



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109890393 A

(43)申请公布日 2019.06.14

(21)申请号 201780061209.0

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

(22)申请日 2017.10.03

代理人 郭名悦 刘文娜

(30)优先权数据

62/403,595 2016.10.03 US

(51)Int.Cl.

A61K 31/7088(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 38/17(2006.01)

2019.04.02

A61K 47/42(2017.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61P 35/00(2006.01)

PCT/US2017/054884 2017.10.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/067526 EN 2018.04.12

(71)申请人 EOS生物科学公司

权利要求书2页 说明书31页

地址 美国加利福尼亚州

序列表7页 附图10页

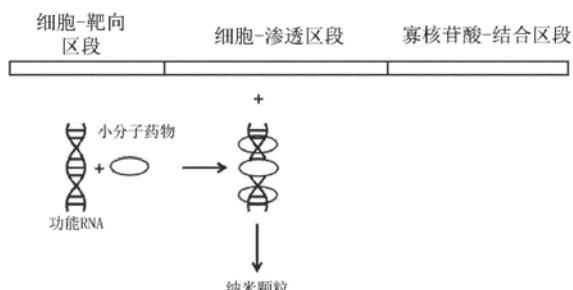
(72)发明人 O·K·哈法尔

(54)发明名称

功能RNA和小分子药物治疗性复合物和纳米  
颗粒递送媒介

(57)摘要

本文公开了治疗性复合物，其包括与功能RNA复合的小分子药物。本文进一步公开了包括纳米颗粒的组合物以及制造和使用这种纳米颗粒的方法，所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物复合的功能RNA分子，其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。进一步描述了治疗患有癌症的受试者的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的包括纳米颗粒的组合物，纳米颗粒包括载体多肽和与小分子化药复合的功能RNA分子，其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。也描述了包括所述纳米颗粒的药物组合物、制品和试剂盒。



1. 一种组合物, 其包括与小分子药物复合的功能RNA分子, 其中所述功能RNA分子调节靶蛋白的表达。
2. 一种组合物, 其包括包含小分子药物嵌入的至少一个互补区域的功能RNA分子。
3. 根据权利要求2所述的组合物, 其中所述功能RNA分子调节靶蛋白的表达。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的组合物, 其包括包含所述功能RNA分子和所述小分子药物的脂质体。
5. 根据权利要求4所述的组合物, 其中所述脂质体包括细胞-靶向区段。
6. 一种包括纳米颗粒的组合物, 所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物复合的功能RNA分子, 其中所述载体多肽包括细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。
7. 根据权利要求6所述的组合物, 其中所述组合物中所述载体多肽与所述功能RNA分子的摩尔比是约3:1至约8:1。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的组合物, 其中所述小分子药物嵌入所述功能RNA分子中, 并且其中所述功能RNA分子包括至少一个互补区域。
9. 根据权利要求6-8中任一项所述的组合物, 其中所述细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。
10. 根据权利要求6-9中任一项所述的组合物, 其中所述寡核苷酸-结合区段是带正电的。
11. 根据权利要求6-10中任一项所述的组合物, 其中所述寡核苷酸-结合区段包括聚赖氨酸。
12. 根据权利要求6-10中任一项所述的组合物, 其中所述寡核苷酸-结合区段包括十赖氨酸。
13. 根据权利要求6-12中任一项所述的组合物, 其中所述组合物中所述纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小。
14. 根据权利要求6-13中任一项所述的组合物, 其中所述载体多肽进一步包括细胞-靶向区段。
15. 根据权利要求5或14所述的组合物, 其中所述细胞-靶向区段结合癌细胞。
16. 根据权利要求5、14和15中任一项所述的组合物, 其中所述细胞-靶向区段结合细胞表面上的受体。
17. 根据权利要求5和14-16中任一项所述的组合物, 其中所述细胞-靶向区段结合HER3或c-MET。
18. 根据权利要求5和14-17中任一项所述的组合物, 其中所述细胞-靶向区段包括:
  - i. 调蛋白序列或其变体; 或
  - ii. 内化素B序列或其变体。
19. 根据权利要求5和14-18中任一项所述的组合物, 其中所述细胞-靶向区段包括调蛋白- $\alpha$ 的受体结合结构域。
20. 根据权利要求1-19中任一项所述的组合物, 其中所述功能RNA分子的至少一部分是双链的。
21. 根据权利要求1-20中任一项所述的组合物, 其中所述功能RNA分子是单链的并且包括至少一个自我互补区域。

22. 根据权利要求1-21中任一项所述的组合物,其中所述功能RNA分子是siRNA分子或shRNA分子。

23. 根据权利要求1-22中任一项所述的组合物,其中所述功能RNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的组合物,其中所述功能RNA分子减少免疫检查点蛋白的表达。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的组合物,其中所述组合物中功能RNA分子与所述小分子药物的摩尔比是约1:1至约1:60。

26. 根据权利要求1-25中任一项所述的组合物,其中所述组合物中所述功能RNA分子与所述小分子药物的摩尔比是约1:5至约1:60。

27. 根据权利要求1-26中任一项所述的组合物,其中所述小分子药物是化疗剂。

28. 根据权利要求1-27中任一项所述的组合物,其中所述小分子药物是蒽环类抗生素、烷基化试剂或烷基化样试剂。

29. 根据权利要求1-28中任一项所述的组合物,其中所述小分子药物是多柔比星。

30. 根据权利要求1-29中任一项所述的组合物,其中所述组合物是无菌的。

31. 根据权利要求30所述的组合物,其中所述组合物是冷冻干燥的。

32. 一种药物组合物,其包括根据权利要求1-31中任一项所述的组合物,还包括药学上可接受的赋形剂。

33. 一种制品,其包括小瓶中的根据权利要求1-32中任一项所述的组合物。

34. 一种试剂盒,其包括根据权利要求1-32中任一项所述的组合物或根据权利要求33所述的制品,和使用说明书。

35. 一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1-32中任一项所述的组合物。

36. 一种同时调节靶蛋白的表达和抑制细胞的生长的方法,所述方法包括向细胞施用有效量的根据权利要求1-32中任一项所述的组合物。

37. 一种在患有癌症的受试者中同时刺激免疫应答和杀伤癌细胞的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1-32中任一项所述的组合物。

38. 一种制造组合物的方法,所述方法包括将小分子药物与功能RNA分子组合,其中所述小分子药物嵌入所述功能RNA分子中。

39. 一种制造纳米颗粒组合物的方法,所述方法包括将载体多肽、功能RNA分子和小分子药物组合,其中所述载体多肽包括细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。

40. 根据权利要求39所述的方法,包括:

将所述功能RNA分子与所述小分子药物组合,以使所述小分子药物与所述功能RNA分子复合;和

将所述载体多肽和与所述小分子药物复合的所述功能RNA分子组合。

41. 根据权利要求39或40所述的方法,其中所述小分子药物嵌入所述功能RNA分子中。

42. 根据权利要求39-40中任一项所述的方法,包括去除未结合的小分子药物。

43. 根据权利要求39-42中任一项所述的方法,进一步包括冷冻干燥所述纳米颗粒组合物。

## 功能RNA和小分子药物治疗性复合物和纳米颗粒递送媒介

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年10月3日提交的、名称为“DRUG-DELIVERY NANOPARTICLES WITH RNA AND SMALL-MOLECULE CARGOS (具有RNA和小分子货物的药物递送纳米颗粒)”的美国临时申请No.62/403,595的优先权权益,其出于所有目的通过引用并入本文。

[0003] 以ASCII文本文件提交的序列表

[0004] 下述以ASCII文本文件提交的内容以其整体通过引用并入本文:计算机可读形式(CRF)的序列表(文件名761542000840SEQLIST.txt,记录日期:2017年10月3日,大小:14KB)。

### 技术领域

[0005] 本发明涉及用于治疗癌症的方法和纳米颗粒组合物。本发明进一步涉及核酸-药物复合物。

### 背景技术

[0006] 目前用于肿瘤的靶向疗法的策略包括抗体-靶向的化疗剂(即,免疫缀合物)、靶向的毒素、信号阻断抗体和抗体-靶向的脂质体(即,免疫脂质体)。例如,曲妥珠单抗是干扰HER2/neu信号传导的单克隆抗体,并且常用于治疗HER2+乳腺癌。但是,在开始治疗之后,也可出现曲妥珠单抗抗性癌症,从而限制了治疗的功效。

[0007] 小分子化疗药,比如多柔比星,也通常用于治疗某些癌症。但是多柔比星也造成心肌病和癌症抗性的巨大风险。通过使用脂质体(比如LipoDox)递送小分子药物,比如多柔比星已经改善了为某些癌症施用药物的功效。但是,许多抗癌剂的毒性为有效的低剂量疗法提出了迫切需求。

[0008] 本文提及的所有出版物、专利和专利申请的内容在此通过引用以它们的整体并入本文。

### 发明内容

[0009] 在一些方面中,提供了包括与小分子药物复合的功能RNA分子的组合物,其中功能RNA分子调节靶蛋白的表达。

[0010] 在另一方面中,提供了功能RNA分子,其包括插入有小分子药物的至少一个互补区域。在一些实施方式中,功能RNA分子调节靶蛋白的表达。

[0011] 在上述组合物的一些实施方式中,组合物包括包含功能RNA分子和小分子药物的脂质体。在一些实施方式中,脂质体包括细胞靶向区段。

[0012] 在另一方面中,提供了包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物复合的功能RNA分子,其中载体多肽包括细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中,载体多肽进一步包括细胞-靶向区段。

[0013] 在一些实施方式中,小分子药物嵌入RNA分子中。在一些实施方式中,RNA分子的至

少一部分是双链的。在一些实施方式中, RNA分子是单链的并且包括至少一个自我互补区域 (self-complementary region)。在一些实施方式中, RNA分子是siRNA、shRNA、miRNA、环RNA (circRNA)、rRNA、Piwi-相互作用RNA (piRNA)、毒性小RNA (tsRNA) 或核酶。在一些实施方式中, RNA分子是反义RNA分子。在一些实施方式中, RNA分子具有至少一个三磷酸5' 端。在一些实施方式中, RNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中, 纳米颗粒组合物中RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:1至约1:60。在一些实施方式中, 组合物中功能RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:5至约1:60。

[0014] 在一些实施方式中, 功能RNA分子减少了免疫检查点蛋白的表达。

[0015] 在一些实施方式中, 小分子药物是化疗剂。在一些实施方式中, 小分子药物是蒽环类抗生素。在一些实施方式中, 小分子药物是多柔比星。在一些实施方式中, 小分子药物是烷基化试剂或烷基化样试剂。在一些实施方式中, 小分子药物具有卡铂 (Carboplatin)、卡莫司汀 (Carmustine)、顺铂 (Cisplatin)、环磷酰胺 (Cyclophosphamide)、左旋溶肉瘤素 (Melphalan)、甲基苄肼 (Procarbazine) 或噻替派 (Thiotepa)。

[0016] 在一些实施方式中, 组合物中载体多肽与RNA分子的摩尔比是约3:1至约8:1。在一些实施方式中, 组合物中载体多肽与RNA分子的摩尔比是约4:1至约5:1。在一些实施方式中, 组合物中载体多肽与RNA分子的摩尔比是约4:1。

[0017] 在一些实施方式中, 细胞-靶向区段结合哺乳动物细胞。在一些实施方式中, 细胞-靶向区段结合患病的细胞。在一些实施方式中, 细胞-靶向区段结合癌细胞。在一些实施方式中, 癌细胞是HER3+癌细胞或c-MET+癌细胞。在一些实施方式中, 癌细胞是头颈癌细胞、胰腺癌细胞、乳腺癌细胞、神经胶质癌细胞、卵巢癌细胞、宫颈癌细胞、胃癌细胞、皮肤癌细胞、结肠癌细胞、直肠癌细胞、肺癌细胞、肾癌细胞、前列腺癌细胞或甲状腺癌细胞。

[0018] 在一些实施方式中, 细胞-靶向区段结合细胞表面上的靶分子。在一些实施方式中, 细胞-靶向区段结合细胞表面上的受体。在一些实施方式中, 细胞-靶向区段结合HER3或c-MET。

[0019] 在一些实施方式中, 细胞-靶向区段包括特异性结合细胞表面上表达的受体的配体。在一些实施方式中, 细胞-靶向区段包括调蛋白 (heregulin) 序列或其变体; 或内化素B 序列或其变体。在一些实施方式中, 细胞-靶向区段包括调蛋白- $\alpha$ 的受体结合结构域。

[0020] 在一些实施方式中, 细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。

[0021] 在一些实施方式中, 寡核苷酸-结合区段是带正电的。在一些实施方式中, 寡核苷酸-结合区段包括聚赖氨酸。在一些实施方式中, 寡核苷酸-结合区段包括十赖氨酸 (decalysine)。

[0022] 在一些实施方式中, 载体多肽是HerPBK10。

[0023] 在一些实施方式中, 组合物中纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小。

[0024] 在一些实施方式中, 组合物是无菌的。在一些实施方式中, 组合物是液体组合物。在一些实施方式中, 组合物是干燥组合物。在一些实施方式中, 组合物是冷冻干燥的。

[0025] 在另一方面中, 提供了包括纳米颗粒、进一步包括药学上可接受的赋形剂的药物组合物, 所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物复合的功能RNA分子, 其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。

[0026] 在另一方面中, 提供了在小瓶中的包括包含纳米颗粒的组合物的制品, 所述纳米

颗粒包括载体多肽和与小分子药物复合的功能RNA分子,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中,小瓶是密封的。

[0027] 在另一方面中,提供了包括组合物和使用说明书的试剂盒,所述组合物包括纳米颗粒,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物复合的功能RNA分子,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。

[0028] 在另一方面中,提供了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物复合的功能RNA分子,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中,癌症是HER3+癌症或c-MET+癌症。在一些实施方式中,癌症是头颈癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、神经胶质癌、宫颈癌、胃癌、皮肤癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、肾癌、前列腺癌细胞或甲状腺癌。

[0029] 在另一方面中,提供了同时调节靶蛋白的表达和抑制细胞的生长的方法,所述方法包括向细胞施用任何上述组合物。

[0030] 在另一方面中,提供了在患有癌症的受试者中同时刺激免疫应答和杀伤癌细胞的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的上述组合物。在一些实施方式中,功能RNA分子减少了免疫检查点蛋白的表达。

[0031] 在另一方面中,提供了制造组合物的方法,所述方法包括将小分子药物与功能RNA分子组合,其中小分子药物嵌入功能RNA分子中。在一些实施方式中,提供了制造纳米颗粒组合物的方法,所述方法包括将载体多肽、功能RNA分子和小分子药物组合,其中载体多肽包括细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中,所述方法包括将RNA分子与小分子药物组合,以将小分子药物与RNA分子复合;和将载体多肽和与小分子药物复合的RNA分子组合。在一些实施方式中,所述方法包括去除未结合的小分子药物。在一些实施方式中,小分子药物嵌入RNA分子中。在一些实施方式中,所述方法进一步包括无菌过滤纳米颗粒组合物。在一些实施方式中,所述方法进一步包括冷冻干燥纳米颗粒组合物。

## 附图说明

[0032] 图1图解了包括细胞-靶向结构域、细胞-渗透结构域和寡核苷酸-结合结构域的载体多肽的示意图。当载体多肽与结合至小分子药物的功能RNA分子组合时,形成了纳米颗粒。

[0033] 图2显示了过滤之前(泳道2和3)上样dox:siRNA1复合物和dox:siRNA2复合物样品的1%琼脂糖凝胶,以及使用10K MWCO过滤器过滤之后的截留物(泳道5和6)和滤液(泳道7和8)。过滤前的复合物和截留物包括siRNA,而滤液不包括siRNA。

[0034] 图3显示了来自在10K MWCO过滤器上过滤之后,dox:siRNA1复合物(上)和dox:siRNA2复合物(下)的截留物和滤液的吸光度光谱。两种复合物的截留物在约480nm处具有最大峰,指示截留物中存在多柔比星。滤液在480nm处没有显著的峰,指示滤液中几乎没有多柔比星。

[0035] 图4显示了来自在10K MWCO过滤器上过滤之后,dox:siScrm1复合物、dox:siRNA1复合物、dox:siRNA2复合物和dox:DNAoligo复合物的截留物和滤液的吸光度光谱。所有四种复合物的截留物在约480nm处具有最大峰,指示截留物中存在多柔比星。滤液在480nm处

没有明显的峰,指示滤液中几乎没有多柔比星。

[0036] 图5A-C显示了用三种不同剂量的siScrm1、siRNA1、siRNA2、dox:siScrm1复合物、dox:siRNA1复合物、dox:siRNA2复合物、dox:DNA oligo复合物或单独多柔比星转染之后24小时(图5A)、48小时(图5B)或72小时(图5C)JIMT1细胞的细胞活力。

[0037] 图6A显示了在用三种不同浓度的siScrm1、siRNA1、siRNA2、dox:siScrm1复合物、dox:siRNA1复合物、dox:siRNA2复合物、dox:DNA oligo复合物或单独多柔比星转染JIMT1(抗曲妥珠单抗的人乳腺癌)细胞之后24小时siRNA1靶mRNA的相对mRNA敲低(由qPCR测量)。

[0038] 图6B显示了在用三种不同浓度的siScrm1、siRNA1、siRNA2、dox:siScrm1复合物、dox:siRNA1复合物、dox:siRNA2复合物、dox:DNA oligo复合物或单独多柔比星转染JIMT1细胞之后24小时siRNA2靶mRNA的相对mRNA敲低(由qPCR测量)。

[0039] 图7显示了来自在10K MWCO过滤器上过滤之后,dox:siScrm2复合物和dox:siRNA3复合物的截留物和滤液的吸光度光谱。两种复合物的截留物在约480nm处具有最大峰,指示截留物中存在多柔比星。滤液在480nm处没有显著的峰,指示滤液中几乎没有多柔比星。

[0040] 图8显示了用三种不同剂量的siScrm2、siRNA3、dox:siScrm2复合物、dox:siRNA3复合物或单独多柔比星转染之后24小时的4T1-Fluc-Neo/eGFP-Puro细胞的细胞活力。4T1-Fluc-Neo/eGFP-Puro细胞是稳定表达Fluc和eGFP的小鼠乳腺肿瘤系细胞。4T1细胞被视为三阴性乳腺癌细胞系。

## 具体实施方式

[0041] 本文提供了治疗性复合物,其包括与小分子药物(比如化疗剂)复合的功能RNA分子(比如双链功能RNA分子siRNA分子)。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。治疗性复合物可作为合并的单个递送包装被递送至细胞,比如通过使用可靶向细胞的脂质体或纳米颗粒递送媒介。例如,在一些方面中,治疗性复合物包括在可将复合物递送至细胞(即,通过脂质转染)的脂质体中。在某些方面中,提供了包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物复合的功能RNA分子。载体多肽包括细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段,并且当与治疗性复合物组合时,可自发组装至纳米颗粒中。在一些方面中,向患有癌症的受试者施用有效量的纳米颗粒组合物或治疗性复合物,以治疗癌症。

[0042] 将功能RNA分子和小分子药物二者同时递送至细胞(比如癌细胞),允许有效的疾病治疗,同时限制非期望的副作用,比如广泛的全身性免疫应答。小分子药物和功能RNA分子的共递送可协同地作用,而产生减缓肿瘤生长或甚至肿瘤消退的效应。之前的用于递送siRNA和多柔比星的系统,比如Liu等,Co-delivery of doxorubicin and siRNA by a simplified platform with oligodeoxynucleotides as a drug carrier,Colloids and Surfaces B:Biointerfaces,第126卷,第531-540页(2015)中描述的那些依赖于将多柔比星嵌入专门设计的包含CGA重复序列的DNA寡核苷酸(即,CGA-DNA寡核苷酸)中,并且将dox:DNA复合物与PEI、CMCS-PEG-NGR和siRNA混合,而形成双货物(cargo)颗粒(即,dox:DNA货物和功能RNA货物)。如本文进一步详述的,已经发现了小分子药物,比如多柔比星,可嵌入功能RNA分子,并且复合物保持功能RNA分子和小分子药物的两种功能特性。此外,与单独施用的小分子药物相比,与功能RNA分子复合的小分子药物产生增加的小分子药物的效力。该令人吃惊的发现指示,小分子药物可结合核酸分子,而不是精心设计的CGA-DNA寡核苷酸。因

为该发现允许小分子药物直接结合RNA分子,所以RNA分子可设计为功能性的,比如调节(即,增加或减少)蛋白质表达和/或具有生物学作用(比如抗癌作用)。此外,小分子药物可直接结合功能RNA分子的发现允许简化的递送单个复合物,而不是dox:DNA复合物和siRNA的混合物。

[0043] 在一些实施方式中,使用可组装至纳米颗粒中的载体多肽将复合物递送至细胞。例如,本文提供了包括纳米颗粒的纳米颗粒组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物复合的功能RNA分子,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。纳米颗粒的载体多肽可保护、运输功能RNA分子和小分子药物并且将功能RNA分子和小分子药物靶向至靶向的细胞,比如癌细胞。载体多肽包括细胞-渗透区段,其允许将功能RNA分子和小分子药物递送至细胞的内部。所以,纳米颗粒可确保有效的靶向递送治疗性复合物,以减少向受试者施用的有效剂量。此外,载体多肽保护功能RNA分子免受可降解功能RNA分子的胞外核酸酶或其他因素的影响。

[0044] 在一些实施方式中,提供了同时调节靶蛋白的表达和抑制细胞的生长的方法,所述方法包括向细胞施用有效量的组合物,其包括与小分子药物(比如化疗药物)复合的功能RNA分子。在一些实施方式中,功能RNA分子是双链功能RNA分子(比如双链siRNA)。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。

[0045] 在一些实施方式中,提供了同时调节靶蛋白的表达和抑制细胞的生长的方法,所述方法包括向细胞施用有效量的包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物(比如化疗药物)复合的功能RNA分子。在一些实施方式中,功能RNA分子是双链功能RNA分子(比如双链siRNA)。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。

[0046] 在一些实施方式中,提供了杀伤细胞的方法,所述方法包括用包括功能RNA分子和小分子药物(比如化疗药物)的复合物转染细胞。在一些实施方式中,功能RNA分子是双链功能RNA分子(比如双链siRNA)。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。

[0047] 在一些实施方式中,提供了杀伤细胞的方法,所述方法包括向细胞施用包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物(比如化疗药物)复合的功能RNA分子。在一些实施方式中,功能RNA分子是双链功能RNA分子(比如双链siRNA)。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。

[0048] 在一些实施方式中,提供了诱导细胞的细胞凋亡的方法,所述方法包括用包括功能RNA分子和小分子药物的复合物转染细胞。在一些实施方式中,功能RNA分子是双链功能RNA分子。在一些实施方式中,小分子药物是化疗剂。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。

[0049] 在一些实施方式中,提供了诱导细胞的细胞凋亡的方法,所述方法包括向细胞施用包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物(比如化疗药物)复合的功能RNA分子。在一些实施方式中,功能RNA分子是双链功能RNA分子。在一些实施方式中,小分子药物是化疗剂。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。

[0050] 在一些实施方式中,提供了诱导细胞的坏死的方法,所述方法包括用包括功能RNA分子和小分子药物的复合物转染细胞。在一些实施方式中,功能RNA分子是双链功能RNA分子。在一些实施方式中,小分子药物是化疗剂。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。

[0051] 在一些实施方式中,提供诱导细胞的坏死的方法,所述方法包括向细胞施用包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物(比如化疗药物)复合的功能RNA分子。在一些实施方式中,功能RNA分子是双链功能RNA分子。在一些实施方式中,小分子药物是化疗剂。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。

[0052] 在一些实施方式中,提供使癌细胞对化疗药物敏感的方法,所述方法包括向癌细胞施用包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与化疗药物复合的功能RNA分子,其中功能RNA分子增加了癌细胞对化疗药物的敏感性。在一些实施方式中,功能RNA分子是双链功能RNA分子(比如双链siRNA)。在一些实施方式中,功能RNA分子是siRNA分子,其减少了与药物流出、化疗药物抗性或化疗药物敏感性相关的蛋白质的表达。在一些实施方式中,化疗药物嵌入功能RNA分子中。

[0053] 在一些实施方式中,提供了使癌细胞对化疗药物敏感的方法,所述方法包括用包括功能RNA分子和化疗药物的复合物转染细胞,其中功能RNA分子增加了癌细胞对化疗药物的敏感性。在一些实施方式中,功能RNA分子是双链功能RNA分子(比如双链siRNA)。在一些实施方式中,功能RNA分子是siRNA分子,其减少了与药物流出、化疗药物抗性或化疗药物敏感性相关的蛋白质的表达。在一些实施方式中,化疗药物嵌入功能RNA分子中。

[0054] 在一些实施方式中,提供了同时调节免疫应答和杀伤癌细胞的方法,所述方法包括向细胞施用有效量的包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物(比如化疗药物)复合的功能RNA分子。在一些实施方式中,功能RNA分子是双链功能RNA分子(比如双链siRNA)。例如,在一些实施方式中,功能RNA分子是减少了免疫检查点蛋白的表达的siRNA分子。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。

[0055] 在一些实施方式中,提供了同时调节免疫应答和杀伤癌细胞的方法,所述方法包括用包括功能RNA分子和小分子药物(比如化疗药物)的复合物转染细胞。在一些实施方式中,功能RNA分子是双链功能RNA分子(比如双链siRNA)。例如,在一些实施方式中,功能RNA分子是减少了免疫检查点蛋白的表达的siRNA分子。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。

[0056] 在一些实施方式中,提供了在患有癌症的受试者中同时调节免疫应答和杀伤癌细胞的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物(比如化疗药物)复合的功能RNA分子。在一些实施方式中,功能RNA分子是双链功能RNA分子(比如双链siRNA)。例如,在一些实施方式中,功能RNA分子是减少了免疫检查点蛋白的表达的siRNA分子。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。

[0057] 在一些实施方式中,提供了在患有癌症的受试者中同时调节免疫应答和杀伤癌细胞的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物(比如化疗药物)复合的功能RNA分子。在一些实施方式中,功能RNA分子是双链功能RNA分子。例如,在一些实施方式中,功能RNA分子是减少了免疫检查点蛋白的表达的siRNA分子。在一些实施方式中,小分子药物是化疗剂。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。

[0058] 在一些实施方式中,提供了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的包括功能RNA分子和小分子药物的复合物。在一些实施方式中,功能RNA分子是

双链功能RNA分子。在一些实施方式中,小分子药物是化疗剂。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。在一些实施方式中,使用载体,比如脂质体、纳米颗粒或载体多肽运输复合物。

[0059] 在一些实施方式中,提供了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物(比如化疗药物)复合的功能RNA分子。在一些实施方式中,功能RNA分子是双链功能RNA分子。在一些实施方式中,小分子药物是化疗剂。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。

[0060] 如本文所使用,除非上下文另外明确指出,否则单数形式“一(an)”、“一(an)”和“所述”包括复数提及物。

[0061] 本文提及“约”值或参数,包括(和描述)涉及该值或参数本身的变型。例如,提及“约X”的描述包括“X”的描述。此外,提及“约X-Y”等同于“约X至约Y”,并且“约X-Y或Y-Z”等同于“约X至约Y或约Y至约Z”。另外,提及“约X、Y或Z或更少”等同于“约X或更少、约Y或更少、或约Z或更少”,并且提及“约X、Y或Z或更多”等同于“约X或更多、约Y或更多、或约Z或更多”。

[0062] 除非另外指出,否则术语“有效的”在本文用于描述当在化合物或组分使用的背景下使用时,产生或实现期望的结果的量,无论该结果是否涉及治疗感染或疾病状态或如本文另外所述的。

[0063] 如本文使用的,术语“药学上可接受的”意思是化合物或组合物适于施用至受试者,包括人受试者,以实现本文所述的治疗,而从疾病的严重程度和治疗的必要性角度没有过度有害的副作用。

[0064] 术语“受试者”或“患者”在本文同义使用,以描述哺乳动物。受试者的例子包括人或动物(包括但不限于狗、猫、啮齿动物(比如小鼠、大鼠或仓鼠)、马、绵羊、母牛、猪、山羊、驴、兔子或灵长类(比如猴子、黑猩猩、猩猩、狒狒或猕猴))。

[0065] 术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”在本文同义使用,指为遭受疾病状态或病况的受试者提供益处的任何动作,所述包括通过减轻、抑制、压制或消除至少一种症状而改善病况;延迟疾病的进展;延迟疾病的复发;或抑制疾病。

[0066] 当相对于特定蛋白(例如,HER3+或c-MET+)未上调的细胞,细胞呈现出更多的该蛋白时,则展示该特定蛋白的上调表达的所述细胞被视为是上调的。

[0067] 应理解,本文所述的本发明的方面和变型包括“由方面和变型组成”和/或“基本上由方面和变型组成”。

[0068] 应当理解,本文所述的各种实施方式的一个、一些或所有特性可组合以形成本发明的其他实施方式。

[0069] 本文使用的章节标题是仅仅为了组织的目的并且不解释为限制描述的主题。

[0070] 功能RNA和小分子药物复合物

[0071] 治疗性复合物包括与小分子药物复合的功能RNA分子。小分子药物可与功能RNA分子复合,例如,通过静电相互作用或通过嵌入功能RNA分子中。

[0072] 功能RNA分子可提供生物学功能,比如使得抑制蛋白质表达(例如,通过RNAi途径)、增加蛋白质表达(例如,通过使用mRNA作为功能RNA分子)或改变一种或多种细胞因子(比如I型干扰素(例如,IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ )、IL-6或IL-8))的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子是抗HER2siRNA。在一些实施方式中,功能RNA分子调节由肿瘤细胞表达的免疫系统检

查点蛋白(例如,程序性细胞死亡蛋白配体1(PD-L1),或程序性细胞死亡蛋白1(PD-1),或细胞毒素T-淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4))的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子是减少免疫系统检查点蛋白的表达的siRNA分子。在一些实施方式中,功能RNA分子调节与药物流出或药物抗性相关的蛋白(比如单羧酸转运蛋白(MCT)、多重抗药蛋白(MDR)、P-糖蛋白、多重抗药相关蛋白(MRP)、肽转运蛋白(PEPT)或Na<sup>+</sup>磷酸转运蛋白(NPT))的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子是减少与药物流出或药物抗性相关的蛋白(比如单羧酸转运蛋白(MCT)、多重抗药蛋白(MDR)、P-糖蛋白、多重抗药相关蛋白(MRP)、肽转运蛋白(PEPT)或Na<sup>+</sup>磷酸转运蛋白(NPT))表达的siRNA分子。在一些实施方式中,功能RNA分子调节与降低药物敏感性相关的蛋白质,比如MAP激酶激活死亡结构域(MADD)蛋白质、Smad3或Smad4的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子是减少与降低药物敏感性相关的蛋白质的表达的siRNA分子,所述蛋白质比如MAP激酶激活死亡结构域(MADD)蛋白质、Smad3或Smad4。在一些实施方式中,具有任何上述活性的功能RNA分子提供化疗的效果。

[0073] 与小分子药物复合的功能RNA分子保留功能RNA分子的功能活性。在一些实施方式中,与小分子药物复合的功能RNA分子保留未与小分子药物复合的功能RNA分子的约50%或更多(比如约60%、70%、80%、90%、95%或100%或更多)的活性。

[0074] 示例性的功能RNA分子包括siRNA、shRNA、miRNA、环RNA(circRNA)、rRNA、Piwi相互作用RNA(piRNA)、毒性小RNA(tsRNA)或核酶。在一些实施方式中,RNA分子是反义RNA分子。功能RNA分子可包括可连接至功能RNA的功能组分的5'或3'端的非功能组分。在一些实施方式中,功能RNA分子是抗癌剂,其可例如通过调节基因表达、通过调节一个或多个免疫系统检查点蛋白而调节免疫应答、或调节细胞因子表达而发挥作用。

[0075] 在一些实施方式中,功能RNA分子是双链的。在一些实施方式中,功能RNA分子是单链的并且包括至少一个自我互补区域。功能RNA分子可包括,例如茎-环结构,其中RNA分子的茎部分包括自我互补区域。双链功能RNA分子不需要完全碱基配对,并且在一些实施方式中包括一个或多个凸起、环、错配或其他二级结构。在一些实施方式中,约80%或更多的核苷酸配对,约85%或更多的核苷酸配对,约90%或更多的核苷酸配对,约95%的核苷酸配对,或约100%的核苷酸配对。

[0076] 在一些实施方式中,功能RNA包括一个或多个三磷酸5'端,比如T7-转录RNA。三磷酸5'端可触发I型干扰素的内源表达,其可进一步促进癌细胞死亡。在一些实施方式中,RNA通过合成产生或不包括一个或多个三磷酸5'端。

[0077] 在一些实施方式中,功能RNA分子的长度是约10-100个核苷酸,比如长度是约10、30、20-40、30-50、40-60、50-70、60-80、70-90或80-100个核苷酸。在一些实施方式中,功能RNA分子的长度是约25-35个核苷酸,比如长度是约25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个核苷酸。在一些实施方式中,寡核苷酸的长度是约25-35个核苷酸,比如长度是约25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个核苷酸。

[0078] 功能RNA分子与小分子药物,比如化疗剂复合。示例性的小分子药物包括蒽环类抗生素(比如多柔比星、柔红霉素、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌、戊柔比星)或烷基化或烷基化样试剂(比如卡铂、卡莫司汀、顺铂、环磷酰胺、左旋溶肉瘤素、甲基苄肼或噻替派)。在一些实施方式中,小分子化合物是约1500道尔顿或更小,比如约1000道尔顿、900道尔顿、800道尔顿、700道尔顿、600道尔顿、500道尔顿、400道尔顿或300道尔顿或更小。在一些实施方

式中,小分子化合物是约100-1500道尔顿(比如约100-200道尔顿、200-300道尔顿、300-400道尔顿、400-500道尔顿、500-600道尔顿、600-700道尔顿、700-800道尔顿、800-900道尔顿、900-1000道尔顿、1000-1100道尔顿、1100-1200道尔顿、1200-1300道尔顿、1300-1400道尔顿或1400-1500道尔顿)。

[0079] 在一些实施方式中,小分子药物的溶解度(如在水中,pH 7,约25℃测量)是约50mg/mL或更小(比如约25mg/mL、10mg/mL、5mg/mL、2mg/mL、1mg/mL、0.5mg/mL、0.25mg/mL、0.1mg/mL、0.05mg/mL、0.025mg/mL、0.01mg/mL、0.005mg/mL、0.0025mg/mL或0.001mg/mL或更小)。在一些实施方式中,小分子药物的溶解度(如在水中,pH 7,约25℃测量)是约0.0001-50mg/mL(比如约0.0001-0.0005mg/mL、0.0005-0.001mg/mL、0.001-0.0025mg/mL、0.0025-0.005mg/mL、0.005-0.01mg/mL、0.01-0.025mg/mL、0.025-0.05mg/mL、0.05-0.1mg/mL、0.1-0.25mg/mL、0.25-0.5mg/mL、0.5-1mg/mL、1-2mg/mL、2-5mg/mL、5-10mg/mL、10-25mg/mL或25-50mg/mL)。

[0080] 在一些实施方式中,治疗性复合物中小分子药物与功能RNA分子的摩尔比为约60:1或更小,比如约50:1、40:1、30:1、20:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:1或更小。在一些实施方式中,治疗性复合物中小分子药物与功能RNA分子的摩尔比在约1:1和约60:1之间,比如约1:1-10:1、5:1-20:1、10:1-30:1、20:1-40:1、30:1-50:1或40:1-60:1。在一些实施方式中,治疗性复合物中小分子药物与功能RNA分子的摩尔比为约1:1、5:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1或60:1。

[0081] 小分子药物与功能RNA分子复合。在一些实施方式中,小分子药物通过静电相互作用、共价键(比如二硫键),或通过嵌入RNA而与功能RNA分子复合。小分子药物与功能RNA分子的复合不是序列特异性的。在一些实施方式中,功能RNA分子与互补的RNA(比如在具有自互补的部分的双链RNA或单链RNA中)配对,其允许小分子药物嵌入在配对的碱基之间。在一些实施方式中,小分子药物与功能RNA分子中的配对的碱基的平均摩尔比是约1:1-1:120(例如,约1:2-1:120、1:2-1:4、1:4-1:8、1:8-1:16、1:16-1:32、1:32-1:64、1:64-1:100或1:100-1:120)。应理解,当考虑小分子药物与功能RNA分子中的配对的碱基的摩尔比时,碱基和其互补碱基应视为两个配对的碱基。

[0082] 在一些实施方式中,提供了包括与小分子药物复合的功能RNA分子(比如双链siRNA分子)的复合物。在一些实施方式中,功能RNA分子调节一种或多种蛋白质的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子包括至少一个互补区域或是双链RNA分子。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。在一些实施方式中,RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:10至约1:60。在一些实施方式中,小分子药物是化疗剂,比如蒽环类抗生素(例如,多柔比星),或烷基化试剂或烷基化样试剂。

[0083] 在一些实施方式中,提供了包括治疗性复合物的脂质体,治疗性复合物包括与小分子药物复合的功能RNA分子(比如双链siRNA分子)。在一些实施方式中,脂质体包括可将脂质体靶向至细胞(比如癌细胞)的靶向区段。在一些实施方式中,功能RNA分子调节一种或多种蛋白质的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子包括至少一个互补区域或是双链RNA分子。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。在一些实施方式中,RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:10至约1:60。在一些实施方式中,小分子药物是化疗剂,比如蒽环类抗生素(例如,多柔比星)或烷基化试剂或烷基化样试剂。

[0084] 治疗性复合物可通过将功能RNA分子与小分子药物(比如化疗剂)组合而形成,其使得小分子药物以非序列特异性方式结合或嵌入功能RNA分子中。在一些实施方式中,功能RNA分子是双链RNA分子(或包括双链区段),并且小分子药物嵌入双链功能RNA分子中。在一些实施方式中,小分子药物和功能RNA分子以下列比例(小分子药物与功能RNA分子)组合:约60:1、50:1、40:1、30:1、20:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:1或更小。在一些实施方式中,小分子药物和功能RNA分子以约1:1和约60:1,比如约1:1-10:1、5:1-20:1、10:1-30:1、20:1-40:1、30:1-50:1或40:1-60:1之间的比例(小分子药物与功能RNA分子)组合。在一些实施方式中,小分子药物和功能RNA分子以下列比例(小分子药物与功能RNA分子)组合:约1:1、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:55或1:60。

[0085] 一旦功能RNA分子和小分子药物组合,则可培育混合物,其使得小分子药物和功能RNA分子形成复合物,例如通过允许小分子药物嵌入功能RNA分子中。未结合的小分子药物可与复合物分开,例如通过使用滤膜将复合物离心。截留物质将包括复合物,并且可被保留,而滤液包括未结合的小分子药物。

[0086] 在一些实施方式中,治疗性复合物是灭菌的,例如通过使用无菌过滤器。在一些实施方式中,治疗性复合物是冷冻干燥的。在一些实施方式中,在被配制用于施用或与载体(例如,脂质体或纳米颗粒)配制之前,冷冻干燥的治疗性复合物被复溶(reconstitute)。

[0087] 形成的治疗性复合物可载入载体,比如脂质体或纳米颗粒中。因此,在一些实施方式中,提供了包括脂质体的组合物,所述脂质体包括治疗性复合物,其中治疗性复合物包括功能RNA和小分子药物。脂质体可包括阳离子脂质(比如lipofectamine),其可结合治疗性复合物的功能RNA分子的负电荷。在一些实施方式中,治疗性复合物载入纳米颗粒、例如包括包含细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段的载体多肽的纳米颗粒中。在一些实施方式中,载体是包括靶向区段、比如抗体或受体结合结构域的靶向载体。

[0088] 包括功能RNA和小分子药物的治疗性复合物可用于杀伤细胞(比如癌细胞)、诱导细胞(比如癌细胞)的细胞凋亡,或治疗患者的癌症。

[0089] 在一些实施方式中,提供了将治疗性复合物递送至细胞(比如癌细胞)的方法,所述方法包括用包括功能RNA分子(比如双链siRNA分子)和小分子药物的复合物转染细胞。在一些实施方式中,功能RNA分子调节一种或多种蛋白质的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子包括至少一个互补区域或是双链RNA分子。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。在一些实施方式中,RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:10至约1:60。在一些实施方式中,小分子药物是化疗剂,比如蒽环类抗生素(例如,多柔比星)或烷基化试剂或烷基化样试剂。

[0090] 在一些实施方式中,提供了将治疗性复合物递送至细胞(比如癌细胞)的方法,所述方法包括使细胞接触包括包含治疗性复合物的脂质体的组合物,治疗性复合物包括与小分子药物复合的功能RNA分子(比如双链siRNA分子)。在一些实施方式中,脂质体包括靶向区段,其可使脂质体靶向细胞。在一些实施方式中,功能RNA分子调节一种或多种蛋白质的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子包括至少一个互补区域或是双链RNA分子。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。在一些实施方式中,RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:10至约1:60。在一些实施方式中,小分子药物是化疗剂,比如蒽环类抗生素(例如,多柔比星)或烷基化试剂或烷基化样试剂。

[0091] 在一些实施方式中,提供了杀伤细胞(比如癌细胞)的方法,所述方法包括用包括功能RNA分子和小分子药物(比如化疗药物)的复合物转染细胞。在一些实施方式中,功能RNA分子调节一种或多种蛋白质的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子包括至少一个互补区域或是双链RNA分子。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。在一些实施方式中,RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:10至约1:60。在一些实施方式中,小分子药物是化疗剂,比如蒽环类抗生素(例如,多柔比星)或烷基化试剂或烷基化样试剂。

[0092] 在一些实施方式中,提供了杀伤细胞(比如癌细胞)的方法,所述方法包括使细胞接触包括包含治疗性复合物的脂质体的组合物,治疗性复合物包括与小分子药物复合的功能RNA分子(比如双链siRNA分子)。在一些实施方式中,脂质体包括靶向区段,其可使脂质体靶向细胞。在一些实施方式中,功能RNA分子调节一种或多种蛋白质的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子包括至少一个互补区域或是双链RNA分子。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。在一些实施方式中,RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:10至约1:60。在一些实施方式中,小分子药物是化疗剂,比如蒽环类抗生素(例如,多柔比星)或烷基化试剂或烷基化样试剂。

[0093] 在一些实施方式中,提供了诱导细胞(比如癌细胞)的细胞凋亡的方法,所述方法包括用包括功能RNA分子和小分子药物的复合物转染细胞。在一些实施方式中,功能RNA分子调节一种或多种蛋白质的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子包括至少一个互补区域或是双链RNA分子。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。在一些实施方式中,RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:10至约1:60。在一些实施方式中,小分子药物是化疗剂,比如蒽环类抗生素(例如,多柔比星)或烷基化试剂或烷基化样试剂。

[0094] 在一些实施方式中,提供了诱导细胞(比如癌细胞)的细胞凋亡的方法,所述方法包括使细胞接触包括包含治疗性复合物的脂质体的组合物,治疗性复合物包括与小分子药物复合的功能RNA分子(比如双链siRNA分子)。在一些实施方式中,脂质体包括靶向区段,其可使脂质体靶向细胞。在一些实施方式中,功能RNA分子调节一种或多种蛋白质的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子包括至少一个互补区域或是双链RNA分子。在一些实施方式中,小分子药物嵌入功能RNA分子中。在一些实施方式中,RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:10至约1:60。在一些实施方式中,小分子药物是化疗剂,比如蒽环类抗生素(例如,多柔比星)或烷基化试剂或烷基化样试剂。

[0095] 在一些实施方式中,提供了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的包括功能RNA分子和小分子化疗药物的复合物。在一些实施方式中,功能RNA分子调节一种或多种蛋白质的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子包括至少一个互补区域或是双链RNA分子。在一些实施方式中,小分子化疗药物嵌入功能RNA分子中。在一些实施方式中,RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:10至约1:60。在一些实施方式中,小分子化疗药物是蒽环类抗生素(例如,多柔比星)、烷基化试剂或烷基化样试剂。在一些实施方式中,提供了用于治疗癌症的治疗性复合物,治疗性复合物包括与小分子化疗药物复合的功能RNA分子。本文进一步提供了用于制造用于治疗癌症的药物的治疗性复合物,治疗性复合物包括与小分子化疗药物复合的功能RNA分子。

[0096] 在一些实施方式中,提供了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的包括包含治疗性复合物的脂质体的组合物,治疗性复合物包括与小分子化疗药

物复合的功能RNA分子。在一些实施方式中,功能RNA分子调节一种或多种蛋白质的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子包括至少一个互补区域或是双链RNA分子。在一些实施方式中,小分子化疗药物嵌入功能RNA分子中。在一些实施方式中,RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:10至约1:60。在一些实施方式中,小分子化疗药物是蒽环类抗生素(例如,多柔比星)、烷基化试剂或烷基化样试剂。在一些实施方式中,提供了用于治疗癌症的脂质体,脂质体包括包含与小分子化疗药物复合的功能RNA分子的治疗性复合物。本文进一步提供了用于制造用于治疗癌症的药物的包括脂质体的组合物,脂质体包括包含与小分子化疗药物复合的功能RNA分子的治疗性复合物。

[0097] 纳米颗粒组合物

[0098] 本文所述的纳米颗粒组合物包括载体多肽,所述载体多肽包括细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中,本文所述的纳米颗粒组合物包括载体多肽,所述载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。纳米颗粒进一步包括与小分子药物复合的功能RNA分子。功能RNA分子可结合载体多肽的寡核苷酸-结合区段。当载体多肽结合功能RNA分子时,纳米颗粒自发形成。

[0099] 功能RNA分子可提供生物学功能,比如使得抑制蛋白质表达(例如,通过RNAi途径)、增加蛋白质表达(例如,通过使用mRNA作为功能RNA分子)、或改变一种或多种细胞因子(比如I型干扰素(例如,IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ )、IL-6或IL-8)的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子是抗HER2siRNA。在一些实施方式中,功能RNA分子调节肿瘤细胞表达的免疫系统检查点蛋白(例如,程序性细胞死亡蛋白配体1(PD-L1),或程序性细胞死亡蛋白1(PD-1),或细胞毒素T-淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4))的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子是减少免疫系统检查点蛋白的表达的siRNA分子。在一些实施方式中,功能RNA分子调节与药物流出或药物抗性相关的蛋白质(比如单羧酸转运蛋白(MCT)、多重抗药蛋白(MDR)、P-糖蛋白、多重抗药相关蛋白(MRP)、肽转运蛋白(PEPT)或Na<sup>+</sup>磷酸转运蛋白(NPT))的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子是siRNA分子,其减少了与药物流出或药物抗性相关的蛋白质(比如单羧酸转运蛋白(MCT)、多重抗药蛋白(MDR)、P-糖蛋白、多重抗药相关蛋白(MRP)、肽转运蛋白(PEPT)或Na<sup>+</sup>磷酸转运蛋白(NPT))的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子调节与降低药物敏感性相关的蛋白质,比如MAP激酶-激活死亡结构域(MADD)蛋白质、Smad3或Smad4的表达。在一些实施方式中,功能RNA分子是siRNA分子,其减少了与降低药物敏感性相关的蛋白质,比如MAP激酶-激活死亡结构域(MADD)蛋白质、Smad3或Smad4的表达。在一些实施方式中,具有任何上述活性的功能RNA分子提供了化疗效果。

[0100] 示例性功能RNA分子包括siRNA、shRNA、miRNA、环RNA(circRNA)、rRNA、Piwi相互作用RNA(piRNA)、毒性小RNA(tsRNA)或核酶。在一些实施方式中,RNA分子是反义RNA分子。功能RNA分子可包括非功能组分,所述非功能组分可连接至功能RNA的功能组分的5'或3'端。在一些实施方式中,功能RNA分子是抗癌剂,所述抗癌剂可例如通过调节基因表达或调节细胞因子表达而发挥作用。

[0101] 与小分子药物复合的功能RNA分子保留功能RNA分子的功能活性。在一些实施方式中,与小分子药物复合的功能RNA分子保留约50%或更多(比如约60%、70%、80%、90%、95%或100%或更多)的未与小分子药物复合的功能RNA分子的活性。

[0102] 在一些实施方式中,功能RNA分子是双链的。在一些实施方式中,功能RNA分子是单

链的并且包括至少一个自我互补区域。功能RNA分子可包括,例如茎-环结构,其中RNA分子的茎部分包括自我互补区域。双链功能RNA分子不需要完全碱基配对,并且在一些实施方式中包括一个或多个凸起、环、错配或其他二级结构。在一些实施方式中,约80%或更多的核苷酸配对,约85%或更多的核苷酸配对,约90%或更多的核苷酸配对,约95%的核苷酸配对,或约100%的核苷酸配对。

[0103] 在一些实施方式中,功能RNA包括一个或多个三磷酸5'端,比如T7-转录RNA。三磷酸5'端可触发I型干扰素的内源表达,其可进一步促进癌细胞死亡。在一些实施方式中,RNA合成产生或不包括一个或多个三磷酸5'端。

[0104] 在一些实施方式中,功能RNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸,比如约长度为10-100个核苷酸,比如长度是约10-30、20-40、30-50、40-60、50-70、60-80、70-90或80-100个核苷酸。在一些实施方式中,寡核苷酸的长度是约25-35个核苷酸,比如约25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个核苷酸。在一些实施方式中,寡核苷酸的长度是约15-25个核苷酸,比如约15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸。

[0105] 纳米颗粒中的功能RNA分子与小分子药物,比如化疗剂复合。小分子药物可与功能RNA分子复合,例如,通过静电相互作用或通过嵌入功能RNA分子中。示例性小分子药物包括蒽环类抗生素(比如多柔比星、柔红霉素、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌、戊柔比星)或烷基化试剂或烷基化样试剂(比如卡铂、卡莫司汀、顺铂、环磷酰胺、左旋溶肉瘤素、甲基苄肼或噻替派)。在一些实施方式中,小分子化合物是约1500道尔顿或更小,比如约1000道尔顿、900道尔顿、800道尔顿、700道尔顿、600道尔顿、500道尔顿、400道尔顿或300道尔顿或更小。在一些实施方式中,小分子化合物是约100-1500道尔顿(比如约100-200道尔顿、200-300道尔顿、300-400道尔顿、400-500道尔顿、500-600道尔顿、600-700道尔顿、700-800道尔顿、800-900道尔顿、900-1000道尔顿、1000-1100道尔顿、1100-1200道尔顿、1200-1300道尔顿、1300-1400道尔顿或1400-1500道尔顿)。

[0106] 在一些实施方式中,小分子药物的溶解度(如在水中,pH 7,约25°C测量)是约50mg/mL或更小(比如约25mg/mL、10mg/mL、5mg/mL、2mg/mL、1mg/mL、0.5mg/mL、0.25mg/mL、0.1mg/mL、0.05mg/mL、0.025mg/mL、0.01mg/mL、0.005mg/mL、0.0025mg/mL或0.001mg/mL或更小)。在一些实施方式中,小分子药物的溶解度(如在水中,pH 7,约25°C测量)是约0.0001-50mg/mL(比如约0.0001-0.0005mg/mL、0.0005-0.001mg/mL、0.001-0.0025mg/mL、0.0025-0.005mg/mL、0.005-0.01mg/mL、0.01-0.025mg/mL、0.025-0.05mg/mL、0.05-0.1mg/mL、0.1-0.25mg/mL、0.25-0.5mg/mL、0.5-1mg/mL、1-2mg/mL、2-5mg/mL、5-10mg/mL、10-25mg/mL或25-50mg/mL)。

[0107] 在一些实施方式中,治疗性复合物中小分子药物与功能RNA分子的摩尔比为约60:1或更小,比如约50:1、40:1、30:1、20:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:1或更小。在一些实施方式中,治疗性复合物中小分子药物与功能RNA分子的摩尔比在约1:1和约60:1之间,比如约1:1-10:1、5:1-20:1、10:1-30:1、20:1-40:1、30:1-50:1或40:1-60:1。在一些实施方式中,治疗性复合物中小分子药物与功能RNA分子的摩尔比为约1:1、5:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1或60:1。

[0108] 小分子药物与功能RNA分子复合。在一些实施方式中,通过静电相互作用、共价键(比如二硫键)或通过嵌入RNA,小分子药物与功能RNA分子复合。例如,功能RNA可与互补的

RNA(比如双链RNA中或具有自互补的部分的单链RNA)配对,其使得小分子药物嵌入配对的碱基之间。在一些实施方式中,小分子药物与功能RNA分子中的配对的碱基的平均摩尔比是约1:1-1:120(例如,约1:2-1:120、1:2-1:4、1:4-1:8、1:8-1:16、1:16-1:32、1:32-1:64、1:64-1:100或1:100-1:120)。应理解,当考虑小分子药物与功能RNA分子中的配对的碱基的摩尔比时,碱基和其互补碱基将视为两个配对的碱基。

[0109] 细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段在单个载体多肽中融合在一起。本文所述的区段是模块化的,并且可以以各种组合而结合。即,载体多肽可包括任何描述的细胞-靶向区段、细胞-渗透区段或寡核苷酸-结合区段。图1图解了具有细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段的载体肽。如图1中进一步显示,将载体肽与功能RNA分子组合导致形成纳米颗粒。任选地,在形成纳米颗粒之前,功能RNA分子预先与小分子药物结合。

[0110] 可通过将载体多肽与功能RNA分子组合形成纳米颗粒。在一些实施方式中,载体多肽与功能RNA分子以下述摩尔比组合:约8:1或更小(例如,约3:1-8:1、3:1-3.5:1、3.5:1-4:1、4:1-4.5:1、4.5:1-5:1、5:1-5.5:1、5.5:1-6:1、6:1-6.5:1、6.5:1-7:1、7:1-7.5:1或7.5:1-8:1),从而形成纳米颗粒组合物。在一些实施方式中,载体多肽与功能RNA分子以下述摩尔比组合:约4:1、4.5:1、5:1、5.5:1、6:1、6.5:1、7:1、7.5:1或8:1。因此,在一些实施方式中,纳米颗粒组合物包括摩尔比为下述的载体多肽和功能RNA分子:约8:1或更小(例如,约3:1-8:1、3:1-3.5:1、3.5:1-4:1、4:1-4.5:1、4.5:1-5:1、5:1-5.5:1、5.5:1-6:1、6:1-6.5:1、6.5:1-7:1、7:1-7.5:1或7.5:1-8:1)。在一些实施方式中,载体多肽与功能RNA分子以下述摩尔比组合:约4:1、4.5:1、5:1、5.5:1、6:1、6.5:1、7:1、7.5:1或8:1。

[0111] 在一些实施方式中,纳米颗粒组合物包括具有均匀摩尔比的载体多肽与功能RNA分子的纳米颗粒。在一些实施方式中,纳米颗粒包括摩尔比为下述的载体多肽和功能RNA分子:约8:1、7:1、6:1、5:1、4:1或3:1。

[0112] 在一些实施方式中,纳米颗粒组合物中的纳米颗粒的平均尺寸为约100nm或更小(比如约90nm、80nm、70nm、60nm、50nm或40nm或更小)。在一些实施方式中,纳米颗粒的平均尺寸在约30nm和约100nm之间(比如约30-40nm、40-50nm、50-60nm、60-70nm、70-80nm、80-90nm或90-100nm)。

[0113] 细胞-靶向区段可结合细胞表面上存在的靶分子。通过细胞-靶向区段结合分子使得纳米颗粒靶向至细胞。因此,细胞上存在的靶向的分子可取决于靶向的细胞。在一些实施方式中,靶向的分子是抗原,比如癌症抗原。在一些实施方式中,癌细胞呈现靶分子的上调表达。上调表达可为例如,增加约10%、20%、30%、40%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更多。在一些实施方式中,靶向的分子是细胞表面受体,比如HER3或c-MET。在一些实施方式中,细胞-靶向区段结合4-IBB、5T4、腺癌抗原、 $\alpha$ -胎蛋白、BAFF、C242抗原、CA-125、碳酸酐酶9(CA-IX)、c-MET、CCR4、CD152、CD19、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23(IgE受体)、CD28、CD30(TNFRSF8)、CD33、CD4、CD40、CD44v6、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CEA、CNT0888、CTLA-4、DR5、EGFR、EpCAM、CD3、FAP、纤连蛋白额外的结构域-B、叶酸受体1、GD2、GD3神经节苷脂、糖蛋白75、GPNMB、肝细胞生长因子(HGF)、人散射因子受体激酶、IGF-1受体、IGF-I、IgG1、L1-CAM、IL-13、IL-6、胰岛素样生长因子I受体、整联蛋白 $\alpha 5\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha \gamma 3$ 、MORAb-009、MS4A1、MUC1、粘蛋白CanAg、N-羟乙酸神经氨酸、NPC-1C、PDGF-R $\alpha$ 、PDL192、

磷脂酰丝氨酸、前列腺癌细胞、RANKL、RON、ROR1、SCH 900105、SDC1、SLAMF7、TAG-72、肌腱蛋白C、TGF $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 、TRAIL-R1、TRAIL-R2、肿瘤抗原CTAA16.88、VEGF-A、VEGFR-1、VEGFR2、波形蛋白、内化素B、细菌侵袭素(Inv)蛋白、或其片段。

[0114] 在一些实施方式中,细胞-靶向区段包括抗体、抗体片段(比如Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fab'片段、或单链可变(scFv)片段)、细胞因子或受体配体。

[0115] 在一些实施方式中,细胞-靶向区段包括特异性结合细胞表面上表达的受体的配体。示例性配体包括调蛋白序列(或其变体)或内化素B序列(或其变体)。调蛋白序列可为例如调蛋白- $\alpha$ 序列,比如调蛋白- $\alpha$ 的受体结合结构域。调蛋白- $\alpha$ 的受体结合结构域包括IG样结构域和EGF样结构域。配体变体保留对于靶向的分子的特异性结合。调蛋白(其可称为“Her”)可特异性结合HER3。SEQ ID NO:2是示例性野生型Her序列,其包括调蛋白- $\alpha$ 的受体结合序列的Ig样结构域和EGF样结构域。内化素B可特异性结合c-MET,并且也可称为“In1B”。

[0116] 在一些实施方式中,由细胞-靶向区段靶向的细胞是哺乳动物细胞,比如人细胞。在一些实施方式中,细胞是患病的细胞,比如癌细胞。在一些实施方式中,细胞是HER3+癌细胞或c-MET+癌细胞。在一些实施方式中,细胞是头颈癌细胞、胰腺癌细胞、乳腺癌细胞、神经胶质癌细胞、卵巢癌细胞、宫颈癌细胞、胃癌细胞、皮肤癌细胞、结肠癌细胞、直肠癌细胞、肺癌细胞、肾癌细胞、前列腺癌细胞或甲状腺癌细胞。细胞-靶向区段可结合靶向的细胞的表面上存在的分子,其使得纳米颗粒靶向至靶向的细胞。

[0117] 载体多肽的细胞-渗透区段促进纳米颗粒进入细胞-靶向区段靶向的细胞。在一些实施方式中,细胞-渗透区段包括(并且,在一些实施方式中,是)五邻体基底(“PB”)蛋白质或其变体。作为例子,在一些实施方式中,细胞-渗透区段包括(并且,在一些实施方式中,是)腺病毒血清型5(Ad5)五邻体基底蛋白。在一些实施方式中,细胞-靶向区段包括(并且,在一些实施方式中,是)具有氨基酸变化或缺失的五邻体基底蛋白。氨基酸变化可为保守突变。在一些实施方式中,细胞-靶向区段是截短的五邻体基底蛋白。

[0118] 细胞-渗透区段可包括增强载体多肽的亚细胞定位的一个或多个变体。例如,在一些实施方式中,细胞-渗透区段包括使得载体多肽优先定位在细胞质或细胞核中的一个或多个变体。在其中载体多肽结合功能RNA分子(其本身与小分子药物复合)的实施方式中,变体细胞-渗透区段优先将功能RNA分子和小分子药物定位至细胞质或细胞核。优先的亚细胞定位可对于某些小分子药物特别有益。例如,许多化疗剂通过结合定位在癌细胞核中的DNA而发挥作用。通过优先靶向细胞核,相关的药物在其发挥作用的地方浓缩。其他小分子药物可在细胞质中发挥作用,并且优先靶向至细胞质可增强药物效力。

[0119] WO 2014/022811中讨论了增强亚细胞定位的示例性细胞-渗透区段突变。已经显示,五邻体基底蛋白中的Leu60Trp突变优先定位至细胞的细胞质。因此,在一些实施方式中,细胞-渗透区段是包括Leu60Trp突变的五邻体基底蛋白。已经显示,Lys375Glu、Val449Met和Pro469Ser突变优先定位至细胞的细胞核。因此,在一些实施方式中,细胞-渗透区段是包括Lys375Glu、Val449Met或Pro469Ser突变的五邻体基底蛋白。在一些实施方式中,细胞-渗透区段是包括Lys375Glu、Val449Met和Pro469Ser突变的五邻体基底蛋白。氨基酸编号参考SEQ ID NO:1的野生型五邻体基底多肽。

[0120] 寡核苷酸-结合区段结合纳米颗粒的功能RNA分子组分。寡核苷酸-结合区段可结

合功能RNA分子,例如,通过静电键合、氢键或离子键。在一些实施方式中,寡核苷酸-结合区段是RNA结合结构域或双链RNA结合结构域。在一些实施方式中,寡核苷酸-结合区段是阳离子(即,带正电的)结构域。在一些实施方式中,寡核苷酸结合结构域包括是聚赖氨酸序列。在一些实施方式中,寡核苷酸-结合区段的长度在约3个氨基酸和约30个氨基酸之间,比如长度在约3个氨基酸和约10个氨基酸之间,约5个氨基酸和约15个氨基酸之间,约10个氨基酸和约20个氨基酸之间,约15个氨基酸和约25个氨基酸之间,或约20个氨基酸和约30个氨基酸之间。在一个示例性实施方式中,寡核苷酸-结合区段包括(并且,在一些实施方式中,是)十赖氨酸(即,十个连续的赖氨酸氨基酸,或“K10”,如SEQ ID NO:4中显示)。

[0121] 示例性载体多肽包括Her(或其变体)、五邻体基底(或其变体)和带正电的寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中,载体多肽包括Her、五邻体基底区段和聚赖氨酸寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中,载体多肽包括Her、五邻体基底区段和十赖氨酸寡核苷酸-结合区段,例如HerPBK10 (SEQ ID NO:3)。其他示例性实施方式包括In1B、五邻体基底(或其变体)和带正电的寡核苷酸-结合区段,比如In1BPBK10。

[0122] 在一些实施方式中,纳米颗粒的直径为约50nm或更小(比如约45nm、40nm、35nm或30nm或更小,如通过动态光散射测量。在一些实施方式中,纳米颗粒的直径为约25-50nm、25-30nm、30-35nm、35-40nm或45-50nm,如通过动态光散射测量。

[0123] 在一个方面中,提供了包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物复合的功能RNA分子,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中,功能RNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中,纳米颗粒组合物中功能RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:1至约1:60。在一些实施方式中,组合物中载体多肽与功能RNA分子的摩尔比是约3:1至约8:1(比如约4:1)。在一些实施方式中,细胞-靶向区段结合哺乳动物细胞,其可为患病的细胞(比如癌细胞)。在一些实施方式中,细胞-靶向区段结合细胞表面上的靶分子,其可为受体(比如HER3或c-MET)。在一些实施方式中,细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。在一些实施方式中,寡核苷酸-结合区段是带正电的,比如聚赖氨酸。在一些实施方式中,载体多肽是HerPBK10。在一些实施方式中,组合物中纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小,或约50nm或更小)。

[0124] 在另一方面中,提供了包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和嵌入功能RNA分子中的小分子药物,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中,功能RNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中,纳米颗粒组合物中功能RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:1至约1:60。在一些实施方式中,组合物中载体多肽与功能RNA分子的摩尔比是约3:1至约8:1(比如约4:1)。在一些实施方式中,细胞-靶向区段结合哺乳动物细胞,其可为患病的细胞(比如癌细胞)。在一些实施方式中,细胞-靶向区段结合细胞表面上的靶分子,其可为受体(比如HER3或c-MET)。在一些实施方式中,细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。在一些实施方式中,寡核苷酸-结合区段是带正电的,比如聚赖氨酸。在一些实施方式中,载体多肽是HerPBK10。在一些实施方式中,组合物中纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小,或约50nm或更小)。

[0125] 在另一方面中,提供了包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和嵌

入双链siRNA分子中的小分子药物,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中,siRNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中,纳米颗粒组合物中siRNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:1至约1:60。在一些实施方式中,组合物中载体多肽与siRNA分子的摩尔比是约3:1至约8:1(比如约4:1)。在一些实施方式中,细胞-靶向区段结合哺乳动物细胞,其可为患病的细胞(比如癌细胞)。在一些实施方式中,细胞-靶向区段结合细胞表面上的靶分子,其可为受体(比如HER3或c-MET)。在一些实施方式中,细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。在一些实施方式中,寡核苷酸-结合区段是带正电的,比如聚赖氨酸。在一些实施方式中,载体多肽是HerPBK10。在一些实施方式中,组合物中纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小,或约50nm或更小)。

[0126] 在另一方面中,提供了包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和嵌入双链siRNA分子中的小分子药物,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段,和其中siRNA包括至少一个5'-三磷酸端。在一些实施方式中,siRNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中,纳米颗粒组合物中siRNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:1至约1:60。在一些实施方式中,组合物中载体多肽与siRNA分子的摩尔比是约3:1至约8:1(比如约4:1)。在一些实施方式中,细胞-靶向区段结合哺乳动物细胞,其可为患病的细胞(比如癌细胞)。在一些实施方式中,细胞-靶向区段结合细胞表面上的靶分子,其可为受体(比如HER3或c-MET)。在一些实施方式中,细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。在一些实施方式中,寡核苷酸-结合区段是带正电的,比如聚赖氨酸。在一些实施方式中,载体多肽是HerPBK10。在一些实施方式中,组合物中纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小,或约50nm或更小)。

[0127] 在另一方面中,提供了包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和嵌入双链siRNA分子中的小分子化疗剂,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段,并且其中siRNA包括至少一个5'-三磷酸端。在一些实施方式中,siRNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中,纳米颗粒组合物中siRNA分子与化疗剂的摩尔比是约1:1至约1:60。在一些实施方式中,组合物中载体多肽与siRNA分子的摩尔比是约3:1至约8:1(比如约4:1)。在一些实施方式中,细胞-靶向区段结合哺乳动物细胞,其可为患病的细胞(比如癌细胞)。在一些实施方式中,细胞-靶向区段结合细胞表面上的靶分子,其可为受体(比如HER3或c-MET)。在一些实施方式中,细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。在一些实施方式中,寡核苷酸-结合区段是带正电的,比如聚赖氨酸。在一些实施方式中,载体多肽是HerPBK10。在一些实施方式中,组合物中纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小,或约50nm或更小)。在一些实施方式中,化疗剂是蒽环类抗生素(比如多柔比星)或烷基化试剂或烷基化样试剂。

[0128] 在另一方面中,提供了包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和嵌入双链siRNA分子中的小分子化疗剂,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段,其中siRNA包括至少一个5'-三磷酸端,和其中细胞-靶向区段靶向HER3+癌细胞。在一些实施方式中,siRNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中,纳米颗粒组合物中siRNA分子与化疗剂的摩尔比是约1:1至约1:60。在一些实施方式中,组合物中载体多肽与siRNA分子的摩尔比是约3:1至约8:1(比如约4:1)。在

一些实施方式中,细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。在一些实施方式中,寡核苷酸-结合区段是带正电的,比如聚赖氨酸。在一些实施方式中,载体多肽是HerPBK10。在一些实施方式中,组合物中纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小,或约50nm或更小)。在一些实施方式中,化疗剂是蒽环类抗生素(比如多柔比星)或烷基化试剂或烷基化样试剂。在一些实施方式中,细胞-靶向区段包括调蛋白序列或其变体。

[0129] 在另一方面中,提供了包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和嵌入双链siRNA分子中的小分子化疗剂,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段,其中siRNA包括至少一个5' -三磷酸端,并且其中细胞-靶向区段靶向c-MET<sup>+</sup>癌细胞。在一些实施方式中,siRNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中,纳米颗粒组合物中siRNA分子与化疗剂的摩尔比是约1:1至约1:60。在一些实施方式中,组合物中载体多肽与siRNA分子的摩尔比是约3:1至约8:1(比如约4:1)。在一些实施方式中,细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。在一些实施方式中,寡核苷酸-结合区段是带正电的,比如聚赖氨酸。在一些实施方式中,载体多肽是HerPBK10。在一些实施方式中,组合物中纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小,或约50nm或更小)。在一些实施方式中,化疗剂是蒽环类抗生素(比如多柔比星)或烷基化试剂或烷基化样试剂。在一些实施方式中,细胞-靶向区段包括内化素B序列或其变体。

[0130] 在另一方面中,提供了包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括HerPBK10和嵌入双链siRNA分子中的小分子化疗剂,其中siRNA包括至少一个5' -三磷酸端。在一些实施方式中,siRNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中,纳米颗粒组合物中siRNA分子与化疗剂的摩尔比是约1:1至约1:60。在一些实施方式中,组合物中载体多肽与siRNA分子的摩尔比是约3:1至约8:1(比如约4:1)。在一些实施方式中,组合物中纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小,或约50nm或更小)。在一些实施方式中,化疗剂是蒽环类抗生素(比如多柔比星)或烷基化试剂或烷基化样试剂。

[0131] 纳米颗粒的生产

[0132] 可通过将多个载体多肽与功能RNA分子和小分子药物组合而生产本文所述的纳米颗粒。在一些实施方式中,载体多肽、功能RNA分子和小分子药物在一起培育而形成纳米颗粒。在一些实施方式中,在与载体多肽组合之前,功能RNA分子与小分子药物预培育。当载体多肽和功能RNA分子组合后,自发组装纳米颗粒。

[0133] 在一些实施方式中,单链互补的(或部分互补的或自互补的)RNA分子退火而形成用于形成纳米颗粒的功能RNA分子。可例如通过将RNA分子组合、加热RNA分子(例如,加热至约80℃或更高)和冷却混合物(例如,在约室温)而进行寡核苷酸的退火。

[0134] 通过将小分子药物和功能RNA分子组合,小分子药物结合功能RNA分子。在一些实施方式中,小分子药物和功能RNA分子以下述摩尔比组合:约60:1、50:1、40:1、30:1、20:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:1或更小。在一些实施方式中,小分子药物和功能RNA分子以下述摩尔比组合:约1:1和约60:1之间,比如约1:1-10:1、5:1-20:1、10:1-30:1、20:1-40:1、30:1-50:1或40:1-60:1。在一些实施方式中,小分子药物和功能RNA分子以下述摩尔比组合:约1:1、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:55或1:60。小分子药物可在退火过程之前、期间或之后与RNA分子混合。一旦小分子药物和功能RNA分子组合,则小分子药物结合功能RNA分子,例如通过嵌入功能RNA分子中或通过静电相互作用。

[0135] 功能RNA分子和小分子药物(它们可预先复合在一起)与载体多肽组合而形成纳米颗粒。在一些实施方式中,载体肽和功能RNA分子以下述摩尔比组合:约8:1或更小(例如,约3:1-8:1、3:1-3.5:1、3.5:1-4:1、4:1-4.5:1、4.5:1-5:1、5:1-5.5:1、5.5:1-6:1、6:1-6.5:1、6.5:1-7:1、7:1-7.5:1或7.5:1-8:1)。在一些实施方式中,载体肽和功能RNA分子以下述摩尔比组合:约4:1、4.5:1、5:1、5.5:1、6:1、6.5:1、7:1、7.5:1或8:1)。在一些实施方式中,载体多肽和功能RNA分子在约4°C至约22°C,比如约4-15°C、或4-10°C培育。在一些实施方式中,载体多肽和功能RNA分子培育小于约30分钟,约30分钟或更多,约1小时或更多,或约2小时或更多。在载体多肽与功能RNA分子组合之后,自发形成纳米颗粒。

[0136] 在一些实施方式中,从包括纳米颗粒的组合物去除过多的寡核苷酸、小分子药物或载体多肽。例如,在一些实施方式中,纳米颗粒组合物进行纯化步骤,比如尺寸排阻色谱。在一些实施方式中,通过超速离心,使未结合的组分与纳米颗粒分开。例如,在一些实施方式中,将组合物添加至截留分子量为约100kD、80kD、70kD、60kD、50kD、40kD、30kD、20kD、10kD或5kD或更小的离心过滤器。

[0137] 任选地,所得的纳米颗粒组合物进行缓冲液交换,例如通过透析、超速离心或切向流过滤。在一些实施方式中,通过例如超速离心将纳米颗粒浓缩。

[0138] 纳米颗粒组合物可进行进一步的加工步骤。例如在一些实施方式中,通过例如无菌过滤,将纳米颗粒组合物灭菌。在一些实施方式中,将纳米颗粒组合物分散在小瓶中(其可然后被密封)。在一些实施方式中,纳米颗粒组合物被冷冻干燥,从而形成干燥的纳米颗粒组合物。在一些实施方式中,将纳米颗粒组合物配制形成药物组合物,例如通过添加一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0139] 在一个方面中,提供了制造纳米颗粒组合物的方法,所述方法包括将载体多肽、功能RNA分子和小分子药物组合,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中,小分子药物嵌入RNA分子中。在一些实施方式中,纳米颗粒组合物被无菌过滤或冷冻干燥。在一些实施方式中,功能RNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中,以约1:1至约1:60的摩尔比提供功能RNA分子和小分子药物。在一些实施方式中,以约3:1至约8:1(比如约4:1)的摩尔比提供载体多肽和功能RNA分子。在一些实施方式中,细胞-靶向区段配置为结合哺乳动物细胞,其可为患病的细胞(比如癌细胞)。在一些实施方式中,细胞-靶向区段配置为结合细胞表面上的靶分子,其可为受体(比如HER3或c-MET)。在一些实施方式中,细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。在一些实施方式中,寡核苷酸-结合区段是带正电的,比如聚赖氨酸。在一些实施方式中,载体多肽是HerPBK10。在一些实施方式中,所得纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小,或约50nm或更小)。

[0140] 在另一方面中,提供了制造纳米颗粒组合物的方法,所述方法包括将功能RNA分子与小分子药物组合,以将药物与RNA分子复合;和将载体多肽和与小分子药物复合的RNA分子组合,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中,小分子药物嵌入RNA分子中。在一些实施方式中,纳米颗粒组合物被无菌过滤或冷冻干燥。在一些实施方式中,功能RNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中,以约1:1至约1:60的摩尔比提供功能RNA分子和小分子药物。在一些实施方式中,以约3:1至约8:1(比如约4:1)的摩尔比提供载体多肽和功能RNA分子。在一些实

施方式中,细胞-靶向区段配置为结合哺乳动物细胞,其可为患病的细胞(比如癌细胞)。在一些实施方式中,细胞-靶向区段配置为结合细胞表面上的靶分子,其可为受体(比如HER3或c-MET)。在一些实施方式中,细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。在一些实施方式中,寡核苷酸-结合区段是带正电的,比如聚赖氨酸。在一些实施方式中,载体多肽是HerPBK10。在一些实施方式中,所得纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小,或约50nm或更小)。

[0141] 在另一方面中,提供了制造纳米颗粒组合物的方法,所述方法包括将双链siRNA分子与小分子药物复合,以使药物与siRNA分子复合;和将载体多肽和与小分子药物复合的siRNA分子复合,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中,小分子药物嵌入siRNA分子中。在一些实施方式中,纳米颗粒组合物被无菌过滤或冷冻干燥。在一些实施方式中,siRNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中,以约1:1至约1:60的摩尔比提供siRNA分子和小分子药物。在一些实施方式中,以约3:1至约8:1(比如约4:1)的摩尔比提供载体多肽和siRNA分子。在一些实施方式中,细胞-靶向区段配置为结合哺乳动物细胞,其可为患病的细胞(比如癌细胞)。在一些实施方式中,细胞-靶向区段配置为结合细胞表面上的靶分子,其可为受体(比如HER3或c-MET)。在一些实施方式中,细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。在一些实施方式中,寡核苷酸-结合区段是带正电的,比如聚赖氨酸。在一些实施方式中,载体多肽是HerPBK10。在一些实施方式中,所得纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小,或约50nm或更小)。

[0142] 在另一方面中,提供了制造纳米颗粒组合物的方法,所述方法包括将双链siRNA分子与小分子化疗剂组合,以将化疗剂与siRNA分子复合;和将载体多肽和与小分子化疗剂复合的siRNA分子组合,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中,化疗剂嵌入siRNA分子中。在一些实施方式中,纳米颗粒组合物被无菌过滤或冷冻干燥。在一些实施方式中,siRNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中,以约1:1至约1:60的摩尔比提供siRNA分子和小分子化疗剂。在一些实施方式中,以约3:1至约8:1(比如约4:1)的摩尔比提供载体多肽和siRNA分子。在一些实施方式中,细胞-靶向区段配置为结合哺乳动物细胞,其可为患病的细胞(比如癌细胞)。在一些实施方式中,细胞-靶向区段配置为结合细胞表面上的靶分子,其可为受体(比如HER3或c-MET)。在一些实施方式中,细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。在一些实施方式中,寡核苷酸-结合区段是带正电的,比如聚赖氨酸。在一些实施方式中,载体多肽是HerPBK10。在一些实施方式中,所得纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小,或约50nm或更小)。在一些实施方式中,化疗剂是蒽环类抗生素(比如多柔比星)或烷基化试剂或烷基化样试剂。

[0143] 在另一方面中,提供了制造纳米颗粒组合物的方法,所述方法包括将双链siRNA分子与小分子化疗剂组合,以使化疗剂与siRNA分子复合,其中siRNA分子包括至少一个5'-三磷酸端;和将载体多肽和与小分子化疗剂复合的siRNA分子组合,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中,化疗剂嵌入siRNA分子中。在一些实施方式中,纳米颗粒组合物被无菌过滤或冷冻干燥。在一些实施方式中,siRNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中,以约1:1至约1:60

的摩尔比提供siRNA分子和小分子化疗剂。在一些实施方式中,以约3:1至约8:1(比如约4:1)的摩尔比提供载体多肽和siRNA分子。在一些实施方式中,细胞-靶向区段配置为结合哺乳动物细胞,其可为患病的细胞(比如癌细胞)。在一些实施方式中,细胞-靶向区段配置为结合细胞表面上的靶分子,其可为受体(比如HER3或c-MET)。在一些实施方式中,细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。在一些实施方式中,寡核苷酸-结合区段是带正电的,比如聚赖氨酸。在一些实施方式中,载体多肽是HerPBK10。在一些实施方式中,所得纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小,或约50nm或更小)。在一些实施方式中,化疗剂是蒽环类抗生素(比如多柔比星)或烷基化试剂或烷基化样试剂。

[0144] 在另一方面中,提供了制造纳米颗粒组合物的方法,所述方法包括将双链siRNA分子与小分子化疗剂组合,以使化疗剂与siRNA分子复合;和将HerPBK10和与小分子化疗剂复合的siRNA分子组合。在一些实施方式中,化疗剂嵌入siRNA分子中。在一些实施方式中,纳米颗粒组合物被无菌过滤或冷冻干燥。在一些实施方式中,siRNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中,以约1:1至约1:60的摩尔比提供siRNA分子和小分子化疗剂。在一些实施方式中,以约3:1至约8:1(比如约4:1)的摩尔比提供载体多肽和siRNA分子。在一些实施方式中,所得纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小,或约50nm或更小)。在一些实施方式中,化疗剂是蒽环类抗生素(比如多柔比星)或烷基化试剂或烷基化样试剂。

#### [0145] 癌症治疗

[0146] 通过向受试者施用有效量的包括纳米颗粒的组合物从而杀伤癌细胞,本文所述的包括治疗性复合物的组合物或本文所述的纳米颗粒组合物可用于治疗受试者的癌症。载体多肽的细胞-靶向区段可靶向癌细胞的表面上的分子,从而将化疗剂(例如,功能RNA分子和小分子药物)递送至癌细胞。在一些实施方式中,癌症是转移癌。在一些实施方式中,治疗性复合物或纳米颗粒组合物用于制造用于治疗癌症的药物。

[0147] 在一些实施方式中,癌症是HER3+癌症。例如,Her细胞-靶向区段可结合HER3+癌细胞的表面上存在的HER3,以将纳米颗粒靶向至癌细胞。在一些实施方式中,癌症是c-MET+癌症。例如,In1B细胞-靶向区段可结合c-MET+癌细胞的表面上存在的c-MET,以将纳米颗粒靶向至癌细胞。

[0148] 在一些实施方式中,将有效量的包括纳米颗粒的组合物施用至受试者,以治疗头颈癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、神经胶质瘤、宫颈癌、胃癌、皮肤癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、肾癌、前列腺癌或甲状腺癌。许多癌症呈现特定细胞表面分子的上调表达。一个或多个这种上调的分子是载体蛋白的细胞-靶向区段的优选靶。

[0149] 在一些实施方式中,治疗患有癌症的受试者的方法进一步包括第二疗法,比如辐射疗法或外科手术。因此,在一些实施方式中,将本文所述的包括纳米颗粒的组合物作为新辅助疗法施用至患有癌症的受试者。

[0150] 在一些实施方式中,在施用本文所述的纳米颗粒之前,受试者还未经历化疗或辐射疗法。在一些实施方式中,受试者已经经历了化疗或辐射疗法。

[0151] 在一些实施方式中,向受试者施用本文所述的纳米颗粒组合物。在一些实施方式中,向受试者施用纳米颗粒组合物用于体内递送至靶向细胞。一般而言,根据标准药学实践,根据受试者的大小和状况确定纳米颗粒组合物施用的剂量和路径。在一些实施方式中,

通过任何路径向受试者施用纳米颗粒组合物,包括口服、透皮、吸入、静脉内、动脉内、肌内、直接施用至创伤位点、施用至外科位点、腹膜内、通过栓剂、皮下、皮内、经皮、通过雾化、胸膜内、心室内、关节内、眼内或脊柱内。在一些实施方式中,静脉内向受试者施用组合物。

[0152] 在一些实施方式中,纳米颗粒组合物的剂量是单个剂量或重复剂量。在一些实施方式中,向受试者给予剂量每天一次、每天两次、每天三次或每天四次或更多次。在一些实施方式中,一周内给予约1个或多个(比如约2、3、4、5、6或7或更多个)剂量。在一些实施方式中,施用组合物每周一次、每2周一次、每3周一次、每4周一次、3周中两周每周一次或4周中3周每周一次。在一些实施方式中,在数天、数周、数月或数年内给予多个剂量。在一些实施方式中,一个疗程是约1个或多个剂量(比如约2、2、3、4、5、7、10、15或20或更多个剂量)。

[0153] 在一些实施方式中,纳米颗粒组合物的施用剂量是约200mg/m<sup>2</sup>、150mg/m<sup>2</sup>、100mg/m<sup>2</sup>、80mg/m<sup>2</sup>、70mg/m<sup>2</sup>、60mg/m<sup>2</sup>、50mg/m<sup>2</sup>、40mg/m<sup>2</sup>、30mg/m<sup>2</sup>、20mg/m<sup>2</sup>、15mg/m<sup>2</sup>、10mg/m<sup>2</sup>、5mg/m<sup>2</sup>或mg/m<sup>2</sup>或更少的小分子药物。

[0154] 在一个方面中,提供了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物复合的功能RNA分子,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中,癌症是头颈癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、神经胶质癌、宫颈癌、胃癌、皮肤癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、肾癌或甲状腺癌。在一些实施方式中,功能RNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中,纳米颗粒组合物中功能RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:1至约1:60。在一些实施方式中,组合物中载体多肽与功能RNA分子的摩尔比是约3:1至约8:1(比如约4:1)。在一些实施方式中,细胞-靶向区段结合癌细胞。在一些实施方式中,细胞-靶向区段结合癌细胞的表面上的靶分子,其可为受体(比如HER3或c-MET)。在一些实施方式中,细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。在一些实施方式中,寡核苷酸-结合区段是带正电的,比如聚赖氨酸。在一些实施方式中,载体多肽是HerPBK10。在一些实施方式中,组合物中纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小,或约50nm或更小)。

[0155] 在一个方面中,提供了治疗受试者的HER3+癌症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物复合的功能RNA分子,其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中,癌症是头颈癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、神经胶质癌、宫颈癌、胃癌、皮肤癌、结肠癌或直肠癌。在一些实施方式中,功能RNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中,纳米颗粒组合物中功能RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:1至约1:60。在一些实施方式中,组合物中载体多肽与功能RNA分子的摩尔比是约3:1至约8:1(比如约4:1)。在一些实施方式中,细胞-靶向区段结合HER3+癌细胞。在一些实施方式中,细胞-靶向区段结合HER3。在一些实施方式中,细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。在一些实施方式中,寡核苷酸-结合区段是带正电的,比如聚赖氨酸。在一些实施方式中,载体多肽是HerPBK10。在一些实施方式中,组合物中纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小,或约50nm或更小)。

[0156] 在一个方面中,提供了治疗受试者的c-MET+癌症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物复合的

功能RNA分子，其中载体多肽包括细胞-靶向区段、细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。在一些实施方式中，癌症是头颈癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、肾癌或甲状腺癌。在一些实施方式中，功能RNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中，纳米颗粒组合物中功能RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:1至约1:60。在一些实施方式中，组合物中载体多肽与功能RNA分子的摩尔比是约3:1至约8:1(比如约4:1)。在一些实施方式中，细胞-靶向区段结合c-MET+癌细胞。在一些实施方式中，细胞-靶向区段结合c-MET。在一些实施方式中，细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。在一些实施方式中，寡核苷酸-结合区段是带正电的，比如聚赖氨酸。在一些实施方式中，组合物中纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小，或约50nm或更小)。

[0157] 在一个方面中，提供了治疗受试者的HER3+癌症的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的包括纳米颗粒的组合物，所述纳米颗粒包括HerPBK10和与小分子药物复合的功能RNA分子。在一些实施方式中，癌症是头颈癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、神经胶质癌、宫颈癌、胃癌、皮肤癌、结肠癌、前列腺癌、肾癌或直肠癌。在一些实施方式中，功能RNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。在一些实施方式中，纳米颗粒组合物中功能RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:1至约1:60。在一些实施方式中，组合物中载体多肽与功能RNA分子的摩尔比是约3:1至约8:1(比如约4:1)。在一些实施方式中，组合物中纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小(比如约60nm或更小，或约50nm或更小)。

#### [0158] 药物组合物

[0159] 在一些实施方式中，将本文所述的组合物配制为包括本文所述的多个纳米颗粒和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0160] 在一些实施方式中，药物组合物是固体，比如粉末。可例如通过冷冻干燥溶液中的纳米颗粒而形成粉末。可例如通过使粉末与含水液体(例如，水或缓冲液)混合而将粉末复溶。在一些实施方式中，药物组合物是液体，例如悬浮在水溶液(比如生理盐水或林格溶液(Ringer's solution))中的纳米颗粒。在一些实施方式中，药物组合物包括药学上可接受的赋形剂，例如填料、粘合剂、包衣、防腐剂、润滑剂、调味剂、甜味剂、着色剂、溶剂、缓冲剂、螯合剂或稳定剂。

[0161] 药学上可接受的填料的例子包括纤维素、磷酸氢钙、碳酸钙、微晶纤维素、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露醇、山梨糖醇、麦芽糖醇、预糊化淀粉、玉米淀粉或马铃薯淀粉。药学上可接受的粘合剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、淀粉、乳糖、木糖醇、山梨糖醇、麦芽糖醇、明胶、蔗糖、聚乙二醇、甲基纤维素或纤维素。药学上可接受的包衣的例子包括羟丙基甲基纤维素(HPMC)、紫胶、玉米蛋白质玉米素或明胶。药学上可接受的崩裂剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素或羧基乙酸淀粉钠。药学上可接受的润滑剂的例子包括聚乙二醇、硬脂酸镁或硬脂酸。药学上可接受的防腐剂的例子包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸或山梨酸。药学上可接受的甜味剂的例子包括蔗糖、糖精、阿巴斯甜糖或山梨糖醇。药学上可接受的缓冲剂的例子包括碳酸盐、柠檬酸盐、葡萄糖酸盐、乙酸盐、磷酸盐或酒石酸盐。

#### [0162] 制品和试剂盒

[0163] 也提供了适当的包装中包括本文所述的组合物的制品。用于本文所述的组合物的适当的包装是本领域已知的，并且包括，例如小瓶(vial)(比如密封小瓶)、容器、安瓿、瓶子

(bottle)、罐、柔性包装(例如,密封Mylar或塑料袋)等。这些制品可进一步被灭菌和/或密封。

[0164] 本发明也提供了包括本文所述的组合物(或制品)的试剂盒并且可进一步包括关于使用组合物的方法,比如本文所述的用途的说明书。本文所述的试剂盒可进一步包括从商业和使用者角度所期望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射器和具有进行本文所述的任何方法的说明书的包装插件。

[0165] 示例性实施方式

[0166] 实施方式1、一种组合物,其包括与小分子药物复合的功能RNA分子,其中功能RNA分子调节靶蛋白的表达。

[0167] 实施方式2、一种组合物,其包括包含小分子药物嵌入的至少一个互补区域的功能RNA分子。

[0168] 实施方式3、根据实施方式2的组合物,其中功能RNA分子调节靶蛋白的表达。

[0169] 实施方式4、根据实施方式1-3中任一项所述的组合物,其包括包含功能RNA分子和小分子药物的脂质体。

[0170] 实施方式5、根据实施方式4所述的组合物,其中脂质体包括细胞-靶向区段。

[0171] 实施方式6、一种包括纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包括载体多肽和与小分子药物复合的功能RNA分子,其中载体多肽包括细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。

[0172] 实施方式7、根据实施方式6所述的组合物,其中组合物中载体多肽与功能RNA分子的摩尔比是约3:1至约8:1。

[0173] 实施方式8、根据实施方式1-7中任一项所述的组合物,其中小分子药物嵌入功能RNA分子中,并且其中功能RNA分子包括至少一个互补区域。

[0174] 实施方式9、根据实施方式6-8中任一项所述的组合物,其中细胞-渗透区段包括五邻体基底多肽或其变体。

[0175] 实施方式10、根据实施方式6-9中任一项所述的组合物,其中寡核苷酸-结合区段是带正电的。

[0176] 实施方式11、根据实施方式6-10中任一项所述的组合物,其中寡核苷酸-结合区段包括聚赖氨酸。

[0177] 实施方式12、根据实施方式6-10中任一项所述的组合物,其中寡核苷酸-结合区段包括十赖氨酸。

[0178] 实施方式13、根据实施方式6-12中任一项所述的组合物,其中组合物中纳米颗粒的平均尺寸是约100nm或更小。

[0179] 实施方式14、根据实施方式6-13中任一项所述的组合物,其中载体多肽进一步包括细胞-靶向区段。

[0180] 实施方式15、根据实施方式5或14所述的组合物,其中细胞-靶向区段结合哺乳动物细胞。

[0181] 实施方式16、根据实施方式5、14或15中任一项所述的组合物,其中细胞-靶向区段结合患病的细胞。

[0182] 实施方式17、根据实施方式5和14-16中任一项所述的组合物,其中细胞-靶向区段结合癌细胞。

[0183] 实施方式18、根据实施方式17所述的组合物,其中癌细胞是HER3+癌细胞或c-MET+癌细胞。

[0184] 实施方式19、根据实施方式17或18所述的组合物,其中癌细胞是头颈癌细胞、胰腺癌细胞、乳腺癌细胞、神经胶质癌细胞、卵巢癌细胞、宫颈癌细胞、胃癌细胞、皮肤癌细胞、结肠癌细胞、直肠癌细胞、肺癌细胞、肾癌细胞、前列腺癌细胞或甲状腺癌细胞。

[0185] 实施方式20、根据实施方式5和14-19中任一项所述的组合物,其中细胞-靶向区段结合细胞表面上的靶分子。

[0186] 实施方式21、根据实施方式5和14-20中任一项所述的组合物,其中细胞-靶向区段结合细胞表面上的受体。

[0187] 实施方式22、根据实施方式5和14-21中任一项所述的组合物,其中细胞-靶向区段结合HER3或c-MET。

[0188] 实施方式23、根据实施方式5和14-22中任一项所述的组合物,其中细胞-靶向区段包括特异性结合细胞表面上表达的受体的配体。

[0189] 实施方式24、根据实施方式5和14-23中任一项所述的组合物,其中细胞-靶向区段包括:

[0190] i. 调蛋白序列或其变体;或

[0191] ii. 内化素B序列或其变体。

[0192] 实施方式25、根据实施方式5和14-24中任一项所述的组合物,其中细胞-靶向区段包括调蛋白- $\alpha$ 的受体结合结构域。

[0193] 实施方式26、根据实施方式1-25中任一项所述的组合物,其中功能RNA分子的至少一部分是双链的。

[0194] 实施方式27、根据实施方式1-25中任一项所述的组合物,其中功能RNA分子是单链的并且包括至少一个自我互补区域。

[0195] 实施方式28、根据实施方式1-27中任一项所述的组合物,其中功能RNA分子是siRNA、shRNA、miRNA、环RNA(circRNA)、rRNA、Piwi-相互作用RNA(piRNA)、毒性小RNA(tsRNA)或核酶。

[0196] 实施方式29、根据实施方式1-28中任一项所述的组合物,其中功能RNA分子是siRNA分子或shRNA分子。

[0197] 实施方式30、根据实施方式1-29中任一项所述的组合物,其中功能RNA分子具有至少一个三磷酸5'端。

[0198] 实施方式31、根据实施方式1-30中任一项所述的组合物,其中功能RNA分子的长度是约10个核苷酸至约100个核苷酸。

[0199] 实施方式32、根据实施方式1-31中任一项所述的组合物,其中组合物中功能RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:1至约1:60。

[0200] 实施方式33、根据实施方式1-32中任一项所述的组合物,其中组合物中功能RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:5至约1:60。

[0201] 实施方式34、根据实施方式1-33中任一项所述的组合物,其中组合物中功能RNA分子与小分子药物的摩尔比是约1:10至约1:60。

[0202] 实施方式35、根据实施方式1-34中任一项所述的组合物,其中小分子药物是化疗

剂。

[0203] 实施方式36、根据实施方式1-35中任一项所述的组合物,其中小分子药物是蒽环类抗生素。

[0204] 实施方式37、根据实施方式1-36中任一项所述的组合物,其中小分子药物是多柔比星。

[0205] 实施方式38、根据实施方式1-36中任一项所述的组合物,其中小分子药物是烷基化试剂或烷基化样试剂。

[0206] 实施方式39、根据实施方式1-36和38中任一项所述的组合物,其中小分子药物具有卡铂、卡莫司汀、顺铂、环磷酰胺、左旋溶肉瘤素、甲基苄肼或噻替派。

[0207] 实施方式40、根据实施方式1-39中任一项所述的组合物,其中组合物是无菌的。

[0208] 实施方式41、根据实施方式1-40中任一项所述的组合物,其中组合物是液体组合物。

[0209] 实施方式42、根据实施方式1-41中任一项所述的组合物,其中组合物是干燥组合物。

[0210] 实施方式43、根据实施方式42所述的组合物,其中组合物是冷冻干燥的。

[0211] 实施方式44、一种药物组合物,其包括根据实施方式1-43中任一项所述的组合物,进一步包括药学上可接受的赋形剂。

[0212] 实施方式45、一种制品,其包括在小瓶中的根据实施方式1-44中任一项所述的组合物。

[0213] 实施方式46、根据实施方式45所述的制品,其中小瓶是密封的。

[0214] 实施方式47、一种试剂盒,其包括根据实施方式1-44中任一项所述的组合物和使用说明书。

[0215] 实施方式48、一种治疗受试者中癌症的方法,包括向受试者施用有效量的根据实施方式1-44中任一项所述的组合物。

[0216] 实施方式49、根据实施方式48所述的方法,其中癌症是HER3+癌症或c-MET+癌症。

[0217] 实施方式50、根据实施方式48或49所述的方法,其中癌症是头颈癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、神经胶质癌、宫颈癌、胃癌、皮肤癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、肾癌、前列腺癌或甲状腺癌。

[0218] 实施方式51、一种制造组合物的方法,包括将小分子药物与功能RNA分子组合,其中小分子药物嵌入功能RNA分子中。

[0219] 实施方式52、一种制造纳米颗粒组合物的方法,包括将载体多肽、功能RNA分子和小分子药物组合,其中载体多肽包括细胞-渗透区段和寡核苷酸-结合区段。

[0220] 实施方式53、根据实施方式52所述的方法,其包括:

[0221] 将功能RNA分子与小分子药物组合,以将小分子药物与功能RNA分子复合;和

[0222] 将载体多肽和与小分子药物复合的功能RNA分子组合。

[0223] 实施方式54、根据实施方式52或53所述的方法,其中小分子药物嵌入功能RNA分子中。

[0224] 实施方式55、根据实施方式51-54中任一项所述的方法,包括去除未结合的小分子药物。

[0225] 实施方式56、根据实施方式51-55中任一项所述的方法,进一步包括无菌过滤纳米颗粒组合物。

[0226] 实施方式57、根据实施方式51-56中任一项所述的方法,进一步包括冷冻干燥纳米颗粒组合物。

[0227] 实施方式58、一种同时调节靶蛋白的表达和抑制细胞的生长的方法,包括向细胞施用有效量的根据实施方式1-44中任一项所述的组合物。

[0228] 实施方式59、一种杀伤细胞的方法,包括向细胞施用有效量的根据实施方式1-44中任一项所述的组合物。

[0229] 实施方式60、一种同时刺激免疫应答和杀伤细胞的方法,包括向细胞施用有效量的根据实施方式1-44中任一项所述的组合物,其中功能RNA分子调节免疫检查点蛋白的表达。

[0230] 实施例

[0231] 仅仅为了示意性目的并且不旨在限制本发明的范围包括本文提供的实施例。

[0232] 实施例1:纳米颗粒组装

[0233] 可使用下述方法组装包括载体多肽、功能RNA分子和小分子药物(比如多柔比星)的纳米颗粒。

[0234] 单链siRNA和其互补RNA分子可通过在沸水中培育等摩尔比的各寡核苷酸5分钟而退火。然后,可将寡核苷酸在室温冷却30分钟。

[0235] 双链、退火的siRNA分子可然后与多柔比星HC1以1:40RNA:Dox的摩尔比在室温培育30分钟。

[0236] 结合多柔比星的siRNA分子可然后与载体多肽(比如HerPBK10)(其包括Her细胞-靶向区段、PB细胞-渗透区段和十赖氨酸(“K10”)寡核苷酸结合区段)以4:1HerPBK10:siRNA-多柔比星的摩尔比(因此HerPBK10:siRNA:多柔比星的摩尔比4:1:40)在HEPES缓冲生理盐水(HBS)中培育。载体多肽和结合多柔比星的siRNA的混合物可在冰上振荡2小时,从而形成纳米颗粒。

[0237] 所得纳米颗粒可进行超速离心。具体而言,可将12mL的无菌HBS添加至可已经在无菌10%甘油中预培育24小时的50kD截留离心过滤器(Amicon Ultra-15)中。可将纳米颗粒混合物添加至离心过滤器内的冷HBS中。过滤器管可在Beckman J6-HC离心机中以2500RPM(5000xg)旋转10-20分钟,直到终体积在200μL和500μL之间。然后,可将浓缩的纳米颗粒转移至1.7mL微量离心管。

[0238] 可通过培育HerPBK10与未与小分子药物复合的siRNA而制备没有纳米颗粒药物的纳米颗粒(参见,例如美国专利申请No.2012/0004181)。可通过例如培育HerPBK10与复合至小分子药物的双链DNA形成其他比较纳米颗粒(参见,例如美国专利No.9,078,927)。

[0239] 实施例2:纳米颗粒杀伤癌细胞和化疗药物抗性细胞的用途

[0240] 可比较具有结合多柔比星的siRNA的纳米颗粒、具有siRNA而没有多柔比星的纳米颗粒、或具有结合多柔比星的dsDNA的纳米颗粒的杀伤各种类型的癌细胞的能力。

[0241] 可将各种剂量的纳米颗粒与MDA-MB-435(人癌症)细胞、BT474(人乳腺癌)细胞、U251(人神经胶质瘤)细胞、SKOV3(人卵巢癌)细胞、LNCaP-GFP(人前列腺癌)细胞或RANKL(人骨转移前列腺癌细胞)培育。

[0242] 可使用细胞活力试验测量暴露于描述的组合物之后的相对细胞存活。可将细胞平铺在黑壁、透明底部的96孔板中。48小时后,可吸出培养基并且用完全培养基和指示浓度的纳米颗粒,以40 $\mu$ L的总体积替换。可将平板在37°C和5%CO<sub>2</sub>振荡4小时,并且然后可将60 $\mu$ L的完全培养基添加至每个孔,以使得总体积达到100 $\mu$ L,并且在不振荡的情况下,在37°C和5%CO<sub>2</sub>继续培育44小时。在培育结束时,可经MTS试验(Promega)根据制造商的指导确定相对细胞活力。具体地,可从孔中去除培养基并且可将100 $\mu$ L的现配的完全培养基添加至每个孔。可将20 $\mu$ L制备的MTS试剂添加至每个孔。然后,可在振荡的情况下,在37°C和5%CO<sub>2</sub>培育平板,并且在1、2和3小时,在分光光度计上在490nm获取平板的读数。可根据下述比例显示结果:在处理组中存活的细胞的数量除以在未处理的组中存活的细胞的数量。因此,1.0的细胞存活指示处理的细胞和未处理的细胞以相同程度存活,而0.2的比例意思是与未处理的细胞组相比,仅仅20%处理的细胞存活。

[0243] 实施例3:用嵌入双链siRNA中的多柔比星组装治疗性复合物

[0244] 通过将多柔比星与双链siRNA(“siRNA1”,长度为21个碱基;和“siRNA2”,长度为21个碱基)组合而形成两种不同的治疗性复合物。对于第一治疗性复合物,10 $\mu$ L的多柔比星-HC1(Sigma-Aldrich;10mM原液)和5.2 $\mu$ L的siRNA1(0.48mM原液)与465 $\mu$ L的HEPES缓冲生理盐水(HBS)组合。对于第二治疗性复合物,10 $\mu$ L的多柔比星(10mM原液)和25 $\mu$ L的siRNA1(0.1mM原液)与484.8 $\mu$ L的HBS组合。在使用10K MWCO过滤器离心以去除未结合的多柔比星之前,将各个治疗性复合物样品在室温在振荡的同时培育30分钟。作为对照,将10 $\mu$ L的多柔比星(10mM原液)添加至490 $\mu$ L的HBS中,但是不穿过过滤器。在1%琼脂糖凝胶上分析过滤之前治疗性复合物的样品(10 $\mu$ L)、截留物和滤液,如图2中显示。泳道和相应的样品显示在表1中:

[0245] 表1:对于图2的泳道样品

泳道	样品
1	梯度
2	Dox:siRNA2 过滤前
3	Dox:siRNA1 过滤前
4	空的
5	Dox:siRNA2 截留物
6	Dox:siRNA1 截留物
7	Dox:siRNA2 滤液
8	Dox:siRNA1 滤液

[0246] [0247] 如图2中显示,在泳道2、3、5和6中检测到了siRNA,但是在泳道7和8中未检测到。这指示两种复合物(Dox:siRNA1和Dox:siRNA2)的siRNA保留在截留物中,并且未穿过过滤器进入滤液。

[0248] 也测量了各个样品的截留物(100 $\mu$ L)和滤液(100 $\mu$ L)自400nm至700nm的吸光度。这些结果显示在图3中(实心圆圈指示截留物并且空心圆圈指示滤液)。对于Dox:siRNA1复合物和Dox:siRNA2复合物二者,截留物在约480nm处具有约0.21的最大吸光度,多柔比星的吸光度最大值。相反,Dox:siRNA1和Dox:siRNA2复合物的滤液在约490nm处没有明显的峰。这指示样品中的多柔比星保留在截留物中,并且因此与siRNA复合。

[0249] 实施例4:使用治疗性复合物的基因沉默和降低的细胞活力

[0250] 通过将100nmol的多柔比星与2.5nmol的RNA或DNA组合而形成复合物,其包括与多柔比星复合的杂乱的非功能双链RNA分子(“siScrm1”,长度为21个碱基)、功能双链siRNA(“siRNA1”,长度为21个碱基;或“siRNA2”,长度为21个碱基)或双链DNA(“DNA oligo”,长度为30个碱基)。对于第一复合物,将10 $\mu$ L的多柔比星-HC1(Sigma-Aldrich;10mM原液)和25 $\mu$ L的siScrm1(0.2mM原液)与365 $\mu$ L HBS组合。对于第二复合物,将10 $\mu$ L的多柔比星(20mM原液)和5.2 $\mu$ L的siRNA1(0.48mM原液)与384.8 $\mu$ L的HBS组合。对于第三复合物,将10 $\mu$ L的多柔比星(20mM原液)和25 $\mu$ L的siRNA2(0.1mM原液)与365 $\mu$ L的HBS组合。对于第四复合物,将10 $\mu$ L的多柔比星(20mM原液)和2.5 $\mu$ L的DNA oligo(1mM原液)与387.5 $\mu$ L的HBS组合。在使用10K MWCO过滤器离心以去除未结合的多柔比星之前,将每个样品在振荡的同时在室温培育30分钟。也测量每个样品的截留物(100 $\mu$ L)和滤液(100 $\mu$ L)的自400nm至700nm的吸光度。这些结果显示在图4中(实心符号指示截留物并且空心符号指示滤液)。每个截留物样品在约480nm处具有吸收峰(Dox:siScrm1最大吸光度~0.9;Dox:siRNA1最大吸光度~0.7;Dox:siRNA2最大吸光度~1.4;Dox:DNA oligo最大吸光度~1.1)。每个样品的滤液没有明显的峰,指示缺乏显著量的多柔比星。将截留物中检测到的多柔比星与DNA或RNA复合。计算多柔比星和DNA或RNA的产率,如表2中显示。使用多柔比星标准曲线,基于在480nm处的吸光度确定多柔比星的产率。在将样品加热至85°C之后,基于在260nm处的吸光度确定核酸(RNA或DNA)的产率。

[0251] 表2:复合物中多柔比星和DNA/RNA的产率

[0252]

	Dox 产率	核酸产率	Dox/核酸比
Dox:DNA oligo	70 nmol	3 nmol	23.3
Dox:siScrm1	50 nmol	3 nmol	16.7
Dos:siRNA1	40 nmol	3 nmol	16.0
Dox:siRNA2	90 nmol	2 nmol	45

[0253] 为了测量复合物对细胞活力的作用,将形成的复合物转染至JIMT1细胞(抗曲妥珠单抗的人乳腺癌)中。将每孔约10,000个细胞在96孔板中铺开,在37°C且5%CO<sub>2</sub>,保持在具有10%胎牛血清、100U/mL青霉素、100 $\mu$ g/mL链霉素的RPMI 1640培养基中。24小时之后,用Opti-MEM I减血清培养基(Invitrogen Life Technologies)替换培养基。RNAiMax lipofectamine(Invitrogen Life Technologies)用作用于siRNA、Dox:siRN复合物和Dox:DNA oligo复合物递送的载体。向没有lipofectamine的对照样品施用多柔比星。转染之后三小时,每个样品中的培养基用完全培养基替换。在24小时、48小时或72小时之后,使用Celltiter Glo Luminescent细胞活力试剂盒(Promega),根据制造商的说明,通过量化ATP确定相对细胞活力。实验平行进行三次。结果显示在图5A(24小时)、5B(48小时)和5C(72小时)中。

[0254] 单独RNA(siScrm1、siRNA1或siRNA2)对于细胞活力几乎没有作用。72小时之后,细胞活力有少许下降,但是这不是剂量依赖性的而归因于该实验过程期间的自然细胞死亡。与多柔比星复合的双链RNA,或单独多柔比星在24小时、48小时和72小时之后,显示细胞活力的剂量依赖性下降。令人吃惊地,包含siRNA和多柔比星的治疗性复合物与单独多柔比星相比,导致显著的细胞活力下降(尤其在48小时和72小时时间点可见)。考虑到向细胞施用

的Dox:siRNA2复合物的多柔比星剂量显著小于单独多柔比星的剂量(0.05/0.2/0.9nmol相比0.3/0.9/3.0nmol),这更令人吃惊。此外,Dox:siRNA复合物使得细胞活力下降至少与Dox:DNA oligo复合物一样,即使施用更低剂量的多柔比星。

[0255] 为了确保转染之后,与多柔比星复合的siRNA保持功能,使用qPCR量化siRNA分子的RNA靶。在转染之后24小时,使用TriZol试剂(Invitrogen Life Technologies)从转染的JIMT1细胞提取总RNA。对1 $\mu$ g的总RNA,使用iScript<sup>TM</sup>cDNA合成试剂盒(Bio-Rad)根据制造商的指导,进行逆转录。特定引物组(Bio-Rad)和SYBR Green用于扩增。如下在Bio-Rad CFX Connect<sup>TM</sup>工具(Bio-Rad)上进行qPCR反应:95°C持续30秒;然后95°C持续10秒和60°C持续30秒,40个循环。通过解链曲线分析来验证反应的特异性。使用 $\Delta\Delta Ct$ 方法,将样品归一化至HPRT1。结果显示在图6A(siRNA1)和6B(siRNA2)中。

[0256] 如预期的,siScrm1和siRNA2不降低siRNA1靶mRNA水平,而siRNA1降低mRNA水平。此外,dox:siScrm1、dox:siRNA2和dox:DNA oligo复合物不影响siRNA1靶的mRNA水平。相反,dox:siRNA1复合物不造成siRNA1靶mRNA水平的显著下降,这指示即使siRNA分子与多柔比星复合,复合物中的siRNA1保持了功能。图6B对于siRNA2靶mRNA显示了类似结果,其中仅仅单独siRNA2分子和dox:siRNA2复合物导致了siRNA2靶mRNA更完全的沉默。

[0257] 这些组合的结果指示形成了dox:siRNA复合物,并且当施用至细胞时,siRNA和多柔比星保留了功能。

[0258] 实施例5:使用治疗性复合物的基因沉默和降低的细胞活力

[0259] 通过将100nmol的多柔比星与2.5nmol RNA的组合形成了复合物,其包括与多柔比星复合的杂乱的非功能双链RNA分子(“siScrm2”,长度为21个碱基)或功能双链siRNA(“siRNA3”,长度为21个碱基)的RNA。对于第一复合物,将20 $\mu$ L的多柔比星-HC1(Sigma-Aldrich;5mM原液)和50 $\mu$ L的siScrm2(0.05mM原液)与350 $\mu$ L的HBS组合。对于第二复合物,将20 $\mu$ L的多柔比星(5mM原液)和50 $\mu$ L的siRNA3(0.05mM原液)与350 $\mu$ L的HBS组合。在使用10K MWCO过滤器离心以去除未结合的多柔比星之前,将每个样品在振荡的同时,在室温培育30分钟。对于每个样品的截留物(100 $\mu$ L)和滤液(100 $\mu$ L),也测量自400nm至700nm的吸光度。这些结果显示在图7中(实心符号指示截留物和空心符号指示滤液)。每个截留物样品在约480nm处具有吸收峰(Dox:siScrm2最大吸光度~0.95;Dox:siRNA3最大吸光度~0.85)。每个样品的滤液没有显著的峰,指示缺乏显著量的多柔比星。将截留物中检测到的多柔比星与DNA或RNA复合。计算多柔比星和RNA的产率,如表3中显示。使用多柔比星标准曲线,基于480nm处的吸光度确定多柔比星的产率。在将样品加热至85°C之后,基于260nm处的吸光度,确定RNA的产率。

[0260] 表3:复合物中多柔比星和RNA的产率

[0261]

	Dox 产率	核酸产率	Dox/RNA 比
Dox:siScrm2	72 nmol	1.8 nmol	40:1
Dos:siRNA3	63.6 nmol	2 nmol	31.8:1

[0262] 为了测量复合物对细胞活力的作用,将形成的复合物转染到4T1-Fluc-Neo/eGFP-Puro细胞(稳定表达FLuc和eGFP的小鼠乳腺癌细胞)中。将每孔约10,000个细胞在96孔板中铺开,在37°C且5%CO<sub>2</sub>,保持在具有10%胎牛血清、100U/mL青霉素、100 $\mu$ g/mL链霉素的RPMI

1640培养基中。24小时之后,用Opti-MEM I减血清培养基(Invitrogen Life Technologies)替换培养基。RNAiMax lipofectamine(Invitrogen Life Technologies)用作用于siScrm2、dox:siScrm2、siRNA3或dox:siRNA3递送的载体。向没有lipofectamine的对照样品施用多柔比星。转染之后三个小时,每个样品中的培养基用完全培养基替换。24小时之后,使用Celltiter Glo Luminescent细胞活力试剂盒(Promega),根据制造商的指导,通过量化ATP测定相对细胞活力。实验平行进行三次。结果显示在图8中。

[0263] 单独RNA(siScrm2或siRNA3)对于细胞活力几乎没有作用。与多柔比星复合的双链RNA,或单独多柔比星显示24小时之后细胞活力的剂量依赖性降低。

## 序列表

<110> HAFFAR, Omar  
<120> 功能RNA和小分子药物治疗性复合物和纳米颗粒递送媒介  
<130> 761542000840  
<140> 未指定  
<141> 与本文同时  
<150> 62/403,595  
<151> 2016-10-03  
<160> 4  
<170> Windows 4.0版本的FastSEQ  
<210> 1  
<211> 571  
<212> PRT  
<213> 未知  
<220>  
<223> 腺病毒血清型5五邻体基底序列  
<400> 1  
Met Arg Arg Ala Ala Met Tyr Glu Glu Gly Pro Pro Pro Ser Tyr Glu  
1 5 10 15  
Ser Val Val Ser Ala Ala Pro Val Ala Ala Ala Leu Gly Ser Pro Phe  
20 25 30  
Asp Ala Pro Leu Asp Pro Pro Phe Val Pro Pro Arg Tyr Leu Arg Pro  
35 40 45  
Thr Gly Gly Arg Asn Ser Ile Arg Tyr Ser Glu Leu Ala Pro Leu Phe  
50 55 60  
Asp Thr Thr Arg Val Tyr Leu Val Asp Asn Lys Ser Thr Asp Val Ala  
65 70 75 80  
Ser Leu Asn Tyr Gln Asn Asp His Ser Asn Phe Leu Thr Thr Val Ile  
85 90 95  
Gln Asn Asn Asp Tyr Ser Pro Gly Glu Ala Ser Thr Gln Thr Ile Asn  
100 105 110  
Leu Asp Asp Arg Ser His Trp Gly Gly Asp Leu Lys Thr Ile Leu His  
115 120 125  
Thr Asn Met Pro Asn Val Asn Glu Phe Met Phe Thr Asn Lys Phe Lys  
130 135 140  
Ala Arg Val Met Val Ser Arg Leu Pro Thr Lys Asp Asn Gln Val Glu  
145 150 155 160  
Leu Lys Tyr Glu Trp Val Glu Phe Thr Leu Pro Glu Gly Asn Tyr Ser

165	170	175
Glu Thr Met Thr Ile Asp Leu Met Asn Asn Ala Ile Val Glu His Tyr		
180	185	190
Leu Lys Val Gly Arg Gln Asn Gly Val Leu Glu Ser Asp Ile Gly Val		
195	200	205
Lys Phe Asp Thr Arg Asn Phe Arg Leu Gly Phe Asp Pro Val Thr Gly		
210	215	220
Leu Val Met Pro Gly Val Tyr Thr Asn Glu Ala Phe His Pro Asp Ile		
225	230	235
Ile Leu Leu Pro Gly Cys Gly Val Asp Phe Thr His Ser Arg Leu Ser		
245	250	255
Asn Leu Leu Gly Ile Arg Lys Arg Gln Pro Phe Gln Glu Gly Phe Arg		
260	265	270
Ile Thr Tyr Asp Asp Leu Glu Gly Asn Ile Pro Ala Leu Leu Asp		
275	280	285
Val Asp Ala Tyr Gln Ala Ser Leu Lys Asp Asp Thr Glu Gln Gly Gly		
290	295	300
Gly Gly Ala Gly Gly Ser Asn Ser Ser Gly Ser Gly Ala Glu Glu Asn		
305	310	315
Ser Asn Ala Ala Ala Ala Met Gln Pro Val Glu Asp Met Asn Asp		
325	330	335
His Ala Ile Arg Gly Asp Thr Phe Ala Thr Arg Ala Glu Glu Lys Arg		
340	345	350
Ala Glu Ala Glu Ala Ala Glu Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gln Pro		
355	360	365
Glu Val Glu Lys Pro Gln Lys Lys Pro Val Ile Lys Pro Leu Thr Glu		
370	375	380
Asp Ser Lys Lys Arg Ser Tyr Asn Leu Ile Ser Asn Asp Ser Thr Phe		
385	390	395
Thr Gln Tyr Arg Ser Trp Tyr Leu Ala Tyr Asn Tyr Gly Asp Pro Gln		
405	410	415
Thr Gly Ile Arg Ser Trp Thr Leu Leu Cys Thr Pro Asp Val Thr Cys		
420	425	430
Gly Ser Glu Gln Val Tyr Trp Ser Leu Pro Asp Met Met Gln Asp Pro		
435	440	445
Val Thr Phe Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Asn Phe Pro Val Val Gly		
450	455	460
Ala Glu Leu Leu Pro Val His Ser Lys Ser Phe Tyr Asn Asp Gln Ala		
465	470	475
		480

Val Tyr Ser Gln Leu Ile Arg Gln Phe Thr Ser Leu Thr His Val Phe  
                          485                         490                         495  
 Asn Arg Phe Pro Glu Asn Gln Ile Leu Ala Arg Pro Pro Ala Pro Thr  
                          500                         505                         510  
 Ile Thr Thr Val Ser Glu Asn Val Pro Ala Leu Thr Asp His Gly Thr  
                          515                         520                         525  
 Leu Pro Leu Arg Asn Ser Ile Gly Gly Val Gln Arg Val Thr Ile Thr  
                          530                         535                         540  
 Asp Ala Arg Arg Arg Thr Cys Pro Tyr Val Tyr Lys Ala Leu Gly Ile  
                          545                         550                         555                         560  
 Val Ser Pro Arg Val Leu Ser Ser Arg Thr Phe  
                          565                         570  
 <210> 2  
 <211> 207  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 2  
 Glu Leu Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala  
  1                     5                         10                         15  
 Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser  
                          20                         25                         30  
 Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys  
                          35                         40                         45  
 Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu  
                          50                         55                         60  
 Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys  
                          65                         70                         75                         80  
 Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Ala  
                          85                         90                         95  
 Ile Val Glu Ser Asn Glu Ile Ile Thr Gly Met Pro Ala Ser Thr Glu  
                          100                         105                         110  
 Gly Ala Tyr Val Ser Ser Glu Ser Pro Ile Arg Ile Ser Val Ser Thr  
                          115                         120                         125  
 Glu Gly Ala Asn Thr Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr  
                          130                         135                         140  
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
                          145                         150                         155                         160  
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
                          165                         170                         175

Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn  
                  180                 185                 190

Val Pro Met Lys Val Gln Asn Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr  
                  195                 200                 205

<210> 3  
 <211> 796  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <400> 3

Glu Leu Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala  
 1                 5                 10                 15

Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser  
                  20                 25                 30

Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys  
                  35                 40                 45

Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu  
                  50                 55                 60

Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys  
                  65                 70                 75                 80

Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Ala  
                  85                 90                 95

Ile Val Glu Ser Asn Glu Ile Ile Thr Gly Met Pro Ala Ser Thr Glu  
                  100                 105                 110

Gly Ala Tyr Val Ser Ser Glu Ser Pro Ile Arg Ile Ser Val Ser Thr  
                  115                 120                 125

Glu Gly Ala Asn Thr Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr  
                  130                 135                 140

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
                  145                 150                 155                 160

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
                  165                 170                 175

Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn  
                  180                 185                 190

Val Pro Met Lys Val Gln Asn Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gly  
                  195                 200                 205

Gly Ser Gly Gly Ser Arg Ser Met Arg Arg Ala Ala Met Tyr Glu Glu  
                  210                 215                 220

Gly Pro Pro Pro Ser Tyr Glu Ser Val Val Ser Ala Ala Pro Val Ala  
 225 230 235 240  
 Ala Ala Leu Gly Ser Pro Phe Asp Ala Pro Leu Asp Pro Pro Phe Val  
 245 250 255  
 Pro Pro Arg Tyr Leu Arg Pro Thr Gly Gly Arg Asn Ser Ile Arg Tyr  
 260 265 270  
 Ser Glu Leu Ala Pro Leu Phe Asp Thr Thr Arg Val Tyr Leu Val Asp  
 275 280 285  
 Asn Lys Ser Thr Asp Val Ala Ser Leu Asn Tyr Gln Asn Asp His Ser  
 290 295 300  
 Asn Phe Leu Thr Thr Val Ile Gln Asn Asn Asp Tyr Ser Pro Gly Glu  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Thr Gln Thr Ile Asn Leu Asp Asp Arg Ser His Trp Gly Gly  
 325 330 335  
 Asp Leu Lys Thr Ile Leu His Thr Asn Met Pro Asn Val Asn Glu Phe  
 340 345 350  
 Met Phe Thr Asn Lys Phe Lys Ala Arg Val Met Val Ser Arg Leu Pro  
 355 360 365  
 Thr Lys Asp Asn Gln Val Glu Leu Lys Tyr Glu Trp Val Glu Phe Thr  
 370 375 380  
 Leu Pro Glu Gly Asn Tyr Ser Glu Thr Met Thr Ile Asp Leu Met Asn  
 385 390 395 400  
 Asn Ala Ile Val Glu His Tyr Leu Lys Val Gly Arg Gln Asn Gly Val  
 405 410 415  
 Leu Glu Ser Asp Ile Gly Val Lys Phe Asp Thr Arg Asn Phe Arg Leu  
 420 425 430  
 Gly Phe Asp Pro Val Thr Gly Leu Val Met Pro Gly Val Tyr Thr Asn  
 435 440 445  
 Glu Ala Phe His Pro Asp Ile Ile Leu Leu Pro Gly Cys Gly Val Asp  
 450 455 460  
 Phe Thr His Ser Arg Leu Ser Asn Leu Leu Gly Ile Arg Lys Arg Gln  
 465 470 475 480  
 Pro Phe Gln Glu Gly Phe Arg Ile Thr Tyr Asp Asp Leu Glu Gly Gly  
 485 490 495  
 Asn Ile Pro Ala Leu Leu Asp Val Asp Ala Tyr Gln Ala Ser Leu Lys  
 500 505 510  
 Asp Asp Thr Glu Gln Gly Gly Ala Gly Gly Ser Asn Ser Ser  
 515 520 525  
 Gly Ser Gly Ala Glu Glu Asn Ser Asn Ala Ala Ala Ala Met Gln

530	535	540
Pro Val Glu Asp Met Asn Asp His Ala Ile Arg Gly Asp Thr Phe Ala		
545	550	555
Thr Arg Ala Glu Glu Lys Arg Ala Glu Ala Glu Ala Ala Ala Glu Ala		
565	570	575
Ala Ala Pro Ala Ala Gln Pro Glu Val Glu Lys Pro Gln Lys Lys Pro		
580	585	590
Val Ile Lys Pro Leu Thr Glu Asp Ser Lys Lys Arg Ser Tyr Asn Leu		
595	600	605
Ile Ser Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gln Tyr Arg Ser Trp Tyr Leu Ala		
610	615	620
Tyr Asn Tyr Gly Asp Pro Gln Thr Gly Ile Arg Ser Trp Thr Leu Leu		
625	630	635
Cys Thr Pro Asp Val Thr Cys Gly Ser Glu Gln Val Tyr Trp Ser Leu		
645	650	655
Pro Asp Met Met Gln Asp Pro Val Thr Phe Arg Ser Thr Arg Gln Ile		
660	665	670
Ser Asn Phe Pro Val Val Gly Ala Glu Leu Leu Pro Val His Ser Lys		
675	680	685
Ser Phe Tyr Asn Asp Gln Ala Val Tyr Ser Gln Leu Ile Arg Gln Phe		
690	695	700
Thr Ser Leu Thr His Val Phe Asn Arg Phe Pro Glu Asn Gln Ile Leu		
705	710	715
Ala Arg Pro Pro Ala Pro Thr Ile Thr Thr Val Ser Glu Asn Val Pro		
725	730	735
Ala Leu Thr Asp His Gly Thr Leu Pro Leu Arg Asn Ser Ile Gly Gly		
740	745	750
Val Gln Arg Val Thr Ile Thr Asp Ala Arg Arg Arg Thr Cys Pro Tyr		
755	760	765
Val Tyr Lys Ala Leu Gly Ile Val Ser Pro Arg Val Leu Ser Ser Arg		
770	775	780
Thr Phe Lys		
785	790	795
<210> 4		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成构建体		

<400> 4

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys  
1 5 10

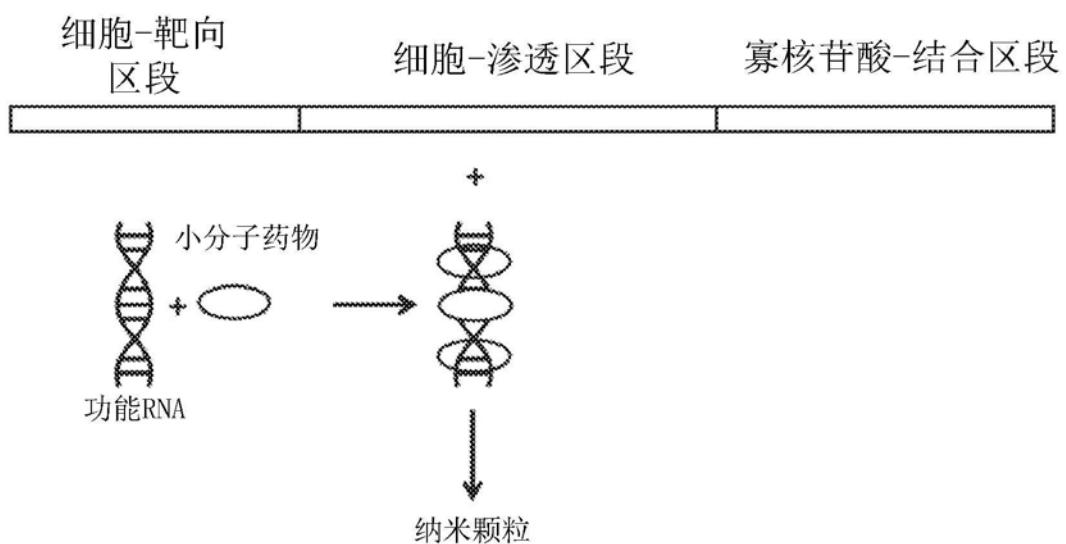
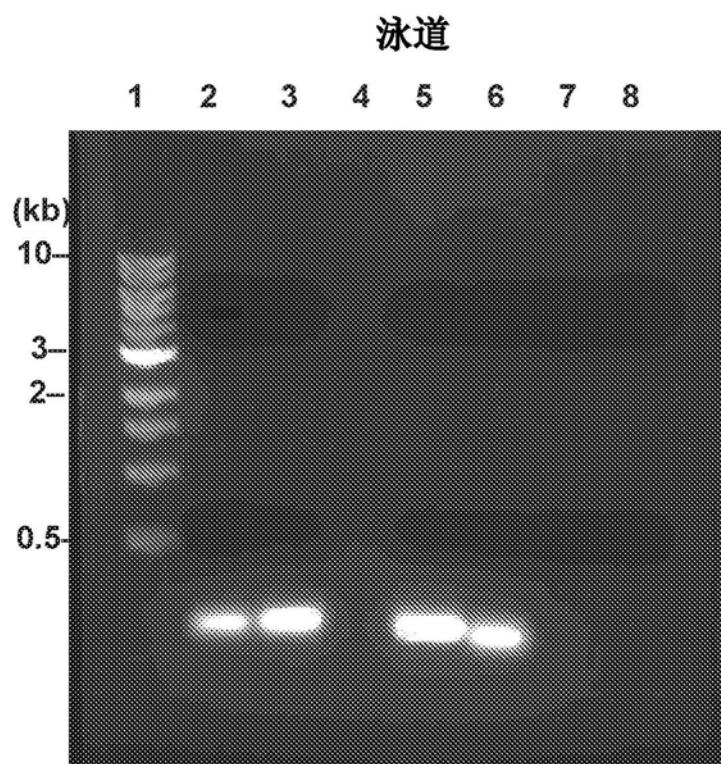
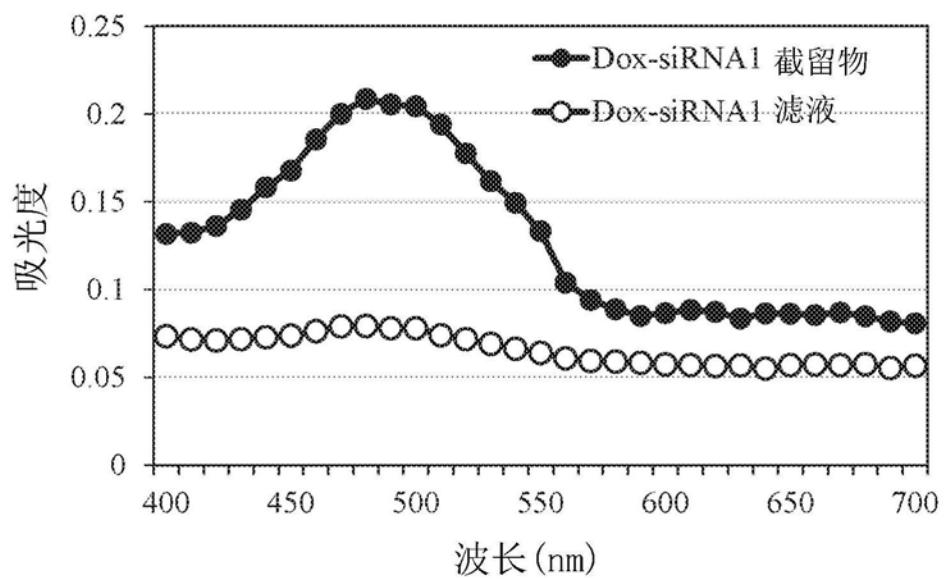


图1



## siRNA1-Dox



## siRNA2-Dox

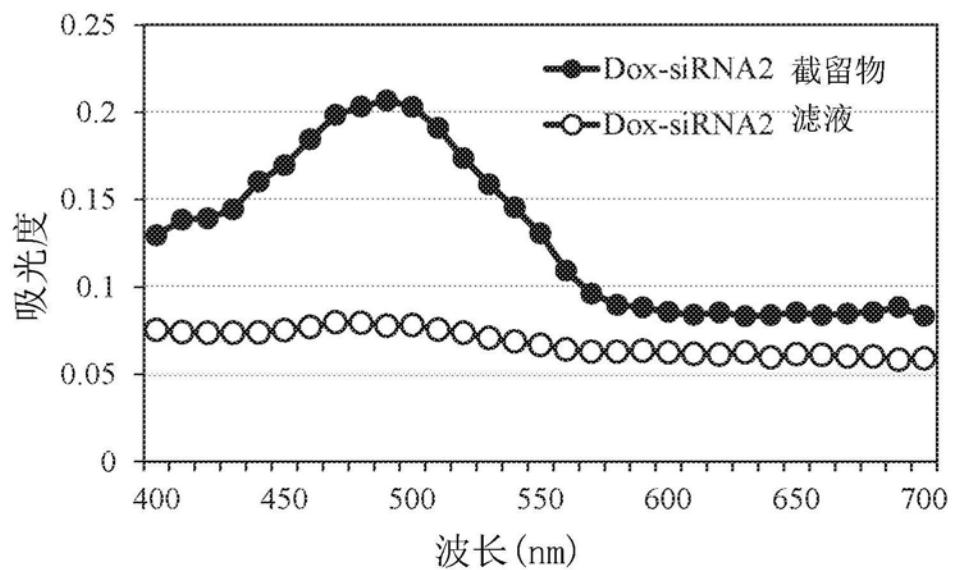


图3

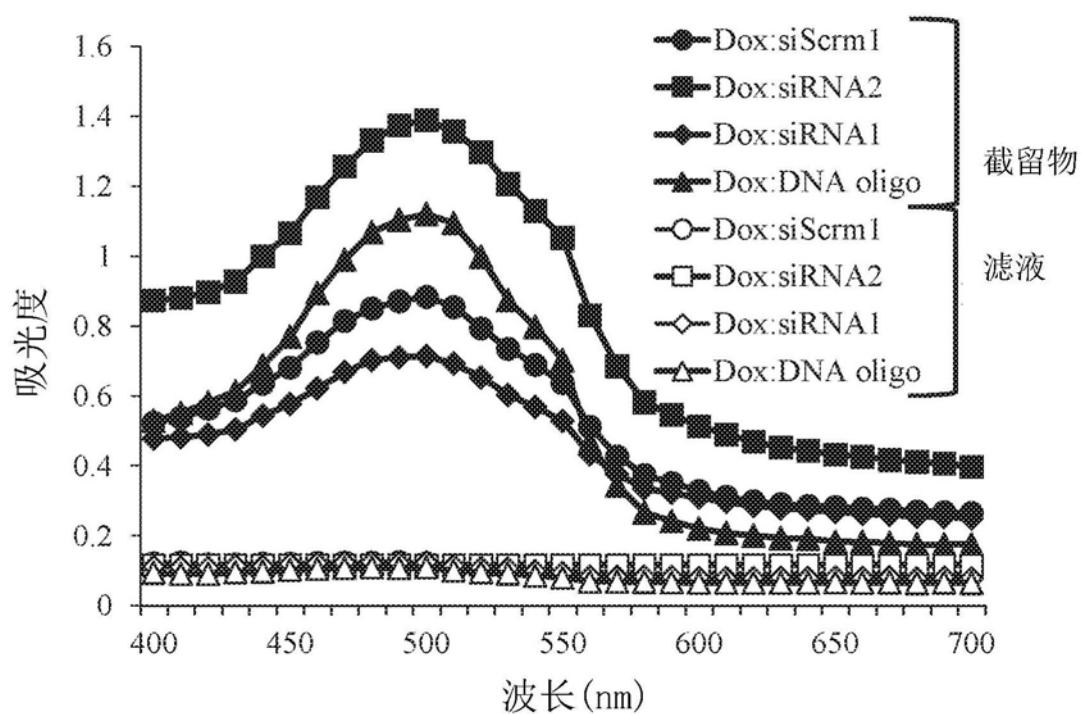


图4

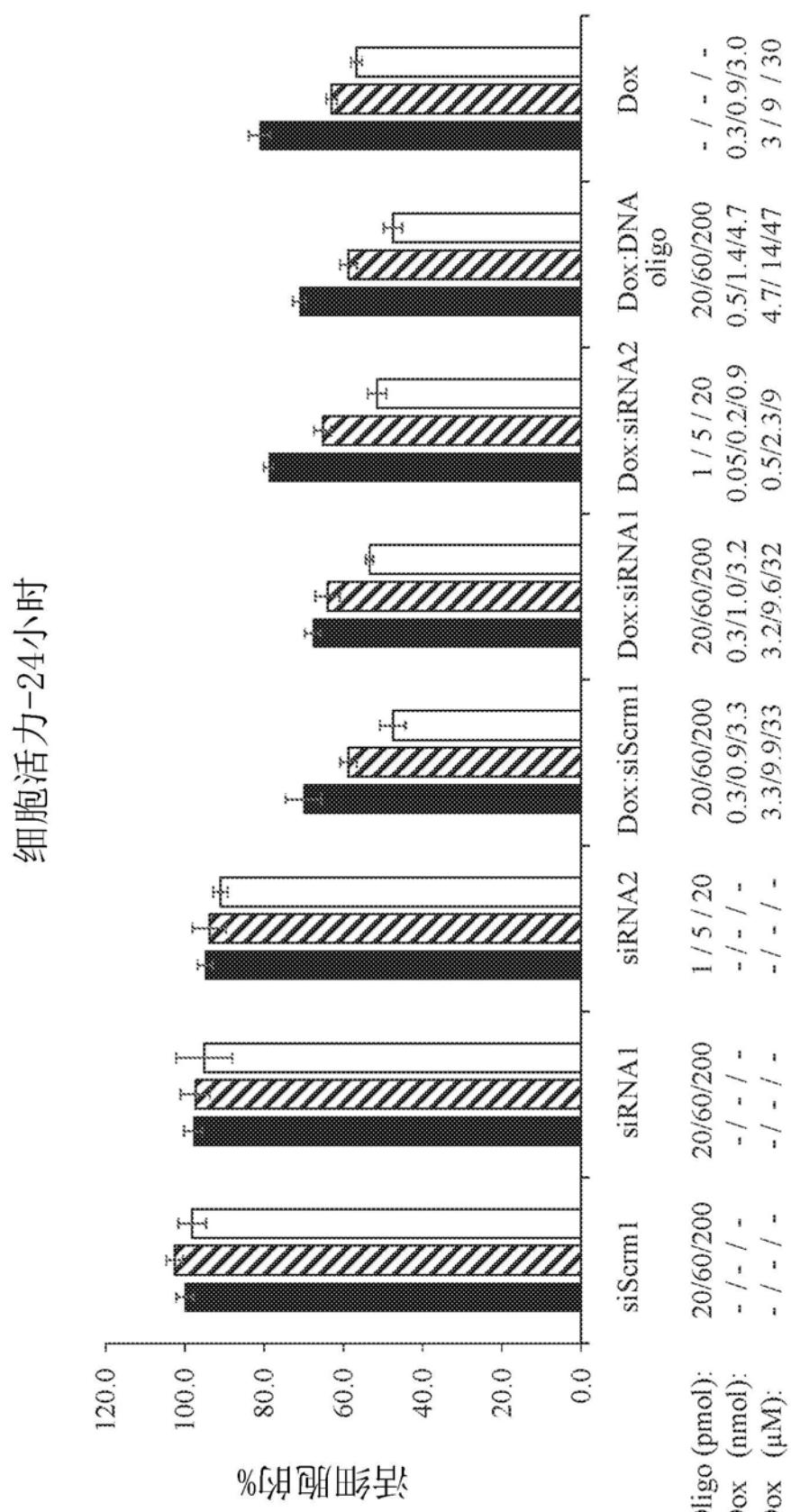


图5A

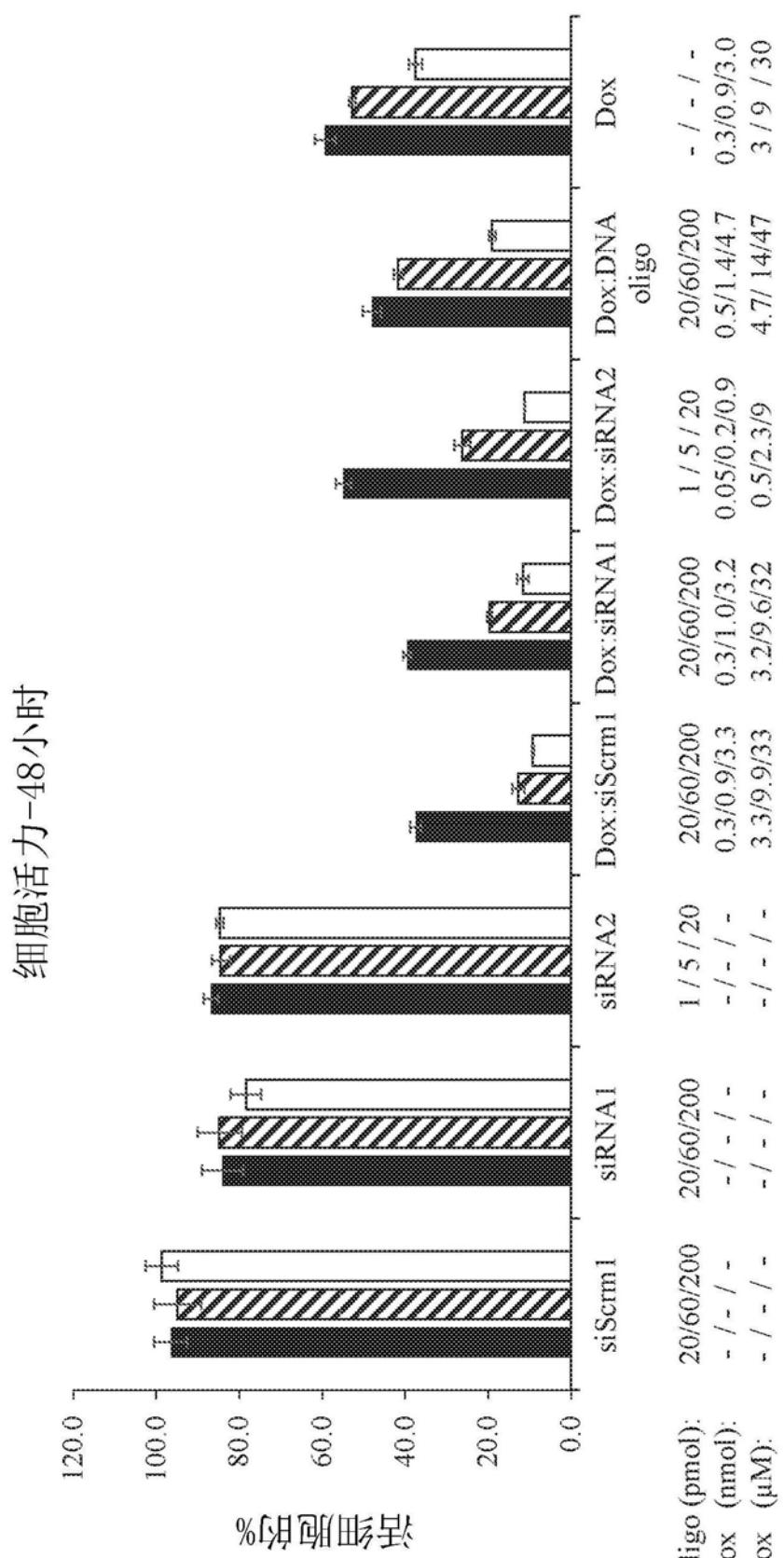


图5B

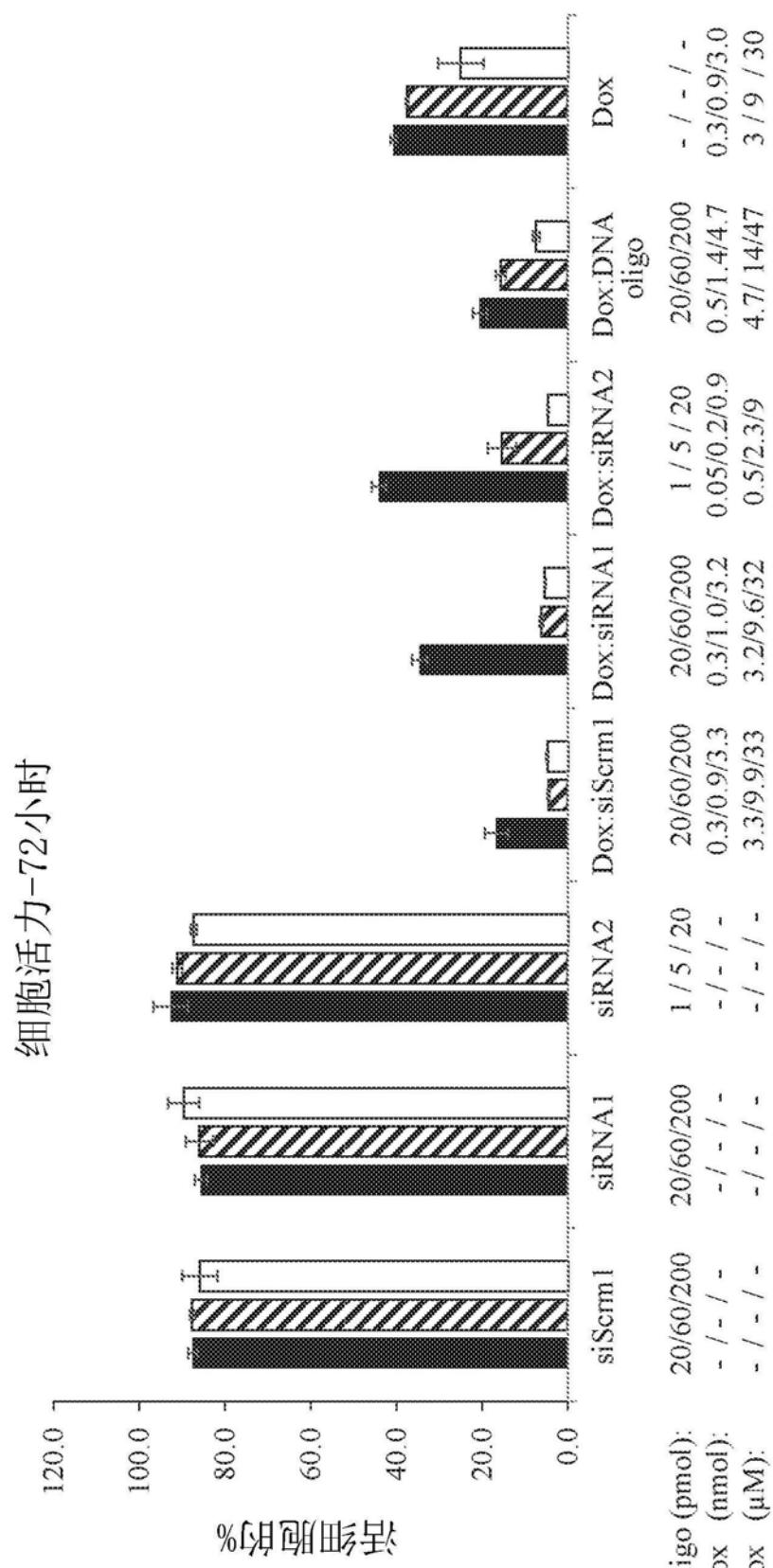


图5C

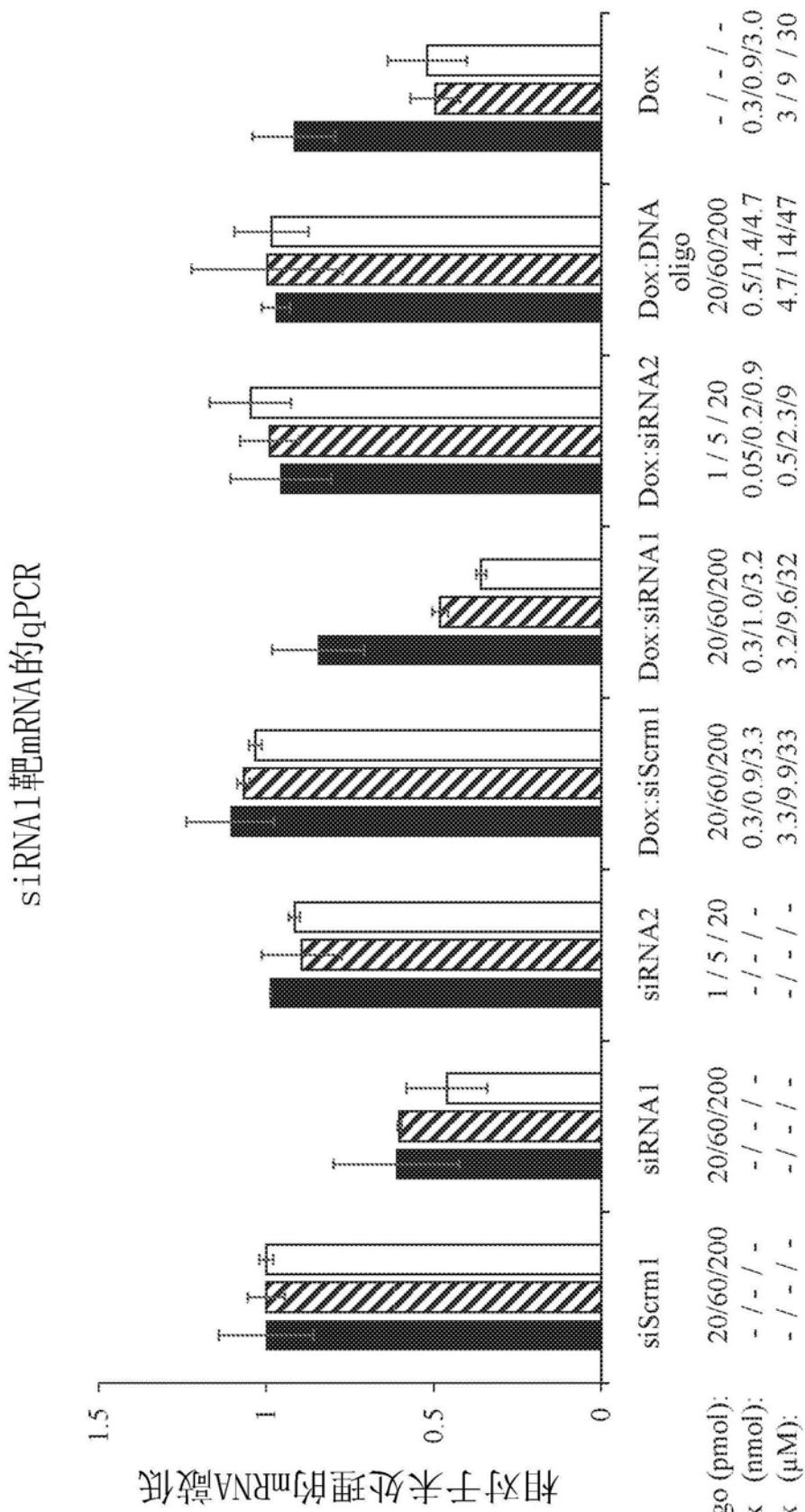


图6A

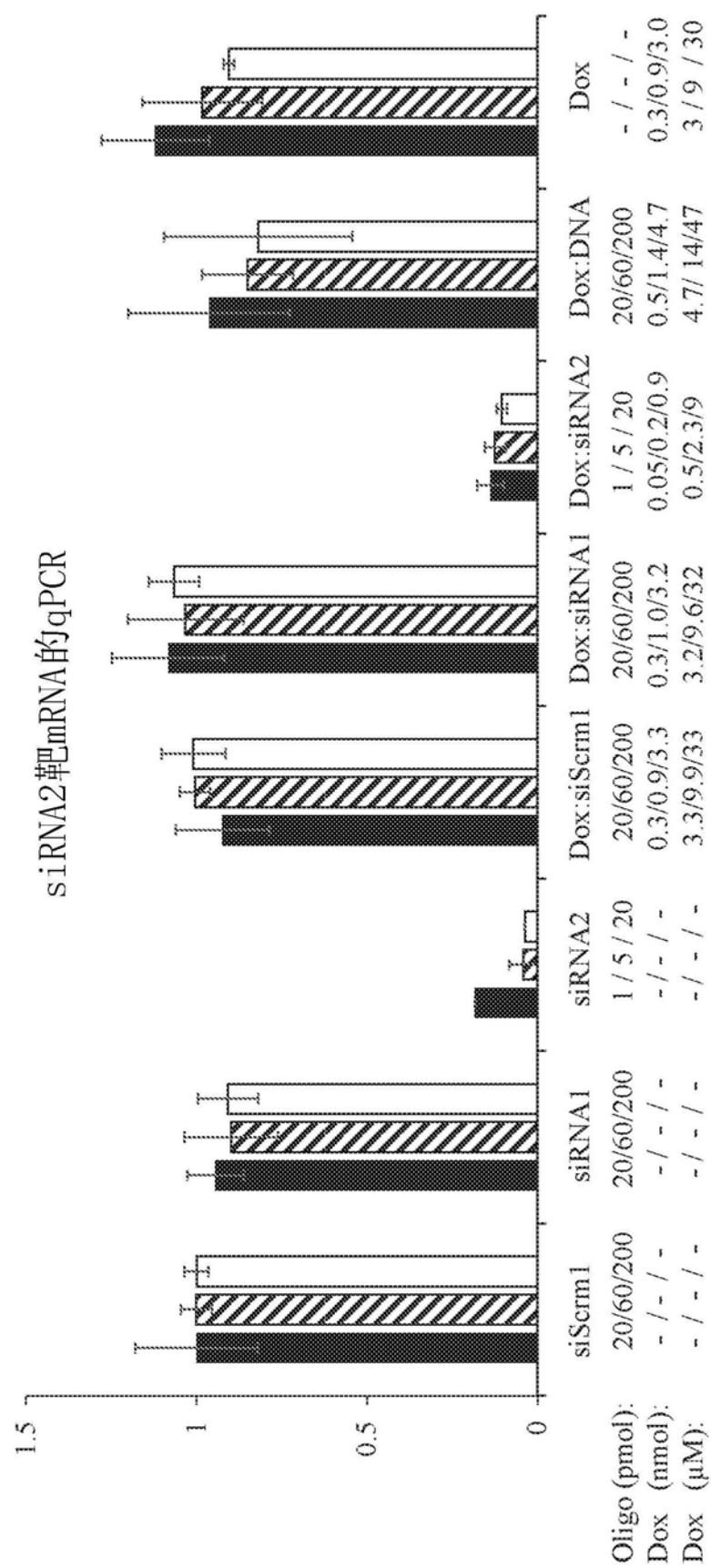


图6B

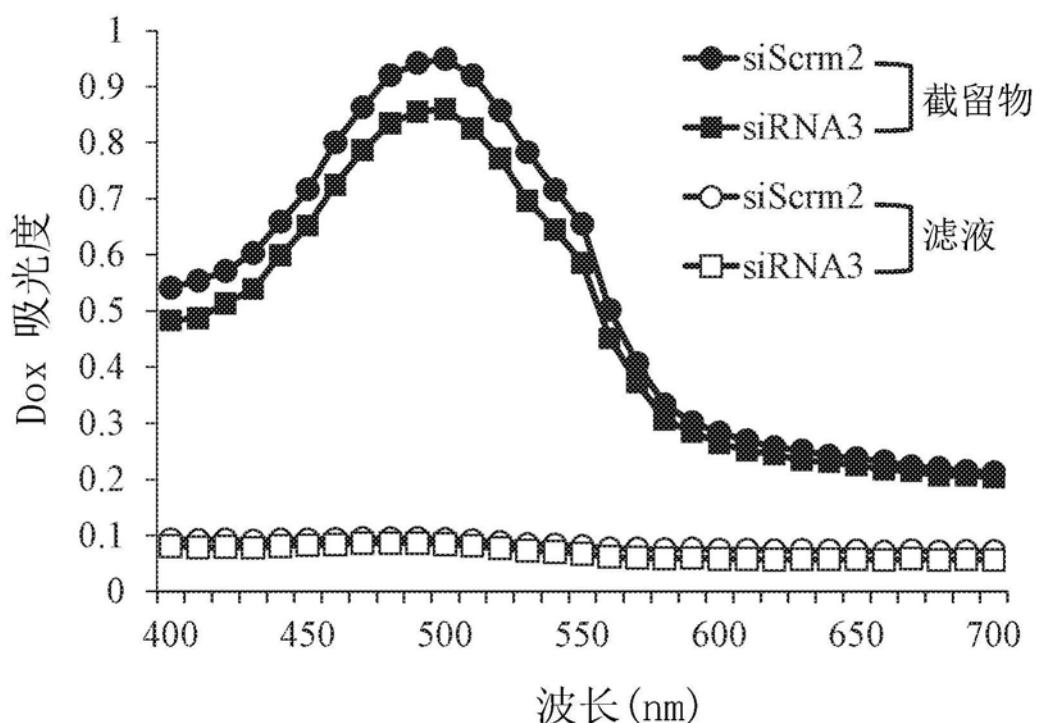


图7

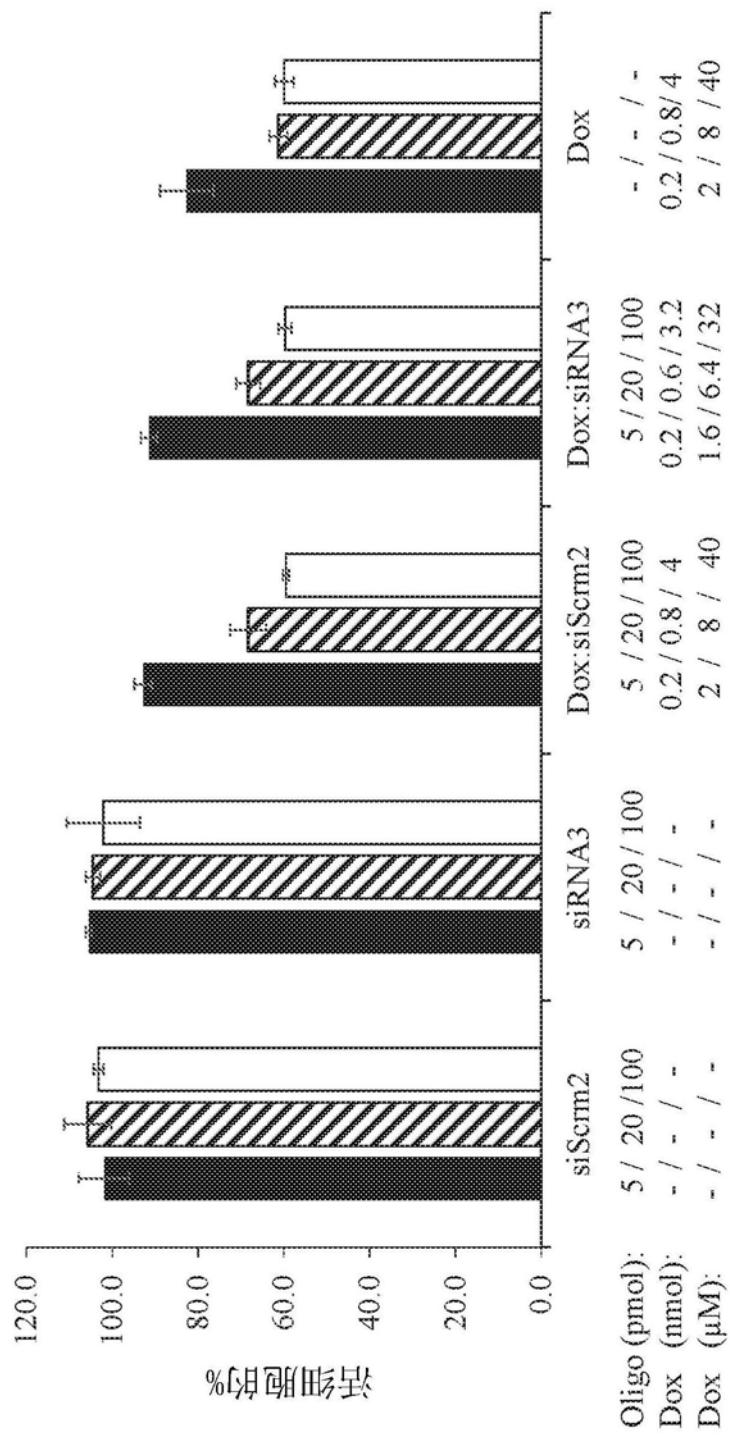


图8