



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101815536 A

(43) 申请公布日 2010.08.25

(21) 申请号 200880110028.3

(22) 申请日 2008.10.01

(30) 优先权数据

60/976,552 2007.10.01 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.04.01

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/078380 2008.10.01

(87) PCT申请的公布数据

W02009/046059 EN 2009.04.09

(71) 申请人 爱尔康研究有限公司

地址 美国德克萨斯州

(72) 发明人 A·R·谢帕德

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 史文静

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 10 页

(54) 发明名称

自补 AAV 介导的干扰 RNA 分子递送以治疗或
预防眼病

(57) 摘要

本发明提供了递送干扰 RNA 分子至患者眼以
治疗眼病的方法。具体来说,本发明的方法包括自
补腺伴随病毒(scAAV)载体的应用,该载体能递
送干扰 RNA 分子至患者眼,从而抑制与眼病相关
的基因的表达。

1. 减弱患者眼中靶 mRNA 的表达的方法,其包括:
 - (a) 提供含有干扰 RNA 分子的自补腺伴随病毒(scAAV)载体;和
 - (b) 将该 scAAV 载体施用至患者眼,其中干扰 RNA 分子能减弱眼中靶 mRNA 的表达
2. 权利要求 1 的方法,其中 scAAV 载体被包装进 scAAV 病毒粒体中。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述载体通过眼内注射、眼局部应用、静脉内注射、口服施用、肌肉注射、腹膜内注射、经皮用或经黏膜用来施用。
4. 权利要求 1 的方法,其中干扰 RNA 分子是 siRNA、miRNA 或 shRNA。
5. 权利要求 1 的方法,其中靶 mRNA 与眼病相关。
6. 权利要求 5 的方法,其中眼病与眼血管生成、干眼、眼炎症状况、眼高血压或青光眼相关。
7. 含有自补腺伴随病毒(scAAV)载体的药物组合物,所述载体携带有治疗有效量的干扰 RNA 分子和眼科可接受的载体,其中干扰 RNA 分子能减弱与眼病相关基因的表达。
8. 权利要求 7 的组合物,其中 scAAV 载体被包装在 scAAV 病毒粒体中。
9. 权利要求 7 的方法,其中干扰 RNA 分子是 siRNA、miRNA 或 shRNA。
10. 权利要求 7 的方法,其中眼病与眼血管生成、干眼、眼炎症状况、眼高血压或青光眼相关。

自补 AAV 介导的干扰 RNA 分子递送以治疗或预防眼病

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求在 35U. S. C. § 119 下提交于 2007 年 10 月 1 号的美国临时专利申请序列号 60/976552 的优先权权益, 该申请的整体内容通过引用并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及通过自补 (self-complementary) 腺伴随病毒 (scAAV) 载体向患者的眼递送干扰 RNA 分子的方法。本发明亦涉及向有此需要的患者施用本发明的干扰 RNA 分子-scAAV 载体以治疗眼病 (ocular disorder) 的方法。

[0004] 发明背景

[0005] RNA 干扰 (RNAi) 是用双链 RNA (dsRNA) 来使基因表达沉默的过程。RNAi 由短 (即 < 30 个核苷酸) 双链 RNA (“dsRNA”) 分子诱发, 所述分子存在于细胞内 (Fire 等人, 1998, *Nature* 391:806-811)。这些被称为“短干扰 RNA”或“siRNA”的短 dsRNA 分子导致与所述 siRNA 享有序列同源性的信使 RNA (“mRNA”) 降解至单个核苷酸水平 (resolution) (Elbashir 等人, 2001, *Genes Dev*, 15:188-200)。人们相信 siRNA 的一条链并入已知为 RNA- 诱导沉默复合体 (RISC) 的核糖核蛋白中。RISC 用这条 siRNA 链来鉴定与所并入的 siRNA 链至少部分互补的 mRNA 分子, 然后切割这些靶 mRNA 或抑制它们的翻译。siRNA 看来像多周转 (multiple-turnover) 酶一样被回收利用, 1 个 siRNA 分子能够引起大约 1000 个 mRNA 分子的切割。因此, siRNA 介导的 RNAi 降解比现有的抑制靶基因表达的技术更有效。

[0006] RNAi 提供了一种非常让人兴奋的治疗以及 / 或者预防疾病的手段。与各种传统疗法相比, RNAi 的一些主要好处包括, RNAi 高特异性地靶向与疾病过程相关的非常特异的基因, 从而减少或者消除靶效应的能力; RNAi 是正常的细胞过程, 它导致高度特异的 RNA 降解及其基因沉默效应的细胞间扩散; 并且, RNAi 不像很多基于抗体的疗法那样触发宿主免疫应答。

[0007] 用 siRNA 来特异性体内靶向和敲除眼疾病靶基因与递送 siRNA 至小梁网 (TM) 靶组织中的某些物理限制有关。另外, 由于核酸通常具有短的玻璃体内半衰期, 为了实现干扰 RNA 的连续存在, 可能需要反复的眼内注射。基于这些原因, 需要长期递送的方法。

[0008] 已有一些干扰 RNA 递送的方法正在被测试 / 开发用于体内使用。例如, 可将 siRNA 在盐溶液中“裸露地”递送; 与聚阳离子、阳离子脂质 / 脂质转染试剂或阳离子肽络合递送; 作为特定分子缀合物 (例如胆固醇修饰的 siRNA、TAT-DRBD/siRNA 复合体) 的组分递送; 作为脂质体的组分递送; 以及作为纳米颗粒的组分递送。

[0009] 用玻璃体内或前眼房 (intracameral) 递送的腺病毒 shRNA 的 TM 的病毒转导是一种可能的手段, 但是这有来自在人中使用的一些不利后果, 包括由抗腺病毒应答消除而导致的瞬时表达。腺伴随病毒 (AAV) 由单链 DNA 基因组组成, 它们毒性有限, 已经被用作基因疗法的病毒载体。遗憾的是, AAV 无法有效地转导 TM 细胞。

[0010] 由于这些方法已经示出不同程度的成功, 仍然需要新的改良的方法来体内递送 siRNA 分子以实现并增强 RNAi 的治疗潜力。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供了在患者的眼中减弱靶 mRNA 表达的方法,包括:(a) 提供含有干扰 RNA 分子的自补腺伴随病毒(scAAV)载体;及(b)将该 scAAV 载体施用至患者眼,其中干扰 RNA 分子能减弱眼中靶 mRNA 的表达。

[0013] 一方面,患者有眼病,诸如眼血管生成、干眼、眼炎症状况(ocular inflammatory conditions)、眼高血压(ocular hypertension)或青光眼。另一方面,干扰 RNA 分子靶向与眼病相关的基因,所述眼病诸如眼血管生成、干眼、眼炎症状况、眼高血压或青光眼。

[0014] 例如通过眼内注射、眼局部应用(ocular topical application)、静脉内注射、口服施用、肌肉注射、腹膜内注射、经皮用(transdermal application)或经黏膜用(transmucosal application)来施用载体。

[0015] 本发明也提供了含有自补腺伴随病毒(scAAV)载体的药物组合物,所述载体携带有治疗有效量的干扰 RNA 分子和眼科可接受的载体,其中干扰 RNA 分子能减弱与眼病相关基因的表达。scAAV 载体可以被包装(package)进 scAAV 病毒粒体中。

[0016] 本发明的具体的优选实施方案将从下面对某些优选实施方案的更详细描述和权利要求中显而易见。

[0017] 发明详述

[0018] 在此所述详细情况采取举例方式,仅用于本发明的优选实施方案的说明性讨论,其目的是为了提供本发明的各种实施方案之原理及概念方面被认为是最有用、最易懂的描述。在这点上,未试图显示比本发明的基本理解所需的那些更详细的本发明的结构细节,与附图和/或实施例相关的描述使得本领域的技术人员清楚知道本发明的多种形式如何具体到实践中。

[0019] 以下的定义及解释,除非在接下来的实例中清楚无疑地被更改、或者该意义的使用导致任何的释义无意义或基本无意义,否则便意味且意图以任何将来的释义限定。在某术语的释义会导致该术语无意义或基本无意义的情况下,该定义应从第三版韦氏词典(Webster's Dictionary)或本领域技术人员公知的词典,诸如牛津生物化学及分子生物学词典(Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology)(Anthony Smith 编辑,牛津大学出版社(Oxford University Press),牛津,2004)中得出。

[0020] 本文中用的所有百分比,除非另外说明,皆指以重量计的百分比。

[0021] 本文所用的术语单数形式(“a”和“an”),除非另外说明,否则意为“一个(one)”,“至少一个(at least one)”或者“一个或更多(one or more)”。除非上下文另有需要,否则本文所用的单数术语应当包括复数形式,而复数术语应当包含单数形式。

[0022] 在某些实施方案中,本发明提供减弱患者眼内靶 mRNA 表达的方法,其包括:(a) 提供自补腺伴随病毒(scAAV)载体,该载体含有靶向在眼内表达的基因的干扰 RNA 分子;以及(b)施用该 scAAV 载体至患者眼,其中干扰 RNA 分子可以减弱眼中靶 mRNA 的表达。在特定的实施方案中,该 scAAV 载体被包装(package)于 scAAV 病毒粒体中。

[0023] 在某些实施方案中,本发明提供预防或治疗患者眼病的方法,所述方法包括:(a) 提供自补腺伴随病毒(scAAV)载体,该载体含有靶向与眼病相关基因的干扰 RNA 分子;以及(b)施用该 scAAV 载体至患者眼,其中干扰 RNA 分子可以减弱与眼病相关基因的表达。scAAV 载体可被包装(package)于 scAAV 病毒粒体中。在特定的实施方案中,眼病与升高的眼内

压 (IOP), 比如眼高血压或青光眼有关。

[0024] 本文中使用的术语“患者”是指患有眼病或处于患上眼病风险的人或其他哺乳动物。与此类病相关的眼部结构可以包括例如眼 (eye)、视网膜、脉络膜、晶状体、角膜、小梁网、虹膜、视神经、视神经头、巩膜、前段或后段、或睫状体。在一些实施方案中, 患者患有与小梁网 (TM) 细胞、睫状上皮细胞或眼的其它细胞类型相关的眼病。

[0025] 本文中所用的术语“眼病”包括与眼血管生成、干眼、炎症状况、眼高血压相关的状况, 以及与升高的眼内压 (IOP) 如青光眼相关的眼疾病。

[0026] 本文中所用的术语“眼血管生成”包括例如, 眼血管生成前状况 (ocular pre-angiogenic conditions) 及眼血管生成状况 (ocular angiogenic condition), 并包括眼血管生成、眼新血管形成、视网膜水肿、糖尿病性视网膜病变、与视网膜缺血相关的后遗症、后段新血管形成 (PSNV) 以及新生血管性青光眼。例如, 本发明的方法中使用的干扰 RNA 在治疗下述患者中有益, 所述患者患有眼血管生成、眼新血管形成、视网膜水肿、糖尿病性视网膜病变、与视网膜缺血相关的后遗症、后段新血管形成 (PSNV) 以及新生血管性青光眼, 或者所述患者处于发展此类状况的风险。术语“眼新血管形成”包括年龄相关性黄斑变性、白内障、急性缺血性视神经病变 (AION)、视网膜震荡、视网膜脱离、视网膜撕裂或视网膜裂孔、医源性视网膜病变及其他缺血性视网膜病变或视神经病变、近视、色素性视网膜炎和 / 或诸如此类。

[0027] 本文中所用的术语“炎症状况”包括例如眼部炎症及过敏性结膜炎等状况。

[0028] 本文中所用的术语“重组 AAV (rAAV) 载体”是指来自重组 AAV 的含有至少一个末端重复序列的核酸。自补 AAV (scAAV) 载体含有双链载体基因组, 该基因组通过从一个 rAAV TR 删除末端解离位点 (terminal resolution site, TR) 而形成, 防止了在被突变端的复制起始。这些构建体生成单链、反向重复序列基因组, 该基因组在每一端有野生型 (wt) TR, 在中间有突变的 TR。已知数种天然存在及杂种的 AAV 血清型, 包括 AAV-1、AAV-2、AAV-3A、AAV-3B、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10 和 AAV-11 (Choi 等人, 2005, Curr. Gene Ther. 5 :299-310)。本领域技术人员会知道 scAAV 载体可以基于以上任意或其他 AAV 血清型来产生。

[0029] 本文中所用的短语“scAAV 病毒颗粒”是指含有 scAAV 载体和蛋白外壳的完整病毒颗粒, 根据本文所述发明, 它能够感染宿主细胞并将干扰 RNA 分子递送到宿主细胞中。

[0030] Xu 等人 (2005, Mol Ther 11 :523-530) 和 Borrás 等人 (2006, J Gene Med 8 :589-602) 进一步论述了含有干扰 RNA 分子 (比如本文所提供的那些) 的 scAAV 载体及 scAAV 病毒颗粒的产生。Xu 等人用 scAAV 载体将 siRNA 递送到抗多种药物性人乳腺癌和口癌细胞中, 以抑制 MDR1 基因表达。Borrás 等人展示了高效 scAAV 转导人小梁网 (TM) 细胞和人 TM 器官灌注培养物 (perfusion organ culture)。另外, Yokoi, K 等人 (2007, Invest Ophthalmol Vis Sci, 48 :3324-3328) 向视网膜下间隙 (subretinal space) 注射 2 型 scAAV 载体并观察到绿色荧光蛋白在视网膜上皮细胞表达。

[0031] 本发明的方法可用于使用 RNA 干扰减弱患者眼中特定基因的表达。

[0032] RNA 干扰 (RNAi) 是用双链 RNA (dsRNA) 来沉默基因表达的方法。尽管不希望受到理论限制, RNAi 由 RNase III 样酶 dicer 将较长的 dsRNA 切成小段干扰 RNA (siRNA) 开始。siRNA 是长度通常为大约 19 到 28 个核苷酸、或 20 到 25 个核苷酸、或 21 到 22 个核苷酸的

dsRNA,通常包含 2 个核苷酸的 3' 突出端,以及 5' 磷酸和 3' 羟基末端。siRNA 的一条链并入已知为 RNA 诱导沉默复合体 (RISC) 的核糖核蛋白复合体中。RISC 用这条 siRNA 链来鉴定与所并入的 siRNA 链至少部分互补的 mRNA 分子,然后切割这些靶 mRNA 或抑制它们的翻译。因此,这条并入 RISC 的 siRNA 链已知为指导链或反义链。另一条 siRNA 链,已知为过客链或有义链,从 siRNA 中被排除掉并且与靶 mRNA 至少部分同源。本领域的技术人员会意识到,原则上 siRNA 的任意一条链都可以并入 RISC 中并发挥指导链的功能。但是 siRNA 的设计(例如在期望的指导链 5' 端减少的双链体稳定性)可以有利于期望的指导链并入 RISC 中。

[0033] siRNA 的反义链是 siRNA 的主动指导物 (active guiding agent),因为所述反义链被并入 RISC,从而使得 RISC 能鉴定与反义 siRNA 链至少部分互补的靶 mRNA 用于切割或翻译抑制。具有与指导链至少部分互补的序列的 mRNA 的 RISC- 介导的切割导致该 mRNA 和由这一 mRNA 所编码的相应蛋白质的稳态水平的降低。可选地, RISC 还可以通过无靶 mRNA 切割的翻译阻抑来降低相应蛋白质的表达。

[0034] 干扰 RNA 似乎是以催化方式作用于对靶 mRNA 的切割,也就是说,干扰 RNA 能以亚化学计量的量来达到靶 mRNA 的抑制。与反义疗法相比,在这种切割条件下,提供疗效所需的干扰 RNA 显著更少。

[0035] 在某些实施方案中,本发明提供了递送干扰 RNA 以抑制靶 mRNA 表达,从而降低患有眼病的患者中靶 mRNA 水平的方法。

[0036] 本文中所用的短语“减弱靶 mRNA 表达”是指施用或表达一定量的干扰 RNA (例如 siRNA),以通过 mRNA 切割或通过直接翻译抑制,来降低靶 mRNA 向蛋白质的翻译。本文所用的术语“抑制”、“沉默”以及“减弱”,是指与没有本发明方法中使用的干扰 RNA 存在时靶 mRNA 或相应蛋白质的表达相比,该靶 mRNA 或相应蛋白质的表达可测量的降低。靶 mRNA 或相应蛋白质表达的降低通常被称为“敲低 (knock-down)”,并且被报道为相对于非靶向对照 RNA (例如非靶向对照 siRNA) 的施用或表达后存在的水平。本文的实施方案预期将表达敲低 50% 至 100% 之间 (包括端点) 的量。但达到这样的敲低水平并非本发明的目的所必需的。

[0037] 通过用定量聚合酶链式反应 (qPCR) 扩增来测量 mRNA 水平或通过用 Western 印迹法或酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来测量蛋白质水平来通常评估敲低。分析蛋白质水平提供了对 mRNA 切割和翻译抑制二者的评估。其它测量敲低的技术包括 RNA 溶液杂交、核酸酶保护、Northern 杂交、用微阵列的基因表达监控、抗体结合、放射免疫测定和荧光激活细胞分析。

[0038] 通过观察眼病症状的改善,可以推断出在人或其它哺乳动物中干扰 RNA 分子减弱了靶基因的表达,包括例如,例如眼内压降低指示了青光眼靶基因的抑制。

[0039] 在一个实施方案中,单种干扰 RNA 分子被递送以降低靶 mRNA 水平。在其他实施方案中,两种或多种靶向 mRNA 的干扰 RNA 被施用以降低靶 mRNA 水平。可以在同一个 scAAV 载体或分别的载体中递送干扰 RNA。

[0040] 本文所用的术语“干扰 RNA”及“干扰 RNA 分子”是指所有能与 RISC 相互作用并参与 RISC 介导的基因表达变化的 RNA 或 RNA 样分子。其他能与 RISC 相互作用的干扰 RNA 分子的实例包括短发夹 RNA (shRNA)、单链 siRNA、微小 RNA (miRNA) 及 dicer- 底物 27-mer

双链体。能与 RISC 相互作用的“RNA 样”分子的实例包括 siRNA、单链 siRNA、微小 RNA 以及 shRNA 分子,所述分子含有一个或多个经化学修饰的核苷酸、一个或多个非核苷酸、一个或多个脱氧核糖核苷酸,以及 / 或者一个或多个非磷酸二酯键。因此, siRNA、单链 siRNA、shRNA、miRNA 以及 dicer- 底物 27-mer 双链体是“干扰 RNA”或“干扰 RNA 分子”的子集。

[0041] 本文中所用的术语“siRNA”,除非另外说明,否则都是指双链干扰 RNA。本发明的方法中使用的 siRNA 通常是含有两条核苷酸链的双链核酸分子,每条链有大约 19 到大约 28 个核苷酸(即约 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 或 28 个核苷酸)。本发明方法中使用的干扰 RNA 通常有约 19 到约 49 个核苷酸的长度。当提到双链干扰 RNA 时,短语“19 到 49 个核苷酸长”是指反义链和有义链独立地有约 19 到约 49 个核苷酸的长度,包括其中有义链和反义链通过接头分子连接起来的干扰 RNA 分子。

[0042] 已经发现单链干扰 RNA 实现 mRNA 沉默,尽管不如双链 RNA 有效。因此,本发明的实施方案也提供了施用单链干扰 RNA。与上述关于双链干扰 RNA 一样,单链干扰 RNA 长约 19 到大约 49 个核苷酸。单链干扰 RNA 具有 5' 磷酸或者在 5' 位置被原位或体内磷酸化。术语“5' 磷酸化”用于描述例如具有磷酸基团的多核苷酸或寡核苷酸,该磷酸基团在该多核苷酸或寡核苷酸的 5' 端以酯键与糖(例如核糖、脱氧核糖或者其类似物)的 C5 羟基相连。

[0043] 单链干扰 RNA 可以化学合成或通过体外转录合成,或从本文所述(根据双链干扰 RNA)的载体或表达盒内源性表达。5' 磷酸基团可通过激酶添加,或者 5' 磷酸可以是核酸酶切割 RNA 的结果。发夹干扰 RNA 是单分子(比如单寡核苷酸链),它含有以茎-环或发夹结构(如 shRNA)的干扰 RNA 的有义链和反义链。例如, shRNA 可从这样 DNA 载体表达,该载体中编码有义干扰 RNA 链的 DNA 寡核苷酸通过短的间隔区与编码反向互补反义干扰 RNA 链的 DNA 寡核苷酸相连。如果所选择的表达载体需要,可以添加 3' 末端 T's 和形成限制性位点的核苷酸。得到的 RNA 转录产物折叠到自己上形成茎-环结构。

[0044] 本文中所用的短语“靶序列”和“靶 mRNA”是指能被本发明方法中所用的干扰 RNA 识别的 mRNA 或 mRNA 序列的部分,其中干扰 RNA 如本文所述沉默基因表达。

[0045] 使用可用的设计工具来选择在靶 mRNA 序列内的干扰 RNA 靶序列(如 siRNA 靶序列)。提供了用于选择 siRNA 的靶序列的技术,例如,通过由 Tuschl, T. 等人, " The siRNA User Guide, " (2004 年 5 月 6 日修订,可以在 Rockefeller University 网站获取;技术公报 #506, " siRNA Design Guidelines, " Ambion Inc (Ambion 的网站);和其他基于网页的设计工具,例如在 Invitrogen、Dharmacon、Integrated DNA Technologies、Genscript 或 Proligo 网站提供。最初的搜索参数可以包括 35% 到 55% 之间的 G/C 含量和 19 到 27 个核苷酸的 siRNA 长度。靶序列可以位于 mRNA 的编码区或者 5' 或 3' 非翻译区中。靶序列可用于衍生干扰 RNA 分子,例如此处所述的那些。可以通过转染表达靶 mRNA 的细胞随后评估如此处所述的敲低来体外测试对应于靶序列的干扰 RNA。可以使用本领域技术人员已知动物模型在体内进一步评估干扰 RNA。

[0046] 可如下在体外评估干扰 RNA 敲低例如 HeLa 细胞中内源性靶基因表达水平的能力。在转染前 24 小时将 HeLa 细胞平板接种在标准生长培养基(例如,补充了 10% 胎牛血清的 DMEM)中。使用例如 Dharmafect 1 (Dharmacon, Lafayette, CO) 根据生产商的教导以 0.1nM 到 100nM 的干扰 RNA 浓度进行转染。将 SiCONTROL™ 非靶向 siRNA#1 和 siCONTROL™ 亲环蛋白 B siRNA (Dharmacon) 分别用作阴性和阳性对照。在转染后 24 小时通过 qPCR 评估靶 mRNA 水

平和亲环蛋白 B mRNA (PPIB, NM_000942) 水平, 使用例如优选覆盖靶位点的 **TAQMAN®** 基因表达测定法 (Applied Biosystems, Foster City, CA)。当转染效率是 100% 时, 阳性对照 siRNA 给出了亲环蛋白 B mRNA 的基本完全的敲低。因此, 通过参考转染了亲环蛋白 B siRNA 的细胞中亲环蛋白 B mRNA 水平来就转染效率校正靶 mRNA 敲低。可以在转染后约 72 小时 (实际的时间取决于蛋白质更新率) 通过例如 western 印迹评估靶蛋白水平。用于从培养的细胞分离 RNA 和 / 或蛋白质的标准技术是本领域技术人员已知的。为了降低非特异性、脱靶效应的机会, 使用干扰 RNA 的最低可能的浓度, 其将产生希望水平的靶基因表达敲低。人角膜上皮细胞或其它人眼细胞系也可用于评估干扰 RNA 对内源靶基因的敲低水平的能力。

[0047] 在某些实施方案中干扰 RNA 分子 - 配体缀合物含有干扰 RNA 分子, 其靶向与眼病相关的基因。设计本发明的干扰 RNA 以靶向的 mRNA 靶基因的实例包括与影响视网膜的病症相关的基因, 与青光眼相关的基因, 和与眼炎症相关的基因。

[0048] 与视网膜病症相关的 mRNA 靶基因的实例包括酪氨酸激酶, 内皮 (TEK); 补体因子 B (CFB); 低氧诱导因子 1, α 亚基 (HIF1A); HtrA 丝氨酸蛋白酶 1 (HTRA1); 血小板 - 衍生生长因子受体 β (PDGFRB); 趋化因子, CXC 基序, 受体 4 (CXCR4); 胰岛素样生长因子 I 受体 (IGF1R); 血管生成素 2 (ANGPT2); v-fos FBJ 鼠骨肉瘤病毒癌基因同源物 (FOS); 组织蛋白酶 L1, 转录变体 1 (CTSL1); 组织蛋白酶 L1, 转录变体 2 (CTSL2); 胞内黏着分子 1 (ICAM1); 胰岛素样生长因子 I (IGF1); 整联蛋白 α 5 (ITGA5); 整联蛋白 β 1 (ITGB1); 核因子 κ -B, 亚基 1 (NFKB1); 核因子 κ -B, 亚基 2 (NFKB2); 趋化因子, CXC 基序, 配体 12 (CXCL12); 肿瘤坏死因子 - α - 转化酶 (TACE); 以及激酶插入结构域受体 (KDR)。

[0049] 和青光眼相关的靶基因的实例包括碳酸酐酶 II (CA2); 碳酸酐酶 IV (CA4); 碳酸酐酶 XII (CA12); β 1 肾上腺素能受体 (ADBR1); β 2 肾上腺素能受体 (ADBR2); 乙酰胆碱酯酶 (ACHE); Na⁺/K⁺-ATP 酶; 溶质载体家族 12 (钠 / 钾 / 氯化物转运蛋白), 成员 1 (SLC12A1); 溶质载体家族 12 (钠 / 钾 / 氯化物转运蛋白), 成员 2 (SLC12A2); 结缔组织生长因子 (CTGF); 血清淀粉样 A (SAA); 分泌的 frizzled- 相关蛋白 1 (sFRP1); gremlin (GREM1); 赖氨酰氧化酶 (LOX); c-Maf; rho- 相关的含卷曲螺旋的蛋白激酶 1 (ROCK1); rho- 相关的含卷曲螺旋的蛋白激酶 2 (ROCK2); 纤溶酶原激活物抑制剂 1 (PAI1); 内皮分化, 鞘脂 G 蛋白偶联受体, 3 (Edg3R); 肌纤蛋白 (MYOC); NADPH 氧化酶 4 (NOX4); 蛋白激酶 C δ (PKC δ); 水通道蛋白 1 (AQP1); 水通道蛋白 4 (AQP4); 补体级联系统的成员; ATP 酶、H⁺ 转运, 溶酶体 V1 亚基 A (ATP6V1A); 间隙连接蛋白 α -1 (GJA1); 甲酰胺受体 1 (FPR1); 甲酰胺受体样 1 (FPRL1); 白介素 8 (IL8); 核因子 κ -B, 亚基 1 (NFKB1); 核因子 κ -B, 亚基 2 (NFKB2); 衰老蛋白 1 (PSEN1); 肿瘤坏死因子 - α - 转化酶 (TACE); 转化生长因子 β 2 (TGFB2); 瞬时受体潜在阳离子通道 (transient receptor potential cation channel), 亚家族 V, 成员 1 (TRPV1); 氯离子通道 3 (CLCN3); 间隙连接蛋白 α -5 (GJA5); 以及壳多糖酶 3 样 -2 (CHI3L2)。

[0050] 和眼炎症相关的 mRNA 靶基因的实例包括肿瘤坏死因子受体超家族, 成员 1A (TNFRSF1A); 磷酸二酯酶 4D, cAMP 特异 (PDE4D); 组胺受体 H1 (HRH1); 脾酪氨酸激酶 (SYK); 白介素 1 β (IL1B); 核因子 κ -B, 亚基 1 (NFKB1); 核因子 κ -B, 亚基 2 (NFKB2); 以及肿瘤坏死因子 - α - 转化酶 (TACE)。

[0051] 此类靶基因在例如美国专利申请中有描述, 所述专利申请具有公开号

20060166919、20060172961、20060172963、20060172965、20060223773、20070149473，以及 20070155690 中，其公开内容以其整体引入作为参考。

[0052] 在一些实施方案中，本发明提供了降低患者眼内压的眼药物组合物，所述组合物含有自补腺伴随病毒 (scAAV) 载体，该载体能在眼科可接受的运载体 (carrier) 中表达治疗有效量的干扰 RNA 分子，其中该干扰 RNA 分子能减弱与眼病相关基因的表达。该 scAAV 载体可被包装在 scAAV 病毒粒体中。

[0053] 本发明的药物组合物优选是制剂，所述制剂含有干扰 RNA 或其盐，以重量计高达 99% 地与可药用运载体介质 (medium) 混合，所述介质包括下面描述的那些，并且例如水、缓冲液、盐水、甘氨酸、透明质酸、甘露醇等等。

[0054] 含有干扰 RNA 的 scAAV 载体或者本发明的药物组合物可以作为溶液剂、混悬剂或乳剂被施用。以下是可用于本发明方法的药物组合物制剂的例子。

[0055]

以重量%表示的量	
干扰 RNA	高达 99 ;0.1-99 ;0.1-50 ;0.5-10.0
羟丙基甲基纤维素	0.5
氯化钠	0.8
苯扎氯铵	0.01
EDTA	0.01
NaOH/HCl	至 pH 7.4
纯化的水 (无 RNA 酶)	至 100mL

[0056]

[0057]

以重量%表示的量	
干扰 RNA	高达 99 ;0.1-99 ;0.1-50 ;0.5-10.0
磷酸缓冲盐溶液	1.0
苯扎氯铵	0.01
聚山梨酯 80	0.5
纯化的水 (无 RNA 酶)	至 100%

[0058]

	以重量%表示的量
干扰 RNA	高达 99 ;0.1-99 ;0.1-50 ;0.5-10.0
磷酸二氢钠	0.05
磷酸氢二钠（无水）	0.15
氯化钠	0.75
EDTA 二钠	0.05
Cremophor EL	0.1
苯扎氯铵	0.01
HCl 和 / 或 NaOH	pH7.3-7.4
纯化的水（无 RNA 酶）	至 100%

[0059]

	以重量%表示的量
干扰 RNA	高达 99 ;0.1-99 ;0.1-50 ;0.5-10.0
磷酸缓冲盐溶液	1.0
羟丙基 - β - 环糊精	4.0
纯化的水（无 RNA 酶）	至 100%

[0060] 如此处所用的术语“治疗有效量”是指在哺乳动物中产生治疗反应所确定的干扰 RNA 或包含干扰 RNA 的药物组合物的量。此类治疗有效量通过本领域普通技术人员并利用如此处所述的方法是容易确定的。

[0061] 通常,本发明的治疗有效量的干扰 RNA 导致靶细胞表面的细胞外浓度为 100pM 到 1 μ M,或 1nM 到 100nM,或 5nM 到约 50nM 或到约 25nM。实现该局部浓度所需的剂量将随着许多因素而变,所述因素包括递送方法、递送位点、递送位点和靶细胞或组织之间细胞层数目,递送是局部还是全身的,等等。递送位点的浓度可以比靶细胞或组织表面的显著更高。根据临床医生的常规考虑,将局部组合物每天一至四次或以延长的递送时间表,如每天、每周、每两周、每月或更长时间递送到靶器官例如眼睛表面。制剂的 pH 为约 pH 4.0 到约 pH9.0,或约 pH 4.5 到约 pH 7.4。

[0062] 制剂的治疗有效量可以取决于如下因素,如受试者的年龄、种族和性别、靶基因转录物 / 蛋白质更新的速率、干扰 RNA 效力、和干扰 RNA 稳定性。在一个实施方案中,将包含干扰 RNA 的 scAAV 载体局部递送到靶器官并且以治疗剂量到达含有靶 mRNA 的组织,如小梁网、视网膜或视神经头,从而改善靶基因相关的疾病过程。

[0063] 预期用针对靶 mRNA 的干扰 RNA 对患者的治疗性治疗比与小分子治疗有益处,干扰 RNA 治疗性治疗通过增加作用持续时间从而允许较低频率给药和更大的患者依从性,并通过增加靶特异性从而减轻副作用来实现所述益处。

[0064] 如此处所用的“眼科可接受的载体”是指那些载体,其最多引起、很少引起或不引起眼刺激、如果需要,提供合适的防腐作用,和以均匀剂量递送本发明的一种或多种干扰 RNA。用于施用本发明实施方案的干扰 RNA 的可接受的载体包括基于阳离子脂类的转染试剂 **TransIT®-TKO** (Mirus Corporation, Madison, WI)、

LIPOFECTIN®、Lipofectamine、OLIGOFECTAMINE™(Invitrogen, Carlsbad, CA) 或 DHARMAFECT™(Dharmacon, Lafayette, CO) ;聚阳离子,如聚乙烯亚胺;阳离子肽,如 Tat、聚精氨酸或者 Penetratin(Antp 肽);纳米颗粒;或者脂质体。脂质体从标准的形成小泡的脂类和固醇,如胆固醇形成,并且可以包括靶向分子,如对细胞表面抗原具有结合亲和力的单克隆抗体。此外,脂质体可以是加入聚乙二醇的脂质体。

[0065] 可以以溶液、悬浮液、或者生物蚀解的或非生物蚀解的递送装置递送包含干扰 RNA 的 scAAV 载体或本发明的药物组合物。例如,可以通过气雾剂、含服、皮肤、皮内、吸入、肌内、鼻内、眼内、肺内、静脉内、腹膜内、经鼻、眼、口、耳、肠胃外、贴剂、皮下、舌下、局部或者经皮施用递送包含干扰 RNA 的 scAAV 载体或本发明的药物组合物。

[0066] 在某些实施方案中,用干扰 RNA 分子治疗眼病是通过将包含干扰 RNA 的 scAAV 载体或本发明的药物组合物直接施用于眼来完成的。由于许多原因,对眼局部施用是有利的,包括:剂量可比全身递送更小,且分子在不同于眼睛的组织中沉默基因靶的机会更少。

[0067] 许多研究已显示在体内成功并有效将干扰 RNA 递送至眼。例如, Kim 等人证实结膜下注射和全身递送靶向 VEGF 通路基因的 siRNA 抑制了小鼠眼中的血管发生 (Kim 等人., 2004, Am. J. Pathol. 165 :2177-2185)。另外,研究已显示递送至玻璃体腔的 siRNA 可扩散至整个眼睛,并在注射后达 5 天都可检测到 (Campochiaro, 2006, Gene Therapy 13 : 559-562)。

[0068] 研究也表明 scAAV 载体可有效地体内转导至人小梁网 (TM) 细胞中。例如, Borrás 等人表明,可以用 scAAV 载体来实现在分离的 HTM 细胞中和来自死后捐献者的完整组织上的 TM 的转导 (Borrás 等人, 2006, J GeneMed 8 :589-602)。

[0069] 可以通过眼组织注射,如眼周、结膜、眼球筋膜下 (subtenon)、前眼房 (intracameral)、玻璃体内、眼内、视网膜下、结膜下、眼球后、或者小管内注射将包含干扰 RNA 的 scAAV 载体或本发明的药物组合物直接递送到眼中;或者使用导管或者其他放置装置,如视网膜弹丸剂、眼内插入物、栓剂或者包含多孔的、非多孔的或者凝胶状材料的植入物直接应用于眼;通过局部眼滴剂或者软膏剂;或者通过盲路中的缓释装置或者植入巩膜附近(经巩膜)或巩膜中(巩膜内)或者眼中进行递送。前眼房注射可以通过角膜注射到前房中以允许活性剂到达小梁网。小管内注射可以注射到静脉集合管引流输淋管或者注射到输淋管中。

[0070] 对于眼递送,包含干扰 RNA 的 scAAV 载体或本发明的药物组合物可以与眼科可接受的防腐剂、共溶剂、表面活性剂、粘性增强剂、渗透增强剂、缓冲剂、氯化钠或者水组合以形成水性的无菌眼用混悬液或溶液。通过将包含干扰 RNA 的 scAAV 载体或本发明的药物组合物溶解在生理学上可接受的等渗水性缓冲液中可以制备溶液制剂。此外,溶液可以包括可接受的表面活性剂以帮助溶解包含干扰 RNA 的 scAAV 载体或本发明的药物组合物。粘性助剂,如羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等等可以加入到本发明的组合物中用于提高化合物的保留。

[0071] 为了制备无菌眼用软膏制剂,将包含干扰 RNA 的 scAAV 载体或本发明的药物组合物与防腐剂在合适的载体 (vehicle),如矿物油、液体羊毛脂或者白矿脂中组合。根据本领域中已知的方法,通过将干扰 RNA 悬浮在从例如 **CARBOPOL®-940** (BF Goodrich, Charlotte, NC) 等的组合制备的亲水基质中制备无菌眼用凝胶制剂。 **VISCOAT®**

(Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX) 可以用于例如眼内注射。在干扰 RNA 在眼中的渗透性较弱的情况下,本发明的其他组合物可以含有渗透增强剂,如 cremephor 和 **TWEEN[®] 80** (聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯, Sigma Aldrich, St. Louis, MO)。

[0072] 在某些实施方案中,本发明还提供了试剂盒,其包括用于减弱如本文引用的 mRNA 在细胞中表达的试剂。该试剂盒含有能够减弱与眼病相关基因表达的干扰 RNA 和 / 或 scAAV 载体和 / 或 scAAV 载体的产生所必须的组分 (例如,包装细胞系以及包含病毒载体模板的载体和用于包装的额外辅助载体)。试剂盒也可以含有阳性和阴性对照 siRNA 或者 shRNA 表达载体 (例如,非靶向对照 siRNA 或者靶向不相关 mRNA 的 siRNA)。试剂盒还可以含有用于评估预期靶基因的敲低的试剂 (例如,用于检测靶标 mRNA 的定量 PCR 的引物和探针和 / 或用于 Western 印迹的抗对应蛋白质的抗体)。备选地,试剂盒可以包含 siRNA 序列或者 shRNA 序列和使用说明书和通过体外转录产生 siRNA 或者构建 shRNA 表达载体必须的材料。

[0073] 还提供了药盒形式的药物组合,其在包装的组合中包括载体工具 (其适于接受与之密切限制的容器工具),和第一个容器工具,其包括干扰 RNA 组合物和 scAAV 载体。如果需要,此类药盒可以还包括多种常规的药物药盒组分的一种或多种,如具有一种或多种可药用的载体的容器、额外容器,等等,如本领域技术人员将显而易见。药盒中也可以包括作为插页或标签的印刷的说明书,其指出待施用的组分的量,施用指导,和 / 或用于混合组分的指导。

[0074] 本文中所引用之参考,以它们为本文所述的那些提供示例性程序或其它细节补充的程度通过参考特异性并入。

[0075] 本领域技术人员参考本公开将理解可以进行本文公开的实施方案的多种修饰而不背离本发明的精神和范围。参考本公开可以不用过度实验就可以做出和实施本文公开的所有实施方案。本发明的完整范围在本公开和其等同实施方案中给出。不应将本说明书理解为过度地限制本发明的完整保护范围。

[0076] 应当理解上述公开强调了本发明的特定技术方案,并且所有等同的修饰或备选方案均在如所附的权利要求中给出的本发明的精神和范围内。