

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 4 月 20 日 (20.04.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/063196 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/11 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/092124
- (22) 国际申请日: 2015 年 10 月 16 日 (16.10.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 宾夕法尼亚大学 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) [US/US]; 美国宾夕法尼亚州费城核桃街 3451 号, PA Pennsylvania 19104 (US)。
- (72) 发明人: 阮庆国 (RUAN, Qingguo); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 陈有海 (CHEN, Youhai H.); 美国宾夕法尼亚州费城核桃街 3451 号, PA Pennsylvania 19104 (US)。 范婷婷 (FAN, Tingting); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 马轶凡 (MA, Yifan); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 蔡锦涛 (CAI, Lintao); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 王绍文 (WANG, Shaowen); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 万晓春 (WAN, Xiaochun); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京三友知识产权代理有限公司 (BEIJING SANYOU INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.); 中国北京市金融街 35 号国际企业大厦 A 座 16 层, Beijing 100033 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: C-REL-SPECIFIC siRNA AND APPLICATION THEREOF FOR TREATING AUTOIMMUNE PSORIASIS

(54) 发明名称: c-Rel 特异性 siRNA 及其用于防治自身免疫性银屑病的应用

(57) Abstract: Provided is a c-Rel-specific siRNA and an application thereof for treating autoimmune psoriasis. Specifically, the c-Rel-specific siRNA has a sequence such as SEQ ID Nos. 1-2 or SEQ ID Nos. 3-4. The present invention adopts a c-Rel-specific small interfering RNA to suppress biosynthesis of c-Rel, and treats autoimmune psoriasis by suppressing IL-23/IL-17A inflammatory axis-related inflammation factors.

(57) 摘要: 提供了 c-Rel 特异性 siRNA 及其用于防治自身免疫性银屑病的应用。具体而言, 所述 c-Rel 特异性 siRNA 具有如 SEQ ID Nos.1~2 或 SEQ ID Nos.3~4 所示序列, 本发明采用 c-Rel 特异的小干扰核糖核酸来抑制 c-Rel 的生物合成, 并通过抑制 IL-23/IL-17A 炎症轴相关炎症因子来防治自身免疫性银屑病。



WO 2017/063196 A1

c-Rel 特异性 siRNA 及其用于防治自身免疫性银屑病的应用

技术领域

本发明涉及以 NF- κ B 家族成员 c-Rel 为靶点来治疗自身免疫性银屑病，具体涉及
5 c-Rel 特异性 siRNA 及其用于防治（预防和/或治疗）自身免疫性银屑病的应用，本发明能有效防治自身免疫性银屑病，同时几乎不影响免疫系统正常功能的发挥。

背景技术

银屑病是影响最为广泛的三大自身免疫病之一，其全球发病率约为 3%，其中三分
10 之一的患者达到中度至重度的程度。银屑病病征表现为皮肤增厚和广泛性损害，可引起瘙痒、鳞屑和疼痛，并严重影响患者的生活质量、心理健康以及社会关系。此外，病症较重者易患合并症，如关节炎、心脏病和糖尿病，具有死亡风险。

1 自身免疫性银屑病

1.1 自身免疫性银屑病致病机理研究进展

15 在 1980 年之前，研究人员仅仅看到银屑病银屑症状的表象并认为银屑病是由于皮肤角质细胞过度增殖引起。随后的 20 年里，随着免疫学的发展，研究人员检测到银屑病患者皮肤内 p40 蛋白的显著增多，而 p40 在当时被认为仅仅是 IL-12p35p40 的亚基，并且 IL-12p35p40 是驱使 naive CD4⁺ T 细胞向 Th1 细胞分化的重要因子。因此，当时的学者认为银屑病是 Th1 细胞异常活化所介导的炎症性疾病。然而，在 2000 年，Oppmann
20 B 等人发现了 p19 蛋白，其可与 p40 聚合形成 IL-23p19p40。于是，研究人员意识到之前基于 p40 表达差异所提出的 Th1 介导银屑病的理论并不可靠。果然，在进一步验证时，Lee E 等人发现银屑病患者皮肤内 IL-23p19、p40 蛋白均明显增多，但 IL-12p35 却无显著变化。在 2005 年左右，Langrish CL、Harrington LE 以及 Park H 等人发现 IL-23 能促使 naive CD4⁺ T 细胞向 Th17 发育，其主要通过分泌 IL-17A 来调控炎症反应。目前，
25 Leslie van der Fits 等人已经证实自身免疫性银屑病主要由 IL-23/IL-17A 炎症轴介导 (van der Fits, L. *et al.* Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **182**, 5836-5845, doi:10.4049/jimmunol.0802999 (2009))，其病理过程主要为：致病因素（如遗传、环境、感染以及物理损伤等）导致先天性免疫细胞（如角质细胞、自然杀伤细胞等）分泌 TNF- α 、
30 IL-1 β 和 IL-6 等促炎性因子，激活树突状细胞等先天免疫细胞。活化的树突状细胞迁移

到皮肤淋巴结等免疫器官中，提呈抗原并分泌 IL-23 等促炎性因子，促使 naive CD4⁺T 细胞向 Th17 分化。分化的自身反应性 Th17 从皮肤的毛细血管中迁移出，浸润到皮肤中的炎症部位。在获得自身抗原的再刺激后，持续增殖并分泌 IL-17A 等多种炎性因子。IL-17A 等因子可激活角质细胞，刺激其增殖，形成银屑症状。另一方面，活化的角质细胞又可分泌抗菌肽（如 LL-37 抗菌肽和 β -防御素）、促炎性因子（TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6）、趋化因子（CXCL8-11、CCL20）以及 S100 蛋白等，这些因子又可激活先天性免疫细胞，导致炎症恶性循环，从而维持并加重银屑病发展。可见，IL-17A 在银屑病先天免疫和适应性免疫的炎症回路中扮演着重要的桥联作用。当然，IL-23/IL-17A 炎症轴仅仅是银屑病病理过程中的某一重要的环节。近期研究发现 $\gamma\delta$ T 细胞以及巨噬细胞也可分泌 IL-17A 而促进银屑病的发生发展（Cai, Y., Fleming, C. & Yan, J. Dermal gammadelta T cells--a new player in the pathogenesis of psoriasis. *International immunopharmacology* **16**, 388-391, doi:10.1016/j.intimp.2013.02.018 (2013)), Th22 细胞可分泌 IL-22 而加重银屑病的发展，其余病理环节还有待发现（Benham, H. *et al.* Th17 and Th22 cells in psoriatic arthritis and psoriasis. *Arthritis research & therapy* **15**, R136, doi:10.1186/ar4317 (2013))。

1.2 自身免疫性银屑病的治疗现状

目前，对银屑病的治疗主要按照疾病的严重程度予以分类治疗。对于轻中度银屑病常局部予以外用药物来治疗，如糖皮质激素、维生素 D3 类似物、维 A 酸、蒽林、焦油类等。外用药物无效或者重度银屑病，尤其是红皮病型银屑病、泛发性脓疱型银屑病及关节病型银屑病等，常采用系统给药疗法，如肌肉或静脉滴注甲氨蝶呤、环孢素等小分子免疫抑制剂。近几年，一些生物制剂也被 FDA 批准用于治疗重度银屑病，如以 T 细胞 CD2 或 CD11a、TNF- α 、IL-12 和 IL-23 为靶点的单抗（表 1）。

表 1. 近几年银屑病药物研发进展

名称	制药公司	类型	靶点	研发进展
Alefacept	生物基因	单抗	T 细胞（CD2）	2003 年获批
Efalizumab	基因泰克	单抗	T 细胞（CD11a）	2003 年获批，2009 年召回
Etanercept	安进	单抗	TNF- α	2004 年获批
Infliximab	扬森生物技术	单抗	TNF- α	2006 年获批
Adalimumab	雅培	单抗	TNF- α	2008 年获批
Ustekinumab	强生、扬森生物技术	单抗	p40 (IL-12&IL-23)	2009 年获批
Briakinumab	雅培	单抗	p40 (IL-12&IL-23)	临床 3 期完成
Tildrakizumab	默克	单抗	IL-23p19	临床 3 期

Guselkumab	扬森生物技术	单抗	IL-23p19	临床 3 期
AMG-139	安进	单抗	IL-23p19	临床 2 期
BI-655066	勃林格殷格翰	单抗	IL-23p19	临床 2 期
LY-3074828	礼来	单抗	IL-23p19	临床 1 期
ABT-122	雅培以及 AbbVie	单抗	IL-17A & TNF	2009 年获批
Secukinumab	诺华	单抗	IL-17A	2015 年获批
Brodalumab	安进	单抗	IL-17RA	临床 3 期
Ixekizumab	礼来	单抗	IL-17A	临床 3 期
Apremilast	新基	小分子	PDE4	2014 年获批
AN2728	Anacor	小分子	PDE4	临床 2 期
Tofacitinib	辉瑞	小分子	JAK	临床 3 期
IM0-3100	Idera	小分子	TLR7 & 9	临床 2 期

这些生物制剂疗效显著，但安全性不明确，有待临床的长期考证。此外，各大医药公司还正积极开发以 IL-23、IL-17 或 IL-17 受体等为靶点的单抗药物，其中诺华公司研发的 Secukinumab 在 2015 年年初获欧盟批准，系全球首个 IL-17 单抗。遗憾的是，出于安全性考虑，中轻度患者在短期内不能使用这些单抗药物。除大分子单抗药物外，一些

5 小分子抑制剂也被 FDA 批准用于治疗银屑病，如以 PDE4 为靶点的口服小分子抑制剂，以 TLR7&9、JAK 为靶点的小分子抑制剂也在进行临床试验。

2 NF- κ B 家族及其成员 c-Rel

2.1 NF- κ B 家族及其成员

现有基础研究中已有关于 NF- κ B 家族及其成员 c-Rel 与自身免疫病关系的相关报

10 道。哺乳动物 NF- κ B 家族由五名成员组成：c-Rel, RelA (p65), RelB, NF- κ B1 (p50/p105), 和 NF- κ B2 (p52/p100)。这些蛋白的氨基末端具有由约 300 个氨基酸残基组成的一个高度保守的区域，称为 Rel 同源区 (RHD)，此同源区的功能包括二聚化、与 I κ B 相互作用、核定位以及与 DNA 结合等；相比之下，这些蛋白的羧基末端则是不保守的，其中，c-Rel、RelA 以及 RelB 的羧基末端具有反式激活功能域。

15 新合成的 NF- κ B 通常以同源或异源二聚体的形式与 I κ B 相结合形成无活性的状态储存于细胞质中。到目前为止，哺乳动物 I κ B 家族已发现有九种成员：I κ B α 、I κ B β 、I κ B ϵ 、I κ B ζ 、I κ B η 、BCL-3、I κ B-NS、p52 的前体蛋白 p100 以及 p50 的前体蛋白 p105。它们主要通过覆盖 NF- κ B 家族成员的核定位序列来阻止 NF- κ B 向核内迁移。一些受体，包括肿瘤坏死因子、IL-1 和神经生长因子 (NGF) 的受体、T 细胞和 B 细胞抗原受体以及

20 Toll 样受体，在与相关配体结合后均能活化 NF- κ B。NF- κ B 的活化需由 I κ B 激酶 (IKK) 介导 I κ B 磷酸化以及随后的 I κ B 蛋白降解或加工处理 (如 p100)。一旦 NF- κ B 被活化，

其会以游离的二聚体形式进入细胞核，并结合到靶基因启动子上的 9-10 个碱基对来调控基因的表达。活化的 NF- κ B 又可通过多种机制（如反馈通路）下调，与新合成的 I κ B 相结合，并以静息状态储存于细胞质中。

2.2 c-Rel 与自身免疫病的发展密切相关

5 研究表明，NF- κ B 除在生理功能以及病理状态的维持方面发挥作用外，其在自身免疫病的发展中也发挥着关键作用。在小鼠以及人体中，1 型糖尿病的发生常伴随着树突状细胞和单核细胞中 NF- κ B 的高度活化，以及组织中这些细胞的浸润。而抑制 NF- κ B 的活化能有效抑制 1 型糖尿病在 NOD 小鼠、CD1 小鼠和 C57BL/6 小鼠中的发生 (Campbell, I. K., Gerondakis, S., O'Donnell, K. & Wicks, I. P. Distinct roles for the NF-kappaB1 (p50) and c-Rel transcription factors in inflammatory arthritis. *The Journal of clinical investigation* **105**, 1799-1806, doi:10.1172/jci8298 (2000);)。为了直接研究 NF- κ B 在自身免疫病的发展中所起的作用，Liou 等人（包括本案发明人所在实验室）以 c-Rel 和 p50 基因敲除鼠为实验对象，研究了 I 型糖尿病、关节炎和脑脊髓炎的发病情况 (B. A. Hilliard, N. Mason, L. Xu, J. Sun, S. E. Lamhamedi-Cherradi, **H. C. Liou**, C. Hunter, **Y. H. Chen**, Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *The Journal of clinical investigation* **110**, 843-850 (2002); published online EpubSep (10.1172/jci15254); S. E. Lamhamedi-Cherradi, S. Zheng, B. A. Hilliard, L. Xu, J. Sun, S. Alsheadat, **H. C. Liou**, **Y. H. Chen**, Transcriptional regulation of type I diabetes by NF-kappa B. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) **171**, 4886-4892 (2003); **Q. Ruan**, V. Kameswaran, Y. Zhang, S. Zheng, J. Sun, J. Wang, J. DeVirgiliis, **H. C. Liou**, A. A. Beg, **Y. H. Chen**, The Th17 immune response is controlled by the Rel-RORgamma-RORgamma T transcriptional axis. *The Journal of experimental medicine* **208**, 2321-2333 (2011); published online EpubOct 24 (10.1084/jem.20110462))。研究发现，c-Rel 敲除的小鼠发育正常，具有结构正常免疫系统，它们不会产生自发的传染病，当受到高剂量的病原体攻击时，它们能正常清除病原体或者清除能力略有降低。同时，c-Rel 敲除的小鼠对自身免疫病具有耐受力，如脑脊
10
15
20
25

3 c-Rel 与自身免疫病中的炎症反应

自身免疫病小鼠体内 APC、T 细胞、B 细胞常伴有 c-Rel 的过度活化，而 c-Rel 敲除的小鼠能抵抗自身免疫病的发生，这说明 c-Rel 在自身免疫病的病理过程中发挥着关键的调控作用。研究发现，c-Rel 参与调控抗原提呈细胞中多种炎性因子的表达和 Th17 的分化发育。主要表现在：

30

3.1 c-Rel 直接调控抗原递呈细胞中多种促炎性因子的表达

树突状细胞和巨噬细胞均是机体先天性免疫系统中的专职抗原递呈细胞，它们能启动适应性免疫系统。本发明人在对骨髓来源的树突状细胞(BMDC)的研究中发现 c-Rel 敲除 BMDC 中 IL-23p19 的表达较野生型 BMDC 明显减少(Carmody, R. J., Ruan, Q., Liou, H. C. & Chen, Y. H. Essential roles of c-Rel in TLR-induced IL-23 p19 gene expression in dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**, 186-191 (2007))。通过体外荧光素酶实验(luciferase)、凝胶迁移实验(EMSA)以及体内染色质免疫共沉淀(ChIP)技术发现，在 Toll 样受体 (TLR) 信号传导时，c-Rel 可与 IL-23p19 基因启动子上两个结合位点特异性结合，并与其它转录因子形成增强体来直接调控 IL-23p19 的表达。最为重要的是，在只有其它转录因子 (p19 启动子上还包含有 AP-1、C/EBP 和 IRF 可能结合的位点) 结合到 p19 基因启动子上时，p19 基因并不活化，这表明 IL-23p19 基因的表达完全依赖于 c-Rel。另外，Nicola Mason 等人研究发现，在炎性刺激 (如 LPS) 时，c-Rel 在巨噬细胞以及树突状细胞中以 c-Rel/p50 异源二聚体的形式直接调控 IL-12p40 的表达(N. Mason, J. Aliberti, J. C. Caamano, H. C. Liou, C. A. Hunter, Cutting edge: identification of c-Rel-dependent and -independent pathways of IL-12 production during infectious and inflammatory stimuli. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **168**, 2590-2594 (2002))。此外，研究发现 c-Rel 还参与调控 APC 中 IL-6 等促炎性因子的表达(J. R. Tumang, C. Y. Hsia, W. Tian, J. F. Bromberg, H. C. Liou, IL-6 rescues the hyporesponsiveness of c-Rel deficient B cells independent of Bcl-xL, Mcl-1, and Bcl-2. *Cellular immunology* **217**, 47-57 (2002))。

3.2 c-Rel 直接或间接调控 Th17 细胞分化发育

早期，研究人员普遍认为 Th1 细胞是自身免疫病病理过程中的主要致病细胞。然而，近几年更深入的研究发现 Th17 细胞在多种自身免疫病中均发挥着更为关键的致病作用，包括多发性硬化症、银屑病、类风湿性关节炎等。不同于 Th1 细胞，Th17 细胞主要产生 IL-17A、IL-17F 和 IL-22 等细胞因子，并在炎性疾病以及抵抗细胞外细菌感染中发挥作用。Th17 谱系特异性因子包括 ROR γ t、ROR α 和 STAT3。

c-Rel 通过两方面作用来影响 Th17 分化发育。一方面，本发明人研究发现 c-Rel 通过在抗原提呈细胞中直接调控 IL-23 的产生来间接调控 Th17 细胞发育(Carmody, R. J., Ruan, Q., Liou, H. C. & Chen, Y. H. Essential roles of c-Rel in TLR-induced IL-23 p19 gene expression in dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**, 186-191 (2007))；另一方面，本发明人发现 c-Rel 还可在 T 细胞中可以直接调控 Th17 分化(Ruan,

Q. *et al.* The Th17 immune response is controlled by the Rel-RORgamma-RORgamma T transcriptional axis. *The Journal of experimental medicine* **208**, 2321-2333, doi:10.1084/jem.20110462 (2011)). 本案发明人 Ruan, Q 等人在使用抗 CD3 单抗和抗 CD28 单抗刺激从 c-Rel 敲除小鼠体内分离的 CD4+ T 细胞时, IL-17A 信使 RNA(mRNA) 以及 IL-17A 蛋白的表达较野生型明显减少; 从 c-Rel 敲除小鼠体内分离的 CD4+T 细胞在体外培养并刺激时, 发现 Th17 数量高达 70%减少 (Ruan, Q. *et al.* The Th17 immune response is controlled by the Rel-RORgamma-RORgamma T transcriptional axis. *The Journal of experimental medicine* **208**, 2321-2333, doi:10.1084/jem.20110462 (2011); Ruan, Q. *et al.* Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity* **31**, 932-940, doi:10.1016/j.immuni.2009.10.006 (2009)). 进一步研究发现 ROR γ 和 ROR γ t 的表达在 c-Rel 敲除的 T 细胞中显著降低, 而 ROR γ 和 ROR γ T 的重建能恢复 c-Rel 敲除 T 细胞中 Th17 的分化缺陷。此外, 通过染色质免疫共沉淀技术, Ruan, Q 等人发现 c-Rel/p65 通过结合并分别激活两种不同的 Ror γ 启动子来调控 ROR γ T 和 ROR γ mRNA 的表达。基于以上研究结果, 本案发明人 Ruan, Q 等人提出了 Th17 分化理论: CD4+T 细胞上 TCR、共刺激分子以及 IL-1、IL-23、IL-6 等细胞因子受体在与相应配体结合时 (Th17 分化条件), 向胞内传导活化信号, 释放多种转录因子入核。其中, 游离的 c-Rel/p65 二聚体与 Ror γ 基因的不同启动子结合, 并与其它释放入核的转录因子 (如 NFAT 和 Stat) 相互作用形成 Ror γ 特异性增强体, 启动 Ror γ 基因的转录, 从而驱动 Th17 细胞分化。值得注意的是, c-Rel/p65 转录因子是目前所发现的唯一与 Ror γ 基因启动子结合并激活转录的转录因子, 其它与 Ror γ 基因启动子结合的转录因子还有待发现。

4 以整个 NF- κ B 家族为靶点来治疗自身免疫性银屑病

理论上, 以整个 NF- κ B 家族为靶点的药物可发挥治疗自身免疫性银屑病的功效, 如蛋白酶抑制剂 (如 FDA 批准的 PS-341)、NF- κ B 的诱饵寡核苷酸、NBD 多肽以及糖皮质激素等 (Vanderlugt, C. L., Rahbe, S. M., Elliott, P. J., Dal Canto, M. C. & Miller, S. D. Treatment of established relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with the proteasome inhibitor PS-519. *Journal of autoimmunity* **14**, 205-211, doi:10.1006/jaut.2000.0370 (2000); May, M. J. *et al.* Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex. *Science* **289**, 1550-1554 (2000); De Stefano, D. Oligonucleotides decoy to NF-kappaB: becoming a reality? *Discovery medicine* **12**, 97-105 (2011)). 但是, 大多数 NF- κ B 家族蛋白在机体许多细胞中普遍表达, 并与机体正常生理功能的维持相关, 如感染过程中先天性以及适应性免疫的调控、炎症反应、抗凋亡、细胞增殖等, 导致这些药物副作用大、特异性

差，只能在短期内使用来控制急性过敏反应。因此，不能使用以整个 NF- κ B 家族为靶点的药物来治疗慢性炎症性疾病，如自身免疫性银屑病。

发明内容

5 本发明一个目的在于采用 c-Rel 特异性的小干扰核糖核酸 (siRNA) 来抑制 c-Rel 的生物合成，从而通过抑制银屑病小鼠体内 IL-23/IL-17A 炎症轴来防治自身免疫性银屑病。

本发明另一目的在于提供一种抑制个体体内 c-Rel 生物合成的 c-Rel 特异的小干扰核糖核酸。所述的个体为哺乳动物（例如小鼠）或人类。

10 本发明另一目的在于提供一种以纳米材料递送 c-Rel 特异性小干扰核糖核酸防治自身免疫性银屑病的方法。

本发明中将所述 c-Rel 特异性小干扰核糖核酸称为 siRel。

鉴于 c-Rel 在炎症反应中的重要作用以及自身免疫性银屑病的病理过程，本发明提出仅以 NF- κ B 家族成员 c-Rel 为靶点，采用 c-Rel 特异性的小干扰核糖核酸 (siRel) 来抑制 c-Rel 的生物合成，从而通过干预银屑病个体体内 IL-23/IL-17A 炎症轴来防治（预防

15 和/或治疗）自身免疫性银屑病。

一方面，本发明采用 c-Rel 特异性的小干扰核糖核酸 (siRel) 来抑制 NF- κ B 家族成员 c-Rel 的生物合成，从而通过干预 IL-23/IL-17A 炎症轴来防治自身免疫性银屑病的方法。

20 根据本发明的具体实施方案，本发明提供了一种 c-Rel 特异的小干扰核糖核酸 (siRel)。可以采用 c-Rel 特异的小干扰核糖核酸 (siRel) 来抑制 c-Rel 的生物合成。具体地，在小鼠体内，所述的 c-Rel 特异的小干扰核糖核酸 (siRel) 序列为：

正义链 5' CAACCGGACAUACCCGUCUdTdT 3' (SEQ ID No. 1)

反义链 5' AGACGGGUAUGUCCGGUUGdTdT 3' (SEQ ID No. 2)

25 对应地，在人体内所述的 c-Rel 特异的小干扰核糖核酸 (siRel) 序列为：

正义链 5' CAACCGAACAUACCCUUCUdTdT 3' (SEQ ID No. 3)

反义链 5' AGAAGGGUAUGUUCGGUUGdTdT 3' (SEQ ID No. 4)

另一方面，本发明还提供了一种以纳米材料递送 c-Rel 特异性小干扰核糖核酸 (siRel) 防治自身免疫性银屑病的方法。具体而言，可以是以纳米胶束（如，

30 PEG-PLL-PLLeu 三嵌段共聚物纳米胶束）为载体，体内输送 siRel 至树突状细胞，达到

预防和/或治疗目的。

另一方面，本发明还提供了 c-Rel 特异性的小干扰核糖核酸在制备通过抑制 c-Rel 的生物合成从而抑制银屑病个体体内 IL-23/IL-17A 炎症轴的药物组合物中的应用。具体而言，其中，所述 c-Rel 特异性的小干扰核糖核酸具有如 SEQ ID Nos. 1~2 或 SEQ ID Nos. 3~4 所示序列。所述的药物组合物还可包括用来携带 c-Rel 特异性的小干扰核糖核酸并将其转运至细胞质中的纳米材料（如，PEG-PLL-PLLeu 三嵌段共聚物胶束）。

另一方面，本发明还提供了一种防治（预防和/或治疗）自身免疫性银屑病的药物组合物，该组合物包括有效量的所述的 c-Rel 特异性的小干扰核糖核酸。优选地，所述药物组合物还包括 PEG-PLL-PLLeu 三嵌段共聚物纳米胶束。此外，所述的药物组合物可包括一种或多种药学上可接受的辅料。在本发明的一具体实施方案，本发明的所述药物组合物可以是防治个体自身免疫性银屑病的外用制剂（可以是用于涂抹皮肤的纳米胶束悬液的形式），其中 c-Rel 特异性的小干扰核糖核酸浓度为 10~100nM，纳米胶束浓度为 10~20μg/ml。所述的个体可以为哺乳动物（例如小鼠）或人类。

本发明还提供了一种防治（预防和/或治疗）自身免疫性银屑病的方法，该方法包括施予个体有效量的 c-Rel 特异性的小干扰核糖核酸来抑制 c-Rel 的生物合成从而抑制银屑病个体体内 IL-23/IL-17A 炎症轴的过程。根据本发明的具体实施方案，本发明提供了使用纳米胶束输送 c-Rel 特异性的 siRNA 来防治自身免疫性银屑病的方法。由于 siRNA 药物存在转染效率低，在生物体内易被酶解、半衰期短等缺点，本发明采用 PEG-PLL-PLLeu 三嵌段共聚物胶束来携带 siRNA 并将其转运至细胞质中。本案发明人研究表明这种三嵌段共聚物胶束生物可降解、转染效率高（Deng, J. *et al.* Self-assembled cationic micelles based on PEG-PLL-PLLeu hybrid polypeptides as highly effective gene vectors. *Biomacromolecules* **13**, 3795-3804, doi:10.1021/bm3012538 (2012)），最重要的是，本案发明人研究发现这种 PEG-PLL-PLLeu 三嵌段共聚物胶束主要富集于脾脏中并被其中树突状细胞摄取（Luo, Z. *et al.* Cationic polypeptide micelle-based antigen delivery system: A simple and robust adjuvant to improve vaccine efficacy. *Journal of Controlled Release* **170**, 259-267, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.05.027 (2013)）。体外实验中，使用 siRel 浓度为 10~100nM，纳米胶束浓度为 10~20μg/ml。在小鼠体内实验中，对于轻度银屑病的治疗每只小鼠腹腔给予 500pmol siRel，对应 100μg 纳米胶束，给药频率为每 2 天一次；对于中度银屑病的治疗每只小鼠腹腔给予 500pmol siRel，对应 100μg 纳米胶束，给药频率为每天一次。在人体内，采用静脉给药或皮损区皮内、皮下或皮肤

上涂抹给药。具体而言,静脉给予 siRel 剂量为 0.3mg/kg,对于纳米胶束剂量为 4.5mg/kg,给药频率为每三周一次;皮内给予 siRel 剂量为 8mg,对应纳米胶束剂量为 8mg,给药体积为 2ml,给药频率为每周一次;皮下给予 siRel 剂量为 16mg,对应纳米胶束剂量为 16mg,给药体积为 4ml,给药频率为每周一次;皮肤上涂抹 siRel 浓度为 10nM,对应纳米胶束剂量为 10 μ g/ml,给药频率为每日 1~3 次,每次按每 500 平方厘米擦涂 0.5ml siRel 纳米胶束悬液。

根据本发明的具体实施方案,在本发明的一具体的体外实验中,先在 NIH3T3、BMDC 和 RAW264.7 细胞系中确证了本发明的 c-Rel 特异性 siRNA 即所述的 siRel 的有效性。本发明发现 siRel 可显著降低 c-Rel 和 IL-23p19 的 mRNA 及蛋白表达水平。

根据本发明的具体实施方案,在本发明的一具体的体内实验中,发现 siRel 可明显控制轻度银屑病小鼠银屑病的发展,显著降低小鼠脾细胞 IL-17A 的产生,并抑制小鼠皮损组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-23p19 以及 IL-17A 的表达,达到了治疗效果。此外,两组小鼠皮肤切片 H&E 染色结果显示,治疗组小鼠皮肤表皮较对照组薄,且治疗组小鼠皮肤内浸润的炎性细胞明显减少。另外,在中度银屑病小鼠上测评该 siRel 药物,发现该 siRel 药物也具有一定的治疗疗效。

综上所述,本发明中,采用纳米胶束可有效输送c-Rel特异性的siRNA至树突状细胞,可显著减少IL-23/IL-17炎症轴相关炎性因子的表达,达到防治自身免疫性银屑病的作用。

附图说明

图 1: siRNA/PEG-PLL-PLLeu 胶束悬液制备示意图。

图 2: siRNA/PEG-PLL-PLLeu 纳米胶束表征。各图片: A, 凝胶阻滞实验检测胶束结合 siRNA 的能力; B, 载 siRNA 胶束混合物 (N/P=15) 的粒径大小和表面电势; C 和 D, 不同 N/P 比混合的载 siRNA 胶束混合物转染 BMDC 或 BM20 效率的测定。数值显示为均值 $\pm$ 标准差 (n=3)。

图 3: siRel/PEG-PLL-PLLeu 纳米胶束体外沉默效果。各图片, A-E, NIH3T3、RAW264.7 以及 BMDC 在 siNC 或 siRel 处理 24 小时后 LPS 刺激或不刺激 4 小时, 采用实时定量 PCR 检测 c-Rel 或 IL23p19 的相对表达; F, BMDC 在 siNC 或 siRel 处理 48 小时后 LPS 刺激或不刺激 4 小时, 通过 ELISA 检测上清中 IL23 的蛋白水平; G-H, 该 siRel 能在蛋白水平降低 c-Rel 的表达, 其中图片 H 为蛋白印迹的量化图。数值显示为均

值±标准差(n=3), *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。

图 4: IMQ 诱导小鼠银屑病模型的构建。各图片: A, IMQ 诱导 BALB/c 小鼠银屑病第 6 天银屑表型(第 0-3 天: 65mg/天; 第 4-5 天: 80mg/天; 第 6 天: 100mg/天); B, IMQ 诱导过程中, 每日对小鼠进行皮损评分 (0-4); C, 第 6 天时, 对照组与 IMQ 诱导组小鼠皮损区皮肤 H&E 染色。数值显示为均值±标准差 (n=3), 非配 t 检验, *: $P < 0.05$ 。

图 5: siRel 处理可有效控制轻度银屑病的发展。各图片: A, BALB/c 小鼠银屑病治疗疗程图, 8-11 周龄小鼠连续 8 天每日于背部涂抹咪喹莫特乳膏(第 0-3 天: 65mg/天; 第 4-5 天: 80mg/天; 第 6-7 天: 100mg/天), 第 1、2、4、6 天时腹腔给予 siNC 或 siRel, 第 8 天处死小鼠并取材; B, 第八天时对照组和治疗组小鼠的表型; C, 治疗过程中, 每日对每组小鼠进行皮损打分 (0-4); D, 对照组与治疗组小鼠皮损区皮肤 H&E 染色。数值显示为均值±标准差 (n=13), 非配 t 检验, *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$ 。

图 6: siRel 处理可有效改善中度银屑病皮损症状。各图片: A, 银屑病治疗疗程图; B, 对照组(siNC)与治疗组(siRel)小鼠皮损区皮肤 H&E 染色。

图 7: siRel 处理组小鼠脾细胞, ELISA 检测 IL17A 的蛋白水平。图中数值显示为均值±标准差 (n=5), 非配对 t 检验, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。

图 8: siRel 处理后采用实时定量 PCR 检测 IL-23p19、IL-17A、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达。数值显示为均值±标准差 (n=5), 非配对 t 检验, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。

图 9: Q-PCR 检测中度银屑病小鼠治疗后第 6 天时小鼠皮肤中炎症因子表达水平。

具体实施方式

为了更清楚地理解本发明的实质, 下面通过具体实施例并配合附图进一步详细说明本发明, 但本发明并不因此而受到任何限制。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照所属领域的常规操作或按照制造厂商所建议的条件进行。

实施例 1

本实施例, 通过体外实验, 先在 NIH3T3 和 RAW264.7 细胞系(NIH3T3 和 RAW264.7 细胞系购自 ATCC) 中确证 c-Rel 特异性 siRNA 即 siRel 的有效性。进一步, 以骨髓来源的树突状细胞 (BMDC) 为研究对象来确证该 siRel 的沉默效果。具体操作如下:

1、c-Rel 特异的小干扰核糖核酸 siRNA 的设计与合成

本实施例中, 采用 c-Rel 特异的小干扰核糖核酸 (siRel) 来抑制 c-Rel 的合成, 在

小鼠体内，该核酸序列为：

正义链 5' CAACCGGACAUACCCGUCUdTdT 3' (SEQ ID No. 1)

反义链 5' AGACGGGUAUGUCCGGUUGdTdT 3' (SEQ ID No. 2)

该 siRel 序列由上海吉玛公司合成，siNC 为通用阴性对照。FAM 标记的 siRel (siRel-FAM)亦由上海吉玛公司合成。

2、siRNA/PEG-PLL-PLLeu 胶束悬液的制备

PEG-PLL-PLLeu 为聚乙二醇-多聚赖氨酸-多聚亮氨酸三嵌段共聚物，由合作者马铁凡和蔡林涛老师采用 NCA 开环聚合法合成(Deng, J. *et al.* Self-assembled cationic micelles based on PEG-PLL-PLLeu hybrid polypeptides as highly effective gene vectors.

Biomacromolecules **13**, 3795-3804, doi:10.1021/bm3012538 (2012))。在水溶液中，大于临界胶束浓度时，该两亲性三嵌段共聚物可自组装形成粒径约 150nm 的胶束。其中，多聚亮氨酸段聚集组成胶束的疏水内核，聚乙二醇形成胶束的外壳，中间的多聚赖氨酸段因含有大量的伯胺基而发生质子化，使该胶束 zeta 电位约为 43mV。通过电性作用，该纳米胶束可以结合带负电的 siRNA，形成带正电的荷载 siRNA 的胶束混悬液。另外，由于细胞膜带负电，荷载 siRNA 纳米胶束通过电性作用吸附于细胞膜上，促进细胞对该胶束的内吞。

请参见图 1，称取适量 PEG-PLL-PLLeu 冻干粉溶于去离子水中，制备成 1mg/ml 的共聚物胶束悬液，0.22 μ m 过滤除菌。按不同 N/P 比（共聚物胶束伯氨基与 siRel 磷酸基的摩尔比），将 OPTI-MEM 稀释的 siRel 与等体积的共聚物悬液混合，室温下静置 30min，获得载 siRel 的共聚物胶束（siRel/PEG-PLL-PLLeu）混悬液。将该胶束悬液滴入细胞培养板中，轻拍混合均匀，以转染细胞。

3、siRNA/PEG-PLL-PLLeu 纳米胶束表征

将如上所述制备的不同 N/P 比混合的 siRel/PEG-PLL-PLLeu 上样于 2%琼脂糖凝胶，使用 TAE 缓冲液在 120mV 电压下电泳 20 分钟，后用紫外凝胶成像仪观察凝胶阻滞结果。纳米胶束的粒径及 zeta 电位使用动态光散射仪(Nano-ZSZEN3600)于室温下测定，结果使用 Malvern Dispersion Technology Software 4.2 软件进行分析。

图 2 中 A 显示凝胶阻滞实验检测胶束结合 siRNA 的能力。从图中可以看出，当 N/P 比大于等于 2 时该共聚物胶束能将 siRNA 全部荷载。

图 2 中 B 显示载 siRNA 胶束混合物（N/P=15）的粒径大小和表面电势。结果表明，当以 N/P 比为 15 的比例混合共聚物胶束和 siRNA 时，检测到荷载 siRel 后胶束粒径由

约 148nm 增大至 180nm 左右, zeta 电位则由约 42 mV 降低至 38mV 左右。

图 2 中 C 和 D 显示不同 N/P 比混合的载 siRNA 胶束混合物转染 BMDC 或 BM20 效率的测定结果。流式结果表明, 当 N/P 比为 10、15 或 20 时, 转染 BMDC 以及 BM20 效率没有显著区别。当 N/P 比为 15 时, 该纳米胶束转染 BMDC 效率约为 45%, 转染

5 BM20 效率约为 60%。

4、siRel/PEG-PLL-PLLeu 纳米胶束体外沉默实验

方法: NIH3T3 以及 RAW264.7 细胞系购自 ATCC, 按标准程序培养。BMDC 为原代分离诱导而来。将 BALB/c 小鼠脱颈处死, 无菌条件下取股骨和胫骨, 使用 1ml 注射器吸取含 2%FBS 的 PBS 液冲洗出骨髓细胞。收集细胞悬液, 离心后采用红细胞裂解液
10 重悬, 裂解 1min 之后使用培养基洗涤三次。采用含 20ng/ml 重组鼠 GM-CSF 和 10ng/ml 重组鼠 IL-4 的 X-Vivo 培养基悬浮细胞, 配制成 2×10^6 个/ml 的细胞悬液, 接种于 24 孔培养板, 每孔 1ml。第三天和第五天时半量换液, 第六天即可获得骨髓来源的树突状细胞 (BMDC)。在对 siRel 体外沉默效果评估时, 将 NIH3T3、RAW264.7 或 BMDC 种植于 24 孔板中, 滴入配制好的荷载 siNC 或 siRel 的纳米胶束, 并且培养液中 siRNA 浓
15 度为 100nM。转染 24h 后, LPS 刺激或不刺激 6h 后收集细胞, 采用 Trizol 试剂从细胞或组织中萃取总 RNA, 以 oligo dT 为引物, 采用 M-MLV Reverse Transcriptase 进行逆转录, 具体实验操作按 promega 公司产品说明书进行。随后采用 Thunderbird SYBR qPCR Mix 进行实时定量 PCR, 以 GAPDH 为内参, 检测 c-Rel、IL-23p19 mRNA 的表达量。BMDC 在转染 48 小时后, 使用 LPS 刺激 6h, 收集上清, 采用 ELISA 检测 IL23p19 的
20 浓度, 具体流程按 Ebioscience 公司说明书进行。BMDC 在转染 48 小时后, 使用 LPS 刺激 6h 后收集细胞, 提取细胞核蛋白, 采用 BCA 法检测蛋白浓度后, 进行蛋白印迹实验, 检测细胞核中 c-Rel 蛋白量。

图 3 显示采用 PEG-PLL-PLLeu 纳米胶束输送 siRel 时的体外沉默效果。其中, 图片 A-C 显示 siRel 能有效降低 NIH 3T3 中 c-Rel mRNA 的水平 ($P < 0.01$); 且该 siRel 能有效降低 RAW 264.7 细胞系中 c-Rel 以及 IL23p19 的 mRNA 水平 ($P < 0.05$)。在采用
25 PEG-PLL-PLLeu 胶束运输 siRNA 至 BMDC, 评估 siRel 的沉默效果时, 图片 D-E 显示, siRel 能在 mRNA 水平显著降低 BMDC 中 c-Rel 和 IL23p19 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$)。图片 F 显示, 该 siRel 亦能在蛋白水平降低 IL23 的表达 ($P < 0.01$)。图片 G-H 显示该 siRel 能在蛋白水平降低 c-Rel 的表达, 其中图片 H 为蛋白印迹的量化图。

实施例 2

银屑病的治疗分为早期、中期、晚期治疗，对应银屑病的严重程度为轻度、中度、重度。在本实验中，分别在轻、中度银屑病小鼠体内进行了 siRel 治疗效果的测评。IMQ 诱导的银屑病模型与人类银屑病的病理变化有较多相似之处，是研究银屑病的理想模型。IMQ 是 Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)7/8 的激动剂，将其涂抹于小鼠的皮肤上，可通过 TLR 途径激活树突状细胞和巨噬细胞以及 TLR 非依赖途径激活角质细胞，促进 IFN- α 、TNF- α 等促炎性因子的分泌，募集炎性细胞到皮肤，产生银屑病样皮损及组织学改变。并且，Leslie van der Fits 等人已经证实 IL-23/IL-17A 炎症轴在 IMQ 诱导的银屑病模型中发挥着关键的作用。与现有技术的报道有所不同的是，本发明在本实施例的实验中，所给予的 IMQ 的剂量是递增的，这是由于 IMQ 药品的厂家不同、小鼠的饲养环境不同会导致诱导银屑病时所需的剂量不同。

1、IMQ 诱导银屑病模型的构建

BALB/c 小鼠经 10%水合氯醛(300mg/kg)腹腔注射进行麻醉后，脱去其背部毛，形成约 2cm X 3cm 的裸露区。每日涂抹 IMQ (day0-3: 65mg/day; day4-day5: 80mg/day; day6-day7: 100mg/day;)，并且每天观察小鼠皮肤并对鳞屑的形成进行打分，评分标准为：0，无；1，轻度；2，中度；3，重度；4，极重度。各组小鼠积分取平均值后绘制趋势线，观察各组小鼠皮损的变化情况。

2、siRel 治疗小鼠轻度银屑病

银屑病小鼠模型构建过程中，在小鼠银屑评分为 0.5 时给予 siRNA 药物治疗。将银屑病小鼠随机分为对照组(siNC) 和治疗组 (siRel)，于第 1、2、4、6 天分别腹腔给予对照组和实验组 siNC/PEG-PLL-PLLeu 和 siRel/PEG-PLL-PLLeu 胶束混悬液，其中 siRNA 剂量为 500pmol，胶束剂量为 100ug。每天观察小鼠皮肤并对鳞屑的形成进行打分，于第 8 天取小鼠皮肤，按照九格法剪取各组小鼠相同部位皮损处组织，固定于 4%多聚甲醛。OCT 包埋后，以 7 μ m 的厚度进行冰冻切片。而后进行 H&E 染色，观察各组小鼠表皮厚度变化。

3、siRel 治疗小鼠中度银屑病

银屑病小鼠模型构建过程中，在小鼠银屑评分达到 2 时给予 siRNA 药物治疗。将银屑病小鼠随机分为对照组(siNC) 和治疗组 (siRel)，第 3、4、5、6、7 天分别腹腔给予对照组和实验组 siNC/PEG-PLL-PLLeu 和 siRel/PEG-PLL-PLLeu 胶束混悬液，其中 siRNA 剂量为 500pmol，胶束剂量为 100ug。每天观察小鼠皮肤并对鳞屑的形成进行打分，于

第 8 天取小鼠皮肤，按照九格法剪取各组小鼠相同部位皮损处组织，固定于 4%多聚甲醛。OCT 包埋后，以 7 μ m 的厚度进行冰冻切片。而后进行 H&E 染色，观察各组小鼠表皮厚度变化。

图 4 显示使用 IMQ 构建银屑病小鼠模型。其中，图片 A 显示第 7 天对照组与 IMQ 诱导组小鼠银屑病表型，可以观察到诱导组小鼠背部有明显的鳞屑。图片 B 显示使用 IMQ 诱导银屑病的过程中，对鳞屑样症状的评分，可以观察到诱导组小鼠的鳞屑评分一直上升，而对照组几乎无鳞屑症状，在第 4、5、6 天时具有明显差异 ($P < 0.05$)。图片 C 显示第 6 天时对照组与 IMQ 诱导组小鼠皮肤切片 H&E 染色结果，可以观察到 IMQ 诱导组小鼠表皮厚度较对照组明显增厚。这些数据表明，本实验中使用的 IMQ 剂量可成功诱导出小鼠银屑病模型。

图 5 显示采用 PEG-PLL-PLLLeu 纳米胶束输送 siRel 时的体内治疗轻度银屑病效果。其中，图片 A 显示 BALB/c 小鼠银屑病治疗疗程图。图片 B 显示 day8 时小鼠的银屑症状，可以观察到治疗组小鼠银屑样皮损得到了明显的控制。图片 C 显示小鼠银屑样症状的评分，可观察到治疗组小鼠的银屑评分一直维持在较低的水平，而对照组小鼠的银屑评分则处于上升状态，在第 7、8 天时具有明显差异 ($P < 0.05$)。图片 D 显示治疗组与对照组小鼠皮肤切片 H&E 染色结果，可观察到治疗组小鼠皮肤表皮较对照组薄，且治疗组小鼠皮肤内浸润的炎性细胞明显减少。这些数据表明，siRel 能有效控制小鼠轻度自身免疫性银屑病的发展。

图 6 显示采用 PEG-PLL-PLLLeu 纳米胶束输送 siRel 时的体内治疗中度银屑病效果。其中，图片 A 显示 BALB/c 小鼠银屑病治疗疗程图。图片 B 显示小鼠银屑样症状的评分，可观察到治疗组小鼠的银屑评分一直下降，而对照组小鼠的银屑评分则一直维持在 2 分左右，在第 8 天时具有明显差异 ($P < 0.001$)。图片 C 显示治疗组与对照组小鼠皮肤切片 H&E 染色结果，可观察到治疗组小鼠皮肤表皮较对照组薄，这些数据表明，siRel 能有效改善小鼠中度自身免疫性银屑病的症状。

4、ELISA 检测小鼠脾细胞产生 IL-17A 的水平

在轻度银屑病小鼠的治疗过程中，于第 2、6、8 天将小鼠脱颈处死，取治疗组和对照组银屑病小鼠的脾，研磨成细胞悬液，按 2×10^6 个接种于 48 孔板中，500ul 培养体系。使用或不使用 0.5ug/ml anti-CD3 抗体、anti-CD28 抗体刺激 48h 后收集上清，通过酶联免疫吸附法检测 IL-17A 的水平。酶联免疫吸附法试剂盒购自 Ebioscience 公司，具体流程按说明书操作。

图 7 显示 ELISA 检测轻度银屑病小鼠治疗过程中第 2、6、8 天时小鼠脾细胞产生 IL-17A 的水平。结果表明, 在第 2、6、8 天时, 治疗组小鼠脾细胞分泌 IL17A 较对照组明显降低($P < 0.05$)。这说明 siRel 可有效降低银屑病小鼠体内脾细胞产生 IL-17A 的水平。

5 5、Q-PCR 检测小鼠皮肤中 IL-23/IL-17A 炎症轴相关炎症因子的表达

轻度银屑病小鼠治疗过程中, 第 2、6 天按照九格法剪取各组小鼠相同部位皮损处组织, 立即放入液氮中, 然后研磨成粉末, 加入 Trizol 试剂以萃取皮肤中总 RNA。以 oligo dT 为引物, 采用 M-MLV Reverse Transcriptase 进行逆转录, 具体实验操作按 promega 公司产品说明书进行。随后采用 Thunderbird SYBR qPCR Mix 进行实时定量 PCR, 以 GAPDH 为内参, 检测 IL-23p19、IL-17A、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子的相对表达。

图 8 显示 Q-PCR 检测轻度银屑病小鼠治疗过程中第 2、6 天时小鼠皮肤中炎症因子的表达水平。结果表明, 治疗组小鼠与对照组小鼠皮肤内 TNF- α 的表达水平在第二天时稍减少 ($P < 0.05$), 而第 8 天时未检测到差异。另外, 治疗组小鼠皮肤内 IL23p19 和 IL6 的水平在第 2 天以及第 6 天时均明显降低 ($P < 0.05$)。此外, 本发明检测到治疗组小鼠与对照组小鼠皮肤内 IL17A、IL-1 β 的表达水平在第 2 天时无差异, 但在第 6 天时治疗组明显减少 ($P < 0.01$)。以上结果表明轻度银屑病小鼠治疗组小鼠皮肤内的炎症反应得到了一定的控制。图 9 显示 Q-PCR 检测中度银屑病小鼠治疗后第 6 天时小鼠皮肤中炎症因子的表达水平。结果表明, 中度银屑病小鼠在治疗第六天后, 治疗组小鼠皮肤内 IL-1 β 、IL-6、IL-23p19、IL-17A、IFN- γ 的表达水平较对照组小鼠明显减少 ($P < 0.05$)。但 IL-12p35、TNF- α 表达水平则无明显差别。以上结果说明中度银屑病小鼠治疗组小鼠皮肤内的炎症反应得到了明显的改善。

以上所述, 仅为本发明的具体实施方式, 但本发明的保护范围并不局限于此, 任何熟悉本领域的技术人员在本发明所揭露的技术范围内, 可经过创造性劳动想到的变化或替换, 都应涵盖在本发明的保护范围之内。

权利要求书

1、c-Rel 特异性的小干扰核糖核酸，其具有如下 SEQ ID Nos. 1~2 或 SEQ ID Nos. 3~4 所示序列：

正义链 5' CAACCGGACAUACCCGUCUdTdT 3' (SEQ ID No. 1)

5 反义链 5' AGACGGGUAUGUCCGGUUGdTdT 3' (SEQ ID No. 2)；或

正义链 5' CAACCGAACAUACCCUUCUdTdT 3' (SEQ ID No. 3)

反义链 5' AGAAGGGUAUGUUCGGUUGdTdT 3' (SEQ ID No. 4)。

2、c-Rel 特异性的小干扰核糖核酸在制备通过抑制 c-Rel 的生物合成从而抑制银屑病个体体内 IL-23/IL-17A 炎症轴的药物组合物中的应用。

10 3、根据权利要求 2 所述的应用，其中，所述 c-Rel 特异性的小干扰核糖核酸具有如 SEQ ID Nos. 1~2 或 SEQ ID Nos. 3~4 所示序列。

4、根据权利要求 2 或 3 所述的应用，其中，所述的药物组合物包括用来携带 c-Rel 特异性的小干扰核糖核酸并将其转运至细胞质中的纳米材料。

15 5、根据权利要求 4 所述的应用，其中，所述纳米材料为 PEG-PLL-PLL_{eu} 三嵌段共聚物胶束。

6、一种防治自身免疫性银屑病的药物组合物，该组合物包括权利要求 1 所述的 c-Rel 特异性的小干扰核糖核酸。

7、根据权利要求 6 所述的药物组合物，该组合物还包括 PEG-PLL-PLL_{eu} 三嵌段共聚物纳米胶束。

20 8、根据权利要求 7 所述的药物组合物，该组合物中，根据权利要求 4 所述的应用，其中，所述药物组合物为防治自身免疫性银屑病的外用制剂，其中 c-Rel 特异性的小干扰核糖核酸浓度为 10~100nM，纳米胶束浓度为 10~20μg/ml。

25 9、一种防治自身免疫性银屑病的方法，该方法包括施予个体有效量的 c-Rel 特异性的小干扰核糖核酸来抑制 c-Rel 的生物合成从而抑制银屑病个体体内 IL-23/IL-17A 炎症轴的过程。

10、根据权利要求 9 所述的方法，其中，是以纳米材料携带 c-Rel 特异性的小干扰核糖核酸并将其转运至细胞质中。

11、根据权利要求 10 所述的方法，其中，所述纳米材料为 PEG-PLL-PLL_{eu} 三嵌段共聚物胶束。

30 12、根据权利要求 9 所述的方法，其中，所述个体为哺乳动物或人类。

13、根据权利要求 9 所述的方法，该方法是用于防治人类自身免疫性银屑病，其中采用静脉给药或皮损区皮内、皮下或皮肤上涂抹给药。

14、根据权利要求 13 所述的方法，其中，静脉给予 siRel 剂量为 0.3mg/kg，对于
5 纳米胶束剂量为 4.5mg/kg，给药频率为每三周一次；皮内给予 siRel 剂量为 8mg，对应纳米胶束剂量为 8mg，给药体积为 2ml，给药频率为每周一次；皮下给予 siRel 剂量为 16mg，对应纳米胶束剂量为 16mg，给药体积为 4ml，给药频率为每周一次；皮肤上涂抹 siRel 浓度为 10nM，对应纳米胶束剂量为 10 μ g/ml，给药频率为每日 1~3 次，每次按每 500 平方厘米擦涂 0.5ml siRel 纳米胶束悬液。

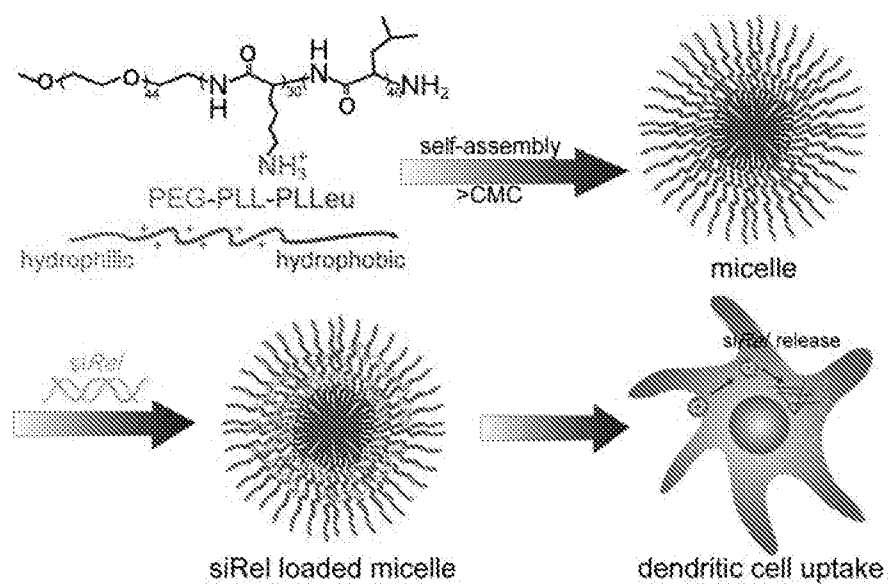


图 1

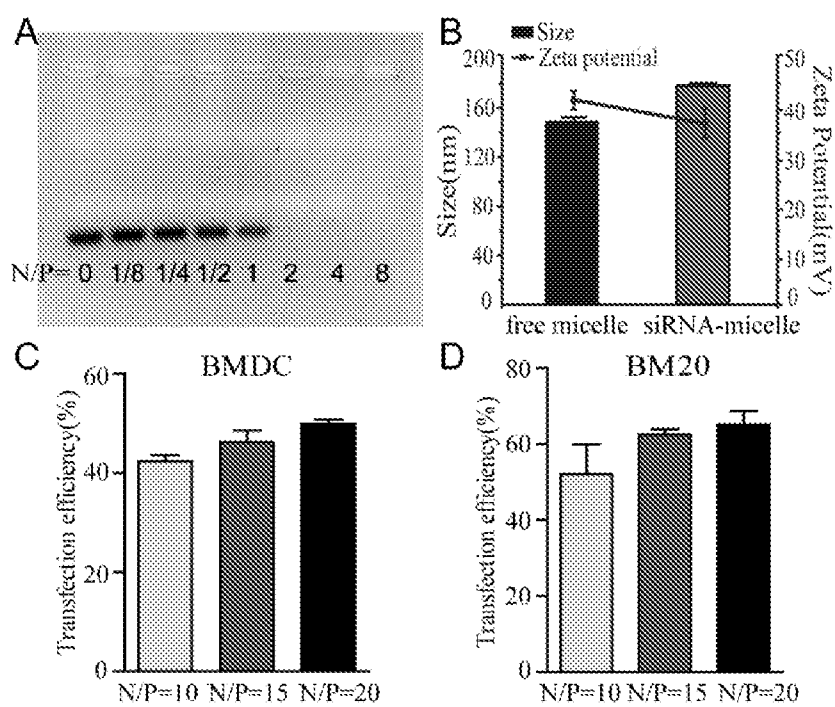


图 2

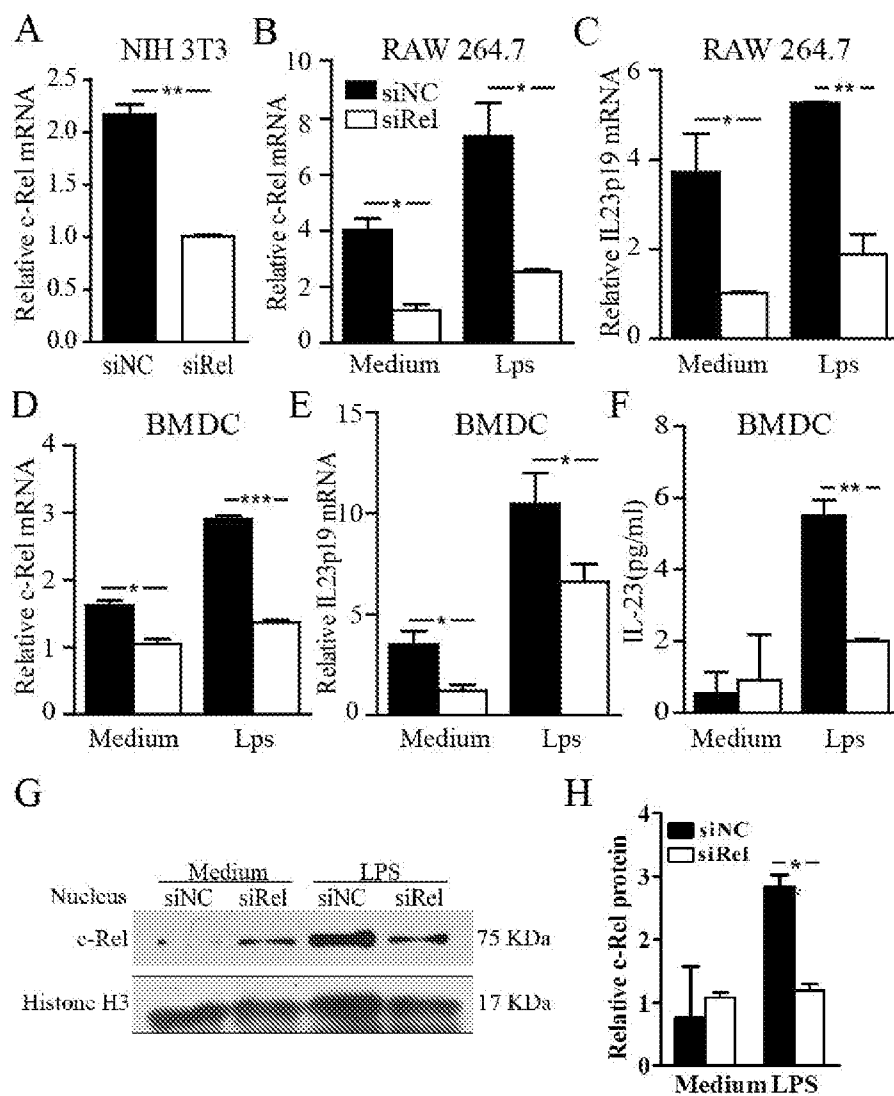


图 3

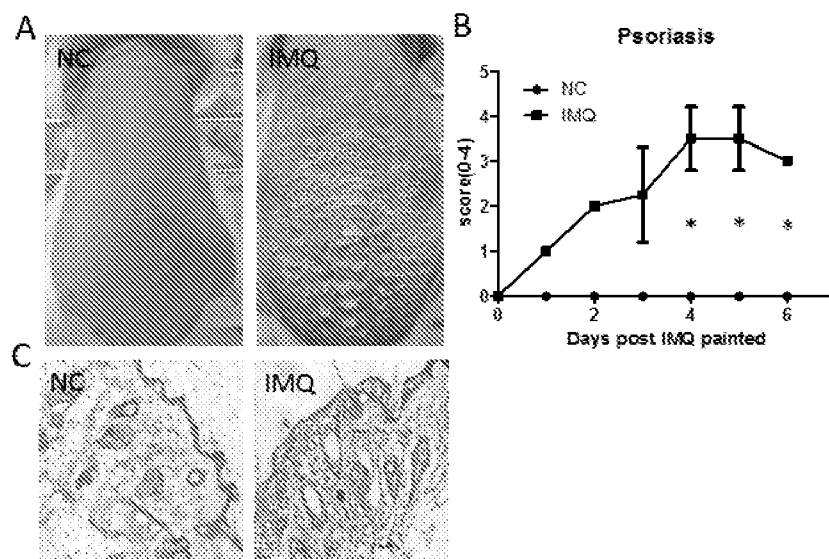


图 4

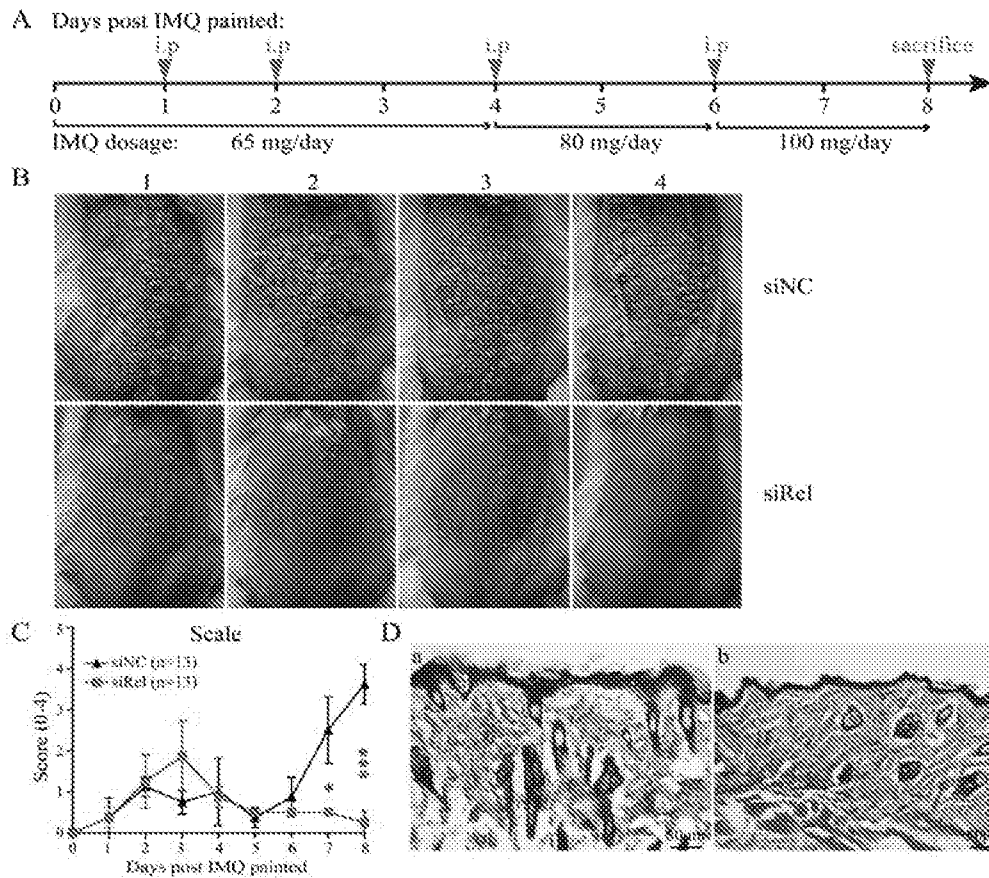


图 5

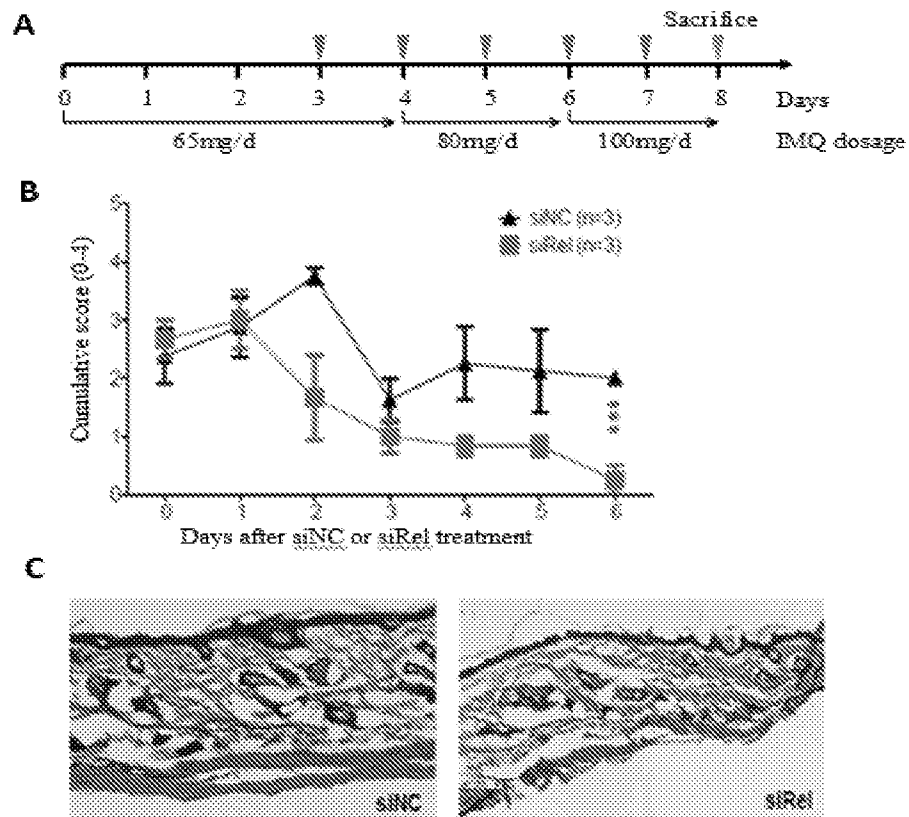


图 6

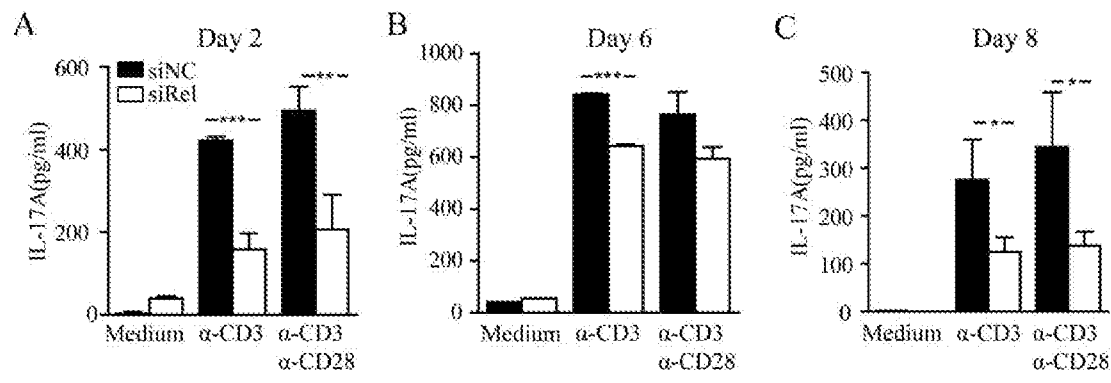


图 7

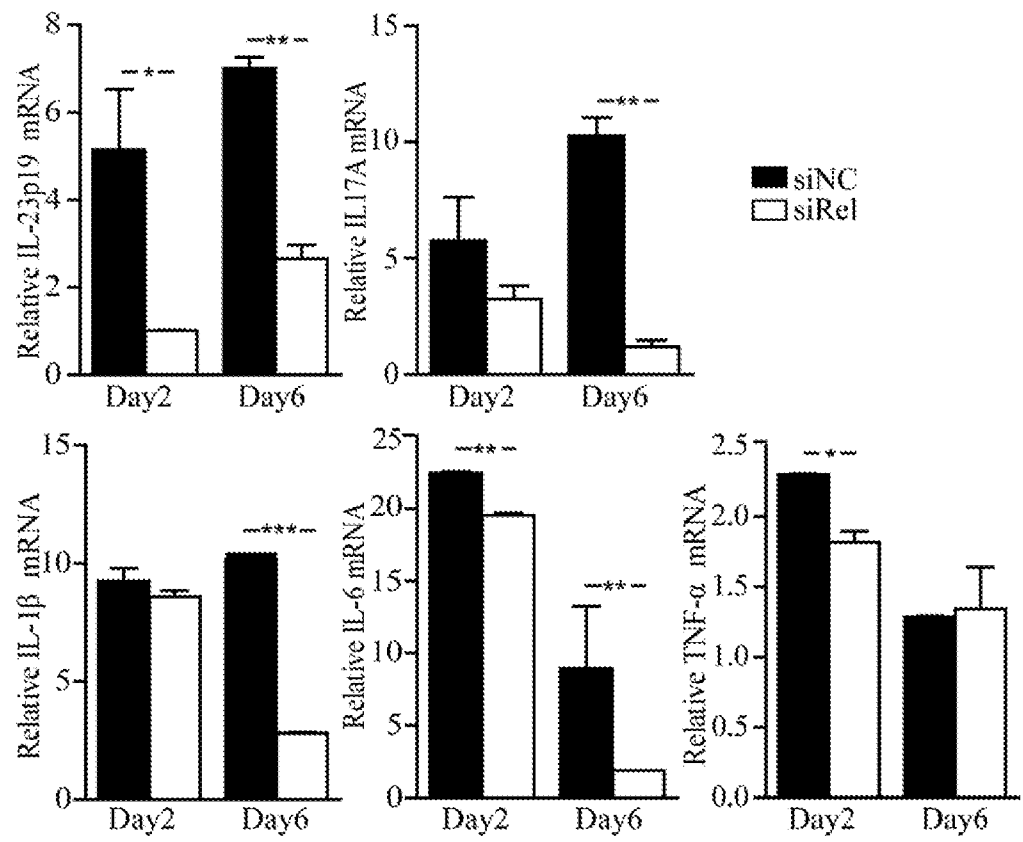


图 8

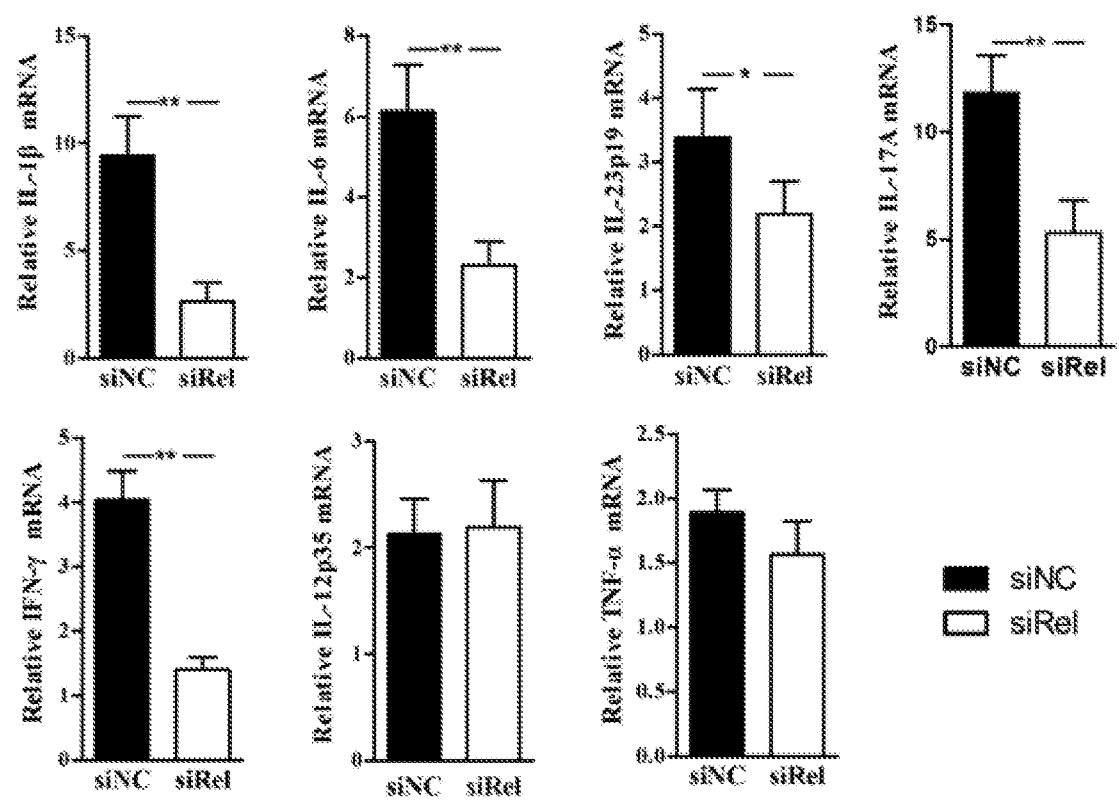


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/092124

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/11 (2006.01) i; A61K 48/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Data Base: CNTXT, CNABS, DWPI, SIPOABS, ISI WEB OF KNOWLEDGE (Biosis, medline, Embase), CNKI, PUBMED, EMBL+GENBANK+DDBJ

Search Terms: small interfering ribonucleic acid, interleukin-17, interleukin-23, siRNA, psoriasis, c-Rel, IL-17, IL-23, search on SEQ ID NOs:1-4

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007100631 A2 (SYNTA PHARMACEUTICALS CORP et al.), 07 September 2007 (2007-09 -07), see claims 20-25	2, 4-5 (parts)
Y	CN 101460634 A (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.), 17 June 2009 (17.06.2009), see claims 1-3	2, 4-5 (parts)
Y	ZHAO, Jingxia et al., "Role of IL-23/IL-17 Inflammatory Axis in the Pathogenesis of Psoriasis-Like Lesions Induced by Imiquimod in Mice IL-23/IL-17", CHINESE JOURNAL OF PATHOPHYSIOLOGY, vol. 29, no. 6, 30 June 2013 (30.06.2013) ISSN: 1000-4718, see page 1087, the last paragraph	2, 4-5 (parts)
A	CN 101646418 A (THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND), 10 February 2010 (10.02.2010), see the whole document	8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 14 July 2016 (14.07.2016)	Date of mailing of the international search report 03 August 2016 (03.08.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer SUN, Yanke Telephone No.: (86-10) 62088439

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/092124

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:9-14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] a method for the treatment of the disease
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/092124

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2007100631 A2	07 September 2007	WO 2007100631 A9	01 November 2007
		WO 2007100631 A3	19 June 2008
CN 101460634 A	17 June 2009	EP 2010225 A4	21 April 2010
		US 2010055116 A1	04 March 2010
		EP 2010225 A2	07 January 2009
		WO 2007120842 A3	31 December 2008
		WO 2007120842 A2	25 October 2007
CN 101646418 A	10 February 2010	CN 101646418 B	17 July 2013

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/092124

A. 主题的分类

C12N 15/11(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: CNTXT, CNABS, DWPI, SIPOABS, ISI WEB OF KNOWLEDGE (Biosis, medline, Embase), CNKI, PUBMED, EMBL + GENBANK + DDBJ 检索词: 银屑病, 牛皮癣, 小干扰核糖核酸, 白介素-17, 白介素-23, siRNA, psoriasis, c-Rel, IL-17, IL-23, 对SEQ ID NO:1-4进行检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	WO 2007100631 A2 (SYNTA PHARMACEUTICALS CORP等) 2007年 9月 7日 (2007 - 09 - 07) 参见权利要求20-25	2、4-5 (部分)
Y	CN 101460634 A (康乃尔研究基金会有限公司) 2009年 6月 17日 (2009 - 06 - 17) 参见权利要求1-3	2、4-5 (部分)
Y	赵京霞等. "IL-23/IL-17炎症轴在咪喹莫特诱导的小鼠银屑病样皮肤损害中的作用" 中国病理生理杂志, 第29卷, 第6期, 2013年 6月 30日 (2013 - 06 - 30), ISSN: 1000-4718, 参见第1087页最后1段	2、4-5 (部分)
A	CN 101646418 A (昆士兰大学) 2010年 2月 10日 (2010 - 02 - 10) 参见全文	1-8

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2016年 7月 14日

国际检索报告邮寄日期

2016年 8月 3日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

孙彦珂

电话号码 (86-10)62088439

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 9-14
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 疾病的治疗方法
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/092124

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2007100631	A2	2007年 9月 7日	WO	2007100631	A9	2007年 11月 1日
				WO	2007100631	A3	2008年 6月 19日
CN	101460634	A	2009年 6月 17日	EP	2010225	A4	2010年 4月 21日
				US	2010055116	A1	2010年 3月 4日
				EP	2010225	A2	2009年 1月 7日
				WO	2007120842	A3	2008年 12月 31日
				WO	2007120842	A2	2007年 10月 25日
CN	101646418	A	2010年 2月 10日	CN	101646418	B	2013年 7月 17日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)