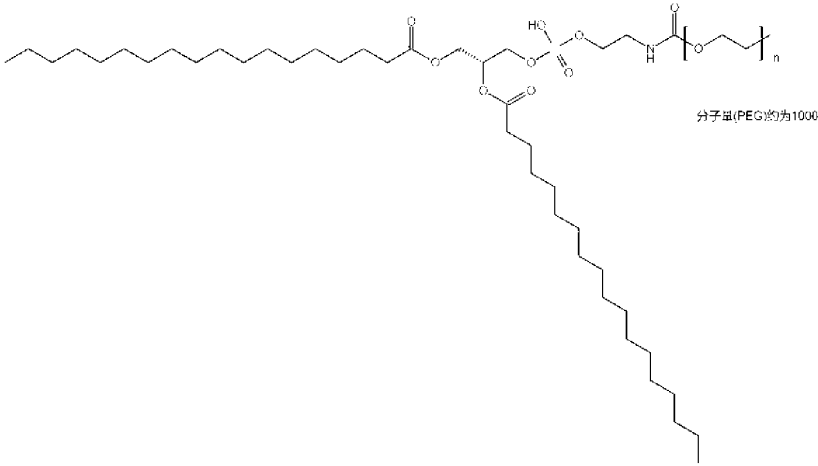
31. 根据权利要求 30 所述的金属-磷脂复合物颗粒, 其中, 所述 PEG-脂质缀合物选自 DSPE-PEG2000 (式 53)



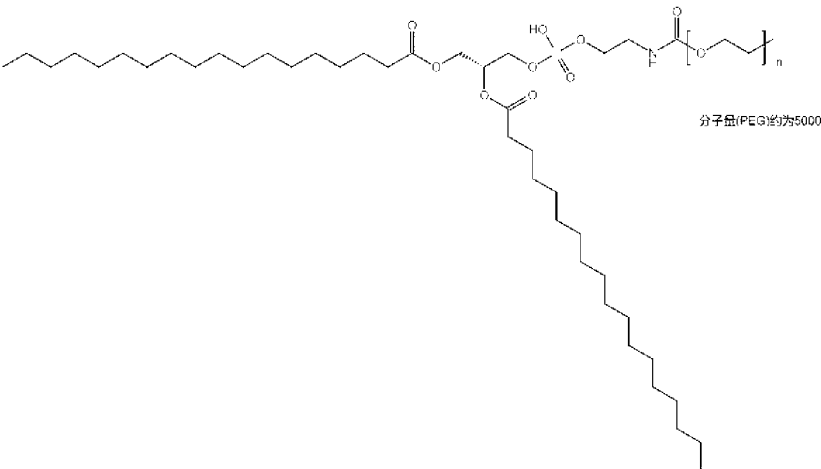
、DSPE-PEG700 (式



50)
DSPE-PEG1000 (式 51)



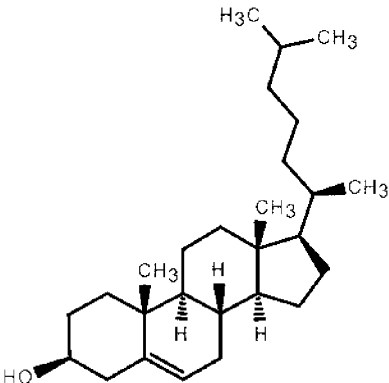
或 DSPE-PEG5000



(式 52)

32. 根据权利要求 27 至 31 任一项所述的金属-磷脂复合物颗粒，其中，(iii) 中所述的非阳离子脂质或非可电离脂质为胆固醇及其衍生物中一种或多种的组合。

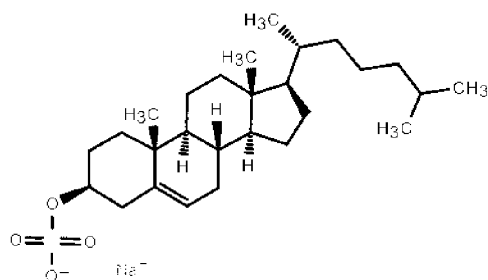
33. 根据权利要求 32 所述的金属-磷脂复合物颗粒，其中，(iii) 中所述的非阳



5 离子脂质或非可电离脂质为胆固醇 (式 40)。

34. 根据权利要求 32 所述的金属-磷脂复合物颗粒，其中，(iii) 中所述的非阳
离子脂质或非可电离脂质还包括选自卵磷脂 PC、磷脂酰乙醇胺 PE、磷脂酰丝氨酸 PS、
磷脂酸 PA、磷脂酰甘油 PG、1-磷酸神经酰胺 SP、磷脂酰肌醇 PI、磷脂酰苏氨酸 PT、鞘
磷脂 SM、溶血卵磷脂 LPC、溶血磷酸酰乙醇胺 LPE、溶血磷脂酰丝氨酸 LPS、溶血磷脂
10 酸 LPA、溶血磷脂酰甘油 LPG、溶血磷脂酰肌醇 LPI、溶血磷脂酰苏氨酸 LPT、溶血鞘磷
脂 LSM、1-磷酸鞘氨醇 SIP、胆固醇硫酸酯，及其衍生物中一种或多种的组合。

35. 根据权利要求 34 所述的金属-磷脂复合物颗粒，其中，(iii) 中所述的非阳
离子脂质或非可电离脂质还包括选自卵磷脂 (PC，式 1)、磷脂酰乙醇胺 (PE，式 2)、
磷脂酰丝氨酸 (PS，式 3)、磷脂酸 (PA，式 4)、磷脂酰甘油 (PG，式 5)、1-磷酸神
经酰胺 (SP，式 6)、磷脂酰肌醇 (PI，式 7)、磷脂酰苏氨酸 (PT，式 8)、鞘磷脂 (SM，
15 式 9)、溶血卵磷脂 (LPC，式 10)、溶血磷酸酰乙醇胺 (LPE，式 11)、溶血磷脂酰丝
氨酸 (LPS，式 12)、溶血磷脂酸 (LPA，式 13)、溶血磷脂酰甘油 (LPG，式 14)、
溶血磷脂酰肌醇 (LPI，式 15)、溶血磷脂酰苏氨酸 (LPT，式 16)、溶血鞘磷脂 (LSM，
式 17)、1-磷酸鞘氨醇 (SIP，式 18)、胆固醇硫酸酯



式 41, 及其衍生物中一种或多种的组合。

36. 根据权利要求 34 或 35 所述的金属-磷脂复合物颗粒, 其中, (iii) 中所述的非阳离子脂质或非可电离脂质包括胆固醇, 以及选自 DSPC、DSPE、DSPA 或 DSPG 中一种或多种的组合。

5 37. 根据权利要求 36 所述的金属-磷脂复合物颗粒, 其中, (iii) 中所述的非阳离子脂质或非可电离脂质包括胆固醇 (式 40) 和 DSPC (式 46)。

38. 根据权利要求 34 至 37 任一项所述的金属-磷脂复合物颗粒, 其中, 所述金属-磷脂复合物颗粒由 (i) 金属-磷脂复合物、(ii) 抑制颗粒聚集的缀合的脂质和 (iii) 非阳离子脂质或非可电离脂质制成, 所述金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为
10 10%~40%, 所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 2%~10%, 所述胆固醇在原料中摩尔占比为 35%~75%, 所述除胆固醇以外的非阳离子脂质或非可电离脂质在原料中摩尔占比为 0%~40%。

39. 根据权利要求 34 或 37 任一项所述的金属-磷脂复合物颗粒, 其中, 所述金属-磷脂复合物颗粒由 (i) 金属-磷脂复合物、(ii) 抑制颗粒聚集的缀合的脂质和 (iii)
15 非阳离子脂质或非可电离脂质制成, 所述金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 5%~小于 10%, 所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 2%~10%, 所述胆固醇在原料中摩尔占比为 15%~小于 35%、35%~75%或大于 75%~80%, 所述除胆固醇以外的非阳离子脂质或非可电离脂质在原料中摩尔占比为 0%~40%或大于 40%~51%; 或

20 所述金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为大于 40%~50%, 所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 2%~10%, 所述胆固醇在原料中摩尔占比为 15%~小于 35%、35%~75%或大于 75%~80%, 所述除胆固醇以外的非阳离子脂质或非可电离脂质在原料中摩尔占比为 0%~40%或大于 40%~51%; 或

25 所述金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 10%~40%, 所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 2%~10%, 所述胆固醇在原料中摩尔占比为 15%~小于 35%或大于 75%~80%, 所述除胆固醇以外的非阳离子脂质或非可电离脂质在原料中摩尔占比为 0%~40%或大于 40%~51%。

40. 根据权利要求 38 或 39 所述的金属-磷脂复合物颗粒, 其中, 所述金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 7%~小于 10%、10%~30%或 20%~30%, 优选为 25%。

41. 根据权利要求 38 至 40 所述的金属-磷脂复合物颗粒, 其中, 所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 3%~10%或 5%~10%, 优选为 10%。
30

42. 根据权利要求 38 至 41 任一项所述的金属-磷脂复合物颗粒, 其中, 所述胆固醇在原料中摩尔占比为 15%~小于 35%、35%~56%或 35%~55%, 优选为 40%。

43. 根据权利要求 38 至 42 任一项所述的金属-磷脂复合物颗粒, 其中, 除胆固醇以外的非阳离子脂质或非可电离脂质在原料中摩尔占比为 5%~30%、25%~40%、大
35 于 40%~45%或 20%~25%。

44. 根据权利要求 38 所述的金属-磷脂复合物颗粒, 其中, 所述金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 15%~25%, 所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占

比为 4%~10%，所述胆固醇在原料中摩尔占比为 40%~46%，所述 DSPC 在原料中摩尔占比为 25%~35%，所述金属-磷脂复合物中金属离子部分选自 Fe^{3+} 。

45. 根据权利要求 44 所述的金属-磷脂复合物颗粒，其中，所述金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 15%，所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 4%，
5 所述胆固醇在原料中摩尔占比为 46%，所述 DSPC 在原料中摩尔占比为 35%；或所述金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 25%，所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 10%，所述胆固醇在原料中摩尔占比为 40%，所述 DSPC 在原料中摩尔占比为 25%；所述金属-磷脂复合物中金属离子部分选自 Fe^{3+} 。

46. 根据权利要求 38 所述的金属-磷脂复合物颗粒，其中，所述金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 10%~30%，所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 3%~10%，所述胆固醇在原料中摩尔占比为 35%~56%，所述 DSPC 在原料中摩尔占比为 34%~40%；所述金属-磷脂复合物中金属离子部分选自 Al^{3+} 。

47. 根据权利要求 39 所述的金属-磷脂复合物颗粒，其中，所述金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 10%~30%，所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 3%~10%，所述胆固醇在原料中摩尔占比为 35%~56%，所述 DSPC 在原料中摩尔占比为 40%~45%；或

所述金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 10%~30%，所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 3%~10%，所述胆固醇在原料中摩尔占比为 15%~35%，所述 DSPC 在原料中摩尔占比为 34%~40%或大于 40%~45%；或

20 所述金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 7%~小于 10%，所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 3%~10%，所述胆固醇在原料中摩尔占比为 15%~小于 35%或 35%~56%，所述 DSPC 在原料中摩尔占比为 34%~40%或大于 40%~45%；所述金属-磷脂复合物中金属离子部分选自 Al^{3+} 。

48. 根据权利要求 47 所述的金属-磷脂复合物颗粒，其中，所述金属-磷脂复合物在原料中摩尔占比为 7%，所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质在原料中摩尔占比为 3%，所述胆固醇在原料中摩尔占比为 56%，所述 DSPC 在原料中摩尔占比为 34%；所述金属-磷脂复合物中金属离子部分选自 Al^{3+} 。

49. 权利要求 27 至 48 任一项所述金属-磷脂复合物颗粒的制备方法，其中，所述制备方法包括将 (i) 金属-磷脂复合物、(ii) 抑制颗粒聚集的缀合的脂质和 (iii) 除所述金属-磷脂复合物和所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的非阳离子脂质或非可电离脂质混合，得到所述金属-磷脂复合物颗粒。

50. 一种药物-脂质颗粒，其中，所述药物-脂质颗粒含有：

(a) 药物，其中所述药物为带有负电荷的分子；和

35 (b) 金属-磷脂复合物颗粒，所述金属-磷脂复合物颗粒为权利要求 27 至 48 任一项所述金属-磷脂复合物颗粒。

51. 根据权利要求 50 所述的药物-脂质颗粒，其中，所述药物包封在所述金属-磷脂复合物颗粒中。

52. 根据权利要求 50 或 51 所述的药物-脂质颗粒，其中所述药物选自核酸、蛋白、多肽、小分子、核酸类似物、蛋白类似物和多肽类似物中一种或多种的组合。

40 53. 根据权利要求 52 所述的药物-磷脂颗粒，其中，所述核酸选自 mRNA、siRNA、sgRNA、ASO、circRNA、microRNA、DNA、ecDNA、人工核酸中一种或多种的组合。

54. 根据权利要求 52 或 53 所述的药物-磷脂颗粒，其中，所述核酸为 SEQ ID No.1 所示的编码 eGFP 的 mRNA 序列、SEQ ID No.2 所示的编码新型冠状病毒 S1 亚基的受体结合域 RBD 的 mRNA 序列、SEQ ID No.3 所示的编码 NY-ESO-1 的 mRNA 序列、反义链为 SEQ ID No.4 和正义链为 SEQ ID No.21 所示的 Bcl-2 基因的 siRNA 序列、反

义链为 SEQ ID No.6 和正义链为 SEQ ID No.23 所示的 PLK1 基因的 siRNA 序列、SEQ ID No.8 所示的 Gal-1 基因的 siRNA 序列、SEQ ID No.10 所示的 STAT-3 基因的 ASO 序列、SEQ ID No.12 所示的 α -syn 基因的 ASO 序列、SEQ ID No.14 所示的 Bcl-2 基因的 ASO 序列、SEQ ID No.16 所示的编码野生型新型冠状病毒 S 蛋白的 mRNA 序列、
5 反义链为 SEQ ID No.17 和正义链为 SEQ ID No.25 所示的双链 DNA 序列、SEQ ID No.18 所示的单链 DNA、或正义链为 SEQ ID No.19 和反义链为 SEQ ID No.26 所示的 B7-H4 基因的 siRNA 序列。

55. 权利要求 50 至 54 任一项所述药物-脂质颗粒的制备方法, 其中, 将药物包
载于金属-磷脂复合物颗粒中, 得到所述药物-脂质颗粒。

10 56. 根据权利要求 55 所述的制备方法, 其中, 金属-磷脂复合物、抑制颗粒聚集的缀合的脂质, 以及除所述金属-磷脂复合物和所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质以外的非阳离子脂质或非可电离脂质溶于有机化合物中形成有机相, 药物溶于缓冲液中形成水相, 将有机相与水相混匀得到药物-脂质颗粒。

57. 根据权利要求 56 所述的制备方法, 其中, 所述有机化合物为乙醇。

15 58. 根据权利要求 56 或 57 所述的制备方法, 其中, 所述缓冲液为无酶 PBS 缓冲液。

59. 根据权利要求 56 至 58 任一项所述的制备方法, 其中, 有机相与水相的混匀方式包含微流控芯片或超声。

60. 权利要求 1 至 19 任一项所述金属-磷脂复合物在核酸递送系统中的应用。

20 61. 根据权利要求 60 所述的应用, 其中, 所述核酸递送系统用于将核酸引入细胞。

62. 根据权利要求 61 所述的应用, 其中, 所述核酸用于在哺乳动物受试者中使靶序列的表达沉默、用于在哺乳动物体内传递药物、用于将药物从体内传递到哺乳动物细胞或用于治疗哺乳动物的疾病或病症。

25 63. 权利要求 27 至 48 任一项所述金属-磷脂复合物颗粒或权利要求 47 至 51 任一项所述药物-脂质颗粒在组合物中的应用, 所述组合物用于药物的递送。

64. 根据权利要求 63 所述的应用, 其中, 所述组合物用于将药物引入细胞。

65. 根据权利要求 63 或 64 所述的应用, 其中, 所述组合物为药剂。

30 66. 根据权利要求 65 所述的应用, 其中, 所述药剂用于在哺乳动物受试者中使靶序列的表达沉默、用于在哺乳动物体内传递药物、用于将药物从体内传递到哺乳动物细胞或用于治疗哺乳动物的疾病或病症。

67. 根据权利要求 62 或 66 所述的应用, 其中, 所述哺乳动物为人。

68. 根据权利要求 62 或 66 所述的应用, 其中, 所述疾病或病症与基因的表达相关, 所述基因包含药物的靶序列。

35 69. 根据权利要求 62 或 66 所述的应用, 其中, 所述疾病或病症包括癌症、病毒感染、自身免疫性疾病、糖尿病或阿尔兹海默症。

70. 根据权利要求 69 所述的应用, 其中, 所述病毒感染包括甲肝、乙肝、丙肝、SARS-Cov-2、HIV、HPV、流感、天花或梅毒。

40 71. 根据权利要求 69 所述的应用, 其中, 所述癌症包括肝癌、胶质瘤、黑色素瘤、肺癌、胰腺癌或乳腺癌。

72. 根据权利要求 65 所述的应用, 其中, 所述药剂为疫苗。

73. 根据权利要求 65 或 72 所述的应用, 其中, 所述药剂的给药途径包括鞘内注射、肌肉给药、颅内注射、静脉注射或瘤内注射。

45 74. 一种含有权利要求 1 至 19 任一项所述金属-磷脂复合物或权利要求 27 至 48 任一项所述金属-磷脂复合物颗粒或权利要求 50 至 54 任一项所述药物-脂质颗粒的

剂。

75. 根据权利要求 74 所述的药剂, 其中, 所述药剂为疫苗。

76. 根据权利要求 75 所述的药剂, 其中, 所述疫苗为新型冠状病毒疫苗。

77. 权利要求 1 至 19 任一项所述金属-磷脂复合物或权利要求 27 至 48 任一项所述金属-磷脂复合物颗粒或权利要求 50 至 54 任一项所述药物-脂质颗粒或权利要求 74 至 76 任一项所述的药剂在预防/治疗哺乳动物的疾病或病症中的应用。

78. 根据权利要求 77 所述的应用, 其中, 所述哺乳动物为人。

79. 根据权利要求 77 所述的应用, 其中, 所述疾病或病症与基因的表达相关, 所述基因包含药物的靶序列。

80. 根据权利要求 77 所述的应用, 其中, 所述疾病或病症包括癌症、病毒感染、自身免疫性疾病、糖尿病或阿尔兹海默症。

81. 根据权利要求 80 所述的应用, 其中, 所述病毒感染包括甲肝、乙肝、丙肝、SARS-Cov-2、HIV、HPV、流感、天花或梅毒。

82. 根据权利要求 80 所述的应用, 其中, 所述癌症包括肝癌、胶质瘤、黑色素瘤、肺癌、胰腺癌或乳腺癌。