



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118931907 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 12

(21) 申请号 202410700060.8

(22) 申请日 2018.08.10

(30) 优先权数据

62/544,220 2017.08.11 US

62/671,604 2018.05.15 US

(62) 分案原申请数据

201880066428.2 2018.08.10

(71) 申请人 希望之城

地址 美国加利福尼亚州

申请人 艾普特纳有限公司

(72) 发明人 J·J·罗西 S·尹 N·哈比

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

专利代理师 崔佳佳 马莉华

(51) Int.Cl.

C12N 15/115 (2010.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 47/54 (2017.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书40页

序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

转铁蛋白受体(TfR)的RNA适体

(57) 摘要

公开了一种核糖核酸化合物,所述核糖核酸化合物包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的RNA序列或由其组成,其中所述RNA序列的长度为29个核苷酸或更短,并且其中所述RNA序列能够结合转铁蛋白受体(TfR)。

1. 一种核糖核酸化合物,其包含与SEQ ID NO:5具有至少90%序列同一性的RNA序列或由其组成,其中所述RNA序列的长度为29个核苷酸或更短,其中所述RNA序列能够结合转铁蛋白受体(TfR)。

2. 如权利要求1所述的核糖核酸化合物,其特征在于,所述RNA序列长度为16个核苷酸。

3. 如权利要求1所述的核糖核酸化合物,其特征在于,所述RNA序列与SEQ IDNO:5具有100%序列同一性。

4. 如权利要求1所述的核糖核酸化合物,其特征在于,所述RNA序列能够结合细胞表面的Trf。

5. 如权利要求1所述的核糖核酸化合物,其特征在于,所述核糖核酸化合物能够内化入细胞。

6. 如权利要求1所述的核糖核酸化合物,其特征在于,所述核糖核酸化合物能够穿越血脑屏障。

7. 如权利要求1所述的核糖核酸化合物,其特征在于,还包含与所述RNA序列共价相连的化合物部分,与所述RNA序列共价相连的所述化合物部分是治疗部分或成像部分。

8. 如权利要求7所述的核糖核酸化合物,其特征在于,所述化合物部分是治疗部分,所述治疗部分是核酸部分、肽部分或小分子药物部分。

9. 如权利要求7所述的核糖核酸化合物,其特征在于,所述化合物部分是治疗部分,所述治疗部分是活化核酸部分或反义核酸部分。

10. 如权利要求7所述的核糖核酸化合物,其特征在于,所述化合物部分是治疗部分,所述治疗部分是miRNA、mRNA、saRNA或siRNA部分。

11. 如权利要求7所述的核糖核酸化合物,其特征在于,所述化合物部分是治疗部分,所述治疗部分是抗癌治疗部分。

12. 如权利要求7所述的核糖核酸化合物,其特征在于,所述化合物部分是治疗部分,所述治疗部分是C/EBP α saRNA部分、SIRT1 saRNA部分或HNF saRNA部分。

13. 如权利要求7所述的核糖核酸化合物,其特征在于,所述化合物部分是成像部分,所述成像部分是生物发光分子、光敏分子、金属或纳米颗粒。

14. 一种药物组合物,包含权利要求1所述的核糖核酸化合物,任选包含药学上可接受的赋形剂。

15. 如权利要求14所述的药物组合物,其特征在于,还包含治疗剂,任选抗癌剂。

16. 一种将化合物部分递送入细胞的体外方法,该方法包括:

(i) 使细胞与权利要求7到13中任一项所述的核糖核酸化合物接触;和

(ii) 使得所述核糖核酸化合物结合所述细胞上的转铁蛋白受体并进入所述细胞,从而将所述化合物部分递送入所述细胞,其中所述方法不为诊断或治疗目的而实施。

17. 如权利要求1到13中任一项所述的核糖核酸化合物、或权利要求14或15所述的组合物在制备用于治疗或预防疾病或病症的药物中的用途。

18. 如权利要求17所述的核糖核酸化合物或组合物的用途,其特征在于,所述疾病或病症是癌症。

19. 如权利要求17所述的核糖核酸化合物或组合物的用途,其特征在于,所述药物还包含抗癌剂。

20. 如权利要求17所述的核糖核酸化合物或组合物的用途,其特征在于,所述疾病或病症是代谢障碍或神经学疾病。

21. 一种检测细胞的体外方法,该方法包括:

(i) 使细胞与权利要求7到13中任一项所述的核糖核酸化合物接触,其中所述核糖核酸化合物包含成像部分;

(ii) 使所述核糖核酸化合物结合所述细胞上的转铁蛋白受体并进入所述细胞;和

(iii) 检测所述成像部分,从而检测所述细胞,

其中所述方法不为诊断或治疗目的而实施。

转铁蛋白受体(TfR)的RNA适体

[0001] 本申请是申请日为2018年08月10日,申请号为201880066428.2,发明名称为“转铁蛋白受体(TfR)的RNA适体”的发明申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2017年8月11日提交的美国临时申请号62/544,220和2018年5月15日提交的美国临时申请号62/671,604的优先权,出于所有的目的通过参考将这些临时申请全文纳入本文。

[0004] 对作为ASCII文件提交的“序列表”、表格或计算机程序清单附件的引用

[0005] 写入文件“EFSLIVE-17561747-v1-RICLP350028_ST25_txt”(2018年8月9日创建,8,935字节,机器格式为IBM-PC,MS-Windows操作系统)的序列表通过引用纳入本文。

发明领域

[0006] 本发明涉及能够结合转铁蛋白受体的核酸化合物,特别是核糖核酸化合物,和组合物及其使用方法。

背景

[0008] 转铁蛋白受体(TfR)是在细胞表面表达的膜糖蛋白,其介导细胞从血浆糖蛋白转铁蛋白摄取铁。转铁蛋白与铁结合形成转铁蛋白-铁复合物(Crichton和Charloteaux-Wauters,Eur J Biochem 1987;164(3):485-506)。这些复合物与TfR结合,结合的转铁蛋白经由受体介导的内吞作用而内化入细胞(Qian ZM等.,Pharmacol Rev.2002,54(4):561-587)。随后转铁蛋白和铁在核内体中释放。

[0009] TfR通常在一系列正常细胞中低水平表达,而在高增殖率的细胞,包括活化的免疫细胞(Bayer AL等.,J Leukoc Biol 1998 64:19-24;Holland JP等.,Nat Med 2012:1586-1591)和癌细胞(Daniels TR等.,Clin Immunol 2006 121:144-158;Daniels TR等.,Clin Immunol 2006 121:159-176)中高表达。因此,能够结合表达TfR的细胞表面的TfR并内化入细胞的化合物可用于这类化合物的靶向递送。

[0010] 适体(有时被称为化学抗体)是通过形状识别与靶标结合的小单链RNA或DNA分子(Stottenburg R等.,Biomol Eng.2007年10月;24(4):381-403)。适体包含能够特异性分子识别其同源靶标的独特三维结构,并且与抗体相比,它们显示出许多优势,包括它们的大小、生产过程、稳定性增强和缺乏免疫原性。能够结合TfR的适体已在WO 2016/061386中描述,其通过引用全文纳入本文。

[0011] 可利用结合TfR的适体将治疗有效载荷靶向递送至全身细胞。然而,限制大多数小分子进入大脑的血脑屏障(BBB)的存在极大阻碍了脑部疾病的治疗。Macdonald等(ACS Chem.Neurosci.2017,8,777-784)描述了一种具有结合TfR并穿过BBB能力的双功能适体。

[0012] 用于靶向治疗递送的其它机制是需要的。

发明概述

[0014] 本发明提供核酸化合物,优选核糖核酸化合物或脱氧核糖核酸化合物,其包含能够结合转铁蛋白受体 (TfR) 的RNA/DNA序列。该核酸化合物的长度为29个核苷酸或更短。

[0015] 在本发明的一个方面,提供了一种核糖核酸化合物,其包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的RNA序列或由其组成,其中所述RNA序列的长度为29个核苷酸或更短。优选地,该RNA序列能够结合转铁蛋白受体 (TfR)。

[0016] 在一些实施方式中,该RNA序列长度为22个核苷酸或更短。在一些实施方式中,该RNA序列长度为22个核苷酸。在一些实施方式中,该RNA序列与SEQ ID NO:1具有100%序列同一性。

[0017] 在另一方面,本发明提供核糖核酸化合物,其包含与SEQ ID NO:5具有至少90%序列同一性的RNA序列或由其组成,其中所述RNA序列的长度为29个核苷酸或更短,并且其中该RNA序列能够结合转铁蛋白受体 (TfR)。

[0018] 在一些实施方式中,该RNA序列长度为16个核苷酸。在一些实施方式中,该RNA序列与SEQ ID NO:5具有100%序列同一性。

[0019] 在另一方面,所述化合物是脱氧核糖核酸化合物,其包含含有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5的DNA序列或由这样的DNA序列组成,其中SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5中的一个或一些或全部的核糖核苷酸被它们的等价脱氧核糖核苷酸残基dAMP、dGMP、dTTP或dCMP取代,其中所述DNA序列的长度为29个核苷酸或更短,并且任选地,该DNA序列能够结合转铁蛋白受体 (TfR)。

[0020] 在一些实施方式中,该核糖核酸化合物或脱氧核糖核酸化合物能够结合细胞表面的TfR。在一些实施方式中,该核糖核酸化合物或脱氧核糖核酸化合物能够内化入细胞。在一些实施方式中,该核糖核酸化合物或脱氧核糖核酸化合物能够穿越血脑屏障。

[0021] 在一些实施方式中,本文提供的核酸化合物还包含与RNA/DNA序列相连的化合物部分。在一些实施方式中,该化合物部分是治疗部分或成像部分。在一些实施方式中,该化合物部分共价连接于RNA/DNA序列。

[0022] 在一些实施方式中,该治疗部分是核酸部分、肽部分或小分子药物部分。在一些实施方式中,该治疗部分是活化核酸部分或反义核酸部分。在一些实施方式中,该治疗部分是miRNA、mRNA、saRNA或siRNA部分。在一些实施方式中,该治疗部分是抗癌治疗部分。在一些实施方式中,该治疗部分是C/EBP α saRNA部分、SIRT1saRNA部分或HNF saRNA部分。

[0023] 在一些实施方式中,该成像部分是生物发光分子、光敏分子、金属或纳米颗粒。

[0024] 还提供了包含本发明的核酸化合物的药物组合物。该组合物可任选包含药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中,该组合物还包含治疗剂,任选抗癌剂。

[0025] 本发明还提供将化合物部分递送入细胞的方法,该方法包括:(i)使细胞与本发明的核酸化合物接触;和(ii)使得所述核酸化合物结合所述细胞上的转铁蛋白受体并进入所述细胞,从而将所述化合物部分递送入所述细胞。

[0026] 还提供将化合物递送入细胞的方法,所述方法包括:(i)使细胞与化合物和本发明的核酸化合物接触;和(ii)使得所述核糖核酸化合物结合所述细胞上的转铁蛋白受体并进入所述细胞,从而将所述化合物递送入所述细胞。在一些实施方式中,该化合物是治疗剂或成像剂。

[0027] 在另一方面,本发明提供用于医学治疗或预防方法的本发明核酸化合物。

[0028] 还提供本发明核酸化合物在制备治疗或预防疾病或病症的药物中的用途。

[0029] 还提供治疗或预防疾病或病症的方法,该方法包括将有效量的本发明核酸化合物给予有此需要的对象。

[0030] 在一些实施方式中,所述疾病或病症是癌症。在一些实施方式中,该方法包括给予抗癌剂。在一些实施方式中,所述疾病或病症是代谢障碍或神经学疾病。

[0031] 还提供了一种检测细胞的方法,该方法包括:(i)使细胞与本发明的核酸化合物接触,其中所述核酸化合物包含成像部分;(ii)使该核酸化合物结合所述细胞上的转铁蛋白受体并进入所述细胞;(iii)检测所述成像部分,从而检测所述细胞。

[0032] 还提供了一种检测细胞的方法,该方法包括:(i)使细胞与成像剂和本发明的核酸化合物接触;(ii)使该核酸化合物与所述细胞上的转铁蛋白受体结合,并使所述成像剂进入所述细胞;和(iii)检测所述成像剂,从而检测所述细胞。

[0033] 本发明包括所述诸多方面和优选特征的组合,除非这样的组合是明显不允许的或明确避免的。

发明详述

[0035] 定义

[0036] 尽管本文示出和描述了本发明的各种实施方式和方面,但是对于本领域技术人员而言显而易见的是,这些实施方式和方面仅以示例的方式提供。本领域技术人员现在将想到许多变化、改变和替换而不脱离本发明。应当理解,本文所述本发明的实施方式的各种替代方案可以用于实施本发明。

[0037] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,而不应解释为限制所描述的主题。本申请中引用的所有文件或文件的一部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍、手册和专题论文,出于任何目的在此明确地通过引用全文纳入。

[0038] 本文使用的缩写具有化学和生物学领域的常规含义。本文阐述的化学结构和结构式按照化学领域已知的化学价的标准规则构建。

[0039] 除非另有定义,否则本文使用的技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常理解相同的含义。参见,例如,Singleton等,《微生物学和分子生物学词典》,第2版,J.Wiley & Sons出版社(纽约,纽约州1994);Sambrook等,《分子克隆,实验室手册》,冷泉港出版社(冷泉港,纽约,1989)。类似或等同于本文描述的那些方法、装置和材料的任何方法、装置和材料都可以用于实施本发明。提供以下定义以便理解本文中经常使用的某些术语,但并不意味着限制本公开的范围。

[0040] “核酸”是指单链、双链或多链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物,或它们的互补形式。术语“多核苷酸”是指核苷酸的线性序列。术语“核苷酸”通常是指多核苷酸的单个单元,即单体。核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或其修饰形式。本文考虑的多核苷酸的实例包括单链和双链DNA、单链和双链RNA(包括siRNA),以及具有单链和双链DNA和RNA的混合物的杂合分子。核酸可以是直链或支链的。例如,核酸可以是核苷酸的线性链,或者核酸可以是分支的,例如使得核酸包含一个或多个核苷酸的臂或分支。任选地,将分支的核酸重复分支以形成更高级的结构,例如树状聚合物等。

[0041] 核酸(包括具有硫代磷酸酯主链的核酸)可包括一个或多个反应性部分。如本文所用,术语反应性部分包括能够通过共价、非共价或其他相互作用与另一分子,例如核酸或多肽反应的任何基团。例如,核酸可包括氨基酸反应性部分,其通过共价、非共价或其他相互作用与蛋白或多肽上的氨基酸反应。

[0042] 该术语还涵盖含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或连接基团的核酸,它们是合成的、天然存在的和非天然存在的,结合特性与参比核酸类似,代谢方式亦与参比核苷酸类似。这样的类似物的实例包括但不限于:磷酸二酯衍生物,包括,例如氨基磷酸酯、二氨基磷酸酯、硫代磷酸酯(也称为硫磷酸酯)、二硫代磷酸酯、磷酸酯基羧酸、磷酸酯基酸酯、磷酸酯基乙酸、磷酸酯基甲酸、磷酸甲酯,磷酸硼酸酯或O-甲基磷酰胺连接基团(参见Eckstein,《寡核苷酸和类似物:实用方法》(Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach),牛津大学出版社);和肽核酸主链以及连接基团。其它类似物核酸包括具有正主链;非离子主链,修饰的糖和非核糖主链(例如,磷酸二酰胺基吗啉代寡核苷酸或锁定核酸(LNA))的那些,包括美国专利号5,235,033和5,034,506,以及Sanghui和Cook编,ASC论坛系列580,“反义研究中的碳水化合物修饰”(Carbohydrate Modifications in Antisense Research),第6和7章所述的那些。含有一种或多种碳环糖的核酸也包括在核酸的一种定义内。出于多种原因可以修饰核糖-磷酸主链,例如,以增加此类分子在生理环境中或作为生物芯片上的探针的稳定性和半衰期。可以制备天然存在的核酸和类似物的混合物;或者,可以制备不同核酸类似物的混合物,以及天然存在的核酸和类似物的混合物。在实施方式中,DNA中的核苷酸连接基团是磷酸二酯、磷酸二酯衍生物或两者的组合。

[0043] 词语“互补的”或“互补性”是指多核苷酸中的核酸与第二多核苷酸中的另一核酸形成碱基配对的能力。例如,序列A-G-T与序列T-C-A互补。互补可以是部分的,其中仅一些核酸根据碱基配对相匹配,或者是完全匹配,其中所有的核酸根据碱基配对相匹配。

[0044] 本文所用的术语“探针”或“引物”定义为可以检测与样品的特异性杂交的一个或多个核酸片段。根据将用于的特定技术,探针或引物可以具有任何长度。例如,PCR引物的长度通常在10至40个核苷酸之间,而用于,例如Southern印迹的核酸探针的长度可以超过一百个核苷酸。探针可以是未标记的或如下所述标记的,从而可以检测其与靶标或样品的结合。可以从染色体的一个或多个特定(预选)部分的核酸源,例如一个或多个克隆,分离的完整染色体或染色体片段或聚合酶链反应(PCR)扩增产物的集合产生探针。固定在靶标元件上的核酸的长度和复杂性不是本发明的关键因素。技术人员可以调整这些因素,以便为给定的杂交程序提供最佳的杂交和信号产生,并在不同的基因或基因组位置之间提供所需的分辨率。

[0045] 所述探针也可以是以阵列形式固定在固体表面(例如,硝酸纤维素、玻璃、石英、熔融二氧化硅载玻片)上的分离的核酸。在一些实施方式中,探针可以是,例如WO 96/17958中所述核酸阵列的成员。为此目的,也可采用能够产生高密度阵列的技术(参见,例如Fodor(1991) Science 767-773; Johnston(1998) Curr. Biol. 8: R171-R174; Schummer(1997) Biotechniques 23:1087-1092; Kern(1997) Biotechniques 23:120-124; 美国专利号5,143,854)。

[0046] 术语“基因”是指参与产生蛋白的DNA区段;它包括编码区之前和之后的区域(前导区和尾区)以及各个编码段(外显子)之间的插入序列(内含子)。前导区、尾区以及内含子包

括基因转录和翻译过程中必需的调控元件。此外,“蛋白基因产物”是从特定基因表达的蛋白。

[0047] 本文所用的关于基因的词语“表达”或“表达的”是指该基因的转录和/或翻译产物。DNA分子在细胞中的表达水平可以根据该细胞内存在的相应mRNA的量或细胞产生的DNA编码的蛋白的量来确定。非编码核酸分子(例如,siRNA)的表达水平可以通过本领域公知的标准PCR或Northern印迹方法检测。参见Sambrook等.,1989《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),18.1-18.88。

[0048] 本文提供的术语“适体”是指与蛋白、肽和小分子结合(例如以高亲和力和特异性)的寡核苷酸(例如短的寡核苷酸或脱氧核糖核苷酸)。由于倾向于形成互补碱基对,适体通常具有限定的二级或三级结构,因此通常能够折叠成不同且复杂的分子结构。三维结构对于适体结合亲和力和特异性至关重要,特定的三维相互作用驱动适体-靶标复合物的形成。可以通过指数富集的配体系统进化过程(SELEX,如Ellington AD,Szostak JW(1990)结合特异性配体的RNA分子的体外选择(In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands)Nature 346:818-822;Tuerk C,Gold L(1990)指数富集的配体系统进化:噬菌体T4 DNA聚合酶的RNA配体(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment:RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase).Science 249:505-510)或通过开发SOMamers(经修饰的慢解离率适体)(Gold L等.(2010)用于发现生物标志物的基于适体的多重蛋白质组学技术(Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery).PLoS ONE 5(12):e15004)从非常大的随机序列文库中体外选择适体。应用SELEX和SOMamer技术包括,例如添加模拟氨基酸侧链的官能团,以扩展适体的化学多样性。结果富集和鉴定了几乎任何蛋白靶标的高亲和力适体。适体显示出靶向药物递送的许多所需特性,例如便于选择和合成、高结合亲和力和特异性、柔性结构、免疫原性低和通用的合成可及性。迄今为止,已经使用适体在体外成功地将多种抗癌剂(例如化疗药物、毒素和siRNA)递送至癌细胞。

[0049] 如本文所指,“反义核酸”是与特定靶核酸(例如可翻译成蛋白的mRNA)的至少一部分互补的核酸(例如DNA或RNA分子)并且能够减少该靶核酸(例如来自DNA的mRNA)的转录或降低该靶核酸(例如mRNA)的翻译或改变转录物剪接(例如单链吗啉代寡核苷酸)。参见,例如Weintraub,Scientific American,262:40(1990)。通常,合成的反义核酸(例如寡核苷酸)的长度通常在15至25个碱基之间。因此,反义核酸能够与靶核酸(例如靶mRNA)杂交(例如选择性杂交)。在实施方式中,反义核酸在严格杂交条件下与靶核酸序列(例如mRNA)杂交。在实施方式中,反义核酸在中等严格杂交条件下与靶核酸(例如mRNA)杂交。反义核酸可以包含天然存在的核苷酸或修饰的核苷酸,例如硫代磷酸酯、磷酸甲酯和-异头糖-磷酸骨架修饰的核苷酸。

[0050] 在细胞中,反义核酸与相应的mRNA杂交,形成双链分子。反义核酸干扰mRNA的翻译,因为细胞不会翻译双链的mRNA。使用反义方法抑制基因的体外翻译是本领域熟知的(Marcus-Sakura,Anal.Biochem.,172:289(1988))。此外,可以使用与DNA直接结合的反义分子。反义核酸可以是单链或双链核酸。反义核酸的非限制性实例包括siRNA(包括其衍生物或前体,例如核苷酸类似物)、短发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)、saRNA(小活化RNA)和核仁小RNA(snoRNA)或它们的某些衍生物或前体。

[0051] 如本文所提供的“siRNA”、“小干扰RNA”、“小RNA”或“RNAi”是指形成双链RNA的核酸,当与某基因或靶基因在同一细胞中表达时,该双链RNA具有减少或抑制该基因或靶基因表达的能力。杂交以形成双链分子的核酸的互补部分通常具有实质性的或完全的同源性。在一个实施方式中,siRNA或RNAi是与靶基因具有实质性或完全的同源性并形成双链siRNA的核酸。在实施方式中,siRNA通过与互补的细胞mRNA相互作用从而干扰互补mRNA的表达,从而抑制基因表达。核酸的长度通常为至少约15-50个核苷酸(例如,双链siRNA的各互补序列的长度为15-50个核苷酸,而双链siRNA的长度为约15-50个碱基对)。在其它实施方式中,所述长度为20-30个碱基核苷酸,优选长度为约20-25或约24-30个核苷酸,例如长度为20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。

[0052] 本文提供的“saRNA”或“小活化RNA”是指形成双链RNA的核酸,当与某基因或靶基因在相同细胞中表达时,该双链RNA具有增加或激活该基因或靶基因表达的能力。杂交形成双链分子的核酸的互补部分通常具有实质性或完全的同源性。在一个实施方式中,saRNA是与靶基因具有实质性或完全同源性并形成双链saRNA的核酸。核酸的长度通常为至少约15-50个核苷酸(例如,双链saRNA的各互补序列的长度为15-50个核苷酸,而双链saRNA的长度为约15-50个碱基对)。在其它实施方式中,长度为20-30个碱基核苷酸,优选长度为约20-25或约24-29个核苷酸,例如长度为20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。

[0053] 当应用于核酸或蛋白时,术语“分离的”是指该核酸或蛋白基本上不含在自然状态下与其结合的其它细胞成分。它可以,例如处于均质状态并且可以处于干燥或水溶液中。通常采用分析化学技术,例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法确定纯度和均质性。在一制剂中占主要种类的蛋白是基本上纯化的。

[0054] 术语“纯化的”表示在电泳凝胶中基本上产生一条带的核酸或蛋白。在一些实施方式中,核酸或蛋白是至少50%纯度,任选地至少65%纯度,任选地至少75%纯度,任选地至少85%纯度,任选地至少95%纯度和任选地至少99%纯度。

[0055] 术语“分离的”也可以指细胞或样品细胞。分离的细胞或样品细胞是这样的单细胞类型,基本上不存在当它们处于其天然状态或最初从其天然状态中移出时基本上通常伴随细胞的许多成分。在某些实施方式中,分离的细胞样品保留将细胞维持在所需状态需要的来自其天然状态的那些组分。在一些实施方式中,一个或多个分离的(例如,纯化的、分开的)细胞是基本上是样品中唯一细胞类型的细胞。纯化的细胞样品可以包含至少60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的一类细胞。可以通过使用细胞标志物或细胞标志物的组合获得分离的细胞样品,二者中的任一种对于未纯化细胞样品中的一种细胞类型都是唯一的。在一些实施方式中,通过利用细胞分选仪分离细胞。在一些实施方式中,针对细胞蛋白的抗体用于分离细胞。

[0056] 本文所用的术语“偶联”是指原子或分子之间的结合。所述结合可以是直接或间接的。例如,本文提供的核酸(如核糖核酸)和化合物部分之间的偶联可以是直接的,例如通过共价键,或间接的,例如通过非共价键。任选地,使用偶联化学方法形成偶联物,包括但不限于亲核取代(例如,胺与醇和酰基卤,活性酯的反应)、亲电子取代(例如,烯胺反应)以及碳-碳和碳-杂原子多键的加成(例如迈克尔反应,狄尔斯-阿尔德加成)。这些和其它有用的反应在,例如March,《高级有机化学》(ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY),第3版,John Wiley & Sons,纽约,1985;Hermanson,《生物偶联物技术》(BIOCONJUGATE TECHNIQUES),学术出版

社,圣地亚哥,1996;和Feeney等.,《蛋白的修饰》(MODIFICATION OF PROTEINS);化学进展系列,第198卷,美国化学学会,哥伦比亚特区华盛顿.,1982中有讨论过。因此,核酸可通过其骨架连接至化合物部分。核糖核酸任选包括促进核糖核酸与化合物部分相互作用的一个或多个反应部分,例如氨基酸反应部分。

[0057] 用于偶联化学方法的有用反应部分或官能团包括,例如:

[0058] (a) 羧基及其各种衍生物,包括但不限于N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基苯并三唑酯、酰基卤、酰基咪唑、硫酸酯、对硝基苯基酯、烷基、烯基、炔基和芳族酯;

[0059] (b) 可以转化为酯、醚、醛等的羟基;

[0060] (c) 卤代烷基,其中卤素可随后被亲核基团取代,所述亲核基团是,例如胺、羧酸根阴离子、硫醇阴离子、碳负离子或烷氧基离子,从而导致新的基团共价连接于卤素原子;

[0061] (d) 能够参与狄尔斯-阿尔德反应的亲二烯基(dienophile group),例如马来酰亚胺基;

[0062] (e) 醛或酮基团,从而可通过形成羰基衍生物(例如亚胺、腙、缩氨基脲或肟)或通过格氏加成或烷基锂加成等机制实现随后的衍生化;

[0063] (f) 用于随后与胺反应的磺酰卤基团,例如形成磺酰胺;

[0064] (g) 可以转化为二硫化物的、与酰基卤反应或与诸如金等金属键合的硫醇基团;

[0065] (h) 可以被,例如酰化、烷基化或氧化的胺或巯基;

[0066] (i) 可以经历,例如环加成、酰化、迈克尔加成等的烯烃;

[0067] (j) 可以与,例如胺和羟基化合物反应的环氧化物;

[0068] (k) 亚磷酰胺和其它可用于核酸合成的标准官能团;

[0069] (l) 金属硅氧化物键合;

[0070] (m) 金属键合至反应性磷基团(例如膦)以形成,例如磷酸二酯键;和

[0071] (n) 砷,例如乙烯基砷。

[0072] 可以选择反应性官能团,使得它们不参与或干扰本文所述蛋白的化学稳定性。例如,核酸可以包括乙烯基砷或其它反应性部分。任选地,核酸可以包括如式S-S-R所示的反应性部分。R可以是,例如保护基。任选地,R为己醇。本文所用的术语己醇包括式 $C_6H_{13}OH$ 所示的化合物,并且包括1-己醇、2-己醇、3-己醇、2-甲基-1-戊醇、3-甲基-1-戊醇、4-甲基-1-戊醇、2-甲基-2-戊醇、3-甲基-2-戊醇、4-甲基-2-戊醇、2-甲基-3-戊醇、3-甲基-3-戊醇、2,2-二甲基-1-丁醇、2,3-二甲基-1-丁醇、3,3-二甲基-1-丁醇、2,3-二甲基-2-丁醇、3,3-二甲基-2-丁醇和2-乙基-1-丁醇。任选地,R为1-己醇。

[0073] 本文所用的术语“约”是指包括指定值的数值范围,本领域普通技术人员会认为该范围合理地类似于指定值。在诸多实施方式中,术语“约”是指落在采用本领域通常可接受的测量值的标准偏差内。在诸多实施方式中,“约”是指扩展到指定值的 $\pm 10\%$ 的范围。在一些实施方式中,“约”是指指定值。

[0074] 术语“蛋白”、“肽”和“多肽”可互换使用,以表示氨基酸聚合物或一组两个或多个相互作用或结合的氨基酸聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0075] 术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸,以及作用方式类似于天然存在的

氨基酸的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及随后被修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即与氢、羧基、氨基结合的碳和R基团,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基硫鎓。此类类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽主链,但是保留了与天然氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指结构与氨基酸的一般化学结构不同但作用方式与天然氨基酸相似的化合物。术语“非天然存在的氨基酸”和“非天然氨基酸”是指自然界中未发现的氨基酸类似物、合成氨基酸和氨基酸模拟物。

[0076] 在本文中,可以采用众所周知的三字母符号或IUPAC-IUB生化命名委员会推荐的单字母符号来表示氨基酸。同样,可以采用普遍接受的单字母代码来指代核苷酸。

[0077] “保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列。关于特定的核酸序列,保守修饰的变体是指编码相同或基本相同的氨基酸序列的那些核酸,或如果该核酸不编码氨基酸序列,则指基本相同的序列。由于遗传密码的简并性,大量功能相同的核酸编码任何给定的蛋白。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU均编码氨基酸丙氨酸。因此,在由密码子指定丙氨酸的每个位置,可以将密码子改变为所描述的任何相应密码子,而不会改变编码的多肽。此类核酸变异是“沉默变异”,其是保守修饰变异的一种。本文中编码多肽的每条核酸序列也描述了核酸的每个可能的沉默变异。本领域技术人员将认识到,可以修饰核酸中的各密码子(除了通常作为甲硫氨酸唯一密码子的AUG,和通常作为色氨酸唯一密码子的TGG)以产生功能相同的分子。因此,相对于表达产物,而非实际探针序列,编码多肽的核酸的各沉默变异都隐含在所述的各序列中。

[0078] 对于氨基酸序列,本领域技术人员将认识到,在所编码序列中改变、添加或缺失单个氨基酸或小部分氨基酸的核酸、肽、多肽或蛋白序列的各取代、缺失或添加是“保守修饰的变体”,其中该改变导致氨基酸被化学上相似的氨基酸取代。提供功能上相似的氨基酸的保守取代表是本领域熟知的。此类保守修饰的变体不仅是并且不排除本发明的多态变体、种间同源物和等位基因。

[0079] 以下八组各自包含彼此保守取代的氨基酸:1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、蛋氨酸(M)、缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参见例如Creighton, Proteins(1984))。

[0080] 对于本文所述的特定蛋白(例如TfR),命名的蛋白包括维持蛋白转录因子活性(例如,与天然蛋白相比,在至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的活性以内)的任何蛋白的天然存在形式、变体或同源物。在一些实施方式中,与天然存在的形式相比,变体或同源物在整个序列或序列的一部分上(例如,50、100、150或200个连续氨基酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列同一性。在其它实施方式中,蛋白是通过其NCBI序列参比鉴定的蛋白。在其它实施方式中,蛋白是通过其NCBI序列参比鉴定的蛋白,其同源物或功能片段。

[0081] 本文提供的术语“TfR”包括维持TfR活性(例如,与天然蛋白相比,在至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的活性以内)的任何转铁蛋白受体(TfR)蛋白天然存在形式、同源物或变体。在一些实施方式中,与天然存在的形式相比,变体或同源

物在整个序列或序列的一部分上(例如,50、100、150或200个连续氨基酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列同一性。在诸多实施方式中,TfR蛋白是通过NCBI序列参比GI:189458817(NCBI参比序列:NP_003225.2;SEQ ID NO:6)鉴定的蛋白。在诸多实施方式中,TfR蛋白是通过NCBI序列参比GI:GI:189458816(NCBI参比序列:NM_003234.3)鉴定的核苷酸序列编码的蛋白。在诸多实施方式中,TfR蛋白是通过NCBI序列参比GI:189458818(NCBI参比序列:NM_001128148.2)鉴定的核苷酸序列编码的蛋白。在诸多实施方式中,TfR蛋白是通过NCBI序列参比GI:189458817(NCBI参比序列:NP_003225.2;SEQ ID NO:6)鉴定的蛋白,其同源物或功能片段。在诸多实施方式中,TfR蛋白是通过NCBI序列参比GI:189458816(NCBI参比序列:NM_003234.3)鉴定的核苷酸序列编码的蛋白,其同源物或功能片段。在诸多实施方式中,TfR蛋白是通过NCBI序列参比GI:189458818(NCBI参比序列:NM_001128148.2)鉴定的核苷酸序列编码的蛋白,其同源物或功能片段。在诸多实施方式中,TfR蛋白是通过对应于NCBI基因ID:7037的核酸序列编码。

[0082] 本文提供的术语“C/EBP α ”或“C/EBP α ”包括维持C/EBP α 的转录因子活性(例如,与天然蛋白相比,在至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的活性以内)的任何CCAAT(胞嘧啶-胞嘧啶-腺苷-腺苷-胸苷)/增强子-结合蛋白 α (C/EBP α)天然存在形式、同源物或变体。在一些实施方式中,与天然存在的形式相比,变体或同源物在整个序列或序列的一部分上(例如,50、100、150或200个连续氨基酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列同一性。在诸多实施方式中,C/EBP α 蛋白是通过NCBI序列参比GI:28872794(NP_004355.2)、GI:551894998(NP_001272758.1)、GI:566559992(NP_001274353.1)或GI:566559994(NP_001274364.1)鉴定的蛋白,其同源物或功能片段。在诸多实施方式中,C/EBP α 蛋白是通过对应于基因ID:1050的核酸序列编码。

[0083] 术语“沉默调节蛋白(Sirtuin)”是指具有单-ADP-核糖基转移酶或脱乙酰基酶活性(包括脱乙酰基酶、脱琥珀酰酶、脱丙二酰酶、脱肉豆蔻酰基酶和脱棕榈糖基酶活性)的一种或多种沉默调节蛋白类蛋白。它们依赖于尼古丁腺嘌呤二核苷酸(NAD),并参与调节衰老机制,对压力起反应以及癌症和糖尿病等疾病(参见例如,North和Verdin,Genome Biol.2004,5(5):224;Preyat和Leo,J.Leukoc.Biol.2013,93(5):669-680;和Satoh A等.,J Neurosci.2010,30(30):10220-10232,这些文献通过引用全文纳入)。人基因组编码7种沉默调节蛋白:SIRT1到SIRT7。“SIRT1”、“SIRT2”、“SIRT3”、“SIRT4”、“SIRT5”、“SIRT6”和“SIRT7”分别指编码Sirt1至Sirt7蛋白的人沉默调节蛋白基因,包括产生可维持Sirt1-Sirt7中一种或多种的脱乙酰酶活性(例如,与天然蛋白相比,在至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的活性以内)的蛋白产品的其同源物和变体。本文提供的“Sirt1”、“Sirt2”、“Sirt3”、“Sirt4”、“Sirt5”、“Sirt6”和“Sirt7”包括维持所述沉默调节蛋白的脱乙酰酶活性(例如,与天然蛋白相比,在至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的活性以内)的任何天然存在形式、同源物或变体。在一些实施方式中,与天然存在的形式相比,变体或同源物在整个序列或序列的一部分上(例如,50、100、150或200个连续氨基酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列同一性。在一些实施方式中,人Sirt1蛋白是通过NCBI参比序列NP_036370.2鉴定的蛋白。在一些实施方式中,人Sirt1蛋白由对应于基因ID:23411的核酸序列编码。人Sirt2可以通过GenBank参比AAK51133.1鉴定的蛋白,并且可由对应于基因ID:22933的核酸序列编码。人

Sirt3可以是通过GenBank参比AAD40851.1鉴定的蛋白,并且可由对应于基因ID:23410的核酸序列编码。人Sirt4可以是通过NCBI参比NP_036372.1鉴定的蛋白,并且可由对应于基因ID:23409的核酸序列编码。人Sirt5可以是通过GenBank参比AAD40853.1鉴定的蛋白,并且可由对应于基因ID:23408的核酸序列编码。人Sirt6可以是通过GenBank参比CAG33481.1鉴定的蛋白,并且可由对应于基因ID:51548的核酸序列编码。人Sirt7可以是通过NCBI参比NP_057622.1鉴定的蛋白,并且可由对应于基因ID:51547的核酸序列编码。

[0084] 术语“HNF”是指一种或多种肝细胞核因子。肝细胞核因子是主要在肝脏中表达的一组转录因子,它们调节基因表达。HNF可以指肝细胞核因子4(HNF4),主要在肝、肠、肾和胰腺β细胞中表达的核受体蛋白。人HNF4有两种同种型:分别由基因HNF4A和HNF4G表达的HNF4α和HNF4γ。人HNF4α和/或HNF4A可以是通过Uniprot P41235鉴定的蛋白/基因,Uniprot P41235还描述了通过使用替代启动子和选择性剪接产生的HNF4α的至少7种同种型。人HNF4γ和/或HNF4G可以是通过Uniprot Q14541鉴定的蛋白/基因,Uniprot Q14541还描述了通过选择性剪接产生的HNF4γ的2种同种型。HNF4A基因的突变或变异与代谢疾病有关,包括年轻人患的成年发病型糖尿病1型(MODY1;参见例如Bulman MP等.,*Diabetologia*.1997,40(7):859-62),非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM;参见例如Hani EH等.,*J Clin Invest*.1998,101(3):521-6)和范可尼肾小管综合征4型伴年轻人患的成年发病型糖尿病(FRTS4;参见例如Hamilton AJ等.,*J Med Genet*.2014,51(3):165-9)。术语“HNF4α”和“HNF4γ”包括维持HNF4α或HNF4γ活性(例如,与天然蛋白相比,在至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的活性以内)的任何天然存在形式、同源物或变体。在一些实施方式中,与天然存在的形式相比,变体或同源物在整个序列或序列的一部分上(例如,50、100、150或200个连续氨基酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列同一性。术语“HNF4A”和“HNF4G”包括产生可维持HNF4α和/或HNF4γ中一种或多种活性(例如,与天然蛋白相比,在至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的活性以内)的蛋白产品的基因及其同源物和变体。

[0085] 本文所用的“细胞”是指执行足以保存或复制其基因组DNA的代谢或其它功能的细胞。可以通过本领域熟知的方法来鉴定细胞,包括,例如完整膜的存在,特定染料的染色,产生子代的能力,或者在配子的情况下,与第二配子结合以产生可存活后代的能力。细胞可以包括原核和真核细胞。原核细胞包括但不限于细菌。真核细胞包括但不限于酵母细胞和源自植物和动物的细胞,例如哺乳动物,昆虫(例如斜纹夜蛾)和人细胞。

[0086] 术语“血脑屏障”是指将循环血液与大脑以及中枢神经系统中的细胞外液分开的高度选择性半透膜屏障。该屏障严格调节血液和大脑之间的离子、分子和细胞的运动,参见例如Daneman和Prat,*Cold Spring Harb Perspect Biol*.2015;7(1):a020412。由于在脑毛细血管内皮壁上的渗透性可忽略不计,许多治疗性分子因而排除在从血液到脑的运输之外。

[0087] “抗癌剂”按照其普通含义使用,是指具有抗肿瘤特性或抑制细胞生长或增殖能力的成分(例如化合物、药物、拮抗剂、抑制剂、调节剂)。在诸多实施方式中,抗癌剂是化疗剂。在诸多实施方式中,抗癌剂是本文鉴定的可用于癌症治疗方法的药剂。在诸多实施方式中,抗癌剂是经FDA或美国以外的国家的类似监管机构批准的用于治疗癌症的药剂。抗癌剂的例子包括但不限于:MEK(例如MEK1、MEK2或MEK1和MEK2)抑制剂(例如XL518、CI-1040、

PD035901、塞来替尼(selumetinib)/AZD6244、GSK1120212/曲美替尼(trametinib)、GDC-0973、ARRY-162、ARRY-300、AZD8330、PD0325901、U0126、PD98059、TAK-733、PD318088、AS703026、BAY 869766)、烷化剂(例如环磷酰胺、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥、白消安、美法仑、甲草胺、尿嘧啶、硫替巴、亚硝基脲,氮芥(例如氯乙胺、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、苯丙氨酸氮芥)、乙烯亚胺和甲基三聚氰胺(例如六甲基三聚氰胺、硫替帕)、烷基磺酸盐(例如白消安)、亚硝基脲(例如卡莫司汀、洛莫斯汀、司莫司汀、链脲霉素)、三氮烯(达卡巴嗪)、抗代谢物(例如5-硫唑嘌呤、亚叶酸钙、卡培他滨、氟达拉滨、吉西他滨、培美曲塞、雷替曲塞,叶酸类似物(例如甲氨蝶呤)、或嘧啶类似物(例如氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷)、嘌呤类似物(例如巯基嘌呤、硫代鸟嘌呤、喷司他丁)等等)、植物生物碱(例如长春新碱、长春碱、长春瑞滨、长春地辛、鬼臼毒素、紫杉醇、多西紫杉醇等)、拓扑异构酶抑制剂(例如伊立替康、托泊替康、氨茶碱、依托泊苷(VP16)、依托泊苷磷酸酯、替尼泊苷等)、抗肿瘤抗生素(例如阿霉素、亚德里亚霉素、柔红霉素、表柔比星、放线菌素、博来霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素等)、铂基化合物(例如顺铂、奥沙利铂、卡铂)、蒽二酮(例如米托蒽醌)、取代的脲(例如羟基脲)、甲基胍衍生物(例如丙卡巴肼)、或肾上腺皮质激素抑制剂(例如米托坦、氨鲁米特)、表鬼臼毒素(例如依托泊苷)。

[0088] 抗癌剂的其它实例包括但不限于:抗生素(例如柔红霉素、阿霉素、博来霉素)、酶(例如L-天冬酰胺酶)、促分裂原活化蛋白激酶信号转导的抑制剂(例如U0126、PD98059、PD184352、PD0325901、ARRY-142886、SB239063、SP600125、BAY 43-9006、渥曼青霉素或LY294002)、mTOR抑制剂、抗体(例如利妥昔单抗)、5-氮杂-2'-脱氧胞苷、阿霉素、长春新碱、依托泊苷、吉西他滨、伊马替尼(Gleevec.RTM)、格尔达霉素、17-N-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素(17-AAG)、硼替佐米、曲妥珠单抗、阿那曲唑;血管生成抑制剂;抗雄激素、抗雌激素;反义寡核苷酸;凋亡基因调节剂;凋亡调节剂;精氨酸脱氨酶;BCR/ABL拮抗剂; β -内酰胺衍生物;bFGF抑制剂;比卡鲁胺;喜树碱衍生物;酪蛋白激酶抑制剂(ICOS);氯米芬类似物;阿糖胞苷达克斯单抗;地塞米松;雌激素激动剂;雌激素拮抗剂;依他硝唑;依托泊苷磷酸盐;依西美坦;法倔唑;非那雄胺;氟达拉滨;氟柔红霉素盐酸盐;特沙弗林;硝酸镓;明胶酶抑制剂;吉西他滨;谷胱甘肽抑制剂;赫赛法(hepsulfam);免疫刺激肽;胰岛素样生长因子-I受体抑制剂;干扰素激动剂;干扰素;白介素;来曲唑;白血病抑制因子;白细胞 α 干扰素;亮丙瑞林+雌激素+孕酮;亮丙瑞林;基质溶素抑制剂;基质金属蛋白酶抑制剂;MIF抑制剂;米非司酮;错配的双链RNA;单克隆抗体;分枝杆菌细胞壁提取物;一氧化氮调节剂;奥沙利铂;潘诺芬;戊唑;磷酸酶抑制剂;纤溶酶原激活物抑制剂;铂络合物;铂化合物;强的松;蛋白酶体抑制剂;基于蛋白A的免疫调节剂;蛋白激酶C抑制剂;蛋白激酶C抑制剂、蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂;嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂;ras法尼基蛋白转移酶抑制剂;ras抑制剂;ras-GAP抑制剂;核酶;信号转导抑制剂;信号转导调节剂;单链抗原结合蛋白;干细胞抑制剂;干细胞分裂抑制剂;溶基质素抑制剂;合成的糖胺聚糖;他莫昔芬甲碘化物;端粒酶抑制剂;甲状腺刺激激素;翻译抑制剂(translation inhibitors);酪氨酸激酶抑制剂;尿激酶受体拮抗剂;类固醇(例如地塞米松)、非那雄胺、芳香酶抑制剂、促性腺激素释放激素激动剂(GnRH)、例如戈舍瑞林或亮丙瑞林、肾上腺皮质类固醇(例如泼尼松)、孕激素(例如羟基孕酮己酸酯、乙酸孕甾酮、醋酸甲羟孕酮)、雌激素(二烯雌酚、乙炔雌二醇)、抗雌激素药(例如他莫昔芬)、雄激素(例如丙酸睾酮、氟甲睾酮)、抗雄激素(例如氟他胺)、免疫刺激剂

(例如卡介苗芽孢杆菌 (BCG)、左旋咪唑、白介素2、 α -干扰素等)、单克隆抗体 (例如抗CD20、抗HER2、抗CD52、抗HLA-DR和抗VEGF单克隆抗体)、免疫毒素 (例如抗CD33单克隆抗体-卡利车霉素偶联物、抗CD22单克隆抗体-假单胞菌外毒素偶联物等)、放射免疫治疗剂 (例如与 ^{111}In 、 ^{90}Y 或 ^{131}I 等偶联的抗CD20单克隆抗体)、雷公藤甲素、高三尖杉酯碱、放线菌素、阿霉素、表柔比星、托泊替康、伊曲康唑、长春地辛、西立伐他汀、长春新碱、脱氧腺苷、舍曲林、匹伐他汀、伊立替康、氯法齐明、5-壬基奈替尼、威罗非尼、达拉非尼、厄洛替尼、吉非替尼、EGFR抑制剂、靶向表皮生长因子受体 (EGFR) - 靶向治疗剂或治疗药物 (例如吉非替尼 (IressaTM)、厄洛替尼 (TarcevaTM)、西妥昔单抗 (ErbixTM)、拉帕替尼 (TykerbTM)、帕尼单抗 (VectibixTM)、凡德他尼 (CaprelsaTM)、阿法替尼/BIBW2992、CI-1033/坎替尼、奈拉替尼/HKI-272、CP-724714、TAK-285、AST-1306、ARRY334543、ARRY-380、AG-1478、达科替尼/PF299804、OSI-420/去甲基厄洛替尼、AZD8931、AEE788、培利替尼/EKB-569、CUDC-101、WZ8040、WZ4002、WZ3146、AG-490、XL647、PD153035、BMS-599626)、索拉非尼、伊马替尼、舒尼替尼、达沙汀等等。

[0089] “化学治疗”或“化疗剂”按照其普通的含义使用,并且是指具有抗肿瘤性质或抑制细胞生长或增殖能力的化学组合物或化合物。

[0090] 此外,本文所述的核糖核酸化合物可与常规免疫治疗剂共同给予或与常规免疫治疗剂共价连接,所述常规免疫治疗剂包括但不限于:免疫刺激剂 (例如卡介苗芽孢杆菌 (BCG)、左旋咪唑、白介素2、 α 干扰素等),单克隆抗体 (例如抗CD20、抗HER2、抗CD52、抗HLA-DR、抗PD-1和抗VEGF单克隆抗体),免疫毒素 (例如抗CD33单克隆抗体-加利车霉素偶联物、抗CD22单克隆抗体-假单胞菌外毒素偶联物等)和放射免疫治疗剂 (例如与 ^{111}In 、 ^{90}Y 或 ^{131}I 等偶联的抗CD20单克隆抗体)。

[0091] 在另一实施方式中,本文所述的核糖核酸化合物可与常规放射治疗剂共同给予,所述常规放射治疗剂包括但不限于放射性核素,例如 ^{47}Sc 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{89}Sr 、 ^{86}Y 、 ^{87}Y 、 ^{90}Y 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{117}Sn 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 和 ^{212}Bi ,任选偶联于抗肿瘤抗原的抗体。

[0092] 术语“样品”包括组织切片,例如活检和尸检样品,以及用于组织学目的的冷冻切片。此类样品包括血液和血液组分或产物 (例如,骨髓、血清、血浆、血小板、红细胞等)、痰、组织、培养的细胞 (例如,原代培养物、外植体和转化细胞)、粪便、尿液、其它生物液体 (例如,前列腺液、胃液、肠液、肾液、肺液、脑脊液等)等。样品通常获自“受试者”,例如真核生物,最优选哺乳动物,例如灵长类动物,例如黑猩猩或人;牛;狗;猫;啮齿动物,例如豚鼠、大鼠、小鼠;家兔;或鸟;爬行动物;或鱼。在一些实施方式中,样品获自人。

[0093] “对照”样品或值是指与测试样品进行比较的用作参照物的样品,通常是已知的参照物。例如,可以从测试条件下,例如在有测试化合物存在下获取测试样品,并与已知条件下获取的样品进行比较,例如在没有测试化合物存在下 (阴性对照) 或在有已知化合物存在下 (阳性对照)。对照也可以代表从多个测试或结果中收集的平均值。本领域技术人员将认识到,可以为评估任何数量的参数将来设计对照。例如,可以设计对照以便基于药理学数据 (例如,半衰期) 或治疗措施 (例如,比较副作用) 来比较治疗益处。本领域技术人员将理解在给定情况下哪些对照是有价值的,并且能够基于与对照值的比较来分析数据。对照对于确定数据的显著性也很有价值。例如,如果在对照中给定参数的值变化很大,则不认为测试样

本中的变化是显著的。

[0094] “疾病”或“病症”是指能够用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的患者或对象的状态或健康状况。在实施方式中,所述疾病是癌症(例如肝癌、胰腺癌、胰腺肝转移瘤、脑癌、前列腺癌、肾癌、转移性癌、黑素瘤、去势耐受性前列腺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、成胶质细胞瘤、卵巢癌、肺癌、鳞状细胞癌(例如头、颈或食道)、结直肠癌、白血病、急性髓细胞性白血病、淋巴瘤、B细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤),传染病(例如HN感染),炎性疾病(例如类风湿性关节炎)或代谢性疾病(例如糖尿病)。在实施方式中,该疾病是与TfR的异常活性、TfR的磷酸化或TfR的途径活性或TfR激活途径相关的疾病(例如由其引起)。在一些实施方式中,所述疾病是癌症(例如前列腺癌、肾癌、转移性癌症、黑素瘤、去势耐受性前列腺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、成胶质细胞瘤、卵巢癌、肺癌、鳞状细胞癌(例如头、颈部或食道)、结直肠癌、白血病、急性髓细胞性白血病、淋巴瘤、B细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤)。

[0095] 本文所用的术语“癌症”是指在哺乳动物中发现的所有类型的癌症、赘生物或恶性肿瘤,包括白血病、淋巴瘤、癌和肉瘤。

[0096] 可以用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的示例性癌症包括胰腺癌、肝癌(例如肝细胞癌)、胰腺肝转移瘤、淋巴瘤、肉瘤、膀胱癌、骨癌、脑癌(例如脑瘤、髓母细胞瘤、成胶质细胞瘤、多形性成胶质细胞瘤)、宫颈癌、结肠癌、食道癌、胃癌、头和颈癌、肾癌、骨髓瘤、甲状腺癌、白血病、前列腺癌、乳腺癌(例如三阴性、ER阳性、ER阴性、抗化疗、赫赛汀耐受性、HER2阳性、抗阿霉素、他莫昔芬耐受性、导管癌、小叶癌、原发性、转移性)、卵巢癌、肺癌(例如非小细胞肺癌、鳞状细胞肺癌、腺癌、大细胞肺癌、小细胞肺癌、类癌、肉瘤)、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、黑色素瘤、去势耐受性前列腺癌、鳞状细胞癌(例如头、颈或食道)、结肠直肠癌、急性髓细胞性白血病、B细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、横纹肌肉瘤、间皮瘤、子宫内膜癌、血小板增多症、华氏巨球蛋白血症(WM)、胰岛素瘤、恶性类癌、恶性皮肤前病变、睾丸癌、恶性高钙血症、肾上腺皮质癌、内分泌或外分泌胰腺肿瘤、甲状腺髓样癌、甲状腺髓样癌、甲状腺乳头状癌、乳头佩吉特病、毛状叶癌、小叶癌、导管癌、胰腺星状细胞癌或肝星状细胞癌。其它实例包括内分泌系统、脑、乳腺、骨、子宫颈、结肠、头颈、食道、肝、肾、肺、非小细胞肺、卵巢、胃、口腔、皮肤、子宫、子宫内膜、胰腺、甲状腺、膀胱、前列腺、睾丸或泌尿生殖道的癌症。

[0097] 术语“白血病”广义上是指血液形成器官的进行性恶性疾病,并且通常以血液和骨髓中白细胞及其前体的增殖和发育畸变为特征。在临床上,通常基于以下标准分类白血病:(1)急性或慢性的持续时间和特征;(2)所涉及的细胞类型;髓样(骨髓),淋巴样(淋巴)或单核细胞;和(3)血液-白血病或无白血病(亚白血病)中异常细胞的数量增加或不增加。可以用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的示例性白血病包括,例如急性非淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、慢性粒细胞性白血病、急性早幼粒细胞性白血病、成人T细胞白血病、非白血性白血病、白血性白血病、嗜碱性白血病、母细胞白血病、牛白血病、慢性髓细胞性白血病、皮肤白血病、胚胎性白血病、嗜酸性白血病、格罗斯(Gross)白血病、毛细胞性白血病、成血细胞性白血病、血细胞性白血病、组织细胞性白血病、干细胞白血病、急性单核细胞性白血病、白细胞性白血病、淋巴性白血病、淋巴母细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、淋巴原性白血病、淋巴白血病、淋巴肉瘤细胞白血病、肥大细胞白血病、巨核细胞白血病、微粒细胞白血病、单核细胞白血病、成髓细胞白血病、粒细胞白

血病、髓性粒细胞白血病、髓单核细胞白血病、内格里氏白血病、浆细胞白血病、多发性骨髓瘤、浆细胞性白血病、早幼粒细胞性白血病、里德细胞白血病、希林白血病、干细胞白血病、亚白血病或未分化细胞白血病。

[0098] 术语“肉瘤”通常是指由类似于胚胎结缔组织的物质组成的肿瘤,并且通常由包埋在纤维状或均质物质中的紧密堆积的细胞组成。可以用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的肉瘤包括软骨肉瘤、纤维肉瘤、淋巴肉瘤、黑色素肉瘤、粘肉瘤、骨肉瘤、阿贝西肉瘤、脂肪肉瘤、脂肉瘤、肺泡软部分肉瘤、成釉细胞肉瘤、葡萄状肉瘤、绿色癌肉瘤、绒毛膜癌、胚胎肉瘤、威尔姆斯瘤肉瘤、子宫内膜肉瘤、基质肉瘤、尤因肉瘤、筋膜肉瘤、成纤维细胞肉瘤、巨细胞肉瘤、粒细胞肉瘤、霍奇金肉瘤、特发性多色性出血性肉瘤、B细胞免疫原性肉瘤、淋巴瘤、T细胞免疫原性肉瘤、詹森肉瘤、卡波西肉瘤、枯否细胞肉瘤、血管肉瘤、白细胞肉瘤、恶性间皮瘤肉瘤、骨旁肉瘤、网状细胞肉瘤、劳斯肉瘤、浆液性肉瘤、滑膜肉瘤或毛细血管扩张肉瘤。

[0099] 术语“黑素瘤”是指源自皮肤和其它器官的黑素细胞系统的肿瘤。可以用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的黑素瘤包括,例如肢端黑素瘤、釉质黑素瘤、良性少年黑素瘤、克劳德曼黑素瘤、S91黑素瘤、哈丁帕西黑素瘤、少年黑素瘤、扁桃体恶性黑色素瘤、恶性黑素瘤、结节性黑素瘤、舌下黑素瘤或浅表性黑色素瘤。

[0100] 术语“癌”是指由趋于浸润周围组织并引起转移的上皮细胞组成的恶性新生长。可以用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的示例性癌包括,例如甲状腺髓样癌、家族性甲状腺髓样癌、腺泡癌、腺泡状癌、腺囊癌、腺样囊性癌、腺瘤癌、肾上腺皮质癌、肺泡癌、肺泡细胞癌、基底细胞癌、基底上皮细胞癌、基底细胞样癌、基底鳞状细胞癌、支气管肺泡癌、细支气管癌、支气管癌、脑样癌、胆管细胞癌、绒毛膜癌、胶体癌、粉刺癌、体癌、筛状癌、胸膜癌、皮肤角质癌、圆柱状癌、圆柱状细胞癌、导管癌、管腺癌、硬脑膜癌、胚胎癌、脑癌、表皮样癌、腺样上皮细胞癌、外生性癌、溃疡前癌、纤维瘤癌、明胶腺癌、胶状癌、巨大细胞癌、巨细胞癌、腺癌、颗粒细胞癌、毛基质癌、血样癌、肝细胞癌、许特莱氏细胞癌、透明膜癌、肾上腺样癌、婴儿胚胎癌、原位癌、表皮内癌、上皮内癌、克罗姆佩切氏癌、库尔奇基氏细胞癌、大细胞癌、豆状癌、透镜状癌、脂质体癌、小叶癌、淋巴管上皮癌、髓质癌、髓样癌、黑素瘤癌、莫勒癌、粘液性癌、粘液癌、粘液细胞癌、粘液表皮样癌、黏液癌、粘液癌、黏液瘤样癌、鼻咽癌、燕麦细胞癌、骨化癌、类骨癌、乳头状癌、门静脉癌、浸润前癌、棘皮细胞癌、脓疱癌、肾脏肾细胞癌、储备细胞癌、肉瘤癌、施奈德癌、硬化癌、阴囊癌、印戒细胞癌、单纯性癌、小细胞癌、类癌、球状细胞癌、梭形细胞癌、海绵状癌、鳞状癌、鳞状细胞癌、管道癌、血管扩张癌、毛细血管扩张癌、移行细胞癌、结节性癌、肾小管癌、结节性癌、疣状癌或绒毛状癌。

[0101] 本文所用的术语“转移”、“转移性”和“转移性癌症”可以互换使用,是指增殖性疾病或病症,例如癌症从一个器官或另一不相邻器官或身体部分的扩散。癌症发生在起源部位,例如乳腺,该部位称为原发肿瘤,例如原发性乳腺癌。原发肿瘤或起源部位中的某些癌细胞具有穿透和浸润局部区域周围正常组织的能力,和/或穿过淋巴系统或血管系统壁,通过该系统循环至身体其它部位和组织的能力。由原发性肿瘤的癌细胞形成的第二临床上可检测的肿瘤称为转移性或继发性肿瘤。当癌细胞转移时,推测转移性肿瘤及其细胞与原始肿瘤相似。因此,如果肺癌转移到乳腺,则乳腺部位的继发性肿瘤由异常的肺细胞而不是异常的乳腺细胞组成。乳腺中的继发性肿瘤被称为转移性肺癌。因此,短语“转移性癌症”是指

对象患有或曾经患有原发性肿瘤并具有一个或多个继发性肿瘤的疾病。短语“非转移性癌症”或患有非转移性癌症的对象是指对象患有原发性肿瘤但没有一个或多个继发性肿瘤的疾病。例如,转移性肺癌是指患有或具有原发性肺肿瘤病史并且在第二部位或多个部位(例如在乳腺中)具有一个或多个继发性肿瘤的对象中的疾病。

[0102] 在与疾病(例如糖尿病、癌症(例如前列腺癌、肾癌、转移性癌症、黑素瘤、去势抵抗性前列腺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、肺癌、鳞状细胞癌(例如头、颈或食道))、结肠直肠癌、白血病、急性髓细胞性白血病、淋巴瘤、B细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤))相关的物质或物质活性或功能的上下文中,术语“相关”或“与……相关”是指该疾病(例如糖尿病、癌症(例如前列腺癌、肾癌、转移性癌症、黑素瘤、去势抵抗性前列腺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、肺癌、鳞状细胞癌(例如头、颈或食道))、结肠直肠癌、白血病、急性髓细胞性白血病、淋巴瘤、B细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤)或病毒性疾病(例如HN感染相关疾病))是由该物质或物质活性或功能引起的(全部或部分),或者该疾病的症状是由该物质或物质活性或功能引起的(全部或部分)。

[0103] 本文所用的术语“异常”是指与正常的不同。当用于描述酶活性时,异常是指活性大于或小于正常对照或正常未患病对照样品的平均值。异常活性可以指导致疾病的活性量,其中使异常活性恢复到正常或与疾病无关的量(例如,通过使用本文所述的方法)导致疾病或一种或多种疾病症状减轻。

[0104] “接触”按照其普通含义使用,是指使至少两种不同的物质(例如化学化合物,包括生物分子或细胞)足够近,从而反应、相互作用或物理接触的过程。然而,应当理解,所得反应产物可以直接由加入的试剂之间的反应产生,或者由可以在反应混合物中产生的所加入试剂的一种或多种中间体产生。接触可以包括允许两种物质反应、相互作用或物理接触,其中所述两种物质可以是本文所述的核酸化合物和细胞(例如癌细胞)。

[0105] 核糖核酸化合物

[0106] 本发明提供了能够结合转铁蛋白受体(TfR)的核酸化合物。在优选的实施方式中,TfR在细胞上,并且在某些情况下,核酸化合物被内化入细胞中。

[0107] TfR在正常细胞上低水平表达。具有高增殖率的细胞,例如活化的免疫细胞和癌症表现出TfR的表达上调。因此,本发明的核酸化合物提供了通过TfR结合靶向多种细胞的机制。

[0108] 在各种实施方式中,本文提供的核酸化合物包含有效载荷,例如治疗性或诊断性分子,因此促进有效载荷向TfR表达细胞的靶向递送。核酸化合物和有效载荷可以被内化入表达TfR的细胞中,从而提供了靶向胞内递送的有效机制。

[0109] WO 2016/061386描述了能够结合TfR的核糖核酸化合物。WO 2016/061386中的核糖核酸化合物包含具有至少30个核苷酸的RNA序列,并且以包含长度为87或43个核苷酸的RNA序列的化合物为例。

[0110] 核酸化合物,例如适体的三维结构对于确定结合亲和力和特异性是必不可少的。因此,不能截断核酸化合物并绝对期望保留其结合相同靶标的能力。预测功能性截短的适体序列并非易事。然而,发明人已经发现,本文提供的29个核苷酸或更少的,特定的较短核酸序列出乎意料地保留了结合TfR的能力,并且仍然能够有效载荷一起被内化入表达TfR的细胞中。

[0111] 此外,由于其尺寸减小,本文所述的核酸化合物能够穿过血脑屏障(BBB)并将治疗或诊断有效载荷递送至脑中表达TfR的细胞靶标。

[0112] 因此,如本文所示,本发明的核酸化合物提供了将有效载荷靶向递送到多种动物物种中的多种细胞类型的高度特异性和有效的手段。本发明还提供了一种有价值的机制,以克服几乎不可渗透、高度选择性和良好协调的血脑屏障BBB,并实现将治疗剂和成像剂递送至大脑。

[0113] 在一些方面,本发明提供了一种核酸化合物,其包含与SEQ ID NO:1具有至少80%序列同一性的RNA序列或由其组成,并且其中所述RNA序列的长度为29个核苷酸或更短。在本文提供的任何实施方式中,所述核酸化合物可以是核糖核酸化合物。

[0114] 在一些实施方式中,所述RNA序列与SEQ ID NO:1具有至少85%、至少87%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。在一些实施方式中,所述RNA序列与SEQ ID NO:1具有至少90%的序列同一性。在一些实施方式中,所述RNA序列与SEQ ID NO:1具有80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在一些实施方式中,所述RNA序列与SEQ ID NO:1具有100%的序列同一性。在一些实施方式中,所述RNA序列能够结合转铁蛋白受体(TfR)。在一些实施方式中,所述RNA序列结合转铁蛋白受体(TfR)。在一些实施方式中,TfR在细胞表面上。在一些实施方式中,所述核酸化合物能够被内化入细胞中。在一些情况下,该细胞是表达TfR的细胞。

[0115] 在一些情况下,所述RNA序列与和SEQ ID NO:1杂交的核酸具有至少80%的序列同一性。在一些情况下,所述RNA序列与和SEQ ID NO:1杂交的核酸具有至少85%、至少87%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%的序列同一性。

[0116] 在一些方面,本发明提供了一种核酸化合物,例如核糖核酸化合物,其包含与SEQ ID NO:5具有至少80%序列同一性的RNA序列或由其组成,并且其中所述RNA序列的长度为29个核苷酸或更短。在一些实施方式中,所述RNA序列与SEQ ID NO:5具有至少85%、至少87%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。在一些实施方式中,所述RNA序列与SEQ ID NO:5具有至少90%的序列同一性。在一些实施方式中,所述RNA序列与SEQ ID NO:5具有80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在一些实施方式中,所述RNA序列与SEQ ID NO:5具有100%的序列同一性。在一些实施方式中,所述RNA序列由SEQ ID NO:5组成。在一些实施方式中,所述RNA序列能够结合转铁蛋白受体(TfR)。在一些实施方式中,所述RNA序列结合转铁蛋白受体(TfR)。在一些实施方式中,TfR在细胞表面上。在一些实施方式中,所述核酸化合物能够被内化入细胞中。在一些情况下,该细胞是表达TfR的细胞。

[0117] 在一些情况下,所述RNA序列与和SEQ ID NO:5杂交的核酸具有至少80%的序列同一性。在一些情况下,所述RNA序列与和SEQ ID NO:5杂交的核酸具有至少85%、至少87%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%的序列同一性。

[0118] 在一些实施方式中,本文提供的RNA序列的长度为29个核苷酸或更少、28个核苷酸或更少、27个核苷酸或更少、26个核苷酸或更少、25个核苷酸或更少、24个核苷酸或更少、23个核苷酸或更少、22个核苷酸或更少、21个核苷酸或更少、20个核苷酸或更少、19个核苷酸或更少、18个核苷酸或更少、17个核苷酸或更少、或16个核苷酸或更少。在一些情况下,所述RNA序列的长度为22个核苷酸或更短。在一些实施方式中,所述RNA序列的长度为16至29个核苷酸。在一些实施方式中,所述RNA序列的长度在16至22个核苷酸之间。

[0119] 在一些实施方式中,所述RNA序列的长度为16个核苷酸。在一些实施方式中,所述RNA序列的长度为17个核苷酸。在一些实施方式中,所述RNA序列的长度为18个核苷酸。在一些实施方式中,所述RNA序列的长度为19个核苷酸。在一些实施方式中,所述RNA序列的长度为20个核苷酸。在一些实施方式中,所述RNA序列的长度为21个核苷酸。在一些实施方式中,所述RNA序列的长度为22个核苷酸。在一些实施方式中,所述RNA序列的长度为23个核苷酸。在一些实施方式中,所述RNA序列的长度为24个核苷酸。在一些实施方式中,所述RNA序列的长度为25个核苷酸。在一些实施方式中,所述RNA序列的长度为26个核苷酸。在一些实施方式中,所述RNA序列的长度为27个核苷酸。在一些实施方式中,所述RNA序列的长度为28个核苷酸。在一些实施方式中,所述RNA序列的长度为29个核苷酸。

[0120] 在一些情况下,所述RNA序列与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5具有至少80%的序列同一性,并且长度为29个核苷酸或更少、28个核苷酸或更少、27个核苷酸或更少、26个核苷酸或更少、25个核苷酸或更少、24个核苷酸或更少、23个核苷酸或更少、22个核苷酸或更少、21个核苷酸或更少、20个核苷酸或更少、19个核苷酸或更少、18个核苷酸或更少、17个核苷酸或更少、或16个核苷酸或更少。

[0121] 在一些情况下,所述RNA序列与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5具有至少85%的序列同一性,并且长度为29个核苷酸或更少、28个核苷酸或更少、27个核苷酸或更少、26个核苷酸或更少、25个核苷酸或更少、24个核苷酸或更少、23个核苷酸或更少、22个核苷酸或更少、21个核苷酸或更少、20个核苷酸或更少、19个核苷酸或更少、18个核苷酸或更少、17个核苷酸或更少、或16个核苷酸或更少。

[0122] 在一些情况下,所述RNA序列与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5具有至少87%的序列同一性,并且长度为29个核苷酸或更少、28个核苷酸或更少、27个核苷酸或更少、26个核苷酸或更少、25个核苷酸或更少、24个核苷酸或更少、23个核苷酸或更少、22个核苷酸或更少、21个核苷酸或更少、20个核苷酸或更少、19个核苷酸或更少、18个核苷酸或更少、17个核苷酸或更少、或16个核苷酸或更少。

[0123] 在一些情况下,所述RNA序列与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5具有至少90%的序列同一性,并且长度为29个核苷酸或更少、28个核苷酸或更少、27个核苷酸或更少、26个核苷酸或更少、25个核苷酸或更少、24个核苷酸或更少、23个核苷酸或更少、22个核苷酸或更少、21个核苷酸或更少、20个核苷酸或更少、19个核苷酸或更少、18个核苷酸或更少、17个核苷酸或更少、或16个核苷酸或更少。

[0124] 在一些情况下,所述RNA序列与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5具有至少91%的序列同一性,并且长度为29个核苷酸或更少、28个核苷酸或更少、27个核苷酸或更少、26个核苷酸或更少、25个核苷酸或更少、24个核苷酸或更少、23个核苷酸或更少、22个核苷酸或更少、21个核苷酸或更少、20个核苷酸或更少、19个核苷酸或更少、18个核苷酸或更少、17个核苷酸或更少、或16个核苷酸或更少。

21个核苷酸或更少、20个核苷酸或更少、19个核苷酸或更少、18个核苷酸或更少、17个核苷酸或更少、或16个核苷酸或更少。

[0133] 在一些情况下,所述RNA序列与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5具有至少100%的序列同一性,并且长度为29个核苷酸或更少、28个核苷酸或更少、27个核苷酸或更少、26个核苷酸或更少、25个核苷酸或更少、24个核苷酸或更少、23个核苷酸或更少、22个核苷酸或更少、21个核苷酸或更少、20个核苷酸或更少、19个核苷酸或更少、18个核苷酸或更少、17个核苷酸或更少、或16个核苷酸或更少。

[0134] 在一些实施方式中,本文提供的RNA序列包含SEQ ID NO:1或由其组成,并且还包含SEQ ID NO:1的1、2、3、4或更多个核苷酸修饰。此类修饰可以是核苷酸添加、取代和/或删除。

[0135] 在一些情况下,与SEQ ID NO:1相比,本文提供的RNA序列有1、2、3或4个核苷酸不同。

[0136] 在一些实施方式中,RNA序列包含SEQ ID NO:1,其中1、2、3、20、21和/或22位中的一个或多个被替代核酸残基取代,例如AMP、GMP、UMP、CMP、dAMP、dGMP、dTTP和/或dCMP。换言之,在一些实施方式中,所述RNA序列包含SEQ ID NO:5和在5'端和3'各自包含3个额外的核苷酸。

[0137] 在一些实施方式中,所述RNA序列包含SEQ ID NO:5或由其组成,并且还包含SEQ ID NO:5的1、2、3、4或更多个核苷酸修饰。此类修饰可以是核苷酸添加、取代和/或删除。

[0138] 在一些情况下,与SEQ ID NO:5相比,本文提供的RNA序列有1、2、3或4个核苷酸不同。

[0139] 预测SEQ ID NO:1的核苷酸4至8位与核苷酸15至19位形成碱基配对。预测SEQ ID NO:5的核苷酸1至5位与核苷酸12至16位形成碱基配对。在一些实施方式中,RNA序列包含SEQ ID NO:1,其中在4至8位和/或15至19位的任一,即一个或多个的核苷酸被导致非经典碱基配对的核苷酸残基取代。在一些实施方式中,RNA序列包含SEQ ID NO:5,其中在1至5位和/或12至16位的任一,即一个或多个的核苷酸被导致非经典碱基配对的核苷酸残基取代。例如,可以将A或U/T替换为C或G,反之亦然。在一些情况下,可以将U-A配对替换为U-G。

[0140] 本文所述的任何RNA序列还可包含额外的核苷酸。可以将额外的核苷酸添加到RNA序列的5'端、3'端或5'和3'端。在一些实施方式中,包含本文所述的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5的RNA序列总共包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13个或更多个额外的核苷酸。当RNA序列包含SEQ ID NO:1时,该RNA序列可以包含总共7个或更少的额外核苷酸。当RNA序列包含SEQ ID NO:5时,该RNA序列可以包含总共13个或更少的额外核苷酸。在一些实施方式中,所述RNA序列能够结合转铁蛋白受体(TfR)。在一些实施方式中,所述RNA序列结合转铁蛋白受体(TfR)。在一些实施方式中,TfR在细胞表面上。在一些实施方式中,所述核酸化合物能够被内化入细胞中。在一些情况下,该细胞是表达TfR的细胞。

[0141] 在一些实施方式中,所述RNA序列包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5或由其组成,还包含本文所述的核苷酸修饰和/或额外的核苷酸,并且长度为29个核苷酸或更少、28个核苷酸或更少、27个核苷酸或更少、26个核苷酸或更少、25个核苷酸或更少、24个核苷酸或更少、23个核苷酸或更少、22个核苷酸或更少、21个核苷酸或更少、20个核苷酸或更少、19个核苷酸或更少、18个核苷酸或更少、17个核苷酸或更少、或16个核苷酸或更少。在一些实施方式

中,所述RNA序列能够结合转铁蛋白受体(TfR)。在一些实施方式中,所述RNA序列结合转铁蛋白受体(TfR)。在一些实施方式中,TfR在细胞表面上。在一些实施方式中,所述核酸化合物能够被内化入细胞中。在一些情况下,该细胞是表达TfR的细胞。

[0142] 本文提供的核酸化合物可包含SEQ ID NO:4。在一些实施方式中,本文提供的RNA序列包含SEQ ID NO:4。

[0143] 在一些方面,本发明提供包含RNA序列的核酸化合物,所述RNA序列包含SEQ ID NO:4,其中所述RNA序列的长度为29个核苷酸或更少、28个核苷酸或更少、27个核苷酸或更少、26个核苷酸或更少、25个核苷酸或更少、24个核苷酸或更少、23个核苷酸或更少、22个核苷酸或更少、21个核苷酸或更少、20个核苷酸或更少、19个核苷酸或更少、18个核苷酸或更少、17个核苷酸或更少、或16个核苷酸或更少。在一些实施方式中,所述RNA序列能够结合转铁蛋白受体(TfR)。在一些实施方式中,所述RNA序列结合转铁蛋白受体(TfR)。在一些实施方式中,TfR在细胞表面上。在一些实施方式中,所述核酸化合物能够被内化入细胞中。在一些情况下,该细胞是表达TfR的细胞。

[0144] 在一些情况下,本文提供的核酸包含含有SEQ ID NO:4的RNA序列。在一些情况下,所述RNA序列的长度为10-29个核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含RNA序列,所述RNA序列包含SEQ ID NO:4,并且长度为10-29个核苷酸,其中所述核酸结合转铁蛋白受体(TfR)。优选地,所述RNA序列的长度为16-29个核苷酸,如上文所述。

[0145] 在某些情况下,所述RNA序列包含环结构。在某些情况下,所述RNA序列包含茎环结构。在某些情况下,所述RNA序列包含分子内碱基配对。在一些实施方式中,所述环包含SEQ ID NO:4。在某些情况下,所述环由SEQ ID NO:4组成。

[0146] 在本文描述的任何实施方式中,所述RNA序列可以是适体。在本文所述的任何实施方式中,所述核酸能够结合转铁蛋白受体(TfR)。在本文描述的任何实施方式中,所述RNA序列能够结合转铁蛋白受体(TfR)。因此,本文提供的RNA序列可以与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5具有至少80% (至少85%等,如上文所述)的序列同一性,并且长度为16至29个核苷酸(如上述),其中所述RNA序列能够与转铁蛋白受体(TfR)结合。在任何实施方式中,所述核酸化合物结合TfR。在任何实施方式中,所述RNA序列结合TfR。在任何实施方式中,TfR在细胞表面。在任何实施方式中,所述核酸化合物能够内化入细胞中。在任何实施方式中,细胞是表达TfR的细胞。

[0147] 如本文所用,术语“在细胞表面”是指分子,例如转铁蛋白受体蛋白在细胞表面的位置。该分子可以某种方式与细胞膜结合。例如,该分子可以是跨越细胞膜并包含胞质域和胞外域的完整或跨膜蛋白,分子可以是脂质锚定的,即与细胞膜中的单个或多个脂质分子共价结合,或该分子可以附着在完整的膜蛋白上。

[0148] 本文所用的术语“能够被内化入细胞中”是指本发明的核酸分子从胞外转运入细胞中的能力。这可以通过诸如内吞作用或吞噬作用等细胞机制来进行。在某些情况下,核酸与TfR结合后被内在化,例如通过网格蛋白介导的TfR-核酸复合物的内吞作用(参见例如Qian ZM等., *Pharmacol Rev.* 2002, 54(4):561-587)。

[0149] “表达TfR的细胞”是产生TfR并将TfR在细胞表面展示为,例如膜蛋白的细胞。

[0150] 在本文提供的任何实施方式中,所述RNA序列包含核糖核苷酸残基。在一些实施方式中,所述RNA序列可以包含一个或多个脱氧核糖核苷酸残基。即,在一些情况下,所述RNA

序列包含选自单磷酸脱氧腺苷 (dAMP)、单磷酸脱氧鸟苷 (dGMP)、单磷酸胸苷/单磷酸脱氧胸苷 (TMP/dTMP) 和单磷酸脱氧胞苷 (dCMP) 的一个或多个残基。在一些情况下,所述RNA序列中的一个或多个单磷酸尿苷 (UMP) 残基被单磷酸脱氧胸苷 (TMP/dTMP) 残基取代。在一些实施方式中,与SEQ ID NO:1具有至少80%序列同一性的RNA序列在SEQ ID NO:1的1、2、3、5、6、11、12、13、14、15、19和/或20位的一个或多个或全部上包含TMP/dTMP残基。在一些实施方式中,与SEQ ID NO:5具有至少80%序列同一性的RNA序列在SEQ ID NO:5的2、3、8、9、10、11、12和/或16位的一个或多个或全部上包含dTMP残基。当本文所述的RNA序列包含SEQ ID NO:4时,所述序列可以在SEQ ID NO:4的4、5、6、7和/或8位的一个或多个或全部上包含dTMP残基。在本文所述的任何RNA序列中,一个或多个AMP、GMP或CMP残基可以取代等效的脱氧核糖核苷酸残基(即dAMP、dGMP或dCMP)。在一些实施方式中,所述RNA序列中的所有核糖核苷酸残基均被等效的脱氧核糖核苷酸残基取代。

[0151] 当RNA序列的一些、大部分或全部由脱氧核糖核苷酸残基组成时,该序列可以描述为DNA序列。因此,本文提供了包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5具有至少80%序列同一性的DNA序列的核酸化合物,其中SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5中的UMP残基被TMP/dTMP残基取代,并且其中DNA序列的长度为29个核苷酸或更短。在一些实施方式中,所述DNA序列能够结合TfR和/或被内化入细胞中,优选表达TfR的细胞。在一些实施方式中,DNA序列与SEQ ID NO:1具有至少85%、至少87%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性,其中SEQ ID NO:1中的UMP残基被dTMP残基取代。在一些实施方式中,SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5中的所有核糖核苷酸残基均被等效的脱氧核糖核苷酸残基取代。

[0152] 本文所述的所有实施方式适用于包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5具有至少80%序列同一性的DNA序列的核酸化合物,其中SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5中的UMP残基被dTMP残基取代,或其中SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:5中的所有核糖核苷酸残基均被等效的脱氧核糖核苷酸残基取代。在这种情况下,该化合物可以描述为脱氧核糖核酸化合物。

[0153] 在一些实施方式中,本文提供的核酸化合物可包含一个或多个脱氧核糖核苷酸残基。换言之,核酸化合物可包含如上所述的RNA/DNA序列,以及额外的一个或多个脱氧核糖核苷酸残基。在这种情况下,该化合物可以描述为脱氧核糖核酸化合物。

[0154] 本文公开的任何核酸/核糖核酸/脱氧核糖核酸化合物可以是分离的和/或基本上纯化的。

[0155] 序列同一性

[0156] 在两个或多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“相同”或“同一性”百分数是指采用,例如具有下文描述的默认参数的BLAST或BLAST 2.0序列比较算法,或者通过手动比对和目视检查(例如,参见NCBI网站<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>等)检测时,两个或多个序列或子序列相同或具有指定百分比的氨基酸残基或核苷酸相同(即,当在比较窗口或指定区域作比较并对齐以获得最大对应性时,在指定区域上具有约60%的同一性,优选65%、70%、75%、80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性。此类序列然后被称为“基本上相同”。该定义还指或可以应用于测试序列的补充。该定义还包括具有缺失和/或添加的序列以及具有取代的那些序列。如下所述,优选算法可以解释间隙等。

[0157] 为作序列比较,通常将一个序列用作参比序列,将其与测试序列进行比较。使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机,必要时指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。优选地,可以使用默认程序参数,或者可以指定替代参数。然后,序列比较算法根据程序参数计算测试序列相对于参比序列的序列同一性百分比。

[0158] 本文所用的“比较窗口”包括参考选自约10至600、通常约50至约200、更通常约100至约150的多个连续位置中的任一的区段,其中在将两个序列最佳比对后,可以将一序列与相同数量的连续位置的参比序列进行比较。

[0159] 用于比较的序列比对方法是本领域熟知的。可以采用本领域技术人员已知的各种方式来进行序列的最佳比对以供比较,例如,通过Smith和Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981) 的局部同源性算法,通过Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970) 的同源性比对算法,通过Pearson和Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988) 的相似度检索方法,通过计算机实施这些算法(威斯康星州遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、PASTA和FASTA,遗传学计算机组,575科学大道,麦迪逊,威斯康辛州)或通过手动比对和目测检查(参见,例如,《分子生物学最新方案》(*Current Protocols in Molecular Biology*) (Ausubel等编.,1995增刊))。可以采用公众可用的计算机软件,例如ClustalOmega (Söding, J. 2005, *Bioinformatics* 21, 951-960)、T-coffee (Notredame等. 2000, *J. Mol. Biol.* (2000) 302, 205-217)、Kalign (Lassmann和Sonnhammer 2005, *BMC Bioinformatics*, 6 (298)) 和MAFFT (Katoh和Standley 2013, *Molecular Biology and Evolution*, 30 (4) 772-780) 软件。使用此类软件时,优选使用默认参数(例如,空位罚分和延长罚分)。

[0160] 适于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的优选实例是BLAST和BLAST 2.0算法,其分别描述于Altschul等., *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977) 和Altschul等., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)。

[0161] 序列

[0162]

SEQ ID NO:	描述	序列
1	TR14 S1-3 (22 聚体)	UUUAUUCACAUUUUUGAAUUGA
2	TR14 (87 聚体)	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAAUGCGUUCACGUUUUUAUUCACAUU UUUGAAUUGAGCAUGAGCUUCGACAGGAGGCUCACAACAGGC
3	TR14 S2 (43 聚体)	GGGGCUCAAUGCGUUCACGUUUUUAUUCACAUUUUUGAAUUGAGC
4	8 聚体环区域	ACAUUUUUU
5	16 聚体截短	AUUCACAUUUUUGAAU
6	人转铁蛋白受体蛋白 1 同种型 1 (GI:189458817; NCBI 参 比序列: NP_003225.2) (GI:189458816; NCBI 参 比序列: NM_003234.3 (转录物变体 1)) (GI:189458818; NCBI 参 比序列: NM_001128148.2 (转 录物变体 2))	MMDQARSASFNSLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNHVMKLAIVDEEEN ADNNTKANVTGPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGKYCKGVEPKTE CERLAGTESPVREEPGEDFPAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDTGTIKL LNENSYVPREAGSQKDNLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVK DSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTK KDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPI VNAELSFHGAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAA AEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSSEKNVCLTVSNVLKEIKILNIF GVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAAGSGVGTALLKLAQMFSMDM VLKDGFPSPRSIIFASWSAGDFGSGATEWLEGYLSSLHLKAFETYINLD KAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNWSKVE KLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPEL NKVARAAAEVAGQFVIKLTVDVLELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRA DIKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDR VMRVEYHFLSPYVSPKESPFRRHVFWGSGSHTLPALLENLKLKQNGA FNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
7	<i>SIRT1</i> saRNA 有义	AUAUGUCCUCCUGGGAAGAUAU
8	<i>SIRT1</i> saRNA 反义	UCUUCCCAGGAGGACAUUUU
9	<i>CEBPA</i> saRNA 有义	GCGGUCAUUGUCACUGGUCUU
10	<i>CEBPA</i> saRNA 反义	GACCAGUGACAAUGACCGCUU
11	P19	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAAUGGCGAAUGCCCGCCUAAUAGG GCGUUUAGACUUGUUGAGUUCGACAGGAGGCUCACAACAGGC

[0163] 化合物部分和化合物

[0164] 本文提供的核酸化合物,例如核糖/脱氧核糖核酸化合物可包含治疗或诊断分子。

[0165] 治疗或诊断分子可以形成本文提供的核酸化合物的一部分,因此称为“化合物部分”,例如治疗部分或成像部分。或者,治疗或诊断分子可以不形成本文提供的核酸化合物的一部分,包括其诸多实施方式,但是可以在本文提供的核酸化合物与表达TfR的细胞上的TfR结合后由所述细胞独立地内在化。在这种情况下,所述治疗或诊断分子称为“化合物”。

[0166] 因此,本文提供的核酸化合物(包括其诸多实施方式)可以包括化合物部分。当核酸化合物包括化合物部分时,该化合物部分可以共价地(例如直接或通过共价键合的中间物)连接于核酸化合物或RNA/DNA序列(参见,例如用于上文所述偶联化学方法的有用反应性部分或官能团)。因此,在一些实施方式中,核酸化合物还包括与核酸化合物或RNA/DNA序列共价连接的化合物部分。在诸多实施方式中,化合物部分和核酸化合物或RNA/DNA序列形成偶联物。在一些实施方式中,化合物部分非共价连接于核酸化合物或RNA/DNA序列,例如经由一个或多个离子键、一个或多个范德华键/相互作用、一个或多个氢键、一个或多个极性键、一个或多个“粘性桥(sticky bridge)”(参见,例如Zhou J等.Nucleic Acids Res.2009;37(9):3094-3109)或它们的组合或混合。化合物部分可通过中间分子,例如模块化链霉亲和素连接体连接至核酸化合物或RNA/DNA序列(参见,例如Chu TC等.,Nucleic Acids Res 2006,34:e73)。如果化合物部分如下文所述被包封,例如在纳米颗粒或脂质体中,包封部分本身可以共价或非共价连接至核酸化合物或RNA/DNA序列。

[0167] 在一些实施方式中,所述化合物部分是共价连接于核酸化合物或RNA/DNA序列的治疗部分或成像部分。

[0168] 本文提供的术语“治疗部分”根据其普通含义使用,并且是指当给予有此需要的对象时具有治疗益处(预防、根除、改善所治疗的潜在疾病)的单价化合物。本文提供的治疗部分可以包括但不限于肽、蛋白、核酸、核酸类似物、小分子、抗体、酶、前药、纳米结构、病毒衣壳、细胞毒性剂(例如毒素),包括但不限于蓖麻毒蛋白、阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、二羟基蒽二酮、放线菌素D、白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE) A、PE40、阿布林和糖皮质激素。在诸多实施方式中,所述治疗部分是本文所述的抗癌剂或化疗剂。在诸多实施方式中,所述治疗部分是核酸部分、肽部分或小分子药物部分。在诸多实施方式中,所述治疗部分是核酸部分。在诸多实施方式中,所述治疗部分是肽部分。在诸多实施方式中,所述治疗部分是小分子药物部分。在诸多实施方式中,所述治疗部分是核酸酶。在诸多实施方式中,所述治疗部分是免疫刺激剂。在诸多实施方式中,所述治疗部分是毒素。在诸多实施方式中,所述治疗部分是核酸酶。在诸多实施方式中,所述治疗部分是锌指核酸酶。在诸多实施方式中,所述治疗部分是转录激活物样效应物核酸酶。在诸多实施方式中,所述治疗部分是Cas9。可以将治疗部分封装在纳米颗粒或脂质体中,其中该纳米颗粒或脂质体连接于核酸化合物或RNA/DNA序列。

[0169] 在一些实施方式中,所述治疗部分是活化核酸部分(包括活化核酸的单价化合物)或反义核酸部分(包括反义核酸的单价化合物)。活化核酸是指能够可检测地增加给定基因或蛋白的表达或活性的核酸。与没有活化核酸存在下的对照相比,活化核酸可以将表达或活性提高10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。在某些情况下,与没有活化核酸存在下的表达或活性相比,表达或活性是1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更高。反义核酸是指这样的核酸,其与特定靶核酸的至少一部分互补并且能够减少靶核酸的转录或减少靶核酸的翻译或改变转录剪接。反义核酸能够可检测地降低给定基因或蛋白的表达或活性。与没有反义核酸存在下的对照相比,反义核酸可将表达或活性降低10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。

[0170] 在一些实施方式中,所述治疗部分是miRNA部分(包括miRNA的单价化合物)、mRNA部分(包括mRNA的单价化合物)、siRNA部分(包括siRNA的单价化合物)或saRNA部分(包括saRNA的单价化合物)。在一些实施方式中,所述治疗部分是miRNA部分。术语“miRNA”按照其普通含义使用,是指能够在转录后调节基因表达的小非编码RNA分子。在一个实施方式中,miRNA是与靶基因实质性或完全相同的核酸。在一些实施方式中,miRNA通过与互补细胞mRNA相互作用藉此干扰互补mRNA的表达,从而抑制基因表达。miRNA的长度通常为至少约15-50个核苷酸(例如,miRNA的各互补序列的长度为15-50个核苷酸,而miRNA的长度为约15-50个碱基对)。在其它实施方式中,长度为20-30个碱基核苷酸,优选长度为约20-25或约24-29个核苷酸,例如长度为20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。在一些实施方式中,所述治疗部分是本文所述的siRNA部分。在一些实施方式中,所述治疗部分是本文所述的saRNA部分。在诸多实施方式中,所述治疗部分是抗癌剂部分。在一些实施方式中,所述治疗部分是mRNA部分。在诸多实施方式中,所述治疗部分是cDNA部分。

[0171] 在一些情况下,本文提供的核酸化合物或RNA/DNA序列连接于核苷酸化合物部分,例如mRNA、miRNA、siRNA或saRNA的有义链。在一些情况下,核酸化合物或RNA/DNA序列连接

于核苷酸化合物部分的反义链。在一些情况下,核酸化合物或RNA/DNA序列连接于核苷酸化合物部分的引导链。在一些情况下,核酸化合物或RNA/DNA序列连接于核苷酸化合物部分的随从链(passenger strand)。

[0172] 在一些实施方式中,所述治疗部分是C/EBP α saRNA部分。本文提供的“C/EBP α saRNA”是能够激活和/或增加C/EBP α 基因和/或C/EBP α 蛋白表达的saRNA。在一些情况下,例如saRNA序列包含SEQ ID NO:9和/或SEQ ID NO:10。

[0173] 在一些实施方式中,所述治疗部分是沉默调节蛋白saRNA部分。本文提供的“沉默调节蛋白saRNA”是能够激活和/或增加沉默调节蛋白基因,例如SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6或SIRT7表达的saRNA。在一些实施方式中,所述治疗部分是SIRT1 saRNA部分。本文提供的“SIRT1 saRNA”是能够激活和/或增加SIRT1基因和/或Sirt1蛋白表达的saRNA。在一些情况下,例如,saRNA序列包含SEQ ID NO:7和/或SEQ ID NO:8。

[0174] 在一些实施方式中,所述治疗部分是HNF saRNA部分。本文提供的“HNF saRNA”是能够激活和/或增加HNF基因和/或蛋白,例如HNF4(包括其同种型和变体)表达的saRNA。HNF saRNA可以是HNF4 saRNA。即,HNF saRNA可以是调节HNF4基因和/或蛋白表达,例如激活和/或增加表达的saRNA。

[0175] 在一些情况下,所述治疗部分可以是NF κ B(活化的B细胞的核因子 κ 轻链增强子)mRNA、miRNA、siRNA或saRNA。

[0176] 在一些情况下,所述治疗部分可以是辅酶,例如NAD⁺/NADH(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸),参见例如Ying W, Front Biosci. 2007年1月1日;12:1863-88。

[0177] 本文提供的化合物部分可以是成像部分。本文提供的“成像部分”是可通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其它物理手段检测的单价化合物。在一些实施方式中,所述成像部分共价连接于核酸化合物或RNA/DNA序列。示例性成像部分不限于³²P、放射性核素、发射正电子的同位素、荧光染料、荧光团、抗体、生物发光分子、化学发光分子、光敏分子、金属、电子致密试剂、酶(例如ELISA中通常使用的)、磁性造影剂、量子点、纳米颗粒,例如金纳米颗粒,生物素、洋地黄毒苷、半抗原和蛋白或其它可制成能检测的实体,例如通过将放射性标记掺入与靶肽特异性反应的肽或抗体中。可以采用本领域已知的任何方法将抗体偶联于该部分,例如采用“Hermanson《生物偶联技术》(Bioconjugate Techniques) 1996,学术出版社.,圣地亚哥”中所述的方法。示例性的荧光团包括荧光素、罗丹明、GFP、香豆素、FITC、Alexa fluor®、Cy3、Cy5、BODIPY和花青染料。示例性放射性核素包括氟18、镓68和铜64。示例性磁性造影剂包括钆、氧化铁和铂铁以及锰。在一些实施方式中,所述成像部分是生物发光分子。在一些实施方式中,所述成像部分是光敏分子。在一些实施方式中,所述成像部分是金属。在一些实施方式中,所述成像部分是纳米颗粒。

[0178] 本文所用的术语“成像剂”描述了当不与本文所述的核酸化合物连接时的上述成像部分。

[0179] 在一些情况下,本文所述的核酸化合物包含(i)本文所述的RNA/DNA序列和(ii)额外的适体分子。当所述RNA/DNA序列是适体时,可以将此类分子描述为双特异性适体。所述额外的适体分子优选不靶向和/或结合TfR。在一些情况下,本文所述的核酸化合物是多价的。在一些情况下,可使用连接至各部分的互补核苷酸接头序列将本文所述核酸的末端退火至额外适体分子的末端(参见例如McNamara, J.O.等. J.Clin. Invest. 2008 118:376-

386,通过引用全文纳入)。

[0180] 可以通过本文所述或本领域已知的任何合适方法将本文所述的化合物部分或化合物与本发明的核酸化合物偶联,参见例如Zhu G等.,*Bioconjug Chem.*201526(11):2186-2197,通过引用全文纳入。基于化学的连接基团可以利用活化试剂,例如间马来酰亚胺基苯甲酰基N-羧基琥珀酰亚胺酯(MBS)、2-亚氨基硫杂环戊烷(Traut试剂)、N-琥珀酰亚胺基-3-2-吡啶基二硫代丙酸酯(SPDP)或可以采用,例如聚乙二醇化或亲和素/生物素技术(参见例如Pardridge WM,*Adv Drug Delivery Rev.*1999,36:299-321;Qian ZM等.,同上,通过引用全文纳入)。

[0181] 修饰

[0182] 本文所述的核酸化合物可包含化学修饰(例如本文所定义的)以增强它们的功能特征,如核酸酶抗性 or 结合亲和力。所述修饰可以存在于核酸化合物, RNA/DNA序列中和/或基于核苷酸的化合物部分或化合物中,例如saRNA、siRNA、miRNA、mRNA。

[0183] 在一些情况下,可以对一个或多个核苷酸的碱基、糖环或磷酸基进行修饰。

[0184] 在一些情况下,本文所述的核酸化合物包含一种或多种修饰的核碱基。例如,所述核酸化合物可包含一个或多个被氟(F)、氨基(NH₂)或O-甲基(OCH₃)基团修饰的核糖/脱氧核糖核碱基。在一些情况下,核碱基在2'位、3'位、5'位或6'位被修饰。在一些情况下,所述核酸化合物可包含一个或多个2'-氨基嘧啶、2'-氟嘧啶、2'-O-甲基核苷酸和/或“锁定”核苷酸(LNA)(参见例如Lin,Y等.,*Nucleic Acids Res.*199422,5229-5234(1994);Ruckman,J.等.,*J.Biol.Chem.*1998 273,20556-20567;Burmeister,PE等.,*Chem.Biol.*2005 12,25-33;Kuwahara,M.和Obika,S.*Artif.DNA PNA XNA* 2013 4,39-48;Veedu,R.N.和Wengel,J.*Mol.Biosyst.*2009 5,787-792)。在一些情况下,所述核酸化合物包含一个或多个L型核酸(参见例如Maasch,C等.,*Nucleic Acids Symp.Ser.(Oxf.)*2008 52,61-62)。其它合适的核酸修饰对本领域技术人员是显而易见的(参见例如Ni S等.,*Int.J.Mol.Sci* 2017 18,1683,通过引用全文纳入)。

[0185] 在一些情况下,核苷酸化合物部分,例如mRNA、miRNA、siRNA或saRNA的有义和/或反义链可包含核苷酸突出端。例如,所述突出端可以是2-核苷酸(UU)突出端。所述突出端可以在一条或两条链的3'端。突出端可能有利于切酶识别核苷酸化合物部分。

[0186] 在一些情况下,本文所述的核酸化合物在3'端包含反向胸苷帽,或包含3'-生物素。在一些情况下,核酸化合物中的磷酸二酯键被磷酸甲基酯或硫代磷酸酯类似物或三唑连接键替代(参见Ni S等.,同上)。

[0187] 在一些情况下,本文所述的核酸化合物包含一个或多个拷贝的C3间隔基团亚磷酰胺。间隔基团可以在内部,例如在RNA/DNA序列和化合物部分之间,或在核苷酸序列的5'或3'端掺入,以便连接例如成像部分。

[0188] 在一些情况下,本文所述的核酸化合物包含修饰以增加半衰期和/或耐受肾脏清除。例如,可以修饰化合物以包含胆固醇、二烷基脂质、蛋白、脂质体、有机或无机纳米材料、纳米颗粒、惰性抗体或聚乙二醇(PEG),例如20kDa PEG、40kDa PEG。此类修饰可能在化合物的5'端。在一些情况下,修饰包含质量高于肾小球截断阈值(~30-50kDa)的分子。在一些情况下,可以用普朗尼克凝胶配制核酸化合物。合适的修饰和制剂的例子可参见,例如Ni等.,同上;Zhou和Rossi,*Nat Rev Drug Disc*2017,16 181-202,二者通过引用全文纳入。

[0189] 本文所述的核酸化合物可包含标签,例如白蛋白标签。其它标签可以包括:聚(His)标签、几丁质结合蛋白(CBP)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、链球菌标签和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)。所述化合物可包含RNA/DNA亲和标签,例如,Srisawat C和Engelke DR, Methods.2002 26(2):156-161和Walker等.,Methods Mol Biol.2008;488:23-40所述的,二者通过引用全文纳入。其它合适的标签是本领域技术人员显而易见的。

[0190] 本文所述的核酸化合物可在核酸部分与化合物部分和/或标签之间包含间隔基团或接头序列。合适的间隔基团或接头序列是本领域技术人员显而易见的。

[0191] 功能特征

[0192] 本文所述的核酸化合物可以通过参考某些功能特性来表征。

[0193] 在一些实施方式中,本文所述的任何核酸/核糖核酸/脱氧核糖核酸化合物可具有以下一种或多种特性:

[0194] 与转铁蛋白受体(TfR)结合;

[0195] 能够结合TfR;

[0196] 特异性结合TfR;

[0197] 能够与TfR特异性结合;

[0198] 与细胞表面的TfR结合;

[0199] 能够结合细胞表面的TfR;

[0200] 能够被细胞内化;

[0201] 能够递送有效载荷,例如化合物部分或化合物进入细胞;

[0202] 能够穿越血脑屏障;

[0203] 能够被运输进入大脑;

[0204] 能够递送有效载荷,例如化合物部分或化合物进入大脑。

[0205] 核酸化合物与转铁蛋白受体的结合可以通过,例如表面等离子共振技术来测定,如本文所示和Drescher等.,Methods Mol Biol.2009;493:323-343中所述。

[0206] 核酸化合物被细胞内化的能力或穿越BBB的能力可以采用与核酸化合物偶联的成像部分(例如荧光染料),并通过适当的手段检测所述成像部分来测定。合适的成像方法在本文有描述或是本领域熟知的。其它方法包括检测脑组织中的治疗部分,例如使用抗体。

[0207] 核酸化合物将有效载荷递送入细胞的能力可以通过检测有效载荷本身来测定,例如通过检测成像部分或本领域已知的其它方式,或通过检测成功递送所述有效载荷的效果,如本文所述。

[0208] 本文提供的术语“内化”、“内化的”或“内在化”是指成分(例如,化合物、核酸化合物、治疗剂、成像剂)被吸入细胞的细胞质中(例如,被细胞膜吞没后)。

[0209] 药物制剂

[0210] 本发明提供了包含本文所述核酸化合物的药物组合物。

[0211] 可以将本文所述的核酸化合物配制成临床使用的药物组合物或药物,并且可以包含药学上可接受的运载体、稀释剂、赋形剂或佐剂。可以将组合物配制为用于局部、肠胃外、全身、腔内、静脉内、动脉内、肌内、鞘内、眼内、结膜内、肿瘤内、皮下、皮内、鞘内、口服或经皮给药途径,包括注射液或输注液。合适的制剂可以在无菌或等渗介质中包含抗原结合分子。可以将药物和药物组合物配制成包括凝胶在内的液体形式。可以配制流体制剂以便通

过注射或输注(例如经由导管)施用于人体或动物体的选定区域。

[0212] 在一些情况下,将本发明的核酸化合物配制成用于注射或输注,例如进入血管或肿瘤。

[0213] 本文提供的核酸化合物的药物组合物可包括具有以治疗或预防有效量(即有效达到其预期目的的用量)包含的治疗部分的组合物。本文提供的核酸化合物的药物组合物可以包括具有以有效量(即有效达到其预期目的的用量)包含的成像部分的组合物。对于特定应用有效的实际量将尤其取决于所治疗、测试、检测或诊断的状况。当在治疗疾病的方法中给予时,此类组合物包含一定量的活性成分以有效实现所需结果,例如调节靶分子的活性,和/或减少、消除或减慢疾病症状的发展。测定本文提供的治疗部分的治疗或预防有效量完全在本领域技术人员的能力范围内,尤其是鉴于本文的详述内容。当在诊断或检测疾病的方法中给予时,此类组合物包含有效实现所需结果的一定量的本文所述成像部分,例如检测对象中靶分子、细胞或肿瘤的存在与否。测定本文提供的成像部分的可检测量完全在本领域技术人员的能力范围内,尤其是鉴于本文的详述。

[0214] 给予哺乳动物的剂量和频率(单次或多次)可根据各种因素而有所不同,例如哺乳动物是否患有另一疾病;给药途径;接受者的大小、年龄、性别、健康状况、体重、体重指数和饮食;所治疗疾病症状的性质和程度,同时治疗的类型,所治疗疾病的并发症或其它健康相关问题。其它治疗方案或药剂可以与本文所述的方法和组合物(包括其诸多实施方式)联用。设定剂量(例如频率和持续时间)的调整和操作完全在本领域技术人员的能力范围内。

[0215] 对于本文所述的任何组合物(例如,所提供的核酸化合物以及抗癌剂和所提供的核酸化合物的组合),可以首先从细胞培养测定中确定治疗有效量。目标浓度将是采用本文所述的方法或本领域已知方法检测的,能够实现本文所述方法的活性化合物的那些浓度。本领域熟知,也可以从动物模型确定用于人的有效量。例如,可以配制人用剂量以实现业已发现对动物有效的浓度。可以通过监测效果并向上或向下调节剂量来调节人的剂量,如上所述。基于上述方法和其它方法调整剂量以在人中获得最大功效完全在普通技术人员的能力范围内。

[0216] 在一方面,本文提供了药物组合物,其包含本文所述的核酸化合物(包括其诸多实施方式),和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中,核酸包括共价连接于核酸化合物或RNA/DNA序列的化合物部分。如上所述,化合物部分可以是与核酸化合物或RNA/DNA序列共价连接的治疗部分或成像部分。

[0217] 在一些方面,药物组合物包括本文提供的核酸化合物(包括其诸多实施方式),和治疗剂。在一些实施方式中,核酸化合物包含化合物部分。在一些实施方式中,核酸化合物和治疗剂不共价连接。本文提供的治疗剂是指具有治疗作用的成分(例如化合物、药物、拮抗剂、抑制剂、调节剂)。在一些实施方式中,治疗剂是抗癌剂。在一些实施方式中,药物组合物包含药学上可接受的赋形剂。

[0218] 在一些方面,提供了药物组合物,其包含本文提供的核酸化合物(包括其诸多实施方式),和本文描述的化合物。即,该组合物包含核酸化合物和化合物,例如不构成核酸化合物本身的一部分的治疗或诊断分子。在一些情况下,核酸化合物包含化合物部分。在一些情况下,药物组合物还包含治疗剂。

[0219] “药学上可接受的赋形剂”和“药学上可接受的运载体”是指有助于将活性剂给予

对象并被其吸收的物质,其可以包括在本发明的组合物中而不会对患者产生显著的不良毒性作用。药学上可接受的赋形剂的非限制性例子包括水、NaCl、生理盐水溶液、乳酸林格氏液、正常蔗糖、生理葡萄糖、粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂、包衣、甜味剂、调味剂、盐溶液(如林格氏溶液)、醇、油、明胶、碳水化合物(例如乳糖、直链淀粉或淀粉)、脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮和色素等。可以对这些制剂进行灭菌,并且如果需要,可以与不会与本发明化合物发生有害反应的辅助剂,如润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂和/或芳香物质等混合。本领域技术人员将认识到,其它药物赋形剂可用于本发明。

[0220] 术语“药学上可接受的盐”是指衍生自本领域熟知的各种有机和无机抗衡离子的盐,仅作为示例包括钠、钾、钙、镁、铵、四烷基铵等;以及当分子包含碱性官能团时,有机或无机酸的盐,例如盐酸盐、氢溴酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、马来酸盐、草酸盐等。

[0221] 术语“组合物”旨在包括活性化合物和包封材料作为提供胶囊的运载体的制剂,其中含或不含其它运载体的活性成分被运载体包围,因此与其缔合。类似地,包括扁囊剂和锭剂。片剂、粉末剂、胶囊剂、丸剂、扁囊剂和锭剂可以用作适合口服的固体剂型。

[0222] 药物组合物任选是单位剂型。在此类形式中,制剂细分为包含适当量的活性成分的单位剂量。单位剂型可以是包装的组合物,该包装包含离散量的组合物,例如小瓶或安瓿中的经包装片剂、胶囊剂和粉末剂。单位剂型本身也可以是胶囊、片剂、扁囊剂或锭剂,或者是适当数量的任何这些包装形式。单位剂型可以是冷冻的分散体。

[0223] 递送方法

[0224] 如上所述,可利用本文提供的核酸化合物,如核糖/脱氧核糖核酸化合物(包括其诸多实施方式)将化合物部分或化合物(例如治疗剂或成像剂)递送入细胞。当化合物部分(例如,治疗部分或成像部分)递送入细胞时,该化合物部分可以共价连接于本文提供的核酸化合物(包括其诸多实施方式)。核酸化合物与细胞上的TfR结合后,化合物部分可以被细胞内化,同时共价连接于核酸化合物。因此,在一方面,提供了将化合物部分递送入细胞的方法。该方法包括,(i)使细胞与本文所提供的核酸化合物(包括其诸多实施方式)或组合物接触,和(ii)使核酸化合物与细胞上的TfR结合并进入细胞,从而将化合物部分递送入细胞。

[0225] 或者,如果将化合物递送入细胞,该化合物(例如,治疗剂或成像剂)可以不与核酸化合物共价连接。当本文提供的核酸化合物(包括其诸多实施方式)与细胞上的TfR结合后,提供的核酸化合物和化合物可以被细胞内化而不彼此共价连接。因此,在另一方面,提供了将化合物递送入细胞的方法。该方法包括,(i)使细胞与化合物以及本文提供的核酸化合物(包括其诸多实施方式)或组合物接触,和(ii)使该核酸化合物与细胞上的TfR结合,该化合物穿入细胞,从而将该化合物递送入细胞。在诸多实施方式中,该化合物是治疗剂或成像剂。在诸多实施方式中,该化合物非共价连接于该核酸化合物。

[0226] 这些方法可以在体外、离体或体内进行。在一些情况下,该方法包括将化合物部分或化合物跨血脑屏障递送入大脑。

[0227] 治疗和预防应用

[0228] 发现本文提供的核酸化合物,例如核糖/脱氧核糖核酸化合物和组合物可用于治疗和预防方法。

[0229] 本发明提供了本文所述的核酸化合物和组合物用于医学治疗或预防方法。本发明还提供了本文所述的核酸化合物和组合物在制备用于治疗或预防疾病或病症的药物中的用途。本文描述的发明还提供了治疗或预防疾病或病症的方法,包括向有此需要的对象给予治疗或预防有效量的本文描述的核酸化合物或组合物。

[0230] 本文所用的“治疗”或“治疗的”或“缓解”或“改善”在本文可互换使用。这些术语是指获得有益或所需结果的方法,包括但不限于治疗益处和/或预防益处。治疗益处是指根除或改善所治疗的潜在疾病。通过消除或改善潜在疾病相关的一种或多种生理症状获得治疗益处,从而尽管患者仍可能患有潜在疾病,但在患者中观察到了改善。为了预防益处,可以将组合物给予有发生特定疾病风险的患者,或给予报告有疾病的一种或多种生理症状的患者,即使可能尚未对该疾病作出诊断。治疗包括预防疾病,即,通过在疾病诱发之前给予保护性组合物而导致疾病的临床症状不发展;阻止疾病,即,在诱发事件之后而在疾病的临床表现或再现之前,通过给予保护性组合物而引起疾病的临床症状不发展;抑制疾病,即,通过在临床症状最初出现后给予保护性组合物使得临床症状的发展停滞;预防疾病的复发和/或缓解疾病,即,通过在临床症状最初出现后给予保护性组合物而引起临床症状的消退。

[0231] 发现本文所述的核酸化合物可用于治疗或预防将从所述化合物和/或相关的治疗或成像部分向表达TfR的细胞的递送中受益的任何疾病/病症。发现所述核酸化合物也可用于治疗或预防将从所述化合物和/或相关部分向脑的递送中受益的任何疾病/病症。

[0232] 应当理解,本发明的治疗和预防用途扩展到治疗将从化合物部分或化合物递送至表达TfR的细胞或脑中受益的任何对象。

[0233] 在一些实施方式中,所述疾病/病症是将从沉默调节蛋白基因/蛋白,例如SIRT1的活化,C/EBP α 基因/蛋白的活化,和/或HNF基因/蛋白的活化中受益的疾病/病症。在一些实施方式中,本文所述的核酸和组合物可用于治疗或预防癌症,代谢障碍或神经疾病。在一些实施方式中,发现本文所述的核酸和组合物可用于预防癌症、代谢障碍或神经学疾病。

[0234] 例如,在一些实施方式中,本文所述的某些方法治疗癌症(例如肝癌(例如肝细胞癌)、胰腺癌、胰腺肝转移瘤、前列腺癌、肾癌、转移性癌、黑素瘤、去势耐受性前列腺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、成胶质细胞瘤、卵巢癌、肺癌、鳞状细胞癌(例如头、颈或食道)、结直肠癌、白血病、急性髓细胞性白血病、淋巴瘤、B细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤)。例如,本文的某些方法通过降低或减少或防止癌症的发生、生长、转移或进展来治疗癌症;或通过减少癌症症状来治疗癌症。癌症(例如肝癌(例如肝细胞癌)、胰腺癌、胰腺肝转移瘤、前列腺癌、肾癌、转移性癌、黑素瘤、去势耐受性前列腺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、成胶质细胞瘤、卵巢癌、肺癌、鳞状细胞癌(例如头、颈或食道)、结直肠癌、白血病、急性髓细胞性白血病、淋巴瘤、B细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤)的症状是本领域普通技术人员已知或可测定的。

[0235] 在一些实施方式中,癌症是本文所述的癌症。在一些实施方式中,癌症是肝癌,例如肝细胞癌、胰腺癌、胰腺肝转移瘤、转移癌或脑癌。

[0236] 在一些情况下,所述癌症是沉默调节蛋白基因/蛋白,例如SIRT1的活化,C/EBP α 基因/蛋白的活化,和/或HNF基因/蛋白的活化具有治疗或预防作用的癌症。

[0237] 在一些实施方式中,本文所述的治疗方法包括给予有此需要的对象治疗或预防有效量的本文所述核酸化合物或组合物,其中所述核酸化合物包含抗癌治疗部分。在一些实

施方式中,治疗方法还包括给予有此需要的对象有效量的抗癌剂。

[0238] 在一些情况下,本文所述的治疗方法包括诱导或抑制自噬,例如通过自噬相关蛋白Beclin1的激活或抑制。参见例如Jin和White, *Autophagy* 2007;3(1):28-31;Rosenfeldt和Ryan, *Expert Rev Mol Med*.2009;11:e36;Mah和Ryan, *Cold Spring Harb Perspect Biol*.2012;4(1):a008821,其通过引用全文纳入本文。在一些情况下,本文所述的治疗方法包括诱导或抑制活化的B细胞的核因子 κ 轻链增强子(NF- κ B)的活性。

[0239] 在一些实施方式中,该疾病/病症是代谢障碍。例如,代谢障碍可以是代谢综合征、I型糖尿病、2型糖尿病、血脂异常、空腹血糖受损、葡萄糖耐量受损、肥胖症、心血管疾病、胰岛素抵抗、高甘油三酯血症、牛皮癣、牛皮癣关节炎、冠状血管疾病如冠心病、冠状动脉疾病、中风和外周动脉疾病、动脉粥样硬化、脂肪肝疾病、非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)、脂肪性肝炎和/或脂肪营养不良性疾病。

[0240] 在一些情况下,所述代谢障碍是沉默调节蛋白基因/蛋白,例如SIRT1的活化,C/EBP α 基因/蛋白的活化,和/或HNF基因/蛋白的活化具有治疗或预防作用的代谢障碍。

[0241] 在一些情况下,本发明的核酸和组合物可用于降低体重、降低体重增益、降低血糖、调节葡萄糖稳态、降低胰岛素耐受、减少白色脂肪组织、减少胆固醇、降低低密度脂蛋白(LDL)、增加高密度脂蛋白(HDL)、增加高密度脂蛋白/低密度脂蛋白(HDL/LDL)比率、降低血清甘油三酯。

[0242] 在一些情况下,发现本发明的核酸和组合物可用于靶向胰腺、脑、心脏、白色和棕色脂肪组织、肌肉和/或肝脏中表达TfR的细胞。

[0243] 在一些实施方式中,该疾病/病症是神经学疾病。例如,神经学疾病可以是阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、运动神经元疾病、帕金森病、亨廷顿病、脊髓和延髓性肌萎缩(SBMA)。

[0244] 在一些情况下,所述神经学疾病是沉默调节蛋白基因/蛋白,例如SIRT1的活化,C/EBP α 基因/蛋白的活化,和/或HNF基因/蛋白的活化具有治疗或预防作用的神经学疾病。

[0245] 在一些情况下,本发明的核酸和组合物可用于治疗或预防,即减少或保护神经变性。

[0246] 如果考虑组合治疗,则本文所述的试剂(即核酸化合物)无意受限于组合的特定性质。例如,本文描述的试剂可以作为简单混合物以及化学杂合物而组合给予。后者的实例是药剂与靶向运载体或活性药物共价连接的情况。共价结合可以多种方式完成,例如但不限于使用市售可得的交联剂。

[0247] “有效量”是足以实现所述目的(例如实现给药效果、治疗疾病、降低酶活性、减轻疾病或病症的一种或多种症状、减少细胞中的病毒复制)的量。“有效量”的例子是足以有助于治疗、预防或减轻疾病的一种或多种症状的量,也可以称为“治疗有效量”。一种或多种症状的“减轻”(和该短语的语法等价形式)是指减轻一种或多种症状的严重程度或频率或消除一种或多种症状。药物的“预防有效量”是当给予对象时具有预期的预防作用,例如预防或延迟损伤、疾病、病理学状况或病症的发作(或复发),或减少损伤、疾病、病理学状况或病症或其症状的发作(或复发)可能性的药物量。完全预防作用不一定通过给予一次剂量而发生,并且可能仅在给予一系列剂量后才发生。因此,可以采用一次或多次给药来给予预防有效量。本文所用的“降低活性的量”是指相对于没有拮抗剂存在下,降低酶或蛋白活性的拮

抗剂所需量。本文所用的“功能破坏量”是指相对于没有拮抗剂存在下,破坏酶或蛋白的功能所需的拮抗剂量。可以在文献中找到给定类别的药物的适当剂量的指南。例如,对于给定参数,有效量会显示增加或降低至少5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%或至少100%。功效也可以表示为“-倍”增加或减少。例如,相比于对照,治疗有效量可以是至少1.2-倍、1.5-倍、2-倍、5-倍或更高的作用。确切的量将取决于治疗目的,并且本领域技术人员可采用已知技术确定(参见,例如Lieberman,《药物剂型》(Pharmaceutical Dosage Forms)(第1-3卷,1992);Lloyd,《药物复配的技巧、科学和技术》(The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding)(1999);Pickar,《剂量计算》(Dosage Calculations)(1999);和《雷明顿:药学科学和实践》(Remington: The Science and Practice of Pharmacy),第20版,2003, Gennaro编., LWW出版社(Lippincott, Williams & Wilkins))。

[0248] “患者”、“对象”或“有此需要的对象”是指患有或易患可通过采用本文提供的方法治疗的疾病或病症的活生物体。该术语不一定表示该对象已诊断有特定疾病,但通常是指在医学监督下的个体。非限制性实例包括人、其它哺乳动物、牛、大鼠、小鼠、狗、猴、山羊、绵羊、牛、鹿和其它非哺乳动物。在一些实施方式中,患者是人。

[0249] 本文所用的术语“给予”是指向对象作口服给予,以栓剂给予,局部接触、静脉内、腹膜内、肌肉内、病变内、鞘内、鼻内或皮下给予,或植入缓释装置,例如微型渗透泵。给药可以通过任何途径进行,包括肠胃外和经粘膜的(例如含服、舌下、经颚(palatal)、经牙龈、经鼻、阴道、直肠或经皮)。肠胃外给药包括例如静脉内、肌内、小动脉内、皮内、皮下、腹膜内、心室内和颅内。其它递送方式包括但不限于使用脂质体制剂、静脉内输注、透皮贴剂等。“共同给予”是指在给予一种或多种其它疗法,例如癌症疗法,如化疗、激素疗法、放疗或免疫疗法的同时、之前或之后给予本文所述的组合物。可以将本发明的化合物单独给予或共同给予患者。共同给予是指包括同时或顺序给予各化合物或组合(一种以上的化合物)。因此,需要时,所述制剂也可以与其它活性物质结合(例如以减少代谢降解)。本发明的组合物可以经皮、通过局部途径递送,或配制成涂抹棒、溶液、悬浮液、乳剂、凝胶、乳膏、软膏、糊剂、啫喱、漆、粉末和气雾剂。

[0250] 利用本文提供的教导,可以计划有效的预防或治疗方案,其不会引起实质性毒性,但有效地治疗特定患者表现出的临床症状。这样的计划应包括通过考虑以下因素来仔细选择活性化合物,例如化合物效力、相对生物利用度、患者体重、不良副作用的存在和严重程度、优选的给药方式以及所选药剂的毒性特征。

[0251] 检测细胞的方法

[0252] 还可利用本文提供的核酸组合物,例如核糖/脱氧核糖核酸化合物将化合物和化合物部分递送至表达TfR的细胞。如上所述,递送的化合物和化合物部分可以是可用于细胞检测的成像剂。因此,在一方面,提供了检测细胞的方法。所述方法包括(i)使细胞与如本文提供的核酸化合物或组合物(包括其诸多实施方式)接触,其中所述核酸化合物还包括成像部分,(ii)使所述核酸化合物或组合物与所述细胞上的转铁蛋白受体结合并进入细胞,(iii)检测所述成像部分从而检测所述细胞。

[0253] 在另一方面,提供了检测细胞的方法。该方法包括(i)使细胞与成像剂和如本文提供的核酸化合物或组合物(包括其诸多实施方式)接触,(ii)使所述核酸化合物或组合物结

合所述细胞上的转铁蛋白受体,使所述成像剂进入细胞,(iii)检测所述成像剂,从而检测所述细胞。

[0254] 在一些情况下,该细胞是恶性细胞。在一些情况下,该细胞是乳腺癌细胞。在一些情况下,该细胞是前列腺癌细胞。在一些情况下,该细胞是肝癌细胞。在一些情况下,该细胞是胰腺癌细胞。在一些情况下,该细胞是脑癌细胞。在一些情况下,该细胞是非恶性细胞。在一些情况下,该细胞是脑细胞。在一些情况下,该细胞形成生物体的一部分。在一些情况下,该生物是哺乳动物。在一些情况下,该细胞形成细胞培养物的一部分。

[0255] 该方法可以在体外、离体或体内进行。在一些情况下,该方法包括将化合物部分或化合物跨血脑屏障递送入大脑。

[0256] ***

[0257] 如果需要,在前文的描述,或以下权利要求或附图中公开的特征,表示为其特定形式或用于执行所公开功能的手段,或用于获得所公开的结果的方法或过程,此类特征可以单独地,或以任何组合的方式来实现本发明的各种形式。

[0258] 尽管已经结合上述示例性实施方式描述了本发明,但是当给出本公开内容时,许多等同的修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。所以,以上阐述的本发明的示例性实施方式应认为是说明性而非限制性的。在不脱离本发明的构思和范围的情况下,可以对所描述的实施方式作出各种改变。

[0259] 为了避免任何疑问,本文提供的任何理论解释是为了增进读者的理解。本发明人不希望受限于任何这些理论解释。

[0260] 除非上下文另有要求,否则在通篇说明书,包括所附的权利要求书中的词语“包括”和“包含”以及诸如“包括的”、“包含的”和“包含着”等变体应理解为暗示包括所述的整数或步骤,或整数或步骤的组,但不排除任何其它整数或步骤,或整数或步骤的组。

[0261] 必须注意,除非上下文另外明确指出,否则在说明书和所附权利要求中使用的单数形式的“一”、“一个”和“该”包括复数指示物。在本文,可以将范围表示为从“约”一特定值和/或到“约”另一特定值。当表示此类范围时,另一实施方式包括从一特定值和/或到其它特定值。类似地,当使用先行词“约”将某一值表示为近似值时,应理解,该特定值形成另一实施方式。数值相关的术语“约”是任选的,是指例如 $\pm 10\%$ 。

[0262] 现将参考附图讨论本发明的诸多方面和实施方式。其它方面和实施方式对于本领域技术人员将是显而易见的。

附图简述

[0264] 现在将参考附图讨论说明本发明原理的实施方式和实验。

[0265] 图1. 适体TR14 S1-3 (TfR; SEQ ID NO:1) 的经预测M折叠结构。

[0266] 图2. 适体TR14 S1-3结合转铁蛋白受体的动力学。

[0267] 图3. 适体TR14 S1-3内化入人肝癌细胞 (HepG2)、人胰腺癌细胞 (PANC-1) 和小鼠胰腺癌细胞 (LTPA)。

[0268] 图4A和4B. 大鼠大脑的神经元组织的免疫组化染色显示TR14 S1-3 (TfR) 穿过血脑屏障的能力。使用SIRT1单克隆抗体检测SIRT1表达。(图4A) 对照大鼠的神经元组织显示蓝色阴性染色。(图4B) 注射TfR-SIRT1 saRNA的大鼠的神经元组织显示SIRT1的棕色核染色。

[0269] 图5A和5B. 诸图显示了在雄性Wistar大鼠的二乙基亚硝胺 (DEN) 诱导肝细胞癌 (HCC) 模型中, 与仅用PBS和TfR的对照相比, TfR-CEBPA和TfR-HNF治疗的效果。TfR-CEBPA和TfR-HNF saRNA治疗减小肿瘤体积 (图5A) 并降低血液中胆红素水平 (图5B)。

[0270] 图6. 图显示了在静脉内 (IV) 或皮下 (SC) 给予TfR-CEBPA saRNA后, 雄性F344大鼠肝细胞癌模型中肿瘤大小变化的百分比。

[0271] 图7A和7B. 诸图显示了与适体对照相比, TfR-CEBPA和P19-CEBPA治疗在小鼠的转移性胰腺癌模型中的作用。(图7A) 用TfR-CEBPA或P19-CEBPA治疗的小鼠显示出肿瘤生长降低 (由减少的光子增益确定)。(图7B) 用TfR-CEBPA或P19-CEBPA治疗的小鼠显示出肿瘤体积减小。

[0272] 图8A到8F. 诸图显示了高脂饮食喂养的F344大鼠中TfR-SIRT治疗改善代谢疾病相关症状的能力。(图8A) 用TfR-SIRT治疗的大鼠体重没有增加。(图8B) 用TfR-SIRT治疗的大鼠的白色脂肪组织减少。(图8C) 用TfR-SIRT治疗的大鼠显示出总胆固醇降低。(图8D) 用TfR-SIRT治疗的大鼠显示低密度脂蛋白 (LDL) 胆固醇水平降低。(图8E) 用TfR-SIRT治疗的大鼠显示高密度脂蛋白 (HDL) /LDL之比增加。(图8F) 用TfR-SIRT治疗的大鼠显示空腹血糖水平降低。

[0273] 实施方式

[0274] 实施方式包括但不限于以下实施方式P1-P32:

[0275] 实施方式P1. 一种核糖核酸化合物, 其包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的RNA序列或由其组成, 其中所述RNA序列的长度为29个核苷酸或更短, 其中所述RNA序列能够结合转铁蛋白受体 (TfR)。

[0276] 实施方式P2. 实施方式P1所述的核糖核酸化合物, 其中所述RNA序列长度为22个核苷酸或更短。

[0277] 实施方式P3. 实施方式P1或实施方式P2所述的核糖核酸化合物, 其中所述RNA序列长度为22个核苷酸。

[0278] 实施方式P4. 实施方式P1-P3中任一项所述的核糖核酸化合物, 其中所述RNA序列与SEQ ID NO:1具有100%序列同一性。

[0279] 实施方式P5. 一种核糖核酸化合物, 其包含与SEQ ID NO:5具有至少90%序列同一性的RNA序列或由其组成, 其中所述RNA序列的长度为29个核苷酸或更短, 并且其中所述RNA序列能够结合转铁蛋白受体 (TfR)。

[0280] 实施方式P6. 实施方式P5所述的核糖核酸化合物, 其中所述RNA序列长度为16个核苷酸。

[0281] 实施方式P7. 实施方式P5或实施方式P6所述的核糖核酸化合物, 其中所述RNA序列与SEQ ID NO:5具有100%序列同一性。

[0282] 实施方式P8. 实施方式P1-P7中任一项所述的核糖核酸化合物, 其中所述RNA序列能够结合细胞表面的TfR。

[0283] 实施方式P9. 实施方式P1-P8中任一项所述的核糖核酸化合物, 其中所述核糖核酸化合物能够内化入细胞。

[0284] 实施方式P10. 实施方式P1-P9中任一项所述的核糖核酸化合物, 其中所述核糖核酸化合物能够穿越血脑屏障。

[0285] 实施方式P11.实施方式P1-P10中任一项所述的核糖核酸化合物,还包含与所述RNA序列相连的化合物部分。

[0286] 实施方式P12.实施方式P11所述的核糖核酸化合物,其中所述化合物部分是治疗部分或成像部分。

[0287] 实施方式P13.实施方式P11或实施方式P12所述的核糖核酸化合物,其中所述化合物部分共价连接于所述RNA序列。

[0288] 实施方式P14.实施方式P12或实施方式P13所述的核糖核酸化合物,其中所述治疗部分是核酸部分、肽部分或小分子药物部分。

[0289] 实施方式P15.实施方式P14所述的核糖核酸化合物,其中所述治疗部分是活化核酸部分或反义核酸部分。

[0290] 实施方式P16.实施方式P14或实施方式P15所述的核糖核酸化合物,其中所述治疗部分是miRNA、mRNA、saRNA或siRNA部分。

[0291] 实施方式P17.实施方式P12到P16中任一项所述的核糖核酸化合物,其中所述治疗部分是抗癌治疗部分。

[0292] 实施方式P18.实施方式P12到P17中任一项所述的核糖核酸化合物,其中所述治疗部分是C/EBP α saRNA部分、SIRT1 saRNA部分或HNF saRNA部分。

[0293] 实施方式P19.实施方式P11到P13中任一项所述的核糖核酸化合物,其中所述成像部分是生物发光分子、光敏分子、金属或纳米颗粒。

[0294] 实施方式P20.一种药物组合物,其包含实施方式P1到P19中任一项所述的核糖核酸化合物,任选包含药学上可接受的赋形剂。

[0295] 实施方式P21.实施方式P20所述的药物组合物,还包含治疗剂,任选抗癌剂。

[0296] 实施方式P22.一种将化合物部分递送入细胞的方法,该方法包括:

[0297] (i) 使细胞与实施方式P11到P19中任一项所述的核糖核酸化合物或实施方式P20或实施方式P21所述的组合物接触;和

[0298] (ii) 使得所述核糖核酸化合物结合所述细胞上的转铁蛋白受体并进入所述细胞,从而将所述化合物部分递送入所述细胞。

[0299] 实施方式P23.一种将化合物递送入细胞的方法,该方法包括:

[0300] (i) 使细胞与化合物和实施方式P1到P10中任一项所述的核糖核酸化合物接触;和

[0301] (ii) 使得所述核糖核酸化合物结合所述细胞上的转铁蛋白受体并进入所述细胞,从而将所述化合物递送入所述细胞。

[0302] 实施方式P24.实施方式P23所述的方法,其中所述化合物是治疗剂或成像剂。

[0303] 实施方式P25.实施方式P1到P19中任一项所述的核糖核酸化合物或实施方式P20或实施方式P21所述的组合物,用于医学治疗或预防方法。

[0304] 实施方式P26.实施方式P1到P19中任一项所述的核糖核酸化合物或实施方式P20或实施方式P21所述的组合物的用途,用于制备治疗或预防疾病或病症的药物。

[0305] 实施方式P27.一种治疗或预防疾病或病症的方法,所述方法包括将有效量的实施方式P1到P19中任一项所述的核糖核酸化合物、或实施方式P20或实施方式P21所述的组合物给予有此需要的对象。

[0306] 实施方式P28.实施方式P25所述应用的核糖核酸化合物或组合物、实施方式P26所

述的核糖核酸化合物或组合物的用途、或实施方式P27所述的方法,其中所述疾病或病症是癌症。

[0307] 实施方式P29.实施方式P28所述应用的核糖核酸化合物或组合物、所述的核糖核酸化合物或组合物的用途、或所述的方法,其中所述方法还包括给予抗癌剂。

[0308] 实施方式P30.实施方式P25所述应用的核糖核酸化合物或组合物、实施方式P26所述的核糖核酸化合物或组合物的用途、或实施方式P27所述的方法,其中所述疾病或病症是代谢障碍或神经学疾病。

[0309] 实施方式P31.一种检测细胞的方法,该方法包括:

[0310] (i) 使细胞与实施方式P1到P13中任一项或实施方式P19所述的核糖核酸化合物、或实施方式P20所述的组合物接触,其中所述核糖核酸化合物包含成像部分;

[0311] (ii) 使所述核糖核酸化合物结合所述细胞上的转铁蛋白受体并进入所述细胞;和

[0312] (iii) 检测所述成像部分,从而检测所述细胞。

[0313] 实施方式P32.一种检测细胞的方法,该方法包括:

[0314] (i) 使细胞与成像剂和实施方式P1到P10中任一项所述的核糖核酸化合物接触;

[0315] (ii) 使所述核糖核酸化合物结合所述细胞上的转铁蛋白受体,并使所述成像剂进入所述细胞;和

[0316] (iii) 检测所述成像剂,从而检测所述细胞。

实施例

[0317] 实施例1

[0318] TfR适体的选择和表征

[0319] 基本上如Tuerk和Gold (Tuerk, C., Methods Mol Biol., 67, 219-230 (1997) 所述, 以及WO 2006/061386的实施例中描述的, 通过蛋白SELEX (通过指数富集的配体系统进化技术) 鉴定能够结合TfR胞外域的适体。

[0320] 2' F RNA的文库用于增加核酸酶耐受性并增强适体折叠。为了分离与完整细胞结合的2' F RNA适体, 通过SELEX筛选了约 4^{40} 个不同的2' F RNA分子 (包含侧接确定序列的40nt长的随机序列) 的文库。12轮选择后, 克隆了高度富集的适体集合。

[0321] 如WO 2006/061386中所述, 鉴定并表征了87-核苷酸的TfR RNA适体 (TR14; SEQ ID NO:2) 和43-核苷酸的TfR RNA适体 (TR14 S2; SEQ ID NO:3)。采用表面等离子共振 (SPR) 技术测量TR14和TR14 S2适体对TfR的结合亲和力。结果复制在表1中。发现TR14和TR14 S2能够被内化入人肝癌细胞 (HepG2; ATCC®HB-8065™) 中。

[0322] 表1. TR14和TR14 S2的动力学

名称	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K^D (M)
TR14 (87-nt)	3.70E+07	1.17E-03	3.17E-11
TR14S2 (43-nt)	8.34E+08	5.77E-04	6.92E-13

[0324] 实施例2

[0325] 22-核苷酸TfR适体

[0326] 合成了TR14适体的较小截短形式 (SEQ ID NO:1)。该22-核苷酸的TfR适体称为“TR14 S1-3”。利用Mfold软件 (Zuker M, Nucleic Acids Res. 2003年7月1日; 31(13):3406-

15) 预测TR14 S1-3的结构,该软件在<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>获得。TR14 S1-3的Mfold预测结构示于图1。

[0327] 通过表面等离子共振 (SPR) 技术分析了TR14 S1-3的动力学。利用Biacore T100 (GE保健公司, 乌普萨拉, 瑞典) 实时监测无标记适体-转铁蛋白受体相互作用。以25 μ g/mL (30mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂) 的浓度, 10 μ L/min注射入结合缓冲液, 将生物素化的适体与链霉亲和素包被的Biacore芯片 (SensorChip SA, BR-1003-98, 通用电子公司-General Electric Company) 偶联。在固定之前, 通过加热至65 $^{\circ}$ C, 然后冷却至37 $^{\circ}$ C, 将RNA重折叠。为了测量结合动力学, 以每分钟10 μ L的流速注入五种浓度的经纯化转铁蛋白受体蛋白。结合后, 通过以每分钟15 μ L的流速注入50mM NaOH, 20秒来再生表面。扣除对照表面的数据。利用BIAevaluation软件 (GE保健公司) 进行分析。用传质模型将结合数据按照1:1结合拟合, 以计算动力学参数。

[0328] 结果示于图2。22-核苷酸TR14 S1-3适体结合转铁蛋白受体蛋白的K_a、K_d和K_d值范围与TR14相似。

[0329] 实施例3

[0330] TR14 S1-3与TfR结合并内化入细胞

[0331] 评估22-核苷酸适体TR14 S1-3结合转铁蛋白受体并内化入细胞的能力。

[0332] 测试了3种癌细胞系:

[0333] 人肝癌细胞 (HepG2, ATCC®HB-8065™)

[0334] 人胰腺癌细胞 (PANC-1, ATCC®CRL-1469)

[0335] 小鼠胰腺癌细胞 (LTPA, ATCC®CRL-2389)。

[0336] 将1 $\times$ 10⁵个细胞接种到35mm玻璃底培养皿 (MatTek公司, 阿什兰, 马萨诸塞州), 并在适当的培养基中生长24小时。利用Cy3沉默siRNA标记试剂盒 (赛默飞世尔科技公司, 沃尔瑟姆, 马萨诸塞州), 用Cy3荧光染料标记适体RNA。将结合缓冲液 (30mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂) 中的Cy3标记适体以200nM的浓度进入细胞, 孵育2小时。成像前, 用DPBS洗涤细胞两次。利用C-Apo 40x/1.2NA水浸物镜和AIM 4.2软件, Zeiss LSM 510Meta倒置双光子共聚焦显微镜系统 (卡尔蔡司公司, 耶拿, 德国) 进行活细胞共聚焦成像。

[0337] 结果示于图3。所有三种癌细胞系 (人HepG2、人PANC-1和鼠LTPA) 均内化了TfR结合的TR14 S1-3适体, 表明TR14 S1-3在物种之间具有交叉反应性。

[0338] TR14 S1-3能穿过血脑屏障

[0339] 评估了22-核苷酸适体TR14 S1-3在体内穿过血脑屏障的能力。

[0340] 合成了核糖核酸, 包含TR14 S1-3 (TfR; SEQ ID NO:1), 五个C3 (亚磷酰胺) 间隔子和SIRT1 saRNA。SIRT1 saRNA的有义和反义链分别显示在SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8中。有义和反义序列各自在3'端包含2-核苷酸(UU)突出端。

[0341] 通过尾部注射TfR-SIRT1 saRNA或对照来处理大鼠。分离两组的神经元组织, 并与SIRT1单克隆抗体接触, 以检测循环TfR是否可以将SIRT1 saRNA载荷递送至脑。

[0342] 结果示于图4A和4B。对照大鼠的神经元组织 (4A) 显示蓝色阴性染色, 而注射TfR-SIRT1 saRNA核糖核酸化合物的大鼠的神经元组织 (4B) 显示SIRT1的棕色核染色。

[0343] 这表明该适体已经穿过血脑屏障并进入神经元组织的核中。这表明TR14 S1-3可以提供将治疗和成像有效载荷输送入脑的机制。

[0344] 实施例4

[0345] TR14 S1-3适体在体内将有效载荷递送至癌细胞

[0346] 评估了TR14 S1-3适体在体内递送治疗有效载荷的能力。

[0347] 合成了核糖核酸,包含TR14 S1-3(TfR;SEQ ID NO:1),五个C3(亚磷酰胺)间隔子和CEBPA或HNF saRNA。CEBPA saRNA的有义和反义序列分别示于SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中。有义和反义序列各自在3'端包含2-核苷酸(UU)突出端。

[0348] 二乙基亚硝胺(DEN)诱导的大鼠肝细胞癌(HCC)模型

[0349] 7周龄的雄性Wistar大鼠(~200g)获自乐斯科生物科技股份有限公司(BioLASCO Taiwan Co.,Ltd.)。将大鼠在标准条件下圈养,所有实验均按照台湾大学的机构动物护理和使用委员会编写的《实验室动物护理和使用指南》(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)进行。每天为所有大鼠提供100ppm(体积/体积)的DEN溶液(西格玛,圣路易斯,密苏里州)作为唯一的饮用水来源,持续9周,然后再提供3周的常规水。五只大鼠一组,每周测量一次动物的平均体重,并且相按照相对于第一周体重的每周体重的比例,每周调整其饮水中DEN的浓度。例如,如果DEN给药第1周和第5周的平均体重值分别为200和300g(1.5倍),则饮水中的DEN浓度分别设置为100和150ppm。

[0350] 对于体内治疗,使用已经暴露于DEN溶液9周的动物。将大鼠随机分为4组:PBS组,TfR组,TfR-CEBPA组和TfR-HNF组(每组n>5)。通过尾静脉每周3次注射PBS、TfR、TfR-CEBPA和TfR-HNF,持续3周。在最后一次注射两天后,利用CO₂处死大鼠,取出肝脏,然后储存以进行以下分析。从心脏收集血液样品,并在室温下以3000rpm离心15分钟,并将血清保存在-80℃直至测定。

[0351] 处死后,立即除去所有肝叶并称重,并测量肝表面和5mm切片切片中所有肉眼可见结节的直径。根据直径>3mm的所有肿瘤结节的总体积确定肿瘤负荷。

[0352] 利用血液分析仪Sysmex HST-N402XE(希森美康,日本)进行全血细胞计数(CBC)测试。用VITROS 5,1FS化学系统(奥托临床诊断公司,美国)测量血清胆红素水平(水平较高表明肝功能异常)。

[0353] 结果示于图5A和5B。与仅接受PBS或TfR的大鼠相比,接受TfR-CEBPA或TfR-HNF治疗的大鼠的肿瘤负荷(肿瘤体积)显著降低(图5A)。用TfR-CEBPA或TfR-HNF治疗的大鼠血液中胆红素水平也显著降低,表明与对照治疗相比,肝功能有所改善(图5B)。

[0354] 大鼠肝上皮细胞肿瘤模型

[0355] 7周龄的雄性F344大鼠(~200g)获自乐斯科生物科技股份有限公司。将大鼠在标准条件下圈养,所有实验均按照台湾大学的机构动物护理和使用委员会编写的《实验室动物护理和使用指南》进行。

[0356] F344大鼠用2%异氟烷混合氧气麻醉。将0.05ml PBS中的约 1×10^6 GP7TB大鼠肝上皮肿瘤细胞注入肝中叶区域,并将0.05ml PBS中的 2×10^6 GP7TB细胞注入大鼠背侧皮肤下。接种后,允许肿瘤发育4周,然后将大鼠随机分组。不同组的大鼠通过尾静脉或皮下途径每周3次注射PBS对照、TfR对照(3nmol)或TfR-CEBPA(3nmol),持续3周。注射治疗期间每周记录一次背部肿瘤大小。在最后一次注射两天后,利用CO₂处死大鼠。从大鼠中取出背部和肝脏中的肿瘤。称重肿瘤,用尺子测量肿瘤大小,然后保存在-80℃以供后续分析。从心脏收集血液样品,并在室温下以3000rpm离心15分钟,并将血清保存在-80℃直至测定。

[0357] 结果示于图6。与对照治疗相比,无论静脉内还是皮下施用TfR,携带CEBPA saRNA的TfR均能够降低肿瘤的生长。

[0358] 小鼠转移性胰腺癌模型

[0359] 将萤火虫萤光素酶片段插入编码氨苄青霉素抗性的pcDNA-3.1(+)骨架,以便在细菌中进行选择,而新霉素基因则用于在哺乳动物细胞中进行选择。使用质粒midi试剂盒(凯杰公司,美国)纯化用于稳定细胞系的重组构建物。用重组构建物转染Panc-1(人胰腺癌)细胞24小时。第二天,将培养基替换为含1.2mg/mL G418(默克公司,德国)的标准培养基,以进行稳定克隆选择。选择后两周,挑出单个稳定细胞系,并维持在含有1.2mg/mL G418的培养基中。使用萤光素酶测定系统评估萤光素酶的表达。

[0360] 为了建立可追踪的肿瘤动物模型,将PBS中的含 1×10^6 个具有萤光素酶表达的Panc-1细胞(Panc-1-Luc)的30 μ l单细胞悬液注射到6-周龄雌性NOD/SCID小鼠(乐斯科生物科技股份有限公司,中国台湾)的肝中叶区域进行皮下植入。接种后,允许肿瘤发育1周,然后将小鼠随机分成5组,通过尾静脉或皮下途径每周3次注射PBS、TfR-CEBPA(1nmol)、对照TfR-CEBPA(1nmol)、P19-CEBPA(1nmol)或对照P19-CEBPA(1nmol),尺寸3周。P19适体描述于WO 2013/154735。在最后一次注射两天后,利用CO₂处死小鼠。从小鼠中取出肿瘤,用尺子测量肿瘤大小。在第一次注射之前和最后一次注射之后一天,利用IVIS200光谱仪评估生物发光来监测肿瘤的生长。

[0361] 在体内成像之前,使用异氟烷麻醉小鼠。然后通过腹膜内途径注射150 μ g/kg D-萤光素的溶液(生物合成公司,美国)。小鼠在IVIS200光谱仪中成像,并使用活像软件(Living Image Software,卡尺生命科学公司-Caliper Life Sciences,阿拉米达,加利福尼亚州)分析生物发光信号。

[0362] 结果示于图7A和7B。与对照组相比,用TfR-CEBPA治疗的小鼠表现出肿瘤生长显著降低(7A;通过减少的光子增益确定)和肿瘤体积显著减少(7B)。

[0363] 实施例5

[0364] TR14 S1-3适体在体内将有效载荷递送给代谢性疾病相关的细胞

[0365] 评估了TR14 S1-3适体和SIRT1 saRNA改善代谢障碍的能力。

[0366] 合成了核糖核酸,包含TR14 S1-3(TfR;SEQ ID NO:1),五个C3(亚磷酰胺)间隔子和SIRT1 saRNA。CEBPA saRNA的有义和反义序列分别示于SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8中。有义和反义序列各自在3'端包含2-核苷酸(UU)突出端。

[0367] 10周龄的20只雄性F344大鼠获自乐斯科生物科技股份有限公司。将大鼠在标准条件下圈养,所有实验均按照台湾大学的机构动物护理和使用委员会编写的《实验室动物护理和使用指南》进行。

[0368] 适应1周后,给大鼠喂高脂饮食:88%的标准实验室饮食,10%的猪油(默克公司,达姆施塔特,德国)和2%的胆固醇1(默克公司,达姆施塔特,德国),持续26周。高脂喂养14周后,将大鼠分成几组(每组5只大鼠)。通过尾静脉或皮下途径每周1次给4组中的大鼠分别注射PBS、FLUC和TfR-SIRT1,持续12周。实验结束时,将动物禁食过夜,然后用CO₂处死。称重从大鼠收获的肝、脑、棕色脂肪和白色脂肪,然后储存在-80℃。将收集在离心管中的血液样品以3000rpm离心15分钟。将血清储存在-80℃,直到用于生化测定。

[0369] 在注射治疗期间每周记录体重。利用血液分析仪Sysmex HST-N402XE(希森美康,

日本) 进行全血细胞计数 (CBC) 测试。使用VITROS 5,1FS化学系统 (奥托临床诊断公司, 美国) 测量血清的葡萄糖、总胆固醇、高密度脂蛋白 (HDL) 胆固醇和低密度脂蛋白 (LDL) 胆固醇的水平。

[0370] 处死大鼠后, 立即取出肝脏和脑, 然后固定在4% (w/v) 低聚甲醛中。然后, 将肝和脑包埋在石蜡中, 切片 (厚度为4 μ m), 然后用H&E染色。

[0371] 为测量胆固醇, 在微型匀浆器中用200 μ l氯仿:异丙醇:NP-40 (7:11:0.1) 提取10mg肝组织。将提取物以15,000g离心5-10分钟。将液体 (有机相) 转移至新管中, 并在50°C下空气干燥以除去氯仿。将样品置于真空下30分钟以去除痕量有机溶剂。按照制造商的说明, 利用胆固醇/胆固醇酯定量测定试剂盒 (K603-100; 生物视觉公司-Biovision) 酶促定量测定从肝脏提取的胆固醇。

[0372] 结果示于图8A到8F。高脂饮食并用TfR-SIRT1治疗的大鼠体重没有增加 (8A)。同样的大鼠还显示白色脂肪组织 (8B)、总胆固醇 (8C)、低密度脂蛋白 (8D) 和空腹血糖 (8F) 水平降低。此外, 大鼠表现出HDL/LDL之比增加 (8E), 因此表明与LDL (“坏”胆固醇) 相比, HDL (“好”胆固醇) 水平更高。所有结果表明, 用TfR-SIRT1进行治疗能够改善代谢障碍, 并且静脉内给予TfR能够将有效载荷输送入需要它的组织。

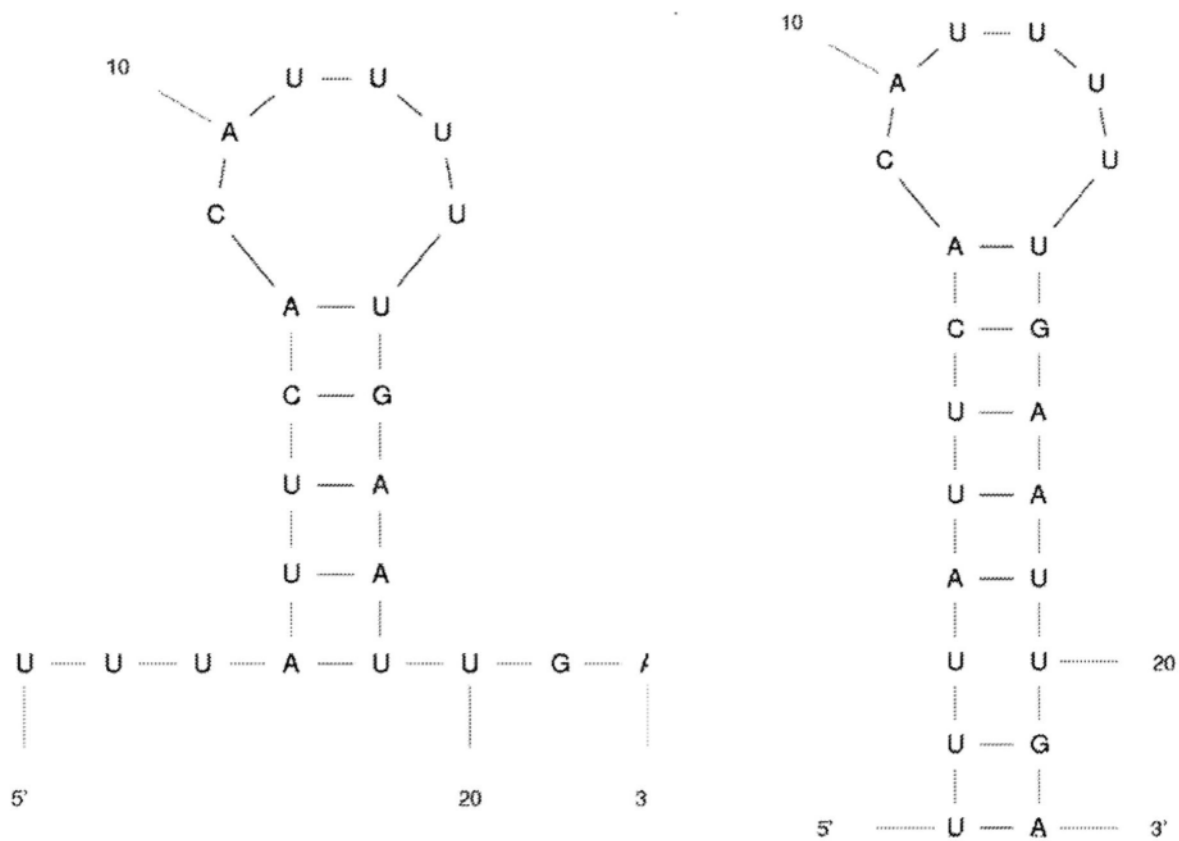
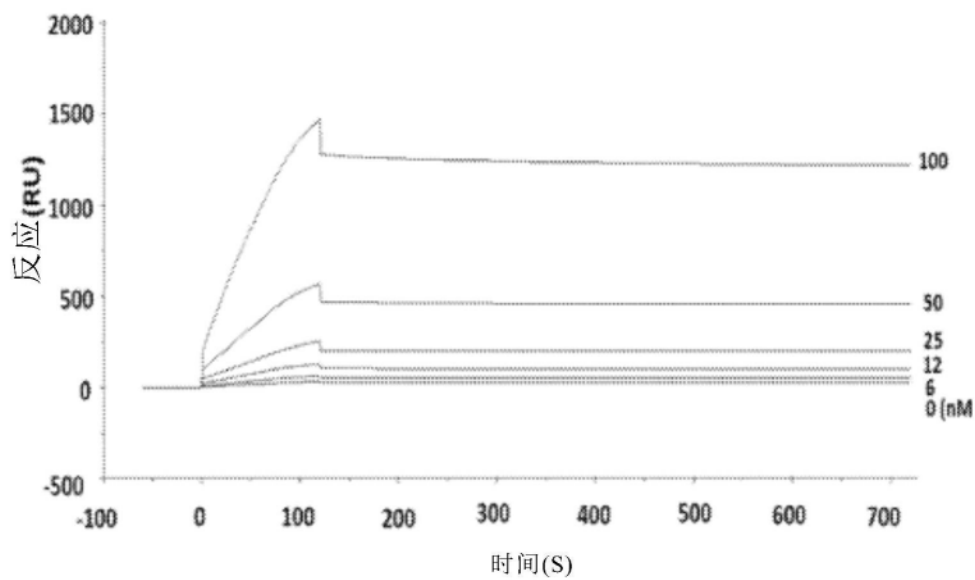


图1



名称	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K ^D (M)
TR14 S1-3 (22-nt)	6.30E+06	1.38E-04	2.20E-11

图2

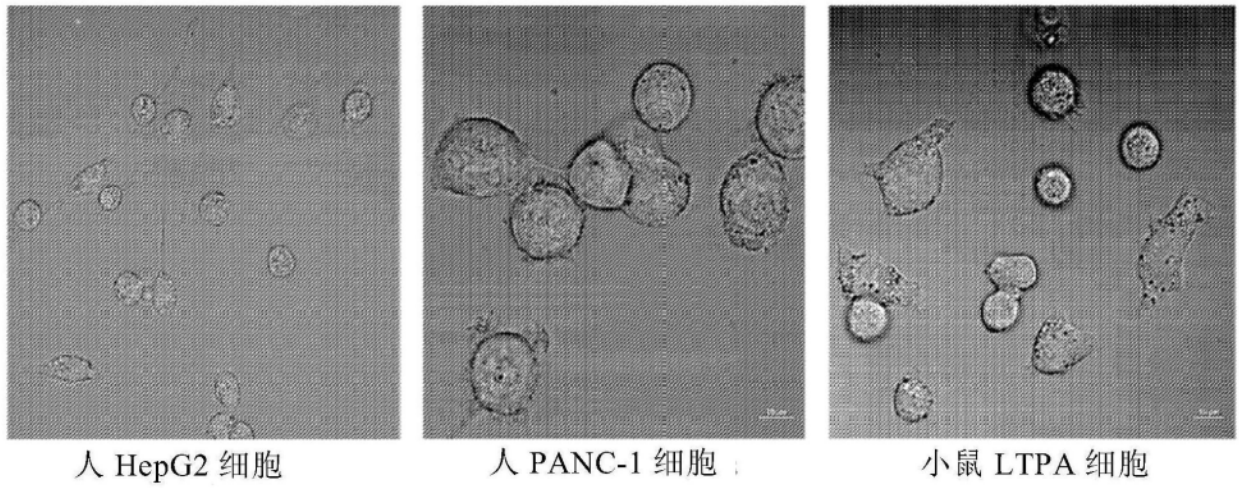


图3

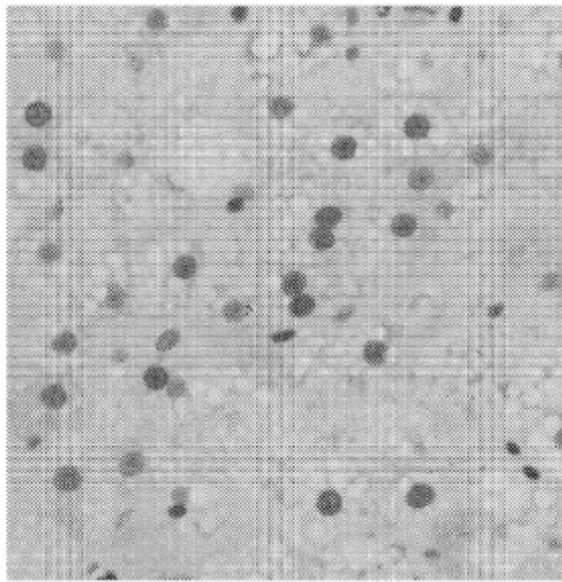


图4A

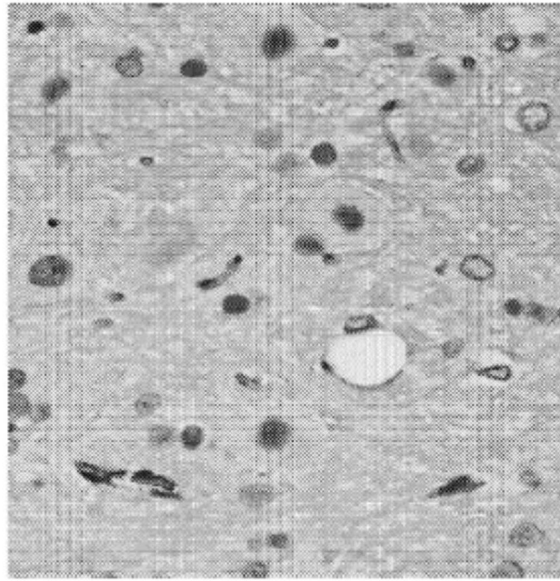


图4B

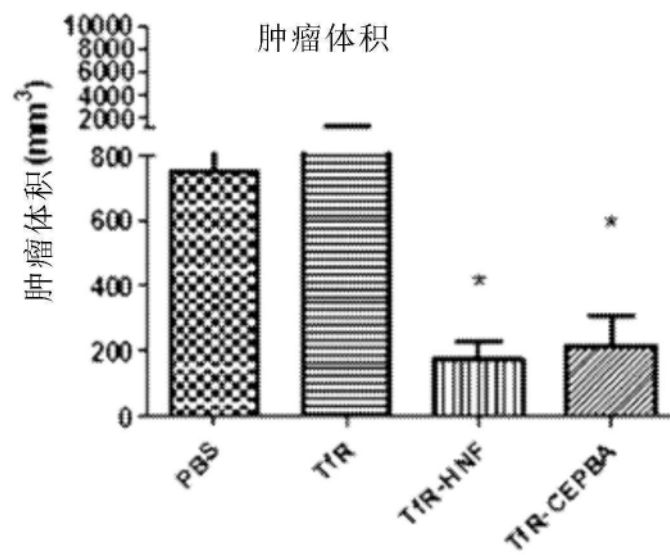


图5A

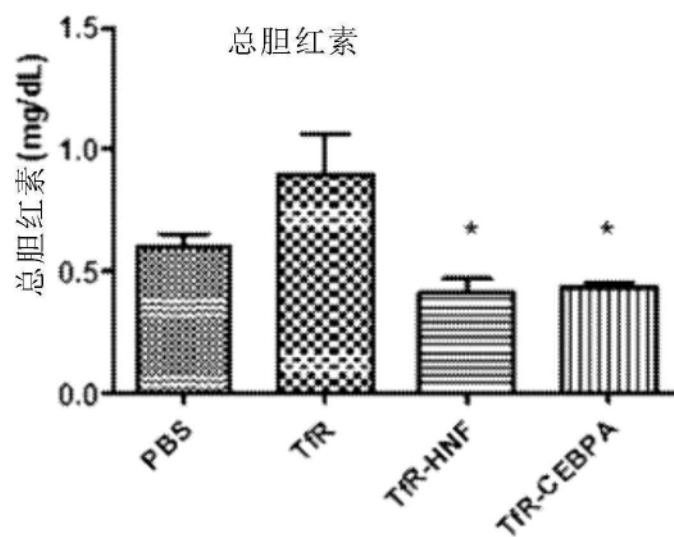


图5B

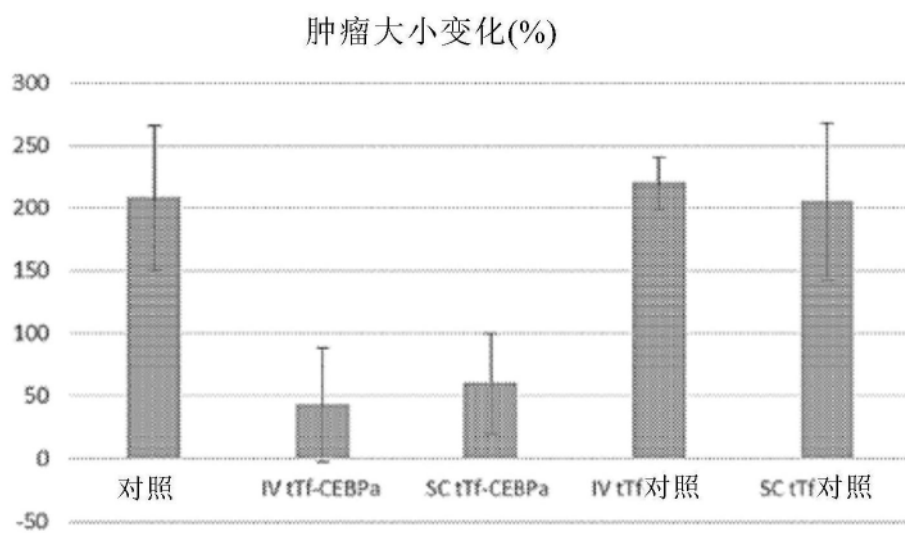


图6

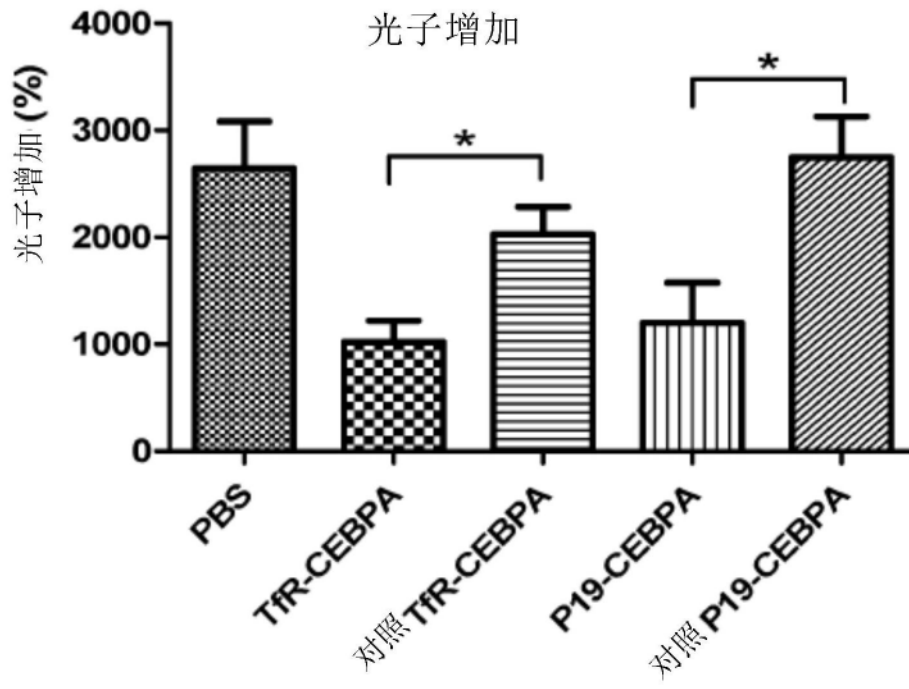


图7A

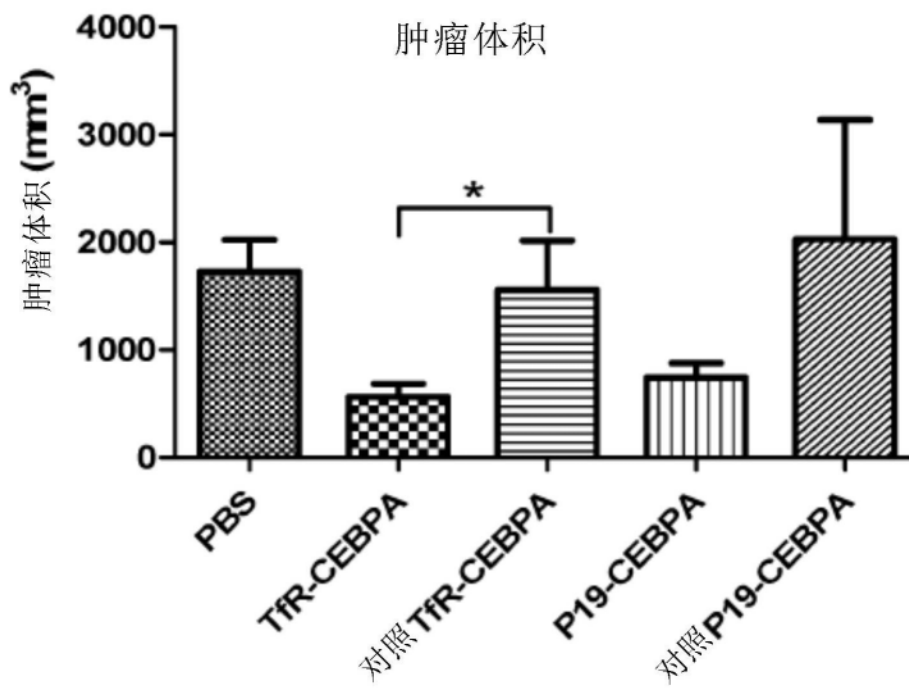


图7B

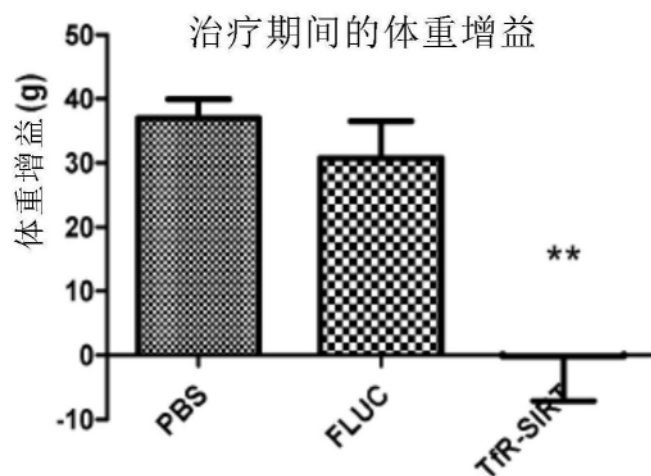


图8A

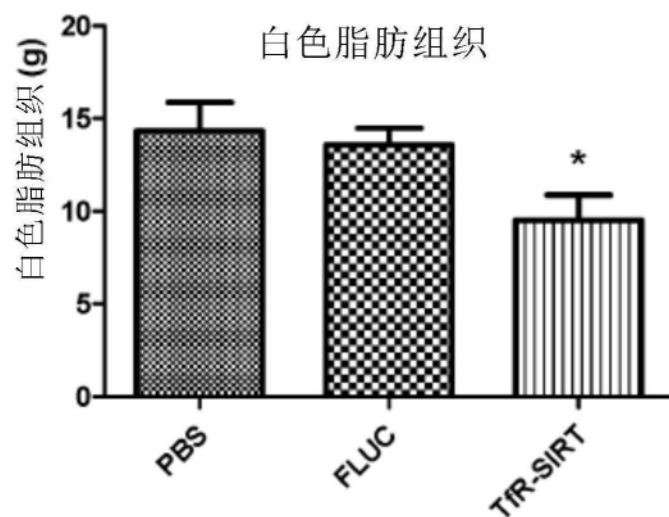


图8B

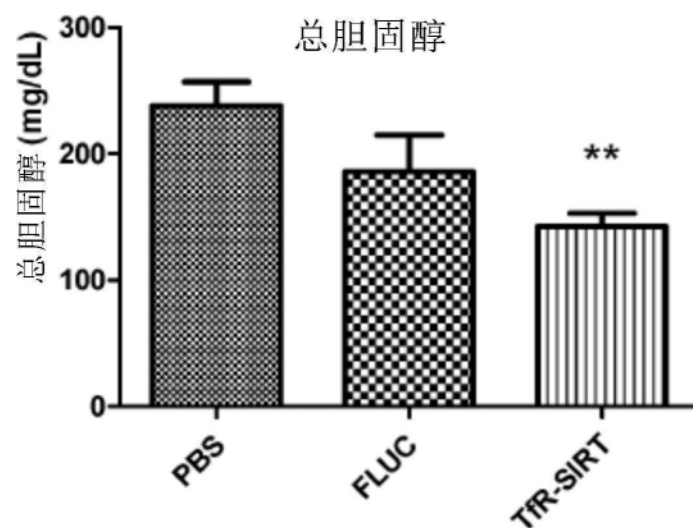


图8C

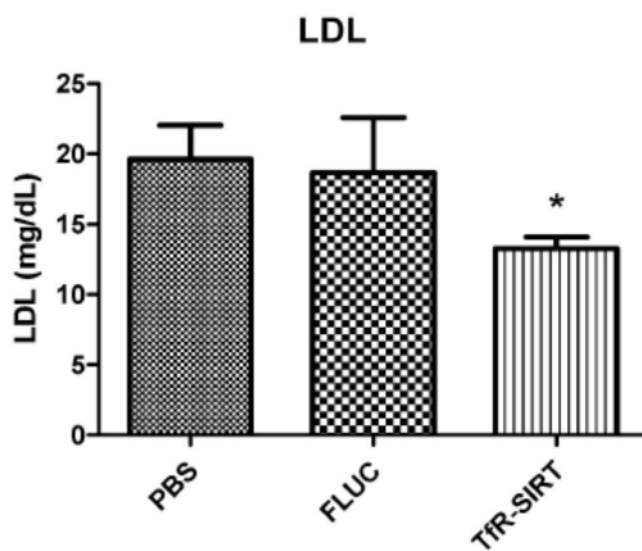


图8D

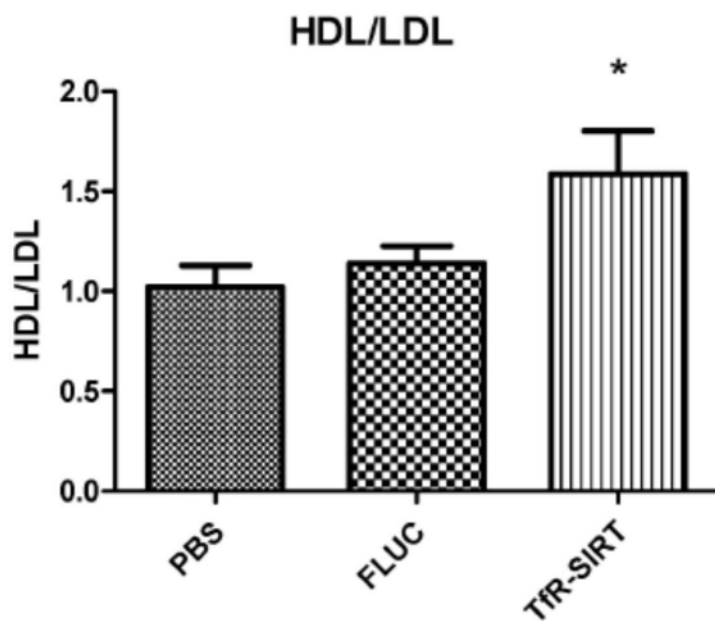


图8E

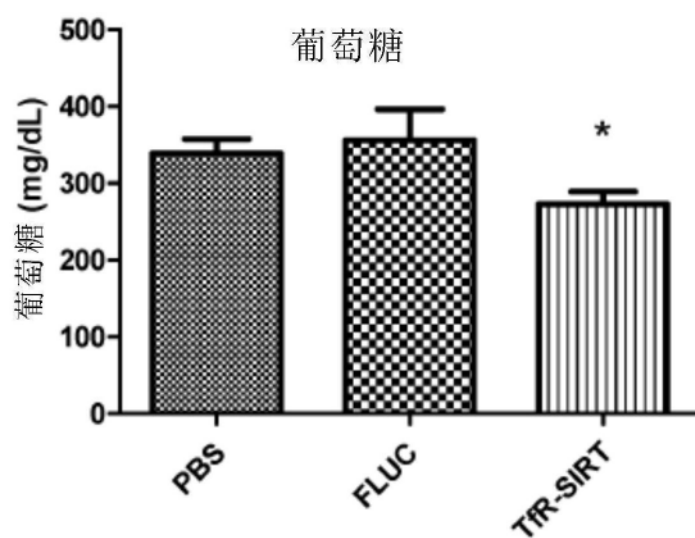


图8F