



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108138181 B

(45) 授权公告日 2022. 05. 24

(21) 申请号 201680055214.6

(22) 申请日 2016.07.26

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108138181 A

(43) 申请公布日 2018.06.08

(30) 优先权数据
62/197,370 2015.07.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.03.23

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2016/001169 2016.07.26

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/017523 EN 2017.02.02

(73) 专利权人 奥利克斯医药有限公司
地址 韩国首尔

(72) 发明人 S·W·弘 I·弘 J·H·金

(74) 专利代理机构 北京嘉和天工知识产权代理
事务所(普通合伙) 11269
专利代理师 甘玲 缪策

(51) Int.Cl.
C12N 15/113 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 1966084 A,2007.05.23
CN 103328633 A,2013.09.25
KR 20110068061 A,2011.06.22
CN 102719432 A,2012.10.10
WO 2009039743 A1,2009.04.02
Sang Mi An 等.Inhibition of
melanogenesis by tyrosinase siRNA in
human melanocytes.《BMB Rep.》.2009,第42卷
(第3期),

审查员 郝佳

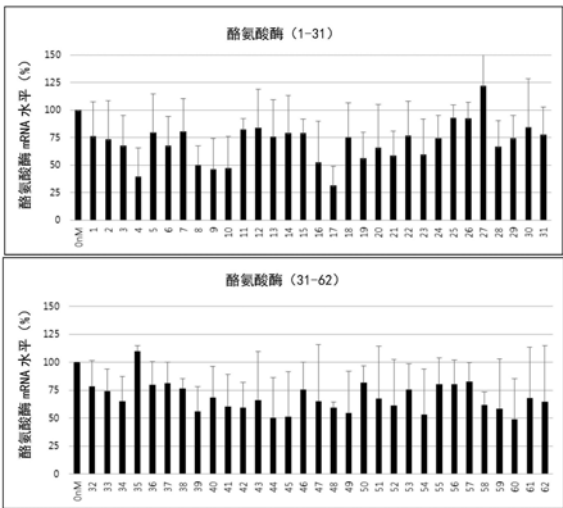
权利要求书4页 说明书25页 附图9页

(54) 发明名称

抑制黑色素生成的RNA复合物

(57) 摘要

在某些方面,本文提供RNA复合物(例如,不对称RNA复合物,如asiRNA和lasiRNA),所述RNA复合物抑制酪氨酸酶表达,并且因此对于减少黑色素生成和对于治疗与过度黑色素生成有关的色素沉着相关紊乱(如黑斑病和老年斑)是有用的。



1. 一种RNA复合物,所述RNA复合物包括具有与酪氨酸酶mRNA序列的序列互补性的长度为19至21个核苷酸(nt)的反义链和具有与所述反义链的序列互补性的长度为16至17nt的有义链,其中所述反义链和所述有义链形成复合物,其中所述反义链的5'端和所述有义链的3'端形成平端,其中所述有义链包括序列(5'→3')asiTYR(4)S:GCUGACAGGAGAUGAA,并且其中所述反义链包括序列(5'→3')asiTYR(4)AS:UUCAUCCUGUCAGCUUCUG。

2. 如权利要求1所述的RNA复合物,其中所述反义链包括选自下表中列出的反义链序列的序列:

| 编号 | 名称 | 序列(5'→3') |
|----|--------------------|------------------------------|
| 1 | asiTYR(4)-1AS | UUCAUCCUGUCAGCU*U*C*U*G |
| 2 | asiTYR(4)-2AS | UUCAUCCUGUCAGCU*U*mC*mU*mG |
| 3 | asiTYR(4)-3AS | UUCAUCCUGUCAGCmU*mU*mC*mU*mG |
| 4 | cp-asiTYR(4)19AS-4 | UUCAUCCUGUCAG*C*U*U*C |
| 5 | cp-asiTYR(4)19AS-5 | UUCAUCCUGUCAG*C*mU*mU*mC |
| 6 | cp-asiTYR(4)19AS-6 | UUCAUCCUGUCAmG*mC*mU*mU*mC |
| 7 | cp-asiTYR(4)19AS-7 | UUCAUCCUGUC*A*G*C*mU*mU*mC |

其中m代表2'-O-甲基RNA,并且*代表硫代磷酸酯键。

3. 如权利要求1所述的RNA复合物,其中所述有义链包括选自下表中列出的有义链序列的序列:

| 编号 | 名称 | 序列(5'→3') |
|----|--------------|--------------------------------|
| 1 | asiTYR(4)-1S | GCUGACAGGAGAUG*A*A*胆甾醇 |
| 2 | asiTYR(4)-4S | mGCmUGmACmAGmGAmGAmUG*mA*A*胆甾醇 |

其中m代表2'-O-甲基RNA,并且*代表硫代磷酸酯键。

4. 如权利要求1所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物能够抑制细胞酪氨酸酶表达。

5. 如权利要求4所述的RNA复合物,其中所述细胞为A375细胞、MNT-1细胞或黑素细胞。

6. 如权利要求5所述的RNA复合物,其中所述细胞为黑素细胞。

7. 如权利要求1所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物能够抑制细胞黑色素生成。

8. 如权利要求7所述的RNA复合物,其中所述细胞为MNT-1细胞或黑素细胞。

9. 如权利要求1所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物包括化学修饰。

10. 如权利要求9所述的RNA复合物,其中所述RNA修饰为2'-O-甲基化核苷、硫代磷酸酯键或胆甾醇部分。

11. 如权利要求10所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物包括胆甾醇部分。

12. 如权利要求11所述的RNA复合物,其中所述胆甾醇部分被附连至所述有义链的3'末端。

13. 如权利要求10所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物包括2'-O-甲基化核苷。

14. 如权利要求13所述的RNA复合物,其中所述2'-O-甲基化核苷被置于所述有义链的所述3'末端。

15. 如权利要求13所述的RNA复合物,其中所述有义链的所述3'末端区包括多个2'-O-甲基化核苷。

16. 如权利要求13所述的RNA复合物,其中所述2'-O-甲基化核苷被置于所述反义链的

3' 末端。

17. 如权利要求13所述的RNA复合物,其中所述反义链的所述3' 末端区包括多个2' -0-甲基化核苷。

18. 如权利要求13的RNA复合物,其中所述2' -0-甲基化核苷被置于所述有义链的所述3' 末端和所述反义链的3' 末端。

19. 如权利要求13所述的RNA复合物,其中所述有义链的所述3' 末端区包括多个2' -0-甲基化核苷,并且所述反义链的3' 末端区包括多个2' -0-甲基化核苷。

20. 如权利要求10所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物包括硫代磷酸酯键。

21. 如权利要求20所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物的所述有义链中的核糖核苷酸之间的键的至少25%为硫代磷酸酯键。

22. 如权利要求20所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物的所述有义链中的核糖核苷酸之间的键的至少50%为硫代磷酸酯键。

23. 如据权利要求20所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物的所述有义链中的核糖核苷酸之间的键的至少75%为硫代磷酸酯键。

24. 如据权利要求20所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物的所述有义链中的核糖核苷酸之间的键全部都为硫代磷酸酯键。

25. 如权利要求20所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物的所述反义链中的核糖核苷酸之间的键的至少25%为硫代磷酸酯键。

26. 如权利要求20所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物的所述反义链中的所述核糖核苷酸之间的键的至少50%为硫代磷酸酯键。

27. 如权利要求20所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物的所述反义链中的所述核糖核苷酸之间的键的至少75%为硫代磷酸酯键。

28. 如权利要求20所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物的所述反义链中的所述核糖核苷酸之间的键全部都为硫代磷酸酯键。

29. 如权利要求9所述的RNA复合物,其中所述有义链和所述反义链选自下表:

| 编号 | 名称 | 序列 (5'→3') |
|-------------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| 1 | asiTYR(4)-1 S | GCUGACAGGAGAUG*A*A*胆甾醇 |
| 2 | asiTYR(4)-4 S | mGCmUGmACmAGmGAmGAmUG*mA*A*胆甾醇 |
| 3 | asiTYR(4)-1 AS | UUCAUCUCCUGUCAGCU*U*C*U*G |
| 4 | asiTYR(4)-2 AS | UUCAUCUCCUGUCAGCU*U*mC*mU*mG |
| 5 | asiTYR(4)-3 AS | UUCAUCUCCUGUCAGCmU*mU*mC*mU*mG |
| 6 | cp-asiTYR(4) 19AS-4 | UUCAUCUCCUGUCAG*C*U*U*C |
| 7 | cp-asiTYR(4) 19AS-5 | UUCAUCUCCUGUCAG*C*mU*mU*mC |
| 8 | cp-asiTYR(4) 19AS-6 | UUCAUCUCCUGUCAmG*mC*mU*mU*mC |
| 9 | cp-asiTYR(4) 19AS-7 | UUCAUCUCCUGUC*A*G*C*mU*mU*mC |
| 其中 m 代表 2'-O-甲基 RNA, 并且 * 代表硫代磷酸酯键; | | |

并且所述有义链和所述反义链的组合选自: 编号1和编号3的组合、编号1和编号4的组

合、编号1和编号5的组合、编号1和编号6的组合、编号1和编号7的组合、编号1和编号8的组合、编号1和编号9的组合、编号2和编号3的组合、编号2和编号4的组合、或者编号2和编号5的组合。

30. 如权利要求9所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物能够在不存在递送运载体的情况下穿透细胞的细胞膜。

31. 如权利要求30所述的RNA复合物,其中所述细胞为A375细胞、MNT-1细胞或黑素细胞。

32. 如权利要求1所述的RNA复合物,其中所述RNA复合物不是细胞毒的。

33. 如权利要求1至32中任一项所述的RNA复合物用于制造用于减少皮肤中黑色素生成的药物的用途。

34. 如权利要求33所述的用途,其中所述药物用于治疗与过度黑色素生成有关的皮肤色素沉着紊乱。

35. 如权利要求34所述的用途,其中所述皮肤色素沉着紊乱为黑斑病或老年斑。

36. 如权利要求33所述的用途,其中所述药物用于局部施用至所述皮肤。

37. 如权利要求33所述的用途,其中所述药物用于与第二皮肤提亮剂一起施用。

38. 如权利要求37所述的用途,其中所述第二皮肤提亮剂选自氢醌、熊果苷、维甲酸、曲酸、杜鹃花酸和氨甲环酸。

39. 如权利要求1至32中任一项所述的RNA复合物用于制造用于治疗与过度黑色素生成有关的皮肤色素沉着紊乱的药物的用途。

40. 如权利要求39所述的用途,其中所述皮肤色素沉着紊乱为黑斑病或老年斑。

41. 如权利要求39所述的用途,其中所述药物用于局部施用至皮肤。

42. 如权利要求39所述的用途,其中所述药物用于与第二皮肤提亮剂一起施用。

43. 如权利要求42所述的用途,其中所述第二皮肤提亮剂选自氢醌、熊果苷、维甲酸、曲酸、杜鹃花酸和氨甲环酸。

44. 一种药物组合物,所述药物组合物包括如权利要求1至32中任一项所述的RNA复合物和药学上可接受的载体。

45. 如权利要求44所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于局部递送。

46. 如权利要求45所述的药物组合物,其中所述药物组合物为乳膏或洗液。

47. 如权利要求44所述的药物组合物,其中所述药物组合物还包括第二皮肤提亮剂。

48. 如权利要求47所述的药物组合物,其中所述第二皮肤提亮剂选自氢醌、熊果苷、维甲酸、曲酸、杜鹃花酸和氨甲环酸。

49. 如权利要求44所述的药物组合物用于制造用于减少皮肤中黑色素生成的药物的用途。

50. 如权利要求49所述的用途,其中所述药物用于治疗与过度黑色素生成有关的皮肤色素沉着紊乱。

51. 如权利要求50所述的用途,其中所述皮肤色素沉着紊乱为黑斑病或老年斑。

52. 如权利要求49所述的用途,其中所述药物用于局部施用至所述皮肤。

53. 如权利要求44所述的药物组合物用于制造用于治疗与过度黑色素生成有关的皮肤色素沉着紊乱的药物的用途。

54. 如权利要求53所述的用途,其中所述皮肤色素沉着紊乱为黑斑病或老年斑。
55. 如权利要求53所述的用途,其中所述药物用于局部施用至皮肤。

抑制黑色素生成的RNA复合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2015年7月27日提交的美国临时申请62/197,370的优先权,其以引用方式被整体并入本文。

背景技术

[0003] 黑素细胞过度黑色素生成与各种各样的皮肤色素沉着相关紊乱有关,所述皮肤色素沉着相关紊乱包含黑斑病和老年斑。在黑斑病中,黑色素的过度生成引起存在于表皮皮肤层中的黑素细胞中的黑色沉积物。黑斑病是发生在女性皮肤中的主要难治性疾病之一。黑斑病经常发生在孕妇和正在服用口服避孕药或贴剂避孕药或经受激素替代疗法的女性中。

[0004] 酪氨酸酶是一种氧化酶,所述氧化酶是黑色素的合成中的限速酶,并且因此是减少色素沉着过多和治疗皮肤色素沉着相关紊乱的药剂的重要治疗靶标。在人中,酪氨酸酶由TYR基因编码。引起受损的酪氨酸酶生成的TYR基因中的突变导致I型眼皮肤白化病。

[0005] 与过度黑色素生成有关的皮肤色素沉着相关紊乱的目前可用的治疗包含氢醌、熊果苷、维甲酸、杜鹃花酸、曲酸、化学脱皮术和微晶磨皮术。然而,这样的治疗常常是无效的,并且可以具有显著的副作用。具有这样的紊乱的个体常常需要依靠化妆品以遮盖过度皮肤色素沉着的区域。

[0006] 因此,需要用于黑色素生成的抑制和皮肤色素沉着相关紊乱(包含黑斑病和老年斑)的治疗的改进的组合物和方法。

发明内容

[0007] 在某些方面,本文提供RNA复合物,所述RNA复合物抑制酪氨酸酶并且对于减少黑色素生成和色素沉着相关紊乱(包含黑斑病和老年斑)的治疗是有用的。在某些方面,本文提供包括这样的RNA复合物的药物组合物,以及使用这样的RNA复合物和药物组合物的方法。

[0008] 在某些方面,本文提供一种RNA复合物,所述RNA复合物包括反义链和有义链,所述反义链具有与酪氨酸酶mRNA序列(例如,人酪氨酸酶mRNA序列)的序列互补性,所述有义链具有与所述反义链的序列互补性。在一些实施方案中,RNA复合物能够抑制细胞(例如,黑素细胞)酪氨酸酶表达。在某些实施方案中,RNA复合物能够抑制细胞(例如,黑素细胞)黑色素生成。在一些实施方案中,RNA复合物是不对称短干扰RNA(asiRNA)。在一些实施方案中,RNA复合物是长不对称短干扰RNA(lasiRNA)。在一些实施方案中,RNA复合物是表1、表2、表4、表5和表6中列出的RNA复合物。

[0009] 在一些实施方案中,本文提供的RNA复合物包括化学修饰,其中所述修饰便利在不存在递送运载体的情况下穿透细胞膜。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基化核苷、硫代磷酸酯键或胆甾醇部分。在一些实施方案中,RNA复合物是表2或表4中列出的经修饰的RNA复合物。在某些实施方案中,RNA复合物不是细胞毒的。

[0010] 在某些方面,本文提供一种包括本文提供的RNA复合物和药学上可接受的载体的药物组合物。在某些实施方案中,药物组合物被配制用于局部递送。在一些实施方案中,药物组合物是乳膏或洗液。在一些实施方案中,药物组合物还包括第二种皮肤提亮剂(例如,氢醌、熊果苷、维甲酸、曲酸、杜鹃花酸或氨甲环酸)。

[0011] 在某些方面,本文提供一种抑制细胞(例如,黑素细胞)酪氨酸酶表达的方法,所述方法包括使细胞与本文提供的RNA复合物接触。在某些方面,本文提供一种抑制细胞(例如,黑素细胞)黑色素生成的方法,所述方法包括使细胞与本文提供的RNA复合物接触。

[0012] 在某些方面,本文提供一种抑制人受试者的皮肤中黑色素生成的方法,所述方法包括向受试者施用本文提供的RNA复合物或药物组合物。在某些方面,本文提供一种为治疗人受试者的与过度黑色素生成有关的皮肤色素沉着紊乱(例如,黑斑病或老年斑)的方法,所述方法包括向受试者施用本文提供的RNA复合物或药物组合物。

附图说明

[0013] 图1示出靶向酪氨酸酶的62种示例性asiRNA的基因沉默效率。将asiRNA以0.3nM的浓度在A375P中转染,并且在24小时之后,使用实时PCR测量酪氨酸酶mRNA表达的程度。该图表描述了三次重复实验的平均值和标准偏差。

[0014] 图2示出示例性酪氨酸酶靶向细胞穿透asiRNA(cp-asiRNA或cp-asiTYR)的基因沉默效率,各种各样的化学修饰已经被应用于所述asiRNA。在无转染运载体且MNT-1细胞存在的情况下,将cp-asiRNA以1 μ M的浓度温育,并且在48小时之后,使用实时PCR测量酪氨酸酶mRNA表达的程度。该图表描述了三次重复实验的平均值和标准偏差。

[0015] 图3示出示例性cp-asiRNA酪氨酸酶蛋白质表达的抑制。在无转染运载体的情况下,将cp-asiRNA与MNT-1细胞接触,并且在72小时后,提取蛋白质并且进行免疫印迹(NT=无处理)。

[0016] 图4示出在无转染运载体的情况下,用示例性cp-asiRNA处理MNT-1细胞72小时之后进行的黑色素含量测试的结果(NT=无处理)。

[0017] 图5示出示例性cp-asiRNA色素沉着抑制。图片(a)描绘了在不无转染载体的情况下,用cp-asiRNA处理72小时之后的MNT-1细胞的颜色变化。图片(b)描绘了在无运载体的情况下,用cp-asiRNA处理MNT-1细胞72小时之后从MNT-1细胞系获得的黑色素的颜色变化(NT=未处理)。

[0018] 图6示出使用LDH测试和CCK-8测试,在无转染运载体的情况下用示例性cp-asiRNA处理的细胞的细胞毒性。图片(a)描绘了如通过LDH测试测定的用示例性cp-asiRNA或指定对照处理24小时之后MNT-1细胞中的细胞毒性。图片(b)描绘了如通过CCK-8测试测定的用cp-asiRNA或指定对照处理24小时之后MNT-1细胞中的细胞毒性。图片(c)描绘了如通过LDH测试测定的用cp-asiRNA或对照处理24小时之后HaCaT细胞中的细胞毒性。图片(d)描绘了如通过CCK-8测试测定的用cp-asiRNA或对照处理24小时之后HaCaT细胞的细胞毒性(NT=未处理)。

[0019] 图7示出不同反义链长度(21或19个核苷酸)并且含有2'-O-甲基化修饰的示例性cp-asiRNA的基因沉默效应。每种cp-asiRNA以1 μ M的浓度在无转染运载体的情况下接触MNT-1,在48小时之后通过实时PCR测量得到的酪氨酸酶mRNA生成。

[0020] 图8示出示例性cp-asiRNA酪氨酸酶蛋白质表达的抑制。在无转染运载体的情况下,将指定的cp-asiRNA与MNT-1细胞接触,并且在72小时之后,提取蛋白质并且进行免疫印迹(NT=未处理)。

[0021] 图9示出在无转染运载体的情况下,用示例性cp-asiRNA处理MNT-1细胞72小时之后进行的黑色素含量测试所产生的结果(NT=未处理)。

[0022] 图10示出示例性cp-asiRNA酪氨酸酶蛋白质表达的抑制。在无转染运载体的情况下,将指定的cp-asiRNA与MNT-1细胞接触,并且在72小时之后,提取蛋白质并且进行免疫印迹(NT=未处理)。

[0023] 图11示出用示例性asiRNA和lasiRNA处理MNT-1细胞的效果。将所鉴定的每种复合物与MNT-1细胞在指定浓度温育48小时,并且通过实时RT-PCR测定酪氨酸酶mRNA表达。

[0024] 图12示出用示例性asiRNA和lasiRNA处理MNT-1细胞的效果。图片(a)描绘了用示例性asiRNA、lasiRNA或对照处理72小时之后,由MNT-1细胞酪氨酸酶表达的免疫印迹产生的结果。图片(b)描绘了用示例性asiRNA、lasiRNA或对照处理72小时之后MNT-1细胞的黑色素含量(NT=未处理)。

[0025] 图13提供了人酪氨酸酶mRNA序列。

[0026] 图14示出示例性cp-asiRNA在重建的皮肤模型中的黑色素合成的抑制。图片(a)描绘了用于研究的实验方案,其中cp-MEL-300-B样品每天在培养基中用asiTYR#4-1处理13天(13次)。图片(b)示出未处理对照样品(NT)、cp-asiTYR#4-1处理的样品和曲酸处理的样品中黑素细胞的光学显微镜分析。图片(c)示出在未处理对照样品(NT)、cp-asiTYR#4-1处理的样品和曲酸处理的样品中用于黑色素分析的Fontana-Massons染色。图片(d)示出如使用实时PCR测量的第14天的酪氨酸酶mRNA水平。图片(e)示出如通过免疫印迹测量的在第14天的酪氨酸酶蛋白质水平。图片(f)示出如使用黑色素含量测试测量的第14天样品的黑色素含量。

具体实施方式

[0027] 综述

[0028] 在某些方面,本文提供不对称RNA复合物(例如,asiRNA或lasiRNA),所述不对称RNA复合物抑制酪氨酸酶表达,并且因此对于减少黑色素生成和与过度黑色素生成有关的色素沉着相关紊乱(如黑斑病和老年斑)的治疗是有用的。在一些实施方案中,RNA复合物被化学修饰以能够在不需要转染运载体的情况下穿透细胞。在一些实施方案中,RNA复合物为表1、表2、表4、表5和表6中列出的RNA复合物。在某些方面,本文提供包括这样的RNA复合物的药物组合物,和使用这样的RNA复合物和药物组合物的方法。

[0029] 酪氨酸酶是在黑色素合成中起关键作用的蛋白质。各种靶向酪氨酸酶的小分子抑制剂(包含氢醌、视黄酸和曲酸)已经被用作皮肤美白产品的活性成分。然而,这样的治疗常常是无效的,并且常常引起严重的副作用(如瘙痒和皮肤褐变)。

[0030] 在某些实施方案中,与目前用于皮肤美白的常规小分子相比,本文提供的RNA复合物具有减少的副作用的风险。如本文所描述的,本文提供的示例性RNA复合物具有显著的酪氨酸酶抑制效果,甚至在低于目前的皮肤美白剂1000倍的浓度下。因此,本文提供的RNA复合物可以代替或补充目前可用的用于改善的皮肤美白效果的小分子产品。

[0031] 在一些实施方案中,本文所描述的RNA复合物是asiRNA或lasiRNA。如本文所使用的,术语asiRNA指双链不对称短干扰RNA分子,所述双链不对称短干扰RNA分子具有19-21nt的反义链和13-17nt的有义链。asiRNA上的附加的信息可以在美国专利公开号2012/0238017和Chang et al., Mol. Ther. 17:725-732 (2009) 中找到,其中的每个以引用的方式被整体并入本文。如本文所使用的,术语lasiRNA指双链长不对称干扰RNA分子,所述双链长不对称干扰RNA分子具有13-21nt的有义链和大于24nt的反义链。lasiRNA上的附加的信息可以在美国专利公开号2013/0273657中找到,其以引用的方式被整体并入本文。

[0032] 在一些实施方案中,本文所描述的RNA复合物使用递送运载体(如脂质体、阳离子聚合物、细胞穿透肽(CPP)、蛋白质转导域(PTD)、抗体和/或适配体)被递送至细胞。在一些实施方案中,本文所描述的RNA复合物被化学修饰以便不需要使用这样的递送运载体介导细胞中的酪氨酸酶抑制。这样的RNA复合物在本文中被称为细胞穿透asiRNA(cp-asiRNA)或细胞穿透lasiRNA(cp-lasiRNA)。

[0033] 定义

[0034] 为了方便起见,此处收集了说明书、实施例和所附权利要求中采用的某些术语。

[0035] 本文中使用的冠词“一(a)”和“一(an)”指代所述冠词的一个或多个(即,至少一个)语法对象。举例来说,“一个要素”意指一个元素或多个元素。

[0036] 如本文所使用的,术语“施用”意指向受试者提供药剂或药物组合物,并且包含,但不限于由医疗技术人员施用和自我施用。

[0037] 如本文所使用的,术语“干扰核酸”、“抑制核酸”可互换地被使用。干扰核酸通常包含环状亚基的序列,每个具有碱基配对部分,通过亚基间连锁连接,所述亚基间连锁允许碱基配对部分与核酸(通常RNA)中的靶标序列通过Watson-Crick碱基配对杂交,以形成核酸:靶标序列内的寡聚体异源双链体。干扰RNA分子包含,但不限于,反义分子、siRNA分子、asiRNA分子、lasiRNA分子、单链siRNA分子、miRNA分子和shRNA分子。这样的干扰核酸可以被设计以阻断或抑制mRNA的翻译或抑制天然前体mRNA拼接加工,或诱导被靶向的mRNA的降解,并且可以被称作“被指向”或“被靶向针对”靶标序列,所述干扰核酸与所述靶标序列杂交。干扰核酸可以包含,例如,肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)、2'-O-甲基寡核苷酸和RNA干扰剂(siRNA剂)。RNAi分子通常通过与靶标分子形成异源双链体起作用,所述靶标分子被选择性地降解或“解体”,由此使靶标RNA失活。在一些情况下,干扰RNA分子也可以通过抑制转录本翻译和/或抑制转录本的转录使靶标转录本失活。当干扰核酸以上文所描述的方式靶向针对靶标的核酸时,干扰核酸更普遍地被称作“被靶向针对”生物学相关的靶标(如蛋白质)。

[0038] 术语“多核苷酸”和“核酸”可互换地被使用。它们是指核苷酸的聚合体形式,不论以任何组合和任何长度的脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸可以具有任何三维结构,并且可以执行任何功能。以下是多核苷酸的非限制性实施例:基因或基因片段的编码或非编码区、由连锁分析确定的基因座(loci)(基因座(locus))、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、核糖酶、cDNA、重组多核苷酸、支化多核苷酸、质粒、载体(vector)、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包括经修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在的话,对核苷酸结构的修饰可以在组装聚合物之前或之后被赋予。多核苷酸可以被进一步修饰,如通过与标记组件偶联。在本文提供的全部核酸序列中,U核苷酸与T核苷酸是可互换的。

[0039] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的载体”意指药学上可接受的材料、组合物或运载体,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂封装材料。

[0040] 如果寡聚体在生理条件下与靶标杂交,则寡核苷酸与靶标多核苷酸“特异性杂交”,并且 T_m 大幅度大于 45°C ,或至少 50°C ,或至少 60°C - 80°C 或更高。这样的杂交符合严格的杂交条件。在给定的离子强度和pH, T_m 是温度,在所述温度下,50%对的靶标序列与互补多核苷酸杂交。此外,这样的杂交可以以反义寡聚物与靶标序列的“近似的”或“大体上的”互补性以及精确的互补性发生。

[0041] 如本文所使用的,术语“受试者”意为选择用于治疗或疗法的人或非人动物。

[0042] 如本文所使用的,短语“治疗有效的量”和“有效量”意为对以适用于任何医疗的合理的益处/风险比率在受试者中的至少亚群体的细胞中产生期望的治疗效果是有效的药剂的量。

[0043] “治疗”受试者中的疾病或“治疗”患有疾病的受试者指使受试者经受药物治疗(例如,药物的施用),使得疾病的至少一种症状被减轻或防止恶化。

[0044] RNA复合物

[0045] 在某些方面,本文提供RNA复合物,所述RNA复合物靶向酪氨酸酶mRNA并且抑制细胞酪氨酸酶表达。酪氨酸酶是一种氧化酶,所述氧化酶是用于控制黑色素的合成的限速酶。人酪氨酸酶mRNA的核酸序列在NCBI登录号NM_000372处可获得,并且在图13中提供。

[0046] 在某些方面,本文提供一种包括反义链和有义链的RNA复合物,所述反义链具有与酪氨酸酶mRNA序列(例如,人酪氨酸酶mRNA序列)的序列互补性,所述有义链具有与所述反义链的序列互补性。在一些实施方案中,RNA复合物能够抑制细胞(例如,黑素细胞)酪氨酸酶表达。在某些实施方案中,RNA复合物能够抑制细胞(例如,黑素细胞)黑色素生成。在一些实施方案中,RNA复合物是不对称短干扰RNA(asRNA)。在一些实施方案中,RNA复合物是长不对称短干扰RNA(lasRNA)。在一些实施方案中,RNA复合物是表1、表2、表4、表5和表6中列出的RNA复合物。本文所描述的RNA复合物可以含有RNA碱基、非RNA碱基或RNA碱基个非RNA碱基的混合物。例如,本文提供的某些RNA复合物可以主要由RNA碱基组成,但是也含有DNA碱基或非天然存在的核苷酸。

[0047] 在一些实施方案中,反义链的长度为至少19个核苷酸(nt)。在一些实施方案中,反义链的长度为19至21nt(即,长度为19、20或21nt)。在一些实施方案中,反义链的至少13、14、15、16、17、18、19、20或21nt与酪氨酸酶mRNA序列互补。完美的互补性不是必需的。在一些实施方案中,反义链与酪氨酸酶mRNA序列完美地互补。

[0048] 在一些实施方案中,反义链的长度为至少24nt(例如,至少25nt的长度、至少26nt的长度、至少27nt的长度、至少28nt的长度、至少29nt的长度、至少30nt的长度或至少31nt的长度)。在一些实施方案中,反义链的长度不大于124nt(例如,不大于100nt的长度、不大于90nt的长度、不大于80nt的长度、不大于70nt的长度、不大于60nt的长度、不大于50nt的长度或不大于40nt的长度)。在一些实施方案中,反义链的长度为31nt。在一些实施方案中,反义链的至少16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、29、29、30或31nt与酪氨酸酶mRNA序列互补。完美的互补性不是必需的。在一些实施方案中,反义链与酪氨酸酶mRNA序列完美地互补。

[0049] 在一些实施方案中,有义链的长度为15至17nt(即,15nt的长度、16nt的长度或

17nt的长度)。在一些实施方案中,有义链的至少15nt、至少16nt或至少17nt与反义链的序列互补。在一些实施方案中,有义链与反义链的序列完美地互补。

[0050] 在一些实施方案中,反义链和有义链形成复合物,其中所述反义链的5'端和所述有义链的3'端形成平端。在一些实施方案中,反义链和有义链形成复合物,其中所述反义链的5'端悬突于所述有义链的3'端(例如,通过1、2、3、4、或5nt)。在一些实施方案中,反义链和有义链形成复合物,其中所述有义链的5'端悬突于所述反义链的3'端(例如,通过1、2、3、4、或5nt)。

[0051] 在一些实施方案中,RNA复合物的反义链和/或有义链具有选自表1、表2、表4、表5和表6中列出的序列的有义链序列和/或反义链序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:1的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:2的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:3的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:4的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:5的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:6的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:7的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:8的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:9的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:10的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:11的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:12的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:13的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:14的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:15的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:16的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:17的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:18的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:19的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:20的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:21的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:22的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:23的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:24的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:25的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:26的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:27的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:28的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:29的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:30的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:31的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:32的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:33的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:34的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:35的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:36的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:37的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:38的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:39的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:40的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:41的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:42的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:43的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:44的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:45的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:46的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:47的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:48的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:49的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:50的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:51的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:2的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:53的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:54的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:55的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:56的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:57的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:58的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:59的序列,并且反

义链具有SEQ ID NO:60的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:61的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:62的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:63的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:64的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:65的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:66的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:67的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:68的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:69的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:70的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:71的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:72的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:73的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:74的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:75的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:76的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:77的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:78的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:79的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:80的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:81的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:82的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:83的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:84的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:85的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:86的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:87的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:88的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:89的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:90的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:91的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:92的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:93的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:94的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:95的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:96的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:97的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:98的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:99的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:100的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:101的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:102的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:103的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:104的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:105的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:106的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:107的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:108的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:109的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:110的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:111的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:112的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:113的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:114的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:115的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:116的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:117的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:118的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:119的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:120的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:121的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:122的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:123的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:124的序列。在一些实施方案中,有义链具有SEQ ID NO:125的序列,并且反义链具有SEQ ID NO:126的序列。

[0052] 在一些实施方案中,本文提供的RNA复合物包括化学修饰,其中所述修饰便利在不存在递送运载体的情况下穿透细胞膜。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基化核苷、硫代磷酸酯键或胆甾醇部分。在一些实施方案中,RNA复合物是表2或表4中列出的经修饰的RNA复合物。在某些实施方案中,RNA复合物不是细胞毒的。

[0053] 本文所描述的RNA复合物可以采用各种各样的寡核苷酸化学。寡核苷酸化学的实施例包含,但不限于,肽核酸(PNA)、联核酸(LNA)、硫代磷酸酯、2'-O-Me-修饰的寡核苷酸和吗啉代化学,包含前述中任何的组合。通常,相对于2'-O-Me寡核苷酸,由于PNA和LNA化学的相对高的靶标结合强度,其可以利用较短的靶标序列。硫代磷酸酯和2'-O-Me-修饰的化学经常被结合以产生2'-O-Me-修饰的寡核苷酸,所述2'-O-Me-修饰的寡核苷酸具有硫代磷酸酯主链。参见,例如,PCT公开号W0/2013/112053和W0/2009/008725,其中的每个以引用方式被整体并入本文。

[0054] 肽核酸(PNA)是DNA的类似物,其中主链与脱氧核糖主链在结构上是同形的,所述脱氧核糖主链由N-(2-氨基乙基)甘氨酸单元组成,嘧啶和嘌呤碱基被附连到所述N-(2-氨基乙基)甘氨酸单元。含有天然嘧啶和嘌呤碱基的PNA与遵从Watson-Crick碱基配对规则的互补寡核苷酸杂交,并且根据碱基对识别模拟DNA。PNA的主链由肽键而不是硫代磷酸酯键形成,使其非常适合反义应用(参见以下结构)。主链是不带电荷的,引起PNA/DNA或PNA/RNA双链体显示出大于正常的热稳定性。PNA不能被核酸酶或蛋白酶识别。

[0055] 尽管天然结构发生彻底的结构变化,但是PNA能够以螺旋形式序列特异性结合至DNA或RNA。PNA的特性包含对互补DNA或RNA的高的结合亲和力、由单碱基错配造成的失稳作用、对核酸酶和蛋白酶的抗性、不依赖于盐浓度与的DNA或RNA的杂交以及与同型嘌呤DNA形成三股螺旋。PANAGENE.TM已经开发了其专利的Bts PNA单体(Bts;苯并噻唑-2-磺酰基基团)和专利的寡聚工艺。使用Bts PNA单体的PNA寡聚由脱保护的重复循环、偶联和加帽组成。PNA可以使用任何本领域已知的技术被合成生产。参见,例如,美国专利号6,969,766、7,211,668、7,022,851、7,125,994、7,145,006和7,179,896。也参见用于PNA制备的美国专利号5,539,082;5,714,331;以及5,719,262。PNA化合物的进一步教导可以在Nielsen et al., Science, 254:1497-1500, 1991中找到。前述中的每个通过引用被整体并入本文。

[0056] 干扰核酸也可以含有“锁核酸”亚基(LNAs)。“LNAs”是被称为桥接核酸(BNA)的一类修饰的成员。BNA的特征在于共价键,所述共价键锁定了C3'-内(北)糖折叠中的核糖环的构象。对于LNA,桥由2'-O和4'-C位置之间的亚甲基组成。LNA增强主链预组织和碱基堆积以增加杂交和热稳定性。

[0057] LNA的结构可以在例如Wengel, et al., Chemical Communications (1998) 455; Tetrahedron (1998) 54:3607和Accounts of Chem. Research (1999) 32:301; Obika, et al., Tetrahedron Letters (1997) 38:8735; (1998) 39:5401以及Bioorganic Medicinal Chemistry (2008) 16:9230中找到。本文提供的化合物可以并入一种或更多种LNA;在一些情况下,化合物可以完全由LNA组成。用于个体LNA核苷亚基的合成及其并入寡核苷酸的方法在例如美国专利号7,572,582、7,569,575、7,084,125、7,060,809、7,053,207、7,034,133、6,794,499和6,670,461中被描述,其中的每个通过引用被整体并入本文。典型的亚基间连接体包含磷酸二酯和硫代磷酸酯部分;可替代地,可以采用不含磷的连接体。一个实施方案是含LNA化合物,其中每个LNA亚基被DNA亚基分开。某些化合物由交替的LNA和DNA亚基组成,其中亚基间连接体是硫代磷酸酯。

[0058] 在某些实施方案中, RNA复合物被连接至胆甾醇部分。在一些实施方案中,胆甾醇部分被附连至有义链的3'末端。在一些实施方案中,胆甾醇部分被附连至反义链的3'末端。在一些实施方案中,胆甾醇部分被附连至有义链的5'末端。在一些实施方案中,胆甾醇部分

被附连至反义链的5'末端。

[0059] 在一些实施方案中RNA复合物包括2'-O-甲基化核苷。2'-O-甲基化核苷在核糖分子的2'-OH残基处带有甲基。2'-O-Me-RNA显示出与RNA相同的(或类似的)行为,但被保护免受核酸酶降解。也可以将2'-O-Me-RNA与硫代磷酸寡核苷酸(PTOs)组合用于进一步稳定化。可以根据本领域的常规技术合成2'-O-Me-RNA(磷酸二酯或硫代磷酸)(参见,例如,Yoo et al.,Nucleic Acids Res.32:2008-16,2004,其以引用方式被并入本文)。

[0060] 在一些实施方案中,2'-O-甲基核苷被置于有义链的3'末端。在一些实施方案中,有义链的3'末端区包括多个2'-O-甲基化核苷(例如,3'末端的6个核苷内的2、3、4、5或6个2'-O-甲基化核苷)。在一些实施方案中,2'-O-甲基核苷被置于反义链的3'末端。在一些实施方案中,反义链的3'末端区包括多个2'-O-甲基化核苷(例如,3'末端的6个核苷内的2、3、4、5或6个2'-O-甲基化核苷)。在一些实施方案中,有义链的3'末端区和反义链的3'末端区两者都包括多个2'-O-甲基化核苷。在一些实施方案中,有义链包括2'-O-甲基化核苷,所述2'-O-甲基化核苷与未经修饰的核苷交替。在一些实施方案中,有义链包括2、3、4、5、6、7或8个2'-O-甲基化核苷的连续序列,所述2'-O-甲基化核苷与未经修饰的核苷交替。在一些实施方案中,反义链包括2'-O-甲基化核苷,所述2'-O-甲基化核苷与未经修饰的核苷交替。在一些实施方案中,反义链包括2、3、4、5、6、7或8个2'-O-甲基化核苷的连续序列,所述2'-O-甲基化核苷与未经修饰的核苷交替。

[0061] 在一些实施方案中,RNA复合物包括硫代磷酸酯键。“硫代磷酸酯”(或S-oligos)是正常DNA的变体,其中非桥接氧中的一个被硫代替。核苷酸间键的硫化减少核酸内切酶和核酸外切酶的活动,所述核酸内切酶和核酸外切酶包含5'至3'和3'至5' DNA POL 1核酸外切酶、核酸酶S1和P1、RNA酶、血清核酸酶和蛇毒磷酸二酯酶。硫代磷酸酯通过两个主要途径制备:通过二硫化碳中的元素硫的溶液对氢磷酸酯的作用,或通过用二硫化四乙基秋兰姆(TETD)或3H-1,2-苯并二硫醇-3-酮-1,1-二氧化物(BDTD)硫化亚磷酸三酯的方法(参见,例如,Iyer et al.,J.Org.Chem.55,4693-4699,1990)。后面的方法避免了元素硫在大多数有机溶剂中的不溶性和二硫化碳的毒性问题。TETD和BDTD方法也产生更高纯度的硫代磷酸酯。

[0062] 在一些实施方案中,RNA复合物的有义链中的核糖核苷酸之间的键的至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%为硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,RNA复合物的有义链中的核糖核苷酸之间的全部键为硫代磷酸酯键。

[0063] 在一些实施方案中,RNA复合物的反义链中的核糖核苷酸之间的键的至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%为硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,RNA复合物的反义链中的核糖核苷酸之间的全部键为硫代磷酸酯键。

[0064] 可以将本文所描述的RNA复合物与细胞接触或者施用至有机体(例如,人)。可替代地,可以将编码RNA复合物的构建体和/或载体(vector)与细胞或有机体接触或引入细胞或有机体。在某些实施方案中,使用病毒、逆转录病毒或慢病毒载体(vector)。

[0065] 本文所描述的RNA复合物可以通过本领域中已知的任何合适的方法制备。例如,在一些实施方案中,本文所描述的RNA复合物通过化学合成或体外转录被制备。

[0066] 药物组合物

[0067] 在某些方面,本文提供一种药物组合物,所述药物组合物包括本文提供的RNA复合物和药学上可接受的载体。在某些实施方案中,药物组合物被配制用于局部递送。在一些实施方案中,药物组合物是乳膏或洗液。在一些实施方案中,药物组合物还包括第二皮肤提亮剂(例如,氢醌、熊果苷、维甲酸、曲酸、杜鹃花酸或氨甲环酸)。在某些实施方案中,药物组合物不包括转染运载体。在一些实施方案中,药物组合物包括递送运载体(例如,脂质体、阳离子聚合物、细胞穿透肽(CPP)、蛋白质转导域(PTD)、抗体和/或适配体)。在一些实施方案中,组合物包含本文所描述的多种(例如,两种或更多种)RNA复合物的组合。

[0068] 如下文详细描述,本文公开的药物组合物可以被特别配制用于以固体或液体形式施用,所述固体或液体形式包含适合于局部施用的那些(例如,作为乳膏或洗液)。

[0069] 制备这些剂型或组合物的方法包含使本文所描述的RNA复合物与载体以及,可选地,一种或更多种辅助成分结合的步骤。通常,剂型通过使本文所描述的药剂与液体载体均匀地且紧密地结合来制备。

[0070] 本文所描述的药物组合物可以以任何美容方面和/或皮肤病学适合的形式(例如,乳剂、乳膏、摩丝、凝胶、泡沫、洗液、面罩、软膏、香膏、溶液、浆液、喷雾、棒状物、贴剂或湿纸巾)被提供。例如,用于局部施用的药物组合物可以或多或少是液体,并且具有白色或有色乳膏、软膏、乳、洗液、浆液、糊剂、摩丝或凝胶的外观。在适当的情况下,其可以以气雾剂的形式应用于皮肤。其也可以以固体形式存在,并且例如以棒状物的形式存在。其可以用作护理产品和/或皮肤化妆品。

[0071] 在一些实施方案中,除RNA复合物之外,本文所描述的药物组合物可以含有至少一种选自以下的化合物:氢醌、熊果苷、维甲酸、杜鹃花酸、氨甲环酸、 α -羟基酸;水杨酸及其衍生物(如n-辛酰基-5-水杨酸);HEPES;丙半胱氨酸;0-辛酰基-6-D-麦芽糖;甲基甘氨酸二乙酸的二钠盐;神经酰胺;类固醇(如薯蓣皂苷元薯蓣皂苷配基和DHEA的衍生物);曲酸;N-乙氧基羰基-4-对氨基苯酚;抗坏血酸及其衍生物;覆盆子提取物;类维生素A以及,特别是视黄醇及其酯类;多肽及其酰化衍生物;植物激素;酵母酿酒酵母的提取物;藻提取物;线状透明颤菌的提取物;大豆的提取物、羽扇豆;玉米和/或豌豆;阿尔维林及其盐,特别是枸橼酸阿尔维林;白藜芦醇;类胡萝卜素以及,特别是番茄红素;生育酚及其酯类;辅酶Q10或泛醌;黄嘌呤以及,特别是咖啡因和含有咖啡因的天然提取物;假叶树和马栗的提取物;及其混合物。

[0072] 在一些实施方案中,本文所描述的药物组合物可以含有至少一种UVA和/或UVB滤料(filter)。遮光滤料可以选自有机滤料和无机滤料及其组合。

[0073] 阻断UV-A和/或UV-B的传播的有机滤料的实施例包含:对氨基苯甲酸的衍生物(例如,PABA、乙基PABA、乙基二羟基丙基PABA、辛基二甲基PABA、甘油基PABA、PEG-25PABA)、水杨酸衍生物(例如,胡莫柳酯、水杨酸异辛酯、水杨酸二丙二醇酯、TEA水杨酸酯)、二苯甲酰基甲烷的衍生物(例如,丁基甲氧基二苯甲酰基甲烷、异丙基二苯甲酰基甲烷)、肉桂酸衍生物(例如,甲氧基肉桂酸乙基己酯、甲氧基肉桂酸异丙酯、甲氧基肉桂酸异戊酯、西诺沙酯、甲氧基肉桂酸DEA盐、二异丙基肉桂酸甲酯、甘油乙基己酸酯二甲氧基肉桂酸酯)、 β , β' -二苯基丙烯酸的衍生物(例如,奥克立林、依托立林)、苯甲酮的衍生物(例如,苯甲酮-1、苯甲酮-2、苯甲酮-3或氧苯酮、苯甲酮-4、苯甲酮-5、苯甲酮-6、苯甲酮-8、苯甲酮-9和苯甲酮-12)、亚苄基樟脑的衍生物(例如,3-亚苄基樟脑、4-甲基亚苄基樟脑、亚苄基樟脑磺酸、樟脑

苯扎铵甲基硫酸盐、对苯二亚甲基二樟脑磺酸和聚丙烯酰胺甲基亚苄基樟脑)、苯基苯并咪唑的衍生物(例如,苯基苯并咪唑磺酸和苯并咪唑盐)、三嗪的衍生物(例如,双-乙基己氧苯酚甲氧苯基三嗪、乙基己基三嗪酮和二乙基己基丁酰胺基三嗪酮)、苯基苯并三唑的衍生物(例如,甲酚曲唑三硅氧烷)、邻氨基苯甲酸衍生物(邻氨基苯甲酸甲酯)、咪唑啉衍生物(例如,乙基己基二甲氧基-苯亚甲基二氧代咪唑啉丙酸盐)、亚苄基丙二酸的衍生物(聚硅氧烷)及其组合。

[0074] 阻断UV-A和/或UV-B的传播的无机滤料的实施例包含:或未涂覆的金属氧化物纳米色素(主要颗粒的平均尺寸:通常,从5nm至100nm,优选地从10nm至50nm),如氧化钛的(无定形或以金红石和/或锐钛矿形式结晶)、氧化铁的、氧化锌的、氧化锆的或氧化铈的纳米色素。此外,涂层剂是氧化铝和/或硬脂酸铝。

[0075] 在某些实施方案中,本文所描述的药物组合物也含有其他化妆品和皮肤病学成分,如亲水胶凝剂或亲脂胶凝剂、防腐剂、抗氧化剂、溶剂、表面活性剂、增稠剂、香料、填充剂、色素、气味吸收剂和着色物质。

[0076] 在某些实施方案中,本文所描述的药物组合物也含有油。可以被包含在本文中描述的药物组合物中的油的实施例包含:动物来源的含烃油(例如,鲨烷),植物来源的含烃油(例如,液体脂肪酸甘油三酯,所述液体脂肪酸甘油三酯包括4至10个碳原子和牛油果油的液体级分),脂肪酸的合成酯和醚(例如,式 R^1COOR^2 和 R^1OR^2 的油,其中 R^1 代表包括8至29个碳原子的脂肪酸的残基,并且 R^2 代表含有从3至30个碳原子的支化的或未支化的烃链,如鸭子尾脂腺油、蚕丝油、肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸辛酯、辛基-2-十二烷醇硬脂酸酯、辛基-2-十二烷醇芥酸酯和异硬脂醇异硬脂酸酯);羟基化酯(如乳酸异硬脂酸酯、羟基硬脂酸辛酯、辛基十二醇羟基硬脂酸酯、二异硬脂醇苹果酸酯、三异鲸蜡醇柠檬酸酯和脂肪醇的庚酸酯、辛酸酯和癸酸酯);多元醇酯(如丙二醇二辛酸酯、新戊二醇二庚酸酯和二甘醇二异壬酸酯);以及季戊四醇酯(如季戊四醇四异硬脂酸酯),线性的或支化的矿物或合成来源的烃(例如,挥发性或非挥发性石蜡油及其衍生物、矿脂、聚癸烯和氢化聚异丁烯(角鲨烷油)),具有从8至26个碳原子的脂肪醇(例如,鲸蜡醇和硬脂醇及其混合物、辛基十二烷醇、2-丁基辛醇、2-己基癸醇、2-十一烷基十五烷醇、油醇或亚油酸醇),部分含烃和/或硅氟化油、硅油(例如,挥发性或非挥发性聚甲基硅氧烷(PDMS),所述聚甲基硅氧烷具有线性或环状硅链且在环境温度下为液体或糊状,特别是环状二甲基聚硅氧烷(环聚二甲基硅氧烷)(如环己硅氧烷));聚二甲基硅氧烷,所述聚二甲基硅氧烷包括烷基、烷氧基或苯基基团,所述烷基、烷氧基或苯基基团是侧链或在硅链的端,其中所述基团具有从2至24个碳原子;苯基化硅(如双苯基六甲基硅氧烷、苯基聚二甲基硅氧烷、苯基三甲基甲硅烷氧基二苯基硅氧烷、二苯基聚二甲基硅氧烷、二苯基甲基二苯基三硅氧烷、2-苯乙基三甲基甲硅烷氧基硅酸酯和聚苯基甲基硅氧烷),及其组合。

[0077] 可以被包含在本文所描述的药物组合物中的乳化剂和共乳化剂的实施例包含O/W乳化剂(如脂肪酸和聚乙二醇的酯(特别是PEG-100硬脂酸酯),以及脂肪酸和甘油的酯(如甘油硬脂酸酯)),以及W/O乳化剂(如氧乙烯化聚(甲基鲸蜡基)(二甲基)-甲基硅氧烷或乙二醇乙酰基硬脂酸酯和甘油三硬脂酸酯的混合物)。

[0078] 可以被包含在本文所描述的药物组合物中的亲水胶凝剂包含羧乙烯基聚合物(卡波姆)、丙烯酸聚合物(如丙烯酸酯/丙烯酸烷基酯共聚物、聚丙烯酰胺、多糖、天然树胶和黏

土),而可以提及的亲脂胶凝剂是改性黏土(如膨润土、脂肪酸的金属盐、疏水二氧化硅和聚乙烯)。

[0079] 可以被包含在本文所描述的药物组合物中的填充剂的实施例包含色素、硅粉、滑石粉、与辛烯基琥珀酸酐交联的淀粉、聚酰胺颗粒、聚乙烯粉末、基于丙烯酸共聚物的微球、膨化粉(如中空微球、硅树脂微珠)及其组合。

[0080] 在某些实施方案中,在具有或不具有合适的透皮吸收促进剂的情况下,本文所描述的药物组合物被配制用于透皮模式的递送(如贴剂等等)。相应地,将组合物或剂型(经常具有透皮吸收促进剂组合物)递送至皮肤的透皮手段是本领域已知和描述的透皮贴剂或类似装置。美国专利号5,146,846、5,223,262、4,820,724、4,379,454和4,956,171中公开了这样的装置的实施例,其中的每个以引用方式被并入本文。在一些实施方案中,本文所描述的组合物通过微针贴剂被递送。美国专利号5,697,901、6,503,231、6,611,707、6,660,987、8,162,901、8,696,637和8,784,363描述了示例性的微针贴剂,其中的每个以引用方式被并入本文。

[0081] 治疗方法

[0082] 在某些方面,本文提供一种抑制细胞(例如,黑素细胞)酪氨酸酶表达的方法,所述方法包括使细胞与本文提供的RNA复合物接触。在一些实施方案中,RNA复合物是经修饰的RNA复合物,并且细胞在不存在转染运载体的情况下与RNA复合物接触。在一些实施方案中,细胞在存在递送运载体(例如,脂质体、阳离子聚合物、细胞穿透肽(CPP)、蛋白质转导域(PTD)、抗体和/或适配体)的情况下与RNA复合物接触。在一些实施方案中,细胞存在于人受试者的皮肤中。在一些实施方案中,受试者具有与过度黑色素生成有关的皮肤色素沉着紊乱(例如,黑斑病或老年斑)。在一些实施方案中,受试者是雌性。在一些实施方案中,受试者是怀孕的或正在服用口服避孕药或贴剂避孕药或正在经受激素替代疗法。

[0083] 在某些方面,本文提供一种抑制细胞(例如,黑素细胞)黑色素生成的方法,所述方法包括使细胞与本文提供的RNA复合物接触。在一些实施方案中,RNA复合物是经修饰的RNA复合物,并且细胞在不存在转染运载体的情况下与RNA复合物接触。在一些实施方案中,细胞在存在递送运载体(例如,脂质体、阳离子聚合物、细胞穿透肽(CPP)、蛋白质转导域(PTD)、抗体和/或适配体)的情况下与RNA复合物接触。在一些实施方案中,细胞存在于人受试者的皮肤中。在一些实施方案中,受试者具有与过度黑色素生成有关的皮肤色素沉着紊乱(例如,黑斑病或老年斑)。在一些实施方案中,受试者是雌性。在一些实施方案中,受试者是怀孕的或正在服用口服避孕药或贴剂避孕药或正在经受激素替代疗法。

[0084] 在某些方面,本文提供一种抑制人受试者的皮肤中的黑色素生成的方法,所述方法包括向受试者施用本文提供的RNA复合物或药物组合物。在一些实施方案中,受试者具有与过度黑色素生成有关的皮肤色素沉着紊乱(例如,黑斑病或老年斑)。在一些实施方案中,受试者是雌性。在一些实施方案中,受试者是怀孕的或正在服用口服避孕药或贴剂避孕药或正在经受激素替代疗法。在一些实施方案中,RNA复合物或药物组合物被局部施用至受试者的皮肤。在一些实施方案中,RNA复合物或药物组合物由受试者自我施用。在一些实施方案中,方法还包括向受试者施用第二皮肤提亮剂(例如,氢醌、熊果苷、维甲酸、曲酸、杜鹃花酸或氨甲环酸)。

[0085] 在某些方面,本文提供一种治疗人受试者的与过度黑色素生成有关的皮肤色素沉着紊乱(例如,黑斑病或老年斑)的方法,所述方法包括向受试者施用本文提供的RNA复合物

或药物组合物。在一些实施方案中,受试者是雌性。在一些实施方案中,受试者是怀孕的或正在服用口服避孕药或贴剂避孕药或正在经受激素替代疗法。在一些实施方案中,RNA复合物或药物组合物被局部施用至受试者的皮肤。在一些实施方案中,RNA复合物或药物组合物由受试者自我施用。在一些实施方案中,方法还包括向受试者施用第二皮肤提亮剂(例如,氢醌、熊果苷、维甲酸、曲酸、杜鹃花酸或氨甲环酸)。

[0086] 在本发明的方法中,本文所描述的RNA复合物可以被施用至受试者,例如,作为无递送运载体情况下的核酸(例如,对于cp-asiRNA和cp-lasiRNA)、与递送试剂组合、和/或作为包括表达本文所描述的RNA复合物的序列的核酸。在一些实施方案中,任何本领域已知的核酸递送方法可以被用于本文所描述的方法中。合适的递送试剂包含,但不限于,例如,Mirus Transit TK0亲脂性试剂;转化脂(lipofectin);阳离子脂质体(lipofectamine);细胞转染剂(cellfectin);聚阳离子(例如,聚赖氨酸)、缺端胶原、nanoplexe和脂质体。Minakuchi et al.Nucleic Acids Res.,32(13):e109(2004);Hanai et al.Ann NY Acad Sci.,1082:9-17(2006);和Kawata et al.Mol Cancer Ther.,7(9):2904-12(2008)中描述了将缺端胶原用作核酸分子的递送运载体,其中的每个被整体并入本文。美国专利号8,283,461、8,313,772、8,501,930、8,426,554、8,268,798和8,324,366中提供了示例性的干扰核酸递送系统,其中的每个以引用方式被整体并入本文。

[0087] 在本文所描述方法的一些实施方案中,脂质体被用于将本文所描述的RNA复合物递送至受试者。适用于本文所描述的方法的脂质体可以由标准囊泡形成脂类形成,所述标准囊泡形成脂类通常包含中性的或带负电的磷脂和甾醇(如胆甾醇)。通常由考虑因素(如期望的脂质体尺寸和脂质体在血流中的半衰期)来指导脂类的选择。已知用于制备脂质体的各种各样的方法,例如,如Szoka et al.(1980),Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9:467;和美国专利号4,235,871、4,501,728、4,837,028和5,019,369中所描述的,其的全部公开内容通过引用被并入本文。

[0088] 用于本发明方法的脂质体也可以被修饰以便避免被单核巨噬细胞系统(“MMS”)和网状内皮系统(“RES”)清除。这样的经修饰的脂质体具有表面上或被并入到脂质体结构中的调理素作用抑制部分。

[0089] 用于制备本文所描述的脂质体的调理素作用抑制部分通常是被结合至脂质体膜的大亲水性聚合物。如本文所使用的,当调理素作用抑制部分以化学方法或以物理方法被附连至膜(例如,通过将脂溶性锚定物嵌入膜自身,或通过直接结合至膜脂的活性基团)时,调理素作用抑制部分被“结合”至脂质体膜。这些调理素作用抑制亲水性聚合物形成保护表面层,所述保护表面层通过MMS和RES显著降低脂质体的摄取;例如,如美国专利号4,920,016中所描述的,其全部公开内容通过引用被并入本文。

[0090] 在一些实施方案中,适于修饰脂质体的调理素作用抑制部分是水溶性聚合物,所述水溶性聚合物具有从约500至约40,000道尔顿,或从约2,000至约20,000道尔顿的数均分子量。这样的聚合物包含聚乙二醇(PEG)或聚丙二醇(PPG)衍生物;例如,甲氧基PEG或PPG,以及PEG或PPG硬脂酸酯;合成聚合物(如聚丙烯酰胺或聚N-乙烯基吡咯烷酮);线性的、支化的或树枝状的聚酰胺;聚丙烯酸;多元醇(例如,聚乙烯醇和聚木糖醇,羧基基团或氨基基团以化学方法被连接至聚乙烯醇和聚木糖醇),以及神经节苷脂(如神经节苷脂GM1)。PEG、甲氧基PEG或甲氧基PPG或其衍生物的共聚物也是合适的。此外,调理素作用抑制聚合物可以

是PEG和聚氨基酸、多糖、聚酰胺胺、聚乙烯胺或多核苷酸的嵌段共聚物。调理素作用抑制聚合物也可以是含有氨基酸或羧酸的天然多糖,例如,半乳糖醛酸、葡糖醛酸、甘露糖醛酸、透明质酸、果胶酸、神经氨酸、藻酸、角叉菜胶;胺化多糖或寡糖(线性的或支化的);或羧基化多糖或寡糖,例如,与碳酸的衍生物反应,生成羧基基团连接。在一些实施方案中,调理素作用抑制部分是PEG、PPG或其衍生物。用PEG或PEG-衍生物修饰的脂质体有时称为“PEG化脂质体”。

[0091] 本文公开的药物组合物可以通过任何合适的施用途径被递送,所述施用途径包含局部、口服和肠胃外。在某些实施方案中,药物组合物通常被递送(例如,经由口服或肠胃外施用)。在某些其他实施方案中,药物组合物通过直接施用至皮肤被局部递送。

[0092] 药物组合物中RNA复合物的实际剂量水平可以变化,以便获得RNA复合物的量,所述RNA复合物的量对实现对特定患者、组合物和施用模式的期望的治疗响应是有效的,而对患者没有毒性。

[0093] 所选择的剂量水平将取决于各种各样的因素,所述因素包含所采用的特定药剂的活性、施用途径、施用时间,正在被采用的特定化合物的排泄或代谢的速率、治疗的持续时间、与所采用的特定化合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、正在被治疗的患者的年龄、性别、体重、病情、总体健康状况和先前的病史,以及医学领域中众所周知的类似因素。

[0094] 具有本领域普通技术的医师可以容易地确定和开出所需要的药物组合物的有效量。例如,医师或兽医可以以低于所需的水平开出和/或施用药物组合物中采用的药剂的剂量,以实现期望的治疗效果并且逐渐增加剂量,直到实现期望的效果。类似地,个体用户可以应用不断增加量的组合物,直到实现期望的美白水平。

[0095] 通常,本文所描述的RNA复合物的合适的日剂量将是有效产生治疗效果的最低剂量的RNA复合物的量。这样的有效剂量将通常取决于上述因素。

[0096] 范例

[0097] 实施例1:筛选酪氨酸酶特异性不对称小干扰RNA

[0098] 为了高效地鉴定抑制酪氨酸酶的不对称小干扰RNA(asiRNA),合成并且筛选了62种asiRNA。筛选的asiRNA的核酸序列提供在表1中。

[0099] 表1:示例性酪氨酸酶-靶向asiRNA的核酸序列

[0100]

| SEQ ID NO.: | 序列 |
|-------------|--------------------------------------|
| 1 | asiTYR(1)S : CAGGGCUUGUGAGCUU |
| 2 | asiTYR(1)AS : AAGCUCACAAGCCCUGCCAGC |
| 3 | asiTYR(2)S : AUAGAGUAGGGCCAAA |
| 4 | asiTYR(2)AS : UUUGGCCCUCACUCUAUUGCCU |
| 5 | asiTYR(3)S : GAAAUCCAGAAGCUGA |
| 6 | asiTYR(3)AS : UCAGCUUCUGGAUUUCUUGUU |
| 7 | asiTYR(4)S : GCUGACAGGAGAUGAA |
| 8 | asiTYR(4)AS : UUCAUCUCCUGUCAGCUUCUG |
| 9 | asiTYR(5)S : AACAAGAAAUCCAGAA |
| 10 | asiTYR(5)AS : UUCUGGAUUUCUUGUUCCAC |
| 11 | asiTYR(6)S : GAUUGGAGGAGUACAA |

[0101]

| | |
|----|--|
| 12 | asiTYR(6)AS : UUGUACUCCUCCAAUCGGCUA |
| 13 | asiTYR(7)S : ACAAGCGAGUCGGAUC |
| 14 | asiTYR(7)AS : GAUCCGACUCGCUUGUCCAA |
| 15 | asiTYR(8)S : GCCGAUUGGAGGAGUA |
| 16 | asiTYR(8)AS : UACUCCUCCAAUCGGCUACUA |
| 17 | asiTYR(9)S : UGAAGCACCAGCUUUU |
| 18 | asiTYR(9)AS : AAAAGCUGGUGCUUCAUGGGC |
| 19 | asiTYR(10)S : AAUGAAAAAUGGAUCA |
| 20 | asiTYR(10)AS : UGAUCCAUUUUUCAUUUGGCC |
| 21 | asiTYR(11)S : ACAAGAAAUCCAGAAG |
| 22 | asiTYR(11)AS : CUUCUGGAUUUCUUGUCCCA |
| 23 | asiTYR(12)S : CCGAUUGGAGGAGUAC |
| 24 | asiTYR(12)AS : GUACUCCUCCAAUCGGCUACA |
| 25 | asiTYR(13)S : CAGCUGAUGUAGAAUU |
| 26 | asiTYR(13)AS : AAUUCUACAUCAGCUGAAGAG |
| 27 | asiTYR(14)S : CUGGCGGGAUGCAGAA |
| 28 | asiTYR(14)AS : UUCUGCAUCCCGCCAGUCCCA |
| 29 | asiTYR(15)S : AGGAGUACAACAGCCA |
| 30 | asiTYR(15)AS : UGGCUGUUGUACUCCUCCAAU |
| 31 | asiTYR(16)S : GCUAUGACUAUAGCUA |
| 32 | asiTYR(16)AS : UAGCUAUAGUCAUAGCCCAGA |
| 33 | asiTYR(17)S : CCCAUGUUUAACGACA |
| 34 | asiTYR(17)AS : UGUCGUUAAACAUGGGUGUUG |
| 35 | asiTYR(18)S : UAGACUCUUCUUGUUG |
| 36 | asiTYR(18)AS : CAACAAGAAGAGUCUAUGCCA |
| 37 | asiTYR(19)S : CUGUGGAGUUUCCAGA |
| 38 | asiTYR(19)AS : UCUGGAAACUCCACAGCAGGC |
| 39 | asiTYR(20)S : CAGGCAGAGGUUCCUG |
| 40 | asiTYR(20)AS : CAGGAACCUCUGCCUGAAAGC |
| 41 | asiTYR(21)S : GGACCUGCCAGUGCUC |
| 42 | asiTYR(21)AS : GAGCACUGGCAGGUCCUAUUA |
| 43 | asiTYR(22)S : UACUCAGCCCAGCAUC |
| 44 | asiTYR(22)AS : GAUGCUGGGCUGAGUAAGUUA |
| 45 | asiTYR(23) S : UCAGUCUUUAUGCAAU |
| 46 | asiTYR(23) AS : AUUGCAUAAAGACUGAUGGCU |
| 47 | asiTYR(24) S : ACAAGAUUCAGACCCA |
| 48 | asiTYR(24) AS : UGGGUCUGAAUCUUGUAGAUUA |
| 49 | asiTYR(25) S : CAAGCGAGUCGGAUCU |

[0102]

| | |
|----|--|
| 50 | asiTYR(25) AS : AGAUCCGACUCGCUUGUUCCA |
| 51 | asiTYR(26) S : UAAAAGGCUUAGGCAA |
| 52 | asiTYR(26) AS : UUGCCUAAGCCUUUUAUAAAU |
| 53 | asiTYR(27) S : CUAUAUGAAUGGAACA |
| 54 | asiTYR(27) AS : UGUUCCAUAUCAUAUAGAUGUG |
| 55 | asiTYR(28) S : AAGAUCUGGGCUAUGA |
| 56 | asiTYR(28) AS : UCAUAGCCCAGAUCUUUGGAU |
| 57 | asiTYR(29) S : GUCCAAUGCACCACUU |
| 58 | asiTYR(29) AS : AAGUGGUGCAUUGGACAGAAG |
| 59 | asiTYR(30) S : UCACAGGGGUGGAUGA |
| 60 | asiTYR(30) AS : UCAUCCACCCCUGUGAAGGGA |
| 61 | asiTYR(31) S : GGCCUUCGUCUUUA |
| 62 | asiTYR(31) AS : UAAAAGACGGAAGGCCACGAC |
| 63 | asiTYR(32) S : CUGCAAGUUUGGCUUU |
| 64 | asiTYR(32) AS : AAAGCCAAACUUGCAGUUUCC |
| 65 | asiTYR(33) S : CAGAGAAGGACAAAUU |
| 66 | asiTYR(33) AS : AAUUUGUCCUUCUCUGGGGCA |
| 67 | asiTYR(34) S : GCAUACCAUCAGCUCA |
| 68 | asiTYR(34) AS : UGAGCUGAUGGUAUGCUUUGC |
| 69 | asiTYR(35) S : UUGGGGGAUCUGAAAU |
| 70 | asiTYR(35) AS : AUUUCAGAUCCCCCAAGCAGU |
| 71 | asiTYR(36) S : UCAGCACCCACAAAU |
| 72 | asiTYR(36) AS : AUUUGUGGGGUGCUGACCUC |
| 73 | asiTYR(37) S : GCCCGAGGGACCUUA |
| 74 | asiTYR(37) AS : UAAAGGUCCUCGGGCGUUC |
| 75 | asiTYR(38) S : CCAUGUUUAACGACAU |
| 76 | asiTYR(38) AS : AUGUCGUAAACAUGGGUGUU |
| 77 | asiTYR(39) S : UGACAGGAGAUGAAAA |
| 78 | asiTYR(39) AS : UUUUCAUCUCCUGUCAGCUUC |
| 79 | asiTYR(40) S : CAACUUCAUGGGAUUC |
| 80 | asiTYR(40) AS : GAAUCCCAUGAAGUUGCCAGA |
| 81 | asiTYR(41) S : GUUCCUGUCAGAAUAU |
| 82 | asiTYR(41) AS : AUAUUCUGACAGGAACCUCUG |
| 83 | asiTYR(42) S : CCUAUGGCCAAAUGAA |
| 84 | asiTYR(42) AS : UUCAUUUGGCCAUAGGUCCCU |
| 85 | asiTYR(43) S : UUCCUGUCAGAAUAUC |
| 86 | asiTYR(43) AS : GAUAUUCUGACAGGAACCUCU |
| 87 | asiTYR(44) S : AGGUUCCUGUCAGAAU |

[0103]

| | |
|-----|---------------------------------------|
| 88 | asiTYR(44) AS : AUUCUGACAGGAACCUCUGCC |
| 89 | asiTYR(45) S : GGCAACUUCAUGGGAU |
| 90 | asiTYR(45) AS : AUCCCAUGAAGUUGCCAGAGC |
| 91 | asiTYR(46) S : AACUUCAUGGGAUUCA |
| 92 | asiTYR(46) AS : UGAAUCCCAUGAAGUUGCCAG |
| 93 | asiTYR(47) S : ACCUAUGGCCAAAUGA |
| 94 | asiTYR(47) AS : UCAUUUGGCCAUAGGUCCCUA |
| 95 | asiTYR(48) S : UAUGGCCAAAUGAAAA |
| 96 | asiTYR(48) AS : UUUUCAUUUGGCCAUAGGUCC |
| 97 | asiTYR(49) S : CUGACAGGAGAUGAAA |
| 98 | asiTYR(49) AS : UUUCAUCUCCUGUCAGCUUCU |
| 99 | asiTYR(50) S : AGCUGACAGGAGAUGA |
| 100 | asiTYR(50) AS : UCAUCUCCUGUCAGCUUCUGG |
| 101 | asiTYR(51) S : ACCCAUGUUUAACGAC |
| 102 | asiTYR(51) AS : GUCGUUAAACAUGGGUGUUGA |
| 103 | asiTYR(52) S : AACACCCAUGUUUAAAC |
| 104 | asiTYR(52) AS : GUUAAACAUGGGUGUUGAUCC |
| 105 | asiTYR(53) S : CAGUCUUUAUGCAAUG |
| 106 | asiTYR(53) AS : CAUUGCAUAAAGACUGAUGGC |
| 107 | asiTYR(54) S : AUCAGUCUUUAUGCAA |
| 108 | asiTYR(54) AS : UUGCAUAAAGACUGAUGGCUG |
| 109 | asiTYR(55) S : CUUGGUGAGAAGAAAC |
| 110 | asiTYR(55) AS : GUUUCUUCUCACCAAGAGUCG |
| 111 | asiTYR(56) S : CUGCCAACGAUCCUAU |
| 112 | asiTYR(56) AS : AUAGGAUCGUUGGCAGAUGCC |
| 113 | asiTYR(57) S : UCCUACAUGGUUCCU |
| 114 | asiTYR(57) AS : AAGGAACCAUGUAGGAUUGCC |
| 115 | asiTYR(58) S : CUUUGUCUGGAUGCAU |
| 116 | asiTYR(58) AS : AUGCAUCCAGACAAAGAGGUC |
| 117 | asiTYR(59) S : ACAUUUGCACAGAUGA |
| 118 | asiTYR(59) AS : UCAUCUGUGCAAUGUCACAC |
| 119 | asiTYR(60) S : GCGGAUGCCUCUCAA |
| 120 | asiTYR(60) AS : UUUGAGAGGCAUCCGCUAUCC |
| 121 | asiTYR(61) S : AACCGGGAUCCUACA |
| 122 | asiTYR(61) AS : UGUAGGAUUGCCGGUUAUGUC |
| 123 | asiTYR(62) S : GGACAUAAACCGGGAU |
| 124 | asiTYR(62) AS : AUUCCCGGUUAUGUCCAAUGG |

[0104] 将表1中列出的asiRNA在 $1 \times$ siRNA双链体缓冲液(STpharm)中在95℃温育2分钟, 并且在37℃温育1小时。经由凝胶电泳确认适当的链退火。对于筛选, 将 1.6×10^4 个A375细胞(ATCC)接种在24孔板中, 所述A375细胞已经在100mm细胞培养皿中的达尔伯克氏改良伊

格尔培养基 (Gibco) 被培养, 所述达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (Gibco) 含有10%胎牛血清 (Gibco) 和100 μ g/ml青霉素/链霉素。根据制造商的说明, 使用Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 用0.3nM的asiRNA转染A375细胞。

[0105] 转染24小时之后, 使用实时RTPCR测量转染的细胞中的酪氨酸酶mRNA水平。具体地, 根据制造商的说明, 使用Isol-RNA裂解试剂 (5PRIME) 提取总RNA, 然后使用大容量cDNA逆转录试剂盒 (Applied Biosystems), 将500ng提取的RNA用于cDNA合成。稀释合成的cDNA, 然后根据制造商的说明使用StepOne实时PCR系统 (Applied Biosystems) 进行定量实时PCR。使用power SYBR green PCR master Mix (Applied Biosystems) 检测酪氨酸酶基因的扩增。将GAPDH扩增为内部对照。使用以下引物序列:

[0106] 人GAPDH-正向5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3' (SEQ ID NO:125)

[0107] 人GAPDH-反向5'-GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG-3' (SEQ ID NO:126)

[0108] 人酪氨酸酶-正向:5'-GGA TCT GGT CAT GGC TCC TT-3' (SEQ ID NO:127)

[0109] 人酪氨酸酶-反向:5'-GTC AGG CTT TTT GGC CCT AC-3' (SEQ ID NO:128)

[0110] 图1中提供了62种asiRNA中每个的酪氨酸酶抑制水平。六种asiRNA序列asiTYR (4)、asiTYR (9)、asiTYR (10)、asiTYR (17)、asiTYR (44) 和asiTYR (45) 被选择用于后续研究。

[0111] 实施例2: 用于自我递送的asiRNA的化学修饰

[0112] 将化学修饰应用于实施例1中选择的六种asiRNA, 并且在不存在其他递送运载体的情况下测验经修饰的asiRNA的细胞递送。如下所述, 某些修饰改善asiRNA的内吞作用和稳定性。这样的细胞穿透asiRNA (cp-asiRNA) 能够不存在递送运载体的情况下被递送到细胞中。

[0113] 筛选了38种潜在的cp-asiRNA (表2), 用于在MNT-1细胞中酪氨酸酶mRNA抑制。将每种潜在的cp-asiRNA在无递送运载体的情况下与1 μ M的人黑素瘤细胞系MNT-1细胞温育, 并且通过实时PCR测量酪氨酸酶mRNA水平。

[0114] 表2. 被测验自我递送和酪氨酸酶抑制的经修饰的asiRNA序列。m=2'-O-甲基RNA。*=硫代磷酸酯键。

| | |
|--------|--|
| [0115] | asiTYR(4)-1 S : GCUGACAGGAGAUG*A*A*胆甾醇 |
| | asiTYR(4)-1 AS : UUCAUCUCCUGUCAGCU*U*C*U*G |
| | asiTYR(4)-2 S : GCUGACAGGAGAUG*A*A*胆甾醇 |

[0116]

| |
|--|
| asiTYR(4)-2 AS : UUCAUCUCCUGUCAGCU*U*mC*mU*mG |
| asiTYR(4)-3 S : GCUGACAGGAGAUG*A*A*胆甾醇 |
| asiTYR(4)-3 AS : UUCAUCUCCUGUCAGCmU*mU*mC*mU*mG |
| asiTYR(4)-4 S : mGCmUGmACmAGmGAmGAmUG*mA*A*胆甾醇 |
| asiTYR(4)-4 AS : UUCAUCUCCUGUCAGCU*U*C*U*G |
| asiTYR(4)-5 S : mGCmUGmACmAGmGAmGAmUG*mA*A*胆甾醇 |
| asiTYR(4)-5 AS : UUCAUCUCCUGUCAGCU*U*mC*mU*mG |
| asiTYR(4)-6 S : mGCmUGmACmAGmGAmGAmUG*mA*A*胆甾醇 |
| asiTYR(4)-6 AS : UUCAUCUCCUGUCAGCmU*mU*mC*mU*mG |
| asiTYR(9)-1 S : UGAAGCACCAGCUU*U*U*胆甾醇 |
| asiTYR(9)-1 AS : AAAAGCUGGUGCUUCAU*G*G*G*C |
| asiTYR(9)-3 S : UGAAGCACCAGCUU*U*U*胆甾醇 |
| asiTYR(9)-3 AS : AAAAGCUGGUGCUUCAmU*mG*mG*mG*mC |
| asiTYR(9)-4 S : mUGmAAmGCmACmCmGCmUU*mU*U*胆甾醇 |
| asiTYR(9)-4 AS : AAAAGCUGGUGCUUCAU*G*G*G*C |
| asiTYR(9)-6 S : mUGmAAmGCmACmCmGCmUU*mU*U*胆甾醇 |
| asiTYR(9)-6 AS : AAAAGCUGGUGCUUCAmU*mG*mG*mG*mC |
| asiTYR(10)-1 S : AAUGAAAAAUGGAU*C*A*胆甾醇 |
| asiTYR(10)-1 AS : UGAUCCAUUUUUCAUUU*G*G*C*C |
| asiTYR(10)-3 S : AAUGAAAAAUGGAU*C*A*胆甾醇 |
| asiTYR(10)-3 AS : UGAUCCAUUUUUCAUUmU*mG*mG*mC*mC |
| asiTYR(10)-4 S : mAAmUGmAAmAAmAUmGGmAU*mC*A*胆甾醇 |
| asiTYR(10)-4 AS : UGAUCCAUUUUUCAUUU*G*G*C*C |
| asiTYR(10)-6 S : mAAmUGmAAmAAmAUmGGmAU*mC*A*胆甾醇 |
| asiTYR(10)-6 AS : UGAUCCAUUUUUCAUUmU*mG*mG*mC*mC |
| asiTYR(17)-1 S : CCCAUGUUUAACGA*C*A*胆甾醇 |
| asiTYR(17)-1 AS : UGUCGUUAAACAUGGGU*G*U*U*G |
| asiTYR(17)-2 S : CCCAUGUUUAACGA*C*A*胆甾醇 |
| asiTYR(17)-2 AS : UGUCGUUAAACAUGGGU*G*mU*mU*mG |
| asiTYR(17)-3 S : CCCAUGUUUAACGA*C*A*胆甾醇 |
| asiTYR(17)-3 AS : UGUCGUUAAACAUGGGmU*mG*mU*mU*mG |
| asiTYR(17)-4 S : mCCmCAmUGmUUmUAmACmGA*mC*A*胆甾醇 |
| asiTYR(17)-4 AS : UGUCGUUAAACAUGGGU*G*U*U*G |
| asiTYR(17)-5 S : mCCmCAmUGmUUmUAmACmGA*mC*A*胆甾醇 |
| asiTYR(17)-5 AS : UGUCGUUAAACAUGGGU*G*mU*mU*mG |
| asiTYR(17)-6 S : mCCmCAmUGmUUmUAmACmGA*mC*A*胆甾醇 |
| asiTYR(17)-6 AS : UGUCGUUAAACAUGGGmU*mG*mU*mU*mG |
| asiTYR(44)-1 S : AGGUUCCUGUCAGA*A*U*胆甾醇 |

[0117]

| |
|---|
| asiTYR(44)-1 AS : AUUCUGACAGGAACCCUC*U*G*C*C |
| asiTYR(44)-3 S : AGGUUCCUGUCAGA*A*U*胆甾醇 |
| asiTYR(44)-3 AS : AUUCUGACAGGAACCCUmC*mU*mG*mC*mC |
| asiTYR(44)-4 S : mAGmGUmUCmCUmGUmCAmGA*mA*U*胆甾醇 |
| asiTYR(44)-4 AS : AUUCUGACAGGAACCCUC*U*G*C*C |
| asiTYR(44)-6 S : mAGmGUmUCmCUmGUmCAmGA*mA*U*胆甾醇 |
| asiTYR(44)-6 AS : AUUCUGACAGGAACCCUmC*mU*mG*mC*mC |
| asiTYR(45)-1 S : GGCAACUUCAUGGG*A*U*胆甾醇 |
| asiTYR(45)-1 AS : AUCCCAUGAAGUUGCCA*G*A*G*C |
| asiTYR(45)-3 S : GGCAACUUCAUGGG*A*U*胆甾醇 |
| asiTYR(45)-3 AS : AUCCCAUGAAGUUGCCmA*mG*mA*mG*mC |
| asiTYR(45)-4 S : mGGmCAmACmUUmCAmUGmGG*mA*U*胆甾醇 |
| asiTYR(45)-4 AS : AUCCCAUGAAGUUGCCA*G*A*G*C |
| asiTYR(45)-6 S : mGGmCAmACmUUmCAmUGmGG*mA*U*胆甾醇 |
| asiTYR(45)-6 AS : AUCCCAUGAAGUUGCCmA*mG*mA*mG*mC |

[0118] 在含有20%胎牛血清(Gibco)、100μg/ml青霉素/链霉素、10%200mM HEPES (Welgene)和10%达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Welgene)的最小必需培养基(Welgene)中培养MNT-1细胞(获得自成均馆大学)。

[0119] 将表2中列出的潜在的cp-asiRNA在OPTI-MEM缓冲液(Gibco)中在95℃温育2分钟,并且在37℃温育1小时。通过凝胶电泳确认潜在的cp-asiRNA的适当的链退火。

[0120] 在cp-asiRNA处理前一天,将 2.0×10^4 个细胞接种在24孔板中。在立即处理前,用1×DPBS缓冲液(Gibco)洗涤MNT-1细胞,然后在OPTI-MEM缓冲液中存在潜在的cp-asiRNA的情况下培养24小时,此时,含有asiRNA的OPTI-MEM培养基被含有血清的培养基代替。24小时后,测定MNT-1细胞中的酪氨酸酶mRNA水平。

[0121] 在图2中提供了38种潜在的cp-asiRNA中每种酪氨酸酶抑制水平。从测验的潜在的cp-asiRNA中选择cp-asiTYR(4)-1用于进一步研究。

[0122] 实施例3:使用酪氨酸特异性cp-asiRNA抑制酪氨酸酶蛋白质和黑色素

[0123] 测验cp-asiTYR(4)-1对酪氨酸酶蛋白质的抑制和黑色素生成的抑制的功效。为了测验非特异性作用,还测验了缺乏与酪氨酸酶mRNA序列的序列互补性的突变的cp-asiTYR(称为cp-asiTYR(种子突变))。表3中提供了cp-asiTYR(种子突变)的序列。

[0124] 表3.cp-asiRNA(4)-1(种子突变)中使用的序列m=2'-O-甲基RNA。*=硫代磷酸酯键。

[0125]

| |
|--|
| cp-asiTYR(4)-1(种子突变)S:GCUGACAGGUCUAC*U*A*胆甾醇 |
| cp-asiTYR(4)-1(种子突变)AS:UAGUAGACCUGUCAGCU*U*C*U*G |

[0126] 将cp-asiRNA在OPTI-MEM缓冲液(Gibco)中在95℃温育2分钟,并且在37℃温育1小时。通过凝胶电泳确认潜在的cp-asiRNA的适当的链退火。

[0127] 将MNT-1细胞在最小必需培养基(Welgene)中温育,所述最小必需培养基(Welgene)含有20%胎牛血清(Gibco)、100μg/ml青霉素/链霉素、10%200mM HEPES

(Welgene) 和10%达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Welgene)。在处理前一天,将 6.5×10^4 个MNT-1细胞接种在12孔板中。立即处理之前,用 $1 \times$ DPBS缓冲液(Gibco)洗涤MNT-1细胞,然后在OPTI-MEM缓冲液中在存在 $1 \mu\text{M}$ 或 $3 \mu\text{M}$ 的cp-asiRNATYR(4)-1的情况下培养24小时,此时,用含有血清的培养基代替OPTI-MEM培养基。

[0128] 在cp-asiTYR(4)-1温育72小时之后,经由免疫印迹测定酪氨酸酶蛋白质表达的水平。简单地说,用RIPA缓冲液(GE)裂解经处理的MNT-1细胞。 $15 \mu\text{g}$ 的总蛋白质提取物被装载到12%SDS-PAGE凝胶上并且在120V进行电泳。在电泳之后,将蛋白质转移到PVDF膜(Bio-rad),所述PVDF膜(Bio-rad)已经被甲醇(Merck)在300mA激活1小时。膜在室温下用5%脱脂乳(Seoul Milk)被封闭1小时,然后在4℃在含有抗酪氨酸酶抗体(Santa Cruz)和抗 β -肌动蛋白抗体(Santa Cruz)的5%脱脂乳中温育过夜。然后膜被用 $1 \times$ TBST洗涤10分钟3次,并且在室温下在5%脱脂乳中用HRP缀合的二级抗体温育1小时。膜被用 $1 \times$ TBST洗涤10分钟,并且用 $1 \times$ ECL处理1分钟。然后使用Chemidoc仪器(Bio-rad)对酪氨酸酶和 β -肌动蛋白条带成像。

[0129] 图3中描绘了免疫印迹测试的结果。作为结果,在全部cp-asiTYR#4-1温育的细胞系中,70%或更多的酪氨酸酶蛋白质抑制被确认。此外,cp-asiTYR显示出在酪氨酸酶抑制能力中比其他酪氨酸酶抑制剂(如氢醌和熊果苷)具有更高的效率(图3)。

[0130] 测验如上所述用cp-asiTYR(4)-1处理的MNT-1细胞的黑色素含量。在存在cp-asiTYR的情况下温育72小时之后,MNT-1细胞被收集,并且用RIPA缓冲液(GE)裂解,并且在13000rpm离心分离。将得到的黑色素沉淀物在85℃溶于 $100 \mu\text{L}$ 1N NaOH(含有10%DMSO)中15分钟,测量光吸收和黑色素生成。

[0131] 如图4所示,用 $1 \mu\text{M}$ cp-asiTYR(4)-1处理的MNT-1细胞在黑色素生成中显示出大于60%的抑制,其比用常用于黑色素生成的化合物(包含氢醌($20 \mu\text{M}$)和熊果苷(2mM))处理时高。

[0132] 实施例4:用cp-asiRNA处理后MNT-1细胞提亮

[0133] 测验cp-asiRNA(4)-1提亮MNT-1细胞颜色的能力。

[0134] 如在实施例3中,在存在 $1 \mu\text{M}$ 或 $3 \mu\text{M}$ cp-asiTYR(4)-1的情况下培养MNT-1细胞。在72小时之后,将细胞沉淀并且观察细胞的颜色变化。如图5所示,cp-asiTYR(4)-1处理的细胞的颜色比未处理的MNT-1对照细胞(NT)、氢醌处理的细胞和熊果苷处理的细胞浅。

[0135] 实施例5:cp-asiRNA的细胞毒性

[0136] 为了测验cp-asiRNA的细胞毒性,用cp-asiTYR#4-1和氢醌处理MNT-1(人黑素瘤细胞系)和HaCaT(人角化细胞细胞系)。

[0137] 将cp-asiRNA在OPTI-MEM缓冲液(Gibco)中在95℃温育2分钟并且在37℃温育1小时。通过凝胶电泳确认潜在的cp-asiRNA的适当的链退火。

[0138] 在用cp-asiRNA(4)-1处理前一天,将 5.0×10^3 个MNT-1细胞或 1.0×10^4 个HaCaT细胞接种到96孔板中。立即处理前用 $1 \times$ DPBS缓冲液(Gibco)洗涤细胞,然后在OPTI-MEM缓冲液中在存在 $1 \mu\text{M}$ 或 $3 \mu\text{M}$ cp-asiRNATYR(4)-1的情况下培养24小时,此时根据制造商的说明使用CytoTox96非放射性细胞毒性测试(Promega)测量细胞毒性水平。然后用含有血清的培养基代替培养基,并且根据制造商的说明使用细胞计数试剂盒-8(Enzo)测量细胞活力。

[0139] 如图6所示,由于用cp-asiRNA处理,在MNT-1或HaCaT中未观察到细胞毒性或细胞

活力损失。另一方面,在用氢醌或熊果昔处理的HaCaT细胞中观察到细胞毒性。

[0140] 实施例6:附加的cp-asiRNA结构

[0141] 合成具有不同链长度和2'-O-甲基化修饰的数量的各种各样的潜在的cp-asiTYR结构,并且测验它们抑制酪氨酸酶表达的能力(表4)。

[0142] 表4.附加的cp-asiRNA序列。 $m=2'$ -O-甲基RNA。 $*$ =硫代磷酸酯键。

| | |
|--------|---|
| [0143] | cp-asiTYR (4) S:GCUGACAGGAGAUG*A*A*胆甾醇 |
| | cp-asiTYR (4) 21AS-1:UUCAUCUCCUGUCAGCU*U*C*U*G |
| | cp-asiTYR (4) 21AS-2:UUCAUCUCCUGUCAGCU*U*mC*mU*mG |
| | cp-asiTYR (4) 21AS-3:UUCAUCUCCUGUCAGCmU*mU*mC*mU*mG |
| | cp-asiTYR (4) 19AS-4:UUCAUCUCCUGUCAG*C*U*U*C |
| | cp-asiTYR (4) 19AS-5:UUCAUCUCCUGUCAG*C*mU*mU*mC |
| | cp-asiTYR (4) 19AS-6:UUCAUCUCCUGUCAmG*mC*mU*mU*mC |

[0144] 测验表4中列出的 $1\mu\text{M}$ 的每种潜在的cp-asiRNA抑制MNT-1细胞中酪氨酸酶mRNA的能力。

[0145] 在最小必需培养基(Welgene)中培养MNT-1细胞,所述最小必需培养基(Welgene)含有20%胎牛血清(Gibco)、 $100\mu\text{g/ml}$ 青霉素/链霉素、10%200mM HEPES(Welgene)和10%达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Welgene)。

[0146] 将表4中列出的潜在的cp-asiRNA在OPTI-MEM缓冲液(Gibco)中在 95°C 温育2分钟并且在 37°C 温育1小时。通过凝胶电泳确认潜在的cp-asiRNA的适当的链退火。

[0147] 处理前一天,将 2.0×10^4 个MNT-1细胞接种在24孔板中。在立即处理之前将MNT-1细胞用 $1 \times \text{DPBS}$ 缓冲液(Gibco)洗涤,然后在OPTI-MEM缓冲液中存在潜在的cp-asiRNA的情况下培养24小时,此时,含有asiRNA的OPTI-MEM培养基被含有血清的培养基代替。24小时后,测定MNT-1细胞中的酪氨酸酶mRNA水平。

[0148] 如图7所示,酪氨酸酶mRNA在21个核苷酸反义链上含有4个硫代磷酸酯键的潜在的cp-asiRNA和在19个核苷酸反义链上含有3个2'-O-甲基化和4个硫代磷酸酯键的潜在的cp-asiRNA表现出最高水平的酪氨酸酶抑制。选择cp-asiTYR (4) 21AS-1和cp-asiTYR (4) 19AS-5用于进一步实验。

[0149] 测验cp-asiTYR (4) 21AS-1和cp-asiTYR (4) 19AS-5对生成酪氨酸酶蛋白质和黑色素生成的作用。

[0150] 将cp-asiRNA在OPTI-MEM缓冲液(Gibco)中在 95°C 温育2分钟,并且在 37°C 温育1小时。通过凝胶电泳确认潜在的cp-asiRNA的适当的链退火。

[0151] 将MNT-1细胞在最小必需培养基(Welgene)中培养,所述最小必需培养基(Welgene)含有20%胎牛血清(Gibco)、 $100\mu\text{g/ml}$ 青霉素/链霉素、10%200mM HEPES(Welgene)和10%达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Welgene)。处理前一天,将 6.5×10^4 个MNT-1细胞接种在12孔板中。立即处理之前,用 $1 \times \text{DPBS}$ 缓冲液(Gibco)洗涤MNT-1细胞,然后在OPTI-MEM缓冲液中存在 $1\mu\text{M}$ 或 $3\mu\text{M}$ 的cp-asiRNATYR (4) -1的情况下培养24小时,此时,OPTI-MEM培养基被含有血清的培养基代替。

[0152] 经由免疫印迹测定在用 $1\mu\text{M}$ 和 $3\mu\text{M}$ cp-asiRNA处理之后MNT-1细胞酪氨酸酶蛋白质表达的水平。简单地说,用RIPA缓冲液(GE)裂解转染的MNT-1细胞。 $15\mu\text{g}$ 的总蛋白质提取物

被装载到12% SDS-PAGE凝胶上,并且在120V进行电泳。在电泳之后,将蛋白质转移到PVDF膜(Bio-rad),所述PVDF膜(Bio-rad)已经被甲醇(Merck)在300mA激活1小时。膜在室温下用5%脱脂乳(Seoul Milk)被封闭1小时,然后在4℃在含有抗酪氨酸酶抗体(Santa Cruz)和抗β-肌动蛋白抗体(Santa Cruz)的5%脱脂乳中温育过夜。然后膜被用1×TBST洗涤10分钟3次,并且在室温下在5%脱脂乳中用HRP缀合的二级抗体温育1小时。膜被用1×TBST洗涤10分钟,并且用1×ECL处理1分钟。然后使用Chemidoc仪器(Bio-rad)对酪氨酸酶和β-肌动蛋白条带成像。

[0153] 如图8所示,用cp-asiTYR (4) 21AS-1或cp-asiTYR (4) 19AS-5处理导致在酪氨酸酶蛋白质的水平中大于70%的抑制。此外,cp-asiTYR (4) 19AS-5表现出比cp-asiTYR (4) 21AS-1略高的抑制活性。

[0154] 测验如上所述用cp-asiTYR (4) 21AS-1或cp-asiTYR (4) 19AS-5处理的MNT-1细胞的黑色素含量。在存在cp-asiTYR的情况下温育72小时之后,MNT-1细胞被收集,并且用RIPA缓冲液(GE)裂解,并且在13000rpm离心分离。将得到的黑色素沉淀物在85℃溶于100μL 1N NaOH(含有10%DMSO)中15分钟,并且测量光吸收和黑色素生成。

[0155] 如图9所示,用1μM cp-asiTYR (4) 21AS-1或cp-asiTYR (4) 19AS-5处理的MNT-1细胞在黑色素生成中显示出约50%的抑制,其比用2mM熊果苷处理的MNT-1细胞中显示的抑制高。

[0156] 合成具有不同链长、2'-O-甲基化修饰的数量和硫代磷酸酯键的数量的附加的潜在的cp-asiTYR结构,并且测验它们抑制酪氨酸酶表达的能力(表5)。

[0157] 表5.附加的cp-asiRNA序列.m=2'-O-甲基RNA.*=硫代磷酸酯键。

| | |
|--------|---|
| [0158] | cp-asiTYR (4) S:GCUGACAGGAGAUG*A*A*胆甾醇 |
| | cp-asiTYR (4) 21AS-1:UUCAUCUCCUGUCAGCU*U*C*U*G |
| | cp-asiTYR (4) 19AS-7:UUCAUCUCCUGUC*A*G*C*mU*mU*mC |

[0159] 测验cp-asiTYR (4) 21AS-1和cp-asiTYR (4) 19AS-7对酪氨酸酶蛋白质生成的作用。

[0160] 将cp-asiRNA在OPTI-MEM缓冲液(Gibco)中在95℃温育2分钟并且在37℃温育1小时。通过凝胶电泳确认潜在的cp-asiRNA的适当的链退火。

[0161] 将MNT-1细胞在最小必需培养基(Welgene)中培养,所述低最小必需培养基(Welgene)含有20%胎牛血清(Gibco)、100μg/ml青霉素/链霉素、10%200mM HEPES(Welgene)和10%达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Welgene)。处理前一天,将 6.5×10^4 个MNT-1细胞接种在12孔板中。立即处理之前,用1×DPBS缓冲液(Gibco)洗涤MNT-1细胞,然后在OPTI-MEM缓冲液中在存在1μM、0.6μM、0.3μM和0.1μM的cp-asiTYR (4) 21AS-1和cp-asiTYR (4) 19AS-7的情况下培养24小时,此时,OPTI-MEM培养基被含有血清的培养基代替。

[0162] 经由免疫印迹测定在用1μM、0.6μM、0.3μM和0.1μM cp-asiRNA处理之后MNT-1细胞酪氨酸酶蛋白质表达的水平。简单地说,用RIPA缓冲液(GE)裂解转染的MNT-1细胞。15μg的总蛋白质提取物被装载到12% SDS-PAGE凝胶上,并且在120V进行电泳。在电泳之后,将蛋白质转移到PVDF膜(Bio-rad),所述PVDF膜(Bio-rad)已经被甲醇(Merck)在300mA激活1小时。膜在室温下用5%脱脂乳(Seoul Milk)被封闭1小时,然后在4℃在含有抗酪氨酸酶抗体(Santa Cruz)和抗β-肌动蛋白抗体(Santa Cruz)的5%脱脂乳中温育过夜。然后膜被用1×TBST洗涤10分钟3次,并且在室温下在5%脱脂乳中用HRP缀合的二级抗体温育1小时。膜被

用1×TBST洗涤10分钟,并且用1×ECL处理1分钟。然后使用Chemidoc仪器(Bio-rad)对酪氨酸酶和β-肌动蛋白条带成像。

[0163] 如图10所示,用cp-asiTYR(4) 21AS-1或cp-asiTYR(4) 19AS-7处理导致在酪氨酸酶蛋白质的水平中大于70%的抑制。此外,cp-asiTYR(4) 21AS-1表现出比cp-asiTYR(4) 19AS-7略高的抑制活性。

[0164] 实施例7:使用具有asiRNA和lasiRNA的细胞穿透肽

[0165] 测验asiRNA或lasiRNA与Pepfect 6 (PF6) 细胞穿透肽的组合对酪氨酸酶mRNA和蛋白质水平的抑制,而不使用另一种转染试剂。

[0166] 将asiTYR(4) 和lasiTYR(21) (表6) 在OPTI-MEM缓冲液(Gibco) 中在95℃温育2分钟,并且在37℃温育1小时。通过凝胶电泳确认asiRNA和lasiRNA的适当的链退火。将DEPC中的退火的RNA和PF6以1:10的RNA复合物:PF6的摩尔比稀释于100μl 0.6×DPBS中,然后在室温下温育30分钟用于复合物形成。通过凝胶电泳确认适当的复合物形成。

[0167] 表6. asiTYR(4) 和lasiTYR(21) 的核酸序列。

| | |
|--------|--|
| [0168] | asiTYR(4) S:GCUGACAGGAGAUGAA (SEQ ID NO:7) |
| | asiTYR(4) AS:UUCAUCUCCUGUCAGCUUCUG (SEQ ID NO:8) |
| | lasiTYR(21) S:GGUCCUGUCAGAAUA (SEQ ID NO:125) |
| | lasiTYR(21) AS:UAUUCUGACAGGAACCUCUGCCUGAAAGCUG (SEQ ID NO:126) |

[0169] 将MNT-1细胞在最小必需培养基(Welgene) 中培养,所述最小必需培养基(Welgene) 含有20%胎牛血清(Gibco)、100μg/ml青霉素/链霉素、10%200mM HEPES (Welgene) 和10%达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Welgene)。处理前一天,将 6.5×10^4 个MNT-1细胞接种在12孔板中。处理前4小时,将细胞培养基用900μL含有FBS的培养基代替。将PF6-复合的asiRNA或lasiRNA加入细胞,并且将细胞温育24小时,此时,培养基被代替。在培养基代替之后24小时,使用实时RT-PCR测量酪氨酸酶mRNA水平。

[0170] 如图11所示,与对照相比,用PF6-复合的asiRNA或lasiRNA处理的MNT-1细胞系具有显著降低的酪氨酸酶mRNA的水平。

[0171] 为了测验经处理的MNT-1细胞的酪氨酸酶蛋白质表达和黑色素生成,在培养基代替48小时之后,如上所述进行免疫印迹和黑色素含量测试。

[0172] 如图12所示,与对照相比,用asiTYR(4)/PF6复合物和lasiTYR(21)/PF6复合物处理的细胞系表现出至少70%的酪氨酸酶蛋白质抑制。此外,用asiTYR(4)/PF6复合物和lasiTYR(21)/PF6复合物处理的细胞比对照表现出更少的黑色素生成。

[0173] 实施例8:使用示例性cp-asiRNA抑制重建的皮肤模型中的黑色素合成

[0174] 在cp-asiTYR#4-1处理的3-D皮肤模型中分析酪氨酸酶表达和黑色素水平。MEL-300-B(MatTek) (一种重建的皮肤模型) 被用于本研究。在用cp-asiTYR#4-1处理之前24小时,MEL-300-B在EPI-100-NMM-113培养基中稳定。为了退火,将溶解在DEPC处理的水中的cp-asiTYR#4-1在95℃温育2分钟,并且在37℃温育1小时。通过将cp-asiTYR#4-1直接加入培养基,每天用cp-asiTYR#4-1处理MEL-300-B样品13天(最终浓度=5μM)。作为对照,如图14(a)中描绘的,将其他MEL-300-B样品用曲酸(Sigma,最终2%)处理。在第14天收获样品,并且使用光学显微镜分析样品中的黑素细胞。如图14(c)所示,cp-asiTYR#4-1处理降低经处理的重建的皮肤模型样品中黑素细胞的水平。使用Fontana-Massons染色分析每个样品

中的黑色素水平。如图14(c)所示,ci-asiTYR#4-1处理降低经处理的重建的皮肤模型样品中的黑色素水平。

[0175] 为了分析第14天的mRNA水平,将样品收获在Isol-RNA裂解试剂(5PRIME)中,并且通过使用匀质器(IKA)搅匀。提取来自每个样品的总RNA。对于每个样品,根据制造商的说明使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems)将500ng提取的RNA用于cDNA合成。然后使用StepOne实时PCR系统(Applied Biosystems)进行定量实时PCR。使用power SYBR green PCR master Mix(Applied Biosystems)检测酪氨酸酶cDNA的扩增。GAPDH被扩增为内部对照。如图14(d)所示,ci-asiTYR#4-1处理降低经处理的重建的皮肤模型样品中酪氨酸酶mRNA的水平。

[0176] 使用免疫印迹进行蛋白质水平分析。通过使用匀质器(IKA)使RIPA缓冲液(GE)中收获的样品分布均匀,并且获得来自每个样品的蛋白质。15微克总蛋白质提取物被装载到12%SDS-PAGE凝胶上并且在120V进行电泳。在电泳之后,将蛋白质转移到PVDF膜(Bio-rad),所述PVDF膜(Bio-rad)已经预先用甲醇(Merck)在300mA激活1小时。膜在室温下用5%脱脂乳(Seoul Milk)被封闭1小时,然后在4℃在含有抗酪氨酸酶抗体(Santa Cruz)和抗β-肌动蛋白抗体(Santa Cruz)的5%脱脂乳中温育过夜。然后膜被用1×TBST洗涤10分钟3次,并且在室温下在5%脱脂乳中用HRP缀合的二级抗体温育1小时。膜被用1×TBST洗涤10分钟,并且用1×ECL处理1分钟。然后使用Chemidoc仪器(Bio-rad)对酪氨酸酶和β-肌动蛋白条带成像。如图14e所示,在cp-asiTYR#4-1处理的重建的皮肤模型样品中观察到酪氨酸酶蛋白质的有效减少。

[0177] 为了测验黑色素含量,在第14天收获样品,用RIPA缓冲液(GE)裂解并且在13000rpm离心分离。将得到的沉淀物在85℃溶解在100μL 1N NaOH(含有10%DMSO)中15分钟,并且测量光吸收和黑色素生成。如图14(f)所示,cp-asiTYR#4-1处理降低经处理的重建的皮肤模型样品中的黑色素水平。

[0178] 通过引用并入

[0179] 本文提到的所有出版物、专利和专利申请全部以引用方式被整体并入本文,犹如每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地和单独地表明通过引用被并入。在冲突的情况下,本申请(包含本文中的任何定义)将受约束。

[0180] 等同物

[0181] 本领域技术人员将认识到或能够使用仅仅常规实验来确定本文中描述的本发明的具体的实施方案的许多等同物。这样的等同物旨在由以下权利要求涵盖。

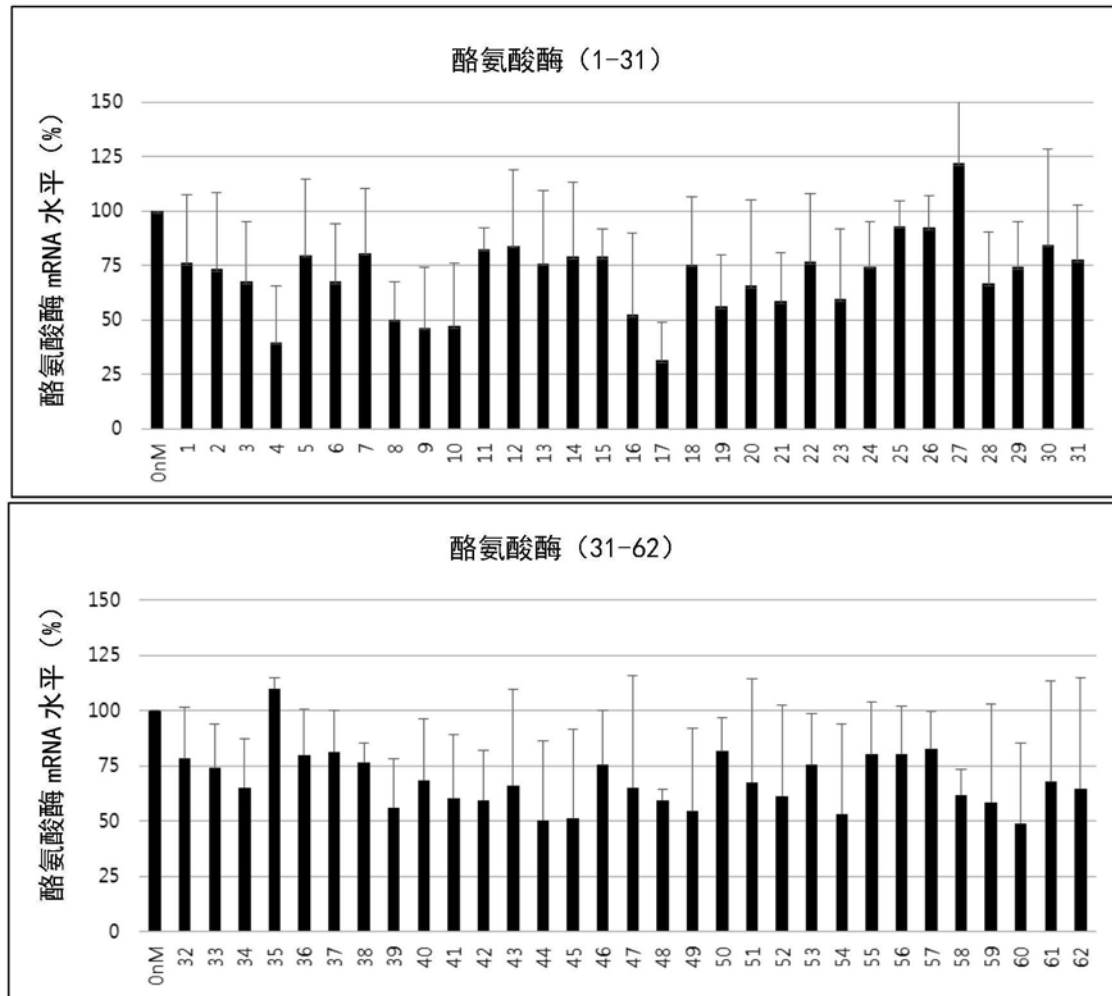


图1

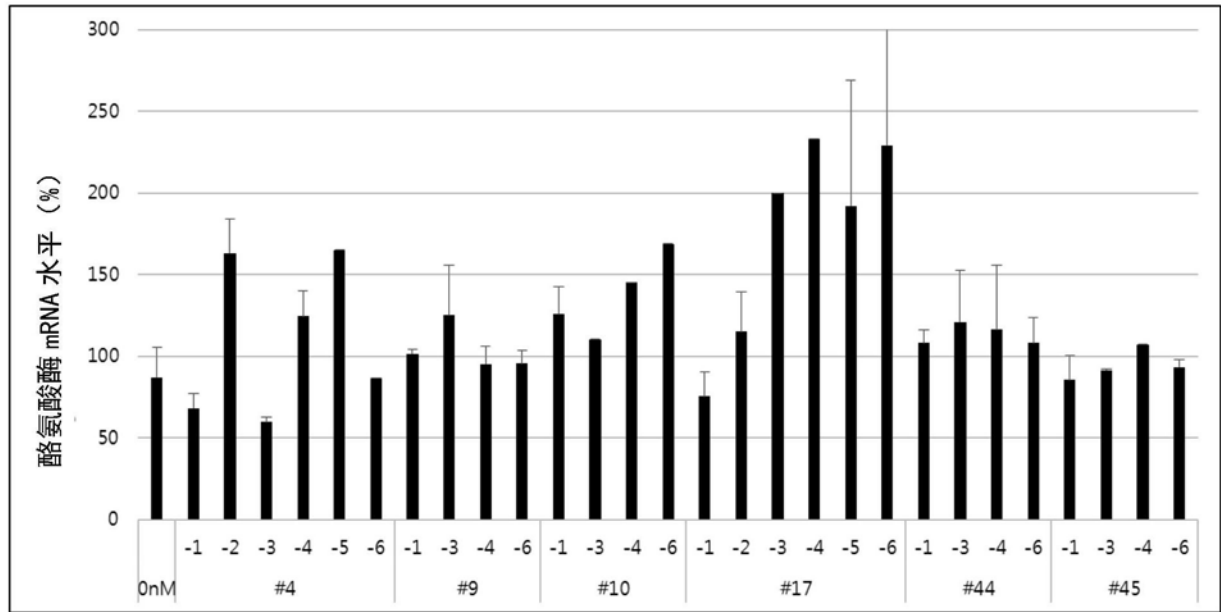


图2

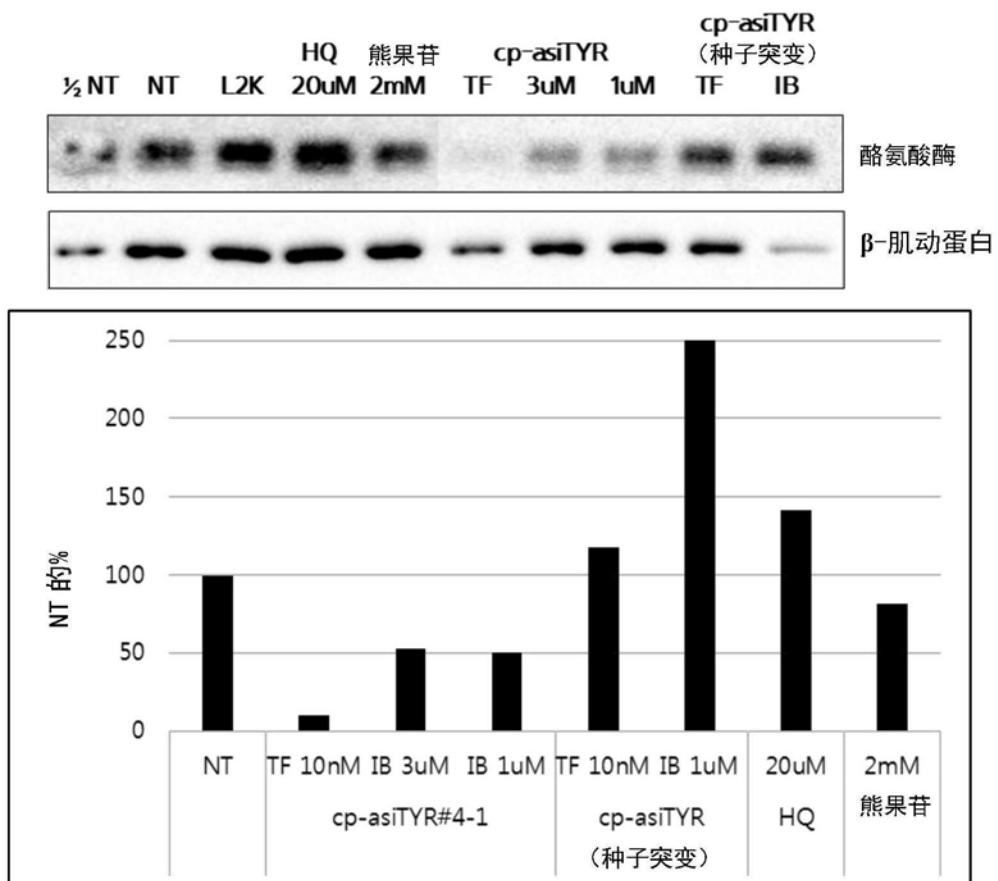


图3

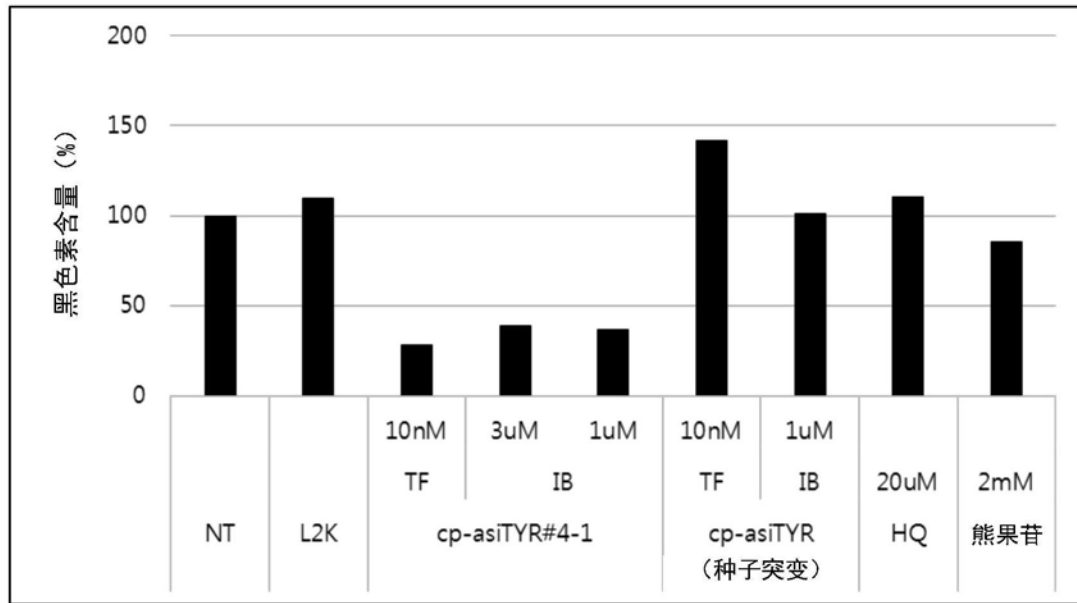
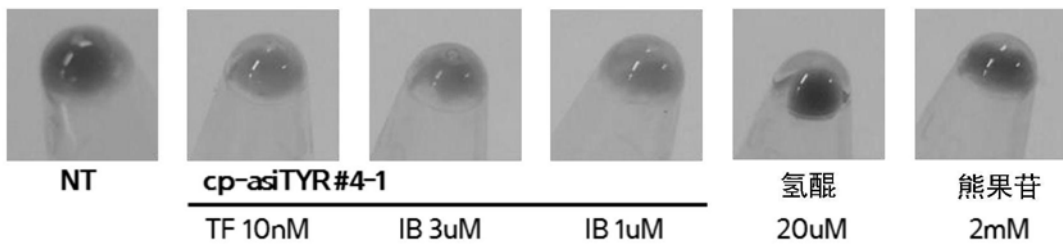


图4

(a)



(b)

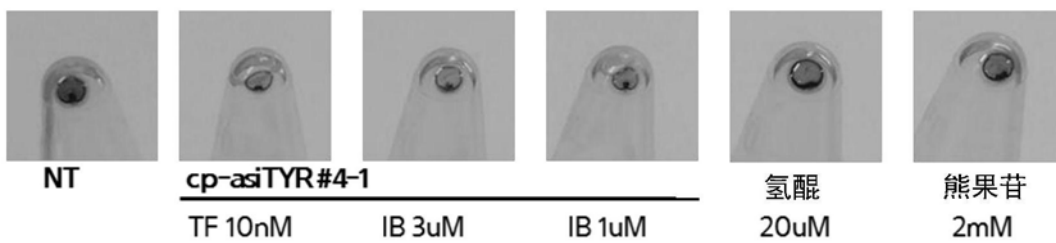


图5

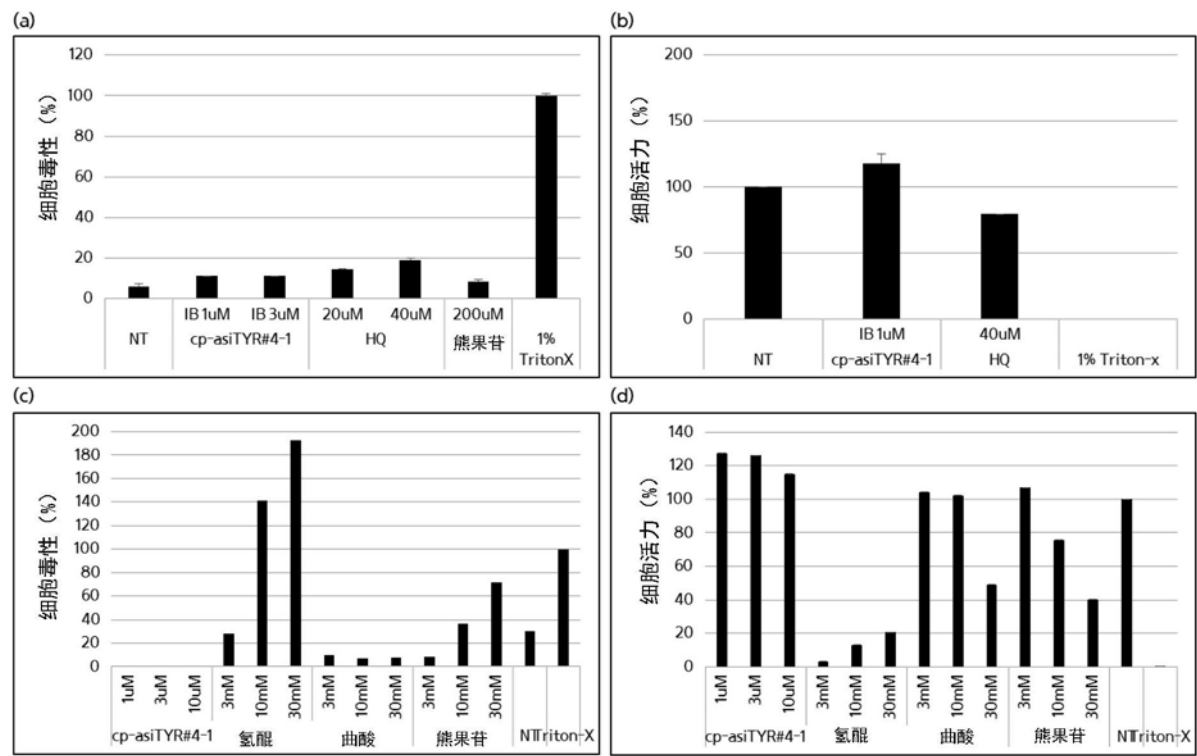


图6

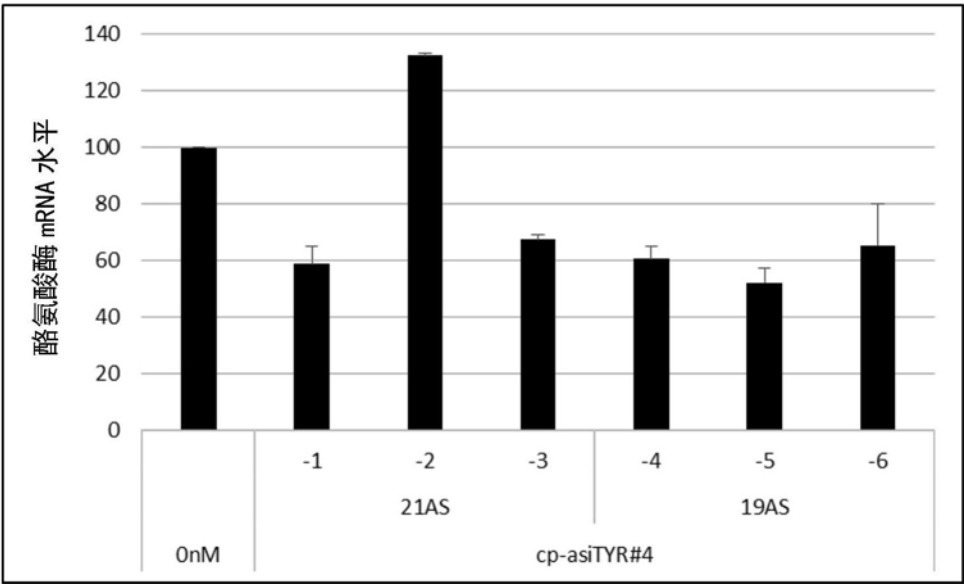


图7

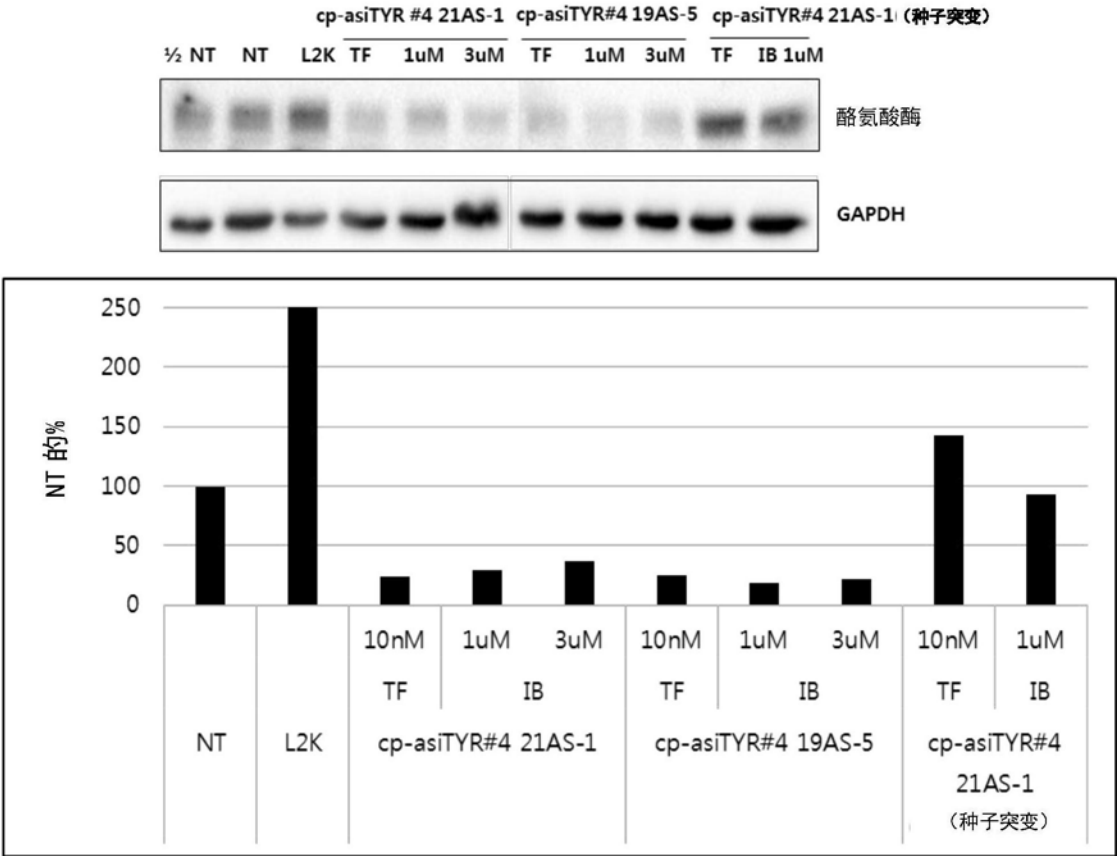


图8

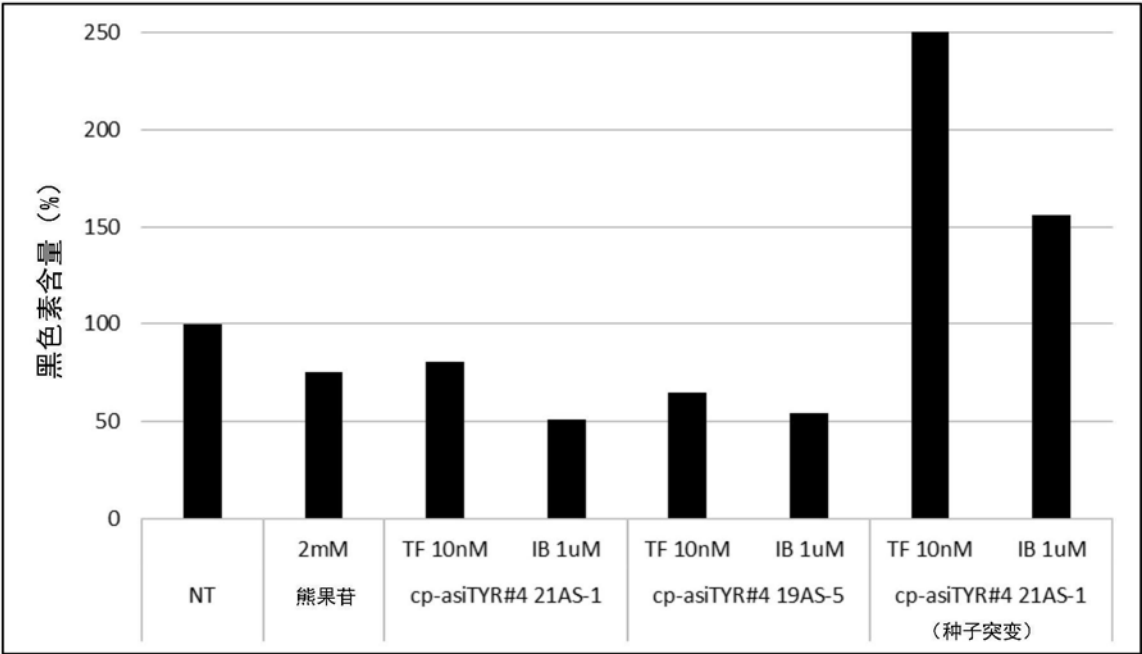


图9

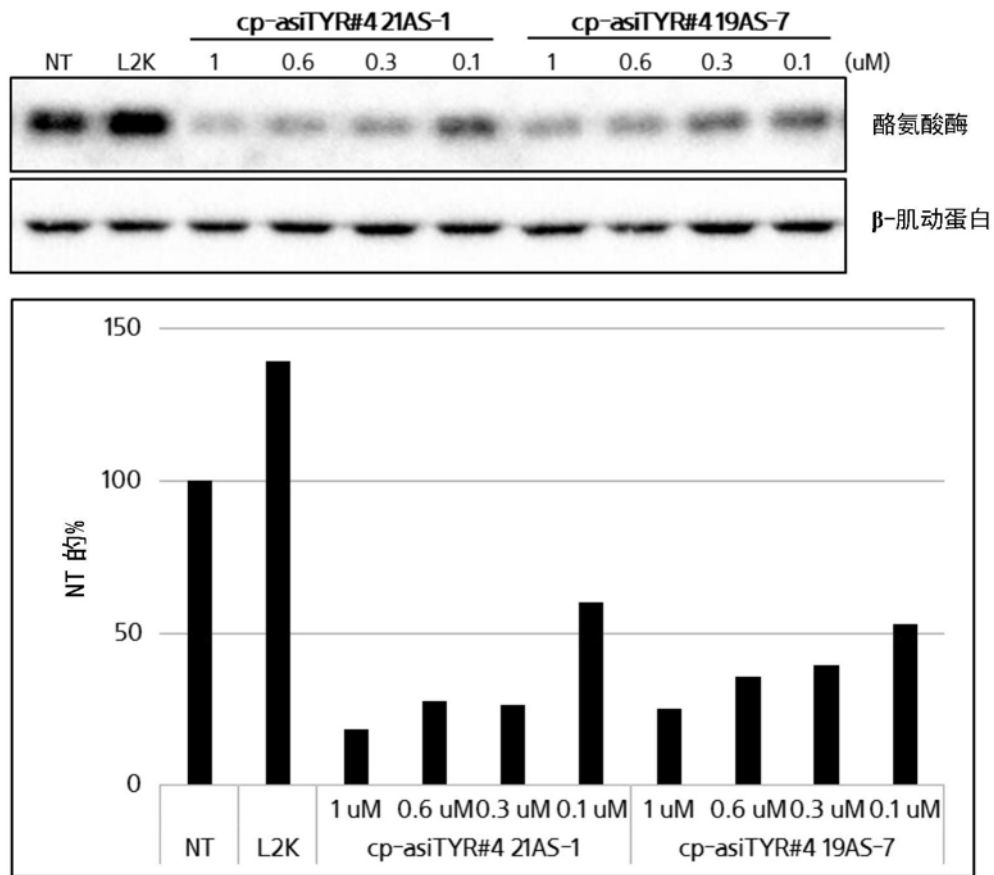


图10

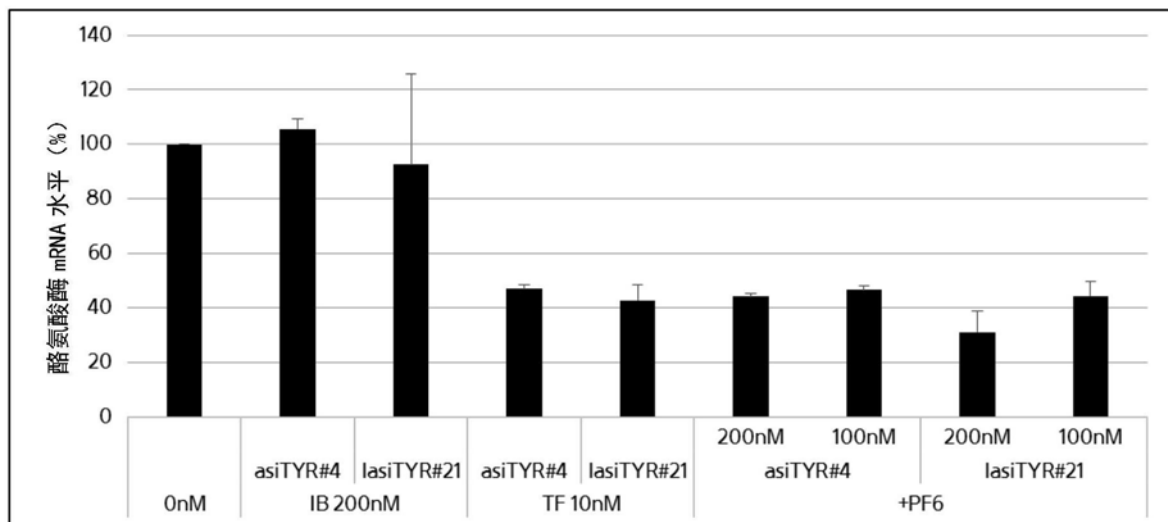


图11

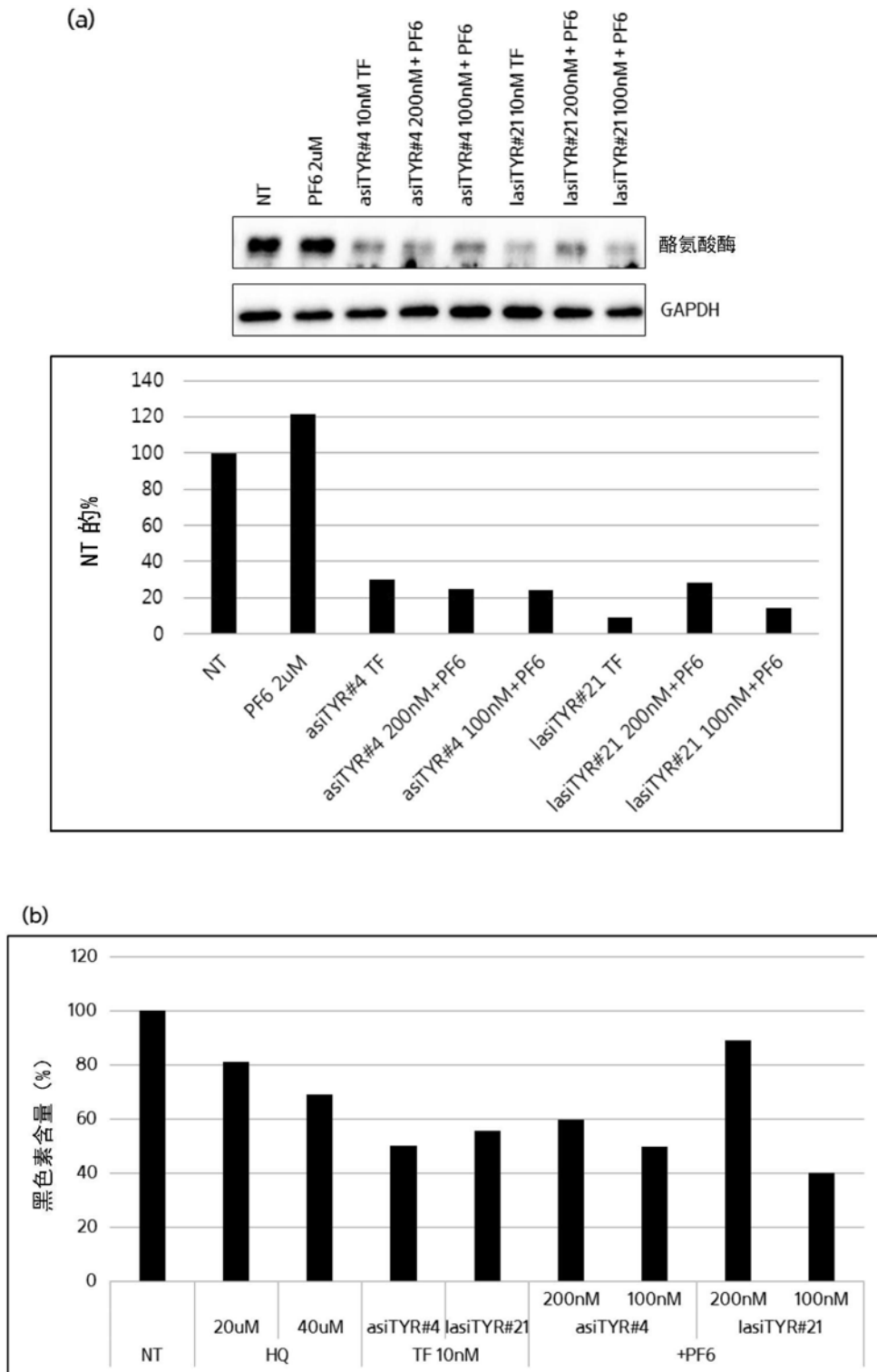


图12

人酪氨酸酶 mRNA 序列.

```
1  atcactgtag tagtagctgg aaagagaaat ctgtgactcc aattagccag ttctgcaga
61  cottgtgagg actagaggaa gaatgtcctt ggctgttttg tactgctgc tgtggagttt
121 ccagacctcc gctggccatt tccctagagc ctgtgtctcc tctaagaacc tgatggagaa
181 ggaatgctgt ccaccgtgga gcggggacag gagtcctgt ggccagcttt caggcagagg
241 ttctgtcag aatatccttc tgtccaatgc accacttggg cctcaatttc ctttcacagg
301 ggtggatgac cgggagtcgt ggccttcctt cttttataat aggacctgcc agtgctctgg
361 caacttcatg ggattcaact gtggaaactg caagtttggc ttttggggac caaactgcac
421 agagagacga ctcttggtga gaagaaacat cttcgatttg agtgccccag agaaggacaa
481 attttttgcc tacctcactt tagcaaagca taccatcagc tcagactatg tcatcccat
541 agggacctat ggccaaatga aaaatggatc aacacccatg tttaacgaca tcaatattta
601 tgacctcttt gtctggatgc attattatgt gtcaatggat gcactgcttg ggggatctga
661 aatctggaga gacattgatt ttgccatga agcaccagct tttctgcctt ggcatagact
721 cttcttggtg cggtgggaaac aagaaatcca gaagctgaca ggagatgaaa acttcactat
781 tccatattgg gactggcggg atgcagaaaa gtgtgacatt tgcacagatg agtacatggg
841 aggtcagcac ccacaaaatc ctaacttact cagcccagca tcattcttct cctcttgga
901 gattgtctgt agccgatttg aggagtacaa cagccatcag tctttatgca atggaacgcc
961 cgagggacct ttacggcgta atcctggaaa ccatgacaaa tccagaaccc caaggctccc
1021 ctcttcagct gatgtagaat tttgcctgag tttgacccaa tatgaatctg gttccatgga
1081 taaagctgcc aatttcagct ttagaaatac actggaagga tttgctagtc cacttactgg
1141 gatagcggat gcctctcaaa gcagcatgca caatgccttg cacatctata tgaatggaac
1201 aatgtcccag gtacagggat ctgccaacga tcctatcttc cttcttcacc atgcatttgt
1261 tgacagtatt tttgagcagt ggctccgaag gcaccgtcct cttcaagaag tttatccaga
1321 agccaatgca ccatttgga acataccgga atcctacatg gttcctttta taccactgta
1381 cagaaatggg gatctcttta tttcatccaa agatctgggc tatgactata gctatctaca
1441 agattcagac ccagactctt ttcaagacta cattaagtcc tatttggaac aagcgagtgc
1501 gatctgggtc tggctccttg gggcggggat ggtaggggac gtctcactg ccctgctggc
1561 agggcttgtg agcttgctgt gtcgtcacia gagaaagcag cttcctgaag aaaagcagcc
1621 actcctcatg gagaaagagg attaccacag cttgtatcag agccatttat aaaaggctta
1681 ggcaatagag tagggccaaa aagcctgacc tcaactaac tcaaagtaat gtccagggtc
1741 ccagagaata tctgctggta tttttctgta aagaccattt gcaaaattgt aacctaatac
1801 aaagtgtagc cttcttccaa ctcaggtaga acacacctgt ctttgtcttg ctgttttcac
1861 tcagcccttt taacattttc ccctaagccc atatgtctaa ggaaaggatg ctatttggtg
1921 atgaggaact gttatttgta tgtgaattaa agtgctctta ttttaaaaaa ttgaaataat
1981 tttgattttt gccttctgat tatttaaaga tctatatatg ttttattggc cccttcttta
2041 ttttaataaa acagtgagaa atctaataaa aaaaaaaaaa aa
```

图13

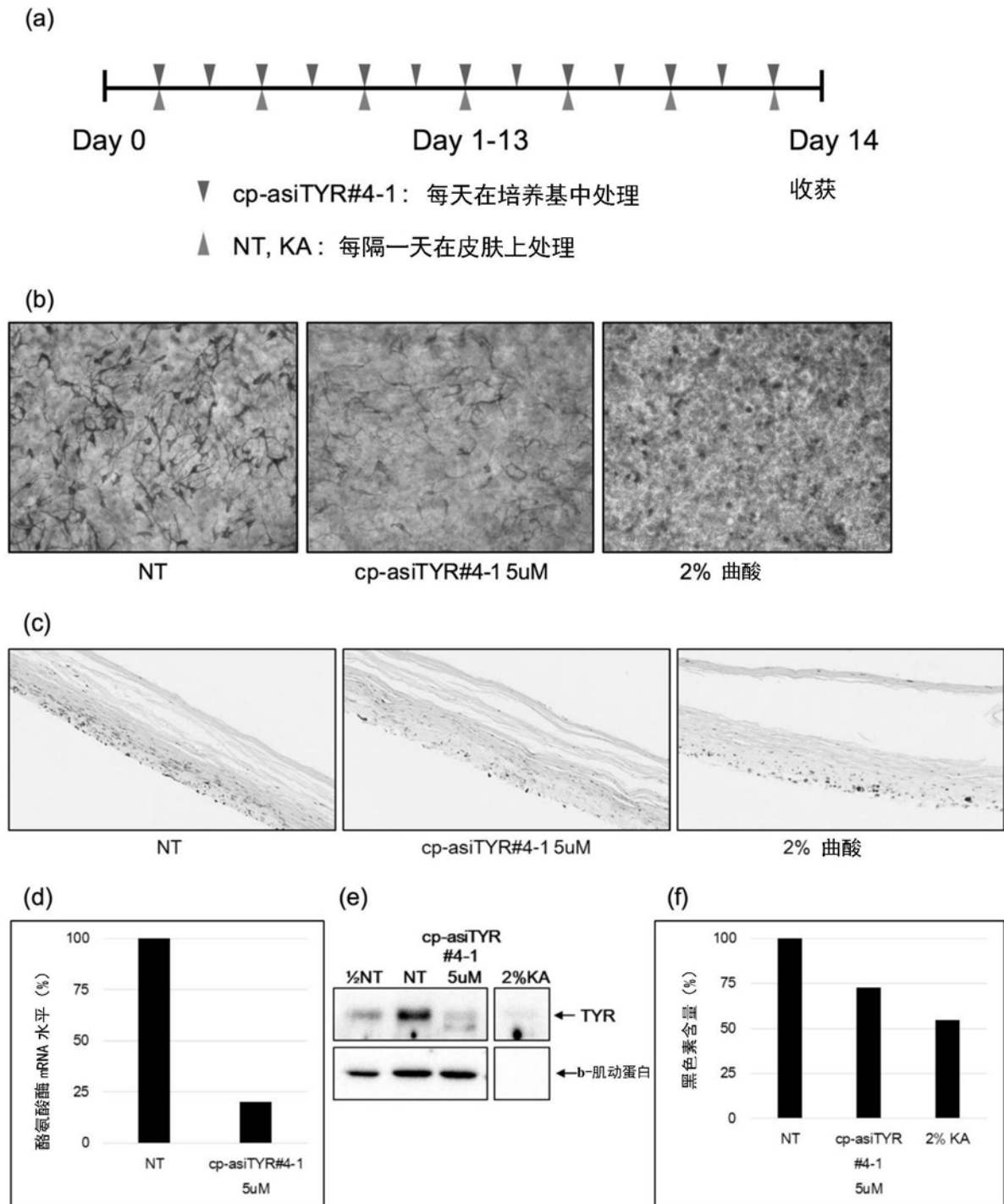


图14