



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117677402 A

(43) 申请公布日 2024.03.08

(21) 申请号 202280030335.0

(22) 申请日 2022.03.08

(30) 优先权数据

10-2021-0029927 2021.03.08 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.10.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2022/003245 2022.03.08

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2022/191567 KO 2022.09.15

(71) 申请人 柏业公司

地址 韩国大田市

申请人 思耐基因

(72) 发明人 H·O·帕克 S·K·李 S·I·尹

O·S·权 E·A·高 Y·H·高

J·H·帕克 K·宋 J·金

M·S·李 S·J·崔

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 陈桢

(51) Int.Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/69 (2006.01)

A61K 47/54 (2006.01)

A61K 47/58 (2006.01)

A61K 47/60 (2006.01)

权利要求书3页 说明书19页

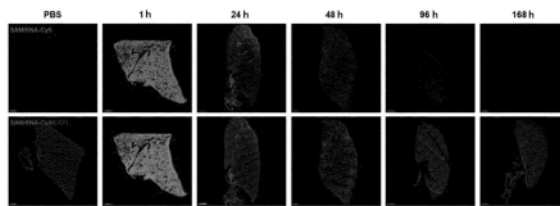
序列表7页 附图6页

(54) 发明名称

用于使用超声雾化器施用用于预防或治疗包括COVID-19的呼吸道病毒感染、由病毒感染引起的肺纤维化或呼吸道疾病的双链寡核苷酸结构的组合物

(57) 摘要

本发明涉及一种用于使用超声雾化器施用双链寡核苷酸结构的组合物。所述方法允许根据本发明的双链寡核苷酸保持与未稀释的溶液材料相同的浓度、分子量、纯度、纳米颗粒大小和摩尔渗透压浓度,所述双链寡核苷酸在水溶液中形成90nm的具有中性电荷的自组装纳米颗粒。另外,所述方法能够保持靶基因抑制能力而没有细胞毒性,并且能够将药物特异性地递送到鼻腔和肺,从而允许本发明用于预防或治疗包括COVID-19的呼吸道病毒感染、由病毒感染引起的肺纤维化或呼吸道疾病。



1. 一种用于预防或治疗呼吸道病毒感染、由病毒感染引起的肺纤维化或呼吸道疾病的包含双链寡核苷酸结构的药物组合物,所述双链寡核苷酸结构包含由以下结构式1表示的结构,其中所述药物组合物使用雾化器施用:

[结构式1]

A-X-R-Y-B

其中A表示亲水性化合物,B表示疏水性化合物,X和Y各自独立地表示简单的共价键或接头介导的共价键,并且R表示双链寡核苷酸。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述雾化器是超声雾化器。

3. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述双链寡核苷酸包含有义链和含有与其互补的序列的反义链。

4. 根据权利要求3所述的药物组合物,其中所述有义链或所述反义链由19至31个核苷酸组成。

5. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述有义链或所述反义链独立地是DNA或RNA。

6. 根据权利要求3所述的药物组合物,其中所述有义链或所述反义链包含化学修饰。

7. 根据权利要求6所述的药物组合物,其中所述化学修饰是选自以下的任何一种或多种:

其中一个或多个核苷酸中的糖结构的2'碳位置处的OH基团被选自甲基(-CH₃)、甲氧基(-OCH₃)、胺基(-NH₂)、氟(-F)、-O-2-甲氧基乙基、-O-丙基、-O-2-甲基硫代乙基、-O-3-氨基丙基、-O-3-二甲基氨基丙基、-O-N-甲基乙酰胺基和-O-二甲基酰胺基氧乙基的任一个取代的修饰;

其中核苷酸中糖结构中的氧被硫取代的修饰;

将核苷酸之间的键修饰成选自硫代磷酸酯键、硼烷磷酸酯键和甲基磷酸酯键的任一个键;以及

修饰为PNA(肽核酸)、LNA(锁核酸)或UNA(解锁核酸)。

8. 根据权利要求3所述的药物组合物,其中至少一个磷酸基团结合到所述反义链的5'端。

9. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述双链寡核苷酸是siRNA、shRNA或miRNA。

10. 根据权利要求1所述的药物组合物,所述药物组合物包含由以下结构式2表示的结构:

[结构式2]

A-X-S-Y-B

AS

其中S和AS分别表示所述双链寡核苷酸的有义链和反义链,并且A、B、X和Y是如权利要求1中所定义的。

11. 根据权利要求10所述的药物组合物,所述药物组合物包含由以下结构式3表示的结构:

[结构式3]

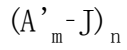
A-X-5' S 3'-Y-B

AS

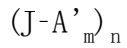
其中A、B、X、Y、S和AS是如权利要求10中所定义的,并且5'和3'分别表示所述有义链的5'端和3'端。

12. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述亲水性化合物具有由以下结构式4或结构式5表示的结构:

[结构式4]

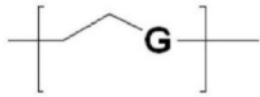


[结构式5]



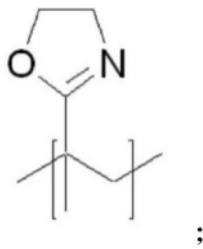
其中A'表示亲水性单体,J表示将m个亲水性单体连接在一起或将m个亲水性单体与siRNA连接的接头,m是范围从1至15的整数,并且n是范围从1至10的整数,亲水性单体A'是选自以下化合物(1)至(3)的任一种化合物,并且所述接头(J)选自 PO_3^- 、 SO_3 和 CO_2 :

[化合物(1)]

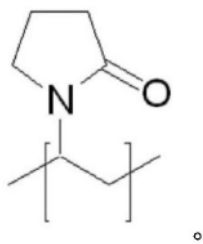


其中G选自 CH_2 、O、S和NH;

[化合物(2)]



[化合物(3)]



13. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述亲水性化合物的分子量为200至10,000。

14. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述亲水性化合物是选自聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯烷酮和聚噁唑啉的任一种。

15. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述疏水性化合物的分子量为250至1,000。

16. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述疏水性化合物是选自类固醇衍生物、甘油酯衍生物、甘油醚、聚丙二醇、 C_{12} - C_{50} 不饱和或饱和烃、二酰基磷脂酰胆碱、脂肪酸、磷脂、脂多胺、脂质、生育酚和生育三烯酚的任一种。

17. 根据权利要求16所述的药物组合物,其中所述类固醇衍生物是选自胆固醇、胆甾烷

醇、胆酸、胆甾醇基甲酸酯、胆甾烷基甲酸酯和胆甾烷基胺的任一种。

18. 根据权利要求16所述的药物组合物,其中所述甘油酯衍生物是选自甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯的任一种。

19. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中由X和Y中的每一个表示的所述共价键是不可降解键或可降解键。

20. 根据权利要求19所述的药物组合物,其中所述不可降解键是酰胺键或磷酸键。

21. 根据权利要求19所述的药物组合物,其中所述可降解键是选自二硫键、酸可降解键、酯键、酸酐键、生物可降解键和酶可降解键的任一种。

22. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述呼吸道疾病选自间质性肺病、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺炎、哮喘、急性和慢性支气管炎、过敏性鼻炎、支气管炎、细支气管炎、咽炎、扁桃体炎和喉炎。

23. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述双链寡核苷酸特异性地抑制选自双调蛋白、RelA/p65和SARS-CoV-2的基因的表达。

24. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述双链寡核苷酸结构在水溶液中形成自组装纳米颗粒以用于施用,所述自组装纳米颗粒的大小为10至100nm并且具有中性电荷。

25. 根据权利要求24所述的药物组合物,其中所述纳米颗粒由包含含有不同序列的双链寡核苷酸的双链寡核苷酸结构的混合物构成。

用于使用超声雾化器施用用于预防或治疗包括COVID-19的呼吸道病毒感染、由病毒感染引起的肺纤维化或呼吸道疾病的双链寡核苷酸结构的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于使用超声雾化器施用双链寡核苷酸结构的组合物,并且具体地涉及一种用于通过使用超声雾化器施用用于预防或治疗包括COVID-19的呼吸道病毒感染、由病毒感染引起的肺纤维化或呼吸道疾病的双链寡核苷酸结构的组合物。

背景技术

[0002] 通过吸入进行药物递送是一种易于使用的药物递送方法,使得药物即使在低药物剂量下也能够展现出希望的效果,可以通过允许药物直接到达靶器官、尤其是支气管或肺来避免或最大程度地减小全身性副作用,并且使得药物能够展现出快速效果。吸入器根据药物形式分为计量吸入器(MDI)、干粉吸入器(DPI)和雾化器。计量吸入器是一种在使用时通过填充到药物容器中的气体的压力释放一定量药物的装置,而干粉吸入器未填充任何气体并且是一种通过其吸入能力吸入药物的形式。雾化器是一种这样的装置,其使用机械振动将药物雾化成小液体颗粒,然后通过空气压力将雾化的颗粒通过吸入管递送到患者体内。由于雾化器将细微雾化的药物颗粒(其效果递送良好)递送到支气管和肺泡,因此其具有能够用于呼吸道病毒感染、间质性肺纤维化、慢性阻塞性肺疾病、哮喘、支气管扩张、支气管炎、肺炎、肺气肿等的优点。雾化器可以根据雾化方法分为压缩机型雾化器和超声雾化器。在压缩机型雾化器中,压缩机通过使空气穿过雾化器药物室而产生雾化的颗粒,并且通过振动筛网的微孔产生气溶胶。在超声雾化器中,超声波在穿过药物室的同时振动药物,从而产生气溶胶。取决于设备,通过使空气或微波穿过筛网的微孔产生具有一定大小的气溶胶。

[0003] 已经进行了各种尝试来开发基于siRNA的药物作为吸入剂。然而,这些吸入剂主要是干粉配制品,包括透明质酸包衣的脂质体喷雾配制品(冻干配制品)、包含白蛋白和PLGA(聚乳酸-共-乙醇酸)的混合物的纳米颗粒配制品、壳聚糖聚合物配制品、阳离子脂质或脂质体配制品以及包含细胞穿透蛋白(MPG、TAT、CADY、LAH4)的纳米颗粒配制品。开发基于脂质体的siRNA药物的吸入剂的最大障碍是脂质体的稳定性在雾化后被破坏的现象,如脂质体在雾化后破碎。为了改进脂质体在雾化后的稳定性,已经尝试了各种配制方法,如将脂质体与胆固醇、高相变磷脂等混合,或使脂质体聚乙二醇化,但是仍然需要改进脂质体本身的稳定性和药物在脂质体中的稳定性(Mindaugas Rudokas, Med.Princ.Pract.2016年3月; 25:60)。另外,在阳离子脂质或脂质体配制品的情况下,颗粒本身具有毒性风险,并且在常规的基于RNAi的药物的情况下,它们具有通过诱导先天性免疫应答以非特异性地激活促炎性细胞因子以及诱导干扰素应答而引起毒性的风险,并且显示出有限的递送效率和药物效应(Hasan Uludag, front.Bioeng.Biotechnol.2020年7月;8:916)。

[0004] 1995年,Guo和Kemphues报道,不仅有义RNA,而且反义RNA也有效抑制秀丽隐杆线虫(C.elegans)中的基因表达,并且从那时起,进行了研究以鉴定其原因。1998年,Fire等人

首先描述了一种现象,其中注射双链RNA(dsRNA)通过特异性地降解与其对应的mRNA而抑制基因表达。这种现象称为RNA干扰(RNAi)。RNAi是一种用于抑制基因表达的过程,可以以简单的方式以低成本展现出独特的抑制基因表达的作用,并且因此这种技术的应用范围已经扩大。

[0005] 由于这种抑制基因表达的技术可以调节特定基因的表达,因此它可以在mRNA水平上去除与癌症、遗传疾病等相关的特定基因,并且可以用作开发用于疾病治疗的治疗剂和验证靶标的重要工具。作为用于抑制靶基因表达的常规技术,已经披露了针对靶基因引入转基因的技术。这些技术包括相对于启动子在反义方向上引入转基因的方法和相对于启动子在反义方向上引入转基因的方法。

[0006] 这种靶向RNA的RNA疗法是针对靶RNA使用寡核苷酸去除目的基因的功能的方法,并且可以被认为与其中治疗剂(如抗体和小分子)主要靶向蛋白质的常规方法不同。用于靶向RNA的方法大致分为两种类型:双链RNA介导的RNAi和反义寡核苷酸(ASO)。目前,正在通过靶向各种疾病中的RNA尝试临床试验。

[0007] 反义寡核苷酸(在下文中称为“ASO”)是短合成DNA,其被设计成根据Watson-Crick碱基配对与靶基因结合,并且可以特异性地抑制基因的特定核苷酸序列的表达。因此,反义寡核苷酸已被用于研究基因的作用以及开发能够在分子水平上治疗疾病(如癌症)的治疗剂。这些ASO具有能够通过设定各种抑制基因表达的靶标而容易地产生的优点,并且为了抑制癌基因表达和癌细胞生长,已经对ASO的使用进行了研究。通过将ASO结合到互补的mRNA序列以诱导RNA酶H活性并且去除所述mRNA,或者通过干扰用于蛋白质翻译的核糖体复合物的形成和进展来完成通过ASO抑制特定基因表达的过程。另外,据报道,ASO与基因组DNA结合以形成三螺旋结构,从而抑制基因转录。ASO具有如上所述的潜力,但为了在临床实践中使用ASO,需要改进ASO对核酸酶的稳定性,并且将ASO有效地递送到靶组织或细胞中,以便特异性地结合靶基因的核苷酸序列。另外,遗传mRNA的二级和三级结构是ASO特异性结合的重要因素,并且其中mRNA二级结构的形成减少的区域对于ASO的进入非常有利。因此,在合成ASO前,已经作出努力通过系统地分析其中mRNA二级结构的形成减少的区域来不仅在体外而且在体内有效地实现基因特异性抑制。这些ASO比siRNA(一种RNA)更稳定,并且具有易溶于水 and 生理盐水的优点。迄今为止,联邦药品管理局(FDA)已批准了三种ASO(Jessica, C., J Postdoc Res, 4:35-50, 2016)。

[0008] 由于发现了RNA干扰(在下文中称为“RNAi”)的作用,因此已经发现RNAi在各种类型的哺乳动物细胞中作用于序列特异性mRNA(Barik, S., J Mol. Med. (2005) 83:764-773)。当双链RNA的长链被递送到细胞中时,所递送的双链RNA被Dicer核酸内切酶转化为加工成21至23个碱基对(bp)的小干扰RNA(在下文中称为“siRNA”)。siRNA与RNA诱导的沉默复合物(RISC)结合,并且通过其中引导(反义)链识别并且降解靶mRNA的过程以序列特异性方式抑制靶基因表达。使用siRNA抑制基因表达的技术被用于抑制靶细胞中的靶基因表达并且观察由此产生的变化,并且有效地用于鉴定靶细胞中的靶基因的功能的研究。特别地,抑制传染性病毒或癌细胞中的靶基因的功能可以有效地用于开发针对目的疾病的治疗方法。作为使用实验动物进行体外研究和体内研究的结果,已经报道了通过siRNA抑制靶基因表达是可能的。

[0009] Bertrand等人报道,siRNA在体外和体内对mRNA表达的抑制作用好于针对相同靶

基因的反义寡核苷酸 (ASO), 并且这种作用持续更久。另外, 关于作用机理, siRNA 通过与靶 mRNA 互补结合以序列特异性方式调节靶基因表达。因此, siRNA 优于常规的基于抗体的药物或化学药物 (小分子药物), 因为 siRNA 适用的受试者的范围可以显著扩大 (MA Behlke, MOLECULAR THERAPY. 2006 13(4):664-670)。

[0010] siRNA 具有优异的作用, 并且可以用于各种应用中, 但为了将 siRNA 开发为治疗剂, 应改进 siRNA 的体内稳定性及其细胞递送效率, 使得 siRNA 可以被有效地递送到靶细胞。为了改进体内稳定性并解决与 siRNA 的非特异性先天免疫刺激相关的问题, 已积极尝试通过修饰 siRNA 的一些核苷酸或其骨架以具有核酸酶抗性, 或使用病毒载体、脂质体或纳米颗粒来对其进行研究。

[0011] 包含病毒载体 (如腺病毒或逆转录病毒) 的递送系统具有高转染功效, 但具有高免疫原性和致癌性。另一方面, 含有纳米颗粒的非病毒递送系统具有比病毒递送系统低的细胞递送效率, 但具有优点, 包括体内高安全性、靶标特异性递送、RNAi 寡核苷酸向细胞或组织中的有效摄取和内化、以及低细胞毒性和免疫刺激。因此, 非病毒递送系统目前被认为是比病毒递送系统更有前景的递送方法 (Akhtar S, J Clin Invest. 2007年12月3日; 117(12):3623-3632)。

[0012] 在非病毒递送系统之中, 使用纳米载体的方法是其中使用各种聚合物 (如脂质体和阳离子聚合物复合物) 形成纳米颗粒并且其中将 siRNA 装载到此类纳米颗粒 (即, 纳米载体) 中并且递送到细胞的方法。在使用纳米载体的方法之中, 常用的方法包括使用聚合物纳米颗粒、聚合物胶束、脂质体复合物 (lipoplex) 等的方法。其中, 脂质体复合物由阳离子脂质构成, 并且功能是与细胞内体的阴离子脂质相互作用以诱导内体的不稳定, 从而允许细胞外递送外核体。

[0013] 另外, 已知可以通过将化学化合物缀合至 siRNA 的随从 (有义) 链的末端区域以赋予其改进的药代动力学特征来增加 siRNA 在体内的效率 (J. Soutschek, Nature 11; 432(7014):173-8, 2004)。在这种情况下, siRNA 的稳定性取决于与 siRNA 的有义 (随从) 链或反义 (指导) 链的末端缀合的化学化合物的特性而变化。例如, 与聚合物化合物 (如聚乙二醇 (PEG)) 缀合的 siRNA 在阳离子化合物的存在下与 siRNA 的阴离子磷酸根基团相互作用以形成复合物, 从而提供具有改进的 siRNA 稳定性的载体 (SH Kim, J Control Release 129(2):107-16, 2008)。特别地, 与其他药物递送系统 (如微球或纳米颗粒) 相比, 由聚合物复合物构成的胶束具有非常小的大小和非常均匀的大小分布, 并且是自发形成的。因此, 这些胶束的优点在于容易管理胶束配制品的质量并且容易确保其可再现性。

[0014] 为了改进 siRNA 的细胞内递送效率, 已经开发了使用 siRNA 缀合物来确保 siRNA 的稳定性和增加 siRNA 的细胞膜渗透性的技术, 所述 siRNA 缀合物是通过经由简单的共价键或接头介导的共价键将作为生物相容性聚合物的亲水性化合物 (例如, 聚乙二醇 (PEG)) 与 siRNA 缀合而获得的 (韩国专利号 883471)。然而, 即使当 siRNA 被化学修饰并且缀合到聚乙二醇 (PEG) (聚乙二醇化) 时, 其仍具有低的体内稳定性以及不容易将其递送到靶器官中的缺点。为了克服这些缺点, 已经开发了双链寡核苷酸 RNA 结构, 其包含与寡核苷酸、特别是双链寡 RNA (如 siRNA) 结合的亲水性和疏水性化合物。此结构通过疏水性化合物的疏水性相互作用而形成称为 SAMiRNA (自组装胶束抑制性 RNA) 的自组装纳米颗粒 (韩国专利号 1224828)。SAMiRNA 技术相对于常规递送技术具有的优点是可以获得大小非常小的均匀纳

米颗粒。

[0015] 具体地,在SAMiRNA技术中,将PEG(聚乙二醇)或HEG(六乙二醇)用作亲水性化合物。PEG是合成聚合物,通常用于增加医用药物(特别是蛋白质)的溶解度并且调节药物的药代动力学。PEG是多分散材料,并且单批聚合物由不同数量的单体构成,并且因此展现出具有高斯曲线的分子量分布。另外,材料的均匀性表示为多分散指数(Mw/Mn)。换句话说,当PEG具有低分子量(3至5kDa)时,其具有约1.01的多分散指数,而当PEG具有高分子量(20kDa)时,其具有约1.2的高多分散指数,表明PEG的均匀性随其分子量的增加而降低。因此,当PEG与药物缀合时,存在的缺点在于,PEG的多分散特性反映在缀合物中,并且因此不容易验证单一材料。由于这种缺点,已经改进了用于合成和纯化PEG的方法,以便产生具有低多分散指数的材料。然而,当PEG与具有低分子量的化合物缀合时,存在与所述化合物的多分散特性相关的问题,包括不容易确认是否容易地实现缀合的问题(Francesco M.V., DRUG DISCOVERY TODAY(2005)10(21):1451-1458)。

[0016] 因此,近年来,已经通过以下方式改进了SAMiRNA技术(即,自组装纳米颗粒):将双链RNA结构的亲水性化合物(构成SAMiRNA)形成为基本单元嵌段,每个嵌段包含1至15个具有均匀分子量的单体;以及(如果需要)接头,使得根据需要使用合适数量的嵌段。因此,已经开发了与常规SAMiRNATM相比具有小的大小和显著改进的多分散特性的新型递送系统技术(韩国专利号18162349)。已经知道,当注射siRNA时,siRNA被血液中存在各种酶快速降解,并且因此将其递送到靶细胞或组织的效率很差。因此,改进的SAMiRNA中也出现稳定性和表达抑制率的变化,这取决于靶基因。因此,为了使用由改进的自组装纳米颗粒构成的SAMiRNA更稳定地且有效地抑制靶基因的表达,本发明的诸位发明人已经试图通过应用双链寡核苷酸来增强SAMiRNA对靶基因的表达抑制作用和SAMiRNA的稳定性,所述双链寡核苷酸包含作为指导(有义)链的ASO的DNA序列和作为随从(反义有义)序列的RNA序列。

[0017] 然而,在RNAi药物递送中,常规RNAi药物递送方法主要基于粉末配制品,如上所述,其具有由颗粒本身导致的毒性以及引起非特异性免疫应答的风险,并且显示出有限的药物递送效率和药物效应。因此,本发明的诸位发明人已经试图基于SAMiRNA的结构特征开发特别适合于SAMiRNA的能够克服这些限制的药物递送方法,并且已经发现,当使用各种药物递送装置之中的超声雾化器时,可以将SAMiRNA有效地特异性地递送到肺而没有细胞毒性,同时显示出与贮料(雾化前的SAMiRNA)相同的浓度、分子量、纯度、纳米颗粒大小和摩尔渗透压浓度,并且保持其抑制靶基因的能力,从而完成了本发明。

[0018] [专利文献]

[0019] 韩国专利号1224828

[0020] 韩国专利号1862349

[0021] [非专利文献]

[0022] Mindaugas Rudokas, Med. Princ. Pract. 2016 March; 25: 60

[0023] Hasan Uludag, Front. Bioeng. Biotechnol. 2020 July; 8: 916

[0024] Jessica, C., J Postdoc Res. 2016 4: 35-50

[0025] MA Behlke, MOLECULAR THERAPY. 2006 13(4): 664-670

[0026] Akhtar S, J Clin Invest. 2007 December 3; 117(12): 3623-3632

[0027] SH Kim, J Control Release 129(2): 107-16, 2008

[0028] Francesco M.V., DRUG DISCOVERY TODAY (2005) 10 (21) :1451-1458

发明内容

[0029] 本发明的目的是提供一种用于将双链寡核苷酸结构特异性地且有效地递送到支气管和肺的药物组合物,所述双链寡核苷酸结构适合于预防或治疗呼吸道感染、病毒性肺纤维化或呼吸道疾病。

[0030] 为了实现以上目的,本发明提供了一种用于预防或治疗呼吸道感染、病毒性肺纤维化或呼吸道疾病的包含双链寡核苷酸结构的药物组合物,所述双链寡核苷酸结构包含由以下结构式1表示的结构,其中将所述药物组合物使用雾化器施用:

[0031] [结构式1]

[0032] A-X-R-Y-B

[0033] 其中A表示亲水性化合物,B表示疏水性化合物,X和Y各自独立地表示简单的共价键或接头介导的共价键,并且R表示双链寡核苷酸。

附图说明

[0034] 图1示出了比较分析从超声雾化器和压缩机型雾化器中的每一个收集的SAMiRNA纳米颗粒的分子量、纯度、纳米颗粒大小和摩尔渗透压浓度的结果。

[0035] 图2示出了评价从超声雾化器收集的SAMiRNA纳米颗粒的细胞毒性的结果。

[0036] 图3示出了分析从超声雾化器收集的SAMiRNA纳米颗粒的靶基因表达抑制活性的结果。

[0037] 图4示出了比较分析从超声雾化器和压缩机型雾化器中的每一个收集的SAMiRNA-Cy5纳米颗粒的Cy5荧光、分子量、纯度、纳米颗粒大小和摩尔渗透压浓度的结果。

[0038] 图5a示出了分析在使用超声雾化器将SAMiRNA-Cy5纳米颗粒施用于仓鼠后24小时收获的包括肺、脾、肝和肾的器官的重量的结果。

[0039] 图5b示出了在使用超声雾化器将SAMiRNA-Cy5纳米颗粒施用于仓鼠后24小时收获的包括肺、脾、肝和肾的器官的光学图像(左)、荧光图像(中)和荧光值分析结果。

[0040] 图6描绘了共聚焦图像,其显示SAMiRNA纳米颗粒被有效地递送到在使用超声雾化器将SAMiRNA-Cy5纳米颗粒施用于仓鼠后24小时收获的肺组织并分布于所述肺组织中。

[0041] 图7a是显示在使用超声雾化器将SAMiRNA-Cy5纳米颗粒施用于小鼠后的不同时间点(1、24、48、96和168小时)收获组织的实验方案。

[0042] 图7b示出了在使用超声雾化器将SAMiRNA-Cy5纳米颗粒施用于小鼠后的不同时间点(1、24、48、96和168小时)收获的肺、脾、肝、肾和心脏的光学图像和荧光图像。

[0043] 图8a示出了定量分析在使用超声雾化器将SAMiRNA-Cy5纳米颗粒施用于小鼠后的不同时间点(1、24、48、96和168小时)收获的鼻腔和肺组织的荧光的结果。

[0044] 图8b示出了在使用超声雾化器将SAMiRNA-Cy5纳米颗粒施用于小鼠后的不同时间点(1、24、48、96和168小时)收获的肺组织的PK分析结果。

[0045] 图9a描绘了共聚焦图像,其显示SAMiRNA-Cy5被递送到在使用超声雾化器将SAMiRNA-Cy5纳米颗粒施用于小鼠后的不同时间点(1、24、48、96和168小时)收获的肺组织并分布在所述肺组织中。

[0046] 图9b描绘了共聚焦图像,其显示SAMiRNA-Cy5被递送到在使用超声雾化器将SAMiRNA-Cy5纳米颗粒施用于小鼠后1小时收获的肺组织并分布在所述肺组织中。

具体实施方式

[0047] 除非另有定义,否则本说明书中所用的所有技术和科学术语都具有与本公开文本所属领域的技术人员通常理解相同的含义。通常,本说明书中所用的命名法是本领域熟知且常用的。

[0048] 据发现,在根据本发明的用于递送双链寡核苷酸的各种装置之中,超声雾化器是不影响结构的物理/化学特性的优化吸入药物递送装置。具体地,作为分析穿过超声气溶胶吸入器的本发明双链寡核苷酸结构的物理特性的结果,证实了浓度、分子量、纯度、纳米颗粒大小和摩尔渗透压浓度保持在与贮料(穿过超声雾化器前的结构)相同的水平。然而,证实了当使用压缩机型雾化器时,穿过压缩机型雾化器后的结构的纳米颗粒大小、分子量和纯度保持在与贮料相同的水平,但是与贮料相比,所述结构的浓度和摩尔渗透压浓度显著降低。

[0049] 同时,作为通过使用人鼻上皮细胞系RPMI2650和人肺癌细胞系A549评价通过超声雾化器施用的结构的细胞毒性的结果,可以看出,即使在50 μ M的高浓度下,所述结构也没有显示出细胞毒性。另外,为了评价每种物质的靶基因抑制活性,用不同浓度的每种物质处理RPMI2650和A549细胞,随后进行分析,并且作为结果,可以证实穿过超声雾化器后的每种物质展现出与穿过超声雾化器后的所述物质相同的靶抑制活性。

[0050] 最后,为了检测本发明的结构是否通过超声雾化器有效地体内递送到肺,将SAMiRNA与Cy5缀合,并且通过超声雾化器施用于仓鼠,然后收获并观察肺组织。作为结果,证实了在构成肺组织的大多数细胞中都发现了SAMiRNA-Cy5的荧光,并且特别地,在肺泡和支气管中发现了SAMiRNA-Cy5的强荧光,表明当将SAMiRNA物质通过超声雾化器施用,其被有效地递送。即,证实了通过超声雾化器可以实现根据本发明的双链寡核苷酸结构和由其自组装的纳米颗粒的优化施用。

[0051] 因此,本发明涉及一种用于预防或治疗呼吸道病毒感染、病毒性肺纤维化或呼吸道疾病的包含双链寡核苷酸结构的药物组合物,所述双链寡核苷酸结构包含由以下结构式1表示的结构,其中将所述药物组合物使用雾化器施用:

[0052] [结构式1]

[0053] A-X-R-Y-B

[0054] 其中A表示亲水性化合物,B表示疏水性化合物,X和Y各自独立地表示简单的共价键或接头介导的共价键,并且R表示双链寡核苷酸。

[0055] 在本发明中,所述雾化器可以是超声雾化器。

[0056] 在本发明中,所述双链寡核苷酸可以包含有义链和含有与其互补的序列的反义链。

[0057] 在本发明中,所述有义链或所述反义链中的每一个可以由19至31个核苷酸组成,而不限于此。

[0058] 在本发明中,所述有义链或所述反义链可以独立地是DNA或RNA,并且可以包含例如呈RNA/RNA、DNA/DNA或DNA/RNA杂交体形式的序列。

- [0059] 在本发明中,所述有义链或所述反义链可以包含化学修饰,
- [0060] 其中所述化学修饰可以是选自而不同于以下化学修饰的一种或多种:其中在一个或多个核苷酸中的糖结构的2'碳位置处的OH基团被选自甲基(-CH₃)、甲氧基(-OCH₃)、胺基(-NH₂)、氟(-F)、-O-2-甲氧基乙基、-O-丙基、-O-2-甲基硫代乙基、-O-3-氨基丙基、-O-3-二甲基氨基丙基、-O-N-甲基乙酰胺基和-O-二甲基酰胺基氧乙基的任一个取代的修饰;
- [0061] 其中核苷酸中糖结构中的氧被硫取代的修饰;
- [0062] 将核苷酸之间的键修饰成选自硫代磷酸酯键、硼烷磷酸酯键(boranophosphate)和甲基磷酸酯键的任一个键;以及
- [0063] 修饰为PNA(肽核酸)、LNA(锁核酸)或UNA(解锁核酸)。
- [0064] 在本发明中,所述化学修饰可以有助于增强体内稳定性,或赋予核酸酶抗性并降低非特异性免疫应答。
- [0065] 在本发明中,可以将一个或多个磷酸基团、优选一至三个磷酸基团结合到反义链的5'端,而不同于此。
- [0066] 根据本发明的双链寡核苷酸意在包括所有具有一般RNAi活性的物质,并且对于本领域普通技术人员将清楚的是,靶基因特异性双链寡核苷酸的例子还包括靶基因特异性shRNA。即,所述寡核苷酸可以是siRNA、shRNA或miRNA。
- [0067] 根据本发明的双链寡核苷酸可以在一条或两条链的3'端处包含突出端,所述突出端包含一个或多个未配对的核苷酸。
- [0068] 根据本发明的双链寡核苷酸优选地呈DNA-RNA杂交体、siRNA(短干扰RNA)、shRNA(短发夹RNA)或miRNA(微RNA)的形式,而不同于此,并且还可以包含可以充当针对miRNA的拮抗剂的单链miRNA抑制剂。
- [0069] 更优选地,根据本发明的药物组合物可以包含由以下结构式2表示的结构:
- [0070] [结构式2]
- [0071] A-X-S-Y-B
- [0072] AS
- [0073] 其中S和AS分别表示所述双链寡核苷酸的有义链和反义链,并且A、B、X和Y是如结构式1中所定义的。
- [0074] 更优选地,根据本发明的药物组合物包含由以下结构式3表示的结构:
- [0075] [结构式3]
- [0076] A-X-5' S3' -Y-B
- [0077] AS
- [0078] 可替代地,根据本发明的药物组合物包含由以下结构式3'表示的结构:
- [0079] [结构式3']
- [0080] A-×-3' S5' -Y-B
- [0081] AS
- [0082] 在以上结构式3和3'中,A、B、X、Y、S和AS是如结构式2中所定义的,并且5'和3'分别表示所述有义链的5'端和3'端。
- [0083] 在本发明中,所述亲水性化合物的分子量可以是200至10,000,而不同于此。
- [0084] 所述亲水性化合物可以选自聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯烷酮和聚噁唑啉,而不限

于此。

[0085] 在本发明中,所述亲水性化合物可以具有由以下结构式4或结构式5表示的结构:

[0086] [结构式4]

[0087] $(A'_m - J)_n$

[0088] [结构式5]

[0089] $(J - A'_m)_n$

[0090] 其中A'表示亲水性单体,J表示将m个亲水性单体连接在一起或将m个亲水性单体与siRNA连接的接头,m是范围从1至15的整数,并且n是范围从1至10的整数,

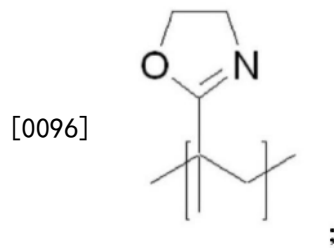
[0091] 亲水性单体A'是选自以下化合物(1)至(3)的任一种化合物,并且所述接头(J)选自 PO_3^- 、 SO_3 和 CO_2 :

[0092] [化合物(1)]

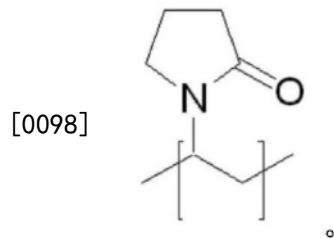


[0094] 其中G选自 CH_2 、O、S和NH;

[0095] [化合物(2)]



[0097] [化合物(3)]



[0099] 当根据本发明的双链寡核苷酸结构具有由以上结构式4或5表示的亲水性嵌段时,其可以具有由以下结构式6或7表示的结构:

[0100] [结构式6]

[0101] $(A'_m - J)_n - X - R - Y - B$

[0102] [结构式7]

[0103] $(J - A'_m)_n - X - R - Y - B$

[0104] 其中X、R、Y和B是如以上结构式1中所定义的,并且A'、J、m和n是如以上结构式4和5中所定义的。

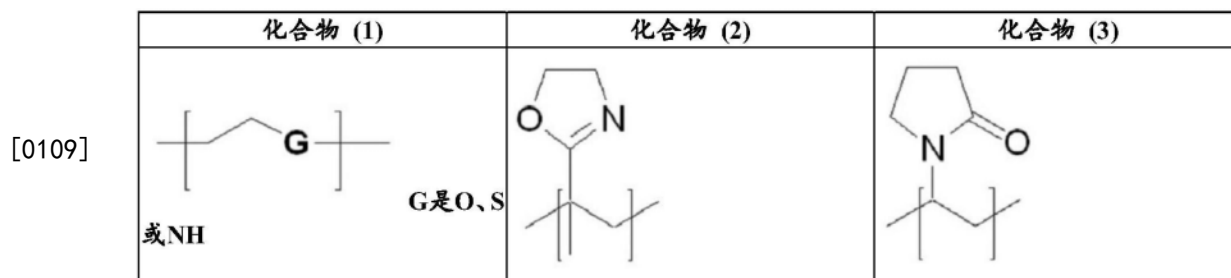
[0105] 作为以上结构式4和5中的亲水性单体(A'),可以使用而限于选自非离子亲水性聚合物的一种,只要其与本发明的目的相容即可。优选地,可以使用选自下表1中列出的化合物(1)至化合物(3)的单体,并且更优选地,可以使用化合物(1)的单体。在化合物(1)中,G

优选地选自O、S和NH。

[0106] 特别地,在亲水性单体之中,由化合物(1)表示的单体非常适合于产生根据本发明的结构,因为所述单体的优点在于可以将各种官能团引入所述单体中,并且所述单体通过具有良好的体内亲和力和优异的生物相容性而诱导很少免疫应答,可以增加包含在由结构式6或7表示的结构中的双链寡核苷酸的体内稳定性,并且可以增加双链寡核苷酸的递送效率。

[0107] [表1]

[0108] 用于本发明的亲水性单体的结构



[0110] 结构式4至结构式7中的亲水性化合物的总分子量优选地在1,000至2,000的范围内。因此,例如,当结构式6和结构式7中的化合物(1)是六乙二醇时,即,其中G是O并且m是6的化合物时,重复数量(n)优选地是3至5,因为六乙二醇间隔子的分子量为344。特别地,本发明的特征在于,可以根据需要使用合适数量(以n表示)的由结构式4和结构式5中的(A'_m-J)或(J-A'_m)_n表示的亲水性基团(亲水性嵌段)的重复单元。每个亲水性嵌段中包含的亲水性单体J和接头J在亲水性嵌段之间可以是相同或不同的。每个亲水性嵌段中包含的亲水性单体J和接头J在亲水性嵌段之间可以是相同或不同的。换句话说,当使用3个亲水性嵌段(n=3)时,可以分别在第一嵌段、第二嵌段和第三嵌段中使用化合物(1)的亲水性单体、化合物(2)的亲水性单体和化合物(3)的亲水性单体,表明可以在所有亲水性嵌段中使用不同的单体。可替代地,选自化合物(1)至(3)的亲水性单体的任何一种亲水性单体也可以用于所有亲水性嵌段中。类似地,作为介导亲水性单体的键合的接头,可以在亲水性嵌段中使用相同的接头,或者还可以在亲水性嵌段中使用不同的接头。另外,亲水性单体的数量m在亲水性嵌段之间也可以是相同或不同的。换句话说,在第一亲水性嵌段中,连接三个亲水性单体(m=3),并且在第二亲水性嵌段中,连接五个亲水性单体(m=5),并且在第三亲水性嵌段中,连接四个亲水性单体(m=4),表明在亲水性嵌段中可以使用不同数量的亲水性单体。可替代地,也可以在所有亲水性嵌段中使用相同数量的亲水性单体。

[0111] 另外,在本发明中,接头(J)优选地选自-PO₃⁻、-SO₃⁻和-CO₂⁻,而不限于此。对于本领域技术人员将清楚的是,可以使用在考虑到所使用的亲水性单体的情况下而选择的任何接头,只要其与本发明的目的相容即可。

[0112] 结构式3'、结构式6和结构式7中的疏水性化合物(B)通过疏水性相互作用起作用以形成由寡核苷酸结构构成的纳米颗粒。疏水性化合物优选地具有250至1,000的分子量,并且可以是选自类固醇衍生物、甘油酯衍生物、甘油醚、聚丙二醇、C₁₂-C₅₀不饱和或饱和烃、二酰基磷脂酰胆碱、脂肪酸、磷脂、脂多胺、脂质、生育酚和生育三烯酚的任一种,而不限于此。对于本领域技术人员将清楚的是,可以使用任何疏水性化合物,只要其与本发明的目的相容即可。

[0113] 类固醇衍生物可以选自胆固醇、胆甾烷醇、胆酸、胆甾醇基甲酸酯、胆甾烷基甲酸酯和胆甾烷基胺,并且甘油酯衍生物可以选自甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯等。在此,甘油酯的脂肪酸优选地是 C_{12} - C_{50} 不饱和或饱和脂肪酸。

[0114] 特别地,在疏水性化合物之中,优选地使用饱和或不饱和烃或胆固醇,因为其可以在合成根据本发明的双链寡核苷酸结构的步骤中容易地结合。最优选地,使用 C_{24} 烃,特别是含有二硫键的疏水性烃。

[0115] 疏水性化合物可以结合到亲水性化合物的远端,并且可以结合到双链寡核苷酸的有义链或反义链上的任何位置。

[0116] 根据本发明的结构式1至3'、6和7中的亲水性或疏水性化合物通过单共价键或接头介导的共价键(X或Y)与双链寡核苷酸结合。介导共价键的接头在双链寡核苷酸的末端处共价键合到亲水性或疏水性化合物,并且没有特别的限制,只要如果需要,其在特定环境中提供可降解键即可。因此,本发明中使用的接头可以是在生产根据本发明的双链寡核苷酸结构的过程中为了激活双链寡核苷酸和/或亲水性(或疏水性)化合物而结合的任何化合物。共价键可以是不可降解键和可降解键中的任一种。在此,不可降解键的例子包括但不限于酰胺键和磷酸键,并且可降解键的例子包括但不限于二硫键、酸可降解键、酯键、酸酐键、可生物降解的键和酶可降解键。

[0117] 另外,在包含根据本发明的双链寡核苷酸的结构中,可以将胺或多组氨酸基团另外引入与所述结构中的寡核苷酸结合的亲水性化合物的远端。

[0118] 这促进了包含含有根据本发明的双链寡核苷酸的结构的车体的细胞内摄取和内体逃逸,并且已经报道了引入胺基和多组氨酸基团可以用于促进载体(如量子点、树状聚合物或脂质体)的细胞内摄取和内体逃逸。

[0119] 具体地,已知引入载体的末端或外部的伯胺基团在生物学pH下被质子化,同时通过与带负电荷的基因相互作用形成缀合物,并且由于细胞内摄取后在低pH下具有缓冲作用的内部叔胺,促进了内体逃逸,由此可以保护载体免受溶酶体降解(Gene Delivery and Expression Inhibition Using Polymer-Based Hybrid Material, Polymer Sci. Technol., 第23卷,第3期,第254-259页)。

[0120] 另外,已知组氨酸(非必需氨基酸)在其残基(-R)处具有咪唑环($pK_a=6.04$),并且因此具有增加在内体和溶酶体中的缓冲能力的作用,并且因此组氨酸修饰可以用于非病毒基因载体(包括脂质体),以便增加内体逃逸效率(Novel histidine-conjugated galactosylated cationic liposomes for efficient hepatocyte selective gene transfer in human hepatoma HepG2 cells. J. Controlled Release 118, 第262-270页)。

[0121] 胺基或多组氨酸基团可以通过一个或多个接头与亲水性化合物或亲水性嵌段连接。

[0122] 当将胺基或多组氨酸基团引入根据本发明的由结构式1表示的双链寡核苷酸结构的亲水性化合物时,所述结构可以具有由以下结构式8表示的结构:

[0123] [结构式8]

[0124] $P-J_1-J_2-A-X-R-Y-B$

[0125] 其中A、B、R、X和Y是如以上结构式1中所定义的,

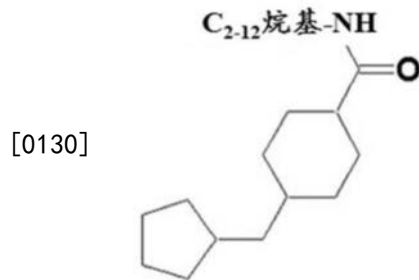
[0126] P表示胺基或多组氨酸基团,并且 J_1 和 J_2 是接头,其各自可以独立地选自简单的共

价键、 PO_3^- 、 SO_3 、 CO_2 、 C_{2-12} 烷基、烯基和炔基,而不限于此。对于本领域技术人员将清楚的是,在考虑到本文所使用的亲水性化合物的情况下而选择的任何接头都可以用作 J_1 和 J_2 ,只要它们与本发明的目的相容即可。

[0127] 优选地,当引入胺基时, J_2 优选地是简单的共价键或 PO_3^- ,并且 J_1 优选地是 C_6 烷基,而不限于此。

[0128] 另外,当引入多组氨酸基团时,优选的是结构式8中的 J_2 是简单的共价键或 PO_3^- ,并且 J_1 是化合物(4),而不限于此。

[0129] [化合物(4)]



[0131] 另外,当由结构式8表示的双链寡核苷酸结构的亲水性化合物是由结构式5或6表示的亲水性嵌段并且向其引入胺基或多组氨酸基团时,双链寡核苷酸结构可以具有由以下结构式9或10表示的结构:

[0132] [结构式9]

[0133] $\text{P}-\text{J}_1-\text{J}_2-(\text{A}'_m-\text{J})_n-\text{X}-\text{R}-\text{Y}-\text{B}$

[0134] [结构式10]

[0135] $\text{P}-\text{J}_1-\text{J}_2-(\text{J}-\text{A}'_m)_n-\text{X}-\text{R}-\text{Y}-\text{B}$

[0136] 其中X、R、Y、B、 A' 、J、m和n是如以上结构式4或5中所定义的,并且P、 J_1 和 J_2 是如以上结构式8中所定义的。

[0137] 特别地,结构式9和结构式10中的亲水性化合物优选地结合到双链寡核苷酸的有义链的3'端。在这种情况下,结构式8至结构式10可以对应于以下结构式11至结构式13:

[0138] [结构式11]

[0139] $\text{P}-\text{J}_1-\text{J}_2-\text{A}-\text{X}-3'\text{S } 5'-\text{Y}-\text{B}$

[0140] AS

[0141] [结构式12]

[0142] $\text{P}-\text{J}_1-\text{J}_2-(\text{A}'_m-\text{J})_n-\text{X}-3'\text{S } 5'-\text{Y}-\text{B}$

[0143] AS

[0144] [结构式13]

[0145] $\text{P}-\text{J}_1-\text{J}_2-(\text{J}-\text{A}'_m)_n-\text{X}-3'\text{S } 5'-\text{Y}-\text{B}$

[0146] AS

[0147] 其中X、R、Y、B、 A' 、J、m、n、P、 J_1 和 J_2 是如以上结构式8至结构式10中所定义的,并且5'和3'分别表示靶基因特异性双链寡核苷酸的有义链的5'端和3'端。

[0148] 可以在本发明中引入的胺基可以是伯、仲或叔胺基团。特别地,优选地使用伯胺基团。引入的胺基可以作为胺盐的形式存在。例如,伯胺基团的盐可以作为 NH_3^+ 的形式存在。

[0149] 另外,可以在本发明中引入的多组氨酸基团优选地包含3至10个组氨酸,更优选5

至8个组氨酸,并且最优选6个组氨酸。除组氨酸之外,还可以包括一个或多个半胱氨酸。

[0150] 同时,当在包含根据本发明的靶基因特异性寡核苷酸的双链寡核苷酸结构和由其形成的纳米颗粒中提供靶向部分时,它可以促进所述结构或纳米颗粒向靶细胞的有效递送,使得所述结构或纳米颗粒甚至可以以相对低的浓度递送到靶细胞,因此展现出调节靶基因表达的强作用。

[0151] 因此,本发明提供了一种双链寡核苷酸RNA结构,其中配体(L),特别是具有特异性地结合到通过受体介导的内吞作用(RME)增强靶细胞内化的受体的特性的配体,进一步结合到由结构式1至3'、6和7中的任一个表示的结构。例如,其中配体与由结构式1表示的双链寡核苷酸RNA结构结合的结构具有由以下结构式14表示的结构:

[0152] [结构式14]

[0153] $(L_i-Z)-A-X-R-Y-B$

[0154] 其中A、B、X和Y是如以上结构式1中所定义的,L是具有特异性地结合到通过受体介导的内吞作用(RME)增强靶细胞内化的受体的特性的配体,并且“i”是范围从1至5,优选从1至3的整数。

[0155] 结构式14中的配体可以优选地选自:具有增强靶细胞内化的RME特性的靶受体特异性抗体、适体和肽;叶酸盐(术语“叶酸盐(folate)”通常可与叶酸(folic acid)互换使用,并且如本文所用的术语“叶酸盐”意指呈天然形式或在人体中激活的叶酸盐);和化学化合物,包括己糖胺,如N-乙酰基半乳糖胺(NAG),以及糖或碳水化合物,如葡萄糖和甘露糖,而不限于此。

[0156] 另外,以上结构式14中的亲水性化合物A可以由结构式4或5表示的亲水性嵌段的形式使用。

[0157] 在本发明中,结构式1至3'、结构式6和结构式7中由R(或S和AS)表示的双链寡核苷酸可以是特异性地抑制选自双调蛋白、Re1A/p65和SARS-CoV-2的基因的表达的任何寡核苷酸,而不限于此。具体地,由R(或S和AS)表示的双链寡核苷酸可以特异性地抑制双调蛋白基因的表达,并且可以包含双调蛋白靶向序列。所述双调蛋白靶向序列可以包含例如SEQ ID NO:5和/或6的序列。具体地,它可以包含SEQ ID NO:5的有义序列和SEQ ID NO:6的反义序列。

[0158] 由R(或S和AS)表示的双链寡核苷酸可以包含靶向SARS-CoV-2的序列。所述靶向SARS-CoV-2的序列可以包含例如选自SEQ ID NO:11至30的序列。

[0159] 本发明适合于预防或治疗各种呼吸道疾病,并且特别适合作为施用用于预防或治疗呼吸道病毒感染、由病毒感染引起的肺纤维化或呼吸道疾病的组合物的方法。

[0160] 在本发明中,所述呼吸道病毒可以是COVID-19,而不限于此。在本发明中,所述由病毒感染引起的肺纤维化是由病毒感染引起的后遗症的一个例子,并且除了肺纤维化外,本发明还可以用于施用用于预防或治疗由病毒感染、特别是呼吸道病毒感染引起的后遗症的组合物。

[0161] 在本发明中,所述呼吸道疾病可以选自间质性肺病、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺炎、哮喘、急性和慢性支气管炎、过敏性鼻炎、支气管炎、细支气管炎、咽炎、扁桃体炎和喉炎,而不限于此。

[0162] 在本发明中,所述双链寡核苷酸结构可以在水溶液中形成自组装纳米颗粒以用于

施用,所述自组装纳米颗粒的大小为10至100nm并且具有中性电荷。

[0163] 在本发明中,所述纳米颗粒可以由包含含有不同序列的双链寡核苷酸的双链寡核苷酸结构的混合物构成。

[0164] 对于施用,除了上述活性成分之外,本发明的组合物还可以进一步包含一种或多种药学上可接受的载体。所述药学上可接受的载体应与所述活性成分相容,并且可以选自生理盐水、无菌水、林格氏溶液、缓冲盐水、右旋糖溶液、麦芽糖糊精溶液、甘油、乙醇及其两种或更多种的混合物。如果需要,则所述组合物可以包含其他常规添加剂,如抗氧化剂、缓冲剂或抑菌剂。另外,可以将稀释剂、分散剂、表面活性剂、粘合剂和润滑剂另外添加到组合物中以制备可注射配制品,如水性溶液、悬浮液和乳液。特别地,所述组合物优选地作为冻干配制品提供。为了制备冻干配制品,可以使用本发明所属领域中已知的常规方法,并且还可以添加用于冻干的稳定剂。此外,所述组合物可以优选地通过本领域已知的合适方法或通过Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA中披露的方法根据每种疾病或组分来配制。

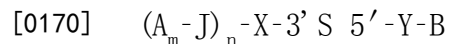
[0165] 本发明的药物组合物优选地经肠胃外施用,特别优选地通过吸入到支气管而施用于肺。根据本发明的组合物的剂量可以根据患者的体重、年龄、性别、健康状况和饮食、施用持续时间、施用方式、排泄率、疾病严重程度等而变化,并且可以由本领域技术人员容易地确定。

[0166] 实施例

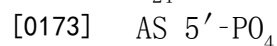
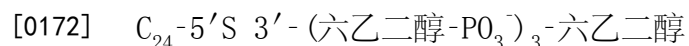
[0167] 在下文中,将参考实施例更详细地描述本发明。这些实施例仅用于更详细地解释本发明,并且对于本领域普通技术人员清楚的是,本发明的范围不受这些实施例的限制。因此,本发明的实质范围将由所附权利要求及其等同物定义。

[0168] 实施例1. 双链寡核苷酸结构的合成

[0169] 本发明中产生的双链寡核苷酸结构(SAMiRNA)具有由以下结构式表示的结构:



[0171] pAS



[0174] 为了合成monoSAMiRNA双链寡核苷酸结构的有义菌株,将3,4,6-三乙酰基-1-六(乙二醇)-CPG用作支持物,并且通过反应将作为亲水性单体的三个去甲氧基三苯甲基(DMT)六乙二醇氨基磷酸酯连续结合到支持物。接下来,进行DNA的合成,然后将含有二硫键的疏水性 C_{24} (C_{19} -S-S- C_6)结合到5'端区域,从而合成有义链,其中六乙二醇- $(-PO_3^-)$ 六乙二醇) $_3$ 结合到3'端,并且 C_{24} (C_{18} -S-S- C_6)结合到5'端。

[0175] 在合成完成后,通过在60°C水浴中用28% (v/v) 氨处理,将合成的DNA单链和DNA-聚合物结构从CPG分离,然后通过去保护反应去除保护残基。通过高效液相色谱(HPLC)从反应产物分离DNA单链、DNA-聚合物结构和配体结合的DNA-聚合物结构,并且使用MALDI-TOF质谱分光光度计(MALDI TOF-MS, SHIMADZU, 日本)测量其分子量,以确认它们是否与希望合成的核苷酸序列和DNA-聚合物结构匹配。

[0176] 为了合成反义链,使用接头(UnyLinkerTM)结合的支持物进行具有与有义链互补的序列的RNA的合成,然后合成具有结合到5'端区域的磷酸基团(PO_4)的反义链。

[0177] 在合成完成后,通过在60°C水浴中用28% (v/v) 氨处理,将合成的RNA单链和RNA-聚合物结构从CPG分离,然后通过去保护反应去除保护残基。在去除保护残基后,在70°C的烘箱中,用体积比为10:3:4的N-甲基吡咯烷酮、三甲胺和三乙胺三氢氟化物处理RNA单链和RNA-聚合物结构,以去除2'-TBDMS(叔丁基二甲基甲硅烷基)。通过高效液相色谱(HPLC)从反应产物分离RNA单链、RNA-聚合物结构和配体结合的RNA-聚合物结构,并且使用MALDI-TOF质谱分光光度计(MALDI TOF-MS, SHIMADZU, 日本)测量其分子量,以确认它们是否与希望合成的核苷酸序列和RNA-聚合物结构匹配。此后,为了产生每个双链寡核苷酸结构,将有义链和反义链以等量混合在一起,添加到1X PBS(磷酸盐缓冲盐水, 30mg/1 ml (1x) PBS) 退火缓冲液(30mM HEPES、100mM乙酸钾、2mM乙酸镁, pH 7.0至7.5)中,允许在90°C水浴中反应5分钟,并且缓慢冷却到室温,从而产生所希望的SAMiRNA。通过高效液相色谱(HPLC, 非变性)证实了产生的双链寡核苷酸RNA结构的退火。关于针对功效评价而合成的SAMiRNA-AREG的序列的信息示于下表2中。

[0178] [表2]

[0179] 人双调蛋白(AREG)靶向序列

[0180] hAREG有义(DNA)	5'-CTGGAAGCGTGAACCATT-3' (SEQ ID NO:5)
hAREG反义(RNA)	5'-AAUGGUUCACGCUUCCCAG-3' (SEQ ID NO:6)

[0181] 实施例2.从雾化器收集SAMiRNA纳米颗粒

[0182] 在本发明中,从超声雾化器和压缩机型雾化器中的每一个收集SAMiRNA。

[0183] 将1ml SAMiRNA放置在超声雾化器(Meshnet2, 中国)的药物室中,并且将吸嘴(mouthpiece)连接到所述室。使气溶胶吸入器在如下状态下运行,将吸嘴的尖端放置在试管中以便于收集。为了收集雾化的SAMiRNA,将冰放入冰箱中并围绕试管放置,并使雾化器运行10分钟,并且考虑到雾化的SAMiRNA的液化时间,雾化的SAMiRNA的收集总共进行20分钟。

[0184] 将1ml SAMiRNA放置在压缩机型雾化器(Philips Non-Thermal Sprayer, 美国)的药物室中,将橡胶软管连接到所述室,并且将用于收集的试管连接到橡胶软管的末端。为了收集雾化的SAMiRNA,将冰放入冰箱中并围绕试管放置,并使雾化器运行10分钟,并且考虑到雾化的SAMiRNA的液化时间,雾化的SAMiRNA的收集总共进行20分钟。

[0185] 实施例3.从每个雾化器收集的SAMiRNA纳米颗粒的物理特性的分析

[0186] 通过高效液相色谱从每种收集的SAMiRNA分离RNA单链、RNA-聚合物结构和配体结合的RNA-聚合物结构,并且使用MALDI-TOF质谱仪进行分析,以确认是否存在目的序列。用Osmomat 3000 (Gonotec, 德国)测量收集的SAMiRNA的摩尔渗透压浓度,以确认捕获的SAMiRNA的摩尔渗透压浓度是否与生理盐水相同,即使当直接进入血管时,生理盐水也不会引起渗透压的变化。根据制造商的方案,使用Zetasizer NANO-ZS (Malvern, 英国) (其是动态光散射(DLS)装置)和qNano Gold (IZON, 新西兰)使用可调电阻脉冲检测(TRPS)分析收集的SAMiRNA的粒度。

[0187] 作为结果,可以证实,从超声雾化器收集的SAMiRNA纳米颗粒的浓度、分子量、纯度、纳米颗粒大小和摩尔渗透压浓度与穿过超声雾化器前的SAMiRNA相同,而在从压缩机型雾化器收集的SAMiRNA的情况下,所述SAMiRNA的纳米颗粒大小、分子量和纯度与穿过压缩机型雾化器前的SAMiRNA相同,但浓度降低了3.6倍(8.3mg/ml),并且摩尔渗透压浓度也显

著低于生理盐水(图1)。

[0188] 实施例4.从每个雾化器收集的SAMiRNA纳米颗粒的细胞毒性的评价

[0189] 使用人肺癌细胞系A549(CCL-185,ATCC,美国)和人鼻上皮细胞系RPMI2650(Korea Cell Line Bank,韩国)来评价从每个雾化器收集的SAMiRNA纳米颗粒的细胞毒性。将A549细胞使用含有10%胎牛血清(Hyclone,美国)和1%青霉素-链霉素(Hyclone,美国)的F12K培养基(Gibco,美国)在37℃下在5% CO₂下培养。将RPMI2650细胞在含有10%胎牛血清(Hyclone,美国)和1%青霉素-链霉素(Hyclone,美国)的RPMI1640培养基(Hyclone,美国)中在37℃下在5% CO₂下培养。将A549细胞以3×10³个细胞/孔的密度接种于96孔板(Falcon,美国)中,并且将RPMI2650细胞以1×10⁴个细胞/孔的密度接种于96孔板(Falcon,美国)中。第二天,用从每个雾化器收集的不同浓度(0、1、5、10、20和50μM)的SAMiRNA处理细胞。在孵育96小时后,根据制造商的方案,使用WST测定试剂盒(DOGEN,韩国)进行实验分析,以便测量SAMiRNA的细胞毒性。

[0190] 作为结果,证实了在两种类型的细胞系中,在穿过超声雾化器之前和之后直至浓度为20μM也没有发现细胞毒性,并且在RPMI2650细胞的情况下,仅在50μM的浓度下发现一些细胞毒性(图2)。

[0191] 实施例5.从每个超声雾化器收集的SAMiRNA纳米颗粒的靶基因表达抑制活性的评价5-1.用从超声雾化器收集的SAMiRNA纳米颗粒处理细胞

[0192] 使用A549细胞(CCL-185,ATCC,美国)和RPMI2650细胞(Korea Cell Line Bank,韩国)分析从超声雾化器收集的SAMiRNA纳米颗粒是否有效抑制靶基因表达。将A549细胞使用含有10%胎牛血清(Hyclone,美国)和1%青霉素-链霉素(Hyclone,美国)的F12K培养基(Gibco,美国)在37℃下在5% CO₂下培养。将RPMI2650细胞在含有10%胎牛血清(Hyclone,美国)和1%青霉素-链霉素(Hyclone,美国)的RPMI1640培养基(Hyclone,美国)中在37℃下在5% CO₂下培养。将A549细胞以5×10⁴个细胞/孔的密度接种于12孔板(Falcon,美国)中,并且将RPMI2650细胞以1.2×10⁵个细胞/孔的密度接种于12孔板(Falcon,美国)中。第二天,用从超声雾化器收集的不同浓度(0、0.1、0.5、1、5和10μM)的SAMiRNA处理细胞。

[0193] 5-2.用从超声雾化器收集的SAMiRNA纳米颗粒处理后靶基因表达的分析

[0194] 根据实施例5-1中所述的方法,用从超声雾化器收集的SAMiRNA纳米颗粒处理每个细胞系。在孵育24小时后,使用通用RNA提取试剂盒(Bioneer,韩国)从细胞裂解物中提取总RNA。使用这种RNA作为模板,根据制造商的方法,使用AccuPower GreenStar™RT-qPCR预混液(Bioneer,韩国)通过qRT-PCR分析人AREG和RPL13A(人参照qPCR引物组,Bioneer,韩国)的mRNA表达水平。基于qPCR阵列后获得的这两个基因的Ct值,通过2^{(-ΔΔC(T))}方法[Livak KJ,Schmittgen TD.2001.Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))}Method.Methods.12月;25(4):4 02-8]分析测试组中的AREG mRNA与对照组中的AREG mRNA相比的相对量(倍数变化)。每个基因的引物序列如下(表3)。

[0195] [表3]

[0196] 人AREG和人RPL13A(内部对照)的引物序列

[0197]

hAREG-正向	5'-ACACCTACTCTGGGAAGCGT-3'(SEQ ID NO:1)
hAREG-反向	5'-GCCAGGTATTTGTGGTTCGT-3'(SEQ ID NO:2)

hRPL13A-正向	5'-CCAGCAATCAAGTTTGCCTA-3' (SEQ ID NO:3)
hRPL13A-反向	5'-GTGGTGGTGGTGGTAATTCA-3' (SEQ ID NO:4)

[0198] 作为结果,观察到穿过超声雾化器之前和之后的SAMiRNA纳米颗粒在两种细胞系中都显示出浓度依赖方式的AREG mRNA抑制功效(图3)。总之,证实了从超声雾化器收集的SAMiRNA纳米颗粒保持了它们的物理和化学特性,没有显示出细胞毒性,并且保持与穿过超声雾化器前的SAMiRNA纳米颗粒相同的靶基因抑制活性。

[0199] 实施例6.在动物模型中使用超声雾化器施用的SAMiRNA纳米颗粒的递送功效的评价

[0200] 6-1.穿过超声雾化器后收集的荧光标记的SAMiRNA (SAMiRNA-Cy5) 纳米颗粒的特性分析

[0201] 根据实施例3的方法分析根据实施例2的方法从超声雾化器收集的SAMiRNA-Cy5纳米颗粒。作为结果,证实了从超声雾化器收集的SAMiRNA-Cy5纳米颗粒具有与穿过气溶胶雾化器前的所述材料相同的荧光值、浓度、分子量、纯度、纳米颗粒大小和摩尔渗透压浓度(图4)。

[0202] 6-2.在仓鼠动物模型中使用超声雾化器施用的SAMiRNA-Cy5纳米颗粒的递送功效的评价

[0203] 使用仓鼠作为实验动物。从Central Laboratory Animal Inc.购买仓鼠(5周龄,雄性),使其适应1周,并且将其用于实验。将超声雾化器的吸嘴贴到仓鼠的面部后,将SAMiRNA-Cy5(5mg/ml)或1ml PBS放置在药物室中,并且在使仓鼠暴露于雾化器的同时,使超声雾化器运行2分钟30秒。在暴露于超声雾化器后24小时,收获肺、肝、脾和肾并称重。使用Davinch-Invivo™成像系统(Davinch-K,韩国)进行每个器官的荧光成像和荧光值分析。

[0204] 作为结果,观察到从通过超声雾化器暴露于SAMiRNA-Cy5的仓鼠收获的肺、脾、肝和肾的重量和重量比与通过超声雾化器暴露于PBS的仓鼠的器官的重量和重量比相比没有变化(图5a)。另外,使用Davinch-Invivo™系统分析从通过超声雾化器暴露于SAMiRNA-Cy5的仓鼠收获的肺、脾、肝和肾组织的荧光图像,并且作为结果,证实了在肝、脾和肾中几乎没有发现荧光,而在肺中发现强荧光(图5b),这表明通过超声雾化器SAMiRNA纳米颗粒经气道被有效地递送到肺。

[0205] 6-3.在仓鼠动物模型中通过超声雾化器施用的SAMiRNA纳米颗粒的肺组织生物分布的分析

[0206] 对在实施例6-2中从通过超声雾化器暴露于PBS和SAMiRNA-Cy5中的每一种的仓鼠收获的肺组织进行免疫荧光染色。将组织在10%中性缓冲福尔马林(Sigma,美国)中储存一天以固定,然后在10%、20%和30%蔗糖(Sigma,美国)溶液中顺序脱水。将每个肺组织样品放置在含有OCT化合物(Sakura Finetek,美国)的基模(Thermo Scientific,美国)中,并且将不锈钢板放置在含有液氮的容器中,并且将基模放置在其上以完全冷冻OCT化合物。将冷冻的组织在-70℃下储存,并且在用超薄切片机切片前将其在-20℃下放置30分钟以有助于进行组织切片。将厚度为14μm的组织切片放置在载玻片上并干燥1小时。接下来,将所述组织与0.1% Triton-X100(Sigma,美国)溶液一起孵育10分钟以使细胞透化,用含有5%正常山羊血清(Abcam,英国)和1% BSA(Sigma,美国)的溶液封闭1小时,并且与α-肌动蛋白-2抗体(Sigma,美国)一起在4℃下孵育一天。在用PBS洗涤后,将组织与二抗抗小鼠Alexa Fluor

488 (Invitrogen, 美国) 一起孵育1小时, 随后洗涤。将组织与1 μ M DAPI (Sigma, 美国) 溶液一起孵育10分钟并洗涤, 并且将封固溶液 (Thermo Scientific, 美国) 滴在其上并用盖玻片 (VWR, 美国) 覆盖。对于染色组织的荧光分析, 使用旋转盘共聚焦显微术 (Dragonfly高速共聚焦成像平台, Andor, 英国) 分析染色组织。

[0207] 作为结果, 在通过超声雾化器暴露于SAMiRNA-Cy5的仓鼠的整个肺中发现了荧光 (SAMiRNA-Cy5)。作为以高放大倍率观察各个部分的结果, 证实了SAMiRNA-Cy5被很好地递送到构成肺的大部分细胞, 并且特别地, 证实了在肺泡和支气管中发现强荧光。(图6)。证实了当使用超声雾化器施用SAMiRNA纳米颗粒时, SAMiRNA纳米颗粒被有效地递送到肺, 这表明双链寡核苷酸结构和纳米颗粒是超声雾化器的优化siRNA平台。

[0208] 6-4. 在小鼠动物模型中通过超声雾化器施用SAMiRNA-Cy5纳米颗粒后组织的时间依赖性荧光图像分析

[0209] 使用C57BL/6小鼠作为实验动物。从DaehanBiolink购买小鼠 (6周龄, 雄性), 并使其在实验前适应1周。使用实施例6-1中使用的材料作为荧光标记的SAMiRNA-Cy5。在将超声雾化器的吸嘴贴到每只小鼠的面部后, 将SAMiRNA-Cy5 (2mg) 或PBS放置在药物室中, 并通过使超声雾化器运行30秒 (吸入15秒-静息15秒-吸入15秒) 来施用 (图7a)。在施用后, 在不同的时间点 (0、1、24、48、96和168小时) 收获鼻腔、肺、肝、脾、肾和心脏并称量, 然后使用Davinch-Invivo™成像系统 (Davinch-K, 韩国) 进行荧光图像分析。在相同条件 (荧光强度、暴露时间等) 下对所有组织 (在不同时间点收获) 进行荧光图像分析。

[0210] 作为结果, 证实了在通过超声雾化器施用后1小时收获的小鼠鼻腔和肺组织中发现最强荧光, 这表明SAMiRNA被有效地递送到鼻腔和肺组织。另一方面, 证实了在肝、肾、心脏、脾、脑、血液等中没有发现荧光信号。观察到, 在24小时后, 鼻腔和肺组织的荧光强度显著低于在1小时的荧光强度, 并且在48小时后, 鼻腔和肺组织的荧光强度开始逐渐降低, 并且在168小时后, 即使在肺组织中也几乎没有发现荧光 (图7b)。

[0211] 6-5. 在小鼠动物模型的鼻腔和肺组织中通过超声雾化器施用的SAMiRNA纳米颗粒的定量分析

[0212] 对使用实施例6-4中从通过超声雾化器暴露于PBS和SAMiRNA-Cy5中的每一种的小鼠收获的鼻腔和肺组织进行荧光定量分析和PK分析。测量每个收获的组织, 并且将整个组织放置在圆底试管 (SPL, 韩国) 中。将1ml组织裂解缓冲液 (Bioneer, 韩国) 添加到组织中, 然后使用匀浆器 (IKA, 德国) 进行匀浆化。在冰上孵育15分钟后, 将组织在4 $^{\circ}$ C下以14,000rpm离心15分钟, 然后将上清液转移到1.5ml琥珀色微量离心管 (Axigen, 美国) 中并储存。通过将SAMiRNA-Cy5以不同浓度 (0.1、0.5、0.25和0.125 μ g/ml) 掺入PBS处理的组织裂解物中来制备用于荧光定量分析的标准样品。将各自100 μ l的标准品和样品分配到黑色96孔微孔板 (Corning Costar, 美国) 的每个孔中, 然后用微板阅读器 (TECAN, 瑞士) 测量其荧光强度 (激发波长645nm, 发射波长675nm), 并且将所述荧光强度代入确定的标准曲线中, 从而确定各个组织中剩余的SAMiRNA-Cy5的量。对于SAMiRNA的PK分析, 使用QIAshredder (QIAGEN) 将裂解的组织样品再匀浆化一次。使用与抗小鼠AGO2抗体 (Sigma, 美国) 缀合的MagListo™蛋白G试剂盒 (Bioneer, 韩国) 从组织裂解物进行Ago2免疫沉淀。通过茎环RT-qPCR对获得的RISC负载的siRNA进行绝对定量分析。使用TaqmanMicroRNA逆转录试剂盒 (Applied Biosystem, 美国)、Mygenie™96 (Bioneer, 韩国) 和SAMiRNA-mRelA反义RT引物 (Bioneer, 韩国) 进行向

cDNA的转化,然后使用AccuPower® Plus DualStar™ qPCR预混液(Bioneer,韩国)、600nMqPCR引物(Bioneer,韩国)、300nM探针和Exicycler™96(Bioneer,韩国)进行qPCR。将用于定量的标准品掺入未处理的样品中,然后以相同的方式用于分析。分析中使用的RT和qPCR引物序列如下(表4)。

[0213] [表4]

[0214] 小鼠RELA的RT和qPCR引物序列

mRELA RT引物	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCGGATT-3' (SEQ ID NO: 7)
mRELA RT正向	5'- CGCATGCGCTTCTCTTCA -3' (SEQ ID NO: 8)
mRELA RT反向	5'- GTGCAGGGTCCGAGGT -3' (SEQ ID NO: 9)
mRELA探针	5'- [FAM] CGCACTGGATACGACCGGATTG (SEQ ID NO: 10) [i-EBQ][辛酸]-3'

[0216] 作为结果,证实了在施用后收获的肺中检测到的SAMiRNA-Cy5的量如下:在施用后1小时为144.18 μ g/g (1.3%),在24小时为1.27 μ g/g (0.01%),以及在48小时为0.77 μ g/g (0.006%)。在鼻通道中检测到的SAMiRNA-Cy5的量如下:在施用后1小时为661.8 μ g/g (8.2%),以及在24小时和48小时为0.7 μ g/g (0.01%)。证实了在施用后1小时检测到通过超声雾化器递送到鼻腔和肺组织的SAMiRNA的最大量,并且检测到的SAMiRNA的量随时间逐渐减少(图8a)。在肺组织的PK分析结果中,与肺组织的荧光定量分析结果类似,证实了SAMiRNA的反义拷贝数在施用后1小时最高(3.E+11),在24小时为2.E+08,并且在48小时为6.E+07,这表明SAMiRNA的反义拷贝数随时间逐渐减少(图8b)

[0217] 对于靶向SARS-CoV-2的SAMiRNA,可以以与上述相同的方式检查SAMiRNA是否被递送到鼻腔和肺组织。靶向SARS-CoV-2的序列示于下表5中。

[0218] [表5]

SCV2-1有义(DNA)	5'- AATAGAGCTCGCACCGTAG -3' (SEQ ID NO: 11)
SCV2-1反义(RNA)	5'- CUACGGUGCGAGCUCUAUU -3' (SEQ ID NO: 12)
SCV2-2有义(DNA)	5'- TGGTACTGGTAAGAGTCAT -3' (SEQ ID NO: 13)
SCV2-2反义(RNA)	5'- AUGACUCUUACCAGUACCA -3' (SEQ ID NO: 14)
SCV2-3有义(DNA)	5'- GTTTATCACCCGCGAAGAA -3' (SEQ ID NO: 15)
SCV2-3反义(RNA)	5'- UUCUUCGCGGGUGAUAAAC -3' (SEQ ID NO: 16)
SCV2-4有义(DNA)	5'- CATAACAGATGCGCAAACA -3' (SEQ ID NO: 17)
SCV2-4反义(RNA)	5'- UGUUUGCGCAUCUGUUAUG -3' (SEQ ID NO: 18)
SCV2-5有义(DNA)	5'- ATAATGATGAATGTCGCAA -3' (SEQ ID NO: 19)
SCV2-5反义(RNA)	5'- UUGCGACAUUCAUUAU -3' (SEQ ID NO: 20)
SCV2-6有义(DNA)	5'- TTAACCAACTACCAC -3' (SEQ ID NO: 21)
SCV2-6反义(RNA)	5'- GUGGUAGUGUUGGUUUA -3' (SEQ ID NO: 22)
SCV2-7有义(DNA)	5'- ATAGTAGGGATGACATTAC -3' (SEQ ID NO: 23)
SCV2-7反义(RNA)	5'- GUAAUGUCAUCCCUACUAU -3' (SEQ ID NO: 24)
SCV2-8有义(DNA)	5'- TCTCTATCAGACATTATGC -3' (SEQ ID NO: 25)
SCV2-8反义(RNA)	5'- GCAUAAUGUCUGAUAGAGA -3' (SEQ ID NO: 26)
SCV2-9有义(DNA)	5'- GCTTCTTCGCGGGTGATAA -3' (SEQ ID NO: 27)
SCV2-9反义(RNA)	5'- UUAUCACCCGCGAAGAAGC -3' (SEQ ID NO: 28)
SCV2-10有义(DNA)	5'- CCATCCGAAAGGGAGTGAG -3' (SEQ ID NO: 29)
SCV2-10反义(RNA)	5'- CUCACUCCCUUCGGAUGG -3' (SEQ ID NO: 30)

[0221] 6-6. 在小鼠动物模型中通过超声雾化器施用的SAMiRNA纳米颗粒的肺组织生物分布的分析

[0222] 对在实施例6-4中从通过超声雾化器暴露于的PBS和SAMiRNA-Cy5中的每一种的小鼠收获的肺组织进行免疫荧光染色。将肺组织在10%中性缓冲福尔马林(Sigma,美国)中储存一天以固定,然后在10%、20%和30%蔗糖(Sigma,美国)溶液中顺序脱水。将每个肺组织样品分成左叶和右叶,然后将它们放置在含有OCT化合物(Sakura Finetek,美国)的基模(Thermo Scientific,美国)中,并且将不锈钢板放置在含有液氮的容器中,并且将基模放置在其上以完全冷冻OCT化合物。将冷冻的组织在-70℃下储存,并且在用超薄切片片机切片前将其在-20℃下放置30分钟以有助于进行组织切片。将厚度为8 μ m的组织切片放置在载玻片上并干燥1小时。接下来,将组织与0.1% Triton-X100(Sigma,美国)溶液一起孵育10分钟以使细胞透化,然后用含有5%正常山羊血清(Abcam,英国)和1%BSA(Sigma,美国)的溶液封闭1小时。接下来,将组织与1 μ M DAPI(Sigma,美国)溶液一起孵育10分钟并洗涤,然后将封固溶液(Thermo Scientific,美国)滴在其上并用盖玻片(VWR,美国)覆盖。对于染色组织的荧光分析,使用旋转盘共聚焦显微术(Dragonfly高速共聚焦成像平台,Andor,英国)分析染色组织。为了准确地分析SAMiRNA在肺组织中随时间的分布,在相同条件(荧光强度、暴露时间等)下对所有肺组织样品进行共聚焦显微术。

[0223] 作为结果,观察到SAMiRNA-Cy5荧光在施用后1小时最高,并且随时间逐渐降低,这与肺组织的荧光定量分析和PK分析的结果类似。对于在肺组织中观察到荧光的1小时、24小时和48小时,观察到SAMiRNA在整个肺组织中均匀地分布(图9a)。作为观察施用后1小时的左肺组织和右肺组织的结果,证实了SAMiRNA均匀地分布在左肺和右肺中,这表明其被有效地递送(图9b)。另外,作为以高放大倍率观察施用后1小时的肺组织的结果,证实了在构成肺组织的大部分细胞中发现SAMiRNA-Cy5,并且其均匀地分布在细支气管、细支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞、肺泡囊等中,这表明其被有效地递送(图9b)。

[0224] 工业实用性

[0225] 根据本发明的双链寡核苷酸结构在水溶液中形成自组装纳米颗粒,其大小为90nm并且具有中性电荷,因此所述自组装纳米颗粒可以充当雾化器的优化siRNA平台,它从雾化器中被以5 μ m或更小的细小颗粒的形式雾化。特别地,当使用超声雾化器时,通过不仅保持待施用的贮料的相同浓度、分子量、纯度、纳米颗粒大小和摩尔渗透压浓度,而且保持靶基因抑制活性,可以有效地将所述药物组合物递送到鼻腔和肺(肺泡),而不会在施用期间发生变化。

[0226] 因此,本发明具有的优点在于,它适合于治疗呼吸道病毒感染、由病毒感染引起的肺纤维化或肺炎或者其他呼吸道疾病,并且特别地,当本发明应用于由SARS-CoV-2(一种在全世界引起爆发性感染和死亡的新型呼吸道病毒)引起的COVID-19的治疗剂时,它允许患者容易地且方便地自我施用所述双链寡核苷酸结构,并且使得能够有效地体内递送所述双链寡核苷酸结构。

[0227] 尽管已经参考具体特征详细地描述了本发明,但对于本领域技术人员而言将清楚的是,此描述仅是本发明的优选实施方案的描述,并不限制本发明的范围。因此,本发明的实质范围将由所附权利要求及其等同方案限定。

[0228] 序列列表自由文本

[0229] 附有电子文件

- <110> 柏业公司
思耐基因
- <120> 用于使用超声雾化器施用用于预防或治疗包括COVID-19的呼吸道病毒感染、由病毒感染引起的肺纤维化或呼吸道疾病的双链寡核苷酸结构的组合物
- <130> PP-B2768
- <160> 30
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 引物
- <400> 1
- acacctactc tgggaagcgt 20
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 引物
- <400> 2
- gccaggtatt tgtggttcgt 20
- <210> 3
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 引物
- <400> 3
- ccagcaatca agtttgccta 20
- <210> 4
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 引物
- <400> 4

gtggtggtgg tggtaattca 20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AREG靶序列

<400> 5

ctgggaagcg tgaaccatt 19

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AREG靶序列

<400> 6

aaugguucac gcuucccag 19

<210> 7

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 7

gtcgtatcca gtgcagggtc cgaggatttc gactggata cgaccggatt 50

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 8

cgcatgcgct tctcttca 18

<210> 9

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 9
gtgcagggtc cgaggt 16
<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 10
cgcaactggat acgaccggat tg 22
<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 有义
<400> 11
aatagagctc gcaccgtag 19
<210> 12
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 反义
<400> 12
cuacggugcg agcucuauu 19
<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 有义
<400> 13
tggtaactggat aagagtcac 19
<210> 14
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 反义
<400> 14
augacucuua ccaguacca 19
<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 有义
<400> 15
gtttatcacc cgcaagaa 19
<210> 16
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 反义
<400> 16
uucuucgagg gugauaac 19
<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 有义
<400> 17
cataacagat gcgcaaaca 19
<210> 18
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 反义
<400> 18
uguuugcgca ucuguuaug 19
<210> 19
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 有义
<400> 19
ataatgatga atgtcgcaa 19
<210> 20
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 反义
<400> 20
uugcgacauu caucuuau 19
<210> 21
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 有义
<400> 21
ttaaaccac cactaccac 19
<210> 22
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 反义
<400> 22
gugguagugu ugguuuuaa 19
<210> 23
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 有义
<400> 23
atagtaggga tgacattac 19
<210> 24
<211> 19
<212> RNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 反义
<400> 24
guaaugucau cccuacuau 19
<210> 25
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 有义
<400> 25
tctctatcag acattatgc 19
<210> 26
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 反义
<400> 26
gcuaaauguc ugauagaga 19
<210> 27
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 有义
<400> 27
gcttcttcgc gggatgataa 19
<210> 28
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 反义
<400> 28
uuaucaaccg cgaagaagc 19
<210> 29
<211> 19

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 有义
<400> 29
ccatccgaaa gggagtgag 19
<210> 30
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 反义
<400> 30
cucacucccu uucggaugg 19

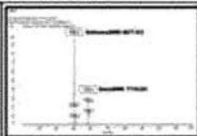
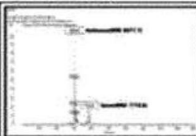
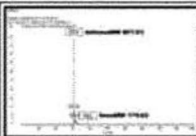
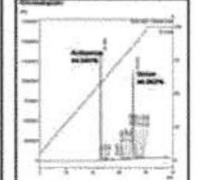
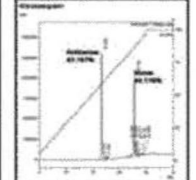
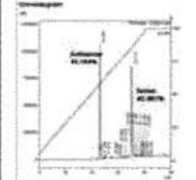



类型	贮料	超声雾化器	压缩机型雾化器
浓度	30mg/ml	30mg/ml	8.3mg/ml
摩尔渗透压浓度	327 mOsmol/kg	320±30 mOsmol/kg	78 mOsmol/kg
MALDI-TOF-MASS	AS: 6082.8 S: 7716.0 	AS: 6079.6 S: 7715.4 	AS: 6073.8 S: 7708.2 
HPLC	AS: 44.565 % S: 44.063% 	AS: 47.167 % S: 43.176% 	AS: 43.194 % S: 42.491% 
qNANO	平均值: 77 众数: 64 	平均值: 125 众数: 115 	平均值: 76 众数: 61 

图1

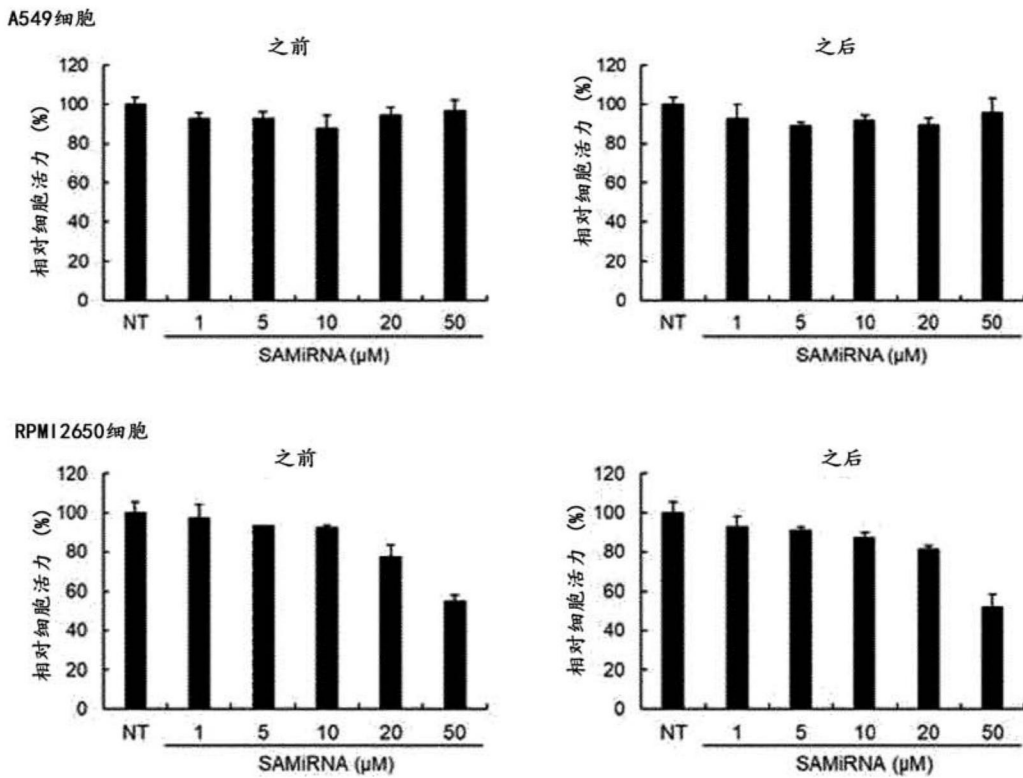


图2

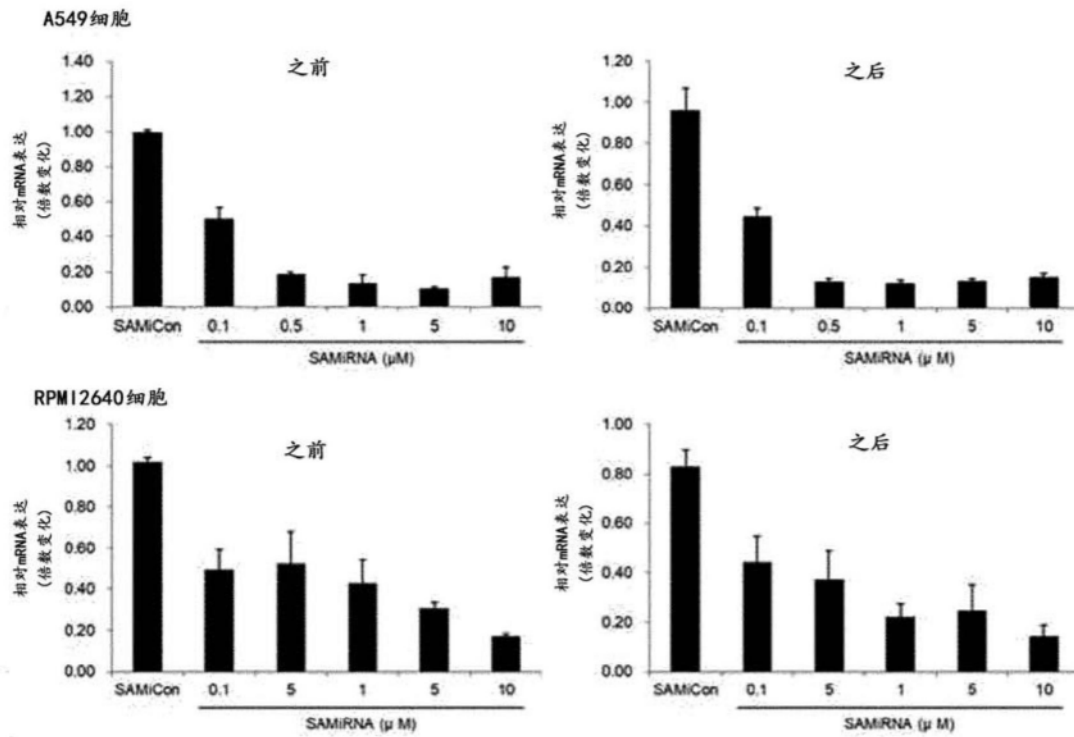


图3

超声雾化器	荧光	质量	HPLC		摩尔渗透压浓度	qNano
之前		AS: 6798.8 S: 7692.2	AS: 45.713% S: 40.121%	双链体 94.336%	平均值 309 mOsmol / kg	平均值: 136 众数: 102
	平均强度 45657	通过	通过	通过	通过	通过
之后		AS: 6798.7 S: 7691.4	AS: 42.893% S: 40.007%	双链体 91.814%	平均值: 339 mOsmol / kg	平均值: 90 众数: 83
	平均强度 45331	通过	通过	通过	通过	通过

图4

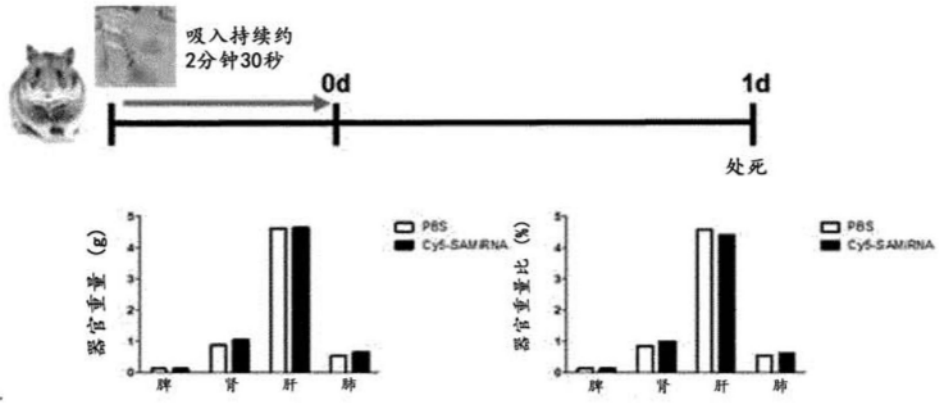


图5a

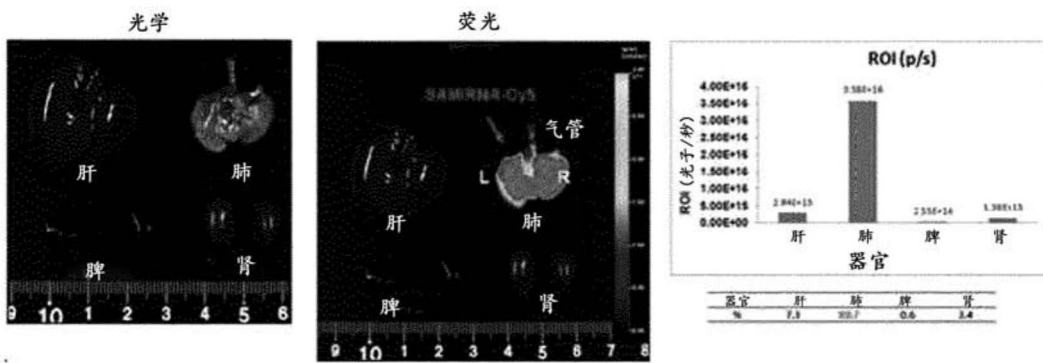


图5b

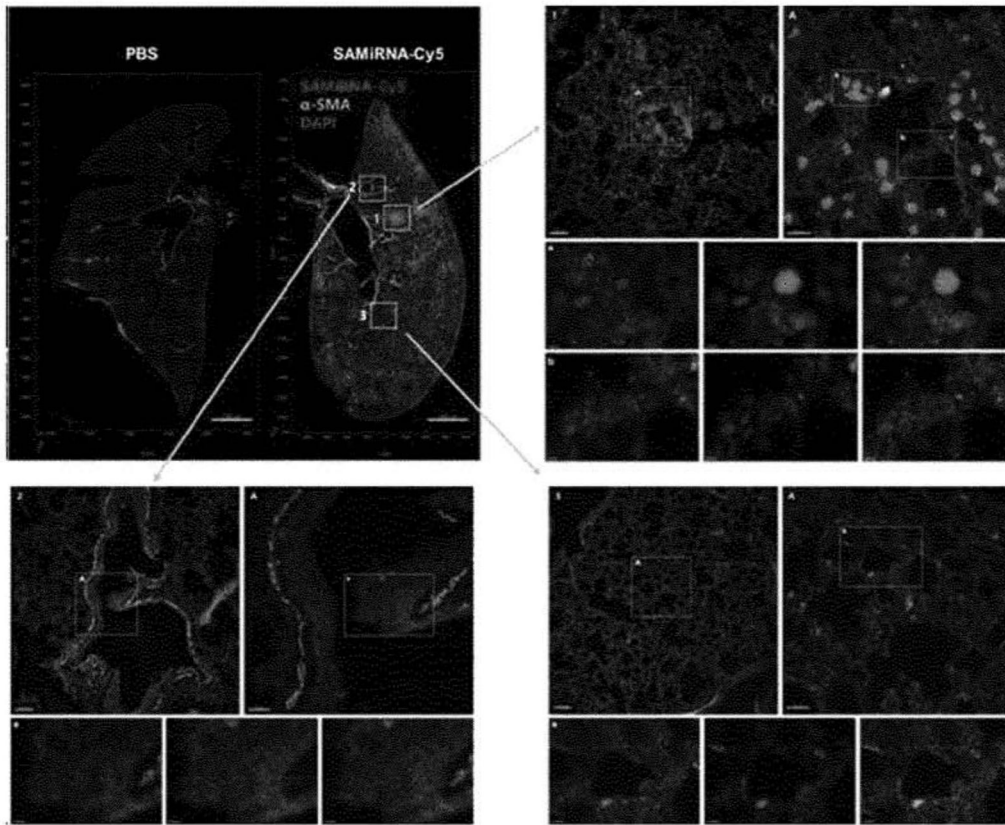


图6

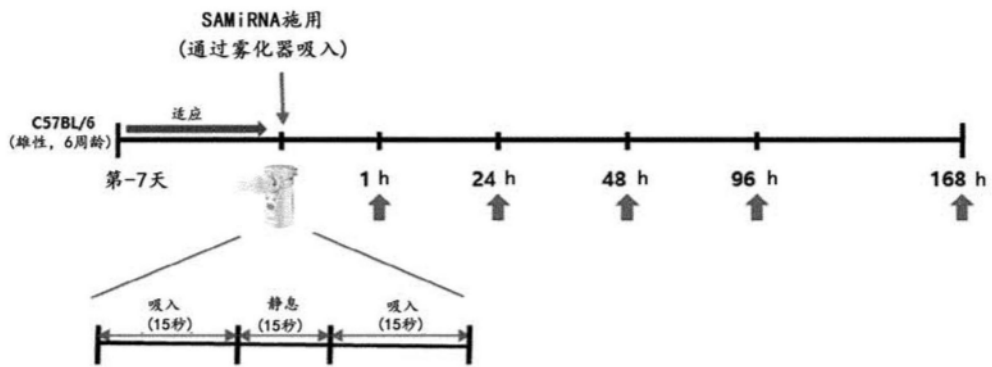


图7a

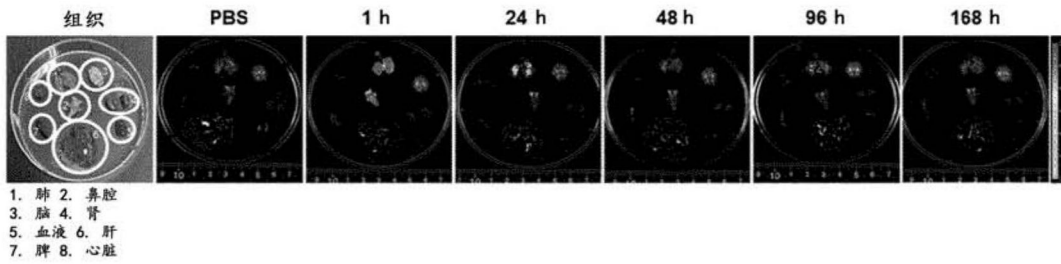


图7b

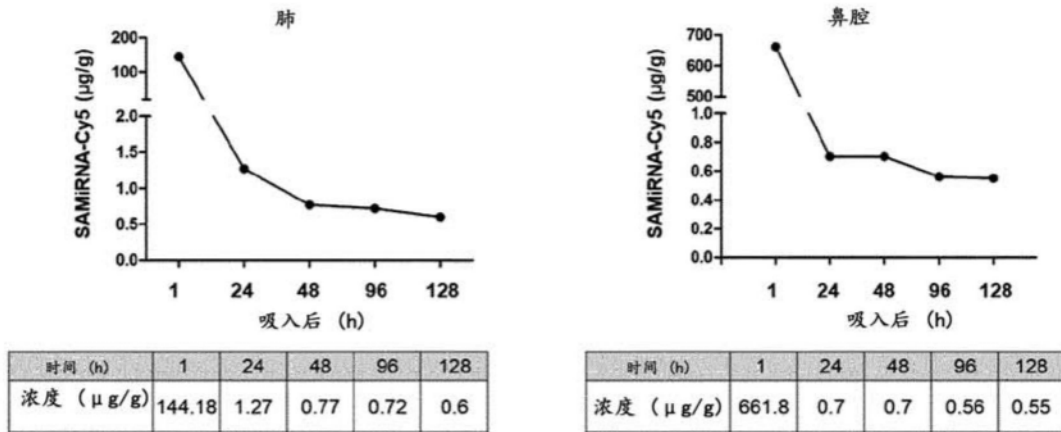


图8a

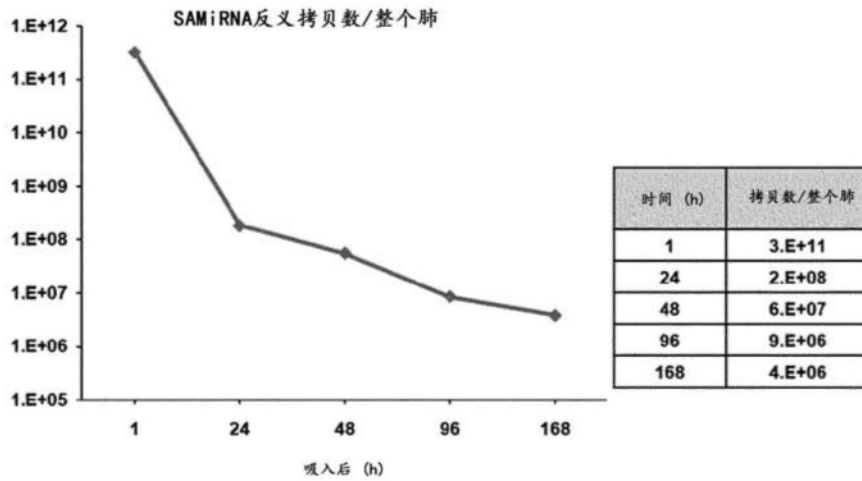


图8b

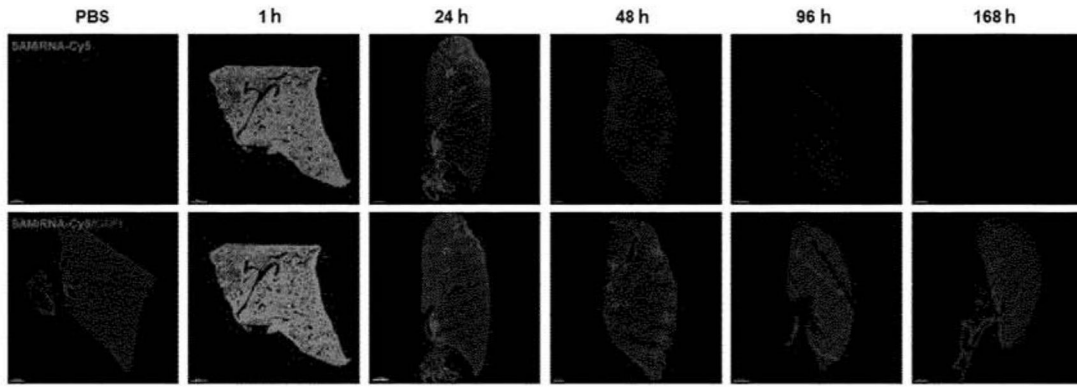


图9a

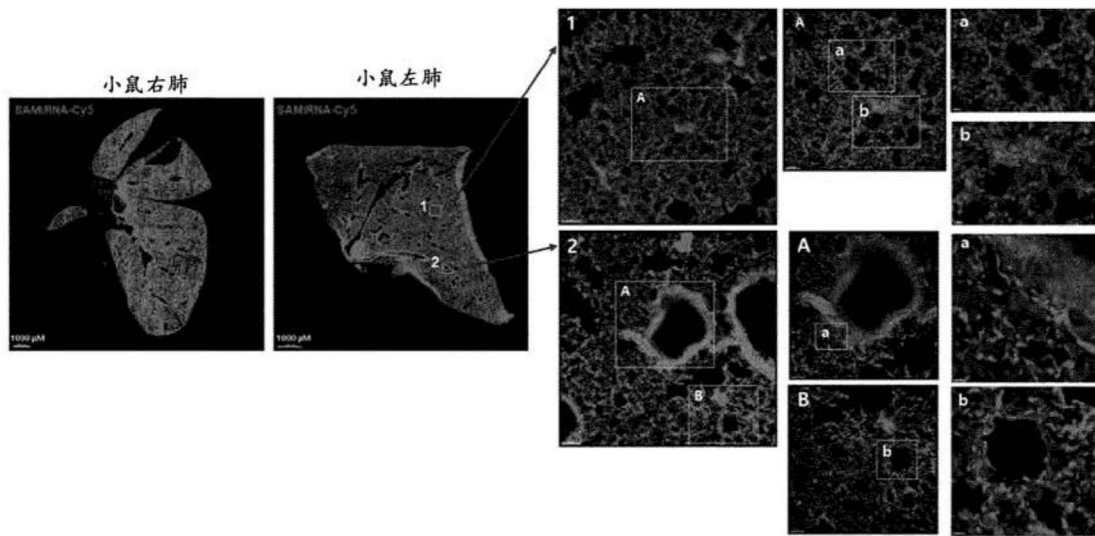


图9b