



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107208095 B

(45) 授权公告日 2021.11.16

(21) 申请号 201580062374.9

N·M·斯尼德 E·P·帝

(22) 申请日 2015.10.01

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(65) 同一申请的已公布的文献号

代理人 封新琴

申请公布号 CN 107208095 A

(51) Int.Cl.

(43) 申请公布日 2017.09.26

G12N 15/113 (2010.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/713 (2006.01)

62/059,056 2014.10.02 US

A61P 31/20 (2006.01)

62/120,149 2015.02.24 US

A61P 31/14 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2017.05.17

W0 2013159109 A1,2013.10.24

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 103635576 A,2014.03.12

PCT/US2015/053569 2015.10.01

Narendra Vaish,et al.Improved

(87) PCT国际申请的公布数据

specificity of gene silencing by siRNAs

W02016/054421 EN 2016.04.07

containing unlocked nucleobase analogs.

(73) 专利权人 阿布特斯生物制药公司

《Nucleic Acids Research》.2010,第39卷(第5

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

期),1823-1832.

审查员 翟羽佳

(72) 发明人 J·L·克罗斯 A·P·迪隆

权利要求书2页 说明书62页

A·C·H·李 I·麦克拉克伦

序列表20页

(54) 发明名称

用于使乙型肝炎病毒基因表达沉默的组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供包含靶向乙型肝炎病毒(HBV)基因表达的诸如siRNA的治疗性核酸的组合物、包含所述治疗性核酸中的一种或多种(例如,组合)的脂质粒子,以及递送和/或施用所述脂质粒子的方法(例如,用于治疗人的HBV感染和/或HDV感染)。

1. 一种经分离的双链siRNA分子,其选自由1m:SEQ ID NO:1和2、2m:SEQ ID NO:3和4、3m:SEQ ID NO:5和6、4m:SEQ ID NO:7和8、5m:SEQ ID NO:9和10、6m:SEQ ID NO:11和12、7m:SEQ ID NO:13和14、8m:SEQ ID NO:15和16、9m:SEQ ID NO:17和18、10m:SEQ ID NO:19和20、11m:SEQ ID NO:21和22、12m:SEQ ID NO:23和24、13m:SEQ ID NO:25和26、14m:SEQ ID NO:27和28及15m:SEQ ID NO:29和30组成的组。

2. 一种药物组合物,其包含一种、两种不同的或三种不同的根据权利要求1所述的经分离的双链siRNA分子和药物学上可接受的载体。

3. 一种药物组合物,其包含三种不同的经分离的双链siRNA分子和药学上可接受的载体,其中所述三种不同的经分离的双链siRNA分子为siRNA分子3m:SEQ ID NO:5和6、6m:SEQ ID NO:11和12和12m:SEQ ID NO:23和24。

4. 一种核酸-脂质粒子,其包含:

(a) 一种、两种不同的或三种不同的经分离的双链siRNA分子,其选自根据权利要求1所述的经分离的双链siRNA分子;

(b) 阳离子脂质;及

(c) 非阳离子脂质。

5. 一种核酸-脂质粒子,其包含:

(a) 三种不同的经分离的双链siRNA分子,其中所述三种不同的经分离的双链siRNA分子为siRNA分子3m:SEQ ID NO:5和6、6m:SEQ ID NO:11和12和12m:SEQ ID NO:23和24;

(b) 阳离子脂质;及

(c) 非阳离子脂质。

6. 根据权利要求4或5所述的核酸-脂质粒子,其中所述阳离子脂质选自由以下各项组成的组:1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二- γ -亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(γ -DLenDMA)、3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(DLinMP-DMA)、4-(二甲基氨基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯、5-(二甲基氨基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯、其盐及其混合物。

7. 根据权利要求4-6中任一项所述的核酸-脂质粒子,其中所述非阳离子脂质为胆固醇或其衍生物、磷脂或所述磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物,所述磷脂选自由二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)及其混合物组成的组。

8. 根据权利要求4-7中任一项所述的核酸-脂质粒子,其还包含抑制粒子聚集的缀合脂质,其中所述抑制粒子聚集的缀合脂质为聚乙二醇(PEG)-脂质缀合物,所述PEG-脂质缀合物选自由PEG-二酰基甘油(PEG-DAG)缀合物、PEG-二烷基氧基丙基(PEG-DAA)缀合物、PEG-磷脂缀合物、PEG-神经酰胺(PEG-Cer)缀合物及其混合物组成的组。

9. 根据权利要求4-8中任一项所述的核酸-脂质粒子,其中所述粒子具有5:1至15:1的总脂质:siRNA质量比。

10. 根据权利要求4-9中任一项所述的核酸-脂质粒子,其中所述阳离子脂质占所述粒子中所存在的总脂质的48摩尔%至62摩尔%。

11. 根据权利要求7-10中任一项所述的核酸-脂质粒子,其包含磷脂及胆固醇或胆固醇

衍生物,其中所述磷脂占所述粒子中所存在的总脂质的7摩尔%至17摩尔%且所述胆固醇或其衍生物占所述粒子中所存在的总脂质的25摩尔%至40摩尔%。

12.根据权利要求8-11中任一项所述的核酸-脂质粒子,其中所述抑制粒子聚集的缀合脂质占所述粒子中所存在的总脂质的0.5摩尔%至3摩尔%。

13.一种药物组合物,其包含根据权利要求4-12中任一项所述的核酸-脂质粒子及药学上可接受的载体。

14.根据权利要求4-12中任一项所述的核酸-脂质粒子或根据权利要求13所述的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物在医学疗法中使用。

15.根据权利要求4-12中任一项所述的核酸-脂质粒子或根据权利要求13所述的药物组合物在制备用于在哺乳动物中的细胞中使乙型肝炎病毒基因的表达沉默的药物中的用途。

16.根据权利要求4-12中任一项所述的核酸-脂质粒子或根据权利要求13所述的药物组合物在制备用于在人中的细胞中使乙型肝炎病毒基因的表达沉默的药物中的用途。

17.根据权利要求4-12中任一项所述的核酸-脂质粒子或根据权利要求13所述的药物组合物在制备用于在哺乳动物中改善一种或多种与乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染相关的症状的药物中的用途。

18.根据权利要求4-12中任一项所述的核酸-脂质粒子或根据权利要求13所述的药物组合物在制备用于在人中改善一种或多种与乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染相关的症状的药物中的用途。

19.根据权利要求4-12中任一项所述的核酸-脂质粒子或根据权利要求13所述的药物组合物在制备用于在哺乳动物中治疗乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染的药物中的用途。

20.根据权利要求4-12中任一项所述的核酸-脂质粒子或根据权利要求13所述的药物组合物在制备用于在人中治疗乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染的药物中的用途。

用于使乙型肝炎病毒基因表达沉默的组合物和方法

[0001] 相关申请案的交叉引用

[0002] 本专利申请案要求2014年10月02日提交的美国申请案序列号62/059,056及2015年2月24日提交的美国申请案序列号62/120,149的优先权权益,所述申请案以引用的方式并入本文中。

[0003] 发明背景

[0004] 乙型肝炎病毒(缩写为“HBV”)为肝DNA病毒家族的成员。该病毒粒子(有时称为病毒体)包括外脂质膜及由蛋白质构成的二十面体状核蛋白壳核心。核蛋白壳囊封病毒DNA及具有反转录酶活性的DNA聚合酶。外膜含有参与易感染细胞(典型地,肝脏肝细胞)的病毒结合及进入的嵌埋蛋白质。除感染性病毒粒子以外,可在已感染个体的血清中发现缺乏核心的丝状及球形体。这些粒子不具传染性且是由形成被称为表面抗原(HBsAg)的病毒体的表面的一部分且在病毒生命周期中过量产生的脂质及蛋白质构成。

[0005] HBV的基因组由环状DNA组成,但其不同寻常,这是因为该DNA不完全为双链。全长链的一端连接于病毒DNA聚合酶。该基因组为3020至3320个核苷酸长(对于全长链)及1700至2800个核苷酸长(对于较短链)。负义(非编码)与病毒mRNA互补。细胞感染后不久即在核中发现病毒DNA。存在四种已知的由该基因组编码的基因,称为C、X、P及S。核心蛋白由基因C(HBcAg)编码,且其起始密码子前面为产生前驱核心蛋白的上游同框AUG起始密码子。HBeAg由前驱核心蛋白的蛋白水解处理产生。DNA聚合酶由基因P编码。基因S为编码表面抗原(HBsAg)的基因。HBsAg基因为一个长开放阅读框,但含有三个同框“起始”(ATG)密码子,从而将该基因分成三部分,即pre-S1、pre-S2及S。由于多个起始密码子,故而产生称为大、中及小的三种不同尺寸的多肽。尚未完全了解由基因X编码的蛋白质的功能,但其与发展肝癌相关。HBV的复制是复杂的过程。尽管复制发生在肝脏中,但该病毒扩散至血液,在已感染人士的血液中发现病毒蛋白质及针对其的抗体。HBV的结构、复制及生物学性质综述于D.Glebe及C.M.Bremer, *Seminars in Liver Disease*, 第33卷, 第2期, 第103-112页(2013)中。

[0006] 人类感染HBV可导致传染性发炎性肝脏疾病。已感染的个体可能多年不展现症状。据估计,全世界人口中约有三分之一已在其生命中的某一时间点经感染,包括35000万长期携带者。

[0007] 该病毒通过传染性血液或体液暴露来传播。围产期感染也可为主要感染途径。急性疾病造成肝脏发炎、呕吐、黄疸及可能死亡。慢性乙型肝炎最终可能造成肝硬化及肝癌。

[0008] 尽管大部分感染HBV的人士通过其免疫系统的作用清除该感染,但一些感染人士遭受侵袭性感染过程(猛暴型肝炎);而其它为长期感染,从而增加其肝脏疾病的几率。目前已批准若干种药疗法用于治疗HBV感染,但已感染的个体以不同的成功程度响应这些药疗法,且这些药疗法中无一种能从已感染人士体内清除该病毒。

[0009] 丁型肝炎病毒(HDV)为仅可在存在乙型肝炎病毒(HBV)的情况下繁殖的小环形包被RNA病毒。具体而言,HDV需要HBV表面抗原蛋白来繁殖其自身。与仅感染HBV相比,感染HBV及HDV两者导致更严重的并发症。这些并发症包括在急性感染时经历肝衰竭的可能性更大

及快速进展至肝硬化,慢性感染时发展肝癌的几率增加。在所有肝炎感染中,丁型肝炎与乙型肝炎病毒的组合具有最高死亡率。HDV的传播途径类似于HBV。感染在很大程度上局限于处在高HBV感染风险下的人士,尤其是注射药物使用者,及接受凝血因子浓缩剂的人士。

[0010] 因而,持续需要用于治疗人的HBV感染以及用于治疗人的HBV/HDV感染的组合物和方法。

发明概要

[0011] 如本文中更充分描述,在一个方面,本发明提供经分离的双链siRNA分子,所述分子各自包括有义链和与该有义链杂交的反义链。本发明这个方面的siRNA靶向HBV基因组的一个或多个基因和/或转录产物。本发明这个方面的siRNA分子的实例为本文中的表A中所阐述的siRNA分子。本发明的siRNA分子当以治疗量施用给感染HBV或HBV/HDV的人类受试者时可用于例如治疗HBV感染和/或HDV感染。更一般而言,本发明提供能够在体外及体内抑制HBV基因表达或使其沉默的siRNA分子。

[0012] 在另一方面,本发明提供经分离的单链核酸分子,诸如表A中所阐述的siRNA分子的经分离的有义链和反义链。上述经分离的有义链和反义链阐述于本文中的表B中。如本文中更充分描述,本发明的siRNA和单链核酸分子经修饰且包括一个或多个UNA部分和/或一个或多个2'-O-甲基修饰(参见例如表A及表B)。

[0013] 本发明还提供包括一个或多个本发明siRNA分子(参见例如表A中所描述的siRNA分子)的组合物,诸如药物组合物。在一个实施方案中,本发明提供包括两个不同的本发明siRNA分子(例如,选自本文中的表A中所披露的siRNA分子的两个不同的siRNA分子)的组合物。在另一实施方案中,本发明提供包括三个不同的本发明siRNA分子(例如,选自本文中的表A中所披露的siRNA分子的三个不同的siRNA分子)的组合物。选自本文中的表A中所披露的siRNA分子的两个不同的siRNA分子的所有可能的组合(“二元组合”)阐述于本文中的实施例2中。选自本文中的表A中所披露的siRNA分子的三个不同的siRNA分子的所有可能的组合(“三元组合”)阐述于本文中的实施例3中。因而,在一个方面,本发明提供包括表A中所阐述的siRNA的上述二元或三元组合之一的组合物(例如药物组合物)。

[0014] 本发明还提供核酸-脂质粒子及其配制物,其中所述脂质粒子各自包括本文中所描述的siRNA、阳离子脂质及非阳离子脂质及任选存在的抑制粒子聚集的缀合脂质中的一种或多种(例如混合液)。可包括在本发明脂质粒子中的siRNA分子的实例为表A中所阐述的siRNA分子及上述siRNA的组合(例如,本文中所描述的二元和三元组合)。典型地,siRNA完全囊封在脂质粒子内。本发明的脂质粒子可用于例如向感染HBV或HBV/HDV的人体细胞(例如,肝细胞)中递送治疗有效量的siRNA,从而治疗HBV感染和/或HDV感染和/或改善HBV感染和/或HDV感染的一种或多种症状。

[0015] 本发明还提供一种药物组合物,其包含靶向HBV基因表达的siRNA分子之一或其混合液及药学上可接受的载体。举例而言,本发明提供各自包括表A中所阐述的靶向HBV基因表达的siRNA分子中的一个、两个或三个的药物组合物。关于包括囊封于脂质粒子内的siRNA混合液的配制物,不同的siRNA分子可共囊封于同一脂质粒子中,或混合液中所存在的各类型的siRNA种类可囊封在其自身的粒子中,或一些siRNA种类可共囊封于同一粒子中,而其它siRNA种类囊封在配制物内不同的粒子中。典型地,本发明的siRNA分子完全囊封

在脂质粒子中。

[0016] 本发明的核酸-脂质粒子可用于向感染HBV或HBV/HDV的人预防性或治疗性递送使一个或多个HBV基因表达沉默的siRNA分子,从而改善人的HBV感染和/或HDV感染的至少一种症状。在一些实施方案中,将本文中所描述的一种或多种siRNA分子配制于核酸-脂质粒子中,且将所述粒子施用给需要这种治疗的哺乳动物(例如,人)。在某些情况下,可向所述哺乳动物施用治疗有效量的核酸-脂质粒子,(例如,用于治疗人的HBV和/或HDV感染)。本发明的核酸-脂质粒子尤其可用于靶向作为大部分HBV基因表达部位的人肝细胞。核酸-脂质粒子的施用可通过本领域中已知的任何途径,诸如经口、鼻内、静脉内、腹膜内、肌肉内、关节内、病灶内、气管内、皮下或皮内。在特定实施方案中,核酸-脂质粒子全身施用,例如经由经肠或非经肠施用途径。

[0017] 在一些实施方案中,通过在核酸-脂质粒子施用之后检测得自哺乳动物的生物样品中的HBV RNA或蛋白水平来判定HBV基因表达下调。在其它实施方案中,通过在核酸-脂质粒子施用之后检测得自哺乳动物的生物样品中的HBV mRNA或蛋白水平来判定HBV基因表达下调。在某些实施方案中,通过在粒子施用之后监测哺乳动物中与HBV感染相关的症状来检测HBV基因表达下调。

[0018] 在另一实施方案中,本发明提供向活细胞中引入使HBV基因表达沉默的siRNA的方法,所述方法包括在siRNA得以进入所述细胞且使所述细胞内的乙型肝炎病毒基因表达沉默的条件下使所述细胞与本发明的核酸-脂质粒子接触的步骤,其中所述核酸-脂质粒子包括靶向HBV的siRNA。

[0019] 在另一实施方案中,本发明提供一种用于改善人的一种或多种与乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染相关的症状的方法,所述方法包括向所述人施用治疗有效量的本发明核酸-脂质粒子的步骤。在一些实施方案中,本发明这个方面的方法中所使用的核酸-脂质粒子包括独立地选自表A中所阐述的siRNA的一种、两种或三种或、更多种不同的siRNA。

[0020] 在另一实施方案中,本发明提供在有需要的哺乳动物(例如人)中使HBV基因表达沉默的方法,其中所述方法各自包括向所述哺乳动物施用本发明的核酸-脂质粒子的步骤。

[0021] 在另一方面,本发明提供用于治疗和/或改善人的一种或多种与HBV和/或HDV感染相关的症状的方法,其中所述方法各自包括向所述人施用治疗有效量的本发明核酸-脂质粒子的步骤。

[0022] 本发明的某些实施方案提供通过向感染HDV的HDV个体施用治疗有效量的一种或多种抑制HBV表面抗原合成的本发明组合物或核酸粒子来抑制HDV复制和/或改善HDV感染的一种或多种症状的组合物和方法。

[0023] 在另一方面,本发明提供用于在有需要的哺乳动物(例如,感染HBV或HBV/HDV的人)中抑制HBV表达的方法,其中所述方法各自包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的本发明核酸-脂质粒子的步骤。

[0024] 在另一方面,本发明提供用于治疗人的HBV和/或HDV感染的方法,其中所述方法各自包括向所述人施用治疗有效量的本发明核酸-脂质粒子的步骤。

[0025] 在另一方面,本发明提供本发明的siRNA分子用于在活细胞中抑制乙型肝炎病毒基因表达的用途。

[0026] 在另一方面,本发明提供本发明的药物组合物用于在活细胞中抑制乙型肝炎病毒基因表达的用途。

[0027] 本发明的组合物(例如,siRNA分子及其经分离的有义链及反义链,及核酸-脂质粒子)也可用于例如生物测定法(例如,体内或体外测定法)中以得到对一种或多种HBV基因和/或转录产物的表达的抑制,从而研究HBV和/或HDV复制及生物学,和/或研究或调节一种或多种HBV基因或转录产物的功能。举例而言,可使用生物测定法筛选本发明的siRNA分子以鉴别可抑制HBV和/或HDV复制且作为用于治疗人的HBV和/或HDV感染和/或改善与人的HBV和/或HDV感染相关的至少一种症状的候选治疗剂的siRNA分子。

[0028] 根据以下详细描述和图,本发明的其它目标、特征及优势对本领域的技术人员将显而易见。

具体实施方式

[0029] 引言

[0030] 本文中所描述的siRNA药物疗法有利地提供用于治疗人类HBV和/或HDV感染及与其相关的症状的重要新组合物和方法。本发明的实施方案可例如每日一次、每周一次或每数周一次(例如,每两周、三周、四周、五周或六周一次)施用。

[0031] 此外,本文中所描述的核酸-脂质粒子使得能够将诸如siRNA的核酸药物有效递送至体内的靶组织和细胞中。脂质粒子的存在可防止核酸酶在血流中降解,允许优先在靶组织中累积且提供药物进入siRNA可执行其预定RNA干扰功能的细胞质的手段。

[0032] 定义

[0033] 除非另外说明,否则如本文中所使用,以下术语具有属于其的含义。

[0034] 术语“乙型肝炎病毒”(缩写为HBV)是指作为病毒的肝病毒家族的一部分且能够在人中引起肝脏发炎的正嗜肝DNA病毒(Orthohepadnavirus)属病毒种类。

[0035] 术语“丁型肝炎病毒”(缩写为HDV)是指能够在人中引起肝脏发炎的丁型肝炎病毒属病毒种类。

[0036] 如本文中所使用的术语“小干扰RNA”或“siRNA”是指当siRNA与靶基因或序列处于同一细胞中时能够减少或抑制靶基因或序列的表达(例如,通过介导与siRNA序列互补的mRNA降解或抑制其翻译)的双链RNA(即,双链体RNA)。siRNA可与靶基因或序列具有实质性或完全一致性,或可包含错配区(即,错配模体)。在某些实施方案中,siRNA的长度可为约19至25个(双链体)核苷酸,且长度优选为约20至24、21至22或21至23个(双链体)核苷酸。siRNA双链体可包含具有约1至约4个核苷酸或约2至约3个核苷酸的3'悬垂物及5'磷酸酯末端。siRNA的实例包括而不限于由两个独立的分子组装的双链聚核苷酸分子,其中一条链为有义链且另一条链为互补反义链。

[0037] siRNA优选由化学方式合成。siRNA也可通过用大肠杆菌RNA酶III或Dicer使较长dsRNA(例如,长度大于约25个核苷酸的dsRNA)裂解来产生。这些酶将dsRNA处理成生物学活性siRNA(参见例如Yang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:9942-9947(2002);Calegari等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:14236(2002);Byrom等人,Ambion TechNotes,10(1):4-6(2003);Kawasaki等人,Nucleic Acids Res.,31:981-987(2003);Knight等人,Science,293:2269-2271(2001);和Robertson等人,J.Biol.Chem.,243:82(1968))。dsRNA的长度优

选为至少50个核苷酸至约100、200、300、400或500个核苷酸。dsRNA的长度可长达1000、1500、2000、5000个核苷酸或更长。dsRNA可编码完整基因转录产物或部分基因转录产物。在某些情况下, siRNA可由质粒编码(例如, 转录为自动折叠成具有发夹环的双链体的序列)。

[0038] 词组“抑制靶基因的表达”是指本发明的siRNA能够使靶基因(例如, HBV基因组内的基因)的表达沉默、减少或受到抑制。为了研究基因沉默的程度, 使测试样品(例如, 得自表达该靶基因的相关生物体的生物样品或表达该靶基因的培养中细胞的样品)与能使靶基因的表达沉默、减少或受到抑制的siRNA接触。将测试样品中靶基因的表达与未与siRNA接触的对照样品(例如, 得自表达该靶基因的相关生物体的生物样品或表达该靶基因的培养中细胞的样品)中靶基因的表达相比较。对照样品(例如, 表达靶基因的样品)可分配值100%。在特定实施方案中, 当测试样品的值相对于对照样品(例如, 仅缓冲液、靶向不同的基因的siRNA序列、错义siRNA序列等)为约100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%时, 达成靶基因的表达的沉默、抑制或减少。适合的测定法包括而限于使用本领域技术人员已知的技术检查蛋白质或mRNA水平, 诸如本领域技术人员已知的斑点印迹法、Northern印迹法、原位杂交、ELISA、免疫沉淀法、酶功能以及表型测定法。诸如siRNA的治疗性核酸的“有效量”或“治疗有效量”为足以产生所要效应, 例如, 与在不存在siRNA的情况下所检测的正常表达水平相比靶序列的表达受到抑制的量。在特定实施方案中, 当利用siRNA所获得的值相对于对照(例如, 仅缓冲液、靶向不同的基因的siRNA序列、错义siRNA序列等)为约100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%时, 达成对靶基因或靶序列的表达的抑制。适用于测量靶基因或靶序列的表达的测定法包括但不限于使用本领域技术人员已知的技术检查蛋白质或mRNA水平, 诸如本领域技术人员已知的斑点印迹法、Northern印迹法、原位杂交、ELISA、免疫沉淀法、酶功能以及表型测定法。

[0039] 如本文中所使用的术语“核酸”是指含有至少两个呈单链或双链形式的核苷酸(即, 脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)的聚合物且包括DNA和RNA。“核苷酸”含有糖脱氧核糖(DNA)或核糖(RNA)、碱基及磷酸基。核苷酸经由磷酸基连接在一起。“碱基”包括嘌呤和嘧啶, 其还包括天然化合物腺嘌呤、胸嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷和天然类似物, 及嘌呤和嘧啶的合成衍生物, 其包括但不限于放置诸如但不限于胺、醇、硫醇、羧酸酯及烷基卤化物的新反应基团的修饰。核酸包括含已知核苷酸类似物或经修饰的主链残基或键联的核酸, 其为合成的、天然存在的及非天然存在的且其具有与参考核酸类似的结合性质。这种类似物和/或经修饰的残基的实例包括而限于硫代磷酸酯、磷酰胺、甲基磷酸酯、手性甲基磷酸酯、2'-O-甲基核糖核苷酸及肽-核酸(PNA)。另外, 核酸可包括一个或多个UNA部分。

[0040] 术语“核酸”包括任何寡核苷酸或聚核苷酸, 其中含有至多60个核苷酸的片段一般称为寡核苷酸, 而更长的片段称为聚核苷酸。脱氧核糖寡核苷酸由称为脱氧核糖的5-碳糖组成, 该脱氧核糖该糖的5'与3'碳处被共价接合于磷酸, 以形成交替的未分支链聚合物。DNA可呈例如反义分子、质粒DNA、预凝聚DNA、PCR产物、载体、表达盒、嵌合序列、染色体DNA或这些群组的衍生物及组合形式。核糖寡核苷酸由类似的重复结构组成, 其中5-碳糖为核

糖。RNA可呈以下形式：小干扰RNA (siRNA)、Dicer底物dsRNA、小发夹RNA (shRNA)、不对称干扰RNA (aiRNA)、微型RNA (miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、病毒RNA (vRNA) 及其组合。因此，在本发明的上下文中，术语“聚核苷酸”和“寡核苷酸”是指由天然存在的碱基、糖和糖间（主链）键联组成的核苷酸聚合物或寡聚物或核苷单体。术语“聚核苷酸”和“寡核苷酸”也包括包含非天然存在的单体的聚合物或寡聚物或其具有类似功能的部分。这种经修饰或取代的寡核苷酸往往优于天然形式，这是由于诸多性质的原因，举例而言，诸如增强的细胞摄取、降低的免疫原性及增加的在核酸酶存在下的稳定性。

[0041] 除非另外指示，否则特定核酸序列也隐含其经保守修饰的变异体（例如，简并密码子取代）、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指示的序列。具体而言，简并密码子取代可通过以下方式来达成：产生一个或多个所选（或所有）密码子的第三位经混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列（Batzer等，Nucleic Acid Res., 19:5081 (1991)；Ohtsuka等，J. Biol. Chem., 260:2605-2608 (1985)；Rossolini等，Mol. Cell. Probes, 8:91-98 (1994)）。

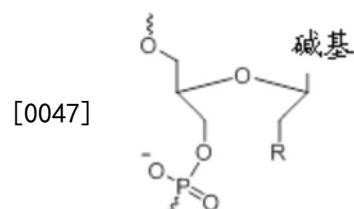
[0042] 本发明涵盖经分离或基本上纯化的核酸分子及含有那些分子的组合物。在本发明的上下文中，“经分离”或“经纯化”的DNA分子或RNA分子为除其天然环境中以外存在的DNA分子或RNA分子。经分离的DNA分子或RNA分子可呈经纯化形式存在，或可存在于非天然环境中，举例而言，诸如转殖基因宿主细胞。举例而言，“经分离”或“经纯化”的核酸分子或其生物学活性部分当通过重组技术产生时基本上不含其它细胞物质或培养基或当化学合成时基本上不含化学前驱物或其它化学物质。在一个实施方案中，“经分离”的核酸不含在得到该核酸的生物体的基因组DNA中天然地侧接该核酸的序列（即，位于该核酸的5'及3'端的序列）。举例而言，在各种实施方案中，经分离的核酸分子可含有少于约5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb或0.1kb在得到该核酸的细胞的基因组DNA中天然地侧接该核酸分子的核苷酸序列。

[0043] 术语“基因”是指包含产生多肽或前驱多肽所必需的编码序列的部分长度或整个长度的核酸（例如，DNA或RNA）序列。

[0044] 如本文中所使用的“基因产物”是指诸如RNA转录产物或多肽的基因产物。

[0045] 术语“解锁核碱基类似物”（缩写为“UNA”）是指核糖环的C2'原子与C3'原子非共价键联的非环状核碱基。术语“解锁核碱基类似物”包括具有称为结构A的以下结构的核碱基类似物：

[0046] 结构A



[0048] 其中R为羟基，且碱基为任何天然或非天然碱基，举例而言，诸如腺嘌呤 (A)、胞嘧啶 (C)、鸟嘌呤 (G) 及胸嘧啶 (T)。可用于实施本发明的UNA包括美国专利序列号8,314,227中称为非环状2'-3'-闭联核苷酸单体的分子，该专利以全文引用的方式并入本文中。

[0049] 术语“脂质”是指包括但不限于脂肪酸酯的有机化合物群组，且以不溶于水但可

溶于许多有机溶剂中为特征。其通常分成至少三类：(1) “简单脂质”，其包括脂肪和油以及蜡；(2) “复合脂质”，其包括磷脂和糖脂；及(3) “衍生脂质”，诸如类固醇。

[0050] 术语“脂质粒子”包括可用于向相关靶部位(例如细胞、组织、器官及类似物)递送治疗性核酸(例如siRNA)的脂质配制物。在优选实施方案中，本发明的脂质粒子典型地由阳离子脂质、非阳离子脂质及任选存在的可防止粒子聚集的已缀合脂质形成。包括核酸分子(例如，siRNA分子)的脂质粒子称为核酸-脂质粒子。典型地，核酸完全囊封在脂质粒子内，从而保护核酸免于酶促降解。

[0051] 在某些情况下，核酸-脂质粒子非常适用于全身施用，这是由于其在静脉内(i.v.)注射后可展现较长循环寿命、其可在远侧部位(例如，与施用部位物理上隔开的部位)积聚且其可在这些远侧部位介导靶基因表达的沉默。核酸可与凝聚剂复合且囊封在脂质粒子内，如PCT公开案第WO 00/03683号中所阐述，该案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0052] 本发明的脂质粒子典型地具有约30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约80nm至约100nm、约90nm至约100nm、约70至约90nm、约80nm至约90nm、约70nm至约80nm、或约30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm的平均直径且基本上是无毒的。另外，当存在于本发明的脂质粒子中时，核酸在水溶液中抗核酸酶降解。核酸-脂质粒子及其制备方法披露于例如美国专利公开案第20040142025号和第20070042031号中，其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0053] 如本文中所使用，“经脂质囊封”可能是指提供诸如siRNA的治疗性核酸以完全囊封、部分囊封或两者的脂质粒子。在一个优选实施方案中，核酸(例如，siRNA)完全囊封于脂质粒子中(例如，以形成核酸-脂质粒子)。

[0054] 术语“脂质缀合物”是指抑制脂质粒子聚集的缀合脂质。所述脂质缀合物包括但不限于PEG-脂质缀合物，诸如与二烷基氧基丙基偶合的PEG(例如，PEG-DAA缀合物)、与二酰基甘油偶合的PEG(例如，PEG-DAG缀合物)、与胆固醇偶合的PEG、与磷脂酰基乙醇胺偶合的PEG及与神经酰胺缀合的PEG(参见例如美国专利第5,885,613号)、阳离子PEG脂质、聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物(例如，POZ-DAA缀合物)、聚酰胺寡聚物(例如，ATTA-脂质缀合物)及其混合物。POZ-脂质缀合物的其它实例描述于PCT公开案第WO 2010/006282号中。PEG或POZ可直接与脂质缀合，或可经由接头(linker)部分与脂质连接。适合于使PEG或POZ与脂质偶合的任何接头部分均可使用，包括例如非含酯接头部分及含酯接头部分。在某些优选实施方案中，使用非含酯接头部分，诸如酰胺或氨基甲酸酯。

[0055] 术语“两性脂质”部分是指任何适合的物质，其中所述脂质物质的疏水性部分适应疏水相，而亲水性部分适应水相。亲水性特征来源于存在诸如碳水化合物、磷酸酯、羧酸、硫酸根、氨基、巯基、硝基、羟基及其它类似基团的极性或非带电基团。可通过包括非极性基团(包括但不限于长链饱和及不饱和脂族烃基)且这种基团经一个或多个芳族、环脂族或杂环基团取代而赋予疏水性。两性化合物的实例包括但不限于磷脂、胺脂及鞘脂。

[0056] 磷脂的代表性实例包括但不限于磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷

脂酰胆碱、二油磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱及二亚油酰磷脂酰胆碱。缺乏磷的其它化合物,诸如鞘脂、鞘糖脂家族、二酰基甘油和 β -酰氧基酸,也在命名为两性脂质的群组内。另外,上述两性脂质可与其它脂质混合,包括甘油三酯及固醇。

[0057] 术语“中性脂质”是指在所选pH值下呈不带电或中性两性离子形式存在的许多脂质种类中的任一种。在生理pH值下,这种脂质包括例如二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂及二酰基甘油。

[0058] 术语“非阳离子脂质”是指任何两性脂质以及任何其它中性脂质或阴离子脂质。

[0059] 术语“阴离子脂质”是指在生理pH值下带负电的任何脂质。这些脂质包括但不限于磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二酰基磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰磷脂酰乙醇胺、赖氨酰磷脂酰甘油、棕榈酰油酰磷脂酰甘油(POPG)及与中性脂质接合的其它阴离子修饰基团。

[0060] 术语“疏水性脂质”是指具有非极性基团(包括但不限于长链饱和及不饱和脂族烃基)且这种基团任选经一个或多个芳族、环脂族或杂环基取代的化合物。适合的实例包括但不限于二酰基甘油、二烷基甘油、N,N-二烷基氨基-1,2-二酰基氧基-3-氨基丙烷及1,2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0061] 术语“阳离子脂质”和“氨基脂质”在本文中可互换用于包括具有一、二、三或更多个脂肪酸或脂肪烷基链及一个pH值可滴定氨基头部基团(例如烷基氨基或二烷基氨基头部基团)的那些脂质及其盐。阳离子脂质典型地在低于阳离子脂质的 pK_a 的pH值下经质子化(即,带正电)且在高于该 pK_a 的pH值下基本上为中性的。本发明的阳离子脂质也可称为可滴定阳离子脂质。在一些实施方案中,阳离子脂质包含:可质子化三级胺(例如,pH值可滴定)头部基团; C_{18} 烷基链,其中各烷基链独立地具有0至3(例如,0、1、2或3)个双键;及介于该头部基团与烷基链之间的醚、酯或酮键联。这种阳离子脂质包括但不限于DSDMA、DODMA、DLinDMA、DLenDMA、 γ -DLenDMA、DLin-K-DMA、DLin-K-C2-DMA(也称为DLin-C2K-DMA、XTC2及C2K)、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLen-C2K-DMA、 γ -DLen-C2K-DMA、DLin-M-C2-DMA(也称为MC2)及DLin-M-C3-DMA(也称为MC3)。

[0062] 术语“盐”包括任何阴离子及阳离子复合物,诸如阳离子脂质与一个或多个阴离子之间所形成的复合物。阴离子的非限制性实例包括无机阴离子和有机阴离子,例如氢阴离子、氟离子、氯离子、溴离子、碘离子、草酸根(例如半草酸根)、磷酸根、膦酸根、磷酸氢根、磷酸二氢根、氧离子、碳酸根、碳酸氢根、硝酸根、亚硝酸根、氮阴离子、亚硫酸氢根、硫离子、亚硫酸根、硫酸氢根、硫酸根、硫代硫酸根、硫酸氢根、硼酸根、甲酸根、乙酸根、苯甲酸根、柠檬酸根、酒石酸根、乳酸根、丙烯酸根、聚丙烯酸根、富马酸根、马来酸根、衣康酸根、羟乙酸根、葡糖酸根、苹果酸根、杏仁酸根、巴豆酸根、抗坏血酸根、水杨酸根、聚甲基丙烯酸根、高氯酸根、氯酸根、亚氯酸根、次氯酸根、溴酸根、次溴酸根、碘酸根、烷基磺酸根、芳基磺酸根、砷酸根、亚砷酸根、铬酸根、重铬酸根、氰离子、氰酸根、硫氰酸根、氢氧根、过氧根、高锰酸根及其混合物。在特定实施方案中,本文中所披露的阳离子脂质的盐为结晶盐。

[0063] 术语“烷基”包括含有1至24个碳原子的直链或支链、非环状或环状饱和脂族烃。代表性饱和直链烷基包括但不限于甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基及类似基团,而饱和支链烷基包括而但不限于异丙基、第二丁基、异丁基、第三丁基、异戊基及类似基团。代表性饱和环状烷基包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基及类似基团,而不饱和环

状烷基包括而限于环戊烯基、环己烯基及类似基团。

[0064] 术语“烯基”包括在相邻碳原子之间含有至少一个双键的如以上所定义的烷基。烯基包括顺式和反式异构体两种。代表性直链和支链烯基包括但不限于乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基及类似基团。

[0065] 术语“炔基”包括在相邻碳之间另外含有至少一个三键的如以上所定义的任何烷基或烯基。代表性直链和支链炔基包括而限于乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基及类似基团。

[0066] 术语“酰基”包括其中连接点上的碳经如以下所定义的氧取代的任何烷基、烯基或炔基。以下为酰基的非限制性实例： $-C(=O)$ 烷基、 $-C(=O)$ 烯基及 $-C(=O)$ 炔基。

[0067] 术语“杂环”包括5至7元单环或7至10元双环杂环，其为饱和、不饱和或芳族的，且其含有1或2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子，且其中所述氮和硫杂原子可任选经氧化，且该氮杂原子可任选经季铵化，包括以上杂环中的任一者与苯环稠合的双环状环。杂环可经由任何杂原子或碳原子连接。杂环包括但不限于如以下所定义的杂芳基以及吗啉基、吡咯烷酮、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、乙内酰脲基、戊内酰胺基、环氧乙烷基、环氧丙烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢嘧啶基、四氢噻吩基、四氢噻吡喃基、四氢嘧啶基、四氢噻吩基、四氢噻吡喃基及类似基团。

[0068] 术语“任选经取代的烷基”、“任选经取代的烯基”、“任选经取代的炔基”、“任选经取代的酰基”及“任选经取代的杂环”意谓当经取代时至少一个氢原子经取代基置换。在氧取代取代基($=O$)的情况下，两个氢原子经置换。就此而言，取代基包括但不限于氧代、卤素、杂环、 $-CN$ 、 $-OR^x$ 、 $-NR^xR^y$ 、 $-NR^xC(=O)R^y$ 、 $-NR^xSO_2R^y$ 、 $-C(=O)R^x$ 、 $-C(=O)OR^x$ 、 $-C(=O)NR^xR^y$ 、 $-SO_nR^x$ 及 $-SO_nNR^xR^y$ ，其中 n 为0、1或2， R^x 与 R^y 相同或不同且独立地为氢、烷基或杂环，且烷基及杂环取代基各自可进一步经一个或多个以下基团取代：氧代、卤素、 $-OH$ 、 $-CN$ 、烷基、 $-OR^x$ 、杂环、 $-NR^xR^y$ 、 $-NR^xC(=O)R^y$ 、 $-NR^xSO_2R^y$ 、 $-C(=O)R^x$ 、 $-C(=O)OR^x$ 、 $-C(=O)NR^xR^y$ 、 $-SO_nR^x$ 及 $-SO_nNR^xR^y$ 。术语“任选经取代”当用于取代基清单之前时意谓该清单中的取代基各自可任选如本文中所描述经取代。

[0069] 术语“卤素”包括氟、氯、溴及碘。

[0070] 术语“融合性”是指脂质粒子与细胞的膜融合的能力。所述膜可为胞质膜或围绕胞器(例如内体、核等)的膜。

[0071] 如本文中所使用，术语“水溶液”是指完全或部分由水构成的组合物。

[0072] 如本文中所使用，术语“有机脂质溶液”是指完全或部分由具有脂质的有机溶剂构成的组合物。

[0073] 术语“电子致密核心”当用于描述本发明的脂质粒子时是指当使用低温透射电子显微术(“cryoTEM”)检视时脂质粒子内部部分的深色外观。本发明的一些脂质粒子具有电子致密核心且缺乏脂质双层结构。本发明的一些脂质粒子具有电子致密中心，缺乏脂质双层结构，且具有逆六方相或立方相结构。尽管不希望受理论束缚，但认为非双层脂质封装提供内含水及核酸的脂质柱体三维网状结构，即，基本上为经含核酸的水性通道贯穿的脂质小滴。

[0074] 如本文中所使用的“远侧部位”是指物理上分开的部位，其不限于相邻毛细血管

床,而是包括广泛分布于生物体中的部位。

[0075] 与核酸-脂质粒子有关的“血清稳定性”意谓所述粒子在暴露于将显著降解游离DNA或RNA的血清或核酸酶测定后不显著降解。适合的测定包括例如标准血清测定、DNA酶测定或RNA酶测定。

[0076] 如本文中所使用,“全身递送”是指导致诸如siRNA的活性剂在生物体内的广泛生物分布的递送。一些施用技术可导致某些药剂而非其它药剂的全身递送。全身递送意谓使适用(优选为治疗)量的药剂暴露于身体的大部分。为了获得广泛生物分布,一般需要一定的血液生存期,使得所述药剂在到达施用部位远侧的疾病部位之前不会快速降解或清除(诸如通过首先通过器官(肝、肺等)或通过快速非特异性细胞结合)。脂质粒子的全身递送可通过本领域中已知的任何手段来进行,包括例如静脉内、皮下和腹膜内。在一个优选实施方案中,脂质粒子的全身递送是通过静脉内递送。

[0077] 如本文中所使用的“局部递送”是指将诸如siRNA的活性剂直接递送至生物体内的目标部位。举例而言,可通过直接注入疾病部位、其它目标部位或目标器官(诸如肝脏、心脏、胰脏、肾脏及其类似物)中来局部递送药剂。

[0078] 如本文中所使用的术语“病毒粒子负载”是指诸如血液的体液中所存在的病毒粒子(例如,HBV和/或HDV)的数目的度量。举例而言,粒子负载可表示为例如每毫升血液的病毒粒子数目。粒子负载测试可使用基于核酸扩增的测试以及非基于核酸的测试来进行(参见例如Puren等人,The Journal of Infectious Diseases,201:S27-36(2010))。

[0079] 术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物种类,诸如人、小鼠、大鼠、狗、猫、仓鼠、豚鼠、兔、家畜及其类似物。

[0080] 某些实施方案的描述

[0081] 本发明提供靶向一个或多个HBV基因的表达的siRNA分子、包含所述siRNA中的一种或多种(例如,混合液)的核酸-脂质粒子以及递送和/或施用所述核酸-脂质粒子的方法(例如,用于治疗人的HBV和/或HDV感染)。

[0082] 在一个方面,本发明提供靶向一个或多个HBV基因的表达的siRNA分子。在某些情况下,本发明提供包含靶向HBV基因组的不同区域的siRNA的组合(例如,混合液、汇集物或混合物)的组合物。在某些情况下,本发明的siRNA分子能够在体外或体内抑制HBV和/或HDV的复制。

[0083] 在特定实施方案中,本发明提供表A中所示的siRNA分子,其中各双链siRNA分子的上链自左向右为5'至3'方向上的有义链;且各双链siRNA分子的下链自左向右为5'至3'方向上的反义链。如表A中所示,所述siRNA分子可包含一个或多个具有2'-O-甲基修饰的核糖核苷酸和/或一个或多个UNA部分。以下表A中所示的IC₅₀值是使用实施例1中所描述的测定法来测定的。

[0084] 表A.

[0085]

名称	双链体序列	IC 50 (nM)
1m	5' <u>A</u> g G u A U g u U G C C C g U u U G U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:1) 3' <u>U</u> <u>U</u> U C C A u A C A A C G G g C A A A C A 5' (SEQ ID NO:2)	1.43
2m	5' <u>G</u> C u c A g U U U A C U A G U G C c A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:3) 3' U U C g A G U C A A A u G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:4)	0.37
3m	5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u u C A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:5) 3' <u>U</u> <u>U</u> G g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:6)	0.06
4m	5' <u>G</u> C u c A g U U U A C U A G U G C c A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:7) 3' <u>U</u> <u>U</u> C g A G U C A A A u G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:8)	0.31
5m	5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u U C A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:9) 3' U U G g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:10)	0.06
6m	5' <u>C</u> u g g C U C A G U U U A C u A g U G U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:11) 3' U U G A C C g A g U C A A A U g A U C A C 5' (SEQ ID NO:12)	0.05
7m	5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u U C A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:13) 3' <u>U</u> <u>U</u> G g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:14)	0.06
8m	5' <u>G</u> C u C A g U U U A C u A g U G C C A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:15) 3' <u>U</u> <u>U</u> C G A G u C A A A U G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:16)	0.24
9m	5' <u>A</u> g G u A U G u U G C C C g U u U G U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:17) 3' <u>U</u> <u>U</u> u C C A u A C A A C G G g C A A A C A 5' (SEQ ID NO:18)	0.13

[0086]

名称	双链体序列	IC 50 (nM)
10m	5' <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C g g A A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:19) 3' <u>U</u> <u>U</u> C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:20)	0.34
11m	5' <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C g g A A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:21) 3' U U C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:22)	0.31
12m	5' <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C G g A A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:23) 3' U U C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:24)	0.16
13m	5' <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C G g A A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:25) 3' <u>U</u> <u>U</u> C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:26)	0.2
14m	5' <u>G</u> C u C A g U U U A C u A g U G C C A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:27) 3' U U C G A G u C A A A U G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:28)	0.16
15m	5' <u>C</u> u g G C u C A G U U u A C U A G U G <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:29) 3' <u>U</u> <u>U</u> G A C C g A G U C A A A U G A U C A C 5' (SEQ ID NO:30)	0.17

小写字母 = 2'O-甲基修饰
下划线 = UNA 部分

[0087] 在其它实施方案中,如本文中的表B中所阐述,本发明提供表A中所阐述的siRNA分子的经分离的有义链和反义链(即,经分离的单链核酸分子)。表B中所阐述的核酸序列布置为序列配对,其中各配对包括有义链及其互补反义链。各序列配对(有义链加反义链)以对应于表A中所示的名称的特定名称加以鉴别。

[0088] 表B中所示的这些经分离的有义链和反义链可用于例如制造可用于在体内或体外减少一个或多个HBV基因的表达的siRNA分子。这些经分离的有义链和反义链也可用于例如作为杂交探针,以用于鉴别和测量得自感染HBV或HBV/HDV的人的诸如组织或血液样品的生物材料中的HBV基因组的量。

[0089] 在特定实施方案中,本发明的寡核苷酸(诸如表B中所阐述的有义和反义RNA链)与靶聚核苷酸序列特异性杂交或互补。如本文中所使用的术语“特异性杂交”和“互补”指示互补性程度足以在DNA或RNA靶标与寡核苷酸之间发生稳定且特异性结合。应理解,寡核苷酸未必与其将特异性杂交的靶核酸序列100%互补。在优选实施方案中,当寡核苷酸与靶序列结合干扰靶序列的正常功能,从而造成其效用或表达损失时,寡核苷酸为可特异性杂交的,且互补性程度足以避免寡核苷酸与非靶序列在需要特异性结合的条件下,即,在体内测定或治疗性治疗的情况下时在生理条件下或在体外测定情况下时在进行测定的条件下的非特异性结合。因而,寡核苷酸与其靶向或特异性杂交的基因或mRNA序列区域相比可包括1、2、3或更多个碱基取代。

[0090] 表B.

名称	有义序列 (5'-3')	反义序列 (5'-3')
1m	<u>A</u> gGuAUguUGCC <u>C</u> gUuUGU <u>U</u> U (SEQ ID NO:1)	ACAAACgGGCAAC <u>A</u> uACC <u>U</u> U <u>U</u> (SEQ ID NO:2)
2m	<u>G</u> CuAgUUUACUAGUGC <u>C</u> AU <u>U</u> (SEQ ID NO:3)	UGGCACUAGuAAACUGAgCUU (SEQ ID NO:4)
3m	<u>C</u> CGUguGCACUuCGCuCAU <u>U</u> (SEQ ID NO:5)	UGAAGCGAAGUgCACACgGUU (SEQ ID NO:6)
4m	<u>G</u> CuAgUUUACUAGUGC <u>C</u> AU <u>U</u> (SEQ ID NO:7)	UGGCACUAGuAAACUGAgCUU (SEQ ID NO:8)
5m	<u>C</u> CGUguGCACUuCGCuUCAU <u>U</u> (SEQ ID NO:9)	UGAAGCGAAGUgCACACgGUU (SEQ ID NO:10)
6m	<u>C</u> uggCUCAGUUUACuAgUGU <u>U</u> (SEQ ID NO:11)	CACUAgUAAACUgAgCCAGUU (SEQ ID NO:12)
7m	<u>C</u> CGUguGCACUuCGCuCAU <u>U</u> (SEQ ID NO:13)	UGAAGCGAAGUgCACACgGUU (SEQ ID NO:14)
8m	<u>G</u> CuCAgUUUACuAgUGCCA <u>U</u> U (SEQ ID NO:15)	UGGCACUAGUAAACuGAGCUU (SEQ ID NO:16)
9m	<u>A</u> gGuAUGuUGCC <u>C</u> gUuUGU <u>U</u> U (SEQ ID NO:17)	ACAAACgGGCAAC <u>A</u> uACC <u>U</u> U (SEQ ID NO:18)
10m	<u>G</u> CCgAuCCAUA <u>C</u> ugCggAAU <u>U</u> (SEQ ID NO:19)	UUCCGCAGUAUGgAUCGgCUU (SEQ ID NO:20)
11m	<u>G</u> CCgAuCCAUA <u>C</u> ugCggAAU <u>U</u> (SEQ ID NO:21)	UUCCGCAGUAUGgAUCGgCUU (SEQ ID NO:22)
12m	<u>G</u> CCgAuCCAUA <u>C</u> ugCGgAAU <u>U</u> (SEQ ID NO:23)	UUCCGCAGUAUGgAUCGgCUU (SEQ ID NO:24)
13m	<u>G</u> CCgAuCCAUA <u>C</u> ugCGgAAU <u>U</u> (SEQ ID NO:25)	UUCCGCAGUAUGgAUCGgCUU (SEQ ID NO:26)
14m	<u>G</u> CuCAgUUUACuAgUGCCA <u>U</u> U (SEQ ID NO:27)	UGGCACUAGUAAACuGAGCUU (SEQ ID NO:28)
15m	<u>C</u> ugGCuCAGUUuACUAGUG <u>U</u> U (SEQ ID NO:29)	CACUAGUAAACUGAgCCAGU <u>U</u> (SEQ ID NO:30)
小写字母 = 2'O-甲基修饰 下划线 = UNA 部分		

[0092] 因而,本发明的某些实施方案提供一种经分离的双链siRNA分子,其选自由1m(SEQ ID NO:1和2)、2m(SEQ ID NO:3和4)、3m(SEQ ID NO:5和6)、4m(SEQ ID NO:7和8)、5m(SEQ ID NO:9和10)、6m(SEQ ID NO:11和12)、7m(SEQ ID NO:13和14)、8m(SEQ ID NO:15和16)、9m(SEQ ID NO:17和18)、10m(SEQ ID NO:19和20)、11m(SEQ ID NO:21和22)、12m(SEQ ID NO:23和24)、13m(SEQ ID NO:25和26)、14m(SEQ ID NO:27和28)、15m(SEQ ID NO:29和30)组成的组。

[0093] 本发明的某些实施方案还提供一种经分离的核酸分子,其选自由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:29组成的组。

[0094] 本发明的某些实施方案还提供一种经分离的核酸分子,其选自由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:30组成的组。

[0095] 本发明还提供一种组合物,其包含一个或多个本文中所描述的经分离的双链siRNA分子(例如,表A中所描述的siRNA分子)。

[0096] 在某些实施方案中,所述组合物包含选自由1m(SEQ ID NO:1和2)、2m(SEQ ID NO:3和4)、3m(SEQ ID NO:5和6)、4m(SEQ ID NO:7和8)、5m(SEQ ID NO:9和10)、6m(SEQ ID NO:11和12)、7m(SEQ ID NO:13和14)、8m(SEQ ID NO:15和16)、9m(SEQ ID NO:17和18)、10m(SEQ ID NO:19和20)、11m(SEQ ID NO:21和22)、12m(SEQ ID NO:23和24)、13m(SEQ ID NO:25和26)、14m(SEQ ID NO:27和28)、15m(SEQ ID NO:29和30)组成的组的两个不同的双链siRNA分子。在某些实施方案中,所述两个不同的双链siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。

[0097] 在某些实施方案中,所述组合物包含选自由1m(SEQ ID NO:1和2)、2m(SEQ ID NO:3和4)、3m(SEQ ID NO:5和6)、4m(SEQ ID NO:7和8)、5m(SEQ ID NO:9和10)、6m(SEQ ID NO:11和12)、7m(SEQ ID NO:13和14)、8m(SEQ ID NO:15和16)、9m(SEQ ID NO:17和18)、10m(SEQ ID NO:19和20)、11m(SEQ ID NO:21和22)、12m(SEQ ID NO:23和24)、13m(SEQ ID NO:25和26)、14m(SEQ ID NO:27和28)、15m(SEQ ID NO:29和30)组成的组的三个不同的双链siRNA分子。在某些实施方案中,所述三个不同的双链siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。

[0098] 本发明还提供一种药物组合物,其包含一种或多种(例如,混合液)本文中所描述的siRNA和药学上可接受的载体。

[0099] 在某些实施方案中,本文中所描述的组合物包含一个或多个siRNA分子,其使乙型肝炎病毒基因的表达沉默。

[0100] 在另一方面,本发明提供一种靶向HBV基因表达的核酸-脂质粒子。核酸-脂质粒子典型地包含一种或多种(例如,混合液)本文中所描述的经分离的双链siRNA分子(例如,如表A中所描述)、阳离子脂质和非阳离子脂质。在某些情况下,核酸-脂质粒子还包含抑制粒子聚集的缀合脂质。核酸-脂质粒子优选包含一种或多种(例如,混合液)本文中所描述的经分离的双链siRNA分子、阳离子脂质、非阳离子脂质和抑制粒子聚集的缀合脂质。

[0101] 在某些实施方案中,所述核酸-脂质粒子包含选自由1m(SEQ ID NO:1和2)、2m(SEQ ID NO:3和4)、3m(SEQ ID NO:5和6)、4m(SEQ ID NO:7和8)、5m(SEQ ID NO:9和10)、6m(SEQ ID NO:11和12)、7m(SEQ ID NO:13和14)、8m(SEQ ID NO:15和16)、9m(SEQ ID NO:17和18)、10m(SEQ ID NO:19和20)、11m(SEQ ID NO:21和22)、12m(SEQ ID NO:23和24)、13m(SEQ ID NO:25和26)、14m(SEQ ID NO:27和28)、15m(SEQ ID NO:29和30)组成的组的两个不同的双链siRNA分子。在某些实施方案中,所述两个不同的双链siRNA分子的组合选自实施例2中所

描述的组合中的任一种。

[0102] 在某些实施方案中,所述核酸-脂质粒子包含选自由1m(SEQ ID NO:1和2)、2m(SEQ ID NO:3和4)、3m(SEQ ID NO:5和6)、4m(SEQ ID NO:7和8)、5m(SEQ ID NO:9和10)、6m(SEQ ID NO:11和12)、7m(SEQ ID NO:13和14)、8m(SEQ ID NO:15和16)、9m(SEQ ID NO:17和18)、10m(SEQ ID NO:19和20)、11m(SEQ ID NO:21和22)、12m(SEQ ID NO:23和24)、13m(SEQ ID NO:25和26)、14m(SEQ ID NO:27和28)、15m(SEQ ID NO:29和30)组成的组的三个不同的双链siRNA分子。在某些实施方案中,所述三个不同的双链siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。

[0103] 在一些实施方案中,本发明的siRNA完全囊封在核酸-脂质粒子中。关于包含siRNA混合液的配制物,混合液(例如,具有不同序列的siRNA化合物)中所存在的不同类型siRNA种类可共同囊封于同一粒子中,或混合液中所存在的各类型siRNA种类可囊封在单独粒子中。siRNA混合液可使用两种、三种或更多种单独的siRNA(各自具有独特序列)以相同、相似或不同的浓度或摩尔比的混合物配制于本文中所描述的粒子中。在一个实施方案中,使用相同、相似或不同的浓度或摩尔比的各siRNA种类配制siRNA(对应于具有不同的序列的多种siRNA)的混合液,且将不同类型的siRNA共囊封于同一粒子中。在另一实施方案中,混合液中所存在的各类型siRNA种类是以相同、相似或不同的siRNA浓度或摩尔比囊封在不同的粒子中,且因而形成的粒子(各自含有不同的siRNA有效负荷)分开施用(例如,根据治疗方案,在不同的时间),或一起作为单一单位剂量(例如,与药学上可接受的载体一起)组合并施用。本文中所描述的粒子具有血清稳定性,对核酸酶降解具有抗性,且对诸如人的哺乳动物实质上无毒。

[0104] 本发明的核酸-脂质粒子中的阳离子脂质可包含例如具有本文中所描述的式I至式III的一种或多种阳离子脂质或任何其它阳离子脂质种类。在一个实施方案中,阳离子脂质为二烷基脂质。在另一实施方案中,阳离子脂质为三烷基脂质。在一个特定实施方案中,阳离子脂质选自由以下各项组成的组:1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二- γ -亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(γ -DLenDMA;化合物(15))、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-C2-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)、二亚油基甲基-3-二甲基氨基丙酸酯(DLin-M-C2-DMA)、4-(二甲基氨基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(DLin-M-C3-DMA;化合物(7))、其盐及其混合物。

[0105] 在另一特定实施方案中,阳离子脂质选自由以下各项组成的组:1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二- γ -亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(γ -DLenDMA;化合物(15))、3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(DLin-MP-DMA;化合物(8))、4-(二甲基氨基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(化合物(7))、5-(二甲基氨基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(13))、其盐或其混合物。

[0106] 在某些实施方案中,阳离子脂质占粒子中所存在的总脂质的约48摩尔%至约62摩尔%。

[0107] 本发明的核酸-脂质粒子中的非阳离子脂质可包含例如一种或多种阴离子脂质和/或中性脂质。在一些实施方案中,非阳离子脂质包含以下中性脂质组分之一:(1)磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物;(2)胆固醇或其衍生物;或(3)磷脂。在某些优选实施方案中,磷脂包含二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)或其混合物。在一个优选实施方案中,非阳离子脂质为DPPC与胆固醇的混合物。在一个优选实施方案中,非阳离子脂质为DSPC与胆固醇的混合物。

[0108] 在某些实施方案中,非阳离子脂质包含磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物,其中所述磷脂占粒子中所存在的总脂质的约7摩尔%至约17摩尔%且胆固醇或其衍生物占粒子中所存在的总脂质的约25摩尔%至约40摩尔%。

[0109] 本发明的核酸-脂质粒子中的脂质缀合物抑制粒子聚集,且可包含例如本文中所描述的脂质缀合物中的一种或多种。在一个特定实施方案中,脂质缀合物包含PEG-脂质缀合物。PEG-脂质缀合物的实例包括但不限于PEG-DAG缀合物、PEG-DAA缀合物及其混合物。在某些实施方案中,所述PEG-脂质缀合物选自PEG-二酰基甘油(PEG-DAG)缀合物、PEG-二烷基氧基丙基(PEG-DAA)缀合物、PEG-磷脂缀合物、PEG-神经酰胺(PEG-Cer)缀合物及其混合物组成的组。在某些实施方案中,PEG-脂质缀合物为PEG-DAA缀合物。在某些实施方案中,脂质粒子中的PEG-DAA缀合物可包含PEG-二癸基氧基丙基(C_{10})缀合物、PEG-二月桂基氧基丙基(C_{12})缀合物、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(C_{14})缀合物、PEG-二棕榈基氧基丙基(C_{16})缀合物、PEG-二硬脂基氧基丙基(C_{18})缀合物或其混合物。在某些实施方案中,其中PEG-DAA缀合物为PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(C_{14})缀合物。在另一实施方案中,PEG-DAA缀合物为化合物(66)(PEG-C-DMA)缀合物。在另一实施方案中,脂质缀合物包含POZ脂质缀合物,诸如POZ-DAA缀合物。

[0110] 在某些实施方案中,抑制粒子聚集的缀合脂质占粒子中所存在的总脂质的约0.5摩尔%至约3摩尔%。

[0111] 在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1的总脂质:siRNA质量比。

[0112] 在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约30nm至约150nm的中值直径。

[0113] 在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有电子致密核心。

[0114] 在一些实施方案中,本发明提供核酸-脂质粒子,其包含:(a)一种或多种(例如,混合液)本文中所描述的siRNA分子(例如,参见表A);(b)一种或多种阳离子脂质或其盐,其占粒子中所存在的总脂质的约50摩尔%至约85摩尔%;(c)一种或多种非阳离子脂质,其占粒子中所存在的总脂质的约13摩尔%至约49.5摩尔%;及(d)一种或多种抑制粒子聚集的缀合脂质,其占粒子中所存在的总脂质的约0.5摩尔%至约2摩尔%。

[0115] 在这个实施方案的一个方面,核酸-脂质粒子包含:(a)一种或多种(例如,混合液)本文中所描述的siRNA分子(例如,参见表A);(b)阳离子脂质或其盐,其占粒子中所存在的总脂质的约52摩尔%至约62摩尔%;(c)磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物,其占粒子中所存在的总脂质的约36摩尔%至约47摩尔%;及(d)PEG-脂质缀合物,其占粒子中所存在的总脂质的约1摩尔%至约2摩尔%。在一个特定实施方案中,配制物为四组分系统,其包含约1.4摩尔%PEG-脂质缀合物(例如,PEG2000-C-DMA)、约57.1摩尔%阳离子脂质(例如,DLink-C2-DMA)或其盐、约7.1摩尔%DPPC(或DSPC)及约34.3摩尔%胆固醇(或其衍生物)。

[0116] 在这个实施方案的另一方面,核酸-脂质粒子包含:(a)一种或多种(例如,混合液)

本文中所描述的siRNA分子(例如,参见表A);(b)阳离子脂质或其盐,其占粒子中所存在的总脂质的约56.5摩尔%至约66.5摩尔%;(c)胆固醇或其衍生物,其占粒子中所存在的总胆固醇的约31.5摩尔%至约42.5摩尔%;及(d)PEG-脂质缀合物,其占粒子中所存在的总脂质的约1摩尔%至约2摩尔%。在一个特定实施方案中,配制物为三组分系统,其不含磷脂且包含约1.5摩尔%PEG-脂质缀合物(例如,PEG2000-C-DMA)、约61.5摩尔%阳离子脂质(例如,DLin-K-C2-DMA)或其盐及约36.9摩尔%胆固醇(或其衍生物)。

[0117] 其它配制物描述于PCT公开案第WO 09/127060号及已公开的美国专利申请公开案第US 2011/0071208 A1号中,其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0118] 在其它实施方案中,本发明提供核酸-脂质粒子,其包含:(a)一种或多种(例如,混合液)本文中所描述的siRNA分子(例如,参见表A);(b)一种或多种阳离子脂质或其盐,其占粒子中所存在的总脂质的约2摩尔%至约50摩尔%;(c)一种或多种非阳离子脂质,其占粒子中所存在的总脂质的约5摩尔%至约90摩尔%;及(d)一种或多种抑制粒子聚集的缀合脂质,其占粒子中所存在的总脂质的约0.5摩尔%至约20摩尔%。

[0119] 在这个实施方案的一个方面,核酸-脂质粒子包含:(a)一种或多种(例如,混合液)本文中所描述的siRNA分子(例如,参见表A);(b)阳离子脂质或其盐,其占粒子中所存在的总脂质的约30摩尔%至约50摩尔%;(c)磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物,其占粒子中所存在的总脂质的约47摩尔%至约69摩尔%;及(d)PEG-脂质缀合物,其占粒子中所存在的总脂质的约1摩尔%至约3摩尔%。在一个特定实施方案中,配制物为四组分系统,其包含约2摩尔%PEG-脂质缀合物(例如,PEG2000-C-DMA)、约40摩尔%阳离子脂质(例如,DLin-K-C2-DMA)或其盐、约10摩尔%DPPC(或DSPC)及约48摩尔%胆固醇(或其衍生物)。

[0120] 在其它实施方案中,本发明提供核酸-脂质粒子,其包含:(a)一种或多种(例如,混合液)本文中所描述的siRNA分子(例如,参见表A);(b)一种或多种阳离子脂质或其盐,其占粒子中所存在的总脂质的约50摩尔%至约65摩尔%;(c)一种或多种非阳离子脂质,其占粒子中所存在的总脂质的约25摩尔%至约45摩尔%;及(d)一种或多种抑制粒子聚集的缀合脂质,其占粒子中所存在的总脂质的约5摩尔%至约10摩尔%。

[0121] 在这个实施方案的一个方面,核酸-脂质粒子包含:(a)一种或多种(例如,混合液)本文中所描述的siRNA分子(例如,参见表A);(b)阳离子脂质或其盐,其占粒子中所存在的总脂质的约50摩尔%至约60摩尔%;(c)磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物,其占粒子中所存在的总脂质的约35摩尔%至约45摩尔%;及(d)PEG-脂质缀合物,其占粒子中所存在的总脂质的约5摩尔%至约10摩尔%。在某些情况下,配制物中的非阳离子脂质混合物包含:(i)占粒子中所存在的总脂质的约5摩尔%至约10摩尔%的磷脂;及(ii)占粒子中所存在的总脂质的约25摩尔%至约35摩尔%的胆固醇或其衍生物。在一个特定实施方案中,配制物为四组分系统,其包含约7摩尔%PEG-脂质缀合物(例如,PEG750-C-DMA)、约54摩尔%阳离子脂质(例如,DLin-K-C2-DMA)或其盐、约7摩尔%DPPC(或DSPC)及约32摩尔%胆固醇(或其衍生物)。

[0122] 在这个实施方案的另一方面,核酸-脂质粒子包含:(a)一种或多种(例如,混合液)本文中所描述的siRNA分子(例如,参见表A);(b)阳离子脂质或其盐,其占粒子中所存在的总脂质的约55摩尔%至约65摩尔%;(c)胆固醇或其衍生物,其占粒子中所存在的总胆固醇的约30摩尔%至约40摩尔%;及(d)PEG-脂质缀合物,其占粒子中所存在的总脂质的约5摩

尔%至约10摩尔%。在一个特定实施方案中,配制物为三组分系统,其不含磷脂且包含约7摩尔%PEG-脂质缀合物(例如,PEG750-C-DMA)、约58摩尔%阳离子脂质(例如,DLin-K-C2-DMA)或其盐及约35摩尔%胆固醇(或其衍生物)。

[0123] 适用配制物的其它实施方案描述于已公开的美国专利申请公开案第US 2011/0076335 A1号中,该案出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0124] 在本发明的某些实施方案中,核酸-脂质粒子包含:(a)一种或多种(例如,混合液)本文中所描述的siRNA分子(例如,参见表A);(b)阳离子脂质或其盐,其占粒子中所存在的总脂质的约48摩尔%至约62摩尔%;(c)磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物,其中磷脂占粒子中所存在的总脂质的约7摩尔%至约17摩尔%且其中胆固醇或其衍生物占粒子中所存在的总脂质的约25摩尔%至约40摩尔%;及(d)PEG-脂质缀合物,其占粒子中所存在的总脂质的约0.5摩尔%至约3.0摩尔%。下文包括本发明这个方面的例示性脂质配制物A-Z。

[0125] 例示性脂质配制物A包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(1.2%)、阳离子脂质(53.2%)、磷脂(9.3%)、胆固醇(36.4%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMA(化合物(66))(1.2%),阳离子脂质为1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)(53.2%),磷脂为DPPC(9.3%),且胆固醇以36.4%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物A,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物A可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物A可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0126] 例示性脂质配制物B包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(0.8%)、阳离子脂质(59.7%)、磷脂(14.2%)、胆固醇(25.3%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DOMG(化合物(67))(0.8%),阳离子脂质为1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)(59.7%),磷脂为DSPC(14.2%),且胆固醇以25.3%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物B,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物B可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在

某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物B可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0127] 例示性脂质配制物C包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(1.9%)、阳离子脂质(52.5%)、磷脂(14.8%)、胆固醇(30.8%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMG(化合物(67))(1.9%),阳离子脂质为1,2-二-γ-亚胺基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(γ-DLenDMA;化合物(15))(52.5%),磷脂为DSPC(14.8%),且胆固醇以30.8%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物C,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物C可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物C可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0128] 例示性脂质配制物D包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(0.7%)、阳离子脂质(60.3%)、磷脂(8.4%)、胆固醇(30.5%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMA(化合物(66))(0.7%),阳离子脂质为3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(DLin-MP-DMA;化合物(8))(60.3%),磷脂为DSPC(8.4%),且胆固醇以30.5%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物D,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物D可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物D可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数

或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0129] 例示性脂质配制物E包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(1.8%)、阳离子脂质(52.1%)、磷脂(7.5%)、胆固醇(38.5%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMA(化合物(66))(1.8%),阳离子脂质为4-(二甲基氨基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(化合物(7))(52.1%),磷脂为DPPC(7.5%),且胆固醇以38.5%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物E,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物E可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物E可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0130] 例示性脂质配制物F包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(0.9%)、阳离子脂质(57.1%)、磷脂(8.1%)、胆固醇(33.8%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DOMG(化合物(67))(0.9%),阳离子脂质为1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二-γ-亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(γ-DLenDMA;化合物(15))(57.1%),磷脂为DSPC(8.1%),且胆固醇以33.8%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物F,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物F可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物F可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0131] 例示性脂质配制物G包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(1.7%)、阳离子脂质(61.6%)、磷脂(11.2%)、胆固醇(25.5%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMG(化合物(67))(1.7%),阳离子脂质为1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二- γ -亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(γ -DLenDMA;化合物(15))(61.6%),磷脂为DPPC(11.2%),且胆固醇以25.5%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物G,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物G可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物G可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0132] 例示性脂质配制物H包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(1.1%)、阳离子脂质(55.0%)、磷脂(11.0%)、胆固醇(33.0%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMA(化合物(66))(1.1%),阳离子脂质为5-(二甲基氨基)戊酸(6Z, 16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(13))(55.0%),磷脂为DSPC(11.0%),且胆固醇以33.0%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物H,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物H可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物H可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0133] 例示性脂质配制物I包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(2.6%)、阳离子脂质(53.1%)、磷脂(9.4%)、胆固醇(35.0%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩

尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMA(化合物(66))(2.6%),阳离子脂质为5-(二甲基氨基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(13))(53.1%),磷脂为DSPC(9.4%),且胆固醇以35.0%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物I,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物I可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物I可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0134] 例示性脂质配制物J包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(0.6%)、阳离子脂质(59.4%)、磷脂(10.2%)、胆固醇(29.8%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMA(化合物(66))(0.6%),阳离子脂质为1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)(59.4%),磷脂为DPPC(10.2%),且胆固醇以29.8%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物J,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物J可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物J可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0135] 例示性脂质配制物K包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(0.5%)、阳离子脂质(56.7%)、磷脂(13.1%)、胆固醇(29.7%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMG(化合物(67))(0.5%),阳离子脂质为4-(二甲基氨基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(化合物(7))(56.7%),磷脂为DSPC(13.1%),且胆固醇以29.7%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如

±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物K,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物K可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物K可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0136] 例示性脂质配制物L包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(2.2%)、阳离子脂质(52.0%)、磷脂(9.7%)、胆固醇(36.2%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMG(化合物(67))(2.2%),阳离子脂质为1,2-二-γ-亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(γ-DLenDMA;化合物(15))(52.0%),磷脂为DSPC(9.7%),且胆固醇以36.2%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物L,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物L可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物L可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0137] 例示性脂质配制物M包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(2.7%)、阳离子脂质(58.4%)、磷脂(13.1%)、胆固醇(25.7%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMA(化合物(66))(2.7%),阳离子脂质为1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)(58.4%),磷脂为DPPC(13.1%),且胆固醇以25.7%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物M,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物M可包含两个不同的siRNA

分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物M可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0138] 例示性脂质配制物N包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(3.0%)、阳离子脂质(53.3%)、磷脂(12.1%)、胆固醇(31.5%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMA(化合物(66))(3.0%),阳离子脂质为1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)(53.3%),磷脂为DPPC(12.1%),且胆固醇以31.5%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物N,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物N可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物N可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0139] 例示性脂质配制物O包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(1.5%)、阳离子脂质(56.2%)、磷脂(7.8%)、胆固醇(34.7%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMA(化合物(66))(1.5%),阳离子脂质为1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)(56.2%),磷脂为DPPC(7.8%),且胆固醇以34.7%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物O,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物O可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物O可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒

子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0140] 例示性脂质配制物P包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(2.1%)、阳离子脂质(48.6%)、磷脂(15.5%)、胆固醇(33.8%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DOMG(化合物(67))(2.1%),阳离子脂质为3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(DLin-MP-DMA;化合物(8))(48.6%),磷脂为DSPC(15.5%),且胆固醇以33.8%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物P,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物P可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物P可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0141] 例示性脂质配制物Q包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(2.5%)、阳离子脂质(57.9%)、磷脂(9.2%)、胆固醇(30.3%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMA(化合物(66))(2.5%),阳离子脂质为5-(二甲基氨基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(13))(57.9%),磷脂为DSPC(9.2%),且胆固醇以30.3%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物Q,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物Q可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物Q可包含三个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0142] 例示性脂质配制物R包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂

质(1.6%)、阳离子脂质(54.6%)、磷脂(10.9%)、胆固醇(32.8%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMA(化合物(66))(1.6%),阳离子脂质为3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(化合物(8))(54.6%),磷脂为DSPC(10.9%),且胆固醇以32.8%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物R,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物R可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物R可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0143] 例示性脂质配制物S包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(2.9%)、阳离子脂质(49.6%)、磷脂(16.3%)、胆固醇(31.3%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMA(化合物(66))(2.9%),阳离子脂质为5-(二甲基氨基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(13))(49.6%),磷脂为DPPC(16.3%),且胆固醇以31.3%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物S,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物S可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物S可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0144] 例示性脂质配制物T包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(0.7%)、阳离子脂质(50.5%)、磷脂(8.9%)、胆固醇(40.0%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,

PEG-脂质为PEG-C-DOMG(化合物(67))(0.7%),阳离子脂质为1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)(50.5%),磷脂为DPPC(8.9%),且胆固醇以40.0%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物T,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物T可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物T可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0145] 例示性脂质配制物U包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(1.0%)、阳离子脂质(51.4%)、磷脂(15.0%)、胆固醇(32.6%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DOMG(化合物(67))(1.0%),阳离子脂质为1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)(51.4%),磷脂为DSPC(15.0%),且胆固醇以32.6%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物U,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物U可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物U可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0146] 例示性脂质配制物V包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(1.3%)、阳离子脂质(60.0%)、磷脂(7.2%)、胆固醇(31.5%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DOMG(化合物(67))(1.3%),阳离子脂质为1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)(60.0%),磷脂为DSPC(7.2%),且胆固醇以31.5%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物V,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举

例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物V可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物V可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0147] 例示性脂质配制物W包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(1.8%)、阳离子脂质(51.6%)、磷脂(8.4%)、胆固醇(38.3%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMA(化合物(66))(1.8%),阳离子脂质为1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)(51.6%),磷脂为DSPC(8.4%),且胆固醇以38.3%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物W,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物W可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物W可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0148] 例示性脂质配制物X包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(2.4%)、阳离子脂质(48.5%)、磷脂(10.0%)、胆固醇(39.2%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMA(化合物(66))(2.4%),阳离子脂质为1,2-二- γ -亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(γ -DLinDMA;化合物(15))(48.5%),磷脂为DPPC(10.0%),且胆固醇以39.2%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如 $\pm 5\%$ (或例如 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物X,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物X可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物X可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:

1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0149] 例示性脂质配制物Y包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(2.6%)、阳离子脂质(61.2%)、磷脂(7.1%)、胆固醇(29.2%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DMA(化合物(66))(2.6%),阳离子脂质为5-(二甲基氨基)戊酸(6Z, 16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(化合物(13))(61.2%),磷脂为DSPC(7.1%),且胆固醇以29.2%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物Y,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物Y可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物Y可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0150] 例示性脂质配制物Z包括以下组分(其中组分的百分比值为摩尔百分比):PEG-脂质(2.2%)、阳离子脂质(49.7%)、磷脂(12.1%)、胆固醇(36.0%),其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。举例而言,在一个代表性实施方案中,PEG-脂质为PEG-C-DOMG(化合物(67))(2.2%),阳离子脂质为4-(二甲基氨基)丁酸(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(化合物(7))(49.7%),磷脂为DPPC(12.1%),且胆固醇以36.0%存在,其中所存在的脂质的实际量可变化例如±5%(或例如±4摩尔%、±3摩尔%、±2摩尔%、±1摩尔%、±0.75摩尔%、±0.5摩尔%、±0.25摩尔%或±0.1摩尔%)。因而,本发明的某些实施方案提供一种基于核酸-脂质粒子的配制物Z,其包含本文中所描述的一种或多种siRNA分子。举例而言,在某些实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物Z可包含两个不同的siRNA分子,其中所述两个不同的siRNA分子的组合选自实施例2中所描述的组合中的任一种。在某些其它实施方案中,基于核酸脂质粒子的配制物Z可包含三个不同的siRNA分子,其中所述三个不同的siRNA分子的组合选自实施例3中所描述的组合中的任一种。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1或约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1或其任何分数或其中的范围的总脂质:siRNA质量比。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约9:1的总脂质:siRNA质量比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:

1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1)。

[0151] 因此,本发明的某些实施方案提供一种本文中所描述的核酸-脂质粒子,其中所述脂质是如配制物A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、X、Y或Z中的任一种中所描述加以配制。

[0152] 本发明还提供包含核酸-脂质粒子及药学上可接受的载体的药物组合物。

[0153] 本发明的核酸-脂质粒子可用于例如治疗性递送使一个或多个HBV基因的表达沉默的siRNA。在一些实施方案中,将靶向HBV基因或转录产物的不同区域(例如重叠和/或非重叠序列)的siRNA的混合液配制成相同或不同的核酸-脂质粒子,且将所述粒子施用给需要这种治疗的哺乳动物(例如,人)。在某些情况下,可向哺乳动物施用治疗有效量的核酸-脂质粒子,例如,用于治疗人的HBV和/或HDV感染。

[0154] 在某些实施方案中,本发明提供一种将本文中所描述的一种或多种siRNA分子引入细胞中的方法,其是通过使该细胞与本文中所描述的核酸-脂质粒子接触。

[0155] 在某些实施方案中,本发明提供一种用于将使乙型肝炎病毒基因的表达沉默的一种或多种siRNA分子引入细胞中的方法,所述方法是通过使该细胞与本文中所描述的核酸-脂质粒子在siRNA借此进入所述细胞且使所述细胞内的乙型肝炎病毒基因的表达沉默的条件下接触。在某些实施方案中,所述细胞处于诸如人的哺乳动物中。在某些实施方案中,人已被诊断患有乙型肝炎病毒感染或乙型肝炎病毒/丁型肝炎病毒感染。在某些实施方案中,乙型肝炎病毒基因表达的沉默使哺乳动物中的乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒粒子负载相对于不存在核酸-脂质粒子时的乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒粒子负载减少至少约50%(例如,约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)。

[0156] 在某些实施方案中,本发明提供一种用于在细胞中使乙型肝炎病毒基因的表达沉默的方法,所述方法包括使包含已表达的乙型肝炎病毒基因的细胞与本文中所描述的核酸-脂质粒子或组合物(例如,药物组合物)在siRNA借此进入所述细胞且使所述细胞内的乙型肝炎病毒基因表达沉默的条件下接触的步骤。在某些实施方案中,所述细胞处于诸如人的哺乳动物中。在某些实施方案中,人已被诊断患有乙型肝炎病毒感染或乙型肝炎病毒/丁型肝炎病毒感染。在某些实施方案中,人已被诊断患有由乙型肝炎病毒感染或乙型肝炎病毒/丁型肝炎病毒感染所造成的肝病。在某些实施方案中,乙型肝炎病毒基因表达的沉默使哺乳动物中的乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒粒子负载相对于不存在核酸-脂质粒子时的乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒粒子负载减少至少约50%(例如,约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)。

[0157] 在一些实施方案中,通过以下施用途径之一来施用本文中所描述的核酸-脂质粒子或组合物(例如,药物组合物):经口、鼻内、静脉内、腹膜内、肌肉内、关节内、病灶内、气管内、皮下及皮内。在特定实施方案中,例如经由经肠或非经肠施用途径全身施用核酸-脂质粒子。

[0158] 在某些方面,本发明提供用于在有需要的哺乳动物(例如,人)中使HBV基因表达沉默的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的包含本文中所描述的一种或多种siRNA(例如,表A中所示的一种或多种siRNA)的核酸-脂质粒子。在一些实施方案中,施用包含本文中所描述的一种或多种siRNA的核酸-脂质粒子使HBV RNA水平相对于不存在所

述siRNA时(例如,缓冲液对照或无关非HBV靶向siRNA对照)所检测的HBV RNA水平减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其中的任何范围)。在其它实施方案中,施用包含一种或多种HBV靶向siRNA的核酸-脂质粒子使HBV RNA水平相对于阴性对照(例如,诸如缓冲液对照或无关非HBV靶向siRNA对照)减少至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100天或更多天(或其中的任何范围)。

[0159] 在其它方面,本发明提供用于在有需要的哺乳动物(例如,人)中使HBV基因表达沉默的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的包含本文中所描述的一种或多种siRNA(例如,表A中所描述的siRNA)的核酸-脂质粒子。在一些实施方案中,施用包含一种或多种HBV siRNA的核酸-脂质粒子使HBV mRNA水平相对于不存在所述siRNA时(例如,缓冲液对照或无关非HBV靶向siRNA对照)所检测的HBV mRNA水平减少至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其中的任何范围)。在其它实施方案中,施用包含一种或多种HBV靶向siRNA的核酸-脂质粒子使HBV mRNA水平相对于阴性对照(例如,诸如缓冲液对照或无关非HBV靶向siRNA对照)减少至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100天或更多天(或其中的任何范围)。

[0160] 本发明的某些实施方案提供本文中所描述的核酸-脂质粒子或组合物(例如,药物组合物),其用于在哺乳动物(例如,人)中的细胞中使乙型肝炎病毒基因的表达沉默。

[0161] 本发明的某些实施方案提供本文中所描述的核酸-脂质粒子或组合物(例如,药物组合物)的用途,其用以制备用于在哺乳动物(例如,人)中的细胞中使乙型肝炎病毒基因的表达沉默的药剂。

[0162] 在其它方面,本发明提供用于在有需要的哺乳动物(例如,人)中治疗、预防HBV和/或HDV感染、降低罹患其的风险或可能性(例如,降低易感染性)、延迟其发作和/或改善一个或多个与其相关的症状的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的包含本文中所描述的靶向HBV基因表达的一种或多种siRNA(例如,如表A中所描述)的核酸-脂质粒子。人中与HBV和/或HDV感染相关的症状的实例包括发烧、腹痛、尿液色深、关节疼痛、食欲不振、恶心、呕吐、虚弱、疲劳及皮肤发黄(黄疸)。

[0163] 本发明的某些实施方案提供一种用于在哺乳动物中治疗乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的如本文中所描述的核酸-脂质粒子或组合物(例如,药物组合物)的步骤。

[0164] 本发明的某些实施方案提供一种核酸-脂质粒子或组合物(例如,药物组合物),其用于在哺乳动物(例如,人)中治疗乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染。

[0165] 本发明的某些实施方案提供核酸-脂质粒子或组合物(例如,药物组合物)的用途,其用以制备用于在哺乳动物(例如,人)中治疗乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染的药剂。

[0166] 本发明的某些实施方案提供一种用于在哺乳动物中改善与乙型肝炎病毒和/或丁

型肝炎病毒感染相关的一种或多种症状的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的包含本文中所述的一种或多种siRNA分子(例如,如表A中所描述)的本文中所描述的核酸-脂质粒子或组合物(例如,药物组合物)的步骤。在某些实施方案中,粒子经由全身途径施用。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子的siRNA抑制乙型肝炎病毒基因在哺乳动物中的表达。在某些实施方案中,哺乳动物为人。在某些实施方案中,人患有肝病。

[0167] 本发明的某些实施方案提供一种如本文中所描述的核酸-脂质粒子或组合物(例如,药物组合物),其用于在哺乳动物(例如,人)中改善一种或多种与乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染相关的症状。

[0168] 本发明的某些实施方案提供如本文中所描述的核酸-脂质粒子或组合物(例如,药物组合物)的用途,其用以制备用于在哺乳动物(例如,人)中改善一种或多种与乙型肝炎病毒和/或丁型肝炎病毒感染相关的症状的药剂。

[0169] 本发明的某些实施方案提供一种用于在哺乳动物(例如,人)中抑制HDV的复制和/或改善HDV感染的一种或多种症状的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的如本文中所描述的核酸-脂质粒子或组合物(例如,药物组合物)的步骤,其中所述核酸-脂质粒子或组合物抑制HBV表面抗原的合成。

[0170] 本发明的某些实施方案提供一种如本文中所描述的核酸-脂质粒子或组合物(例如,药物组合物),其用于在哺乳动物(例如,人)中抑制HDV的复制和/或改善HDV感染的一种或多种症状,其中所述核酸-脂质粒子或组合物抑制HBV表面抗原的合成。

[0171] 本发明的某些实施方案提供如本文中所描述的核酸-脂质粒子或组合物(例如,药物组合物)的用途,其用以制备用于在哺乳动物(例如,人)中抑制HDV的复制和/或改善HDV感染的一种或多种症状的药剂,其中所述核酸-脂质粒子或组合物抑制HBV表面抗原的合成。

[0172] 本发明的某些实施方案提供一种如本文中所描述的核酸-脂质粒子或组合物(例如,药物组合物),其用于医学疗法中。

[0173] 在其它方面,本发明提供用于在有需要的哺乳动物(例如,人)(例如,罹患HBV感染或HBV/HDV感染的人)中使HBV和/或HDV不活化的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的包含本文中所述的靶向HBV基因表达的一种或多种siRNA的核酸-脂质粒子。在一些实施方案中,施用包含一种或多种HBV靶向siRNA的核酸-脂质粒子使HBV蛋白水平(例如,HBV表面抗原蛋白)相对于不存在所述siRNA时(例如,缓冲液对照或无关非HBV靶向siRNA对照)所检测的HBV蛋白水平下降、减少或降低至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其中的任何范围)。

[0174] 举例而言,可使用分支DNA测定法(QuantiGene®; Affymetrix)测量HBV mRNA。分支DNA测定法为使用bDNA分子扩增来自所俘获的靶RNA的信号的夹心核酸杂交法。

[0175] 除其在出于治疗目的使任一HBV基因的表达沉默方面的效用以外,本文中所描述的siRNA也可用于研究及开发应用以及诊断、预防、预后、临床及其它健康照护应用。作为一个非限制性实例,siRNA可用于针对测试HBV基因家族的特定成员是否具有作为治疗标靶的潜力的标靶验证研究。

[0176] 产生siRNA分子

[0177] siRNA可呈若干形式提供,包括例如作为一个或多个经分离的小干扰RNA(siRNA)双链体、作为较长的双链RNA(dsRNA)或作为自DNA质粒中的转录盒转录的siRNA或dsRNA。在一些实施方案中,可由酶或通过部分/总有机合成来产生siRNA,且可通过体外酶促或有机合成来引入经修饰的核糖核苷酸。在某些情况下,各链通过化学方式制备。合成RNA分子的方法在本领域中为已知的,例如,如Verma和Eckstein(1998)中所描述或如本文中所描述的化学合成方法。

[0178] 用于分离RNA、合成RNA、使核酸杂交、制造及筛选cDNA库以及进行PCR的方法在本领域中为熟知的(参见例如Gubler及Hoffman, Gene, 25:263-269(1983); Sambrook等人,同上; Ausubel等人,同上), PCR方法同样如此(参见例如美国专利第4,683,195号和第4,683,202号; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis等人编, 1990))。表达库对于本领域的技术人员也是熟知的。披露本发明所使用的一般方法的其它基本文稿包括Sambrook等人, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (第2版, 1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); 及Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人编, 1994)。这些参考文献的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0179] siRNA优选由化学方式合成。包含本发明的siRNA分子的寡核苷酸可使用本领域中已知的多种技术中的任一种来合成, 诸如以下文献中所描述的那些技术: Usman等人, J. Am. Chem. Soc., 109:7845(1987); Scaringe等人, Nucl. Acids Res., 18:5433(1990); Wincott等人, Nucl. Acids Res., 23:2677-2684(1995); 及Wincott等人, Methods Mol. Bio., 74:59(1997)。寡核苷酸的合成利用常用核酸保护基和偶合基, 诸如5'端的二甲氧基三苯甲基以及3'端的亚磷酰胺。作为一个非限制性实例, 可在Applied Biosystems合成器上使用0.2 μ mol规模方案进行小规模合成。或者, 0.2 μ mol规模的合成可在得自Protogene (Palo Alto, CA) 的96孔板合成器上进行。然而, 更大或更小的合成规模也在本发明的范围内。用于寡核苷酸合成的适合试剂、用于RNA脱保护的方法以及用于RNA纯化的方法对于本领域技术人员为已知的。

[0180] 可由两个不同的寡核苷酸组装siRNA分子, 其中一个寡核苷酸包含siRNA的有义链且另一个包含siRNA的反义链。举例而言, 可分开合成各链且在合成和/或脱保护之后通过杂交或连接而接合在一起。

[0181] 含有治疗性核酸的载体系统

[0182] A. 脂质粒子

[0183] 在某些方面, 本发明提供包含一种或多种siRNA分子(例如, 表A中所描述的一种或多种siRNA分子)和一种或多种阳离子(氨基)脂质或其盐的脂质粒子。在一些实施方案中, 本发明的脂质粒子还包含一种或多种非阳离子脂质。在其它实施方案中, 脂质粒子还包含一种或多种能够减少或抑制粒子聚集的缀合脂质。

[0184] 本发明的脂质粒子优选包含一种或多种siRNA分子(例如, 表A中所描述的siRNA分子)、阳离子脂质、非阳离子脂质和抑制粒子聚集的缀合脂质。在一些实施方案中, 将siRNA分子完全囊封在脂质粒子的脂质部分内, 使得脂质粒子中的siRNA分子在水溶液中对核酸酶降解具有抗性。在其它实施方案中, 本文中所描述的脂质粒子对诸如人的哺乳动物实质

上无毒。本发明的脂质粒子典型地具有约30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm或约70至约90nm的平均直径。在某些实施方案中,本发明的脂质粒子具有约30nm至约150nm的中值直径。本发明的脂质粒子还典型地具有约1:1至约100:1、约1:1至约50:1、约2:1至约25:1、约3:1至约20:1、约5:1至约15:1或约5:1至约10:1的脂质:核酸比(例如,脂质:siRNA比)(质量/质量比)。在某些实施方案中,核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1的脂质:siRNA质量比。

[0185] 在优选实施方案中,本发明的脂质粒子为血清稳定性核酸-脂质粒子,其包含一种或多种siRNA分子(例如,如表A中所描述的siRNA分子)、阳离子脂质(例如,如本文中所阐述的一种或多种具有式I至式III的阳离子脂质或其盐)、非阳离子脂质(例如,一种或多种磷脂与胆固醇的混合物)和抑制粒子聚集的缀合脂质(例如,一种或多种PEG-脂质缀合物)。脂质粒子可包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个靶向本文中所描述的一个或多个基因的siRNA分子(例如,表A中所描述的siRNA分子)。核酸-脂质粒子及其制备方法描述于例如美国专利第5,753,613号、第5,785,992号、第5,705,385号、第5,976,567号、第5,981,501号、第6,110,745号和第6,320,017号以及PCT公开案第W0 96/40964号中,其公开内容各自出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0186] 在本发明的核酸-脂质粒子中,一个或多个siRNA分子(例如,如表A中所描述的siRNA分子)可完全囊封在粒子的脂质部分内,从而保护siRNA免于核酸酶降解。在某些情况下,核酸-脂质粒子中的siRNA在所述粒子于37℃下暴露于核酸酶至少约20、30、45或60分钟之后基本上不降解。在某些其它情况下,核酸-脂质粒子中的siRNA在所述粒子在37℃下于血清中培育至少约30、45或60分钟或至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34或36小时之后基本上不降解。在其它实施方案中,使siRNA与所述粒子的脂质部分复合。本发明配制物的益处之一为核酸-脂质粒子组合物对诸如人的哺乳动物实质上无毒。

[0187] 术语“完全囊封”指示核酸-脂质粒子中的siRNA(例如,如表A中所描述的siRNA分子)在暴露于血清或会显著降解游离DNA或RNA的核酸酶测定之后不显著降解。在完全囊封的系统中,在正常将降解100%游离siRNA的治疗中,优选少于约25%的处于粒子中的siRNA降解,更优选少于约10%且最优选少于约5%的处于粒子中的siRNA降解。“完全囊封”也指示核酸-脂质粒子为血清稳定的,即,其在体内施用后不快速分解成其组成部分。

[0188] 在核酸的情形下,完全囊封可通过进行使用当与核酸缔合时具有增强的荧光的染料的膜不渗透性荧光染料排除测定法来测定。诸如 OliGreen® 和 RiboGreen® (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA) 的特定染料可用于质粒DNA、单链脱氧核糖核苷酸和/或单链或双链核糖核苷酸的定量测定。囊封是通过向脂质体配制物中添加染料,测量所产生的荧光且将其与添加少量非离子清洁剂后所观测的荧光相比较来测定。清洁剂介导的脂质体双层破坏释放所囊封的核酸,从而允许其与膜不渗透性染料相互作用。核酸囊封率可计算为 $E = (I_0 - I) / I_0$, 其中I和I₀是指添加清洁剂前后的荧光强度(参见Wheeler等人, Gene Ther., 6:271-281 (1999))。

[0189] 在其它实施方案中,本发明提供一种核酸-脂质粒子组合物,其包含多种核酸-脂质粒子。

[0190] 在一些情况下,核酸-脂质粒子组合物包含完全囊封在粒子的脂质部分内的siRNA

分子,使得约30%至约100%、约40%至约100%、约50%至约100%、约60%至约100%、约70%至约100%、约80%至约100%、约90%至约100%、约30%至约95%、约40%至约95%、约50%至约95%、约60%至约95%、约70%至约95%、约80%至约95%、约85%至约95%、约90%至约95%、约30%至约90%、约40%至约90%、约50%至约90%、约60%至约90%、约70%至约90%、约80%至约90%或至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%(或其任何分数或其中的范围)的粒子中囊封有siRNA。

[0191] 在其它情况下,核酸-脂质粒子组合物包含完全囊封在粒子的脂质部分内的siRNA分子,使得约30%至约100%、约40%至约100%、约50%至约100%、约60%至约100%、约70%至约100%、约80%至约100%、约90%至约100%、约30%至约95%、约40%至约95%、约50%至约95%、约60%至约95%、约70%至约95%、约80%至约95%、约85%至约95%、约90%至约95%、约30%至约90%、约40%至约90%、约50%至约90%、约60%至约90%、约70%至约90%、约80%至约90%或至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%(或其任何分数或其中的范围)的输入siRNA囊封在粒子中。

[0192] 视本发明的脂质粒子的预定用途而定,组分的比例可变化且特定配制物的递送效率可使用例如核内体释放参数(ERP)测定法加以测量。

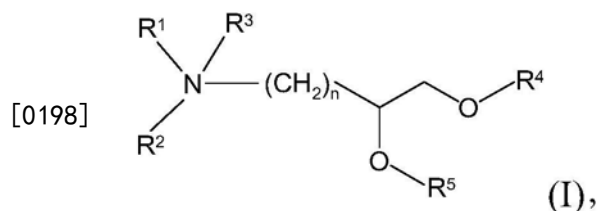
[0193] 1. 阳离子脂质

[0194] 多种阳离子脂质或其盐中的任一种均可单独或与一种或多种其它阳离子脂质种类或非阳离子脂质种类组合用于本发明的脂质粒子中。阳离子脂质包括其(R)和/或(S)对映异构体。

[0195] 在本发明的一个方面,阳离子脂质为二烷基脂质。举例而言,二烷基脂质可包括包含两条饱和或不饱和烷基链的脂质,其中所述烷基链各自可经取代或未经取代。在某些实施方案中,这两条烷基链各自包含至少例如8个碳原子、10个碳原子、12个碳原子、14个碳原子、16个碳原子、18个碳原子、20个碳原子、22个碳原子或24个碳原子。

[0196] 在本发明的一个方面,阳离子脂质为三烷基脂质。举例而言,三烷基脂质可包括包含三条饱和或不饱和烷基链的脂质,其中所述烷基链各自可经取代或未经取代。在某些实施方案中,这三条烷基链各自包含至少例如8个碳原子、10个碳原子、12个碳原子、14个碳原子、16个碳原子、18个碳原子、20个碳原子、22个碳原子或24个碳原子。

[0197] 在一个方面,具有以下结构的式I阳离子脂质可用于本发明:



[0199] 或其盐,其中:

[0200] R^1 与 R^2 相同或不同且独立地为氢(H)或任选经取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基或 C_2 - C_6 炔基,或 R^1 与 R^2 可接合以形成具有4至6个碳原子及1或2个选自由氮(N)、氧(O)及其混合物组成的组的杂原子的任选经取代的杂环;

[0201] R^3 不存在或为氢(H)或 C_1 - C_6 烷基以提供季胺;

[0202] R^4 与 R^5 相同或不同且独立地为任选经取代的 C_{10} - C_{24} 烷基、 C_{10} - C_{24} 烯基、 C_{10} - C_{24} 炔基或 C_{10} - C_{24} 酰基,其中 R^4 和 R^5 中至少一个包含至少两个不饱和位点;且

[0203] n 为0、1、2、3或4。

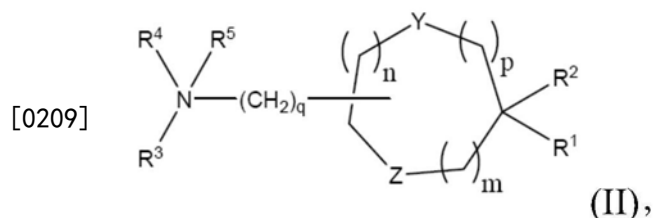
[0204] 在一些实施方案中, R^1 和 R^2 独立地为任选经取代的 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或 C_2 - C_4 炔基。在一个优选实施方案中, R^1 和 R^2 均为甲基。在其它优选实施方案中, n 为1或2。在其它实施方案中,当pH值高于阳离子脂质的 pK_a 时 R^3 不存在且当pH值低于阳离子脂质的 pK_a 时 R^3 为氢,以便将氨基头部基团质子化。在一个替代实施方案中, R^3 为任选经取代的 C_1 - C_4 烷基以提供季胺。在其它实施方案中, R^4 和 R^5 独立地为任选经取代的 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 烷基、 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 烯基、 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 炔基或 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 酰基,其中 R^4 和 R^5 中至少一个包含至少两个不饱和位点。

[0205] 在某些实施方案中, R^4 和 R^5 独立地选自由十二碳二烯基部分、十四碳二烯基部分、十六碳二烯基部分、十八碳二烯基部分、二十碳二烯基部分、十二碳三烯基部分、十四碳三烯基部分、十六碳三烯基部分、十八碳三烯基部分、二十碳三烯基部分、花生四烯酰基部分及二十二碳六烯酰基部分以及其酰基衍生物(例如,亚油酰基、次亚油酰基、 γ -亚油酰基等)组成的组。在一些情况下, R^4 和 R^5 之一包含支链烷基(例如植烷基部分)或其酰基衍生物(例如,植酰基部分)。在某些情况下,十八碳二烯基部分为亚油基部分。在某些其它情况下,十八碳三烯基部分为亚麻基部分或 γ -亚麻基部分。在某些实施方案中, R^4 和 R^5 均为亚油基部分、亚麻基部分或 γ -亚麻基部分。在特定实施方案中,式I的阳离子脂质为1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二亚油基氧基-(N,N-二甲基)-丁基-4-胺(C2-DLinDMA)、1,2-二亚油酰氧基-(N,N-二甲基)-丁基-4-胺(C2-DLinDAP)或其混合物。

[0206] 在一些实施方案中,式I的阳离子脂质与一个或多个阴离子形成盐(优选为结晶盐)。在一个特定实施方案中,式I的阳离子脂质为其草酸(例如,半草酸)盐,盐优选为结晶盐。

[0207] 诸如DLinDMA及DLenDMA以及其它阳离子脂质的阳离子脂质的合成描述于美国专利公开案第20060083780号中,该案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。诸如C2-DLinDMA及C2-DLinDAP以及其它阳离子脂质的阳离子脂质的合成描述于国际专利申请案第W02011/000106号中,该案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0208] 在另一方面,具有以下结构的式II的阳离子脂质(或其盐)可用于本发明:



[0210] 其中 R^1 与 R^2 相同或不同且独立地为任选经取代的 C_{12} - C_{24} 烷基、 C_{12} - C_{24} 烯基、 C_{12} - C_{24} 炔基或 C_{12} - C_{24} 酰基; R^3 与 R^4 相同或不同且独立地为任选经取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基或 C_2 - C_6 炔基,或 R^3 与 R^4 可接合以形成具有4至6个碳原子及1或2个选自氮和氧的杂原子的任选经

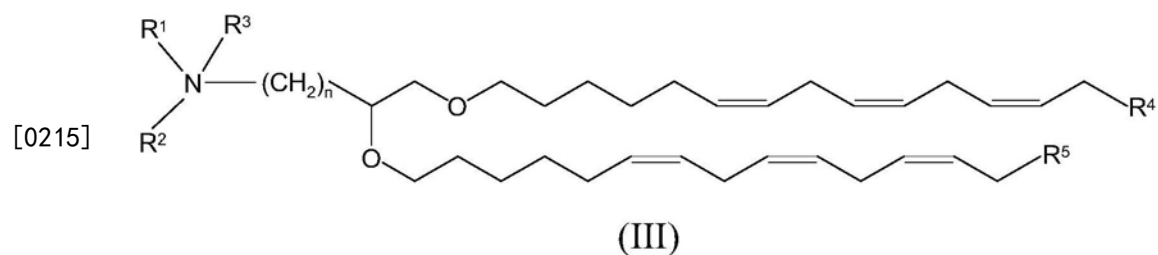
取代的杂环; R^5 不存在或为氢 (H) 或 C_1-C_6 烷基以提供季胺; m 、 n 和 p 相同或不同且独立地为 0、1 或 2, 其限制条件为 m 、 n 和 p 不同时为 0; q 为 0、1、2、3 或 4; 且 Y 与 Z 相同或不同且独立地为 O、S 或 NH。在一个优选实施方案中, q 为 2。

[0211] 在一些实施方案中, 式 II 的阳离子脂质为 2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环 (Dlin-K-C2-DMA; “XTC2” 或 “C2K”)、2,2-二亚油基-4-(3-二甲基氨基丙基)-[1,3]-二氧戊环 (Dlin-K-C3-DMA; “C3K”)、2,2-二亚油基-4-(4-二甲基氨基丁基)-[1,3]-二氧戊环 (Dlin-K-C4-DMA; “C4K”)、2,2-二亚油基-5-二甲基氨基甲基-[1,3]-二噁烷 (Dlin-K6-DMA)、2,2-二亚油基-4-N-甲基哌嗪基-[1,3]-二氧戊环 (Dlin-K-MPZ)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环 (Dlin-K-DMA)、2,2-二油酰基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环 (D0-K-DMA)、2,2-二硬脂酰基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环 (DS-K-DMA)、2,2-二亚油基-4-N-吗啉基-[1,3]-二氧戊环 (Dlin-K-MA)、2,2-二亚油基-4-三甲基氨基-[1,3]-二氧戊环氯化物 (Dlin-K-TMA • Cl)、2,2-二亚油基-4,5-双(二甲基氨基甲基)-[1,3]-二氧戊环 (Dlin-K²-DMA)、2,2-二亚油基-4-甲基哌嗪-[1,3]-二氧戊环 (Dlin-K-N-甲基哌嗪) 或其混合物。在优选实施方案中, 式 II 的阳离子脂质为 Dlin-K-C2-DMA。

[0212] 在一些实施方案中, 式 II 的阳离子脂质与一个或多个阴离子形成盐 (优选为结晶盐)。在一个特定实施方案中, 式 II 的阳离子脂质为其草酸 (例如, 半草酸) 盐, 盐优选为结晶盐。

[0213] 诸如 Dlin-K-DMA 以及其它阳离子脂质的阳离子脂质的合成描述于 PCT 公开案第 WO 09/086558 号中, 该案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。诸如 Dlin-K-C2-DMA、Dlin-K-C3-DMA、Dlin-K-C4-DMA、Dlin-K6-DMA、Dlin-K-MPZ、D0-K-DMA、DS-K-DMA、Dlin-K-MA、Dlin-K-TMA.Cl、Dlin-K²-DMA 及 Dlin-K-N-甲基哌嗪以及其它阳离子脂质的阳离子脂质的合成描述于 2009 年 10 月 9 日提交的名为 “Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids” 的 PCT 申请案第 PCT/US2009/060251 号中, 该案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0214] 在另一方面, 具有以下结构的式 III 阳离子脂质可用于本发明:



[0216] 或其盐, 其中: R^1 与 R^2 相同或不同且独立地为任选经取代的 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基或 C_2-C_6 炔基, 或 R^1 与 R^2 可接合以形成具有 4 至 6 个碳原子及 1 或 2 个选自由氮 (N)、氧 (O) 及其混合物组成的组的杂原子的任选经取代的杂环; R^3 不存在或为氢 (H) 或 C_1-C_6 烷基以提供季胺; R^4 和 R^5 不存在或存在且当存在时相同或不同且独立地为任选经取代的 C_1-C_{10} 烷基或 C_2-C_{10} 烯基; 且 n 为 0、1、2、3 或 4。

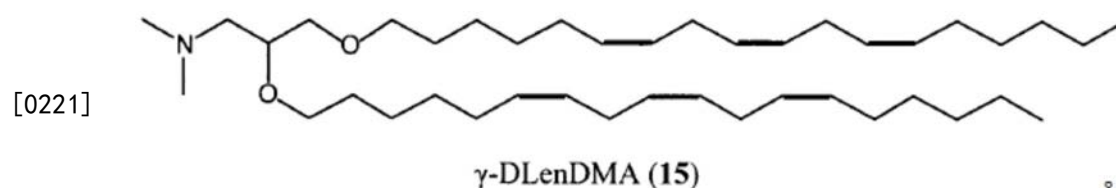
[0217] 在一些实施方案中, R^1 和 R^2 独立地为任选经取代的 C_1-C_4 烷基、 C_2-C_4 烯基或 C_2-C_4 炔基。在一个优选实施方案中, R^1 和 R^2 均为甲基。在另一个优选实施方案中, R^4 和 R^5 均为丁基。在另一个优选实施方案中, n 为 1。在其它实施方案中, 当 pH 值高于阳离子脂质的 pK_a 时 R^3 不存

在且当pH值低于阳离子脂质的 pK_a 时 R^3 为氢,以便将氨基头部基团质子化。在一个替代实施方案中, R^3 为任选经取代的 C_1-C_4 烷基以提供季胺。在其它实施方案中, R^4 和 R^5 独立地为任选经取代的 C_2-C_6 或 C_2-C_4 烷基或 C_2-C_6 或 C_2-C_4 烯基。

[0218] 在一个替代实施方案中,式III的阳离子脂质包含介于氨基头部基团与两个烷基链之一者或两者之间的酯键联。在一些实施方案中,式III的阳离子脂质与一个或多个阴离子形成盐(优选为结晶盐)。在一个特定实施方案中,式III的阳离子脂质为其草酸(例如,半草酸)盐,盐优选为结晶盐。

[0219] 尽管式III中的烷基链各自在位置6、9和12上含有顺式双键(即,顺,顺,顺- Δ^6 , Δ^9 , Δ^{12}),但在一个替代实施方案中,两条烷基链之一者或两者中的这些双键中一个、两个或三个可呈反式构形。

[0220] 在一个特别优选的实施方案中,式III的阳离子脂质具有以下结构:



[0222] 诸如 γ -DLenDMA (15) 以及其它阳离子脂质的阳离子脂质的合成描述于2009年7月1日提交的名为“Improved Cationic Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids”的美国临时申请案第61/222,462号中,该案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0223] 诸如DLin-M-C3-DMA (“MC3”) 以及其它阳离子脂质(例如,MC3的某些类似物)的阳离子脂质的合成描述于2009年6月10日提交的名为“Novel Lipids and Compositions for the Delivery of Therapeutics”的美国临时申请案第61/185,800号和2009年12月18日提交的名为“Methods and Compositions for Delivery of Nucleic Acids”的美国临时申请案第61/287,995号中,其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0224] 可包括在本发明的脂质粒子中的其它阳离子脂质或其盐的实例包括但不限于阳离子脂质,诸如W02011/000106中所描述的那些阳离子脂质,其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中;以及阳离子脂质,诸如N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、1,2-二油烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DODMA)、1,2-二硬脂基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DSDMA)、N-(1-(2,3-二油烯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、3-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨甲酰基)胆固醇(DC-Chol)、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟基乙基溴化铵(DMRIE)、2,3-二油烯基氧基-N-[2(精胺-甲酰胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙烷三氟乙酸铵(DOSPA)、二(十八烷基)酰胺甘氨酸精胺(DOGS)、3-二甲基氨基-2-(胆固醇-5-烯-3- β -氧基丁-4-氧基)-1-(顺,顺-9,12-十八碳二烯氧基)丙烷(CLInDMA)、2-[5'-(胆固醇-5-烯-3- β -氧基)-3'-氧杂戊氧基]-3-二甲基-1-(顺,顺-9',1'-2'-十八碳二烯氧基)丙烷(CpLinDMA)、N,N-二甲基-3,4-二油烯基氧基苯甲胺(DMOBA)、1,2-N,N'-二油烯基氨甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(DOcarbDAP)、1,2-N,N'-二亚油基氨甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLincarbDAP)、1,2-二亚油基氨甲酰基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油基氧基-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-

DAC)、1,2-二亚油基氧基-3-吗啉基丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油基硫-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚油基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亚油基氧基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TMA • Cl)、1,2-二亚油酰基-3-三甲基丙烷氯化物盐(DLin-TAP • Cl)、1,2-二亚油基氧基-3-(N-甲基哌嗪基)丙烷(DLin-MPZ)、3-(N,N-二亚油基氨基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油烯基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亚油基氧代-3-(2-N,N-二甲基氨基)环氧丙烷(DLin-EG-DMA)、1,2-二油烯基氨甲酰基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DO-C-DAP)、1,2-二肉豆蔻基油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DMDAP)、1,2-二油酰基-3-三甲基氨基丙烷氯化物(DOTAP • Cl)、二亚油基甲基-3-二甲基氨基丙酸酯(DLin-M-C2-DMA;也称为DLin-M-K-DMA或DLin-M-DMA)及其混合物。可包括在本发明的脂质粒子中的其它阳离子脂质或其盐描述于美国专利公开案第20090023673号中,该案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0225] 诸如CLinDMA以及其它阳离子脂质的阳离子脂质的合成描述于美国专利公开案第20060240554号中,该案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。诸如DLin-C-DAP、DLinDAC、DLinMA、DLinDAP、DLin-S-DMA、DLin-2-DMAP、DLinTMA • Cl、DLinTAP • Cl、DLinMPZ、DlinAP、DOAP和DLin-EG-DMA以及其它阳离子脂质的阳离子脂质的合成描述于PCT公开案第W0 09/086558号中,该案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。诸如DO-C-DAP、DMDAP、DOTAP • Cl、DLin-M-C2-DMA以及其它阳离子脂质的阳离子脂质的合成描述于2009年10月9日提交的名为“Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids”的PCT申请案第PCT/US2009/060251号中,该案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。许多其它阳离子脂质和相关类似物的合成已描述于美国专利第5,208,036号、第5,264,618号、第5,279,833号、第5,283,185号、第5,753,613号和第5,785,992号以及PCT公开案第W0 96/10390号中,其公开内容各自出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。另外,可使用阳离子脂质的许多市售制剂,例如,诸如 **LIPOFECTIN[®]** (包括DOTMA和DOPE,可得自Invitrogen); **LIPOFECTAMINE[®]** (包括DOSPA和DOPE,可得自Invitrogen); 和 **TRANSFECTAM[®]** (包括DOGS,可得自Promega Corp.)。

[0226] 在一些实施方案中,阳离子脂质占粒子中所存在的总脂质的约50摩尔%至约90摩尔%、约50摩尔%至约85摩尔%、约50摩尔%至约80摩尔%、约50摩尔%至约75摩尔%、约50摩尔%至约70摩尔%、约50摩尔%至约65摩尔%、约50摩尔%至约60摩尔%、约55摩尔%至约65摩尔%或约55摩尔%至约70摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。在特定实施方案中,阳离子脂质占粒子中所存在的总脂质的约50摩尔%、51摩尔%、52摩尔%、53摩尔%、54摩尔%、55摩尔%、56摩尔%、57摩尔%、58摩尔%、59摩尔%、60摩尔%、61摩尔%、62摩尔%、63摩尔%、64摩尔%或65摩尔%(或其任何分数)。

[0227] 在其它实施方案中,阳离子脂质占粒子中所存在的总脂质的约2摩尔%至约60摩尔%、约5摩尔%至约50摩尔%、约10摩尔%至约50摩尔%、约20摩尔%至约50摩尔%、约20摩尔%至约40摩尔%、约30摩尔%至约40摩尔%、或约40摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。

[0228] 适用于本发明的脂质粒子中的阳离子脂质的其它百分比及范围描述于PCT公开案

第W0 09/127060号、美国已公开申请案第US 2011/0071208号、PCT公开案第W02011/000106号和美国已公开申请案第US 2011/0076335号中,这些专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0229] 应理解,本发明的脂质粒子中所存在的阳离子脂质的百分比为目标量,且配制物中所存在的阳离子脂质的实际量可变化例如 ± 5 摩尔%。举例而言,在一种例示性脂质粒子配制物中,阳离子脂质的目标量为57.1摩尔%,但阳离子脂质的实际量可为该目标量 ± 5 摩尔%、 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%,配制物的其余部分由其它脂质组分组成(加和达粒子中所存在的总脂质的100摩尔%;然而,本领域技术人员应理解,总摩尔%可能由于四舍五入而稍微偏离100%,例如99.9摩尔%或100.1摩尔%)。

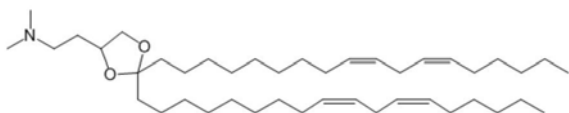
[0230] 可用于包括在本发明中所使用的脂质粒子中的阳离子脂质的其它实例如下所示:

[0231]



[0232] N,N-二甲基-2,3-双((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基氧基)丙-1-胺(5)

[0233]



[0234] 2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基乙胺(6)

[0235]



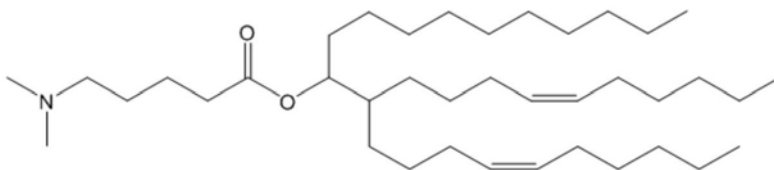
[0236] 4-(二甲基氨基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯(7)

[0237]



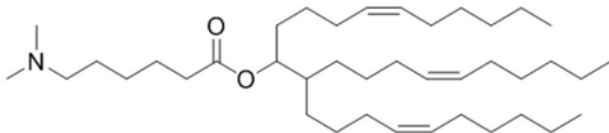
[0238] 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(8)

[0239]

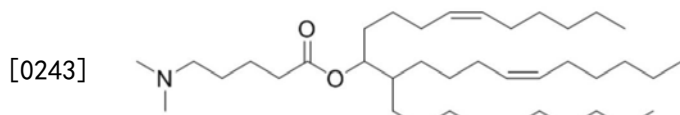


[0240] 5-(二甲基氨基)戊酸(Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-16-烯-11-基酯(53)

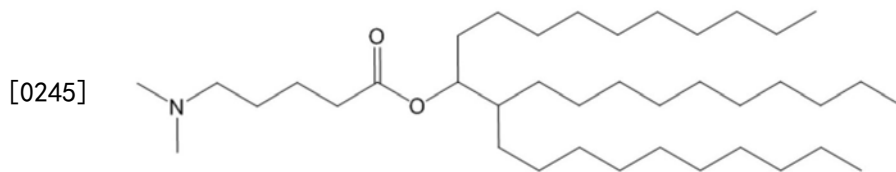
[0241]



[0242] 6-(二甲基氨基)己酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(11)



[0244] 5-(二甲基氨基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二碳-6,16-二烯-11-基酯(13)



[0246] 5-(二甲基氨基)戊酸12-癸基二十二烷-11-基酯(14)。

[0247] 2.非阳离子脂质

[0248] 本发明的脂质粒子中所使用的非阳离子脂质可为能够产生稳定复合物的多种中性不带电、两性离子或阴离子脂质中的任一种。

[0249] 非阳离子脂质的非限制性实例包括磷脂,诸如卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、二鲸蜡基磷酸酯、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)、棕榈酰油酰磷脂酰甘油(POPG)、二油酰基磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-甲酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE)、单甲基磷脂酰乙醇胺、二甲基磷脂酰乙醇胺、二反油酰基磷脂酰乙醇胺(DEPE)、硬脂酰油酰磷脂酰乙醇胺(SOPE)、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰胆碱及其混合物。也可使用其它二酰基磷脂酰胆碱及二酰基磷脂酰乙醇胺磷脂。这些脂质中的酰基优选为来源于具有C₁₀-C₂₄碳链的脂肪酸的酰基,例如月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基或油酰基。

[0250] 非阳离子脂质的其它实例包括固醇,诸如胆固醇及其衍生物。胆固醇衍生物的非限制性实例包括极性类似物,诸如5 α -胆甾烷醇、5 β -粪甾烷醇、胆固醇基-(2'-羟基)-乙醚、胆固醇基-(4'-羟基)-丁基醚及6-酮基胆甾烷醇;非极性类似物,诸如5 α -胆甾烷、胆甾烯酮、5 α -胆甾烷酮、5 β -胆甾烷酮及癸酸胆固醇酯;及其混合物。在优选实施方案中,胆固醇衍生物为极性类似物,诸如胆固醇基-(4'-羟基)-丁基醚。胆固醇基-(2'-羟基)-乙醚的合成描述于PCT公开案第W0 09/127060号中,其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0251] 在一些实施方案中,脂质粒子中所存在的非阳离子脂质包含一种或多种磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物或由其组成。在其它实施方案中,脂质粒子中所存在的非阳离子脂质包含一种或多种磷脂或由其组成,例如无胆固醇脂质粒子配制物。在其它实施方案中,脂质粒子中所存在的非阳离子脂质包含胆固醇或其衍生物或由其组成,例如无磷脂脂质粒子配制物。

[0252] 适用于本发明中的非阳离子脂质的其它实例包括非含磷脂质,例如,诸如硬脂胺、十二烷胺、十六烷胺、棕榈酸乙酰酯、蓖麻酸甘油酯、硬脂酸十六烷基酯、肉豆蔻酸异丙酯、

两性丙烯酸类聚合物、三乙醇胺硫酸月桂酯、烷基芳基硫酸酯聚乙氧基脂肪酸酰胺、二(十八烷基)二甲基溴化铵、神经酰胺、鞘磷脂及其类似物。

[0253] 在一些实施方案中,非阳离子脂质占粒子中所存在的总脂质的约10摩尔%至约60摩尔%、约20摩尔%至约55摩尔%、约20摩尔%至约45摩尔%、约20摩尔%至约40摩尔%、约25摩尔%至约50摩尔%、约25摩尔%至约45摩尔%、约30摩尔%至约50摩尔%、约30摩尔%至约45摩尔%、约30摩尔%至约40摩尔%、约35摩尔%至约45摩尔%、约37摩尔%至约45摩尔%或约35摩尔%、36摩尔%、37摩尔%、38摩尔%、39摩尔%、40摩尔%、41摩尔%、42摩尔%、43摩尔%、44摩尔%或45摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。

[0254] 在脂质粒子含有磷脂与胆固醇或胆固醇衍生物的混合物的实施方案中,混合物可占粒子中所存在的总脂质的约40摩尔%、45摩尔%、50摩尔%、55摩尔%或60摩尔%。

[0255] 在一些实施方案中,混合物中的磷脂组分可占粒子中所存在的总脂质的约2摩尔%至约20摩尔%、约2摩尔%至约15摩尔%、约2摩尔%至约12摩尔%、约4摩尔%至约15摩尔%或约4摩尔%至约10摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。在某些实施方案中,混合物中的磷脂组分占粒子中所存在的总脂质的约5摩尔%至约17摩尔%、约7摩尔%至约17摩尔%、约7摩尔%至约15摩尔%、约8摩尔%至约15摩尔%或约8摩尔%、9摩尔%、10摩尔%、11摩尔%、12摩尔%、13摩尔%、14摩尔%或15摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。作为一个非限制性实例,包含磷脂与胆固醇的混合物的脂质粒子配制物可包含例如相对于粒子中所存在的总脂质占约7摩尔%(或其任何分数)的诸如DPPC或DSPC的磷脂与占约34摩尔%(或其任何分数)的胆固醇或胆固醇衍生物的混合物。作为另一个非限制性实例,包含磷脂与胆固醇的混合物的脂质粒子配制物可包含例如相对于粒子中所存在的总脂质占约7摩尔%(或其任何分数)的诸如DPPC或DSPC的磷脂与占约32摩尔%(或其任何分数)的胆固醇或胆固醇衍生物的混合物。

[0256] 进一步举例而言,可用于实施本发明的脂质配制物具有约10:1的脂质与药物(例如siRNA)比(例如,9.5:1至11:1或9.9:1至11:1或10:1至10.9:1的脂质:药物比)。在某些其它实施方案中,可用于实施本发明的脂质配制物具有约9:1的脂质与药物(例如siRNA)比(例如,8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1的脂质:药物比,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1和9.8:1)。

[0257] 在其它实施方案中,混合物中的胆固醇组分可占粒子中所存在的总脂质的约25摩尔%至约45摩尔%、约25摩尔%至约40摩尔%、约30摩尔%至约45摩尔%、约30摩尔%至约40摩尔%、约27摩尔%至约37摩尔%、约25摩尔%至约30摩尔%或约35摩尔%至约40摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。在某些优选实施方案中,混合物中的胆固醇组分占粒子中所存在的总脂质的约25摩尔%至约35摩尔%、约27摩尔%至约35摩尔%、约29摩尔%至约35摩尔%、约30摩尔%至约35摩尔%、约30摩尔%至约34摩尔%、约31摩尔%至约33摩尔%或约30摩尔%、31摩尔%、32摩尔%、33摩尔%、34摩尔%或35摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。

[0258] 在脂质粒子不含磷脂的实施方案中,胆固醇或其衍生物可占粒子中所存在的总脂质的约25摩尔%、30摩尔%、35摩尔%、40摩尔%、45摩尔%、50摩尔%、55摩尔%或60摩尔%。

[0259] 在一些实施方案中,无磷脂脂质粒子配制物中的胆固醇或其衍生物可占粒子中所

存在的总脂质的约25摩尔%至约45摩尔%、约25摩尔%至约40摩尔%、约30摩尔%至约45摩尔%、约30摩尔%至约40摩尔%、约31摩尔%至约39摩尔%、约32摩尔%至约38摩尔%、约33摩尔%至约37摩尔%、约35摩尔%至约45摩尔%、约30摩尔%至约35摩尔%、约35摩尔%至约40摩尔%或约30摩尔%、31摩尔%、32摩尔%、33摩尔%、34摩尔%、35摩尔%、36摩尔%、37摩尔%、38摩尔%、39摩尔%或40摩尔% (或其任何分数或其中的范围)。作为一个非限制性实例,脂质粒子配制物可包含占粒子中所存在的总脂质的约37摩尔% (或其任何分数) 的胆固醇。作为另一个非限制性实例,脂质粒子配制物可包含占粒子中所存在的总脂质的约35摩尔% (或其任何分数) 的胆固醇。

[0260] 在其它实施方案中,非阳离子脂质占粒子中所存在的总脂质的约5摩尔%至约90摩尔%、约10摩尔%至约85摩尔%、约20摩尔%至约80摩尔%、约10摩尔% (例如,仅磷脂) 或约60摩尔% (例如,磷脂与胆固醇或其衍生物) (或其任何分数或其中的范围)。

[0261] 适用于本发明的脂质粒子中的非阳离子脂质的其它百分比及范围描述于PCT公开案第W0 09/127060号、美国已公开申请案第US 2011/0071208号、PCT公开案第W02011/000106号和美国已公开申请案第US 2011/0076335号中,其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0262] 应理解,本发明的脂质粒子中所存在的非阳离子脂质的百分比为目标量,且配制物中所存在的非阳离子脂质的实际量可变化例如 ± 5 摩尔%、 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%。

[0263] 3. 脂质缀合物

[0264] 除阳离子脂质和非阳离子脂质以外,本发明的脂质粒子可还包含脂质缀合物。缀合脂质为适用的,因为其可防止粒子聚集。适合的缀合脂质包括但不限于PEG-脂质缀合物、POZ-脂质缀合物、ATTA-脂质缀合物、阳离子聚合物-脂质缀合物(CPL)及其混合物。在某些实施方案中,粒子包含PEG-脂质缀合物或ATTA-脂质缀合物与CPL。

[0265] 在一个优选实施方案中,脂质缀合物为PEG-脂质。PEG-脂质的实例包括但不限于如例如PCT公开案第W0 05/026372号中所描述的与二烷基氧基丙基耦合的PEG (PEG-DAA)、如例如美国专利公开案第20030077829号和第2005008689号中所描述的与二酰基甘油耦合的PEG (PEG-DAG)、与诸如磷脂酰乙醇胺的磷脂耦合的PEG (PEG-PE)、如例如美国专利第5,885,613号中所描述的与神经酰胺缀合的PEG、与胆固醇或其衍生物缀合的PEG及其混合物。这些专利文献的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0266] 适用于本发明的其它PEG-脂质包括而不限于mPEG2000-1,2-二-O-烷基-sn3-氨甲酰基甘油酯(PEG-C-DMG)。PEG-C-DMG的合成描述于PCT公开案第W0 09/086558号中,其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。其它适合的PEG-脂质缀合物包括而不限于1-[8'-(1,2-二肉豆蔻酰-3-丙氧基)-甲酰胺基-3',6'-二氧杂辛基]氨甲酰基- ω -甲基-聚(乙二醇)(2KPEG-DMG)。2KPEG-DMG的合成描述于美国专利第7,404,969号中,该专利出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0267] PEG为具有两个末端羟基的乙烯PEG重复单元的线性水溶性聚合物。PEG系按其分子量加以分类;举例而言,PEG 2000具有约2,000道尔顿的平均分子量,且PEG 5000具有约5,000道尔顿的平均分子量。PEG可购自Sigma Chemical Co.及其它公司,且包括但不限于以下各项:单甲氧基聚乙二醇(MePEG-OH)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯(MePEG-S)、单甲氧

基聚乙二醇-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯 (MePEG-S-NHS)、单甲氧基聚乙二醇-胺 (MePEG-NH₂)、单甲氧基聚乙二醇-三氟乙磺酸酯 (MePEG-TRES)、单甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基 (MePEG-IM) 以及含有末端羟基替代末端甲氧基的所述化合物 (例如, HO-PEG-S、HO-PEG-S-NHS、HO-PEG-NH₂等)。其它 PEG, 诸如美国专利第 6,774,180 号和第 7,053,150 号中所描述的那些 PEG (例如, mPEG (20KDa) 胺) 也可用于制备本发明的 PEG-脂质缀合物。这些专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。另外, 单甲氧基聚乙二醇-乙酸 (MePEG-CH₂COOH) 尤其可用于制备 PEG-脂质缀合物, 包括例如 PEG-DAA 缀合物。

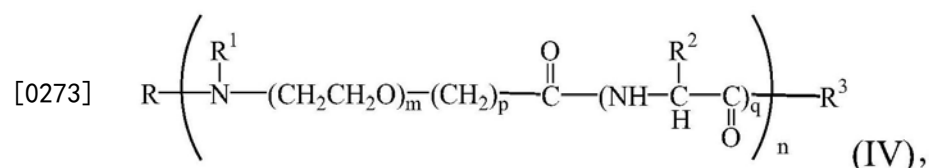
[0268] 本文中所描述的 PEG-脂质缀合物的 PEG 部分可包含介于约 550 道尔顿至约 10,000 道尔顿范围内的平均分子量。在某些情况下, PEG 部分具有约 750 道尔顿至约 5,000 道尔顿 (例如, 约 1,000 道尔顿至约 5,000 道尔顿、约 1,500 道尔顿至约 3,000 道尔顿、约 750 道尔顿至约 3,000 道尔顿、约 750 道尔顿至约 2,000 道尔顿等) 的平均分子量。在优选实施方案中, PEG 部分具有约 2,000 道尔顿或约 750 道尔顿的平均分子量。

[0269] 在某些情况下, PEG 可任选由烷基、烷氧基、酰基或芳基取代。PEG 可直接与脂质缀合, 或可经由接头部分与脂质连接。适合于使 PEG 与脂质偶合的任何接头部分均可使用, 包括例如非含酯接头部分和含酯接头部分。在一个优选实施方案中, 接头部分为非含酯接头部分。如本文中所使用, 术语“非含酯接头部分”是指不含羧酸酯键 (-OC(O)-) 的接头部分。适合的非含酯接头部分包括但不限于酰胺基 (-C(O)NH-)、氨基 (-NR-)、羰基 (-C(O)-)、氨基甲酸酯 (-NHC(O)O-)、脲 (-NHC(O)NH-)、二硫键 (-S-S-)、醚 (-O-)、琥珀酰基 (- (O)CCH₂CH₂C(O)-)、琥珀酰氨基 (-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-)、醚、二硫键以及其组合 (诸如含有氨基甲酸酯接头部分和酰胺基接头部分的接头)。在一个优选实施方案中, 使用氨基甲酸酯接头使 PEG 与脂质偶合。

[0270] 在其它实施方案中, 使用含酯接头部分使 PEG 与脂质偶合。适合的含酯接头部分包括例如碳酸酯 (-OC(O)O-)、琥珀酰基、磷酸酯 (-O-(O)POH-O-)、磺酸酯及其组合。

[0271] 存在多种具有不同链长度及饱和度的酰基链基团的磷脂酰乙醇胺可与 PEG 缀合以形成脂质缀合物。这种磷脂酰乙醇胺可购自市面, 或可使用本领域技术人员已知的常规技术分离或合成。含有碳链长度介于 C₁₀ 至 C₂₀ 范围内的饱和或不饱和脂肪酸的磷脂酰基-乙醇胺优选。也可使用具有单不饱和或双不饱和脂肪酸及饱和与不饱和脂肪酸的混合物的磷脂酰乙醇胺。适合的磷脂酰乙醇胺包括但不限于二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺 (DMPE)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺 (DPPE)、二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE)。

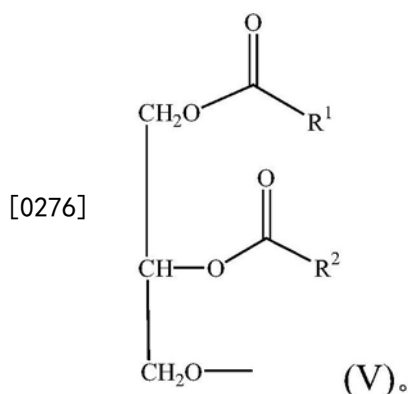
[0272] 术语“ATTA”或“聚酰胺”包括而限于美国专利第 6,320,017 号和第 6,586,559 号中所描述的化合物, 其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。这些化合物包括具有下式的化合物:



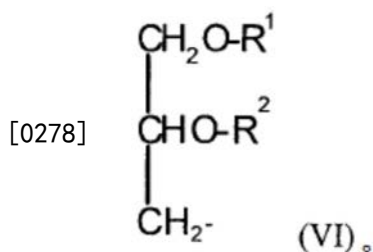
[0274] 其中 R 为选自由氢、烷基和酰基组成的组的成员; R¹ 为选自由氢和烷基组成的组的成员; 或任选地, R 和 R¹ 与其所缀合的氮形成叠氮基部分; R² 为选自由氢、任选经取代的烷基、任

选经取代的芳基和氨基酸侧链的组的成员; R^3 为选自由氢、卤素、羟基、烷氧基、巯基、胍基、氨基和 NR^4R^5 组成的组的成员, 其中 R^4 和 R^5 独立地为氢或烷基; n 为 4 至 80; m 为 2 至 6; p 为 1 至 4; 且 q 为 0 或 1。本领域技术人员应显而易见, 其它聚酰胺可用于本发明化合物中。

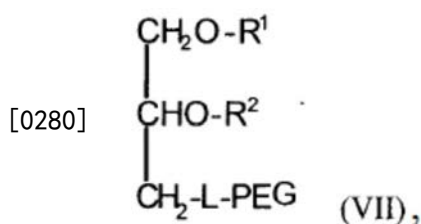
[0275] 术语“二酰基甘油”或“DAG”包括具有 2 条脂肪酰基链 R^1 和 R^2 的化合物, 两者独立地具有通过酯键联与甘油的 1 位和 2 位键结的介于 2 与 30 个之间的碳。酰基可为饱和的或具有不同的不饱和度。适合的酰基包括但不限于月桂酰基 (C_{12})、肉豆蔻酰基 (C_{14})、棕榈酰基 (C_{16})、硬脂酰基 (C_{18}) 和二十碳酰基 (C_{20})。在优选实施方案中, R^1 与 R^2 相同, 即, R^1 与 R^2 均为肉豆蔻酰基 (也即, 二肉豆蔻酰基), R^1 与 R^2 均为硬脂酰基 (即, 二硬脂酰基) 等。二酰基甘油具有以下通式:



[0277] 术语“二烷基氧基丙基”或“DAA”包括具有 2 条烷基链 R^1 和 R^2 的化合物, 两者独立地具有介于 2 与 30 个之间的碳。烷基可为饱和的或具有不同的不饱和度。二烷基氧基丙基具有以下通式:



[0279] 在一个优选实施方案中, PEG-脂质为具有下式的 PEG-DAA 缀合物:



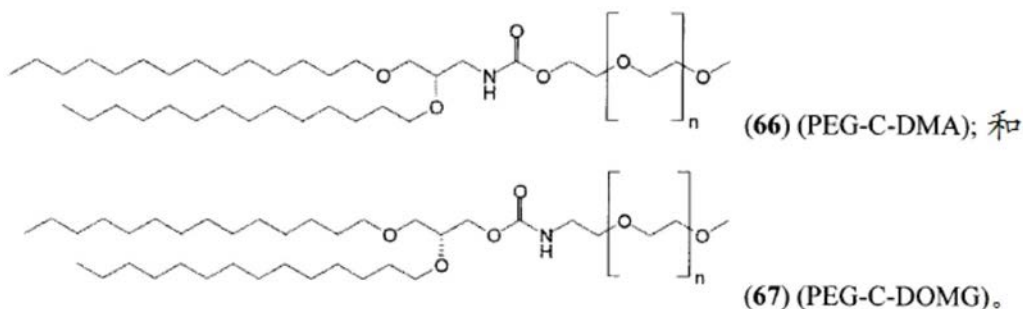
[0281] 其中 R^1 和 R^2 独立地选择且为具有约 10 至约 22 个碳原子的长链烷基; PEG 为聚乙二醇; 且 L 为如以上所描述的非含酯接头部分或含酯接头部分。长链烷基可为饱和或不饱和的。适合的烷基包括但不限于癸基 (C_{10})、月桂基 (C_{12})、肉豆蔻基 (C_{14})、棕榈基 (C_{16})、硬脂基 (C_{18}) 及二十烷基 (C_{20})。在优选实施方案中, R^1 与 R^2 相同, 即, R^1 与 R^2 均为肉豆蔻基 (即, 二肉豆蔻基), R^1 与 R^2 均为硬脂基 (即, 二硬脂基) 等。

[0282] 在以上式 VII 中, PEG 具有介于约 550 道尔顿至约 10,000 道尔顿范围内的平均分子量。在某些情况下, PEG 具有约 750 道尔顿至约 5,000 道尔顿 (例如, 约 1,000 道尔顿至约 5,000

道尔顿、约1,500道尔顿至约3,000道尔顿、约750道尔顿至约3,000道尔顿、约750道尔顿至约2,000道尔顿等)的平均分子量。在优选实施方案中,PEG具有约2,000道尔顿或约750道尔顿的平均分子量。PEG可任选经烷基、烷氧基、酰基或芳基取代。在某些实施方案中,末端羟基经甲氧基或甲基取代。

[0283] 在一个优选实施方案中,“L”为非含酯接头部分。适合的非含酯接头包括但不限于酰胺基接头部分、氨基接头部分、羰基接头部分、氨基甲酸酯接头部分、脲接头部分、醚接头部分、二硫键接头部分、琥珀酰胺基接头部分及其组合。在一个优选实施方案中,非含酯接头部分为氨基甲酸酯接头部分(也即,PEG-C-DAA缀合物)。在另一个优选实施方案中,非含酯接头部分为酰胺基接头部分(也即,PEG-A-DAA缀合物)。在另一个优选实施方案中,非含酯接头部分为琥珀酰胺基接头部分(也即,PEG-S-DAA缀合物)。

[0284] 在特定实施方案中,PEG-脂质缀合物选自:



[0286] 使用本领域技术人员已知的标准技术和试剂合成PEG-DAA缀合物。应认识到,PEG-DAA缀合物将含有各种酰胺、胺、醚、硫、氨基甲酸酯及脲键联。本领域技术人员应认识到,用于形成这些键的方法和试剂为熟知的且容易获得的。参见例如March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY (Wiley 1992); Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS (VCH 1989); 及Furniss, VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY, 第5版 (Longman 1989)。也应理解,所存在的任何官能团可能均需要在PEG-DAA缀合物合成中的不同的时间点进行保护及脱保护。本领域技术人员应认识到,这种技术为熟知的。参见例如Green和Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991)。

[0287] PEG-DAA缀合物优选为PEG-二癸基氧基丙基(C_{10})缀合物、PEG-二月桂基氧基丙基(C_{12})缀合物、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(C_{14})缀合物、PEG-二棕榈基氧基丙基(C_{16})缀合物或PEG-二硬脂基氧基丙基(C_{18})缀合物。在这些实施方案中,PEG优选具有约750道尔顿或约2,000道尔顿的平均分子量。在一个特别优选的实施方案中,PEG-脂质缀合物包含PEG2000-C-DMA,其中“2000”表示PEG的平均分子量,“C”表示氨基甲酸酯接头部分,且“DMA”表示二肉豆蔻基氧基丙基。在另一个特别优选的实施方案中,PEG-脂质缀合物包含PEG750-C-DMA,其中“750”表示PEG的平均分子量,“C”表示氨基甲酸酯接头部分,且“DMA”表示二肉豆蔻基氧基丙基。在特定实施方案中,PEG的末端羟基经甲基取代。本领域技术人员应容易了解,其它二烷基氧基丙基可用于本发明的PEG-DAA缀合物中。

[0288] 除上述以外,本领域技术人员应容易了解可使用其它亲水性聚合物替代PEG。可用于替代PEG的适合聚合物的实例包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羟基丙基甲基丙烯酸酰胺、聚甲基丙烯酸酰胺及聚二甲基丙烯酸酰胺、聚乳酸、聚乙醇酸及衍生纤维素,诸如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素。

[0289] 除上述组分以外,本发明的脂质粒子可还包含阳离子聚(乙二醇)(PEG)脂质或CPL(参见例如Chen等人,Bioconj.Chem.,11:433-437(2000);美国专利第6,852,334号;PCT公开案第W0 00/62813号,其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中)。

[0290] 适合的CPL包括具有式VIII的化合物:

[0291] A-W-Y (VIII),

[0292] 其中A、W和Y如下所描述。

[0293] 关于式VIII,“A”为充当脂质锚定点的脂质部分,诸如两性脂质、中性脂质或疏水性脂质。适合的脂质实例包括但不限于二酰基甘油、二烷基甘油、N,N-二烷基氨基-1,2-二酰基氧基-3-氨基丙烷和1,2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0294] “W”为聚合物或寡聚物,诸如亲水性聚合物或寡聚物。亲水性聚合物优选为非免疫原性或具有低固有免疫原性的生物相容性聚合物。或者,亲水性聚合物在与适当的佐剂一起使用时可具有弱抗原性。适合的非免疫原性聚合物包括但不限于PEG、聚酰胺、聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸/聚乙醇酸共聚物及其组合。在一个优选实施方案中,聚合物具有约250至约7,000道尔顿的分子量。

[0295] “Y”为聚阳离子部分。术语聚阳离子部分是指在所选pH值下,优选在生理pH值下具有正电荷,优选至少2个正电荷的化合物、衍生物或官能团。适合的聚阳离子部分包括碱性氨基酸及其衍生物,诸如精氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸和组氨酸;精胺;亚精胺;阳离子树枝状聚合物;聚胺;聚胺糖;及氨基多糖。聚阳离子部分可为线性的,诸如结构上呈分枝或树枝状的线性四赖氨酸。聚阳离子部分在所选pH值下具有介于约2至约15个之间的正电荷,优选介于约2至约12个之间的正电荷,且更优选介于约2至约8个之间的正电荷。选择使用何种聚阳离子部分可由所需粒子应用的类型决定。

[0296] 聚阳离子部分上的电荷可分布在整个粒子部分周围,或替代地,其可为该粒子部分的一个特定区域中的电荷密度的离散性凝集,例如电流冲击。如果电荷密度分布于粒子上,则电荷密度可平均分布或不平均分布。本发明涵盖聚阳离子部分的电荷分布的所有变化方案。

[0297] 脂质“A”和非免疫原性聚合物“W”可通过各种方法且优选通过共价连接来连接。本领域技术人员已知的方法可用于共价连接“A”与“W”。适合的键联包括但不限于酰胺、胺、羧基、碳酸酯、氨基甲酸酯、酯和脰键联。本领域技术人员应了解,“A”和“W”必须具有互补官能团以实现键联。这两个基团(一个处于脂质上且另一个处于聚合物上)的反应将提供所要键联。举例而言,当脂质为二酰基甘油且末端羟基经活化(例如用NHS和DCC)以形成活性酯且随后与含有氨基的聚合物,诸如与聚酰胺反应时(参见例如美国专利第6,320,017号和第6,586,559号,其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中),这两个基团之间将形成酰胺键。

[0298] 在某些情况下,聚阳离子部分可具有连接的配位体,诸如靶向配位体或用于复合钙的螯合部分。优选地,在连接配位体之后,阳离子部分维持正电荷。在某些情况下,所连接的配位体具有正电荷。适合的配位体包括但不限于具有反应性官能团的化合物或装置,且包括脂质、两性脂质、载体化合物、生物亲和性化合物、生物材料、生物聚合物、生物学装置、分析检测化合物、治疗活性化合物、酶、肽、蛋白质、抗体、免疫刺激物、放射性标记、荧光团、生物素、药物、半抗原、DNA、RNA、多糖、脂质体、病毒体、胶束、免疫球蛋白、官能团、其它

靶向部分或毒素。

[0299] 在一些实施方案中,脂质缀合物(例如,PEG-脂质)占粒子中所存在的总脂质的约0.1摩尔%至约3摩尔%、约0.5摩尔%至约3摩尔%或约0.6摩尔%、0.7摩尔%、0.8摩尔%、0.9摩尔%、1.0摩尔%、1.1摩尔%、1.2摩尔%、1.3摩尔%、1.4摩尔%、1.5摩尔%、1.6摩尔%、1.7摩尔%、1.8摩尔%、1.9摩尔%、2.0摩尔%、2.1摩尔%、2.2摩尔%、2.3摩尔%、2.4摩尔%、2.5摩尔%、2.6摩尔%、2.7摩尔%、2.8摩尔%、2.9摩尔%或3摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。

[0300] 在其它实施方案中,脂质缀合物(例如PEG-脂质)占粒子中所存在的总脂质的约0摩尔%至约20摩尔%、约0.5摩尔%至约20摩尔%、约2摩尔%至约20摩尔%、约1.5摩尔%至约18摩尔%、约2摩尔%至约15摩尔%、约4摩尔%至约15摩尔%、约2摩尔%至约12摩尔%、约5摩尔%至约12摩尔%或约2摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。

[0301] 在其它实施方案中,脂质缀合物(例如PEG-脂质)占粒子中所存在的总脂质的约4摩尔%至约10摩尔%、约5摩尔%至约10摩尔%、约5摩尔%至约9摩尔%、约5摩尔%至约8摩尔%、约6摩尔%至约9摩尔%、约6摩尔%至约8摩尔%或约5摩尔%、6摩尔%、7摩尔%、8摩尔%、9摩尔%或10摩尔%(或其任何分数或其中的范围)。

[0302] 应理解,本发明的脂质粒子中所存在的脂质缀合物的百分比为目标量,且配制物中所存在的脂质缀合物的实际量可变化例如 ± 5 摩尔%、 ± 4 摩尔%、 ± 3 摩尔%、 ± 2 摩尔%、 ± 1 摩尔%、 ± 0.75 摩尔%、 ± 0.5 摩尔%、 ± 0.25 摩尔%或 ± 0.1 摩尔%。

[0303] 适用于本发明的脂质粒子中的脂质缀合物的其它百分比及范围描述于PCT公开案第W0 09/127060号、美国已公开申请案第US 2011/0071208号、PCT公开案第W02011/000106号和美国已公开申请案第US 2011/0076335号中,其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0304] 本领域技术人员应了解,脂质缀合物的浓度可视所采用的脂质缀合物和脂质粒子的膜融合速率而变化。

[0305] 通过控制脂质缀合物的组成和浓度,可控制脂质缀合物自脂质粒子中交换出的速率且转而控制脂质粒子的膜融合速率。举例而言,当使用PEG-DAA缀合物作为脂质缀合物时,可改变脂质粒子的膜融合速率,例如通过改变脂质缀合物的浓度、通过改变PEG的分子量或通过改变PEG-DAA缀合物上的烷基的链长度及饱和度。另外,其它变量,包括例如pH值、温度、离子强度等,可用于改变和/或控制脂质粒子的膜融合速率。在阅读本发明后,可用于控制脂质粒子的膜融合速率的其它方法对于本领域技术人员将显而易见。此外,通过控制脂质缀合物的组成和浓度,可控制脂质粒子尺寸。

[0306] B. 其它载体系统

[0307] 适用于本发明的其它基于脂质的载体系统的非限制性实例包括脂质复合物(参见例如美国专利公开案第20030203865号;及Zhang等人,J.Control Release,100:165-180(2004))、pH值敏感性脂质复合物(参见例如美国专利公开案第20020192275号)、可逆遮蔽脂质复合物(参见例如美国专利公开案第20030180950号)、基于阳离子脂质的组合物(参见例如美国专利第6,756,054号;和美国专利公开案第20050234232号)、阳离子脂质体(参见例如美国专利公开案第20030229040号、第20020160038号和第20020012998号;美国专利第5,908,635号;及PCT公开案第W0 01/72283号)、阴离子脂质体(参见例如美国专利公开案第

20030026831号)、pH值敏感性脂质体(参见例如美国专利公开案第20020192274号;及AU 2003210303)、经抗体涂布的脂质体(参见例如美国专利公开案第20030108597号;及PCT公开案第W0 00/50008号)、细胞类型特异性脂质体(参见例如美国专利公开案第20030198664号)、含核酸和肽的脂质体(参见例如美国专利第6,207,456号)、含经可释放亲水性聚合物衍生化的脂质的脂质体(参见例如美国专利公开案第20030031704号)、脂质俘获的核酸(参见例如PCT公开案第W0 03/057190号和第W0 03/059322号)、脂质囊封的核酸(参见例如美国专利公开案第20030129221号;和美国专利第5,756,122号)、其它脂质体组合物(参见例如美国专利公开案第20030035829号和第20030072794号;和美国专利第6,200,599号)、脂质体与乳液的稳定混合物(参见例如EP1304160)、乳液组合物(参见例如美国专利第6,747,014号)及核酸微乳液(参见例如美国专利公开案第20050037086号)。

[0308] 适用于本发明的基于聚合物的载体系统的实例包括但不限于阳离子聚合物-核酸复合物(即,聚复合物)。为了形成聚复合物,核酸(例如siRNA分子,诸如表A中所描述的siRNA分子)典型地与将核酸凝集于能够与细胞表面上的阴离子蛋白聚糖相互作用且通过胞吞作用进入细胞的带正电粒子中的具有线性、分支、星形或树枝状聚合结构的阳离子聚合物复合。在一些实施方案中,聚复合物包含核酸(例如siRNA分子,诸如表A中所描述的siRNA分子)与阳离子聚合物,诸如聚乙烯亚胺(PEI)(参见例如美国专利第6,013,240号;可作为体内用jetPEI™(PEI的线性形式)购自Qbiogene, Inc. (Carlsbad, CA))、聚丙烯亚胺(PPI)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚-L-赖氨酸(PLL)、二乙基氨基乙基(DEAE)-葡多糖、聚(β-氨基酯)(PAE)聚合物(参见例如Lynn等人, J. Am. Chem. Soc., 123:8155-8156 (2001))、壳多糖、聚酰胺胺(PAMAM)树枝状聚合物(参见例如Kukowska-Latallo等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:4897-4902 (1996))、卟啉(参见例如美国专利第6,620,805号)、聚乙烯醚(参见例如美国专利公开案第20040156909号)、多环脒(参见例如美国专利公开案第20030220289号)、包含一级胺、亚胺、胍和/或咪唑基的其它聚合物(参见例如美国专利第6,013,240号;PCT公开案第W0/9602655号;PCT公开案第W095/21931号;Zhang等人, J. Control Release, 100:165-180 (2004);及Tiera等人, Curr. Gene Ther., 6:59-71 (2006))及其混合物的复合物。在其它实施方案中,聚复合物包含如美国专利公开案第20060211643号、第20050222064号、第20030125281号和第20030185890号以及PCT公开案第W0 03/066069号中所描述的阳离子聚合物-核酸复合物;如美国专利公开案第20040071654号中所描述的生物可降解聚(β-氨基酯)聚合物-核酸复合物;如美国专利公开案第20040142475号中所描述的含聚合物基质的微粒;如美国专利公开案第20030157030号中所描述的其它微粒组合物;如美国专利公开案第20050123600号中所描述的凝集核酸复合物;及如AU 2002358514及PCT公开案第W0 02/096551号中所描述的纳米胶囊和微胶囊。

[0309] 在某些情况下,siRNA可与环糊精或其聚合物复合。基于环糊精的载体系统的非限制性实例包括美国专利公开案第20040087024号中所描述的经环糊精修饰的聚合物-核酸复合物;美国专利第6,509,323号、第6,884,789号和第7,091,192号中所描述的线性环糊精共聚物-核酸复合物;和美国专利第7,018,609号中所描述的环糊精聚合物复合剂-核酸复合物。在某些其它情况下,siRNA可与肽或多肽复合。基于蛋白质的载体系统的实例包括但不限于PCT公开案第W095/21931中所描述的阳离子寡肽-核酸复合物。

[0310] 脂质粒子的制备

[0311] 本发明的核酸-脂质粒子,其中核酸(例如,如表A中所描述的siRNA)俘获在该粒子的脂质部分内且防止降解,可通过本领域中已知的任何方法来形成,包括但不限于连续混合法、直接稀释法及在线稀释法。

[0312] 在特定实施方案中,阳离子脂质可包含单独或与其它阳离子脂质组合的具有式I至式III的脂质或其盐。在其它实施方案中,非阳离子脂质为卵鞘磷脂(ESM)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰胆碱(POPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、单甲基磷脂酰乙醇胺、二甲基磷脂酰乙醇胺、14:0PE(1,2-二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(DMPE)、16:0PE(1,2-二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE))、18:0PE(1,2-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE))、18:1PE(1,2-二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE))、18:1反式PE(1,2-二反油酰基-磷脂酰乙醇胺(DEPE))、18:0-18:1PE(1-硬脂酰基-2-油酰基磷脂酰乙醇胺(SOPE))、16:0-18:1PE(1-棕榈酰基-2-油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE))、基于聚乙二醇的聚合物(例如PEG 2000、PEG 5000、经PEG修饰的二酰基甘油或经PEG修饰的二烷基氧基丙基)、胆固醇、其衍生物或其组合。

[0313] 在某些实施方案中,本发明提供经由连续混合法产生的核酸-脂质粒子,例如,包括如下步骤的方法:在第一储存器中提供包含siRNA的水溶液;在第二储存器中提供有机脂质溶液(其中所述有机脂质溶液中所存在的脂质溶解于有机溶剂中,例如低碳烷醇,诸如乙醇);及混合该水溶液与该有机脂质溶液,使得该有机脂质溶液与该水溶液混合以便基本上立即产生脂质囊泡(例如脂质体),从而将siRNA囊封在脂质囊泡内。这种方法和进行这种方法的设备详细描述于美国专利公开案第20040142025号中,该案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0314] 向混合环境中,诸如在混合室中连续引入脂质和缓冲溶液的动作引起用缓冲溶液连续稀释脂质溶液,从而在混合后基本上立即产生脂质囊泡。如本文中所使用,词组“用缓冲溶液连续稀释脂质溶液”(及变化形式)一般意谓在水化过程中用足以实现囊泡产生的力度足够快速地稀释脂质溶液。通过混合包含核酸的水溶液与有机脂质溶液,在缓冲溶液(即,水溶液)存在下对有机脂质溶液进行连续逐步稀释以产生核酸-脂质粒子。

[0315] 使用连续混合法形成的核酸-脂质粒子典型地具有约30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约80nm至约100nm、约90nm至约100nm、约70nm至约90nm、约80nm至约90nm、约70nm至约80nm、小于约120nm、110nm、100nm、90nm或80nm、或约30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm(或其任何分数或其中的范围)的尺寸。因而形成的粒子不会聚集且任选经尺寸化以达成均匀粒子尺寸。

[0316] 在另一实施方案中,本发明提供经由直接稀释法产生的核酸-脂质粒子,该方法包括形成脂质囊泡(例如脂质体)溶液并且将该脂质囊泡溶液立即并直接引入含有受控量的稀释缓冲液的收集容器中。在优选方面,收集容器包括一个或多个经配置以搅拌该收集容器的内含物从而促进稀释的组件。在一个方面,收集容器中所存在的稀释缓冲液的量基本上等于引入其中的脂质囊泡溶液的体积。作为一个非限制性实例,处于45%乙醇中的脂质囊泡溶液当引入含有等体积稀释缓冲液的收集容器中时将有利地产生较小粒子。

[0317] 在另一实施方案中,本发明提供经由在线稀释法产生的核酸-脂质粒子,其中含有

稀释缓冲液的第三储存器与第二混合区流体偶合。在这个实施方案中,第一混合区中所形成的脂质囊泡(例如脂质体)溶液立即且直接与第二混合区中的稀释缓冲液混合。在优选方面,第二混合区包括经布置以使得脂质囊泡溶液及稀释缓冲液流体作为相对180°的流体相遇的T形连接器;然而,可使用提供较浅角度的连接器,例如约27°至约180°(例如约90°)。泵机构将可控缓冲液流体递送至第二混合区。在一个方面,将供应至第二混合区的稀释缓冲液的流速控制为基本上等于自第一混合区引入其中的脂质囊泡溶液的流速。这个实施方案有利地允许进一步控制与第二混合区中的脂质囊泡溶液混合的稀释缓冲液的流动,且因此也允许进一步控制第二混合过程中脂质囊泡溶液于缓冲液中的浓度。对稀释缓冲液流速的这种控制有利地允许在降低的浓度下进行小粒子尺寸形成。

[0318] 这些方法及进行这些直接稀释及在线稀释方法的设备详细描述于美国专利公开案第20070042031号中,该案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0319] 使用直接稀释及在线稀释方法形成的核酸-脂质粒子典型地具有约30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约80nm至约100nm、约90nm至约100nm、约70nm至约90nm、约80nm至约90nm、约70nm至约80nm、小于约120nm、110nm、100nm、90nm或80nm、或约30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm(或其任何分数或其中的范围)的尺寸。因而形成的粒子不会聚集且任选经尺寸化以达成均匀粒子尺寸。

[0320] 如果有需要,则本发明的脂质粒子可通过可用于对脂质粒进行尺寸化的任何方法进行尺寸化。可进行尺寸化以达成所要尺寸范围及相对狭窄的粒子尺寸分布。

[0321] 若干技术可用于将粒子尺寸化至所要尺寸。用于脂质体且同样适用于本发明粒子的一种尺寸化方法描述于美国专利第4,737,323号中,该专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。通过溶液或探针超声处理对粒子悬浮液进行超声处理产生渐进性尺寸减小,使粒子尺寸降至小于约50nm。均质化为依赖于剪切能从而使较大粒子破碎成较小粒子的另一方法。在一典型均质化程序中,使粒子再循环通过标准乳液均质器直至观测到所选粒子尺寸,典型地介于约60nm与约80nm之间。在两种方法中,可通过常规激光束粒子尺寸辨别法或QELS来监测粒子尺寸分布。

[0322] 粒子经由小孔隙聚碳酸酯膜或不对称陶瓷膜挤出也是一种用于使粒子尺寸降至相对明确的尺寸分布的有效方法。典型地,悬浮液循环通过该膜一个或多次直至达成所要粒子尺寸分布。粒子可依次经由更小孔隙的膜挤出,以达成尺寸逐渐减小。

[0323] 在一些实施方案中,粒子中所存在的核酸(例如siRNA分子)如例如美国专利申请案第09/744,103号中所描述进行预凝集,该案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0324] 在其它实施方案中,该方法可还包括添加可用于使用本发明组合物实现细胞的脂质转染的非脂质聚阳离子。适合的非脂质聚阳离子的实例包括溴化己二甲铵(以商标名**POLYBRENE**[®]出售,得自Aldrich Chemical Co.,Milwaukee,Wisconsin,USA)或己二甲铵的其它盐。其它适合的聚阳离子包括例如聚-L-鸟氨酸、聚-L-精氨酸、聚-L-赖氨酸、聚-D-赖氨酸、聚烯丙胺及聚乙烯亚胺的盐。优选在形成粒子之后添加这些盐。

[0325] 在一些实施方案中,所形成的核酸-脂质粒子中的核酸(例如siRNA)与脂质比(质

量/质量比)将介于约0.01至约0.2、约0.05至约0.2、约0.02至约0.1、约0.03至约0.1或约0.01至约0.08的范围内。起始物质(输入)的比也属于这个范围内。在其它实施方案中,粒子制备使用每10mg总脂质约400 μ g核酸,或约0.01至约0.08且更优选为约0.04的核酸与脂质质量比,此对应于每50 μ g核酸1.25mg总脂质。在其它优选实施方案中,粒子具有约0.08的核酸:脂质质量比。

[0326] 在其它实施方案中,所形成的核酸-脂质粒子中的脂质与核酸(例如siRNA)比(质量/质量比)将介于约1(1:1)至约100(100:1)、约5(5:1)至约100(100:1)、约1(1:1)至约50(50:1)、约2(2:1)至约50(50:1)、约3(3:1)至约50(50:1)、约4(4:1)至约50(50:1)、约5(5:1)至约50(50:1)、约1(1:1)至约25(25:1)、约2(2:1)至约25(25:1)、约3(3:1)至约25(25:1)、约4(4:1)至约25(25:1)、约5(5:1)至约25(25:1)、约5(5:1)至约20(20:1)、约5(5:1)至约15(15:1)、约5(5:1)至约10(10:1)或约5(5:1)、6(6:1)、7(7:1)、8(8:1)、9(9:1)、10(10:1)、11(11:1)、12(12:1)、13(13:1)、14(14:1)、15(15:1)、16(16:1)、17(17:1)、18(18:1)、19(19:1)、20(20:1)、21(21:1)、22(22:1)、23(23:1)、24(24:1)或25(25:1)的范围或其任何分数或其中的范围内。起始物质(输入)的比也属于此范围内。

[0327] 如先前所论述,缀合脂质可还包括CPL。本文中论述多种用于制造脂质粒子-CPL(含CPL的脂质粒子)的一般方法。两种一般技术包括“后插入”技术,即将CPL插入例如预先形成的脂质粒子中;及“标准”技术,其中CPL在例如脂质粒子形成步骤期间包括在脂质混合物中。后插入技术产生CPL主要处于脂质粒子双层膜的外面中的脂质粒子,而标准技术提供CPL处于内面与外面的脂质粒子。该方法尤其可用于由磷脂制造的囊泡(其可含有胆固醇)以及含有PEG-脂质的囊泡(诸如PEG-DAA及PEG-DAG)。制造脂质粒子-CPL的方法教示于例如美国专利第5,705,385号、第6,586,410号、第5,981,501号、第6,534,484号和第6,852,334号、美国专利公开案第20020072121号及PCT公开案第W0 00/62813号中,其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0328] 试剂盒

[0329] 本发明还提供提供呈试剂盒形式的脂质粒子。在一些实施方案中,试剂盒包括经隔室化以容纳脂质粒子的各种要素(例如活性剂,诸如siRNA分子及粒子的个别脂质组分)的容器。试剂盒优选包括容纳本发明的脂质粒子的容器(例如小瓶或安瓿),其中所述粒子通过本文中所阐述的方法之一产生。在某些实施方案中,该试剂盒可还包括核内体膜去稳定剂(例如钙离子)。该试剂盒典型地含有呈处于药学上可接受的载体中的悬浮液形式或呈脱水形式的本发明粒子组合物与其复水(如果冻干)及施用说明书。

[0330] 本发明的配制物可经改适以优先靶向相关特定细胞、组织或器官。核酸-脂质粒子的优先靶向可通过控制脂质粒子本身的组成来进行。在特定实施方案中,本发明的试剂盒包括这些脂质粒子,其中所述粒子呈悬浮液形式或呈脱水形式存在于容器中。

[0331] 在某些情况下,可能需要靶向部分连接于脂质粒子表面以进一步增强粒子的靶向。连接靶向部分(例如抗体、蛋白质等)与脂质(诸如本发明粒子中所使用的那些脂质)的方法是本领域技术人员已知的。

[0332] 脂质粒子的施用

[0333] 一旦形成后,本发明的脂质粒子尤其可用于将siRNA分子(例如表A中所描述的siRNA分子)引入细胞中。因此,本发明还提供用于将siRNA分子引入细胞中的方法。在特定

实施方案中,将siRNA分子引入受感染细胞中。该方法可通过首先如以上所描述形成粒子且随后使所述粒子与细胞接触足以将siRNA递送至细胞的时间段而在体外或体内进行。

[0334] 本发明的脂质粒子(例如核酸脂质粒子)可吸收至几乎任何与其混合或接触的细胞类型。一旦吸收后,粒子可由细胞的一部分吞噬,与细胞膜交换脂质,或与细胞融合。粒子的siRNA部分的转移或并入可经由这些途径中的任一种来进行。具体而言,当融合发生时,粒子膜并入细胞膜中且粒子的内含物与细胞内液合并。

[0335] 本发明的脂质粒子(例如核酸-脂质粒子)可单独或呈与根据施用途及标准医药实务选择的药学上可接受的载体(例如生理盐水或磷酸盐缓冲液)的混合物的形式施用。一般而言,将采用正常缓冲生理盐水(例如135至150mM NaCl)作为药学上可接受的载体。其它适合的载体包括例如水、缓冲水、0.4%生理盐水、0.3%甘氨酸及其类似物,包括用于增强稳定性的糖蛋白,诸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。其它适合的载体描述于例如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版(1985)中。如本文中所使用,“载体”包括任何及所有溶剂、分散介质、媒剂、包衣剂、稀释剂、抗菌剂及抗真菌剂、等渗剂及吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶体及其类似物。词组“药学上可接受”是指当施用给人时不产生过敏性或类似不良反应的分子实体及组合物。

[0336] 一般在脂质粒子形成之后添加药学上可接受的载体。因而,在形成脂质粒子之后,可将粒子稀释于药学上可接受的载体中,诸如正常缓冲生理盐水。

[0337] 药物配制物中的粒子浓度可广泛变化,即,以重量计低于约0.05%,通常为或至少为约2%至5%,至多达约10%至90%,并且将根据所选择的特定施用模式,主要由流体体积、黏度等加以选择。举例而言,可增加浓度以降低与治疗相关的流体负载。此在患有动脉粥样硬化相关的充血性心脏衰竭或严重高血压的患者中可能尤其理想。或者,可将包含刺激性脂质的粒子稀释至低浓度以减轻施用部位的炎症。

[0338] 本发明的药物组合物可通过常规的熟知灭菌技术进行灭菌。水溶液可经包装以供使用,或在无菌条件下过滤并冻干,在施用前将冻干制剂与无菌水溶液组合。所述组合物可视需要含有药学上可接受的辅助物质以接近生理条件,诸如pH值调节及缓冲剂、张力调节剂及其类似物,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾及氯化钙。另外,粒子悬浮液可包括储存时保护脂质以防自由基及脂质过氧化损伤的脂质保护剂。诸如 α 生育酚的亲脂性自由基淬灭剂及诸如铁草胺的水溶性铁特异性螯合剂是适合的。

[0339] 在一些实施方案中,本发明的脂质粒子尤其可用于治疗性递送一种或多种siRNA分子(例如表A中所描述的siRNA分子)的方法。具体而言,本发明的一个目标在于提供通过使一个或多个HBV基因的转录和/或翻译下调或沉默而治疗人的HBV和/或HDV感染的体内方法。

[0340] A. 体内施用

[0341] 已使用核酸-脂质粒子,诸如PCT公开案第WO 05/007196号、第WO 05/121348号、第WO 05/120152号和第WO 04/002453号中所描述的那些核酸-脂质粒子达成用于体内疗法的全身性递送,例如经由身体系统(诸如循环)将本文中所描述的siRNA分子,诸如表A中所描述的siRNA递送至远程靶细胞,其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。本发明还提供完全囊封的脂质粒子,其保护siRNA以防在血清中发生核酸酶降解,非免疫原性,尺寸较小且适合于重复给与。另外,一种或多种siRNA分子可于本发明的脂质粒子中单

独施用,或与包含肽、多肽或诸如常规药物的小分子的脂质粒子组合施用(例如共同施用)。

[0342] 对于体内施用,施用可用本领域中已知的任何方式进行,例如通过注射、经口施用、吸入(例如鼻内或气管内)、经皮施用或直肠施用。施用可经由单次或分次剂量来实现。药物组合物可非经肠施用,即,关节内、静脉内、腹膜内、皮下或肌肉内。在一些实施方案中,通过推注经静脉内或腹膜内施用药物组合物(参见例如美国专利第5,286,634号)。细胞内核酸递送也论述于Straubinger等人,Methods Enzymol.,101:512(1983);Mannino等人,Biotechniques,6:682(1988);Nicolau等人,Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.,6:239(1989);及Behr,Acc.Chem.Res.,26:274(1993)中。施用基于脂质的治疗剂的其它方法描述于例如美国专利第3,993,754号、第4,145,410号、第4,235,871号、第4,224,179号、第4,522,803号和第4,588,578号中。脂质粒子可通过在疾病部位直接注射或通过向疾病部位的远侧部位注射来施用(参见例如Culver,HUMAN GENE THERAPY,MaryAnn Liebert,Inc.,Publishers,New York.第70-71页(1994))。上述参考文献的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0343] 在本发明的脂质粒子经静脉内施用的实施方案中,所述粒子的总注射剂量中至少约5%、10%、15%、20%或25%在注射之后于血浆中存在约8、12、24、36或48小时。在其它实施方案中,所述脂质粒子的总注射剂量中多于约20%、30%、40%且多达约60%、70%或80%在注射之后于血浆中存在约8、12、24、36或48小时。在某些情况下,多种粒子中多于约10%在施用之后于哺乳动物的血浆中存在约1小时。在某些其它情况下,脂质粒子的存在在施用所述粒子之后至少约1小时可检测到。在一些实施方案中,siRNA分子的存在在施用之后约8、12、24、36、48、60、72或96小时可在细胞中检测到。在其它实施方案中,siRNA分子下调靶序列(诸如病毒或宿主序列)的表达在施用之后约8、12、24、36、48、60、72或96小时可检测到。在其它实施方案中,siRNA分子下调靶序列(诸如病毒或宿主序列)的表达优先在受感染细胞和/或能够被感染的细胞中发生。在其它实施方案中,siRNA分子在施用部位的近侧或远侧部位的细胞中的存在或效应在施用之后约12、24、48、72或96小时或约6、8、10、12、14、16、18、19、20、22、24、26或28天可检测到。在其它实施方案中,本发明的脂质粒子非经肠或经腹膜内施用。

[0344] 本发明的组合物可单独或与其它适合的组分组合制成气雾剂配制物(即,其可“雾化”)以便经由吸入(例如经鼻内或经气管内)施用(参见Brigham等人,Am.J.Sci.,298:278(1989))。气雾剂配制物可放置于加压可接受的推进剂中,诸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气及其类似物。

[0345] 在某些实施方案中,药物组合物可通过鼻内喷雾、吸入和/或其它气雾剂递送媒介来递送。用于经由鼻用气雾剂喷雾将核酸组合物直接递送至肺部的方法已描述于例如美国专利第5,756,353号和第5,804,212号中。同样,使用鼻内微粒树脂及溶血磷脂酰基甘油化合物递送药物(美国专利5,725,871)在医药技术中也是熟知的。类似地,呈聚四氟乙烯负载基质形式的透黏膜药物递送描述于美国专利第5,780,045号中。上述专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0346] 适用于非经肠施用(举例而言,诸如关节内(关节中)、静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内及皮下途径)的配制物包括水性及非水性等渗无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂及使得配制物与预定受体的血液等渗的溶质;以及水性及非水性无菌悬浮液,

其可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂及防腐剂。在实施本发明时,举例而言,优选通过静脉内输注、经口、局部、腹膜内、囊泡内或鞘内施用组合物。

[0347] 一般而言,当经静脉内施用时,脂质粒子配制物系与适合的药物载体一起配制。许多药学上可接受的载体可用于本发明的组合物和方法中。适用于本发明的配制物见于例如 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版(1985)中。可使用多种水性载体,例如水、缓冲水、0.4%生理盐水、0.3%甘氨酸及其类似物,且可包括用于增强稳定性的糖蛋白,诸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。一般而言,将采用正常缓冲生理盐水(135至150mM NaCl)作为药学上可接受的载体,但其它适合的载体将满足需要。这些组合物可通过诸如过滤的常规脂质粒灭菌技术进行灭菌。所述组合物可视需要含有药学上可接受的辅助物质以接近生理条件,诸如pH值调节及缓冲剂、张力调节剂、润湿剂及其类似物,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、单月桂酸脱水山梨醇酯、油酸三乙醇胺酯等。这些组合物可使用以上所提及的技术进行灭菌,或替代地,其可在无菌条件下产生。所得水溶液可经包装以供使用,或在无菌条件下过滤并冻干,在施用前将冻干制剂与无菌水溶液组合。

[0348] 在某些应用中,本文中所披露的脂质粒子可经由经口施用个体加以递送。所述粒子可并有赋形剂且以可食用锭剂、经颊锭剂、喉锭、胶囊剂、丸剂、口含锭、酞剂、嗽口水、悬浮液、经口喷雾、糖浆、糯米片及其类似物的形式使用(参见例如美国专利第5,641,515号、第5,580,579号和第5,792,451号,其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中)。这些经口剂量形式也可含有以下各项:黏合剂、明胶、赋形剂、润滑剂和/或调味剂。当单位剂型为胶囊剂时,除以上所描述的材料以外,其也可含有液体载体。各种其它材料可作为包衣剂存在或以其它方式调节剂量单位的物理形式。固然,用于制备任何单位剂型的任何材料均应为医药学纯的且在所采用的量下实质上无毒。

[0349] 典型地,这些经口配制物可含有至少约0.1%或更多脂质粒子,但固然,所述粒子的百分比可变化且宜在总配制物重量或体积的约1%或2%与约60%或70%之间或更大。自然,可能制备的各治疗上适用的组合物中的粒子用量使得将在该化合物的任何指定单位剂量下获得适合剂量。制备这种药物配制物的领域的技术人员将预见诸如溶解度、生物利用率、生物半衰期、施用途径、产品保质期以及其它药理学考虑的因素,且因而多种剂量及治疗方案可为理想的。

[0350] 适合于经口施用的配制物可由以下各项组成:(a)液体溶液,诸如有效量的封装 siRNA 分子(例如,表A中所描述的 siRNA 分子)悬浮于诸如水、生理盐水或 PEG 400 的稀释剂中;(b)胶囊剂、扁囊剂或锭剂,各自含有预定量的 siRNA 分子,呈液体、固体、颗粒或明胶形式;(c)于适当液体中的悬浮液;及(d)适合的乳液。锭剂形式可包括乳糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、磷酸钙、玉米淀粉、马铃薯淀粉、微晶纤维素、明胶、胶体二氧化硅、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸及其它赋形剂、着色剂、填充剂、黏合剂、稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂、调味剂、染料、崩解剂及药学上相容的载体中的一种或多种。口含锭形式可包含处于调味剂(例如蔗糖)中的 siRNA 分子,以及包含处于惰性基质中的治疗性核酸的喉锭,诸如明胶及甘油或蔗糖及阿拉伯胶乳液、凝胶及除 siRNA 分子以外还含有本领域中已知的载体的类似物。

[0351] 在其用途的另一实例中,脂质粒子可并入多种局部剂型中。举例而言,含核酸-脂质粒子的悬浮液可配制为凝胶剂、油剂、乳液、局部乳膏、糊剂、软膏、洗液、泡沫、慕思及其

类似物并施用。

[0352] 当制备本发明脂质粒子的药物制剂时,优选使用大量已经纯化以减少或消除空粒子的粒子或与外表面缔合的含诸如siRNA的治疗剂的粒子。

[0353] 本发明的方法可在多种宿主中实施。优选宿主包括哺乳动物物种,诸如灵长类(例如人及黑猩猩以及其它非人类灵长类)、犬、猫、马、牛、绵羊、山羊、啮齿动物(例如大鼠及小鼠)、兔形目动物及猪。

[0354] 所施用的粒子的量将视siRNA分子与脂质的比、所使用的特定siRNA、所治疗的HBV菌株、患者的年龄、体重及病状以及临床医师的判断而定,但一般将介于每公斤体重约0.01与约50mg之间,优选介于约0.1与约5mg/kg体重之间或每次施用(例如注射)约 10^8 至 10^{10} 个粒子。

[0355] B. 体外施用

[0356] 对于体外应用,siRNA分子可递送至于培养基中生长的任何细胞中。在优选实施方案中,细胞为动物细胞,更优选为哺乳动物细胞且最优选为人细胞。

[0357] 细胞与脂质粒子之间的接触当在体外进行时在生物学上相容的培养基中发生。粒子的浓度视特定应用而广泛变化,但一般介于约 $1\mu\text{mol}$ 与约 10mmol 之间。用脂质粒子处理细胞一般在生理温度(约 37°C)下进行约1至48小时、优选约2至4小时之时间段。

[0358] 在一组优选实施方案中,将脂质粒子悬浮液添加至60%至80%汇合接种细胞中,细胞密度为约 10^3 至约 10^5 个细胞/毫升、更优选为约 2×10^4 个细胞/毫升。添加至细胞中的悬浮液的浓度优选为约0.01至 $0.2\mu\text{g/ml}$,更优选为约 $0.1\mu\text{g/ml}$ 。

[0359] 在细胞组织培养可能需要的程度上,在本领域中是熟知的。举例而言,Freshney, Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 第3版, Wiley-Liss, New York (1994); Kuchler等人, Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. (1977) 及其中所引用的参考文献提供细胞培养的一般指导。培养细胞系统通常呈单细胞层形式,但也使用细胞悬浮液。

[0360] 使用核内体释放参数(ERP)测定法,可优化本发明的核酸-脂质粒子的递送效率。ERP测定法详细描述于美国专利公开案第20030077829号中,其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。更具体而言,ERP测定法的目的在于基于脂质粒子的各种阳离子脂质及辅助脂质组分对结合/吸收或与核内体膜融合/去稳定的相对效应来辨别其效应。此测定法允许定量测定脂质粒子的各组分对递送效率有何影响,从而优化脂质粒子。通常,ERP测定法测量报告蛋白质(例如荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、绿色荧光蛋白(GFP)等)的表达,且在一些情况下,经优化以用于表达质粒的脂质粒子配制物也将适用于囊封siRNA。在其它情况下,ERP测定法可能适于测量靶序列在存在或不存在siRNA时的转录或翻译的下调。通过比较各种脂质粒子各自的ERP,可容易地确定优化系统,例如在细胞中具有最高吸收的脂质粒子。

[0361] C. 脂质粒子的检测

[0362] 在一些实施方案中,在约1、2、3、4、5、6、7、8或更多个小时可在个体中检测到本发明的脂质粒子。在其它实施方案中,可在施用粒子之后约8、12、24、48、60、72或96小时或约6、8、10、12、14、16、18、19、22、24、25或28天在个体中检测到本发明的脂质粒子。可在得自个体的细胞、组织或其它生物样品中检测粒子的存在。所述粒子可例如通过直接检测粒子、检

测siRNA序列、检测相关靶序列(即,通过检测相关序列的表达或减少的表达)、检测EBOV蛋白(例如干扰素)调节的化合物、检测个体中的病毒负载或其组合加以检测。

[0363] 1. 粒子的检测

[0364] 本发明的脂质粒子可使用本领域中已知的任何方法加以检测。举例而言,可使用本领域中所熟知的方法使标记直接或间接偶合于脂质粒子的组分。可使用多种标记,其中标记的选择视所需敏感性、与脂质粒子组分缀合的容易性、稳定性要求及可利用的仪器及处理规定而定。适合的标记包括但不限于光谱标记,诸如荧光染料(例如荧光素及衍生物,诸如异硫氰酸荧光素(FITC)及Oregon GreenTM;若丹明及衍生物,诸如得克萨斯红、异硫氰酸四若丹明(TRITC)等、洋地黄毒苷、生物素、藻红蛋白、AMCA、CyDyesTM及其类似物;放射性标记,诸如³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、³²P、³³P等;酶,诸如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等;光谱比色标记,诸如胶态金或有色玻璃或塑料珠粒,诸如聚苯乙烯、聚丙烯、胶乳等。该标记可使用本领域中已知的任何手段加以检测。

[0365] 2. 核酸的检测

[0366] 本文中通过本领域技术人员所熟知的许多手段中的任一种来检测并定量核酸(例如siRNA分子)。核酸的检测可通过熟知的方法来进行,诸如Southern分析、Northern分析、凝胶电泳、PCR、放射性标记、闪烁计数及亲和色谱法。也可采用其它分析型生物化学方法,诸如分光光度法、X射线照相术、电泳、毛细管电泳、高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)及超扩散色谱法。

[0367] 核酸杂交形式的选择不重要。本领域技术人员已知多种核酸杂交形式。举例而言,常用形式包括夹心测定法及竞争或易位测定法。杂交技术一般描述于例如“Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach”, Hames及Higgins编, IRL Press(1985)中。

[0368] 可通过使用放大所检测的靶核酸的核酸扩增系统来提高杂交测定法的敏感性。适用于扩增序列以用作分子探针或用于产生核酸片段以供随后亚克隆的体外扩增技术是已知的。足以指导技术人员进行这种体外扩增方法的技术的实例,包括聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)、Q β -复制酶扩增及其它RNA聚合酶介导的技术(例如NASBATM)见于以下文献中:Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2000); 及Ausubel等人, SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Current Protocols编, Greene Publishing Associates, Inc. 及John Wiley & Sons, Inc. (2002); 以和美国专利第4,683,202号; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications (Innis等人编) Academic Press Inc. San Diego, CA(1990); Arnheim & Levinson(1990年10月1日), C&EN 36; The Journal Of NIH Research, 3:81(1991); Kwok等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173(1989); Guatelli等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874(1990); Lomell等人, J. Clin. Chem., 35:1826(1989); Landegren等人, Science, 241:1077(1988); Van Brunt, Biotechnology, 8:291(1990); Wu及Wallace, Gene, 4:560(1989); Barringer等人, Gene, 89:117(1990); 以及Sooknanan及Malek, Biotechnology, 13:563(1995)。体外克隆经扩增的核酸的改良方法描述于美国专利第5,426,039号中。本领域中所描述的其它方法为基于核酸序列的扩增(NASBATM, Cangene, Mississauga, Ontario)及Q β -复制酶系统。这些系统可用于直接鉴别突变体,其中设计PCR或LCR引物以便仅在存在所选序列时延伸或连接。或者,一般可使用例如非特异性PCR引物来扩增所选序列且稍后探测

所扩增的目标区域中指示突变的特定序列。上述参考文献的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0369] 用作例如体外扩增方法中的探针、用作基因探针或用作抑制剂组分的核酸典型地根据由Beaucage等人, *Tetrahedron Letts.*, 22:1859-1862 (1981) 所描述的固相亚磷酰胺三酯法, 例如, 如Needham VanDevanter等人, *Nucleic Acids Res.*, 12:6159 (1984) 中所描述使用自动合成仪进行化学合成。必要时典型地通过如Pearson等人, *J. Chrom.*, 255:137-149 (1983) 中所描述的天然丙烯酰胺凝胶电泳或通过阴离子交换HPLC进行聚核苷酸的纯化。可使用Maxam及Gilbert (1980), Grossman及Moldave (编) Academic Press, New York, *Methods in Enzymology*, 65:499的化学降解法验证合成聚核苷酸的序列。

[0370] 用于测定转录水平的替代手段为原位杂交。原位杂交测定法是熟知的且概述于Angerer等人, *Methods Enzymol.*, 152:649 (1987) 中。在原位杂交测定法中, 将细胞固定于固体载体, 典型地玻璃载物片。如果欲探测DNA, 则利用热或碱使细胞变性。随后使细胞与杂交溶液在中等温度下接触以允许欲标记的特定探针退火。优选使用放射性同位素或荧光报告基因标记探针。

[0371] 实施例

[0372] 将通过特定实施例更详细地描述本发明。以下实施例是出于说明的目的而提供, 而不欲以任何方式限制本发明。本领域技术人员应容易地识别可加以变化或修改以产生本质上相同的结果的多种非重要参数。

[0373] 实施例1.

[0374] 本实施例描述用于测试表A中所阐述的15个siRNA序列的HBV基因沉默活性的生物测定。

[0375] 编辑HBV基因组序列 (登记号EU939600.1) 以完美匹配所有候选siRNA。具体地, 在计算机上接合以下四个序列区, 包括各序列区域的5'和3'端上的30bp侧接序列且含有候选siRNA的靶位点: 212至803、1062至1922、2237至2460及2783至2862。插入六个突变 (位置454C>T; 位置598T>C; 位置1206A>C; 位置1287A>C; 及位置1461G>C, 相对于EU939600.1) 以确保所有候选siRNA与这个合成一致HBV靶片段完美互补。合成一致HBV靶片段, 其中限制酶位点XhoI和NotI分别添加至5'和3'端, 以便有助于克隆于psiCHECK-2双荧光素酶载体中。XhoI/NotI克隆位点介于psiCHECK-2双荧光素酶载体上的海肾荧光素酶的终止密码子与聚腺苷酸化信号之间。

[0376] 通过在Dual-Glo测定系统 (Promega, Madison, WI, USA) 中测量海肾荧光素酶 (R-Luc) 活性相对于萤火虫荧光素酶 (F-Luc) 活性的降低来测试候选siRNA的HBV基因沉默活性。简而言之, 将Cos-7细胞以25,000个细胞/孔的密度接种于96孔板中且使用Lipofectamine 2000以每孔100ng报告质粒进行转染。在37°C/5%CO₂下培育4小时之后, 移除培养基且用HBV siRNA以一式四份以不同浓度转染Cos-7细胞, 随后在以上所描述的条件再培育20小时。通过荧光检测来测定两种荧光素酶的表达。将经HBV-siRNA处理的样品的R-Luc/F-Luc表达相对于经阴性 (非靶向) siRNA处理的细胞中的R-Luc/F-Luc表达平均值标准化。作为阳性对照, 包括针对R-Luc的siRNA。通过XLfit功能 (IDBS MathIQ) 计算50%抑制浓度 (IC₅₀)。

[0377] 实施例2.

[0378] 本实施例描述选自名为1m至15m(参见表A)的siRNA组中的两个不同的siRNA的所有可能的“二元”组合。如本申请案的实施例2和实施例3中所使用的术语“组合”意谓所组合的siRNA分子共同存在于同一物质组合物中(例如,一起溶解于同一溶液内;或一起存在于同一脂质粒子内;或一起存在于脂质粒子的同一药物配制物中,但药物配制物内的各脂质粒子可能包括或可能不包括该siRNA组合的各不同的siRNA)。所组合的siRNA分子通常不共价连接在一起。

[0379] 个别siRNA各自以名称1m至15m加以鉴别,如表A中所示。组合内的各siRNA编号以短划线(-)隔开;举例而言,记法“1m-2m”表示siRNA编号1m与siRNA编号2m的组合。短划线不意谓组合内的不同的siRNA分子彼此共价连接。不同的siRNA组合由分号隔开。组合中的siRNA编号的顺序不重要。举例而言,组合1m-2m等效于组合2m-1m,因为此两个记法描述siRNA编号1m与siRNA编号2m的同一组合。

[0380] 本实施例中所描述的siRNA组合可用于例如实施本发明以便治疗人的HBV和/或HDV感染且改善与HBV感染和/或HDV感染相关的至少一种症状。

[0381] siRNA 1m至15m的二元siRNA组合为:1m-2m;1m-3m;1m-4m;1m-5m;1m-6m;1m-7m;1m-8m;1m-9m;1m-10m;1m-11m;1m-12m;1m-13m;1m-14m;1m-15m;2m-3m;2m-4m;2m-5m;2m-6m;2m-7m;2m-8m;2m-9m;2m-10m;2m-11m;2m-12m;2m-13m;2m-14m;2m-15m;3m-4m;3m-5m;3m-6m;3m-7m;3m-8m;3m-9m;3m-10m;3m-11m;3m-12m;3m-13m;3m-14m;3m-15m;4m-5m;4m-6m;4m-7m;4m-8m;4m-9m;4m-10m;4m-11m;4m-12m;4m-13m;4m-14m;4m-15m;5m-6m;5m-7m;5m-8m;5m-9m;5m-10m;5m-11m;5m-12m;5m-13m;5m-14m;5m-15m;6m-7m;6m-8m;6m-9m;6m-10m;6m-11m;6m-12m;6m-13m;6m-14m;6m-15m;7m-8m;7m-9m;7m-10m;7m-11m;7m-12m;7m-13m;7m-14m;7m-15m;8m-9m;8m-10m;8m-11m;8m-12m;8m-13m;8m-14m;8m-15m;9m-10m;9m-11m;9m-12m;9m-13m;9m-14m;9m-15m;10m-11m;10m-12m;10m-13m;10m-14m;10m-15m;11m-12m;11m-13m;11m-14m;11m-15m;12m-13m;12m-14m;12m-15m;13m-14m;13m-15m;及14m-15m。

[0382] 实施例3.

[0383] 本实施例描述选自名为1m至15m(参见表A)的siRNA分子群组中的三个不同的siRNA的所有可能的“三元”组合。个别siRNA各自以名称1m至15m加以鉴别,如表A中所示。各siRNA编号以短划线(-)隔开;举例而言,记法“1m-2m-3m”表示siRNA编号1m、siRNA编号2m及siRNA编号3m的组合。短划线不意谓组合内的不同的siRNA分子彼此共价连接。不同的siRNA组合由分号隔开。组合中的siRNA编号的顺序不重要。举例而言,组合1m-2m-3m等效于组合3m-2m-1m,因为此两个记法描述siRNA编号1m与siRNA编号2m及siRNA编号3m的同一组合。

[0384] 本实施例中所描述的siRNA组合适用于例如实施本发明以便治疗人的HBV和/或HDV感染且改善与HBV感染和/或HDV感染相关的至少一种症状。

[0385] siRNA 1m至15m的三元siRNA组合为:1m-2m-3m;1m-2m-4m;1m-2m-5m;1m-2m-6m;1m-2m-7m;1m-2m-8m;1m-2m-9m;1m-2m-10m;1m-2m-11m;1m-2m-12m;1m-2m-13m;1m-2m-14m;1m-2m-15m;1m-3m-4m;1m-3m-5m;1m-3m-6m;1m-3m-7m;1m-3m-8m;1m-3m-9m;1m-3m-10m;1m-3m-11m;1m-3m-12m;1m-3m-13m;1m-3m-14m;1m-3m-15m;1m-4m-5m;1m-4m-6m;1m-4m-7m;1m-4m-8m;1m-4m-9m;1m-4m-10m;1m-4m-11m;1m-4m-12m;1m-4m-13m;1m-4m-14m;1m-4m-15m;1m-5m-6m;1m-5m-7m;1m-5m-8m;1m-5m-9m;1m-5m-10m;1m-5m-11m;1m-5m-12m;1m-5m-13m;

1m-5m-14m; 1m-5m-15m; 1m-6m-7m; 1m-6m-8m; 1m-6m-9m; 1m-6m-10m; 1m-6m-11m; 1m-6m-12m;
1m-6m-13m; 1m-6m-14m; 1m-6m-15m; 1m-7m-8m; 1m-7m-9m; 1m-7m-10m; 1m-7m-11m; 1m-7m-
12m; 1m-7m-13m; 1m-7m-14m; 1m-7m-15m; 1m-8m-9m; 1m-8m-10m; 1m-8m-11m; 1m-8m-12m; 1m-
8m-13m; 1m-8m-14m; 1m-8m-15m; 1m-9m-10m; 1m-9m-11m; 1m-9m-12m; 1m-9m-13m; 1m-9m-14m;
1m-9m-15m; 1m-10m-11m; 1m-10m-12m; 1m-10m-13m; 1m-10m-14m; 1m-10m-15m; 1m-11m-12m;
1m-11m-13m; 1m-11m-14m; 1m-11m-15m; 1m-12m-13m; 1m-12m-14m; 1m-12m-15m; 1m-13m-14m;
1m-13m-15m; 1m-14m-15m; 2m-3m-4m; 2m-3m-5m; 2m-3m-6m; 2m-3m-7m; 2m-3m-8m; 2m-3m-9m;
2m-3m-10m; 2m-3m-11m; 2m-3m-12m; 2m-3m-13m; 2m-3m-14m; 2m-3m-15m; 2m-4m-5m; 2m-4m-
6m; 2m-4m-7m; 2m-4m-8m; 2m-4m-9m; 2m-4m-10m; 2m-4m-11m; 2m-4m-12m; 2m-4m-13m; 2m-4m-
14m; 2m-4m-15m; 2m-5m-6m; 2m-5m-7m; 2m-5m-8m; 2m-5m-9m; 2m-5m-10m; 2m-5m-11m; 2m-5m-
12m; 2m-5m-13m; 2m-5m-14m; 2m-5m-15m; 2m-6m-7m; 2m-6m-8m; 2m-6m-9m; 2m-6m-10m; 2m-6m-
11m; 2m-6m-12m; 2m-6m-13m; 2m-6m-14m; 2m-6m-15m; 2m-7m-8m; 2m-7m-9m; 2m-7m-10m; 2m-
7m-11m; 2m-7m-12m; 2m-7m-13m; 2m-7m-14m; 2m-7m-15m; 2m-8m-9m; 2m-8m-10m; 2m-8m-11m;
2m-8m-12m; 2m-8m-13m; 2m-8m-14m; 2m-8m-15m; 2m-9m-10m; 2m-9m-11m; 2m-9m-12m; 2m-9m-
13m; 2m-9m-14m; 2m-9m-15m; 2m-10m-11m; 2m-10m-12m; 2m-10m-13m; 2m-10m-14m; 2m-10m-
15m; 2m-11m-12m; 2m-11m-13m; 2m-11m-14m; 2m-11m-15m; 2m-12m-13m; 2m-12m-14m; 2m-12m-
15m; 2m-13m-14m; 2m-13m-15m; 2m-14m-15m; 3m-4m-5m; 3m-4m-6m; 3m-4m-7m; 3m-4m-8m; 3m-
4m-9m; 3m-4m-10m; 3m-4m-11m; 3m-4m-12m; 3m-4m-13m; 3m-4m-14m; 3m-4m-15m; 3m-5m-6m;
3m-5m-7m; 3m-5m-8m; 3m-5m-9m; 3m-5m-10m; 3m-5m-11m; 3m-5m-12m; 3m-5m-13m; 3m-5m-14m;
3m-5m-15m; 3m-6m-7m; 3m-6m-8m; 3m-6m-9m; 3m-6m-10m; 3m-6m-11m; 3m-6m-12m; 3m-6m-13m;
3m-6m-14m; 3m-6m-15m; 3m-7m-8m; 3m-7m-9m; 3m-7m-10m; 3m-7m-11m; 3m-7m-12m; 3m-7m-
13m; 3m-7m-14m; 3m-7m-15m; 3m-8m-9m; 3m-8m-10m; 3m-8m-11m; 3m-8m-12m; 3m-8m-13m; 3m-
8m-14m; 3m-8m-15m; 3m-9m-10m; 3m-9m-11m; 3m-9m-12m; 3m-9m-13m; 3m-9m-14m; 3m-9m-15m;
3m-10m-11m; 3m-10m-12m; 3m-10m-13m; 3m-10m-14m; 3m-10m-15m; 3m-11m-12m; 3m-11m-13m;
3m-11m-14m; 3m-11m-15m; 3m-12m-13m; 3m-12m-14m; 3m-12m-15m; 3m-13m-14m; 3m-13m-15m;
3m-14m-15m; 4m-5m-6m; 4m-5m-7m; 4m-5m-8m; 4m-5m-9m; 4m-5m-10m; 4m-5m-11m; 4m-5m-12m;
4m-5m-13m; 4m-5m-14m; 4m-5m-15m; 4m-6m-7m; 4m-6m-8m; 4m-6m-9m; 4m-6m-10m; 4m-6m-11m;
4m-6m-12m; 4m-6m-13m; 4m-6m-14m; 4m-6m-15m; 4m-7m-8m; 4m-7m-9m; 4m-7m-10m; 4m-7m-
11m; 4m-7m-12m; 4m-7m-13m; 4m-7m-14m; 4m-7m-15m; 4m-8m-9m; 4m-8m-10m; 4m-8m-11m; 4m-
8m-12m; 4m-8m-13m; 4m-8m-14m; 4m-8m-15m; 4m-9m-10m; 4m-9m-11m; 4m-9m-12m; 4m-9m-13m;
4m-9m-14m; 4m-9m-15m; 4m-10m-11m; 4m-10m-12m; 4m-10m-13m; 4m-10m-14m; 4m-10m-15m;
4m-11m-12m; 4m-11m-13m; 4m-11m-14m; 4m-11m-15m; 4m-12m-13m; 4m-12m-14m; 4m-12m-15m;
4m-13m-14m; 4m-13m-15m; 4m-14m-15m; 5m-6m-7m; 5m-6m-8m; 5m-6m-9m; 5m-6m-10m; 5m-6m-
11m; 5m-6m-12m; 5m-6m-13m; 5m-6m-14m; 5m-6m-15m; 5m-7m-8m; 5m-7m-9m; 5m-7m-10m; 5m-
7m-11m; 5m-7m-12m; 5m-7m-13m; 5m-7m-14m; 5m-7m-15m; 5m-8m-9m; 5m-8m-10m; 5m-8m-11m;
5m-8m-12m; 5m-8m-13m; 5m-8m-14m; 5m-8m-15m; 5m-9m-10m; 5m-9m-11m; 5m-9m-12m; 5m-9m-
13m; 5m-9m-14m; 5m-9m-15m; 5m-10m-11m; 5m-10m-12m; 5m-10m-13m; 5m-10m-14m; 5m-10m-
15m; 5m-11m-12m; 5m-11m-13m; 5m-11m-14m; 5m-11m-15m; 5m-12m-13m; 5m-12m-14m; 5m-12m-
15m; 5m-13m-14m; 5m-13m-15m; 5m-14m-15m; 6m-7m-8m; 6m-7m-9m; 6m-7m-10m; 6m-7m-11m;

6m-7m-12m;6m-7m-13m;6m-7m-14m;6m-7m-15m;6m-8m-9m;6m-8m-10m;6m-8m-11m;6m-8m-12m;6m-8m-13m;6m-8m-14m;6m-8m-15m;6m-9m-10m;6m-9m-11m;6m-9m-12m;6m-9m-13m;6m-9m-14m;6m-9m-15m;6m-10m-11m;6m-10m-12m;6m-10m-13m;6m-10m-14m;6m-10m-15m;6m-11m-12m;6m-11m-13m;6m-11m-14m;6m-11m-15m;6m-12m-13m;6m-12m-14m;6m-12m-15m;6m-13m-14m;6m-13m-15m;6m-14m-15m;7m-8m-9m;7m-8m-10m;7m-8m-11m;7m-8m-12m;7m-8m-13m;7m-8m-14m;7m-8m-15m;7m-9m-10m;7m-9m-11m;7m-9m-12m;7m-9m-13m;7m-9m-14m;7m-9m-15m;7m-10m-11m;7m-10m-12m;7m-10m-13m;7m-10m-14m;7m-10m-15m;7m-11m-12m;7m-11m-13m;7m-11m-14m;7m-11m-15m;7m-12m-13m;7m-12m-14m;7m-12m-15m;7m-13m-14m;7m-13m-15m;7m-14m-15m;8m-9m-10m;8m-9m-11m;8m-9m-12m;8m-9m-13m;8m-9m-14m;8m-9m-15m;8m-10m-11m;8m-10m-12m;8m-10m-13m;8m-10m-14m;8m-10m-15m;8m-11m-12m;8m-11m-13m;8m-11m-14m;8m-11m-15m;8m-12m-13m;8m-12m-14m;8m-12m-15m;8m-13m-14m;8m-13m-15m;8m-14m-15m;9m-10m-11m;9m-10m-12m;9m-10m-13m;9m-10m-14m;9m-10m-15m;9m-11m-12m;9m-11m-13m;9m-11m-14m;9m-11m-15m;9m-12m-13m;9m-12m-14m;9m-12m-15m;9m-13m-14m;9m-13m-15m;9m-14m-15m;10m-11m-12m;10m-11m-13m;10m-11m-14m;10m-11m-15m;10m-12m-13m;10m-12m-14m;10m-12m-15m;10m-13m-14m;10m-13m-15m;10m-14m-15m;11m-12m-13m;11m-12m-14m;11m-12m-15m;11m-13m-14m;11m-13m-15m;11m-14m-15m;12m-13m-14m;12m-13m-15m;12m-14m-15m;及13m-14m-15m。

[0386] 实施例4.

[0387] 本实施例描述一种建立个别HBV siRNA分子的免疫刺激概况的方法。

[0388] 自健康成年志愿者收集人全血于个别含肝素真空容器中。将血液收集管倒置8次以防止凝结且与无菌生理盐水1:1混合,随后将180微升(μ L)此混合物接种于96孔透明聚苯乙烯组织培养板。同时,使用PBS作为稀释剂来制备各经LNP配制的siRNA分子的10X溶液。二十微升各10X经LNP配制的siRNA添加至含180 μ L血液:生理盐水的孔中以产生600nM的最终siRNA浓度。对于各供体,在三个重复孔中测试各siRNA分子。在37℃/5%CO₂下将经分离的人血液与个别siRNA分子一起培育24小时。培育后,通过使培育板以1200rpm自旋20分钟来收集血浆。自各孔收集至少125 μ L血浆且转移至无菌96孔板中并且用透明乙酸酯板密封件密封。

[0389] 经由Luminex测定法(Luminex Corp,Austin TX,USA),通过定量人干扰素 α 2 (IFN α 2)、白介素1受体拮抗剂(IL-1RA)、白介素6 (IL-6)及单核细胞趋化因子蛋白-1 (MCP-1)与跟单独PBS一起培育的人全血相比的相对诱导水平来产生各siRNA分子的免疫刺激概况。在Luminex 200系统上俘获数据且使用xPonent 3.1.871.0软件使用相对于标准曲线的逻辑5参数加权拟合进行内插。汇集人全血三次重复实验且在技术复制物中加以测定。表1中的数据为经PBS处理的得自十二名供体的血液的变化倍数平均值。对于此实验,使用未经化学修饰的siRNA(S链序列5'-3':GAAGGCCAGACGCGAAUUAATT;SEQ ID NO:31)作为阳性对照,对于所指示的细胞因子,相对于经PBS处理的血液产生以下倍数增加:25.1 (IFN α 2);14.3 (IL-1RA);1,226.5 (IL-6);及51.6 (MCP-1)。

表 1

		相对于经 PBS 处理的血液的变化倍数			
名称:		IFNa2	IL-1RA	IL-6	MCP-1
[0390]	1m	0.9	5.7	571.3	16.6
	2m	1.0	12.9	1,986.8	43.3
	3m	0.8	9.6	1,384.1	31.3
	4m	1.1	13.3	2,109.1	45.7
	5m	1.0	10.6	1,944.9	37.5
	6m	0.9	13.2	1,403.1	43.7
	7m	1.0	10.5	1,598.3	34.9
[0391]	8m	1.0	12.2	1,429.3	45.4
	9m	0.9	5.6	479.6	16.3
	10m	0.7	9.3	945.7	27.2
	11m	0.8	9.7	1,189.9	29.8
	12m	0.8	9.4	1,111.4	28.0
	13m	0.7	8.8	855.5	20.6
	14m	1.0	13.5	1,967.7	49.0
	15m	0.9	13.3	1,335.4	46.1

[0392] 实施例5.

[0393] 作为评估HBV siRNA的有义(S)链是否能够引起RNAi基因调低的手段,构建基于荧光素酶的报告质粒以充当S链沉默的传感器.S链沉默的潜在含义包括对与本文中所描述的HBV siRNA的S链具有互补性的内源性基因的不希望或不合需要的“脱靶”效应.理想siRNA将不显示S链基因沉默能力。

[0394] 为了构建S链感测报告质粒,将实施例1中所描述的HBV靶片段克隆于psi-CHECK2质粒载体的逆补体方向,介于海肾荧光素酶终止密码子与聚腺苷酸化信号之间.名为“psi-HBV BACKWARD”的所得质粒转录仅允许由S链而非反义链实现RNAi沉默的海肾荧光素酶-HBV mRNA.值得注意的是,因为当靶mRNA与所述siRNA链之间存在完美互补性时RNAi基因沉默效应最稳定,所以这个报告基因设计提供观测S链的任何沉默能力的最可能时机.预期部分互补性将仅产生较弱或不产生基因沉默.无所注内源性人mRNA与表A中所列出的siRNA的S链完全互补。

[0395] 通过在双荧光素酶报告基因(DLR)测定系统(Promega, Madison, WI, USA)中测量海肾荧光素酶(RLuc)活性相对于萤火虫荧光素酶(FLuc)活性的降低来测试HBV siRNA的基因沉默活性.在逆转染程序中将Cos-7细胞用于96孔板.各孔含有25,000个细胞及40ng质粒加所指示浓度的与Lipofectamine 2000复合的siRNA.在37℃/5%CO₂下培育24小时之后,移除培养基且处理细胞以便进行荧光测量.自Dual Luciferase® Reporter试剂盒中,将50ul被动溶解缓冲液(1×浓缩)添加至各孔,避光保存,且在100rpm下振荡30min.通过荧光检测来评估溶解产物中两种荧光素酶的表达.计算RLuc/FLuc比且相对于仅经质粒转染的细胞

(“阴性对照”)进行标准化。

[0396] 所报告的数据为一式三份转染孔的平均值(表2)。 $\%RLuc/FLuc$ 相对于阴性对照值100将指示无基因沉默。

[0397] 表2

名称	psi-HBV 反向		
	$\%RLuc/FLuc$ 相对于阴性对照		
	50 ng/ml	5 ng/ml	1 ng/ml
3m	99.5	92.1	104.0
12m	98.6	97.6	106.6

[0399] 在与实验样品相同的剂量下直接靶向海肾荧光素酶基因的阳性对照siRNA分别产生16.1、37.3及91.1的平均 $\%RLuc/FLuc$ 相对于阴性对照值。

[0400] 使用本实施例中所披露的细胞类型、转染方法及剂量水平,所指示的siRNA的中靶基因沉默(即,采用“psi-HBV”报告基因质粒)产生以下 $\%RLuc/FLuc$ 相对于阴性对照值,表明这些siRNA的中靶沉默在这种细胞类型及转染条件下确实起作用:

[0401] 3m:在剂量水平50、5及1ng/ml下分别为9.7、18.2、54.7;及

[0402] 12m:在剂量水平50、5及1ng/ml下分别为11.2、24.9、59.5。

[0403] 总而言之,这些结果指示本文中所描述的HBV siRNA的S链不显示明显RNAi基因沉默能力。因此,S链引发不需要的内源性基因沉默的可能性较低或可忽略。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 普洛体维生物治疗公司
- [0003] <120> 用于使乙型肝炎病毒基因表达沉默的组合物和方法
- [0004] <130> 08155.035US1
- [0005] <140> 15/515,952
- [0006] <141> 2017-03-30
- [0007] <150> PCT/US2015/053569
- [0008] <151> 2015-10-01
- [0009] <150> 62/120,149
- [0010] <151> 2015-02-24
- [0011] <150> 62/059,056
- [0012] <151> 2014-10-02
- [0013] <160> 31
- [0014] <170> PatentIn version 3.5
- [0015] <210> 1
- [0016] <211> 21
- [0017] <212> RNA
- [0018] <213> 人工序列
- [0019] <220>
- [0020] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
- [0021] <220>
- [0022] <221> modified_base
- [0023] <222> (1) .. (1)
- [0024] <223> UNA部分
- [0025] <220>
- [0026] <221> modified_base
- [0027] <222> (2) .. (2)
- [0028] <223> 2'-O-甲基修饰
- [0029] <220>
- [0030] <221> modified_base
- [0031] <222> (4) .. (4)
- [0032] <223> 2'-O-甲基修饰
- [0033] <220>
- [0034] <221> modified_base
- [0035] <222> (7) .. (8)
- [0036] <223> 2'-O-甲基修饰
- [0037] <220>
- [0038] <221> modified_base

[0039] <222> (14) .. (14)
[0040] <223> 2'-O-甲基修饰
[0041] <220>
[0042] <221> modified_base
[0043] <222> (16) .. (16)
[0044] <223> 2'-O-甲基修饰
[0045] <220>
[0046] <221> modified_base
[0047] <222> (20) .. (21)
[0048] <223> UNA部分
[0049] <400> 1
[0050] agguauguug cccguuuguu u 21
[0051] <210> 2
[0052] <211> 21
[0053] <212> RNA
[0054] <213> 人工序列
[0055] <220>
[0056] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0057] <220>
[0058] <221> modified_base
[0059] <222> (7) .. (7)
[0060] <223> 2'-O-甲基修饰
[0061] <220>
[0062] <221> modified_base
[0063] <222> (15) .. (15)
[0064] <223> 2'-O-甲基修饰
[0065] <220>
[0066] <221> modified_base
[0067] <222> (20) .. (21)
[0068] <223> UNA部分
[0069] <400> 2
[0070] acaaacgggc aacauaccuu u 21
[0071] <210> 3
[0072] <211> 21
[0073] <212> RNA
[0074] <213> 人工序列
[0075] <220>
[0076] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0077] <220>

[0078]	<221> modified_base
[0079]	<222> (1) .. (1)
[0080]	<223> UNA部分
[0081]	<220>
[0082]	<221> modified_base
[0083]	<222> (3) .. (4)
[0084]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0085]	<220>
[0086]	<221> modified_base
[0087]	<222> (6) .. (6)
[0088]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0089]	<220>
[0090]	<221> modified_base
[0091]	<222> (18) .. (18)
[0092]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0093]	<220>
[0094]	<221> modified_base
[0095]	<222> (21) .. (21)
[0096]	<223> UNA部分
[0097]	<400> 3
[0098]	gcucaguuua cuagugccau u 21
[0099]	<210> 4
[0100]	<211> 21
[0101]	<212> RNA
[0102]	<213> 人工序列
[0103]	<220>
[0104]	<223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0105]	<220>
[0106]	<221> modified_base
[0107]	<222> (10) .. (10)
[0108]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0109]	<220>
[0110]	<221> modified_base
[0111]	<222> (18) .. (18)
[0112]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0113]	<400> 4
[0114]	uggcacuagu aaacugagcu u 21
[0115]	<210> 5
[0116]	<211> 21

[0117] <212> RNA
[0118] <213> 人工序列
[0119] <220>
[0120] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0121] <220>
[0122] <221> modified_base
[0123] <222> (1) .. (1)
[0124] <223> UNA部分
[0125] <220>
[0126] <221> modified_base
[0127] <222> (5) .. (6)
[0128] <223> 2'-O-甲基修饰
[0129] <220>
[0130] <221> modified_base
[0131] <222> (12) .. (12)
[0132] <223> 2'-O-甲基修饰
[0133] <220>
[0134] <221> modified_base
[0135] <222> (16) .. (17)
[0136] <223> 2'-O-甲基修饰
[0137] <220>
[0138] <221> modified_base
[0139] <222> (20) .. (21)
[0140] <223> UNA部分
[0141] <400> 5
[0142] ccgugugcac uucgcucau u 21
[0143] <210> 6
[0144] <211> 21
[0145] <212> RNA
[0146] <213> 人工序列
[0147] <220>
[0148] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0149] <220>
[0150] <221> modified_base
[0151] <222> (12) .. (12)
[0152] <223> 2'-O-甲基修饰
[0153] <220>
[0154] <221> modified_base
[0155] <222> (18) .. (18)

[0156]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0157]	<220>
[0158]	<221> modified_base
[0159]	<222> (20) .. (21)
[0160]	<223> UNA部分
[0161]	<400> 6
[0162]	ugaagcgaag ugcacacggu u 21
[0163]	<210> 7
[0164]	<211> 21
[0165]	<212> RNA
[0166]	<213> 人工序列
[0167]	<220>
[0168]	<223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0169]	<220>
[0170]	<221> modified_base
[0171]	<222> (1) .. (1)
[0172]	<223> UNA部分
[0173]	<220>
[0174]	<221> modified_base
[0175]	<222> (3) .. (4)
[0176]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0177]	<220>
[0178]	<221> modified_base
[0179]	<222> (6) .. (6)
[0180]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0181]	<220>
[0182]	<221> modified_base
[0183]	<222> (18) .. (18)
[0184]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0185]	<220>
[0186]	<221> modified_base
[0187]	<222> (20) .. (21)
[0188]	<223> UNA部分
[0189]	<400> 7
[0190]	gcucaguuua cuagugccau u 21
[0191]	<210> 8
[0192]	<211> 21
[0193]	<212> RNA
[0194]	<213> 人工序列

[0195] <220>
[0196] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0197] <220>
[0198] <221> modified_base
[0199] <222> (10) .. (10)
[0200] <223> 2'-O-甲基修饰
[0201] <220>
[0202] <221> modified_base
[0203] <222> (18) .. (18)
[0204] <223> 2'-O-甲基修饰
[0205] <220>
[0206] <221> modified_base
[0207] <222> (20) .. (21)
[0208] <223> UNA部分
[0209] <400> 8
[0210] uggcacuagu aaacugagcu u 21
[0211] <210> 9
[0212] <211> 21
[0213] <212> RNA
[0214] <213> 人工序列
[0215] <220>
[0216] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0217] <220>
[0218] <221> modified_base
[0219] <222> (1) .. (1)
[0220] <223> UNA部分
[0221] <220>
[0222] <221> modified_base
[0223] <222> (5) .. (6)
[0224] <223> 2'-O-甲基修饰
[0225] <220>
[0226] <221> modified_base
[0227] <222> (12) .. (12)
[0228] <223> 2'-O-甲基修饰
[0229] <220>
[0230] <221> modified_base
[0231] <222> (16) .. (16)
[0232] <223> 2'-O-甲基修饰
[0233] <220>

[0234] <221> modified_base
[0235] <222> (21) .. (21)
[0236] <223> UNA部分
[0237] <400> 9
[0238] ccgugugcac uucgcucau u 21
[0239] <210> 10
[0240] <211> 21
[0241] <212> RNA
[0242] <213> 人工序列
[0243] <220>
[0244] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0245] <220>
[0246] <221> modified_base
[0247] <222> (12) .. (12)
[0248] <223> 2'-O-甲基修饰
[0249] <220>
[0250] <221> modified_base
[0251] <222> (18) .. (18)
[0252] <223> 2'-O-甲基修饰
[0253] <400> 10
[0254] ugaagcgaag ugcacacggu u 21
[0255] <210> 11
[0256] <211> 21
[0257] <212> RNA
[0258] <213> 人工序列
[0259] <220>
[0260] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0261] <220>
[0262] <221> modified_base
[0263] <222> (1) .. (1)
[0264] <223> UNA部分
[0265] <220>
[0266] <221> modified_base
[0267] <222> (2) .. (4)
[0268] <223> 2'-O-甲基修饰
[0269] <220>
[0270] <221> modified_base
[0271] <222> (15) .. (15)
[0272] <223> 2'-O-甲基修饰

[0273] <220>
[0274] <221> modified_base
[0275] <222> (17) .. (17)
[0276] <223> 2'-O-甲基修饰
[0277] <220>
[0278] <221> modified_base
[0279] <222> (21) .. (21)
[0280] <223> UNA部分
[0281] <400> 11
[0282] cuggcucagu uuacuagugu u 21
[0283] <210> 12
[0284] <211> 21
[0285] <212> RNA
[0286] <213> 人工序列
[0287] <220>
[0288] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0289] <220>
[0290] <221> modified_base
[0291] <222> (6) .. (6)
[0292] <223> 2'-O-甲基修饰
[0293] <220>
[0294] <221> modified_base
[0295] <222> (13) .. (13)
[0296] <223> 2'-O-甲基修饰
[0297] <220>
[0298] <221> modified_base
[0299] <222> (15) .. (15)
[0300] <223> 2'-O-甲基修饰
[0301] <400> 12
[0302] cacuaguaaa cugagccagu u 21
[0303] <210> 13
[0304] <211> 21
[0305] <212> RNA
[0306] <213> 人工序列
[0307] <220>
[0308] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0309] <220>
[0310] <221> modified_base
[0311] <222> (1) .. (1)

[0312]	<223> UNA部分
[0313]	<220>
[0314]	<221> modified_base
[0315]	<222> (5) .. (6)
[0316]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0317]	<220>
[0318]	<221> modified_base
[0319]	<222> (12) .. (12)
[0320]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0321]	<220>
[0322]	<221> modified_base
[0323]	<222> (16) .. (16)
[0324]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0325]	<220>
[0326]	<221> modified_base
[0327]	<222> (20) .. (21)
[0328]	<223> UNA部分
[0329]	<400> 13
[0330]	ccgugugcac uucgcucau u 21
[0331]	<210> 14
[0332]	<211> 21
[0333]	<212> RNA
[0334]	<213> 人工序列
[0335]	<220>
[0336]	<223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0337]	<220>
[0338]	<221> modified_base
[0339]	<222> (12) .. (12)
[0340]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0341]	<220>
[0342]	<221> modified_base
[0343]	<222> (18) .. (18)
[0344]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0345]	<220>
[0346]	<221> modified_base
[0347]	<222> (20) .. (21)
[0348]	<223> UNA部分
[0349]	<400> 14
[0350]	ugaagcgaag ugcacacggu u 21

[0351] <210> 15
[0352] <211> 21
[0353] <212> RNA
[0354] <213> 人工序列
[0355] <220>
[0356] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0357] <220>
[0358] <221> modified_base
[0359] <222> (1) .. (1)
[0360] <223> UNA部分
[0361] <220>
[0362] <221> modified_base
[0363] <222> (3) .. (3)
[0364] <223> 2'-O-甲基修饰
[0365] <220>
[0366] <221> modified_base
[0367] <222> (6) .. (6)
[0368] <223> 2'-O-甲基修饰
[0369] <220>
[0370] <221> modified_base
[0371] <222> (12) .. (12)
[0372] <223> 2'-O-甲基修饰
[0373] <220>
[0374] <221> modified_base
[0375] <222> (14) .. (14)
[0376] <223> 2'-O-甲基修饰
[0377] <220>
[0378] <221> modified_base
[0379] <222> (20) .. (21)
[0380] <223> UNA部分
[0381] <400> 15
[0382] gcucaguuua cuagugccau u 21
[0383] <210> 16
[0384] <211> 21
[0385] <212> RNA
[0386] <213> 人工序列
[0387] <220>
[0388] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0389] <220>

[0390] <221> modified_base
[0391] <222> (15) .. (15)
[0392] <223> 2'-O-甲基修饰
[0393] <220>
[0394] <221> modified_base
[0395] <222> (20) .. (21)
[0396] <223> UNA部分
[0397] <400> 16
[0398] uggcacuagu aaacugagcu u 21
[0399] <210> 17
[0400] <211> 21
[0401] <212> RNA
[0402] <213> 人工序列
[0403] <220>
[0404] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0405] <220>
[0406] <221> modified_base
[0407] <222> (1) .. (1)
[0408] <223> UNA部分
[0409] <220>
[0410] <221> modified_base
[0411] <222> (2) .. (2)
[0412] <223> 2'-O-甲基修饰
[0413] <220>
[0414] <221> modified_base
[0415] <222> (4) .. (4)
[0416] <223> 2'-O-甲基修饰
[0417] <220>
[0418] <221> modified_base
[0419] <222> (8) .. (8)
[0420] <223> 2'-O-甲基修饰
[0421] <220>
[0422] <221> modified_base
[0423] <222> (14) .. (14)
[0424] <223> 2'-O-甲基修饰
[0425] <220>
[0426] <221> modified_base
[0427] <222> (16) .. (16)
[0428] <223> 2'-O-甲基修饰

[0429]	<220>
[0430]	<221> modified_base
[0431]	<222> (20) .. (21)
[0432]	<223> UNA部分
[0433]	<400> 17
[0434]	agguauguug cccguuuguu u 21
[0435]	<210> 18
[0436]	<211> 21
[0437]	<212> RNA
[0438]	<213> 人工序列
[0439]	<220>
[0440]	<223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0441]	<220>
[0442]	<221> modified_base
[0443]	<222> (7) .. (7)
[0444]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0445]	<220>
[0446]	<221> modified_base
[0447]	<222> (15) .. (15)
[0448]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0449]	<220>
[0450]	<221> modified_base
[0451]	<222> (19) .. (19)
[0452]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0453]	<220>
[0454]	<221> modified_base
[0455]	<222> (20) .. (21)
[0456]	<223> UNA部分
[0457]	<400> 18
[0458]	acaaacgggc aacauaccuu u 21
[0459]	<210> 19
[0460]	<211> 21
[0461]	<212> RNA
[0462]	<213> 人工序列
[0463]	<220>
[0464]	<223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0465]	<220>
[0466]	<221> modified_base
[0467]	<222> (1) .. (1)

[0468]	<223> UNA部分
[0469]	<220>
[0470]	<221> modified_base
[0471]	<222> (4) .. (4)
[0472]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0473]	<220>
[0474]	<221> modified_base
[0475]	<222> (6) .. (6)
[0476]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0477]	<220>
[0478]	<221> modified_base
[0479]	<222> (13) .. (14)
[0480]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0481]	<220>
[0482]	<221> modified_base
[0483]	<222> (16) .. (17)
[0484]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0485]	<220>
[0486]	<221> modified_base
[0487]	<222> (20) .. (21)
[0488]	<223> UNA部分
[0489]	<400> 19
[0490]	gccgauccau acugcggaau u 21
[0491]	<210> 20
[0492]	<211> 21
[0493]	<212> RNA
[0494]	<213> 人工序列
[0495]	<220>
[0496]	<223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0497]	<220>
[0498]	<221> modified_base
[0499]	<222> (8) .. (8)
[0500]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0501]	<220>
[0502]	<221> modified_base
[0503]	<222> (13) .. (13)
[0504]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0505]	<220>
[0506]	<221> modified_base

[0507]	<222> (18) .. (18)
[0508]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0509]	<220>
[0510]	<221> modified_base
[0511]	<222> (20) .. (21)
[0512]	<223> UNA部分
[0513]	<400> 20
[0514]	uuccgcagua uggaucggcu u 21
[0515]	<210> 21
[0516]	<211> 21
[0517]	<212> RNA
[0518]	<213> 人工序列
[0519]	<220>
[0520]	<223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0521]	<220>
[0522]	<221> modified_base
[0523]	<222> (1) .. (1)
[0524]	<223> UNA部分
[0525]	<220>
[0526]	<221> modified_base
[0527]	<222> (4) .. (4)
[0528]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0529]	<220>
[0530]	<221> modified_base
[0531]	<222> (6) .. (6)
[0532]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0533]	<220>
[0534]	<221> modified_base
[0535]	<222> (13) .. (14)
[0536]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0537]	<220>
[0538]	<221> modified_base
[0539]	<222> (16) .. (17)
[0540]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0541]	<220>
[0542]	<221> modified_base
[0543]	<222> (21) .. (21)
[0544]	<223> UNA部分
[0545]	<400> 21

[0546] gccgauccau acugcggaau u 21
[0547] <210> 22
[0548] <211> 21
[0549] <212> RNA
[0550] <213> 人工序列
[0551] <220>
[0552] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0553] <220>
[0554] <221> modified_base
[0555] <222> (8) .. (8)
[0556] <223> 2'-O-甲基修饰
[0557] <220>
[0558] <221> modified_base
[0559] <222> (13) .. (13)
[0560] <223> 2'-O-甲基修饰
[0561] <220>
[0562] <221> modified_base
[0563] <222> (18) .. (18)
[0564] <223> 2'-O-甲基修饰
[0565] <400> 22
[0566] uuccgcagua uggaucggcu u 21
[0567] <210> 23
[0568] <211> 21
[0569] <212> RNA
[0570] <213> 人工序列
[0571] <220>
[0572] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0573] <220>
[0574] <221> modified_base
[0575] <222> (1) .. (1)
[0576] <223> UNA部分
[0577] <220>
[0578] <221> modified_base
[0579] <222> (4) .. (4)
[0580] <223> 2'-O-甲基修饰
[0581] <220>
[0582] <221> modified_base
[0583] <222> (6) .. (6)
[0584] <223> 2'-O-甲基修饰

[0585] <220>
[0586] <221> modified_base
[0587] <222> (13) .. (14)
[0588] <223> 2'-O-甲基修饰
[0589] <220>
[0590] <221> modified_base
[0591] <222> (17) .. (17)
[0592] <223> 2'-O-甲基修饰
[0593] <220>
[0594] <221> modified_base
[0595] <222> (21) .. (21)
[0596] <223> UNA部分
[0597] <400> 23
[0598] gccgauccau acugcggaau u 21
[0599] <210> 24
[0600] <211> 21
[0601] <212> RNA
[0602] <213> 人工序列
[0603] <220>
[0604] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0605] <220>
[0606] <221> modified_base
[0607] <222> (8) .. (8)
[0608] <223> 2'-O-甲基修饰
[0609] <220>
[0610] <221> modified_base
[0611] <222> (13) .. (13)
[0612] <223> 2'-O-甲基修饰
[0613] <220>
[0614] <221> modified_base
[0615] <222> (18) .. (18)
[0616] <223> 2'-O-甲基修饰
[0617] <400> 24
[0618] uuccgcagua uggaucggcu u 21
[0619] <210> 25
[0620] <211> 21
[0621] <212> RNA
[0622] <213> 人工序列
[0623] <220>

[0624]	<223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0625]	<220>
[0626]	<221> modified_base
[0627]	<222> (1) .. (1)
[0628]	<223> UNA部分
[0629]	<220>
[0630]	<221> modified_base
[0631]	<222> (4) .. (4)
[0632]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0633]	<220>
[0634]	<221> modified_base
[0635]	<222> (6) .. (6)
[0636]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0637]	<220>
[0638]	<221> modified_base
[0639]	<222> (13) .. (14)
[0640]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0641]	<220>
[0642]	<221> modified_base
[0643]	<222> (17) .. (17)
[0644]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0645]	<220>
[0646]	<221> modified_base
[0647]	<222> (20) .. (21)
[0648]	<223> UNA部分
[0649]	<400> 25
[0650]	gccgauccau acugcggaau u 21
[0651]	<210> 26
[0652]	<211> 21
[0653]	<212> RNA
[0654]	<213> 人工序列
[0655]	<220>
[0656]	<223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0657]	<220>
[0658]	<221> modified_base
[0659]	<222> (8) .. (8)
[0660]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0661]	<220>
[0662]	<221> modified_base

[0663]	<222> (13) .. (13)
[0664]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0665]	<220>
[0666]	<221> modified_base
[0667]	<222> (18) .. (18)
[0668]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0669]	<220>
[0670]	<221> modified_base
[0671]	<222> (20) .. (21)
[0672]	<223> UNA部分
[0673]	<400> 26
[0674]	uuccgcagua uggaucggcu u 21
[0675]	<210> 27
[0676]	<211> 21
[0677]	<212> RNA
[0678]	<213> 人工序列
[0679]	<220>
[0680]	<223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0681]	<220>
[0682]	<221> modified_base
[0683]	<222> (1) .. (1)
[0684]	<223> UNA部分
[0685]	<220>
[0686]	<221> modified_base
[0687]	<222> (3) .. (3)
[0688]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0689]	<220>
[0690]	<221> modified_base
[0691]	<222> (6) .. (6)
[0692]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0693]	<220>
[0694]	<221> modified_base
[0695]	<222> (12) .. (12)
[0696]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0697]	<220>
[0698]	<221> modified_base
[0699]	<222> (14) .. (14)
[0700]	<223> 2'-O-甲基修饰
[0701]	<220>

[0702] <221> modified_base
[0703] <222> (21) .. (21)
[0704] <223> UNA部分
[0705] <400> 27
[0706] gcucaguuua cuagugccau u 21
[0707] <210> 28
[0708] <211> 21
[0709] <212> RNA
[0710] <213> 人工序列
[0711] <220>
[0712] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0713] <220>
[0714] <221> modified_base
[0715] <222> (15) .. (15)
[0716] <223> 2'-O-甲基修饰
[0717] <400> 28
[0718] uggcacuagu aaacugagcu u 21
[0719] <210> 29
[0720] <211> 21
[0721] <212> RNA
[0722] <213> 人工序列
[0723] <220>
[0724] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0725] <220>
[0726] <221> modified_base
[0727] <222> (1) .. (1)
[0728] <223> UNA部分
[0729] <220>
[0730] <221> modified_base
[0731] <222> (2) .. (3)
[0732] <223> 2'-O-甲基修饰
[0733] <220>
[0734] <221> modified_base
[0735] <222> (6) .. (6)
[0736] <223> 2'-O-甲基修饰
[0737] <220>
[0738] <221> modified_base
[0739] <222> (12) .. (12)
[0740] <223> 2'-O-甲基修饰

[0741] <220>
[0742] <221> modified_base
[0743] <222> (20) .. (21)
[0744] <223> UNA部分
[0745] <400> 29
[0746] cuggcucagu uuacuagugu u 21
[0747] <210> 30
[0748] <211> 21
[0749] <212> RNA
[0750] <213> 人工序列
[0751] <220>
[0752] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0753] <220>
[0754] <221> modified_base
[0755] <222> (15) .. (15)
[0756] <223> 2'-O-甲基修饰
[0757] <220>
[0758] <221> modified_base
[0759] <222> (20) .. (21)
[0760] <223> UNA部分
[0761] <400> 30
[0762] cacuaguaaa cugagccagu u 21
[0763] <210> 31
[0764] <211> 21
[0765] <212> DNA
[0766] <213> 人工序列
[0767] <220>
[0768] <223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸
[0769] <220>
[0770] <223> 组合DNA/RNA分子的描述:合成寡核苷酸
[0771] <400> 31
[0772] gaaggccaga cgcgaauuat t 21