



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117916249 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 19

(21) 申请号 202280059708.7

(22) 申请日 2022.06.30

(30) 优先权数据

63/202,970 2021.07.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.03.01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/035870 2022.06.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/278802 EN 2023.01.05

(71) 申请人 西达-赛奈医疗中心

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 爱德华多·马尔万

艾哈迈德·G·易卜拉欣

(74) 专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理

有限公司 11444

专利代理师 韩飞 王刚

(51) Int.Cl.

C07K 1/00 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/113 (2006.01)

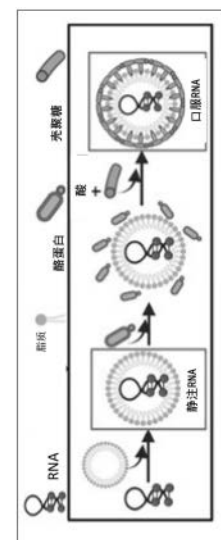
权利要求书6页 说明书34页
序列表(电子公布) 附图25页

(54) 发明名称

用于口服递送核酸的制剂

(57) 摘要

本发明提供了被配置用于口服递送核酸,例如非编码RNA的制剂。本发明提供的制剂包含用于将核酸包封在胶束内的多种阳离子脂质和用于涂覆脂质的酪蛋白和壳聚糖聚合物的混合物,所述混合物在胶束上形成包衣。涂覆的胶束赋予制剂耐酸性,使得在提高核酸对与炎症或纤维化相关的病症的生物利用度的同时口服给予是可能的,所述病症例如肥厚性心肌病、射血分数保留型心力衰竭、肌肉紊乱,例如肌营养不良、硬皮病和/或病毒感染。



1. 一种用于口服递送核酸的制剂, 包含:
核酸;
阳离子脂质;
至少一种酪蛋白; 和
壳聚糖。
2. 根据权利要求1所述的制剂, 其中
所述核酸包含核糖核酸 (RNA), 并且其中所述RNA以所述制剂的约0.0001%至0.01%重量/体积的量存在;
其中, 所述至少一种酪蛋白包含至少一种 α -s1酪蛋白亚单元, 并且其中所述至少一种酪蛋白以所述制剂的约0.5%至5%重量/体积的量存在; 并且
其中, 壳聚糖以所述制剂的约0.001%至1%重量/体积的量存在。
3. 根据权利要求2所述的制剂, 进一步包含乙酸, 其中所述乙酸以所述制剂的约0.01%至1%重量/体积的量存在。
4. 根据权利要求2所述的制剂, 其中, 所述阳离子脂质相对于每微克核酸以约0.1微升至约5微升的量存在。
5. 根据权利要求2所述的制剂, 其中, 所述核酸包含非编码RNA。
6. 根据权利要求2所述的制剂, 进一步包含酸。
7. 根据权利要求6所述的制剂, 其中所述酸以所述制剂的约0.001%至1%体积的量存在, 并且其中所述酸选自乙酸、柠檬酸、磷酸和柠檬酸。
8. 根据权利要求2所述的制剂, 其中, 所述壳聚糖是低分子量壳聚糖。
9. 根据权利要求8所述的制剂, 其中, 所述低分子量壳聚糖的质量范围为约50至约190千道尔顿。
10. 根据权利要求2所述的制剂, 其中, 所述核酸包含非编码RNA, 其中所述非编码RNA以所述制剂的约0.001%至约0.005%重量/体积的量存在,
其中, 所述至少一种酪蛋白包含 α -s1酪蛋白亚单元、 α -s2酪蛋白亚单元、 β -酪蛋白亚单元和 κ -酪蛋白亚单元的混合物, 其中所述酪蛋白亚单元以所述制剂的约1%至3%重量/体积的量存在; 并且
其中, 所述壳聚糖以所述制剂的约0.01%至0.1%重量/体积的量存在。
11. 根据权利要求10所述的制剂, 其中, 所述非编码RNA以所述制剂的约0.0015%至约0.004%重量/体积的量存在,
其中, 所述酪蛋白亚单元的混合物以所述制剂的约2%至3%重量/体积的量存在;
其中, 所述壳聚糖以所述制剂的约0.05%至0.1%重量/体积的量存在; 并且
其中, 所述阳离子脂质相对于每微克核酸以约1微升至约3微升的量存在。
12. 根据权利要求11所述的制剂, 其中, 所述非编码RNA以所述制剂的约0.0015%至约0.0035%重量/体积的量存在,
其中, 所述酪蛋白亚单元的混合物以所述制剂的约2.2%至2.8%重量/体积的量存在;
其中, 所述壳聚糖以所述制剂的约0.06%至0.09%重量/体积的量存在; 并且
其中, 所述阳离子脂质相对于每微克核酸以约1微升至约2微升的量存在。
13. 根据权利要求12所述的制剂, 其中, 对受试者给药后, 所述非编码RNA降低IL1-B、

IL-6、TGF β 、NLRP3、p21和IL-4中的一种或多种的表达。

14. 根据权利要求12所述的制剂,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA降低所述受试者的收缩压。

15. 根据权利要求2所述的制剂,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA降低所述受试者的舒张压。

16. 根据权利要求12所述的制剂,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA增强所述受试者的至少一个肌肉的肌肉耐力、肌肉抗疲劳性、肌肉力量和/或肌肉收缩性。

17. 根据权利要求16所述的制剂,其中,所述肌肉是骨骼肌或心肌。

18. 根据权利要求12所述的制剂,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA降低脑钠肽的表达。

19. 根据权利要求12所述的制剂,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA降低舒张期二尖瓣口流入速度与二尖瓣环组织速度比率(E/e')。

20. 根据权利要求12所述的制剂,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA增强所述受试者的葡萄糖耐受性。

21. 根据权利要求12所述的制剂,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA减少所述受试者的每单位体重的肥胖和/或皮下脂肪组织。

22. 根据权利要求12所述的制剂,其中,对患有心肌梗塞的受试者给药后,所述非编码RNA减小心肌梗塞后的梗塞面积。

23. 根据权利要求12所述的制剂,其中,对患有心肌梗塞的受试者给药后,所述非编码RNA降低心肌梗塞后的循环心肌肌钙蛋白I浓度。

24. 根据权利要求1至23中任一项所述的制剂,其中,所述制剂减轻与炎症和/或纤维化增加相关的疾病的一种或多种症状。

25. 根据权利要求24所述的制剂,其中,所述疾病选自射血分数保留型心力衰竭、心肌梗塞、肌营养不良、硬皮病、病毒感染和肥厚性心肌病。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的制剂,其中,所述核酸包含与SEQ ID NO:1-25、31、32中的一个或多个具有至少90%序列同一性的序列。

27. 根据权利要求1至26中任一项所述的制剂,其中,所述核酸基本上由与SEQ ID NO:1-25、31、32中的一个或多个具有至少90%序列同一性的序列组成。

28. 一种用于口服递送核酸的制剂,包含:

人工脂质胶束,

核酸,其中所述核酸被包封在所述人工脂质胶束内,和

在所述人工脂质胶束上的包衣,其中所述包衣包含酪蛋白和壳聚糖聚合物的混合物。

29. 根据权利要求28所述的制剂,其中,

所述核酸包含核糖核酸(RNA),并且其中所述RNA以所述制剂的约0.0001%至0.01%重量/体积的量存在;

其中,所述酪蛋白和壳聚糖聚合物的混合物包含至少一种 α -s1酪蛋白亚单元,并且其中所述至少一种酪蛋白以所述制剂的约0.5%至5%重量/体积的量存在;以及

其中壳聚糖以所述制剂的约0.001%至1%重量/体积的量存在。

30. 根据权利要求28或29所述的制剂,进一步包含乙酸,其中所述乙酸以所述制剂的约

0.01%至1%重量/体积的量存在。

31. 根据权利要求28、29或30所述的制剂,其中,所述阳离子脂质相对于每微克核酸以约0.1微升至约5微升的量存在。

32. 根据权利要求28至31中任一项所述的制剂,其中,所述核酸包含非编码RNA。

33. 根据权利要求28、29或31至32所述的制剂,进一步包含酸。

34. 根据权利要求33所述的制剂,其中,所述酸以所述制剂的约0.001%至1%体积的量存在,并且其中所述酸选自乙酸、柠檬酸、磷酸和柠檬酸。

35. 根据权利要求28至34中任一项所述的制剂,其中,所述壳聚糖是低分子量壳聚糖。

36. 根据权利要求35所述的制剂,其中,所述低分子量壳聚糖的质量范围为约50至约190千道尔顿。

37. 根据权利要求29所述的制剂,其中,所述核酸包含非编码RNA,其中所述非编码RNA以所述制剂的约0.001%至约0.005%体积的量存在,

其中,所述至少一种酪蛋白包含 α -s1酪蛋白亚单元、 α -s2酪蛋白亚单元、 β -酪蛋白亚单元和 κ -酪蛋白亚单元的混合物,其中所述酪蛋白亚单元以所述制剂的约1%至3%的量存在;并且

其中,所述壳聚糖相对于每微克核酸以约1微升至约3微升的量存在。

38. 根据权利要求37所述的制剂,其中,所述非编码RNA以所述制剂的约0.0015%至约0.005%体积的量存在,

其中,所述酪蛋白亚单元的混合物以所述制剂的约2%至3%体积的量存在;

其中,所述壳聚糖以所述制剂的约0.05%至0.1%体积的量存在;并且

其中,所述阳离子脂质相对于每微克核酸以约1微升至约2微升的量存在。

39. 根据权利要求37或38所述的制剂,其中,所述非编码RNA以所述制剂的约0.0015%至约0.0035%体积的量存在,

其中,所述酪蛋白亚单元的混合物以所述制剂的约2.2%至2.8%体积的量存在;

其中,所述壳聚糖以所述制剂的约0.06%至0.09%体积的量存在;并且

其中,所述阳离子脂质相对于每微升核酸以约15ng至约25ng的量存在。

40. 根据权利要求28至39中任一项所述的制剂,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA减少IL1-B、IL-6、TGF β 、NLRP3、p21和IL-4中的一种或多种的表达。

41. 根据权利要求28至40中任一项所述的制剂,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA降低所述受试者的收缩压。

42. 根据权利要求28至41中任一项所述的制剂,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA降低所述受试者的舒张压。

43. 根据权利要求28至42中任一项所述的制剂,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA增强所述受试者的至少一个肌肉的肌肉耐力、肌肉抗疲劳性、肌肉力量和/或肌肉收缩性。

44. 根据权利要求43所述的制剂,其中,所述肌肉是骨骼肌或心肌。

45. 根据权利要求28至44中任一项所述的制剂,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA减少脑钠肽的表达。

46. 根据权利要求28至45中任一项所述的制剂,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA降低舒张期二尖瓣口流入速度与二尖瓣环组织速度比率(E/e')。

47. 根据权利要求28至46中任一项所述的制剂,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA增强所述受试者的葡萄糖耐受性。

48. 根据权利要求28至47中任一项所述的制剂,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA减少所述受试者的每单位体重的肥胖和/或皮下脂肪组织。

49. 根据权利要求28至48中任一项所述的制剂,其中,对患有心肌梗塞的受试者给药后,所述非编码RNA减小心肌梗塞后的梗塞面积。

50. 根据权利要求28至48中任一项所述的制剂,其中,对患有心肌梗塞的受试者给药后,所述非编码RNA降低心肌梗塞后的循环心肌钙蛋白I浓度。

51. 根据权利要求28至50中任一项所述的制剂,其中,所述制剂减轻与炎症和/或纤维化增加相关的疾病的一种或多种症状。

52. 根据权利要求51所述的制剂,其中,所述疾病选自射血分数保留型心力衰竭、心肌梗塞、肌营养不良、硬皮病、病毒感染和肥厚性心肌病。

53. 根据权利要求28至52中任一项所述的制剂,其中,所述核酸包含与SEQ ID NO:1-25、31、32中的一个或多个具有至少90%序列同一性的序列。

54. 根据权利要求1至25中任一项所述的制剂,其中,所述核酸基本上由与SEQ ID NO:1-25、31、32中的一个或多个具有至少90%序列同一性的序列组成。

55. 一种治疗与炎症和/或纤维化相关的疾病的方法,包含给予患有表现出炎症和/或纤维化的疾病的受试者治疗有效量的根据权利要求1至54中任一项所述的制剂。

56. 根据权利要求1至54中任一项所述的制剂用于治疗与炎症和/或纤维化相关的疾病的用途。

57. 根据权利要求1至54中任一项所述的制剂用于制备用于治疗与炎症和/或纤维化相关的疾病的药物的用途。

58. 根据权利要求55或56所述的用途,其中,所述疾病包含射血分数保留型心力衰竭、心肌梗塞、肌营养不良、硬皮病、病毒感染和/或肥厚性心肌病。

59. 一种制备用于口服递送核酸的制剂的方法,包含:

通过使核酸与包含阳离子脂质的溶液接触将核酸包封在人工脂质胶束中,从而产生包含核酸的人工脂质胶束;

通过使所述包含核酸的人工脂质胶束与包含2%至10%的酪蛋白的溶液接触来使酪蛋白涂覆包含核酸的人工脂质胶束,从而产生包含核酸的酪蛋白涂覆的人工脂质胶束;

将包含核酸的酪蛋白涂覆的人工脂质胶束暴露于酸和壳聚糖聚合物的混合物,其中酸和壳聚糖聚合物的混合物允许壳聚糖连同酪蛋白的嵌入以及包含核酸的酪蛋白-壳聚糖涂覆的脂质胶束的沉淀。

60. 根据权利要求59所述的方法,其中,所述核酸与所述阳离子脂质以约10ng至30ng核酸比1 μ L脂质溶液的比率接触。

61. 根据权利要求60所述的方法,进一步包含向所述核酸和阳离子脂质溶液中加入液体介质至约100 μ L的最终体积。

62. 根据权利要求59所述的方法,其中,所述酪蛋白包含于5%牛酪蛋白溶液的溶液内,并且以1:10的体积比添加到所述包含核酸的人工脂质胶束中。

63. 根据权利要求59所述的方法,其中,所述酸和壳聚糖聚合物的混合物包含约0.05%

至2%的乙酸溶液和约0.1%至2%的壳聚糖溶液。

64.一种用于治疗或改善与炎症和/或纤维化相关的疾病的方法,包含:

向有需要的受试者给予口服制剂,所述口服制剂包含:

核酸;

阳离子脂质;

至少一种酪蛋白;和

壳聚糖。

65.根据权利要求64所述的方法,其中,

所述核酸包含核糖核酸(RNA),并且其中所述RNA以所述制剂的约0.0001%至0.01%重量/体积的量存在;

其中,所述至少一种酪蛋白包含至少一种 α -s1酪蛋白亚单元,并且其中所述至少一种酪蛋白以所述制剂的约0.5%至5%重量/体积的量存在;并且

其中,所述壳聚糖以所述制剂的约0.001%至1%重量/体积的量存在。

66.根据权利要求65所述的方法,其中,所述制剂进一步包含乙酸,其中所述乙酸以所述制剂的约0.01-1%重量/体积的量存在。

67.根据权利要求64、65或66所述的方法,其中,所述阳离子脂质相对于每微克核酸以约0.1微升至约5微升的量存在。

68.根据权利要求64至67中任一项所述的方法,其中,所述核酸包含非编码RNA。

69.根据权利要求64至68中任一项所述的方法,其中,所述制剂进一步包含酸。

70.根据权利要求69所述的方法,其中,所述酸以所述制剂的约0.001%至1%体积的量存在,并且其中所述酸选自乙酸、柠檬酸、磷酸和柠檬酸。

71.根据权利要求64至70中任一项所述的方法,其中,所述壳聚糖是低分子量壳聚糖。

72.根据权利要求71所述的方法,其中,所述低分子量壳聚糖的质量范围为约50至约190千道尔顿。

73.根据权利要求64至72中任一项所述的方法,其中,所述核酸包含非编码RNA,其中所述非编码RNA以所述制剂的约0.001%至约0.005%重量/体积的量存在,

其中,所述至少一种酪蛋白包含 α -s1酪蛋白亚单元、 α -s2酪蛋白亚单元、 β -酪蛋白亚单元和 κ -酪蛋白亚单元的混合物,其中所述酪蛋白亚单元以所述制剂的约1%至3%重量/体积的量存在;并且

其中,所述壳聚糖以所述制剂的约0.01%至0.1%重量/体积的量存在。

74.根据权利要求73所述的方法,其中,所述非编码RNA以所述制剂的约0.002%至0.005%重量/体积的量存在,

其中,所述酪蛋白亚单元的混合物以所述制剂的约2%至3%重量/体积的量存在;

其中,所述壳聚糖以所述制剂的约0.05%至0.1%重量/体积的量存在;并且

其中,所述阳离子脂质相对于每微克核酸以约1微升至约3微升的量存在。

75.根据权利要求74所述的方法,其中,所述非编码RNA以所述制剂的约0.0025%至约0.004%重量/体积的量存在,

其中,所述酪蛋白亚单元的混合物以所述制剂的约2.2%至2.8%重量/体积的量存在;

其中,所述壳聚糖以所述制剂的约0.06%至0.09%重量/体积的量存在;并且

其中,所述阳离子脂质相对于每微克核酸以约1微升至约2微升的量存在。

76.根据权利要求75所述的方法,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA减少IL1-B、IL-6、TGF β 、NLRP3、p21和IL-4中的一种或多种的表达。

77.根据权利要求75所述的方法,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA降低所述受试者的收缩压。

78.根据权利要求75所述的方法,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA降低所述受试者的舒张压。

79.根据权利要求75所述的方法,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA增强所述受试者的至少一个肌肉的肌肉耐力、肌肉抗疲劳性、肌肉力量和/或肌肉收缩性。

80.根据权利要求79所述的方法,其中,所述肌肉是骨骼肌或心肌。

81.根据权利要求75所述的方法,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA降低脑钠肽的表达。

82.根据权利要求75所述的方法,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA降低舒张期二尖瓣口流入速度与二尖瓣环组织速度比率(E/e')。

83.根据权利要求75所述的方法,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA增强所述受试者的葡萄糖耐受性。

84.根据权利要求75所述的方法,其中,对受试者给药后,所述非编码RNA减少所述受试者的每单位体重的肥胖和/或皮下脂肪组织。

85.根据权利要求75所述的方法,其中,对患有心肌梗塞的受试者给药后,所述非编码RNA减小心肌梗塞后的梗塞面积。

86.根据权利要求75所述的方法,其中,对患有心肌梗塞的受试者给药后,所述非编码RNA降低心肌梗塞后的循环心肌肌钙蛋白I浓度。

87.根据权利要求64至86中任一项所述的方法,其中,所述疾病选自射血分数保留型心力衰竭、心肌梗塞、肌营养不良、硬皮病、病毒感染和肥厚性心肌病。

88.根据权利要求64至87中任一项所述的方法,其中,所述核酸包含与SEQ ID NO:1-25、31、32中的一个或多个具有至少90%序列同一性的序列。

89.根据权利要求64至88中任一项所述的方法,其中,所述核酸基本上由与SEQ ID NO:1-25、31、32中的一个或多个具有至少90%序列同一性的序列组成。

用于口服递送核酸的制剂

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2021年7月1日提交的美国临时申请第63/202,970号的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 联邦资助的研发活动的声明

[0004] 本发明是在政府支持下根据美国国立卫生研究院授予Dr. Eduardo Marbán的授权号R01HL124074进行的。政府具有本发明的某些权利。

[0005] 序列表的引用

[0006] 本申请与电子格式的序列表一起提交。序列表为在2022年6月30日创建的名称为CSMC018W02_ST25.txt的文件,其大小为16,471字节。序列表的电子格式的信息通过引用整体并入本文。

背景技术

技术领域

[0007] 本发明涉及用于口服递送核酸例如治疗性RNA(例如,非编码或编码RNA)的制剂。在一些实施方式中,所述制剂增强了此类RNA的口服生物利用度,从而以口服递送而不是通过如注射递送的来治疗各种疾病,特别是以炎症和/或纤维化为特征的疾病。

发明内容

[0008] 在一些实施方式中,提供了用于口服递送核酸的制剂,其包含核酸、阳离子脂质、至少一种酪蛋白和壳聚糖。

[0009] 在一些实施方式中,所述制剂中的核酸包含核糖核酸(RNA),其中所述RNA以所述制剂的0.0001%至约0.01%重量/体积的量存在。在一些实施方式中,所述至少一种酪蛋白包含至少一种 α -s1酪蛋白亚单元,所述 α -s1酪蛋白亚单元以所述制剂的约0.25%至约7%重量/体积的量存在,所述壳聚糖以所述制剂的约0.0001%至4%重量/体积的量存在。

[0010] 在一些实施方式中,提供了一种用于口服递送核酸的制剂,其包含多个人工脂质胶束、多个核酸、和在所述人工脂质胶束上的包衣,其中所述核酸的一部分被包封在所述人工脂质胶束内,其中所述包衣包含酪蛋白和壳聚糖聚合物的混合物。在一些实施方式中,所述核酸包含核糖核酸(RNA),并且其中所述RNA以所述制剂的约0.00001%至约0.05%重量/体积的量存在,所述酪蛋白和壳聚糖聚合物的混合物包含至少一种 α -s1酪蛋白亚单元,所述 α -s1酪蛋白亚单元以所述制剂的约0.5%至约5%重量/体积的量存在,并且其中所述壳聚糖以所述制剂的约0.001%至约1%重量/体积的量存在。

[0011] 在一些实施方式中,所述制剂还包含酸。在一些实施方式中,所述酸以所述制剂的约0.001%至约1%体积的量存在,并且所述酸选自乙酸、柠檬酸、磷酸和柠檬酸。在一个实施方式中,所述制剂还包含乙酸,其中所述乙酸以所述制剂的约0.01%至约1%重量/体积的量存在。

[0012] 在一些实施方式中,所述阳离子脂质相对于每微克核酸以约0.1微升至约5微升的量存在。在一些实施方式中,所述核酸包含非编码RNA、编码RNA(例如mRNA)或其组合。在一些实施方式中,所述壳聚糖是低分子量壳聚糖。在一些实施方式中,所述低分子量壳聚糖的质量范围为约50至约190千道尔顿。

[0013] 在一些实施方式中,所述核酸包含非编码RNA或编码RNA,其中RNA以所述制剂的约0.001至约0.005%重量/体积的量存在,其中至少一种酪蛋白包含 α -s1酪蛋白亚单元、 α -s2酪蛋白亚单元、 β -酪蛋白亚单元和 κ -酪蛋白亚单元的混合物,其中酪蛋白亚单元以所述制剂的约1%至3%重量/体积的量存在,并且其中壳聚糖以所述制剂的约0.01%至0.1%重量/体积的量存在。

[0014] 在一些实施方式中,所述核酸包含非编码RNA或编码RNA,其中所述RNA以制剂的约0.0015至约0.004%重量/体积的量存在,其中所述酪蛋白亚单元的混合物以所述制剂的约2%至3%重量/体积的量存在,其中所述壳聚糖以所述制剂的约0.05%至约0.1%重量/体积的量存在,并且其中所述阳离子脂质相对于每微克核酸以约1微升至约3微升的量存在。

[0015] 在一些实施方式中,所述核酸包含非编码RNA或编码RNA,其中所述RNA以所述制剂的约0.0015至约0.0035%重量/体积的量存在,其中所述酪蛋白亚单元的混合物以所述制剂的约2.2%至2.8%重量/体积的量存在,其中所述壳聚糖以所述制剂的约0.06%至0.09%重量/体积的量存在,并且其中所述阳离子脂质相对于每微克核酸以约1微升至约2微升的量存在。

[0016] 在一些实施方式中,对受试者给药后,所述RNA减少IL1-B、IL-6、TGF β 、NLRP3、p21和IL-4中的一种或多种的表达。在一些实施方式中,对受试者给药后,所述RNA降低受试者的收缩压。在一些实施方式中,对受试者给药后,所述RNA降低受试者的舒张压。在一些实施方式中,对受试者给药后,所述RNA增强受试者的至少一个肌肉的肌肉耐力、肌肉抗疲劳性、肌肉力量和/或肌肉收缩性。根据实施方式,肌肉可以是骨骼肌或心肌。在一些实施方式中,对受试者给药后,所述RNA降低脑钠肽的表达。

[0017] 在一些实施方式中,对受试者给药后,所述RNA降低舒张期二尖瓣口流入速度与二尖瓣环组织速度比率(E/e')。在一些实施方式中,对受试者给药后,所述RNA增强受试者的葡萄糖耐受性。在一些实施方式中,对受试者给药后,所述RNA减少受试者每单位体重的肥胖和/或皮下脂肪组织。在一些实施方式中,对患有心肌梗塞的受试者给药后,所述RNA减小心肌梗塞后的梗塞面积。在一些实施方式中,在对患有心肌梗塞的受试者给药后,所述RNA降低心肌梗塞后的循环心肌钙蛋白I浓度。

[0018] 在一些实施方式中,所述制剂减轻与炎症和/或纤维化增加相关的疾病的一种或多种症状。在一些实施方式中,所述疾病选自射血分数保留型心力衰竭、心肌梗塞、肌营养不良、硬皮病、病毒感染和肥厚性心肌病。在一些实施方式中,所述制剂包含与SEQ ID NO: 1-25、31、32中的一个或多个具有至少90%序列同一性的核酸。在一些实施方式中,所述制剂包含基本上由与SEQ ID NO: 1-25、31、32中的一个或多个具有至少90%序列同一性的序列组成的核酸。在一些实施方式中,所述制剂包含与SEQ ID NO. 26-30中的一个或多个具有至少80%序列同一性的一种或多种酪蛋白。

[0019] 还提供了一种用于治疗与炎症和/或纤维化相关的疾病的方法,包含给予患有表现出炎症和/或纤维化的疾病的受试者治疗有效量的本发明公开的制剂。另外提供了本发

明公开的制剂用于治疗与炎症和/或纤维化相关的疾病的用途。另外提供了本发明公开的制剂用于制备用于治疗与炎症和/或纤维化相关的疾病的药物的用途。在一些实施方式中,所述疾病包含射血分数保留型心力衰竭、心肌梗塞、肌营养不良、硬皮病、病毒感染和/或肥厚性心肌病。

[0020] 在一些实施方式中,提供了一种制造用于口服递送核酸的制剂的方法,所述方法包含通过使核酸与包含阳离子脂质的溶液接触来将核酸包封在人工脂质胶束中,从而产生包含核酸的人工脂质胶束,通过使所述包含核酸的人工脂质胶束与包含2%至10%酪蛋白的溶液接触来使酪蛋白涂覆包含核酸的人工脂质胶束,从而产生包含核酸的酪蛋白涂覆的人工脂质胶束,并且将所述包含核酸的酪蛋白涂覆的人工脂质胶束暴露于酸和壳聚糖聚合物的混合物,其中所述酸和壳聚糖聚合物的混合物允许所述壳聚糖连同酪蛋白的嵌入以及包含核酸的酪蛋白-壳聚糖涂覆的脂质胶束的沉淀。

[0021] 在一些实施方式中,使所述核酸以每微克核酸约0.5 μ L至2.0 μ L脂质溶液的比例与阳离子脂质接触。在一些实施方式中,所述方法还包含将液体介质添加到所述核酸和阳离子脂质溶液中以达到约100 μ L的最终体积。在一些实施方式中,所述酪蛋白包含于5%牛酪蛋白溶液的溶液内,并且以1:10的体积比添加到所述包含核酸的人工脂质胶束中。在一些实施方式中,所述酸和壳聚糖聚合物的混合物包含约0.05%至2%的乙酸溶液和约0.1%至2%的壳聚糖溶液。

[0022] 在一些实施方式中,提供了一种用于治疗与炎症和/或纤维化相关的疾病的方法,包含向受试者给予口服制剂,所述口服制剂包含核酸、阳离子脂质、至少一种酪蛋白、和壳聚糖。在一些实施方式中,每天给予所述口服制剂。在一些实施方式中,单次口服给药有效地改善或治疗与炎症和/或纤维化相关的疾病。在一些实施方式中,所述核酸包含核糖核酸(RNA),并且其中RNA以所述制剂的约0.00001%至0.01%重量/体积的量存在,其中至少一种酪蛋白包含至少一种 α -s1酪蛋白亚单元,并且以所述制剂的约0.5%至5%重量/体积的量存在;并且其中壳聚糖以所述制剂的约0.001%至1%重量/体积的量存在。

[0023] 提供了一种分离的核酸,所述核酸包含CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG (SEQ ID NO: 12)的核苷酸序列,其中所述核酸是RNA,其中所述核酸的长度至多为30nt。还提供了一种分离的核酸,所述核酸包含与CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG (SEQ ID NO: 12)至少95%相同的核苷酸序列,其中所述核酸是RNA,其中所述核酸的长度至多为30nt。任选地,所述核酸包含至少一个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含1-10个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含核苷酸序列1-12位上的至少一个化学修饰的核苷酸和/或13-24位上的至少一个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸包含主链修饰。在一些实施方式中,所述主链修饰包含主链糖修饰。在一些实施方式中,所述核酸包含核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位上的一个或多个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸是锁核酸(LNA)。在一些实施方式中,所述核苷酸序列包含核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位上的LNA。在一些实施方式中,所述核酸的长度为24个核苷酸。

[0024] 提供了一种分离的核酸,所述核酸包含与CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG (SEQ ID NO: 12)至少95%相同的核苷酸序列,其中所述核酸是RNA。任选地,所述核苷酸序列为CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG (SEQ ID NO: 12)。在一些实施方式中,所述核酸包含至少一个

化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含1-10个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含核苷酸序列1-12位上的至少一个化学修饰的核苷酸和/或13-24位上的至少一个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸包含主链修饰。在一些实施方式中,所述主链修饰是主链糖修饰。在一些实施方式中,所述核酸还包含在核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位上的一个或多个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸是锁核酸(LNA)。在一些实施方式中,所述核苷酸序列包含核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位上的LNA。在一些实施方式中,所述核酸的长度至多为30nt。

[0025] 在一些实施方式中,核酸由以下核苷酸序列组成或基本上由以下核苷酸序列组成:CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG。

[0026] 一种由以下核苷酸序列组成的核酸:CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG (SEQ ID NO:2), 其中所述核酸是RNA,其中所述核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位上的每个是LNA。

[0027] 还提供了一种组合物,所述组合物包含:本发明的任意一种分离的核酸;和药学上可接受的赋形剂。任选地,所述组合物还包含转染试剂。任选地,所述转染试剂包含脂质体、细胞外囊泡(EV)和聚乙二醇(PEG)-阳离子脂质复合物(PCLC)中的一种或多种。在一些实施方式中,所述转染试剂包含来源于心肌球衍生细胞(CDC)的EV。在一些实施方式中,所述组合物还包含酪蛋白磷酸蛋白。任选地,所述组合物还包含壳聚糖。任选地,所述分离的核酸封装在酪蛋白-壳聚糖复合物中。在一些实施方式中,所述组合物包含酪蛋白胶束。

[0028] 提供了一种暴露于或转染有本发明的任意一种核酸的巨噬细胞,其中与不含所述核酸的巨噬细胞相比,所述巨噬细胞的抗炎活性增加。任选地,所述巨噬细胞在受试者体内。任选地,所述巨噬细胞在培养物中。

[0029] 还提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含:本发明的任意一种核酸;和转染试剂。任选地,转染试剂是脂质体、细胞外囊泡(EV)和聚乙二醇(PEG)-阳离子脂质复合物(PCLC)中的一种或多种。在一些实施方式中,所述试剂盒还包含药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中,所述试剂盒还包含酪蛋白磷酸蛋白。在一些实施方式中,所述试剂盒还包含壳聚糖。

[0030] 还提供了一种用于治疗心脏病症或其症状的方法,所述方法包含向需要治疗心脏病症或其症状的受试者给予治疗有效量的本发明所述核酸中的任一种或本发明所述组合物中的任一种,从而治疗心脏病症或其症状。任选地,所述心脏病症包含心力衰竭的症状和/或后遗症。在一些实施方式中,所述心脏病症包含肥厚性心肌病。在一些实施方式中,所述心脏病症包含射血分数保留型心力衰竭(HFpEF)。在一些实施方式中,所述心脏病症包含感染性疾病的症状或后遗症。在一些实施方式中,所述感染性疾病包含病毒感染。在一些实施方式中,所述受试者患有心脏病症。在一些实施方式中,所述受试者有发展心脏病症的风险。在一些实施方式中,所述受试者在给药之前表现出以下中的一种或多种:高血压、通过超声心动描记术检测的升高的E/e'比率、心脏肥大、心肌纤维化、肥胖、消瘦、耐力下降和系统性炎症标志物升高。

[0031] 还提供了一种用于治疗肌肉紊乱或其症状的方法,所述方法包含向需要治疗肌肉紊乱或其症状的受试者给予治疗有效量的本发明所述核酸中的任一种或本发明所述组合物中的任一种,从而治疗肌肉紊乱或其症状。任选地,所述肌肉紊乱包含肌营养不良或心脏病症。在一些实施方式中,所述肌肉紊乱包含裘馨氏肌肉萎缩症。在一些实施方式中,所述

受试者患有肌肉紊乱。在一些实施方式中,所述受试者有发展肌肉紊乱的风险。在一些实施方式中,所述受试者在遗传上倾向于发展肌肉紊乱。在一些实施方式中,所述受试者在给药之前表现出以下中的一种或多种:耐力下降和骨骼肌功能下降。

[0032] 还提供了一种用于治疗炎症病症的方法,所述方法包含向需要治疗炎症病症的受试者给予治疗有效量的本发明所述核酸中的任一种或本发明所述组合物中的任一种,从而治疗炎症病症。任选地,所述炎症病症包含感染性疾病的症状或后遗症。在一些实施方式中,所述感染性疾病包含病毒感染。在一些实施方式中,所述炎症病症包含细胞因子风暴。在一些实施方式中,所述炎症病症与免疫治疗(例如,针对癌症)相关。在一些实施方式中,所述炎症病症是硬皮病,所述硬皮病是影响皮肤的自身免疫病症。在一些实施方式中,所述炎症病症是系统性硬化,所述系统性硬化是类似硬皮病但不仅影响皮肤而且影响包含肺和心脏在内的内部器官的自身免疫病症。

[0033] 还提供了一种用于治疗纤维化病症的方法,所述方法包含向需要治疗纤维化病症的受试者给予治疗有效量的本发明所述核酸中的任一种或本发明所述组合物中的任一种,从而治疗纤维化病症。任选地,所述纤维化病症包含感染性疾病的症状或后遗症。在一些实施方式中,所述感染性疾病包含病毒感染。在一些实施方式中,纤维化病症是特发性肺纤维化。在一些实施方式中,纤维化病症是肝硬化。

[0034] 在一些实施方式中,所述治疗有效量的核酸包含约0.001 μ g/g至约100 μ g/g。在一些实施方式中,本发明所述任意一种用于治疗的方法包含给予治疗有效量的核酸或组合物不超过一周两次。在一些实施方式中,所述方法包含静脉内、肌内、心内或口服给予治疗有效量的核酸或组合物。任选地,口服给予治疗有效量的核酸或组合物。

[0035] 还提供了一种提升巨噬细胞的抗炎活性的方法,所述方法包含将本发明所述核酸中的任一种或本发明所述组合物中的任一种与巨噬细胞群体接触,从而提升所述群体的巨噬细胞的抗炎活性。任选地,所述接触包含向需要治疗特征为炎症或纤维化的病症的受试者给予有效量的核酸或组合物,从而提升受试者中巨噬细胞的抗炎活性。在一些实施方式中,所述巨噬细胞是人巨噬细胞。

附图说明

[0036] 图1A-1B示出了本发明提供的口服制剂的各种非限制性示意图。图1A示出了非限制性示意图,其中脂质用于包封例如治疗性核酸的核酸,并且用酪蛋白-壳聚糖复合物涂覆包封的核酸允许口服递送,图1B为用于治疗性核酸的替代制剂的替代非限制性示意图,例如RNA(例如,非编码RNA或编码RNA)。

[0037] 图2A-2C示出了与本发明提供的口服制剂相关的示意图和数据。图2A、2B示出了非编码RNA(2A中的TY4和2B中的piR-659/piREX1)以及根据本发明的实施方式中其在脂质-酪蛋白-壳聚糖复合物中的包封的各种非限制性示意图。图2C示出了证明piREX1(及其衍生物,U至A)口服给药有效降低梗塞质量和心肌肌钙蛋白水平(与对照相比)的数据。

[0038] 图3A-3M示出了根据本发明中的一些非限制性实施方式,在射血分数保留型心力衰竭(HFpEF)中给予TY4的治疗效果。图3A为在HFpEF模型中测量TY4治疗效果的方案的示意图。图3B为比较收缩压(左图)和舒张压(右图)的图。图3C为比较跑步机锻炼距离的图。图3D为比较早期舒张期二尖瓣口流入速度与二尖瓣环组织速度的比率(E/e')的图。图3E为比较

系统性脑钠肽 (BNP) 水平的图。图3F为比较收缩压 (左图) 和舒张压 (右图) 的图的集合。图3G为比较早期舒张期二尖瓣口流入速度与二尖瓣环组织速度的比率 (E/e') 的图。图3H为比较跑步机锻炼距离的图。图3I为比较系统性BNP水平的图。图3J为比较收缩压随时间变化的图。图3K为比较舒张压随时间变化的图。图3L为比较 E/e' 比率随时间变化的图。图3M为比较跑步机锻炼距离随时间变化的图。

[0039] 图4A-4F示出了根据本发明中的一些非限制性实施方式,在射血分数保留型心力衰竭 (HFpEF) 中给予TY4的治疗效果。图4A-4E的数据来自图3的对应数据的附加重复组 (例如,更大的样本量)。图4A为比较在接受对照、溶剂对照、口服制剂的动物中收缩压的图。图4B为比较在接受对照、溶剂对照、口服制剂的动物中舒张压的图。图4C为比较在接受对照、溶剂对照、口服制剂的动物中,早期舒张期二尖瓣口流入速度与二尖瓣环组织速度的比率 (E/e') 的图。图4D为比较在接受对照、溶剂对照、口服制剂的动物中,系统性脑钠肽 (BNP) 水平的图。图4E为比较在接受对照、溶剂对照、口服制剂的动物中,跑步机锻炼距离的图。图4F为比较在接受对照、溶剂对照、口服制剂的动物中,循环血糖水平的图。图4G示出了接受对照、溶剂对照、口服制剂的动物的心脏尺寸。

[0040] 图5A-5E示出了与在心肌梗塞模型中口服给予治疗性RNA的功效相关的数据。图5A示出了与梗塞面积相关的数据。图5B示出了来自各种治疗组的心脏组织切片。图5C示出了损伤后48小时的心肌肌钙蛋白循环水平的数据。图5D示出了与梗塞质量相关的附加数据,其中包含在口服制剂中不使用壳聚糖的治疗组。图5E示出了与心肌肌钙蛋白循环水平相关的附加数据,其中包含在口服制剂中不使用壳聚糖的治疗组。

[0041] 图6A-6E示出了与在硬皮病模型中递送治疗性核酸的口服制剂相关的数据。图6A示出了与指定治疗组中的跑步机上行进的距离相关的数据。图6B示出了与体重相关的数据。图6C示出了与心脏重量与体重的比率相关的数据,表示心脏指数 (HI)。图6d示出了与肺重量与体重的比率相关的数据,表示肺指数 (PI)。图6E示出了与指定组的肺重量相关的数据。

[0042] 图7A-7D示出了与在硬皮病模型中递送治疗性核酸的口服制剂相关的附加数据。图7A示出了与心脏纤维化相关的组织学数据。图7B示出了心脏纤维化数据的概要,按治疗组分列。图7C示出了与皮肤纤维化相关的组织学。图7D示出了皮肤纤维化数据的概要,按治疗组分列。

[0043] 图8A-8F示出了与硬皮病相关的附加数据。所描绘的数据示出了IL1-B (8A)、IL-6 (8B)、TGF β (8C)、NLRP3 (8D)、p21 (8E) 和IL-4 (8F) 的定量。

[0044] 图9A-9H示出了与在肌肉营养不良模型中递送治疗性核酸的口服制剂相关的数据。图9A示出了与测量左心室射血分数 (EF) 的经胸超声心动图相关的数据。图9B示出了Masson三色显微照片和汇总数据 (右子图),显示口服给予治疗性核酸比溶剂对照小鼠导致更少的心肌纤维化。图9C示出了总结在基线和8周后肌肉功能的数据。图9D示出了Masson三色显微照片和汇总数据 (右子图),显示口服给予治疗性核酸比溶剂对照小鼠导致更少的肌肉纤维化。图9E示出了与对照中的肌纤维计数相对于口服递送的治疗性RNA有关的数据。图9F示出了与口服治疗的动物相对于对照的运动能力相关的数据。图9G示出了与口服治疗的动物相对于对照的心脏功能相关的数据。图9H示出了与口服治疗的动物相对于对照的肌肉功能相关的数据。

具体实施方式

[0045] 核酸治疗提供了从基因层面治疗疾病的潜力。许多常规治疗通常诱导瞬时的治疗效果,因为它们靶向蛋白质而不是根本原因。相反,核酸治疗具有经由基因抑制、添加、替换或编辑的持久(或甚至永久,例如,治愈)效果的潜力。然而,核酸治疗的成功使用将围绕稳定性和/或生物利用度的递送技术。

[0046] 在一些实施方式中,本发明提供的制剂允许增强核酸向受试者的递送。在一些实施方式中,所述核酸包含DNA。在一些实施方式中,所述核酸包含RNA。在一些实施方式中,所述核酸包含编码RNA(例如,信使RNA或mRNA)。在一些实施方式中,所述核酸包含非编码RNA(ncRNA)。mRNA可以通过递送编码产生治疗效果的蛋白质的序列来提供治疗效果。根据实施方式,其可以是取代非功能性蛋白质的蛋白质。在其它实施方式中,编码RNA可以编码需要免疫应答的蛋白质(例如,病毒蛋白质),例如用于产生针对该蛋白质的抗体。已知ncRNA基于其增加抗炎细胞因子分泌或减少炎性细胞因子分泌的能力而表现出阳性治疗效果。某些ncRNA表现出心脏保护性、抗纤维化和/或抗肥厚作用。

[0047] 在本发明提供的公开内容之前,ncRNA经由肠胃外给药途径(诸如肌内、皮下或经由静脉内给药)递送至有需要的受试者。在一些实施方式中,本发明提供了允许口服递送ncRNA或其他治疗性核酸的制剂。在一些实施方式中,所述制剂保护核酸免受上/中胃肠道(例如胃)的低酸环境的影响,使得它们以完整形式到达下胃肠道并以允许实现它们的抗炎和/或抗纤维化作用的形式被吸收。

[0048] 在一些实施方式中,本发明提供的制剂允许核酸用于治疗炎症和/或组织损伤是病理的主要驱动因素的病症的用途。在一些实施方式中,使用此类制剂用于治疗的病症包含但不限于炎性疾病、肌营养不良或心脏损伤。在一些实施方式中,对患有心脏损伤的受试者给药后,所述制剂具有心脏保护作用,所述心脏损伤由于但不限于心肌梗塞和/或心力衰竭以及其他疾病,例如硬皮病和/或肌营养不良导致。不受理论的束缚,本发明的组合物允许将核酸,例如ncRNA成功递送到下胃肠道,其中它们容易被吸收并且可以,例如,通过促进由巨噬细胞分泌白细胞介素10(IL-10)来增加巨噬细胞的抗炎活性。在一些实施方式中,本发明的组合物允许将核酸,例如ncRNA成功递送到下胃肠道,其中它们容易被吸收并且可以诱导暴露于核酸的巨噬细胞中的一种或多种基因产物的表达和/或表观遗传变化的变化。在一些实施方式中,通过给予包含本发明的核酸的制剂用于治疗病症,例如炎性疾病、肌营养不良或心脏损伤。

[0049] 定义

[0050] 如本文所用,术语“核酸”或“寡核苷酸”是指多个核苷酸(例如,包含连接到一个磷酸基团和一个可交换有机碱基的糖(例如核糖或脱氧核糖)的分子,所述可交换有机碱基是一个取代的嘧啶(例如胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U))或一个取代的嘌呤(例如腺嘌呤(A)或鸟嘌呤(G))。该术语包含多核苷(即,多核苷酸减去磷酸盐)和任意其他含有有机碱基的聚合物。嘌呤和嘧啶包含但不限于腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、次黄嘌呤核苷、5-甲基胞嘧啶、2-氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、次黄嘌呤和其它天然和非天然存在的核苷碱基、取代和未取代的芳香族。核酸可以包含任何其他合适的修饰。因此,所述术语核酸还涵盖例如在碱基和/或糖中具有取代或修饰的核酸。

[0051] 本发明的多肽或核酸分子可以与参考分子(例如,参考多肽或参考多核苷酸),例

如与本领域描述的分子(例如,工程或设计分子或野生型分子)共享一定程度的序列相似性或同一性。本领域已知的术语“同一性”是指通过比较序列而确定的两种或更多种多肽或多核苷酸的序列之间的关系。在本领域中,同一性还意味着它们之间的序列相关性的程度,所述序列相关性由两个或更多个氨基酸残基串或核酸残基串之间的匹配的数量确定。同一性测量由特定数学模型或计算机程序(例如,“算法”)解决的具有空位比对(如果有)的两个或更多个序列中较小者之间的相同匹配的百分比。相关肽的同一性可以通过已知方法容易地计算。当它适用于多肽或多核苷酸序列时,“%同一性”被定义为在比对序列并在必要时引入空位以实现最大百分比同一性之后,候选氨基酸或核酸序列中与第二序列的氨基酸序列或核酸序列中的残基相同的残基(氨基酸残基或核酸残基)的百分比。可以使用用于比对的任何合适的方法和计算机程序。应当理解,同一性取决于同一性百分比的计算,但是可能由于在计算中引入的空位和罚分而在值上不同。通常,通过本发明描述的和本领域技术人员所知的序列比对程序和参数而确定,一个特定多核苷酸或多肽的变体与其特定参考多核苷酸或多肽具有至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%但小于100%的序列同一性。这种用于比对的工具包含BLAST套件(Stephen F. Altschul等人(1997),“Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402)。另一种流行的局部比对技术基于Smith-Waterman算法(Smith, T.F. & Waterman, M.S. (1981) “Identification of common molecular subsequences.” *J. Mol. Biol.* 147: 195-197)。一种基于动态编程的通用全局比对技术为Needleman-Wunsch算法(Needleman, S.B. & Wunsch, C.D. (1970) “A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequences of two proteins.” *J. Mol. Biol.* 48: 443-453)。最近,已经开发了一种快速优化全局序列比对算法(FOGSAA),据称该算法比其他包含Needleman-Wunsch算法的优化全局比对算法更快地产生核苷酸和蛋白质序列的全局比对。本发明中具体地在以下“同一性”的定义中描述了其他工具。

[0052] 术语“同一性”是指聚合物分子之间,例如多核苷酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的总体相关性。例如,两个多核酸序列的同一性百分比的计算可通过将两个序列进行比对,以达到优化比较目的(例如,为了优化比对,可以在第一和第二核酸序列中的一个或两个中引入空位,并且为了比较目的可以忽略不相同的序列)。在某些实施方式中,为了比较目的比对序列的长度为参考序列长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%。然后比较相应核苷酸位置处的核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的对应位置相同的核苷酸占据时,则分子在该位置处相同。在考虑到为了优化比对而引入的空位的数量和每个空位的长度的情况下,两个序列之间的同一性百分比是序列共享的相同位置的数量的一种功能。可以使用合适的数学算法来完成序列的比较和确定两个序列之间的同一性百分比。例如,两个核酸序列之间的同一性百分比可以使用例如在Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., 及 Griffin, H.G., eds., Humana Press, New

Jersey,1994;和Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.及Devereux,J.,eds.,M Stockton Press,New York,1991中描述的方法来确定;其各自通过引用并入本文。例如,两个核酸序列之间的同一性百分比可以使用Meyers-Miller算法(CABIOS,1989,4:11-17)来确定,其已经使用PAM 120重量残基表、空位长度罚分12分以及空位罚分4分并入ALIGN程序(版本2.0)中。或者,两个核酸序列之间的同一性百分比可以使用GCG软件包的GAP程序,使用NWSgapdna.CMP矩阵来确定。通常用于确定序列之间的同一性百分比的方法包含但不限于Carillo,H.,and Lipman,D.,SIAM J Applied Math.,48:1073(1988)中公开的方法;其通过引用并入本文。用于确定同一性的技术被编码在公开可用的计算机程序中。用于确定两个序列之间的同源性的示例性计算机软件包含但不限于GCG程序包,Deverux,J.等人,Nucleic Acids Research,12(1),387(1984),BLASTP,BLASTN和FASTA Altschul,S.F.等人,J.Biol.,215,403(1990)。

[0053] 术语“Watson-Crick碱基配对”或“碱基配对”是指在特定的核苷酸碱基对(“互补碱基对”)之间形成氢键。例如,腺嘌呤(A)和尿嘧啶(U)之间形成两个氢键,鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)之间形成三个氢键。一种评估两个多核苷酸之间的键合强度的方法是通过量化两个多核苷酸的鸟嘌呤和胞嘧啶碱基之间形成的键的百分比(“GC含量”)。在一些实施方式中,多聚体分子(例如,mRNA多聚体分子)的两个核酸之间的键的GC含量为至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%。在一些实施方式中,多聚体分子(例如,mRNA多聚体分子)的两个核酸之间的键的GC含量为10%至70%、约20%至约60%、或约30%至约60%。通过互补碱基对的键形成核酸双链体也可称为“杂交”。通常,共享互补性区域的两种核酸在合适的条件下能够杂交(例如,经由核酸碱基配对)以形成双链体结构。互补性区域的尺寸可以变化。在一些实施方式中,互补性区域的长度范围为约2个碱基对至约100个碱基对。在一些实施方式中,互补性区域的长度范围为约5个碱基对至约75个碱基对。在一些实施方式中,互补性区域的长度范围为约10个碱基对至约50个碱基对。在一些实施方式中,互补性区域的长度范围为约20个碱基对至约30个碱基对。

[0054] 本发明所使用的“分离的”指分离的生物分子,如核酸,对本领域普通技术人员而言,具有与本发明内容相同的常规和普通含义。分离的生物分子,例如分离的核酸,通常处于非自然环境中,或者处于如果没有人类对生物分子或其环境的干预,生物分子本来不会处于的环境中。在一些实施方式中,分离的生物分子不在细胞或生物体内。

[0055] 本发明所使用的“细胞外囊泡”或“EV”对本领域普通技术人员而言,具有与本发明内容相同的常规和普通含义。EV包含由细胞产生的脂质双分子层结构,并且包含外泌体(exosomes)、微囊泡(microvesicles)、附睾小体(epididimosomes)、阿尔戈体(argosomes)、外泌体样囊泡(exosome-like vesicles)、微粒(microparticles)、突出体(promininosomes)、前列腺小体(prostasomes)、帝萨体(dexosomes)、德萨体(texosomes)、dex、tex、四醚脂质体(archeosomes)和癌小体(oncosomes)。

[0056] 本发明所使用的“胶束”对本领域普通技术人员而言,具有与本发明内容相同的常规和普通含义。酪蛋白胶束是可以包含一种或多种酪蛋白磷酸蛋白(例如, α -S1酪蛋白、 α -S2酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白中的一种或多种,两种或更多种,三种或更多种,或全部四种)的聚集体的胶体粒子。

[0057] 本发明所使用的“受试者”是指任何包含哺乳动物和非哺乳动物脊椎动物。受试者

可以包含灵长类动物,包含人和非灵长类哺乳动物,例如啮齿动物、家畜或野生动物。非灵长类哺乳动物可包含小鼠、大鼠、仓鼠、兔、狗、狐、狼、猫、马、牛、猪、绵羊、山羊、骆驼、鹿、水牛、野牛等。非哺乳动物可以包含鸟类(例如,鸡、鸵鸟、鹌鹑、鸽子)、爬行类动物(例如,蛇、蜥蜴、龟)、两栖类动物(例如,蛙、蝾螈)、鱼类(例如,鲑鱼、鳕鱼、河豚、金枪鱼)等。术语“个体”、“受试者”和“受试者”在本发明中可互换使用。

[0058] 本发明所使用的“给药”可包含给予本发明公开的治疗剂或组合物的任何合适的给药途径。合适的给药途径包含但不限于口服、肠胃外、静脉内、肌内、皮下、透皮、气道(气溶胶)、肺、皮肤、注射或局部给药。给药可以是局部的或系统性的。

[0059] 如本发明所使用,“治疗”包含治愈、改善、缓解、降低其严重性、预防、减缓其进展和/或延迟其疾病、病症和/或症状的出现。

[0060] 如果本文所述的病症的一种或多种体征或症状以有益的方式改变,其他临床接受的症状得到改善,或甚至得到缓解,或在根据本文所述的方法治疗后诱导所需反应例如至少2%、3%、4%、5%、10%或更多,则治疗可被认为是如本文所用的“有效的”或“治疗有效的”。例如,可以通过测量根据本发明所述方法治疗的病症的标记、指标、症状和/或发生率或任何其他合适的可测量参数(例如,锻炼耐力)来评估功效。功效也可以通过如住院所评估的个体没有恶化或需要医疗干预(例如,疾病的进展停止)来测量。治疗包含个体或动物(一些非限制性实施例包含人或动物)中的疾病或病症的任何治疗,并且包含:(1)抑制疾病或病症,例如,预防症状(例如,疼痛或炎症)恶化;或(2)减轻疾病或病症的严重性,例如,引起症状消退。用于治疗疾病或病症的有效量是指,当对有需要的受试者给药时,足以对该疾病或病症产生本文所定义的有效治疗效果的用量。可以通过评估病症或预期反应(例如,肌肉功能、质量或体积)的身体指标来确定试剂的功效。本领域技术人员可以通过测量这些参数中的任何一个或参数的任何组合来监测给药和/或治疗的功效。

[0061] 如本发明所使用,术语“有效量”或“治疗有效量”是指减轻疾病或病症的至少一种或多种症状所需的组合物或药剂的量,并且涉及足够量的治疗组合物以提供所需效果。术语“有效量”或“治疗有效量”可以是指在对典型受试者给药时足以提供特别是抗炎和/或心脏保护作用的组合物或治疗剂的量。在各种语境下,本发明所用的有效量可包含足以延迟疾病或病症的症状的发展、改变症状疾病或病症的进程(例如但不限于,减慢疾病或病症的症状的进展)或逆转疾病或病症的症状的量。在一些实施方式中,所述治疗有效量以一种或多种剂量的治疗剂进行给药。在一些实施方式中,所述治疗有效量以单次给药或在一段时间内以多个剂量给药。

[0062] 如本发明所使用,短语“生理学上相容的”和“药学上可接受的”在本文中可互换使用,指那些化合物、材料、组合物和/或剂型,所述化合物、材料、组合物和/或剂型在合理的医学判断的范围内适用于与人类和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的益处/风险比相称。

[0063] 细胞生物学和分子生物学中常见术语的定义可见于“Merck Manual of Diagnosis and Therapy”,第十九版,由Merck Research Laboratories出版,2006(ISBN 0-91 1910-19-0);Robert S.Porter等人(eds.),The Encyclopedia of Molecular Biology,由Blackwell Science Ltd.出版,1994(ISBN 0-632-02182-9);Benjamin Lewin, Genes X,由Jones&artlett Publishing出版,2009(ISBN-10:0763766321);Kendrew等人

(eds.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, 由 VCH Publishers, Inc. 出版, 1995 (ISBN 1-56081-569-8) 和 *Current Protocols in Protein Sciences 2009*, Wiley Intersciences, Coligan 等人, eds.

[0064] 除非上下文另有明确指示, 否则单数术语“一个”、“一种”和“所述”包含复数指示物。类似地, 除非上下文另有明确指示, 词语“或”旨在包含“和”。“例如”在本发明中用于指示非限制性实施例。因此, 缩写“例如”与术语“例如”同义。本发明所使用的术语“约”例如定义分子量的值和范围是指指示的值和/或范围限制可以在 $\pm 20\%$ 内, 例如, 在 $\pm 10\%$ 内, 包含在 $\pm 5\%$ 内变化。在数字之前使用“约”时包含数字本身。例如, “约5”为“5”提供了明确的支持。范围中提供的数字包含重叠范围和其间的整数; 例如1-4和5-7的范围包含例如1-7、1-6、1-5、2-5、2-7、4-7、1、2、3、4、5、6和7。

[0065] 组合物

[0066] 在一些实施方式中, 本发明提供了被配置用于口服给药并且包含治疗性核酸(例如, 由组合物包封的RNA(编码或非编码RNA)分子)的组合物。在一些实施方式中, 所述组合物是药物组合物。在一些实施方式中, 所述组合物包含药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中, 所述组合物是无细胞组合物, 例如, 组合物基本上不含细胞, 例如CDC。在一些实施方式中, 所述组合物不含细胞衍生的材料, 例如外泌体或细胞囊泡。在一些实施方式中, 所述组合物包含人工囊泡(例如, 由脂质, 例如阳离子脂质形成的囊泡)。

[0067] 可用作药学上可接受的赋形剂的材料的一些非限制性实例包含: (1) 糖, 例如乳糖、葡萄糖和蔗糖; (2) 淀粉, 例如玉米淀粉和马铃薯淀粉; (3) 纤维素及其衍生物, 例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素和乙酸纤维素; (4) 粉末状黄芪胶; (5) 麦芽; (6) 明胶; (7) 润滑剂, 例如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石; (8) 可可脂和栓剂蜡; (9) 油, 例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油; (10) 二醇, 例如丙二醇; (11) 多元醇, 例如甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇(PEG); (12) 酯, 例如油酸乙酯和月桂酸乙酯; (13) 琼脂; (14) 缓冲剂, 例如氢氧化镁和氢氧化铝; (15) 海藻酸; (16) 无热原水; (17) 等渗盐水; (18) 林格氏液; (19) 乙醇; (20) pH缓冲溶液; (21) 聚酯、聚碳酸酯和/或聚酐; (22) 膨胀剂, 例如多肽和氨基酸 (23) 血清组分, 例如血清白蛋白、HDL和LDL; (22) C2-C12醇, 例如乙醇; 和 (23) 药物制剂中使用的其它无毒的相容物质。

[0068] 在一些实施方式中, 所述组合物包含转染试剂, 例如, 用于促进核酸递送到靶细胞靶标(体外或体内)。所述组合物中可包含任意合适的转染试剂。合适的转染试剂包含但不限于脂质体、细胞外囊泡(EV)和聚乙二醇(PEG)-阳离子脂质复合物(PCLC)。在一些实施方式中, 使用阳离子脂质。在一些实施方式中, 所述转染试剂包含 DharmaFECT® 或 Lipofectamine®。在一些实施方式中, 所述转染试剂包含 DharmaFECT®。在一些实施方式中, 本发明所述核酸与所述组合物中的转染试剂一起制成, 用于促进核酸的细胞摄取和/或药代动力学。

[0069] 脂质体是人工制备的囊泡, 主要由脂质双分子层(或以球形单层取向使得脂质的疏水性尾部位于球内)组成, 并且可以用作给予药物制剂的递送溶剂对照。脂质体可以具有不同的尺寸, 例如但不限于多层囊泡(MLV)、直径可以小于50nm的小单层囊泡(SUV)和直径可以在50nm至500nm的大单层囊泡(LUV), 所述多层囊泡(MLV)具有可以为数百纳米的直接并且包含一系列由狭窄的水性隔室分隔的同心双层。脂质体设计可以包含但不限于调理素

或配体,以便改善脂质体与靶组织/细胞的附着,或激活事件,例如但不限于内吞作用。脂质体可含有低或高pH以改善物质(例如,本发明所述核酸)的递送。

[0070] 在一些实施方式中,所述组合物包含但不限于例如由1,2-二油酰氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DODMA)脂质体、来自Marina Biotech(Bothell,Wash.)的DiLa2脂质体、1,2-二亚林酰氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-DMA)、2,2-二亚林酰氧基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]二氧戊环(DLin-KC2-DMA)和MC3形成的脂质体,以及例如但不限于来自Janssen Biotech,Inc.(Horsham,Pa.)的DOXIL®脂质体。

[0071] 在一些实施方式中,所述组合物包含阳离子脂质。任意合适的阳离子脂质可用于本发明所述组合物中。合适的阳离子脂质包含但不限于DLin-DMA、DLin-D-DMA、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA和氨基醇脂质。在一些实施方式中,所述组合物包含阳离子脂质复合物,例如,聚乙二醇(PEG)-阳离子脂质复合物(PCLC)。在一些实施方式中,所述阳离子脂质是聚乙二醇化的,例如2kDa PEG(“PEG2000”)。可以使用任何合适的选项来聚乙二醇化阳离子脂质。在一些实施方式中,通过将PEG和阳离子脂质的混合物暴露于一个或多个冷冻/解冻循环,例如,1个、2个、3个、4个、5个或更多个冷冻/解冻循环来形成PCLC。在一些实施方式中,冷冻/解冻循环包含用液氮(例如,约-190°C)冷冻混合物约5分钟,并在约60°C下解冻约5分钟。本发明的核酸可以与PCLC混合以产生核酸和PCLC的复合物。

[0072] 在一些实施方式中,所述组合物包含酪蛋白,例如,酪蛋白胶束。在一些实施方式中,所述组合物包含壳聚糖。在一些实施方式中,所述组合物包含酪蛋白和壳聚糖。在一些实施方式中,所述组合物包含酪蛋白-壳聚糖复合物。在一些实施方式中,所述组合物中分离的核酸被包封在酪蛋白-壳聚糖复合物中。在一些实施方式中,所述组合物包含一种或多种磷酸蛋白: α -s1酪蛋白、 α -s2酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白。在一些实施方式中,所述组合物包含两种或更多种、三种或更多种或全部四种磷酸蛋白: α -s1酪蛋白、 α -s2酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白。所述磷酸蛋白可以以任何合适的浓度(相对于彼此,并且相对于组合物的总体积)存在于组合物中,并且在一些实施方式中,以适合形成酪蛋白胶束的量存在。在一些实施方式中,所述酪蛋白磷酸蛋白以约5%至10%(重量/体积)共同存在于组合物中。除非另有说明,否则术语重量/体积的使用假定1g/100mL=1%w/v。在一些实施方式中,酪蛋白磷酸蛋白以约8%(重量/体积)共同存在于组合物中。酪蛋白磷酸蛋白可以来自任意合适动物,例如哺乳动物,例如但不限于人、非人类灵长类动物、牛、猪、马、骆驼、山羊和绵羊。在一些实施方式中,所述酪蛋白磷酸蛋白是牛 α -s1酪蛋白、牛 α -s2酪蛋白、牛 β -酪蛋白和牛 κ -酪蛋白。具有EV的合适酪蛋白制剂提供于,例如,Aminzadeh等人,J Extracell Vesicles.2021年1月;10(3):e12045中,其全部内容通过引用并入本文。在一些实施方式中,用本发明提供的酪蛋白制成的本发明的组合物(例如药物组合物)适合于向受试者口服给药。

[0073] 在一些实施方式中,一种用于增强本发明所述治疗性核酸的口服生物利用度的组合物包含在生理学上相容的赋形剂中的选自 α -s1酪蛋白、 α -s2酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白的至少两种磷酸蛋白,其中磷酸蛋白以组合物的约5%至约10%(重量/体积)的量存在。在一些实施方式中,所述组合物包含组合物中的磷蛋白质量的约0%至约50%(例如,约10%至约45%,约20%至约40%,约25%至约40%,约包含30%至约40%)(按重量计)的量的 α -s1酪蛋白、约0%至约20%(例如,约5%至约15%,约7%至约12%,包含约8%至约

12%) (按重量计)的量的 α -s2酪蛋白、约0%至约50% (例如,约10%至约45%,约20%至约40%,约25%至约40%,约包含30%至约40%) (按重量计)的量的 β -酪蛋白和约0%至约20% (例如,约5%至约18%,约8%至约18%,包含约10%至约15%) (按重量计)的量的 κ -酪蛋白。本发明所述组合物可提高治疗性核酸,例如非编码RNA的口服生物利用度。在一些实施方式中,所述治疗性核酸包含RNA,例如但不限于mRNA和非编码RNA (例如,miRNA、lncRNA)。在一些实施方式中,所述有效载荷是合成分子,例如小分子或药物。

[0074] 在一些实施方式中,本发明提供的制剂为脂质键囊泡形式,例如,胶束或脂质体,因此可包含任意合适数量的粒子。在一些实施方式中,胶束 (例如,酪蛋白-壳聚糖涂覆的胶束) 的量在约 10^6 至约 10^{10} 粒子的范围内,例如,约 2×10^6 至约 10^{10} 粒子、约 5×10^6 至约 10^{10} 粒子、约 10^7 至约 5×10^9 粒子、约 2×10^7 至约 5×10^9 粒子、约 5×10^7 至约 5×10^9 粒子,包含约 1×10^8 至约 2×10^9 粒子。在一些实施方式中,在群体中胶束 (例如,酪蛋白-壳聚糖涂覆的胶束) 的量为约 10^6 、约 2×10^6 、约 5×10^6 、约 10^7 、约 2×10^7 、约 5×10^7 、约 10^8 、约 2×10^8 、约 5×10^8 、约 10^9 、约 2×10^9 、约 5×10^9 、或约 10^{10} 粒子,或前述值中的任何两个之间的量。

[0075] 在一些实施方式中,所述组合物包含酪蛋白-壳聚糖涂覆的脂质胶束,其中所述酪蛋白磷酸蛋白以合适的量 (例如,组合物中合适的磷酸蛋白质量总量、相对于彼此的合适比例的磷酸蛋白) 存在于组合物中。在一些实施方式中,所述组合物包含选自 α -s1酪蛋白、 α -s2酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白中的两种、三种或全部四种磷酸蛋白。在一些实施方式中,所述组合物中磷酸蛋白的量取决于组合物中存在的一种或多种其它磷酸蛋白的量。

[0076] 在一些实施方式中,所述 α -s1酪蛋白是与基因名称CSN1S1相关的磷酸蛋白。所述 α -s1酪蛋白可以是来自任意合适哺乳动物的CSN1S1磷酸蛋白。在一些实施方式中,所述 α -s1酪蛋白是牛 (Gene ID:282208)、猪 (Gene ID:445514)、马 (Gene ID:100033982)、绵羊 (Gene ID:443382)、山羊 (GeneID:100750242)、骆驼 (Gene ID:105090954) 或人 (Gene ID:1446) 的 α -s1酪蛋白。在一些实施方式中,所述 α -s1酪蛋白是非人 α -s1酪蛋白。在一些实施方式中, α -s1酪蛋白是具有与SEQ ID NO:26所示序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或约100%相同的氨基酸序列的多肽。

[0077] 在一些实施方式中,所述组合物包含任意合适量的 α -s1酪蛋白。在一些实施方式中,所述组合物包含 α -s1酪蛋白,其量按重量计占组合物中的磷酸蛋白质量的约0%至约50%,例如,约5%至约50%,约10%至约50%,约15%至约45%,约20%至约45%,包含约25%至约40%。在一些实施方式中,所述组合物包含按重量计约0%、5%、10%、15%、20%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%的 α -s1酪蛋白,或由前述值中的任何两个限定的范围内的量。

[0078] 在一些实施方式中,所述 α -s2酪蛋白是与基因名称CSN1S2相关的磷酸蛋白。所述 α -s2酪蛋白可以是来自任意合适哺乳动物的CSN1S2磷酸蛋白。在一些实施方式中,所述 α -s2酪蛋白是牛 (Gene ID:282209)、猪 (Gene ID:445515)、马 (Gene ID:100327035)、绵羊 (Gene ID:443383)、山羊 (GeneID:100861229) 或骆驼 (Gene ID:105090951) 的 α -s2酪蛋白。在一些实施方式中, α -s2酪蛋白是具有与SEQ ID NO:27所示序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或约100%相同的氨基酸序列的多肽。

[0079] 所述组合物可包含任意合适量的 α -s2酪蛋白。在一些实施方式中,所述组合物包含 α -s2酪蛋白,其量按重量计占组合物中的磷酸蛋白质量的约0%至约20%,例如约2%至

约18%、约3%至约18%、约4%至约17%、约5%至约16%、包含约5%至约15%。在一些实施方式中,所述组合物包含按重量计约0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、18%、20%的 α -s2酪蛋白,或由前述值中的任何两个限定的范围内的量。

[0080] 在一些实施方式中,所述 β -酪蛋白是与基因名称CSN2相关的磷酸蛋白。所述 β -酪蛋白可以是来自任意合适哺乳动物的CSN2磷酸蛋白。在一些实施方式中,所述 β -酪蛋白是牛(Gene ID:281099)、猪(Gene ID:404088)、马(Gene ID:100033903)、绵羊(Gene ID:443391)、山羊(Gene ID:100860784)、骆驼(Gene ID:105080412)或人(Gene ID:1447)的 β -酪蛋白。在一些实施方式中,所述 β -酪蛋白是非人 β -酪蛋白。在一些实施方式中,所述 β -酪蛋白是具有与SEQ ID NO:28或29所示序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或约100%相同的氨基酸序列的多肽。

[0081] 所述组合物可包含任意合适量的 β -酪蛋白。在一些实施方式中,所述组合物包含 β -酪蛋白,其量按重量计占组合物中的磷酸蛋白质量的约0%至约50%,例如约5%至约50%,约10%至约50%,约15%至约45%,约20%至约45%,包含约25%至约40%。在一些实施方式中,所述组合物包含按重量计约0%、5%、10%、15%、20%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%的 β -酪蛋白,或由前述值中的任何两个限定的范围内的量。

[0082] 在一些实施方式中,所述 κ -酪蛋白是与基因名称CSN3相关的磷酸蛋白。所述 β 酪蛋白可以是来自任意合适哺乳动物的CSN3磷酸蛋白。在一些实施方式中,所述 κ -酪蛋白是牛(Gene ID:281728)、猪(Gene ID:445511)、马(Gene ID:100033983)、绵羊(Gene ID:443394)、山羊(Gene ID:100861231)、骆驼(Gene ID:105080408或105090949)或人(Gene ID:1448)的 κ -酪蛋白。在一些实施方式中,所述 κ -酪蛋白是非人 κ -酪蛋白。在一些实施方式中,所述 κ -酪蛋白是具有与SEQ ID NO:30所示序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或约100%相同的氨基酸序列的多肽。

[0083] 所述组合物可包含任意合适量的 κ -酪蛋白。在一些实施方式中,所述组合物包含 κ -酪蛋白,其量按重量计占组合物中的磷酸蛋白质量的约0%至约20%,例如约2%至约18%、约3%至约18%、约4%至约17%、约5%至约16%、包含约5%至约15%。在一些实施方式中,所述组合物包含按重量计约0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、18%、20%的 κ -酪蛋白,或由前述值中的任何两个限定的范围内的量。

[0084] 在一些实施方式中,使用来自不同物种的酪蛋白的组合。例如,在一些实施方式中,一种或多种人酪蛋白与一种或多种牛酪蛋白组合使用。在一些实施方式中使用酪蛋白的比率,例如 α -s1酪蛋白: α -s2酪蛋白: β -酪蛋白: κ -酪蛋白的比率为3:1:3:1。在一些实施例中,可以使用不同的比率,例如4:1:4:1、2:1:2:1、或1:1:1:1。所述组合物中任意两种给定的酪蛋白之间也可以使用范围为1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、10:1、1:5、1:4、1:3、1:2等的比率。

[0085] 组合物中可存在任意合适总量的磷酸蛋白。在一些实施方式中,所述磷酸蛋白以组合物的5%至约10%,例如,约6%至约10%,约6%至约9%,包含约6%至约8%(重量/体积)的量存在。在一些实施方式中,所述磷酸蛋白以组合物的约5%、6%、7%、8%、9%、10%

的量或由前述值中的任何两个(重量/体积)限定的范围内的量存在。

[0086] 在一些实施方式中,一种或多种酪蛋白磷酸蛋白是非人酪蛋白磷酸蛋白。在一些实施方式中,所述外泌体和至少一种酪蛋白磷酸蛋白来自不同的物种。在一些实施方式中,所述外泌体是人外泌体,且一种或多种酪蛋白磷酸蛋白是非人酪蛋白磷酸蛋白。在一些实施方式中,所述外泌体是人外泌体,且一种或多种酪蛋白磷酸蛋白是牛(或绵羊、猪、山羊、骆驼或马)酪蛋白磷酸蛋白。

[0087] 在一些实施方式中,所述组合物包含由至少一部分酪蛋白磷酸蛋白形成的胶束结构。在一些实施方式中,所述酪蛋白胶束基本上是球形的。在一些实施方式中,所述组合物中的酪蛋白胶束的平均直径(按胶束测量)为约40nm、约50nm、约60nm、约70nm、约80nm、约90nm、约100nm、约110nm、约120nm、约130nm、约150nm、约200nm、约250nm、约300nm、约350nm、约400nm、约450nm、约500nm或更大,或平均直径在由前述值中的任何两个限定的范围内。在一些实施方式中,所述组合物中的酪蛋白胶束的平均直径(按胶束测量)为约40nm至约500nm,例如约40nm至约400nm、约50nm至约300nm、约60nm至约250nm、约70nm至约250nm、约80nm至约200nm,包含约90nm至约150nm。本发明组合物所述酪蛋白胶束通常不沉淀或呈凝胶形式。

[0088] 在一些实施方式中,所述组合物包含一种或多种胶体矿物质(例如,悬浮液中的矿物质)。在一些实施方式中,使用复合(例如,两种或更多种)矿物质作为胶体矿物质复合物。所述胶体矿物质复合物可包含任意合适的矿物质化合物和/或其盐。在一些实施方式中,所述胶体矿物质复合物包含但不限于钙、镁、无机磷酸盐、柠檬酸盐、钠、钾和氯化物或它们各自的盐中的一种或多种。在一些实施方式中,所述胶体矿物复合物以组合物中的磷酸蛋白质量的约2%至约15%,例如,约2%至约12%、约5%至约10%、约5%至约9%,包含约6%至约9%(按重量计)的量存在。在一些实施方式中,所述胶体矿物复合物以约2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%的量或由前述百分比中的任何两个限定的范围内的量存在。

[0089] 本发明所述组合物通常包含生理学上相容的赋形剂,例如但不限于水或缓冲剂。通常,所述生理学上相容的赋形剂是基本上不干扰酪蛋白磷酸蛋白的保护特性(例如,基本上不干扰由酪蛋白磷酸蛋白形成的胶束结构和/或它们的保护性质)的赋形剂。合适的生理学相容性赋形剂包含但不限于盐水、水性缓冲溶液、溶剂和/或分散介质。在一些实施方式中,所述生理学相容性赋形剂是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。可用作生理学相容性赋形剂的材料的其他非限制性实例包含:(1)糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素和乙酸纤维素;(4)粉末状黄芪胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)润滑剂,例如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石;(8)可可脂和栓剂蜡;(9)油,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇,例如丙二醇;(11)多元醇,例如甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇(PEG);(12)酯,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏液;(19)乙醇;(20)pH缓冲溶液;(21)聚酯、聚碳酸酯和/或聚酐;(22)膨胀剂,例如多肽和氨基酸(23)血清组分,例如血清白蛋白、HDL和LDL;(22)C2-C12醇,例如乙醇;和(23)药物制剂中使用的其它无毒的相容物质。在一些实施方式中,所述生理学相容性赋形剂是饮料。在一些实施方式中,所

述生理学相容性赋形剂是液体婴儿配方。在一些实施方式中,所述赋形剂抑制活性剂例如,含核酸的胶束的降解。

[0090] 在一些实施方式中,所述组合物包含酪蛋白胶束,所述酪蛋白胶束包含以下(按重量计):约30%至40%(例如,约36%)的 α -s1酪蛋白、约5%至15%(例如,约10%)的 α -s2酪蛋白、约30%至40%(例如,约34%)的 β -酪蛋白、约5%至15%(例如,约12%)的 κ -酪蛋白和约7%的磷酸盐缓冲盐水中的胶体矿物质复合物(包含磷酸盐、钙、镁和柠檬酸盐),其中酪蛋白磷酸蛋白的总量为组合物的约8%(重量/体积)。

[0091] 如本发明所述,还提供了制备用于增强治疗性核酸的口服生物利用度的组合物的方法。所述方法通常包含在足以形成包含组合物中的至少两种磷酸蛋白的胶束的条件下,将以下物质组合:治疗性核酸、选自 α -s1酪蛋白、 α -s2酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白中的至少两种磷酸蛋白;和生理学上相容的赋形剂。可以使用任意合适的选项来组合组合物的组分。在一些实施方式中,首先将酪蛋白磷酸蛋白与生理上相容的赋形剂组合以制备酪蛋白组合物,然后将核酸与酪蛋白组合物组合以产生用于增强核酸的口服生物利用度的组合物。可以使用任意合适的选项来产生酪蛋白组合物。例如在欧洲专利No. 2732710B1中描述了提供一种具有酪蛋白磷酸蛋白的组合物的合适方法,其全部公开内容通过引用并入本文。

[0092] 在一些实施方式中,保存组合物的一种或多种组分,并且可以将其重构成用于向受试者口服给予核酸的组合物。在一些实施方式中,保存所述组合物的酪蛋白磷酸蛋白,并将其重构到组合物中,用于向受试者口服给予核酸。在一些实施方式中,所述核酸被保存,并且被重构成用于口服给予受试者的组合物(例如,具有酪蛋白磷酸蛋白和生理学上相容的赋形剂的组合物)。如本发明所使用,“保留”可描述其中如本文所述的核酸的功能活性(无论是单独的,还是整合到本文提供的组合物中)在标准储存条件下保持至少限定的时间段的状态。在一些实施方式中,与保存之前的功能活性相比,所述保存的核酸在储存之后重构时保留功能活性的10%或更多,例如20%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、75%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、95%或更多或约100%。

[0093] 在一些实施方式中,将所述核酸(例如,包封在酪蛋白-壳聚糖涂覆的胶束中)保存并在标准储存条件下储存1天或更多,例如,2天或更多、5天或更多、2周或更多、1个月或更多、3个月或更多、6个月或更多、1年或更多、3年或更多、5年或更多,包含10年或更多。在一些实施方式中,将所述核酸(例如,包封在酪蛋白-壳聚糖涂覆的胶束中)保存并在标准储存条件下储存1天至5年,例如5天至3年、10天至2年、1个月至1年,包含3个月至6个月。

[0094] 在一些实施方式中,将所述核酸(例如,包封在酪蛋白-壳聚糖涂覆的胶束中)在任何合适的标准储存条件下储存。在一些实施方式中,标准储存条件包含25°C或更低的温度,例如,20°C或更低、15°C或更低、10°C或更低、5°C或更低、0°C或更低、-10°C或更低、-20°C或更低、-30°C或更低、-40°C或更低、-50°C或更低、-60°C或更低、-70°C或更低,包含-80°C或更低。在一些实施方式中,标准储存条件具有在-90°C至-80°C、-80°C至-70°C、-70°C至-60°C、-60°C至-50°C、-50°C至-40°C、-40°C至-30°C、-30°C至-20°C、-20°C至-10°C、-10°C至-5°C、-5°C至0°C、0°C至5°C、5°C至10°C、10°C至15°C、15°C至20°C、20°C至25°C、25°C至30°C或30°C至35°C范围内的温度。在一些实施方式中,标准储存条件是在室温和标准大气压下。

[0095] 在一些实施方式中,所述核酸(例如,包封在酪蛋白-壳聚糖涂覆的胶束中)以任意合适的方式保存。在一些实施方式中,是冷冻的。冷冻外泌体的方法描述于例如Bosch等人, Sci Rep.2016年11月8日;6:36162。在一些实施方式中,是冻干的。冻干外泌体的方法描述于例如PCT公开号W02018070939中。

[0096] 在一些实施方式中,使用任意合适的选项将所述核酸(例如,包封在酪蛋白-壳聚糖涂覆的胶束中)重构成组合物。在一些实施方式中,将所述外泌体重构成生理学上可接受的赋形剂,例如水或缓冲溶液。

[0097] 本发明所述组合物用于需要系统性递送治疗性核酸(例如,编码或非编码RNA)的各种情况,例如,用于治疗可通过系统性递送治疗性核酸治疗的病症或疾病。因此,本发明提供了包含向受试者口服给予本发明所述任何组合物的方法。在一些实施方式中,所述受试者患有或有发生肌肉退行疾病的风险,并且所述组合物包含治疗性核酸,从而治疗肌肉退行疾病。在一些实施方式中,所述受试者是人。

[0098] 当口服给予组合物时,本发明所述组合物可提供治疗性核酸的增强的生物利用度。在一些实施方式中,与合适的对照组合物(例如,一个不包含酪蛋白磷酸蛋白、壳聚糖聚合物和/或酪蛋白-壳聚糖复合物的组合物)相比,生物利用度增强。在一些实施方式中,与对照组合物的口服生物利用度相比,所述组合物中治疗性核酸的口服生物利用度增强约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约11倍、约12倍、约13倍、约14倍、约15倍、约16倍、约17倍、约18倍、约19倍、约20倍、约25倍、约30倍、约40倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍、约100倍、约200倍、约300倍、约400倍、约500倍、约1000倍、约2000倍、约5000倍、约10000倍或更多,或增强由前述值中的任何两个限定的范围内的倍数量。

[0099] 在一些实施方式中,增强的口服生物利用度包括增加有效载荷分子类别中不同物种的代表性(例如,所有核酸序列中的独特核酸序列)。在一些实施例中,在一类有效载荷分子中,基本上所有物种都具有生物可利用性。在一些实施方式中,在一类有效载荷分子中的至少约50%,例如,至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约97%、至少约98%,包含至少约99%的物种具有生物可利用性。在一些实施方式中,所述有效载荷分子是外泌体核酸。在一些实施方式中,所述有效载荷分子是mRNA、ncRNA、lncRNA或miRNA。在一些实施方式中,所述有效载荷分子是蛋白质。在一些实施方式中,所述有效载荷分子是小分子。在一些实施方式中,所述有效载荷分子是合成的有效载荷,例如,合成核酸、蛋白质或小分子。

[0100] 在一些实施方式中,通过组合物在口服给药后约1周内、约5天内、约3天内、约1天内、约18小时内、约12小时内、约10小时内、约8小时内、约6小时内、约5小时内、约4小时内、约3小时内、约2小时内、约1小时内、约30分钟内、约15分钟内或由前述值中的任何两个限定的范围内的任何时间间隔内实现了增强口服生物利用度。

[0101] 在一些实施方式中,所述壳聚糖是低分子量壳聚糖。在一些实施方式中,所述壳聚糖的质量范围约为50至约190千道尔顿。在一些实施方式中,使用较高分子量壳聚糖。在一些实施方式中,所述壳聚糖以约0.001至约0.1%重量/体积的量存在。在一些实施方式中,所述壳聚糖以约0.01至约0.1%重量/体积的量存在。在一些实施方式中,所述壳聚糖以约0.05至约0.1%重量/体积的量存在。

[0102] 在一些实施方式中,基于制剂的各种组分的比率生成制剂。例如,酪蛋白与RNA与壳聚糖的比率为约1000:1:25至约500:1:15(%w/v)。在一些实施方式中,酪蛋白与RNA的比率为约500:1至约1000:1。在一些实施方式中,RNA与壳聚糖的比率为约1:10至约1:50。在一些实施方式中,相对于每微克所用RNA,这些比率与范围为约0.5微升至约3微升体积的脂质体一起使用。组合物的任何两种给定组分之间也可以使用范围为1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、10:1、50:1、100:1、1000:1、1:1000、1:500、1:100、1:50、1:5、1:4、1:3、1:2等的比率。

[0103] 在一些替代实施方式中,所述组合物包含细胞外囊泡(EV),例如,外泌体。所述细胞外囊泡(EV)可以来自任意合适来源,例如衍生自心肌球衍生细胞(CDC)或来自成纤维细胞的EV。合适的EV,例如CDC衍生的EV,提供于例如,美国申请公开号20080267921、20160158291和20160160181;Smith等人,Circulation.2007.115:896-908;Aminzadeh, M.A.等人Stem Cell Reports 10,942-955(2018);和Ibrahim等人,Stem Cell Reports.2014年5月8日;2(5):606-19,Ibrahim,A.G.等人Nanomedicine 33,102347(2020),其全部内容通过引用并入本文。在一些实施方式中,所述EV是从由培养物中的人CDC调节的无血清培养基中分离的那些。在一些实施方式中,所述组合物包含EV和脂质体和/或PCLC作为转染试剂。在一些实施方式中,所述组合物基本上不含CDC衍生的EV。

[0104] 根据实施方式,本发明公开的EV,例如外泌体的大小可以变化。根据实施例,所述EV的尺寸的直径范围约为15nm至约95nm,包含约15nm至约20nm、约20nm至约30nm、约30nm至约40nm、约40nm至约50nm、约50nm至约60nm、约60nm至约70nm、约70nm至约80nm、约80nm至约90nm、约90nm至约95nm及其重叠范围。在一些实施例中,EV较大(例如,范围从约140nm至约210nm,包含约140nm至约150nm、约150nm至约160nm、约160nm至约170nm、约170nm至约180nm、约180nm至约190nm、190nm至约200nm、约200nm至约210nm及其重叠范围)。在一些实施例中,EV直径在约15nm至约200nm的范围内,包含约15nm至约20nm、约20nm至约30nm、约30nm至约40nm、约40nm至约50nm、约50nm至约60nm、约60nm至约70nm、约70nm至约80nm、约80nm至约90nm、约90nm至约100nm、约100nm至约110nm、约110nm至约120nm、约120nm至约130nm、约130nm至约140nm、约140nm至约150nm、约150nm至约160nm、约160nm至约170nm、约170nm至约180nm、约180nm至约190nm、约190nm至约200nm及其重叠范围。在一些实施例中,从原始细胞体生成的EV在至少一个维度(例如,直径)上比原始细胞体小100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000或10000倍。

[0105] 包含本发明所述EV和核酸的组合物可以使用任何合适的选项来制备。在一些实施方式中,将所述核酸装载到EV中包含:将核酸与脂质体和/或PCLC配制,例如如上所述,以产生核酸-脂质体混合物;将核酸-脂质体混合物与EV组合;以及富集与外泌体标记物相关的EV,以产生富集核酸的EV群体。可以使用任何合适的选项将核酸-脂质体混合物与EV组合。在一些实施方式中,所述核酸-脂质体混合物与EV在37°C下在摇动下组合约30分钟或更长时间。富集以产生富集核酸的EV群体可以使用任何合适的选项来完成。在一些实施方式中,所述富集与外泌体标记物相关的EV包含使用对外泌体标记特异性的抗体免疫沉淀与外泌体标记相关的EV。在一些实施方式中,所述外泌体标记物是CD9、CD63和CD81中的一种或多种。在一些实施方式中,所述富集与外泌体标志物相关的EV包含免疫沉淀与所有外泌体标志物CD9、CD63和CD81相关的EV。在一些实施方式中,所述富集核酸的EV群体的大小分布基本上是单峰的。在一些实施方式中,至少80%、85%、90%、95%、97%、99%的群体的直径在

尺寸分布中具有单个峰。在一些实施方式中,所述富集核酸的EV群体的平均直径为约50至180nm,例如60至170nm、70至160nm、80至150nm、90至140nm、100至130nm或约110至130nm。

[0106] 核酸

[0107] 如上所述,核酸治疗剂提供了以遗传水平治疗疾病的潜力。因为常规治疗通常靶向蛋白质,而不是潜在的遗传原因,所以诱导的治疗效果可能是短暂的。相反,核酸治疗具有经由基因抑制、添加、替换或编辑的持久(或甚至永久,例如,治愈)效果的潜力。如本文所公开的,核酸治疗剂的成功使用将影响改善稳定性和/或生物利用度的递送技术。

[0108] 在一些实施方式中,本文提供的制剂允许增强核酸向受试者的递送。在一些实施方式中,所述核酸包含DNA。在一些实施方式中,所述核酸包含RNA。在一些实施方式中,所述核酸包含编码RNA(例如,信使RNA或mRNA)。在一些实施方式中,所述核酸包含非编码RNA(ncRNA)。mRNA可以通过递送编码产生治疗效果的蛋白质的序列来提供治疗效果。根据实施方式,其可以是取代非功能性蛋白质的蛋白质。在其它实施方式中,编码RNA可以编码需要免疫应答的蛋白质(例如,病毒蛋白质),例如用于产生针对该蛋白质的抗体。已知ncRNA基于其增加抗炎细胞因子分泌或减少炎性细胞因子分泌的能力而表现出阳性治疗效果。某些ncRNA表现出心脏保护性、抗纤维化和/或抗肥厚作用。

[0109] 非编码RNA(ncRNA)越来越多地被认为是生物活性的。衍生自祖细胞的细胞外囊泡(EV)含有大量和不同的ncRNA;心肌球衍生细胞,例如分泌富含小Y RNA的EV。可以使用本发明提供的制剂递送表现出治疗效果的核酸。作为非限制性实例,可以根据本发明公开的实施方式使用抑制分离的巨噬细胞中的肥厚、炎症和纤维化基因家族、恢复心脏功能和锻炼耐力和/或减少心力衰竭和炎症的血清生物标志物的ncRNA。另外,可以使用拮抗ERK/Map激酶的上调、组织中的纤维化和炎症信号传导的ncRNA。根据本发明公开的实施方式,可以使用表现出对病理过程的积极作用的任何ncRNA,所述病理过程为如缺血(心肌梗塞)、肌肉退行(裘馨氏肌肉萎缩症)和自身免疫(硬皮病)或表现出其他积极的改变疾病的生物活性。表1包含用于治疗与炎症和/或纤维化相关的疾病的治疗剂的这种ncRNA的非限制性实例。

[0110] 表1

[0111]

名称	序列	SEQ ID NO:
EV-YF1 变体 2 由 5 起始	CUGGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAGAACUUAUUAAC AUUAGUGUCACUAAAGU	7
EV-YF1 变体 2 由 m5_54U 至 A	CUGGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAGAACUUAUUAAC AUUAGUGUCACUAAAGA	8
EV-YF1 变体 2 由 m5_54U 至 A LNA_Gapmer	CUGGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAGAACUUAUUA CAUUAGUGUCACUAAAGA	9
EV-YF1 变体 2 从 m5_54U 至 A LNA_Mixmer	CUGGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAGAACUUAUUA CAUUAGUGUCACUAAAGA	10
TY4 (原始)	GGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG	11
TY4 1G 至 C	<u>C</u> GUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG	12
TY4 1G 至 C LNA_Gapmer	<u>C</u>GUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG	13
TY4 1G 至 C LNA_Mixmer	<u>C</u>GUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG	2
EV-YF1	GGCUGGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAGAACUUAUU AACAUUAGUGUCACUAAAGU	1
Fomivirsen	GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCG	14
Mipomersen	GCCUCAGTCTGCTTCGCACC	15
Nusinersen	UCACUUUCAUAAUGCUGG	16
Eteplirsen	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	17
Inotersen	TCTTGTTTACATGAAATCCC	18
Patisiran	GUAACCAAGAGUAUUCCAUTT	19
Golodirsen	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	20
Givosiran	CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA	21
Viltolarsen	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	22

[0112]

名称	序列	SEQ ID NO:
Volanesorsen	AGCTTCTTGTCAGCTTTAT	23
Inclisiran	CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU	24
Lumasiran	GACUUUCAUCCUGGAAUAUA	25
piR-659/piREX1	CCCCCAGCUGCUAAAUUUGACUGGUU	31
piR-659/piREX1 U 至 A	CCCCCAGCUGCUAAAUUUGACUGGUA	32

[0113] 本发明提供了分离的核酸,其包含CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG (SEQ ID NO:12) 或其变体的核苷酸序列。在一些实施方式中,所述核酸是RNA。在一些实施方式中,所述核酸包含与CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG (SEQ ID NO:12) 或与本文提供的任何核酸序列至少80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、98%、99%相同的核苷酸序列。在一些实施方式中,所述核酸包含CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG (SEQ ID NO:12) 的核苷酸序列,其序列变异在核苷酸序列中的至多1、2、3、4或5个位置。如本发明所使用,相对于核苷酸序列或核酸的5'末端定义核苷酸序列或核酸内的“位置”。在一些实施方式中,所述核酸的核苷酸序列为CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG (SEQ ID NO:12) 或其序列变体。所述核酸可以是任何合适的长度。在一些实施方式中,所述核酸的长度为24个核苷酸(nt)。在一些实施方式中,所述核酸的长度为16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40nt或更长。在一些实施方式中,所述核酸的长度至多为30nt。在一些实施方式中,所述核酸的长度为16nt至30nt,或24nt至30nt。

[0114] 本发明的核酸可以是单链或双链的(例如,RNA/DNA杂交体)。在一些实施方式中,所述核酸是单链的。

[0115] 在一些实施方式中,本发明的分离的核酸包含一个或多个化学修饰的核苷酸,例如具有修饰的主链的核苷酸。通常,化学修饰是基本上保留或增强核酸的治疗潜力的化学修饰。所述核酸的任何合适数量的核苷酸可以被化学修饰。在一些实施方式中,所述核酸包含1个或更多、2个或更多、3个或更多、4个或更多、5个或更多、6个或更多、7个或更多、8个或更多、9个或更多、10个或更多、11个或更多、12个或更多、13个或更多、14个或更多、15个或更多、16个或更多、17个或更多、18个或更多、19个或更多、20个或更多、21个或更多、22个或更多、23个或更多、24个或更多、25个或更多、26个或更多、27个或更多、28个或更多、29个或更多、30个或更多化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含1至5、1至6、1至7、1至8、1至9、1至10、1至15、1至20、1至25或1至30个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含1至10个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含8个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含6个化学修饰的核苷酸。

[0116] 所述化学修饰的核苷酸可以以任何合适的方式沿着分离的核酸分布。在一些实施方式中,所述核酸包含在核酸的第一半部分内的至少一个化学修饰的核苷酸,例如核酸的5'半部分。在一些实施方式中,所述核酸包含在核酸的第二半部分内的至少一个化学修饰的核苷酸,例如核酸的3'半部分。在一些实施方式中,所述核酸包含在核酸的第一半部分内

的至少一个化学修饰的核苷酸,例如核酸的5'半部分,和在核酸的第二半部分内的至少一个化学修饰的核苷酸,例如核酸的3'半部分。在一些实施方式中,所述核酸包含从核酸的5'端起的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多核苷酸内的一个或多个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含从核酸的3'端起的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多核苷酸内的一个或多个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,在所述核酸中没有两个化学修饰的核苷酸彼此相邻。在一些实施方式中,所述核酸包含分别在从核酸的5'端起的1个、2个、3个、5个、5个、6个、7个、8个、9个、10个核苷酸内的1个、1个、2个、2个、3个、3个、4个、4个、5个、5个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含分别在从核酸的3'端起的1个、2个、3个、5个、5个、6个、7个、8个、9个、10个核苷酸内的1个、1个、2个、2个、3个、3个、4个、4个、5个、5个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸在核酸的5'半部分和3'半部分中包含相同数量的化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含距核酸5'端5个核苷酸内的3个化学修饰的核苷酸和/或距核酸3'端5个核苷酸内的3个化学修饰的核苷酸。

[0117] 在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸在CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG (SEQ ID NO:12) 或其序列变体或本发明提供的其他核酸序列的核苷酸序列内。在一些实施方式中,所述核酸包含在核苷酸序列的第一半部分内的至少一个化学修饰的核苷酸,例如核苷酸序列的5'半部分。在一些实施方式中,所述核酸包含在核苷酸序列的1至12位内的至少一个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含在核苷酸序列的第二半部分内的至少一个化学修饰的核苷酸,例如核苷酸序列的3'半部分。在一些实施方式中,所述核酸包含在核苷酸序列的13至24位内的至少一个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含在核苷酸序列的1至12位内的至少一个化学修饰的核苷酸,和在核苷酸序列的位置13至24内的至少一个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含在从核苷酸序列的5'端起的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多核苷酸内的一个或多个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含在从核苷酸序列的3'端起的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多核苷酸内的一个或多个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,在所述核苷酸序列中没有两个化学修饰的核苷酸彼此相邻。在一些实施方式中,所述核酸包含分别在从核苷酸序列的5'端起的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个核苷酸内的1个、1个、2个、2个、3个、3个、4个、4个、5个、5个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含分别在从核苷酸序列的3'端起的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个核苷酸内的1个、1个、2个、2个、3个、3个、4个、4个、5个、5个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸在核苷酸序列的5'半部分和3'半部分中包含相同数量的化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含距核苷酸序列的5'端5个核苷酸内的3个化学修饰的核苷酸和/或距核苷酸序列的3'端5个核苷酸内的3个化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸在核苷酸序列的5'半部分和3'半部分中包含不同数量的化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸在核苷酸序列的3'半部分中包含比5'半部分中更多数量的化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述核酸包含距核苷酸序列的5'端5个核苷酸内的3个化学修饰的核苷酸和/或距核苷酸序列的3'端5个核苷酸内的3个、4个或5个化学修饰的核苷酸。

[0118] 在一些实施方式中,所述分离的核酸包含在核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位上

的一个或多个位置处的化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述分离的核酸包含在核苷酸序列的1、3、5、20、22和24位上的化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述分离的核酸具有核苷酸序列CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG (SEQ ID NO:12) 或其序列变体,其中1、3、5、20、22和24位上的一个或多个被化学修饰。在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸增加核酸的体外和/或体内稳定性。在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸增加核酸的治疗效力,例如用于治疗炎症病症、心脏损伤或肌营养不良。

[0119] 在一些实施方式中,所述分离的核酸包含一种类型,或两种或更多种不同类型的化学修饰的核苷酸。在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸具有连接核苷酸糖环的2' - 0原子和4' - C原子以锁定构象(锁核酸(LNA))的亚甲基桥。在一些实施方式中,所述分离的核酸包含核苷酸序列CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG (SEQ ID NO:12) 或其序列变体,其中1、3、5、20、22和24位上的一个或多个是LNA。在一些实施方式中,所述分离的核酸具有核苷酸序列CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG (SEQ ID NO:12) 或其序列变体,其中1、3、5、20、22和24位上的一个或多个是LNA。在一些实施方式中,所述分离的核酸包含核苷酸序列CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG (SEQ ID NO:2) 或其序列变体,其中1、3、5、20、22和24位上是LNA。在一些实施方式中,分离的核酸具有核苷酸序列CGUCCGAUGGUAGUGGGUUAUCAG (SEQ ID NO:2),其中1、3、5、20、22和24位上是LNA。

[0120] 在一些实施方式中,所述分离的核酸可以包含任何合适的化学修饰。在一些实施方式中,所述化学修饰是主链修饰,例如糖/磷酸盐主链的修饰。在一些实施方式中,所述化学修饰是主链糖修饰。在一些实施方式中,所述化学修饰的核苷酸包含LNA。在一些实施方式中,所述化学修饰包含引入硫代磷酸酯基团作为核苷酸之间的接头。所述化学修饰的核苷酸的合适主链修饰包含但不限于硫代磷酸酯、磷酸三酯、甲基膦酸盐、短链烷基或环烷基糖间键或短链杂原子或杂环糖间键。在一些实施例中,所述化学修饰是碱修饰。

[0121] 可以使用任何合适的选项制备本发明所述核酸。合适的选项包含但不限于化学合成、酶促生产和/或生物生产。在一些实施方式中,使用化学合成制备所述核酸。可以使用化学合成核酸的任何合适的选项。合适的选项包含但不限于磷酸二酯、磷酸三酯、亚磷酰胺、亚磷酸酯-三酯和固相合成方法。在一些实施方式中,制备所述核酸包含体外转录。在一些实施方式中,使用重组DNA技术制备所述核酸。在一些实施方式中,通过化学修饰具有感兴趣的核苷酸序列的未修饰核酸来制备所述核酸。

[0122] 方法

[0123] 本发明提供了使用本发明的制剂(本文也称为“治疗方法”)用于治疗有需要的受试者的方法,所述制剂包含携带核酸(例如,RNA)作为治疗性有效载荷的口服制剂。可通过治疗方法治疗的病症包含但不限于与例如炎症和/或纤维化相关的疾病。病症包含但不限于心脏病症、肌肉紊乱、心肌梗塞、心脏紊乱、心肌病变、肌营养不良、纤维化疾病、炎症性疾病、病毒感染、硬皮病、射血分数保留型心力衰竭、败血症和/或伤口愈合。在一些实施方式中,通过本治疗方法治疗的病症是感染的症状和/或后遗症。在一些实施方式中,所述感染是病毒感染,例如呼吸道病毒感染,例如COVID-19,由于其他的冠状病毒引起的感染,或其他病毒病原体(例如,流感、H1N1、丙型肝炎、HIV等)。

[0124] 在一些实施方式中,治疗方法包含用于治疗肌肉紊乱(或肌肉病症)或其症状的方法,所述方法包含向需要治疗肌肉紊乱或其症状的受试者口服给予治疗有效量的一种或多

种含有本发明的核酸的组合物。所述肌肉紊乱可以是但不限于骨骼肌紊乱或心肌紊乱。在一些实施方式中,所述肌肉紊乱包含肌营养不良,例如,裘馨氏肌肉萎缩症。在一些实施方式中,受试者患有肌营养不良,或有发生肌营养不良的风险。在一些实施方式中,受试者在遗传上倾向于发生肌营养不良,例如,裘馨氏肌肉萎缩症。在一些实施方式中,受试者在肌营养不良蛋白基因中具有一个或多个突变,所述突变使受试者倾向于发生肌营养不良,例如裘馨氏肌肉萎缩症。

[0125] 在一些实施方式中,治疗方法包含用于治疗心脏病症或其症状的方法,所述方法包含向需要治疗心脏病症或其症状的受试者口服给予治疗有效量的包含本发明的核酸的一种或多种组合物。在一些实施方式中,所述受试者是人类受试者。在一些实施方式中,所述受试者是非人类受试者,例如非人类哺乳动物。

[0126] 可通过所述方法治疗多种心脏病症。在一些实施方式中,所述心脏病症包含心力衰竭或心肌梗塞的症状和/或后遗症。在一些实施方式中,所述心脏病症包含肥厚性心肌病。在一些实施方式中,所述心脏病症包含射血分数保留型心力衰竭(HFpEF)。

[0127] 在一些实施方式中,所述受试者处于发展心脏病症的风险中。在一些实施例中,受试者处于基于受试者的家族史、遗传倾向、生活方式和病史中的一个或多个发展心脏病症的风险中。在一些实施方式中,所述受试者在心肌肌钙蛋白I中具有突变,该突变使受试者倾向于发生肥厚性心肌病(HCM)。在一些实施方式中,受试者具有一种或多种心脏病症的合并症。在一些实施方式中,所述一种或多种合并症包含肥胖和高血压。在一些实施方式中,受试者患有或诊断患有心脏病症。

[0128] 在一些实施方式中,受试者表现出以下中的一种或多种:高血压、升高的E/e'比率、心脏肥大、心肌纤维化、肥胖、消瘦、耐力下降和系统性炎症标志物升高。在一些实施方式中,受试者患有高血压,并且给予治疗有效量的核酸(或其组合物)降低受试者的血压。在一些实施方式中,患有高血压的受试者具有超过130/90mmHg的静息血压。在一些实施方式中,患有高血压的受试者具有超过140/90mmHg的静息血压。在一些实施方式中,给予治疗有效量的核酸(或其组合物)降低受试者的收缩压或舒张压。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者的血压(收缩压或舒张压)降低至少约5%、7.5%、10%、12.5%、15%、17.5%、20%、25%、30%或更多,或降低由任何两个前述值限定的范围内的百分比。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者的血压(收缩压或舒张压)至少降低至被认为不再是高血压的水平。

[0129] 在一些实施方式中,受试者具有升高的E/e'比率,并且给予治疗有效量的核酸(或其组合物)降低E/e'比率。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者的E/e'比率降低至少约5%、7.5%、10%、12.5%、15%、17.5%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或更多,或降低由任何两个前述值限定的范围内的百分比。在一些实施方式中,在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后,受试者的E/e'比率至少降低至被认为不再临床相关的水平。

[0130] 在一些实施方式中,受试者患有心脏肥大,并且口服给予治疗有效量的包含核酸的组合物减少心脏肥大。可以使用任何合适的选项来测量心脏肥大。在一些实施方式中,使用超声心动描记术测量心脏肥大。在一些实施方式中,通过超声心动描记术测量,患有心脏肥大的受试者具有增加的舒张末期室间隔厚度(IVSd)和/或舒张末期左心室后壁厚度

(LVPWd), 并且给予治疗有效量的核酸(或其组合物)减少IVSd和/或LVPWd。在一些实施方式中, 在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后, 受试者的IVSd或LVPWd减少至少约5%、7.5%、10%、12.5%、15%、17.5%、20%、25%、30%或更多, 或减少由任何两个前述值限定的范围内的百分比。在一些实施方式中, 在给予治疗有效量的包含核酸的组合物之后, 受试者的IVSd或LVPWd至少降低至被认为不再肥厚的水平。

[0131] 在一些实施方式中, 受试者患有心肌纤维化, 并且口服给予治疗有效量的包含本发明提供的治疗性核酸的组合物防止或减少纤维化。如本发明所使用, “纤维化”可包含心肌的任何重塑(例如, 病理重塑), 例如但不限于纤维化和/或脂肪组织的沉积、用纤维化和/或脂肪组织替换肌肉组织等。使用任何合适的手段监测心脏纤维化, 例如活检、超声检查或MRI。在一些实施方式中, 口服给予包含本发明提供的治疗性核酸的组合物消除或延缓心肌纤维化和/或肌肉纤维化的发展。

[0132] 在一些实施方式中, 受试者表现出消瘦或体重减轻, 并且口服给予包含本发明提供的治疗性核酸的组合物延缓或防止消瘦。在一些实施方式中, 在给予治疗有效量的核酸(或其组合物)之后, 受试者表现出至多约20%、15%、10%、5%、3%或更低, 或由前述值中的任何两个限定的范围内的百分比的体重减轻。在一些实施方式中, 在口服给予包含本发明提供的治疗性核酸的组合物之后, 受试者的体重恢复到或基本上保持在治疗前水平。

[0133] 在一些实施方式中, 所述受试者表现出耐力下降, 例如锻炼耐力, 并且口服给予包含本发明提供的治疗性核酸的组合物延缓或防止耐力下降。在一些实施方式中, 在口服给予包含本发明提供的治疗性核酸的组合物之后, 受试者表现出至多约20%、15%、10%、5%、3%或更低, 或在由前述值中的任何两个限定的范围内的百分比的耐力下降。在一些实施方式中, 在口服给予包含本发明提供的治疗性核酸的组合物之后, 受试者的锻炼耐力恢复到或基本上保持在治疗前水平。在一些实施方式中, 在口服给予包含本发明提供的治疗性核酸的组合物之后, 受试者表现出至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%或更高, 或在由前述值中的任何两个限定的范围内的百分比的耐力改善。在一些实施方式中, 在口服给予包含本发明提供的治疗性核酸的组合物之后, 在治疗期间持续改善耐力。在一些实施方式中, 在口服给予包含本发明提供的治疗性核酸的组合物之后, 在多次给药中持续改善耐力。

[0134] 在一些实施方式中, 所述受试者表现出升高水平的系统性炎症标志物, 例如在外周血中。在一些实施方式中, 系统性炎症标记物包含IL-6和脑钠肽(BNP)中的一种或多种。在一些实施方式中, 在口服给予包含本发明提供的治疗性核酸(或其组合物)之后, 系统性炎症标志物降低至少约5%、7.5%、10%、12.5%、15%、17.5%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或更多, 或降低由任何两个前述值限定的范围内的百分比。在一些实施方式中, 在口服给予包含本发明提供的治疗性核酸的组合物之后, 受试者的全身性炎症标志物至少降低至被认为不再升高的水平。

[0135] 在一些实施方式中, 在受试者肥胖的情况下, 给予核酸的治疗效果独立于受试者的肥胖。在一些实施方式中, 口服给予包含本发明提供的治疗性核酸的组合物不影响受试者的重量。

[0136] 在一些实施方式中, 受试者表现出骨骼肌功能下降, 例如骨骼肌群施加的力或扭矩的量。在一些实施方式中, 受试者表现出降低的骨骼肌功能并且口服给予包含如本发明

所提供的治疗性核酸的组合物延缓了骨骼肌功能下降的发展、防止骨骼肌功能的恶化,或增强骨骼肌功能。在一些实施方式中,在口服给予包含本发明提供的治疗性核酸的组合物之后,受试者的骨骼肌功能恢复到或基本上保持在治疗前水平。在一些实施方式中,在口服给予包含本发明提供的治疗性核酸的组合物之后,受试者表现出至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%或更高的骨骼肌功能改善,或在由前述值中的任何两个限定的范围内的百分比。

[0137] 在一些实施方式中,口服给予包含本发明提供的治疗性核酸的组合物的任何治疗效果在治疗期间持续。在一些实施方式中,口服给予包含本发明提供的治疗性核酸的组合物的任何治疗效果跨多个给药剂量维持。在一些实施方式中,口服给予包含本发明提供的治疗性核酸的组合物的任何治疗效果在治疗期间不是瞬时的。

[0138] 在一些实施方式中,本发明的治疗方法用于治疗多种炎症病症中的任何一种或多种。在一些实施方式中,所述炎症病症是慢性病症。在一些实施方式中,所述炎症病症是响应IL-10的抗炎作用的病症。在一些实施方式中,所述炎症病症包含自身免疫疾病、移植宿主疾病(GVHD)或对器官移植的免疫应答。在一些实施方式中,所述炎症病症包含病毒感染、败血症、关节炎(类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、牛皮癣关节炎)、多发性硬化、天疱疹和1型糖尿病(也称为胰岛素依赖型糖尿病(IDDM))。在一些实施方式中,所述炎症病症包含白塞病、多肌炎/皮肌炎、自身免疫性细胞减少、自身免疫性心肌炎、原发性肝硬化、Goodpasture综合征、自身免疫性脑膜炎、Sjögren综合征、系统性红斑狼疮、阿迪森氏病、斑秃、强直性脊柱炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性腮腺炎、克罗恩病、胰岛素依赖型糖尿病、营养不良型大疱性表皮松解症、表皮炎、肾小球肾炎、格雷夫斯病、Guillain-Barré综合征、桥本病、溶血性贫血、多发性硬化、重症肌无力、寻常型天疱疮、银屑病、风湿性热、类风湿性关节炎、肉样瘤病、硬化、脊椎关节病、甲状腺炎、脉管炎、白癜风、黏液性水肿、恶性贫血和溃疡性结肠炎。在一些实施方式中,所述炎症与骨髓移植有关。在一些实施方式中,所述炎症与组织移植后的同种异体移植物排斥有关。在一些实施方式中,所述自身免疫性疾病是心脏自身免疫性疾病,例如自身免疫性心肌炎。

[0139] 在一些实施方式中,本发明所述的治疗方法,用于治疗多种感染性疾病中的任何一种或多种的症状和/或后遗症。在一些实施方式中,本发明所述的核酸治疗心脏病症或炎症病症,包含感染性疾病的症状和/或后遗症。在一些实施方式中,所述感染性疾病与心肌损伤相关。在一些实施方式中,所述心脏病症包含与感染性疾病相关的急性心肌炎。在一些实施方式中,所述炎症病症包含与感染性疾病相关的细胞因子风暴或超炎。在一些实施方式中,所述炎症病症包含急性肺损伤或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。

[0140] 在一些实施方式中,感染性疾病是通过但不限于以下病原体中的一种或多种的感染:病毒(包含但不限于,冠状病毒、人免疫缺陷病毒、单纯疱疹病毒、乳头瘤病毒、副流感病毒、流感病毒、肝炎病毒、柯萨奇病毒、带状疱疹病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹、狂犬病病毒、出血性病毒热、H1N1等)、阮病毒、寄生虫、真菌、霉菌、酵母和细菌(革兰氏阳性和革兰氏阴性)。在一些实施方式中,病原体包含但不限于白色念珠菌、黑曲霉菌、大肠杆菌(E.coli)、绿脓杆菌(P.aeruginosa),和金黄色葡萄球菌(S.aureus)、A族乙型溶血性链球菌、肺炎链球菌、结核分枝杆菌、空肠弯曲菌、沙门氏菌、志贺氏菌和多种耐药细菌。

[0141] 在一些实施方式中,所述炎症在病毒,例如DNA或RNA病毒感染之后或同时发生。在

一些实施方式中,所述病毒是RNA病毒,例如单链或双链病毒。在一些实施方式中,所述RNA病毒是正义单链RNA病毒。在一些实施方式中,所述病毒属于套式病毒目。在一些实施方式中,所述病毒属于冠病毒科家族。在一些实施方式中,所述病毒属于 α 冠状病毒、 β 冠状病毒、 γ 冠状病毒或 δ 冠状病毒属。在一些实施方式中,所述 α 冠病毒是但不限于人冠状病毒229E、人冠状病毒NL63或传染性胃肠炎病毒(TGEV)。在一些实施方式中, β 冠病毒是但不限于严重急性呼吸道综合征冠状病毒(SARS-CoV)、SARS-CoV-2(COVID-19)、中东呼吸道综合征(MERS-CoV)、人冠状病毒HKU1或人冠状病毒OC43。在一些实施方式中, γ 病毒是传染性支气管炎病毒(IBV)。

[0142] 核酸可以以任何合适的量(例如,本发明提供的口服制剂内的量)给予受试者。在一些实施方式中,核酸的治疗有效量包含约0.01 μ g、0.02 μ g、0.05 μ g、0.1 μ g、0.2 μ g、0.5 μ g、1 μ g、2 μ g、3 μ g、4 μ g、5 μ g、6 μ g、7 μ g、8 μ g、9 μ g、10 μ g、15 μ g、20 μ g、25 μ g、30 μ g、40 μ g、50 μ g、75 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、250 μ g、300 μ g、400 μ g、500 μ g、600 μ g、700 μ g、800 μ g、900 μ g、1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、10mg、15mg、20mg、30mg、40mg、50mg、75mg、100mg或更多,或由前述值中的任何两个限定的量。在一些实施方式中,核酸的治疗有效量包含以体重计约0.001 μ g/g、0.002 μ g/g、0.005 μ g/g、0.01 μ g/g、0.02 μ g/g、0.05 μ g/g、0.1 μ g/g、0.15 μ g/g、0.2 μ g/g、0.5 μ g/g、1 μ g/g、2 μ g/g、3 μ g/g、4 μ g/g、5 μ g/g、6 μ g/g、7 μ g/g、8 μ g/g、9 μ g/g、10 μ g/g、15 μ g/g、20 μ g/g、25 μ g/g、30 μ g/g、35 μ g/g、40 μ g/g、45 μ g/g、50 μ g/g、60 μ g/g、70 μ g/g、80 μ g/g、90 μ g/g、100 μ g/g或更多,或由前述值中的任何两个限定的量。

[0143] 核酸或组合物可以以任何合适的给药方案给予受试者。在一些实施方式中,向受试者给予治疗有效量的核酸或组合物不超过每周两次、每周一次、每两周一次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次、每四个月一次或更长,或以由前述值中的任何两个限定的范围内的频率给药。在一些实施方式中,将所述核酸给予受试者1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30或更多次。在一些实施方式中,以规则的间隔向受试者给予核酸。

[0144] 虽然本发明公开了可以使用任何合适的途径给药的制剂,但是所提供的制剂的一些实施方式出乎意料地适合于口服递送。或者,给药可以是局部的或系统性的。在一些实施方式中,是肠胃外给药。用于给药的合适选项包含但不限于静脉内、肌内、皮下、动脉内、腹膜内或口服给药。在一些实施方式中,所述核酸或组合物静脉内给药。在一些实施方式中,通过输注给予核酸或组合物。根据优选的实施方式,所述组合物是口服给药。

[0145] 试剂盒

[0146] 本发明还提供了包含本发明所述的含有核酸的组合物的试剂盒。如本发明提供,在一些实施方式中,所述试剂盒可用于治疗肌肉紊乱、心脏病症或炎症病症(例如,与病毒感染相关)。试剂盒可以包含本发明所述的核酸和转染试剂。所述转染试剂可以是本发明提供的任何合适的转染试剂。在一些实施方式中,所述试剂盒包含如本发明提供的药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中,所述试剂盒包含酪蛋白和/或壳聚糖。试剂盒可包含用于支持试剂盒的一个或多个部件的一个或多个容器(例如,小瓶、安瓿、试管、烧瓶或瓶子)。试剂盒还可以包含使用试剂盒治疗病症(例如,HCM、HFpEF、肌营养不良、硬皮病和/或与病毒感染相关的炎症病症)的说明书。信息和说明可以是文字、图片或两者的形式等。

[0147] 本发明中引用的所有专利和其他出版物;包含文献参考文献、授权的专利、公开的专利申请和共同未决的专利申请,为了描述和公开例如可能与本发明描述的技术结合使用

的这些出版物中描述的方法,通过引用明确地并入本发明。这些出版物仅在本申请提交日之前公开。这方面的任何内容都不应被解释为承认发明人无权因先前的发明或任何其他原因而提前公开。所有关于这些文件的日期或内容的陈述均基于申请人所掌握的信息,并不构成对这些文件的日期或内容正确性的任何承认。

[0148] 本发明的实施例的描述并非旨在穷举或将本公开限制于所公开的精确形式。虽然本发明出于说明性目的描述了本发明的具体实施例和示例,但是如本领域技术人员将认识到的,各种等效修改在本发明的范围内是可能的。例如,虽然以给定顺序呈现了方法步骤或功能,但是替代实施例可以以不同的顺序执行功能,或者可以基本上同时执行功能。本发明提供的教导可以适当地应用于其他程序或方法。本发明描述的各种实施例可以组合以提供另外的实施例。如果需要,可以修改本发明的各方面以采用上述参考文献和应用的组成、功能和概念来提供本发明的另外的实施例。此外,由于生物功能等效性考虑,可以在蛋白质结构中进行一些改变而不影响种类或量的生物或化学作用。根据详细描述,可以对本发明进行这些和其他改变。所有这些修改旨在包含在所附权利要求的范围内。

[0149] 上述任何实施例中的特定元素都可以组合或替代其他实施例中的元素。此外,虽然已经在这些实施例的上下文中描述了与本发明的某些实施例相关联的优点,但是其他实施例也可以表现出这样的优点,并且并非所有实施例都必须表现出这样的优点以落入本发明的范围内。

[0150] 本发明描述的技术通过以下实施例进一步说明,这些实施例决不当被解释为进一步限制。

[0151] 实施例

[0152] 实施例1

[0153] 如本文所提供的,一些实施方式涉及生成包含治疗性核酸例如编码或非编码RNA的组合物,所述组合物被配制用于口服给药。在一些实施方式中,这些组合物根据例如图1A的一般示意图配制。图1B示出了替代实施例。图1A描绘了非限制性实施方式,其中核酸(例如RNA,特别是在给药后具有治疗效果的非编码RNA)被包封在人工脂质胶束中。这种包封的RNA适合于任选的静脉递送。然而,根据本发明公开的几个实施方式,人工胶束用酪蛋白涂覆。随后将酪蛋白涂覆的胶束暴露于酸性溶液和壳聚糖,生成酪蛋白-壳聚糖涂覆的胶束。酪蛋白-壳聚糖涂覆的胶束允许核酸的口服递送,同时由于酪蛋白-壳聚糖涂覆的胶束赋予组合物耐酸性,增加了核酸的生物利用度,允许其以有限的降解通过胃的酸性环境。

[0154] 作为非限制性实例,图2A-2B示出了以这种方式包封的RNA的两个实施例。图2A示出了包含TY4 RNA的组合物。图2B示出了包含piR-659(也称为piREX1)的组合物。图2C示出了样品数据(来自心肌梗塞模型),表明与接受溶剂对照的动物相比,口服递送的包封的piREX1 RNA(以及具有核酸修饰的piREX1)显著降低了梗塞面积。类似地,根据本发明提供的组合物,当口服递送治疗性piREX1RNA时,心肌肌钙蛋白I(心脏损伤的标志物)的循环浓度显著降低。

[0155] 这些数据证明,可使用本发明提供的组合物来实现核酸,例如产生治疗效果的RNA的口服递送,由于治疗性RNA的更大生物利用度而具有增强的治疗效果。

[0156] 实施例2

[0157] 该非限制性实施例示出了治疗性核酸的治疗效果,这里非限制性实施例是TY4,特

别是在射血分数保留型心力衰竭 (HFpEF) 模型中口服给予TY4。

[0158] 在HFpEF中口服TY4的治疗益处。先前的研究已经显示了各种RNA分子的生物活性,例如在肥大模型中的EV-YF1 (参见美国临时专利申请号63/202970的实施例2,其全部内容通过引用并入本文) 和在相同模型中的TY4的类似治疗潜力 (参见美国临时专利申请63/202970的实施例4,其全部内容通过引用并入本文), 在HFpEF小鼠中测试TY4了,也研究了口服给药。该“二次打击 (two-hit)”模型结合了通常与人HFpEF (肥胖和高血压) 相关的两种合并症,并再现了来自HFpEF受试者的心脏组织中看到的一氧化氮信号异常。图3A描绘了实验方案。小鼠在没有干预 (WT) 或饲喂高脂饮食 (HFD) 和L-NAME补充水的情况下被观察。在5周内,HFD/L-NAME小鼠变得肥胖和高血压,具有舒张障碍但正常的EF (通过基线超声心动描记术)。然后随机分配HFpEF小鼠以接受每周两次溶剂对照或TY4的r.o.注射 (“静脉注射”) 或口服剂量 (“口服”)。每次注射或口服TY4的剂量为0.15 μ g/g。对于口服给药,首先将TY4与脂质体组合以形成TY4-脂质体复合物,然后将其包封在本发明提供的酪蛋白-壳聚糖复合物中。输注给药前/口服给药前和在各种时间点之后,小鼠经历血压测量、跑步机测试、超声心动描记术和/或循环生物标志物的抽血。组之间的基线的唯一差异是与疾病相关的 (高血压、低锻炼耐力、HFpEF对比WT的升高的E/e' 比率)。

[0159] 10周后,以下差异是明显的:在TY4动物 (静脉注射) 中,血压较低 (图3B),锻炼耐力较高 (图3C),E/e' 比率较低 (图3D),并且与给予溶剂对照的HFpEF动物相比,脑钠肽 (BNP) 水平较低 (图3E)。这些健康指数与WT水平 (非HFpEF动物) 相当。这种效果不是由于饮食消耗:TY4小鼠保持肥胖。该发现揭示了TY4的显著的疾病修饰生物活性,特别是考虑到HFpEF的难治性。

[0160] 图3A-3C:静脉内给药的TY4逆转HFpEF小鼠的疾病进展。图3A:示意性研究设计。在研究终点,静脉内接受TY4的动物具有较低的收缩压 (SBP) 和舒张压 (DBP) (图3B),改善的锻炼耐力 (图3C) 和舒张功能 (E/e', 图3D),以及降低的心力衰竭血清生物标志物水平 (BNP; 图3E)。

[0161] 严格地,所述TY4口服给药导致类似的治疗效果,并且在一些情况下产生更优异的治疗效果。与给予溶剂对照的HFpEF动物相比,TY4口服给药降低了收缩压和舒张压 (图3F),降低了E/e' 比率 (图3G),增加了锻炼耐力 (图3H),并且降低了BNP水平 (图3I)。在TY4口服治疗的动物中,血压、锻炼耐力和E/e' 比率与WT水平 (非HFpEF动物) 相当。

[0162] 图3F-3I:TY4的口服给药逆转HFpEF小鼠的疾病进展。实验方案示于图3A中。在研究终点,口服接受TY4的动物具有较低的收缩压 (SBP) 和舒张压 (DBP) (图3F),改善的舒张功能 (E/e', 图3G) 和锻炼耐力 (图3H),以及降低的心力衰竭的血清生物标志物水平 (BNP; 图3I)。

[0163] 在静脉内和口服治疗的动物中,在治疗过程中始终观察到TY4的治疗效果。在第9周立刻观察到收缩压降低 (图3J),而从第7周观察到舒张压降低 (图3K)。从第9周并且至少在第14周观察到改善的E/e' 比率 (图3L)。在口服治疗的动物中更一致地观察到改善的锻炼耐力,并且所有TY4治疗的动物在至少第11周显示更高的锻炼耐力 (图3M)。

[0164] 在一些实施方式中,向患有HFpEF的受试者口服给予治疗有效量的治疗性核酸,例如功能类似于TY4的非编码RNA以治疗HFpEF (或其一种或多种症状,包括但不限于炎症和/或纤维化)。在一些实施方式中,向患有HFpEF的受试者重复口服给予核酸例如非编码RNA以

治疗HFpEF (或其一种或多种症状)。在一些实施方式中,向患有HFpEF的受试者静脉内或口服给予治疗有效量的TY4以减少或缓解HFpEF的一种或多种症状。在一些实施方式中,向患有HFpEF的受试者静脉内或口服给予治疗有效量的TY4以减少或缓解由于HFpEF引起的锻炼耐力受损、血压升高、E/e' 比率升高和系统性炎症中的一种或多种。

[0165] 实施例3

[0166] 该非限制性实施例代表实施例2的进一步实验重复。图4A示出了在递送治疗性核酸的非限制性实施方式(在该实施例中为TY4RNA)之后与收缩压相关的数据。如图4A所示,与溶剂对照(和未处理的)相比,口服给予在酪蛋白-壳聚糖涂覆的胶束中的治疗性RNA导致降低的收缩压。图4B显示了口服给予治疗性RNA时舒张血压的协调降低。图4C显示了口服给予治疗性RNA后E/e' 比率的降低。图4D显示了与溶剂对照相比脑钠肽的减少。图4E表示在口服递送治疗性RNA之后,耐力恢复,实际上适度高于对照水平。

[0167] 图4F示出了实施例2以外的新数据。评估动物的循环血糖浓度。如图4F所示,与对照相比,单独用溶剂对照治疗导致血糖浓度升高。根据本发明公开的实施方式的含核酸组合物的口服给药导致循环血糖水平的显著降低,这可能与HFpEF相关的肥胖相关。图4G示出了在溶剂对照治疗的小鼠中的脂肪积聚。如在接受治疗性核酸的口服给药的最右边的小鼠所示,脂肪积聚减少。

[0168] 总之,这些另外的和新的数据进一步增强了包含治疗性核酸(例如非编码RNA)的口服递送的组合物可有效地治疗HFpEF。在一些实施方式中,当口服给药时,本发明提供的组合物和方法可以有效地减少炎症和/或纤维化,或疾病的症状。

[0169] 实施例4

[0170] 该非限制性实施例显示了测试治疗性核酸的体内递送的不同制剂的研究设计,其非限制性实施例是TY4和/或其衍生物(图1B)。

[0171] PEG包裹。使用2kDa聚乙二醇(PEG2000;30% v/v)和Dharmafect的混合物形成PEG-阳离子脂质复合物(PCLC)。参考先前的制备,使用5个冷冻/解冻循环(液氮/60°C)形成复合物。单次冷冻-解冻循环涉及将混合物在-190°C(液氮)冷冻5分钟,随后在60°C解冻5;通过将适当浓度的TY4(和/或其衍生物)与5μl PCLC混合至100μl的最终体积来制备TY4(和/或其衍生物)与PCLC的复合物。将制剂在室温下搅拌培养5分钟。

[0172] 在一些实施方式中,治疗性核酸例如TY4(和/或其衍生物)被配制为与PCLC的复合物。在一些实施方式中,治疗性核酸例如TY4(和/或其衍生物)的药物组合物包含TY4(和/或其衍生物)和PCLC。在一些实施方式中,治疗性核酸(例如TY4(和/或其衍生物))的PEG包裹促进核酸(例如RNA,特别是非编码RNA)的口服摄取,产生治疗效果。

[0173] 实施例5

[0174] 该非限制性实施例示出了用于口服给药的具有酪蛋白的CDC-EV的制剂。

[0175] 当口服给药时,可以吸收未改变的CDC-EV。酪蛋白,作为母乳中的显性蛋白可以增强吞入的CDC-EV的摄取和生物活性,改变血细胞中的基因表达并增强mdx(肌营养不良)小鼠中的肌肉功能。

[0176] 定量口服摄取。如所述使用已建立的NanoSight方法对脂质体或EV进行计数。选择 10^7 粒子作为起始“剂量”。包含治疗性核酸的治疗性化合物(非限制性实施例包含TY4和/或其衍生物)按原样给药或与8%酪蛋白溶液在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中混合给药。每种治疗

性化合物制剂或酪蛋白溶液和每种治疗性化合物制剂的混合物在仅禁食18小时后通过口服灌胃被饲喂至HFpEF小鼠,并且与在只禁食18小时后单独饲喂PBS或单独饲喂8%酪蛋白溶液进行比较。在口服给予每个测试制品一小时后,从下腔静脉收集血液用于RNA提取。通过使用RNA分离方法通过qPCR测量全血中的治疗化合物水平来定量血液中的摄取。将测量的PCR循环与通过将已知水平的TY4掺入小鼠血液中产生的标准进行比较。TY4来源于人特异性序列,因此小鼠中的背景水平低于可靠PCR检测的极限。进一步表征的选择基于血液中的TY4的测量水平。如果通过对照的2个扩增循环[Ct]或更早通过qPCR检测到TY4,则可以认为制剂(无论是否具有酪蛋白)提供口服递送。在一些实施方式中,制剂通过qPCR提供了低于最接近的竞争者>3Ct的检测。可以进一步测试制剂的体内生物活性。

[0177] 体内生物活性。为了评估改变生物活性的疾病,使用小鼠HFpEF模型。在高脂饮食+L-NAME开始后5周开始,将每隔一天向HFpEF小鼠饲喂溶剂对照(PBS)和每个先进制剂(具有或不具有酪蛋白)。

[0178] 在一些实施方式中,治疗性核酸,包含非编码RNA,例如TY4(和/或其衍生物)(在脂质体或CDC-EV中)与酪蛋白一起配制。在一些实施方式中,TY4(和/或其衍生物)的药物组合物包含脂质体或CDC-EV中的TY4(和/或其衍生物)和酪蛋白。在一些实施方式中,TY4(和/或其衍生物)的药物组合物包含脂质体或CDC-EV中的TY4(和/或其衍生物)和8%酪蛋白。在一些实施方式中,TY4(和/或其衍生物)(在脂质体或CDC-EV中)和酪蛋白(例如8%酪蛋白)的制剂促进TY4(和/或其衍生物)的口服摄取。

[0179] 实施例6

[0180] 该非限制性实施例显示包含包封在脂质胶束中并用酪蛋白-壳聚糖复合物涂覆的治疗性核酸的口服制剂改善心肌梗塞的症状。

[0181] 为了评估治疗性核酸的口服递送的有效性,通过冠状动脉左前降支的开胸闭塞45分钟,然后再灌注来模拟小鼠中的心肌梗塞。然后闭合胸部。再灌注后20分钟,给予小鼠溶剂对照或由本发明所提供的由脂质包封的治疗性RNA组成的静脉注射组合物,或包含包封在脂质胶束中并用酪蛋白-壳聚糖涂覆的治疗性RNA的口服组合物。这里使用的核酸有效载荷的非限制性实施例是TY4。心肌梗塞后48小时切除心脏,并通过组织学方法定量梗塞面积(IS)。

[0182] 图5A示出了与梗塞面积相关的汇总数据。如图所示,静脉注射和口服组合物都导致梗塞面积减小。值得注意的是,TY4的口服递送示出了梗塞面积的进一步减小。每组的代表性左心室切片显示在图5B中,其中口服治疗的组示出了明显较少的梗塞疤痕。作为心脏损伤的标志物,图5C示出了口服给药的TY4与对照相比产生显著降低。总之,组织学和肌钙蛋白I的数据相互加强示出了口服递送的治疗性核酸(例如非编码RNA TY4)的心脏保护功效。

[0183] 进一步建立这些发现,图5D和5E中示出了附加的比较分析。图5D示出了容纳在根据本发明公开的实施方式的组合物中的静脉注射TY4(或其扩充形式)或口服给药的TY4(例如,用酪蛋白-壳聚糖涂覆的胶束)。本发明的附加组包含包封在胶束中的口服TY4,所述胶束仅涂覆有酪蛋白(无壳聚糖)。图5D的数据增强了上面讨论的关于口服递送治疗性RNA的发现,但也证明,根据优选的实施方式,脂质胶束被酪蛋白和壳聚糖两者涂覆。图5D右侧的实验组是仅涂覆有酪蛋白的包封RNA的胶束。该组的梗塞面积显著增加,表明TY4的生物利

用度降低,这被认为是由于在胃的低酸环境中对组合物的保护不太稳健而导致的。图5E示出了与测量心肌钙蛋白I有关的功效下降较少,但是仅涂覆酪蛋白的制剂似乎至少趋向于升高的浓度(较少治疗效果)。总之,这些数据支持使用如本发明在一些实施方式中提供的酪蛋白-壳聚糖涂层口服递送的治疗性核酸(例如非编码RNA TY4)的心脏保护功效。

[0184] 实施例7

[0185] 该非限制性实施例显示包含包封在脂质胶束中并且用酪蛋白-壳聚糖复合物涂覆的治疗性核酸的口服制剂改善硬皮病的症状。

[0186] 硬皮病是自身免疫性疾病,表现为进行性皮肤增厚以及皮肤、心脏和肺纤维化。使用硬皮病的动物模型,其中小鼠在3周内皮内注射博来霉素。然后用本发明提供的配置用于口服递送治疗性RNA分子的组合物处理动物。该实验使用非限制性实施例RNA TY4,其被包封在涂覆有酪蛋白-壳聚糖的脂质胶束中并口服递送。使用乱码RNA序列的口服递送(在相同递送组合物中)作为对照。

[0187] 图6A示出了与跑步机上的耐力测试相关的数据。如图所示,口服递送治疗性RNA导致未处理的对照小鼠的耐力完全恢复,PBS对照和乱码RNA序列对照各自显示耐力显著降低。图6B示出了,口服递送治疗性RNA允许小鼠维持体重,使得其于对照没有显著性差异。图6C示出了心脏指数(HI),其将心脏重量与每组小鼠的体重相关联。如非治疗性组的体重降低所预期的,这些组表现出升高的HI。而且,心脏重量的增加(例如,由于纤维化)也可以解释为是增加HI的一个方面。同样地,当测量肺指数(PI)(其将肺重量作为体重的函数进行指数)时,口服递送的治疗性RNA与非治疗性组相比导致显著降低的PI(尽管PI仍然高于对照)。图6E示出了单独的肺重量数据,其对应于PI数据。

[0188] 具体地,对于心脏测量,图7A示出了与纤维化相关的组织学数据。最上面的行用对应于第二行中提供的放大视图的虚线框示出代表性组织染色。口服递送的治疗性RNA示出了组织的纤维化大大降低。图7B示出了每组的纤维化定量,表明治疗性RNA的口服递送导致显著减少的心脏纤维化。对于影响皮肤的硬皮病的症状,图7C和7D涉及皮肤的纤维化。图7C示出了与皮肤相关的组织学数据,其中左上示出了对照皮肤,右上示出了溶剂对照,左下示出了乱码RNA,以及右下示出了口服递送的TY4 RNA。作为治疗性RNA的非限制性实例,口服递送的TY4 RNA与非治疗组相比导致皮肤明显更少的增厚/纤维化。图7D用每组的皮肤厚度图证实了这一点,其中口服递送的治疗性RNA没有导致皮肤厚度与对照显著不同。

[0189] 关于各种炎性细胞因子的表达水平进行另外的研究。图8A-8F显示了与IL1-B(8A)、IL-6(8B)、TGF β (8C)、NLRP3(8D)、p21(8E)和IL-4(8F)的定量相关的qPCR数据。当给予口服递送的治疗性RNA时,这些细胞因子中的每一种等同于或显示表达仅适度增加。因此,这些数据支持口服递送治疗性RNA以减少纤维化和/或炎性疾病,例如硬皮病的继发或症状的功效。

[0190] 实施例8

[0191] 该非限制性实施例显示了包含包封在脂质胶束中并涂覆有酪蛋白-壳聚糖复合物的治疗性核酸的口服制剂改善了肌营养不良症的症状。

[0192] 为了确定口服递送的治疗性RNA的作用,每周两次,持续8周给12-14个月大的雌性mdx小鼠被饲喂TY4(0.15 μ g/g体重)或对照。在喂养之前(即基线)和在8周研究终点测量心脏和骨骼肌功能。解剖心和胫骨前肌(TA)并处理用于Masson's三色染色以定量间质纤维

化。

[0193] 如图9A所示,对轻度麻醉的mdx小鼠进行经胸超声心动描记术以测量左心室射血分数(EF)。在基线处,在组之间没有检测到差异。8周后,接受治疗性RNA的口服给药实施例TY4的mdx相对于溶剂对照具有较高的EF,溶剂对照在研究过程中具有下降的EF。如图9B所示,Masson's三色显微照片和汇总数据(右子图)示出了接受口服给予TY4的mdx小鼠比溶剂对照小鼠具有更少的心肌纤维化。对于通过将mdx小鼠的脚附接到铝鞋(其被附接到力传感器的伺服马达)并刺激左腓总神经来记录前腿肌肉的体内肌肉功能,其中胫骨前(TA)产生该肌肉群的扭矩输出的85%。在200Hz下记录强直扭矩。在基线处,在组之间没有检测到差异(见图9C)。8周后,接受口服给予TY4的mdx小鼠比溶剂对照小鼠产生更多的扭矩。图9D涉及肌肉纤维化并显示Masson's三色显微照片和汇总数据(右子图)。这些数据表明,接受口服给予TY4的mdx小鼠比溶剂对照小鼠具有更少的肌肉纤维化。图9E总结了收集的生理数据,其表明存在更大的肌纤维计数(每 mm^2)。

[0194] 收集的功能数据进一步支持通过使用包封治疗性RNA并用酪蛋白-壳聚糖复合物包被的脂质胶束递送口服给药的治疗性RNA的功效。图9E显示,除了降低的间质纤维化(图9C/9D)之外,通过使用包封治疗性RNA的脂质胶束递送的方式口服给予治疗性RNA提高了TA中肌纤维的数量。在功能测定(图9H-9H)中证实了这种生理效果,所述功能测定分别显示在接受通过使用脂质胶束包封治疗性RNA的递送来口服给予治疗性RNA的动物中增强锻炼能力、心脏功能和肌肉功能。使用双因素方差分析(two-way ANOVA)或独立样本t检验来确定组之间的统计学显著性。 $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。数据表示为平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM)。

[0195] 这些数据进一步支持口服给予的治疗性RNA通过使用脂质胶束包封治疗性RNA并用酪蛋白-壳聚糖复合物涂覆的递送的功效。在一些实施方式中,通过口服给药递送治疗性RNA的此类组合物导致RNA的生物利用度增加,这进而导致炎症和/或纤维化引起的疾病(诸如肌营养不良症)的治疗结果增强。

[0196] 尽管为了清楚和理解的目的已经通过图示和实施例的方式详细描述了前述内容,但是本领域技术人员将理解,在不脱离本发明的精神的情况下可以进行修改。因此,应该理解的是,本发明所公开的形式仅是说明性的,并不是意在限制本发明的范围,而是也涵盖了与本发明的实施例的真正范围和精神相一致的所有修改和替代方案。

[0197] 预期可进行上文所揭示的实施例的特定特征及方面的各种组合或子组合。此外,本文中关于实施例的任何特定特征、方面、方法、性质、特性、质量、属性、元素等的公开可以用于本发明中阐述的所有其他实施例中。因此,应当理解,所公开的实施例的各种特征和方面可以彼此组合或替代,以便形成所公开的主题的不同模式。因此,本发明的范围不应限于上述特定公开的实施例。此外,虽然所公开的主题易于进行各种修改和替代形式,但是其特定实施例已经在附图中示出并且在本发明中详细描述。然而,应当理解,本发明不限于所公开的特定形式或方法,而是覆盖落入所描述的各种实施例和所附权利要求的精神和范围内的所有修改、等同物和替代方案。

[0198] 本发明公开的任何方法不需要以所述顺序执行。本发明公开的方法包含由从业者采取的某些动作;然而,它们还可以明确地或暗示地包含那些动作的任何第三方指令。例如,“向需要治疗心脏病症或其症状的受试者口服给予治疗有效量的核酸”的动作包含“指导向受试者给予有效量的核酸”。此外,在本发明的特征或方面根据马库什组来描述的情况

下,本领域技术人员将认识到,本公开因此也根据马库什组的成员的任何单独成员或子组来描述。

[0199] 本发明公开的范围还涵盖任何和所有与其重叠的、其子范围及其组合。例如“上至”、“至少”、“大于”、“小于”、“之间”等语言包含所列举的数字。前面有例如“约”或“近似”的术语的数字包含所述数字。例如,“约90%”包含“90%”。在一些实施方式中,至少95%相同包含与参考序列96%、97%、98%、99%和100%相同。此外,当序列被公开为“包含”核苷酸或氨基酸序列时,除非另外指出,否则此类参考还应包含所述序列“包含”、“由……组成”或“基本上由……组成”。

[0200] 除非另有明确说明,否则在本申请中使用的术语和短语及其变型,尤其是在所附权利要求中,应当被解释为开放式的而不是限制性的。作为前述的实施例,术语“包含”应当被理解为意指“非限制性包含”、“包含但不限于”等。

[0201] 本发明中引用的所有专利和其他出版物;包含文献参考文献、授权的专利、公开的专利申请和共同未决的专利申请,为了描述和公开例如可能与本发明描述的技术结合使用的这些出版物中描述的方法,通过引用明确地并入本发明。这些出版物仅在本申请提交日之前公开。这方面的任何内容都不应被解释为承认发明人无权因先前的发明或任何其他原因而提前公开。所有关于这些文件的日期或内容的陈述均基于申请人所掌握的信息,并不构成对这些文件的日期或内容正确性的任何承认。

A

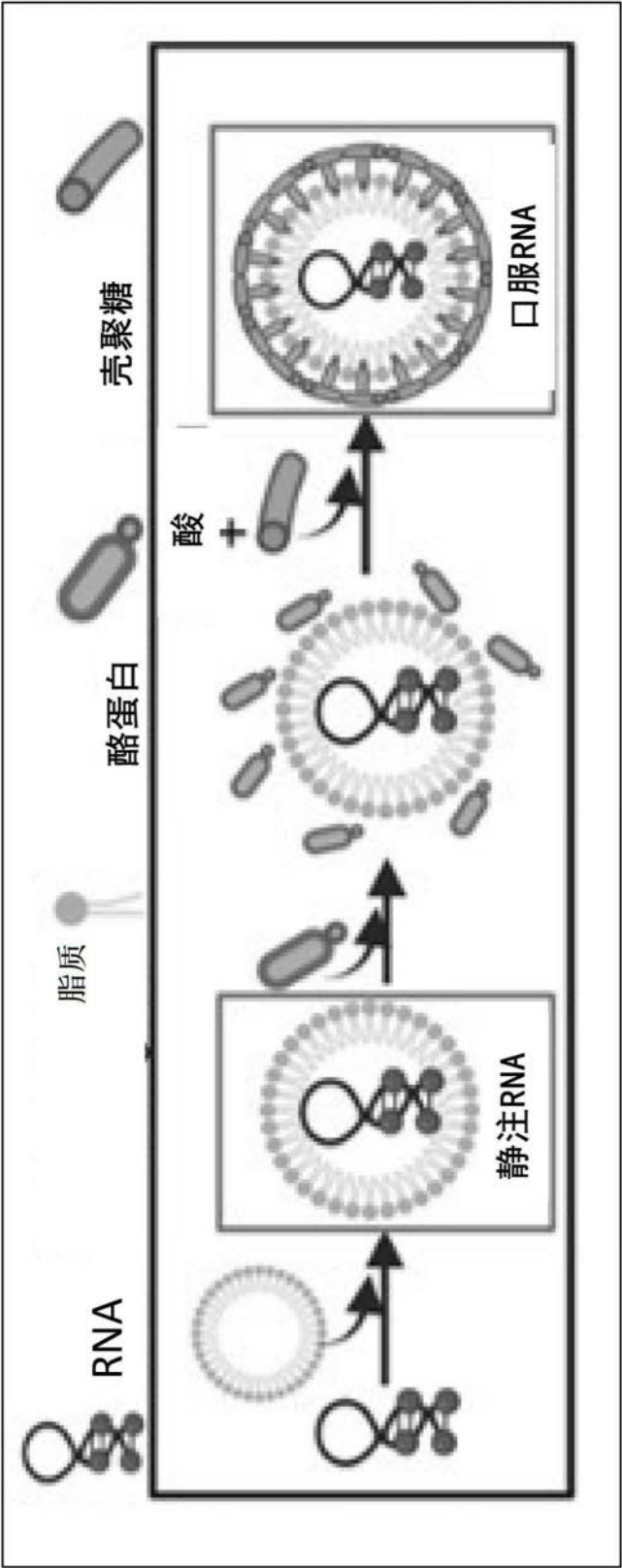


图1A

B

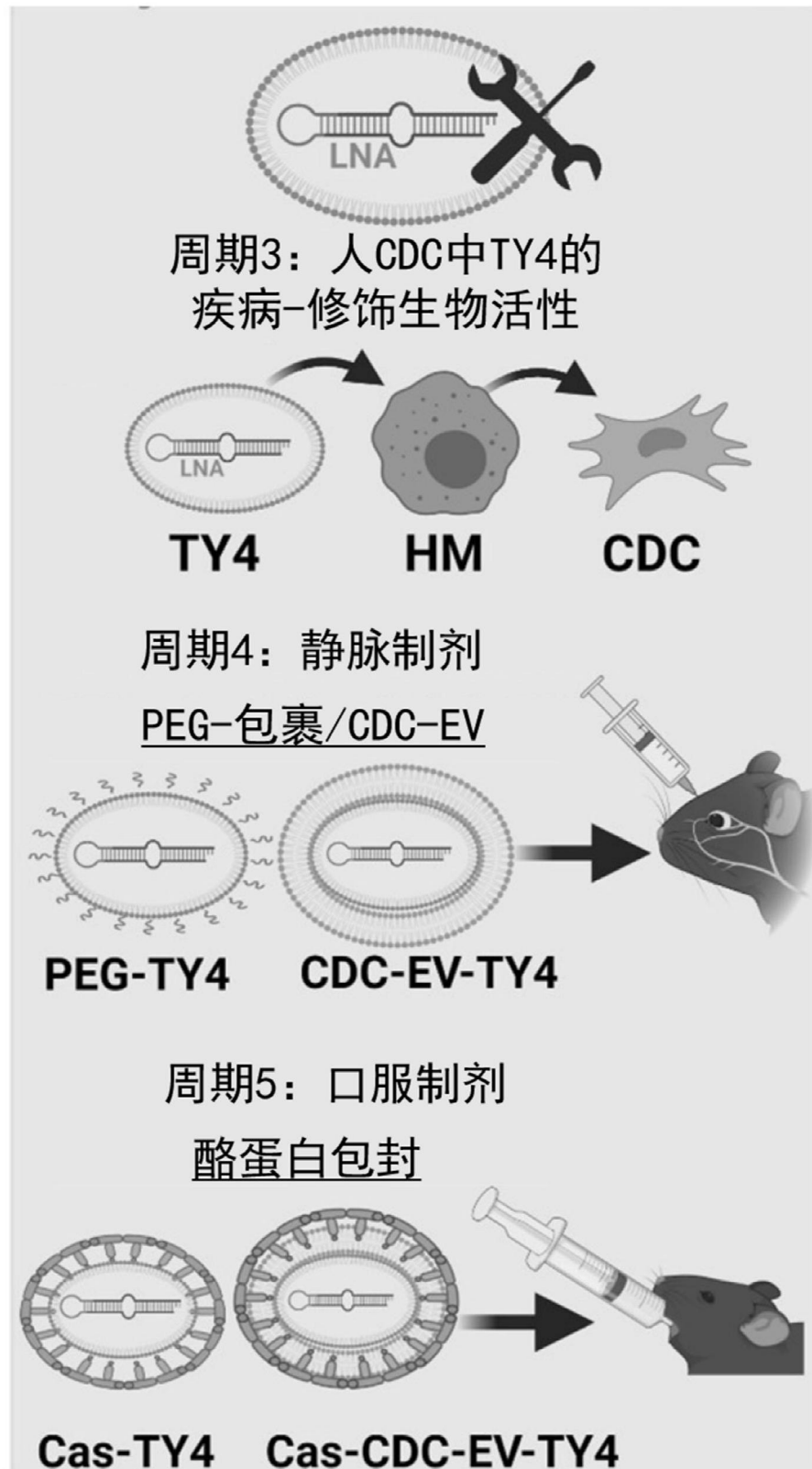
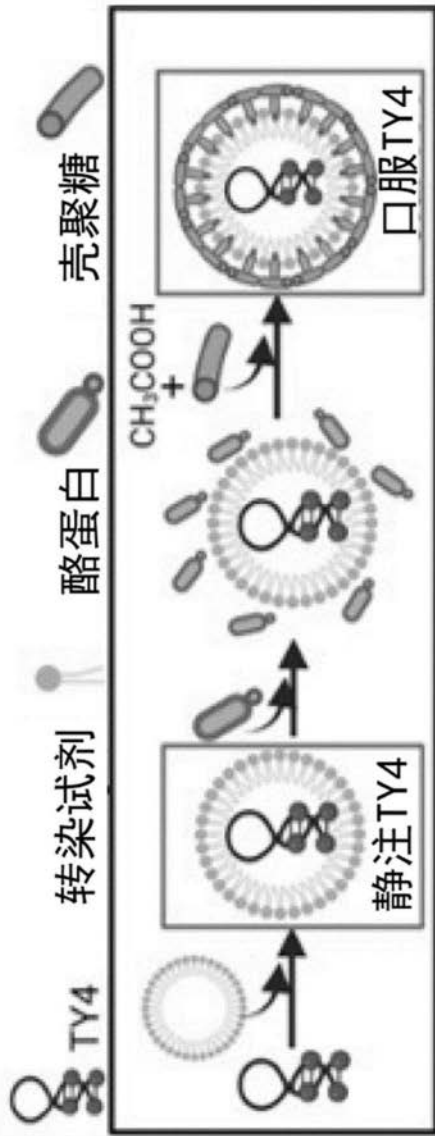


图1B

A



B

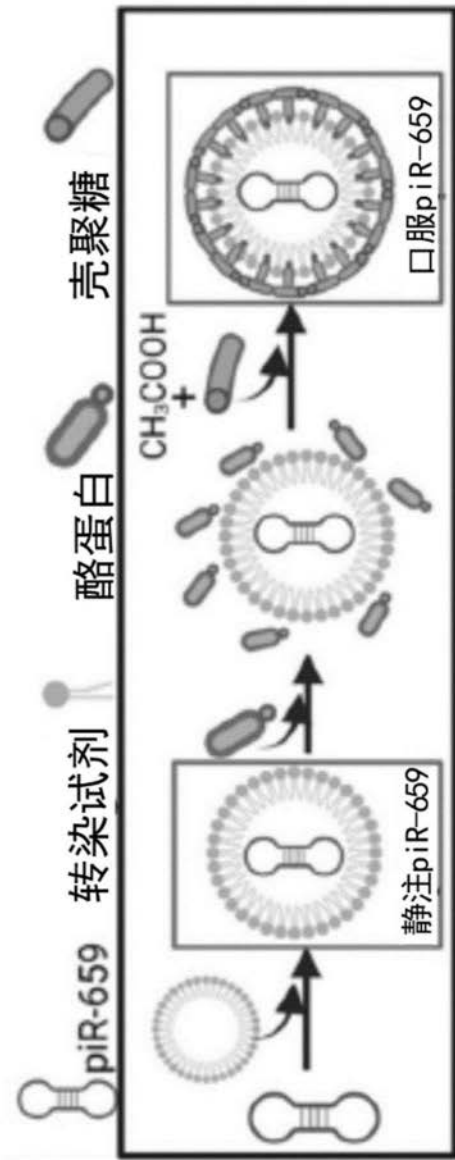


图2A-2B

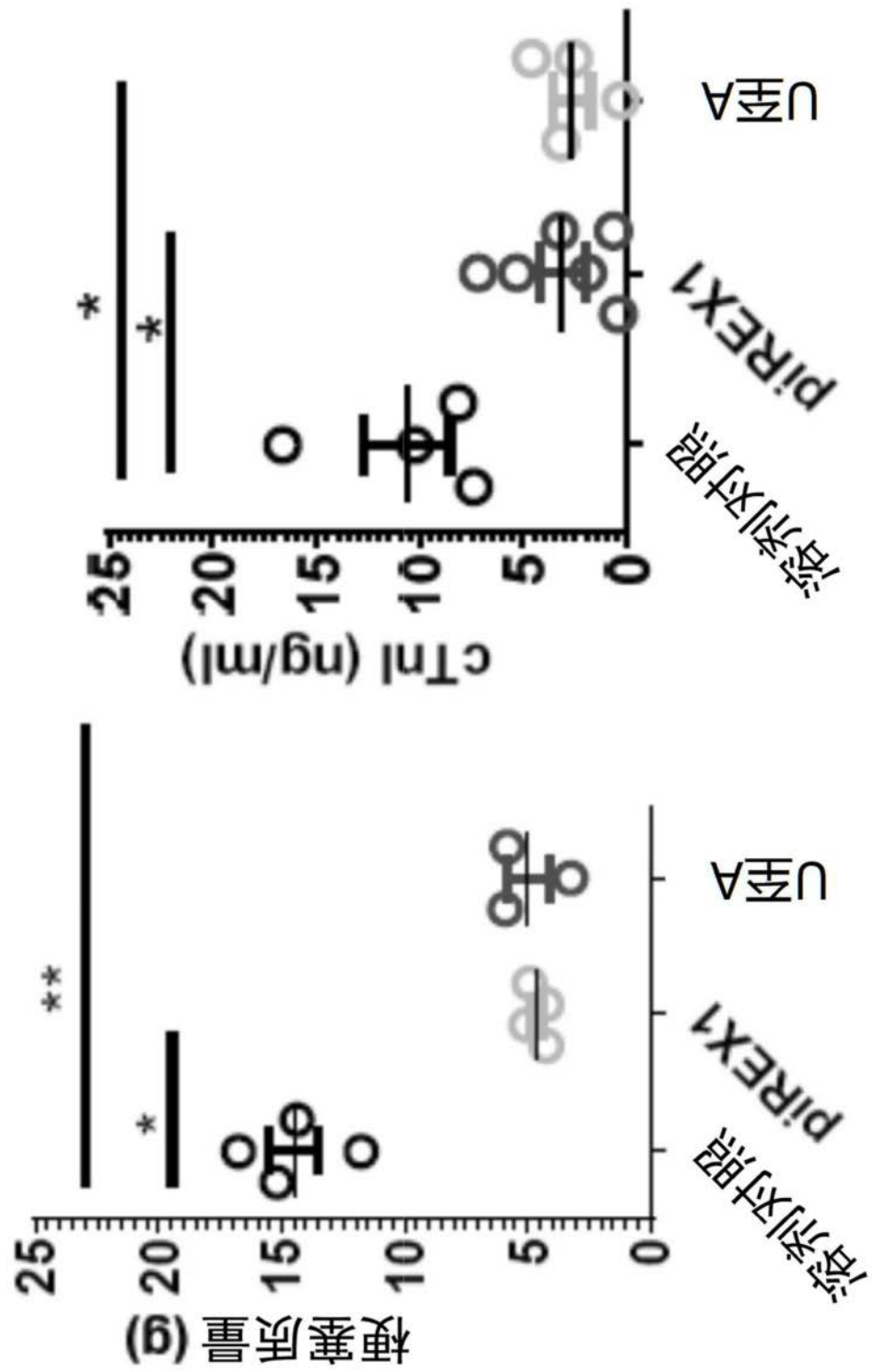


图2C

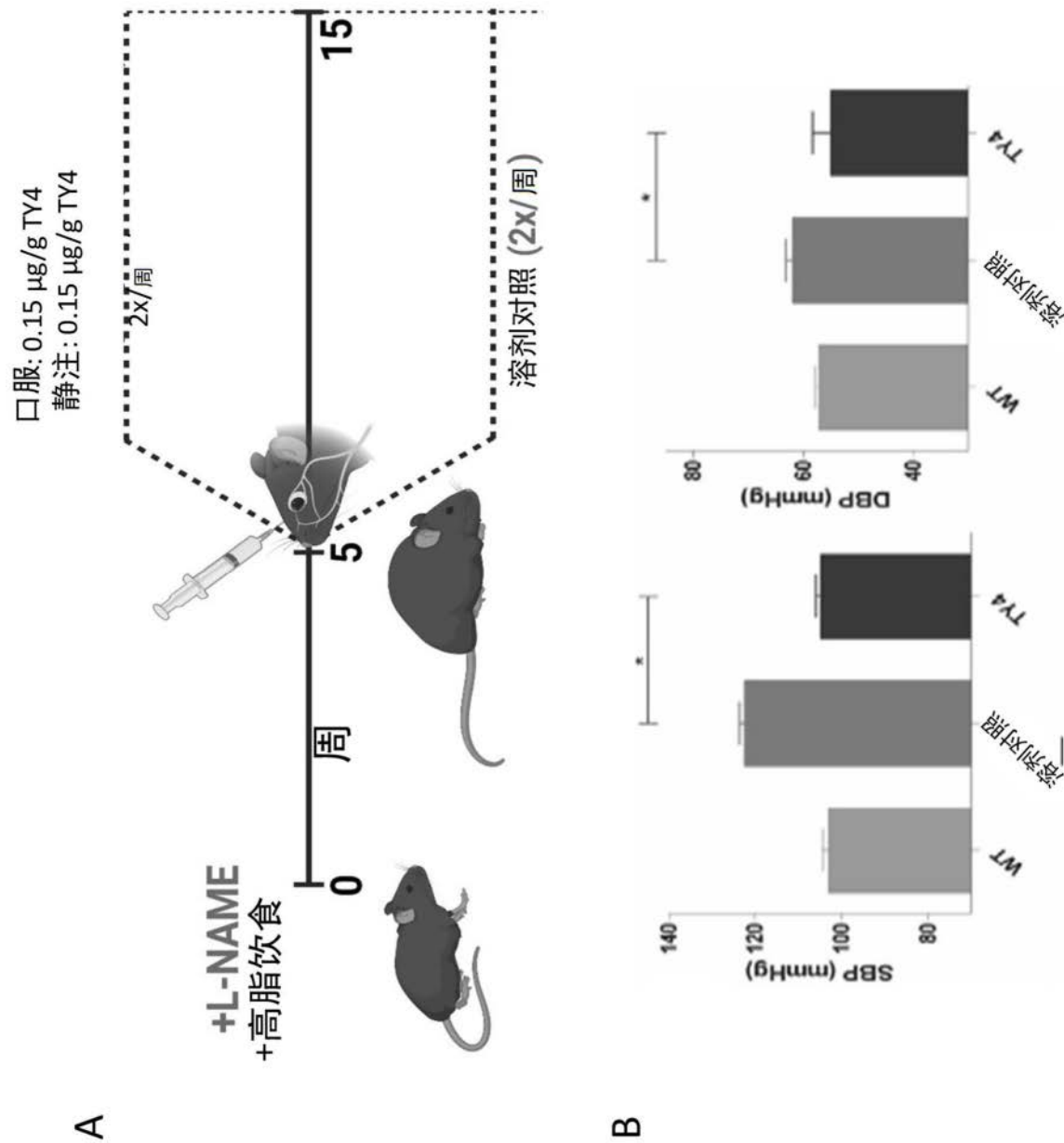


图3A-3B

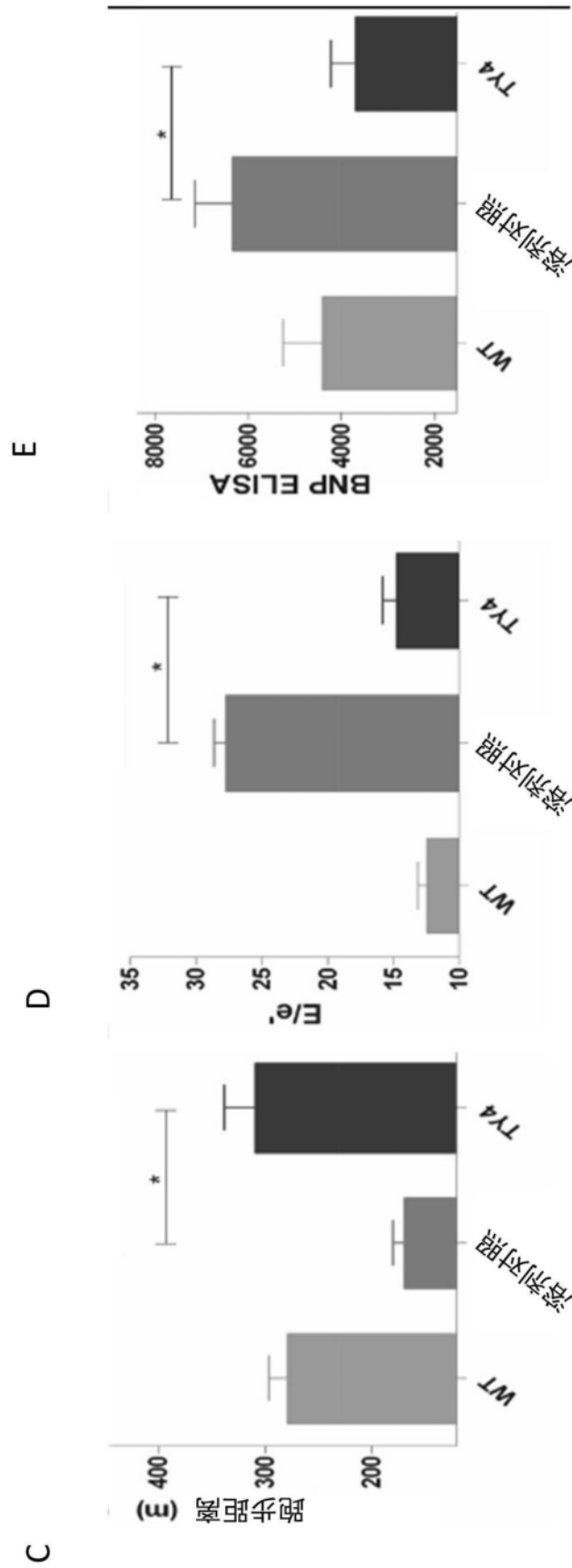


图3C-3E

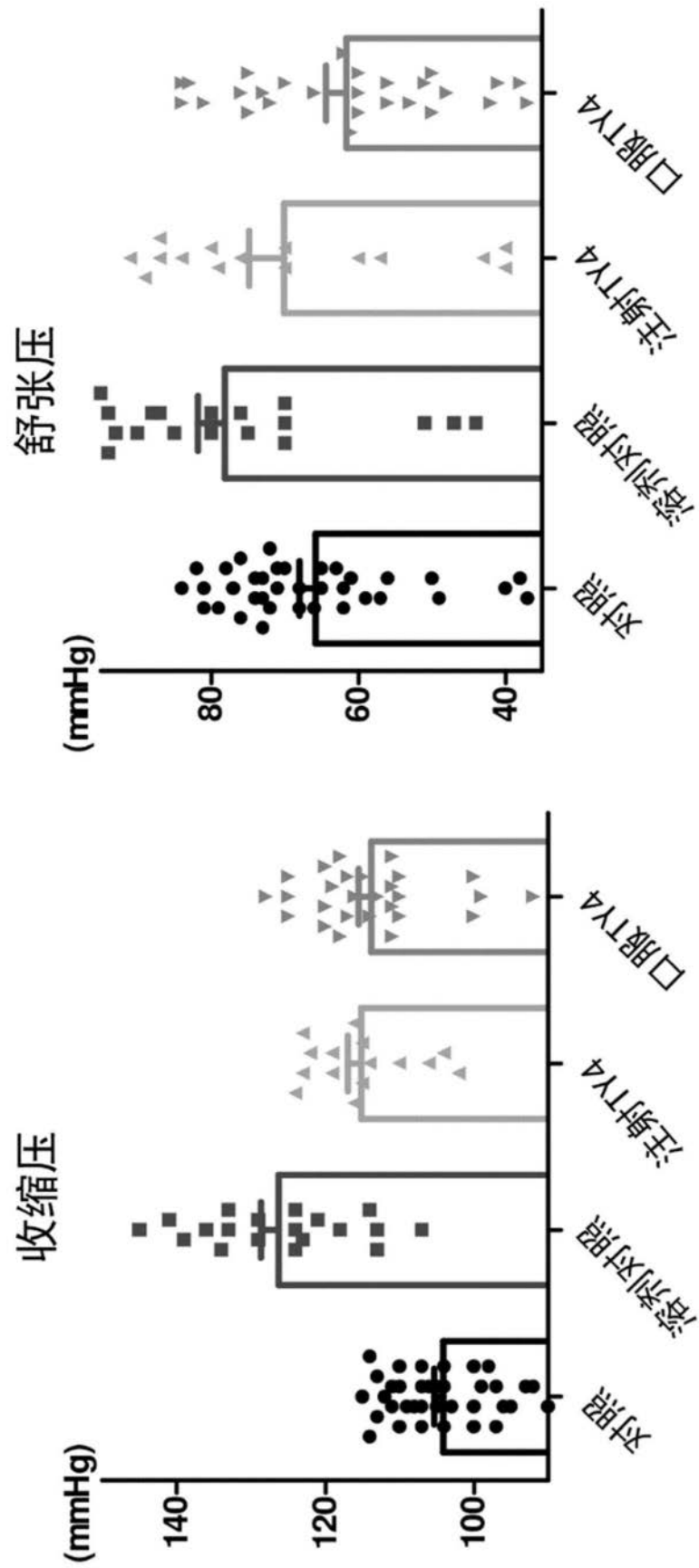


图3F

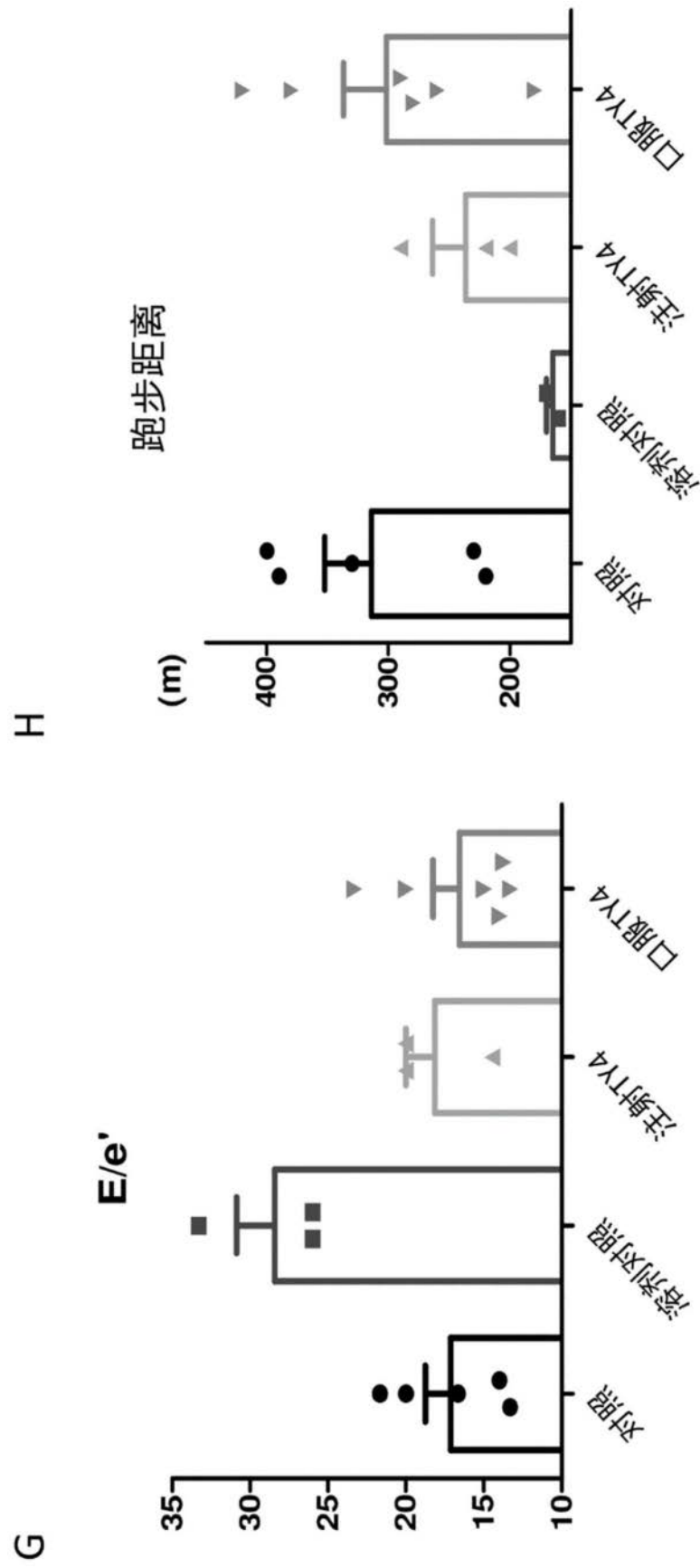


图3G-3H

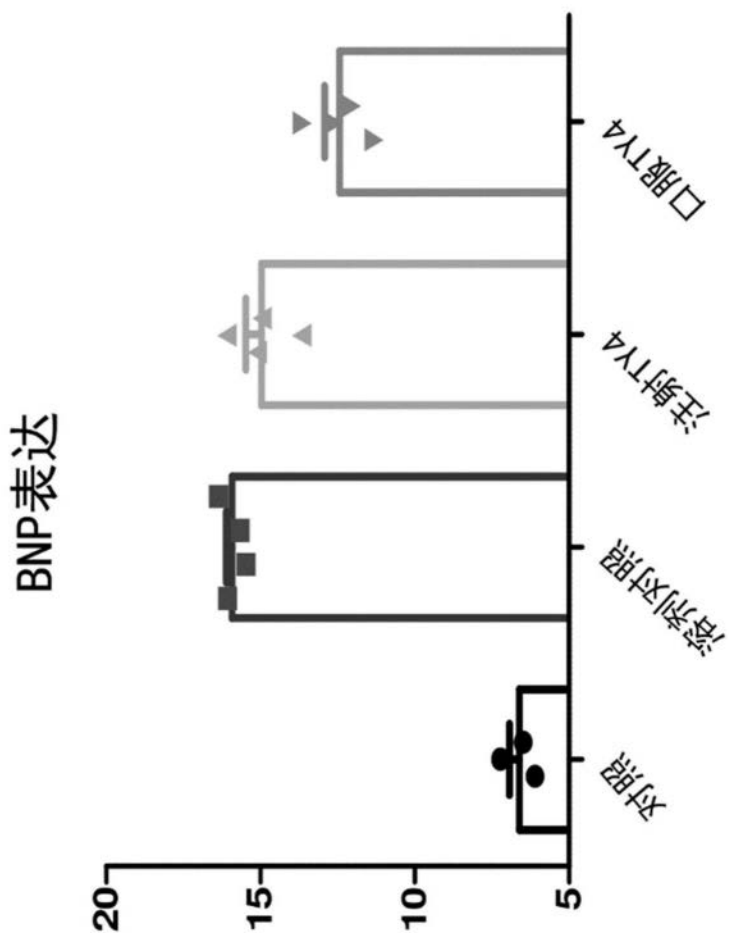
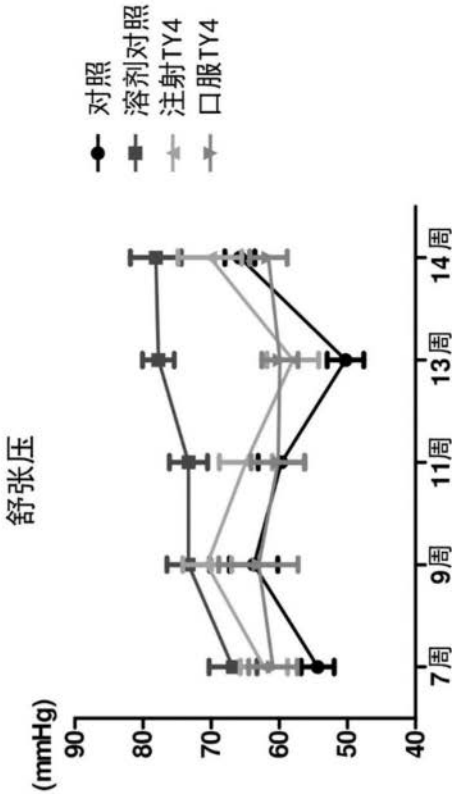


图3I

K



J

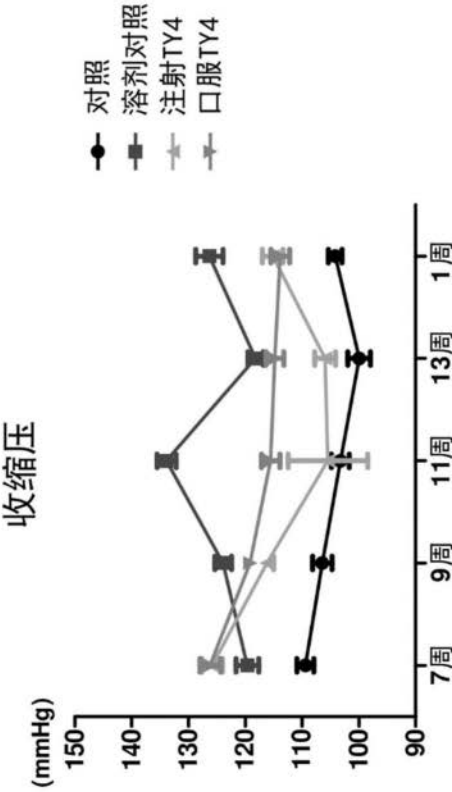


图3J-3K

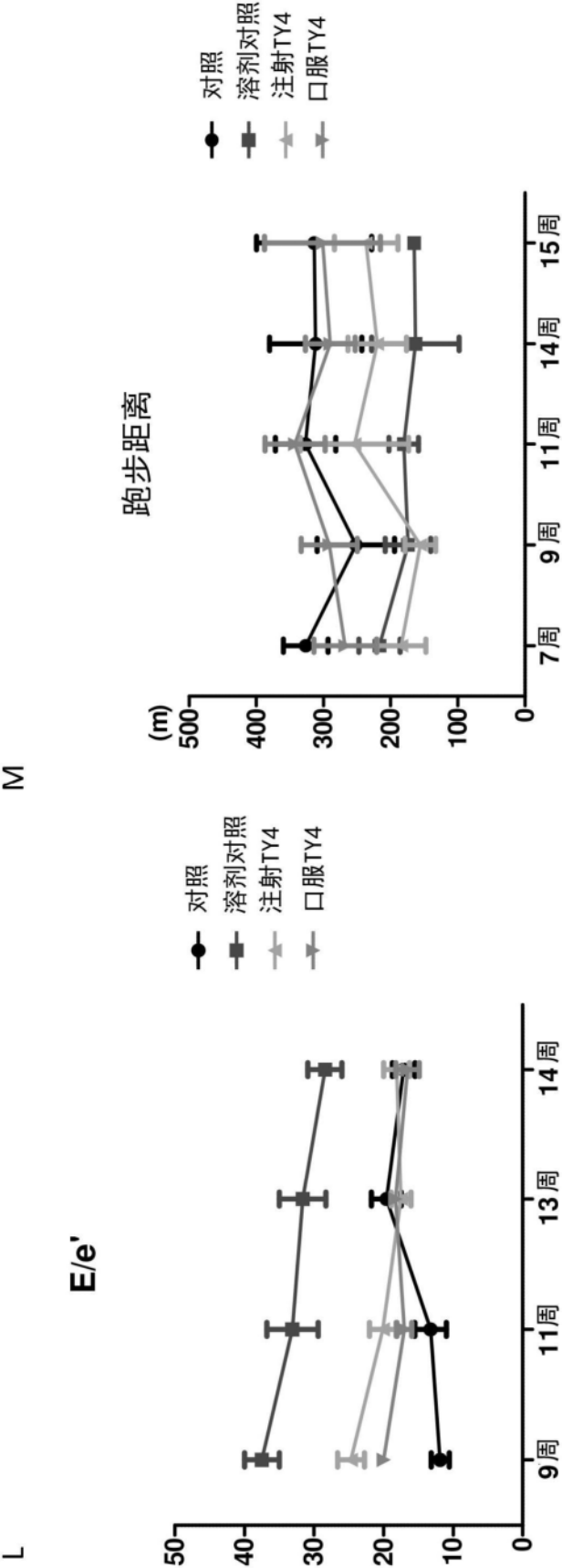


图3L-3M

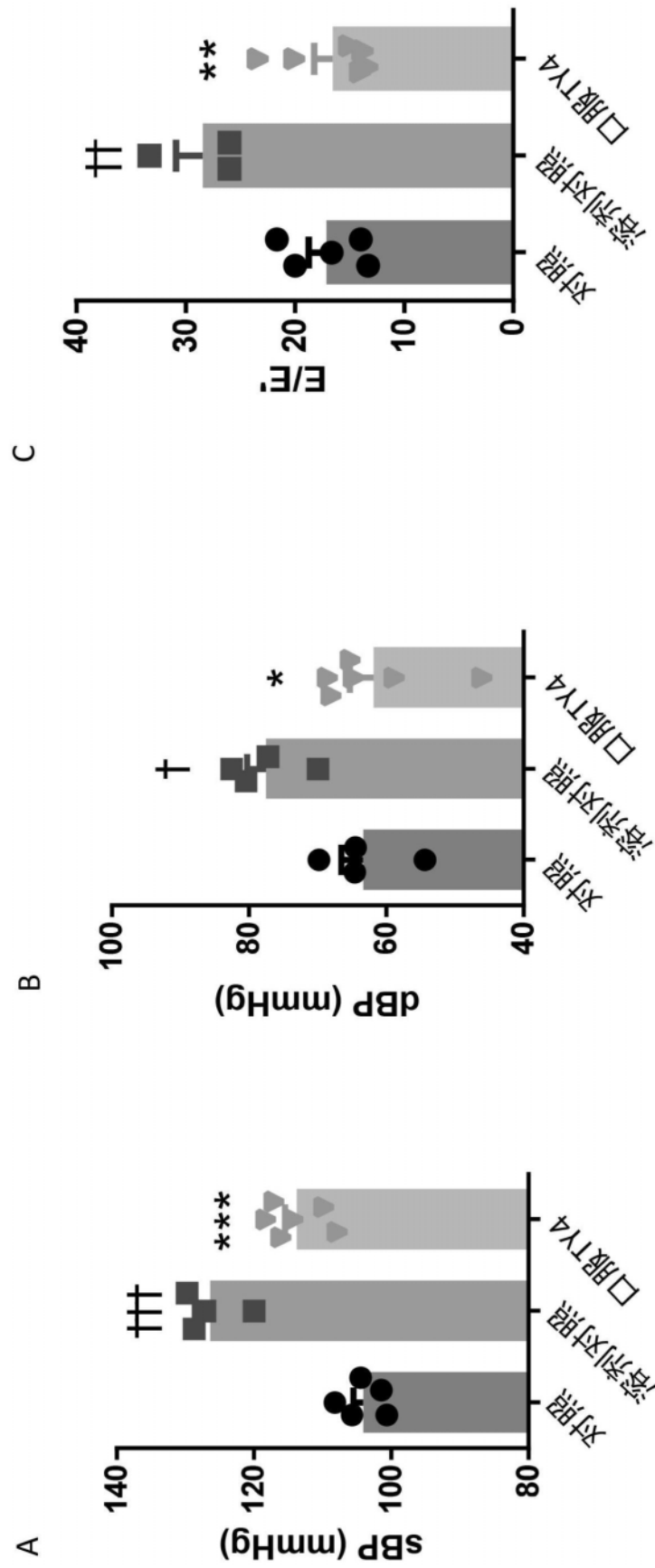


图4A-4C

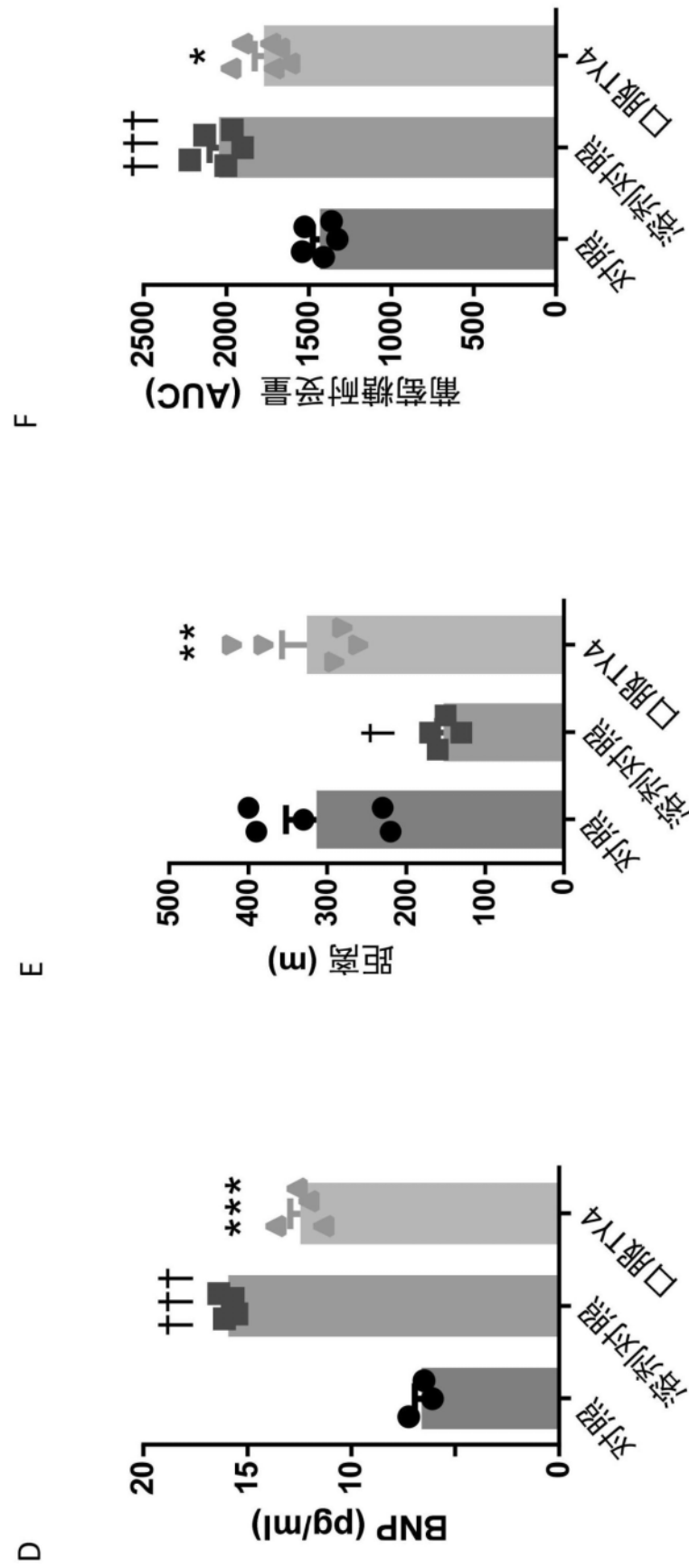


图4D-4F

G

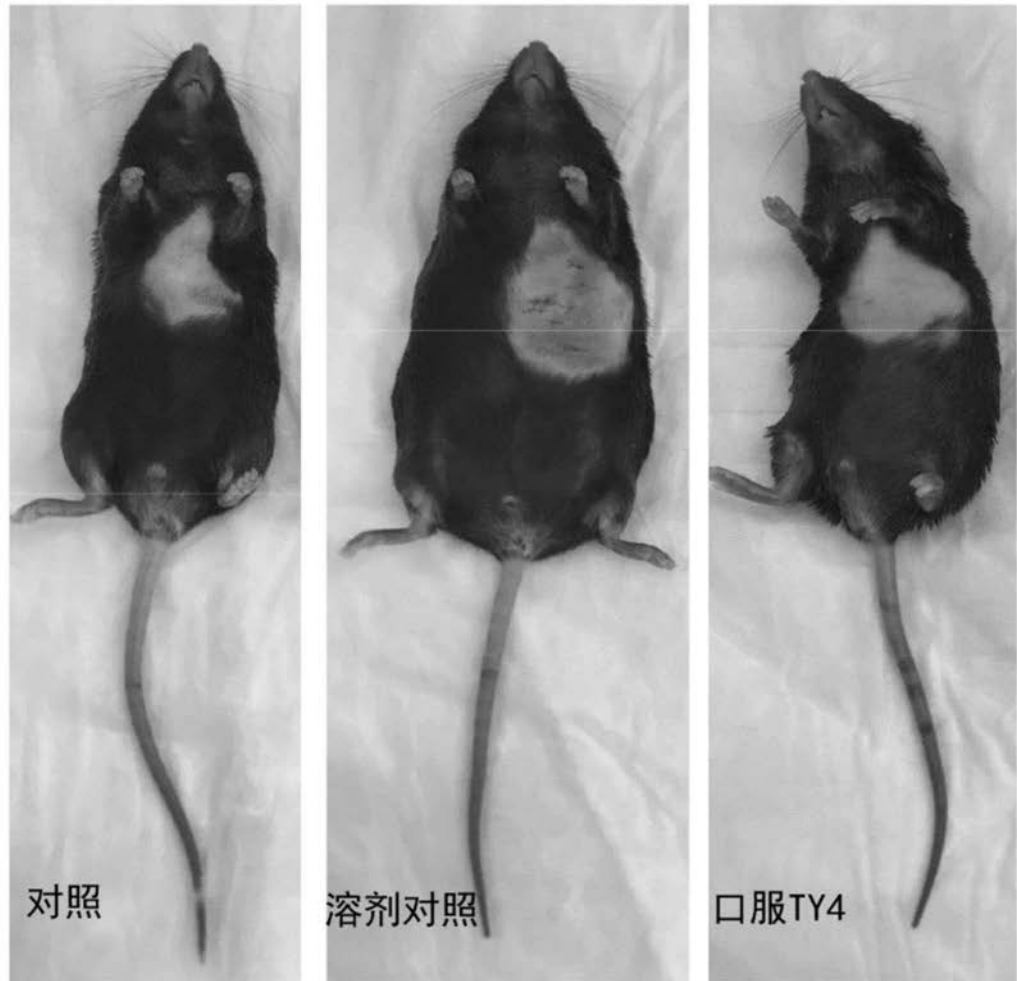


图4G

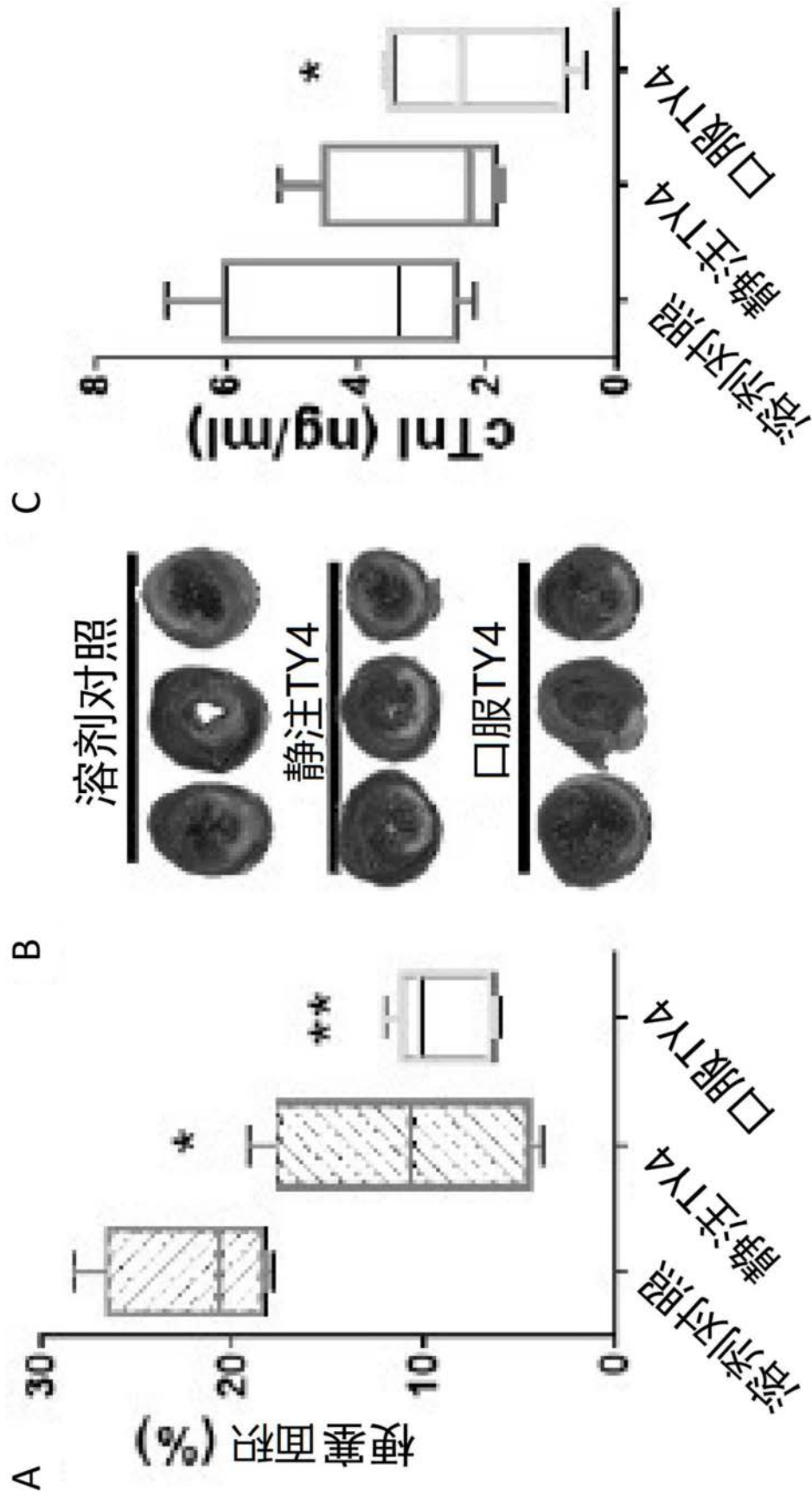


图5A-5C

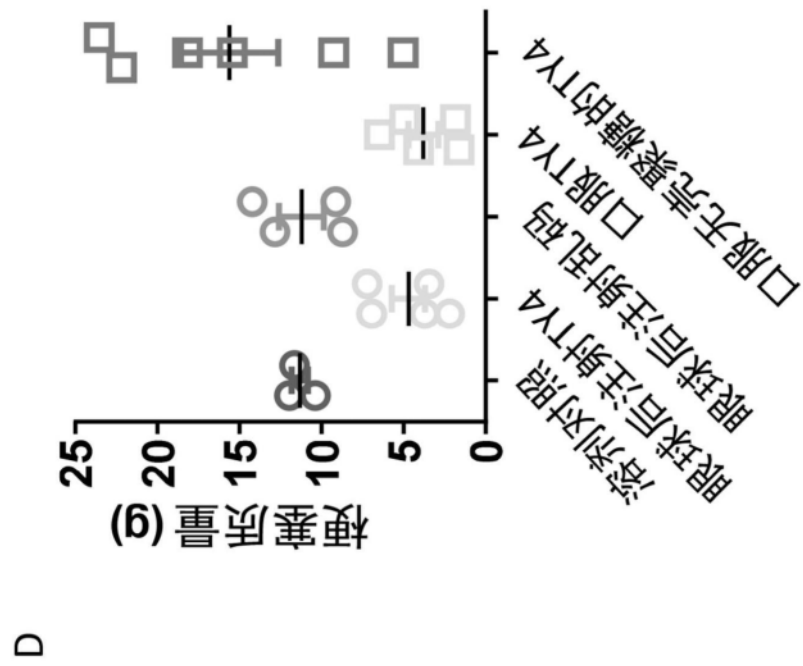
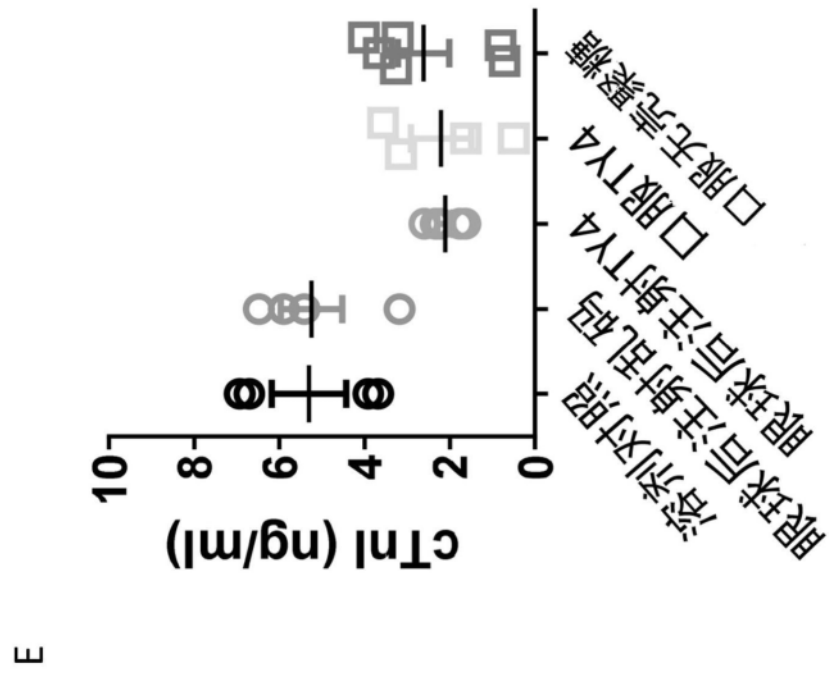


图5D-5E

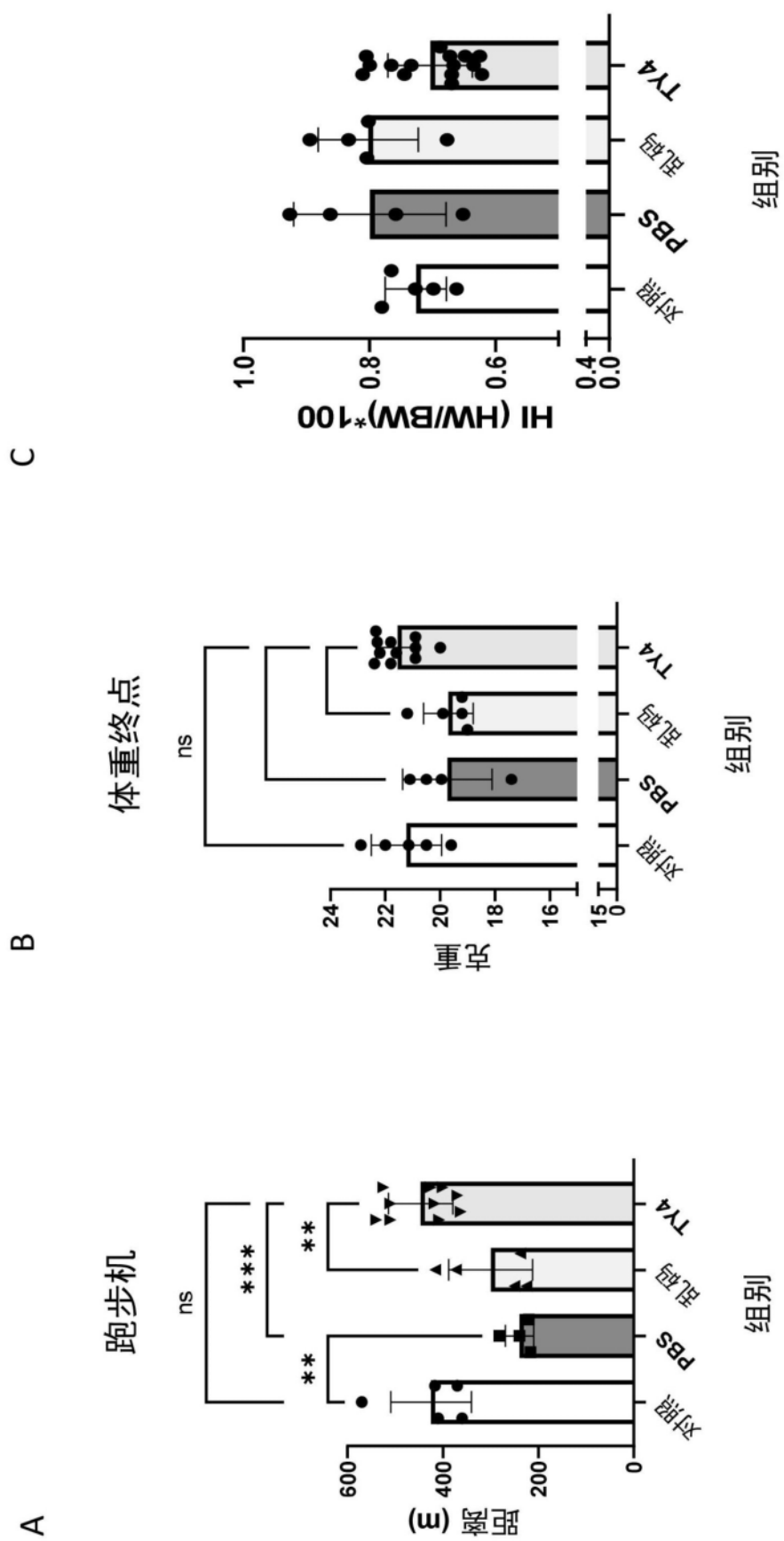
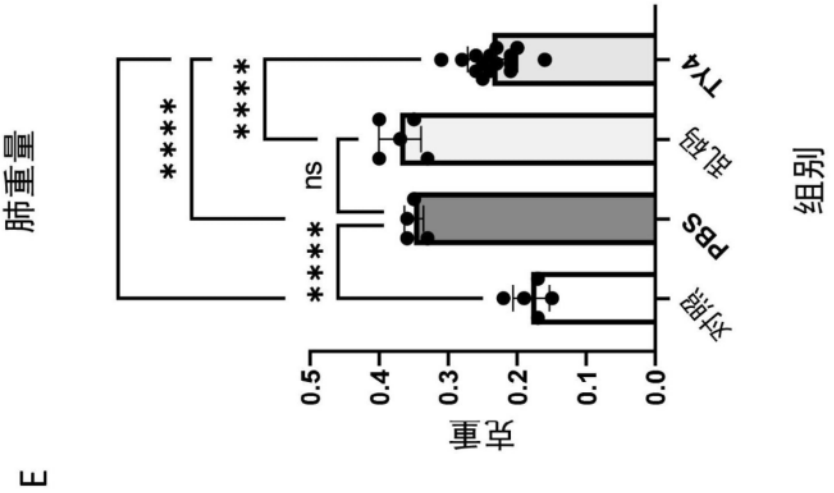


图6A-6C



D

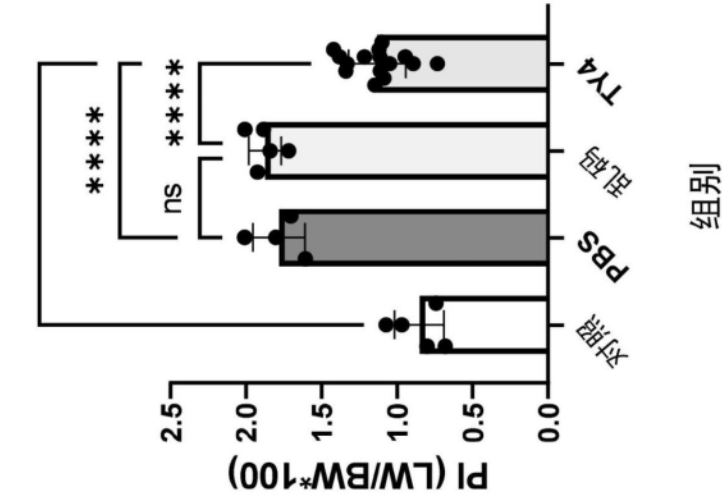


图6D-6E

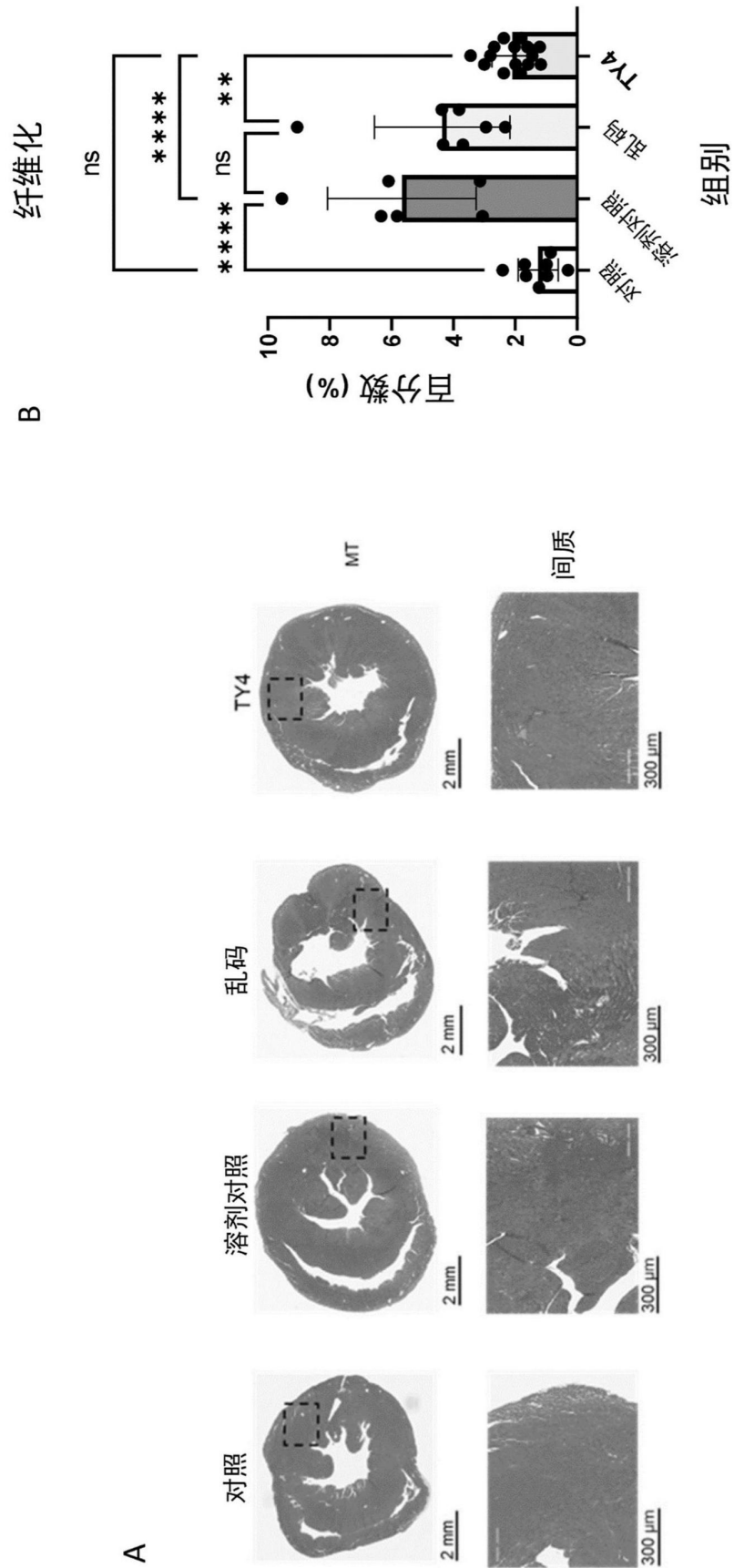
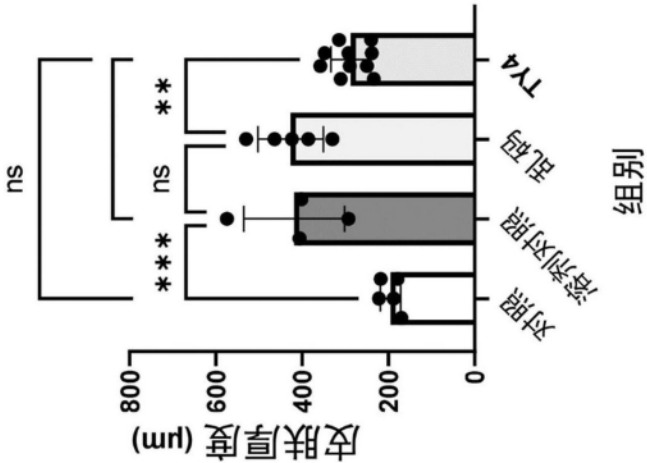
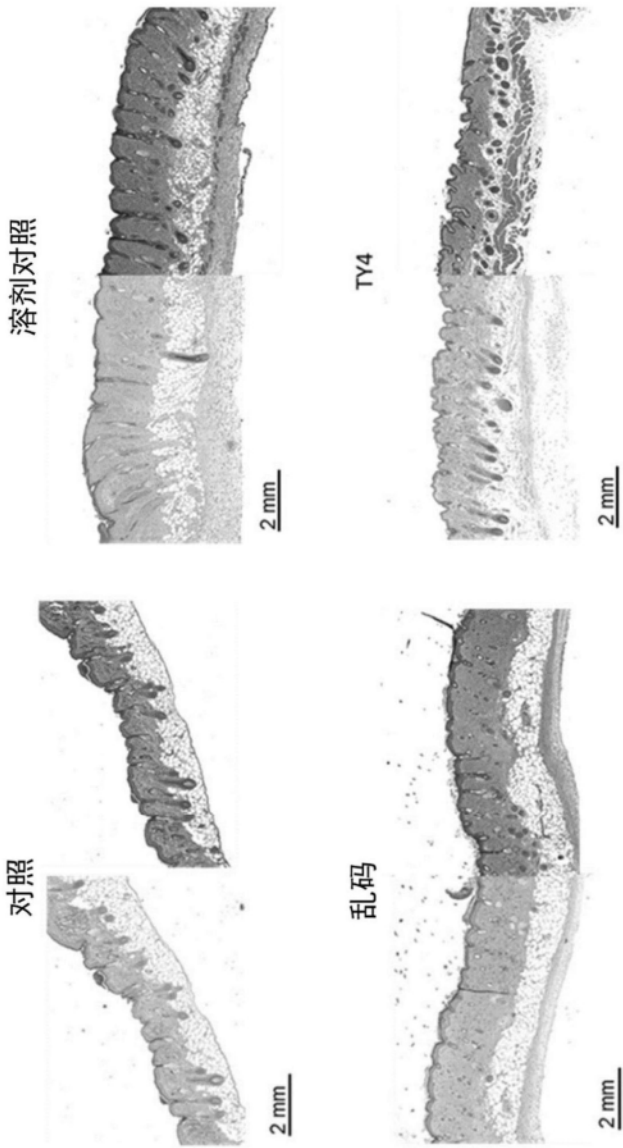


图7A-7B

D



C



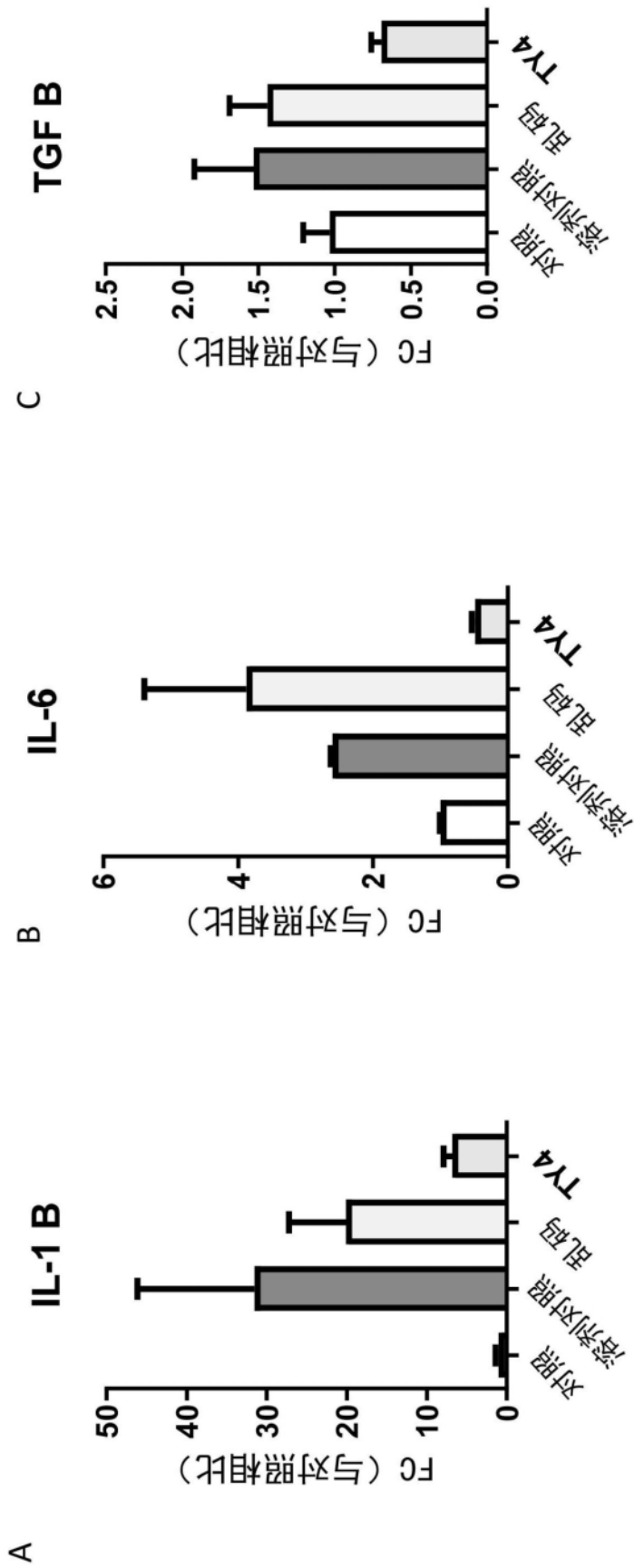


图8A-8C

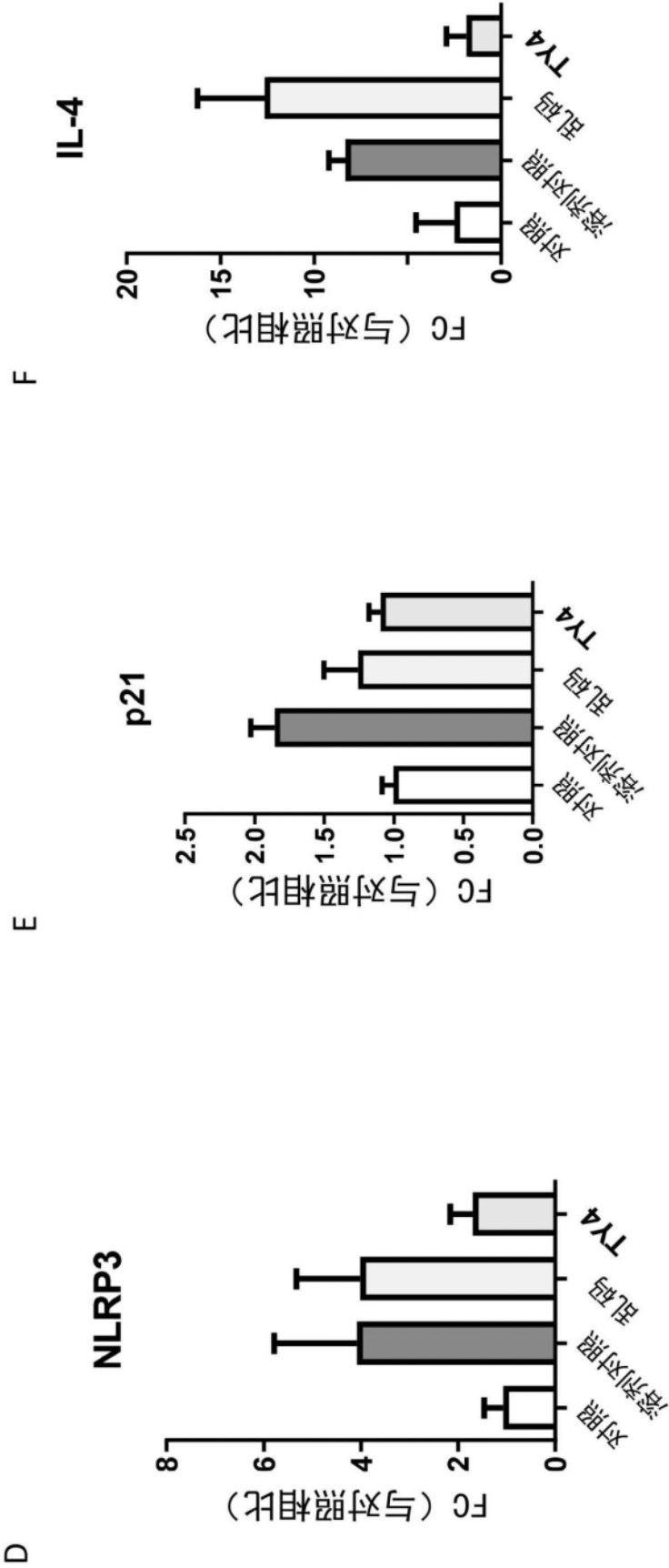


图8D-8F

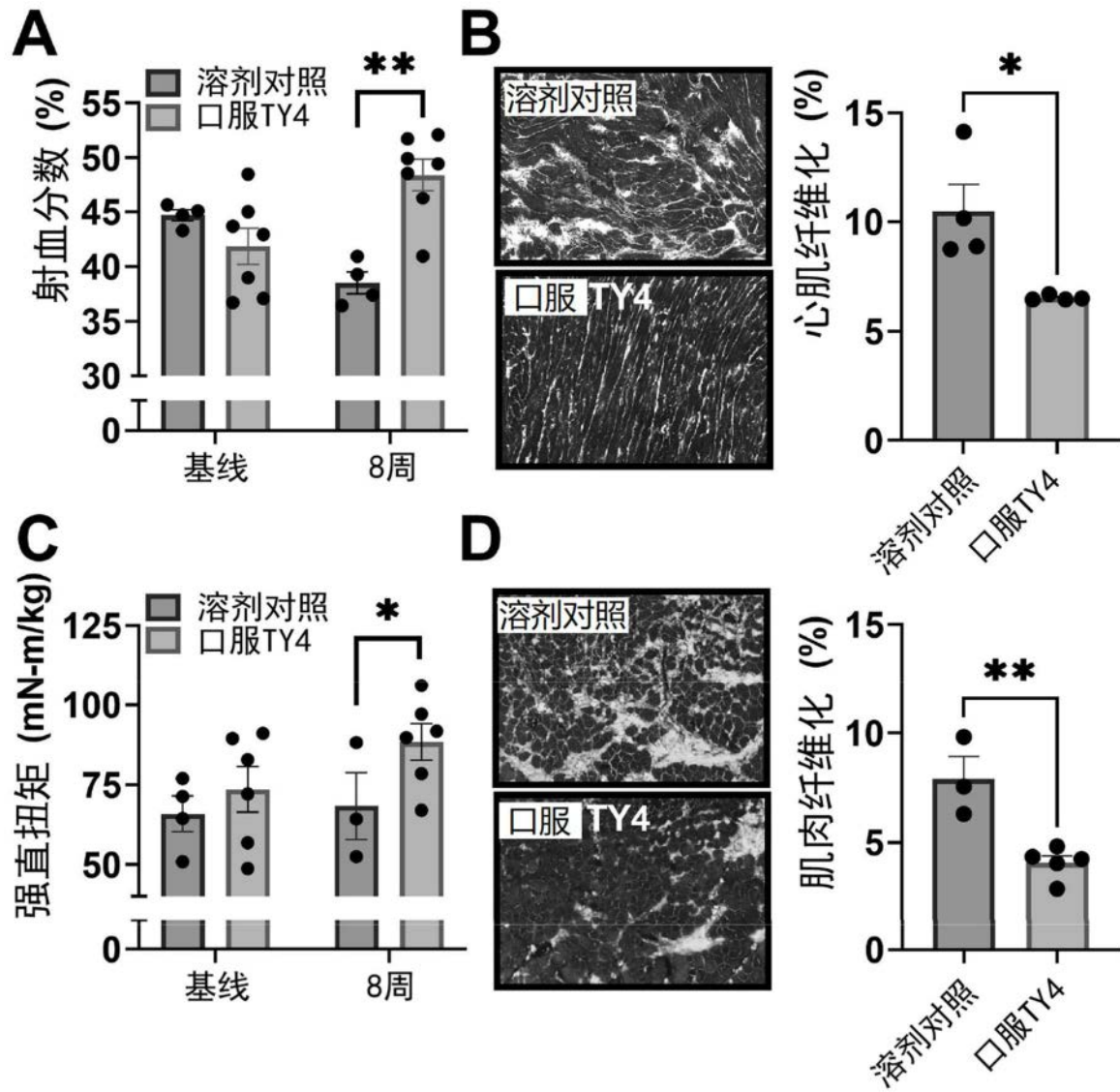


图9A-9D

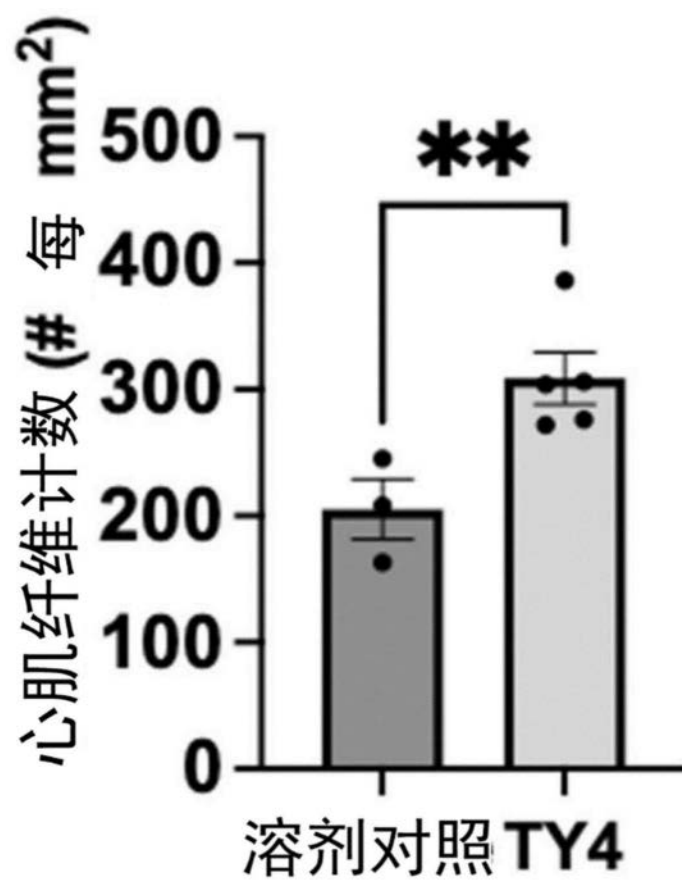


图9E

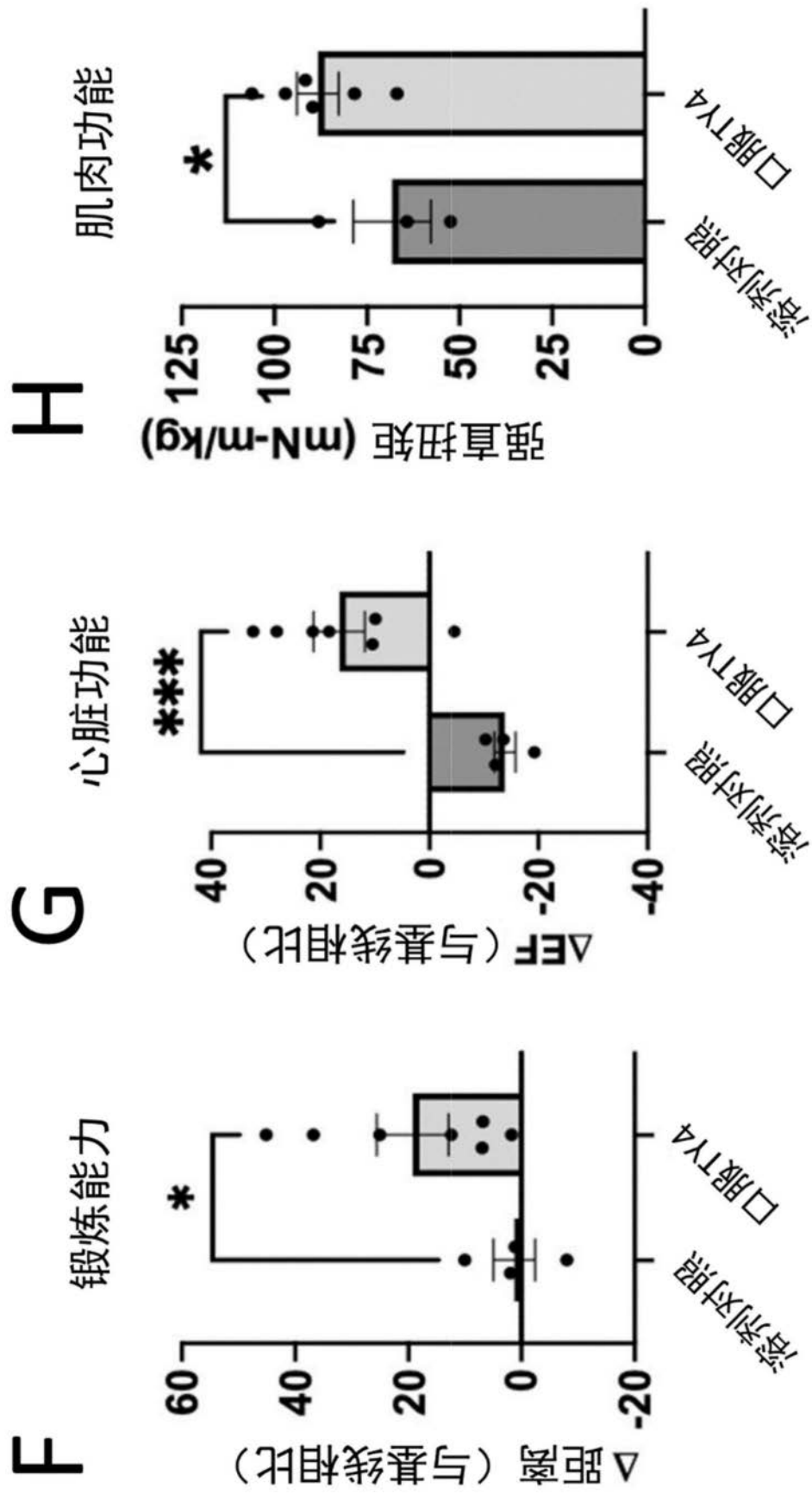


图9F-9H