



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101087527 B

(45) 授权公告日 2012. 01. 18

(21) 申请号 200580044486. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2005. 10. 21

A01N 43/04 (2006. 01)*C07H 21/04* (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/621, 552 2004. 10. 22 US

11/151, 976 2005. 06. 14 US

11/151, 893 2005. 06. 14 US

(56) 对比文件

US 2003203356 A1, 2003. 10. 30, 全文.

US 2004204420 A1, 2004. 10. 14, 全文.

US 6506559 B1, 2003. 01. 14, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 06. 22

审查员 于保华

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/038269 2005. 10. 21

(87) PCT申请的公布数据

W02006/062596 EN 2006. 06. 15

(73) 专利权人 南阿拉巴马州医药科学基地

地址 美国阿拉巴马州

(72) 发明人 赛伦·巴勒克

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

权利要求书 1 页 说明书 27 页

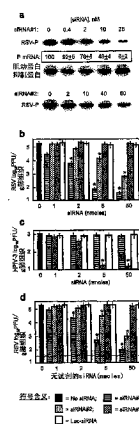
序列表 7 页 附图 4 页

(54) 发明名称

RSV、PIV 和其它呼吸道病毒的 RNAi 调节及其用途

(57) 摘要

本发明基于如下体内存在的事实,即鼻内施用 RNAi 试剂以及肠胃外施用该试剂可以抑制 RSV 和 PIV。而且本发明显示了针对一种以上病毒的同时治疗可以有效地降低病毒。基于这些发现,本发明提供了通常的和特定的用于降低受试者体内 RSV 或 PIV mRNA 水平、RSV 或 PIV 蛋白水平和病毒效价的组合物和方法,所述受试者例如为哺乳动物,如人。这些发现可以应用于其它呼吸道病毒。



1. 第一 siRNA 试剂和第二 siRNA 试剂的组合在制备鼻内施用的用于降低受试者呼吸道细胞中的 RSV 病毒和 PIV 病毒的病毒效价水平的药物中的用途,其中所述第一 siRNA 试剂包含由序列号 4 的序列构成的有义链和由序列号 3 的序列构成的反义链,所述第二 siRNA 试剂包含由 21-23 个连续核苷酸构成的有义链,其中至少 19 个核苷酸与序列号 10 的序列相同,和由 21-23 个连续核苷酸构成的反义链,其中至少 19 个核苷酸与序列号 9 的序列相同,且所述第二 siRNA 试剂的所述反义链的 19-21 个连续核苷酸与来自 PIV 的靶 RNA 互补。

2. 根据权利要求 1 的用途,其中所述 siRNA 试剂是通过吸入或喷雾而施用。

3. 根据权利要求 1 的用途,其中所述第二 siRNA 试剂的所述反义链由序列号 9 的序列构成,且所述第二 siRNA 试剂的所述有义链由序列号 10 的序列构成。

4. 根据权利要求 3 的用途,其中所述 siRNA 试剂是通过吸入或喷雾而施用。

5. 第一 siRNA 试剂和第二 siRNA 试剂的组合在制备鼻内施用的用于降低受试者呼吸道细胞中的 RSV 病毒和 PIV 病毒的病毒效价水平的药物中的用途,其中所述第一 siRNA 试剂包含由 21-23 个连续核苷酸构成的有义链,其中至少 19 个核苷酸与序列号 4 的序列相同,和由 21-23 个连续核苷酸构成的反义链,其中至少 19 个核苷酸与序列号 3 的序列相同,且所述第一 siRNA 试剂的所述反义链的 19-21 个连续核苷酸与来自 RSV 的靶 RNA 互补;所述第二 siRNA 试剂包含由 21-23 个连续核苷酸构成的有义链,其中至少 19 个核苷酸与序列号 10 的序列相同,和由 21-23 个连续核苷酸构成的反义链,其中至少 19 个核苷酸与序列号 9 的序列相同,且所述第二 siRNA 试剂的所述反义链的 19-21 个连续核苷酸与来自 PIV 的靶 RNA 互补。

6. 根据权利要求 5 的用途,其中所述 siRNA 试剂是通过吸入或喷雾而施用。

RSV、PIV 和其它呼吸道病毒的 RNAi 调节及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及呼吸道病毒治疗领域以及用于调控病毒复制的组合物和方法,特别涉及由寡核苷酸经由 RNA 干扰对呼吸道病毒的某个基因(多个)的下调,其中所述寡核苷酸通过吸入/鼻内被局部施用到肺部和鼻通道或经由注射/脉内被施用到全身。

背景技术

[0002] 呼吸道的天然功能要求其暴露于大量能够引起各种呼吸疾病的空气传播病原体。在发达国家,呼吸道病毒感染是婴儿住院治疗的最普遍原因,在美国预计每年有 91,000 人因此住院,花费 3 亿美元。人呼吸道合胞病毒(RSV)和副流感病毒(PIV)是呼吸道疾病的两个主要因素。同时,它们感染上下呼吸道,导致哮喘、肺炎和细支气管炎(Openshaw, P. J. M. . Respir. Res. 3(Suppl 1), S15-S20(2002), Easton, A.J., et al., Clin. Microbiol. Rev. 17, 390-412(2004))。一岁以下婴儿仅 RSV 感染就达到了 65%,两岁以下的所有儿童基本上都被感染。在老年人中它也是发病和死亡的主要原因。RSV 感染后的免疫既不完全又不持久,因此在所有的年龄组都存在反复感染。经历 RSV 细支气管炎的婴儿在其生命的晚期很可能发展成哮喘和哮喘。对 RSV 的有效治疗和疫苗的研究在近四十年已经取得了一些成果(Openshaw, P. J. M. . Respir. Res. 3(Suppl 1), S15-S20(2002), Maggon, K. et al., Rev. Med. Virol. 14, 149-168(2004))。但目前仍没有一种针对 RSV 或 PIV 的疫苗在临床中是有效的。两种病毒的株系也存在于非人类的动物中,例如牛、山羊、猪和绵羊,农业、牛奶场和肉类加工业因此遭到了重大损失(Easton, A. J., et al., Clin. Microbiol. Rev. 17, 390-412(2004))

[0003] RSV 和 PIV 都包含非节段性的负链 RNA 基因组(nonsegmented negative-strand RNA genome)并且属于 Paramyxoviridae 科。这些病毒的许多特征都增加了对它们预防和治疗的困难。由于 RNA 基因组缺乏复制校阅机制所以病毒基因组会高速突变,这给可靠疫苗或抗病毒药的设计提出了重大的挑战(Sullender, W. M. Clin. Microbiol. Rev. 13, 1-15(2000))。有希望的 RSV 融合蛋白质(F)的抑制剂被放弃,其中部分原因为病毒发展了绘制到 F 基因的抗性突变(Razinkov, V, et al., Antivir. Res. 55, 189-200(2002), Morton, C. J. et al. Virology 311, 275-288(2003))。两种病毒与细胞蛋白质的联合增加了获得用于疫苗接种的无细胞病毒材料的困难(Burke, E., et al., Virology 252, 137-148(1998), Burke, E., et al., J. Virol. 74, 669-675(2000), Gupta, S., et al., J. Virol. 72, 2655-2662(1998))。最后,这两种病毒,尤其是 RSV 的免疫学非常的复杂(Peebles, R. S., Jr, et al., Viral. Immunol. 16, 25-34(2003), Haynes, L. M., et al., J. Virol. 77, 9831-9844(2003))。变性的 RSV 蛋白质作为疫苗的使用导致“免疫强化”或疫苗增强疾病(vaccine-enhanced disease)(Polack, F. P. et al. J. Exp. Med. 196, 859-865(2002)),并且该现象对于 PIV 既没有测试到也没有被排除。最近结束的许多抗 RSV 生物药物方案强调了所有问题。

[0004] RSV 基因组包含单股负链 RNA(single strand of negative sense RNA),该 RNA

长度为 15,222 个核苷酸并能产生 11 个主要蛋白质。(Falsey, A. R., and E. E. Walsh, 2000, *Clinical Microbiological Reviews* 13:371-84.) 这些蛋白质中的两个, F(融合) 和 G(附着) 糖蛋白是主要的表面蛋白并且是诱导保护性免疫的最重要的蛋白。SH(小分子疏水) 蛋白、M(基质) 蛋白、和 M2(22kDa) 蛋白与病毒包膜相关但不诱导保护性免疫反应。N(主要核壳关联蛋白)、P(磷蛋白) 和 L(主要聚合酶蛋白) 蛋白质与病毒体 RNA 相关。两个非结构蛋白, NS1 和 NS2, 估计参与宿主-病毒交互作用, 但不存在于感染性病毒体中。

[0005] 人 RSV 株系被分成两大类, A 和 B。已经发现 G 糖蛋白在 RSV 蛋白中是最不同 (divergent)。两类 RSV 之间或之内的 RSV G 糖蛋白的变异性确信对于 RSV 引起疾病年度爆发的能力是重要的。G 糖蛋白包含 289-299 个氨基酸 (根据 RSV 株系), 并且具有细胞内、跨膜、和高度糖基化的 90kDa 的柄结构 (stalk structure), 还有肝素结合结构域。糖蛋白以分泌和结合有膜的形式存在。

[0006] 目前还没有治疗 RSV 感染的成功方法 (Maggon and Barik, 2004, *Reviews in Medical Virology* 14:149-68)。在大部分情况下 RSV 引起的下呼吸道感染是自限性疾病。对于具有疾病的婴儿和儿童如何治疗或何时入院或出院没有确定的指导方针或规范。与 RSV 感染有关的缺氧可以通过鼻套管用氧气治疗。对呼吸衰竭、休克、或复发呼吸暂停的儿童进行机械换气能够降低死亡率。一些医师的处方使用了类固醇。然而, 许多研究已经显示类固醇治疗不能对具有细支气管炎入院的婴儿和儿童的临床疗程产生效果。这样, 单独使用皮质甾类或与支气管扩张药联合使用可能对除了健康的通气不畅的患者之外的细支气管炎的治疗是无效的。在具有如下潜在心肺疾病的婴儿和儿童中, 如支气管肺性语言障碍症 (bronchopulmonary dysphasia) 和哮喘, 也已经使用类固醇。

[0007] 自从 1980 年代中期, 具有抗病毒活性的鸟苷类似物利巴韦林也被用于治疗患有 RSV 细支气管炎的婴儿和儿童, 但许多研究已经评价它的使用已经显示出不一致的结果。在大部分中心, 现在已经限制利巴韦林用于免疫妥协患者和那些具有严重疾病的患者。

[0008] RSV 细支气管炎的严重程度已经与低血清视黄醇浓度相关联, 但是对就医的 RSV 细支气管炎儿童的试验已将显示出维生素 A 的补充没有提供有益效果。对于 RSV 的下呼吸道感染进行静脉注射 1500mg/kg RSV 免疫球蛋白或吸入 100mg/kg 免疫球蛋白的治疗试验也没有显示出实质上有益效果。

[0009] 在发达国家, RSV 下呼吸道感染的治疗一般限制于症状治疗。因为高费用和缺乏效果一致性, 抗病毒治疗通常限于生命危机的情况。在发展中国家, 输氧是主要疗法 (当可以利用时), 并且是通过预防降低死亡率的唯一方式。

[0010] RNA 干扰或 “RNAi” 是最初由 Fire 与其同事创造的术语, 用于描述观察到的双链 RNA (dsRNA) 引入蠕虫时能够阻碍基因表达 (Fire et al, *Nature* 391:806-811, 1998)。在许多生物体中, 包括脊椎动物, 短 dsRNA 指导基因特异的转录后沉默, 并提供了一种新的研究基因功能的工具。RNAi 已经被建议作为开发新一类治疗剂的方法。然而, 到目前为止, 由于没有 RNAi 能够用于治疗的证据, 该方法通常是个建议。

[0011] 因此, 需要一种针对 RSV 的安全和有效的疫苗, 尤其是对婴儿和儿童的安全和有效的疫苗。还需要用于治疗所有年龄阶段的 RSV 感染和免疫妥协个体的试剂和方法。还需要一种科学的方法以表征对 RSV 的保护性免疫应答, 这样可以研究疾病的发病机制, 并有利于筛选可用的治疗剂和疫苗。本发明克服了目前该领域存在的缺陷, 其是通过提供有效

调制或预防 RSV 和 PIV 甚至其它呼吸道病毒感染的方法和组合物而实现的。特别是本发明通过提供已经显示出降低体内 RSV 和 PIV 水平的 iRNA 试剂和这类分子治疗活性的展示发展了该领域。而且本发明证明了一种以上的病毒能够同时治疗。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明基于鼻内施用 RNAi 试剂以及肠胃外施用该试剂可抑制 RSV 和 PIV 的体内证据。而且,本发明显示了同时使用两种不同的 iRNA 试剂治疗处理一种以上的病毒能够有效地降低病毒效价。基于这些发现,本发明提供了通常的和特定的组合物和方法用于降低受试者如哺乳动物例如人的 RSV 或 PIV mRNA 水平、RSV 或 PIV 蛋白水平以及 RSV 和 PIV 病毒效价。这些发现可被应用于其它呼吸道病毒。

[0014] 本发明特别提供了 iRNA 试剂,该试剂的组成为或包含有 RSV、PIV 或其它呼吸道病毒基因之一的基因中的 15 个连续核苷酸,特别是 RSV 或 PIV 的 P 基因和 RSV 的 N、G、F、SH、M 和 L 基因。iRNA 试剂优选每条链包含少于 30 个核苷酸,例如 21-23 个核苷酸。双链 iRNA 试剂或者具有平末端或者更优选在试剂的一个或两个 3' 末端具有 1-4 个核苷酸的突出端。

[0015] 而且, iRNA 试剂或者仅包含天然存在的核糖核苷酸亚单位、或者可通过合成以包含一个或多个位于该试剂的核糖核苷酸亚单位的糖或碱基上的修饰。也可以进一步修饰 iRNA 试剂使其粘附到配体上,该被选择的配体是用于改进试剂的稳定性、分布或对例如胆固醇的试剂的细胞吸收。进一步地, iRNA 可以是被分离出的单独形式或是作为药物组合物的一部分用于本文描述的方法,特别是作为配制可递送到肺部或鼻道的药物组合物或配制成胃肠道外给药剂型的药物组合物。药物组合物可以包含一种或多种 iRNA 试剂,并且在一些实施方案中,可以包含两种或多种 iRNA 试剂,其中,每种针对不同的呼吸道病毒,例如 RSV 和 PIV。

[0016] 本发明进一步提供了一种降低细胞中 RSV、PIV 或其它呼吸道病毒 mRNA 的方法。本发明的方法利用 RNA 干扰相关的细胞机制选择性地降低细胞中病毒 mRNA,其包含用本发明的抗病毒 iRNA 试剂中的一种接触细胞的步骤。该方法可以直接实施于细胞或通过本发明的 iRNA 试剂 / 药物组合物中的一种施用于受试者而作用于哺乳动物受试者。细胞中病毒 mRNA 的降低导致病毒蛋白产量的降低,并且在生物体中,导致复制病毒效价的降低。实施例用 PIV 和 RSV 证明了这个结论,并且该结论可以扩展到其它呼吸道病毒。

[0017] 本发明进一步提供了降低细胞中两种或多种呼吸道病毒 mRNA 水平的方法,每种 mRNA 来自不同的病毒。该方法利用 RNA 干扰相关的细胞机制选择性地降低细胞中不同病毒 mRNA,其包含用本发明的两种抗病毒 iRNA 试剂接触细胞的步骤。该方法可以直接实施于细胞或将本发明的两种 iRNA 试剂施用于受试者而作用于哺乳动物受试者。细胞中的两种病毒 mRNA 的降低导致两种病毒蛋白产量的降低,并且生物体中,导致两种病毒的复制病毒效价的降低。实施例用 PIV 和 RSV 以及同时施用多种 iRNA 试剂证明了这个结论。本发明的该实施方案可以应用于任何两种呼吸道病毒。

[0018] 对于本发明的方法和组合物,例如所述方法和 iRNA 组合物,可以以本文描述的任何剂量和 / 或配方,以及本文描述的任何给药方式而使用。特别重要的是本文显示了 iRNA 试剂的鼻内给药,以及其在呼吸组织中抑制病毒复制的能力。该发现可以应用于其它呼吸道病毒,如实施例中显示的 PIV,也可应用其它方式局部递送到肺部,如通过吸入 / 喷雾法。

[0019] 本发明的一个和多个实施方案的详细描述参考下面的附图和附图描述进行。本发

明的其它的特征、目标和优点将通过说明书、附图、和权利要求的描述更加清楚。本申请以引用方式全文并入所有引证参考、专利、和专利申请的全部内容。

[0020] 附图简述

[0021] 图 1. 先体外后体内 (ex vivo) 的抗病毒 siRNA 滴定。(a) RSV 感染的 A549 细胞 (先体外后体内) 全蛋白免疫印迹分析, 用肌动蛋白抑制蛋白 (profilin) 作为内部对照。方框中的数字表示 siRNA 处理后的靶 PmRNA 水平, 其表示为占未治疗水平的百分数。在下面的三个组中, 施用 siRNA 后 4 小时接种病毒。(b) RSV 感染的小鼠中的肺感染病毒 (每个数据点 $n = 8$), (c) HPIV3 感染的小鼠中的肺感染病毒 (每个数据点 $n = 8$)。 (d) 与 (b) 相同, 但除了无转染试剂下施用 siRNA 之外。星号表示显著抑制 ($P < 0.05$)。siRNA 描述在表 1 中。

[0022] 图 2. 在 siRNA 治疗的鼠肺中病毒抗原在无 IFN 激活下被击倒。a) 施用 siRNA 后 4 小时接种病毒, 接种 4 天后 (4 days p.i.) 通过肺间接免疫组织学检测病毒抗原 (绿色, RSV; 红色, HPIV3)。 (1) 假性感染, 用 RSV 抗体探测; (2-6) RSV 感染, 用 RSV 抗体探测; (7-8) HPIV3 感染, 用 HPIV3 抗体探测。然后使用 siRNA (5nmole, 约 $70 \mu g$): (1, 2) 无; (3) siRNA#1 加上 TransIT-TKO 试剂; (4) siRNA#1, 无试剂; (5) 阴性对照 siRNA 加上 TransIT-TKO 试剂; (6) luc-siRNA 加上 TransIT-TKO; (7) 无; (8) siRNA#4 加上 TransIT-TKO。代表的肺组织是接种 5 天 (5 days p.i.) (Bar = 400um)。 (b) 在施用 siRNA 后 2 天, 使用 RSV P DNA 作为探针, 通过不同量的肺组织总 RNA 印迹分析检测 siRNA#1 的反义链。针对 RSV NS1 的探针没有反应, 显示了检测的特异性。 (c) IN siRNA (每只鼠 10nmole 或 $140 \mu g$) 没有激活高于检测阈值 (约 $10pg/ml$) 的类型 I (IFN- α) 或类型 II (IFN- γ) 的肺 IFN, 然而, 在对照肺中, RSV 感染激活了类型 II 和低水平的类型 I。泳道: 1, siRNA#1; 2, siRNA#4; 3, Luc siRNA; 4, 无 siRNA 但有 RSV 感染 (显示误差范围)。siRNA 被施用后 2 天和感染后 4 天获取肺 (每个图中 $n = 4$)。 (d) 通过间接免疫组织学测量 siRNA 介导的 RSV 和 HPIV3 的双感染抑制 (绿色, RSV; 红色, HPIV3)。 (1, 5) 无 siRNA; (2, 6) siRNA#1, 5 纳摩尔 ($70 \mu g$); (3, 7) siRNA#4, 5 纳摩尔 ($70 \mu g$); (4, 8) siRNA#1 和 siRNA#4, 每个 5 纳摩尔。 (1-4) 用 RSV 抗体探测; (5-8) 用 HPIV3 抗体探测。施用 siRNA 4 小时后接种病毒, 并且接种 4 天后检查肺组织 (Bar = 400um)。

[0023] 图 3. RSV 和 HPIV3 双感染下高浓度 siRNA 的竞争性病毒抑制。 (a) 实时 PCR (体外); (b) 免疫印迹 (体外); (c) 用羊抗病毒抗体进行的肺免疫印迹。定量各个病毒 N 蛋白带强度并表示为无 siRNA 治疗肺样品的百分含量。施用 siRNA 后 4 小时接种病毒, 并且在接种 5 天后检查 (对于每个数值点, $n = 4$) 肺组织。黑条, RSV; 白条, HPIV3。显示了标准误差。

[0024] 图 4. siRNA#1 治疗的鼠体内肺病理的减轻和哮喘标记的降低, (a) 呼吸速率; (b) 肺组织病理; (c) 白细胞三烯。在所有分析中 $P < 0.002$; 对于每个数据点, $n = 4$; 显示了标准误差。施用 siRNA 后 4 小时接种病毒 ($70 \mu g$)。阴性对照 siRNA 治疗的小鼠与未用 siRNA 治疗的之间没有差别 (未显示数据)。

[0025] 图 5. RSV 疾病的 siRNA 治疗效果。小鼠的 RSV 感染期间 (a) 体重和 (b) 肺病毒效价的改变。显示了标准误差; 对于每个数据点, $n = 6$ 。箭头表示施用 siRNA ($70 \mu g$) 的日期。

[0026] 发明详述

[0027] 为方便理解,本文有时使用的术语“核苷酸”或“核糖核苷酸”是指 RNA 试剂的一个或多个单体亚单位。应当理解的是,在修饰的 RNA 或核苷酸替代物的情况下,本文所用的术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”也指修饰的核苷酸、或替代物替换部分,如下面的一处或多处所作的描述。

[0028] 本文所用的“RNA 试剂”是未修饰的 RNA、修饰的 RNA 或核苷替代物,它们均在本文有所描述或在 RNA 合成领域是熟知的。当描述多个修饰的 RNA 和核苷替代物时,优选的实例包括比未修饰的 RNA 具有更强的抵抗核酸酶降解能力的那些 RNA。优选的实例包括具有如下修饰的 ARNA:2' 糖修饰、单链突出端的修饰,优选 3' 单链突出端的修饰,或,尤其是,如果是单链,包括一个或多个磷酸基团或一个或多个磷酸基团类似物的 5' 修饰。

[0029] 本文中,有时际作“RNAi 试剂”的“iRNA 试剂”(“干扰 RNA 试剂”的缩写)是 RNA 试剂,其能够下调目标基因如 RSV 的表达。不期望受到理论的限制,iRNA 试剂可以通过一个或多个机制作用,包括靶 mRNA 的转录后切割,该 mRNA 在本领域有时是指 RNAi,或转录前或翻译前机制。iRNA 试剂可以包括一个单链或可以包括一个以上的单链,例如其可以是双链(ds)iRNA 试剂。如果 iRNA 试剂是单链,那么其特别是优选包括 5' 修饰,该 5' 修饰包括一个或多个磷酸基团或一个或多个磷酸基团类似物。

[0030] 本文的“单链 iRNA 试剂”是单分子组成的 iRNA 试剂。其可以包括通过链内配对形成的双链区,例如其可以是,或包括发夹结构或锅柄结构。单链 iRNA 试剂优选反义于靶分子。

[0031] 本文的“ds iRNA 试剂”(“双链 iRNA 试剂”的缩写)是包括多于一个,优选 2 个链的 iRNA 试剂,其链间杂交可形成双链区。

[0032] 本文描述的包括 ds iRNA 试剂和 siRNA 试剂的分离出的单独 iRNA 试剂可以介导靶基因的沉默,例如通过 RNA 降解。方便起见,该 RNA 在本文也指被沉默的 RNA。这样的基因也指靶基因。优选地,被沉默的 RNA 是内源 RSV 基因的产物。

[0033] 如本文所用,短语“介导 RNAi”是指试剂以序列特异性方式沉默靶基因的能力。“沉默靶基因”是一种过程,当不与试剂接触的时候,细胞包含和/或分泌基因的某些产物,当与试剂接触的时候,与不接触试剂的相似细胞相比,细胞包含和/或分泌至少少于 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或 90% 的该基因产物。该靶基因的产物,例如,可以是信使 RNA(mRNA)、蛋白或调控元件。

[0034] 在本发明的抗病毒用途中,靶基因的沉默将导致细胞中病毒效价降低。如本文所用,“病毒效价降低”是指细胞产生的或在经受病毒靶基因沉默的生物体中发现的存活病毒数量降低。细胞的病毒生成量的减少将首先导致经过治疗的受试者的组织中产生的可测量病毒量的减少和病毒感染症状程度的减轻。本发明的 iRNA 试剂也称作“抗病毒 iRNA 试剂”。

[0035] 如本文所用,“RSV 基因”是指在 RSV 病毒基因组中所鉴别的任一个基因(参见 Falsey, A. R., and E. E. Walsh, 2000, *Clinical Microbiological Reviews* 13:371-84)。这些基因在本领域易于得知,它们包括 F、G、SH、M、N、P 和 L 基因。

[0036] 如本文所用,“PIV 基因”是指在 PIV 病毒基因组中所鉴别的任一个基因(参见 GenBank Accession #NC 001796)。这些基因在本领域易于得知,它们包括 N、P、C、D、V、M、F、HN 和 L 基因。

[0037] 如本文所用,“呼吸道病毒”是指在呼吸系统细胞内复制的病毒。这些病毒包括,但不限于 RSV、PIV、流感病毒、偏肺病毒、腺病毒、和冠状病毒(如 SARS)。

[0038] 如本文所用,术语“互补”用于表示充分的互补,以致于本发明的化合物和靶 RNA 分子,如 RSV、PIV 或其它呼吸道病毒 mRNA 分子之间发生稳定和特异性的结合。特异性结合需要互补充分,以避免低聚化合物与非靶序列在特异性结合所需的条件下的非特异性结合,该条件也就是在体内分析或治疗性处理下的生理条件,或体外分析时进行分析的条件。非靶序列一般至少具有 4 个核苷酸的差异。

[0039] 如本文所用,如果 iRNA 试剂降低了细胞中靶 RNA 编码的蛋白的生成量,那么 iRNA 试剂就充分地互补于靶 RNA,例如靶 mRNA(例如靶 RSV 或 PIVmRNA)。iRNA 试剂也可以“严格地互补”(排除包含亚单位(一个或多个)的 SRMS)于靶 RNA,例如靶 RNA 和 iRNA 试剂退火优选形成杂交体,该杂交体均是由严格互补区内的 Watson-Crick 碱基对形成。“充分互补”的 iRNA 试剂可以包括严格互补于靶病毒 RNA 的内部区域(例如至少 10 个核苷酸的区域)。而且,在一些实施方案中,iRNA 试剂特异地识别单核苷酸的差异。在该情况下,如果发现严格互补发生在此区域(例如单核苷酸差异在 7 个核苷酸以内),那么 iRNA 试剂仅介导 RNAi。优选的 iRNA 试剂将基于或包含实施例提供的有义和反义序列,或由实施例提供的有义和反义序列组成。

[0040] 如本文所用的,当涉及第一个核苷酸序列和第二核苷酸序列比较的时候,“基本相同”是指第一核苷酸序列和第二核苷酸序列除了至多一个、两个或三个核苷酸取代(例如用尿嘧啶取代腺苷)外其它都相同。

[0041] 如本文所用的,“受试者”是指由于病毒表达如 RSV 或 PIV 感染而患病并接受治疗的或是被预防性处理以防止病毒感染的哺乳动物生物体。受试者可以是任何哺乳动物,如灵长目动物、牛、马、小鼠、大鼠、狗、猪、羊。在优选的实施方案中,受试者是人。

[0042] 如本文所用的,治疗 RSV 感染、PIV 感染或其它的呼吸道病毒感染是指任何生物学终点或病理学终点的改善,其中所述终点是指 1) 部分由于受试者中存在的病毒所介导,和 2) 其结果可受病毒蛋白存在水平降低的影响。

[0043] 如本文所用的,“联合施用”是指给受试者施用两种或多种试剂,尤其是两种或多种 iRNA 试剂。试剂可以包含于单一的药物组合物中并同时施用,或试剂包含在分开的剂型中并相继施用于受试者。只要两种试剂能够在受试者体内同时被检测到,两种试剂就可以说是联合施用。

[0044] 在许多情况下因为介导沉默的 iRNA 试剂可以在施用 iRNA 试剂组合物后维持几天,所以可以每天少于一次的频率施用该组合物,或,对于一些情况,在整个治疗方案中仅施用一次。

[0045] iRNA 试剂的设计和选择

[0046] 本发明基于如下的证明,即局部施用 iRNA 试剂到肺和鼻通道后,体内呼吸道病毒基因中的靶基因被沉默,从而导致病毒感染得到治疗,其中所述施用是通过鼻内施药/吸入或通过注射进行系统/非肠胃给药。本发明进一步将 iRNA 试剂的用途扩展到一种以上的呼吸道病毒,并且使用两种或多种试剂联合给药同时治疗两种病毒感染。

[0047] 基于这些结果,本发明特别提供了能够用于治疗病毒感染、特别是呼吸道病毒和特别是 RSV 或 PIV 感染的 iRNA 试剂,该试剂是分离出的单独形式或作为下述的药物组合

物。该试剂包括具有互补于病毒基因的至少 15 个连续核苷酸的有义链和具有互补于有义链序列的至少 15 个连续核苷酸的反义链。特别有益的试剂是包含来自 RSV 或 PIV 的 P 蛋白基因的核苷酸序列的 iRNA 试剂。RSV 中的其它靶基因包括 F, G, SH, M, N 和 L。PIV 中的其它基因包括 N, P, C, D, V, M, F, HN 和 L 基因。在表 1 中提供了示例试剂。

[0048] 候选的 iRNA 试剂可以通过执行,例如,要作为 iRNA 靶点的病毒基因的基因步查分析来设计。可以生产和测试相应于所有或部分转录区的重叠、毗连、紧密间隔 (closely spaced) 的候选试剂。可以测试和分析每个 iRNA 试剂下调目标基因表达的能力 (参加下面“候选 iRNA 试剂的分析”)。

[0049] 可以根据序列信息和所需特性合理地设计 iRNA 试剂。例如,可以根据候选双链体的相关变性温度设计 iRNA 试剂。一般地,双链体的反义链的 5' 末端比其反义链的 3' 末端具有较低的变性温度。

[0050] 因此,本发明提供了包含有义链和反义链的 iRNA 试剂,每个链包含至少 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 或 23 个核苷酸序列,如上所述,该序列与来自呼吸道病毒的基因、特别是 RSV 或 PIV 的 P 蛋白基因的部分基本相同。示例 iRNA 试剂包含来自表 1 提供的一个试剂中的且含有 15 个连续核苷酸的那些。

[0051] iRNA 试剂的反义链长度应该等于或至少是 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40 或 50 个核苷酸。其长度应该等于或至少 50, 40 或 30 个核苷酸。优选的长度范围是 15-30, 17-25, 19-23, 和 19-21 个核苷酸。在多个实施方案中,试剂应该包含来自表 1 的一个试剂的 15 个核苷酸。

[0052] iRNA 试剂的有义链的长度应该等于或至少是 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40 或 50 个核苷酸。其长度应该等于或至少 50, 40 或 30 个核苷酸。优选的长度范围是 15-30, 17-25, 19-23, 和 19-21 个核苷酸。在多个实施方案中,试剂应该包含来自表 1 的一个试剂的 15 个核苷酸。

[0053] iRNA 试剂的双链部分的长度应该等于或至少是 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 40 或 50 个核苷酸对。其长度应该等于或至少 50, 40 或 30 个核苷酸对。优选的长度范围是 15-30, 17-25, 19-23, 和 19-21 个核苷酸对。

[0054] 表 1 中提供的试剂的每个链长度为 21 个核苷酸。iRNA 试剂包含 19 个核苷酸双链区,试剂的双链区的每个 3' 末端具有 2 个核苷酸突出。如本文所述,这些试剂能够被修饰以获得至少包含这些序列的一部分或 / 和寡核苷酸碱基和连接子的修饰的等同物。

[0055] 一般地,本发明的 iRNA 试剂包含充分互补于病毒基因,如 RSV 或 PIV 的 P 蛋白的区域,并且就核苷酸而言足够长,这样,iRNA 试剂或其片段能够介导特异性病毒基因的下调节。本发明 iRNA 试剂的反义链优选完全互补于病毒基因的 mRNA 基因,如本文的 RSV 或 PIV 的 P 蛋白的 mRNA 基因。然而,iRNA 试剂和靶之间没有必要完全互补,但是它们之间应具有足够的一致性以使得 iRNA 试剂或其切割产物能够控制序列特异性沉默,例如通过对 RSV mRNA 的 RNAi 切割。

[0056] 这样,本发明的 iRNA 试剂包含有义链和反义链,每个链包含至少有 16, 17 和 18 个核苷酸的序列,如上所述,除了每个链上少于 1, 2 或 3 个核苷酸分别被其它核苷酸取代 (如尿嘧啶取代腺苷) 外,该序列与病毒基因、特别是 RSV 或 PIV 的 P 蛋白基本上相同,同时其基本上保留抑制培养人细胞中的 RSV 表达,如下详细说明。因此,除了引入相对于目标病

毒 mRNA 序列或在有义链和反义链之间的 1,2 或 3 个碱基错配外,这些试剂将与病毒基因、特别是 RSV 或 PIV 的 P 蛋白基因序列中的一个具有至少 15 个核苷酸相同。末端区域的相对于目标病毒 mRNA 序列的错配最易被接受,尤其是在反义链中,而且,如果有错配出现的话,优选存在于 1 个末端区域或多个末端区域,例如在 5' 和 / 或 3' 末端的 6,5,4,或 3 个核苷酸中,最优选是在有义链的 5' 末端或反义链的 3' 末端的 6,5,4,或 3 个核苷酸中。有义链仅需要充分互补于反义链以维持分子的整体双链特性。

[0057] 优选的是,选择有义链和反义链以致于 iRNA 试剂的分子一端或两端包含单链或未配对区域,例如表 1 中示例的那些。这样,iRNA 包含有义链和反义链,优选它们配对后具有突出,例如一个或两个 5' 或 3' 突出,但优选 2-3 个核苷酸的 3' 突出。最优选的实施方案是具有 3' 突出。优选 siRNA 试剂具有单链突出,优选在 siRNA 试剂的一个或两个末端具有长度为 1-4 个、或优选 2 或 3 个核苷酸的 3' 突出。突出是一个链长于另一个链得到的,或相同的两条链错开后得到的。5' 末端优选被磷酸化。

[0058] 优选双链区的长度为 15-30,更优选为 18,19,20,21,22,和 23 个核苷酸长,例如,如上讨论的 siRNA 试剂范围。在其中的一个实施方案中,siRNA 试剂的两条链被连接,例如还包括共价连接。发夹或其它提供所需双链区的单链结构、以及优选的 3' 突出也在本发明的范围内。

[0059] 候选 iRNA 试剂的评价

[0060] 评价候选 iRNA 试剂下调靶基因表达的能力。例如,提供候选 iRNA 试剂,然后将其与细胞接触,例如人细胞,该细胞已经被目标病毒感染或将被感染,所述病毒例如为含靶基因的病毒。可选择的,细胞被表达靶病毒基因的构建体转染,这样不再需要病毒感染性模型。将与候选 iRNA 试剂接触前后的靶基因表达水平进行比较,例如对 mRNA、蛋白水平或病毒效价进行比较。如果与 iRNA 试剂接触后所测量的 RNA、蛋白或靶基因的病毒表达降低,则可以总结出 iRNA 试剂下调靶基因表达。细胞中靶病毒 RNA 或病毒蛋白水平或细胞中的病毒效价可以通过任何想到的方法测量。例如可以通过 RNA 印迹分析、反转录酶-聚合酶链式反应 (RT-PCR)、bDNA 分析、或 RNA 酶保护分析来测量靶 RNA 的水平。蛋白的水平可以通过例如蛋白印迹分析或免疫荧光来测量。病毒效价可以通过空斑形成分析来测量。

[0061] iRNA 试剂的稳定性测试、改进,和再测试

[0062] 评价候选 iRNA 试剂的稳定性,如其对核酸内切酶和核酸外切酶切割的灵敏度,例如当将 iRNA 试剂引入受试者体内时。可以采用鉴别对修饰的敏感位点、尤其是对切割、如受试者体内发现的组分的切割敏感位点的方法。当鉴别到对切割敏感的位点时,进一步设计和 / 或合成 iRNA 试剂,其中潜在切割位点被制备成抗切割,例如在切割位点引入 2' 修饰,例如 2' -O- 甲基。对 iRNA 试剂进一步测试其稳定性,而且该过程可以反复进行直到 iRNA 试剂表现出所需的稳定性。

[0063] 体内测试

[0064] 被鉴定能够抑制 RSV 基因表达的 iRNA 试剂可以在动物模型(例如,哺乳动物,如小鼠或大鼠)体内进行功能测试,如实施例所示。例如,将 iRNA 试剂施用于动物,然后测量 iRNA 试剂的有关生物分布、稳定性、和其抑制病毒,如 RSV 或 PIV 的能力,基因表达或降低病毒效价方面的能力。

[0065] 可将 iRNA 试剂直接施用于目标组织,例如通过注射,或者,可将 iRNA 试剂通过与

将其施用于人相同的方式施用于动物模型。如本文所示,所述试剂优选通过吸入给药来作为治疗病毒感染的手段。

[0066] 也可以评价 iRNA 试剂的细胞内分布。该评价包括测量 iRNA 试剂是否被吸收进入细胞。该评价也可以包括测量 iRNA 试剂的稳定性(如半衰期)。iRNA 试剂的体内评价可以通过使用连接了可追踪标记物(例如荧光标记物,如荧光素;放射性标记,如 ^{35}S 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、或 ^3H ;金颗粒;或用于免疫组织化学的抗原颗粒)的 iRNA 试剂来促进。

[0067] 用于检测生物分布的 iRNA 试剂在体内可以缺少基因沉默活性。例如, iRNA 试剂可以靶向动物中不存在的基因(例如,注射到小鼠中的 iRNA 试剂靶向荧光素酶),或 iRNA 试剂具有非有义链序列,其不靶向任何基因(例如任何的内源基因)。iRNA 的位置和生物分布可以检测,例如通过粘附到 iRNA 试剂上的可追踪标记,如上面所述的可追踪试剂。

[0068] 可以评价 iRNA 试剂下调病毒基因表达的能力。可以测量病毒基因在体内的表达水平,例如,通过原位杂交,或通过从与 iRNA 试剂接触前与接触后的组织中分离出 RNA。为了获得组织,需要宰杀动物,未处理的对照动物用于比较。可以通过所需方法测量靶病毒 mRNA,包括但不限于 RT-PCR, RNA 印迹、支链 DNA 分析、或 RNA 酶保护分析。可选择的,或其它的,可以通过对 iRNA 试剂处理的组织提取物实施蛋白印迹分析来检测病毒基因表达。可以通过使用空斑形成单位测定病毒效价。

[0069] iRNA 化学

[0070] 本文所述的是单独的 iRNA 试剂,例如介导 RNAi 抑制病毒基因表达如 RSV 或 PIV 的 P 蛋白的 RNA 分子(双链;单链)。

[0071] 本文论述的 RNA 试剂包括未修饰的 RNA,同时包括为提高功效而被修饰的 RNA,和核苷替代物的聚合物。未修饰的 RNA 是指分子中的核酸的组分,也就是糖、碱基和磷酸部分与天然存在的分子、优选人体中天然存在的分子相同和基本相同的分子。现有技术中把稀有的或独特的但天然存在的 RNA 称为修饰的 RNA,参见如 Limbach et al., (1994) Nucleic Acids Res. 22:2183-2196。这些稀有的或独特的 RNA,经常称为修饰的 RNA(modified RNA)(很明显,因为这些分子是转录后修饰的结果),是属于所述的未修饰 RNA 的范围。如本文所用,本文所用的修饰的 RNA 是指分子中的核酸的一个或多个组分,也就是糖、碱基、和磷酸部分是不同于天然存在的,优选与人体中存在的不同。当它们被称作修饰的“RNA”时,因为修饰,所以它们当然包括不是 RNA 的分子。核苷替代物是其中的核糖磷酸骨架被非核糖磷酸构建体替换的分子,该非核糖磷酸构建体允许碱基以正确的空间关系呈现,从而使杂交基本相似于与核糖磷酸骨架杂交中所见的杂交,如核糖磷酸骨架的非荷电模拟物。本文论述了上述的每个实例。

[0072] 本文所述的修饰可以实施到任何的双链 RNA 和本文的 RNA 样分子,如 iRNA 试剂。修饰 iRNA 试剂的反义链和有义链中的一个或两个可能是需要的。当核酸是亚单位或单体的聚合物时,下述的许多修饰可以在核酸内的重复位置进行,例如碱基修饰,或磷酸部分修饰,或磷酸部分的未连接的 O 修饰。在许多情况中,修饰可以在核酸分子所有的目标位置发生,但在许多,和实际的大多数情况下并不能发生。通过实施例,修饰可仅发生在 3' 和 5' 末端位置,可仅发生在末端区域,例如在末端核苷酸和在链的最后 2, 3, 4, 5 或 10 个核苷酸。修饰可以在双链区,单链区或两者同时发生。例如,在未连接的 O 位的硫代磷酸酯修饰可仅发生在一个或两个末端,可仅发生在末端区,例如在末端核苷酸位置或在链的最后 2, 3, 4, 5

或 10 个核苷酸,或发生在双链和单链区,尤其是在多个末端。同样地,修饰可以发生在有义链、反义链,或两者。在一些情况下,有义链和反义链将具有相同修饰或相同类别的修饰,但在另外的情况下,有义链和反义链将具有不同的修饰,例如,在一些情况下其可能仅需要修饰一条链,例如有义链。

[0073] 将修饰引入 iRNA 试剂的两个主要目的是生物环境中对降解的稳定性和药理学性质的改进,例如药效学性质,其在下面进一步讨论。对于 iRNA 试剂中的糖、碱基或骨架的其它的适当修饰描述在同时享有的 PCT 申请号 PCT/US2004/01193 中,申请日是 2004 年 4 月 16 日。iRNA 试剂可以包括非天然存在的碱基,例如描述于共同享有的 PCT 申请号 PCT/US2004/011822 中,申请日是 2004 年 4 月 16 日。iRNA 试剂可以包括非天然存在的糖,例如非糖类环载体分子(non-carbohydrate cyclic carrier molecule)。iRNA 试剂中使用的非天然存在糖的示例特征描述在共同享有的 PCT 申请号 PCT/US2004/11829 中,申请日是 2003 年 4 月 16 日。

[0074] iRNA 试剂可以包括用于增强核酸酶抗性的核苷酸间键(例如手性硫代磷酸酯键)。另外,或可选择地,iRNA 可以包括核糖模拟物以增加核酸酶抗性。用于增加核酸酶抗性的示例核苷酸间键和核糖模拟物描述在共同享有的 PCT 申请号 PCT/US2004/07070 中,申请日为 2004 年 3 月 8 日。

[0075] iRNA 试剂可以包括结合配体的亚单位和单体,以用于寡核苷酸的合成。示例性单体描述在共同享有的美国申请号 10/916,185 中,申请日是 2004 年 8 月 10 日。

[0076] iRNA 可以具有 ZXY 结构,例如描述在共同享有的 PCT 申请号 PCT/US2004/07070 中,申请日为 2004 年 3 月 8 日。

[0077] iRNA 试剂可以与两性部分复合,用于 iRNA 试剂的示例性两性部分描述在共同享有的 PCT 申请号 PCT/US2004/07070 中,申请日为 2004 年 3 月 8 日。

[0078] 在另一个实施方案中,iRNA 试剂可以复合到以模块复合物(modular complex)为特征的递送试剂上。复合物包括连接到一个或多个如下(优选是两个或多个,更优选是所有的三个)的载体试剂:(a) 冷凝剂(例如能够吸引,如结合核酸的试剂,如通过离子或静电作用);(b) 融合剂(如能够融合和/或通过细胞膜被转运的试剂);和(c) 靶基团,如细胞或组织的靶向试剂,例如凝集素、糖蛋白,脂质或蛋白,例如结合到特定的细胞类型的抗体。复合到递送试剂的 iRNA 试剂描述在共同享有的 PCT 申请号 PCT/US2004/07070 中,申请日为 2004 年 3 月 8 日。

[0079] iRNA 试剂具有如在 iRNA 双链体中的有义链和反义链序列之间的非规则配对,非规则配对的 iRNA 试剂的示例特征描述在共同享有的 PCT 申请号 PCT/US2004/07070 中,申请日为 2004 年 3 月 8 日。

[0080] 增强的核酸酶抗性

[0081] iRNA 试剂,例如靶向 RSV 的 iRNA 试剂对核酸酶具有增强的抗性。一种增强抗性的方式是鉴定切割位点并修饰该位点以阻止切割。例如,二核苷酸 5' -UA-3', 5' -UG-3', 5' -CA-3', 5' -UU-3', 或 5' -CC-3' 能够作为切割位点。

[0082] 为增强核酸酶抗性和/或对目标的结合亲和力,iRNA 试剂,例如 iRNA 试剂的有义链和/或反义链可以包括,例如,2' 修饰的核糖单位和/或硫代磷酸酯键。例如,2' 羟基(OH)可以被修饰或用许多不同的“氧”或“脱氧”替代物替换。

[0083] “氧”-2' 羟基修饰的示例包括烷氧基或芳氧基 (OR, 例如, R = H, 烷基, 环烷基, 芳基, 芳烷基, 杂芳基或糖); 聚乙二醇 (PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$; 2' 羟基通过亚甲基桥连接到相同核糖的 4' 碳上的“封闭”核酸 (LNA); $O-AMINE$ ($AMINE = NH_2$; 烷基胺, 二烷基胺, 杂环, 芳基胺, 二芳基胺, 杂芳基胺, 或二杂芳基胺, 乙二胺, 多胺) 和氨基烷氧基, $O(CH_2)_nAMINE$ (例如 $AMINE = NH_2$; 烷基胺, 二烷基胺, 杂环, 芳基胺, 二芳基胺, 杂芳基胺, 或二杂芳基胺, 乙二胺, 多胺)。值得注意的是仅包含甲氧乙基 (MOE) 的寡核苷酸, ($OCH_2CH_2OCH_3$, PEG 衍生物), 比用强的硫代磷酸酯修饰的那些表现出核酸酶稳定性。

[0084] “脱氧”修饰包括氢 (也就是脱氧核糖, 其与部分双链 RNA 的突出部分特别关联); 卤素 (如氟); 氨基 (如 NH_2 ; 烷基胺, 二烷基胺, 杂环, 芳基胺, 二芳基胺, 杂芳基胺, 二杂芳基胺或氨基酸); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2-AMINE$ ($AMINE = NH_2$; 烷基胺, 二烷基胺, 杂环, 芳基胺, 二芳基胺, 杂芳基胺或二杂芳基胺), $-NHC(O)R$ ($R =$ 烷基, 环烷基, 芳基, 芳烷基, 杂芳基或糖), 氰基; 巯基; 烷基硫代烷基; 硫代烷氧基; 和烷基, 环烷基, 芳基, 烯基和炔基, 它们可以任选被如氨基官能团取代, 优选取代基是 2'-甲氧基乙基, $T-OCH_3$, 2'-C-烯丙基, 2'-烯丙基, 和 2'-氟。

[0085] 为了最大化核酸酶抗性, 2' 修饰可以同一个或多个磷酸连接修饰 (例如硫代磷酸酯) 结合使用。所谓的“嵌合” (chimeric) 寡核苷酸是包含两个或多个不同修饰的那些。

[0086] 在某些实施方案中, iRNA 试剂的所有嘧啶都具有 2'-修饰, 并且其中 iRNA 试剂已经增强了对核酸内切酶的抗性。增强的核酸酶抗性也可以通过修饰 5' 核苷酸获得, 可得到结果的, 例如, 在至少一个 5' - 尿苷 - 腺嘌呤 -3' (5' -UA-3') 二核苷酸中, 其中尿苷是 2' 修饰的核苷酸; 至少一个 5' - 尿苷 - 鸟嘌呤 -3' (5' -UG-3') 二核苷酸, 其中 5' - 尿苷是 2' 修饰的核苷酸; 至少一个 5' - 胞苷 - 腺嘌呤 -3' (5' -CA-3') 二核苷酸, 其中 5' - 胞苷是 2' 修饰的核苷酸; 至少一个 5' - 尿苷 - 尿苷 -3' (5' -UU-3') 二核苷酸, 其中 5' - 尿苷是 2' 修饰核苷酸; 或至少一个 5' - 胞苷 - 胞苷 -3' (5' -CC-3') 二核苷酸, 其中 5' - 胞苷是 2' 修饰核苷酸。iRNA 试剂可以包括至少 2 个, 至少 3 个, 至少 4 个或至少 5 个这样的二核苷酸。

[0087] 寡核苷酸骨架中含呋喃糖也可以降低核酸内切酶切割。iRNA 试剂可以进一步通过包含 3' 阳离子基团而修饰, 或通过 3' 末端用 3' -3' -键转化核苷。在其它的可选择中, 3' 末端可以用氨基烷基封闭, 例如 3'C5 氨基烷基 dT。其它的 3' 结合可以抑制 3' -5' 核酸外切酶切割。当不局限于理论的时候, 3' 结合物, 如蔡普生或布洛芬, 可以通过空间封闭核酸外切酶与寡核苷酸 3' 末端的结合来抑制核酸外切酶切割。甚至小的烷基链、芳基、或杂环结合物或被修饰的糖 (D-核糖, 脱氧核糖, 葡萄糖等) 可以封闭 3' -5' -核酸外切酶。

[0088] 同样, 5' 结合物可以抑制 5' -3' 核酸外切酶切割。当不局限于理论的时候, 5' 结合物, 如蔡普生或布洛芬, 可以通过空间封闭核酸外切酶与寡核苷酸 5' 末端的结合来抑制核酸外切酶切割。甚至小的烷基链、芳基、或杂环结合或被修饰的糖 (D-核糖, 脱氧核糖, 葡萄糖等) 可以封闭 3' -5' -核酸外切酶。

[0089] 当双链 iRNA 试剂在至少一个末端包含单链核苷酸突出的时候, iRNA 试剂能够增强对核酸酶的抗性。在优选的实施方案中, 核苷酸突出包括 1-4 个, 优选 2-3 个未配对核苷酸。在优选的实施方案中, 直接与末端核苷对临近的单链突出的未配对核苷酸包含嘌呤碱基, 和末端核苷酸对是 G-C 对或最后 4 个互补核苷酸对中的至少两个是 G-C 对。在进一步

的实施方案中,核苷酸突出可以具有 1 或 2 个未配对核苷酸,以及在示例实施方案中该核苷酸突出是 5' -GC-3'。在优选的实施方案中,核苷突出是在反义链的 3' 末端。在一个实施方案中,iRNA 试剂在反义链的 3' 末端包含基序 5' -CGC-3',这样形成了 2nt 的突出 5' -GC-3'。

[0090] 这样,iRNA 试剂可以包含已被修饰的单体以抑制如核酸酶的降解,核酸酶如受试者体内发现的核酸内切酶或核酸外切酶。这些单体在本文是指 NRM 或核酸酶抗性促进单体或修饰体。在许多情况下,这些修饰体还将调节 iRNA 试剂的其它性质,例如与蛋白相互作用的能力,蛋白如转运蛋白,如血清白蛋白,或 RISC 的一个成员,或第一和第二序列与其它序列形成双链体或与其它序列如目标分子形成双链体的能力。

[0091] 优选的可用于产生适合上述定义的核酸抗性标准的 iRNA 试剂的修饰包括糖、碱基、和 / 或磷酸骨架的一个或多个下述化学和 / 或立体化学修饰:

[0092] (i) 手性 (S_p) 硫代酯 (thioates)。至此,优选的 NRM 包含核苷酸二聚体,该二聚体具有富含或完全是特定手性形式的修饰的磷酸基团,该磷酸基团在非桥接处如 S_p 或 R_p ,在一般被氧占位的 X 位置含有杂原子。在 X 处的原子也可以是 S, Se, Nr_2 或 Br_3 。当 X 是 S 的时候,富含或完全是手性 S_p 连接是优选的。富含是指是优选形式的至少 70, 80, 90, 95 或 99%。该 NRM 在下面更详细地讨论。

[0093] (ii) 一个或多个阳离子基团在糖、碱基和 / 或磷酸的磷原子或修饰的磷酸骨架部分上的附着。至此,优选的 NRM 在末端位置包含单体,所述末端位置为阳离子基团衍生而来。由于反义链序列的 5' 末端应该具有末端 -OH 或磷酸基团,该 NRM 优选不用于反义序列的 5' 末端。该基团应该附着在碱基的某一位置,所述位置干扰 H 键和杂交的程度最小,例如远离与其它链上的互补碱基形成的面,如嘧啶的 5' 位或嘌呤的 7 位。这些在下面更详细的讨论。

[0094] (iii) 末端的非磷酸酯键合。至此,优选的 NRM 包含非磷酸酯键合,如 4 个原子的键合,其产生了比磷酸酯键更强的剪切抗性。实例包括 3' $CH_2-NCH_3-O-CH_2-5'$ 和 3' $CH_2-NH-(O=)-CH_2-5'$ 。

[0095] (iv) 3' - 桥接硫代磷酸酯和 5' 桥接硫代磷酸酯。至此,优选的 NRM 可以包含这些结构。

[0096] (v) L-RNA, 2' -5' 键合,反向键合, α - 核苷。至此,其它优选的 NRM 包括:L 核苷和由 L 核苷衍生的二聚体核苷酸;2' -5' 磷酸酯,非磷酸酯和修饰的磷酸酯键合(例如硫代磷酸酯,氨基磷酸酯和磷酸硼);具有反向键合的二聚物,例如 3' -3' 或 5' -5' 键合;在糖的 1 位具有 α 键合的单体,如本文描述的具有 α 键合的结构。

[0097] (vi) 结合基团。至此,优选的 NRM 包含,例如本文描述的与单体结合的靶向部分或结合配体,例如通过糖、碱基或骨架。

[0098] (vii) 无碱基键合。至此,优选的 NRM 可以包含无碱基单体,例如本文描述的无碱基单体(如无核酸碱基单体);如本文描述的芳香族或杂环或聚杂环芳香族单体(polyheterocyclic aromatic monomer);和

[0099] (viii) 5' - 磷酸酯和 5' - 磷酸酯前药。至此,优选的 NRM 包含单体,优选在末端位置,例如在 5' 位,其中一个或多个磷酸酯基团的原子被保护基团衍生,该保护基团(一个或多个)由于组分在受试者体内(例如羧基酯酶或受试者体内的酶)的作用而被除去。例

如,磷酸酯前药,其中的羧基酯酶切割受保护的分子导致硫代酯(thioate)阴离子的产生,该硫代酯阴离子进攻临近磷酸酯的 O 的碳原子并导致无保护的磷酸酯的产生。

[0100] 一个或多个不同的 NRM 修饰可以引入到 iRNA 试剂中或引入到 iRNA 试剂的序列中。NRM 修饰可以在序列中或在 iRNA 试剂中使用一次以上。由于 NRM 干扰杂交,所引入的总量应该使 iRNA 试剂的双链体形成维持在可接受的水平。

[0101] 在一些实施方案中,将 NRM 修饰引入到末端切割位点或序列的切割区域(有义链或序列),所述序列不靶向受试者体内的目的序列或基因。这样能够减少脱靶沉默。

[0102] 核酸酶抗性修饰包括一些仅在末端被替换的修饰和其它的在任何位点的修饰。一般地,能够抑制杂交的修饰仅用于末端区域,并且优选不在切割位点或靶向受试者序列或基因的序列的切割区域。如果 iRNA 试剂的两个序列之间的充分杂交能够维持,那么它们可以用于有义序列的任何位置。在一些实施方案中,需要将 NRM 置于切割位点或不靶向受试者序列或基因的序列的切割区域,因为这样能够最小化脱靶沉默。

[0103] 在大部分情况下,促进核酸酶抗性的修饰的分布取决于该序列是否将靶向受试者的序列(经常是指作为反义序列)或将不靶向受试者序列(经常是指有义序列)。如果序列将靶向受试者序列,干扰或抑制核酸内切酶切割的修饰将不能插入到 RISC 介导切割的区域,例如切割位点或切割区域(如 Elbashir et al, 2001, Genes and Dev. 15:188 中所述,在此作为参考并入本文)。靶的切割发生在向导 RNA 中间约 20-21nt,或互补于向导序列的第一个核苷酸上游的约 10-11 核苷酸。如本文所用,切割位点是指在切割位点的任一侧的核苷酸,该切割位点是在靶上或在与靶杂交的 iRNA 试剂链上。切割区域含义是切割位点的任意方向的具有 1, 2 或 3 个核苷酸的核苷酸。

[0104] 这样的修饰可以引入到靶向受试者中的序列或不靶向受试者中的序列的末端区域,例如在末端的位点或在具有 2, 3, 4 或 5 个位点的末端位置。

[0105] 束缚配体(Tethered ligand)

[0106] iRNA 试剂的性质,包括其药理学性质,可以被改变或调控,例如通过引入配体,如束缚配体。

[0107] 很多种实体,如配体,可以被束缚到 iRNA 试剂,如束缚到结合配体的单体亚单位的载体上。实例描述在下面的结合配体的单体亚单位的内容部分,但其仅仅是优选的,实体可以在其它位点被耦合到 iRNA 试剂。

[0108] 优选的部分是配体,其通过插入束缚而直接或间接地被耦合到载体,优选是共价耦合。在优选的实施方案中,配体通过插入束缚而被附着到载体上。当结合配体的单体被引入至正在增长的链中时,配体或束缚配体可以存在于结合配体的单体上。在一些实施方案中,在结合配体的“前体”单体亚单位(“precursor”ligand-conjugated monomer subunit)已经被并入正在增长的链中后,可以将配体并入该“前体”结合配体的单体亚单位中。例如,具有例如端氨基束缚的单体,如 $\text{TAP}-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ 的单体可以被并入至正在增长的有义或反义链中。在接下来的操作中,也就是前体单体亚单位并入链中之后,具有亲电基团的配体,如具有五氟苯基酯基团或醛基的配体可以通过将配体的亲电基团与前体结合配体的单体亚单位束缚的末端亲核基团的耦合后束缚到前体结合配体的单体。

[0109] 在优选的实施方案中,配体改变了其所并入的 iRNA 试剂的分布、靶向或生命期。在优选的实施方案中,相比较于缺少配体的种类,配体提供了增强的对所选择靶的亲合性,

该选择靶如为分子、细胞或细胞类型、代谢区域,如细胞或器官的代谢区域、组织、器官或身体的一部分。

[0110] 优选的配体能够改进转运、杂交、和特异性并且也可以改进合成的天然或修饰的寡核苷酸的核酸酶抗性,或改进包含本文所述的单体的任何结合的聚合分子的核酸酶抗性,和 / 或改进天然的或修饰的核糖核苷酸的核酸酶抗性。

[0111] 配体一般包含治疗性修饰物,如,用于增强吸收;诊断化合物或报道基团,如用于检测分布;交联剂;赋予核酸酶抗性的部分;和天然或特异的核糖碱基。一般的例子包括亲脂体、脂质体、类固醇(如乌发醇、hecigenin、diosgenin)、萜(如三萜,如萨洒皂苷配基,无羁萜,表木栓醇衍生的石胆酸)、维生素(如叶酸,维生素 A,生物素,吡哆醛)、糖类、蛋白质、蛋白质结合剂、整联蛋白靶分子(integrin targeting molecule)、聚阳离子固色剂(polycationics)、肽、多胺、和肽模拟物。

[0112] 配体可以包括天然存在的物质,(如人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL),或球蛋白);糖类(如,葡聚糖,支链淀粉,壳多糖,菊糖,环糊精或透明质酸);氨基酸,或脂。配体也可以是重组或合成的分子,如合成的聚合物,如合成的聚氨基酸。聚氨基酸的例子包括聚氨基酸是聚赖氨酸(PLL),聚 L- 天冬氨酸,聚 L- 谷氨酸,苯乙烯-马来酸酐共聚物,聚(L- 乳酸羟基乙酸)共聚物,乙烯醚-马来酸酐共聚物,N-(2- 羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA),聚乙二醇(PEG),聚乙烯醇(PVA),聚氨基甲酸乙酯,聚(2- 乙基丙烯酸),N- 异丙基丙烯酰胺聚合物,或聚磷嗪。多胺的例子包含:聚氮丙啶,聚赖氨酸(PLL),肌胺,精胺,多胺,伪肽-多胺,拟肽类多胺,枝形大分子多胺,精氨酸,脘,鱼精蛋白,阳离子部分,如阳离子脂质,阳离子卟啉,多胺的季盐,或 α 螺旋肽。

[0113] 配体可以包含靶向基团,如,细胞或组织靶向试剂,如,凝血素,糖蛋白,脂质或蛋白,如,抗体,其结合到特异性的细胞类型,如肝细胞或空肠细胞。靶向基团可以是促甲状腺激素,促黑素,凝血素,糖蛋白,表面活化蛋白 A,粘蛋白糖类,多价乳糖,多价半乳糖,N- 乙酰-半乳糖胺,N- 乙酰-gulucosamine 多价甘露糖,多价盐皮质,糖基化的聚氨基酸,多价的半乳糖,转铁蛋白,二磷酸酯,聚谷氨酸,聚天冬氨酸,脂质,胆固醇,类固醇,胆汁酸,叶酸盐,维生素 B12,生物素,或 RGD 肽或 RGD 肽模拟物。

[0114] 配体可以是蛋白质,如糖蛋白,或肽,如对协同配体具有特异性亲和力的分子,或抗体,如结合到特定细胞类型如癌细胞、内皮细胞或骨细胞的抗体。配体还可以包含激素和激素受体。它们还可以包含非肽类,如脂类,凝集素,糖类,维生素,辅因子,多价乳糖,多价半乳糖,N- 乙酰-半乳糖胺,N- 乙酰-gulucosamine 多价甘露糖,多价盐皮质。配体可以是,例如脂多糖,p38 MAP 激酶的激活剂,或 NF- κ B 的激活剂。

[0115] 配体可以是物质,如,药物,其能够增加 iRNA 试剂吸收至细胞,例如,通过破坏细胞的细胞骨架,如通过破坏细胞的微管,微丝,和 / 或中间丝。药物可以是,例如,taxon,长春新碱,长春碱,松胞菌素,诺考达唑,japlakinolide,微丝解聚剂 A,鬼笔环肽,swinholid A,吲达尼定,或 myoservin。

[0116] 一方面,配体是脂质或脂基分子。如脂质或脂基分子优选结合到血清蛋白,如人血清白蛋白(HSA)。结合配体的 HSA 允许结合物向靶组织的分布,例如肝组织,包括肝组织的实质细胞。能够结合 HSA 的其它分子也可以用于配体,例如,可以使用 neproxin 或阿司匹林。脂质或脂基配体可以 (a) 增加对结合物的降解抗性,(b) 增加靶向或输送至靶细胞或

细胞膜,和/或(c)可以用于调节与血清蛋白如人血清白蛋白的结合。

[0117] 脂基配体可以用于调节,例如调控结合物与靶组织的结合。例如,越强烈地结合到 HSA 的脂质或脂基配体就越不可能被定位于肾,因此更不可能从身体中清除。较弱结合到 HSA 的脂质或脂基配体可以用于将结合物靶向肾。

[0118] 在优选的实施方案中,脂基配体结合 HSA。优选地,其以充分的亲和力结合 HSA,以致于结合物将优选分布到非肾组织。然而,优选亲和力不是如此的强,以至于 HSA-配体结合不能逆转。

[0119] 另一方面,配体是一个部分,例如维生素,其被目标细胞如增殖细胞吸收。这些特别有益于不需要的细胞增殖为特征的病症,细胞增殖如恶性或非恶性类的,如癌细胞。示例的维生素包含维生素 A, E, 和 K。其它示例维生素包含 B 族维生素,如叶酸, B12, 核黄素, 生物素, 吡哆醛或其他的被癌细胞吸收的维生素或营养素。还包括的是 HSA 和低密度脂蛋白 (LDL)。

[0120] 在另一方面,配体是细胞渗透剂,优选为螺旋细胞渗透剂。优选地,试剂是两性分子。示例的试剂是 tat 或 antennopodia。如果试剂是肽,其可以被修饰,包括肽基模拟物,反转异构体 (invertomer),非肽或伪肽键合,和 D-氨基酸的使用。螺旋剂优选为 α -螺旋剂,其优选具有亲脂相和疏脂相。

[0121] 5' - 磷酸酯修饰

[0122] 在优选的实施方案中, iRNA 试剂是 5' - 磷酸化的或在最初的 5' 末端 (5' -primeterminus) 处含有磷酸基的类似物。反义链的 5' - 磷酸酯修饰包含适于 RISC 介导基因沉默的那些。适当的修饰包含: 5' 单磷酸酯 ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$); 5' - 二磷酸酯 ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$); 5' - 三磷酸酯 ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$); 5' - 鸟苷帽 (7-甲基化或非甲基化的) ($7\text{m}-\text{G}-\text{O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$); 5' - 腺苷帽 (Appp), 和任何的修饰的或未修饰的核苷酸帽结构 ($\text{N}-\text{O}-5'-(\text{OH})(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{OH})(\text{O})\text{P}-(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$); 5' - 单硫代磷酸酯 (硫代磷酸酯; $(\text{HO})_2(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$); 5' - 单二硫代磷酸酯 (二硫代磷酸酯; $(\text{HO})(\text{HS})(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$), 5' - 硫代磷酸酯 ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{S}-5'$); 任何其它的氧/硫替代的单磷酸酯、二磷酸酯和三磷酸酯 (5' - α - 硫代磷酸酯, 5' - γ - 硫代三磷酸酯等) 的结合, 5' - 氨基磷酸酯 ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{NH}-5'$, $(\text{HO})(\text{NH}_2)(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$), 5' - 烷基磷酸酯 ($\text{R} = \text{烷基} = \text{甲基}, \text{乙基}, \text{异丙基}, \text{丙基}, \text{等}, \text{如 } \text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'-(\text{OH})_2(\text{O})\text{P}-5'-\text{CH}_2-$), 5' - 烷基醚磷酸酯 ($\text{R} = \text{烷基醚} = \text{甲氧基甲基} (\text{MeOCH}_2-), \text{乙氧基甲基}, \text{等}, \text{如 } \text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'-(\text{O}-\text{Me})$ 。

[0123] 为了阻止有义链的活性和防止活性 RISC 的形成,可以对有义链进行修饰,这样潜在地降低了脱靶效应。这可以通过防止有义链的 5' - 磷酸化的修饰来实现,例如用 5' -O- 甲基核糖核苷酸修饰 (参见 Nykanen et al, (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. Cell 107, 309-321)。其它的防止磷酸化的修饰也可以采用,例如仅用 H 取代 5' -OH 而非 O-Me。可选择的,大量的基团可以加到 5' - 磷酸酯,将其转换为磷酸二酯键。

[0124] iRNA 试剂向组织和细胞的传送

[0125] 剂型

[0126] 制备本文描述的 iRNA 试剂以施用于受试者,优选通过吸入或鼻内例如通过注射

局部地施于肺或鼻道（呼吸组织）。为简易表述，该部分讨论的剂型、组合物，和方法很多是关于未修饰的 iRNA 试剂。需要了解的是，无论如何，这些剂型、组合物、和方法可以使用于其它的 iRNA 试剂，例如使用修饰的 iRNA 试剂，并且该使用是在本发明的范围之内。

[0127] 制备的组合物可以呈现各种状态。在一些实施例中，组合物至少部分是结晶，均匀的结晶和 / 或无水的（例如少于 80, 50, 30, 20 或 10% 的水）。在其它的例子中，iRNA 在水相中，例如在含水的溶液中，该剂型是通过吸入给药的优选剂型。

[0128] 水相或结晶组合物可以掺入传送媒介，例如脂质体（特别是对于水相），或颗粒（例如，例如适于晶体组合物的微颗粒）。一般地，iRNA 组合物以适于所需给药方法的剂型配制。

[0129] 制备 iRNA 制剂可以结合其它的试剂，如其它的治疗试剂或使 iRNA 稳定的试剂，如与 iRNA 复合以形成 iRNP 的蛋白。还有其它的试剂包括螯合剂，如 EDTA（如，用于除去二价阳离子，如 Mg^{2+} ），盐，RNA 酶抑制剂（如特异性广泛的 RNA 酶抑制剂，如 RNAsin）等。

[0130] 在一个实施方案中，iRNA 制剂包括其它的 iRNA 试剂，如能够介导第二基因的 RNAi 的第二 iRNA 试剂。还有其它的制剂可以包括至少 3, 5, 10, 20, 50 或 100 或更多的不同 iRNA 种类。在一些实施方案中，试剂被定向于相同病毒，但不同的靶序列。在其它的实施方案中，每个 iRNA 试剂定向于不同的病毒。如实施例所证明，多于一个病毒可以被联合施用的两种 iRNA 试剂在很短的间隔时间同时抑制，每个定向于被治疗的病毒中的一个。

[0131] 治疗方法和传送方式

[0132] 包含本发明的 iRNA 试剂的组合物，例如靶向 RSV 或 PIV 的 iRNA 试剂，可以通过许多路径传送到受试者。示例性的路径包括吸入，鞘内，薄壁组织，静脉，鼻内，口服，和眼部传送。优选的施用本发明 iRNA 试剂的方式是通过直接施用到肺和鼻道或通过胃肠外施用的系统性给药。

[0133] iRNA 试剂可以掺入到适于施用的药物组合物中。例如组合物包含一种或多种 iRNA 试剂和药物可接受的载体。如本文所用，术语“药物可接受的载体”意为包含适合于药物施用的任何和所有的溶剂、分散介质、涂层、抗菌和抗真菌剂，等渗和吸收延期剂等。用于药学上活性物质的这些介质和试剂的用途在本领域是已知的。除了与活性化合物不相容的任何常规的介质或试剂的范围外，它们在组合物中的用途是考虑到的。增加的活性物质也可纳入到组合物中。

[0134] 根据是否需要局部或系统治疗和被治疗的区域，本发明的药物组合物可以以许多方式给药。可以是局部（包括眼睛，鼻内，经皮，肺内），口服或胃肠外给药。胃肠外给药包含静脉滴注，皮下，腹膜内或肌内注射，或鞘内或心室内给药。

[0135] 一般情况下，本发明的 iRNA 试剂的传送是为实现向受试者的感染部位的递送。实现该目的的优选方式是通过局部施用到肺或鼻道，例如通过吸入或鼻内施用到呼吸组织，或者通过系统性施用，例如胃肠外施用。吸入或胃肠外施用的剂型在本领域是公知的。该剂型可以包括无菌水溶液，其也可以含有缓冲液，稀释剂和其它合适的添加剂。对于静脉使用，应该控制溶液的总浓度以保证制剂的等渗。

[0136] 本文公开的活性化合物优选以适当的方式施用到受试者的肺（或两个）或鼻道。活性化合物可以通过可呼吸颗粒的气雾剂施用，其中的颗粒包含受试者吸入的一种活性化合物或多种活性化合物。活性化合物可以以多种形式雾化，例如，但不限于，干粉吸入剂，计

量剂量吸入剂,或液体/液体悬浮液。可呼吸的颗粒可以是液体或固体。颗粒可以任选地包含其它的治疗组分,如阿米洛利,苯扎明或苯丙胺,并包含的有效量的所选化合物,以抑制从气管粘液分泌物中再吸收水,如美国专利号 4,501,729 中所述。

[0137] 微粒子药物组合物可以任选地与载体组合用于辅助分散或传输。可以将适当的载体如糖(也就是乳糖,蔗糖,海藻糖,D 甘露醇)与一种活性化合物或多种活性化合物以任意合适的比例(如重量比 1:1)混合。

[0138] 实施本发明的含有活性化合物的颗粒应该包含可呼吸尺寸的颗粒,也就是,颗粒的尺寸要足够小以通过嘴或鼻子和喉,接着吸入和进入肺的支气管和肺泡。一般地,范围在 1-10 微米大的颗粒(更优选地,尺寸小于约 5 微米)适于呼吸。包含在气雾剂中的非呼吸尺寸的颗粒倾向于沉积喉部和被吞咽,并且气雾剂中非呼吸颗粒的量优选最小化。对于鼻部施用,优选 10-500 μm 的颗粒尺寸确保滞留于鼻腔中。

[0139] 制备气雾剂的活性化合物的液体药物组合物可以通过组合活性化合物和适当的媒介来制备,媒介如灭菌无热原水。用于实现本发明的高渗生理盐水溶液优选是灭菌的,无热原的,包含 1-15%(重量)的生理可接受的盐,并且更优选是包含 3-7%重量的生理可接受的盐。

[0140] 包含活性化合物的液体颗粒气雾剂可以通过适当的方式制备,如使用压力雾化器和超声波雾化器,参见如美国专利号 4,501,729。雾化器是商业上可得到的设备,其转换活性成分的溶液或悬浮液为治疗的气雾剂雾,该转换借助压缩气体(一般是空气或氧气)的激发通过狭窄的文氏管孔,或通过超声波振荡。

[0141] 对于雾化器中用的适当配方包含液体载体中的活性组分,配方中含有至多 40% w/w 的活性组分,但优选不少于 20% w/w。载体一般是水(并且最优选是灭菌、无热原的水)或水稀释的乙醇溶液,优选是等渗制备,但可通过加入如氯化钠使其对体液是高渗的。如果制剂没有灭菌,任选的添加剂包含防腐剂,如羟苯甲酯,抗氧化剂,调味剂,挥发油,缓冲剂和表面活性剂。

[0142] 包含活性成分的固体颗粒气雾剂同样可以使用任何的固体颗粒治疗用的烟雾发生器。用于给药固体颗粒治疗到受试者的烟雾发生器生产可呼吸的颗粒和以适于人体给药的速度产生含有预先定量剂量的治疗剂的气雾剂体积。固体颗粒烟雾发生器的一个示例类型是吹入器。适于吹入法给药的适当配方包含精细粉碎粉末,其可以通过吹入器被传送或通过吸入至鼻腔。在吹入器中,粉末(如实现本文所述治疗的有效的定量剂量)包含在一般由明胶或塑料制备的胶囊或药桶中,其在原处是刺孔或者是开口并且粉末通过吸入设备或通过手工操作泵的驱动而被空气传输。在吹入器中使用的粉末或者包含单独活性成分或者是包含活性成分、合适的粉末稀释剂,如乳糖,和任选的表面活性剂的混合粉末。一般在配方中包含 0.1-100% w/w 的活性成分。

[0143] 示例烟雾发生器的第二种类型包含计量剂量吸入器。计量剂量吸入器是被施压的气雾剂配药机,一般包含或液化推进剂中的活性成分的悬浮液制剂或溶液制剂。在使用这些设备期间,通过适于传输定量体积的阀门排放制剂以产生含有活性成分的精细颗粒喷雾,定量体积一般为 10-200 μl 。适当的推进剂包含某些氯氟烃化合物,例如二氯二氟甲烷,三氯氟甲烷,克立氟烷和它们的混合物。制剂可以另外含有一种或多种辅助溶剂,如,乙醇,表面活性剂,如甘油三油酸酯或脱水山梨醇三油酸酯,抗氧化剂和适当的调味剂。

[0144] 可以是受试者给药或是其他人如护理者给药。护理者可以是对人提供护理的任何实体,例如,医院,晚期病人医院,医师诊室,门诊所;卫生保健工作者,如医生,护士,或其它的从业者;或配偶或监护人,如父母。药物可以所定剂量的形式提供或以传送计量的剂量的分配器的形式提供。术语“治疗有效量”是存在于组合物中的量,该量提供给需要治疗受试者的所需药物水平以达到预期的生理反应。在一个实施方案中,同时施用两种或多种 iRNA 试剂的治疗有效量到受试者,每个试剂针对不同的呼吸道病毒,例如 RSV 和 PIV。

[0145] 术语“生理学有效量”是递送给受试者以提供所需的减轻或治疗效果的量。

[0146] 术语“药学上可接受的载体”意为载体可以被送入到肺中对肺没有显著的负面的毒理学影响。

[0147] 用作载体的药物赋形剂的类型包括稳定剂,如人血清白蛋白 (HSA),填充剂如糖,氨基酸和多肽;pH 调节剂或缓冲液;盐如氯化钠;及其类似物。这些载体可以是晶体或无定形形式或可以是两种的混合物。

[0148] 尤其重要的填充剂包含合适的糖,多肽,氨基酸或它们的组合。适当的糖包含单糖,如半乳糖,D-甘露糖,山梨糖,及其类似物;二糖,如乳糖,海藻糖,及其类似物;环糊精,如 2-羟丙基-β-环糊精;和多糖,如棉子糖,糊精-麦芽糖复合剂,葡聚糖,及其类似物;糖醇,如甘露醇,木糖醇,及其类似物。优选的糖包含乳糖,threhalose,棉子糖,糊精-麦芽糖复合剂,和甘露醇。适当的多肽包含天冬酰苯丙氨酸甲酯。氨基酸包含丙氨酸和甘氨酸,优选甘氨酸。

[0149] 适当的 pH 调节剂和缓冲液包含由有机酸和碱制备的有机盐,柠檬酸钠,抗坏血酸钠,及其类似物;优选柠檬酸钠。

[0150] 剂量。iRNA 试剂的施用剂量为单位剂量小于约 75mg/kg 体重,和少于约 70,60,50,40,30,20,10,5,2,1,0.5,0.1,0.05,0.01,0.005,0.001,或 0.0005mg/kg 体重,和少于 200nmole 的 RNA 试剂(例如,约 4.4×10^{16} 份)/kg 体重,和少于 1500,750,300,150,75,15,7.5,1.5,0.75,0.15,0.075,0.015,0.0075,0.0015,0.00075,0.00015nmole 的 RNA 试剂/kg 体重。例如,单位剂量可以通过下述方式施用:注射(如,静脉注射或肌肉注射,鞘内注射,或直接注射到器官),吸入剂量,或局部施用。

[0151] 可以以约 0.00001mg 至 3mg/器官的剂量等级直接递送 iRNA 到器官(如,直接到肝),或优选为 0.0001-0.001mg/器官,约 0.03-3.0mg/器官,约 0.1-3.0mg/器官或约 0.3-3.0mg/器官。

[0152] 剂量可以是治疗或预防疾病或病症的有效量。

[0153] 在一个实施方案中,通常以少于每天一次的频率施用单位剂量,例如所述频率少于 2,4,8 或 30 天一次。在另一个实施方案中,不以频率施用单位剂量(例如不规则频率)。例如,单次施用单位剂量。

[0154] 在一个实施方案中,以其它的传统治疗形式施用单位剂量。

[0155] 在一个实施方案中,将起始剂量的 iRNA 试剂,和一次或多次维持剂量的 iRNA 试剂施用于受试者,所述 iRNA 试剂例如为双链 iRNA 试剂,和 siRNA 试剂,(例如,前体,例如,能够被加工成 siRNA 试剂的较大分子量的 iRNA 试剂,或能够编码 iRNA 试剂的 DNA,例如双链 iRNA 试剂,或 iRNA 试剂,或其前体)。维持剂量一般低于起始剂量,例如低于起始剂量的半剂量。

[0156] 维持方案包含用每日 0.01 μ g-75mg/kg 体重的单一剂量或多剂量治疗受试者,如每日 70,60,50,40,30,20,10,5,2,1,0.5,0.1,0.05,0.01,0.005,0.001,或 0.0005mg/kg 体重。维持剂量优选不超过每 5,10 或 30 天一次。另外,治疗方案可以维持一段时间,该时间根据特定疾病的性质严重性和受试者的全面状况而变化。在优选的实施方案中,剂量可以不超过每天一次的施用频率,例如所述频率不超过 24,36,48,或更多小时一次,例如不超过 5 或 8 天一次。接下来的治疗,可以监测受试者病症的改变和疾病状态的减轻。化合物的剂量或者在受试者对目前的剂量水平反应不显著的情况下增加,或者是如果疾病状态的减轻,如果疾病状态已经消除,或者如果出现不愿发生的副作用,那么剂量可以降低。

[0157] 在特定的情况下,在适当的需要或考虑时,有效剂量可以以单剂量或两剂量或多剂量给药。如果希望有利于重复或频繁输液,可以适当地植入传输设备,如,泵,半固定支架(如静脉,腹膜内,脑池内或囊内),或储存器。

[0158] 在一个实施方案中,iRNA 试剂治疗组合物包含多个 iRNA 试剂种类。iRNA 试剂种类可以具有如下序列:该序列相对于天然存在的靶序列(如 RSV 基因的靶序列)是非重叠的和非临近的。在另一个实施方案中,许多 iRNA 试剂种类特异于不同的天然存在的靶基因。例如,靶向 RSV 的 P 蛋白基因的 iRNA 试剂可以存在于靶向不同的基因(如 N 蛋白基因)的 iRNA 试剂的药物组合物中。在另一个实施方案中,iRNA 试剂特异于不同的病毒,如 RSV 和 PIV。

[0159] 成功的治疗后,需要让受试者进行维持治疗以防疾病状态的复发,其中以 0.01 μ g-100g/kg 体重的维持剂量施用本发明的化合物(参见 US6,107,094)。

[0160] iRNA 试剂组合物的浓度是足以有效治疗或预防疾病或调节人的生理状况的量。所施用的 iRNA 试剂的浓度或量将依赖于所测量的试剂的参数和给药方法,如鼻,含服,或肺。例如,鼻制剂倾向于要求一些组分的浓度较低,以避免对鼻道的刺激或灼伤。有时需要稀释口服制剂到 10-100 倍以提供适当的鼻制剂。

[0161] 某些因素可能影响有效治疗受试者所需的剂量,包括但不限于疾病或病症的严重性,先前的治疗,受试者的综合健康和/或年龄,和其它的已有的疾病。而且,使用治疗有效量的 iRNA 试剂对受试者的治疗可以包含单一治疗或,优选可以包含一系列的治疗,其中的 iRNA 试剂如双链 iRNA 试剂,或 siRNA 试剂(例如,前体,如,能够被加工成 siRNA 试剂的较大分子量的 iRNA 试剂,或能够编码 iRNA 试剂的 DNA,例如双链 iRNA 试剂,或 siRNA 试剂,或其前体)。可以理解 iRNA 试剂,如用于治疗的 siRNA 试剂的剂量可以根据特定治疗的过程而增加或降低。剂量的变化可取得疗效并使得本文描述的诊断分析结果显而易见。例如,可以在施用 iRNA 试剂组合物后监测受试者。例如。根据检测信息,可以施用附加量的 iRNA 试剂组合物。

[0162] 定量给药依赖于所治疗疾病状况的严重程度和反应性,所述给药伴随有持续几天到几个月的治疗过程,或伴随有直到治疗有效或疾病的状态减轻的治疗过程。最佳的定量给药时间表可以由受试者体内药物累积的测量来计算。普通技术人员能够很容易地确定最佳剂量、定量给药方法和重复率。最佳剂量可以根据各个化合物的相对效力而变化,并且一般根据动物模型的体内或体外有效的 EC50 值来估计。在一些实施方案中,动物模型包括表达人基因的转基因动物,如生产靶 RSV RNA 的基因的转基因动物。在另一个实施方案中,用

于测试的组合物包含 iRNA 试剂,其互补于,至少在内部区域互补于动物模型的靶 RSV RNA 和人的靶 RSV RNA 之间的保守序列。

[0163] 本发明进一步通过下面的实施例解释,其不应该构成进一步的限制。

[0164] 实施例

[0165] 设计防治 RSV 和 HPIV3 磷蛋白 mRNA 的抗病毒 siRNA

[0166] 防治 RSV P 的 siRNA 和防治 HPIV3 P mRNA 的 siRNA 已被化学合成 (Bitko, V. & Bank, S. BMC Microbiol. 1, 34 (2001)), 并体外测量了它们的 IC₅₀ (使目标减少 50% 的 siRNA 浓度) (图 1a)。列出了 siRNA 序列和 IC₅₀ 值 (表 1)。抗 RSV P (#1, #2) 的两种 siRNA 和抗 HPIV3 (#4) 的一种显示了显著的抑制活性, 并且选择它们用于进一步研究。靶 mRNA 与蛋白的相关性, 如 siRNA #1 (Fig. 1a) 的示例, 与 RNAi 机理一致, 并且如下面我们所展示的, siRNA 的体外击倒活性也与其在动物 (体内) 中的活性匹配。这样, 体外的分析提供了可靠的、廉价、快速和方便的抗病毒 siRNA 药物的初始筛选。

[0167] 鼻内 (IN) siRNA 抑制小鼠肺中 RSV 和 HPIV3 复制

[0168] 为了测定体外具有活性的 siRNA 在实际感染中是否具有效果, 使用了动物模型。BALB/c 小鼠是沿用已久的 RSV 感染的实验室模型, 其用于研究疾病的进展、病理学, 和免疫学 (Graham, B. S., et al., J. Med. Virol. 26, 153-162 (1988), vanSchaik, S. M., et al., J. Infect. Dis. 177, 269-276 (1998), Haeberle, H. A. et al. J. Virol. 75, 878-890 (2001))。用复合了 TransIT-TKO(R) 的 siRNA 通过鼻内处理小鼠, 4 小时后也通过鼻内用 10⁷ pfu 的 RSV 或 HPIV3 攻击每个动物。在接种后约 5-6 天在鼠肺中观察到最大化的 RSV 增长, 并且该时间点用于进一步研究。体外有效的 (图 1a) siRNA 在动物体内是高度抗病毒的 (图 1b, c)。在每只小鼠鼻内给药的剂量为 5 nmol 的 siRNA (对于双链 siRNA 平均约为 70 μg) 时, siRNA #1 和 siRNA #4 分别以约 5000 和 100 倍降低了每个感染的肺 RSV 和 HPIV3 的效价 (图 1b, c)。重要的是, 无转染试剂的 siRNA 也显著地抑制肺病毒效价 (图 1d)。这说明了使用单一的含 iRNA 试剂的药物组合物对于基于吸入给药的抗病毒治疗是可能的。值得一提的是 HPIV3 不能如 RSV 一样易于感染小鼠 (Durbin, A. P., Elkins, W. R. & Murphy, B. R. Vaccine 18, 2462-2469 (2000)), 这也是小鼠肺中 HPIV3 复制相对低的原因 (图 1c)。以蔗糖纯化的高效价 HPIV3 作为接种物能够使模型获得可测量的小鼠肺部感染。

[0169] 实施例的其它的几个特征可应用于本发明的各种实施方案。首先, 该结果证明了 siRNA 的病毒特异性效果 (图 1)。甚至是效力最强的抗 RSV 的 siRNA (#1) 也仅抑制 RSV 而不能抑制 HPIV3, 反之亦然, 其独自能反驳 IN siRNA 具有非特异性抗病毒效果的言论。第二, 对于抗荧光素酶 siRNA (Elbashir, S. M. et al. Nature 411, 494-498 (2001)), 即使以最高剂量测试 (每只鼠 50 nmole 或 700 μg), 其也不抑制任一病毒 (图 1b-d)。最后, 在未感染小鼠中, 具有或不具有 TransIT-TKO 试剂的 IN siRNA 没有引起明显的不舒适 (通过普通表皮、活性、食欲和体重增加, 和没有任何呼吸不良的鉴定), 由此说明了其良好的药理学作用, 可用于潜在药物开发。

[0170] 值得注意的是在本文描述的所有试验中, 病毒蛋白免疫印迹分析的结果通常与病毒效价相一致, 因此, 对于某一给定的试验, 它们都能够作为另一种试验的过剩标记并且不提供所有的补充数据。

[0171] IN siRNA 防治肺感染的特异性抗病毒效果

[0172] 虽然上面显示的结果证明了对病毒复制的抑制,但是它们没有直接提供肺组织病毒感染的根除。因此,我们使用特异于适当病毒的抗体在接种 5 天后探查双肺的各个部分。用 10pfu 滴注每只小鼠,两种病毒使健康肺感染。在一般的结果中(图 2a),在用复合了 TransIT-TKO 的 5nmole (70 μ g) 抗 RSV siRNA#1 预治疗的小鼠中高效地根治了感染。用 5nmole 的抗 HPIV3 的 siRNA#4 也相似地降低了 HPIV3 感染。同病毒效价一样,无转染试剂的 siRNA 显示了对感染显著的降低,如针对 RSV 所呈现的。对于同样的 siRNA 量,我们估算了无试剂复合的 siRNA 大约等效于复合了 TransIT-TKO 的 siRNA 的 70-80%。虽然在余下的篇幅中我们仅提供了复合了 TransIT-TKO 的 siRNA,但这些结果指出了纯化的、单纯的和没有其它化合物的 siRNA 的鼻内递送可以提供防治呼吸道病原体的实质性保护。这特别重要,因为转染试剂本身可具有不良作用。我们在此指出聚乙烯亚胺 (PEI) 已经成功地用作静脉注射 (IV) 的载体,以及气管内 (IT) 递送防治流感病毒的 siRNA 和 DNA 的载体 (Ge, Q., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 8676-8681 (2004))。然而,在我们的试验中,直接地鼻内施用 (Intranasal) PEI, 不管其是否具有 siRNA, 经常导致小鼠的明显患病和/或死亡。

[0173] IN siRNA 定位于肺部并免激活干扰素

[0174] 为了提供肺部观察的抑制是鼻部施用的 siRNA 的直接和特异效果的进一步证据,进行了两种试验。首先,我们能够通过特定的 RNA 分析检测肺部的 siRNA 的反义链。第二,通过下述内容排除 siRNA 抗病毒的效果是由于激活干扰素 (IFNs) 的可能性。一般而言,副粘病毒编码各种机制抵抗 IFNs; 尤其是 RSV 对 I 型 IFNs (IFN- α / β) 非常稳定, 尽管其对 II 型 IFN (IFN- γ) 敏感 (Schlender, J., et al., J. Virol. 74, 8234-8242 (2000), Ramaswamy, M., et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 30, 893-900 (2004))。我们早期的研究显示 siRNA 在含有 I 型 IFN 基因缺失的 Vero 细胞中具有防治 RSV 和 HPIV3 的活性 (数据未示出)。虽然如此,我们在用不同 siRNA 治疗后的不同日期测量了鼠肺中 IFN- α 和 IFN- γ 的水平, 结果发现没有激活任一类型的 IFN (图 2c)。

[0175] 防治 RSV 和 HPIV3 混合感染的 siRNA 竞争保护

[0176] 由多种因素导致的呼吸道的同时感染通常是可能的,并且在一些研究中, RSV 和 HPIV3 的联合感染已经被诊断 (Coiras, M. T., et al., J. Med. Virol. 72, 484-495 (2004))。实际上,在能够对两种病毒同时提供保护的期望下,已经构建了嵌合病毒和合并了 RSV 和 HPIV3 抗原的重组疫苗 (Schmidt, A. C., et al., J. Virol. 75, 4594-4603 (2001), Bernhard, W. et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 25, 725-731 (2001))。siRNA#1 和 siRNA#4 防治 RSV 和 HPIV3 的特异抗病毒效果分别提示我们在两种病毒混合感染的小鼠中测试它们 (5nmole 或 70 μ g)。对照小鼠用单一种类的 siRNA (或者 #1 或者 #4) 治疗。因为难于确定混合病毒中的每一个的 pfu, 所以如上所述,我们借助免疫荧光显微术,并使用抗 RSV 和抗 HPIV3 抗体的混合物对肺组织部分进行双染色。肺组织的混合感染通过该标准实际完成 (图 2d)。在用 siRNA#1 或 siRNA#4 预治疗的小鼠中, RSV 和 HPIV3 感染分别被抑制,如或者绿或者红荧光的消失所示,但不是都消失 (图 2d)。使用两种 siRNA (每种 5nmole, 也就是 70 μ g) 的组合,两类荧光都消失了,证明了两种病毒被抑制 (图 2d)。如上,不含转染试剂的相同 siRNA 也具有高活性 (数据没有显示)。

[0177] 有趣的是,在双感染分析中,当过量使用一种 siRNA 的时候,另一种的 siRNA 的活

性被抑制(图3)。当 siRNA#1(抗 RSV) 的浓度从 0 到 20 到 200nM 增加时,通过定量实时 RT-PCR, siRNA#4(抗 HPIV3 P) 的体外 IC₅₀ 以 15, 35, 100nM 增加。这些结果是经免疫印迹的 HPIV3 P 蛋白的测量确认有效的(图 3b)。在小鼠的双感染中,每个病毒 N 蛋白的免疫印迹定量产生了基本上相同的结论:在相同的模式下,每个 siRNA 为 5nmole (70 μg) 时有效抑制两种病毒,但 50nmol 的一种 siRNA 却降低了相同模式下 5nmole 的另一种 siRNA 的效果。

[0178] IN siRNA 抑制肺病理

[0179] 因为 siRNA 抑制感染,一个逻辑问题是它们是否也能够抑制病理特征的发展。根据可见的观察, siRNA 治疗的暴露于 RSV 的小鼠行为和表现基本同未感染的小鼠一样具有正常的活动、光亮的表皮和普通的健康。然后,我们测量了呼吸速率,白细胞三烯的降低,和肺的炎症的降低。已知 BALB/c 小鼠的呼吸速率相应于 RSV 感染增加 (Haeberle, H. A. et al. J. Virol. 75, 878-890 (2001), Volovitz, B., et al., Pediatr. Res. 24, 504-507 (1988))。脂氧合酶途径产生的白细胞三烯结合到了存在于支气管平滑肌的白细胞三烯受体并且在哮喘病人的呼吸分泌物、RSV 感染的人婴儿,和 RSV 感染的小鼠中提高 (Volovitz, B., et al., Pediatr. Res. 24, 504-507 (1988), Welliver, R. C., 2nd, et al., J Infect. Dis. 187, 1773-1779 (2003))。这些化合物通过炎症细胞激发了气管粘液分泌,支气管收缩和气管浸润,它们是严重 RSV 疾病的重要标志。当在施用 RSV 之前或在施用 RSV 的同时施用抗 RSV 的 siRNA#1 时,我们发现了呼吸速率显著减少、肺组织病理的显著降低和支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中白细胞三烯的积累。这些值保持接近基线并基本相当于假感染小鼠中的那些值。至少在感染后的 14 天,所有的参数都很低,表明 siRNA 实际上抑制了疾病而不只是延缓它。实际上,直到观察的 6 周, siRNA 治疗的小鼠没有显示了可见的呼吸窘迫特征。阴性对照 RNA 或 luc-siRNA (表 1) 显示在所有的试验中没有减轻症状 (数据没有显示)。

[0180] IN siRNA 是有效的感染后抗病毒药

[0181] 已经显示了如果在感染前给药, siRNA 能够抑制呼吸道病毒疾病,我们提出了一个问题,当感染一旦发生,它们是否具有治疗效果,因为这在儿科医学中是重要的目标。在该一系列试验中,我们在 RSV 感染的几天后施用 siRNA#1 并每天称量小鼠的体重。已知 RSV 感染后的至多 8-10 天一直减轻体重,之后根据起始接种物的过高或中等至低等,它们或者死亡或者缓慢恢复体重 (Haeberle, H. A. et al. J. Virol. 75, 878-890 (2001))。在相似的一组小鼠中,在预定的天数采集肺样品,以用于分析感染性病毒。如期望的一样,无 siRNA 治疗的小鼠维持其体重约 4 天 (p. i.), 接着逐渐减轻直到至少 9 天 (图 5a)。在 RSV 感染之前 (数据没有显示) 或与 RSV 感染的同时 (0 天) 用 siRNA 治疗的小鼠基本上显示未感染状态并持续不间断增加体重。在 1 天的时候接受 siRNA 的大部分小鼠也很难与假感染对照相区分。在接下来的几天 (1-4 天) 接受 siRNA 的那些显示越来越少的保护,尽管对于所有的治疗在所有的时间观察到了体重显著的改善。

[0182] 当在第 2, 4, 6, 8, 10, 和 16 天测量这些小鼠的肺 RSV 效价的时候显现了相似的图象。在无 siRNA 治疗的小鼠中,效价增长直到第 4-5 天,然后缓慢降低到第 16 天的无法检测的水平。RSV 感染之前或同时的 siRNA 治疗在所有测试天数内保持效价下降了 5000 倍的水平。越是在感染后的时间施用 siRNA,其效果就越小,但是在测试的任何天数内病毒效价一直低于未治疗对照。这显示了无论何时给药 siRNA,其降低了病毒复制的速率,产生了较低峰值的效价。接着,效价降低到可检测水平之下,并且施用 siRNA 的时间越早,效价降

低到可检测水平之下所用的时间也越少。例如,在未治疗的感染小鼠中肺 RSV 直到第 16 天 (p. i.) 可以检测到肺 RSV,但在第 1 天用 siRNA 治疗 (表 1) 的小鼠中第 10 天后就检测不到了。如前述,阴性对照 siRNA 或荧光素酶 siRNA (表 1) 在所有的试验中没有效果 (未显示数据)。总之,这些结果显示了甚至当感染后给药,RSV P siRNA 也具有治疗效果,并且相比未治疗组,小鼠通常具有更少的病状且恢复地更快。

[0183] 讨论

[0184] 该文的主要发现是适当设计的 siRNA,经鼻内施用,对呼吸道感染提供保护,同时提供了感染后施用的显著治疗。通过简单手持吸入器传送的小颗粒气雾剂的 siRNA 能够用于预防和治疗肺感染。当我们的手稿处于准备阶段的时候,两个报告显示了在鼠模型中 siRNA 抑制了流感病毒,该病毒是另一个主要的呼吸道病原体 ((Ge, Q., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101,8676-8681(2004), Tompkins, S. M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101,8682-8686(2004))。在一个研究中 (Ge, Q., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101,8676-8681(2004)),合成的 siRNA 或表达 siRNA 的质粒 DNA 通过 TV 和 IT 途径的结合而被施用。在其它的研究中 (Tompkins, S. M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101,8682-8686(2004)),首先通过水压 IV 递送 siRNA;均通过 IN 途径在 16-24 小时后用流感病毒感染小鼠并给予第二剂量的脂质载体中的 siRNA。在 2 天后测试到肺病毒的存在,发现对不同的流感株系具有 10-50 倍的抑制。相对先前的研究,我们针对 RSV 和 PIV 的研究提供了以下改进和简单性:(i) 递送只是单独鼻内给药,因此,相对的非扩散和无痛,使其适于基于吸入器或基于雾气的治疗;(ii) 无任何载体的 siRNA 显著有效,因此减少了潜在的载体负面作用的风险;(iii) 约 5 纳摩尔的 siRNA (70 μ g 的双链 RNA) 的单一剂量显示了对感染的全过程提供了有益效果。目标序列 (如 RSV P) 的更加广泛的筛选,更新化学物质的应用可以使得 siRNA 具有显著的更低的 IC₅₀ 和更好的药物动力学,从而导致使用更低的剂量。siRNA 表现了各种程度的非特异性、脱靶效应,尤其是高浓度时 (Jackson, A. L. et al. Nat. Biotechnol. 21,635-637(2003), Sledz, C. A., et al., Nat. Cell Biol. 5,834-839(2003), Persengiev, S. P., et al., RNA 10,12-18(2004), Bridge, A. J., et al., Nat. Genet. 34, 263-264(2003))。这在治疗中是明显关注的,并且 siRNA 的 IV 给药可以产生系统性的副作用。相反,鼻内递送的 siRNA 更期望被集中在呼吸组织中 (如果所述 siRNA 没有被独占性地局部定位),这样,最小化了副作用。通过鼻内施用合成的 siRNA 不激活 IFN 该不激活支持和扩展了这一发现:先前的化学合成的缺少 5' 磷酸基的 siRNA 不能激活培养细胞的 IFN 途径 (Kim, D. H. et al. Nat. Biotechnol. 22,321-325(2004))。总之,抗病毒活性与具有特异的 mRNA 击倒的相关性 (图 1),靶组织 (肺) 中的 siRNA 检测 (图 2b), IFN 活性的缺乏 (图 2c),和 siRNA 的病毒特异性效果 (图 1-3),所有的这些提供了抗病毒效果是特异性的,定向和是 RNAi 介导的。(iii) 呼吸道病毒,如 RSV 和 PIV,在感染呼吸组织中的组织嗜性方面表现了高选择性。这样,IN 递送保证了 siRNA 被定向于感染的位点——这是药理学的理想状态。

[0185] 虽然 RSV 和 HPIV 有时共感染,但是它们的相互作用被大大忽视。所观察到的一个 siRNA 被另一个 siRNA 抑制的现象需要进一步研究来确定其准确的原因。这一事实也发生在体外 (ex vivo (细胞培养)),从而反驳了认为是动物体内的体液因子和细胞因子,如干扰素的作用的结论,当然这些因素也不被安全排除。RSV 实际上抑制了干扰素

激活 (Schlender, J., et al., J. Virol. 74, 8234-8242 (2000), Ramaswamy, M., et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 30, 893-900 (2004)), 因此, 其应该促进而不是抑制 PIV 生长。其它的可能性是一个病毒的生长抑制另一个生长, 这是通过其它机理, 如细胞内资源的竞争。另一方面, 已知细胞内的 RNAi 机理是可饱和的, 因此两种 siRNA 可能潜在竞争该机理的固定量 (Barik, S. Virus Res. 102, 27-35 (2004), (Hutvagner, G, et al., PLoS Biol. 2, E98 (2004))。值得注意的是, 该竞争仅在相对高的 siRNA 剂量下才能被观察到, 例如, 使用几十或几百纳摩尔 (图 3)。然而, 仅有几纳摩尔时, 本发明的 siRNA 在小鼠中就提供了几乎完全的保护。这样, 对于 IC50 在低纳摩尔范围的 siRNA 而言, 所发现的竞争不能成为实际担心的问题。

[0186] 当 siRNA 用作预防药的时候, 其不仅预防感染而且抑制所测的疾病过程中各个方面的表现, 如体重, 肺病理, 呼吸参数和过敏反应标记 (图 4)。小鼠和人类的疾病过程的动力学比较相似, 但当感染 RSV 后, 这两个种类的免疫病理的改变就很快产生。当 siRNA 用作感染发生后的治疗药物时, 其不被期望能够校正已经发生的病理。即便如此, 对病毒进一步生长的抑制也会导致快速治愈和恢复 (图 5)。因此, 似乎治疗的“机会之窗”时刻存在于 RSV 感染的患者中, 但作为任何疾病, 都是早治疗应该能够获得更好的预后。裸 siRNA 的有效性需要解释。呼吸组织, 尤其是肺可能本身更容易接受小分子的互换, 或者是, 可能被感染时才变得如此。

[0187] 最后, 根据 siRNA-靶之间配对的严格性, 暴露于 siRNA 可引起抗 siRNA 的病毒的选择, 并且这在 HIV 中已经得到证明 (Das, A T. et al. J. Virol. 78, 2601-2605 (2004))。对于这里测试的 siRNA, 我们还没有正视这个问题。从 siRNA 治疗的鼠肺中移出的病毒生长在 A549 细胞培养物中, 发现其对于 siRNA 表现出与原始接种物相同的 IC50 (没有显示数据)。而且, 对 6 个独立噬斑纯化的 RSV 隔离群中的 P 基因的 siRNA 区域的测序显示了野生双亲序列 (数据没有显示)。即使偶然的抗性在将来发生, 可将具有低 IC50 且靶向 P mRNA 的不同区域或不同病毒的 mRNA 的第二 siRNA 用于多药物方案中, 由此减少病毒抗性发生的几率。

[0188] 方法

[0189] 病毒, siRNA 和其它试剂 RSVLong 株系和人 PIV 类型 3 (HPIV3) JS 株系生长在 HEp-2 单层上, 如对 RSV 的描述 (Burke, E., et al., Virology 252, 137-148 (1998), Burke, E., et al., J. Virol. 74, 669-675 (2000), Gupta, S., et al., J. Virol. 72, 2655-2662 (1998))。在约 70 小时从含游离的子代病毒的细胞外培养基收集 RSV 和在 50 小时收集 HPIV3。纯化病毒并用聚乙二醇 (MW 8,000) 沉淀, 然后用蔗糖梯度离心, 基本上如对 RSV 的描述 (Ueba, O. Acta. Med. Okayama 32, 265-272 (1978))。最终的产品具有 10^8 - 10^9 pfu/ml 的感染效价, 然后以小部分将其冷冻在 -80°C 保藏。在 Hep-2 上用中性红染色通过琼脂糖空斑试验测定所有的传染性病毒效价 (pfu) (Burke, E., et al., Virology 252, 137-148 (1998), Burke, E., et al., J. Virol. 74, 669-675 (2000), Gupta, S., et al., J. Virol. 72, 2655-2662 (1998))。

[0190] 从 Dharmacon 购买 siRNA 并按照生产者的建议处理 (Bitko, V. & Barik, S. BMC Microbiol. 1, 34 (2001)). The TransIT-TKO(R) reagent was from Minis Bio Corp (Madison, Wisconsin)。从家兔培植的 RSV-P 抗体, 用于所有的免疫组织学染色 (Bitko, V. & Barik, S. BMC Microbiol. 1, 34 (2001))。在羊中培养抗病毒体的多克隆

RSV 和 HPIV3 抗体并从 Chemicon(Temecula, California) 和 BiosPacific(Emeryville, California) 分别购买;在免疫印迹中核壳蛋白(N)是用这些抗体检测的主要病毒带。肌动蛋白抑制蛋白(profilin)抗体已有描述(Burke,E.,et al.,J.Virol.74,669-675(2000), Gupta, S., et al., J.Virol.72,2655-2662(1998))。

[0191] 病毒感染和 siRNA 治疗在单层上对 A549 细胞生长进行感染和 siRNA 治疗描述在(Bitko, V.& Barik, S.BMC Microbiol.1,34(2001))中。对小鼠的 RSV 的鼻内应用是已经确立的方法并引起细支气管炎。从 Charles River Laboratories 购买体重为 16-20g 的无病原体的 8-10 周的雌性 BALB/c 小鼠。通过腹膜内注射 0.2ml 的戊巴比妥(5mg/ml)进行麻醉,用于感染或施用 siRNA。用 0.3ml 的戊巴比妥麻醉后通过断颈使其无痛死亡。在生产者提供的稀释缓冲液中适当地稀释 siRNA 以致于所需的量包含在 1 μ l 内。试验前快速用 5 μ l 的 TransIT-TKO(R) 和 35 μ l 的 Opti-MEM(Gibco Life Technologies,Invitrogen, Carlsbad, CA) 将其混合以获得总体积为 41 μ l。当使用无载体的 siRNA 时,用 5 μ l 的 Opti-MEM 替代 5 μ l 的转染试剂。感染前快速将蔗糖纯化的病毒适当地稀释在冷磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,这样 10^7 pfu 的病毒包含在 30 μ l 中。假感染是用相同体积的无病毒 PBS 进行。将 siRNA 混合物和病毒均分别平分到两个鼻孔中,并用微量加液器给药(也就是每个鼻孔接受 20.5 μ l 中的 35 μ g siRNA 和 15 μ l 中的 0.5×10^7 pfu 病毒)。对于小鼠不需要任何的特殊设备,这是因为小鼠通过自然的呼吸吸入所有的液体。对于双感染,将 RSV 和 HPIV3 原液稀释,使得每个小鼠接受 10^7 pfu 的每个病毒的以及 5nmole(70 μ g)的混合物,所述混合物和前面所述的一样,包括相同体积的 siRNA#1 和 siRNA#4。所有的动物试验遵从规定的指导并经过 IACUC 核准。

[0192] 肺病毒分析和临床测量每日检查动物并称重。注意到了标准的 RSV 症状,所述症状包括:鼻粘液,由于淤血和细支气管炎而增加的呼吸速率,表皮暗淡,皮毛混乱和/或掉毛,和一般的嗜睡及抑郁。通过视频记录测量呼吸速率(每分钟的呼吸次数)(Volovitz, B.,et al.,Pediatr. Res. 24,504-507(1988))。喷嚏,嗤鼻和叹息不做记录。在感染后(PL)的不同天数,将肺移出,通过加下描述的感染病毒分析、免疫印迹分析,或免疫染色对 RSV 进行检测。

[0193] 为测量病毒效价,将肺在 2% FBS 补充的冷 DMEM 中匀浆(2mlDMEM/100mg 组织)。提取物在 2,000xg 下高速离心 10 分钟,然后测定悬浮液的系列稀释液的 pfu。对于病毒蛋白的免疫印迹(Burke,E.,et al.,Virology 252,137-148(1998)),将 10 μ l 的均匀样品(离心前的)加入到 10 μ l 的 2x SDS-PAGE 样品缓冲液中,在 98°C 下加热上述混合物 5 分钟,室温下在微离心管中离心澄清,然后用羊抗 RSV 和抗 HPIV3 抗体通过免疫印迹分析 10 μ l 的澄清悬浮液。为测量 IFN(Durbin, J.E.et al.J. Immunol. 168,2944-2952(2002)),将肺在 PBS 中匀浆,如上处理,然后通过最小检测量为 10pg/ml 的 ELISA 试剂盒(R&D Systems, Minneapolis, MN)分析系列稀释液。

[0194] 对于肺组织病理,灌注肺并固定在 10%缓冲甲醛中然后包埋在石蜡中。用苏木精和伊红染色多个厚度为 4 μ m 的切片,然后两个独立的研究人员在光学显微镜下分析细胞炎症。通过计算脉管和细支气管周围的浸润细胞的层数来分析炎症浸润。0-3 层的浸润细胞被认为是正常的,而脉管或细支气管的周围的 50%或 50%以上有多于三层的浸润细胞的话,则认为是不正常的。不正常的血管周围的空间和细支气管周围的空间除以全部的

周围空间就是作为病理分数。每个动物的每个肺总量约为 20 个单位空间。使用 10^7 RSV (无 siRNA) (Haeberle, H. A. et al. J. Virol. 75, 878-890 (2001)), 约 30-35% 的血管周围和支气管周围的空间在早期如第 1 天发现并在第 5 天达到峰值。

[0195] 对于免疫组织学 (Haeberle, H. A. et al. J. Virol. 75, 878-890 (2001)), 将肺组织包埋在 100% 的 OCT 化合物, 然后在 -80°C 下冷冻。将切片切割到载玻片上、风干, 在丙酮中固定, 在 PBS 中洗涤, 然后用 0.2% 的 Triton X-100 (PBS 中) 渗透, 室温下用 10% 羊血清在 PBS 中封闭 20 分钟。在 PBS 中多次洗涤后, 用 PBS 中稀释的含 1.5% 羊血清的抗 RSV-P 或抗 HPIV3 抗体将组织在室温下孵育 2 小时。在 PBS 中再次多次洗涤载玻片, 然后用结合 FITC 的抗兔和结合 TRITC 的抗羊免疫球蛋白 G 抗体检测两种抗体。室温下孵育 1 小时后, 在 PBS 中最后洗涤载玻片, 用 DABCO-DAPI 固定介质固定, 然后用荧光显微镜观察 (Bitko, V. & Barik, S. BMC Microbiol. 1, 34 (2001))。

[0196] 通过用 $5 \times 1.0\text{ml}$ 的普通生理盐水 (每 ml 含 $10\mu\text{g}$ 的吡啶美辛) 灌注支气管和肺来收集支气管肺泡灌注液 (BALF) (Bernhard, W. et al. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 25, 725-731 (2001)); 每个鼠的总 BALF 回收物是 4.2-4.4ml。丢弃含可见血污染的样品。 4°C 下 $5000 \times g$ 离心 15 分钟从 BALF 中除去细胞, 然后将样品储存在 -80°C 直到进一步分析。使用 ELISA 试剂盒按照生产者的建议 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) 测量 BALF 中的半胱氨酸白稀薄阿三烯结合物的浓度。根据产物插入 (product insert), 试剂盒与各种白细胞三烯的交叉反应性是 LTC₄ 100%, LTD₄ 115%, LTE₄ 63% 和 LTB₄ 1.2%。

[0197] 对于实时 PCR 试验, 从 HPIV3 感染的细胞中分离 RNA 并用 GeneAmp RNAPCR Core 试剂盒 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, California) 制备第一链 cDNA。通过来自 Premier Biosoft 的 Beacon Designer software v 2.13 设计引物。下面的引物用于扩增 HPIV3 P mRNA:

[0198] 5' -GGTCATCACACGAATGTACAAC-3' (SEQ ID NO:1) 和

[0199] 5' -CTTGGAACATCTGCAGATFGTC-3' (SEQ ID NO:2)

[0200] 使用 iQ Sybr Green SuperMix 在 BioRad Laboratories (Hercules, California) 的 iCycler iQ Quantitative PCR 系统中进行实时 PCR。用生产者的软件和 GAPDH 作为内部对照计算基因表达测量。

[0201] 提取肺中的 siRNA 反义链并使用末端标记了 ^{32}P 的互补的合成寡核苷酸通过如描述于 (Reinhart, B. J., et al., Genes & Dev. 16, 1616-1626 (2002)) 的 RNA 印迹杂交进行检测。

[0202] 统计分析. 分析治疗组之间和体外试验组之间的变化的手段如下: 通过单向方差分析 (one-way ANOVA), 然后用 Bonferroni 校正的 Student's t 检测。通过 Mann-Whitney 测试确定白细胞三烯浓度的增加。从至少 3 个独立的试验收集所有的数据。结果表示为平均数 $\pm$ SEM (图表中的错误范围)。P < 0.05 时被认为显著差异。

[0203] 表 1 siRNA 序列

名称	靶	序列号	siRNA 序列	IC50 (nM)
siRNA#1	RSV-P	<u>3</u>	5'-CGAUAAUUAACUGCAAGAdTdT-3'	18
		<u>4</u>	3'-dTdTGCUAUUAUAUUGACGUUCU-5'	
siRNA#2	RSV-P	<u>5</u>	5'-CCCUACACCAAGUGAUAAUdTdT-3'	80
		<u>6</u>	3'-dTdTGGGAUGUGGUUCACUAUUA-5'	
siRNA#3	RSV-P	<u>7</u>	5'-GAUGCCAUGAUUGGUUUAAdTdT-3'	>300
		<u>8</u>	3'-dTdTTCUACGGUACUAACCAAAUU-5'	
siRNA#4	HPIV3-P	<u>9</u>	5'-CGAGUUGUAUGUGUAGCAAdTdT-3'	15
		<u>10</u>	3'-dTdTGCUCAACAUAACAUCGUU-5'	
siRNA#5	HPIV3-P	<u>11</u>	5'-GAUAGACUCCUAGCAGGAdTdT-3'	>300
		<u>12</u>	3'-dTdTTCUAUCUGAAGGAUCGUCCU-5'	
Luc-siRNA	萤光素酶	<u>13</u>	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT-3'	--
		<u>14</u>	3'-dTdTGC AUGCGCCUUAUGAAGCU-5'	
阴性对照		<u>15</u>	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3'	--
		<u>16</u>	3'-dTdTAAAGAGGCUUGCACAGUGCA-5'	

[0205] RSV-P、HPIV3-P 和虫荧光素酶序列的 GenBank 序列号分别是 M22644、Z11575 和 X65324。注释: siRNA 序列是基于我们实验室的病毒株的实际测试;因此, siRNA#2 与 GenBank 序列具有一个核苷酸的差异 (M22644 中下划线的 C 是 U)。阴性对照 siRNA 序列来自 Qiagen (Valencia, California)。

序列表

<110> 南阿拉巴马州医学科学基底
(University of South Alabama College of Medicine)

<120>RSV、PIV 和其它呼吸道病毒的 RNAi 调节及其用途
(RNAI MODULATION OF RSV, PIV AND OTHER
RESPIRATORY VIRUSES AND USES THEREOF)

<130>18358-002W01

<150>US 11/151, 976

<151>2005-06-14

<150>US 60/621, 552

<151>2004-10-22

<150>US 11/151, 893

<151>2005-06-14

<160>16

<170>FastSEQ for Windows Version 4.0

<210>1

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>1

ggatcatcaca cgaatgtaca ac 22

<210>2

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>2

cttgaacat ctgcagattg tc 22

<210>3

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 通过合成生成的寡核苷酸 (Synthetically generated oligonucleotide)

<220>

<221>misc_feature

<222>20, 21

<223>n = deoxythymidine

<400>3

cgauaauaua acugcaagan n 21

<210>4

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 通过合成生成的寡核苷酸 (Synthetically generated oligonucleotide)

<220>

<221>misc_feature

<222>20, 21

<223>n = 脱氧胸苷 (deoxythymidine)

<400>4

ucuugcaguu auauuauagn n 21

<210>5

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 通过合成生成的寡核苷酸 (Synthetically generated oligonucleotide)

<220>

<221>misc_feature

<222>20, 21

<223>n = 脱氧胸苷 (deoxythymidine)

<400>5

cccuacacca agugauaun n 21

<210>6

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 通过合成生成的寡核苷酸 (Synthetically generated oligonucleotide)

<220>

<221>misc_feature

<222>20, 21

<223>n = 脱氧胸苷 (deoxythymidine)

<400>6

auuauacacuu gguguagggn n 21

<210>7

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 通过合成生成的寡核苷酸 (Synthetically generated oligonucleotide)

<220>

<221>misc_feature

<222>20,21

<223>n = 脱氧胸苷 (deoxythymidine)

<400>7

gaugccauga uugguuaan n 21

<210>8

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 通过合成生成的寡核苷酸 (Synthetically generated oligonucleotide)

<220>

<221>misc_feature

<222>20,21

<223>n = 脱氧胸苷 (deoxythymidine)

<400>8

uuaaaccaau cauggcaucn n 21

<210>9

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 通过合成生成的寡核苷酸 (Synthetically generated oligonucleotide)

<220>

<221>misc_feature

<222>20,21

<223>n = 脱氧胸苷 (deoxythymidine)

<400>9

cgaguuguau guguagcaan n 21

<210>10

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 通过合成生成的寡核苷酸 (Synthetically generated oligonucleotide)

<220>

<221>misc_feature

<222>20, 21

<223>n = 脱氧胸苷 (deoxythymidine)

<400>10

uugcuacaca uacaacucgn n 21

<210>11

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 通过合成生成的寡核苷酸 (Synthetically generated oligonucleotide)

<220>

<221>misc_feature

<222>20, 21

<223>n = 脱氧胸苷 (deoxythymidine)

<400>11

gauagacuuc cuagcaggan n 21

<210>12

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 通过合成生成的寡核苷酸 (Synthetically generated oligonucleotide)

<220>

<221>misc_feature

<222>20, 21

<223>n = 脱氧胸苷 (deoxythymidine)

<400>12

uccugcuagg aagucuaucn n 21

<210>13

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 通过合成生成的寡核苷酸 (Synthetically generated oligonucleotide)

<220>

<221>misc_feature

<222>20, 21

<223>n = 脱氧胸苷 (deoxythymidine)

<400>13

cguacgcgga auacuucgan n 21

<210>14

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 通过合成生成的寡核苷酸 (Synthetically generated oligonucleotide)

<220>

<221>misc_feature

<222>20, 21

<223>n = 脱氧胸苷 (deoxythymidine)

<400>14

ucgaaguauu ccgcguacgn n 21

<210>15

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 通过合成生成的寡核苷酸 (Synthetically generated oligonucleotide)

<220>

<221>misc_feature

<222>20, 21

<223>n = 脱氧胸苷 (deoxythymidine)

<400>15

uucuccgaac gugucacgun n 21

<210>16

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 通过合成生成的寡核苷酸 (Synthetically generated oligonucleotide)

<220>

<221>misc_feature

<222>20, 21

<223>n = 脱氧胸苷 (deoxythymidine)

<400>16

acgugacacg uucggagaan n 21

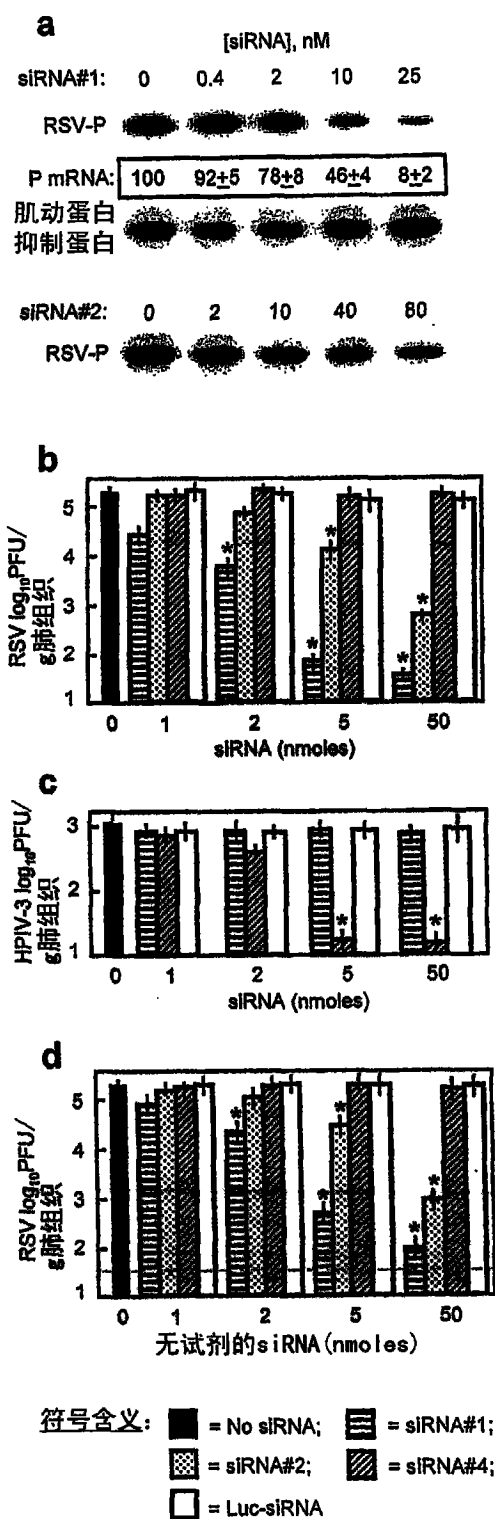


图 1

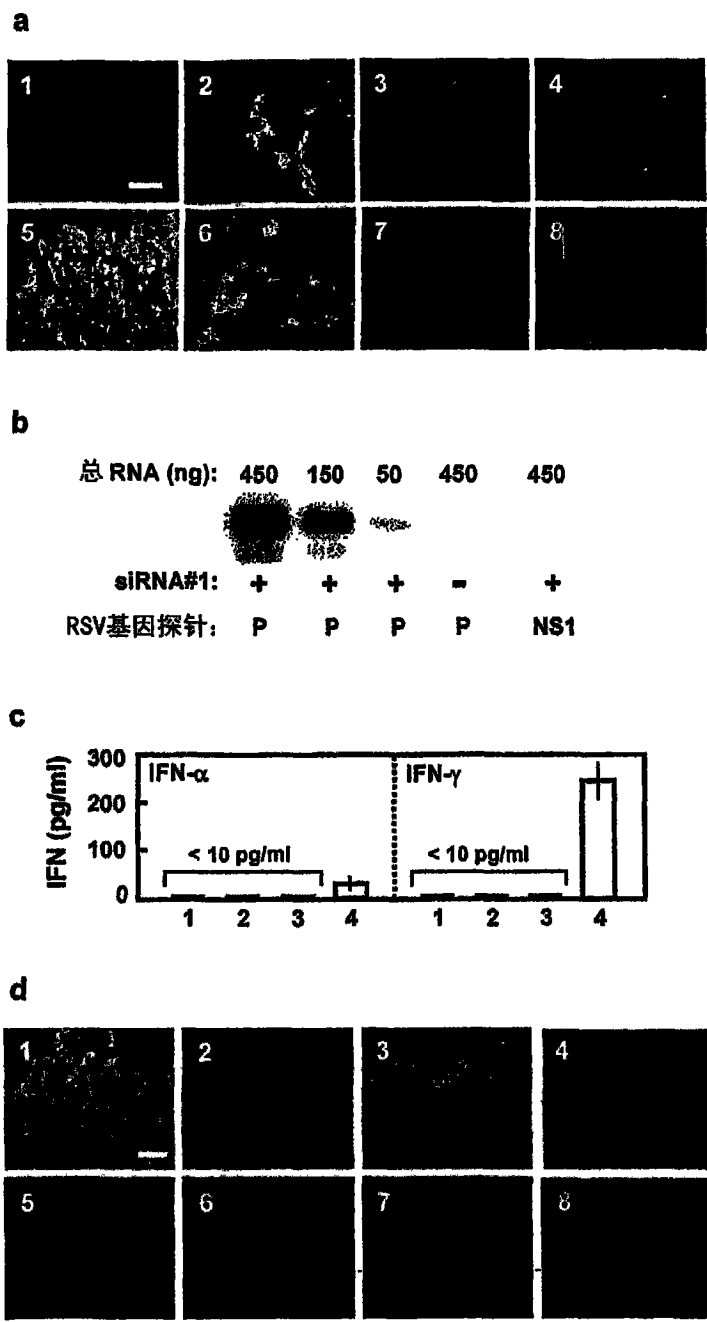


图 2

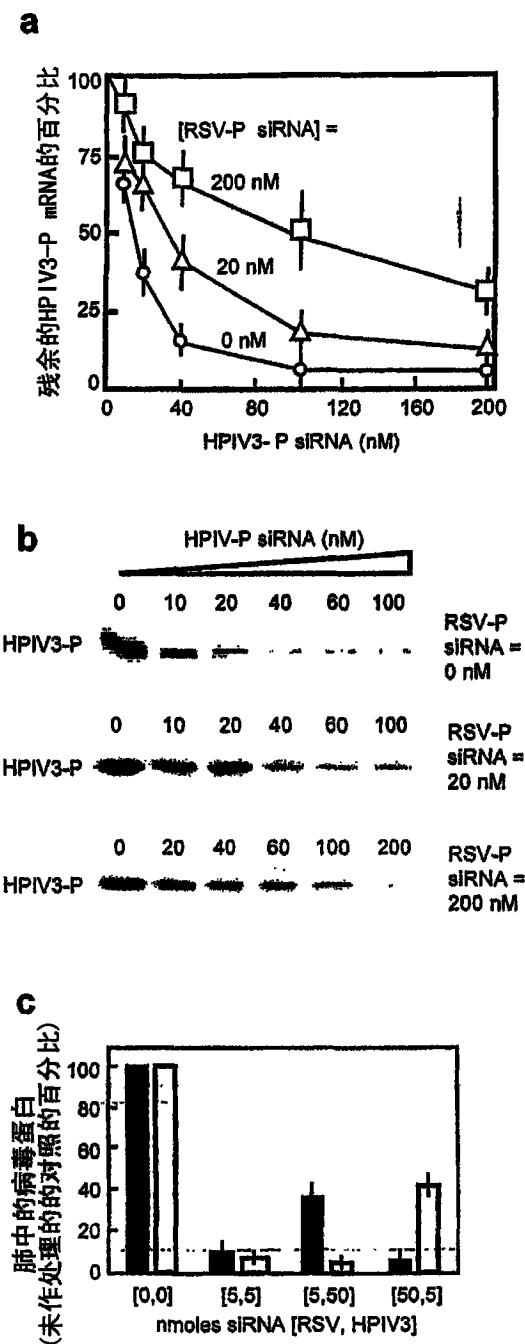


图 3

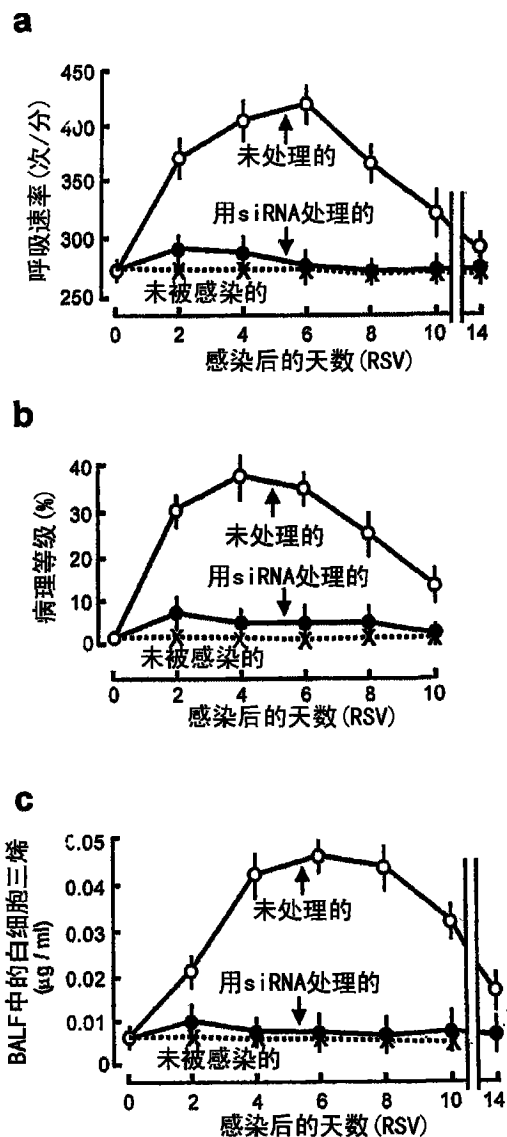


图 4

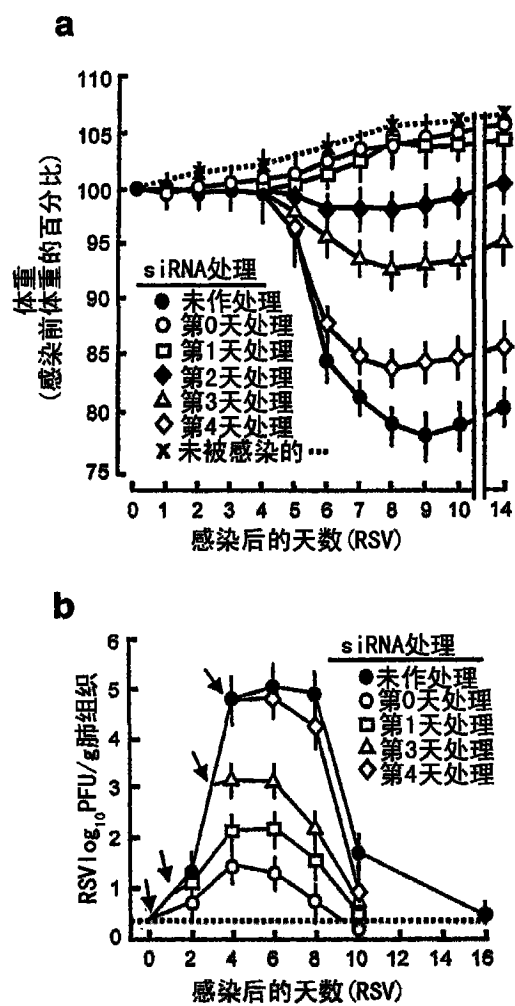


图 5