



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101331231 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 21

(21) 申请号 200680046865. 5

(22) 申请日 2006. 10. 13

(30) 优先权数据

60/727, 216 2005. 10. 14 US

60/733, 664 2005. 11. 04 US

60/825, 878 2006. 09. 15 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 06. 13

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/040174 2006. 10. 13

(87) PCT申请的公布数据

W02007/047482 EN 2007. 04. 26

(73) 专利权人 玛瑞纳生物技术有限公司

地址 美国华盛顿

(72) 发明人 罗杰·C·阿达米 朱恬英 崔坤元

小迈克尔·E·休斯顿 陈力山

陈郁静

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 杨淑媛 郑霞

(51) Int. Cl.

C12N 15/87 (2006. 01)

C12N 15/11 (2006. 01)

C12N 15/88 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2005021044 A, 2005. 03. 10, 全文.

审查员 李振鹏

权利要求书 2 页 说明书 49 页

序列表 35 页 附图 7 页

(54) 发明名称

用于 RNA 治疗的肽核糖核酸缩合粒子的复合物及方法

(57) 摘要

含有直径小于 1000nm 缩合粒子的复合物, 其中所述粒子包括一个或多个双链核糖核酸 (dsKNA) 和一个或多个肽。该复合物、组合物和方法用于通过 RNA 干扰调节基因表达。

1. 一种组合物,所述组合物包括双链 RNA(dsRNA)、第一肽和第二肽,其中所述组合物中第一肽的浓度提供所述第一肽和所述 dsRNA 的 N/P 比为 0.2 至 1,并且其中所述组合物中第二肽的浓度提供所述组合物的 N/P 比为 0.5 至 20,并且其中所述 dsRNA、第一肽和第二肽形成具有直径为 0.5nm-1000nm 的粒子。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽为所述粒子质量的 5% -99%。

3. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽为所述粒子质量的 5% -50%。

4. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽和所述第二肽为所述粒子质量的 50% -99%。

5. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽和所述第二肽的氨基酸序列独立地包括选自 SEQ ID NO :28-37、43、67-71 和 87-95 的氨基酸序列。

6. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽和所述第二肽的氨基酸序列独立地包括选自 SEQ ID NO :28、34、37、38 和 39 的氨基酸序列。

7. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽的氨基酸序列包括 SEQ ID NO :28 的氨基酸序列。

8. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述第一肽和 / 或所述第二肽是聚乙二醇化的。

9. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述粒子的直径为 10nm-300nm。

10. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述粒子的直径为 40nm-100nm。

11. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述粒子是交联的。

12. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述粒子的 ζ 电位值为至少 20mV。

13. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述粒子的 ζ 电位值为至少 30mV。

14. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述 dsRNA 为 siRNA。

15. 一种制备组合物的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 将第一肽与双链 RNA(dsRNA) 结合,其中所述第一肽与所述 dsRNA 形成第一粒子,并具有 N/P 比为 0.2 至 1;

b) 将第二肽与所述第一粒子结合,其中所述第二肽调节 N/P 比为 0.5 至 20;并且其中所述第一肽、所述第二肽和所述 dsRNA 形成具有直径为小于 1000nm 的第二粒子。

16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述第一肽为所述第二粒子质量的 5% -99%。

17. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述第一肽为所述第二粒子质量的 5% -50%。

18. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述第一肽和所述第二肽为所述第二粒子质量的 50% -99%。

19. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述第一肽和所述第二肽的氨基酸序列独立地包括选自 SEQ ID NO :28-37、43、67-71 和 87-95 的氨基酸序列。

20. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述第一肽和所述第二肽的氨基酸序列独立地包括选自 SEQ ID NO :28、34、37、38 和 39 的氨基酸序列。

21. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述第一肽的氨基酸序列包括 SEQ ID NO :28 的氨基酸序列。

22. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述第一肽和 / 或所述第二肽是聚乙二醇化的。

23. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述第二粒子的直径为 10nm-300nm。

24. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述第二粒子的直径为 40nm-100nm。

25. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述第二粒子的 ζ 电位值为至少 20mV。
26. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述第二粒子的 ζ 电位值为至少 30mV。
27. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述第二粒子是交联的。
28. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述第一肽与所述 dsRNA 混合。
29. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述第二肽与所述第一肽和所述 dsRNA 混合。

用于 RNA 治疗的肽核糖核酸缩合粒子的复合物及方法

发明领域

[0001] 本发明一般涉及 RNA 干扰和 RNA 治疗剂递送领域。更具体地,本发明涉及肽核糖核酸缩合粒子的复合物和组合物,及其用于药剂的用途和作为治疗剂递送的用途。本发明一般涉及在 RNA 干扰中使用肽核糖核酸缩合复合物来对哺乳动物基因表达进行基因特异性抑制的方法。

[0002] 发明背景

[0003] RNA 干扰 (RNAi) 是指序列特异性转录后基因沉默的方法,其由称为短干扰 RNA (siRNA) 的双链 RNA (dsRNA) 所介导。参见 Fire 等, Nature 391 :806, 1998, 和 Hamilton 等, Science 286 :950-951, 1999。RNAi 由不同的群 (flora) 和门共享,并且被认为是进化保守的、抗外源基因表达的细胞防御机制。参见 Fire 等, Trends Genet. 15 :358, 1999。

[0004] 因此, RNAi 是一种使用小的非编码 RNA 来使基因表达沉默的普遍存在的内源性机理。参见 Dykxhoorn, D. M. 和 J. Lieberman, Annu. Rev. Biomed. Eng. 8 :377-402, 2006。RNAi 可以调节细胞死亡、分化和发育中所涉及的重要基因。RNAi 还可以保护基因组使其免受转座子和病毒编码的遗传成分侵入。当 siRNA 被引入细胞时,其与内源性 RNAi 结构结合而高特异性破坏含互补序列的 mRNA 的表达。任何引起疾病的基因和任何细胞类型或组织都有可能被靶向。该项技术已被快速用于基因功能分析和药物靶发现和验证。利用 RNAi 也很有希望用于治疗,但是将 siRNA 引入体内细胞依然是重大障碍。

[0005] RNAi 的机理是通过裂解靶 mRNA, 尽管仍未得到完全证实。RNAi 反应涉及核酸内切酶络合物, 该核酸内切酶络合物被称为诱导 RNA 沉默的络合物 (RISC), 其介导与 siRNA 双链体反义链互补的单链 RNA 的裂解。靶 RNA 的裂解发生在与 siRNA 双链体反义链互补的区域的中部 (Elbashir 等, Genes Dev. 15 :188, 2001)。

[0006] 进行 RNAi 的一种方式是在细胞中引入或表达 siRNA。另一种方式是利用称为切酶 (dicer) 的内源性核糖核酸酶 III。切酶的一种活性是将长 dsRNA 加工成 siRNA。参见 Hamilton 等, Science 286 :950-951, 1999 ; Berstein 等, Nature 409 :363, 2001。由切酶获得的 siRNA 通常总长为约 21-23 个核苷酸, 带有约 19 个双链的碱基对。参见 Hamilton 等, 同上 ; Elbashir 等, Genes Dev. 15 :188, 2001。实质上, 长 dsRNA 可以作为 siRNA 的前体引入细胞中。

[0007] RNAi 疗法、反义疗法和基因疗法等的开发, 产生了对基于活性核酸的物质引入细胞中的有效方式的需求。一般而言, 核酸在细胞或血浆中只能稳定极短的时间。但是, 可以通过聚集和结合成缩合的复合物来稳定基于核酸的物质, 所述缩合的复合物所展现的粒子足够小以用于细胞递送。

[0008] 所需要的是包括小粒子的复合物以及制备所述复合物的方法, 其中所述小粒子含有用于细胞内递送并最终作为治疗剂的活性核酸物质。特别地, 需要将双链 RNA 递送至细胞以产生 RNAi 反应的复合物和方法。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明通过提供用于 RNA 干扰和其他治疗方法的一系列肽-核糖核酸复合物和组

合物,克服了本领域的这些及其他缺点。本发明特别提供了复合物和制备所述复合物的方法,所述复合物包括与一个或多个肽缩合成稳定的小粒子的一个或多个核糖核酸物质,所述稳定的小粒子具有通过 RNA 干扰来抑制靶基因表达的活性。该概述与附图说明、发明详述以及所附的实施例、权利要求和附图一起,作为一个整体,涵盖了所公开的发明。

[0011] 在一些方面中,本发明提供了用于 RNA 干扰和其他治疗方法的一系列肽-RNA 复合物和组合物,包括含有缩合成稳定的小粒子的 RNA 和肽的复合物,所述稳定的小粒子具有通过 RNAi 来抑制靶基因表达的活性。本发明的复合物一般作为合成肽与核酸的多种混合物或缩合物提供。

[0012] 在其他方面中,本发明的缩合复合物和组合物包括肽-RNA 络合物的稳定小粒子。在一些实施方案中,这些复合物和粒子可以通过交联进一步稳定。在其他实施方案中,本发明的复合物和组合物包括诸如聚乙二醇的隐形 (stealth) 或表面改性剂以便促进递送。

[0013] 在另外的方面中,本发明的复合物包括一个或多个核糖核酸与一个或多个肽组分的缩合络合物。所述肽组分可以具有足够的正电荷以便结合核糖核酸,从而形成非共价连接的肽-核糖核酸缩合复合物。

[0014] 在一些方面中,本发明的缩合复合物可以形成均匀的粒子。在一些实施方案中,肽-核酸复合物球形粒子的直径具有窄的分布,平均小于 1000 纳米 (nm)。

[0015] 本发明的肽-核酸缩合复合物可以提供它们自身的多组分制剂。在一些实施方案中,复合物可以与用于药物递送的其他物质相结合,例如用于递送至细胞的载体或赋形剂,或者用于体内治疗的各种递送基质。

[0016] 在一些实施方案中,通过以下方式由一个或多个核糖核酸和一个或多个肽提供复合物:将至少一个核糖核酸物质溶解于含水溶液中,然后向所述含水溶液添加至少一个肽组分,从而使粒子缩合成小于 1000nm 的直径,之后向所述含水溶液添加增加所述粒子质量的第二或后续肽组分。

[0017] 在另外的实施方案中,通过以下方式由一个或多个核糖核酸物质和一个或多个肽组分提供复合物:将第一肽组分溶解于含水溶液中,然后向所述含水溶液添加所述核糖核酸物质,从而使粒子缩合成小于 1000nm 的直径,之后向所述含水溶液添加增加所述粒子质量的第二或后续肽组分。

[0018] 在本发明的一个方面中,依据对核酸的相对亲和力来选择肽组分。可以对肽组分进行选择,以便允许所述肽组分与核酸结合程度的变化。

[0019] 在一些方面中,核糖核酸-肽缩合复合物可以可逆地结合。核糖核酸与一定量带正电荷的核糖核酸结合肽的复合物在细胞外的生物环境中基本上是稳定的,并且在接触细胞内的内体后释放出核糖核酸。所述释放可以产生 RNAi 反应。

[0020] 在另外的方面中,提供了稳定肽-核糖核酸复合物的结构和方法,包括在所述复合物内交联核糖核酸结合肽。防止肽-核糖核酸复合物在生物有机体内降解的方法包括交联所述复合物内的至少一部分肽。

[0021] 本发明进一步提供了所述复合物作为药剂的用途,以及制备用于动物和人类 RNAi 疗法的药剂的用途。

[0022] 附图简述

[0023] 图 1 :在不同的 G1498 浓度和不同的氮 / 磷比 (N/P) 下, siRNA G1498 与肽 PN183 的缩合粒子的直径。对于在特定 N/P 处的各组的三条柱形图而言,最左边的柱形的 G1498 浓度为 100ug/ml,中间的柱形的浓度为 50ug/ml,最右边的柱形的浓度为 10ug/ml。在 N/P 为 0.2 至 0.5 处,当 G1498 的浓度为 10ug/ml 时,粒子是相当小的。

[0024] 图 2 :在不同的氮 / 磷比 (N/P) 下, siRNA G1498 与肽 PN183 的缩合粒子的直径。对于在特定 N/P 处的各组的两条柱形图而言,左边的柱形采用了涡旋,而右边的柱形未采用涡旋。数据在混合之后立即获取。

[0025] 图 3 :在不同的氮 / 磷比 (N/P) 下, siRNA G1498 与肽 PN183 的缩合粒子的直径。对于在特定 N/P 处的各组的两条柱形图而言,左边的柱形采用了涡旋,而右边的柱形未采用涡旋。数据在混合之后 30 分钟获取。

[0026] 图 4 :在不同的氮 / 磷比 (N/P) 下, siRNA G1498 与肽 PN183 的缩合粒子的直径。对于在特定 N/P 处的各组的两条柱形图而言,左边的柱形采用了涡旋,而右边的柱形未采用涡旋。数据在混合之后 60 分钟获取。

[0027] 图 5 :在不同的氮 / 磷比 (N/P) 下, siRNA G1498 与肽 PN183 的缩合粒子的直径。对于在特定 N/P 处的各组的两条柱形图而言,左边的柱形采用了涡旋,而右边的柱形未采用涡旋。数据在混合之后 24 小时获取。

[0028] 图 6 :在 G1498 浓度为 100ug/ml 时, siRNA G1498 与肽 PN183 的缩合粒子于不同 pH 值的直径。

[0029] 图 7 :在氯化钠浓度增加时,所获得的 siRNA G1498 与肽 PN183 的缩合粒子的直径。

[0030] 图 8 :在不同的 N/P 比和不同的组分添加顺序下,所获得的 siRNA G1498 与肽 PN183 的缩合粒子的直径。对于在特定 N/P 处的各组的两条柱形图而言,左边的柱形是首先添加 siRNA 获得的,而右边的柱形是首先添加肽获得的。

[0031] 图 9 :siRNA G1498 与肽 PN183 的缩合粒子的电子透射显微照片。图例长度标记为 200nm。

[0032] 图 10 :siRNA G1498 与肽 PN183 的缩合粒子的透射电子显微照片。图例长度标记为 200nm。

[0033] 图 11 :通过鼻内施用包括 siRNA Inm-4 和肽 PN183 以及 PN939 的组合物而在小鼠模型中进行 LPS 诱导 TFN- α 表达 (pg/ml) 的敲低 (knock down) 试验结果。最左边的柱形图是缓冲液对照,随后是 Inm-4/PN183/PN939 缩合物的数据,右边跟随的是与戊二醛 (G) 交联的 Inm-4/PN183/PN939 复合物的数据。安慰剂不含 siRNA,而 Qneg 含有无活性的 siRNA。

[0034] 图 12 :lac-z siRNA 与肽 PN183 以及各种第二肽的缩合物在大鼠神经胶质瘤成纤维细胞 9L/LacZ 中 lac-z 表达的体外敲低试验结果。最左边的柱形图是使用 HiPerFect™ (Qiagen ;Valencia (巴伦西亚),California (加利福尼亚)) 的比较数据,随后是本发明各种复合物的数据。PN183 的 N/P 比为 0.75,而第二肽的 N/P 比为 0.3。

[0035] 发明详述

[0036] 本发明提供了用于 RNA 干扰和其他治疗方法的一系列肽-RNA 复合物和组合物。更具体地,本发明包括含有缩合成稳定的小粒子的 RNA 和肽的复合物,所述稳定的小粒子具有通过 RNAi 抑制靶基因表达的活性。

[0037] 本发明的复合物一般作为合成肽与核酸的混合物或缩合物提供。可以使用各式各

样的肽来形成复合物。肽的质量通常小于约 120kDa,或小于约 60kDa,或小于约 30kDa。复合物的肽可以是粘膜渗透性调节剂或粘膜渗透促进剂。

[0038] 缩合的复合物包括肽-RNA 络合物的稳定小粒子。这些复合物和粒子可以通过使用各种试剂交联而进一步稳定。在一些实施方案中,本发明的复合物和组合物包括诸如聚乙二醇的隐形或表面改性剂以便促进递送。

[0039] 本发明的复合物包括由一个或多个核糖核酸和一个或多个肽组分构成的缩合络合物。所述肽组分可以具有足够的正电荷以便结合核糖核酸,从而形成非共价连接的肽-核糖核酸缩合复合物。提供了稳定的核糖核酸络合物,所述核糖核酸络合物包括核糖核酸和与该核糖核酸结合的肽,所述肽的量在体内条件下有效地稳定了所述核糖核酸。肽-核酸络合物组分的结合部分是由于离子力,并且可以包括其他不同的相互作用,比如范德华力或氢键。

[0040] 本发明的肽-核酸缩合复合物可以包括均匀的粒子。肽-核酸复合物球形粒子的直径可以具有窄的分布,平均小于 1000 纳米 (nm)。球形粒子的直径可以小于 1000 纳米,为约 0.5 纳米至约 400 纳米,约 10 纳米至约 300 纳米,约 40 纳米至约 100 纳米。稳定粒子的 ζ 电位值可以大于约 20 毫伏,或者大于约 30 毫伏。

[0041] 本文使用的术语“均匀的”是指复合物的大部分粒子具有窄的直径分布。在均匀粒子复合物中可以存在超过一种的直径分布。窄的直径分布与粒度分布图中的峰相对应,该粒度分布图基于对粒度分析仪的原始相关系数与时间的数据。优选地,均匀的复合物在一个窄的直径分布中具有至少 30% 的粒子。

[0042] 本发明的肽-核酸缩合复合物提供了它们自身的多组分制剂,并且可以与用于药物递送的其他物质进一步结合,例如用于递送至细胞的载体或赋形剂,或者用于体内治疗的各种递送基质。

[0043] 本发明的复合物和组合物可以分散于药学上可接受的介质中,与基质结合,或者与用于递送至细胞或受治疗者的载体或媒介物结合。包括本发明复合物或粒子的分散体的溶液可以作为治疗剂递送。

[0044] 肽组分

[0045] 适用于本发明复合物的肽组分可以是合成的或者是从天然或其他来源获得的。

[0046] 肽组分长度上可以含有 2 至约 1000 个氨基酸、2 至约 600 个氨基酸、2 至约 60 个氨基酸、5 至约 30 个氨基酸和 5 至约 25 个氨基酸。

[0047] 所述肽组分可以包括多个正电荷。例如,肽组分可以包括 1 至约 100 个正电荷、5 至约 30 个正电荷和 9 至约 15 个正电荷。肽组分的正电荷可以由带正电荷的赖氨酸或精氨酸残基提供。

[0048] 可以使用各式各样的肽来形成肽-核酸复合物。肽组分的质量通常小于约 120kDa,或小于约 60kDa,或小于约 30kDa。肽组分的肽可以任选地与聚合物轭合或衍生化,所述聚合物如聚环氧烷、聚环氧乙烷、聚环氧丙烷或其组合。例如,本发明复合物的肽组分可以与聚乙二醇 (PEG) 共价衍生化。

[0049] 促进多核苷酸递送的多肽的功能域对于递送 siNA 进入细胞的能力是有用的。这些功能域包括膜附着区、基因融合区和核苷酸结合区。膜附着描述了示例性的促进多核苷酸递送的多肽结合细胞膜的能力。基因融合特征反映了脱离细胞膜并进入细胞质的能力。

肽的膜附着区和基因融合区机械紧密地连接在一起（即，肽进入细胞的能力），因此从实验上可能难以区分开。最后，核苷酸结合描述了肽与核苷酸结合的能力。

[0050] 复合物的肽可以含有已知促进复合物跨屏障（如粘膜屏障）递送的结构特征。促进递送的特征的实例包括各种蛋白质转导域。肽组分可以是粘膜渗透性调节剂。

[0051] 本发明促进多核苷酸递送的多肽的蛋白质转导域实例包括：

[0052] 1. TAT 蛋白质转导域 (PTD) (SEQ ID NO :1) KRRQRRR；

[0053] 2. 穿透素 PTD (SEQ ID NO :2) RQIKIWFQNRRMKWKK；

[0054] 3. VP22 PTD (SEQ ID NO :3) DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVD；

[0055] 4. Kaposi FGF 信号序列 (SEQ ID NO :4) AAVALLPAVLLALLAP 和 (SEQ ID NO :5) AAVLLPVLLPVLLAAP；

[0056] 5. 人 β 3 整合素信号序列 (SEQ ID NO :6) VTVLALGALAGVGVG；

[0057] 6. gp41 融合序列 (SEQ ED NO :7) GALFLGWLGAAGSTMGA；

[0058] 7. 窄吻凯门鳄 (Caiman crocodylus) Ig(v) 轻链 (SEQ ID NO :8) MGLGLHLLVLAALQGA；

[0059] 8. hCT- 衍生肽 (SEQ ID NO :9) LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP；

[0060] 9. 转运体 (Transportan) (SEQ ID NO :10) GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL；

[0061] 10. 寡聚体 (Loligomer) (SEQ ID NO :11) TPPKKRKRKVEDPKKKK；

[0062] 11. 精氨酸肽 (SEQ ID NO :12) RRRRRRR；和

[0063] 12. 两亲性模型肽 (SEQ ID NO :13) KLALKLALKALKALKLA。

[0064] 本发明促进多核苷酸递送的多肽的病毒融合肽基因融合域的实例包括：

[0065] 1. 流感病毒 HA2 (SEQ ID NO :14) GLFGAIAGFIENGWEG；

[0066] 2. 仙台病毒 F1 (SEQ ID NO :15) FFGAVIGTIALGVATA；

[0067] 3. 呼吸道合胞病毒 F1 (SEQ ID NO :16) FLGFLLGVGSAIASGV；

[0068] 4. HIV gp41 (SEQ ID NO :17) GVFVLGFLGFLATAGS；和

[0069] 5. 埃博拉病毒 GP2 (SEQ ID NO :18) GAAIGLAWIPYFGPAA。

[0070] 在一些实施方案中，提供了引入 DNA 结合域或基序的促进多核苷酸递送的多肽，所述 DNA 结合域或基序在本发明的方法和组合物中促使多肽-siNA 络合物形成和 / 或促进 siNA 的递送。基于这点，示例性的 DNA 结合域包括各种“锌指”域，如针对下文表 1 中鉴别的 DNA 结合调节蛋白质和其他蛋白质所描述的（参见，如 Simpson 等，J. Biol. Chem. 278 : 28011-28018, 2003）。

[0071]

表 1：

[0072]

不同 DNA 结合蛋白质的示例性锌指基序

[0073]

肽	结构
PN183	(SEQ ID NO: 28) NH ₂ -KETWWETWWTEWSQPGRKKRRQRRRPPQ- 酰胺
PN183 类似物 1	(SEQ ID NO: 29) NH ₂ -WWTWWWWWWWEWSQPKKKKRRRRRRRPPQ- 酰胺
PN183 类似物 2	(SEQ ID NO: 30) NH ₂ -WWWWWWWWWSQPKKKKKKKKKK- 酰胺
PN183 类似物 3	(SEQ ID NO: 31) NH ₂ -WWWWWWWWWSQPRRRRRRRRR- 酰胺
PN183 类似物 4	(SEQ ID NO: 32) NH ₂ -KWWWWWWWWWEWSQPKKKKRRRRRRKKK- 酰胺
PN938	(SEQ ID NO: 33) NH ₂ -(Lys-His) ₁₀ - 酰胺
PN939	(SEQ ID NO: 34) PEG (2kDa)- (Lys-His) ₁₀ - 酰胺
PN951	(SEQ ID NO: 35) NH ₂ -(His) ₆ -Arg-Ser-Val-Cys-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Cys-Arg-Arg-Arg-Gly-Gly-Cys-Tyr-Try-Lys-Cys-Thr-Xaa-Arg-Pro-Tyr- 酰胺
PN970	(SEQ ID NO: 36) PEG (10kS.Mal)-(Lys) ₉ -Gly-Leu-Phe-Gly-Ala-Ile-Ala-Gly-Phe-Ile-Glu-Xaa-Gly-Trp-Glu-Gly-Met-Ile-Asp-Gly- 酰胺
PN826	(SEQ ID NO: 37) Ac-KGSKKAVTKAQQKKEGKKRKRKRKRKESYSVYVYKVLKQ- 酰胺
PN861	(SEQ ID NO: 38) Ac-(Arg) ₉ - 酰胺
PN924	(SEQ ID NO: 39) NH ₂ -(Lys) ₂₀ - 酰胺
PN859	(SEQ ID NO: 40) Ac-(Arg) ₁₈ - 酰胺
PN907	(SEQ ID NO: 41) PEG (10kS.Mal)-(Lys) ₃₀ - 酰胺
PN73	(SEQ ID NO: 42) NH ₂ -KGSKKAVTKAQQKKGKKRKRKRKRKESYSVYVYKVLKQ- 酰胺
PN526	(SEQ ID NO: 43) PEG1-KLALKLALKALKALKLA- 酰胺

[0084] 下文所附实施例中给出了用于本发明复合物的肽的另外实例。

[0085] 缩合复合物及其制剂

[0086] 本发明提供了肽-核糖核酸缩合复合物,所述肽-核糖核酸缩合复合物包括的粒子直径小于约 1000nm,为约 0.5nm 至约 400nm,约 10nm 至约 300nm 和约 40nm 至约 100nm。

[0087] 所述复合物的肽组分可以为粒子质量的 5-95%,或者为粒子质量的 45-95%。

[0088] 在本发明的一些实施方案中,通过以下方式从一个或多个核糖核酸物质和一个或多个肽组分提供肽-核酸复合物:将核糖核酸物质与肽组分在含水溶液中缩合,由此形成直径小于 1000nm 的粒子。

[0089] 一般而言,本发明的复合物包括由一个或多个肽和一个或多个核酸形成的肽-核

酸缩合物。所述缩合物在部分地由肽相对于核酸的氮 / 磷比 (N/P 比) 来表征。

[0090] 本发明的复合物可以包括直径小于 1000nm 的缩合粒子, 其中每个粒子包括至少 10 个双链核糖核酸 (dsRNA) 分子和至少 10 个肽。本文使用的“至少 10 个肽”是指偏摩尔量为 10 个肽分子, 所述肽分子的结构可以相同或不同。因此, “至少 10 个肽”可以是一种肽结构的偏摩尔量, 或者是两种或多种不同肽结构的偏摩尔量。

[0091] 通常, 本文使用的术语如“肽”和“核酸”以及“dsRNA”和“siRNA”, 是指那些分子的量足以形成本发明的复合物。换言之, 通常, 这些术语是指偏摩尔量而不是指个别的分子。例如, “肽”是一个或多个肽分子, 如阿伏加德罗常数的肽分子。“向核糖核酸物质添加两个肽”是指两种不同结构的肽各自以偏摩尔量与核糖核酸物质混合。

[0092] 络合物或缩合物中与核酸 (NA) 结合的肽的量可使用一分子对的肽: NA 配料比从所结合的核酸量获得, 所述肽: NA 配料比也称为氮 / 磷比 (N/P 比)。缩合之后溶液中剩余的游离肽量由物料平衡得出。因此, 本文的 N/P 配料比是指初始缩合溶液中一个肽组分与一个核酸物质的初始 N/P 配料比。

[0093] 通常, 溶液中核酸物质的浓度仅受其溶解度的限制。调节溶液的肽组分浓度以提供所需的 N/P 比。

[0094] 在一些实施方案中, 调节溶液肽组分的浓度以提供约 1 的组合 N/P 比。当 N/P 比为大约 1 时, 则根据离子电荷, 肽组分或核酸物质都不过量。

[0095] 在一些实施方案中, 调节溶液各种肽组分的浓度以提供约 0.2 至约 50、约 0.5 至约 20、约 0.5 至约 7 或约 0.5 至约 2.5 的 N/P 比。

[0096] 溶液的 pH 通常小于约 11, 小于约 9 和小于约 8。可任选地涡旋溶液以混合组分。

[0097] 在一些实施方案中, 通过向含有肽组分的溶液添加核酸物质来制备缩合复合物。

[0098] 在一些实施方案中, 溶液可以含有无机盐或有机盐。例如, 含水溶液可含有氯化钠, 所述氯化钠的浓度小于或等于约 1M, 小于或等于约 0.5M, 小于或等于约 0.25M。

[0099] 任选地, 可从溶液中分离特定粒度分布的肽 - 核酸缩合复合物。在一些实施方案中, 过滤含有肽 - 核酸缩合复合物的溶液以分离不同粒度的粒子。

[0100] 在其他实施方案中, 透析含有肽 - 核酸缩合复合物的溶液以除去过量或未结合的肽组分。

[0101] 在一些实施方案中, 将分离的肽 - 核酸粒子进行冷冻干燥。

[0102] 在本发明的一些实施方案中, 通过以下方式从一个或多个核糖核酸物质和一个或多个肽组分提供肽 - 核酸复合物: 将至少一个核糖核酸物质溶解于含水溶液, 然后向所述含水溶液添加至少一个肽组分, 从而使粒子缩合成直径小于 1000nm, 之后向所述含水溶液添加第二肽组分或后续肽组分, 由此增加所述粒子的质量。

[0103] 在本发明的一些实施方案中, 通过以下方式从一个或多个核糖核酸物质和一个或多个肽组分提供肽 - 核酸复合物: 将第一肽组分溶解于含水溶液, 然后向所述含水溶液添加所述核糖核酸物质, 从而使粒子缩合成直径小于 1000nm, 之后向所述含水溶液添加第二肽组分或后续肽组分, 由此增加所述粒子的质量。

[0104] 在本发明的一个方面中, 提供了肽 - 核酸复合物, 其中的肽组分通过其对核酸的相对亲和力进行选择。例如, 各种肽与核酸的相对结合分析通过测量肽对 SYBR 金核酸结合染料的置换来进行。通过鉴定肽组分对复合物中核酸的相对亲和力, 可以选择肽组分以改

变肽组分与核酸结合度。

[0105] 改变肽组分与核酸的结合度允许首先使用较强结合的肽组分、之后使用较弱结合的肽组分来形成缩合粒子,反之亦然,或者允许多次添加不同结合强度的组分。

[0106] 在一些实施方案中,希望与核酸物质缩合的第一肽组分具有比后续肽组分更高的对所述核酸物质的结合亲和力。在这些实施方案中,调节溶液中第一肽组分的浓度以提供约 0.2 至约 7,约 0.2 至约 2.5,或约 0.2 至约 1 的 N/P 比。在这些实施方案中,调节后续肽组分的浓度以提供约 0.2 至约 50,约 0.5 至约 20,约 0.5 至约 7,或约 0.5 至约 2.5 的 N/P 比。

[0107] 可逆结合的核糖核酸-肽缩合复合物包括核糖核酸和一定量带正电荷的核糖核酸结合肽,所述核糖核酸和核糖核酸结合肽形成了在细胞外生物环境中基本上稳定的核糖核酸-肽缩合物,并且在与细胞内的内体接触后可以释放出核糖核酸。

[0108] 提供了多种肽-核酸缩合物,其中的肽包括一定量的有效地结合核糖核酸的带正电荷的残基。核糖核酸-肽缩合物在细胞外的生物环境中基本上是稳定的,并且可以在细胞内以有效产生 RNAi 反应的方式释放核糖核酸。

[0109] 在本发明的一些方面中,使用试剂来交联肽-RNA 缩合物。例如,肽-RNA 缩合物的稳定性可以通过引入二醛基(如戊二醛)来交联肽或粒子上的表面氨基而增加。交联剂的其他实例包括甲醛、丙烯醛和二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)。交联的缩合复合物可以具有提高的对血清内切核酸酶代谢的抗性。

[0110] 在一些实施方案中,与核酸物质缩合的第一肽组分在添加后续肽组分之前进行交联。任选地,第一肽组分的缩合物可以在添加后续肽组分之后进行交联。在一些实施方案中,第一肽组分的缩合物在添加后续肽组分之前和之后进行交联。

[0111] 稳定肽-核糖核酸复合物的方法包括将所述复合物内的核糖核酸-结合肽与例如戊二醛交联剂进行交联。保护生物有机体内肽-核糖核酸复合物免受降解的方法包括使用例如戊二醛交联剂来交联所述复合物内的至少一部分肽。

[0112] 本发明的肽-核糖核酸复合物也可以通过添加表面改性剂如表面活性剂、中性脂质或聚环氧乙烷来稳定。例如,添加至缩合复合物溶液的聚乙二醇可以粘附至该复合物的粒子。例如,可以添加非离子的聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物,以稳定复合物的粒子。

[0113] 本文包括本发明复合物用于制备动物和人类 RNAi 疗法中使用的药剂的用途。

[0114] 核酸物质

[0115] 用于本发明的核酸物质可以是单链核酸、双链核酸、修饰的核酸或抗降解的核酸、RNA、DNA-RNA 嵌合体、反义核酸或核酶。

[0116] 关于这点,本发明提供了通过 RNA 干扰来调节基因表达的复合物、组合物和方法。本发明的复合物或组合物可以向细胞释放产生 RNAi 反应的核糖核酸物质。本发明的复合物或组合物在与细胞内的内体接触后可以向细胞释放核糖核酸物质。核糖核酸物质在细胞内的释放提供了细胞中基因表达的抑制。

[0117] 用于本发明的核糖核酸物质可以靶向各种基因。例如,本发明的 siRNA 物质具有与 TNF- α 基因区互补的序列。在本发明的一些实施方案中,复合物和组合物用于调节肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的表达。TNF- α 与例如肺部疾病中产生的炎性过程相关,并具有抗炎作用。通过递送本发明组合物来阻滞 TNF- α ,可用于治疗或预防类风湿性关节炎的病症

和 / 或症状。

[0118] 本发明提供了通过 RNA 干扰来调节 TNF- α 表达和活性的复合物、组合物和方法。

[0119] TNF- α 的表达和 / 或活性可通过向细胞递送例如 siRNA 分子 Inm-4 进行调节。Inm-4 是与人 TNF- α 基因序列同源的双链 21-nt siRNA 分子。Inm-4 在有义链上具有 3' dTdT 突出端,在反义链上具有 3' dAdT 突出端。Inm-4 的一级结构为

[0120] (SEQ ID NO :44) 有义

[0121] 5' -CCGUCAGCCGAUUUGCUAUdTdT

[0122] (SEQ ID NO :45) 反义

[0123] 5' -AUAGCAAAUCGGCUGACGGdTdT

[0124] TNF- α 的表达和 / 或活性可通过向细胞递送例如 siRNA 分子 LC20 进行调节。LC20 是与人 TNF- α 基因序列同源的双链 21-nt siRNA 分子。LC20 针对人 TNF- α 的 3'-UTR 区。LC20 具有 19 个碱基对,其中在有义链上具有 3' dTdT 突出端,在反义链上具有 3' dAdT 突出端。钠盐形式的分子量为 14, 298。LC20 的一级结构为

[0125] (SEQ ID NO :46) 有义

[0126] (5')GGGUCGGAACCCAAGCUUAdTdT

[0127] (SEQ ID NO :47) 反义

[0128] (5')UAAGCUUGGGUCCGACCCdTdA

[0129] 本发明的 siRNA 可以具有与病毒基因区互补的序列。例如,本发明的一些组合物和方法用于调节流感病毒基因组的表达。

[0130] 关于这点,本发明提供了通过 RNA 干扰来调节流感病毒表达及感染活性的组合物和方法。流感病毒的表达和 / 或活性可以通过向细胞递送例如短干扰 RNA 分子进行调节,所述短干扰 RNA 分子具有与流感病毒 RNA 聚合酶亚单元区互补的序列。例如,表 3 示出了与流感病毒 RNA 聚合物亚单元序列同源的双链 siRNA 分子。

[0131]

表 3 :

[0132]

靶向流感病毒的双链 siRNA 分子

[0133]

siRNA	亚单元	序列
G3789	PB2	(SEQ ID NO 48) CGGGACUCUAGCAUACUUAdTdT
		(SEQ ID NO 49) UAAGUAUGCUAGAGUCCCGdTdT
G3807	PB2	(SEQ ID NO 50) ACUGACAGCCAGACAGCGAdTdT
		(SEQ ID NO 51) UCGCUGUCUGGCUGUCAGUdTdT
G3817	PB2	(SEQ ID NO 52) AGACAGCGACCAAAAGAAUdTdT
		(SEQ ID NO 53) AUUCUUUUGGUCGUCUCUdTdT

G6124	PB1	(SEQ ID NO 54)	AUGAAGAUCUGUCCACCAdTdT
		(SEQ ID NO 55)	UGGUGGAACAGAUUCUCAdTdT
G6129	PB1	(SEQ ID NO 56)	GAUCUGUCCACCAUUGAAdTdT
		(SEQ ID NO 57)	UUCAAUGGUGGAACAGAUcTdT
G8282	PA	(SEQ ID NO 58)	GCAAUUGAGGAGUGCCUGAdTdT
		(SEQ ID NO 59)	UCAGGCACUCCUCAAUUGCdTdT
G8286	PA	(SEQ ID NO 60)	UUGAGGAGUGCCUGAUUAAdTdT
		(SEQ ID NO 61)	UUAUCAGGCACUCCUCAAdTdT
G1498	NP	(SEQ ID NO 62)	GGAUCUUAUUUCUUCGGAGdTdT
		(SEQ ID NO 63)	CUCCGAAGAAUAAGAUCcTdT

[0134] 本发明的 siRNA 可以具有与流感病毒 RNA 聚合酶亚单元区互补的序列。

[0135] 本发明提供了施用针对流感病毒 mRNA 的 siRNA 的组合物和方法,所述 siRNA 有效地下调了流感病毒 RNA,并由此减少、预防或改善流感病毒感染。

[0136] RNA 干扰疗法

[0137] 在一些实施方案中,本发明提供了复合物、组合物和方法,所述方法通过向受治疗者施用含有有效量 RNAi- 诱导复合物的组合物来抑制受治疗者靶转录物的表达,其中所述 RNAi- 诱导复合物如短干扰寡核苷酸分子或其前体。RNAi 使用小的干扰 RNA (siRNA) 来靶向信使 RNA (mRNA) 并减少翻译。例如,本发明使用的 siRNA 可以是用于 dicer 酶切加工的前体,如加工成 siRNA 的长 dsRNA。本发明提供了治疗或预防疾病或病征的方法,该疾病或病征与靶转录物的表达或靶转录物编码的肽或蛋白质的活性有关。

[0138] 可以使用基于 RNAi 的治疗策略,通过停止病毒或微生物的生长或功能以及通过停止疾病通路中内源性基因产物的功能,来治疗各式各样的疾病。

[0139] 在一些实施方案中,本发明提供了用于递送 RNAi- 诱导复合物的新型组合物和方法,所述 RNAi- 诱导复合物如短干扰寡核苷酸分子及其前体。特别地,本发明提供了含有 RNAi- 诱导复合物的组合物,该 RNAi- 诱导复合物靶向受治疗者细胞、组织和 / 或器官的一种或多种转录物。

[0140] siRNA 可以是具有长度约为 19 个核苷酸的互补区的两条 RNA 链。siRNA 任选地包括一个或两个单链突出端或环。

[0141] shRNA 可以是具有自互补区的 RNA 单链。所述 RNA 单链可以与茎和环,或者与 RNA 5' 部分和 / 或 3' 部分的一个或多个未配对的部分一起形成发夹结构。

[0142] 活性治疗剂可以是化学修饰的 siRNA,其对体内核酸酶降解具有改善的抗性和 / 或具有改善的细胞摄取,并且保留了 RNAi 活性。

[0143] 本发明的 siRNA 物质可以具有与靶基因区互补的序列。本发明的 siRNA 可以具有 29-50 个碱基对,例如,dsRNA 具有与靶基因区互补的序列。可选地,双链核酸可以是 dsDNA。

[0144] 在一些实施方案中,活性剂可以为短干扰核酸 (siNA)、短干扰 RNA (siRNA)、双链 RNA (dsRNA)、微 RNA 或调节基因产物表达的短发夹 RNA (shRNA)。

[0145] 提供了类似的方法和组合物,该方法和组合物靶向表达了与受治疗者特定疾病病征相关的一种或多种不同的基因,所述基因包括大量基因中的任何一种,已知其表达作为与选定疾病病征相关的偶然因素或必然因素而异常增加。

[0146] 本发明的 RNAi- 诱导复合物可以与其他用于疾病病征的已知治疗一起施用。

[0147] 在一些实施方案中,本发明的特征组合物含有与促进递送的复合物混合或络合或吻合的小核酸分子,如短干扰核酸、短干扰 RNA、双链 RNA、微 RNA 或短发夹 RNA。

[0148] 本文使用的术语“短干扰核酸”、“siNA”、“短干扰 RNA”、“siRNA”、“短干扰核酸分子”、“短干扰寡核苷酸分子”以及“化学修饰的短干扰核酸分子”,是指例如能够通过以序列特异性方式介导 RNA 干扰 (RNAi) 或基因沉默来抑制或下调基因表达或病毒复制的任何核酸分子。

[0149] 在一些实施方案中,siNA 是包括自互补性有义区和反义区的双链多核苷酸分子,其中所述反义区包括与用于下调表达的靶核糖核酸分子中核苷酸序列互补的核苷酸序列或其部分,所述有义区包括与所述靶核糖核酸序列或其部分相对应(即,序列与其基本同一)的核苷酸序列。

[0150] “siNA”指小干扰核酸,例如 siRNA,其为短长度的双链核酸或其任选的较长前体。在一些实施方案中,本发明有用的 siNA 的长度被优化为约 20bp 至 50bp 的长度。但是,对于有用的 siNA (包括 siRNA) 的长度没有特殊限制。例如,siNA 起初可以以前体形式存在于细胞中,该前体形式在本质上不同于一经递送或递送至靶细胞后存在并发挥基因沉默活性的 siNA 的最终形式或加工形式。例如,siNA 的前体形式包括前体序列元件,所述前体序列元件在递送时或递送后被加工、降解、改变或裂解得到在细胞内具介导基因沉默活性的 siNA。在一些实施方案中,有用的 siNA 应具有前体的长度,例如约 100-200 个碱基对,或 50-100 个碱基对,或小于约 50 个碱基对,该长度在靶细胞内获得了具有活性的加工的 siNA。在其他实施方案中,有用的 siNA 或 siNA 前体的长度为大约 10bp 至 49bp,或 15bp 至 35bp,或约 21bp 至 30bp。

[0151] 在本发明的一些实施方案中,使用促进多核苷酸递送的多肽来促使比常规 siNA (包括 siNA 的大核酸前体) 更大的核酸分子的递送顺利进行。例如,可以采用本文的方法和组合物来促进较大的核酸的递送,所述较大的核酸代表所需 siNA 的“前体”,其中在递送至靶细胞之前、期间或之后所述前体的氨基酸被裂解或以其他方式加工形成用于调节靶细胞内基因表达的活性 siNA。

[0152] 例如,可以选择作为环状单链多核苷酸的 siNA 前体多核苷酸,其具有两个或多个包括自互补性有义区和反义区的环结构和茎,其中所述反义区包括与靶核酸分子或其部分的核苷酸序列互补的核苷酸序列,所述有义区具有与靶核酸序列或其部分相对应的核苷酸序列,并且其中该环状多核苷酸可以在体内或体外被加工生成能够介导 RNAi 的活性 siNA 分子。

[0153] 本发明的 siNA 分子,特别是非前体形式,可少于 30 个碱基对,或者为约 17-19bp,

或 19-21bp, 或 21-23bp。

[0154] siRNA 可以介导哺乳动物系统中的选择性基因沉默。具有短环并且在茎中具有 19 至 27 个碱基对的发夹 RNA 也选择性地使与双链茎中的序列同源的基因表达沉默。哺乳动物细胞可将短发夹 RNA 转化为 siRNA, 以介导选择性基因沉默。

[0155] RISC 介导单链 RNA 的裂解, 该单链 RNA 具有与 siRNA 双链体反义链互补的序列。靶 RNA 的裂解在与 siRNA 双链体反义链互补的区域内发生。当具有 21 个核苷酸的 siRNA 双链体含有两个核苷酸 3' 突出端时, 通常最具活性。

[0156] 将具有 2-核苷酸 3' 突出端的 21-mer siRNA 双链体的 3' 突出端片段替换为脱氧核糖核酸不会对 RNAi 活性产生不利的影 响。允许将 siRNA 每端多达 4 个的核苷酸替换为脱氧核糖核酸, 但是完全替换为脱氧核糖核酸可导致无 RNAi 活性。

[0157] 可选地, siRNA 可以作为一种或多种转录产物进行递送, 所述转录产物由编码一种或多种 siRNA 并指导它们在靶细胞内表达的多核苷酸载体表达。在这些实施方案中, 有待在靶细胞内表达的 siRNA 最终转录产物的双链部分长度可以为, 例如 15bp 至 49bp, 15bp 至 35bp, 或约 21bp 至 30bp。

[0158] 在本发明的一些实施方案中, 两条链被配对的 siRNA 双链区可以含有凸起或错配部分, 或两者。两条链被配对的 siRNA 双链部分不限于完全配对的核苷酸片段, 并且可以含有例如因错配 (对应的核苷酸不是互补的)、凸起 (在一条链上缺少对应的互补核苷酸) 或悬垂而导致的非配对部分。非配对部分的包含程度为它们不干扰 siRNA 的形成。在一些实施方案中, “凸起” 可包括 1 至 2 个非配对的核苷酸, 并且两条链配对的 siRNA 双链区可以含有约 1 至 7, 或约 1 至 5 个凸起。此外, siRNA 双链区中包含的 “错配” 部分可以以约 1 至 7, 或约 1 至 5 的数目存在。通常在错配的情况中, 一个核苷酸为鸟嘌呤, 另一个为尿嘧啶。例如, 所述错配可归因于编码有义 RNA 的相应 DNA 中 C 至 T 的突变, G 至 A 的突变, 或其组合 (mixtures), 但也包括其他的原因。

[0159] 本发明 siRNA 的末端结构可以是平端或黏端 (突出端), 只要 siRNA 保留其使靶基因表达沉默的活性即可。黏端 (突出端) 结构不限于 3' 突出端, 其还包括 5' 突出端结构, 只要其保留诱导基因沉默的活性即可。此外, 突出端核苷酸的数目不限于 2 个或 3 个核苷酸, 还可以为任何数目的核苷酸, 只要其保留诱导基因沉默的活性即可。例如, 突出端可以包括 1 至约 8 个核苷酸, 或 2 至 4 个核苷酸。

[0160] 具有黏端 (突出端) 结构的 siRNA 长度可以借助各端配对的双链体部分和任何突出端部分来表示。例如, 带有 2-bp 3' 反义突出端的 25/27-mer siRNA 双链体具有 25-mer 有义链和 27-mer 反义链, 其中配对部分的长度为 25bp。

[0161] 任何突出端序列都可以具有对靶基因的低特异性, 并且可以不与靶基因序列互补 (反义) 或同一 (有义)。只要 siRNA 保留基因沉默的活性, 其就可以在突出端部分中包含低分子量结构, 所述低分子量结构例如天然 RNA 分子, 如 tRNA、rRNA、病毒 RNA; 或人工 RNA 分子。

[0162] siRNA 的末端结构可以具有茎-环结构, 在该茎-环结构中, 双链核酸一侧的末端通过连接体核酸如连接体 RNA 连接。双链区 (茎-环部分) 的长度可以为, 例如 15bp 至 49bp, 或 15bp 至 35bp, 或约 21bp 至 30bp 长。可选地, 有待在靶细胞中表达的最终转录产物——双链区的长度可以为, 例如, 约 15bp 至 49bp, 或 15bp 至 35bp, 或约 21bp 至 30bp 长。

[0163] siNA 可以含有单链多核苷酸,所述单链多核苷酸具有与靶核酸分子或其部分的核苷酸序列互补的核苷酸序列,其中所述单链多核苷酸可含有末端磷酸基团,如 5' - 磷酸(参见,例如 Martinez 等, Cell. 110 :563-574, 2002 和 Schwarz 等, Molecular Cell 10 : 537-568, 2002) 或 5' , 3' - 二磷酸。

[0164] 本文使用的术语 siNA 分子不限于仅含有天然存在的 RNA 或 DNA 的分子,还包括化学修饰的核苷酸和非核苷酸。在一些实施方案中,本发明的短干扰核酸分子缺少含有 2' - 羟基 (2' -OH) 的核苷酸。在一些实施方案中,短干扰核酸无需存在具有 2' - 羟基的核苷酸来介导 RNAi,因而本发明的短干扰核酸分子任选地不包括任何核糖核苷酸(如,具有 2' -OH 的核苷酸)。但是,无需在 siNA 分子内存在核糖核苷酸以支持 RNAi 的 siNA 分子可以具有附着的一个或多个连接体,或其他附着或缔合的基团、部分,或含有一个或多个带有 2' -OH 基团的核苷酸的链。siNA 分子可包括的核糖核苷酸为核苷酸位置的至少约 5%、10%、20%、30%、40% 或 50%。

[0165] 本文使用的术语 siNA 包括能够介导序列特异性 RNAi 的核酸分子,例子如短干扰 RNA (siRNA) 分子、双链 RNA (dsRNA) 分子、微 RNA 分子、短发夹 RNA (shRNA) 分子、短干扰寡核苷酸分子、短干扰核酸分子、短干扰修饰的寡核苷酸分子、化学修饰的 siRNA 分子和转录后基因沉默 RNA (ptgsRNA) 分子等。

[0166] 在一些实施方案中, siNA 分子包括分开的有义序列和反义序列或分开的有义区和反义区,其中所述有义区和反义区通过核苷酸连接体分子或非核苷酸连接体分子共价连接,或者通过离子相互作用、氢键、范德华相互作用、疏水性相互作用和 / 或堆积作用进行非共价连接。

[0167] “反义 RNA”是具有与靶基因 mRNA 互补的序列的 RNA 链,其可通过结合靶基因 mRNA 来诱导 RNAi。

[0168] “有义 RNA”是具有与反义 RNA 互补的序列的 RNA 链,并退火为其互补性的反义 RNA 以形成 siRNA。

[0169] 本文使用的术语“RNAi 构建体”或“RNAi 前体”是指诱导 RNAi 的复合物,如小干扰 RNA (siRNA)、发夹 RNA,及其他可在体内裂解形成 siRNA 的 RNA 种类。本文的 RNAi 前体还包括能够使在细胞中形成 dsRNA 或发夹 RNA 的转录物和 / 或可以在体内产生 siRNA 的转录物生成的表达载体(也称为 RNAi 表达载体)。

[0170] si 杂交分子是具有类似于 siRNA 功能的双链核酸。si 杂交分子是由 RNA 链和 DNA 链构成的,而不是双链的 RNA 分子。优选地, RNA 链是结合靶 mRNA 的反义链。由 DNA 链与 RNA 链杂交形成的 si 杂交分子具有杂交的互补部分并且优选有至少一个 3' 突出端。

[0171] 用于本发明的 siNA 可以由两个分开的寡核苷酸装配,在该寡核苷酸中一条链是有义链而另一条是反义链,其中所述反义链和有义链是自互补的(即,每条链包括与另一条链中的核苷酸序列互补的核苷酸序列;比如所述反义链和有义链形成双链体或双链结构,例如其中的双链区为约 19 个碱基对)。所述反义链可包括与靶核酸分子或其部分中的核苷酸序列互补的核苷酸序列,而所述有义链可包括与该靶核酸序列或其部分相对应的核苷酸序列。可选地, siNA 可以由一个寡核苷酸装配,在该寡核苷酸中 siNA 的自互补性有义区和反义区经由基于核酸或基于非核酸的连接体进行连接。

[0172] 在一些实施方案中,用于细胞内递送的 siNA 可以是带有双链体、不对称双链体、

发夹或不对称发夹二级结构的多核苷酸,其具有自互补性有义区和反义区,其中所述反义区包括与分开的靶核酸分子或其部分中的核苷酸序列互补的核苷酸序列,而所述有义区包括与该靶核酸序列或其部分相对应的核苷酸序列。

[0173] 可在 siNA 中做出的化学修饰的实例包括磷硫酰核苷酸间键合、2' - 脱氧核糖核苷酸、2' -O- 甲基核糖核苷酸、2' - 脱氧 -2' - 氟代核糖核苷酸、“通用碱基”核苷酸、“无环”核苷酸、5-C- 甲基核苷酸,和末端甘油基和 / 或倒置的脱氧无碱基残基掺入。

[0174] siNA 分子的反义区可包括位于所述反义区 3' - 端的磷硫酰核苷酸间键合。反义区可包括位于所述反义区 5' - 端的约 1 至约 5 个的磷硫酰核苷酸间键合。siNA 分子的 3' - 端核苷酸突出端可包括在核酸的糖、碱基或骨架经化学修饰的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。3' - 端核苷酸突出端可包括一个或多个通用碱基核糖核苷酸。3' - 端核苷酸突出端可包括一个或多个无环核苷酸。

[0175] 例如,化学修饰的 siNA 在一条链中可具有 1,2,3,4,5,6,7,8 或更多个磷硫酰核苷酸间键合,或者在每条链中可具有 1 至 8 个或更多个磷硫酰核苷酸间键合。磷硫酰核苷酸间键合可存在于 siNA 双链体的一条或两条寡核苷酸链,例如存在于有义链、反义链或两条链。

[0176] siNA 分子可包括位于有义链、反义链或两条链的 3' - 端、5' - 端或 3' - 端和 5' - 端两者的一个或多个磷硫酰核苷酸间键合。例如,示例性的 siNA 分子可包括位于有义链、反义链或两条链的 5' - 端的 1,2,3,4,5 或更多个连续的磷硫酰核苷酸间键合。

[0177] 在一些实施方案中,siNA 分子在有义链、反义链或两条链中包括 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 或更多个嘧啶磷硫酰核苷酸间键合。

[0178] 在一些实施方案中,siNA 分子在有义链、反义链或两条链中包括 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 或更多个嘌呤磷硫酰核苷酸间键合。

[0179] siNA 分子可包括环状核酸分子,其中 siNA 长度为约 38 至约 70 个核苷酸,例如,约 38,40,45,50,55,60,65 或 70 个核苷酸,具有约 18 至约 23 个碱基对,例如,约 18,19,20,21,22 或 23 个碱基对,其中环状寡核苷酸形成了具有约 19 个碱基对和 2 个环的哑铃形结构。

[0180] 环状 siNA 分子可包含两个环基序,其中 siNA 分子的一个或两个环部分是生物可降解的。例如,环状 siNA 分子的环部分在体内可被转化生成带有 3' - 端突出端的双链 siNA 分子,如包括约 2 个核苷酸的 3' - 端核苷酸突出端。

[0181] siNA 分子中修饰的核苷酸可在反义链、有义链或两者中。例如,修饰的核苷酸可具有 Northern 构象(如, Northern 假旋转环,参见,例如 Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag 编,1984)。具有 Northern 构型的核苷酸实例包括锁核酸(LNA)核苷酸(如,2' -O,4' -C- 亚甲基-(D- 呋喃核糖基)核苷酸)、2' - 甲氧基乙氧基(MOE)核苷酸、2' - 甲基-硫代-乙基核苷酸、2' - 脱氧-2' - 氟代核苷酸、2' - 脱氧-2' - 氯代核苷酸、2' - 叠氨基核苷酸和 2' -O- 甲基核苷酸。

[0182] 化学修饰的核苷酸可抵抗核酸酶降解,而同时保持介导 RNAi 的能力。

[0183] 双链 siNA 分子的反义链具有位于该反义链的 3' - 端、5' - 端或 3' - 端和 5' - 端两者的端帽部分,如倒置的脱氧无碱基部分。

[0184] 轭合物的实例包括在 Vargeese 等人 2003 年 4 月 30 日提交的美国申请序号 10/427,160 中所描述的轭合物和配体,通过引用将其全部内容(包括附图)并入本文。

[0185] 在本发明的一些实施方案中,所述轭合物可经由生物可降解的连接体来共价连接于化学修饰的 siNA 分子。例如,轭合物分子可在化学修饰的 siNA 分子的有义链、反义链或两条链的 3' - 端进行连接。

[0186] 在一些实施方案中,轭合物分子在化学修饰的 siNA 分子的有义链、反义链或两条链的 5' - 端进行连接。在一些实施方案中,轭合物分子在化学修饰的 siNA 分子的有义链、反义链或两条链的 3' - 端和 5' - 端进行连接,或其任何组合。

[0187] 在一些实施方案中,轭合物分子包括促使化学修饰的 siNA 分子递送进入诸如细胞的生物系统中的分子。

[0188] 在一些实施方案中,连接于化学修饰的 siNA 分子的轭合物分子为聚乙二醇、人血清白蛋白,或介导细胞摄取的细胞受体的配体。本发明所涵盖的可连接于化学修饰的 siNA 分子的具体轭合物分子的实例在 Vargeese 等人的美国专利公布文本第 20030130186 号和美国专利公布文本第 20040110296 号中描述,由此通过引用将各篇的全部内容并入。

[0189] siNA 可包含连接 siNA 有义区与 siNA 反义区的核苷酸连接体、非核苷酸连接体或混合的核苷酸 / 非核苷酸连接体。在一些实施方案中,核苷酸连接体的长度可为 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 或 10 个核苷酸。在一些实施方案中,核苷酸连接体可为核酸适配子。本文使用的术语“适配子”或“核酸适配子”包括与靶分子特异性结合的核酸分子,其中所述核酸分子包含由其自然环境中的靶分子识别的序列。或者,适配子是与靶分子结合的核酸分子,其中该靶分子不容易与核酸结合。

[0190] 例如,可使用适配子来结合蛋白质的配体结合域,从而防止天然存在的配体与蛋白质的相互作用。参见,例如 Gold 等, *Annu. Rev. Biochem.* 64 :763, 1995 ; Brody 和 Gold, *J. Biotechnol.* 74 :5, 2000 ; Sun, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2 :100, 2000 ; Kusser, *J. Biotechnol.* 74 :27, 2000 ; Hermann 和 Patel, *Science* 287 :820, 2000 ; 以及 Jayasena, *Clinical Chemistry* 45 :1628, 1999。

[0191] 非核苷酸连接体可以为无碱基核苷酸、聚醚、多胺、聚酰胺、肽、碳水化合物、脂质、聚合烃或其他聚合物(如聚乙二醇,比如具有 2 至 100 个乙二醇单元的那些)。具体的实例包括由以下文献描述的那些: Seela 和 Kaiser, *Nucleic Acids Res.* 18 :6353, 1990 及 *Nucleic Acids Res.* 15 :3113, 1987 ; Cload 和 Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* 113 :6324, 1991 ; Richardson 和 Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* 113 :5109, 1991 ; Ma 等, *Nucleic Acids Res.* 21 :2585, 1993 及 *Biochemistry* 32 :1751, 1993 ; Durand 等, *Nucleic Acids Res.* 18 :6353, 1990 ; McCurdy 等, *Nucleosides & Nucleotides* 10 :287, 1991 ; Jschke 等, *Tetrahedron Lett.* 34 :301, 1993 ; Ono 等, *Biochemistry* 30 :9914, 1991 ; Arnold 等, 国际公布文本第 W0 89/02439 号 ; Usman 等, 国际公布文本第 W0 95/06731 号 ; Dudycz 等, 国际公布文本第 W0 95/11910 号, 以及 Ferentz 和 Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* 113 :4000, 1991。

[0192] “非核苷酸连接体”是指可掺入核酸链中一个或多个核苷酸单元位置处的基团或化合物,包括糖和 / 或磷酸置换,并且其允许剩余的碱基表现出它们的酶活性。所述基团或化合物可以是无碱基的,因为其不含有通常识别的例如位于糖 C1 位的核苷酸碱基,如腺苷、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶。

[0193] 在一些实施方案中,修饰的 siNA 分子可具有磷酸骨架修饰,包括一个或多个硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、磷酸三酯、吗啉代、酰胺化氨基甲酸酯、羧甲基、乙酰

基酰胺化物 (acetamidate)、聚酰胺、磺酸酯、磺酰胺、氨基磺酸酯、甲缩醛 (formacetal)、硫代甲缩醛和 / 或烷基甲硅烷基置换。寡核苷酸骨架修饰的实例在以下中给出: Hunziker 和 Leumann, *Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties*, in *Modern Synthetic Methods* (核酸类似物: 在现代合成方法中的合成和性质), VCH, pp. 331-417, 1995, 以及 Mesmaeker 等, *Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides*, in *Carbohydrate Modifications in Antisense Research* (反义研究的碳水化合物修饰中寡核苷酸的新型骨架置换), ACS, pp. 24-39, 1994。

[0194] 可进行化学修饰的 siNA 分子通过以下步骤合成: (a) 合成 siNA 分子的两条互补链; 和 (b) 在适合获得双链 siNA 分子的条件下使两条互补链退火在一起。在一些实施方案中, siNA 分子互补部分的合成通过固相寡核苷酸合成进行, 或者通过固相串联寡核苷酸合成进行。

[0195] 使用本领域已知的方案来合成寡核苷酸 (如, 某些修饰的寡核苷酸或缺少核糖核苷酸的寡核苷酸部分), 例如在以下文献中所描述的: Caruthers 等, *Methods in Enzymology* 211:3-19, 1992; Thompson 等, 国际 PCT 公布第 WO 99/54459 号; Wincott 等, *Nucleic Acids Res.* 23:2677-2684, 1995; Wincott 等, *Methods Mol. Bio.* 74:59, 1997; Brennan 等, *Biotechnol Bioeng.* 61:33-45, 1998; 以及 Brennan, 美国专利第 6,001,311 号。RNA (包括本发明某些 siNA 分子) 的合成遵循一般的规程, 例如在以下文献中所描述的: Usman 等, *J. Am. Chem. Soc.* 109:7845, 1987; Scaringe 等, *Nucleic Acids Res.* 18:5433, 1990; 以及 Wincott 等, *Nucleic Acids Res.* 23:2677-2684, 1995; Wincott 等, *Methods Mol. Bio.* 74:59, 1997。

[0196] 本文使用的“不对称发夹”是线性 siNA 分子, 其包括反义区、包含核苷酸或非核苷酸的环部分, 和有义区, 所述有义区包括的核苷酸与所述反义区相比更少, 减少的程度为所述有义区具有足够的互补核苷酸来与所述反义区进行碱基配对并形成带环的双链体。

[0197] 本文使用的“不对称双链体”是具有两条分开的链的 siNA 分子, 所述两条分开的链包括有义区和反义区, 其中所述有义区包括的核苷酸与所述反义区相比更少, 减少的程度为所述有义区具有足够的互补核苷酸来与所述反义区进行碱基配对并形成双链体。

[0198] 本文使用的“调节基因表达”是上调或下调靶基因的表达, 其包括上调或下调细胞中存在的 mRNA 水平, 或 mRNA 翻译, 或由靶基因编码的蛋白质或蛋白质亚基的合成。

[0199] 本文使用的术语“抑制”、“下调”或“减少表达”是指基因表达、或编码一个或多个蛋白质或蛋白质亚基的 RNA 分子或等价的 RNA 分子的水平、或由靶基因编码的一个或多个蛋白质或蛋白质亚基的水平或活性, 被减少到不存在本发明的核酸分子 (如 siNA) 时所观察到的水平之下。

[0200] 本文使用的“基因沉默”是指细胞中基因表达的部分或完全抑制, 并且还可以称为“基因敲低”。基因沉默的程度可通过本领域已知的方法来确定, 其中的一些方法概述于国际公布文本第 WO 99/32619 号。

[0201] 本文使用的术语“核糖核酸”和“RNA”是指含有至少一个核糖核苷酸残基的分子。核糖核苷酸是在 β -D-核糖-呋喃糖部分的 2' 位置处带有羟基的核苷酸。这些术语包括双链 RNA, 单链 RNA, 分离的 RNA 如部分纯化的 RNA、基本纯的 RNA, 合成 RNA, 重组产生的 RNA, 以及通过添加、缺失、置换、修饰和 / 或改变一个或多个核苷酸而不同于天然存在的 RNA 的

修饰和改变的 RNA。RNA 的改变可包括例如向 siNA 的端部添加非核苷酸物质,或例如在 RNA 的一个或多个核苷酸内部添加非核苷酸物质。

[0202] RNA 分子中的核苷酸包括非标准核苷酸,如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些改变的 RNA 被称为类似物。

[0203] “高度保守的序列区”是指靶基因中核苷酸序列的一个或多个区不会显著地从一代变化至另一代,或者从一种生物系统变化至另一种生物系统。

[0204] “有义区”是指与 siNA 分子的反义区具有互补性的 siNA 分子的核苷酸序列。此外, siNA 分子的反义区可包括与靶核酸序列具有同源性的核酸序列。

[0205] “反义区”是指与靶核酸序列具有互补性的 siNA 分子的核苷酸序列。此外, siNA 分子的反义区可包括与 siNA 分子的反义区具有互补性的核酸序列。

[0206] “靶核酸”是指其表达或活性即将被调节的任何核酸序列。靶核酸可为 DNA 或 RNA。

[0207] “互补性”是指核酸可以通过传统的沃森-克里克结合方式或通过其他非传统的结合方式与另一核酸序列一起形成氢键。

[0208] 本文使用的术语“生物可降解的连接体”是指被设计为连接一个分子与另一个分子的生物可降解的连接体的核酸或非核酸连接体分子,所述一个分子与另一个分子例如生物活性分子与 siNA 分子,或 siNA 分子的反义链与反义链。对生物可降解的连接体进行设计,使其稳定性可被调节以用于特定目的,如递送至特定的组织或细胞类型。基于核酸的生物可降解的连接体分子的稳定性可进行不同的调节,例如,通过组合核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸和化学修饰的核苷酸,所述化学修饰的核苷酸如 2' -O- 甲基、2' - 氟代、2' - 氨基、2' -O- 氨基、2' -C- 烯丙基、2' -O- 烯丙基及其他 2' - 修饰的或碱基修饰的核苷酸。生物可降解的核酸连接体分子可以是二聚体、三聚体、四聚体或较长的核酸分子,例如长度为约 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 或 20 个核苷酸的寡核苷酸;或者可包括一个带有基于磷的键合的核苷酸,所述基于磷的键合例如氨基磷酸酯键合或磷酸二酯键合。生物可降解的核酸连接体分子还可包括核酸骨架、核酸糖或核酸碱基修饰。

[0209] 就本文描述的 2' - 修饰的核苷酸而言,“氨基”是指 2' -NH₂ 或 2' -O--NH₂, 其可以是修饰或未修饰的。此类修饰的基团在例如 Eckstein 等人的美国专利第 5, 672, 695 号和 Matulic-Adamic 等人的美国专利第 6, 248, 878 号中描述。

[0210] 施用

[0211] 例如,用于递送本发明使用的核酸分子的一些方法在以下文献中描述: Akhtar 等, Trends Cell Bio. 2 :139, 1992; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, Akhtar 编, 1995; Maurer 等, Mol. Membr. Biol. 16 :129-140, 1999; Hofland 和 Huang, Handb. Exp. Pharmacol. 137 :165-192, 1999; 以及 Lee 等, ACS Symp. Ser. 752 : 184-192, 2000。Sullivan 等人的国际 PCT 公布文本第 WO 94/02595 号进一步描述了用于递送酶核酸分子的一般方法。可以利用这些方案来补充或完善本发明所涵盖的任何核酸分子的实际递送。

[0212] 核酸分子和肽可通过本领域技术人员已知的各种方法来施用至细胞,包括但不限于在单独含有 siNA 和肽的剂型内施用,或者在进一步含有一种或多种其他组分的剂型内施用,所述其他组分如药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂、佐剂、乳化剂、缓冲剂、稳定剂、防腐剂等。在某些实施方案中, siNA 和 / 或肽可被包裹入脂质体中,通过离子电渗疗法

施用或者引入其他的基质中施用,如水凝胶、环糊精、生物可降解的纳米胶囊、生物粘附微球或蛋白质的载体(参见,例如, O' Hare 和 Normand, 国际 PCT 公布文本第 WO 00/53722 号)。或者,核酸/肽/基质组合可通过直接注射或通过使用输液泵来进行局部递送。本发明核酸分子的直接注射(无论是皮下、肌内还是皮内注射),均可使用标准的针和注射器方法或者通过无针技术来进行,所述无针技术如以下描述的那些:Conry 等, Clin. Cancer Res. 5 :2330-2337, 1999, 以及 Barry 等, 国际 PCT 公布文本第 WO 99/31262 号。

[0213] 本发明的组合物可有效地用作药物。所述药物预防、调节了患者疾病状态或其他不利情况的发生或严重程度,或者对患者疾病状态或其他不利情况进行治疗(使一种或多种症状减轻至可检测或可测量的程度)。

[0214] 因此,在其他实施方案中,本发明提供了药物组合物和方法,其特征在于存在或施用了一种或多种聚核酸,所述聚核酸通常为与肽组合、络合或轭合的一种或多种 siNA,任选地与药学上可接受的载体如稀释剂、稳定剂、缓冲剂等进行配制。

[0215] 本发明通过提供用以调节与受治疗者特定疾病状态或其他不利情况相关的基因表达的短干扰核酸(siNA)分子,实现了其他的目的和优势。通常,siNA 靶向的基因是作为与受治疗者疾病状态或不利情况相关的偶然因素或必然因素以升高的水平表达的基因。由于这个原因,siNA 将基因表达有效地下调至预防、减轻一种或多种相关疾病症状严重程度或减少一种或多种相关疾病症状发生的水平。或者,对于各种截然不同的疾病模型而言,靶基因的表达不会作为疾病或其他不利情况的结果或后果而必然升高,靶基因的下调通过降低基因表达仍然产生治疗效果(即,减少选定的 mRNA 和/或靶基因蛋白质产物的水平)。或者,本发明的 siNA 可靶向较低表达的一种基因,其导致表达受靶基因产物或活性负调节的“下游”基因的上调。

[0216] 本发明的这种 siNA 可以以任何形式施用,例如经皮施用或通过局部注射施用。提供了类似的方法和组合物,该方法和组合物靶向表达了与动物受治疗者选定疾病病征相关的一种或多种不同的基因,所述基因包括大量基因中的任何一种,已知其表达作为与选定疾病病征相关的偶然因素或必然因素而异常增加。

[0217] 本发明的负电荷多核苷酸(如 RNA 或 DNA)可通过任何标准的方式在具有或没有稳定剂、缓冲剂等等情况下形成药物组合物而施用于患者。当需要使用脂质体递送机理时,遵循形成脂质体的标准规程。本发明的组合物还可被配制并用作口服施用的片剂、胶囊剂或酞剂,直肠施用的栓剂,可注射施用的无菌溶液、悬浮液,以及本领域已知的其他组合物。

[0218] 本发明还包括此处所描述组合物的药学上可接受的剂型。这些剂型包括上述复合物的盐,如酸加成盐,例如盐酸盐、氢溴酸盐、乙酸盐和苯磺酸盐。

[0219] siNA 还可以以栓剂的形式施用,如用于药物的直肠施用。这些组合物可通过将药物与适宜的无刺激性赋形剂混合而制备,所述赋形剂在常温为固体但在直肠温度为液体,因而其在直肠中可熔化并释放药物。这样的材料包括可可脂和聚乙二醇。

[0220] 核酸分子可通过本领域技术人员已知的多种方法来施用至细胞,包括但不限于包裹入脂质体中,通过离子电渗疗法施用或者通过引入其他的基质中施用,如生物可降解的聚合物、水凝胶、环糊精(参见,例如, Gonzalez 等, Bioconjugate Chem. 10 :1068-1074, 1999; Wang 等, 国际 PCT 公布文本第 WO 03/47518 和 WO 03/46185 号)、聚(乳酸-乙醇酸共聚物)(PLGA) 和 PLCA 微球(参见,例如美国专利第 6, 447, 796 号和美国专利申请公

布号 US2002130430)、生物可降解的纳米胶囊、生物粘附微球;或者通过蛋白质载体施用(O' Hare 和 Normand, 国际 PCT 公布第 WO 00/53722 号)。或者,核酸/基质组合通过直接注射或通过使用输液泵来进行局部递送。本发明核酸分子的直接注射(无论是皮下、肌内还是皮内注射),均可使用标准的针和注射器方法或者通过无针技术来进行,所述无针技术如以下文献描述的那些:Conry 等, Clin. Cancer Res. 5 :2330-2337, 1999, 以及 Barry 等, 国际 PCT 公布文本第 WO 99/31262 号。本发明的分子可用作药物。所述药物预防、调节了受治疗者疾病状态的发生,或者对受治疗者疾病状态进行治疗(使症状减轻至某种程度,优选使所有的症状减轻至某种程度)。

[0221] 可将本发明阳离子肽中的任何一种或组合进行选择或组合,以获得有效的促进多核苷酸递送的多肽试剂,从而诱导或促使本发明方法和组合物中的 siNA 的细胞内递送。

[0222] 药物组合物

[0223] 本发明还包括此处描述复合物的药学上可接受的剂型或组合物。这些剂型包括上述复合物的有机盐和无机盐,如酸加成盐,例如盐酸盐、氢溴酸盐、乙酸盐和苯磺酸盐。

[0224] 含水悬浮液包含与适用于制备含水悬浮液的赋形剂混合的活性物质。所述赋形剂为悬浮剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄耆树胶和阿拉伯胶;分散剂或润湿剂,其可以为天然存在的磷脂(如卵磷脂),或烯化氧(alkylene oxide)与脂肪酸的缩合产物(例如聚氧乙烯硬脂酸酯),或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物(例如十七乙烯氧基十六烷醇),或环氧乙烷与由脂肪酸和己糖醇衍生的部分酯的缩合产物(如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯),或环氧乙烷与由脂肪酸和己糖醇衍生的部分酯的缩合产物(例如聚乙烯失水山梨糖醇单油酸酯)。含水悬浮液还可以包含一种或多种防腐剂,例如苯甲酸乙酯或苯甲酸正丙酯、苯甲酸对羟酯;一种或多种着色剂;一种或多种调味剂;以及一种或多种甜味剂,如蔗糖或糖精。

[0225] 含油悬浮液通过将活性成分悬浮于植物油或矿物油中制备,所述植物油例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油,所述矿物油如液体石蜡。含油悬浮液可以包含增稠剂,例如蜂蜡、固体石蜡或十六醇。可加入甜味剂和调味剂以提供适口的口服制剂。这些组合物可通过添加抗氧化剂如抗坏血酸来进行保护。

[0226] 适用于含水悬浮液制剂的可分散的粉末和颗粒通过水的加入来实现活性成分与分散剂或润湿剂、悬浮剂以及一种或多种防腐剂的混合。也可存在其他的赋形剂,例如甜味剂、调味剂和着色剂。

[0227] 本发明的药物组合物还可以为水包油乳剂的形式。油相可为植物油或矿物油,或其混合物。适宜的乳化剂可以是天然存在的树胶,例如阿拉伯胶或黄耆树胶;天然存在的磷脂,例如大豆卵磷脂;以及由脂肪酸和己糖醇或己糖醇衍生的酯或部分酯,例如失水山梨糖醇单油酸酯,以及所述部分酯与环氧乙烷的缩合产物,例如聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯。乳剂还可以包含甜味剂和调味剂。

[0228] 药物组合物可以是可注射的无菌含水悬浮液或含油悬浮液的形式。该悬浮液可使用适宜分散剂或润湿剂和/或悬浮剂来配制。可注射的无菌制剂还可以是存在于无毒的相互可接受的稀释剂或溶剂(例如 1,3-丁二醇溶液)中的可注射的无菌溶液或悬浮液。

[0229] 在用于药物组合物的可接受的载体、基质和溶剂中,可以采用的是水、林格氏液和等渗的氯化钠溶液。此外,习惯采用无菌的不挥发油作为载体、基质、溶剂或悬浮介质。出

于此目的,可以采用任何温和的不挥发油,包括合成的甘油一酯或甘油二酯。另外,脂肪酸如油酸在可注射的制剂中得到了应用。

[0230] 由此通过引用而分别将本文引证的所有出版物、参考文献、专利和专利申请的全部内容逐一地并入。

[0231] 虽然本发明已经就某些实施方案进行了描述,而且许多细节也为说明的目的而被提出,但是对于本领域技术人员显而易见的是,本发明包括其他的实施方案,并且本文描述的一些细节可以进行相当大的改变而不脱离本发明。本发明包括所述的其他实施方案、改进和等价。

[0232] 本文使用的术语“一 (a)”、“一 (an)”、“所述 (the)”以及描述本发明的类似术语和权利要求中的类似术语,应解释为包括单数和复数。术语“包括 (comprising)”、“具有 (having)”和“包含 (containing)”应解释为开放式术语,其含义为,例如“包括但不限于”。本文列举的数值范围预期单独地指落入该范围内的各个分开的数值,如同其被本文单独地列举,而无论该范围内的一些数值是否被明确地列举。本文所采用的具体数值应理解为示例性的并且不限制本发明的范围。

[0233] 本文给出的实施例以及本文使用的示例性语言,仅用于说明的目的而不预期限制本发明的范围。

[0234] 实施例

[0235] 制备实施例 1

[0236] PN0826 :siRNA 复合物水溶液。复合物如下制备 :将 82.12 μ l 不含核糖核酸酶的水加至离心管,然后加入 10 μ l G1498 (1mg/ml,于不含核糖核酸酶的水中)。涡旋该溶液以混合。最后,添加 7.88 μ l PN0826 (1mg/ml,于不含核糖核酸酶的水中)并涡旋混合。

[0237] 制备实施例 2

[0238] PN0826、F-108 和水。复合物如下制备 :首先向离心管添加 82.12 μ l 不含核糖核酸酶的水,然后添加 10 μ l G1498 (1mg/ml,于不含核糖核酸酶的水中)。涡旋混合。之后添加 7.88 μ l PN0826 (1mg/ml,于不含核糖核酸酶的水中)并涡旋混合。最后,添加 5 μ l Pluronic F108 (20mg/ml,0.2 μ M 过滤)并吹吸混合。

[0239] 制备实施例 3

[0240] Cy5-Inm4、PN0183,过夜。复合物如下制备 :首先向离心管添加 119.40 μ l 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液 (pH 5.0),然后添加 15.60 μ l 的肽 PN0183 (2mg/ml,于不含核糖核酸酶的水中)并涡旋混合。该溶液在 4° 贮存过夜。最后,添加 15 μ l Cy5-Inm4 (1mg/ml,于不含核糖核酸酶的水中)并再次涡旋混合。

[0241] 制备实施例 4

[0242] Cy5-Inm4、PN0183、F127,过夜。复合物如下制备 :首先向离心管添加 119.40 μ l 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液 (pH 5.0),然后添加 15.60 μ l 的肽 PN0183 (2mg/ml,于不含核糖核酸酶的水中)和 7.5 μ l 的 Pluronic F127 (20mg/ml,0.2 μ M 过滤)。涡旋混合。该溶液在 4° 贮存过夜。最后,添加 15 μ l Cy5-Inm4 (1mg/ml,于不含核糖核酸酶的水中)并再次涡旋混合。

[0243] 制备实施例 5

[0244] G1498、PN0183、稀释用水,首先添加肽。复合物如下制备 :首先向离心管添加

85.83 μ l 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液 (pH 5.0), 然后添加 4.17 μ l 的肽 PN0183 (5mg/ml, 于不含核糖核酸酶的水中), 并涡旋混合。最后, 向该溶液加入 10 μ l G1498 (1mg/ml, 于不含核糖核酸酶的水中) 并再次涡旋混合。

[0245] 制备实施例 6

[0246] G1498、PN0183、稀释用缓冲液, 首先添加肽。复合物如下制备: 首先向离心管添加 85.83 μ l 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液 (pH 5.0), 然后添加 4.17 μ l 的肽 PN0183 (5mg/ml, 于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液中), 并涡旋混合。最后, 向该溶液加入 10 μ l G1498 (1mg/ml, 于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液中) 并再次涡旋混合。

[0247] 制备实施例 7

[0248] G1498、PN0183, 首先添加肽且不涡旋。复合物如下制备: 首先向离心管添加 85.83 μ l 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液 (pH 5.0), 然后添加 4.17 μ l 的肽 PN0183 (5mg/ml, 于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液中), 并吹吸混合。最后, 向该溶液加入 10 μ l G1498 (1mg/ml, 于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液中) 并再次吹吸混合。

[0249] 制备实施例 8

[0250] G1498、PN0183, 首先添加肽并通过稀释降低浓度。复合物如下制备: 首先向离心管添加 85.83 μ l 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液 (pH 5.0), 然后添加 4.17 μ l 的肽 PN0183 (5mg/ml, 于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液中), 并涡旋混合。向该溶液加入 10 μ l G1498 (1mg/ml, 于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液中) 并再次涡旋混合。最后, 将该溶液稀释 10 倍至较低浓度。

[0251] 制备实施例 9

[0252] G1498、PN0183, 首先添加 siRNA。复合物如下制备: 首先向离心管添加 85.83 μ l 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液 (pH 5.0), 然后添加 10 μ l G1498 (1mg/ml, 于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液中), 并涡旋混合。

[0253] 制备实施例 10

[0254] G1498、PN0183, 首先添加肽并等待 30 分钟。复合物如下制备: 首先向离心管添加 85.83 μ l 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液 (pH 5.0), 然后添加 4.17 μ l 的肽 PN0183 (5mg/ml, 于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液中), 并涡旋混合。最后, 向该溶液加入 10 μ l G1498 (1mg/ml, 于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液中) 并再次涡旋混合。将该溶液在冰上平衡 30 分钟。

[0255] 制备实施例 11

[0256] G1498、PN0183, 首先添加肽并等待 60 分钟。复合物如下制备: 首先向离心管添加 85.83 μ l 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液 (pH 5.0), 然后添加 4.17 μ l 的肽 PN0183 (5mg/ml, 于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液中), 并涡旋混合。最后, 向该溶液加入 10 μ l G1498 (1mg/ml, 于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液中) 并再次涡旋混合。将该溶液在冰上平衡 60 分钟。

[0257] 制备实施例 12

[0258] G1498、PN0183, 首先添加肽并等待 24 小时。复合物如下制备: 首先向离心管添加 85.83 μ l 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液 (pH 5.0), 然后添加 4.17 μ l 的肽 PN0183 (5mg/ml, 于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液中), 并涡旋混合。最后, 向该溶液加入 10 μ l

G1498(1mg/ml,于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液中)并再次涡旋混合。将该溶液在冰上平衡 24 小时。

[0259] 制备实施例 13

[0260] Inm4、PN0183、PN0939,在即将剂量给药之前添加 siRNA。复合物如下制备:首先向离心管添加 259.1 μ l 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液 (pH5.0),然后添加 15.60 μ l 的 PN0183(5mg/ml,于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液中)和 10.30 μ l 的 PN0939(5mg/ml,于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液中)。涡旋混合。最后,添加 15.00 μ l 的 Inm4(5mg/ml, pH 5.0 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液)。涡旋混合。

[0261] 制备实施例 14

[0262] Inm4,依次为 siRNA、PN0183、PN0939,并吹吸混合。复合物如下制备:首先向离心管添加 172.00 μ l 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液 (pH 5.0),然后添加 10 μ l Inm4(5mg/ml,于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液中)。吹吸混合。稍后加入 11.20 μ l 的 PN0183(5mg/ml,于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液中)。吹吸混合。最后,加入 6.80 μ l PN0939(5mg/ml,于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液中)。再次吹吸混合。将该溶液在冰上平衡 1 小时。

[0263] 制备实施例 15

[0264] Inm4,依次为 siRNA、PN0183、PN0939,并涡旋混合。复合物如下制备:首先向离心管添加 2289.50 μ l 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液 (pH5.0),然后添加 24.00 μ l Inm4(20mg/ml,于不含核糖核酸酶的水中)。涡旋混合。稍后加入 53.60 μ l 的 PN0183(10mg/ml,于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液中)。涡旋混合。最后,加入 32.90 μ l PN0939(20mg/ml,于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液中)。吹吸混合。将该溶液在冰上平衡 1 小时。

[0265] 制备实施例 16

[0266] Inm4,依次为 siRNA、PN0183、PN0939,且 pH 7.4。复合物如下制备:首先向离心管添加 376.19 μ l 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液 (pH 7.4),然后添加 5 μ l Inm4(20mg/ml,于不含核糖核酸酶的水中)。涡旋混合。稍后加入 15.39 μ l 的 PN0183(7.26mg/ml,于不含核糖核酸酶的水中)。涡旋混合。最后,加入 3.42 μ l PN0939。吹吸混合。

[0267] 制备实施例 17

[0268] G1498、PN0183 和叔丁醇。复合物如下制备:首先向离心管添加 72.93 μ l 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液 (pH 5.0),然后添加 4.17 μ l PN0183(5mg/ml,于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液中)。涡旋混合。稍后加入 10 μ l 的 G1498(1mg/ml,于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液中)。再次涡旋混合。最后,加入 12.90 μ l 叔丁醇并吹吸混合。

[0269] 制备实施例 18

[0270] G1498、PN0183 和乙醇。复合物如下制备:首先向离心管添加 73.33 μ l 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液 (pH 5.0),然后添加 4.17 μ l PN0183(5mg/ml,于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液中)。涡旋混合。稍后加入 10 μ l 的 G1498(1mg/ml,于 pH 5.0 的 10mM HEPES/5%葡萄糖缓冲液中)。再次涡旋混合。最后,加入 12.50 μ l 乙醇并吹吸混合。

[0271] 制备实施例 19

[0272] Lac-Z、PN0183、PN0939。复合物如下制备：将 5.0 μ l 的 Lac-Z siRNA (20 μ M) 稀释入 120 μ l 的 OPTI-MEM 培养基。向 121.40 μ l 的 OPTI-MEM 培养基添加 1.62 μ l 的 PN0183 (1mg/ml) 和 1.98 μ l 的 PN0939 (1mg/ml)。合并两种溶液并吹吸混合。

[0273] Lac-Z 的结构为：

[0274] 有义：CN2938. (SEQ ID NO :64)

[0275] 5' -r (CUACACAAAUCAGCGAUUU) dTdT-3'

[0276] 反义：CN2939. (SEQ ID NO :65)

[0277] 5' -r (AAAUCGCUGAUUUUGUGUAG) dTdT-3'

[0278] 制备实施例 20

[0279] Lac-Z、PN0183、PN0938。复合物如下制备：将 5.0 μ l 的 Lac-Z siRNA (20 μ M) 稀释入 120 μ l 的 OPTI-MEM 培养基。将 1.62 μ l 的 PN0183 (1mg/ml) 和 0.97 μ l 的 PN0938 (1mg/ml) 一起添加至 122.41 μ l 的 OPTI-MEM 培养基。合并两种溶液并吹吸混合。

[0280] 制备实施例 21

[0281] Lac-Z、PN0183、PN0939 并交联。复合物如下制备：将 5.0 μ l 的 Lac-Z siRNA (20 μ M) 稀释入 120 μ l 的 OPTI-MEM 培养基。将 1.62 μ l 的 PN0183 (1mg/ml) 和 1.98 μ l 的 PN0939 (1mg/ml) 添加至 119.80 μ l 的 OPTI-MEM 培养基。合并两种溶液并吹吸混合。然后添加 1.60 μ l 的戊二醛 (0.05%, W/V) 并吹吸混合。该溶液在室温平衡 1 小时。

[0282] 制备实施例 22

[0283] Lac-Z、PN0183、交联、PN0939。复合物如下制备：将 5.0 μ l 的 Lac-Z siRNA (20 μ M) 稀释入 120 μ l 的 OPTI-MEM 培养基。将 1.62 μ l 的 PN0183 (1mg/ml) 添加至 119.80 μ l 的 OPTI-MEM 培养基。合并两种溶液然后添加 1.60 μ l 的戊二醛 (0.05%, W/V)。吹吸混合。该溶液在室温平衡 1 小时。最后，添加 1.98 μ l 的 PN0939 (1mg/ml)。吹吸混合。

[0284] 制备实施例 23

[0285] Lac-Z、PN0183、交联、PN0939、交联。复合物如下制备：将 5.0 μ l 的 Lac-Z siRNA (20 μ M) 稀释入 120 μ l 的 OPTI-MEM 培养基。将 1.62 μ l 的 PN0183 (1mg/ml) 添加至 119.80 μ l 的 OPTI-MEM 培养基。合并两种溶液然后添加 0.8 μ l 的戊二醛 (0.05%, W/V)。吹吸混合。该溶液在室温平衡 1 小时。之后添加 1.98 μ l 的 PN0939 (1mg/ml) 和 0.8 μ l 的戊二醛 (0.05%, W/V)。吹吸混合。

[0286] 制备实施例 24

[0287] Lac-Z、PN0183、交联、透析、PN0939。复合物如下制备：首先通过添加 158.6 μ l 的 10mM HEPES/5% 葡萄糖缓冲液 (pH 7.4)、103.45 μ l 的 Lac-Z siRNA (20 μ M) 和 33.53 μ l 的 PN0183 (1mg/ml) 来使 Lac-Z siRNA 与 PN0183 合并。涡旋混合。然后添加 4.4 μ l 的戊二醛 (0.05%, W/V)。吹吸混合。该溶液在室温平衡 2 小时。之后该溶液在 4° 透析过夜。将 43.5 μ l 的交联合并液稀释入 331.5 μ l 的 OPTI-MEM。将 4.96 μ l 的 PN0939 (0.1mg/ml) 稀释入 57.54 μ l 的 OPTI-MEM。合并两种稀释的溶液并吹吸混合。

[0288] 制备实施例 25

[0289] Lac-Z、PN0183、PN0826 和 PEG 3350。复合物如下制备：将 5.0 μ l 的 Lac-Z siRNA (20 μ M) 和 1.6 μ l 的 PN0183 (0.1mg/ml) 添加至 120 μ l 的 OPTI-MEM 培养基，并涡旋混合。将 3.96 μ l 的 PN0826 (0.1mg/ml) 和 2.50 μ l 的 PEG 3350 (10mg/ml) 添加至 118.54 μ l

的 OPTI-MEM 培养基。合并两种溶液并吹吸混合。

[0290]

实施例 1

[0291]

肽-siRNA 亲和力的金色染料置换试验

[0292] 各种肽与 siRNA 经由快速筛选的相对结合通过间接测量 SYBR 金色核酸结合染料的置换来评估。在测量平板中制备 siRNA、肽和 SYBR 金色染料的两份缓冲液混合物,以使肽和 SYBR 金色染料同时竞争性结合 siRNA。siRNA 的浓度固定在 $10 \mu\text{g/mL}$, 并且其与各种肽的滴定液合并,其中所述各种肽的浓度范围与 0.05 至 10 的肽: siRNA 配料比相对应。因为 SYBR 金色染料只有在结合于 siRNA 之后才发出荧光,所以肽与 siRNA 的结合抑制了染料结合,从而减少荧光。因此,荧光的量与肽和 siRNA 的结合呈逆相关。计算了 K_d 和 B_{max} 值。更大的 K_d 值表示肽与 siRNA 之间更强的结合亲和力。

[0293] SYBR 金色核酸结合染料储备液 (10,000x 浓缩物) 由 Invitrogen (Carlsbad, CA) 供应,并于 -20°C 贮存。在使用无 Hyclone 核酸酶的水以 1:100 稀释之前,允许该浓缩物平衡至室温。将该浓缩物在实验平板中以 1:10 稀释成用于试验的最终 10x 浓缩物。这是实现与浓度范围高达 $50 \mu\text{g/mL}$ 浓度的 siRNA 双链体线性结合的最佳稀释。用来生成用于说明 SYBR 金色染料与 G1498 siRNA 线性结合的标准曲线的值示于表 4。

[0294]

表 4:

[0295] G1498 siRNA 标准曲线值

[0296]

[G1498] $\mu\text{g/mL}$	荧光平均值	标准偏差
0	0	3.86
1.56	376	10.0
3.13	840	44.8
6.25	3254	91.4
12.5	10591	762
25.0	26276	1497
50.0	36543	240

[0297] 样品在 384 孔分析平板中直接混合。首先,使用多通道移液管将 $5 \mu\text{L}$ SYBR 金色染料移至每个孔中,多通道移液管的尖端触及孔的底部以完全吸出溶液。其次,使用单通道移液管添加 $22.5 \mu\text{L}$ 的 2x 溶液。最后,使用多通道移液管添加 $22.5 \mu\text{L}$ 的 2x siRNA。立即使用箔材覆盖平板并轻轻地敲打,以便混合并震落孔壁的任何液滴。

[0298] 使用从 Molecular Devices (Sunnyvale, CA) 获得的 SpectraMax 荧光平板读数仪来测量荧光。平板设置包括读数前的振摇,每孔读数一次,其中激发波长为 495nm,发射波长为 537nm。在添加 siRNA 30 分钟内对平板读数。

[0299] 肽结合的 Scatchard 曲线

[0300] Scatchard 曲线是肽结合（结合肽 / 游离肽）与结合肽的曲线。该曲线的线性回归斜率为 $-1/Kd$, B_{max} 为 y 轴截距。由于游离肽和结合肽的浓度不能直接测量, 因此使用间接测量的 siRNA 来进行计算。根据测量的荧光使用标准曲线来确定游离的 siRNA。根据已知的 siRNA 初始浓度 ($10 \mu\text{g/mL}$) 的质量平衡从标准曲线确定结合的 siRNA。

[0301] 通过假定一分子对的 (siRNA : 肽) 结合摩尔比等于 (siRNA : 肽) 配料比, 来从结合的 siRNA 计算结合的肽。根据这项计算的结合肽量, 通过质量平衡来计算游离的肽。

[0302] 粒度和 ζ 电位

[0303] 采用 Malvern Zetasizer Nano ZS (马尔文纳米粒度仪) (Malvern, Worcestershire, UK) 在 25° 测量粒度和 ζ 电位, 其使用了 DTS1060C 清洁的一次性 ζ 电池。用于粒度测量的分散剂是粘度为 1.0200CP 的 PBS, 或粘度为 0.8872CP 的水。用于 ζ 电位测量的分散剂是粘度为 0.8872CP 的水。将分散剂粘度用作样品粘度。当测量 ζ 电位和粒度时, 使用清洁的一次性 ζ 电池。当仅测量粒度时, 则使用小体积一次性分级比色皿。

[0304]

实施例 2

[0305] 在不同核酸浓度和 N/P 比下缩合粒子的大小

[0306] 图 1 显示在不同的 G1498 浓度和不同的 N/P 比下, siRNA G1498 与肽 PN183 的缩合复合物的粒子直径。对于在特定 N/P 处的各组的三条柱形图而言, 最左边的柱形的 G1498 浓度为 $100\mu\text{g/mL}$, 中间的柱形的浓度为 $50\mu\text{g/mL}$, 最右边的柱形的浓度为 $10\mu\text{g/mL}$ 。在 N/P 为 0.2 至 0.5 处, 当 G1498 的浓度为 $10\mu\text{g/mL}$ 时, 粒子是相当小的, 因此不显示该柱形。

[0307] 在 N/P 比低于约 1.4 处, 对于所有浓度的 siRNA 而言, 粒度均低于约 200nm。在 N/P 比为约 1.4 或超过约 1.4 处, 除了最高浓度 ($100\mu\text{g/mL}$) 之外, 对于所有浓度的 RNA 而言, 缩合粒子的大小保持在低于约 200nm。

[0308]

实施例 3

[0309] 在不同核酸浓度和 N/P 比下缩合粒子的大小

[0310] 图 2-5 显示在混合后的不同时间和不同的氮 / 磷比 (N/P) 下, 所获得的 siRNA G1498 与肽 PN183 的缩合复合物的粒子直径。在图 2-5 的每一幅中, 对于在特定 N/P 比处的各组的两条柱形图而言, 左边的柱形采用了涡旋, 而右边的柱形未采用涡旋。

[0311] 图 2 中的粒度是在混合后立即获得的, 而图 3、图 4 和图 5 的粒度分别是在混合后 30 分钟、60 分钟和 24 小时获得的。

[0312]

实施例 4

[0313] pH 对缩合粒子大小的影响

[0314] 图 6 显示在 G1498 浓度为 $100\mu\text{g/mL}$ 以及 N/P 比为 1.4 时, 不同 pH 值下获得的 siRNA G1498 与肽 PN183 的缩合复合物的粒子直径。

[0315] 在 pH 低于约 12 时, 缩合粒子的大小减少, 并且随着 pH 的降低而继续减小。pH 低于约 11 时粒度低于约 500nm。

[0316] 强度为反向散射光子 (反向散射模式) 的量度。粒度是使用扩散自相关算法计算的尺寸。

[0317]

实施例 5

[0318] 盐浓度对缩合粒子大小的影响

[0319] 图 7 显示在不同的氯化钠浓度下,所获得的 siRNA G1498 与肽 PN183 的缩合复合物的粒子直径。

[0320] 在氯化钠浓度高达约 0.5 时,粒度从约 100nm 增加至约 275nm。在氯化钠浓度大于约 0.5 时,缩合粒子的大小上下波动。

[0321] 实施例 6

[0322] RNA 和肽的加入顺序对缩合粒子大小的影响

[0323] 图 8 显示在不同的 N/P 比和不同的混合顺序下, siRNA G1498 与肽 PN183 的缩合复合物的粒子直径。在 N/P 比为约 0.5 或低于约 0.5 时,粒度受到添加顺序的影响并不大。在 N/P 比高于约 0.5,并且在首先将 siRNA 引入溶液再向 siRNA 溶液添加肽时,粒度一般较小。

[0324] 实施例 7

[0325] 缩合粒子的形态

[0326] 肽 -RNA 缩合复合物的粒子形态通过透射电子显微镜 (TEM) 成像法来确定。使用了以下方案:

[0327] 将 15 μ L 样品滴至格栅顶部,10min;

[0328] 浸入半浓度的 Karnofsky 氏液;

[0329] 浸入二甲砷酸盐缓冲液;

[0330] TEM 对比剂:3%乙酸双氧铀(UA);

[0331] 浸入水,3X,浸入 UA,在湿滤纸上吸掉余量,干燥。

[0332] 混合物 1:(最初的 Karnovsky 氏混合物)

[0333] 16%多聚甲醛溶液: 20mL;

[0334] 50%戊二醛 EM 级别:8mL;

[0335] 0.2M 磷酸钠缓冲液:25mL;

[0336] 蒸馏水: 25mL。

[0337] 最终混合物为 78mL 的 0.08M 缓冲液,其中有 5%戊二醛,4%甲醛。

[0338] 该混合物的摩尔渗透压浓度超过 2000m OSM。

[0339] 二甲砷酸钠缓冲液 0.1M;

[0340] 二甲砷酸钠:4.28gm;

[0341] 氯化钙:25.0gm;

[0342] 0.2N 盐酸:2.5ml;

[0343] 用蒸馏水稀释至 200ml, pH 7.4。

[0344] 使用上述不放热的方案,图 9 显示 siRNA G1498(浓度 100 μ g/ml)与肽 PN183(N/P = 1.4)的缩合复合物粒子的 TEM。该图像显示粒子大小均匀并且具有球形形态。粒度低于 100nm,通常为大约 50-60nm。

[0345] 使用上述放热的方案,图 10 显示 siRNA G1498(浓度 100 μ g/ml)与肽 PN183(N/P = 1.4)的缩合复合物粒子的 TEM。该图像显示粒子大小均匀并且具有球形形态。粒度低于 100nm,通常为大约 30-60nm。

[0346] 实施例 8

[0347] 肽 -RNA 缩合复合物的粒度特征

[0348] 表 5 概括了一些肽-RNA 缩合复合物的粒度特征。

[0349] 表 5:

[0350] 肽-RNA 缩合复合物的粒度特征

[0351]

复合物	N/P	半峰高处的粒度 (nm, 总数的%)	Z- 平均 直径 (nm)	ζ 电位 (mV)
G1498/PN183	0.5	40-106 (98.7%)	63.8	-35.7 (100%)
G1498/PN183	2	50-110 (100%)	93.2	27.9 (100%)
G1498/PN826	2	103-120 (92.7%)	189 峰	34.6
G1498/PN183/PN826	0.5;1	90-145 (47.4%) 190-340 (52.6%)	119 峰 268 峰	31.3 (100%)
G1498/PN861	2	180-330 (98.7%)	241	----
G1498/PN939	2	20-70 (92.1%)	37.0	----
G1498/PN938	2	< 10 (32.3%) 180-500 (56.8%)	< 10 283 峰	----
G1498/PN183/PN939	0.5;1	< 1 (9.8%) 15-35 (68.5%) 200-400 (21.7%)	0.8 峰 23.2 峰 274 峰	----
G1498/PN924	2	< 1 (41.4%) 5-8 (11.3%) 80-200 (47.3%)	0.8 峰 6.2 峰 135 峰	----
G1498/PN859	2	530-770 (94.7%)	702	----

[0352] 例如, N/P 为 0.5 时的 G1498/PN183 复合物展示的峰为总强度的 98.7%, 峰直径为 73.3nm, 峰宽为 32.9nm, Z- 平均直径为 63.8。

[0353] 实施例 9

[0354] 在使用肽-RNA 缩合物的 LPS 刺激的小鼠肺中 TFN- α 的体内敲低试验

[0355] 通过使用肽-siRNA 缩合复合物转染细胞来测定 siRNA 的敲低活性。将随机 siRNA 序列用作阴性对照。

[0356] 图 11 显示通过鼻内施用包括 siRNA Inm-4 和肽 PN183 以及 PN939 的缩合复合物的组合物而在小鼠模型中进行 LPS 诱导 TFN- α 表达 (pg/ml) 的敲低试验结果。

[0357] 在图 11 中,最左边的柱形图是缓冲液对照,随后是 Inm-4/PN183/PN939 缩合物的数据,右边跟随的是与戊二醛 (G) 交联的 Inm-4/PN183/PN939 复合物的数据。安慰剂不含 siRNA,而 Qneg 含有无活性的 siRNA。

[0358] 表 6 给出了图 11 的数据。

[0359] 表 6 :

[0360] 在使用 Inm-4 siRNA 的 LPS 刺激小鼠肺中 TFN- α 的敲低

复合物	试验	LPS 肺试验	
		平均	SD
缓冲液 (10 mM HEPES/5%葡萄糖)		211.3	25
PN183/PN939 N/P=0.75/0.5	安慰剂	188.3	10
	Qneg	207.1	95
	Inm-4 剂	97.0	55
PN183/PN939/G N/P=0.75/0.5 G=0.8 ME	安慰剂	179.1	51
	Qneg	161.7	108
	Inm-4 剂	119.4	6

[0362] 剂量经鼻内施用。在剂量给药后 4 小时和 24 小时,使用 0.625ng LPS (50 μ l) 对动物进行诱导。LPS 后 2 小时收集肺。进行 TNF α ELISA 试验和 BCA 总蛋白质试验。用于试验的材料和方法如下:

[0363] 动物:正常小鼠

[0364] 剂量:0.5mg/kg

[0365] 体积:50uL

[0366] 重复:n = 3

[0367] 组总数:10

[0368] 对照:基质、Qneg

[0369] siRNA:Inm4

[0370] 剂量给药:使用 Inm4 制备 0.5mg/kg 的制剂。每种制剂总共有 200uL。每只小鼠 (n = 3) 接受 50uL。

[0371] siRNA 制品:使用 HEPES/缓冲液将现有的 20mg/ml Inm-4 siRNA 储备液稀释为 5mg/ml。使用现有的 3.29mg/ml Qneg 储备液。

[0372] 肽:使用缓冲液将肽稀释为合适的浓度 (10mM HEPES/5%葡萄糖)。

[0373] 赋形剂制品:使用戊二醛 (0.05% W/V), 0.2um 过滤至无菌。

[0374] 制剂制品:将各组分添加至 Bio-pur Eppendorf 1.5ml 管。

[0375] (A) 首先加入缓冲液,作为其他组分小体积的接受体积。

[0376] (B) 按照以下顺序加入所有的组分:siRNA、肽 -1、肽 -2、添加剂 (如果有的话)、缓冲液。

[0377] (C) 使用戊二醛对制剂进行交联,在剂量给药前等待 1 小时。

[0378] 表 7 给出了代表性的制剂。

[0379]

表 7：

[0380]

肽-siRNA 复合物制剂

[0381]

制剂	siRNA 储备液 体积 (u1)	肽储备 液-1 体 积 (u1)	肽储 备液-2 体积 (u1)	添加剂 体积 (u1)	缓冲液 体积 (u1)	总体积 (u1)
缓冲液 (10mM HEPES, 5%葡萄糖)	0	0	0	0	200	200
PN0183/PN0939 N/P = 0.75, N/P = 0.5	0.00	11.20	6.80	0.00	182.00	200
PN0183/PN0939/G N/P = 0.75, N/P = 0.5, 0.8 摩尔当量	0.00	11.20	6.80	34.48	147.52	200
Q. Neg/PN0183/PN0939 N/P = 0.75, N/P = 0.5	15.20	11.20	6.80	0.00	166.80	200
Q. Neg/PN0183/PN0939/G N/P = 0.75, N/P = 0.5, 0.8 摩尔当量	15.20	11.20	6.80	34.48	132.32	200
Inm4/PN0183/PN0939 N/P = 0.75, N/P = 0.5	10.00	11.20	6.80	0.00	172.00	200
Inm4/PN0183/PN0939/G N/P = 0.75, N/P = 0.5, 0.8 摩尔当量	10.00	11.20	6.80	34.48	137.52	200

[0382] 表 8 和表 9 给出了代表性制剂的细节。

[0383]

表 8

[0384]

siRNA 终浓度=	250ug/ml (0.5mg/kg)
siRNA Inm4 储备液浓度=	5mg/ml

Qneg. =	3.29mg/ml
PN0183 =	5mg/ml
PN0939 =	5mg/ml
戊二醛 =	0.05% W/V

[0385]

表 9

[0386]

材料	批号	浓度
Inm4	BS31	20mg/ml
Q. Neg	B324P167	3.29mg/ml
PN0183-2	BP1	10mg/ml
PN0939-2	BP9	20mg/ml
戊二醛	BR39	0.05% W/V
缓冲液	BB72	10mM Hepes/5%葡萄糖

[0387]

实施例 10

[0388] 在大鼠神经胶质肉瘤成纤维细胞 (9L/LacZ) 中 Lac-z 表达的体外敲低试验

[0389] 图 12 显示 lac-z siRNA 与肽 PN183 以及各种第二肽的缩合复合物在大鼠神经胶质肉瘤成纤维细胞 9L/LacZ 中 lac-z 表达的体外敲低试验结果。

[0390] 在图 12 中,最左边的柱形图是使用 HiPerFect™(Qiagen ;Valencia(巴伦西亚), California(加利福尼亚)) 的比较数据,随后是本发明各种复合物的数据。PN183 的 N/P 比为 0.75,而第二肽的 N/P 比为 0.3。表 10 给出了图 12 的数据。

[0391]

表 10 :

[0392]

Lac-z 体外敲低试验

[0393]

		击倒 平均	SD
HiPerFect		0.221048	0.028369
PN0183 (N/P=0.75)/ 肽 2 (N/P=0.3)	PN0939	0.905998	0.053035
	PN0938	1.007354	0.1546
	PN0826	0.762651	0.069725
	PN0951	0.629382	0.128045
	PN0970	0.806908	0.11293
	PN0526	0.682695	0.045614

[0394] 用于本试验的材料和方法如下：

[0395] 细胞：9L/LacZ

[0396] 剂量：100nM；基于 100ul 总转染体积。

[0397] 体积：25uL 制剂体积。

[0398] 重复：n = 3。

[0399] 组总数：20。

[0400] 对照：Qneg w/Alexis 546。

[0401] siRNA：LacZ。

[0402] Lac-Z 或 Qneg：54ul siRNA+17.28ul PN0183+1278ul OPTI-MEM。

[0403] 使用 OPTI-MEM 培养基将肽稀释至合适的浓度。所有的赋形剂均 0.2um 过滤至无菌。

[0404] 制剂：

[0405] (A) 使用 OPTI-MEM 一起稀释 siRNA 和 PN0183 以形成粒子。涡旋。

[0406] (B) 使用 OPTI-MEM 稀释递送基质。涡旋混合该递送基质。

[0407] (C) 对于每种制剂而言，首先向 96 个孔中加入稀释的递送基质，然后加入 siRNA/PN0183 制剂。吹吸混合。在送至转染前等待 30 分钟。转染：每种制剂为 125ul，其对于 5 个孔是足够的。每孔 (n = 3) 接受 25ul。

[0408] 表 11 给出了代表性的制剂。

[0409]

表 11

[0410]

含有 PN183 的制剂	用于 6 个池的肽储备液 1 的体积 (ul)	用于 10 个池的肽储备液 2 的体积 (ul)	用于 10 个池的添加剂的体积 (ul)	用于添加剂稀释的最佳体积 (10 个池 ;ul)	用于递送物质稀释的总体积 (10 个池 ;ul)
PN939	0.96	5.95	0.00	119.05	125.00
PN938	0.96	2.91	0.00	122.09	125.00
PN826	0.96	3.96	0.00	121.04	125.00
PN951	0.96	3.12	0.00	121.88	125.00
PN970	0.96	25.85	0.00	99.15	125.00
PN526	0.96	6.90	0.00	118.10	125.00

[0411] 表 12 给出了代表性制剂的细节。

[0412]

表 12

[0413]

材料	批号	浓度		
Lac-Z	Qiagen (Cat 1027020; Lot 161545/161546); 20 uM			
Q.Neg (Alexis 546)	Qiagen (Cat 1027098; Lot 160427/160428); 20 uM			
PN0183-2	BP86	7.26 mg/ml		
PN0939-2	BP9	20 mg/ml		
PN0826-2	BP2	5 mg/ml		
PN0951-2	BP10	10 mg/ml		
PN0970-1	462-124	2 mg/ml		
PN0526-2		3.91 mg/ml		
缓冲液	BB72	10 mM HEPES/5% 葡萄糖		

[0414]

实施例 11

[0415] 在大鼠神经胶质肉瘤成纤维细胞 (9L/LacZ) 中 Lac-z 表达的体外敲低试验

[0416] 表 13 显示各种缩合复合物对大鼠神经胶质肉瘤成纤维细胞 9L/LacZ 中 lac-z 表达的体外敲低试验结果。

[0417]

表 13 :

[0418]

在大鼠模型细胞系 9L/LacZ 中 Lac-z 表达的敲低

[0419]

复合物	N/P 比	LacZ 试验		相对蛋白质浓度 (Qneg)	
		平均	SD	平均	SD
HiPerFect™	-----	0.165	0.028	0.413	0.057
PN0183/G(0.25 摩尔当量透析)/PN0951	0.75/2	0.510	0.071	1.059	0.121
PN0183/G(0.25 摩尔当量透析)/PN0951	0.75/5	0.613	0.194	1.051	0.150
PN0183/G(0.25 摩尔当量透析)/PN0939	0.75/0.5	0.725	0.129	1.146	0.183
PN0183/G(5 摩尔当量透析)/PN0939	0.75/0.5	0.524	0.107	1.218	0.042

[0420] 用于本试验的材料和方法如下：

[0421] 细胞：9L/LacZ。

[0422] 剂量：100nM；基于 100ul 的总转染体积。

[0423] 体积：25uL 制剂体积。

[0424] 重复：n = 3。

[0425] 组总数：20。

[0426] 对照：Qneg w/ Alexis 546。

- [0427] siRNA ;LacZ。
- [0428] 转染 :每种制剂有 125ul,其对于 5 个孔是足够的。每孔 (n = 3) 接受 25ul。
- [0429] 肽制品 :使用 OPTI-MEM 培养基将肽稀释至合适的浓度。
- [0430] 赋形剂制品 :所有的赋形剂均 0.2um 过滤至无菌。
- [0431] 制剂制品 :
- [0432] (A) 对于无 PN0183 的制剂而言,首先加入递送基质,然后加入 siRNA,吹吸混合。
- [0433] (B) 对于有 PN0183 的制剂而言,首先制备 siRNA 和 PN0183 的络合物。在 96 孔平板中,首先添加递送基质,然后添加 siRNA/PN0183 络合物,吹吸混合。
- [0434] (C) 对于交联的制剂而言,首先制备 siRNA/PN0183 络合物,然后进行透析 (4° ,过夜) 或者不进行透析。之后在次日清晨,首先添加另一递送基质,然后添加 siRNA/PN0183 络合物,随后吹吸混合。
- [0435] 表 14 给出了代表性的制剂。
- [0436] 表 14
- [0437]

代码	制剂	用于 10 个池的递送试剂体积 (ul)	用于递送试剂稀释的最佳体积 (10 池 ;ul)	用于递送物质稀释的总体积 (10 池 ; ul)
U	PN0183/G/PN0951 N/P = 0.75, 0.25ME, D, N/P = 2	20.82	104.18	125.00
V	PN0183/G/PN0951 N/P = 0.75, 0.25ME, D, N/P = 5	52.05	72.95	125.00
W	PN0183/G/PN0939 N/P = 0.75, 0.25ME, D, N/P = 0.5	9.92	115.08	125.00
Y	PN0183/G/PN0939 N/P = 0.75, 5ME, D, N/P = 0.5	9.92	115.08	125.00

[0438] 表 15、表 16 和表 17 给出了代表性制剂的细节。

[0439] 表 15

[0440]

交联 :首先制备 siRNA/PN0183 络合物。
0.25ME 交联 :103.45ul 的 siRNA 储备液 (20uM)+33.53ul PN0183(1 mg/ml)+4.4 戊二醛 (0.505%)+158.6ul HEPES 缓冲液。

5ME 交联 :68.97ul 的 siRNA 储备液 (20uM)+22.35ul PN0183(1 mg/ml)+5.9ul 戊二醛 (0.5%)+102.78ul Hepes 缓冲液。
5ME, 不进行透析 :17.24ul siRNA(20uM)+5.59ul PN0183(1mg/ml)+1.48ul 戊二醛 (0.5%)+25.69ul Hepes 缓冲液。
对于 0.25ME 交联 :43.5ul 交联络合物 +331.50PTI-MEM。
对于 5ME 交联 :8.7ul 交联络合物 +66.3ul OPTI-MEM。

[0441] 表 16

[0442]

G =	戊二醛
ME =	摩尔当量
D =	透析
交联 =	于室温 2 小时
PN0951 =	0.1mg/ml
PN0939 =	0.1mg/ml
OPTI-MEM	

[0443] 表 17

[0444]

材料	批号	浓度		
Lac-Z	Qiagen (Cat 1027020; Lot 161545/161546); 20 uM			
Q.Neg (Alexis 546)	Qiagen (Cat 1027098; Lot 160427/160428); 20 uM			
PN0951-2	BP10	10mg/ml		
PN0183-2	BP86	7.26mg/ml		
PN0939	BP9	20mg/ml		
缓冲液		10mMHepes/5%葡萄糖, pH7.4		
OPTI-MEM	BB57			

[0445]

实施例 12

[0446]

促进多核苷酸递送的多肽

[0447] 示例性的促进多核苷酸递送的多肽 PN73 是从人组蛋白 2B(H2B) 蛋白质的氨基酸序列获得的, 其示于下文。存在于 H2B 蛋白质内的加下划线的残基 13 至 48 标识出了用以衍生 PN73 的片段。其还可以通过 H2B 氨基酸 12 至 48 表示。PN73 的一级结构也示于下文。

[0448] H2B(组蛋白 2B) 氨基酸序列 (SEQ ID NO :66)

[0449] MPEPAKSAPAPKKGSKKAVTKAQKKDSKKRKRSRKESYSVYVYKVLKV

[0450] HPDTGISSKAMGIMNSFVNDIFERIAGEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRL

[0451] LLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK

[0452] PN73(13-48)(SEQ ID NO :42)

[0453] NH₂-KGSKKAVTKAQKKDGGKKRKRSRKESYSVYVYKVLKQ- 酰胺

[0454] 表 18 示出了一些促进多核苷酸递送的多肽突变体的结构,所述突变体是通过示例性的促进多核苷酸递送的多肽 PN73 的残基置换和缺失来制备的。

[0455] 表 18 :

[0456] PN73 残基置换和缺失序列

[0457]

肽	SEQ ID NO :	氨基酸序列
PN73	42	KGSKKAVTKAQKKDGGKKRKRSRKESYSVYVYKVLKQ
PN644	67	KGSKKAVTKAQKKDGGKKRKRSRKESYVYVYKVLKQ
PN645	68	KGSKKAVTKAQKKDGGKKRKRSRKWSYSVYVYKVLKQ
PN646	69	KGSKKAVTKAQKKDGGKKRKRSRKFSYSVYVYKVLKQ
PN647	70	KGSFKAVTKAQKKDGGKKRKRSRKFSYSVYVYKVLKQ
PN729	71	KGSFKAVTKAQKKFGKKRKRSRKFSYSVYVYKVLKQ

[0458] 表 19 示出了示例性的促进多核苷酸递送的多肽 PN73 及其截短的衍生物的结构。以下列出的 PN360 和 PN361 的氨基酸序列与对应的 PN73 氨基酸序列进行比对。

[0459] 表 19 :

[0460] PN73 缺失系列

[0461]

C端 标记	肽	SEQ ID NO:	氨基酸序列
无	PN73	42	KGSKKAVTKAQKKGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ-酰胺
	PN360	72	KGSKKAVTKAQKKGKRRKRSRK-酰胺
	PN361	73	KKDGGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ-酰胺
	PN766 (PN708)	74	RKESYSVYVYKVLKQ-酰胺
FITC(荧光素-5-异硫氰酸酯)标记物 (即, -GK[ε]G-酰胺)	PN690 (PN73)	75	KGSKKAVTKAQKKGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ-GK[ε]-5CFG-酰胺
	PN661	76	KAQKKGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ-GK[ε]-5CFG-酰胺
	PN685	77	VTKAQKKGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ-GK[ε]-5CFG-酰胺
	PN660	78	AQKKGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ-GK[ε]-5CFG-酰胺
	PN735	79	KDGGKRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ-GK[ε]-5CFG-酰胺
	PN655	80	KRRKRSRKESYSVYVYKVLKQ-GK[ε]-5CFG-酰胺
	PN654	81	KRSRKESYSVYVYKVLKQ-GK[ε]-5CFG-酰胺
	PN708	82	RKESYSVYVYKVLKQ-GK[ε]-5CFG-酰胺
	PN653	83	SYSVYVYKVLKQ-GK[ε]-5CFG-酰胺
	PN652	84	VYVYKVLKQ-GK[ε]-5CFG-酰胺
	PN651	85	YKVLKQ-GK[ε]-5CFG-酰胺
PN768	86	KVLKQ-GK[ε]-5CFG-酰胺	

[0462] PN360 具有 PN73 的 N 端,但是缺失 PN73 的 C 端,而 PN361 具有 PN73 的 C 端,但缺失 PN73 的 N 端。PN766 代表 PN73 的 15 个 C 端氨基酸。PN73、PN360、PN361 和 PN766 未使用 C 端 FITC(荧光素-5-异硫氰酸酯)(即,-GK[ε]G-酰胺)进行标记。表 19 还示出 PN73 的 11 个截短的形式,所述截短的形式是通过从肽的 N 端同时缺失 3 个连续的残基(除 PN768 外)而形成的。所有这些肽均使用 C 端 FITC(荧光素-5-异硫氰酸酯)标记物(即,-GK[ε]G-酰胺)进行标记,以使含有所述肽的细胞能被荧光显微镜检测到和/或被流式细胞仪分选。PN766 和 PN708 具有相同的氨基酸序列,唯一的不同之处在于 PN708 具有 C 端 FITC 标签。

[0463] 实施例 13

[0464] 用于 siRNA 细胞摄取和靶基因敲低的体外方法和规程

[0465] 本实施例对用于评价实施例 12 中表 18 和表 19 所列示例性促进多核苷酸递送的多肽促进 siRNA 细胞摄取和 siRNA 介导的靶基因敲低活性效力的方法和规程进行了说明。还评价了细胞生存力。下文详细解释了用于每项试验的细胞培养条件和规程。

[0466] 细胞培养物

[0467] 原代人单核细胞:来自健康供体的新鲜人血样品从 Golden WestBiologicals 购买。为了分离单核细胞,在接收后立即用 PBS 以 1 : 1 的比例对血液样品进行稀释。通过 Ficoll(Amersham) 梯度从全血中首先分离出外周血单核细胞(PBMC)。使用 Miltenyi CD 14 阳性选择试剂盒和所提供的规程(MILTENYT BIOTEC)从 PBMC 中进一步纯化单核细胞。

为了评价单核细胞制品的纯度,将细胞与抗 CD 14 抗体 (BD Biosciences) 一起孵育,然后通过流式细胞仪分选。单核细胞制品的纯度超过 95%。

[0468] 人单核细胞的活化通过向细胞培养物添加 0.1-1.0ng/ml 的脂多糖、LPS (Sigma, St Louis, MO) 来进行,以便刺激肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的产生。在与 LPS 孵育 3 小时后收获细胞,并根据制造商的说明书通过 Quantigene 试验 (Genospectra, Fremont, CA) 来测定 mRNA 水平。

[0469] 小鼠尾部成纤维细胞:小鼠尾部成纤维 (MTF) 细胞是从 C57BL/6J 小鼠的尾部获得的。将尾部切除,浸入 70% 乙醇中,然后使用刀片切成小段。这些段用 PBS 洗涤三次,然后在 37°C 的振荡器中与 0.5mg/mL 胶原酶、100 单位/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素一起孵育以破坏组织。之后将尾段在完全培养基 (Dulbecco 改良的必需培养基,含有 20% FBS、1mM 丙酮酸钠、非必需氨基酸和 100 单位/mL 青霉素以及 100 μ g/mL 链霉素) 中培养直至确立细胞。按照上述叙述的,在 37°C, 5% CO₂ 下将细胞于完全培养基中培养。

[0470] 细胞生存力 (MTT 试验)

[0471] 使用 MTT 试验 (MTT-100, MatTek 试剂盒) 对细胞生存力进行评价。该试剂盒测量了四唑盐的摄取以及四唑盐向甲 吩 (formazan) 染料的转化。在脂质的剂量给药期结束前 1 小时,通过将 2mL 的 MTT 浓缩物与 8mL 的 MTT 稀释液混合来制备融化和稀释的 MTT 浓缩物。每种细胞培养物插入片段用含有 Ca⁺² 和 Mg⁺² 的 PBS 洗涤两次,然后转移至新的 96 孔转运平板,该平板的每个孔含有 100 μ L 的混合 MTT 溶液。之后将该 96 孔转运平板在 37°C 和 5% CO₂ 下孵育 3 小时。在 3 小时孵育后,除去 MTT 溶液并将培养物转移至第二 96 孔饲料盘,该盘的每个孔含有 250 μ L MTT 提取溶液。向每个培养孔的表面添加另外 150 μ L MTT 提取溶液,并将样品在室温避光放置,最少 2 小时,最多 24 小时。然后用移液管尖端刺穿插入膜,并且允许上部孔和下部孔中的溶液混合。将 200 μ L 的混合提取溶液连同提取的空白 (阴性对照) 转移至 96 孔平板,以便使用全自动定量绘图酶标仪进行测量。在平板读数仪上于 570nm 处测量样品的光密度 (OD),其中减去了 650nm 处的背景。细胞生存力以百分数表示,并且如下计算:已处理的插入片段的 OD 读数除以 PBS 处理的插入片段的 OD 读数,再乘以 100。出于本试验的目的,假定 PBS 对细胞生存力无影响,因而其代表 100% 的细胞生存力。

[0472] siRNA 制品

[0473] 寡核苷酸的合成使用标准的 2- 氰基乙基亚磷酰胺法 (1) 在长链烷基胺控制的孔玻璃上进行,所述孔玻璃使用选定的 5' -O- 二甲基三苯甲基 -2' -O- 叔丁基二甲基甲硅烷基 -3' -O- 琥珀酰基核糖核苷衍生化,或者在适用时使用 5' -O- 二甲基三苯甲基 -2' -脱氧 -3' -O- 琥珀酰基胸腺嘧啶载体衍生化。所有的寡核苷酸都采用 ABI 3400 DNA/RNA 合成仪 (Applied Biosystems, 福斯特城, CA) 在 0.2 μ mol 或 1 μ mol 量程进行合成——使用浓缩的 NH₄OH 从固体载体裂解,并在 55°C 使用 NH₄OH : 乙醇为 3 : 1 的混合物进行脱保护。通过将碱基脱保护的 RNA 与 N- 甲基吡咯烷酮 / 三乙胺 / 三乙胺三氢氟酸盐 (NMP/TEA/3HF; 体积比 6 : 3 : 4) 溶液 (600 μ L/ μ mol) 在 65°C 孵育 2.5 小时而实现 2' -TBDMS 保护基的脱保护。A、U、C 和 G (Proligo, Boulder, CO) 的对应结构单元、5' - 二甲氧基三苯甲基 -N-(tac)-2' -O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-3' -[(2- 氰基乙基)-(N, N- 二异丙基)]- 亚磷酰胺和修饰的亚磷酰胺、5' -DMTr-5- 甲基 -U-TOM-CE- 亚

磷酸胺、5'-DMTr-2'-OMe-Ac-C-CE 亚磷酸胺、5'-DMTr-2'-OMe-G-CE 亚磷酸胺、5'-DMTr-2'-OMe-U-CE 亚磷酸胺、5'-DMTr-2'-OMe-A-CE 亚磷酸胺 (Glen Research, Sterling VA) 均直接从供应商处购买。三乙胺三氢氟酸盐、N-甲基吡咯烷酮和浓缩的氢氧化铵从 Aldrich (密尔沃基, WI) 购买。所有 HPLC 分析和纯化都在采用 Xterra™ C18 柱的 Waters 2690HPLC 系统上进行。所有其他试剂从 Glen 科技有限公司 (Glen Research Inc) 购买。根据 RP-HPLC 所测定的,寡核苷酸被纯化至超过 97% 的纯度。用于小鼠注射的 siRNA 从 Qiagen (巴伦西亚, CA) 购买,为体内级别,其在退火后进行 HPLC 纯化。单链 siRNA 的量用分光光度法测定,其基于钠盐形式在 $\lambda = 260\text{nm}$ 处的计算的吸光系数 $35.0 \mu\text{g}/\text{OD}$ 。当两条链被退火时,观察到大约 10% 的减色现象;因此,对于定量的双链形式而言,吸光系数降低了 10%。siRNA 的内毒素水平通常等于或小于 $0.0024\text{EU}/\text{mg}$ 。

[0474] 肽合成

[0475] 通过采用 Rainin Symphony 合成仪 CLEAR-酰胺树脂上的固相 Fmoc 化学来合成肽。偶联步骤使用 5 当量的 HCTU 和 Fmoc 氨基酸与过量的 N-甲基吗啡啉进行 40 分钟。Fmoc 的去除通过使用 20% 的哌啶 DMF 溶液来对肽树脂进行 2 个 10 分钟循环的处理而实现。一旦完成整个肽之后,使用哌啶除去 Fmoc 基团,并用 DMF 充分洗涤。马来酰亚胺基修饰的肽通过以下制备:在 6 当量的 N-甲基吗啡啉存在下,使 3.0 当量的 3-马来酰亚胺基丙酸和 HCTU 与肽树脂的 N 端偶联。偶联的程度由 Kaiser 检验监测。通过添加 10mL 含有 2.5% 水和 2.5 三异丙基硅烷的 TFA,然后在室温轻微搅拌 2h 来使肽从树脂上裂解。通过使用醚进行研磨然后进行过滤来收集所得的粗品肽。将粗产物溶解于微孔水 (Millipore water) 并冷冻至干燥。将粗品肽溶解于 15mL 含有 0.05% TFA 和 3mL 乙酸的水中,并通过 5mL 注射环以 5mL/min 的流速装载至 Zorbax RX-C8 反向 (22mm ID x 250mm, $5 \mu\text{m}$ 粒度)。通过运行 0.1% B/min 的线性 AB 梯度来完成纯化,其中溶剂 A 为 0.05% 的 TFA 水溶液,溶剂 B 为 0.05% 的 TFA 乙腈溶液。纯化的肽通过 HPLC 和 ESMS 进行分析。

[0476] 流式细胞仪

[0477] 荧光活化细胞分选 (FACS) 分析采用贝克曼库尔特 FC500 细胞分析仪 (富勒敦,加利福尼亚) 进行。根据所使用的荧光探针 (FAM 或 Cy5 用于 siRNA, FITC 和 PE 用于 CD14) 来调节仪器。将碘化丙啶 (Fluka, St Louis) 和 AnnexinV (R&D 系统,明尼阿波利斯) 用作细胞生存力和细胞毒性的指示剂。下文详细给出了简明的逐步方案。

[0478] (a) 在暴露于 siRNA/肽络合物后,细胞孵育至少 3 小时。

[0479] (b) 用 $200 \mu\text{l}$ PBS 洗涤细胞。

[0480] (c) 用 $15 \mu\text{l}$ TE 分离细胞,在 37°C 孵育。

[0481] (d) 使用 $30 \mu\text{l}$ FACS 溶液 (含有 0.5% BSA 和 0.1% 叠氮化钠的 PBS) 将细胞重新悬浮于 5 个孔中。

[0482] (e) 将全部 5 个孔合并至管中。

[0483] (f) 向每管添加 $5 \mu\text{l}$ PI (碘化丙啶)。

[0484] (g) 根据制造商的说明书使用荧光活化细胞分选 (FCAS) 分析细胞。

[0485] 对于 siRNA 摄取分析,使用 PBS 洗涤细胞,胰蛋白酶进行处理 (仅附着的细胞),然后通过流式细胞仪分析。上文描述的 siRNA 指定 BA 的摄取也通过细胞中的 Cy5 或 FITC 荧光强度来测量,而细胞生存力通过添加碘化丙啶或 AnnexinV-PE 进行评估。为了区分细胞

摄取与荧光标记 siRNA 的膜插入,使用锥虫蓝来猝灭细胞膜表面的荧光。

[0486]

实施例 14

[0487]

示例性的促进多核苷酸递送多肽的缺失分析

[0488] 多肽 PN73 的全长形式和截短形式进入细胞的效力通过使用原代小鼠尾部成纤维 (MTF) 细胞的细胞摄取试验来进行体外检测。接受 FITC 标记肽的培养物中细胞的数目由流式细胞仪测量。肽细胞摄取的百分数相对于培养物中存在的细胞总数来表示。此外,使用平均荧光强度 (MFI) 来评价细胞内存在的 FITC 标记的肽的量。MFI 与细胞内 FITC 标记的肽的量直接相关;更高的相对 MFI 值与更高的细胞内 FITC 标记的肽的量相关。肽在 0.63 μ M、2.5 μ M 和 10 μ M 浓度进行评价;PN768 在 2 μ M、10 μ M 和 50 μ M 检测。

[0489] 在转染的前一天,将示例性的促进多核苷酸递送的多肽 PN73 的全长形式和截短形式暴露于细胞。在室温使用 Opti-MEM[®] 培养基 (Invitrogen) 稀释 FITC 标记的肽约 5 分钟,然后添加至细胞。在 PBS 中转染细胞 3 小时并用 PBS 洗涤,使用胰蛋白酶进行处理,之后通过流式细胞仪分析。如上测定细胞生存力。使用锥虫蓝来猝灭细胞膜表面的任何荧光而区别细胞摄取和膜插入。

[0490] 对于细胞摄取试验而言,全长 FITC 标记的 PN73 肽 (PN690) 在所有的测试浓度达到了将近 100% 的细胞摄取 (10 μ M 结果显示于表 20 题为“%肽细胞摄取”的列中)。除了 PN768 需要 50 μ M 的浓度之外,其余的 PN73 截短形式在 10 μ M 浓度时获得了与 PN690 相当的细胞摄取百分数 (圆括号中的值),这表明 PN73 的 N 端残基无需肽具有进入细胞的能力。PN73 的 5 个 C 端残基 (鉴定为 PN768) 对于肽细胞摄取是足够的。PN73 的截短形式在 0.63 μ M 显示出与肽长度成比例的降低的细胞摄取活性。换言之,肽在 0.63 μ M 浓度进行测试的一般观察结果为,随着 PN73 肽的长度减少,其细胞摄取活性降低,因此表明肽细胞摄取活性具有剂量依赖性。

[0491] 表 20 概括了细胞摄取和靶基因敲低 (KD) 的数据。

[0492]

表 20:

[0493]

PN73 肽缺失系列的功能域分析概括

[0494]

C端 标记物	肽	肽细胞摄取	肽 FITC MFI	% siRNA 细胞摄取	siRNA Cy5 MFI	KD
无	PN73	N/A	N/A	98% (10 μ M)	13 (10 μ M)	+
	PN360	N/A	N/A	0%	NT	NT
	PN361	N/A	N/A	55% (20 μ M)	NT	NT
FITC (荧光素-1-异硫氰酸盐) 标记物 (即, -CN[ϵ](-)-酰胺)	PN690 (PN73)	100 (10 μ M)	125 (10 μ M)	58 (2.5 μ M)	50 (10 μ M)	+
	PN661	100 (10 μ M)	128 (10 μ M)	49 (2.5 μ M)	59 (10 μ M)	NT
	PN685	100 (2.5 μ M)	151 (10 μ M)	24 (2.5 μ M)	61 (10 μ M)	NT
	PN660	100 (10 μ M)	121 (10 μ M)	41 (2.5 μ M)	68 (10 μ M)	+
	PN735	100 (10 μ M)	82 (10 μ M)	13 (2.5 μ M)	38 (10 μ M)	-
	PN655	100 (10 μ M)	63 (10 μ M)	14 (10 μ M)	44 (10 μ M)	NT
	PN654	95 (10 μ M)	10 (10 μ M)	27 (10 μ M)	14 (10 μ M)	\pm
	PN708	97 (10 μ M)	10 (10 μ M)	42 (10 μ M)	34 (10 μ M)	+
	PN653	95 (10 μ M)	8 (10 μ M)	1.7 (10 μ M)	4 (10 μ M)	-
	PN652	86 (10 μ M)	5 (10 μ M)	1.8 (10 μ M)	5 (10 μ M)	NT
	PN651	90 (10 μ M)	5 (10 μ M)	0	3 (6.5 μ M)	NT
	PN768	91 (50 μ M)	9 (50 μ M)	NT	NT	NT

[0495] NT = 未测试; 所给定的肽浓度 (圆括号中) 是达到给定摄取 (%) 或 MFI 相对值的那些。

[0496] 表 20 显示 PN73 的 N 端缺失部分 (参见 PN361) 使 siRNA 细胞摄取活性减少 50%; 而 C 端残基 (参见 PN360) 的去除也降低了 siRNA 细胞摄取活性。这些数据显示示例性的促进多核苷酸递送的多肽 PN73 的 C 端结构域有助于肽的核苷酸细胞摄取活性。

[0497] 通过本发明 siRNA/ 促进多核苷酸递送的多肽络合物有效敲低靶基因表达得到了证实。具体而言, 评价了 siRNA/ 肽络合物调节人肿瘤坏死因子- α (hTNF- α) 基因表达的能力。靶向 hTNF- α (hTNF- α) 基因的重要性在于, 当该基因在人类和其他哺乳动物受治疗者中过表达时, 参与介导类风湿性关节炎 (RA) 发生或发展。

[0498] 将人单核细胞用作模型系统, 以测定 siRNA/ 肽络合物对 hTNF- α 基因表达的作用。Qneg 代表随机 siRNA 序列并起阴性对照的作用。将观察到的 Qneg 敲低活性标准化至 100% (100% 基因表达水平), 并且下列 siRNA 中每种敲低活性表示为阴性对照的相对百分数: A19S21, 21/21 和 LC20。A19S21, 21/21 和 LC20 是靶向 hTNF- α mRNA 的 siRNA。示例性的促进多核苷酸递送的多肽 PN643 (全长 PN73 减去 C 端标记物)、PN690 (带有 C 端 FITC 标记物的全长 PN73) 以及来自缺失序列的 PN73 截短形式、PN660、PN735、PN654 和 PN708 与上述列出的 siRNA 络合, 以便测定它们对每种 siRNA 降低人单核细胞中 hTNF- α 基因表达水平能力的影响。示例性的促进多核苷酸递送多肽 PN73 的全长形式和截短形式的敲低活性概括于上文的表 20 中。“KD” 列中的“+”表明肽 / siRNA 络合物的敲低活性为 Qneg 阴性对照 siRNA 的 80% (与 Qneg 阴性对照相比, mRNA 水平降低 20%)。“+/-”表明肽 / siRNA 络合物的敲低活性为 Qneg 阴性对照 siRNA 的大约 90% (与 Qneg 阴性对照相比, mRNA 水平降低 10%)。最后,“-”表明肽 / siRNA 络合物与 Qneg 阴性对照相比没有显著的敲低活性。

[0499] 健康人血从 Golden West Biologicals (CA) 购买, 外周血单核细胞 (PBMC) 使用 Ficoll-Paque plus (Amersham) 梯度从血液中纯化。然后使用由 Miltenyi Biotec 获得的磁微珠从 PBMC 部分纯化人单核细胞。将分离的人单核细胞重新悬浮于添加有 4mM 谷氨酰胺

胺、10% FBS、1x 非必需氨基酸和 1x pen-strep 的 IMDM 中,并在 4°C 贮存直至使用。

[0500] 在 96 孔平底平板中,将人单核细胞以 100K/孔 /100 μ l 接种于 OptiMEM 培养基 (Invitrogen)。在室温下,示例性的促进多核苷酸递送的多肽与 20nM siRNA 以 1 : 5 的摩尔比于 OptiMEM 培养基中混合 5 分钟。在孵育结束时,向混合物添加 FBS (最终为 3%),并将 50 μ l 的混合物添加至细胞。细胞在 37°C 孵育 3 小时。在孵育之后,将细胞转移至 V 底平板,并以 1500rpm 持续 5 分钟以使其沉淀。细胞重新悬浮于生长培养基 (含有谷氨酰胺、非必需氨基酸和 pen-strep 的 IMDM)。在孵育过夜后,通过应用 1ng/ml 的 LPS (Sigma) 3 小时来刺激单核细胞,以提高 TNF- α 表达的表达式。在通过 LPS 诱导之后,如上收集细胞用于 mRNA 定量,如果需要,保存上清液用于蛋白质定量。

[0501] 对于 mRNA 测量而言,根据制造商的说明书来使用从 Genospectra (CA) 获得的分支 DNA 技术。为了量化细胞中的 mRNA 水平,测量了看家基因 (cypB) 和靶基因 (TNF- α) mRNA,并使用 cypB 标准化 TNF- α 读数以获得相对的发光单位。

[0502] 一般而言,对于所有测试的 siRNA,PN643 (全长非 FITC 标记的 PN73) 和 PN690 (全长 FITC 标记的 PN73) 具有相当的 siRNA 敲低活性,如“KD”列中以“+”标明的 (表 20 显示的结果)。另外,对于所有测试的 siRNA,PN660 的 siRNA 敲低活性与 PN643 和 PN690 的相当,其表明 PN73 肽最靠近 N 端的 9 个残基的去除不会影响 siRNA 介导的靶 TNF- α mRNA 的敲低活性。PN654 针对 A19S21 和 21/21 siRNA 显示出适度的敲低活性,而不是针对 LC20 siRNA (在敲低活性列中,敲低活性以“ \pm ”表示)。但是,与 PN708 或 PN735 络合的 siRNA 并未导致针对任何 siRNA 的可观测的敲低活性。

[0503]

实施例 15

[0504]

促进多核苷酸递送的多肽 PN708

[0505] 如上所述,细胞摄取试验测定了在与肽络合时接受 Cy5- 标记的 siRNA 的细胞数目。siRNA 细胞摄取通过流式细胞仪评价 (细节参考实施例 2)。摄取以百分数表示,其如下计算:含有 Cy5- 标记的 siRNA 的细胞数目除以培养物中转染细胞和未转染细胞的总数。平均荧光强度 (MFI) 由流式细胞仪测量,并且其确定了存在于细胞内的 Cy5- 标记的 siRNA 的量。MFI 值与细胞内 Cy5- 标记的 siRNA 的量直接相关,因此,MFI 值越高表明细胞内存在的 Cy5- 标记的 siRNA 的数目越多。

[0506] 在本实施例中,PN643 (全长 PN73 减去 C 端标记物)、PN690 (带有 C 端 FITC 标记物的全长 PN73) 和 PN708 (通过缺失 PN73 的 21 个 N 端残基而衍生的 15-mer) 在 5 μ M、10 μ M、20 μ M 和 40 μ M 进行测试。PN643 和 PN690 还在 2.5 μ M 进行了测试,并且 PN690 另外测试了 1.25 μ M。PN643 和 PN708 也都在 80 μ M 进行了测试。

[0507] 如表 21 所示,非 FITC 标记的 PN73 (PN643) 肽在 10 μ M 浓度获得了将近 100% 的 siRNA 摄取。但是,当使用 FITC 标签 (PN690) 来标记 PN73 肽时,其最大的细胞摄取活性被降至大约 70%。PN708 的 siRNA 细胞摄取活性显示出剂量依赖性的增加。PN708 在 80 μ M 获得的最大 siRNA 细胞摄取活性为 95%。对于全长 PN73 肽而言,细胞生存力随着肽浓度的增加而增加。相反,与 PN708 肽一起孵育的细胞在所有测试浓度情况下保持高于 90% 的细胞生存力。在本实施例中,截短的肽 PN708 与全长 PN73 (PN690) 肽相比,有大约两倍量的 Cy5-siRNA 被递送入细胞中。

[0508]

表 21 :

[0509]

PN708 促进 siRNA 递送特征的概述

[0510]

治疗	肽浓度	%siRNA 细胞摄取	siRNA Cy5-MFI	%细胞生存力
阴性对照 (未处理)	0	0	0	98%
Cy5-LC20 siRNA + PN643	2.5 μ M	61%	8	95%
	5 μ M	96%	13	95%
	10 μ M	97%	17	94%
	20 μ M	84%	10	93%
	40 μ M	44%	7	78%
	80 μ M	12%	14	26%
Cy5-LC20 siRNA + PN690	1.25 μ M	30%	7	95%
	2.5 μ M	47%	17	97%
	5 μ M	71%	56	94%
	10 μ M	64%	67	92%
	20 μ M	55%	90	91%
	40 μ M	45%	218	71%
Cy5-LC20 siRNA + PN708	5 μ M	35%	9	96%
	10 μ M	55%	23	96%
	20 μ M	83%	85	97%
	20 μ M	93%	212	94%
	80 μ M	96%	378	91%

[0511] 通过测定多肽 PN708 对 siRNA 介导的靶基因表达减少的影响来对其进行表征。在评价 PN708 肽与 siRNA 络合时促进靶基因表达减少的能力之前,除去 PN708 肽的 C 端 FITC 标记物。在缺少 FITC 标记物的情况下,截短的示例性促进多核苷酸递送的多肽被命名为 PN766 (参考实施例 12 中的表 19)。对 siRNA/肽络合物调节人肿瘤坏死因子- α (hTNF- α) 基因表达的能力进行评估 (试验方案的细节可在实施例 3 中找到)。在本实施例中,将随机 siRNA 序列 Qneg 用作阴性对照,并且 siRNA LC20 和 LC17 被用来靶向人单核细胞中的 hTNF- α mRNA。siRNA 与受试肽的摩尔比为 1 : 5、1 : 10、1 : 25、1 : 50、1 : 75 和 1 : 100。LC20 和 LC17 以 20nM 的浓度使用。

[0512] 敲低结果为:LC20/PN766 和 LC17/PN766 siRNA/肽络合物在 1 : 5、1 : 10 和 1 : 25 时使 hTNF- α mRNA 水平降低至 Qneg siRNA 阴性对照的大约 70% -80% (即,与 Qneg 阴性对照相比,mRNA 水平降低 20% -30%)。与 Qneg 对照相比,siRNA/肽比值为 1 : 50、1 : 75 和 1 : 100 时对 hTNF- α mRNA 水平无显著影响。在 PN766 肽存在下,未观察到人单核细胞的细胞毒性效应。

[0513]

实施例 16

[0514]

肽介导的 siRNA 细胞摄取活性

[0515] siRNA 细胞摄取试验和 MFI 测量如先前在实施例 2 和 3 中所描述的进行。数据概括于表 22。各种肽在 0.63 μ M、1.25 μ M、2.5 μ M 和 5 μ M 浓度进行测试。

[0516]

表 22 :

[0517]

PN73 突变体介导的 siRNA 递送特征概况

[0518]

肽	浓度	%siRNA 细胞摄取	siRNA Cy5 MFI	%细胞生存力
未处理	N/A	0%	2	92%
PN73	0.63 μ M	52%	2	87%
	1.25 μ M	62%	4	82%
	2.5 μ M	74%	14	88%
	5 μ M	91%	22	93%
PN644	0.63 μ M	67%	4	88%
	1.25 μ M	71%	8	90%
	2.5 μ M	70%	24	86%
	5 μ M	83%	37	87%
PN645	0.63 μ M	68%	5	84%
	1.25 μ M	70%	11	89%
	2.5 μ M	78%	21	90%
	5 μ M	88%	28	90%
PN646	0.63 μ M	67%	4	81%
	1.25 μ M	70%	10	85%
	2.5 μ M	73%	24	87%
	5 μ M	88%	24	92%
PN647	0.63 μ M	71%	13	85%
	1.25 μ M	74%	34	83%
	2.5 μ M	83%	39	88%
	5 μ M	85%	41	87%
PN729	0.63 μ M	61%	4	82%
	1.25 μ M	69%	10	91%
	2.5 μ M	79%	16	92%
	5 μ M	86%	30	90%

[0519]

实施例 17

[0520]

促进多核苷酸递送的多肽

[0521] 对于表 23 的促进多核苷酸递送多肽的递送 siRNA 进入小鼠尾部成纤维 (MTF) 细胞的能力进行筛选。

[0522]

表 23 :

[0523]

筛选促进递送的多肽的 siRNA 细胞摄取活性

[0524]

肽	氨基酸序列	名称
PN680	(SEQ ID NO :87) RSVCRQIKICRRRGGCYKCTNRPY- 酰胺	Androctonin

PN665	(SEQ ID NO :88) GFFALIPKIISSPLFKTLLSAVGSALSSSGDQE- 酰胺	Paradaxin
PN734	(SEQ ID NO :89) GTAMRILGGVIPRKKRRQRRRPPQ- 酰胺	m- 钙蛋白 酶 +TAT
PN681	(SEQ ID NO :90) KKKKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKK- 酰胺	MARCKS
PN694	(SEQ ID NO :91) RQIKIWFQNRMRKWK- 酰胺	穿透素
PN714	(SEQ ID NO :92) RQIRIWFQNRMRWR- 酰胺	PenArg
PN760	(SEQ ID NO :93) RKKRRQRRRPPVAYISRGGVSTYYSDTVKGRFTRQKYNKRA- 酰胺	TAT+ 肽 P3a
PN759	(SEQ ID NO :94) LGLLLRHLRHHSNLLANIPRKKRRQRRRPP- 酰胺	结合蛋白 + TAT
PN682	(SEQ ID NO :95) KETWWETWWTEWSQPKKKRKV- 酰胺	Pep-1

[0525] 与 siRNA 络合的促进多核苷酸递送多肽的 siRNA 细胞摄取活性列于表 23 中。表 24 概括了每种多肽的 siRNA 细胞摄取数据、平均荧光强度 (MFI) 测量值和细胞生存力数据。达到 75% 或更高 siRNA 细胞摄取百分数的多肽在“处理”列中以灰色突出显示。这些突出显示的 siRNA/ 肽络合物中每一种的具体 siRNA 细胞摄取百分数在“% siRNA 细胞摄取”列中也以灰色突出显示。

[0526] LC20 是用于 siRNA 靶向人肿瘤坏死因子- α (hTNF- α) mRNA 的寡基, 并由以下核糖核苷酸序列表示:

[0527] (SEQ ID NO :96)

[0528] UAGGGUCGGAACCCAAGCUUA

[0529] 通过流式细胞仪来评估细胞的 siRNA 摄取 (细节参考实施例 2)。摄取以百分数表示, 其如下计算: 含有 Cy5- 标记的 siRNA 的细胞数目除以培养物中转染细胞和未转染细胞的总数。平均荧光强度 (MFI) 由流式细胞仪测量, 并且其确定了存在于细胞内的 Cy5- 标记

的 siRNA 的量。MFI 值与细胞内 Cy5- 标记的 siRNA 的量直接相关,因此,MFI 值越高表明细胞内的 Cy5- 标记的 siRNA 的数目越多。

[0530] 数据显示,当与 siRNA 络合时,PN680、PN681、PN709、PN760、PN759 和 PN682 递送 siRNA 进入细胞中。表 23 中显示的多肽的筛选结果示于表 24 中。

[0531] 表 24 :

[0532] 多肽介导的 siRNA 递送筛选数据 (NT = 未检测)

[0533]

处理 siRNA/肽络合物	肽 浓度	%siRNA 细胞摄取	Cy5-siRNA MFI	%细胞 生存力
未处理	N/A	0.0%	0.0	97.6%
Cy5-LC20 + PN643 (阳性对照)	5 μ M	95.4%	7.2	98.8%
Cy5-LC20 + PN680	0.63 μ M	0.2%	N/T	98.2%
	2.5 μ M	1.8%	1.4	98.3%
	10 μ M	82.6%	4.5	99.2%
	40 μ M	79.1%	5.2	95.7%
Cy5-LC20 + PN665	0.63 μ M	0.0%	N/T	97.7%
	2.5 μ M	0.6%	N/T	95.1%
	10 μ M	N/T	N/T	N/T
	40 μ M	N/T	N/T	N/T
Cy5-LC20 + PN734	0.63 μ M	0.1%	N/T	98.2%
	2.5 μ M	0.2%	N/T	98.7%
	10 μ M	1.2%	1.3	98.4%
	40 μ M	4.5%	1.6	97.0%
Cy5-LC20 + PN681	0.63 μ M	0.2%	1.8	97.1%
	2.5 μ M	69.9%	4.6	98.9%
	10 μ M	97.3%	15.3	98.2%
	40 μ M	91.2%	13.7	92.6%
Cy5-LC20 + PN694	0.63 μ M	0.2%	1.4	97.1%
	2.5 μ M	0.2%	1.8	97.9%
	10 μ M	48.0%	4.2	97.8%
	40 μ M	54.0%	3.9	83.6%
Cy5-LC20 + PN714	0.63 μ M	0.4%	1.2	95.1%
	2.5 μ M	0.5%	2.3	96.4%
	10 μ M	19.1%	2.5	97.6%
	40 μ M	43.0%	4.9	94.7%
Cy5-LC20 + PN709	0.63 μ M	0.1%	1.0	94.0%
	2.5 μ M	0.2%	1.0	96.6%
	10 μ M	18.6%	1.9	97.1%
	40 μ M	76.6%	5.8	97.1%
Cy5-LC20 + PN760	0.63 μ M	60%	2.9	84.7%
	2.5 μ M	85.5%	78.5	90.8%
	10 μ M	90.6%	96.9	91.9%
	40 μ M	82.8%	77.4	83.2%
Cy5-LC20 + PN759	0.63 μ M	43%	2.1	81.7%
	2.5 μ M	72.9%	7.3	85.2%
	10 μ M	83.6%	40.9	86.7%
	40 μ M	25%	10.5	26.6%
Cy5-LC20 + PN682	0.63 μ M	52.1%	2.4	86.2%
	2.5 μ M	50.6%	2.2	91.3%
	10 μ M	56.9%	2.3	90.6%
	40 μ M	92%	9.0	97.1%

[0534] 如表 24 题为“% siRNA 细胞摄取”的列中所显示的，“未处理”的阴性对照显示无 siRNA 细胞摄取，而阳性对照肽达到了 95% 的 siRNA 细胞摄取活性百分数。与促进多核苷酸递送的多肽 PN680、PN681、PN709、PN760、PN759 或 PN682 络合的 Cy5 轭合的 LC20 siRNA 达到了超过 75% 或更高的 siRNA 细胞摄取活性百分数。多肽 PN694 和 PN714 分别表现出 54% 和 43% 的适度 siRNA 细胞摄取活性。多肽 PN665 和 PN734 经证明没有显著的 siRNA 细胞摄取活性（小于 5%）。

[0535] 通过分析平均荧光强度 (MFI) 来进一步表征多肽转染 siRNA 进入细胞的能力。当细胞摄取试验测定含有 Cy5 标记的 siRNA 的细胞百分数的同时, MFI 测量测定了进入细胞的 Cy5 标记的 siRNA 的相对平均量。如表 24 题为“siRNA Cy5 MFI”的列中所显示的, 由阳性对照肽 PN643 递送的 Cy5 标记的 siRNA 达到约 7 个单位的 MFI。如所预期的, “未处理”的阴性对照没有可测量的 MFI。未检测促进多核苷酸递送的多肽 PN665 的 MFI。PN743、PN694 和 PN714 的 MFI 测量值显著低于阳性对照的 MFI 测量值。促进多核苷酸递送的多肽 PN680、PN709 和 PN682 显示的 MFI 测量值与 PN643 阳性对照的测量值相当, 而 PN681 的 MFI 是阳性对照的两倍。PN760 和 PN759 的 MFI 测量值比阳性对照的测量值分别高约 13 倍和 6 倍。

[0536] 以下的规程用来测试表 23 中列出的促进多核苷酸递送的多肽。在完全培养基中转染的前一天, 将大约 80,000 个/孔的小鼠尾部成纤维 (MTF) 细胞平铺于 24 孔平板中。除阳性对照之外, 每种递送肽在 0.5 μ M Cy5 标记的 siRNA 存在下, 以 0.63 μ M、2.5 μ M、10 μ M 和 40 μ M 的浓度进行测试。对于 siRNA/肽络合物而言, Cy5 标记的 siRNA 和肽分别以终浓度的两倍在 Opti-MEM[®] 培养基 (Invitrogen) 中进行稀释。混合相同体积的 siRNA 和肽, 并允许其在室温络合 5 分钟。将 siRNA/肽络合物添加至事先用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤的细胞。细胞在 37°C, 5% CO₂ 下转染 3 小时。用 PBS 洗涤细胞, 胰蛋白酶进行处理, 然后通过流式细胞仪分析。通过细胞内的 Cy5 荧光强度来测量 siRNA 细胞摄取。使用碘化丙啶摄取或 AnnexinV-PE (BD Biosciences) 染色来测定细胞生存力。为了区别细胞摄取和被标记的 siRNA (或荧光素标记的肽) 的膜插入, 使用锥虫蓝猝灭细胞膜表面的任何荧光。向细胞添加锥虫蓝 (Sigma) 至 0.04% 的终浓度, 并在流式细胞仪上再次运行以评估是否具有指示荧光定位于细胞膜的任何荧光强度变化。

[0537] 实施例 18

[0538] siRNA 和多肽的敲低活性

[0539] 评估了 siRNA/肽络合物调节人肿瘤坏死因子- α (hTNF- α) 基因表达的能力。

[0540] 将人单核细胞用作模型系统, 以测定 siRNA/肽络合物对 hTNF- α 基因表达的作用。Qneg 代表随机 siRNA 序列并起阴性对照的作用。将观察到的 Qneg 敲低活性标准化至 100% (100% 基因表达水平), 并且下列 siRNA 中每种敲低活性表示为阴性对照的相对百分数: A19S21MD8, 21/21MD8 和 LC20。A19S21MD8, 21/21MD8 和 LC20 是靶向 hTNF- α mRNA 的 siRNA。

[0541] 多肽 PN602 是先前实施例中使用的阳性对照的乙酰化形式, 在本实施例中, 其作为阳性对照用于有效递送 siRNA 进入人单核细胞并允许 hTNF- α mRNA 的敲低活性水平由 siRNA 介导。

[0542] 数据显示, 促进多核苷酸递送的多肽 PN680 递送 siRNA 进入细胞, 并准许有效的 siRNA 介导的基因沉默。PN602、PN680 和 PN681 的敲低活性示于表 25。符号“+”表示肽/siRNA 络合物的敲低活性为 Qneg 阴性对照 siRNA 的 80% (与 Qneg 阴性对照相比, mRNA 水平降低 20%)。“+/-”表示肽/siRNA 络合物的敲低活性为 Qneg 阴性对照 siRNA 的大约 90% (与 Qneg 阴性对照相比, mRNA 水平降低 10%)。最后,“-”表示肽/siRNA 络合物与 Qneg 阴性对照相比无显著的敲低活性。

[0543] 表 25:

[0544] 与多肽络合的 siRNA 的 siRNA 敲低活性

[0545]

肽 ID#	siRNA: 肽 比值	siRNA		
		A19S21 MD8	21/21 MD8	LC20
PN602 (阳性对照)	1:5	+/-	+/-	+/-
	1:10	+/-	+/-	+/-
PN680	1:5	+	+	+
	1:10	+/-	+/-	+
PN681	1:5	+/-	-	-
	1:10	+/-	-	-

[0546] 表 25 中显示的结果表明,全部三种 siRNA 与促进多核苷酸递送的多肽(阳性对照 PN602)以 1 : 5 至 1 : 10 的比值络合时,和与相同多肽络合的 Qneg 阴性对照相比,适度降低了 hTNF- α 基因表达水平。但是,相同的 siRNA 与促进多核苷酸递送的多肽 PN681 以 1 : 5 至 1 : 10 络合时,与 Qneg 阴性对照 siRNA/PN681 络合物相比,几乎未显示敲低活性。相反,促进多核苷酸递送的多肽 PN680 与任何 hTNF- α 特异性 siRNA 以 1 : 5 的比值络合时,与 Qneg/PN680 对照络合物相比,表现出显著的 hTNF- α mRNA 敲低活性。此外,LC20/PN680 络合物比值为 1 : 10 时,与 Qneg/PN680 对照络合物相比,经证实也具有显著的敲低活性。

[0547] 健康人血从 Golden West Biologicals(CA) 购买,外周血单核细胞(PBMC)使用 Ficoll-Paque plus(Amersham) 梯度从血液中纯化。然后使用由 Miltenyi Biotech 获得的磁微珠从 PBMC 部分纯化人单核细胞。将分离的人单核细胞重新悬浮于添加有 4mM 谷氨酰胺、10% FBS、1x 非必需氨基酸和 1x pen-strep 的 IMDM 中,并在 4°C 贮存直至使用。

[0548] 在 96 孔平底平板中,将人单核细胞以 100K/孔 /100 μ l 接种于 OptiMEM 培养基(Invitrogen)。在室温下,促进多核苷酸递送的多肽与 20nM siRNA 以 1 : 5 或 1 : 10 的摩尔比于 OptiMEM 培养基中混合 5 分钟。在孵育结束时,向混合物添加 FBS(最终为 3%),并将 50 μ l 的混合物添加至细胞。细胞在 37°C 孵育 3 小时。在孵育之后,将细胞转移至 V 底平板,并以 1500rpm 持续 5 分钟以使其沉淀。细胞重新悬浮于生长培养基(含有谷氨酰胺、非必需氨基酸和 pen-strep 的 IMDM)。在孵育过夜后,通过应用 1ng/ml 的 LPS(Sigma)3 小时来刺激单核细胞,以提高 TNF- α 表达的表达水平。在通过 LPS 诱导之后,如上收集细胞用于 mRNA 定量,如果需要,保存上清液用于蛋白质定量。

[0549] 对于 mRNA 测量而言,根据制造商的说明书来使用从 Genospectra(CA) 获得的分支 DNA 技术。为了量化细胞中的 mRNA 水平,测量了看家基因(cypB)和靶基因(TNF- α)mRNA,并使用 cypB 标准化 TNF- α 读数以获得相对的发光单位。

序列表

<110> 纳斯泰克制药公司

<120> 用于 RNA 治疗的肽核糖核酸缩合粒子的复合物及方法

<130>06-32PCT

<140>

<141>

<150>60/727, 216

<151>2005-10-14

<150>60/733, 664

<151>2005-11-04

<150>60/825, 878

<151>2006-09-15

<160>96

<170>PatentIn Ver. 3.3

<210>1

<211>7

<212>PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400>1

Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1

5

<210>2

<211>16

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 :未知穿透素 PTD 肽

<400>2

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210>3

<211>34

<212>PRT

<213> 单纯疱疹病毒

<400>3

Asp Ala Ala Thr Ala Thr Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr
1 5 10 15
Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Pro
 20 25 30

Val Asp

<210>4

<211>16

<212>PRT

<213> 人类

<400>4

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
1 5 10 15

<210>5

<211>16

<212>PRT

<213> 人类

<400>5

Ala Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro
1 5 10 15

<210>6

<211>15

<212>PRT

<213> 人类

<400>6

Val Thr Val Leu Ala Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly
1 5 10 15

<210>7

<211>17

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :gp41 融合肽

<400>7

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15
Ala

<210>8

<211>17

<212>PRT

<213> 窄吻凯门鳄

<400>8

Met Gly Leu Gly Leu His Leu Leu Val Leu Ala Ala Ala Leu Gln Gly
1 5 10 15
Ala

<210>9

<211>24

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 :hCT- 衍生肽

<400>9

Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro

20

<210>10

<211>26

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 :未知转运体肽

<400>10

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Lys Tle Asn Leu Lys

1

5

10

15

Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu

20

25

<210>11

<211>16

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 :未知寡聚物肽

<400>11

Thr Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Lys Lys Lys Lys

1

5

10

15

<210>12

<211>7

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 :未知精氨酸肽

<400>12

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210>13

<211>18

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :两亲性模型肽

<400>13

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys

1 5 10 15

Leu Ala

<210>14

<211>16

<212>PRT

<213> 流感病毒

<400>14

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly

1 5 10 15

<210>15

<211>16

<212>PRT

<213> 仙台病毒

<400>15

Phe Phe Gly Ala Val Ile Gly Thr Ile Ala Leu Gly Val Ala Thr Ala

1 5 10 15

<210>16

<211>16

<212>PRT

<213> 呼吸道合胞病毒

<400>16

Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val

1	5	10	15
<210>17			
<211>16			
<212>PRT			
<213> 人免疫缺陷病毒			
<400>17			
Gly Val Phe Val Leu Gly Phe Leu Gly Phe Leu Ala Thr Ala Gly Ser			
1	5	10	15
<210>18			
<211>16			
<212>PRT			
<213> 埃博拉病毒			
<400>18			
Gly Ala Ala Ile Gly Leu Ala Trp Ile Pro Tyr Phe Gly Pro Ala Ala			
1	5	10	15
<210>19			
<211>56			
<212>PRT			
<213> 未知有机体			
<220>			
<223> 未知有机体的描述 : 示例性的锌指基序			
<400>19			
Ala Cys Thr Cys Pro Tyr Cys Lys Asp Ser Glu Gly Arg Gly Ser Gly			
1	5	10	15
Asp Pro Gly Lys Lys Lys Gln His Ile Cys His Ile Gln Gly Cys Gly			
	20	25	30
Lys Val Tyr Gly Lys Thr Ser His Leu Arg Ala His Leu Arg Trp His			
	35	40	45
Thr Gly Glu Arg Pro Phe Met Cys			
	50	55	
<210>20			
<211>54			

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的锌指基序

<400>20

Ala	Cys	Thr	Cys	Pro	Asn	Cys	Lys	Asp	Gly	Glu	Lys	Arg	Ser	Gly	Glu
1				5					10					15	
Gln	Gly	Lys	Lys	Lys	His	Val	Cys	His	Ile	Pro	Asp	Cys	Gly	Lys	Thr
				20					25					30	
Phe	Arg	Lys	Thr	Ser	Leu	Leu	Arg	Ala	His	Val	Arg	Leu	His	Thr	Gly
				35				40						45	
Glu	Arg	Pro	Phe	Val	Cys										
				50											

<210>21

<211>55

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的锌指基序

<400>21

Ala	Cys	Thr	Cys	Pro	Asn	Cys	Lys	Glu	Gly	Gly	Gly	Arg	Gly	Thr	Asn
1				5					10					15	
Leu	Gly	Lys	Lys	Lys	Gln	His	Ile	Cys	His	Ile	Pro	Gly	Cys	Gly	Lys
				20					25					30	
Val	Tyr	Gly	Lys	Thr	Ser	His	Leu	Arg	Ala	His	Leu	Arg	Trp	His	Ser
				35				40						45	
Gly	Glu	Arg	Pro	Phe	Val	Cys									
				50										55	

<210>22

<211>56

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的锌指基序

<400>22

Ala	Cys	Scr	Cys	Pro	Asn	Cys	Arg	Glu	Gly	Glu	Gly	Arg	Gly	Ser	Asn
1				5					10					15	
Glu	Pro	Gly	Lys	Lys	Lys	Gln	His	Ile	Cys	His	Ile	Glu	Gly	Cys	Gly
			20					25						30	
Lys	Val	Tyr	Gly	Lys	Thr	Ser	His	Leu	Arg	Ala	His	Leu	Arg	Trp	His
			35					40						45	
Thr	Gly	Glu	Arg	Pro	Phe	Ile	Cys								
			50				55								

<210>23

<211>60

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的锌指基序

<400>23

Arg	Cys	Thr	Cys	Pro	Asn	Cys	Thr	Asn	Glu	Met	Ser	Gly	Leu	Pro	Pro
1				5					10					15	
Ile	Val	Gly	Pro	Asp	Glu	Arg	Gly	Arg	Lys	Gln	His	Ile	Cys	His	Ile
				20					25					30	
Pro	Gly	Cys	Glu	Arg	Leu	Tyr	Gly	Lys	Ala	Ser	His	Leu	Lys	Thr	His
				35					40					45	
Leu	Arg	Trp	His	Thr	Gly	Glu	Arg	Pro	Phe	Leu	Cys				
				50					55					60	

<210>24

<211>58

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的锌指基序

<400>24

Thr Cys Asp Cys Pro Asn Cys Gln Glu Ala Glu Arg Leu Gly Pro Ala
 1 5 10 15
 Gly Val His Ile Arg Lys Lys Asn Ile His Ser Cys His Ile Pro Gly
 20 25 30
 Cys Gly Lys Val Tyr Gly Lys Thr Ser His Leu Lys Ala His Leu Arg
 35 40 45
 Trp His Thr Gly Glu Arg Pro Phe Val Cys
 50 55

<210>25

<211>53

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的锌指基序

<400>25

Arg Cys Thr Cys Pro Asn Cys Lys Ala Ile Lys His Gly Asp Arg Gly
 1 5 10 15
 Ser Gln His Thr His Leu Cys Ser Val Pro Gly Cys Gly Lys Thr Tyr
 20 25 30
 Lys Lys Thr Ser His Leu Arg Ala His Leu Arg Lys His Thr Gly Asp
 35 40 45
 Arg Pro Phe Val Cys
 50

<210>26

<211>56

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的锌指基序

<400>26

Pro Gln Ile Ser Leu Lys Lys Lys Ile Phe Phe Phe Ile Phe Ser Asn
 1 5 10 15

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的肽

<400>28

Lys	Glu	Thr	Trp	Trp	Glu	Thr	Trp	Trp	Thr	Glu	Trp	Ser	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15	
Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Pro	Pro	Gln				
			20					25							

<210>29

<211>28

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的肽

<400>29

Trp	Trp	Thr	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Glu	Trp	Ser	Gln	Pro	Lys
1				5					10					15	
Lys	Lys	Lys	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Pro	Pro	Gln				
			20					25							

<210>30

<211>23

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的肽

<400>30

Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Ser	Gln	Pro	Lys	Lys	Lys
1				5					10					15	
Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys									
			20												

<210>31

<211>23

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的肽

<400>31

Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Ser	Gln	Pro	Arg	Arg	Arg
1				5						10						15
Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg									
																20

<210>32

<211>28

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的肽

<400>32

Lys	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Glu	Trp	Ser	Gln	Pro	Lys
1				5						10						15
Lys	Lys	Lys	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Lys	Lys	Lys				
																20
																25

<210>33

<211>20

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的肽

<400>33

Lys	His	Lys	His	Lys	His	Lys	His	Lys	His	Lys	His	Lys	His	Lys	His
1				5						10					15

Lys His Lys His
20

<210>34

<211>20

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的肽

<400>34

Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His Lys His
1 5 10 15
Lys His Lys His
20

<210>35

<211>30

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的肽

<220>

<221>MOD_RES

<222> (27)

<223> 可变的残基

<400>35

His His His His His His Arg Ser Val Cys Arg Gln Ile Lys Ile Cys
1 5 10 15
Arg Arg Arg Gly Gly Cys Tyr Lys Cys Thr Xaa Arg Pro Tyr
20 25 30

<210>36

<211>29

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的肽

<220>

<221>MOD_RES

<222>(21)

<223> 可变的残基

<400>36

Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala
1				5						10					15	
Gly	Phe	Ile	Glu	Xaa	Gly	Trp	Glu	Gly	Met	Ile	Asp	Gly				
			20						25							

<210>37

<211>36

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的肽

<400>37

Lys	Gly	Ser	Lys	Lys	Ala	Val	Thr	Lys	Ala	Gln	Lys	Lys	Glu	Gly	Lys
1				5						10				15	
Lys	Arg	Lys	Arg	Ser	Arg	Lys	Glu	Ser	Tyr	Ser	Val	Tyr	Val	Tyr	Lys
			20						25				30		
Val	Leu	Lys	Gln												
			35												

<210>38

<211>9

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 : 示例性的肽

<400>38

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210>39

<211>20

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 :示例性的肽

<400>39

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys

20

<210>40

<211>18

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 :示例性的肽

<400>40

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg

<210>41

<211>30

<212>PRT

<213> 未知有机体

<220>

<223> 未知有机体的描述 :示例性的肽

<400>41

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>44

ccgucagccg auuugcuaut

21

<210>45

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>45

auagcaaauc ggcugacggt t

21

<210>46

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>46

gggucggaac ccaagcuuat t

21

<210>47

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>47

uaagcuuggg uuccgaccct a

21

<210>48

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>48

cgggacucua gcgauacuua t

21

<210>49

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>49

uaaguaugcu agagucccgt t

21

<210>50

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>50

acugacagcc agacagcgat t

21

<210>51

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>51

ucgcugucug gcugucagut t

21

<210>52

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>52

agacagcgac caaaagaaut t

21

<210>53

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>53

auucuuuugg ucgcugucut t

21

<210>54

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>54

augaagaucu guuccacat t

21

<210>55

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>55	
ugguggaaca gaucuucaut t	21
<210>56	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA	
<400>56	
gaucuguucc accauugaat t	21
<210>57	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA	
<400>57	
uucaauggug gaacagauct t	21
<210>58	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA	

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>58

gcaauugagg agugccugat t

21

<210>59

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>59

ucaggcacuc cucaauugct t

21

<210>60

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>60

uugaggagug ccugauuaat t

21

<210>61

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>61

uuaaucaggc acuccucaat t

21

<210>62

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>62

ggaucuuauu ucuucggagt t

21

<210>63

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>63

cuccgaagaa auaagaucct t

21

<210>64

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>64

cuacacaaau cagcgauuut t

21

<210>65

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :合成的 siRNA

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>65

aaaucgcuga uuuguguagt c

21

<210>66

<211>125

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的多肽

<400>66

Met Pro Glu Pro Ala Lys Ser Ala Pro Ala Pro Lys Lys Gly Ser Lys

1

5

10

15

Lys Ala Val Thr Lys Ala Gln Lys Lys Asp Ser Lys Lys Arg Lys Arg

20

25

30

Ser Arg Lys Glu Ser Tyr Ser Val Tyr Val Tyr Lys Val Leu Lys Val
 35 40 45
 His Pro Asp Thr Gly Ile Ser Ser Lys Ala Met Gly Ile Met Asn Ser
 50 55 60
 Phe Val Asn Asp Ile Phe Glu Arg Ile Ala Gly Glu Ala Ser Arg Leu
 65 70 75 80
 Ala His Tyr Asn Lys Arg Ser Thr Ile Thr Ser Arg Glu Ile Gln Thr
 85 90 95
 Ala Val Arg Leu Leu Leu Pro Gly Glu Leu Ala Lys His Ala Val Ser
 100 105 110
 Glu Gly Thr Lys Ala Val Thr Lys Tyr Thr Ser Ser Lys
 115 120 125

<210>67

<211>36

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>67

Lys Gly Ser Lys Lys Ala Val Thr Lys Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys
 1 5 10 15
 Lys Arg Lys Arg Ser Arg Lys Glu Ser Tyr Trp Val Tyr Val Tyr Lys
 20 25 30
 Val Leu Lys Gln
 35

<210>68

<211>36

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>68

Lys Gly Ser Lys Lys Ala Val Thr Lys Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Arg Ser Arg Lys Trp Ser Tyr Ser Val Tyr Val Tyr Lys
 20 25 30

Val Leu Lys Gln
 35

<210>69

<211>36

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>69

Lys Gly Ser Lys Lys Ala Val Thr Lys Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Arg Ser Arg Lys Phe Ser Tyr Ser Val Tyr Val Tyr Lys
 20 25 30

Val Leu Lys Gln
 35

<210>70

<211>36

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>70

Lys Gly Ser Phe Lys Ala Val Thr Lys Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Arg Ser Phe Lys Phe Ser Tyr Ser Val Tyr Val Tyr Lys
 20 25 30

Val Leu Lys Gln
 35

<210>71

<211>35

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>71

Lys Gly Ser Phe Lys Ala Val Thr Lys Ala Gln Lys Lys Phe Gly Lys

1 5 10 15

Lys Arg Lys Arg Ser Arg Lys Ser Phe Ser Val Tyr Val Tyr Lys Val

 20 25 30

Leu Lys Gln

 35

<210>72

<211>23

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>72

Lys Gly Ser Lys Lys Ala Val Thr Lys Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys

1 5 10 15

Lys Arg Lys Arg Ser Arg Lys

 20

<210>73

<211>25

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>73

Lys Lys Asp Gly Lys Lys Arg Lys Arg Ser Arg Lys Glu Ser Tyr Ser

1 5 10 15

Val Tyr Val Tyr Lys Val Leu Lys Gln
 20 25

<210>74

<211>15

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>74

Arg Lys Glu Ser Tyr Ser Val Tyr Val Tyr Lys Val Leu Lys Gln
 1 5 10 15

<210>75

<211>36

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>75

Lys Gly Ser Lys Lys Ala Val Thr Lys Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys
 1 5 10 15
 Lys Arg Lys Arg Ser Arg Lys Glu Ser Tyr Ser Val Tyr Val Tyr Lys
 20 25 30
 Val Leu Lys Gln
 35

<210>76

<211>33

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>76

Lys Lys Ala Val Thr Lys Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys Lys Arg Lys
 1 5 10 15
 Arg Ser Arg Lys Glu Ser Tyr Ser Val Tyr Val Tyr Lys Val Leu Lys
 20 25 30
 Gln

<210>77

<211>30

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>77

Val Thr Lys Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys Lys Arg Lys Arg Ser Arg
 1 5 10 15
 Lys Glu Ser Tyr Ser Val Tyr Val Tyr Lys Val Leu Lys Gln
 20 25 30

<210>78

<211>27

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>78

Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys Lys Arg Lys Arg Ser Arg Lys Glu Ser
 1 5 10 15
 Tyr Ser Val Tyr Val Tyr Lys Val Leu Lys Gln
 20 25

<210>79

<211>24

<212>PRT

<213> 人工序列

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>82

Arg Lys Glu Ser Tyr Ser Val Tyr Val Tyr Lys Val Leu Lys Gln
1 5 10 15

<210>83

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>83

Ser Tyr Ser Val Tyr Val Tyr Lys Val Leu Lys Gln
1 5 10

<210>84

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>84

Val Tyr Val Tyr Lys Val Leu Lys Gln
1 5

<210>85

<211>6

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>85

Tyr Lys Val Leu Lys Gln

1 5

<210>86

<211>5

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>86

Lys Val Leu Lys Gln

1 5

<210>87

<211>25

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>87

Arg Ser Val Cys Arg Gln Ile Lys Ile Cys Arg Arg Arg Gly Gly Cys

1 5 10 15

Tyr Tyr Lys Cys Thr Asn Arg Pro Tyr

20 25

<210>88

<211>33

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>88

Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Phe Lys
 1 5 10 15
 Thr Leu Leu Ser Ala Val Gly Ser Ala Leu Ser Ser Ser Gly Asp Gln
 20 25 30
 Glu

<210>89

<211>24

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>89

Gly Thr Ala Met Arg Ile Leu Gly Gly Val Ile Pro Arg Lys Lys Arg
 1 5 10 15
 Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
 20

<210>90

<211>25

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>90

Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser
 1 5 10 15
 Gl y Phe Ser Phe Lys Lys Asn Lys Lys
 20 25

<210>91

<211>16

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>91

Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys
1			5					10					15		

<210>92

<211>16

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>92

Arg	Gln	Ile	Arg	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Arg	Trp	Arg	Arg
1			5					10					15		

<210>93

<211>41

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>93

Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Pro	Pro	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser
1			5					10					15		
Arg	Gly	Gly	Val	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe
			20					25				30			
Thr	Arg	Gln	Lys	Tyr	Asn	Lys	Arg	Ala							
			35				40								

<210>94

<211>30

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>94

Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Arg	His	Leu	Arg	His	His	Ser	Asn	Leu	Leu	Ala
1				5					10					15	
Asn	Ile	Pro	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Pro	Pro		
			20					25					30		

<210>95

<211>21

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的肽

<400>95

Lys	Glu	Thr	Trp	Trp	Glu	Thr	Trp	Trp	Thr	Glu	Trp	Ser	Gln	Pro	Lys
1				5					10					15	
Lys	Lys	Arg	Lys	Val											
20															

<210>96

<211>21

<212>RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 siRNA

<400>96

uagggucgga acccaagcuu a

21

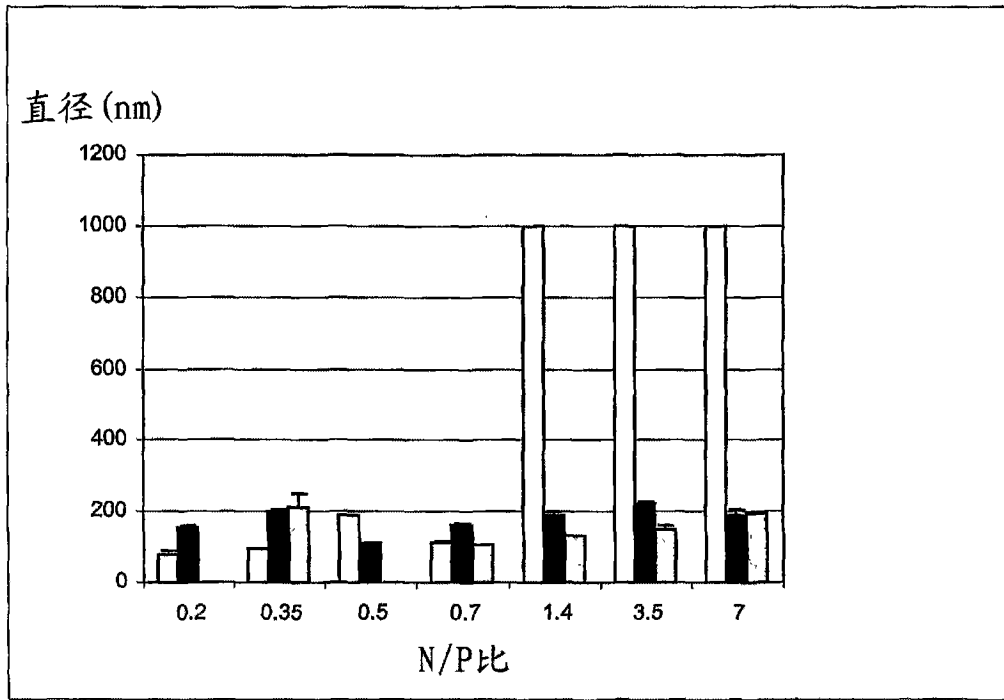


图 1

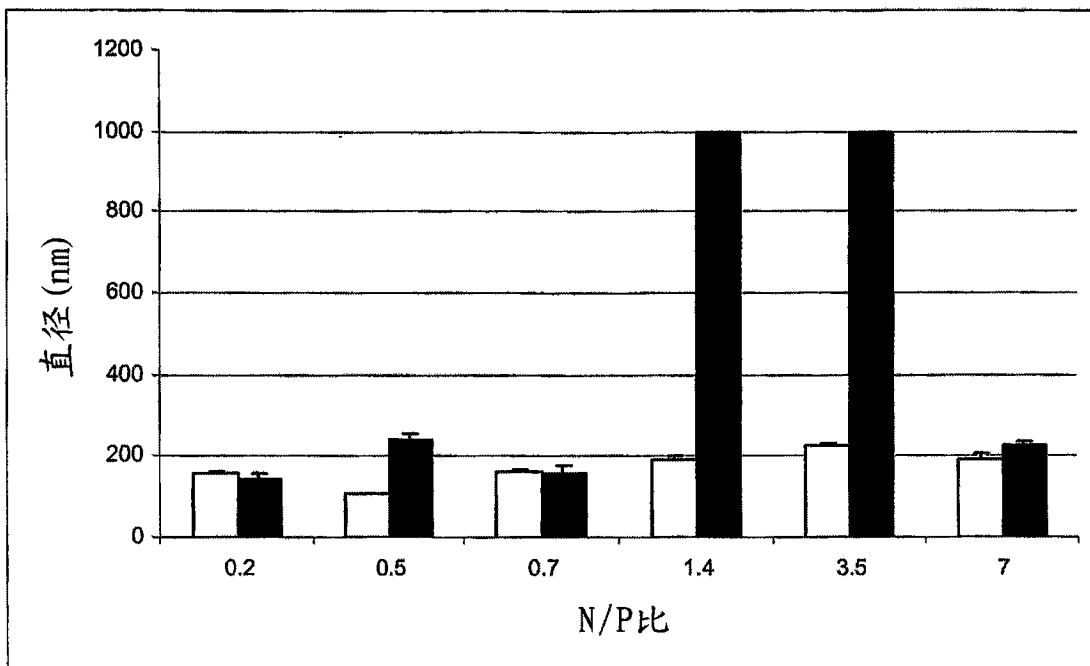


图 2

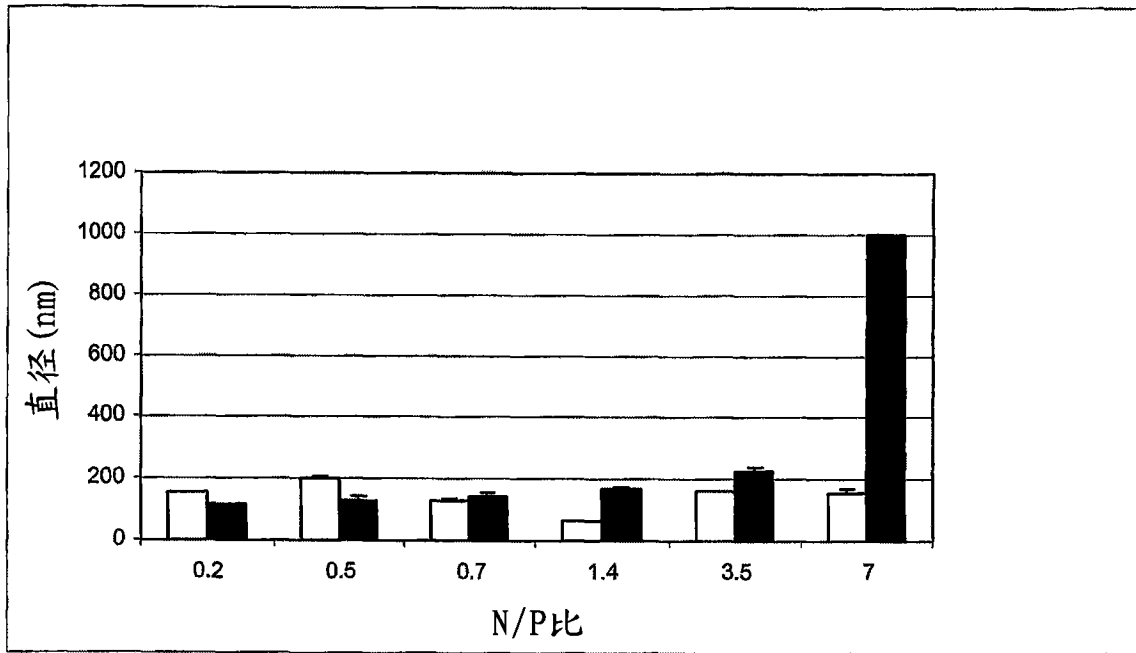


图 3

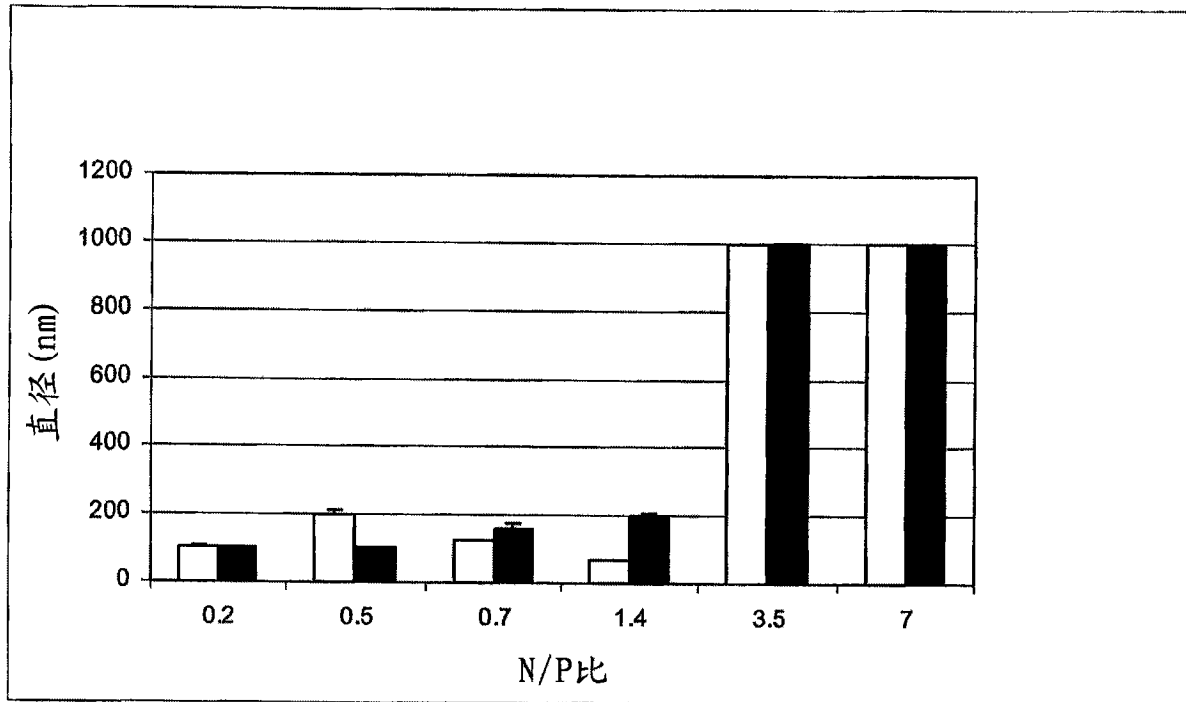


图 4

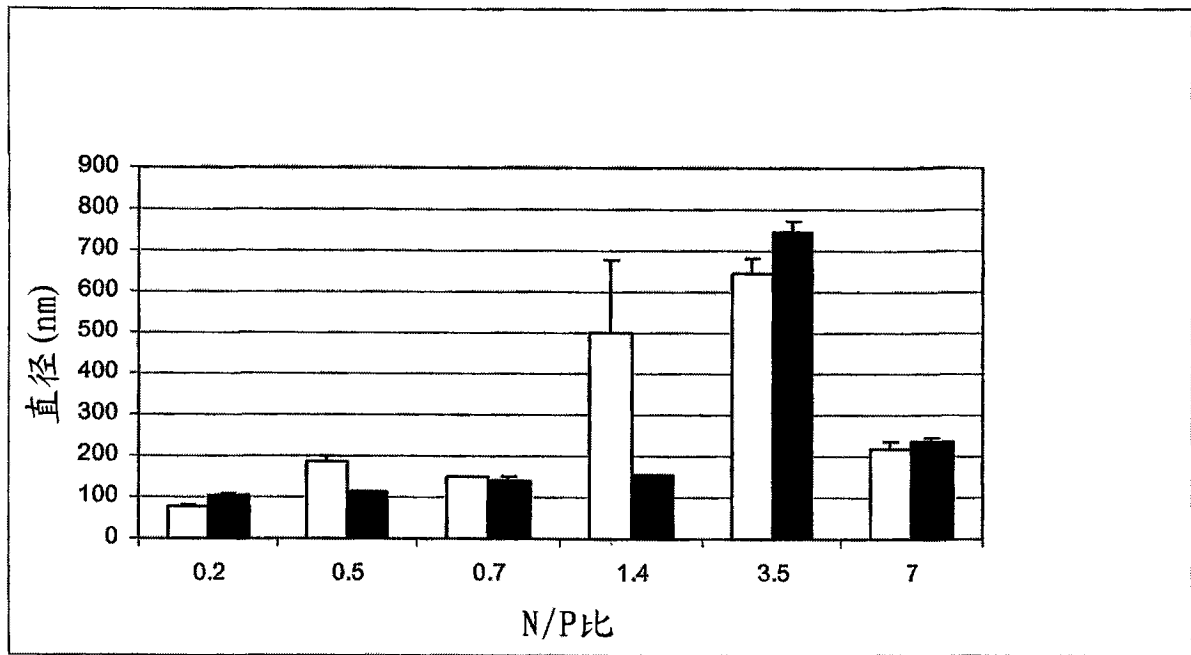


图 5

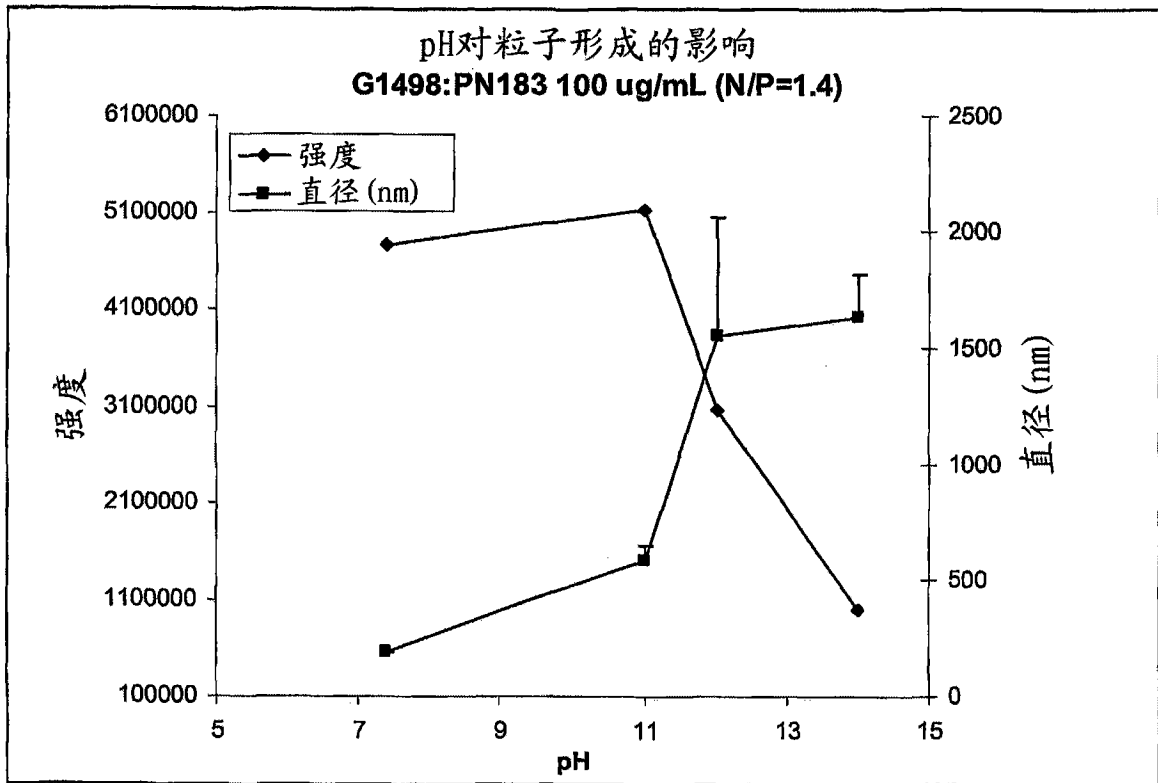


图 6

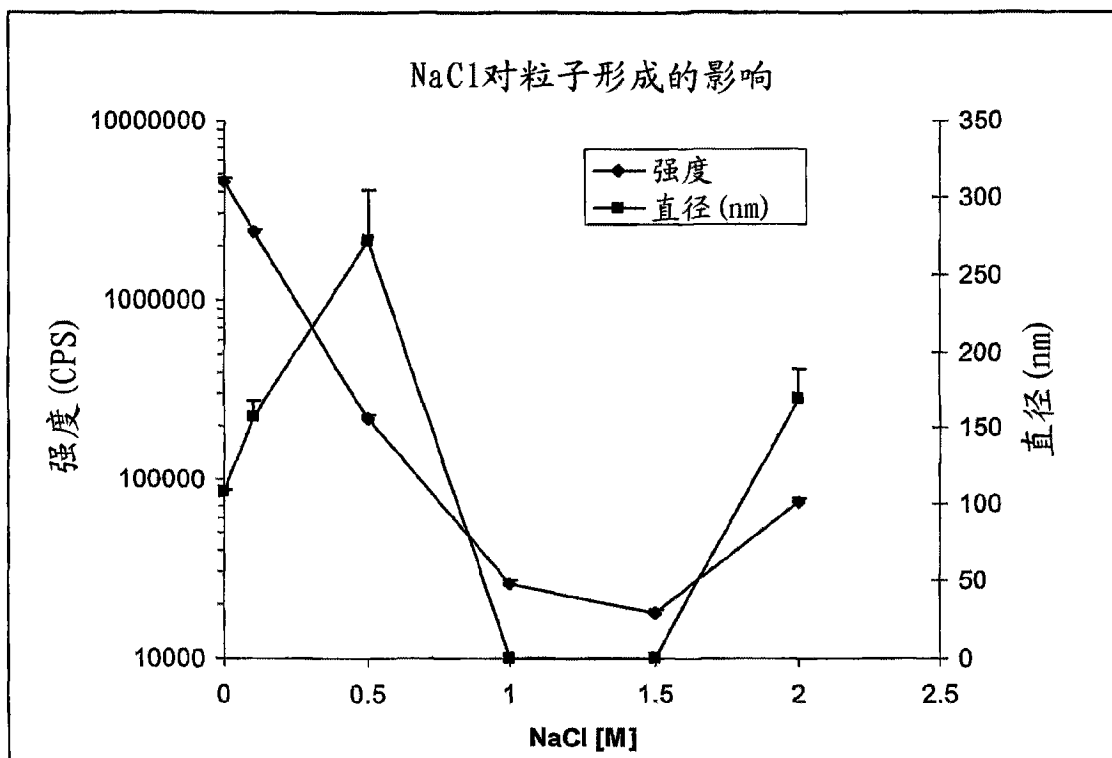


图 7

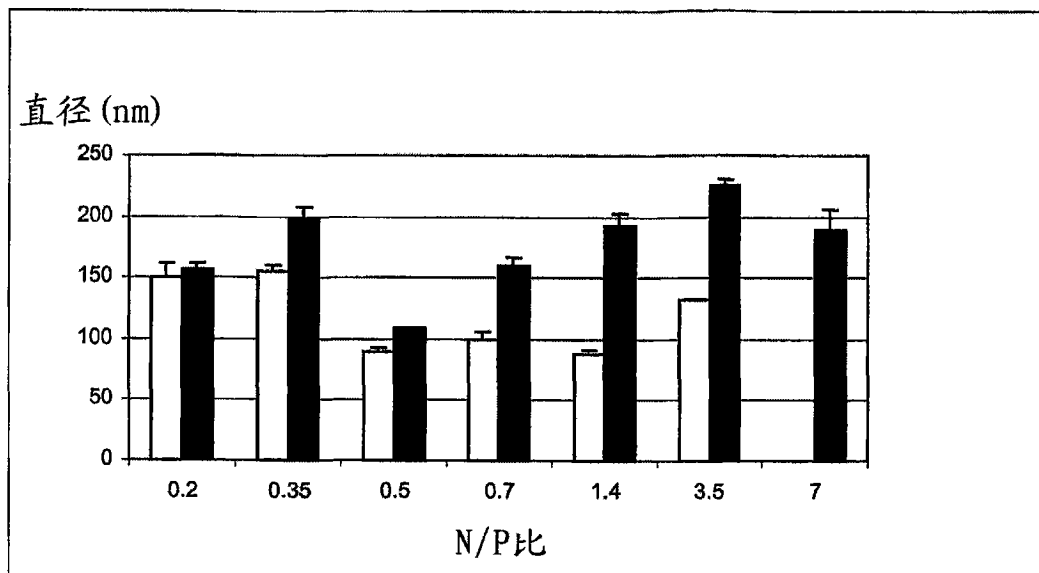


图 8

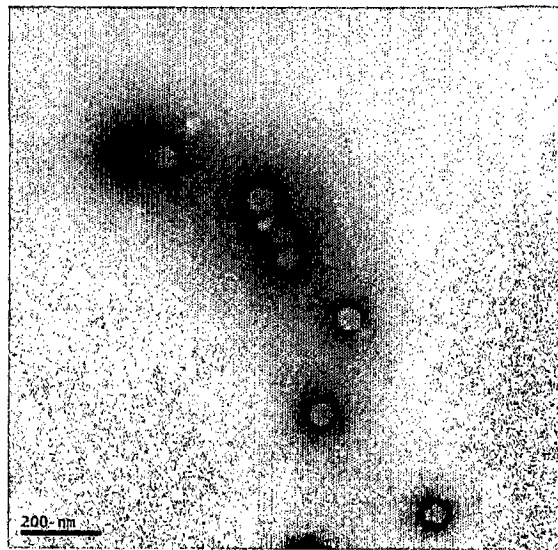


图 9

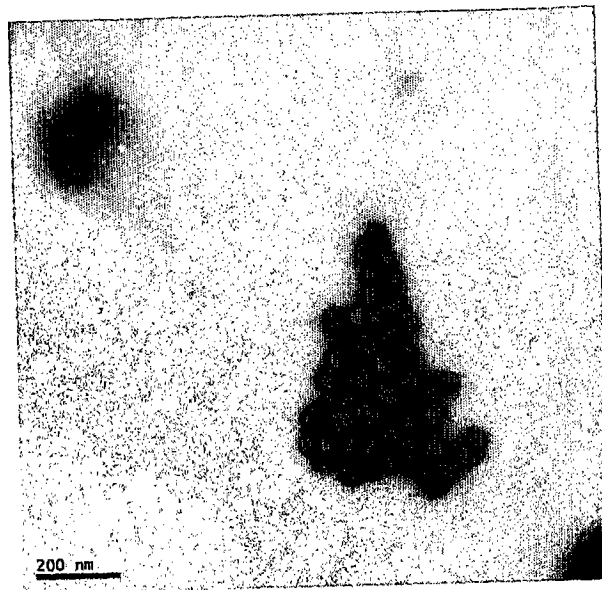


图 10

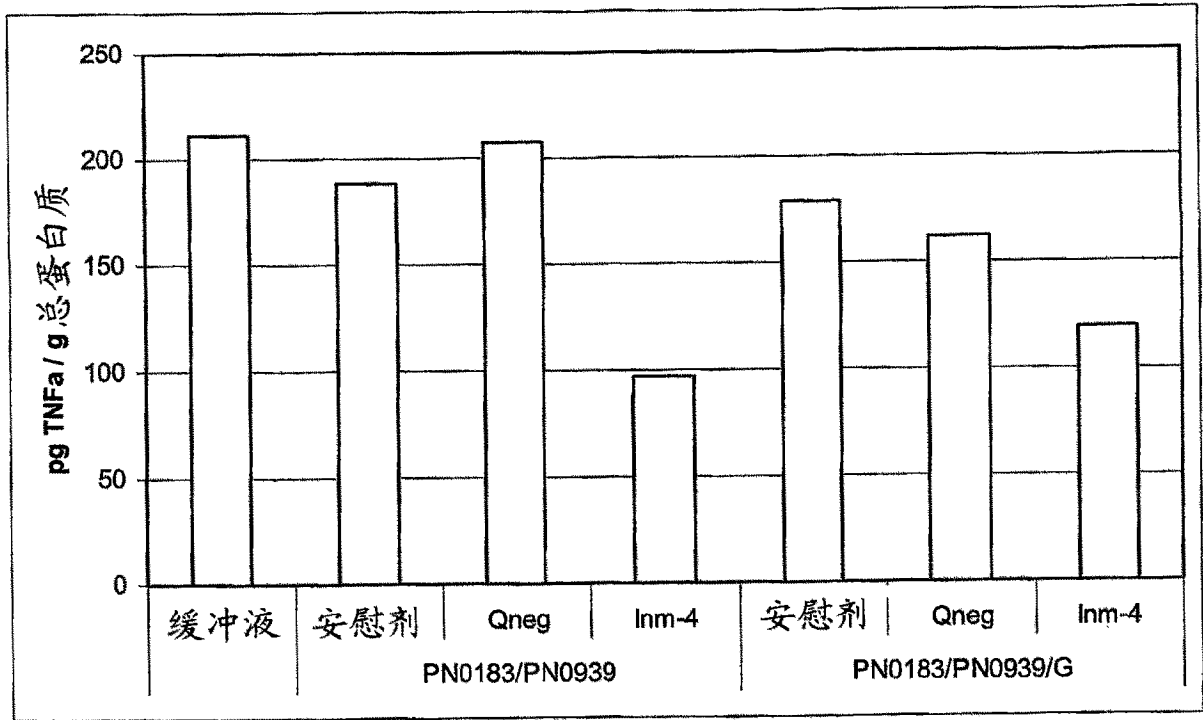


图 11

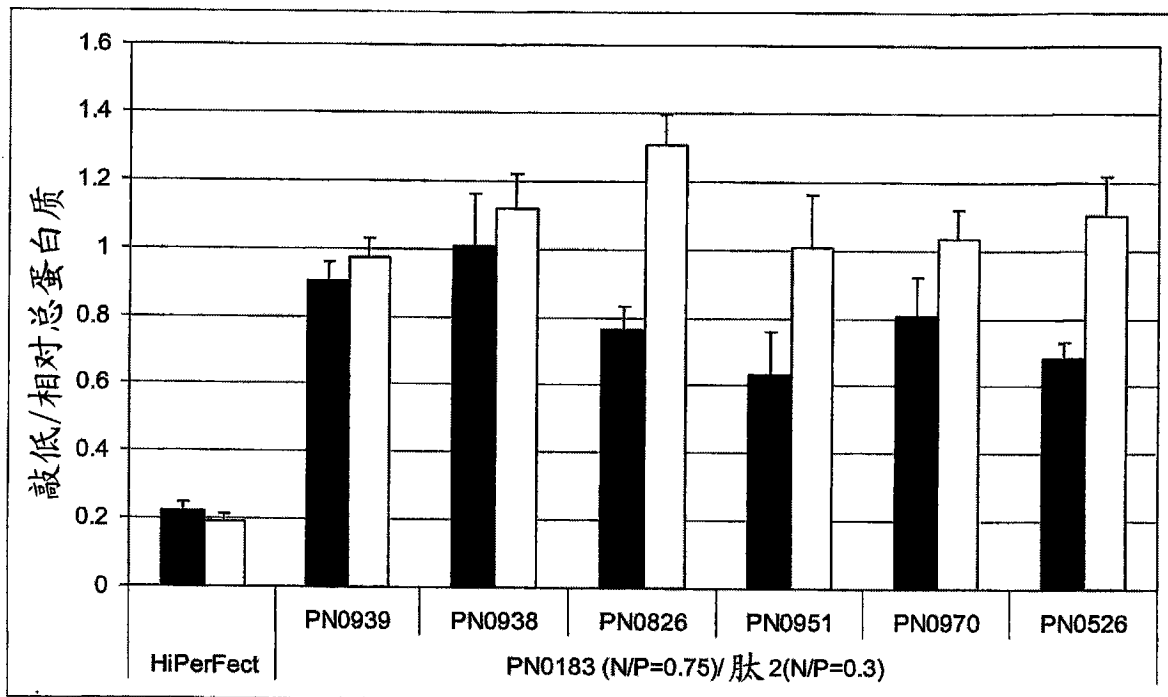


图 12